Osaka University Knowledge Archive

Title	皮膚を標的とする経皮免疫製剤を活用したワクチン・アレルゲン免疫療法の開発
Author(s)	伊藤, 沙耶美
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76495
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

課程博士

皮膚を標的とする経皮免疫製剤を活用した
ワクチン・アレルゲン免疫療法の開発

薬剤学（ワクチン・免疫制御学プロジェクト）

伊藤　沙耶美

2019 年度

目次

略語一覧 1

1. 緒論 4

2. 本論

第 1 章　MN 技術を活用した経皮ワクチン製剤の開発

第 1 節　MN 製剤による経皮免疫誘導メカニズムの解明

背景 7

材料と方法 7

結果 14

考察 18

第 2 節　経皮ワクチン用アジュバントの探索および安全性試験

背景 21

材料と方法 21

結果 28

考察 33

第 2 章　HG を活用した経皮アレルゲン免疫療法の開発

第 1 節　EPIT に対する HG の安全性・有効性評価

背景 36

材料と方法 36

結果 39

考察 41

第 2 節　重症牛乳アレルギーに対する HG を活用した EPIT の有効性評価

背景 44

材料と方法 44

結果 47

考察 49

3. 結論 52

4. 謝辞 53

5. 参考文献 54

図表 63

略語一覧

2-ME	・・・・・	2-mercaptoethanol
7AAD	・・・・・	7-amino-actinomycin D
AF647	・・・・・	Alexa Fluor 647
ALA		α-lactalbumin
Alum	・・・・・	Aluminum salt
APC	・・・・・	Allophycocyanin
BLG		β-lactoglobulin
BSA	・・・・・	Bovine serum albumin
BV	・・・・・	Brilliant Violet
CCL	・・・・・	CC chemokine ligand
CCR	・・・・・	CC chemokine receptor
CD	・・・・・	Cluster of differentiation
CXCR	・・・・・	CXC chemokine receptor
Cy	・・・・・	Carboxylic
DAPI	・・・・・	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCs	・・・・・	Dendritic cells
dDCs	・・・・・	Dermal dendritic cells
DLNs	・・・・・	Draining lymph nodes
DNA	・・・・・	Deoxyribonucleic acid
DT	・・・・・	Diphtheria toxoid
DW	・・・・・	Distilled water
ELISA	・・・・・	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPIT	・・・・・	Epicutaneous immunotherapy
FBS	・・・・・	Fetal bovine serum
FACS	・・・・・	Flow cytometry
FITC	・・・・・	Fluorescein isothiocyanate
F-OVA	・・・・・	Fluorescein-labeled OVA
FPKM	・・・・・	Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments
FSC	・・・・・	Forward scatter
GAPDH	・・・・・	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GC	・・・・・	Germinal center
HA	・・・・・	Hemagglutinin
HE	・・・・・	Hematoxylin and eosin
HEPES	・・・・・	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HG	・・・・・	Hydrophilic gel patch

HRP	·····	Horseradish peroxidase
ID	·····	Intradermal injection
IgD	·····	Immunoglobulin delta
IgE	·····	Immunoglobulin epsilon
IgG	·····	Immunoglobulin gamma
IL	·····	Interleukin
IL-1R	·····	Interleukin-1 receptor
IM	·····	Intramuscular injection
IRF	·····	Interferon regulatory factor
LCs	·····	Langerhans cells
MACS	·····	Magnetic activated cell sorting
MHC	·····	Major histocompatibility complex
MN	·····	Microneedle
MPC	·····	Milk protein concentrate
MyD88	·····	Myeloid differentiation primary response 88
NF-kB	·····	Nuclear factor-kappa B
OD	·····	Optional density
OFC	·····	Oral food challenge
OIT	·····	Oral immunotherapy
OVA	·····	Ovalbumin
OVM	·····	Ovomucoid
PBS		Phosphate-buffered saline
pDCs	·····	Plasmacytoid dendritic cells
PE	·····	Phycoerythrin
PGA	·····	Polyglycolic acid
PNA	·····	Peanut agglutinin
QOL	·····	Quality of life
qPCR	·····	Quantitative polymerase chain reaction
RNA	·····	Ribonucleic acid
RO	·····	Reverse osmosis
RT	·····	Reverse transcription
SC	·····	Subcutaneous injection
SCIT	·····	Subcutaneous immunotherapy
sdMN	·····	self-dissolving Microneedle
SDS	·····	Sodium dodecyl sulfate
SLIT	·····	Sublingual immunotherapy
SSC	·····	Side scatter
STING	·····	Stimulator of interferon genes

TBST	·····	0.05% Tween-20/Tris-buffered saline
T_{CM}	·····	Central memory T
TCR	·····	T cell receptor
T_{EFF}	·····	Effector T
T_{EM}	·····	Effector memory T
Tfh	·····	Follicular helper T
Th1	·····	Type 1 helper T
Th2	·····	Type 2 helper T
TLR	·····	Toll-like receptor
TMB	·····	Tetramethylbenzidine
T_N	·····	Naïve T
TNF-a	·····	Tumor necrosis factor a
TSLP	·····	Thymic stromal lymphopoietin
WT	·····	Wild type

1. 緒論

ワクチンは、感染症に対する唯一根本的予防法であり、疾患の発症や重篤化を抑制することができる画期的な医薬品である。1796 年 Edward Jenner により世界で初めて種痘（天然痘ワクチン）が開発されて以降、免疫学、微生物学、分子細胞生物学の飛躍的な進歩により、数々の安全で有効なワクチンが開発されてきた。しかしながら依然として感染症は蔓延・発生を繰り返しており、ワクチンが十分に調達できていない発展途上国における主な死亡原因となっている。さらに物流の国際化や交通網の発達した現代社会において、ヒトやモノの移動の広域化・高速化に伴う病原体の拡散も容易となっている。2014 年のエボラ出血熱 [1] や 2015 年の中東呼吸器症候群 [2] のパンデミックが記憶に新しいように、新興・再興感染症の地球規模での蔓延が脅威となっている今、国際的な感染症対策が急務の課題となっている。

発展途上国におけるワクチン普及の大きな障壁となっている問題として、ワクチンの投与方法が挙げられる。これまでに実用化されてきたワクチンの大半は注射剤形であり、製造・輸送・保管に徹底した低温管理(コールドチェーン）が求められること、使用済み注射器などの適切な医療廃棄物の処理が必要であるなどの費用的な問題や、接種に医療従事者を必要とする技術的な問題がある。そこで注射投与型ワクチンに代わる簡便性・利便性に優れる新規ワクチン手法として、著者は皮膚をターゲットとした経皮ワクチン製剤の開発を推進している。

皮膚は生体を外界環境から隔離・保護し、生体の水分保持や体温調節、外来異物の侵入防御など生命維持に必要不可欠な機能を司っている。皮膚は外側から角質層、生きた表皮、真皮の大きく 3 層に分けられ、最外の角質層は脱核した角質細胞が幾重にも重なり、細胞間隙をセラミドなどの角質細胞間脂質が埋めることで強固な物理的バリアを構築している。さらに角質層下の生きた表皮や真皮には、ランゲルハンス細胞（Langerhans cells; LCs）や真皮樹状細胞（Dermal dendritic cells; dDCs）といった免疫学的バリアを構築する多種多彩な免疫担当細胞群が存在しており [3]、抗原提示細胞として外来異物に対する生体防御機構において需要な役割を担っている。また生きた表皮を構成する細胞の 90% 以上を占めるケラチノサイトは、異物の侵入を感知してサイトカインやケモカインなどの炎症メディエーターを産生し、自然免疫応答の誘導に関わっている。しかしながら従来の皮下投与（Subcutaneous injection; SC）型ワクチンは、これらの免疫担当細胞がほとんど存在しない皮下組織に抗原が送達されるため、皮膚に備わっている免疫機構を生

かすことができない。そこで当研究室では、これらの免疫担当細胞により形成される皮膚免疫システムを利用した経皮免疫製剤の開発に着手し[4, 5]、ワクチン抗原を生きた表皮や真皮へと送達可能なデバイスとして自己溶解型マイクロニードル（self-dissolving microneedle; sdMN, Fig. 1A）[6]の有用性を評価してきた。

sdMN は、乾燥製剤であるため輸送・保管が容易であり一貫したコールドチェーンが不要になる可能性がある。さらに使用法も非常に簡便であることから、将来誰にでも、また自分でもワクチン接種を可能とする。また針自体が皮膚内の水分で完全に溶解するため医療廃棄物の削減につながることから、発展途上国におけるワクチン普及が見込める。既に臨床研究において、季節性インフルエンザ HA（hemagglutinin）抗原を装填した sdMN 製剤の安全性と SC ワクチンに匹敵する有効性を証明している[7-9]。そこで著者は、本 sdMN を活用した新規経皮ワクチンを早期実用化の段階まで押し上げるべく、安全性と有効性に対する科学的・理論的根拠となる経皮免疫誘導メカニズムの解明と、ワクチン抗原用量や投与回数の低減（コスト削減）ならびに免疫応答増強の見込めるアジュバントの探索を行った。

また当研究室においては、コスメディ製薬株式会社（Kyoto, Japan）との共同により、親水性ゲルパッチ（Hydrophilic gel patch; HG, Fig. 1B）を考案・開発してきた[10]。HG は、皮膚を傷つけることなく微量の抗原を皮膚内に送達し、抗原特異的な免疫応答を誘導・制御することができる。この特性を活かし、著者は小児食物アレルギーに対する新規経皮免疫療法（Epicutaneous immunotherapy; EPIT）の開発へと展開した。小児食物アレルギー有病率は日本をはじめとする先進国を中心に増加しており、未だ病態解明や予防法、根治療法は確立されていない。そのため患児およびその家族は、誤食によるアナフィラキシーショック誘発の危険を常に抱えており多大な疾病負担を強いられる。食物アレルギーの治療の基本は的確な診断に基づく最小限の原因食品の除去と、誘発症状に対する抗ヒスタミン剤や副腎皮質ホルモン剤を用いた対症療法であるが、近年アレルギー疾患に対する唯一の根治療法である「アレルゲン免疫療法（減感作療法）」が食物アレルギーに対しても積極的に導入されるようになってきた[11-13]。これはアレルゲン物質を少しずつ体内へ投与することで、アレルゲンに対する過剰反応を徐々に軽減し、免疫寛容（耐性獲得）を誘導する治療法である。現行のアレルゲン免疫療法は主に皮下注射法（Subcutaneous immunotherapy; SCIT）により行われているが、長期にわたる通院を必要とするばかりではなく、投与時に疼痛を伴うことから子どもに注射への恐怖心を持たせることになり、継続的な治療が困難になるケースがある。また頻度は少ないもののアナ

フィラキシーショックといった重篤な全身性副反応を生じる危険性もあり、「簡便性」「安全性」に欠ける。そこで新たなアレルゲン投与法として、痛みを伴わず、自己投与可能な経口免疫療法（Oral immunotherapy; OIT）[14]や舌下免疫療法（Sublingual immunotherapy; SLIT）[15]が世界的に試みられてきた。これらの治療法は、減感作を誘導できるなど一定の効果が得られるものの、SCIT と同様に重篤な副反応を認めることや耐性獲得に至りにくいことも明らかとなってきた[16, 17]。さらに SLIT に関しては大人でも服用方法が難しく、途中で治療を断念する例も多いことから、治療対象の大半が子どもである食物アレルギーにおいて適切なアレルゲン投与法とは言い難い。このような現状を鑑みて著者は、多彩な免疫応答を誘導する皮膚がアレルゲン免疫療法においても高いポテンシャルを有すると予想し、アレルゲン装填 HG を活用した EPIT の安全性および有効性を動物実験ならびに探索的臨床研究にて検証した。

2. 本論

第 1 章　MN 技術を活用した経皮ワクチン製剤の開発

第 1 節　MN 製剤による経皮免疫誘導メカニズムの解明

これまでに著者らは、sdMN を活用した経皮ワクチン製剤が装填抗原の種類に関係なく、従来の SC 型ワクチン製剤と比較して抗原特異的免疫応答の誘導に優れることを報告してきた [18]。これは、皮膚表層に抗原を投与する経皮ワクチン製剤に、注射型ワクチン製剤とは異なる特有の免疫応答誘導機序が存在することを想起させ、皮膚内に存在する多種多様な免疫担当細胞の連携が経皮ワクチン製剤による効率的な抗体産生誘導に寄与しているのではないかと推察された（Fig. 2)。皮膚には、機能や発現分子の異なる樹状細胞（Dendritic cells; DCs）サブセットが豊富に局在している [19, 20]。これらの DCs は、皮膚の 90%を構成するケラチノサイトなどの常在細胞が産生するサイトカインシグナルを受け取り、所属リンパ節（Draining lymph nodes; DLNs（上腕リンパ節，腋窩リンパ節，鼠経リンパ節））への遊走過程において MHC（Major histocompatibility complex）class II や補助分子の発現を上昇させ、T 細胞の分化誘導を促すことが報告されている [21-23]。そこで著者は、経皮ワクチン製剤の有効性・安全性に対する理論的・科学的根拠を提示するべく経皮免疫誘導機序の解明および創薬・創剤標的とすべき免疫担当細胞および免疫関連分子の同定に取り組み、経皮ワクチン製剤の実用化研究を加速する基礎情報の収集を図った。

【材料と方法】

（動物）

C57BL/6 マウス（H-2^b; 雌，6 週齢）および BALB/c マウス（H-2^d; 雌，6 週齢）は、日本エスエルシー株式会社（Hamamatsu，Japan）より購入した。MyD88-KO（Myeloid differentiation primary response 88-knockout）マウス（Background; C57BL/6）はオリエンタルバイオサービス株式会社（Kyoto，Japan）から購入した [24]。CD90.1 マウス（B6.PL-Thy1a/CyJ マウス）、CD45.1 マウス（B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ）、OT-I マウス（C57BL/6-Tg（TcraTcrb）1100Mjb/J)、OT-II マウス（B6. Cg-Tg（TcraTcrb）425Cbn/J)、IL-1R（Interleukin-1 receptor)-KO マウス（B6.129S7-Il1r1^{tm1Imx}/J)、STING（Stimulator of interferon genes）マウス

(STING^{gt}, C57BL/6J-Sting1^{gt}/J) はジャクソン・ラボラトリー (Bar Harbor, ME) から購入した。 IRF (Interferon regulatory factor) 3-KO マウス (B6;129S6-Bcl2l12/Irf3<tm1Ttg>/TtgRbrc) [25] および IRF7-KO マウス (B6;129P2-Irf7<tm1Ttg>/TtgRbrc) [26] は理研バイオリソースセンター (Ibaraki, Japan) から購入した。ST2-KO は、兵庫医科大学免疫学講座 善本知広先生から供与頂いた [27]。これらのマウスは、大阪大学大学院薬学研究科実験動物施設で飼育した。本研究は、動物の愛護および管理に関する法律のガイドラインとポリシーに基づいて実験動物の管理および使用を適切に行い、2%イソフルラン麻酔吸入下で実施した。

(MN の作製)

sdMN の作製は、Ovalbumin (OVA, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を PBS (Phosphate Buffered Saline, pH7.4) に溶解した OVA 溶液と、ヒドロキシエチルデンプン 70,000 (Hydroxyethyl starch; HES) を PBS に溶解した HES 溶液を混合 (OVA:HES = 1:1 w/w) し、マイクロニードル(microneedle; MN)を成形するための型(複数の円錐形状の凹を持つ)に充填した。23℃で十分に乾燥させた後、コンドロイチン硫酸ナトリウム(Chondroitin sulfate; CS)を含む水溶液を塗布したポリエチレンテレフタレート (polyethylene terephthalate; PET) シートと貼り合わせた。35℃で十分に乾燥させた後、MN を含む PET シートを型から分離させることにより、OVA 装填 sdMN (針長 430 μm, 針数 9 本) を作製した (Fig. 1B)。上記と同様の方法にて、Alexa Fluor 647 標識 OVA (AF647-OVA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) あるいは Fluorescein 標識 OVA (F-OVA, Thermo Fisher Scientific) を 10 μg ずつ装填 sdMN および placebo-sdMN (針長 430 μm, 針数 9 本)を作製した。作製した MN はアルミニウム袋に入れ、使用するまで 10℃以下で保存した。

樹脂製 MN (plastic-MN) の作製は、紫外線硬化性樹脂を上記と同様の型に充填し、デシケータで脱泡した。十分に脱泡させた後、PET シートを貼り合わせた。紫外線照査装置により樹脂を十分に硬化させた後、MN を含む PET シートを型から分離させることにより plastic-MN を作製し、アルミニウム袋に入れ室温で保存した。

(抗原投与方法)

マウス背部皮膚の毛を電気クリッパーで剃毛し、Epilat（Kracie Holdings, Ltd., Tokyo、Japan）を塗布した。5 分後に 38 度のお湯で Epilat を洗い流し、完全に除毛できていることを確認した。48 時間後に、野生型（Wild type; WT）マウスならびに遺伝子改変マウスの除毛背部皮膚に各種 MN を 5 分間、専用のアプリケーターを用いて貼付し経皮投与を施した。対照群としては、除毛背部皮膚に皮内投与（intradermal injection; ID）あるいは SC を 50 μL/head で実施した。

（蛍光免疫染色）

マウス除毛背部皮膚に専用のアプリケーターを用いて F-OVA 装填 sdMN（10 μg/patch）を貼付した。貼付 5 分後、直ちに皮膚を回収し、O.C.T. Compound（Sakura Finetek, Tokyo, Japan）で満たされた包埋皿に入れ、液体窒素にて凍結ブロックを作製した。クリオスタット（Leica, Wetzlar, Germany）により厚さ 6 μm に薄切した。皮膚切片を完全に風乾させた後 O.C.T. compound（Sakura Finetek）を RO（reverse osmosis）水で除去し、ProLong® Gold antifade reagent with DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole, Thermo Fisher Scientific）を用いて核の染色を行った。

胚中心（Germinal center; GC）の染色には、sdMN あるいは SC にて OVA を免疫し、1 週間後の DLNs を使用した。回収した DLNs は 4%パラホルムアルデヒド/PBS に浸漬し、4°C で一晩固定した。10～30%スクロース溶液に順次置換し脱水処理を行った後、O.C.T. compound（Sakura Finetek）で満たされた包埋皿に入れ、液体窒素にて凍結ブロックを作製した。クリオスタット（Leica）により厚さ 8 μm に薄切した皮膚切片を完全に風乾させた後、Super PAP Pen（Daido Sangyo, Saitama, Japan）で切片を囲み、撥水性サークルを描いた。サークル内にブロッキング溶液（5% Goat serum, 0.3% Triton, 0.05% proclin, 1×PBS）を適量滴下し、25°C で 1 時間インキュベーションすることによりブロッキング処理を行った。アスピレーターでブロッキング液を吸引除去し、抗体希釈バッファー（1% BSA（Bovine serum albumin), 0.3% Triton, 0.05% proclin, 1×PBS）にて最適濃度に希釈した Vector Laboratories（Burlingame, CA）の Fluorescein anti-PNA（Peanut Agglutinin)、Alexa Fluor 594 anti-mouse CD（Cluster of differentiation）3 antibody（BioLegend, clone 17A2)、Alexa Fluor 647 anti-mouse IgD（Immunoglobulin delta）antibody（BioLegend, clone 11-26c.2a）を切片上に滴下した。4°C で一晩インキュベーションした後、TBST（Tris buffered saline with Tween-20; 20 mM Tris-

HCl, 40 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4）で1分×3 回洗浄を行い、ProLong® Gold antifade reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いて封入した。

蛍光染色した切片は、蛍光顕微鏡（BZ-8000, KEYENCE, Osaka, Japan）により観察した。

（OVA 特異的抗体価の測定）

眼底静脈叢から経時的に採取した血液を遠心分離（1500 rpm, 15 分, 室温）し、回収した血清中の OVA 特異的抗体価を ELISA（Enzyme-linked immunosorbent assay）によって測定した。炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.6）にて 10 μg/mL に調整した OVA を 96-well ELISA plate（C96 Maxisorp CERT; Thermo Fisher Scientific）に 50 μL/well ずつ播種した。4°C で一晩インキュベーションすることにより、OVA 固相化プレートを作製した。8%スキムミルク/PBS 溶液を 200 μL/well で添加し、37°C で 2 時間インキュベーションすることによりブロッキング処理を行った。0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて血清を 1/2 連続希釈し、50 μL/well ずつブロッキング処理後の ELISA plate に播種した。25°C で 2 時間インキュベーションした後、TBST にて 5 回洗浄を行った。OVA 特異的 IgG（Immunoglobulin gamma）抗体の検出には、HRP（Horseradish peroxidase)-conjugated anti-mouse IgG（Southern Biotechnology, Birmingham, AL）を使用した。この HRP 抗体は 0.8%スキムミルク/TBST にて最適濃度に希釈し、ELISA plate に 50 μL/well で添加した。25°C で 1 時間インキュベーションした後、TBST にて 7 回洗浄した。RO 水にて、1 回 well を洗浄後、TMB（Tetramethylbenzidine）ultra-sensitive substrate（Moss, Inc., Pasadena, MD）を 100 μL/well ずつ添加し発色反応を行った。15 分後 2N 硫酸を 100 μL/well ずつ添加することで反応を停止させ、吸光度（主波長 = 450 nm, 副波長 = 655 nm）を SpectraMax iD5 マイクロプレートリーダー（Molecular devices, San Jose, CA）で測定した。今回、吸光度（Optimal density; OD, OD450 nm-655 nm）が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal $\log_2$ titer として表した。

（MN 貼付部位における病理組織像の観察）

マウス除毛背部皮膚に placebo-sdMN を 5 分間貼付、あるいは PBS 溶液を SC、ID にて 50 μL ずつ注射投与した。24 時間後に MN 貼付あるいは注射投与した皮膚を回収し、10%中性ホルマリン溶液

に浸漬した。固定した組織標本はパラフィン包埋を施し、HE (Hematoxylin and eosin) 染色ならびにギムザ染色に供した。各染色の実施および病理組織像所見をアプライドメディカルリサーチ（Osaka, Japan）に委託した。

（皮膚内抗原滞留性の評価）

マウスの除毛背部皮膚に F-OVA 装填 sdMN（10 μg/patch）を貼付、あるいは F-OVA 溶液（10 μg/50 μL/）を SC あるいは ID した。投与直後、2、4、6、12、24、48、120 時間後に貼付部位を *In vivo* 蛍光イメージング装置（Maestro, PerkinElmer, Waltham, MA）で観察した。なお、撮影条件は露光時間: 100 msec、スペクトル分解能:10 nm（500-700 nm）とした。

（抗原特異的 T 細胞の分裂増殖）

OT-II マウス由来 CD4 陽性 T 細胞あるいは OT-I マウス由来 CD8 陽性 T 細胞は、マウス脾細胞および DLNs から mouse $CD4^+$ T Cell Isolation Kit あるいは mouse $CD8^+$ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて autoMACS (Magnetic activated cell sorting, Miltenyi Biotec) により単離した。細胞懸濁液 2×10^7 cells/mL に 20 μM eFluor 670 in PBS を終濃度 10 μM 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で蛍光標識した。これらの細胞を C57BL/6 マウスに 5×10^6 cells/500 μL ずつ尾静脈内投与し、翌日に OVA 装填 sdMN（20 μg/patch）を貼付、あるいは OVA 溶液（20 μg/50 μL）で SC した。OVA 免疫から 4 日後、マウスから DLNs を回収し eFluor 670 の蛍光強度の減弱を指標に各移入細胞の分裂増殖を FACS Canto II （BD, Franklin Lakes, NJ）にて解析した。

（FACS 解析）

マウスの脾臓と DLNs を回収し、冷 RPMI-1640 中に浸漬した。ピンセットで脂肪組織を取り除き、2 枚のスライドグラスのフロスト部分を使ってすりつぶした。細胞懸濁液を 70 μmのフィルターに通し、1500 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清を吸引除去後、RPMI-1640 で再懸濁し細胞数を計測した。1×10^7 cells/mL に調整した細胞懸濁液に 20 μg/mL の Rat anti mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding（BioLegend, clone:

93）を添加し 4℃で 15 分間インキュベーションした。細胞表面マーカーのカクテルを染色バッファー（2% FBS (Fetal bovine serum), 0.05%NaN_3, 1×PBS）に懸濁し、氷上で 30 分間インキュベーションした。染色した細胞は、遠心分離（400×g, 5 分, 4 °C）した後染色バッファーで懸濁した。 FACS Canto II （BD）で染色細胞を検出し、FlowJo ソフトウェア（BD）を使用してデータ解析した。

各 DCs サブセット存在比の解析には、FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated anti-mouse B220 (BD, clone RA3-6B2)、BV (Brilliant Violet) 510-conjugated anti-mouse CD326 (BD, clone G8.8)、PE (Phycoerythrin)-conjugated anti-mouse CD103 (BioLegend, clone 2E7)、PE-Cy (Carboxylic) 7-conjugated anti-mouse CD205 (BioLegend, clone NLDC-145)、APC (Allophycocyanin)-conjugated anti-mouse CD207 (Miltenyi Biotec, clone caa8-28H10)、7-AAD (7-Amino-Actinomycin D, Beckman Coulter) を用いて染色を行った。

抗原特異的 T 細胞の分裂増殖には、FITC anti-CD45.1 (BioLegend, clone A20)、eFluor 450 anti-CD4 (Thermo Fisher Scientific, clone GK1.5)、 PE-Cy7 anti-CD8α (Thermo Fisher Scientific, clone 53-6.7)、V450 anti-CD90.1 (BD, clone OX-7)、Zombie Green (BioLegend)、Zombie Aqua (BioLegend) を用いて染色を行った。

抗原特異的 T 細胞の活性化および分化には、eFluor 450 anti-CD4 (Thermo Fisher Scientific, clone GK1.5)、PerCP-Cy5.5 anti-CCR7 (BD, clone 4B12)、PE-Cy7 anti-CD62L (BioLegend, clone MEL-14)、APC anti-CD127 (BioLegend, A7R34)、APC-Cy7 anti-CD44 (BioLegend, clone IM7)、Zombie Aqua (BioLegend) を用いて染色を行った。

なおこれらはすべての FACS 抗体は濃度検討により決定した適切な濃度で使用した。

（抗原特異的 T 細胞の活性化および分化）

OT-II マウスの脾細胞および DLNs を回収し、mouse $CD4^+$ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて autoMACS （Miltenyi Biotec）により単離した。これらの細胞を C57BL/6 マウスに 5×10^6 cells/500 μL ずつ尾静脈内投与し、翌日に OVA 装填 sdMN（20 μg/patch）を貼付、あるいは OVA 溶液（20 μg/50 μL/PBS）で SC した。OVA 免疫から 1 週間後にマウスから DLNs を回収し、FACS により移入 OT-II 細胞の

活性化・分化状態を FACS により解析した。

（各 DCs サブセット存在比の変化）

除毛した BALB/c マウスの背部皮膚に placebo-sdMN、OVA 装填 sdMN（20 μg/patch）を 5 分間貼付、あるいは OVA 溶液（20 μg/50 μL/PBS）を ID あるいは SC にて投与した。24 時間後にマウスの DLNs を回収し、各種 DCs サブセットの存在割合を FACS にて解析した。

抗原捕捉細胞の解析には、AF647-OVA 装填 sdMN（10 μg/patch）を 5 分間貼付、あるいは AF647-OVA 溶液（10 μg/50 μL/PBS）を SC した。投与 2、6、12、24 時間後に各マウスの DLNs を経時的に回収し、各種 DCs サブセットに分類した中の $AF647^{+}$ 細胞を FACS にて解析した。

（RNA（Ribonucleic acid）シーケンス解析および RT-qPCR（Reverse transcription- Quantitative polymerase chain reaction））

OVA 装填 sdMN（20 μg/patch）、placebo-sdMN、plastic-MN は、48 時間前に除毛したマウスの背部皮膚に専用アプリケーターを用いて 5 分間貼付した。比較対象として、除毛背部皮膚に OVA 溶液（20 μg/50 μL/PBS）を ID あるいは SC した。免疫 24 時間後に貼付部位の皮膚を回収し、RNA later（Merck、Darmstadt、Germany）に浸漬した。RNA 抽出および網羅的遺伝子発現解析（RNA シーケンス解析）は、大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センターゲノム解析室に委託した。

無処置の皮膚と MN 貼付 24 時間後の皮膚を回収し、RT-qPCR を行った。回収した皮膚組織は、TRIzol® Reagent（Thermo Fisher Scientific）に浸漬し、ホモジナイザーで皮膚片が見えなくなる程度まで粉砕した。クロロホルムを添加し、遠心（17700×g，10 分，室温）し、上層を回収した。イソプロパノールや 80%エタノールと混和し、再び遠心することで RNA を沈殿させ RNA 抽出を行った。RNA を DNase I で処理した後、Super Script III Reverse Transcriptase を用いた逆転写反応により complementary DNA（deoxyribonucleic acid）を合成した。この complementary DNA をテンプレートとして、RT-qPCR を TaqMan probe（IRF3, IRF7, MyD88, STING，GAPDH（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase））を用いて実施した。解析は内在性コントロールである GAPDH でテンプレートの DNA 量をサンプル間で補正し、Intact の発現量を 1 とした場合の発

現量を比較した。

【結果】

（sdMN を貼付した皮膚における抗原滞留性および組織学的変化）

今回、脱核したケラチノサイトから成る角質層と生きた表皮は DAPI 染色による核の存在有無を指標に、生きた表皮と真皮は、生きた表皮の最深部に一列に整列して存在する基底細胞を指標に、各々の境界線を判断した。マウス除毛背部皮膚に貼付した sdMN は、貼付 5 分で針が完全に溶解し、針先端部に装填された抗原（F-OVA）を皮膚内へと送達できた（Fig. 3A)。さらに装填抗原は、生きた表皮および真皮上層部において観察されたことから、sdMN を用いた経皮投与は LCs や dDCs が豊富に局在する皮膚表層に抗原を送達可能なデバイスであることが示された。

皮膚内に投与された抗原の滞留性を経時的に観察したところ、深部に抗原溶液を注入する SC は、投与直後においても検出される蛍光強度が低く、投与 4 時間後までに蛍光が完全に消失したのに対し（Fig. 3B)、皮膚表層に抗原溶液を注入する ID を行った場合においては、SC と比較して抗原滞留性に優れており投与 6 時間後まで観察された。sdMN により経皮投与された蛍光標識抗原は、9本の穿刺孔付近に検出され、時間経過に伴って徐々に拡散した。投与 48 時間後まで蛍光が検出され、他の投与法と比較して最も皮膚内滞留性に優れることが明らかとなった。これは、sdMN が乾燥製剤であり皮膚内の極僅かな水分にしか溶解しないことや、sdMN の溶解液による粘性が OVA 溶解度の減少をもたらし、拡散速度の低下につながったと考えられる。

sdMN 貼付後における皮膚の組織学的調査を行ったところ、SC および ID においては Intact と比較して顕著な変化は認められなかった（Fig. 3C)。sdMN 群においては、貼付皮膚周辺に炎症性細胞（好中球、リンパ球およびマクロファージ）の浸潤が観察され、軽微な炎症が起こっていると推察された。この炎症は、sdMN を皮膚に貼付する物理的な刺激に伴い起こり、免疫応答の増強に起因する可能性が考えられた。そこで OVA を sdMN あるいは SC により投与し抗原特異的な抗体産生誘導能を評価したところ、sdMN 群は SC 群と比較して迅速で強力な抗体価を示したことから（Fig. 4)、sdMN による優れた抗体産生プロファイルには、皮膚内での抗原滞留性向上に伴うリンパ管を介した抗原流入の増大や、sdMN 貼付によって誘導さ

れた軽微な炎症による皮膚常在性 DCs の活性化、抗原取り込み効率上昇の関与が示唆された。

（抗原特異的 T 細胞の活性化および分化）

OVA 免疫から 4 日後の DLNs における OVA 特異的 $CD8^+$ T 細胞（移入 OT-I 細胞）および OVA 特異的 $CD4^+$ T 細胞（移入 OT-II 細胞）の分裂回数を比較したところ、sdMN 群はいずれの T 細胞においても分裂頻度が高く、SC 群と比較して分裂回数の多い細胞が増加した。すなわち sdMN 群は、DCs から T 細胞への抗原提示効率が亢進していることを明らかとした（Fig. 5A)。分裂増殖した移入 OT-II 細胞の活性化および分化状態は、表面マーカーの発現解析により比較した。sdMN を用いて OVA を経皮投与した場合、移入 OT-II 細胞の CD44（T 細胞活性化マーカー）高発現分画（$CD44^{high}$）の割合は SC 群と比較して高く、抗原提示を受けた T 細胞が活性化状態にあることを示した（Fig. 5B)。活性化した移入 OT-II 細胞は表面マーカーにより naïve T（T_N; $CD44^{low}$, $CD62L^+$）細胞、effector T（T_{EFF}; $CD44^{high}$, $CD127^-$, CCR（CC chemokine receptor）7^-）細胞、effector memory T（T_{EM}; $CD44^{high}$, $CD127^+$, $CCR7^-$）細胞、および central memory T（T_{CM}; $CD44^{high}$, $CD127^+$, $CCR7^+$）細胞に分画した。Intact 群は、移入 OT-II 細胞のほとんどが T_N 細胞の表現型を示したのに対し、sdMN 群および SC 群は T_{EFF} 細胞の大幅な増加が認められた（Fig. 5C)。移入 OT-II 細胞における T_{EFF} 細胞の割合は、SC 群よりも sdMN 群において高く、抗原提示を受けた T 細胞が効率よく T_{EFF} 細胞へと分化したことが明らかとなった。また T 細胞サブセット全体から見ると、わずかではあるが T_{EM} 細胞への分化効率においても sdMN 群が優れていた。以上の結果より、一次免疫応答においては皮膚内への抗原送達（sdMN 群）が皮下への抗原投与（SC 群）よりも抗原特異的 CD4 陽性 T_N 細胞をより効率よく感作し、抗原特異的 CD4 陽性 T_{EFF} 細胞の増殖および活性化を誘発することが示唆された。

（GC の形成）

sdMN あるいは SC にて OVA を免疫し、1 週間後における DLNs の GC を蛍光顕微鏡にて観察した。DLNs の外側から pre-B（IgD）細胞（青）および T 細胞（赤）が両群において検出され、T 細胞領域および B 細胞領域が明確であった。GC（PNA, 緑）は sdMN 群にのみ観察され、大きさ、数ともに増大していた (Fig. 5D)。すなわち sdMN を用いた経皮ワクチンは従来の SC ワクチンと比較して、低親和性抗体のみなら

ず、抗原との反応性が極めて高い高親和性抗体の産生を誘導できる可能性を示し、病原体再感染時において高いワクチン効果を発揮すると考えられた。

（各 DCs サブセット存在比の変化）

経皮投与あるいは SC に伴う各 DCs サブセットの DLNs における存在割合を、細胞表面マーカーを指標に FACS 解析した（Fig. 6A）。もともとリンパ節に存在しているリンパ節常在性 DCs（CD8α^{+} DCs, pDCs (plasmacytoid dendritic cell), Other CD11c^{+} cells）の存在比は、各投与群において変化は認められず Intact と同等の存在割合であった。一方、皮膚常在性 DCs の存在割合は Intact と SC においてが同程度であったのに対して、placebo-sdMN および OVA-sdMN においては、特に皮膚常在性 DCs である LCs および CD207^{-} dDCs の存在割合が顕著に増加した（Fig. 6B）。そこで、皮膚表層に PBS 溶液を注入する ID 群を設け、皮膚常在性 DCs の遊走能を評価したところ、placebo-sdMN と同様に LCs および CD207^{-} dDCs の存在比が有意に増加した（Fig. 6C）。以上の結果より、LCs および CD207^{-} dDCs の皮膚から DLNs への遊走は抗原の装填有無に関係なく、皮膚表層に MN を用いて穿刺する、あるいは溶液を注入する、という物理的刺激に伴って亢進された可能性が高いと考えられた。

次に、皮膚から遊走してきた DCs が投与された抗原を捕捉しているか評価したところ、SC はいずれの DCs サブセットにおいても抗原を捕捉している細胞がほとんど検出されなかった（Fig. 7）。sdMN および ID では投与 2 時間後には全ての DCs サブセットにおいて抗原捕捉細胞数の増加が認められ、時間経過にともなって減少するプロファイルを示した。また、sdMN は ID と比較しても抗原捕捉効率に優れ、皮膚内での抗原滞留に伴い皮膚常在性 DCs の抗原取り込みや抗原捕捉が亢進し DLNs への遊走が起こったと推察した。また、sdMN の貼付によって存在比に変化がなかったリンパ節常在性 DCs が抗原を保持していたことから、抗原捕捉した皮膚常在性 DCs がリンパ節常在性 DCs に抗原を受け渡す可能性や、リンパ管を通って抗原が DLNs へと流入する可能性が考えられた。

（皮膚局所における遺伝子発現解析）

免疫 24 時間後における皮膚内遺伝子発現変動を網羅的に解析したところ、SC 群および ID 群において

は Intact 群と同様の遺伝子発現プロイファイルが認められた（Fig. 8A)。OVA-sdMN、placebo-sdMN、plastic-MN においては、類似した遺伝子発現パターンを示し、OVA-sdMN 群においては約 650 個の遺伝子発現増加と、約 350 個の遺伝子発現低下が認められた。これらの結果より、遺伝子発現変動の要因は抗原の装填有無および構成基剤の影響ではなく、MN を皮膚に貼付するという物理的刺激であることが示唆された。さらにシグナル解析の結果、炎症部位への白血球誘引、Alarmin を認識するパターン認識受容体、DCs の成熟、転写因子 IRF の活性化に寄与する遺伝子群に顕著な発現上昇が認められた（Fig. 8B、C)。

特に発現量が増加した遺伝子を優先して RT-qPCR を用いバリデーションをとった。MN 貼付 24 時間後において、特に IRF7 の遺伝子発現量が無処置と比較して約 10 倍増加していた。その他にも Alarmin 認識経路に重要とされる MyD88、STING の発現亢進が認められ、転写因子 IRF3 においては変化しなかった(Fig. 8D)。これらの結果は RNA シーケンス解析結果と一致しており、データの整合性をとることができた。

以上の結果より、MN を用いた経皮ワクチンにおいては、MN 貼付に伴う物理的刺激（皮膚組織傷害）によって皮膚細胞から炎症性サイトカインや Alarmin が産生・分泌され、これらの因子により遊走亢進・機能増進した LCs および CD207^{-} dDCs などの皮膚常在性 DCs が効率的な抗原特異的免疫応答の誘導に寄与していると考えられた。

（MN による抗体産生誘導に寄与する因子の同定）

前述した皮膚内の遺伝子発現変動の解析において、遺伝子発現レベルに変化が認められなかった転写因子 IRF3 と、上昇が認められた転写因子 IRF7、IL-1R、MyD88、STING、ST2 において、それぞれの遺伝子を欠損あるいは変異を加えたマウスを用いて、MN 貼付後における抗体産生誘導能を評価した。IRF3-KO マウス、IRF7-KO マウス、MyD88-KO マウス、ST2-KO マウスに MN を用いて経皮投与した場合おいては、WT マウスと比較して同様の抗体産生プロファイルを示した。IL-1R-KO マウスおよび STING^{gt} マウスにおいては抗体価の減弱が認められた（Fig. 9A-F)。SC 後の抗体産生プロファイルを観察すると、IRF3-KO マウスおよび ST2-KO マウスにおいては、WT とほぼ同じ抗体価を示した。つまり sdMN あるいは SC によって誘導される抗体産生に、IRF3 および ST2 の寄与は小さいと推察された。IRF7-KO マウスおよび MyD88-KO マウスに SC した場合は、WT マウスと比較して抗体価が顕著に上昇した。IRF7 あるいは MyD88 におい

ては、確かに自然免疫応答に関与する因子であるが過剰な免疫応答を調節する役割も担っているのではないかと推察された。IL-1R-KO マウスにおいては sdMN と同様に SC においても抗体産生が減弱したことから、IL-1R の欠損により抗原に対するマウスの反応性が弱くなったことが要因と考えられた。以上のことから MN による優れた免疫誘導効果には、皮膚傷害により産生された Alarmin が内因性アジュバントとして STING に作用している可能性が示された。

また各種遺伝子改変マウスにおける初期免疫応答の違いを抗原特異的 T 細胞の分裂増殖により評価した。IRF7-KO マウスは、$CD8^+$ T 細胞の分裂に影響しなかったものの、$CD4^+$ T 細胞の分裂増殖は WT マウスと比較して明らかに低下し、IRF7 の欠損により T 細胞への抗原提示能が減弱することが明らかとなった。すなわち IRF7 の欠損は最終的な抗体産生には影響しないものの、初期免疫応答における抗原感作・活性化が低下する可能性が考えられた。現在、その他の遺伝子改変マウスにおける抗原特異的 T 細胞の分裂増殖と各種 DCs の遊走能においても評価しており、MN 投与により観察された優れたプライミング効果の発揮に重要な因子の同定を進めている。

【考察】

投与された抗原に対する血中特異的抗体価は、ワクチンの有効性を表す指標の1つである[28]。sdMN を用いた経皮ワクチンが、従来の SC ワクチンと比較して抗体産生誘導能に優れる要因として、著者は T 細胞のヘルパー機能が増進されていることを推察した。本研究において、sdMN による皮膚内への抗原送達は、SC と比較して T 細胞を効率よく感作・活性化し、分裂増殖を促進することが明らかとなった。また sdMN 群では活性化した $CD4^+$ T 細胞はメモリーT 細胞への分化が亢進しており、二次免疫応答時における免疫反応をより迅速かつ強力に惹起できると考えられる。さらに sdMN による経皮投与は、DLNs における GC の形成をも促進した。GC には、高親和性抗体を産生する形質細胞が存在し、同一抗原の再侵入に対して迅速かつ強力に病原体を体外に排除する役割を担っている[29]。また GC の形成や維持には濾胞ヘルパーT（Follicular helper T; Tfh）細胞と GCB 細胞との相互作用が重要であることが知られている[30]。本研究においては、Tfh や B 細胞の局在までフォローすることができず、今後の検討課題ではあるものの、sdMN によって皮膚に抗原を投与することで、T 細胞の活性化から抗体産生に至るまでの免疫応答の質や強度が増大することが示

された。

T 細胞に抗原提示を行う DCs サブセットとして SC ワクチンでの抗原処理に寄与しないと考えられる皮膚常在性 DCs が、経皮ワクチンにおける T 細胞への抗原提示に関与していると予想した。sdMN を用いた経皮ワクチンでは、皮膚に局在する LCs や CD207⁻ dDCs の皮膚から DLNs への遊走を向上させていた。皮膚常在性 DCs は、常に外界からの異物侵入に備えているため、抗原提示能が高いことが報告されており、DLNs において LCs および CD207⁻ dDCs が抗原を捕捉していたことから、これらが抗原提示細胞として機能している可能性が高い。今後は、投与された抗原と皮膚常在性 DCs の動態を解析する。さらに抗原提示細胞として機能する DCs サブセットを同定するべく、各種 DCs サブセットを選択的に枯渇可能なマウスを活用・作製し、経皮ワクチンが T 細胞への感作に優れる免疫学的要因を解明していきたい。

皮膚常在性 DCs の遊走は、皮膚に MN を穿刺するという物理的な刺激に伴って誘導されたと考えられた。一般的に組織傷害や細胞死が発生すると、ダメージを受けた細胞から Alarmin と呼ばれる起炎因子が放出される[31, 32]。Alarmin は内因性アジュバントとして免疫細胞に発現する自然免疫受容体に作用し、活性化・成熟を促し、IL-1や IL-33 といった炎症性サイトカインを産生することが報告されている。sdMN を皮膚に貼付した場合においても、一時的に皮膚が傷害されることで Alarmin が放出し、これらがトリガーとなり皮膚常在性 DCs の活性化・成熟が起こり、皮膚から DLNs への遊走を亢進していると推察した。各種 MN 投与後における皮膚組織の遺伝子発現変動を網羅的に解析したところ、いずれの MN においても Toll 様受容体（Toll-like receptor; TLR）やインフラマソームの構成タンパク質、細胞質内 DNA センサーなど Alarmin を認識する遺伝子の発現が顕著に上昇していた。すなわち MN 投与により発現上昇した遺伝子やそのシグナルが抗原提示の質や抗体産生能の促進に寄与している可能性が考えられた。そこで、遺伝子改変マウスを用いて抗体産生誘導能や抗原特異的分裂増殖を評価したところ、転写因子や MyD88、ST2-KO マウスにおける抗体産生は WT マウスと同程度であったことから、各種遺伝子を個々に欠損させたとしても、その他の受容体やアダプター分子、転写因子を介してシグナル入力が起こっているものと推察された。また本研究において、STING が経皮ワクチンにおける免疫誘導能に寄与が大きい遺伝子と考えられた。STING は、DNA が cGAS（環状 GMP-AMP 合成酵素）と結合することによって活性化する。活性化した STING が TBK1（TANK-binding kinase）との相互作用し、下流の転写因子 IRF3 を活性化し I 型 IFN の産生を誘導する。また別経

路として、NF-κB （Nuclear factor-kappa B）依存的あるいは IRF7 依存的に炎症性サイトカインが産生されることも報告されているが、その機構は未だ明らかではない [33, 34]。今回 RNA シーケンスの結果、cGAS の発現上昇も僅かながら確認されたため、これら一連のシグナルが sdMN による抗体産生に寄与している可能性も考えられた。そこで現在我々は、初期免疫応答として抗原特異的 T 細胞の分裂増殖や遊走解析により STING の寄与を精査している。

本研究では MN を用いた経皮ワクチンにより誘発される皮膚および DLNs における免疫学イベントの解析を行うことにより、経皮免疫応答誘導メカニズムの解明に向けた有益な情報を提示することができた。これらの前臨床で得られた結果をもとに、現在著者らはセービン株不活化ポリオワクチンを装填した sdMN の実用化研究を推進しており、WHO を中心とするポリオ根絶計画の最終段階戦略に貢献できると期待している。さらに本研究を発展させることで、特定の抗原提示細胞に対する抗原ターゲティングによる有効性増強や高親和性抗体産生に寄与する Tfh 細胞・GCB 細胞の分化誘導促進による免疫応答スペクトルの拡大など、さらなる付加価値を伴った次世代型経皮ワクチンの開発につなげていきたい。

第 2 節　経皮ワクチン用アジュバントの探索および安全性試験

経皮ワクチン製剤の実用化に向けての課題は、ワクチン用量および接種回数を抑えることによるコストの削減と、安定した免疫誘導能の保証である。著者はこれらの問題を解決する方策として、経皮ワクチン製剤に免疫応答を増強・修飾できるアジュバントの適用を企図した。ワクチン製剤におけるアジュバントの併用は古くから重要視されており、現在世界で認可されているワクチンの大半にはアジュバントとしてアルミニウム塩（aluminum salt; Alum）が使用されている[35]。Alum はワクチン特異的な IgG 抗体産生誘導能に長けているが、細胞傷害や特異的 IgE （Immunoglobulin epsilon）抗体産生（アレルギー反応）といった副作用の引き金となり[36]、また水に不溶であることから sdMN を活用した経皮ワクチン製剤への適用は困難である。したがって、アジュバントを適用した経皮ワクチン製剤の開発には、経皮投与によってアジュバント活性を発揮できる候補物質を新たに探索・同定し、得られた候補物質の安全性・有効性評価と活性機序の解明を図る必要がある。そこで我々が経皮アジュバント候補物質として着目したのが、自然免疫と獲得免疫のクロストークに重要な TLRs に対するリガンドである。現在開発中のアジュバントの多くは、この TLRs を標的としたリガンド分子である[37, 38]。これまでの精力的な基礎研究によって TLRs の機能やシグナル経路が詳細に解明されつつあり、さらに強力な研究ツールとなる KO マウスの開発も行われているため[39, 40]、TLR リガンド分子をアジュバントとして利用するのは合理的と言える。そこで著者は、より安定した免疫誘導効果と免疫回数低減が見込め、経皮免疫製剤に適用可能なアジュバントとして TLRs に対するリガンドを中心にスクリーニングを実施した。

【材料および方法】

（動物）

C57BL/6 マウス（H-2^b; 雌, 6 週齢）および BALB/c マウス（H-2^d; 雌, 6 週齢）およびヘアレスマウス（HR-1, Background; BALB/c）は日本エスエルシー株式会社より購入した[41]。TLR9-KO（Background; C57BL/6）はオリエンタルバイオサービス株式会社から購入した[42]。CD90.1 マウス、CD45.1 マウス、OT-I マウス、OT-II マウスは、ジャクソン・ラボラトリーから購入した。 これらのマウスは、大阪大学の実験動物施設で飼育した。本実験は、動物の愛護および管理に関する法律のガイドラインとポリシーに基づいて実験動

物の管理および使用を適切に行い、2%イソフルラン麻酔吸入下で実施した。

(HG の作製および OVA 装填 HG の作製)

HG の作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。アクリレーツ/ビニルピロリドン共重合体、ヒアルロン酸ナトリウム、乳酸オクチルドデシル、グリセリンを 100：45：30：0.2 の重量配合比率で酢酸エチル/アセトンに溶解し、ポリエチレンテレフタレート離型フイルムに厚さ 200 μm で塗工した。塗工シートを室温 30 分間、80°C、15 分間静置して有機溶媒を蒸発除去することで HG を得た。

低エンドトキシン OVA（<1 EU/mg）は、滅菌蒸留水（Distilled water; DW）にて無菌条件下で 143 μg/mL に調製した。HG (直径 1 cm の円形) に 70 μL ずつ滴下し、クリーンベンチ内で十分に乾燥させることで 10 μg OVA 装填 HG を作製した。

(抗原投与方法)

マウス背部皮膚の毛を電気クリッパーで剃毛し、Epilatを塗布した。5 分後に 38 度のお湯で Epilat を洗い流し、完全に除毛できていることを確認した。除毛 48 時間後に、OVA を 10 μg/50 μL/PBS、ジフテリアトキソイド（diphtheria toxoid; DT，一般財団法人　阪大微生物病研究会より供与）を 1 μg/50 μL/PBS、A/California/7/2009 株由来のインフルエンザ HA 抗原（一般財団法人　阪大微生物病研究会より供与）を 10 ng/50 μL/PBS に調整した溶液を、除毛背部皮膚に ID あるいは SC した。さらに OVA (10 μg) と HA (10 ng) の混合溶液あるいは OVA (10 μg) と K3 (20 μg) の混合溶液も同様に、50 μL ずつ除毛背部皮膚に ID あるいは SC した。

アジュバントのスクリーニング実験で用いた経皮投与法として、マウス除毛背部皮膚にコスメディ製薬株式会社に作製頂いた PGA (Polyglycolic acid)-MN (直径 1 cm，針長 300 μm，針数 481 本) を用いて穿刺孔を形成し[43]、各種アジュバント（Table 1）溶液を滴下後、速やかに OVA (10 μg) 装填 HG を 24 時間貼付する poke-and-patch 法を実施した（Fig. 10A)。本実験で用いたアジュバント投与量は、感染症ワクチンや癌ワクチンの基礎研究で用いられている量を参考に設定した。また K3（ATCGACTCTCGAGCGTTCTC）のコントロールであるスクランブル核酸 （Scramble;

ATGCACTCTGCAGGCTTCTC）は K3 と同用量を使用した。

（抗原特異的抗体価の測定）

眼底静脈叢から経時的に採取した血液は遠心（1500 rpm，15 分，室温）し、血清を回収した。血清中 OVA 特異的抗体価の測定は、前節に準じて行った。HA および DT 特異的抗体価の測定は、ELISA によって測定した。炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.6）にてそれぞれ 1 μg/mL あるいは 10 μg/mL に調整した HA あるいは DT を 96-well ELISA plate (Thermo Fisher Scientific) に 50 μL/well ずつ播種した。4°C で一晩インキュベーションすることにより、固相化プレートを作製した。8%スキムミルク/PBS 溶液を 200 μL/well で添加し、37°C で 2 時間インキュベーションし、ブロッキング処理を行った。0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて血清を 1/2 連続希釈し、50 μL/well ずつブロッキング処理後の ELISA plate に播種した。25°C で 2 時間インキュベーションした後、TBST にて 5 回洗浄を行った。抗原特異的 IgG および IgG サブクラスの検出には、HRP-conjugated anti-mouse IgG、IgG1、IgG2a、IgG2c（Southern Biotechnology）を使用した。この HRP 抗体は 0.8%スキムミルク/TBST にて最適濃度に希釈し、96-well ELISA plate に 50 μL/well で添加した。25°C で 1 時間インキュベーションした後、TBST にて 7 回洗浄した。RO 水にて、1 回 well を洗浄後、TMB ultra-sensitive substrate (Moss, Inc.) を 100 μL/well ずつ添加し発色反応を行った。15 分後 2N 硫酸を 100 μL/well ずつ添加することで反応を停止させ、吸光度（主波長 = 450 nm，副波長 = 655 nm）を SpectraMax iD5 マイクロプレートリーダー（Molecular devices）で測定した。

また OVA 特異的 IgE 抗体価の測定は、上記と同様にブロッキング処理を行った後、0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて血清を 1/2 連続希釈し、50 μL/well ずつブロッキング処理後の ELISA plate に播種した。4°C で 2 時間インキュベーションした後、TBST にて 5 回洗浄した。0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて、Biotin Rat anti-mouse IgE 抗体を 0.5 μg/mL に調整し、50 μL/well ずつ添加した。4°C で 1 時間インキュベーションした後 TBST で 5 回洗浄し、0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて最適濃度に希釈した Streptavidin-HRP を 50 μL/well ずつ添加した。4°C で 30 分インキュベーションした後、TBST で 7 回洗浄した。さらに RO 水にて、1 回 well を洗浄後、TMB ultra-sensitive substrate (Moss, Inc.) を 100 μL/well ずつ添加し発色反応を行った。15 分後 2N 硫酸を 100 μL/well ずつ添加することで反応を停止させ、吸光度（主

波長 = 450 nm，副波長 = 655 nm）を SpectraMax iD5 マイクロプレートリーダー（Molecular devices）で測定した。

今回吸光度（OD450 nm-655 nm）は、0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal $\log_2$ titer として表した。

（表皮および真皮シートの作製）

マウス除毛背部皮膚と耳介皮膚を回収し、0.5%dispase を含む complete RPMI（cPRMI; 50 μM 2-ME (2-mercaptoethanol), 10% FBS, 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 1 mM sodium pyruvate, 100 unit/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin and 0.25 μg/mL amphotericin B in RPMI-1640）に浮かべた。37℃で 1 時間インキュベーションした後、表皮および真皮をピンセットにて分離した。表皮シートは、0.25%trypsin および 0.025%DNase を含む cPRMI に浸漬し、 37℃で 5 分間インキュベート後、70 μm のフィルターに通し表皮細胞懸濁液を得た。真皮シートは 1%collagenase、0.25%trypsin および 0.025%DNase を含む cRPMI 中で細断し、37°C で 30 分間撹拌することにより真皮細胞懸濁液を作製した。

（FACS 解析）

マウスの脾臓と DLNs を回収し、冷 RPMI-1640 中に浸漬した。ピンセットで脂肪組織を取り除き、2 枚のスライドグラスのフロスト部分を使ってすりつぶした。細胞懸濁液を 70 μm のフィルターに通し、1500 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清を吸引除去後、RPMI-1640 で再懸濁し細胞数を計測した。1×10^7 cells/mL に調整した細胞懸濁液に 20 μg/mL の Rat anti mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding（BioLegend, clone: 93）を添加し 4℃で 15 分間インキュベートした。細胞表面マーカーのカクテルを染色バッファー（2%FBS (Fetal bovine serum), 0.05%NaN_3, 1×PBS）に懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした。細胞内染色には、Transcription Factor Buffer Set (BD) を使用し、製造元のプロトコールに従って細胞の染色・遠心操作を行った。染色した細胞を 4℃で 5 分間、遠心分離した後、上清を除去し染色バッファーで懸濁した。FACS Canto II（BD）で染色細胞を検出し、FlowJo ソフトウェア（BD）を使用してデータ解析した。

皮膚細胞の染色には、APC anti-MHC class II (BioLegend, clone AF6-120.1)、7-ADD (BioLegend)、APC anti-CD11c (BD, clone N418)、PE anti-TLR1 (Novus Biologicals, clone eBio TR23)、PE anti-TLR2 (Novus

Biologicals, clone 6C2)、PE anti-TLR3 (Novus Biologicals, clone 40C1285.6)、PE anti-TLR4 (Novus Biologicals, clone 76B357.1)、PE anti-TLR5 (Novus Biologicals, clone 85B152.5)、PE anti-TLR6 (Novus Biologicals, clone 418601)、PE anti-TLR7 (Novus Biologicals)、PE anti-TLR8 (Novus Biologicals, clone 44C143)、PE anti-TLR9 (Novus Biologicals, clone 26C593.2) を用いて染色した。

T 細胞および B 細胞の分化・活性化には、FITC anti-IgG1 (Southern Biotech, polyclone)、PE anti-IgD (Thermo Fisher Scientific, clone 11-26c. 2a)、 eFluor 450 anti-CD4 (Thermo Fisher Scientific, clone GK1.5)、PE anti-CD80 (BD, clone 16-10A1)、PE-Cy7 anti-CD95 (BD, clone Jo2)、APC anti-CD138 (BD, clone 281-2)、APC-Cy7 anti-B220 (BD, clone RA3-6B2)、PE-Cy7 anti-CD62L (BioLegend, clone MEL-14)、APC anti-CD127 (BioLegend, clone A7R34)、APC anti-CD86 (BioLegend, clone GL-1)、APC-Cy7 anti-CD44 (BioLegend, clone IM7)、Alexa Fluor 647 anti-GL7 (BioLegend, clone GL7)、BV421 anti-B220 (BioLegend, clone RA3-6B2)、Zombie Green (BioLegend)、Zombie Aqua (BioLegend)、VioBlue anti-CD38 (Miltenyi Biotec, clone 90.4) を用いて染色した。

抗原特異的 T 細胞の分裂増殖には、FITC anti-CD45.1 (BioLegend, clone A20)、eFluor 450 anti-CD4 (Thermo Fisher Scientific, clone GK1.5)、 PE-Cy7 anti-CD8α (Thermo Fisher Scientific, clone 53-6.7)、V450 anti-CD90.1 (BD, clone OX-7)、Zombie Green (BioLegend)、Zombie Aqua (BioLegend) を用いて染色した。

なおこれらはすべて濃度検討により決定した適切な濃度で使用した。

(T 細胞および B 細胞の分化・活性化)

除毛 48 時間後のマウス除毛背部皮膚に poke-and-patch 法を実施し、K3 あるいは Scramble を滴下した。1 回免疫 1 週間後、あるいは 3 回免疫 2 週間後を行った後、DLNs あるいは脾臓を回収した。各組織における Linage マーカーや T 細胞および B 細胞の活性化・分化の染色は、FACS 染色の項目に従って行った。

(抗原再刺激後におけるサイトカイン産生)

Poke-and-patch 法において K3 あるいは Scramble を併用し、3 回免疫 2 週間後に脾臓を回収した。1×10^7

cells/mL に調整した脾細胞懸濁液を 24-well plate の各 well に 2.5×10^6 細胞になるように播種した。2 mg/mL の OVA（<1 EU/mg）溶液を作製し、500 μl/well ずつ添加した。各 well が 1 mL になるように cRPMI を添加し、37℃インキュベーターで 48 時間培養後、培養上清を遠心分離（400×g, 4°C, 5 分）した。ペレットが混じらないように上清のみを回収し、使用するまで冷凍保管（-20 °C）した。培養上清中の IL-2、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17、IFN-γおよび TNF-αは Bio-Plex マウスサイトカインアッセイ（Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA）を用いて製造元の実験手順に従い測定した。

（蛍光免疫染色）

OVA および K3 の局在を蛍光観察するため、OVA および AF647 標識 K3 を用いて poke-and-patch 法による経皮投与を行った。経時的に回収した皮膚および DLNs は 4%パラホルムアルデヒド/PBS に浸漬し、4°C で一晩固定した。10～30%スクロース溶液に順次置換し脱水処理を行った後、O.C.T. compound（Sakura Finetek）で満たされた包埋皿に入れ、液体窒素にて凍結ブロックを作製した。クリオスタット（Leica）により厚さ 8 μm に薄切した。皮膚切片を完全に風乾させた後、O.C.T. compound（Sakura Finetek）を RO 水で除去し、Super PAP Pen（Daido Sangyo）を用いて撥水性サークルを描いた。サークル内にブロッキング溶液（5% Goat serum, 0.3% Triton, 0.05% proclin, 1×PBS）を適量滴下し、25°C で 1 時間インキュベーションすることによりブロッキング処理を行った。アスピレーターでブロッキング液を吸引除去し、抗体希釈バッファー（1% BSA（Bovine serum albumin), 0.3% Triton, 0.05% proclin, 1×PBS）にて最適濃度に希釈した purified anti-OVA（abcam, Cambridge, UK）を 4℃で一晩インキュベートした。TBST で洗浄後、Alexa Fluor 546 anti-rabbit IgG（Thermo Fischer scientific）を滴下し、室温で 2 時間インキュベートすることにより OVA の染色を行った。最後に、DAPI を含む Prolong Gold 退色防止試薬（Thermo Fischer scientific）で封入した。蛍光染色した切片は、蛍光顕微鏡（KEYENCE）により観察した。

（抗原特異的 T 細胞の分裂増殖）

OT-II マウス由来 $CD4^+$ T 細胞あるいは OT-I マウス由来 $CD8^+$ T 細胞は、マウス脾細胞および DLNs から mouse $CD4^+$ T Cell Isolation Kit あるいは mouse $CD8^+$ T Cell Isolation Kit（Miltenyi Biotec）を用いて

autoMACS により単離した。細胞懸濁液 2×10^7 cells/mL に 20 μM eFluor 670 in PBS を終濃度 10 μM 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で蛍光標識した。これらの細胞を C57BL/6 マウスに 5×10^6 cells/500 μL ずつ尾静脈内投与し、翌日に poke-and-patch 法にて OVA 装填 HG および K3、あるいは OVA 装填 HG および Scramble を経皮投与した。OVA 免疫から 4 日後にマウスから DLNs を回収し、eFluor 670 の蛍光強度の減弱を指標に各移入細胞の分裂増殖を FACS にて評価した。

(B 細胞の In vitro アッセイ)

WT あるいは TLR9-KO マウスから脾臓と DLNs を摘出し、mouse B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を使用して auto MACS (Miltenyi Biotec) により B 細胞をネガティブセレクションした。得られた B 細胞を cRPMI に懸濁し、24-well plate に 1×10^6 細胞ずつ well に播種した。さらに 1 μg の K3 あるいは Scramble を各ウェルに添加し、37℃のインキュベーターで培養した。 6 時間後 B 細胞を回収し、各種活性化マーカーの発現を FACS により解析した。使用した FACS 抗体は、FACS 解析の T 細胞および B 細胞の分化・活性化に記載した。

(ヒト安全性試験)

経皮投与した K3 の安全性を評価するべく、無作為化プラセボ対照二重盲検比較試験（第 I 相試験）を実施した。本臨床研究プロトコールは、国立病院機構三重病院の倫理委員会によって承認された。

選択基準を以下に示す。1) 20～40 歳の健康な成人男性。2) 該当する試験審査委員会において承認を受けた文書による同意が得られた者。3) 試験参加中の遵守事項を守れるもの。4) 本試験実施計画書に定められた診察を受け、症状などの申告ができる者。除外基準は以下に示す。1) 臨床試験開始前 180 日以内に K3 の投与を受けた者。2) 食品や医薬品等によって、過去にアナフィラキシーを呈したことがある者。3) 心臓・血管系・血液系・呼吸器系・肝臓・腎臓・消化器系あるいは神経精神系で重篤な疾患の現病歴のある者。4) 過去にギランバレー症候群や急性散在性脳脊髄炎の既往のある者。5) 本試験開始前 4 ヶ月以内に、試験または臨床試験などに参加し、投薬を受けた者。6) 本試験開始前 27 日以内に生ワクチン、または 6 日以内に不活化ワクチン・トキソイドの投与を受けた者。7) 本試験開始前 3 ヶ月以内に輸血又はガンマ

グロブリン製剤の投与を受けた者、または 6 ヶ月以内にガンマグロブリン製剤の大量療法を受けた者。8) 試験期間中にパートナーの妊娠を希望する者、または試験期間中に性行為を行う可能性があり適切な避妊法を行えない者。9) その他、試験責任/分担医師が本試験の被験者として不適当と判断した者。

K3-lodaded sdMN あるいは placebo-sdMN は専用のアプリケーターを用いて上腕外側皮膚に密着させ、1 時間貼付した。MN は、0 日目と 21 日目に異なる場所に 2 回適用した (Fig. 10B)。被験者は sdMN 投与前後に、診察、バイタルサイン、採血、および尿検査を受けた。採取された血液は、一般的な血液検査、生化学検査、およびサイトカイン産生測定に使用した。被験者は、腋窩体温、皮膚局所反応、自覚症状および他覚所見を日誌に記録した (Table 2)。

【結果】

(ID・SC における各種抗原特異的な抗体産生誘導能評価)

結核菌に対する BCG (Bacille de Calmette et Guérin) ワクチンに代表される ID は、SC よりも抗原特異的免疫応答を強力に誘導できることが報告されている [44, 45]。これは皮膚内に局在する免疫担当細胞の寄与が考えられ、皮膚内に抗原を投与する場合はアジュバントを併用せずとも抗原量の低減やコストダウンが図れる可能性が高い。経皮投与デバイスである sdMN は ID と同様に角質層下への抗原デリバリーを可能とするため、アジュバントを併用せずとも適用するだけで SC に勝る十分な免疫応答を惹起することができると考えられた。そこで、モデル抗原である OVA やワクチン抗原である DT・HA を ID あるいは SC し、免疫誘導効果を観察することで経皮投与におけるアジュバントの必要性を評価した。

OVA ならびに DT を投与した場合、抗原投与部位の違いによる免疫応答に違いは認められず、ID、SC ともに同等の抗体産生プロファイルを示した (Fig. 11A, B)。一方、HA 抗原を ID すると、SC と比較して有意に高い抗体価の上昇を確認した (Fig. 11C)。これらの結果から、OVA や DT などの純度の高い精製タンパク抗原を ID しても SC と比較して顕著な抗原特異的免疫応答は惹起できないが、HA 抗原などワクチン抗原に含まれるウイルス由来のタンパク質や核酸などの夾雑物が含まれている場合、これらがアジュバントとして機能し免疫応答を惹起する可能性を考えた。そこで OVA と HA 抗原の混合溶液を ID あるいは SC したところ、OVA 特異的 IgG 抗体価において有意な差は認められないものの ID において抗体産生の上昇傾向が

認められた（Fig. 11D)。さらに興味深いことに HA 抗原特異的抗体価は、HA 単独投与と同様に SC と比較して ID において有意な差が認められた（Fig. 11E)。また注射ワクチンアジュバントとして利用されている K3 を併用すると、確かに ID において速やかな抗体価の上昇が観察された（Fig. 11F)。以上の結果から、HA に含まれる夾雑物がアジュバントとして機能していること、純度の高い抗原においてはアジュバントを併用することで SC に勝る抗原特異的免疫誘導が起こること、が明らかとなった。したがって、MN を用いた経皮投与においてもアジュバントを併用することで、優れた免疫応答を惹起できるものと推察された。

（MN に適用可能なアジュバントの活性評価）

マウス皮膚細胞における TLRs の発現を解析したところ、抗原提示細胞として機能する LCs および dDCs において、TLR1 から TLR9 までの発現が確認された（Fig. 12)。ケラチノサイトにおいては TLR3、7、8、9 の僅かな発現が観察された。皮膚は病原体の侵入を防ぐ物理的バリアを構築しているだけではなく、病原体を排除する免疫学的バリアも備わっているため、皮膚に存在するこれらの免疫担当細胞が TLR を介して病原体の侵入を迅速に察知し、自然免疫の誘導を促していると考えられる。したがって、今回発現が認められた TLR に対するリガンドをアジュバントとして経皮ワクチン製剤に適用することで、優れたアジュバント効果が発揮されるものと予想された。

免疫増強効果の期待できるアジュバントとして TLR を標的に、poke-and-patch 法にてスクリーニングを実施したところ、TLR9 リガンドである K3 においてのみ初回免疫後から抗体価の上昇が確認された。その後 K3 併用群においては、免疫 2 回目、3 回目と OVA 単独群と比較して有意に高い OVA 特異的 IgG 抗体価を示した（Fig. 13A)。これは C57BL/6 および BALB/c マウスにおいて同じ傾向であったことから、マウスの系統に関係なく K3 が優れたアジュバント活性を発揮できるアジュバントであることが示された。他のアジュバント併用群においては、OVA 単独投与群とほぼ同じ抗体価を示したことから、本方法・本用量においてはアジュバント活性を誘導しにくい可能性が考えられた。また IgG サブクラスを測定したところ、OVA 単独群においては IgG1 抗体が大半を占めていることから Th2 型免疫応答を誘導しているのに対し、K3 併用群では Th1 型 IgG サブクラスである IgG2c あるいは IgG2a が検出され、OVA 単独群と比較して有意に高かった（Fig. 13B)。他のアジュバント併用群に関しても、IgG2c あるいは IgG2a 抗体が上昇している個体も認められたが

K3 併用群ほど顕著ではなく、OVA 単独群と比較しても有意な差は認められなかった。さらに OVA 特異的 IgE 抗体価は、すべての群において OVA 単独群と変わらない値であり、一過性の上昇は認められなかった (Fig. 13C)。次に生体内における K3 の免疫賦活化メカニズムを調べるために、WT または K3 の作用する TLR9 を欠損した TLR9-KO マウスを用いて経皮投与を実施した。WT マウスは K3 併用群で優れた OVA 特異的抗体産生誘導能を示したが、TLR9-KO マウスにおいては K3 によるアジュバント活性はキャンセルされ、Scramble 群と同程度の抗体価であった (Fig. 13D)。以上の結果から K3 を併用した経皮投与は、TLR9 を介して免疫増強を誘導するのみならず、他の TLR リガンドでは誘導が困難な Th1 型免疫応答を増強できることが明らかとなった。さらに OVA 特異的 IgE 抗体は一過性に上昇しなかったことから、K3 の併用により副反応（アレルギー反応）出現のリスクも最小限に抑えられ、経皮ワクチン製剤用アジュバントとして非常に有望であると推察された。

(K3 併用による T 細胞および B 細胞の活性化と分化)

poke-and-patch 法により、K3 あるいは Scramble を OVA とともに経皮投与し、脾細胞中における各種細胞サブセットの数的変化を評価した。脾細胞の総数は K3 併用により大幅に増加しており、特に B 細胞においては Scramble 群と比較して有意な差を示した (Fig. 14A)。そこで表面マーカーを指標に B 細胞サブセットとして形質細胞（$CD45R^-$, IgD^-, $CD138^+$）、GCB 細胞（$CD45R^+$, $IgG1^+$, $GL7^+$, $CD95^+$）および記憶 B 細胞（$CD45R^+$, $IgG1^+$, $GL7^-$, $CD38^+$）に分画し、分化傾向を解析したところ、脾臓および DLNs において、B 細胞のサブポピュレーションは K3 併用により大幅に増加した。特に、脾臓では抗体産生誘導能に特化した形質細胞が (Fig. 14B)、DLNs では抗原情報を保存するメモリーB 細胞が有意に増大した (Fig. 14C)。すなわち、皮膚から K3 を投与することで、B 細胞の活性化と増殖を引き起こし、形質細胞やメモリーB 細胞へと分化が促進され、K3 併用による効率的な抗体産生誘導に寄与していると示唆された。

また K3 を併用時における $CD4^+$ T 細胞の活性化状態を CD44 の発現により解析し、表面マーカーを指標に T_{EFF}、T_{EM}、T_{CM} の大きく 3 つに分画した。$CD44^{high}$ 発現割合は、K3 群と Scramble 群において変化は認められず、K3 の経皮投与は $CD4^+$ T 細胞の活性化に影響しないことが明らかとなった (Fig. 14D)。各 $CD4^+$ T 細胞のサブセットは脾臓および DLNs の細胞数に伴って増加し、特に脾臓のメモリーT 細胞と DLNs の

T_{EFF}は有意に増加した（Fig. 14E，14F)。OVA と K3 の複数回投与により、T_{EFF}からメモリーT 細胞へと効率的に分化することは、再曝露時における迅速な免疫応答の誘導に優れていると考えられる。

次に経皮投与後の脾細胞に OVA の再刺激を行い、培養上清中の各種サイトカインを測定した。IL-5、IL-9、IL-13、IL-17、および TNF-αの測定した殆どのサイトカインは検出限界以下であった。IL-4 および IL-10 においては、Scramble 群と同様に低値を示した一方で、IFN-γおよび IL-2 は、K3 の併用により産生量に増加が認められ、Th1 細胞への分化が促進されている可能性が考えられた（Fig. 14G)。K3 併用により Th1 型免疫偏向性が認められたことから、抗原特異的 $CD8^+$T 細胞（細胞傷害性 T 細胞）の誘導が起こった可能性が高い。そこで、K3 併用後における細胞傷害性 T 細胞の誘導を FACS により解析したところ、本実験条件（抗原，用量，投与方法）では残念ながら細胞性免疫の誘導には至らなかった。以上の結果より、OVA 特異的 IgG サブクラスやサイトカイン産生の結果から K3 併用により、抗原特異的免疫応答の増強のみならず、Th1 型の免疫応答をも誘導できることが明らかとなった。

（一次免疫応答における経皮ワクチン製剤の K3 の特徴）

K3 と Scramble を併用し、poke-and-patch 法により経皮投与した際の移入 OT-II 細胞および移入 OT-I 細胞の分裂増殖を評価することにより、抗原提示細胞による T 細胞への抗原提示効率について評価した。初回免疫 4 日後の DLNs において、K3 併用による OT-I ならびに OT-II 細胞の分裂頻度は Scramble 群と比較して同等であった（Fig. 15A)。さらに K3 併用群は、初回免疫 4 日後における DLNs 中の T 細胞数にも増加が認められなかったことから、経皮投与した K3 によるアジュバント効果は、TLR9 を発現する DCs から T 細胞への抗原提示効率には影響しないことが示唆された（Fig. 15B)。

一方 B 細胞の存在割合および数は、初回免疫 4 日後において著しく増加しており、これらは、初期活性化マーカーである CD69 や共刺激分子である CD86 の発現上昇が確認された（Fig. 16C，D)。すなわち poke-and-patch 法により K3 を経皮投与することで、DLNs 中の B 細胞が活性化および成熟すること明らかとなった。B 細胞にはエンドソーム内において TLR9 の発現が検出され、DLNs に流入した K3 が DLNs に存在する B 細胞に作用している可能性が示された（Fig. 16A)。そこで WT マウスあるいは TLR9-KO マウスから B 細胞を単離し、K3 あるいは Scramble を含む培地で共培養した。WT マウスの B 細胞においては、

Scramble 添加により発現しなかった活性化マーカー（CD40, CD69, CD80, CD86）が K3 添加群においてのみ上昇した（Fig. 16B)。さらにこれは、TLR9-KO マウス由来の B 細胞を使用した場合には検出されなかったことから、K3 は B 細胞に発現する TLR9 を介し、直接アジュバント活性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、K3 が B 細胞内の TLR9 に作用しアジュバント活性を発揮することを示しており、K3 により増加した B 細胞はその後経皮投与により活性化・増殖した抗原特異的 T 細胞と相互作用することで、優れた抗原特異的免疫応答の誘導を惹起していると推察された。

（蛍光免疫染色法における OVA および K3 の局在解析）

poke-and-patch 法によって投与された OVA と K3 の局在は、経皮投与した皮膚と DLNs を経時的に回収することで蛍光観察した。HG に装填された OVA は、貼付 1 時間後および 3 時間後の角質層において僅かに観察され、時間経過に伴って皮膚内および DLNs では検出されなかった（Fig. 17)。一方 K3 は、基底細胞の一部が欠落した穿刺孔において観察された。K3 は時間とともに皮膚内へと速やかに移行・拡散し、DLNs においても投与 12 時間後から検出された。すなわち poke-and-patch 法による経皮投与において、K3 は皮膚に存在する抗原提示細胞だけではなく、DLNs に存在する抗原提示細胞や免疫細胞に作用し、アジュバント活性を発揮している可能性が高いことが示された。

（ヒト安全性試験）

ヒト皮膚に対する K3 の安全性を評価するべく、健康成人男性を対象に臨床試験を実施した。K3-loaded sdMN および placebo-sdMN の投与には、専用のアプリケーターを使用した（Fig. 10B)。placebo-sdMN を貼付した ID-1 および ID-2 においては、初回接種の翌日（Day 1）に適用部位に発赤が出現したが 21 日後には消失した（Fig. 18、 Day 21)。 2 回目の接種では、翌日僅かに局所反応が観察されたものの 1 回目と比較して軽度であり（Day 22)、21 日後においては完全に接種痕が消失した（Day 42)。

一方、K3-loaded sdMN は、初回接種の翌日に浸潤を伴う紅斑を示し（Day 1)、21 日後に色素沈着を残した（Day 21)。2 回目の接種では初回接種と比較して、被験者の局所反応の出現度合いに差が認められた（局所反応なし: ID 6、軽減: ID 3、同等: ID 4、悪化: ID 5、Day 22)。特に ID 5 の被験者では、21 日後に滲

出を伴う強い浸潤が観察された (Day 42)。placebo-sdMN および K3-loaded sdMN の両群において、バイタルサイン、血液検査、尿所見、炎症性サイトカイン産生、全身性副反応は試験を通して変化はなかった。以上の結果から、今後は K3-loaded sdMN による皮膚局所反応を軽減するべく、K3 の用量や sdMN の針長・本数を最適するなど、更なる研究が必要と考えられたが、K3 を皮膚から投与した場合においても重篤な副作用を引き起こすことなくヒト皮膚にも適用できることが明らかとなった。

【考察】

現行のワクチンの大半は注射による接種が行われており、投与部位に応じて筋肉 (intramuscular injection; IM)、SC、ID 型注射に分類される。いずれの投与法も、特定の IgG 産生に代表される全身性免疫応答の誘導に優れており、感染症の原因となる病原体を体内から排除し、病気の発症と重症度を抑えることができる [46]。最も優れた免疫誘導効果を有する注射投与法として ID が挙げられるが、これは溶液を厚さ数 mm の皮膚表面に投与するため非常に難しく、熟練した技術を要する。そこで、簡便かつ的確な ID を可能にするデバイスとして SoluviaTM (BD)[47] や Immucise (Terumo)[48] がこれまでに開発されており、皮膚を標的とするワクチンの有用性が注目されている。しかし、ID は従来の注射投与と同様に一貫したコールドチェーンが必要であり、医療廃棄物処理のコストとリスクが懸念される。IM や SC 型注射と比較して、皮下組織の末梢血および神経を損傷するリスクは減少するが、針の長さが 0.9-1.4 mm であるため投与時に痛みを伴うデメリットもある [49]。そこで我々は、これらの問題を一挙に解決でき、簡便な経皮投与を可能とするワクチン製剤として sdMN 製剤を開発しており、既に前臨床・臨床において安全性・有効性を証明している [7]。本 sdMN 製剤を実用化の段階に近づけるべく、著者はワクチン抗原の量と投与回数を減らし、有効性をさらに向上させ、ワクチンの副反応を抑制できるアジュバント候補物質の探索を試みた。

本実験では、sdMN に抗原と各 TLR リガンドを混合装填する条件を整え、プロトタイプを作製するのに時間と費用がかかるため、sdMN と同様の経皮投与を可能にする poke-and-patch 法を実施した。K3 の併用は、抗原特異的抗体産生だけでなく、メモリー細胞や形質細胞への分化誘導にも優れていた。これは細菌またはウイルスの再感染により、抗原特異的抗体産生と迅速かつ強力な免疫応答を誘導でき、ワクチン用アジュバントとして非常に有望と考えられる。また K3 併用群は特異的 IgE 抗体が急激に産生されなかったこと

より、ワクチン接種時の副反応として IgE 抗体が誘導されやすい幼児や[50]、免疫機能が低下している高齢者においても十分なワクチン効果が得られると考えられる[51]。本実験に用いた抗原および K3 の投与量、投与方法においては、残念ながら粘膜免疫や細胞性免疫の誘導は起こらなかったが、Th1 型優位な免疫応答が認められた。これはワクチンのみならず、Th2 型免疫疾患であるアレルギーに対する免疫療法用アジュバントとしても活用できると考えられる。

K3 のアジュバント効果は TLR9 に依存するため、皮膚に存在する LCs または dDCs が免疫応答に深く関与していると考えられた。しかしながら、1) 抗原特異的 T 細胞の分裂増殖は Scranble 群と同等であったこと、2) K3 は DLNs に速やかに移動すること、3) DLNs 中の B 細胞が活性化および増殖すること、が明らかとなった。これらの事象から poke-and-patch 法を用いて経皮投与した場合、K3 は皮膚に存在する抗原提示細胞に作用するのではなく、リンパ管を通って DLNs へと移行し B 細胞に発現した TLR9 に作用する可能性が高い。この場合、K3 による B 細胞の活性化と経皮投与による T 細胞の活性化により強い相互作用が誘導され、それに伴って記憶細胞と抗体産生細胞への分化が促進されたのではないかと考えられる。CpG-ODN には A-type、B-type、C-type があり、作用する免疫細胞や産生されるサイトカインが異なる[52]。 A-type は pDCs に作用して IFN-αの産生を促す一方[53]、K3 を含む B-type は B 細胞に作用して NF-κB シグナル経路を活性化することにより IL-6 産生を促進することが報告されている[54]。C-type は、A-type と B-type の両方の特性を持つと言われている[55]。したがって、K3 の作用は従来の注射投与と同様であるが、リンパ管を介して皮膚表層から DLNs へと効率的に輸送されることによって DLNs 中の B 細胞に直接作用している可能性が高いと思われる。

臨床試験では、K3-loaded sdMN の適用により、皮膚局所反応が観察された。経皮免疫は高濃度の抗原やアジュバントを皮膚の浅い部分に送達するため、局所反応として検出されやすくなる。さらに副反応は、免疫応答の増強に伴って発生し、sdMN にワクチン抗原と K3 を混合装填した場合より強い副反応が出現する可能性がある。したがって、今後 K3 の装填量と針の長さや数を最適化する必要がある。K3 はヒト型の CpG-ODN であるため、経皮免疫製剤用アジュバントとして開発・実用化する上で有利である。さらに GMP グレードに準拠した製造体性も整備されており、既に K3 を併用したマラリアワクチンの臨床試験が実施されており、SC における安全性が証明されている[56,57]。今後は経皮免疫製剤を最適化し、ヒトでの有効性を証明すること

により、安全で有効な経皮ワクチンの創出に取り組む。我々の研究成果は、ワクチン接種を簡便・低侵襲、安価にすることにより、ワクチンの世界的な普及を強力に促進し、感染症に対する安全で安心な社会の実現に大きく貢献できるものと考える。

第 2 章　HG を活用した経皮アレルゲン免疫療法の開発

第 1 節　EPIT に対する HG の安全性・有効性評価

著者らがコスメディ製薬株式会社と共同開発してきた HG は、皮膚を傷つけることなく微量の抗原を皮膚内にデリバリーでき、抗原特異的な免疫応答を誘導できる非常に画期的なパッチ製剤である[10]。HG は親水性アクリル系粘着剤をベースに、医薬品や化粧品などで作用されている安全性の高い基剤を混合して作製されており、厚さが約 200 μm と薄く柔軟であるため皮膚表面に密着・追随することができる。この HG に抗原溶液を添加すると、溶媒はゲル内部に拡散あるいは蒸発し HG 表面から消失する。一方高分子の抗原蛋白質は、HG 表面において高度に濃縮される構造をとる（Fig. 1B)。これを皮膚に貼付するだけで角質層が水和・膨潤し、抗原蛋白質が角質層下へと徐々に送達される。また HG 製剤は、特殊な装置や技術の必要がないため、誰にでも、どこででも服用できるという大きな利点がある。これらの特性を活かし、本研究においては鶏卵アレルゲン（OVA あるいは OVM）装填 HG を用いて経皮投与を実施し、免疫誘導効果を調査することで EPIT に対する HG の安全性および有効性を評価することとした。

【材料および方法】

(動物)

Hartley モルモット（雌，3 週齢)、BALB/c マウス（H-2^d; 雌，6 週齢)、C57BL/6 マウス（H-2^b; 雌、6 週齢）は日本エスエルシー株式会社より購入し、大阪大学の実験動物施設で飼育した。本実験は、動物の愛護および管理に関する法律のガイドラインとポリシーに基づいて実験動物の管理および使用を適切に行い、2%イソフルラン麻酔吸入下で実施した。

(鶏卵アレルゲン装填 HG の作製)

HG の作製は前章の材料および方法に準じた。

鶏卵アレルゲン装填 HG に装填する OVA (Hyglos GmbH, Bernried am Starnberger See, Germany) あるいは OVM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) は、無菌条件下で滅菌 DW に溶解し 14.3 mg/mL および 1.43

mg/mL に調整した。HG（直径 1 cm）に、抗原溶液を 70 μL ずつ滴下することで、1 mg OVA 装填 HG および 1 mg あるいは 0.1 mg OVM 装填 HG を作製した （Fig. 19）。さらに placebo-HG は、HG 表面に滅菌 DW を 70 μL 滴下し乾燥させることにより作製した。

（抗原投与方法）

モルモットの耳介皮膚に OVA 装填 HG（1 mg/patch）を 1 日 12 時間貼付し、経皮投与を実施した。この免疫操作を左右交互の耳に 2 週間連日繰り返し、貼付部位の観察を行った。placebo-HG も同様に耳介皮膚に貼付し、連日の HG 貼付による皮膚局所反応を観察した。また、滅菌 PBS で調整した OVA 溶液を 100 μg/100 μL/head で背部皮膚に SC する群も設けた。

マウス背部皮膚に経皮投与する場合は、毛を電気クリッパーで剃毛し Epilat（Kracie Holdings）を塗布した。5 分後に 38 度のお湯で Epilat を洗い流し、除毛が完全にできていることを確認した。除毛から 48 時間後に、OVM 装填 HG（1 mg/patch）を背部皮膚に 24 時間貼付した。対照群としては、除毛背部皮膚に滅菌 PBS で調整した OVM 溶液（100 μg/100 μL）を SC した。これらの免疫操作は 1 週間隔で合計 4 回実施した。

HG に適用可能なアジュバントのスクリーニング実験は、C57BL/6 あるいは BALB/c マウスの除毛背部皮膚に OVA（100 μg）と各種アジュバント（Table 1）の混合溶液を装填した HG を 2 週間隔で計 3 回貼付した。

（能動的全身性アナフィラキシー反応試験）

耳介皮膚に OVA 装填 HG あるいは SC によって抗原を連日投与したモルモットに、OVA 溶液を 2 mg/kg で静脈内投与をした。経時的に行動観察および直腸温測定を行い、アナフィラキシー反応を評価した。

（OVA あるいは OVM 特異的抗体価の測定）

経時的にモルモットあるいはマウスの尾静脈あるいは眼窩静脈叢から血液を回収し、1500 rmp で 15 分室温にて遠心することにより血清を得た。血清中 OVA あるいは OVM 特異的抗体価は ELISA によって測定し

た。炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.6）にて 10 μg/mL に調整した OVA あるいは OVM（名古屋大学生命農学研究科 松田幹先生より供与）を 96-well ELISA plate（Thermo Fisher Scientific）に 50 μL/well ずつ播種した。4°C で一晩インキュベーションすることにより、固相化プレートを作製した。8%スキムミルク/PBS 溶液を 200 μL/well で添加し、37°C で 2 時間インキュベーションすることでブロッキング処理を行った。0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて血清を 1/2 連続希釈し、50 μL/well ずつブロッキング処理後の ELISA plate に播種した。25°C で 2 時間インキュベーションした後、TBST にて 5 回洗浄を行った。特異的 IgG の検出には、HRP-conjugated anti-mouse IgG（Southern Biotechnology）を使用した。この HRP 抗体は 0.8%スキムミルク/TBST にて最適濃度に希釈し、ELISA plate に 50 μL/well で添加した。25°C で 1 時間インキュベーションした後、TBST にて 7 回洗浄した。RO 水にて、1 回 well を洗浄後、TMB ultra-sensitive substrate（Moss, Inc.）を 100 μL/well ずつ添加し発色反応を行った。15 分後 2N 硫酸を 100 μL/well ずつ添加することで反応を停止させ、吸光度（主波長 = 450 nm，副波長 = 655 nm）を SpectraMax iD5 マイクロプレートリーダー（Molecular devices）で測定した。

また OVA および OVM 特異的 IgE 抗体価の測定は、上記と同様にブロッキング処理を行った後、0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて血清を 1/2 連続希釈し、50 μL/well ずつブロッキング処理後の ELISA plate に播種した。4°C で 2 時間インキュベーションした後、TBST にて 5 回洗浄した。0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて、Biotin Rat anti-mouse IgE 抗体を 0.5 μg/mL に調整し、50 μL/well ずつ添加した。4°C で 1 時間インキュベーションした後 TBST で 5 回洗浄し、0.8%スキムミルク/TBST 溶液を用いて最適濃度に希釈した Streptavidin-HRP を 50 μL/well ずつ添加した。4°C で 30 分インキュベーションした後、TBST で 7 回洗浄した。さらに RO 水にて、1 回 well を洗浄後、TMB ultra-sensitive substrate（Moss, Inc.）を 100 μL/well ずつ添加し発色反応を行った。15 分後 2N 硫酸を 100 μL/well ずつ添加することで反応を停止させ、吸光度（主波長 = 450 nm，副波長 = 655 nm）を SpectraMax iD5 マイクロプレートリーダー（Molecular devices）で測定した。

今回、吸光度（OD450 nm-655 nm）が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal $\log_2$ titer として表した。

(抗原再刺激後におけるサイトカイン測定)

OVM 装填 HG あるいは SC により抗原を投与した BALB/c マウスにおいて、最終免疫 1 週間後に DLNs を摘出した。3 匹の DLNs を混合し、cRPMI-1640 を用いて 5×10^6 cells/mL に調製した。この細胞懸濁液 500 μL と 2 mg/mL に調整した OVM 溶液 500 μL を混合し、24-well plate に播種した。37℃インキュベーターで 48 時間培養後、培養上清を遠心分離（400×g, 4°C, 5 分）した。ペレットが混じらないように上清のみを回収し、使用するまで冷凍保管（-20 °C）した。培養上清中の IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17、IFN-γおよび TNF-αは Bio-Plex マウスサイトカインアッセイ（Bio-Rad Laboratories）を用いて製造元の実験手順に従い測定を行った。

(OVM 装填 HG の長期安定性試験)

OVM 装填 HG (1 mg および 0.1 mg/patch) の貼付面をタンパク低吸着性の離型紙で覆い、遮光・防湿のためアルミラミネートパックに入れて密封した (Fig. 19)。4°C で保管し、2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年後に HG からの OVM 溶出量を測定した。溶出試験は、離型紙を剥がした貼付面を下にして HG を PBS 500 μL/well の入ったタンパク低吸着性 24-well plate (MD24 with LID Low cell binding; Thermo Fisher Scientific) に浮かべ、1 時間、34°C、200 rpm で振とうした後、溶液を回収した。溶液中のタンパク量は Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。

【結果】

(OVA 装填 HG の安全性試験)

モルモットは、皮膚炎を起こしやすくアレルギー誘発率が高い実験動物である。今回アレルゲン装填 HG の安全性を検証するため、比較的厳しい実験条件で経皮投与を行った。placebo-HG 貼付群においては、投与 14日までに目立った外観所見は認められなかった一方、OVA 装填 HG 貼付群では、痒みのせいか耳介皮膚を掻き毟り、貼付 5 日目から徐々に真っ赤に腫上がり糜爛した (Fig. 20A)。したがって、今回モルモットに観察された皮膚炎は、連日 HG 貼付することが原因ではなく、皮膚内に OVA が送達され皮膚内の免疫担当細胞が活性することで炎症病態に至った可能性が高いと推察された。

OVA 投与 14 日目の血清中特異的抗体価は、HG 群 SC 群ともに同程度の特異的 IgG 抗体（アレルギー中和抗体）価の上昇が認められた（Fig. 20B)。特異的 IgE 抗体（アレルギー誘発抗体）は、皮膚局所反応の重症度合いに反し SC 群において高値を示し、HG 群においては僅かな上昇を示したのみであった。これらのモルモットに OVA 溶液を静脈内曝露したところ、両群とも速やかに直腸温度が低下した。最終的に SC 群においては 4 匹中 2 匹が、HG 群では 3 匹中 2 匹が死亡したことから、全身性副反応であるアナフィラキシーショックに至ったと考えられた（Fig. 20C)。これらの結果から、HG は装填アレルゲンを皮膚内に送達することができることが明らかとなり、アレルゲン装填 HG を同一部位に貼付し続ける、あるいは皮膚が傷害された部位に貼付することで SC と同様にアレルギー感作に至る可能性を示し、抗原刺激と皮膚傷害が相まってアレルギー病態の悪化に繋がる可能性を示した。

（OVM 装填 HG の免疫誘導効果）

OVM 装填 HG を用いた経皮免疫誘導効果を検証するために、HG 貼付を 1 週間隔に延ばし、4 回貼付した際の血清中 OVM 特異的 IgG および IgE 抗体価の推移を評価した。OVM 装填 HG を patch 法により経皮投与した BALB/c マウスにおいては、SC 群と同様に免疫回数に依存した血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価が観察された（Fig. 21A)。また SC 群において、免疫 3 回後に OVM 特異的 IgE 抗体価が急激に上昇した一方、HG 群においては特異的 IgG 抗体価の上昇に伴い緩やかな特異的 IgE 抗体価の上昇を示した (Fig. 21B)。IgE と IgG 抗体価を比率で表したところ、SC 群は IgE 抗体価の比率が一過性に上昇したのに対し、HG 群は常に一定の比を示し（Fig. 21C)、OVM 装填 HG は特異的免疫応答を誘導可能であるとともに、SC と比較して特異的 IgE 抗体産生の急激な上昇が起こりにくいことが明らかとなった。

抗原再刺激後の培養上清中のサイトカインを測定したところ、SC 群においては IL-2 や IL-13、IL-10 といった各種サイトカインが検出されたのに対して、HG 群においては検出限界以下を示した（Fig. 21D)。以上の結果より、バリア機能が保たれた皮膚に経皮投与を行うことで OVM 特異的 IgE 抗体や Th2 型サイトカインの産生を抑制でき、副反応誘発リスクを低減できると考えられた。

（OVM 装填 HG の長期安定性試験）

OVM（1 mg および 0.1 mg/patch）装填 HG においては、保管 1 ヶ月まで安定的に保存できることが示されたが、それ以降 OVM 溶出率が徐々に低下するとともに離型紙側への OVM 吸着が認められた（Fig. 22）。HG はゲル体であるため、十分乾燥したとしても僅かに水分を保持していた可能性が高い。この状態で密封することによって、濃縮された OVM がゲル中の水分を吸収・安定化し離型紙側に吸着した可能性が考えられる。また HG の構成基剤であるグリセリンが溶出した可能性も否定できない。つまり OVM 装填 HG においては、1 ヶ月以上の長期保管が難しく、製剤安定性の向上には HG 調製方法あるいは HG 構成基剤の最適化が必要と考えられた。

(HG に適用可能なアジュバントのスクリーニング)

前章と同様に経皮投与デバイスである HG においても適用可能なアジュバントをスクリーニングした。OVA 装填 HG を用いて経皮投与したところ、OVA 特異的 IgG 抗体産生はすべてのアジュバント併用群において OVA 単独群よりも高い抗体価を示し、系統間の差は認められなかった（Fig. 23A）。特に、Poly I:C および Imiquimod においては 1 回免疫 2 週間後において抗体価が上昇した。これらは、比較的分子量が小さいため、皮膚内への送達効率が高かったと考えられる。

IgG サブクラス解析において、OVA 単独群は IgG1 抗体のみが検出されるのに対し、K3 においては両系統とも IgG2cあるいは IgG2a の高い抗体価を示したことから Th1 型免疫応答を誘導していると考えられる（Fig. 23B）。BALB/c マウスにおいては、Th1 型アジュバントと言われている Poly I:C や Imiquimod の併用により IgG2a 抗体の産生が認められた。さらに IgG 抗体価と同様に IgE 抗体価の測定を行ったところ、Pam3CSK4、LTA、Imiquimod において OVA 特異的 IgE 抗体価は、OVA 単独群と比較して上昇する傾向を示したが、Poly I:C および K3 は OVA 単独群と変わらず（Fig. 23C）、これらのアジュバントは免疫増強効果や Th1 偏向性のみならず、OVA 特異的な IgE 依存性アレルギー反応は誘発されにくい HG 用アジュバントとして有望であることが示唆された。

【考察】

小児食物アレルギーは先進国を中心に増加しており、効果的かつ根本的な治療法の確立は急務の課題

である[58]。近年、少しずつ微量のアレルゲンを体内に投与し徐々にアレルゲンに身体を慣らすアレルゲン免疫療法が制御性 T 細胞の誘導や中和抗体の増加につながり、唯一の根本的予防法になるのではないかと言われ、食物アレルギーにも積極的に導入されるようになってきた。SCIT や OIT などのアレルゲン免疫療法が既に実施されており[11, 14]、優れた治療効果が多数報告されている。しかし一方で、全身性副反応の出現のみならず急速経口免疫療法を受け重篤な呼吸器症状を呈し、低酸素脳症にいたった有害事象が報告されるなど安全面において問題を抱えている[59]。皮膚の免疫システムを利用した EPIT は、2009 年頃から報告され始めた新たなアレルゲン免疫療法である[60]。アレルギー疾患に対する免疫療法として未だ一般的ではないものの、重篤な副反応の誘発リスクは低いことや、症状誘発閾値の上昇、脱感作に至るケースなど EPIT の安全性や有効性が証明されつつある[61-63]。また EPIT は痛みなく服用できるというメリットから、治療対象の大半が子どもである食物アレルギーにおいて、長期にわたる継続的な治療を可能にする手法としても期待されている。そこで本研究では、独自開発した HG を応用し、皮膚に貼るだけで食物アレルゲンに対する減感作・耐性獲得を可能とする EPIT の創出を試みた。

今回我々が EPIT に活用した HG は、物理的バリアを担う角質層を除去することなく、皮膚に貼付するだけで角質層下の LCs や dDCs への抗原送達を可能とし、アレルギー反応を誘導するリスクを最小限に抑えることができると考えられる。そこでモルモットを用いた免疫実験を行ったところ、連日耳介皮膚に HG を貼付することによって炎症や肥厚が認められた。モルモットは皮膚炎症を誘導しやすい動物であるため、皮膚内にアレルゲン（異物）が送達されたことにより、免疫担当細胞が活性し炎症性サイトカインを産生した可能性が高い。

近年の研究において経皮的な抗原曝露がアレルゲンの感作と、それに続く食物アレルギーの発症の引き金であると考えられている[64]。イギリスでは新生児の入浴後に皮膚にオイルを塗る習慣があるが、ピーナッツオイルを配合したスキンケア製品を使用すると乳児期のピーナッツアレルギーの発症が約8倍増加すると報告されている[59]。また、乳児湿疹やアトピー性皮膚炎に伴う皮膚のバリア傷害もアレルゲンの感作を促進すると報告されている。これには、皮膚上皮細胞から産生される IL-33 あるいは TSLP が注目されている[65-67]。特に TSLP はアトピー性皮膚炎患者の上皮に強発現しており、経皮感作を誘導する重要な因子として考えられている。TSLP はプロテアーゼアレルゲンや黄色ブドウ球菌、機械的刺激などにより表皮細胞で産生さ

れ、抗原提示細胞などに作用して Th2 型の炎症を誘導する。さらに興味深いことに TSLP はケラチノサイトのフィラグリン発現を低下させるとの報告もされている。また IL-33 も皮膚傷害によって皮膚細胞から産生・放出され、抗原提示細胞に作用し Th2 型炎症を引き起こすことが示されている。つまり経皮感作は、皮膚のバリア障害、ケラチノサイトの活性化、皮膚抗原提示細胞の活性化が連続的に起こることで発症し、皮膚のバリア機能を担う角質層の存在がアレルギー発症の抑止につながる。

そこでマウス実験においては角質層のバリア機能を維持するため、経皮投与の頻度削減やエリザベスカラーを着用させたところ、急激なアレルゲン特異的 IgE 抗体価の上昇が起こらなかった。以上のことから、アトピー性皮膚炎を併発している割合が非常に高い食物アレルギー患者の場合、バリア機能が保たれた皮膚に抗原を送達することがアレルギー悪化の抑止や奏効率の改善につながり、場合によってはプロアクティブ療法（スキンケア）との併用が望ましいと思われる。そこで現在国立病院機構三重病院との共同研究として、重症鶏卵アレルギー患者を対象に OVM 装填 HG を用いた EPIT の二重盲検プラセボ対照平行群間ランダム化比較検討を実施している。本臨床研究においては、プロアクティブ療法を併用しており、閾値の上昇ならびに制御性 T 細胞の誘導など優れた治療効果を得ている。

今回著者はアレルゲン装填量や投与回数の削減が見込めるアジュバントとして、Poly I:C および K3 を見出した。これらの Th1 型アジュバントを HG に併用することで、アレルゲン投与に伴う副反応を回避し、より奏効率が上がる可能性が見込める。今後は、アジュバントを併用したアレルゲン装填 HG の安全性・有効性を検証するためにも、まずは食物アレルギーモデル動物の作製を試み、EPIT の減感作・耐性獲得につながる作用メカニズムの解明に取り組みたい。さらにアレルゲン装填 HG の製剤安定性を向上させるべく HG 構成基剤の改良を試み、日本発世界初の EPIT 用貼付製剤として HG の上市・臨床応用を目指したい。

第 2 節　重症牛乳アレルギーに対する HG を活用した EPIT の有効性評価

本邦において牛乳アレルギーは鶏卵に次いで罹患者数が 2 番目に多く[68]、牛乳蛋白質に含まれるカゼインが主要アレルゲンである。カゼインは加熱処理をしてもアレルゲン免疫原性は変化しないため、牛乳アレルギー患児は多くの乳製品を摂取することができない。牛乳アレルギーは、乳幼児期　(0 歳) に発症率が高く、その後加齢に伴い自然寛解 (耐性獲得) に至るケースが多いが、牛乳アレルギー患児のカルシウム摂取量は健常児の半分以下であり、最も体が発達する乳幼児期におけるカルシウム不足は、骨や歯の成長に影響を及ぼす [69]。牛乳アレルギー患児を持つ親は、代替食により不足栄養素を補っているものの、時間的・身体的・費用的な問題もあり親の生活の質 (quality of life; QOL) 低下を招きかねない。そこで本研究においては、鶏卵アレルギーと同様にニーズの高い牛乳アレルギーに対する「安全」「有効」「簡便」なアレルギー治療法として HG を活用した EPIT の有用性を評価することとした。

【材料および方法】

(マウス)

牛乳アレルゲンに対して反応性が高いことが知られている DBA/2 マウス (H-2^{d}; 雌, 6 週齢) は日本エスエルシー株式会社より購入し実験に供した。本実験は、動物の愛護および管理に関する法律のガイドラインとポリシーに基づいて実験動物の管理および使用を適切に行い、2%イソフルラン麻酔吸入下で実施した。

(MPC 装填 HG の作製)

MPC 装填 HG (1 mg/patch) は、濃縮ミルクタンパク (milk protein concentrate; MPC, ビーンスターク・スノー株式会社, Tokyo, Japan) を滅菌 DW に溶解し、14.3 mg/mL に調整した。HG (直径 1 cm) に、MPC 溶液を 70 μL ずつ滴下し室温乾燥することで 1 mg MPC 装填 HG を作製した (Fig. 19)。

(MPC の免疫方法)

DBA/2 マウスの除毛背部皮膚の毛を電気クリッパーで剃毛し、Epilat (Kracie Holdings) を塗布した。5 分後に 38 度のお湯で Epilat を洗い流し、除毛が完全にできていることを確認した。除毛から 48 時間後に、

MPC 装填 HG (1 mg/patch) を背部皮膚に 24 時間貼付した (Fig. 24 left, patch 法)。また場合によっては、除毛背部皮膚に予め PGA-MN を用いて穿刺孔を形成し[43]、その後 MPC 装填 HG (1 mg/patch) を 24 時間貼付した (Fig. 24 right, poke-and-patch 法)。対照群には背部に MPC 溶液 (100 μg/100 μL/PBS) を SC した。これらの免疫操作は 1 週間隔で計 4 回実施し、経時的にマウスの眼窩静脈叢から採血を行い、血清を回収した。

(MPC 特異的抗体価の測定)

血清中 MPC 特異的抗体価は ELISA によって測定した。炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.6) にて 1 μg/mL に調整した MPC を 96-well ELISA plate (Thermo Fisher Scientific) に 50 μL/well ずつ播種した。4°C で一晩インキュベーションすることにより、固相化プレートを作製した。4%ブロックエース/PBS 溶液を 200 μL/well で添加し、37°C で 2 時間インキュベーションすることでブロッキング処理を行った。0.4%ブロックエース/TBST 溶液を用いて血清を 1/2 連続希釈し、50 μL/well ずつブロッキング処理後の ELISA plate に播種した。25°C で 2 時間インキュベーションした後、TBST にて 5 回洗浄を行った。MPC 特異的 IgG の検出には、HRP-conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotechnology) を使用した。この HRP 抗体は 0.4%ブロックエース/TBST にて最適濃度に希釈し、ELISA plate に 50 μL/well で添加した。25°C で 1 時間インキュベーションした後、TBST にて 7 回洗浄した。RO 水にて、1 回 well を洗浄後、TMB ultra-sensitive substrate (Moss, Inc.) を 100 μL/well ずつ添加し発色反応を行った。15 分後 2N 硫酸を 100 μL/well ずつ添加することで反応を停止させ、吸光度 (主波長 = 450 nm, 副波長 = 655 nm) を SpectraMax iD5 マイクロプレートリーダー (Molecular devices) で測定した。

また MPC 特異的 IgE 抗体価の測定は、上記と同様にブロッキング処理を行った後、0.4%ブロックエース/TBST 溶液を用いて血清を 1/2 連続希釈し、50 μL/well ずつブロッキング処理後の ELISA plate に播種した。4°C で 2 時間インキュベーションした後、TBST にて 5 回洗浄した。0.4%ブロックエース/TBST 溶液を用いて、Biotin Rat anti-mouse IgE (BD) 抗体を 0.5 μg/mL に調整し、50 μL/well ずつ添加した。4°C で 1 時間インキュベーションした後 TBST で 5 回洗浄し、0.4%ブロックエース/TBST 溶液を用いて最適濃度に希釈した Streptavidin-HRP (BD) を 50 μL/well ずつ添加した。4°C で 30 分インキュベーションした後、TBST で

7 回洗浄した。さらに RO 水にて、1 回 well を洗浄後、TMB ultra-sensitive substrate (Moss, Inc.) を 100 μL/well ずつ添加し発色反応を行った。15 分後 2N 硫酸を 100 μL/well ずつ添加することで反応を停止させ、吸光度（主波長 = 450 nm，副波長 = 655 nm）を SpectraMax iD5 マイクロプレートリーダー（Molecular devices）で測定した。

今回、吸光度（OD450 nm-655 nm）が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal $\log_2$ titer として表した。

(MPC 装填 HG における長期安定性試験)

MPC 装填 HG（1 mg/patch）の貼付面をタンパク低吸着性の離型紙で覆い、遮光・防湿のためアルミラミネートパックに入れて密封した（Fig. 19)。4°C で保管し、2 週、1 ヵ月、2 ヵ月、3 ヵ月、6 ヵ月、1 年、3 年、5 年後に HG からの MPC 溶出量を測定した。溶出試験は、PBS が 500 μL/well ずつ入ったタンパク低吸着性 24-well plate（Thermo Fisher Scientific）に、離型紙を剥がした貼付面を下にして HG を浮かべ、1 時間、34°C、200 rpm で振とうすることにより行った。溶液中の MPC 量は、Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク定量した。また、1 年間保管した MPC 装填 HG の溶出液あるいは用時調製 MPC 溶液をそれぞれ DBA/2 マウスの背部に 100 μg/100 μL/PBS で SC し、血清中 MPC 特異的抗体価を比較することで MPC の免疫原性を確認した。

(探索的臨床研究)

本臨床研究は、国立病院機構三重病院倫理審査委員会の審査・承認を受けて実施した。法的保護者の同意を得られ、かつ本人の意思確認ができ、アレルギー症状誘発閾値が牛乳 1 mL 未満の重症牛乳アレルギー患児 8 名（3 歳～15 歳の男女）を対象とした。本臨臨床研究における選択基準は、1）経口負荷試験で確定診断され、寛解傾向のない牛乳アレルギー患者、2）経口負荷試験による閾値（総負荷量）が牛乳 3 mL 以下の患者、とした。除外基準は、1）牛乳摂取状況が直近の 3 ヶ月間に大きく変化している者、2）牛乳の経口免疫療法を中止してから 6 ヶ月以内の者、3）何らかの免疫療法を行っている者、4）心疾患、肝疾患、腎疾患などがあり、現在治療中の者、5）気管支喘息、アトピー性皮膚炎があり、現在コントロール不良の者、とした。これらの患児に、1 mg の MPC を装填した HG（直径 1 cm）を夕刻の入浴後から翌日起床

後までの 12 時間、健常皮膚に連日貼付した。主要アウトカム評価項目として、治療前後の経口負荷試験における症状誘発閾値を測定した。副次アウトカム評価項目として血中牛乳特異的 IgG および IgG4 抗体価を ELISA（Thermo Fisher Scientific）により、および IgE 抗体価をイムノキャップ法（Thermo Fisher Scientific）によりそれぞれ測定した。さらに、MPC 装填 HG 貼付部位の局所反応や全身性のアレルギー反応の観察を行った。

【結果】

(MPC 溶液の特性)

我々はこれまでに可溶性抗原を HG に装填することで抗原特異的抗体産生を誘導できるが、難溶性抗原や粒子を形成するような抗原については、免疫応答を誘導しにくいことを明らかにしている [65]。MPC は構成成分の約 80％が難溶性を示すカゼインであり、残りの約 20％はα-lactalbumin（ALA）やβ-lactoglobulin（BLG）などの乳清蛋白質である。さらにカゼインは、巨大なミセル会合体を形成するため、HG を用いた経皮投与において皮膚内透過が起こりにくい可能性が考えられた。そこでまずは MPC 溶液の存在状態を調べるため、非変性条件下で Native-PAGE を行った（Fig. 25A)。下層の 10-20 kDa に認められる 2 つのバンドは、κ-カゼインまたはγ-カゼイン、あるいは ALA および BLG の分子量と一致する。中央のバンドはカゼインの中でも存在割合が高いα-カゼイン（33 kDa）およびβ-カゼイン（29 kDa）の分子量と一致しており、MPC 溶液中においてこれらが単体として存在している可能性が高い。約 70 kDa で検出された最も高分子のバンドは、いずれの MPC 構成蛋白質の分子量より大きいことから、カゼインによって形成された複合体であると推定された。そこで SDS（陰イオン界面活性剤）を各 MPC 溶液に添加し熱変性処理を行ったところ、70 kDa バンドがほぼ完全に消失したことからカゼイン複合体が単体に解離したと考えられる。0.8-、0.45-、および 0.2-μm フィルターを通過した後の MPC 溶液では、バンドの位置や濃さは変化しなかった。フィルターろ過後の各 MPC 溶液の粒子サイズは約 200 nm であり（Fig. 25B)、報告されているカゼインミセルの粒子径と一致した。以上の結果より、MPC 溶液に含まれるカゼインはミセルを形成しているものの僅かに単体としても存在していることから、極微量の MPC が皮膚内透過している可能性が考えられた。

(MPC 装填 HG 貼付に伴う免疫誘導効果)

MPC 装填 HG を用いた経皮免疫誘導効果を検証するために、マウスに 1 週間隔で 4 回貼付した際の血清中アレルゲン特異的 IgG および IgE 抗体価の推移を評価した。MPC (1 mg/patch) 装填 HG を patch 法により経皮投与した DBA/2 マウスにおいては、血清中 MPC 特異的 IgG ならびに IgE 抗体価は検出限界以下であった (Fig. 26A, B)。そこで poke-and-patch 法により MPC の皮膚内送達を促進させると、SC 群と同様に免疫回数の増加に伴って血清中 MPC 特異的 IgG および IgE 抗体価の上昇が認められた。以上の結果より、MPC は intact なマウス皮膚を透過しにくいものの、皮膚内への送達効率を促進させれば免疫応答を惹起する免疫原性を示すことが明らかとなった。さらに抗体価の上昇が認められた poke-and-patch 法および SC において、MPC 特異的 IgE 抗体と IgG 抗体の比を表したところ、その割合は両群間でほぼ変化が認められず、両群とも MPC 特異的 IgG 抗体価の上昇に伴い特異的 IgE 抗体価が上昇していることが考えられた (Fig. 26C)。したがって、HG 製剤は装填アレルゲン特異的な免疫応答を誘導するとともに、特異的 IgE 抗体産生の急激な誘導が起こりにくいことが明らかとなった。

(MPC 装填 HG 製剤の長期安定性評価)

MPC 装填 HG の製剤安定性・長期保存性を保証するため、MPC 装填 HG を冷蔵保管し定期的にアレルゲン溶出量を測定した。MPC (1 mg/patch) 装填 HG を冷蔵保管した場合において、作製 1 年後までほぼ 100%の MPC 溶出率を示した (Fig. 27A)。また長期保管後における MPC の免疫原性を評価すべく、1 年保管後の MPC (1 mg/patch) 装填 HG の溶出液を DBA/2 マウスに SC した。MPC 特異的抗体価の推移は、用時調製した MPC 溶液と変化なく、免疫回数に応じ血清中 MPC 特異的 IgG 抗体価の上昇が認められた (Fig. 27B)。以上の結果から、少なくとも HG 作製 1 年後までアレルゲンとしての免疫原性を維持したまま安定して保存できることが明らかとなった。

(MPC 装填 HG を用いた EPIT の探索的臨床研究)

ヒトにおける EPIT の安全性・有用性を評価するため、製剤安定性・長期保存性が保証された MPC 装填 HG を用い、重症牛乳アレルギー患児を対象とした探索臨床研究を実施した。試験開始時における患児の

臨床的特徴は Table 3 に示した。

MPC 装填 HG 貼付に伴い、蕁麻疹や発赤など局所の皮膚症状は認められたものの、アナフィラキシーショックなど重篤な副反応は全例において認めなかった。さらに EPIT 実施により、8 例中 4 例においてアレルギー症状誘発閾値が上昇し、牛乳 3 mL 以上を経口摂取することが可能となった (Fig. 28)。

これは、タンパク量で牛乳 3 mL に相当するバターを摂取できることを示し、バターの含まれる多くの食品を経口摂取できるようになったことから大幅な QOL 改善につながったと考えられ、EPIT の有効性が示された。これらの患児においては、OIT に移行し継続的に治療を続けたところ、100 mL 近くの牛乳を飲むことが可能となった。さらに milk、ALA、BLG、カゼイン特異的 IgE 抗体価は EPIT 実施後、緩やかに低下傾向を示す一方 (Fig. 29A)、ALA、BLG、カゼイン特異的 IgG 抗体価およびブロック抗体として機能する IgG4 抗体価の上昇傾向が認められた (Fig. 29B, C)。したがって EPIT は OIT が困難な重症アレルギー患児への導入部分としても、非常に効果的であり、OIT への移行を可能にする手段であると考えられる。

一方残念ながら 32 週目において特異的 IgE 抗体価に著しい上昇が認められた 1 例、閾値の上昇は認められたものの MPC 装填 HG 貼付部位の蕁麻疹が頻回となった 1 例、閾値の改善効果が得られなかった 2 例において本試験を中止した。milk およびカゼイン特異的 IgE 抗体価が急上昇した症例においては、試験中止後特異的 IgE 抗体価の速やかな減少を示した。以上のことから、EPIT の実施により局所の皮膚反応やアレルゲン特異的抗体価の上昇などの副反応が生じることも明らかとなり、HG の使用を中止することでその症状は速やかに正常状態に戻ることが示された。

これらの探索的臨床研究のデータは、HG を応用した EPIT が簡便な食物アレルギー根治療法として非常に有望であることを示唆するとともに、試験中止につながった副反応を軽減するアプローチを導入することができれば、本療法の恩恵にあずかる食物アレルギー患児を大幅に拡大できる可能性を示唆した。

【考察】

本研究において、MPC 装填 HG を Intact なマウスに経皮免疫した場合、免疫応答は誘導されなかった。これは MPC の主成分であるカゼインは強大な会合体を形成する性質を持つため [70]、皮膚への透過が十分ではない可能性が考えられた。しかしながら MPC 装填 HG は、免疫原性を維持したまま長期保管が可能で

あったことから臨床研究を実施したところ、すべての被験者において HG 貼付初期に発赤や蕁麻疹などの皮膚局所反応が認められた。すなわち、極微量のアレルゲンが皮膚内へと透過しており、既に感作成立している患者においては有用なデバイスであると考えられる。現段階では、皮膚内にどのくらいのアレルゲンが送達されているか詳細な量は不明であるが、時間経過に伴ってゆっくりとアレルゲンが送達されることが、全身性の副反応を誘発せず、アナフィラキシーショック経験のある重度のアレルギー患者においても適用できる安全性につながっていると考えられる。有効性に関しては、今回パイロットスタディであるため軽度の副反応の出現でも専門医師の判断のもと試験を中止したが、8 名中 4 名の患者において優れた症状誘発閾値の上昇が認められた。特に本研究より EPIT は、OIT を実施できない重症食物アレルギー患者において OIT への移行をも可能に手段であることが示された。

多くの食物アレルギーは IgE 依存性の反応であり、アレルゲン特異的 IgE 抗体は全身に存在するマスト細胞上に発現する FcεRI を介してアレルゲンを捕捉し、ヒスタミンなどの化学メディエーターを放出することによって蕁麻疹や下痢、喘息を誘発する [71]。アレルゲン免疫療法の有効性につながる奏効機序に関しては未だ未解明な部分が多いが、治療に伴いアレルゲン特異的 IgE 抗体の産生が徐々に抑制され、中和抗体として作用するアレルゲン特異的 IgG4 および IgA 抗体の産生増加が有効性評価につながる指標として考えられている [72, 73]。これは本実験で有効性の認められた患児の特異的抗体価の推移と非常に類似していることから、HG を用いた EPIT は安全性・有効性の高い免疫療法であると考えられた。さらに近年のめざましい研究成果によりアレルゲン免疫療法の有効性に関しては、Th1/Th2 バランスの是正や T 細胞機能の変化、制御性 T 細胞や制御性 B 細胞の存在が重要であることが明らかとなってきた [74、75]。EPIT に関してもこれらの免疫抑制細胞や免疫バランスが、有効性に関係していると考えられることから、今後は減感作・耐性獲得に作用する細胞や因子を同定し、減感作・耐性獲得に関わる奏効機序の解明につなげたい。

今回、残念ながら閾値の上昇が認められなかった患児および軽微な有害反応により EPIT を中止した患者に対しては、免疫バランスを Th1 型へと変更可能なアジュバントの併用が有効と考えられる。前節で明らかとなった HG に適用可能な Th1型アジュバントとして見出した Poly I:C あるいは K3 を活用することで、Th2 型に傾いた免疫応答を Th1 型にシフトができ、アレルゲン投与量の削減も期待できることから副反応の出現を回避できる可能性がある。最終的には、前臨床研究で得られた成果を治験・製品化研究に適切に橋渡し

すべく、科学性・理論性が十分に担保された質の高い臨床研究を実施し、EPIT の優位性を実証し、簡便・安全・有効な新規 EPIT の早期実用化を目指したい。

3. 結論

(1) MNを貼付する物理的な刺激に伴って皮膚常在性DCsがDLNsへと遊走し、これらが抗原特異的CD4陽性T細胞をより強力に感作・活性化する可能性を示した。

(2) MNによる経皮抗原送達によってDLNsにおける抗原特異的CD4陽性T細胞のメモリーT細胞への分化やGC形成が促進されており、これら一連の細胞が連携することで優れた抗体産生を誘導できる可能性を示した。

(3) MNに適用可能なアジュバントとしてTh1型免疫偏向性をもつK3を見出し、K3装填MNがヒト皮膚に対して安全に適用できることを明らかとした。

(4) HGを応用した食物アレルギーに対するEPITは、アナフィラキシーショックを誘発することなく、食物アレルギーに対する簡便な根治療法の確立に貢献できる治療戦略であることを明らかとした。

4. 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科ワクチン・免疫制御学プロジェクト教授　岡田直貴先生、同准教授　立花雅史先生、附属実践薬学教育研究センター講師　廣部祥子先生に甚大なる謝意を表します。

本研究において、経皮投与デバイスの作製にご協力下さるとともに、貴重な御助言を賜りました富士フイルム株式会社　小山田孝嘉先生ならびに吉田淳哉先生、コスメディ製薬株式会社　神山文男先生ならびに権　英淑先生に深謝いたします。K3-MN の安全性試験ならびに EPIT の探索的臨床研究を遂行するにあたりご協力下さるとともに貴重な御助言を賜りました国立病院機構三重病院　藤澤隆夫先生、長尾みづほ先生、桑原優先生に深くお礼申し上げます。

本稿をまとめるにあたり、貴重なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学分野教授　藤尾慈先生、大阪大学大学院薬学研究科医薬品・医療機器規制科学プロジェクト教授　近藤昌夫先生、大阪大学大学院薬学研究科生体応答制御分野教授　齊藤達哉先生に御礼申し上げます。

本研究に御協力、御助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科ワクチン・免疫制御学プロジェクトの皆様に感謝いたします。最後に、研究に専念できる環境、時間を与えてくださり、長い学生生活を終始温かく見守って下さった家族に心から感謝の意を捧げます。

5. 参考文献

1. Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, Soropogui B, Sow MS, Keïta S, De Clerck H. *et al*. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1418-142 5 (2014).
2. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet* **386**, 995-1007 (2015).
3. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 935-947 (2008).
4. Hirobe S, Okada N, Nakagawa S. Transcutaneous vaccines – current and emerging strategies. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 485–498 (2013).
5. Matsuo K, Hirobe S, Okada N, Nakagawa S. Frontiers of transcutaneous vaccination systems: Novel technologies and devices for vaccine delivery. *Vaccine* **31**, 2403–2415 (2013).
6. Matsuo K, Yokota Y, Zhai Y, Quan YS, Kamiyama F, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens. *J. Control. Release* **161**, 10–17 (2012).
7. 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* **57**, 50-58 (2015).
8. Ono A, Ito S, Sakagami S, Asada H, Saito M, Quan YS, Kamiyama F, Hirobe S, Okada N. Development of Novel Faster-Dissolving Microneedle Patches for Transcutaneous Vaccine Delivery. *Pharmaceutics* 9, 1-13 (2017).
9. Nakatsukasa A, Kuruma K, Okamatsu M, Hiono T, Suzuki M, Matsuno K, Kida H, Otamada T, Sakoda Y. Potency of whole virus particle and split virion vaccines using dissolving microneedle against challenges of H1N1 and H5N1 influenza viruses in mice. *Vaccine* **35**, 2855-61 (2017).
10. Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K, Quan YS, Kamiyama F, Fujita T, Yamamoto A, Nakagawa S. *et al*. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial

infection. *J. Control. Release* **131,** 113–120 (2008).

11. Akdis CA. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med.* **18**, 736-49 (2012).

12. Soyer OU, Akdis M, Ring J, Behrendt H, Crameri R, Lauener R, Akdis CA. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* **68**, 161-70 (2013).

13. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*. **8**, 17 (2015).

14. Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG, Matsui EC, Burks AW, Wood RA. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. **122**, 1154-1160 (2008).

15. Yamanaka K, Shah SA, Sakaida H, Yamagiwa A, Masuda S, Mizutani H, Takeuchi K. Immunological parameters in prophylactic sublingual immunotherapy in asymptomatic subjects sensitized to Japanese cedar pollen. *Allergol. Int.* **64**, 54-59 (2015).

16. Jones SM, Burks AW, Dupont C. State of the art on food allergen immunotherapy: Oral, sublingual, and epicutaneous. *J Allergy Clin Immunol*. **133**, 318-23 (2014).

17. Wood RA. Food allergen immunotherapy: Current status and prospects for the future. *J Allergy Clin Immunol*. 137, 973–82 (2016).

18. Tozuka M, Oka T, Jounai N, Egawa G, Ishii KJ, Kabashima K, *et al*. Efficient antigen delivery to the draining lymph nodes is a key component in the immunogenic pathway of the intradermal vaccine. *J Dermatol Sci*. **82**, 38-45 (2016).

19. Miller LS, Modlin RL. Toll-like receptors in the skin. *Semin Immunopathol*. **29**, 15-26 (2007).

20. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 417-426 (2014).

21. Yao C, Zurawski SM, Jarrett ES, Chicoine B, Crabtree J, Peterson EJ, Zurawski G, Kaplan DH, Igyártó BZ. Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *J. Allergy Clin Immunol.* **136**, 1387-1397 (2015).

22. Förster R, Braun A, Worbs T. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol*. **33**, 271–280 (2012).

23. Igyártó BZ, Haley K, Ortner D, Bobr A, Gerami-Nejad M, Edelson BT, Zurawski SM, Malissen B, Zurawski G, Berman J. *et al*. *Immunity* **35**, 260-272 (2011).

24. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**, 143-150 (1998).

25. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N. *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539-548 (2000).

26. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N. *et al*. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-777 (2005).

27. Hoshino K, Kashiwamura S, Kuribayashi K, Kodama T, Tsujimura T, Nakanishi K, Matsuyama T, Takeda K, Akira S. The absence of interleukin 1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function. *J. Exp. Med.* **190**, 1541-1548 (1999).

28. 日本ワクチン学会編, ワクチンの事典, 18-23 (2004).

29. Phan TG, Paus D, Chan TD, Turner ML, Nutt SL, Basten A, Brink R. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* **203**, 2419–24 (2006).

30. Hatzi K, Nance JP, Kroenke MA, Bothwell M, Haddad EK, Melnick A, Crotty S. BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* **212**, 539-53 (2015).

31. Saalbach A, Klein C, Schirmer C, Briest W, Anderegg U, Simon JC. Dermal Fibroblasts Promote the Migration of Dendritic Cells. *J. Invest Dermatol.* **130**, 444-54 (2010).

32. Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. Curr. *Allergy Asthma Rep.* 18, 63 (2018).

33. Shu C, Li X, Li P. DepartmentThe mechanism of double-stranded DNA sensing through the cGAS-STING pathway. *Cytokine growth Factor Rev*. **25**, 641-648 (2015).

34. Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol.* **17**, 1142-1149 (2016).

35. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin. Immunol.* **39**, 14-21 (2018).

36. Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int. Rev. Immunol.* **32**, 209-220 (2013).

37. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* **7**, 179-90 (2007).

38. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* **5**, 987-95 (2004).

39. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* **19**, 24-32 (2007).

40. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* **162**, 3749-3752 (1999).

41. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Zygosity determination in hairless mice by PCR based on Hr(hr) gene analysis. *Exp. Amin.* **62**, 267-273 (2013).

42. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).

43. Ono A, Azukizawa H, Ito S, Nakamura Y, Asada H, Quan YS, Kamiyama F, Katayama I, Hirobe S, Okada N. Development of novel double-decker microneedle patches for transcutaneous vaccine delivery. *Int. J. Pharm.* **532**, 374-383 (2017).

44. Anand A, Zaman K, Estívariz CF, Yunus M, Gary HE, Weldon WC, Bari TI, Steven Oberste M, Wassilak SG, Luby SP. *et al.* Early priming with inactivated poliovirus vaccine (IPV) and intradermal fractional dose IPV administered by a microneedle device: A randomized controlled trial. *Vaccine* **33**,

6816-6822 (2015).

45. Van Damme P, Oosterhuis-Kafeja F, Van der Wielen M, Almagor Y, Sharon O, Levin Y. Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine* **27**, 454-459 (2009).

46. Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *J. Infect. Dis.* **171**, 1387-1398 (1995).

47. Belshe RB, Newman FK, Cannon J, Duane C, Treanor J, Van Hoecke C, Howe BJ, Dubin G. Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2286-2294 (2004).

48. Arakane R, Annaka R, Takahama A, Ishida K, Yoshiike M, Nakayama T, Takeshita F. Superior immunogenicity profile of the new intradermal influenza vaccine compared to the standard subcutaneous vaccine in subjects 65 years and older: A randomized controlled phase III study. *Vaccine* **33**, 6650-6658 (2015).

49. Gupta J, Park SS, Bondy B, Felner EI, Prausnitz MR. Infusion pressure and pain during microneedle injection into skin of human subjects. *Biomaterials*, **32**, 6823-6831 (2011).

50. Nagao M, Fujisawa T, Ihara T, Kino Y. Highly increased levels of IgE antibodies to vaccine components in children with influenza vaccine-associated anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 861-867 (2016).

51. Ciabattini A, Nardini C, Santoro F, Garagnani P, Franceschi C, Medaglini D. Vaccination in the elderly:

The challenge of immune changes with aging. *Semin. Immunol.* **40**, 83-94 (2018).

52. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human Peripheral Blood Cells Differentially Recognize and Respond to Two Distinct CpG Motifs. *J. Immunol.* **166**, 2372-2377 (2001).

53. Sivori S, Carlomagno S, Moretta L, Moretta A. Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 961-967 (2006).

54. Gürsel M, Verthelyi D, Gürsel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 813-820 (2002).

55. Marshall JD, Fearon K, Abbate C, Subramanian S, Yee P, Gregorio J, Coffman RL, Van Nest G. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 781-792 (2003).

56. Tougan T, J Ishii K, Horii T. Development and Application of Next Generation SE36 Malaria Vaccine Formulated with a Novel Adjuvant: Approach to Travelers' Vaccine. *Yakugaku Zasshi* **133**, 1153-1157 (2013).

57. Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36 / AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother*. **9**, 283-90 (2013).

58. Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T. Japanese guidelines for food allergy 2017. *Allergol. Int.* **66**, 248-264 (2017).

59. 日本小児アレルギー学会，経口免疫療法による注意喚起，https://www.jspaci.jp/news/member/20171114095819/

60. Senti G, Graf N, Haug S, Rüedi N, von Moos S, Sonderegger T, Johansen P, Kündig TM. Epicutaneous

allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 997–1002 (2009).

61. Mondoulet L, Dioszeghy V, Vanoirbeek JAJ, Nemery B, Dupont C, Benhamou PH. Epicutaneous immunotherapy using a new epicutaneous delivery system in mice sensitized to peanuts. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **154**, 299–309 (2011).

62. Jones SM, Agbotounou WK, Fleischer DM, Burks AW, Pesek RD, Harris MW, Martin L, Thebault C, Ruban C, Benhamou PH. Safety of epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy: A phase 1 study using the Viaskin patch. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 1258-1261 (2016).

63. Jones SM, Sicherer SH, Burks AW, Leung DY, Lindblad RW, Dawson P, Henning AK, Berin MC, Chiang D, Vickery BP. *et al*. Epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy in children and young adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 1242–1252 (2016).

64. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 121(6), 1331-6 (2008).

65. Licona-limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA.Th2 allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat. Rev*. **14**, 536-543 (2013).

66. Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Haneda T, Mizutani H, Yoshimoto T. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad.* **110**, 13921-13926 (2013).

67. Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA, Noti M, Monticelli LA, Sonnenberg GF, Hepworth MR, Van Voorhees AS, Comeay MR, Artis D. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med*. **5**, 1–12 (2013).

68. 一般社団法人日本アレルギー学会，アレルギー総合ガイドライン, 404-407 (2016).

69. Dupont C, Chouraqui JP, Linglart A, Bocquet A, Darmaun D, Feillet F, Frelut ML, Girardet JP, Hankard

R, Rozé JC. *et al*. Nutritional management of cow's milk allergy in children: An update. *Arch. Pediatr.* **25**, 236-243 (2018).

70. 石井哲也, カゼインミセルの構造および性質に関する最近の研究動向, *Milk Science* **54**, 1-8 (2005).

71. Kinet J-P. THE HIGH-AFFINITY IgE RECEPTOR (FcεRI): From Physiology to Pathology. *Annu Rev Immunol.* **17**,931–72 (1999).

72. Berings M, Karaaslan C, Altunbulakli C, Gevaert P, Akdis M, Bachert C, Akdis CA. Advances and highlights in allergen immunotherapy: On the way to sustained clinical and immunologic tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **140**, 1250-1267 (2017).

73. Şahin E, Bafaqeeh SA, Güven SG, Çetinkaya EA, Muluk NB, Coşkun ZO, Lopatin A, Kar M, Pinarbasli MO, Cingi C. Mechanism of action of allergen immunotherapy. *Am. J. Rhinol Allergy* **30**, 1-3 (2016).

74. Syed A, Garcia MA, Lyu SC, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, et al. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol*. **133**, 500-510 (2014).

75. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol*. **138**, 656-65 (2016).

Fig. 1

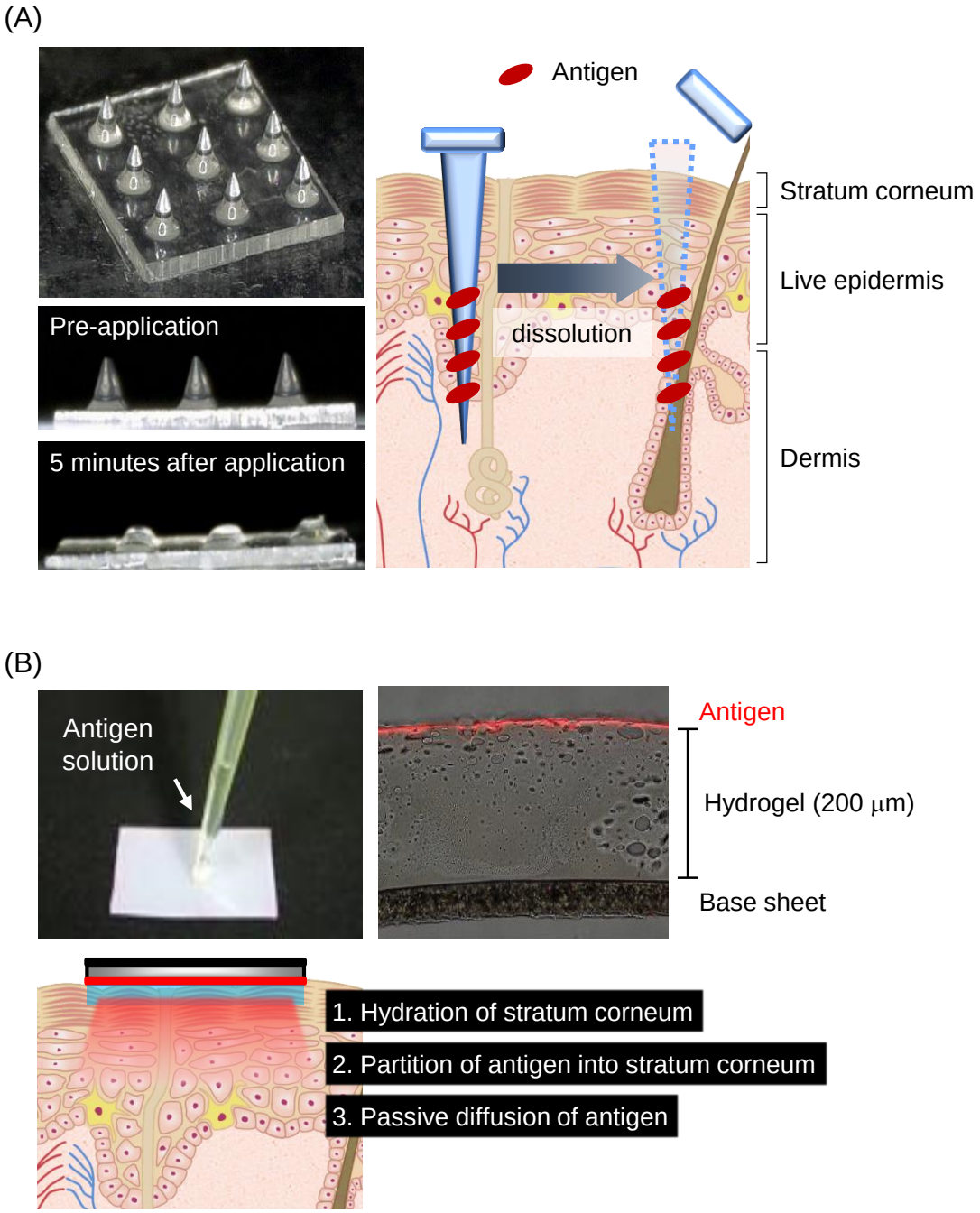


Fig. 1. Two types of novel transcutaneous immunization devices.
(A) The sdMN is loaded with antigen only at the needle tips. After application to the skin, the needle dissolves in just 5 minutes by skin moisture. The loaded antigen can be delivered into the skin. (B) The antigen solution was dropped on the HG and dried for a few hours. The HG formed an antigen-concentrated layer on its surface. After applying HG to the skin, hydration of the stratum corneum promotes the partition of antigen. Antigen penetrates the skin with passive diffusion.

Fig. 2

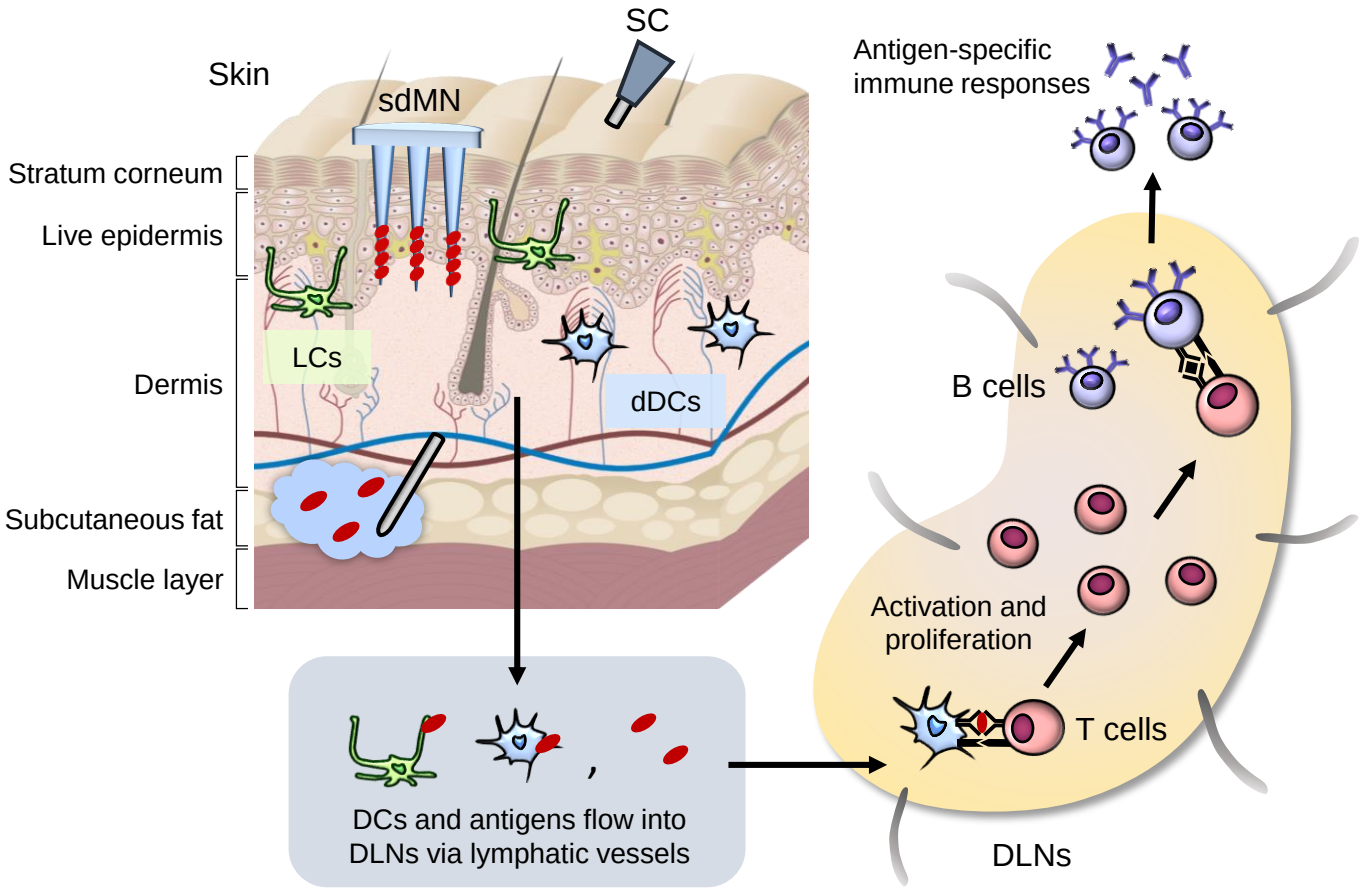
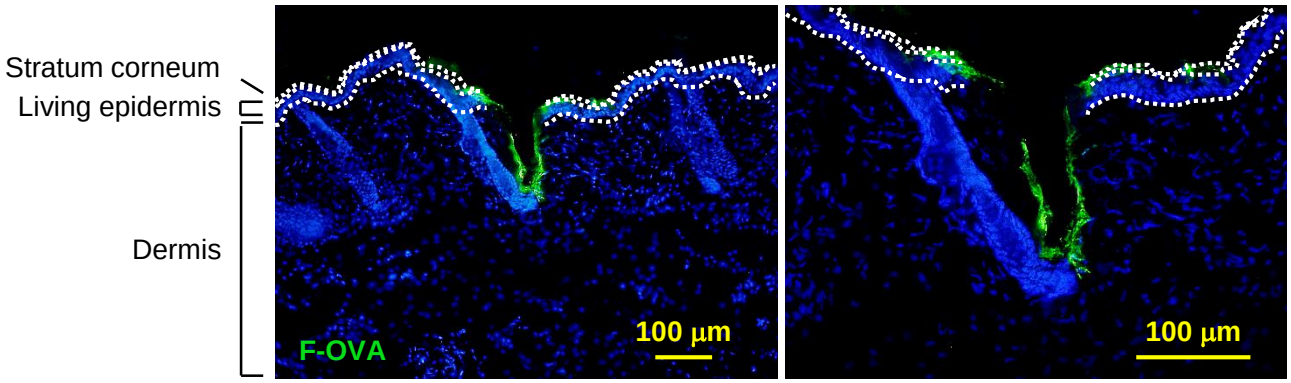


Fig. 2. Strategy of transcutaneous immunization using the sdMN.
SC delivers the antigen to the subcutaneous tissue where there are few immune cells. On the other hand, epicutaneous injection using sdMN can deliver antigens to the skin surface where abundant DCs such as LCs and dDCs are present. After captured antigens, DCs migrate into DLNs. Migrated DCs present antigens to T cells, and activate antigen-specific T cells and B cells. Activated T cells and B cells migrate to each tissue and induce antigen-specific immune responses.

Fig. 3A, B

(A)


Stratum corneum
Living epidermis
Dermis
F-OVA
100 μm
100 μm

(B)

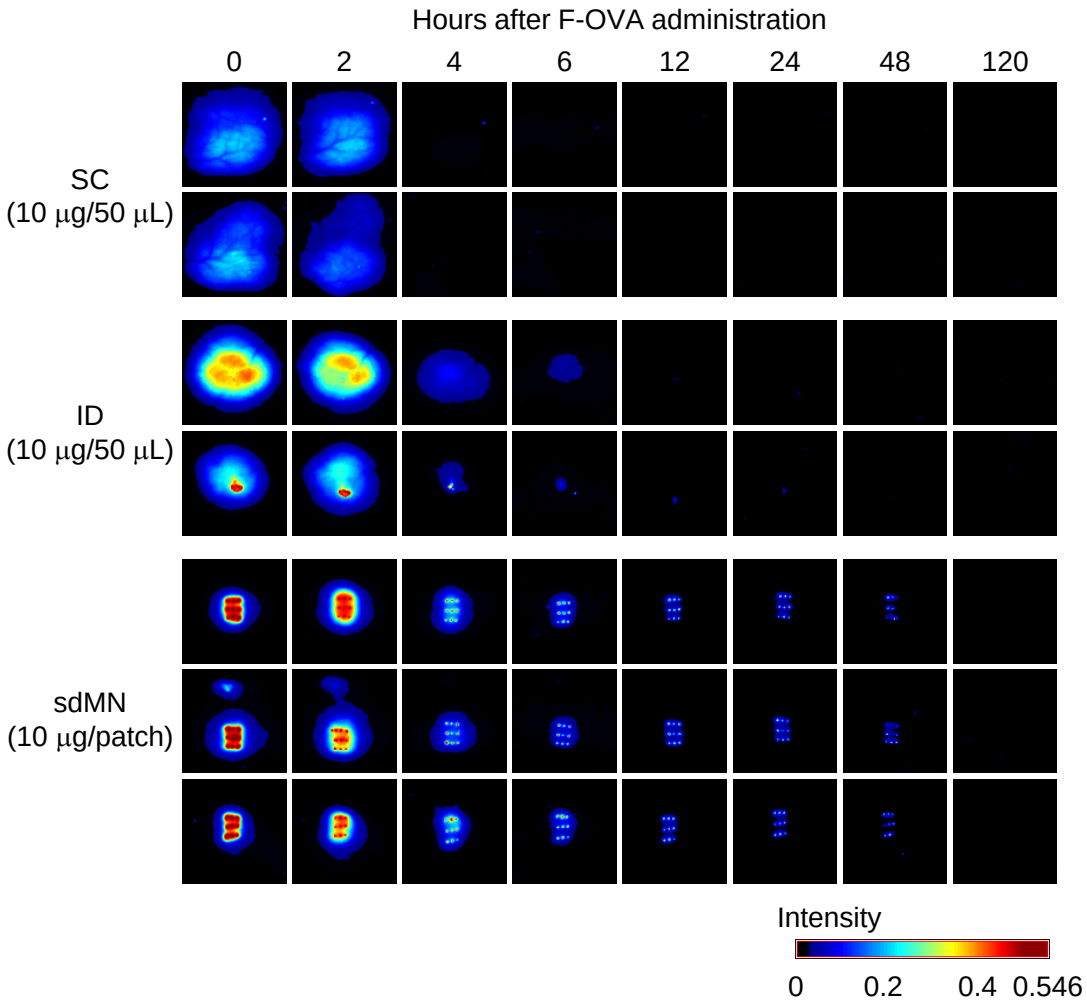
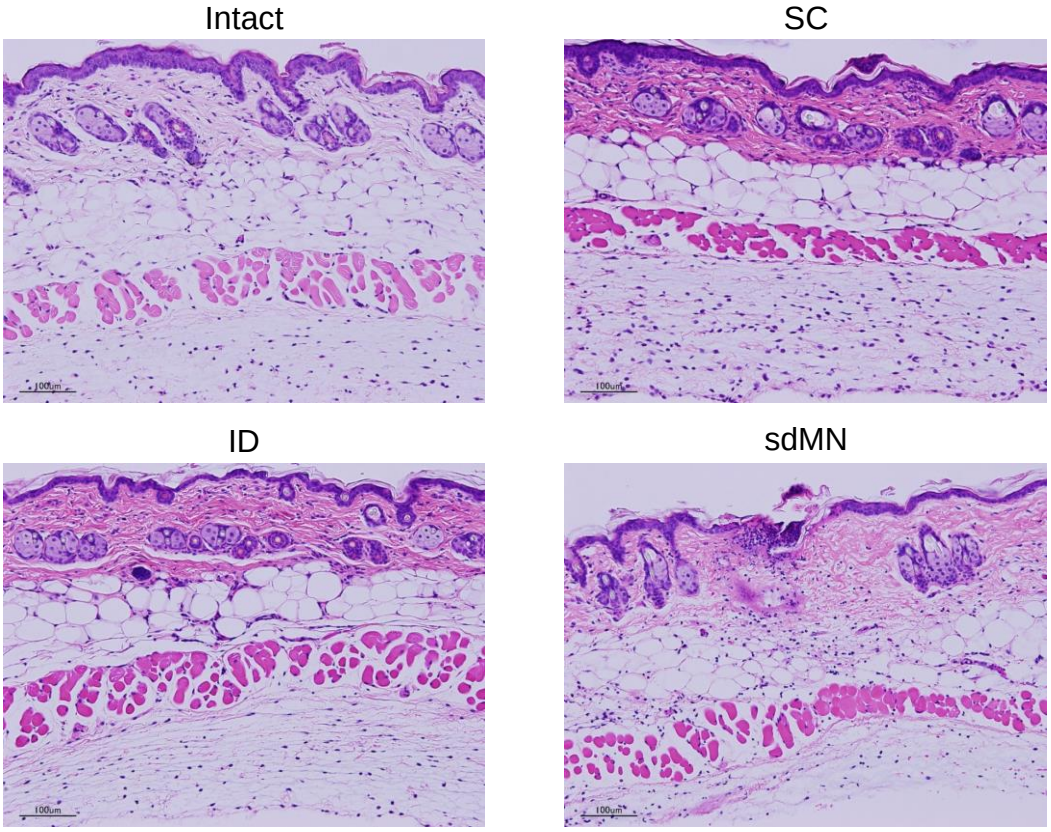

Hours after F-OVA administration
0
2
4
6
12
24
48
120
SC
(10 μg/50 μL)
ID
(10 μg/50 μL)
sdMN
(10 μg/patch)
Intensity
0
0.2
0.4
0.546

Fig. 3C

(C)



	Intact	SC	ID	sdMN
scabs	0	1	0	1
acanthosis	1	1	0	0
Inflammatory cell infiltration	0	0	1	2
lymphocyte and macrophage	-	-	+-	+-
neutrophils	-	-	-	+
eosinophils	-	-	-	-
mast cell	+-	+-	+-	+-

Grade 0: none 1:extremely mild 2:mild 3:moderate 4:severe

Cell number few - +- + ++ +++ many

Fig. 3. Localization of OVA and histological evaluation in the skin with the sdMN.
(A) C57BL/6 mice were immunized with F-OVA (green) at the dorsal skin by the sdMN (430 μm). After removal of the sdMN, skin samples were collected and frozen with liquid nitrogen. Frozen sections were photographed using the fluorescence microscope. The nucleus was counterstained using DAPI (blue). White dotted lines indicate the surfaces of stratum corneum, epidermis, and superficial dermis, respectively, from top to bottom. (B) F-OVA (10 μg) was administered by sdMN, ID or SC. Images were captured by the CRi Maestro EX system at the indicated time point after administration. The results are shown as fluorescence intensity. N=2-3 per group. (C) C57BL/6 mice were applied placebo-sdMN or injected PBS by SC or ID at dorsal skin. Skins were collected 24 hours after application and were assayed with HE-staining and photographed by bright microscope. Representative photomicrographs demonstrating with HE-staining in skin sections (Scale bar; 100 mm in inset). N=2 per group.

Fig. 4

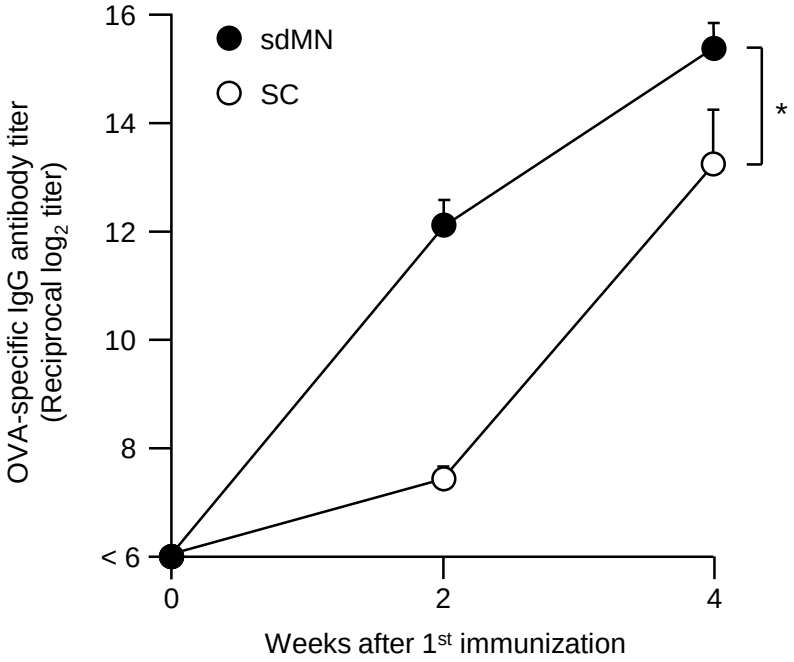


Fig. 4. Antibody production inducing ability by OVA-containing sdMN.
C57BL/6 mice were immunized using OVA-containing sdMN twice at 2 weeks interval (●). As a control, the same dose of OVA solution was injected subcutaneously on the same schedule (○). Serum collected from these mice were assayed to determine the each OVA-specific IgG titer by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of results from three mice. *p<0.05 versus SC by Student's t-test.

Fig. 5

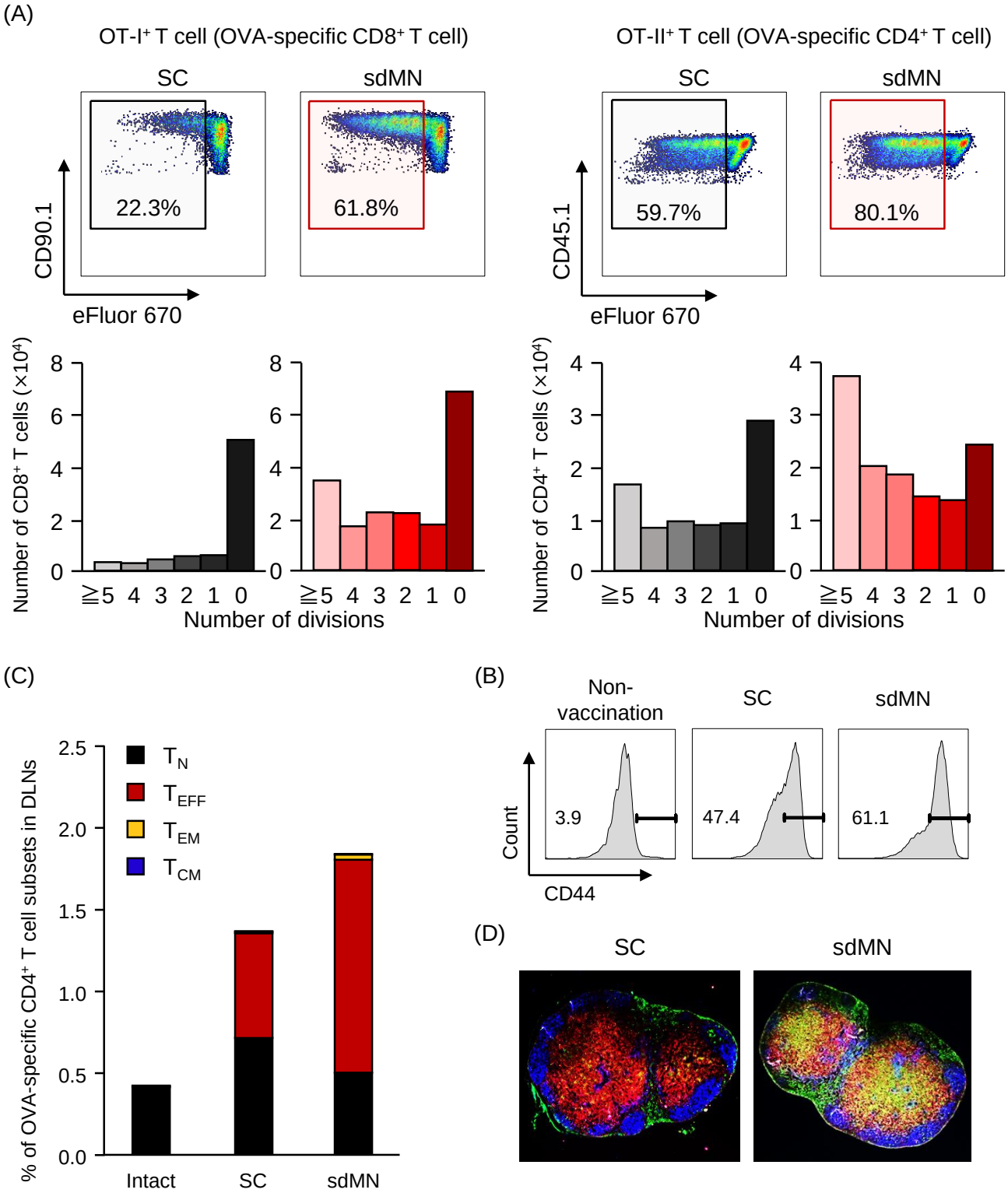
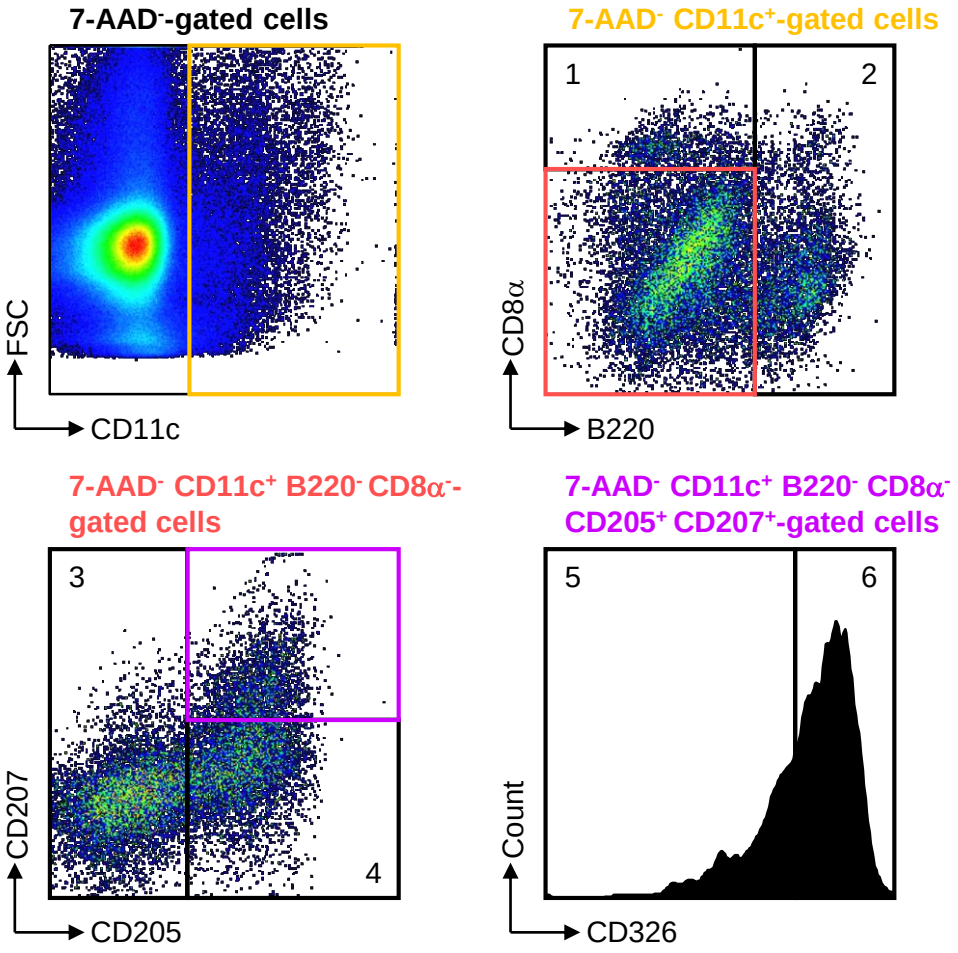


Fig. 5. Primary immune response in epicutaneous administration using the sdMN.
(A) WT mice (CD45.2, CD90.2) were intravenously transferred with eFluor 670-labelled OT-I (CD45.2, CD90.1) or OT-II cells (CD45.1, CD90.2). The next day, mice were epicutaneously immunized 20 μg OVA by sdMN or SC. Four days after immunization, the cell division of OT-I or OT-II cells in the DLNs was analyzed by FACS. (B) Activated OVA-specific CD4+ T cell in DLNs were analyzed using CD44 expression. (C) DLNs cells were stained for T_{EFF}, T_{EM}, or T_{CM} to investigate the differentiation state of OVA-specific CD4+ T cell. (D) WT mice were epicutaneously immunized 10 μg OVA by sdMN or SC. One week after immunization, DLNs were collected and GCs were stained by IgD (blue), T cell (red), and PNA (green).

Fig. 6A

(A)



Gated ID	DC subset
1	CD8α$^+$ DCs (CD11c$^+$ B220$^-$ CD8α$^+$)
2	pDCs (CD11c$^+$ B220$^+$)
3	Other CD11c$^+$ cells (CD11c$^+$ B220$^-$ CD8α$^-$ CD205$^-$)
4	CD207$^-$ dDCs (CD11c$^+$ B220$^-$ CD8α$^-$ CD205$^+$ CD207$^-$)
5	CD207$^+$ dDCs (CD11c$^+$ B220$^-$ CD8α$^-$ CD205$^+$ CD207$^+$ CD326$^-$)
6	LCs (CD11c$^+$ B220$^-$ CD8α$^-$ CD205$^+$ CD207$^+$ CD326$^+$)

Fig. 6B

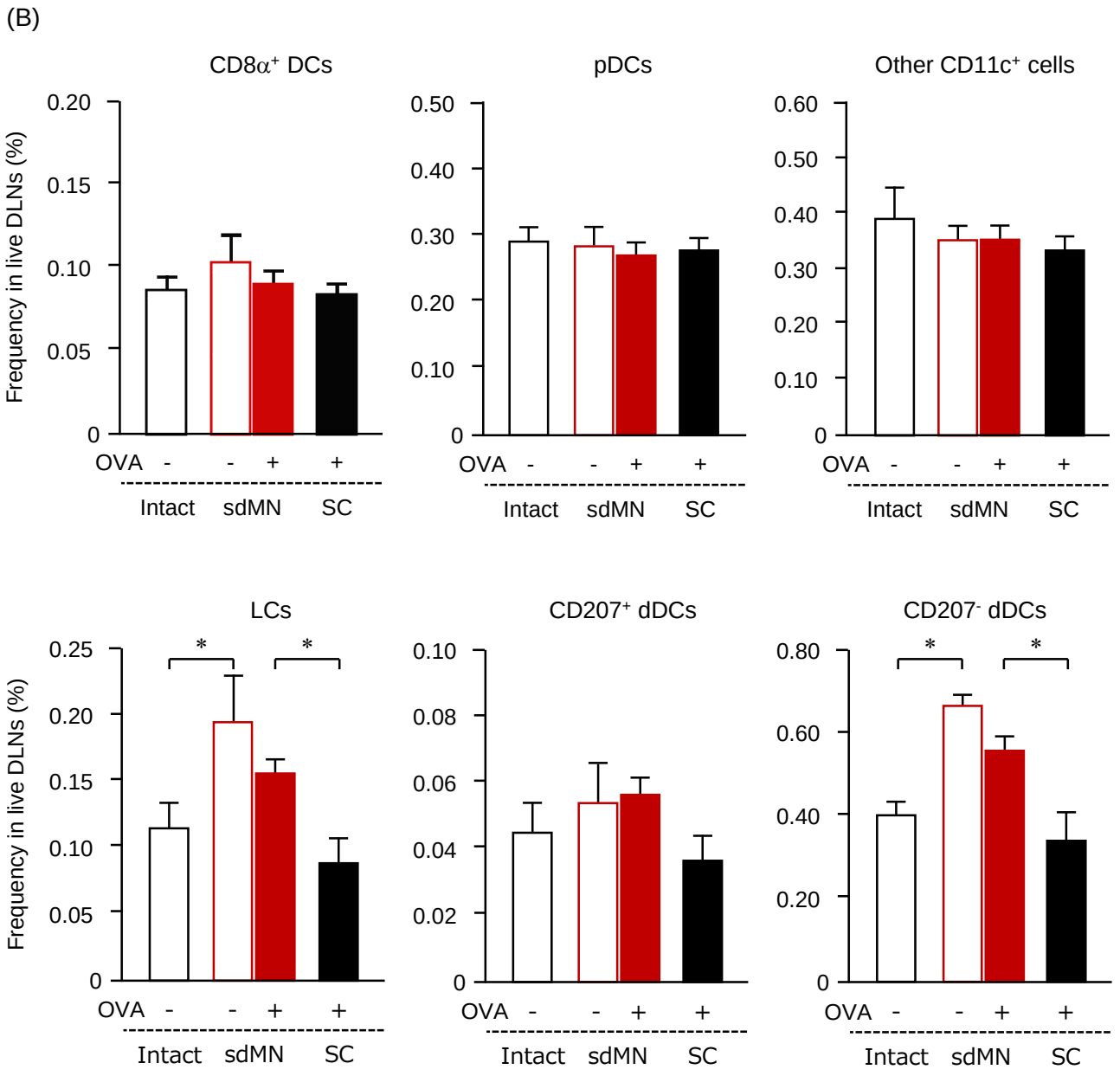

(B)
CD8α+ DCs
pDCs
Other CD11c+ cells
LCs
CD207+ dDCs
CD207- dDCs
Frequency in live DLNs (%)
OVA - - + +
Intact sdMN SC
*

Fig. 6C

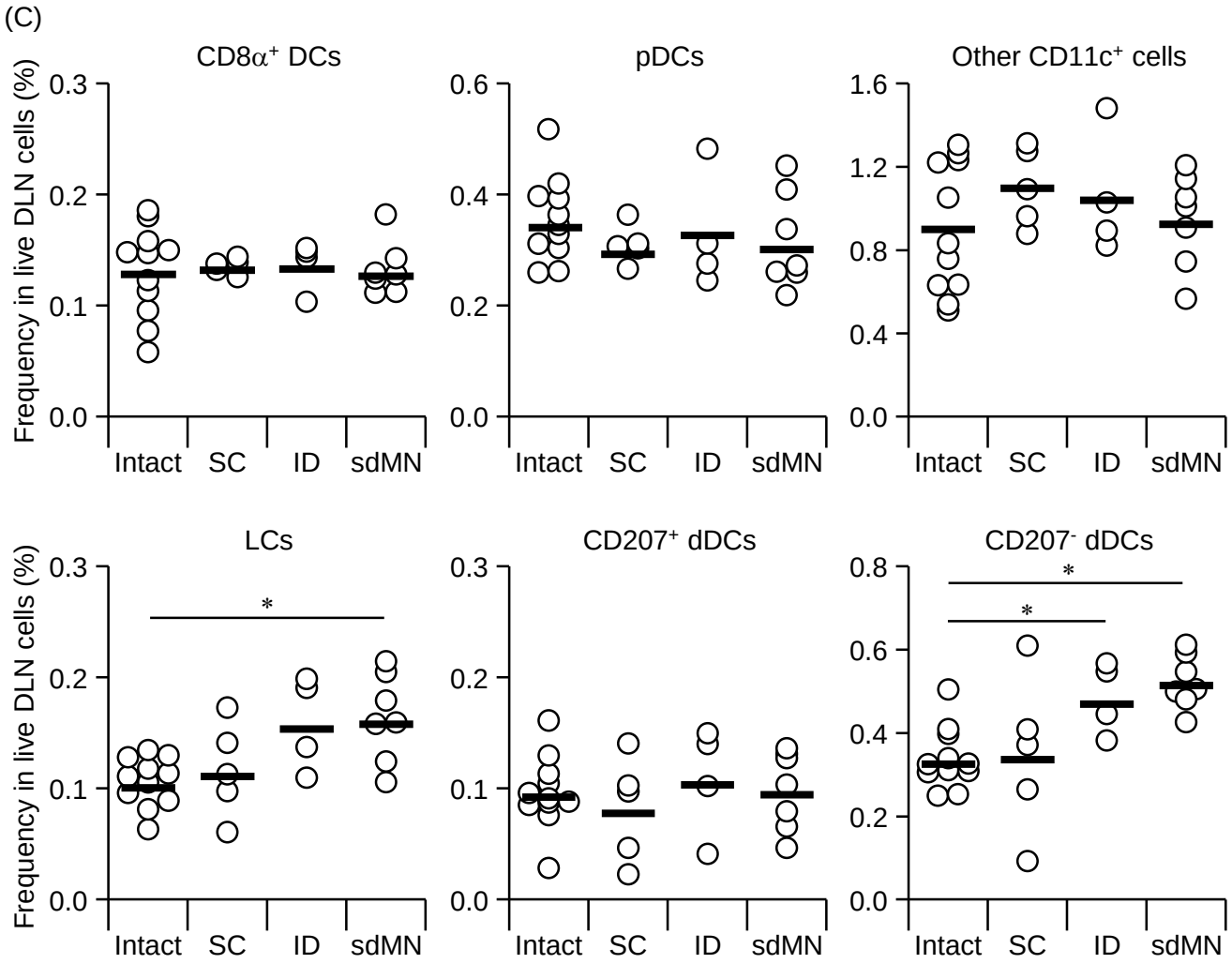


Fig. 6. Change in the existence ration of various DC subsets.
The collected DLNs were stained with the following antibodies to analyze the DC subpopulation.（A) $CD11c^+$ DC from 7-AAD^- cell (Live cell) were divided into $CD8\alpha^+$ DC ($CD11c^+$ $B220^-$ $CD8\alpha^+$; subset 1), plasmacytoid DC (pDCs; $CD11c^+$ $B220^+$; subset 2), Other $CD11c^+$ cell ($CD11c^+$ $B220^-$ $CD8\alpha^-$ $CD205^-$; subset 3), $CD207^-$ dDC ($CD11c^+$ $B220^-$ $CD8\alpha^-$ $CD205^+$ $CD207^-$; subset 4), $CD207^+$ dermal DC (dDCs; $CD11c^+$ $B220^-$ $CD8\alpha^-$ $CD205^+$ $CD207^+$ $CD326^-$; subset 5), and Langerhans cell (LCs; $CD11c^+$ $B220^-$ $CD8\alpha^-$ $CD205^+$ $CD207^+$ $CD326^+$; subset 6). (B) BALB/c mice were applied OVA-containing sdMN or placebo-sdMN. DLNs were collected 24 hours after immunization and analyze for the presence of the each DC. Data are expressed as mean ± SEM of results from 4-7 mice. (C) Frequency of the each DC subset in DLNs of BALB/c receiving immunization. Data are expressed as mean ± SEM of results from 4-7 mice. *; $p<0.05$ versus Non by Dunnett's test

Fig. 7

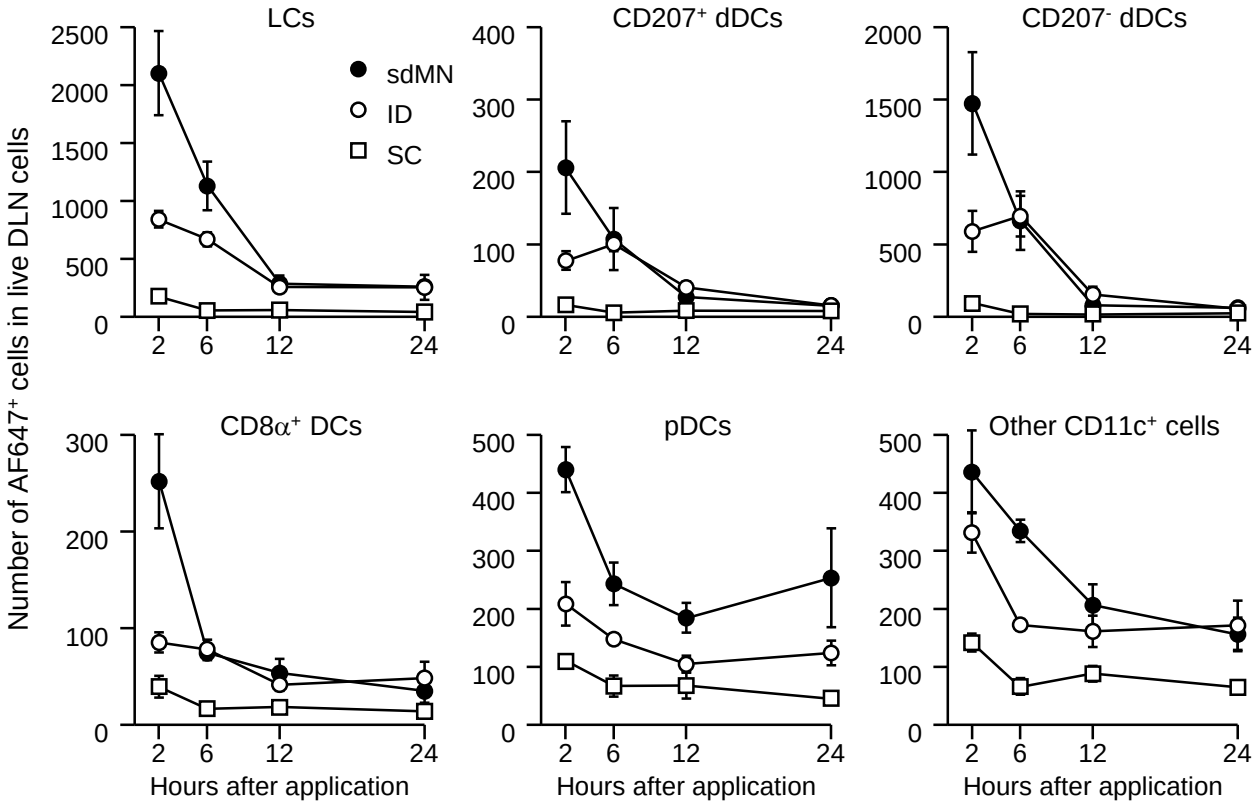


Fig. 7. Change in the existence ration of various DCs subsets that captured antigen.
BALB/c mice were administered with 10 μg AF647-OVA by MN, SC or ID. DLNs were collected at the indicated time and the number of AF647-OVA positive cells were analyzed. Data are expressed as mean ± SEM of results from 3 mice. *; $p<0.05$ versus Non by Dunnett's test.

Fig. 8

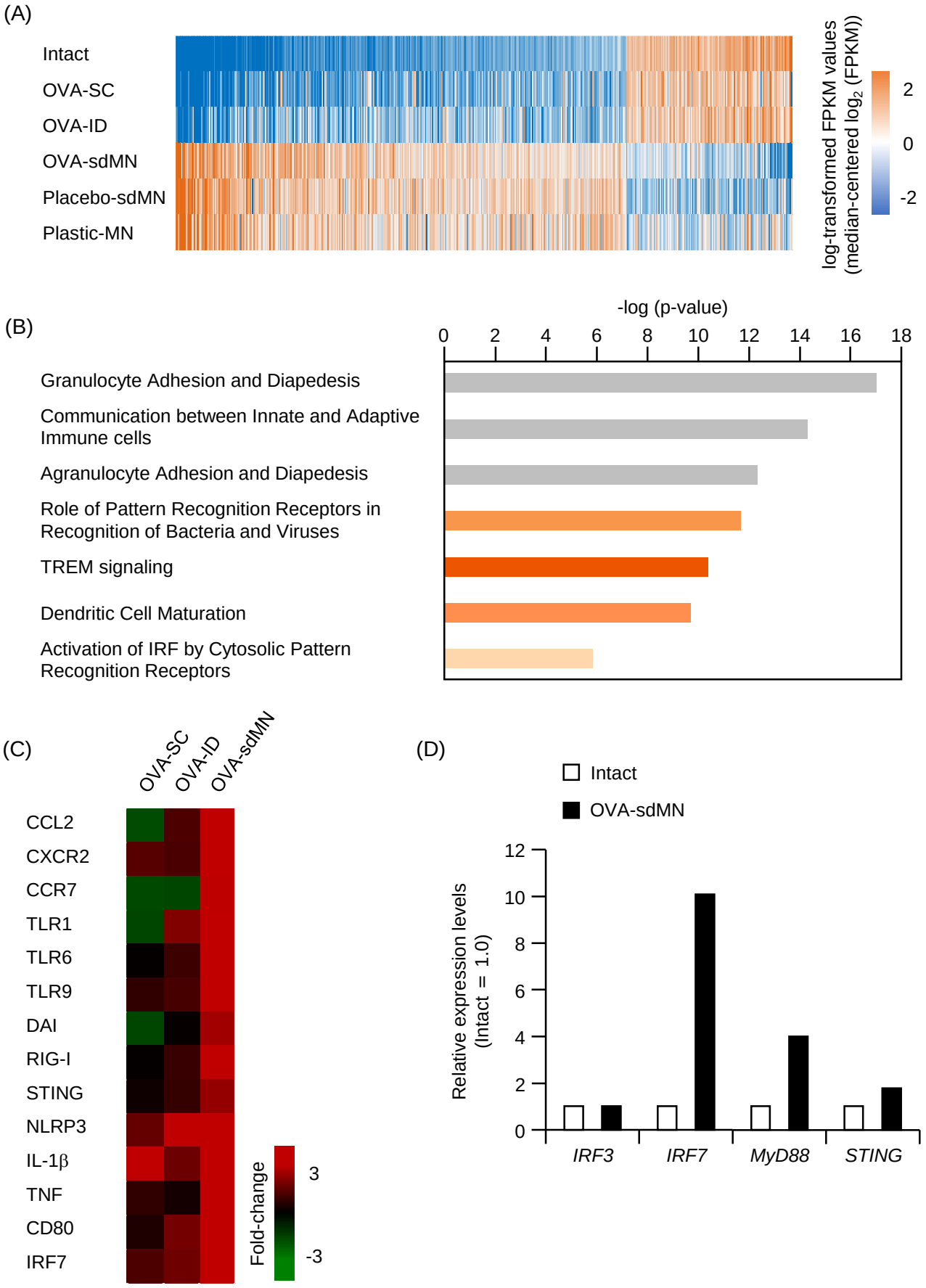

(A)
Intact
OVA-SC
OVA-ID
OVA-sdMN
Placebo-sdMN
Plastic-MN
log-transformed FPKM values
(median-centered log2 (FPKM))
2
0
-2
(B)
-log (p-value)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Granulocyte Adhesion and Diapedesis
Communication between Innate and Adaptive Immune cells
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses
TREM signaling
Dendritic Cell Maturation
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors
(C)
OVA-SC
OVA-ID
OVA-sdMN
CCL2
CXCR2
CCR7
TLR1
TLR6
TLR9
DAI
RIG-I
STING
NLRP3
IL-1β
TNF
CD80
IRF7
Fold-change
3
-3
(D)
Intact
OVA-sdMN
Relative expression levels
(Intact = 1.0)
12
10
8
6
4
2
0
IRF3
IRF7
MyD88
STING

Fig. 8. Gene expression at OVA-sdMN application site.
C57BL/6 mice were administrated OVA-sdMN (10 μg), placebo-sdMN, or plastic-MN epicutaneously. For comparison, OVA solution (10 μg) was administrated subcutaneously or intradermally. Each skin 24 hours after administration was collected and conducted to RNA-sequence analysis. (A) Genes were normalized for those with an FPKM value of 0.1 or more, and genes whose expression was more than doubled or 1/2 or less were represented by a heat map. (B) Signal analysis was performed using the genes obtained in the OVA-sdMN group. (C) In the signal analysis, genes whose expression fluctuations were particularly remarkable were selected, and the expression level was compared with Intact group. (D) RNA was extracted from the skin 24 hours after OVA-sdMN application, and complementary DNA synthesis was performed. RT-qPCR was performed using the TaqMan probe, focusing on genes that were particularly highly expressed by RNA-sequence.

Fig. 9

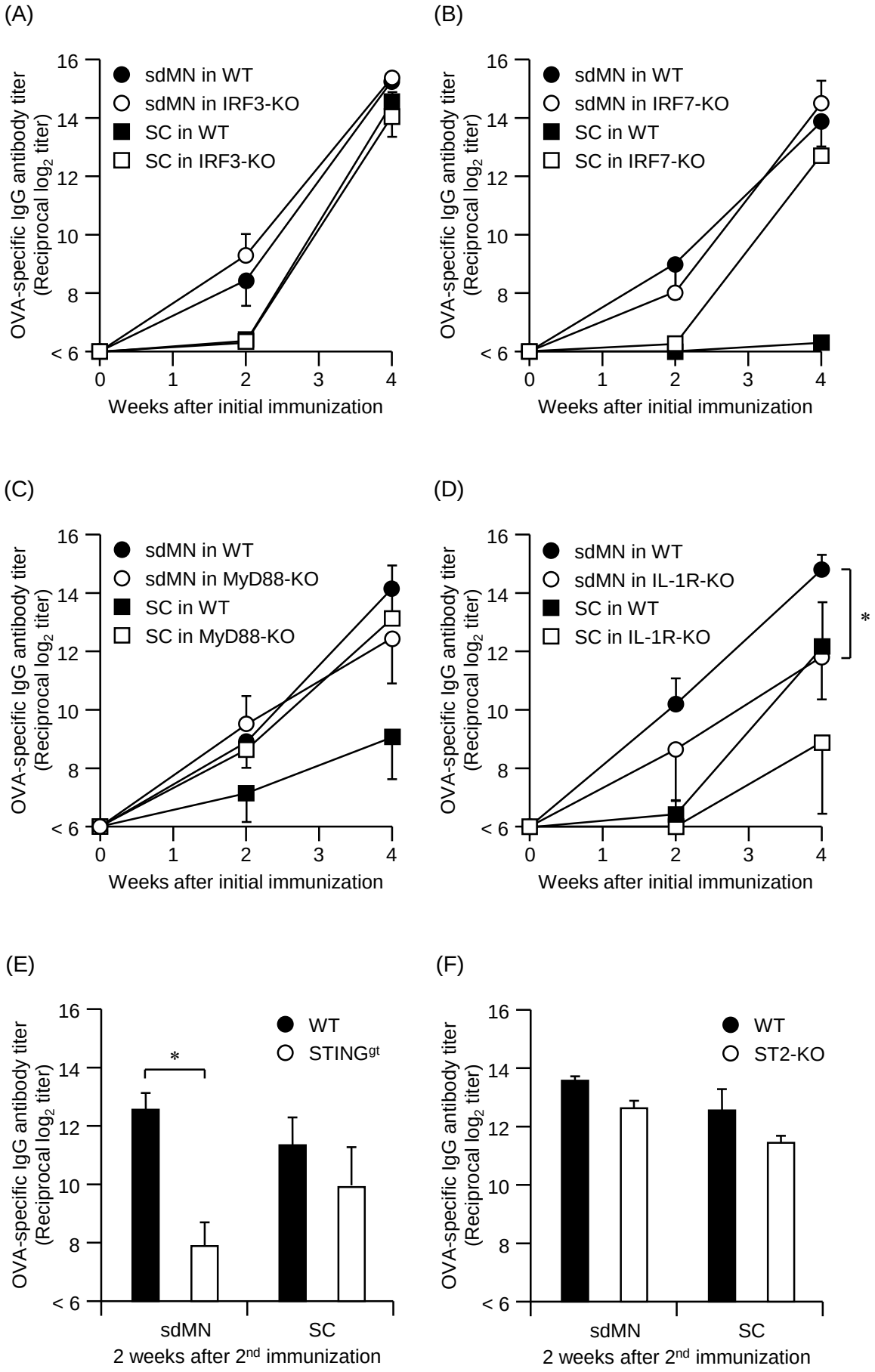

(A)
sdMN in WT
sdMN in IRF3-KO
SC in WT
SC in IRF3-KO
OVA-specific IgG antibody titer (Reciprocal log2 titer)
Weeks after initial immunization
(B)
sdMN in WT
sdMN in IRF7-KO
SC in WT
SC in IRF7-KO
OVA-specific IgG antibody titer (Reciprocal log2 titer)
Weeks after initial immunization
(C)
sdMN in WT
sdMN in MyD88-KO
SC in WT
SC in MyD88-KO
OVA-specific IgG antibody titer (Reciprocal log2 titer)
Weeks after initial immunization
(D)
sdMN in WT
sdMN in IL-1R-KO
SC in WT
SC in IL-1R-KO
*
OVA-specific IgG antibody titer (Reciprocal log2 titer)
Weeks after initial immunization
(E)
WT
STINGgt
*
OVA-specific IgG antibody titer (Reciprocal log2 titer)
sdMN
SC
2 weeks after 2nd immunization
(F)
WT
ST2-KO
OVA-specific IgG antibody titer (Reciprocal log2 titer)
sdMN
SC
2 weeks after 2nd immunization

Fig. 9

(G)

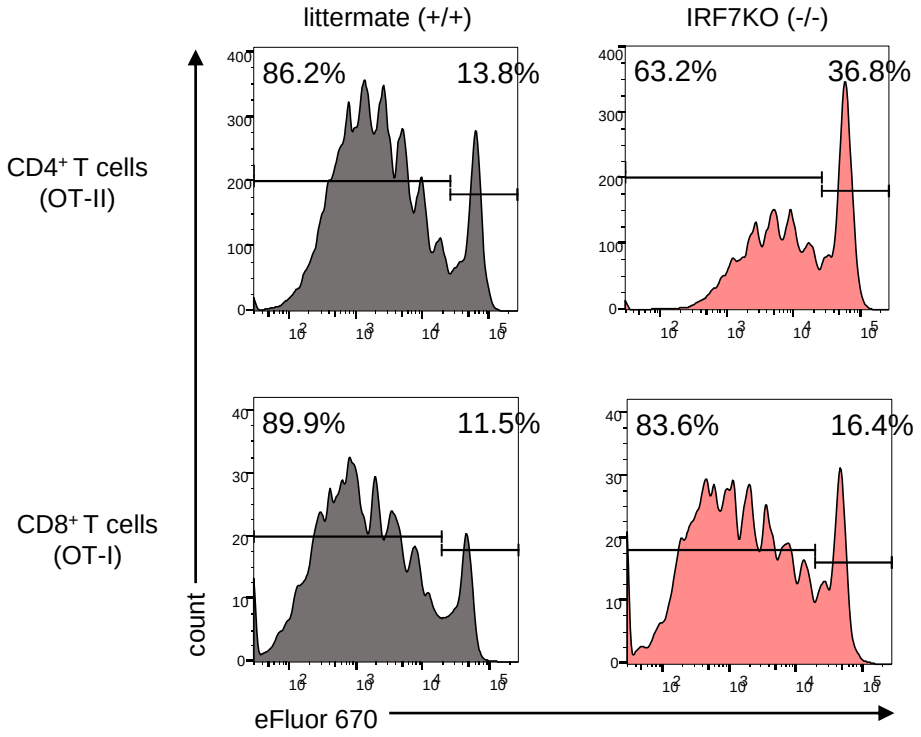


Fig. 9. Identification of factors contributing to sdMN immune induction

(A-F) WT (C57BL/6 or BALB/c) or each transgenic mice were immunized using OVA-containing sdMN twice at 2 weeks interval (●, ○). The same dose of OVA solution was injected subcutaneously on the same schedule (■, □). Serum collected from these mice were assayed to determine the each OVA-specific IgG titer by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of results from three mice. *p<0.05 versus SC by Student's t-test. (G) IRF7-KO mice or littermate (CD45.2, CD90.2) were intravenously transferred with eFluor 670-labelled OT-I (CD45.2, CD90.1) or OT-II cells (CD45.1, CD90.2). The next day, mice were epicutaneously immunized 20 μg OVA by sdMN or SC. Four days after immunization, the cell division of OT-I or OT-II cells in the DLNs was analyzed by FACS.

Table 1

Table 1 Types and properties of TLR ligands using transcutaneous administration.

TLR ligand	Property	MW	Dose	Target TLR
Pam3CSK4	synthetic triacylated lipopeptide	1500 Da	20 μg	TLR1/2
LTA-SA	immunostimulatory component of Gram-positive bacteria	4000 – 8000 Da	100 μg	TLR2
Poly I:C	double stranded RNA	1500 – 8000 Da	50 μg	TLR3
Imiquimod	4-amino-1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo [4,5-c] quinoline	240 Da	100 μg	TLR7
K3	CpG-ODN	6300 Da	20 μg	TLR9

Fig. 10

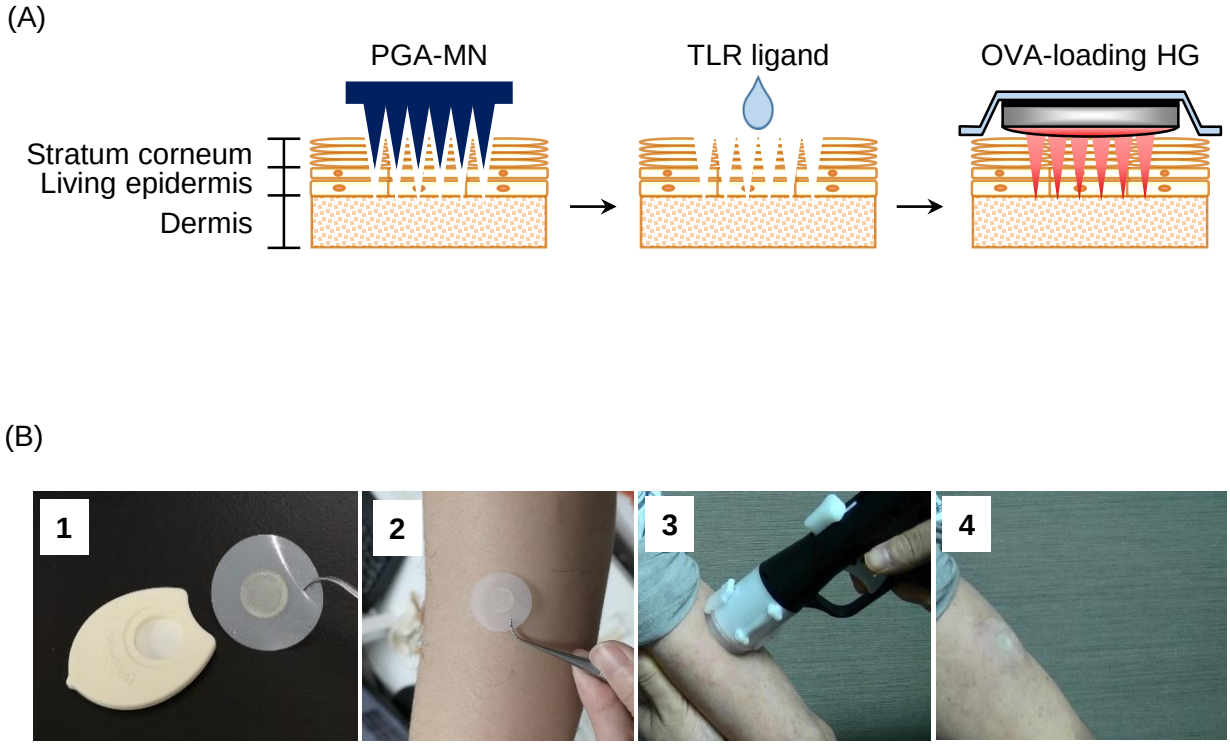


Fig. 10. Methods for epicutaneous immunization using poke-and-patch.
Puncture holes were made on the hairless back skin of mice using biodegradable polyglycolic acid-microneedle (PGA-MN). A 5 μL volume of toll-like receptor (TLR) ligand and OVA-loaded hydrophilic gel patch (HG) were applied to the holes (A). In human subjects, (1) K3-loading self-dissolving microneedle (sdMN) and placebo-sdMN were fixed to the plastic case that (2) was placed on the skin of the lateral upper arm, and (3) applied with a handheld spring-type applicator that was (4) attached for an hour (B).

Table 2

Table 2 The clinical protocol for assessing the safety of the K3-loading sdMN.

Day	0	1	2~7	8~20	21	22	23~28	29~41	42
Vaccination	●				●				
Medical examination	●	●			●	●			●
Vital sign measurement	●	●			●	●			●
Blood count and biochemistry	●	●			●	●			●
Urinalysis	●	●			●	●			●
Cytokine production	●	●			●	●			●
Diary by subjects	●	●	●	▲	●	●	●	▲	▲
Confirmation of adverse events by phone			●				●		

● Required

▲ When an adverse event occurs

Fig. 11

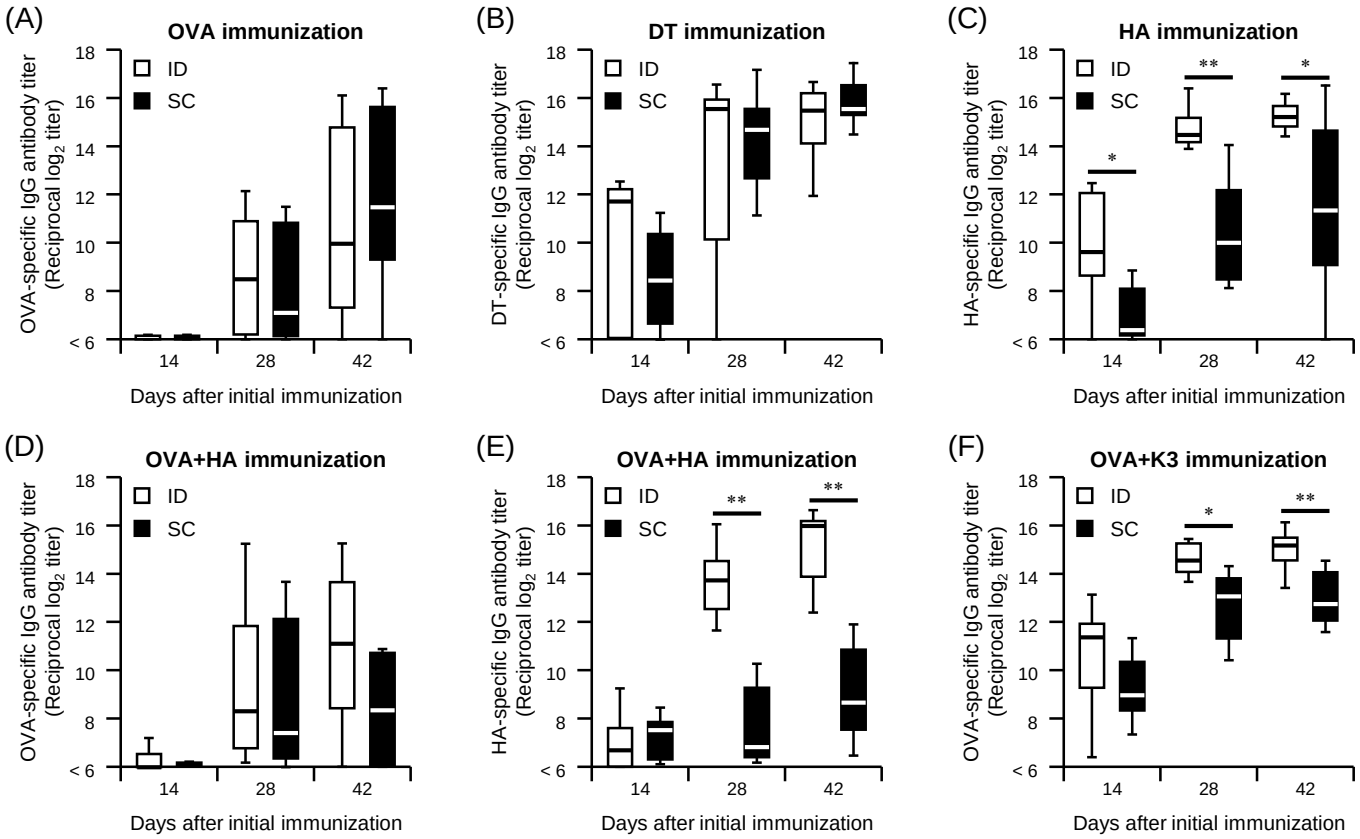


Fig. 11. Difference in effect of antigen-specific immune responses administrated by ID or SC.
Mice were intradermally or subcutaneously immunized with (A) OVA, (B) HA, (C) DT, (D, E) OVA plus HA and (F) OVA plus K3. The immunization was conducted three times at two week intervals. Sera collected after immunization were assayed to determine the antigen-specific IgG titer by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of results from three mice. (student's t-test, *P<0.05, **P<0.01)

Fig. 12

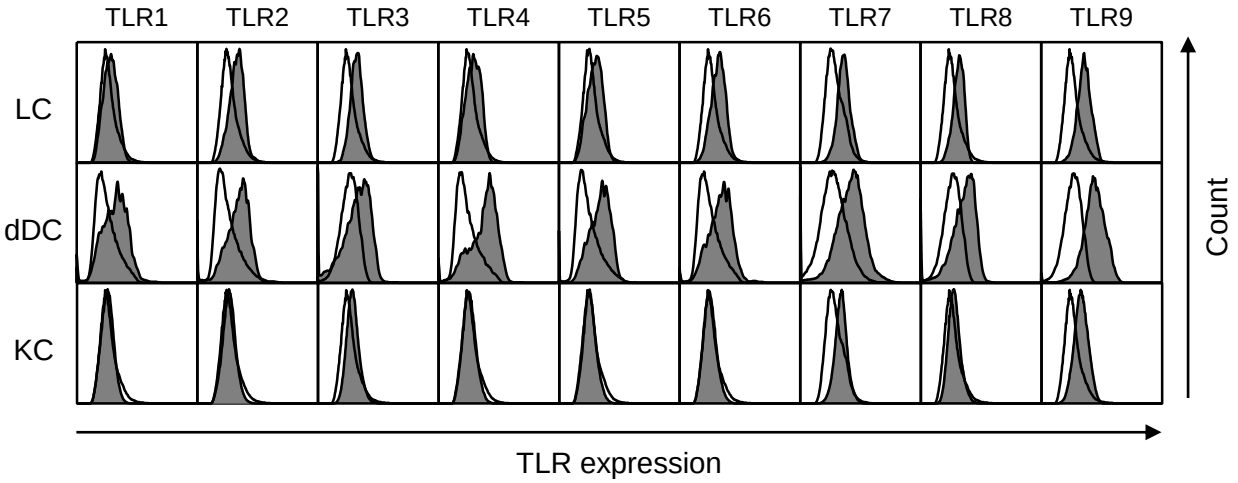
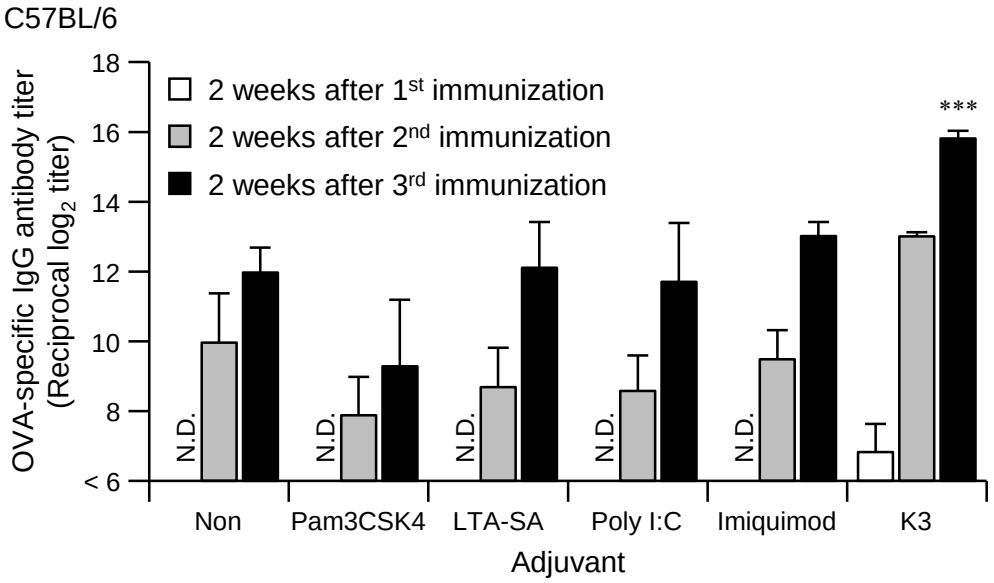


Fig. 12. Expression analysis of TLRs in skin cells.
Epidermal cells and dermal cells suspensions were analyzed for the expression of TLRs by FACS. For detection of intracellular TLRs, cell fixation-permeabilization were performed before staining with TLRs. Open histogram represents isotype control group, and filled histogram represents staining group.

Fig. 13A

(A)


C57BL/6
OVA-specific IgG antibody titer
(Reciprocal log2 titer)
18
16
14
12
10
8
< 6
2 weeks after 1st immunization
2 weeks after 2nd immunization
2 weeks after 3rd immunization
N.D.
***
Non
Pam3CSK4
LTA-SA
Poly I:C
Imiquimod
K3
Adjuvant

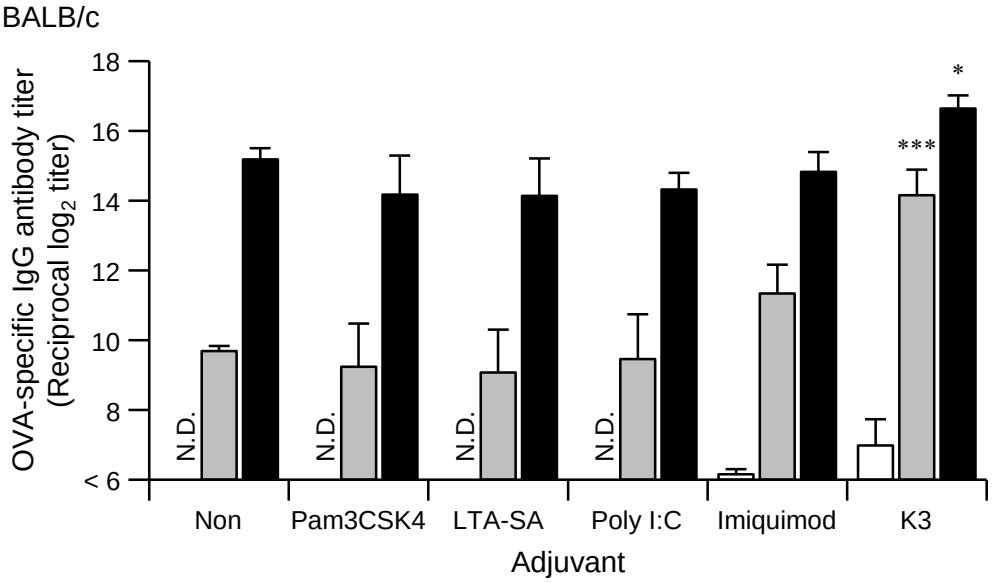
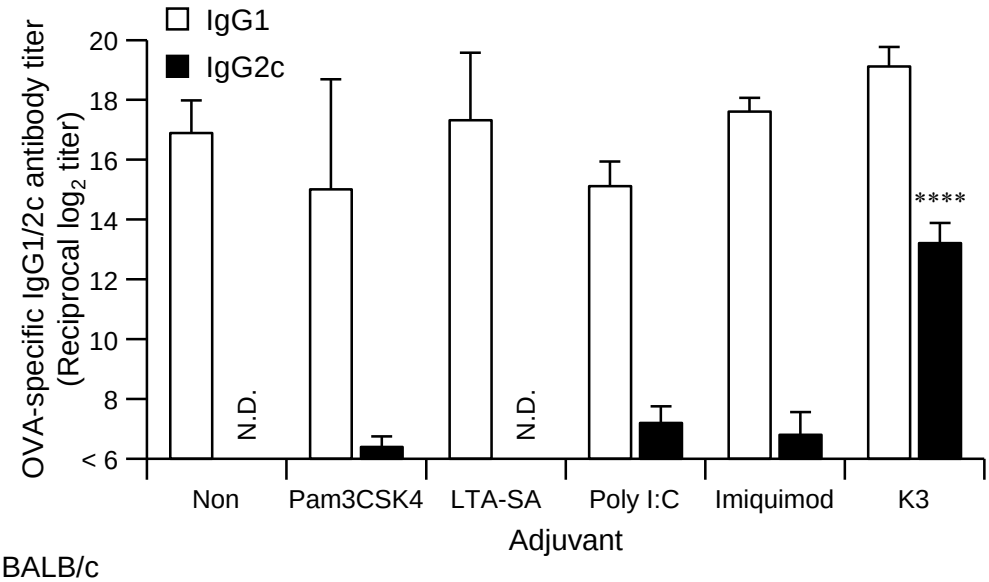

BALB/c
OVA-specific IgG antibody titer
(Reciprocal log2 titer)
18
16
14
12
10
8
< 6
N.D.
***
*
Non
Pam3CSK4
LTA-SA
Poly I:C
Imiquimod
K3
Adjuvant

Fig. 13B

(B)

C57BL/6



BALB/c

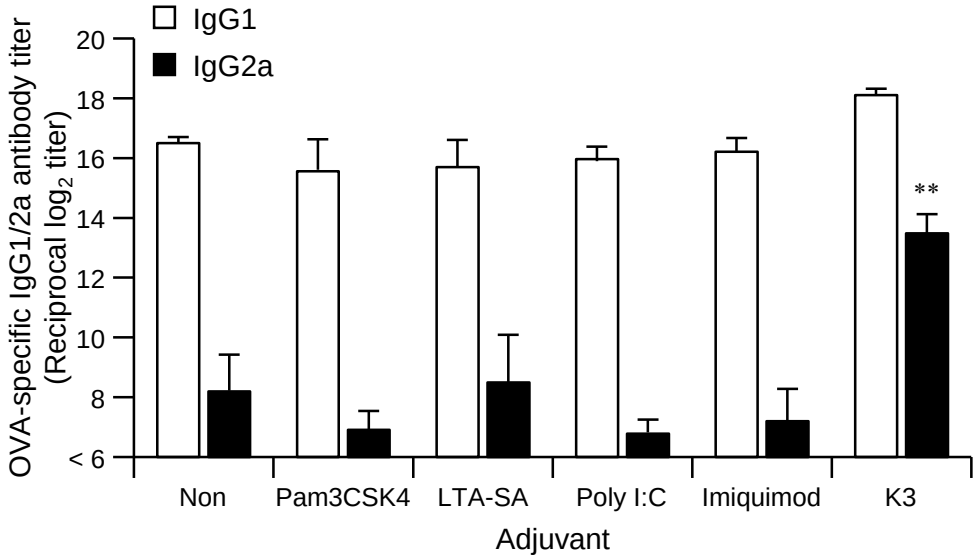
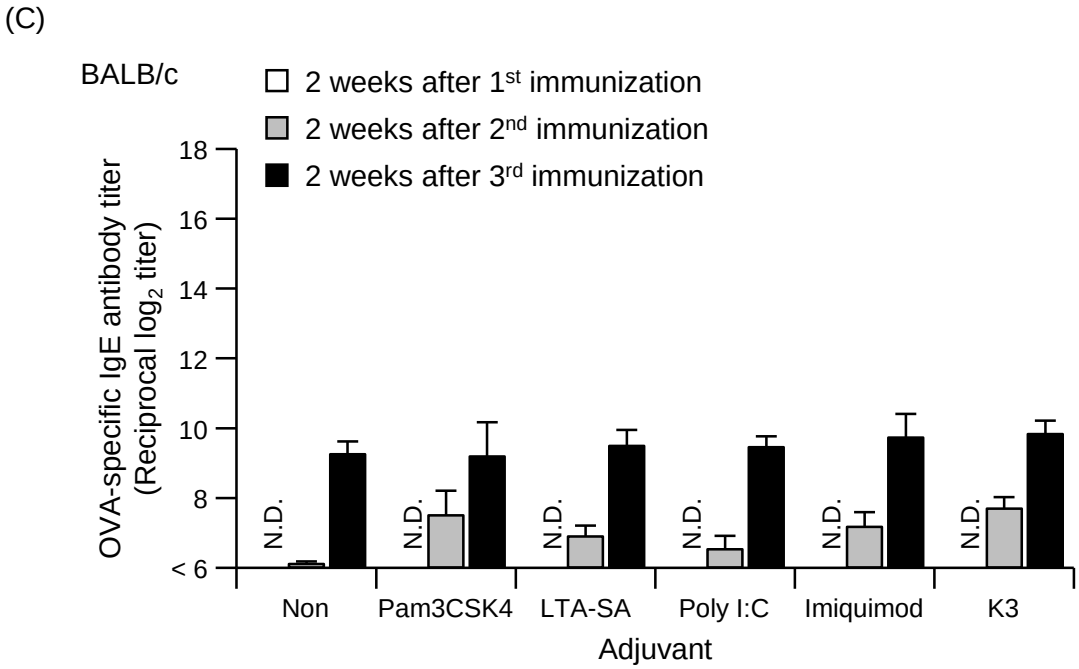


Fig. 13C, D



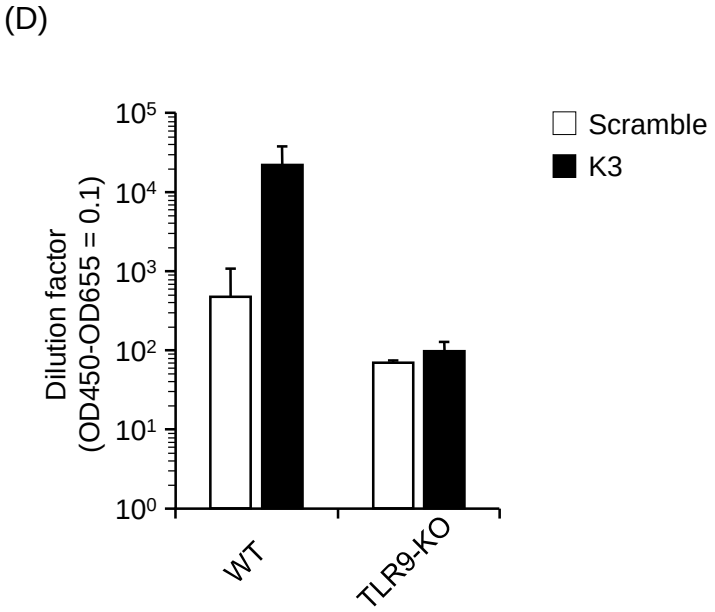


Fig. 13. OVA-specific antibody response using poke-and-patch method with OVA plus TLR ligands. C57BL/6 mice and BALB/c mice were immunized using poke and patch method three times at two week intervals with OVA in combination with each TLR ligands. Sera collected after immunization were assayed to determine the (A) antigen-specific IgG titer, (B) IgG subclass titer, and (C) IgE titer by ELISA. (D) WT mice or TLR9-KO mice were epicutaneously immunized with K3 or Scramble using the poke-and-patch method. Immunization was performed three times at two week intervals. After 2 weeks of final immunization, OVA-specific IgG antibody titers were measured by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of result from 3-5 mice. (student's t-test, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$, $****p<0.001$)

Fig. 14A-C

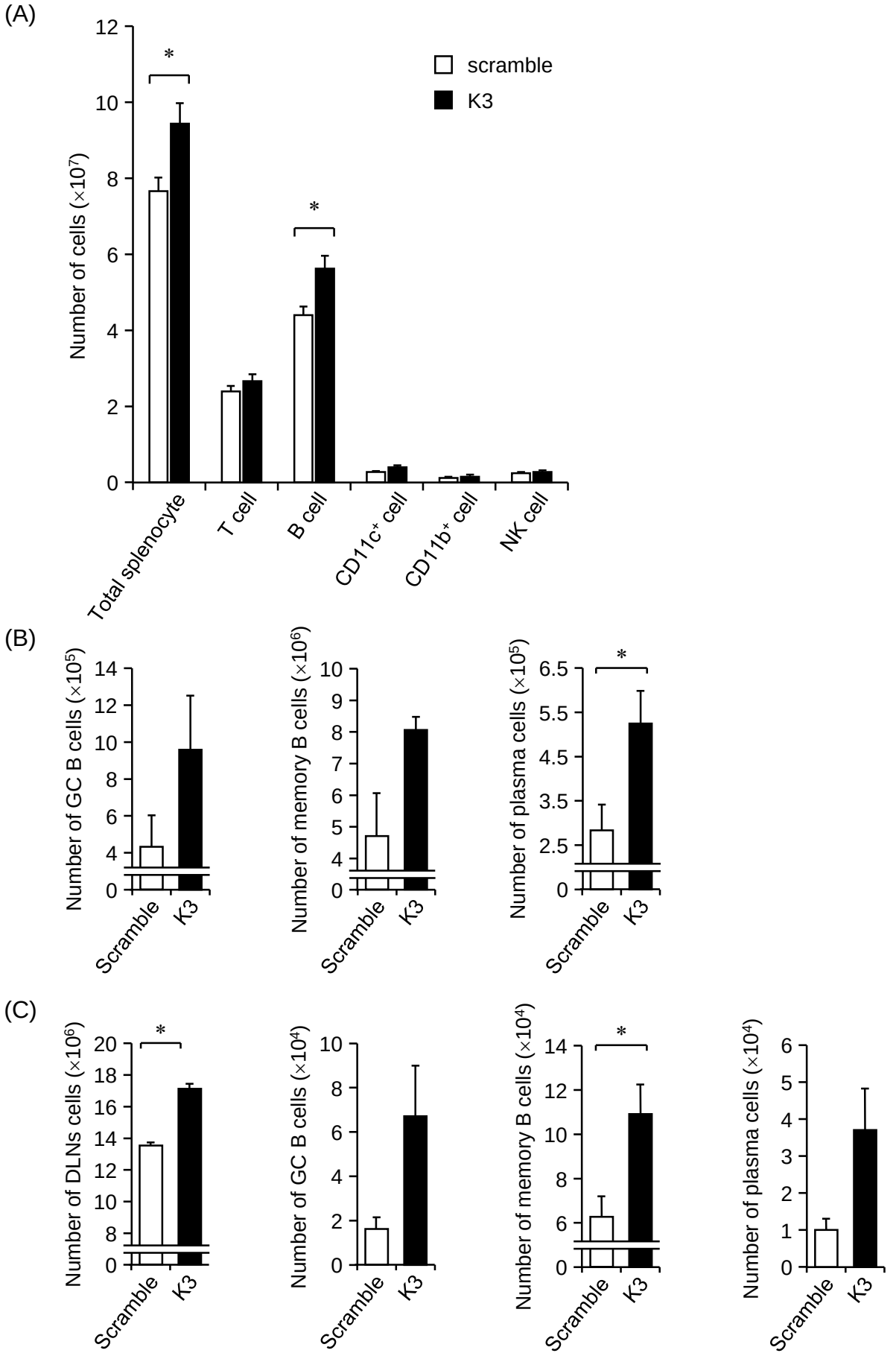

(A)
scramble
K3
Number of cells (×10^7)
Total splenocyte
T cell
B cell
CD11c+ cell
CD11b+ cell
NK cell
(B)
Number of GC B cells (×10^5)
Number of memory B cells (×10^6)
Number of plasma cells (×10^5)
Scramble
K3
(C)
Number of DLNs cells (×10^6)
Number of GC B cells (×10^4)
Number of memory B cells (×10^4)
Number of plasma cells (×10^4)
Scramble
K3

Fig. 14D-G

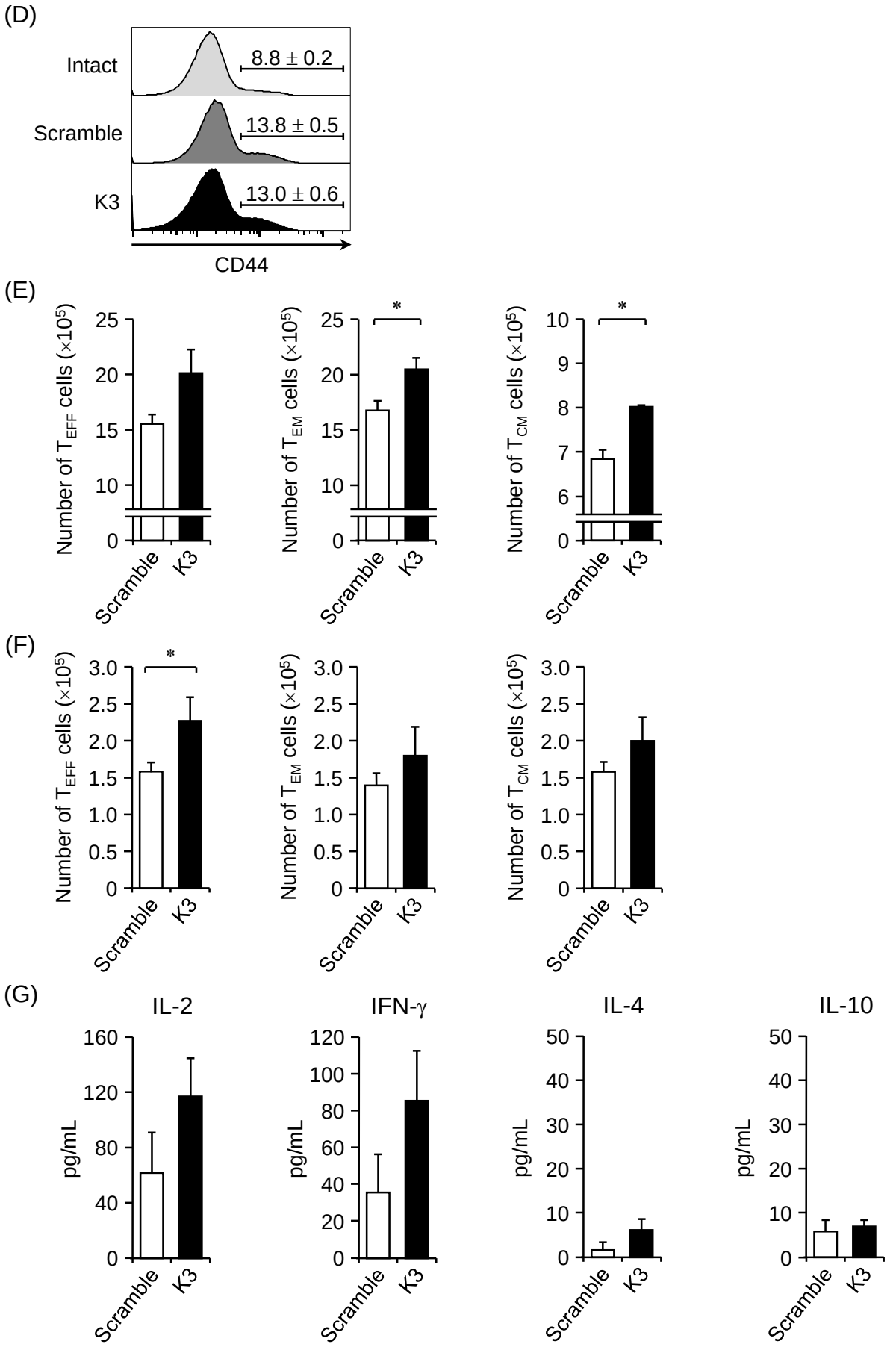

(D)
Intact
Scramble
K3
8.8 ± 0.2
13.8 ± 0.5
13.0 ± 0.6
CD44
(E)
Number of T_{EFF} cells (×10^5)
Number of T_{EM} cells (×10^5)
Number of T_{CM} cells (×10^5)
Scramble
K3
*
(F)
Number of T_{EFF} cells (×10^5)
Number of T_{EM} cells (×10^5)
Number of T_{CM} cells (×10^5)
Scramble
K3
*
(G)
IL-2
IFN-γ
IL-4
IL-10
pg/mL
Scramble
K3

Fig. 14. Activation and differentiation of T cells and B cells in combination with K3.
C57BL/6 mice were epicutaneously immunized with K3 or Scramble using the poke-and-patch method. The immunization was performed three times at two weeks intervals., and (A) the splenocyte were stained with the linage markers. (B) The splenocyte and (C) DLNs cells were stained for GC B cells, memory B cells and plasma cell. (D) Activated T cells in the spleen were analyzed using CD44 expression. (E) The splenocyte and (F) DLNs cells were stained for T_{EFF}, T_{EM}, or T_{CM}. (G) The splenocyte were prepared and cultured with 1 mg OVA for 48 hours. The culture supernatant were collected and cytokine production were evaluated by Bioplex. Data are expressed as mean ±SEM of results from three mice.

Fig. 15

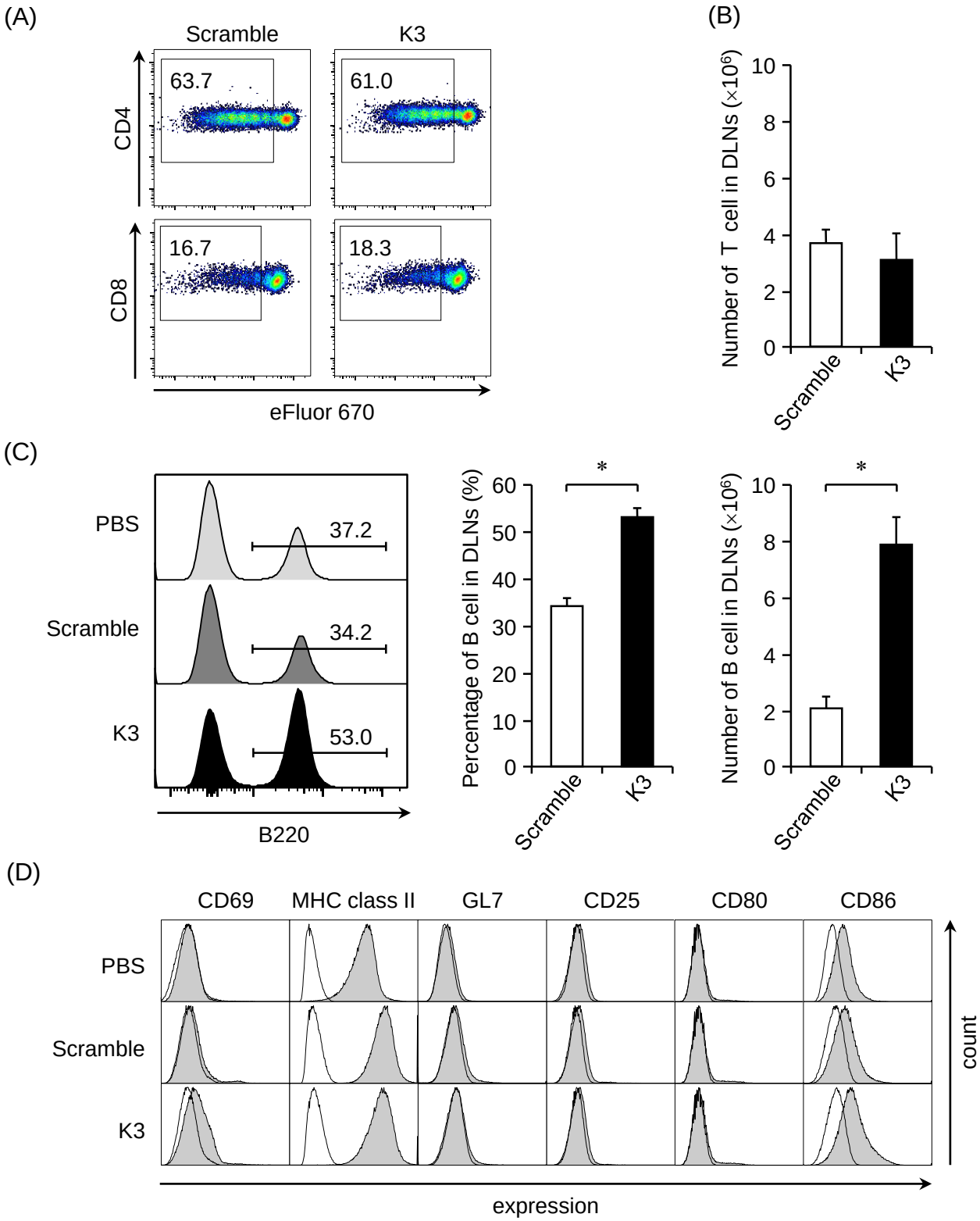


Fig. 15. Characteristic of K3 for transcutaneous vaccine formation in the primary immune response. (A) WT mice (CD45.2, CD90.2) were intravenously transferred with eFluor 670-labelled OT-I (CD45.2, CD90.1) or OT-II cells (CD45.1, CD90.2). The next day, mice were epicutaneously immunized with K3 or Scramble using the poke-and-patch method. Four days after immunization, the cell division of OT-I or OT-II cells in the DLNs was analyzed by FACS. (B) C57BL/6 mice were immunized in the same manner as above. One week after immunization, numerical changes of (B) T cells and (C) B cells in DLNs were analyzed by FACS. (D) The activation state of B cells was investigated with surface markers.

Fig. 16

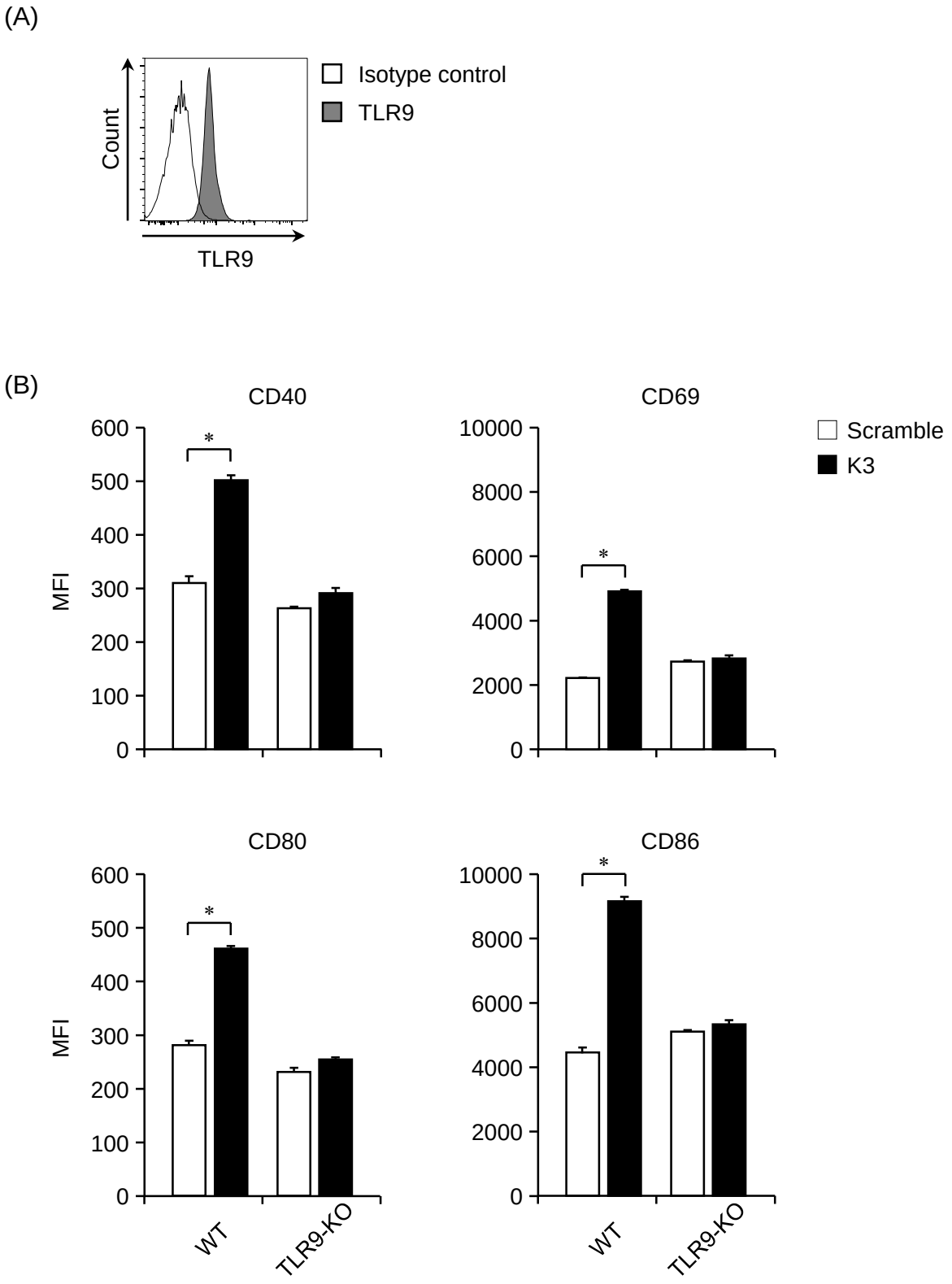


Fig. 16. The mechanism of K3 epicutaneous administrated.
(A) B cells were analyzed for the expression of TLR9 by FACS. For the detection of intracellular TLRs, cell fixation-permeabilization was performed before staining with antibodies. (B) B cells were isolated from WT mice or TLR9-KO mice, and cultured for 6 hours in the presence of K3 or Scramble. The activated state of the B cells was analyzed with a surface marker.

Fig. 17

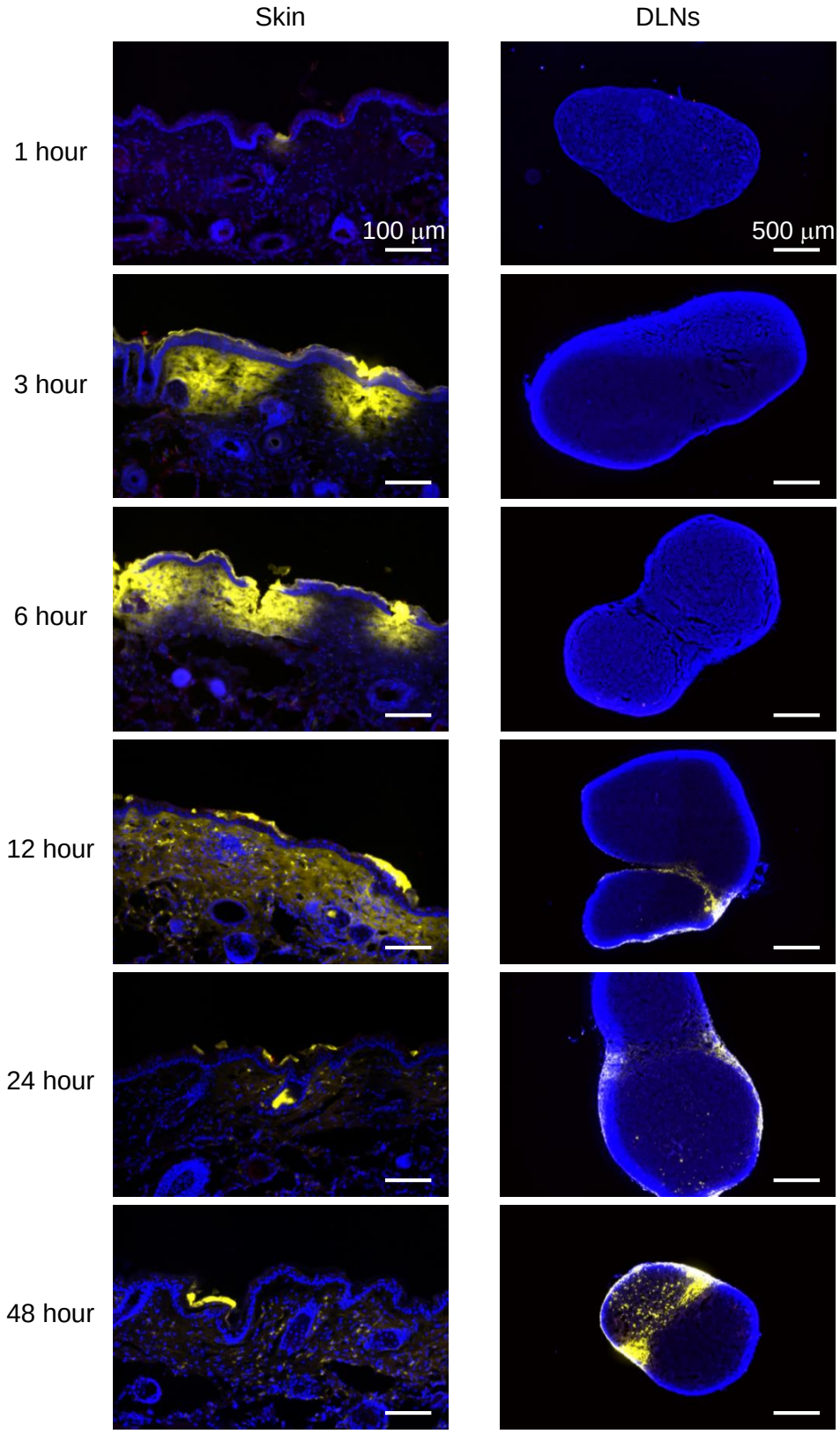


Fig. 17. Localization of AF647-K3 in the skin and DLNs.
HR-1 mice were formed puncture holes at the hair-removed back skin using PGA-MN. 20 μg/5 μL of AF647-labeled K3 was dropped, and OVA 10 μg-loading HG was attached. The HG-attached skin and DLNs were collected and frozen with liquid nitrogen. Frozen sections were stained and observed OVA (red), K3 (yellow) and nucleus (blue) by fluorescence microscope.

Fig. 18

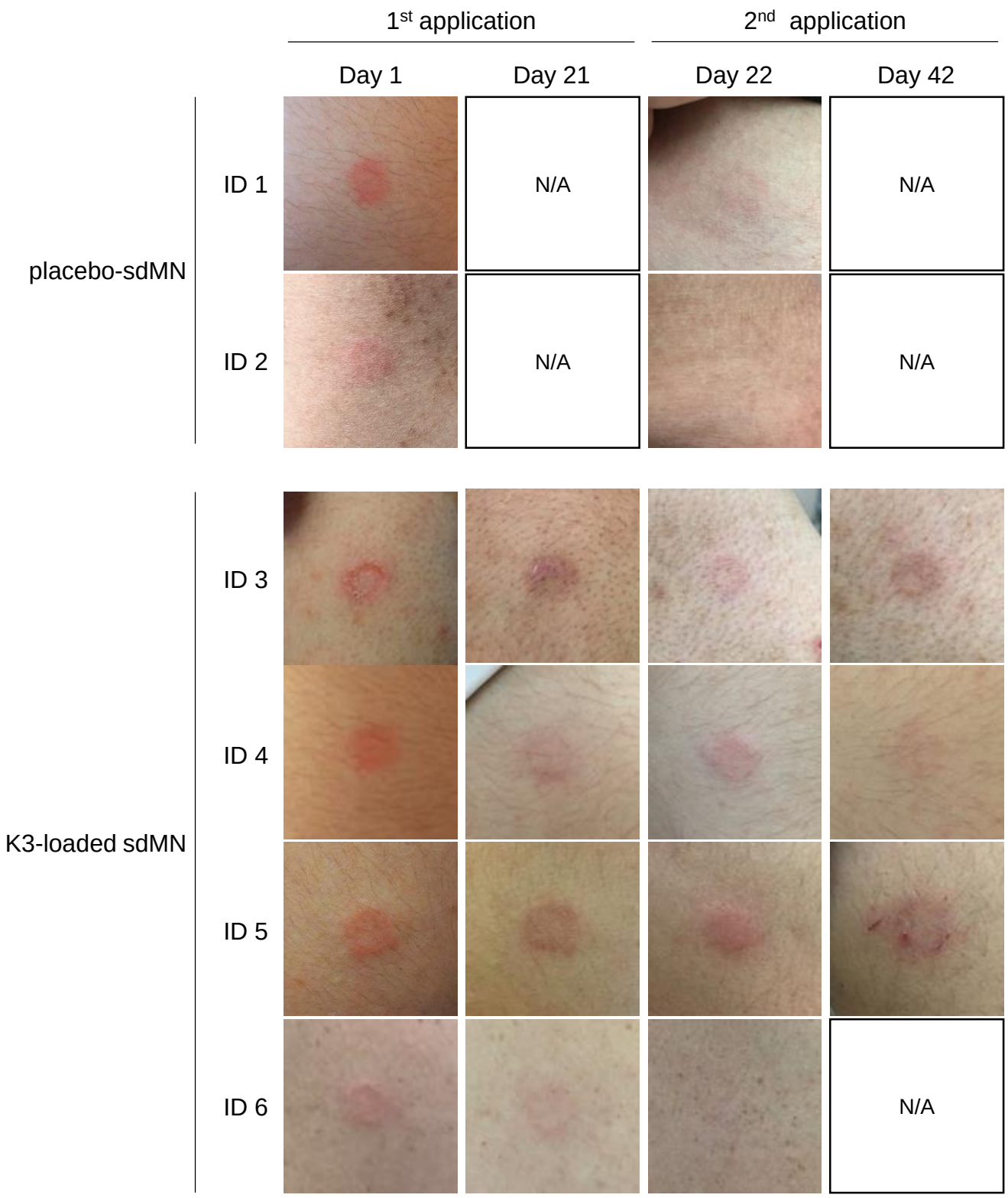


Fig. 18. Safety evaluation of K3-loading sdMN use in humans
Placebo-sdMN or K3-loaded sdMN were applied to the upper arm of participants twice every three weeks using an applicator. The day after administration (Day 1, Day 22) and three weeks after the first application (Day 21, Day 42), local skin reactions at the application site were observed.

Fig. 19

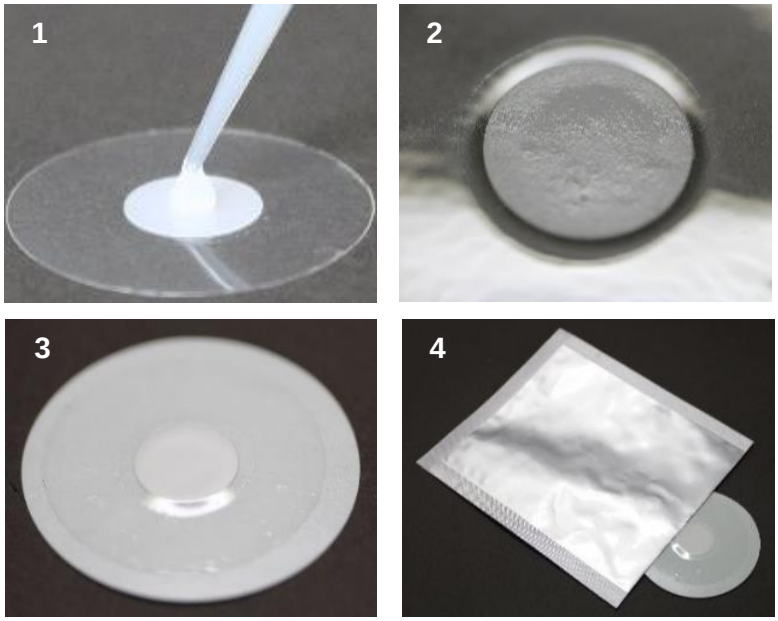


Fig. 19. Preparation of allergen-containing HG.
(1) Allergen solution was added as a drop to a 1-cm diameter HG and (2) allowed to dry for a few hours. (3) The HG was covered with low protein adsorptive paper, (4) sealed with aluminum laminate, and stored at 4°C.

Fig. 20A

(A)

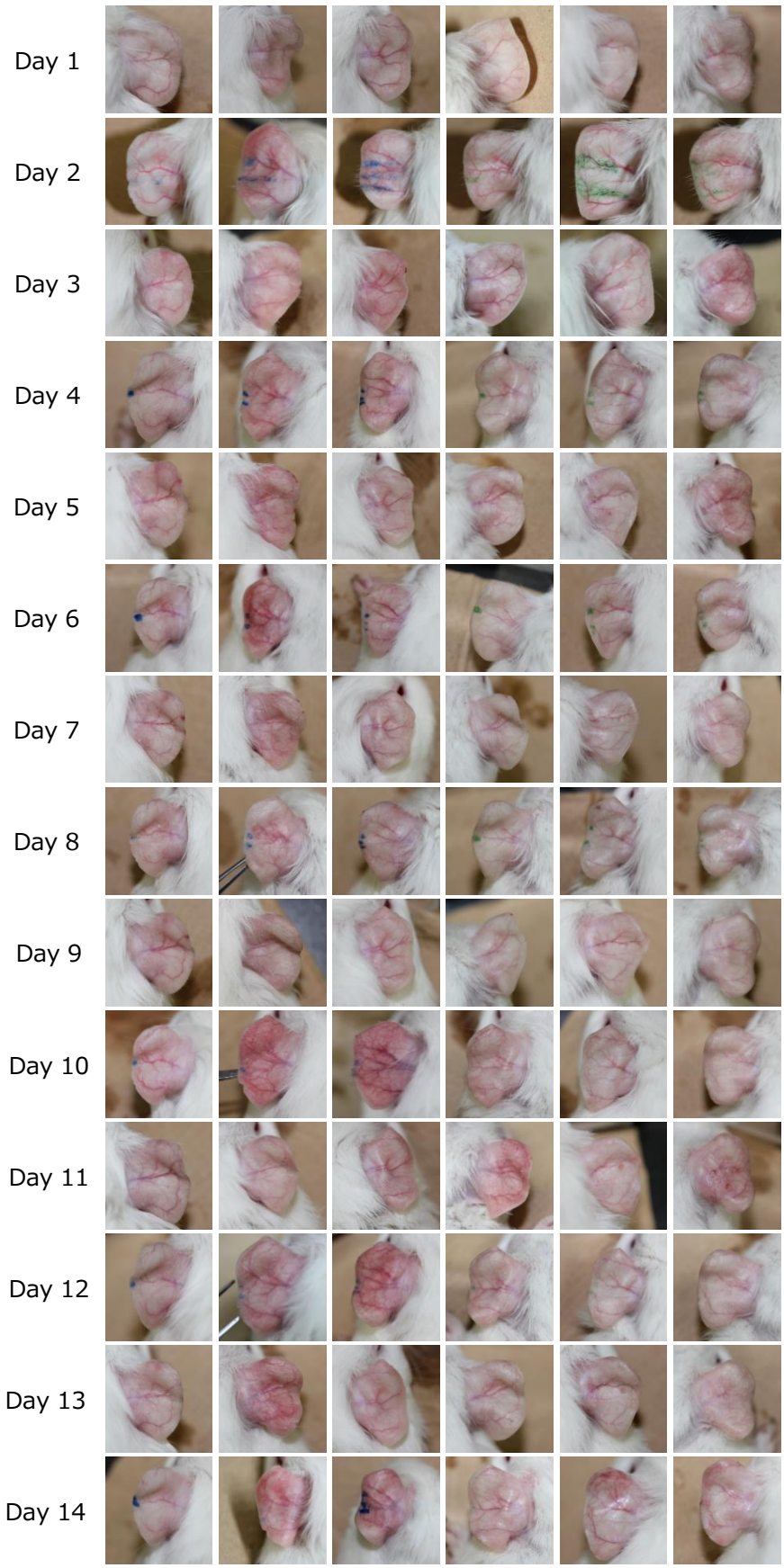

OVA-containing HG
Placebo-HG
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day 8
Day 9
Day 10
Day 11
Day 12
Day 13
Day 14

Fig. 20B, C

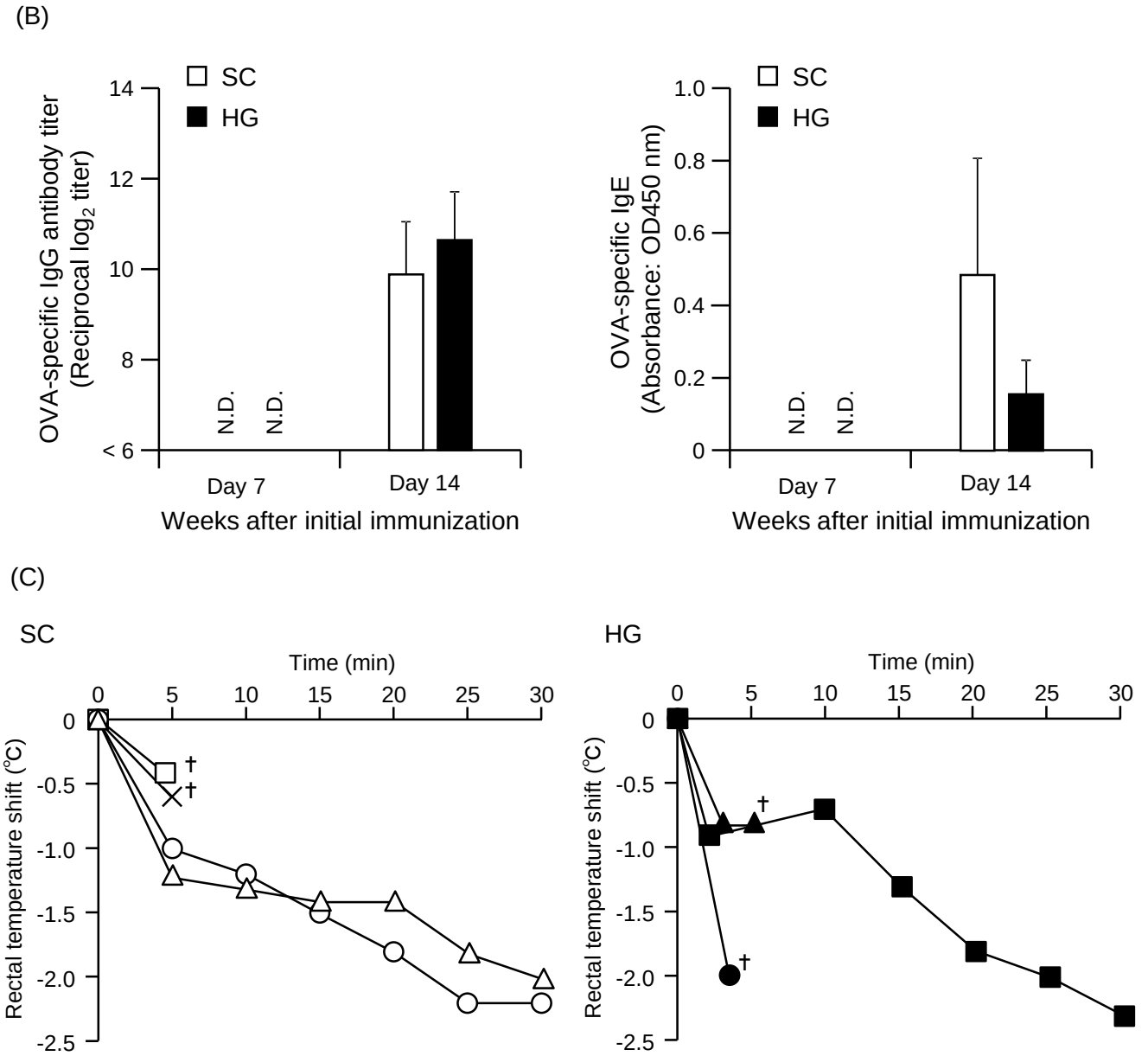


Fig. 20. Skin local reaction and active anaphylaxis test by applying OVA-containing HG.
(A) OVA-containing HG was applied to the ear of guinea pig daily for 14 days. The application site was observed on day 1 to day 14. (B) On day 7 and day 14, serum OVA-specific IgG and IgE were measured by ELISA. (C) On day 14, the OVA solution was intravenously administered at 2 mg/kg, and changes in rectal temperature were measured over time.† showed the time point when the guinea pig died.

Fig. 21A, B, C

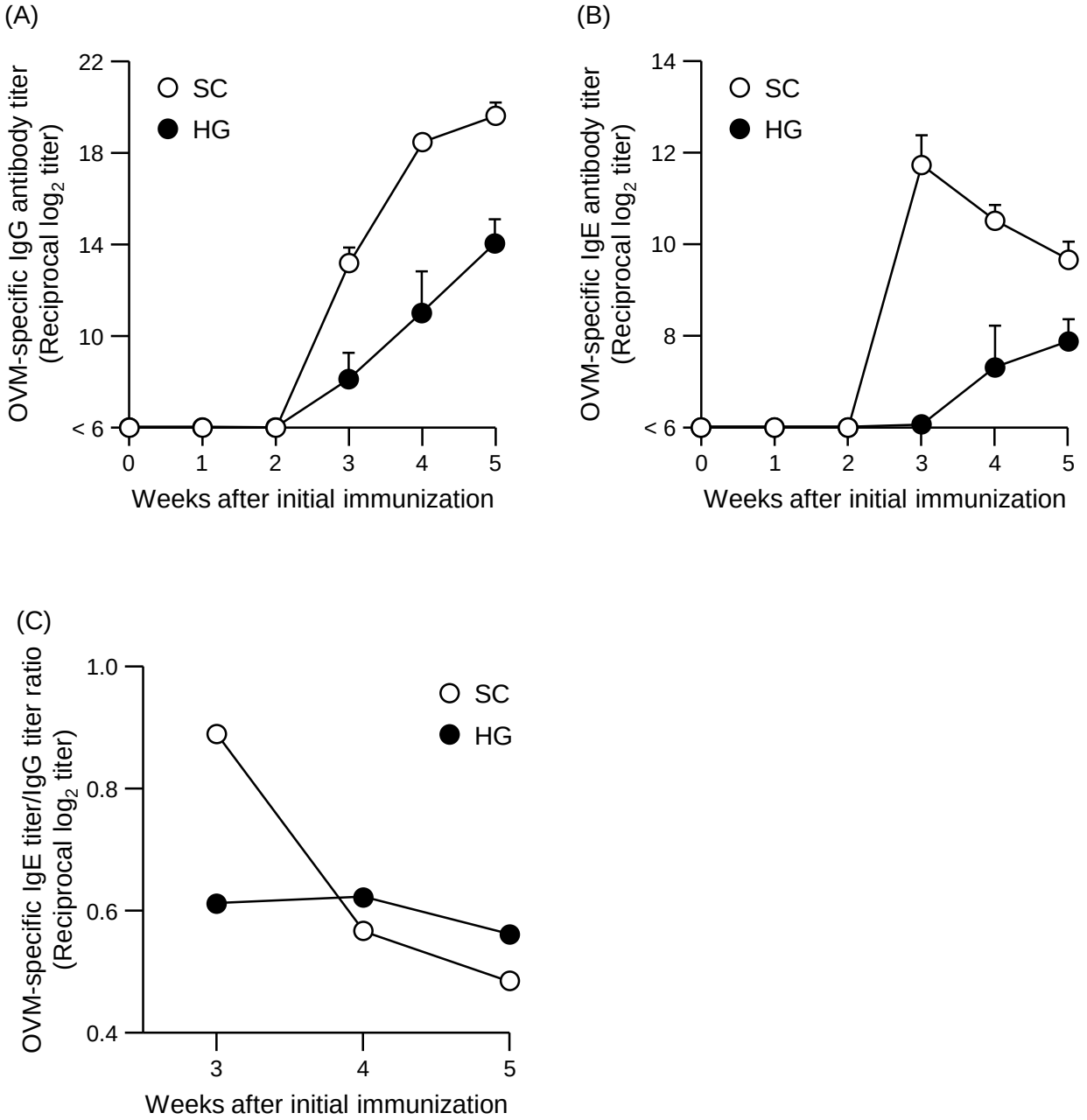

(A)
OVM-specific IgG antibody titer
(Reciprocal log2 titer)
22
18
14
10
< 6
SC
HG
0
1
2
3
4
5
Weeks after initial immunization
(B)
OVM-specific IgE antibody titer
(Reciprocal log2 titer)
14
12
10
8
< 6
SC
HG
0
1
2
3
4
5
Weeks after initial immunization
(C)
OVM-specific IgE titer/IgG titer ratio
(Reciprocal log2 titer)
1.0
0.8
0.6
0.4
SC
HG
3
4
5
Weeks after initial immunization

Fig. 21D

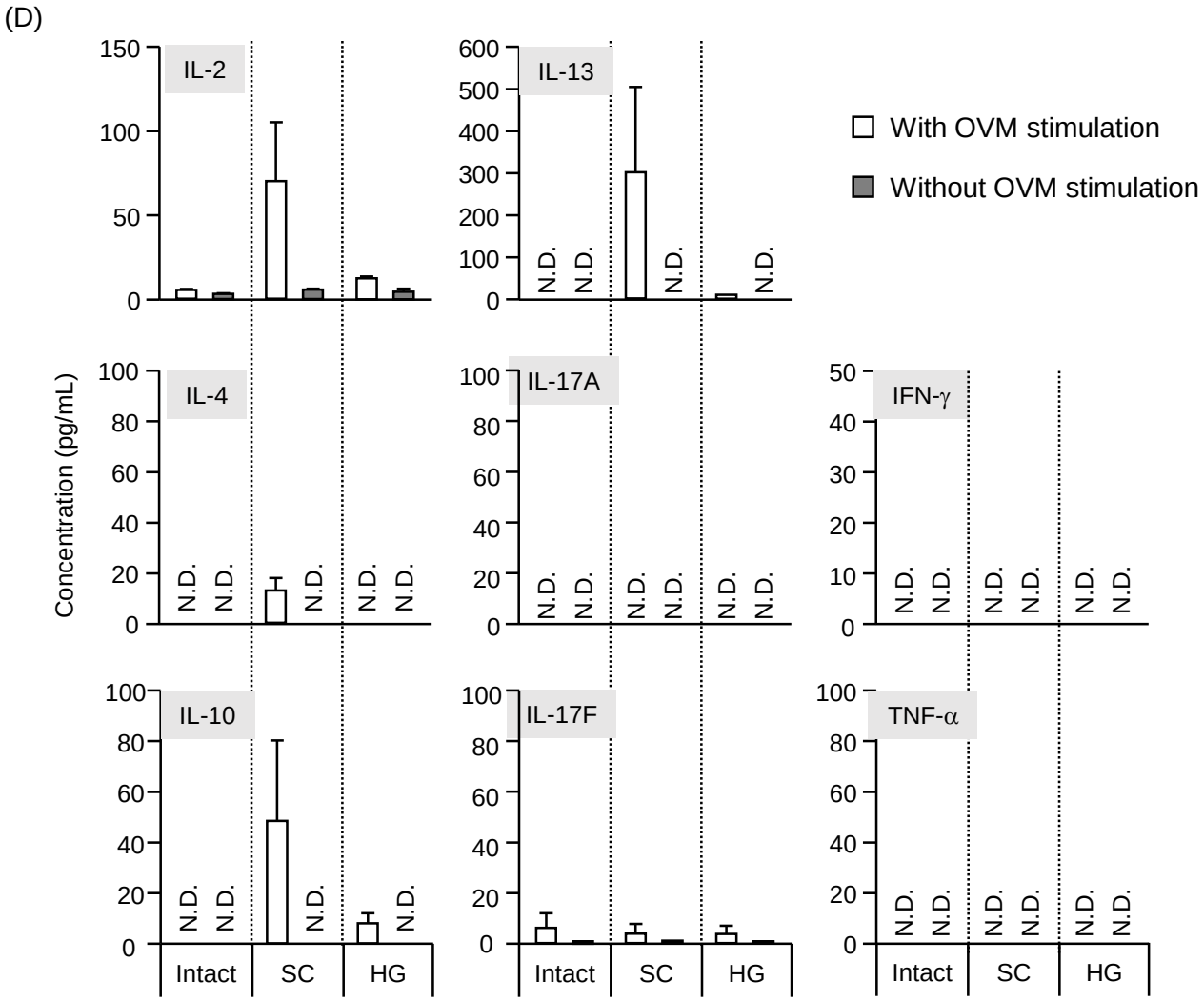


Fig. 21. Ability of OVM-specific immune response using OVM-containing HG.
(A) 1 mg OVM-containing HG was applied on BALB/c mice back skin (●). 100 μg OVM solution was immunized subcutaneously in BALB/c mice (○). Sera collected were assayed to determine OVM-specific IgG and (B) IgE titer by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of result from three mice. (C)The ratio of IgE/IgG titer was shown. (D) One week after the final immunization, single-cell suspensions of lymph node cells were prepared and cultured with (□) or without (■) 1 mg/mL OVM for 24 hours. The culture supernatant were collected and cytokine production were evaluated by Bioplex. Data are expressed as mean ±SEM of results from three mice. N.D.: not detected.

Fig. 22

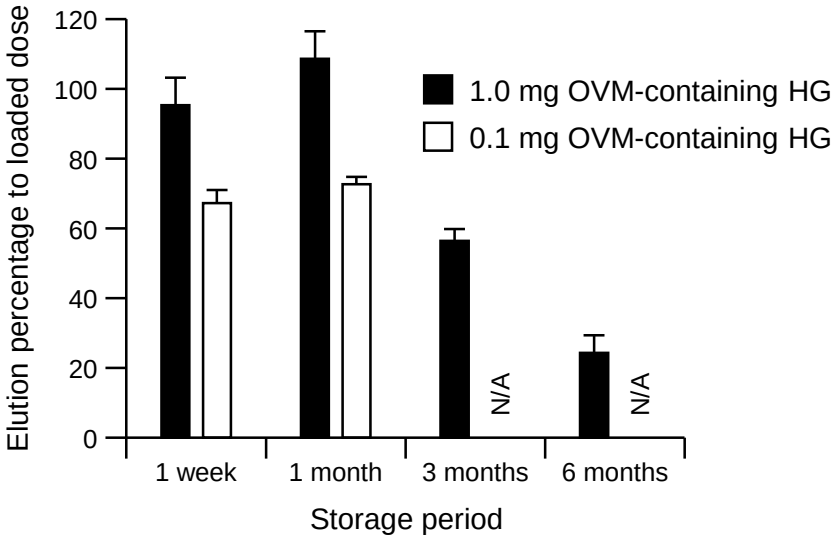
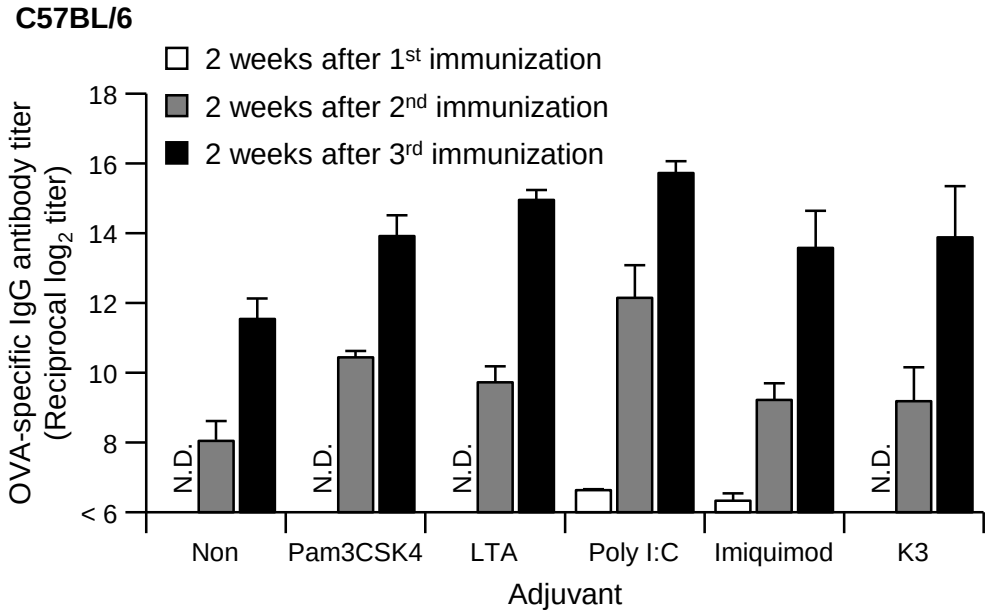


Fig. 22. Long-term storage stability of OVM patch
1 mg or 0.1 mg OVM-containing HG was stored at 4°C for 1 week, 1 month, 3 months, 6 months. The patch was performed to a dissolution test and quantitative protein assay using by Bradford methods. The dissolution rate was calculated assuming that the HG-containing amount was 100%. Data is expressed as mean ± SEM of results from three patches.

Fig. 23A

(A)


C57BL/6
2 weeks after 1st immunization
2 weeks after 2nd immunization
2 weeks after 3rd immunization
OVA-specific IgG antibody titer
(Reciprocal log2 titer)
18
16
14
12
10
8
< 6
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
Non
Pam3CSK4
LTA
Poly I:C
Imiquimod
K3
Adjuvant

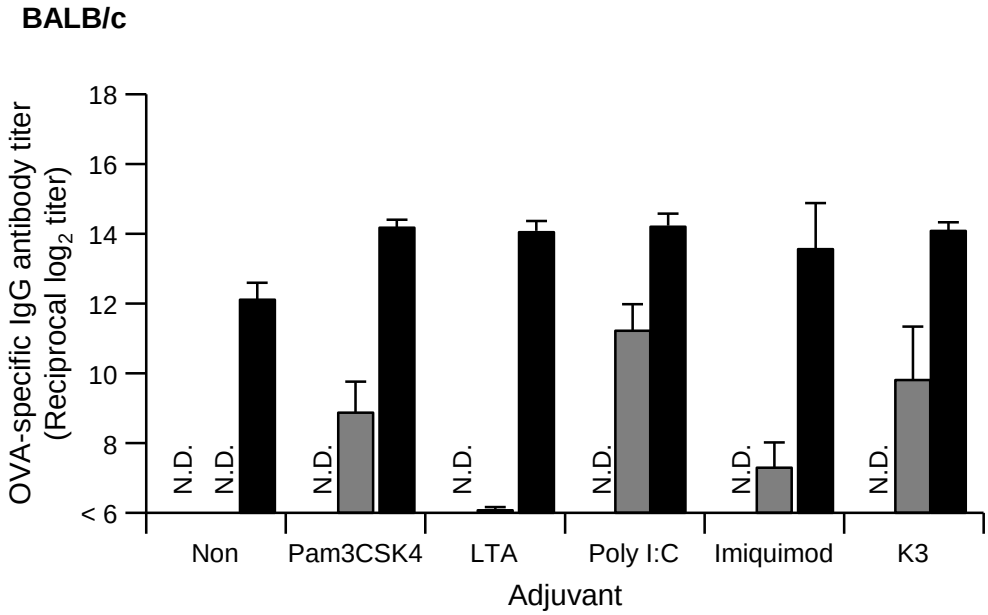
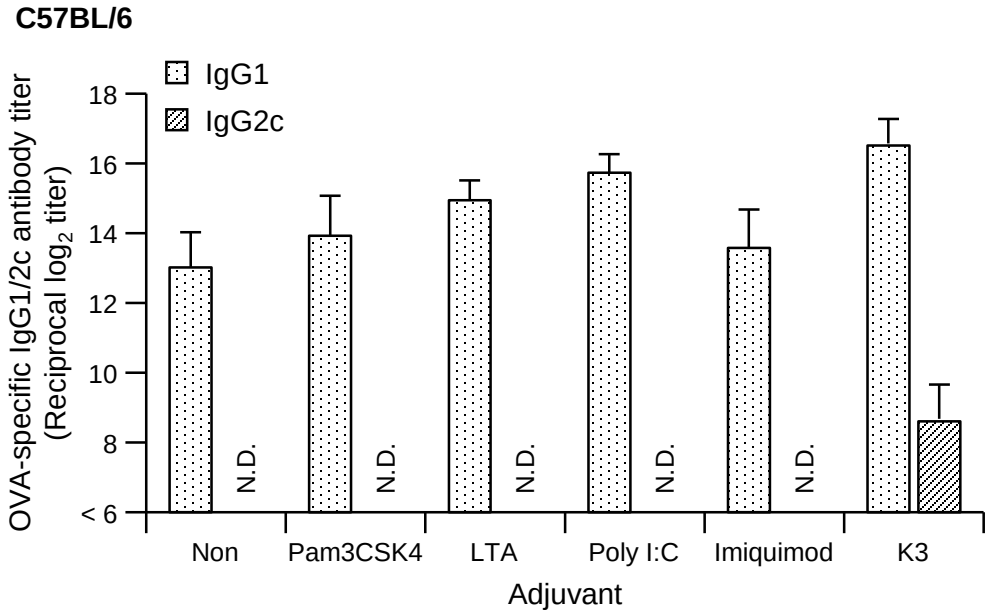

BALB/c
OVA-specific IgG antibody titer
(Reciprocal log2 titer)
18
16
14
12
10
8
< 6
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
Non
Pam3CSK4
LTA
Poly I:C
Imiquimod
K3
Adjuvant

Fig. 23B

(B)


C57BL/6
IgG1
IgG2c
OVA-specific IgG1/2c antibody titer
(Reciprocal log2 titer)
18
16
14
12
10
8
< 6
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
Non
Pam3CSK4
LTA
Poly I:C
Imiquimod
K3
Adjuvant

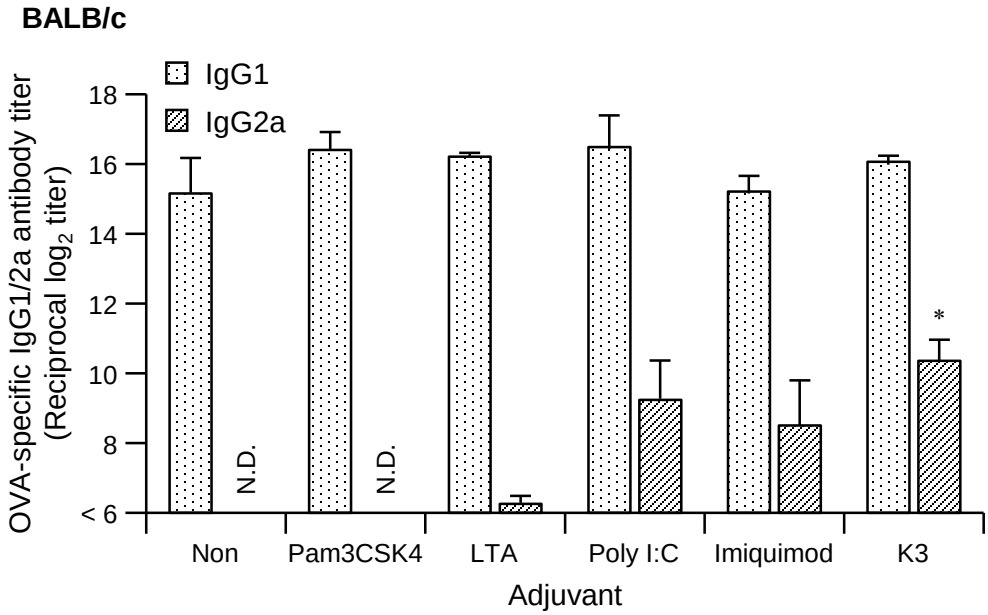

BALB/c
IgG1
IgG2a
OVA-specific IgG1/2a antibody titer
(Reciprocal log2 titer)
18
16
14
12
10
8
< 6
N.D.
N.D.
*
Non
Pam3CSK4
LTA
Poly I:C
Imiquimod
K3
Adjuvant

Fig. 23C

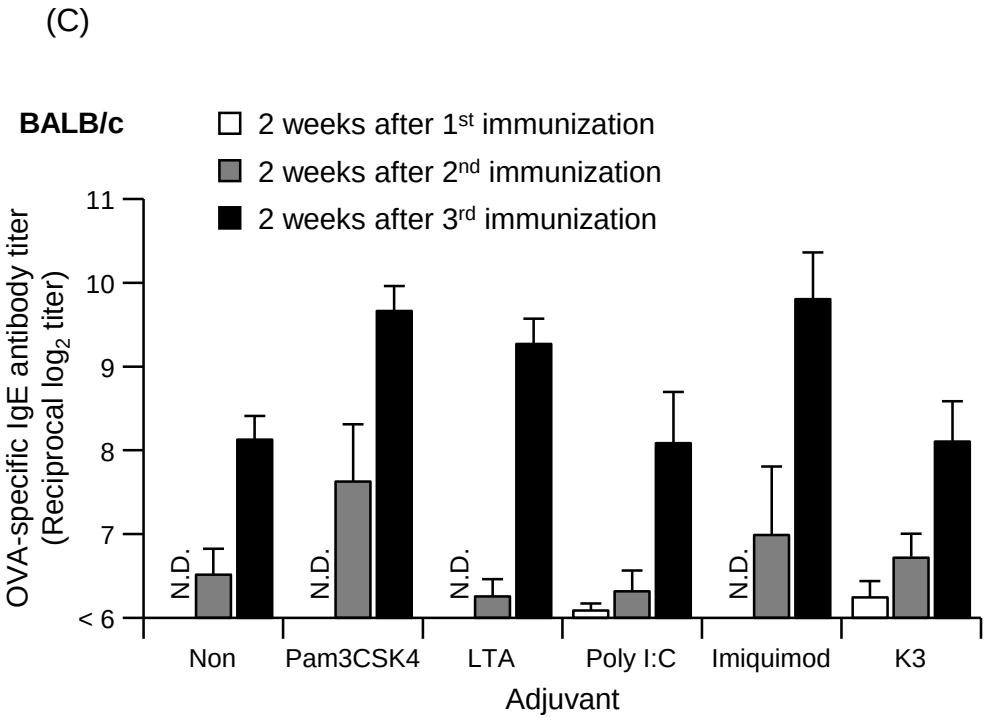


Fig. 23. OVA-specific antibody response using OVA plus TLR ligand-containing HG.
C57BL/6 mice and BALB/c mice were immunized three times at two week intervals with OVA in combination with each TLR ligands epicutaneously. Sera collected on day0, day14, day28 and day42 were assayed to determine the (A) antigen-specific IgG titer, (B) IgG subclass titer, and (C) IgE titer by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of results from three mice. Student's t-test; *P<0.05, N.D.: not detected.

Fig. 24

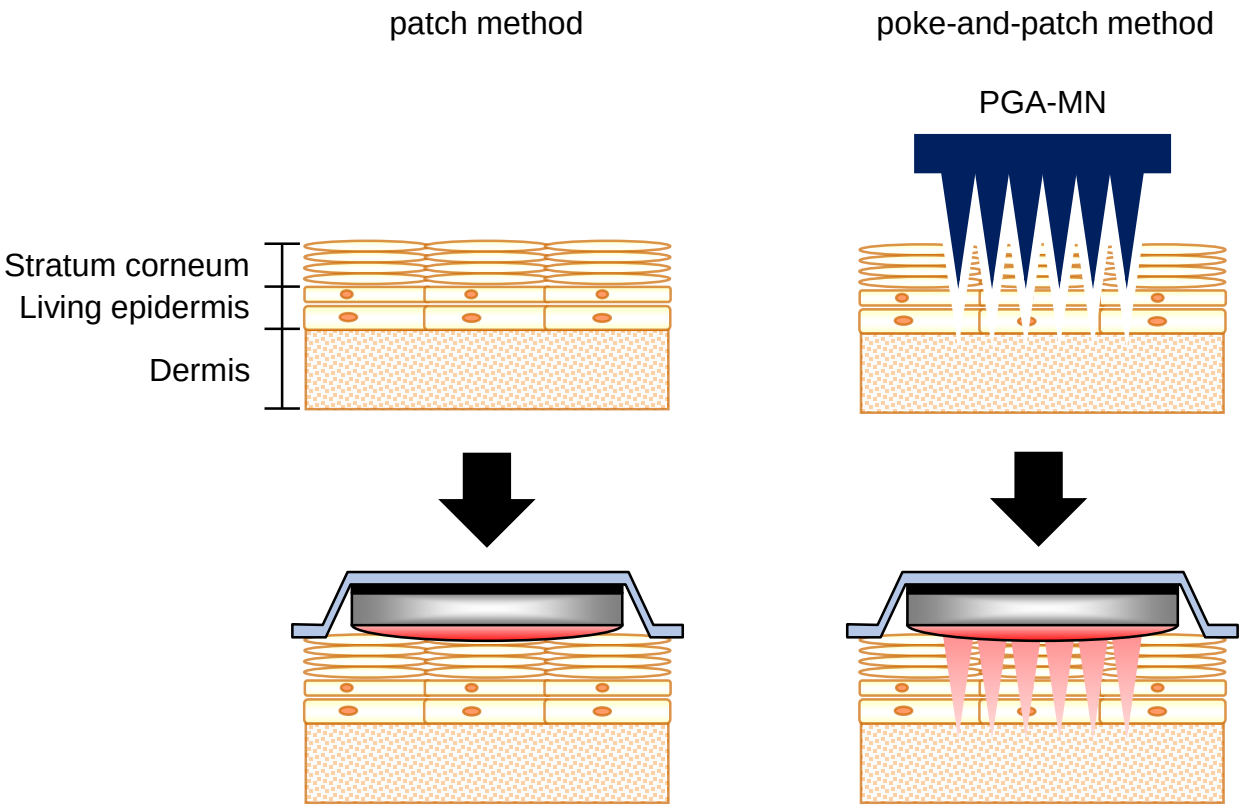


Fig. 24. Epicutaneous immunization methods of the MPC-containing HG.
MPC-containing HG was applied to intact skin with the hair removed (patch method), or was applied after puncturing the skin using a PGA-MN (poke-and-patch method).

Fig. 25

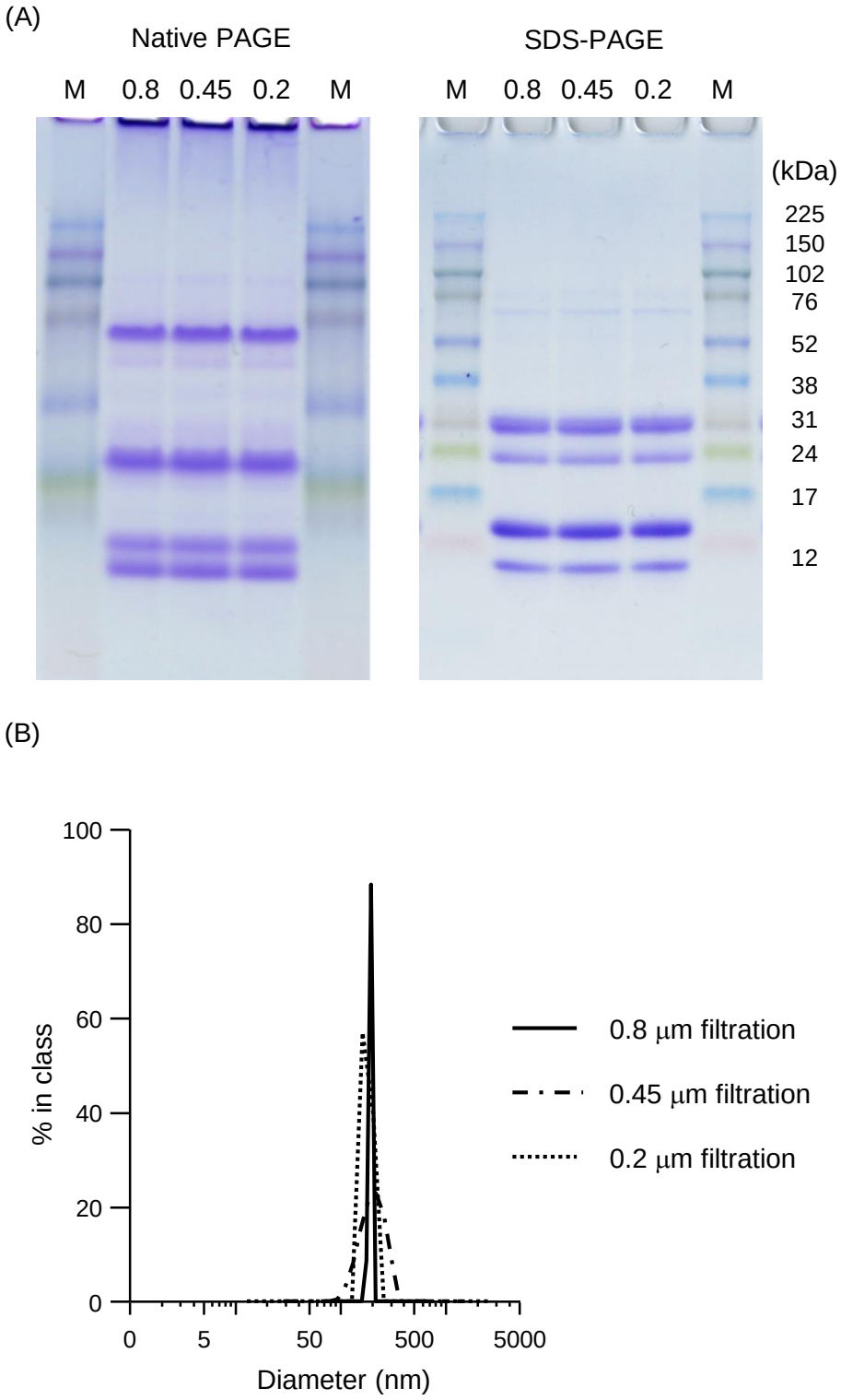


Fig. 25. Preparation and state of MPC solution.
(A) MPC was dissolved in distilled water and sequentially passed through 0.8-, 0.45-, and 0.2-μm filters. Each MPC solution was analyzed by native PAGE under non-denaturing conditions or by SDS-PAGE after heat denaturation. M: marker (B) Particle diameter in each MPC solution was measured by dynamic light scattering.

Fig. 26

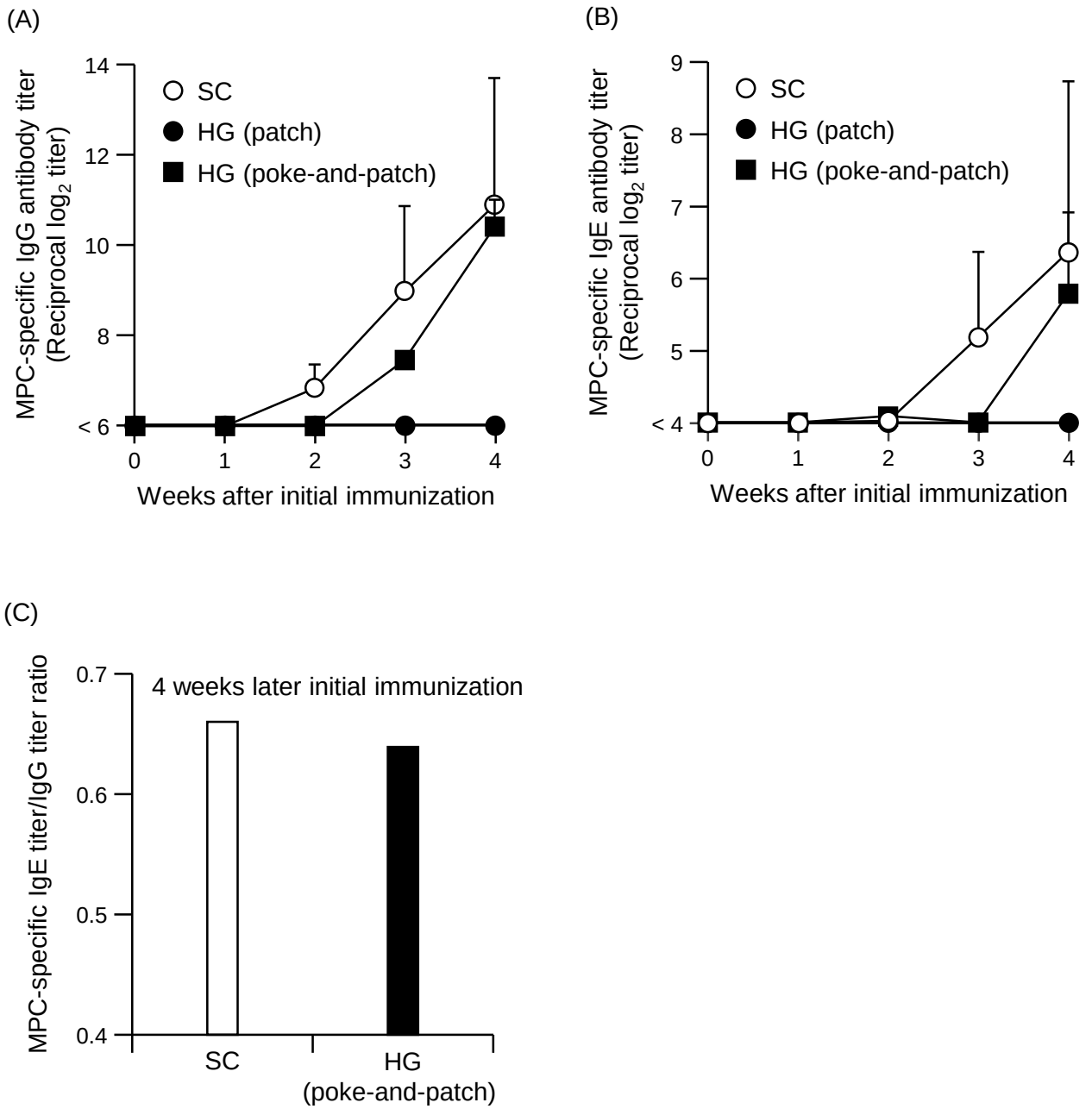
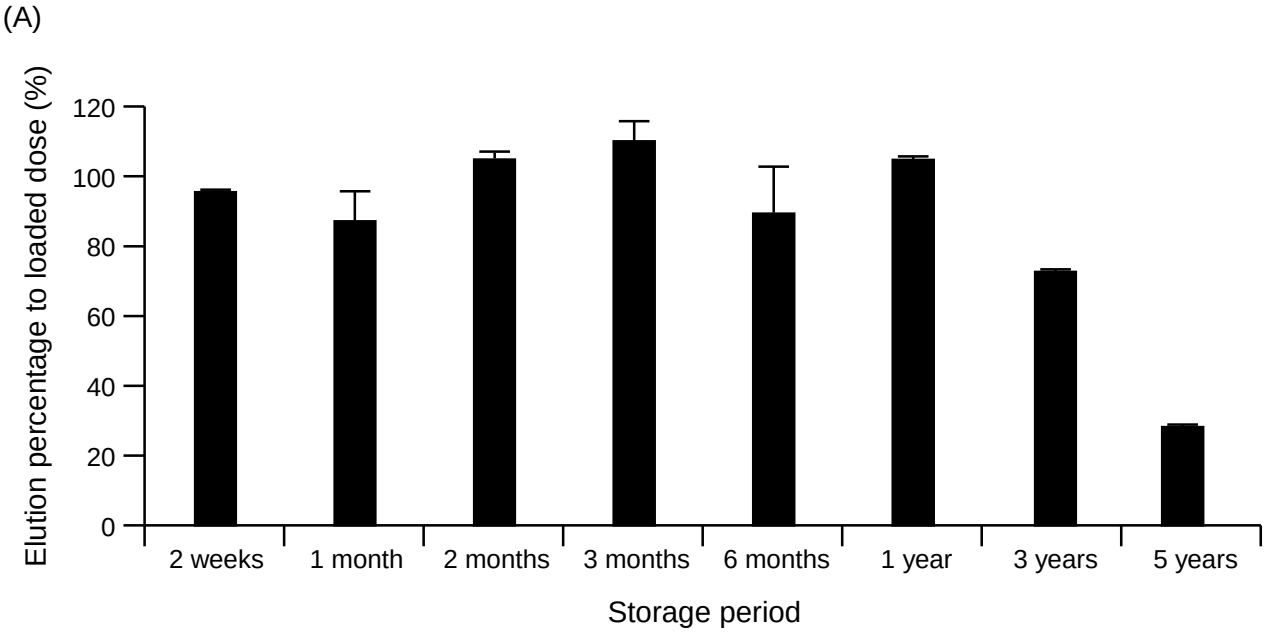


Fig. 26. MPC-specific antibody inducing effect using the MPC-containing HG.
DBA/2 mice were epicutaneously immunized by application of 1 mg MPC-containing HG (1 mg) to the dorsal skin with the hair removed using the patch and poke-and-patch methods or were immunized with 100 μg MPC solution delivered subcutaneously. (A) MPC-specific IgG and (B) IgE titers in serum samples were measured by ELISA. (C) The ratio of IgE/IgG titer was shown. Data are expressed as mean ± SEM of results from three mice.

Fig. 27



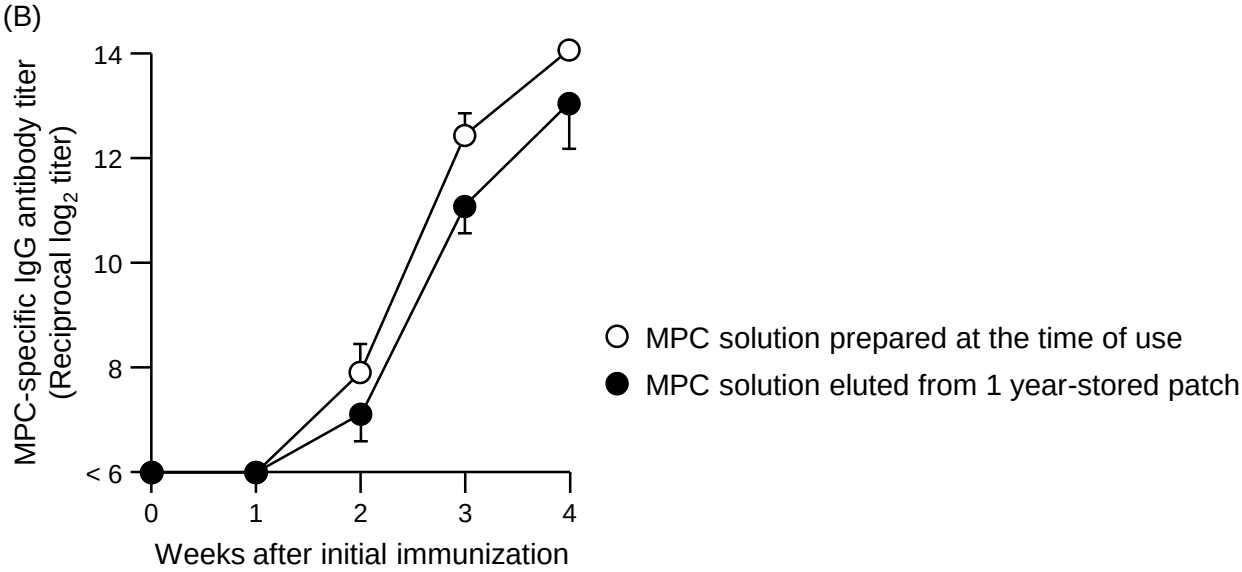


Fig. 27. Stability of MPC-containing HG over long-term storage.
(A) A dissolution test and protein quantification with the Bradford method was performed for HG containing 1 mg MPC. Dissolution rate was calculated for MPC-loaded in HG as 100%. (B) Solution eluted from the 1 mg MPC-containing HG stored for 1 year was used to subcutaneously immunize DBA/2 mice at 100 μg/100 μl. As a control, DBA/2 mice were similarly immunized with MPC solution prepared at the time of use. MPC-specific IgG and IgE titer in serum samples were measured by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of results from three mice.

Table 8

Table 1 Demographic and clinical characteristic at the start of the studies.

Participants (n = 8)	
Gender (male:female)	5:3
Age (years); median (range)	6 (3-8)
Atopic dermatitis; number (%)	8 (100)
Asthma; number (%)	2 (25)
MILK-specific IgE (UA/mL)); median (range)	116.5 (3.88-206)
ALA-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	10.5 (0.1-77.3)
BLG-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	9.3 (0.1-45.2)
Casein-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	124.5 (4.81-227)
Threshold dose at DBPCFC (mL); median (range)	0.5 (0.5-1)

Fig. 28

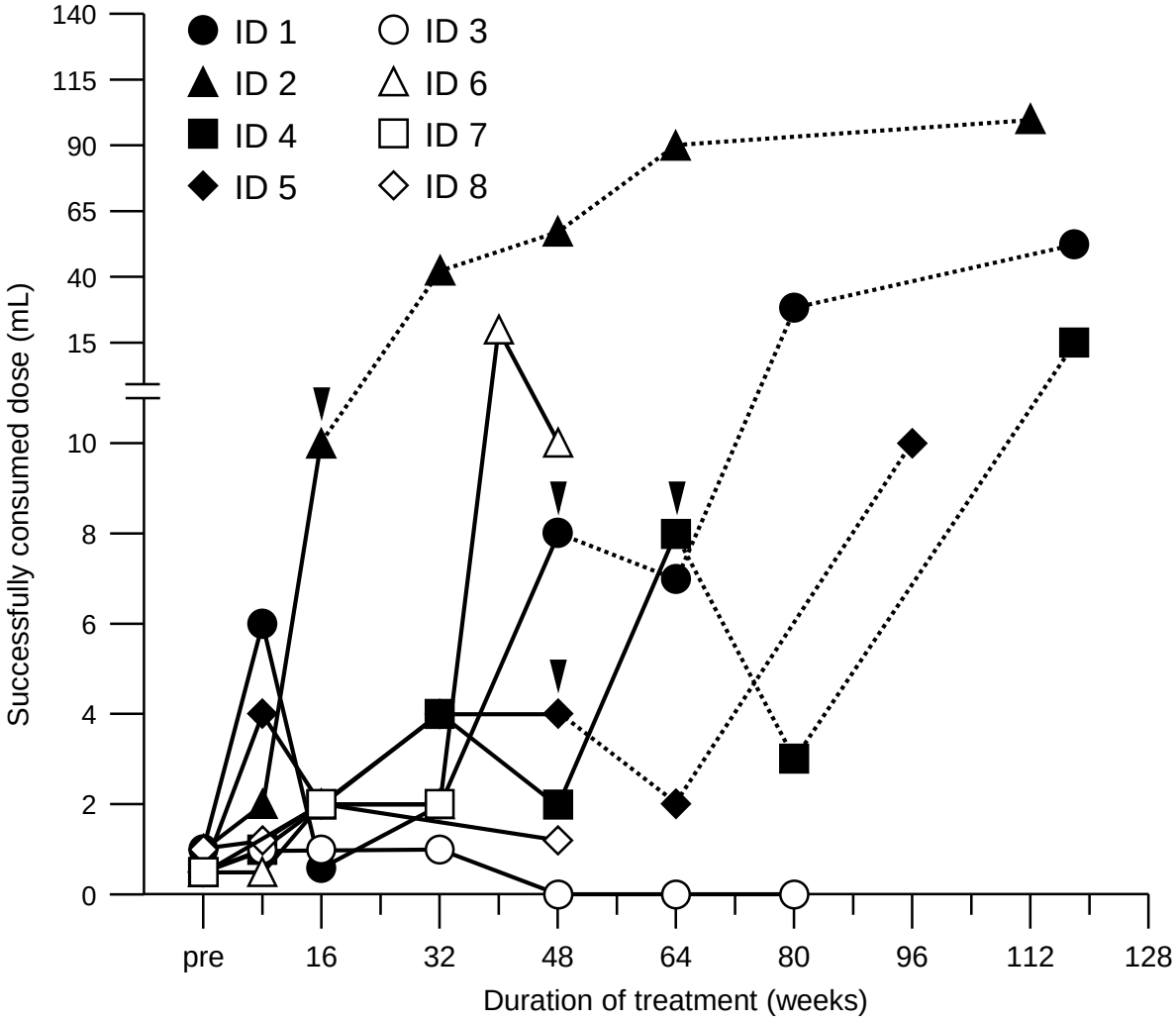


Fig. 28. Effect of EPIT using the HG on the dose of milk successfully consumed by patients with severe milk allergy.

The OFC test was carried out in children suffering milk allergy after they had initiated EPIT. Black symbols (●, ▲, ■, and ◆) indicate patients that were able to drink milk without experiencing allergy symptoms and were able to switch to OIT; white symbols (○, △, □, and ◇) indicate patients for whom EPIT terminated; and ▼ shows the time point at which patients switched to OIT, and the subsequent change in the cumulative amount is indicated by a dotted line.

Fig. 29A

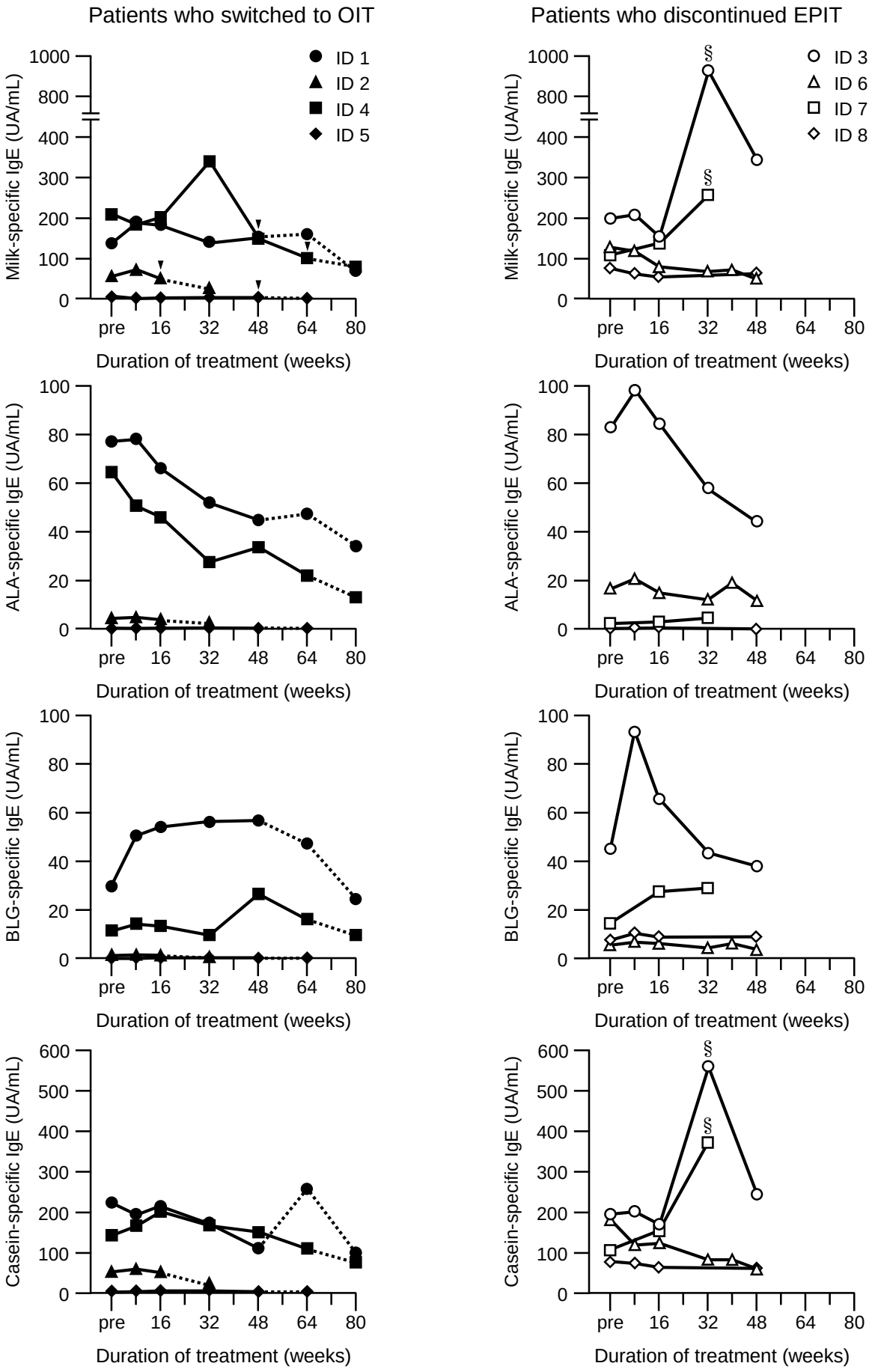

Patients who switched to OIT
Patients who discontinued EPIT
ID 1
ID 2
ID 4
ID 5
ID 3
ID 6
ID 7
ID 8
Milk-specific IgE (UA/mL)
ALA-specific IgE (UA/mL)
BLG-specific IgE (UA/mL)
Casein-specific IgE (UA/mL)
Duration of treatment (weeks)
pre
16
32
48
64
80
§

Fig. 29B

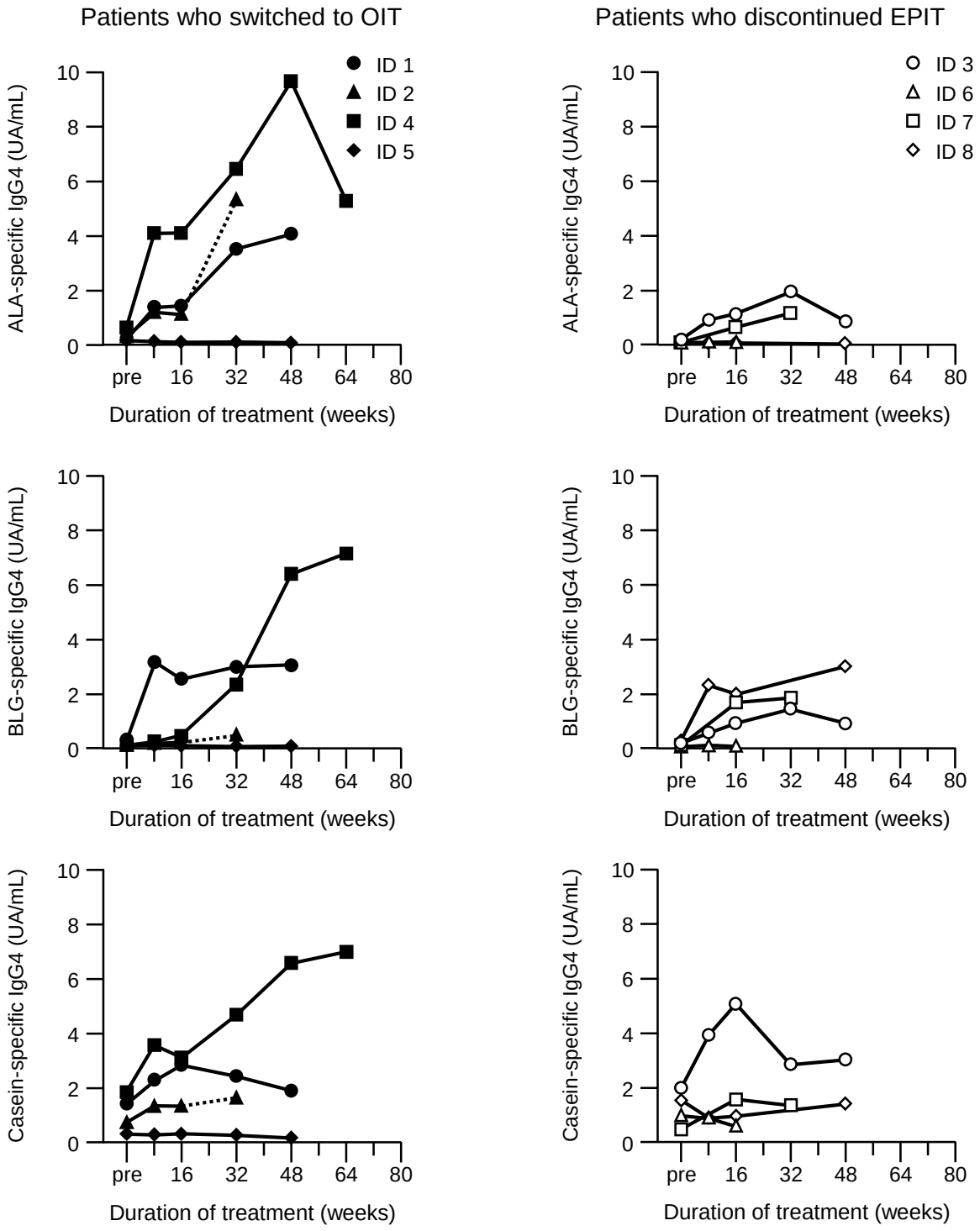

Patients who switched to OIT
Patients who discontinued EPIT
ID 1
ID 2
ID 4
ID 5
ID 3
ID 6
ID 7
ID 8
ALA-specific IgG4 (UA/mL)
BLG-specific IgG4 (UA/mL)
Casein-specific IgG4 (UA/mL)
0
2
4
6
8
10
pre
16
32
48
64
80
Duration of treatment (weeks)

Fig. 29C

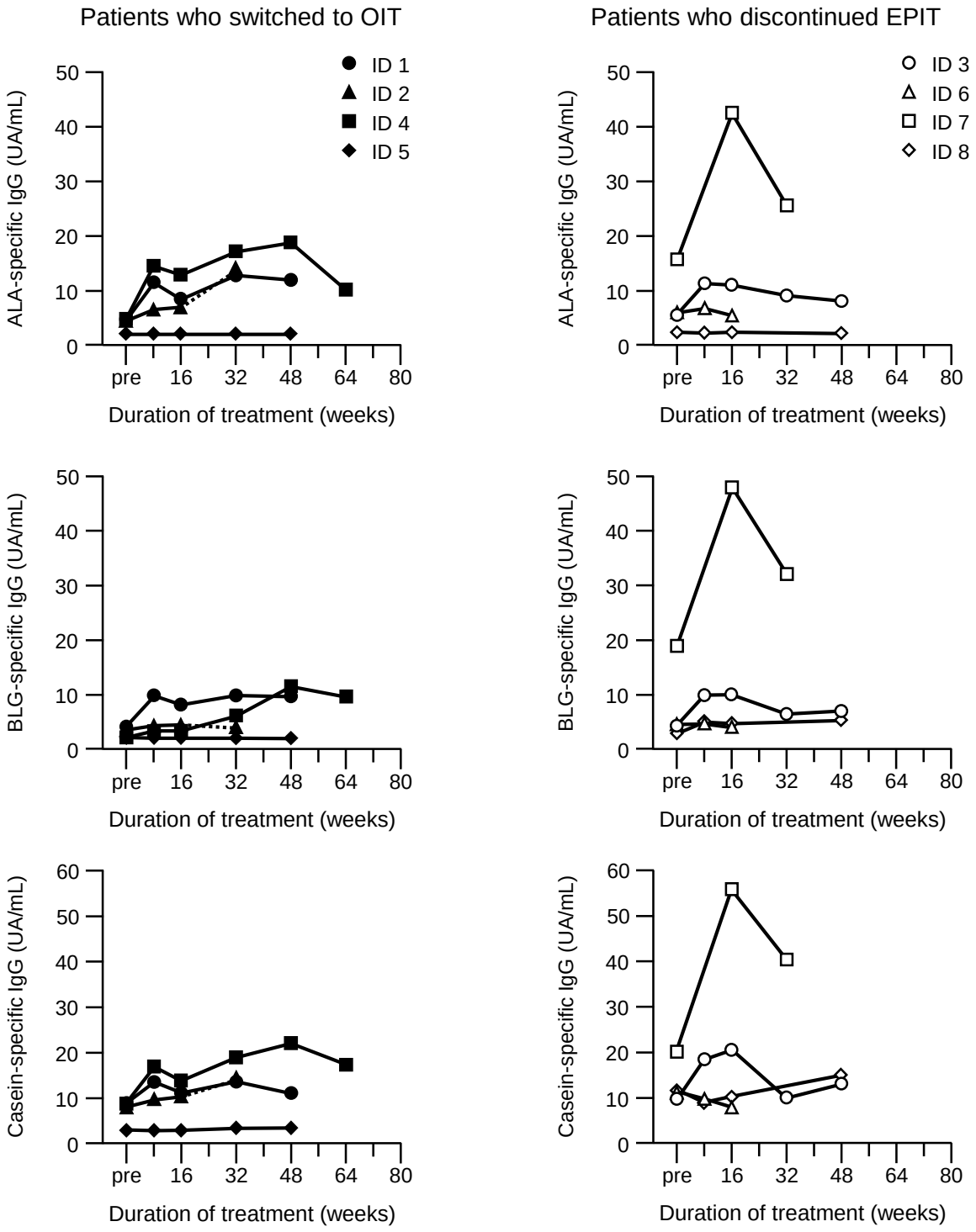


Fig. 29. Allergen-specific immune responses in patients following EPIT using HG.
Blood samples were periodically collected from patients with severe milk allergy after EPIT. Milk-, ALA-, BLG-, and casein-specific IgE (A), IgG4 (B), and IgG (C) levels were measured using ImmunoCAP. Black symbols (●, ▲, ■, and ◆) indicate patients who were able to drink milk without experiencing allergy symptoms and were able to switch to OIT; white symbols (○, △, □, and ◇) indicate patients for whom EPIT was terminated; ▼ shows the time point at which patients switched to OIT, and the subsequent change in the cumulative amount is indicated by a dotted line; and § indicates the time point at which the clinical research was halted due to the sharp rise in allergen-specific IgE antibody production.