

201110028A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

生分解性マイクロニードルを応用した
画期的「貼るワクチン製剤」の
開発と実用化に資する研究の総合的推進

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田直貴

平成24(2012)年5月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

生分解性マイクロニードルを応用した
画期的「貼るワクチン製剤」の
開発と実用化に資する研究の総合的推進

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田直貴

平成24(2012)年5月

目 次

I. 総括研究報告

生分解性マイクロニードルを応用した画期的「貼るワクチン製剤」の ----- 1
開発と実用化に資する研究の総合的推進

研究代表者 大阪大学大学院薬学研究科 岡田 直貴

II. 分担研究報告

1. 研究分担者 大阪大学大学院医学系研究科 小豆澤 宏明 ----- 75

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 89

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

生分解性マイクロニードルを応用した画期的「貼るワクチン製剤」の
開発と実用化に資する研究の総合的推進

研究代表者 岡田 直貴
大阪大学大学院薬学研究科 准教授

本研究課題では、独自に開発した生分解性マイクロニードル（MicroHyal; MH）を基材とするインフルエンザ経皮ワクチン製剤の開発に向けた基礎情報収集と基盤技術熟成を図る。また、ヒトにおける本製剤の安全性と有効性を検証する臨床研究を実施することによって、経皮ワクチン製剤の治験・製品化研究への移行期間の短縮に焦点を当てる。さらに、Toll様受容体リガンド（TLR-L）を中心に経皮ワクチン製剤用のアジュバントとして有望な候補物質の探索を推進し、抗原特異的 IgG 抗体産生（体液性免疫応答）の誘導のみならず細胞性免疫応答および粘膜免疫応答の活性化をも達成できる未来型インフルエンザ経皮ワクチン製剤の創出に取り組む。その中で本年度は、1. 各種 MH の物理化学的特性解析、2. インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性・安全性評価（前臨床研究）、3. MH のヒトにおける安全性評価（臨床研究）、4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索、について以下の結果を得た。

1. MH が角質層下の皮膚組織に効率よく物質送達できる経皮ワクチンデバイスであり、長期保存性にも優れることを実証した。
2. 動物実験において MH を応用したインフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性および安全性を明らかにした。
3. MH のヒト皮膚に対する穿刺特性を明らかとし、本デバイスがヒトに安全に適用できることを実証した。
4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの候補物質として MPLA と ODN1826 を見出し、これらの皮膚常在性免疫細胞に対する作用を明らかにした。

研究分担者 小豆澤 宏明
大阪大学大学院医学系研究科 助教

A. 研究目的

感染症パンデミックの脅威に対抗する唯一の根本的予防法はワクチンであり、従来の注射型ワクチン製剤と比較して簡便性に優れる経皮吸収型ワクチン製剤（貼るワクチン）は世界的に早期の実用化が待望されている。本観点から研究代表者の岡田らは、抗原を表皮に常在する抗原提示細胞に効率よく送達できる生分解性マイクロニードル（皮膚内容解型マイクロニードル：MicroHyal; MH）を開発し、これを応用した新規経皮ワクチン製剤を考案した。

本研究課題では、MHにインフルエンザHA抗原を装填した貼るワクチンについて、実験動物を用いた基礎・前臨床研究を強力に推進することで基礎情報集積と基盤技術熟成を図りつつ、研究分担者である小豆澤の主導により倫理委員会の審査・承認を経てヒトにおける安全性・有効性を検証する臨床研究を実施する。また、経皮ワクチン製剤に適用可能なアジュバントのスクリーニングを並行して実施し、抗原特異的IgG抗体産生（体液性免疫応答）のみならず細胞性免疫応答および粘膜免疫応答をも惹起できる未来型インフルエンザ経皮ワクチン製剤の創出を目指す。

経皮ワクチン製剤は使用法が皮膚に貼付するだけという簡便性のために、ワクチンの迅速大規模接種や注射針に対して恐怖症のある小児へのコンプライアンス向上に極めて効果的である。さらには、従来の注射型ワクチン製剤で必要とされる生産から消費までの一貫した低温温度管理（cold chain）が不要でコストダウンが図れる。これらの特長は開発途上国へのワクチン普及を強力に推進するとともに、新興・再興感染症パンデミックやバイオテロリズム発生時に本邦の社会的・経済的損耗を最小限に食い止める方策に威力を発揮する。本研究課題において得られる成果を経皮ワクチン

製剤の実用化研究を加速する基盤情報として活用し、将来的に本邦発の経皮ワクチン製剤を上市することができれば、ワクチン市場におけるインパクトと発展性は非常に大きく、安心・安全な社会の実現に大いに貢献するものとなる。

B. 研究方法

B.1. 各種 MH の物理化学的特性解析

B.1.1. 各種 MH の皮膚穿刺特性

(1) MHの作製

MHの無菌的作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。医療用ヒアルロン酸ナトリウム/ポリビニルピロリドン/デキストランの混合溶液をマイクロニードル鋳型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより、針部の長さおよび形状が異なる4種類のMH (MH200, MH300, MH500, MH800) を作製した (Fig. 1)。MH200とMH300はコニーデ型の針部形状であり、針先端部の長さはそれぞれ50 μm と100 μm である。また、MH500とMH800の針部形状は円錐型であり、針全長はそれぞれ500 μm と800 μm である。作製した各種MHはアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで室温で保管した。

(2) 針部強度の測定

MHの針部強度はテクスチャーアナライザー (TA. XT Plus; Stable Micro Systems) を用いて測定した。直径0.5 mmのステンレス製円盤をMH500、MH800の針部の軸に対して垂直にそれぞれ0.7 mm/min、1.1 mm/minの速度で押しあて、微小針が折れるのに要した力 (負荷) を測定した。直径0.5 mm の円形範囲に存在するMHの微小針の本数 (55本) でその負荷を除することで、微小針1本を折るのに必要な力 (N/needle) を算出した。なお、温度21.5°C、湿度47.0%の環境下で測定した。

(3) MH の貼付

MHの皮膚への貼付には、バネの弾性を利用してプラスチック製円盤をMHに押し当てるバネ式アプリケーターを用いた (Fig. 2)。マウスあるいはラットの除毛した背部皮膚上にMHを静置し、その上からバネを一

杯に縮めたアプリケーターをかぶせた。アプリケーターのバネ縮みを解放することで円盤部分がMHを16.3 N/cm²の力で皮膚に押し込んで穿刺・圧着した。MHの剥離を防ぐために、創傷保護シート (BIOCLUSIVE; Johnson & Johnson) をMHの上から貼付した。

(4) 針部溶解過程の観察

MH200、MH300、あるいはMH800をBALB/cマウス (H-2^d, 雌性, 6週齢; 日本SLC) またはWistar STラット (雌性, 6週齢; 日本SLC) の除毛した背部皮膚に貼付した。マウスにおいてはMH貼付5分後および60分後に、ラットにおいてはMH貼付5分後、15分後、30分後、および60分後に剥離したMHの針部を実体顕微鏡 (SZX16; オリンパス) にて観察した。

(5) 皮膚刺激性の評価

MH200、MH300、あるいはMH800をWistar STラット (雌性, 6週齢; 日本SLC) の除毛した背部皮膚に30分間貼付した。各MHを剥離してから5分後、2時間後、6時間後、24時間後、および48時間後に貼付部位の皮膚を観察し、Draizeの評価基準 (Table 1) に従って紅斑および浮腫の程度をスコア化した。

(6) 皮膚電気抵抗値の測定

MH200、MH300、あるいはMH800をWistar STラット (雌性, 6週齢; 日本SLC) の除毛した背部皮膚に30分間貼付した。各MHを剥離してから5、15、30、60、および120分後の時点で貼付部位の皮膚の電気抵抗値を測定した。電気抵抗値はPocket Tester (CDM-03D; CUSTOM) の電極の一方をMH適用部位に、もう一方をMH非適用部位に当てることで測定した。対照群には、Scotch tape (住友 3M) を用いたテープス

トリッピングにより角質層を物理的に除去したラットを用意した。

B. 1. 2. 各種 MH の皮膚内物質送達特性

(1) MH の作製

MHの無菌的作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。ヒアルロン酸ナトリウム/コラーゲン溶液と各種蛍光標識物質溶液を混合してマイクロニードル鑄型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより、蛍光標識物質装填MH200、MH300、あるいはMH800を作製した。なお蛍光標識物質には、fluorescein isothiocyanate-labeled ovalbumin (FITC-OVA; Molecular Probes) または FITC-labeled amorphous silica particle (FITC-SP; Micromod Partikel technologie) を使用した。作製した各種MHはアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) 送達物質の皮膚組織内局在の観察

FITC-OVA あるいは FITC-SP を装填した MH200、MH300 および MH800 を ICR マウス (雌性, 7-10 週齢; 日本 SLC) または HWY ヘアレスラット (雌性, 7-10 週齢; 日本 SLC) の除毛した背部皮膚に貼付した。なお、MH の貼付法は B. 1. 1. (3) に準拠した。貼付 1、3、6、12、あるいは 24 時間後に摘出した皮膚を O. C. T. compound (サクラ精機) に包埋後、直ちに液体窒素に浸漬して凍結ブロックを作製した。厚さ 8 μm の凍結組織切片を作製し、ProLong Gold Antifade reagent with DAPI (Molecular Probes) を用いて封入したプレパラートを蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000; Keyence) にて観察することで、FITC-OVA あるいは FITC-SP の皮膚組織内局在を解析した。

(3) 送達物質の皮膚内残存性の評価

FITC-labeled dextran (分子量 4000, FD4; SIGMA-ALDRICH) を装填した MH200、MH300、あるいは MH800 を ICR マウス (雌性, 7-10 週齢; 日本 SLC) の除毛した背部皮膚に 1 時間貼付した。なお、MH の貼付法は B. 1. 1. (3) に準拠した。各種 MH を剥離してから 24 時間ごとに、in vivo イメージング装置 (Maestro EX; CRi) を用いて MH 貼付局所における FD4 の残存性を観察した。なお、FD4 は Blue フィルターを用いて露光時間 800 ms で蛍光撮影した。対照群には FD4 を 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 、あるいは 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ で背部皮内に注射投与したマウスを用意した。

B. 1. 3. MH の物理化学的特性に与える湿度の影響

(1) MH の作製

B. 1. 1. (1) に準拠して MH800 を作製した。

(2) 各種湿度条件下での MH の保管

各種湿度条件の調整は飽和塩法に従った。デシケーター内にモレキュラーシーブスまたは各種塩 (塩化リチウム、酢酸カリウム、塩化マグネシウム、炭酸カリウム、塩化ナトリウム) の過飽和水溶液を入れることにより、容器内の湿度を 0, 11, 22, 33, 44, 75% に調整した。アルミラミネートPETパックから取り出したMHを各種湿度条件下のデシケーター内で1週間保管した。

(3) MH針部強度の測定

各種湿度条件下で1週間保管したMHの針部強度はB. 1. 1. (2) に準拠し、温度 20. 8°C、湿度 51. 2% の環境下で測定した。

(4) 水分活性の測定

各種湿度条件下で1週間保管したMHの水分活性は水分活性測定システム (rotoronic hygrolab) を用いて測定した。

B. 1. 4. MHの長期保存性

(1) MHの作製

MHの無菌的作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。医療用ヒアルロン酸ナトリウム/ポリビニルピロリドン/デキストラン溶液と破傷風トキソイド (TT) 溶液およびジフテリアトキソイド (DT) 溶液 (TT, DTはいずれも阪大微生物病研究会より供与) を混合してマイクロニードル鑄型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより、TT/DT装填MH800を作製した。これをアルミラミネートPETパックに密封包装し、4°C、25°C、あるいは40°Cにおいて6ヶ月間および12ヶ月間保管した。

(2) MHの針部溶解性

6ヶ月間あるいは12ヶ月間保管したTT/DT装填MH800をWistar STラット(雌性, 6週齢; 日本SLC)の除毛した背部皮膚に貼付した。なお、MHの貼付法はB. 1. 1. (3)に準拠した。貼付から5分後あるいは60分後に剥離したMHの針部を実体顕微鏡下で観察した。

(3) MHの免疫効果

6ヶ月間あるいは12ヶ月間保管したTT/DT装填MH800をWistar STラット(雌性, 6週齢; 日本SLC)の除毛した背部皮膚に6時間貼付した。なお、MHの貼付法はB. 1. 1. (3)に準拠し、この経皮免疫操作を2週間隔で5回繰り返した。

経目的に回収した血清におけるTT/DT特異的IgG抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate buffer (pH 9.6) で10 µg/mLに調製したTTあるいはDTを50 µL/wellで96-well ELISA plateに分注し、4°Cで一晩静置することで固相化した。2%ブロッカー (DSファーマバイオメディカル)/PBSを200 µL/wellで添加し、37°Cで2

時間ブロッキング処理を行った。0.4%ブロッカー/Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TBST) で連続2倍希釈した血清検体を50 µL/wellで添加し、室温で2時間反応させた。各wellをTBSTで3回洗浄し、0.4%ブロッカー/TBSTを用いて10,000倍希釈したHorseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ラットIgG抗体 (Southern Biotech) を50 µL/wellで添加した。室温で2時間反応させた後、各wellをTBSTで3回洗浄し、TMB溶液 (Moss Inc.) を100 µL/wellで添加した。室温で発色反応を行った後、2N H₂SO₄を50 µL/wellで添加して反応を停止し、吸光波長450 nm、副波長655 nmにて吸光度を測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が0.1以上高い最大希釈倍率の逆数の対数をReciprocal log₂ titerとして表した。

また、最終免疫から1ヶ月経過したラットに、致死量 (1 µg/head) の破傷風毒素 (Sigma-Aldrich) を大腿内側皮下投与し、4日間生存を観察する耐過試験を行った。

B. 2. インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性・安全性評価 (前臨床研究)

B. 2. 1. 三価季節性インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性評価

(1) 三価季節性インフルエンザHA抗原装填MHの作製

MHの無菌的作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。ヒアルロン酸ナトリウム/コラーゲン溶液と三価季節性インフルエンザHA抗原 (A/Brisbane/59/2007 (H1N1) 株由来HA抗原、A/Uruguay/716/2007 (H3N2) 株由来HA抗原、B/Florida/4/2006株由来HA抗原: 阪大微生物病研究会より供与) 溶液を混合してマイクロニードル鑄型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより、三価季節性インフルエンザHA抗原装填MH800を作製した。これをアルミラミネ

ートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) 三価季節性インフルエンザHA抗原のワクチン投与

BALB/cマウス (H-2^d, 雌性, 6週齢; 日本SLC) に三価季節性インフルエンザHA抗原を下記の7群に4週間隔で2回免疫投与した。

- ① 経皮免疫群 (MH800): 三価季節性インフルエンザHA抗原を各0.2 µgずつ装填したMH800を除毛した背部皮膚に6時間貼付した。なお、MHの貼付法はB. 1. 1. (3) に準拠した。
- ② 筋肉内注射免疫群: 三価季節性インフルエンザHA抗原を各0.2 µgずつ含む溶液50 µLを大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ③ 筋肉内注射免疫群 (Alum併用): 三価季節性インフルエンザHA抗原を各0.2 µgずつと水酸化アルミニウムゲルアジュバント (Alum; LSL) 100 µgとを含む混合液50 µLを大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ④ 皮内注射免疫群: 三価季節性インフルエンザHA抗原を各0.2 µgずつ含む溶液50 µLを背部皮内に注射投与した。
- ⑤ 皮内注射免疫群 (Alum併用): 三価季節性インフルエンザHA抗原を各0.2 µgずつとAlum 100 µgとを含む混合液50 µLを背部皮内に注射投与した。
- ⑥ 経鼻免疫群: 三価季節性インフルエンザHA抗原を各0.2 µgずつ含む溶液3 µLを点鼻投与した。
- ⑦ 経鼻免疫群 (CT併用): 三価季節性インフルエンザHA抗原を各0.2 µgずつとCholera toxin (CT; BioAcademia) 10 µgとを含む混合液3 µLを点鼻投与した。

(3) サンプル回収

経日的にマウス尾静脈よりヘマトクリッ

ト毛細管を用いて採血し、5,000 rpmで15分間遠心分離することで血清を得た。また、経日的に回収した糞便を秤量し、5%ウシ胎仔血清 (FCS; GIBCO)/PBS (0.02% NaN₃を含む) で100 µg/mLに調製した。4°Cで30分間攪拌して得られた懸濁液を4°C、14,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を糞便抽出液とした。また、最終免疫から16週間後に鼻腔洗浄液、唾液、および膣洗浄液を回収した。鼻腔洗浄液は安楽死させたマウスの気道より鼻腔へ向け200 µLのPBSを流すことで得た。唾液はPBSで1 mg/mLに調製したピロカルピン溶液 100 µLをマウス腹腔内に投与し、分泌を促進することで回収した。膣洗浄液は膣内をPBS 50 µLで洗浄することで回収した。

(4) HA特異的抗体価の測定

サンプル中のHA特異的抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate buffer (pH 9.6) で10 µg/mLに調製した各インフルエンザHA抗原を50 µL/wellで96-well ELISA plateに分注し、4°Cで一晩静置することで固相化した。2%スキムミルク/PBSを200 µL/wellで添加し、37°Cで2時間ブロッキング処理を行った。0.2%スキムミルク/TBSTで連続2倍希釈したサンプルを50 µL/wellで添加し、室温で2時間反応させた。各wellをTBSTで3回洗浄し、0.2%スキムミルク/TBSTを用いてメーカー推奨濃度に希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG, IgA, IgG1, あるいはIgG2a抗体 (Southern Biotech) を50 µL/wellで添加した。室温で2時間反応させた後、各wellをTBSTで3回洗浄し、TMB溶液 (Moss Inc.) を50 µL/wellで添加した。室温で発色反応を行った後、2N H₂SO₄を50 µL/wellで添加して反応を停止し、吸光波長450 nm、副波長655 nmにて吸光度を測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が0.1以上高い最大希釈倍率の逆

数の対数をReciprocal \log_2 titerとして表した。

(5) インフルエンザHA抗原のHA価の測定

PBSを用いて各HA抗原の連続2倍希釈検体を作製し、96-well plateに50 μ L/wellで添加した。0.5%ニワトリ赤血球浮遊液（日本バイオテスト研究所）を50 μ L/wellで添加し、800 rpmで1分間攪拌後、室温で1時間静置した。その後プレートを傾けて赤血球の凝集を判定し、完全凝集を与える最小HA抗原希釈値の逆数をHA価とした。なお、プレートを傾けて血球が流れたものを非凝集と判定した。

(6) Hemagglutination inhibition (HI) 試験

血清検体中の非特異的血球凝集阻止因子および非特異的血球凝集因子を除去するために、RDE (II)（デンカ生研）による前処理を行った。血清10 μ LにRDE (II)を30 μ L加えて37°Cで19時間静置し、56°Cで1時間加温した後、室温にまで冷却した。ここに1,500 rpmで5分間遠心分離してペレットにしたニワトリ赤血球10 μ Lと生理食塩水160 μ Lを添加し、穏やかに転倒混和した後、室温で1時間静置した。なお、血球が沈殿しないように途中数回転倒混和した。その後、1,200 rpmで10分間遠心分離した上清をRDE処理血清とした。

上記B.2.1.(5)で求めたHA価に基づいて各HA抗原の4 HA/25 μ L抗原液を調製し、使用前に再度HA価を確認してから同日中にHI試験に供した。PBSを用いてRDE処理血清の連続2倍希釈検体を作製し、96-well plateに25 μ L/wellで添加した。各wellに4 HA/25 μ Lを添加し、800 rpmで1分間攪拌した後、室温で60分間以上静置した。0.5%ニワトリ赤血球浮遊液を50 μ L/wellで加え、800 rpmで1分間攪拌した後、室温で60分間静置した。

その後プレートを傾けて赤血球の凝集を判定し、完全に凝集を阻止する最小抗体希釈値の逆数をHI価とした。なお、プレートを傾けて血球が流れたものを非凝集と判定した。

B.2.2. A/PR/8/34 (H1N1) 株由来インフルエンザ HA 抗原を装填した経皮ワクチン製剤の有効性評価

(1) A/PR/8/34 (H1N1) 株由来インフルエンザHA抗原装填MHの作製

MHの無菌的作製はコスメディ製薬株式会社に委託した。ヒアルロン酸ナトリウム/コラーゲン溶液とA/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原（阪大微生物病研究会より供与）溶液を混合してマイクロニードル鑄型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより、A/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原装填MH800を作製した。これをアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) A/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原のワクチン投与

BALB/cマウス（H-2^d，雌性，6週齢；日本SLC）にA/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原を下記の4群に4週間隔で2回免疫投与した。

- ① 経皮プラセボ群（MH800）：抗原を含まないMH800を除毛した背部皮膚に6時間貼付した。なお、MHの貼付法はB.1.1.(3)に準拠した。
- ② 経皮免疫群（MH800）：A/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原を0.4 μ g装填したMH800を除毛した背部皮膚に6時間貼付した。なお、MHの貼付法はB.1.1.(3)に準拠した。
- ③ 筋肉内注射免疫群：A/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原を0.4 μ g含む溶液50 μ Lを大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ④ 経鼻免疫群（CT併用）：A/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原を0.4 μ gとCT 10 μ g

とを含む混合液3 μL を点鼻投与した。

(3) サンプル回収

経目的にマウス尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpmで15分間遠心分離することで血清を得た。また、最終免疫から2週間後に糞便抽出液、鼻腔洗浄液、唾液、および膣洗浄液を回収した。回収した糞便を秤量し、5%ウシ胎仔血清(FCS; GIBCO)/PBS (0.02% NaN_3 を含む)で100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した。4°Cで30分間攪拌して得られた懸濁液を4°C、14,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を糞便抽出液とした。鼻腔洗浄液は安楽死させたマウスの気道より鼻腔へ向け200 μL のPBSを流すことで得た。唾液はPBSで1 mg/mLに調製したピロカルピン溶液 100 μL をマウス腹腔内に投与し、分泌を促進することで回収した。膣洗浄液は膣内をPBS 50 μL で洗浄することで回収した。

(4) HA特異的抗体価の測定

A/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原に特異的な抗体価は、B. 2. 1. (4) に準拠して測定した。

(5) インフルエンザHA抗原のHA価の測定

A/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原のHA価は、B. 2. 1. (5) に準拠して測定した。A/PR/8/34 (H1N1) 株由来HA抗原の固相化には、50 mM bicarbonate buffer (pH 9.6) で0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した溶液を用いた。

(6) HI試験

血清検体のHI価は、B. 2. 1. (6) に準拠して測定した。

(7) A/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルスの感染実験

インフルエンザウイルス感染実験は日本

生物科学センターに委託した。最終免疫2週後にA/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルスを 5×10^6 plaque forming unit (PFU)/headでマウスに点鼻投与した。

(8) 体重測定および一般状態の観察

A/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルス接種直前、接種後1日目、3日目、6日目に各マウスの体重を測定した。ウイルス接種後から毎日各マウスの一般状態を観察し、Table 2の基準に沿って評価した。

(9) ウイルスプラークアッセイ

ウイルス接種6日後にマウスから摘出した肺の右葉を細片化した後、生理食塩水2 mLを加えてホモジナイズし、肺組織液500 μL を得た。肺組織液の原液、10倍、100倍、1000倍希釈液を0.1 mLずつMDCK細胞に接種し、ウイルスを細胞に1時間吸着させた後にアガロース添加培地を細胞に重層した。アガロース液が固まった後、37°C、5% CO_2 条件下で2日間培養し、ウイルスプラークを計数した。

(10) 臓器肉眼的検査および重量測定

ウイルス接種6日後に摘出した肺を肉眼的に観察し、肺組織のConsolidation (硬化) を1~5の5段階スコアにより評価した。また、回収した肺を左葉と右葉に分けて重量を測定した。なお、感染実験の途中で死亡した個体については死亡日に実施した。

(11) 病理組織学的検査

回収した肺の左葉を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、Paraffinブロックに包埋した。組織切片を作製し、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色の後、光学顕微鏡を用いて観察した。各個体の気管支肺炎および間質性肺炎の程度を0~4の5段階スコアにより評価した。

B. 2. 3. H5N1 組換え型 HA 蛋白質を装填した経皮ワクチン製剤の有効性評価

(1) H5N1組換え型HA蛋白質装填MHの作製

MHの無菌的作製はコスメディ製薬株式会社に委託した。ヒアルロン酸ナトリウム/コラーゲン溶液とH5N1組換え型HA蛋白質溶液を混合してマイクロニードル鑄型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより、H5N1組換え型HA蛋白質装填MH300およびMH800を作製した。これをアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) H5N1組換え型HA蛋白質のワクチン投与

BALB/cマウス (H-2^d, 雌性, 7週齢; 日本SLC) にH5N1組換え型HA蛋白質を下記の6群に4週間隔で2回免疫投与した。

- ① 経皮免疫群 (MH300): H5N1組換え型HA蛋白質を0.05 µg装填したMH300を除毛した背部皮膚に6時間貼付した。なお、MHの貼付法はB. 1. 1. (3) に準拠した。
- ② 経皮免疫群 (MH800): H5N1組換え型HA蛋白質を0.05 µg装填したMH800を除毛した背部皮膚に6時間貼付した。なお、MHの貼付法はB. 1. 1. (3) に準拠した。
- ③ 筋肉内注射免疫群: H5N1組換え型HA蛋白質を0.05 µg含む溶液50 µLを大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ④ 筋肉内注射免疫群 (Alum併用): H5N1組換え型HA蛋白質0.05 µgとAlum 10 µgとを含む混合液50 µLを大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ⑤ 経鼻免疫群: H5N1組換え型HA蛋白質を0.05 µg含む溶液3 µLを点鼻投与した。
- ⑥ 経鼻免疫群 (CT併用): H5N1組換え型HA蛋白質0.05 µgとCholera toxin (CT; BioAcademia) 10 µgとを含む混合液3 µLを点鼻投与した。

(3) サンプル回収

経日的にマウス尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpmで15分間遠心分離することで血清を得た。また、経日的に回収した糞便を秤量し、5%ウシ胎仔血清 (FCS; GIBCO)/PBS (0.02% NaN₃を含む) で100 µg/mLに調製した。4°Cで30分間攪拌して得られた懸濁液を4°C、14,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を糞便抽出液とした。

(4) HA特異的抗体価の測定

H5N1組換え型HA蛋白質に特異的な抗体価は、B. 2. 1. (4) に準拠して測定した。H5N1組換え型HA蛋白質の固相化には、50 mM bicarbonate buffer (pH 9.6) で2 µg/mLに調製した溶液を用いた。

(5) HA特異的サイトカイン (IFN-γ/IL-4) 産生量の測定

最終免疫から2週間後に調製した脾細胞を24-well plateに2 × 10⁶ cells/mL/wellで播種し、H5N1組換え型HA蛋白質を1 µg/mLで添加して培養することによりin vitro抗原再刺激を行った。24時間後に培養上清を回収し、IFN-γならびにIL-4産生量をELISAにより測定した。

B. 3. 皮膚内溶解型マイクロニードルのヒトにおける安全性評価 (臨床研究)

B. 3. 1. 針部到達深度の解析

(1) MHの作製

B. 1. 1. (1) に準拠してMH500およびMH800を作製した (Fig. 1)。なお本臨床研究には、物性試験、異物試験、微生物学的検査に適合したMHを使用した。

(2) MHの貼付

MHの貼付法はB. 1. 1. (3) に準拠した。MHを被験者の上腕外側皮膚に置き、バネ式ア

プリケーターを用いて皮膚に圧着させた (Fig. 3)。健康男性被験者2名にMH500およびMH800を貼付し、5秒後、1時間後、および2時間後に剥離した。

(3) 共焦点レーザー生体顕微鏡によるMH貼付部位の観察

MH剥離後の皮膚を共焦点レーザー生体顕微鏡 (VivaScope 1500; Lucid) により観察した。皮膚表面から深部に向けて1 μm間隔で撮影した連続断面像をデジタル処理により3次元化し、深さ100 μmの皮膚断面像を構築した。また、縦横8枚ずつ視野をずらして撮影した64枚の画像をデジタル処理によって結合し、皮膚状態を広範囲に観察した。

B. 3. 2. 針部溶解性ならびに皮膚水分蒸散量の評価

(1) MHの作製

B. 3. 1. (1)に準拠してMH800および針部を持たないMH (MH-needleless) を作製した (Fig. 1)。

(2) MHの貼付

MHの貼付法はB. 3. 1. (2) に準拠した。健康男性被験者3名の上腕外側皮膚にMH800を貼付し、5秒後、1時間後、および6時間後に剥離した。MH-needlelessも同様に貼付し、6時間後に剥離した。

(3) 針部溶解性の観察

剥離したMH800の針部を実体顕微鏡 (SZX16; オリンパス) にて観察した。

(4) 皮膚水分蒸散量の測定

MH800の剥離から5秒後、17分後、30分後、および60分後に皮膚からの水分蒸散量 (transepidermal water loss; TEWL) を携帯型水分蒸散量測定装置 (Mobile Tewameter MSC100/TM30; Courage + Khazaka

electronic GmbH) により測定した。

B. 3. 3. MHのヒトにおける安全性評価

(1) MHの作製

B. 3. 1. (1)に準拠してMH300、MH500、MH800、およびMH-needlelessを作製した (Fig. 1)。

(2) MHの貼付

MHの貼付法はB. 3. 1. (2) に準拠した。健康男性被験者20名 (25歳~56歳) の上腕外側皮膚にMH300、MH500、MH800、およびMH-needlelessを6時間貼付した。本安全性評価の臨床研究スケジュールをTable 3にまとめた。

(3) 局所副作用の評価

MH貼付開始から2日後および3日後にMH適用皮膚局所を観察し、ICDRGの判定基準 (Table 4) に従った皮膚刺激性評価を実施した。また、17名の被験者においては皮膚局所反応として紫斑の有無も評価した。

(4) 全身性副作用の評価

MH貼付前ならびに貼付2日後に採取した血液を用いて血算検査 (ヘモグロビン、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、MCV、MCH、MCHC、血小板数)、生化学検査 (C-反応性蛋白; CRP、BUN、クレアチニン、AST、ALT、LDH、GGT) を行った。

(5) MH貼付時の疼痛評価

17名の被験者においては、MH貼付時の痛みを疼痛VAS (Visual Analogue Scale; 無痛を0、考え得る最大の痛みを100とする) により評価した。

B. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

B. 4. 1. MH構成成分のアジュバント効果

(1) OVA と MH 構成成分のワクチン投与

BALB/cマウス (H-2^d, 雌性, 6 週齢; 日本SLC) にOVA (2 µg; SIGMA-ALDRICH) とMH構成成分である医療用ヒアルロン酸ナトリウム (cHA; 0.01, 0.1, 1 mg)、ポリビニルピロリドン (PVP; 0.01, 0.1, 1 mg)、あるいはデキストラン (Dex; 0.01, 0.1, 1 mg) との混合液 50 µl を 2 週間隔で 2 回皮内注射投与した。

(2) OVA 特異的抗体価の測定

経日的にマウス尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpm で 15 分間遠心分離することで血清を得た。血清中のOVA特異的抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate buffer (pH 9.6) で 10 µg/mL に調製したOVAを 50 µL/well で 96-well ELISA plate に分注し、4°C で一晩静置することで固相化した。2% ブロックエース/PBS を 200 µL/well で添加し、37°C で 2 時間ブロッキング処理を行った。0.4% ブロックエース/TBST で連続 2 倍希釈したサンプルを 50 µL/well で添加し、室温で 2 時間反応させた。各wellをTBSTで3回洗浄し、0.4% ブロックエース/TBST を用いてメーカー推奨濃度に希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Southern Biotech) を 50 µL/well で添加した。室温で 2 時間反応させた後、各wellをTBSTで3回洗浄し、TMB溶液 (Moss Inc.) を 50 µL/well で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H₂SO₄ を 50 µL/well で添加して反応を停止し、吸光波長 450 nm、副波長 655 nm にて吸光度を測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率の逆数の対数を Reciprocal log₂ titer として表した。

B.4.2. 各種 Toll 様受容体リガンド (TLR-L) のアジュバント効果および安全性

(1) MH の作製

MH の無菌的作製はコスメディ製薬株式会社 に委託した。ヒアルロン酸ナトリウム/コラーゲン溶液と OVA 溶液ならびに各種 TLR-L 溶液を混合してマイクロニードル鑄型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより、OVA/TLR-L 装填 MH800 を作製した。これをアルミラミネート PET パックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。本研究で使用した TLR-L は、Pam3CSK4、LTA-SA、FSL-1、Poly(I:C)、MPLA、Flagellin、Imiquimod、ssRNA、ODN1826 (全て Invitrogen)、LPS (SIGMA-ALDRICH) の 10 種類である。また、OVA と CT (MLB) を混合装填した MH800 も同様に作製した (Table 5)。

(2) OVA/TLR-L 装填 MH800 のワクチン投与

作製したMH800 をC57BL/6 マウス (H-2^b, 雌性, 8 週齢; 日本SLC) の除毛した背部皮膚に6時間貼付した。2週間後にOVAのみを装填したMH800 を再度貼付した。なお、MHの貼付法はB.1.1.(3) に準拠した。また、OVA 50 µg と CT 1 µg との混合液 3 µL を点鼻投与し、粘膜免疫誘導のポジティブコントロール群とした。

(3) サンプルの回収

B.2.3.(3) に準拠して血清および糞便抽出液を回収した。

(4) OVA 特異的抗体価の測定

B.4.1.(2) に準拠して測定した。

(5) OVA 特異的サイトカイン (IFN-γ/IL-4) 産生細胞数の測定

最終免疫から 2 週間後に腋窩リンパ節、鼠径部リンパ節、および脾臓を摘出し、調製したリンパ節細胞ならびに脾細胞を 24-well plate に 2 × 10⁶ cells/mL/well で播種した。OVA を 1 mg/mL で添加して培養す

ることにより *in vitro* 抗原再刺激を行い、24 時間後に IFN- γ ELISPOT assay kit (BD Pharmingen) および IL-4 ELISPOT assay kit (BD Pharmingen) により、OVA 特異的 IFN- γ /IL-4 産生細胞数を測定した。

(6) 皮膚刺激性

B.1.1.(5) に準拠して、各種 MH800 をマウス背部皮膚に 6 時間貼付した際の剥離直後および 24 時間後の皮膚刺激性を評価した。

(7) 血清生化学的検査

最終免疫から 2 週間後に回収した血清中の glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 活性、glutamic pyruvic transaminase (GPT) 活性、およびクレアチニン濃度を、トランスアミナーゼ CII-テストワコー、クレアチニン-テストワコー (和光純薬) にて測定した。

B.4.3. MPLA および ODN1826 のアジュバント活性発現機序の解析

(1) マウスランゲルハンス細胞 (LC)、ケラチノサイト (KC)、および真皮樹状細胞 (dDC) の単離

除毛した C57BL/6 マウス (H-2^b, 雌性, 8 週齢; 日本 SLC) あるいは C3H/He マウス (H-2^k, 雌性, 8 週齢; 日本 SLC) の胴部皮膚ならびに耳介皮膚を採取した。耳介皮膚はピンセットを用いて軟骨の層を境に二層に分離した後、それぞれを 0.5% Dispase (Roche)/RPMI1640 (50 μ M 2-ME、10% FCS、0.1 mM NEAA、抗生物質を含む) に角質層が上になるように浮かべた。37°C で 3 時間インキュベーションした後、ピンセットを用いて角質層と生きた表皮 (表皮シート) を真皮層 (真皮シート) から分離した。

採取した表皮シートをピペッティングすることによって単細胞にし、セルストレイナー (pore size: 70 μ m) を通して表皮細胞懸濁液とした。

真皮シートについては、10 mL の 1% コラゲナーゼ (和光純薬)/PBS 中で細切し、37°C でスターラーを用いて 30 分間攪拌した。その後、ピペッティングにより組織を破碎し、40 mL の PBS を加えた後にセルストレイナー (pore size: 70 μ m) を通して真皮細胞懸濁液とした。表皮細胞懸濁液あるいは真皮細胞懸濁液を氷冷した 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA; SIGMA-ARDRICH) と 0.05% NaN₃ を含む PBS (Staining buffer) にて 1×10^7 cells/mL に調製し、ラット抗マウス CD16/CD32 (Fc γ RIII/II) 抗体 (clone 2.4G2; BD Pharmingen) を 100 μ g/mL で添加後、氷上で 20 分間インキュベーションした。

表皮細胞懸濁液については、FITC 標識抗マウス MHC class II 抗体 (clone 11-5.2; BD Pharmingen) を 50 μ g/mL で添加し、真皮細胞懸濁液については、APC 標識抗マウス CD11c 抗体 (clone N418; eBioscience) を 5 μ g/mL で添加して氷上で 20 分間静置した。その後、細胞を Staining buffer で洗浄し、FACS Aria II (BD) にて表皮細胞懸濁液から LC (MHC class II 陽性分画) および KC (MHC class II 陰性分画) を、真皮細胞懸濁液から dDC (CD11c 陽性分画) をソーティングした。

(2) TLR4 および TLR9 の発現確認

Staining buffer にて 1×10^7 cells/mL に調製した LC、KC、あるいは dDC 懸濁液に PE 標識抗マウス TLR4 抗体 (clone 6C2; eBioscience) を 5 μ g/mL で添加し、氷上で 20 分間静置した。一方 TLR9 発現の解析においては、細胞を Staining buffer で洗浄した後 Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen) に懸濁し、氷上で 20 分間放置することによって細胞膜透過処理を行った。その後、Perm/Wash buffer (BD Pharmingen) で細胞を洗浄し、PE 標識抗マウス TLR9 抗体 (clone

26C593.2; Imgenex) を 5 µg/mL で添加して、氷上で 20 分間静置した。

その後、細胞を Staining buffer にて洗浄し、7-AAD Viability Dye (Beckman Coulter) を添加することで死細胞を染色してから Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter) を用いてフローサイトメトリー (FCM) 解析した。

(3) TLR-L の LC、KC、および dDC に対する細胞傷害性

単離した LC、KC、および dDC を RPMI1640 (50 µM 2-ME、10% FCS、0.1 mM NEAA、および抗生物質を含む) で懸濁し、 10^4 cells/well で 96-well plate に播種した。各 well に OVA (終濃度: 10 µg/mL) と MPLA (Invivogen; 終濃度: 1、10、100 µg/mL) あるいは ODN1826 (Invivogen; 終濃度: 1、10、100 µg/mL) を添加し、24 時間培養後に細胞生存率を Crystal Violet 染色法ならびに WST-8 (ナカライテスク) assay により評価した。

(4) LC および dDC の表面マーカー発現解析

単離した LC および dDC を RPMI1640 (50 µM 2-ME、10% FCS、0.1 mM NEAA、および抗生物質を含む) で懸濁し、 5×10^5 cells/well で 24-well plate に播種した。各 well に MPLA あるいは ODN1826 を終濃度 10 µg/mL で添加し、24 時間培養後、回収した細胞を Staining buffer で 1×10^7 cells/mL に調製した。ラット抗マウス CD16/CD32 (FcγRIII/II) 抗体 (clone 2.4G2) を 100 µg/ml で添加後、氷上で 20 分間インキュベーションした。続いて PE 標識ラット抗マウス CD40 抗体 (clone 1C10; eBioscience)、PE 標識ラット抗マウス CD197 (CCR7) 抗体 (clone 4B12; eBioscience)、APC 標識ハムスター抗マウス CD80 (B7-1) 抗体 (clone 16-10A1; BioLegend)、APC 標識ラット抗マウス CD86

(B7-2) 抗体 (clone GL1; BioLegend)、PE 標識マウス抗マウス MHC class I (H-2K^b) 抗体 (clone AF6-88.5; BD Pharmingen)、PE 標識マウス抗マウス MHC class I (H-2K^k) 抗体 (clone 36-7-5; BD Pharmingen)、eFluor 780 標識ラット抗マウス MHC class II (I-A^{b,d,q}/I-E^{d,k}) 抗体 (clone M5/114.15.2; eBioscience)、あるいは PE 標識マウス抗マウス MHC class II (I-A^k) 抗体 (clone 11-5.2; BD Pharmingen) をそれぞれ 5 µg/ml で添加し、氷上で 20 分間静置した。その後、細胞を Staining buffer にて洗浄し、Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter) を用いて FCM 解析した。

(5) LC、dDC、および KC のサイトカイン産生量の測定

単離した LC および dDC を RPMI1640 (50 µM 2-ME、10% FCS、0.1 mM NEAA、および抗生物質を含む) で懸濁し、 5×10^5 cells/well で 24-well plate に播種した。各 well に MPLA あるいは ODN1826 を終濃度 10 µg/mL で添加し、500 µL/well で 24 時間培養した。培養上清を回収し、TNF-α、IL-1β、IL-6、および IL-12 濃度を ELISA 法により測定した。

(倫理面への配慮)

本研究課題における動物実験はすべて大阪大学における動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて研究計画を立案し、動物実験委員会の審査・承認を得て行う。

また、本研究課題における臨床研究の実施に当たっては、大阪大学医学部医学倫理委員会および大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の審査・承認を受け、被験者に対するインフォームド・コンセントを書面で行う。臨床研究により取得した被験者の個人情報 は 厳重に保管・管理し、成果発表においても個人が特定されること

のないよう十分に配慮する。

C. 研究結果

C. 1. 各種MHの物理化学的特性解析

C. 1. 1. 各種MHの皮膚穿刺特性

テクスチャーアナライザーを用いて各種MHにステンレス製の円盤を一定の速度で押し当てていくと、微小針が折れることによって負荷が急激に低下するポイントが認められる (Fig. 4)。このポイントにおける負荷を針の強度として表わすと、MH500およびMH800における微小針1本あたりの強度はそれぞれ 0.21 ± 0.02 N および 0.29 ± 0.05 N であった (Table 6)。

次にマウスおよびラットの皮膚に各種MHを貼付した際の針部溶解性を経時的に観察したところ、MH200およびMH300については貼付5分後に針先端部が完全に溶解し、貼付60分後にはコニーデ型針部の根元のところまでほとんど溶解していた (Fig. 5)。MH800については、貼付5分後において針の半分程度が溶解し、貼付60分後には針の根元まで完全に溶解した。

続いて、各種MHの皮膚刺激性を評価した。MH200およびMH300を貼付したラット皮膚では、剥離直後においてもほとんど紅斑は認められなかった (Fig. 6A)。MH800を適用した皮膚においては、剥離直後に軽度の紅斑が認められたが、これらの紅斑は72時間後には全例で消失した (Fig. 6B)。また、いずれのMHを適用した皮膚についても浮腫はみとめられなかった。

MHは微小な針が角質層に孔をあけるため、皮膚のバリア機能への影響が懸念される。そこで、皮膚の電気抵抗値を指標に皮膚バリア機能を評価した (Fig. 6C)。いずれのMHにおいても剥離直後には皮膚の電気抵抗値に低下が認められ、針の穿刺に伴う一時的なバリア機能の障害が示唆された。しかし、MHの剥離から2時間経過した皮膚では、貼付前と同等の電気抵抗値を示したことから、角質層の穿刺孔は比較的速やかに閉じ

て元の皮膚状態に回復することが示唆された。一方、テープストリップ処理により角質層を物理的に除去した皮膚の電気抵抗値は剥離後著しく低下し、その後24時間以内に回復することはなかった。

C. 1. 2. 各種MHの皮膚内物質送達特性

マウス背部皮膚にMH200を貼付した際には、FITC-OVAならびにFITC-SP由来の蛍光が生きた表皮の下部で観察され、MH300、MH800を貼付した際は、両物質由来の蛍光が生きた表皮から真皮にかけて確認された (Fig. 7A)。一方、ラット背部皮膚にMH200あるいはMH300を貼付した際は、生きた表皮の下部にFITC-OVAおよびFITC-SP由来の蛍光が認められ、MH800を貼付した際には両物質由来の蛍光が生きた表皮から真皮にかけて観察された (Fig. 7B)。

続いて、FITC-OVA装填MHをマウス背部皮膚に種々の時間貼付し、皮膚内におけるFITC-OVAの局在を観察したところ、貼付3時間後ではいずれのMHにおいてもFITC-OVAは多少の拡散は認められるもののニードルが穿刺された周囲に存在していた (Fig. 8)。貼付6時間後においても同様にニードルが穿刺された周囲に蛍光が観察され、さらに12時間、24時間と貼付時間を延長すると、観察される蛍光強度は減弱していくものの、依然として穿刺部位付近に留まっていた。

また、FD4装填MHを貼付した皮膚をin vivoイメージング装置で観察すると、剥離直後においてはドット状に蛍光が観察された (Fig. 9)。MH200を適用した皮膚においては剥離してから2日後まで、MH300およびMH800を適用した皮膚においては剥離してから4日後まで貼付部位にFD4由来の蛍光が検出された。一方、FD4を皮内注射投与すると、投与直後においては投与量依存的に強い蛍光が観察されたが、10 μ g、1 μ gを投与した皮膚では投与1日後には蛍光がほぼ観

察できず、最も強い蛍光が観察された100 µgのFD4を投与した皮膚においても2日後にはほぼ消失した。

C. 1. 3. MH の物理化学的特性に与える湿度の影響

MHは水分を吸収することによって溶解するため、その保管においては空気中の水蒸気が製剤の安定性に影響すると考えられる。そこで、湿度とMH800の水分活性ならびに針部強度との関係を検討した。種々の湿度条件に1週間静置したMH800の水分活性は、保管環境の湿度が上昇するにつれて増加し、75%の調湿条件下のMH800は作製直後のMH800と比較して約2倍の水分活性を有していた (Fig. 10A)。また、湿度が0%あるいは11%という乾燥した環境下で保管したMH800の水分活性は作製直後のMH800と比べて低下した。次に、これらMH800の針部強度を測定したところ、保管環境の湿度が上昇するにつれて低下する傾向を示し、最も水分活性が高くなった湿度75%条件下で保管したMH800は作製直後のMH800と比較して針部強度が約半分にまで低下していた (Fig. 10B)。

C. 1. 4. MH の長期保存性

空気中の水蒸気を遮断できるアルミラミネートPETパックで包装したTT/DT装填MH800を4°C、25°C、あるいは40°Cという温度条件において6ヶ月間あるいは12ヶ月間保存した後の微小針の形状と溶解性を観察した (Fig. 11)。保存前と比較して、いずれの温度条件で保管しても微小針の形状に変化はなかった。また、どのMH800も保管前のTT/DT装填MH800と同様に貼付5分後には微小針の半分が溶解し、1時間後には根元まで完全に溶解した。

次に、MHに装填したTT/DTの抗原性の維持を調べるために、各温度条件で保管した

TT/DT装填MH800を貼付したラットの抗トキソイド抗体価を測定した。その結果、6ヶ月間あるいは12ヶ月間保管のいずれのTT/DT装填MH800でも保存前のTT/DT装填MH800と同様の抗体産生プロファイルを示した (Fig. 12)。また、いずれのTT/DT装填MH800で免疫した群も、致死量の破傷風毒素投与に対する耐過試験において全例が生存した (Table 7)。

C. 2. インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性・安全性評価 (前臨床研究)

C. 2. 1. 三価季節性インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性評価

三価季節性インフルエンザHA抗原を装填したMH800にて経皮ワクチンしたマウスにおいては、三価HA抗原それぞれに対して特異的なIgG抗体の産生が血清中に検出された (Fig. 13)。また、それらの抗体価は筋肉内注射免疫群 (Alum併用)、皮内注射免疫群 (Alum併用)、および経鼻免疫群 (CT併用) の抗体価と比較して同等もしくはそれ以上であり、アジュバントを併用しなかった筋肉内注射免疫群、皮内注射免疫群、および経鼻免疫群の抗体価と比較すると明らかに高値を示した。また、最終免疫から16週間後 (初回免疫から20週間後) においても高い抗体価が維持されており、MHを応用した経皮ワクチンによってインフルエンザHA抗原に対する長期的な免疫を獲得できることが明らかとなった。

次に、産生された抗HA抗体のHI価を測定したところ、MH800を応用した経皮免疫群のHI価は160以上であり、筋肉内注射免疫群およびアジュバントを併用した皮内注射免疫群と比較して同等もしくはそれ以上であった (Fig. 14)。したがって、MH800を用いた経皮ワクチンによってインフルエンザウイルスの感染に必要なHAの活性を中和できる抗体が誘導されることが示された。

続いて、最終免疫から16週間後の鼻腔洗浄液、唾液、および膣洗浄液中のHA特異的IgA抗体価を測定した。その結果、経鼻免疫群（CT併用）においては粘膜面での高い抗HA IgA抗体産生が検出されたが、経皮免疫群をはじめとする他の免疫群においてはIgA抗体産生がほとんど認められなかった（Fig. 15）。また、糞便抽出液中のHA特異的IgA抗体価を測定したところ、どの免疫群においても抗体価はReciprocal log₂ titerで5程度であり、経鼻免疫群（CT併用）においても他の粘膜組織由来サンプル中におけるIgA抗体価と比べて低かった（Fig. 16）。血清中のIgA抗体価については、経鼻免疫群（CT併用）では最終免疫から2週間後にピークを迎えたのに対し、MHを用いた経皮免疫群をはじめとする他の免疫群は経日的に上昇する傾向にあり、糞便抽出液中と血清中のIgA抗体産生プロファイルに相関は認められなかった。

さらに、産生されたHA特異的IgG抗体のサブクラス解析を行ったところ、経皮免疫群におけるIgG2a抗体（Th1型）とIgG1抗体（Th2型）の産生比率は他の免疫群と比較して明らかな差異は認められなかった（Fig. 17）。

C.2.2. A/PR/8/34 (H1N1) 株由来インフルエンザ HA 抗原を装填した経皮ワクチン製剤の有効性評価

A/PR/8/34 (H1N1) 株由来のインフルエンザHA抗原とウイルスを用いて、MHを応用した経皮ワクチン製剤の感染防御効果を検討した。経皮免疫群における血清中抗原特異的IgG抗体価を測定したところ、筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）を上回る値が検出された（Fig. 18A）。また、誘導された抗体のHI価も経皮免疫群では筋肉注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）と比較して高い値を示した（Fig. 18B）。次に、

最終免疫から2週間後に回収した血清、糞便抽出液、鼻腔洗浄液、唾液、膣洗浄液中のHA特異的IgA抗体価を測定したところ、経鼻免疫群（CT併用）では全てのサンプルにおいて抗体価の上昇が確認できた（Fig. 19）。一方、経皮免疫群および筋肉内注射免疫群においては、各サンプルのHA特異的IgA抗体価は経鼻免疫群（CT併用）よりも明らかに低い、もしくは検出限界以下であった。さらに、最終免疫から2週間後の血清中に含まれるHA特異的IgG抗体のサブクラス解析を行ったところ、経皮免疫群と筋肉内注射免疫群は、Th1型のIgG2a抗体価よりもTh2型のIgG1抗体価が高く、経鼻免疫群（CT併用）はIgG1とIgG2aの抗体価が同程度であった（Fig. 20）。

続いて、最終免疫から2週間後に、これら免疫マウスにA/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルスを経鼻接種し、その後の状態観察および感染防御能評価を行った。経皮免疫群および経鼻免疫群（CT併用）においては接種1日後から3日後にかけて軽度の体重減少が認められたが、観察終了時の6日後においては接種3日後の体重と比べて維持、または若干の増加傾向を示した（Fig. 21）。接種3日後までの体重の減少は、ウイルス接種前の体重の10%以内の減少であった。これに対して、経皮プラセボ群ではウイルス接種後から体重が減少し続け、接種4日後には10例中1例が死亡し、接種6日後には接種前の体重から30%も減少していた。さらに一般状態を観察した結果、経皮プラセボ群では被毛状態の悪化および行動やその他の症状の悪化が観察され、接種6日後における一般状態が中程度から重度であったのに対し、経皮免疫群ならびに経鼻免疫群（CT併用）では被毛状態の悪化、およびその他の症状が観察されたのみであり、軽度のスコア上昇であった（Fig. 22）。筋肉内注射免疫群は被毛状態の悪化が認められたが、