

その他の症状は観察されず、経皮免疫群ならびに経鼻免疫群（CT併用）と比較して低いスコアであった。また、肺中のインフルエンザウイルス量をプラークアッセイ法により測定した結果、経皮免疫群、筋肉内注射免疫群、および経鼻免疫群（CT併用）では検出限界以下であった（Fig. 23）。したがって、経皮免疫により誘導されたHA特異的抗体はインフルエンザウイルスに対する感染阻止活性を有しており、インフルエンザの発症予防に効果的であることが示された。

また、インフルエンザの合併症として起こりやすい肺炎について、ウイルス接種6日後に各群における肺重量測定および肺炎スコア評価により検討した。経皮免疫群の肺重量は筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）の肺重量と同程度であり、経皮プラセボ群の肺重量はそれらと比較して顕著な増加が認められた（Table 8）。肉眼的所見においては、経皮免疫群で10例中9例、筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）では全例にConsolidation（硬化および浸潤影）は認められずスコアは1付近であった。一方、経皮プラセボ群では全例でConsolidationが観察され、スコアが3または4付近と高かった（Table 9）。さらに、肺の病理組織学的検査により肺炎の程度を気管支肺炎と間質性肺炎に分類して評価し、平均スコアを比較した。筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）では経皮プラセボ群よりも有意にスコアは低く、経皮免疫群では有意差こそ認められなかったものの明らかに炎症は抑制される傾向にあった（Fig. 24）。これらの結果から、MHを用いたインフルエンザ経皮ワクチンは注射ワクチンおよび経鼻ワクチンと同様にインフルエンザウイルスの感染に対して優れた発症予防効果を発揮できることが実証された。

C. 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

インフルエンザパンデミック時に必要とされるワクチン抗原の大量製造にも対応し得るH5N1組換え型HA蛋白質を抗原とするインフルエンザ経皮ワクチンの有効性を検討した。MH800を用いて経皮免疫したマウスの血清中HA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筋肉内注射免疫群（Alum併用）に匹敵する高値が検出された（Fig. 25）。また、これらの免疫群と比較すると、MH300を用いた経皮免疫群の抗体価はわずかではあるが低値を示した。一方、経鼻免疫群についてはアジュバントとしてCTを併用した場合においてもHA特異的IgG抗体はわずかしか誘導されなかった（Fig. 26）。

次に、血清中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との間にIgG2a（Th1型）/IgG1（Th2型）バランスの明らかな差異は認められなかった（Fig. 26）。なお、経鼻免疫群はCTを併用した場合においてもIgGサブクラスの抗体価は検出限界以下であった。また、免疫したマウスの脾細胞における抗原特異的IFN- γ /IL-4産生を評価したところ、MH800を応用した経皮免疫群では筋肉内注射免疫群（Alum併用）と同様にIFN- γ の高い産生が認められた（Fig. 27）。一方、IL-4産生に関しては、全ての免疫群において検出限界以下であった（data not shown）。この結果は、MH800を応用した経皮免疫群と筋肉内注射免疫群（Alum併用）で誘導される免疫応答が他の免疫群のそれと比較してTh1偏向性であることを示唆しているが、前述のIgGサブクラス解析の結果とは矛盾が認められる。Th1/Th2免疫応答バランスについては様々な免疫イベントが複雑に関与していることから、今後MHを応用した経皮ワクチン製剤の免疫誘導メカニズムについて

より詳細な検討が必要とされる。

C. 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）

C. 3. 1. 針到達深度の解析

MH500あるいはMH800をヒト皮膚に貼付して5秒後に剥離し、共焦点レーザー生体顕微鏡によりMH適用部位の皮膚を観察した（Fig. 28）。皮膚表面には穿刺孔が鮮明に観察され、皮膚断面画像では少なくとも深さ100 μm まで針部の到達が確認された。ヒト皮膚では角質層が10~20 μm 、生きた表皮が約200 μm の厚さであることから、MHのニードルはヒト皮膚においても装填された抗原を角質層下の生きた表皮に送達可能であることが示された。また、MH貼付時間の延長に伴ってこれらの穿刺孔は塞がる傾向が認められた（Fig. 29）。したがって、MHを数時間適用した皮膚においてはバリア機能の破壊や二次感染の危険性を考慮する必要はほとんどないことが示唆された。

C. 3. 2. 針部溶解性ならびに皮膚水分蒸散量の評価

MHは皮膚内で針部が溶解することによって、装填した抗原を経皮送達できるように設計されていることから、ヒト皮膚における微小針の溶解性を検証した。MH800を1時間貼付すると、3名の被験者のうち2名では針部が根元近くまで溶解し、残りの1名では針部は半分程度溶解した（Fig. 30）。また、6時間貼付すると全ての被験者で針部全体の溶解が確認された。したがって、針部溶解に要する時間には個人差が認められたものの、臨床研究での安全性評価におけるMHの貼付時間は6時間が妥当であろうと判断した。

MHは角質層に直接孔を開けることから、皮膚バリア機能への影響が懸念される。そこで、皮膚水分蒸散量を指標に角質層のバ

リア機能を評価した。MH800剥離直後の皮膚では水分蒸散量が顕著に増加しており、角質層を貫通した穿刺孔による影響が考えられた（Fig. 31）。その後、剥離部位の水分蒸散量は時間経過とともに徐々に低下し、皮膚バリア機能の回復、すなわち、穿刺孔の閉塞が確認された。さらに、5秒間貼付あるいは1時間貼付と比較して、6時間貼付では水分蒸散量が全体的に小さく、長時間貼付することでニードルが完全に溶解し、貼付中すでに穿刺孔の閉塞が始まっているものと推察された。

C. 3. 3. MHのヒトにおける安全性評価

各種MHを6時間貼付して剥離した2日後の皮膚を観察すると、MH300適用では被験者20名中1名、MH500適用では12名、MH800適用では13名において、わずかな紅斑を認めた（Table 10）。しかし、これら軽度の局所反応はほとんどの被験者において1週間以内に消失し、1ヶ月後には全ての被験者で元の皮膚状態に回復した。また、針が長いMH500およびMH800の貼付では、毛細血管の傷害に伴う血色素漏出（紫斑）が3日後におよそ半数の被験者に認められた。しかし、軽度の色素沈着が残存した1名を除き、遅くとも1ヶ月後には元の皮膚状態に回復した。したがって、MHの貼付は一過性の弱い皮膚刺激を伴うのみであり、重篤な局所反応を惹起しないことが明らかとなった。

また、MH貼付前後でいずれの被験者の血液検査値にも明らかな差異は無く、顕著な全身性の副作用は認められなかった。

さらに、MH貼付時における痛みを17名の被験者においてVASにより評価した。VASスコアについてSteel-Dwass法による多重比較を行った結果、MH-needleless、MH300、MH500、MH800の間で大きな差異は認められなかった（Table 11）。MH-needlelessにおいてもVASスコアの上昇が観察されたのは、

貼付時のバネ式アプリーケーターの打撃による影響と考えられるが、そのスコアは最大の痛みを100とするVAS評価において軽微であった。したがって、MHの皮膚への貼付において針部の穿刺に伴う痛みはほとんどないことが示された。

C. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

C. 4. 1. MH 構成成分のアジュバント効果

MH800の針部容量が約1.2 μ Lであることを考慮すると、MH構成成分の皮膚内に注入される最大量は1 mg程度と考えられる。そこで、各成分0.1~1 mgとOVAを混合して皮内に注射投与したところ、いずれの群においてもOVA単独免疫群と比較して血清中抗OVA IgG抗体価に有意な上昇は認められなかった (Fig. 32)。したがって、MH構成成分は顕著なアジュバント活性を持たないことが示された。

C. 4. 2. 各種 TLR-L のアジュバント効果および安全性

各種 TLR-L と OVA を混合して装填したMH800をマウスに貼付したところ、MPLAあるいはODN1826を併用した群においてOVA単独免疫群よりも高い血清中抗OVA IgG抗体価が検出された (Table 12)。特にMPLA併用群に関しては1回免疫後 (Day 13) の時点で、OVA単独免疫群の2回免疫後 (Day 27) の抗体価に匹敵する高値を示した。また、MPLAあるいはODN1826を混合したMH800に装填されているOVA量は、OVAを単独で装填したMH800の7割程度であったことを考え合わせると、これら2種類のTLR-Lは経皮ワクチン製剤用アジュバントの候補物質として極めて有望である。

続いて、TLR-Lを併用することにより誘導されるIgG抗体のサブクラスを2回免疫後 (Day 27) の血清を用いて解析した。そ

の結果、Th2型抗体であるIgG1の抗体価は各群とも高値を示しており顕著な差は認められなかった。一方、Th1型抗体であるIgG2b抗体に関しては、MPLAあるいはODN1826を併用した群で著しい産生増強が認められた。また同様にTh1型抗体であるIgG2c抗体に関しては、Poly (I:C)、MPLA、Flagellin、Imiquimod、ssRNA/LyoVec、あるいはODN1826併用群でのみ産生が検出され、特にMPLAあるいはODN1826を併用した群で高い抗体価を示した。さらに、TLR-Lの併用による粘膜免疫応答への影響を検討すべく各免疫マウスの粘膜組織におけるOVA特異的IgA抗体価を測定したところ、いずれのTLR-Lを併用した群においても検出限界以下であった (Table 12)。

次に、経皮ワクチンにおいて最も副反応の影響が懸念される皮膚局所における刺激性を評価した。初回免疫時におけるMH800剥離直後に皮膚を観察したところ、全群で軽度の紅班が認められたが、LPS併用群、ssRNA/LyoVec併用群およびCT併用群以外のTLR-L併用群では24時間以内にそれらの局所反応は消失した (Fig. 33)。また、LPS併用群およびssRNA/LyoVec併用群で観察された紅班もMH剥離から48時間後には消失した。したがって、今回MH800に装填したTLR-Lの用量においては、経皮ワクチン用アジュバントとして適用した際に重篤な皮膚局所反応を誘発しないことが示された。

そこで次に、アジュバント候補物質として有望なMPLAあるいはODN1826を併用した際の免疫応答特性を評価するために、最終免疫から2週間後のリンパ組織におけるOVA特異的IFN- γ /IL-4産生細胞数を解析した。MPLA併用群あるいはODN1826併用群においては、所属リンパ節ならびに脾臓のどちらにおいても、OVA単独免疫群と比較してIFN- γ 産生細胞数は明らかな増加を示し

た (Fig. 34)。一方、IL-4 産生細胞数については MPLA 併用群、ODN1826 併用群、OVA 単独免疫群の間で大きな差は認められなかった。

続いて、MPLA あるいは ODN1826 併用に伴う全身性の副反応についても検討した。各群の体重推移をモニタリングしたところ、いずれの群においても無処理群のマウスと同様の体重増加曲線を示した (Fig. 35A)。また、主要臓器の重量についても顕著な差は認められず (Fig. 35B)、血清中 GOT 活性、GPT 活性、クレアチニン濃度に関して各群とも正常値範囲内であった (Fig. 35C)。したがって、MH800 に装填して経皮投与した MPLA と ODN1826 は、アジュバント活性を発揮した用量において重篤な全身性副反応を誘発しないことが示された。

C. 4. 3. MPLA および ODN1826 のアジュバント活性発現機序の解析

抗原特異的免疫応答の誘導には抗原提示細胞による抗原捕食とそれに続く T 細胞への抗原提示が必要となる。経皮免疫においては、皮膚特有の抗原提示細胞として生きた表皮に LC が、真皮には dDC が存在する。さらに、生きた表皮の約 95% を占める KC は サイトカインやケモカインを産生することにより炎症反応や免疫応答の誘導に大きく関与すると言われている。そこで、これらの細胞に対する MPLA と ODN1826 の作用を解析すべく、それぞれの標的 TLR である TLR4 と TLR9 の発現を FCM 解析により確認した。C57BL/6 マウスおよび C3H/He マウスの両系統において LC、KC、dDC に TLR4 および TLR9 の発現が認められた (Fig. 36)。C3H/He マウスは TLR4 遺伝子の細胞質内領域に点突然変異 (コドン 712 のプロリンのヒスチジンへの置換) があるために、TLR4 のリガンドに対する感受性が低いことが知られているが、TLR4 を蛋白質として発現しているこ

とが確認された。

次に、MPLA と ODN1826 の LC、KC、dDC に対する細胞傷害性を検討したところ、いずれも 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度範囲であれば細胞生存率に影響を与えなかった (Fig. 37)。

抗原提示細胞による T 細胞への抗原提示は MHC 分子を介して抗原情報を伝達するが、このイベントには MHC 分子による TCR を介したシグナルだけでなく、細胞表面の共刺激分子を介した補助シグナルが必要である。そこで LC や dDC 上のこれら T 細胞への抗原提示に必要な分子の発現に及ぼす MPLA および ODN1826 の影響を解析した。C57BL/6 マウス由来の LC と dDC に MPLA あるいは ODN1826 を作用させると、共刺激分子である CD40 や CD80/86、MHC class I/II、さらには抗原提示細胞のリンパ節遊走に必須な CCR7 の発現上昇が認められた (Fig. 38)。

一方、C3H/He マウス由来の LC および dDC を用いた場合には、ODN1826 の作用による各種分子の発現上昇パターンは C57BL/6 マウス由来の細胞と同様であったが、MPLA を作用させても各種分子の発現レベルは vehicle 群と同程度であった。

続いて、C57BL/6 マウス由来の LC、dDC、および KC に MPLA あるいは ODN1826 を作用させた際のサイトカイン産生量を測定したところ、Vehicle 群と比較して LC および dDC からは TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12 の高い産生が認められた (Fig. 39)。MPLA 作用群と ODN1826 作用群とを比較すると、TNF- α 、IL-1 β に関しては MPLA を作用させた場合の方が高い産生量を示し、IL-12 は ODN1826 を作用させた場合の方が明らかに高値を示した。KC については LC や dDC ほど劇的ではないものの、MPLA あるいは ODN1826 の作用によって TNF- α 、IL-1 β 、および IL-6 の産生が増強した。一方、C3H/He マウス由来の LC、dDC、および KC を用いた場合には、やはり MPLA の作用はキャンセルされてサ

イトカイン産生量は Vehicle 群と同等であった。

以上の結果から、MPLAとODN1826のアジュバント活性にはLCやdDCの活性化および成熟化の促進が寄与しており、少なくともMPLAの作用発現がTLR4を介したシグナルに依存することが示された。

D. 考察

D.1. 各種 MH の物理化学的特性解析

皮膚の免疫系においては角質層下の生きた表皮および真皮にそれぞれ常在する LC および dDC が抗原提示細胞として重要な役割を果たしており、これらが経皮ワクチンにおける抗原送達標的細胞である (*Immunol. Res.* **36**, 127-136, 2006)。しかし、皮膚最外層の角質層は物質透過に対するバリアとして働くため、ワクチン抗原を単に皮膚表面に塗布するだけでは角質層下へと抗原をデリバリーすることが困難である (*Nat. Biotechnol.* **22**, 165-167, 2004)。そこで、痛みを伴うことなく角質層を物理的に突破して皮膚組織内へ効率よく物質をデリバリーできるマイクロニードルが、経皮ワクチンにおける有望な抗原送達デバイスとして注目されてきた (*Expert Rev. Med. Devices* **8**, 459-482, 2011)。しかしながら、従来のチタン、ステンレス、あるいはシリコンを素材とするマイクロニードルは、皮膚に適用した際のアレルギー反応や折れた微小針が皮膚組織内に残留する危険性が指摘され、未だ経皮ワクチンデバイスとして臨床応用された例はない。

この点に関して我々が独自に開発した MH は、皮膚構成成分であるヒアルロン酸を主素材としているため生体適合性に優れるとともに、微小針が皮膚内の水分で溶解するため皮膚内での折れ残りを心配する必要のない、安全面において非常に優れた次世代型マイクロニードルである。また、MH は微小針に装填できるサイズであれば、物質の性状がいかなるものであろうと角質層下の生きた表皮および真皮にまで装填物質をデリバリーすることができる。現在のワクチン製剤に使用されている抗原が可溶性蛋白質、病原体構成コンポーネント、無毒化・弱毒化病原体、など多岐にわたることを考慮すると、MH はワクチンデバイスとして極

めて汎用性に優れることが期待される。さらに、MH は低温温度管理を要することなく、湿気を遮断できる包装を施すことで微小針の強度や剛性ならびに装填した抗原の活性を長期にわたって維持できる。この点は、生産から使用に至るまで一貫した冷蔵管理が必要とされる従来の注射ワクチン製剤と比較して、ワクチンの普及ならびに備蓄の観点で大きな優位性となる。

免疫応答を増強する手段の一つに投与抗原の局所滞留性を向上させることが挙げられるが (*Nature Rev. Microbiol.* **5**, 505-517, 2007)、MH を用いた経皮投与は従来の注射投与と異なり、抗原を数日間皮膚組織内に滞留させる効果があることが示唆され、MH による経皮ワクチンがアジュバントを併用せずとも比較的強力な免疫応答を誘導できる要因の一つとして考えられる。また、MH は針長を種々改変することで装填した抗原の皮膚内送達部位を変更できる。生きた表皮、真皮にはそれぞれ異なる免疫応答を誘導する細胞群が存在することが示唆されているため (*Immunity* **35**, 260-272, 2011)、抗原の送達部位をコントロールできる MH は、種々の感染症に応じて好適な免疫応答を誘導しうる可能性を有している。今後、針長に付随する免疫応答特性を評価し、この可能性の検証を進める予定である。

D.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)

インフルエンザワクチンは病原体であるインフルエンザウイルスが容易に変異することから、毎年接種することが推奨されている。したがって、現行の注射型ワクチンよりも接種が簡便で注射針やシリンジといった医療廃棄物がでない経皮ワクチン製剤の開発が待望されている。

今回、インフルエンザ HA 抗原を装填した

MH 製剤を用いてマウスに経皮ワクチンしたところ、HA 抗原特異的な抗体産生が誘導されるとともに、インフルエンザウイルスに対する感染阻止活性が認められた。これまでに、Sullivan らが溶解型マイクロニードルを用いたインフルエンザワクチンの有効性を報告しており (*Nat. Med.* **16**, 915-920, 2010)、インフルエンザ不活化抗原 6 μg を経皮投与することで抗体産生の誘導ならびに感染防御効果を確認している。これに対して我々は、三価季節性インフルエンザ HA 抗原は各 0.2 μg 、A/PR/8/34 (H1N1) 株由来インフルエンザ HA 抗原は 0.4 μg という比較的少量の抗原を装填した MH を用いて十分な有効性を引き出すことができた。このように我々独自の MH を応用した経皮ワクチン製剤は、装填抗原量を低減しても高いワクチン効果を誘発することが可能であり、製品化・実用化におけるコスト削減の面で有利性を持つと考えられる。

今回、A/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルスを用いた感染実験において、経皮免疫によって誘導された HA 特異的抗体が HA 活性を中和し、インフルエンザウイルスの感染を阻止したものと考えられた。しかし、病理組織学的検査の気管支肺炎の項目において、経皮免疫群はプラセボ群と同程度のスコアであり、筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群のスコアは有意に低かった。経皮免疫群において肺中ウイルス量はその他の免疫群同様に検出限界以下であり、インフルエンザウイルス感染による肺炎の可能性は低いと考えられるが、詳細については今後の検討課題である。

毎冬に流行する季節性インフルエンザは、弱毒性のインフルエンザウイルスによるものであり、ワクチン投与やノイラミニダーゼ阻害薬により症状の重篤化を抑えることが可能である。近年、高病原性インフルエンザウイルスのヒトへの感染が散発的に発

生しており、一旦ヒト-ヒト感染が起これば社会・経済に大打撃を与えるパンデミックとなることは明らかである (*N. Engl. J. Med.* **352**, 333-340, 2005)。そのため、短時間で大量にワクチン抗原を製造できる体制の整備とそのワクチン抗原を迅速に大規模接種できる手法の開発が望まれる。そこで我々は、簡便性・普及性に優れ、大規模接種に対応し得るデバイスである MH に、遺伝子工学的技術により作製された H5N1 組換え型 HA 蛋白質をワクチン抗原として装填し、その経皮免疫によってマウス血清中に HA 特異的抗体産生が誘導されることを示した。同様に Weldon らも、抗原を微小針表面にコーティングしたマイクロニードルを用いて、組換え型 HA 抗原の免疫応答誘導能を検証している (*Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 647-654, 2011)。しかし彼らの報告では、組換え型 HA 抗原を三量体として安定化することで抗原性の向上を図っており、組換え型 HA 抗原単独投与 (3 μg) では後に症状の回復は認められるものの、抗体産生は低く、顕著な感染防御効果は得られていない。我々の検討ではわずか 0.05 μg の投与において、注射免疫群との比較ではあるが、抗体産生は同程度であることを確認している。今後は、経皮ワクチンに適したアジュバントを探索し、組換え型蛋白質を用いたワクチンの更なる有効性増進を目指していく予定である。また、針長が短い MH300 を用いた経皮免疫では、抗体産生や IFN- γ 産生量の低下が認められており、経皮投与による抗原送達部位の違いが免疫応答特性に影響を与えることが示唆された。今後は、経皮免疫誘導機構の解明を積極的に進めていき、経皮ワクチン製剤の有効性向上を図りたいと考えている。

また、インフルエンザウイルスは気道粘膜から感染することから、粘膜面でウイルス感染を防御する IgA 抗体を誘導すること

は重要である。さらに、交差感染防御能に優れている IgA 抗体は変異体の多いインフルエンザウイルスに対して有利に働くと考えられ、その誘導が望まれる。今回、MH を応用した経皮免疫群においては明らかな IgA 抗体の産生増強は認められなかった。従来の注射型ワクチンでは粘膜免疫を誘導できないことから、現在のワクチン研究領域では抗原を粘膜面に直接投与できる経鼻ワクチンや経口ワクチンの開発が積極的に進められている (*Expert Rev. Vaccines* 8, 1083-1097, 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8794-8799, 2010)。しかし、経鼻ワクチンにおいては強い副反応を示す CT を併用しなければ満足な免疫応答を誘導できず、また経鼻投与による脳への薬物送達の影響が懸念される (*Nat. Mater.* 9, 572-578, 2010) など、臨床適用へのハードルは高いのが現状である。経口ワクチンでは腸管で粘膜免疫誘導を司るパイエル板へと抗原を届ける必要があるが、消化管においては抗原が消化酵素による分解や酸による変性を受ける可能性があるため、開発は困難となっている。この現状を踏まえて、今後 MH にアジュバントを装填することで、粘膜免疫応答をも誘導可能な経皮ワクチン製剤の開発を推進する必要がある。

D. 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)

経皮ワクチン製剤はその簡便性・普及性から開発途上国において、さらには大規模接種にも対応し得ることから先進国においても、有用な新規ワクチン製剤として期待されている。また、皮内投与がこれまで臨床で実施されてきた皮下注射や筋肉内注射と同等以上の免疫応答を誘導し、経皮投与がワクチン効果を高める可能性が示唆されている (*N. Engl. J. Med.* 351, 2295-2301, 2004)。最近、皮内マイクロインジェクション

デバイスとして開発された Soluvia™ (Becton Dickinson: *Vaccine* 25, 8833-8842, 2007) を用いた三価季節性インフルエンザワクチン製剤、Intanza®/IDflu® (Sanofi Pasteur SA: *Adv. Ther.* 29, 41-52, 2012) が上市された。これは、皮内ワクチン接種が従来までの注射型ワクチン接種法と比較して簡便性・有効性の観点から重要視されていることを窺わせるものであり、事実、世界的に様々なマイクロニードルデバイスの開発研究が行われている。しかし、Intanza®/IDflu®は抗原溶液が充填されたプレフィルドシリンジと使い捨てのマイクロニードルデバイスを連結して使用するものであり、従来の注射型ワクチン製剤と同様に抗原溶液の室温保存への対応や医療廃棄物の削減までは望めない。

一方、我々が独自に開発した MH は抗原を装填した微小針を有するシート状の乾燥製剤であり、室温保存による安定性が保証されている。また、注射ワクチン製剤と比較すると使用後の廃棄物量は大きく削減することができる。今回、MH がヒトにおいて安全な経皮ワクチンデバイスであることを実証し、簡便性・普及性に優れる経皮ワクチン製剤の開発を基礎研究から臨床研究へと展開させる足掛かりを得ることができた。これら安全性評価の結果に基づいて、現在、インフルエンザ HA 抗原を装填した MH 製剤のヒトにおける安全性ならびに有効性を検証する臨床研究に着手している。

D. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

ワクチン開発の歴史は、生物として生きたままの病原体の病原性を弱めた弱毒化生ワクチンから、病原体に化学処理等を施して死滅させた不活化ワクチン、病原体を構成する蛋白質等を精製したコンポーネントワクチンへと発展し、ワクチンのデメリッ

トとされてきた原材料（病原体）由来の毒性（副反応）は抑制できるようになってきた。一方、コンポーネントワクチンをはじめ精製度が向上した現在のワクチン抗原の多くは、単味投与では免疫応答を誘導しにくいということが次第に明らかになり、アジュバントを併用する必要性が広く認められるようになってきた。

近年の免疫学の発展によって、自然免疫応答の活性化がワクチンにとって重要な獲得免疫応答の成立に必須であることが明らかになった (*Nature* 388, 394-397, 1997)。また、自然免疫応答を惹起する重要な分子として TLR が同定され、そのリガンドは優れたアジュバントになり得ると考えられている (*Curr. Opin. Immunol.* 21, 339-345, 2009)。実際に、TLR4 のリガンドである MPLA は欧米では既に上市されたワクチンのアジュバント成分の一つとして使用されており、TLR3, 5, 7, 8, 9 に対するそれぞれのリガンドもアジュバント候補物質として臨床試験が盛んに行われているなど、TLR のリガンドは有効かつ安全なアジュバントとしての地位を確立しつつある。しかしながら、これらのアジュバントの投与方法は筋肉内注射あるいは皮下注射である。投与部位が異なれば、そのアジュバントの作用する細胞群も異なるため、投与形態に応じたアジュバント開発が必要である。

そこで、OVA とともに各種 TLR-L を装填した MH を用いてマウスにおける OVA 特異的免疫応答に対する増強効果を比較したところ、TLR4-L である MPLA と TLR9-L である ODN1826 が、抗原量や免疫回数の低減につながる有望な経皮アジュバント候補物質であることを見出した。アジュバントは免疫応答を増強する一方で、過剰な炎症反応を誘導するなどの危険性をはらむ諸刃の剣であると言える。そのため、MPLA と ODN1826 の安全性についても評価した結果、いずれ

も局所ならびに全身性に重篤な副反応を引き起こさず、アジュバント活性を発揮する用量で安全に適用できることが示唆された。前述のとおり MPLA は既に注射型ワクチンのアジュバントとして臨床応用されており、また ODN1826 はヒト型に改変された同様の CpG ODN について臨床試験が進められている。したがって、これら両候補物質を経皮ワクチンアジュバントとして開発していくにあたって、ヒトでの安全性および有効性を検証する臨床研究へと展開する際の倫理的ハードルは比較的超えやすいことが予想される。

E. 結論

E.1. 各種 MH の物理化学的特性解析

- 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。

E.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）

- 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。

E.3. MH のヒトにおける安全性評価（臨床研究）

- 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。

E.4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

- 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。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

- 1) Kazuhiko Matsuo, Yayoi Yokota, You Zhai, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Yohei Mukai, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedles patch for soluble and particulate antigens: *J. Control. Release* in press (2012)
- 2) Kazuhiko Matsuo, Sachiko Hirobe, Yayoi Yokota, Yurika Ayabe, Masashi Seto, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Takahiro Tougan, Toshihiro Horii, Yohei Mukai, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza: *J. Control. Release* in press (2012)
- 3) 松尾一彦, 岡田直貴, 中川晋作: 感染症予防対策に資する経皮免疫製剤 (貼るワクチン) の開発: *日本臨床* 69(9): 1561-1566 (2011)
- 4) 松尾一彦, 岡田直貴, 中川晋作: マイクロニードル型経皮ワクチン製剤 (貼るワクチン) の開発: *総合臨床* 60(11): 2211-2214 (2011)
- 5) 松尾一彦, 岡田直貴, 中川晋作: 新規経皮ワクチンデバイスを応用した経皮ワクチン製剤 (貼るワクチン) の開発: “次世代経皮吸収型製剤の開発と応用” シーエムシー出版: 177-184 (2011)
- 6) 松尾一彦, 岡田直貴, 中川晋作: 感染症予防対策に資する画期的経皮免疫製剤 (貼るワクチン) の開発: “次世代バイオ医薬品の製剤設計と開発戦略” シーエムシー出版: 231-237 (2011)

- 7) 廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: 経皮ワクチン製剤の実用化に向けた取り組み: “バイオ・ゲノム関連医薬品開発におけるニーズ・技術動向・開発ノウハウ” 技術情報協会: 189-196 (2011)

G.2. 学会発表

- 1) 廣部祥子, 松尾一彦, 権英淑, 神山文男, 小豆澤宏明, 片山一朗, 鈴木博, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 皮膚内溶解型マイクロニードルの穿刺特性および安全性に関する臨床研究: **第27回日本DDS学会学術集会**, 東京, 2011年6月9-10日
- 2) 仁木一順, 廣部祥子, 松尾一彦, 権英淑, 神山文男, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いたアトピー性皮膚炎治療の可能性: **第29回日本美容皮膚科学会学術集会**, 下関, 2011年9月10-11日
- 3) 岡本英揚, 松尾一彦, 権英淑, 神山文男, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いたアルツハイマー型認知症に対する経皮ワクチン療法の開発: **第10回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォラム2011**, 仙台, 2011年10月8-9日
- 4) 廣部祥子, 松尾一彦, 横田やよい, 権英淑, 神山文男, 小豆澤宏明, 片山一朗, 森川彰子, 井上龍巳, 角田秀信, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた貼るワクチンの実用化に向けて: **第10回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォラム2011**, 仙台, 2011年10月8-9日
- 5) 廣部祥子, 松尾一彦, 権英淑, 神山文男, 浅田秀夫, 小豆澤宏明, 片山一朗, 鈴木博, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 経皮ワクチン製剤「貼るワクチン」の実用化を目指した橋渡し研究ーヒト

における安全性・有効性の評価：**第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会**，神戸，2011 年 10 月 22 日

- 6) 松尾一彦，廣部祥子，翟 優，権 英淑，神山文男，向 洋平，岡田直貴，中川晋作：感染症予防対策に資する経皮ワクチン製剤（貼るワクチン）の開発—マイクロニードル型貼るワクチン：**第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会**，神戸，2011 年 10 月 22 日
- 7) 岡本英揚，松尾一彦，岡田直貴，中川晋作：アルツハイマー病モデルマウスにおけるアミロイドβ装填マイクロニードル製剤の経皮ワクチン効果：**第 40 回日本免疫学会学術総会**，千葉，2011 年 11 月 27-29 日
- 8) 松尾一彦，廣部祥子，岡田直貴，中川晋作：皮膚内溶解型マイクロニードルを応用した経皮免疫製剤の感染防御効果：**第 40 回日本免疫学会学術総会**，千葉，2011 年 11 月 27-29 日
- 9) 廣部祥子，松尾一彦，岡田直貴，中川晋作：経皮ワクチン製剤のヒトにおける安全性および有効性の評価：**第 40 回日本免疫学会学術総会**，千葉，2011 年 11 月 27-29 日
- 10) 西内 翠，廣部祥子，松尾一彦，権 英淑，神山文男，岡田直貴，中川晋作：経皮ワクチンデバイス—皮膚内溶解型マイクロニードル—のヒトにおける安全性試験：**第 15 回日本ワクチン学会学術集会**，東京，2011 年 12 月 10-11 日
- 11) 翟 優，松尾一彦，齋場雄貴，権 英淑，神山文男，岡田直貴，中川晋作：経皮ワクチン（貼るワクチン）における Toll 様受容体リガンドのアジュバント効果：**第 15 回日本ワクチン学会学術集会**，東京，2011 年 12 月 10-11 日
- 12) 松尾一彦，横田やよい，廣部祥子，権 英淑，神山文男，岡田直貴，中川晋作：

皮膚内溶解型マイクロニードルを用いたインフルエンザ経皮ワクチンの開発：**第 15 回日本ワクチン学会学術集会**，東京，2011 年 12 月 10-11 日

- 13) 仁木一順，松尾一彦，廣部祥子，権 英淑，神山文男，向 洋平，岡田直貴，中川晋作：新型インフルエンザパンデミックに即時対応できる経皮ワクチンシステムの開発：**日本薬学会第 132 年会**，札幌，2012 年 3 月 28-31 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

H. 1. 特許取得

- 1) (発明の名称)：DNA ワクチンマイクロニードル，(発明人)：権 英淑，神山文男，中川晋作，岡田直貴，(出願人)：コスメディ製薬株式会社，(出願日)：平成 23 年 9 月 1 日，(出願番号)：特願 2011-205253

H. 2. 実用新案登録

該当事項なし

H. 3. その他

該当事項なし

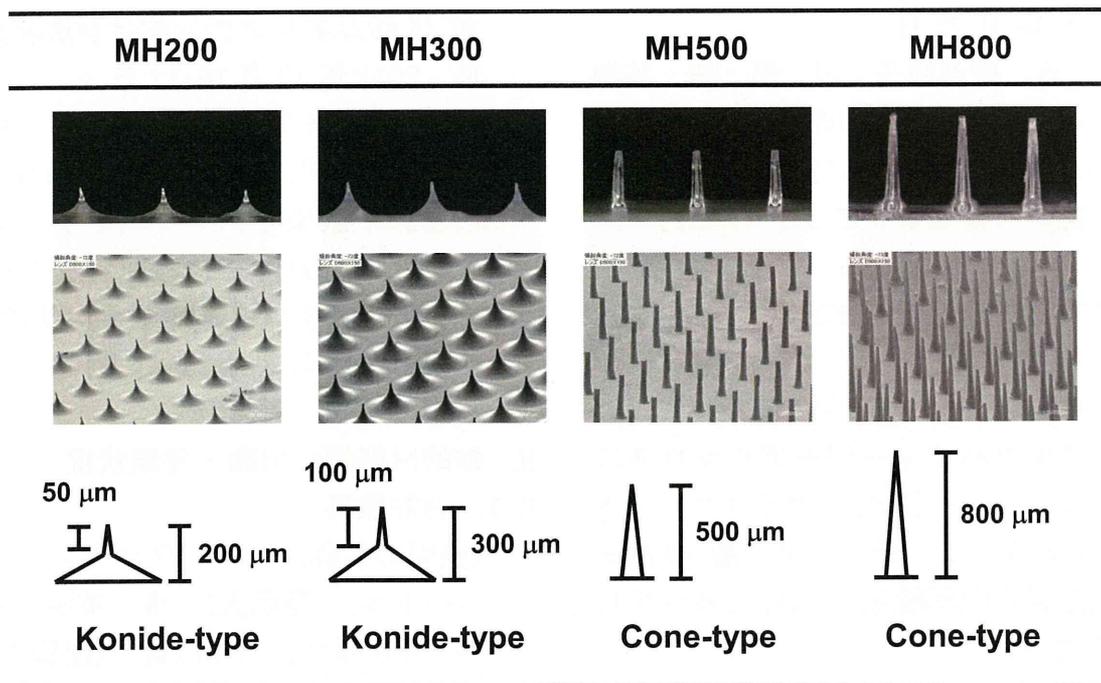


Fig. 1 Dimension of self-dissolving microneedle array (MicroHyal; MH).

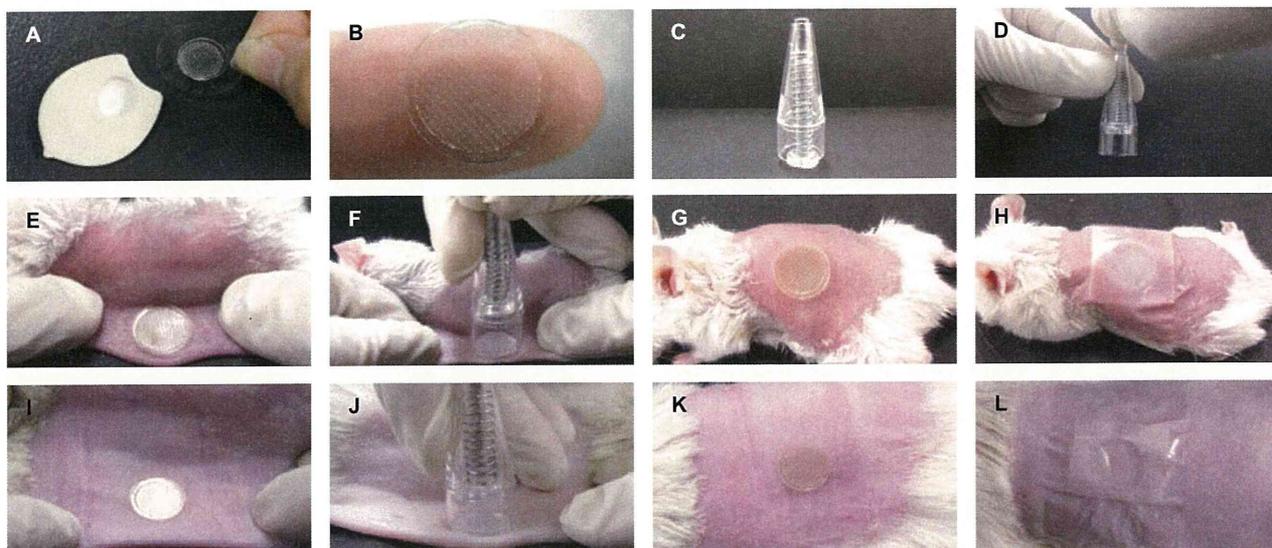


Fig. 2 Schematic drawing of transcutaneous vaccination procedure. A and B; MH, C and D; applicator for MH application, E, F, G, I, J, and K; application of MH to back skin of mice (E, F, G) or rats (I, J, K), H and L; covering with a wound management film over MH.

Table 1 Draize dermal scoring criteria

Erythema and crust	Score	Edema	Score
No erythema	0	No edema	0
Very mild erythema	1	Very mild edema	1
Obvious erythema	2	Mild edema	2
Moderate or advanced erythema	3	Moderate edema	3
Advanced erythema and formation of a slight crust	4	Advanced edema	4

Table 2 Score for signs and symptoms of illness

Score	Condition			
	Eye	Fur	Behavior	Others
5	Death	Death	Death	Death
4	Blepharosynechia	Very dull fur	Decrease in spontaneous behavior (Severe)	Respiration failure, Cooling of body, Cadaverous
3	Loss of eyelid reflex	Dull fur, Piloerection (Moderate)	Decrease in spontaneous behavior (Moderate)	Irregular respirations, Cadaverous
2	Closed eye	Piloerection (Mild)	Hyperkinesis	Irregular respirations
1	Good	Good	Normal	Normal

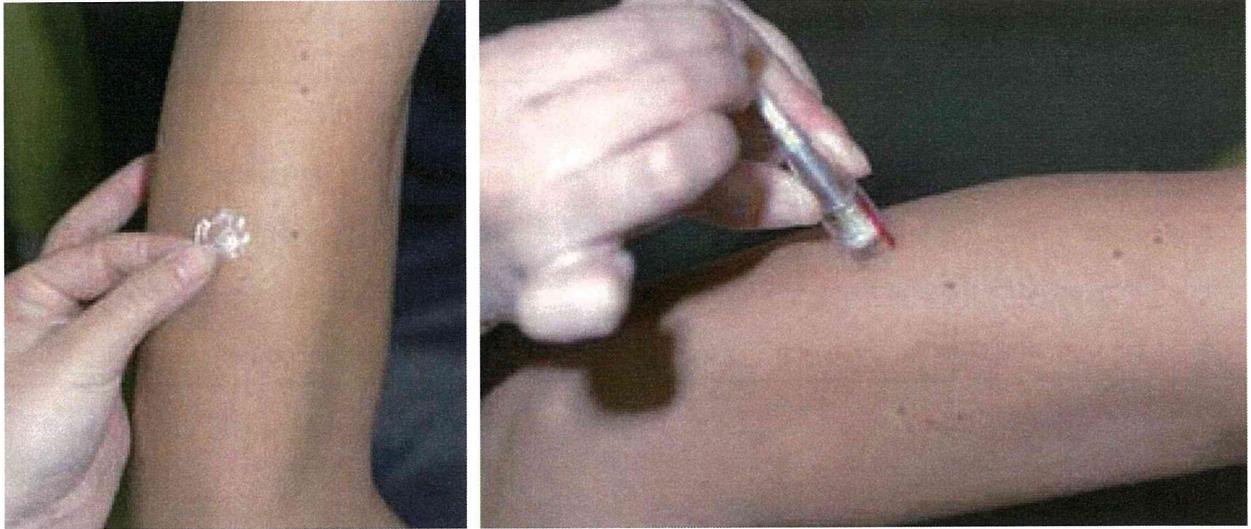


Fig. 3 Images of MH application to human skin.

Table 3 Procedure of clinical study

	Time after experimental beginning					
	0	6 h	2 d	3 d	7 d	30 d
MHs	Application	Removal				
ICDRG scoring Purpura evaluation			●	●	●	●
Blood test	●		●			

Table 4 Scoring of patch test according to ICDRG

Score	Reactions
-	Negative reaction
+?	Doubtful reaction; faint erythema only
+	Weak (non-vesicular) positive reaction; erythema, infiltration and possibly papules
++	Strong (vesicular) positive reaction; erythema, infiltration, papules, vesicles
+++	Extreme positive reaction; bullous reaction
IR	Irritant reaction

Table 5 MH800 containing OVA and adjuvant

OVA dose (µg)	Adjuvant	Target TLR	Adjuvant dose (µg)
1.2	-	-	-
0.8	Pam3CSK4	TLR1/2	N.D.
0.4	LTA-SA	TLR2	N.D.
0.8	FSL-1	TLR2/6	N.D.
1.0	Poly(I:C)	TLR3	0.3
0.8	MPLA	TLR4	N.D.
0.2	LPS	TLR4	N.D.
0.4	Flagellin	TLR5	N.D.
0.6	Imiquimod	TLR7	N.D.
0.7	ssRNA40/Lyo Vec	TLR7	0.7
0.8	ODN1826	TLR9	0.2
0.8	CT	-	1.1

N.D.: not determined

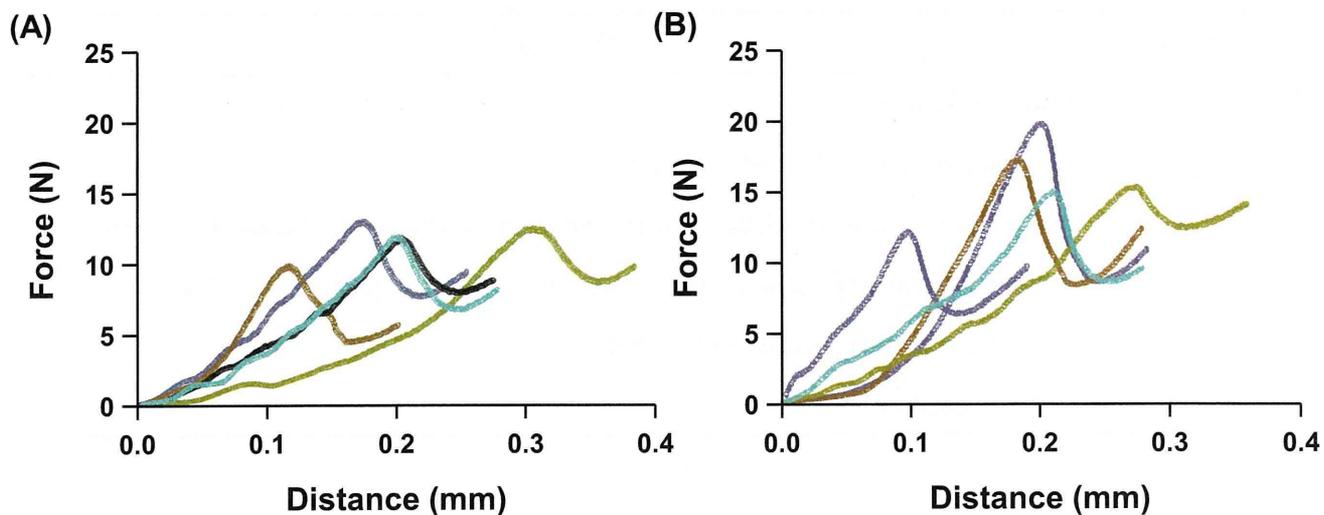


Fig. 4 Mechanical strength of MH500 (A) and MH800 (B). On 5 MHs, the force required to fracture 40 microneedles is shown. The point is identified by the sudden decrease in axial force.

Table 6 Failure force of MH500 and MH800

	MH500	MH800
	0.23	0.36
	0.18	0.31
Force (N/needle)	0.22	0.27
	0.21	0.22
	0.21	0.27
Average	0.21	0.29
S.D.	0.02	0.05
%CV	10	18

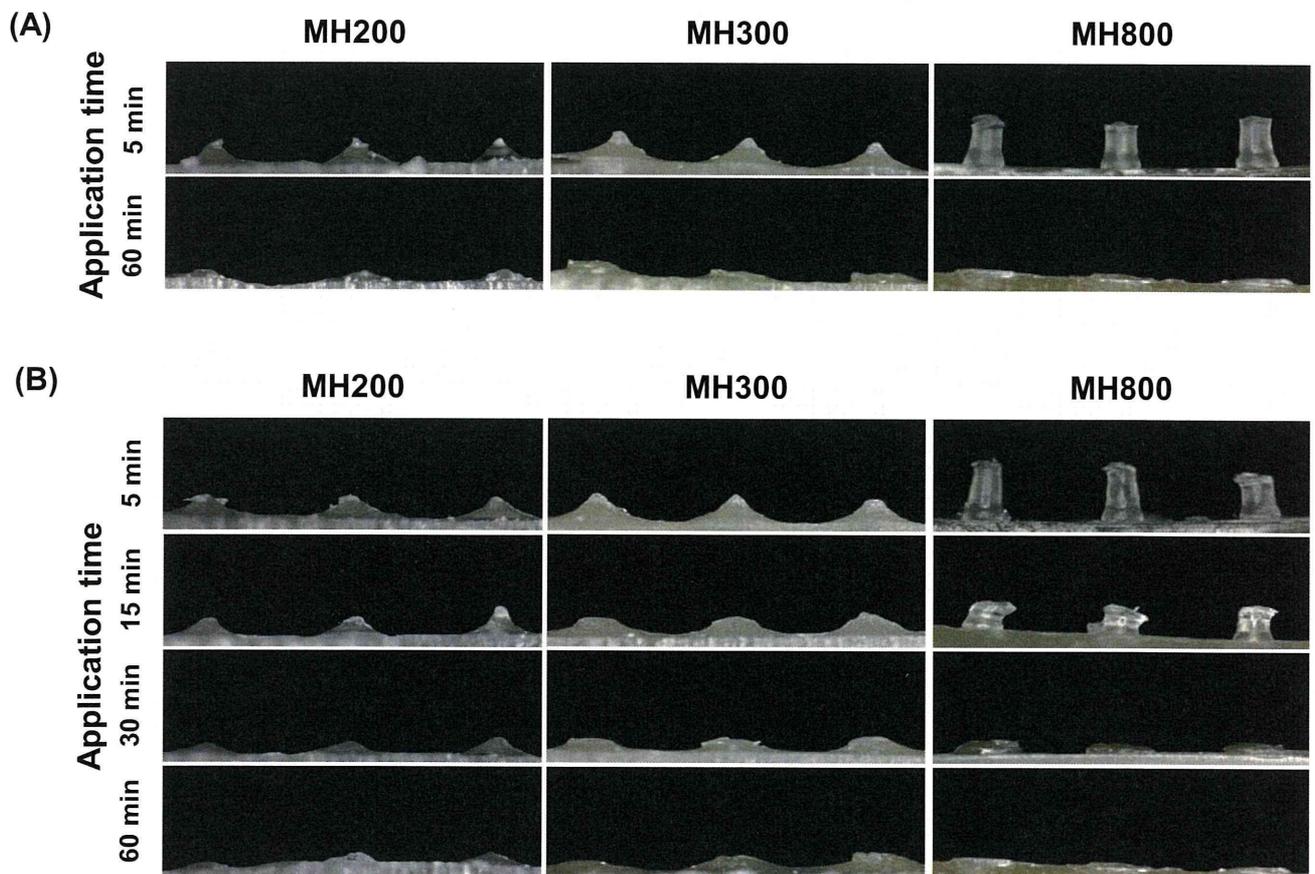


Fig. 5 Dissolution kinetics of microneedles of each MH after application. The MH200, MH300, and MH800 were applied on the back skin of BALB/c mice (A) or Wistar ST rats (B) for the indicated minutes. After removal of the MH, the microneedles remaining on each MH were photographed under a stereoscopic microscope.

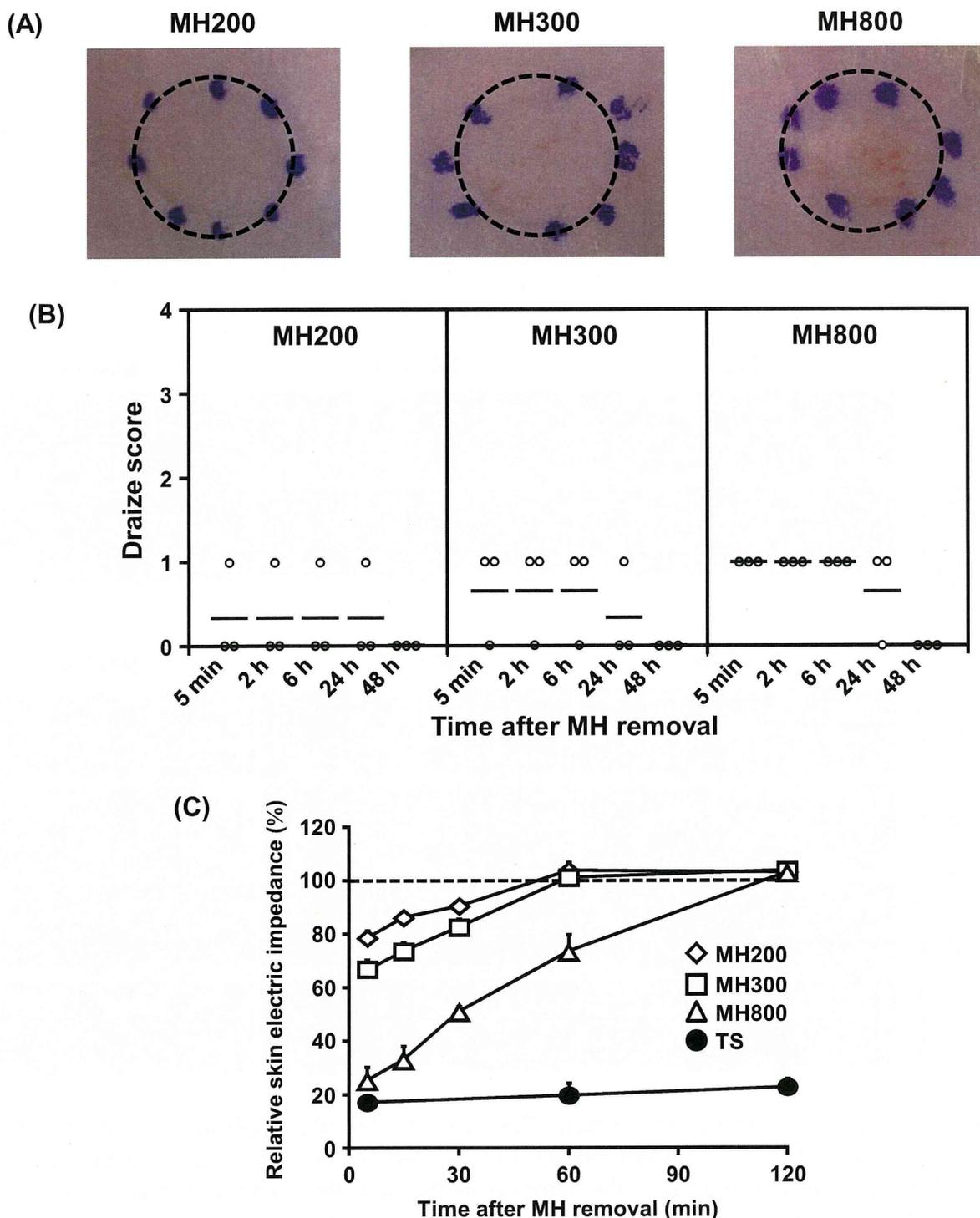


Fig. 6 Assessment of skin irritation caused by application of each MH. The MH200, MH300, or MH800 were applied to the back skin of Wistar ST rats for 30 min. (A) After MH removal, the application site was observed. (B) The degree of erythema on the skin of Wistar ST rats was scored using the Draize scoring system: 0, no erythema or edema; 1, very slight erythema and/or barely perceptible edema; 2, well-defined erythema and/or slight edema; 3, moderate to severe erythema or moderate edema, and 4, severe erythema and/or edema. Mean value is shown as a bar. (C) Skin impedance between the MH application area and non-application area was measured 5, 15, 30, 60, and 120 min after the removal of each MH. As the control group, the back skin of Wistar ST rats were tape-stripped. Data are expressed as mean \pm SE of results from 3 rats. TS; tape-stripped.

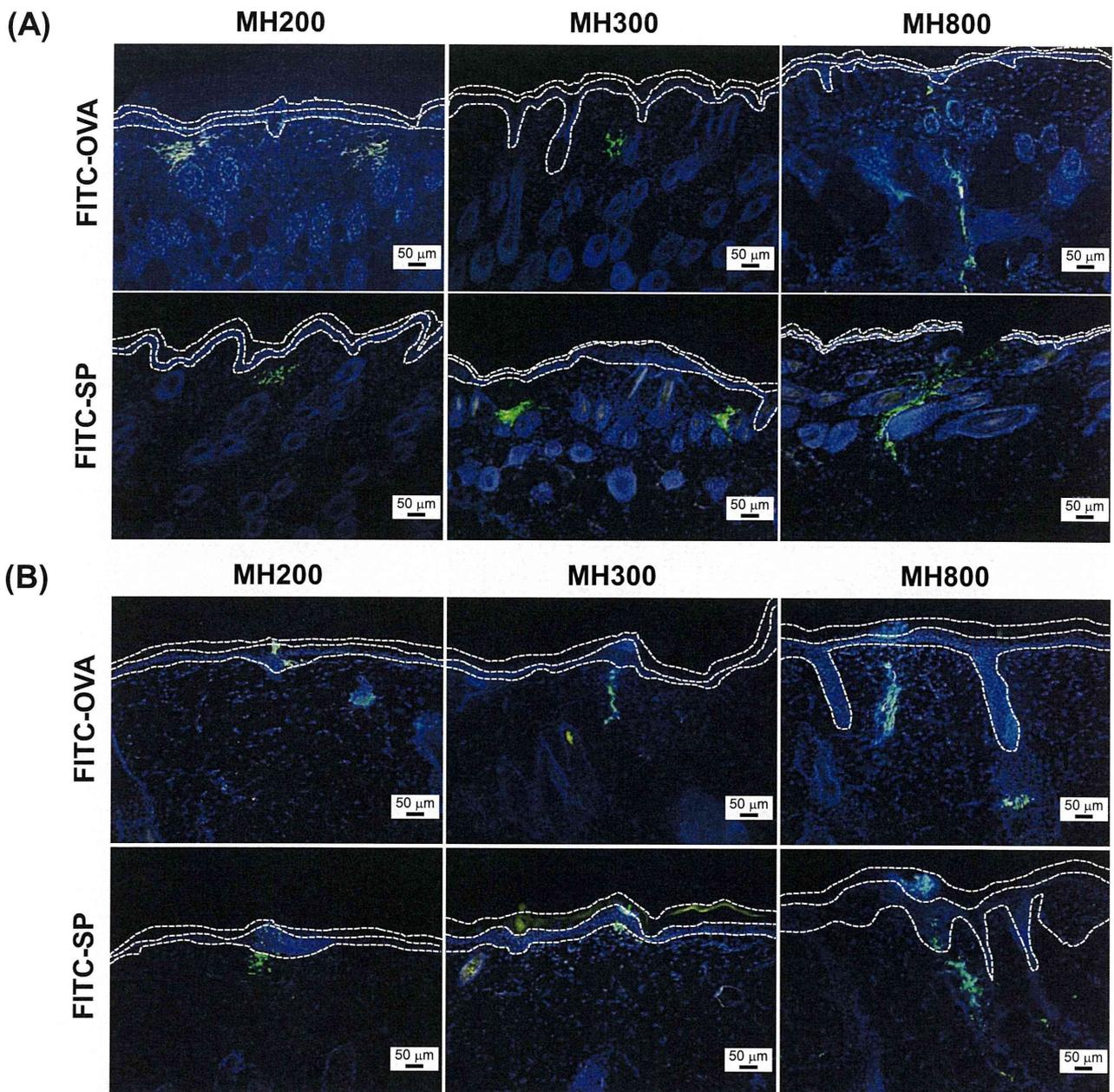


Fig. 7 Skin sections from animals applied with each MH encapsulating FITC-OVA or FITC-SP. FITC-OVA or FITC-SP-containing MH200, MH300, MH800 were placed on the back skin of ICR mice (A) or Wistar ST rats (B) for 1 h . The skin was harvested and frozen. Frozen section (8- μm thick) were photographed under a fluorescence microscope. In each section, between top of line and the middle of line means Stratum corneum, between the middle of line and bottom of lene means Living epidermis and under the bottom line means Dermis.