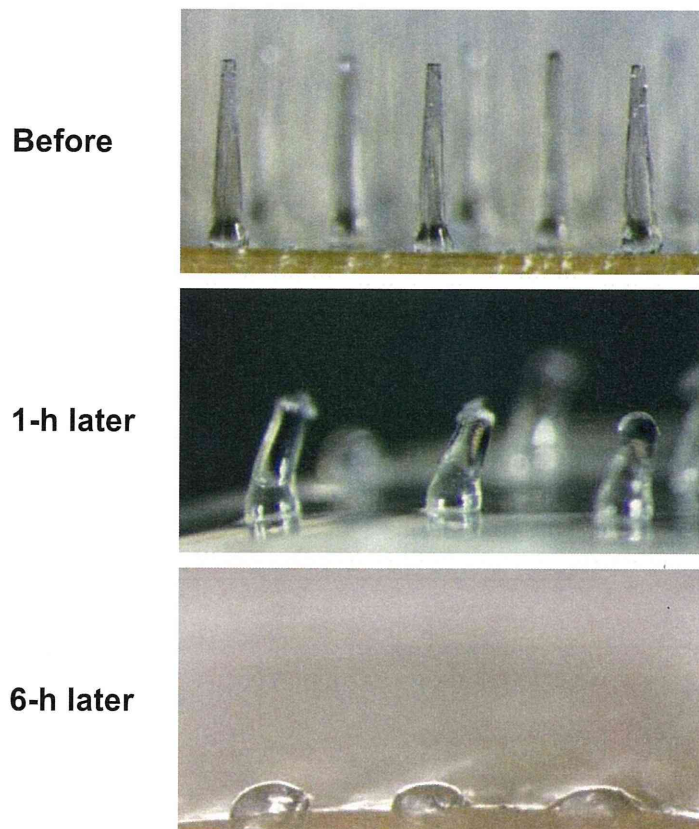
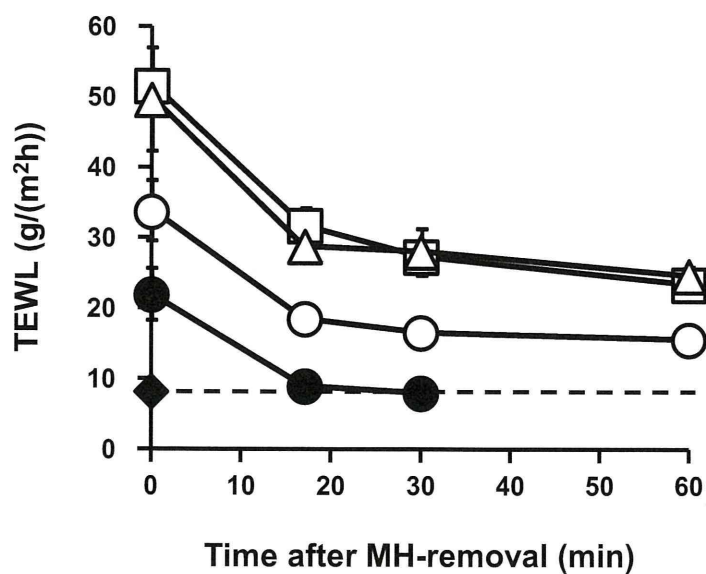


**Fig. 29** In vivo confocal microscopic images after MH application on human skin. MH800 or MH500 was applied to the skin of left lateral upper arm of 2 healthy volunteers for 5 second, 1 hour, or 2 hours, and then skin images were immediately or 1-hour later photographed under in vivo confocal scanning laser microscope. Numerical values shown at upper right in each photo indicate the number of puncture holes in the field of view. N.D.; not determined.



**Fig. 30** Stereoscopic microscopic images of MH800 after application to human skin. The MH800 was applied to the skin of left lateral upper arm of healthy volunteer for 1 h or 6 h, and then the microneedle arrays were immediately observed under stereoscopic microscope.



**Fig. 31** Transepidermal water loss (TEWL) after MH application. MH800 were applied to the skin of left lateral upper arm of 3 healthy volunteers for 5 sec (□), 1 h (△), or 6 h (○). As control, MH-needleless was applied for 6 h (●). At the indicated time after MH-removal, TEWL of the application sites was measured. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 3 subjects. ◆; TEWL of untreated skin.

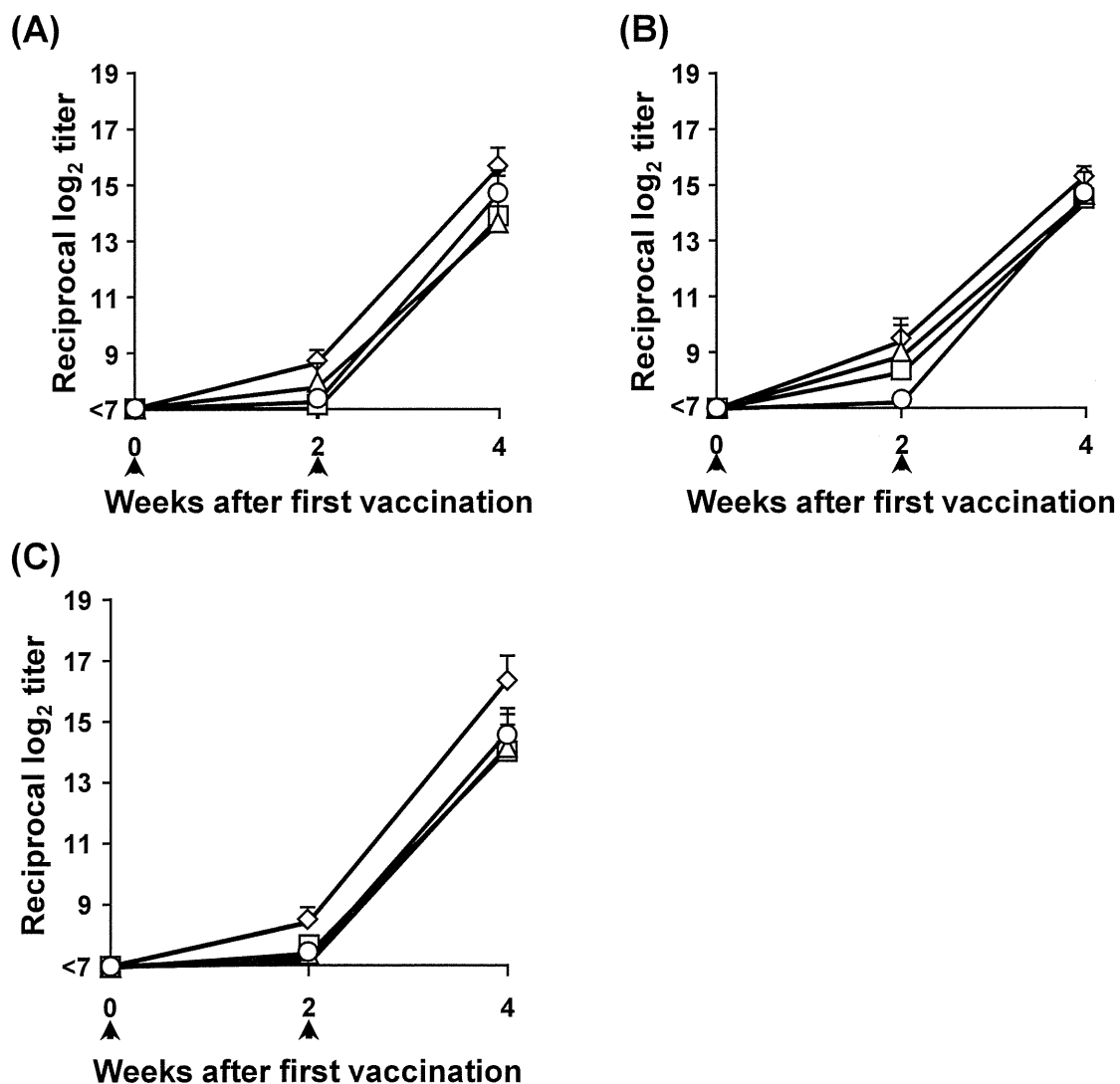
**Table 10** Local adverse event after application of MHs

MH	Day	ICDRG score			Purpura
		-	+?	+	
MH300	2	19/20 (95.0%)	1/20 (5.0%)	0/20 (0%)	0/17 (0%)
	3	20/20 (100%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/17 (0%)
	7	20/20 (100%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/17 (0%)
	30	20/20 (100%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/17 (0%)
MH500	2	8/20 (40.0%)	12/20 (60.0%)	0/20 (0%)	6/17 (35.3%)
	3	13/20 (65.0%)	6/20 (30.0%)	1/20 (5.0%)	8/17 (47.1%)
	7	19/20 (95.0%)	0/20 (0%)	1/20 (5.0%)	6/17 (35.3%)
	30	20/20 (100%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/17 (0%)
MH800	2	7/20 (35.0%)	13/20 (65.0%)	0/20 (0%)	6/17 (35.3%)
	3	13/20 (65.0%)	7/20 (35.0%)	0/20 (0%)	10/17 (58.8%)
	7	19/20 (95.0%)	1/20 (5.0%)	0/20 (0%)	5/17 (29.4%)
	30	20/20 (100%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/17 (0%)

**Table 11** Pain scale assessment on MH application

ID	MH-needleless	MH300	MH500	MH800
01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
04	5	5	8.5	8.5
05	3	3	6	6
06	12	12	21	24
07	13	13	27	30
08	19	34	51	51
09	16	17	23	23
10	11	11	12	11
11	2	2	2	3
12	3	20	12	28
13	16	16	17	16
14	0	6	10	6
15	30	15	28	32
16	10	12	15	19
17	6	10	11	11
18	0	15	29	41
19	7	11	7	8
20	0	0	0	0
<b>Mean ± SD</b>	9.0 ± 8.1	11.9 ± 8.0	16.4 ± 12.5	18.7 ± 14.2

N.D.; not determined



**Fig. 32** OVA-specific antibody response in BALB/c mice after intradermal immunization with OVA and components of cMH. OVA (2  $\mu$ g) without (○) or with 0.01 mg (□), 0.1 mg (△) or 1 mg (◇) hyaluronic acid (clinic grade) (A), polyvinylpyrrolidone (B), or dextran (C) two times at 2-week intervals. Sera collected from these mice were assayed for the IgG titer to OVA by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 4 animals.

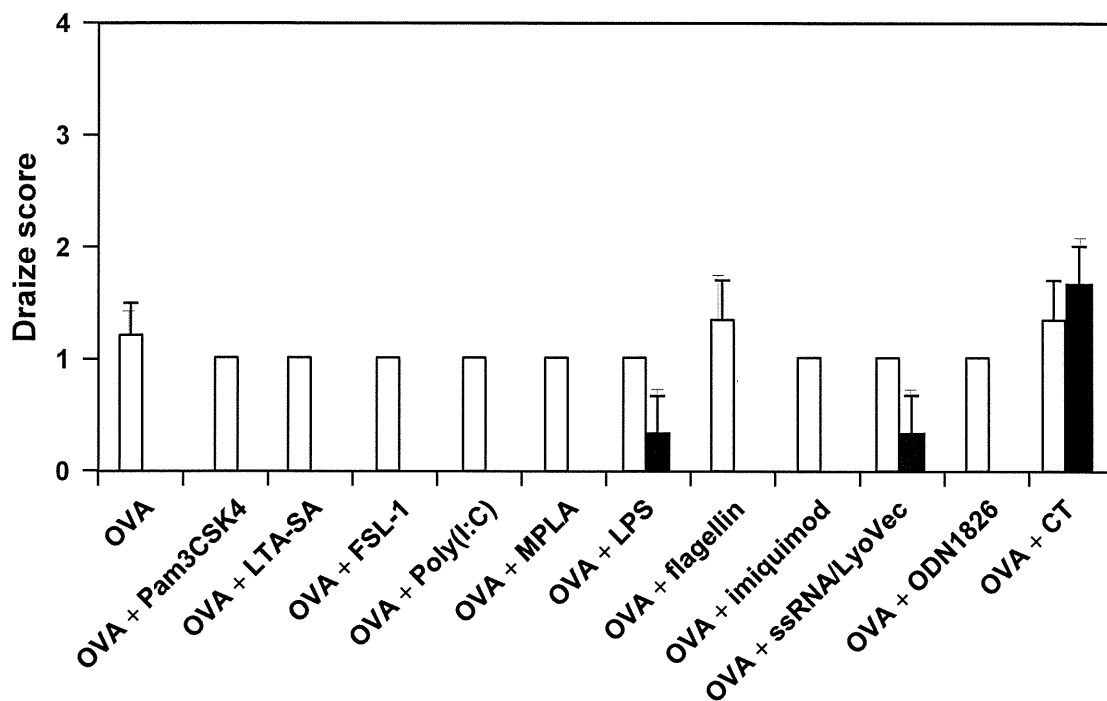
**Table 12** OVA-specific antibody titer in mice applied with MH800 containing OVA and TLR-L

Vaccination				OVA –specific antibody titer (Reciprocal log <sub>2</sub> titer)						
Route	Adjuvant (μg)	Target TLR	OVA (μg)	ID	Total IgG		IgG1	IgG2b	IgG2c	IgA
					Day 13	Day 27	Day 27	Day 27	Day 27	Day 27
TCI	-	-	1.2	726	8.2	12.7	12.3	9.6	< 6.0	< 2.0
				727	9.6	13.8	11.6	8.2	< 6.0	< 2.0
				728	9.1	16.1	14.5	14.8	< 6.0	< 2.0
				729	11.1	15.0	13.2	11.7	< 6.0	< 2.0
				730	13.6	16.5	15.9	13.9	< 6.0	< 2.0
				Ave	10.3	14.8	13.5	11.6	-	-
TCI	Pam3CSK4 (N.D.)	TLR1/2	0.8	731	9.0	16.6	16.6	9.5	< 6.0	< 2.0
				732	8.4	16.7	16.0	14.8	< 6.0	< 2.0
				733	8.7	15.7	15.2	11.8	< 6.0	< 2.0
				Ave	8.2	16.3	15.9	12.0	-	-
TCI	LTA-SA (N.D.)	TLR2	0.4	734	7.9	14.8	13.8	12.7	< 6.0	< 2.0
				735	8.8	13.7	13.0	11.5	< 6.0	< 2.0
				736	7.8	15.1	15.1	< 6.0	< 6.0	< 2.0
				Ave	8.2	14.5	11.0	-	-	-
TCI	FSL-1 (N.D.)	TLR2/6	0.8	737	7.6	16.5	16.0	13.3	< 6.0	< 2.0
				738	9.8	15.3	14.9	11.8	< 6.0	< 2.0
				739	11.1	16.4	15.8	13.7	< 6.0	< 2.0
				Ave	10.2	16.1	15.6	12.9	-	-
TCI	Poly(I:C) (0.3)	TLR3	1.0	740	9.8	14.4	14.2	10.2	6.9	< 2.0
				741	8.6	16.6	16.2	12.9	< 6.0	< 2.0
				742	10.7	15.3	14.9	7.1	< 6.0	< 2.0
				Ave	9.7	15.4	15.1	10.1	-	-
TCI	MPLA (N.D.)	TLR4	0.8	743	15.5	18.0	13.8	17.1	11.5	< 2.0
				744	13.4	17.4	15.0	17.2	12.8	< 2.0
				745	14.7	17.9	15.3	16.8	13.8	< 2.0
				Ave	14.5	17.8	14.7	17.0	12.7	-
TCI	LPS (N.D.)	TLR4	0.2	746	< 6.0	15.2	13.0	< 6.0	< 6.0	< 2.0
				747	12.7	14.1	13.3	13.0	< 6.0	< 2.0
				748	7.0	13.0	13.0	10.3	< 6.0	< 2.0
				Ave	-	14.1	13.1	-	-	-

(continued)

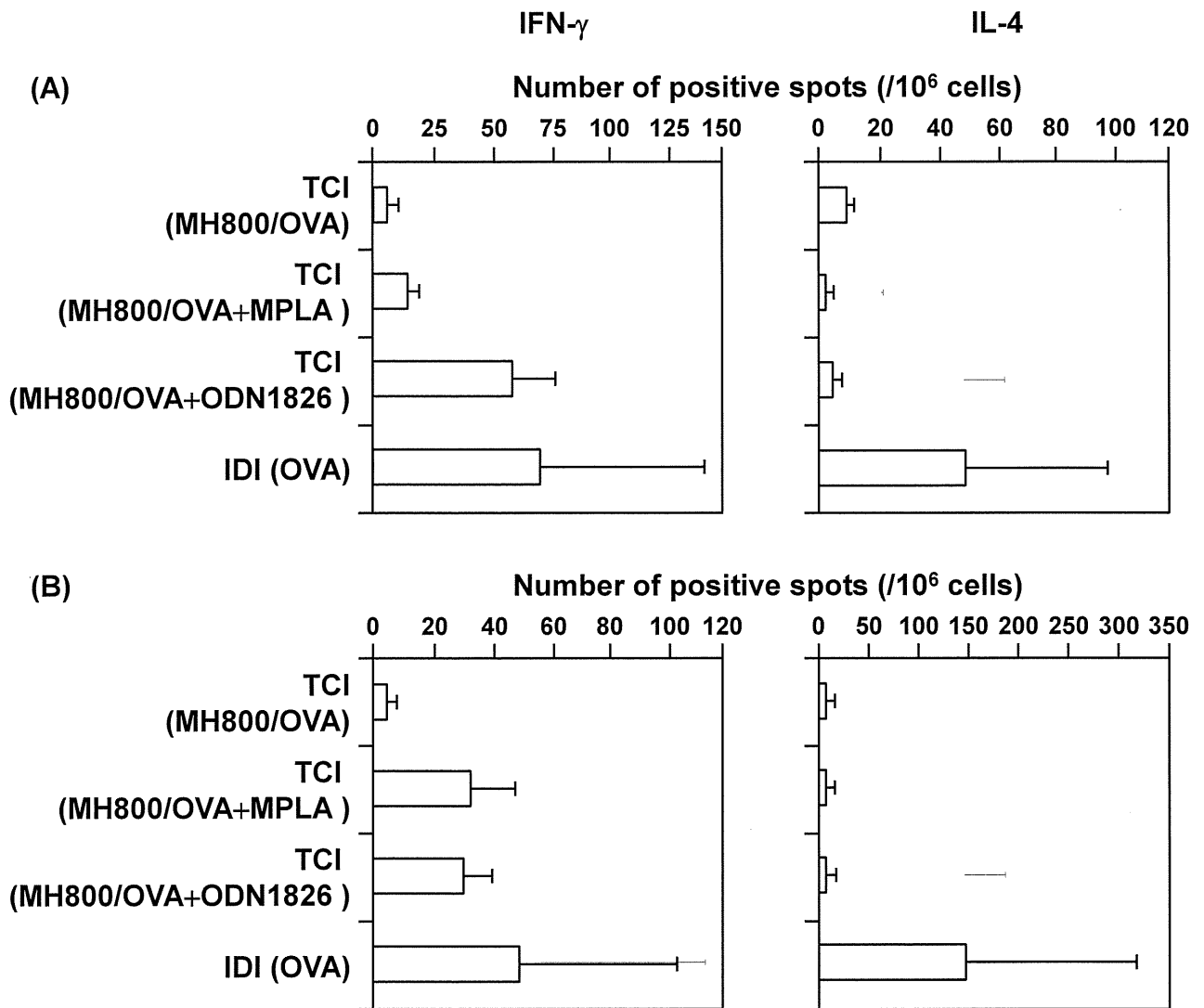
Vaccination				OVA –specific antibody titer (Reciprocal log <sub>2</sub> titer)						
Route	Adjuvant (μg)	Target TLR	OVA (μg)	ID	Total IgG		IgG1	IgG2b	IgG2c	IgA
					Day 13	Day 27	Day 27	Day 27	Day 27	Day 27
TCI	Flagellin (N.D.)	TLR5	0.4	749	9.6	16.4	15.6	12.4	< 6.0	< 2.0
				750	8.2	16.8	16.2	12.3	< 6.0	< 2.0
				751	8.7	15.4	14.2	13.4	8.7	< 2.0
				Ave	8.8	16.2	15.3	12.7	-	-
TCI	Imiquimod (N.D.)	TLR7	0.6	752	8.8	15.9	14.7	12.8	9.2	< 2.0
				753	12.7	15.8	15.0	10.4	8.4	< 2.0
				754	7.4	15.3	15.2	9.4	< 6.0	< 2.0
				Ave	9.6	15.7	15.0	10.9	-	-
TCI	ssRNA40 /LyoVec (0.7)	TLR7	0.7	755	8.0	14.8	12.8	14.7	8.5	< 2.0
				756	6.3	13.2	12.7	10.4	< 6.0	< 2.0
				757	8.6	15.8	15.7	7.7	< 6.0	< 2.0
				Ave	9.6	14.6	13.7	10.9	-	-
TCI	ODN1826 (0.2)	TLR9	0.8	758	10.7	16.0	13.9	15.7	9.0	< 2.0
				759	11.9	16.9	15.0	15.7	9.8	< 2.0
				760	14.7	16.0	13.8	15.0	10.7	< 2.0
				Ave	12.4	16.3	14.2	15.5	9.8	-
TCI	CT (1.1)	-	0.8	761	9.7	18.4	17.7	14.9	< 6.0	< 2.0
				762	10.5	16.4	16.0	13.4	6.8	< 2.0
				763	11.6	17.7	17.2	11.7	< 6.0	< 2.0
				Ave	10.6	17.5	17.0	13.3	-	-
IDI	-	-	1.0	767	< 6.0	< 6.0	< 6.0	< 6.0	< 6.0	< 2.0
				768	< 6.0	< 6.0	< 6.0	< 6.0	< 6.0	< 2.0
				769	8.0	14.1	13.5	11.0	< 6.0	< 2.0
				Ave	-	-	-	-	-	-
INI	CT (1.0)	-	50	770	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.8
				771	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.4
				772	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.0
				Ave	-	-	-	-	-	4.4

N.D.; not determined



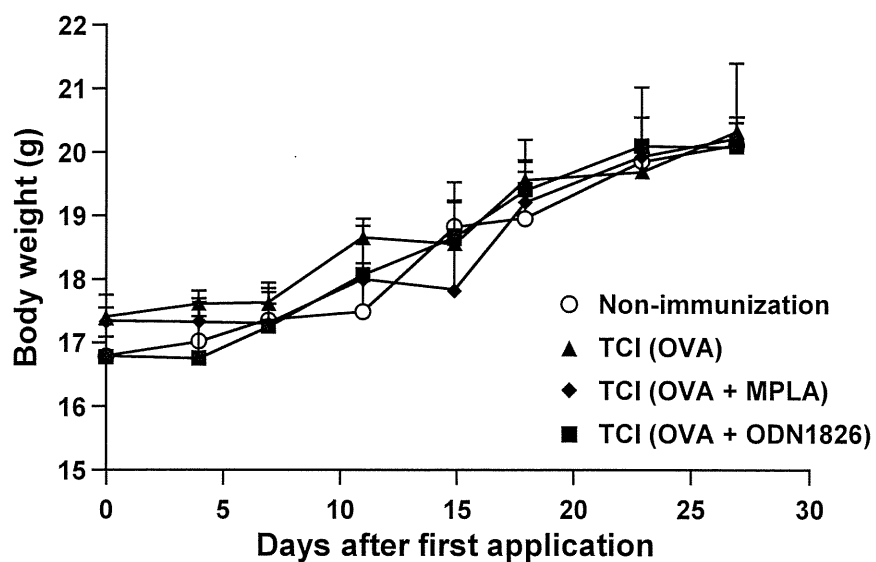
**Fig. 33** Assessment of skin irritation caused by TLR-L-containing MH800 application. The MH800 containing OVA in combination with or without either TLR-L or CT were applied to the back skin of C57BL/6. These mice were observed for signs of erythema soon after MH800 removal ( $\square$ ), and 24 hours later ( $\blacksquare$ ). Observations of erythema were scored according to the Draize scale for scoring skin reactions. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 3-5 mice.



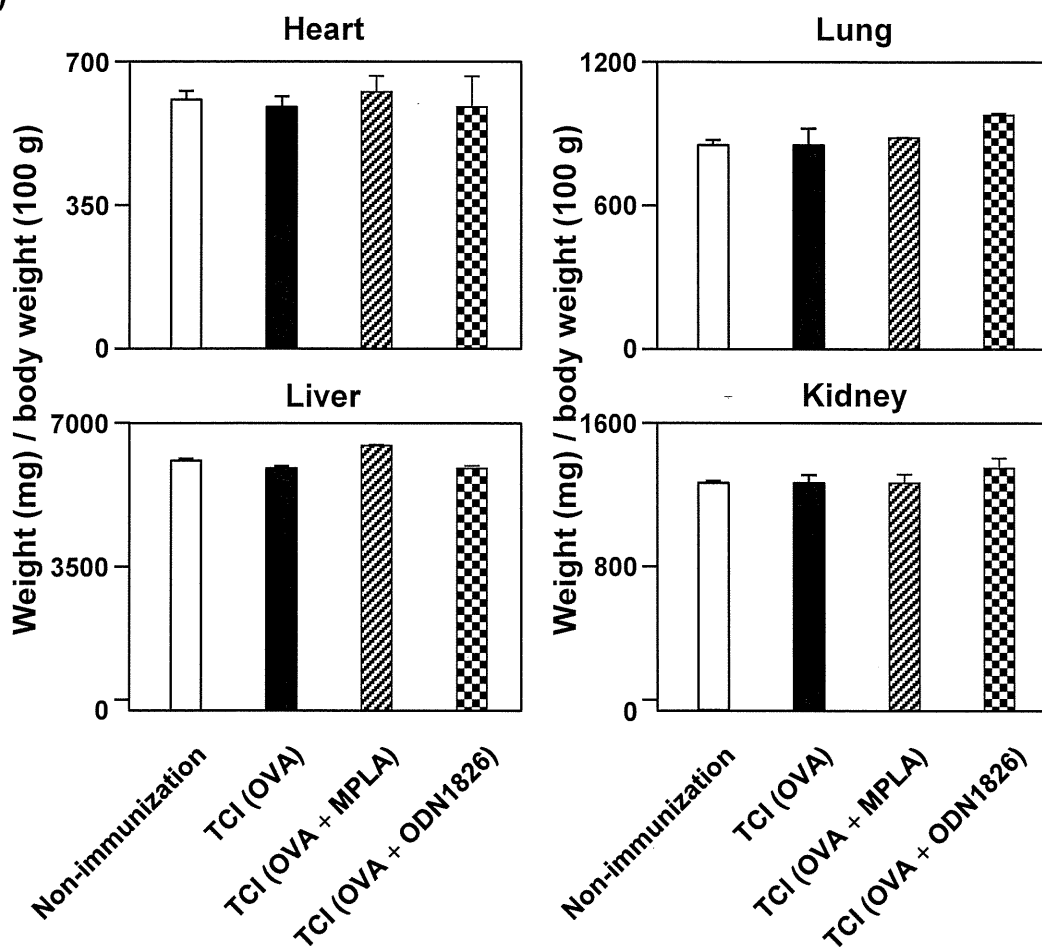


**Fig. 34** The frequency of OVA-specific cytokine-secreting cells in splenocyte of C57BL/6 mice by transcutaneous vaccination using MH800 containing OVA and TLR-L. C57BL/6 mice were transcutaneously vaccinated two times at 2-week intervals with OVA in combination with or without either MPLA or ODN1826. Two weeks after final vaccination, single-cell suspensions of splenocytes (A) or lymphocytes (B) were prepared and the ELISPOT assay was performed after stimulating the cells with 1 mg/mL OVA for 24 h. The levels of OVA-specific IFN- $\gamma$  and IL-4-secreting cells were examined by individual cytokine-specific ELISPOT assay. Mice were intradermally vaccinated 2 times weekly with OVA as i.d.. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 3-5 mice.

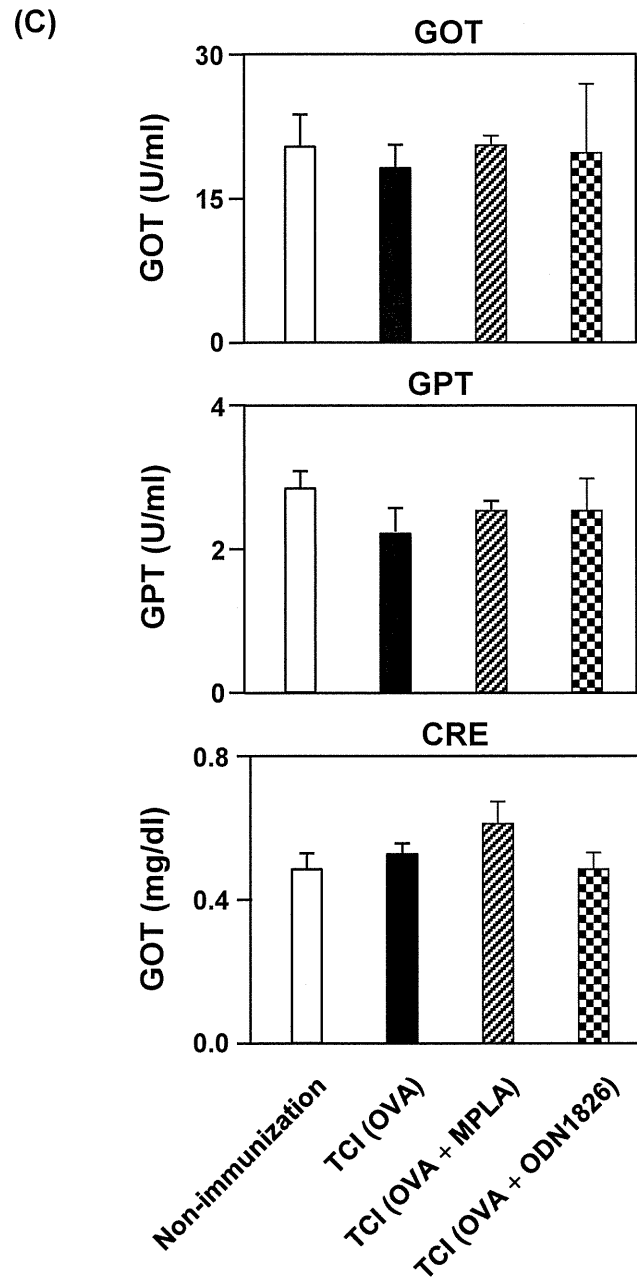
(A)



(B)

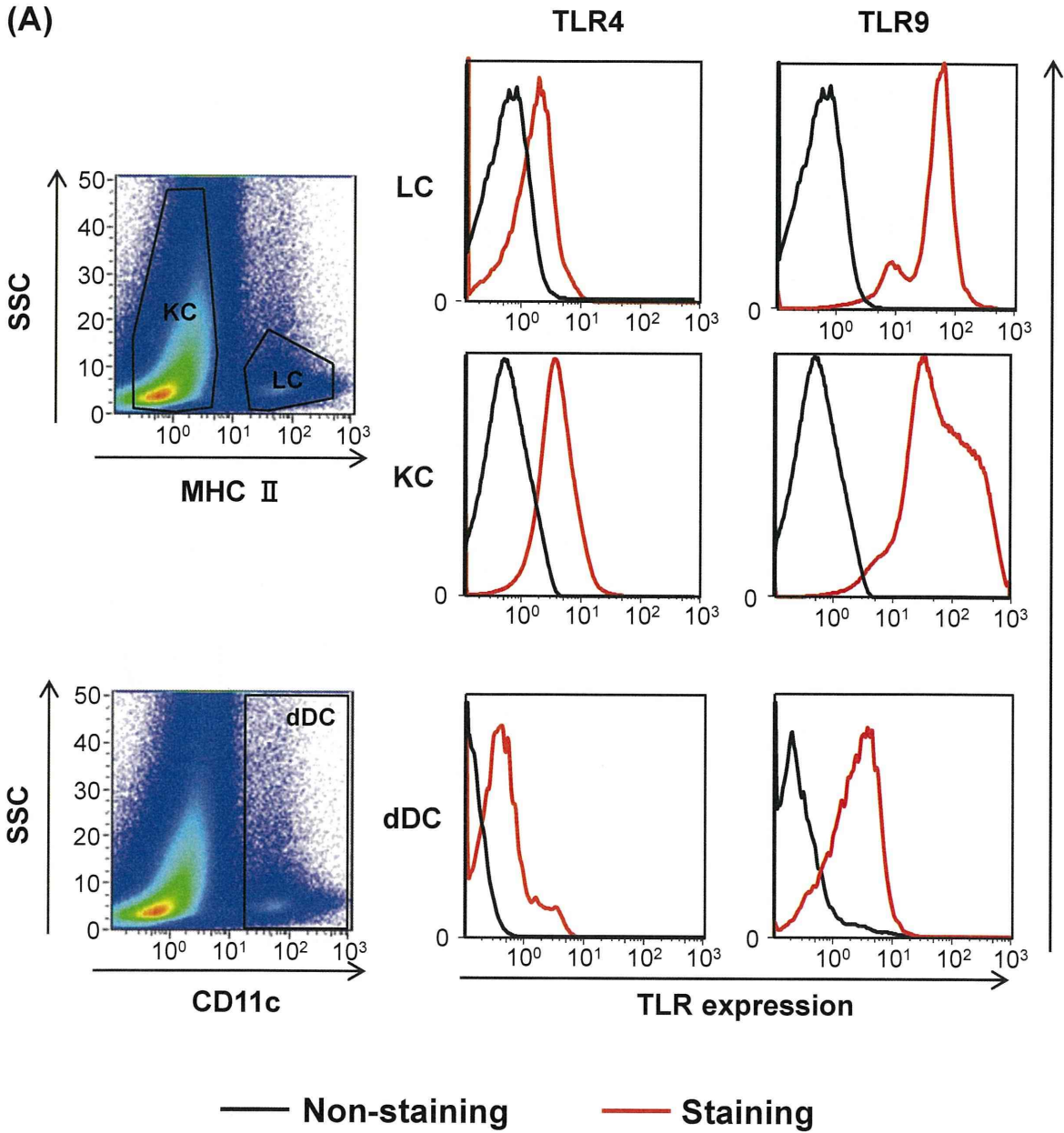


(continued)

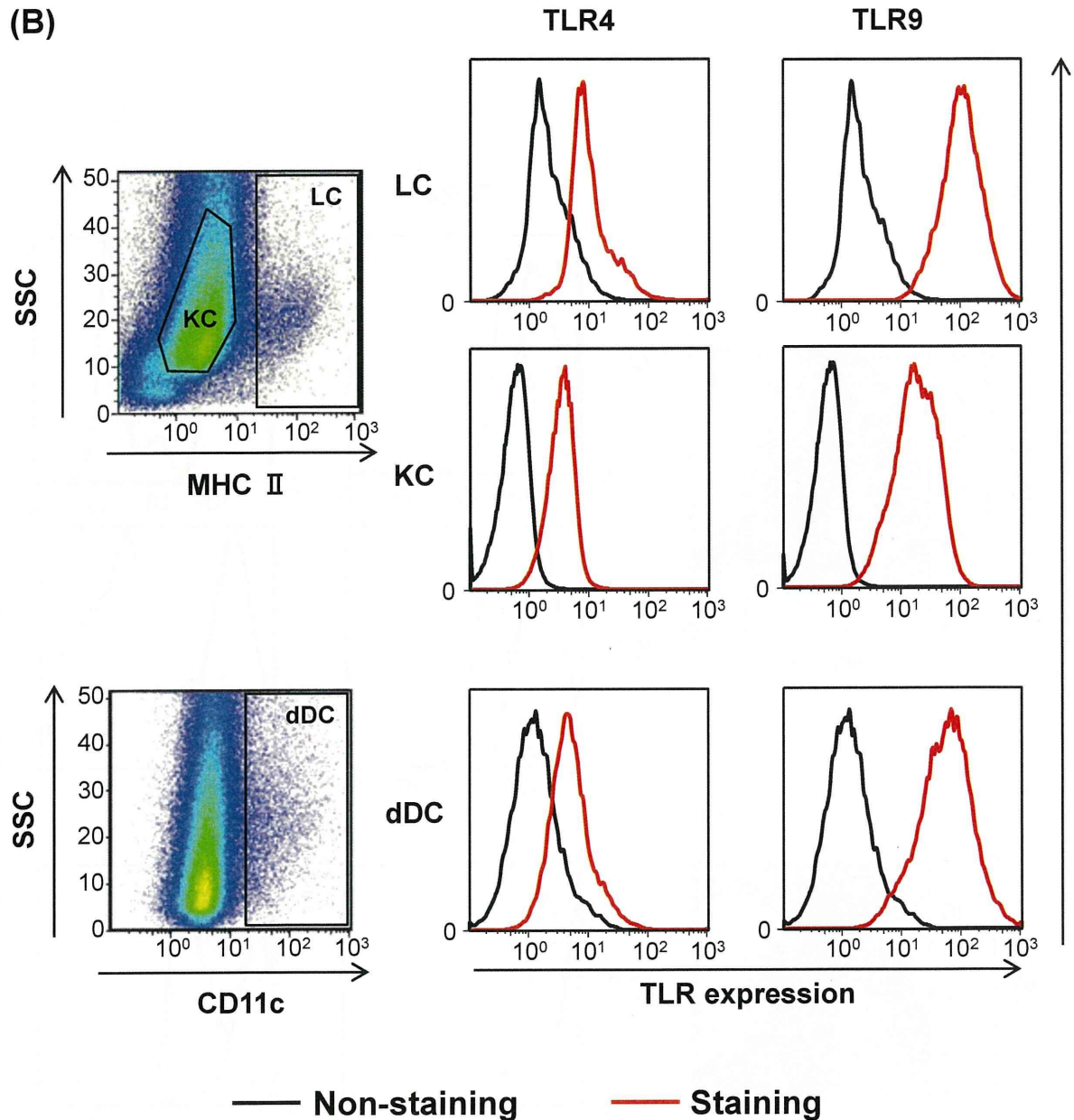


**Fig. 35** Systemic side effects induced by TCI using TLR-L-containing MH800. C57BL/6 mice were applied with MH800 containing OVA in combination with or without either MPLA or ODN1826 on day 0 and 14. (A) Body weight change of these mice was measured. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 3-5 mice. (B) Organ weight of these mice was measured on day 28. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 3-5 mice. (C) GOT, GPT, and creatinine in the sera collected from these mice on day 28 were measured. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 3-5 mice.

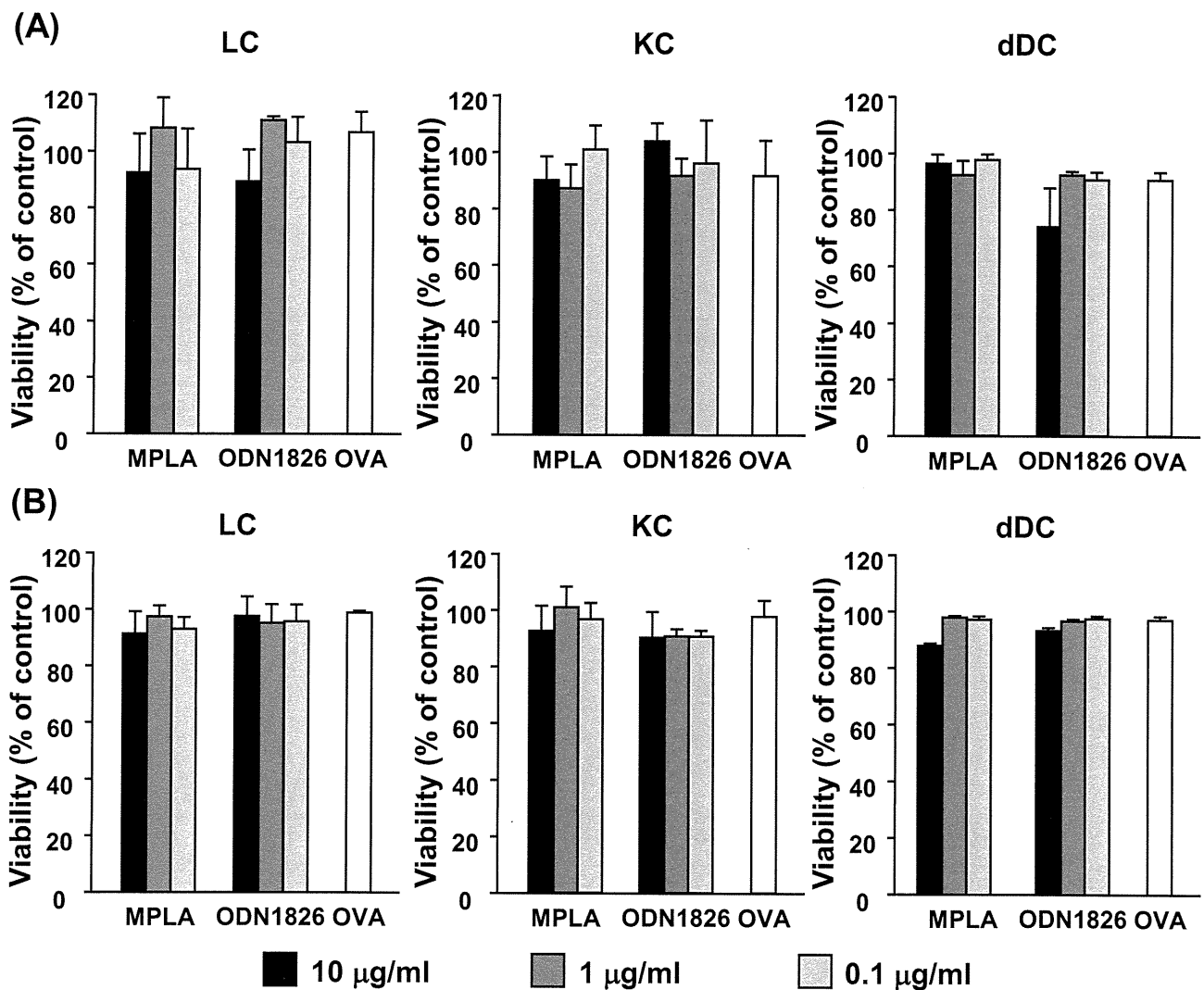
(A)



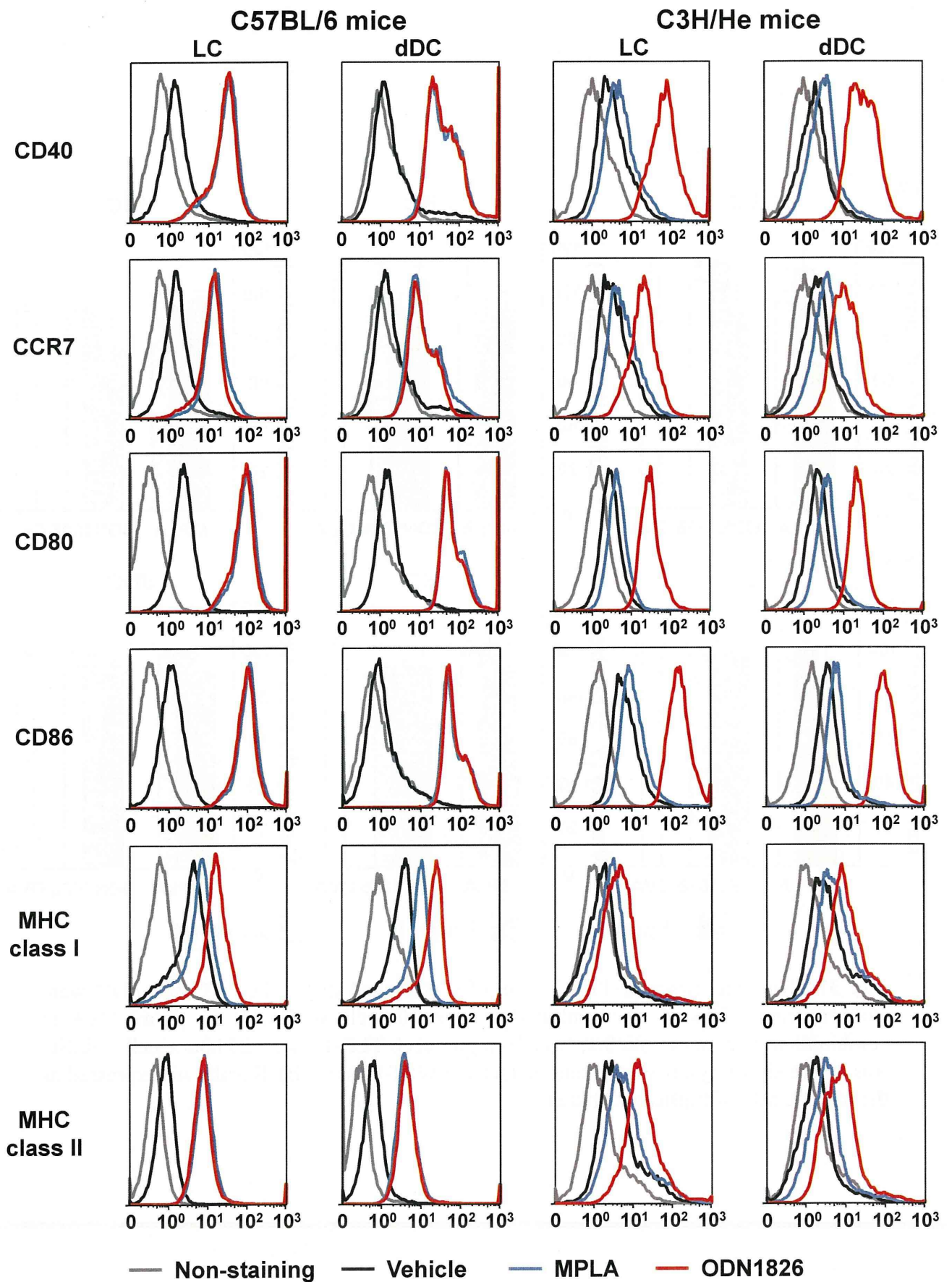
(continued)



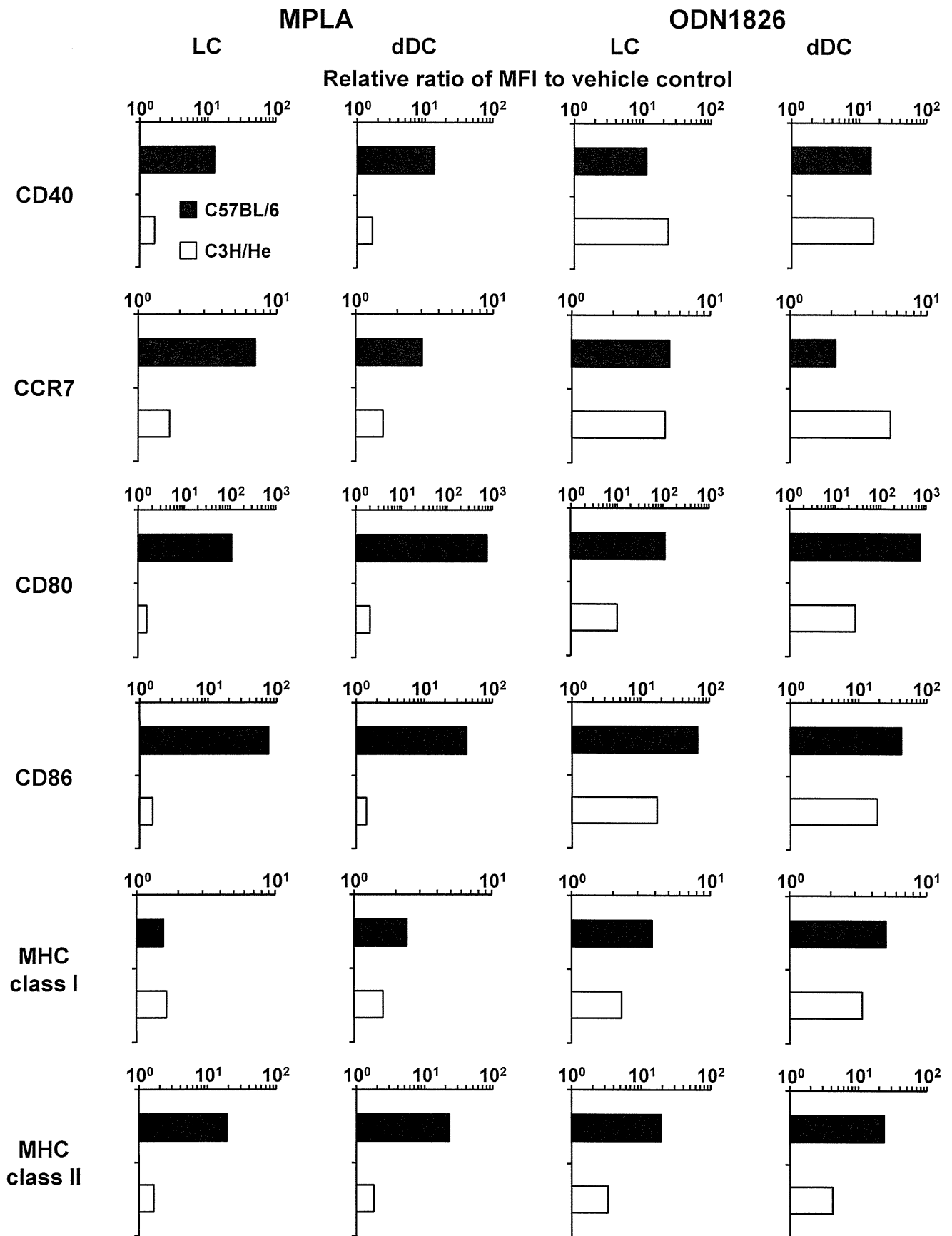
**Fig. 36** Expression of TLR4 and TLR9 on LCs, KCs, and dDCs. Epidermal cells and dermal cells were isolated from skin of C57BL/6 mice (A) or C3H/He mice (B) and were stained with anti-MHC class II antibody and anti-CD11c antibody, respectively. After that, these cells were stained with anti-TLR4 and anti-TLR9. For intracellular detection of TLR, cell fixation-permeabilization was performed before staining with antibodies. These cells were analyzed for the expression of TLR4 and TLR9 by flow cytometry. LCs and KCs were gated by MHC class II positive cells and negative cells on FSC-SSC dot plot of epidermal cells, respectively. dDCs were gated by CD11c positive cells on FSC-SSC dot plot of dermal cells. Black histogram represents non-staining group, and red histogram represents staining group.



**Fig. 37** Cytotoxic effect of TLR-Ls for LCs, KCs and dDCs. LC, KC and dDC were isolated from C57BL/6 mice cultured at  $1 \times 10^4$  cells/well with 10 µg/ml OVA in combination without or with 0.1, 1, or 10 µg/ml each TLR-L. After 24 hours, cell viability was assessed by Crystal Violet staining (A) and WST-8 assay (B). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of triplicate cultures.

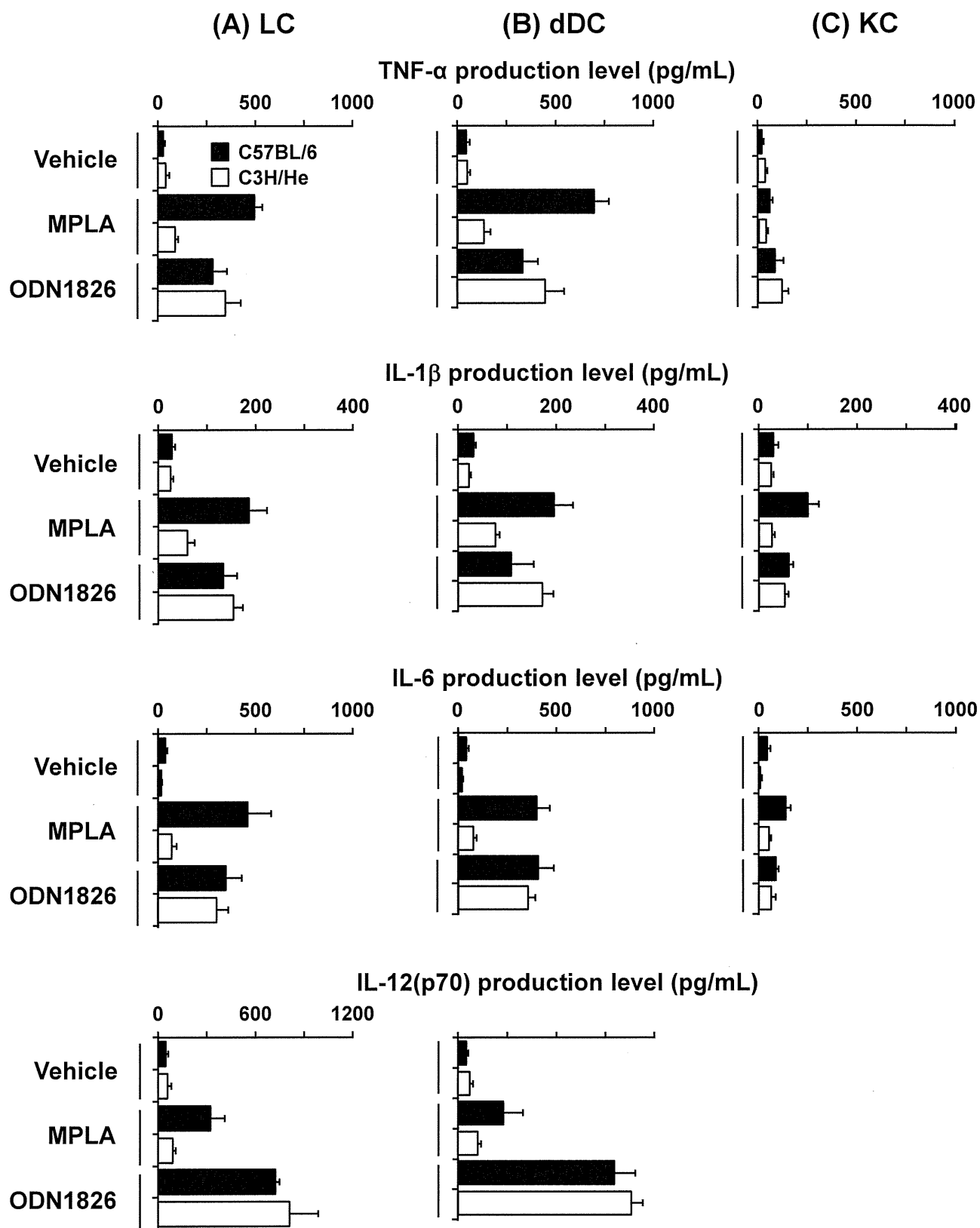


(continued)



**Fig. 38** Expression pattern of cell surface marker on LCs and dDCs from C57BL/6 mice or C3H/He mice stimulated by TLR-Ls. LCs and dDCs isolated from C57BL/6 mice or C3H/He mice were cultured at  $5 \times 10^5$  cells/well without (black histogram) or with 10  $\mu$ g/ml MPLA (blue histogram) or ODN1826 (red histogram). After 24 hours cultivation, cells were stained using mAbs of the indicated specificities and analyzed by flow cytometry. Gray histogram represents non-staining group. X-med shows the medial MFI value. X-mean shows the average MFI value.





**Fig. 39** Cytokine profile of LC, KCs and dDC from C57BL/6 mice or C3H/He mice stimulated by TLR-Ls. LCs, KCs and dDCs isolated from C57BL/6 mice (■) or C3H/He mice (□) were cultured at  $5 \times 10^5$  cells/well with or without 10  $\mu\text{g/ml}$  MPLA or ODN1826 each. After 24 hours cultivation, cell free supernatants were collected, and TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) and IL-12 (D) production level were measured by ELISA. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of triplicate cultures.

分担研究報告書

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

研究分担者 小豆澤 宏明  
大阪大学大学院医学系研究科 助教

本分担研究では、独自に開発した生分解性マイクロニードル（皮膚内溶解型マイクロニードル）を基材とするインフルエンザ経皮ワクチン製剤のヒトにおける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。本年度は、抗原を装填していない皮膚内溶解型マイクロニードルをヒト皮膚に貼付し、本デバイスの穿刺特性を解析するとともに安全性評価を実施した。皮膚内溶解型マイクロニードルは針部に装填した抗原をヒト皮膚組織内へと痛みを伴うことなく簡便に送達し得ることを見出した。また、皮膚内溶解型マイクロニードルの貼付は一過性の軽微な皮膚局所反応を示すのみであり、重篤な副作用を誘発しないことを確認した。これらの結果を総合して、皮膚内溶解型マイクロニードルがヒトに安全に適用できる経皮ワクチンデバイスであると判断し、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。

#### 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（皮膚内溶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。

本研究では、倫理委員会の審査・承認を経て MH のヒト皮膚への穿刺特性を検証し、経皮ワクチンデバイスとしての基礎情報の集積を図る。また、MH のヒトにおける安全性、さらにはインフルエンザ HA 抗原を装填

した MH 製剤のヒトにおける安全性・有効性を検証する臨床研究を実施する。

本研究成果を経皮ワクチン製剤の実用化研究を加速する臨床情報として活用し、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. 針部到達深度の解析

#### (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、針部の長さおよび形状が異なるMH500およびMH800を作製した (Fig. 1)。作製した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。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格したMHを使用した。

#### (2) MHの貼付

MHを被験者の上腕外側皮膚に置き、パネ式アプリーケーターを用いて皮膚に圧着させた (Fig. 2)。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  $\mu\text{m}$ 間隔で撮影した連続断層像をデジタル処理により3次元化し、深さ100  $\mu\text{m}$ 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.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.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。

#### (2) MHの貼付

MHの貼付法はB.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. MHのヒトにおける安全性評価

#### (1) MHの作製

B.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.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 1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 2) 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。

#### (倫理面への配慮)

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には厳重に保管・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。