

## 第9章 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

松尾一彦\*1, 岡田直貴\*2, 中川晋作\*3

### 1 はじめに

新興・再興感染症の世界的流行が危惧される昨今、薬物治療の陰に隠れていたワクチンの重要性が再認識されるようになってきた<sup>1)</sup>。周知のように、ワクチンは病原体の弱毒・無毒化株、あるいは病原体に含まれるコンポーネントの一部を生体内に投与することで体内に免疫を誘導し、感染症を未然に罹りにくくする唯一の根本的予防手段である。しかし現在実用化されているワクチンは、ポリオに対する経口免疫など一部を除けば、その大半が注射による免疫法である。注射は、①痛みを伴う、②接種に医療技術者を必要とする、③注射針を介した感染の危険性がある、④輸送や保管に一貫した冷蔵管理を必要とする、などの問題点を有しており、これらの点はワクチンを最も必要としている開発途上国などの地域に、技術的・経済的な理由からワクチンが浸透しにくい原因となっている。また注射投与型ワクチンでは感染症パンデミックなどが発生したときに迅速に大規模ワクチン接種を施行しにくいことも欠点としてあげられる。したがって、注射投与に代わる効果的かつ簡便、安価、低侵襲な新規ワクチン手法の開発は世界共通の研究課題であると言える<sup>2, 3)</sup>。本観点から筆者らは、注射に代わる新規剤形ワクチンとして経皮免疫製剤（貼るワクチン）の開発研究を推進し、開発途上国へのワクチン普及の促進に大きく貢献できる基盤技術の確立を図っており、本稿ではその取り組みについて紹介する。

### 2 免疫組織としての皮膚

貼るワクチンの標的組織である皮膚は解剖学的に観察すると、外側から角質層、生きた表皮、真皮の3層に分けられる（図1）。皮膚は常時外界からの異物侵入の危機にさらされているために、皮膚の最外に存在する角質層を中心とした「物理的バリア」を有している<sup>4)</sup>。また近年皮膚は生体を守る「免疫学的バリア」としても非常に重要な役割を果たしていることが知られるようになった。生きた表皮を構成する細胞の約95%を占めるケラチノサイトは、異物侵入を感知してサイトカイン・ケモカインを産生することで自然免疫の誘導に関わる<sup>5)</sup>。またケラチノサイトの細胞間隙には、ランゲルハンス細胞（Langerhans cell; LC）と呼ばれる強力な抗原提示細

\*1 Kazuhiko Matsuo 大阪大学 薬学研究科 薬剤学分野 特任研究員

\*2 Naoki Okada 大阪大学 薬学研究科 薬剤学分野 准教授

\*3 Shinsaku Nakagawa 大阪大学 薬学研究科 薬剤学分野 教授

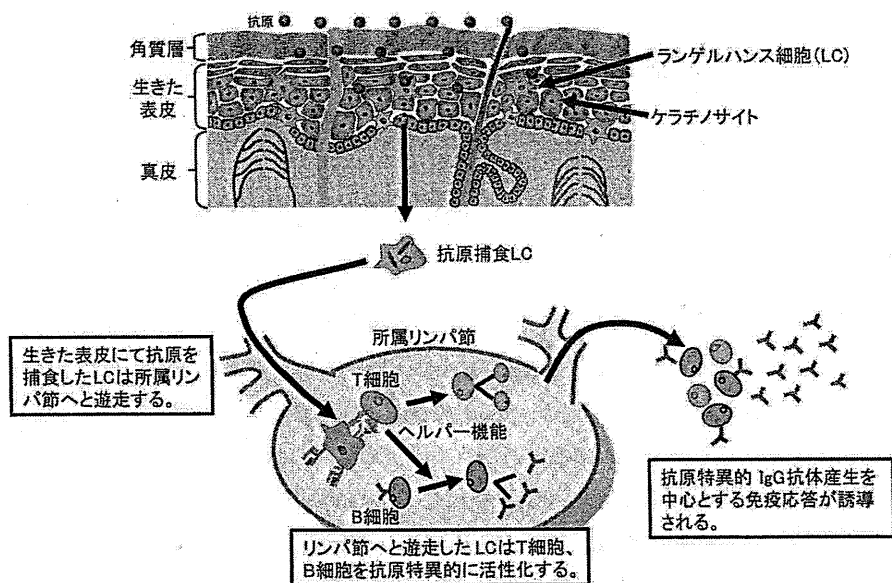


図1 経皮免疫誘導メカニズム

胞が存在しており、生きた表皮にて異物を認識・捕食したLCは所属リンパ節へと遊走し、T細胞、B細胞を抗原特異的に活性化する<sup>6)</sup>。すなわち、ワクチン抗原を生きた表皮に存在するLCへと送達することができれば、それに続く一連の免疫応答により、抗原特異的なワクチン効果が期待できる(図1)。

### 3 経皮薬物デリバリー技術を用いた経皮ワクチンの開発

上述したように、皮膚の最外層を構成する角質層は物質透過における最大の障壁として機能しているために、ワクチン抗原のようなペプチドや蛋白質を単に皮膚に塗布するだけではLCの存在する生きた表皮へと送達することは困難である<sup>4)</sup>。

そこで、経皮薬物デリバリー技術を用いてワクチン抗原をLCが常在する生きた表皮へと局所的に送達することでワクチン効果の誘導を期待する経皮投与型ワクチンが考案された。具体的には、エレクトロポレーション法<sup>7)</sup>、イオントフォoresis法<sup>8)</sup>、ソノフォoresis法<sup>9)</sup>を利用した経皮ワクチンの開発が試みられてきた。しかしながら、これらの経皮ワクチンは確かに注射型ワクチンと同レベルの免疫応答を誘導することが報告されているが、いずれも大型な電源装置を必要とするために汎用性に欠けるなどの課題を残している。また現在では、より簡便で安全な経皮ワクチン手法の開発が行われており、まさに皮膚に貼るだけという簡便な操作で免疫応答を誘導することができる経皮ワクチン製剤の研究開発に注目が集まっている。

#### 4 親水性ゲルパッチを応用した貼るワクチンの開発

筆者らは、コスメディ製薬㈱との共同で経皮ワクチンデバイスとして親水性ゲルパッチを応用した経皮免疫製剤の開発を推進している<sup>10-12)</sup>。親水性ゲルパッチはアクリル酸エステル系の粘着基材をベースに、吸収促進剤や湿潤剤を配合したシート状のデバイスである（図2A）。本パッチは医薬品または化粧品として既にヒトに使用されている素材のみで作製しているために、安全性には問題ないと考えられる。また、本パッチに抗原溶液を滴下するだけという簡便な方法で経皮免疫製剤を調製することができ、抗原を含有させた状態で取り扱うことができるために、輸送や保管が容易になる。さらに本製剤は水分のみが高分子ゲル体に吸収され、パッチ表面上に抗原の濃縮層が形成される特徴を有する（図2B）。

これまでに、蛍光標識モデル抗原を含有させた親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に貼付すると、抗原は角質層を透過して表皮にまで到達し、LCに捕捉されることを確認している。また抗原を取り込んだLCは免疫誘導の場である所属リンパ節へと遊走し、抗原的な免疫応答を誘導できることを明らかとしている。

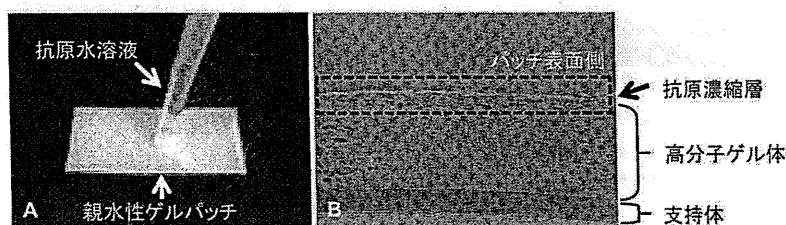


図2 親水性ゲルパッチ

#### 5 親水性ゲルパッチを応用した破傷風・ジフテリアトキソイドワクチンの有効性

そこで、本親水性ゲルパッチを用いて破傷風・ジフテリア感染症モデルにおける経皮ワクチンシステムの有効性と安全性について検証した。破傷風トキソイド (TT) およびジフテリアトキソイド (DT) (一般財団法人阪大微生物病研究会より提供) を混合して浸み込ませた親水性ゲルパッチを調製し、ヘアレスラット背部皮膚に24時間、2週間隔で8回貼付することで経皮ワクチンを実施した（図3）。これらのラットでは、2回免疫後から血中に各トキソイド特異的なIgG抗体価の上昇が確認され、その後免疫回数を増やすことで注射ワクチン群と同等またはそれ以上の抗体価を示すことが判明した。また、誘導された各トキソイド特異的IgG抗体が破傷風毒素あるいはジフテリア毒素に対する十分な中和活性を有していることも明らかとしている。

さらに感染症予防におけるワクチンは抗原特異的抗体を一時的に産生するのではなく、長期的な免疫記憶をも形成させることが理想である。そこで本経皮ワクチンにより誘導された抗トキソイド抗体価の長期的な推移を観察した（図4）。二種混合経皮ワクチン群においては、時間経過

次世代バイオ医薬品の製剤設計と開発戦略

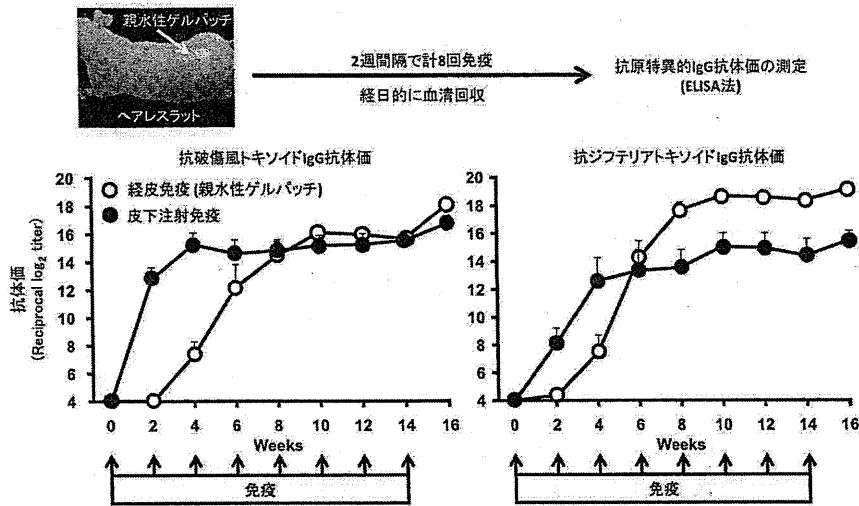


図3 TT/DT 経皮ワクチンによる抗原特異的IgG抗体産生

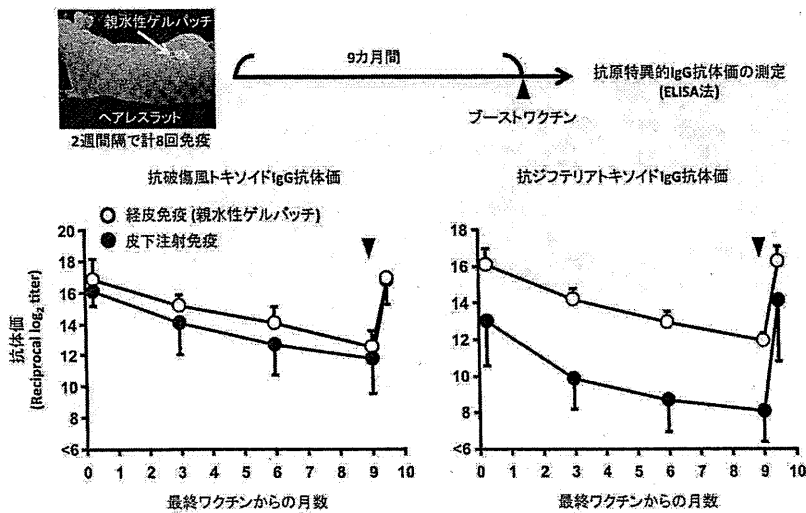


図4 TT/DT 経皮ワクチンの長期免疫誘導効果

とともに徐々に抗体価の減少が認められるものの注射免疫群と同等であり、最終ワクチンから9カ月経過した時点においても高い抗トキソイド抗体価が維持されていた。これらのラットに追加ワクチン（ブーストワクチン）したところ、抗トキソイド抗体価の回復が認められた。このことからワクチン接種してから長期間経過した状態においても、本経皮ワクチンシステムにより形成された免疫記憶によってブースト効果が得られることが示された。以上のことから、筆者ら独自の経皮ワクチン製剤は破傷風・ジフテリアに対して非常に有効なワクチン効果を発揮できることが実証できた。また、これらのラットにおいてパッチを貼付した皮膚局所に顕著な刺激性は観察されなかったこと、血液検査や主要臓器の病理組織検査においても異常は認められなかったこと

から、本経皮ワクチン製剤は安全性にも優れることが判明した。これらの動物実験の結果に基づき、破傷風・ジフテリア経皮ワクチンの安全性・有効性を検証する臨床研究を奈良県立大学にて実施したところ、顕著な副反応を示すことなく抗トキソイド抗体価の上昇を達成できることが明らかとなり、親水性ゲルパッチは早期実用化が期待できる非常に有用な新規経皮ワクチンデバイスであることが示された。

## 6 皮膚内溶解型マイクロニードルを応用した貼るワクチンの開発

親水性ゲルパッチは抗原がトキソイドのような可溶性抗原の場合には高い角質層透過促進効果を発揮できるものの、インフルエンザ HA 抗原をはじめとする粒子状抗原の皮膚内デリバリーには不適である。現行のワクチン抗原の大半が粒子状の形態であることを考慮すると、貼るワクチンの汎用性や利便性の拡大に向けては、可溶性抗原のみならず粒子状抗原にも対応できる新たな経皮ワクチンデバイスの開発が必要不可欠となる。

そこで筆者らはコスメディ製薬㈱との共同でヒアルロン酸を主成分とする皮膚内溶解型マイクロニードル (MicroHyal; MH) を応用した経皮ワクチン製剤の開発にも取り組んでいる (図5)。マイクロニードル法は微小針を用いて角質層を物理的に突破し、痛みを伴うことなく針に内包または吸着させた抗原を簡便に皮膚内へと送達する技術であり、それを利用した蛋白質医薬品の経皮投与、経皮ワクチンなどの開発は世界的な関心を集めている。しかしながら、ステンレスやチタンを用いる従来のマイクロニードルは微小針が皮膚内で折れ残る危険性が指摘されてきた<sup>18)</sup>。一方、MH は生体適合性に優れたヒアルロン酸を主成分としているために高い安全性が期待できるとともに、針自体が皮膚内の水分によって溶解して内封抗原を角質層下へ送達し、針の折れ残りの心配がない。実際に、抗原封入皮膚内溶解型マイクロニードルを貼付すると、針は皮

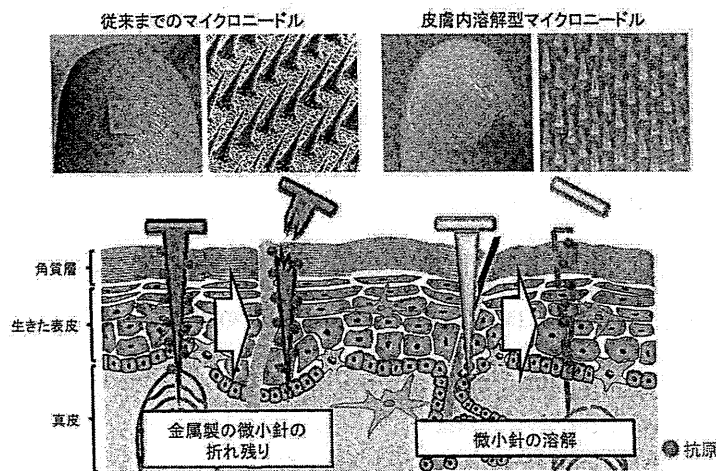


図5 皮膚内溶解型マイクロニードル

膚内で溶解しており、内包物質の形状が可溶性分子、不溶性粒子に拘わらず、LCが存在する生きた表皮、さらにはその下の真皮へと送達できることが示された。さらに本マイクロニードルはニードルの長さや形状を自由に調節することが可能である。現在、TT/DTや三価季節性インフルエンザHA抗原、SE36マラリア抗原（一般財団法人阪大微生物病研究会より提供）を用いた有効性評価において良好な結果が得られており、今後の展開に期待がもたれる。

## 7 おわりに

現在では他の研究グループにおいても、パッチ製剤ならびにマイクロニードルを利用した経皮免疫製剤の基盤技術開発および臨床試験が行われている。また従来の注射投与に代わる新規ワクチン手法として、抗原を経鼻的に投与する「吸うワクチン」<sup>14)</sup>や経口的に投与する「飲むワクチン」<sup>15)</sup>の基礎研究ならびに応用研究も進められており、最近では噴霧型のインフルエンザ生ワクチンとしてFlumistが実用化された。我が国においても、このような次世代型ワクチンの研究に多大な国家予算が投じられており、産官学が一丸となって取り組んでいる。さらに、新規ワクチンに対する臨床・非臨床・アジュバントのガイドラインも作成され、次世代型ワクチンの革新的な技術の審査基準に反映し、その開発を加速する対策も取られている。これらのことから、新規剤形ワクチンの開発、そしてその応用製品の実用化ならびに上市がいかに待望されているかが窺える。

本研究で示した親水性ゲルパッチならびに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（貼るワクチン）は、従来までの注射に代わる新規剤形ワクチンとして、接種を簡便、安全、安価にする非常に有用なアプローチであり、いずれの経皮免疫製剤も臨床応用の一歩手前の段階にある。したがって、本研究成果は世界初の貼るワクチンの実用化に向けた革新的な一歩を与えるものであると確信しており、ワクチン普及を強力に推進することで感染症に対して安全・安心な社会の実現に大きく貢献できることを期待する。

## 文 献

- 1) E.K. Hui, *Microbes. Infect.*, **8**, 905 (2006)
- 2) E.L. Giudice *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 68 (2006)
- 3) N. Azad *et al.*, *Curr. Drug Deliv.*, **3**, 137 (2006)
- 4) B.W. Barry, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 165 (2004)
- 5) K. Sugita *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, **147**, 176 (2007)
- 6) A.R. Mathers *et al.*, *Immunol. Res.*, **36**, 127 (2006)
- 7) P. Chiarella *et al.*, *Curr. Gene Ther.*, **10**, 281 (2010)

第9章 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

- 8) Y. Wang *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **60**, 179 (2005)
- 9) B.E. Polat *et al.*, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **7**, 1415 (2010)
- 10) Y. Ishii *et al.*, *J. Control. Release*, **131**, 113 (2008)
- 11) K. Matsuo *et al.*, *J. Control. Release*, **149**, 15 (2011)
- 12) K. Matsuo *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 586 (2011)
- 13) S.A. Coulman *et al.*, *Curr. Drug Deliv.*, **3**, 65 (2006)
- 14) M. Prabakaran *et al.*, *Antiviral Res.*, **86**, 180 (2010)
- 15) T. Nochi *et al.*, *Nat. Mater.*, **9**, 572 (2010)

## 第2節 経皮ワクチン製剤の実用化に向けた取り組み

はじめに

2009年にメキシコで発生したH1N1豚インフルエンザ<sup>1)</sup>はその後世界的規模で流行し、社会ならびに経済に大きな打撃を与えた。また、結核<sup>2)</sup>やマラリア<sup>3)</sup>のような一度は抑圧された感染症が多剤耐性株の出現などにより、世界中で再び猛威を奮っている。このような新興・再興感染症の蔓延が脅威となる中、ワクチンがその阻止に最も効果的な対策であることから、現在様々な観点で新規ワクチンの開発が試みられている。新種の感染症に対する抗原あるいは既知の感染症に対するより有効かつ安全なワクチン抗原の同定・精製、パンデミック発生時に抗原を大量かつ迅速に供給できる抗原作製技術や大規模接種を可能とする安全かつ簡便、安価なワクチンデバイスの開発が多くの研究グループによって行われている。

とりわけ、新規ワクチンデバイスの開発は、従来のワクチン手法が抱える問題点を克服し、様々な感染症ワクチンの有用性を向上させると考えられる。これまでに実用化された数多くのワクチンは、ポリオ生ワクチンの経口免疫など一部を除いて、その大半が注射型ワクチンである。しかしながら、注射型ワクチン製剤は投与に医療従事者を必要とし、注射針を介した二次感染の危険性がある。また、注射剤の輸送・保管にコールドチェーンが不可欠であるなど、技術的・経済的な制約が実際にワクチンを最も必要としている開発途上国などの地域にワクチンが浸透しにくい原因となっている。さらに、感染症パンデミックやバイオテロリズム発生時にワクチンの大規模投与を迅速に施行できない点も懸念されている。このように、注射に代わる簡便で有効かつ安全な新規ワクチン手法の確立が待望されていることから、筆者らは皮膚をターゲットとした経皮ワクチン製剤、すなわち「貼るワクチン」の開発を推進しており、その実用化に向けた取り組みを紹介する。

### 1. 免疫組織としての皮膚

皮膚は、経皮ワクチンのターゲットとして非常に優れた器官である(図1)。解剖学的に皮膚は外側から、角質層、生きた表皮、真皮という順番で大きく3層に分けられている。そして常に外界からの異物侵入の危険にさらされている器官であるため、最外層に存在する角質層が物質透過を制限する物理的バリアーとして機能している。また、皮膚は物理的バリアーとしてだけでなく、生体を守る免疫系が高度に発達した「免疫学的バリアー」をも兼ね備えた組織である。生きた表皮は各種サイトカインやケモカイン、増殖因子を分泌するケラチノサイトが約90%を占



めており、異物侵入に対する自然免疫の誘導に関わっている。また、ケラチノサイトの細胞間隙には、抗原提示細胞の一つであるランゲルハンス細胞（LC）が散在している。さらに真皮には、真皮樹状細胞や肥満細胞、単球などの細胞群が存在し、免疫学的バリアーの形成に関与している。特に生きた表皮に常在する LC は免疫監視機構において非常に重要な役割を担っており、異物を認識・捕食した LC は免疫誘導の場である所属リンパ節へと遊走する。そして T 細胞ならびに B 細胞を抗原特異的に活性化することで、全身性の獲得免疫応答を誘導する。したがって、ワクチンとして抗原を効率よく生きた表皮に送達することができれば、抗原特異的な免疫応答を強力に誘導できるものと期待される。

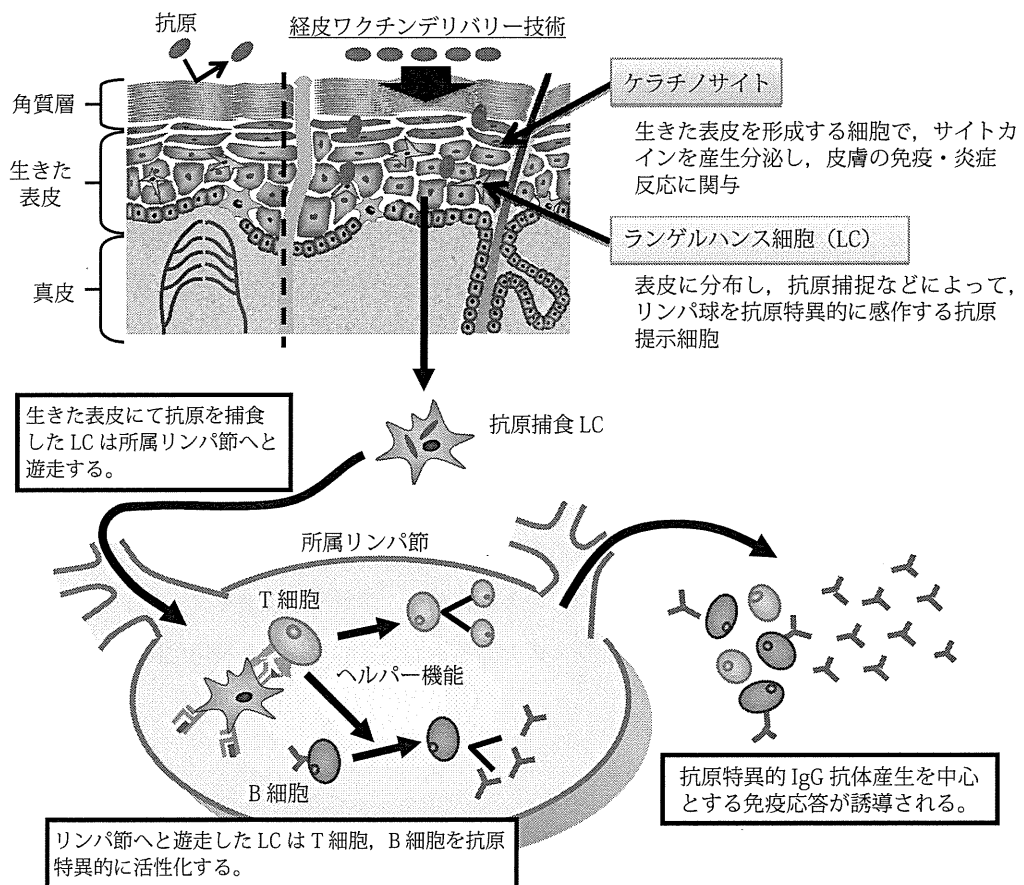


図1 経皮免疫誘導メカニズム

## 2. 経皮薬物デリバリー技術の経皮ワクチンへの応用

上述のとおり、皮膚には物質透過のバリアーとなる角質層が存在するため、水溶性で分子量

500 以上の物質は透過しにくいと言われている<sup>4)</sup>。したがってペプチドや蛋白質といった高分子の抗原を単に皮膚表面に塗布するだけでは、生きた表皮に常在する LC に抗原を効率よく送達することはできず、効果的な免疫応答を誘導することはできない。そこで、DDS 領域で開発されてきた経皮薬物デリバリー技術を経皮ワクチンデリバリー技術として応用し、角質層下の生きた表皮にまでワクチン抗原を送達でき、ワクチン効果を得られる「経皮ワクチン」の開発が試みられてきた<sup>5)</sup>。

具体例としては、皮膚への電圧負荷により一時的に角質層に孔をあけるエレクトロポレーション法<sup>6)</sup>、電圧負荷による水の移動とともに抗原を生きた表皮へと送達するイオントフォoresis 法<sup>7)</sup>、Jet injector という特殊なデバイスを用いて空気の圧力によって抗原を送達する方法<sup>8)</sup>を応用した経皮ワクチンが報告されている。これらの手法によって確かに抗原が角質層を透過して生きた表皮にまで送達されることが実証されており、抗原特異的 IgG 抗体価の上昇が認められている。しかし特殊な装置を必要とすることから簡便性に乏しく、何よりも角質層本来のバリアー機能を破壊してしまうために二次的な炎症や感染を引き起こす危険性があるため、今のところ実用化までには至っていない。現在ではより簡便で安全な経皮ワクチン手法の開発が行われており、まさに皮膚に貼るだけという簡便な操作で免疫応答を誘導することができる経皮ワクチン製剤の研究開発に注目が集まっている。

### 3. パッチを用いた「貼るワクチン」の開発

特殊な装置を必要とせず、まさに皮膚に貼るだけで免疫応答を誘導可能な「貼るワクチン」の開発が精力的に行われている。IOMAI 社（2008 年に Intercell 社により買収）および国立感染症研究所は、粘着性パッチおよびガーゼパッチを応用した「貼るワクチン」において、抗原特異的な免疫応答を誘導できることを報告している<sup>9,10)</sup>。しかしながら、これらの経皮ワクチン製剤は抗原の十分なデリバリーのために、角質層あるいは角質層脂質成分を部分的に除去する前処理を必要とし、また効果的な免疫応答を誘導するためにはアジュバントを併用しなければならない。さらに、ガーゼパッチを応用した経皮ワクチン製剤は、皮膚に適用する直前に抗原溶液を浸み込ませるため、簡便性に欠けており、また注射型ワクチンと同様に抗原溶液の輸送や保管にコールドチェーンを必要とする。このような問題点が指摘される中、筆者とコスメディ製薬株式会社が共同開発した親水性ゲルパッチを応用した貼るワクチン（図 2A）は、皮膚の前処理やアジュバントの併用をすることなく抗原特異的な抗体産生を誘導できる点で画期的である<sup>11-13)</sup>。親水性ゲルパッチはアクリル酸エステル系粘着基剤をベースに、湿潤剤、吸収促進剤など既に臨床適用されている安全性の高い材料を配合して作製している。また、本パッチの皮膚貼付面に抗原タン

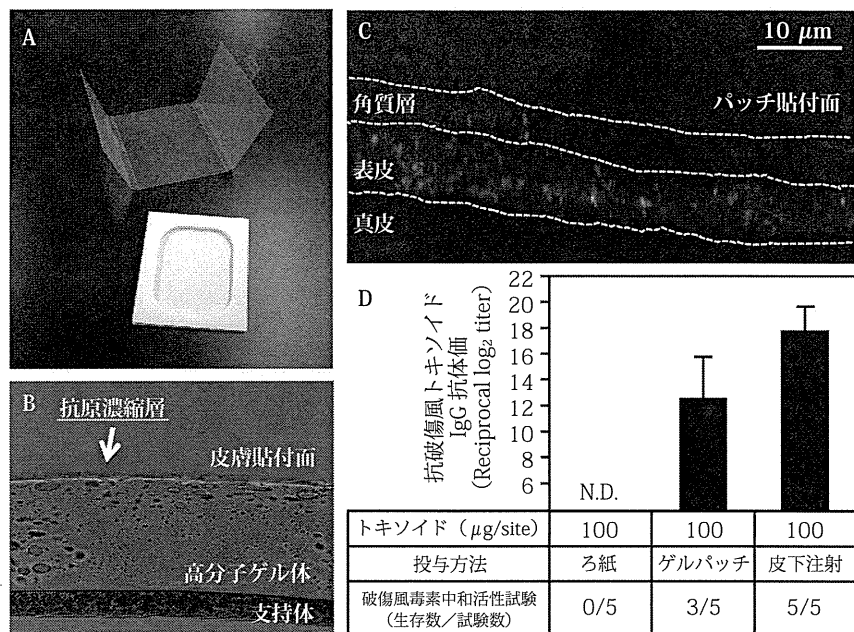
パク質水溶液を滴下すると、水分のみが高分子ゲル体に吸収されてパッチ表面に抗原タンパク質の濃縮層が形成される（図 2B）。このように、抗原を含浸させた状態で取り扱うことができるために、輸送・保管が容易になると考えられる。

親水性ゲルパッチによる抗原分子の角質層透過の一つの機構として、パッチの角質層に対する水和効果が挙げられる。すなわちパッチを皮膚に貼付すると、皮膚からの水分蒸散が妨げられ、角質層の水分含量が増大する。それによって角質層の細胞間隙を構成する脂質二重層の構造が緩み、水溶性の高分子が角質層へと分配しやすくなると考えられる。またもう一つの機構としては、パッチを用いることにより皮膚表面の抗原濃度勾配が増大できることが挙げられる。抗原濃縮層が形成されたパッチを皮膚に貼付すると、角質層にワクチン抗原が分配し、皮膚表面に大きな抗原濃度勾配が現出される。これが単純拡散の駆動力となって抗原の角質層透過が促進されると考えられる。これまでに、蛍光標識モデル抗原を含浸させた親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に貼付すると、抗原は角質層を透過して表皮組織にまで到達することを確認している（図 2C）。また、角質層を透過した抗原を捕食した LC が免疫誘導の場である所属リンパ節へと遊走し、抗原特異的な免疫応答を誘導できることを明らかにしている<sup>11)</sup>。

本親水性ゲルパッチを用いて破傷風感染症モデルにおける経皮ワクチンシステムの有効性について検証した（図 2D）。破傷風トキソイドを浸み込ませたろ紙あるいは親水性ゲルパッチを調製し、ヘアレスラット背部皮膚に 24 時間貼付することで経皮ワクチンを実施した。2 週間隔で 3 回免疫し、最終免疫から 2 週間後における血中の破傷風トキソイド特異的な IgG 抗体価を測定したところ、親水性ゲルパッチ貼付群において抗体価上昇が認められた。また、誘導された破傷風トキソイド特異的な IgG 抗体が破傷風毒素に対する十分な中和活性を有していることも判明した。破傷風・ジフテリアトキソイド混合ワクチンにおいても、各トキソイド特異的な IgG 抗体が産生され、それらが各毒素に対する中和活性を有することを明らかにしている<sup>12)</sup>。さらに、これらのラットにおいてパッチを貼付した皮膚局所に顕著な刺激性は認められなかったこと、各種血液検査や病理組織学的検査などにおいても異常が認められなかったことから、本経皮ワクチン製剤は安全性にも優れることが確認された。これらの動物実験の結果に基づき、破傷風・ジフテリア経皮ワクチンの安全性・有効性をヒトにおいて検証する臨床研究を実施したところ、顕著な副反応を示すことなく各トキソイド特異的な抗体価の上昇を達成できることが明らかとなり、親水性ゲルパッチは早期実用化が期待できる非常に有用な新規経皮ワクチンデバイスであることが示された。

しかしながら、今回臨床研究で用いた親水性ゲルパッチには、各トキソイドそれぞれ 2 mg という大量の抗原を使用している。そのため、簡便かつ安全だけでなく安価でより有効な経皮ワクチン製剤の実用化に向けては、抗原の角質層透過効率に優れる親水性ゲルパッチ、ならびに免

疫増強効果を図るための臨床応用可能な経皮アジュバントの開発をしていかなければならない。また、製剤安定性の評価、製剤製造法の樹立や品質試験法の確立など、「貼るワクチン」の製品化・実用化に向けた取り組みを推進していく必要がある。



- A. 製品化を志向した親水性ゲルパッチの形状と包装  
 B. 抗原タンパク質（赤色蛍光標識）水溶液を滴下して 30 分後の親水性ゲルパッチ断面の顕微鏡写真  
 C. 抗原タンパク質（赤色蛍光標識）を含む親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に 6 時間貼付した後、パッチ適用部位の皮膚組織を摘出し、LC の蛍光免疫染色（緑色）を行った。共焦点レーザー顕微鏡にて撮像した二次元データから三次元画像を構築した。  
 D. ヘアレスラット背部皮膚に破傷風トキシイド 100 µg を含んだ 1cm × 2cm のろ紙または親水性ゲルパッチを 24 時間貼付した。対照群のヘアレスラットには同量の破傷風トキシイドを背部皮下注射した。これらの免疫操作を 2 週間隔で 3 回繰り返す。最終免疫 2 週間後に血中の抗トキシイド抗体価を ELISA 法により測定した。また、最終免疫 2 週間後の血清を致死量の破傷風毒素と混和し、37℃ で 1 時間インキュベート後、マウスの大腿内側に皮下注射し、4 日間生存を観察した。N.D.; not detectable

図 2 親水性ゲルパッチ ※カラーの図は巻頭ページ参照

#### 4. マイクロニードルを用いた「貼るワクチン」の開発

親水性ゲルパッチは水溶性抗原物質の角質層への分配とその後の単純拡散を増大することによって LC への送達効率を上昇させるため、抗原物質が水に不溶性あるいは懸濁された粒子状形態の場合には適用が困難である。ところが、注射型ワクチン製剤として実用化されている抗原の多くは、無毒・弱毒化したウイルスや細菌、あるいはそれら病原体由来コンポーネントの凝集体といった粒子状形態であり、親水性ゲルパッチに適応可能なワクチン抗原は限定されてしまう

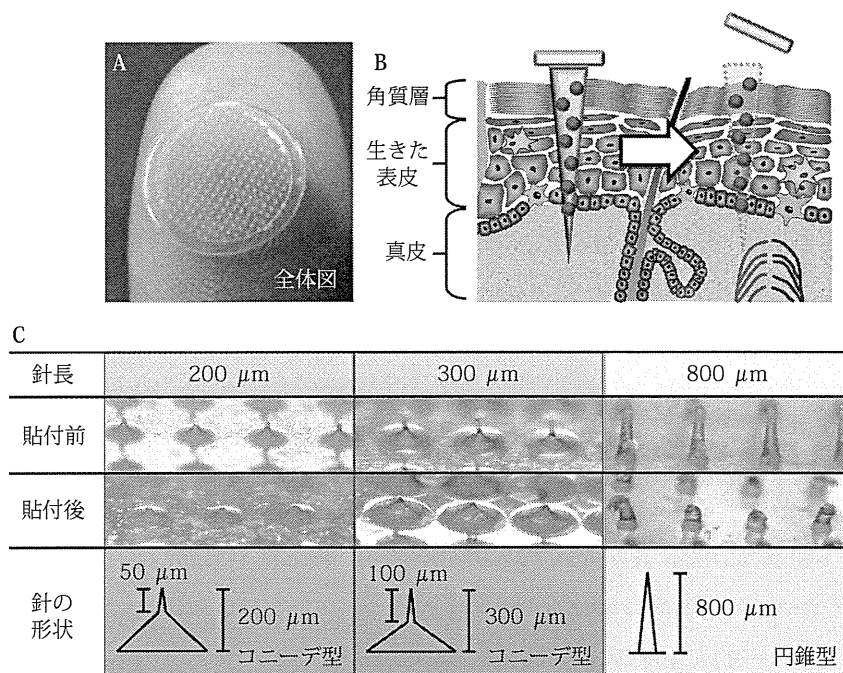
(表 1)。そこで、経皮ワクチン製剤の適応を拡大するためには、不溶性ならびに粒子状ワクチン抗原にも対応しうる新たな経皮ワクチンデバイスが必要とされる。

表 1 臨床使用されているワクチン抗原

成分	生ワクチン	不活化ワクチン	
	無毒化あるいは弱毒化した病原体	化学処理などにより死んだ病原体 不活化した毒素（トキソイド） 病原体の抗原部分（コンポーネント）	
抗原形態	粒子状抗原		水溶性蛋白質抗原
例	BCG 経口生ポリオワクチン 麻疹ワクチン 風疹ワクチン おたふく風邪ワクチン 水痘ワクチン 黄熱病ワクチン	インフルエンザワクチン コレラワクチン 狂犬病ワクチン 日本脳炎ワクチン A型肝炎ウイルスワクチン B型肝炎ウイルスワクチン	百日咳ワクチン ジフテリアワクチン 破傷風ワクチン

この様な背景のもと、微小な針により角質層に孔をあけることで抗原を送達するマイクロニードル法を用いた「経皮ワクチン」が考案された<sup>14)</sup>。この方法は神経終末が存在する真皮にまで針が到達しないことから痛みを伴わず、またマイクロニードル製剤を貼るだけという簡便な操作でワクチンすることができる利点がある。さらに、抗原透過のバリアーとなる角質層を物理的に突破するため、様々なワクチン抗原に対応可能な新規経皮ワクチンデリバリー技術として注目を集めている。しかし、開発中の大半のマイクロニードルは金属製のニードルアレイを用いており、皮膚内でその針が折れて残存するという危険性があることが最大の克服すべき課題とされている。筆者らと共同研究を行っているコスメディ製薬株式会社は、生体適合性に優れる高分子を素材とした皮膚内溶解型マイクロニードルの開発に成功し、簡便性・安全性に優れる経皮ワクチンへの応用が注目を集めている（図 3A）。筆者らの皮膚内溶解型マイクロニードルはヒアルロン酸が主成分であり、穿刺された針部が皮膚内の水分によって溶解し、装填されていた抗原を角質層下へ安全に送達できることが期待された（図 3B）。実際に、抗原装填皮膚内溶解型マイクロニードルを貼付すると、針は皮膚内で溶解しており、装填物質の形状が可溶性分子、不溶性粒子に拘わらず、LCが存在する生きた表皮、さらにはその下の真皮へと送達できることが示された。さらに、本マイクロニードルはニードルの長さや形状を自由に調節することが可能である（図 3C）。世界的にも同アプローチによる研究開発において、インフルエンザワクチンへの有効性が報告されている<sup>15)</sup>。筆者らのマイクロニードルに関しても、破傷風・ジフテリアトキソイド混合ワクチンやインフルエンザワクチン、ワクチン抗原 SE36 を用いた新規マラリアワクチ

ンなど様々な抗原の有効性評価において良好な結果が得られており、簡便かつ抗原種を問わない新規ワクチン手法として、本経皮ワクチンデバイスの今後の展開に期待がもたれる。



- A. 皮膚内溶解型マイクロニードルの全体像。面積は0.8 cm<sup>2</sup>であり、生体適合性に優れたヒアルロン酸を主成分として形成された250本の微小な針を有する。  
 B. 皮膚内溶解型マイクロニードルの抗原送達機構。穿刺された針部が皮膚内の水分によって溶解し、装填された抗原を角質層下へと送達する。  
 C. 針部の長さおよび形状が異なる3種類の皮膚内溶解型マイクロニードルをラット背部皮膚に1時間貼付した。貼付前後の針部を実体顕微鏡で観察した写真ならびに針の形状模式図。

図3 皮膚内溶解型マイクロニードル ※カラーの図は巻頭ページ参照

おわりに

DDS技術を基盤とした経皮ワクチンが考案・開発されている中、パッチ製剤ならびにマイクロニードル製剤を用いた経皮免疫製剤による「貼るワクチン」の研究開発に期待が寄せられ、その早期実用化が待望されている。筆者らが独自に開発した親水性ゲルパッチを用いた「貼るワクチン」は、従来までの注射に代わる新規剤型ワクチンとして、接種を簡便、安全にする非常に有用なアプローチであり、臨床応用の一歩前の段階にある。また、多種多様な抗原に適用できる皮膚内溶解型マイクロニードルを応用した経皮ワクチン製剤に関しても、臨床研究実施へ向けて動き始めている。簡便性・普及性に優れた経皮ワクチン製剤「貼るワクチン」が実用化されれば、乳幼児へのワクチン接種の負担を大きく軽減できるのみならず、感染症地域への渡航者に対する

事前予防ワクチンの施行，開発途上国へのワクチン普及に大きく貢献できるものと期待する。

#### 謝辞

本稿にて紹介した研究内容は、「保健医療分野における基盤研究推進事業（独立行政法人医薬基盤研究所）」からの研究助成によるものであり，コスメディ製薬株式会社 神山文男先生，権英淑先生，ならびに奈良県立医科大学皮膚科学講座 浅田秀夫先生との共同による成果であります。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また，破傷風・ジフテリアトキソイドを快く提供いただきました一般財団法人阪大微生物病研究会に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) K. Ungchusak *et al.*, *N Engl J Med*, **352**, 333-40 (2005)
- 2) E. Valadas *et al.*, *Eur J Radiol*, **55**, 154-7 (2005)
- 3) C. C. Campbell, *FEMS Immunol Med Microbiol*, **18**, 325-31 (1997)
- 4) B. W. Barry, *Nat Biotechnol*, **22**, 165-7 (2004)
- 5) E. L. Giudice *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev*, **58**, 68-89 (2006)
- 6) Y. L. Zhao *et al.*, *Vaccine*, **24**, 1282-90 (2006)
- 7) P. Batheja *et al.*, *Expert Opin Drug Deliv*, **3**, 127-38 (2006)
- 8) L. A. Jackson *et al.*, *Vaccine*, **19**, 4703-9 (2001)
- 9) G. M. Glenn *et al.*, *Nat Med*, **6**, 1403-6 (2000)
- 10) S. Naito *et al.*, *Vaccine*, **25**, 8762-70 (2007)
- 11) Y. Ishii *et al.*, *J Control Release*, **131**, 113-20 (2008)
- 12) K. Matsuo *et al.*, *J Control Release*, **149**, 15-20 (2011)
- 13) K. Matsuo *et al.*, *Biol Pharm Bull*, **34**, 586-9 (2011)
- 14) M. R. Prausnitz, *Adv Drug Deliv Rev*, **56**, 581-7 (2004)
- 15) S. P. Sullivan *et al.*, *Nat Med*, **16**, 915-20 (2010)

## II. ワクチン基礎研究の最新動向と展望

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

松尾一彦 岡田直貴 中川晋作

Development of transcutaneous vaccine formulations for  
the infectious disease countermeasure

Kazuhiko Matsuo, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa

Laboratory of Biotechnology and Therapeutics,

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

## Abstract

The recent vigorous transnational migration of people and materials reflecting the development of transportation facilities have increased the global spread of infections. On the basis of this social background, the development of vaccination, which is the only fundamental prophylaxis, is in attention. Even if, however, rapid manufacture of vaccine antigen is actualized, there are several problems that vaccine is not easily spread across the developing country, because conventional vaccination is performed mainly by injection. Our group developed two transcutaneous vaccine devices which delivered antigens to antigen-presenting cells: a hydrogel patch and a dissolving microneedle patch. Our transcutaneous immunization system using these devices receives a high evaluation as novel, easy-to-use, and low-invasive vaccination method against infections from home and abroad.

**Key words:** transcutaneous immunization, hydrogel patch, dissolving microneedle patch, skin

## はじめに

近年、SARS(重症急性呼吸器症候群)や高病原性鳥インフルエンザなどの新興感染症や結核などの再興感染症の蔓延が危惧されている<sup>1,2)</sup>。このような感染症に対してはワクチンが最も効果的な予防対処法であることから、現在様々な研究グループが‘ワクチン抗原の同定・精製’、‘抗原を大量かつ迅速に作製できる技術開発’などの迅速なワクチン製造供給体制に力を注いで

いる<sup>3)</sup>。しかしながら、ワクチン製造の迅速化が図られたとしても、現在実用化されているワクチンは、大半が注射による投与方法であるため、ワクチンを最も必要としている開発途上国に技術的・経済的な理由からワクチンが普及しにくいといった課題を残している<sup>4)</sup>。したがって、ワクチン抗原の安定供給体制が整ったとしても、その抗原を広く全世界に行き渡らせるためには、注射投与に代わる‘効果的かつ簡便、安価、低侵襲な新規ワクチン手法の開発’が必要不可欠



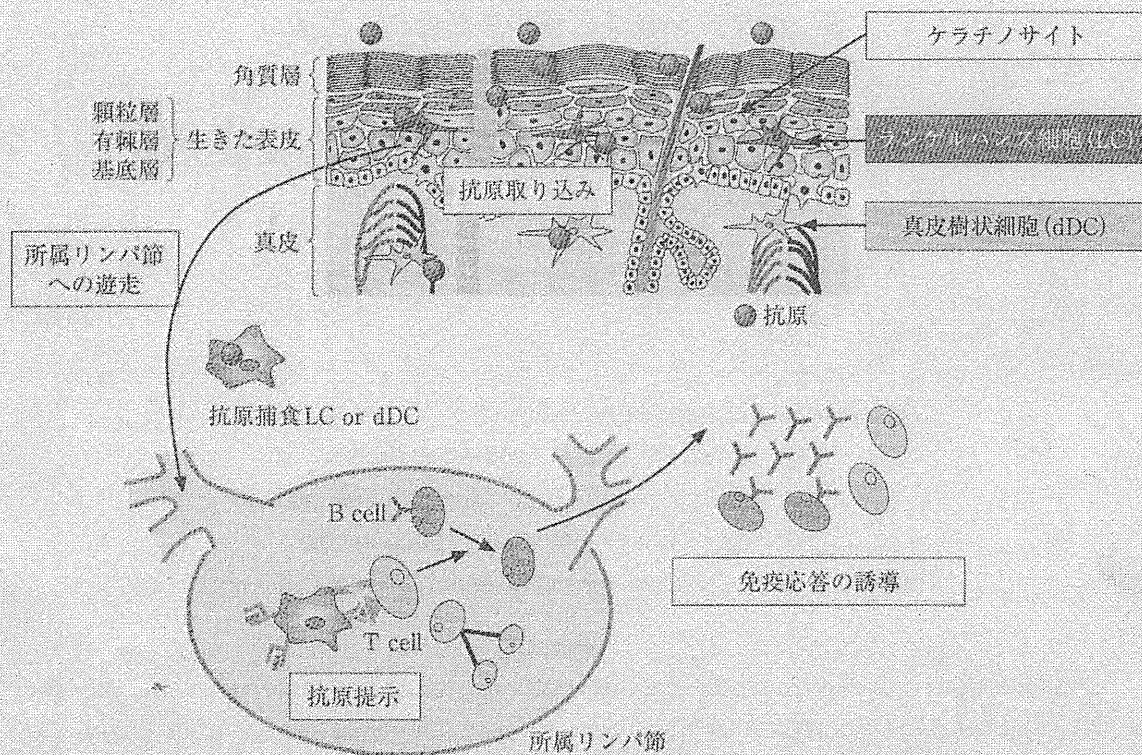


図1 経皮免疫誘導機構

である。

本観点から著者らは、新規剤形ワクチンとして経皮免疫製剤(貼るワクチン)の開発研究を推進し、開発途上国へのワクチン普及の促進に大きく貢献できる基盤技術の確立を図っている。

## 1. 皮膚の構造と免疫学的役割

貼るワクチンの標的組織である皮膚は、外来物質の侵入を防ぐ物理的障壁としての役割を果たすと同時に、生体内に侵入してきた異物を排除する高度な免疫系を構築している。皮膚は解剖学的にみれば、外側から角質層、生きた表皮(顆粒層、有棘層、基底層)、真皮の大きく3層に分けられる(図1)。生きた表皮を構成する細胞の約95%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することで自然免疫の誘導にかかわる<sup>9)</sup>。またケラチノサイトの細胞間隙には、ランゲルハンス細胞(Langerhans cell: LC)と呼ばれる強力な抗原提示細胞が存在している<sup>9)</sup>。更に真皮には真皮樹

状細胞(dermal dendritic cell: dDC)が常在しており<sup>9)</sup>、異物を認識・捕食したLCやdDCは所属リンパ節へと遊走し、T細胞、B細胞を抗原特異的に活性化することで、異物に対する免疫応答を誘導する。したがって、ワクチン抗原をLCやdDCに送達することができれば、高いワクチン効果の誘導が期待できる。しかし、皮膚の最外層に存在する角質層は生体内への異物侵入の第一関門となる物理的バリアとして働くため<sup>9)</sup>、単に抗原を塗布するだけではワクチン効果は見込めない。そのため、効果的な貼るワクチンを開発するにあたっては、LCやdDCへの抗原送達を可能とする基盤技術の開発が必要とされる。

## 2. 親水性ゲルパッチを応用した経皮免疫製剤の開発

著者らは、コスメディ製薬との共同で経皮ワクチンデバイスとして親水性ゲルパッチ(図2-a)を利用した経皮免疫製剤の開発を推進している<sup>9-11)</sup>。親水性ゲルパッチは親水性高分子ゲ

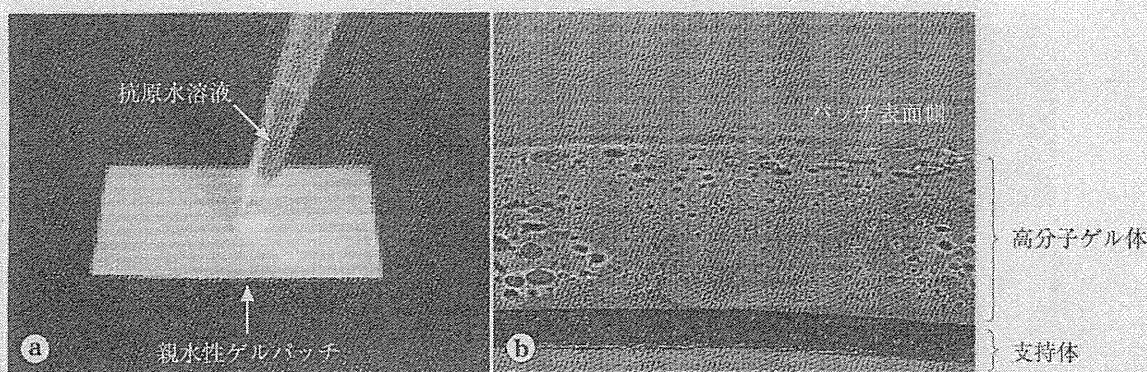


図2 親水性ゲルパッチ

ル体をベースとしたパッチ製剤であり、既に医療用絆創膏として、また化粧品としてヒトに使用されている安全性の高い材料のみで作製されている。本パッチの表面に抗原水溶液を滴下すると、水分のみが高分子ゲル体に吸収されて、表面に抗原濃縮層が形成される特徴をもつ(図2-b)。これまでに蛍光標識抗原を用いた抗原の皮膚内挙動を解析した結果、抗原は角質層を透過して表皮にまで到達し、LCに捕捉されることを確認している。また抗原を取り込んだLCは免疫誘導の場である所属リンパ節へと遊走することを明らかにしている。

本パッチの抗原の角質層透過促進機構の一つの要因としては、親水性ゲルパッチ貼付による角質層の水和・膨潤が考えられる。すなわち親水性ゲルパッチを皮膚に貼付すると水分の蒸散が妨げられ、皮膚中の水分含量が増大する水和効果が生じる。この水和効果により角質層の膨潤が起こり、細胞間隙を埋める脂質成分の構造が緩むことで水溶性高分子が透過しやすくなると考えている。二つ目の要因としては、親水性ゲルパッチ表面に形成される抗原濃縮層が寄与すると考えている。抗原含浸親水性ゲルパッチを貼付すると、皮膚表面上で大きな抗原濃度勾配が生じ、これが物質透過の駆動力となることで抗原の角質層透過が促進されると考えられる。

### 3. 破傷風・ジフテリア二種混合ワクチンとしての有効性

本項では、破傷風/ジフテリア感染症モデルにおける本経皮ワクチンシステムの有効性につ

いて検証した結果を紹介する。破傷風/ジフテリアトキソイド(TT/DT)を100 $\mu$ gずつ混合して浸み込ませた親水性ゲルパッチ(1 $\times$ 2cm<sup>2</sup>)を調製し、ヘアレスラット背部皮膚に24時間貼付することで、経皮ワクチンを実施した。これらのラットでは、2回投与することにより抗TT IgG抗体ならびに抗DT IgG抗体の産生が認められ、その後投与回数を増やすことで、従来までの皮下注射投与群と同程度またはそれ以上の抗体価を示すことが判明した(図3)。更に免疫したラットに破傷風毒素を投与する耐過試験において、誘導された抗トキソイドIgG抗体は十分な毒素中和活性を有していることも明らかとしており(図4)。破傷風/ジフテリアに対する著者ら独自の経皮ワクチンシステムの有効性を実証することができた。予防接種法に基づいて実施されている破傷風/ジフテリアワクチンは合計で3回ワクチン接種を行うことが原則であることを考えると、著者らの経皮ワクチンシステムは現行の注射型ワクチンに取って代わるワクチン手法となりうると期待できる。

これらの研究成果に基づき、現在、破傷風/ジフテリア経皮ワクチンとして有効性・安全性を検証する臨床研究プロトコールを実施しており、一日も早い本手法の実用化に向け研究を推進している。

### 4. 親水性ゲルパッチによる抗原タンパク質の角質層透過特性

親水性ゲルパッチに適用したタンパク質はコンフォメーションを保ったまま生きた表皮へと

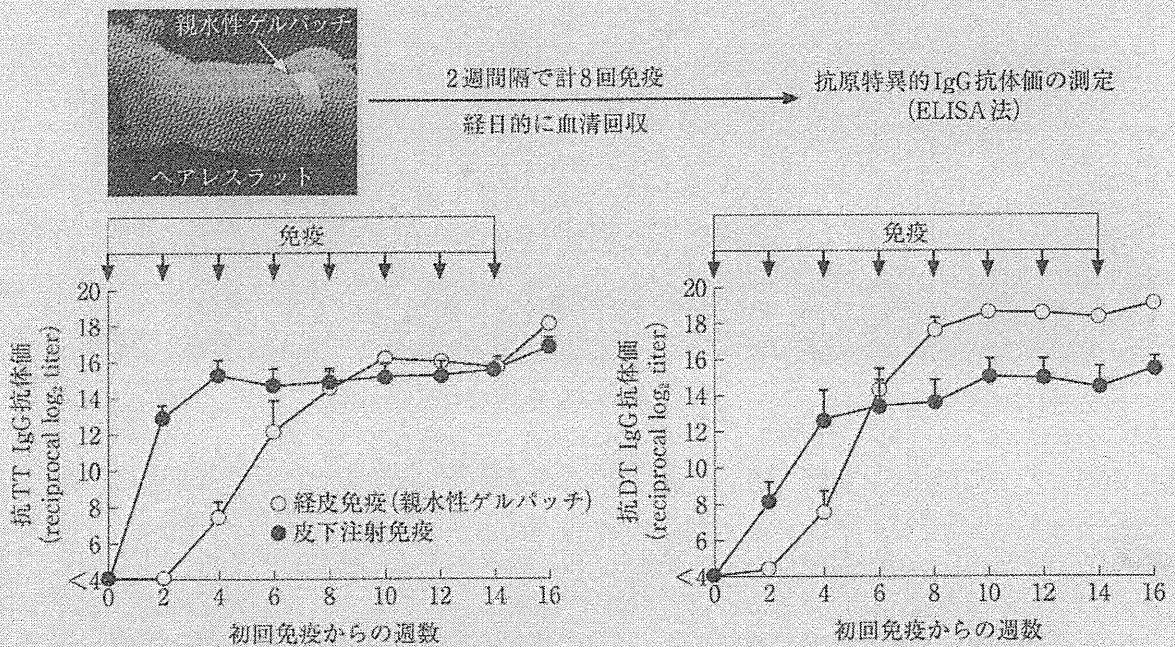
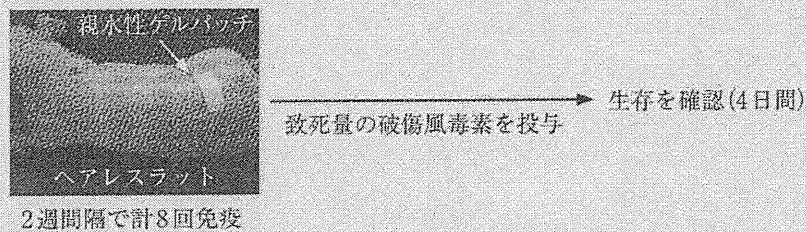


図3 親水性ゲルパッチを応用した破傷風(TT)/ジフテリア(DT)ワクチンの有効性



免疫方法	生存したラットの数/被験ラットの数
経皮免疫(親水性ゲルパッチ)	5/5
皮下注射免疫	5/5
無免疫	0/5

図4 破傷風毒素投与による耐過試験

送達されているのか、それとも一部が分解することで角質層を透過しているのかについての詳細は明らかとなっていない。そこで、親水性ゲルパッチによって皮膚内へと送達されたタンパク質の活性を評価することで、親水性ゲルパッチによる抗原の角質層透過特性について検討した。

ジフテリア毒素含有親水性ゲルパッチを適用した皮膚においては、明らかな組織傷害が観察された(図5-a, b)。更に病理組織観察の結果から、生きた表皮ならびに真皮において、ジフ

テリア毒素による重度の炎症反応が認められた(図5-c, d)。したがって、親水性ゲルパッチは適用したタンパク質のコンフォメーションを保ったまま角質層下へと送達することが明らかとなった。またこれらの結果から、親水性ゲルパッチは経皮ワクチンデバイスとしての機能のみならず、タンパク質医薬<sup>12)</sup>や核酸医薬<sup>13)</sup>を皮膚内へと送達する皮膚疾患治療用デバイスとしての有用な特性をも持ち合わせていることが示唆された。

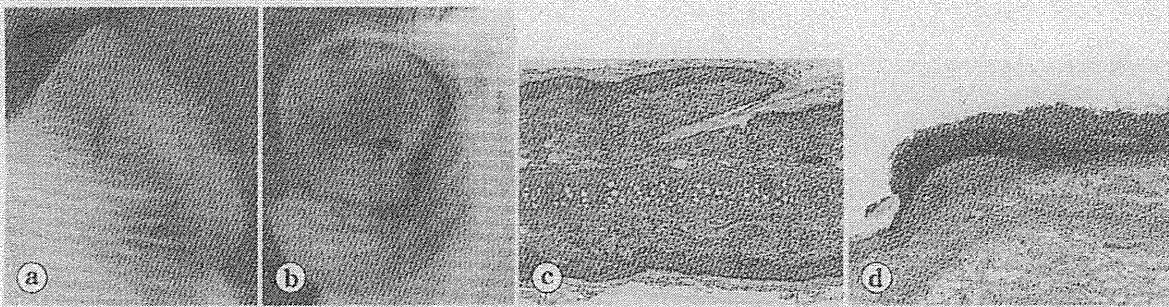


図5 親水性ゲルパッチにより送達されたタンパク質の活性

a. 未処理の皮膚, b. ジフテリア毒素含有パッチ貼付皮膚, c. 未処理の皮膚, d. ジフテリア毒素含有パッチ貼付皮膚.

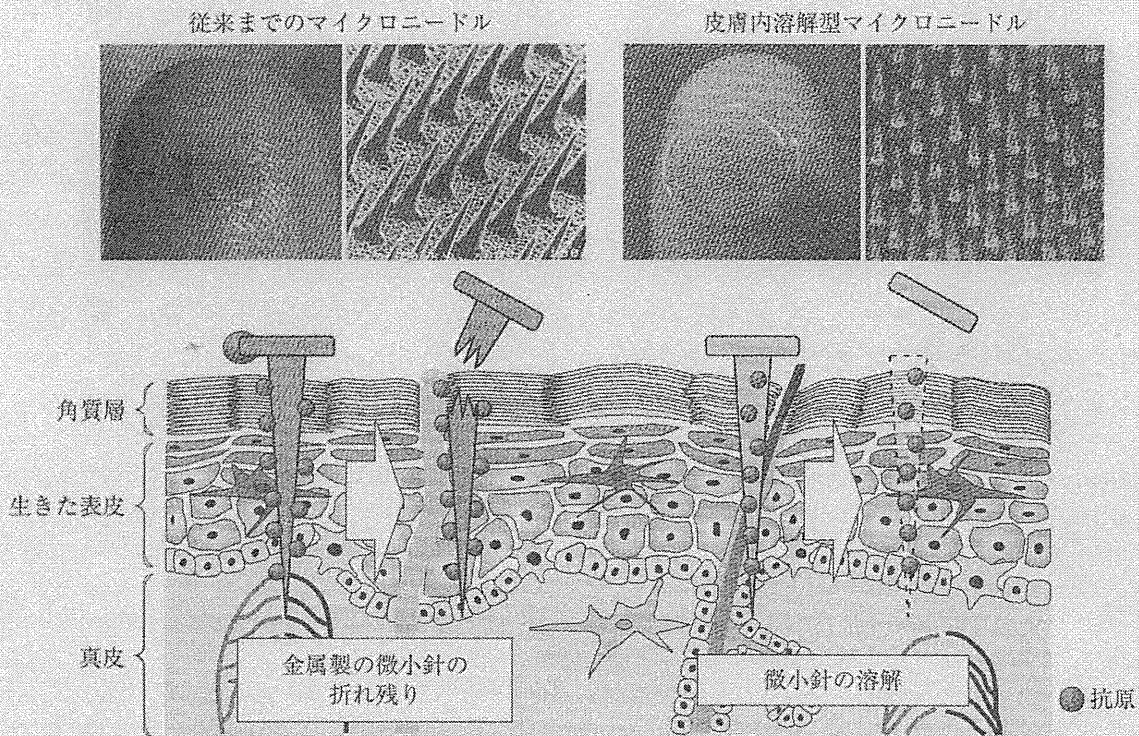


図6 皮膚内溶解型マイクロニードル

### 5. 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開発

親水性ゲルパッチは水溶性抗原物質の角質層への分配とその後の単純拡散を増大することによってLCへの送達効率を上昇させるため、抗原物質が水に不溶性あるいは懸濁された粒子状形態の場合には適用が困難である。ところが、注射ワクチン製剤として実用化されている抗原の多くは、無毒・弱毒化したウイルスや細菌、あるいはそれら病原体由来コンポーネントの凝

集体といった粒子状形態であり、経皮免疫製剤の汎用性を拡大するためにはこれらのワクチン抗原にも対応しうる経皮ワクチンデバイスが必要とされる。

そこで著者らはコスメディ製薬との共同でヒアルロン酸を主成分とする皮膚内溶解型マイクロニードル (MicroHyal: MH) を応用した経皮ワクチン製剤の開発にも取り組んでいる (図6)。マイクロニードル法は微小な針を用いて角質層を物理的に突破し、痛みを伴うことなく簡便に針に内包または吸着させた物質を皮膚内へと送