

201208021A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田直貴

平成25(2013)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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田直貴

平成 25 (2013) 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 ----- 50

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 60

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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. MH の物理化学的特性解析、2. 経皮ワクチン製剤の安全性評価（前臨床研究）、3. インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性・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. 新たに作製した MH300 および MH500 の皮膚内物質送達特性を明らかにした。また、インフルエンザ HA 抗原を装填した MH800 製剤の長期安定性を確認した。
2. モルモットを用いたアレルギー誘発試験法において、MH 経皮投与が抗原特異的 IgE の産生およびそれに伴うアレルギー反応を引き起こしにくいワクチン接種法であることを示した。
3. MH800 を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤がヒト皮膚に安全に適用できることを実証し、ヒトにおいて従来の注射型ワクチンと同等のワクチン効果が得られることを明らかにした。
4. ODN1826 および MPLA の経皮免疫応答に対する増強特性を解析するとともに、これらアジュバント候補物質の経皮投与が重篤な皮膚局所反応を伴わないことを明らかにした。

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

新興・再興感染症の世界的流行（パンデミック）が脅威となっている今日、唯一の根本的予防法であるワクチンの開発研究に高い関心が集まっており、従来の注射ワクチン製剤に代わる簡便・低侵襲な投与方法である経皮ワクチン製剤（貼るワクチン）は、普及性・備蓄性に優れるとともにワクチンの迅速大規模接種を可能とすることから、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・真皮に常在する抗原提示細胞（ランゲルハンス細胞；LC、真皮樹状細胞；dDC）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. MHの物理化学的特性解析

B. 1. 1. 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3種類のMH (MH300, MH500, MH800) を作製した (Fig. 1)。MH300、MH500、MH800の針部形状は円錐型であり、針全長はそれぞれ300 μm 、500 μm 、800 μm である。また、医療用ヒアルロン酸ナトリウム/ポリビニルピロリドン/デキストラン溶液にニワトリ卵白アルブミン (OVA) 溶液を混合して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、ATRAまたはOVA装填MH300、MH800を作製した。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、実験に供するまで室温で保管した。

(2) 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ーケーターを用いた (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ーケーターをかぶせた。アプリー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。

(3) 針部溶解過程の観察

MH300あるいはMH500をICRマウス (雌性、

8週齢; 日本SLC) またはWistar STラット (雌性, 10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の針部をデジタル顕微鏡 (VHX-1000; KEYENCE) にて観察した。

(4) 皮膚刺激性の評価

MH300あるいはMH500をWistar STラット (雌性, 10週齢; 日本SLC) の除毛した背部皮膚に6時間貼付した。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。

(5) 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 cmのステンレス製円盤をMH300、MH800の針部の軸に対して垂直にそれぞれ0.6 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 cmの円形範囲に存在するMHの微小針の本数 (MH300; 113本、MH800; 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。

B. 1. 2. 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/ポリビニルピロリドン/デキストラン溶液にfluorescein-labeled OVA (F-OVA) 溶液を混合して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、F-OVA装填MH300を作製した。

作製したMHはアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) 送達物質の皮膚内滞留性の評価

F-OVA (10 μg) 装填 MH300 を HR-1 ヘアレスマウス (雌性, 6 週齢; 日本 SLC) の背部皮膚に 1 時間貼付した。なお、MH の貼付法は B. 1. 1. (2) に準拠した。対照群には、F-OVA (10 μg)/PBS 溶液あるいは MH を PBS に溶解した液と F-OVA (10 μg) 溶液との混合溶液を HR-1 ヘアレスマウスの背部皮膚に 50 $\mu\text{L}/\text{site}$ で皮内注射した。MH 剥離直後 (皮内注射 1 時間後) を 0 時間とし、0 時間、3 時間、12 時間、24 時間、48 時間、および 72 時間後に *in vivo* イメージング装置 (Maestro EX; CRi) を用いて MH 貼付局所あるいは皮内投与局所における F-OVA の滞留性を観察した。なお、F-OVA は Blue フィルターを用いて露光時間 200 ms で蛍光撮影した。

B. 1. 3. 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/デキストラン溶液に三価季節性インフルエンザ HA 抗原 (A/California/7/2009 (H1N1) 株由来 HA 抗原、A/Victoria/210/2009 (H3N2) 株由来 HA 抗原、B/Brisbane/60/2008 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、HA 抗原装填 MH800 を作製した。作製した MH はアルミラミネート 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 ヶ月間保管した。

(2) MH の針部強度

針部強度の測定は、B. 1. 1. (5) に準拠した。

(3) HA 抗原の定量

作製直後ならびに 6 ヶ月間保管後の HA 抗原装填 MH800 を PBS に溶解し、試料溶液とした。試料溶液と 4% SDS 溶液とを等量混合し、Lowry 法 (DC Protein Assay Kit; BioRad) によりタンパク量を測定した。なお標準品には、MH の作製に用いた三価季節性インフルエンザ HA 抗原溶液を用いた。また、試料溶液中のヒアルロン酸濃度を ELISA 法 (QnE Hyaluronic Acid (HA) ELISA Assay; Biotech Trading Partners) により測定し、ヒアルロン酸 1 mg に対する HA 抗原量 (μg) を算出した。

(4) HA 価の測定

B. 1. 3. (3) の試料溶液ならびに 4°C、25°C、あるいは 40°C において 6 ヶ月間保管した三価季節性インフルエンザ HA 抗原溶液を PBS により 1 μg (HA 抗原)/mL から連続 1/2 倍希釈し、96-well plate に 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、700 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。

B. 2. 経皮ワクチン製剤の安全性評価 (前臨床研究)

B. 2. 1. アレルギー誘発試験

(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/デキストラン溶液に OVA 溶液を混合してマイクロニード

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、OVA装填MH200K、MH300K、あるいはMH800を作製した。MH200KおよびMH300K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 (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、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) OVAの投与

Hartleyモルモット (雌性, 8週齢; 日本SLC) にOVAを下記の5群に分けて投与した。

- ① MH200K経皮免疫 (TCI (MH200K)) 群: OVAを1 μg 装填したMH200Kを除毛した背部皮膚に6時間貼付した。この免疫操作を2週間隔で4回繰り返した。なお、MHの貼付法はB. 1. 1. (2) に準拠した。
- ② TCI (MH300K) 群: OVAを1 μg 装填したMH300Kを除毛した背部皮膚に6時間貼付した。この免疫操作を2週間隔で4回繰り返した。なお、MHの貼付法はB. 1. 1. (2) に準拠した。
- ③ TCI (MH800) 群: OVAを1 μg 装填したMH800を除毛した背部皮膚に6時間貼付した。この免疫操作を2週間隔で4回繰り返した。なお、MHの貼付法はB. 1. 1. (2) に準拠した。
- ④ 皮下注射免疫 (SCI) 群: OVA (1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) を背部に皮内注射した。この免疫操作を2週間隔で5回繰り返した。
- ⑤ 腹腔内注射免疫 (IPI) 群 (Alum併用): OVA 1 μg とAlum 5 mgとの混合液100 μL を腹腔内に投与した。この免疫操作を2週間隔で2回繰り返した。

(3) サンプル回収

経時的にモルモットの足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。

(4) OVA特異的IgG抗体価の測定

サンプル中の OVA 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したOVAを 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 1/2 倍希釈したサンプルを 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 標識ヤギ抗モルモット IgG 抗体 (Southern Biotech) を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H_2SO_4 を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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) OVA特異的IgE抗体価の測定

サンプル中の OVA 特異的 IgE 抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate buffer (pH9.6) で10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した抗モルモット IgE抗体を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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。3% BSA/PBSを 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で1時間ブロッキング処理を行った。1% BSA/TBSTで1/16倍希釈したサンプルを 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、4°Cで3時間反応させた。各wellをTBSTで3回洗浄し、ビオチン化OVAを 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。4°Cで3時間反応させた後、各wellをTBSTで3回洗浄し、1% BSA/TBSTを用いてメーカー推奨濃度に希釈したHRP標識ヤギ抗ビオ

チン抗体 (Vector) を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。4°Cで3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 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H_2SO_4 を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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。

(6) モルモット抗血清に対するラット受動的皮膚アナフィラキシー反応 (PCA反応)

最終免疫2週間後に回収したモルモットの血清 (IPI群のみ1/128倍希釈血清) 100 μL を除毛したラットの背部皮内に投与した。24時間後にEvans blue (5 mg/mL) + OVA (2.5 mg/mL) 溶液を1 mL/mouseで尾静脈内投与し、30分後にそれぞれのラットの背部皮膚を摘出した。皮膚の裏面に露出したEvans blueの青斑の長径と短径を計測し、[(長径 + 短径)/2]が5以上の場合をPCA陽性と判断した。

(7) モルモット能動的全身性アナフィラキシー反応 (ASA反応)

最終免疫1ヶ月後のモルモットに誘発抗原 (OVA) を2 mg/kgで耳縁静脈内に投与した。投与後30分以内の全身性アナフィラキシー反応の有無および24時間以内の生存率を観察し、ASA評価基準 (Table 2) に基づいて評点を算出した。

B. 3. インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性・安全性評価 (臨床研究)

B. 3. 1. ヒト皮膚穿刺特性

(1) MHの作製

B. 1. 3. (1) に準拠して三価季節性インフルエンザHA抗原を各15 μg 装填したMH800を作製した。作製したMHはアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。なお本臨床研究には、物性試験、異物試験、微生物学的検査に合格したMHを使用した。

(2) ワクチン投与

20~40歳代の健康男性40人をランダムに20人ずつの2群に分け、三価季節性インフルエンザHA抗原を3週間隔で2回免疫投与した。本臨床研究のスケジュールをTable 3にまとめた。

- ① TCI群: MHの貼付法はB. 1. 1. (2) に準拠した。各HA抗原を15 μg ずつ装填したMH800を被験者の上腕外側皮膚に置き、バネ式アプリーケーターを用いて皮膚に圧着させた。6時間後にMHを剥離した。
- ② SCI群: 医薬品として販売されているビケンHA 0.5 mL (各HA抗原を15 μg 以上ずつ含有) を上腕外側皮下に注射投与した。

(3) 針部溶解性の観察

剥離したMH800の針部をデジタル顕微鏡 (VHX-1000; KEYENCE) により観察した。残存した微小針を計数し、溶解した針部の割合を算出した。

(4) 疼痛評価

MH貼付あるいは皮下注射時の痛みを疼痛VAS (Visual Analogue Scale; 無痛を0、考え得る最大の痛みを100とする) 法により評価した。

B. 3. 2. 安全性評価

(1) MHの作製

B. 3. 1. (1) に準ずる。

(2) ワクチン投与

B. 3. 1. (2) に準ずる。

(3) 局所副反応の評価

ワクチン投与から2日後、7日後、および21日後に自覚症状についての問診を行うとともに、皮膚局所における紅斑の有無なら

びにその直径を評価した。貼付部位をガラス板で圧迫し、通常の紅斑を消失させることで紫斑を観察し、色素沈着、硬結、圧痛、熱感、水疱なども併せて検討した。

(4) 全身性副反応の評価

ワクチン投与前ならびに投与から2日後、7日後、および21日後に採血を行い、採取した血液を用いて血算検査、肝機能検査、腎機能検査を実施した。

B. 3. 3. 有効性評価

(1) MHの作製

B. 3. 1. (1) に準ずる。

(2) ワクチン投与

B. 3. 1. (2) に準ずる。

(3) サンプル回収

ワクチン投与前ならびに投与から7日後および21日後に採血を行い、血清を回収した。また、ハナノア（小林製薬）を用いて鼻うがいをすることで回収した液を0.45 μmフィルターを用いて粗雑物を除去後、限外濾過法により濃縮し、1 mg/mLの鼻腔洗浄液を得た。さらに、ワクチン投与前ならびに投与21日後に末梢血細胞を回収した。

(4) HA価の測定

B. 1. 3. (4) に準拠して実施した。A/California/7/2009 (H1N1) 株由来HA抗原、B/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対してはニワトリ赤血球を、A/Victoria/210/2009 (H3N2) 株由来HA抗原に対しては七面鳥赤血球を使用した。

(5) Hemagglutination inhibition (HI) 試験

血清ならびに鼻腔洗浄液検体中のHI試験は株式会社SRLに依頼した。検体中の非特異

的血球凝集阻止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。RDEは血清検体用にバイアル1本を20 mLの生理食塩液に溶解した液（血清用RDE）と、鼻腔洗浄液検体用にバイアル1本を3.3 mLの生理食塩液に溶解した液（鼻腔洗浄液用RDE）を準備した。血清0.1 mLに血清用RDEを0.3 mL加えて37°Cで19時間静置した。56°Cで1時間加温した後、室温にまで冷却し、PBSを0.6 mL加えた。ここに、振り混ぜて均等にした50%吸収用赤血球浮遊液を50 μL加えて十分に混和後、常温にて1時間静置した。次いで、900 ×gで5分間遠心分離し、非特異的血球凝集因子を除去した。上清を回収し、1/10倍希釈されたHI価試験用処理済血清サンプルを調製した。また、鼻腔洗浄液と鼻腔洗浄液用RDEは2:1の割合で混合した。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50%赤血球浮遊液を鼻腔洗浄液と等量加えて十分に混和後、常温にて1時間静置した。次いで、900 ×gで5分間遠心分離し、非特異的血球凝集因子を除去した。上清を回収し、1/2倍希釈されたHI価試験用処理済鼻腔洗浄液サンプルを調製した。

上記B. 3. 3. (4) で求めたHA価に基づいて各HA抗原の4 HA/25 μL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 μL/wellで添加した。各wellに4 HA/25 μLを添加し、800 rpmで1分間攪拌した後、常温で30分間静置した。0.5%赤血球浮遊液を50 μL/wellで加え、800 rpmで1分間攪拌した後、常温で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。

(6) サイトカイン産生細胞数の測定

回収した末梢血細胞に各HA抗原を10 µg/mLで添加して培養することにより *in vitro* 抗原再刺激を行い、24時間後にIFN- γ ELISPOT assay kit (BD Biosciences) により、HA特異的IFN- γ 産生細胞数を測定した。

B. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

B. 4. 1. 各種アジュバント候補物質の *in vivo* スクリーニング

(1) MH の作製

B. 1. 1. (1) に準拠してMH300を作製した。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。

(2) 親水性ゲルパッチの作製

親水性ゲルパッチの作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。アクリル粘着剤、湿潤剤、経皮吸収促進剤などの混合溶液(HGA1015)をPET離型紙上に塗布し、連続乾燥により溶媒を揮散させて粘着層を形成させた。実験に供するまで室温で保管した。

(3) OVA とアジュバント候補物質の混合溶液の調製

Pam3CSK4、LTA-SA、Poly (I:C)、Imiquimod、R848、ODN1826 (全て Life Technologies) は 4 mg/mL in water に、MPLA (Life Technologies)、Retinoic acid (ナカライテスク) は 2 mg/mL in 20% DMSO に調製し、OVA (EndoGrade OVA; J. K. International) 溶液 (20 mg/mL) と等量混合した。

(4) OVA とアジュバント候補物質の混合溶液の投与 (Puncturing 法)

B. 1. 1. (2) に準拠して C57BL/6 マウス (H-2^b, 雌性, 7 週齢; 日本 SLC) の除毛した背部皮膚に MH300 を貼付し、5 秒後に剥

離して穿孔した部位に B. 4. 1. (3) で調製した OVA とアジュバント候補物質の混合溶液を 5 µL 滴下した (Fig. 3)。上から MH と同じサイズ (直径; 1 cm) の親水性ゲルパッチを貼付した。親水性ゲルパッチの剥離を防ぐためにメンディングテープで被覆し、6 時間後に剥離した。2 週間後、同様の手法により OVA 溶液のみを経皮投与した。

(5) サンプルの回収

経時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 2 週間後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

(6) OVA 特異的抗体価の測定

サンプル中の OVA 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 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。8%スキムミルク/TBS 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。8%スキムミルク/TBST で連続 1/2 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 5 回洗浄し、8%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 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 5 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 100 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。

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

B. 4. 1. (5) で調製した脾細胞に 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. (4) に準拠して、親水性ゲルパッチ剥離直後ならびに剥離24時間後の皮膚刺激性を評価した。

(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。

C. 研究結果

C.1. MHの物理化学的特性解析

C.1.1. MHの皮膚穿刺特性

本研究のコアテクノロジーであるMH作製は、研究や応用の目的に合わせて微小針の形状、長さ、本数を自在に調節可能である。MHを応用した経皮ワクチンシステムの汎用性を拡大するためには、皮膚内に送達するワクチン抗原量やそれらの送達深度をコントロールするために多くのMHバリエーションを揃えることが望ましい。そこで本年度は、針形状が円錐型で針長がそれぞれ300 μm あるいは500 μm であるMH300およびMH500を新たに作製し (Fig. 1)、それらの皮膚穿刺特性をマウスおよびラットにおいて検討した。

まずMH300およびMH500を皮膚に貼付した際の針部溶解性を経時的に観察したところ、いずれのMHも貼付5分後にはすでに針の80%以上が溶解し、貼付60分後には針の根元まで完全に溶解した (Fig. 4)。本結果は従来のMH200K、MH300K、MH800を用いた検討結果と同等の溶解速度を示しており、MH300とMH500が皮膚への安定した穿刺能力と微小針溶解に伴う内封物質の速やかな皮膚内送達能を達成できることが示された。

次に、MH300およびMH500のラット皮膚に対する刺激性を評価したところ、剥離直後にはわずかに紅斑が認められたものの、48時間後には全例で消失する軽度な反応であった (Fig. 5)。また、浮腫についてはいずれのMH貼付部位にも観察されなかった。したがって、MH300およびMH500の貼付は一時的に軽微な皮膚刺激性を示すものの、重篤な局所反応を誘発しないことが確認された。

MH300については、皮膚穿刺能力の一つの指標となる針部強度を従来のMH800と比較評価した。また、モデル抗原としてOVAを装填した場合の針部強度への影響についても併せて検討した (Fig. 6)。MH300の針部耐

荷重値はMH800の1/3~1/2を示し、これはMH300のほうが個々の微小針が細いことに起因すると考えられた。MH300およびMH800にOVAを装填したところ、いずれのMHも耐荷重値は0.05 N/needle程度にまで低下し、OVA装填量を変化させても針部強度はほぼ一定であることが明らかとなった。

C.1.2. MHの皮膚内物質送達特性

皮膚内に投与されたワクチン抗原の組織滞留性が、生きた表皮および真皮にそれぞれ常在するLCおよびdDCによる抗原認識・捕捉効率に影響することは容易に予想される。すなわち、抗原の皮膚内滞留性の増大は、抗原提示細胞による特異的免疫応答の誘導を増強し、より優れたワクチン効果の発揮につながる可能性がある。そこで、MHを用いて経皮投与した蛍光標識モデル抗原の皮膚内残存性を生体イメージング法により評価した (Fig. 7)。

マウス背部皮膚にF-OVAを装填したMHを1時間貼付したところ、剥離直後の適用部位にはF-OVAに由来する強い蛍光が観察された。その後、時間経過とともに蛍光強度は低下したものの、MH剥離から72時間後においても適用部位には明らかにF-OVAの残存が確認できた。一方、F-OVA溶液の皮内注射では、投与直後には非常に強い蛍光を観察できたにもかかわらず、3時間後には既にほとんどのF-OVAが拡散して投与部位からクリアランスされていた。また、F-OVAをMH溶解液と混合して皮内注射した場合もほぼ同様の蛍光消失プロファイルを示し、MH貼付群におけるF-OVAの良好な皮膚内滞留性がMH成分の物性や作用に基づくというよりも、むしろMHによる皮膚表層への多数穿刺という物質送達特性に起因することが示唆された。

今後、MHを用いて経皮投与された抗原の皮膚内動態解析や捕捉細胞の同定を進める

ことで、MH経皮ワクチン製剤の免疫応答誘導に寄与する分子・細胞メカニズムの解明を図る予定である。

C. 1. 3. MHの長期保存性

経皮ワクチン製剤は、従来の注射ワクチン製剤と比較して接種の簡便性に優れるのみならず、乾燥製剤という特性が低温温度管理 (cold chain) を不要とし、輸送・保管・備蓄におけるコストを大幅に低減させる可能性を秘めている。そこで、インフルエンザ HA 抗原を装填した MH800 について、各種温度条件下で 6 ヶ月間保管した際の製剤安定性を評価した。

まず、長期保管後における本経皮ワクチン製剤の針部強度は、作製直後と比較すると耐荷重値が 20~50%低下していたが、皮膚への穿刺能力は担保されるレベルと判断された (Fig. 8)。また、この針部強度低下と保管温度との間に関連性は認められなかった。

次に、本経皮ワクチン製剤に装填された HA 抗原の安定性について検討した。HA 蛋白量については、いずれの保管温度においても作製直後から 6 ヶ月後まで安定に維持されていることを確認した (Fig. 9A)。一方、HA 価については、4°C、6 ヶ月間保管では作製直後と同等な値を示したが、保管温度が高くなるにつれて明らかな低下を示すことが判明した (Fig. 9B)。現在、これら 6 ヶ月間保管後の製剤から溶出させた HA 抗原をマウスに免疫投与し、特異的抗体産生レベルを比較検討することで HA 価の低下が及ぼすワクチン効果への影響について判定を進めている。

C. 2. 経皮ワクチン製剤の安全性評価 (前臨床研究)

C. 2. 1. アレルギー誘発試験

経皮ワクチン製剤の安全性を担保するた

めには、皮膚局所に対する刺激性や起炎性の評価のみならず、皮膚表層への複数回の抗原暴露に伴うアレルギー誘発の可能性について検討が求められる。そこで、アレルギー誘発試験法として古くから主流であるモルモットを用いた試験を実施した (Fig. 10)。

各種経路により OVA を投与したモルモットの血清中 OVA 特異的抗体レベルを評価したところ、IgG 抗体価はいずれの群においても高値であったのに対し (Fig. 10A)、IgE 抗体産生についてはポジティブコントロール群 (IPI 群) で顕著な亢進が認められたのみであり、TCI 群は SCI 群と同様に低値を維持していた (Fig. 10B)。

次に、これらのモルモットの血清を用いて PCA 反応を実施した。IPI 群の血清 (1/128 倍希釈) を投与した部位ではエバンスブルーの漏出径が 5 以上を示したのに対して、TCI 群の血清 (希釈なし) を投与した部位では SCI 群の血清 (希釈なし) を投与した部位と同等もしくはそれ以下の漏出径に抑えられていた (Fig. 10C)。

さらに、OVA 免疫モルモットに OVA を静脈内投与した際の ASA 反応を検討したところ、IPI 群では 6 例中 5 例がアナフィラキシー症状により死亡したのに対して、TCI 群では一部の個体が SCI 群と同様に軽い症状を示したが、ほとんどは無症状のままであった (Fig. 10D)。

これらの結果から、MH 経皮投与は高い抗原特異的 IgG 産生を誘導する一方で、抗原特異的 IgE の産生増強に伴うアレルギー反応を誘発しにくいワクチン接種法であることが示唆された。

C. 3. インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性・安全性評価 (臨床研究)

C. 3. 1. ヒト皮膚穿刺特性

昨年度の臨床研究において、MH800 がヒト

皮膚に対して安全に適用できる経皮ワクチンデバイスであることを示した。そこで、MH800に三価季節性インフルエンザHA抗原（A/California/7/2009（H1N1）株由来HA抗原、A/Victoria/210/2009（H3N2）株由来HA抗原、B/Brisbane/60/2008株由来HA抗原）を装填したインフルエンザ経皮ワクチン製剤を作製し、ヒトへの適用における安全性ならびに有効性を検証する臨床研究を実施した。

まず、本製剤を被験者の上腕外側皮膚に貼付し、6時間後における針部の溶解をデジタル顕微鏡により観察した（Fig. 11）。昨年度のプラセボMH800を用いた臨床研究では、全ての被験者において貼付6時間後には針部が根元まで完全に溶解することを確認した。しかし、今回のHA抗原装填MH800においては、微小針の完全な溶解が確認できたのは22例中3例のみであり、微小針の一部あるいはほとんどが溶解していない被験者が多数を占めた（Table 4）。この原因としては、本製剤を貼付する際に用いたバネ式アプリケーション（Type A shown in Table 4）の扱いに不慣れであったため、パッチの中央部からずれた位置を打突したり、パッチに対して垂直に打突できなかつたり、といった操作における不備が挙げられる。また、貼付してから剥離するまでの6時間における被験者の行動によっては、パッチの一部が剥離して針部の溶解が不十分となる可能性も疑われた。

そこで2サイクル目における本製剤の貼付には、パッチに対する打突位置を確認しながら使用できるバネ式アプリケーション（Type B shown in Table 4）に変更するとともに、貼付後のパッチを一回り大きいサイズの粘着シールで覆うことで剥離を防止する工夫を施した。これにより、被験者全員において貼付6時間後における針部の完全な溶解が確認できた（Table 4）。

したがって、ヒト皮膚に微小針を確実に穿刺できるMH製剤の開発には、製剤特性を最適化するのみならず、貼付に使用するアプリケーションの改良にも注力する必要がある。

VASを用いたワクチン投与時の疼痛評価においては、経皮免疫（TCI）群のスコアが皮下注射免疫（SCI）群と比較して若干低値を示した（Fig. 12）。しかしながら、疼痛評価については客観的な測定が困難であり、また今回の検討では各被験者がTCIまたはSCIのどちらかに振り分けられているため、痛みに対する個人差が評価に及ぼす影響が大きいと考えられた。

C. 3. 2. 安全性評価

インフルエンザ経皮ワクチン製剤のヒトに対する副反応誘発の可能性を評価するために、まず貼付部位の皮膚局所反応について経時的に検討した（Table 5）。TCI群の被験者全員においてパッチ製剤貼付部位に紅斑を認めたが、時間経過とともに回復する傾向にあった。Fig. 13は、最も顕著な紅斑が認められた被験者の貼付部位を経時的に撮影した写真である。ワクチン投与から2日後にマイクロニードルの面積よりも少し広い範囲の紅斑が認められたが、日を追うごとにその反応は終息していく様子が観察された。一方、SCI群では、1回目のワクチン投与から2日後に紅斑が認められた被験者数は5人と少なかったが、21日後においても約半数の被験者では注射針の穿刺痕が判別できた。両群での紅斑出現頻度の差異については、SCI群における皮下組織に投与したHA抗原に対する生体反応（炎症）が外面的に判別しづらいのに対して、TCIによって皮膚表層に送達されたHA抗原に対する炎症は容易に識別されたことに起因すると考えられる。また、1回目のワクチン投与後と比較して2回目のワクチン投与後のほうが、両

群とも紅斑が認められた被験者数は多くなり、それらの紅斑が消失するまでの期間も長くなることが判明した。これは、1回目のワクチン投与によって被験者のHA抗原特異的免疫応答が活性化されたことに伴う変化だと推察された。

毛細血管の傷害に伴う内出血によって生じる紫斑については、TCI群ではワクチン投与2日後の時点で半数以上の被験者で陽性と判定されたが、21日後には全ての被験者において消失した。またTCI群における色素沈着については、ワクチン投与2日後にはいずれの被験者でも認められなかったが、21日後には約半数の被験者で確認された。TCI群における1回目と2回目のワクチン後において、紫斑および色素沈着の出現頻度に明らかな差は認められなかった。これらの結果は、MH800の密な微小針（200本/cm²）の皮膚へ刺入が若干の毛細血管傷害を伴い、漏出した赤血球の組織沈着による紫斑、その後の貪食細胞による赤血球（ヘモグロビン）の分解過程で生じるヘモジデリンによる色素沈着を引き起こすことを示している。その後のフォローアップにおいて、これらの紫斑および色素沈着は時間経過とともに消失し、最終的には元の皮膚の状態にまで回復することを確認している。一方、SCI群においては、2回目のワクチン投与から2日後（Day 23）においてのみ被験者の半数以上に紫斑が認められたが、その他の観察日では紫斑・色素沈着が現れた被験者は殆どいなかった。

硬結はワクチン投与2日後に両群それぞれ一部の被験者に確認されたが、7日後には消失した。圧痛や熱感、SCI群のほうがTCI群よりも僅かながら高頻度に観察される傾向にあった。水疱は両群のいずれの被験者にも認められなかった。

次に、インフルエンザ経皮ワクチン製剤の適用が全身性副反応を誘発する可能性に

ついて血液検査値を指標に検証した。血算検査（白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値、血小板数、MCV、MCH、MCHC）ならびに生化学検査（C反応性タンパク、BUN、クレアチニン、AST、ALT、LDH、GGT、ALP、LAP、コリンエステラーゼ、総ビリルビン、直接ビリルビン）において、TCI群およびSCI群ともにいずれの検査値についてもワクチン投与に起因する明らかな変化はなかった。

以上の安全性評価に関する結果をまとめると、MH800を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤は貼付部位の皮膚局所に対して刺激性や起炎性を示すものの、それらはワクチン接種において容認される範囲の生体反応であり、ヒトへの適用を妨げる局所性および全身性の重篤な副反応は認められなかった。

C.3.3. 有効性評価

本臨床研究のプライマリーエンドポイントであったインフルエンザ経皮ワクチン製剤のヒトに対する安全性が確認されたため、セカンダリーエンドポイントである本製剤のヒトでの有効性を評価した。まず、経時的に被験者から採取した血清中のHI価を測定し、抗体陽転率（Seroconversion）、抗体保有率（Seroprotection）ならびに抗体変化率（GMT fold increase value）を算出した。これらのパラメーターをインフルエンザワクチンの有効性評価における国際基準である欧州医薬品庁（EMA）基準（Table 6）に則って解析した（Table 7）。

両群ともに、A/California/7/2009（H1N1）株由来HA抗原に対するHI価の上昇が最も顕著であり、B/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対するHI価は上昇しにくい傾向が認められた（Fig. 14）。EMA基準での判定においては、ワクチン1回投与後ではTCI群はSCI群と比較して有効性に若干劣るも

の、ワクチン2回投与後ではTCI群とSCI群とでほぼ同等のワクチン効果が得られることが明らかとなった。また本判定において、Table 4で示したインフルエンザ経皮ワクチン製剤の針部溶解割合（抗原投与効率）を考慮して、ワクチン投与1回目・2回目ともに50%以上の抗原を皮膚内へ送達できた7名をプロトコルに適合した被験者集団（PPS; Per Protocol Set）として再解析した（Table 8）。その結果、1回目のワクチン投与後においてもTCI群のA型株に対する有効性はSCI群に匹敵し、B型株に対するワクチン効果についてはTCI群のほうがSCI群よりも高いことが判明した。

インフルエンザウイルスは気道粘膜上皮細胞に感染するため、ワクチン投与によって全身性免疫応答のみならず分泌型IgAを主体とする粘膜免疫応答をも活性化できることが望ましい。そこで、インフルエンザ経皮ワクチン製剤の粘膜免疫誘導能について検討するために、被験者の鼻腔洗浄液中のHI価を測定し、抗体陽転率と抗体変化率を算出した。血清中HI価上昇のプロファイル（Fig. 14）とは異なり、鼻腔洗浄液中ではB/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対するHI価が最も顕著に上昇し（Fig. 15）、TCI群およびSCI群ともに2回目のワクチン投与後には算出したパラメーターがEMA基準を満たした（Table 9）。また、PPSに絞って再解析した場合においても、鼻腔洗浄液中のHI価上昇の傾向は大きな変化を認めなかった（Table 10）。このB/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対するHI抗体のサブタイプの同定をELISA法により試みたところ、IgAよりもむしろIgGが主体であることが判明した。したがって、今回の鼻腔洗浄液中のHI価上昇については、TCIあるいはSCIによる粘膜免疫の誘導に基づくものではなく、全身性免疫応答として産生増強された血中の抗原特異的IgGが鼻腔粘膜面に漏出した

ことに起因するものと推察された。しかし、各株HA抗原に対するHI価上昇率は血清中と鼻腔洗浄液中で相関が認められず、血清中では最もHI価上昇率が低かったB/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対して鼻腔洗浄液中のHI価上昇率が最も高かった理由については不明である。

さらに、インフルエンザウイルスに感染した細胞の排除に働く細胞性免疫応答の誘導効果を検討するために、ワクチン投与前後に被験者から回収した末梢血細胞におけるHA抗原特異的IFN- γ 産生細胞数を評価した（Table 11）。SCI群ではワクチン投与前からIFN- γ 産生細胞数が多い被験者の割合が高かったものの、TCI群、SCI群ともにワクチン投与によって被験者のHA抗原特異的IFN- γ 産生細胞数が増加する傾向が認められた。本結果のみで細胞性免疫応答の活性化について論じることはできないが、TCIによって抗原特異的なIFN- γ 産生細胞が誘導されたことは、ヒトに対するワクチン効果を引き出す上で好材料の一つであると考ええる。

これら有効性評価のデータを総合すると、MH800を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤は、皮膚に微小針を確実に穿刺する、すなわち装填ワクチン抗原を確実に皮膚内に送達する、ための方策が必要とされるものの、ヒトにおいて従来の注射型インフルエンザワクチンと同等のワクチン効果が得られることが明らかとなった。

C. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

C. 4. 1. 各種アジュバント候補物質の *in vivo* スクリーニング

OVAを用いた多数の免疫学的評価系が確立されているため、OVAは免疫学およびワクチン学の基礎研究において繁用されるモデル抗原である。しかし、市販のOVAにはわず

かではあるがエンドトキシンをはじめとする夾雑物が含まれており、アジュバント探索研究においては、夾雑物のアジュバント活性が候補物質の活性評価や作用機序解析に影響を及ぼす可能性を否定できない。そこで本研究では、夾雑物の混入が低いOVAとして販売されているEndoGrade OVA (J. K. International) を使用した。

Puncturing 法 (Fig. 3) を用いてアジュバント候補物質と OVA の混合溶液をマウスに経皮免疫したところ、ODN1826 を併用した群ではわずか 1 回の免疫で 13 日後には OVA 特異的抗体価の明らかな上昇が認められた (Table 12)。また、2 回目の免疫から 13 日後 (Day 27) の時点においては、ODN1826 併用群に次いで MPLA 併用群の抗体価上昇が顕著であった。そこで、ODN1826 ならびに MPLA を有望な経皮ワクチン用アジュバント候補物質として以降の検討を実施した。

アジュバントの併用は、免疫応答を増強するばかりでなく免疫応答特性 (Th1/Th2 バランス) を偏向させる効果も期待される。そこで、2 回免疫後 (Day 27) の血清を用いて OVA 特異的 IgG 抗体のサブクラス解析を行い、ODN1826 および MPLA の併用が免疫応答特性に及ぼす影響を検討した (Fig. 16)。OVA 単独免疫群においては、Th2 型サブクラスである IgG1 と IgG2b の抗体価上昇が検出され、Th1 型の IgG2c の抗体価は検出限界以下であった。これに対して ODN1826 併用群では、IgG1 と IgG2b の抗体価上昇が一層増強されるとともに、IgG2c 抗体価の著しい上昇が認められた。また、MPLA 併用群においても、ODN1826 併用群と比較すると低いレベルではあるが IgG2c の抗体価上昇が検出された。さらに、これらの群のマウスから調製した脾細胞について、OVA 特異的な IFN- γ 産生細胞数あるいは IL-4 産生細胞数を比較検討した (Fig. 17)。

ODN1826 併用群では、OVA 単独免疫群と比較して IFN- γ 産生細胞数は 2 倍以上の増加を示し、IL-4 産生細胞数には減少が認められた。一方、MPLA 併用群では、IFN- γ 産生細胞数、IL-4 産生細胞数ともに増加していた。これらの結果から、経皮ワクチン用アジュバントとして ODN1826 を併用すると免疫応答を Th1 優位に活性化し、MPLA を併用すると Th1 型/Th2 バランスを維持したまま免疫応答を活性化することが明らかとなった。

アジュバント候補物質を実用的なアジュバントとして開発するには、免疫増強活性の評価と併せて安全性を担保するための検討が不可欠である。そこで、ODN1826 あるいは MPLA を併用して経皮投与した際の皮膚刺激性について評価した (Fig. 18)。その結果、いずれの併用群も OVA 単独免疫群と同等の軽度な紅斑を認めたのみであり、それらの紅斑も 24 時間後までには完全に消失した。したがって、ODN1826 と MPLA は皮膚刺激性の低い経皮ワクチン用アジュバント候補物質であることが示された。

D. 考察

D. 1. MH の物理化学的特性解析

皮膚を標的とする経皮ワクチンにおいては、角質層下の生きた表皮に常在する LC と真皮上層に存在する dDC が抗原特異的な免疫応答の惹起に重要な役割を果たしている (*Immunol. Res.* 36, 127-136, 2006)。LC と dDC はともに抗原提示細胞に分類されるが、それらの免疫学的機能は一部異なることが報告されており (*J. Invest. Dermatol.* 120, 891-892, 2003, *J. Invest. Dermatol.* 124, 343-350, 2005)、開発する経皮ワクチンの種類や適応疾患に応じて抗原送達の標的細胞を定めることの重要性が議論され始めている。そのため、LC あるいは dDC に対する抗原送達標的化を行える技術は、この議論に対する理論的根拠を提示する手段として有用であり、さらにワクチン標的細胞を厳密に制御できる次世代経皮ワクチン製剤の開発に貢献できると考えられる。

我々が独自に開発した MH 製造技術は、MH 基盤上に並ぶ微小針の数 (密度) や長さ・形状を自在に調節できることから、皮膚組織内での分布に深度依存性がある LC および dDC に対する抗原送達効率を任意に制御できる可能性を秘めている。そこで、皮膚内の様々な深度部位への抗原送達に対応できる MH バリエーションを揃えることが必要であると考え、新たに 300 μm の長さの円錐型微小針を 764 本/ cm^2 で並べた MH (MH300)、および 500 μm の円錐型微小針を 344 本/ cm^2 で並べた MH (MH500) を作製した。これらをマウスおよびラットの皮膚に貼付した際の針部溶解性を観察したところ、従来の MH (MH200K, MH300K, MH800) と同様に微小針は 1 時間で根元まで完全に溶解した。また、安全面に関しても重篤な皮膚刺激性や起炎性は認められず、現在これら 2 種類の MH について装填した物質の皮膚内送達部位の解析を進めている。今後、各種

MH を用いた皮膚内抗原送達部位と免疫応答特性の連関を評価し、経皮免疫造成に関与する分子・細胞メカニズムの解明や次世代経皮ワクチン製剤の開発に有益な基礎情報の集積を図る予定である。

ヒアルロン酸を主成分とする MH を応用した経皮ワクチン製剤は、微小針が皮膚内で溶解することによって装填抗原を放出するシステムであり、MH への抗原装填によって組成が変化し、針部強度 (皮膚穿刺能力) が影響を受けることが予想される。MH300 および MH800 を用いて OVA 装填に伴う針部強度変化を評価したところ、MH の種類ならびに OVA 装填量に拘らず針部耐荷重値は 0.05 N/needle 程度にまで低下した。先端の直径が 25 μm の微小針を皮膚に穿刺するには 0.058 N/needle の耐荷重値が必要であると報告されており (*J. Control. Release* 104, 51-66, 2005)、MH300 および MH800 の微小針先端の直径が 30 μm であることを考慮すると同等の針部耐荷重値が求められる。微小針の皮膚穿刺能力は先端直径ばかりでなく形状や密度によっても影響されると考えられるが、MH への抗原装填時に微小針の確実な皮膚刺入を保障するには針部強度を増大するための組成改変等が必要だと考えている。

乾燥製剤である経皮ワクチン製剤は、従来の注射ワクチン製剤で必要とされてきた製造から使用までの一貫した低温温度管理 (cold chain) が不要となる可能性がある。これは開発途上国を含めた世界規模でのワクチン普及を容易にするとともに、新興・再興感染症パンデミックに備えたワクチンの備蓄においても有益な特性となる。

インフルエンザ HA 抗原装填 MH を用いた長期保管試験では、皮膚への安定な穿刺を担保する微小針強度に保管温度 (4~40°C) は大きな影響を及ぼさなかった。一方、MH 製剤に装填された HA 抗原の力価 (HA 価) に

については保管温度の上昇に伴って明らかな低下が認められた。装填 HA 抗原のタンパク量自体には変化が認められず、昨年度の検討において MH 製剤の皮膚穿刺時における微小針溶解性に長期保管は影響しなかったことを考え合わせると、長期保管 MH 製剤の皮膚内 HA 抗原送達量は作製直後の MH 製剤と同等であると強く予想される。しかし、ワクチンとして投与する HA 抗原の力価が免疫応答の誘導効果に影響を及ぼす可能性が報告されており (*AAPS PharmSciTech* 11, 1193-1201, 2010)、現在、各温度で長期保管した MH 製剤の装填 HA 抗原の HA 特異的抗体産生誘導の比較評価を進めることで、MH を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤の cold chain-free の可能性を追究している。

MH 製剤の微小針溶解に伴う皮膚内抗原送達特性に関してさらなる解析を進めたところ、注射針を用いた皮内投与された抗原と比較して MH により経皮投与された抗原は、皮膚からの消失が著しく遅れること（皮膚内滞留性の向上）が明らかとなった。他の研究グループによるステンレス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についても、同様に抗原の皮膚内滞留時間の延長が報告されている (*MBio* 3, e00012-12, 2012)。注射ワクチン製剤においてアジュバントとして使用されているアルミニウムゲルの免疫応答賦活化機構のひとつとして、投与部位における抗原滞留性の向上とそれに伴う抗原提示細胞による抗原捕捉効率の増強が示されており (*Nature Rev. Microbiol.* 5, 505-517, 2007)、MH を用いた経皮ワクチン製剤による効率のよい抗原特異的免疫応答の活性化に皮膚内抗原滞留性の向上が寄与する可能性がある。

D. 2. 経皮ワクチン製剤の安全性評価（前臨床研究）

ワクチン抗原の経皮投与は、従来の注射による皮下投与や筋肉内投与と比較して免疫応答誘導効果に優れており (*N. Engl. J. Med.* 351, 2295-2301, 2004, *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 415-427, 2011)、特に Th2 型免疫応答を強く惹起することが報告されている (*Semin. Immunol.* 17, 273-283, 2005)。したがって、経皮ワクチン製剤は有効性を発揮する抗原特異的な IgG 抗体産生のみならず、アレルギー反応の原因となる IgE 抗体の産生をも誘導してしまう危険性がある。そこで、モデル抗原として OVA を装填した MH 製剤を貼付したモルモットにおけるアレルギー誘発試験を実施したところ、OVA 特異的 IgE 抗体産生は皮下注射免疫群と比較して同等以下のレベルを示し、アナフィラキシーに関する検討においても陽性反応は認められなかった。したがって、本経皮ワクチン製剤のアレルギー誘発に起因する副反応が従来の注射ワクチン製剤を上回る可能性は極めて低いと判断し、本結果を根拠にヒトでの安全性を検証する臨床研究へと展開することにした。

D. 3. インフルエンザ経皮ワクチン製剤の有効性・安全性評価（臨床研究）

インフルエンザに対するワクチンは、毎シーズン流行する株が異なるために毎年の予防接種が推奨されていることや、インフルエンザパンデミックの危険性があるために世界中での大規模接種が必要とされることから、簡便に接種可能な剤形の開発が求められている。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製剤の非臨床研究に関しては、シリコン製あるいはステンレス製マイクロニードルばかりでなく (*J. Control. Release* 136, 71-78, 2009, *PLoS ONE* 4, e4773, 2009)、我々と同様のコンセプトによる溶解型マイクロニードルを用いた研究報告も認められる (*Nat. Med.*