

16, 915-921, 2010)。しかし、ヒトに適用して安全性ならびに有効性を検証した報告はほとんどなく、唯一、シリコン製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がヒトにおいて免疫応答を誘導可能であることを示した報告がなされている (*Vaccine* 27, 454-459, 2009)。この論文においては、マイクロニードル型インフルエンザ経皮ワクチン製剤が簡便性に優れるだけでなく、ヒトにおいて投与抗原量を少なくとも従来の筋肉内注射と同等の有効性を発揮できることを示している。しかしながら、経皮ワクチンデバイスとして使用されているシリコン製マイクロニードルは中空型であり、従来の注射ワクチン製剤と投与デバイス（注射針ならびにシリンジ）が異なるだけで、抗原溶液の低温温度管理の必要性や注射針を介した二次感染の危険性を払拭できないという課題がある。一方、我々の MH（溶解型マイクロニードル）は微小針が皮膚内で溶解することから安全面に優れるだけでなく、乾燥製剤として製造するため輸送や保管の大幅なコストダウンにつながる cold chain-free を図れる可能性があるため、その実用化に大きな期待が寄せられている。

そこで、MH を用いた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ならびに有効性を検証する臨床研究を実施した。本製剤を貼付した皮膚局所には明らかな紅斑が認められたが、これは抗原送達部位が従来の皮下注射投与と比較してより皮膚の表層であるために免疫反応（炎症反応）が外面的に認知されやすくなったためであると考えられた。確認された紅斑は経時的に回復し、皮膚局所に対する一過性の刺激性や起炎性以外に重篤な副反応は認められなかった。また、いずれの被験者においても本製剤の貼付に起因する血液検査値の顕著な変化は認められなかったため、全身性の

副反応も誘発されなかったと判断された。さらに、インフルエンザ経皮ワクチンはヒトにおいて HA 抗原特異的抗体産生を誘導し、その感染防御効果（HI 価）はインフルエンザワクチンの有効性判定における指標である EMA 基準を満たすことが判明した。しかし、経皮ワクチン製剤適用被験者群における HI 価上昇効果は、対照群である従来の注射ワクチン製剤を適用した被験者群と比較して僅かながら劣っていた。これは、今回の臨床研究において MH 製剤の貼付が不完全であった被験者が多数いたことに起因しており、2 回の MH 製剤の貼付においていずれも微小針の 50%以上が溶解していた（装填 HA 抗原量の 50%以上が投与された）被験者 7 名に絞って解析を実施したところ、MH 経皮ワクチン群は注射ワクチン群に匹敵する有効性が得られることが判明した。また、経皮ワクチン群では B 型株 HA 抗原に対する抗体産生誘導効果が注射ワクチン群と比較して優れていることも明らかになった。A 型インフルエンザウイルスは一般的に流行感染しやすく、被験者の中にも感染歴がある可能性が高いのに対して、B 型インフルエンザウイルスによる流行感染は頻度が比較的少ないとされている。したがって、A 型株 HA 抗原投与はブースト免疫として作用している可能性があり、経皮投与ならびに注射投与ともに高いワクチン効果が得られたと考えられる。一方、B 型株 HA 抗原の投与によって特異的抗体産生を増大させるには、初回免疫として強力な免疫応答誘導能が必要であり、抗原提示細胞である LC や dDC が豊富に存在する皮膚表層を標的とした経皮投与だからこそそれを満たした可能性が考えられる。このように、MH を用いた経皮ワクチン製剤はヒトにおいても高い免疫応答誘導能を有することが実証された。また、50%以上の微小針が溶解したという基準（抗原利用率 50%以上）を設けた解析に

において、経皮ワクチン製剤の有効性は注射ワクチン製剤（抗原利用率 100%）に匹敵したことから、経皮投与はワクチン効果を引き出すための投与抗原量を低減できる可能性が示唆された。

今後、本臨床研究のより詳細なデータ解析を進めるとともに、簡便性・普及性に優れた経皮ワクチン製剤の実用化を目指して、確実にヒト皮膚に穿刺できる針部強度を備えた MH の改良やアプリケーションの開発に取り組む予定である。

#### D. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

免疫賦活能に優れる安全なアジュバントの探索は昨今のワクチン開発研究において重要な課題となっており、特に TLR のリガンドを用いたアジュバント開発は獲得免疫応答の成立を強力に手助けする手段として注目されている (*Curr. Opin. Immunol.* 21, 339-345, 2009)。

本研究では、従来の注射ワクチン製剤とは抗原送達部位が異なる経皮ワクチン製剤において有効で安全なアジュバントの探索を進めている。昨年度の研究において、モデル抗原である OVA と各種アジュバント候補物質とを混合装填した MH を作製し、それらを貼付したマウスにおける OVA 特異的抗体の産生レベルを指標としてアジュバント活性のスクリーニングを行った。しかし、MH への混合装填においては、各アジュバント候補物質の物性が大きく異なることが要因となり、OVA の装填量を一定に調整することが困難であった。すなわち、アジュバントを併用する各群間での OVA 投与量を均一化できる *in vivo* スクリーニング系の構築が必要とされた。そこで本年度においては、MH の貼付によって予め穿孔した皮膚に対して一定量の抗原 (OVA) とアジュバント候補物質を含む溶液を塗布し、それを親

水性ゲルパッチによって被覆することで皮膚内へと確実に浸透させる実験法を確立した (Puncturing 法)。

Puncturing 法において各種アジュバント候補物質の免疫応答増強効果を再評価したところ、昨年度の結果と同じく MPLA (TLR4 リガンド) ならびに ODN1826 (TLR9 リガンド) が強力なアジュバント活性を示すことが確認された。特に、ODN1826 は初回免疫から高い抗原特異的抗体産生を誘導し、また免疫応答バランスを Th1 型優位に偏向させることも示唆された。また、これらのアジュバント候補物質の皮膚刺激性や起炎性が低いことも確認され、安全性の観点からも MPLA と ODN1826 は経皮ワクチン製剤用アジュバントとして有望であることが示された。

今後は、候補物質の中で最もアジュバント活性に優れていた ODN1826 に着目し、その経皮投与後の皮膚内動態や安定性、ならびに経皮免疫応答に対する賦活化機構を詳細に解析していく予定である。TLR9 リガンドである CpG ODN については、ヒトに最適な配列の開発やヒト型 CpG ODN の臨床研究 (*J. Clin. Immunol.* 24, 693-701, 2004) が進められており、これらの情報を活用することで経皮ワクチン製剤用アジュバントとして臨床研究に展開していきたいと考えている。

## E. 結論

### E.1. MH の物理化学的特性解析

- 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。

### E.2. 経皮ワクチン製剤の安全性評価（前臨床研究）

- 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。

### E.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）

- 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。

### E.4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

- 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。

## 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, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Frontiers of transcutaneous vaccination systems: Novel technologies and devices for vaccine delivery: *Vaccine* 31(19): 2403-2415 (2013)
- 2) Sachiko Hirobe, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Transcutaneous vaccines: current and emerging strategies: *Expert Opin. Drug Deliv.* 10(4): 485-498 (2013)
- 3) Yasuhiro Hiraishi, Takeshi Nakagawa, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Performance and characteristics evaluation of a sodium hyaluronate-based microneedle patch for a transcutaneous drug delivery system: *Int. J. Pharm.* 441(1-2): 570-579 (2013)
- 4) 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* 161(1): 10-17 (2012)
- 5) 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* 160(3): 495-501 (2012)

- 6) 廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: 経皮ワクチンの進歩と展望: *臨床免疫・アレルギー科* 58(3): 313-321 (2012)

### G.2. 学会発表

- 1) 岡田直貴: 経皮ワクチン製剤 (貼るワクチン) の基礎から臨床: *日本薬学会第133年会*, 神奈川県 (横浜市), 2013年3月27-30日
- 2) 大塚梨沙, 平石恭大, 廣部祥子, 権英淑, 神山文男, 岡田直貴, 中川晋作: レチノイン酸装填マイクロニードルを用いた脂漏性角化症に対する新規薬物治療法の開発: *日本薬学会第133年会*, 神奈川県 (横浜市), 2013年3月27-30日
- 3) 佐藤智美, 平石恭大, 廣部祥子, 翟優, 横田やよい, 権英淑, 神山文男, 岡田直貴, 中川晋作: 経皮免疫造成に寄与する皮膚内溶解型マイクロニードルの特性解析: *日本薬学会第133年会*, 神奈川県 (横浜市), 2013年3月27-30日
- 4) 岡田直貴: The cutting edge of the transcutaneous vaccine development (経皮 (貼る) ワクチン開発の最前線): *第86回日本細菌学会総会*, 千葉県 (千葉市), 2013年3月18-20日
- 5) Hiroaki Azukizawa, Sachiko Hirobe, Takaaki Hanafusa, Kazuhiko Matsuo, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Ichiro Katayama, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: A Clinical study of influenza vaccine using a dissolving microneedle array: *日本研究皮膚科学会第37回年次学術大会*, 沖縄県 (那覇市), 2012年12月7-9日
- 6) Sachiko Hirobe, Hiroaki Azukizawa, Takaaki Hanafusa, Kazuhiko Matsuo,

Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Ichiro Katayama, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Clinical study of transcutaneous influenza vaccine using a self-dissolving microneedle patch: **第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム**, 京都府 (京都市), 2012年11月23-24日

- 7) 岡田直貴: 世界初、日本発の貼るワクチンの実用化を目指して: **第4回経皮投与製剤FGシンポジウム**, 東京都 (品川区), 2012年11月19日
- 8) 岡田直貴: マイクロニードル型経皮ワクチン製剤の実用化を目指して: **第16回日本ワクチン学会学術集会**, 神奈川県 (横浜市), 2012年11月17-18日
- 9) 廣部祥子, 小豆澤宏明, 花房崇明, 松尾一彦, 権 英淑, 神山文男, 片山一朗, 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インフルエンザ経皮ワクチンの臨床研究: **第16回日本ワクチン学会学術集会**, 神奈川県 (横浜市), 2012年11月17-18日
- 10) 大塚梨沙, 平石恭大, 廣部祥子, 仁木一順, 権 英淑, 神山文男, 岡田直貴, 中川晋作: レチノイン酸装填マイクロニードルを用いた脂漏性角化症に対する新たな治療法の開発: **第62回日本薬学会近畿支部総会・大会**, 兵庫県 (西宮市), 2012年10月20日
- 11) 岡田直貴: 本邦発の経皮ワクチン製剤の実用化を目指して: **第28回日本DDS学会学術集会**, 北海道 (札幌市), 2012年7月4-5日
- 12) 廣部祥子, 小豆澤宏明, 花房崇明, 仁木一順, 松尾一彦, 権 英淑, 神山文男, 片山一朗, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作: インフルエンザ HA 抗原装填マイクロニードルパッチ製剤のヒトにおける

安全性・有効性の検証: **第28回日本DDS学会学術集会**, 北海道 (札幌市), 2012年7月4-5日

- 13) 中川岳志, 平石恭大, 権 英淑, 神山文男, 松尾一彦, 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経皮ワクチン製剤の物理化学的特性: **日本薬剤学会第27年会**, 兵庫県 (神戸市), 2012年5月24-26日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H.1. 特許取得

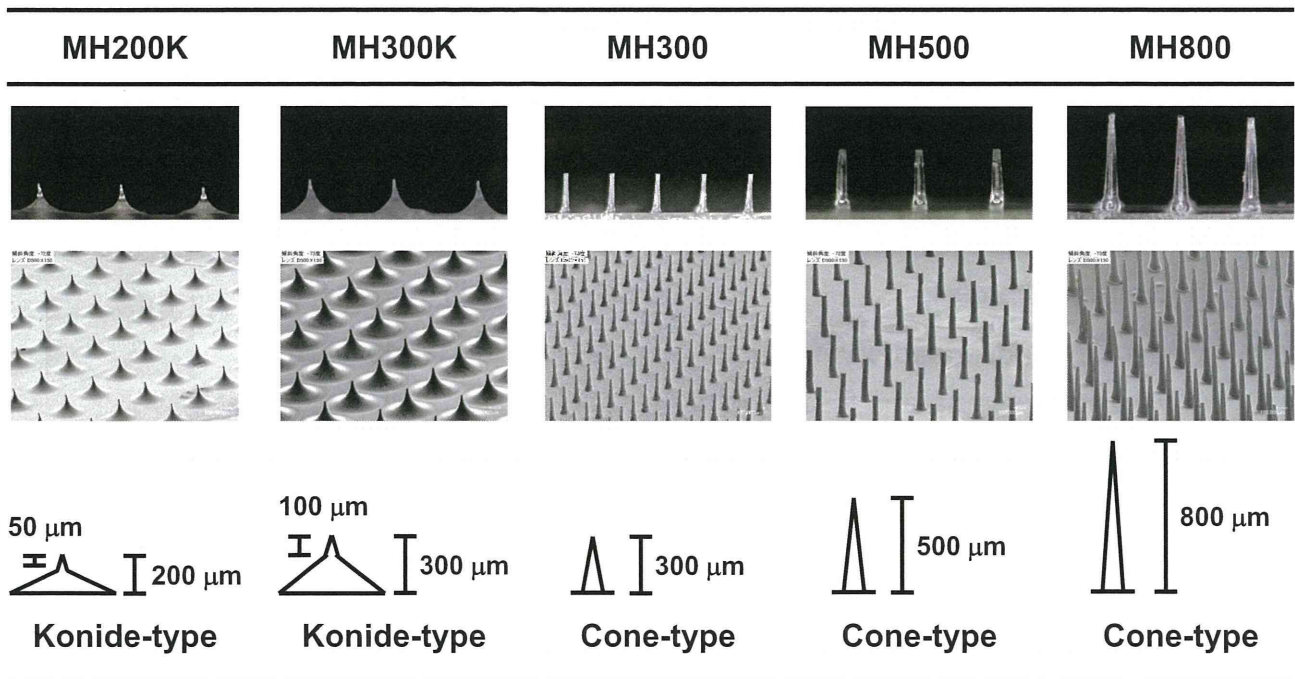
該当事項なし

### H.2. 実用新案登録

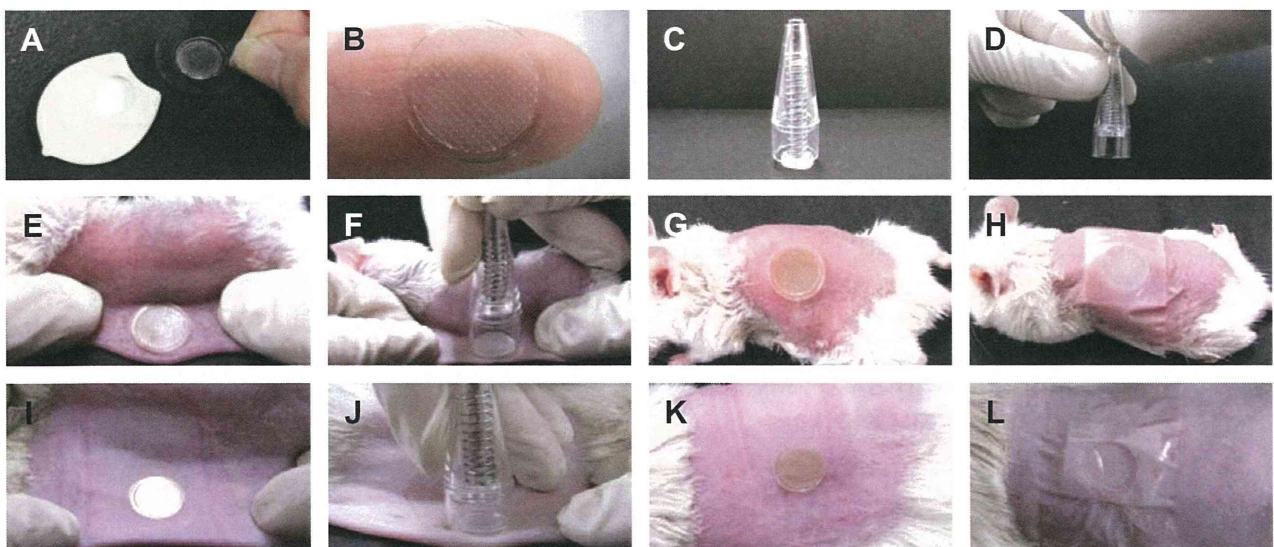
該当事項なし

### 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

<b>Erythema and crust</b>	<b>Score</b>	<b>Edema</b>	<b>Score</b>
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

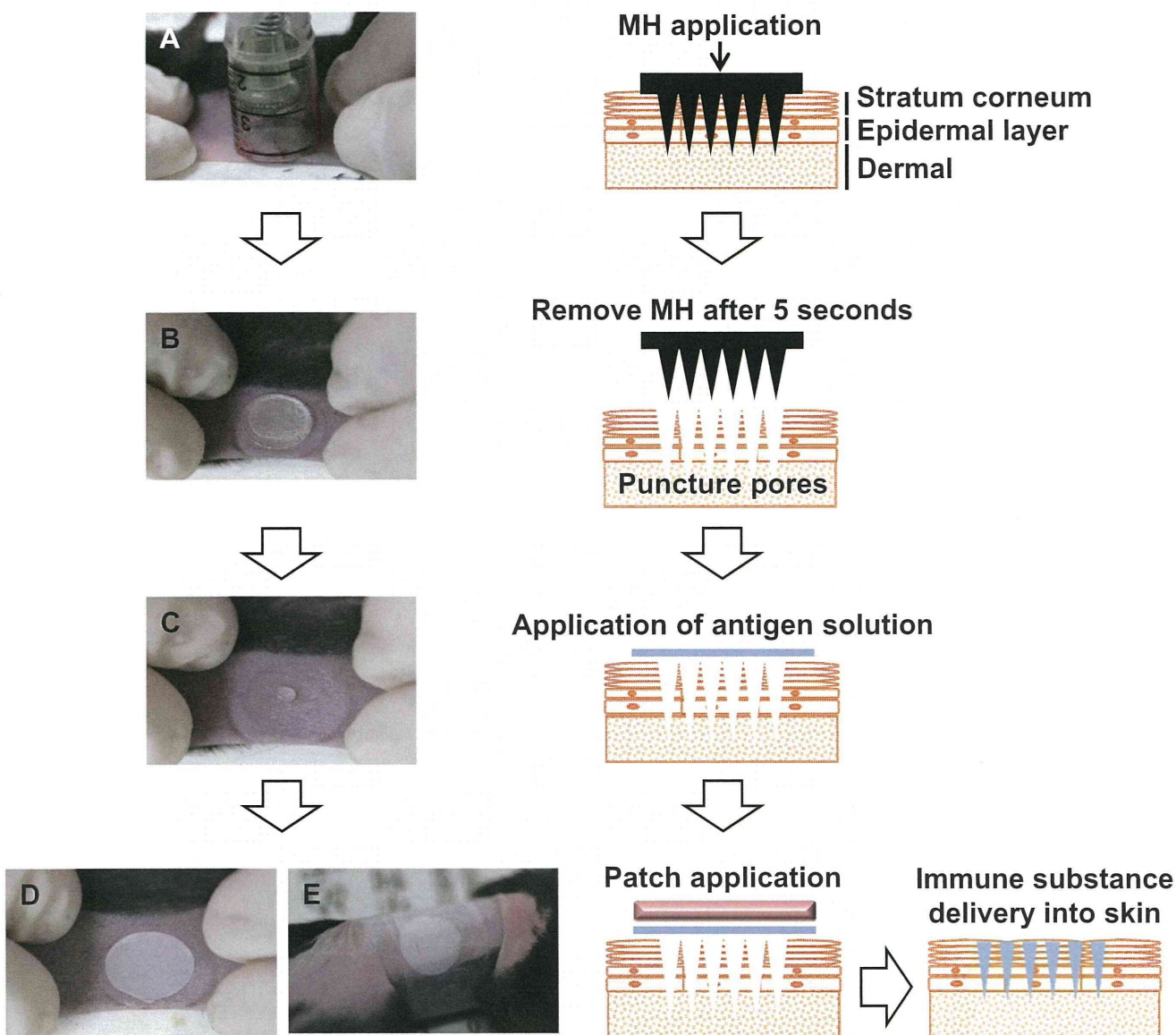
**Table 2** ASA scoring system

<b>Score</b>	<b>Symptoms</b>
0	Symptomless
1	Rubbing face and ears, cough more than 2 times
2	Cyanosis caused on eye or ear, intense spasm and tumbling
3	Death

**Table 3** Procedure of clinical study

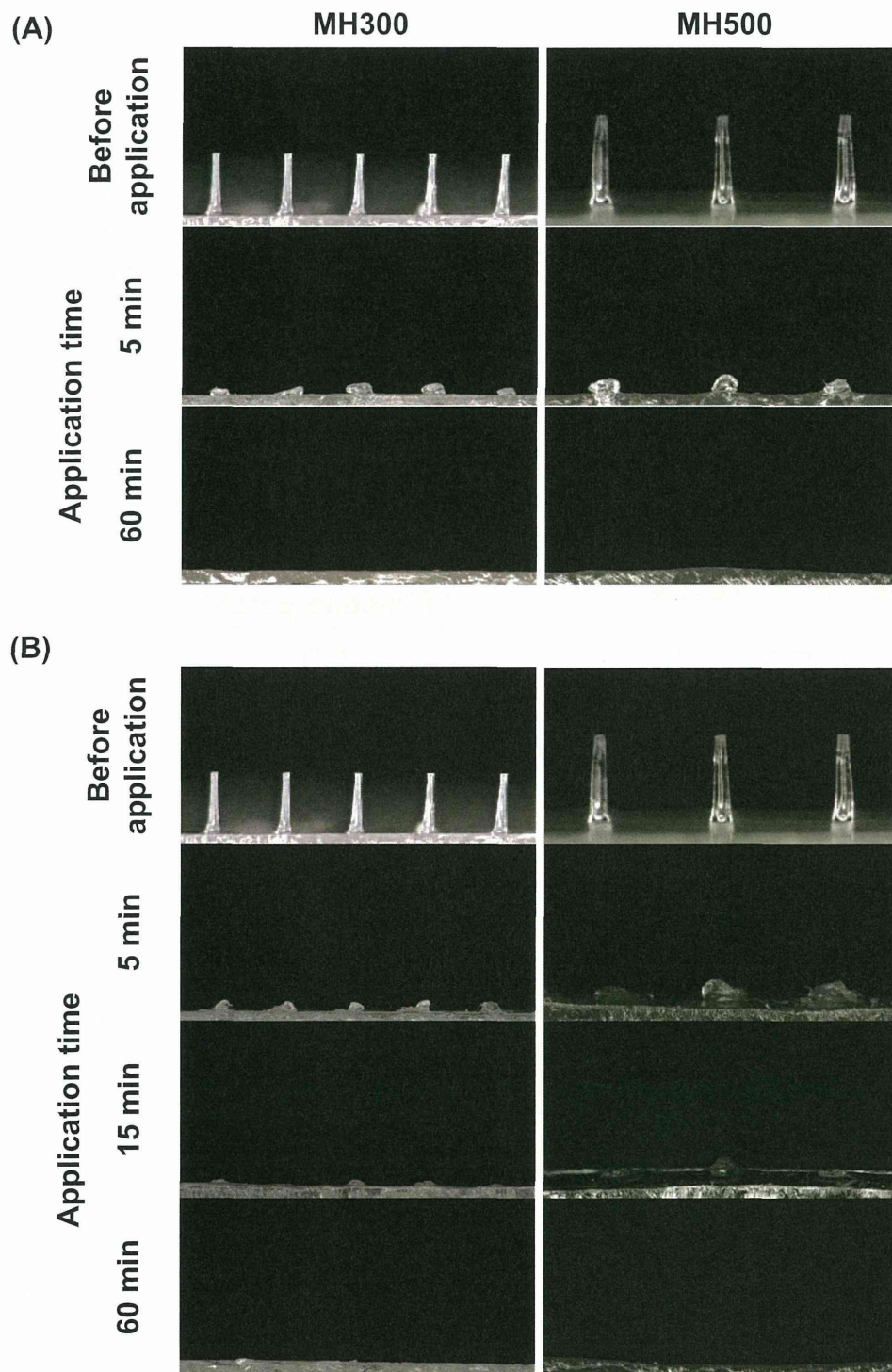
	<b>Time after experimental beginning</b>			
	<b>Day 0</b>	<b>Day 2</b>	<b>Day 7</b>	<b>Day 21</b>
1 <sup>st</sup> vaccination				
2 <sup>nd</sup> vaccination	<b>Day 21</b>	<b>Day 23</b>	<b>Day 28</b>	<b>Day 42</b>
<b>Skin irritation</b>		●	●	●
<b>Purpura evaluation</b>				
<b>Blood test</b>	●	●	●	●
<b>Pain scale (VAS)</b>	●			
<b>Antibody measurement (HI test)</b>	●		●	●
<b>Cytokine production</b>	●			●





**Fig. 3** Schematic drawing of puncturing method using a MH and a hydrogel patch. A and B; application of a MH to back skin of mice and removal of the MH, C; dropping antigen solution on the MH-applied skin, D and E; applying a hydrogel patch and then covering with a wound management film over the hydrogel patch.



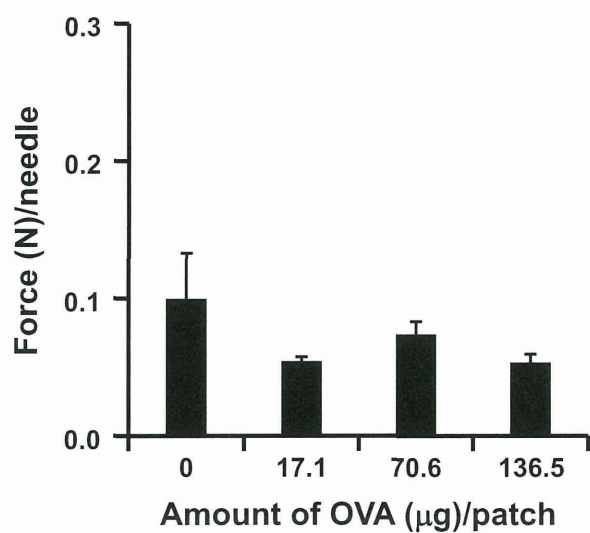
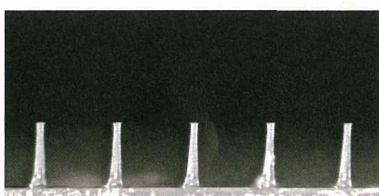


**Fig. 4** Dissolution kinetics of microneedles of MH300 and MH500 after application. The MH300 and MH500 were applied on the back skin of ICR mice (A) or Wistar ST rats (B) for the indicated time. After removal of the MH, the microneedles remaining on each MH were photographed under a digital microscope.



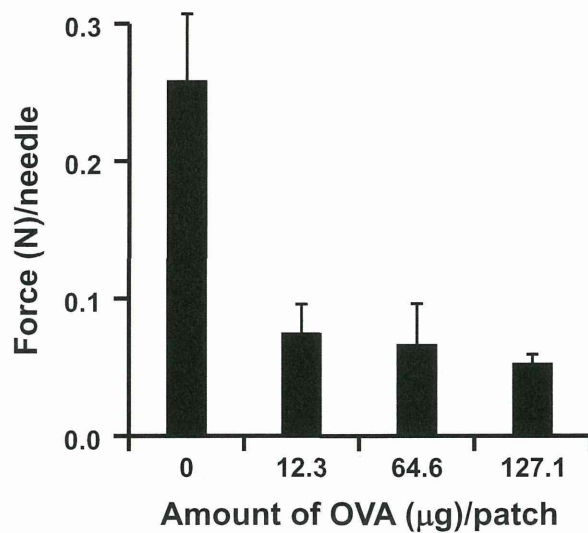
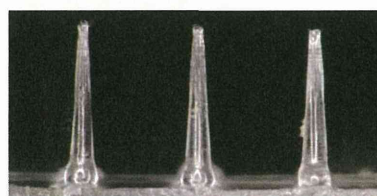
(A) MH300

 300  $\mu\text{m}$



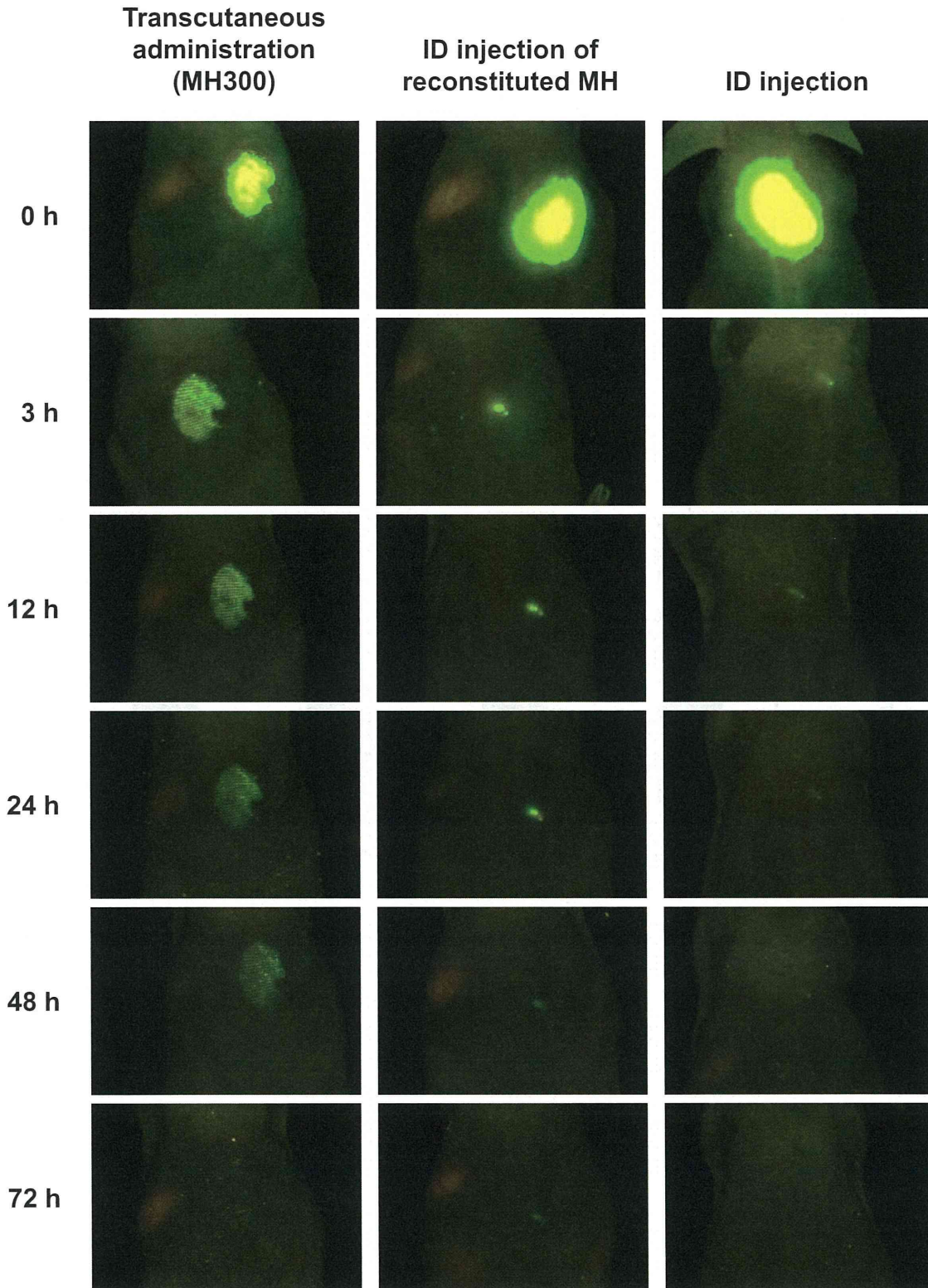
(B) MH800

 800  $\mu\text{m}$

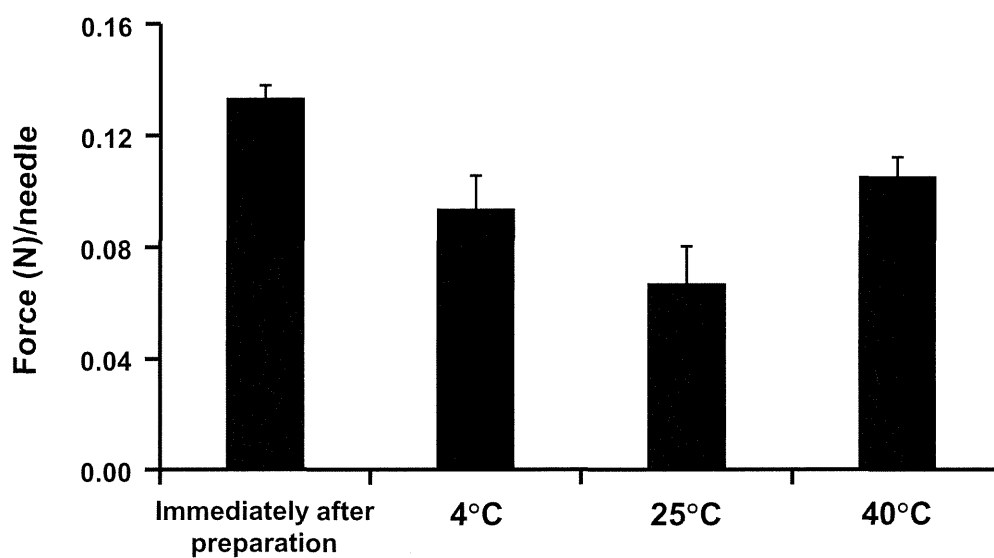


**Fig. 6** Mechanical failure force for MHs with or without protein loaded. The force required to fracture 113 (A; MH300) or 55 (B; MH800) microneedles was measured using a texture analyzer. Data represent the mean  $\pm$  SD of 3 measurements each.

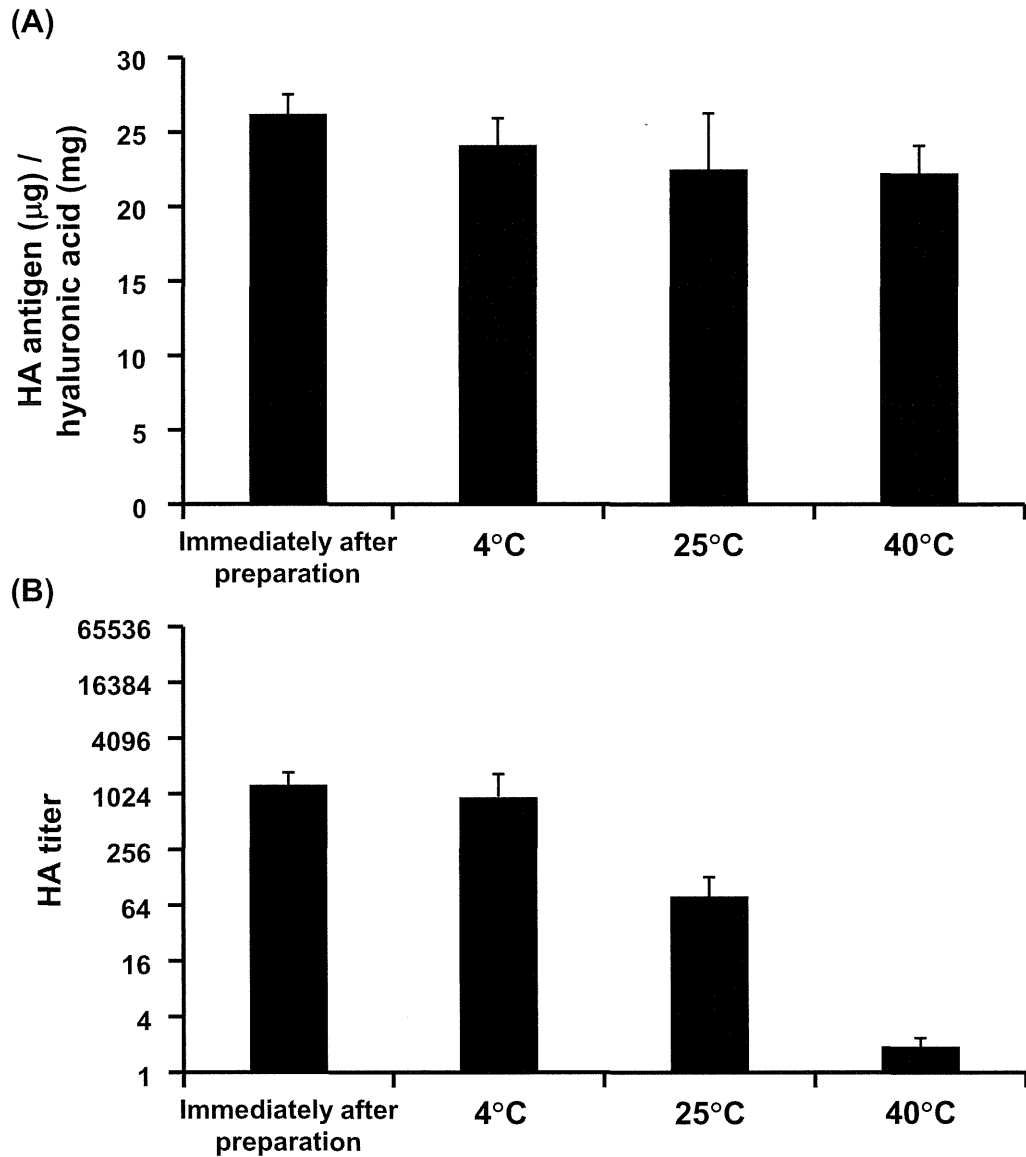




**Fig. 7** Kinetics of antigen deposition after F-OVA administration to HR-1 hairless mice via MH300 patch delivery, intradermal (ID) injection of reconstituted F-OVA, or ID injection of phosphate-buffered saline containing F-OVA. Representative in vivo fluorescence imaging for antigen deposition from 4 mice for each group. Images were captured by the CRi Maestro EX system at the indicated time point after administration. Here, time 0 means the time of MH300 removal after 1-h application.



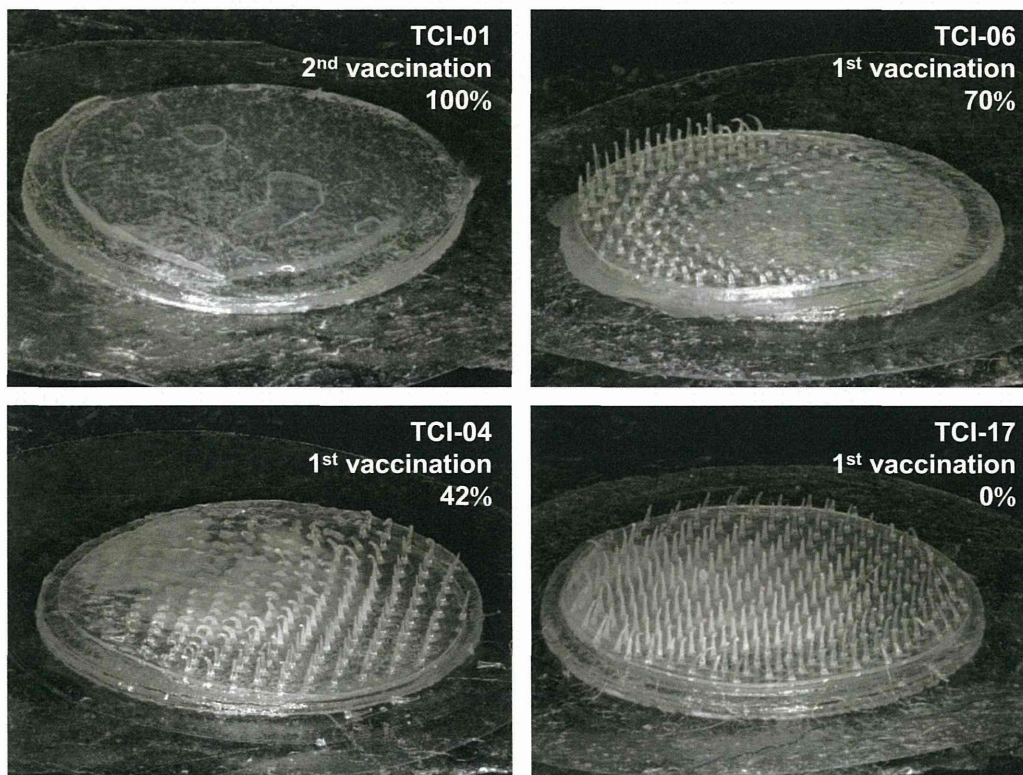
**Fig. 8** Mechanical failure force of antigen-loaded MH800 before and after 6-month storage at various temperatures. MH800 loaded with influenza HA antigen were stored at 4, 25, or 40°C for 6 months. Then, the force required to fracture 55 microneedles was measured using a texture analyzer. Data represent the mean  $\pm$  SD of 3 measurements each.



**Fig. 9** Amount and titer of HA antigen loaded in MH800 before and after 6-month storage at various temperatures. (A) Amount of HA antigen and hyaluronic acid in each MH800 were determined by Lowry method and ELISA, respectively. (B) HA titer in HA antigen solution prepared from each MH800 was determined by hemagglutination assay. Data represent the mean  $\pm$  SD of 5 measurements each.



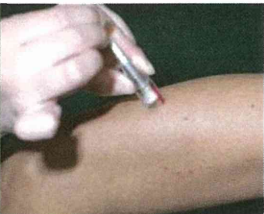




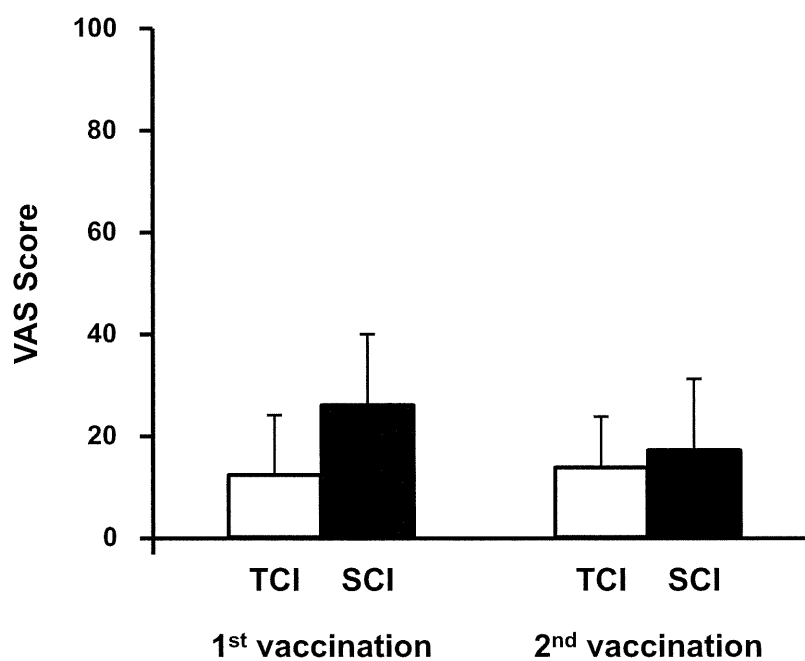


**Fig. 11** Digital microscopic images of MH800 containing influenza HA antigens after application to human skin. The MH800 was applied to the skin of left lateral upper arm of healthy volunteer for 6 h, and then the microneedle arrays were observed under digital microscope. Percentage of microneedle dissolution in each subjects was calculated by counting remained microneedles.

**Table 4** Microneedle dissolution in each subjects

		Type A	Type A	Type B
<b>Handheld applicator used in application</b>				
Study	ID	% of microneedle dissolution		
<b>Pilot</b>	TCI-01	<b>86</b>	<b>100</b>	
	TCI-02	<b>100</b>	<b>57</b>	
	TCI-03	<b>100</b>	<b>96</b>	
<b>Prospective</b>	TCI-04		42	100
	TCI-05		16	100
	TCI-06		<b>70</b>	<b>100</b>
	TCI-07		<b>94</b>	<b>100</b>
	TCI-08		13	100
	TCI-09		3	100
	TCI-10		26	100
	TCI-11		<b>51</b>	<b>100</b>
	TCI-12		0	100
	TCI-13		41	100
	TCI-14		29	100
	TCI-15		0	100
	TCI-17		0	100
	TCI-18		27	100
	TCI-19		<b>59</b>	<b>100</b>
	TCI-20		16	100

The numerical values of > 50 are written in bold.

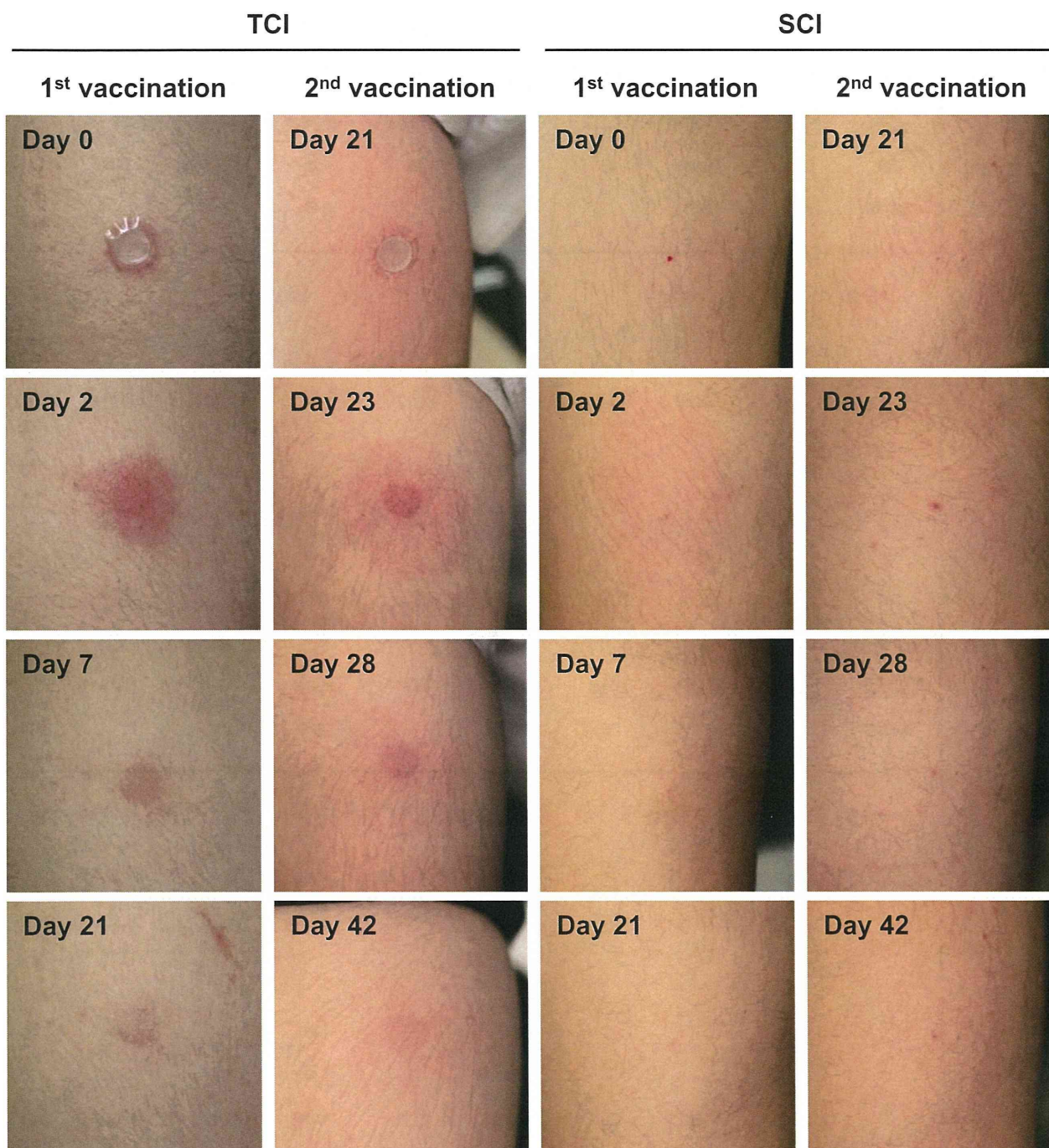


**Fig. 12** Pain scale assessment on TCI using MH800 loaded with influenza HA or SCI using injectable HA vaccine. Subjects were asked to grade the pain experienced using a VAS from 0 (no pain) to 100 (unbearable pain). Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 19 (TCI) or 20 (SCI) subjects.

**Table 5** Local adverse events by application of MH800 loaded with influenza HA

		<b>Erythema</b>				<b>Purpura</b>		<b>Pigmentation</b>	
		<b>Diameter (mm)</b>		<b>No. of positive subjects</b>		<b>No. of positive subjects</b>		<b>No. of positive subjects</b>	
		<b>TCI</b>	<b>SCI</b>	<b>TCI</b>	<b>SCI</b>	<b>TCI</b>	<b>SCI</b>	<b>TCI</b>	<b>SCI</b>
		<b>(n=19)</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=19)</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=19)</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=19)</b>	<b>(n=20)</b>
<b>1<sup>st</sup></b>	<b>Day 2</b>	14.0 ± 4.8	12.2 ± 24.3	19 (100%)	5 (25%)	13 (68%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
	<b>Day 7</b>	10.4 ± 4.9	1.0 ± 1.3	16 (84%)	8 (40%)	12 (63%)	1 (5%)	3 (16%)	0 (0%)
	<b>Day 21</b>	3.3 ± 6.0	1.0 ± 1.3	5 (26%)	8 (40%)	0 (0%)	1 (5%)	10 (53%)	0 (0%)
<b>2<sup>nd</sup></b>	<b>Day 23</b>	14.8 ± 6.8	1.7 ± 1.5	19 (100%)	13 (65%)	14 (74%)	13 (65%)	0 (0%)	0 (0%)
	<b>Day 28</b>	11.6 ± 3.5	1.3 ± 1.2	19 (100%)	12 (60%)	6 (32%)	1 (5%)	3 (16%)	1 (5%)
	<b>Day 42</b>	9.3 ± 3.6	1.1 ± 1.0	17 (89%)	13 (65%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (53%)	0 (0%)
		<b>Induration</b>		<b>Pressure pain</b>		<b>Feeling of feverishness</b>		<b>A water blister</b>	
		<b>No. of positive subjects</b>		<b>No. of positive subjects</b>		<b>No. of positive subjects</b>		<b>No. of positive subjects</b>	
		<b>TCI</b>	<b>SCI</b>	<b>TCI</b>	<b>SCI</b>	<b>TCI</b>	<b>SCI</b>	<b>TCI</b>	<b>SCI</b>
		<b>(n=19)</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=19)</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=19)</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=19)</b>	<b>(n=20)</b>
<b>1<sup>st</sup></b>	<b>Day 2</b>	8 (42%)	1 (5%)	1 (5%)	5 (25%)	0 (0%)	5 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
	<b>Day 7</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<b>Day 21</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>2<sup>nd</sup></b>	<b>Day 23</b>	5 (26%)	1 (5%)	0 (0%)	1 (5%)	3 (16%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
	<b>Day 28</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<b>Day 42</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)





**Fig. 13** Photographs of human skin after TCI using MH800 loaded with influenza HA or SCI using injectable HA vaccine.