

図2 親水性ゲルパッチ

- A: 親水性ゲルパッチ (1 cm×2 cm) への抗原蛋白質水溶液の滴下。  
 B: 抗原蛋白質 (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: 抗原蛋白質 (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で撮像した2次元データから3次元画像を構築した。  
 D: ヘアレスラット背部皮膚にジフテリアトキソイド100 μgを含んだ1 cm×2 cmの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ジフテリアトキソイドを背部皮下注射した。これらのワクチン投与を2週間隔で5回繰り返す (図中の↑)。経時的に回収した血中の抗トキソイド抗体価をELISA法により測定した。

### 親水性ゲルパッチを用いた 経皮ワクチン

著者がコスメディ製薬株式会社と共同開発した親水性ゲルパッチを応用した経皮ワクチンは、皮膚の前処理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>8-11)</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、吸収促進剤などすでに医薬品や化粧品などで用いら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蛋白質水溶液を滴下すると (図 2-A)、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蛋白質の濃縮層が形成される (図 2-B)。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。抗原含有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 (図 2-C)。親水性ゲルパッチによる抗原分子の角質層透過機構の一つとして、ゲルパッチの貼付により抗原が角質層に分配し、現出した皮膚内の抗原濃度勾配が単純拡散の駆動力となつて抗原の生きた表皮への送達を促進させることがあげられる。また、ゲルパッチの貼付により角質層が水和することで、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ことも考えられる。角質層下に送達された抗原はAPCにより捕食され、そのAPCが免疫誘導の場である所属リンパ節へと遊走し、抗原特異的免疫応答を誘導することを確認している<sup>8)</sup>。

次に、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について検証した (図 2-D)。トキソイド含有親水性ゲルパッチの貼付により

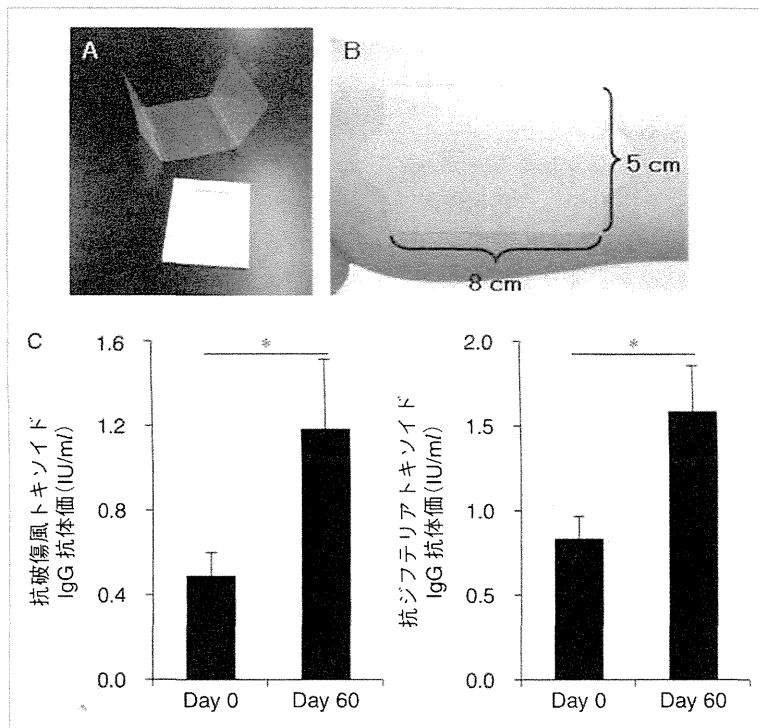


図3 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの臨床研究

- A: 製品化を志向した親水性ゲルパッチの形状と包装。  
 B: 親水性ゲルパッチのヒト上腕内側皮膚への貼付写真。  
 C: 破傷風・ジフテリアトキソイドを各2 mg含有した5 cm×8 cmの親水性ゲルパッチをヒト上腕内側皮膚に24時間貼付した。貼付前ならびに貼付60日後に血中の抗トキソイド抗体価をELISA法により測定した。データはmean±S.E.を示した。\* $P < 0.01$  (paired *t*-test)

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が確認された<sup>10)</sup>。同量の抗原をろ紙に浸み込ませて貼付したところ、トキソイドに対する抗体産生はまったく認められず、われわれ独自の親水性ゲルパッチはその表面上に抗原濃縮層を形成することで優れた抗原送達を可能にしていることが示唆された。また、抗原を含有したゲル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確認されなかったことから、本経皮ワクチン製剤の安全性が実証された<sup>11)</sup>。

さらに著者らは、これらの結果に基づき、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<sup>12)</sup>。破

傷風・ジフテリアトキソイドを含有させた親水性ゲルパッチ製剤(5 cm×8 cm)を作製し(図3-A)、ヒト上腕内側皮膚に24時間貼付した(図3-B)。その結果、ゲルパッチ剥離直後に貼付部位において一時的な軽微な紅斑が認められたものの、数日以内に消失した。また、各種血液検査においても顕著な変化は確認されず、ゲルパッチ製剤の貼付は全身性の副反応を誘発しないことが示された。さらに、各トキソイドに対する抗体価を測定すると、本経皮ワクチン製剤の貼付によりヒトにおいても有意に抗体価の上昇が達成されることが明らかとなった(図3-C)。このように親水性ゲルパッチはヒトにおいても安全かつ有効なワクチンデバイスであることが実証された。本邦では多くの人が、乳幼児期の破傷風・ジフテリアトキソイドワクチンの接種により抗トキソイド抗体を有している。

しかし、その抗体価は年齢を重ねるとともに低下するといわれており、皮膚に貼るだけと簡便な手法でブースト免疫を誘導できる本製剤は非常に有用な新規ワクチン製剤であるといえる。

しかしながら、これまで開発されてきたガーゼパッチはもちろんのこと、著者らの親水性ゲルパッチについても、十分な抗原を皮膚内へ送達するためには大量の抗原を必要とする。親水性ゲルパッチについて、角質層下に送達される抗原量は含浸させた量の数%程度であることを確認しており、注射に比べて抗原の利用率が低いのが現状である。そのため、簡便かつ安全な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を開発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、経皮ワクチンの製品化・実用化に向けた取り組みを推進していくことが重要である。

### 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

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APC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(BCG, 麻疹ワクチンなど)、あるいはそれら病原体由来コンポーネントの凝集体(インフルエンザHA抗原など)といった粒子状形態であるため、親水性ゲルパッチに適應可能なワクチン抗原は限定されてしまう。すなわち、経皮ワクチン製剤の適應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。

そこで著者らは、微小な針により角質層に孔をあけることで物質を送達するマイクロニードル法を用いた経皮ワクチンの開発に着目した<sup>13)</sup>。この方法は神経終末が存在する真皮の深部にまで針が到達しないことから、痛みを伴わずにワ

クチン投与ができる。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、さまざま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期待されている。マイクロニードルという概念は1976年にGerstelとPlaceらによつてはじめて報告されて以来<sup>14)</sup>、製造技術が困難であることから費用対効果の面が問題となり開発研究は停滞していた。しかしながら、1990年代になって電子工業が発展することで微細加工技術が容易になり、現在ではさまざまなマイクロニードルの開発が進められている<sup>15)~18)</sup>(図4)。

これまでに開発されてきたマイクロニードルは、経皮送達機構や構成材料の種類によってさまざまなタイプに分類される。第一世代のマイクロニードルはシリコンや金属(ステンレス、チタン)を構成材料としたものであり、マイクロニードルで処置した皮膚に対してワクチン抗原を塗布する(図4-A)、微小針の中空から抗原溶液を注入する(図4-B)、微小針にワクチン抗原を吸着させて経皮送達する(図4-C)、といった方法がある。これらは剛性に優れる、成形しやすい、といった利点を有しているが、微小針が生体内で折れ残り、重篤な組織傷害をひき起こす危険性が払拭できないために、実用化する上で大きな課題を抱えている。そこで近年では、第二世代マイクロニードルとして、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸・グリコール酸(PLGA)といった生分解性バイオポリマーやヒアルロン酸などを利用した溶解型マイクロニードルの開発が注目されている<sup>19)19)</sup>。これらは生体適合性に優れる構成素材を使用し、微小針自体が溶解することによって装填あるいは吸着した抗原を皮膚内へと送達することができるといった特徴を有する(図4-D)。そのため、第一世代マイクロニードルの安全面における問題点を克服できると考えられており、臨床応用・実用化が待望されている。

著者らは共同研究を行っているコスメディ製薬株式会社が独自に開発した皮膚内溶解型マイクロニードルを経皮ワクチンへと応用することに成功している<sup>19)20)</sup>(図5-A)。この第二世代マイクロニードルは皮膚組織成分であるヒアルロン酸を主成分

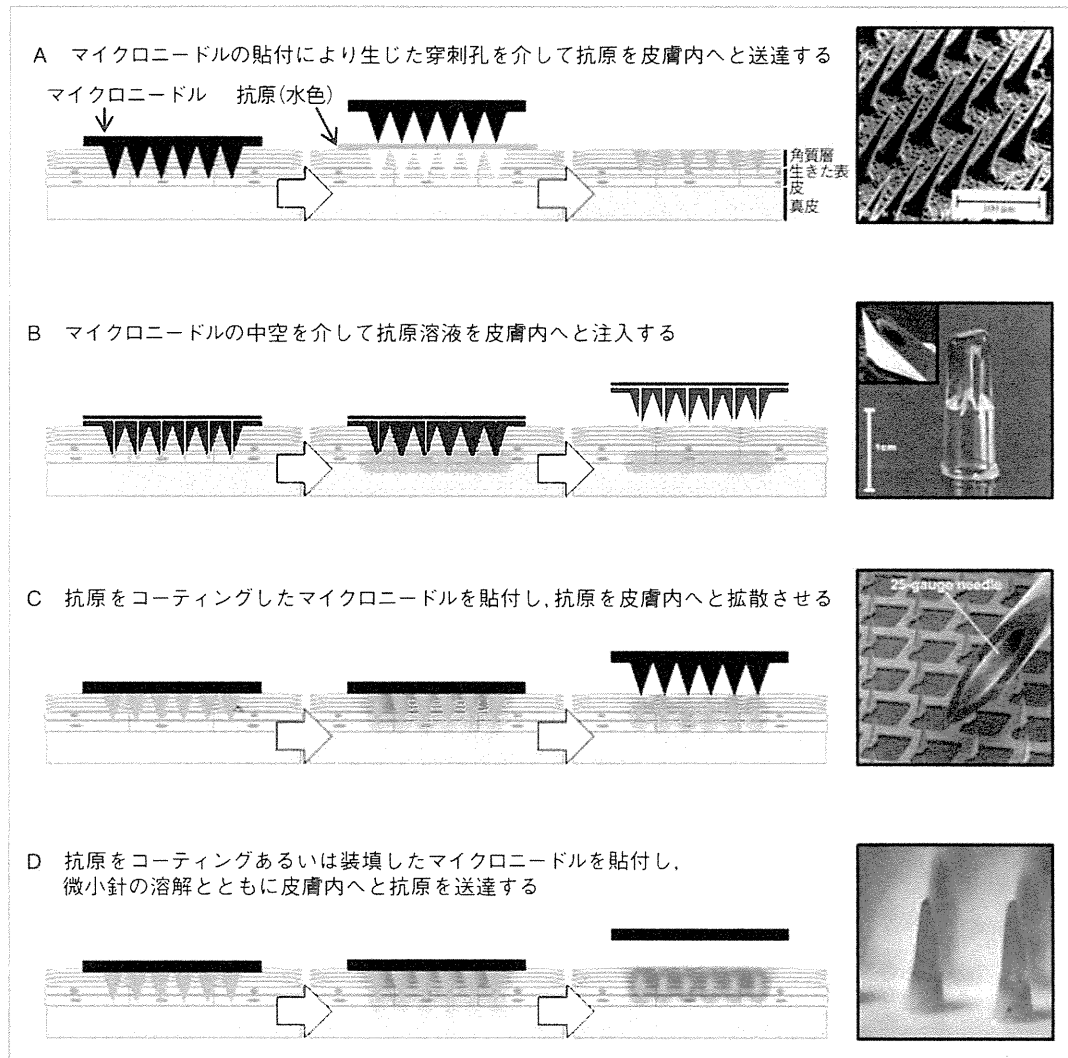


図4 マイクロニードルを用いた経皮送達機構とその例

A: シリコン製マイクロニードル<sup>15)</sup>, B: シリコン製中空マイクロニードル(NanoPass)<sup>16)</sup>, C: チタン製コーティング用マイクロニードル<sup>17)</sup>, D: ポビドン主体溶解型マイクロニードル<sup>18)</sup>.

としており、針長が200  $\mu\text{m}$ のマイクロニードルは、すでに化粧品として上市・販売されていることから、医薬品のデバイスとしてもヒトへの適用が期待できる(表1)。本マイクロニードルの微小針は皮膚内へと挿入された後、水分を吸収することによって溶解し、装填した抗原を角質層下へと容易に送達するように設計されている。また、微小針の形状や長さは自由に制御することができる。実際に、さまざまな形状の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

性粒子にかかわらず、APCが存在する生きた表皮ならびに真皮へと物質を送達できることが確認された(図5-B)。また、針部の長さ依存して抗原を送達する部位が異なることが示され、皮膚内への物質送達においてその深度までも制御可能であることが示唆された。さらに、可溶性抗原である破傷風・ジフテリアトキソイドのみならず、粒子状抗原であるインフルエンザHA抗原を装填したマイクロニードルパッチにおいても動物皮膚に貼付することで抗原特異的抗体産生が誘導され、その抗体価は注射群よりもわずかではあるが、高値

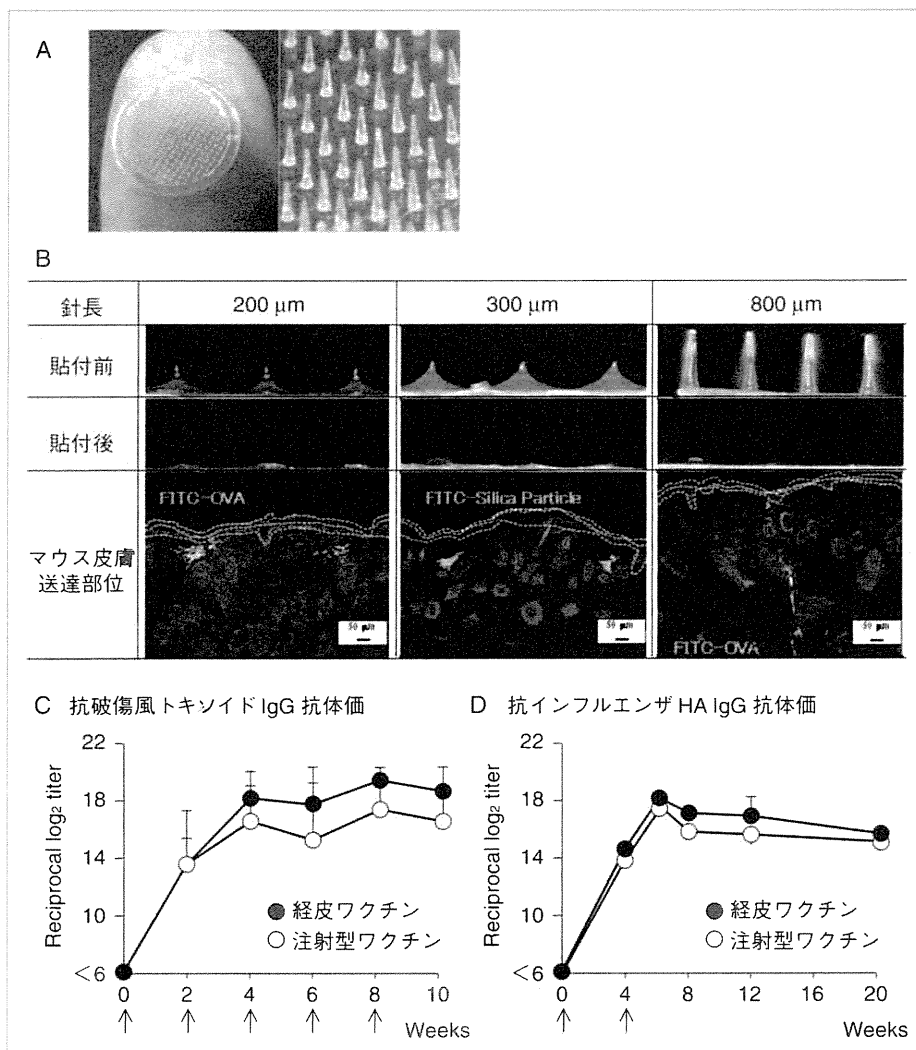


図5 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

- A: 皮膚内溶解型マイクロニードル、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微小な針を有する。
- B: 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に蛍光標識OVAあるいは蛍光標識ナノ粒子を装填し、マウス背部皮膚に6時間貼付した。貼付部位の皮膚を回収し、凍結切片を作製後、蛍光顕微鏡により観察した。
- C: 破傷風トキソイドを10 μg装填した針長800 μmのマイクロニードルパッチをラット背部皮膚に6時間貼付した。対照群のラットには同量の破傷風トキソイドを背部皮下注射した。これらのワクチン投与を2週間隔で5回繰り返し(図中の↑)、経時的に血中の抗トキソイド抗体価をELISA法により測定した。
- D: インフルエンザHA抗原[A/Brisbane/59/2007(H1N1)]を0.2 μg装填した針長800 μmのマイクロニードルパッチをマウス背部皮膚に6時間貼付した。対照群のマウスには同量のインフルエンザHA抗原を大腿部筋肉内注射した。これらのワクチン投与を4週間隔で2回実施し(図中の↑)、経時的に血中の抗HA抗体価をELISA法により測定した。

を示すことが明らかとなった(図5-C, D)。これらの成果に基づき、すでに著者らは本デバイスのヒトへの適用を検証する臨床研究を開始しており、

抗原装填マイクロニードルパッチが皮下注射とほぼ同等の抗体産生を誘導することを確認している。現在欧米のみならず、本邦においても新規剤形で

表1 マイクロニードル製剤の開発状況

開発・実施者	マイクロニードル 構成材料	開発対象	ステージ
コスメディ製薬	ヒアルロン酸 コラーゲン	しわ、美白用機能性化粧品	上市・販売
	ヒアルロン酸 デキストラン ポビドン	インフルエンザ経皮ワクチン 脂漏性角化症治療(レチノイン酸)	臨床研究 基礎研究
Zosano	チタン	骨粗鬆症治療(副甲状腺ホルモン)	PII(国外) PI(国内予定)
3M	ポリカーボネート	骨粗鬆症治療(副甲状腺ホルモン)	前臨床研究
Georgia Institute of Technology	ポビドン	インフルエンザ経皮ワクチン	基礎研究 (2015年に国外でPI)

あるマイクロニードルを用いた医薬品の治験が開始されつつあり(表1)、新規経皮デバイスの臨床応用は近い将来実現すると考えられる。抗原装填マイクロニードルパッチの臨床研究に関して、現在さらなる詳細な解析を進めている段階であるが、本経皮ワクチン製剤は実用化に適う画期的な新規ワクチン製剤であるといえる。

### 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、皮膚に貼るだけでワクチン施行が可能な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ワクチンの研究開発に期待が寄せられている。著者らは独自に開発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ワクチン製剤をすでに臨床研究へと展開しており、ヒトにおける有用性を見出している。これらの研究成果は本邦初の経皮ワクチンの実現を大きく前進させるものである。簡便性・普及性に優れる経皮ワクチン製剤が実用化されれば、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：本稿で紹介した研究内容は、「先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業(独立行政法人医薬基盤研究所)」、「厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)」ならびに「文部科学研究費補助金(挑戦的萌芽)

(基盤研究B)」からの研究助成によるものであり、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたりご協力いただきましたコスメディ製薬株式会社・神山文男先生、権英淑先生、奈良県立医科大学・浅田秀夫先生、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) Radetsky M. Smallpox : a history of its rise and fall. *Pediatr Infect Dis J* 1999 ; 18 : 85.
- 2) Barry BW. Breaching the skin's barrier to drugs. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 165.
- 3) Zhao YL, Murthy SN, Manjili MH, et al. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization. *Vaccine* 2006 ; 24 : 1282.
- 4) Batheja P, Thakur R, Michniak B. Transdermal iontophoresis. *Expert Opin Drug Deliv* 2006 ; 3 : 127.
- 5) Jackson LA, Austin G, Chen RT, et al. Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors. *Vaccine* 2001 ; 19 : 4703.
- 6) Glenn GM, Taylor DN, Li X, et al. Transcutaneous immunization : a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat Med* 2000 ; 6 : 1403.
- 7) Naito S, Maeyama J, Mizukami T, et al. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine* 2007 ;

- 25 : 8762.
- 8) Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, et al. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J Control Release* 2008 ; 131 : 113.
- 9) Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, et al. Characterization of transcutaneous protein delivery by a hydrogel patch in animal, human, and tissue-engineered skin models. *Biol Pharm Bull* 2011 ; 34 : 586.
- 10) Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, et al. Transcutaneous vaccination using a hydrogel patch induces effective immune responses to tetanus and diphtheria toxoid in hairless rat. *J Control Release* 2011 ; 149 : 15.
- 11) Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, et al. Compositional optimization and safety assessment of a hydrogel patch as a transcutaneous immunization device. *Biol Pharm Bull* 2011 ; 34 : 1835.
- 12) Hirobe S, Matsuo K, Quan YS, et al. Clinical study of transcutaneous vaccination using a hydrogel patch for tetanus and diphtheria. *Vaccine* 2012 ; 30 : 1847.
- 13) Prausnitz MR. Microneedles for transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004 ; 56 : 581.
- 14) Gerstel MS, Place VA. Drug delivery device. US Patent No. 3 1976 ; 964 : 482.
- 15) Henry S, McAllister DV, Allen MG, Prausnitz MR. Microfabricated microneedles : a novel approach to transdermal drug delivery. *J Pharm Sci* 1998 ; 87 : 922.
- 16) Van Damme P, Oosterhuis-Kafeja F, Van der Wielen M, et al. Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine* 2009 ; 27 : 454.
- 17) Matriano JA, Cormier M, Johnson J, et al. Macroflux microprojection array patch technology : a new and efficient approach for intracutaneous immunization. *Pharm Res* 2002 ; 19 : 63.
- 18) Sullivan SP, Koutsonanos DG, Del Pilar Martin M, et al. Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat Med* 2010 ; 16 : 915.
- 19) Matsuo K, Yokota Y, Zhai Y, et al. A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens. *J Control Release* 2012 ; 161 : 10.
- 20) Matsuo K, Hirobe S, Yokota Y, et al. Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. *J Control Release* 2012 ; 160 : 495.

\* \* \*



