

201307004A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田直貴

平成26(2014)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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田直貴

平成26(2014)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 ----- 25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 32

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、独自に開発したマイクロニードル（MN）を基材とする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った。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た。さらに、Toll 様受容体リガンド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、ワクチン抗原の用量や投与回数、免疫応答増強に基づく安定した有効性発揮を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んだ。その中で本年度は、

1. 新素材 MN の物理化学的特性解析、
2. 新素材 MN を用いた経皮ワクチン製剤の有効性評価（前臨床研究）、
3. 新素材 MN の安全性評価（臨床研究）、
4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索、

について以下の成果を得た。

1. 新たにナイロン 6 を素材とする MN（nMN）およびポリグリコール酸を素材とする MN（pMN）を開発し、それらの皮膚穿刺特性ならびに皮膚内物質送達特性を明らかにした。
2. nMN にモデル抗原としてニワトリ卵白アルブミンを装填した経皮ワクチン製剤の免疫応答誘導能を確認した。
3. nMN および pMN のヒト皮膚に対する穿刺特性を明らかとし、これらのデバイスがヒトに安全に適用できることを実証した。
4. CpG オリゴデオキシヌクレオチドの経皮免疫応答におけるアジュバント効果を精査するとともに、その作用機序の一端を明らかにした。

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

ワクチン研究においては、短時間で大量のワクチンを供給できる製造技術・体制の整備と併せて、パンデミック発生時の接種を想定した簡便な新規ワクチン手法およびその製剤化技術の開発も重要である。本研究課題では、独自に開発したマイクロニードル（MN）技術を応用した新規経皮ワクチン製剤の開発を推進し、既に皮膚内容解型 MN にインフルエンザ HA 抗原を装填した「貼るワクチン製剤」の高い安全性と有効性を臨床研究において実証した。しかし、皮膚内容解型という MN の特性は、既存のワクチン抗原を装填したとしても「新薬」として承認申請手続きを進める必要があり、この制度上の経済的・時間的負荷は実用化を大きく遅滞させる原因となる。そこで同様のコンセプトでありながら「剤形変更」として承認申請手続きが行える異なるアプローチの必要性が高まり、本年度は皮膚内容解型 MN とは構成素材ならびに抗原装填方式が異なる新素材 MN の開発に着手し、経皮ワクチンデバイスとしての安全性ならびに有用性を前臨床研究および臨床研究において検証した。

また、ワクチンの安定した効果を保証するためには、安全性と有効性を兼備した新規アジュバントの開発が待望されている。本邦ではアジュバントとして主にアラム（アルミニウム塩アジュバントの総称）が用いられているが、不溶性に伴う利便性の悪さやアルミニウムの毒性・細胞傷害性といった問題を抱えている。そこで本研究では、Toll 様受容体（TLR）リガンドを中心に経皮ワクチン製剤に応用可能な可溶性アジュバント候補物質を探索し、ワクチン抗原の用量や投与回数の低減、免疫応答増強に基づく安定した有効性発揮を達成できる未来型経皮ワクチン製剤の創出を目指した基盤情報の収集を図った。

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。さらには乾燥製剤として開発することで、従来の注射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）を不要とし、コストダウンが図れる可能性がある。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. 新素材 MN の物理化学的特性解析

B. 1. 1. 皮膚穿刺特性

(1) MNの作製

ナイロン6を素材としたMN (nMN) ならびにポリグリコール酸を素材としたMN (pMN) の作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。ナイロン6あるいはポリグリコール酸を射出成形によりマイクロニードル鑄型に押し込むことでnMNおよびpMNを作製した (Fig. 1)。作製した各MN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) 針部耐荷重値の測定

MNの針部耐荷重値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nMNあるいはpMNの針部の軸に対して垂直に0.1 mm/secの速度で押しあて、微小針が曲がるのに要した力 (負荷) を測定した。直径0.5 cmの円形範囲に存在するMNの微小針の本数 (130本) でその負荷を除することで、微小針1本あたりの耐荷重値 (N/needle) を算出した。

B. 1. 2. 皮膚内物質送達特性

(1) MNの作製

B. 1. 1. (1) に準拠してnMNおよびpMNを作製した。

(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) MNの貼付

MN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MNに押し当てるバネ式アプリーケーターを用いた (Fig. 2)。マウスの除毛した背部皮膚上にMN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MNを16.3 N/cm²の力で皮膚に押し込んで穿刺・圧着した。

(4) Puncturing 法による経皮投与 (Fig. 3)

ICRマウス (雌性, 10週齢; 日本SLC) の除毛した背部皮膚にB. 1. 2. (3) に準拠してnMNあるいはpMNを貼付し、5秒後に剥離して穿孔した部位にFluorescein標識ニワトリ卵白アルブミン (F-OVA) 溶液 (5 mg/mL) を5 μL滴下した。上からMNと同サイズ (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 (Scotch; 3M) で被覆した。

(5) 送達物質の皮膚組織内局在の観察

B. 1. 2. (4) に準拠してF-OVAを経皮投与し、6時間後に摘出した皮膚をO.C.T. compound (サクラ精機) に包埋した後、直ちに液体窒素に浸漬して凍結ブロックを作製した。厚さ8 μmの凍結組織切片を作製し、ProLong Gold Antifade reagent with DAPI (Life Technologies) を用いて封入したプレパラートを蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000; Keyence) にて観察することで、皮膚組織内に送達されたF-OVAの局在を解析した。

B. 2. 新素材 MN を用いた経皮ワクチン製剤の有効性評価 (前臨床研究)

B. 2. 1. 抗原特異的抗体産生誘導能

(1) MNの作製

B. 1. 1. (1) に準拠してnMNを作製した。nMNの先端をOVA/ヒドロキシプロピルセルロー

ス (HPC) 溶液に浸漬し、その後乾燥させることによって (dip-dry method) OVA装填nMNを作製した (Fig. 4)。作製したOVA装填nMN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

C57BL/6マウス (H-2K^b, 雌性, 6週齢; 日本SLC) にOVAを下記の6群に分けて投与した。

- ① OVA 8.6 μg 経皮免疫群 (TCI; 8.6 μg): OVAを8.6 μg 装填したnMNをB. 1. 2. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に貼付し、剥離を防ぐためにメンディングテープで被覆した。nMNは2時間後に剥離した。2週間後に同様の方法で2回目の経皮投与を行った。
- ② OVA 1.5 μg 経皮免疫群 (TCI; 1.5 μg): OVAを1.5 μg 装填したnMNをB. 1. 2. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に貼付し、剥離を防ぐためにメンディングテープで被覆した。nMNは2時間後に剥離した。2週間後に同様の方法で2回目の経皮投与を行った。
- ③ OVA 8.6 μg 皮下注射免疫群 (SCI; 8.6 μg): 8.6 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ のOVA/phosphate-buffered saline (PBS) 溶液を背部皮下に2週間隔で2回注射した。
- ④ OVA 1.5 μg 皮下注射免疫群 (SCI; 1.5 μg): 1.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ のOVA/PBS溶液を背部皮下に2週間隔で2回注射した。
- ⑤ OVA 8.6 μg /HPC溶液皮下注射免疫群 (SCI-HPC; 8.6 μg): 8.6 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ のOVA/HPC溶液を背部皮下に2週間隔で2回注射した。
- ⑥ OVA 1.5 μg /HPC溶液皮下注射免疫群 (SCI-HPC; 1.5 μg): 1.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ のOVA/HPC溶液を背部皮下に2週間隔で2回注射した。

(3) 血清中OVA特異的IgG抗体価の測定

1回目および2回目のOVA投与からそれぞれ2週間後に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。血清中のOVA特異的IgG抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate-buffered solution (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。8%スキムミルク/Tris-buffered saline (TBS)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。0.8%スキムミルク/TBS with 0.05% Tween 20 (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5回洗浄し、0.8%スキムミルク/TBSTを用いて1/5000に希釈したHorseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス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7回、蒸留水で1回洗浄し、TMB溶液 (Moss Inc.) を100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H₂SO₄を100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 log₂ titerとして表した。

B. 3. 新素材 MN の安全性評価 (臨床研究; Table 1)

B. 3. 1. ヒト皮膚穿刺特性

(1) MNの作製

B. 1. 1. (1)に準拠してnMNならびにpMNを作製した。作製したMN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MNを使用した。

(2) MNの貼付

20～60歳代の健康男性10人を被験者として、上腕外側皮膚にnMNとpMNを30分間貼付した。MNの貼付にはカセット型のMNをセットして用いるバネ式アプリーケーターを使用した (Fig. 5)。

(3) 疼痛評価

MN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) 法により評価した。

(4) 皮膚水分蒸散量の測定

MN剥離直後に皮膚からの水分蒸散量 (transepidermal water loss; TEWL) を携帯型閉鎖チャンバー方式水分蒸散量測定装置 (VAPO SCAN AS-VT100RS; ASAHI BIOMED) により測定した。

B. 3. 2. 安全性評価

(1) MNの作製

B. 3. 1. (1)に準ずる。

(2) MNの貼付

B. 3. 1. (2)に準ずる。

(3) 皮膚局所反応の評価

MN貼付から2日後および7日後に自覚症状についての問診を行うとともに、MN適用皮膚局所を観察し、International Contact Dermatitis Research Group (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、皮膚局所反応として紫斑の有無も評価した。

B. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

B. 4. 1. CpG オリゴデオキシヌクレオチド

(CpG-ODN) の表皮細胞への影響

(1) ケラチノサイト (KC) の単離

除毛した C57BL/6 マウス (H-2K^b, 雌性, 6 週齢; 日本 SLC) から、耳介皮膚ならびに胸部皮膚を採取した。耳介皮膚はピンセットを用いて軟骨の層を境に二層に分離した後、それぞれを 0.5% Dispase (Roche) /RPMI1640 (50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME), 10% ウシ胎仔血清 (FCS), 0.1 mM 非必須アミノ酸 (NEAA), 抗生物質を含む; 和光純薬) に角質層が上になるように浮かべた。37°C で 3 時間インキュベーションした後、表皮層をピンセットによって剥ぎ取り、表皮シートを調製した。採取した表皮シートをピペッティングし、セルストレイナー (pore size = 70 μ m; BD Falcon) を通して表皮細胞懸濁液を得た。表皮細胞を氷冷した staining buffer (0.5% FCS, 0.05% NaN₃ を含む PBS) にて 1×10^7 cells/mL に懸濁し、Rat anti-mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding (clone 2.4G2) を添加後、氷上で 20 分間インキュベーションした。FITC-conjugated anti-mouse MHC Class II (clone M5/114.15.2; eBioscience) を添加し、氷上で 20 分間静置した後、FACS Aria™ II cell sorter (BD Bioscience) を用いて MHC class II 分子陰性分画を KC として分取した。

(2) CpG-ODN 刺激による KC のサイトカイン・ケモカイン産生

RPMI1640 (50 μ M 2-ME, 10% FCS, 0.1 mM NEAA, 抗生物質を含む) で懸濁した KC を 5×10^5 cells/500 μ L/well で 24-well plate (nunc) に播種し、CpG-ODN である ODN1826 (Invivogen) を終濃度 10 μ g/mL で添加した。24 時間後、培養上清を回収し、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、TNF- α の濃度を Mouse

Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex (eBioscience) により測定した。また IL-8 濃度は IL-8 ELISA キット (CUSABIO) により測定した。

B. 4. 2. CpG-ODN のアジュバント効果における TLR9 依存性

(1) 皮膚内溶解型マイクロニードル (MicroHyal; MH) の作製

MH の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、針部の長さが 300 μm で、針部形状が円錐型の MH 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) OVA と CpG-ODN の混合溶液の調製

CpG-ODN である ODN1826 あるいは K3 (GeneDesign, Inc.) を Sterile Endotoxin-free Water で 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、同じく Sterile Endotoxin-free Water にて 2 mg/mL に調製した EndoGrade OVA (J. K. International) 溶液と等量混合した。

(3) 抗原含有親水性ゲルパッチの作製

親水性ゲルパッチは B. 1. 2. (2) に準拠して作製した。直径 1 cm のベルトポンチ (トラスコ中山) により裁断した親水性ゲルパッチに、OVA 溶液 (1 mg/mL) あるいは B. 4. 2. (2) で調製した OVA と CpG-ODN の混合溶液を 50 μL 滴下し、室温下でパッチ表面を乾燥させた。

(4) OVA と CpG-ODN の投与 (Puncturing 法; Fig. 3)

C57BL/6 マウス (H-2K^b, 雌性, 7-10 週齢; 日本 SLC) および TLR9 欠損マウス

(Background; C57BL/6J, H-2K^b, 雌性, 7-10 週齢) の除毛した背部皮膚に MH を貼付し、5 秒後に剥離して穿孔した部位に B. 4. 2. (3) で作製した OVA あるいは OVA と CpG-ODN を含有した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、24 時間後に剥離した。2 週間後、同様の手法により OVA のみを含有した親水性ゲルパッチを用いて経皮投与した。

(5) 血清中 OVA 特異的抗体価の測定

B. 2. 1. (3) に準拠して測定した。検出抗体に 0.8% 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 IgG1、IgG2b、あるいは IgG2c 抗体 (全て Southern Biotech) を用いることで IgG サブクラス抗体価についても測定した。

(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・承認を得て実施した。

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った。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. 新素材 MN の物理化学的特性解析

C. 1. 1. 皮膚穿刺特性

医療用具・医療機器の原材料として使用実績があるナイロン6あるいはポリグリコール酸を素材とするnMNおよびpMNを新たに開発した。これら新素材MNの皮膚穿刺能力を推し量る一つの指標として針部耐荷重値を測定した。テクスチャーアナライザーを用いてMNにステンレス製の円盤を一定の速度で押し当てていくと、微小針が曲がることによって負荷が急激に低下するポイントが認められる (Fig. 6)。このポイントにおける負荷から微小針1本あたりの耐荷重値を算出すると、nMNおよびpMNはそれぞれ 0.033 ± 0.004 N/needle および 0.065 ± 0.005 N/needle であった (Table 3)。

C. 1. 2. 皮膚内物質送達特性

nMNあるいはpMNを用いて穿刺したマウス皮膚に塗布されたF-OVAの皮膚内送達部位を観察した。いずれのMNを用いた場合にもF-OVA由来の蛍光は生きた表皮から真皮にかけて観察され、送達深度は皮膚表面から200~300 μm であった (Fig. 7)。

C. 2. 新素材 MN を用いた経皮ワクチン製剤の有効性評価 (前臨床研究)

C. 2. 1. 抗原特異的抗体産生誘導能

モデル抗原であるOVAを針部先端に装填したnMN製剤について、マウスに適用した際の血清中OVA特異的抗体産生誘導能を指標にワクチン効果を評価した。nMNを用いた経皮免疫群では、皮下注射免疫群と比較して初回免疫後の抗体価はわずかに低値を示したが、2回免疫後には皮下注射免疫群を上回る抗体価の上昇が認められた (Fig. 8)。また、nMNの針部にOVAを装填するために使用した高粘度HPC溶液が、抗原特異的抗体産生の誘導に対して影響がないことも併せて確

認した。

C. 3. 新素材 MN の安全性評価 (臨床研究)

C. 3. 1. ヒト皮膚穿刺特性

MN貼付時の痛みをVASにより評価したところ、半数以上の被験者が10以下のきわめて低いスコアを申告し、平均値10.9はほとんど痛みを伴わない投与手法であることを示すものと判断された (Table 4)。

またMNを30分間貼付した皮膚のTEWLを測定したところ、いずれの被験者においても無処置の皮膚と比較して値の上昇が認められ、nMNおよびpMNによるヒト皮膚角質層に対する穿孔が示唆された (Fig. 9)。同一被験者での両MNによるTEWL上昇程度を比較すると、nMN適用部位のほうがpMN適用部位よりも低値を示した被験者が多く、nMNは被験者によっては穿刺が浅かったり、穿刺できた微小針の数が少なかったりした可能性が疑われた。この結果は、nMNよりもpMNのほうが針部耐荷重値が高かった (Table 3) ことに関係するものと予想され、ヒト皮膚に対する確実な穿刺を達成する経皮ワクチンデバイスとしてはpMNが有望であろうと判断された。

C. 3. 2. 安全性評価

MN貼付における皮膚局所反応を経時的に観察したところ、貼付から2日後において2人の被験者に紅斑が残っていたものの非常に軽微であり (Fig. 10)、7日後には全ての被験者で元の皮膚状態への回復が確認された (Table 5)。したがってnMNとpMNは、ヒト皮膚に対して重篤な局所反応を誘発しない経皮ワクチン用デバイスであることが実証された。

C. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

C. 4. 1. CpG-ODN の表皮細胞への影響

昨年度までの検討において、CpG-ODNが経皮ワクチン製剤用アジュバントとして有望な候補物質であることを見出した。CpG-ODNのアジュバント効果については注射ワクチン等での報告が多数認められ、既に新規アジュバントとしてヒト型CpG-ODNの開発が臨床試験の段階に進んでいる。しかし、経皮投与したCpG-ODNのアジュバント効果およびその特性および発現機序の詳細については未知のままである。

そこでまず、生きた表皮層を構成する細胞の90%以上を占めるKCに着目し、CpG-ODN刺激に伴う10種類のサイトカイン・ケモカイン (GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、TNF- α) について分泌量を測定したところ、いずれも検出限界以下であった。一方、IL-8の分泌量には顕著な増加が認められ (Fig. 11)、IL-8が好中球やT細胞を誘引するケモカインであることから、CpG-ODNの経皮投与によるアジュバント効果に皮膚内への免疫細胞動員が寄与する可能性が示された。

C. 4. 2. CpG-ODNのアジュバント効果におけるTLR9依存性

昨年度までの検討において、KCならびに皮膚常在性抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞 (LC) および真皮樹状細胞 (dDC) が、CpG-ODNの受容体であるTLR9を発現していることを確認した。そこで、CpG-ODNの経皮投与によるアジュバント効果がTLR9のシグナル伝達に依存した反応であることの確証を得るために、TLR9欠損マウスを用いた検討を行った。

野生型マウスにおいては、OVAのみを経皮投与した場合と比較してCpG-ODNを混合経皮投与することで、血清中OVA特異的抗体産生誘導に明らかな増強効果が認められた (Fig. 12)。一方、TLR9欠損マウスではOVA単独投与群とOVA/CpG-ODN混合投与群

との間で抗体価の差異が認められなかったことから、CpG-ODNの経皮投与により発揮されるアジュバント効果はTLR9を介した反応に基づくことが示された。

また、OVAの経皮投与によって誘導された血清中OVA特異的IgG抗体のサブクラス解析を行ったところ、CpG-ODNの併用はTh1型サブクラスとされるIgG2bおよびIgG2cの産生を増強し、その効果はTLR9欠損マウスにおいて消失することが判明した (Fig. 13)。したがって経皮投与したCpG-ODNによるTLR9刺激は、Th1型免疫応答の増強に強く関与することが示唆された。

D. 考察

D.1. 新素材 MN 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おり (*Immunol. Res.* 36, 127-136, 2006)、MN 技術はこれら抗原提示細胞にワクチン抗原を効率よく送達するデバイス開発に大いに貢献できる。従来の MN は金属やシリコンを素材として開発が進められてきたため (*Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1547-1568, 2012)、穿刺・剥離の際の機械的な力によって皮膚内で針部が折損・残存する危険性を拭えないことが実用化への妨げとなってきた。そこで我々は、皮膚構成成分であるヒアルロン酸を素材とする皮膚内溶解型 MN を独自に開発し、季節性インフルエンザ HA 抗原をはじめとする種々のワクチン抗原を装填した貼るワクチン製剤について、既に動物実験ならびに健康成人ボランティアを対象とした臨床研究における高い安全性と注射ワクチンに匹敵する有効性を実証し、国内外から高い評価を受けている。しかしながら本剤は、皮膚内溶解型という特性によって MN 成分と含有抗原とを同時に皮膚内に投与する「合剤」としてカテゴリ化されるため、既に注射剤として臨床応用されているワクチン抗原を装填したとしても「新薬」としての承認申請手続きを進めなければならない可能性がある。この制度上の経済的・時間的負荷は製薬メーカーの共同開発への参画意欲をくじく原因となることが想定されるため、製薬メーカーの協力のもと経皮ワクチン製剤の一日も早い実用化を実現するためには、同様のコンセプトでありながら承認申請手続きが「剤形変更」として行える異なるアプローチも並行して進める必要があると考えられた。

本観点から我々は、新たにナイロン 6 あ

るいはポリグリコール酸を素材とする非溶解型ソリッド MN (nMN および pMN) を開発し、針部先端にコーティングしたワクチン抗原のみを皮膚内へ送達可能なシステムの構築に取り組むこととした。本法であれば非溶解型ソリッド MN は既存のワクチン抗原を経皮投与するための医療機器としてカテゴリ化され、本デバイスに承認済ワクチン抗原を装填した経皮ワクチン製剤については「剤形変更」による承認申請のみで実用化できる可能性が高い。ナイロン 6 およびポリグリコール酸は、縫合糸をはじめとする医療用具や医療機器の原材料として臨床での使用実績を有しており、金属やシリコンと比較すると軟らかい材質であることから過度の機械的な力が加わっても針部は「折れる」ことなく「曲がる」のみで皮膚内に微小針が残存する危険性が小さい。また、皮膚内溶解型 MN では抗原を MN に内封していたため溶出速度の調整には MN 素材組成の変更を要するが、新たに開発した非溶解型ソリッド MN では抗原を針部にコーティングさせる抗原装填方法であるため、MN 組成はそのまま (針部強度や皮膚穿刺特性は維持したまま) でコーティング基剤の変更のみで抗原の溶出速度を適切に調節できる利点も有する。

新規開発した nMN および pMN の皮膚穿刺能力を評価する指標として針部耐荷重値を測定したところ、それぞれ 0.034 N/needle および 0.064 N/needle と算出された。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)、nMN および pMN の微小針先端の直径が約 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、これら両 MN の抗原装填時にお

ける確実な皮膚刺入を達成するには、皮膚内での針部折損を防ぐ柔軟性を保ちつつ現在の針部耐荷重値（針部強度）を高める改良や工夫が必要となる可能性がある。

nMN および pMN により皮膚内に送達された物質の局在を観察したところ、角質層下の生きた表皮から真皮上部にかけて 300 μm 程度の深さまで到達していることが判明した。今回は Puncturing 法に限った観察しか行えていないため、今後、針部先端にモデル物質を装填した nMN あるいは pMN を用いて経皮投与した場合の皮膚内物質送達特性についても比較検討を進める必要がある。LC と dDC はともに皮膚常在性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、Puncturing 法を含めた経皮抗原送達技術は、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。

D. 2. 新素材 MN を用いた経皮ワクチン製剤の有効性評価（前臨床研究）

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。MN を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤の前臨床研究に関しては、シリコン製あるいはステンレス製 MN ばかりでなく (*J. Control. Release* 136, 71-78, 2009, *PLoS ONE* 4, e4773, 2009)、溶解型

MN を用いた研究報告も認められる (*Nat. Med.* 16, 915-921, 2010)。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)。

今回は OVA をモデル抗原として針部先端にコーティングした nMN 製剤を作製し、その経皮ワクチン効果を動物実験において検証した。OVA 装填 nMN 製剤により経皮免疫されたマウスにおいては、OVA を皮下注射免疫した群に匹敵する血清中 OVA 特異的抗体価の上昇が認められ、今回開発した新素材 MN の経皮ワクチン用デバイスとしての高い有用性が示された。今後、各種ワクチン抗原の針部コーティング条件の最適化や抗原装填 MN 製剤の安定性評価など、実用化を見据えた基盤技術の強化・改良と基礎データの集積を図る予定である。

D. 3. 新素材 MN の安全性評価（臨床研究）

ワクチン接種対象者の多くが乳幼児・小児であることを考慮すると、接種に痛みを伴わない経皮ワクチン製剤はコンプライアンスの向上にも大きく貢献できる。痛みの程度を客観的に評価することは非常に難しいとされるが、10 名の被験者に新素材 MN 貼付時の痛みを VAS により申告してもらったところ、総じて痛みがほとんどないワクチン接種法であるとの認識が得られた。また、新素材 MN はヒト角質層を突破する穿刺能力を有しており、重篤な皮膚局所反応を誘発しないデバイスであることも実証された。今後、新素材 MN にワクチン抗原を装填した経皮ワクチン製剤の安全性ならびに有効性を検証する臨床研究を推し進めるとともに、臨床現場で本製剤を使用する際の利

便性や簡便性を改善しうるアプリケーションの開発・改良を図る予定である。

D. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

本邦ではアジュバントとして主にアラムが用いられているが、不溶性に伴う利便性の悪さやアルミニウムの毒性・細胞傷害性といった問題を抱えている。ワクチンの安定した効果を保証するために、安全性と有効性を兼備した新規アジュバントの探索・開発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)。

本研究では昨年度までに TLR9 リガンドである CpG-ODN が経皮免疫応答を増強できる有望なアジュバント候補物質であることを見出した。そこで本年度は、CpG-ODN のアジュバント効果発現機序の解明に取り組み、経皮投与された CpG-ODN の作用が TLR9 を介して発揮されていること、また CpG-ODN により刺激された KC が IL-8 の産生分泌を亢進させることを明らかとした。また、ヒト型 CpG-ODN として開発が進んでいる K3 (*Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 283-290, 2013) についても経皮投与においてアジュバント活性が発揮されることを確認した。

今後、これらの基礎情報を活用してワクチン抗原の用量や投与回数の低減（コスト削減）ならびに免疫応答増強に基づく安定した有効性を達成できる未来型経皮ワクチン製剤の創出を図り、その有用性を検証するための臨床研究へと展開していきたいと考えている。

E. 結論

E. 1. 新素材 MN の物理化学的特性解析

- 新たに nMN および pMN を開発し、それらの皮膚穿刺特性ならびに皮膚内物質送達特性を明らかにした。

E. 2. 新素材 MN を用いた経皮ワクチン製剤の有効性評価（前臨床研究）

- nMN にモデル抗原として OVA を装填した各経皮ワクチン製剤の免疫応答誘導能を確認した。

E. 3. 新素材 MN の安全性評価（臨床研究）

- nMN および pMN のヒト皮膚に対する穿刺特性を明らかとし、これらのデバイスがヒトに安全に適用できることを実証した。

E. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

- CpG-ODN の経皮免疫応答におけるアジュバント効果を精査するとともに、その作用機序の一端を明らかにした。

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) Sachiko Hirobe, Hiroaki Azukizawa, Kazuhiko Matsuo, You Zhai, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Hiroshi Suzuki, Ichiro Katayama, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Development and clinical study of a self-dissolving microneedle patch for transcutaneous immunization device: *Pharm. Res.* **30**(10): 2664-2674 (2013)
- 2) Yasuhiro Hiraishi, Sachiko Hirobe, Hiroshi Iioka, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Hideo Asada, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Development of a novel therapeutic approach using a retinoic acid-loaded patch for seborrheic keratosis treatment and safety study in humans: *J. Control. Release* **171**(2): 93-103 (2013)
- 3) 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)
- 4) Sachiko Hirobe, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Transcutaneous vaccines: current and emerging strategies: *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**(4): 485-498 (2013)
- 5) 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: *薬学雑誌* **133** (12): 1363-1372 (2013)
- 6) 廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: 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: *感染・炎症・免疫* **43**(3): 259-262 (2013)

G.2. 学会発表

- 1) 廣部祥子, 権 英淑, 神山文男, 岡田直貴, 中川晋作: インフルエンザ経皮ワクチン製剤のヒトにおける免疫誘導特性および長期保存安定性: **第17回日本ワクチン学会学術集会**, 三重県 (津市), 2013年11月30日-12月1日
- 2) 大栗千佳, 廣部祥子, 権 英淑, 神山文男, 岡田直貴, 中川晋作: Th2 偏向性免疫応答を誘導するアルツハイマー病経皮ワクチン療法の開発: **第17回日本ワクチン学会学術集会**, 三重県 (津市), 2013年11月30日-12月1日
- 3) 須佐井 亮, 廣部祥子, 権 英淑, 神山文男, 岡田直貴, 中川晋作: 経皮投与した CpG オリゴヌクレオチドのアジュバント活性に関する基礎的検討: **第17回日本ワクチン学会学術集会**, 三重県 (津市), 2013年11月30日-12月1日
- 4) Risa Otsuka, Yasuhiro Hiraishi, Sachiko Hirobe, Hiroshi Iioka, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Hideo Asada, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Development of a novel therapeutic approach using a retinoic acid-loaded microneedle patch for seborrheic keratosis treatment: *The Asian Federation for Pharmaceutical Sciences Conference 2013 (AFPS 2013)*, Jeju, Republic of Korea, November 20-22, 2013
- 5) Sachiko Hirobe, Hiroaki Azukizawa, Kazuhiko Matsuo, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Ichiro Katayama, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Development and clinical study of a dissolving microneedle patch for transcutaneous immunization device: *The Asian Federation for Pharmaceutical Sciences Conference*

- 2013 (AFPS 2013), Jeju, Republic of Korea, November 20-22, 2013
- 6) 大塚梨沙, 平石恭大, 権 英淑, 神山文男, 浅田秀夫, 廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: レチノイン酸装填マイクロニードル製剤のヒトにおける安全性・有効性評価 ～色素斑ならびに脂漏性角化症に対する新規治療法の確立を目指して～: **第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会**, 京都府 (京田辺市), 2013 年 10 月 12 日
 - 7) 廣部祥子, 西内 翠, 権 英淑, 神山文男, 岡田直貴, 中川晋作: マイクロニードルデバイスをを用いた経皮 DNA ワクチンに関する基礎的検討: **遺伝子・デリバリー研究会 第 13 回夏期セミナー**, Honolulu, Hawaii, U.S.A., July 24, 2013
 - 8) Sachiko Hirobe, Kazuhiko Matsuo, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: A novel transcutaneous vaccine formulation using a self-dissolving microneedle patch: **The 40th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society**, Honolulu, Hawaii, U.S.A., July 21-24, 2013
 - 9) 廣部祥子, 権 英淑, 神山文男, 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長期保存安定性に関する検討: **第 29 回日本 DDS 学会学術集会**, 京都府 (京都市), 2013 年 7 月 4-5 日
 - 10) 大塚梨沙, 平石恭大, 廣部祥子, 権 英淑, 神山文男, 浅田秀夫, 岡田直貴, 中川晋作: 脂漏性角化症治療を目指したレチノイン酸装填マイクロニードル製剤の開発: **第 29 回日本 DDS 学会学術集会**, 京都府 (京都市), 2013 年 7 月 4-5 日
 - 11) 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, 岡田直貴, 中川晋作: 臨床研究におけるインフルエンザ経皮ワクチン製剤の免疫誘導特性に関する解析: **日本薬剤学会第 28 年会**, 愛知県 (名古屋市), 2013 年 5 月 23-25 日
 - 12) 大栗千佳, 廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: ランゲルハンス細胞ターゲットイングを目指した Fc 融合アミロイドβペプチドの創製: **日本薬剤学会第 28 年会**, 愛知県 (名古屋市), 2013 年 5 月 23-25 日
 - 13) 須佐井亮, 王 淇, 廣部祥子, 権 英淑, 神山文男, 岡田直貴, 中川晋作: CpG オリゴヌクレオチドの経皮アジュバント活性に関する基礎的検討: **日本薬剤学会第 28 年会**, 愛知県 (名古屋市), 2013 年 5 月 23-25 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

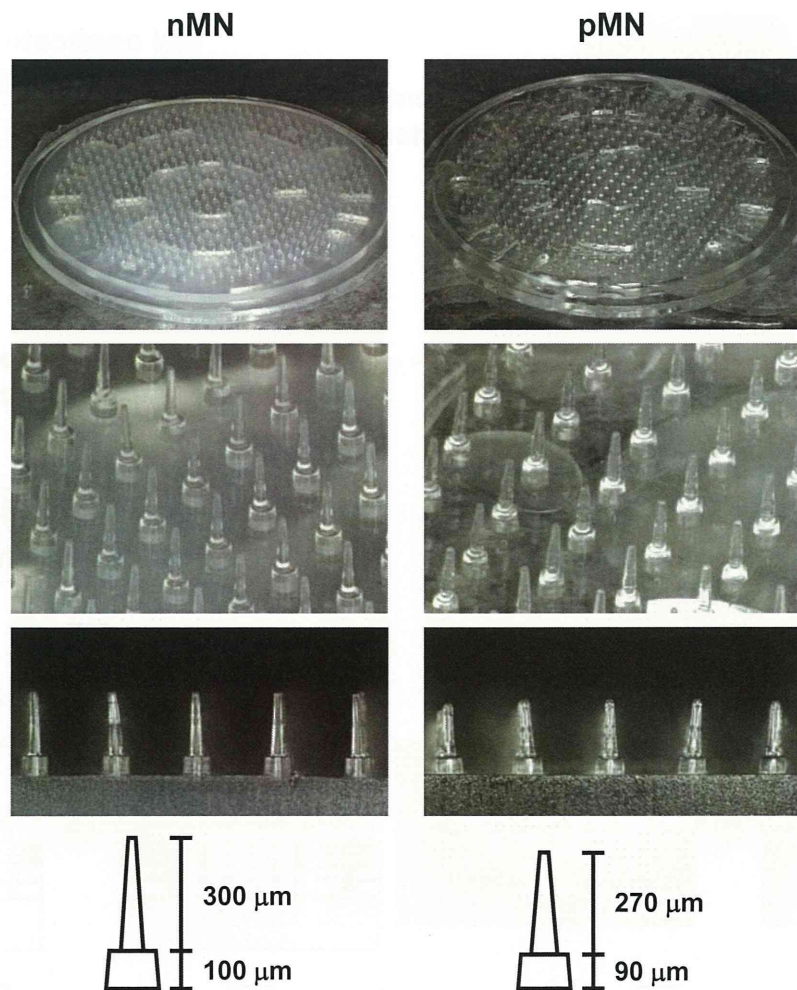


Fig. 1 Dimension of solid microneedle array (nMN and pMN).

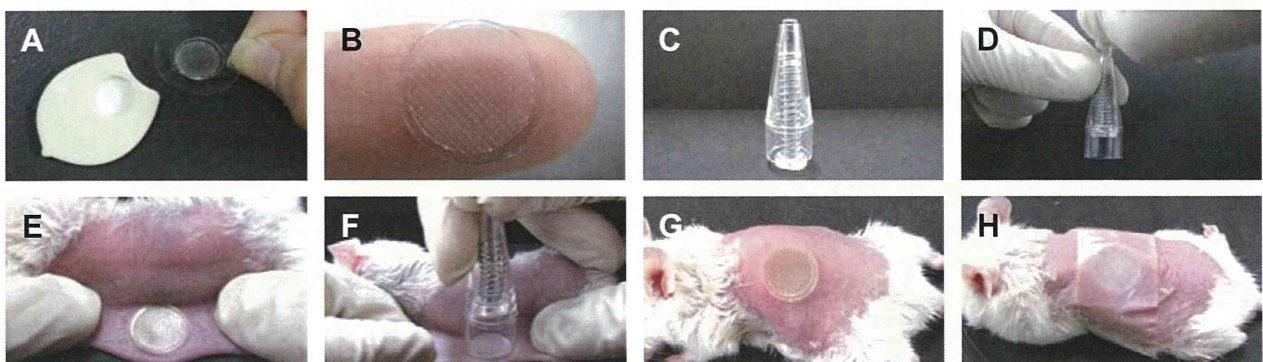


Fig. 2 Schematic drawing of transcutaneous vaccination procedure. A and B; MN, C and D; applicator for MN application, E, F, and G; application of MN to back skin of mice, H; covering with a mending tape over MN.

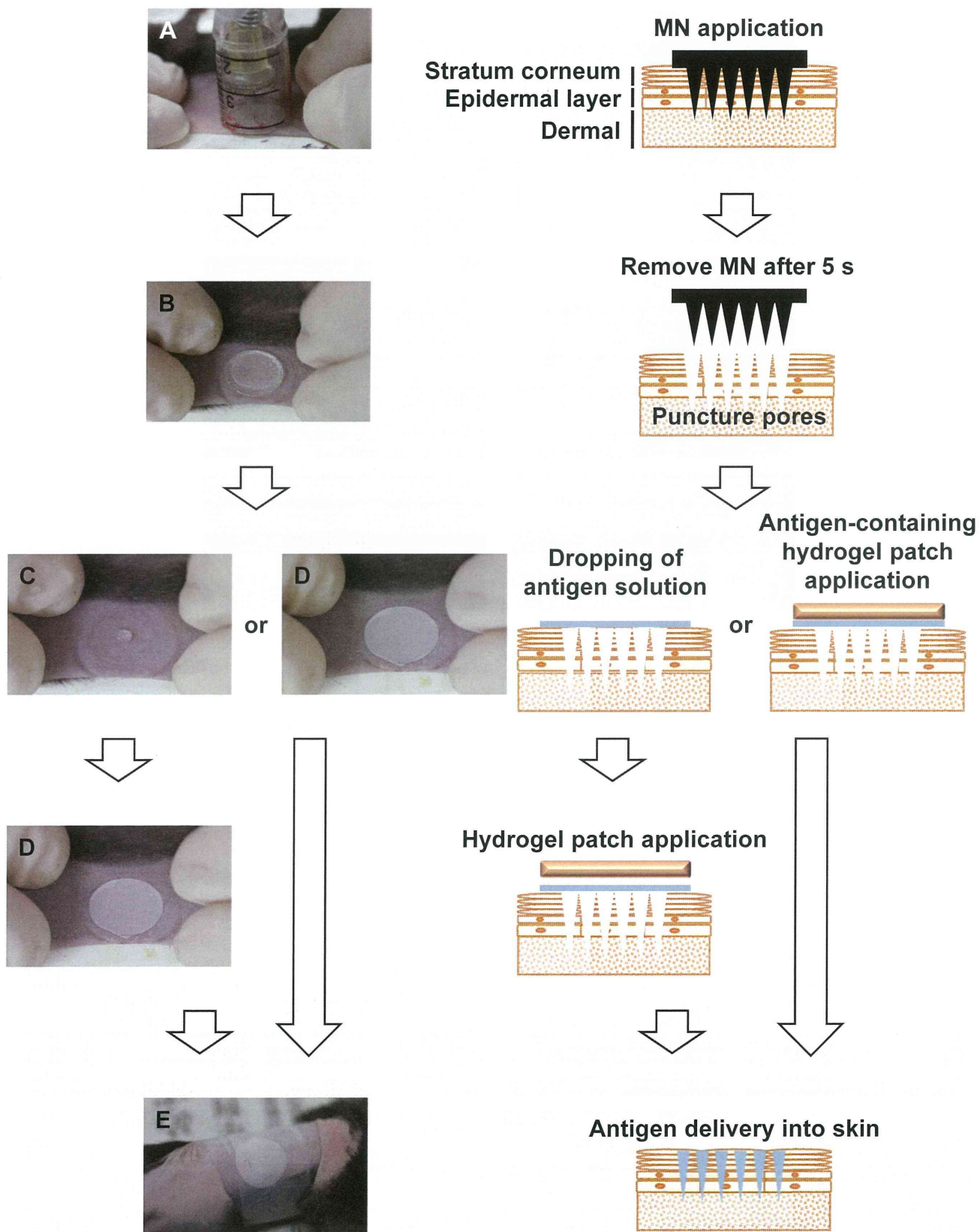


Fig. 3 Schematic drawing of the puncturing method for transcutaneous antigen delivery. (A, B) application of MN to animal skin. (C) removal of the MN, and then dropping antigen solution on the MN-applied site. (D, E) application of a hydrogel patch, and then covering with a wound management film over the hydrogel patch.

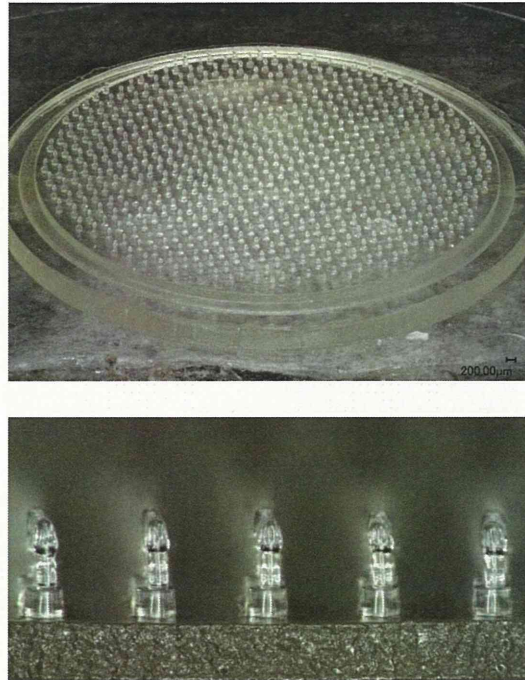


Fig. 4 Image of OVA-coated nMN.

Table 1 Procedure of clinical study using nMN and pMN

	Time after experimental beginning			
	0	30 min	2 d	7 d
nMN and pMN	Application	Removal		
Pain scale (VAS)	●			
TEWL measurement		●		
ICDRG scoring			●	
Purpura evaluation				●