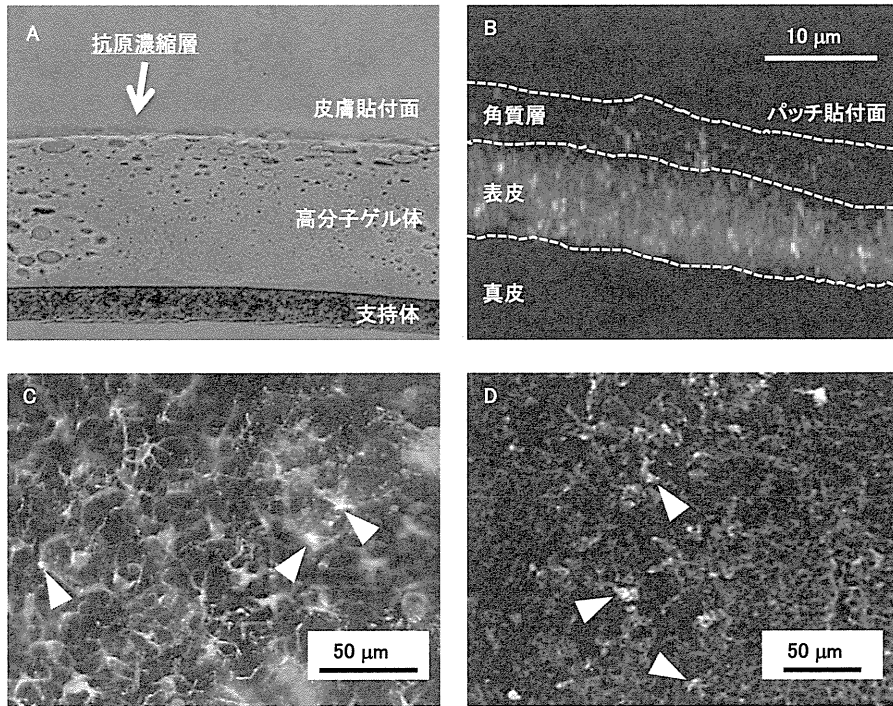


3.1 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの開発

親水性ゲルパッチは、アクリル酸エステル系粘着剤をベースに、浸潤剤、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、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2A)。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は、特別な前処理を必要とすることなくただ貼るだけで、抗原を表皮組織にまで送達することができる(図2B)。また、皮膚内に送達された抗原はランゲルハンス細胞に取り込まれており(図2C)、さらにリンパ節内へと抗原を取り込んだランゲルハンス細胞が遊走していることが確認された(図2D)。そこで、破傷風・ジフテリアトキソイドを含有した親水性ゲルパッチをラット背部皮膚に貼付したところ、各トキソイド特異的なIgG抗体が産生された(図2E)。親水性ゲルパッチによる抗原分子の角質層透過は、ゲルパッチの貼付により水和した角質層の細胞間隙に水溶性の高分子が分配し、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って促進されたと考えられる。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を動物実験にて実証した²⁴⁾。

3.2 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの臨床研究

前臨床研究の成果に基づき、我々は破傷風・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²⁷⁾(図3A)。破傷風・ジフテリアトキソイドをそれぞれ2 mg含有した親水性ゲルパッチ製剤(図3B)をヒト上腕内側皮膚に24時間貼付したところ(図3C)、重篤な局所ならびに全身性の副反応を観察することなく、抗原特異的な免疫応答を誘導可能であることが明らかとなった(図3D)。また、ラマン共焦点分光装置によってパッチ貼付後における角質層内の成分を解析したところ、水分含量の増加、パッチ構成成分である浸潤剤(グリセリン)ならびに吸収促進剤(乳酸オクチルドデシル)の角質層への移行が確認された。このことから、角質層の膨潤と角質層に移行した各成分の作用が合わさることで、水溶性の高分子である破傷風トキソイドならびにジフテリアトキソイドを角質層下へと送達できたと推察される。このように親水性ゲルパッチはヒトにおいてもただ貼るだけで免疫応答を誘導可能な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。



E 抗破傷風トキソイドIgG抗体価

抗ジフテリアトキソイドIgG抗体価

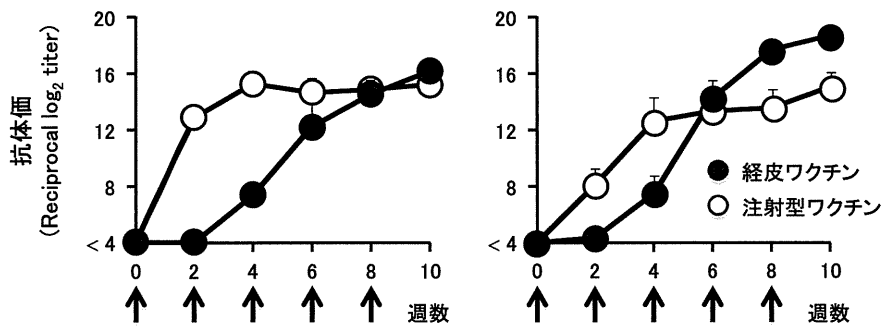


図2 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチン

- (A) 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
- (B) 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、ランゲルハンス細胞の蛍光免疫染色 (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。
- (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2時間貼付した後、パッチ適用部位の表皮シートを作製した。ランゲルハンス細胞の蛍光免疫染色 (緑色) を行った後、蛍光顕微鏡にて観察した。
- (D) 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24時間貼付し、剥離24時間後に摘出した所属リンパ節の凍結切片を作製した。ランゲルハンス細胞の蛍光免疫染色

(緑色)を行った後、蛍光顕微鏡にて観察した。

(E) ヘアレスラット背部皮膚に破傷風トキソイドならびにジフテリアトキソイドを各 100 μg を含んだ 1 cm \times 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破傷風トキソイドならびにジフテリアトキソ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 5 回繰り返し (图中的 \uparrow)、経時的に回収した血清中の抗トキソイド抗体価を ELISA 法により測定した。

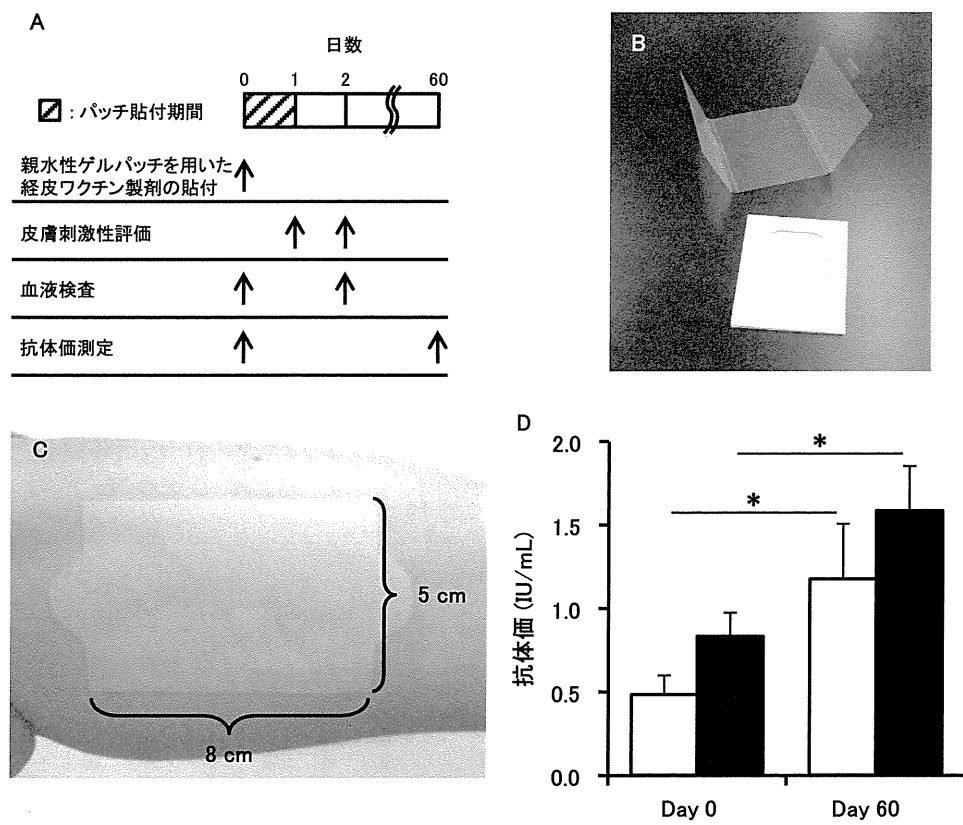


図 3 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの臨床研究

- (A) 破傷風・ジフテリア経皮ワクチン製剤の臨床研究スケジュール
 (B) 製品化を志向した親水性ゲルパッチ製剤
 (C) 親水性ゲルパッチのヒト上腕内側皮膚への貼付写真
 (D) 破傷風・ジフテリアトキソイドを各 2 mg 含有した 5 cm \times 8 cm の親水性ゲルパッチを 27 人の健康成人の左上腕内側皮膚に 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。□；抗破傷風トキソイド IgG 抗体価。■；抗ジフテリアトキソイド IgG 抗体価。データは mean \pm S.E. を示した。*: $p < 0.01$ (paired t-test)

3.3 親水性ゲルパッチの実用化に向けた今後の課題

著者らの親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチン製剤は十分なワクチン効果を得るために、注射型ワクチンに比べて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、抗原の利用率が低いのが現状である²⁶⁾。したがって、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。

4. 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用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用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の開発が必要とされる。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抗原を送達するマイクロニードル法に着目した²⁸⁾。

4.1 各種マイクロニードルデバイスの開発

マイクロニードル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抗原を投与できる利点がある。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。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、① マイクロニードルの貼付により生じた穿刺孔を介して抗原を皮膚内へ送達する²⁹⁾（**図 4A**）、② マイクロニードルの中空を介して抗原溶液を皮膚内へと注入する³⁰⁾（**図 4B**）、③ 抗原をコーティングしたマイクロニードルを貼付して抗原を皮膚内へと拡散させる³¹⁾（**図 4C**）、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おり、シリコン製中空マイクロニードルを用いたインフルエンザワクチンについて臨床試験の成果が報告されている。しかし、これらの固形マイクロ

ニードルは生体内で折れ残り、重篤な組織傷害を引き起こす危険性が払拭できないために、実用化が困難となっている。そこで、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を用いることで、たとえ微小針が皮膚内で折損したとしても針自身が分解し、残存することがないマイクロニードルが設計された。さらに、皮膚内への薬物送達効率ならびに薬物送達速度の向上を目的に、生体成分であるヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸ナトリウムを利用した溶解型マイクロニードルが開発された^{32, 33)}。これらは生体適合性に優れた構成素材を使用し、特に溶解型マイクロニードルについては、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う特徴を有する (図 4D)。このように第二世代マイクロニードルは投与後に針が消失することから、第一世代マイクロニードルが抱える安全面の問題を克服できると考えられ、臨床応用・実用化が期待される。

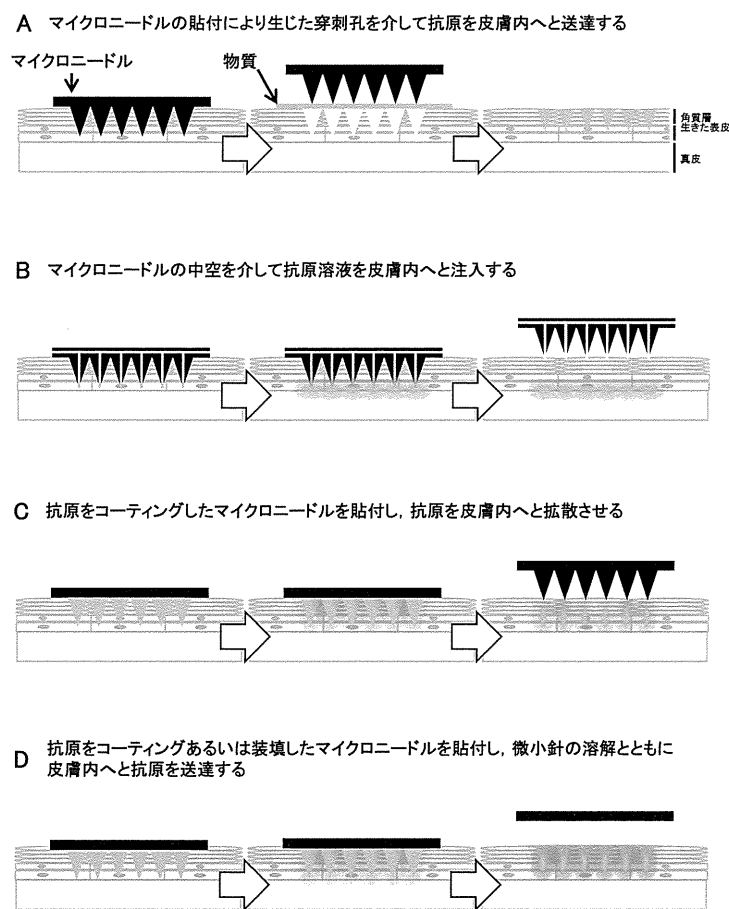


図 4 マイクロニードルを用いた経皮送達機構

4.2 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチンの開発

著者らはコスメディ製薬株式会社との共同研究により独自に開発した皮膚内溶解型マイクロニードル (図 5A) を用いた経皮ワクチンの開発を進めている。これは皮膚組織成分であるヒアルロン酸を主成分としており、マイクロニードルの形状や長さは自由に制御することができる³³⁻³⁶⁾。実際に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を明らかにしている (図 5B)。可溶性抗原である破傷風トキソイドを装填したマイクロニードルパッチをラット背部皮膚に貼付したところ、抗体価は注射ワクチン群と同様に上昇し、最終的には注射ワクチン群の抗体価を上回ることが確認された (図 5C)。さらに、皮膚内溶解型マイクロニードルに粒子状抗原であるインフルエンザ HA 抗原を装填し、マウス背部皮膚に貼付した際にも注射ワクチン群に匹敵する抗体産生が確認された (図 6A)。産生された抗体が有する HA 抗原の赤血球凝集阻止活性 (HI 価) は、わずかではあるが経皮投与群の方が皮下注射群よりも高かった (図 6B)。さらに、ワクチン投与によるマウスの感染防御能を評価するために、インフルエンザウイルスを経鼻感染させたところ、プラセボ投与群では顕著な体重減少や肺組織内にインフルエンザウイルスの増殖が認められたものの、経皮免疫群は注射免疫群と同様に顕著な体重減少や肺組織内のウイルスは確認されなかった (図 6C,D)。以上のように、皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチンは注射投与に取って代わる新たな手法として有望であることが示された。

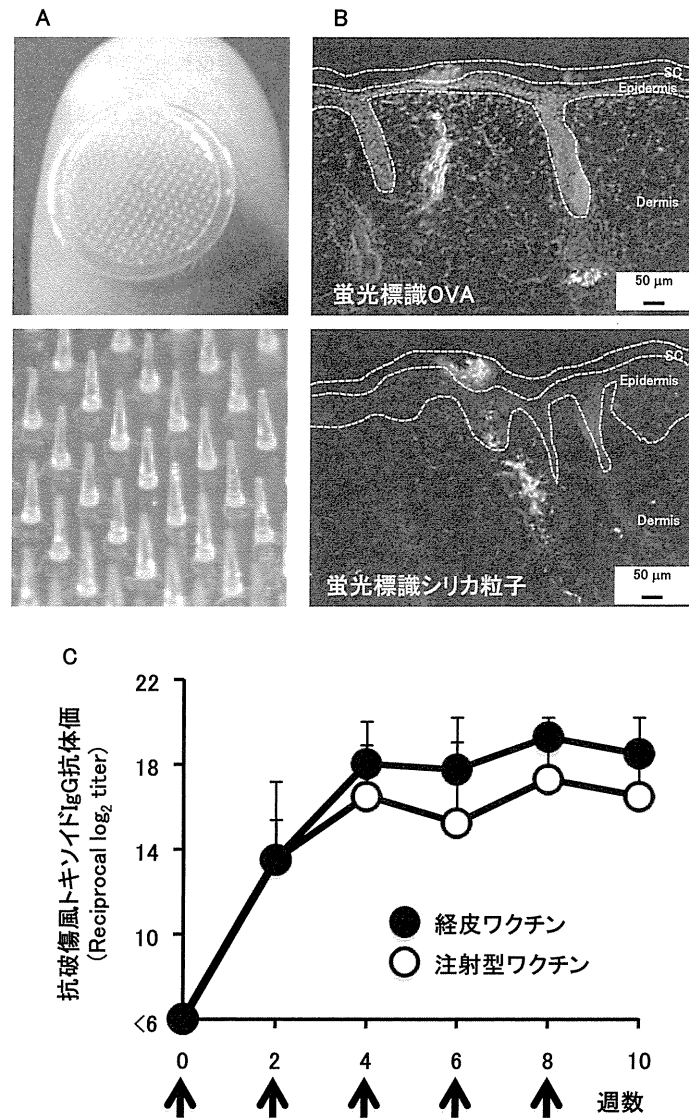


図 5 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

- (A) 皮膚内溶解型マイクロニードルの全体像。面積は 0.8 cm^2 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約 200 本の微小な針を有する。
- (B) 針長 $800 \mu\text{m}$ の皮膚内溶解型マイクロニードルパッチに蛍光標識 OVA あるいは蛍光標識シリカ粒子を装填し、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 $10 \mu\text{g}$ 装填した針長 $800 \mu\text{m}$ 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。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。

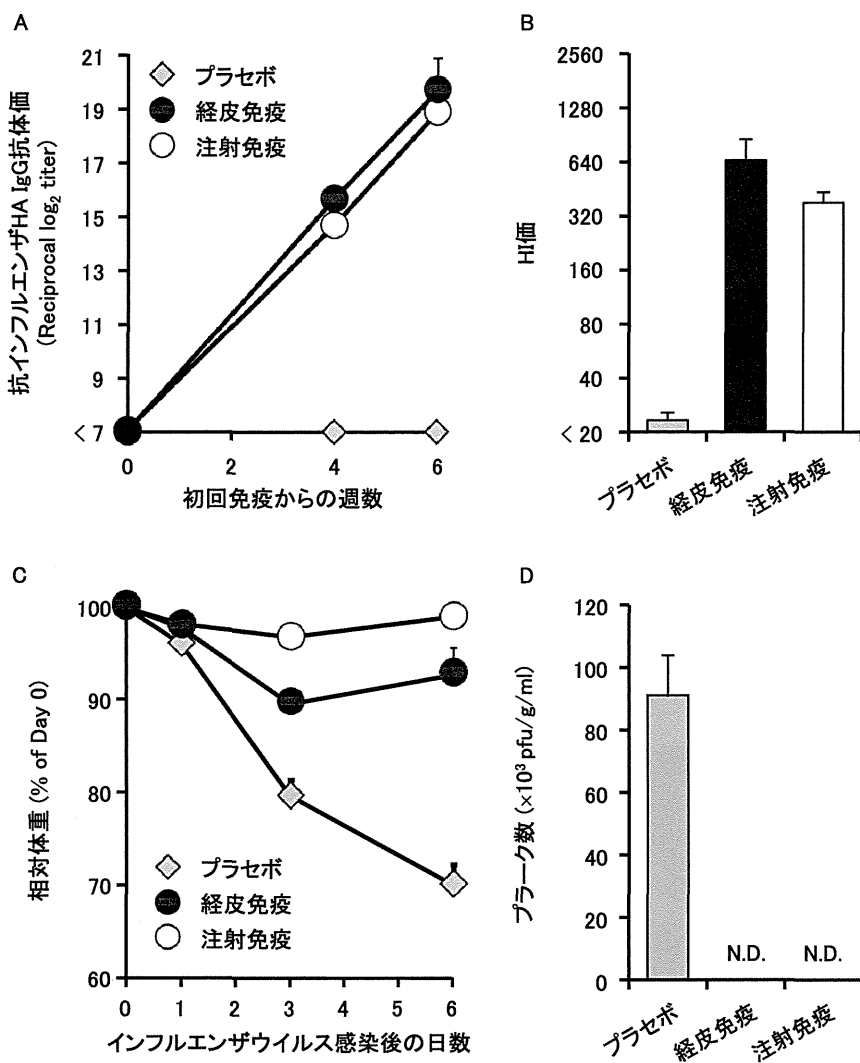


図6 インフルエンザ経皮ワクチンの前臨床研究

インフルエンザHA抗原(A/PR/8/34(H1N1))を0.4 μ g装填した針長800 μ m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回実施した。最終免疫2週間後にインフルエンザウイルス(A/PR/8/34(H1N1))を 5×10^6 pfu/headでマウスに鼻腔投与した。

- (A) 経時的に血中の抗HA抗体価をELISA法により測定した。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) 血中のHI価を赤血球凝集阻止試験により測定した。
- (C) インフルエンザウイルス投与後、経時的に体重を測定した。
- (D) インフルエンザウイルス投与6日後、摘出した肺の右葉を細分化し、ホモジネートすることで肺組織液を得た。肺組織液をMDCK細胞に接種し、培養することで、インフルエンザウイルスプラークを計測した。

4.3 皮膚内溶解型マイクロニードルの臨床研究

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いる。ヒト皮膚に針長 800 μm の皮膚内溶解型マイクロニードルを貼付したところ、1 時間後には針の約半分が、6 時間後には針全体が溶解した (図 7A)。また、皮膚内溶解型マイクロニードル貼付後の皮膚を共焦点レーザー生体顕微鏡により観察した結果、皮膚表面に微小針による穿刺孔が認められ、三次元画像の構築により皮膚断面を観察すると、その穿刺孔は角質層を突破し、生きた表皮に到達していることが確認された (図 7B)。さらに、20 人の健康成人被験者において、マイクロニードルの貼付による重篤な皮膚局所反応や全身性の副作用がないことを確認している³⁶⁾。このように、ヒトにおいても著者らの皮膚内溶解型マイクロニードルは装填した物質を角質層下へと安全に送達できることが示唆された。現在、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を実施しており、抗原装填マイクロニードルパッチがヒト皮膚に対して安全に適用でき、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。今後は、実用化に向けて、製剤製造法の樹立や品質試験法の確立など、製品化に焦点をおいた取り組みを推進していくことが重要であると考えている。

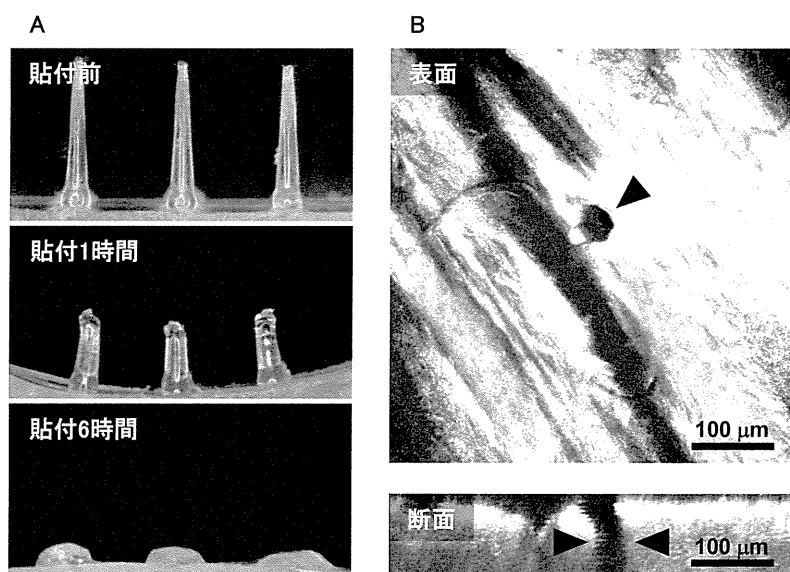


図7 皮膚内溶解型マイクロニードルのヒト皮膚への適用

- (A) 針長 800 μm の皮膚内溶解型マイクロニードルパッチを成人健康男性の左上腕外側皮膚に 1 時間あるいは 6 時間貼付し、剥離後のマイクロニードルを実体顕微鏡により観察した。
- (B) 針長 800 μm の皮膚内溶解型マイクロニードルパッチを成人健康男性の左上腕外側皮膚に 5 秒間貼付し、剥離直後の貼付部位を共焦点レーザー生体顕微鏡により観察した。深さ 1 μm 毎に撮影した画像を三次元構築することで、皮膚断面像を得た。

おわりに

DDS 技術を基盤とした経皮ワクチン製剤が多数考案・開発されている中、皮膚に貼るだけという簡便な操作で予防接種を施行可能なパッチ製剤ならびにマイクロニードル製剤の研究開発に期待が寄せられている。著者らはコスメディ製薬と共同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。経皮ワクチン製剤が従来までの注射に代わる簡便性・普及性に優れる新規剤型ワクチンとして実用化されれば、乳幼児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、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）（若手研究 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、大阪大学医学系研究科 小豆澤宏明先生、片山一朗先生、一般財団法人阪大微生物病研究会に深謝いたします。

参考文献

- 1) Radetsky M. *Pediatr Infect Dis J* **18**, 85-93 (1999)
- 2) Valladeau J, Saeland S. *Semin. Immunol.* **17**, 273-83 (2005)
- 3) Sugita K, et al. *Clin. Exp. Immunol.* **147**, 176-83 (2007)
- 4) Barry BW. *Nat. Biotech.* **22**, 165-7 (2004)
- 5) Weaver JC. *Methods Mol. Biol.* **55**, 3-28 (1995)
- 6) Zhao YL, et al. *Vaccine* **24**, 1282-90 (2006)
- 7) Cristillo AD, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 29-35 (2008)
- 8) Hirao LA, et al. *Vaccine* **26**, 440-8 (2008)
- 9) Kelly K, et al. *Vaccine* **26**, 1344-52 (2008)
- 10) Roberts LK, et al. *Vaccine* **23**, 4867-78 (2005)
- 11) Jones S, et al. *Vaccine* **27**, 2506-12 (2009)

- 12) Cassaday RD, et al. *Clin. Cancer Res.* **13**, 540-9 (2007)
- 13) Wang R, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10817-22 (2001)
- 14) Epstein JE, et al. *Hum. Gene. Ther.* **13**, 1551-60 (2002)
- 15) Aboud S, et al. *Clin. vaccine immunol.* **17**, 1124-31 (2010)
- 16) Williams J, et al. *Vaccine* **18**, 1939-43 (2000)
- 17) Frech SA, et al. *Lancet* **371**, 2019-25 (2008)
- 18) Frech SA, et al. *Vaccine* **23**, 946-50 (2005)
- 19) Vogt A, et al. *J. Immunol.* **180**, 1482-9 (2008)
- 20) Combadiere B, et al. *PLoS one* **5**, e10818 (2010)
- 21) Yagi H, et al. *Can. Res.* **66**, 10136-44 (2006)
- 22) Ishii Y, et al. *J. Control. Release* **131**, 113-20 (2008)
- 23) Matsuo K, et al. *J. Control. Release* **149**, 15-20 (2011)
- 24) Matsuo K, et al. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1835-40 (2011)
- 25) Matsuo K, et al. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 586-9 (2011)
- 26) Matsuo K, et al. *J. Pharm. Sci.* **102**, 1936-47 (2013)
- 27) Hirobe S, et al. *Vaccine* **30**, 1847-54 (2012)
- 28) Prausnitz MR. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 581-7 (2004)
- 29) Henry S, et al. *J. Pharm. Sci.* **87**, 922-5 (1998)
- 30) Van Damme P, et al. *Vaccine* **27**, 454-9 (2009)
- 31) Matriano JA, et al. *Pharm. Res.* **19**, 63-70 (2002)
- 32) Sullivan SP, et al. *Nat. Med.* **16**, 915-20 (2010)
- 33) Matsuo K, et al. *J. Control. Release* **161**, 10-7 (2012)
- 34) Matsuo K, et al. *J. Control. Release* **160**, 495-501 (2012)
- 35) Hiraishi Y, et al. *Int. J. Pharm.* **441**, 570-9 (2013)
- 36) Hirobe S, et al. *Pharm. Res.* in press

別刷り

応用が広がる DDS

人体環境から農業・家電まで

第1編 人体環境における DDS 医薬の学問的基礎と応用展開

第1章 医学・薬学を中心とした学問的基礎

第9節 次世代ワクチンの DDS

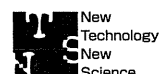
3 経皮ワクチン

大阪大学 廣部 祥子

大阪大学 岡田 直貴

大阪大学 中川 晋作

「応用が広がるDDS—人体環境から農業・家電まで—」(2013年7月8日 株式会社エヌ・ティー・エス 刊)



3 経皮ワクチン

1. はじめに

ワクチンは感染症に対する根本的な予防法であり、多くの人々の命を感染症から守ってきた輝かしい実績を有する医療技術である。しかしながら、現行の予防接種の大半は注射型製剤であり、投与に医療従事者が必要、注射針を介した二次感染の危険性、注射剤の輸送・保管にコールドチェーンが不可欠など、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、ワクチンによる感染症対策を推進するためには、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必要とされており、さまざまなアプローチによる皮膚をターゲットとした経皮ワクチン手法の開発が進められている。

2. 免疫組織としての皮膚

皮膚は、ワクチンの投与部位として非常に優れた組織である(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組織であるため、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

ン、増殖因子を産生・分泌するケラチノサイトが90%以上を占めており、異物侵入に対する自然免疫の誘導に関わっている。そして、皮膚には免疫応答の要となる抗原提示細胞(APC)として、生きた表皮にランゲルハンス細胞(LC)が、真皮には真皮樹状細胞(dDC)が常在し、免疫監視機構において非常に重要な役割を担っている。LCは液性免疫を強く誘導することが報告されており、一方でdDCはクロスプレゼンテーションにより細胞性免疫を活性化する可能性を秘めている¹⁾。このように、皮膚には深度によって異なる性質を有するAPCが存在し、これらを標的とする経皮ワクチンはさまざまな免疫応答を惹起可能な優れたワクチン手法であるといえる。LCならびにdDCは、異物を認識・捕食した後に免疫誘導の場である所属リンパ節へと遊走し、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皮膚内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。

3. 経皮ワクチンデリバリー技術の発展

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いわれている²⁾。したがって、ペプチドやタンパク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、皮膚内に常在するAPC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応用することで、角質層下の生きた表皮にま

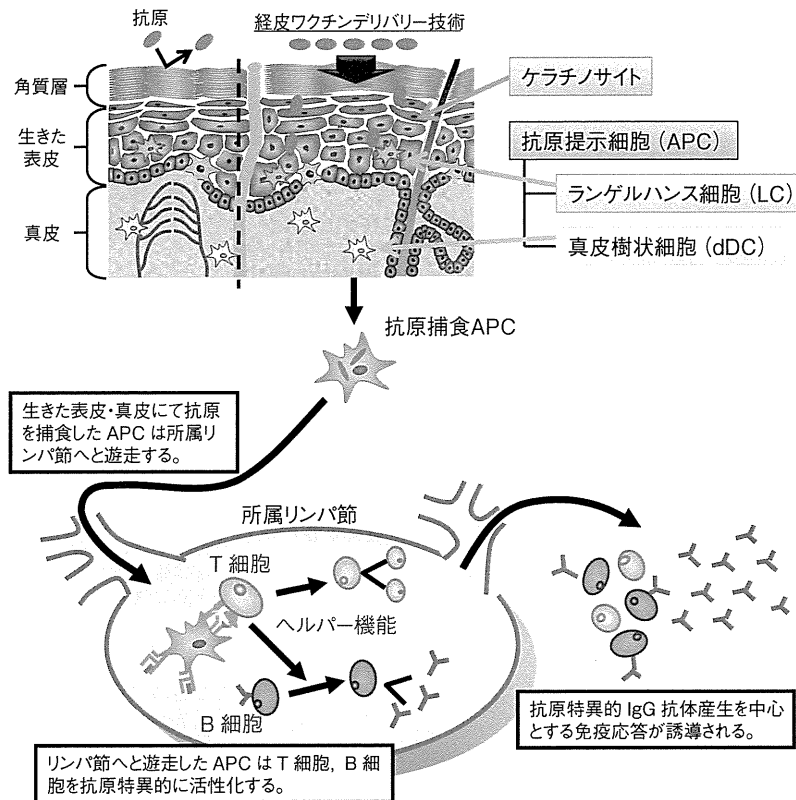


図1 経皮免疫誘導メカニズム

皮膚表面に塗布した抗原は角質層が障壁となり皮膚内へ到達しないが、経皮ワクチンデリバリー技術を用いることで角質層下へと抗原を送達することができる。APCとして生きた表皮にはLC、真皮にはdDCが存在し、抗原を捕食したAPCは所属リンパ節へと遊走する。リンパ節にてAPCは、T細胞、B細胞を抗原特異的に活性化し、獲得免疫を誘導する。また、生きた表皮の90%以上を占めるケラチノサイトは、サイトカインの産生・分泌を担い、自然免疫の活性化に寄与する。

でワクチンを送達し、感染防御効果を得られる「経皮ワクチン」の開発が試みられている。

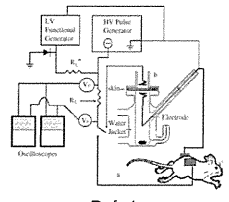
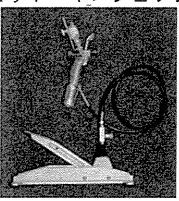
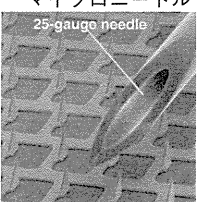
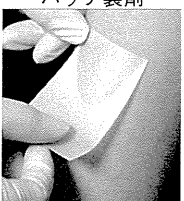
具体例としては、超音波を水溶液などの媒体を介して当てることで抗原の皮膚透過を高めるソノフォレシス法³⁾や皮膚への電圧負荷により一時的に角質層に孔をあけるエレクトロポレーション法⁴⁾、空気圧力によって抗原を注入するジェット・インジェクター法^{5),6)}などが挙げられる(表1)。これらの手法によって確かに抗原が角質層を透過して生きた表皮にまで送達されることが実証されており、抗原特異的IgG抗体価の上昇が認められている。しかし、ソノフォレシス法やエレクトロポレーション法は、特殊な装置を必要とすることから簡便性に乏しく、コストが高いために、今のところ実用化までにはいたっていない。また、無針注射法としてジェット・インジェクターはヒトに対して使用された実績を有

するが、神経線維の損傷が多発したことや痛みが大きい投与方法であることが普及を困難としている。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パッチやマイクロニードルを用いた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用いた経皮ワクチン

特殊な装置を必要とせず、まさに皮膚に貼るだけという簡便な操作で抗原特異的な免疫応答を誘導できる粘着性パッチおよびガーゼパッチの研究開発がIOMAI社(2008年にIntercell社により買収)および国立感染症研究所により報告されている^{7),8)}(表

表1 経皮デリバリー技術を用いた経皮ワクチンの研究開発

| 経皮ワクチンデリバリー技術 | 方法 | ○利点 ×欠点 |
|--|--|---|
| <p>エレクトロポレーション</p>  <p>Ref. 4</p> | <p>正負の両電極間に負荷する電圧により、一時的に皮膚に孔を生じさせることで、抗原の角質層透過を促進する</p> | <p>○抗原送達とともに免疫担当細胞を活性化できる</p> <p>×高コスト ×安全性に問題がある ×特殊な装置が必要</p> |
| <p>ジェット・インジェクター</p>  <p>Ref. 6</p> | <p>特殊なデバイスを用いて、圧力によって抗原を皮膚内に注入する</p> | <p>○ワクチン投与が迅速 ○輸送・保管が容易</p> <p>×投与時に痛みを伴う ×特殊なデバイスが必要 ×高コスト</p> |
| <p>マイクロニードル</p> <p>25-gauge needle</p>  <p>Ref. 19</p> | <p>微小な針を用いて、角質層に孔をあけ、抗原を皮膚内へと送達する</p> | <p>○痛みを伴わない ○投与が簡便 ○輸送、管理、備蓄が容易</p> <p>×針の皮膚内残存の危険性 ×製造技術の確立が必要</p> |
| <p>パッチ製剤</p>  <p>Ref. 13</p> | <p>抗原を含んだガーゼパッチあるいは粘着性パッチを皮膚に貼付して、抗原を送達する</p> | <p>○痛みを伴わない ○輸送、管理、備蓄が容易 ○投与が簡便</p> <p>×抗原の利用率が低い</p> |

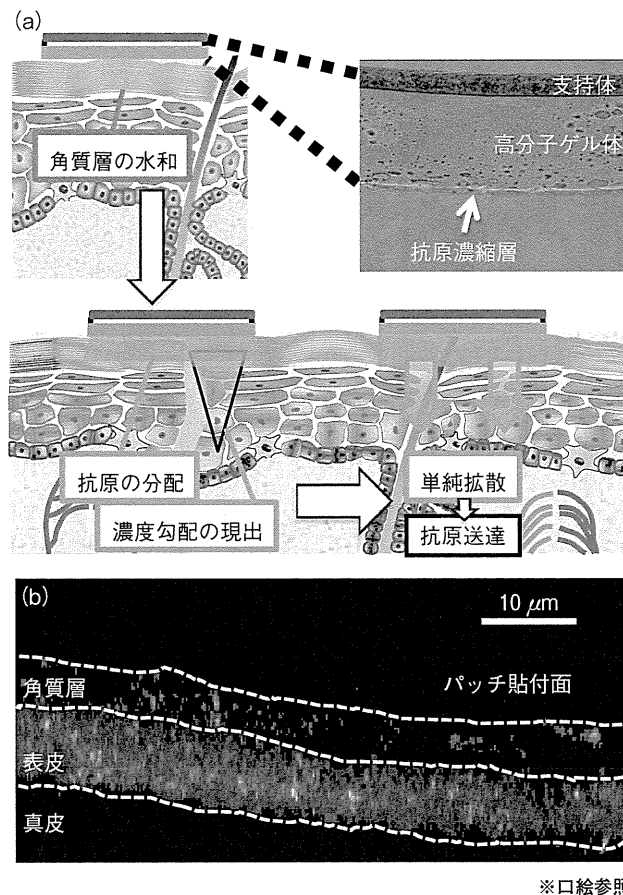
1)。しかしながら、これらの経皮ワクチン製剤は抗原を十分に浸透させるために、角質層あるいは角質層脂質成分を部分的に除去する前処理を必要とする。さらに、ガーゼパッチを応用した経皮ワクチン製剤は、皮膚に適用する直前に抗原溶液を浸み込ませるため、簡便性に欠けており、また注射型ワクチンと同様に抗原溶液の輸送や保管にコールドチェーンを必要とするなど、開発途上国へのワクチン普及を推し進めるためにはさらなる改良を加える必要がある。

筆者らがコスメディ製薬(株)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^{9)~12)}。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2(a))。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。これにより現出した皮膚表面の抗原濃度勾配が単純拡散の駆動力となって抗原の皮膚内送達を促進させることが抗原分子の角質層透過機構として挙げられる。実際に、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(b))。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⁹⁾。

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ところ、トキシイド含有親水性ゲルパッチの貼付により各トキシイド特異的な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¹⁰⁾。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ず、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。これら動物モデルにおける結果をもとに、筆者らは破傷風・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¹³⁾。破傷風・ジフテリアトキシイドを含有させた親水性ゲルパッチ



※口絵参照

図2 親水性ゲルパッチ

- (a) 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と親水性ゲルパッチによる抗原の角質層透過機構の模式図。
- (b) 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。

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, 抗原含有ゲルパッチ製剤の貼付により皮膚局所ならびに全身性の重篤な副反応は認められず, 各トキソイドに対する抗体価はヒトにおいても有意に上昇することが明らかとなった (図 3 (c))。このように, 2 種類の抗原それぞれに対して抗原特異的抗体価の上昇が確認されたことから, 親水性ゲルパッチは混合ワクチンに適用できるデバイスであることが明らかとなり, 予防接種の負担軽減やコスト低減に貢献すると考えられる。また, 抗原含有ゲルパッチ製剤はただ貼るだけで分子量 150 kDa にもなる巨大な分子である破傷風トキソイドを皮膚内へ送達しており, 高分子である蛋白質の角質層透過を促進する画

期的な製剤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。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, 筆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

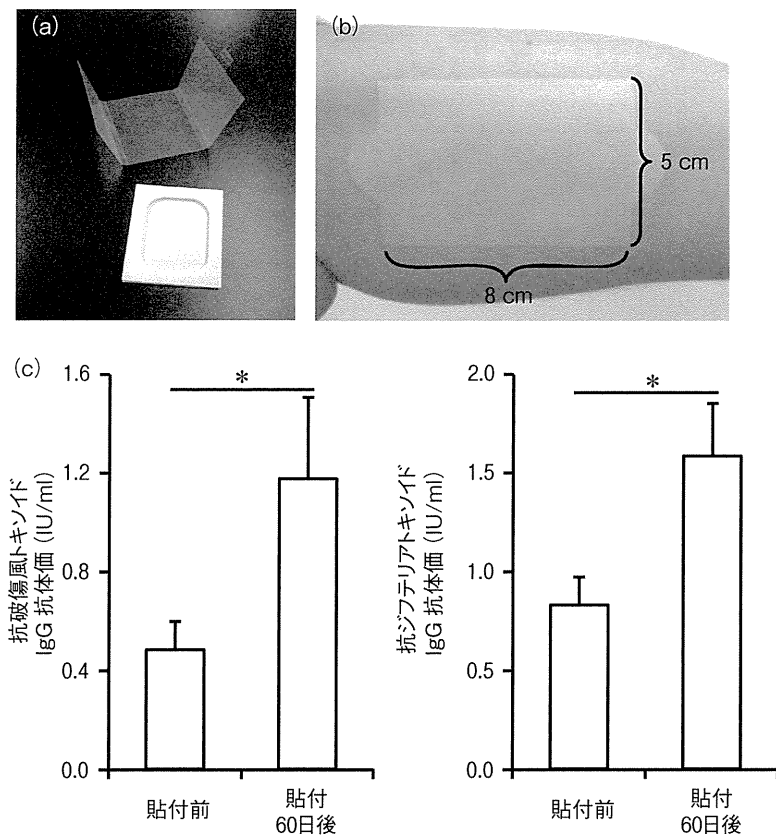


図 3 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの臨床研究

- (a) 製品化を志向した親水性ゲルパッチの形状と包装。
- (b) 5 cm × 8 cm の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)

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・実用化に向けた取組みを推進していくことが重要である。

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

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、麻疹ワクチン等）、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抗原等）といった粒子状形態であるため、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2）。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。

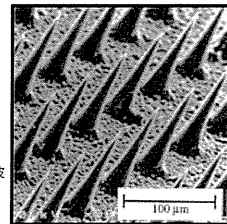
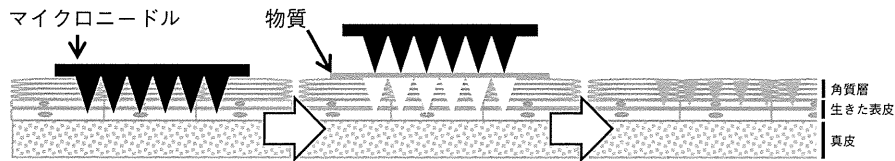
そこで筆者らは、微小な針により角質層に孔をあけることで物質を送達するマイクロニードル法を用いた経皮ワクチンの開発に着目した¹⁴⁾。この方法は神経終末が存在する真皮の深部にまで針が到達し

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らによってはじめて報告されて以来¹⁵⁾、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。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)¹⁶⁾、微小針の中空から抗原溶液を注入する（図4(b)¹⁷⁾、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)^{18),19)}、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、重篤な組織傷害を引き起こす危険性が払拭できないために、実用化するうえ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（図4(d)^{20),21)}。これらは生体適合性に優れる構成素材

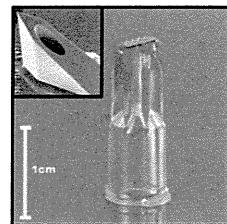
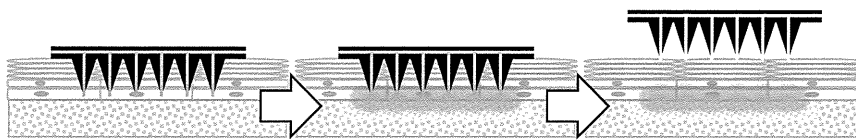
表2 臨床で使用されているワクチン

| 分類 | 生ワクチン | 不活化ワクチン | |
|------|--|---|---------------------------------|
| 成分 | 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 | | 水溶性タンパク質抗原 |
| 例 | BCG 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 |

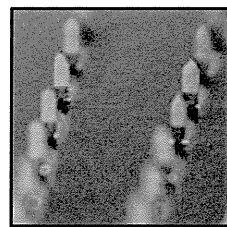
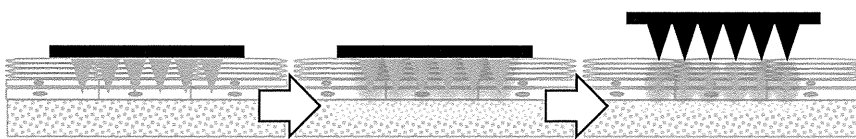
(a) マイクロニードルの貼付により生じた穿刺孔を介して抗原を皮膚内へと送達する



(b) マイクロニードルの中空を介して抗原溶液を皮膚内へと注入する



(c) 抗原をコーティングしたマイクロニードルを貼付し、抗原を皮膚内へと拡散させる



(d) 抗原をコーティングあるいは装填したマイクロニードルを貼付し、微小針の溶解とともに皮膚内へと抗原を送達する

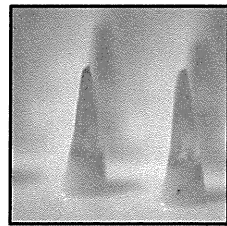
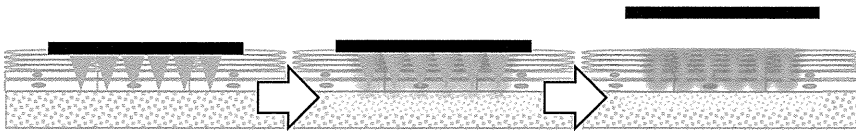


図4 マイクロニードルデバイスの種類

- (a) シリコン製マイクロニードル¹⁶⁾。
- (b) シリコン製中空マイクロニードル (NanoPass)¹⁷⁾。
- (c) ステンレス製コーティング用マイクロニードル¹⁸⁾。
- (d) ポピドン主体溶解型マイクロニードル²⁰⁾。

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う特徴を有する。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。

筆者らはコスメディ製薬㈱との共同研究により、

独自の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開発に成功している(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としており、針長が200 μm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。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。実際に、針長 $800\ \mu\text{m}$ の皮膚内溶解型マイクロニードルをラット背部皮膚に貼付すると、針は皮膚内で溶解しており (図 5 (b)), 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 (c))²¹⁾。また、微小針の形状や長さは自由に制御することができ、針部の長さ依存して抗原を送達する部位が異なることを確認しており、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トキソイドのみならず、粒子状抗原であ

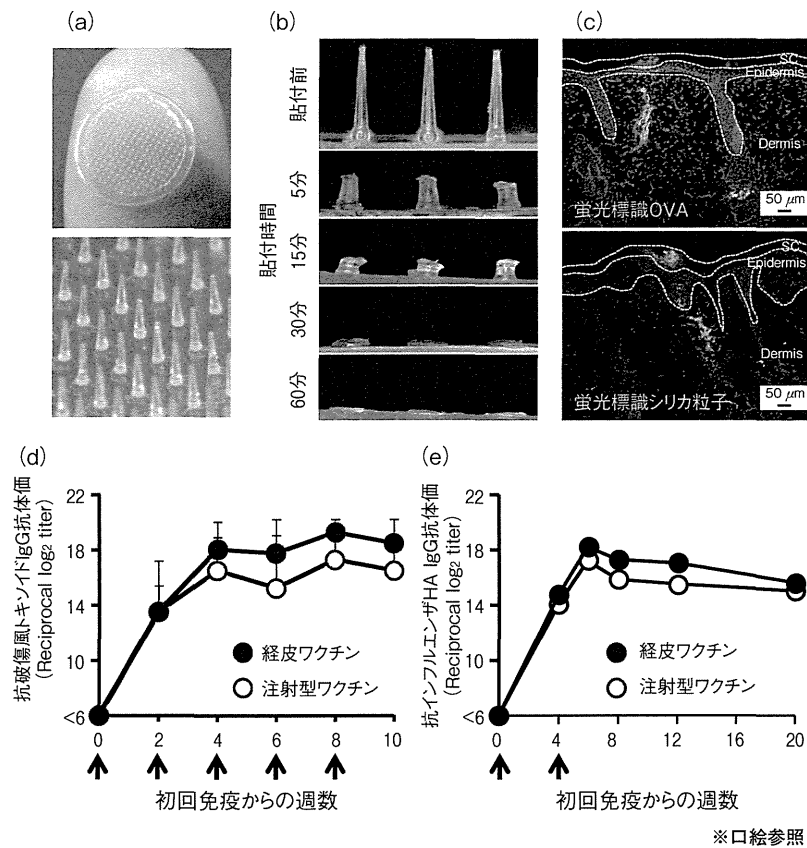


図 5 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

- (a) 皮膚内溶解型マイクロニードル。面積は $0.8\ \text{cm}^2$ 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 200 本有する。
- (b) 針長 $800\ \mu\text{m}$ の皮膚内溶解型マイクロニードルパッチをラット背部皮膚に 5, 15, 30 あるいは 60 分間貼付し、剥離後のマイクロニードルパッチを実体顕微鏡により観察した。
- (c) 針長 $800\ \mu\text{m}$ の皮膚内溶解型マイクロニードルパッチに蛍光標識 OVA あるいは蛍光標識シリカ粒子を装填し、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。
- (d) 破傷風トキソイドを $10\ \mu\text{g}$ 装填した針長 $800\ \mu\text{m}$ 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。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。
- (e) インフルエンザ HA 抗原 (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)) を $0.2\ \mu\text{g}$ 装填した針長 $800\ \mu\text{m}$ 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。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。