

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背部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に高値を示すことが明らかとなった(図5(d), (e))²²⁾。これらの成果に基づき、すでに筆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、本邦においても副甲状腺ホルモンによる骨粗鬆症治療に対して新規剤形で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、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、今後さらなる詳細な解析を進めていき、画期的な新規ワクチン製剤の実用化を目指す。

6. 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。筆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世界初の経皮ワクチンの実現を大きく前進させるものであり、「貼るワクチン」の実用化に向けた安全性・有効性評価ガイドラインの作成に有益な情報を与えるものと言える。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)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) 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、(一財)阪大微生物病研究会に深謝いたします。

【引用・参考文献】

- 1) J. Valladeau, S. Saeland : *Semin. Immunol.*, **17**, 273 (2005).
- 2) B. W. Barry : *Nat. Biotechnol.*, **22**, 165 (2004).
- 3) A. Dahlan, et al. : *Int. J. Pharm.*, **368**, 123 (2009).
- 4) Y. L. Zhao, et al. : *Vaccine*, **24**, 1282 (2006).
- 5) L. A. Jackson, et al. : *Vaccine*, **19**, 4703 (2001).
- 6) K. Kelly, et al. : *Vaccine*, **26**, 1344 (2008).
- 7) G. M. Glenn, et al. : *Nat. Med.*, **6**, 1403 (2000).
- 8) S. Naito, et al. : *Vaccine*, **25**, 8762 (2007).
- 9) Y. Ishii, et al. : *J. Control. Release*, **131**, 113 (2008).
- 10) K. Matsuo, et al. : *J. Control. Release*, **149**, 15 (2011).
- 11) K. Matsuo, et al. : *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 586 (2011).
- 12) K. Matsuo, et al. : *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1835 (2011).
- 13) S. Hirobe, et al. : *Vaccine*, **30**, 1847 (2012).
- 14) M. R. Prausnitz. : *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 581 (2004).
- 15) M. S. Gerstel, V. A. Place : *US Patent*, No. 3,964,482 (1976).
- 16) S. Henry, et al. : *J. Pharm. Sci.*, **87**, 922 (1998).
- 17) P. Van Damme, et al. : *Vaccine*, **27**, 454 (2009).
- 18) H. S. Gill, M. R. Prausnitz : *Pharm. Res.*, **24**, 1369 (2007).
- 19) J. A. Matriano, et al. : *Pharm. Res.*, **19**, 63 (2002).
- 20) S. P. Sullivan, et al. : *Nat. Med.*, **16**, 915 (2010).
- 21) K. Matsuo, et al. : *J. Control. Release*, **161**, 10 (2012).
- 22) K. Matsuo, et al. : *J. Control. Release*, **160**, 495 (2012).

〈廣部 祥子／岡田 直貴／中川 晋作〉

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製剤の開発

廣部祥子*¹, 岡田直貴*², 中川晋作*³

2.1 はじめに

感染症は細菌やウイルスなどの病原体によりもたらされる病気の総称であり、公衆衛生の改善や抗菌薬・抗ウイルス薬、そしてワクチンの開発が感染症の人類への影響を低減してきた。しかしながら、依然として感染症は世界における死亡原因の第一位を占めており、2009年のインフルエンザパンデミック騒動が記憶に新しいように、交通網の発達した現代においては国際的な視野での感染症対策が喫緊の課題となっている。このような社会的背景のもと、ワクチンは感染症に対する根本的予防における唯一の手段であることから、近年のワクチン研究領域においては各種感染症に対するワクチンの開発・改良のみならず、ワクチンを大量かつ迅速に製造・供給できる技術の開発や大規模接種を可能とするワクチン接種デバイスの開発、といった様々な取り組みが進められている。なかでも、簡便、安全、安価な新規ワクチン接種デバイスの開発は、全世界へとワクチンを普及させるために重要な研究課題として注目を集めている。これまでに実用化されたワクチンの大半は注射製剤として開発されており、接種に医療従事者を必要とする技術的な問題や、製造・輸送・保管における一貫した低温管理(cold chain)を必要とする費用的な問題が、開発途上国へのワクチン普及の大きな障壁となっている。また、注射投与は痛みを伴うとともに、注射針を介した二次感染の危険性や医療廃棄物の処理などの安全面での問題も有する。したがって、簡便性・普及性に一層優れた新規ワクチン手法の早期実用化が待望されており、筆者らはその一つとして単に皮膚に貼るだけで免疫応答を誘導可能な経皮ワクチン製剤「貼るワクチン」の開発を推進している。本稿では、経皮ワクチンデリバリー技術¹⁾として近年注目されているマイクロニードル法について概説するとともに、筆者らの皮膚内溶解型マイクロニードルを応用した「貼るワクチン」に関する研究成果を紹介する。

2.2 ワクチンの標的組織としての皮膚

皮膚は外側から、角質層、生きた表皮、真皮の3層に分けられる(図1)。角質層は、幾重にも重なった角質細胞によって構成されており、物理的バリアーとして外界からの異物侵入を防いでいる。そして、生きた表皮ならびに真皮にはそれぞれランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞と呼ばれる抗原提示細胞(APC)が存在し、皮膚を介した細菌やウイルスなどの攻撃から生体を守る司令塔として機能している²⁾。また、生きた表皮の90%以上を占めているケラチノサイトは、サイトカインの産生・分泌を行うことで皮膚における免疫応答に関与する³⁾。経皮ワクチンは、これらの免疫担当細胞により形成される皮膚の免疫学的バリアーを利用する新規ワクチン手法である。

* 1 Sachiko Hirobe 大阪大学 大学院薬学研究科 薬剤学分野 助教

* 2 Naoki Okada 大阪大学 大学院薬学研究科 薬剤学分野 准教授

* 3 Shinsaku Nakagawa 大阪大学 大学院薬学研究科 薬剤学分野 教授

つまり、皮膚内のAPCへとワクチン抗原を送達することができれば、ワクチン抗原を捕食したAPCが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強力な免疫応答を惹起できると考えられる。

しかしながら、経皮ワクチンの開発において障害となるのが、前述した角質層の存在である。角質層はケラチンや繊維状タンパク質、さらにはセラミドや中性脂質から成り立っており、水溶性物質や分子量が500以上の物質の透過を制限している⁴⁾。現在実用化されているワクチンは、①弱毒化した生きたウイルスや細菌を用いる生ワクチン（BCG、麻疹ワクチンなど）、②病原性をなくした病原体全体あるいは病原性に関わる免疫原を用いる不活化ワクチン（日本脳炎ワクチン、インフルエンザHAワクチンなど）、③細菌が出す毒素の毒性をなくしたトキシド（ジフテリアトキシドなど）、などの高分子蛋白質や粒子状のコンポーネント、細菌やウイルス自体である。したがって、ワクチン抗原を単に皮膚表面に塗布するだけでは、皮膚内へと送達することができず、免疫応答を誘導することは困難である。

角質層下、主に真皮へと抗原を送達する古くからの手法が皮内注射である。インフルエンザワクチンにおいて、皮内注射は従来の筋肉内注射と比較して有効性が高いことが報告されている^{5,6)}。しかしながら、皮内注射は厚さ数mmの皮膚内に溶液を注入するといった熟練された技術を必要とする手法であることから、簡便に皮内投与できるデバイスの開発が求められていた。最近、皮内マイクロインジェクションデバイスとして開発されたSoluviaTM（Becton Dickinson）⁷⁾を用いた三価季節性インフルエンザワクチン製剤、Intanza[®]/IDflu[®]（Sanofi Pasteur SA）が上市され、皮膚を標的としたワクチンの有用性が示されつつある⁸⁾。しかし、Intanza[®]/IDflu[®]は抗原溶液が充填されたプレフィルドシリンジと使い捨てのマイクロインジェクションデバイスを連結して使用するものであり、従来の注射型ワクチン製剤と同様に抗原溶液の冷蔵管理が必要とされるとともに、医療廃棄物の発生が懸念される。また、長さ1.5 mmの針を用いるために、投与の際に痛みが生じるという欠点があり、経皮的に抗原を角質層下へ送達する新たなデバイスの開発が望まれている。

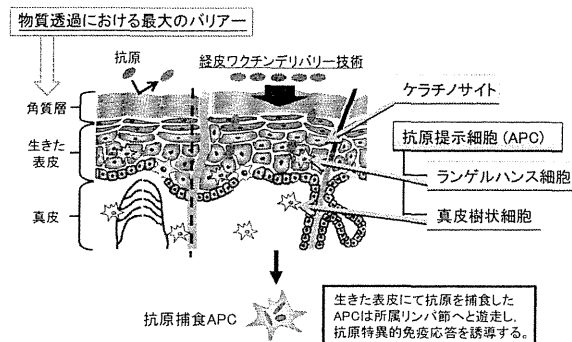


図1 経皮免疫誘導メカニズム

経皮デリバリー技術を用いることで角質層下に存在するAPCへとワクチンを送達することができる。APCとして生きた表皮にはランゲルハンス細胞、真皮には真皮樹状細胞が存在し、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、免疫応答を活性化する。

2.3 マイクロニードル法

マイクロニードル法は、微小な針により角質層に孔をあけることで物質を皮膚内へと送達する手法である。マイクロニードルは長さ1 mm以下の微小針であり、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、また貼るだけという簡便な操作でワクチンを接種できる。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⁹⁾、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年代になって微細加工技術が発展したことで、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。

2.3.1 ソリッドマイクロニードル

ソリッドマイクロニードルはシリコンや金属などで作製された剣山のような微小針であり、これを貼付することで生じた穿刺孔を介してワクチン抗原を皮膚内へ送達することができる(図2A)¹⁰⁾。ワクチン抗原を塗布する前にマイクロニードルを貼付するだけで、無処置の皮膚と比較して高い抗体産生を誘導できることが確認されている¹¹⁾。また、皮膚にワクチン抗原を塗布した後にマイクロニードルを用いて皮膚表面を軽く引っ掻くことで、痛みなく免疫応答を惹起できる手法も報告されている¹²⁾。これらのマイクロニードル前処置あるいは後処置による経皮ワクチンは簡便な手法であるが、ワクチンの投与量やデバイスの貼付時間などの設定が難しいという課題がある。

2.3.2 中空マイクロニードル

先程のソリッドマイクロニードルを用いた経皮ワクチン手法では、ワクチンの皮膚内へのデリバリーはマイクロニードルによる穿刺孔を介した受動拡散に依存するため、投与ワクチン量を調整することは困難である。中空マイクロニードルは、注射針と同様にニードルの中心に空洞がある微小な針であり、シリンジやポンプを用いることで、その空洞を通して皮膚内の特定部位に一定量のワクチンを注入できる(図2B)。ヒトにおいて、インフルエンザワクチンを中空マイクロニードルにより経皮投与することで、従来型の筋肉内注射による投与よりも少ないワ

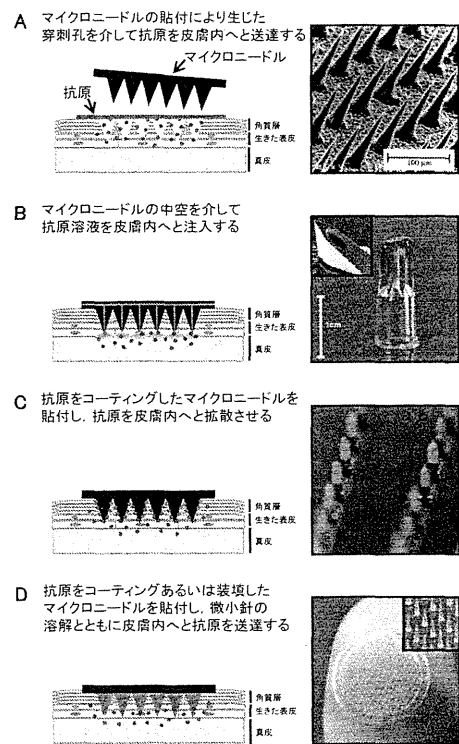


図2 マイクロニードルデバイスを用いた経皮ワクチン手法

A) シリコン製ソリッドマイクロニードル¹⁰⁾, B) シリコン製中空マイクロニードル¹³⁾, C) ステンレス製コーティングマイクロニードル¹⁴⁾, D) ヒアルロン酸を素材とした溶解型マイクロニードル (MH)¹⁷⁾

クチン抗原量で同等の有効性を発揮することが報告されている¹³⁾。しかしながら、本デバイスの実用化に向けては、注入したワクチンが皮膚内から漏れ出さないように、投与部位の深さや投与速度を最適化する必要がある。

2.3.3 コーティングマイクロニードル

ソリッドマイクロニードルや中空マイクロニードルを用いた手法では、ワクチン抗原を含む溶液を用いるために、現在の注射型ワクチン製剤と同様に一貫した冷蔵管理を必要とする。開発途上国におけるワクチン普及を推進するためには、この課題を克服しなければならない。そこで開発されたのが、ソリッドマイクロニードルの表面にワクチンをコーティングし、その微小針を皮膚に穿刺することでワクチン抗原を皮膚内へ拡散させる手法である(図2C)¹⁴⁾。本手法では、マイクロニードルの表面上にワクチンが乾燥状態で吸着しているため、溶液状態における保管よりもワクチンの安定性が高いと考えられており、生きた細菌やウイルスを使用する生ワクチンへの応用も図られている¹⁵⁾。現在、マイクロニードルの素材やコーティング溶液の組成を最適化することで、ワクチン抗原をより多く、より安定に保持できるコーティングマイクロニードル製剤の開発が進められている。

2.3.4 溶解型マイクロニードル

先述した3種類のマイクロニードルは第一世代マイクロニードルと呼ばれており、シリコンや金属(ステンレス、チタン)を材料として作製されている。第一世代マイクロニードルは剛性に優れる、成形しやすい、といった利点を有している一方で、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。そこで近年では、第二世代マイクロニードルとして、生分解性バイオポリマーやヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などを利用した溶解型マイクロニードルの開発が目ざされている^{16~18)}。第二世代マイクロニードルは、生体適合性に優れる素材を使用し、マイクロニードル自体が溶解することによって装填あるいは吸着したワクチンを皮膚内へと送達するといった特徴を有する(図2D)。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・実用化が期待されている。

2.4 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

筆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(MicroHyal[®]; MH)を用いた経皮ワクチンの開発を進めている^{17,19,20)}。MH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(図3A)。MHをラット背部皮膚に貼付すると、30分以上の貼付によって針は完全に溶解し、またMHは可溶性高分子であるニワトリ卵白アルブミン(OVA)だけでなく、直径300nmのシリカ粒子をもAPCが存在する生きた表皮ならびに真皮へと送達できる(図3B, C)。そこで、可溶性蛋白質であるジフテリアトキソイド(DT)を用いた経皮ワクチンの有効性を検討したところ、装填されたDT量(10, 1, 0.1 μg)に依存した抗原特異的抗体価の上昇が確認

非経口投与製剤の開発と応用

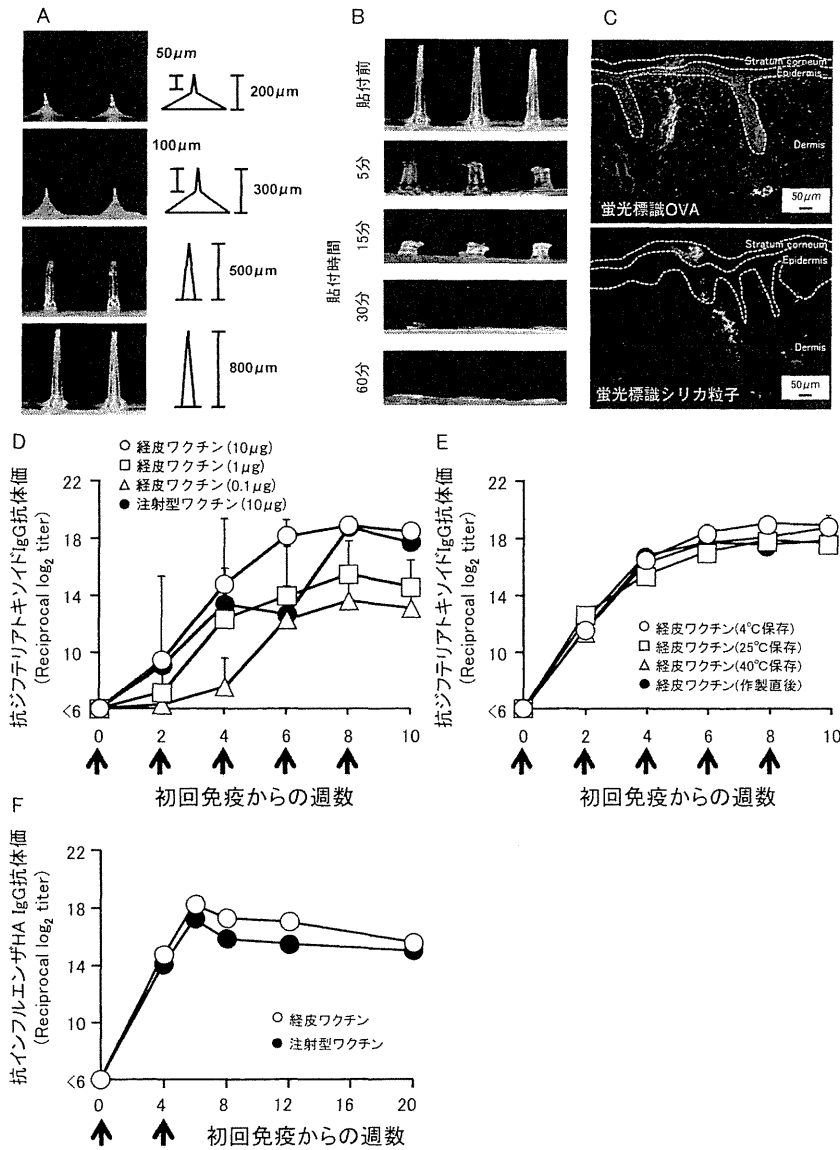


図3 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

- A) 針の形状はコニーデ型 (上段二つ) と円錐型 (下段二つ) があり、針の長さは200~800 μmまで自在に作製可能である。面積は0.8 cm²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 μmのMHをラット背部皮膚に5分、15分、30分あるいは60分間貼付し、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。
- C) 針長800 μmのMH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) DTを10 μg, 1 μg, 0.1 μg装填した針長800 μmのMHをラット背部皮膚に6時間貼付した。対照群のラ (次頁に続く→)

された(図3D)。また、4℃、25℃、40℃の各温度条件下において1年間保管したDT(10 μ g)装填MHの抗体産生能を評価すると、いずれの保管温度においても抗体産生能は作製直後と変わらなかった(図3E)。DT(1 μ g)装填MH貼付群において確認された明らかな抗体価の低下(図3D)が、25℃や40℃において1年間保管したDT(10 μ g)装填MH貼付群では認められなかったことから、MHに装填されたDTは非冷蔵条件下での長期保管においても免疫応答の誘導に十分な抗原性を維持していたと考えられ、MHが冷蔵管理を必要としない経皮ワクチン製剤のデバイスとして有用であることが示された。さらに、粒子状抗原であるインフルエンザHA抗原を装填したMHにおいても抗原特異的抗体価の上昇が認められ、その抗体価は最終免疫16週間後(初回免疫から20週間後)においても高く維持されていた(図3F)。このことから、MHを用いた経皮ワクチン製剤によって、インフルエンザHA抗原に対する長期的な免疫を誘導できることが明らかとなった。これらの成果に基づき、すでに筆者らはMH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開始しており、抗原装填MH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。今後は、経皮ワクチンの実用化に向けて、安全性・有効性に関わる理論的根拠を実証するために、経皮免疫機構の解明を強力に推進する必要がある。また、その理論に基づいた経皮ワクチンデバイスの改良や経皮ワクチン用アジュバントの探索を実施することで、より安全性・有効性に優れた経皮ワクチンの開発を目指す。

2.5 おわりに

DDS分野において発展してきた経皮薬物デリバリー技術のワクチンデリバリーへの応用が進む中、皮膚に貼るだけという簡便な操作でワクチンを接種できる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。現在欧米のみならず、本邦においても新規剤形であるマイクロニードルを用いたパラトルモンによる骨粗鬆症治療の治験について準備が進んでおり、マイクロニードルデバイスをを用いた予防・治療の臨床応用が近い将来実現すると考えられる。マイクロニードル

ットには10 μ gのDT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DT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) DTを10 μ g装填した針長800 μ mのMHを作製直後、ならびに4℃、25℃、40℃の各温度条件下で1年間保管後、ラット背部皮膚に6時間貼付した。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DT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。

F) インフルエンザHA抗原(A/Brisbane/59/2007(H1N1))を0.2 μ g装填した針長800 μ mのMH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。

非経口投与製剤の開発と応用

を用いた経皮ワクチン製剤が従来までの注射に代わる簡便性・普及性に優れた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、感染症流行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) 神山文男先生、権英淑先生、大阪大学大学院医学系研究科 小豆澤宏明先生、片山一朗先生、(財)阪大微生物病研究会に深謝いたします。

文 献

- 1) S. Hirobe *et al.*, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **10**, 485 (2013)
- 2) J. Valladeau *et al.*, *Semin. Immunol.*, **17**, 273 (2005)
- 3) K. Sugita *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, **147**, 176 (2007)
- 4) B. W. Barry *Nat. Biotechnol.*, **22**, 165 (2004)
- 5) R. B. Belshe *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 2286 (2004)
- 6) R. T. Kenney *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 2295 (2004)
- 7) P. E. Laurent *et al.*, *Vaccine*, **25**, 8833 (2007)
- 8) R. Prymula *et al.*, *Adv. Ther.*, **29**, 41 (2012)
- 9) M. S. Gerstel *et al.*, US Patent No. 3, 964, 482 (1976)
- 10) S. Henry *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 922 (1998)
- 11) Z. Ding *et al.*, *J. Control. Release*, **136**, 71 (2009)
- 12) J. A. Mikszta *et al.*, *Nat. Med.*, **8**, 415 (2002)
- 13) P. Van Damme *et al.*, *Vaccine*, **27**, 454 (2009)
- 14) H. S. Gill *et al.*, *Pharm. Res.*, **24**, 1369 (2007)
- 15) Y. Hiraishi *et al.*, *Vaccine*, **29**, 2626 (2011)
- 16) S. P. Sullivan *et al.*, *Nat. Med.*, **16**, 915 (2010)
- 17) K. Matsuo *et al.*, *J. Control. Release*, **161**, 10 (2012)
- 18) S. Naito *et al.*, *Vaccine*, **30**, 1191 (2012)
- 19) K. Matsuo *et al.*, *J. Control. Release*, **160**, 495 (2012)
- 20) Y. Hiraishi *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **441**, 570 (2013)

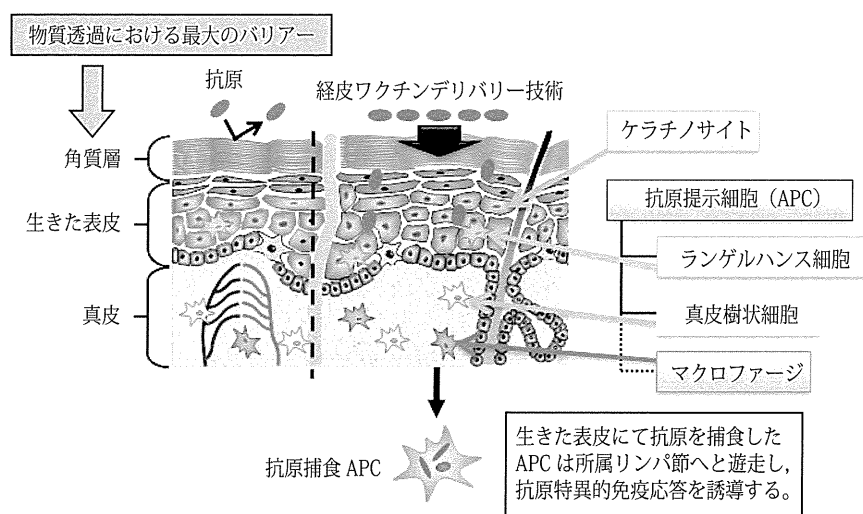
<2> 経皮ワクチン製剤の DDS 技術の動向と実用化の可能性

はじめに

ワクチンは感染症に対する根本的な予防対策であり、疾患の発症ならびに症状の重篤化を抑制する画期的な医薬品である。種痘法は天然痘に対する予防策として、1798年にエドワード・ジェンナーにより開発され、ワクチンの起源であるとともに1980年の天然痘撲滅宣言に多大な貢献をした¹⁾。このような背景をもとに、数多くのワクチンが開発されており、現在の日本では15種類を超える感染症に対してワクチン接種が可能である。しかしながら、これらのワクチンの大半が注射型ワクチンであり、接種に痛みを伴うことや医師による投与が必要であることがワクチン接種の普及を妨げている。また、ワクチン抗原の輸送や保管に冷蔵管理が求められることや、注射針を介した二次感染が危惧されるといった問題が、開発途上国においてワクチンで予防可能な感染症が未だ蔓延している原因となっている。そこで、我々は簡便な予防接種を可能にする皮膚を標的とした経皮ワクチンに着目し、本節では様々な観点から開発された経皮ワクチンデリバリー技術を概説するとともに、著者らの経皮ワクチン製剤の実用化に向けた取り組みを紹介する。

1. 皮膚の免疫学的特徴

皮膚は生体を外界と隔てる障壁であり、常に外界の異物に曝されているために、異物の侵入を防ぐ“物理的バリアー”と異物の除去を担う“免疫学的バリアー”を有する。皮膚は外側から角質層、生きた表皮、真皮に分けられており、皮膚の最外層に存在する角質層は、体で最も硬いケラチンタンパク質で出来た角質細胞が幾重にも重なることで構成され、物理的バリアーの主役となっている(図1)。一方で、角質層下の生きた表皮ならびに真皮に存在する様々な細胞群が免疫学的バリアーとして機能している。獲得免疫応答誘導の要となる抗原提示細胞(APC)として、生きた表皮にはランゲルハンス細胞、真皮には真皮樹状細胞が常在し、外来異物に対する免疫監視機構において重要な役割を担っている²⁾。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・分泌を行い、自然免疫を活性化する³⁾。また、真皮に存在するマクロファージは、死んだ細胞や細菌を処理する食作用と外来抗原を異物として提示する抗原提示作用を有し、皮膚の免疫学的バリアーの形成に寄与するとされている⁴⁾。これらのことから、角質層下に存在する免疫担当細胞、特にAPCへと抗原を送達することができれば、抗原を捕食したAPCがリンパ節へと遊走し、抗原特異的にT細胞ならびにB細胞を活性化することで、強力な獲得免疫応答を誘導できると考えられる。そのため、経皮ワクチンの開発においては、ワクチン抗原を物理的バリアーである角質層を突破し、免疫学的バリアーが構築されている生きた表皮ならびに真皮へと送達しなければならない。



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ランゲルハンス細胞、真皮には真皮樹状細胞が存在し、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。真皮に存在するマクロファージは、死んだ細胞や細菌を貪食する食作用と抗原提示作用を有し、皮膚の免疫学的バリアーの形成に貢献している。

図1 経皮免疫誘導メカニズム

2. 経皮ワクチンデリバリー技術の発展

ワクチン抗原は可溶性の高分子タンパク質や病原体由来コンポーネントの凝集体、さらには無毒・弱毒化したウイルスや細菌である。角質層は水溶性ならびに分子量 500 以上の物質についてその透過を制限することが報告されており⁵⁾、高分子あるいは粒子状のワクチン抗原を単に皮膚表面に塗布しただけでは皮膚内へと送達することは困難である。そこで、様々な戦略をもとに抗原を皮膚内へ送達する手法が開発されている。

2.1 弾性リポソーム

角質層を突破する手法の一つとして、毛包や汗腺を利用した経皮送達が挙げられる。その代表例がナノ粒子であり、近年では特に弾性リポソームの開発が精力的に行われている⁶⁾。弾性リポソームは脂質や界面活性剤から形成された柔軟な二重膜を有しており、従来のリポソームと比較して皮膚付属器官だけでなく角質層間隙の透過も容易になるとされている。また、ナノ粒子を用いた経皮ワクチンデリバリーは、抗原とアジュバントの両物質を同じ粒子に内包することが可能であり、免疫応答を効率的に活性化できる⁷⁾。実用化に向けては、脂質や界面活性剤の種類、またその比率を適切に調製することで、ワクチン効果を発揮するに十分な抗原量を送達できる弾性リポソームの開発をしていかなければならない。

2.2 エレクトロポレーション

エレクトロポレーション法は、皮膚への電圧負荷により角質層に一時的に孔をあけて抗原を皮膚内へ送達する物理的経皮送達手法の一つである⁸⁾。本手法の特徴は、電圧パルスによって細胞膜の構造が緩むことから、様々な皮膚細胞内へ直接抗原を導入できることであり、特に DNA を用いたワクチンにおいて効率的に免疫応答を誘導できる。動物モデルにおいてエレクトロポレーションを用いた経皮ワクチンの有効性は多数示されており⁹⁻¹¹⁾、注射型製剤に比べて低侵襲な手法であることから、ヒトへの適用が期待されている。しかしながら、エレクトロポレーションの装置が特殊かつ巨大であるためにコストが高いことが実用化に向けた大きな課題となっている。

2.3 Jet injector

Jet injector は針を用いずに、空気の圧力によって抗原を皮膚内へ送達する手法である¹²⁾。針を介した二次感染の危険性がなく、迅速な大規模接種を可能にすることから、軍隊での使用を目的に開発された。日本においても 1970 年代に小・中学校の予防接種に用いら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ことを受け、すでに使用は取りやめられている。現在ではより安価かつ簡便に扱える Jet injector の開発が進められ、臨床試験において様々な感染症に対する有効性が報告されており（表 1(A)）¹³⁻¹⁹⁾、実用化に向けた安全性の担保が求められている。

表1 経皮ワクチンデリバリー製剤の臨床研究

デバイス	ワクチン	Phase	文献
(A) Jet injector			
PMED™ (powder)	インフルエンザ DNA ワクチン	phase I (Pfizer)	13, 14
	gp100DNA ワクチン (メラノーマ)	phase I	15
	マラリア DNA ワクチン	phase I	16, 17
Biojector® (liquid)	HIV DNA ワクチン	phase I (Bioject)	18
	不活化 A 型肝炎ワクチン	phase I	19
(B) パッチ			
SPS	易熱性エンテロトキシンワクチン (旅行者下痢症)	phase III (IOMA/Intercell)	20
	不活化三価季節性インフルエンザワクチン	phase II	21
CSSS	不活化インフルエンザワクチン	phase I	22, 23
	メラノーマペプチドワクチン, HIV ペプチドワクチン	phase I	24
親水性ゲルパッチ	破傷風・ジフテリアトキソイド	clinical study (CoSMED)	29
(C) マイクロニードル			
MicronJet®	三価季節性インフルエンザ HA ワクチン	phase I (NanoPass)	32
MicroHyla®	三価季節性インフルエンザ HA ワクチン	clinical study (CosMED)	unpublished

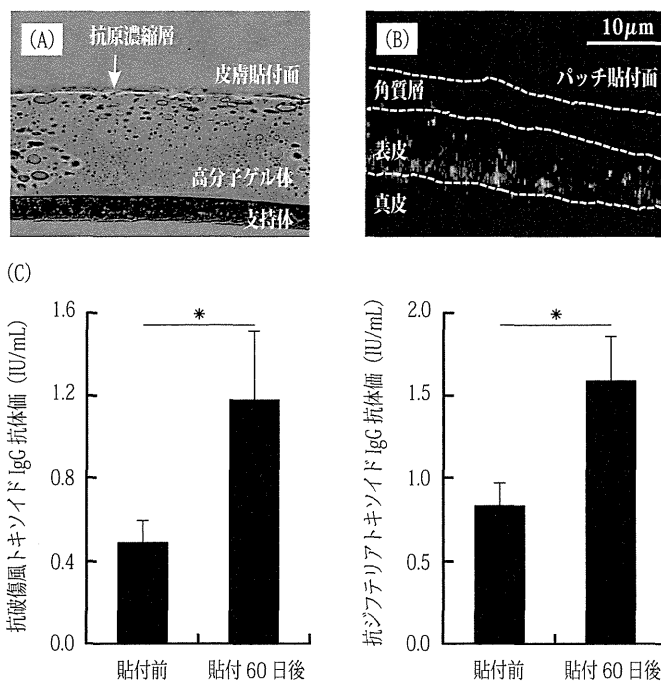
PMED, Particle Mediated Epidermal Delivery ; SPS, Skin Preparation System ; CSSS, cyanoacrylate skin surface stripping ; HIV, human immunodeficiency virus ; HA, hemagglutinin

3. 粘着性およびガーゼパッチを用いた経皮ワクチン

経皮ワクチンデリバリー技術の中でも特殊な装置を必要とせず、ただ貼るだけでワクチン効果を誘導できる粘着性パッチおよびガーゼパッチの開発が世界各国へのワクチン普及や大規模接種の観点から重要視されている。IOMAI 社 (2008 年に Intercell 社により買収) は、アルコールと綿棒で角質層を除去する SPS (skin preparation system) という手法を用いたガーゼパッチワクチンを開発しており^{20,21)}、旅行者下痢症に対する経皮ワクチンは phase III まで臨床試験が進行している (表 1(B))。他にも、接着剤であるシアノアクリレートを用いた角質層の除去 (CSSS ; cyanoacrylate skin surface stripping) により、抗原透過を促進するガーゼパッチ製剤のヒトへの適用が検討されている²²⁻²⁴⁾。しかしながら、これらのパッチ製剤は貼付前に角質層を除去する前処理を必要とするだけでなく、皮膚に適用する直前に抗原溶液をパッチに浸み込ませるため、簡便性に欠けている。また、注射型ワクチンと同様に抗原溶液の輸送や保管に冷蔵管理を要するなど、さらなる改良を加える必要がある。

3.1 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの開発

そこで著者らは、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製剤の開発を推進している²⁵⁻²⁸⁾。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。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しており (図 2(B))、破傷風・ジフテリア感染症モデルにおいて各トキソイド特異的な IgG 抗体が産生されることを確認している。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、その結果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が動物実験にて実証された²⁷⁾。



- (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
- (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、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) 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)

図 2 親水性ゲルパッチを用いた貼るワクチン

※ カラーの図は巻頭ページを参照

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

前臨床研究における成果に基づき、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²⁹⁾。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 (5 cm × 8 cm) をヒト上腕内側皮膚に 24 時間貼付したところ、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 2(C))。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、ヒトにおいても 150 kDa にもなる巨大分子である破傷風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。本邦では多くの人が、乳幼児に破傷風・ジフテリアトキソイドワクチンの接種を受け、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低下すると言われており、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であるといえる。

3.3 粘着性およびガーゼパッチの実用化に向けた今後の課題

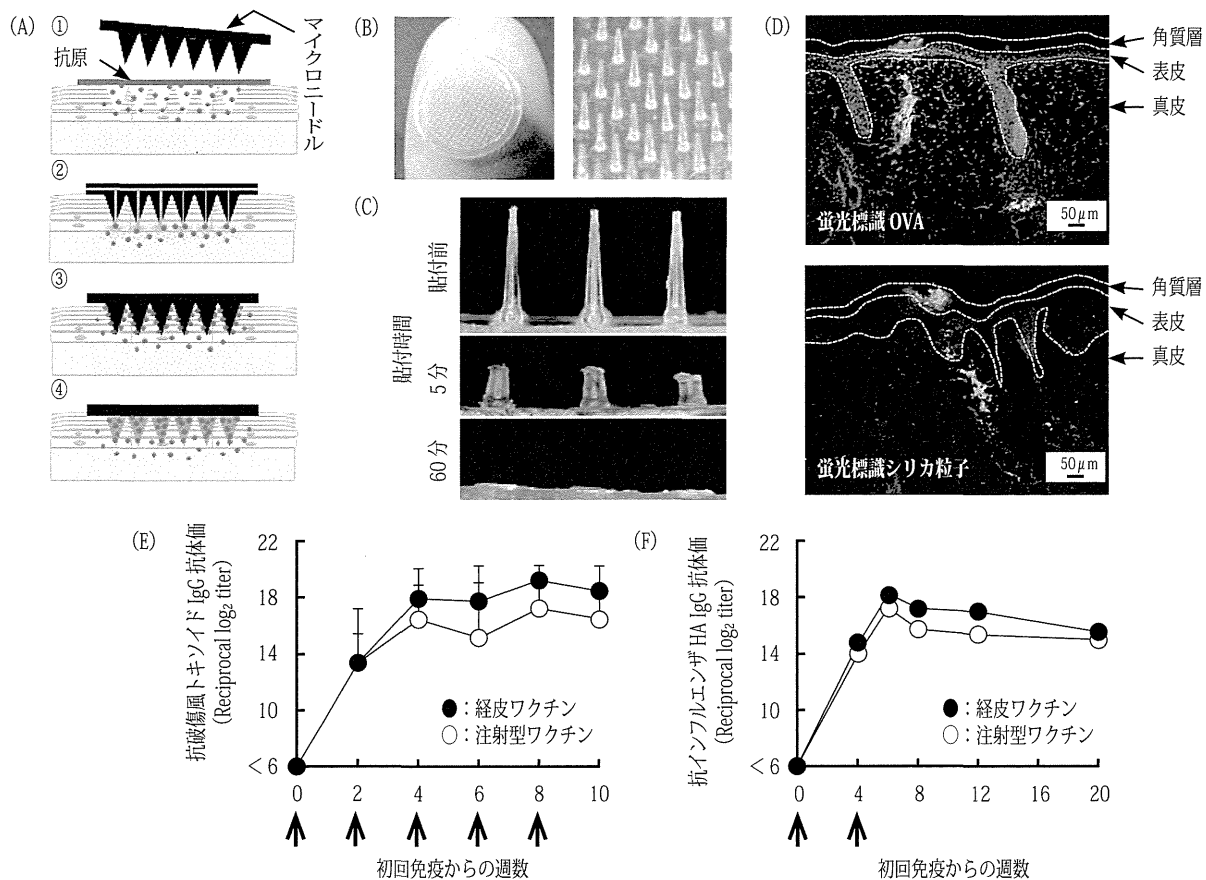
これまで開発されてきたガーゼパッチはもちろんのこと、著者らの親水性ゲルパッチについても、十分なワクチン効果を得るためには、注射型ワクチンに比べて大量の抗原を必要とする。親水性ゲルパッチについて、角質層下に送達される抗原量は含浸させた量の数%程度であることを確認しており、抗原の利用率が低いのが現状である。そのため、簡便かつ安全だけでなく安価でより有効な経皮ワクチン製剤の実用化に向けては、抗原の角質層透過効率に優れるゲルパッチ、ならびに免疫増強効果を図るための臨床応用可能な経皮アジュバントを開発していかなければならない。また、製剤安定性の評価、製剤製造法の樹立や品質試験法の確立など、経皮ワクチンの製品化・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. 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³⁰⁾。

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ワクチンを接種することができる利点がある。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³¹⁾、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³²⁾、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³³⁾、といった方法がある（図 3(A)）。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（表 1(C)）。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。そこで近年では、第二世代マイクロニードルとして、生分解性バイオポリマーやヒアルロン酸、コンドロイチン硫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³⁴⁾。これらは生体適合性に優れた構成素材を使用し、④マイクロニードル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、といった特徴を有する。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・実用化が期待されている。



- (A) 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。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注入する。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。④マイクロニードル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送達する。
- (B) 皮膚内溶解型マイクロニードルの全体像。面積は 0.8 cm² 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。
- (C) 針長 800 μm 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 分あるいは 60 分間貼付し、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。
- (D) 針長 800 μm 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。
- (E) 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 回繰り返す (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。
- (F) 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↑)、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。

図3 マイクロニードルを用いた貼るワクチン

※ カラーの図は巻頭ページを参照

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

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 (図 3(B))³⁵⁻³⁷。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 3(C), (D))。また、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た (図 3(E), (F))。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あるマイクロニードルを用いたパラトルモンによる骨粗鬆症治療の治験が開始されつつあり、マイクロニードルデバイスを用いた予防・治療の臨床応用が近い将来実現すると考え

られる。

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。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

本節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）」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、大阪大学大学院医学系研究科 小豆澤宏明先生、片山一郎先生、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. *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) Nestle FO, Nickoloff BJ. *J. Clin. Invest.* **117**, 2382-5 (2007)
- 6) Gupta PN, et al. *Int. J. Pharm.* **293**, 73-82 (2005)
- 7) Schlosser E, et al. *Vaccine* **26**, 1626-37 (2008)
- 8) Weaver JC. *Methods Mol. Biol.* **55**, 3-28 (1995)
- 9) Zhao YL, et al. *Vaccine* **24**, 1282-90 (2006)
- 10) Cristillo AD, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 29-35 (2008)
- 11) Hirao LA, et al. *Vaccine* **26**, 440-8 (2008)
- 12) Kelly K, et al. *Vaccine* **26**, 1344-52 (2008)
- 13) Roberts LK, et al. *Vaccine* **23**, 4867-78 (2005)
- 14) Jones S, et al. *Vaccine* **27**, 2506-12 (2009)
- 15) Cassaday RD, et al. *Clin. Cancer Res.* **13**, 540-9 (2007)
- 16) Wang R, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10817-22 (2001)
- 17) Epstein JE, et al. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1551-60 (2002)
- 18) Aboud S, et al. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 1124-31 (2010)
- 19) Williams J, et al. *Vaccine* **18**, 1939-43 (2000)
- 20) Frech SA, et al. *Lancet* **371**, 2019-25 (2008)
- 21) Frech SA, et al. *Vaccine* **23**, 946-50 (2005)
- 22) Vogt A, et al. *J. Immunol.* **180**, 1482-9 (2008)
- 23) Combadiere B, et al. *PLoS One* **5**, e10818 (2010)
- 24) Yagi H, et al. *Cancer Res.* **66**, 10136-44 (2006)
- 25) Ishii Y, et al. *J. Control. Release* **131**, 113-20 (2008)

- 26) Matsuo K, et al. *J. Control. Release* **149**, 15-20 (2011)
- 27) Matsuo K, et al. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1835-40 (2011)
- 28) Matsuo K, et al. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 586-9 (2011)
- 29) Hirobe S, et al. *Vaccine* **30**, 1847-54 (2012)
- 30) Prausnitz MR. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 581-7 (2004)
- 31) Henry S, et al. *J. Pharm. Sci.* **87**, 922-5 (1998)
- 32) Van Damme P, et al. *Vaccine* **27**, 454-9 (2009)
- 33) Matriano JA, et al. *Pharm. Res.* **19**, 63-70 (2002)
- 34) Sullivan SP, et al. *Nat. Med.* **16**, 915-20 (2010)
- 35) Matsuo K, et al. *J. Control. Release* **161**, 10-7 (2012)
- 36) Matsuo K, et al. *J. Control. Release* **160**, 495-501 (2012)
- 37) Hiraishi Y, et al. *Int. J. Pharm.* **441**, 570-579 (2013)

Development and Clinical Study of a Self-Dissolving Microneedle Patch for Transcutaneous Immunization Device

Sachiko Hirobe · Hiroaki Azukizawa · Kazuhiko Matsuo · You Zhai · Ying-Shu Quan · Fumio Kamiyama · Hiroshi Suzuki · Ichiro Katayama · Naoki Okada · Shinsaku Nakagawa

Received: 10 December 2012 / Accepted: 28 May 2013 / Published online: 18 June 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

ABSTRACT

Purpose We previously reported the safety and efficacy in animal experiments of transcutaneous immunization (TCI) using a self-dissolving microneedle patch (MicroHyal; MH) made of hyaluronic acid and collagen. However, this MH was an unsuitable TCI device for the human skin, as collagen is suspected to induce inflammation. In this study, we developed an improved collagen-free MH (new-MH) and conducted clinical study to evaluate the fundamental properties and safety in human.

Methods Microneedle dissolution, skin irritation, and antigen-specific antibody production about new-MH were measured in mice and/or rats. On the basis of the results, the clinical study was conducted in healthy volunteers to evaluate local and systemic adverse events caused by new-MH application.

Results We confirmed that the microneedles of new-MH, as well as those on our old-MH that contained collagen, could easily pierce stratum corneum without severe skin irritation, and that TCI using new-MH efficiently increased antibody titer with comparable to TCI using old-MH. Application of new-MH caused no severe adverse reactions in 20 healthy volunteers enrolled in a clinical study.

Conclusions These results verified that new-MH is a safe TCI device in human, and greatly encouraged us to advance PI/PII clinical studies of antigen-loaded new-MH.

KEY WORDS clinical study · diphtheria · self-dissolving microneedle patch · tetanus · transcutaneous vaccination

ABBREVIATION

ASA	active systemic anaphylaxis
BSA	bovine serum albumin
DT	diphtheria toxoid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ICDRG	international contact dermatitis research group
IPI	intraperitoneal immunization
MH	MicroHyal
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate-buffered saline
PCA	passive cutaneous anaphylaxis
SCI	subcutaneous immunization
TBS-T	Tris-HCl buffered saline containing 0.1% Tween-20
TCI	transcutaneous immunization
TEWL	transepidermal water loss
TT	tetanus toxoid
VAS	visual analogue scale

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11095-013-1092-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Hirobe · K. Matsuo · Y. Zhai · N. Okada (✉) · S. Nakagawa (✉)
Laboratory of Biotechnology and Therapeutics
Graduate School of Pharmaceutical Sciences
Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita
Osaka 565-0871, Japan
e-mail: okada@phs.osaka-u.ac.jp
e-mail: nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp

H. Azukizawa · I. Katayama
Department of Dermatology, Course of Integrated Medicine
Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita
Osaka 565-0871, Japan

Y.-S. Quan · F. Kamiyama
CosMED Pharmaceutical Co. Ltd.
32 Higashikujokawanishi-cho, Minami-ku
Kyoto 601-8014, Japan

H. Suzuki
Integral Corporation
1-17-11 Shinjuku, Shinjuku-ku
Tokyo 160-0022, Japan

INTRODUCTION

Vaccination, which is the only fundamental prophylaxis against illness and death from infectious disease, has greatly contributed to improving human health globally. However, injection as major vaccination system is painful, requires medical personnel with technical skill, and comes with the risk of needle-related diseases and injuries. Moreover, antigen solutions require cold chain storage and transportation systems (1,2). These disadvantages of conventional injections hamper the delivery of vaccination technologies to developing countries. As a result, 4,000 children die every day of diseases that are preventable by vaccination (3). The earlier practice of easy-to-use vaccination method is expected to replace injected vaccinations. In addition, the development of new vaccination systems to enable worldwide mass-treatment is critical to evade pandemics of emerging infectious diseases such as severe acute respiratory syndrome (4), H5N1 highly pathogenic avian influenza (5), and reemergence of infectious diseases such as tuberculosis (6), and malaria (7). One of the innovative methods that resolves these issues and is attracting great attention is transcutaneous immunization (TCI) systems (8,9).

Administration of antigen solution to the skin surface fails to penetrate the stratum corneum and deliver sufficient antigen into the skin (10–12). Therefore, TCI systems must deliver antigen to the epidermal layer and dermis, which contain antigen-presenting cells that induce immune responses. Among many TCI devices, microneedle technologies, which utilize needles of micron-size, are under active research as a novel device that induce immune responses (13). Microneedles can physically penetrate the stratum corneum and directly deliver the antigen into the skin with easy application. Moreover, their application is painless because microneedles do not penetrate the lower dermis, where pain-sensing neurons are densely present. Many research groups have reported the efficacy of TCI using microneedle arrays. However, most conventional microneedles suffer from the risk of fracture, which leaves metal, stainless steel, or silicon microneedle fragments in the skin. (14–16). To address this, novel microneedles that are made of dissolvable or biodegradable materials have been developed by a few research groups including us (17–21). These self-dissolving microneedles leave no bio-hazardous sharp medical waste, and remove the risk of secondary infection by used-needles. Thus, the self-dissolving microneedle array is extremely promising as a novel improved TCI device.

We have developed a self-dissolving microneedle patch (MicroHyal; MH) made of biocompatible hyaluronic acid and collagen (20,21). In a previous study, we reported that TCI using MH effectively induced immune responses against various antigens in animal models. In addition, the application of MH resulted in very little skin irritation in rats. Unfortunately, however, MH is unsuitable for the human skin because the collagen content of MH (old-MH) is suspected to

induce inflammation. The major purpose of this study was to realize the practical use of our TCI system. Therefore, we developed a new MH that can be applied to human skin; this new MH does not contain collagen (new-MH). Subsequently, we evaluated its safety and efficacy as a TCI device in animal models and then conducted clinical studies to examine the safety of new-MH on the human skin. Here we showed that our new-MH is a practical and safe device for human immunization.

MATERIALS AND METHODS

Animals

BALB/c mice (female, 6-week-old), Wistar ST rats (female, 6-week-old), Hartley guinea pigs (female, 8-week-old), and HWY hairless rats (female, 7-week-old) were purchased from SLC Inc. (Hamamatsu, Japan). Animals were maintained in the experimental animal facility at Osaka University and experiments were conducted in accordance with the guidelines provided by the Animal Care and Use Committee of Osaka University.

Preparation of Self-Dissolving Microneedle Patches

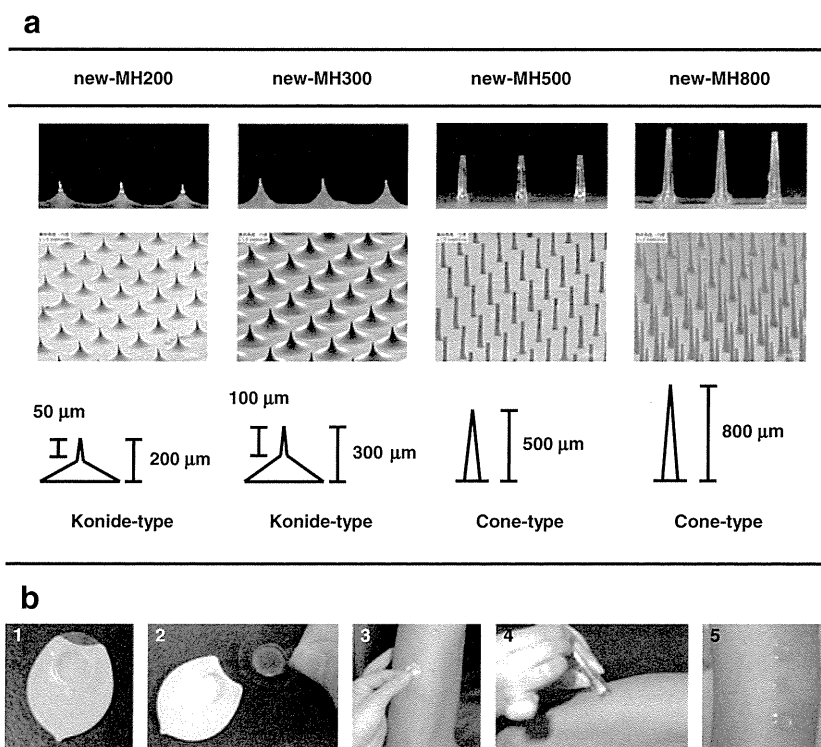
Self-dissolving microneedle patches were created using micro-molding technologies with sodium hyaluronate as the base material. Our MH, which is referred to as old-MH in this study, was made of sodium hyaluronate (JSQI grade, Kikkoman Biochemifa Company, Tokyo, Japan) and hydrolyzed collagen (Nippi, Inc., Tokyo, Japan), with a weight ratio of 7:3. The self-dissolving microneedle patch without collagen, which is referred to as new-MH in this study, was made of sodium hyaluronate (JP grade, Kikoman Biochemifa Company), Dextran 70 (JP grade, Meito sangyo, Nagoya, Aichi), and Povidone (JPE grade, BASF Japan, Tokyo, Japan) with a weight ratio of 11:8:1. Briefly, solutions of these MH materials were cast into micro-molds and dried in a desiccator at room temperature. Self-dissolving microneedle patches were then separated from the molds. Microneedle lengths were 200 μm (MH200), 300 μm (MH300), 500 μm (MH500), or 800 μm (MH800). These microneedles were photographed using a stereoscopic microscope (VHX-1000 or VHX-D500/510, KEYENCE, Osaka, Japan; Fig. 1a). To form the transcutaneous microneedle patch system, patches with an area of 0.8 cm^2 (containing 200 microneedles) were fixed onto 2.3 cm^2 adhesive films.

Analysis of Microneedle Dissolution Kinetics

New-MH200, new-MH300, and new-MH800 microneedle patches were applied to the back skin of BALB/c mice and Wistar ST rats for 5, 15, 30, or 60 min as previously described (20). After removing the new-MH patches, microneedles were

Fig. 1 Dimension of new-MHs (a) and procedure of new-MH application to the human skin (b).

(a) The new-MHs contain 200 microneedles in an area of 0.8 cm². New-MH200 and new-MH300 have 200 μ m and 300 μ m cone-type microneedles of 50 μ m and 100 μ m lengths, respectively. New-MH500 and new-MH800 contain cone-type microneedles of 500 μ m and 800 μ m length, respectively. Images of microneedles were taken using a stereoscopic microscope. (b) New-MH was fixed to the plastic case as a new-MH formulation (1), was adhered to the center of a 2.3 cm² adhesive film (2), was put on skin of the lateral upper arm (3), was applied by impact of a handheld spring-type applicator (4), and was removed 6 h after application (5).



immediately observed under stereoscopic microscope (VHX-1000, KEYENCE).

Assessment of Skin Irritation

New-MH200, new-MH300, and new-MH800 patches were applied to the back skin of Wistar ST rats for 30 min. Skin was observed and scored for signs of erythema or edema according to the Draize dermal scoring criteria 5 min, and 2, 6, 24, and 48 h after treatment with each new-MH (22,23).

Measurement of Skin Surface Impedance

New-MH200, new-MH300, and new-MH800 patches were applied to the back skin of Wistar ST rats for 30 min. Subsequently, skin surface impedance between application and non-application areas, which indicates the degree of skin barrier dysfunction, was measured using a Pocket Tester (CDM-03D; Custom Inc., Kanagawa, Japan) at 5, 15, 30, 60, and 120 min after removal of new-MH patches.

Vaccine Protocol Using New-MH

Tetanus toxoid (TT) and diphtheria toxoid (DT) were kindly provided by The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University (Suita, Japan). New-MH800 or old-MH800 with 20 μ g TT and 10 μ g DT/needles were applied to the back skin of Wistar ST rats for 1 h or 6 h, five times at 2-week intervals. Subcutaneous immunization (SCI) was

conducted with the combination of 20 μ g TT and 10 μ g DT five times at 2-week intervals. Toxoid-specific IgG titers in sera were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

New-MH200, new-MH300, and new-MH800 with 1 μ g ovalbumin (OVA; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO)/needles were applied to the back skin of guinea pigs for 6 h four times at 2-week intervals. The SCI group received 1 μ g OVA five times at 2-week intervals and the intraperitoneal immunization (IPI) group was injected with 1 μ g OVA containing 5 mg alum (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) two times at 2-week intervals. Sera were collected from immunized guinea pigs 2 weeks after final vaccination, and OVA-specific IgG and IgE titers were measured.

Antibody Titer Measurement

Antigen-specific IgG titers were determined by ELISA as previously described (24). Anti-TT and anti-DT IgGs in rats or anti-OVA IgG in guinea pigs was detected by a peroxidase-labeled goat anti-rat IgG antibody or a peroxidase-labeled goat anti-guinea pig IgG antibody (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA), respectively. End-point titers of antigen-specific antibodies were expressed as the reciprocal log₂ of the last dilution that had an absorbance of 0.1 after subtracting the background. Anti-OVA IgE was detected using the following method: Briefly, 96-well titer plates were coated with purified anti-guinea pig

IgE monoclonal antibody and were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Inc.) in phosphate-buffered saline (PBS). After blocking, serum samples were diluted 16-fold with 1% BSA/PBS and were incubated for 3 h. Plates were washed 3 times with Tris-HCl buffer saline containing 0.1% Tween-20 (TBS-T), and biotinylated OVA diluted in 1% BSA/PBS was added to plates and incubated. After 3 h, plates were washed 3 times with TBS-T and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-biotin IgG polyclonal antibody was added. After 3 h, the reaction was developed using a tetramethylbenzidine solution, and color development was terminated by adding 2 N H₂SO₄. Optical densities were measured at 450–650 nm.

Monitoring of Tetanus Toxin Challenge

Four weeks after the final vaccination, 1- μ g tetanus toxin (Sigma-Aldrich Inc.) was injected subcutaneously into the right thigh of TT-immunized rats. The rats were then monitored daily for up to 4 days, and were euthanized in cases of severe paralysis.

Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) Reaction Against Antisera of Guinea Pigs

The PCA reaction was performed by modifying the method of Hattori *et al.* (25). Hairless rats were inoculated intradermally with 100 μ L of the collected antibody at 1/1, 1/16, 1/64, or 1/128 dilutions. After 24 h, PCA was elicited by intravenous injection of a 1-mL solution containing 2.5 mg OVA and 5 mg of Evans blue. After 0.5 h, the diameter of the skin reaction spots, which occurred following extravasation of dye at the site of serum injection, were measured using the following formula: diameter of spot = (long diameter + short diameter)/2.

Active Systemic Anaphylaxis (ASA) of Immunized Guinea Pigs

Measurement of ASA was performed using the modified method of Aida *et al.* (26). Guinea pigs were inoculated intravenously with OVA (2 mg/kg) 2 weeks after the final vaccination. Anaphylactic symptoms and the ratio of survival were scored after 0.5 and 24 h, respectively, in guinea pigs using the ASA scoring system: 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.

Clinical Study Design for Safety Assessment of New-MH

Twenty healthy male volunteers (25–56 years of age) were enrolled in the study. Written informed consent was received from all volunteers before enrollment. Four types of self-

dissolving microneedle patches (new-MH300, new-MH500, new-MH800, and new-MH-needleless) were applied to the skin of left lateral upper arms of 20 subjects for 6 h using a handheld applicator at 12.8 N/200 microneedles (Fig. 1b). To assess local adverse effects, skin irritation reactions were scored 2, 3, 7, and 30 days after applying the patch, according to the classification of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) (27,28): -, negative reaction; ?+, doubtful reaction, faint erythema only; +, weak (non-vesicular) positive reaction, erythema, infiltration and possibly papules; ++, strong (vesicular) positive reaction, erythema, infiltration, papules, vesicles; +++, extreme positive reaction, bullous reaction; IR, irritant reaction. In 17 volunteers, the presence of purpura was observed by disappearing erythema after pressure was applied to the skin with a glass plate. Blood samples were collected at day 0 and day 2. General peripheral blood tests and biochemical tests of liver and renal function were performed to evaluate the presence of systemic adverse reactions. All clinical procedures were approved by Institutional Review Board for Clinical Research, Osaka University Graduate School of Medicine.

Observation of New-MH Application Sites by *In Vivo* Confocal Laser-Scanning Microscopy

New-MH500 and new-MH800 patches were removed immediately, 1 h, or 2 h after application. Application sites were observed using a confocal laser-scanning microscope (Vivascope 1500; Lucid Inc., Rochester, NY, USA) immediately or 1 h after patch removal. Photographs of 0.5 μ m \times 0.5 μ m areas were taken for every 1 μ m depth, and a z-axis image was constructed at the depth of 100 μ m. In addition, a wide range of 4 \times 4 mm images were obtained; numbering 64 photographs from 8 vertical \times 8 horizontal pieces.

Analysis of Microneedle Dissolution Kinetics in Humans

New-MH800 patches were applied to the skin of the left lateral upper arms of three volunteers, and were removed 1 h and 6 h after application. Microneedle patches were immediately observed using a stereoscopic microscope (VHX-1000, KEYENCE).

Measurement of Transepidermal Water Loss (TEWL)

New-MH800 patches were applied to the skin of the left lateral upper arms of three volunteers, and were removed immediately, 1 h, and 6 h after application. As controls, new-MH-needleless patches were applied for 6 h. To evaluate the degree of skin barrier dysfunction, TEWL was measured in the sites of application using a Mobile Tewameter