

topical application of DT in mice [92]. The immune response was further boosted by co-application of cholera toxin (CT), suggesting that selective addition of adjuvants may lower the antigen dose required [93]. A 3M has developed the micro-structured transdermal system using coated or uncoated solid microneedles. In collaboration with VaxInnate, these microneedles will be used for the delivery of an influenza vaccine.

As a variant of the treatment using solid microneedles, a post-treatment method was developed [94]. The skin was painted with a vaccine solution and then gently scraped by microneedles to expose the epidermis to the vaccine without causing pain sensation. Using BD's OnVax[®] device, which has a microneedle length ranging from 50 to 200 μm over a 1 cm^2 area, stronger and less variable immune responses were achieved compared to intramuscular and intradermal injection with the same dose of hepatitis B DNA vaccine (100 μg). Moreover, 100% seroconversion was achieved after only two vaccinations, whereas only 40 – 50% conversion was obtained by intramuscular injection.

In general, pre- or post-treatment with the microneedle array is considered a simple approach for TCI that has great potential, but parameters such as dose and application time should be optimized.

3.2.4.2 Hollow microneedles

During pretreatment with a solid microneedle array, antigen delivery is dependent on passive diffusion along the conduits created by the microneedles. Although this is a relatively easy approach from a technical point of view, it is difficult to optimize the antigen quantity required to activate immune cells in the skin because of limited transport through the conduits. Hollow microneedle arrays can inject the vaccine to a well-defined depth in the skin by precisely steering the flow rate using a syringe or a pump (Figure 3B).

Hollow microneedles are made of various materials, such as silicon, metal and glass [95]. Recently, the potential of hollow microneedles for vaccination has received attention as it can be used for both TCI and intradermal vaccination depending on the microneedle length. Influenza vaccination (3.3 μg of hemagglutinin [HA] per strain) using a hollow microneedle array (450 μm long, 4 \times 1, MicronJet developed by Nanopass) induced immune responses similar to those induced by intramuscular injection of 15 μg HA per strain to human volunteers (Table 1) [96].

The main technical demands are avoiding leakage and clogging of the microneedles during injection. Whereas clogging can be prevented using a beveled tip [83], the short-length needle increases the chance for leakage. Therefore, optimization of the flow rate, needle length and localization of the opening are demanded. In addition, the hollow microneedle formulation has the disadvantage of requiring cold chain storage and transportation of antigen solutions in addition to the injection system.

3.2.4.3 Coated microneedles

Microneedle arrays pre-coated (Figure 3C) with 1 μg OVA induced a 100-fold increase in immune response compared to intramuscular injection of the same dose [97]. The titanium microneedles in the array were 300 μm long and were applied to the skin using an impact insertion applicator. Furthermore, an extensive study was conducted on the influence of OVA-coated microneedle properties on the immune response. The immune response was found to be dose-dependent, but practically independent of depth of delivery, density of microneedles or area of application. Interestingly, OVA vaccination with short microneedles (225 μm) in a high-density array (725 microneedles/ cm^2) induced an immune response similar to that induced by longer microneedles (600 μm) in a low-density array (140 microneedles/ cm^2) [82]. This led to the development of the macroflux system, which is now undergoing a Phase I clinical study for TCI with an influenza vaccine. Efficacy using coated microneedles was reported for various antigens including OVA, H3N2 influenza antigen, inactivated influenza virus and hepatitis C DNA.

Coatings are usually applied by dipping the microneedle into a vaccine formulation [98,99]. Another method is to use gas jet coating to achieve a more uniform coating of densely packed microneedles [100]. Coated microneedle arrays may not be very attractive for transdermal drug delivery as only a limited quantity of active compounds can be coated onto the microneedle. However, this quantity might be sufficient for antigens to elicit a protective immune response. In addition, one of the advantages of coated microneedles is that dried antigen adhered to the surface of the microneedles may improve the long-term stability [101]. It was reported that coating reduced the immunogenicity of the vaccine, thus requiring trehalose to partially retain the activity [102,103].

A method of combining coated microneedles with electroporation has been developed [104]. The EasyVaxTM device inserts coated microneedle arrays into the skin, followed by electrical pulses, to deliver DNA into the cells. Neutralizing antibody titers induced by TCI with a smallpox DNA vaccine using this system were greater than those induced by the traditional live virus vaccine administered by scarification. However, the main drawback of this approach for practical use is the complexity of the device.

3.2.4.4 Dissolving microneedles

Conventional microneedles suffer from the risk of fracture, which might leave metals, stainless steel or silicon microneedle fragments in the skin. The use of dissolvable or biodegradable materials containing vaccine components is an elegant way to deliver a vaccine without the possibility of microneedles breaking off in the skin (Figure 3D). Moreover, dissolving microneedles leave no biohazardous sharp medical waste and remove the risk of secondary infection by used needles.

The first microneedles were made of maltose [105] and later, development of dextrin microneedle array was reported for the delivery of insulin and erythropoietin [106,107]. Recently,

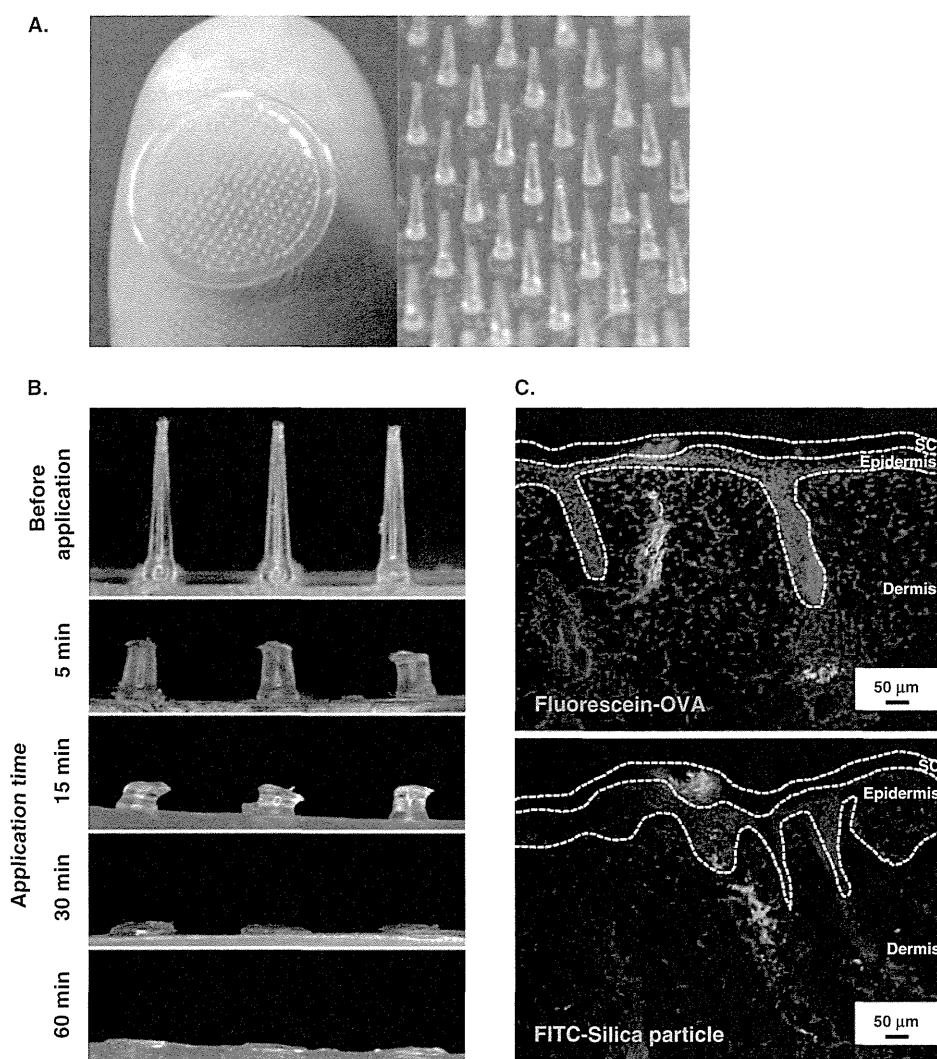


Figure 4. Photographs of MH and observation of microneedles and skin after MH application. (A) MH is made of hyaluronic acid and contains 200 microneedles/patch (0.8 cm²). (B) MH of 800 µm long needle were applied to the back skin of Wistar ST rats for the indicated times. After removal of MH, the microneedles remaining on MH were photographed using a stereoscopic microscope. (C) Fluorescein-OVA (green) or FITC-silica particle (green)-containing MH of 800 µm long needle were applied to the back skin of Wistar ST rats for 6 h. The skin was harvested and frozen. Frozen sections (6 µm thick) were photographed under a fluorescence microscope. The nucleus was counterstained using DAPI (blue).

Sullivan *et al.* showed that immunization with polymeric dissolving microneedles containing inactivated influenza virus induced a strong antibody and cellular response and provided protection against challenge by influenza [108]. The manufacture of dissolving microneedles requires technical expertise to allow the antigen to be incorporated into the matrix of the microneedle material using mild procedures that do not cause antigen breakdown or compromise material strength. The high temperatures required to mold polymers led to significant drug loss. The microneedles used by Sullivan *et al.* are made by a photo-polymerization method, which uses UV light to form microneedles without compromising β -galactosidase activity. Companies, such as

Theraject and BioSerenTach, are currently developing dissolving microneedle systems for vaccine delivery. The Theraject VaxMAT, made of a sugar matrix containing vaccine components, is fabricated in various lengths from 100 to 1,000 µm and is assembled with an adhesive patch. After application, the microneedles dissolve and the antigen diffuses into the epidermis and dermis within a few minutes.

We have developed a self-dissolving microneedle patch (MicroHyal[®]; MH) made of biocompatible hyaluronic acid (Figure 4A) [109,110]. Our MH was prepared in various lengths from 200 to 800 µm and in two shapes of microneedle; konide and cone [109]. Sixty minutes after application, the microneedles had dissolved completely and delivered both

Table 2. Development of adjuvants for transcutaneous vaccination.

Transcutaneous adjuvant	Antigen	Immune response	Refs.
CT, CTB	DT	IgG	[111]
	TT	IgG	[111]
	OVA	IgG, IgG2a, CTL, CD4 ⁺	[115,116]
LT	Influenza	IgG, IgG1, CD4 ⁺	[113,114]
	TT	IgG, IgG1	[112]
Imiquimod	OVA	CTL	[121]
CpG ODN	TT	IgG, IgG2a	[112]
	Influenza	IgG2a, CD4 ⁺	[113,114]

CT: Cholera toxin; CTB: B subunit of cholera toxin; CTL: Cytotoxic T cell; DT: Diphtheria toxoid; LT: *Escherichia coli* heat-labile toxin; ODN: Oligodeoxynucleotide; OVA: Ovalbumin; TT: Tetanus toxoid.

soluble and particulate material into the skin (Figure 4B and 4C). We previously reported that TCI using MH effectively induced immune responses against various antigens in animal models, and furthermore, the application of MH resulted in minimal skin irritation in rats [110]. Moreover, we conducted a clinical study to assess the safety of the MH device in humans and showed that our new MH is a practical and safe device for use in human immunization. A clinical study using influenza HA antigen-containing MH is in progress, and we have confirmed that TCI using MH induced immune responses without severe side effects (unpublished data).

4. Adjuvant development for TCI

In TCI, the co-application of adjuvants with the antigen is required for induction of a strong immune response. Aluminum hydroxide hydrate and Freund's adjuvant are commonly used as immune adjuvants. However, these adjuvants are not useful in TCI because their relatively large sizes do not permit skin penetration. Adjuvants for TCI can be divided into bacterial enterotoxin and toll-like receptor (TLR) ligands (Table 2).

4.1 Bacterial enterotoxins

Bacterial enterotoxins have high adjuvant activity and are most often used preclinically for TCI. CT and LT are the most intensively studied [73]. CT and LT not only produce anti-CT and anti-LT antibodies but also improve the total immune response and affect the quality of the immune response (Table 2) [111-114]. In addition to antibody responses, it was shown that CT can induce a CTL response [115] and that A and B subunits of CT (CTA and CTB) are responsible for the expression of different cytokines from restimulated lymphocytes isolated from the spleens of immunized mice [116]. However, the safety cannot be assured because LT or CT, which are toxins, can cause excessive tissue injury or necrosis. Difficulties have been encountered applying the toxin to the human skin, and additional studies are required to elucidate how toxins affect immune responses.

4.2 TLR ligands

TLRs are important signal molecules when cells sense danger [117] and are expressed on the surface of LCs, dDCs and keratinocytes. Therefore, purified or synthetic TLR ligands are expected to be suitable adjuvants for vaccination purposes [118,119]. One example is imiquimod, which is a ligand for TLR7 and TLR8. Imiquimod induced migration of LCs and resulted in the production of IFN- α and TNF- α (Table 2) [120-122]. Another ligand is cytosine-phosphate-guanine (CpG) oligodeoxynucleotide (ODN). By signaling through TLR9, CpG ODN enhanced the vaccine's immunogenicity and induced antibody production and proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IFN- γ [113,114]. Various TLR ligands are currently being developed as effective adjuvants for practical use.

5. Conclusion

The skin is an important immunological site and has the potential to be an ideal non- or low-invasive vaccination site, although it possesses a complex barrier. TCI provides effective, easy-to-use and painless vaccination with little side effect and safer handling than conventional injections. The main challenges of TCI are ensuring accurate delivery of antigens into the epidermal or dermal skin tissue where LCs and dDCs are present, and to activate specific immune response. Many different approaches have been developed of which several ways may lead to successful TCI, and clinical studies of some devices have been conducted. However, satisfactory guidelines about the standard for formulation and evaluation of safety and efficacy have not yet been regulated because of the novelty of this formulation. Various information about the characteristics of skin as a target and the fundamental properties of TCI devices may lead to the establishment and refinement of guidelines for TCI formulation. Such guidelines will encourage researchers and pharmaceutical companies to develop practical TCI systems.

6. Expert opinion

Many strategies, in particular microneedle devices [123-125], have been developed for TCI systems. Such strategies could be easy-to-use methods of vaccination. For the practical use of these TCI formulations, the safety and efficacy of TCI must be confirmed. Therefore, knowing the function of immunocytes, such as APCs, T cells, macrophages and keratinocytes, in the skin is important. Analysis of the immunological characteristics of each type of cell (e.g., surface marker expression and cytokine production) can help elucidate the molecular and/or cellular mechanisms that underlie the immunity of the skin. In addition, recent studies using two-photon confocal microscopy or genetically modified mice have enabled direct observation of the kinetics and distribution of immune cells in the skin and the interaction between APCs and T cells in draining lymph nodes and

have lead to understand skin immunity *in vivo* [126,127]. Such studies are useful for the development/improvement of transcutaneous vaccination formulations and can guarantee the safety and efficacy of TCI systems. Moreover, transcutaneous delivery of adjuvant is required for more effective immune responses, the reduction of antigen dose and/or number of administrations and the expansion of applications to various diseases. Advances in understanding the functional properties of immunocytes in the skin contribute to the development of adjuvants suitable for TCI by providing information on the delivery target of antigen and adjuvant. Thus, if the bias of immune responses can be controlled by the appropriate selection of TCI methods and/or adjuvants, TCI systems could be used to create strategies against Alzheimer's disease, autoimmune diseases and cancer. Basic scientific research must be actively evolved to the translational research to assess

application of TCI systems to human. We believe that the practical use is achieved early by promoting the consistent studies from basic research to clinical trial led by TCI researchers including us.

Declaration of interest

Our studies mentioned in this review were conducted in collaboration with CosMED Pharmaceuticals Co. Ltd., Nara Medical University, Osaka University Graduate School of Medicine, and The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University. Our work was supported by the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), the Ministry of Health, Labour and Welfare, and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

- Leppin A, Aro AR. Risk perceptions related to SARS and avian influenza: theoretical foundations of current empirical research. *Int J Behav Med* 2009;16:7-29
- Haque A, Lucas B, Hober D. Influenza A/H5N1 virus outbreaks and preparedness to avert flu pandemic. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007;65:125-33
- Valadas E, Antunes F. Tuberculosis, a re-emergent disease. *Eur J Radiol* 2005;55:154-7
- Campbell CC. Malaria: an emerging and re-emerging global plague. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;18:325-31
- Jones JH, Salathe M. Early assessment of anxiety and behavioral response to novel swine-origin influenza A(H1N1). *PLoS One* 2009;4:e8032
- Azad N, Rojanasakul Y. Vaccine delivery—current trends and future. *Curr Drug Deliv* 2006;3:137-46
- Kersten G, Hirschberg H. Needle-free vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2007;4:459-74
- UNICEF's work on immunisation. Available from: <http://www.unicef.org.uk/UNICEFs-Work/What-we-do/UNICEFs-work-on-immunisation/>
- Glenn GM, Scharton-Kersten T, Alving CR. Advances in vaccine delivery: transcutaneous immunisation. *Expert Opin Investig Drugs* 1999;8:797-805
- Levine MM. Can needle-free administration of vaccines become the norm in global immunization? *Nat Med* 2003;9:99-103
- Mathers AR, Larregina AT. Professional antigen-presenting cells of the skin. *Immunol Res* 2006;36:127-36
- Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. Mast cell functions in the innate skin immune system. *Immunobiology* 2008;213:251-60
- Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, et al. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol* 2007;147:176-83
- Mutyambizi K, Berger CL, Edelson RL. The balance between immunity and tolerance: the role of Langerhans cells. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:831-40
- Nestle FO, Nickoloff BJ. Deepening our understanding of immune sentinels in the skin. *J Clin Invest* 2007;117:2382-5
- Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17:273-83
- Gockel CM, Bao S, Beagley KW. Transcutaneous immunization induces mucosal and systemic immunity: a potent method for targeting immunity to the female reproductive tract. *Mol Immunol* 2000;37:537-44
- Rougier A, Rallis M, Krien P, et al. In vivo percutaneous absorption: a key role for stratum corneum/vehicle partitioning. *Arch Dermatol Res* 1990;282:498-505
- Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol* 2000;9:165-9
- Barry BW. Breaching the skin's barrier to drugs. *Nat Biotechnol* 2004;22:165-7
- Glenn GM, Villar CP, Flyer DC, et al. Safety and immunogenicity of an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine patch containing heat-labile toxin: use of skin pretreatment to disrupt the stratum corneum. *Infect Immun* 2007;75:2163-70
- McKenzie R, Bourgeois AL, Frech SA, et al. Transcutaneous immunization with the heat-labile toxin (LT) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): protective efficacy in a double-blind, placebo-controlled challenge study. *Vaccine* 2007;25:3684-91
- Glenn GM, Taylor DN, Li X, et al. Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat Med* 2000;6:1403-6
- Frech SA, Dupont HL, Bourgeois AL, et al. Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. *Lancet* 2008;371:2019-25
- **Wide-scale clinical trial of transcutaneous vaccination.**
- Frech SA, Kenney RT, Spyr CA, et al. Improved immune responses to influenza vaccination in the elderly using an

- immunostimulant patch. *Vaccine* 2005;23:946-50
26. Yagi H, Hashizume H, Horibe T, et al. Induction of therapeutically relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization. *Cancer Res* 2006;66:10136-44
 27. Vogt A, Mahe B, Costagliola D, et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol* 2008;180:1482-9
 28. Combadiere B, Vogt A, Mahe B, et al. Preferential amplification of CD8 effector-T cells after transcutaneous application of an inactivated influenza vaccine: a randomized phase I trial. *PLoS One* 2010;5:e10818
 29. 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;131:113-20
 30. 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;149:15-20
 31. 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;34:1835-40
 32. 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;34:586-9
 33. Hirobe S, Matsuo K, Quan YS, et al. Clinical study of transcutaneous vaccination using a hydrogel patch for tetanus and diphtheria. *Vaccine* 2012;30:1847-54
 34. Kohli AK, Alpar HO. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int J Pharm* 2004;275:13-17
 35. Shaker DS, Sloat BR, Le UM, et al. Immunization by application of DNA vaccine onto a skin area wherein the hair follicles have been induced into anagen-onset stage. *Mol Ther* 2007;15:2037-43
 36. Vogt A, Combadiere B, Hadam S, et al. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J Invest Dermatol* 2006;126:1316-22
 37. Schlosser E, Mueller M, Fischer S, et al. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine* 2008;26:1626-37
 38. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:329-47
 39. Mattheolabakis G, Lagoumintzis G, Panagi Z, et al. Transcutaneous delivery of a nanoencapsulated antigen: induction of immune responses. *Int J Pharm* 2010;385:187-93
 40. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2010;58:1423-30
 41. Prego C, Paolicelli P, Diaz B, et al. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine* 2010;28:2607-14
 42. Bal SM, Slutter B, Jiskoot W, et al. Small is beautiful: N-trimethyl chitosan-ovalbumin conjugates for microneedle-based transcutaneous immunisation. *Vaccine* 2011;29:4025-32
 43. Bal SM, Slutter B, van Riet E, et al. Efficient induction of immune responses through intradermal vaccination with N-trimethyl chitosan containing antigen formulations. *J Control Release* 2010;142:374-83
 44. Bal SM, Ding Z, Kersten GF, et al. Microneedle-based transcutaneous immunisation in mice with N-trimethyl chitosan adjuvanted diphtheria toxoid formulations. *Pharm Res* 2010;27:1837-47
 45. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes. *Int J Pharm* 2004;276:143-61
 46. Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur J Immunol* 1995;25:3521-4
 47. Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Vaccine* 1998;16:188-95
 48. Gupta PN, Mishra V, Rawat A, et al. Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. *Int J Pharm* 2005;293:73-82
 49. Mishra D, Mishra PK, Dubey V, et al. Systemic and mucosal immune response induced by transcutaneous immunization using Hepatitis B surface antigen-loaded modified liposomes. *Eur J Pharm Sci* 2008;33:424-33
 50. Jain S, Vyas SP. Mannosylated niosomes as carrier adjuvant system for topical immunization. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:1177-84
 51. Dahlan A, Alpar HO, Stickings P, et al. Transcutaneous immunisation assisted by low-frequency ultrasound. *Int J Pharm* 2009;368:123-8
 52. Tezel A, Paliwal S, Shen Z, et al. Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. *Vaccine* 2005;23:3800-7
 53. Dahlan A, Alpar HO, Murdan S. An investigation into the combination of low frequency ultrasound and liposomes on skin permeability. *Int J Pharm* 2009;379:139-42
 54. Weaver JC. Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol Biol* 1995;55:3-28
 55. Prausnitz MR, Bose VG, Langer R, et al. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10504-8
 56. Vanbever R, Lecouturier N, Preat V. Transdermal delivery of metoprolol by electroporation. *Pharm Res* 1994;11:1657-62
 57. Zhao YL, Murthy SN, Manjili MH, et al. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization. *Vaccine* 2006;24:1282-90
 58. Cristillo AD, Weiss D, Hudacik L, et al. Persistent antibody and T cell responses induced by HIV-1 DNA vaccine delivered by electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:29-35

59. Hirao LA, Wu L, Khan AS, et al. Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine* 2008;26:440-8
60. Macklin MD, McCabe D, McGregor MW, et al. Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus. *J Virol* 1998;72:1491-6
61. Chen D, Zuleger C, Chu Q, et al. Epidermal powder immunization with a recombinant HIV gp120 targets Langerhans cells and induces enhanced immune responses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:715-22
62. Kelly K, Loskutov A, Zehring D, et al. Preventing contamination between injections with multiple-use nozzle needle-free injectors: a safety trial. *Vaccine* 2008;26:1344-52
63. Chen D, Weis KF, Chu Q, et al. Epidermal powder immunization induces both cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses to protein antigens of influenza and hepatitis B viruses. *J Virol* 2001;75:11630-40
64. Chen D, Endres R, Maa YF, et al. Epidermal powder immunization of mice and monkeys with an influenza vaccine. *Vaccine* 2003;21:2830-6
65. Roberts LK, Barr LJ, Fuller DH, et al. Clinical safety and efficacy of a powdered Hepatitis B nucleic acid vaccine delivered to the epidermis by a commercial prototype device. *Vaccine* 2005;23:4867-78
66. Drape RJ, Macklin MD, Barr LJ, et al. Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. *Vaccine* 2006;24:4475-81
67. Dincer Z, Jones S, Haworth R. Preclinical safety assessment of a DNA vaccine using particle-mediated epidermal delivery in domestic pig, minipig and mouse. *Exp Toxicol Pathol* 2006;57:351-7
68. Cassaday RD, Sondel PM, King DM, et al. A phase I study of immunization using particle-mediated epidermal delivery of genes for gp100 and GM-CSF into uninvolved skin of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:540-9
69. Braun RP, Dong L, Jerome S, et al. Multi-antigenic DNA immunization using herpes simplex virus type 2 genomic fragments. *Hum Vaccin* 2008;4:36-43
70. Jones S, Evans K, McElwaine-John H, et al. DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled phase 1b clinical trial. *Vaccine* 2009;27:2506-12
71. Wang R, Epstein J, Baraceros FM, et al. Induction of CD4(+) T cell-dependent CD8(+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10817-22
72. Epstein JE, Gorak EJ, Charoenvit Y, et al. Safety, tolerability, and lack of antibody responses after administration of a PfCSP DNA malaria vaccine via needle or needle-free jet injection, and comparison of intramuscular and combination intramuscular/intradermal routes. *Hum Gene Ther* 2002;13:1551-60
73. Williams J, Fox-Leyva L, Christensen C, et al. Hepatitis A vaccine administration: comparison between jet-injector and needle injection. *Vaccine* 2000;18:1939-43
74. Aboud S, Nilsson C, Karlen K, et al. Strong HIV-specific CD4+ and CD8+ T-lymphocyte proliferative responses in healthy individuals immunized with an HIV-1 DNA vaccine and boosted with recombinant modified vaccinia virus ankara expressing HIV-1 genes. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1124-31
75. Belshe RB, Newman FK, Cannon J, et al. Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. *N Engl J Med* 2004;351:2286-94
- **Benefit of transcutaneous vaccination.**
76. Kenney RT, Frech SA, Muenz LR, et al. Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N Engl J Med* 2004;351:2295-301
- **Benefit of transcutaneous vaccination.**
77. BD Soulvia™ Prefillable Microinjection System. Available from: <http://www.bd.com/pharmaceuticals/products/microinjection.asp>
78. Laurent PE, Bonnet S, Alchas P, et al. Evaluation of the clinical performance of a new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system. *Vaccine* 2007;25:8833-42
79. Prymula R, Usluer G, Altinel S, et al. Acceptance and opinions of Intanza/IDflu intradermal influenza vaccine in the Czech Republic and Turkey. *Adv Ther* 2012;29:41-52
80. Gerstel MS, Place VA. Drug delivery device. US Patent No. 3 1976;964:482
81. Reihnsner R, Balogh B, Menzel EJ. Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the in vivo configuration. *Med Eng Phys* 1995;17:304-13
82. Widera G, Johnson J, Kim L, et al. Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine* 2006;24:1653-64
83. Martanto W, Moore JS, Kashlan O, et al. Microinfusion using hollow microneedles. *Pharm Res* 2006;23:104-13
84. Martanto W, Moore JS, Couse T, et al. Mechanism of fluid infusion during microneedle insertion and retraction. *J Control Release* 2006;112:357-61
85. Davis SP, Landis BJ, Adams ZH, et al. Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *J Biomech* 2004;37:1155-63
86. Donnelly RF, Raj Singh TR, Woolfson AD. Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety. *Drug Deliv* 2010;17:187-207
87. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol* 2008;26:1261-8
88. Prausnitz MR, Mikszta JA, Cormier M, et al. Microneedle-based vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;333:369-93
89. Henry S, McAllister DV, Allen MG, et al. Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *J Pharm Sci* 1998;87:922-5
- **First proof of concept about microneedle study.**
90. Banks SL, Pinninti RR, Gill HS, et al. Flux across [corrected] microneedle-treated skin is increased by increasing charge of naltrexone and naltrexol in vitro. *Pharm Res* 2008;25:1677-85
91. Verbaan FJ, Bal SM, van den Berg DJ, et al. Improved piercing of microneedle

- arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method. *J Control Release* 2008;128:80-8
92. Ding Z, Verbaan FJ, Bivas-Benita M, et al. Microneedle arrays for the transcutaneous immunization of diphtheria and influenza in BALB/c mice. *J Control Release* 2009;136:71-8
93. Ding Z, Van Riet E, Romeijn S, et al. Immune modulation by adjuvants combined with diphtheria toxoid administered topically in BALB/c mice after microneedle array pretreatment. *Pharm Res* 2009;26:1635-43
94. Mikszta JA, Alarcon JB, Brittingham JM, et al. Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery. *Nat Med* 2002;8:415-19
95. McAllister DV, Wang PM, Davis SP, et al. Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13755-60
96. 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;27:454-9
- **Clinical study against infection disease using microneedle device.**
97. Matriano JA, Cormier M, Johnson J, et al. Macroflux microprojection array patch technology: a new and efficient approach for intracutaneous immunization. *Pharm Res* 2002;19:63-70
98. Gill HS, Prausnitz MR. Coated microneedles for transdermal delivery. *J Control Release* 2007;117:227-37
99. Zhu Q, Zarnitsyn VG, Ye L, et al. Immunization by vaccine-coated microneedle arrays protects against lethal influenza virus challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:7968-73
100. Chen X, Prow TW, Crichton ML, et al. Dry-coated microprojection array patches for targeted delivery of immunotherapeutics to the skin. *J Control Release* 2009;139:212-20
101. Gill HS, Prausnitz MR. Coating formulations for microneedles. *Pharm Res* 2007;24:1369-80
102. Kim YC, Quan FS, Compans RW, et al. Formulation and coating of microneedles with inactivated influenza virus to improve vaccine stability and immunogenicity. *J Control Release* 2010;142:187-95
103. Kim YC, Quan FS, Compans RW, et al. Stability kinetics of influenza vaccine coated onto microneedles during drying and storage. *Pharm Res* 2011;28:135-44
104. Hooper JW, Golden JW, Ferro AM, et al. Smallpox DNA vaccine delivered by novel skin electroporation device protects mice against intranasal poxvirus challenge. *Vaccine* 2007;25:1814-23
105. Miyano T, Tobinaga Y, Kanno T, et al. Sugar micro needles as transdermic drug delivery system. *Biomed Microdevices* 2005;7:185-8
106. Ito Y, Hagiwara E, Saeki A, et al. Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin. *Eur J Pharm Sci* 2006;29:82-8
107. Ito Y, Yoshimitsu J, Shiroyama K, et al. Self-dissolving microneedles for the percutaneous absorption of EPO in mice. *J Drug Target* 2006;14:255-61
108. Sullivan SP, Koutsonanos DG, Del Pilar Martin M, et al. Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat Med* 2010;16:915-20
109. 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;161:10-17
110. 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;160:495-501
- **Efficacy against various antigens of dissolving microneedles.**
111. Glenn GM, Rao M, Matyas GR, et al. Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 1998;391:851
112. Tierney R, Beignon AS, Rappuoli R, et al. Transcutaneous immunization with tetanus toxoid and mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvants elicits strong protective antibody responses. *J Infect Dis* 2003;188:753-8
113. Beignon AS, Briand JP, Muller S, et al. Immunization onto bare skin with synthetic peptides: immunomodulation with a CpG-containing oligodeoxynucleotide and effective priming of influenza virus-specific CD4+ T cells. *Immunology* 2002;105:204-12
114. Ozaki T, Yauchi M, Xin KQ, et al. Cross-reactive protection against influenza A virus by a topically applied DNA vaccine encoding M gene with adjuvant. *Viral Immunol* 2005;18:373-80
115. Kahlon R, Hu Y, Orteu CH, et al. Optimization of epicutaneous immunization for the induction of CTL. *Vaccine* 2003;21:2890-9
116. Anjuere F, George-Chandy A, Audant F, et al. Transcutaneous immunization with cholera toxin B subunit adjuvant suppresses IgE antibody responses via selective induction of Th1 immune responses. *J Immunol* 2003;170:1586-92
117. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7
118. Manning BM, Enioutina EY, Visic DM, et al. CpG DNA functions as an effective adjuvant for the induction of immune responses in aged mice. *Exp Gerontol* 2001;37:107-26
119. Seya T, Akazawa T, Tsujita T, et al. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006;3:31-8.discussion 133-137
120. Thissen MR, Kuijpers DI, Krekels GA. Local immune modulator (imiquimod 5% cream) as adjuvant treatment after incomplete Mohs micrographic surgery for large, mixed type basal cell carcinoma: a report of 3 cases. *J Drugs Dermatol* 2006;5:461-4
121. Johnston D, Bystryjn JC. Topical imiquimod is a potent adjuvant to a weakly-immunogenic protein prototype vaccine. *Vaccine* 2006;24:1958-65
122. Zhu J, Lai K, Brownlie R, et al. Porcine TLR8 and TLR7 are both activated by a selective TLR7 ligand, imiquimod. *Mol Immunol* 2008;45:3238-43
123. Combadiere B, Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin* 2011;7:811-27
124. Kim YC, Park JH, Prausnitz MR. Microneedles for drug and vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1547-68

S. Hirobe et al.

125. van der Maaden K, Jiskoot W, Bouwstra J. Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery. *J Control Release* 2012;161:645-55
126. Celli S, Albert ML, Bousso P. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med* 2011;17:744-9
127. Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, et al. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J Exp Med* 2011;208:2607-13

Affiliation

Sachiko Hirobe¹, Naoki Okada^{†2} PhD & Shinsaku Nakagawa^{*3} PhD

^{†*}Authors for correspondence

¹Assistant Professor,
Osaka University,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Laboratory of Biotechnology and Therapeutics,
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

²Associate Professor,
Osaka University,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Laboratory of Biotechnology and Therapeutics,
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
Tel: +81 6 6879 8176;
Fax: +81 6 6879 8176;
E-mail: okada@phs.osaka-u.ac.jp

³Professor,
Osaka University,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Laboratory of Biotechnology and Therapeutics,
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
Tel: +81 6 6879 8175;
Fax: +81 6 6879 8179;
E-mail: nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp

経皮ワクチン製剤（貼るワクチン）の基礎から臨床

岡田直貴

From Basic Principles to Clinical Applications on Transcutaneous Vaccine

Naoki Okada

Laboratory of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

(Received August 30, 2013)

The recent vigorous transnational migration of people and materials reflecting the development of transportation facilities, changes in social structure, and war disasters has increased the global spread of emerging and re-emerging infectious diseases. Vaccine, which is the major fundamental prophylaxis against infectious diseases, has greatly contributed to the maintenance and improvement of human health worldwide. However, the disadvantages of conventional injection systems hamper the speedy mass-vaccination and the global distribution of vaccines. Transcutaneous immunization systems, which are easy-to-use and low-invasive methods of vaccination, have the potential to overcome certain issues associated with injectable vaccinations. In this review, we provide an outline of recent trends in the development of techniques for the transcutaneous delivery of vaccine antigens. We also introduce basic and clinical research involving our transcutaneous immunization systems that incorporate self-dissolving microneedle patch.

Key words—vaccine; transcutaneous immunization; microneedle; influenza

1. はじめに

人類と感染症の係わりの歴史は古く、エジプトのミイラからは天然痘に感染した痕が確認されている。ウイルスや細菌の誕生が人類の誕生以前の出来事であったことを想起すれば、人類の誕生とともに感染症との闘いの歴史が始まったといっても過言ではない。人類は感染症との長い闘いの中で、医学の進歩や公衆衛生事業の拡大により多くの戦果を得てきた。なかでもワクチンは、感染症に対する根本的予防における唯一の手段であり、疾患の発症並びに症状の重篤化を抑制する画期的な医薬品である。

ワクチン開発は1798年のEdward Jennerによる牛痘接種法（天然痘ワクチン）に始まり、200年以上の歴史を持つ。Jennerの種痘以後、細菌学、ウイルス学の発達により、感染症の原因となる病原体が次々と同定され、数多くのワクチンが開発されてきた。現在においても、新たに分子生物学的手法を

駆使して、より安全で有効なワクチンの開発が進められている。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、高度に発達した交通網が様々な人的・物的交流に伴う国境を越えた病原体の移動を可能にしている。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、新興・再興感染症の世界規模での流行の脅威にさらされている現代社会においては、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。

このような社会背景の下、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・改良やワクチンを大量かつ迅速に製造・供給できる技術の開発と併せて、簡便、低侵襲、安価な新規ワクチン接種法及びワクチン剤形の開発が重要な研究課題として注目されている。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

The author declares no conflict of interest.

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6）

e-mail: okada@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第133年会シンポジウム S30-106 で発表した内容を中心に記述したものである。

全面での問題も有する。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おけるワクチンの迅速大規模接種に注射投与では対応できない点も懸念されている。

そこで筆者らは、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製剤「貼るワクチン」の開発を推進しており、本稿では、経皮ワクチンデリバリー技術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パッチを応用した「貼るワクチン」に関する研究成果を紹介する。

2. ワクチンの標的組織としての皮膚

皮膚は生体を外界と隔てる障壁であり、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 (Fig. 1)。解剖学的にみれば外側から角質層 (stratum corneum; SC), 生きた表皮 (顆粒層, 有棘層, 基底層), 真皮の大きく3層に分けられており, 最外層のSCはケラチンタンパク質でできた角質細胞が幾重にも重なることによって構成され, 物理的バリアーの主役となっている。

一方, 角質層下の生きた表皮並びに真皮には免疫学的バリアーを構築する様々な細胞群が存在しており, なかでも生きた表皮に常在するランゲルハンス細胞 (Langerhans cells; LC) と真皮に分布する真皮樹状細胞 (dermal dendritic cell; dDC) は, 抗原提示細胞として外来異物に対する生体防御機構において重要な役割を担っている。¹⁾ また, 生きた表皮を構成する細胞の90%以上を占めるケラチノサイト (keratinocyte; KC) は, 異物の侵入を感知してサイトカイン・ケモカインなどの炎症メディエーターを産生することで自然免疫の誘導に係わる。²⁾ 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り, 皮膚内のLCやdDCへと効率よく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これら抗原提示細胞が所属リンパ節へと遊走し, T細胞並びに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, 経皮ワクチン開発においてワク

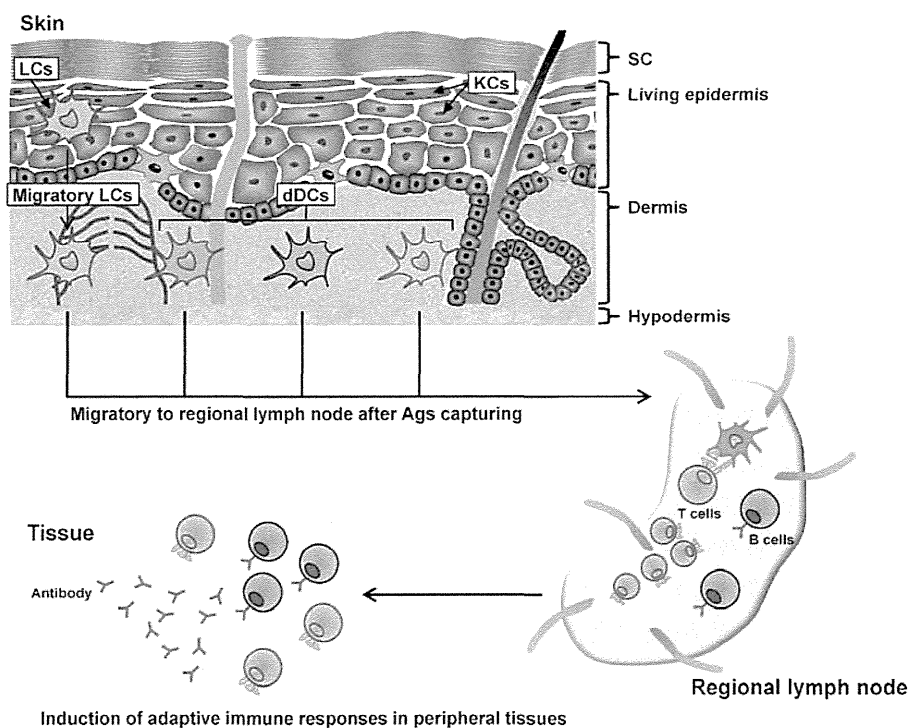


Fig. 1. Skin Immune System

The stratum corneum (SC) is the outermost of the epidermis and is largely responsible for the vital barrier function of the skin. The living epidermis and dermis under the SC are enriched with various immunocompetent cells such as Langerhans cells (LCs), keratinocytes (KCs), and several kinds of dermal dendritic cells (dDCs). KCs as principal epidermal cells are mainly involved in the induction of inflammation and innate immunity by cytokine production. LCs and dDCs capture external antigens (Ags), migrate into regional lymph nodes, present Ags to T cells, and activate Ag-specific T cells and B cells. Activated T cells and B cells distribute to peripheral tissues and demonstrate Ag-specific immune responses.

チン抗原デリバリーの障壁となるのが、前述した SC の存在である。SC 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なり立っており、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。³⁾ 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係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細菌が出す毒素を不活化したトキソイド (破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイドなど)、といった高分子タンパク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到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 HA 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。^{4,5)} しかし、皮内注射は厚さ数 mm の皮膚内に溶液を注入する熟練の技術が必要とされることから、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 Soluvia™ (Becton Dickinson 社)⁶⁾ を用いた三価季節性インフルエンザ HA ワクチン製剤、Intanza®/IDflu® (Sanofi Pasteur 社) 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。⁷⁾ 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、従来の注射ワクチン製剤と同様に抗原溶液の cold chain が必要とされるとともに、医療廃棄物処理における費用と危険性が懸念される。また、長さ 1.5 mm の針を用いるために投与の際に痛みを伴うという欠点があり、より低侵襲な手法でワクチン抗原を角質層下へと確実に送達できる経皮投与デバイスの開発が望まれている。

3. 経皮ワクチンデリバリー技術の発展

3-1. Electroporation Electroporation 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 1 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 Electroporation 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。しかしながら実用化に向けては、Electroporation 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大きな課題となっている。

3-2. 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、既に使用は取りやめられている。現在ではより安価で簡便に扱える 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、¹³⁻¹⁵⁾ 臨床での定着・普及に向けて安全性の担保が重要課題である。

3-3. 弾性リポソーム 角質層を突破する手法の 1 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。¹⁶⁾ 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。¹⁷⁾ 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。

3-4. パッチ型製剤 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及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) 及び国立感染症研究所により報告されている。^{18,19)} 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、また注射ワクチンと同様に抗原溶液の cold chain を必要とするなど、開発途上国へのワクチン普及を押し進めるためには更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。²⁰⁻²⁵ 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。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、既に破傷風・ジフテリアトキソイドをワクチン抗原として含浸させた経皮ワクチン製剤については、臨床研究においてヒトにおける安全性・有効性を実証している。²⁴ わが国では多くの人が、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な新規ワクチン製剤であると言える。

しかしながら、筆者らの親水性ゲルパッチをもってしても角質層下に送達される抗原量は含浸させた量の数%程度であり、²⁵ 注射と比較すると抗原の利用率が圧倒的に低いことが課題として残されている。そのため、簡便かつ安全だけでなく安価でより有効なパッチ型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の改良や免疫増強効果を図るために経皮ワクチン用アジュバントの探索を進める必要がある。

4. 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。マイクロニードルは、1976年にその概念が Gerstel と Placeらによって報告されて以来、²⁶ 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、1990年代になって微細加工技術が発展したことで、現在では様々なマイクロニードルの開発が進められている。

4-1. 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 [Fig. 2(A)].²⁷ 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。²⁸ 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。²⁹ 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、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。

4-2. 中空マイクロニードル 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 [Fig. 2(B)]. ヒトにおいて、インフルエンザ HA 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。³⁰ 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。

4-3. 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、現在の注射ワクチン製剤と同様に cold chain 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

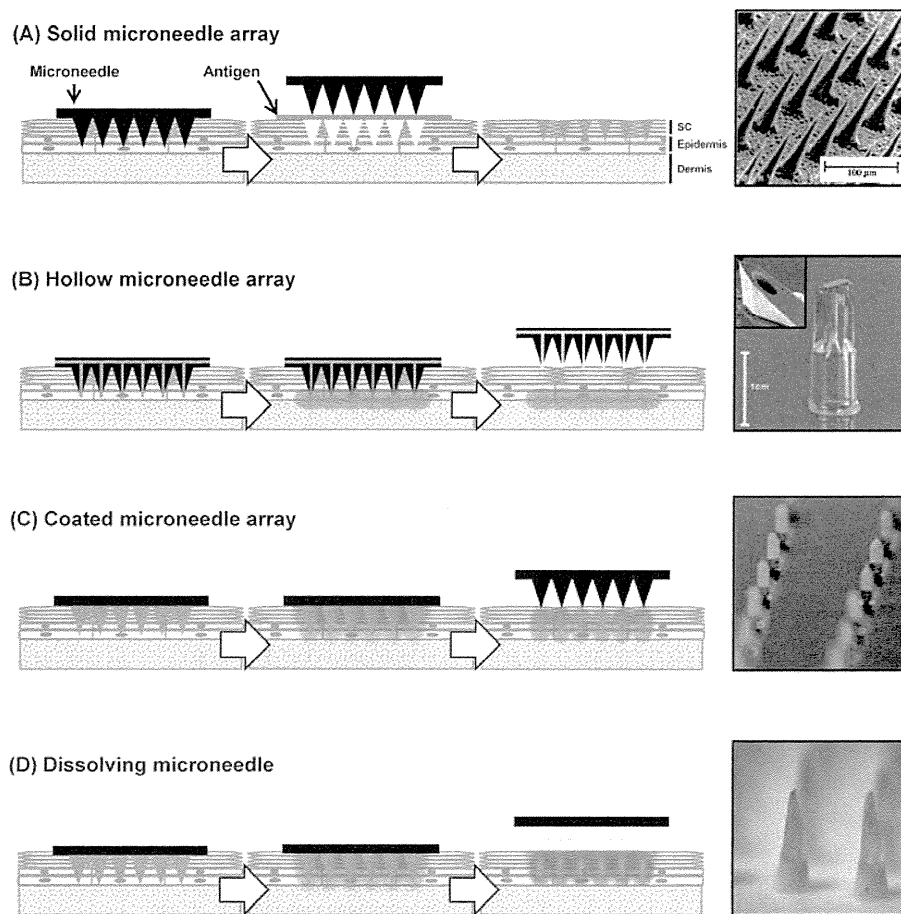


Fig. 2. Examples of Transcutaneous Delivery Using Microneedle Array

A: Deliver antigen into the skin through the puncture holes created using a microneedle array, B: Inject antigen into the skin through a hollow microneedle array, C: Diffuse antigen into the skin using an antigen-coated microneedle array; D: Deliver antigen into the skin with dissolution of the antigen-coated or antigen-loaded microneedle array.

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 [Fig. 2(C)].³¹⁾ 本手法では、マイクロニードル表面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。³²⁾ 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。

4-4. 溶解型マイクロニードル 上述した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に分類され、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

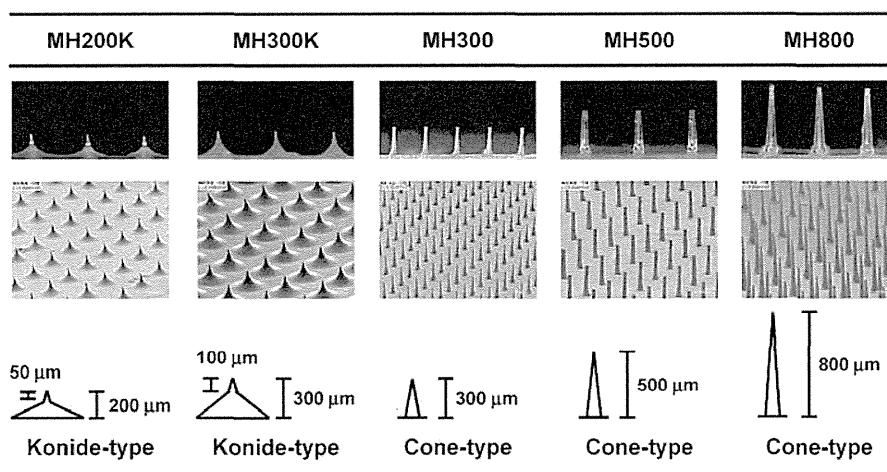
ニードルは剛性に優れる、成形し易い、といった利点を有している一方で、生体内で折れ残り、重篤な組織傷害を引き起こす危険性を払拭できないことが実用化を困難にしている。そこで近年では、第二世代マイクロニードルとして、生分解性バイオポリマーや生体由来成分であるヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などを利用した溶解型マイクロニードルの開発が注目されている [Fig. 2(D)].³³⁻³⁵⁾ 第二世代マイクロニードルは、生体適合性に優れる素材を使用し、マイクロニードル自体が溶解することによって装填あるいは吸着したワクチン抗原を皮膚内へと送達するといった特徴を有する。そのため、第一世代マイクロニードルの安全面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。

5. 皮膚内溶解型マイクロニードルパッチを用いた経皮ワクチン製剤

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パッチ (MicroHyal[®]; MH) を用いた経皮ワクチン製剤の開発を進めている.³⁵⁻³⁸⁾ 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調整することができる [Fig. 3(A)]. MH をマウスやラットの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、その針部に装填できる物質であれば可溶性タンパク質のみならず、粒子状物質をも生きた表皮並びに真皮へと確実に送達可能である [Fig.

3(B)].³⁵⁾ そこで、可溶性タンパク質抗原である破傷風・ジフテリアトキソイドを装填した MH 製剤をラットの背部皮膚に貼付したところ、従来の注射ワクチン接種群と同様のプロファイルで血中トキソイド特異的抗体価が上昇し、それらの抗体は毒素に対する中和活性を発揮した.³⁶⁾ また、粒子状抗原であるインフルエンザ HA 抗原を装填した MH 製剤をマウス背部皮膚に貼付した際にも筋肉内注射接種 (intramuscular injection; IMI) 群に匹敵する HA 特異的抗体産生が認められ [Fig. 4(A)], 産生された抗体のインフルエンザウイルス感染阻止活性 (HA 抗原の赤血球凝集に対する阻止活性; HI 価) については、経皮接種 (transcutaneous immuniza-

(A)



(B)

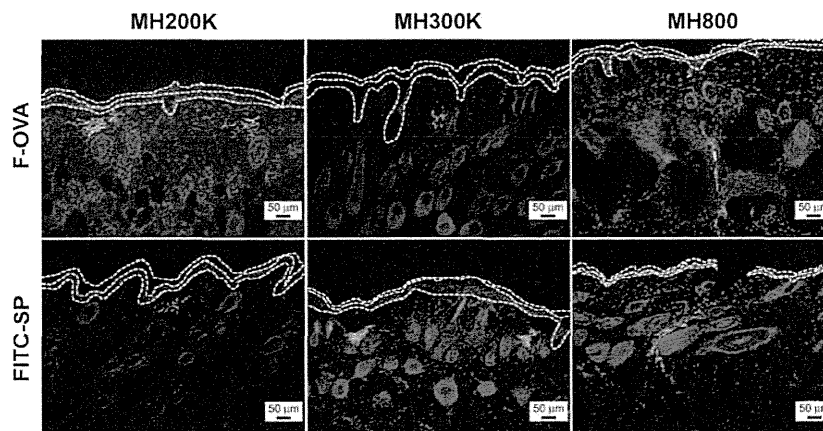


Fig. 3. Dimension (A) and Antigen Delivery Properties (B) of Self-dissolving Microneedle Array (MicroHyal; MH)

A: The microneedle of the MH series is controllable to various shapes and length. B: MH200K, MH300K, or MH800 loaded with fluorescein-labeled ovalbumin (F-OVA) or fluorescein isothiocyanate-labeled silica particles (300 nm in diameter; FITC-SP) were applied on the back skin of mice for 1 h. The skin frozen section (8- μ m thick) were photographed under a fluorescence microscope. The nucleus was counterstained using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The white dotted lines indicate the surfaces of the stratum corneum, epidermis, and superficial dermis, respectively, from top to bottom.

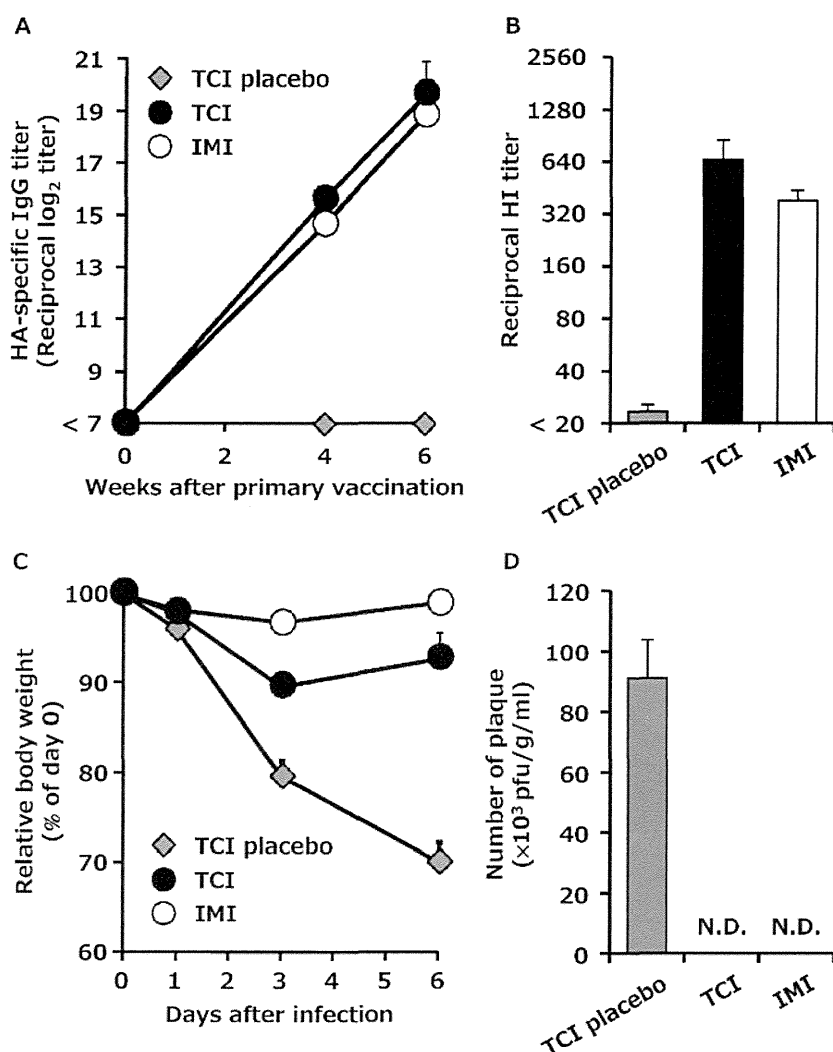


Fig. 4. Protection of Vaccinated Mice against Influenza Virus Challenge

BALB/c mice were transcutaneously vaccinated with MH containing 0.4 μ g of hemagglutinin (HA) antigen from influenza virus [A/PR/8/34(H1N1)] for 6 h twice at 4-week intervals (TCI group). Control groups were transcutaneously treated with MH application without HA antigen (TCI placebo group) or intramuscularly injected with 0.4 μ g of HA antigen (IMI group), twice at 4-week intervals. These mice were intranasally infected with 6×10^5 plaque-forming unit (PFU) of the A/PR/8/34 (H1N1) virus. A: At the indicated points, sera collected from these mice were assayed for the HA-specific IgG titer by ELISA. B: Two weeks after the final vaccination, sera collected from these mice were assayed for the hemagglutination inhibition (HI) titer. C: Body weight was measured and is presented as a percentage of the initial weight before infection (day 0). D: Six days after infection, the lungs were collected from these mice and number of viruses in the lung homogenate was determined using a plaque assay system. Data are expressed as mean \pm S.E. of results from 13 (A and B) or 10 (C and D) mice.

tion; TCI) 群のほうが IMI 群よりも高値を示した [Fig. 4(B)].³⁶⁾ さらに、これらワクチン投与マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させたところ、プラセボ群では著しい体重減少や肺組織内でのウイルス増殖が認められたのに対し、TCI 群では全例においてそれらの感染症状を示さず、MH 製剤が感染防御に非常に効果的な経皮ワクチン製剤であることが実証された [Figs. 4(C) and (D)].³⁶⁾

これらの基礎・前臨床研究の成果に基づき、筆者らは MH を応用したインフルエンザ経皮ワクチン製剤のヒトでの安全性及び有効性を検証すべく、倫

理委員会の審査・承認の下健康成人男性ボランティアを対象とした臨床研究を実施した。まずパイロットスタディーとして、針長 800 μ m の MH をヒト皮膚に適用した際の針部溶解性を観察したところ、貼付 6 時間後には対象とした 3 人の被験者全員において MH の針部は根元まで溶解した [Fig. 5(A)].³⁸⁾ また、MH 貼付後の皮膚を共焦点レーザー生体顕微鏡により観察すると、皮膚表面には整列した微小針による穿刺孔が多数認められ、三次元画像の構築からそれらの穿刺孔が確実に角質層を突破して生きた表皮・真皮にまで到達していることを確認した

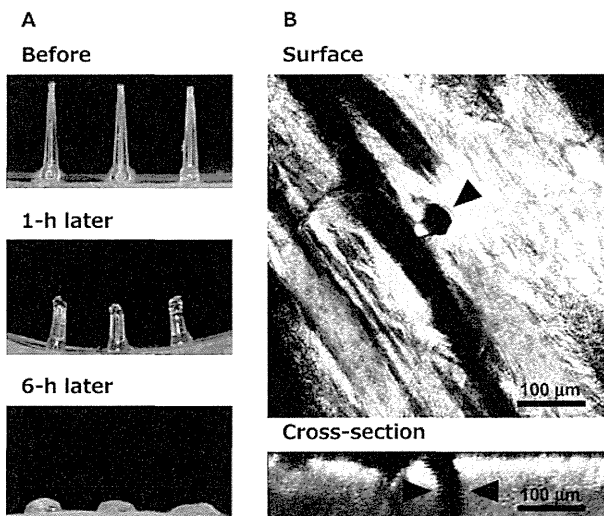


Fig. 5. Needle-dissolution of MH800 (A) and Status of Skin Treated with MH800 (B) in Humans

The MH800 was applied to the skin of left lateral upper arm of healthy volunteers. A: One or 6 h later, the microneedle arrays were observed under stereoscopic microscope. B: Five seconds after MH800-application, skin images were photographed under *in vivo* confocal scanning laser microscope.

[Fig. 5 (B)].³⁸⁾ そこで、20人の被験者を対象にMHを6時間貼付した後の経過観察・問診・血液検査を実施したところ、重篤な皮膚局所反応や全身性の副作用は認められず、MHがヒト皮膚に対しても安全に適用できる経皮ワクチンデバイスであることが示された。³⁸⁾ これらの結果を踏まえて、三価季節性インフルエンザHA抗原を装填したMH製剤を作製し、20人の被験者に3週間隔で2回貼付した際の安全性及び有効性を従来の皮下注射接種した被験者群と比較する臨床研究プロトコルを実施した。HA抗原装填MH製剤を貼付した被験者において、重篤な皮膚刺激性・起炎性は認められず、全身性の副反応を伴うことなく皮下注射群とほぼ同等の血中HI抗体価の上昇が確認できた(投稿準備中)。本臨床研究結果は、筆者らのMHを応用した経皮ワクチン製剤が注射に代わる簡便、低侵襲、安全、有効なワクチン接種法として極めて有望であることを示すものであり、新規剤形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接種、開発途上国へのワクチン普及など、世界的な感染症対策に大きく貢献できるものと考えられる。

6. おわりに

従来の注射ワクチン製剤に代わる新規剤形ワクチ

ンとして、「貼るワクチン」のほかにも抗原を経鼻投与する「吸うワクチン」^{39,40)}や経口投与する「飲むワクチン」^{41,42)}の開発が進められており、最近では経鼻噴霧型のインフルエンザ生ワクチンとしてFluMist® (MedImmune)が米国で承認・実用化された。わが国においてもこのような次世代型ワクチンの研究に多大な国家予算が投じられており、新規ワクチンに対する非臨床・臨床・アジュバントのガイドラインの策定など、産学官連携体制によってその開発を加速する対策もとられている。革新的ワクチン技術に対する社会的ニーズの高まりに対して、筆者ら独自のMHを応用した経皮ワクチン製剤は、ワクチン接種を簡便、安全、安価にすることでワクチンの世界的普及を強力に推進し、感染症に対して安全・安心な社会の実現に大きく貢献できる可能性を有する。本稿で紹介した基礎研究から臨床研究までの成果が、近い将来、世界初、日本発の理想的なワクチン製剤の上市という形で予防医療の一翼を担うことを期待したい。

謝辞 本研究の遂行に有益な御助言及び御支援を賜りました大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授 中川晋作先生に心より感謝いたします。本研究は、コスメディ製薬株式会社 代表取締役 神山文男先生、同取締役 権 英淑先生、奈良県立医科大学皮膚科学教室 教授 浅田秀夫先生、大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学講座 助教 小豆澤宏明先生との共同による成果であります。この場をお借りして御礼申し上げます。また、各種ワクチン抗原を御供与頂きました一般財団法人阪大微生物病研究会に感謝いたします。さらに、本研究における実験・解析を不断の努力により進めて頂きました大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野 助教 廣部祥子先生を始めとする研究室員諸氏に敬意を表するとともに厚く御礼申し上げます。なお本研究は、独立行政法人医薬基盤研究所「先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業」、厚生労働科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業」、並びに文部科学省科学研究費補助金「基盤研究(B)」の助成を受けて実施したものです。

REFERENCES

- 1) Valladeau J., Saeland S., *Semin. Immunol.*, **17**, 273-283 (2005).

- 2) Sugita K., Kabashima K., Atarashi K., Shimauchi T., Kobayashi M., Tokura Y., *Clin. Exp. Immunol.*, **147**, 176–183 (2007).
- 3) Barry B. W., *Nat. Biotechnol.*, **22**, 165–167 (2004).
- 4) Belshe R. B., Newman F. K., Cannon J., Duane C., Treanor J., Van Hoecke C., Howe B. J., Dubin G., *N. Engl. J. Med.*, **351**, 2286–2294 (2004).
- 5) Kenney R. T., Frech S. A., Muenz L. R., Villar C. P., Glenn G. M., *N. Engl. J. Med.*, **351**, 2295–2301 (2004).
- 6) Laurent P. E., Bonnet S., Alchas P., Regolini P., Mikszta J. A., Pettis R., Harvey N. G., *Vaccine*, **25**, 8833–8842 (2007).
- 7) Prymula R., Usluer G., Altinel S., Sichova R., Weber F., *Adv. Ther.*, **29**, 41–52 (2012).
- 8) Weaver J. C., *Methods Mol. Biol.*, **55**, 3–28 (1995).
- 9) Zhao Y. L., Murthy S. N., Manjili M. H., Guan L. J., Sen A., Hui S. W., *Vaccine*, **24**, 1282–1290 (2006).
- 10) Cristillo A. D., Weiss D., Hudacik L., Restrepo S., Galmin L., Suschak J., Draghia-Akli R., Markham P., Pal R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 29–35 (2008).
- 11) Hirao L. A., Wu L., Khan A. S., Satishchandra A., Draghia-Akli R., Weiner D. B., *Vaccine*, **26**, 440–448 (2008).
- 12) Kelly K., Loskutov A., Zehrunge D., Puaa K., LaBarre P., Muller N., Guiqiang W., Ding H. G., Hu D., Blackwelder W. C., *Vaccine*, **26**, 1344–1352 (2008).
- 13) Roberts L. K., Barr L. J., Fuller D. H., McMahon C. W., Leese P. T., Jones S., *Vaccine*, **23**, 4867–4878 (2005).
- 14) Jones S., Evans K., McElwaine-John H., Sharpe M., Oxford J., Lambkin-Williams R., Mant T., Nolan A., Zambon M., Ellis J., Beadle J., Loudon P. T., *Vaccine*, **27**, 2506–2512 (2009).
- 15) Aboud S., Nilsson C., Karlén K., Marovich M., Wahren B., Sandström E., Gaines H., Biberfeld G., Godoy-Ramirez K., *Clin. Vaccine Immunol.*, **17**, 1124–1131 (2010).
- 16) Gupta P. N., Mishra V., Rawat A., Dubey P., Mahor S., Jain S., Chatterji D. P., Vyas S. P., *Int. J. Pharm.*, **293**, 73–82 (2005).
- 17) Schlosser E., Mueller M., Fischer S., Basta S., Busch D. H., Gander B., Groettrup M., *Vaccine*, **26**, 1626–1637 (2008).
- 18) Glenn G. M., Taylor D. N., Li X., Frankel S., Montemarano A., Alving C. R., *Nat. Med.*, **6**, 1403–1406 (2000).
- 19) Naito S., Maeyama J., Mizukami T., Takahashi M., Hamaguchi I., Yamaguchi K., *Vaccine*, **25**, 8762–8770 (2007).
- 20) Ishii Y., Nakae T., Sakamoto F., Matsuo K., Matsuo K., Quan Y. S., Kamiyama F., Fujita T., Yamamoto A., Nakagawa S., Okada N., *J. Control. Release*, **131**, 113–120 (2008).
- 21) Matsuo K., Ishii Y., Quan Y. S., Kamiyama F., Mukai Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S., *J. Control. Release*, **149**, 15–20 (2011).
- 22) Matsuo K., Ishii Y., Quan Y. S., Kamiyama F., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 586–589 (2011).
- 23) Matsuo K., Ishii Y., Quan Y. S., Kamiyama F., Asada H., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1835–1840 (2011).
- 24) Hirobe S., Matsuo K., Quan Y. S., Kamiyama F., Morito H., Asada H., Takaya Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Vaccine*, **30**, 1847–1854 (2012).
- 25) Matsuo K., Ishii Y., Kawai Y., Saiba Y., Quan Y. S., Kamiyama F., Hirobe S., Okada N., Nakagawa S., *J. Pharm. Sci.*, **102**, 1936–1947 (2013).
- 26) Gerstel M. S., Place V. A., U.S. Patent No. 3, 964, 482 (1976).
- 27) Henry S., McAllister D. V., Allen M. G., Prausnitz M. R., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 922–925 (1998).
- 28) Ding Z., Verbaan F. J., Bivas-Benita M., Bungenier L., Huckriede A., van den Berg D. J., Kersten G., Bouwstra J. A., *J. Control. Release*, **136**, 71–78 (2009).
- 29) Mikszta J. A., Alarcon J. B., Brittingham J. M., Sutter D. E., Pettis R. J., Harvey N. G., *Nat. Med.*, **8**, 415–419 (2002).
- 30) Van Damme P., Oosterhuis-Kafeja F., Van der Wielen M., Almagor Y., Sharon O., Levin Y., *Vaccine*, **27**, 454–459 (2009).
- 31) Gill H. S., Prausnitz M. R., *Pharm. Res.*, **24**, 1369–1380 (2007).
- 32) Hiraishi Y., Nandakumar S., Choi S. O., Lee

- J. W., Kim Y. C., Posey J. E., Sable S. B., Prausnitz M. R., *Vaccine*, **29**, 2626–2636 (2011).
- 33) Sullivan S. P., Koutsonanos D. G., Del Pilar Martin M., Lee J. W., Zarnitsyn V., Choi S. O., Murthy N., Compans R. W., Skountzou I., Prausnitz M. R., *Nat. Med.*, **16**, 915–920 (2010).
- 34) Naito S., Ito Y., Kiyohara T., Kataoka M., Ochiai M., Takada K., *Vaccine*, **30**, 1191–1197 (2012).
- 35) Matsuo K., Yokota Y., Zhai Y., Quan Y. S., Kamiyama F., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *J. Control. Release*, **161**, 10–17 (2012).
- 36) Matsuo K., Hirobe S., Yokota Y., Ayabe Y., Seto M., Quan Y. S., Kamiyama F., Tougan T., Horii T., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *J. Control. Release*, **160**, 495–501 (2012).
- 37) Hiraishi Y., Nakagawa T., Quan Y. S., Kamiyama F., Hirobe S., Okada N., Nakagawa S., *Int. J. Pharm.*, **441**, 570–579 (2013).
- 38) Hirobe S., Azukizawa H., Matsuo K., Zhai Y., Quan Y. S., Kamiyama F., Suzuki H., Katayama I., Okada N., Nakagawa S., *Pharm. Res.*, **30**, 2664–2674 (2013).
- 39) Nochi T., Yuki Y., Takahashi H., Sawada S., Mejima M., Kohda T., Harada N., Kong I. G., Sato A., Kataoka N., Tokuhara D., Kurokawa S., Takahashi Y., Tsukada H., Kozaki S., Akiyoshi K., Kiyono H., *Nat Mater.*, **9**, 572–578 (2010).
- 40) van Riet E., Ainaï A., Suzuki T., Hasegawa H., *Vaccine*, **30**, 5893–5900 (2012).
- 41) Nochi T., Takagi H., Yuki Y., Yang L., Masumura T., Mejima M., Nakanishi U., Matsumura A., Uozumi A., Hiroi T., Morita S., Tanaka K., Takaiwa F., Kiyono H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10986–10991 (2007).
- 42) Wilkhu J., McNeil S. E., Kirby D. J., Perrie Y., *Ther. Deliv.*, **2**, 1141–1164 (2011).

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

* 大阪大学大学院薬学研究科
薬剤学分野

廣部祥子, 岡田直貴,
中川晋作

はじめに

感染症は古くから人類へ多大なる影響を与えてきた疾患であり、未だに世界における死亡原因の約4分の1を占める。また、現在の発達した交通網は国境を越えた病原体の移動を容易にしており、新興あるいは再興感染症が発生した際に瞬く間に世界的流行へと発展することが危惧されている。このような社会背景の下、感染症の阻止に最も効果的な対策となるワクチンが再び注目されている。

しかしながら、現行の注射型ワクチン製剤は投与に医療従事者を必要とするだけでなく、ワクチン製剤の輸送・保管に一貫した低温温度管理の整備が求められているため、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く、また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という課題を有する。したがって、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さまざまな感染症ワクチンの有用性を向上させると考えられることから、筆者らは皮膚をターゲットとした経皮ワクチン製剤、すなわち「貼るワクチン」^{1,2)}の開発を進めており、その実用化に向けた取り組みを紹介する。

1. ワクチンの投与部位としての皮膚

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層に分けられる(図1)。そして皮膚は、常に外界からの異物侵入の危険にさらされているため、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。さらに、皮膚には生体を守るべく発達した免疫担当細胞が豊富に存在し、「免疫学的バリアー」が形成されている。ケラチノサイトは生きた表皮の約90%を占める細胞であり、各種サイトカインやケモカイン、増殖因子を分泌することで異物侵入に対する免疫反応に関与するとされている。また、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(LC)が、真皮には真皮樹状細胞(dDC)が存在する。したがって、角質層下のLCやdDCに抗原を効率よく送達することができれば、抗原特異的な免疫応答を誘導できるものと考えられる。しかしながら、前述したように、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、ペプチドや蛋白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ない。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皮膚内へと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を推進している。

2. マイクロニードルを用いた経皮ワクチンデリバリー

マイクロニードル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、痛みを伴わずに抗原を投与することができる。マイクロニードルという概念は1976年にGerstelとPlaceらによって初めて報告され³⁾、製造技術の困難さにより開発研究が停滞していたものの、近年の微細加工技術の発展に伴い、現在ではさまざまなマイクロニードルが開発されている。第一世代のマイクロニードル(図1左)⁴⁾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、剛性に優れる、成形しやすい、といった利点を有している^{5,6)}。しかし、第一世代マイクロニードルは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、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

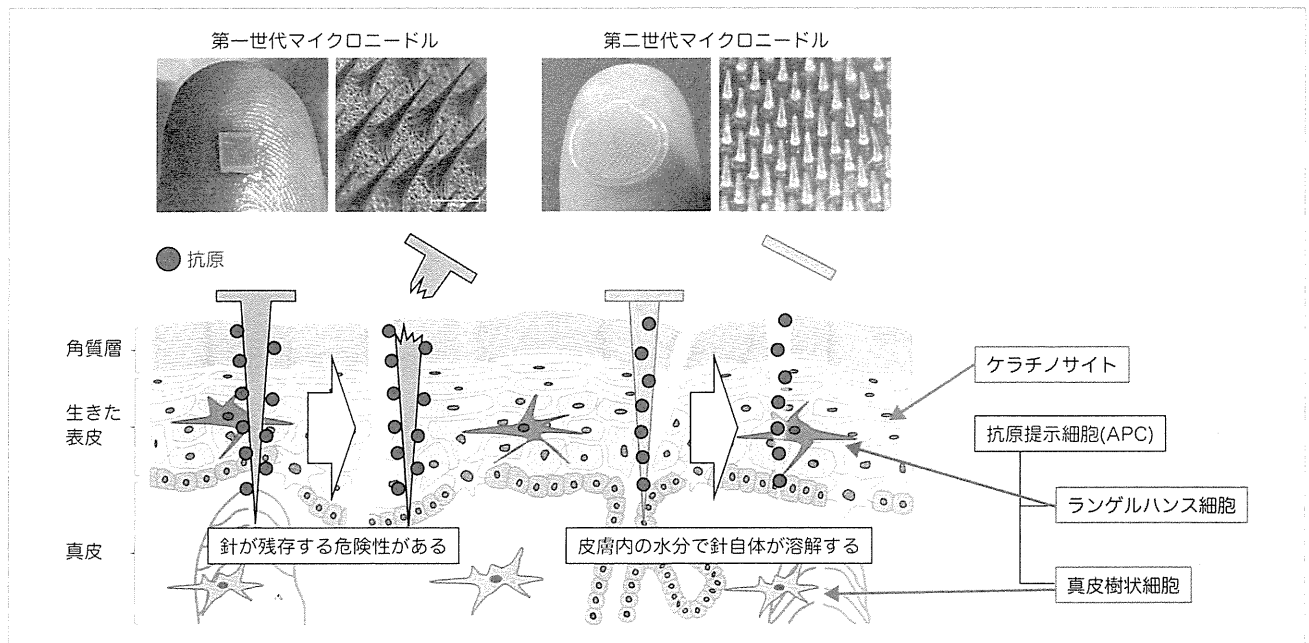


図1 マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

皮膚は免疫応答誘導の要となる抗原提示細胞としてランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞を有し、ワクチンの標的として優れた組織である。マイクロニードル法は、ただ貼るだけで痛みなく、抗原を皮膚内へと直接送達できる手法である。シリコンや金属で作製された第一世代マイクロニードルには皮膚内で折れて針が残存する危険性があるが、第二世代マイクロニードルは針自身が皮膚内で溶解するため安全性が高く、実用化が期待できる。写真は文献1(第二世代), 4(第一世代)より転載。

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^{7,8)}(図1右)。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。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。

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^{8~10)}。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、皮膚内の水分で針自身が溶解することで、装填物質を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2[A])。また動物実験において、破傷風/ジフテリアトキソイドワクチンやインフルエンザワクチンとして有効かつ安全であることを明らかにしている(図2[B])。これらの研究結果をもとに、筆者らはすでに皮膚内溶解型マイクロニードルをヒト皮膚に適用する臨床

研究を実施している。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2[C])。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確認され、その穿刺孔は三次元画像を構築し、皮膚断面を観察すると少なくとも深さ100 μm 以上にまで到達していることが判明した(図2[D])。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¹¹⁾。このように、ヒトにおいても筆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