

201307004B

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

生分解性マイクロニードルを応用した
画期的「貼るワクチン製剤」の
開発と実用化に資する研究の総合的推進

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田直貴

平成26(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

生分解性マイクロニードルを応用した
画期的「貼るワクチン製剤」の
開発と実用化に資する研究の総合的推進

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田直貴

平成26(2014)年5月

目 次

I. 総合研究報告

生分解性マイクロニードルを応用した画期的「貼るワクチン製剤」の ----- 1
開発と実用化に資する研究の総合的推進

研究代表者 大阪大学大学院薬学研究科 岡田 直貴

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 101

III. 研究成果の刊行物・別刷

総合研究報告書

生分解性マイクロニードルを応用した画期的「貼るワクチン製剤」の
開発と実用化に資する研究の総合的推進

研究代表者 岡田 直貴
大阪大学大学院薬学研究科 准教授

本研究課題では、独自に開発したマイクロニードル（MN）を基材とする経皮ワクチン製剤の開発に向けた基礎情報収集と基盤技術熟成を図った。また、ヒトにおける本製剤の安全性と有効性を検証する臨床研究を実施することによって、経皮ワクチン製剤の治験・製品化研究への移行期間の短縮に焦点を当てた。さらに、Toll様受容体リガンドを中心に経皮ワクチン製剤用のアジュバントとして有望な候補物質の探索を推進し、ワクチン抗原の用量や投与回数等の低減、免疫応答増強に基づく安定した有効性発揮を達成できる未来型インフルエンザ経皮ワクチン製剤の創出に取り組んだ。平成23年度～25年度において、1. MNの物理化学的特性解析、2. MNの安全性評価、3. MNを用いた経皮ワクチン製剤の安全性・有効性評価、4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索、について以下の成果を得た。

1. 皮膚内溶解型 MN (MH)、ナイロン6製 MN (nMN)、およびポリグリコール酸製 MN (pMN) が角質層下の皮膚組織に効率よく物質送達できる経皮ワクチンデバイスであることを実証した。また、皮膚内溶解型 MN を用いた経皮ワクチン製剤の長期安定性を確認した。
2. MH、nMN、および pMN のヒト皮膚に対する穿刺特性を明らかとし、これらのデバイスがヒトに安全に適用できることを実証した。
3. 動物実験および臨床研究において、MH を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤の安全性および有効性を実証した。また、nMN にモデル抗原としてニワトリ卵白アルブミンを装填した各経皮ワクチン製剤の免疫応答誘導能を確認した。
4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの候補物質として CpG オリゴデオキシヌクレオチドを見出し、経皮投与における安全性を確認するとともに、その作用機序の一端を明らかにした。

研究分担者 小豆澤 宏明
大阪大学大学院医学系研究科 助教

A. 研究目的

新興・再興感染症のパンデミックが脅威となっている今日、有効性・安全性に優れた新たなワクチンの開発のみならず、パンデミック発生時を想定した短時間で大量のワクチンを供給できる製造技術・体制の整備、ならびに簡便で迅速な新規ワクチン手法とその製剤化技術の開発が求められている。経皮ワクチン製剤（貼るワクチン）は、従来の注射ワクチン製剤と比較して簡便・低侵襲な投与方法であるため、ワクチンの普及および迅速大規模接種を容易にすることが可能であり、世界的に早期の実用化が待望されている。

本観点から研究代表者の岡田らは、ワクチン抗原を表皮・真皮に常在する抗原提示細胞（ランゲルハンス細胞；LC、真皮樹状細胞；dDC）へと効率よく送達できる独自のマイクロニードル（MN）技術を開発し、これを応用した新規経皮ワクチン製剤を考案した。本研究課題では、各種 MN の経皮ワクチンデバイスとしての有用性を検証する基礎研究、MN を応用した経皮ワクチン製剤の安全性・有効性を動物実験により実証する前臨床研究、をそれぞれ強力に推進することで基礎情報集積と基盤技術熟成を図った。またこれらの成果に基づき、研究分担者である小豆澤の主導により、倫理委員会の審査・承認を経てヒトにおける経皮ワクチン製剤の安全性・有効性を検証する質の高い臨床研究を実施した。

一方、ワクチンの安定した効果を保証するためには、安全性と有効性を兼備した新規アジュバントの開発が必要とされている。本邦ではアジュバントとして主に Alum（アルミニウム塩アジュバントの総称）が用いられているが、不溶性に伴う利便性の悪さやアルミニウムの毒性・細胞傷害性といった問題を抱えている。そこで本研究課題では、Toll 様受容体リガンド（TLR-L）を中

心に経皮ワクチン製剤に応用可能な可溶性アジュバント候補物質を探索し、ワクチン抗原の用量や投与回数の低減、免疫応答増強に基づく安定した有効性発揮を達成できる未来型経皮ワクチン製剤の創出を目指した基盤情報の収集に取り組んだ。

経皮ワクチン製剤は使用法が皮膚に貼付するだけという簡便性のために、ワクチンの迅速大規模接種や注射針に対して恐怖症のある小児へのコンプライアンス向上に極めて効果的である。さらには乾燥製剤として開発することで、従来の注射ワクチン製剤で必要とされる生産から消費までの一貫した低温温度管理（cold chain）を不要とし、コストダウンが図れる可能性がある。これらの特長は開発途上国へのワクチン普及を強力に推進するとともに、新興・再興感染症パンデミックやバイオテロリズム発生時に本邦の社会的・経済的損耗を最小限に食い止める方策に威力を発揮する。本研究課題において得られる成果を経皮ワクチン製剤の実用化研究を加速する基盤情報として活用し、将来的に本邦発の経皮ワクチン製剤を上市することができれば、ワクチン市場におけるインパクトと発展性は非常に大きく、安心・安全な社会の実現に大いに貢献するものとなる。

B. 研究方法

B. 1. MN の物理化学的特性解析

B. 1. 1. MN の皮膚穿刺特性

(1) MNの作製

皮膚内溶解型MN (MicroHyal; MH)、ナイロン6を素材としたソリッドMN (nMN)、ならびにポリグリコール酸を素材としたソリッドMN (pMN) の無菌的作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。

針部の長さおよび形状が異なる5種類のMH (MH200K, MH300K, MH300, MH500, MH800) は医療用ヒアルロン酸ナトリウム/ポリビニルピロリドン/デキストランの混合溶液をMN鑄型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより作製した (Fig. 1)。また、医療用ヒアルロン酸ナトリウム/ポリビニルピロリドン/デキストラン溶液にニワトリ卵白アルブミン (OVA) 溶液を混合してMN鑄型に流し込み、デシケーター内にて室温で乾燥させることにより、OVA装填MH300およびMH800を作製した。

nMNおよびpMNはそれぞれナイロン6およびポリグリコール酸を射出成形によりMN鑄型に押し込むこと作製した (Fig. 2)。

作製した各種MNはアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで室温で保管した。

(2) 針部耐荷重値の測定

各種MNの針部耐荷重値はテクスチャーアナライザー (TA.XT Plus; Stable Micro Systems) を用いて測定した。直径0.5 mmのステンレス製円盤をMNの針部の軸に対して垂直に0.6 mm/min (MH300)、0.7 mm/min (MH500)、1.1 mm/min (MH800)、あるいは0.1 mm/min (nMNおよびpMN) の速度で押しあて、微小針が折れるあるいは曲がるのに要した力 (負荷) を測定した。直径0.5 mmの円形範囲に存在するMNの針部本数 (MH300; 113本、MH500、MH800; 55本、nMN; 130本、お

よびpMN; 130本) でその負荷を除することで、微小針1本あたりの耐荷重値 (N/needle) を算出した。

(3) 動物皮膚への貼付

MNの皮膚への貼付には、バネの弾性を利用してプラスチック製円盤をMNに押し当てるバネ式アプリーケーターを用いた (Fig. 3)。マウスあるいはラットの除毛した背部皮膚上にMNを静置し、その上からバネを一杯に縮めたアプリーケーターをかぶせた。アプリーケーターのバネ縮みを解放することで円盤部分がMNを16.3 N/cm²の力で皮膚に押し込んで穿刺・圧着した。MNの剥離を防ぐために、創傷保護シート (BIOCLUSIVE; Johnson & Johnson) あるいはメンディングテープ (Scotch; 3M) で被覆した。

(4) 針部溶解過程の観察

MH200K、MH300K、MH300、MH500、あるいはMH800をBALB/cマウス (H-2^d, 雌性, 6週齢; 日本SLC)、ICRマウス (雌性, 8週齢; 日本SLC)、またはWistar STラット (雌性, 6~10週齢; 日本SLC) の除毛した背部皮膚に貼付した。マウスにおいては貼付5分後および60分後に、ラットにおいては貼付5分後、15分後、30分後、および60分後に剥離したMHの針部を実体顕微鏡 (SZX16; オリパス) あるいはデジタル顕微鏡 (VHX-1000; KEYENCE) にて観察した。

B. 1. 2. MN の皮膚内物質送達特性

(1) MN の作製

B. 1. 1. (1) に準拠して蛍光標識物質装填MH200K、MH300K、MH300、あるいはMH800を作製した。なお蛍光標識物質には、fluorescein-labeled OVA (F-OVA; Molecular Probes)、fluorescein isothiocyanate-labeled amorphous silica particle (FITC-SP; Micromod Partikel

technologie)、および FITC-labeled dextran (分子量 4000, FD4; SIGMA-ALDRICH) を使用した。作製した各種蛍光標識物質装填MHはアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

nMNおよびpMNはB. 1. 1. (1)に準拠して作製した。

(2) MHにより送達された物質の皮膚組織内局在の観察

F-OVA あるいは FITC-SP を装填した MH200K、MH300K、およびMH800をB. 1. 1. (3)に準拠して ICR マウス (雌性, 7~10 週齢; 日本 SLC) または HWY ヘアレスラット (雌性, 7~10 週齢; 日本 SLC) の除毛した背部皮膚に貼付した。貼付1時間後、3時間後、6時間後、12時間後、あるいは24時間後にMHを剥離し、適用部位の皮膚を摘出した。摘出皮膚はO. C. T. compound (サクラ精機) に包埋後、直ちに液体窒素に浸漬して凍結ブロックを作製した。厚さ 8 μm の凍結組織切片を作製し、ProLong Gold Antifade reagent with DAPI (Molecular Probes) を用いて封入したプレパラートを蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000; Keyence) にて観察することで、F-OVA あるいは FITC-SP の皮膚組織内局在を解析した。

(3) MHにより送達された物質の皮膚内滞留性の評価

FD4 を装填した MH200K、MH300K、あるいはMH800をB. 1. 1. (3)に準拠して ICR マウス (雌性, 7~10 週齢; 日本 SLC) の除毛した背部皮膚に1時間貼付した。対照群にはFD4を100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 、あるいは1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ で背部皮膚に皮内注射した。MHを剥離してから24時間ごとに、*in vivo*イメージング装置 (Maestro EX; CRI) を用いてMH貼付局所におけるFD4の滞留性

を観察した。なお、FD4はBlueフィルターを用いて露光時間800 msで蛍光撮影した。

また、F-OVA (10 μg) を装填した MH300をB. 1. 1. (3)に準拠してHR-1ヘアレスマウス (雌性, 6 週齢; 日本 SLC) の背部皮膚に1時間貼付した。対照群には、F-OVA (10 μg)/PBS溶液あるいはMHをPBSに溶解した液とF-OVA (10 μg) 溶液との混合溶液をHR-1ヘアレスマウスの背部皮膚に50 $\mu\text{L}/\text{site}$ で皮内注射した。MH剥離直後 (皮内注射1時間後) を0時間とし、0時間、3時間後、12時間後、24時間後、48時間後、および72時間後に *in vivo*イメージング装置 (Maestro EX) を用いてMH貼付局所あるいは皮内投与局所におけるF-OVAの滞留性を観察した。なお、F-OVAはBlueフィルターを用いて露光時間200 msで蛍光撮影した。

(4) 親水性ゲルパッチの作製

親水性ゲルパッチの作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。

アクリル粘着剤、湿潤剤、経皮吸収促進剤などの混合溶液 (HGA1015) をPET離型紙上に塗布し、連続乾燥により溶媒を揮散させて粘着層を形成させた。実験に供するまで室温で保管した。

(5) Puncturing 法による経皮投与 (Fig. 4)

ICR マウス (雌性, 10 週齢; 日本 SLC) の除毛した背部皮膚にB. 1. 1. (3)に準拠してnMNあるいはpMNを貼付し、5秒後に剥離して穿孔した部位にF-OVA溶液 (5 mg/mL) を5 μL 滴下した。上からMNと同サイズ (直径; 1 cm) の親水性ゲルパッチを貼付した。親水性ゲルパッチの剥離を防ぐためにメンディングテープで被覆した。

(5) Puncturing法により送達された物質の

皮膚組織内局在の観察

B. 1. 2. (5)に準拠してF-OVAを経皮投与し、6時間後に摘出した皮膚組織内におけるF-OVAの局在をB. 1. 2. (2)に準拠して解析した。

B. 1. 3. MHの針部耐荷重値に与える湿度の影響

(1) MHの作製

B. 1. 1. (1)に準拠してMH800を作製した。

(2) 各種湿度条件下でのMHの保管

各種湿度条件の調整は飽和塩法に従った。デシケーター内にモレキュラーシーブスまたは各種塩（塩化リチウム、酢酸カリウム、塩化マグネシウム、炭酸カリウム、塩化ナトリウム）の過飽和水溶液を入れることにより、容器内の湿度を0, 11, 22, 33, 44, 75%に調整した。アルミラミネートPETパックから取り出したMHを各種湿度条件下のデシケーター内で1週間保管した。

(3) 針部耐荷重値および水分活性の測定

各種湿度条件下で1週間保管したMHの針部耐荷重値はB. 1. 1. (2)に準拠し、温度20.8°C、湿度51.2%の環境下で測定した。また、MHの水分活性は水分活性測定システム（rotoronic hygrolab）を用いて測定した。

B. 1. 4. MH製剤の長期保存性

(1) MHの作製

B. 1. 1. (1)に準拠してワクチン抗原装填MH800を作製した。なおワクチン抗原には、阪大微生物病研究会より供与を受けた破傷風トキソイド（TT）、ジフテリアトキソイド（DT）、および三価季節性インフルエンザHA抗原（A/California/7/2009（H1N1）株由来HA抗原、A/Victoria/210/2009（H3N2）株由来HA抗原、B/Brisbane/60/2008株由来HA抗原）を使用した。作製したTT/DT装填MH800

および三価季節性インフルエンザHA抗原（3-HA）装填MH800はアルミラミネートPETパックに密封包装し、4°C、25°C、あるいは40°Cにおいて6ヶ月間あるいは12ヶ月間保管した。

(2) 針部耐荷重値の測定

MH製剤の針部耐荷重値の測定は、B. 1. 1. (2)に準拠した。

(3) 針部溶解過程の観察

6ヶ月間あるいは12ヶ月間保管したTT/DT装填MH800をB. 1. 1. (3)に準拠してWistar STラット（雌性、6週齢；日本SLC）の除毛した背部皮膚に貼付した。貼付5分後あるいは60分後に剥離したMHの針部を実体顕微鏡（SZX16）にて観察した。

(4) 長期保管したTT/DT装填MH800の免疫誘導能の解析

6ヶ月間あるいは12ヶ月間保管したTT/DT装填MH800をB. 1. 1. (3)に準拠してWistar STラット（雌性、6週齢；日本SLC）の除毛した背部皮膚に6時間貼付した。この経皮免疫操作を2週間隔で5回繰り返した。

経時的に回収した血清におけるTT/DT特異的IgG抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate-buffered solution (pH 9.6) で10 µg/mLに調製したTTあるいはDTを50 µL/wellで96-well ELISA plateに分注し、4°Cで一晩静置することで固相化した。2%ブロッカー（DSファーマバイオメディカル）/PBSを200 µL/wellで添加し、37°Cで2時間ブロッキング処理を行った。0.4%ブロッカー/Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TBST) で連続1/2倍希釈した血清検体を50 µL/wellで添加し、室温で2時間反応させた。各wellをTBSTで3回洗浄し、0.4%ブロッカー

/TBST を用いて 1/10,000 倍希釈した Horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Southern Biotech) を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で 2 時間反応させた後、各 well を TBST で 3 回洗浄し、TMB 溶液 (Moss Inc.) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H_2SO_4 を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加して反応を停止し、吸光波長 450 nm、副波長 655 nm にて吸光度を測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率の逆数の対数を Reciprocal \log_2 titer として表した。

また、最終免疫から 1 ヶ月経過したラットに、致死量 (1 $\mu\text{g}/\text{head}$) の破傷風毒素 (Sigma-Aldrich) を大腿内側皮下投与し、4 日間生存を観察する耐過試験を行った。

(5) HA 抗原の定量

作製直後ならびに 6 ヶ月間保管後の 3-HA 装填 MH800 を PBS に溶解し、試料溶液とした。試料溶液と 4% SDS 溶液とを等量混合し、Lowry 法 (DC Protein Assay Kit; BioRad) によりタンパク量を測定した。なお標準品には、MH の作製に用いた 3-HA 溶液を用いた。また、試料溶液中のヒアルロン酸濃度を ELISA 法 (QnE Hyaluronic Acid (HA) ELISA Assay; Biotech Trading Partners) により測定し、ヒアルロン酸 1 mg に対する HA 抗原量 (μg) を算出した。

(6) HA 価の測定

B. 1. 4. (5) の試料溶液ならびに 4°C、25°C、あるいは 40°C において 6 ヶ月間保管した 3-HA 溶液を PBS により 1 μg (HA 抗原)/mL から連続 1/2 倍希釈し、96-well plate に 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。0.5%ニワトリ赤血球浮遊液 (日本バイオテスト研究所) を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、700 rpm で 1 分間攪拌後、室温で 1 時間静置した。その後プレートを

傾けて赤血球の凝集を判定し、完全凝集を与える最小 HA 抗原希釈値の逆数を HA 価とした。なお、プレートを傾けて血球が流れたものを非凝集と判定した。

(7) 長期保管した 3-HA 装填 MH800 の免疫誘導能の解析

B. 1. 4. (5) の試料溶液を PBS により 100 ng (HA 抗原)/mL に希釈し、100 μL を BALB/c マウス (H-2^d, 雌性, 6 週齢; 日本 SLC) の背部に皮下注射した。この免疫操作を 4 週間隔で 2 回実施した。2 回目の免疫から 2 週間後にマウス尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpm で 15 分間遠心分離することで血清を得た。

血清中の HA 特異的抗体価は ELISA 法により測定した。50 mM bicarbonate-buffered solution (pH 9.6) でウサギ抗インフルエンザ HA 抗体 [clone 376 for A/H1N1, clone 2 for A/H3N2, clone 004 for B; Sino Biological Inc.] をそれぞれ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、40 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 96-well ELISA plate に分注後 4°C で一晩静置することで固相化した。各 well を TBST で 3 回洗浄後、8%スキムミルク/PBS を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、37°C で 2 時間ブロッキング処理を行った。8%スキムミルク/PBS で各インフルエンザ HA 抗原を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、25 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加後、室温で 2 時間反応させた。各 well を TBST で 5 回洗浄後、8%スキムミルク/PBS で連続 1/2 倍希釈したサンプルを 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で 2 時間反応させた。各 well を TBST で 5 回洗浄し、8%スキムミルク/PBS を用いて 1/5000 希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Southern Biotech) を 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で 2 時間反応させた後、各 well を TBST で 7 回、純水で 1 回洗浄し、TMB 溶液 (Moss Inc.) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H_2SO_4 を 100

μL/well で添加して反応を停止し、吸光波長 450 nm、副波長 655 nm にて吸光度を測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率の逆数の対数を Reciprocal log₂ titer として表した。

B. 2. MN の安全性評価

B. 2. 1. MH のラット皮膚における安全性評価

(1) MHの作製

B. 1. 1. (1)に準拠して MH200K、MH300K、MH300、MH500、およびMH800 を作製した。

(2) 皮膚刺激性の評価

MH200K、MH300K、MH300、MH500、あるいはMH800をB. 1. 1. (3)に準拠してWistar STラット（雌性、6～10週齢；日本SLC）の除毛した背部皮膚に30分間あるいは6時間貼付した。各MHを剥離してから5分後、2時間後、6時間後、24時間後、および48時間後に貼付部位の皮膚を観察し、Draize の評価基準（Table 1）に従って紅斑および浮腫の程度をスコア化した。

(3) 皮膚電気抵抗値の測定

MH200K、MH300K、あるいはMH800をB. 1. 1. (3)に準拠してWistar STラット（雌性、6週齢；日本SLC）の除毛した背部皮膚に30分間貼付した。各MHを剥離してから5分後、15分後、30分後、60分後、および120分後に貼付部位皮膚の電気抵抗値を測定した。電気抵抗値はPocket Tester (CDM-03D; CUSTOM) の電極の一方をMH適用部位に、もう一方をMH非適用部位に当てることで測定した。対照群には、Scotch tape (住友3M) を用いたテープストリッピングにより角質層を物理的に除去したラットを用意した。

B. 2. 2. MH のヒト皮膚における穿刺特性

(1) MHの作製

B. 1. 1. (1)に準拠してMH500、MH800、および針部を持たないMH (MH-needleless) を作製した。なお本臨床研究には、物性試験、異物試験、微生物学的検査に適格したMHを使用した。

(2) ヒト皮膚への貼付

MHを被験者の上腕外側皮膚に置き、バネ式アプリケーションャーを用いて皮膚に圧着させた (Fig. 5)。

(3) 共焦点レーザー生体顕微鏡によるMH貼付部位の観察

健康成人男性被験者2名にMH500およびMH800を貼付し、5秒後、1時間後、および2時間後に剥離した。MH剥離後の皮膚を共焦点レーザー生体顕微鏡 (VivaScope 1500; Lucid) により観察した。皮膚表面から深部に向けて1 μm間隔で撮影した連続断層像をデジタル処理により3次元化し、深さ100 μmの皮膚断面像を構築した。また、縦横8枚ずつ視野をずらして撮影した64枚の画像をデジタル処理によって結合し、皮膚状態を広範囲に観察した。

(4) 針部溶解過程の観察

健康成人男性被験者3名にMH800を貼付し、5秒後、1時間後、および6時間後に剥離した。剥離したMH800の針部を実体顕微鏡 (SZX16) にて観察した。

(5) 皮膚水分蒸散量 (transepidermal water loss; TEWL) の測定

健康成人男性被験者3名にMH800を貼付し、5秒後、1時間後、および6時間後に剥離した。MH-needlelessも同様に貼付し、6時間後に剥離した。剥離してから5秒後、17分後、30分後、および60分後にTEWLを携帯型水分蒸

散量測定装置 (Mobile Tewameter MSC100/TM30; Courage + Khazaka electronic GmbH) により測定した。

B. 2. 3. MH のヒトにおける安全性評価 (Table 2)

(1) MHの作製

B. 1. 1. (1) に準拠してMH300K、MH500、MH800、およびMH-needlelessを作製した。なお本臨床研究には、物性試験、異物試験、微生物学的検査に適格したMHを使用した。

(2) MHの貼付

B. 2. 2. (2) に準拠して健康成人男性被験者20名 (25歳～56歳) の上腕外側皮膚にMH300、MH500、MH800、およびMH-needlelessを6時間貼付した。

(3) 安全性評価

MH貼付開始から2日後および3日後に自覚症状についての問診を行うとともに、MH適用皮膚局所を観察し、International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) の判定基準 (Table 3) に従った皮膚刺激性評価を実施した。また、17名の被験者においては皮膚局所反応として紫斑の有無も評価した。

さらに、MH貼付前ならびに貼付2日後に採取した血液を用いて血算検査 (ヘモグロビン、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、MCV、MCH、MCHC、血小板数)、生化学検査 (C-反応性蛋白; CRP、BUN、クレアチニン、AST、ALT、LDH、GGT) を行った。

(4) 疼痛評価

17名の被験者においては、MH貼付時の痛みを疼痛VAS (Visual Analogue Scale; 無痛を0、考え得る最大の痛みを100とする) 法により評価した。

B. 2. 4. nMN および pMN のヒト皮膚における穿刺特性および安全性評価 (Table 4)

(1) MNの作製

B. 1. 1. (1) に準拠してnMNならびにpMNを作製した。なお本臨床研究には、物性試験、異物試験、微生物学的検査に適格したMNを使用した。

(2) ヒト皮膚への貼付

20～60歳代の健康男性10人を被験者として、上腕外側皮膚にnMNとpMNを30分間貼付した。MNの貼付にはカセット型のMNをセットして用いるバネ式アプリーケーターを使用した (Fig. 6)。

(3) 疼痛評価

B. 2. 3. (4) に準拠して疼痛VAS法により評価した。

(4) TEWLの測定

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

(4) 皮膚局所反応の評価

MN貼付から2日後および7日後に自覚症状についての問診を行うとともに、MN適用皮膚局所を観察し、ICDRGの判定基準 (Table 3) に従った皮膚刺激性評価を実施した。また、皮膚局所反応として紫斑の有無も評価した。

B. 3. MN を用いた経皮ワクチン製剤の安全性・有効性評価

B. 3. 1. OVA 装填 MH 製剤を用いたアレルギー誘発試験

(1) OVA装填MH製剤の作製

B. 1. 1. (1) に準拠してOVA装填MH200K、MH300K、あるいはMH800を作製した。これら

をアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) OVAの投与

Hartleyモルモット（雌性，8週齢；日本SLC）にOVAを下記の5群に分けて投与した。

- ① OVA装填MH200K貼付（TCI（MH200K））群：
OVAを1 μg 装填したMH200KをB. 1. 1. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に6時間貼付した。この免疫操作を2週間隔で4回繰り返した。
- ② OVA装填MH300K貼付（TCI（MH300K））群：
OVAを1 μg 装填したMH300KをB. 1. 1. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に6時間貼付した。この免疫操作を2週間隔で4回繰り返した。
- ③ OVA装填MH800貼付（TCI（MH800））群：
OVAを1 μg 装填したMH800をB. 1. 1. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に6時間貼付した。この免疫操作を2週間隔で4回繰り返した。
- ④ 皮下注射免疫（SCI）群：OVA（1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ）を背部に皮内注射した。この免疫操作を2週間隔で5回繰り返した。
- ⑤ 腹腔内注射免疫（IPI）群（Alum併用）：
OVA 1 μg とAlum 5 mgとの混合液100 μL を腹腔内に投与した。この免疫操作を2週間隔で2回繰り返した。

(3) 血清中OVA特異的IgG抗体価およびIgE抗体価の測定

経時的にモルモットの足静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpmで15分間遠心分離することで血清を得た。

血清中OVA特異的IgG抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate-buffered solution (pH 9.6)で10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したOVAを50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で96-well ELISA plateに分注し、4°Cで一晩静置することで固相化した。2%ブロッ

クス/PBSを200 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、37°Cで2時間ブロッキング処理を行った。0.4%ブロックス/PBSで連続1/2倍希釈した血清を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で2時間反応させた。各wellをTBSTで3回洗浄し、0.4%ブロックス/PBSを用いてメーカー推奨濃度に希釈したHRP標識ヤギ抗モルモットIgG抗体（Southern Biotech）を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で2時間反応させた後、各wellをTBSTで3回洗浄し、TMB溶液（Moss Inc.）を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H_2SO_4 を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加して反応を停止し、吸光波長450 nm、副波長655 nmにて吸光度を測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が0.1以上高い最大希釈倍率の逆数の対数をReciprocal \log_2 titerとして表した。

血清中OVA特異的IgE抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate-buffered solution (pH9.6)で10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した抗モルモットIgE抗体を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で96-well ELISA plateに分注し、4°Cで一晩静置することで固相化した。3%ウシ血清アルブミン（BSA；SIGMA-ARDRICH）/PBSを200 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で1時間ブロッキング処理を行った。1%BSA/TBSTで1/16倍希釈したサンプルを50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、4°Cで3時間反応させた。各wellをTBSTで3回洗浄し、ビオチン化OVAを50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。4°Cで3時間反応させた後、各wellをTBSTで3回洗浄し、1%BSA/TBSTを用いてメーカー推奨濃度に希釈したHRP標識ヤギ抗ビオチン抗体（Vector Laboratories Inc.）を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。4°Cで3時間反応させた後、各wellをTBSTで3回洗浄し、TMB溶液（Moss Inc.）を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H_2SO_4 を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加して反応を停止

し、吸光波長 450 nm、副波長 655 nm にて吸光度を測定した。

(4) モルモット抗血清に対するラット受動的皮膚アナフィラキシー反応 (PCA反応)

最終免疫2週間後に回収したモルモットの血清 (IPI群のみ1/128倍希釈血清) 100 μ Lを除毛したラットの背部に皮内注射した。24時間後にEvans blue (5 mg/mL) + OVA (2.5 mg/mL) 溶液を1 mL/mouseで尾静脈内投与し、30分後にそれぞれのラットの背部皮膚を摘出した。皮膚の裏面に露出したEvans blueの青斑の長径と短径を計測し、[(長径 + 短径)/2]が5以上の場合をPCA陽性と判断した。

(5) モルモット能動的全身性アナフィラキシー反応 (ASA反応)

最終免疫1ヶ月後のモルモットに誘発抗原 (OVA) を2 mg/kgで耳縁静脈内に投与した。投与後30分以内の全身性アナフィラキシー反応の有無および24時間以内の生存率を観察し、ASA評価基準 (Table 5) に基づいて評点を算出した。

B. 3. 2. 3-HA 装填 MH 製剤の有効性評価

(1) 3-HA装填MH製剤の作製

B. 1. 1. (1)に準拠して3-HA装填MH800を作製した。これをアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) 3-HAのワクチン投与

BALB/cマウス (H-2^d, 雌性, 6週齢; 日本SLC) に3-HAを下記の7群に4週間隔で2回免疫投与した。

- ① 経皮免疫群 (MH800): 3-HAを各0.2 μ gずつ装填したMH800をB. 1. 1. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に6時間貼付した。
- ② 筋肉内注射免疫群: 3-HAを各0.2 μ gずつ含む溶液50 μ Lを大腿外側筋肉内に注射

投与した。

- ③ 筋肉内注射免疫群 (Alum併用): 3-HAを各0.2 μ gずつとAlum 100 μ gとを含む混合液50 μ Lを大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ④ 皮内注射免疫群: 3-HAを各0.2 μ gずつ含む溶液50 μ Lを背部皮内に注射投与した。
- ⑤ 皮内注射免疫群 (Alum併用): 3-HAを各0.2 μ gずつとAlum 100 μ gとを含む混合液50 μ Lを背部皮内に注射投与した。
- ⑥ 経鼻免疫群: 3-HAを各0.2 μ gずつ含む溶液3 μ Lを点鼻投与した。
- ⑦ 経鼻免疫群 (CT併用): 3-HAを各0.2 μ gずつと Cholera toxin (CT; BioAcademia) 10 μ gとを含む混合液3 μ Lを点鼻投与した。

(3) 試料の採取

経日的にマウス尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpmで15分間遠心分離することで血清を得た。また、経日的に回収した糞便を秤量し、5%ウシ胎仔血清 (FCS; GIBCO)/PBS (0.02% NaN₃を含む) で100 μ g/mLに調製した。4°Cで30分間攪拌して得られた懸濁液を4°C、14,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を糞便抽出液とした。また、最終免疫から16週間後に鼻腔洗浄液、唾液、および膣洗浄液を採取した。鼻腔洗浄液は安楽死させたマウスの気道より鼻腔へ向け200 μ LのPBSを流すことで得た。唾液はPBSで1 mg/mLに調製したピロカルピン溶液 100 μ Lをマウス腹腔内に投与し、分泌を促進することで採取した。膣洗浄液は膣内をPBS 50 μ Lで洗浄することで得た。

(4) HA特異的抗体価の測定

試料中のHA特異的抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate-buffered solution (pH 9.6) で10 μ g/mLに調製した

各インフルエンザ HA 抗原を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 96-well ELISA plate に分注し、4°C で一晚静置することで固相化した。2%スキムミルク/PBS を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、37°C で 2 時間ブロッキング処理を行った。0.2%スキムミルク/TBST で連続 1/2 倍希釈したサンプルを 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で 2 時間反応させた。各 well を TBST で 3 回洗浄し、0.2%スキムミルク/TBST を用いてメーカー推奨濃度に希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス IgG, IgA, IgG1, あるいは IgG2a 抗体 (Southern Biotech) を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で 2 時間反応させた後、各 well を TBST で 3 回洗浄し、TMB 溶液 (Moss Inc.) を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H_2SO_4 を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加して反応を停止し、吸光波長 450 nm、副波長 655 nm にて吸光度を測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率の逆数の対数を Reciprocal \log_2 titer として表した。

(5) HA 価の測定

PBS を用いて各 HA 抗原の連続 1/2 倍希釈検体を作製し、96-well plate に 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。0.5%ニワトリ赤血球浮遊液 (日本バイオテスト研究所) を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、800 rpm で 1 分間攪拌後、室温で 1 時間静置した。その後プレートを傾けて赤血球の凝集を判定し、完全凝集を与える最小 HA 抗原希釈値の逆数を HA 価とした。なお、プレートを傾けて血球が流れたものを非凝集と判定した。

(6) Hemagglutination inhibition (HI) 試験

血清検体中の非特異的血球凝集阻止因子および非特異的血球凝集因子を除去するために、RDE (II) (デンカ生研) による前処理を行った。血清 10 μL に RDE (II) を 30 μL

加えて 37°C で 19 時間静置し、56°C で 1 時間加温した後、室温にまで冷却した。ここに 1,500 rpm で 5 分間遠心分離してペレットにしたニワトリ赤血球 10 μL と生理食塩水 160 μL を添加し、穏やかに転倒混和した後、室温で 1 時間静置した。なお、血球が沈殿しないように途中数回転倒混和した。その後、1,200 rpm で 10 分間遠心分離した上清を RDE 処理血清とした。

B.3.2.(5) で求めた HA 価に基づいて各 HA 抗原の 4 HA/25 μL 抗原液を調製し、使用前に再度 HA 価を確認してから同日中に HI 試験に供した。PBS を用いて RDE 処理血清の連続 1/2 倍希釈検体を作製し、96-well plate に 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。各 well に 4 HA/25 μL を添加し、800 rpm で 1 分間攪拌した後、室温で 60 分間以上静置した。0.5%ニワトリ赤血球浮遊液を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で加え、800 rpm で 1 分間攪拌した後、室温で 60 分間静置した。その後プレートを傾けて赤血球の凝集を判定し、完全に凝集を阻止する最小抗体希釈値の逆数を HI 価とした。なお、プレートを傾けて血球が流れたものを非凝集と判定した。

B.3.3. A/PR/8/34 (H1N1) 株由来インフルエンザ HA 抗原 (PR8-HA) を装填した MH 製剤の有効性評価

(1) PR8-HA 装填 MH 製剤の作製

B.1.1.(1) に準拠して PR8-HA 装填 MH800 を作製した。これをアルミラミネート PET パックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。なお、PR8-HA は阪大微生物病研究会より供与を受けた。

(2) PR8-HA のワクチン投与

BALB/c マウス (H-2^d, 雌性, 6 週齢; 日本 SLC) に PR8-HA を下記の 4 群に 4 週間隔で 2 回免疫投与した。

① 経皮プラセボ群 (MH800): 抗原を含ま

ないMH800をB. 1. 1. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に6時間貼付した。

- ② 経皮免疫群 (MH800): PR8-HAを0.4 μg 装填したMH800をB. 1. 1. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に6時間貼付した。
- ③ 筋肉内注射免疫群: PR8-HAを0.4 μg 含む溶液50 μL を大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ④ 経鼻免疫群 (CT併用): PR8-HAを0.4 μg とCT 10 μg とを含む混合液3 μL を点鼻投与した。

(3) 試料の採取

経日的にB. 3. 2. (3)に準拠して血清を得た。また、最終免疫から2週間後にB. 3. 2. (3)に準拠して糞便抽出液、鼻腔洗浄液、唾液、および膣洗浄液を採取した。

(4) HA特異的抗体価の測定

試料中のPR8-HA特異的抗体価は、B. 3. 2. (4)に準拠して測定した。なお、PR8-HAの固相化には、50 mM bicarbonate-buffered solution (pH 9.6)で0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した溶液を用いた。

(5) HA価の測定

PR8-HAのHA価は、B. 3. 2. (5)に準拠して測定した。

(6) HI試験

血清検体のHI価は、B. 3. 2. (6)に準拠して測定した。

(7) A/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルスの感染実験

インフルエンザウイルス感染実験は日本生物科学センターに委託した。最終免疫2週後にA/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルスを 5×10^6 plaque forming unit (PFU)/headでマウスに点鼻投与した。

A/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルス投与直前、投与後1日目、3日目、6日目に各マウスの体重を測定した。ウイルス投与後から毎日各マウスの一般状態を観察し、Table 6の基準に沿って評価した。

ウイルス投与6日後にマウスから摘出した肺の右葉を細片化した後、生理食塩水2 mLを加えてホモジナイズし、肺組織液500 μL を得た。肺組織液の原液、1/10倍、1/100倍、1/1000倍希釈液を0.1 mLずつMDCK細胞に接種し、ウイルスを細胞に1時間吸着させた後にアガロース添加培地を細胞に重層した。アガロース液が固まった後、37°C、5% CO₂条件下で2日間培養し、ウイルスプラークを計数した。

ウイルス投与6日後に摘出した肺を肉眼的に観察し、肺組織のConsolidation (硬化)を1~5の5段階スコアにより評価した。また、回収した肺を左葉と右葉に分けて重量を測定した。なお、感染実験の途中で死亡した個体については死亡日に実施した。

回収した肺の左葉を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、Paraffinブロックに包埋した。組織切片を作製し、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色の後、光学顕微鏡を用いて観察した。各個体の気管支肺炎および間質性肺炎の程度を0~4の5段階スコアにより評価した。

B. 3. 4. H5N1 組換え型 HA 蛋白質 (H5N1-HA) を装填した MH 製剤の有効性評価

(1) H5N1-HA装填MH製剤の作製

B. 1. 1. (1)に準拠してH5N1-HA装填MH300KおよびMH800を作製した。これをアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。なお、H5N1-HAは株式会社UMNファーマより供与を受けた。

(2) H5N1-HAのワクチン投与

BALB/cマウス (H-2^d, 雌性, 7週齢; 日本

SLC) にH5N1-HAを下記の6群に4週間隔で2回免疫投与した。

- ① 経皮免疫群 (MH300): H5N1-HAを0.05 µg 装填したMH300をB. 1. 1. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に6時間貼付した。
- ② 経皮免疫群 (MH800): H5N1-HAを0.05 µg 装填したMH800をB. 1. 1. (3)に準拠して除毛した背部皮膚に6時間貼付した。
- ③ 筋肉内注射免疫群: H5N1-HAを0.05 µg 含む溶液50 µLを大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ④ 筋肉内注射免疫群 (Alum併用): H5N1-HA 0.05 µgとAlum 10 µgとを含む混合液50 µLを大腿外側筋肉内に注射投与した。
- ⑤ 経鼻免疫群: H5N1-HAを0.05 µg含む溶液3 µLを点鼻投与した。
- ⑥ 経鼻免疫群 (CT併用): H5N1-HA 0.05 µgとCT 10 µgとを含む混合液3 µLを点鼻投与した。

(3) 試料の採取

経日的にB. 3. 2. (3)に準拠して血清および糞便抽出液を得た。

(4) HA特異的抗体価の測定

試料中のH5N1-HA特異的抗体価は、B. 3. 2. (4)に準拠して測定した。なお、H5N1-HAの固相化には、50 mM bicarbonate-buffered solution (pH 9.6)で2 µg/mLに調製した溶液を用いた。

(5) 脾細胞のサイトカイン産生プロファイルの解析

最終免疫から2週間後に各マウスから調製した脾細胞を24-well plateに 2×10^6 cells/mL/wellで播種し、H5N1-HAを1 µg/mLで添加して培養することにより抗原再刺激を行った。24時間後に培養上清を回収し、IFN- γ ならびにIL-4産生量をELISA法により

測定した。

B. 3. 5. 3-HA 装填 MH 製剤のヒト皮膚における穿刺特性およびヒトにおける安全性・有効性評価 (Table 7)

(1) 3-HA装填MH製剤の作製

3-HAとしてA/California/7/2009 (H1N1) 株由来HA抗原、A/Victoria/210/2009 (H3N2) 株由来HA抗原、B/Brisbane/60/2008 株由来HA抗原を使用した。B. 1. 1. (1)に準拠して3-HA装填MH800 (各HA抗原を15 µgずつ含有) を作製した。これをアルミラミネートPETパックに密封包装し、試験に供するまで冷蔵保管した。なお本臨床研究には、物性試験、異物試験、微生物学的検査に適格したMH製剤を使用した。

(2) ワクチン投与

20~40歳代の健康成人男性40人をランダムに20人ずつの2群に分け、3-HAを3週間隔で2回免疫投与した。

① TCI群: B. 2. 2. (2)に準拠して3-HA装填MH800を被験者の上腕外側皮膚に6時間貼付した。

② SCI群: 医薬品として販売されているビケンHA 0.5 mL (各HA抗原を15 µg以上ずつ含有) を上腕外側皮下に注射投与した。

(3) 針部溶解性の観察

剥離したMH800の針部をデジタル顕微鏡 (VHX-1000) により観察した。残存した微小針を計数し、溶解した針部の割合を算出した。

(4) 安全性評価

ワクチン投与から2日後、7日後、および21日後に自覚症状についての問診を行うとともに、皮膚局所における紅斑の有無ならびにその直径を評価した。貼付部位をガラ

ス板で圧迫し、通常の紅斑を消失させることで紫斑を観察し、色素沈着、硬結、圧痛、熱感、水疱なども併せて検討した。

ワクチン投与前ならびに投与から2日後、7日後、および21日後に採血を行い、採取した血液を用いて血算検査、肝機能検査、腎機能検査を実施した。

(5) 疼痛評価

MH貼付あるいは皮下注射時の痛みを疼痛VAS (Visual Analogue Scale; 無痛を0、考え得る最大の痛みを100とする) 法により評価した。

(6) 試料の採取

ワクチン投与前ならびに投与から7日後および21日後に採血を行い、血清を回収した。また、ハナノア (小林製薬) を用いて鼻うがいをすることで回収した液を0.45 μm フィルターを用いて粗雑物を除去後、限外濾過法により濃縮し、1 mg/mLの鼻腔洗浄液を得た。さらに、ワクチン投与前ならびに投与21日後に末梢血細胞を採取した。

(7) HA価の測定

B.3.2.(5) に準拠して測定した。A/California/7/2009 (H1N1) 株由来HA抗原、B/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対してはニワトリ赤血球を、A/Victoria/210/2009 (H3N2) 株由来HA抗原に対しては七面鳥赤血球を使用した。

(8) HI試験

血清ならびに鼻腔洗浄液検体中のHI試験は株式会社SRLに依頼した。測定方法はB.3.2.(6)に準拠した。

(9) サイトカイン産生細胞数の測定

採取した末梢血細胞に各HA抗原を10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加して培養することにより抗原

再刺激を行い、24時間後にIFN- γ ELISPOT assay kit (BD Biosciences) により、HA特異的IFN- γ 産生細胞数を測定した。

B.3.6. OVA 装填 nMN 製剤の抗原特異的抗体産生誘導能

(1) OVA装填nMN製剤の作製

B.1.1.(1)に準拠して作製したnMNの先端をOVA/ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) 溶液に浸漬し、その後乾燥させることによって (dip-dry method) OVA装填nMNを作製した (Fig. 7)。作製したOVA装填nMNはアルミラミネートPETパックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保管した。

(2) OVAの投与

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

- ① OVA 8.6 μg 経皮免疫群 (TCI; 8.6 μg): OVAを8.6 μg 装填したnMNをB.1.1.(3)に準拠して除毛した背部皮膚に貼付した。nMNは2時間後に剥離した。2週間後に同様の方法で2回目の経皮投与を行った。
- ② OVA 1.5 μg 経皮免疫群 (TCI; 1.5 μg): OVAを1.5 μg 装填したnMNをB.1.1.(3)に準拠して除毛した背部皮膚に貼付した。nMNは2時間後に剥離した。2週間後に同様の方法で2回目の経皮投与を行った。
- ③ OVA 8.6 μg 皮下注射免疫群 (SCI; 8.6 μg): 8.6 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ の OVA/phosphate-buffered saline (PBS) 溶液を背部皮下に2週間隔で2回注射した。
- ④ OVA 1.5 μg 皮下注射免疫群 (SCI; 1.5 μg): 1.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ のOVA/PBS溶液を背部皮下に2週間隔で2回注射した。
- ⑤ OVA 8.6 $\mu\text{g}/\text{HPC}$ 溶液皮下注射免疫群 (SCI-HPC; 8.6 μg): 8.6 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ のOVA/HPC溶液を背部皮下に2週間隔で2回

注射した。

- ⑥ OVA 1.5 μg /HPC溶液皮下注射免疫群 (SCI-HPC; 1.5 μg): 1.5 μg /100 μL の OVA/HPC溶液を背部皮下に2週間隔で2回注射した。

(3) 血清中OVA特異的IgG抗体価の測定

1回目および2回目のOVA投与からそれぞれ2週間後に尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpmで15分間遠心分離することで血清を得た。血清中のOVA特異的IgG抗体価はELISA法により測定した。50 mM bicarbonate-buffered solution (pH 9.6) で10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したOVAを50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で96-well ELISA plateに分注し、4°Cで一晩静置することで固相化した。8%スキムミルク/TBSを200 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、37°Cで2時間ブロッキング処理を行った。0.8%スキムミルク/TBSTで連続1/2倍希釈したサンプルを50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で2時間反応させた。各wellをTBSTで5回洗浄し、0.8%スキムミルク/TBSTを用いて1/5000に希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Southern Biotech) を50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で2時間反応させた後、各wellをTBSTで7回、蒸留水で1回洗浄し、TMB溶液 (Moss Inc.) を100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。室温で発色反応を行った後、2N H_2SO_4 を100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加して反応を停止し、吸光波長450 nm、副波長655 nmにて吸光度を測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が0.1以上高い最大希釈倍率の逆数の対数をReciprocal \log_2 titerとして表した。

B. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

B. 4. 1. MH構成成分のアジュバント効果

(1) OVAとMH構成成分のワクチン投与

BALB/c マウス (H-2^d, 雌性, 6週齢; 日本 SLC) に OVA (2 μg ; SIGMA-ALDRICH) と

MH 構成成分である医療用ヒアルロン酸ナトリウム (cHA; 0.01, 0.1, 1 mg)、ポリビニルピロリドン (PVP; 0.01, 0.1, 1 mg)、あるいはデキストラン (Dex; 0.01, 0.1, 1 mg) との混合液 50 μl を2週間隔で2回皮下注射投与した。

(2) OVA 特異的抗体価の測定

経日的にマウス尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpmで15分間遠心分離することで血清を得た。血清中のOVA特異的抗体価はB. 3. 1. (3)に準拠してELISA法により測定した。

B. 4. 2. 各種アジュバント候補物質の *in vivo*スクリーニング

(1) MHの作製

B. 1. 1. (1)に準拠してMH300を作製した。

(2) 親水性ゲルパッチの作製

B. 1. 2. (4)に準拠して親水性ゲルパッチを作製した。

(3) OVAとアジュバント候補物質の混合溶液の調製

Pam3CSK4、LTA-SA、Poly (I:C)、Imiquimod、R848、ODN1826 (全てLife Technologies) は4 mg/mL in Sterile Endotoxin-free Water (Invivogen) に、MPLA (Life Technologies)、Retinoic acid (ナカライテスク) は2 mg/mL in 20% DMSO に調製し、OVA (EndoGrade OVA; J. K. International) 溶液 (20 mg/mL) と等量混合した。

(4) OVAとアジュバント候補物質の混合溶液の投与 (Puncturing法; Fig. 4)

B. 1. 2. (5)に準拠してC57BL/6 マウス (H-2^b, 雌性, 7週齢; 日本 SLC) の除毛した背部皮膚にMH300を用いてB. 4. 2. (3)で

調製した OVA とアジュバント候補物質の混合溶液 5 μL を経皮投与した。親水性ゲルパッチは 6 時間後に剥離した。2 週間後、同様の手法により OVA 溶液のみを経皮投与した。

(5) 血清中 OVA 特異的抗体価の測定

経目的にマウス尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血し、5,000 rpm で 15 分間遠心分離することで血清を得た。血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価は B.3.6. (3) に準拠して ELISA 法により測定した。

(6) OVA 特異的サイトカイン (IFN- γ /IL-4) 産生細胞数の測定

最終免疫 2 週間後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。脾細胞に OVA を 1 mg/mL で添加して培養することにより抗原再刺激を行い、24 時間後に IFN- γ ELISPOT assay kit (BD Pharmingen) および IL-4 ELISPOT assay kit (BD Pharmingen) により、OVA 特異的 IFN- γ /IL-4 産生細胞数を測定した。

(7) 皮膚刺激性

初回経皮免疫時において親水性ゲルパッチ剥離直後ならびに剥離 24 時間後の皮膚を観察し、Draize の評価基準 (Table 1) に従って紅斑および浮腫の程度をスコア化した。

B.4.3. MPLA および ODN1826 のアジュバント活性発現機序の解析

(1) マウスランゲルハンス細胞 (LC)、ケラチノサイト (KC)、および真皮樹状細胞 (dDC) の単離

除毛した C57BL/6 マウス (H-2^b, 雌性, 8 週齢; 日本 SLC) あるいは C3H/He マウス (H-2^k, 雌性, 8 週齢; 日本 SLC) の胴部皮膚ならびに耳介皮膚を採取した。耳介皮膚はピンセットを用いて軟骨の層を境に二層

に分離した後、それぞれを 0.5% Dispase (Roche)/RPMI1640 (50 μM 2-mercaptoethanol (2-ME), 10% FCS, 0.1 mM 非必須アミノ酸 (NEAA)、抗生物質を含む) に角質層が上になるように浮かべた。37°C で 3 時間インキュベーションした後、ピンセットを用いて角質層と生きた表皮 (表皮シート) を真皮層 (真皮シート) から分離した。

採取した表皮シートをピペッティングすることによって単細胞にし、セルストレイナー (pore size: 70 μm) を通して表皮細胞懸濁液とした。真皮シートについては、10 mL の 1% コラゲナーゼ (和光純薬)/PBS 中で細切し、37°C でスターラーを用いて 30 分間攪拌した。その後、ピペッティングにより組織を破碎し、40 mL の PBS を加えた後にセルストレイナー (pore size: 70 μm) を通して真皮細胞懸濁液とした。表皮細胞懸濁液あるいは真皮細胞懸濁液を氷冷した 0.1% BSA と 0.05% NaN_3 を含む PBS (Staining buffer) にて 1×10^7 cells/mL に調製し、ラット抗マウス CD16/CD32 (Fc γ RIII/II) 抗体 (clone 2.4G2; BD Pharmingen) を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加後、氷上で 20 分間インキュベーションした。

表皮細胞懸濁液については、FITC 標識抗マウス MHC class II 抗体 (clone 11-5.2; BD Pharmingen) を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加し、真皮細胞懸濁液については、APC 標識抗マウス CD11c 抗体 (clone N418; eBioscience) を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加して氷上で 20 分間静置した。その後、細胞を Staining buffer で洗浄し、FACSAria II (BD) にて表皮細胞懸濁液から LC (MHC class II 陽性分画) および KC (MHC class II 陰性分画) を、真皮細胞懸濁液から dDC (CD11c 陽性分画) をソーティングした。

(2) TLR4 および TLR9 の発現確認

Staining buffer にて 1×10^7 cells/mL に調製した LC、KC、あるいは dDC 懸濁液に PE 標識抗マウス TLR4 抗体 (clone 6C2; eBioscience) を $5 \mu\text{g/mL}$ で添加し、氷上で 20 分間静置した。一方 TLR9 発現の解析においては、細胞を Staining buffer で洗浄した後に Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen) に懸濁し、氷上で 20 分間放置することによって細胞膜透過処理を行った。その後、Perm/Wash buffer (BD Pharmingen) で細胞を洗浄し、PE 標識抗マウス TLR9 抗体 (clone 26C593.2; Imgenex) を $5 \mu\text{g/mL}$ で添加して、氷上で 20 分間静置した。

その後、細胞を Staining buffer にて洗浄し、7-AAD Viability Dye (Beckman Coulter) を添加することで死細胞を染色してから Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter) を用いてフローサイトメトリー (FCM) 解析した。

(3) TLR-L の LC、KC、および dDC に対する細胞傷害性

単離した LC、KC、および dDC を RPMI1640 ($50 \mu\text{M}$ 2-ME、10% FCS、 0.1 mM NEAA、および抗生物質を含む) で懸濁し、 10^4 cells/well で 96-well plate に播種した。各 well に OVA (終濃度: $10 \mu\text{g/mL}$) と MPLA (Invivogen; 終濃度: 1、10、 $100 \mu\text{g/mL}$) あるいは ODN1826 (Invivogen; 終濃度: 1、10、 $100 \mu\text{g/mL}$) を添加し、24 時間培養後に細胞生存率を Crystal Violet 染色法ならびに WST-8 (ナカライテスク) assay により評価した。

(4) LC および dDC の表面マーカー発現解析

単離した LC および dDC を RPMI1640 ($50 \mu\text{M}$ 2-ME、10% FCS、 0.1 mM NEAA、および抗生物質を含む) で懸濁し、 5×10^5 cells/well で 24-well plate に播種した。各 well に MPLA あるいは ODN1826 を終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ で添加

し、24 時間培養後、回収した細胞を Staining buffer で 1×10^7 cells/mL に調製した。ラット抗マウス CD16/CD32 (FcγRIII/II) 抗体 (clone 2.4G2) を $100 \mu\text{g/mL}$ で添加後、氷上で 20 分間インキュベーションした。続いて PE 標識ラット抗マウス CD40 抗体 (clone 1C10; eBioscience)、PE 標識ラット抗マウス CD197 (CCR7) 抗体 (clone 4B12; eBioscience)、APC 標識ハムスター抗マウス CD80 (B7-1) 抗体 (clone 16-10A1; BioLegend)、APC 標識ラット抗マウス CD86 (B7-2) 抗体 (clone GL1; BioLegend)、PE 標識マウス抗マウス MHC class I (H-2K^b) 抗体 (clone AF6-88.5; BD Pharmingen)、PE 標識マウス抗マウス MHC class I (H-2K^k) 抗体 (clone 36-7-5; BD Pharmingen)、eFluor 780 標識ラット抗マウス MHC class II (I-A^{b,d,q}/I-E^{d,k}) 抗体 (clone M5/114.15.2; eBioscience)、あるいは PE 標識マウス抗マウス MHC class II (I-A^k) 抗体 (clone 11-5.2; BD Pharmingen) をそれぞれ $5 \mu\text{g/mL}$ で添加し、氷上で 20 分間静置した。その後、細胞を Staining buffer にて洗浄し、Gallios™ Flow Cytometer を用いて FCM 解析した。

(5) LC、dDC、および KC のサイトカイン・ケモカイン産生量の測定

単離した LC、dDC、および KC を RPMI1640 ($50 \mu\text{M}$ 2-ME、10% FCS、 0.1 mM NEAA、および抗生物質を含む) で懸濁し、 5×10^5 cells/500 μL /well で 24-well plate に播種した。各 well に MPLA あるいは ODN1826 を終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ で添加した。24 時間後、培養上清を回収し、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、および IL-12 濃度を ELISA 法により測定した。

ODN1826 で刺激した KC (C57BL/6 マウス由来) の培養上清については、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、TNF- α の濃度を Mouse