

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

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

##### (1) MH の作製

B. 1. 1. (1) に準拠して MH300 を作製した。

##### (2) OVA と CpG-ODN の混合溶液の調製

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

##### (3) 抗原含有親水性ゲルパッチの作製

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

##### (4) OVA と CpG-ODN の混合溶液の投与 (Puncturing 法; Fig. 4)

B. 1. 2. (5) に準拠して C57BL/6 マウス (H-2K<sup>b</sup>, 雌性, 7-10 週齢; 日本 SLC) および TLR9 欠損マウス (Background; C57BL/6J, H-2K<sup>b</sup>, 雌性, 7-10 週齢) の除毛した背部皮膚に MH300 を用いて穿孔した部位に、B. 4. 4. (3) で作製した OVA あるいは OVA と CpG-ODN を含有した親水性ゲルパッチを貼付した。親水性ゲルパッチは 24 時間後に剥離した。2 週間後、同様の手法により OVA のみを含有した親水性ゲルパッチを用いて経皮投与した。

##### (5) 血清中 OVA 特異的抗体価の測定

1 回目および 2 回目の免疫投与からそれぞれ 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 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。検出抗体に 0.8% スキムミルク/TBST を用いてメーカー推奨濃度に希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス IgG1、IgG2b、あるいは IgG2c 抗体 (全て Southern Biotech) を用いることで IgG サブクラス抗体価についても測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究課題における動物実験はすべて大阪大学における動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて研究計画を立案し、動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

また、本研究課題における臨床研究の実施に当たっては、大阪大学医学部医学倫理委員会および大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の審査・承認を受け、被験者に対するインフォームド・コンセントを書面で行った。臨床研究により取得した被験者の個人情報には厳重に保管・管理し、成果発表においても個人が特定されることのないよう十分に配慮する。

## C. 研究結果

### C. 1. MN の物理化学的特性解析

#### C. 1. 1. MN の皮膚穿刺特性

本研究のコアテクノロジーである MN 作製は、研究や応用の目的に合わせて微小針の形状、長さ、本数を自在に調節可能である。MN を応用した経皮ワクチンシステムの汎用性を拡大するためには、皮膚内に送達するワクチン抗原量やそれらの送達深度をコントロールするために多くの MN バリエーションを揃えることが望ましい。そこで、各種 MN の皮膚穿刺能力を推し量る一つの指標として針部耐荷重値を測定した。

テクスチャーアナライザーを用いて各種 MH にステンレス製の円盤を一定の速度で押し当てていくと、微小針が折れることによって負荷が急激に低下するポイントが認められる (Fig. 8)。このポイントにおける負荷を針の強度として表わすと、MH500 および MH800 における微小針 1 本あたりの強度はそれぞれ  $0.21 \pm 0.02$  N および  $0.29 \pm 0.05$  N であった (Table 8)。また、MH300 の針部耐荷重値は MH800 の  $1/3 \sim 1/2$  を示し、これは MH300 のほうが個々の微小針が細いことに起因すると考えられた (Fig. 9)。さらに、モデル抗原として OVA を装填した場合の針部耐荷重値への影響についても併せて検討したところ、MH300 および MH800 のいずれも耐荷重値は  $0.05$  N/needle 程度にまで低下し、OVA 装填量を変化させても針部耐荷重値はほぼ一定であることが明らかとなった。

次にマウスおよびラットの皮膚に各種 MH を貼付した際の針部溶解過程を経時的に観察した。MH200K および MH300K については貼付 5 分後に針先端部が完全に溶解し、貼付 60 分後にはコニーデ型針部の根元のところまでほとんど溶解していた (Fig. 10)。MH800 については、貼付 5 分後において針の半分程度が溶解し、貼付 60 分後には針の根元まで

完全に溶解した。MH300 および MH500 はいずれも貼付 5 分後にはすでに針の 80% 以上が溶解し、貼付 60 分後には針の根元まで完全に溶解した (Fig. 11)。

これらの結果は、MH200K、MH300K、MH300、MH500、および MH800 が皮膚への安定した穿刺と微小針溶解に伴う内封物質の速やかな皮膚内送達を達成できる経皮ワクチンデバイスであることを示すものである。

皮膚内溶解型という MH の特性は、既存のワクチン抗原を装填したとしても「新薬」として承認申請手続きを進める必要があり、この制度上の経済的・時間的負荷は実用化を大きく遅滞させる原因となる。そこで、同様のコンセプトでありながら「剤形変更」として承認申請手続きが行える異なるアプローチの必要性が高まり、MH とは構成素材ならびに抗原装填方式が異なる新素材 MN の開発に取り組んだ。

医療用具・医療機器の原材料として使用実績があるナイロン 6 あるいはポリグリコール酸を素材とする nMN および pMN を新たに開発し、これら新素材 MN の針部耐荷重値を測定した (Fig. 12)。nMN および pMN の微小針 1 本あたりの耐荷重値はそれぞれ  $0.033 \pm 0.004$  N/needle および  $0.065 \pm 0.005$  N/needle と算出された (Table 9)。

#### C. 1. 2. MN の皮膚内物質送達特性

マウス背部皮膚に MH200K を貼付した際には、F-OVA ならびに FITC-SP 由来の蛍光が生きた表皮の下部で観察され、MH300K、MH800 を貼付した際は、両物質由来の蛍光が生きた表皮から真皮にかけて確認された (Fig. 13A)。一方、ラット背部皮膚に MH200K あるいは MH300K を貼付した際は、生きた表皮の下部に F-OVA および FITC-SP 由来の蛍光が認められ、MH800 を貼付した際には両物質由来の蛍光が生きた表皮から真皮にかけて観察された (Fig. 13B)。

続いて、F-OVA装填MH200K、MH300K、あるいはMH800をマウス背部皮膚に種々の時間貼付し、皮膚内におけるF-OVAの局在を観察した。貼付3時間後ではいずれのMHを適用した皮膚においてもF-OVAは多少の拡散は認められるもののニードルが穿刺された周囲に存在していた (Fig. 14)。貼付6時間後においても同様にニードルが穿刺された周囲に蛍光が観察され、さらに12時間、24時間と貼付時間を延長すると、観察される蛍光強度は減弱していくものの、依然として穿刺部位付近に留まっていた。

皮膚内に投与されたワクチン抗原の組織滞留性が、生きた表皮および真皮にそれぞれ常在するLCおよびdDCによる抗原認識・捕捉効率に影響することは容易に予想される。すなわち、抗原の皮膚内滞留性の増大は、抗原提示細胞による特異的免疫応答の誘導を増強し、より優れたワクチン効果の発揮につながる可能性がある。そこで、MHを用いて経皮投与した蛍光標識モデル抗原の皮膚内残存性を生体イメージング法により評価した。

FD4装填MH200K、MH300K、あるいはMH800を貼付した皮膚では、剥離直後においてはドット状に蛍光が観察された (Fig. 15)。MH200Kを適用した皮膚においては剥離してから2日後まで、MH300KあるいはMH800を適用した皮膚においては剥離してから4日後まで貼付部位にFD4由来の蛍光が検出された。一方、FD4を皮内注射投与すると、投与直後においては投与量依存的に強い蛍光が観察されたが、10  $\mu\text{g}$ 、1  $\mu\text{g}$ を投与した皮膚では投与1日後には蛍光がほぼ観察できず、最も強い蛍光が観察された100  $\mu\text{g}$ のFD4を投与した皮膚においても2日後にはほぼ消失した。

マウス背部皮膚にF-OVAを装填したMH300を1時間貼付した場合にも、剥離直後の適用部位にはF-OVAに由来する強い蛍光が観察

された (Fig. 16)。その後、時間経過とともに蛍光強度は低下したものの、剥離から72時間後においても適用部位には明らかにF-OVAの残存が確認できた。一方、F-OVA溶液の皮内注射では、投与直後には非常に強い蛍光を観察できたにもかかわらず、3時間後には既にほとんどのF-OVAが拡散して投与部位からクリアランスされていた。また、F-OVAをMH溶解液と混合して皮内注射した場合もほぼ同様の蛍光消失プロファイルを示し、MH貼付群におけるF-OVAの良好な皮膚内滞留性がMH成分の物性や作用に基づくというよりも、むしろMHによる皮膚表層への多数穿刺という物質送達特性に起因することが示唆された。

今後、MHを用いて経皮投与された抗原の皮膚内動態解析や捕捉細胞の同定を進めることで、MH経皮ワクチン製剤の免疫応答誘導に寄与する分子・細胞メカニズムの解明を図る予定である。

また、新たに開発したnMNおよびpMNを用いて穿刺したマウス皮膚に塗布されたF-OVAの皮膚内送達部位を観察した (Fig. 17)。いずれのMNを用いた場合にもF-OVA由来の蛍光は生きた表皮から真皮にかけて観察され、送達深度は皮膚表面から200~300  $\mu\text{m}$ であった。

### C. 1. 3. MH の針部耐荷重値に与える湿度の影響

MHは水分を吸収することによって溶解するため、その保管においては空気中の水蒸気が製剤の安定性に影響すると考えられる。そこで、湿度とMH800の水分活性ならびに針部耐荷重値との関係を検討した。種々の湿度条件に1週間静置したMH800の水分活性は、保管環境の湿度が上昇するにつれて増加し、75%の調湿条件下のMH800は作製直後のMH800と比較して約2倍の水分活性を有していた (Fig. 18A)。また、湿度が0%

あるいは 11%という乾燥した環境下で保管した MH800 の水分活性は作製直後の MH800 と比べて低下した。次に、これら MH800 の針部耐荷重値を測定したところ、保管環境の湿度が上昇するにつれて低下する傾向を示し、最も水分活性が高くなった湿度 75% 条件下で保管した MH800 は作製直後の MH800 と比較して針部耐荷重値が約半分にまで低下していた (Fig. 18B)。

#### C. 1. 4. MH 製剤の長期保存性

経皮ワクチン製剤は、従来の注射ワクチン製剤と比較して接種の簡便性に優れるのみならず、乾燥製剤という特性が低温温度管理 (cold chain) を不要とし、輸送・保管・備蓄におけるコストを大幅に低減させる可能性を秘めている。

空気中の水蒸気を遮断できるアルミラミネート PET パックで包装した TT/DT 装填 MH800 を 4°C、25°C、あるいは 40°C という温度条件において 6 ヶ月間あるいは 12 ヶ月間保存した後の微小針の形状とラット皮膚に貼付した際の溶解性を観察した (Fig. 19)。保存前と比較して、いずれの温度条件で保管しても微小針の形状に変化はなかった。また、どの MH800 も保管前の TT/DT 装填 MH800 と同様に貼付 5 分後には微小針の半分が溶解し、1 時間後には根元まで完全に溶解した。

続いて MH に装填した TT/DT の抗原性の維持を調べるために、各温度条件で保管した TT/DT 装填 MH800 を貼付したラットの抗トキソイド抗体価を測定した。その結果、6 ヶ月間あるいは 12 ヶ月間保管のいずれの TT/DT 装填 MH800 でも保存前の TT/DT 装填 MH800 と同様の抗体産生プロファイルを示した (Fig. 20)。また、いずれの TT/DT 装填 MH800 で免疫した群も、致死量の破傷風毒素投与に対する耐過試験において全例が生存した (Table 10)。

次に、インフルエンザ HA 抗原を装填した MH800 について、各種温度条件下で 6 ヶ月間保管した際の製剤安定性を評価した。長期保管後における本経皮ワクチン製剤の針部耐荷重値は、作製直後と比較すると耐荷重値が 20~50%低下していたが、皮膚への穿刺能力は担保されるレベルと判断された (Fig. 21)。また、この針部耐荷重値低下と保管温度との間に関連性は認められなかった。さらに、本経皮ワクチン製剤に装填された HA 抗原の安定性について検討した。HA 蛋白量については、いずれの保管温度においても作製直後から 6 ヶ月後まで安定に維持されていることを確認した (Fig. 22A)。一方、HA 価については、4°C、6 ヶ月間保管では作製直後と同等な値を示したが、保管温度が高くなるにつれて明らかな低下を示すことが判明した (Fig. 22B)。そこで、これら 6 ヶ月間保管後の製剤から溶出させた HA 抗原をマウスに免疫投与し、特異的抗体産生レベルを比較検討することで HA 価の低下が及ぼすワクチン効果への影響について評価をした。A/H1N1 型株に対する抗体産生は、3-HA 装填 MH800 の保管温度が上昇するにつれて低下する傾向が認められた (Fig. 23A)。一方、A/H3N2 型株ならびに B 型株の HA 抗原は、3-HA 装填 MH800 の保管温度が上昇しても作製直後の場合と同等の抗体産生誘導能を保持していた (Fig. 23B and C)。したがって、MH800 に装填したインフルエンザ HA 抗原のワクチン活性は、長期保存において亜型ごとに安定性が異なる可能性が示唆された。

#### C. 2. MN の安全性評価

##### C. 2. 1. MH のラット皮膚における安全性評価

MH200KおよびMH300Kを貼付したラット皮膚では、剥離直後においてもほとんど紅斑は認められなかった (Fig. 24A and B)。

MH300、MH500、およびMH800を適用した皮膚においては、剥離直後に軽度の紅斑が認められたが、これらの紅斑は48～72時間後には全例で消失する軽度な反応であった。また、いずれのMHを適用した皮膚についても浮腫は観察されなかった。したがって、MHの貼付は一時的に軽微な皮膚刺激性を示すものの重篤な局所反応を誘発しないことが確認された。

MHは微小な針が角質層に孔をあけるため、皮膚のバリア機能への影響が懸念される。そこで、皮膚の電気抵抗値を指標に皮膚バリア機能を評価した (Fig. 24C)。MH200K、MH300K、MH800のいずれにおいても剥離直後には皮膚の電気抵抗値に低下が認められ、針の穿刺に伴う一時的なバリア機能の障害が示唆された。しかし、MHの剥離から2時間経過した皮膚では、貼付前と同等の電気抵抗値を示したことから、角質層の穿刺孔は比較的速やかに閉じて元の皮膚状態に回復することが示唆された。一方、テープストリップ処理により角質層を物理的に除去した皮膚の電気抵抗値は剥離後著しく低下し、その後24時間以内に回復することはなかった。

### C. 2. 2. MH のヒト皮膚における穿刺特性

MH500あるいはMH800をヒト皮膚に貼付して5秒後に剥離し、共焦点レーザー生体顕微鏡によりMH適用部位の皮膚を観察した (Fig. 25)。皮膚表面には穿刺孔が鮮明に観察され、皮膚断面画像では少なくとも深さ100  $\mu\text{m}$ まで針部の到達が確認された。ヒト皮膚では角質層が10～20  $\mu\text{m}$ 、生きた表皮が約200  $\mu\text{m}$ の厚さであることから、MHのニードルはヒト皮膚においても装填された抗原を角質層下の生きた表皮に送達可能であることが示された。また、MH貼付時間の延長に伴ってこれらの穿刺孔は塞がる傾向が認められた (Fig. 26)。したがって、MHを数

時間適用した皮膚においてはバリア機能の破壊や二次感染の危険性を考慮する必要はほとんどないことが示唆された。

MHは皮膚内で針部が溶解することによって、装填した抗原を経皮送達できるように設計されていることから、ヒト皮膚における微小針の溶解過程を検証した (Fig. 27)。MH800を1時間貼付すると、3名の被験者のうち2名では針部が根元近くまで溶解し、残りの1名では針部は半分程度溶解した。また、6時間貼付すると全ての被験者で針部全体の溶解が確認された。したがって、針部溶解に要する時間には個人差が認められたものの、臨床研究での安全性評価におけるMHの貼付時間は6時間が妥当であろうと判断した。

MHは角質層に直接孔を開けることから、皮膚バリア機能への影響が懸念される。そこで、皮膚水分蒸散量を指標に角質層のバリア機能を評価した (Fig. 28)。MH800剥離直後の皮膚では水分蒸散量が顕著に増加しており、角質層を貫通した穿刺孔による影響が考えられた。その後、剥離部位の水分蒸散量は時間経過とともに徐々に低下し、皮膚バリア機能の回復、すなわち、穿刺孔の閉塞が確認された。さらに、5秒間貼付あるいは1時間貼付と比較して、6時間貼付では水分蒸散量が全体的に小さく、長時間貼付することでニードルが完全に溶解し、貼付中すでに穿刺孔の閉塞が始まっているものと推察された。

### C. 2. 3. MH のヒトにおける安全性評価

MH300K、MH500、およびMH800を6時間貼付して剥離した2日後の皮膚を観察すると、MH300K適用では被験者20名中1名、MH500適用では12名、MH800適用では13名において、わずかな紅斑を認めた (Table 11)。しかし、これら軽度の局所反応はほとんどの被験者において1週間以内に消失し、1ヶ月後には

全ての被験者で元の皮膚状態に回復した。また、針が円錐形で長いMH500およびMH800の貼付では、毛細血管の傷害に伴う色素漏出（紫斑）が3日後におよそ半数の被験者に認められた。しかし、軽度の色素沈着が残存した1名を除き、遅くとも1ヶ月後には元の皮膚状態に回復した。したがって、MHの貼付は一過性の弱い皮膚刺激を伴うのみであり、重篤な局所反応を惹起しないことが明らかとなった。また、MH貼付前後でいずれの被験者の血液検査値にも明らかな差異は無く、顕著な全身性の副作用は認められなかった。

さらに、MH貼付時における痛みを17名の被験者においてVASにより評価した。VASスコアについてSteel-Dwass法による多重比較を行った結果、MH-needleless、MH300K、MH500、MH800の間で大きな差異は認められなかった（Fig. 29）。MH-needlelessにおいてもVASスコアの上昇が観察されたのは、貼付時のバネ式アプリケーターの打撃による影響と考えられるが、そのスコアは最大の痛みを100とするVAS評価において軽微であった。したがって、MHの皮膚への貼付において針部の穿刺に伴う痛みはほとんどないことが示された。

#### C. 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

nMNおよびpMN貼付時の痛みをVASにより評価したところ、半数以上の被験者が10以下のきわめて低いスコアを申告し、平均値10.9はほとんど痛みを伴わない投与手法であることを示すものと判断された（Table 12）。

またnMNおよびpMNを30分間貼付した皮膚のTEWLを測定したところ、いずれの被験者においても無処置の皮膚と比較して値の上昇が認められ、両MNによるヒト皮膚角質層に対する穿孔が示唆された（Fig. 30）。同

一被験者での両MNによるTEWL上昇程度を比較すると、nMN適用部位のほうがpMN適用部位よりも低値を示した被験者が多く、nMNは被験者によっては穿刺が浅かったり、穿刺できた微小針の数が少なかったりした可能性が疑われた。この結果は、nMNよりもpMNのほうが針部耐荷重値が高かった（Table 9）ことに関係するものと強く予想され、ヒト皮膚に対する確実な穿刺を達成する経皮ワクチンデバイスとしてはpMNが有望であろうと判断された。

nMNおよびpMN貼付における皮膚局所反応を経時的に観察したところ、貼付から2日後において2人の被験者に紅斑が残っていたものの非常に軽微であり（Fig. 31）、7日後には全ての被験者で元の皮膚状態への回復が確認された（Table 13）。したがってnMNとpMNは、ヒト皮膚に対して重篤な局所反応を誘発しない経皮ワクチン用デバイスであることが実証された。

### C. 3. MN を用いた経皮ワクチン製剤の安全性・有効性評価

#### C. 3. 1. OVA 装填 MH 製剤を用いたアレルギー誘発試験

経皮ワクチン製剤の安全性を担保するためには、皮膚局所に対する刺激性や起炎性の評価のみならず、皮膚表層への複数回の抗原暴露に伴うアレルギー誘発の可能性について検討が求められる。そこで、アレルギー誘発試験法として古くから主流であるモルモットを用いた試験を実施した。

各種経路によりOVAを投与したモルモットの血清中OVA特異的抗体レベルを評価したところ、IgG抗体価はいずれの群においても高値であったのに対し（Fig. 32A）、IgE抗体産生についてはポジティブコントロール群（IPI群）で顕著な亢進が認められたのみであり、TCI群はSCI群と同様に低値を維持していた（Fig. 32B）。

次に、これらのモルモットの血清を用いてPCA反応を実施した (Fig. 32C)。IPI群の血清 (1/128倍希釈) を投与した部位ではエバンスブルーの漏出径が5以上を示したのに対して、TCI群の血清 (希釈なし) を投与した部位ではSCI群の血清 (希釈なし) を投与した部位と同等もしくはそれ以下の漏出径に抑えられていた。

さらに、OVA免疫モルモットにOVAを静脈内投与した際のASA反応を検討したところ、IPI群では6例中5例がアナフィラキシー症状により死亡したのに対して、TCI群では一部の個体がSCI群と同様に軽い症状を示したが、ほとんどは無症状のままであった (Fig. 32D)。

これらの結果から、MH経皮投与は高い抗原特異的IgG産生を誘導する一方で、抗原特異的IgEの産生増強に伴うアレルギー反応を誘発しにくいワクチン接種法であることが示唆された。

### C. 3. 2. 3-*HA* 装填 MH 製剤の有効性評価

三価季節性インフルエンザHA抗原を装填したMH800にて経皮ワクチンしたマウスにおいては、三価HA抗原それぞれに対して特異的なIgG抗体の産生が血清中に検出された (Fig. 33A)。また、それらの抗体価は筋肉内注射免疫群 (Alum併用)、皮内注射免疫群 (Alum併用)、および経鼻免疫群 (CT併用) の抗体価と比較して同等もしくはそれ以上であり、アジュバントを併用しなかった筋肉内注射免疫群、皮内注射免疫群、および経鼻免疫群の抗体価と比較すると明らかに高値を示した。また、最終免疫から16週間後 (初回免疫から20週間後) においても高い抗体価が維持されており、MHを応用した経皮ワクチン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獲得できることが明らかとなった。

次に、産生された抗HA抗体のHI価を測定

したところ、MH800を応用した経皮免疫群のHI価は160以上であり、筋肉内注射免疫群およびアジュバントを併用した皮内注射免疫群と比較して同等もしくはそれ以上であった (Fig. 33B)。したがって、MH800を用いた経皮ワクチンによってインフルエンザウイルスの感染に必要なHAの活性を中和できる抗体が誘導されることが示された。

続いて、最終免疫から16週間後の鼻腔洗浄液、唾液、および膣洗浄液中のHA特異的IgA抗体価を測定した (Fig. 33C)。その結果、経鼻免疫群 (CT併用) においては粘膜面での高い抗HA IgA抗体産生が検出されたが、経皮免疫群をはじめとする他の免疫群においてはIgA抗体産生がほとんど認められなかった。また、糞便抽出液中のHA特異的IgA抗体価を測定したところ、どの免疫群においても抗体価はReciprocal  $\log_2$  titerで5程度であり、経鼻免疫群 (CT併用) においても他の粘膜組織由来サンプル中におけるIgA抗体価と比べて低かった (Fig. 33D)。血清中のIgA抗体価については、経鼻免疫群 (CT併用) では最終免疫から2週間後にピークを迎えたのに対し、MHを用いた経皮免疫群をはじめとする他の免疫群は経日的に上昇する傾向にあり、糞便抽出液中と血清中のIgA抗体産生プロファイルに相関は認められなかった。

さらに、産生されたHA特異的IgG抗体のサブクラス解析を行ったところ、経皮免疫群におけるIgG2a抗体 (Th1型) とIgG1抗体 (Th2型) の産生比率は他の免疫群と比較して明らかな差異は認められなかった (Fig. 33E)。

### C. 3. 3. PR8-HA を装填した MH 製剤の有効性評価

A/PR/8/34 (H1N1) 株由来のインフルエンザHA抗原とウイルスを用いて、MHを応用した経皮ワクチン製剤の感染防御効果を検討

した。経皮免疫群における血清中抗原特異的IgG抗体価を測定したところ、筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）を上回る値が検出された（Fig. 34A）。また、誘導された抗体のHI価も経皮免疫群では筋肉注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）と比較して高い値を示した（Fig. 34D）。

次に、最終免疫から2週間後に回収した血清、糞便抽出液、鼻腔洗浄液、唾液、膣洗浄液中のHA特異的IgA抗体価を測定したところ、経鼻免疫群（CT併用）では全てのサンプルにおいて抗体価の上昇が確認できた（Fig. 34C）。一方、経皮免疫群および筋肉内注射免疫群においては、各サンプルのHA特異的IgA抗体価は経鼻免疫群（CT併用）よりも明らかに低い、もしくは検出限界以下であった。

さらに、最終免疫から2週間後の血清中に含まれるHA特異的IgG抗体のサブクラス解析を行ったところ、経皮免疫群と筋肉内注射免疫群は、Th1型のIgG2a抗体価よりもTh2型のIgG1抗体価が高く、経鼻免疫群（CT併用）はIgG1とIgG2aの抗体価が同程度であった（Fig. 34B）。

続いて、最終免疫から2週間後に、これら免疫マウスにA/PR/8/34（H1N1）株インフルエンザウイルスを経鼻接種し、その後の状態観察および感染防御能評価を行った。経皮免疫群および経鼻免疫群（CT併用）においては接種1日後から3日後にかけて軽度の体重減少が認められたが、観察終了時の6日後においては接種3日後の体重と比べて維持、または若干の増加傾向を示した（Fig. 34E）。接種3日後までの体重の減少は、ウイルス接種前の体重の10%以内の減少であった。これに対して、経皮プラセボ群ではウイルス接種後から体重が減少し続け、接種4日後には10例中1例が死亡し、接種6日後には接種前の体重から30%も減少していた。

さらに一般状態を観察した結果、経皮プ

ラセボ群では被毛状態の悪化および行動やその他の症状の悪化が観察され、接種6日後における一般状態が中程度から重度であったのに対し、経皮免疫群ならびに経鼻免疫群（CT併用）では被毛状態の悪化、およびその他の症状が観察されたのみであり、軽度のスコア上昇であった（Fig. 34F）。筋肉内注射免疫群は被毛状態の悪化が認められたが、その他の症状は観察されず、経皮免疫群ならびに経鼻免疫群（CT併用）と比較して低いスコアであった。

肺中のインフルエンザウイルス量をプラークアッセイ法により測定した結果、経皮免疫群、筋肉内注射免疫群、および経鼻免疫群（CT併用）では検出限界以下であった（Fig. 34G）。したがって、経皮免疫により誘導されたHA特異的抗体はインフルエンザウイルスに対する感染阻止活性を有しており、インフルエンザの発症予防に効果的であることが示された。

また、インフルエンザの合併症として起こりやすい肺炎について、ウイルス接種6日後に各群における肺重量測定および肺炎スコア評価により検討した。経皮免疫群の肺重量は筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）の肺重量と同程度であり、経皮プラセボ群の肺重量はそれらと比較して顕著な増加が認められた（Table 14）。

肉眼的所見においては、経皮免疫群で10例中9例、筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）では全例にConsolidation（硬化および浸潤影）は認められずスコアは1付近であった（Table 15）。一方、経皮プラセボ群では全例でConsolidationが観察され、スコアが3または4付近と高かった。

さらに、肺の病理組織学的検査により肺炎の程度を気管支肺炎と間質性肺炎に分類して評価し、平均スコアを比較した（Fig. 34H）。筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群（CT併用）では経皮プラセボ群よりも有意



にスコアは低く、経皮免疫群では有意差こそ認められなかったものの明らかに炎症は抑制される傾向にあった。これらの結果から、MHを用いたインフルエンザ経皮ワクチンは注射ワクチンおよび経鼻ワクチンと同様にインフルエンザウイルスの感染に対して優れた発症予防効果を発揮できることが実証された。

#### C. 3. 4. H5N1-HA を装填した MH 製剤の有効性評価

インフルエンザパンデミック時に必要とされるワクチン抗原の大量製造にも対応し得るH5N1組換え型HA蛋白質を抗原とするインフルエンザ経皮ワクチンの有効性を検討した。MH800を用いて経皮免疫したマウスの血清中HA特異的IgG抗体価を測定したところ、筋肉内注射免疫群および筋肉内注射免疫群（Alum併用）に匹敵する高値が検出された（Fig. 35A）。これらの免疫群と比較すると、MH300Kを用いた経皮免疫群の抗体価はわずかではあるが低値を示した。一方、経鼻免疫群についてはアジュバントとしてCTを併用した場合においてもHA特異的IgG抗体はわずかしか誘導されなかった（Fig. 35B）。また血清中HA特異的IgG抗体のサブクラス解析を行ったところ、経皮免疫群と筋肉内注射免疫群との間にIgG2a（Th1型）/IgG1（Th2型）バランスの明らかな差異は認められなかった（Fig. 35B）。なお、経鼻免疫群はCTを併用した場合においてもIgGサブクラスの抗体価は検出限界以下であった。

さらに、免疫したマウスの脾細胞における抗原特異的IFN- $\gamma$ /IL-4産生を評価したところ、MH800を応用した経皮免疫群では筋肉内注射免疫群（Alum併用）と同様にIFN- $\gamma$ の高い産生が認められた（Fig. 35C）。一方、IL-4産生に関しては、全ての免疫群において検出限界以下であった（data not shown）。

この結果は、MH800を応用した経皮免疫群と筋肉内注射免疫群（Alum併用）で誘導される免疫応答が他の免疫群のそれと比較してTh1偏向性であることを示唆しているが、前述のIgGサブクラス解析の結果とは矛盾が認められる。Th1/Th2免疫応答バランスについては様々な免疫イベントが複雑に関与していることから、今後MHを応用した経皮ワクチン製剤の免疫誘導メカニズムについてより詳細な検討が必要とされる。

#### C. 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

MH800に3-HAを装填したインフルエンザ経皮ワクチン製剤を作製し、ヒトへの適用における安全性ならびに有効性を検証する臨床研究を実施した。

まず、本製剤を被験者の上腕外側皮膚に貼付し、6時間後における針部の溶解をデジタル顕微鏡により観察した（Fig. 36）。C. 2. 2. およびC. 2. 3. におけるプラセボMH800を用いた臨床研究では、全ての被験者において貼付6時間後には針部が根元まで完全に溶解することを確認した。しかし、HA抗原装填MH800においては、微小針の完全な溶解が確認できたのは22例中3例のみであり、微小針の一部あるいはほとんどが溶解していない被験者が多数を占めた（Table 16）。この原因としては、本製剤を貼付する際に用いたバネ式 applicator（Type A shown in Table 16）の扱いに不慣れであったため、パッチの中央部からずれた位置を打突したり、パッチに対して垂直に打突できなかつたり、といった操作における不備が挙げられる。また、貼付してから剥離するまでの6時間における被験者の行動によっては、パッチの一部が剥離して針部の溶解が不十分となる可能性も疑われた。そこで本製剤の2回目の貼付には、パッ

チに対する打突位置を確認しながら使用できるバネ式アプリケーター (Type B shown in Table 16) に変更するとともに、貼付後のパッチを一回り大きいサイズの粘着シールで覆うことで剥離を防止する工夫を施した。これにより、被験者全員において貼付6時間後における針部の完全な溶解が確認できた。したがって、ヒト皮膚に微小針を確実に穿刺できるMH製剤の開発には、製剤特性を最適化するのみならず、貼付に使用するアプリケーターの改良にも注力する必要がある。

VASを用いたワクチン投与時の疼痛評価においては、経皮免疫 (TCI) 群のスコアが皮下注射免疫 (SCI) 群と比較して若干低値を示した (Fig. 37)。しかしながら、疼痛評価については客観的な測定が困難であり、また今回の検討では各被験者がTCIまたはSCIのどちらかに振り分けられているため、痛みに対する個人差が評価に及ぼす影響が大きいと考えられた。

インフルエンザ経皮ワクチン製剤のヒトに対する副反応誘発の可能性を評価するために、まず貼付部位の皮膚局所反応について経時的に検討した (Table 17)。TCI群の被験者全員においてパッチ製剤貼付部位に紅斑を認めたが、時間経過とともに回復する傾向にあった。Fig. 38は、最も顕著な紅斑が認められた被験者の貼付部位を経時的に撮影した写真である。ワクチン投与から2日後にMH製剤の面積よりも少し広い範囲の紅斑が認められたが、日を追うごとにその反応は終息していく様子が観察された。一方、SCI群では、1回目のワクチン投与から2日後に紅斑が認められた被験者数は5人と少なかったが、21日後においても約半数の被験者では注射針の穿刺痕が判別できた。両群での紅斑出現頻度の差異については、SCI群における皮下組織に投与したHA抗原に対する生体反応 (炎症) が外面的に判別

しづらいのに対して、TCIによって皮膚表層に送達されたHA抗原に対する炎症は容易に識別されたことに起因すると考えられる。また、1回目のワクチン投与後と比較して2回目のワクチン投与後のほうが、両群とも紅斑が認められた被験者数は多くなり、それらの紅斑が消失するまでの期間も長くなることが判明した。これは、1回目のワクチン投与によって被験者のHA抗原特異的免疫応答が活性化されたことに伴う変化だと推察された。

毛細血管の傷害に伴う内出血によって生じる紫斑については、TCI群ではワクチン投与2日後の時点で半数以上の被験者で陽性と判定されたが、21日後には全ての被験者において消失した。またTCI群における色素沈着については、ワクチン投与2日後にはいずれの被験者でも認められなかったが、21日後には約半数の被験者で確認された。TCI群における1回目と2回目のワクチン後において、紫斑および色素沈着の出現頻度に明らかな差は認められなかった。これらの結果は、MH800の密な微小針 (200本/cm<sup>2</sup>) の皮膚へ刺入が若干の毛細血管傷害を伴い、漏出した赤血球の組織沈着による紫斑、その後の貪食細胞による赤血球 (ヘモグロビン) の分解過程で生じるヘモジデリンによる色素沈着を引き起こすことを示している。その後のフォローアップにおいて、これらの紫斑および色素沈着は時間経過とともに消失し、最終的には元の皮膚の状態にまで回復することを確認している。一方、SCI群においては、2回目のワクチン投与から2日後 (Day 23) においてのみ被験者の半数以上に紫斑が認められたが、その他の観察日には紫斑・色素沈着が現れた被験者は殆どいなかった。

硬結はワクチン投与2日後に両群それぞれ一部の被験者に確認されたが、7日後には消失した。圧痛や熱感、SCI群のほうがTCI

群よりも僅かながら高頻度に観察される傾向にあった。水疱は両群のいずれの被験者にも認められなかった。

次に、インフルエンザ経皮ワクチン製剤の適用が全身性副反応を誘発する可能性について血液検査値を指標に検証した。血算検査（白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値、血小板数、MCV、MCH、MCHC）ならびに生化学検査（C反応性タンパク、BUN、クレアチニン、AST、ALT、LDH、GGT、ALP、LAP、コリンエステラーゼ、総ビリルビン、直接ビリルビン）において、TCI群およびSCI群ともにいずれの検査値についてもワクチン投与に起因する明らかな変化はなかった。

以上の安全性評価に関する結果をまとめると、MH800を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤は貼付部位の皮膚局所に対して刺激性や起炎性を示すものの、それらはワクチン接種において容認される範囲の生体反応であり、ヒトへの適用を妨げる局所性および全身性の重篤な副反応は認められなかった。

本臨床研究のプライマリーエンドポイントであったインフルエンザ経皮ワクチン製剤のヒトに対する安全性が確認されたため、セカンダリーエンドポイントである本製剤のヒトでの有効性を評価した。まず、経時的に被験者から採取した血清中のHI価を測定し（Fig. 39）、抗体陽転率（Seroconversion）、抗体保有率（Seroprotection）ならびに抗体変化率（GMT fold increase value）を算出した。これらのパラメーターをインフルエンザワクチンの有効性評価における国際基準である欧州医薬品庁（EMA）基準（Table 18）に則って解析した（Table 19）。

両群ともに、A/California/7/2009（H1N1）株由来HA抗原に対するHI価の上昇が最も顕著であり、B/Brisbane/60/2008株

由来HA抗原に対するHI価は上昇しにくい傾向が認められた。EMA基準での判定においては、ワクチン1回投与後ではTCI群はSCI群と比較して有効性に若干劣るものの、ワクチン2回投与後ではTCI群とSCI群とでほぼ同等のワクチン効果が得られることが明らかとなった。また本判定において、Table 16で示したインフルエンザ経皮ワクチン製剤の針部溶解割合（抗原投与効率）を考慮して、ワクチン投与1回目・2回目ともに50%以上の抗原を皮膚内へ送達できた7名をプロトコルに適合した被験者集団（PPS; Per Protocol Set）として再解析した（Table 20）。その結果、1回目のワクチン投与後においてもTCI群のA型株に対する有効性はSCI群に匹敵し、B型株に対するワクチン効果についてはTCI群のほうがSCI群よりも高いことが判明した。

インフルエンザウイルスは気道粘膜上皮細胞に感染するため、ワクチン投与によって全身性免疫応答のみならず分泌型IgAを主体とする粘膜免疫応答をも活性化できることが望ましい。そこで、インフルエンザ経皮ワクチン製剤の粘膜免疫誘導能について検討するために、被験者の鼻腔洗浄液中のHI価を測定し、抗体陽転率と抗体変化率を算出した（Fig. 40 and Table 21）。血清中HI価上昇のプロファイルとは異なり鼻腔洗浄液中ではB/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対するHI価が最も顕著に上昇し、TCI群およびSCI群ともに2回目のワクチン投与後には算出したパラメーターがEMA基準を満たした。また、PPSに絞って再解析した場合においても、鼻腔洗浄液中のHI価上昇の傾向は大きな変化を認めなかった（Table 22）。このB/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対するHI抗体のサブタイプの同定をELISA法により試みたところ、IgAよりもむしろIgGが主体であることが判明した。したがって、今回の鼻腔洗浄液中のHI価上昇に

については、TCIあるいはSCIによる粘膜免疫の誘導に基づくものではなく、全身性免疫応答として産生増強された血中の抗原特異的IgGが鼻腔粘膜面に漏出したことに起因するものと推察された。しかし、各株HA抗原に対するHI価上昇率は血清中と鼻腔洗浄液中で相関が認められず、血清中では最もHI価上昇率が低かったB/Brisbane/60/2008株由来HA抗原に対して鼻腔洗浄液中のHI価上昇率が最も高かった理由については不明である。

さらに、インフルエンザウイルスに感染した細胞の排除に働く細胞性免疫応答の誘導効果を検討するために、ワクチン投与前後に被験者から回収した末梢血細胞におけるHA抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞数を評価した (Table 23)。SCI群ではワクチン投与前からIFN- $\gamma$ 産生細胞数が多い被験者の割合が高かったものの、TCI群、SCI群ともにワクチン投与によって被験者のHA抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞数が増加する傾向が認められた。本結果のみで細胞性免疫応答の活性化について論じることはできないが、TCIによって抗原特異的なIFN- $\gamma$ 産生細胞が誘導されたことは、ヒトに対するワクチン効果を引き出す上で好材料の一つであると考えられる。

これら有効性評価のデータを総合すると、MH800を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤は、皮膚に微小針を確実に穿刺する、すなわち装填ワクチン抗原を確実に皮膚内に送達する、ための方策が必要とされるものの、ヒトにおいて従来の注射型インフルエンザワクチンと同等のワクチン効果が得られることが明らかとなった。

### C. 3. 6. OVA 装填 nMN 製剤の抗原特異的抗体産生誘導能

モデル抗原であるOVAを針部先端に装填したnMN製剤について、マウスに適用した際

の血清中OVA特異的抗体産生誘導能を指標にワクチン効果を評価した。nMNを用いた経皮免疫群では、皮下注射免疫群と比較して初回免疫後の抗体価はわずかに低値を示したが、2回免疫後には皮下注射免疫群を上回る抗体価の上昇が認められた (Fig. 41)。また、nMNの針部にOVAを装填するために使用した高粘度HPC溶液が、抗原特異的抗体産生の誘導に対して影響がないことも併せて確認した。

## C. 4. 経皮ワクチン製剤用アジュバントの探索

### C. 4. 1. MH 構成成分のアジュバント効果

MH800の針部容量が約1.2  $\mu$ Lであることを考慮すると、MH構成成分の皮膚内に注入される最大量は1 mg程度と考えられる。そこで、各成分0.1~1 mgとOVAを混合して皮内に注射投与したところ、いずれの群においてもOVA単独免疫群と比較して血清中抗OVA IgG抗体価に有意な上昇は認められなかった (Fig. 42)。したがって、MH構成成分は顕著なアジュバント活性を持たないことが示された。

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

OVAを用いた多数の免疫学的評価系が確立されているため、OVAは免疫学およびワクチン学の基礎研究において多用されるモデル抗原である。しかし、市販のOVAにはわずかなではあるがエンドトキシンをはじめとする夾雑物が含まれており、アジュバント探索研究においては、夾雑物のアジュバント活性が候補物質の活性評価や作用機序解析に影響を及ぼす可能性を否定できない。そこで本研究では、夾雑物の混入が低いOVAとして販売されているEndoGrade OVA (J. K. International) を使用した。

Puncturing 法 (Fig. 4) を用いてアジュ

バント候補物質と OVA の混合溶液をマウスに経皮免疫したところ、ODN1826 を併用した群ではわずか 1 回の免疫で 13 日後には OVA 特異的抗体価の明らかな上昇が認められた (Table 24)。また、2 回目の免疫から 13 日後 (Day 27) の時点においては、ODN1826 併用群に次いで MPLA 併用群の抗体価上昇が顕著であった。そこで、ODN1826 ならびに MPLA を有望な経皮ワクチン用アジュバント候補物質として以降の検討を実施した。

アジュバントの併用は、免疫応答を増強するばかりでなく免疫応答特性 (Th1/Th2 バランス) を偏向させる効果も期待される。そこで、2 回免疫後 (Day 27) の血清を用いて OVA 特異的 IgG 抗体のサブクラス解析を行い、ODN1826 および MPLA の併用が免疫応答特性に及ぼす影響を検討した (Fig. 43)。OVA 単独免疫群においては、Th2 型サブクラスである IgG1 と IgG2b の抗体価上昇が検出され、Th1 型の IgG2c の抗体価は検出限界以下であった。これに対して ODN1826 併用群では、IgG1 と IgG2b の抗体価上昇が一層増強されるとともに、IgG2c 抗体価の著しい上昇が認められた。また、MPLA 併用群においても、ODN1826 併用群と比較すると低いレベルではあるが IgG2c の抗体価上昇が検出された。さらに、これらの群のマウスから調製した脾細胞について、OVA 特異的な IFN- $\gamma$  産生細胞数あるいは IL-4 産生細胞数を比較検討した (Fig. 44)。ODN1826 併用群では、OVA 単独免疫群と比較して IFN- $\gamma$  産生細胞数は 2 倍以上の増加を示し、IL-4 産生細胞数には減少が認められた。一方、MPLA 併用群では、IFN- $\gamma$  産生細胞数、IL-4 産生細胞数ともに増加していた。これらの結果から、経皮ワクチン用アジュバントとして ODN1826 を併用すると免疫応答を Th1 優位に活性化し、MPLA を併用すると Th1 型/Th2 バランスを維持した

まま免疫応答を活性化することが明らかとなった。

アジュバント候補物質を実用的なアジュバントとして開発するには、免疫増強活性の評価と併せて安全性を担保するための検討が不可欠である。そこで、ODN1826 あるいは MPLA を併用して経皮投与した際の皮膚刺激性について評価した (Fig. 45)。その結果、いずれの併用群も OVA 単独免疫群と同等の軽度な紅斑を認めたのみであり、それらの紅斑も 24 時間後までには完全に消失した。したがって、ODN1826 と MPLA は皮膚刺激性の低い経皮ワクチン用アジュバント候補物質であることが示された。

#### C. 4. 3. MPLA および ODN1826 のアジュバント活性発現機序の解析

抗原特異的免疫応答の誘導には抗原提示細胞による抗原捕食とそれに続く T 細胞への抗原提示が必要となる。経皮免疫においては、皮膚特有の抗原提示細胞として生きた表皮に LC が、真皮には dDC が存在する。さらに、生きた表皮の約 95% を占める KC はサイトカインやケモカインを産生することにより炎症反応や免疫応答の誘導に大きく関与すると言われている。

そこで、これらの細胞に対する MPLA と ODN1826 の作用を解析すべく、それぞれの標的 TLR である TLR4 と TLR9 の発現を FCM 解析により確認した。C57BL/6 マウスおよび C3H/He マウスの両系統において LC、KC、dDC に TLR4 および TLR9 の発現が認められた (Fig. 46)。C3H/He マウスは TLR4 遺伝子の細胞質内領域に点突然変異 (コドン 712 のプロリンのヒスチジンへの置換) があるために、TLR4 のリガンドに対する感受性が低いことが知られているが、TLR4 を蛋白質として発現していることが確認された。

次に、MPLA と ODN1826 の LC、KC、dDC に

対する細胞傷害性を検討したところ、いずれも 10 µg/mL までの濃度範囲であれば細胞生存率に影響を与えなかった (Fig. 47)。

抗原提示細胞による T 細胞への抗原提示は MHC 分子を介して抗原情報を伝達するが、このイベントには MHC 分子による TCR を介したシグナルだけでなく、細胞表面の共刺激分子を介した補助シグナルが必要である。そこで LC や dDC 上のこれら T 細胞への抗原提示に必要な分子の発現に及ぼす MPLA および ODN1826 の影響を解析した (Fig. 48)。C57BL/6 マウス由来の LC と dDC に MPLA あるいは ODN1826 を作用させると、共刺激分子である CD40 や CD80/86、MHC class I/II、さらには抗原提示細胞のリンパ節遊走に必須な CCR7 の発現上昇が認められた。一方、C3H/He マウス由来の LC および dDC を用いた場合には、ODN1826 の作用による各種分子の発現上昇パターンは C57BL/6 マウス由来の細胞と同様であったが、MPLA を作用させても各種分子の発現レベルはコントロール群と同程度であった。

続いて、C57BL/6 マウス由来の LC、dDC、および KC に MPLA あるいは ODN1826 を作用させた際のサイトカイン産生量を測定したところ、コントロール群と比較して LC および dDC からは TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 の高い産生が認められた (Fig. 49)。MPLA 作用群と ODN1826 作用群とを比較すると、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  に関しては MPLA を作用させた場合の方が高い産生量を示し、IL-12 は ODN1826 を作用させた場合の方が明らかに高値を示した。KC については LC や dDC ほど劇的ではないものの、MPLA あるいは ODN1826 の作用によって TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、および IL-6 の産生が増強した。一方、C3H/He マウス由来の LC、dDC、および KC を用いた場合には、やはり MPLA の作用はキャンセルされてサイトカイン産生量はコントロール群と同等であった。

以上の結果から、MPLA と ODN1826 のアジュバント活性には LC や dDC の活性化および成熟化の促進が寄与しており、少なくとも MPLA の作用発現が TLR4 を介したシグナルに依存することが示された。

生きた表皮層を構成する細胞の 90% 以上を占める KC のアジュバント効果における寄与を精査するために、C57BL/6 マウス由来 KC の ODN1826 刺激に伴う各種サイトカイン・ケモカイン (GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$ ) の分泌量変化を測定したところ、IL-8 の分泌量にのみ顕著な増加が認められ (Fig. 50)、IL-8 が好中球や T 細胞を誘引するケモカインであることから、ODN1826 の経皮投与によるアジュバント効果に皮膚内への免疫細胞動員が寄与する可能性が示された。

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

CpG-ODN (ODN1826 および K3) の経皮投与によるアジュバント効果が TLR9 のシグナル伝達に依存した反応であることの確証を得るために、TLR9 欠損マウスを用いた検討を行った。

野生型マウスにおいては、OVA のみを経皮投与した場合と比較して CpG-ODN を混合経皮投与することで、血清中 OVA 特異的抗体産生誘導に明らかな増強効果が認められた (Fig. 51)。一方、TLR9 欠損マウスでは OVA 単独投与群と OVA/CpG-ODN 混合投与群との間で抗体価の差異が認められなかったことから、CpG-ODN の経皮投与により発揮されるアジュバント効果は TLR9 を介した反応に基づくことが示された。

また、OVA の経皮投与によって誘導された血清中 OVA 特異的 IgG 抗体のサブクラス解析を行ったところ、CpG-ODN の併用は Th1 型サブクラスとされる IgG2b および IgG2c

の産生を増強し、その効果は TLR9 欠損マウスにおいて消失することが判明した (Fig. 52)。したがって経皮投与した CpG-ODN による TLR9 刺激は、Th1 型免疫応答の増強に強く関与することが示唆された。

## D. 考察

### D. 1. MN の物理化学的特性解析

皮膚を標的とする経皮ワクチンにおいては、角質層下の生きた表皮に常在する LC と真皮上層に存在する dDC が抗原特異的な免疫応答の惹起に重要な役割を果たしている (*Immunol. Res.* **36**, 127-136, 2006)。しかし、皮膚最外層の角質層は物質透過に対するバリアとして働くため、ワクチン抗原を単に皮膚表面に塗布するだけでは角質層下へと抗原をデリバリーすることが困難である (*Nat. Biotechnol.* **22**, 165-167, 2004)。LC と dDC はともに抗原提示細胞に分類されるが、それらの免疫学的機能は一部異なることが報告されており (*J. Invest. Dermatol.* **120**, 891-892, 2003, *J. Invest. Dermatol.* **124**, 343-350, 2005)、開発する経皮ワクチンの種類や適応疾患に応じて抗原送達の標的細胞を定めることの重要性が議論され始めている。そのため、LC あるいは dDC に対する抗原送達標的化を行える技術は、この議論に対する理論的根拠を提示する手段として有用であり、さらにワクチン標的細胞を厳密に制御できる次世代経皮ワクチン製剤の開発に貢献できると考えられる。

そこで、痛みを伴うことなく角質層を物理的に突破して皮膚組織内へ効率よく物質をデリバリーできる MN が、経皮ワクチンにおける有望な抗原送達デバイスとして注目されてきた (*Expert Rev. Med. Devices* **8**, 459-482, 2011)。しかしながら、従来のチタン、ステンレス、あるいはシリコンを素材とする MN は、皮膚に適用した際のアレルギー反応や折れた微小針が皮膚組織内に残留する危険性が指摘され、未だ経皮ワクチンデバイスとして臨床応用された例はない。この点に関して我々が独自に開発した MH は、皮膚構成成分であるヒアルロン酸を主素材としているため生体適合性に優れると

ともに、微小針が皮膚内の水分で溶解するため皮膚内での折れ残りを心配する必要のない、安全面において非常に優れた次世代型 MN である。また、MH は微小針に装填できるサイズであれば、物質の性状がいかなるものであろうと角質層下の生きた表皮および真皮にまで装填物質をデリバリーすることができる。現在のワクチン製剤に使用されている抗原が可溶性蛋白質、病原体構成コンポーネント、無毒化・弱毒化病原体、など多岐にわたることを考慮すると、MH はワクチンデバイスとして極めて汎用性に優れることが期待される。さらに我々の MH 製造技術は、MH 基盤上に並ぶ微小針の数(密度)や長さ・形状を自在に調節できることから、皮膚組織内での分布に深度依存性がある LC および dDC に対する抗原送達効率を任意に制御できる可能性を秘めている。

皮膚内の様々な深度部位への抗原送達に対応できる MH バリエーションについて、マウスおよびラットの皮膚に貼付した際の針部溶解過程を観察したところ、いずれの MH についても針部は 1 時間で根元まで完全に溶解した。また、安全面に関しても重篤な皮膚刺激性や起炎性は認められなかった。さらに、MH は低温温度管理を要することなく、湿気を遮断できる包装を施すことで微小針の強度や剛性を長期にわたって維持できることが明らかとなった。ヒアルロン酸を主成分とする MH を応用した経皮ワクチン製剤は、微小針が皮膚内で溶解することによって装填抗原を放出するシステムであり、MH への抗原装填によって組成が変化し、針部耐荷重値(皮膚穿刺能力)が影響を受けることが予想される。MH300 および MH800 を用いて OVA 装填に伴う針部耐荷重値変化を評価したところ、MH の種類ならびに OVA 装填量に拘らず針部耐荷重値は 0.05 N/needle 程度にまで低下した。先端の直径が 25  $\mu\text{m}$  の微小針を皮膚に穿刺するには



0.058 N/needle の耐荷重値が必要であると報告されており (*J. Control. Release* 104, 51-66, 2005)、MH300 および MH800 の微小針先端の直径が 30  $\mu\text{m}$  であることを考慮すると同等の針部耐荷重値が求められる。微小針の皮膚穿刺能力は先端直径ばかりでなく形状や密度によっても影響されると考えられるが、MH への抗原装填時に微小針の確実な皮膚刺入を保障するには針部耐荷重値を増大するための組成改変等が必要だと考えている。

前述のとおり、MH は針長を種々調整することで装填した抗原の皮膚内送達部位を変更できる。生きた表皮、真皮にはそれぞれ異なる免疫応答を誘導する抗原提示細胞群の存在が示唆されているため (*Immunity* 35, 260-272, 2011)、抗原の送達部位をコントロールできる MH は種々の感染症に応じて好適な免疫応答を誘導しうる可能性を有している。また、免疫応答を増強する手段の一つに投与抗原の局所滞留性を向上させることが挙げられるが (*Nature Rev. Microbiol.* 5, 505-517, 2007)、MH を用いた経皮投与は注射針を用いた皮内投与と異なり、抗原の皮膚からの消失が著しく遅れること (皮膚内滞留性の向上) が明らかとなった。他の研究グループによるステンレス MN を用いたインフルエンザ経皮ワクチンについても、同様に抗原の皮膚内滞留時間の延長が報告されている (*MBio* 3, e00012-12, 2012)。注射ワクチン製剤においてアジュバントとして使用されているアルミニウムゲル (Alum) の免疫応答賦活化機構のひとつとして、投与部位における抗原滞留性の向上とそれに伴う抗原提示細胞による抗原捕捉効率の増強が示されており (*Nature Rev. Microbiol.* 5, 505-517, 2007)、MH を用いた経皮ワクチン製剤がアジュバントを併用せずとも比較的強力な免疫応答を誘導できる要因の一つとして皮膚

内抗原滞留性の向上が考えられる。今後、各種 MH を用いた皮膚内抗原送達部位と免疫応答特性の連関を評価し、経皮免疫造成に関与する分子・細胞メカニズムの解明や次世代経皮ワクチン製剤の開発に有益な基礎情報の集積を図る予定である。

乾燥製剤である経皮ワクチン製剤は、従来の注射ワクチン製剤で必要とされてきた製造から使用までの一貫した低温温度管理 (cold chain) が不要となる可能性がある。これは開発途上国を含めた世界規模でのワクチン普及を容易にするとともに、新興・再興感染症パンデミックに備えたワクチンの備蓄においても有益な特性となる。インフルエンザ HA 抗原装填 MH を用いた長期保管試験では、皮膚への安定な穿刺を担保する微小針強度に保管温度 (4~40°C) は大きな影響を及ぼさなかった。一方、MH 製剤に装填された HA 抗原の力価 (HA 価) については保管温度の上昇に伴って明らかな低下が認められた。装填 HA 抗原のタンパク量自体には変化が認められず、MH 製剤の皮膚穿刺時における微小針溶解性に長期保管は影響しなかったことを考え合わせると、長期保管 MH 製剤の皮膚内 HA 抗原送達量は作製直後の MH 製剤と同等であると強く予想された。しかし、長期保管した 3-HA 装填 MH800 から溶出した HA 抗原のワクチン活性を評価したところ、亜型によっては HA 特異的抗体産生誘導能が低下することが判明した。他のグループからもワクチンとして投与する HA 抗原の力価が免疫応答の誘導効果に影響を及ぼす可能性が報告されており (*AAPS PharmSciTech* 11, 1193-1201, 2010)、現在、MH を用いたインフルエンザ経皮ワクチン製剤の cold chain-free 対応に向けた取り組みを進めている。

MH を応用した経皮ワクチン製剤は、皮膚内溶解型という特性によって MH 成分と含有抗原とを同時に皮膚内に投与する「合

剤」としてカテゴライズされるため、既に注射剤として臨床応用されているワクチン抗原を装填したとしても「新薬」としての承認申請手続きを進めなければならない可能性がある。この制度上の経済的・時間的負荷は製薬メーカーの共同開発への参画意欲をくじく原因となることが想定されるため、製薬メーカーの協力のもと経皮ワクチン製剤の一日も早い実用化を実現するためには、同様のコンセプトでありながら承認申請手続きが「剤形変更」として行える異なるアプローチも並行して進める必要があると考えられた。

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

きる利点も有する。

新規開発した nMN および pMN の皮膚穿刺能力を評価する指標として針部耐荷重値を測定したところ、それぞれ 0.034 N/needle および 0.064 N/needle と算出された。これら両 MN の抗原装填時における確実な皮膚刺入を達成するには、皮膚内での針部折損を防ぐ柔軟性を保ちつつ現在の針部耐荷重値（針部強度）を高める改良や工夫が必要となる可能性がある。

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

## D. 2. MN の安全性評価

経皮ワクチン製剤はその簡便性・普及性から開発途上国において、さらには大規模接種にも対応し得ることから先進国においても、有用な新規ワクチン製剤として期待されている。また、皮内投与がこれまで臨床で実施されてきた皮下注射や筋肉内注射と同等以上の免疫応答を誘導し、経皮投与がワクチン効果を高める可能性が示唆されている (*N. Engl. J. Med.* 351, 2295-2301, 2004)。近年、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: *Vaccine* 25, 8833-8842, 2007) 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: *Adv. Ther.* 29, 41-52, 2012) が上市された。これは、皮内ワクチン接種が従来までの注射型ワクチン接種法と比較して簡便性・有効性の観点から重要視されていることを窺わせるものであり、事実、

世界的に様々な MN デバイスの開発研究が行われている。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 MN 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室温保存への対応や医療廃棄物の削減までは望めない。

一方、我々が独自に開発した MH は抗原を装填した微小針を有するシート状の乾燥製剤であり、室温保存による安定性が保証されている。また、注射ワクチン製剤と比較すると使用後の廃棄物量は大きく削減することができる。MH がヒトにおいて安全な経皮ワクチンデバイスであることを実証できたことは、簡便性・普及性に優れる経皮ワクチン製剤の開発を基礎研究から臨床研究へと展開させる橋頭堡として重要な成果であったと確信している。

ワクチン接種対象者の多くが乳幼児・小児であることを考慮すると、接種に痛みを伴わない経皮ワクチン製剤はコンプライアンスの向上にも大きく貢献できる。痛みの程度を客観的に評価することは非常に難しいとされるが、VAS による評価では MH、nMN、pMN のいずれも貼付時の痛みがほとんどない経皮ワクチンデバイスであるとの判断が得られた。

### D. 3. MN を用いた経皮ワクチン製剤の安全性・有効性評価

ワクチン抗原の経皮投与は、従来の注射による皮下投与や筋肉内投与と比較して免疫応答誘導効果に優れており (*N. Engl. J. Med.* 351, 2295-2301, 2004, *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 415-427, 2011)、特に Th2 型免疫応答を強く惹起することが報告されている (*Semin. Immunol.* 17, 273-283, 2005)。したがって、経皮ワクチン製剤は有効性を発揮する抗原特異的な IgG 抗体産生のみならず、アレルギー反応の原因となる

IgE 抗体の産生をも誘導してしまう危険性がある。そこで、モデル抗原として OVA を装填した MH 製剤を貼付したモルモットにおけるアレルギー誘発試験を実施したところ、OVA 特異的 IgE 抗体産生は皮下注射免疫群と比較して同等以下のレベルを示し、アナフィラキシーに関する検討においても陽性反応は認められなかった。したがって、本経皮ワクチン製剤のアレルギー誘発に起因する副反応が従来の注射ワクチン製剤を上回る可能性は極めて低いと判断し、本結果を根拠にヒトでの安全性を検証する臨床研究へと展開することにした。

インフルエンザワクチンは病原体であるインフルエンザウイルスが容易に変異することから、毎年接種することが推奨されている。したがって、現行の注射型ワクチンよりも接種が簡便で注射針やシリンジといった医療廃棄物がでない経皮ワクチン製剤の開発が待望されている。インフルエンザ HA 抗原を装填した MH 製剤を用いてマウスに経皮ワクチンしたところ、HA 抗原特異的な抗体産生が誘導されるとともに、インフルエンザウイルスに対する感染阻止活性が認められた。これまでに、Sullivan らが溶解型 MN を用いたインフルエンザワクチンの有効性を報告しており (*Nat. Med.* 16, 915-920, 2010)、インフルエンザ不活化抗原 6  $\mu\text{g}$  を経皮投与することで抗体産生の誘導ならびに感染防御効果を確認している。これに対して我々は、三価季節性インフルエンザ HA 抗原は各 0.2  $\mu\text{g}$ 、A/PR/8/34 (H1N1) 株由来インフルエンザ HA 抗原は 0.4  $\mu\text{g}$  という比較的低用量の抗原を装填した MH を用いて十分な有効性を引き出すことができた。このように我々独自の MH を応用した経皮ワクチン製剤は、装填抗原量を低減しても高いワクチン効果を誘発することが可能であり、製品化・実用化におけるコスト削減の面で有利性を持つと考えられる。

A/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルスを用いた感染実験において、経皮免疫によって誘導された HA 特異的抗体が HA 活性を中和し、インフルエンザウイルスの感染を阻止したものと考えられた。しかし、病理組織学的検査の気管支肺炎の項目において、経皮免疫群はプラセボ群と同程度のスコアであり、筋肉内注射免疫群および経鼻免疫群のスコアは有意に低かった。経皮免疫群において肺中ウイルス量はその他の免疫群同様に検出限界以下であり、インフルエンザウイルス感染による肺炎の可能性は低いと考えられるが、詳細については今後の検討課題である。

毎冬に流行する季節性インフルエンザは、弱毒性のインフルエンザウイルスによるものであり、ワクチン投与やノイラミニダーゼ阻害薬により症状の重篤化を抑えることが可能である。近年、高病原性インフルエンザウイルスのヒトへの感染が散発的に発生しており、一旦ヒト-ヒト感染が起これば社会・経済に大打撃を与えるパンデミックとなることは明らかである (*N. Engl. J. Med.* 352, 333-340, 2005)。そのため、短期間で大量にワクチン抗原を製造できる体制の整備とそのワクチン抗原を迅速に大規模接種できる手法の開発が望まれる。そこで我々は、簡便性・普及性に優れ、大規模接種に対応し得るデバイスである MH に、遺伝子工学的技術により作製された H5N1 組換え型 HA 蛋白質をワクチン抗原として装填し、その経皮免疫によってマウス血清中に HA 特異的抗体産生が誘導されることを示した。同様に Weldon らも、抗原を微小針表面にコーティングした MN を用いて、組換え型 HA 抗原の免疫応答誘導能を検証している (*Clin. Vaccine Immunol.* 18, 647-654, 2011)。しかし彼らの報告では、組換え型 HA 抗原を三量体として安定化することで抗原性の向上を図っており、組換え型 HA 抗原

単独投与 (3  $\mu$ g) では後に症状の回復は認められるものの、抗体産生は低く、顕著な感染防御効果は得られていない。我々の検討ではわずか 0.05  $\mu$ g の投与において、注射免疫群との比較ではあるが、抗体産生は同程度であることを確認している。今後は、経皮ワクチンに適したアジュバントを探索し、組換え型蛋白質を用いたワクチンの更なる有効性増進を目指していく予定である。また、針長が短い MH300K を用いた経皮免疫では、抗体産生や IFN- $\gamma$  産生量の低下が認められており、経皮投与による抗原送達部位の違いが免疫応答特性に影響を与えることが示唆された。今後は、経皮免疫誘導機構の解明を積極的に進めていき、経皮ワクチン製剤の有効性向上を図りたいと考えている。

また、インフルエンザウイルスは気道粘膜から感染することから、粘膜面でウイルス感染を防御する IgA 抗体を誘導することは重要である。さらに、交差感染防御能に優れている IgA 抗体は変異体の多いインフルエンザウイルスに対して有利に働くと考えられ、その誘導が望まれる。しかし残念ながら、MH を応用した経皮免疫群においては明らかな IgA 抗体の産生増強は認められなかった。従来の注射型ワクチンでは粘膜免疫を誘導できないことから、現在のワクチン研究領域では抗原を粘膜面に直接投与できる経鼻ワクチンや経口ワクチンの開発が積極的に進められている (*Expert Rev. Vaccines* 8, 1083-1097, 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8794-8799, 2010)。しかし、経鼻ワクチンにおいては強い副反応を示す CT を併用しなければ満足な免疫応答を誘導できず、また経鼻投与による脳への薬物送達の影響が懸念される (*Nat. Mater.* 9, 572-578, 2010) など、臨床適用へのハードルは高いのが現状である。経口ワクチンでは腸管で粘膜免疫誘導を司るパ