

Fig. 49 Cytokine secretion profile of LCs, KCs, and dDCs by stimulation with TLR-Ls. LCs, KCs, and dDCs isolated from C57BL/6 (solid column) or C3H/He mice (open column) were cultured at 5×10^5 cells/well with or without (control) 10 $\mu\text{g/ml}$ MPLA or ODN1826. After 24-h cultivation, supernatants were collected, and TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-12p70 secretion levels were measured by ELISA. Results are expressed as the mean \pm S.E. of triplicate cultures.

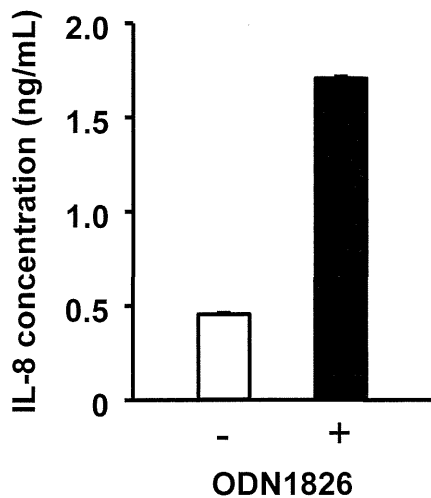


Fig. 50 IL-8 production of KCs stimulated with ODN1826. KCs isolated from C57BL/6 mice were cultured at 5×10^5 cells/well with (filled column) or without (open column) 10 μ g/ml ODN1826. After 24 h, cell free supernatants were collected, and IL-8 production level were measured by ELISA. Results are expressed as the mean \pm S.E. of triplicate cultures.

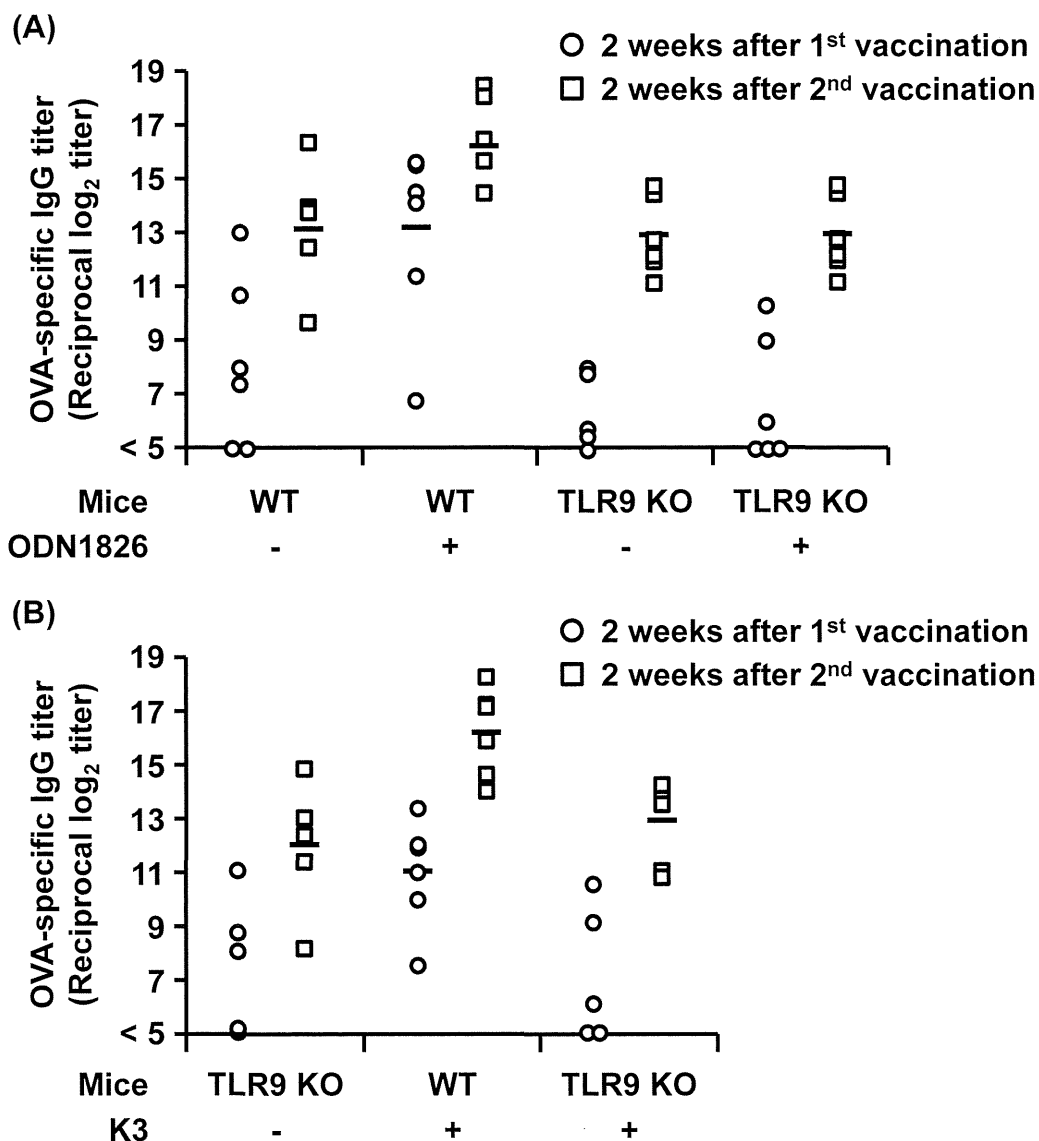


Fig. 51 OVA-specific antibody titers in mice immunized transcutaneously with OVA plus ODN1826 (A) or K3 (B). C57BL/6 mice (WT) or TLR9 KO mice were transcutaneously immunized with 50 μ g OVA alone or combined with ODN1826 or K3 by using puncturing method. Two weeks later, mice were immunized again with 50 μ g OVA alone by using puncturing method. Sera collected from these mice were assayed for the IgG titer specific against OVA by ELISA. Black bars are expressed as mean of results from 5-6 mice. Circles and squares indicate antibody titer of individuals.

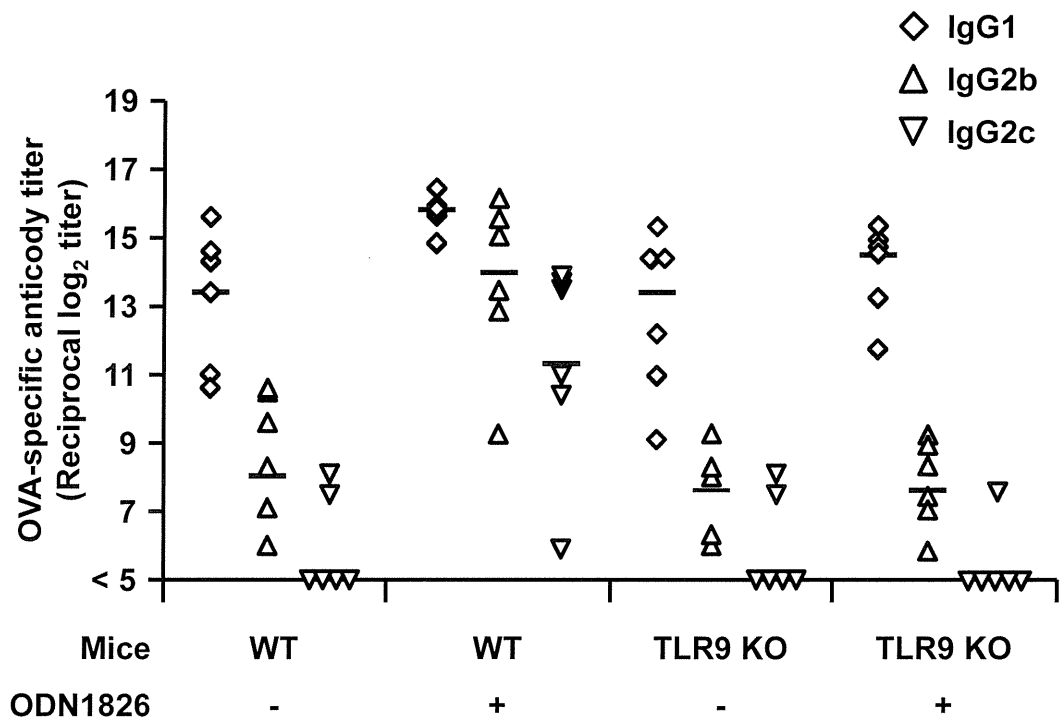


Fig. 52 OVA-specific IgG subclass analysis in mice immunized transcutaneously with OVA plus ODN1826. C57BL/6 mice (WT) or TLR9 KO mice were transcutaneously immunized with 50 μ g OVA alone or combined with ODN1826 by using puncturing method. Two weeks later, mice were immunized again with 50 μ g OVA alone by using puncturing method. Two weeks after second vaccination, OVA-specific IgG subclass (IgG1, IgG2b, IgG2c) titer in sera collected from these mice were determined by ELISA. Black bars are expressed as mean of results from 5-6 mice.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作	経皮ワクチン		ワクチン開発における最新動向～規制動向・安全性評価・品質管理・アジュバント・開発事例～	情報機構	東京	2013	197-211
廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作	経皮ワクチン	寺田弘, 中川晋作, 辻孝三, 牧野公子, 絹田精鎮, 西野敦	応用が広がるDDS—人体環境から農業・家電まで—	エヌ・テイー・エス	東京	2013	310-318
廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作	皮膚内容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	山本昌	非経口投与製剤の開発と応用—次世代型医薬品の新規投与形態の開拓を目指して—	シーエムシー出版	東京	2013	172-178
廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作	経皮ワクチン製剤のDDS技術の動向と実用化の可能性		DDS製剤の開発・評価と実用化手法	技術情報協会	東京	2013	186-193
廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作	皮膚を標的とした新規ワクチン製剤「貼るワクチン」の開発	田畑泰彦	遺伝子医学MOOK別冊 — こまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 — 古くて新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) —	メディカルドゥ	大阪	2013	277-282

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sachiko Hirobe, Hiroaki Azukizawa, Kazuhiko Matsuo, You Zhang, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Hiroshi Suzuki, Ichiro Katayama, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa	Development and clinical study of a self-dissolving microneedle patch for transcutaneous immunization device	Pharmaceutical Research	30(10)	2664-2674	2013
Yasuhiro Hirai, Sachiko Hirobe, Hiroshi Iizuka, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Hideo Asada, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa	Development of a novel therapeutic approach using a retinoic acid-loaded patch for seborrheic keratosis treatment and safety study in humans	Journal of Controlled Release	171(2)	93-103	2013
Kazuhiko Matsuo, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa	Frontiers of transcutaneous vaccination systems: Novel technologies and devices for vaccine delivery	Vaccine	31(19)	2403-2415	2013
Sachiko Hirobe, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa	Transcutaneous vaccines: current and emerging strategies	Expert Opinion on Drug Delivery	10(4)	485-498	2013
Yasuhiro Hirai, Takeshi Nakagawa, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa	Performance and characteristics evaluation of a sodium hyaluronate-based microneedle patch for a transcutaneous drug delivery system	International Journal of Pharmaceutics	441(1-2)	570-579	2013
岡田直貴	経皮ワクチン製剤（貼るワクチン）の基礎から臨床	薬学雑誌	133 (12)	1363-1372	2013
廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作	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	感染・炎症・免疫	43(3)	259-262	2013

Kazuhiko Matsuo, Yayoi Yokota, You Zhai, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa	A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle patch for soluble and particulate antigens	Journal of Controlled Release	161(1)	10-17	2012
Kazuhiko Matsuo, Sachiko Hirobe, Yayoi Yokota, Yurika Ayabara, Masashi Sette, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Takahiro Togan, Toshihiro Horii, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa	Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza	Journal of Controlled Release	160(3)	495-501	2012
廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作	経皮ワクチンの進歩と展望	臨床免疫・アレルギー科	58(3)	313-321	2012

第7節 経皮ワクチン

はじめに

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

1. ワクチンの投与部位としての皮膚

皮膚は外的環境から身体を守る組織であり、常に外界の異物に曝されているために、異物の侵入を防ぐ“物理的バリアー”と異物の除去を担う“免疫学的バリアー”を有する。皮膚は外側から角質層、生きた表皮、真皮の三層に分けられる。皮膚の最外層に存在する角質層は、ケラチンタンパク質で出来た角質細胞が幾重にも重なることで構成され、生きた細胞の集合体である生体がウイルスや細菌に満ちた環境で生きていくための物理的バリアーとなっている(図1)。一方で、角質層下の生きた表皮ならびに真皮に存在する様々な細胞群が免疫学的バリアーとして機能している。抗原提示細胞(APC)として、生きた表皮にはランゲルハンス細胞、真皮には真皮樹状細胞が常在しており、獲得免疫応答誘導の要となっている²⁾。生きた表皮の90%以上を占めるケラチノサイトは、サイトカインの産生・分泌を行い、外来異物に対する免疫応答を活性化するとされている³⁾。これらのことから、角質層下に存在する免疫担当細胞、特にAPCへと抗原を送達することができれば、抗原を捕食したAPCがリンパ節へと遊走し、抗原特異的にT細胞ならびにB細胞を活性化することで、強力な獲得免疫応答を誘導できると考えられる。そのため、経皮ワクチン開発においては、ワクチン抗原を物理的バリアーである角質層を突破させ、免疫学的バリアーが構築されている生きた表皮ならびに真皮へと送達しなければならない。

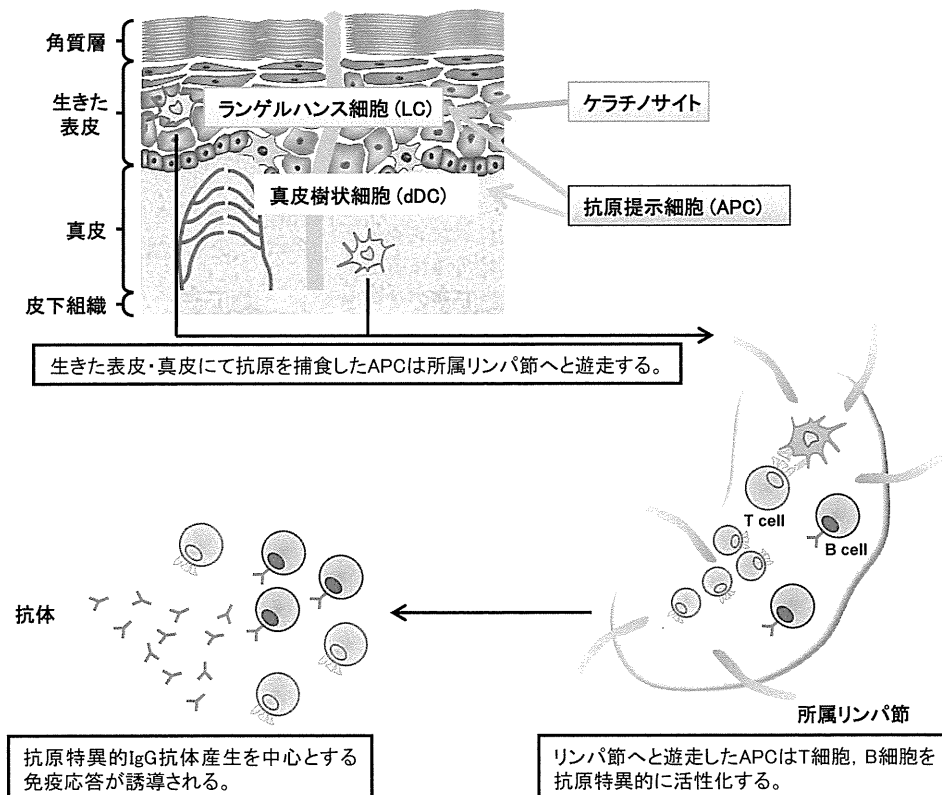


図1 経皮免疫誘導メカニズム

APCとして生きた表皮にはランゲルハンス細胞、真皮には真皮樹状細胞が存在し、抗原を捕食したAPCは所属リンパ節へと遊走する。リンパ節にてAPCは、T細胞、B細胞を抗原特異的に活性化し、獲得免疫を誘導する。また、生きた表皮の90%以上を占めるケラチノサイトは、サイトカインの産生・分泌を担い、免疫反応の活性化に寄与する。

2. 経皮ワクチンデリバリー技術の発展

ワクチン抗原は可溶性の高分子蛋白質や病原体由来コンポーネントの凝集体、さらには無毒・弱毒化したウイルスや細菌である。角質層は水溶性ならびに分子量500以上の物質についてその透過を制限することが報告されており⁴⁾、高分子あるいは粒子状のワクチン抗原を単に皮膚表面に塗布しただけでは皮膚内へと送達することは困難である。そこで、様々なアプローチにより抗原を皮膚内へと送達する手法が開発されている(表1)。

表1 代表的な経皮ワクチンデリバリー技術

経皮ワクチンデリバリー技術	方法	利点と欠点
<p>エレクトロポレーション</p> 	<p>正負の両電極間に負荷する電圧により、一時的に皮膚に孔を生じさせることで、抗原の角質層透過を促進する</p>	<p>(利点)</p> <ul style="list-style-type: none"> 細胞内へと直接物質を送達することも可能 <p>(欠点)</p> <ul style="list-style-type: none"> 費用が高い 特殊で大型の装置が必要
<p>Jet injector</p> 	<p>特殊なデバイスを用いて、圧力によって抗原を皮膚内に注入する</p>	<p>(利点)</p> <ul style="list-style-type: none"> 投与が迅速 <p>(欠点)</p> <ul style="list-style-type: none"> 投与時の痛み 神経線維の損傷 費用が高い
<p>マイクロニードル</p> 	<p>微小な針を用いて、角質層に孔をあけ、抗原を皮膚内へと送達する</p>	<p>(利点)</p> <ul style="list-style-type: none"> 痛みがない 投与が簡便 輸送、管理、備蓄が容易 <p>(欠点)</p> <ul style="list-style-type: none"> 針の皮膚内残存の危険性
<p>パッチ製剤</p> 	<p>抗原を含んだガーゼパッチあるいは粘着性パッチを皮膚に貼付して、抗原を送達する</p>	<p>(利点)</p> <ul style="list-style-type: none"> 痛みがない 投与が簡便 輸送、管理、備蓄が容易 <p>(欠点)</p> <ul style="list-style-type: none"> 抗原の利用率が低い

2.1 エレクトロポレーション

エレクトロポレーション法は、皮膚への電圧負荷により角質層に一時的に孔をあけて抗原を皮膚内へ送達する物理的経皮送達手法の一つである⁵⁾。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、皮膚細胞内へ直接物質を導入できることであり、特に DNA を用いたワクチンにおいて効率的に免疫応答を誘導できる。動物モデルにおいてエレクトロポレーションを用いた経皮ワクチンの有効性は多数示されており⁶⁻⁸⁾、注射型製剤に比べて低侵襲な手法であることから、ヒトへの適用が期待されている。しかしながら、実用化に向けては、特殊かつ大きな装置を必要とするために、コストが高いことが大きな課題となっている。

2.2 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⁹⁾。針を介した二次感染の危険性がなく、迅速な大規模接種を可能にすることから、軍隊での使用を目的に開発された。日本においても 1970 年代に小・中学校の予防接種に用いられた実績を有するが、神経線維の損傷が多発したことや痛みが大きいことを受け、すでに使用は取りやめられている。現在ではより安価かつ簡便に扱える Jet injector の開発が進められ、臨床試験において様々な感染症に対する有効性が報告されており¹⁰⁻¹⁶⁾、実用化に向けた安全性の担保が重要となっている。

3. 粘着性およびガーゼパッチを用いた経皮ワクチン

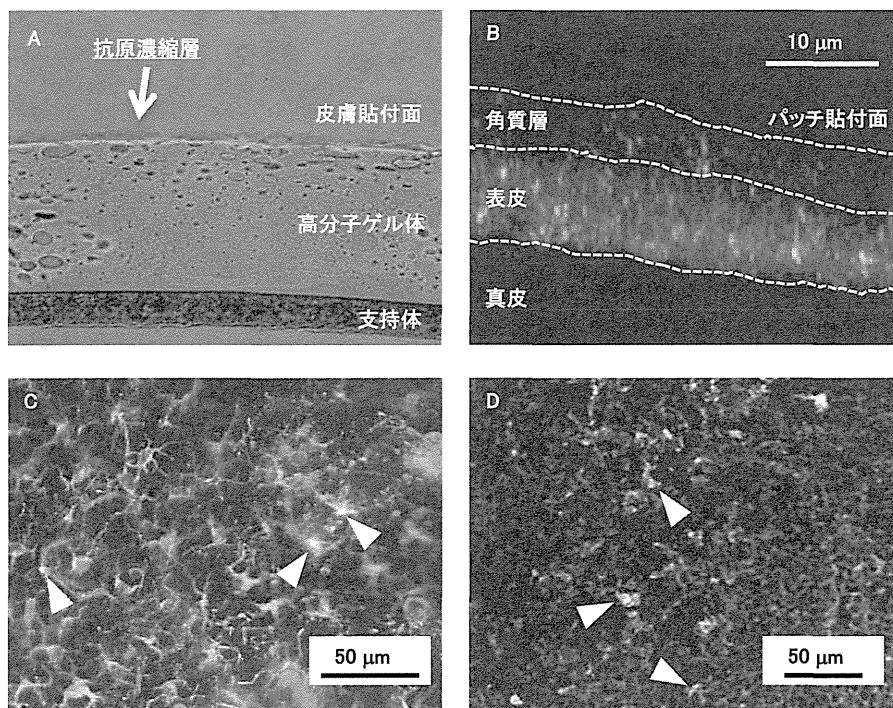
経皮ワクチンデリバリー技術の中でも特殊な装置を必要とせず、ただ貼るだけでワクチン効果を誘導できる粘着性パッチおよびガーゼパッチの開発が世界各国へのワクチン普及や大規模接種の観点から重要視されている。IOMAI 社（2008 年に Intercell 社により買収）は、アルコールと綿棒で角質層を除去する SPS (skin preparation system) という手法を用いたガーゼパッチワクチンを開発している^{17,18)}。他にも、接着剤であるシアノアクリレートを用いた角質層の除去 (CSSS; cyanoacrylate skin surface stripping) により、抗原透過を促進するガーゼパッチ製剤のヒトへの適用が検討されている¹⁹⁻²¹⁾。しかしながら、これらの従来型のパッチ製剤は貼付前に角質層の一部を除去する前処理を必要とするだけでなく、皮膚に適用する直前に抗原溶液をパッチに浸み込ませるため、簡便性に欠けている。また、注射型ワクチンと同様に抗原溶液の輸送や保管に冷蔵管理を要するなど、さらなる改良を加える必要がある。そこで著者らは、コスメディ製薬株式会社と共同開発した親水性ゲルパッチを応用した経皮ワクチン製剤の開発を推進している²²⁻²⁷⁾。

3.1 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの開発

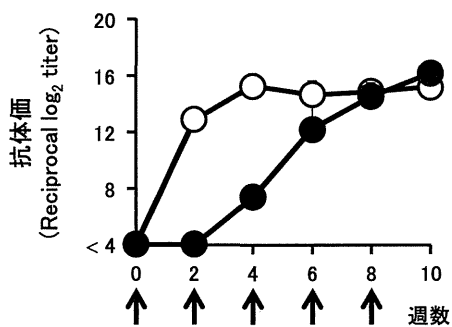
親水性ゲルパッチは、アクリル酸エステル系粘着剤をベースに、浸潤剤、吸収促進剤などすでに医薬品や化粧品などで用いられている安全性の高い材料を配合して作製している。また、本パッチの皮膚貼付面に抗原蛋白質水溶液を滴下すると、水分のみが高分子ゲル体に吸収されてパッチ表面に抗原蛋白質の濃縮層が形成される(図2A)。このように、抗原を含浸させた状態で取り扱うことができるために、輸送・保管が容易になると考えられる。抗原含有親水性ゲルパッチは、特別な前処理を必要とすることなくただ貼るだけで、抗原を表皮組織にまで送達することができる(図2B)。また、皮膚内に送達された抗原はランゲルハンス細胞に取り込まれており(図2C)、さらにリンパ節内へと抗原を取り込んだランゲルハンス細胞が遊走していることが確認された(図2D)。そこで、破傷風・ジフテリアトキソイドを含有した親水性ゲルパッチをラット背部皮膚に貼付したところ、各トキソイド特異的なIgG抗体が産生された(図2E)。親水性ゲルパッチによる抗原分子の角質層透過は、ゲルパッチの貼付により水和した角質層の細胞間隙に水溶性の高分子が分配し、現出した皮膚内の抗原濃度勾配が単純拡散の駆動力となって促進されたと考えられる。また、抗原を含有したゲルパッチを貼付した皮膚局所に顕著な刺激性は認められなかったこと、各種血液検査や病理組織学的検査などにおいても異常が確認されなかったことから、本経皮ワクチン製剤の安全性を動物実験にて実証した²⁴⁾。

3.2 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの臨床研究

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



E 抗破傷風トキソイドIgG抗体価



抗ジフテリアトキソイドIgG抗体価

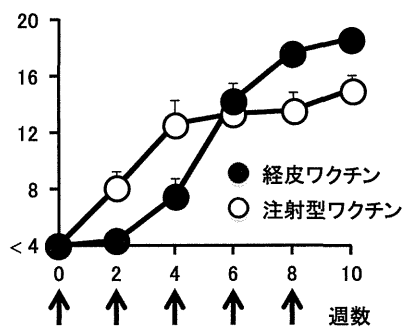


図2 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチン

- (A) 抗原蛋白質（赤色蛍光標識）水溶液を滴下して30分後の親水性ゲルパッチ断面の顕微鏡写真
- (B) 抗原蛋白質（赤色蛍光標識）を含む親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に6時間貼付した後、パッチ適用部位の皮膚組織を摘出し、ランゲルハンス細胞の蛍光免疫染色（緑色）を行った。共焦点レーザー顕微鏡にて撮像した二次元データから三次元画像を構築した。
- (C) 抗原蛋白質（赤色蛍光標識）を含む親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に2時間貼付した後、パッチ適用部位の表皮シートを作製した。ランゲルハンス細胞の蛍光免疫染色（緑色）を行った後、蛍光顕微鏡にて観察した。
- (D) 抗原蛋白質（赤色蛍光標識）を含む親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に24時間貼付し、剥離24時間後に摘出した所属リンパ節の凍結切片を作製した。ランゲルハンス細胞の蛍光免疫染色

(緑色)を行った後、蛍光顕微鏡にて観察した。

(E) ヘアレスラット背部皮膚に破傷風トキソイドならびにジフテリアトキソイドを各 100 μ g を含んだ 1 cm \times 2 cm の親水性ゲルパッチを 24 時間貼付した。対照群のヘアレスラットには同量の破傷風トキソイドならびにジフテリアトキソイドを背部皮下注射した。これらの免疫操作を 2 週間隔で 5 回繰り返し (図中の \uparrow)、経時的に回収した血清中の抗トキソイド抗体価を ELISA 法により測定した。

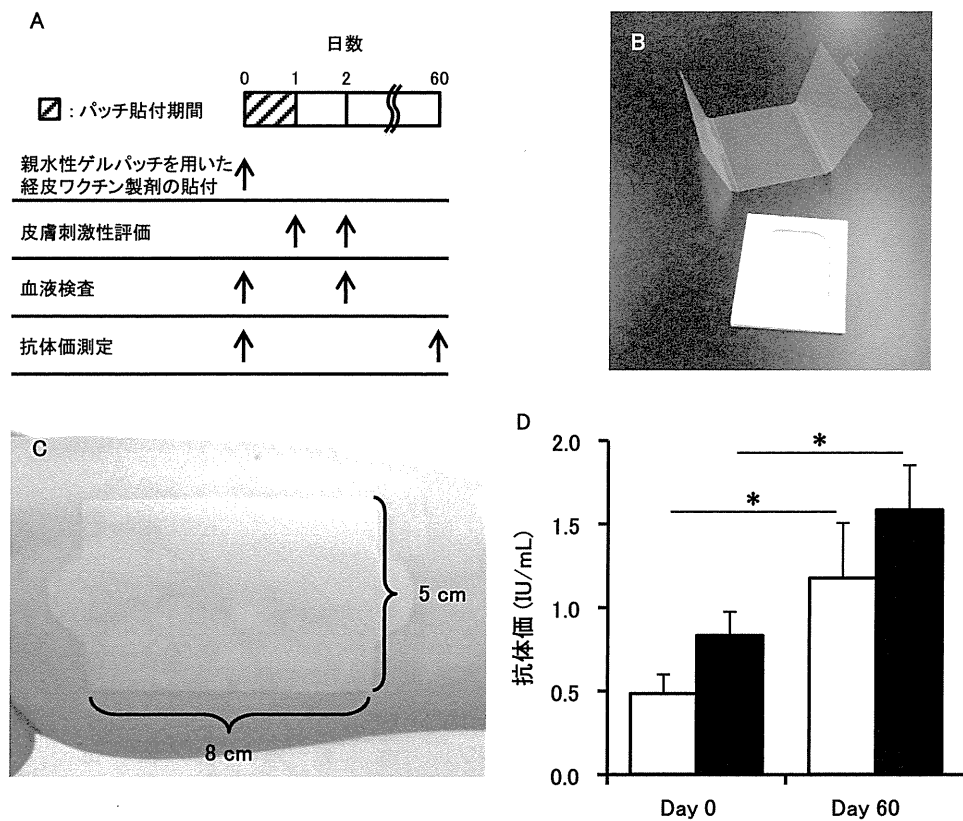


図 3 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの臨床研究

- (A) 破傷風・ジフテリア経皮ワクチン製剤の臨床研究スケジュール
 (B) 製品化を志向した親水性ゲルパッチ製剤
 (C) 親水性ゲルパッチのヒト上腕内側皮膚への貼付写真
 (D) 破傷風・ジフテリアトキソイドを各 2 mg 含有した 5 cm \times 8 cm の親水性ゲルパッチを 27 人の健康成人の上腕内側皮膚に 24 時間貼付した。貼付前ならびに貼付 60 日後に血中の抗トキソイド抗体価を ELISA 法により測定した。□；抗破傷風トキソイド IgG 抗体価。■；抗ジフテリアトキソイド IgG 抗体価。データは mean \pm S.E. を示した。*：p < 0.01 (paired t-test)

3.3 親水性ゲルパッチの実用化に向けた今後の課題

著者らの親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチン製剤は十分なワクチン効果を得るために、注射型ワクチンに比べて大量の抗原を必要とする。親水性ゲルパッチについて、角質層下に送達される抗原量は含浸させた量の数%程度であることを確認しており、抗原の利用率が低いのが現状である²⁶⁾。したがって、簡便かつ安全だけでなく安価でより有効な経皮ワクチン製剤の実用化に向けては、抗原の角質層透過効率に優れるゲルパッチ、ならびに免疫増強効果を図るための臨床応用可能な経皮アジュバントを開発していかなければならない。また、製剤安定性の評価、製剤製造法の樹立や品質試験法の確立など、経皮ワクチンの製品化・実用化に向けた取り組みを推進していくことが重要である。

4. マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

親水性ゲルパッチは水溶性抗原物質の角質層への分配とその後の単純拡散によってAPCへの送達効率を上昇させるため、抗原物質が水に不溶性あるいは懸濁された粒子状形態の場合には適用が困難である。ところが、注射型ワクチン製剤として実用化されている抗原の多くは、無毒・弱毒化したウイルスや細菌（BCG、麻疹ワクチンなど）、あるいはそれら病原体由来コンポーネントの凝集体（インフルエンザHA抗原など）といった粒子状形態であるため、親水性ゲルパッチに適用可能なワクチン抗原は限定されてしまう。すなわち、経皮ワクチン製剤の適用を拡大するためには、不溶性ならびに粒子状ワクチン抗原にも対応しうる新たな経皮ワクチンデバイスの開発が必要とされる。そこで著者らは、微小な針により角質層に孔をあけることで抗原を送達するマイクロニードル法に着目した²⁸⁾。

4.1 各種マイクロニードルデバイスの開発

マイクロニードルは神経終末が存在する真皮にまで針が到達しないことから痛みを伴わず、またマイクロニードル製剤を貼るだけという簡便な操作で抗原を投与できる利点がある。さらに、抗原透過のバリアーとなる角質層を物理的に突破するため、様々なワクチンに対応可能な新規経皮ワクチンデリバリー技術として注目を集めている。第一世代のマイクロニードルはシリコンや金属（ステンレス、チタン）を構成材料としたものであり、①マイクロニードルの貼付により生じた穿刺孔を介して抗原を皮膚内へ送達する²⁹⁾（**図4A**）、②マイクロニードルの中空を介して抗原溶液を皮膚内へと注入する³⁰⁾（**図4B**）、③抗原をコーティングしたマイクロニードルを貼付して抗原を皮膚内へと拡散させる³¹⁾（**図4C**）、といった方法がある。これらは剛性に優れる、成形しやすい、といった利点を有しており、シリコン製中空マイクロニードルを用いたインフルエンザワクチンについて臨床試験の成果が報告されている。しかし、これらの固形マイクロ

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

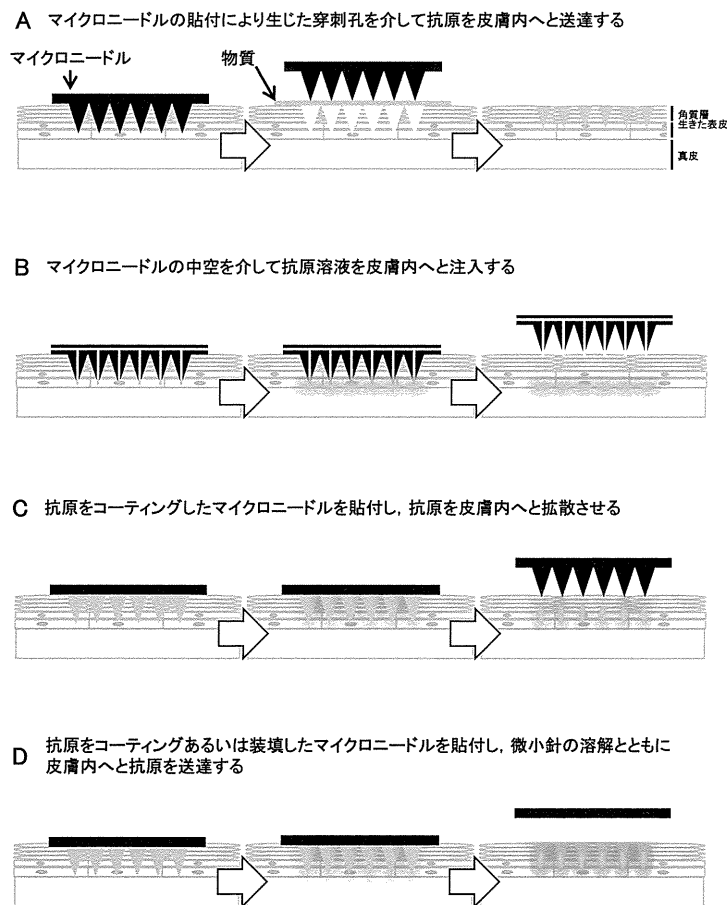


図 4 マイクロニードルを用いた経皮送達機構

4.2 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチンの開発

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

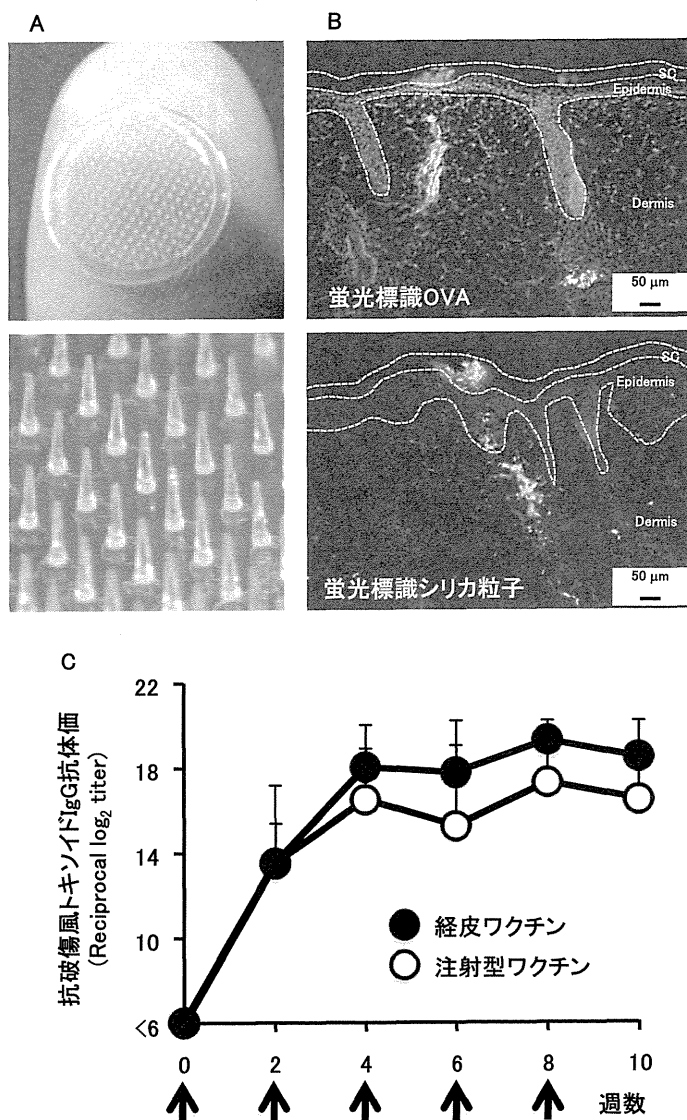


図 5 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

- (A) 皮膚内溶解型マイクロニードルの全体像。面積は 0.8 cm^2 であり、生体適合性に優れたヒアルロン酸を主成分として形成された約 200 本の微小な針を有する。
- (B) 針長 $800 \mu\text{m}$ の皮膚内溶解型マイクロニードルパッチに蛍光標識 OVA あるいは蛍光標識シリカ粒子を装填し、マウス背部皮膚に 6 時間貼付した。貼付部位の皮膚を回収し、凍結切片を作製後、蛍光顕微鏡により観察した。
- (C) 破傷風トキソイドを $10 \mu\text{g}$ 装填した針長 $800 \mu\text{m}$ のマイクロニードルパッチをラット背部皮膚に 6 時間貼付した。対照群のラットには同量の破傷風トキソイドを背部皮下注射した。これらのワクチン投与を 2 週間隔で 5 回繰り返し (図中の \uparrow)、経時的に血中の抗トキソイド抗体価を ELISA 法により測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率の逆数の対数を Reciprocal log₂ titer として表した。

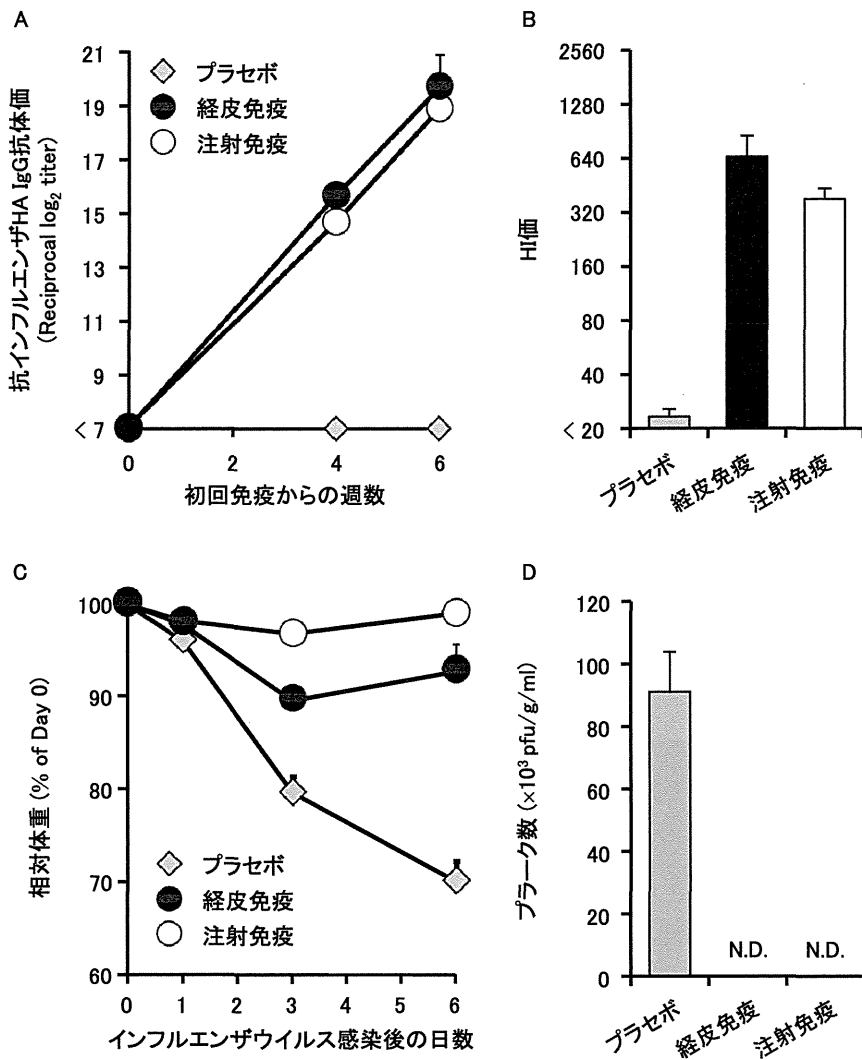


図6 インフルエンザ経皮ワクチンの前臨床研究

インフルエンザHA抗原(A/PR/8/34(H1N1))を0.4 μg装填した針長800 μmのマイクロニードルパッチをマウス背部皮膚に6時間貼付した。対照群のマウスには同量のインフルエンザHA抗原を大腿部筋肉内注射した。これらのワクチン投与を4週間隔で2回実施した。最終免疫2週間後にインフルエンザウイルス(A/PR/8/34(H1N1))を5 × 10⁶ pfu/headでマウスに鼻腔投与した。

- (A) 経時的に血中の抗HA抗体価をELISA法により測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が0.1以上高い最大希釈倍率の逆数の対数をReciprocal log₂ titerとして表した。
- (B) 血中のHI価を赤血球凝集阻止試験により測定した。
- (C) インフルエンザウイルス投与後、経時的に体重を測定した。
- (D) インフルエンザウイルス投与6日後、摘出した肺の右葉を細分化し、ホモジネートすることで肺組織液を得た。肺組織液をMDCK細胞に接種し、培養することで、インフルエンザウイルスプラークを計測した。

4.3 皮膚内溶解型マイクロニードルの臨床研究

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

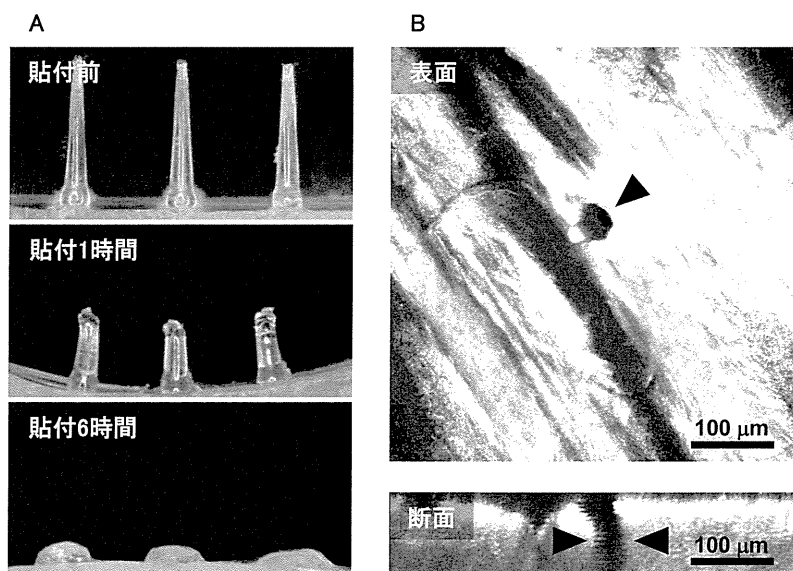


図7 皮膚内溶解型マイクロニードルのヒト皮膚への適用

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

おわりに

DDS 技術を基盤とした経皮ワクチン製剤が多数考案・開発されている中、皮膚に貼るだけという簡便な操作で予防接種を施行可能なパッチ製剤ならびにマイクロニードル製剤の研究開発に期待が寄せられている。著者らはコスメディ製薬と共同開発した親水性ゲルパッチならびに皮膚内溶解型マイクロニードルを応用した経皮ワクチン製剤をすでに臨床研究へと展開しており、ヒトにおける有用性を見出している。経皮ワクチン製剤が従来までの注射に代わる簡便性・普及性に優れた新規剤型ワクチンとして実用化されれば、乳幼児のワクチン接種の負担を大きく軽減できるのみならず、感染症地域への渡航者に対する事前予防ワクチンの施行、開発途上国へのワクチン普及に大きく貢献できるものと期待する。

謝 辞

本稿にて紹介した研究内容は、先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業（独立行政法人医薬基盤研究所）、「厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）」ならびに「文部科学研究費補助金（挑戦的萌芽）（基盤研究 B）（若手研究 B）」からの研究助成によるものであり、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたりご協力いただきましたコスメディ製薬株式会社 神山文男先生、権英淑先生、奈良県立医科大学 浅田秀夫先生、大阪大学医学系研究科 小豆澤宏明先生、片山一朗先生、一般財団法人阪大微生物病研究会に深謝いたします。

参考文献

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