

表1 経皮ワクチンデリバリー製剤の臨床研究

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MicroHyla®	三価季節性インフルエンザ HA ワクチン	clinical study (CosMED)	unpublished

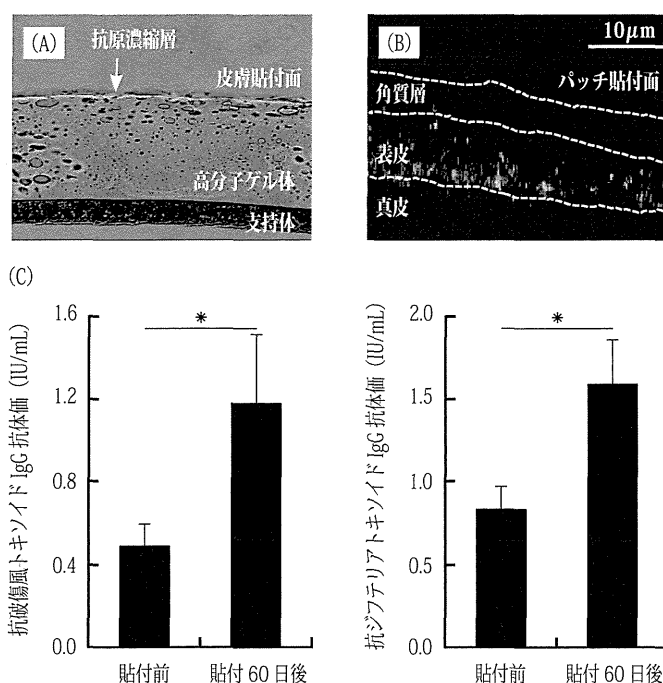
PMED, Particle Mediated Epidermal Delivery ; SPS, Skin Preparation System ; CSSS, cyanoacrylate skin surface stripping ; HIV, human immunodeficiency virus ; HA, hemagglutinin

### 3. 粘着性およびガーゼパッチを用いた経皮ワクチン

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

#### 3.1 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの開発

そこで著者らは、コスメディ製薬株式会社と共同開発した親水性ゲルパッチを応用した経皮ワクチン製剤の開発を推進している<sup>25-28)</sup>。親水性ゲルパッチは、アクリル酸エステル系粘着剤をベースに、浸潤剤、吸収促進剤などすでに医薬品や化粧品などで用いられている安全性の高い材料を配合して作製している。また、本パッチの皮膚貼付面に抗原タンパク質水溶液を滴下すると、水分のみが高分子ゲル体に吸収されてパッチ表面に抗原タンパク質の濃縮層が形成される (図 2(A))。このように、抗原を含浸させた状態で取り扱うことができるために、輸送・保管が容易になると考えられる。抗原含有親水性ゲルパッチは、特別な前処理を必要とすることなくただ貼るだけで、抗原を表皮組織にまで送達しており (図 2(B))、破傷風・ジフテリア感染症モデルにおいて各トキソイド特異的な IgG 抗体が産生されることを確認している。親水性ゲルパッチによる抗原分子の角質層透過は、ゲルパッチの貼付により水和した角質層の細胞間隙に水溶性の高分子が分配し、その結果現出した皮膚内の抗原濃度勾配が単純拡散の駆動力となって促進されたと考えられる。また、抗原を含有したゲルパッチを貼付した皮膚局所に顕著な刺激性は認められなかったこと、各種血液検査や病理組織学的検査などにおいても異常が確認されなかったことから、本経皮ワクチン製剤の安全性が動物実験にて実証された<sup>27)</sup>。



- (A) 抗原タンパク質 (赤色蛍光標識) 水溶液を滴下して 30 分後の親水性ゲルパッチ断面の顕微鏡写真
- (B) 抗原タンパク質 (赤色蛍光標識) を含む親水性ゲルパッチをマウス耳皮膚に 6 時間貼付した後、パッチ適用部位の皮膚組織を摘出し、ランゲルハンス細胞の蛍光免疫染色 (緑色) を行った。共焦点レーザー顕微鏡にて撮像した二次元データから三次元画像を構築した。
- (C) 破傷風・ジフテリアトキソイドを各 2 mg 含有した 5 cm × 8 cm の親水性ゲルパッチをヒト上腕内側皮膚に 24 時間貼付した。貼付前ならびに貼付 60 日後に血中の抗トキソイド抗体価を ELISA 法により測定した。データは mean ± S.E. を示した。\*: p < 0.01 (paired t-test)

図 2 親水性ゲルパッチを用いた貼るワクチン

※ カラーの図は巻頭ページを参照

### 3.2 親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの臨床研究

前臨床研究における成果に基づき、我々は破傷風・ジフテリア経皮ワクチンの安全性・有効性をヒトにおいて検証する臨床研究を実施した<sup>29)</sup>。破傷風・ジフテリアトキソイドをそれぞれ 2 mg 含有した親水性ゲルパッチ製剤 (5 cm × 8 cm) をヒト上腕内側皮膚に 24 時間貼付したところ、重篤な局所ならびに全身性の副反応を観察することなく、抗原特異的な免疫応答を誘導可能であることが明らかとなった (図 2(C))。また、ラマン共焦点分光装置によってパッチ貼付後における角質層内の成分を解析したところ、水分含量の増加、パッチ構成成分である浸潤剤 (グリセリン) ならびに吸収促進剤 (乳酸オクチルドデシル) の角質層への移行が確認された。このことから、角質層の膨潤と角質層に移行した各成分の作用が合わさることで、ヒトにおいても 150 kDa にもなる巨大分子である破傷風トキソイドを角質層下へと送達できたと推察される。このように親水性ゲルパッチはヒトにおいてもただ貼るだけで免疫応答を誘導可能な安全かつ有効なワクチンデバイスであることが実証された。本邦では多くの人が、乳幼児に破傷風・ジフテリアトキソイドワクチンの接種を受け、抗トキソイド抗体を有している。しかし、その抗体価は年齢を重ねると低下すると言われており、皮膚に貼るだけと簡便な手法でブースト免疫を誘導できる本製剤は非常に有用であるといえる。

### 3.3 粘着性およびガーゼパッチの実用化に向けた今後の課題

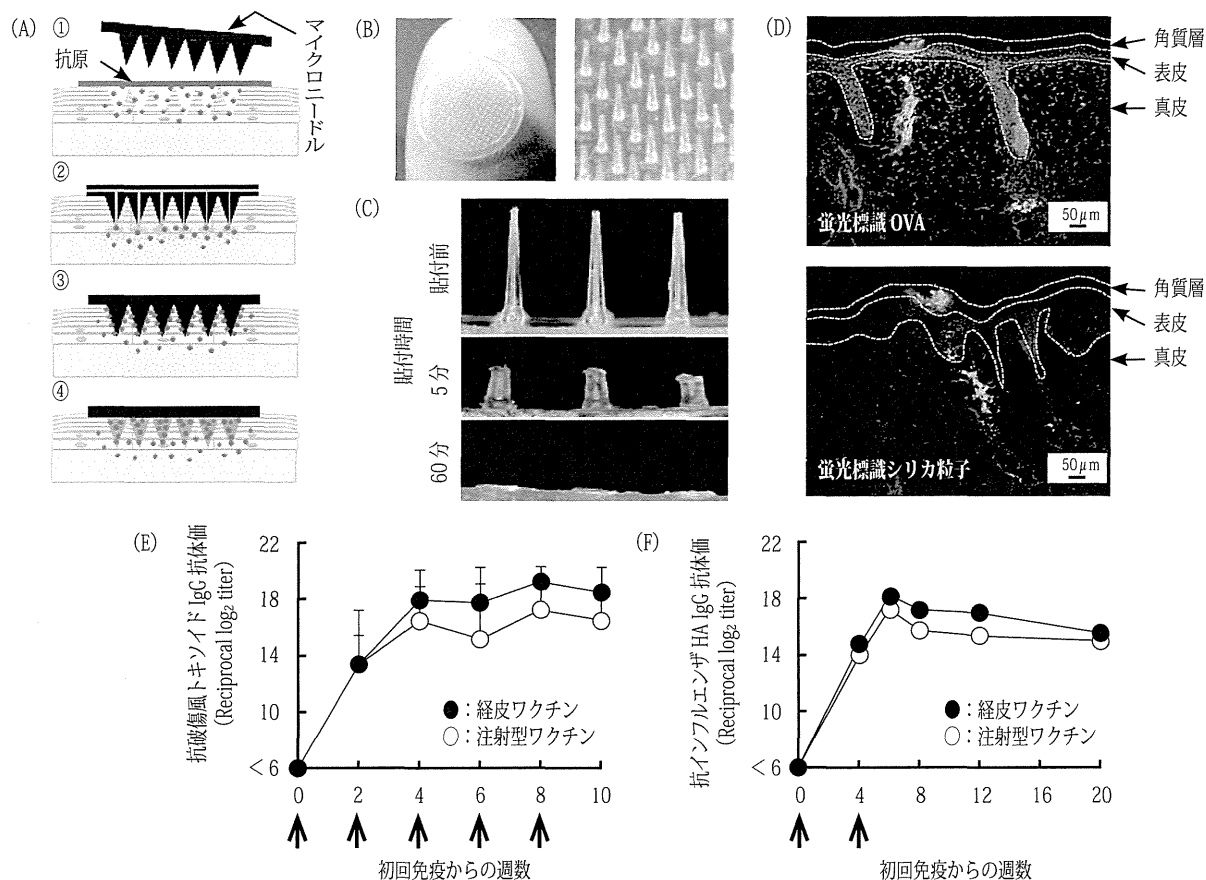
これまで開発されてきたガーゼパッチはもちろんのこと、著者らの親水性ゲルパッチについても、十分なワクチン効果を得るためには、注射型ワクチンに比べて大量の抗原を必要とする。親水性ゲルパッチについて、角質層下に送達される抗原量は含浸させた量の数%程度であることを確認しており、抗原の利用率が低いのが現状である。そのため、簡便かつ安全なだけでなく安価でより有効な経皮ワクチン製剤の実用化に向けては、抗原の角質層透過効率に優れるゲルパッチ、ならびに免疫増強効果を図るための臨床応用可能な経皮アジュバントを開発していかなければならない。また、製剤安定性の評価、製剤製造法の樹立や品質試験法の確立など、経皮ワクチン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

#### 4. 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

親水性ゲルパッチは水溶性抗原物質の角質層への分配とその後の単純拡散によって APC への送達効率を上昇させるため、抗原物質が水に不溶性あるいは懸濁された粒子状態の場合には適用が困難である。ところが、注射型ワクチン製剤として実用化されている抗原の多くは、無毒・弱毒化したウイルスや細菌（BCG、麻疹ワクチンなど）、あるいはそれら病原体由来コンポーネントの凝集体（インフルエンザ HA 抗原など）といった粒子状態であるため、親水性ゲルパッチに適用可能なワクチン抗原は限定されてしまう。すなわち、経皮ワクチン製剤の適用を拡大するためには、不溶性ならびに粒子状ワクチン抗原にも対応しうる新たな経皮ワクチンデバイスの開発が必要とされる。そこで著者らは、微小な針により角質層に孔をあけることで抗原を送達するマイクロニードル法に着目した<sup>30)</sup>。

##### 4.1 各種マイクロニードルデバイスの開発

マイクロニードルは神経終末が存在する真皮にまで針が到達しないことから痛みを伴わず、またマイクロニードル製剤を貼るだけという簡便な操作でワクチンを接種することができる利点がある。さらに、抗原透過のバリアーとなる角質層を物理的に突破するため、様々なワクチン抗原に対応可能な新規経皮ワクチンデリバリー技術として注目を集めている。第一世代のマイクロニードルはシリコンや金属（ステンレス、チタン）を構成材料としたものであり、①マイクロニードルの貼付により生じた穿刺孔を介して抗原を皮膚内へ送達する<sup>31)</sup>、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<sup>32)</sup>、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<sup>33)</sup>、といった方法がある（図 3(A)）。これらは剛性に優れる、成形しやすい、といった利点を有しており、シリコン製中空マイクロニードルを用いたインフルエンザワクチンについて臨床試験の成果が報告されている（表 1(C)）。しかし、これらの固形マイクロニードルは生体内で折れ残り、重篤な組織傷害を引き起こす危険性が払拭できないために、実用化が困難となっている。そこで近年では、第二世代マイクロニードルとして、生分解性バイオポリマーやヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などを利用した溶解型マイクロニードルの開発が注目されている<sup>34)</sup>。これらは生体適合性に優れた構成素材を使用し、④マイクロニードル自体が溶解することによって装填あるいは吸着した抗原を皮膚内へと送達する、といった特徴を有する。そのため、第一世代マイクロニードルの安全面における問題点を克服できると考えられており、臨床応用・実用化が期待されている。



- (A) ①マイクロニードルの貼付により生じた穿孔孔を介して抗原を皮膚内へ送達する。②マイクロニードルの中空を介して抗原溶液を皮膚内へ注入する。③抗原をコーティングしたマイクロニードルを貼付して抗原を皮膚内へと拡散させる。④マイクロニードル自体が溶解することによって装填あるいは吸着した抗原を皮膚内へ送達する。
- (B) 皮膚内溶解型マイクロニードルの全体像。面積は 0.8 cm<sup>2</sup> であり、生体適合性に優れたヒアルロン酸を主成分として形成された約 200 本の微小な針を有する。
- (C) 針長 800 μm の皮膚内溶解型マイクロニードルパッチをラット背部皮膚に 5 分あるいは 60 分間貼付し、剥離後のマイクロニードルを実体顕微鏡により観察した。
- (D) 針長 800 μm の皮膚内溶解型マイクロニードルパッチに蛍光標識 OVA あるいは蛍光標識シリカ粒子を装填し、マウス背部皮膚に 6 時間貼付した。貼付部位の皮膚を回収し、凍結切片を作製後、蛍光顕微鏡により観察した。
- (E) 破傷風トキソイドを 10 μg 装填した針長 800 μm のマイクロニードルパッチをラット背部皮膚に 6 時間貼付した。対照群のラットには同量の破傷風トキソイドを背部皮下注射した。これらのワクチン投与を 2 週間隔で 5 回繰り返す (図中の↑)、経時的に血中の抗トキソイド抗体価を ELISA 法により測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率の逆数の対数を Reciprocal log<sub>2</sub> titer として表した。
- (F) インフルエンザ HA 抗原 (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)) を 0.2 μg 装填した針長 800 μm のマイクロニードルパッチをマウス背部皮膚に 6 時間貼付した。対照群のマウスには同量のインフルエンザ HA 抗原を大腿部筋肉内注射した。これらのワクチン投与を 4 週間隔で 2 回実施し (図中↑)、経時的に血中の抗 HA 抗体価を ELISA 法により測定した。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率の逆数の対数を Reciprocal log<sub>2</sub> titer として表した。

図 3 マイクロニードルを用いた貼るワクチン

※ カラーの図は巻頭ページを参照

#### 4.2 皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチン

著者らはコスメディ製薬株式会社との共同研究により独自に開発した皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチンの開発を進めている。これは皮膚組織成分であるヒアルロン酸を主成分としており、マイクロニードルの形状や長さは自由に制御することができる (図 3(B))<sup>35-37</sup>。実際にマイクロニードルを貼付すると、針は皮膚内で溶解しており、装填物質の形状が可溶性分子、不溶性粒子にかかわらず、APC が存在する生きた表皮ならびに真皮へと物質を送達できることを明らかにしている (図 3(C), (D))。また、可溶性抗原である破傷風トキソイドのみならず、粒子状抗原であるインフルエンザ HA 抗原を装填したマイクロニードルパッチにおいても、動物皮膚に貼付することで抗原特異的抗体産生が誘導された (図 3(E), (F))。これらの成果に基づき、すでに著者らは本デバイスのヒトへの適用を検証する臨床研究を開始しており、抗原装填マイクロニードルパッチが皮下注射とほぼ同等の抗体産生を誘導することを確認している。現在欧米のみならず、本邦においても新規剤形であるマイクロニードルを用いたパラトルモンによる骨粗鬆症治療の治験が開始されつつあり、マイクロニードルデバイスを用いた予防・治療の臨床応用が近い将来実現すると考え

られる。

#### おわりに

DDS 技術を基盤とした経皮ワクチン製剤が多数考案・開発されている中、皮膚に貼るだけという簡便な操作で予防接種を施行可能なパッチ製剤ならびにマイクロニードル製剤の研究開発に期待が寄せられている。著者らは独自に開発した親水性ゲルパッチならびに皮膚内溶解型マイクロニードルを応用した経皮ワクチン製剤をすでに臨床研究へと展開しており、ヒトにおける有用性を見出している。経皮ワクチン製剤が従来までの注射に代わる簡便性・普及性に優れ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

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

#### 文 献

- 1) Radetsky M. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18, 85-93 (1999)
- 2) Valladeau J, Saeland S. *Semin. Immunol.* 17, 273-83 (2005)
- 3) Sugita K, et al. *Clin. Exp. Immunol.* 147, 176-83 (2007)
- 4) Nestle FO, Nickoloff BJ. *J. Clin. Invest.* 117, 2382-5 (2007)
- 6) Gupta PN, et al. *Int. J. Pharm.* 293, 73-82 (2005)
- 7) Schlosser E, et al. *Vaccine* 26, 1626-37 (2008)
- 8) Weaver JC. *Methods Mol. Biol.* 55, 3-28 (1995)
- 9) Zhao YL, et al. *Vaccine* 24, 1282-90 (2006)
- 10) Cristillo AD, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 29-35 (2008)
- 11) Hirao LA, et al. *Vaccine* 26, 440-8 (2008)
- 12) Kelly K, et al. *Vaccine* 26, 1344-52 (2008)
- 13) Roberts LK, et al. *Vaccine* 23, 4867-78 (2005)
- 14) Jones S, et al. *Vaccine* 27, 2506-12 (2009)
- 15) Cassaday RD, et al. *Clin. Cancer Res.* 13, 540-9 (2007)
- 16) Wang R, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10817-22 (2001)
- 17) Epstein JE, et al. *Hum. Gene Ther.* 13, 1551-60 (2002)
- 18) Aboud S, et al. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 1124-31 (2010)
- 19) Williams J, et al. *Vaccine* 18, 1939-43 (2000)
- 20) Frech SA, et al. *Lancet* 371, 2019-25 (2008)
- 21) Frech SA, et al. *Vaccine* 23, 946-50 (2005)
- 22) Vogt A, et al. *J. Immunol.* 180, 1482-9 (2008)
- 23) Combadiere B, et al. *PLoS One* 5, e10818 (2010)
- 24) Yagi H, et al. *Cancer Res.* 66, 10136-44 (2006)
- 25) Ishii Y, et al. *J. Control. Release* 131, 113-20 (2008)

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

### 6. 予防

# 1) 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

廣部祥子・岡田直貴・中川晋作

#### 要旨

経皮ワクチン、すなわち「貼るワクチン」は免疫担当細胞が多数存在する皮膚を標的としており、投与が簡便なだけでなく、高いワクチン効果が期待できる。しかしながら、皮膚には外界と生体を隔てるバリアとなる角質層が存在するため、抗原の皮膚内への送達は容易ではない。そこで筆者らは、2種類の経皮ワクチンデバイス（親水性ゲルパッチ、皮膚内溶解型マイクロニードル）を創製し、その実用化をめざしている。簡便・安全・有効な貼るワクチンは、開発途上国へのワクチン普及を促進するとともに、新興・再興感染症の世界的流行を阻止し、感染症対策に大きく貢献できる。

**キーワード** ワクチン， 経皮薬物デリバリー， 親水性ゲルパッチ， 皮膚内溶解型マイクロニードル， ヒアルロン酸， 破傷風， ジフテリア， トキソイド， インフルエンザ， 臨床研究

#### はじめに

感染症の歴史は生物の発生とともに幕を開け、感染症の人類への影響は多大なるものであった。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。しかしながら、現在の発達した交通網は世界のボーダレス化を進展させ、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としている。昨今話題となっている高病原性鳥インフルエンザウイルスはひとたびヒト-ヒト感染が成立すれば世界規模の流行を招きかねない。このように新興・再興感染症の蔓延が脅威となる中、ワクチンがその阻止に最も効果的な対策であることから、その重要性が再認識されつつある。

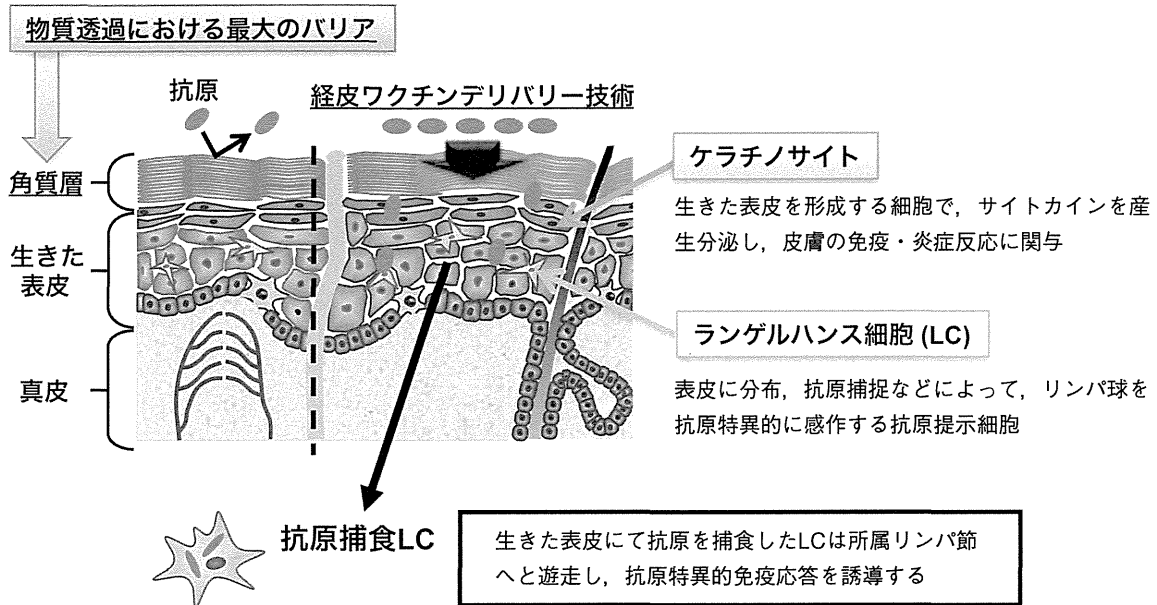
新規ワクチンデバイスの開発は、従来のワクチン手法が抱える問題点を克服し、様々な感染症ワクチンの有用性を向上させると考えられる。これまでに実用化されたワクチンは、大半が注射型ワクチンである。しかしながら、注射型ワクチン製剤は投与に医療従事者を必要と

し、注射針を介した二次感染の危険性がある。また、注射剤の輸送・保管にコールドチェーンが不可欠であるなど、技術的・経済的な制約が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い原因となっている。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ワクチンの大規模投与を迅速に施行できない点も懸念されている。このように、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待望されていることから、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」の開発を推進している。

#### I. 皮膚を標的としたワクチンの開発

皮膚は、ワクチンのターゲットとして非常に優れた組織である（図①）。解剖学的に皮膚は外側から、角質層、生きた表皮、真皮という順番で大きく3層に分けられている。そして常に外界からの異物侵入の危険にさらされている組織であるため、最外層に存在する角質層が

図① 経皮免疫誘導メカニズム



物質透過を制限する物理的バリアとして機能している。また、皮膚は物理的バリアとしてだけでなく、生体を守る免疫系が高度に発達した「免疫学的バリア」をも兼ね備えた組織である。生きた表皮は各種サイトカインやケモカイン、増殖因子を分泌するケラチノサイトが約90%を占めており、異物侵入に対する自然免疫の誘導に関わっている。また、ケラチノサイトの細胞間隙には、抗原提示細胞の1つであるランゲルハンス細胞 (LC) が散在している。さらに真皮には、真皮樹状細胞や肥満細胞、単球などの細胞群が存在し、免疫学的バリアの形成に関与している。特に生きた表皮に常在するLCは免疫監視機構において非常に重要な役割を担っており、異物を認識・捕食したLCは免疫誘導の場である所属リンパ節へと遊走する。そしてT細胞ならびにB細胞を抗原特異的に活性化することで、全身性の獲得免疫応答を誘導する。したがって、ワクチンとして抗原を効率よく生きた表皮に送達することができれば、抗原特異的な免疫応答を強力に誘導できるものと期待される。

上述のとおり、皮膚には物質透過のバリアとなる角質層が存在するため、水溶性で分子量500以上の物質は透過しにくいと言われている<sup>1)</sup>。したがって、ペプチドやタンパク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、生きた表皮に常在するLCに抗原を効率よく送達することはできず、効果的な免疫応答を誘導す

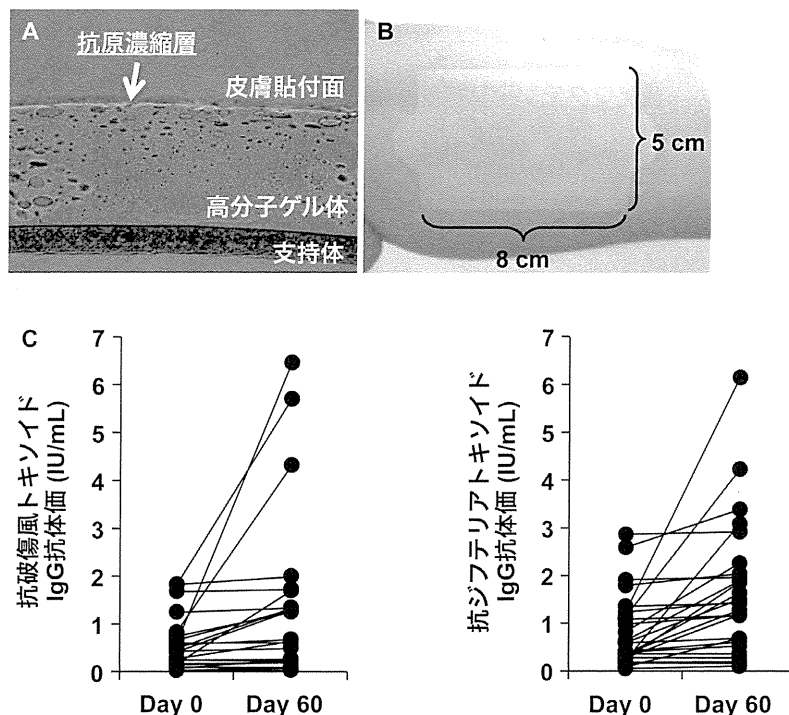
ることはできない。そこで、DDS領域で開発されてきた経皮薬物デリバリー技術を応用することで、角質層下の生きた表皮にまでワクチン抗原を送達し、感染防御効果を得られる「経皮ワクチン」の開発が試みられている<sup>2)</sup>。

## II. ゲルパッチを用いた「貼るワクチン」の臨床研究

特殊な装置を必要とせず、まさに皮膚に貼るだけで免疫応答を誘導可能な「貼るワクチン」の開発が精力的に行われている。IOMAI社 (2008年にIntercell社により買収) および国立感染症研究所は、粘着性パッチおよびガーゼパッチを応用した「貼るワクチン」において、抗原特異的な免疫応答を誘導できることを報告している<sup>3)4)</sup>。しかしながら、これらの経皮ワクチン製剤は抗原の十分なデリバリーの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し、また効果的な免疫応答を誘導するためにはアジュバントを併用しなければならない。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るうえ、注射型ワクチンと同様に抗原溶液の輸送や保管に一貫した冷蔵管理を必要とする。このような問題点が指摘される中、筆者とコスメディ製薬が共同開発した親水性ゲルパッチを応用した貼るワク



図② 親水性ゲルパッチを用いた貼るワクチン



- A. 抗原タンパク質（赤色蛍光標識）水溶液を滴下して30分後の親水性ゲルパッチ断面の顕微鏡写真  
 B. 親水性ゲルパッチのヒト上腕内側皮膚への貼付写真  
 C. 破傷風・ジフテリアトキソイドを各2 mg含有した5 cm×8 cmの親水性ゲルパッチをヒト上腕内側皮膚に24時間貼付した。貼付前ならびに貼付60日後に血中の抗トキソイド抗体価をELISA法により測定した。

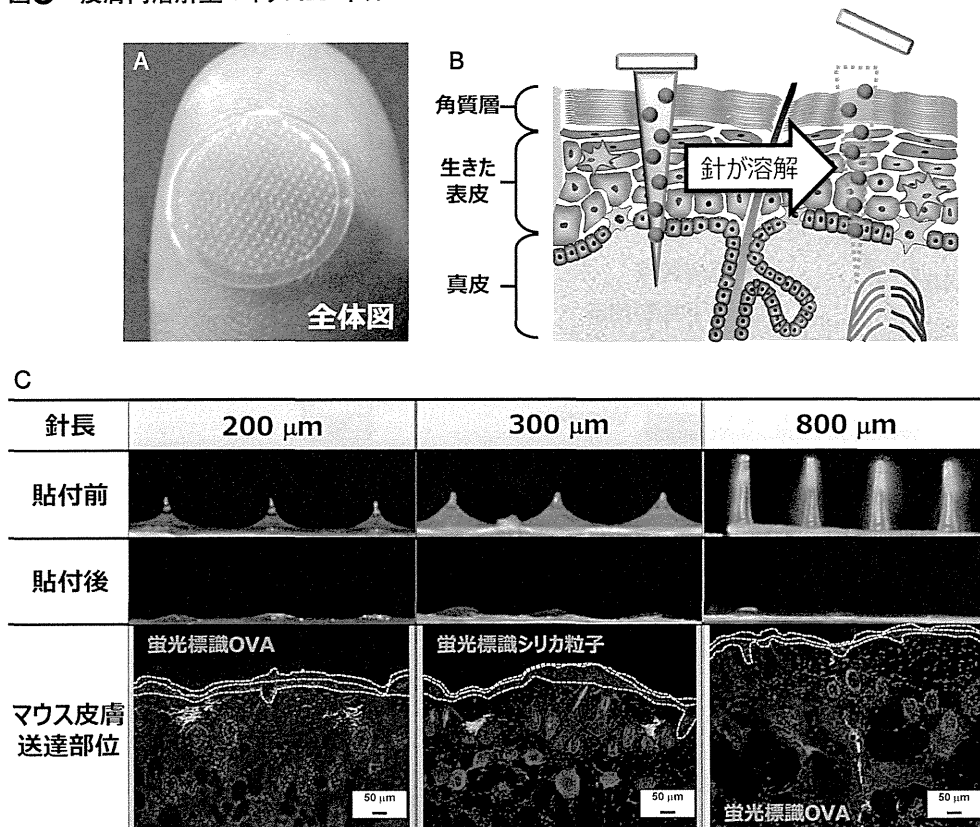
(グラビア頁参照)

チンは、皮膚の前処理やアジュバントの併用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<sup>5)8)</sup>。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、吸収促進剤などすでに医薬品および化粧品においてヒトに適用されている安全性の高い材料を配合して作製している。また、本パッチの皮膚貼付面に抗原タンパク質水溶液を滴下すると、水分のみが高分子ゲル体に吸収されてパッチ表面に抗原タンパク質の濃縮層が形成される(図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。

親水性ゲルパッチによる抗原分子の角質層透過機構の1つとして、パッチの角質層に対する水和効果が挙げられる。すなわちパッチを皮膚に貼付すると、皮膚からの水分蒸散が妨げられ、角質層の水分含量が増大する。そ

れによって角質層の細胞間隙を構成する脂質二重層の構造が緩み、水溶性の高分子が角質層へと分配しやすくなると考えられる。またもう1つの機構としては、パッチを用いることにより皮膚表面の抗原濃度勾配が増大できることが挙げられる。抗原濃縮層が形成されたパッチを皮膚に貼付すると、角質層にワクチン抗原が分配し、皮膚表面に大きな抗原濃度勾配が現出される。これが単純拡散の駆動力となって抗原の角質層透過が促進されると考えられる。これまでに、角質層を透過した抗原を捕食したLCが免疫誘導の場である所属リンパ節へ遊走していることを確認するとともに<sup>5)</sup>、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用いた経皮ワクチンが中和活性を有する抗原特異的なIgG抗体を誘導することを明らかにしている<sup>6)</sup>。さらに、抗原含有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

図③ 皮膚内溶解型マイクロニードル



- 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<sup>2</sup>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200本の微小な針を有する。
- B. 皮膚内溶解型マイクロニードルの抗原送達機構。穿刺された針部が皮膚内の水分によって溶解し、装填された抗原を角質層下へと送達する。
- C. 針部の長さおよび形状が異なる3種類の皮膚内溶解型マイクロニードルに蛍光標識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。

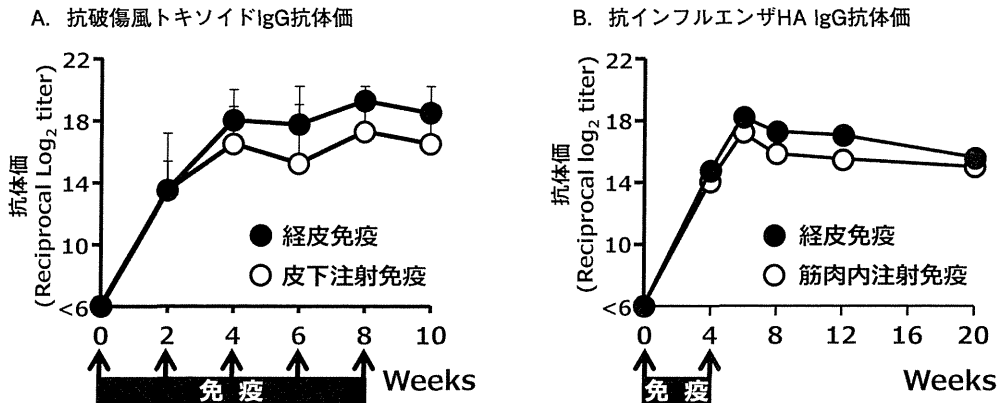
(グラビア頁参照)

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認められなかったことから、本経皮ワクチン製剤は安全性にも優れることが確認された<sup>8)</sup>。

さらに筆者らは、これらの結果に基づき、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奈良県立医科大学 浅田秀夫先生のご協力を得て実施した<sup>9)</sup>。破傷風・ジフテリアトキソイドをそれぞれ2 mg含有した親水性ゲルパッチ製剤(5 cm×8 cm)を作製し、ヒト上腕内側皮膚に24時間貼付した(図②B)。その結果、本製剤がヒトにおいても顕著な副反応を示すことなく、各トキソイド特異的抗体価を上昇させることを明らかとした(図②C)。このよ

うに筆者らの親水性ゲルパッチは、早期実用化が期待できる非常に有用な新規経皮ワクチンデバイスであることが示された。しかしながら、今回臨床研究で用いた親水性ゲルパッチには、各トキソイドを2 mgという大用量で使用している。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た親水性ゲルパッチ、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の開発を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、「貼るワクチン」の製品化・実用化に向けた取り組みを推進していく必要がある。

図4 マイクロニードルを用いた貼るワクチンの有効性



- A. 破傷風トキソイドを10 $\mu$ g装填した針長800 $\mu$ 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。これらの免疫操作を2週間隔で5回繰り返し、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。
- B. インフルエンザHA抗原 (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)) を0.4 $\mu$ g装填した針長800 $\mu$ m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。これらの免疫操作を4週間隔で2回実施し、経時的に血中の抗HA抗体価をELISA法により測定した。

### Ⅲ. マイクロニードルを用いた「貼るワクチン」の開発

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を増大することによってLC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、あるいはそれら病原体由来コンポーネントの凝集体といった粒子状形態であり、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。そこで、経皮ワクチン製剤の適応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が必要とされる。

このような背景のもと、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を用いた経皮ワクチンが考案された<sup>10)</sup>。この方法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、またマイクロニードル製剤を貼るだけという簡便な操作でワクチンすることができる利点がある。さらに、抗原透過のバリアとなる角質層を物理的に突破するため、様々なワクチン抗原に対応可能な新規経皮ワク

チンデリバリー技術として注目を集めている。しかし、開発中の大半のマイクロニードルは金属製あるいはシリコン製のニードルアレイを用いており、皮膚内でその針が折れて残存するという危険性があることが克服すべき最大の課題とされている。筆者らと共同研究を行っているコスメディ製薬は、生体適合性に優れた高分子を素材とした皮膚内溶解型マイクロニードルの開発に成功し、簡便性・安全性に優れた経皮ワクチンへの応用が注目を集めている (図3A)<sup>11)12)</sup>。筆者らの皮膚内溶解型マイクロニードルはヒアルロン酸が主成分であり、穿刺された針部が皮膚内の水分によって溶解し、装填されていた抗原を角質層下へ安全に送達できることが期待された (図3B)。実際に、抗原装填皮膚内溶解型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、LCが存在する生きた表皮、さらにはその下の真皮へと送達できることが示された (図3C)<sup>11)</sup>。さらに、可溶性抗原である破傷風・トキソイドのみならず、粒子状抗原であるインフルエンザHA抗原を装填したマイクロニードルパッチにおいても動物皮膚に貼付することで抗原特異的抗体産生が誘導され、その抗体価は注射群よりもわずかではあるが高値を示すことが明らかとなった (図4)<sup>12)</sup>。ヒアルロン酸を主体とする本マイクロニードルを用いた経

皮投与では、皮内注射と比較して皮膚組織内における抗原の滞留性が高まっていることを確認しており、強力な免疫応答誘導に寄与していると考えている。これらの成果に基づき、すでに筆者らは本デバイスのヒトへの適用を検証する臨床研究を開始しており、抗原装填マイクロニードルパッチが皮下注射とほぼ同等の抗体産生を誘導することを確認している。現在さらに詳細な解析を進めている段階であるが、本経皮ワクチン製剤は実用化に適う画期的な新規ワクチン製剤であると言える。

## ● おわりに ●

DDS技術を基盤とした経皮ワクチンが考案・開発されている中、ゲルパッチ製剤ならびにマイクロニードルパッチ製剤を用いた経皮免疫製剤による「貼るワクチン」の研究開発に期待が寄せられ、その早期実用化が待望されている。筆者らが独自に開発した親水性ゲルパッチを用いた「貼るワクチン」は、従来までの注射に代わる新規剤型ワクチンとして、接種を簡便・安全にする非常に

有用なアプローチであり、臨床応用の一歩前の段階にある。また、多種多様な抗原に適用できる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に関しても、すでに臨床研究へと展開し、ヒトにおける有用性を見出している。簡便性・普及性に優れる経皮ワクチン製剤「貼るワクチン」が実用化されれば、乳幼児へのワクチン接種の負担を大きく軽減できるのみならず、感染症地域への渡航者に対する事前予防ワクチンの施行、開発途上国へのワクチン普及に大きく貢献できるものと期待する。

## 謝辞

本稿にて紹介した研究内容は、「先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業（独立行政法人医薬基盤研究所）」ならびに「厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）」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、破傷風・ジフテリアトキソイドおよびインフルエンザHA抗原を快く提供していただきました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) Barry BW : Nat Biotechnol 22, 165-167, 2004.
- 2) Giudice EL, Campbell JD : Adv Drug Deliv Rev 58, 68-89, 2006.
- 3) Glenn GM, Taylor DN, et al : Nat Med 6, 1403-1406, 2000.
- 4) Naito S, Maeyama J, et al : Vaccine 25, 8762-8770, 2007.
- 5) Ishii Y, Nakae T, et al : J Control Release 131, 113-120, 2008.
- 6) Matsuo K, Ishii Y, et al : J Control Release 149, 15-20, 2011.
- 7) Matsuo K, Ishii Y, et al : Biol Pharm Bull 34, 586-589, 2011.
- 8) Matsuo K, Ishii Y, et al : Biol Pharm Bull 34, 1835-1840, 2011.
- 9) Hirobe S, Matsuo K, et al : Vaccine 30, 1847-1854, 2012.
- 10) Prausnitz MR : Adv Drug Deliv Rev 56, 581-587, 2004.
- 11) Matsuo K, Yokota Y, et al : J Control Release 161, 10-17, 2012.
- 12) Matsuo K, Hirobe S, et al : J Control Release 160, 495-501, 2012.

## 参考ホームページ

・大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野  
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/index.html>

## ● 廣部祥子

2012年 大阪大学薬学部薬学科卒業  
 同大学院薬学研究科博士課程中退  
 同大学院薬学研究科薬剤学分野助教

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

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

## ABBREVIATION

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

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

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

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

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

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

## INTRODUCTION

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

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

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

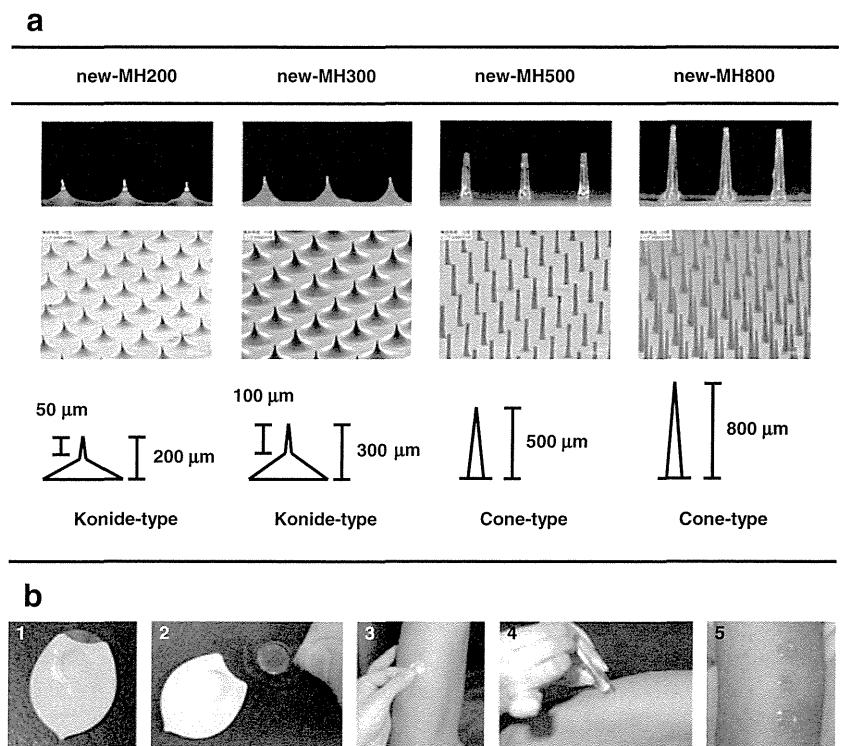
### Preparation of Self-Dissolving Microneedle Patches

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

### Analysis of Microneedle Dissolution Kinetics

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

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



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

### Assessment of Skin Irritation

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

### Measurement of Skin Surface Impedance

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

### Vaccine Protocol Using New-MH

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

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

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

### Antibody Titer Measurement

Antigen-specific IgG titers were determined by ELISA as previously described (24). Anti-TT and anti-DT IgGs in rats or anti-OVA IgG in guinea pigs was detected by a peroxidase-labeled goat anti-rat IgG antibody or a peroxidase-labeled goat anti-guinea pig IgG antibody (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA), respectively. End-point titers of antigen-specific antibodies were expressed as the reciprocal log<sub>2</sub> of the last dilution that had an absorbance of 0.1 after subtracting the background. Anti-OVA IgE was detected using the following method: Briefly, 96-well titer plates were coated with purified anti-guinea pig

IgE monoclonal antibody and were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Inc.) in phosphate-buffered saline (PBS). After blocking, serum samples were diluted 16-fold with 1% BSA/PBS and were incubated for 3 h. Plates were washed 3 times with Tris-HCl buffer saline containing 0.1% Tween-20 (TBS-T), and biotinylated OVA diluted in 1% BSA/PBS was added to plates and incubated. After 3 h, plates were washed 3 times with TBS-T and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-biotin IgG polyclonal antibody was added. After 3 h, the reaction was developed using a tetramethylbenzidine solution, and color development was terminated by adding 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Optical densities were measured at 450–650 nm.

### Monitoring of Tetanus Toxin Challenge

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

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

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

### Active Systemic Anaphylaxis (ASA) of Immunized Guinea Pigs

Measurement of ASA was performed using the modified method of Aida *et al.* (26). Guinea pigs were inoculated intravenously with OVA (2 mg/kg) 2 weeks after the final vaccination. Anaphylactic symptoms and the ratio of survival were scored after 0.5 and 24 h, respectively, in guinea pigs using the ASA scoring system: 0, symptomless; 1, rubbing face and ears, cough more than 2 times; 2, cyanosis caused on eye or ear, intense spasm and tumbling; 3, death.

### Clinical Study Design for Safety Assessment of New-MH

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

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

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

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

### Analysis of Microneedle Dissolution Kinetics in Humans

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

### Measurement of Transepidermal Water Loss (TEWL)

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



(MSC100/TM300; Courage +Khazaka electronic GmbH, Köln, Germany).

### Assessment of Pain

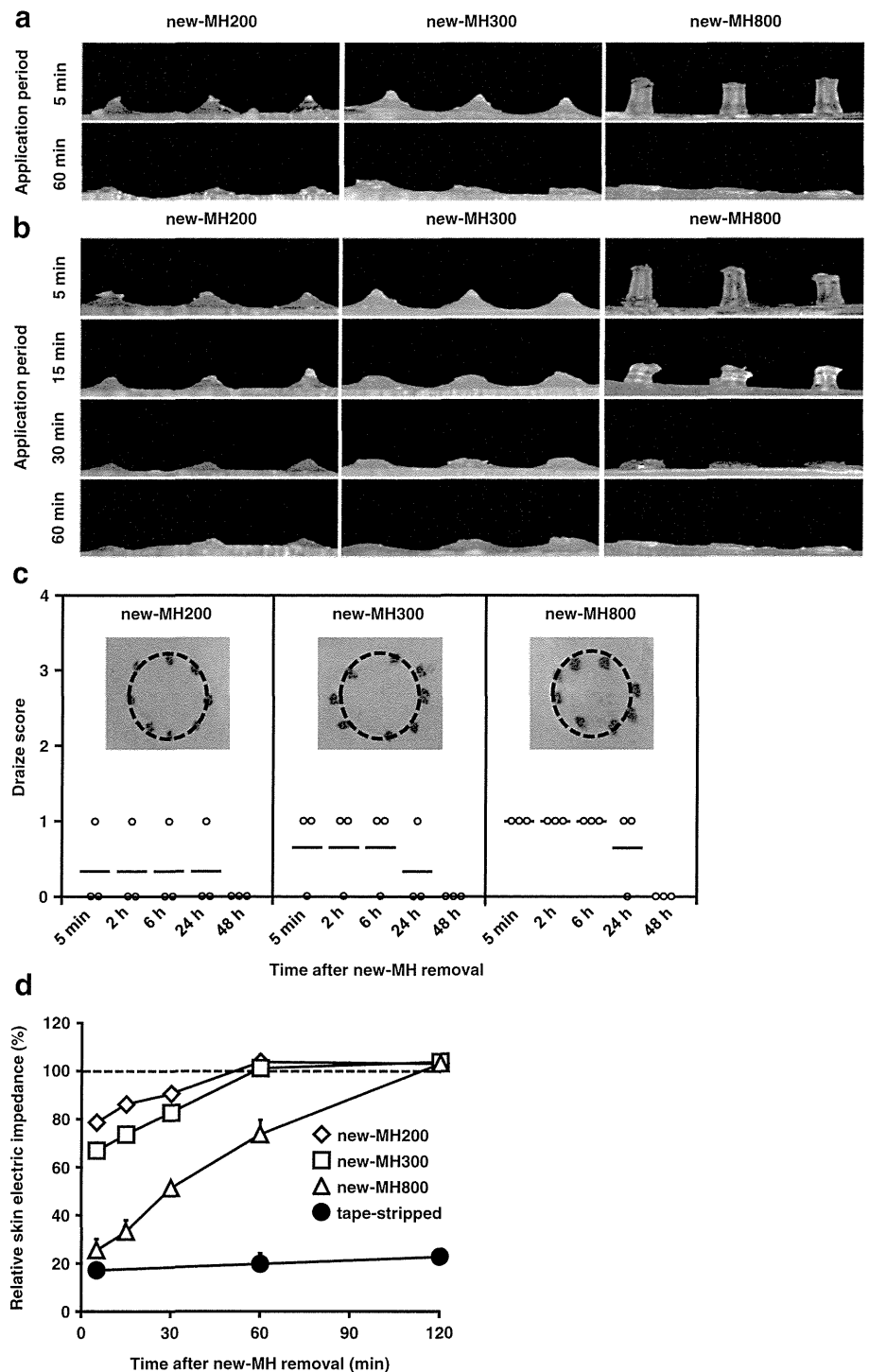
The pain associated with application of microneedle patches was expressed numerically using a Visual Analogue Scale (VAS) from 0 (no pain) to 100 (unbearable pain).

**Fig. 2** Needle-dissolution kinetics of new-MH, and skin status after application of new-MH. **(a and b)** New-MH200, new-MH300, and new-MH800 were applied on the back skin of BALB/c mice **(a)** or Wistar ST rats **(b)** for the indicated times. After removal of new-MH, the microneedles remaining on each new-MH were photographed using a stereoscopic microscope. **(c)** New-MH200, new-MH300, or new-MH800 were applied to the back skin of Wistar ST rats for 30 min. The degree of erythema on the skin of Wistar ST rats was scored using the Draize scoring system: 0, no erythema or edema; 1, very slight erythema and/or barely perceptible edema; 2, well-defined erythema and/or slight edema; 3, moderate to severe erythema or moderate edema, and 4, severe erythema and/or edema, 5 min, 2 h, 6 h, 24 h, or 48 h after removing new-MHs. The mean score is shown as a bar. Each panel shows photographs of application areas 5 min after new-MH removal. **(d)** Skin impedance of new-MH application areas and non-application areas was measured 5, 15, 30, 60, and 120 min after 30-min applications. As controls, back skin of Wistar ST rats were tape-stripped. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of data from three rats.

## RESULTS

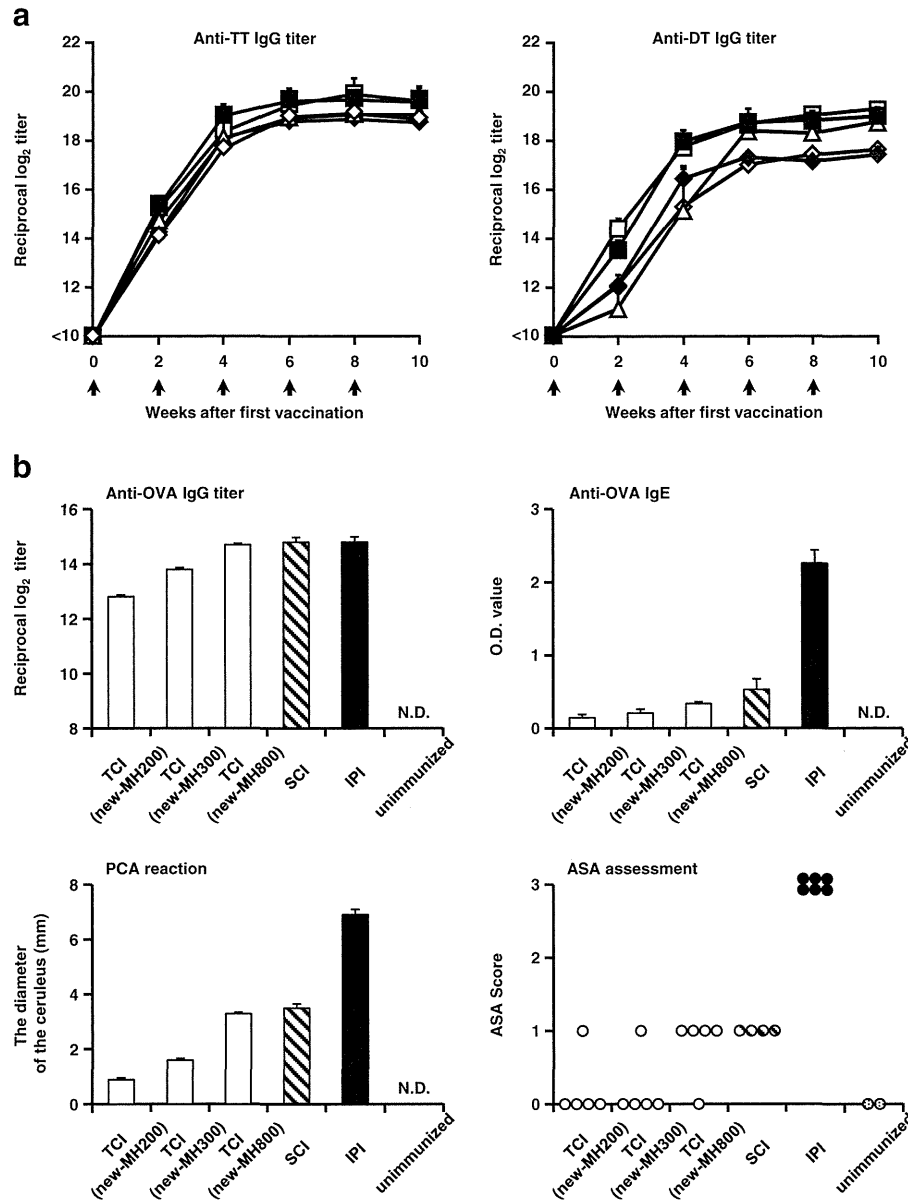
### Comparison of Fundamental Characteristics of New-MH and Old-MH

We investigated dissolution kinetics of microneedles in mice and rats, whose skins differ in hardness and in thickness by approximately 10  $\mu$ m. New-MH200 and new-MH300 microneedle



tips dissolved rapidly and microneedles on new-MH800 resulted in a 50% reduction in length after 5 min in both mice and rats (Fig. 2a and b). The dissolution of microneedles progressed with application time, and all new-MH had dissolved completely after 60 min. These dissolution kinetics and technique for the insertion of microneedles were identical

to those of old-MHs independent of the components. We evaluated erythema and edema at the application site using the Draize scoring system 30 min after applying new-MHs. Five minutes after patch removal, slight erythema was observed in 1 of 3 rats treated with new-MH200, in 2 of 3 rats treated with new-MH300, and in all rats treated with new-MH800. These



**Fig. 3** Immune responses induced by antigen loaded new-MH formulations. (a) The new-MH800 (◇ and ◆) or old-MH800 (□ and ■) with 20 μg TT and 10 μg DT/needles were applied to the back skin of Wistar ST rats five times at 2-week intervals for 1 h (◇ and □) or 6 h (◆ and ■). Wistar ST rats were subcutaneously injected with equivalent TT and DT doses (▲). At the indicated points, sera collected from these rats were assayed for TT or DT IgG titers by ELISA. Data are expressed as mean ± SE of results from five rats. Arrows indicate the vaccination point. (b) Hartley guinea pigs were treated with new-MH200, new-MH300, or new-MH800 containing 1 μg OVA/needles for 6 h four times at 2-week intervals, or were subcutaneously immunized with 1 μg OVA (SCI) five times at 2-week intervals. As positive controls, Hartley guinea pigs were immunized by intraperitoneal injection of 1-μg OVA and 5-mg Alum (IPI) twice at 2-week intervals. Two weeks after the final vaccination, sera were collected from these animals and were assayed for OVA-specific IgG titers, and O.D. value of IgE (16-fold dilution) by ELISA. For the PCA reaction, non-sensitized Wistar ST rats were injected with sera from immunized-guinea pigs. Twenty-four hours later, these rats were intravenously injected with Evans blue and OVA, and a leak blue spot at the injection site was measured 30 min later. Data are expressed as mean ± SE of results from 4 to 6 guinea pigs. In ASA assessments, guinea pigs were intravenously injected with OVA a month after the final vaccination, and the performance status of guinea pigs was scored using the ASA scoring system. N.D.; not detected.

observations suggest that erythema is exacerbated by needle length (Fig. 2c). However, erythema disappeared within 48 h, and edema was not observed in any rats. Thus, application of new-MH caused only minor irritation of the skin. Using skin impedance measurements, we observed the recovery of skin with microneedle puncture holes. Application of either new-MH200 or new-MH300 decreased skin impedance to 60–80%, whereas application of new-MH800 or tape-strips decreased skin impedance to 20% (Fig. 2d). The impedance of tape-stripped skin did not recover within 120 min. On the other hand, skin impedance recovered within 60 min after removal of new-MH200 or new-MH300 patches, and within 120 min after removal of new-MH800 patches. Therefore, puncture holes that were caused by insertion of microneedles closed within a few hours of new-MH application, indicating a low risk of secondary infection. Given similar fundamental characteristics of new-MH and old-MH, we conclude that new-MH is a safe and minimally invasive device.

### Immune Responses Induced by TCI Using Antigen-Loaded New-MH

We selected MH800, and compared vaccine delivery efficiency between TCI using new-MH and old-MH over 1 h or 6 h. The profile of anti-toxoid IgG antibody production following application of new-MH was similar to that of old-MH (Fig. 3a). Thus, we confirmed that the components of microneedles did not influence the intended immune response. In addition, there was no significant difference between the 1-h and 6-h application periods, indicating that the complete dissolution of microneedles within 1 h of application was sufficient to deliver antigen into the skin and to achieve effective vaccination. To further assess vaccination efficacy, we evaluated whether toxoid-specific antibodies, produced by application of new-MH, neutralized tetanus toxin. Immunized rats were resistant to the lethal toxin after tetanus toxin challenge, whereas the rats treated with antigen-free new-MH800 died (Table 1). Therefore, we have confirmed that antigen-contained new-MH patches induce a protective immune response against infectious diseases as effectively as those of old-MH (21).

To assess unintended immune responses, we evaluated antigen-specific IgE production in guinea pigs, which is mainly used to identify allergic reactions. Anti-OVA IgG titer increased in all immunized guinea pigs, and the TCI and SCI groups showed little induction of anti-OVA IgE (Fig. 3b). In addition, we conducted PCA and ASA analyses to assess allergic reactions. In the PCA analysis, antigen-specific Evans blue leak from the injection site was measured in sera from immunized guinea pigs. In the IPI group, a positive PCA reaction (>5 mm) was observed; the diameter of the ceruleus was 6.9 mm in a 1/128 dilution of sera. On the other hand, sera of TCI and SCI groups did not give positive

PCA reactions, even in undiluted sera. In ASA assessments, allergic reactions, which appeared after injection of antigen into immunized guinea pigs, was evaluated. Positive control guinea pigs died immediately, but guinea pigs of the TCI and SCI groups remained alive. The ASA scores of TCI and SCI groups were all below 1, although minor anaphylactic symptoms were observed in TCI-treated animals following application of new-MH800, as well as in SCI animals. Because these results showed that TCI using new-MH induced antigen-specific immune responses and did not cause allergic reactions, we conclude that new-MH is a safe and efficacious device for practical use in TCI system.

### State of the Human Skin After Application of New-MHs

In animal experiments, we showed that the new-MH device is practical and suitable for TCI. Subsequently, we conducted a clinical study to demonstrate the application of new-MHs to human skin. We examined skin using a confocal laser-scanning microscope immediately after 5-s application of new-MH500 or new-MH800 to the human skin. Puncture holes were distinct on the skin surface, and the delivery depth was at least 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 4a). As the thickness of human stratum corneum is approximately 10–20  $\mu\text{m}$ , this indicates that the microneedles of new-MH were able to deliver antigen into the epidermal layer of the human skin. Given that the thickness and water content of skin differs between animals and humans, we confirmed the solubility of microneedles in humans at various times after application. After 1 h, the microneedles had completely dissolved in 2 of 3 subjects, and their length was reduced by 50% in the other subject (Fig. 4b). In all subjects, the microneedles fully dissolved within 6 h after new-MH application, although complete dissolution times varied between individuals. These data showed that the new-MH patches deliver antigen to humans in 6 h. Next, we monitored the closing of puncture holes by measuring TEWL as an index of skin barrier

**Table 1** Passive-Challenge Experiment of Wistar ST Rat with Tetanus Toxin

Vaccination			No. of survival rats/ No. of tested rats
Route	Tetanus toxoid ( $\mu\text{g}/\text{site}$ )	Application period (h)	
TCI; (new-MH800)	20	1	3/3
TCI; (new-MH800)	20	6	5/5
TCI; (old-MH800)	20	1	3/3
TCI; (old-MH800)	20	6	5/5
TCI; (new-MH800)	–	6	0/3
SCI	20	–	3/3

MH MicroHyal; TCI transcutaneous immunization; SCI subcutaneous immunization

dysfunction. TEWL of treated skin increased immediately after new-MH800 patches were removed and decreased gradually with time (Fig. 4c), indicating rapid recovery of skin barrier function. After 6-h application of new-MH patches, TEWL was lower than that after 5-s or 1-h application. In addition, confocal laser-scanning microscopy showed that the puncture holes tended to close with longer new-MH application periods (Supplementary Material Fig. S1). Hence, given the dissolution kinetics, we did not consider barrier dysfunction or the risk of secondary infection after 6 h applications of new-MH.

To further assess the safety and utility of new-MH patches, we evaluated the pain of new-MH application using VAS assessments in 17 subjects. Among subjects treated with new-MH-needleless, new-MH300, new-MH500, and new-MH800, no significant differences in VAS scores were identified by the Steel–Dwass test (Fig. 4d). We assumed that the VAS scores associated with new-MH-needleless, which did not have microneedles, resulted from the impact of the handheld spring-type applicator. The VAS scores for each new-MH were low, suggesting that the insertion of microneedles into the skin was minimally painful.

**Fig. 4** Status of skin treated with new-MHs, and needle-dissolution of new-MH in humans. **(a)** New-MH800 or new-MH500 were applied to the skin of the left lateral upper arms of two healthy volunteers for 5 s, and skin images were immediately photographed using *in vivo* confocal scanning laser microscopy. **(b)** New-MH800 was applied to the skin of the left lateral upper arms of three healthy volunteers for 1 h or 6 h, and microneedle patches were immediately observed using a stereoscopic microscope. **(c)** New-MH800 was applied to the skin of the left lateral upper arms of three healthy volunteers for 5 s (□), 1 h (△), or 6 h (○). As a control, new-MH-needleless was applied for 6 h (●). At the indicated time after new-MH removal, TEWL of the application sites was measured. Data are expressed as mean ± SE of results from three subjects. ◆; TEWL of untreated skin. **(d)** New-MH-needleless, new-MH300, new-MH500, and new-MH800 were applied to the skin of left lateral upper arms of 17 healthy volunteers. Subjects were asked to grade the pain experienced using a VAS from 0 (no pain) to 100 (unbearable pain). Data are expressed as mean ± SE of results from 17 subjects.

