OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	利便性及び汎用性に優れた経皮ワクチンデバイスの開発に資する新規マイクロニードルアレイの設計研究
Author(s)	小野, 彰彦
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72332
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

課程博士

利便性及び汎用性に優れた経皮ワクチンデバイス の開発に資する新規マイクロニードルアレイの設計研究

小野彰彦

平成 31 年 (2019)

目次 (Contents)

略語一覧 (Abbreviations)..... 3

緒論 (Introduction)..... 5

第一章　ヒト皮膚貼付時間短縮化を指向した速溶型 MN の開発..... 10

背景 (Background)..... 10

第一節　速溶型 MN の製剤設計..... 11

材料と方法 (Materials and Methods)..... 11

結果 (Results)..... 14

第二節　プラセボ速溶型 MN を用いた臨床研究..... 19

材料と方法 (Materials and Methods)..... 19

結果 (Results)..... 21

考察 (Discussion)..... 25

第二章　利便性及び汎用性を指向した二段型 MN の開発..... 29

背景 (Background)..... 29

第一節　二段型 MN の製剤設計..... 31

材料と方法 (Materials and Methods)..... 31

結果 (Results)..... 33

第二節　プラセボ二段型 MN を用いた臨床研究..... 38

材料と方法 (Materials and Methods)..... 38

結果 (Results)..... 40

第三節　PGA-MN を用いた臨床適用製剤の設計..... 42

材料と方法 (Materials and Methods)..... 42

結果 (Results)..... 44

考察 (Discussion)..... 47

総括 (Summary) 52

結論 (Conclusion) 54

謝辞 (Acknowledgements) 55

参考文献 (References) 56

略語一覧 (Abbreviations)

略語		正式名
APC	・・・	Antigen-presenting cell
CMC Na	・・・	Carboxymethylcellulose Sodium
CQA	・・・	Critical Quality Attribute
dDC	・・・	Dermal dendritic cell
dNP	・・・	dissolving Nanopatch
DT	・・・	Diphtheria Toxoid
ELISA	・・・	Enzyme-linked immunosorbent assay
flu-MH	・・・	A seasonal trivalent influenza HA antigen-containing MH
flu-PGA-MN	・・・	A seasonal tetravalent influenza HA antigens-loaded PGA-MN
F-OVA	・・・	Fluorescein-labeled ovalbumin
HA	・・・	Hemagglutinin
HEC	・・・	Hydroxyethyl cellulose
HI	・・・	Hemagglutination inhibition
High flu-PGA-MN content	・・・	PGA-MN patches loaded with a high level of tetravalent HA antigens
HN	・・・	Hyaluronan
HPC	・・・	Hydroxypropyl cellulose
HRP	・・・	Horseradish peroxidase
ICDRG	・・・	International Contact Dermatitis Research Group
IPV	・・・	Inactivated Polio Vaccine
LC	・・・	Langerhans cell
LDH	・・・	Layered double hydroxides
MERS	・・・	Middle East Respiratory Syndrome
MN	・・・	Microneedle
MH	・・・	MicroHyala
NTDs	・・・	Neglected Tropical Diseases
Nylon-MN	・・・	MN patches made from Nylon 6
OCT imaging	・・・	Optical coherence tomographic imaging
OVA	・・・	Ovalbumin
PBS	・・・	Phosphate-buffered solution
PGA	・・・	Polyglycolic acid
PLA	・・・	Polylactic acid
PLGA	・・・	Polylactic-co-glycolic acid
PGA-MN	・・・	MN patches made from PGA
RBC	・・・	Red blood cell
SCI	・・・	Subcutaneous immunization

TCI	・・・	Transcutaneous immunization
TDDS	・・・	Transdermal Drug Delivery Systems
TEWL	・・・	Transepidermal water loss
TT	・・・	Tetanus Toxoid

緒論 (Introduction)

経皮投与型製剤は、「投与方法及び投与中断が簡便」、「注射剤と比較して低侵襲性」、「経口吸収における消化管腔内薬物代謝及び肝初回通過効果を回避可能」、「経口剤の内服困難な嚥下障害の患者へも適用可能」といった利便性、有用性及び安全性の観点より、経口及び注射に代わる投与剤形として注目されていることから、世界中で Transdermal Drug Delivery System (TDDS) の研究開発が鋭意進められている [1-5] 。しかしながら、皮膚は常に外界と接していることから、化学物質や細菌といった体外からの異物侵入を防ぎ、かつ体内の水分蒸散及び体液漏出を抑制するバリア機能を果たしており、生体と外界を隔てる防御障壁として重要な役割を担っている。そのため、この生体本来の防御機構が、薬物の経皮吸収性を大きく制限し、かつ経皮吸収経路を複雑にしているため、経皮投与型製剤の開発における大きなハードルとなっている。皮膚は外側から角質層、生きた表皮、真皮の 3 層にて構成されており、異物の侵入を防ぐ物理的バリアと異物の除去を担う免疫学的バリアの 2 種類が、防御障壁機構として機能している。特に皮膚の最外層に存在する角質層は、表皮を構成するケラチノサイトが角化し、幾層にも重なることで形成されており、皮膚物質透過における最大の物理的バリアとして機能している。したがって、良好な皮膚透過性を示す薬物は、物理化学的特性が、分子量 500 Da 以下の低分子、オクタノール/水分配係数が 1～4 と適度に脂溶性、融点 200ºC 以下といったものに限定されている。また、角質層下の生きた表皮及び真皮には、それぞれランゲルハンス細胞 (Langerhans cell; LC) 及び真皮樹状細胞 (Dermal dendritic cell; dDC) とよばれる抗原提示細胞 (Antigen-presenting cell; APC) が豊富に常在しており、獲得免疫応答の誘導に寄与することによって、外来異物に対する免疫学的バリアとして機能している。

近年、新興国及び開発途上国における人口増加、貧困、医療環境及び保健衛生の未整備といった社会的要因が複合的に伴ったことに起因して、感染症の増加が国際的な課題となっている。新興国及び開発途上国の主要な死亡原因となっているマラリア、結核、HIV/エイズの 3 大感染症をはじめ、熱帯地域を中心に蔓延する顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Diseases; NTDs) [6] 等が、その代表例として挙げられる。また 2014 年上期は、中東呼吸器症候群 (Middle East Respiratory Syndrome; MERS) をはじめ、鳥インフルエンザウイルス A/H7N9 型、エボラウイルス疾患等が各地で猛威を振るった [7-9] 。加えて、2015～2016 年にかけては、ジカウィルス感染症であるジカ熱の発症が大き

な話題となった [7, 8] 。経済のグローバル化で人やモノの動きが地球レベルで活発化した現在では、新興或いは再興感染症の世界的流行 (パンデミック) が危惧される等、一つの国で発生した感染症は容易に国境を超えて世界中へ伝搬し、先進国をも巻き込む憂慮すべき事態となっている。そのため、感染症は全人類にとって脅威の疾患であり、もはや一国の問題ではなくなっている。このような感染症に対する唯一の根本的予防対策がワクチンである。これまでに実用化されているワクチン製剤は、ポリオ生ワクチンの経口免疫等、一部を除いて、ほとんどが注射剤である。そのためワクチン製剤は一般的に、医療従事者による投与及び一貫した低温温度管理 (コールドチェーン) による輸送・保管が必須である。しかしながら、医療サービス及びインフラが未成熟な開発途上国では、経済的要因によりワクチン製剤が十分普及しないといった医薬品アクセス問題がある。また、注射剤には医療従事者の針刺し事故といった潜在リスクが存在するのに加え、開発途上国では公衆衛生教育の不十分さ及び文化的価値観の相違に起因し、医療現場において注射針の再利用が常態化しているといった深刻な医療問題を抱えている。そのため、ワクチンを最も必要としている新興国及び開発途上国へも汎用可能な、注射投与型ワクチン製剤に代わる、簡便性、利便性及び普及性を兼ね備えた新たな投与剤形の開発が待望されている。

有用な新規ワクチン投与手法の一つに、経皮投与型製剤 (経皮ワクチン製剤) の適用が挙げられる。経皮ワクチン製剤は、LC や dDC といった皮膚に常在する免疫担当細胞を標的とすることから、皮膚の免疫機能を最大限利用できると考えられ [10, 11] 、従前の注射型ワクチンに取って代わる優れた新規ワクチン製剤となることが期待される。また、投与方法が皮膚に貼付するだけと非常に簡便性に優れ、患者自身による自己投与も可能となり得ることから、これまでワクチン製剤の浸透が不十分な開発途上国に対しても、投薬利便性向上に伴った普及促進効果が期待できる。また、注射針の針刺し事故や再利用といった医療事故・過誤の懸念が一切払拭できるばかりでなく、注射針に対して恐怖心のある小児等へのコンプライアンス向上も期待できることから、より患者指向のユーザーフレンドリーな医薬品であると考えられる。これまでに我々の研究室では臨床研究において、破傷風トキソイド (tetanus toxoid; TT) 及びジフテリアトキソイド (diphtheria toxoid; DT) を含有させた親水性ゲルパッチをヒト皮膚へ貼付した結果、局所及び全身性の副反応を誘発することなく、抗原特異的な免疫応答を誘導したことを報告した [12] 。

しかしながら、皮膚最外層の角質層は外界と生体内とを区切る物理的バリアとして機能し、物質透過を制限しているため、ワクチン抗原をはじめとする高分子物質の経皮剤開発を困難としている。一方、マイクロニードル (Microneedle; MN) は 1 mm 未満の微小針が複数本配置された経皮投与デバイスであり、皮膚へ貼付するだけで、経皮吸収の物質透過障壁である角質層に簡便かつ低侵襲的に微小孔を開けることから、薬物の経皮吸収効率を向上可能である。また、経皮ワクチン製剤としては、ワクチン抗原を物理的かつ合理的に APC の常在する皮内へ送達することから、抗原特異的免疫応答を強力に誘導することが期待できるばかりでなく、微小針が神経終末の存在する真皮の深部にまで到達しないため、痛みを伴わないワクチン接種を可能とする。したがって、MN は従来の注射型ワクチンに取って代わる経皮ワクチン用デバイスとなり得ることが期待されるため、TDDS のブレークスルー技術として近年注目されており、世界中で経皮免疫療法への適用研究が精力的に進められている [13-18] 。

MN は、ソリッド MN、中空 MN、コーティング MN 及び溶解型 MN の 4 種類に大別され、ソリッド MN、中空 MN 及びコーティング MN は第一世代 MN、溶解型 MN は第二世代 MN と呼ばれている [13, 19-22] 。第一世代 MN は微小針の構成材料に、剛性及び成型性に優れるシリコンや金属 (ステンレス、チタン) を使用しているため、MN 貼付によって生じた折損針が皮膚内に残留して重篤な副作用を惹起するといった危険性が潜在している。そのため、実用化する上での安全性確保が共通の課題となっている。一方、第二世代 MN である溶解型 MN は、ヒアルロン酸 (Hyaluronan; HN) 、コンドロイチン硫酸、カルボキシメチルセルロースナトリウム (Carboxymethylcellulose Sodium; CMC Na) といった生体成分及び生体適合性基剤を構成材料とし、ワクチン抗原を微小針内に装填する。加えて、溶解型 MN は皮膚へ貼付すると、微小針自体が皮膚内で溶解するため、微小針に装填したワクチン抗原を確実に皮膚内へ送達できる。したがって、溶解型 MN は、第一世代 MN で懸念されるような折損残留針が皮膚内で組織障害を惹起するといった安全面の課題を一切払拭できることから、実用化が大いに期待されている。我々の研究室では臨床研究を通じて、創製した溶解型 MN の MicroHyara (MH) が安全かつ確実にヒト皮膚へ穿刺可能であったこと [23] 、三価季節性インフルエンザ HA (Hemagglutinins) 抗原を装填した MH (flu-MH) が、ヒトにおいて局所及び全身性の副反応を誘発することなく、HA 抗原特異的免疫応答を誘導したこと [24] を確認しており、MH が臨床使用

可能となり得る有用な経皮ワクチンデバイスであることを実証してきた。また、Prausnitz らの設計した溶解型 MN によるインフルエンザ HA ワクチン接種は、phase 1 study において、安全かつ頑健に免疫応答を誘導することが実証されている。加えて、被験者自身による自己投与の適用可能性も示されている [25, 26] 。

しかしながら、これまでの製剤化研究を通じて、MH の実用化を達成するためには、まだ複数の課題を克服する必要があると考えられた。MH の微小針はヒト皮膚内で遅溶性のため、ワクチン抗原を皮膚内へ確実に送達するためには 6 時間、ヒト皮膚へ貼付する必要がある [23, 24] 。そのため、簡便性の観点から、微小針の皮膚内溶解速度を向上して、MN の皮膚貼付時間を短縮化する必要がある。また、溶解型 MN は構成基剤とワクチン抗原を混合して微小針を成型することから、装填するワクチン抗原の種類及び含有量が、微小針の針部強度 (Needle failure force) に影響を及ぼす [24, 27] 。針部強度は、微小針の皮膚穿刺確実性に大きく寄与する MN の重要品質特性 (Critical Quality Attribute; CQA) であることから、実用化のためには、針部強度がワクチン抗原の種類や装填量に影響されない微小針特性を示す MN の設計が必要である。

本研究では前述の課題を、MH の改良によって解決を試みたのとともに、新たな経皮ワクチン用 MN の開発にも取り組み、2 種類のアプローチにて MN の早期実用化を目指した (Fig. 1) 。

溶解型 MN の皮膚貼付時間短縮化については、ヒト皮膚内針部溶解時間が 30 分以内となるような速溶型 MN の設計を試みた。

装填するワクチン抗原の物性及び含有量に影響されることなく、確実なヒト皮膚穿刺特性及び皮膚内薬物送達性を示す MN の設計については、ワクチン抗原を微小針先端へ溶着或いはコーティングする装填機構のソリッド MN に着目した。ソリッド MN は、皮膚穿刺能力に直結する重要パラメーターの針部強度が、装填するワクチン抗原に依存されないといった利点があるため、様々なワクチン抗原への適用可能性が期待できる。さらに、ワクチン抗原を乾燥した固形製剤とすることで安定化が図れることから、注射型ワクチンが生産から消費まで一貫して必要とする低温温度管理 (コールドチェーン) を不要とできる可能性があり、開発途上国への普及促進へ繋がることが期待される。したがって、ソリッド MN は、ワクチン抗原と一体型の溶解型 MN と比較して、汎用性に優れた経皮ワクチン製剤になり得ると考えられたため、MN の実用化を強力に推進できると考えた。

本研究では、従前のソリッド MN における安全面の課題克服を重要視し、新規ソリッド MN の基剤に、生分解性ポリマーで剛性に優れるポリグリコール酸 (Polyglycolic acid; PGA) [28, 29] 及び生体適合性及び弾力性に優れる Nylon 6 [30] を用いた。また、MN へのワクチン抗原装填量を高含有化するための製剤的工夫として、微小針が新規デザインとなる二段テーパー型のソリッド MN (二段型 MN) を設計した。プラセボの二段型 MN にて、ヒト皮膚への穿刺確実性及び安全性を確認し、よりヒト皮膚穿刺能力の優れる MN を選択して、有効性 (抗原特異的免疫応答誘導能) を確認するとともに、臨床適用を指向したワクチン抗原の高用量装填 MN を作製して、保存安定性を評価した。

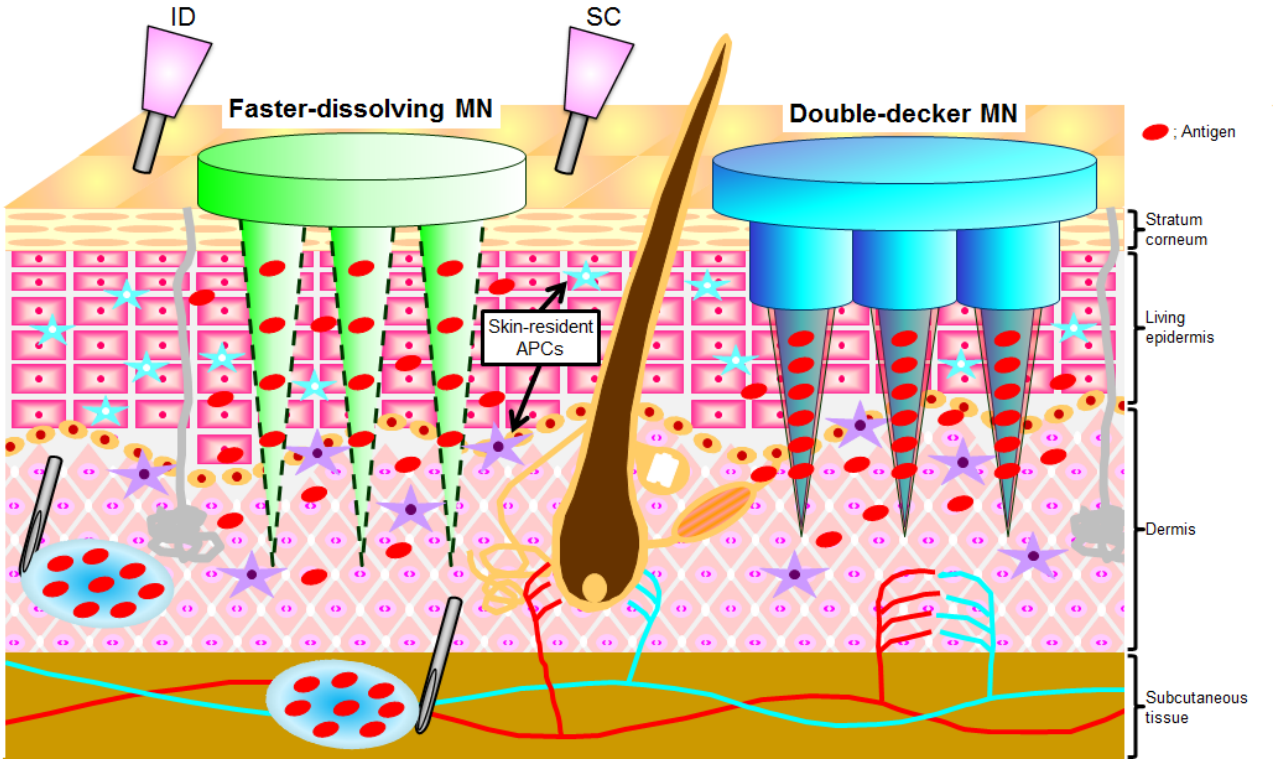


Fig. 1　Development of novel faster-dissolving microneedle patches and double-decker microneedle patches for transcutaneous vaccine delivery.

第一章　ヒト皮膚貼付時間短縮化を指向した速溶型 MN の開発

背景 (Background)

我々は臨床研究を通じて、創製した MH が臨床使用可能となり得る有用な経皮ワクチンデバイスであることを実証してきた [23, 24] 。しかしながら、MH の実用化を実現するためには、これまでの製剤化研究において見出された幾つかの課題を克服する必要があった。

MH の微小針はヒト皮膚内において遅溶性であることから、ワクチン抗原を皮膚内へ確実に送達するために、ヒト皮膚へ 6 時間貼付する必要がある [23, 24] 。したがって、MN の実用化のためには、ヒト皮膚への貼付時間を顕著に短縮化して、臨床使用における簡便性及び利便性を向上させる必要があると考えられた。現在の日本におけるワクチン注射では、接種後にアレルギー反応やアナフィラキシー等、副反応が認められないか確認するため、被接種者に 30 分の院内待機を推奨している。そのため、MN による経皮ワクチン接種の場合、医療従事者が被接種者に MN パッチを貼付して剥離し、接種後の副反応所見を確認するといった全医療行為に掛かる所要時間を考慮すると、溶解型 MN の皮膚内針部溶解時間は少なくとも 30 分以内であることが望ましい。

本章では、溶解型 MN のさらなる実用化推進に向けて、MN の皮膚貼付時間を短縮化するために、ヒト皮膚内針部溶解時間が 30 分以内となるような速溶型 MN の設計を試みた (Fig. 2) 。設計アプローチとしては、MH で確立されたヒト皮膚穿刺確実性及び安全性を踏襲した速溶型 MN を設計するため、溶解型 MN の主構成基剤のみで作製したプロトタイプ製剤を設計し、組成改変して処方を最適化するための基礎情報収集に取り組んだ。プロトタイプ製剤を構成する単一基剤には、MH の主構成基剤である HN に加えて、水溶性高分子で一般的な医薬品添加剤である CMC Na を選択した。CMC Na は、皮下注射剤では粘稠化剤、懸濁化剤等として、経皮用パップ剤ではゲル構成基剤として用いられており、極めて安全性の高い生体適合性材料である。そのため、溶解型 MN の構成基剤として適用された研究事例が既に複数報告されている [31-36] 。しかしながら、ヒトにおける皮膚貼付必要時間及び皮膚内針部溶解時間については全く報告がないため、簡便性の観点で、CMC Na が溶解型 MN の基剤として有用か否か、現状明確ではない。そこで本研究では、CMC Na の物理化学的特性及び高い安全性に着目し、HN 処方 (HN-MN) 同様に CMC Na 処方 (CMC-MN) も評価し、臨床研究にて、微小針のヒト皮膚内針部溶解時間の把握を試みた。

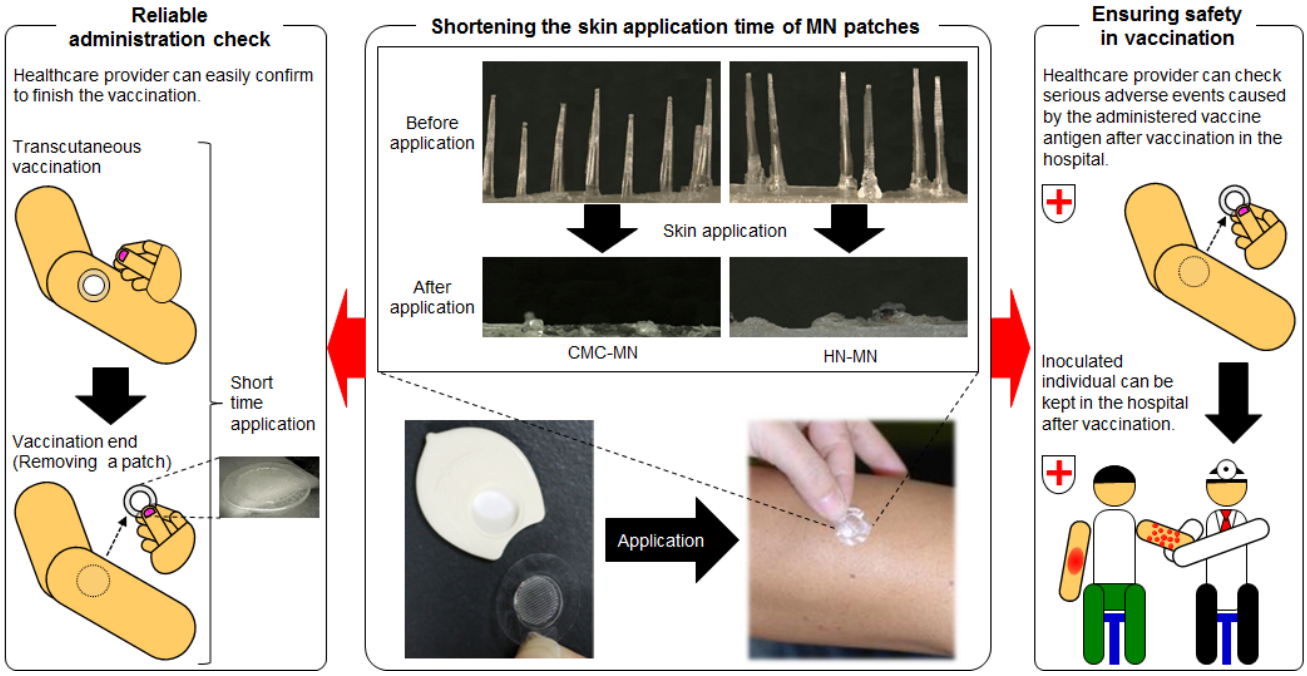


Fig. 2　Development of highly practical dissolving microneedle patches for transcutaneous vaccine delivery.

第一節　速溶型 MN の製剤設計

材料と方法 (Materials and Methods)

【動物】

Wistar ラット (雌性、7 週齢) は、日本 SLC より購入し、実験に供するまで、大阪大学動物飼育施設にて飼育管理した。また、動物の飼育及び実験は全て、大阪大学動物実験規定 (the guidelines provided by the Animal Care and Use Committee of Osaka University) に準じて行った。

【速溶型 MN の作製及び針部強度の測定】

CMC-MN 及び HN-MN は、微小鋳型成型法 (Micromolding) にて無菌的に作製した。作製した MN の形状等、製剤学的特性を Fig. 3 にまとめた。基剤である CMC Na (ダイセルファインケム (株) 、日局適合品) 或いは HN (キッコーマンバイオケミファ (株) 、日局適合品) の溶解液を鋳型に流し込み、室温にて乾燥後、鋳型より成型体を剥がし取った。蛍光標識モデル抗原である F-OVA (fluorescein-labeled ovalbumin, Molecular Probes, Inc., USA) 或いはモデル抗原である OVA (EndoGrade Ovalbumin, Hyglos GmbH, Germany) を装填した MN は、それぞれの抗原を基剤と一緒に溶解し、以

降のプロセスは同一の方法にて作製した。得られた MN は全て、アルミラミネート PET パックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保存した。

MN の微小針部の耐荷重値は、TA-XT plus texture analyzer (StableMicro Systems, Surrey, UK) にて測定した。MN をテストステーションに固定し、直径 5 mm のステンレスシリンダーを MN の上から、速度 0.1 mm/秒にて針部の軸に対し垂直となるよう下降し、微小針に押し当てて、微小針が折損或いは屈曲するのに要した機械的応力を計測した。得られた機械的応力を折損或いは屈曲した微小針数で除した時の耐荷重値を、微小針 1 本当たりの針部強度とした。

【速溶型 MN の in vivo 微小針溶解性評価】

バネ式アプリケーターにて、プラセボの速溶型 MN を除毛した Wistar ラットの背部皮膚に所定の時間、貼付して剥離した。剥離後の MN を側面からデジタルマイクロスコープ (VHX-1000, Keyence, Japan) にて画像撮影し、微小針の溶解度合いを目視確認した。

【In vivo 蛍光画像解析による蛍光標識モデル抗原の皮膚内滞留性評価】

バネ式アプリケーターにて、F-OVA 装填 MN (F-OVA 含有量：36 μg/patch) を除毛した Wistar ラットの背部皮膚へ 5 分間貼付し、剥離した。対照群には、F-OVA/PBS (36 μg/40 μL) を背部に皮内注射した。MN を剥離後、CRI Maestro EX in vivo imaging system (Cambridge Research and Instrumentation, Woburn, MA, USA) を用いて、投与部位における蛍光物質の局在性を経時的に観察した。投与部位の撮影は、励起に UV ランプを用い、露光時間 200 ms、青色フィルター (emission filter at 515 nm) 、スペクトルの解像度を 10 nm に設定して行った。撮影した画像は、Maestro version 2.10 software によって解析し、投与部位における蛍光由来の緑点の発色より、単位発光面積当たりの蛍光強度 (蛍光強度/発光面積) を求めた。投与されたモデル抗原の皮膚内滞留性は、投与直後 (time = 0 hr) における蛍光強度/発光面積を 100%とし、各観察時点の残存率を蛍光残存率として経時的な蛍光残存率推移を評価した。

【OVA 抗原装填 MN の経皮免疫による in vivo 抗原特異的抗体産生誘導能の評価】

OVA 抗原量が 10 μg/patch となるよう装填された速溶型 MN を、除毛した Wistar ラットの背部皮膚へ 10 分或いは 4 時間貼付し、剥離した。この免疫操作を 2 週間隔で計 3 回行った。対照群には、OVA/PBS (10 μg/50 μL) を 2 週間隔で計 8 回或いは OVA/PBS (100 μg/50 μL) を 2 週間隔で計 3 回、Wistar ラットの背部に皮下注射した。経時的に採血し、血清は抗体価測定に供するまで冷凍保存した。

血清中の OVA 抗原特異的 IgG 抗体価は、ELISA 法により測定した。OVA 抗原を固相化した 96-well ELISA plate をブロッキングし、1/2 連続希釈した血清を添加して、室温にて 2 時間反応させた。ラット IgG の検出には Horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Southern Biotech) を用いた。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度 (吸光波長 450 nm、副波長 655 nm) 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。

【蛍光物質を用いた MN のヒト皮膚内物質送達特性】

ヒト背部皮膚組織は、大阪大学医学部付属病院臨床研究倫理審査委員会 (Institutional Review Board for Clinical Research at Osaka University Hospital) の審査・承認を経て、ボランティアより、外科手術によって生じた余剰皮膚を提供された。また、ボランティアに対し、本研究で使用する旨のインフォームド・コンセントを書面にて行った。また、F-OVA 装填 MN は、F-OVA 含有量が 36 μg/patch のものを使用した。バネ式アプリケーターにて、F-OVA 装填 MN をヒト摘出皮膚組織に貼付し、貼付 1 時間後に MN を剥離して、適用部位の皮膚を摘出した。摘出皮膚は O.C.T. compound (サクラ精機) に包埋後、液体窒素に浸漬して凍結ブロックを作製した。凍結ブロックは、クリオスタット (Leica CM1850; ライカ マイクロシステムズ (株)) にて厚さ 8 μm の組織切片にカットし、Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) を用いてマウントし、プレパラート中に封入した。得られたプレパラートを蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000; KEYENCE) にて観察し、F-OVA の皮膚内局在性を画像解析した。

【統計解析】

ラット OVA 抗原特異的 IgG 抗体価の解析において、分散分析を行い、次いで、Bonferroni-Dunn 法 (Statcel version 2.0 software, OMS publishing, Tokorozawa, Japan) による多重比較検定を実施した。

結果 (Results)

【速溶型 MN の製剤学的特性及びラット皮膚内針部溶解時間】

ヒト皮膚内で速溶性の微小針を設計するため、組成を CMC-Na 或いは HN の単一基剤とした速溶型 MN (CMC-MN 及び HN-MN) を成型し、製剤学的特性を評価した (Fig. 3) 。速溶型 MN はいずれも、微小針長 800 μm、針先の幅 40 μm、針基の幅 140 μm、針同士の間隔 540 μm に設計し、パッチ当たりの微小針密度を 318 本/patch とした。MN の皮膚穿刺能力に直結する重要パラメーターである針部強度は、両 MN とも同じであり、差異は認められなかった。

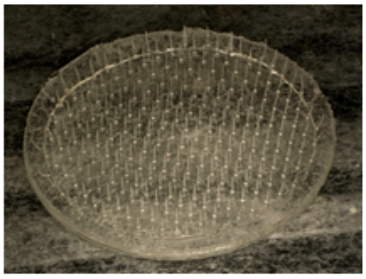
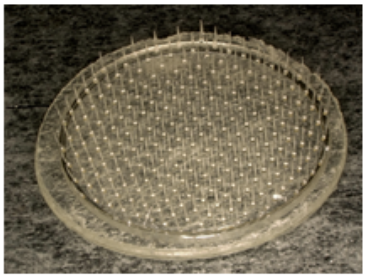
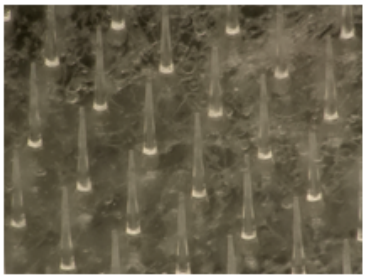
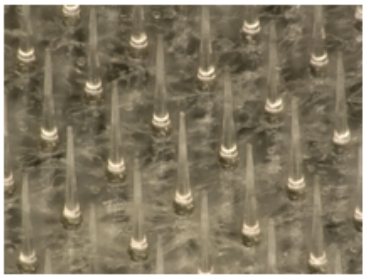
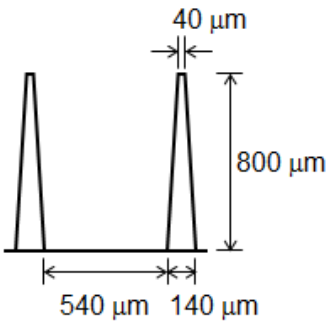
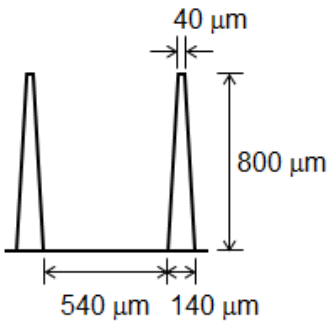
		CMC-MN	HN-MN
Constituent		Carboxymethylcellulose	Hyaluronan
Stereomicroscopic image	Patch		
	MN		
Dimension			
Patch area (cm^2)		0.785	0.785
MN density (/patch)		318	318
MN failure force (N/needle)		0.048 ± 0.014	0.044 ± 0.013

Fig. 3 Pharmaceutical characteristics of novel faster-dissolving MN patches. Data of MN failure forces are expressed as mean ± SD of results from four measurements.

速溶型 MN の皮膚内針部溶解時間は、MN をラット背部皮膚へ貼付し、剥離した MN の微小針状態を目視確認して評価した。(Fig. 4) 。いずれの MN も皮膚穿刺後の微小針は、貼付 2 分で 7 割以上溶解し、貼付 5 分でほぼ完全に溶解した。したがって、設計コンセプト通り、微小針が速溶性の溶解型 MN を得ることができたと考えられ、ヒト皮膚内においても速溶性であることが期待された。

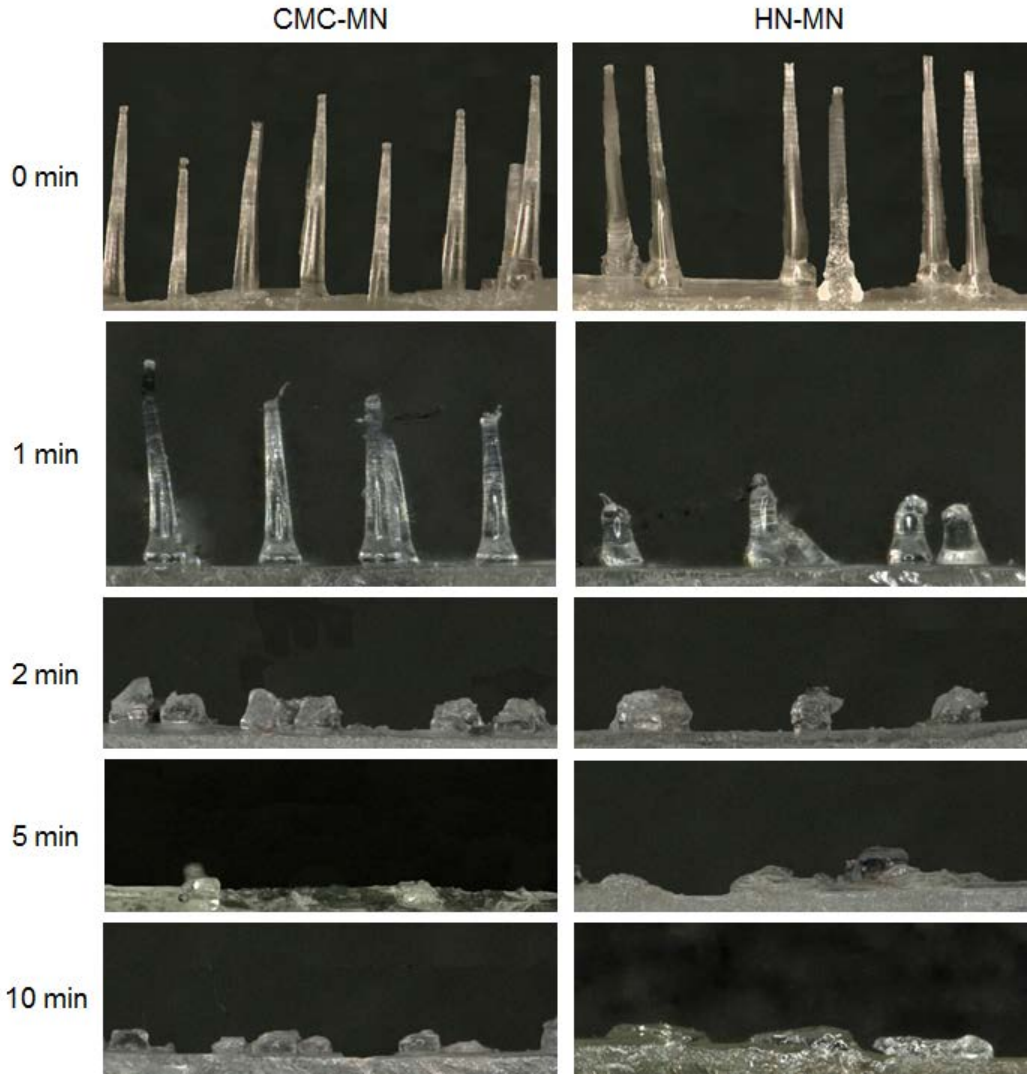


Fig. 4 MN-dissolution kinetics of faster-dissolving MNs after patch applications to rat skin. Placebo CMC-MN and HN-MN patches were applied to the back skin of Wistar rats for 1, 2, 5, or 10 min. After removal of MN patches, the remaining MNs on each CMC-MN and HN-MN patch were photographed using a stereoscopic microscope.

【速溶型 MN 経皮投与による皮膚内抗原滞留性】

得られた速溶型 MN は設計意図通り、微小針が皮膚内で速溶性であると考えられたことから、経皮投与されたワクチン抗原の皮膚内挙動を把握する目的で、F-OVA 装填 MN をラットへ経皮投与し、投与後の F-OVA 由来蛍光物質を in vivo 画像解析して、F-OVA 溶液の皮内注射投与群と比較した (Fig. 5) 。蛍光由来の緑点の発色は、CMC-MN では 24 時間まで、HN-MN では 48 時間まで、MN 適用部位で観察されたのに対し、皮内注射群における蛍光由来の緑点発色持続時間は 4 時間までであった (Fig. 5 (A)) 。また、皮内注射群及び MN 経皮投与群の蛍光残存率推移を比較すると、皮内注射群は蛍光残存率が投与 4 時間以降で顕著に減衰し、12 時間以降の蛍光残存率が 5%未満になったのに対し、CMC-MN 及び HN-MN 経皮投与群の蛍光残存率はそれぞれ、投与 24 時間後で 20%以上及び 10%以上であった (Fig. 5 (B)) 。したがって、速溶型 MN の経皮投与により、皮膚内へ送達された抗原の滞留性が、皮内注射より向上することが明らかとなった。

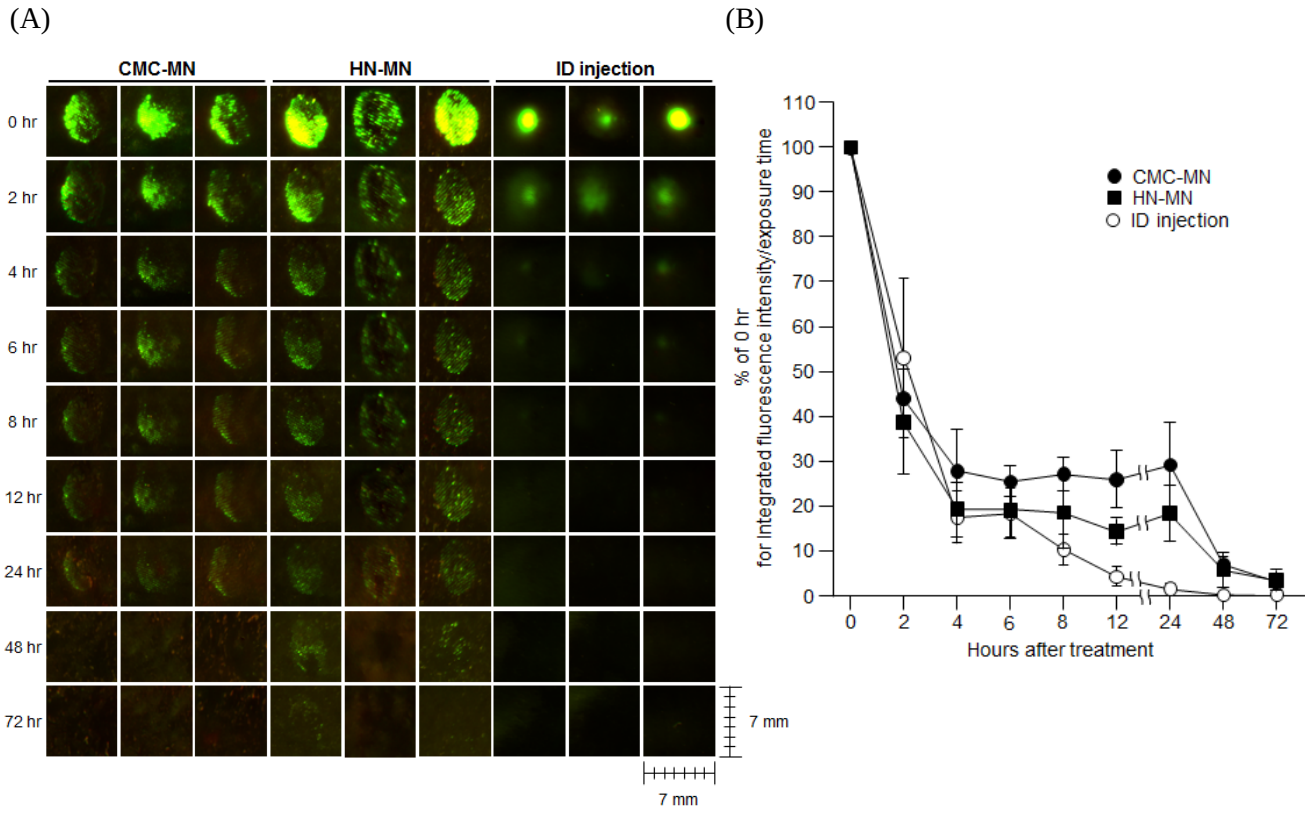


Fig. 5　Time course of antigen deposition at the skin administration site after F-OVA administration to rats via an MN patch or ID injection. (A) Representative in vivo fluorescence imaging for antigen deposition from three rats for each group, transcutaneous administration of CMC-MN and HN-MN patches, and ID injection. (B) Time course profiles of the residual fluorescence intensity at the administration site after F-OVA-loaded MN patch applications or ID injection. The residual fluorescence intensity at the administration site was defined as % of the initial fluorescence intensity at 0 h. Data are expressed as mean ± SEM of results from three rats.

【OVA 抗原装填 MN の in vivo 抗原特異的免疫応答誘導能】

モデル抗原である OVA を装填した速溶型 MN をラットへ経皮投与し、経皮ワクチン製剤の基本機能である in vivo 抗原特異的免疫応答誘導能を確認した (Fig. 6)。

いずれの MN も初回免疫から OVA 抗原特異的 IgG 抗体の産生が血清中に認められ、二回、三回と経皮免疫を繰り返すことにより、血中 OVA 抗原特異的 IgG 抗体価は上昇して行った。また、OVA 抗原特異的 IgG 抗体の産生量推移は、両 MN とも同様であり、かつ皮膚貼付時間が 10 分と 4 時間で同程度であったことから、貼付時間による差もないと考えられた。加えて、皮下注射群と比較すると、同用量の 10 μg/rat では OVA 抗原特異的 IgG 抗体の産生が、四回免疫後において初めて血清中に検出され、血中 OVA 抗原特異的 IgG 抗体価は、以降の皮下注射免疫から上昇して行った。さらに、10 倍用量の 100 μg/rat における血中 OVA 抗原特異的 IgG 抗体価の上昇推移は、速溶型 MN の経皮投与群と同様であった。

以上の結果より、本研究にて開発した新規速溶型 MN は、ワクチン製剤の基本機能である抗原特異的免疫応答を誘導できる経皮デバイスであることを確認した。また、皮下注射群との比較結果より、新規速溶型 MN は皮下注射よりも抗体産生応答の誘導を増強し得ることが明らかとなった。

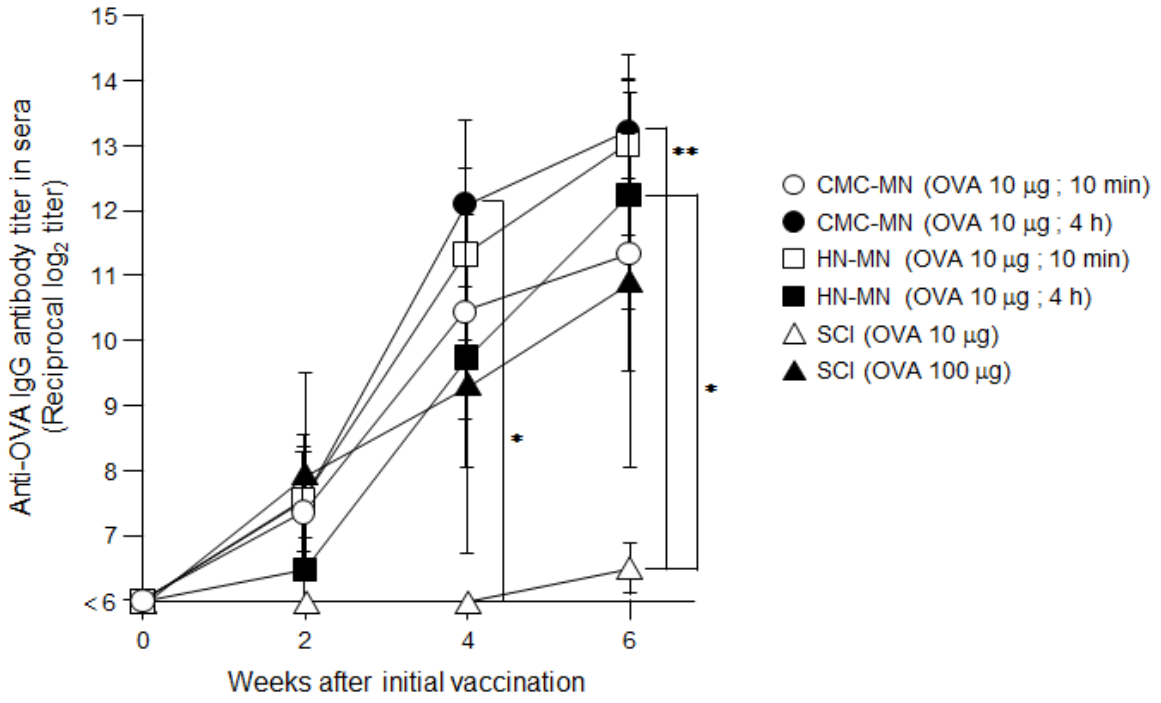


Fig. 6　OVA-specific antibody titers induced by TCI using OVA-loaded-faster-dissolving MN patches. OVA (10 μg)-loaded faster-dissolving MN patches were applied to the back skin of Wistar rats for 10 min or 4 h three

times at 2-week intervals. As controls, each OVA solution in the same dose (10 μg/50 μL) and in the tenfold dose (100 μg/50 μL) was subcutaneously administered three times at 2-week intervals. Sera collected from these rats were assayed for the IgG titer specific for OVA by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of results from four or six rats. $*p < 0.05$ vs. SCI (10 μg), $**p < 0.01$ vs. SCI (10 μg).

【ヒト皮膚内物質送達特性】

設計した速溶型 MN が、ラット経皮投与において微小針が速溶性かつ抗原特異的な免疫応答を誘導できたことから、F-OVA を装填した速溶型 MN をヒト摘出皮膚組織へ貼付し、送達された F-OVA 由来蛍光物質の皮膚内局在部位を観察することにより、ヒト皮膚穿刺特性を評価した。その結果、両 MN とも F-OVA 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. 7 (A)) ことから、両 MN ともヒト皮膚へ確実に穿刺でき、かつ装填したワクチン抗原を表皮層及び真皮層へ送達でき得ると考えられた。

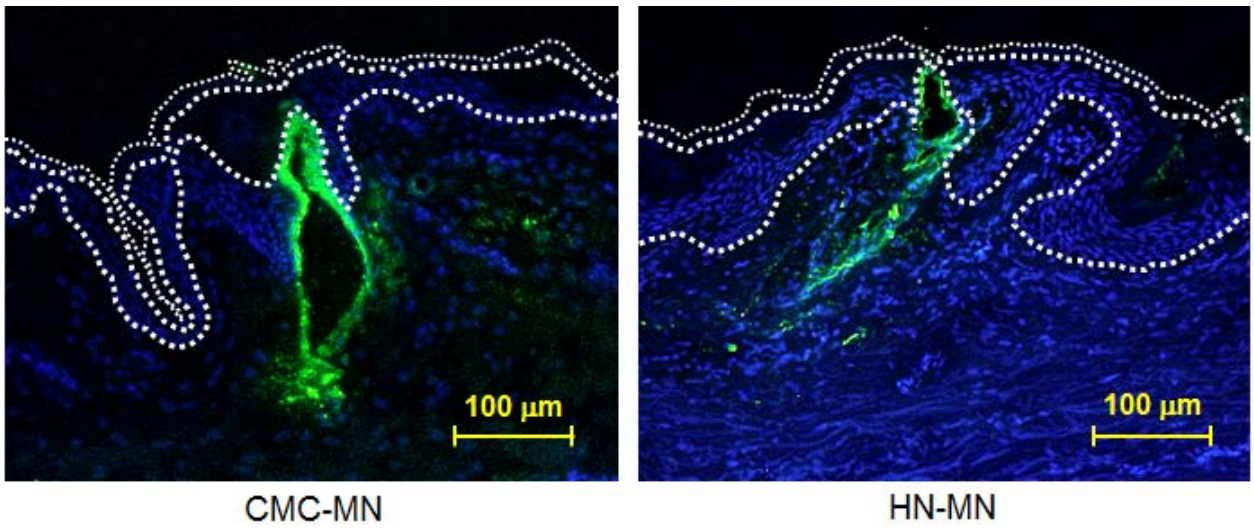


Fig. 7 Antigen delivery images using faster-dissolving MN patches on human skin. F-OVA-loaded MN patches were applied to the resected human dermal tissues. In the fluorescence images, the area between the top line and the middle line represents the stratum corneum, the area between the middle line and the bottom line represents the living epidermis, and the dermis is located under the bottom line. Green and blue fluorescence indicate F-OVA and nucleus (DAPI), respectively.

第二節　プラセボ速溶型 MN を用いた臨床研究

材料と方法 (Materials and Methods)

【速溶型 MN の作製】

第一節の材料と方法 (Materials and Methods) の項に従った。

【臨床研究による MN 貼付後の針部溶解性評価、MN 適用部位の皮膚水分蒸散量 (Transepidermal water loss; TEWL) 測定及び安全性評価】

試験計画は、各項目について下記のとおり設定し、奈良県立医科大学倫理審査委員会 (Ethics Committee of Nara Medical University) の審査・承認を受けた後に実施した。

試験計画内容：

① 対象被験者及び人数、選択基準、除外基準及び設定した被験者数を妥当とした根拠

- 対象被験者及び人数：健常人、約 20 名
- 選択基準：本臨床研究への参加協力を、自身で判断できる健常な成人
- 除外基準：
  - ✓ 書面によるインフォームド・コンセントを受けることが困難な者
  - ✓ 医師が本試験の参加を不適当と判断した者

② 手順

(1) 健常被験者の上腕内側または外側に、エタノール消毒後、CMC-MN を 3 枚貼付する。また、対側の上腕内側または外側に、エタノール消毒後、HN-MN を 3 枚貼付する。

(2) 貼付 0.5、1、2 時間後に左右の MN を 1 枚ずつ剥離し、微小針の溶解状態を目視確認する。

(3) 貼付開始から 48 時間後に局所皮膚の肉眼的観察、写真撮影、自覚症状の問診を行う。

(4) 貼付開始から 7 日後に局所皮膚の肉眼的観察、写真撮影、自覚症状の問診を行う。なお、7 日後に、何らかの症状がある場合には、14 日後に再度皮膚の観察を行う。

③ 主要評価項目

ヒト皮膚内針部溶解時間 (皮膚へ貼付した MN の微小針の溶解状態) 、局所皮膚の肉眼的観察所見及び自覚症状の問診

④ 副次評価項目

MN 適用部位の皮膚水分蒸散量 (Transepidermal water loss; TEWL)

⑤ その他

被験者は試験参加中であっても、自由意思により参加同意を撤回できる。

選択基準及び除外基準に基づいて、被験者に対するインフォームド・コンセントを書面で行い、19～54 歳の健常被験者 19 名 (男性 14 名、女性 5 名) を選定して、プラセボの速溶型 MN (CMC-MN 及び HN-MN) を健常人皮膚へ貼付する臨床研究を実施した。皮膚適用部位をエタノール消毒後、バネ式アプリケーターを用いて、健常被験者の上腕外側皮膚に MN を貼付した。主要評価項目であるヒト皮膚内針部溶解時間は、貼付 30 分後、60 分後或いは 120 分後に MN を剥離して、それぞれの MN 外観をデジタルマイクロスコープ (VHX-1000, Keyence, Japan) にて画像撮影し、微小針の溶解度合いを目視確認した。

副次評価項目である皮膚水分蒸散量 (TEWL) 及び主要評価項目である皮膚局所反応は、30 分間貼付した MN の適用部位について評価した。TEWL は、MN 剥離後、直ちに MN の適用部位を携帯型閉鎖チャンバー方式水分蒸散量測定装置 (VAPO SCAN AS-VT100RS; ASAHI BIOMED) を用いて測定した。皮膚局所反応の評価は、共同研究者である浅田秀夫医師が、MN 貼付 2 日後及び 7 日後に自覚症状について問診したのと同時に、MN 適用局所を観察して、International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) の判定基準 (Table 1) に従った皮膚刺激性評価を行った。加えて、皮膚局所反応として紫斑の有無も評価した。

Table 1 Scoring of patch test in accordance with ICDRG.

Score	Reactions
–	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

【統計解析】

臨床研究における TEWL 測定結果の解析において、2 つの MN 経皮投与群の有意差検定を実施した。分散分析を行い、次いで、Bonferroni-Dunn 法 (Statcel version 2.0 software, OMS publishing, Tokorozawa, Japan) による多重比較検定を実施した。

結果 (Results)

【ヒトにおける皮膚内針部溶解時間、皮膚穿刺特性及び皮膚局所刺激性】

ヒト摘出皮膚を用いた評価において、速溶型 MN が、ヒト皮膚へ確実に穿刺でき、かつ装填したワクチン抗原を皮膚内へ送達でき得ると考えられたことから、臨床研究にて、当初の目的であったヒト皮膚内における微小針の速溶性を検証すると同時に、ヒトへ適用した時の皮膚穿刺特性及び安全性を評価した。主要評価項目であるヒト適用時の皮膚内針部溶解時間は、皮膚貼付後の MN 外観を目視確認し、微小針の溶解度合いにて評価した。Fig. 8 (A) には、ヒト皮膚へ適用した MN の代表的な外観結果をそれぞれ示すが、両 MN とも微小針の溶解度合いは、貼付 30 分後で約半分、貼付 60 分後で約 8 割であり、微小針が完全に溶解したのは貼付 120 分後であった。

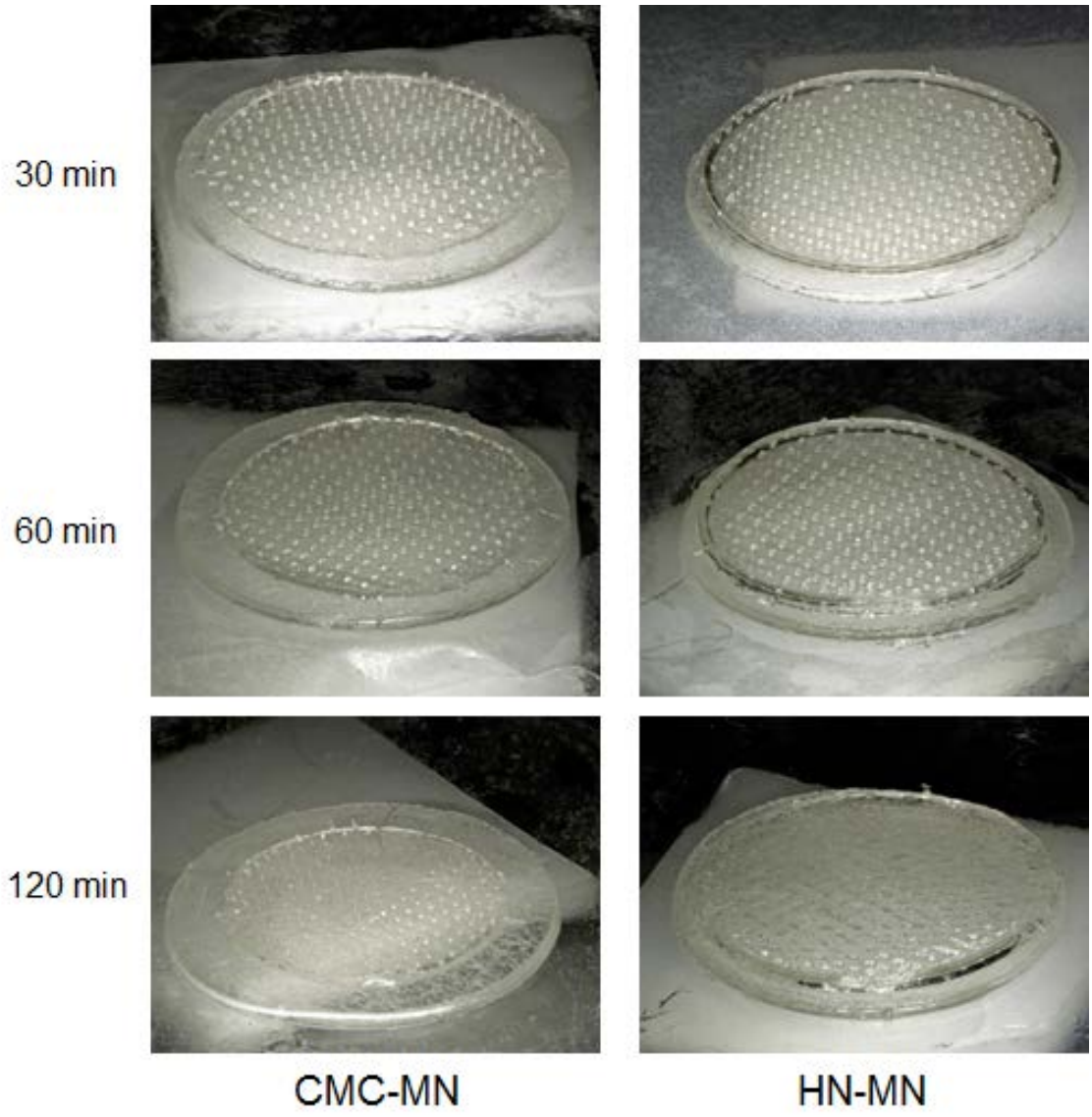
MN のヒト皮膚穿刺特性は、副次評価項目である MN パッチ剥離部位の皮膚水分蒸散量 (TEWL) を測定することにより確認した (Fig. 8 (B))。TEWL は、角質層のバリア機能が低下すると上昇することから、皮膚バリア機能の評価指標として活用されている。MN の皮膚貼付後における TEWL の上昇は、微小針の穿刺によって角質層に微小孔が形成されたことを示唆するため、MN のヒト皮膚穿刺特性評価の指標として使用されている [37] 。評価した全被験者 (6 例) において、速溶型 MN 適用群の TEWL は無処置よりも上昇していたことから、両 MN とも貼付によるヒト皮膚角質層の穿孔形成が示唆された。また、TEWL の上昇値を MN 間で比較すると、いずれの被験者においても同程度であった。したがって、両 MN ともヒト皮膚穿刺能力は同等であり、十分なヒト皮膚穿刺特性を示すと判断された。

主要評価項目であるヒト皮膚局所刺激性は、MN パッチ剥離部位の皮膚局所反応を経時的に観察し、ICDRG スコアにて評価した (Fig. 8 (C)) 。CMC-MN 適用群では 15/19 例、また HN-MN 適用群では 18/19 例において、貼付 2 日後に紅斑及び軽度の紅斑所見が観察された。また、本局所反応所見

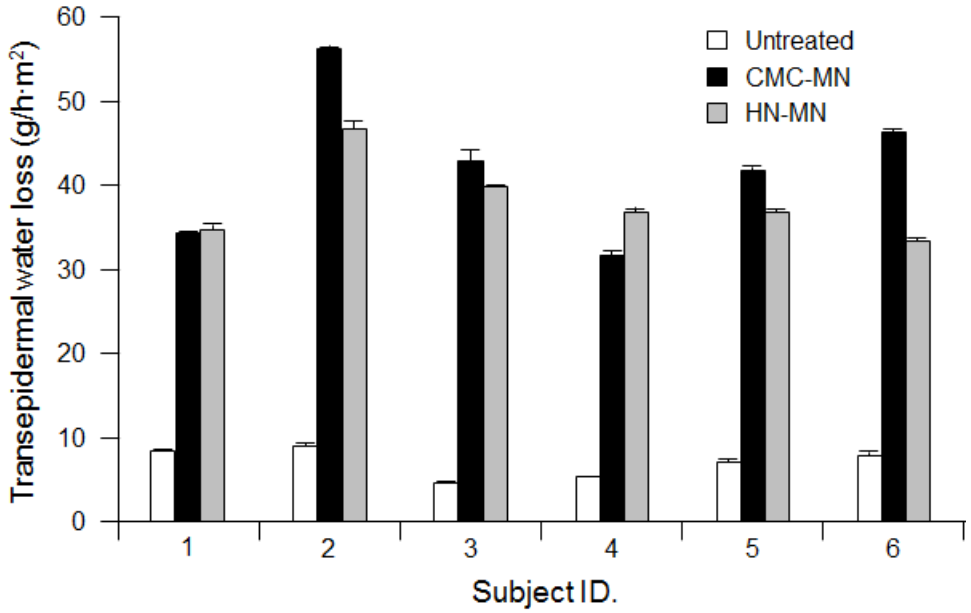
は、性別によって発生頻度に差異はみられなかった。しかしながら、ICDRG の判定基準に従うと、5 段階評価の内、最も低重篤度の score から数えて 2 番目の score (+? : Doubtful reaction; faint erythema only) であったため、軽度の一次局所反応が認められてはいるものの、皮膚科領域において容認できるレベルの局所反応と判断された。貼付 7 日後では、僅かな色素沈着が CMC-MN 適用群において 8/19 例、HN-MN 適用群において 14/19 例観察された。しかしながら、ICDRG の判定基準は最も低重篤度の score (- : Negative reaction) であった。加えて、貼付 2 日後及び 7 日後に実施した被験者に対する問診では、自覚症状を訴える被験者が全く認められなかった。したがって、全て皮膚科領域において容認可能な一過性局所反応所見と結論付けられたことから、両 MN とも、適用局所において重篤な副作用を誘発するようなことはない安全な経皮デバイスであると判断した。

以上の結果より、設計した速溶型 MN のプロトタイプ製剤はいずれも、ヒト皮膚へ安全かつ確実に穿刺でき、装填したワクチン抗原を皮膚内へ送達可能であると考えられた。また、ヒト皮膚内針部溶解時間が 2 時間であったことから、MH よりもヒト皮膚貼付時間を短縮することができた。ヒト皮膚内針部溶解時間が「30 分以内」という当初の目標は達成できなかったものの、本プロトタイプ処方をベースに、微小針の組成改変を行うことで、さらなる微小針の速溶化を図ることが可能と考えられる。

(A)



(B)



(C)

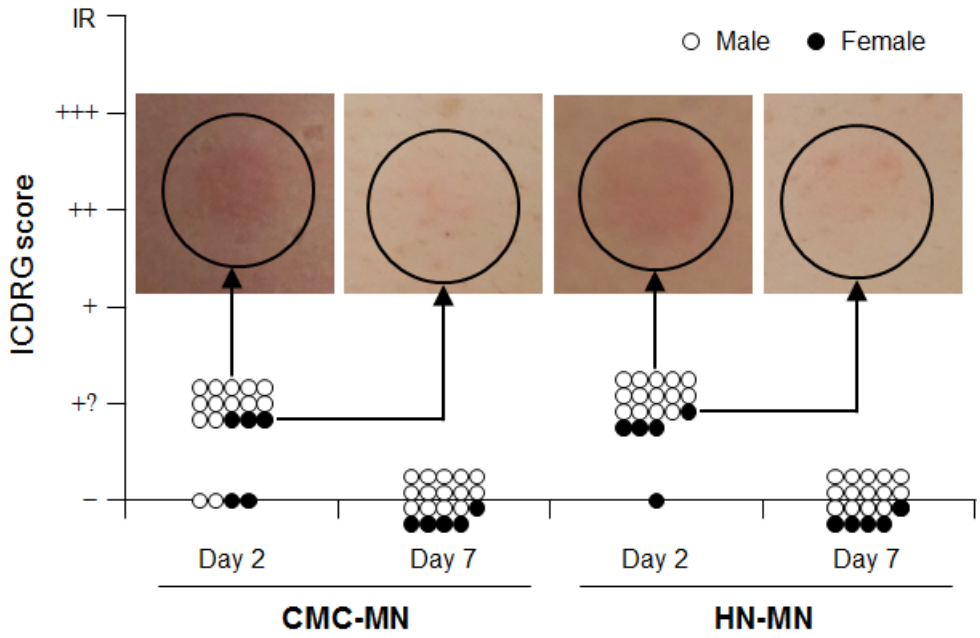


Fig. 8 Dissolution of MNs, skin puncturability and safety using faster-dissolving MN patches on human skin. (A) Placebo CMC-MN and HN-MN patches were each applied to the skin of upper outer arm of 19 healthy volunteers (14 male and 5 female) for the indicated times. After removal of MN patches, the remaining MNs on each CMC-MN and HN-MN patch were photographed using a stereoscopic microscope. (B) After MN patch applications of 30 min, TEWL at the application site was measured immediately after MN patch removal. Data are expressed as mean ± SD of results from three measurements. (C) Skin irritation caused by application of MN patches was assessed in accordance with the ICDRG score. Each plot expresses the score of an individual subject. Four photographs show the site judged as +? "doubtful reaction; faint erythema only."

考察 (Discussion)

MN の中でも、ソリッド MN 及び中空 MN は実用化の観点で多くの制約・課題があるため、多くの研究者は溶解型 MN 及びコーティング MN の特徴・利点に注目し、経皮ワクチン製剤への適用研究に鋭意取り組んでいる [22, 25, 26] 。我々も溶解型 MN の実用可能性に着目し、MH の経皮ワクチン製剤としての有用性を実証してきたが、実用化に向けた新たな課題を抽出した [23, 24] 。MH の微小針はヒト皮膚内で遅溶性のため、ワクチン抗原を確実に皮膚内へ送達するためにはヒトへ 6 時間貼付する必要がある。そのため、微小針の皮膚内溶解速度を向上し、ヒト皮膚貼付時間の短縮化へと繋げることが、簡便性の観点から必須と考えられた。また、MH は装填するワクチン抗原と微小針が一体型の経皮ワクチン製剤であるため、ヒト皮膚穿刺確実性を担保するような針部強度を適正に維持するためには、現状、装填可能なワクチン抗原の種類及び量に制限がある。そのため、針部強度がワクチン抗原の物理化学的特性や装填量に影響されないような処方及び製造法の改良が、今後必要である。

接種したワクチン抗原に起因して惹起されるアレルギー反応やアナフィラキシー反応は通常、接種 1 時間以内に認められることから、Nokleby はワクチン接種後の 15～20 分間、被接種者の様子を観察するよう推奨している [38] 。本研究では、日本の注射によるワクチン接種の現医療手順を考慮して、MN のヒト皮膚内針部溶解時間を「30 分以内」と目標設定した新規速溶型 MN を設計し、MN の皮膚貼付時間短縮化を試みた。2 種類の基剤 (CMC Na 及び HN) を用いて作製した速溶型 MN のプロトタイプ製剤は、皮膚内針部溶解時間がいずれも、ラットでは 5 分であったのに対し、ヒトでは 2 時間であった。先に我々が開発した MH (MH800) の皮膚内針部溶解時間は、マウス及びラットで 1 時間、ヒトでは 6 時間であったことから、溶解型 MN の皮膚内針部溶解時間は適用する動物種によって差異が認められると考えられる [23] 。本研究で開発した新規速溶型 MN のプロトタイプ製剤は、両 MN ともラット及びヒトの両者において、皮膚内針部溶解時間が MH より短縮されたことから、単一の構成基剤で溶解型 MN を処方化する設計手法は、微小針の速溶化に対し有効なアプローチであったと考えられる。しかしながら、目標としたヒト皮膚内針部溶解時間である「30 分以内」を満足することはできなかったため、さらなる処方改良が必要である。皮膚へ穿刺された新規速溶型 MN の微小針の溶解機構は、皮膚内で微小針が水和されて一旦ゲル化し、その後、溶解している

と推察される。微小針のさらなる溶解速度向上の手法としては、微小針内に水分を引き込む溶解助剤を添加し、微小針のゲル化速度を向上させる処方化アプローチが挙げられる。微小針長 100 μm の dissolving Nanopatch (dNP) は、CMC と糖アルコールであるソルビトールを 1 : 30 で配合することにより、マウス耳垂へ貼付後 5 秒で装填した薬物 (OVA) を放出したと報告されている。 [32] 。また、微小針長 165 μm の溶解型 MN (Nanocomposite-strengthened dissolving microneedle patches) は、CMC に層状複水酸化物 (Layered double hydroxides; LDH) のナノパーティクルを配合することによって、高い針部強度を付与しながら、貼付した豚摘出皮膚において微小針が 1 分以内に溶解したと報告されている [36] 。したがって、さらなる微小針速溶化手法としては、CMC や HN のような増粘剤に対し、糖アルコールや層状複水酸化物の配合が有効と考えられた。

臨床研究では、両 MN とも皮膚適用部位において、重篤な局所刺激性所見が全く認められなかった。また、両 MN とも皮膚適用後の適用部位において TEWL の上昇が認められたことから、十分なヒト皮膚穿刺能を有すると判断された。したがって、本研究で開発した新規速溶型 MN は、これまで MH で培った重要品質特性であるヒト皮膚穿刺特性及び安全性を基本的に踏襲できたと考えられる。しかしながら、速溶型 MN のプロトタイプ製剤は、皮膚穿刺能に直結する重要パラメーターの針部強度が MH の 2 割弱であったため、より堅牢な皮膚穿刺確実性を保証するための処方改良が必要と考えられた [23] 。本速溶型 MN と類似した微小針形状で Allender らが設計した溶解型 MN (微小針長: 750 μm、針先の幅: 10 μm、針基の幅: 200 μm、針同士の間隔: 400 μm) は、CMC に糖であるマルトースを 1 : 1 で配合することにより、針部強度を顕著に上昇させている [31] 。今後の速溶型 MN の処方改良は、微小針の針部強度と皮膚内速溶性の両立に留意しながら進める必要があるものの、CMC や HN のような増粘剤に対し、トレハロースやマルトースといった糖を配合する設計アプローチが、針部強度の向上に有用な手段と考えられる。

動物実験にて、OVA 抗原を装填した速溶型 MN の in vivo 抗原特異的免疫応答誘導能を確認した結果、抗原特異的 IgG 抗体の産生が血清中に認められた。したがって、本研究にて開発した新規速溶型 MN はいずれも、経皮ワクチン製剤として有効に機能することを確認できた。また、初回免疫後の抗原特異的抗体産生量が皮下注射群を上回っていたことから、MN による経皮免疫は皮下注射免疫よりも抗体産生応答の誘導を増強でき得ることが示された。これは、ヒト摘出皮膚を用いた皮膚

内物質送達性結果 (Fig. 7 (A)) 及び F-OVA 装填 MN をラット経皮投与後の in vivo 蛍光画像解析結果 (Fig. 5) で示されている通り、MN が、生きた表皮層及び真皮層へ確実かつ効率的にワクチン抗原を送達し、皮膚内の抗原滞留性を皮内注射よりも持続させられることに起因していると考えられた。MN は角質層下の皮膚常在性 APC へ効率的にワクチン抗原を送達できるだけでなく、ワクチン抗原の皮膚内滞留時間を延長することから、皮膚常在性 APC の抗原補足効率が増すことによって、より免役応答が増強されると推察される。

MN の経皮投与時に使用するアプリケーターも、微小針の確実な皮膚穿刺特性を保証する上で極めて重要なファクターである。ラットを用いた評価において観察された CMC-MN と HN-MN の皮膚内抗原滞留時間の差異及び OVA 抗原特異的 IgG 抗体価の個体間バラつきは、アプリケーターによる MN 貼付精度のバラつきが要因として示唆された。MN の皮膚穿刺確実性をより向上させる手法としては、アプリケーター及びパッチ土台部の素材を柔軟なものへと変更し、ヒト皮膚表面の曲率に影響されることなく、MN の全微小針が皮膚表面に対して垂直となるよう方向規制を施す工夫が挙げられる。Jung らは、アプリケーターに装着された micropillar が溶解型 MN (微小針長: 600 μm、針先の幅: 10 μm、針基の直径: 250 μm、基剤: CMC) の微小針底面を直接押し出す投与機構の Microlancer を開発し、投与者の手技・手法に依存することなく、微小針の確実な皮膚穿刺特性を達成しようとしている [34] 。今後は、医療従事者の貼付方法、被ワクチン接種者間の皮膚硬さバラつき等に影響されない、頑健な MN をアプリケーターも含めて設計する必要があると考えられる。

本研究では、MN のヒト皮膚貼付時間を短縮化して簡便性を向上するために、穿刺後の微小針が皮膚内で速溶解する速溶型 MN の設計を試みた。本速溶型 MN は、微小針がヒト皮膚へ安全かつ確実に穿刺されたことから、MH の製剤特性が踏襲されたものと判断された。また、ヒト皮膚内深部溶解時間が 2 時間であったことから、MH よりもヒト皮膚への貼付時間を短縮することができた。したがって、微小針の構成材料である生体成分或いは生体適合性材料を、単一基剤にて処方化するアプローチは、微小針の速溶化に有効であることが示された。残念ながら、設計したプロトタイプ製剤では、ヒト皮膚内針部溶解時間が 30 分以内という目標を満足できなかったが、今後の処方改良へ繋がる有益な基礎情報を収集できたと考えている。今後は、本プロトタイプ製剤の設計で得られた知見を基に、前述した糖の配合等、微小針の組成改変を行い、皮膚内針部溶解時間のさらなる短

縮化を検討継続する予定である。また、溶解型 MN には、季節性インフルエンザワクチン [24, 39] をはじめ、ジフテリアトキソイド (DT) 、破傷風トキソイド (TT) 、マラリアワクチン候補物質である SE36 [15, 23, 27] 、不活化ポリオワクチン (Inactivated Polio Vaccine; IPV) [38] 、豚レンサ球菌 (Streptococcus suis) [41] と多数のワクチン適用事例がある。我々の開発した速溶型 MN でも同様に、不活化ワクチン、トキソイド、生ワクチンと適用事例を集積し、適用可能なワクチン抗原の種類及び装填可能量を拡充して、経皮ワクチンデバイスとしての実用化を強力に推進したいと考えている。

第二章　利便性及び汎用性を指向した二段型 MN の開発

背景 (Background)

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) を構成材料としていたことから、これらの材質は剛性及び成型性に優れる反面、貼付後に微小針が皮膚内で折損し残存してしまった場合、重篤な組織障害を惹起する危険性があり、安全面での課題が払拭できないため、実用化が困難な状況にあった (Fig. 9 左図) 。そのため近年では、生分解性ポリマーであるポリ乳酸 (Polylactic acid; PLA) 、ポリグリコール酸 (Polyglicolic acid; PGA) 、ポリ乳酸グリコール酸共重合体 (Polylactic-co-glycolic acid; PLGA) 等を基剤に用い、臨床適用時の安全性確保を指向して設計されたソリッド MN が開発されている [28, 29] 。

我々は、装填するワクチン抗原の物性及び含有量に影響されることなく、確実なヒト皮膚穿刺特性及び皮膚内薬物送達性を達成でき得る MN として、ワクチン抗原の装填機構が、微小針先端への溶着或いはコーティングであるソリッド MN に着目した。ソリッド MN は、ヒト皮膚穿刺能力に直結する重要パラメーターの針部強度が、装填されるワクチン抗原には依存しないといった利点があるため、様々なワクチン抗原への適用可能性が期待できる。そのため、ソリッド MN は経皮投与用デバイスという医療機器 (medical device) としての開発が可能となり得ることから、既承認済みのワクチン抗原を装填した場合、当局への医薬品製造販売承認申請区分を新薬ではなく剤形変更或いは剤形追加とでき得る。さらに、ワクチン抗原を乾燥した固形製剤とすることにより、ワクチン抗原の安定化が図れるため、注射型ワクチンが生産から消費まで一貫して必要とする低温温度管理 (コールドチェーン) を不要とでき得ることから、利便性及び普及性の向上に繋がる可能性が期待できる。したがって、ソリッド MN は、ワクチン抗原と一体型の溶解型 MN と比較して、汎用性に優れた経皮ワクチン製剤となることが期待されるため、MN の実用化を強力に推進できると考えた。

そこで本研究では、従前のソリッド MN の課題克服を重要視し、新規ソリッド MN の基剤に、生分解性ポリマーで剛性に優れるポリグリコール酸 (PGA) [28, 29] 並びに生体適合性及び弾力性に優れる Nylon 6 [30] を選択した。また、MN へのワクチン抗原装填量を高含有化するための製剤的工夫として、微小針が新規デザインとなる二段テーパー型のソリッド MN (二段型 MN) を設計した (Fig. 9 右図) 。テーパー形状の微小針を二段積み重ねることにより、多量のワクチン抗原が微小針へ装

填されても、二段目の土台部分がワクチン抗原の受け皿となって装填を可能とすることが期待できる。

本研究では、臨床適用可能な新規ソリッド MN の開発を目的として、製剤の必須具備要件である確実な皮膚穿刺能力、安全性及び有効性を確認し、全てを満足するプロトタイプ製剤を設計した。その上で、コールドチェーンフリーも考慮した実用化を目指し、ワクチン抗原が高用量装填され、かつ長期保存安定性に優れた最適化製剤の設計を試みた。MN のヒト皮膚穿刺特性及び皮膚内薬物送達性は、蛍光標識モデル抗原をヒト摘出皮膚へ穿刺した時の皮膚内物質局在性を可視化することで確認した。また臨床研究にて、ヒト皮膚穿刺確実性及び安全性を評価した。In vivo 抗原特異的免疫応答誘導能は、既に臨床使用されている四価季節性インフルエンザ HA 抗原をラットへ経皮投与し、抗原特異的 IgG 抗体産生の誘導を確認した。最後に、得られたプロトタイプ製剤の基礎情報を基に、四価季節性インフルエンザ HA 抗原を高用量装填した MN を設計し、保存安定性を評価して、経皮ワクチン製剤としての最適化を図ったのと同時に、コールドチェーンフリーの適用可能性を考察した。

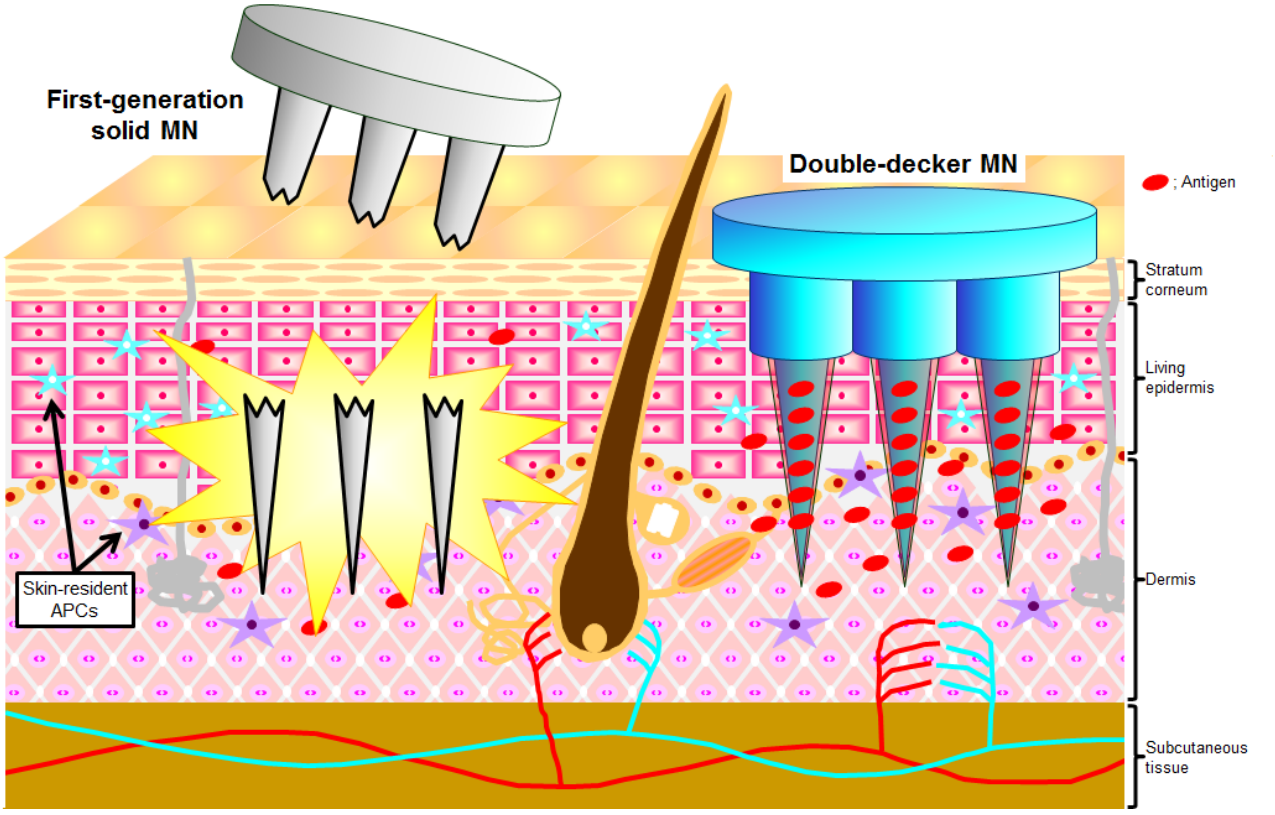


Fig. 9　Development of novel double-decker microneedle patches for transcutaneous vaccine delivery.

第一節　二段型 MN の製剤設計

材料と方法 (Materials and Methods)

【動物】

C57/BL6 マウス (雌性、6 週齢) は、日本 SLC より購入し、実験に供するまで、大阪大学動物飼育施設にて飼育管理した。また、動物の飼育及び実験は全て、大阪大学動物実験規定 (the guidelines provided by the Animal Care and Use Committee of Osaka University) に準じて行った。

【二段型 MN の作製及び針部強度の測定】

PGA-MN 及び Nylon-MN は、射出成型機 (ROBOSHOT, FANUK Co.) を用い、それぞれシリンダー温度を 240ºC 及び 260ºC に設定して無菌的に射出成形した。作製した MN の形状等、物理学的特性を Fig. 10 (A) にまとめた。また、蛍光標識モデル抗原である F-OVA を装填した二段型 MN (F-OVA 装填 MN) は、ヒドロキシプロピルセルロース (Hydroxypropyl cellulose; HPC) を溶解した水溶液中に抗原を溶解し、抗原溶液を微小針に浸漬させかつ乾燥することにより、微小針先端に抗原を装填して作製した (dip-dry method) 。得られた MN は全て、アルミラミネート PET パックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保存した。

MN の微小針部の耐荷重値は、TA-XT plus texture analyzer (StableMicro Systems, Surrey, UK) にて測定した。MN をテストステーションに固定し、直径 5 mm のステンレスシリンダーを MN の上から、速度 0.1 mm/秒にて針部の軸に対し垂直となるよう下降し、微小針に押し当てて、微小針が折損或いは屈曲するのに要した機械的応力を計測した。得られた機械的応力を折損或いは屈曲した微小針数で除した時の耐荷重値を、微小針 1 本当たりの針部強度とした。

【蛍光物質を用いた MN のヒト皮膚内物質送達特性】

ヒト背部皮膚組織は、大阪大学医学部付属病院臨床研究倫理審査委員会 (Institutional Review Board for Clinical Research at Osaka University Hospital) の審査・承認を経て、ボランティアより、外科手術によって生じた余剰皮膚を提供された。また、ボランティアに対し、本研究で使用する旨のインフォームド・コンセントを書面にて行った。また、F-OVA 装填 MN は、F-OVA 含有量が 9 μg/patch の

ものを使用した。バネ式アプリケーターにて、F-OVA 装填 MN をヒト摘出皮膚組織に貼付し、貼付 1 時間後に MN を剥離して、適用部位の皮膚を摘出した。摘出皮膚は O.C.T. compound (サクラ精機) に包埋後、液体窒素に浸漬して凍結ブロックを作製した。凍結ブロックは、クリオスタット (Leica CM1850; ライカ マイクロシステムズ (株)) にて厚さ 8 μm の組織切片にカットし、Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) を用いてマウントし、プレパラート中に封入した。得られたプレパラートを蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000; KEYENCE) にて観察し、F-OVA の皮膚内局在性を画像解析した。

【Optical coherence tomographic (OCT) imaging 法による PGA-MN 穿刺後のヒト摘出皮膚画像解析】

ヒト皮膚切片 (Science care, Phoenix, AZ) は、Dermatome (Aesculap AG, Tuttlingen, Germany) を用いて、厚さ 1 mm の組織切片にカットした。処理したヒト摘出皮膚に PGA-MN を貼付して、5 分後に剥離し、MN の穿刺部位を即座に Ganymede model OCT imaging system (Thorlabs Inc, Newton, NJ)にてスキャンして画像解析した。スキャン条件は、標準対物レンズ LSM03 を用い、A スキャン速度を 30 kHz に設定して行った。

【In vivo 蛍光画像解析による蛍光標識モデル抗原の皮膚内滞留性評価】

バネ式アプリケーターにて、F-OVA 装填 MN (F-OVA 含有量 : 9 μg/patch) を除毛した C57/BL6 マウスの背部皮膚へ 5 分間貼付し、剥離した。対照群には、F-OVA/PBS (9 μg/40 μL) を背部に皮下注射した。MN を剥離後、CRI Maestro EX in vivo imaging system (Cambridge Research and Instrumentation, Woburn, MA, USA) を用いて、投与部位における蛍光物質の局在性を経時的に観察した。投与部位の撮影は、励起に UV ランプを用い、露光時間 400 ms、青色フィルター (emission filter at 515 nm) 、スペクトルの解像度を 10 nm に設定して行った。撮影した画像は、Maestro version 2.10 software によって解析し、投与部位における蛍光由来の緑点の発色の蛍光強度を求めた。

結果 (Results)

【二段型 MN の製剤学的特性及び皮膚内物質送達特性】

生分解性ポリマーである PGA 或いは生体適合性高分子である Nylon 6 を用いて、新規ソリッド MN である二段型 MN (PGA-MN 及び Nylon-MN) を作製し、製剤学的特性を評価した。PGA-MN 及び Nylon-MN の微小針長はそれぞれ 360 μm 及び 400 μm とし、針部と土台部の比率をいずれも 3 : 1 となるよう設計した。また、針長以外の微小針特性として、針先の幅を 40-50 μm、土台部の幅を 140 μm、針同士の間隔を 400 μm に設計し、パッチ当たりの微小針密度は 481 本/patch とした。

MN の皮膚穿刺能力に直結する重要パラメーターである針部強度は、PGA-MN の方が Nylon-MN よりも 2 倍高値であった (Fig. 10 (A)) 。また、針部強度測定後の MN 外観を確認した結果、TA-XT plus texture analyzer のステンレスシリンダーが押し当てられた圧縮負荷箇所の微小針は湾曲していたものの、折損針は全く認められなかった。

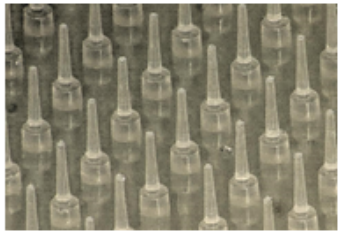
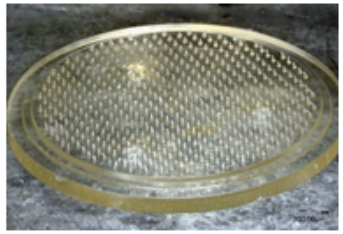
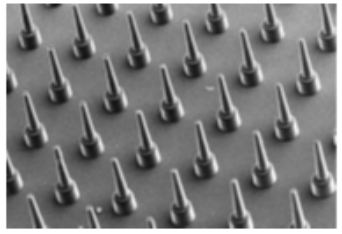
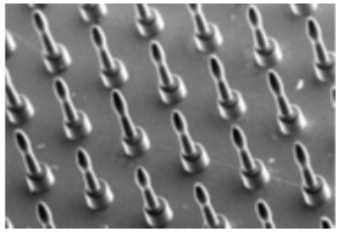
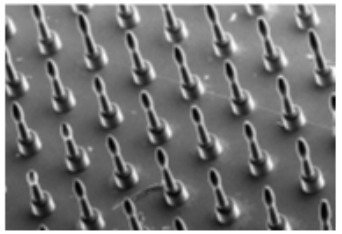
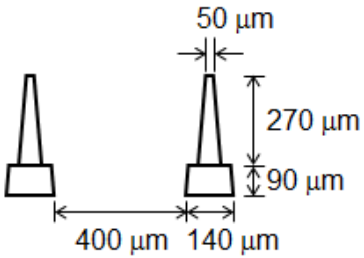
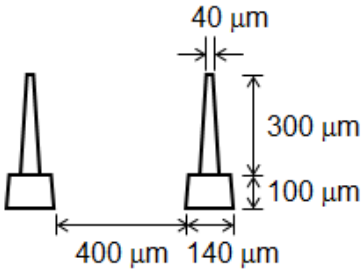
F-OVA を装填した二段型 MN をヒト摘出皮膚組織へ貼付し、送達された F-OVA の皮膚内局在部位を観察した結果、両 MN とも F-OVA 由来の蛍光が生きた表皮から真皮にかけて観察された (Fig. 10 (B)) 。また Nylon-MN では、より皮膚の深層で蛍光物質の局在が認められたことから、微小針長の差異に依存し、より皮膚の深層へ微小針が穿刺されたものと推察された。

二段型 MN が経皮投与により、装填した抗原を確実に皮膚内へ送達可能であったことから、F-OVA 装填 MN をマウス背部皮膚へ貼付し、投与された抗原の皮膚内挙動を in vivo 蛍光画像解析にて評価し、F-OVA 溶液の皮内注射群と比較した (Fig. 10 (C)) 。蛍光由来の緑点の発色が、PGA-MN では 72 時間まで、Nylon-MN では 48 時間まで、MN の貼付部位において観察された。一方、皮内注射群における蛍光由来の緑点発色持続時間は 24 時間までであった。画像結果より解析した投与部位の蛍光強度推移プロファイルからも、二段型 MN の経皮投与によって、皮膚内抗原滞留性が皮内注射よりも向上することが示唆された。

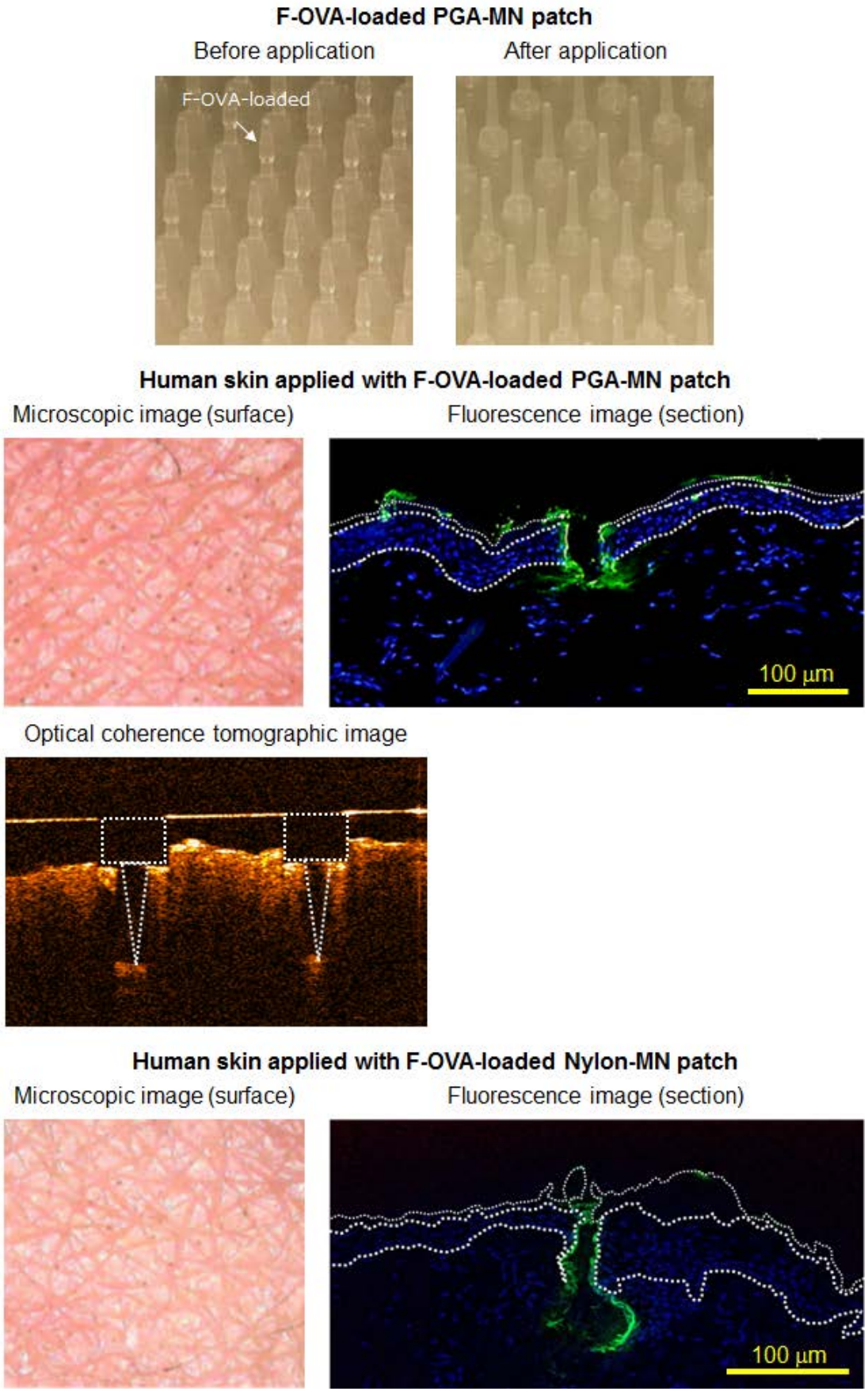
以上の結果より、両 MN は針部強度に差異があるものの、ヒト摘出皮膚を用いた蛍光標識モデル抗原の皮膚内局在性結果から、いずれもヒト皮膚へ確実に穿刺でき、かつ装填したワクチン抗原を表皮層及び真皮層へ送達することができると考えられた。また、針部強度測定後の MN 外観結果から、ヒト皮膚へ貼付しても、微小針が皮膚内で折損して残留する可能性は低いと考えられ、従前の

ソリッド MN の潜在的課題である安全面の懸念を克服できる可能性が示唆された。また、新規二段型 MN は、経皮投与によって抗原の皮膚内滞留性を皮内注射よりも持続させられることが明らかとなった。加えて、MN の皮膚穿刺能力は、両 MN で認められた皮膚内抗原滞留時間の差異により、PGA-MN の方が Nylon-MN より優る可能性が示唆された。

(A)

	PGA-MN patch		Nylon-MN patch	
Constituent	Polyglycolic acid		Nylon 6	
Stereomicroscopic image	Patch	 MN	 Patch	MN
SEM image	 Placebo	 Antigen-loaded	Placebo	 Antigen-loaded
Dimension				
Patch area (cm^2)	0.785		0.785	
MN density (/patch)	481		481	
MN failure force (N/needle)	0.065 ± 0.005		0.029 ± 0.000	

(B)


F-OVA-loaded PGA-MN patch
Before application
After application
F-OVA-loaded
Human skin applied with F-OVA-loaded PGA-MN patch
Microscopic image (surface)
Fluorescence image (section)
100 μm
Optical coherence tomographic image
Human skin applied with F-OVA-loaded Nylon-MN patch
Microscopic image (surface)
Fluorescence image (section)
100 μm

(C)

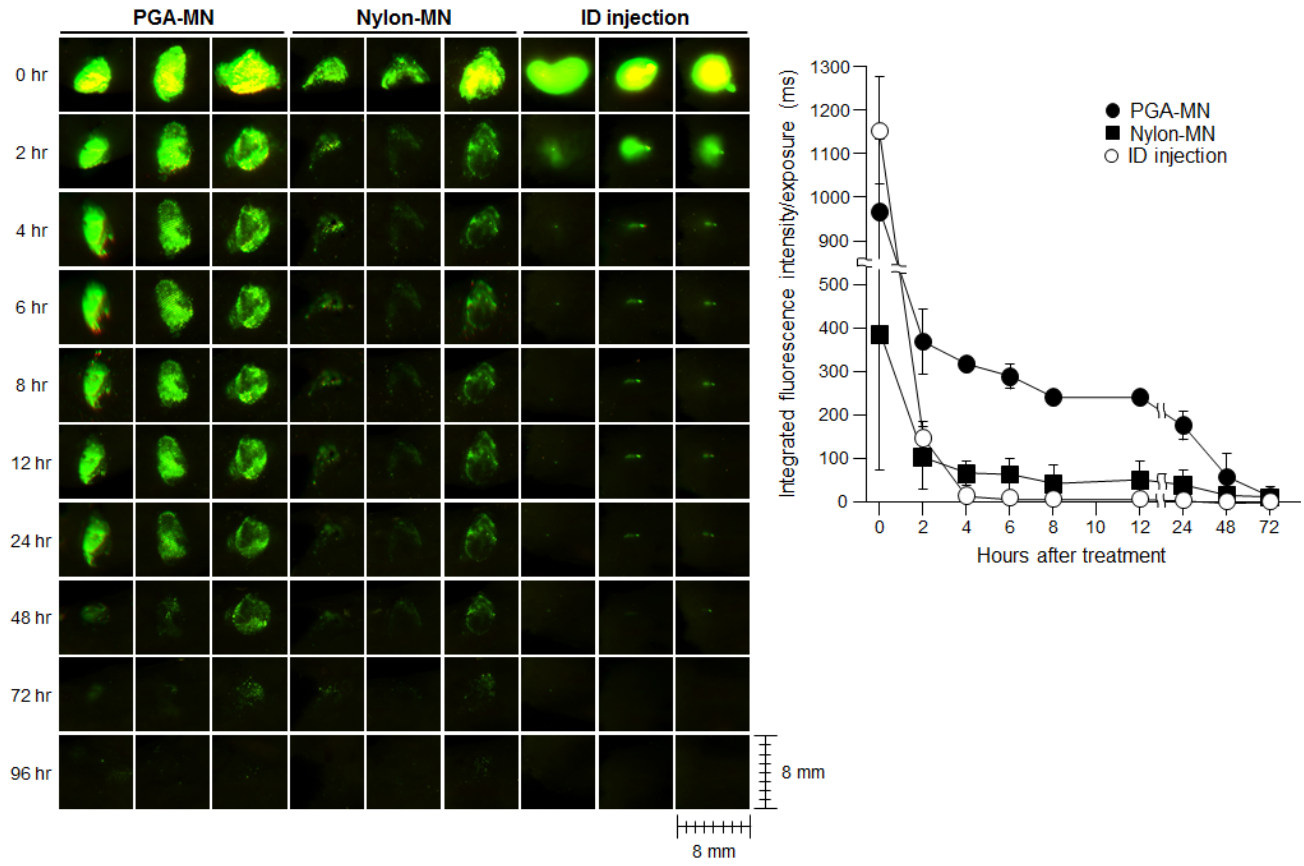


Fig. 10 Pharmaceutical characteristics and antigen delivery images of novel double-decker MN patches. (A) Pharmaceutical characteristics of PGA-MN and Nylon-MN are summarized. Data of needle failure forces are expressed as mean ± SD of results from three or four measurements. (B) The fundamental assessment of human skin puncturabilities for novel double-decker MN patches is represented. Each appearance of F-OVA-loaded PGA-MN patch before and after skin application (Upper). The human skin puncturing properties of PGA-MN (Middle) and Nylon-MN (Lower) after human skin tissue application are summarized. In the fluorescence images, the area between the top line and the middle line represents the stratum corneum, between the middle line and the bottom line represents the living epidermis, and under the bottom line represents the dermis. Green and blue fluorescence indicate F-OVA and nuclea (DAPI), respectively. The optical coherence tomographic image represents the insertion of PGA-MN (dotted white line) into the skin. (C) Time course of antigen deposition images at the administration site of the skin after F-OVA administration to C57BL/6 mice via an MN patch or ID injection. (Left) Representative in vivo fluorescence imaging for antigen deposition from three mice for each group, transcutaneous administration of PGA-MN and Nylon-MN patches, and ID injection. (Right) Time course profiles of the integrated fluorescence intensity in the administration site after F-OVA-loaded MN patch applications or ID injection. Data are expressed as mean ± SEM of results from three mice.

第二節　プラセボ二段型 MN を用いた臨床研究

材料と方法 (Materials and Methods)

【二段型 MN の作製】

第一節の材料と方法 (Materials and Methods) の項に従った。

【臨床研究による MN 適用部位の皮膚水分蒸散量 (TEWL) 測定及び安全性評価】

試験計画は、各項目について下記のとおり設定し、大阪大学医学部医学倫理委員会 (Institutional Review Board for Clinical Research, Osaka University Graduate School of Medicine) の審査・承認を受けた後に実施した。

試験計画内容：

① 対象被験者及び人数、選択基準、除外基準及び設定した被験者数を妥当とした根拠

- 対象被験者及び人数：健常男性、10 名
- 選択基準：

  年齢 20 歳以上 65 歳以下の健常男性で、本臨床研究への参加協力を自身で判断できる者
- 除外基準：
  - ✓ 女性 (妊娠中、授乳中または妊娠の可能性の如何に関わらず)
  - ✓ 貼付当日に明らかな発熱を呈している者
  - ✓ 過去にけいれんの既往のある者
  - ✓ 重篤な急性疾患に罹患していることが明らかな者
  - ✓ 上腕外側にワクチンの支障となり得る皮膚疾患を有する者
  - ✓ 書面によるインフォームド・コンセントを受けることが困難な者
  - ✓ その他、医師が本試験の参加を不適当と判断した者

② 手順

(1) 0.05%クロルヘキシジングルコン酸にて、MN 貼付部位の消毒を行う。

(2) アプリケーターを用いて、PGA-MN 及び Nylon-MN のパッチを男性被験者の上腕外側に貼付する。

(3) 貼付してから 30 分後に MN を剥離する。

(4) 貼付開始から 48 時間後に局所皮膚の肉眼的観察、写真撮影、自覚症状の問診を行う。

(5) 貼付開始から 7 日後に局所皮膚の肉眼的観察、写真撮影、自覚症状の問診を行う。なお、7 日後に、何らかの症状がある場合には、21 日後に再度皮膚の観察及び自覚症状の問診を行う。

③ 主要評価項目

有害事象の発生とその程度 (局所皮膚の肉眼的観察所見) 及び自覚症状の問診

④ 副次評価項目

MN 適用部位の皮膚水分蒸散量 (Transepidermal water loss; TEWL)

⑤ その他

被験者は試験参加中であっても、自由意思により参加同意を撤回できる。

選択基準及び除外基準に基づいて、被験者に対するインフォームド・コンセントを書面で行い、22～60 歳の健常男性被験者 10 名を選定して、プラセボのソリッド MN (PGA-MN 及び Nylon-MN) を健常人皮膚へ貼付する臨床研究を実施した。皮膚適用部位を 0.05%クロルヘキシジングルコン酸にて消毒後、バネ式アプリケーターを用いて、健常男性被験者の左上腕外側皮膚に、プラセボの PGA-MN 或いは Nylon-MN を貼付した。また、30 分間貼付した後に、MN を剥離した。

副次評価項目である MN 適用部位の皮膚水分蒸散量 (TEWL) は、MN 剥離後、直ちに携帯型閉鎖チャンバー方式水分蒸散量測定装置 (VAPO SCAN AS-VT100RS; ASAHI BIOMED) を用いて測定した。

主要評価項目の MN 貼付による皮膚局所反応の評価は、共同研究者である小豆沢宏明医師が、貼付 2 日後及び 7 日後に自覚症状について問診したのと同時に、MN 適用局所を観察して、International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) の判定基準 (Table 1) に従った皮膚刺激性評価を行った。加えて、皮膚局所反応として紫斑の有無も評価した。

結果 (Results)

【ヒト皮膚穿刺特性及び皮膚局所刺激性】

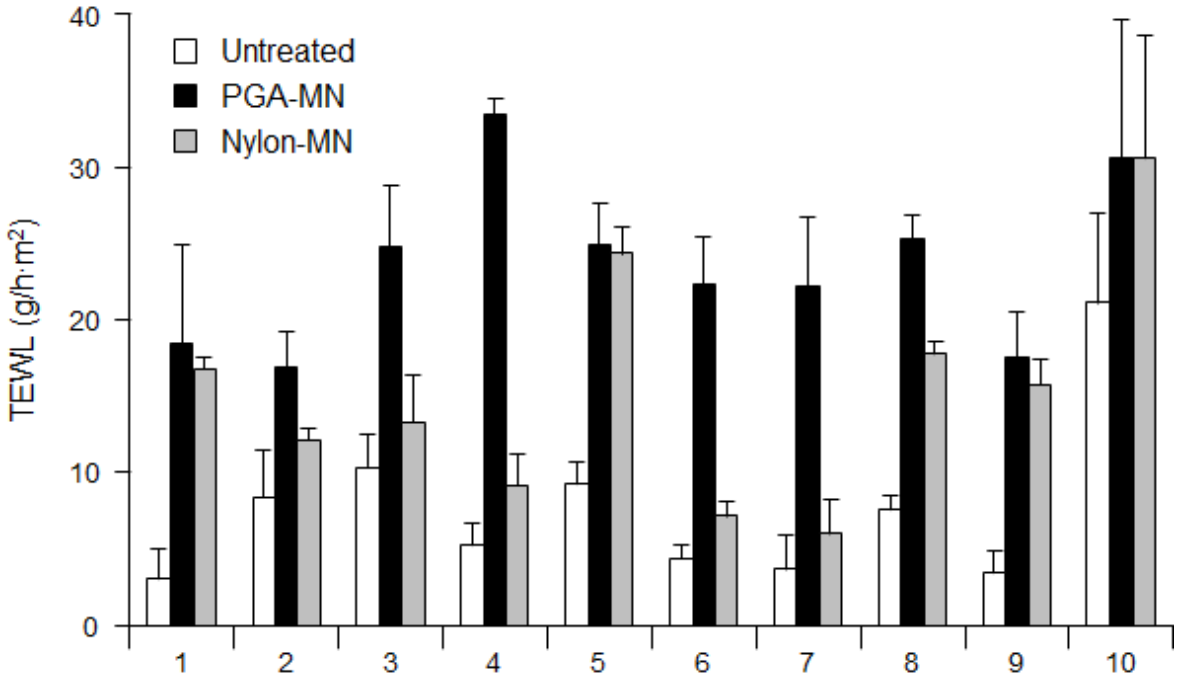
設計した二段型 MN がヒト皮膚穿刺能力を有すると判断されたことから、臨床研究にて、二段型 MN のヒト皮膚穿刺特性及び安全性を確認し、経皮ワクチンデバイスとしての適用可能性を検証した。

MN の皮膚穿刺特性は、副次評価項目である MN パッチ剥離部位の皮膚水分蒸散量 (TEWL) 測定によって確認した (Fig. 11 (A))。全被験者において、二段型 MN 適用群の TEWL は無処置よりも上昇していたことから、いずれの MN も貼付によりヒト皮膚角質層の穿孔形成が示唆された。PGA-MN 適用群と Nylon-MN 適用群の TEWL を比較すると、PGA-MN は、全被験者において Nylon-MN と同等以上、被験者 ID 2, 3, 4, 6, 7, 8 では Nylon-MN を上回っていた。したがって、両 MN とも十分なヒト皮膚穿刺特性を有すると考えられたものの、針部強度及び TEWL 上昇値の差異より、PGA-MN の方が Nylon-MN よりもヒト皮膚穿刺能力に優れると考えられた。

主要評価項目であるヒト皮膚局所刺激性は、MN パッチ剥離部位の皮膚局所反応を経時的に観察し、ICDRG スコアにて評価した (Fig. 11 (B)) 。PGA-MN 適用群では 2/10 例、また Nylon-MN 適用群では 1/10 例において、貼付 2 日後に軽度の紅斑所見が観察された。しかしながら、ICDRG の判定基準に従うと、5 段階評価の内、最も低重篤度の score から数えて 2 番目の score (+? : Doubtful reaction; faint erythema only) であったことから、皮膚科領域において容認できるレベルの局所反応と判断された。また、両 MN 適用群とも貼付 7 日後では、全被験者の MN 適用部位が元の皮膚状態にまで回復しており、かつ ICDRG の判定基準が最も低重篤度の score (- : Negative reaction) であった。加えて、貼付 2 日後及び 7 日後に実施した被験者に対する問診では、自覚症状を訴える被験者が全く認められなかった。したがって、全て皮膚科領域において容認可能な一過性局所反応所見と結論付けられたことから、両 MN とも、適用局所において重篤な副作用を誘発するようなことはない安全な経皮デバイスであると判断した。

以上の結果から、よりヒト皮膚穿刺特性に優れることが示唆された PGA-MN を用いて、季節性インフルエンザ HA 抗原を装填し (flu-PGA-MN) 、経皮ワクチンデバイスとしての有効性を確認した。

(A)



(B)

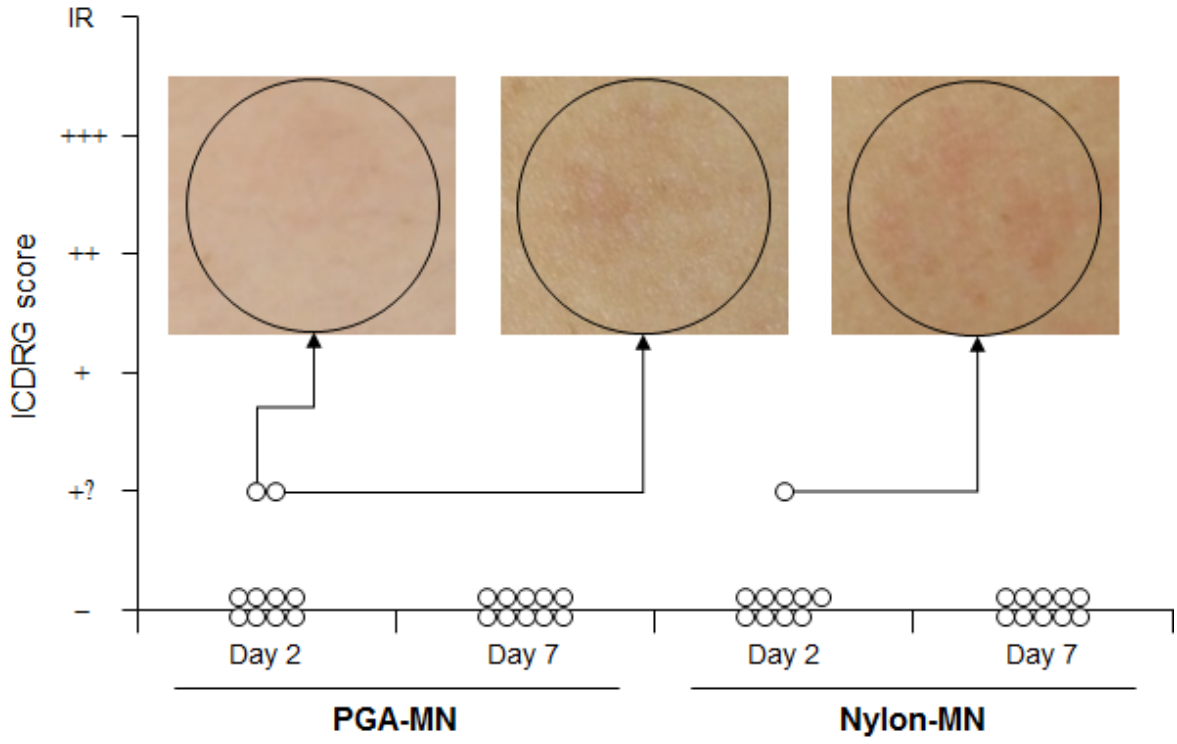


Fig. 11 TEWL and local adverse events after human skin application of MN patches. Placebo PGA-MN and Nylon-MN were each applied to the skin of left lateral upper arm of 10 healthy volunteers for 30 min. (A) TEWL at the application site was measured immediately after MN patch removal. Data are expressed as mean ± SD of results from three measurements. (B) Skin irritation caused by application of MN patches was assessed in accordance with

the ICDRG score. Each plot expresses the score of the individual subject. Three photographs show the site judged as +? “doubtful reaction; faint erythema only.”

第三節　PGA-MN を用いた臨床適用製剤の設計

材料と方法 (Materials and Methods)

【動物】

Wistar ラット (雄性、8 週齢) は、日本 SLC より購入し、実験に供するまで、大阪大学動物飼育施設にて飼育管理した。また、動物の飼育及び実験は全て、大阪大学動物実験規定 (the guidelines provided by the Animal Care and Use Committee of Osaka University) に準じて行った。

【二段型 MN の作製】

第一節の材料と方法 (Materials and Methods) の項に従った。動物試験に供したインフルエンザ HA 抗原装填 PGA-MN (flu-PGA-MN) は、HPC を溶解した水溶液中に抗原を溶解し、抗原溶液を微小針に浸漬させかつ乾燥することにより、微小針先端に抗原を装填して作製した (dip-dry method) 。保存安定性試験においては、HPC とトレハロース (Trehalose) を溶解した四価季節性インフルエンザ HA 抗原 (四価 HA 抗原) を PGA-MN に装填した。得られた MN は全て、アルミラミネート PET パックに密封包装し、実験に供するまで冷蔵保存した。

【インフルエンザ HA 抗原装填 PGA-MN (flu-PGA-MN) の経皮免疫による in vivo 抗原特異的抗体産生誘導能の評価】

除毛した Wistar ラットの腹部皮膚へ、四価季節性インフルエンザ HA 抗原 [A/California/7/2009 (H1N1) , A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) , B/Phuket/3073/2013 及び B/Texas/2/2013] の単価 HA 抗原量が各 1 μg/patch (総 HA 蛋白量: 4 μg/patch) 或いは 5 μg/patch (総 HA 蛋白量: 20 μg/patch)となるよう装填された flu-PGA-MN の 30 分貼付を 3 週間隔で 2 回行った。対照群には、同用量の HA 抗原を同一の投与スケジュールで皮下注射した。経時的に採血し、血清は抗体価測定に供するまで冷凍保存した。

血清中の HA 抗原特異的 IgG 抗体価は、ELISA 法により測定した。各単価 HA 抗原を固相化した 96-well ELISA plate をブロッキングし、1/2 連続希釈した血清を添加して、室温にて 2 時間反応させた。ラット IgG の検出には Horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Southern Biotech) を用いた。抗体価は免疫前のサンプルよりも吸光度 (吸光波長 450 nm、副波長 655 nm) 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。

【高用量四価季節性インフルエンザ HA 抗原装填 PGA-MN (High flu-PGA-MN content) の保存安定性】

単価 HA 抗原の装填量が各 15 μg/patch (総 HA 蛋白量: 60 μg/patch) となるよう作製された高用量四価 HA 抗原装填 PGA-MN (High flu-PGA-MN content) を、アルミラミネート PET パックに密封包装し、4ºC、25ºC あるいは 35ºC にて 6 及び 12 ヶ月間保存した。MN 作製前のインフルエンザ HA 抗原溶液、作製直後の MN パッチ(保存前)及び保存後の MN パッチは、PBS にて HA 抗原を抽出し、Lowry 法にて抽出液中の総 HA 蛋白量を測定した。また、HA 蛋白濃度を 1.8 μg/mL に調製し、赤血球凝集試験法 (Hemagglutination assay) により試料溶液の HA 価を測定した [42] 。0.5%濃度のニワトリ赤血球溶液に 1/2 連続希釈した試料溶液を等量加え、凝集反応が起こった最小の希釈倍率の逆数を Reciprocal log2 titer として表した。

【統計解析 (Student の t-検定) 】

Flu-PGA-MN を用いた動物実験におけるインフルエンザ HA 抗原特異的 IgG 抗体価の解析にあたり、MN 経皮投与群及び比較対照である皮下投与群の抗体価を正規対数分布に変換し、対応のある t 検定を実施した。

結果 (Results)

【季節性インフルエンザ HA 抗原装填 PGA-MN (flu-PGA-MN) の in vivo 抗原特異的免疫応答誘導能】

臨床研究結果より、PGA-MN の方がヒト皮膚穿刺特性に優れると考えられたことから、四価季節性インフルエンザ HA 抗原を装填した flu-PGA-MN を用い、in vivo 抗原特異的免疫応答誘導能をラットにて確認した。

B 型インフルエンザは、近年 2 種類の混合流行が広がりを見せているため、世界的に三価ワクチンから、A 型 2 種類に B 型も 2 種類加えられた四価ワクチンの採用へと移行している。米国では、2013/2014 シーズンから、日本では、2015/2016 シーズンから四価ワクチンをインフルエンザワクチンに用いられるようになった。したがって、成人を対象としたインフルエンザ HA ワクチンの臨床用量は、各単価 HA 抗原が 15 μg 以上であることから、四価季節性インフルエンザ HA ワクチンの場合、総 HA 蛋白量が 60 μg 以上となる。

ラット in vivo 抗原特異的 IgG 抗体産生誘導能の確認実験では、三価 HA 抗原ではなく四価 HA 抗原をワクチン抗原に使用した。四価 HA 抗原を装填した flu-PGA-MN をラット腹部皮膚へ貼付した結果、全ての単価 HA 抗原において、それぞれの抗原に特異的な IgG 抗体の産生が血清中に検出された (Fig. 12) 。投与量 5 μg/rat において経皮投与群と皮下注射群を比較すると、A 型ワクチン (A/H1N1 及び A/H3N2) に対する初回免疫後の抗原特異的 IgG 抗体価は、皮下注射群よりも有意に高かった (Student's t-test) 。特に、A/H3N2 に対する抗原特異的 IgG 抗体価は、二回免疫後も皮下注射群を有意に上回った (Student's t-test) 。一方、B 型ワクチンに対する抗原特異的 IgG 抗体価は、初回免疫後、二回免疫後とも皮下注射群と同程度であり、差異が見られなかった。

以上の結果より、本研究にて開発した新規二段型 MN の PGA-MN は、ワクチン製剤の基本機能である抗原特異的免疫応答を誘導できる経皮デバイスであることを確認した。また、初回免疫後の抗体価結果より、投与するワクチン抗原によっては、抗体産生応答の誘導を皮下注射よりも増強できることが明らかとなった。

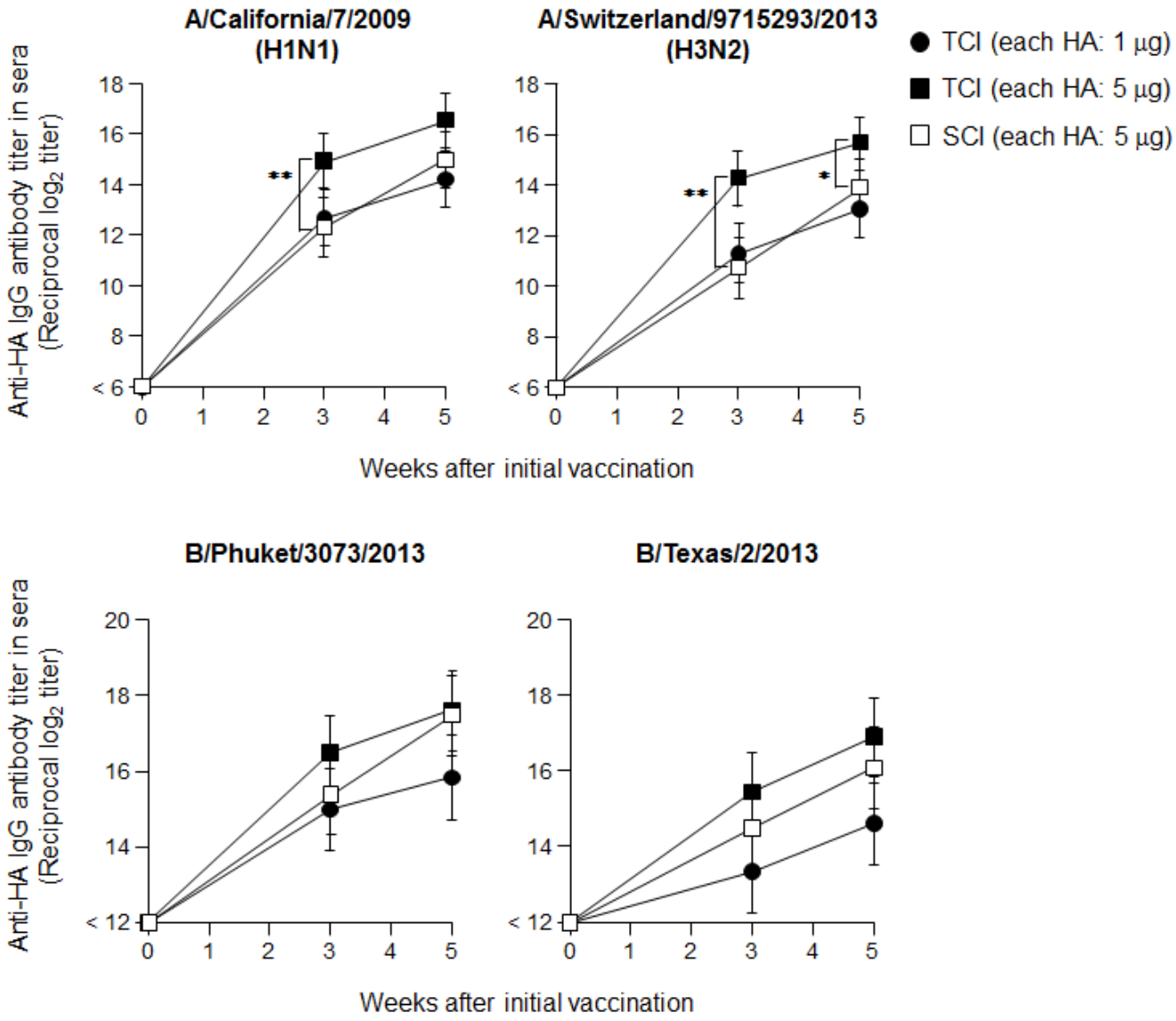


Fig. 12　HA antigen-specific antibody titers induced by TCI using tri- or tetra-flu-PGA-MN patches. The flu-PGA-MN patches were applied to back skin of Wistar rats twice at a 3-week interval. As a control, the HA antigen solution was subcutaneously administered at the same dose and schedule. Sera collected from these animals were assayed for the IgG titer specific for each HA antigen by ELISA. Data are expressed as mean ± SD of results from six rats (Student's t-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$).

【四価 HA 抗原装填 PGA-MN の保存安定性】

これまでの検討結果より、PGA-MN が有効性及び安全性の観点から、実用化を期待できる経皮ワクチンデバイスと判断されたため、臨床使用を指向した四価 HA 抗原の高用量装填 flu-PGA-MN (High flu-PGA-MN content) を作製し、保存安定性を評価した。作製した高用量装填 flu-PGA-MN は 4ºC、25ºC 及び 35ºC にて 6 ヶ月保存した。

製剤中の総 HA 価は、MN の作製前後及び 35ºC の 12 ヶ月保存後において、全く変化なかったことから、高用量装填 flu-PGA-MN はいずれの保存温度においても、装填した四価 HA 抗原の総 HA 価を損なうことなく 12 ヶ月間安定して保持できることが示された (Fig. 13) 。したがって、作製した高用量装填 flu-PGA-MN は長期に亘って抗体産生誘導能を保持している可能性があり、ワクチン接種時期の 1 シーズン (約半年間) であれば、コールドチェーンフリー (低温温度管理不要) で取り扱える可能性も示唆された。

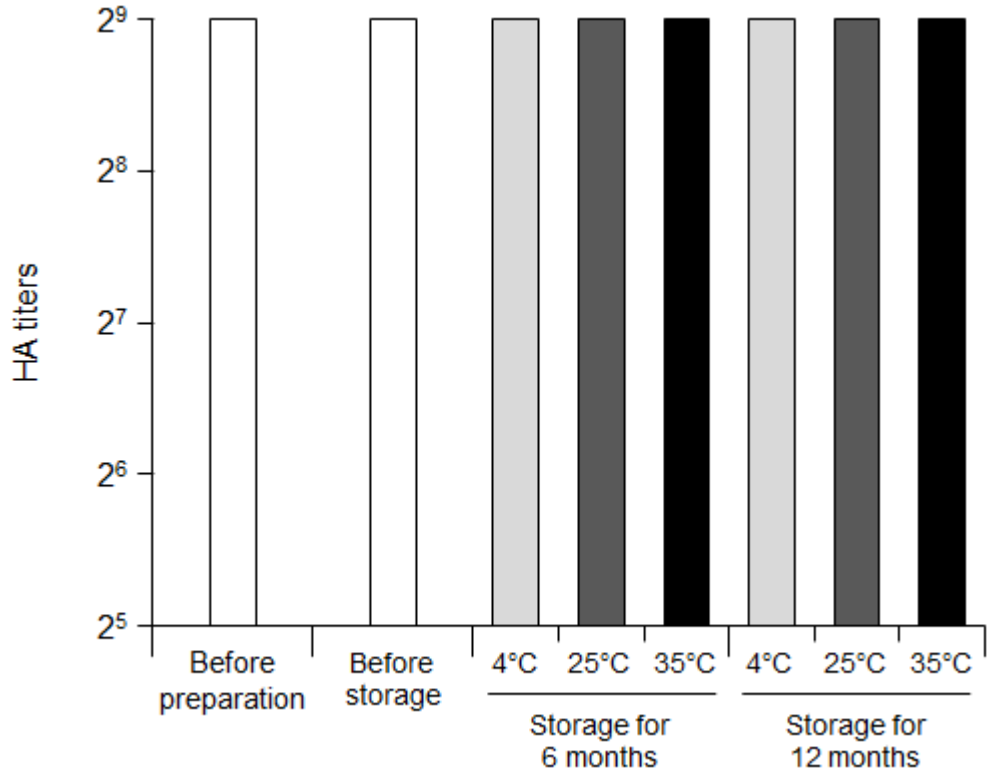


Fig. 13 Titers of HA antigen in the patches with high flu-PGA-MN content before and after storage at various temperatures. HA titers in the HA antigen solution prepared from the high flu-PGA-MN content were determined using hemagglutination assay. Data are expressed as the mean of three measurements for the HA antigen solution before MN patch preparation as a control, five measurements for the prepared MN patches before storage (0 months of storage of MN patches), three measurements after 6 months of storage of MN patches and two measurements after 12 months of storage of MN patches.

考察 (Discussion)

MN は、ソリッド MN、中空 MN、コーティング MN 及び溶解型 MN の 4 種類に大別され、ソリッド MN、中空 MN 及びコーティング MN は第一世代 MN、溶解型 MN は第二世代 MN と呼ばれている [13, 19-21] 。第一世代 MN は、剛性及び成型性に優れるシリコンや金属 (ステンレス、チタン) を微小針の構成材料に使用しているため、MN 貼付によって生じた折損針が皮膚内に残留して重篤な副作用を惹起するといった危険性が潜在しており、臨床応用・実用化する上で、安全性の確保が共通の課題となっている。一方、生体成分や生体適合性基剤を微小針の構成材料に用い、穿刺された微小針自体が皮膚内で溶解して薬物を送達する製剤コンセプトの溶解型 MN は、折損残留針が皮膚内で組織障害を惹起するといった安全面の懸念を考慮する必要が一切ない。そのため我々は、溶解型 MN が最も実用化の可能性が高いと考え、MH の開発に鋭意注力してきた [23, 24] 。しかしながら、これまでの製剤化研究を通じて、MH の実用化における課題を新たに抽出した。MH は、装填するワクチン抗原と微小針が一体型の経皮ワクチン製剤であることから、適正な針部強度を維持するためには、装填可能なワクチン抗原の種類及び量に限界がある。また、シーズン毎にワクチン株や型が変更となるワクチン抗原の場合は都度、最適化のための製剤設計作業が必要となる。特にインフルエンザワクチンの場合は、製剤設計作業が毎年発生するのに加え、定期のワクチン接種時期までに製品供給を間に合わせなければならないため、製造業者は限られたリードタイムで必ず製剤設計を完遂させなければならず、毎年大きな負担を強いられることになる。

一方、ワクチン抗原を微小針先端へ搭載する装填機構のソリッド MN は、微小針の針部強度がワクチン抗原非依存的なため、ワクチン抗原の変更にも柔軟に対応可能であり、ワクチン抗原の装填可能量も溶解型 MN を上回れる可能性がある。したがって、溶解型 MN が抱える現状の課題を克服できる可能性が期待されたことから、本研究において、ソリッド MN に分類される二段型 MN を新規に設計した。また、装填するワクチン抗原を限定しない経皮投与用デバイスとして開発することにより、医療機器 (medical device) としての開発が可能となるため、既承認済みのワクチン抗原を適用した経皮ワクチン製剤の開発は、製造販売承認申請区分を新薬ではなく剤形変更或いは剤形追加とでき得る。したがって、新規ソリッド MN である二段型 MN の開発は、経皮ワクチン製剤の開発加速化に大いに貢献でき、MN の実用化を強力に推進できると考えた。

本研究では、新規に開発した 2 種類の二段型 MN について、ヒト皮膚へ貼付した時の微小針穿刺能及び安全性を臨床研究にて評価した。新規二段型 MN の基剤に用いた Nylon 6 は、カテーテルや手術用縫合糸、PGA は合成吸収性縫合糸の原材料であり、医療用具や医療機器に汎用されている生体適合性基剤である [30] 。臨床研究では、いずれの MN においても貼付部位で重篤な局所刺激所見が全く認められなかったことから、設計コンセプト通り、MN の生体適合性向上に起因して安全性の確保に繋がったと考えられる。また、針部強度測定におけるステンレスシリンダーの荷重負荷箇所の外観結果より、両 MN とも、ヒト皮膚貼付によって微小針が折損する可能性は極めて低いと推察された。したがって、従前のソリッド MN の潜在的課題である折損残留針が惹起し得る副作用の発生リスクは、非常に小さいと考えられた。

また、臨床研究では両 MN とも、皮膚適用後に角質層の穿刺孔形成を示唆する TEWL の上昇が認められたことから、二段型 MN は十分なヒト皮膚穿刺能を有すると考えられた。MN が折損や屈曲することなく、ヒト皮膚へ確実に穿刺されるためには、MN の針部強度が、ヒト皮膚へ穿刺する際に要する最小挿入力 (Required insertion force into skin) を十分上回っている必要がある [28] 。これまで報告されているインフルエンザワクチンをコーティングしたソリッド MN は、微小針の形状が様々ではあるものの、500～750 μm の針長を多く採用している [43-45] 。しかしながら、MN の微小針長が長くなると、確実にヒト皮膚へ穿刺するために、アプリケーター等によって MN 貼付時に加える挿入力 (Required insertion force) が、より大きく必要となる。本研究では、二段型 MN の微小針形状に、従来のような円錐型、先端傾斜型、ピラミッド型等ではなく、上段を針部 (円錐部) 、下段を土台部とする二段型を採用した。二段型に設計して微小針長の短縮化を図ったことにより、皮膚穿刺に要する最小挿入力が低減できたと考えられ、結果として、確実なヒト皮膚穿刺特性を達成できたのではないかと推察している。今後は、二段型 MN の皮膚穿刺に要する最小挿入力を詳細に調査し、アプリケーターも含めた、さらなる設計最適化へ繋げたいと考えている。

動物実験にて、四価インフルエンザ HA 抗原を装填した flu-PGA-MN の in vivo 抗原特異的免疫応答誘導能を確認した結果、それぞれの単価 HA 抗原に対する特異的 IgG 抗体の産生が血清中に認められた。したがって、本研究にて開発した新規二段型 MN の PGA-MN は、経皮ワクチン製剤として有効に機能することを確認した。また、flu-PGA-MN の in vivo 免疫実験では、投与される抗原によ

って、初回免疫後の抗原特異的抗体産生量が皮下注射群を上回っていた。本結果から、MN による経皮免疫は、従来の皮下注射免疫よりも抗体産生応答の誘導を増強でき得ることが示唆された。これは、ヒト摘出皮膚を用いた皮膚内物質送達性結果 (Fig. 10 (B)) 及び F-OVA 装填 MN をマウスへ経皮投与した in vivo 蛍光画像解析結果 (Fig. 10 (C)) で示されている通り、MN が、生きた表皮層及び真皮層へ確実かつ効率的にワクチン抗原を送達し、皮膚内の抗原滞留性を皮内注射よりも持続させられることに起因していると考えられる。我々が創製した MH においても、OVA を装填した MH300 及び MH800 を C57BL/6 マウスへ経皮投与した時の抗原特異的 IgG 抗体価が、初回免疫で皮下及び皮内注射群を上回っており [14] 、また F-OVA 装填 MH300 を HR-1 ヘアレスマウスへ経皮投与した時の皮膚内抗原滞留持続時間が 74 時間と皮内注射投与と比較して長かった [27] ことを報告している。また第 1 章において、F-OVA を装填した速溶型 MN を Wistar ラットへ経皮投与した結果、CMC-MN 及び HN-MN の皮膚内抗原滞留持続時間が、それぞれ 24 時間及び 48 時間であったことを示した (Fig. 5 (A)) 。皮膚には APC として、生きた表皮に LC が、真皮に dDC が常在しており、獲得免疫応答の誘導に寄与している。MN は、これらの皮膚常在性 APC へ効率的にワクチン抗原を送達するため、皮膚内の APC が効果的に獲得免疫応答を誘導できると考えられ、皮下注射投与よりも高いワクチン効果を発揮することが期待される [10, 11] 。また、ワクチン抗原の皮膚内滞留時間が延長されることにより、皮膚常在性 APC の抗原補足効率が増すと推察され、結果として免役応答の増強へ繋がっていると期待される。また、二段型 MN、溶解型 MN である MH 及び速溶型 MN の全てにおいて、経皮投与による皮膚内抗原滞留持続時間の延長が観察されたことから、微小針の皮膚内溶解速度は経皮免疫応答誘導機序へほとんど影響しないと推察された。

今後の研究展望には、MN を用いた経皮ワクチン接種による経皮免疫応答機序の解明が挙げられる。所属リンパ節内における APC サブセットのポピュレーション変化、MN の微小針穿刺によって生じる皮膚刺激と皮膚常在性 APC のリンパ節への遊走性、リンパ節での抗原特異的な免疫応答誘導等、誘導機序に関与していると考えられる免疫反応イベントの in vitro 解析を行うとともに、経皮投与時に皮膚内へ実際に送達されたワクチン抗原の絶対量を評価して、両者の相関関係を明確にできれば、経皮ワクチン MN のさらなる設計改良へ繋げられると考えられる。

一方で、ワクチン接種時の副反応で最も懸念されるのは、アナフィラキシーをはじめとするアレルギー反応である。特に、経皮ワクチン製剤の臨床使用においては、皮膚へ適用してもアレルギー反応を誘発しないのは勿論、経皮感作も惹起しないよう、ワクチン接種者の安全性確保に細心の注意を払わなければならないと考えられる。そのため今後は、溶解型／非溶解型 MN に関わらず、ワクチン抗原を装填した MN の経皮投与によって、血中 IgE 抗体の産生が誘導されないこと、加えて OVA-IgE マウス等のアレルギーモデル動物に経皮投与してもアレルギー反応所見が全く認められないことを確認し、実用化のための安全性検証をさらに積み重ねる必要があると考えている。

F-OVA 装填 MN をマウスへ経皮投与した蛍光標識モデル抗原の皮膚内滞留性実験において、PGA-MN と Nylon-MN の間には抗原滞留持続時間に差異が認められ、Nylon-MN では F-OVA 由来の蛍光強度が投与 2 時間以降で顕著に減衰した (Fig. 10 (C)) 。経時的に撮影した画像を解析して求めた蛍光強度 (Fluorescence intensity derived from F-OVA) を両 MN で比較すると、F-OVA を同用量 (9 μg/patch) 経皮投与したにも関わらず、Nylon-MN の貼付直後 (0 時間) における蛍光強度は、PGA-MN の約 40%であった。また、マウス経皮投与後の Nylon-MN 外観を観察すると、穿刺されず微小針先端に残留していた F-OVA が半分以上認められた。したがって、両 MN で認められた皮膚内抗原滞留持続時間の差異は、Nylon-MN の皮膚穿刺能力に起因したものであり、Nylon-MN が経皮投与によって F-OVA を全量、皮膚内へ送達できなかったためと考えられる。針部強度及び臨床研究の TEWL 測定結果より、PGA-MN を開発用経皮デバイスとして最終的に選択したが、本結果も、Nylon-MN より PGA-MN の方が皮膚穿刺能力に優れていることを示唆する有益な情報である。また、マウス皮膚内抗原滞留性実験において、MN 貼付部位の in vivo 蛍光画像撮影は、MN を皮膚から剥離している必要があったため、MN の貼付時間を 5 分に設定し、5 分後の剥離直後に撮影した画像を貼付 0 時間として取り扱った。しかしながら、確実に皮膚内へ抗原を送達するのに必要な最短の MN 貼付時間を、実用化の観点から今後精査する必要があると考えている。

一般的に、インフルエンザワクチンの予防接種における注射接種用量は、単価インフルエンザ HA 抗原にして 15 μg 以上である。したがって、四価季節性インフルエンザ HA ワクチンの場合、成人を対象とした臨床用量は、総 HA 蛋白量にして 60 μg 以上となる。そのため、保存安定性試験に用いた四価 HA 抗原の高用量装填 flu-PGA-MN (High flu-PGA-MN content) は臨床用経皮ワクチン製剤を指

向し、単価 HA 抗原の HA 蛋白量が 15 μg/patch となるよう設計した。装填したインフルエンザワクチンが四価 HA 抗原の場合、総 HA 蛋白量は 60 μg/patch と非常に高含量になるが、一般的にワクチン抗原の MN 製剤中への高含量化は困難であるのに対し、PGA-MN は極めて高装填量の蛋白搭載を達成できた。実用化の観点では、成人を対象とした場合、高用量装填 flu-PGA-MN を 1〜2 枚貼付することにより臨床用量を満足することができる。加えて、MN の作製直後 (保存 0 ヶ月) 及び保存 12 ヶ月後において、製剤中 HA 価の低下は全く認められなかった。安定化剤であるトレハロースとヒドロキシエチルセルロース (HEC; Hydroxyethyl cellulose) 或いは CMC といった増粘剤を組み合わせた処方を適用することにより、インフルエンザ HA 抗原をコーティングしたソリッド MN の長期保存安定性が顕著に改善されたと報告されている [43, 46-47] 。高用量装填 flu-PGA-MN は、抗原装填用処方中に安定化剤であるトレハロースと結合剤である HPC を配合しているが、HPC は増粘剤としての作用も期待できることから、35ºC 保存の 12 ヶ月後においても製剤中の総 HA 価が安定して保持されたと考えられる。また本結果より、ワクチン接種時期の 1 シーズン (約半年間) であれば、コールドチェーンフリー (低温温度管理不要) の適用可能性が期待される。三価 HA 抗原を装填した溶解型 MN において、トレハロースと単糖類のスクロースを組み合わせることにより、製剤中 HA 活性が 25ºC 保存下で 2 年間維持されたとの報告もあることから [39] 、今後も検討を継続することにより、flu-PGA-MN のさらなる保存安定性向上が可能と推察される。また、本高用量装填 flu-PGA-MN の有効性 (インフルエンザ HA 抗原特異的免疫応答誘導能の確認) 及び安全性 (局所刺激性) を臨床研究にて評価し、本新規二段型 MN の経皮ワクチンデバイスとしての有用性をさらに追求していきたいと考えている。

本研究では、インフルエンザワクチンを適用候補として、PGA-MN を中心に製剤化を検討したが、他のワクチン抗原への汎用性については明らかにできていない。ソリッド MN では不活化ワクチン以外に、生ワクチンである BCG (bacillus Calmette-Guerin) 及び麻疹を適用した設計事例が、これまでに報告されている [48, 49] 。ワクチン抗原に対する二段型 MN の汎用性検証には、既に小児適用されている三種混合ワクチン、四種混合ワクチンといった不活化ワクチン及びトキソイド、また、生ワクチン等を候補に、PGA-MN への適用事例を集積していく研究展開を考えている。

総括 (Summary)

感染症の脅威はもはや一国の問題に留まらず国際的な課題となっていることから、新興国及び開発途上国へのワクチン製剤の普及促進は急務であり、かつ着実な公衆衛生の進展が必要である。そのため、従前の注射型ワクチンに代わる利便性、汎用性及び普及性に優れたワクチン製剤の開発が待望されている。上述の世界的及び社会的課題に対し、MN を活用した経皮ワクチン製剤が、感染症対策に最も有効な手段と考えられたことから、本研究において著者は、MN の早期実用化を指向した新規マイクロ―ニードルアレイを設計し、利便性、汎用性及び普及性を向上した経皮ワクチンデバイスの開発に資する基礎的研究に取り組んだ。

第一章では、これまでに開発した MH のさらなる改良を指向して、MN 皮膚貼付後における微小針の皮膚内速溶化を図り、MN の皮膚貼付時間短縮化へと繋げる利便性の向上に取り組んだ。CMC Na 或いは HN を用い、単一基剤で処方設計した 2 種類の速溶型 MN プロトタイプ製剤 (CMC-MN 及び HN-MN) は、ヒト皮膚へ安全に適用でき、かつ微小針が確実にヒト皮膚へ穿刺されたため、従前の MH の製剤特性が踏襲されたと判断した。また、ヒト皮膚内針部溶解時間を MH より短縮できたことから、微小針の構成基剤のみで設計する処方化アプローチが、微小針の速溶化に有効であった。微小針が皮膚内で完全に溶解するのに 2 時間要したため、当初の設計目標であった「ヒト皮膚貼付後の針部溶解時間：30 分以内」を達成することはできなかったが、例えば糖の配合等、組成改変を行うことにより、さらなる微小針の速溶化が可能と考えられる。したがって今後は、確実なヒト皮膚穿刺能力を有する針部強度を維持しながら、ヒト皮膚内針部速溶化を図る処方改良を検討する予定である。

第二章では、溶解型 MN とは異なるタイプのソリッド MN を採用し、微小針を全く新規の二段テーパー形状に設計することによって、ワクチン抗原の高装填化、コールドチェーンフリーの適用可能性を調査し、経皮ワクチンデバイスとしての利便性及び普及性を追求した。設計した 2 種類の二段型 MN において、経皮ワクチン製剤の必須具備要件であるヒト皮膚穿刺確実性及びヒト皮膚適用時の安全性が示され、PGA-MN については、経皮ワクチン製剤の基本機能である in vivo 抗原特異的免疫応答誘導能も確認した。また、臨床使用を指向して設計した四価季節性インフルエンザ HA 抗原の高用量装填 PGA-MN (高用量装填 flu-PGA-MN) は 35ºC で 12 ヶ月間、製剤中の総 HA 価が全く

低下しなかったため、コールドチェーンフリーの適用可能性が示された。したがって、PGA-MN が利便性及び普及性に優れた経皮ワクチンデバイスとして最も有望と考えられた。

本研究成果である実用化を指向した溶解型 MN の処方設計アプローチ並びに新規ソリッド MN の開発は、利便性及び汎用性に優れる経皮ワクチンデバイスの開発に大きく貢献する知見である。今後は、両 MN ともヒトでの有効性が早期に検証され、一日も早い MN の経皮ワクチン実用化が実現されることにより、本研究成果が全世界の感染症対策及び医療の発展に貢献することを大いに期待する。

結論 (Conclusion)

本研究では、経皮ワクチン製剤としての MN 実用化を強力に推進するため、利便性、汎用性及び普及性の向上を指向した新規マイクロニードルアレイの設計に取り組み、以下の結論を得た。

(1) 速溶型 MN

- CMC Na 或いは HN を用い、単一基剤で処方化した速溶型 MN のラット皮膚内針部溶解時間は、CMC-MN、HN-MN とも 5 分であった。
- CMC-MN、HN-MN とも、in vivo 経皮免疫実験において皮下注射よりも抗原特異的抗体産生応答の誘導を増強し、皮内注射よりも皮膚内抗原滞留性を持続し、装填した蛍光標識抗原をヒト摘出皮膚内へ確実に送達した。
- CMC-MN 及び HN-MN の微小針は、ヒト皮膚へ安全かつ確実に穿刺可能であった。しかしながら、いずれの MN もヒト皮膚内針部溶解時間が 2 時間であったことから、より短時間での経皮ワクチンデリバリーを実現するためには、さらなる処方改良が必要と判断された。

(2) 二段型 MN

- PGA 或いは Nylon 6 を構成基剤に用いて作製した PGA-MN 及び Nylon-MN の微小針は、ヒト皮膚へ安全かつ確実に穿刺可能であった。
- PGA-MN 及び Nylon-MN は、装填した蛍光標識抗原をヒト摘出皮膚内へ確実に送達し、皮内注射よりも皮膚内抗原滞留性を高めることができた。また、PGA-MN は、in vivo 経皮免疫実験において注射免疫群に匹敵する或いは上回る抗原特異的抗体産生を誘導した。
- 針部強度及び臨床研究における TEWL の測定結果から、PGA-MN の方が Nylon-MN よりも、ヒト皮膚穿刺能力が優れると考えられた。
- 四価季節性インフルエンザ HA 抗原を高用量装填した PGA-MN (高用量装填 flu-PGA-MN) は 35ºC で 12 ヶ月間保存しても、製剤中の総 HA 価が全く低下することなく安定に維持されていた。したがって、高用量装填 PGA-MN は、コールドチェーンフリーの適用可能性が示唆された。

謝辞 (Acknowledgements)

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野 教授 中川晋作先生に甚大なる謝意を表します。また、このようなチャンスを与えてくださったご配慮にも深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導、ご鞭撻並びに多大なるご配慮、ご協力を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 ワクチン・免疫制御学プロジェクト 教授 岡田直貴先生、大阪大学大学院薬学研究科 附属実践薬学教育研究センター 臨床薬理学教育研究プロジェクト 専任講師 廣部祥子先生に心より深謝いたします。

本研究における皮膚内速溶型マイクロニードル製剤並びに二段型マイクロニードル製剤の作製にご協力くださるとともに、貴重なご指導、ご助言を賜り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、齋藤美香様に謹んで深謝いたします。また、マイクロニードル製剤の臨床研究を遂行するにあたり、ご協力、貴重なご助言を賜りました奈良県立医科大学医学部 教授 浅田秀夫先生、准教授 小豆澤宏明先生、中村由紀先生、大阪大学名誉教授 片山一朗先生 (元大阪大学大学院医学系研究科 教授) に深く御礼申し上げます。さらに、CRi imaging system を用いた皮膚内抗原滞留性評価、動物への免疫実験、ELISA による抗原特異的 IgG 抗体価測定等、ご協力賜りました大阪大学大学院薬学研究科 ワクチン・免疫制御学プロジェクト 伊藤沙耶美修士並びに坂上　俊学士に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、日々の研究活動をサポートいただきました大阪大学大学院薬学研究科 ワクチン・免疫制御学プロジェクト 特任准教授 立花雅史先生をはじめ、同プロジェクトの皆様、大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野の皆様に感謝いたします。

本学位論文の副査をご快諾いただき、建設的なご指導、貴重なご助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 臨床薬効解析学分野 藤尾　慈先生、大阪大学大学院薬学研究科 先端化粧品科学 (マンダム) 共同研究講座 岡田文裕先生に感謝申し上げます。

最後に、研究に専念できる環境及び時間を与えてくれ、研究生活を終始暖かく見守り支えてくれた妻と娘達に心から感謝の意を捧げます。

参考文献 (References)

[1] Prausnitz M.R., Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 26: 1261-1268 (2008)

[2] Prausnitz M.R., Mitragotri S., Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 115-124 (2004)

[3] Lee H., Song C., Baik S., Kim D., Hyeon T., Kim D.-H. Device-assisted transdermal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 127: 35-45 (2018)

[4] Alexander A., Dwivedi S., Ajazuddin, Giri T.K., Saraf S., Saraf S., Tripathi D.-K. Approaches for breaking barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J. Control. Release.* 164: 26-40 (2012)

[5] Wiedersberg S., Guy R.-H. Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting! *J. Control. Release.* 190: 150-156 (2014)

[6] 一盛和世 世界の顧みられない熱帯病 (NTDs) の現状と対策 臨床評価 43: 194-198 (2015)

[7] 岡部信彦 近年問題となった新興感染症と現状 日本内科学会雑誌 105: 2120-2125 (2016)

[8] 川名明彦 注目される新興感染症 ～MERS を中心に～ 日本内科学会雑誌 106: 552-556 (2017)

[9] 渡邊治雄 感染症の世界的動向と対応 モダンメディア 61: 313-322 (2015)

[10] Lee M.-Y., Shin M.-C., Yang V.C. Transcutaneous antigen delivery system. *BMB Rep.* 46: 17-24 (2013)

[11] Engelke L., Winter G., Hook S., Engert J. Recent insights into cutaneous immunization: How to vaccinate via the skin. *Vaccine* 33: 4663-4674 (2015)

[12] Hirobe S., Matsuo K., Quan Y.-S., Kamiyama F., Morito H., Asada H., Takaya Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. Clinical study of transcutaneous vaccination using a hydrogel patch for tetanus and diphtheria. *Vaccine.* 30: 1847-1854 (2012)

[13] Matsuo K., Hirobe S., Okada N., Nakagawa S. Frontiers of transcutaneous vaccination systems: Novel technologies and devices for vaccine delivery. *Vaccine* 31: 2403-2415 (2013)

[14] Matsuo K., Yokota Y., Zhai Y., Quan Y.-S., Kamiyama F., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens. *J. Control. Release.* 161: 10-17 (2012)

[15] Matsuo K., Hirobe S., Yokota Y., Ayabe Y., Seto M., Quan Y.-S., Kamiyama F., Tougan T., Horii T., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. Transcutaneous immunization using dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. *J. Control. Release.* 160: 495-501 (2012)

[16] Sullivan S.P., Koutsonanos D.G., Martin M.P., Lee J.W., Zarnitsyn V., Choi S.-O, Murthy N., Compans R.W., Skountzou I., Prausnitz M.R. Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat. Med.* 16: 915-920 (2010)

[17] DeMuth P.C., Li A.V., Abbink P., Liu J., Li H., Stanley K.A., Smith K.M., Lavine C.L., Seaman M.S., Kramer J.A., Miller A.D., Abraham W., Suh H., Elkhader J., Hammond P.T., Barouch D.H., Irvine D.J. Vaccine delivery with microneedle skin patches in nonhuman primates. *Nat. Biotechnol.* 31: 1082-1085 (2013)

[18] Bachy V., Hervouet C., Becker P.D., Chorro L., Carlin L.M., Herath S., Papagatsias T., Barbaroux J.-B., Oh S.-J., Benlahrech A., Athanasopoulos T., Dickson G., Patterson S., Kwon S.-Y., Geissmann F., Klavinskis L.S. Langerin negative dendritic cells promote potent CD8+ T-cell priming by skin delivery of live adenovirus vaccine microneedle arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 3041-3046. (2013)

[19] Hirobe S., Okada N., Nakagawa S. Transcutaneous vaccines – current and emerging strategies. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10: 485-498 (2013)

[20] Kim Y.-C., Park J.-H., Prausnitz M.R. Microneedles for dug and vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64: 1547-1568 (2012)

[21] Maaden K., Jiskoot W., Bouwstra J. Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery. *J. Control. Release.* 161: 645-655 (2012)

[22] Rejinold N.S., Shin J.-H., Seok H.Y., Kim Y.-C. Biomedical applications of microneedles in therapeutics: recent advancements and implications in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13: 109-131 (2016)

[23] Hirobe S., Azukizawa H., Matsuo K., Zhai Y., Quan Y.-S., Kamiyama F., Suzuki H., Katayama I., Okada N., Nakagawa S. Development and clinical study of a self-dissolving microneedle patch for transcutaneous immunization device. *Pharm. Res.* 30: 2664-2674 (2013)

[24] Hirobe S., Azukizawa H., Hanafusa T., Matsuo K., Quan Y.-S., Kamiyama F., Katayama I., Okada N., Nakagawa S. Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch. *Biomaterial* 57: 50-58 (2015)

[25] Rouphael N.G., Paine M., Mosley R., Henry S., McAllister D.V., Kalluri H., Pewin W., Frew P.M., Yu T., Thornburg N.J., Kabbani S., Lai L., Vassilieva E.V., Skountzou I., Compans R.W., Mulligan M.J., Prausnitz M.R. The safety, immunogenicity, and acceptability of inactivated influenza vaccine delivered by microneedle patch (TIV-MNP 2015): a randomised, partly blinded, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* 390: 649-658 (2017)

[26] Vassilieva E.V., Kalluri H., McAllister D., Taherbhai M.T., Esser E.S., Pewin W.P., Pulit-Penaloza J.A., Prausnitz M.R., Compans R.W., Scountzou I. Improved immunogenicity of individual influenza vaccine components delivered with a novel dissolving microneedle patch stable at room temperature. *Drug Deliv. Transl. Res.* 5: 360-371 (2015)

[27] Hiraishi Y., Nakagawa T., Quan Y.-S., Kamiyama F., Hirobe S., Okada N., Nakagawa S. Performance and characteristics evaluation of a sodium hyaluronate-based microneedle patch for a transcutaneous drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 441: 570-579 (2013)

[28] Park J.-H., Yoon Y.-K., Choi S.-O, Prausnitz M.R., Allen M.G. Tapered conical polymer microneedles fabricated using an integrated lens technique for transdermal drug delivery. *IEEE Trans. Biomedical Eng.* 54: 903-913 (2007)

[29] Park J.-H., Allen M.G., Prausnitz M.R. Biodegradable polymer microneedles: Fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. *J. Control. Release.* 104: 51-66 (2005)

[30] Tajirian A.L., Goldberg D.J. A review of sutures and other skin closure materials. *J. Cosmet Laser Ther.* 12: 296-302. (2010)

[31] Loizidou E.Z., Williams N.A., Barrow D.A., Eaton M.J., McCrory J., Evans S.L., Allender C.J. Structural characterisation and transdermal delivery studies on sugar microneedles: Experimental and finite element modelling analyses. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 89: 224-231 (2015)

[32] Raphael A.P., Crichton M.L., Falconer R.J., Meliga S., Chen X., Fernando G.J.P., Huang H., Kendall M.A.F. Formulations for microprojection/microneedle vaccine delivery: structure, strength and release profiles. *J. Control. Release.* 225: 40-52 (2016)

[33] Raphael A.P., Prow T.W., Crichton M.L., Chen X., Fernando G.J.P., Kendall M.A.F. Targeted, needle-free vaccinations in skin using multilayered, densely-packed dissolving microprojection arrays. *Small* 6: 1785-1793 (2010)

[34] Lahiji S.F., Dangol M., Jung H. A patches dissolving microneedle delivery system enabling rapid and efficient transdermal drug delivery. *Sci. Rep.* 5: 7914 (2015)

[35]Lee J.W., Park J.-H., Prausnitz M.R. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials.* 29: 2113-2124 (2008)

[36] Yan L., Raphael A.P., Zhu X., Wang B., Chen W., Tang T., Deng Y., Sant H.J., Zhu G., Choy K.W., Gale B.K., Prow T.W., Chen X. Nanocomposite-strengthened dissolving microneedles for improved transdermal delivery to human skin. *Adv. Healthcare Mater.* 3: 555-564 (2014)

[37] Sivamani R.K., Stoeber B, Liepmann D, Maibach H.I. Microneedle penetration and injection past the stratum corneum in humans. *J. Dermatolog. Treat.* 20: 156-159 (2009)

[38] Nokleby H. Vaccination and anaphylaxis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 6: 9-13 (2006)

[39] Mistilis M.J., Joyce J.C., Esser E.S., Skountzou I., Compans R.W., Bommarius A.S., Prausnitz M.R. Long-term stability of influenza vaccine in a dissolving microneedle patch. *Drug Deliv. Transl. Res.* 7: 195-205 (2017)

[40] Edens C., Dybdahi-Sissoko N.C., Weldon W.C., Oberste M.S., Prausnitz M.R. Inactivated polio vaccination using a microneedle patch is immunogenic in the rhesus macaque. *Vaccine.* 33: 4683-4690 (2015)

[41] Hsueh K.-J., Chen M.-C., Cheng L.-T., Lee J.-W., Chung W.-B., Chu C.-Y. Transcutaneous immunization of Streptococcus suis bacterin using dissolving microneedles. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 50: 78-87 (2017)

[42] Hirst G.K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.* 75: 49-64 (1942)

[43] Kim Y.-C., Quan F.-S., Compans R.W., Kang S.-M., Prausnitz M.R. Formulation and coating of microneedles with inactivated influenza virus to improve vaccine stability and immunogenicity. *J. Cont. Release.* 142: 187-195 (2010)

[44] Kommareddy S., Baudner B.C., Bonificio A., Gallorini S., Palladino G., Determan A.S., Dohmeier D.M., Kroells K.D., Sternjohn J.R., Singh M., Dormitzer P.R., Hansen K.J., O'Hagan D.T. Influenza subunit vaccine coated microneedle patches elicit comparable immune responses to intramuscular injection in guinea pigs. *Vaccine.* 31: 3435-3441 (2013)

[45] Choi H.-J., Yoo D.-G., Bondy B.J., Quan F.-S., Compans R.W., Kang S.-M., Prausnitz M.R. Stability of influenza vaccine coated onto microneedles. *Biomaterials.* 33: 3756-3769 (2012)

[46] Kim S.-J., Shin J.-H., Noh J.-Y., Song C.-S., Kim Y.-C. Development of the novel coating formulations for skin vaccination using stainless steel microneedle. *Drug Deliv. Transl. Res.* 6: 486-497 (2016)

[47] Choi H.-J., Bondy B.J., Yoo D.-G., Compans R.W., Kang S.-M., Prausnitz M.R. Stability of whole inactivated influenza virus vaccine during coating onto metal microneedles. *J. Control. Release.* 166: 159-171 (2013)

[48] Hiraishi Y., Nandakumar S., Choi S.-O., Lee J.W.., Kim Y.-C., Posey J.E., Sable S.B., Prausnitz M.R. Bacillus Calmette-Guérin vaccination using a microneedle patch. *Vaccine.* 29: 2626-2636 (2011)

[49] Edens C., Collins M.L., Ayers J., Rota P.-A.., Prausnitz M.R. Measles vaccination using a microneedle patch. *Vaccine.* 31: 3403-3409 (2013)