

令和元年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05112

研究課題名(和文) インフルエンザマイクロニードルワクチンの前臨床並びに臨床研究と免疫誘導機構の解析

研究課題名(英文) Preclinical and clinical study of influenza microneedle vaccine and analysis of immunity induction mechanism

研究代表者

中川 晋作 (Nakagawa, Shinsaku)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：70207728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：経皮ワクチンの実用化を念頭に新規マイクロニードル(MN)ワクチンを開発し、その安全性と有効性を前臨床研究並びにヒト臨床研究にて評価した。その結果ポリグリコール酸を用いて作製した新規MNは、皮膚への穿刺特性に優れ、マウス及びラットを用いた動物実験により、その安全性と有効性を確認した。また経皮ワクチンにおける免疫誘導メカニズムについてもその一部を明らかにした。さらにこれらの結果を踏まえ、四価のインフルエンザHA抗原を塗布した新規MNワクチン製剤のヒトにおける安全性と有効性評価を行った。その結果、重篤な副作用を示すことなく抗原特異的抗体価が上昇する事を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、実用化を目指した経皮ワクチン製剤の開発を目的に、ポリグリコール酸(PG)を用いた新規マイクロニードル(PGA-MN)ワクチンの開発研究を実施した。このPG-MNを経皮ワクチン製剤として開発するに当たり、皮膚に対する穿刺特性や針の折損、薬物の溶出特性等の物理化学的特性を明らかにした事、さらに経皮ワクチンにおける免疫誘導機構の一部を明らかにした事、動物実験での安全性と有効性を示せた事について、学術的意義は大きい。さらにヒト臨床研究において安全性と有効性を示せた事は、学術的意義が大きく、また実用化が望まれている状況から考えると社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：A novel microneedle (MN) vaccine was developed with the practical application of a transdermal vaccine in mind, and its safety and efficacy were evaluated in preclinical research and human clinical research. As a result, the novel MN using polyglycolic acid is excellent in skin puncture properties, and animal experiments using mice and rats confirmed its safety and effectiveness. We also clarified some of the immune induction mechanisms in transdermal vaccines. Furthermore, based on these results, we evaluated the safety and efficacy of a novel MN vaccine preparation coated with tetravalent influenza HA antigen in humans. As a result, an increase in antigen-specific antibody titer was confirmed without showing serious side reactions.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：ワクチン 経皮免疫 インフルエンザ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ等の感染症に対して最も効果的な予防手段はワクチンである。しかし、実用化されているワクチンの大半が注射投与であるため、技術的・経済的な負担が大きく、ワクチンを最も必要としている開発途上国にワクチンを浸透させにくい原因となっている。また、注射型ワクチンではパンデミック発生時に大規模なワクチン接種を迅速に行えないことも欠点として挙げられる。本観点から、我々は注射型ワクチンに比べ、経済的で簡便性・普及性・備蓄性に優れた経皮ワクチン製剤の開発を推進している。これまでに我々が独自に開発した皮膚内溶解型のマイクロニードル(MN)を用いた経皮ワクチンが、抗原特異的抗体産生を中心とした効果的な免疫応答を誘導することを明らかにしている。さらにはこの皮膚内溶解型 MN を用いた 3 価季節性インフルエンザワクチンのヒト臨床研究を実施し、その安全性と有効性を報告している。また一方で本臨床研究を通じて、MN ワクチンの実用化を目指すに当たっては、解決しなければならない問題点も明らかになった。その問題点は、皮膚内溶解型 MN に大量の抗原蛋白質を封入すると針の強度(硬さ)が低下し、皮膚に 100%の効率で穿刺できない場合がある。これまでの 3 価インフルエンザ HA 抗原を封入した皮膚内溶解型 MN ワクチンでは、針部強度に問題が無く、確実に皮膚に穿刺できていたが、平成 27 年度よりインフルエンザワクチンは 4 価に変更になった為、より多くの HA 抗原蛋白質を皮膚内溶解型 MN 内に封入する必要がある。その為、針部強度が低下し、皮膚に穿刺できない可能性が拭いされないことから、実用化を目指すためには、これまでの安全性を確保した上で確実な有効性を担保する為に、皮膚に 100%の効率で穿刺できる新規な MN を開発する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、実用化に資する MN ワクチン製剤を開発することを目的に、まず皮膚へ安全且つ確実に穿刺できる素材としてポリグリコール酸(PGA)を用いて高い針部強度を有する MN (PGA-MN) を作製する。皮膚に確実に穿刺できるこの PGA-MN の針先にワクチン抗原を装填することで PGA-MN ワクチン製剤を作製し、その製剤特性(製剤安定性、抗原溶出特性等)を評価すると共に実験動物を用いた前臨床研究において安全性と有効性を実証する。さらにこれらの成果をもとに医師主導型ヒト臨床研究においてその安全性と有効性を実証する。さらに MN ワクチンが注射型ワクチンに比べて顕著に高い抗体産生能を有し、有効性に優れていることの科学的根拠を示すべく、MN ワクチンによる免疫誘導メカニズムを解明する。具体的には、皮膚内に存在する抗原提示細胞並びに所属リンパ節内でのリンパ球反応に焦点を絞り、その機能解析を行なう。最終的には、本研究課題において得られる成果を世界初の MN ワクチン製剤の実用化を加速する基礎情報として活用する。

### 3. 研究の方法

【PGA-MN の作製とその製剤学的特性、皮膚内への物質送達特性及び動物実験での有効性、安全性評価】

PGA-MN は、射出成型機を用いてシリンドラ温度を 240 に設定し、無菌的にポリグリコール酸(PGA)を熔融させ射出成形した。PGA-MN の写真並びに規格を Fig. 1 に示す。

抗原装填 PGA-MN は、抗原を溶解した溶液に微小針を浸漬させ、その後乾燥することにより作製した。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。

PGA-MN の微小針部の耐荷重値は、TA-XT plus texture analyzer にて測定した。抗原送達特性は、F-OVA 装填 PGA-MN をヒト摘出皮膚に貼付し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。動物実験での有効性、安全性評価は、4 価インフルエンザ HA 抗原装填 PGA-MN を用いて行った。単価 HA 抗原量は、1 µg/patch 及び 5 µg/patch となるように調整し、その HA 抗原装填 PGA-MN をラット腹部皮膚に 30 分貼付し、これを 3 週間隔で 2 回行った。PGA-MN 貼付部位の皮膚刺激性を評価すると共に経時的に採血し、抗原特異的抗体価を ELISA 法により測定した。

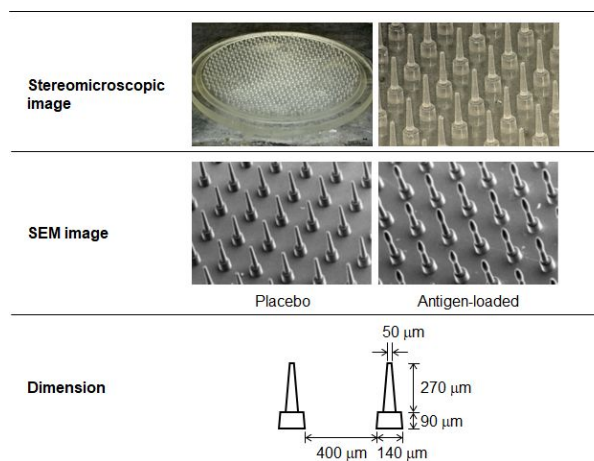


Fig. 1 Image and demension of PGA-MN

【MN ワクチンの免疫誘導メカニズム解析に向けた皮膚常在性抗原提示細胞の機能・動態解析並びに所属リンパ節におけるリンパ球特性解析】

マウスの背部皮膚に MN を貼付し、表皮及び真皮における各種遺伝子発現変動をマイクロアレイによって経時的に解析した。また MN を貼付したマウス皮膚を経時的に回収し、10%ホルマリソに浸漬した後、皮膚組織標本を作製し、各種染色により貼付部位への細胞集積を解析した。

さらに MN を貼付したマウスもしくは皮下注射を施したマウスの所属リンパ節を経時的に回収し、樹状細胞サブセットの割合並びに表面マーカーの発現レベルをフローサイトメトリーにより解析した。さらに抗原特異的抗体産生における T 細胞の関与を明らかにすべく、T 細胞欠損マウス並びに CD4 陽性 T 細胞枯渇マウスに OVA を注射或いは MN を用いて投与し、経日的に抗原特異的抗体価を ELISA にて評価した。また、OVA 特異的 T 細胞受容体を有する CD4 陽性 T (OT-II) 細胞を移入した野生型マウスに OVA を経皮投与あるいは皮下注射し、所属リンパ節における OT-II 細胞の増殖、活性化及び分化状態をフローサイトメトリー解析により評価した。

【臨床研究による有効性及び安全性評価】

PGA-MN 自体の安全性並びにヒト皮膚への穿刺特性については、PGA-MN を健康人男性 10 名の上腕外側にアプリケーターを用いて貼付した。30 分後に MN を剥離し、MN 適用部位の皮膚水分蒸散量 (TEWL) を測定すると共に肉眼的観察を行った。また剥離した MN の微小針の状態を顕微鏡で観察した。

次にインフルエンザ HA 抗原装填 PGA-MN の有効性と安全性については、上記と同様にインフルエンザ HA 抗原装填 PGA-MN を健康人男性 10 名の上腕外側に貼付した。貼付 2 時間後に MN を剥離し、2 日後と 7 日後、4 週間後に貼付部位の肉眼的観察、自覚症状の問診並びに採血による血液学的検査、生化学的検査により安全性を評価した。また 4 週間後の血清中の HI 価を測定し、有効性の指標とした。

4. 研究成果

【PGA-MN の作製とその製剤学的特性、皮膚内への物質送達特性及び動物実験での有効性、安全性評価】

生分解性ポリマーである PGA を用いて、新規に PGA-MN を作製し、製剤学的特性を評価した。その結果、PGA-MN の針部強度は、0.065 N/needle であったことから、十分に皮膚に穿刺出来る強度を有していると判断した。また、針部強度測定後の MN 外観を確認した結果、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。

次に皮膚内への抗原送達特性を評価すべく、F-OVA 装填 PGA-MN をヒト摘出皮膚組織へ貼付した。その結果、表皮から真皮にかけて F-OVA 由来の蛍光が観察された (Fig. 2)。

次に 4 価インフルエンザ HA 抗原装填 PGA-MN を作製し、その HA 抗原の溶出特性評価した。その結果 100% に近い量の HA 抗原が速やかに溶出されることを明らかにした。また溶出された HA 抗原の HA 価は失活していない事を確認した。この HA 抗原装填 PGA-MN を用いてラットに免疫したところ、HA 抗原に対して抗原特異的な抗体産生が得られることを明らかにした (Fig. 3)。投与量 5 µg/rat において MN 投与群 (TCI) と皮下注射群 (SCI) 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。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。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 (Fig. 3)。また穿刺した部位の皮膚刺激性を評価した結果、これまで報告してきた皮膚内溶解型 MN と同様

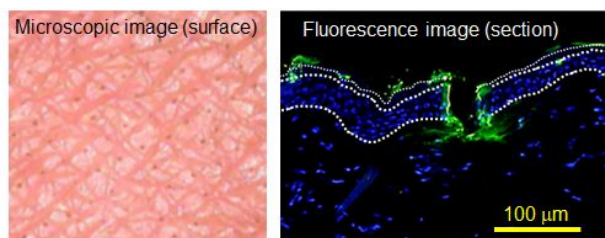


Fig. 2 Antigen delivery images by novel PGA-MN patches. In the fluorescence images, the area between the top line and the middle line represents the stratum corneum, between the middle line and the bottom line represents the living epidermis, and under the bottom line represents the dermis. Green and blue fluorescence indicate F-OVA and nuclei (DAPI), respectively.

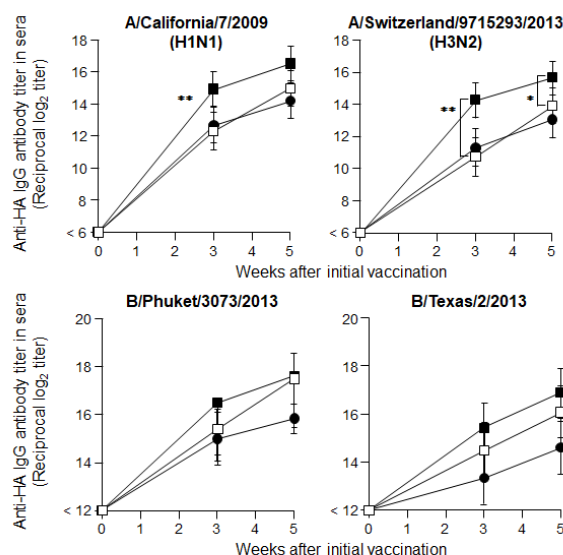


Fig. 3 HA antigen-specific antibody titers induced by TCI using tetra-flu-PGA-MN patches. The flu-PGA-MN patches were applied to back skin of Wistar rats twice at a 3-week interval. ●; TCI (each HA: 1 µg), ■; TCI (each HA: 5 µg), □; SCI (each HA: 5 µg) Data are expressed as mean ± SD of results from six rats (Student's t-test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

ベルであった。

#### 【MN ワクチンの免疫誘導メカニズム解析に向けた皮膚常在性抗原提示細胞の機能・動態解析並びに所属リンパ節におけるリンパ球特性解析】

MN 貼付後の皮膚組織における遺伝子発現変動をマイクロアレイにより解析した結果、TNF- $\alpha$  や IL-1、IL-33、DAI、IRF-7 の mRNA レベルが MN の貼付に伴い顕著に増加していた。病理組織学的解析からは、MN 貼付局所の皮膚周辺において炎症性細胞の浸潤が認められた。また各炎症性細胞の浸潤を経時的に解析したところ、MN 貼付から 6 時間、12 時間後に好中球の浸潤が、12 時間と 24 時間後にリンパ球及びマクロファージの浸潤が顕著に増加する事を明らかにした。また、皮膚常在性抗原提示細胞の機能・動態解析については、MN 貼付により所属リンパ節内でランゲルハンス細胞及び CD207 陰性真皮樹状細胞の存在比が顕著に増加していた。さらにこの様な皮膚由来樹状細胞サブセットの増加は、プラセボ投与群においても抗原投与群と同程度誘導されることが示された。また、プラセボの MN 貼付後の所属リンパ節における皮膚常在性樹状細胞サブセットのポピュレーション変動を経時的に解析したところ、ランゲルハンス細胞の存在比が貼付 24 時間後で増加していたのに対して、CD207 陰性真皮樹状細胞の存在比は貼付 2 時間後から 24 時間後にかけて徐々に増加していることを明らかにした。

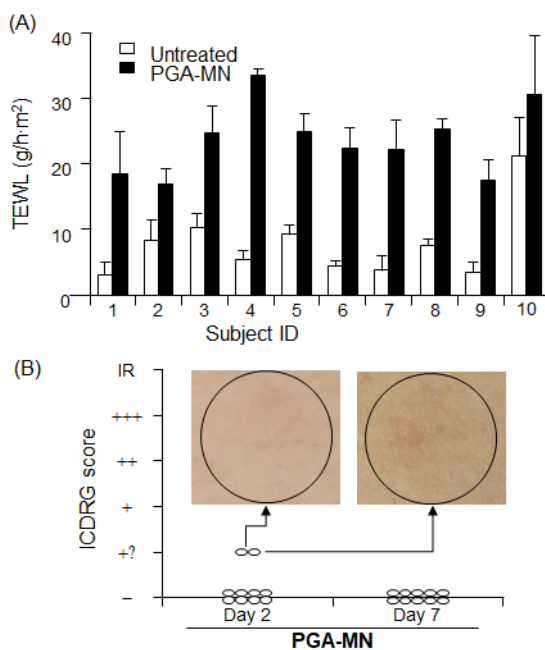
一方、MN ワクチンによる抗原特異的抗体産生における T 細胞の関与を明らかにすべく、T 細胞欠損マウス並びに CD4 陽性 T 細胞枯渇マウスを用いて評価した結果、何れのマウスにおいても抗体産生誘導効果が失われていることが判明した。また抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の所属リンパ節でのレスポンスを評価する目的で、蛍光標識した OVA 特異的 T 細胞レセプターを有する CD4 陽性 T 細胞 (OT-II 細胞) を移入したマウスに、注射或いは MN にて OVA 免疫を行い、移入した OVA 特異的 CD4 陽性 T 細胞の分裂増殖を検討した。その結果、MN 群の分裂頻度は、注射群と比較して高い状態を示した。さらに本実験にて分裂増殖した T 細胞について、MN 群では注射群よりもエフェクター T 細胞への誘導効果が高い傾向が認められ、またエフェクターメモリー T 細胞への分化誘導率も MN 群の方が注射群よりも優れる傾向にあった。

#### 【臨床研究による有効性及び安全性評価】

上記に示した種々の評価において、PGA-MN はこれまで我々が示してきた皮膚内溶解型 MN の問題点を克服した上で、製剤特性並びに安全性及び有効性については、同等以上である可能性が示された。そこでまず PGA-MN 自体の安全性並びにヒト皮膚に対して確実に穿刺出来るかをヒト臨床研究にて評価した。健康成人男性の上腕外側部の皮膚に PGA-MN を貼付したところ、貼付部位において水分蒸散量が上昇したことから、PGA-MN は確実に皮膚に穿刺出来ていると判断した。また貼付部位は、軽微な紅斑は観察されたが浮腫等の重篤な皮膚刺激性は認められなかった (Fig. 4)。

そこで次に 4 価のインフルエンザ HA 抗原を塗布した PGA-MN のヒトでの有効性及び安全性評価を行った。HA 抗原装填 PGA-MN を上腕外側部の皮膚に貼付し、4 週間後における血清中 HI 価を測定した結果、全てのインフルエンザ HA ワクチン株において、貼付前よりも上昇していることを明らかにした。また、安全性については、貼付直後から貼付部位に紅斑が観察されたが、7 日後には局所の炎症反応がほぼ軽快していた。さらに血液生化学的検査においても異常が認められなかったことから、安全性においても問題が無いと判断した。

以上の成果は、MN ワクチン製剤の実用化を実現する上で有用な基礎情報を提供するものであると確信している。



**Fig. 4 TEWL and local adverse events after human skin application of MN patches.** Placebo PGA-MN was 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  $\pm$  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.”

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、マイクロニードルを用いた経皮ワクチン製剤、ファルマシア、査読無、52巻、2016、1030-1034

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、新たなワクチン投与方法 - 経皮ワクチン、化学療法の領域、査読無、32巻、2016、100-108

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、感染症対策に貢献する経皮ワクチン製剤の開発、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、査読無、47巻、2016、93-100

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、次世代ワクチンとしての経皮ワクチン製剤、薬剤学生命とくすり、査読有、76巻、2016、18-24

### 〔学会発表〕(計10件)

坂上 俊、小野彰彦、伊藤沙耶美、廣部祥子、小豆澤宏明、浅田秀夫、斎藤美生、権 英淑、神山文男、片山一朗、立花雅史、中川晋作、岡田直貴、生体適合材料を用いた二段型ソリッドマイクロニードルの開発、第33回日本 DDS 学会学術集会、2017年7月6日~2017年7月7日、京都市勧業館みやこめッセ

伊藤沙耶美、中川雄介、江口涼介、吉田淳哉、小山田孝嘉、岸下奈津子、石井 健、立花雅史、中川晋作、岡田直貴、マイクロニードル製剤により誘導される経皮免疫応答における IL-1 の役割、第33回日本 DDS 学会学術集会、2017年7月6日~2017年7月7日、京都市勧業館みやこめッセ

Sayami Ito, Honoka Takeuchi, Sachiko Hirobe, Masashi Tachibana, Shinsaku Nakagawa, Naoki Okada, Proliferation and differentiation of antigen-specific T cells in the draining lymph node with transcutaneous immunization., 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5日~2016年12月7日、沖縄宜野湾市

Ryousuke Eguchi, Sachiko Hirobe, Masashi Tachibana, Shinsaku Nakagawa, Naoki Okada, Population fluctuation of dendritic cell subsets in the draining lymph node with transcutaneous immunization., 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5日~2016年12月7日、沖縄宜野湾市

中川雄介、伊藤沙耶美、立花雅史、廣部祥子、中川晋作、岡田直貴、経皮ワクチン製剤に適したアジュバントの探索と有効性評価、第66回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016年10月15日、大阪

江口涼介、廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、経皮ワクチン製剤の貼付に伴う皮膚常在性樹状細胞サブセットの所属リンパ節への遊走、第20回日本ワクチン学会学術集会、2016年10月22日~2016年10月23日、東京

中川晋作、世界初、日本発の経皮ワクチン製剤の開発を目指して、第32回日本 DDS 学会学術集会(招待講演)、2016年6月30日~2016年7月1日、静岡

伊藤沙耶美、廣部祥子、竹内ほのか、中川晋作、岡田直貴、経皮ワクチン製剤により誘導される T 細胞応答の解析、第32回日本 DDS 学会学術集会、2016年6月30日~2016年7月1日、静岡

江口涼介、廣部祥子、吉田淳哉、小山田孝嘉、中川晋作、岡田直貴、経皮ワクチン製剤の貼付による抗原提示細胞サブセットのポピュレーション変動、第32回日本 DDS 学会学術集会、2016年6月30日~2016年7月1日、静岡

伊藤沙耶美、廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、K3(CpG-ODN)の経皮免疫製剤用アジュバントとしての特性解析、日本薬剤学会第31年会、2016年5月19日~2016年5月21日、岐阜

### 〔図書〕(計1件)

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、シーエムシー出版、マイクロニードルの製造と応用展開、2016、181

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：浅田 秀夫

ローマ字氏名：Asada Hideo

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60252681

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡田 直貴

ローマ字氏名：Okada Naoki

研究協力者氏名：廣部 祥子

ローマ字氏名：Hirobe Sachiko

研究協力者氏名：小豆澤 宏明

ローマ字氏名：Azukizawa Hiroaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。