

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 27 日現在

機関番号：34306
 研究種目：基盤研究 B
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22310082
 研究課題名（和文）マイクロニードル経皮ワクチン

研究課題名（英文）Microneedle skin vaccine

研究代表者 高田 寛治（TAKADA KANJI）
 京都薬科大学 薬学部 教授
 研究者番号：30102106

研究成果の概要（和文）：

先端部に卵白アルブミン（OA）を配置した 2 層および 3 層からなる溶解性マイクロニードル MNs を調製して検討を行った結果、3 層 MNs は表皮層に分布する Langerhans 細胞への効率的な抗原のデリバリーを可能にし、より強い免疫反応を誘導した。一方、破傷風ワクチンにおいては皮膚の表皮層に多く分布する Langerhans 細胞が経皮免疫のターゲット部位となっていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Two- and three-layered dissolving microneedles was loaded with ovalbumin (OA) at the acral and second portion of the needles. As 3-layered MNs delivered antigen to Langerhans cells that localize in the epiderm, stronger immunological reaction was induced. On the other hand, the target site of tetanus toxoid was revealed to be the Langerhans cells distributed mainly in the skin epiderm.

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

(金額単位：円)

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロファブリケーション

1. 研究開始当初の背景

1998 年に米国の Glenn¹⁾らがコレラトキシンをアジュバントにして卵白アルブミン(OVA)をモデル抗原としたマウス実験系において循環血液中抗体価の上昇を発表して以

来、経皮ワクチンは免疫学研究における一大トレンドとなった。しかし、コレラトキシンはアジュバントとしての機能よりも経皮吸収促進剤としての機能の方が大きいので、安全性の高い経皮ワクチン用吸収促進剤の探

素研究が活発に行われてきている。また、エレクトロポレーション、イオントフォレシスなどの物理的 DDS も経皮ワクチンへの応用が試みられているが、火傷などの副作用が懸念され実用化には至っていない。²⁾国内では吸収促進剤を用いたゲル軟膏貼付剤の研究が行われている。安全性の点で海外の研究よりも優れている。しかし、抗原蛋白の吸収率が低く、新規の抗原蛋白は極めて高価なことから、医薬品としての採算性を欠き、抗原性および吸収率を高めるための強力なアジュバントおよび吸収促進剤の研究へと向かっている。

一方、米国では長さ約 500 μm のチタン製のマイクロニードルで皮膚の表皮にピアス（細孔）を開けた後に抗原蛋白を塗布するという経皮ワクチン (MacrofluxTM) やポリプロピレン製マイクロニードルの表面に抗原蛋白を塗布する経皮ワクチンシステムが臨床試験中である。しかし、いずれも医薬品製剤ではなく医療器具のカテゴリーに属す。

我々はコンドロイチン硫酸、デキストラン、ヒアルロン酸などの水溶性かつ曳糸性のポリマーを基剤として自己溶解性マイクロニードルを発明し、2006 年に PCT にて国際特許出願を行うとともに、2012 年 1 月に日本国特許を取得した。次いで実用化を目指して、1.0c m^2 のチップ上に長さ 500 μm 、底部直径 300 μm のマイクロニードルを 10 行 10 列で 100 本集積した自己溶解性マイクロニードル・アレイ・チップを考案し、2007 年に特許を出願した。マイクロニードル・アレイ・チップは上記の生体内ポリマーを基剤に使用したマイクロニードルであることから、極めて安全性の高い経皮 DDS である。そこで、申請者はマイクロニードル・アレイ・チップの最大の用途は経皮ワクチンにあると考え、本研究においては、1.0c m^2 のチップ上に高度に集積した長さ 500 μm 、底部直径 300 μm のマイクロニードル・アレイ 225 本の先端部に抗原蛋白を搭載させることに挑むとともに、皮膚の表皮に存在する免疫系の Langerhans 細胞および真皮に分布する樹状細胞の 1 種である Dendritic 細胞へのデリバリーの可能性が強く求められている。

1) Skin immunization made possible by cholera toxin. Nature, 391, 851, 1998.

2) Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, 2007.

2. 研究の目的

癌、肝炎、アルツハイマー病などの難治性疾患治療薬の開発は難航状態にあることから難治性疾患治療用ワクチンの開発が活発化してき、各種の天然由来および合成ペプチドのワクチン注射剤が開発されつつある。1998 年に米国の Glenn らがコレラトキシンをア

ジュバントに用いて抗原蛋白を経皮的に投与し、経皮ワクチンの概念を立証した。ターゲット細胞である免疫細胞 (Langerhans 細胞および Dendritic 細胞) の存在する皮膚表皮～真皮へ抗原蛋白をデリバリーすればアジュバント不要な経皮ワクチンを開発することが可能となる。そこで、マイクロニードル先端の皮膚表皮挿入部位に抗原蛋白を局在させた高度集積マイクロニードル・アレイ・チップを開発し、新規の経皮ワクチン DDS としての可能性について探索的な研究を行う。

3. 研究の方法

①先端部に抗原蛋白を搭載したマイクロニードル・アレイ・チップの製法の確立

1.0c m^2 のチップ上に長さ 500 μm 、上部開口部直径 300 μm の逆円錐状のウェル 225 本を微細加工技術を駆使して形成し、鋳型とする。鋳型の素材としては、有機ソフトマテリアルであるシリコン、ポリプロピレン、熱可塑性樹脂を用い、成形性・耐久性・剥離性などの点から最適化を行った。抗原蛋白としては OVA、破傷風ワクチン抗原を用いた。抗原およびトレーサー色素であるエバンスブルー (EB) を水溶性の曳糸性ポリマー基剤 (コンドロイチン硫酸、デキストラン) と混和し、一旦、超分子複合体とした後、微量分注機にてウェル内に充填した。次いで、基剤のみから成る親水性ゲルを充填することにより先端部に抗原蛋白を保持したマイクロニードル・アレイを作成した。硬化・乾燥後、チップ上に反転することにより 1.0c m^2 あたりにマイクロニードルアレイ 225~300 本を高度に集積したマイクロニードル・アレイ・チップを得た。ビデオマイクロスコープを用いて、マイクロニードル・アレイ・チップの計測を行った。計測解析ソフトを用いて画像処理を行い、調製したマイクロニードル・アレイ・チップ中における先端からの抗原の充填位置、充填容積、形状、ニードル先端の鋭利性の検証を行った。さらに走査型電子顕微鏡を用いて微細観察を行い、マイクロニードル表面の滑面性について解析を行った。

②先端部抗原蛋白搭載マイクロニードル・アレイ・チップの製剤学的評価

マイクロニードル調製過程における抗原蛋白の分注量の再現性を検証するために、OVA およびトレーサー標識色素である EB を配合したマイクロニードル・アレイ・チップを調製した。得られた EB 標識マイクロニードル・アレイ・チップをビデオマイクロスコープにて撮影するとともに計測ソフトウェアによりデジタル画像処理を行うことにより、先端部からの EB および OVA の充填位置を計測した。次いで、PBS を用いてマイクロニードル・アレイ・チップから EB および

OVA を抽出し、EB 含量を測定した。マイクロニードル・アレイ・チップ間における EB 含量の変動率を求め、医薬品製剤としての含量均一性を達成できるよう改良を行った。

③先端部抗原蛋白搭載マイクロニードル・アレイ・チップの免疫薬理学的評価

水溶性の洩糸性ポリマーであるコンドロイチン硫酸を基剤として調製した OVA マイクロニードル・アレイ・チップを 1 群 4-5 匹からなるラット背部皮膚表皮に OVA の投与量として 0.1, 1.0 および 10.0 μg にて投与した。コントロール群としては、OVA を配合せずポリマー単独にて調製したマイクロニードル・アレイ・チップを同様の方法にてラットに投与した。ポジティブコントロール群としては、OVA 水溶液を用いて、0.1, 1.0, 10.0 μg の投与量で皮下注射によりマウスに投与する。1 週間の wash-out 後、ブースターとして OVA の同量を先端部に搭載したマイクロニードル・アレイ・チップにて経皮免疫を行った。他の製剤についても同様にブースター投与を行った。ブースター投与 2 週間後にラットを安楽死させ、頸静脈より血液サンプルを採取した。血液サンプルを遠心分離後、血清サンプルを用いて ELISA 法にて OVA 抗体価を測定した。

破傷風ワクチン抗原：OVA 含有マイクロニードル・アレイ・チップの実験において成功を収めたコンドロイチン硫酸を用いて先端部に搭載したマイクロニードルを調製した。含有抗原量として 1, 10, 100 μg の 3 段階にふって作成したマイクロニードル・アレイ・チップをラットの皮膚に投与した。1 週間の投与間隔においてラットに同投与量でブースターを投与し、循環血液を 3 週間にわたり採取し、血清中の抗体価の推移を測定した。投与前の抗体価と比較することにより、ワクチンとしての免疫薬理学的評価を行った。

④蛍光標識抗原蛋白先端搭載マイクロニードル・アレイ・チップからのラット皮膚表皮および真皮内デリバリー部位の解析

蛍光標識用色素である FITC でラベルを施した OVA を調製し、FITC-OVA を添加して先端蛍光標識マイクロニードル・アレイ・チップを調製した。除毛ラット腹部皮膚に麻酔下で投与し、1, 5, 10 分, 1 時間, 2 時間, 24 時間後に皮膚を摘出した。凍結、固定を行い、20 μm の厚さの皮膚薄膜切片を作成し、蛍光顕微鏡下にて薄膜皮膚組織像を撮影した。画像処理ソフトウェアを用いて蛍光強度の分布状態の解析を行うことにより、先端部に蛍光標識を施したマイクロニードル・アレイ・チップにより蛍光標識体の皮膚内デリバリー部位である表皮～真皮接合部へのデリバリー率を測定した。さらに、固定皮膚を皮膚表面と平行して 20 μm の厚さでスライス切片を作成した。角質層から真皮の深部まで得た 20

枚の皮膚スライス切片から FITC-OVA を抽出し、各スライス切片中の含有量を蛍光分光法にて測定した。得られた角質層～表皮～真皮への OVA の分布動態を解析した。

⑤マイクロニードル・アレイ・チップ安全性の検証

先端部に抗原を配置したマイクロニードル・アレイ・チップは優れた経皮ワクチン用 DDS であることが立証できたので、将来のヒト試験への移行に必要な安全性に関する情報を収集した。すなわち、抗原を含有しない基剤単独で調製したマイクロニードル・アレイ・チップ（ブラシーボ製剤）を用いて臨床第 I 相試験を実施した。10 名の健康男子成人をボランティアとし、コンドロイチン硫酸およびデキストランから成るマイクロニードル・アレイ・チップを上腕部裏側の皮膚に投与した。投与前および 1 ヶ月後にわたり共同研究者である札幌医大・皮膚科の小野准教授が臨床的な観察を行った。また、ラットの除毛腹部皮膚にブラシーボ製剤を投与し、その後、3 時間にわたり経時的に皮膚からの漏出液を採取し、局所障害性の指標となる lactate dehydrogenase(LDH)活性を測定した。

4. 研究成果

MNs の形状計測の結果、2 層及び 3 層 MNs の抗原保持部位は先端から各々 $155 \pm 2 \mu\text{m}$ 及び $175 \pm 1 \sim 224 \pm 1 \mu\text{m}$ であった。各 MNs を用いて経皮免疫した結果、いずれの投与群においても同量の抗原の皮下注射投与群に比べ、有意に高い Ig(G+A+M) 抗体の産生誘導が認められた。さらに 3 層 MNs 投与群における血漿中 Ig(G+A+M) 抗体は、2 層 MNs 投与群に比べ 2.5~7 倍の高値を示した。MNs 投与 2 週間後において IgE 抗体を測定したところ、IgE 抗体の産生は認められなかった。また、MNs 投与後の皮膚に炎症は認められなかった。一方、皮下注射投与群における IgE 抗体の変化率はプラセボ MNs 投与群に比べ有意に高い値を示した。また、各 MNs からのラット皮膚内における抗原送達部位を測定したところ、2 層 MNs を投与した後、皮膚表面から約 200 μm 付近に強い発光が確認された。一方 3 層 MNs の場合には、表面から約 100 μm 付近にわたり強い発光が認められた。最大蛍光強度は、各々皮膚表面から 20 μm 及び 120 μm の部位に認められた。従って、2 層及び 3 層 MNs に保持された抗原は、各々真皮層及び表皮層へデリバリーされることが確認された。すなわち、3 層 MNs は表皮層に分布する Langerhans 細胞への効率的な抗原のデリバリーを可能にし、より強い免疫反応を誘導したものと考えられる。

破傷風ワクチン抗原を先端部に配置した溶解性 2 層マイクロニードル・アレイ・チップを高い再現性でもって調製する方法を確

立した。抗原の充填部位の長さは先端から約 $70\ \mu\text{m}$ であった。至適投与量を探索するために高用量と低用量の2種類のチップを調製してワクチン抗原含量を測定したところ、約 1.0Lf および 2.0Lf であった。そこで、ラットを用いて免疫学的実験を行った。2層マイクロニードル・アレイ・チップ投与群については、1.0Lf 投与群において、2週間後の血清中抗体価は ND であったが、その後、抗体価の上昇が認められた。すなわち、 $5622 \pm 1195\text{U}$ (4 weeks), $5341 \pm 1278\text{U}$ (6 weeks), $4053 \pm 1322\text{U}$ (8 weeks) であった。一方、2.0Lf 投与群では、2週間後の血清中抗体価は同様に ND であったが、その後、抗体価の上昇が認められ、 $4251 \pm 1020\text{U}$ (4 weeks), $3553 \pm 1347\text{U}$ (6 weeks), $1436 \pm 539\text{U}$ (8 weeks) であった。次いで、3層マイクロニードル・アレイ・チップの調製にチャレンジして、成功を収めた。抗原の充填部位は先端から約 $250 \sim 370\ \mu\text{m}$ であった。抗原の含量は約 1.0Lf および 1.5Lf であった。1.0Lf 投与群において、血清中抗体価は、 $12849 \pm 3200\text{U}$ (2 weeks), $37863 \pm 6415\text{U}$ (4 weeks), $200758 \pm 39079\text{U}$ (6 weeks), $146441 \pm 21948\text{U}$ (8 weeks) であった。一方、1.5Lf 投与群では、血清中抗体価は、 $4220 \pm 812\text{U}$ (2 weeks), $267750 \pm 48572\text{U}$ (4 weeks), $172329 \pm 21342\text{U}$ (6 weeks), $163573 \pm 33895\text{U}$ (8 weeks) であった。このように、3層マイクロニードルが極めて高い抗体価の誘導に成功を収めた。2層および3層マイクロニードル・アレイ・チップからの抗原のデリバリー部位は各々真皮層および表皮層であるので、破傷風ワクチンにおいては皮膚の表皮層に多く分布する Langerhans 細胞が経皮免疫のターゲット部位となっていることが明らかとなった。

溶解性マイクロニードルの基剤として使用したコンドロイチン硫酸およびデキストランの安全性を検証するために臨床第 I 相試験を行ったが、投与部位の皮膚には発赤および炎症はみとめられず、安全性に富む DDS であることが検証された。

以上の結果、3層 MNs は、従来の抗原接種方法に比べ簡便性・有効性・安全性に優れた新規経皮ワクチン用 DDS であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Asuka Ikejiri, Yukako Ito and Kanji Takada: High percutaneous bioavailability of granisetron by dissolving microneedles. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.*, 22, 500-504 (2012) 査読有
- 2) Yukako Ito, Takuya Nakhigashi, Naoko

Yoshimoto, Yuriko Ueda, Noriyuki Hamasaki, and Kanji Takada: Transdermal Insulin application system with dissolving microneedles. *Diabetes. Technol. Ther.* 14, 891-899 (2012) 査読有

- 3) Yukako Ito, Muneyuki Hirono, Keizo Fukushima, Nobuyuki Sugioka and Kanji Takada: Two-layered dissolving microneedles formulated with intermediate-acting insulin. *Int. J. Pharm.*, 436, 387-393 (2012) 査読有
- 4) Asuka Ikejiri, Seishiro Naito, Yukako Ito and Kanji Takada: Two- and three-layered Dissolving Microneedles for Transcutaneous Delivery of Model. Vaccine Antigen in Rats. *J. Biomaterials. Nanobiotech.* 3, 325-334 (2012) 査読有
- 5) Seishiro Naito, Yukako Ito, Tomoko Kiyohara, Michiyo Kataoka, Masaki Ochiai and Kanji Takada: Antigen-loaded dissolving microneedle array as a novel tool for percutaneous vaccination. *Vaccine*, 30, 1191-1197 (2012). 査読有.
- 6) Ito Y., Yoshimura M, Tanaka T and Takada K.: Effect of lipophilicity on the bioavailability of drugs after percutaneous administration by dissolving microneedles. *J. Pharm. Sci.* 15, 145-56 (2012) 査読有
- 7) Yukako Ito, Hiroshi Murano Noriyuki Hamasaki, Keizo Fukushima and Kanji Takada: Incidence of low bioavailability of leuprolide acetate after percutaneous administration to rats by dissolving microneedles. *Int. J. Pharm.*, 407, 126-131 (2011). 査読有.
- 8) Keizo Fukushima, Yukako Ito, Masahiro Ishihata, Nobuyuki Sugioka and Kanji Takada: Insulin micropiles comprising biodegradable polymers for production of a long-term hypoglycemic effect. *J. Drug Target.*, 19, 212-218 (2011). 査読有
- 9) Yukako Ito, Sumie Kashihara, Keizo Fukushima and Kanji Takada: Two-layered dissolving microneedles for percutaneous delivery of sumatriptan. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 37, 1387-1393 (2011). 査読有
- 10) Yukako Ito, Takenao Yamazaki, Nobuyuki Sugioka and Kanji Takada: Self-dissolving micropile array tips for percutaneous administration of insulin. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 21, 835-841 (2010). 査読有
- 11) Yukako Ito, Ryo Hasegawa, Keizo

Fukushima, Nobuyuki Sugioka and Kanji Takada : Self-dissolving micropile array tips as percutaneous delivery system of protein drug. Biol. Pharm. Bull., 33, 683-690 (2010). 査読有

- 12) Yukako Ito, Ayaka Ise, Nobuyuki Sugioka and Kanji Takada : Molecular weight dependence on bioavailability of FITC-dextran after administration of self-dissolving micropile to rat skin. Drug. Dev. Ind. Pharm., 36, 845-851 (2010). 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) Kanji Takada, Seoshiro Naito, Yukako Ito, Mangatt Sudhakaran S., Asuka Ikejiri : Usefulness of three-layered dissolving microneedles for skin vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 (横浜) 2012. 11.
- 2) 高田寛治、小野一郎、伊藤由佳子、上田祐理子、松地大輝、家田和奈、櫻井紀代美 : 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) 含有マイクロニードル・アレイ・チップに関する基礎的研究. 第 42 回日本創傷治癒学会 (札幌) 2012. 12.
- 3) 濱崎紀行、仲東卓也、伊藤由佳子、高田寛治 : マイクロニードル投与用デバイス. 第 27 回日本DDS学会(東京大学本郷キャンパス) 2011 年 6 月 9 日~10 日
- 4) Seishiro Naito, Yukako Ito, Tomoko Kiyohara, Michiyo Kataoka, Masaki Ochiai, Kanji Takada : Epidermal vaccination of hepatitis A using a dissolving microneedle array. 5th Vaccine ISV Annual Global Congress, (Seattle, U.S.A.) 2011 年 10 月 2 日~4 日 October 2-4.
- 5) Kanji Takada, Yukako Ito : Transdermal insulin application system with dissolving microneedles. 11th Annual Diabetes Technology Meeting, (San Francisco, U.S.A.) 2011 年 27 日~29 日.
- 6) Yukako Ito, Keizo Fukushima, Nobuyuki Sugioka and Kanji Takada : Factors affecting the bioavailability of drugs from dissolving microneedles in rats. First International Conference on microneedles (Atlanta, USA) 2010 年 5 月 23 日~25 日.
- 7) Kanji Takada and Yukako Ito : Dissolving microneedles for percutaneous delivery of insulin. European Association for the study of Diabetes, 46th Annual Meeting, (Stockholm, Sweden) 2010 年 9 月 20 日~24 日.

[図書] (計 1 件)

- 1) 高田寛治 : 第 12 章 3 節. 経皮投与 (マイクロニードル) 技術の動向. ワクチンの市場動向と 開発・製造 実務集, pp. 361-379, 技術情報協会 (2012).

[その他]

- 1) 高田寛治 : アカデミックフォーラム「経皮ワクチン用溶解性 3 層マイクロパイル投与システム」. 第 11 回国際バイオテクノロジー展/技術会議 (東京ビックサイト), 2012. 4. 27.
- 2) 高田寛治 : 「2 層溶解性マイクロニードル製造装置」. BioJapan 2012 (パシフィコ横浜), 2012. 10. 11.
- 3) 高田寛治 : バイオアカデミックフォーラム「2 層マイクロニードル・アレイ・チップと製造装置」. 第 10 回バイオテクノロジー国際会議 (東京ビックサイト), 2011. 6. 29.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田寛治 (TAKADA KANJI)
京都薬科大学 薬学部 教授
研究者番号 : 30102106

(2) 連携研究者

伊藤 由佳子 (ITO YUKAKO)
京都薬科大学 薬学部 講師
研究者番号 : 30278444