

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24年 5月29日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791066

研究課題名（和文）マイクロニードルによるワクチン法の理論的根拠の確立

研究課題名（英文） percutaneous peptide immunization using microneedles.

研究代表者

鬼頭 由紀子 (KITO YUKIKO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30572854

研究成果の概要(和文):角層を剥離した皮膚へ抗原ペプチドを塗布すると物質の浸透が高まり、かつ活性化されたランゲルハンス細胞がリンパ節へ遊走し、ペプチド特異的キラーT細胞が誘導される。Stage III/IVのメラノーマ患者約60名に経皮免疫療法を行ったところ、約半数の患者において腫瘍特異的キラーT細胞が誘導され、皮膚転移層に多数浸潤していることが確認された。そこで、角層を剥離した皮膚にマイクロニードルでワクチンを投与すれば、皮膚自体がアジュバント化し、高いワクチン効果が得られると考え、検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

Removal of stratum corneum induces increase in the permeability of the skin. Application of antigen peptides to this predisposed skin activates and initiates migration of Langerhans cells to lymph nodes, which results in the induction of peptide specific killer T cells.

Previously, we performed percutaneous peptide immunization in 60 patients with stage III/IV malignant melanoma. Tumor specific killer T cells were induced in more than 50% of treated patients, and immunohistochemical study revealed the presence of induced tumor specific killer T cells within the metastatic skin lesion.

Accordingly, we sought to evaluate the effect of peptide immunization by using microneedles, in postulation that the use of microneedles will enhance the vaccination efficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：マイクロニードル、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

感染症、癌、アレルギー等のワクチン治療では、従来、注射針を用いた皮内、皮下、筋肉内へのワクチン投与が行われている。この方法は簡便ではあるが、痛み、出血など患者に与える精神的、肉体的負担が大きい。また、施術者では、針刺し事故の心配もある。さらに、ワクチン素材単独では治療効果が高くないため、種々のアジュバントが添加されて同時に投与されるが、これら物質による様々な副作用も報告されている。従来の注射針を用いた感染症、癌、アレルギー等のワクチン治療では、ワクチン素材単独では治療効果が高くないため、種々のアジュバントが添加されているが、これによる副作用も報告されている。これに対し、角層を剥離した皮膚では皮膚ランゲルハンス細胞が活性化され、かつ菲薄化した角層からの物質の浸透性が高まることが分かっている。よって角層を剥離後、マイクロニードルを用いてワクチン接種をすれば、角層剥離により皮膚全体がアジュバント化するため、アジュバントを用いることなくワクチン接種を行うことができると考えた。またマイクロニードルは針の高さが微小であるため、針が血管や神経まで届かず、痛み、出血も少なく、また誤った針さしトラブルを防ぐといった効果も期待される。

2. 研究の目的

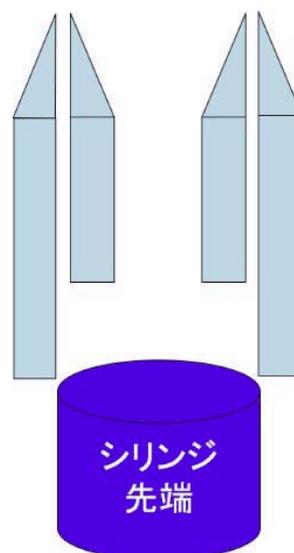
角層を剥離した皮膚において、マイクロニードルでワクチン素材を投与すれば、菲薄化した皮膚表面から均一にマイクロニードルが挿入され、かつ、アジュバントを用いることなく高いワクチン効果が得られると考えた。本研究で得られる成果は、安全で簡便でしかも高い効果が求められる今後の癌、感染症さらにはアレルギーに対するワクチン法の礎

となるに違いない。

3. 研究の方法

ラットを用いて、抜毛処理、角層剥離後、麻疹ワクチンをマイクロシリンジに装着したマイクロニードル型ワクチン接種機器を用いて投与した。さまざまな長さのニードルを用いてワクチン接種を行い、実際に投与できたワクチンの量を計測し、またELISAを用いて血清中の抗体価を測定し、最適なニードルを検証した。

また経皮免疫療法を行ったメラノーマの患者60名の皮膚転移層の生検および末梢血を採取し、免疫染色および、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。



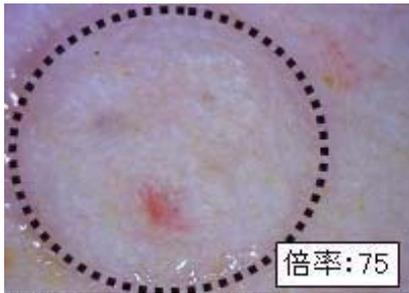
マイクロニードルの形状。微小かつ中空の突起状の針が均一に揃っているのが特徴である。

4. 研究成果

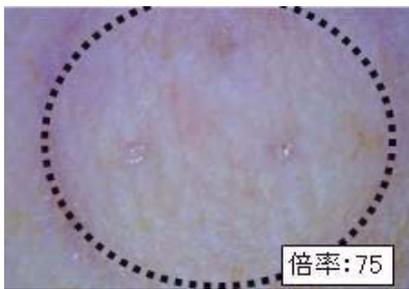
当初、表皮下層から真皮上層までしか針が届かず、血管や神経を傷つける可能性の低い、針の長さ $100\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 、針の数3-25本のマイクロニードルを作成したが、ワクチンを注入することが不可能であった。

そこで、ラットの背部に $1000\mu\text{m}$ の針と $1500\mu\text{m}$ のマイクロニードルを使用し麻疹ワクチンを $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $30\mu\text{l}$ 、それぞれ3匹ずつ投与した。漏れた薬液を綿棒にて吸い取り、その重さから漏れた量、投与できた量を確認した。また麻疹抗体価を投与22、29、36日目に測定した。

① $1000\mu\text{m}$ の針を使用した群ではワクチンの漏れが多く、実際のワクチンの投与量は、平均で予定量の50.4%しか投与できなかったが、 $1500\mu\text{m}$ の針を使用した群では、平均で予定量の93.3%を投与することができた。



$1000\mu\text{m}$ のマイクロニードルを使用してワクチンを摂取した後。多量のワクチンが漏れているのが分かる。



$1500\mu\text{m}$ のマイクロニードルを使用してワクチンを摂取した後。ほぼ100%のワクチンが摂取できた。

② $1000\mu\text{m}$ の針を使用した群の結果（投与36日目）EIA法
麻疹ワクチンを $10\mu\text{L}$ 投与したときの抗体

価の平均は8.6

麻疹ワクチンを $20\mu\text{L}$ 投与したときの抗体価の平均は13.2

麻疹ワクチンを $30\mu\text{L}$ 投与したときの抗体価の平均は8.9

③ $1500\mu\text{m}$ の針を使用した群の結果（投与36日目）

麻疹ワクチンを $10\mu\text{L}$ 投与したときの抗体価の平均は13.4

麻疹ワクチンを $20\mu\text{L}$ 投与したときの抗体価の平均は17.0

麻疹ワクチンを $30\mu\text{L}$ 投与したときの抗体価の平均は16.1であった。

以上をまとめると、 $1000\mu\text{m}$ の針でもワクチンの漏れが大きいが、 $1500\mu\text{m}$ の針を使用した群では、平均で予定量の93.3%のワクチンを投与することができ、また、抗体価も投与量と比例して上昇した。よって針の長さは $1500\mu\text{m}$ が適切であると考えられた。



ワクチン接種の様子

また本年までで Stage III/IV のメラノーマ患者約60名に経皮免疫療法を行ったところ、約半数の患者に腫瘍特異的キラーT細胞が誘導され、縮小傾向にあるメラノーマ皮膚転移巣を切除し腫瘍内浸潤リンパ球を解析したところ、腫瘍特異的キラーT細胞が多く浸潤していることが確認された。また生命予後の有意な改善も認められた。今後本研究を癌、感染症、アレルギーに対するワクチン法へと応用できればと考えている。

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3件) いずれも査読あり

1. Kito Y, Hashizume H, Tokura Y.
Rosacea-like Demodicosis Mimicking
Cutaneous Lymphoma.
Acta Derm Venereol. 2012, 169-170

2. Kito Y, Ito T, Tokura Y, Hashizume H.
High-dose intravenous immunoglobulin monotherapy
for drug-induced hypersensitivity syndrome. Acta
Derm Venereol. 92(1), 2012, 100-101

3. 鬼頭由紀子、戸倉新樹、中島大毅アトピー
一性皮膚炎と好酸球性膿疱性毛包炎は合併
するか Visual Dermatology
10(12), 2011, 1312-1313

[学会発表] (計1件)

鬼頭由紀子、間嶋祐太、橋爪秀夫、戸倉新樹
マイコプラズマの関与が疑われ Sweet
病様の臨床像を呈した2例

第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学
会総会学術大会

2011年7月16日 甲府市

6. 研究組織

(1) 研究代表者 鬼頭 由紀子

(KITO YUKIKO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30572854

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：