

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390041

研究課題名(和文) 自己溶解型マイクロニードルパッチを応用したインフルエンザ経皮ワクチン製剤の開発

研究課題名(英文) Development of the transcutaneous influenza vaccine formulation using a self-dissolving microneedle patch

研究代表者

岡田 直貴 (OKADA, NAOKI)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90312123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、独自に開発した自己溶解型マイクロニードルパッチを基材とする経皮ワクチン製剤の開発に向けた基礎情報収集と基盤技術熟成を図った。また、ヒトにおける本製剤の安全性と有効性を検証する臨床研究を実施することによって、経皮ワクチン製剤の治験・製品化研究への移行期間の短縮に焦点を当てた。さらに、Toll様受容体リガンドを中心に経皮ワクチン製剤用のアジュバントとして有望な候補物質の探索を推進し、ワクチン抗原の用量や投与回数、免疫応答増強に基づく安定した有効性発揮を達成できる未来型インフルエンザ経皮ワクチン製剤の創出に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：In this study, we made efforts for collection of the basic information and improvement of the fundamental technology for the development of the transcutaneous vaccine formulation using our original self-dissolving microneedle patch. Also, we focused on shortening for the transition period to the clinical trial and the manufacture study of the transcutaneous vaccine formulation by conducting clinical research to investigate safety and efficacy. Furthermore, we pushed forward with the screening of a promising candidate as adjuvant for transcutaneous vaccine formulations mainly on Toll-like receptor ligands and attempted to create the future-type transcutaneous influenza vaccine formulation capable of achieving stable efficacy based on the vaccine dose reduction, the vaccination frequency reduction, and the immune response reinforcement.

研究分野：薬剤学、免疫学

キーワード：ワクチン マイクロニードル インフルエンザ 臨床研究

1. 研究開始当初の背景

感染症対策において抗生物質などの陰に隠れていたワクチンが、根本的予防における唯一の手段として世界的に高い関心を集めている。本邦においても、新興・再興感染症パンデミックの発生、バイオテロリズムの恐怖、感染症の危険が多い海外旅行者の増大、高齢化・高度医療に伴う日和見感染症の増加等、感染症に関連する多くの問題を抱えており、国民の社会活動や医療の現場において大きな損失をもたらす感染症への万全の予防対策が求められている。

2009年にWHOがフェーズ6の宣言をしたH1N1亜型インフルエンザは、幸いにも病原性が弱く致死率も1%未満とされていることから社会・経済活動に大きな影響を与えていないものの、H5N1鳥インフルエンザウイルスや、H7、H9といった他のインフルエンザウイルスのヒトへの感染が散発的に発生しており、これらはいずれも致死率が数%台～60%程度と非常に強い病原性を有している。1918年に発生したスペイン風邪の致死率が2%～3%であったこと、またH1N1亜型インフルエンザでも明らかなように世界的な感染拡大は事実上防ぎきれないものではないため、一旦致死率の高い新興・再興感染症のヒト-ヒト感染が起これば、国家機能をも破綻させかねないパンデミックが避けられないと強く予想される。そのため、短期間で大量にワクチンを供給できる製造技術の一刻も早い開発が待望されているとともに、パンデミック発生時に接種されることを想定したワクチン製剤化技術の開発も併せて進められるべきである。

経皮ワクチン製剤(貼るワクチン)は使用方法が皮膚に貼付するだけという簡便性のために、ワクチンの迅速大規模接種や注射針に対して恐怖症のある小児へのコンプライアンス向上に極めて効果的である。さらには、従来の注射ワクチン製剤で必要とされる生産から消費までの一貫した低温温度管理(cold chain)が不要でコストダウンが図れる。これらの特長は開発途上国へのワクチン普及を強力に推進するとともに、新興・再興感染症パンデミックやバイオテロリズム発生時に本邦の社会的・経済的損耗を最小限に食い止める方策に威力を発揮する。すなわち、注射に代わる有効かつ簡便・安全・安価・低侵襲な経皮ワクチン手法の開発は、国際的な関心が高く、その応用製品に対して早期の上市・普及が大いに期待されるとともに、我が国の感染症に対する国際貢献・国防政策に重要な指針を与える急務の研究課題と言える。

2. 研究の目的

本研究課題では、独自に開発した自己溶解型マイクロニードルパッチを基材として応用する季節性インフルエンザに対する経皮ワクチン製剤の開発に向けた基礎情報の収

集と基盤技術の熟成を図るとともに、ヒトにおける本製剤の安全性と有効性を検証する臨床研究を実施することによって、新型インフルエンザパンデミックの抑止に貢献する経皮ワクチン製剤の治験・製品化研究への移行期間の短縮に焦点を当てた。また並行して、Toll様受容体(TLR)リガンドを中心に経皮ワクチン用アジュバントとして有望な候補物質を探索した。経皮ワクチンに有用なアジュバントが存在しない現状においては、免疫応答の増強や修飾を達成しうるアジュバント候補物質を新たに探索・同定し、その安全性・有効性評価と活性発現機序解明を独自に推進する必要がある。本成果を経皮ワクチン製剤に導入することで、抗原特異的IgG抗体産生(体液性免疫応答)の誘導のみならず、インフルエンザワクチンに求められる細胞性免疫応答および粘膜免疫応答の活性化をも達成できる未来型のインフルエンザ経皮ワクチン製剤の創出を図る。最終的には、本研究課題において得られる成果を経皮ワクチン製剤の実用化研究を加速する基礎情報として活用し、我が国発の経皮ワクチン製剤の一日も早い上市・臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザ経皮ワクチン製剤の基礎研究

針形状・針長等が異なる数種類の自己溶解型マイクロニードルパッチに種々の用量の季節性インフルエンザHA抗原を装填した経皮ワクチン製剤を作製した。これらについて装填抗原量均一性、装填抗原の安定性、皮膚への針部刺入特性を評価した。

(2) インフルエンザ経皮ワクチン製剤の前臨床研究

三価季節性インフルエンザHA抗原を装填した経皮ワクチン製剤を除毛したマウス背部皮膚に貼付し、経時的にHA抗原特異的抗体価を測定した。また、インフルエンザウイルスA/PR/8/34(H1N1)株(マウスに感染する)由来のHA抗原を装填した経皮ワクチン製剤をマウスの背部皮膚に適用し、その後A/PR/8/34株を経鼻感染させた際の一般状態・体重のモニタリング、肺の肉眼的・病理学的観察、肺中ウイルス量の測定、等を行った。

(3) インフルエンザ経皮ワクチン製剤の臨床研究

倫理委員会の審査・承認を経て、GMP準拠で製造した三価季節性インフルエンザ経皮ワクチン製剤について、健康成人ボランティアを対象とした安全性評価を実施した(プライマリーエンドポイント)。安全性が確認された時点で、血中抗HA IgG抗体価ならびに鼻腔洗浄液中抗HA IgA抗体価の上昇を指標に本経皮ワクチン製剤のヒトにおける有効性を評価した(セカンダリーエンドポイン

ト)

(4) 経皮ワクチン用アジュバントの探索

各種 TLR リガンド (Pam3CSK4、LTA、FSL-1、Poly(I:C)、MPLA、Flagellin、Imiquimod、ssRNA40、CpG-DNA 等) と OVA とを混合装填した自己溶解型マイクロニードル製剤をマウスの背部皮膚に適用し、アジュバント効果および安全性を評価した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザ経皮ワクチン製剤の基礎研究

長期保管後におけるインフルエンザ経皮ワクチン製剤の針部耐荷重値は、作製直後と比較すると耐荷重値が 20~50%低下していたが、皮膚への穿刺能力は担保されるレベルと判断された。また、この針部耐荷重値低下と保管温度との間に関連性は認められなかった。さらに、本経皮ワクチン製剤に装填された HA 蛋白量については、いずれの保管温度においても作製直後から 6 ヶ月後まで安定に維持されていることを確認した。

(2) インフルエンザ経皮ワクチン製剤の前臨床研究

三価季節性インフルエンザ HA 抗原を装填した自己溶解型マイクロニードルパッチにて経皮ワクチンしたマウスにおいては、三価 HA 抗原それぞれに対して特異的な IgG 抗体の産生が血清中に検出された。また、それらの抗体価は筋肉内注射群 (アラム併用)、皮内注射群 (アラム併用)、および経鼻投与群 (コレラトキシン併用) の抗体価と比較して同等もしくはそれ以上であり、アジュバントを併用しなかった筋肉内注射群、皮内注射群、および経鼻投与群の抗体価と比較すると明らかに高値を示した。また、産生された HA 特異的 IgG 抗体のサブクラス解析を行ったところ、経皮投与群における IgG2a 抗体 (Th1 型) と IgG1 抗体 (Th2 型) の産生比率は他の免疫群と比較して明らかな差異は認められなかった。

A/PR/8/34 (H1N1) 株由来のインフルエンザ HA 抗原とウイルスを用いて、経皮ワクチン製剤の感染防御効果を検討した。最終免疫から 2 週間後のマウスに A/PR/8/34 (H1N1) 株インフルエンザウイルスを経鼻接種し、その後の状態観察および感染防御能評価を行った。経皮投与群および経鼻投与群 (コレラトキシン併用) においては接種 1 日後から 3 日後にかけて軽度の体重減少が認められたが、観察終了時の 6 日後においては接種 3 日後の体重と比べて維持、または若干の増加傾向を示した。接種 3 日後までの体重の減少は、ウイルス接種前の体重の 10%以内の減少であった。これに対して、経皮プラセボ群ではウイルス接種後から体重が減少し続け、接種 4 日後には 10 例中 1 例が死亡し、接種 6 日後には接種前の体重から 30%も減少していた。

さらに一般状態を観察した結果、経皮プラセボ群では被毛状態の悪化および行動やその他の症状の悪化が観察され、接種 6 日後における一般状態が中程度から重度であったのに対し、経皮投与群ならびに経鼻投与群 (コレラトキシン併用) では被毛状態の悪化、およびその他の症状が観察されたのみであり、軽度のスコア上昇であった。筋肉内注射群は被毛状態の悪化が認められたが、その他の症状は観察されず、経皮投与群ならびに経鼻投与群 (コレラトキシン併用) と比較して低いスコアであった。

肺中のインフルエンザウイルス量をプラークアッセイ法により測定した結果、経皮投与群、筋肉内注射群、および経鼻投与群 (コレラトキシン併用) では検出限界以下であった。したがって、経皮ワクチンにより誘導された HA 特異的抗体はインフルエンザウイルスに対する感染阻止活性を有しており、インフルエンザの発症予防に効果的であることが実証された。

(3) インフルエンザ経皮ワクチン製剤の臨床研究

三価季節性インフルエンザ HA 抗原を装填したインフルエンザ経皮ワクチン製剤を作製し、ヒトへの適用における安全性ならびに有効性を検証する臨床研究を実施した。

まず、本製剤を被験者の上腕外側皮膚に貼付し、皮膚局所反応について経時的に検討した。経皮投与群の被験者全員においてパッチ製剤貼付部位に紅斑を認めたが、時間経過とともに回復する傾向にあった。一方、皮下注射群では、1 回目のワクチン投与から 2 日後に紅斑が認められた被験者数は 5 人と少なかったが、21 日後においても約半数の被験者では注射針の穿刺痕が判別できた。両群での紅斑出現頻度の差異については、皮下注射における皮下組織に投与した HA 抗原に対する生体反応 (炎症) が外面的に判別しづらいのに対して、経皮投与によって皮膚表層に送達された HA 抗原に対する炎症は容易に識別されたことに起因すると考えられる。また、1 回目のワクチン投与後と比較して 2 回目のワクチン投与後のほうが、両群とも紅斑が認められた被験者数は多くなり、それらの紅斑が消失するまでの期間も長くなることが判明した。これは、1 回目のワクチン投与によって被験者の HA 抗原特異的免疫応答が活性化されたことに伴う変化だと推察された。硬結はワクチン投与 2 日後に両群それぞれ一部の被験者に確認されたが、7 日後には消失した。圧痛や熱感、皮下注射群のほうが経皮投与群よりも僅かながら高頻度に観察される傾向にあった。水疱は両群のいずれの被験者にも認められなかった。

次に、インフルエンザ経皮ワクチン製剤の適用が全身性副反応を誘発する可能性について血液検査値を指標に検証した。血算検査ならびに生化学検査において、経皮投与群お

よび注射投与群ともにいずれの検査値についてもワクチン投与に起因する明らかな変化はなかった。

以上の安全性評価に関する結果をまとめると、インフルエンザ経皮ワクチン製剤は貼付部位の皮膚局所に対して刺激性や起炎性を示すものの、それらはワクチン接種において容認される範囲の生体反応であり、ヒトへの適用を妨げる局所性および全身性の重篤な副反応は認められなかった。そこで、セカンドリーエンドポイントである本製剤のヒトでの有効性を評価した。

経時的に被験者から採取した血清中の HI 価を測定し、抗体陽転率、抗体保有率ならびに抗体変化率を算出した。これらのパラメータをインフルエンザワクチンの有効性評価における国際基準である欧州医薬品庁 (EMA) 基準に則って解析した。両群ともに、A/California/7/2009 (H1N1) 株由来 HA 抗原に対する HI 価の上昇が最も顕著であり、B/Brisbane/60/2008 株由来 HA 抗原に対する HI 価は上昇しにくい傾向が認められた。EMA 基準での判定において、経皮投与群の A 型株に対する有効性は皮下注射群に匹敵し、B 型株に対するワクチン効果については経皮投与群のほうが皮下注射群よりも高いことが判明した。

(4) 経皮ワクチン用アジュバントの探索

アジュバント候補物質と OVA の混合溶液をマウスに経皮投与したところ、CpG-ODN を併用した群ではわずか 1 回の投与で OVA 特異的抗体価の明らかな上昇が認められた。そこで、CpG-ODN を有望な経皮ワクチン用アジュバント候補物質として以降の検討を実施した。

OVA 単独投与群においては、Th2 型サブクラスである IgG1 と IgG2b の抗体価上昇が検出され、Th1 型の IgG2c の抗体価は検出限界以下であった。これに対して CpG-ODN 併用群では、IgG1 と IgG2b の抗体価上昇が一層増強されるとともに、IgG2c 抗体価の著しい上昇が認められた。また、これらのマウスから調製した脾細胞について、OVA 特異的な IFN- γ 産生細胞数あるいは IL-4 産生細胞数を比較検討した。CpG-ODN 併用群では、OVA 単独投与群と比較して IFN- γ 産生細胞数は 2 倍以上の増加を示し、経皮ワクチン用アジュバントとして CpG-ODN を併用すると免疫応答を Th1 優位に活性化することが示唆された。

抗原特異的免疫応答の誘導には抗原提示細胞による抗原捕食とそれに続く T 細胞への抗原提示が必要となる。経皮免疫においては、皮膚特有の抗原提示細胞として生きた表皮にランゲルハンス細胞が、真皮には真皮樹状細胞が存在する。そこで、C57BL/6 マウス由来のこれらの細胞に CpG-ODN を作用させたところ、共刺激分子である CD40 や CD80/86、MHC class I/II、さらには抗原提示細胞のリンパ節遊走に必須な CCR7 の発現上昇が認められた。

CpG-ODN の経皮投与によるアジュバント効果が TLR9 のシグナル伝達に依存した反応であることの確証を得るために、TLR9 欠損マウスを用いた検討を行った。野生型マウスにおいては、OVA のみを経皮投与した場合と比較して CpG-ODN を混合経皮投与することで、血清中 OVA 特異的抗体産生誘導に明らかな増強効果が認められた。一方、TLR9 欠損マウスでは OVA 単独投与群と OVA/CpG-ODN 混合投与群との間で抗体価の差異が認められなかったことから、CpG-ODN の経皮投与により発揮されるアジュバント効果は TLR9 を介した反応に基づくことが示された。

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 19 件)

Sachiko Hirobe, Hiroaki Azukizawa, Takahiro Hanafusa, Kazuhiko Matsuo, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Ichiro Katayama, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch: *Biomaterials* 57: 50-58 (2015): 査読有

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.007

Sachiko Hirobe, Hiroaki Azukizawa, Kazuhiko Matsuo, You Zhai, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Hiroshi Suzuki, Ichiro Katayama, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Development and clinical study of a self-dissolving microneedle patch for transcutaneous immunization device: *Pharm. Res.* 30(10): 2664-2674 (2013): 査読有

DOI: 10.1007/s11095-013-1092-6

Yasuhiro Hiraishi, Takeshi Nakagawa, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: Performance and characteristics evaluation of a sodium hyaluronate-based microneedle patch for a transcutaneous drug delivery system: *Int. J. Pharm.* 441(1-2): 570-579 (2013)

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.10.042

Kazuhiko Matsuo, Yayoi Yokota, You Zhai, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Yohei Mukai, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa: A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedles patch for soluble and particulate antigens: *J. Control. Release* 161(1): 10-17 (2012)

DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.033
Kazuhiko Matsuo, Sachiko Hirobe,
Yayoi Yokota, Yurika Ayabe, Masashi
Seto, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama,
Takahiro Tougan, Toshihiro Horii,
Yohei Mukai, Naoki Okada, and Shinsaku
Nakagawa: Transcutaneous
immunization using a dissolving
microneedle array protects against
tetanus, diphtheria, malaria, and
influenza: *J. Control. Release*
160(3): 495-501 (2012)
DOI: 1016/j.jconrel.2012.04.001

〔学会発表〕(計4件)

岡田直貴: 経皮デリバリー技術を応用
した貼るワクチン製剤の開発: 第31回
日本 DDS 学会学術集会 [東京都 (新宿
区), 2015年7月2-3日]: ワークショッ
プ招待講演

岡田直貴: 経皮デリバリー技術を活用
したワクチン・免疫製剤の開発: 日本薬
学会第135年会 [兵庫県 (神戸市),
2015年3月26-28日]: シンポジウム招
待講演

岡田直貴: 新しいデバイスによる経皮
免疫療法の可能性: 第51回日本小児ア
レルギー学会 [三重県 (四日市市),
2014年11月8-9日]: シンポジウム招待
講演

岡田直貴: 日本発、世界初の貼るワクチ
ンの開発: 第30回日本 DDS 学会学術集
会 [東京都 (港区), 2014年7月30-31
日]: シンポジウム招待講演

岡田直貴: 経皮ワクチン製剤 (貼るワ
クチン) の基礎から臨床: 日本薬学会
第133年会 [神奈川県 (横浜市), 2013
年3月28-30日]: シンポジウム招待講
演

岡田直貴: The cutting edge of the
transcutaneous vaccine development
(経皮 (貼る) ワクチン開発の最前線):
第86回日本細菌学会総会 [千葉県 (千
葉市), 2013年3月18-20日]: ワークシ
ョップ招待講演

岡田直貴: 世界初、日本発の貼るワクチ
ンの実用化を目指して: 第4回経皮投与
製剤 FG シンポジウム [東京都 (品川区),
2012年11月19日]: シンポジウム招待
講演

岡田直貴: マイクロニードル型経皮ワ
クチン製剤の実用化を目指して: 第16
回日本ワクチン学会学術集会 [神奈川
県 (横浜市), 2012年11月17-18日]:
シンポジウム招待講演

岡田直貴: 本邦発の経皮ワクチン製剤
の実用化を目指して: 第28回日本 DDS
学会学術集会 [北海道 (札幌市), 2012
年7月4-5日]: ワークショッパ招待講
演

〔図書〕(計10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貼るワクチンの
開発: “注射剤・経口製剤に代わる新し
い薬剤投与デバイスの開発” 技術情報
協会: 41-45 (2014)

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: 経皮
ワクチン: “ワクチン開発における最新
動向~規制動向・安全性評価・品質管
理・アジュバント・開発事例~” 情報
機構: 197-211 (2013)

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: 経皮
ワクチン: “応用が広がる DDS - 人体環
境から農業・家電まで - ” エヌ・ティ
ー・エス: 310-318 (2013)

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: 皮膚
内溶解型マイクロニードルを用いた経
皮ワクチン製剤の開発: “非経口投与製
剤の開発と応用 - 次世代型医薬品の新
規投与形態の開拓を目指して - ” シー
エムシー出版: 172-178 (2013)

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: 経皮
ワクチン製剤の DDS 技術の動向と実用化
の可能性: “DDS 製剤の開発・評価と実
用化手法” 技術情報協会: 186-193
(2013)

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作: 皮膚
を標的とした新規ワクチン製剤「貼るワ
クチン」の開発: “遺伝子医学 MOOK 別
冊 - ここまで広がるドラッグ徐放技術
の最前線 - 古くて新しいドラッグデリ
バリーシステム (DDS) - ” メディカル
ドゥ: 277-282 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: レチノイン酸マイクロニードル
発明者: 権 英淑, 神山文男, 斎藤美生, 中
川晋作, 岡田直貴, 廣部祥子, 浅田秀夫
権利者: コスメディ製薬株式会社, 国立大学
法人大阪大学, 奈良県立医科大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-253664
出願年月日: 平成 24 年 11 月 2 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.phs.osaka-u.ac.jp/information/topics_detail.cgi?id=1353386678

http://www.phs.osaka-u.ac.jp/information/topics_detail.cgi?id=1367471314

http://www.phs.osaka-u.ac.jp/information/topics_detail.cgi?id=1372214412

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 直貴 (OKADA, Naoki)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：9 0 3 1 2 1 2 3