

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08108

研究課題名(和文) 抗原・アジュバント複合化ナノ粒子を用いた経皮ワクチンシステムの開発

研究課題名(英文) Development of nano-composite particle for transdermal vaccination system

研究代表者

藤井 まき子 (FUJII, Makiko)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：50199296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚に浸透しやすい油性基剤を用いた経皮ワクチンの開発を試みた。抗原タンパクは親水性で油に配合することは難しい。軽質流動パラフィンを用いたレシチン逆紐状ミセルに極性物質として配合する少量の水にグリセリンを添加し、そこに抗原タンパクOVAを加えることにより安定性に優れた製剤が調製できた。本製剤は皮膚の微小な間隙に入り込みやすいレオロジー特性を持ち、蛍光標識OVAの皮膚移行が改善された。ヘアレスマウスに適用したところ、皮下注射では著しい抗体価の上昇が見られたが、皮膚適用では閉塞投与で有意な抗体価の上昇が見られたが、効果は小さかった。今後さらに皮膚移行を高める方法との併用を検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Oil based formulation for transdermal vaccine was developed. Oil easily penetrates in stratum corneum, however, it is hard to combine hydrophilic materials such as protein type antigen. We developed lecithin reverse wormlike micellar solution with light type liquid paraffin as oil, and water/glycerin mixture as polar material and succeeded to mix ovalbumin. Rheological characteristics of this formulation showed appropriate for penetration in narrow pore of the skin. The penetration of FITC-OVA into the skin was improved. Subcutaneous injection of this formulation increased OVA antibody value about 100-times higher than that of OVA solution. The formulation also increased antibody after skin application with closed condition, however, it was not large enough. It is necessary to combined use of other penetration enhance methods.

研究分野：薬剤学

キーワード：経皮 ワクチン レシチン逆ひも状ミセル

1. 研究開始当初の背景

感染の予防にはワクチン投与が重要であるが、原則として注射投与である。近年、経皮ワクチンが注目されているが、抗原は皮膚透過しにくいいため、マイクロニードルによる強制的な皮膚内投与が中心で、これは本質的には注射と変わらない。皮膚には免疫細胞としてランゲルハンス細胞が多数存在することが知られているが、皮膚に刺激を与えると、休止状態のランゲルハンス細胞が活性化し、表皮に存在するタイトジャンクションから樹状突起を出し、抗原を取り込むことが報告されている。このことは、マイクロニードルのように表皮内まで抗原を送達しなくても、角層下まで送達すれば免疫が確立する可能性を示している。

ヘアレスマウスを用いた検討より、脱毛により局所のランゲルハンス細胞が数日間活性化するが、毛包内へのナノ粒子の蓄積を高めるのは脱毛直後のみであり、翌日にはそのような作用は見られないことを明らかとした。ナノ粒子を経皮適用すると脱毛直後に適用した場合、毛包に蓄積しやすいことを見出した。また、卵白アルブミン(OVA)をモデル抗原、アジュバンドとして酸化チタンナノ粒子を用いた製剤をヘアレスマウスに投与したところ、皮下注射ではOVA単独に比べ酸化チタンが共存することにより有意に抗体価の上昇が見られたが、皮膚適用では効果が見られなかった。これは基剤が水性で、皮膚との親和性が低いことが一因であると考えられた。

2. 研究の目的

抗原タンパクの皮膚移行性を高めるため、皮膚に浸透しやすい油性基剤に着目した。しかし、抗原タンパクは親水性で油に配合することは難しい。そこで、抗原及びアジュバンドを少量の水に溶解又は分散し、これを油相にナノ分散させた油性基剤を調製し、皮膚への抗原の送達能の高い製剤の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試薬

大豆レシチン(ホスファチジルコリン含量95%)はH. Holstein GmbH & Co.製のものをを使用した。流動パラフィン(ハイコールK-160)はカネダ株式会社製の食品添加物規格に合格したものをを使用した。水は大塚製薬社製の注射用水を使用した。グリセリン(GL)は関東化学株式会社製(特級)を使用した。ニワトリ卵白由来アルブミン(OVA)はSIGMA-ALDRICH. Co製のものをを使用した。オボアルブミンフルオレセイン標識体(FITC-OVA)はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製のものをを使用した。

(2) レシチン逆紐状ミセルの調製方法

GL水溶液(GLaq.)にOVAを溶解し、OVA/GLaq.

を作製した。バイアルに、レシチン、流動パラフィン、OVA/GLaq.を量り取りマグネチックスターラーを用いて攪拌した。なお、レシチンは30wt%とした。共焦点レーザー顕微鏡で観察する際には、OVAの代わりにFITC-OVAを用いた。

(3) 相状態図の作成

GL濃度、OVA濃度、OVA/GLaq.の添加濃度を変えた際の相状態を目視、偏光顕微鏡(ECLIPSE E600W POL, 株式会社ニコン, 東京)にて判別した。

(4) レオロジー測定

レオロジー測定は、ペルチェ温度コントローラーを装着したストレス制御式レオメーター(HAAKE MARS, Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA)を用い、パラレルプレートセンサー(直径35mm, ギャップを0.52mm)を用いて32で行った。定常流粘度測定は段階的にせん断応力を上げ、各ステップでせん断速度が安定した値を測定して粘度を算出した。動的粘弾性測定は、線形粘弾性領域内のひずみ()を用いて、貯蔵弾性率(G')および損失弾性率(G'')の周波数()依存性を調べた。また、溶媒の蒸発を防止するためにソルベントトラップを用いて測定を行った。

(5) *In vitro* 皮膚移行実験

Yucatan micropig (YMP, 日本チャールスリバー株式会社, 神奈川)皮膚に試料を100 mg/cm²塗布し、32 恒温槽中に24時間置いた。皮膚上に残ったサンプルを取り除き、さらにテープストリッピングを1回行った。OCTコンパウンド(ティシュー・テック O.C.T. コンパウンド, サクラファインテックジャパン株式会社, 東京)に包埋し、凍結した。20 μm厚さの切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, カールツァイスマイクロコピー株式会社, ドイツ)を用いて、フルオレセインの緑色蛍光を観察した。なお、適用製剤の処方を表1に示す。

表1 *In vitro* 実験に用いた OVA 含有レシチン逆紐状ミセルの処方 (wt%)

	A-2 (1.75wt%)	C-1 (1.75wt%)	C-3 (2.63wt%)
Lecithin	30	30	30
50 mg/g OVA in 0% GLaq.	1.75		
50 mg/g OVA in 50%GLaq.		1.75	
150 mg/g OVA in 50%GLaq.			2.63
LP	68.25	68.25	67.37

(6) *In vivo* 感作実験

6週齢雄性ヘアレスマウス(HR-1, 星野実験動物)を1週間馴化後、シアノアクリレートストリッピング後の背部に2週毎3回、試料

を単純塗布又はフィンチャンパーを用いて閉塞投与した。最終投与の1週間後、採血を行い、OVA 特異的 IgG 抗体価を Ovalbumin IgG2a ELISA Kit (コスモバイオ)を用いて測定した。また、皮下投与により OVA の抗原性を確認した。なお、本実験は日本大学動物実験委員会の許可(承認番号 AP16P010)を得て行った。

4. 研究成果

(1) 皮膚浸透に適した油の選択

基剤の皮膚との親和性を考慮し、適切な油性基剤を選択するために皮膚塗布時の基剤の状態を共焦点レーザー顕微鏡を用いてリアルタイムで観察する方法を開発した。種々の油の適用直後の皮膚表面、表皮での移動状況を蛍光物質ナイルレッドを用いて観察したところ、油の粘性、表面張力により毛包への侵入が異なることが明らかとなった。外用剤として使用前例があるものとしては、軽質流動パラフィンやミリスチン酸イソプロピルが適していると考えられた。

(2) レシチン逆紐状ミセルの生成条件

軽質流動パラフィンが皮膚への浸透性が良好であることが分かったが、流動パラフィンには水溶性薬物の添加が困難である。そこで、軽質流動パラフィンを用いたレシチン紐状ミセルへの OVA の添加を試みた。

レシチン逆紐状ミセルの生成条件を詳細に検討するために、GL 濃度、OVA 濃度、OVA/GLaq. の添加濃度を变化させた際の相状態を調べた。図 1 は GL 濃度を 0~50%、OVA 濃度を 20~150 mg/g、OVA/GLaq. 添加濃度を 0.5~4.0 wt% の範囲で变化させた際の相図を示す。液晶ゲル形成領域は黄色、半透明の逆紐状ミセル形成領域は赤色、逆紐状ミセル中に OVA が析出し白濁した領域は緑色、分離してゲル化しなかった領域は灰色で示す。

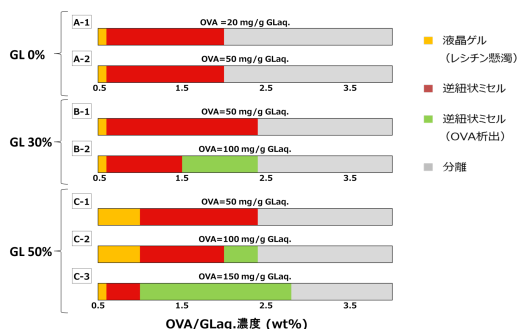


図 1 相状態に及ぼす OVA/GLaq.添加濃度の影響

いずれの系においても、OVA/GLaq. の添加濃度が少ないと、ラメラ液晶から成るゲル(液晶ゲル)が形成し、さらに OVA/GLaq. の添加量が増えると逆紐状ミセルへと変化し、最終的には相分離することがわかった。

逆紐状ミセル形成領域(赤色および緑色)は、GL 濃度が増加するのに伴い広がること

がわかった。これは、水の代わりに GL を極性物質に用いると逆紐状ミセルの形成領域が広がるためである。また、GL を含有する系では逆紐状ミセル中に OVA が析出しても安定なことがわかった。ちなみに OVA が析出した理由は、OVA に溶媒和していたグリセリンと水がレシチン逆紐状ミセルの形成に使われてしまうためである。また、レシチン逆紐状ミセル中の OVA 含有量を比較すると、GL 濃度および OVA 濃度がそれぞれ 0%および 50 mg/g の系(A-2)では OVA 含有量は 0.083wt%であったのに対し、GL 濃度および OVA 濃度がそれぞれ 50%および 150 mg/g の系(C-3)では OVA 含有量は 0.342wt%であった。

以上の結果より、水の代わりにグリセリン水溶液(GLaq.)を用いることで、製剤中の OVA の添加濃度を高めることができた。

(3) レシチン逆紐状ミセルのレオロジー特性

レシチン逆紐状ミセルのレオロジー挙動に及ぼす OVA/GLaq. 添加濃度および GL 濃度の影響について検討した。

図 2(a)には OVA/GLaq. 添加濃度を変えた際のレシチン逆紐状ミセルの動的粘弾性測定の結果を示す。動的粘弾性測定は試料に周期的ひずみを印加し、試料の貯蔵弾性率(G')と損失弾性率(G'')の変化を調べることができる。ここで、貯蔵弾性率(G')は弾性すなわち固体としての性質を反映しており、損失弾性率(G'')は粘性すなわち液体としての性質をそれぞれ反映している。OVA/GLaq. 添加濃度が 1.75wt%以下では、 G' と G'' はある周波数で交点を示し、交点よりも低周波数側では粘性成分である G'' が優位で、高周波数側

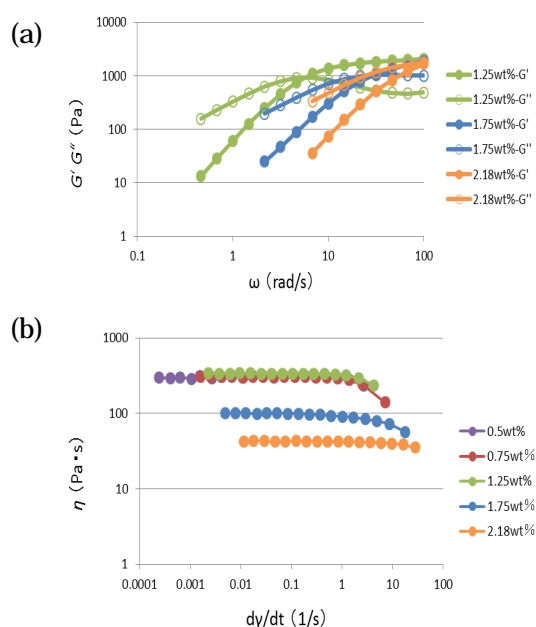


図 2 レシチン逆紐状ミセルのレオロジー特性に及ぼす OVA/GLaq.添加濃度の影響 (a)動的粘弾性測定,(b)定常流粘度測定 (GL 濃度 50%, OVA 濃度 50 mg/g, 32)

では弾性成分である G' が優位であった。このことから試料は粘弾性体であることが示された。一方、OVA/GLaq. 添加濃度が 2.18wt% では、測定した周波数の範囲において常に粘性成分の G'' が優位であったことから、試料は高粘性体であることが示された。また、低周波数側で粘性優位であることから、皮膚へ適用した際にぬれ広がり、毛包へ入り込むことができると考えられる。

図 2(b)には OVA/GLaq. 添加濃度を変えた際のレシチン逆紐状ミセルの定常流粘度測定の結果を示す。いずれの添加濃度においてもせん断速度を増加させても粘度がほぼ一定の値を示す領域を有していたことから、このせん断速度の範囲ではニュートン流動を示すことが明らかとなった。これは、このせん断速度の範囲内では逆紐状ミセルからなる網目構造が見かけ上壊れないことを示している。また、平坦部分の粘度は、OVA/GLaq. 添加濃度が 1.25 wt% までは変化がないが、それ以上では添加濃度が高くなるほど粘度は低下した。これは、OVA/GLaq. 添加量の増加に伴い、レシチン逆紐状ミセルが鎖状から分枝状に構造転移するためだと考えられる。

GL 濃度を変えた際の動的粘弾性測定および定常流粘度測定も行ったが、レシチン逆紐状ミセルのレオロジー挙動に及ぼす GL 濃度の影響は小さいことがわかった。

(4) YMP 皮膚塗布前後の試料の様子

図 3 には、サンプル A-2 (1.75wt%) および C-3 (2.63wt%) の YMP 皮膚塗布前と塗布 24 時間後の偏光顕微鏡像を示す。塗布前は光学的に等方な像が確認されたことから逆紐状ミセルを形成していることがわかる。一方、皮膚塗布 24 時間後では、典型的なラメラ液晶の偏光像であるオイリーストリークが確認されたことから、逆紐状ミセルからラメラ液晶に構造転移したことがわかった。これは、皮膚の水分がレシチン逆紐状ミセルの親水基部分に入り込み臨界充填パラメータを変化させたためである。

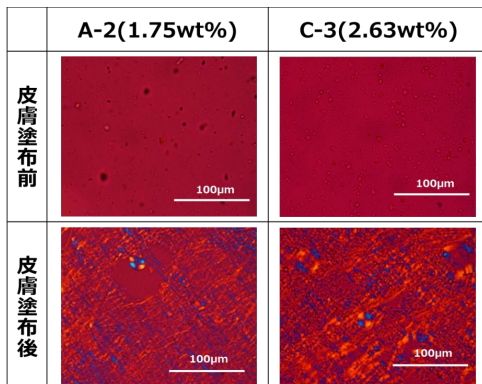


図 3 皮膚塗布前および塗布後のサンプルの偏光顕微鏡画像

(5) FITC-OVA の YMP 皮膚移行性

図 6 には、A-2 (1.75wt%), C-1 (1.75wt%), C-3 (2.63wt%) の各サンプル塗布後の皮膚切片共焦点レーザー顕微鏡画像を示す。なお、比較対象には FITC-OVA 水溶液を用いた。FITC-OVA 水溶液では、角質に沿って OVA の移行は観察されたが生きた表皮までの移行は観察されなかった。一方、A-2 (1.75wt%), C-1 (1.75wt%), C-3 (2.63wt%) では、OVA は角質層を通過し、生きた表皮までの移行が観察された。

今回検討した中で、OVA 含有量が最も少ない A-2 (1.75wt%) と最も多い C-3 (2.63wt%) を比較すると、C-3 (2.63wt%) の方が蛍光強度が強くなっており、生きた表皮の深部まで蛍光が観察された。このことから、レシチン逆紐状ミセルの OVA 含量に依存して OVA の皮膚移行量が向上し、さらに表皮のより深くまで移行することが確認された。また、皮膚移行への GL の影響を観察するために、それぞれ含有されている OVA 量が同量であるが、GL の添加の有無だけが異なる A-2 (1.75wt%), C-1 (1.75wt%) を比較すると GL が 50% 添加されている C-1 (1.75wt%) の方が生きた表皮の奥まで蛍光が観察された。このことから、GL により OVA が表皮の深くに移行し、GL に皮膚移行促進作用があることが示唆された。

これらの結果から、レシチン逆紐状ミセルによる OVA の皮膚移行の要因としては、皮膚の水分を吸収してラメラ液晶へ相転移し、OVA を放出しやすくなること、主成分のレシチンが皮膚のバリア機能を変化させること、GL に皮膚移行促進作用があることが考えられた。

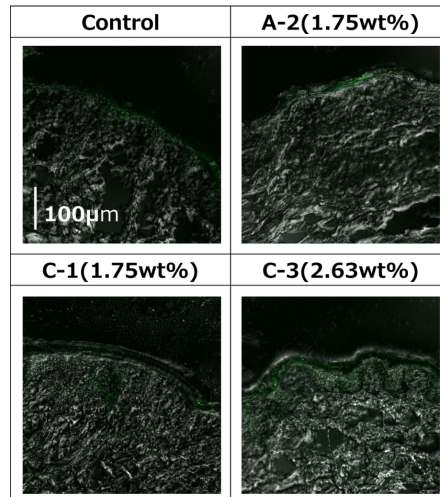


図 4 FITC-OVA の YMP 皮膚への移行

(6) *In vivo* 感作性試験

OVA の皮膚移行性の向上が見られたので、感作試験を行った。皮膚浸透性の優れていた GL50% 添加の C 系列の処方を用いた。表 2 に用いた処方を示す。アジュバントとして用いた CpG の濃度は一定とし、OVA 濃度を 10 倍変化させた。また、比較のため、OVA-CpG 水溶液を用いた。

表2 In vitro 感作性試験に用いた処方

	Rp.a	Rp.b	Rp.c
OVA	0.08	0.8	0.8
CpG	0.08	0.08	0.08
Lecithin	30	30	
Water	0.795	0.795	96.37
GL	0.795	0.795	2.75
LP	68.25	67.53	

表3 適用条件

群	処方	適用方法	面積 (cm ²)	量 (mg)	OVA (µg/body)
Control	-	-	-	-	0
a	Rp.a	open	1	10	8
b	Rp.b	open	1	10	80
A	Rp.a	open	10	100	80
B	Rp.b	open	10	100	800
B*	Rp.b	closed	2	80	640
C*	Rp.c	closed	2	80	640

油性基剤中で OVA の感作性が保たれているかを確認するため、Rp.a を皮下注射したところ、血中 OVA 特異的 IgG 抗体価は、同濃度の水溶液を適用したときの約 100 倍の 1.4×10^4 U/mL を示し、製剤の有用性が確認できた。そこで、表 3 に示す様々な条件でヘアレスマウスに皮膚適用した。

皮膚適用 a 群と b 群は、適用面積は同じで適用濃度が 10 倍である。抗体価は約 1.5 倍となったが、有意な上昇ではなかった。A 群は a 群と同じ製剤を 10 倍の面積に適用し、適用量は b 群と同じである。抗体価も b 群とほぼ同等であった。さらに 10 倍濃度の製剤を 10 倍面積適用した B 群では約 2.5 倍と有意な上昇が見られた。OVA 投与量が増えるにつれ、抗体価の上昇傾向が見られたが、単純塗布では B 群のみ有意な上昇であった。

そこで、単純塗布で最も抗体価の上昇した B 群に近い方法で閉塞適用した。フィンチャンバーを用いたので、適用量は 8 割とできたが、適用面積は B 群の 1/5 となった。抗体価は B 群の約 10 倍と有意な上昇が見られたが、閉塞投与では水溶液でも抗体価の上昇が見られ、その差は 2 倍程度であった(図 5)。

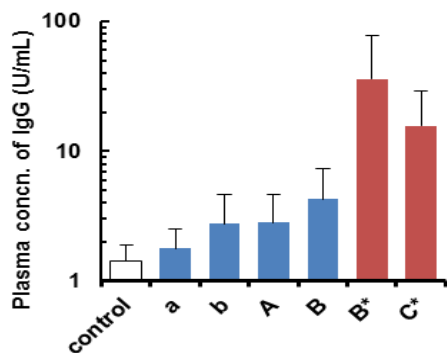


図5 ヘアレスマウス経皮適用時の OVA 特異的 IgG 濃度の変化

皮下注射と比較すると、最も高い閉塞投与であっても投与量が約 1000 倍であるにもか

かわらず、抗体価は 1/100 であり、経皮適用では効率が悪いことが示された。

以上より、水溶性たんぱくである OVA を安定に配合できる油性基剤を開発することができた。皮膚への OVA の移行は水溶液に比べ促進されたが、感作には十分ではないことが示唆された。

今後さらに皮膚移行を高める方法との併用を考える必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 藤井まき子, 橋崎 要, 石毛亜依, 岩淵彩奈, 今井美湖, 田口博之, 水溶性高分子配合レシチン逆紐状ミセルの調製と皮膚移行に与える影響, 日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月, 金沢)

2) 佐藤あんな, 藤井まき子, 栗岡 瑤, 増田年紀, 伊達友哉, 小泉直也, 渡辺善照, 経皮感作における酸化チタンナノ粒子の影響, 第 59 回日本薬学会関東支部大会 (2015 年 9 月, 千葉)

3) 鈴木桃子, 藤井まき子, 飯野隼人, 小泉直也, 渡辺善照, 共焦点レーザー顕微鏡による新規皮膚移行性評価法の構築, 第 59 回日本薬学会関東支部大会 (2015 年 9 月, 千葉)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ゲル状組成物及びゲル状組成物の製造方法

発明者: 橋崎要, 藤井まき子

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-148418

出願年月日: 2016 年 7 月 28 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/research/about/activity/case-study27/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 まき子 (FUJII, Makiko)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号: 50199296

(2) 研究分担者

田口 博之 (TAGUCHI, Hiroyuki)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60236403

橋崎 要 (HASHIZAKI, Kaname)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60318459

渡辺 善照 (WATANABE, Yoshiteru)
昭和薬科大学・薬学部・教授
研究者番号： 70175131

小泉 直也 (KOIZUMI, Naoya)
昭和薬科大学・薬学部・講師
研究者番号： 80433845