

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590212

研究課題名(和文)毛包をターゲットとしたナノ粒子化経皮ワクチンシステムの開発

研究課題名(英文)Development of dermal vaccine system targeting hair follicle with nanoparticle

研究代表者

藤井 まき子(FUJII, Makiko)

昭和薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50199296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚に塗擦するワクチンの基礎的検討として、モデル抗原として卵白アルブミン(OVA)、ナノ粒子として酸化チタン(TiO₂)を用いた製剤を調製した。ヘアレスマウス(HR)皮膚を脱毛し、その直後に適用するとナノ粒子が毛包深部に到達すること、また、脱毛によりランゲルハンス細胞が直後から少なくとも2日間は活性化することが明らかとなった。2週毎に3回、HR皮膚を脱毛し、その直後に皮膚適用したが、OVA溶液、OVA-TiO₂共にOVA特異的IgG濃度の上昇はわずかであった。皮下注射ではOVA-TiO₂でIgG濃度が上昇したことから、皮膚送達を高める方法などさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop the dosage form of vaccine rubbed to the skin. Ovalbumin (OVA) and titanium dioxide (TiO₂) was used as model antigen and nanoparticle, respectively. Nanoparticle applied to hairless mouse (HR) skin immediately after hair removal was observed in the deep part of hair follicle. Langerhans cells were activated by hair removal at least 2 d. OVA and OVA-TiO₂ were applied three times every two weeks by subcutaneous injection (s.c.) or rubbing to HR skin immediately after hair removal (dermal). Serum concentration of OVA specific IgG showed no change after s.c. application of OVA, and became high after s.c. application of OVA-TiO₂. However, IgG concentration tended high but not significant by dermal application both in the cases of OVA and OVA-TiO₂. Further studies, such as development of more effective skin delivery method, are necessary for dermal immunization.

研究分野：薬剤学

キーワード：ワクチン 皮膚適用 毛包 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

感染症の予防は世界的に重要な課題であり、その唯一の予防方法がワクチン投与である。現在、一部経口投与可能なワクチンもあるが、ほとんどのワクチンが注射剤として用いられている。注射剤は直接体内に適用するので、効果は確実である半面、無菌性の保証が必要であり、製造および使用に制限があり、より簡便な使用方法が望まれている。

そこで注目されているのが経皮投与である。従来から皮下注射を行っていること、また、皮内適用でも抗原抗体反応がおこることから、皮膚内に入れば効果があると考えられるが、皮膚は生体と環境を隔てる強固なバリア機能を持つ。特に最外層の角層は水溶性物質や高分子量の物質の透過を阻止している。そのため、通常の状態では抗原となるタンパクのような物質は皮膚から侵入しない。そこで、強制的に皮内に適用するマイクロニードルの適用が広く検討されている¹⁾。しかし、マイクロニードルはいわゆる注射のような痛みは伴わないものの、原理的には注射と同じである。

2. 研究の目的

皮膚は、全身および局所の薬物投与経路として注目されているが、バリア機能があり、特に抗原となるタンパクのような物質は透過しにくい。一方、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おり、物理的バリアである角層を通過すれば、免疫が確立する可能性がある²⁾。皮膚に存在する毛包は、表面からほぼ垂直方向に侵入しており、その構造は表皮に類似しており、ランゲルハンス細胞も存在する。従って、水平面積は小さいものの実効面積は広く、また、ナノマテリアルの安全性に関する研究において、ナノ粒子が、脱毛時に、毛包内に蓄積することを明らかにしている³⁾。

より簡便に適用できるワクチンの経皮投与製剤開発の基礎的検討として、モデル抗原として卵白アルブミン(OVA)を用いてナノ粒子を設計し、脱毛した毛包をターゲットとしたワクチン製剤の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子の設計と皮膚移行性の評価

固体のナノ粒子を芯物質とし、それに抗原などを吸着させる方法として酸化チタンナノ粒子(TiO₂, 一次粒子径 35, 15nm)に OVA を吸着させる方法を試みた。また、皮膚移行性を確認するために OVA と同等の分子量を持つ水溶性蛍光物質 FITC 標識デキストラン 40000(FD-40)を用い、ヒトに近い Yucatan micropig(YMP) 摘出皮膚または感作性実験に用いるヘアレスマウス(以下 HR, Hos :

HR-1, 6week,) 皮膚に適用し、FD-40 の移行を共焦点レーザー顕微鏡 (CLMS) を用いて観察した。

(2) ナノ粒子の抗原性評価

ナノ粒子と複合化した OVA の抗原性の評価を皮下注射により評価した。方法は primary PLNA 法に準拠し、Balb/c マウス(6week,) 足蹠に左に溶媒コントロール、右に試料を皮下注射し、1 週間後に膝窩リンパ節を摘出し、溶媒投与側に対する試料投与側の細胞数の比 CI を算出した。

(3) ランゲルハンス細胞活性化の評価

MHC Class の発現をランゲルハンス細胞の活性化の指標とした。HR 背部皮膚をシアノアクリレートストリッピング 1 回処理し、脱毛した。脱毛後 1 h, 1 d, 2 d, 1week 後に皮膚を摘出し、切片を作成した。ブロック剤として 5% BSA, 一次抗体 MHC Class -A -E, 二次抗体 FITC Goat anti rat IgG で免疫染色を行った。

(4) 皮膚適用による感作性評価

HR 頭頂部付近をシアノアクリレートにより脱毛し、その直後に溶媒、OVA 溶液または OVA 含有ナノ粒子(OVA+TiO₂)を適用した。2 週間ごとに同様の操作を 3 回繰り返す、最終投与 1 週間後に血液を採取し、血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価を測定した。比較のため、皮下注射を同様の日程で行った。

なお、すべての動物実験は昭和薬科大学動物倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) ナノ粒子の設計と皮膚移行性の評価

ナノ粒子の設計として、固体のナノ粒子を芯物質とし、それに抗原などを吸着させる方法として表面無処理の TiO₂(35nm)を安定に分散させ、OVA を吸着させる方法について検討を行った。TiO₂ は疎水性が高く、分散させることは困難であるが、表面積が広いこと

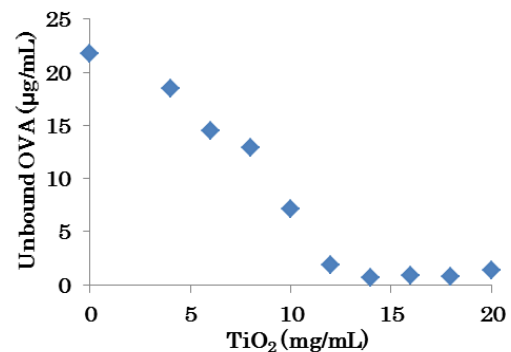


Fig.1 Effect of TiO₂ amount on unbound OVA concentration

Initial OVA concn.; 20µg/mL, unbound OVA concn. was determined by protein assay after centrifugation.

から、物質の吸着量は広いと推測された。その結果、高圧ホモジナイザーを用いた湿式分散と、OVA を保護コロイドとして用いる方法でナノ粒子が得られた。OVA の吸着量はTiO₂の添加量に依存した (Fig.1)。なお、分散性を改良した表面親水処理 TiO₂ についても検討を行ったが、OVA 吸着量は低かった。

また、FD-40 においても OVA と同様の吸着現象が見られたので、皮膚移行について、FD-40 を保持させた TiO₂ をヒトに近い表面構造を持つ YMP 皮膚に適用し、CLMS にて観察した。その結果、FD-40 水溶液を適用するよりも、毛包付近や角層内への移行が見られ、移行が高まることが定性的に示された。さらに皮膚適用を容易にするため、増粘効果のある高分子を併用するとより皮膚移行性の改善が見られた。

しかし、本試料は YMP 皮膚への移行性を改善することができたものの、より毛包が小さく、感受性試験に用いるヘアレスマウス摘出皮膚への移行性は改善されなかった。これは、ナノ粒子とともに凝集粒子も存在し、皮膚上でさらに凝集するためと考えられた。そこで、さらに粒子径の小さい 15nm の TiO₂ を用い、超音波分散後、残存する粗大凝集体を遠心分離で除去したところ、平均粒子径約 60nm 約 1mg/mL の TiO₂ 分散液が得られた。OVA または FD-40 を吸着させたところ、分散 TiO₂ 量の減少により OVA や FD-40 吸着量は減少したが、HR 摘出皮膚においても脱毛皮膚で皮膚移行が確認できた。

さらに *in vivo* において HR 皮膚移行性の確認を行ったところ、脱毛直後に適用した場合は毛包深部まで FD-40 の蛍光が確認されたが (Fig. 2), 脱毛 1 日後には脱毛による空隙が観察されず、皮膚移行も確認できなかった。

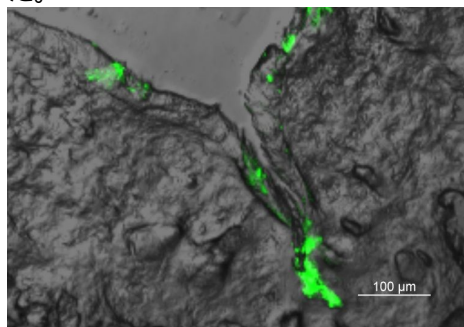


Fig. 2 Image of CLMS of hairless mouse skin after application of FD-40 with nano suspended TiO₂

Sample was applied immediately after hair removal by cyanoacrylate stripping.

このことから、脱毛直後にナノ粒子を適用すれば毛包内に送達でき、また、脱毛による障害は比較的速やかに回復することから、適用

物質以外の皮膚移行への影響は小さいと考えられる。

(2) ナノ粒子の抗原性評価

OVA を TiO₂ に吸着させると、タンパク変性がおこり抗原性がなくなる可能性がある。そこで、OVA 溶液と TiO₂+OVA を用いて PLNA にて感受性を評価した。皮膚適用する際に用いる高分子増粘剤の影響も同時に検討した。

PLN CI が 2 以上で感受性があるといわれており、OVA では弱い感受性が確認できた。TiO₂ そのものには感受性はないが、OVA と共投与することにより、OVA 単独よりも高い感受性が見られた。また、使用する高分子について検討したところ、カチオン性高分子 CSA では単独でもリンパ節の腫脹がみられ、適切ではないと判断した。セルロース系高分子 HS は単独では、感受性がなく、また、OVA+TiO₂ の感受性にも影響しないことから、皮膚適用時の増粘剤として適切であると考えられる (Fig. 3)。

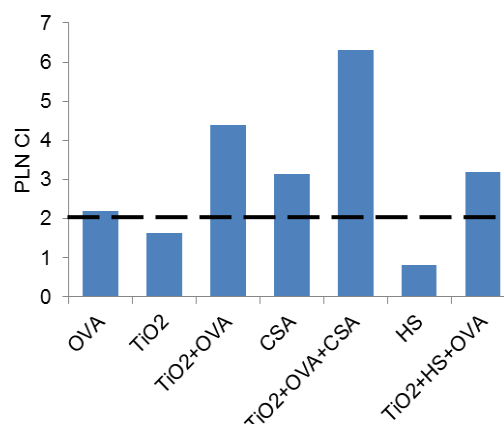


Fig.3 PLN cell index of OVA and related formulation

(3) ランゲルハンス細胞活性化の評価

Kubo らは、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を報告している²⁾。また、Taira らは、毛包にもランゲルハンス細胞があり、特にバルジ付近に多いことを報告している⁴⁾。

感受実験で用いる HR に関してはランゲルハンス細胞に関する報告がなく、また、脱毛処理の影響についても知られていない。そこで HR 皮膚について、正常時と脱毛処理の影響を検討するために、ランゲルハンス細胞の活性化の指標となる MHC Class の発現を免疫染色により観察した (Fig. 4)。その結果、

HR 皮膚にもランゲルハンス細胞が存在し、脱毛後1時間で、MHC class の発現が上昇し、脱毛によりランゲルハンス細胞が著しく増加または活性化することが確認できた。2日後でも上昇が維持されたが、1週間後には元のレベルに戻った。脱毛後のナノ粒子の移行状態とランゲルハンス細胞の活性化の状況を考え合わせると、脱毛直後に抗原を適用することが有用と考えられる。

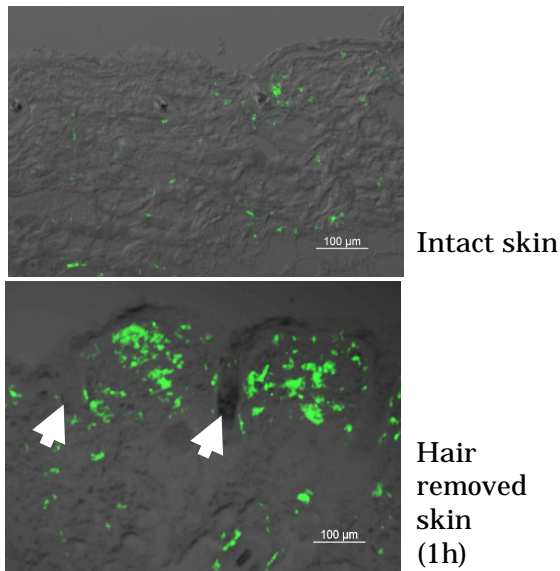


Fig. 4 Immunostaining of Langerhans cells in intact skin and hair removed skin at 1 h after hair removal

Blocking, BSA; Primary antibody, MHC Class II-A I-E, Secondary antibody, FITC Goat anti rat IgG

(4) 皮膚適用による感作性評価

毛包移行性に優れたナノ粒子が調製でき、OVA の抗原性が維持されていること、また、脱毛直後には毛包内へのナノ粒子の移行が高まること及びランゲルハンス細胞が活性化されていることが明らかとなった。そこで、HR の頭部付近をシアノアクリレートにより脱毛し、その直後に溶媒(5%グリセリン水溶液)、OVA または OVA+TiO₂ を塗擦した。対象として、皮下注射(s.c.)を行った。皮下投与では、OVA ではほとんど抗体価の上昇は見られなかったが、OVA+TiO₂ では抗体価が上昇した。このことから、OVA+TiO₂ とすることにより効果が改善されたと考えられる。一方、皮膚適用群では、溶媒群に比べ上昇傾向はみられるものの変化のない個体も多く、効果がなかった (Fig.5)。この原因としては大きく分けて2点考えられる。1つは、皮膚内への送達量が少なくいこと、もうひとつは、TiO₂ のアジュバント能が強くないため感作が成立しにくいことがあげられる。今回の適用は水性の基剤としたため、皮膚との界面張力が

大きく、毛包内への浸透に不利だった可能性があり、今後さらに基剤との組み合わせを考慮する必要がある。また、コレラ毒素のようなアジュバントを併用し感作性を高めることも必要であり、今後の検討課題である。

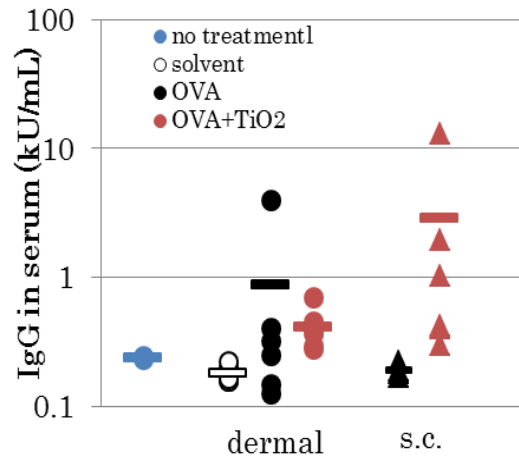


Fig. 5 OVA specific IgG concentration after 3-times application of OVA

OVA (60μg/50μL) was applied as OVA solution or OVA with TiO₂ suspension. dermal, rubbed sample in skin immediately after hair removal; s.c., subcutaneous injection

参考文献

- 1) Bal, S., Ding, Z., Kersten, G., Jiskoot, W., Bouwstra, J. Microneedle-based transcutaneous immunisation in mice with n-trimethyl chitosan adjuvanted diphtheria toxoid formulations. *Pharm. Res.*, **27** (2010) 1837-1847
- 2) Senzui, M., Tamura, T., Miura, K., Ikarashi, Y., Watanabe, Y., Fujii, M., Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *J. Toxicol. Sci.*, **35**(2010), 107-113
- 3) Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., Amagai, M., External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.*, **206** (2009) 2937-2946
- 4) Taira K, Narisawa Y, Nakafusa J, Misago N, Tanaka T. Spatial relationship between Merkel cells and Langerhans cells in human hair follicles. *J. Derm.Sci.*, **30** (2002) 195-204

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)

[学会発表](計2件)

伊達友哉, 藤井まき子, 増田年紀, 佐藤
あんな, 小泉直也, 渡辺善照

微粒子酸化チタンが水溶性高分子の皮膚移行に及ぼす影響

第58回日本薬学会関東支部大会, 昭和薬科大学(町田・東京) 2014年10月

増田年紀, 藤井まき子, 伊達友哉, 佐藤
あんな, 小泉直也, 渡辺善照

卵白アルブミン特異的抗体産生に及ぼす
ナノ粒子の影響

第57回日本薬学会関東支部大会, 帝京大学(板橋・東京) 2013年10月

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 まき子 (FUJII, Makiko)

昭和薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 50199296

(2)研究分担者

渡辺 善照 (WATANABE, Yoshiteru)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 70175731

研究分担者

小泉 直也 (KOIZUMI, Naoya)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 80433845