DDS技術を基盤とした経皮ワクチン製剤の開発

特集 感染症対策に資する新規ワクチンシステムの開発

松尾一彦・岡田直貴・中川晋作*

Development of transcutaneous vaccine formulations based on DDS technology

Transcutaneous immunization (TCI) system utilizing skin immune function is a promising needle-free, easy-to-use, and non-invasive vaccination method instead of conventional injectable vaccination method. For effective TCI system, it is essential to establish the fundamental techniques that antigenic proteins were delivered to antigen-presenting cells in the epidermal layer.

In this review, we give outline of recent research trend about antigenic protein delivery techniques for TCI and introduce our basic and preclinical research about TCI using our original hydrogel patch formulation containing antigenic proteins.

皮膚の免疫機能を最大限に利用した経皮ワクチンは、注射に代わる簡便で安価かつ非侵襲的な新規ワクチン手法として期待されている。経皮ワクチンにおいては、抗原を表皮組織に存在する抗原提示細胞へと送達する基盤技術の確立が必須であり、その研究開発が精力的に行われている。

本稿では、近年の経皮ワクチンデリバリー技術の研究動向についての解説を交えながら、筆者らが独自に開発した親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンの研究成果について紹介する。

Kazuhiro Matsuo・Naoki Okada・Shinsaku Nakagawa*

key words : transcutaneous immunization, vaccine, hydrogel patch, skin, Langerhans cell

先般、WHO がフェーズ 6 を宣言した H1N1 型インフルエンザウイルス (the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus)¹⁾ による感染が拡大の一端をたどっているように、現在になってもなお、新興・再興感染症の蔓延は人類の社会経済活動に対する脅威となっている^{2,3)}。このような感染症に対してはワクチンが唯一の根本的予防手段であることから、本邦においてもワクチン研究に高い関心が集まっており、産官学連携のもと迅速なワクチン製造供給体制の整備ならびに新規ワクチン開発に力を注ぐ社会要請が高まっている。

しかしながら、ワクチン製造の迅速化が図られたとしても、現在実用化されているワクチンの大半は注射による接種であるため、投与に医療従事者を必要とする、ワクチンの輸送・貯蔵に冷蔵管理を必要とする、といった理由から、開発途上国へのワクチン普及や、緊急時におけるワクチン大規模投与が困

難であるという問題を残している。そこで、注射投与型ワクチンに代わる簡便性・利便性にすぐれる新規ワクチン手法の開発に期待が寄せられており、経口ワクチン「飲むワクチン」、経鼻ワクチン「吸うワクチン」、経皮ワクチン「貼るワクチン」の実用化に向けた研究が数多く行われている^{4~6)}。

新規ワクチン手法の一つである経皮ワクチンのターゲットとなる皮膚、特に表皮は、体内の生命環境 (水環境) と体外の非生命環境 (空気環境) との間の境界バリアを形成している。この水-空気環境バリア機能に最も重要な構造は角質細胞間にある脂質多重層構造、つまり角質層、という物理的バリアの構築である。また、皮膚は、免疫系が高度に発達した「免疫学的バリア」をも兼ね備えた組織である。角質層下の生きた表皮組織の 90% 以上を占めるケラチノサイトは、サイトカイン・ケモカインを産生することで自然免疫の誘導に関わり、そして残りの数%を占めるランゲルハンス細胞 (LC) は、強力な抗原提示細胞として抗原特異的免疫応答の誘導に関わることで、皮膚の免疫学的バリアの形成に関与し

* Department of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University 大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野

表1 経皮ワクチンデリバリー技術・デバイスの開発

	原 理	利 点	欠 点
a. エレクトロポレーション法	正負の両電極間に負荷する電圧により、一時的に皮膚に孔を生じさせることで、抗原の角質層透過を促進する。	抗原送達とともに、免疫担当細胞を活性化できる。	高コスト 安全性に問題がある。 特殊な装置が必要
b. イオントフォoresis法	電極を有する二つのリザーバーを貼付し、電圧負荷をかけると、水の移動が生じることで水溶性高分子が経皮吸収される。	抗原送達とともに、免疫担当細胞を活性化できる。	高コスト 安全性に問題がある。 特殊な装置が必要
c. ソノフォoresis法	超音波を用いて一時的に皮膚のバリア機能を低下させることにより、抗原分子を皮膚内へと送達させる。	抗原送達とともに、免疫担当細胞を活性化できる。	高コスト 安全性に問題がある。 特殊な装置が必要
d. Jet Injector 法	特殊なデバイスを用いて、圧力によって抗原を皮膚内に送達する。	輸送、管理、備蓄が容易 二次感染の防止	投与時に痛みを伴う。 特殊なデバイスが必要
e. マイクロニードル法	マイクロメートルサイズのニードルを用いて、角質層に孔をあけ、抗原分子を生きた表皮に送達する。	痛みを伴わない。 輸送、管理、備蓄が容易 二次感染の防止	針の皮膚内残存の危険性 製造技術の確立の必要性
f. パッチ製剤	角質層を除去または脂質成分を排除した皮膚に、抗原水溶液を浸み込ませたガーゼパッチまたは粘着性のパッチ製剤を貼付する。	痛みを伴わない。 輸送、管理、備蓄が容易 二次感染の防止	皮膚を前処理する必要がある。

ている(図1)⁷⁾。

したがって、ワクチン抗原を生きた表皮にまで送達することができれば、LCを起点とする効果的な抗原特異的免疫応答の誘導が期待できる。しかしながら、皮膚の最外層には角質層が存在するために、高分子である抗原を単に皮膚に塗布するだけでは、生きた表皮への抗原デリバリーはきわめて困難である。したがって効果的な経皮ワクチンを開発するためには、抗原の角質層透過を促進し、生きた表皮に常在するLCに抗原を効率よく送達するDrug Delivery System (DDS)基盤技術、すなわち「経皮ワクチンデリバリー技術ならびにデバイス」の開発が必須である⁸⁾。

そこで本稿では、近年の「経皮ワクチンデリバリー技術ならびにデバイス」の研究開発状況について概説するとともに、筆者らがコスメディ製薬社と共同で開発した経皮ワクチンデバイスである「親水性ゲルパッチ」を用いた経皮ワクチンの研究成果について紹介する。

経皮ワクチンデリバリー技術ならびにデバイス開発

DDSは薬物を必要量、目的の部位へ効率よく送

達するための技術として発展してきた。そのなかで古くから経皮薬物デリバリー技術の開発が行われており、ワクチン抗原を薬物として捉えると、これらのデリバリー技術は経皮ワクチンへの応用が可能である。

たとえば、電圧および超音波負荷により一時的に皮膚のバリア機能を低下させて物質の経皮デリバリーを促進する、エレクトロポレーション法(表1a)⁹⁾、イオントフォoresis法(表1b)¹⁰⁾、ソノフォoresis法(表1c)¹¹⁾を用いた経皮ワクチンが開発されている。しかしながらこれらの手法は、大型なデバイスを必要とすることから簡便性に乏しく、なによりも角質層本来の機能を低下させてしまうために二次的な感染や炎症の危険性があり、いまのところ実用化には至っていない。また、圧力によって抗原の経皮デリバリーを促進するJet Injector(表1d)¹²⁾を用いた経皮ワクチンは一部実用化されているが、抗原溶液の保管に冷蔵管理を必要とする、痛みを伴う、といった注射型ワクチンと同様の問題点が残される。

近年、マイクロニードル法(表1e)¹³⁾、またはパッチ製剤(表1f)¹⁴⁾を応用した経皮免疫製剤による経皮ワクチンが考案された。これらの手法は、痛みを伴わずに、まさに貼るだけという簡便な操作でワク

図1 経皮ワクチンにおける抗原デリバリー技術の必要性

チンを施行できることが最大の利点である。マイクロニードル法は微小な針(マイクロメートルサイズのニードル)を用いて角質層に孔をあけることで物質の経皮デリバリーを可能とする技術であり、現在開発中のマイクロニードルの大半は金属製のニードルアレイを使用している。しかし、その製造技術が未発達であるために、皮膚内でニードルが折れて残存する危険性があることから、マイクロニードル法を応用した経皮ワクチンの実用例はこれまでに一例もない。この点について、最近筆者らのグループは、生体適合性にすぐれる高分子を素材とした生分解性マイクロニードルの開発に成功しており、安全性にもすぐれる経皮ワクチンデバイスとして注目を集めている。

筆者らの生分解性マイクロニードルを応用した経皮ワクチンの研究成果については、本稿では紙面の都合上、その詳細を割愛させていただくが、さまざまなワクチン抗原に対応して有効なワクチン効果を示すことを確認している。また、パッチ製剤を用いた経皮ワクチンについても、いくつかの研究グルー

プが開発に取り組んでおり、その実用化が待望されている。なかでも IOMAI 社(2008年に Intercell 社により買収)で開発された旅行者下痢症に対する heat-labile enterotoxin 含有パッチ製剤を用いた「貼るワクチン」が、第Ⅱ相臨床試験まで進んでいる¹⁵⁾。しかしながら本手法においては、紙やすりのようなもので角質層を剥離してからワクチンを施行しなければならないという点が、簡便性ならびに安全性の観点から克服すべき課題といえる。

経皮ワクチンデリバリーデバイスとしての親水性ゲルパッチ

筆者らも、皮膚に貼付するだけで抗原の角質層透過を促進する新規経皮ワクチンデバイスとして独自の親水性ゲルパッチ(図2a)を開発し、それを応用した「貼るワクチン」の研究に取り組んでいる¹⁶⁾。

親水性ゲルパッチは親水性高分子ゲル体をベースとしたパッチ製剤であり、すでに医療用絆創膏として臨床使用されている安全性の高い材料のみで作製

図2 親水性ゲルパッチ

- a: 親水性ゲルパッチ (1 × 2cm²) に抗原水溶液を滴下し、乾燥させて経皮免疫製剤とする。
b: 親水性ゲルパッチ断面の蛍光顕微鏡写真。赤: TR-OVA

図3 抗原分子の生体内挙動

- a: TR-OVA 含浸親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に 12 時間貼付した後の皮膚切片を蛍光顕微鏡により観察した。矢印: 抗原由来の赤色蛍光
b: TR-OVA 含浸親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に 2 時間貼付した後に表皮シートを作製した。Alexa488 標識 anti-CD207 抗体を用いて LC を免疫染色し、蛍光顕微鏡観察した。矢印: 抗原と LC との局在が一致した黄色の領域
c: TR-OVA 含浸親水性ゲルパッチをマウス耳介皮膚に 24 時間貼付した。その 96 時間後に回収した所属リンパ節の凍結組織切片を作製し、Alexa488 標識 anti-CD207 抗体を用いて LC を免疫染色した。矢印: 抗原捕捉 LC を表わす黄色の領域
赤: TR-OVA, 緑: LC, 黄: 赤と緑の重なった領域

図4 抗Ad IgG抗体の産生誘導とAd感染抑制効果

アデノウイルスベクター(Ad)カプシド蛋白質を100 μg 含浸させた親水性ゲルパッチを2週間隔で2回マウス耳介皮膚(角質層有または無)に24時間貼付した。コントロール群には同様のスケジュールでAdカプシド蛋白質を100 μg 皮内注射した。最終免疫から2週間後に血清を回収し、抗Ad抗体価をELISAにより測定した(a)。また最終免疫から2週間後にルシフェラーゼ発現Adを尾静脈内投与し、その48時間後に回収した肝臓中のルシフェラーゼ活性を測定した(b)。

Ad-Luc: ルシフェラーゼ発現Ad. i.v.: intravenous administration. ND: not detectable

されている。本パッチの表面に抗原としてTexasRed-OVA (TR-OVA)水溶液を滴下すると、水分のみが高分子ゲル体に吸収されて、表面に抗原濃縮層が形成される(図2b)。そしてTR-OVAを含浸させた親水性ゲルパッチを角質層が存在する状態のマウス耳介皮膚に12時間貼付すると、抗原は角質層を透過し、生きた表皮にまで到達することが明らかとなった(図3a)。また、角質層を透過して生きた表皮にまで到達したTR-OVAはLCに取り込まれることも判明した(図3b)。さらに、TR-OVA捕捉LCは免疫誘導の場である所属リンパ節に遊走していることが観察された(図3c)。

したがって、親水性ゲルパッチは角質層が存在する皮膚に対しても、まさに貼るだけで抗原の角質層透過を促進し、生きた表皮に常在するLCへと抗原デリバリーできる非常に有望な経皮ワクチンデバイスであることが示された。

本手法の角質層透過促進機構の一つの要因としては、親水性ゲルパッチ貼付による角質層の水和・膨潤が考えられる。すなわち親水性ゲルパッチを皮膚に貼付すると水分の蒸散が妨げられ、皮膚中の水分含量が増大する水和効果が生じる。この水和効果により角質層の膨潤が起こり、細胞間隙を埋める脂質成分の構造が緩むことで水溶性高分子が透過しやすくなると考えている。

二つ目の要因としては、親水性ゲルパッチ表面に形成される抗原濃縮層が寄与すると考えている。抗

原含浸親水性ゲルパッチを貼付すると、皮膚表面上で大きな抗原濃度勾配が生じ、これが物質透過の駆動力となることで抗原の角質層透過が促進されると考えられる。

親水性ゲルパッチを応用した経皮ワクチンの有効性

親水性ゲルパッチを用いた「貼るワクチン」の有効性を示す一例として、アデノウイルスベクター(Ad)感染モデル実験におけるワクチン効果を図4に示す。本実験においては、Adを超音波破碎することにより調製したAdカプシド蛋白質を抗原として用いた。Adカプシド蛋白質100 μgを経皮ワクチンしたマウスでは、角質層の有無にかかわらず皮内注射免疫群に匹敵する抗原特異的IgG抗体価の上昇が認められた(図4a)。そしてAd感染防御効果を検討するために、ルシフェラーゼを発現するAdを尾静脈内投与した。

全身性に投与されたAdは、その90%が肝臓に集積し、遺伝子発現をすることが報告されている。そこで、肝臓におけるルシフェラーゼの活性を測定することにより、誘導された抗Ad抗体によるAd除去効果を比較検討した。その結果、親水性ゲルパッチを用いて経皮ワクチンしたマウスにおけるルシフェラーゼの活性は、皮内注射免疫群と同等レベルにまで抑制された(図4b)ことから、本手法によ

り誘導された抗 Ad IgG 抗体は Ad 中和活性を有していることが示された。興味深いことに、その抑制効果は角質層が存在する皮膚に抗原含浸親水性ゲルパッチを適用した場合のほうが、角質層を除去した皮膚に適用した場合よりも大きかった。このことは、角質層が抗原のリザーバーとしての役割を果たし、徐々に抗原を生きた表皮に供給することで免疫誘導の増強に関与していることを示唆している。

また、破傷風トキソイドに対するワクチン効果についても検証したところ、親水性ゲルパッチを用いた経皮ワクチンは、皮下注射免疫群に匹敵する抗破傷風トキソイド IgG 抗体産生を誘導し、その抗体は破傷風毒素中和活性を有することを明らかにしている。

以上の結果より、親水性ゲルパッチを用いた「貼るワクチン」は、細菌およびウイルス感染に対して効率よく抗原特異的免疫応答を誘導し、有効なワクチン効果を発揮できることが示された。

さらに抗原特異的 IgG 抗体のサブクラス解析から、本手法においては、注射免疫群と比較して IgG2a 抗体(Th1 型抗体)より IgG1 抗体(Th2 型抗体)のほうが誘導されやすいことが判明した。すなわち、親水性ゲルパッチを応用した経皮ワクチンは細菌感染症に対しては非常に有効な手法であるといえる。しかしながら、ウイルス感染症には細胞性免疫の誘導や、経粘膜面からの感染阻止のためには粘膜免疫の誘導が必要となる。したがって、本手法の適用感染症の拡大に向けては、Th1/Th2 の免疫バランスを制御しうるアジュバントの併用が必須であると考えられ、現在筆者らは経皮ワクチン用アジュバントの探索を行っており、今後の研究動向に期待が寄せられる。

おわりに

DDS 技術を基盤とした経皮ワクチンが多数案・開発されているなか、マイクロニードル法ならびにパッチ製剤を用いた経皮免疫製剤による「貼るワクチン」の研究開発に期待が寄せられ、その早期実用化が待望されている。

筆者らが独自に開発した親水性ゲルパッチを用い

た「貼るワクチン」は、現在、奈良県立医科大学医学部皮膚科学講座 浅田秀夫博士の協力のもと、臨床研究を実施しており、抗原を含まない親水性ゲルパッチのヒトにおける安全性をすでに確認している。2009 年度中にも、破傷風・ジフテリア経皮ワクチンとして有効性・安全性を検証する臨床研究プロトコルを実施する予定である。

このような有効性・簡便性・利便性にすぐれた「貼るワクチン」が実用化すれば、パンデミックならびに生物兵器によるバイオテロリズム発生時の迅速大規模ワクチン接種や、感染症地域への渡航者に対する事前予防ワクチンの施行に大きく貢献できるものと期待する。

本稿にて紹介した筆者らの研究成果は、「保健医療分野における基盤研究推進事業(独立行政法人医薬基盤研究所)」からの研究助成によるものであり、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Michaelis M, Doerr HM, Cinatl JJ : An Influenza A H1N1 Virus Revival-Pandemic H1N1/09 Virus. *Infection* 37 : 381-389, 2009.
- 2) Wong GW, Leung TF : Bird flu : lessons from SARS. *Paediatr Respir Rev* 8 : 171-176, 2007.
- 3) Valadas E, Antunes F : Tuberculosis, a re-emergent disease. *Eur J Radiol* 55 : 154-157, 2005.
- 4) Nuchi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T et al. : Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 10986-10991, 2007.
- 5) Sullivan VJ, Mikszta JA, Laurent P, Huang J, Ford B : Non-invasive delivery technologies : respiratory delivery of vaccines. *Expert Opin Drug Deliv* 3 : 87-95, 2006.
- 6) Glenn GM, Kenney RT, Ellingsworth LR, Frech SA, Hammond SA et al. : Transcutaneous immunization and immunostimulant strategies : capitalizing on the immunocompetence of the skin. *Expert Rev Vaccines* 2 : 253-267, 2003.
- 7) Schiller M, Metze D, Luger TA, Grabbe S, Gunzer M : Immune response modifiers-mode of action. *Exp Dermatol* 15 : 331-341, 2006.
- 8) Giudice EL, Campbell JD : Needle-free vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 58 : 68-89, 2006.
- 9) Zhao YL, Murthy SN, Manjili MH, Guan LJ, Sen A et al. : Induction of cytotoxic T-lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization. *Vaccine* 24 : 1282-1290, 2006.
- 10) Wang Y, Thakur R, Fan Q, Michniak B : Transdermal iontophoresis : combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 60 : 179-191, 2005.
- 11) Tezel A, Paliwal S, Shen Z, Mitragotri S : Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. *Vaccine* 23 : 3800-3807, 2005.

- 12) Jackson LA, Austin G, Chen RT, Stout R, DeStefano F et al. : Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors. *Vaccine* 19 : 4703-4709, 2001.
- 13) Kim YC, Quan FS, Yoo DG, Compans RW, Kang SM et al. : Improved influenza vaccination in the skin using vaccine coated microneedles. *Vaccine* 27 : 6932-6938, 2009.
- 14) Glenn GM, Flyer DC, Ellingsworth LR, Frech SA, Frerichs DM et al. : Transcutaneous immunisation with heat-labile enterotoxin : development of a needle-free vaccine patch. *Expert Rev Vaccines* 6 : 809-819, 2007.
- 15) Frech SA, Dupont HL, Bourgeois AL, McKenzie R, Belkind-Gerson J et al. : Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea : a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. *Lancet* 371 : 2019-2025, 2008.
- 16) Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K et al. : A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J Control Release* 131 : 113-120, 2008.