マイクロニードル技術を活用した 経皮ワクチン製剤の開発

大阪大学 大学院薬学研究科 薬剤学分野*

伊藤沙耶美*・中川晋作*・岡田直貴*

Development of transcutaneous vaccine formulations utilizing the microneedle technology

Conventional vaccination is performed mainly by injection, which has several inherent problems: pain, the need for trained personnel, associated needle-related diseases or injuries, and storage or transport issues. In some areas, vaccine coverage against infection is low due to failure in follow-up as well as a lack of trained medical personnel and facilities. Thus, the development of needle-free, easy-to-use, and low-invasive vaccination methods is an urgent task. With its advantages that overcome the inherent problems of vaccination by injection, transcutaneous immunization is now attracting attention as an alternative vaccination route. Herein, we provide an outline of recent trends in the development of transcutaneous vaccine formulations utilizing the microneedle technology.

現行のワクチンの大半は注射製剤であるため、投与に医療従事者を必要とするだけでなく、ワクチン製剤の輸送・保管に一貫した低温温度管理(cold chain)の整備が求められる。そのため、実際にワクチンを最も必要としている開発途上国などの地域にワクチンが浸透しにくく、また感染症パンデミックやバイオテロリズム発生時にワクチンの大規模接種を迅速に施行できないという課題を有する。したがって、注射に代わる簡便で有効かつ安全な新規ワクチン手法を開発することがさまざまな感染症ワクチンの有用性を向上させると考えられる。本稿では、近年開発が進むさまざまな新規ワクチン剤形のなかで、皮膚に貼るだけという簡便性と低侵襲性を併せもった経皮ワクチン製剤の開発状況について紹介する。

Sayami Ito*, Shinsaku Nakagawa*, Naoki Okada*

Keywords: Vaccine, Transcutaneous immunization, Microneedle, Influenza, Clinical research

1. はじめに

ウイルスや細菌の誕生が人類の誕生以前のできごとであったことを想起すれば、人類の誕生とともに感染症との闘いの歴史が始まったといっても過言ではない。人類は感染症との闘いに挑み続け、近代以降には医学の進歩や公衆衛生事業の拡大により多くの戦果を得てきた。なかでも「ワクチン」は、感染症に対する根本的予防における唯一の手段であり、疾患の発症や重篤化を抑制することのできる画期的な

医薬品である。

ワクチン開発は1798年の Edward Jenner による牛痘接種法(天然痘ワクチン)に始まり、200年以上の歴史をもつ。Jenner の種痘以後、細菌学、ウイルス学の発達により、感染症の原因となる病原体が次々と同定され、数多くのワクチンが開発されてきた。現在においても、新たに分子生物学的手法を駆使して、より安全で有効なワクチンの開発が進められている。しかしながら、依然として感染症は世界における死亡原因の第一位を占めており、高度に発達した交通網がさまざまな人的・物的交流に伴う国境を越えた病原体の移動を可能にしている。インフルエンザパンデミック騒動(2009～2010年)、エボラ出血熱(2014年)や MERS(2015年)のエピデ

* Laboratory of Biotechnology and Therapeutics,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6

ミック報道が記憶に新しいように、新興・再興感染症の世界規模での流行の脅威にさらされている現代社会においては、国際的な視野での感染症対策が喫緊の課題となっている。

このような社会背景のもと、近年のワクチン研究領域においては、各種感染症に対するワクチンの開発・改良やワクチンを大量かつ迅速に製造・供給できる技術の開発とあわせて、簡便、低侵襲、安価な新規ワクチン接種法およびワクチン剤形の開発が、重要な研究課題として注目されている。これまでに実用化されたワクチンの大半は注射製剤として開発されており、接種に医療従事者を必要とする技術的な問題や、製造・輸送・保管における一貫した低温管理(cold chain)を必要とする費用的な問題が、開発途上国へのワクチン普及の大きな障壁となっている。また、注射は痛みを伴うとともに、注射針を介した二次感染の危険性や医療廃棄物の処理などの安全面での問題も有する。さらに、感染症パンデミックやバイオテロリズム発生時におけるワクチンの迅速大規模接種に注射投与では対応が困難である点も懸念されている。

そこで筆者らは、簡便な予防接種を可能にする皮膚を標的とした経皮ワクチン製剤「貼るワクチン」の開発を推進しており、本稿では、経皮ワクチンデリバリー技術として近年注目されているマイクロニードル法について概説するとともに、筆者らの自己溶解型マイクロニードルパッチを応用した「貼るワクチン」に関する研究成果を紹介する。

2. ワクチン標的器官としての皮膚組織

皮膚は生体を外界と隔てる障壁であり、異物の侵入を防ぐ“物理的バリアー”と異物の除去を担う“免疫学的バリアー”を有する(図1)。解剖学的にみれば外側から角質層、生きた表皮(顆粒層、有棘層、基底層)、真皮の大きく3層に分けられており、最外の角質層はケラチンタンパク質でできた角質細胞が幾重にも重なることで構成され、物理的バリアーの主役となっている。一方、角質層下の生きた表皮ならびに真皮には免疫学的バリアーを構築するさまざまな細胞群が存在しており、なかでも生きた表皮に常在するランゲルハンス細胞と真皮に分布する真皮樹状細胞は、抗原提示細胞として外来異物に対する生体防御機構において重要な役割を担っている¹⁾。また、生きた表皮を構成する細胞の90%以上を占めるケラチノサイトは、異物の侵入を感知してサイトカイン・ケモカインなどの炎症メディエーターを産生することで自然免疫の誘導に関わる²⁾。経皮ワクチンは、これらの免疫担当細胞により形成される皮膚の免疫学的バリアーを利用する新規ワクチン

図1 ワクチンの標的部位としての皮膚

表皮や真皮には抗原提示細胞やケラチノサイトのような免疫応答の誘導に寄与する細胞群が多数常在している。皮下注射によるワクチン接種はこれらの免疫担当細胞がほとんど存在しない皮下組織へと抗原を送達することから、皮膚が有する免疫機構の強みを活かすことができていないと考えられる。一方、経皮ワクチンは表皮ならびに真皮へと抗原を送達することで、皮膚内の抗原提示細胞が効率的に獲得免疫応答を誘導し、高いワクチン効果の発揮につながることが期待される。

チン手法であり、皮膚内のランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞へと効率よくワクチン抗原を送達することができれば、ワクチン抗原を捕食したこれら抗原提示細胞が所属リンパ節へと遊走し、T細胞ならびにB細胞を抗原特異的に活性化することで強力な免疫応答を惹起できると考えられる。

しかしながら、経皮ワクチンの開発においてワクチン抗原デリバリーの障壁となるのが、前述した角質層の存在である。角質層はケラチンや繊維状タンパク質、さらにはセラミドや中性脂質から成り立っており、水溶性物質や分子量が500以上の物質の透過を制限している³⁾。現在実用化されているワクチンは、①弱毒化した生きたウイルスや細菌を用いる生ワクチン(BCG、麻疹ワクチンなど)、②病原性をなくした病原体全体あるいは病原性に関わる免疫原を用いる不活化ワクチン(日本脳炎ワクチン、インフルエンザHAワクチンなど)、③細菌が出す毒素を不活化したトキソイド(破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイドなど)といった高分子タンパク質や粒子状のコンポーネント、細菌やウイルス自体である。したがって、ワクチン抗原を単に皮膚表面に塗布するだけでは皮膚内へと到達することができないため、経皮ワクチンの開発においては、簡便かつ低侵襲な手法でワクチン抗原を角質層下へとデリバリーできるDDS基盤技術が必要不可欠とされる。

3. マイクロニードル法

マイクロニードル法は、微小な針により角質層に孔をあけることで物質を皮膚内へと送達する手法である。マイクロニードルは長さ1 mm以下の微小針であるため皮膚に穿刺しても神経終末(侵害受容器)を損傷しにくく、痛みを伴わないワクチン接種を可能にする。1976年にその概念がGerstelとPlaceによって報告されて以降⁴⁾、製造技術が困難であることから費用対効果の面が問題となりマイクロニードル開発研究は停滞していた。しかし、1990年代になって微細加工技術が発展したことで、現在ではさまざまなマイクロニードルの開発が進められている。

3-1. 中空マイクロニードル

中空マイクロニードルは、注射針と同様にニードルの中心に空洞がある微小な針であり、シリンジやポンプを用いることで、その空洞を通して皮膚内の特定部位に一定量のワクチンを注入できる(図2A)。また中空マイクロニードルはプレフィルドシリンジなどを連結して使用するため、現在使用されている抗原溶液をそのまま使用することが可能であり、マイクロニードルの形状や製造方法が抗原の種類に影響されないことが大きな利点である。ヒトにおいて、インフルエンザHAワクチンあるいは不活化ポリオワクチンを中空マイクロニードル(MicronJet600; NanoPass Technologies社)により経皮投与することで、従来の筋肉内注射による投与よりも少ないワクチン抗原量で同等の有効性を発揮することが報告されている^{5,6)}。本デバイスの実用化に向けては、注入したワクチンが皮膚内から漏れ出さないように投与部位の深さや投与速度を最適化する必要がある。

3-2. ソリッドマイクロニードル

ソリッドマイクロニードルは、シリコンや金属などで作製された剣山のような微小針であり、これを

図2 マイクロニードルの種類とデリバリー方法

A: 中空マイクロニードルは針部の空洞を介して皮膚内に抗原溶液を投与する。B: ソリッドマイクロニードルは皮膚に穿刺孔を形成して塗布された抗原溶液の皮膚内送達を促進する。C: コーティングマイクロニードルはあらかじめ針部に吸着させた抗原を皮膚内で溶解させて送達する。D: 溶解型マイクロニードルは抗原を封入した針部が皮膚内で溶解することにより抗原を送達する。

貼付することで生じた穿刺孔を介してワクチン抗原を皮膚内へ送達することができる(図2B)⁷⁾。ワクチン抗原を塗布する前にマイクロニードルを貼付するだけで、無処置の皮膚と比較して高い抗体産生を誘導できることが確認されている⁸⁾。また、皮膚にワクチン抗原を塗布した後にマイクロニードルを用いて皮膚表面を軽く引っ掻くことで、痛みなく免疫応答を惹起できる手法も報告されている⁹⁾。これらのマイクロニードル前処置あるいは後処置による経皮ワクチンは簡便な手法であるが、ワクチンの皮膚内へのデリバリーはマイクロニードルによる穿刺孔を介した受動拡散に依存するため、ワクチンの投与量やデバイスの貼付時間などの設定が難しいという課題がある。

3-3. コーティングマイクロニードル

中空マイクロニードルやソリッドマイクロニードルを用いた手法では、ワクチン抗原を含む溶液を用いるために、現在の注射ワクチン製剤と同様に cold chain を必要とする。開発途上国におけるワクチン普及を推進するためには、この課題を克服しなければならない。そこで開発されたのが、ソリッドマイクロニードルの表面にワクチンをコーティングし、その微小針を皮膚に穿刺することでワクチン抗原を皮膚内へ拡散させる手法である(図2C)¹⁰⁾。本手法では、マイクロニードル表面にワクチンが乾燥状態で吸着しているため、溶液状態における保管よりもワクチンの安定性が高いと考えられており、生きた細菌やウイルスを使用する生ワクチンへの応用も図られている¹¹⁾。現在、マイクロニードルの素材やコーティング溶液の組成を最適化することで、ワクチン抗原をより多く、より安定に保持できるコーティングマイクロニードル製剤の開発が進められている。

3-4. 溶解型マイクロニードル

上述した3種類のマイクロニードルは第一世代マイクロニードルに分類され、シリコンや金属(ステンレス、チタン)を材料として作製されている。第一世代マイクロニードルは剛性に優れる、成形しやすい、といった利点を有している一方で、生体内で折れ残り、重篤な組織傷害を引き起こす危険性を

払拭できないことが実用化を困難にしている。そこで近年では、第二世代マイクロニードルとして、生分解性バイオポリマーや生体由来成分であるヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などを利用した溶解型マイクロニードルの開発が注目されている(図2D)^{12~14)}。第二世代マイクロニードルは、生体適合性に優れる素材を使用し、マイクロニードル自体が溶解することによって装填あるいは吸着したワクチン抗原を皮膚内へと送達するといった特徴を有する。そのため、第一世代マイクロニードルの安全面における問題点を克服できると考えられており、臨床応用・実用化が期待されている。

4. 自己溶解型マイクロニードルパッチを用いた経皮ワクチン製剤

筆者らはコスメディ製薬株式会社との共同研究により独自に開発した自己溶解型マイクロニードルパッチ(MicroHyal[®]; MH)を用いた経皮ワクチン製剤の開発を進めている^{14~19)}。MHは皮膚組織成分であるヒアルロン酸を主成分としており、マイクロニードルの形状や長さは自由に調整することができる(図3A)。すでに動物実験において、破傷風・ジフテリアトキソイド、インフルエンザHA抗原、マラリアSE36抗原、アミロイド β (アルツハイマー病ワクチン)といった抗原に対して特異的な免疫応答を誘導できることを実証しており^{15,17)}、これら基礎・前臨床研究の成果に基づいてMH800(針長800 μm)を応用した経皮ワクチン製剤の臨床研究を実施した(図3B)¹⁸⁾。パイロットスタディーとして、MH800をヒト皮膚に適用した際の針部溶解性を観察したところ、貼付6時間後には対象とした3人の被験者全員においてMH800の針部は根元まで溶解した(図3C)。また、MH800貼付後の皮膚を共焦点レーザー生体顕微鏡により観察すると、皮膚表面には整列した微小針による穿刺孔が多数認められ、三次元画像の構築からそれらの穿刺孔が確実に角質層を突破して、生きた表皮・真皮にまで到達していることを確認した(図3D)。そこで、20人の被験者を対象にMH800を6時間貼付した後の経過観察・問診・血液検査を実施したところ、重篤な皮膚

図3 MH のヒト皮膚に対する穿刺特性

A : MH の針部の形状や長さはさまざまに調整することができる。B : MH の皮膚への貼付にはアプリケーターを使用する。C : ヒト皮膚に貼付した MH800 は1時間で針部の約50 % が溶解し、6時間後には根元まで完全に溶解した。D : MH800 を貼付した皮膚表面には多数の穿刺孔が認められ、穿刺孔は角質層を突破して生きた表皮に到達していることが確認された。

局所反応や全身性の副作用は認められず、MH がヒト皮膚に対しても安全に適用できる経皮ワクチンデバイスであることが示された。これらの結果を踏まえて、三価季節性インフルエンザ HA 抗原を装填した MH800 製剤を作製し、7 人の被験者に3週間隔

で2回貼付した際の安全性および有効性を従来の皮下注射接種した被験者群と比較する臨床研究プロトコルを実施した(図4 A)¹⁹⁾。HA 抗原装填 MH800 製剤を貼付した被験者において、重篤な皮膚刺激性・起炎性は認められず(図4 B)、全身性の副反応を伴

うことなく皮下注射群と同等あるいはそれ以上のワクチン効果が確認できた(図4 C)。本臨床研究結果

は、筆者らの MH を応用した経皮ワクチン製剤が注射に代わる簡便、低侵襲、安全、有効なワクチン

A

プロトコル項目	初回ワクチン投与後の日数						
	0	2	7	21	23	28	42
ワクチン投与	●			●			
皮膚刺激性評価		●	●	●	●	●	●
血液検査	●	●	●	●	●	●	●
血清中抗体検査(HI価)	●		●	●		●	●

B

C

パラメーター (EMA 評価基準)	日数	A/California/7/2009 (H1 N1)		A/Victoria/210/2009 (H3 N2)		B/Brisbane/60/2008	
		皮下注射	経皮	皮下注射	経皮	皮下注射	経皮
抗体変化率 (>2.5)	21	7.0	4.4	3.1	3.6	2.3	3.0
	42	8.6	6.6	5.1	4.9	3.1	4.4
抗体陽転率 (>40%)	21	60%	57%	40%	29%	25%	43%
	42	65%	71%	60%	43%	35%	43%
抗体保有率 (>70%)	21	95%	100%	90%	71%	35%	86%
	42	95%	100%	95%	71%	40%	86%

網掛けの数値はインフルエンザワクチンの有効性の国際的な評価基準 (EMA 評価基準) を満たすことを示す。

図4 MH800を用いた経皮インフルエンザワクチン製剤の安全性と有効性

A:三価季節性インフルエンザHA抗原(A/H1N1型、A/H3N2型、B型)を装填したMH800を健康成人男性ボランティアの左上腕側皮膚に6時間貼付した。対照群には同用量のインフルエンザHA抗原を左上腕皮膚に皮下注射した。3週間隔で2回ワクチン接種し、経時的に皮膚刺激性評価、血液検査、血清中抗体検査を実施した。B:ワクチン接種部位における局所反応を観察したところ、経皮ワクチン群では明らかな紅斑を認める被験者が多数認められたが、時間経過とともに元の皮膚状態へと回復した。C:血清中HI抗体価(中和抗体価)をEMA評価基準に照らし合わせると、A/H1N1型およびA/H3N2型に対する経皮ワクチン群の有効性は皮下注射ワクチン群と同等であった。B型に対するワクチン効果は、皮下注射ワクチン群よりも経皮ワクチン群のほうが優れていた。

接種法として極めて有望であることを示すものであり、新規剤形ワクチンとして実用化されれば、乳幼児のワクチン接種の負担を大きく軽減できるのみならず、感染症地域への渡航者に対する事前予防ワクチンの接種、開発途上国へのワクチン普及など、世界的な感染症対策に大きく貢献できるものと考えらる。

5. おわりに

革新的ワクチン技術に対する社会的ニーズの高まりに対して、筆者ら独自のMHを応用した経皮ワクチン製剤は、ワクチン接種を簡便、安全、安価にすることでワクチンの世界的普及を強力に推進し、感染症に対して安全・安心な社会の実現に大きく貢献できる可能性を有する。このDDS技術を基盤とした経皮ワクチン製剤を実用化の段階まで押し上げるには、筆者らを含めた研究機関(学)による基礎・臨床研究成果の積み重ねのみならず、関連省庁(官)による品質や承認に関するガイドラインの策定、ならびに製薬メーカー(産)による製剤製造法や品質試

験法の確立など、新規ワクチン剤形であるからこそ抱える課題を産官学のオールジャパン体制によってクリアしていくことが必要とされる。日本発・世界初の経皮ワクチン製剤の実用化による世界的な感染症対策への貢献が一日でも早く実現できればと願っている。

謝辞

本研究は、コスメディ製薬株式会社、奈良県立医科大学皮膚科学教室、大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学講座との共同による成果であります。この場をお借りして御礼申し上げます。また、各種ワクチン抗原を御供与いただきました一般財団法人阪大微生物病研究会に感謝いたします。なお本研究は、独立行政法人医薬基盤研究所「先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業」、厚生労働科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業」、国立研究開発法人日本医療研究開発機構研究費「新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業」、ならびに文部科学省科学研究費補助金「基盤研究(B)」の助成を受けて実施したものです。

文献

- 1) J. Valladeau, S. Saeland: Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* 17, 273-283(2005)
- 2) K. Sugita, *et al.*: Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin. Exp. Immunol.* 147, 176-183(2007)
- 3) B. W. Barry: Breaching the skin's barrier to drugs. *Nat. Biotechnol.* 22, 165-167(2004)
- 4) M. S. Gerstel, V. A. Place: Drug delivery device. *US Patent* No. 3(964), 482(1976)
- 5) P. Van Damme, *et al.*: Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine* 27, 454-459(2009)
- 6) A. Anand, *et al.*: Early priming with inactivated poliovirus vaccine (IPV) and intradermal fractional dose IPV administered by a microneedle device: A randomized controlled trial. *Vaccine* 33, 6816-6822(2015)
- 7) S. Henry, *et al.*: Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 87, 922-925(1998)
- 8) Z. Ding, *et al.*: Microneedle arrays for the transcutaneous immunization of diphtheria and influenza in BALB/c mice. *J. Control. Release* 136, 71-78(2009)
- 9) J. A. Mikszta, *et al.*: Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery. *Nat. Med.* 8, 415-419(2002)
- 10) H. S. Gill, M. R. Prausnitz: Coating formulations for microneedles. *Pharm. Res.* 24, 1369-1380(2007)
- 11) Y. Hiraishi, *et al.*: Bacillus Calmette-Guérin vaccination using a microneedle patch. *Vaccine* 29, 2626-2636(2011)
- 12) S. P. Sullivan, *et al.*: Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat. Med.* 16, 915-920(2010)
- 13) S. Naito, *et al.*: Antigen-loaded dissolving microneedle array as a novel tool for percutaneous vaccination. *Vaccine* 30, 1191-1197(2012)
- 14) K. Matsuo, *et al.*: A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens. *J. Control. Release* 161, 10-17(2012)
- 15) K. Matsuo, *et al.*: Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. *J. Control. Release* 160, 495-501(2012)
- 16) Y. Hiraishi, *et al.*: Performance and characteristics evaluation of a sodium hyaluronate-based microneedle patch for a transcutaneous drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 441, 570-579(2013)
- 17) K. Matsuo, *et al.*: Vaccine efficacy of transcutaneous immunization with amyloid β using a dissolving microneedle array in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* 266, 1-11(2014)
- 18) S. Hirobe, *et al.*: Development and clinical study of a self-dissolving microneedle patch for transcutaneous immunization device. *Pharm. Res.* 30, 2664-2674(2013)
- 19) S. Hirobe, *et al.*: Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch. *Biomaterials* 57, 50-58(2015)