薬物の経皮吸収及び経皮免疫接種への応用に向けた

マイクロニードルの利用に関する研究

竹内　亜砂佳

目次

略号/記号 4
諸言 5
第 1 章　経皮吸収型製剤としての MN のキャラクタリゼーション 12
第 1 節　経皮吸収を目的とした水溶性低分子化合物含有溶解性 MN の開発 13
第 1 項　実験の部 15
1. 試薬及び実験材料 15
2. 実験動物 15
3. 試験製剤の調製 16
3-1. GST 含有 MNAC の調製 16
3-2. 静脈内注射用 GST 溶液の調製 16
4. MN の形状観察 17
5. MNAC 中の GST 含量測定、投与後の残存量測定及び投与量の計算 17
6. *In vivo* 動物実験 (経皮投与実験、静脈内投与実験) 18
7. 血漿中 GST 濃度測定 (LC-MS/MS 法) 18
8. 薬物動態学的評価 19
9. 製剤安定性試験 20
10. 統計解析 20
第 2 項　結果の部 21
1. MN の形状観察 21
2. MNAC 中の GST 含量と投与後の残存量測定及び投与量の算出 22
3. ラット *in vivo* における MNAC 皮膚投与後の GST 全身吸収動態評価 23
4. 種々温度条件下での製剤中薬物の安定性 25
第 3 項　考察 27
第 4 項　小括 30
第 2 章　経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーション (抗原の皮内送達と抗体産生) 31
第 1 節　経皮免疫を目的とした高分子化合物 (モデル抗原) 含有溶解性 MN の開発 33
第 1 項　実験の部 34
1. 試薬及び実験材料 34
2. 実験動物 34
3. 試験製剤の調製 34
3-1. OA 含有 MNAC の調製 34
3-2. 皮下注射用 OA 溶液の調製 35
4. MN の形状観察 35

5. MNAC 中の OA 含量測定、投与後の残存量測定及び投与量の計算.....36
6. *In vivo* 免疫応答実験 36
7. 抗体価測定 37
8. 統計解析 37
第 2 項 結果の部 38
1. MN の形状観察 38
2. MNAC 中の OA 含量と投与後の残存量測定及び投与量の算出 39
3. *In vivo* 免疫応答実験結果 40
第 3 項 考察 42
第 4 項 小括 44
第 2 節 MN からの高分子化合物 (モデル抗原) の皮内送達部位についての検証.....45
第 1 項 実験の部.....46
1. 試薬及び実験材料 46
2. 実験動物 46
3. OA 含有 3 層性 MNAC (3 層性 MN) の調製.....46
4. MN の形状観察 47
5. 3 層性 MN の OA 含量測定、投与後の残存量測定及び投与量の計算 47
6. 3 層性 MN 及び 2 層性 MN からの皮内抗原送達部位の評価方法 47
6-1. ビデオマイクロスコープによる皮膚組織垂直切片の作成及び観察法 47
6-2. 皮膚組織水平切片の作成と切片中 FL-OA 分布率の測定方法 48
7. *In vivo* 免疫応答実験 49
8. 抗体価測定 49
9. 統計解析 49
第 2 項 結果の部 50
1. MN の形状観察 50
2. 皮内における抗原送達部位の評価.....52
2-1. MN 投与後の皮膚組織垂直切片の観察 52
2-2. 皮膚組織水平切片中 FL-OA 分布率の評価.....53
3. 3 層性 MN 中の OA 含量と投与後の残存量測定及び投与量の算出.....54
4. *In vivo* 免疫応答実験結果 55
第 3 項 考察 59
第 4 項 小括 61
第 3 章 経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーション (物理的刺激に関する初期評価).....62
第 1 節 MN 投与に伴う皮膚への物理的刺激が皮膚樹状細胞へ与える影響について 63

第 1 項 実験の部 65
1. 試薬及び実験材料 65
2. 実験動物 65
3. MN の形状観察 65
4. MN の皮内刺入距離の評価 66
4-1. コーティングマイクロニードルの調製.....66
4-2. 皮内刺入距離の測定.....66
5. 皮膚への物理的処置及び免疫応答実験.....67
5-1. 物理的処置後の表皮樹状細胞 (LC) の評価.....67
5-2. 物理的処置後の真皮樹状細胞 (dDC) の評価 67
6. 表皮細胞及び真皮細胞分散液の調製.....68
7. 樹状細胞表面抗原の解析.....68
8. In vivo 皮膚形態学的観察 69
9. 統計解析 69
第 2 項 結果の部 71
1. MN の形状観察 71
2. MN の皮内刺入距離結果 72
3. 物理的処置に伴う皮内免疫応答 (表皮).....74
3-1. 500 μm MN 処置に伴う LC 表面抗原の発現変化 74
3-2. 種々処置後の LC 表面抗原の発現変化の比較.....76
3-3. 500 μm MN 処置に伴う LC 表面抗原の経時的発現変化 77
4. 物理的処置に伴う皮内免疫応答 (真皮).....78
4-1. 500 μm MN 処置に伴う dDC 表面抗原の発現変化.....78
4-2. 種々処置後の dDC 表面抗原の発現変化の比較 81
5. 皮膚形態学的評価 82
第 3 項 考察 83
第 4 項 小括 86
総括.....87
謝辞.....93
引用文献.....94

略号/記号

略語

BA	Bioavailability
dDC	dermal Dendritic cells
DDS	Drug Delivery System
EPO	Erythropoietin
FL-OA	Fluorescein labeled Ovalbumin
GST	Granisetron
hGH	human Growth Hormone
HPLC	High performance liquid chromatography
IV	Intravenous
LC	Langerhans cells
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MN	Micro Needle
MNAC	Dissolving Micro Needle Array Chip
OA	Ovalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
RMFI	Relative Mean Fluorescence Intensity
SC	Subcutaneous
TDDS	Transdermal Drug Delivery System
TS	Tape Stripping

記号

AUC	血漿中薬物濃度-時間曲線下面積
C_{max}	最高血漿中濃度
k	消失速度定数
$t_{1/2}$	終末相消失半減期
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間

諸言

新薬を上市するまでには、200~300 億という多額なコストと 9 年~17 年という長期間を必要とする。さらに、その成功確率は 1/10,000 以下とも言われている [1)]。Drug Delivery System (DDS) を含む創剤技術は、既存薬物に対し、その欠点を補い、薬物本来のポテンシャルを引き出すことで価値を高め、既存薬物をさらに医療に貢献できる医薬品として生まれ変わらせる。新薬創出が年々難しくなっている中、創剤研究は、非常に重要な研究として位置づけられている。

現在、上市されている医薬品の有効成分は、低分子化合物からペプチド、ワクチン等の高分子化合物まで多岐にわたる。これら医薬品において、主に用いられている剤形は、経口剤あるいは注射剤である [2)]。経口剤は、利便性が良くかつ安価に調製できるため、最も使用頻度が高い。しかし消化管分解を受ける薬物には適さない剤形である。近年、医薬品市場での勢いが増してきているワクチンや抗体医薬といったバイオ医薬品は、その筆頭である。さらに、高齢化社会が進む中で、嚥下困難な高齢患者の服用が増えることを考えると、経口剤が最適な剤形とは言い切れない。一方、注射剤は、速やかな薬効が期待できる剤形である。しかし疼痛を伴うことはもちろん、生産から使用までの cold chain が必要なこと、投与に医療従事者が必要になるといったハンドリング上の欠点を有するほか、感染症のリスクも伴う。

このような状況下、経口剤や注射剤に代わる剤形として、経皮投与製剤が注目を集めている。経皮投与製剤には、下記 1) ~ 5) にあげるような利点 [3,4)]がある。

1) 消化管吸収に伴う初回通過効果の回避により、薬物の分解低減が可能である
2) 注射に比べて痛みがない
3) 投与方法が簡便である
4) 持続的な薬効発現が可能である
5) 副作用発生時における服用中止が容易である

ただし、高分子や親水性の医薬品は、皮膚最外層に存在する角層バリアの影響で、皮膚透過が制限されるため、経皮投与製剤への適用は難しい。この課題を解決するため、薬物の皮膚透過性を向上させる技術として、外部エネルギーを利用した物理的促進法による Transdermal Drug Delivery System (TDDS) の研究が進められてきた [5,6,7,8]。TDDS 技術の一つがマイクロニードル (MN) である。

MN は、長さ数 100 μm の微小なニードルを利用して皮膚に小孔を開け、皮膚透過の律速段階である角層バリアを物理的に貫通し、確実に薬物透過ルートを形成する経皮透過促進デバイスであり、TDDS の中でも特に注目を集めている。その微小構造により、MN は神経等付属器官の存在する真皮深部には達しないため、痛みを伴わない。さらに、投与に特別な器具を用いず、自己投与を可能とする MN も研究されている。Table 1 及び Figure 1 に、MN の種類について基剤別及び薬物送達機構別にまとめた。1970 年代後半に、Gerstel によって初めて MN の概念が提唱された [9]後、1990 年代には電子工学による微細加工技術の向上に伴い、金属やシリコーンといった非生分解性物質を基剤とした MN の開発が進められてきた [10]。現在報告されている MN の薬物送達機構としては、MN 内の空洞から薬液を注入する中空型 [11]や MN に薬物をコーティングした中実型 [12]、そのほか、MN で小孔を開けた後に薬液を塗る 2 段階投与型が挙げられる。これら非生分解性 MN は、優れた成形性及び強度を有している。ただし、その薬物送達メカニズム上 (Figure 1 (A)~(C))、これら非生分解性 MN は、投与工程が煩雑であることや投与可能な主成分量が少なくなるといった欠点も有している。2000 年代に入ると、生分解性物質を基剤とし、薬物を MN に内包させ、MN の溶解と共に薬物を投与する (Figure 1 (D)) 皮内溶解性マイクロニードルの研究も始まった。溶解性 MN の基剤として、麦芽糖、ポリ乳酸あるいはポリグリコール酸を用いた製剤が報告されている [13,14]。しかしこれらは、製造工程中に加熱工程や有機溶媒の使用が発生するため、含有薬物が変性する可能

性がある。熱や有機溶媒で結晶形が変化する医薬品はもちろん、ワクチン等の高分子タ

ンパクの適用も制限される。

Table 1 マイクロニードルの基剤別分類

分解性	基剤	利点	欠点
非生分解性	金属 シリコーン	強度が強い	脱落した MN の 皮内残存リスク
	非水溶性合成高分子 (ポリカーボネート)	大量生産向き 成形性に優れている	脱落した MN の 皮内残存リスク
	水溶性合成高分子	大量生産向き 成形性に優れている	強度が弱い 吸湿に弱い
生分解性	ポリ乳酸 ポリグリコール酸	安全性に優れている 大量生産向き 含有薬物の持続放出	製造時有機溶媒の使用 生体内での分解の遅さ
	麦芽糖 ゼラチン	安全性に優れている 速やかな皮内溶解性	製造時高熱処理が必要 強度が弱い 吸湿に弱い
	コンドロイチン硫酸 Na デキストリン ヒアルロン酸	安全性に優れている 速やかな皮内溶解性 簡便な製造工程	吸湿に弱い

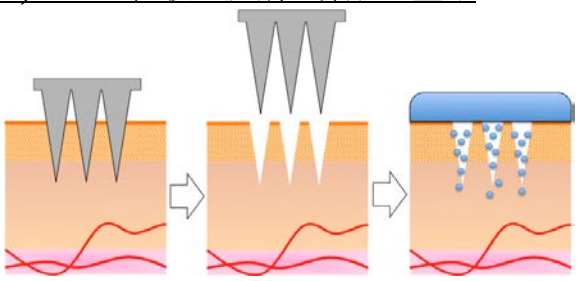
このように、様々なタイプの MN が研究されてきたが、いずれも医療用として実用化までには至っていない。

TDDS として MN を実用化させるためには、MN の基本的な特性を把握することを通じて有用性を明らかにすることが必要である。本研究では、より良い MN の開発と共に、その有用性の評価及び MN の基本的な特性の把握を行った。以下にその概要を述べる。

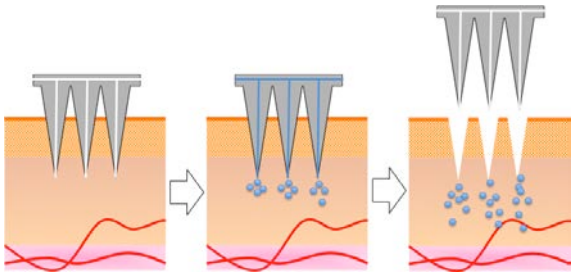
＜MN の開発＞

本研究では、洩糸性のコンドロイチン硫酸ナトリウムを基剤とし、内部に薬物を含有させた溶解性 MN の開発を行った。本製剤投与後、皮内の水分で速やかに MN が溶解し、含有薬物を放出する仕組みとなっている。

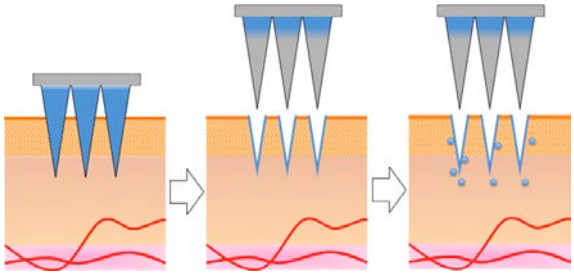
(A) MN 処置後の皮膚に薬物を塗布



(B) 中空型 MN の中から薬物溶液を注入



(C) MN に薬物をコーティングさせ MN と共に薬物を投与



(D) MN 内に薬物を内包させ MN の溶解と共に薬物を投与

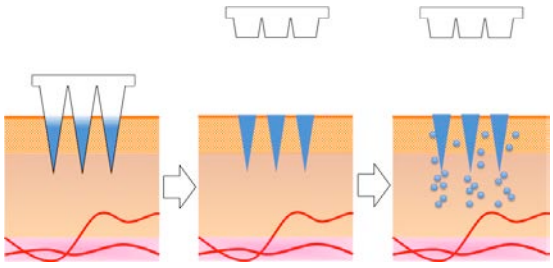


Figure 1　マイクロニードルからの薬物デリバリー方法の種類

＜MN の有用性評価＞

溶解性 MN については、デスモプレシン、インスリン、human Growth Hormone (hGH)、Erythropoietin (EPO) といった分子量 1 kDa ~ 35 kDa のホルモン性医薬品を適用させ、経皮吸収性を評価した報告が複数されている [15,16,17]。しかし、これらより低分子の水溶性

化合物や、これらより高分子のバイオ医薬品については、溶解性 MN 適用時の有用性に関して十分な検討がされていない。

角層に小孔を開けて薬物透過ルートを形成する MN の特徴から、いかなる薬物も、皮膚透過が可能になると考えられる。一方で、皮膚透過後の薬物の血中移行性は、適用薬物の分子量に依存すると [18)]言われていることから、比較的低分子の薬物に対しては、MN は経皮吸収デバイスとして、一方高分子の薬物に対しては、適用部位での反応 (局所作用、経皮免疫など) を期待する皮内投与デバイスとして効果を発揮することが予想される。本研究では、低分子薬物あるいは高分子薬物を含有させた MN について、それぞれ全身循環への薬物の移行性及び免疫惹起性について評価し、その有用性を確かめた。

＜MN の基本的特性の把握＞

MN の実用化に向け、把握しておくべき基本的な特性としては、MN の形状、皮内刺入深度、穿刺力、強度、安定性といった製剤学的な特性から、投与薬物の体内動態、薬効発現に関する特性、安全性、投与後の皮膚の修復性、皮内細胞への影響に関する特性まで多岐にわたる。本研究ではこれらの項目のうち、MN の形状、皮内刺入深度、投与薬物の体内動態及び皮内細胞への影響に特に着目し、MN のキャラクタリゼーションを行った。

MN を経皮吸収型製剤として開発する場合、投与後の薬物の全身吸収動態の特徴について把握しておく必要がある。

また、MN を経皮免疫製剤として開発する場合、初期ターゲットとされる皮膚樹状細胞と MN との関係について把握しておくことが、非常に重要だと考える。

皮膚は、その構造に着目した場合、単に外界とのバリアではなく免疫の場としても考えられている。表皮には強力な抗原提示能を有するランゲルハンス細胞 (Langerhans cells: LC) が、真皮には各種サブセットを含む真皮樹状細胞 (dermal Dendritic cells:

dDC) が高密度に分布していて、初期免疫を司っている。近年、これら皮膚樹状細胞をターゲットとした経皮ワクチンの効果も、多数報告されている [19,20,21]。また、ワクチンの皮内注射と皮下注射とでは、皮内注射の方が効率良く免疫を惹起できると言われている [22]。さらに、ワクチン投与後、LC や dDC がクロスプレゼンテーションの違いを始めとした異なる挙動を示すことも報告されており [23]、ワクチンは投与部位の違いにより、その免疫応答のメカニズム及び効果に差があると考えられている。また、皮膚への物理的刺激が免疫応答に影響することも報告されている [24]。

ワクチンは感染症領域の枠を超え、がんやアレルギー疾患の領域にもその適応が拡大してきている。TDDS の中でも、MN は皮内への優れた抗原送達能を有するため、経皮免疫の分野でさらなる開発が期待されている。

しかし、経皮ワクチンへの MN の適用は研究段階であり、基本的特性について不明な点も多い。実際、経皮免疫の初期ターゲットとされる皮膚樹状細胞と MN との関係についても明らかになっていない。さらに、MN のような物理的な刺激が樹状細胞に対して影響を及ぼす可能性があるが、そのような点も明らかにされていない。よって、経皮免疫製剤としての MN の基本的特性をより詳細に把握する必要があると考える。

以上を踏まえ、経皮吸収及び経皮免疫 (ワクチン) 製剤としての MN の実用化に向けた MN の有用性評価と基本的特性を明らかにすることを目的に、本研究を行った。

本研究では、第 1 章で、経皮吸収型製剤としての MN のキャラクタリゼーションを行うため、第 1 節にて難皮膚透過性薬物である水溶性低分子化合物を含有させた溶解性 MN を調製し、その経皮吸収性を評価した。次に第 2 章で、経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーションを行うため、第 1 節では、難皮膚透過性薬物である高分子化合物 (モデル抗原) を含有させた溶解性 MN を調製し、その経皮免疫性を評価した。続いて、MN の経皮免疫分野での発展を見据え、皮膚樹状細胞との関わりに着目し、第 2 節では、高分子化合物 (モデル抗原) の皮内送達部位の検証を行い、経皮免疫用 MN に

おける適切な薬物保持部位及び皮内送達部位について明らかにした。さらに第3章第1節では、MN投与に伴う物理的刺激に注目し、初期検討として、より一般的なMNを用い、その刺激が皮膚樹状細胞に与える影響について評価した。

[注釈] 現状、FDA等の規制当局において、MNに関するレギュレーションは設定されていない。MN が貼付剤 (経皮投与製剤) もしくは注射剤に分類されるかについては、検討段階にある。また、MN に要求される製剤設計 (針の長さ及び基剤など)、 評価系及び分類などを含めた MN の定義も確立していない。 今回、本学位論文内では、MNを貼付剤 (経皮投与製剤) としてとらえ、研究を実施している。

第 1 章　経皮吸収型製剤としての MN のキャラクタリゼーション

現在上市されている医薬品は、主に、経口剤か注射剤として使用されている。経皮投与の利点を考慮すると、経皮投与製剤化が望まれる医薬品化合物は多いが、皮膚最外層に存在する角層の突破が難関となり、実用化はあまり進んでいない。角層を透過できる化合物の分子量は 500 Da 以下だと考えられている [25)]。また、角層の構成成分は、角質細胞とトリグリセリド、遊離脂肪酸及びセラミドからなる親油膜である [26)]。そのため、化合物が皮膚透過するためには、適度な脂溶性も必要であり、低分子であっても水溶性化合物の皮膚透過性は極めて低いことが知られている。MN は、上記特性を持つ角層に対し、物理的に小孔を開けて確実に薬物透過ルートを形成する。よって、従来の方法では皮膚透過が難しい薬物に対しても、MN を使用することで経皮投与製剤化が期待できる。

これまでに、デスモプレシン、インスリン、hGH 及び EPO といった分子量 1 kDa ~ 35 kDa のホルモン性医薬品を溶解性 MN に適用させた際の有用性及びそのキャラクタリゼーションが行われてきた [15,16,17)]。一般的には、皮膚透過後の薬物の全身循環系への移行は、その分子量に依存し、5 kDa 以下の分子量の薬物は、速やかに血中へ移行すると言われている [27)]。溶解性 MN 開発の前段階として検討していた 1 本状溶解性マイクロパイルでも、含有薬物の分子量が小さくなるほど拡散性が増大し、Bioavailability (BA) の増加及び最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) の早期化が確認されている [18)]。つまり、すでに報告のあるホルモン性医薬品より低分子の化合物については、溶解性 MN に含有させることで、薬物の速やかな経皮吸収が期待される。しかし、その有用性及び特性についてはほとんど評価されていない。

そこで、本章第 1 節では、経皮吸収型製剤としての MN の実用化に向け、水溶性低分子化合物含有溶解性 MN の開発を行い、経皮吸収性の評価及びキャラクタリゼーションを行った。

第 1 節　経皮吸収を目的とした水溶性低分子化合物含有溶解性 MN の開発

本節では、難皮膚透過性薬物である水溶性低分子化合物を含有させた溶解性 MN を調製し、経皮吸収型製剤としての有用性評価及び特性把握を行った。

本節では、モデル薬物としてグラニセトロン (GST) を選択した。グラニセトロンは、分子量 348.87 Da、*n*-オクタノール/水分配係数 0.23 の水溶性低分子化合物である [28)]。現在、抗悪性腫瘍薬服用時の副作用 (悪心嘔吐) の治療薬として、注射剤及び経口剤で使用されている。しかし、注射剤は、外来患者の慢性治療には適していない。また経口剤についても、即効性が期待できず、悪心嘔吐の症状を伴う患者にとって望ましい剤形とはいえない。GST は、これまでにも経皮投与製剤化の検討が進められてきた。経皮投与製剤は、持続的な薬効発現が期待できる一方、即効性には劣り、さらに BA を確保することも難しいことが知られている。実際、特別な技術を用いない経皮投与製剤では、即効性も無くかつ 40%の BA しか得られていない [29,30)]。BA を改善するため、TDDS であるイオントフォレシス [31)]やナノエマルション化 [32)]による試みも報告されているが、BA は約 60%と依然として低いままである。つまり、即効性もありかつ BA も良好な経皮投与製剤は、これまで報告されていない。

以上を踏まえ、即効性かつ BA の改善が期待できる GST 含有溶解性 MN の調製を試みた。本溶解性 MN は、洩糸性のコンドロイチン硫酸ナトリウムを基剤とし、底面 300 μm、高さ 500 μm の円錐状の形状を有している。円錐型 MN の上部に薬物を含有し、下部は薬物を含有しない 2 層性の構造を基本とする。この MN を、基盤に数 100 本列状に並べたものが、Dissolving Micro Needle Array Chip (MNAC) である。また、本製剤の製造方法はシンプルで加熱工程や有機溶媒を必要としないことから、薬物本体への影響は少ないと考えられる。

本製剤を用い、MN 適用後の GST の全身吸収性について評価した。また、成形後の形状確認と製剤中の GST の安定性を評価することで、GST 含有溶解性 MN の製剤特

性の評価も合わせて行った。

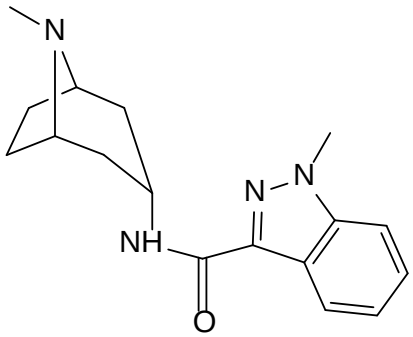
難皮膚透過性薬物であるGSTの溶解性MNへの適用を確認し、さらに、薬物動態学的解析により評価を行うことで、水溶性低分子化合物含有溶解性 MN の経皮吸収型製剤としての基本的特性が把握できると考える。

本節で得られる情報は、経皮吸収型製剤として溶解性 MN の開発を行う上で、重要な基礎的知見になると考える。

第 1 項　実験の部

1. 試薬及び実験材料

グラニセトロン (Granisetron: GST) (Figure 2) は、LKT Laboratories 社 (Minnesota、USA) より購入した。コンドロイチン硫酸ナトリウム、メチレンブルー、アセトニトリル、ジエチルエーテル、酢酸アンモニウム及び酢酸はナカライテスク (京都、日本) より購入した。その他の試薬類は、すべて市販の特級品を精製せずに用いた。



Molecular formula: $C_{18}H_{24}N_4O$・HCl
Molecular weight: 348.87
n-octanol / water partition coefficient: 0.23

Figure 2　Chemical structure and physical properties of GST

2. 実験動物

Wistar Hannover 系雄性ラット (体重 313~351 g) は、日本エスエルシー株式会社 (静岡、日本) より購入した。なお、動物の飼育及び実験は京都薬科大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、京都薬科大学動物実験倫理規定に従い行った。

3. 試験製剤の調製

3-1. GST 含有 MNAC の調製

MN の上部に GST を含有し、下部は含有しない 2 層性 MNAC を調製した。

まず、1 cm^2あたりに深さ約 500 μm、開口部直径約 300 μm の逆円錐状細孔を列状に 100 個有するシリコーン樹脂製のメス型を準備した。また、GST を 1 mg あるいは 4 mg、メチレンブルー0.5 mg 及び水溶性の洩糸性高分子物質であるコンドロイチン硫酸ナトリウム 25 mg をサンプルカップに秤量した後、100 μL の精製水を加え、ゲル状になるまで練り、粘調性の濃厚液を室温下で調製した。次に、粘稠性濃厚液をシリコーン樹脂製のメス型に塗布し、サランラップ (クレハ化学、東京、日本) を被せ、卓上遠心分離器クボタ 4000 (クボタ、東京、日本) を用いて 2,300×*g* で樹脂基盤ごと 15 分間回転させ、遠心力を利用し、加重下充填した。乾燥後、コンドロイチン硫酸ナトリウム 25 mg に精製水 20 μL を加えて作成した粘調性濃厚液をメス型に塗布した。上記のように、粘稠性濃厚液をメス型に塗布する工程は、2 工程とした (工程 1: GST 含有コンドロイチン硫酸ナトリウムゲルの塗布、工程 2: コンドロイチン硫酸ナトリウムゲルの塗布)。塗布工程 2 に続き、基盤をメス型の上に被せ、メス型ごと 15 分間回転させ、遠心力を利用して加重下で充填及び乾燥した。3 時間後、基盤をメス型に対して垂直方向に引き離すことにより、基盤に MN を転写し、低含量及び高含量の 2 層性 MNAC を得た。

3-2. 静脈内注射用 GST 溶液の調製

静脈内注射用 GST 溶液は、GST を生理食塩水に溶解させて調製した (50 μg /mL)。

4. MN の形状観察

3-1. で調製した MNAC を、ビデオマイクロスコープ (VH-5500; キーエンス社、大阪、日本) で観察及び撮影し、MN 基底部の直径、高さ及び青色に着色された GST 保持部の先端からの長さを測定した。

5. MNAC 中の GST 含量測定、投与後の残存量測定及び投与量の計算

調製した MNAC を 1.0 mL の蒸留水が入ったサンプルカップの中で溶解させ、MNAC 中の GST を抽出した。サンプルカップを遠心分離 (9,000×*g*、5 分) し、上澄み 100 μL をとり、試料溶液とした。別途 GST の標準溶液を調製して HPLC 法 (絶対検量線法) にて分析し、MNAC 中の GST 含量を算出した。HPLC 法の測定条件を Table 2 に示した。また、後述する動物実験で使用した後の MNAC を回収し、同様の方法で MNAC 中の GST 残存量を算出した。さらに、MNAC 中の GST 含量から GST 残存量を差し引くことで、GST 投与量を算出した。

Table 2 HPLC-UV condition for GST in samples

Items	Condition
HPLC system	LC-10A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)
Automatic sample injector	AS-8010 (Tosoh Corp., Tokyo, Japan)
Column	YMC Pack® ODS-A (4.6 mm i.d.×250 mm)
Column temperature	60°C
Mobile phase	10 mM ammonium acetate buffer with 0.5% acetic acid : acetonitrile = 60 : 40 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
UV ditector	SPD-10A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)

6. *In vivo* 動物実験 (経皮投与実験、静脈内投与実験)

Wistar Hannover 系雄性ラット (体重 313~351 g) に、ペントバルビタール生理食塩水を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した。麻酔下、固定台で背位固定した状態で実験を行った。実験動物を低含量 MNAC 投与群、高含量 MNAC 投与群及び静脈内投与群 (IV) の 3 群に分けた。サンプル数は、各群 4~5 匹とした。MNAC 投与群のラットの腹部を、電気シェーバー (ES7111; パナソニック社、大阪、日本) で除毛した。試験製剤投与 5 分前に左頸静脈から 250 μL の血液を採取した。次に、MNAC 投与群のラット腹部除毛皮膚に各 MNAC を投与した。なお MNAC 投与には特別な器具は用いず、MNAC を手に持ち、2 本の指で皮膚を挟むように MNAC を押し当てることで、皮膚に対して垂直にかつ均一に投与した。MNAC は 3 分間皮膚に貼付し、その後回収した (実験 5. 投与後の残存量測定に使用)。また、静脈内投与群には、3-2. で調製した静脈内注射用 GST 溶液を右頸静脈から投与した (50 μg/kg)。各試験製剤投与後、経時的に左頸静脈から 250 μL の血液を採取し、遠心分離 (9,000×*g*、15 分間、4°C) した後、血漿 100 μL を分取した。分取した血漿は、測定まで-80°C にて凍結保存した。

7. 血漿中 GST 濃度測定 (LC-MS/MS 法)

血漿試料中における GST 濃度測定は、Jiang らの方法 [33]に準じて LC-MS/MS 法にて行った。検量線の作成に際し、GST 標準水溶液を用いて標準試料を調製した (0.1-1,000 ng/mL)。血漿及び標準試料 100 μL に対し、除タンパク剤としてアセトニトリル 200 μL を加え、攪拌した後、遠心分離 (9,000×*g*、15 分間、4°C) した。上清 260 μL を 1.5 mL マイクロチューブに移し、ジエチルエーテル 1.2 mL を加え 1 分間激しく攪拌した後、再び遠心分離した。有機溶媒相をサンプルバイアルに移し、窒素ガスを吹き付けながら湯浴上 (70°C) で蒸発乾固した後、100 μL の LC-MS/MS 用移動相溶液にて再溶解し、その 5 μL を LC-MS/MS システム (API3200; Applied Biosystems、California、

USA) に注入して測定した。GST の検出質量荷電比 (*m/z*) は、 313.1→138.1 *m/z* にて行った。LC-MS/MS 法の測定条件を Table 3 に示した。

Table 3　LC-MS/MS condition for GST in samples

Items	Condition
Pump	LC-10AD (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)
Automatic sample injector	AS8020 (Tosoh Corp., Tokyo, Japan)
Column	Chemcopak® ODS (2.1 mm i.d. × 100 mm)
Column temperature	25°C
Mobile phase	10 mM ammonium acetate buffer with 0.5% acetic acid : acetonitrile = 60 : 40 (v/v)
Flow rate	0.2 mL/min
Ionization	ESI-positive ion mode

8. 薬物動態学的評価

GST の薬物動態学的パラメータは、ノンコンパートメント解析法 [34)]で求めた。C_{max} (最高血漿中濃度) 及び T_{max} (最高血漿中濃度到達時間) は実測値より求めた。消失速度定数 (k) は終末相の直線部分の勾配から線形最小二乗法を用いて算出した。血漿中薬物濃度-時間曲線下面積 AUC は最終実測値までの値を線形台形公式により求めた (AUC_{last})。それ以降の値は無限時間まで外挿し、それぞれ補正項として Cp(last)/k を加えて $AUC_{0-\infty}$ (h・ng/mL) を求めた。終末相消失半減期 ($t_{1/2}$) は $t_{1/2}$=ln2/k より算出した。

生物学的利用能 (Bioavailability: BA(%)) を以下のように定義した。

$BA (\%) = (AUC_{MNAC}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{MNAC}) \times 100$

$Dose_{MNAC}$： MNAC 中 GST 含量から GST 残存量を差し引くことで求めた GST 投与量

9. 製剤安定性試験

低含量 MNAC を、-80、4、23 及び 40°C の条件下で 3 ヶ月間保存し、経時後、MNAC 中の GST 含量を HPLC 法 (実験 5 参照) にて求めた。試験開始時と GST 含量を比較し、製剤中の GST の安定性を確認した。

10. 統計解析

データはすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。

第 2 項　結果の部

1. MN の形状観察

Figure 3 に調製した MNAC の全体画像 (A) 及び拡大画像 (B) を示す。全体画像より 1.0 cm×1.0 cm 四方の基盤上に、10×10 本の MN が列上に並んでいることが確認できた。拡大画像より、個々の MN の形状も円錐形をしていることが確認できた。

Figure 3 (B) の (a)、(b) 及び (c) の両矢印でそれぞれ示す MN の高さ、底面部の直径及び GST 保持部分の長さに関する形状計測結果を Table 4 に示す。低含量及び高含量の 2 種類の GST 含有溶解性 MN の高さは、それぞれ 484±5 μm 及び 487±6 μm であり、底面部の直径は、それぞれ 292±3 μm 及び 299±2 μm であった。また、GST 保持部分は、MN 先端から 322±1 μm 及び 327±3 μm であった。形状観察の結果、調製した 2 種類の MNAC は、設計通り、高さ約 500 μm、底面約 300 μm の円錐上の形状の MN を有していることが確認できた。

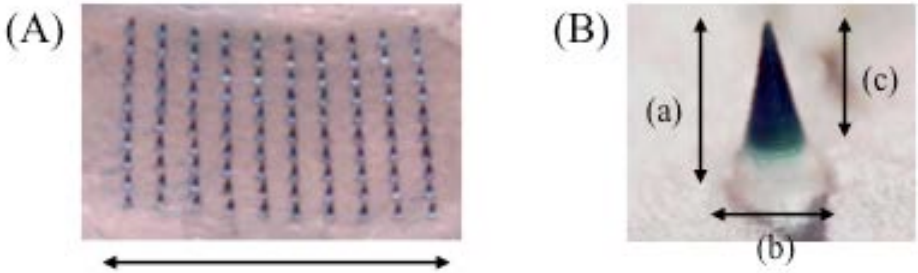


Figure 3　GST loaded dissolving microneedle array chip made of chondroitin sulfate as the base used in the *in vivo* rat absorption studies. (A) Overview image of dissolving microneedle arrays. (B) Enlarged image of a dissolving microneedle containing GST at its acral portion: (a) entire length, (b) diameter of the basement, and (c) length of the drug-loaded space.

Table 4　Physicochemical properties of GST loaded dissolving microneedle array chips

Array chip	Total height (a) (μm)	Diameter of the basement (b) (μm)	Length of GST loaded space (c) (μm)
Low dose type	484±5	292±2	322±1
High dose type	487±6	299±2	327±3

The alphabets inside the parentheses represent the corresponding length in Figure 3. Each value shows the mean±S.E. (n=5-10).

2. MNAC 中の GST 含量と投与後の残存量測定及び投与量の算出

Table 5 に MNAC 中の GST 含量、投与後の残存量及び投与量の計算結果を示した。低含量タイプの GST 含量 ： 高含量タイプの GST 含量を 1 : 4 になるよう処方設計した。調製した製剤における GST 含量比は、処方設計通り、低含量タイプの GST 含量 ： 高含量タイプの GST 含量＝1 ： 4 であった。投与後の MNAC 中には、2 種類の MNAC 共に、含量の約半量の GST が残存していた。また、投与後の MNAC を目視にて観察したところ、青色色素が残った状態であった (data not shown)。

以上より、MNAC 投与で、MN の全長が皮膚に刺さるわけではなく、MN の先端よりある一定の深さまでしか皮膚に刺入できないことが示唆された。また、含量及び残存量から投与量を計算した結果、低含量タイプの MNAC による GST 投与量 ： 高含量タイプの MNAC による GST 投与量＝1 : 4 であることを確認した。

Table 5　GST contents in dissolving microneedle array chips, recovered amounts of GST and the estimated administered doses

Array chip	GST content (μg)	Recovered amount of GST (μg)	Administered dose (μg/rat)
Low dose type	10.0±0.12	4.73±1.09	4.91±0.85
High dose type	37.6±2.31	19.2±1.50	18.3±1.50

Each value represents the mean±S.E. (n=4)

3. ラット *in vivo* における MNAC 皮膚投与後の GST 全身吸収動態評価

Figure 4 は、GST を、静脈内投与または MNAC にて経皮投与した際の血中 GST 濃度の時間的推移を示している。得られた薬物動態学的パラメータを Table 6 に示す。

静脈内投与群及び MNAC 投与群共に、投与後、血中の GST は徐々に消失していき、4 時間後には血中薬物濃度は検出限界以下となった。両群の消失速度定数に差はなかった。

高含量 MNAC 投与群及び低含量 MNAC 投与群いずれでも速やかな T_{max} が得られ、両群に差は無かった。本結果より、MNAC 投与後 MN が皮内にて溶解し、GST が速やかに吸収されたことが示唆された。

また、高含量 MNAC 投与群の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ は、それぞれ 14.7±1.6 ng/mL、7.5±0.7 h・ng/mL であった。一方低含量 MNAC 投与群の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ は、それぞれ 3.9±0.8 ng/mL、2.1±0.5 h・ng/mL であった。両製剤投与群において投与量依存性が認められた。

さらに、MNAC 経皮吸収実験及び GST 静脈内投与実験より求めた BA は、高含量 MNAC 投与群及び低含量 MNAC 投与群それぞれ、97.6±9.7%及び 93.1±14.9%と良好であった。本結果より、MNAC 投与により角層を突破した GST が、ほぼ全量血中に移行したことが示唆された。

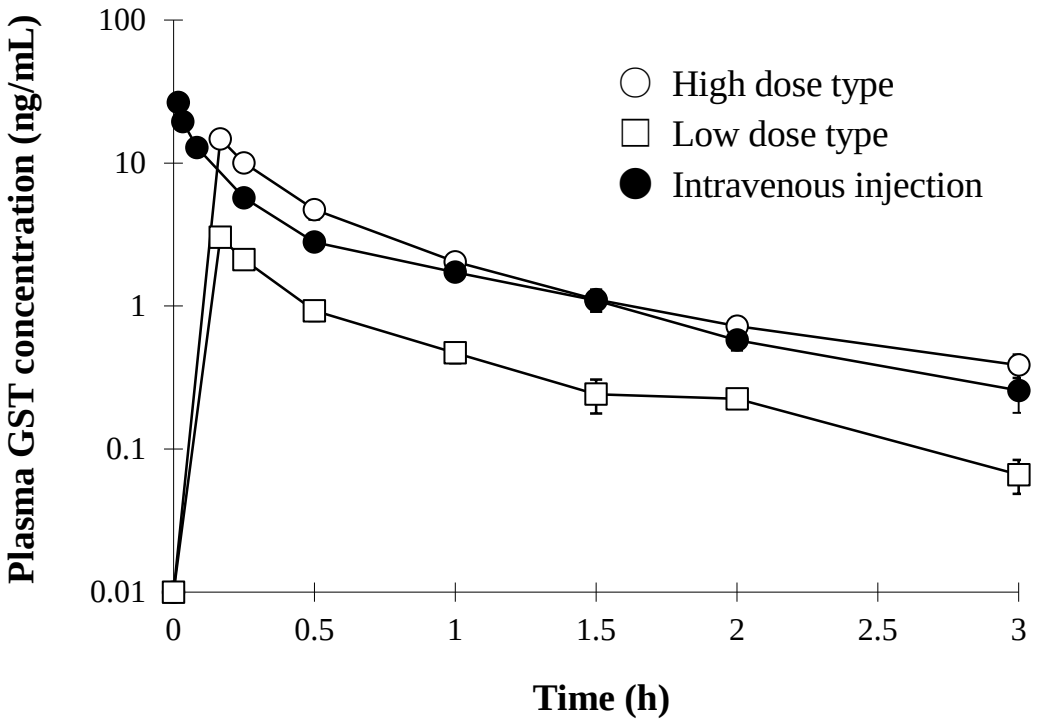


Figure 4 Plasma GST concentration vs. time profiles in semilogarithmic scale after intravenous injection of GST solution and percutaneous administration of GST dissolving microneedles to the abdominal rat skin. Plasma GST concentrations were measured using LC-MS/MS. Open squares show that obtained after administration of dissolving microneedles containing low doses of GST: 10.0±0.1 μg. Open circles denote that of high GST content dissolving microneedles: 37.6±2.3 μg. Closed circles denote that obtained after intravenous injection of GST solution to rats, 50 μg/kg. Each point represents the mean±S.E. of 4-5 experiments.

Table 6　Pharmacokinetic parameters of GST after intraveneous injection and percutaneous administration of dissolving microneedle array chips to rats

Formulation	Dose (μg/kg)	k (1/h)	$t_{1/2}$ (min)
IV injection solution	50	0.665±0.24	62.5±32.2
Low dose type microneedle	14.8±2.60	0.750±0.15	55.4±14.2
High dose type microneedle	55.6±4.31	0.702±0.10	60.2±6.34

Formulation	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	$AUC_{0\to\infty}$ (h･ng/mL)	BA (%)
IV injection solution	26.5±1.74	-	7.25±0.12	-
Low dose type microneedle	3.91±0.81	10.0±0	2.09±0.49	97.6±9.7
High dose type microneedle	14.7±1.63	10.0±0	7.50±0.77	93.1±14.9

k: terminal elimination rate constant
$t_{1/2}$: elimination half-life
C_{max}: maximum plasma GST concentration
T_{max}: time when plasma GST concentration reaches to its maximum concentration, C_{max}
$AUC_{0\to\infty}$: area under the plasma GST concentration-time curve from time zero to infinity
BA: bioavailability
Each value shows the mean±S.E. (n=4-5)

4. 種々温度条件下での製剤中薬物の安定性

MNAC を-80、4、23 及び 40°C の条件下でそれぞれ 3 ヶ月保存後、MNAC 中の GST 含量を測定し、製剤中の薬物安定性を指標とした。Table 7 に示すように、いずれの条件でも 3 ヶ月間にわたり、100%の含量を維持した。本結果より、GST は、試験した条件下で少なくとも 3 ヶ月間は MNAC 中で安定に存在していることが確認できた。

Table 7 Stability of GST in dissolving microneedles at 3 months

Temperature (℃)	% remaining of GST
-80	100.0±2.1
4	101.2±2.2
23	100.6±1.2
40	101.4±1.2

Each value represents the mean±S.E. (n=6)

第 3 項 考察

皮膚透過が困難なため、経皮投与製剤化が難しい医薬品化合物として、水溶性低分子化合物が挙げられる。様々な TDDS 技術で、これら薬物の皮膚透過性の改善が検討されているが、簡便でかつ高いBAを得られるデバイスは少ない。経皮吸収型製剤として MN の開発を進めるにあたり、MN の有用性評価及びその特性把握は、基本でありかつ重要な項目である。本節では、難皮膚透過性薬物である水溶性低分子化合物のGSTをモデル薬物として、GST 含有 MNAC を調製し、皮膚適用後の GST の全身吸収性について評価した。

In vivo 動物実験では、低含量及び高含量の MNAC 共に、その BA は約 95%と良好であった。これは、MN が角層を突破し、含有されていた GST が皮内に確実に送達できたことを示している。したがって、MN は難皮膚透過性薬物である水溶性低分子化合物の全身循環系への吸収率を大幅に改善できると考えられた。

本研究では、GST のみを低分子化合物として検討したため、様々な物性を有する薬物と比較することはできず、良好な BA が得られる薬物の特性 (分子量や脂溶性など) については明らかにできない。最近の研究では、溶解性 MN に含有させる低分子化合物の脂溶性の違いにより、皮内での残存率が変化し、脂溶性の増加に比例してBAが減少するという特性も明らかにされている [35)]。本研究では、少なくとも水溶性低分子化合物ならば、MNAC により薬物の効率的な全身循環系への移行が期待できることが明らかとなった。

角層透過後の薬物の吸収速度は、組織中の拡散速度、毛細血管の透過速度及び血流速度などが関係してくると考えられている。これまでの研究で、溶解性 MN に含有させる薬物について、脂溶性及び分子量の増加と皮内拡散性及び BA の減少さらに T_{max}の遅延が相関することが報告されている [18,35)]。皮内拡散性の低下に伴う皮内薬物残存量の増加や、皮内での加水分解など複合的な要因により、BA が減少するものと考えられる。

また、GSTのlog Pは-0.64、pKaは9.4である[28,35]。皮内のpHがほぼ中性であることより、投与後皮内で溶解した GST の多くはイオン型で存在しており、毛細血管の透過には適していないように考えられる。しかし実験の結果、GST の速やかな全身循環への吸収が認められた。以上より、溶解性 MN により角層を突破した薬物の全身循環への移行は、薬物の溶解に伴う組織中の拡散が律速になるものと考えられた。なお、水溶性溶液を皮下注射した場合は、薬物の毛細血管への透過は、薬物の分子量に最も依存すると言われている。GST は、溶解性が良好でかつ低分子であることが、全身循環への速やかな移行に寄与したものと考える。

MN は、経皮吸収の律速段階である角層バリアを物理的に貫通し、薬物を皮内に送達できるので、低分子化合物に対しては速やかな吸収が期待される。Table 6 に示したように、T_{max}は MNAC 投与後 10 分であった。これは、MNAC 投与後、基剤であるコンドロイチン硫酸ナトリウムが、皮内の水分[36]により速やかに溶解し、含有されていたGSTが放出されたことに加え、放出されたGSTが速やかに血中に移行したことを示している。本結果により、MN においても、水溶性低分子化合物に対して、注射剤と同様に即効性を期待した製剤化が可能であると考えられた。また、消失速度定数は、MNAC 投与群と静脈内投与群とで差はなかった。MNAC は注射剤と類似の即効性はあるものの、注射剤と同様、持続的な薬効発現には寄与しないと考えられた (GST 治療的薬物血中濃度: 1-2 ng/mL)。さらにMNの利用価値を拡大していくためには、低分子化合物のBA及び即効性は保ちつつ、MNの溶解速度制御により持続的な血中薬物濃度が得られるような製剤化検討も、行っていく必要があると考える。

また、MNACからのGSTの良好なBAは確認できたものの、投与時の薬物のロス (製剤中残存量) は大きかった。本節での溶解性MNは、先端から300 μmまで薬物を保持している。MN は、その全長が皮膚に刺さるわけではなく、先端から一定の距離までしか皮膚に刺入することはできない可能性が高い [37]。本節における投与時の薬物のロスも、このことに起因すると考えられる。これら知見を加味し、MN 内の薬物の保持部位をコント

ロールし、投与後の製剤中残存量を少なくする製剤設計が必要だと考えられた。

製剤中の薬物安定性を評価した結果、室温条件での GST の長期安定性が確認できた。本溶解性 MN の処方は、主薬とコンドロイチン硫酸ナトリウム及びトレーサー色素のみであるため、含有薬物と添加剤との相互作用のリスクは少ないと考えられる。また、製造方法もシンプルであるため、製剤調製工程での GST の分解も起こりにくい。一方、MN の形状や硬度といった製剤物性の安定性については、本研究内では評価していない。溶解性 MN の形状や硬度は、高湿度条件下では維持できないと考えられるため、開発ステージに即して、MN の適切な保管条件等の情報も調査していく必要があると考える。

第 4 項 小括

経皮吸収型製剤として MN を開発及び利用していく上で、適用薬物の血中移行性などの MN の有用性及び基本的な特性を把握することは重要である。今回、GST を含有した溶解性 MN を開発し、MN からの薬物の吸収性及び MN 内での薬物の安定性を評価した。本製剤からの GST の経皮吸収は、非常に速やかかつ良好 (BA 約 95%) であることが明らかになった。安定性についても良好であった。以上より、水溶性低分子化合物含有溶解性 MN は、薬物の全身送達を目的とした経皮吸収型製剤として効果を発揮するということが明らかになった。

第 2 章　経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーション (抗原の皮内送達と抗体産生)

第 1 章では、水溶性低分子化合物の経皮吸収に関する MN のキャラクタリゼーションを行い、速やかな全身送達に対して MN が有用であることを明らかにした。第 2 章では、経皮ワクチン分野の発展及び MN の本分野への応用を見据え、抗原の皮内送達と抗体産生に着目し、MN の経皮免疫製剤としてのキャラクタリゼーションを行った。

現在、世界では、1 日当たり約 4,000 人がワクチンによって予防可能な感染症により死亡している [38)]。実用化されているワクチンの大半は注射により接種されているため、施術者が必要となる。そのため、新型ウイルスのパンデミック時や医療従事者の少ない発展途上国おいて、ワクチンの大規模投与が迅速に実施できないという問題が発生している。また、消毒不十分な注射器の回し打ちによる二次感染も発生している [39)]。さらに近年、ワクチンの需要は、感染症領域の枠を超え、がん、自己免疫疾患及びアレルギー疾患の領域へ広がっている [40,41,42)]。このような現状の中、注射よりも大規模投与が可能で、かつより有効なワクチンの投与方法の確立が強く望まれている。

皮膚は、外界からの異物の侵入を防ぐ物理的バリアとしての働きだけでなく、異物侵入時には免疫学的バリアとしても働く [43)]。角層直下にある表皮層及び真皮層には、強力な抗原提示能を有する LC 及び dDC が、それぞれ分布している [44,45,46)]。さらに、表皮の構成細胞の 95%を占めるケラチノサイトは、異物の侵入に対しサイトカイン等のメディエーターを産生し、自然免疫の誘導を引き起こす [47,48,49)]。このような特徴に基づくと、皮膚はワクチン投与部位として有力な組織の一つだと考えられるため、経皮ワクチンの研究が盛んに行われている [50,51,52,53,54,55,56)]。

MN は、皮膚に物理的に小孔を開けて薬物透過ルートを形成するため、高分子化合物も皮内に送達できる可能性が高い。よって、経皮的なワクチン接種に対しても非常に有用なデバイスだと考えられる。

ワクチン治療の需要の拡大、皮膚の構造及び MN の特性を考慮すると、今後、MN の経皮免疫製剤としての発展の可能性は非常に高いと予想される。これまで、経皮ワクチンデバイスとして、非生分解性 MN を使用した例は複数報告されている [57,58)]。しかし、その効果及び考察は皮内に抗原を送達できたかに基づいて議論されているものが中心であり、経皮ワクチンの初期ターゲット細胞である皮膚樹状細胞と MN との関係性に着目した報告は、ほとんどない。MN を経皮免疫製剤として確立し、ワクチン接種に応用していくためには、MN と皮内免疫系との関わりに着目し、その特性を把握していくことが重要だと考える。

これらのことを踏まえ、本章第 1 節では、経皮免疫を目的とした高分子化合物 (モデル抗原) 含有溶解性 MN の開発を行い、有用性評価及び特性把握を行った。第 2 節では、モデル抗原の効率的な皮内デリバリーを目指して開発した溶解性 MN について、免疫応答性の評価を行った。

第 1 節　経皮免疫を目的とした高分子化合物 (モデル抗原) 含有溶解性 MN の開発

ワクチン抗原は、消化管分解を受けるため、現在、注射投与が基本となっている。注射投与は、医療従事者が必要であり、特にワクチンを必要としている発展途上国での普及の妨げになっている。そのため、注射投与よりも簡便、安全かつ有効な投与方法の確立が強く望まれている。

ワクチン抗原は、ペプチド、タンパク、糖及び脂質などの複合体からなる高分子であり、皮膚透過が困難である。経皮免疫製剤として MN を実用化するためには、まずは、高分子化合物 (モデル抗原) を MN へ含有させ、抗原が皮内に送達され、免疫が惹起されるかどうかを評価する必要がある。

本節では、高分子化合物のモデル薬物として、オブアルブミン (ovalbumin; OA, 分子量約 45 kDa[59]) を選択した。OA を含有させた溶解性 MN を調製し、血漿中抗体価をバイオマーカーとして免疫応答性について評価した。また成形後の形状観察を行い、製剤学的な特性把握も行った。

第 1 項　実験の部

1. 試薬及び実験材料

OA は、Sigma-Aldrich Corp. (Missouri、USA) より購入した。フルオレッセインイソチオシアネートラベル化 OA (Fluorescein labeled OA: FL-OA) は、Molecular Probes Inc. (Oregon、USA) より購入した。OA-specific Ig (G+A+M) 及び IgE 抗体価測定用の ELISA kit は、Alpha Diagnostic International Inc. (Texas、USA) より購入した。なお、OA-specific Ig (G+A+M) 抗体価測定用の ELISA kit は、OA 特異的な Ig G、Ig A 及び Ig M を同時に測定する kit である。OA 測定用 ELISA kit は、森永生科学研究所株式会社 (東京、日本) より購入した。コンドロイチン硫酸ナトリウムは、ナカライテスク (京都、日本) より購入した。ブリリアントブルーは、東京化成工業株式会社 (東京、日本) より購入した。その他の試薬類は、すべて市販の特級品を精製せずに用いた。

2. 実験動物

Brown Norway 系雄性ラット (10-12 週齢) は、日本エスエルシー株式会社 (静岡、日本) より購入した。なお、動物の飼育及び実験は京都薬科大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、京都薬科大学動物実験倫理規定に従い行った。

3. 試験製剤の調製

3-1. OA 含有 MNAC の調製

MN の上部に OA を含有し、下部は含有しない 2 層性 MNAC を調製した。

2.25 cm^2あたりに深さ約 500 μm、開口部直径約 300 μm の逆円錐状細孔を 225 個有するシリコーン樹脂製のメス型を準備した。また、OA を 2、10 あるいは 20 mg、ブリリアント

ブルー0.1 mg 及び水溶性の洩糸性高分子物質であるコンドロイチン硫酸ナトリウム 35 mgをサンプルカップに秤量した後、OA採取量に合わせて、それぞれ110、140あるいは170 μLの精製水を加え、ゲル状になるまで練り、粘調性の濃厚液を15°C条件下で調製した。次に、粘稠性濃厚液をシリコーン樹脂製のメス型に塗布し、サランラップ (クレハ化学、東京、日本) を被せ、卓上遠心分離器クボタ 4000 (クボタ、東京、日本) を用いて2,300×*g* で樹脂基盤ごと15 分間回転させ、遠心力を利用し、加重下充填した。乾燥後、コンドロイチン硫酸ナトリウム15 mgに精製水 25 μLを加えて作成した粘調性濃厚液をメス型に塗布した。上記のように、粘稠性濃厚液をメス型に塗布する工程は 2 工程とした(工程1: OA含有コンドロイチン硫酸ナトリウムゲルの塗布、工程2: コンドロイチン硫酸ナトリウムゲルの塗布)。塗布工程2に続き、基盤をメス型の上に被せ、メス型ごと15分間回転させ、遠心力を利用して加重下で充填及び乾燥した。3 時間後に基盤をメス型に対して垂直方向に引き離すことにより、基盤にMNを転写し、OA含有量が異なる3種類の2 層性 MNACを得た。また、OAを含有しないコンドロイチン硫酸ナトリウムのみからなるPlacebo MNAC及び形状観察用のFL-OA含有の2層性MNACを同製法により調製した。なお、OA : FL-OA 比を3 : 1として調製した。

3-2. 皮下注射用OA溶液の調製

皮下注射用 OA 溶液は、OA をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) に溶解させて調製した。なお、皮下注射用OA溶液は、0.05、0.5及び5 mg/mLの3種類調製した。

4. MNの形状観察

3-1. で調製したFL-OA含有MNACを、明視野条件下及び蛍光照射下、ビデオマイク

ロスコープ (VH-5500; キーエンス社、大阪、日本) にて観察及び撮影した。MN 基底部の直径、高さ及び着色している FL-OA 保持部の先端からの長さを測定した。

5. MNAC 中の OA 含量測定、投与後の残存量測定及び投与量の計算

調製した OA 含有 MNAC を、10 mL の 0.1 mM PBS (pH 7.4) が入ったサンプルカップに入れて溶解させ、MNAC 中の OA を抽出して試料溶液とした。得られた試料溶液中の OA 濃度を、ELISA 法にて測定し、MNAC 中の OA 含量を算出した。また、後述する *in vivo* 免疫応答実験で使用した後の MNAC を回収し、同様の方法で投与後の MNAC 中の OA 残存量を算出した。さらに、MNAC 中の OA 含量から投与後の OA 残存量を差し引くことで、ラット 1 匹あたりの OA 投与量を算出した。

6. *In vivo* 免疫応答実験

Brown Norway 系雄性ラット (10-12 週齢) に、ペントバルビタール生理食塩水を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した。麻酔下、固定台で背位固定した状態で実験を行った。OA 含量の異なる 3 種類の OA 含有 MNAC、Placebo MNAC 及び皮下投与群 (10、100 及び 1,000 μg/rat) の 7 群に分けた。サンプル数は、各群 4~5 匹とした。全郡のラット腹部を、電気シェーバー (ES7111; パナソニック社、大阪、日本) で除毛した。試験製剤投与 5 分前に左頸静脈から 500 μL の血液を採取した。次に、MNAC 投与群のラット腹部除毛皮膚に各 MNAC を投与した。なお、MNAC 投与に特別な器具は用いず、MNAC を手に持ち、2 本の指で皮膚を挟むように MNAC を押し当てることで、皮膚に対して垂直にかつ均一に投与した。MNAC は 3 分間皮膚に貼付し、その後回収した (実験 5. 投与後の残存量測定に使用)。また、ポジティブコントロールである皮下投与群には、3-2. で調製した皮下注射用 OA 溶液を、10、100 及び 1,000 μg/rat となるようを腹部

除毛皮膚に皮下投与した。また、初回投与後 2 週間後に、同製剤にて追加免疫を行った。なお、初回免疫 2 及び 4 週間後に、左頸静脈から 500 μL の血液を採取し、遠心分離 (9,000×*g*、10 分間、4°C) した後、血漿 200 μL を分取した。分取した血漿は、測定まで-80°C にて凍結保存した。

7. 抗体価測定

血漿試料中における OA 特異的 Ig (G+A+M) 抗体価及び IgE 抗体価の測定は、ELISA 法にて行った。なお血漿中抗体価は、OA 抗体測定用標準溶液より求めた。プレート洗浄にはマイクロプレートウォッシャー (Dia-washer II; Dia Iatron Co. Ltd、東京、日本) を用いた。吸光度は、マイクロプレートリーダー (MTP-300; コロナ電気株式会社、茨城、日本) を使用し、450 nm の条件にて測定した。なお、初回免疫 2 週間後の IgE 抗体価の変化率は、以下の計算式で求めた。

IgE level の変化率 (%) =

100 × (免疫後 IgE level – 免疫前 IgE level) / 免疫前 IgE level

8. 統計解析

データはすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。血漿中抗体価の解析には、対応のない二群間の検定 (Student's unpaired *t*-test) を用い、有意水準を 1%または 5%とした。

第 2 項 結果の部

1. MN の形状観察

Figure 5 及び Figure 6 に、調製した FL-OA 含有 MNAC の明視野条件下及び蛍光照射下撮影した画像を示す。拡大画像より、個々の MN の先端部に FL-OA が保持できていることが確認できた。

Figure 6 (a)、 (b) 及び (c) の両矢印でそれぞれ示す MN の高さ、FL-OA 保持部分の長さ及び底面部の直径に関する形状計測結果を Table 8 に示す。

本調製方法で作製した FL-OA 含有 MN の高さ及び底面部の直径は、それぞれ 480±9 μm 及び 275±8 μm であり、FL-OA 保持部分は、MN 先端から 155±5 μm であった。形状観察の結果、調製した FL-OA 含有 MNAC は、設計通り、高さ約 500 μm、底面約 300 μm の円錐上の形状を有していること及び MN の上部に FL-OA を保持していることが確認できた。

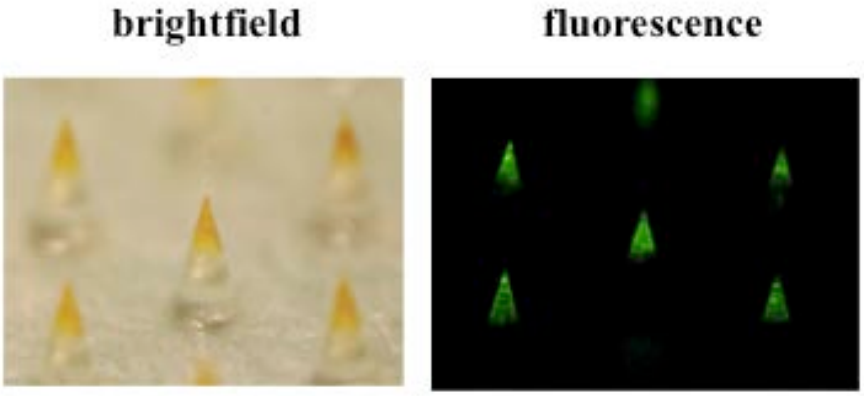


Figure 5 Microscopical images of the FL-OA dissolving microneedles made of chondroitin sulfate. Left panel portrays overview images of dissolving microneedles under normal light. Right panel is fluorescence microscopical image.

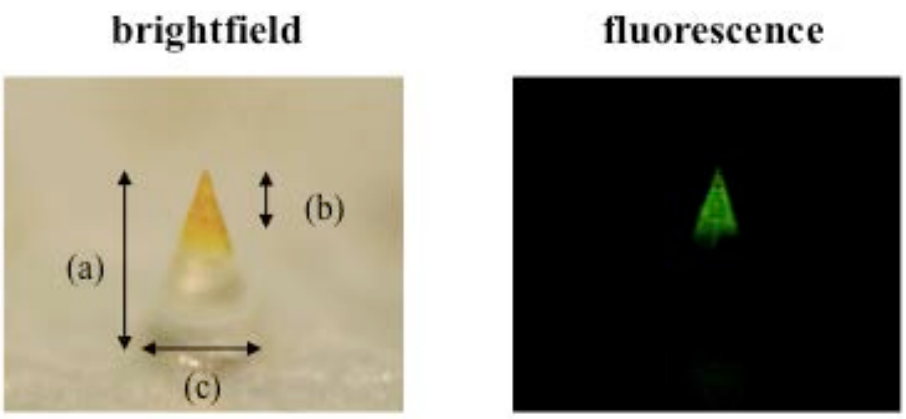


Figure 6　Microscopy of enlarged image of the FL-OA dissolving microneedles. Left panel portrays overview images of dissolving microneedles under normal light. Right panel is fluorescence microscopical image. Arrows indicate the following lengths: (a) whole length, (b) length of the FL-OA space, and (c) diameter of the basement.

Table 8　Physicochemical properties of FL-OA dissolving microneedles

Microneedle Array	Height (a)* (μm)	Length of FL-OA space (b)* (μm)	Diameter at basement (c)* (μm)
FL-OA dissolving microneedles	480±9	0~155±5	275±8

Each value shows the mean±S.E. (n=6)

*The alphabets inside the parentheses represent the corresponding length in Figure 6.

2. MNAC 中の OA 含量と投与後の残存量測定及び投与量の算出

Table 9 に MNAC 中の OA 含量、投与後の残存量及び投与量の計算結果を示す。含量が異なるよう処方設計した 3 種類の OA 含有 MNAC は、それぞれ、2.2±0.4、12.6±2.4

及び22.7±1.3 μgのOAを保持できていることが確認できた。投与後の残存量は、初回含量の5%以下であり、ほぼ全量投与できているこがわかった。

Table 9　OA content in dissolving microneedle array chips, recovered amount of OA and administered dose

Formulation	OA content (μg)	Recovered amount of OA (μg)	Administered dose (μg/rat)
OA dissolving microneedles	2.2±0.4	0.1±0.1	2.2±0.1
	12.6±2.4	0.5±0.2	12.0±0.2
	22.7±1.3	0.7±0.2	22.0±0.2
SC injection solution	-	-	10*
	-	-	100*
	-	-	1000*
Placebo microneedles	-	-	-

Each value shows the mean±S.E. (n=4-10), *injected dose

3. *In vivo* 免疫応答実験結果

OA 含有 MNAC 投与群及びポジティブコントロールである皮下投与群における、初回免疫 2 及び 4 週間後の血漿中抗体価を Table 10 に示す。同投与量 (約 10 μg/rat) における免疫結果を比較すると、OA 含有 MNAC 投与群は、皮下投与群と同等以上の血漿中 Ig (G+A+M) 抗体の産生が認められた。また、OA 含有 MNAC 投与群 (約 10 μg/rat) は投与量が 10 倍の皮下投与群 (100 μg/rat) と同じレベルの抗体価が得られた。

Table 11 は、placebo MNAC、OA 含有 MNAC (投与量 12.0±0.2 及び 22.0±0.2 μg/rat) 及び皮下注射 (投与量 1,000 μg/rat) 投与 2 週間後の血漿中 IgE 抗体価の結果を示す。OA 含有 MNAC 投与後、血漿中 IgE 抗体価は投与前と比べ有意な上昇を認めなかった。さらに、placebo MNAC でも IgE 抗体価の上昇は認められなかったことより、本

製剤投与により、アレルギー反応が起こらないことが確認できた。一方、皮下投与群では IgE 抗体価の上昇が認められ、その変化率は Placebo MNAC 投与群と比べて有意に高値を示した。

Table 10　Administered dose of OA and total Ig (G+A+M) antibody

Formulation	Administered dose (μg/rat)	Total Ig (G+A+M) after 2 weeks $\times 10^4$ (U/mL)	Total Ig (G+A+M) after 4 weeks $\times 10^4$ (U/mL)
OA dissolving microneedles	2.2±0.1	3.2±0.3	39.8±13.3
	12.0±0.2	2.5±0.5	145.6±25.8
	22.0±0.2	2.8±0.6	70.3±39.2
SC injection solution	10*	2.0±0.8	67.1±23.5
	100*	4.7±1.1	124.0±38.1
	1000*	9.7±3.1	164.0±30.0
Placebo microneedles	-	0.2±0.1	0.5±0.2

Each value shows the mean±S.E. (n=4-10), *injected dose

Table 11　Plasma anti-OA IgE levels and the changing rate of IgE level at 2 weeks after the start of transcutaneous immunization against the pretreatment level

Formulation	Administered dose (μg/rat)	IgE level (U/mL)		Changing rate of IgE level (%)
		0 week	2 week	
Placebo microneedles	-	51.9±0.9	50.9±0.5	-1.7±2.3
OA dissolving microneedles	12.0±0.2	58.9±0.2	56.1±1.2	-4.7±2.0
	22.0±0.2	57.4±1.9	59.9±0.9	5.8±1.9
SC injection solution	1000	53.9±1.0	63.1±1.0	17.0±1.6[a]

Changing rate; 100× (IgE level after immunization − IgE level before immunization)/IgE level before immunization injected dose, [a] p <0.01; significantly different placebo microneedles preparation. Each value shows the mean±S.E. (n=4-10)

第 3 項 考察

経皮ワクチンは、近年その注目度が上がってきている。ワクチン抗原も難皮膚透過性の高分子であるため、経皮ワクチンにおける最大の難関は、ワクチン抗原の皮膚透過である。溶解性 MN への高分子化合物の適用及び経皮免疫の効果を評価し、その特性を把握することは、経皮免疫接種を可能にする MN 製剤開発のために重要である。

本節で用いた MN には、含有した OA の投与ロス (製剤中残存量) はほとんど認められなかった。これは、MN 中の OA の保持部位 (先端からの長さ) に起因すると考える。第 1 章第 1 節で調製した GST 含有 MNAC と比較すると、OA 保持部位 (先端~155 μm) は、GST 保持部位 (先端~327 μm) より短い。以上より、本溶解性 MN は、先端から一定の長さ (160 μm~330 μm) までの刺入が可能であることが示唆された。

In vivo 免疫応答実験にて、同投与量 (10 μg/rat) における OA 含有 MNAC 投与群と皮下投与群を比較すると、MNAC 投与群の抗体価の方が高い傾向にあった。また、MNAC 投与群 (10 μg/rat) と 10 倍量の OA で処置した皮下投与群 (100 μg/rat) を比較すると、抗体価に差はなかった。これらの結果から、MNAC により OA が皮内に送達され、さらに皮下注射より少ない抗原量で免疫を惹起できることが明らかになった。ワクチンの皮下投与と皮内投与では免疫応答メカニズムが異なり、皮下投与よりも皮内投与の方が免疫賦活作用が高いことが報告されているので[22,23]、皮内に直接抗原を送達できる MN によって高い免疫賦活効果が得られたものと考えられる。

一方、OA 含有 MNAC 投与で Ig (G+A+M) 抗体産生が誘導できたことから、MNAC により皮内送達された OA が、低分子化合物とは異なり、皮内に留まり免疫応答に有利に働いていることが推測される。OA よりも分子量の小さいインスリン (分子量 6 kDa)、hGH (分子量 22 kDa) 及び EPO (分子量 34 kDa) といったホルモン性医薬品については、溶解性 MN にて投与した際の BA が、それぞれ 97.9±17.3%、72.8~89.9%及び 65.9~69.0%であり、高い割合で全身循環系に吸収されることが報告されている[15,16,17]。ま

た、溶解性 MN の前段階として検討していた 1 本状溶解性マイクロパイルによる薬物送達に関する報告では、適用薬物の分子量が 40 kDa 以上の物質の場合は、皮内残存量の増加及び BA の低下のため、このような薬物に対する全身循環移行性の改善には適さないことが確認されている [18)]。以上を踏まえると、OA 分子量 (45 kDa) 近辺に、皮内滞留と全身移行を分ける分子サイズの境界があることが予想される。よって、OA よりも高分子であるワクチン抗原は MN により皮内送達された後、皮内に残存し易く、効率良く免疫応答を惹起すると考えられる。加えて、ワクチンアジュバントとして有名な水酸化アルミニウムの役割の一つとして、抗原を投与部位に貯留させる効果 [60)]があると提唱されていることから、抗原が皮内に留まることは、免疫効果増強に繋がると考える。

以上より、高分子化合物含有溶解性 MN は、ワクチン接種に応用可能な皮内送達型製剤として有用性が高いと考えられた。

第 4 項 小括

OA 含有溶解性 MN の投与により、皮下注射と同等以上の抗体産生が認められた。溶解性 MN は、難皮膚透過性薬物である高分子化合物 (モデル抗原) の皮膚透過に有用であること、さらに、ワクチン接種に応用可能な皮内送達型製剤として効果を発揮するということが明らかになった。

第 2 節　MN からの高分子化合物 (モデル抗原) の皮内送達部位についての検証

高さ 500 μm の針長を有する溶解性 MN は、皮膚に投与後、角層を突破し、表皮層から真皮層上部に到達すると報告されている [61,37]。角層の厚さは 10~20 μm、表皮層の厚さは 50~150 μm であり [62,63]、その下に真皮層及び皮下組織が続いている。表皮層には強力な抗原提示能を有する LC が、真皮層には各種サブセットを含む dDC が分布している。経皮ワクチンターゲットとしてどちらの層が望ましいか、つまり、どちらの免疫細胞が経皮免疫への寄与が大きいかについては、意見が分かれている。一般的に LC は強力な抗原提示細胞として知られているが、LC 有力説 [64,65,66,67,68,69]、dDC 有力説 [70,71]共に報告があり、結論は出ていない。

従来の TDDS 技術では、皮膚表層部から深部への抗原の拡散が基本となるため、特に深部の真皮層特異的な効果を評価することは困難である [72]。したがって、従来の TDDS 技術では、経皮ワクチン送達に対する、皮内送達部位の影響については検証されてこなかった。また、各層への抗原送達を可能とする MN 製剤も、現在のところ報告されていない。一方、本研究で調製した溶解性 MN は、基剤単独及び抗原を含有する基剤の組み合わせからなる多層構造とすることが可能である。すなわち、MN 内の抗原の保持部位を変えることで、皮内各層への抗原送達のコントロールが可能になると考えた。

そこで本節では、溶解性 MN による抗原の皮内デリバリー及び免疫効果について明らかにすることを目的とし、先端に抗原を保持する基本の 2 層性 MN（1 層目: 抗原+基剤、2 層目: 基剤）に加え、MN の中間層に抗原を保持する 3 層性 MN（1 層目: 基剤、2 層目: 抗原+基剤、3 層目: 基剤）を調製し、抗体産生能に基づき抗原送達部位による免疫応答の違いについて評価した。

第 1 項　実験の部

1. 試薬及び実験材料

第 2 章第 1 節 1 項 1. 試薬及び実験材料の項に準じた。

2. 実験動物

第 2 章第 1 節 1 項 2. 実験動物の項に準じた。また、Wistar Hannover 系雄性ラット (体重 265~305 g) も、実験動物として用いた。

3. OA 含有 3 層性 MNAC (3 層性 MN) の調製

基本的な調製方法は、第 2 章第 1 節 1 項 3-1. OA 含有マイクロニードル・アレイ・チップ (MNAC) の調製の項に準じた。なお、第 2 章第 1 節 1 項 3-1. で調製した 2 層性 MNAC と比較するため、本節では、調製した 3 層性の MNAC を 3 層性 MN、第 2 章第 1 節 1 項 3-1. で調製した 2 層性の MNAC を 2 層性 MN と表記する。

3 層性 MN の調製では、粘稠性濃厚液をシリコーン樹脂製のメス型に塗布する工程を、3 工程とした (工程 1: コンドロイチン硫酸ナトリウムゲルの塗布、工程 2: OA 含有コンドロイチン硫酸ナトリウムゲルの塗布、工程 3: コンドロイチン硫酸ナトリウムゲルの塗布)。上記調製方法にて、3 層構造を有する 3 層性 MN を得た。なお、含有量の異なる 3 種類の 3 層性 MN を調製した。さらに、形状観察及び皮内デリバリー性の評価用に、FL-OA 含有の 3 層性 MN を同手法により調製した。なお、OA : FL-OA 比を 3 : 1 として調製した。以下に本節で調製した 3 層性 MN 及び第 2 章第 1 節 1 項 3-1. で調製した 2 層性 MN の詳細を記す。

＜3 層性 MN＞

第 1 層　先端部：構成成分　基剤

第 2 層　中間部：構成成分　OA/FL-OA+基剤

第 3 層　根元部：構成成分　基剤

＜2 層性 MN＞

第 1 層　先端部：構成成分　OA/FL-OA+基剤

第 2 層　中間部～根元部：構成成分　基剤

4. MN の形状観察

第 2 章第 1 節 1 項 4. MN の形状観察の項に準じた。

5. 3 層性 MN の OA 含量測定、投与後の残存量測定及び投与量の計算

第 2 章第 1 節 1 項 5. MNAC 中の OA 含量測定、投与後の残存量測定及び投与量の計算の項に準じた。

6. 3 層性 MN 及び 2 層性 MN からの皮内抗原送達部位の評価方法

FL-OA 含有 3 層性 MN 及び 2 節で調製した FL-OA 含有 2 層性 MN について、FL-OA の皮内抗原送達部位について評価した。

6-1. ビデオマイクロスコープによる皮膚組織垂直切片の作成及び観察法

Wistar Hannover 系雄性ラットに、ペントバルビタール生理食塩水を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与し、麻酔下、固定台で背位固定した状態で実験を行った。ラット腹部を、

電気シェーバー (ES7111; パナソニック社、大阪、日本) で除毛した。FL-OA 含有 3 層性 MN 及び 2 層性 MN をそれぞれラット腹部除毛皮膚に投与した。投与 30 秒、2 分及び 5 分後に皮膚組織を摘出した。摘出した皮膚組織を、凍結包埋剤 (Histo Prep®; Fisher Scientific International、New Jersey、USA) に包埋し、-80°C の deep-freezer にて速やかに凍結させた。垂直方向の皮膚凍結切片 (厚さ約 40 μm) を、マイクロトーム (THK; Kenis Ltd.、大阪、日本) により作製し、明視野条件下ビデオマイクロスコープ (VH-5500; 株式会社キーエンス、大阪、日本) にて観察した。さらに 495 nm 蛍光照射下 FL 観察用にフィルターを取り付けた本マイクロスコープにて、皮膚凍結切片を観察した。

6-2. 皮膚組織水平切片の作成と切片中 FL-OA 分布率の測定方法

6-1. と同様の方法で FL-OA 含有 3 層性 MN 及び 2 層性 MN をそれぞれラット腹部除毛皮膚に投与した。投与後皮膚組織を摘出した。摘出した皮膚組織を、凍結包埋剤に包埋し、-80°C の deep-freezer にて速やかに凍結させた。水平方向の皮膚凍結切片 (厚さ 20 μm) を、皮膚表面から 400 μm の深度までクライオスタット (Leica CM 3050 S; Leica Inc.、Nussloch、Germany) により作製した。得られた凍結切片を、0.1 N NaOH 溶液を 700 μL 入れたサンプルカップにそれぞれ移し、1 分間激しく攪拌し、各切片から FL-OA を抽出した。抽出液を遠心分離 (9,000×*g*、5 分、4°C) した後、上澄み 100 μL を分取し、Fluoroskan (Ascent CF; Labsystems、Helsinki、Finland) にて蛍光強度を測定した (EX 485 nm、EM 538 nm)。各 MN 投与後のラット皮膚深度における FL-OA 分布率は、以下の計算式で求めた。

FL-OA 分布率 (%)

=100 × 各皮膚切片における蛍光強度 / 全皮膚切片における最大蛍光強度

7. *In vivo* 免疫応答実験

第 2 章第 1 節 1 項 6. *In vivo* 免疫応答実験の項に準じた。

8. 抗体価測定

第 2 章第 1 節 1 項 7. 抗体価測定の項に準じた。

9. 統計解析

データは、すべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。血漿中抗体価の解析には、対応のない二群間の検定 (Student's unpaired *t*-test) を用い、有意水準を 1%または 5%とした。

第 2 項 結果の部

1. MN の形状観察

Figure 7 及び Figure 8 に、FL-OA 含有 2 層性 MN 及び 3 層性 MN の明視野条件下及び蛍光照射下撮影した画像を示す。2 層性 MN の結果は、第 2 章 1 節 Figure 5 及び Figure 6 から引用した。3 層性 MN の拡大画像より、個々の MN の中層部に FL-OA が保持できていることが確認できた。Figure 8 (a)、(b) 及び (c) の両矢印でそれぞれ示す MN の高さ、FL-OA 保持部分の長さ及び底面部の直径に関する形状計測結果を Table 12 に示す。本調製方法で作製した FL-OA 含有溶解性 MN の高さ及び底面部の直径は、それぞれ 485±7 μm 及び 281±3 μm であり、FL-OA 保持部分は、MN 先端から 175±4~225±5 μm であった。形状観察の結果、調製した FL-OA 含有 3 層性 MN は、第

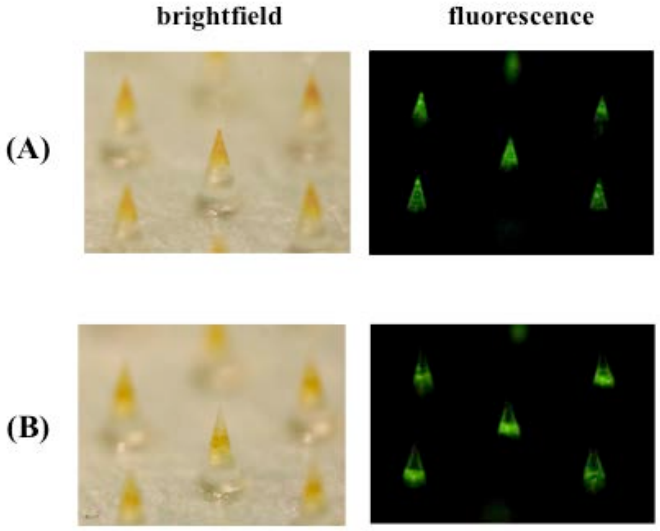


Figure 7 Microscopical images of the (A) two- and (B) three-layered FL-OA dissolving microneedles made of chondroitin sulfate as the base used in the *in vivo* delivery and distribution experiments. Left panels portray overview images of dissolving microneedles under normal light. Right panels are fluorescence microscopical images.

2 章第 1 節で調製した 2 層性 MN と比較し、FL-OA 保持部位のみ異とする同様の形状に調製できていることを確認した。

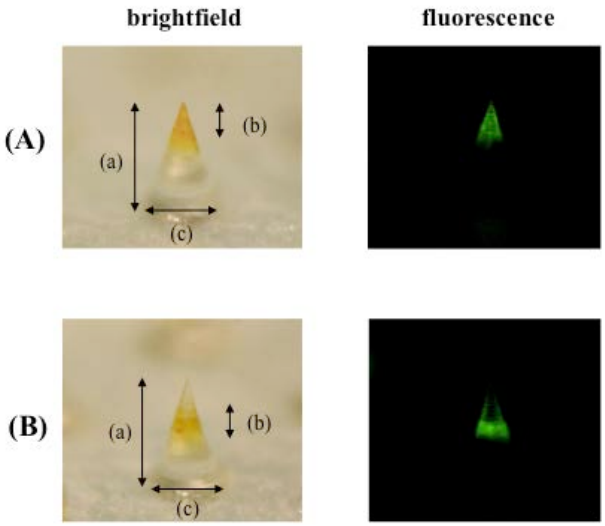


Figure 8　Microscopy of enlarged images of the (A) two- and (B) three-layered FL-OA dissolving microneedles. Left panels portray overview images of dissolving microneedles under normal light. Right panels are fluorescence microscopical images. Arrows indicate the following lengths: (a) whole length, (b) length of the FL-OA space, and (c) diameter of the basement.

Table 12　Physicochemical properties of two- and three- layered dissolving microneedles

Microneedle array	Height (a)* (μm)	Length of FL-OA space (b)* (μm)	Diameter at basement (c)* (μm)
Two-layered microneedles	480±9	0~155±5	275±8
Three-layered microneedles	485±7	175±4~255±5	281±3

Each value shows the mean±S.E. (n=6)

*The alphabets inside the parentheses represent the corresponding length in Figure 8.

2. 皮内における抗原送達部位の評価

FL-OA 含有 2 層性 MN 及び 3 層性 MN 適用後の FL-OA の皮内送達部位について評価した結果を以下に示す。

2-1. MN 投与後の皮膚組織垂直切片の観察

Figure 9 に、2 層性 MN (A) 及び 3 層性 MN (B) 投与後の皮膚垂直切片画像を示す。FL-OA 含有 2 層性 MN 投与群については、皮膚表面から約 200 μm 付近に強い発光が確認された。一方、FL-OA 含有 3 層性 MN 投与群については、皮膚表面から約 100 μm 付近までに強い発光が確認された。2 層性 MN は主に真皮層に、一方 3 層性 MN は真皮上部及び表皮層へ抗原を送達していると考えられた。また、本製剤投与 30 秒後には皮内に FL-OA の蛍光が確認できたことより、投与後速やかに溶解性 MN が一部溶解し、含有されていた FL-OA が皮内に放出され始めたことが確認できた。また、投与 2 分及び 5 分後においても同部位に強い蛍光が確認された。

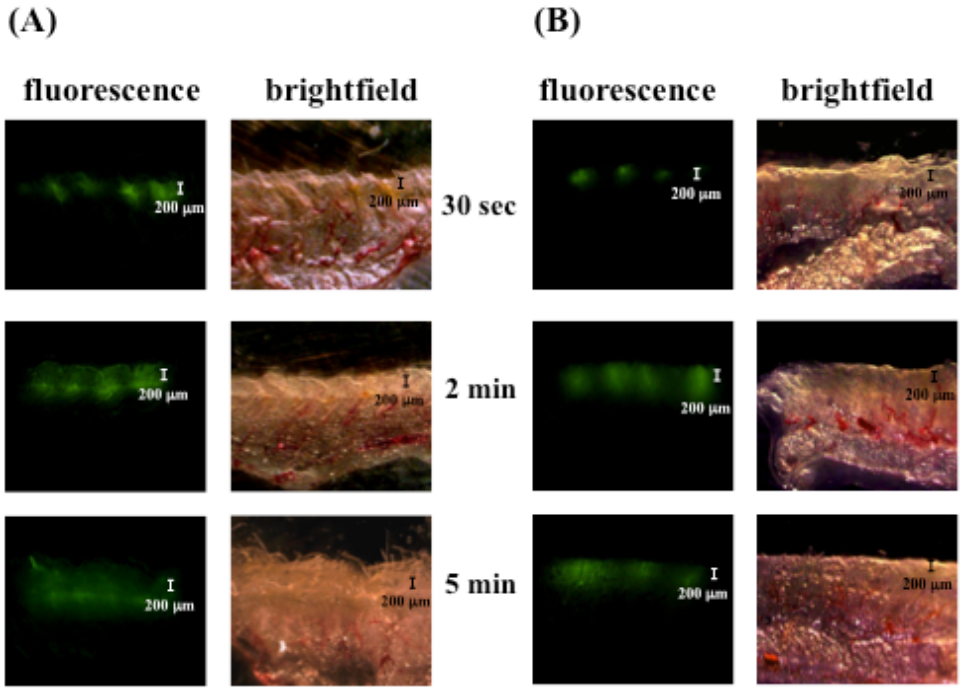


Figure 9　Microscopical images of the skin of rats who received the (A) two- and (B) three-layered dissolving microneedles containing FL-OA, as visualized through a 50× objective (scale bar : 200 μm). Dissolving microneedles of two types were administered to the rat abdominal skin. Thereafter, skin tissue samples were obtained at 30 s and 2 min and 5 min. Left panels are fluorescence microscopical images. Right panels show the corresponding brightfield microscopical images.

2-2. 皮膚組織水平切片中 FL-OA 分布率の評価

FL-OA 含有 2 層性 MN 及び 3 層性 MN 投与後の皮膚深さ方向における FL-OA 分布率を Figure 10 に示す。2 層性 MN 投与後では、皮膚表面から 120 μm の部位で FL-OA の分布率の最大値が観測された。分布率のパターンは、皮膚表面から深部 120 μm にかけて徐々に増大し、それより深くなるに従い徐々に低下した。さらに、皮膚深部 160 μm~260 μm の部位における蛍光強度は、3 層性 MN に比べ有意に高かった。一方、3 層性 MN 投与後では、皮膚深部 20 μm の部位で FL-OA の分布率の最大値が観測された。分布率のパターンは、皮膚深部に向かって低下し、260 μm より深部でほぼ一定値となった。皮膚表面から 20 μm の部位における分布率は、2 層性 MN に比べ有意に高か

った。ラット腹部の皮膚は、角層の厚さ約 5 μm、表皮層の厚さ約 10~20 μm といわれている [73,74]。本結果は、ラット皮膚において、2 層性 MN は主に真皮層に、一方 3 層性 MN は真皮上部及び表皮層へ抗原を送達したことを示唆している。

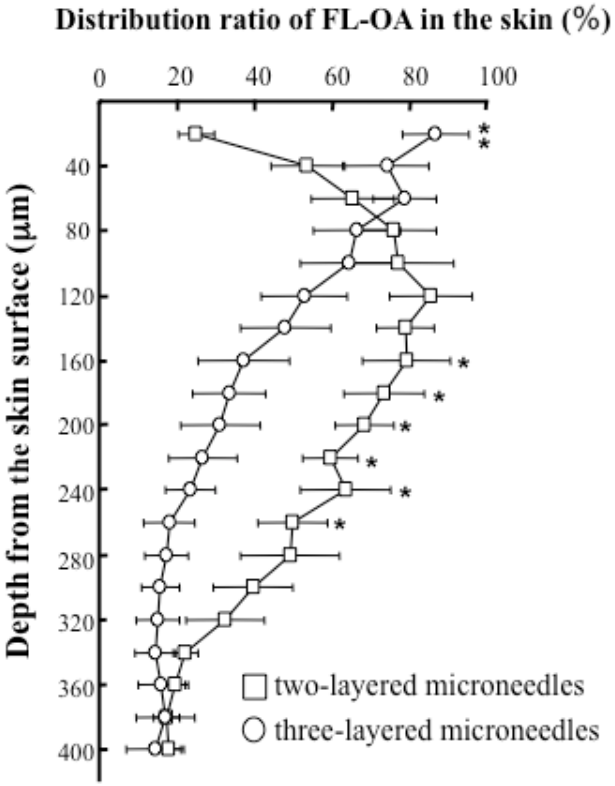


Figure 10　Distribution profiles of FL-OA in the rat skin after administration by dissolving microneedles. Dissolving microneedles of two types were administered to the rat skin. Skin tissue samples were obtained at 1 min. The 20 μm thick slice samples were obtained and FL-OA contents in each slice were determined spectrofluorometrically. The distribution ratio of FL-OA in rat skin was calculated using 100×fluorescent intensity of each section/maximum fluorescent intensity in all sections. The open squares show data obtained after administration of two-layered dissolving microneedles containing FL-OA. The open circles represent data for three-layered dissolving microneedles. $^{**}p < 0.01$; significantly different from two-layered microneedles. $^{*}p < 0.05$; significantly different from three-layered microneedles. Each value shows the mean±S.E. (n=5).

3. 3 層性 MN 中の OA 含量と投与後の残存量測定及び投与量の算出

Table 13 に OA 含有 3 層性 MN 中の OA 含量、投与後の残存量及び投与量の測定結

果を示す。なお、OA 含有 2 層性 MN 及び皮下投与群の結果と比較するため、第 2 章第 1節で得られた結果を、同じ Table 内に合わせて示す。含量が異なるよう処方設計した 3 種類の OA 含有 3 層性 MN は、それぞれ、2.2±0.3、13.7±0.5 及び 21.1±1.6 μg の OA を含有していた。また、投与後の残存量も第 2 章第 1 節で示した 2 層性 MN 同様極めて少なく、ほぼ全量投与できていることが確認できた。

Table 13　OA content in dissolving microneedle array chips, recovered amount of OA and administered dose

Formulation	OA content (μg)	Recovered amount of OA (μg)	Administered dose (μg/rat)
Two-layered microneedles	2.2±0.4	0.1±0.1	2.2±0.1
	12.6±2.4	0.5±0.2	12.0±0.2
	22.7±1.3	0.7±0.2	22.0±0.2
Three-layered microneedles	2.2±0.3	0.5±0.2	1.8±0.2
	13.7±0.5	1.0±0.8	12.6±0.7
	21.1±1.6	0.7±0.3	20.4.±0.3
SC injection solution	-	-	10*
	-	-	100*
	-	-	1000*
Placebo microneedles	-	-	-

Each value shows the mean±S.E. (n=4-10), *injected dose

4. *In vivo* 免疫応答実験結果

OA 含有 3 層性 MN 投与群における初回免疫 2 及び 4 週間後の血漿中抗体価を Table 14 及び Figure 11 に示す。なお、OA 含有 2 層性 MN 及び皮下投与群の結果と比較するため、第 2 章第 1 節で得られた結果を同じ Table 及び Figure 内に合わせて示す。

同投与量における 2 層性 MN 及び 3 層性 MN を比較すると、OA 含有 3 層性 MN 投

与群から得られた血漿中 Ig (G+A+M) 抗体価は有意に高く、2 層性 MN 投与群に比べ 2.5~7 倍の価を示した。また、3 層性 MN では、皮下投与群に比べても明らかに高い抗体産生が確認できた。3 層性 MN 投与群においても、2 層性 MN 投与群同様、IgE 抗体の産生は認められなかった (Table 15)。

Table 14 Administered dose of OA and total Ig (G+A+M) antibody

Formulation	Administered dose (μg/rat)	Total Ig (G+A+M) after 2 weeks $\times 10^4$ (U/mL)	Total Ig (G+A+M) after 4 weeks $\times 10^4$ (U/mL)
Two-layered microneedles	2.2±0.1	3.2±0.3	39.8±13.3
	12.0±0.2	2.5±0.5	145.6±25.8
	22.0±0.2	2.8±0.6	70.3±39.2
Three-layered microneedles	1.8±0.2	16.5±1.9[a]	282.8±78.5[b]
	12.6±0.7	13.0±4.3	368.4±42.5[a]
	20.4.±0.3	14.4±0.6[a]	394.6±45.6[a]
SC injection solution	10*	2.0±0.8	67.1±23.5
	100*	4.7±1.1	124.0±38.1
	1000*	9.7±3.1	164.0±30.0
Placebo microneedles	-	0.2±0.1	0.5±0.2

Each value shows the mean±S.E. (n=4-10), *injected dose, [a, b] compared to two-layered dissolving microneedles group at the corresponding dose ([a] p <0.01, [b] p <0.05)

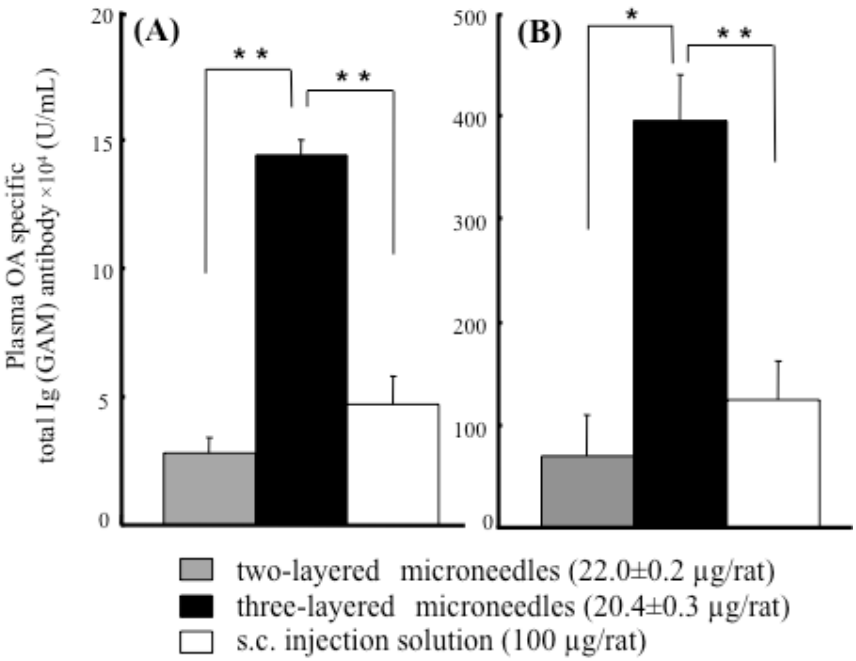


Figure 11 Plasma OA specific total Ig (G+A+M) antibody concentrations at (A) 2 and (B) 4 weeks post first immunization after transcutaneous administration of two- and three-layered dissolving microneedles containing OA to the abdominal rat skin. Plasma OA specific total Ig (G+A+M) antibody concentrations were measured using ELISA. The gray bars denote antibody concentrations obtained after administration of two-layered OA dissolving microneedles, 22.0±0.2 μg/rat. The black bars denote those obtained after administration of three-layered OA dissolving microneedles, 20.4±0.3 μg/rat. The white bars denote those obtained after subcutaneous administration of OA: 100 μg/rat. * p <0.05, * * p <0.01: significantly different from three-layered microneedles. Each value shows the mean±S.E. (n=4-5).

Table 15 Plasma anti-OA IgE levels and the changing rate of IgE level at 2 weeks after the start of transcutaneous immunization against the pretreatment level

Formulation	Administered dose (μg/rat)	IgE level (U/mL)		Changing rate of IgE level (%)
		0 week	2 week	
placebo microneedles	-	51.9±0.9	50.9±0.5	-1.7±2.3
Two-layered microneedles	12.0±0.2	58.9±0.2	56.1±1.2	-4.7±2.0
	22.0±0.2	57.4±1.9	59.9±0.9	5.8±1.9
Three-layered microneedles	12.6±0.7	61.7±0.6	58.2±1.9	-5.4±4.0
	20.4±0.3	60.2±1.1	56.4±0.8	-6.3±2.5
SC injection solution	1000*	53.9±1.0	63.1±1.0	17.0±1.6[a]

Changing rate; 100× (IgE level after immunization − IgE level before immunization)/IgE level before immunization, *injected dose, [a] p <0.01; significantly different placebo microneedles preparation. Each value shows the mean±S.E. (n=4-10)

第 3 項 考察

現在、注射に代わる簡便なワクチンの投与方法の確立が望まれている。またワクチンは、感染症のパンデミック時には大規模投与が必要になることに加え、大量生産が難しい医薬品であることから、より効率的にその効果が得られる投与システムの構築が非常に重要だと考えられる。

皮膚は、解剖生理学的に免疫に適した組織である。さらに皮内を組織学的に細分化した場合、存在している免疫細胞群は異なる。本研究では、効率的にワクチン効果を得るため、LC の分布する表皮層あるいは、dDC の分布する真皮層に抗原をデリバリーすることを考えた。抗原の皮内送達部位のコントロールには、MN の針長を調整する方法と薬物の保持部位を調整する方法が考えられる。溶解性 MN の場合、その強度を保つため、針長を基本形状である 500 μm から短くすることは望ましくない。よって本節では、抗原保持部位の調整を試み、基本の 2 層性 MN に構造上の工夫を施した 3 層性 MN を調製した。

抗原送達部位のコントロールのため、皮内構造 [62,63]及び MN が皮膚に刺入する深さ [37,61]を加味し、2 層性 MN は真皮層に、一方 3 層性 MN は表皮層と真皮層上部に、抗原を送達するよう設計した。FL-OA 分布画像及び皮内分布率の結果より、2 層性 MN は 3 層性 MN と比べて、真皮層を中心に抗原を送達することが確認できた。

In vivo 免疫応答実験において、2 層性 MN、3 層性 MN 及び皮下投与群を比較すると、3 層性 MN 投与群で最も高い抗体産生が確認された。このことは、MN の抗原保持部位を調整することで、抗原の表皮層への送達が可能となり、より少量で効率的なワクチン効果を誘導できる可能性があることを示している。

以上の結果から、抗原保持部位を調整するなど MN に製剤学的工夫を施すことにより、抗原の皮内送達をコントロールし、より効率的なワクチン効果をもたらす経皮免疫製剤の開発が可能になるものと考える。

なお本研究では、送達した抗原の免疫細胞への捕食率やリンパ節移行後の抗原提示能などは評価していないため、今後は免疫学的な評価及び解析を行い、経皮ワクチンにおける各免疫細胞の役割を明らかにしていくことが必要であると考える。

一方、表皮層や真皮層の厚さは、体表部位、人種及び年齢によって異なる。抗原保持部位について、複数のパターンの MN を調製できれば、将来、個別化医療にも応用できると考える。

以上より、経皮ワクチンデバイスとして溶解性 MN を設計する際、表皮層から真皮層上部が標的となるように MN 中に抗原を保持させることで、効率的な経皮免疫を行うことが可能であることが明らかになった。このような MN の特性を生かすことで、より少量の抗原で、最大のワクチン効果が得られる経皮免疫製剤の開発に繋がると考える。

第 4 項 小括

本節で開発した 3 層性 MN が、注射に代わる簡便かつ効率的な経皮免疫製剤であることが示唆された。免疫学的観点から、溶解性 MN の特性を生かして抗原保持部位を調整し、皮内送達部位をコントロールすることの重要性が明らかになった。

第 3 章　経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーション (物理的刺激に関する初期評価)

経皮ワクチン分野の発展及び MN の本分野への応用を見据え、第 2 章では、抗原の皮内送達と抗体産生に着目し、MN の経皮免疫製剤としてのキャラクタリゼーションを行った。MN は、微小なニードルを利用して皮膚に物理的に小孔を開け、薬物透過ルートを形成する。つまり、MN の投与には物理的な刺激が伴う。皮膚への物理的刺激が免疫応答に影響することも報告されており [24)]、MN のような物理的な刺激が樹状細胞に対して影響を及ぼす可能性があるが、これらに着目した研究は現在のところ報告されていない。そこで、第 3 章では MN の投与に伴う物理的な刺激に着目し、MN の経皮免疫製剤としてのキャラクタリゼーションを行った。

第 1 節　MN 投与に伴う皮膚への物理的刺激が皮膚樹状細胞へ与える影響について

前述してきたように、皮膚は解剖生理学的に、単なる物理的バリアとしてだけではなく、免疫学的なバリアとしても働いている [43)]。LC や dDC といった樹状細胞やケラチノサイトの働きで、侵入してきた異物に対し免疫応答を引き起こす。

実際、皮膚の角層を物理的に取り除くテープストリッピング法により、LC が活性化することが知られている。活性化した LC は、細胞表面抗原である MHC class-II や共刺激分子が増加する。テープストリッピング法で活性化した LC は、通常の LC に比べ、高い免疫惹起能を有すると報告されている [24,75,76,77)]。以上の知見より、皮膚への物理的な刺激は皮内環境に影響を及ぼし、免疫反応が起きやすい状態を作ると考えられる。MN の投与も同様に皮内環境に影響を及ぼすと考えられるが、その詳細は明らかにされていない。

現在、ワクチン開発の問題点として、アジュバントの効果とその安全性の確保が挙げられている。アジュバントは、免疫応答賦活剤として ワクチンに添加され、ワクチン本体の効果を高める。アジュバントの働きとして自然免疫活性化が挙げられる。そのアウトプットの一つとして樹状細胞上の共刺激分子の発現増加が知られている [78)]。また、これらアジュバント作用は、ワクチンの効果を得るために必須だと考えられている [79)]。一方、アジュバントの安全性については、IgE 誘導によるアレルギー反応や発熱を始め、Alum による神経系統へのダメージ [80,81)]、さらに自己抗体誘導に伴う重症筋無力症 [82)]や全身性エリテマトーデス [83)]などの多くの副作用が報告されている。

以上の知見を加味し、MN 投与に伴う皮膚への物理的刺激も免疫賦活作用として働く、つまり物理的刺激がアジュバント様効果をもたらすのではないかと考えた。加えて MN はこれまでの研究により安全性にも優れていることが明らかにされている。そこで本節では、MN 投与に伴う皮膚への物理的刺激が、皮膚樹状細胞を賦活化させるアジュバント様効果をもたらすかどうかについて検討することにした。

本節では、MN の投与に伴う物理的刺激に着目したため、皮膚への刺入深さを指標として、刺激の強弱による免疫細胞への影響も評価した。刺入深さの調整のため、針長の異なる MN を用いる必要がある。しかし、溶解性 MN の針長を基本形状である 500 μm から短くすることは、MN の強度の観点から望ましくない。よって、評価の正確性及び簡便性を優先し、本節では金属製 MN を用いて初期評価を行った。物理的刺激後の免疫細胞の評価については、細胞表面抗原分子の発現率を分子生物学的手法で解析した。さらに皮膚の形態学的な観察を行い、MN 投与後の皮膚の修復性、発赤及び紅斑等の有無を評価した。

第 1 項 実験の部

1. 試薬及び実験材料

マイクニードルスタンプは、CA CELEB BEAUTY (大阪、日本) より購入した。FcR Blocking regent、phycoerythrin (PE)-labeled CD11b、Allophycocyanin (APC)-labeled MHC class-II は、Miltenyi Biotec K.K. (Bergisch Gladbac、Germany) より購入した。APC/Cy7-labelled CD45、Brilliant Violet 511-labelled CD11c、PE/Cy7-labelled CD86、Brilliant Violet 421-labelled CD80 及び Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled CD54 は、Biolegend Co. Ltd. (California、USA) より購入した。コンドロイチン硫酸ナトリウムは ZPD A/S (Esbjerg、Denmark) より購入した。ブリリアントグリーンは、和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) より購入した。その他の試薬類は、すべて市販の特級品を精製せずに用いた。

2. 実験動物

C57BL/6 系雄性マウス (7 週齢) は、三共ラボサービス (東京、日本) より購入した。1 週間の順化後、健康なマウスを実験に用いた。なお、動物の飼育及び実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験倫理規定に従い行った。

3. MN の形状観察

本節で用いた 2 種類のマイクロニードルスタンプ (針長 500 μm: 500 μm MN、針長 300 μm: 300 μm MN) の形状観察を、Microscope (VHX-2000: KEYENCE、大阪、日本) を用いて行った。各 MN の高さ及び底面の直径を測定した。

4. MN の皮内刺入距離の評価

500 μm MN 及び 300 μm MN 処置群における MN の皮内刺入距離 (刺入深度) を評価するために、それぞれの MN を以下に示す様にコーティングし、*in vivo* 実験にて確認した。

4-1. コーティングマイクロニードルの調製

第 2 章第 2 節までの知見を元に、500 μm MN 及び 300 μm MN のマイクロニードルに溶解性ゲルをコーティングし、皮内に到達した深さまでコーティング部分が溶解するコーティングマイクロニードルを調製した。まず、トレーサー色素であるブリリアントグリーン 1 mg 及びコンドロイチン硫酸ナトリウム 100 mg をサンプルカップに秤量し、160 μL の精製水を加え、ゲル状になるまで練り、粘調性の濃厚液を室温下で調製した。粘稠性濃厚液をマイクロニードルに塗布し、シリカゲル (関東化学、東京、日本) 入り密閉容器にて乾燥させた。1 時間後取り出し、溶解性コーティングマイクロニードルを得た。

4-2. 皮内刺入距離の測定

C57BL/6 系雄性マウス (8 週齢) に、ペントバルビタール生理食塩水を 30 mg/kg の用量で腹腔内投与した。麻酔下にて固定台で腹位固定した状態で実験を行った。マウスの背部を、電気シェーバー (ES7111; パナソニック社、大阪、日本) 及び除毛クリーム (epilat; クラシエホールディング株式会社、東京、日本) で除毛した。背部除毛皮膚にコーティングマイクロニードルを投与後、各製剤を回収し、コーティング溶解部分の長さを測定した。溶解部分の長さを皮内刺入距離とした。

5. 皮膚への物理的処置及び免疫応答実験

C57BL/6 系雄性マウス (8 週齢) に、ペントバルビタール生理食塩水を 30 mg/kg の用量で腹腔内投与した。マウスの背部を左右 1×2 cm^2ずつ、電気シェーバー (ES7111; パナソニック社、大阪、日本) 及び除毛クリーム (epilat; クラシエホールディング株式会社、東京、日本) で除毛した。各処置群につき 8 匹以上のマウスで実験を行った。

5-1. 物理的処置後の表皮樹状細胞 (LC) の評価

実験動物を処置毎に 5 群に分けた。処置群は、500 μm MN 処置群、300 μm MN 処置群、テープストリッピング処置群 (TS)、生理食塩水皮下注射処置群 (SC) 及び無処置群とした。テープストリッピング処置は LC を活性化することが知られているため、ポジティブコントロールとして選択した。各物理的処置は、右背部除毛皮膚に行った。左背部は各群のコントロールとした。MN 処置は、製剤を手に持ち 10 秒間押し当てることで行った。テープストリッピング処置については、adhesive テープ (セロテープ ®、ニチバン株式会社、東京、日本) で、3 回ストリッピング処理を行った。生理食塩水皮下注射処置群については、処置部位に計 3 箇所 0.1 mL ずつ生理食塩水を投与した。無処置群については、除毛のみ行い、左右皮膚共に物理的処置は行わず、ネガティブコントロールとした。各処置群につき、処置 12 時間後、左右の皮膚を摘出した。また、LC 細胞表面抗原の発現について経時的変化を評価するため、500 μm MN 処置群については、別途実験を行い、処置 3、6、12 及び 24 時間後に左右の皮膚を摘出した。摘出皮膚は、実験 6. 表皮細胞及び真皮細胞分散液の調製に使用した。

5-2. 物理的処置後の真皮樹状細胞 (dDC) の評価

実験動物を処置毎に 4 群に分けた。処置群は、500 μm MN 処置群、300 μm MN 処置群、生理食塩水皮下注射処置群 (SC) 及び無処置群とした。それぞれの処置後の操作

は、実験 5-1. 物理的処置後の表皮樹状細胞 (LC) の評価に準じた。

6. 表皮細胞及び真皮細胞分散液の調製

実験 5. で得られた摘出皮膚を、速やかに Epidermal dissociation kit (Miltenyi Biotec K.K.、Bergisch Gladbach、Germany) にて、酵素処理した。5℃以下で 16 時間酵素処置した後、ピンセットを用い表皮組織と真皮組織に分離した。表皮細胞の分散には kit 内酵素を使用した。分散液を繰り返しピッペティング操作した後、70 μm cell strainer (BD Biosciences、Le Pont de Claix、France) で濾過し、表皮細胞懸濁液を調製した。真皮組織は、Hyaluronidase type IV-S (シグマアルドリッチ株式会社、東京、日本) 及び Collagenase Type II (フナコシ株式会社、東京、日本) で 37℃、5%CO_2条件下で 1 時間インキュベートして分散させた。さらに、分散液を繰り返しピペッティング操作し、70 μm cell strainer で濾過し、真皮細胞懸濁液を調製した。

7. 樹状細胞表面抗原の解析

表皮及び真皮細胞懸濁液中の単離細胞は、洗浄後約 1×10^6 cells になるよう調製し、各蛍光抗体染色に用いた。細胞懸濁液は、同処置群のマウス 2 匹分を合わせて使用した。FcR による非特異的結合を防ぐため、細胞懸濁液に FcR Blocking regent を添加し、氷上暗所 (4°C) 条件下で 10 分間処理した後、抗体染色を行った。細胞表面抗原の解析に用いたモノクロナール抗体を下記に示す; APC/Cy7-labelled CD45、PE-labeled CD11b 、Brilliant Violet 511-labelled CD11c 、APC-labeled MHC class-II 、PE/Cy7-labelled CD86、Brilliant Violet 421-labelled CD80 及び FITC-labeled CD54。上記抗体で 7 重染色を行った。抗体染色は、氷上暗所 (4°C) の条件で、30 分間行った。細胞表面抗原の測定には、FACScan; MACS Quant Analyzer (Miltenyi Biotec K.K.、Bergisch Gladbach、Germany) を用いた。死細胞を検出するため、細胞懸濁液に 1%

propidium iodide 溶液 (PI; Miltenyi Biotec K.K.、Bergisch Gladbach、Germany) を添加して測定した。PE 陰性、CD45 陽性、 CD11b 陽性及び CD11c 陽性をゲーティングし、樹状細胞を選別した。LC、dDC に相当する本細胞集団における CD86、CD80、CD54 及び MHC class-II の発現量を評価した [84,85,86,87]。細胞表面抗原の発現量の評価方法として、平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity: MFI) を用いた。各群間における細胞表面抗原の発現量の相対比較を行うため、相対平均蛍光強度 (Relative Mean Fluorescence Intensity: RMFI) を以下の計算式で求めた。

相対平均蛍光強度 (RMFI) =
物理的処置部位における樹状細胞表面抗原の平均蛍光強度 (右背面部皮膚) /
物理的無処置部位における樹状細胞表面抗原の平均蛍光強度 (左背面部皮膚)

8. In vivo 皮膚形態学的観察

C57BL/6 系雄性マウス (8 週齢) に、ペントバルビタール生理食塩水を 30 mg/kg の用量で腹腔内投与した。マウスの背部を電気シェーバー (ES7111; パナソニック社、大阪、日本) 及び除毛クリーム (epilat; クラシエホールディング株式会社、東京、日本) で除毛した後、除毛皮膚に 500 μm MN、300 μm MN で処置した。処置直後から経時的に観察及び撮影を行うことで、投与後の皮膚の様子を評価した。皮膚撮影には Digital Camera D60 (NIKON、東京、日本) を使用した。

9. 統計解析

データはすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。2 群間における細胞表面抗原発現量の解析には、対応のない二群間の検定 (Student's unpaired *t*-test) を用い、有意水準

を 0.1、1 または 5%とした。また多群間における細胞表面抗原発現量の解析には、ANOVA を用い、Dunnett 検定あるいは Tukey 検定を行い、有意水準を 0.1、1 または 5%とした。

第 2 項 結果の部

1. MN の形状観察

Figure 12 は、本節で用いたマイクロニードルスタンプの全体画像 (A) 及びニードル部の拡大画像 (B) を示す。本製剤は、直径 8 mm 円形台座に、円錐状のチタン性 MN を 34 本有している。MN の高さ及び底面部の直径の形状計測結果を Table 16 に示す。500 μm MN 及び 300 μm MN の 2 種類の MN の高さは、それぞれ 497.6±0.9 μm 及び 298.7±1.4 μm であり、底面部の直径は、それぞれ 179.6±1.8 μm 及び 157.6±2.0 μm であった。形状観察の結果、本節で用いた 2 種類のマイクロニードルスタンプは、各 MN が、高さ約 500 μm あるいは約 300 μm であることを形状観察により確認できた。

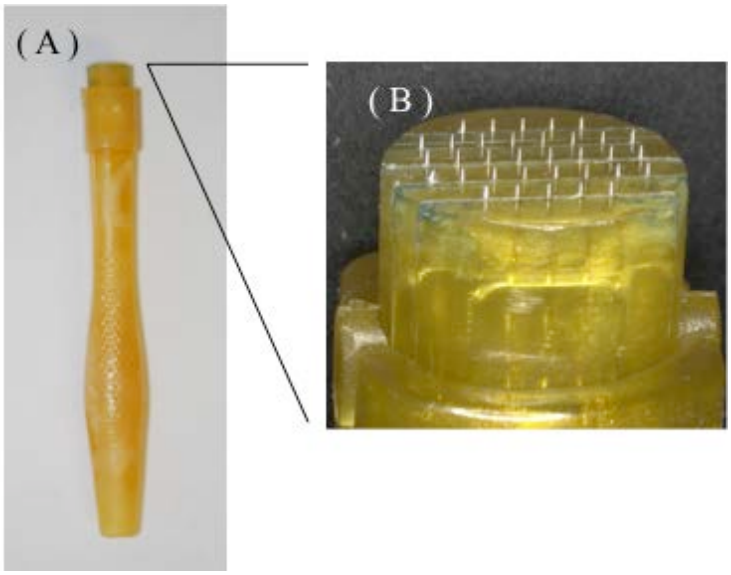


Figure 12 (A) Stamp-type microneedle device (Derma Stamp). (B) Magnified view of microneedles, observed by a video microscope. The microneedles are composed of titanium arranged in a circle of 8 mm radius. The Derma Stamp has 34 microneedles.

Table 16　Size of microneedle in two-stamp microneedle devices

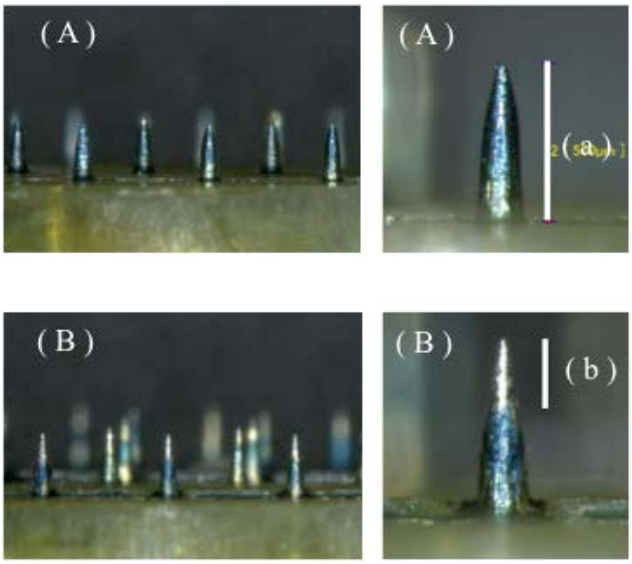
	Actual height (μm)	Actual diameter at basement (μm)
500 μm microneedles	497.6±0.9	179.6±1.8
300 μm microneedles	298.7±1.4	157.6±2.0

Each value shows the mean±SE (n=9).

2. MN の皮内刺入距離結果

Figure 13 は、コーティングした 500 μm MN 及び 300 μm MN の皮膚投与前後の画像を示す。皮膚投与後に、先端から部分的にコーティングが溶解している像が観察され、皮内に刺入した部分を示していると考えられる。皮膚投与前のコーティング部位及び皮膚投与後のコーティング溶解部分の計測結果を Table 17 に示す。皮膚投与後の 500 μm MN 及び 300 μm MN におけるコーティング溶解部分の長さは、それぞれ先端から、230.3±4.9 及び 127.7±3.3 μm であった。この長さは、各マイクロニードルの皮内刺入距離と考えられる。

500 μm **MN**



300 μm **MN**

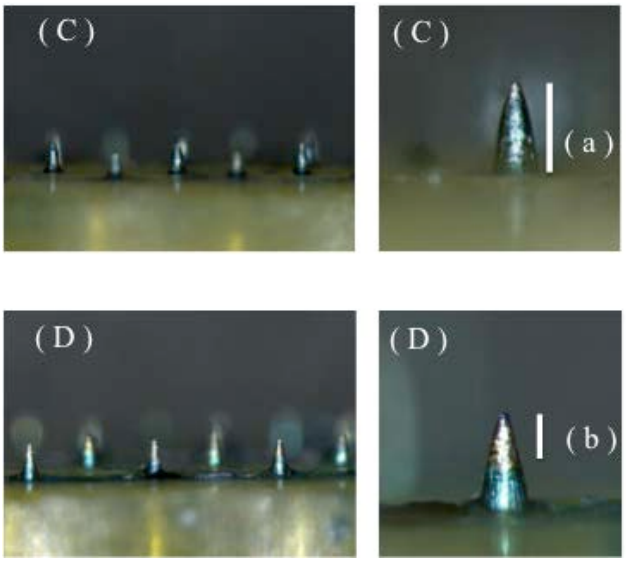


Figure 13 Microscopic images of the 500 μm (A, B) and 300 μm (C, D) microneedles coated with a mixture of chondroitin sulfate and Brilliant Green. (A, C) Images of coated microneedles before application. (B, D) Images of coated microneedles after the application on the shaved dorsal skin. The white bars indicate the whole coated portion before application (a) and the dissolved portion after application (b).

Table 17　The lengths of the coated portions of microneedles before application and the lengths of the dissolved portions of microneedles after application to mouse skin

	Length of coated portion (μm)	Length of dissolved portion (μm)
500 μm microneedles	494.9 ± 3.5	230.3 ± 4.9
300 μm microneedles	300.4 ± 1.8	127.7 ± 3.3

Each value shows the mean±SE (n=6-11).

3. 物理的処置に伴う皮内免疫応答 (表皮)

3-1. 500 μm MN 処置に伴う LC 表面抗原の発現変化

抗原提示細胞は、活性化すると、MHC class-II、共刺激分子である CD86、CD80 あるいは CD54 分子の発現強度が上がることが知られている[24,84,88,89]。Figure 14 は、500 μm MN 処置群における LC 表面上の各分子の発現変化を示している。Figure 14 (A) 及び (B) は、それぞれ各分子のヒストグラム及び MFI を示している。なお、抗体無添加にて同解析を行い、物理的処置の有無による各波長での自家蛍光及びその変化がないことを確認した。LC 上のこれら細胞表面抗原分子について、500 μm MN 処置皮膚と無処置皮膚を比較した結果、MN 処置により LC 上の MHC class-II 分子及び共刺激分子の発現が増加した。MFI は、MHC class-II、CD86、CD80 及び CD54 分子に対してそれぞれ 3.5、3.5、1.4 及び 1.3 倍増加しており、このうち MHC class-II、CD86 及び CD54 分子の発現増加は有意であった。これらの結果は、MN 処置により LC が活性化することを示している。

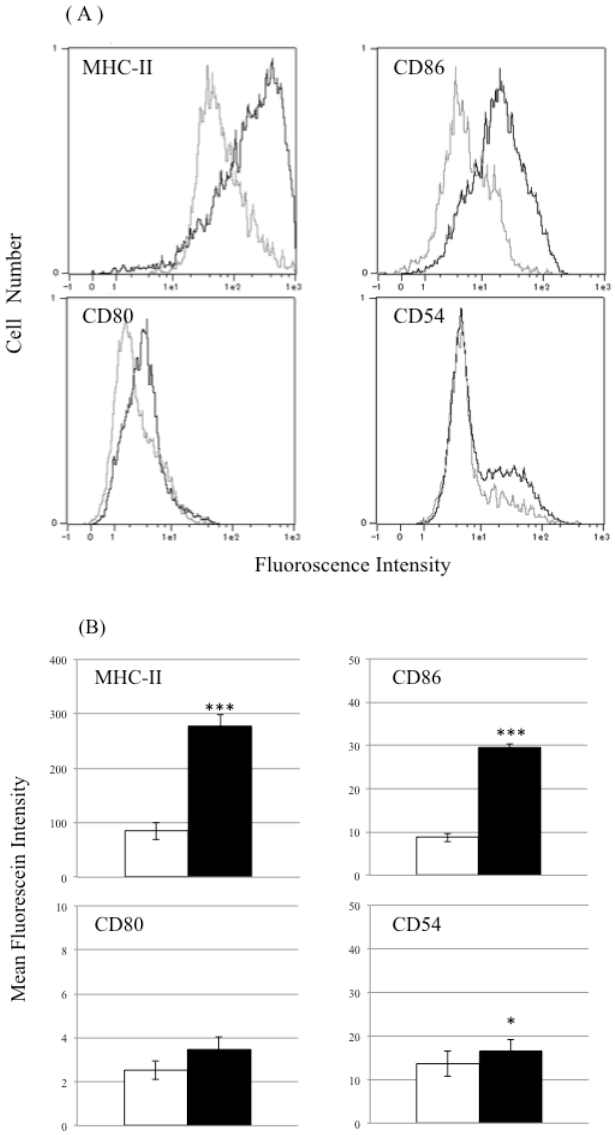


Figure 14 Expression of MHC class-II, CD86, CD80, and CD54 on epidermal LCs (A) (histogram; gray: control, black: treated with 500 μm microneedles) Epidermal cell suspensions were prepared from skin treated with or without application of 500 μm microneedles. The treated skin samples were obtained 12 h after application of microneedles. The MFI of MHC class-II, CD86, CD80, and CD54 on LCs in epidermal cells was measured using flow cytometry (B) (MFI; white bar: control, black bar: treated with 500 μm microneedles). Each point shows the mean±S.E. of five experiments. Statistical significance was evaluated by paired *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: significantly different from control.

3-2. 種々処置後の LC 表面抗原の発現変化の比較

皮膚への様々な物理的処置に伴うLCの活性化を評価するため、LC表面抗原の発現変化の解析を行った。Figure 15 に各物理的処置後における細胞表面抗原の発現変化を示す。ポジティブコントロールであるTS処置により、MHC class-II及びCD86分子の発現が増加する傾向を示した。500 μm MN 及び 300 μm MN 処置群については、MHC class-II、CD86 及び CD80 分子の発現が有意に増加し、特に MHC class-II 及び CD86 に対する影響が顕著であった。さらに、500 μm MN処置群でのMHC class-II及びCD86分子の発現は、TS 処置群に比べ有意に高かった。500 μm MN 処置及び 300 μm MN 処置群を比較した結果、MHC class-II 発現に対して 500 μm MN 処置で有意に高い発現を示し、CD86 に対しては有意な差は無いものの 500 μm MN 処置の方が、発現が高い傾向を示した。したがって、MNの皮内刺入距離の差、つまりMNによる皮膚への物理的刺激強度の差により LC の活性化に差がある可能性が考えられた。なお、一般的なワクチン投与方法である皮下注射処置群において、細胞表面抗原の発現変化は認められなかった。

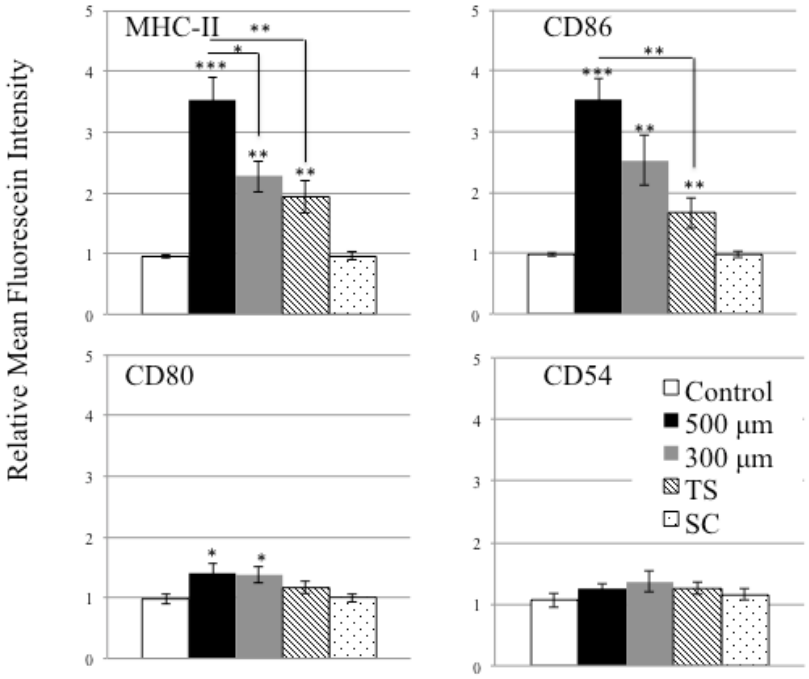


Figure 15　Expression of MHC class-II, CD86, CD80, and CD54 on the epidermal LCs after treatment with microneedles, TS or subcutaneous injection. The RMFI was calculated as MFI of treated skin samples (right dorsal skin)/MFI of control skin samples (left dorsal skin). The epidermal cell suspensions were prepared from right and left dorsal skin. The right dorsal skin was treated with microneedles, TS, or subcutaneous injection 12 h previously. The left dorsal skin was not treated. Each point shows the mean±S.E. of four to six experiments. Statistical significance was evaluated using ANOVA with Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: significantly different from control or 500 μm microneedles group.

3-3. 500 μm MN 処置に伴う LC 表面抗原の経時的発現変化

Figure 16 は、500 μm MN 処置群における LC 表面抗原の経時的発現変化を示す。処置後 3、6、12 及び 24 時間での LC 上の細胞表面抗原の発現を評価した。MHC class-II 及び CD86 発現は、処置後経時的に増大し、12 時間後に最大の発現を示した。CD80 及び CD54 はその発現強度は弱いものの、処置後 3 時間で最大値を示し、24 時

間後の発現強度は刺激を与える前の状態に戻っていた。以上の結果より、500 μm MN 処置により、LC は速やかにかつ一過性に活性化されることが示唆された。

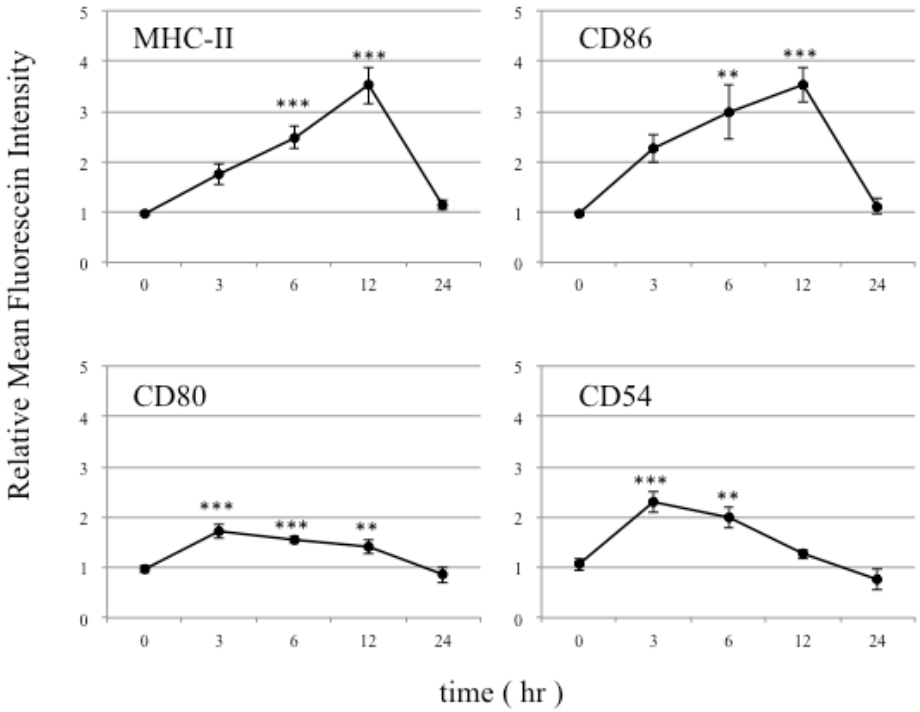


Figure 16　The time-dependent change in the expression of MHC class-II, CD86, CD80, and CD54 on the epidermal LCs at 3, 6, 12, and 24 h after application with 500 μm microneedles. The RMFI was calculated as MFI of treated skin samples with application of 500 μm microneedles (right dorsal skin)/MFI of control skin samples (left dorsal skin). Each value shows the mean±S.E. of four to five experiments. Statistical significance was evaluated using ANOVA with Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the RMFI at 0 h.

4. 物理的処置に伴う皮内免疫応答 (真皮)

4-1. 500 μm MN 処置に伴う dDC 表面抗原の発現変化

Figure 17 は、500 μm MN 処置群における真皮表面上の各分子の発現変化を示している。Figure 17 (A) 及び (B) は、それぞれ各分子のヒストグラム及び MFI を示している。なお、抗体無添加にて同解析を行い、物理的処置の有無による各波長での自家蛍光及

びその変化がないことを確認した。dDC 上の 4 分子について、500 μm MN 処置皮膚と無処置皮膚を比較した結果、MN 処置により dDC 上の MHC class-II 及び CD86 分子の発現がそれぞれ 2.1 及び 1.7 倍増加しており、その発現は有意に高かった。これらの結果は、MN 処置により dDC が活性化されることを示唆している。

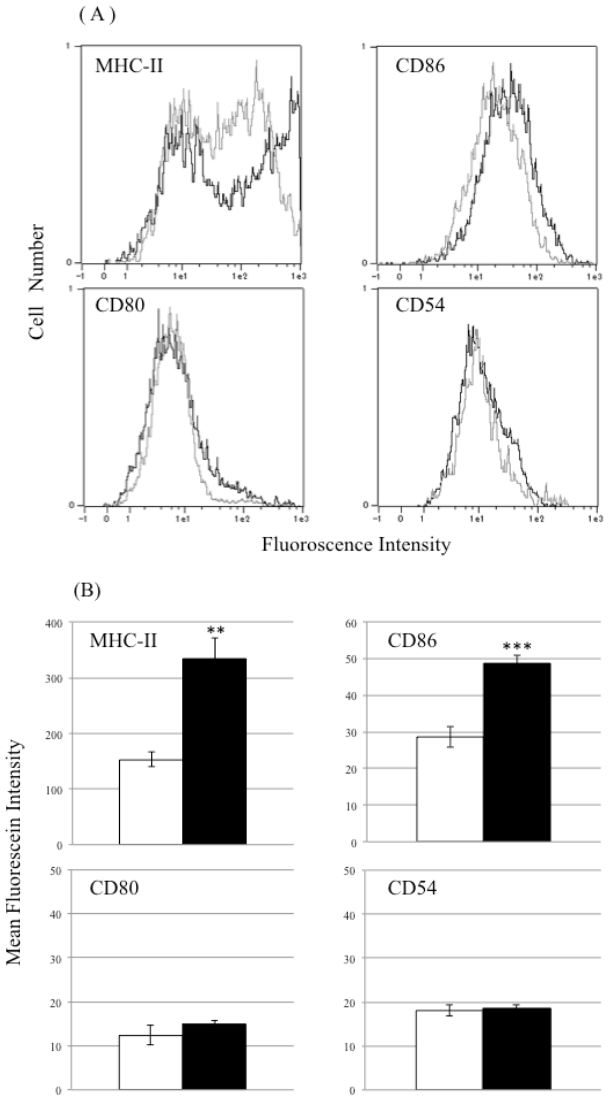


Figure 17 Expression of MHC class-II, CD86, CD80, and CD54 on dDCs (A) (histogram; gray: control, black: treated with 500 μm microneedles). Dermal cell suspensions were prepared from skin treated with or without application of 500 μm microneedles. The treated skin samples were obtained at 12 h after this application. The epidermal sheet was removed from the skin samples. Subsequently, the dermal cells were isolated from the residual skin samples. The MFI of MHC class-II, CD86, CD80, and CD54 on dDC in dermal cells was measured using flow cytometry (B) (MFI; white bar: control, black bar: treated with 500 μm microneedles). Each point shows the mean±S.E. of five experiments. Statistical significance was evaluated by paired *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: significantly different from control.

4-2. 種々処置後の dDC 表面抗原の発現変化の比較

Figure 18 に各物理的処置後における dDC 表面抗原の発現変化を示す。500 μm MN 及び 300 μm MN 処置群については、MHC class-II 及び CD86 分子の発現が、有意に増加した。500 μm MN 処置群及び 300 μm MN 処置群を比較した結果、500 μm MN 処置群の方が各分子の発現は高い傾向があるものの、有意な差は認められなかった。なお、一般的なワクチン投与方法である皮下注射処置群において、dDC 表面抗原の発現は誘導されなかった。

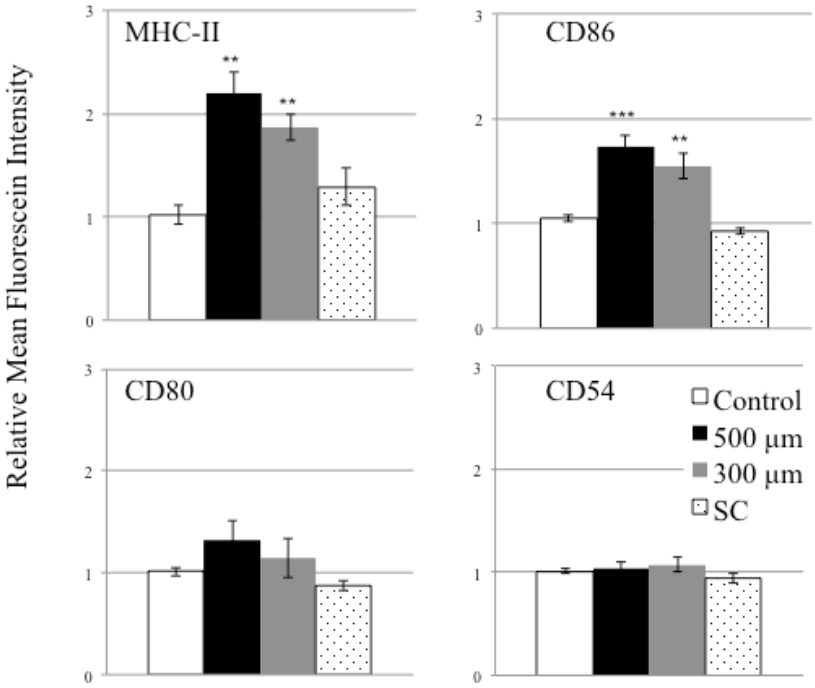


Figure 18　Expression of MHC class-II, CD86, CD80, and CD54 after treatment with microneedles or subcutaneous injection. The RMFI was calculated as MFI of treated skin samples (right dorsal skin)/MFI of control skin samples (left dorsal skin). The dermal cell suspensions were prepared from right and left dorsal skin. The right dorsal skin was treated with microneedles or subcutaneous injection 12 h previously. The left dorsal skin was not treated. Each point shows the mean±S.E. of four to five experiments. Statistical significance was evaluated using ANOVA with Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: significantly different from control group.

5. 皮膚形態学的評価

Figure 19 は、マウス除毛皮膚に 500 μm MN、300 μm MN を投与した後、経時的に撮影した皮膚表面画像を示す。MN 処置直後、皮膚には穿孔が確認された。時間の経過と共にその穿孔は薄れていき、500 μm MN 投与 15 分後には確認できたが、1 時間後には元通りの皮膚の状態に戻った。一方、300 μm MN 投与後についても同様で、時間の経過と共に穿孔は薄れ、1 時間後には元通りの皮膚の状態に戻った。MN 投与後の皮膚には、発赤や紅斑等は残らなかった。これらは、MN による皮膚構造変化が、一過性であることを示唆している。

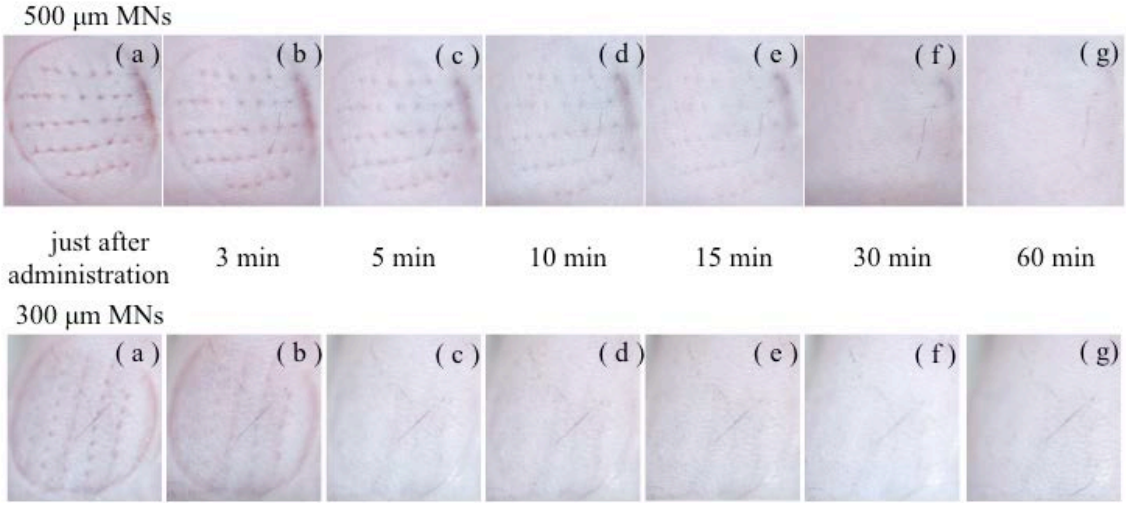


Figure 19 Photographs of mouse skin after the application of 500 μm microneedles and 300 μm microneedles

第 3 項 考察

皮膚は物理的バリアであると同時に、免疫学的バリアでもある。これまでの研究で、MN が物理的に皮膚角層を突破し、薬物を皮内に送達できることは確認されている。しかし、MN が経皮免疫の初期ターゲットである皮膚樹状細胞に与える影響については、ほとんど報告されていない。MN を経皮免疫製剤として確立し、ワクチン接種に応用していくためには、皮内に存在する免疫応答細胞に対する影響を明らかにすることが重要だと考える。

MN 処置後、LC 及び dDC の細胞表面抗原である MHC class-II 及び CD86 の発現は、顕著に増加していた。また、LC 活性化に対するポジティブコントロールとして用いた TS 処置に比べ、MN 処置後の LC のこれら分子の発現は有意に増加していた。一方、従来のワクチン投与方法である皮下注射処置群では、これら分子の発現変動は認められなかった。これらの知見は、MN が皮膚樹状細胞の働きを活性化することを示唆している。また、共刺激分子である CD86 が顕著に増加していたことから、MN が自然免疫を活性化する能力、すなわちアジュバント様作用を持つことが示唆された。CD86 は共刺激分子の中でも、獲得免疫始動において最も重要な分子と考えられている [24)]。共刺激分子の発現は、アジュバントがもたらすアウトプットの一つである。アジュバントのレセプターとして知られている Toll Like Receptor は、炎症性サイトカインである IL-1 の受容体と相同性のある TIR ドメインを持つことが知られている [90)]。IL-1 はケラチノサイトの細胞質や膜結合型として貯留されており、外界からの刺激を察知し、ケラチノサイトが免疫系を賦活化するためのシグナル伝達を誘導する際に放出される [91)]。MN 投与のような物理的刺激が、同様の機構によりアジュバント様作用をもたらしたことも考えられ、今後はサイトカイン等のメディエーターについても評価し、物理的刺激のアジュバント様作用の詳細についても検討する必要がある。なお、皮下注射も、針を刺すという物理的な刺激を伴う方法ではあるものの、皮膚樹状細胞の活性化は引き起こさなかった。針が一本であることより、皮

膚表面を広く覆うケラチノサイトへの物理的刺激が、MN に比べて弱かったものと考えられた。さらに、樹状細胞の局在していない皮下組織への注射となるため、樹状細胞への影響がほとんど無かったものと考える。

本節では、針長の異なる2種類のMNを用い、物理的刺激強度の違いによる免疫細胞への影響を評価した。MN は 500 μm 以上の長さになると、神経等付属器官が存在する真皮深部に達し、痛みを感じるデメリットにつながる。そこで本節では、針長 500 μm 及び 300 μm の MN を用いて実験を行った。まず、コーティングマイクロニードルを調製し、それぞれが皮膚深部約 230 μm 及び 130 μm まで到達することを確認した。LC 及び dDC の細胞表面抗原の発現は、300 μm MN 処置群と比べ、500 μm MN 処置群の方が増加する傾向を示した。しかしながら、Figure 15 に示すように、500 μm MN 処置群及び 300 μm MN 処置群の間で、LC 上の MHC class-II 以外の分子の発現には有意な差はなかったため、皮膚表面から約 130 μm 以上の深部に到達するMNであれば、樹状細胞を活性化させる特性を有していると考えることもでき、今後検証が必要である。MN の製剤強度及びハンドリングの観点から、MN の基本形状は針長 500 μm が良いと考えられているが免疫学的観点からも、この針長が優れているものと考えられる。

LC 表面抗原の経時的発現変化の結果より、処置後 3 時間という初期段階から、これら分子の発現が増加していることが明らかになった。また、24 時間後には LC 表面抗原は刺激を与える前の状態に戻っていた。これまでの知見に基づけば、ワクチン抗原をはじめとした高分子化合物は、MN にて投与後、皮内に一定時間留まることが想定される。そのため、LC の活性化が初期段階から起こっていれば、LC によるワクチン抗原の捕食の増加も期待できる。しかし本検討は、物理的刺激による LC の活性化に着目しているが、LC の抗原捕食能や抗体産生能は評価していない。TS 刺激で活性化した LC は、24 時間後リンパ節に移行するという報告 [24)]もあることから、抗原捕食能や抗体産生能の経時的変化、さらには活性化された LC のリンパ節への移行などの観点からも検討の必要があると考える。

本節では、アジュバント作用によるアウトプットの一つとして樹状細胞活性化を評価した。実際に、経皮ワクチンによる特異的免疫の獲得には、ワクチン抗原の皮膚透過、アジュバントの作用によるサイトカイン産生、ワクチンのタンパク結合、樹状細胞の活性化等に続いて、抗原特異的な T 細胞の増殖、抗体産生といった鍵となる反応がある。MN 投与に伴う物理的刺激による樹状細胞の活性化、つまりアジュバント様作用が、最終的な獲得免疫にどの程度寄与するか考察するためには、より詳細な検討が必要になるだろう。

本節の結果、TDDS の一つである MN が、優れた薬物送達を可能にするだけではなく、物理的刺激により免疫系を活性化するアジュバント様作用を示すことが明らかとなった。つまり、免疫誘導の効率化という観点から、経皮ワクチンデバイスとしての MN の可能性が高まると考えられる。

第 4 項 小括

経皮免疫製剤としてのMNのキャラクタリゼーションを行うため、MN投与に伴う物理的刺激が、皮膚樹状細胞に与える影響を評価した。本刺激が、LC及びdDCを活性化させることが明らかとなった。これは、MN が薬物の経皮送達に優れた TDDS 技術という位置付けにとどまらず、効率的な免疫誘導を引き起こすアジュバント様作用をも兼ね備えている可能性を示唆している。ワクチン開発は、感染症領域の枠を超え、がんやアレルギー疾患の領域にも広がっている。今後益々注目を集めるワクチン分野において、今回の報告が、経皮免製剤としての MN の発展に寄与することが期待される。

総括

MN は、皮膚に投与しても痛みを感じず、さらに従来の TDDS 技術では経皮投与が困難な薬物にも適用可能な製剤である。MN は、経皮吸収型製剤はもちろん、経皮ワクチンデバイスとしてもその関心が高まっている。経皮吸収及び経皮免疫 (ワクチン) 製剤としての MN の実用化に向け、MN の開発、有用性評価及びキャラクタリゼーションを行うことを目的に、下記の項目について検証を行った。

第 1 章 経皮吸収型製剤としての MN のキャラクタリゼーション

第 1 節 経皮吸収を目的とした水溶性低分子化合物含有溶解性 MN の開発

第 2 章 経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーション

(抗原の皮内送達と抗体産生)

第 1 節 経皮免疫を目的とした高分子化合物 (モデル抗原) 含有溶解性 MN の開発

第 2 節 MN からの高分子化合物 (モデル抗原) の皮内送達部位についての検証

第 3 章 経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーション

(物理的刺激に関する初期評価)

第 1 節 MN 投与に伴う皮膚への物理的刺激が皮膚樹状細胞へ与える影響について

以下にその要約及び総括的考察を示す。

第 1 章 経皮吸収型製剤としての MN のキャラクタリゼーション

第 1 節 経皮吸収を目的とした水溶性低分子化合物含有溶解性 MN の開発

本研究では、難皮膚透過性薬物である水溶性低分子化合物含有溶解性 MN の調製を行い、その経皮吸収性を薬物動態学的に評価し、経皮吸収型製剤としての基本的特

性を明らかにした。

モデル薬物として、水溶性低分子化合物であるグラニセトロンを選択した。本製剤は、その円錐上部にGSTを含有し、下部は基剤のみで形成された2層性構造である。1 cm^2 あたり100本の溶解性MNを有するGST含有MNACを調製し、本製剤投与後のGSTのBAを評価した。その結果、約95%という良好なBAが得られた。これは、MNが角層を突破し、含有されていたGSTが皮内に送達できたことを意味しており、MNが難皮膚透過性である水溶性低分子化合物の全身循環系への移行を、大幅に改善できることを示唆している。また T_{max} は、MNAC投与後10分で得られた。これは、MNAC投与後、MNの基剤であるコンドロイチン硫酸ナトリウムが速やかに溶解することにより、含有されていたGSTが放出され血中に移行したことを示唆している。この結果から、本製剤は含有薬物の速やかな血中への移行という点で有用であることが明らかとなった。自己投与可能で注射剤と類似した血中濃度推移を示すことは、極めて有用な特徴と考えられ、即効性を期待する他の薬物に対しても利用できると考えられる。

本節の結果、薬物の全身送達を目的とした低分子化合物含有溶解性MNは、経皮吸収型製剤として有用なデバイスになり得ると考えられた。

第2章 経皮免疫製剤としてのMNのキャラクタリゼーション (抗原の皮内送達と抗体産生)

現在、ワクチンは感染症分野のみならず、がんやアレルギー疾患の領域でもその応用が進んでいる。また、他組織と比べ、皮内には免疫関連の細胞が豊富に存在していることからも、経皮ワクチン分野の発展が見込まれ、本分野へのMNの応用が期待されている。そこで、本章では経皮ワクチン分野へのMNの応用及び経皮免疫(ワクチン)製剤としてのMNの基本的特性の把握を行った。

第 1 節 経皮免疫を目的とした高分子化合物 (モデル抗原) 含有溶解性 MN の開発

本研究では、難皮膚透過性薬物である高分子化合物 (モデル抗原) 含有溶解性 MN の調製を行い、その経皮免疫性について全身血中抗体価をバイオマーカーとして解析した。そして、ワクチン接種への応用に向けた皮内送達型製剤としての本 MN の基本的特性を明らかにした。

モデル抗原として、高分子タンパクである OA を選択した。MNAC としての全体構造は、第 1 章第 1 節から改良を行い、2.25 cm^2あたり 225 本の溶解性 MN を有するよう調製した。

OA 含有 MNAC 投与群の血漿中 Ig (G+A+M) 抗体価は、同投与量の皮下注射投与群と同等以上であったことより、本製剤により、高分子化合物である OA を経皮送達できることが明らかになった。また OA 含有 MNAC 投与群では、抗原量を 10 倍投与した皮下注射投与群とほぼ同等の抗体価が得られた。皮下注射での投与より少量の抗原によって、皮下注射と同等以上の免疫応答を惹起する傾向が確認できたことより、MN が注射に代わる有用な経皮ワクチンデバイスになり得ることが示唆された。一方、投与後に IgE 抗体価には変動が生じなかったことから、本製剤によりアレルギー反応は誘発されないものと考えられた。また本節では、モデル抗原を MN に含有させ、バイオマーカーとして血漿中抗体価を指標としたため、ワクチン効果の指標である感染後生存率や抗原除去率は評価できなかった。そのため、MN の経皮免疫製剤としての有用性をさらに評価するためには、実際のワクチン抗原を MN に適用させ、他の投与方法と比較することが必要になると考える。

本節の結果、高分子であるワクチン抗原を含有させた溶解性 MN は、経皮的免疫獲得を目的とした皮内送達型ワクチン接種製剤として応用できると考えられた。

第 2 節 MN からの高分子化合物 (モデル抗原) の皮内送達部位についての検証

皮膚は外側から、表皮、真皮及び皮下組織の 3 層に分けられる。表皮層に、高い抗原

提示能を有する樹状細胞であるLCが、真皮層には、各種サブセットを含むdDCが分布している。基本の2層性MNは、真皮層に抗原をデリバリーすると考えられる。本研究では、表皮層への抗原デリバリーを目的に、MNの中間層に抗原を保持させた3層性MNを調製した。3層性MNと2層性MNとの皮内送達部位について組織学的に評価した結果、3層性MNは表皮層及び真皮層上部に、2層性MNは真皮層に抗原をデリバリーすることが明らかとなった。さらにその両者の免疫応答性を比較すると、3層性MN投与群の血漿中Ig (G+A+M) 抗体価は、皮下投与群及び2層性MN投与群と比べ有意に上昇していることが明らかとなった。

ワクチンは、パンデミック時には大規模投与が必要になる。ワクチン供給量には限りがあるため、少ない投与量で最大の効果が得られる製剤が求められている。これまで報告されているTDDS技術は、その特性上、皮膚内部においてデリバリー性を持たせることは難しい。一方、本MNは、抗原保持部位を調整し、皮内デリバリー性のコントロールを行うことで、より少量で効率的なワクチン効果が期待できる製剤であることが示唆された。本結果は、MNの構造設計を考える上でも重要な情報になると考える。

第3章 経皮免疫製剤としてのMNのキャラクタリゼーション (物理的刺激に関する初期評価)

MNは、皮膚に物理的に小孔を開けて薬物透過ルートを形成する。第3章では、MNの投与に伴う物理的な刺激に着目し、MNの経皮免疫製剤としての基本的特性の把握を行った。

第1節 MN投与に伴う皮膚への物理的刺激が皮膚樹状細胞へ与える影響について

経皮ワクチンは、皮膚の免疫機能を利用する方法であり、経皮免疫製剤としてのMNは、LCやdDCといった皮膚樹状細胞を初期ターゲットにしている。しかし、MNのような

物理的な刺激がこれら免疫応答細胞に与える影響を評価した報告はほとんどない。本研究では、MN 投与に伴う皮膚への物理的刺激に着目し、その刺激自体が、樹状細胞の活性化、すなわちアジュバント作用の一つである自然免疫の活性化を引き起こすかどうかを明らかにするために、MN 投与後の LC 及び dDC について分子生物学的に評価した。

MN 投与後の LC において、活性化分子である MHC class-II 及び CD86 等の共刺激分子が顕著に増加した。dDC においては、LC よりも低い傾向ではあったものの、これら分子の発現が顕著に増加した。これらの結果は、MN 投与に伴う物理的刺激が、皮膚樹状細胞を活性化させることを示唆している。

さらに、皮膚への物理的刺激の強弱による樹状細胞への影響の違いを評価するため、針長の異なる 2 種の MN を用い、皮膚樹状細胞の活性化に対する刺入深度の影響を評価した。500 μm MN は皮内 230 μm の深さまで、一方、300 μm MN は皮内 130 μm の深さまで到達することを確認した。500 μm MN 処置群は、300 μm MN 処置群と比べ、活性化分子の発現率は高い傾向を示し、物理的刺激の強さの程度が樹状細胞活性化に影響することを示唆するものであった。さらに、LC における活性化分子の経時的発現変化を調べたところ、その発現は早期的かつ一過性であることが確認された。MN 投与後の皮膚の形態学的評価を行ったところ、一過性の穿孔は残るものの、発赤や紅斑等の副反応は観察されなかった。

本節の結果は、皮膚への MN 投与による物理的刺激そのものが免疫系を活性化するアジュバント様作用を有する可能性を示しており、MN により含有させたワクチン抗原の皮内送達と合わせて、経皮ワクチン投与の合理性をサポートする結果であると考える。

TDDS としての MN の確立を目指し、経皮吸収あるいは経皮免疫を目的とした MN を開発し、基本的特性及びその有用性を明らかにした。

その結果、難皮膚透過性薬物である水溶性低分子化合物を含有させた溶解性 MN は、

薬物の全身送達及び即効性を期待した経皮吸収型製剤として、一方高分子化合物 (モデル抗原) を含有させた溶解性 MN は、ワクチン接種に応用可能な皮内送達型製剤として、有用であることが明らかになった。これらの知見は、従来の技術では経皮投与が困難な難皮膚透過性薬物に対し、MN を応用できるということを示している。

経皮免疫製剤として MN を利用する場合、溶解性 MN の抗原保持部位を調整し、強力な抗原提示能を有する LC が分布する表皮層へ抗原のデリバリーを達成することで、より効率的なワクチン接種が可能になるということが明らかになった。さらに、これら皮膚樹状細胞に対し、MN 投与に伴う物理的な刺激が、免疫系を活性化するアジュバント様作用を有する可能性も示唆された。

本研究により、MN の基本的特性を把握することができ、初期製剤開発及びその有用性を引き出すための知見を得ることができた。本研究で得られた知見を生かして MN の開発を行うことで、より有用な経皮投与製剤の創出に繋がると考える。

謝辞

本研究に臨み終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学部病院薬剤学講座教授 上田秀雄 先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行に当たり終始有益なご指導、ご助言を賜りました城西大学薬学部病院薬剤学講座助教 木村聡一郎 先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、学位論文の査読をしていただいた城西大学薬学部生化学講座教授 荒田洋一郎 先生ならびに城西大学薬学部食毒性学講座教授 和田政裕 先生に深謝いたします。

さらに、本研究の遂行にあたり有益なご意見並びに実験のご協力をいただいた株式会社バイオセレンタック（京都薬科大学前薬物動態学教室教授）高田寛治様並びにゼリア新薬工業株式会社中央研究所医薬開発研究部リサーチスペシャリスト折川有紀博士に感謝の意を表します。

また、本研究の実施にご協力いただきました、城西大学薬学部病院薬剤学講座 野本くん、渡邉さんをはじめとする城西大学薬学部病院薬剤学講座関係諸氏に深く感謝いたします。

また、本研究の機会をお与えくださり、御激励とご配慮を賜りました伊部 充弘社長、平賀 義裕中央研究所所長、武州製薬（ゼリア新薬工業前製剤研究部部長）山口幸也様、西山哲之中央研究所製剤研究部部長、原口紫リサーチマネージャー、楢木泰俊リサーチスペシャリストに深く感謝いたします。

引用文献

1) 日本製薬工業協会「製薬協ガイド2012 - 2013」

2) 薬価基準収載品目リスト及び後発医薬品に関する情報について，厚生労働省（平成27年10月1日適用）

3) Brown MB, Traynor MJ, Martin GP, Akomeah FK. Transdermal drug delivery systems: skin perturbation devices. *Methods Mol. Biol.*, **437**, 119-139 (2008).

4) Arora A, Prausnitz MR, Mitragotri S. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **364**, 227-236 (2008).

5) Tang T, Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Theoretical Description of Transdermal Transport of Hydrophilic Permeants: Application to Low-Frequency Sonophoresis. *J. Pharm. Sci.*, **90**, 545-568 (2001).

6) Chiarella P, Fazio VM, Signori E. Application of electroporation in DNA vaccination protocols. *Curr. Gene. Ther.*, **10**, 281-286 (2010).

7) Denet AR, Ucakar B. Transdermal delivery of timolol and atenolol using electroporation and iontophoresis in combination: a mechanistic approach. *Pharm. Res.*, **20**, 1946-1951 (2003).

8) Simon JK, Carter M, Pasetti MF, Sztein MB, Kotloff KL, Weniger BG, Campbell JD, Levine MM. Safety, tolerability, and immunogenicity of inactivated trivalent seasonal influenza vaccine administered with a needle-free disposable-syringe jet injector. *Vaccine*, **29**, 9544-9550 (2011).

9) Gerstel MS, Place VA. Drug Delivery Device. US Patent No. 3,964,482 (1976)

10) Verbaan FJ, Bal SM, van den Berg DJ, Groenink WH, Verpoorten H, Lüttge R, Bouwstra JA. Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin. *J. Control. Release*, **117**, 238-245 (2007).

11) Burton SA, Ng CY, Simmers R, Moeckly C, Brandwein D, Gilbert T, Johnson N, Brown K, Alston T, Prochnow G, Siebenaler K, Hansen K. Rapid Intradermal Delivery of Liquid Formulations Using a Hollow Microstructured Array. *Pharm. Res.*, **28**, 31-40 (2011).

12) Vrdoljak A, McGrath MG, Carey JB, Draper SJ, Hill AV, O'Mahony C, Crean AM, Moore AC. Coated microneedle arrays for transcutaneous delivery of live virus vaccines. *J. Control. Release*, **159**, 34-42 (2012).

13) Nguyen HX, Banga AK. Enhanced skin delivery of vismodegib by microneedle treatment. *Drug Deliv. Transl. Res.*, **5**, 407-423 (2015).

14) Gomaa YA, Garland MJ, McInnes FJ, Donnelly RF, El-Khordagui LK, Wilson CG. Microneedle/nanoencapsulation-mediated transdermal delivery: Mechanistic insights. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **86**, 145-155 (2014).
15) Fukushima K, Ise A, Morita H, Hasegawa R, Ito Y, Sugioka N, Takada K. Two-layered dissolving microneedles for percutaneous delivery of peptide/protein drugs in rats. *Pharm. Res.*, **28**, 7-21 (2011).
16) Takada K. Microfabrication derived DDS: From batch to individual production. *Drug. Discov. Thrapeutics*, **2**, 140-155 (2008).
17) Ito Y, Hasegawa R, Fukushima K, Sugioka N, Takada K. Self-dissolving microarray chip as percutaneous delivery system of protein drug. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 683-690 (2010).
18) Ito Y, Ise A, Sugioka N, Takada K. Molecular weight dependence on bioavailability of FITC-dextran after administration of self-dissolving micropile to rat skin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **36**, 845-851 (2010).
19) Babiuk S, Baca-Estrada M, Babiuk LA, Ewen C, Foldvari M. Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery. *J. Control. Release*, **66**, 199-214 (2000).
20) Cristillo AD, Weiss D, Hudacik L, Restrepo S, Galmin L, Suschak J, Draghia-Akli R, Markham P, Pal R. Persistent antibody and T cell responses induced by HIV- 1 DNA vaccine delivered by electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 29-35 (2008).
21) Jones S, Evans K, McElwaine-Johnn H, Sharpe M, Oxford J, Lambkin-Williams R, Mant T, Nolan A, Zambon M, Ellis J, Beadle J, Loudon PT. DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled phase 1b clinical trial. *Vaccine*, **27**, 2506-2512 (2009).
22) Wahl M, Hermodsson S. Intradermal, subcutaneous or intramuscular administration of hepatitis B vaccine: side effects and antibody response. *Scand. J. Infect. Dis.*, **19**, 617-621 (1987).
23) Stoitzner P, Tripp CH, Eberhart A, Price KM, Jung JY, Bursch L, Ronchese F, Romani N. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 7783-7788 (2006).
24) Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, Seo N, Furukawa F, Takigawa M. Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.*, **109**, 175-182 (1997).
25) Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000).

26) Barry BW. Dermatological formulations: percutaneous absorption. in Drugs and the Pharmaceutical Sciences: Edited by J Swarbrick. New York/Basel, Marcel Dekker, 95-126 (1983).
27) 児玉庸夫. <http://www1.jiu.ac.jp/~biopharm/pm-slide6.pdf#searc>
28) 医薬品インタビューフォーム，中外製薬株式会社, 5-HT3 受容体拮抗型制吐剤，カイトリル®注1 mg，カイトリル®注3 mg，カイトリル®点滴静注バッグ 3 mg/50 mL，カイトリル®点滴静注バッグ 3 mg/100 mL
29) Tuca A. Use of granisetron transdermal system in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a review. *G. Cancer Manag. Res.*, **2**, 1-12 (2010).
30) Boccia RV, Gordan LN, Clark G, Howell JD, Grunberg SM. Efficacy and tolerability of transdermal granisetron for the control of chemotherapy-induced nausea and vomiting associated with moderately and highly emetogenic multi-day chemotherapy: a randomized, double-blind, phase III study. *Support. Care Cancer*, **19**, 1609-1617 (2011).
31) Cázares-Delgadilloa J, Ganem-Ronderob A, Quintanar-Guerrerob D, López-Castellanoc AC, Merinod V, Kalia YN. Using transdermal iontophoresis to increase granisetron delivery across skin in vitro and *in vivo*: Effect of experimental conditions and a comparison with other enhancement strategies. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **39**, 387-393 (2010).
32) Zheng WW, Zhao L, Wei YM, Ye Y, Xiao SH. Preparation and the in vitro evaluation of nanoemulsion system for the transdermal delivery of granisetron hydrochloride. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1015-1019 (2010).
33) Jiang Y, Lin M, Fan G, Chen Y, Li Z, Zhao W, Wu Y, Hu J. Rapid determination of granisetron in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and its application to bioequivalence study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42,** 464-473 (2006).
34) Yoshikawa Y, Kato K, Sone H, Takada K. Development and Evaluation of Noncompartmental Pharmacokinetic Analysis Program "WinHARMONY" Using Visual BASIC Language Having a Function of an Automatic Recognition of Terminal Elimination Phase of Plasma Drug Concentration vs. Time Profile. *Japanese J. Clin. Pharmacol. Thrapeutics*, **29**, 475-487 (1998).
35) Ito Y, Yoshimura M, Tanaka T, Takada K. Effect of Lipophilicity on the Bioavailability of Drugs After Percutaneous Administration by Dissolving Microneedles. *J. Pharm. Sci.*, **15**, 145-156 (2012).

36) Caspers JP, Lucassen WG, Bruining AH, Puppels JG. Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid *in vivo* determination of water concentration profiles in human skin. *J. Raman Spectrosc.*, **31**, 813-818 (2008).
37) Ito Y, Hasegawa R, Fukushima K, Sugioka N, Takada K. Self-Dissolving Micropile Array Chip as Percutaneous Delivery System of Protein Drug. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 683-690 (2010).
38) World Health organization Unicef, Global Immunization Data, <http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/global_immunization_data.pdf?ua=1> July (2014).
39) Miller MA, Pisani E. The cost of unsafe injections. *Bull. World Health Organ.*, **77**, 808-811 (1999).
40) Gilkey MB, Malo TL, Shah PD, Hall ME, Brewer NT. Quality of Physician Communication about Human Papillomavirus Vaccine: Findings from a National Survey. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **24**, 1-7 (2015).
41) Brightbill HD, Jeet S, Lin Z, Yan D, Zhou M, Tan M, Nguyen A, Yeh S, Delarosa D, Leong SR, Wong T, Chen Y, Ultsch M, Luis E, Ramani SR, Jackman J, Gonzalez L, Dennis MS, Chuntharapai A, DeForge L, Meng YG, Xu M, Eigenbrot C, Lee WP, Refino CJ, Balazs M, Wu LC. Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *J. Clin. Invest.*, **120**, 2218-2229 (2010).
42) Nikolic WV, Bai Y, Obregon D, Hou H, Mori T, Zeng J, Ehrhart J, Shytle RD, Giunta B, Morgan D, Town T, Tan J. Transcutaneous β-amyloid immunization reduces cerebral β-amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 2507-2512 (2007).
43) Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, Burdick J, Elmagd KA, Zeevi A, Lopez-Cepero M, Daller JA, Gritsch HA, Reed EF, Jonsson J, Hawkins D, Britz JA. Assessing relative risks of infection and rejection : a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation*, **82**, 663-668 (2006).
44) Mathers AR, Larregina AT. Professional antigen-presenting cells of the skin. *Immunol. Res.*, **36**, 127-136 (2006).
45) Nestle FO, Meglio PD, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 679-691 (2009).
46) Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat. Immunol.*, **10**, 1237-1244 (2009).
47) Wu C, Li C, Wei L, Zheng Z. Innate immune modulation of keratinocytes by antikeratin 16 antibodies. *Exp. Dermatol.*, **17**, 645-652 (2008).

48) Owsiak DG, Ogg GS. The Epidermis as an Adjuvant. *J. Invest. Dermatol.*, **132**, 940-948 (2012).
49) Gro¨ne A, Tierpathologie IB. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **88**, 1-12 (2002).
50) Dean HJ, Chen D. Epidermal powder immunization against influenza. *Vaccine*, **23**, 681-686 (2004).
51) Liu Y, Costigan G, Bellhouse BJ. Performance studies of conical nozzle designed for the macromolecular skin delivery. *J. Drug Target.*, **16**, 206-212 (2008).
52) Zhao YL, Murthy SN, Manjili MH, Guan LJ, Sen A, Hui SW. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization. *Vaccine*, **24**, 1282-1290 (2006).
53) Cristillo AD, Weiss D, Hudacik L, Restrepo S, Galmin L, Suschak J, Draghia-Akli R, Markham P, Pal R. Persistent antibody and T cell responses induced by HIV- 1 DNA vaccine delivered by electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 29-35 (2008).
54) Dahlan A, Alpar HO, Stickings P, Sesardic D, Murdan S. Transcutaneous immunisation assisted by low-frequency ultrasound. *Int. J. Pharm.*, **368**, 123-128 (2009).
55) Tezel A, Paliwal S, Shen Z, Mitragotri S. Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. *Vaccine*, **23**, 3800-3807 (2005).
56) Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine*, **25**, 8762-8770 (2007).
57) Zhu Q, Zarnitsyn VG, Ye L, Wen Z, Gao Y, Pan L, Skountzou I, Gill HS, Prausnitz MR, Yang C, Compans RW. Immunization by vaccine-coated microneedle arrays protects against influenza virus challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 7968-7973 (2009).
58) Matriano JA, Cormier M, Johnson J, Young WA, Buttery M, Nyam K, Daddona PE. Macroflux microprojection array patch technology: A new and efficient approach for intracutaneous immunization. *Pharm. Res.*, **19**, 63-70 (2002).
59) Ito A, Chemical Engineering Department Tokyo Institute of Technology Web, <http://chemeng.in.coocan.jp/memb/m_mb4.html> August (2010).
60) Gregorio ED, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur. J. Immunol.*, **38**, 2068-2071 (2008).

61) Ito Y, Yamazaki T, Sugioka N, Takada K. Self-dissolving micropile array tips for percutaneous administration of insulin. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **21**, 835-841 (2010).
62) Birchall JC. Stratum corneum bypassed or removed. In Enhancement in Drug Delivery: Edited by Touitou E, Barry BW. CRC Press, 337-351 (2007).
63) Sparber F, Tripp CH, Hermann M, Romani N, Stoitzner P. Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: Possible targets for vaccination through the skin. *Immunobiology*, **215**, 770-779 (2010).
64) Rozis G, Silva S, Benlahrech A, Papagatsias T, Harris J, Gotch F, Dickson G, Patterson S. Langerhans cells are more efficiently tranduced expressing either group C or B fibre protein: Implications for mucosal vaccines. *Eur. J. Immunol.*, **35**, 2617-2626 (2005).
65) Flacher V, Tripp CH, Stoitzner P, Haid B, Ebner S, Frari BD, Koch F, Park CG, Steinman RM, Idoyaga J, Romani N. Epidermal Langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type Lectin-targeting antibodies deposited in the dermis. *J. Investig. Dermatol.*, **130**, 755-762 (2010).
66) Pearton M, Kang S, Song J, Kim Y, Quan F, Anstey A, Ivory M, Prausnitz MR, Compans RW, Birchall JC. Influenza virus-like particles coated onto micronedles can elicit stimulatory effects on Langerhans cells in human skin. *Vaccine*, **28**, 6104-6113 (2010).
67) Sparber F, Tripp CH, Hermann M, Romani N, Stoitzner P. Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: Possible targets for vaccination through the skin. *Immunobiology*, **215**, 770-779 (2010).
68) Schneider LP, Schoonderwoerd AJ, Moutaftsi M, Howard RF, Reed SG, Jong EC, Teunissen MBM. Intradermally administered TLR4 agonist GLA-SE enhances the capacity of human skin DCs to activate T cells and promotes emigration of Langerhans cells. *Vaccine*, **30**, 4216-4224 (2012).
69) O'Haran DT, Rappuoli R. Novel approaches to pediatric vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 29-51 (2006).
70) Furmanov K, Elnekave M, Lehmann D, Clausen BE, Kotton DN, Hovav H. The role of skin-derived dendric cells in $CD8^+$ T cell priming following immunization with lentivectors. *J. Immunol.*, **184**, 4889-4897 (2010).
71) Romani N, Thurnher M, Idoyaga J, Steinman RM, Flacher V. Targeting of antigens to skin dendritic cells: possibilities to enhance vaccine efficacy. *Immunol. Cell Biol.*, **88**, 424-430 (2010).

72) Gerlinck LBS, Bemt BJF, Marijt WAF, Biji AF, Visser LG, Cats HA, Rimmelzwaan GF, Kroon FP. Intradermal influenza vaccination in immunocompromized patients is immunogenic and feasible. *Vaccine*, **27**, 2469-2474 (2009).
73) Monteiro-Riviere AN, Bristol GD, Manning OT, Roger AR, Riviere EJ. Interspecies and interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser Doppler blood flow measurements at five custaneous sites in nine species. *J. Invest. Dermatol*., **95**, 582-586 (1990).
74) Bhattacharyya TK. Skin aging in animal models: Histological perspective. Textbook of Aging Skin, Springer Press: Edited by Farage MA, Miller KW, Maibach HI. Verliag Berlin Heidelberg, 5-12 (2010).
75) Stoitzner P, Green LK, Jung JY, Price KM, Tripp CH, Malissen B, Kissenpfennig A, Hermans IF, Ronchese F. Tumor immunotherapy by epicutaneous immunization requires langerhans cells. *J. Immunol*., **180**, 1991-1998 (2008).
76) Kahlon R, Hu Y, Orteu CH, Kifayet A, Trudeau JD, Tan R, Dutz JP. Optimization of epicutaneous immunization for the induction of CTL. *Vaccine*, **21**, 2890-2899 (2003).
77) Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, Seo N, Furukawa F, Takigawa M. Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. *J. Invest. Dermatol*., **109**, 175-182 (1997).
78) 長井良憲. アジュバントと自然免疫制御 新たな展開と疾患の制御, *ファルマシア*, **46**, 61-65 (2010).
79) Ishii KJ, Uematsu S, Akira S. 'Toll' gates for future immunotherapy. *Curr. Pharm. Des*., **12**, 4135-4142 (2006).
80) Shaw CA, Petrik MS. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 1555-1562 (2009).
81) Petrik MS, Wong MC, Tabata RC, Garry RF, Shaw CA. Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Med.*, **9**, 83-100 (2007).
82) 厚生労働省, サーバリックス重篤症例一覧 <http://www.mhlw.go.jp/file.jsp?id=146124&name=2r9852000002x65r_2.pdf>
83) Tsumiyama K, Miyazaki Y, Shiozawa S. Self-Organized Criticality Theory of Autoimmunity. *PLoS ONE*, **4**, e8382 (2009).
84) Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, Takigawa M. Photohapten TCSA painting plus UVA irradiation of murine skin augments the expression of MHC class II molecules and CD86 on Langerhans cells. *J. Derm. Sci.*, **19**, 202-207 (1999).

85) Shimada S, Caughman SW, Sharrow SO, Stephany D, Katz SI. Enhanced antigen-presenting capacity of cultured Langerhans cells is associated with markedly increased expression of Ia antigen. *J. Immunol.*, **139**, 2551-2555 (1987).
86) Pure E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD, Ruberti G, Fathman G, Steinman RM. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J. Exp. Med.*, **172**, 1459-1469 (1990).
87) Lee MG, Borkowski TA, Udey MC. Regulation of expression of B7 by murine Langerhans cells: a direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 883-886 (1993).
88) Seo N, Tokura Y, Nishijima T, Hashizume H, Furukawa F, Takigawa M. Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 371-376 (2000).
89) Ito T, Seo N, Yagita H, Tsujimura K, Takigawa M, Tokura Y. Alterations of immune functions in barrier disrupted skin by UVB irradiation. *J. Derm. Sci.*, **33**, 151-149 (2003).
90) Li X, Qin J. Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J. Mol. Med.*, **83**, 258-266 (2005).
91) Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist. *Intern. Rev. Immunol.*, **16**, 457-499 (1998).