

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05217

研究課題名(和文) タンニン酸-PEG複合体の形状・サイズ制御法の確立とワクチンへの応用

研究課題名(英文) Shape and size control of tannic acid-PEG complex and application to vaccine

研究代表者

新倉 謙一 (Niikura, Kenichi)

日本工業大学・基幹工学部・教授

研究者番号：40360896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：加熱したアガロース水溶液と室温でのタンニン酸水溶液を混合することでサブミクロン粒子が容易に得られることがわかった。タンニン酸を過剰に使うことで、アガロースのゲル形成を阻害するだけでなく複合体の分散剤として作用し、良好な分散性を与えた。複合体は、2段階の熱応答を示し、50°Cまで加熱することで複合体からタンニン酸が放出された。タンニン酸は、それ自身の薬剤機能だけでなく、さまざまな分子との親和性が高いため、薬剤を保持することも可能である。したがって、放出機能を有する粒子として(例えば、薬物送達担体として)天然アガロースを利用する新しい用途につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行時はコロナ禍と重なっており、ワクチンの重要性が再認識された時期である。本研究は将来的にワクチンの効果を高めるための生体適合性の高い粒子の作製を目指した。この粒子は抗原や核酸を運搬し、免疫細胞に届けることを目的としている。ワクチン運搬時でもできる限り冷蔵から室温において保存できることが望ましく、アガロースとタンニン酸からなる粒子のもつ安定した水中での分散性と生体適合性の両立はそれらの課題解決につながる可能性がある。またアガロースの粒子化はワクチンに限らず、広く多糖の生体材料としての応用範囲を広げるものである。

研究成果の概要(英文)：We found that agarose-based submicron particles were obtained easily by mixing TA and heated-agarose. When a large excess of TA to agarose was used for complex formation, a stable Aga-TA complex was obtained, indicating that TA acts as an inhibitor of agarose gel formation as well as a dispersant of Aga-TA complexes to give good dispersibility. Aga-TA complexes showed a two-step thermal response, with TA released from the complex during the first transition by heating to 50°C. TA provides not only its own drug functionality, but also the ability to retain various drugs for delivery in particles due to its high affinity to various molecules. Thus, our findings are expected to lead to new applications that utilize natural agarose as particles (e.g., as drug delivery carriers) having a release function.

研究分野：生体機能材料

キーワード：サブミクロン粒子 アガロース

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ワクチンの効果を高めるためにナノ粒子(数十~数百 nm) に抗原を固定化する方法が注目されている。ナノ粒子をワクチンとして利用する際に、その形状やサイズの重要性が見いだされてきた。しかし、形状やサイズが制御しやすい金属やシリカなどの無機粒子を使った報告がほとんどで、生体適合性の高い有機分子を使つての効果の検証・応用には至っていない。これは有機分子の場合、サイズや形状を制御することが難しいからである。本研究では生体適合性の高い有機分子であるタンニン酸とポリエチレングリコールの複合体の形状・サイズ制御法を確立し、ナノ粒子のワクチン応用を大きく広げることを目指した。この研究をスタートさせる当初はコロナ禍前であったが、コロナ禍に入りワクチンの重要性がますます大きくなった。

2. 研究の目的

ワクチン効果を補助できる粒子材料である「生体適合性の高い有機分子」として当初考えていたポリエチレングリコール(PEG) の他に広く探索してみた。PEG はすでにワクチンで実用化されるなど安全性の高い高分子ではあるが、それでも抗体ができてしまう懸念はある。そこで新たに多糖を中心にタンニン酸との複合体形成の可能性を探索し、粒径を制御する方法を見出すことを目的とした。PEG 分子はタンニン酸と複合体を形成することが知られているが、粒子形成を目的とした多糖とタンニン酸の複合体についてはほとんど報告例が見つけられない。そこでいくつか市販の多糖とタンニン酸を混合し、どの多糖が相互作用しうのかを溶液の白濁度で判断した。その結果、アガロース溶液とタンニン酸溶液との混合で最も白濁したため、アガロースとタンニン酸との複合体による粒子形成を調べることにした。

アガロースは、食品でもある寒天に含まれる生体適合性が高い中性多糖であり、ゲル化するため電気泳動などにも使われる。アガロースを用いた生体材料なども報告されているが^[1,2]、ゲル化しやすいためフィルムや膜などの応用が中心で、化学修飾なしのアガロース分子をサブミクロンオーダーで粒子形成させる一般的手法はまだ確立されていない。その課題に挑戦し、今までにない粒子の形成を目指した。

3. 研究の方法

タンニン酸 (TA と略)とアガロースの複合体形成のために以下の溶液 A と B を用意した。アガロースはタカラバイオ社製の Agarose L03「TAKARA」を用いた。タンニン酸は富士フィルム和光純薬製のものを用いた。

溶液 A: プラスチックチューブの中にタンニン酸を入れ、濃度 100 mg/mL となるようにリン酸緩衝液(10 mM, pH 7.4)を加え、ボルテックスにより溶解させた。

溶液 B: プラスチックチューブの中にアガロース 20 mg を入れ、ついで 1 mg/mL となるようにリン酸緩衝液(10 mM, pH 7.4)を加えた。プラスチックチューブを 95°C で 1 時間インキュベートし、ボルテックスミキサーを使い溶解させた。

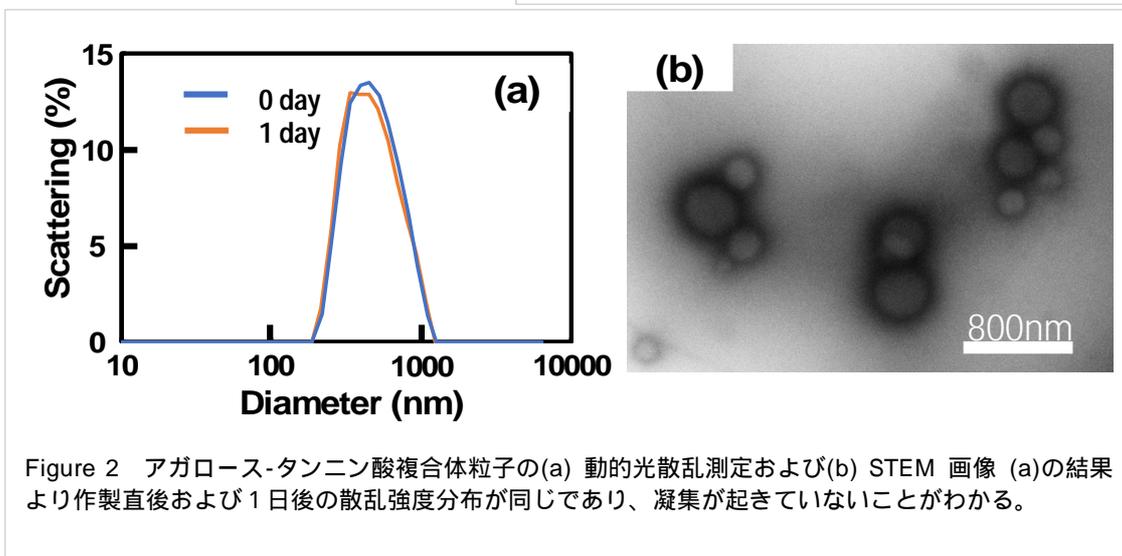
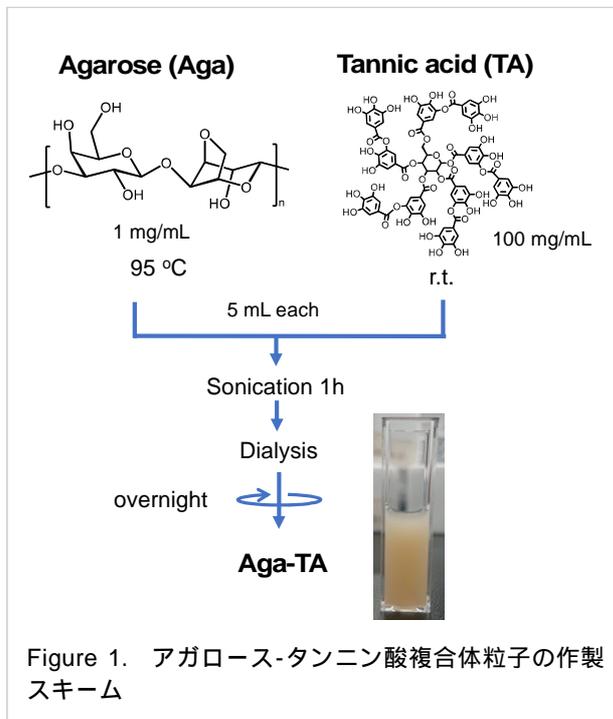
95 °C に温めた溶液 B (5 mL) に、室温の溶液 A (5 mL)を加えバス型超音波を 1 時間照射した。2 つ溶液を混合すると白濁が見られた。超音波を照射するのは複合体をよく分散させるためである。ここで重要なのは、アガロース溶液を加熱した状態でタンニン酸溶液と混合することである。室温まで戻って時間が経過すると、タンニン酸と混合しても白濁しない。質量ベースで、タンニン酸はアガロースの 100 倍も加えているため、透析(透析カセット Slide-A-Lyzer, 20000 MWCO, Thermo Fisher Scientific)により遊離のタンニン酸を除いた。ゲル濾過も試したが、タンニン酸とアガロースの複合体は溶出されず、透析が遊離タンニン酸の除去に有効であった。100 倍ものタンニン酸を加えているのは複合体が沈殿することなく安定に分散させるためである。低濃度のタンニン酸を添加しても白濁はするが、生じた白濁がすぐに沈殿してしまう。これはタンニン酸が高分子量のアガロースに十分に結合し、ゲル化を阻害するためには高濃度が必要であることを示している。透析によってどの程度のタンニン酸が除去できたかを確認するため、透析後のサンプルを凍結乾燥すると 320 mg (もともと 505 mg)であった。320 mg の中身は、5 mg のアガロース(アガロースは透析によって除去されないと仮定)と 315 mg のタンニン酸であり、この混合物をアガロース-タンニン酸複合体(Aga-TA と略)と呼ぶ。

4. 研究成果

(1) 複合体粒子の安定性と粒径

タンニン酸とアガロースからなる分散性の高い複合体の作製方法を図 1 にまとめた。ここで得られた Aga-TA の白濁溶液の動的光散乱による平均粒子径(大塚電子/キユムラント法にて解析)は 430 nm であった。ここで重要なのは白濁溶液ではあるが、目視できるような沈殿物は観

察されない、すなわち分散性の高い粒子であることである。この溶液を1日静置した後に動的光散乱測定を行っても散乱強度の分布はほぼ重なっており、凝集などが起きていないことがわかる(図2)。これは Aga-TA が pH 7.4 の緩衝液中で安定に分散していることを支持するものである。日本工業大学の走査透過電子顕微鏡 (STEM) を用いて Aga-TA の電子顕微鏡像を得た(図 2b)。興味深いことに 200-500nm 程度の粒径をもつ球状の物体が数多く観察された。この大きさは動的光散乱の結果とも一致している。これらのことより Aga-TA の複合体が水を多く含み、乾燥時に大きく大きさが変化してしまうような物体ではなく、密度の高いものと考えられる。タンニン酸をアガロース質量の 100 倍ではなく 20 倍にすると、粒子は凝集しやすいことも動的光散乱の結果からわかった。



(2) 複合体粒子形成に及ぼす pH の効果

次に凝集に及ぼす pH の効果(pH5 と pH7.4) について調べた。TA のヒドロキシ基でもっとも低い pKa は 8.5 程度であり^[3]、電離に伴う粒子の安定性に溶液 pH の影響が現れると考えた。アガロースは加熱後すぐの溶液を用いて、pH 5.0 および 7.4 で TA 濃度を上げながら、アガロース溶液の濁度を調べた(図 3)。pH 5 で濁り始める濃度は pH7.4 の約 5 分の 1 であった(pH5.0 で 0.1 mg/mL、pH7.4 で 0.5 mg/mL)。すなわち pH 5.0 の方がアガロースとタンニン酸が凝集しやすいことを意味する。ここで注意しなければならないのは「懸濁」イコール「結合した」ではなく、可視光を散乱するような大きさにまで複合体が凝集しやすいかどうかを示す指標である点である。ヒドロキシル基の脱プロトン化数は pH7.4 のほうが pH5 より(1 分子では数個レベルではあるが)多い。そのため pH7.4 で形成された粒子は負電荷の静電反発により高い分散性を有し、白濁するような粒子形成のためにより多くのタンニン酸が必要となる。すなわち pH 5 のほうが凝集し、大きくなりやすいと考えられる。pKa よりも高い pH での実験はタンニン酸の酸化が進んでしまうため、生体内 pH である pH7.4 を選択した。

(3) NMR による複合体相互作用解析

複合体がどのような相互作用によって形成促進されるのかを調べるに ¹H-NMR による解析を行なった。アガロースとタンニン酸は水中では白濁してしまうため、重ジメチルスルホキシド(DMSO-d₆)中で調べた。DMSO はアガロースの良溶媒であることが知られており、アガロースは DMSO にゲル化せず溶解する。タンニン酸も DMSO によく溶解するため、DMSO 中でアガロースとタンニン酸を混合しても白濁などの現象は見られない。しかしながら、混合後も溶液

のままであることは相互作用の NMR 解析には適している。興味深いことに TA のヒドロキシ基の 2 つのピークの 1 つは、アガロース濃度の増加に伴い、9.39 から 9.29 ppm に大きくシフトした。タンニン酸の他のピークにシフトは見られなかった。これよりヒドロキシ基の水素結合により、アガロースとタンニン酸が相互作用していることが支持された。今までも PEG とタンニン酸の間で水素結合による DMSO 中でのピークシフトは報告されている。^[4] 我々の結果は DMSO 中での結果ではあるが、良溶媒である DMSO でも相互作用していることを考慮すると、ゲル化が進む(すなわち DMSO よりも溶媒が外れやすい)水中でも同様な相互作用が予想される。

(4) 複合体の温度応答性

アガロースはゾルゲル転移を示すことから Aga-TA 複合体の熱安定性について調べた。加熱によって粒子が壊れるようであれば、薬剤放出機能を持たせることも可能になるであろう。タンニン酸の吸収がない 500 nm の吸光度を懸濁度の指標とし、温度依存性を調べた(図 4)。懸濁度の温度依存性は 2 段階のステップからなることがわかった。室温から 50°C にかけてのゆっくりとした懸濁度減少はタンニン酸がアガロースから脱離するステップであり、70°C を超えてから始まる 2 段階目の懸濁度減少はアガロース鎖同士の解消(ゲルからゾルになる)によるものであると考えている。最初のステップであるが、タンニン酸が脱離したかどうかは、各温度でスピンドルし、脱離したタンニン酸が増えたことが証明できれば良い。遊離した TA 量は 277 nm の吸光度から求めた。25°C では添加した全タンニン酸量の 56% が濾過された。これは室温において、たとえ透析後のサンプルでも約半分のタンニン酸はアガロースに結合しているが、残りはフリーな状態として溶液に溶解していることを示している。50°C まで加熱すると濾過されるタンニン酸量が増加し、アガロースから遊離していることがわかった。これらの結果より、最初のステップはアガロースの脱離だと判断した。2つ目の小さな懸濁度の減少は、アガロースの溶解過程と考えた。グラフには 3% と 0.5% のアガロースゲルの溶解曲線を示したが、アガロース濃度が低ければ溶解が始まる温度も低くなっている。今回の Aga-TA の場合、アガロース濃度は 0.05% と非常に低い。この低濃度にもかかわらず 70°C 以上で溶解したのは、タンニン酸によって集合化したアガロースの一部がサブミクロンオーダーでゲル化したのではないかと考えた。これらの結果をまとめると図 5 のようなイラストレーションを書くことができる。アガロースは加熱するとお互いの鎖の相互作用が解けて水中に溶解するが、この溶解したランダムな鎖とタンニン酸が相互作用しやすいことが予想される。事実溶解している DMSO 中でも相互作用が見られた。

(5) 粒径制御・DNA 固定化の試み

応用として得られた粒子に蛍光標識した短鎖 DNA が結合するかどうかを確かめたが、残念ながら有意な結合は見られなかった(どのようにして生体分子を固定化するのは課題として残った)。上記研究では Agarose L03 「TAKARA」を用いたが、さらに分子量が小さいアガロースを利用することでタンニン酸の添

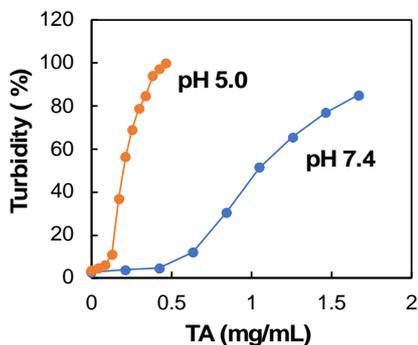


Figure 3. アガロース溶液にタンニン酸を添加した時の白濁度変化。白濁度は 500 nm の吸光度で pH 5.0 の最大値を 100% とした。

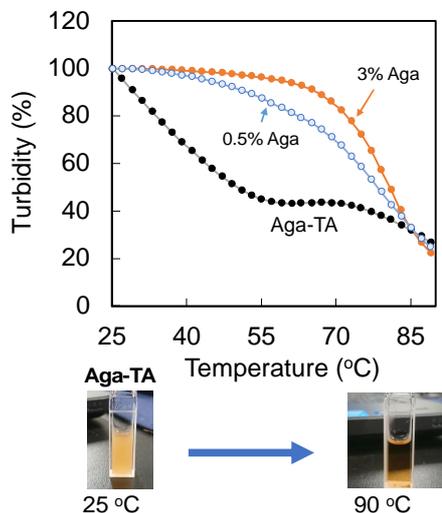


Figure 4. Aga-TA 溶液の加熱時における吸光度変化。500 nm の変化を懸濁度としてプロットした。3% と 0.5% Aga はそれぞれの濃度のゲルを加熱した際の懸濁度変化を示している。写真は Aga-TA の加熱前後のものである。

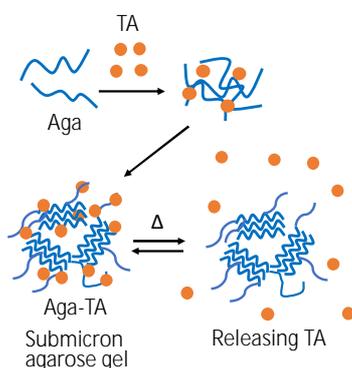


Figure 5. Aga-TA 複合体の模式図。タンニン酸はランダムな領域に結合し、ゲル化を阻害していると考えられる。

「TAKARA」を用いたが、さらに分子量が小さいアガロースを利用することでタンニン酸の添

加量を減らしても分散性の高い粒子が得られることがわかった。またアガロースとタンニン酸の量比を変化させると、粒径も 200~500 nm の間で制御できることもわかってきた。

(6) まとめ

加熱したアガロース溶液とタンニン酸を混合することでサブミクロン粒子が容易に得られることがわかった。複合体形成に質量ベースでアガロースの 100 倍量の TA を使用した場合に安定した Aga-TA 複合体が得られた(透析後は 63 倍量になるが安定性は維持された)。TA がアガロースゲル形成の阻害剤および Aga-TA 複合体の分散剤として作用し、良好な分散性を示した。Aga-TA 複合体は、2 段階の熱応答を示し、50°C に加熱することで複合体から TA が放出された。タンニン酸は、独自の薬剤機能だけでなく、さまざまな分子との親和性が高いため、粒子で送達するために薬剤を保持することも可能である。したがって、放出機能を有する粒子として(例えば、薬物送達担体として)天然アガロースを利用する新しい用途につながることを期待される。

謝辞 NMR 解析では芝浦工業大学材料工学科の幡野先生に大変お世話になりました。感謝申し上げます。

References

- [1] P. Zarrintaj, S. Manouchehri, Z. Ahmadi, M. R. Saeb, A. M. Urbanska, D. L. Kaplan, M. Mozafari, *Carbohydr. Polym.* **2018**, 187, 66.
- [2] M. K. Yazdi, A. Taghizadeh, M. Taghizadeh, F. J. Stadler, M. Farokhi, F. Mottaghitlab, P. Zarrintaj, J. D. Ramsey, F. Seidi, M. R. Saeb, M. Mozafari, *J. Control. Release* **2020**, 326, 523.
- [3] I. Erel-Unal, S. A. Sukhishvili, *Macromolecules* **2008**, 41, 3962.
- [4] M. Shin, K. Kim, W. Shim, J. W. Yang, H. Lee, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, 2, 687.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 浅野 波輝, 新倉 謙一
2. 発表標題 アガロースのサブミクロン粒子化と熱応答性
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Namiki Asano, Kenichi Niikura
2. 発表標題 Particle Formation of Polysaccharides Complexed with Polyphenols and their Thermal Responses
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Namiki Asano, Kenichi Niikura
2. 発表標題 Complex Formation of Polyphenol Compounds with Polysaccharides
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野波輝・新倉謙一
2. 発表標題 多糖とタンニン酸で作る生体適合性の高いナノ粒子の開発
3. 学会等名 第31回 高分子学会埼玉地区懇話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤塚瑠奈・新倉謙一
2. 発表標題 タンニン酸-PEG積層膜に対するタンパク質の吸着挙動
3. 学会等名 第31回 高分子学会埼玉地区懇話会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kenichi Niikura (Editor: Tuan Vo-Dinh)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 263 (223-234ページ担当執筆)
3. 書名 Nanoparticle-Mediated Immunotherapy (Bioanalysis 12) /担当Chapterタイトル: Development of Nanoparticles as a Vaccine Platform	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------