

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550200

研究課題名（和文）核酸とエンドトキシンの分離のためのシクロデキストリン架橋球状粒子の調製と応用

研究課題名（英文） $\gamma$ -Cyclodextrin-polyurethane copolymer adsorbent for selective removal of endotoxin from DNA solution

研究代表者

坂田 真砂代（SAKATA MASAYO）

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：60187391

研究成果の概要（和文）：本研究では、 $\gamma$ -cyclodextrin(CyD)をクロロメチルオキシランおよびウレタンで架橋したポリマー粒子を合成し、同架橋粒子のCyD空孔内疎水部とLPSのアルキル鎖との疎水性吸着作用を利用して、新規なLPS吸着剤の開発を試みた。結果として、ウレタン架橋型 $\gamma$ -CyD粒子は、pH 4-6、イオン強度  $\mu=0.05-0.2$  の水溶液環境下で、DNAを吸着することなく、LPSのみに高い選択性を示した。

研究成果の概要（英文）：The copolymer particles for removal of lipopolysaccharide (LPS) were prepared by suspension copolymerization of  $\gamma$ -cyclodextrin (CyD) and 1,6-hexamethylenediisocyanate. The copolymer (CyD content: 14-20 mol%) could selectively removed LPS from a DNA solution (50  $\mu\text{g/ml}$ ) containing LPS (15 EU/ml) at pH 6 and ionic strength ( $\mu$ ) of 0.05-0.2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学、高分子・繊維材料

キーワード：高分子微粒子・エンドトキシン・LPS吸着剤・DNA分離・包接作用・選択吸着

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) エンドトキシンとは

エンドトキシンは、大腸菌やサルモネラ菌の細胞壁成分の一つであり、その化学構造はlipopolysaccharide (LPS)である(図1)。LPSは水道水に普遍的に混在しており、注射用タンパク質材料中にも微量混在している。LPSを微量でも含む医薬を体内に注射されると発熱やショック反応を起こすため、日本薬局方では注射用液からLPSを10ピコグラム/mL以下に除去することが規定されている。

## (2) DNA ワクチンについて

最近、ワクチン開発分野において、遺伝子を組み替えられたプラスミドDNAが治療薬として応用されるようになり、DNAワクチンバルクからのLPSの除去が切望されるようになってきた。

## (3) LPS除去剤の開発例について

美濃部ら (Journal of Chromatography, Vol. 248, 1982, pp. 401-408) はヒスチジン固定

化アガロース粒子が高いLPS吸着能を有することを報告している。しかしながら同吸着剤の粒子表面の $pK_a$ が6.2と低いため、生体環境に近い水溶液(中性, 塩濃度0.15M)中では、LPS吸着能が著しく低下した。この分野において、すでに、申請者らは、高分子粒子の表面にカチオン性リガンドを修飾し、さらに粒子基体の細孔サイズを制御することにより、同粒子がLPSを含むタンパク質水溶液から、生体環境に近い条件で、効率良くLPSのみを選択吸着できることを見出し、商品化にも成功している(American Biotechnology Laboratory, Vol. 20, 2002, pp. 36-38)。しかしながら、カチオン性リガンドをLPS吸着剤として用いる限り、LPSと同様にリン酸残基を構造にもつDNAも同時に吸着剤に吸着され、DNAとLPSの混合液からのLPSの選択分離は困難である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究においては、従来のカチオン性リガンドを用いることなく、シクロデキストリン(CyD)の架橋体を吸着剤として設計し、吸着剤表面に生じるCyD由来の空孔(キャビティ)中にLPSを包接により選択吸着させることを試みる(図1)。

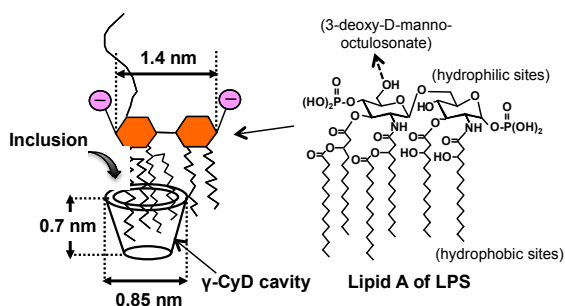


図1. CyDキャビティへのLPS取り込み予想図

(2) CyDには、 $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ タイプのものがあり、各々キャビティサイズが0.45、0.7および0.85 nmと異なる。LPSの物理および化学構造を考慮して、LPSの包接に最適なCyDキャビティサイズを決定する。さらに、CyDに適した架橋剤の種類や架橋率を検討し、水に不要なCyDポリマーの構築を試みる。

(3) CyDポリマーの吸着剤として求められる条件としては、①LPSに対する高い吸着能を有すること、②プラスミドDNA、通常の断片型棒状DNA、タンパク質やその他のLPS以外の生体関連物質に対する相互作用

をもたないこと、③広範囲のpHやイオン強度の条件下で使用できること、④LPSフリーにするための洗浄に用いるアルカリ溶液(0.2 M水酸化ナトリウム水溶液)に耐性を有すること、などの特性を有するものを設計・開発する。

(4) エンドトキシン(LPS)が微量混在するプラスミドDNAおよび断片型DNA水溶液から、DNAを吸着することなく、LPSのみを選択吸着除去することが可能なシクロデキストリン架橋粒子の調製とその応用を試みる。最終的には、生体環境に近いpHおよびイオン強度の条件下で、試料溶液のLPS濃度を10pg/mL(0.1 EU/mL)以下まで吸着除去可能な吸着剤の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) クロロメチルオキシラン(CMO)で架橋したCyDポリマー粒子の合成法: 50°Cの6.0 Mケイ酸ナトリウム水溶液に水酸化ナトリウムとCyDを溶解させ、油浴中で1時間攪拌した後、架橋剤としてCMOを添加し、65°Cで24時間攪拌することにより、CyD/CMO架橋粒子(図2)を得た。

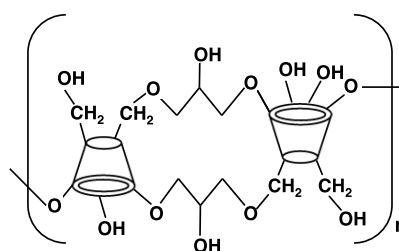


図2. CyD/CMO copolymerの構造

(2) 1,6-hexamethylenediisocyanate(HMDI)で架橋したCyDポリマー粒子の合成法:  $\gamma$ -CyDと架橋剤(HMDI)をDMF中で、70°Cで24時間攪拌することにより調製された(図3)。

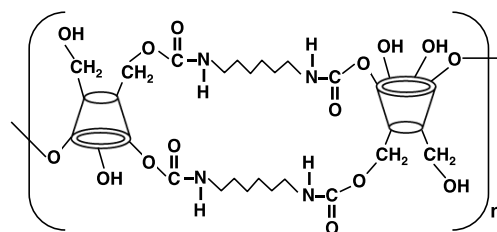


図3. CyD/HMDI copolymerの構造

(3) 得られた架橋粒子の物性評価法：顕微鏡観察，元素分析及び IR 測定により評価した。種々の CyD ポリマー粒子と種々の市販吸着剤との LPS 選択吸着能の比較は、主にバッチ法により行なった。試料中の LPS 濃度はリムルステスト(比濁時間法)により、DNA 濃度は UV 法(260 nm)により定量した。タンパク質濃度は、BCA キットを用いた UV 法により定量した。

#### 4. 研究成果

(1) CyD 架橋粒子の観察：CMO で架橋した  $\gamma$ -CyD 球状粒子の光学顕微鏡写真を図 4 に示す。得られた種々の粒子のうち 20~105  $\mu\text{m}$  の粒子を吸着剤として用いた。

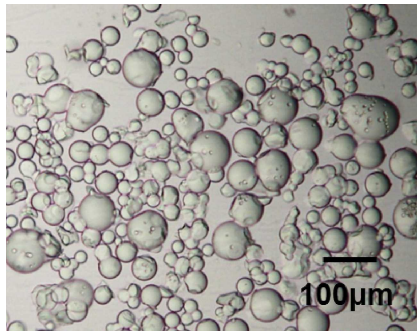


図 4. 得られた  $\gamma$ -CyD/CMO 架橋粒子

(2) CyD 架橋粒子の LPS 吸着活性：吸着剤の官能基として  $\gamma$ -CyD を用いることにより、キャビティサイズを LPS 包摂に適したサイズ(0.85 nm)に絞り込み、かつ、最適な疎水性をもつウレタン(HMDI)を架橋剤として用いた。その結果、吸着剤の  $\gamma$ -CyD 含有率を 7 から 20%まで増大させると、LPS 吸着容量は 212 から 324  $\mu\text{g}/\text{ml-wet particles}$  に増大し、LPS 解離定数は  $1.0 \times 10^{-9}$  から  $4.8 \times 10^{-11}$  M に著しく低下させることができた。

(3) LPS 選択性能の評価：図 5 に、 $\gamma$ -CyD 架橋体と種々の吸着剤の LPS に対する選択性能を比較した結果を示す。市販カチオン性吸着剤のポリリジン固定化 Cellufine (図 5a) と疎水性吸着剤の活性炭(図 5b)はともに、幅広いイオン強度域 ( $\mu = 0.05 \sim 0.8$ ) で高い LPS 吸着率 (90~99%) を示したが、同時に DNA の吸着率も高い値 (60~98%) を示した。一方、本研究で開発した  $\gamma$ -CyD/CMO (7/93) 粒子の LPS 吸着能 (図 5c) はこれら 2 つの吸着剤には及ばないが、DNA を吸着することなく、LPS を選択吸着することができた (LPS 吸着率 78~90%)。さらに、 $\gamma$ -CyD/HMDI (20/80) 粒子を用いると、幅広いイオン強度域で、DNA を吸着することなく、高い LPS 吸着率 (95~99%) を示した。得られた結果より、pH 6、

イオン強度  $\mu = 0.05 \sim 0.2$  の条件で、 $\gamma$ -CyD 架橋粒子は、DNA ワクチン原材料からの LPS 除去剤として期待できることがわかった。

同粒子の高い LPS 吸着除去能は、吸着剤をウレタン架橋することにより、 $\gamma$ -CyD 含有率を増大させることができたこと、吸着剤表面の  $\gamma$ -CyD キャビティが DNA に対してサイズ排除効果を達成できたことに起因する(図 6)。

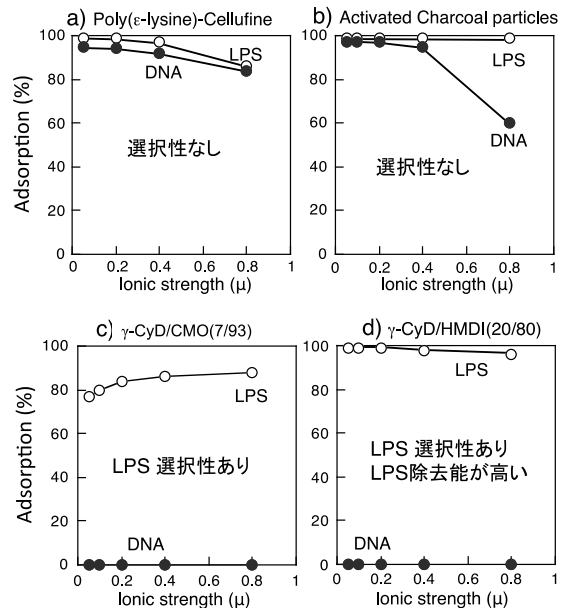


図 5. LPS 選択除去能に及ぼすイオン強度の影響  
吸着剤: 0.1 wet-g, 試料 2 mL (DNA:  $M_w$   $3 \times 10^5$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS: 15 EU/mL, pH 6.0,  $\mu = 0.05 \sim 0.8$ )

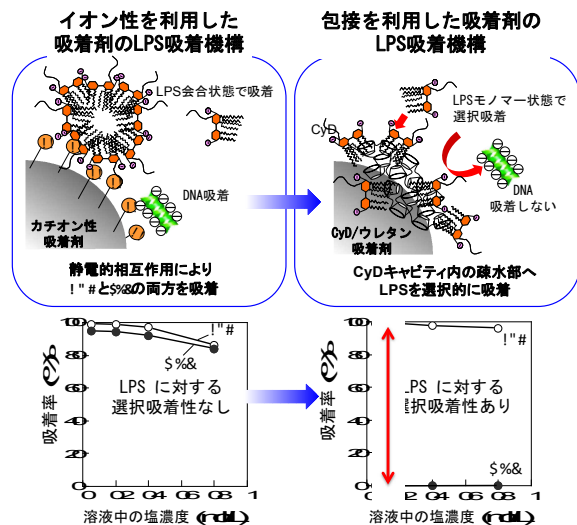


図 6. イオン性吸着剤とキャビティを利用する吸着剤との LPS 選択吸着機構の比較

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① M. Sakata, F. Kurogi, K. Kai, M. Kunitake, Selective Removal of Gluco-amylose from unpasteurized sake materials, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 査読有, 印刷中, DOI:10.1080/10826076.2012.692145.
- ② M. Sakata, A. Funatsu, S. Sonoda, T. Ogata, T. Taniguchi, Y. Matsumoto, Immobilization of trypsin on graphene oxide nanosheets for increased proteolytic stability, Chemistry letters, 査読有, Vol. 41, No. 12, 2012, pp. 1625-1627.
- ③ M. Koinuma, C. Ogata, Y. Kamei, K. Hatakeyama, H. Tateishi, Y. Watanabe, T. Taniguchi, K. Gezuhara, S. Hayami, A. Funatsu, M. Sakata, Y. Kawahara, S. Kurihara, Y. Matsumoto, Photochemical engineering of graphene oxide nanosheets, Journal of Physical Chemistry C, 査読有, Vol.116, No.37, 2012, pp.19822-19827.
- ④ M. Sakata, K. Yoshimura, I. Sakamoto, M. Todokoro, M. Kunitake, Selective removal of endotoxin from a DNA solution by cross-linked cyclodextrin beads, Analytical Sciences, 査読有, Vol. 27, 2011, pp. 213-216.

[学会発表] (計16件)

- ① 坂田眞砂代、船津麻美、園田将平、松本泰道、酵素修飾ナノシートの調製とその酵素活性維持能の評価、日本化学会第93春季年会、2013.3.23、立命館大学びわこくさつキャンパス(草津市滋賀県)
- ② M. Sakata, K. Uezono, K. Kimura, M. Todokoro,  $\gamma$ -Cyclodextrin-polyurethane copolymer adsorbent for selective removal of endotoxin from DNA solution, 3rd International Cellulose Conference, 2012.10.11, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & SPA Resort (Sapporo, Japan)
- ③ Y. Goto, E. Ikegami, Y. Tatenaka, M. Sakata, Design of cellulose beads grafted with cationic polymer for chromatographic separation of DNA from protein solution, 3rd International Cellulose Conference, 2012.10.11, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & SPA Resort (Sapporo, Japan)
- ④ 木村かさね、上園康史、戸所正美、坂田眞砂代、DNA溶液からのエンドトキシン選択除去のためのシクロデキストリン-ウレタン共重合粒子、第61回高分子討論会、2012.9.19、名古屋工業大学(名古屋市)
- ⑤ M. Sakata, Y. Goto, Y. Tatenaka, K. Ishikura, Chromatographic separation of DNA from protein solution by cellulose beads grafted with cationic polymer chains through ATRP, 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2012.6.19, Anaheim Marriott, (California, USA)
- ⑥ 上園康史、吉村佳奈、國武雅司、坂田眞砂代、シクロデキストリン架橋粒子によるDNA溶液からの内毒素のクロマト分離、第26回産学官技術交流会、2012.1.18、熊本県産業技術センター(熊本市)
- ⑦ K. Uezono, K. Yoshimura, M. Sakata, M. Kunitake, Chromatographic removal of endotoxin from DNA solution by cross-linked cyclodextrin beads, The 12<sup>th</sup> Pacific Polymer Conference, 2011.11.14, The Shilla Hotel (Jeju Island, Korea)
- ⑧ M. Sakata, K. Uezono, K. Yoshimura, M. Kunitake, Cross-linked cyclodextrin beads for chromatographic removal of endotoxin from DNA solution, The 3rd Asian Symposium on Advanced Materials, 2011.9.20, 九州大学(福岡)
- ⑨ 上園康史、吉村佳奈、坂田眞砂代、國武雅司、 $\gamma$ -シクロデキストリン架橋粒子を用いたDNA溶液からのエンドトキシンの除去、第48回化学関連支部合同九州大会、2011.7.9、北九州国際会議場(北九州市)
- ⑩ 五島裕介、立中佑希、坂田眞砂代、國武雅司、DNAクロマト分離に及ぼすアミノ化セルロース粒子のリガンド密度とポアサイズの影響、第48回化学関連支部合同九州大会、2011.7.9、北九州国際会議場(北九州市)
- ⑪ M. Sakata, K. Yoshimura, K. Uezono, M. Kunitake, Removal of endotoxin from DNA solution by cyclodextrin polymer beads, The 2nd FAPS Polymer Congress, 2011.5.10, China National Convention Center (Beijing, China)
- ⑫ M. Sakata, Y. Tatenaka, Md. Ashaduzzaman, K. Ishikura, M. Kunitake, Design of cellulose beads grafted with cationic polymer for chromatographic separation of DNA from protein solution, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010.12.16, Convention

- Center (Honolulu, Hawaii, U.S.A)
- ⑬ 吉村佳奈, 坂本逸美, 上園康史, 坂田眞砂代, 國武雅司, LPS 選択吸着除去のためのシクロデキストリン架橋粒子の設計とその応用、2010年日本化学会西日本大会、2010.11.6、熊本大学(熊本市)
- ⑭ 吉村佳奈, 坂本逸美, 坂田眞砂代, DNA水溶液からのLPS除去のためのシクロデキストリン架橋粒子の調製, 第59回高分子学会年次大会, 2010.5.26-28 (パシフィコ横浜, 横浜市)
- ⑮ Md. Ashaduzzaman, Y. Tatenaka, K. Ishikura, M. Sakata, M. Kunitake, Chromatographic separation of DNA from protein solution by cellulose beads grafted with cationic polymer chains through ATRP, 10<sup>th</sup>International Conference on Fundamentals of Adsorption, 2010.5.25, Awaji Yumebutai International Conference Center (Awaji, Japan)
- ⑯ M. Sakata, T. Ogata, M. Todokoro, M. Kunitake, Novel endotoxin assay by adsorption method with polycation-immobilized cellulose beads and limulus amoebocyte lysate, 10<sup>th</sup>International Conference on Fundamentals of Adsorption, 2010.5.24, Awaji Yumebutai International Conference Center (Awaji, Japan)

〔図書〕(計1件)

- ① Masayo Sakata, Chuichi Hirayama, Encyclopedia of Chromatography (3rd Edition), Biopolymers: Separations. Cazes (EDT), Marcel Dekker Inc., Vol.1, 2010, pp. 268-273.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計1件)
- ①名称: エンドトキシン吸着材  
発明者: 坂田眞砂代, 戸所 正美  
権利者: 熊本大学、JNC株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-123281  
出願年月日: 平成 24 年 5 月 30 日  
国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

- ①名称: エンドトキシン吸着体、及びそれを用いたエンドトキシンの除去方法  
発明者: 戸所正美、平山忠一、國武雅司、坂田眞砂代  
権利者: チッソ株式会社

種類: 特許  
番号: 特許 2012-4996791  
年月日: 平成 24 年 5 月 18 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

- ホームページ等
- ①www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/. . . file/release121019-2.pdf
- ②http://www.spsj.or.jp/koho/21PMF/21PMF\_4.pdf
- ③DNA ワクチンの製造時、有害物質除く吸着剤、日本経済新聞、2012.10.25, 35 面
- ④ワクチンから有毒物質除去、熊本日日新聞、2012.10.31, 32 面

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 眞砂代 (SAKATA MASAYO)  
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号: 60187391

(2) 連携研究者

佐々木 満 (SASAKI MITSURU)  
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号: 40363519