

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02560

研究課題名（和文）ナノ粒子を用いた細胞内反応の詳細な解析と生命活動の制御原理の理解

研究課題名（英文）Intercellular reaction analysis using nanoparticles

研究代表者

加藤 大 (Kato, Masaru)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30332943

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：カートリッジや高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いた機能性物質内包ナノ粒子の優れた精製法を開発した。HPLC用カラムを利用した手法では、ナノ粒子の表面電位に基づいて識別が行われ、ゼータ電位の大きさに基づいて粒子が分離された。固相抽出カートリッジを利用した手法では、短時間での精製が可能になった。本手法を用いることで、均一なナノ粒子の入手が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発したナノ粒子の分離精製法は、簡便に均一なナノ粒子の入手が可能になった。また分析法は、ナノ粒子の表面電位に基づいて分離が行われるので、効率的な精製が可能になった。均一なナノ粒子は、内包物質の放出をより正確に制御することが可能であり、安全なナノ粒子の利用に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed an excellent purification method for functional nanoparticles using cartridges or HPLC. In the HPLC method, discrimination was based on the surface potential of the nanoparticles and particles were separated based on the magnitude of the zeta potential. A technique using a solid-phase extraction cartridge enabled purification in a short period of time. By using these methods, it became possible to obtain uniform nanoparticles.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノ粒子 タンパク質 精製 固相抽出 HPLC

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

代表者は、機能性物質を内包したナノ粒子を開発した。本ナノ粒子は、光照射によって内包物質を放出することから、機能性物質を放出するタイミングや量の制御が可能である。そこで、本粒子を用いて、細胞内の機能を制御し、細胞内でのタンパク質等の機能の詳細な解析を目指した。

2. 研究の目的

優れた機能の有するナノ粒子が多数開発され、いろいろな分野で利用されるようになっていく。我々は、ゲルが形成する網目構造によって物質を内包し、外部刺激によって、内包物質を放出するナノ粒子を開発した。本ナノ粒子を用いて、目的の物質を標的部位に送達させ、外部刺激で放出し機能させることで、細胞等の機能制御が実現すると期待された。そこで、本研究では機能性物質内包ナノ粒子の精製と応用に関して研究を行った。特に本報告では、機能性ナノ粒子の精製法に関する検討結果を報告する。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子

代表的なナノ粒子として、Doxil と細胞外小胞を使用した。Doxil と細胞外小胞はどちらもリン脂質二重膜で構成されており、Doxil は表面にポリエチレングリコールが修飾され、細胞外小胞は脂質二重層に膜タンパク質が存在している。ナノトラッキング解析 (NTA) で測定したゼータ電位は、Doxil は -22 mV で、細胞外小胞は -40 mV であった。

(2) 固相抽出によるナノ粒子の精製とナノ粒子の検出

コンディショニングとして、まず固相抽出カートリッジに 5 M NaCl 溶液、水、および 10 mM Tris 緩衝液を通し洗浄および活性化を行った。次に、試料のナノ粒子溶液 (200 μ L) をカートリッジにのせ、9,100 g で遠心した。溶離液を収集し、非保持画分とした。次に、溶離液中の Tris 濃度を段階的に (10 mM から 50、100、200、500、および 1000 mM) 増加させ、溶出した画分をチューブで回収した。最後に、5M NaCl を溶離液として使用し、モノリス体に保持されていた全ての物質の溶出を試みた。次に、各溶出画分の吸光度または蛍光をプレートリーダーで測定した。Doxil 及びドキシソルピシンは、ドキシソルピシンの蛍光 (ex = 480 nm、em = 575 nm) を利用して検出した。

4. 研究成果

(1) 固相抽出カートリッジによる精製

NH₂ 修飾カートリッジ

図 1a に 2 種のナノ粒子と 3 種の夾雑物質の溶出挙動を示した。検討した pH 範囲で Doxil は、強い蛍光が 2 つの領域 (非保持画分と高濃度画分 (500 ~ 5,000 mM)) で観察された。そこで、各画分の粒子径分布と散乱強度を動的散乱法で測定した。高濃度画分 (500 mM Tris (pH 8)) では、平均粒子径 86 nm のナノ粒子と共に強い散乱光が検出された。一方、非保持画分では平均粒子径が 86 nm と 1 nm の信号が検出されたが、散乱光が検出されなかった。したがって、ドキシソルピシンが非保持画分に、Doxil が高濃度画分に溶出していると考えられる。pH6 と 7 では、Tris 濃度が 1,000 mM 未満の時、Doxil は溶出しなかった。一方、pH 8 と 9 では Tris 濃度が 500 mM 以上で溶出した。モノリス表面に存在する NH₂ 基の解離は、pH が高くなると抑制され、NH₂ のイオン交換作用が弱まり、Doxil の溶出が起こりやすくなったと考えられる。細胞外小胞は、pH6 では溶出せず、pH7 以上では溶離液に 1,000 mM Tris および 5 M NaCl を用いると溶出した。ドキシソルピシンとアルブミンは、どの pH 条件下でもほとんど保持されず、非保持画分に溶出した。

Poly-Lys 修飾カートリッジ

5 種の物質 (2 種のナノ粒子、3 種の夾雑物質) の溶出挙動を図 1b に示した。いずれの検討でも Doxil は、2 領域 (低濃度と高濃度画分) で蛍光が観察され、これは NH₂ 修飾カートリッジで得られた結果と一致していた。Doxil の溶出に必要な Tris 濃度は、NH₂ 修飾カートリッジよりも低く、poly-Lys 修飾カートリッジによる Doxil の保持は弱いと考えられる。細胞外小胞は、1000 mM Tris で溶出した。NH₂ 修飾カートリッジでは、pH6 で細胞外小胞が溶出しなかったが、poly-Lys 修飾モノリスでは 1000 mM Tris で溶出した。ドキシソルピシンとアルブミンは、検討した pH 条件ではほとんど保持されず、非保持画分に溶出した。ドキシソルピシンは、poly-Lys 修飾カー

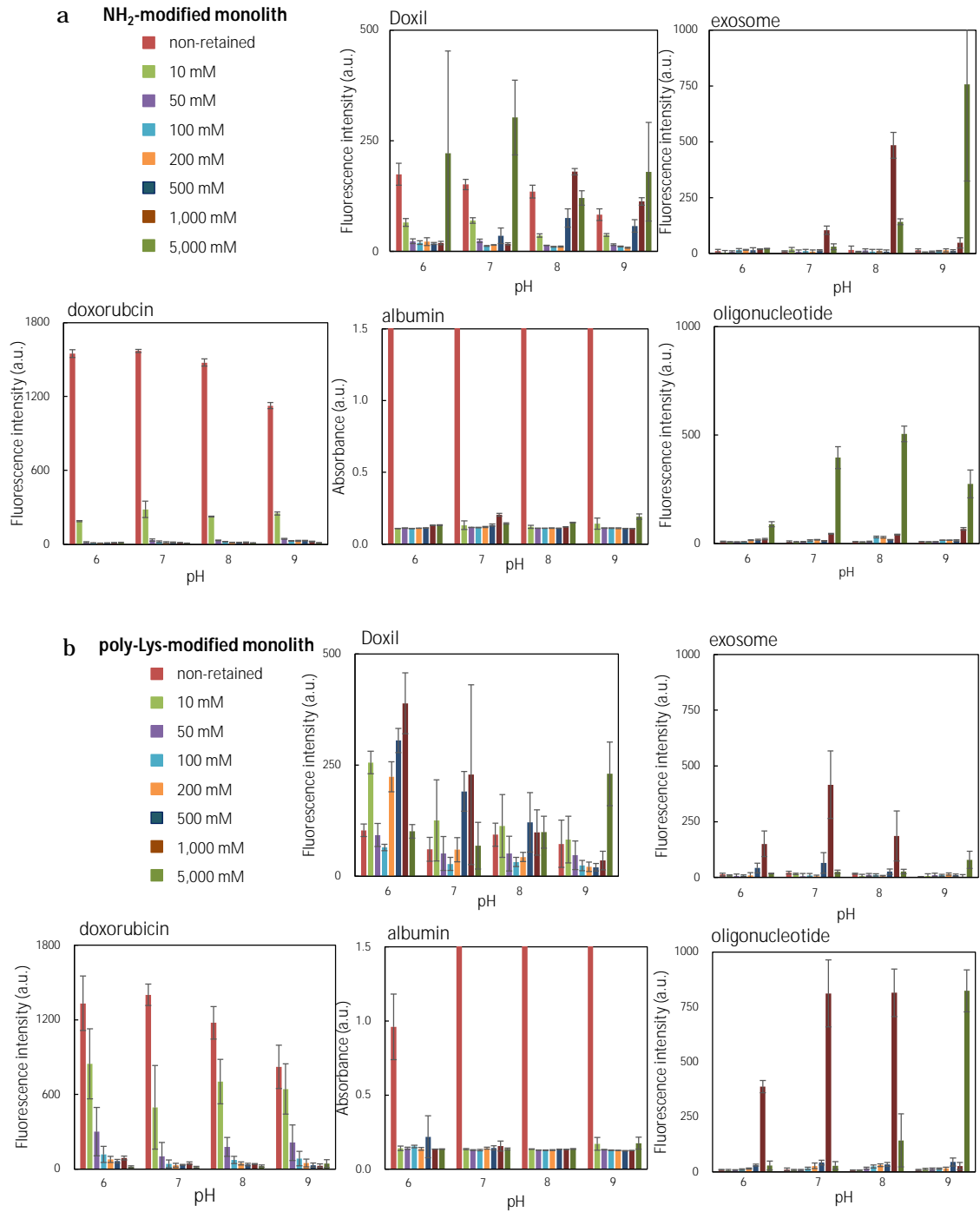


図 1 a,b 固相カートリッジでのナノ粒子と夾雑成分の溶出挙動

トリッジでは、10 および 50mM Tris 溶液でもわずかに溶出したため、NH₂ 修飾カートリッジよりも poly-Lys 修飾カートリッジに対して強い親和性を示した。一方、オリゴヌクレオチドは、pH6~8 の 1000 mM Tris 緩衝液および pH9 の 5 M Tris 緩衝液で溶出した。NH₂ 修飾カートリッジと比較すると、オリゴヌクレオチドの溶出に必要な塩濃度は低かった。このことから、pH6~8 の溶離液を使用することで、Doxil は遊離薬物（ドキソルピシン、オリゴヌクレオチド）および血液タンパク質（アルブミン）から分離および精製できると考えられる。一方で、細胞外小胞とオリゴヌクレオチドは脱離に必要な溶離液の Tris 濃度と pH に差異が見られなかったことから、2つの物質を poly-Lys 修飾カートリッジで分離精製するのは困難であると予想された。

上記の結果に基づいて、我々は、Doxil 溶液に含まれる漏出したドキソルピシンの除去を試みた。Doxil とドキソルピシンの混合液を poly-Lys 修飾カートリッジにのせ、分離精製を行った。図 2 に、混

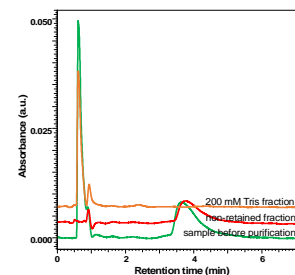


図 2 各画分の HPLC による分離

合試料溶液、非保持画分、および 200 mM Tris 緩衝液 (pH 6) で溶出した画分を HPLC で分析した結果を示した。混合試料溶液では、0.7 分に Doxil が、3.6 分にドキシソルピシンが検出された。一方、非保持画分ではドキシソルピシンのピークのみが、200mM Tris 画分では Doxil のみが検出された。したがって、poly-Lys 修飾カートリッジを使用して Doxil の精製に成功した。

(2) HPLC カラムによる分離精製

上記の検討で、ナノ粒子と夾雑物質との分離精製に成功した。次に、類似のナノ粒子の分離が可能な手法の開発を試みた。ナノ粒子の僅かな違いを分離するために、上記の検討で使用した poly-Lys を HPLC 用モノリス型カラムに修飾し、検討に用いた。

移動相の pH とイオン強度を変化させた時の細胞外小胞の溶出挙動を調べた。移動相の pH を 6 から 8 の間で変化させたところ、いずれの pH でも Tris 濃度が 100mM の時は溶出せず、300 ~ 400 mM 以上では 1.5 分に溶出した。溶出時間は、pH や Tris 濃度を変化させてもほとんど一定であった。ピーク強度は、Tris 濃度が高くなるほど少しずつ大きくなり、700 ~ 800 mM 以上になると、それ以上は変化しなかった。これは、細胞外小胞は、細胞内で産生されているため、表面電荷は小胞ごとで均一でなくばらつきがあるので、溶出に必要な Tris 濃度は小胞ごとで異なるためと考えた。

次に Doxil の溶出挙動を調べた。Doxil 溶液を分析すると 1.5 分の Doxil のピークに加えて、3-4 分に Doxil から溶出した医薬品のドキシソルピシンの小さなピークが検出された。Doxil の溶出挙動も、pH の影響をほとんど受けなかった。固定相に修飾した poly-Lys のアミノ基の解離は pH が上昇すると抑制されるため、イオン交換の作用が弱まり Doxil が溶出し易くなると考えられる。しかし、Doxil のピークが検出され始める Tris 濃度が、pH6、7 では 300mM であるのに対して、pH8 では 400mM であった。これは、Tris 緩衝液は Tris と塩酸を混合して調製しているため、Tris 濃度が同じであっても溶液中の塩化物イオン濃度は、pH が低くなるほど高くなる。そのため、移動相のイオン強度による溶出力は pH が低くなるほど強くなるため、pH 6、7 ではより低濃度 (300mM) で溶出したと考えられる。ピーク強度は、ピークが検出され始めたら、その強度は急激に大きくなり、その後はほぼ一定になった。例えば、pH7 では 300mM でピークが検出され、それ以上濃度を上昇させても、ピーク強度はほとんど変化しなかった。これは、Doxil は工業的に調製されているため、均一性が高く、溶出に必要な Tris 濃度はほとんどの Doxil で同じためと考えた。

このようにナノ粒子が形状を維持した状態で固定相に保持され、移動相中の Tris 濃度で溶出をコントロールできることが分かったので、グラジエント溶離を用いて Doxil と細胞外小胞の分離を試みた。その結果、pH8 の移動相を用いて、Doxil と細胞外小胞を分離に成功した。3.5 分付近に Doxil から溶出したドキシソルピシンのピークが、6.5 分付近に Doxil が 9.5 分付近に細胞外小胞のピークが溶出した。このように 2 つのナノ粒子が良好に分離された。2 つのナノ粒子が分離された原因としてゼータ電位を予想した。Doxil と細胞外小胞のゼータ電位は、それぞれ -22 と -40 mV であり、細胞外小胞の方がより負に帯電していた。つまり、固定相のアミノ基に対して強い親和性を有すると考えられ、イオン交換作用によって固定相に強く保持された今回の結果を説明することができる。

本研究では、機能性ナノ粒子の分離精製法を開発した。開発したカートリッジやカラムを用いることで、短時間で夾雑物質とナノ粒子やナノ粒子同士の分離精製が可能になった。今後は、本手法を用いて精製したナノ粒子を用いて、標的部位での機能発現し、細胞等の機能制御を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 A. Watanabe, M. Takagi, S. Murata, M. Kato,	4. 巻 148
2. 論文標題 Stability and drug release studies of an antimycotic nanomedicine using HPLC, dynamic light scattering and atomic force microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 149-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2017.09.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Ayako, Karasawa Koji, Murayama Shuhei, Sano Yoshihiro, Takagi Mio, Yamamoto Eiichi, Murata Shigeo, Kato Masaru	4. 巻 1564
2. 論文標題 Enrichment of liposomal nanomedicines using monolithic solid phase extraction discs following preactivation with bivalent metal ion solutions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 224 ~ 227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chroma.2018.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Shinichi, Kato Masaru, Hiraga Tatsuru, Ishida Masaru, Kanno Hiroshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Quantitative determination of plasma cabozantinib concentration using HPLC?UV and its application to patients with renal cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedical Chromatography	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bmc.5599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamazaki Yasunori, Kato Masaru, Karasawa Koji	4. 巻 219
2. 論文標題 Methylgakinone content determination and geographical origin discrimination for P. quassioides via fluorescence fingerprint and principal component analyses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 114932 ~ 114932
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2022.114932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Masaru, Nakamoto Riho, Ishizuka Masaki, Watanabe Noriko	4. 巻 413
2. 論文標題 Facile and simple purification method for small extracellular vesicles obtained from a culture medium through cationic particle capture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 2523 ~ 2528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-021-03207-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Masaru, Yamaguchi Misa, Morita Tomoka, Watanabe Noriko, Ota Shigenori, Yamamoto Eiichi	4. 巻 1664
2. 論文標題 A method for purifying nanoparticles using cationic modified monoliths and aqueous elution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 462802 ~ 462802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2021.462802	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Ayako, Murayama Shuhei, Karasawa Koji, Yamamoto Eiichi, Morikawa Satoru, Takita Ryo, Murata Shigeo, Kato Masaru	4. 巻 67
2. 論文標題 A Simple and Easy Method of Monitoring Doxorubicin Release from a Liposomal Drug Formulation in the Serum Using Fluorescence Spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 367 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00868	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Karasawa Koji, Takakura Masatoshi, Kato Saori, Akatsuka Momoha, Kato Masaru	4. 巻 68
2. 論文標題 Simple and Rapid Evaluation of the Unique Manuka Factor in Manuka Honey Using Fluorescence Fingerprints and Principal Component Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 762 ~ 765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00208	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Masaru, Athumi Yukino, Yamaguchi Misa, Date Haruka, Yamamoto Eiichi, Murayama Shuhei, Karasawa Koji	4. 巻 1617
2. 論文標題 Trimethylammonium modification of a polymer-coated monolith column for rapid and simultaneous analysis of nanomedicines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 460826 ~ 460826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2019.460826	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 加藤 大、金井 優佳、萬田 夕貴、山本 栄一、宮崎 将太、青山 千顕、秋武 将俊、太田 茂徳
2. 発表標題 poly-Lys修飾HPLCカラムによる表面物性の異なる2種のナノ粒子の分離
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 大
2. 発表標題 HPLCによるナノメディシンの 評価法の開発
3. 学会等名 第14回JBFシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 大
2. 発表標題 医療貢献を目指した分析化学
3. 学会等名 第33回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaru Kato
2. 発表標題 HPLC column for 100nm nanoparticles analysis
3. 学会等名 PBA2021 Kyoto (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学薬学部基礎薬学講座生体分析化学部門 https://www.showa-u.ac.jp/education/pharm/major/bachem.html
--

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
---------	---------