

フジシール財団 研究助成事業
成果報告書

公益財団法人フジシール財団
理事長 岡 崎 裕 夫 殿

報告日 2026 年 5 月 21 日

研究課題	ワクチン宿主細胞の室温保存パッケージ	助成金額
		300 万円
助成名	特別長期研究助成・研究助成・若手研究助成	
ふりがな	たかす あきのり	研究助成申請年度
研究者氏名	高須 昭則	2025 年度
所属機関	名古屋工業大学	研究期間
		2025 年 4 月 1 日から 2026 年 3 月 31 日
役 職		

下記の通り、研究成果を報告いたします。

記

1. 研究成果の概要

本研究では、「パッケージの新展開」を念頭にポリオキサゾリンの生体適合性と水和・脱水和（下限臨界溶液温度:LCST）特性を活用してワクチン量産および備蓄のための宿主細胞長期保存用のハイドロゲルを創製した。本研究では、ハイドロゲルをワクチン宿主細胞の保存用のパッケージと見立てて研究を展開した。具体的には、①天然多糖のアルギン酸にポリオキサゾリン側鎖を導入し（第70回、72回および73回高分子討論会一部発表済み）、続いてカルシウムによる物理架橋とゲルの特性解析を行った。LCST 温度以上では、宿主細胞はアルギン酸に接着し成長・分化して宿主細胞としての機能を失うが、LCST 以下の温度では水和によりゲル中に遊離し長期保存が可能になると考えた（図1）。続いて②得られたゲルの中で宿主細胞の長期室温保存を行った。具体的な内容を次ページに記した。

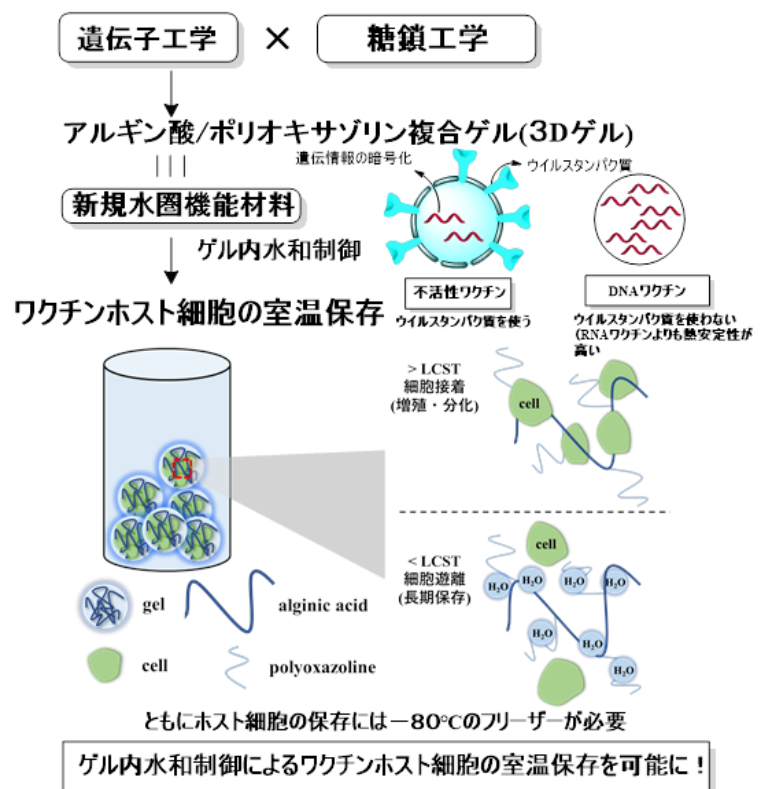


図1. アルギン酸/ポリオキサゾリンゲルの水和制御によるワクチン宿主細胞の室温保存のイメージ図（宿主細胞の保存にフリーザーが必要なくなる。）

<緒言>

細胞保存の最も有効な手法は、凍結保存である。しかし、この手法には、高度なフリーザーの確保、運搬時の利便性や細胞破壊など様々な欠点が存在する。そこで課題を克服するには、常温保存が不可欠であると考えた。すでに短時間ではあるが、細胞の常温保存が可能なアルギン酸ナトリウムを用いたハイドロゲルが知られている¹⁾。本研究では、保存期間の延長を試みるために、疑似ポリペプチド構造を有するオキサゾリンをアルギン酸へ導入し、新規複合ゲルを調製した。また、オキサゾリン導入率によるゲル特性の違いや遺伝子組み換え大腸菌を用いた常温保存について評価した。

<実験>

カチオン開環反応を用いて、ポリ(2-オキサゾリン)を合成し、その成長末端にジアミンを用いて停止反応を行った。次に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) と *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を用いたアミド反応で、アルギン酸にオキサゾリン側鎖を導入した(図2)。その後、透析操作にて未反応のポリマーを除き、凍結乾燥を行うことで目的の高分子を精製した(図2)。そして

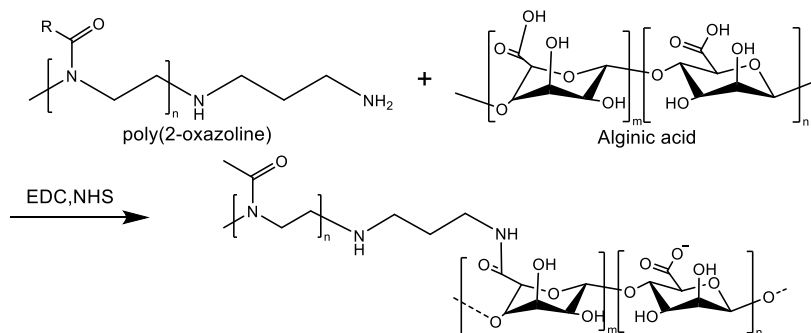


図2.アルギン酸へのポリ(2-オキサゾリン)側鎖の導入スキーム

得られたこの高分子を2 wt%水溶液に調製し、緑色蛍光タンパク質(GFP)がエンコードされた遺伝子組み換え大腸菌と混合させた。ゲル保存前にタンパク質発現誘導剤(イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド: IPTG)を加え、その後すぐに5 wt%のカルシウム溶液に滴下することで、大腸菌を含有した複合ゲル(Al/Oxgel)を調製した。ゲル状態のまま常温下(25 °C)で保存し、一定期間後にキレート剤としてエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を用いてゲルを崩壊することで、保存した大腸菌の宿主細胞としての性能を評価した。

<結果・考察>

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)測定と¹H NMR測定により、アルギン酸へのポリ(2-オキサゾリン)側鎖の導入が確認できた($M_n = 1.3 \times 10^5$, $M_w/M_n = 1.68$)。¹H NMR測定により見積もったポリ(2-オキサゾリン)の導入率は5%と算出された。細胞保存の評価には、蛍光測定を用いた。一定期間保存した後にゲル崩壊すると、その直後にはタンパク質発現を確認できなかったが、6時間ほど37 °Cでインキュベートすると発現が確認できた(図3)。また、現段階では最大3週間、常温下での細胞保存に成功している。²⁾さらに、オキサゾリン導入率向上に向け様々な反応条件で実験を行った結果や、異なるオキサゾリン側鎖で合成した複合ゲルの評価、GFPタンパク質がエンコードされた大腸菌(宿主細胞)に代わりコロナウイルス宿主細胞を用いた保存結果も併せて学会発表をおこなった。

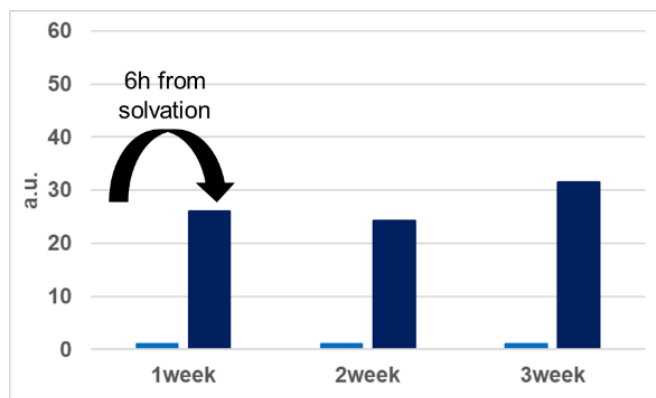


図3. 蛍光測定による細胞の保存状態の確認

- 1) Chen, B.; Wright, B.; Sahoo, R.; Connon, C, J. Tissue Eng. Part C Methods **2013**, 19(7), 568-576.
- 2) Tsurube, M. ; Takasu, A. Preparation of Alginate/Poly(2-Oxazoline) Hybrid Gels and Their Use in Cell Preservation. *Macromolecular Materials and Engineering* **2024**, 309 (4), Article. DOI: 10.1002/mame.202300356.

2. 研究成果のパッケージ産業への貢献の可能性

世界中を震撼させたコロナウイルス (COVID-19) のパンデミックは記憶に新しく、今後の SARS や COVID-2019 のような感染症対策には、世界中で最も多く摂取された RNA ワクチンに加え、遺伝子組み換えワクチンおよび DNA ワクチンの生産・備蓄・輸送が安全安心な人類の生活には急務の課題である。コドンに関する研究と制限酵素の発達から大腸菌の遺伝子組み換え技術を積極的に応用した多くのウイルスタンパク抗原 (スパイクタンパク質) の生合成が可能になってきた。遺伝子組み換えワクチンは、免疫源となるウイルスタンパク質を接種して免疫を誘導する。このような体外から投与するワクチンとは異なり、DNA および RNA ワクチンの場合、ウイルス抗原 (スパイクタンパク質) の遺伝子を投与することにより、免疫源のスパイクタンパク質を体内の細胞で産生させる。遺伝子組み換えワクチン、RNA および DNA ワクチンの生合成には、その発現および増殖ホスト細胞 (ともに大腸菌が使用される場合が多い) の保存のためには、 -80°C のフリーザーの確保が不可欠である。そのため、オンデマンドでワクチンを輸送するためには、室温で細胞を死滅させることなく輸送できるパッケージが必要である。2013 年に、Chen らがアルギン酸ハイドロゲルを用いることでマウスとヒト由来の幹細胞を室温で 2 週間保存することに成功し、報告されている (*Tissue Engineering - Part C: Methods* **2013**)。その生存率は 74% (マウス)、80% (ヒト) となり、凍結保存したサンプルと同等な生存率を示している。その保存メカニズムの解明や保存期間の延長は、人類科学に残された重要な課題であるものの全く手つかずの状況となっている。よって、本研究では天然多糖であるアルギン酸の改質からスタートし、ゲルの調製および細胞の保存まで期間内に試みた。現在のところ室温で 3 週間の室温保存に成功しており、ポリオキサゾリンを複合化したアルギン酸ゲルを新規に調製し、細胞室温保存用の “未来のセルパッケージ” としての機能を見出すことができたといえる。

3. 学会発表、学会誌等への論文掲載、産業財産権出願などの実績

1. 遠藤美南、山田修二、高須昭則 “細胞保存に向けたアルギン酸ナトリウム-*graft*-PEG の合成と特性評価” 第 74 回高分子討論会
2. 釣部真琴、高須昭則 “アルギン酸/ポリオキサゾリン複合ゲルの調製と細胞の室温保存” 第 72 回高分子討論会
3. 釣部真琴、高須昭則 “アルギン酸/ポリオキサゾリン複合ゲルの調製と細胞保存” 第 71 回高分子討論会
4. Tsurube, M. ; Takasu, A. Preparation of Alginate Acid/Poly(2-Oxazoline) Hybrid Gels and Their Use in Cell Preservation. *Macromolecular Materials and Engineering* **2024**, 309 (4), Article. DOI: 10.1002/mame.202300356.