

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術  
の創成」  
研究課題「免疫制御能を有する高分子ナノ粒子ワ  
クチンの製造」

## 研究終了報告書

研究期間 平成 19年 10月～平成 25年 3月

研究代表者：明石 満  
(大阪大学大学院工学研究科、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本研究は、ナノテクノロジーに立脚した安全かつ効果的な高分子ナノ粒子ワクチンの製造技術の開発と臨床応用を目的としている。そのために、両親媒性生分解高分子の自己組織化を基盤としたナノ粒子合成技術の確立、安全性試験、ナノ粒子による免疫応答制御能の評価とメカニズム解明、およびその解析結果に基づく最適なナノ粒子の分子設計指針を明確にし、ナノ粒子製造とワクチン製剤化の基盤技術を構築する。最終的には、肝臓・大腸癌患者に対するナノ粒子ワクチンのトランスレーショナルリサーチを実施し、産学・医工連携による革新的ナノ医療の具現化および新規アジュバントの創成を目指す。

ナノ粒子ワクチンの臨床応用に向けて、Good Manufacturing Practice (GMP)に準拠したナノ粒子製造を行うための粒子合成方法の最適化を行い、高効率・高再現性のナノ粒子の大量製造技術を構築した。また、大阪大学医学部附属病院薬剤部の協力のもと、GMP 準拠のナノ粒子製造プロセスを確立し、臨床適応可能なナノ粒子を製造した。疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸) ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子の基礎的な物性については、粒子径制御技術の確立、抗原内包ナノ粒子の細胞内分解挙動と局在の評価、ナノ粒子のリンパ節移行性・体内動態を解析し、臨床応用のための基礎的な知見を集積した。さらに疎水化  $\gamma$ -PGA の特徴を効果的に引き出し、ドラッグデリバリーシステム (DDS)としての多様化を図るために、疎水化  $\gamma$ -PGA の会合制御に基づく新たな材料設計と構造制御、得られたナノ・マイクロ構造体と細胞間との相互作用を評価してきた。この疎水化  $\gamma$ -PGA は、疎水性アミノ酸の種類・導入率(疎水化度)や会合体調製時の条件(溶媒、濃度、温度等)により、高分子鎖の会合数、粒子サイズ、形状を巧みに制御することが可能であり、さらには1本の高分子鎖からなるユニマーナノ粒子の調製にも成功している(明石 G)。

ナノ粒子ワクチンの免疫誘導メカニズムに関しては、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子と樹状細胞との相互作用を中心に、ナノ粒子の細胞内への抗原デリバリーと活性化能およびそれら活性化に関するシグナル伝達系を解析し、ナノ粒子の優れたアジュバント活性を明らかにした。また、ノックアウトマウスを用いた免疫実験により、ナノ粒子のアジュバント活性に関するレセプターを解析し、抗原提示細胞上に発現している Toll 様受容体 (TLR) が重要な役割を果たしていることを見出した。実際の抗原特異的な免疫誘導効果については、ナノ粒子ワクチンの投与量、投与経路、他の既存アジュバントの比較を実施し、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の優れた細胞性免疫誘導効果およびナノ粒子ワクチンの作用機序を明らかにした(馬場 G)。

がんワクチンとしてのトランスレーショナルリサーチ(医師主導型治験)への展開に向けては、マウス免疫実験において、がん抗原ペプチドを用いたナノ粒子ワクチンが、肝腫瘍に対する抗腫瘍活性を示し、既存のアジュバントより効果的かつ安全な治療法であることを証明した。また、がんペプチド固定化ナノ粒子の安全性評価として、「疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンの雄ラットを用いた14日間反復投与毒性試験」および「疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンのモルモットを用いた抗原性試験」において、ナノ粒子ワクチンは顕著な毒性を示さず、ナノ粒子そのものの抗原性も認められず、高い安全性が確認された。以上の結果を踏まえて、消化器癌に対する EphA2 ペプチド-疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンの臨床試験計画の大阪大学医学部倫理委員会での承認及び実施を目指し、臨床試験計画書を大阪大学医学部附属病院未来医療センターへ提出し、現在審議中である(巽 G)。

### (2) 顕著な成果

#### 1. 概要: 臨床展開に向けたナノ粒子ワクチンの製造技術の確立

疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の粒径制御技術の開発および GMP 準拠したナノ粒子の製造プロセスの構築により高活性・高安全性ながんワクチンシステムを開発し、トランスレーショナルリサーチへの展開を図ることができた。

## 2. 概要： ナノ粒子ワクチンのメカニズム解析

ナノ粒子の抗原デリバリーとしての機能および樹状細胞に対する活性化能を明らかにし、ナノ粒子ワクチンの免疫誘導メカニズムおよび作用機序を分子レベルで明らかにすることができた。

## 3. 概要： 企業との連携による実用化研究の実現

CREST 研究の基盤技術をもとに、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子をアジュバントとしたワクチンの実用化・産業化に向けた応用基盤の構築を目的に、大阪大学－武田薬品工業(株)の共同研究講座が設置された。

## § 2. 研究構想

### (1) 当初の研究構想

免疫系の人為的な制御に基づくワクチンは、感染症・がん・自己免疫疾患の予防・治療に対する免疫療法として有効な手段となる。しかしながら、従来の生物製剤(弱毒生ワクチン、不活化ワクチン)を用いたワクチンでは、現在ワクチン開発が求められている多くの疾患に対して、高い安全性と十分な予防・治療効果を両立させることは困難であり、サイエンスとテクノロジーの融合による新たな治療戦略が求められている。そこで本研究では、化学合成・高分子合成・自己組織化によるボトムアップ型ナノテクノロジーを基盤とした生分解性ナノ粒子合成・製造の基盤技術を確立し、ワクチン抗原を担持するナノ粒子の製造プロセスを構築することでナノ粒子ワクチンを実用化する。また、ナノ粒子自身に免疫賦活化剤(アジュバント)としての機能と、抗原の組織・細胞内動態制御能を付与することで、免疫応答制御を可能とする抗原デリバリー型アジュバントを創製する。5年6ヶ月間の研究期間を通して、1)産学連携による高分子ナノテクノロジーを基盤としたナノ粒子製造技術の確立、2)抗原とナノ粒子とのコンジュゲーションによるワクチン製剤化プロセスの確立、3)ナノ粒子のワクチン効果と安全性評価、4)ナノ粒子ワクチンのメカニズム解析、5)医工連携のもと実用化を目指したがんワクチンに対するトランスレーショナルリサーチへと展開を図る。

明石 G では、生分解性高分子を基盤とした免疫応答制御能を有するナノ粒子を開発し、高分子ナノ粒子ワクチンを実用化するための製造技術および製剤化プロセスを確立する。馬場 G では、ナノ粒子と免疫担当細胞、特に抗原提示細胞である樹状細胞との相互作用について、既存のアジュバントと比較しながら、培養細胞及び実験動物を用いて評価する。巽 G では、ナノ粒子－癌抗原ペプチドを用いた肝癌・消化器癌免疫治療法の開発を実施する。

### (2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

ナノ粒子ワクチンの安全性に関する指摘を受けていたが、追加で別途予算を分配頂いたことで、平成 23 年度に「疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンの雄ラットを用いた 14 日間反復投与毒性試験」および「疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンのモルモットを用いた抗原性試験」を外注試験により実施することができた。ナノ粒子-EphA2 ペプチドワクチンは遠位尿細管の空胞化など軽微な変化を認めしたが、有意な毒性変化はないと判定された。また、能動的全身アナフィラキシー及び受動的皮膚アナフィラキシーいずれも認めず、ナノ粒子の抗原性はないと判定され、安全性を担保することができた。

ナノ粒子の細胞内・体内動態の詳細な評価が必要との助言に対して、放射性同位体ラベル化ナノ粒子を調製し、単一光子放射断層撮影 (SPECT: Single photon emission computed tomography) により、ナノ粒子および内包抗原の投与部位への局在、動態、分解、代謝、排泄等の評価を平成 24 年度に実施した(大阪大学大学院医学系研究科核医学講座 畑澤 順先生・金井泰和先生と共同研究)。また、近赤外光の蛍光ラベル化ナノ粒子を調製し、in vivo 蛍光イメージャーを用いた体内動態の評価も実施した(国立循環器病センター研究所生体医工学部 山岡哲二先生・馬原 淳先生と共同研究)。

今後の展開に向けて製薬企業の参画が必須であり、そのための努力が必要とのコメントに対し、平成 24 年 2 月より、武田薬品工業(株)との共同研究講座が立ち上がり、ナノ粒子アジュバントの産業化・実用化に向けてのパイプラインを構築することができた。

### § 3 研究実施体制

#### (1)「明石」グループ

##### ① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
明石 満	阪大院工	教授	H19.10～
木田 敏之	阪大院工	准教授	H19.10～
松崎 典弥	阪大院工	助教	H19.10～
赤木 隆美	阪大院工	特任准助教	H20.04～
佐藤 智子	阪大院工	事務員	H20.04～H22.08
橋本 奈津子	阪大院工	事務員	H22.08～
麻生 隆彬	阪大院工	研究員	H19.10～H21.03
伊藤 祐貴	阪大院工	D3	H19.10～H20.03
和久 友則	阪大院工	D3	H19.10～H21.03
施 冬健	阪大院工	D3	H19.10～H21.08
金 亨振	阪大院工	D3	H19.10～H22.03
大道 正明	阪大院工	D3	H19.10～H23.03
吉田 裕安材	阪大院工	D3	H19.10～H23.03
申 鶴雲	阪大院工	研究員	H19.10～H24.04
井本 鷹行	阪大院工	M2	H19.10～H21.03
門脇 功治	阪大院工	D3	H21.04～H24.03
渡辺 一輝	阪大院工	M2	H21.04～H23.03
松本 匡広	阪大院工	D2	H21.04～
PhassamonPiya pakorn	阪大院工	D2	H21.04～
朱 葉	阪大院工	D2	H23.07～
島 史明	阪大院工	D1	H21.04～
西口 昭広	阪大院工	D1	H23.04～
福本 遼太	阪大院工	M2	H23.04～
首藤 真奈見	阪大院工	M1	H24.04～
山崎 靖人	大鵬薬品工業(株)研究開発本部	P マネージャー	H19.10～H23.03
三好 和久	大鵬薬品工業(株)飯能研究センター	副所長	H20.04～H23.03
浅香 直正	大鵬薬品工業(株)飯能研究センター	主任研究員	H19.10～H23.03
山口 修司	大鵬薬品工業(株)安全性研究所	所長	H19.10～H23.03
山下 親正	大塚製薬(株)製剤研究所	主任研究員	H21.04～H24.03
真鍋 寛	大塚製薬(株)製剤研究所	研究員	H21.04～H24.03
松本 真	大塚製薬(株)微生物研究所	所長	H21.04～H24.03
澁谷 功	大塚製薬(株)微生物研究所	研究員	H21.04～H24.03
田中 直毅	京工織大院工	准教授	H21.04～
和久 友則	京工織大院工	助教	H21.04～
渡邊 ゆかり	京工織大院工	M2	H21.04～H22.03
大石 雅子	阪大医学部病院 薬剤部	副部長	H21.04～
中村 歩	阪大医学部病院 薬剤部	製剤室員	H21.04～
野崎 周英	(財)化学及血清療法研究所	部長	H22.04～H24.03
上仲 一義	(財)化学及血清療法研究所	研究員	H22.04～H24.03
宇都 倫史	阪大院工	特任研究員	H24.02～
戸井田 力	阪大院工	特任助教	H24.04～H24.11

三輪 哲生	武田薬品工業(株)CMC 研究センター	センター長	H24.04～
長尾 将男	武田薬品工業(株)CMC 研究センター	主席研究員	H24.04～
鈴木 元	武田薬品工業(株)ワクチンビジネス部	課長代理	H24.04～
山下 知輝	武田薬品工業(株)ワクチンビジネス部	部員	H24.04～
日下 雅美	武田薬品工業(株)CMC 研究センター	主席部員	H24.04～
今川 昌之	武田薬品工業(株)ワクチンビジネス部	G マネージャー	H24.04～
小松 幹生	武田薬品工業(株)事業開発部	主席部員	H24.04～
吉田 恵里香	武田薬品工業(株)ワクチンビジネス部	課長代理	H24.04～

## ②研究項目

高分子ナノ粒子ワクチンの製造

- ・疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の製造と安全性試験
- ・抗原-疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の製剤化
- ・新規高分子ナノ粒子・ナノカプセルの合成と抗原固定化
- ・ナノ粒子の体内動態イメージング

## (2)「馬場」グループ

### ①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
馬場 昌範	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 附属難治ウイルス病態制御研究センター	教授	H19.10～
宇都 倫史	同上	特任研究員	H20.04～H24.01
善久 理加	同上	M2	H19.10～H21.03
時任 真衣子	同上	M2	H19.10～H21.03
外山 政明	同上	D3	H21.04～
吉盛 利奈	同上	M2	H21.04～H23.03
西 庸介	同上	M2	H22.04～H24.03
吉永 圭介	熊本高等専門学校	助教	H21.04～H24.03

## ②研究項目

ナノ粒子ワクチンによる免疫応答と制御機構の解析

- ・疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の免疫誘導効果の解析
- ・新規ナノ粒子と樹状細胞との相互作用解析
- ・ナノ粒子による普遍的な免疫応答制御への展開

## (3)「巽」グループ

### ①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
巽 智秀	大阪大学大学院医学系研究科消化器 内科学	助教	H19.10～
林 紀夫	同上	教授	H19.10～H22.03
竹原 徹郎	同上	教授	H19.10～
笹川 哲	同上	D4	H19.10～H22.03
山本 政司	同上	D4	H19.10～H24.03
山口 真二郎	同上	研究生	H19.10～H21.03
明田 寛史	同上	D4	H21.04～

常松 日奈子	同上	D4	H21.04～
青野 悟志	同上	D2	H23.04～
西尾 啓	同上	D1	H24.04～
大西 良輝	同上	D1	H24.04～

②研究項目

ナノ粒子ー癌抗原ペプチドを用いた肝臓・消化器癌免疫治療法の開発

- ・マウス腫瘍モデルにおけるナノ粒子ワクチンの有用性の検討
- ・トランスレーショナルリサーチ

## § 4 研究実施内容及び成果

### 4. 1 高分子ナノ粒子の製造と機能評価(大阪大学 明石グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

##### 1) 疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の製造技術の確立

納豆菌由来のポリ( $\gamma$ -グルタミン酸) ( $\gamma$ -PGA) に疎水性アミノ酸である L-フェニルアラニンエチルエステル (Phe) を導入 (図 1) することで、両親媒化構造に起因した高分子会合により、水分散性に優れ、凍結乾燥可能な 200 nm 程度のナノ粒子が調製可能であることを明らかにしている。この基盤技術をもとに、臨床応用のためのナノ粒子の高効率・高再現性の大量製造技術の確立に向けて、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の合成方法を反応条件、用いる溶媒、精製・回収方法など様々な観点から精査し、安全性を考慮した合成ルートの最適化とナノ粒子大量合成技術を確立した。

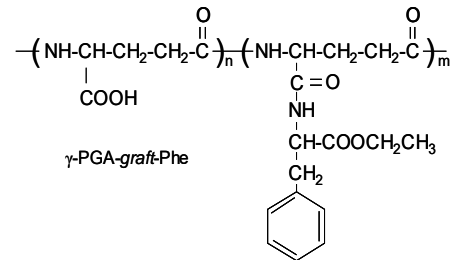


図 1. 疎水化  $\gamma$ -PGA の構造

##### 2) GMP に準拠したナノ粒子の製造

大阪大学医学部附属病院内での癌抗原ペプチド-疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンの製造・製剤化を目指して、Good Manufacturing Practice (GMP) 準拠化を含めてハードおよびソフト面の環境を整備した。大阪大学医学部附属病院・薬剤部の協力のもと、薬剤部に設置されているアイソレーター内 (クラス 100) でのナノ粒子製造のパイロット試験を実施し、GMP 準拠のナノ粒子製造プロセスを確立した (図 2, 3)。



図 2. アイソレーター内でのナノ粒子の製造風景



図 3. GMP (準拠) 製造した疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子サンプル

##### 3) 疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の粒径制御と機能評価

高分子ナノ粒子をワクチンキャリアとして利用する場合、粒子径、表面性状、粒子を構成する高分子鎖の組成がキャリアとしての性能を決定する重要な因子となる。そこで、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子のワクチンキャリアとしての最適な粒径を検討することを目的に、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の粒径制御技術の確立と得られた粒径の異なるナノ粒子の蛋白質キャリアとしての機能について評価した。

$\gamma$ -PGA ( $M_w = 3.8 \times 10^5$ ) に疎水性アミノ酸である L-phenylalanine ethyl ester (Phe) および L-tryptophan methylester (Trp) を導入した、疎水化  $\gamma$ -PGA ( $\gamma$ -PGA-Phe-55 および  $\gamma$ -PGA-Trp-64) を合成した (末尾の数字はその疎水性アミノ酸の導入率)。疎水化  $\gamma$ -PGA を 10 mg/ml になるように DMSO に溶解し、当量の異なる NaCl 濃度の水溶液 ( $\gamma$ -PGA-Phe: 0, 0.05, 0.1, 0.15 M NaCl,  $\gamma$ -PGA-Trp: 0, 0.02, 0.03, 0.05M NaCl) に加えてナノ粒子を調製した。調製したナノ粒子を透析・凍



結乾燥し、PBS に分散後、動的光散乱 (DLS) 法により粒径を測定した。各塩濃度の水溶液を用いて  $\gamma$ -PGA-Phe および  $\gamma$ -PGA-Trp ナノ粒子を調製した結果、NaCl 濃度の低下に伴い、ナノ粒子の粒径減少が認められ、NaCl 濃度を調節することで、ナノ粒子の粒径を制御することができた (図 4)。これは、塩濃度の低下に伴い、疎水化  $\gamma$ -PGA の静電反発が増加し、高分子鎖の会合数および凝集力が低下することに起因していると考えられる。また、 $\gamma$ -PGA-Phe ナノ粒子は、各粒径において凍結乾燥前後で粒径の変化は認められず、凍結乾燥による保存・再分散が可能であった。粒径の違いによる表面ゼータ電位の大きな変化はなく、いずれの粒径でも表面に  $\gamma$ -PGA 由来のカルボキシル基の存在が示唆された。

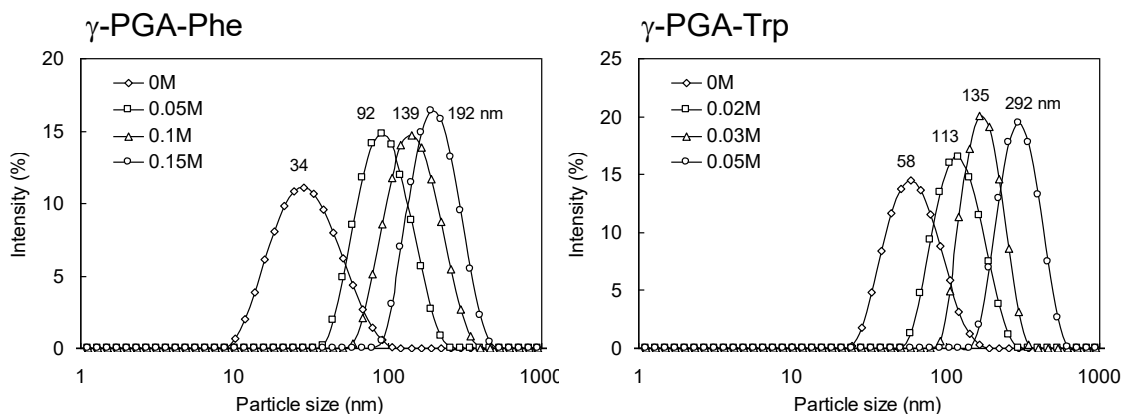


図 4. 調製時の塩濃度による疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の粒径制御

次に、粒径の異なる蛋白質内包ナノ粒子の調製を行った。モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を用い、OVA を溶解した NaCl 水溶液の OVA (0~2 mg/ml) と NaCl (0~0.15 M) 濃度をそれぞれ変化させ、その溶液に疎水化  $\gamma$ -PGA in DMSO (10 mg/ml) 溶液を添加し、得られた OVA 内包ナノ粒子中の OVA 量と粒径を測定した。その結果、単位粒子重量あたりの OVA 内包量は、NaCl 濃度に関わらず、仕込みの OVA 濃度依存的に増加した。また、粒径測定の結果、OVA 溶液中の NaCl 濃度を調節することで、蛋白質内包ナノ粒子の粒径も容易に制御可能であることが明らかとなった。さらに、粒子重量あたりの OVA 内包量は粒径に依存せず、いずれの粒径においても、OVA 内包効率は約 50%であった。

#### 4) 疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の樹状細胞活性化に対する粒径効果

疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を樹状細胞に作用させることで、樹状細胞が活性化 (成熟化) されることが明らかとなっている。そこで、組成は同じで粒径のみ異なる疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子 (30~200 nm) を調製し、樹状細胞の活性化能に対する粒径の影響を検討した。未成熟のマウス樹状細胞にナノ粒子を作用させることで、樹状細胞の成熟化 (活性化) マーカーである、CD40, 80, 86 および MHC class I の発現増加が認められた (図 5)。この発現増加は粒径に依存しており、粒径が小さくなる程、樹状細胞に対する活性化能が増強した。TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生においても同様の傾向を示した。これは、粒径減少に伴うナノ粒子表面積の増加により、樹状細胞-ナノ粒子間の相互作用が増加したためだと考えられる。

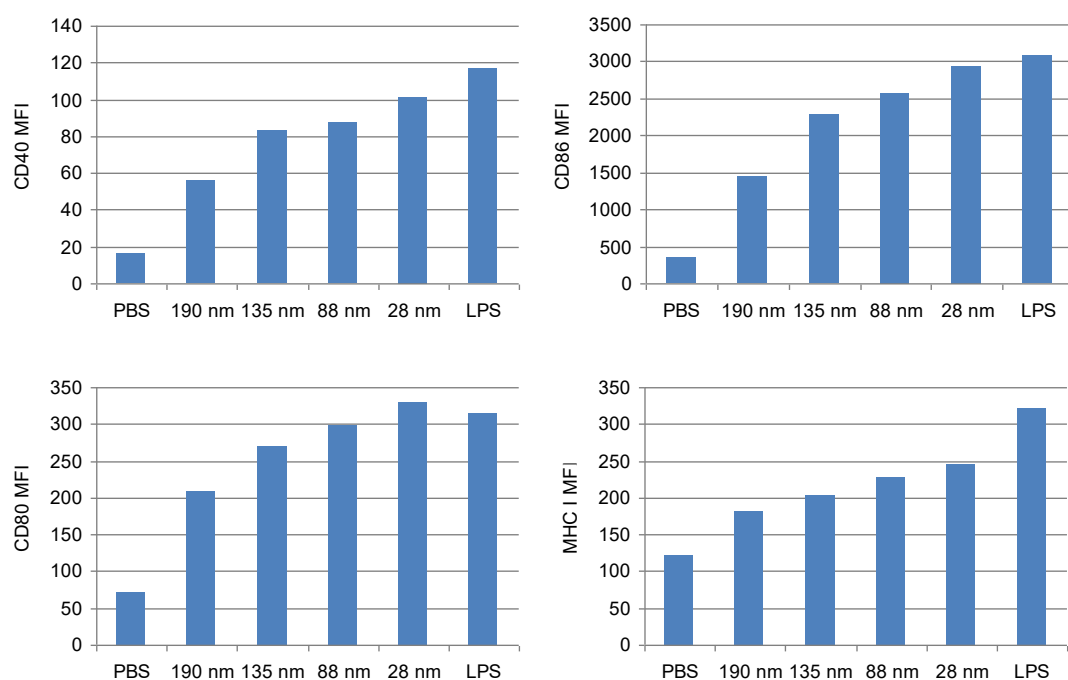


図 5. 粒径の違いによる樹状細胞に対する活性化能への影響(ナノ粒子による樹状細胞の活性化マーカー(CD40, 80, 86, MHC class I)の発現評価)。PBS (phosphate buffered saline): リン酸緩衝生理食塩水(未刺激)、LPS (Lipopolysaccharide): リポ多糖(positive control)、MFI (mean fluorescence intensity): 平均蛍光強度

##### 5) 抗原を内包した疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の細胞内動態の解析

抗原蛋白を内包した疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージに効率よく取込まれることが明らかとなっている。そこで、細胞内に取り込まれた抗原内包ナノ粒子の、抗原およびナノ粒子の分解挙動と局在について共焦点顕微鏡により評価した。また、それらの粒径効果について解析した。

粒径の異なる蛋白質内包疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子(40, 200 nm)のマウス由来細胞株であるマクロファージ RAW264 における取込み量および細胞内での内包蛋白質の分解挙動と局在について評価した。RAW264 に対する蛋白質内包ナノ粒子の取込み量はナノ粒子濃度および時間に依存して増加し、40 nm と 200 nm の比較においては、粒径の大きい 200 nm の方が高い取込み量を示した。細胞内に取り込まれた蛋白質内包ナノ粒子の分解性を評価した結果、フリーの蛋白質は細胞内に取り込まれた後、数十分後には分解が見られたのに対して、ナノ粒子に内包された蛋白質は、細胞内での分解抑制が認められた。また粒径の違いによって内包蛋白質の分解挙動に違いが観察され、より粒径の小さい 40 nm のナノ粒子の方が細胞内での蛋白質分解が遅い傾向が認められた(図 6)。次に、これら蛋白質の分解挙動がナノ粒子の細胞内動態の違いに起因していると考えられるため、エンドソーム(蛋白質を分解する細胞小器官)染色により Texas Red (TR)-OVA-NPs の細胞内局在を評価した結果、粒径により内包 OVA の細胞内局在に大きな違いは観察されなかった(図 7)。40, 200 nm のナノ粒子に内包された OVA は、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれて、エンドソームへと移行する。その後、時間経過と共に OVA がエンドソームから細胞質への移行が認められたが、粒径の違いによるエンドソームエスケープ能に大きな差は認められなかった。粒径による内包蛋白質の局在に違いが認められなかったことより、内包蛋白質の分解挙動の違いは、細胞内でのナノ粒子からの蛋白質放出挙動の違いが原因だと考えられる。今後、内包蛋白質に加え、ナノ粒子自身の細胞内分解挙動・局在を評価することで、より詳細な解析が可能であると考えられる。

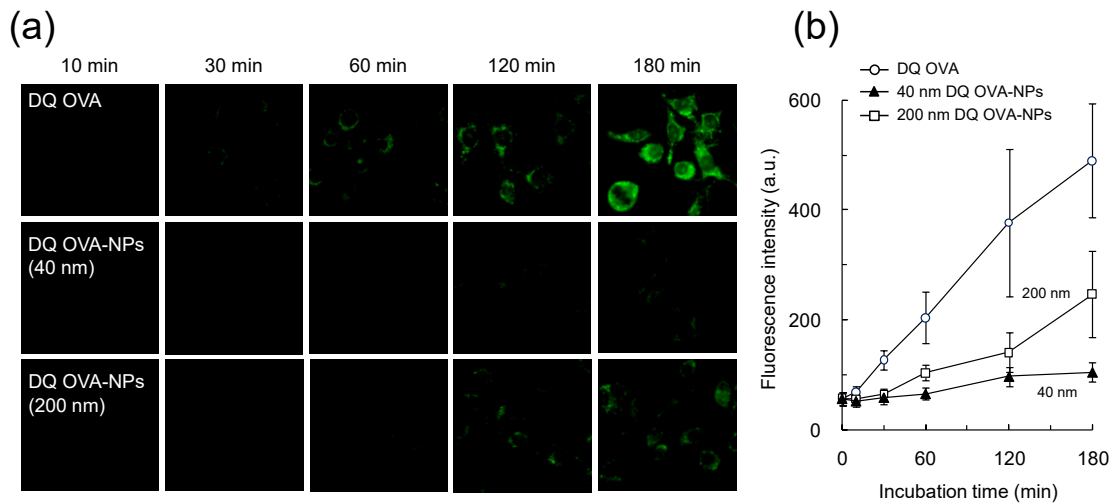


図 6. 蛋白質内包ナノ粒子の細胞内分解挙動。蛋白質が分解することで蛍光を発する DQ OVA を内包したナノ粒子(粒径 40 nm と 200 nm)を調製し、DQ OVA 取込み量が同じになるようにナノ粒子を RAW264 細胞に添加した。経時的に蛍光顕微鏡で観察し、蛋白質の分解挙動(分解すると緑に見える)を評価した。フリーの蛋白質は取込み初期で分解が見られたが、粒子に内包された蛋白質は、その分解が抑制された。

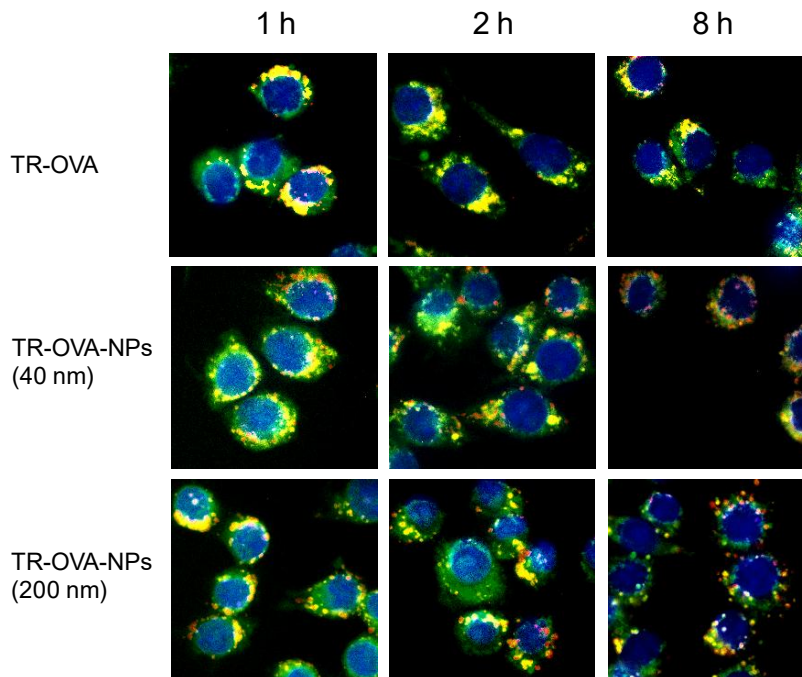


図 7. OVA 内包ナノ粒子の細胞内局在。RAW264 細胞に TR-OVA alone, TR-OVA-NPs (40, 200 nm) を取り込ませ、共焦点顕微鏡により観察。赤: TR-OVA、緑: エンドソーム、黄: エンドソーム内に局在する TR-OVA、青: 核を示している。TR-OVA alone はエンドソームに局在(黄色)しているが、TR-OVA-NPs (40, 200 nm)は細胞質に TR-OVA がエスケープ(赤色)している像が観察されたが、粒径による大きな違いは見られなかった。

## 6) 疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子のリンパ節移行性に対する粒径効果

通常、皮下投与されたワクチンは投与部位に存在する抗原提示細胞により貪食され、その細胞がリンパ節に移行することで、免疫応答が引き起こされる。そのため、ワクチン抗原のリンパ節移行性は、抗原特異的な免疫誘導効果に大きな影響を与えられている。そこで、粒径の異なる疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子のリンパ節移行性の違いを、蛍光ラベル化粒子を用いてマウス *in vivo* にて評価した。

Alexa488 ラベル化ナノ粒子(粒径 40, 100, 200 nm)をマウス皮下に投与し、1, 3, 6, 9 日後に所属リンパ節を回収し、フローサイトメトリーによりナノ粒子のリンパ節移行性を解析した。リンパ節中のナノ粒子を取り込んだ樹状細胞の数は、投与 3 日後にピークを示した。粒径効果については、リンパ節中の粒子を取り込んだ樹状細胞の数は 40 nm が最も多く、1 個の樹状細胞が取り込んだ粒子の量(=抗原の量)は 200 nm が最も高い値を示した。これらのリンパ節移行性の粒径効果と免疫誘導効果の関連性については現在解析中である。

## 7) ナノ粒子と既存アジュバントとの併用による免疫増強効果の検討

疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は、担持抗原を効率よく抗原提示細胞にデリバリーすると共に、粒子自身に細胞を活性化させるアジュバント作用があることが分かっている。そこで、既存アジュバントとナノ粒子の併用によるアジュバント活性の増強効果を検討した。既存アジュバントとして CpG オリゴヌクレオチド(ODN)を選択し、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子へのコンジュゲーション方法を検討した結果、カチオン性蛋白質であるプロタミンと CpG ODN より polyplex を作成し、その polyplex を粒子に内包させることで、安定に CpG を粒子に担持させることができた。次に、CpG ODN 内包ナノ粒子(CpG ODN-NPs)のアジュバント活性をマクロファージから産生されるサイトカイン(TNF- $\alpha$ )を指標に調べた結果、CpG ODN-NPs において顕著な TNF- $\alpha$ 産生が認められた。今後、*in vivo* での免疫誘導効果を評価し、アジュバント併用の有用性および最適な組み合わせを検討する。

## 8) 疎水化 $\gamma$ -PGA からなるユニマーナノ粒子の調製

両親媒性のランダム共重合体のユニークな特徴として、高分子鎖内での疎水性相互作用により、1 本の高分子鎖からなるユニマーミセルの形成が知られている。ユニマー粒子は、単位重量あたりの表面積が大きく、ターゲット分子を効率よく捕捉できることから DDS キャリアとしての利用が期待される。そこで、疎水化  $\gamma$ -PGA に導入するフェニルアラニン(Phe)の量を精密に制御し、ナノ粒子調製条件を検討することで疎水化  $\gamma$ -PGA からなるユニマーナノ粒子の調製を行った。

疎水化  $\gamma$ -PGA はフェニルアラニン(Phe)が  $\gamma$ -PGA 側鎖の COOH 基にランダムに導入された両親媒性のグラフト共重合体であるため、Phe の導入率や調製条件によって高分子鎖の会合数を制御でき、生分解性のユニマーナノ粒子の調製が可能であると考えられる(図 8)。そこで、疎水化  $\gamma$ -PGA の会合数変化によるナノ粒子の粒径制御と 1 本の疎水化  $\gamma$ -PGA からなる生分解性のユニマーナノ粒子の調製を試みた。疎水化  $\gamma$ -PGA の Phe 導入率を精密に制御することでユニマーナノ粒子の調製が可能であった。Phe 導入率 42%の  $\gamma$ -PGA-Phe-42 から調製されたユニマー粒子は、粒子径が 8 nm で、粒子内部に 100 個の Phe から形成される疎水性ドメインが約 5 個存在することが明らかとなった。

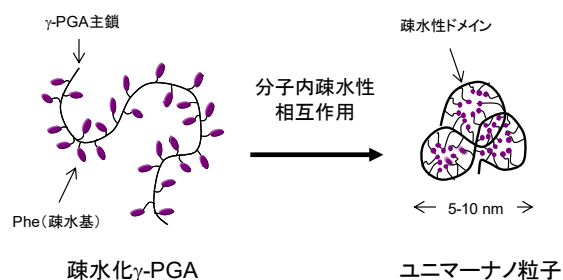


図 8. 疎水化  $\gamma$ -PGA からなるユニマーナノ粒子

## 9) 疎水化 $\gamma$ -PGA からなるユニマーナノ粒子の機能評価

疎水化  $\gamma$ -PGA の会合挙動を制御することで、1 本の疎水化  $\gamma$ -PGA からなるユニマーナノ粒子の調製と構造解析を実施してきた。得られたユニマーナノ粒子の物性および薬物キャリアとして機能評価するために、難溶性低分子薬剤(イリノテカン、シスプラチン)とのコンジュゲーションを行い、薬物の担持能、放出挙動を調べた。その結果、ユニマーナノ粒子は難溶性低分子薬剤を吸着す

ることが可能であり、また従来用いているナノ粒子(200 nm)と比較して、高い薬剤吸着能を示した。疎水性薬剤(イリノテカン)は、粒子内部に存在するフェニルアラニンが会合して形成される疎水性ドメインに吸着していると考えられるため、粒子内部構造の差異により、薬剤吸着能に違いが見られたと考察される。

#### 10) 疎水化 $\gamma$ -PGA からなるナノマイクロ構造体の形状制御

近年、様々な形状を有する有機および無機ナノマイクロ構造体において、その形状が細胞への吸着・取り込み量、毒性、薬物放出挙動、体内動態等に影響を与えることが明らかになっている。そこで、ワクチンキャリアとしての形態と機能との相関性を検討することを目的に、疎水化  $\gamma$ -PGA を用いて様々な形態を有するナノおよびマイクロ構造体を調製した。疎水化  $\gamma$ -PGA は疎水基の導入率(親疎水バランス)や会合体調製時の条件(ポリマー濃度、溶媒、温度等)を制御することで、ロッド状の形態や中空カプセル、多孔質粒子などを調製することが可能であった。

Phe の導入率 70% の  $\gamma$ -PGA-Phe ( $\gamma$ -PGA-Phe-70) の良溶媒として DMSO を用いた場合、ナノ粒子の形成が確認された。一方、 $\gamma$ -PGA-Phe-70 の良溶媒としてクロロホルムを用いた場合(エマルション法)、マイクロサイズの中空粒子が調製できた(図 9a, b)。また、クロロホルムに溶解させた  $\gamma$ -PGA-Phe-70 溶液にエタノールを等量添加し、水に滴下することで多孔質粒子が得られた(図 9c, d)。一般的なエマルション法による粒子調製時には、エマルションを安定化するために界面活性剤を使用するが、 $\gamma$ -PGA-Phe-70 ではポリマー自体の両親媒性構造により、界面活性剤フリーでも Oil in Water (O/W) エマルションが安定化され、中空粒子が調製できたと考えられる。また、エマルション中に極性の高い溶媒を添加しておくことで、外水相の水がエマルション内に流入することで、多孔質粒子が得られたと考えられる。得られた中空粒子、多孔質粒子の薬物(ペプチド)担持能を評価した結果、O/W エマルション法によりペプチドを内包することが可能であった。

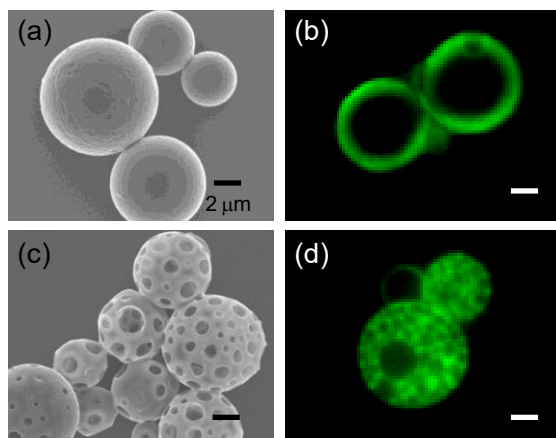


図 9. 疎水化  $\gamma$ -PGA からなる中空(a, b)および多孔質(c, d)マイクロ粒子。(a, c)SEM 像、(c, d)共焦点顕微鏡像(FITC ラベル化ポリマーより調製)。

#### 11) 疎水化 $\gamma$ -PGA からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子の調製

反対電荷を有する 2 種類の水溶性ポリアミノ酸を混合することで、静電的相互作用によるポリイオンコンプレックス(PIC)が形成される。これら PIC は水中(純水)では安定な会合体を形成しているが、高塩濃度の緩衝液中や pH 変化、希釈により、ポリマー鎖間の相互作用が遮へいされることで、会合体の溶解や凝集が引き起こされる。そこで、静電相互作用に加え、疎水性相互作用を利用することで、生理的環境下で安定に機能する PIC ナノ粒子の調製を試みた。水に可溶性疎水化  $\gamma$ -PGA (アニオン)とカチオン性高分子を用いて、ポリイオンコンプレックス(PIC)ナノ粒子の調製と機能評価を行った。Phe 導入率の異なる疎水化  $\gamma$ -PGA とカチオン性ポリアミノ酸であるポリ( $\epsilon$ -リジン) ( $\epsilon$ -PL)を種々の濃度で混合し、静電的相互作用と疎水性相互作用から形成させる PIC ナノ粒子の生理環境中での安定性および薬物キャリアとしての機能を調べた。

アニオンおよびカチオン性のポリアミノ酸として  $\gamma$ -PGA およびポリ( $\epsilon$ -リジン) ( $\epsilon$ -PL)を用いた。 $\gamma$ -PGA の側鎖の COOH 基に L-フェニルアラニンエチルエステル(Phe)を導入し、Phe 導入率が 16, 24, 40%の水に可溶性疎水化  $\gamma$ -PGA ( $\gamma$ -PGA-Phe-16, 24, 40)を調製した。疎水化  $\gamma$ -PGA (10 mg/ml)と  $\epsilon$ -PL (2 mg/ml)を PBS (pH 7.4)に溶解し、等量混合後、動的光散乱(DLS)により粒径を測定した。 $\gamma$ -PGA-Phe-24, 40 では、200-300 nm のナノ粒子の形成が認められ、 $\gamma$ -PGA-Phe-40/ $\epsilon$ -PL ナノ粒子は、緩衝溶液中の長期保存により粒径の変化は認められなかった。



この高い安定性は、粒子内部での **Phe** による疎水性ドメインの形成に起因していた。疎水化 PIC ナノ粒子は、静電的相互作用に加え、導入した疎水化基の疎水性相互作用により、安定なナノ粒子が形成可能であった(図 10)。

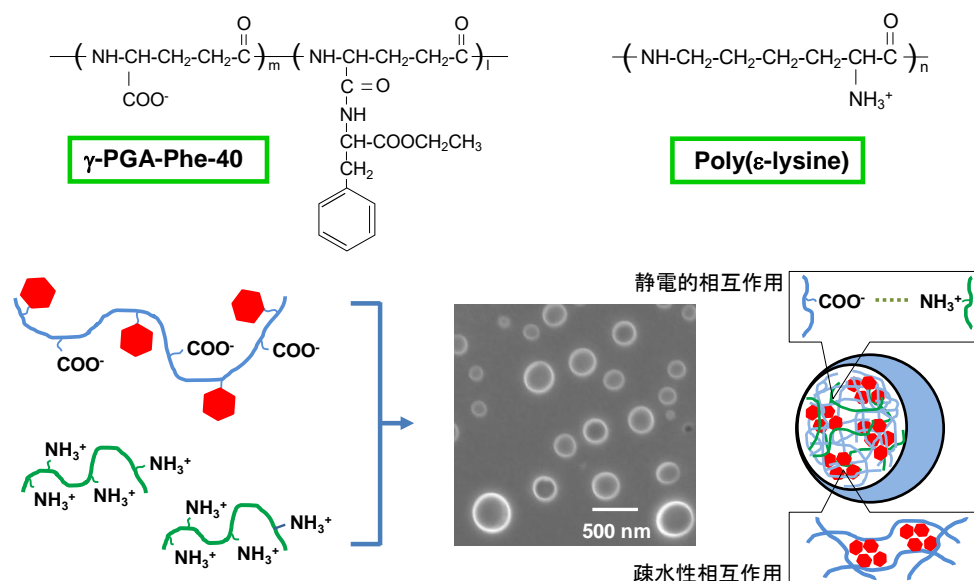


図 10. 疎水化  $\gamma$ -PGA をポリイオンコンプレックナノ粒子の安定化

## 12) 両性電解質高分子からなるナノ粒子の調製

高分子系ナノ粒子は高分子鎖間の静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワース力などの相互作用が会合体形成の駆動力として利用されている。その中でも静電相互作用を利用したポリイオンコンプレックス(PIC)は、一般的に反対電荷を有する 2 種の高分子水溶液を混合することによって会合体の形成が行われている。しかしながら、カチオン性とアニオン性部位を同一高分子鎖内に有する両性電解質高分子を用いたナノ構造体の形成およびそれらの機能に関する報告例はほとんどない。そこで、 $\gamma$ -PGA の側鎖にカチオン性アミノ酸であるアルギニン(Arg)をグラフトさせた両性電解質ポリアミノ酸( $\gamma$ -PGA-Arg)を合成し、ナノ粒子形成および蛋白質キャリアとしての機能を評価した。

Arg および縮合剤の仕込み量を変化させることで、Arg 導入率 41%, 56%, 83% のポリマーが得られた。各種ポリマーの分散液を動的光散乱(DLS)によるサイズを測定した結果、導入率が 41%, 56%, 83% のポリマーにおいて、それぞれ 500 nm, 147 nm, 356 nm のナノ粒子形成が確認できた(図 11)。この結果より  $\gamma$ -PGA-Arg

ポリマーは  $\gamma$ -PGA 側鎖に残存しているカルボキシル基と Arg のグアニジニウム基の分子内および分子間の架橋により両性電解質のナノ粒子が形成されたとことが示唆され、さらに Arg 導入率によりナノ粒子のサイズが制御可能であった。また、粒子の Zeta 電位を測定したところ、粒子表面電荷は Arg 導入率に依存しており、Arg 導入率 56, 83% のナノ粒子表面はカチオン性を示し、導入率 41% ではアニオン性であった。次に、得ら

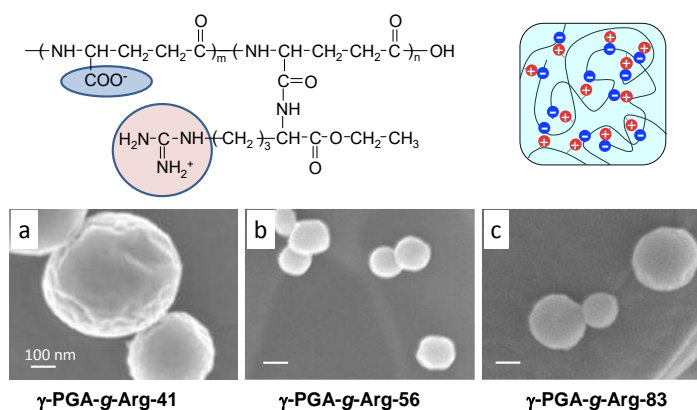


図 11. 両親媒性高分子( $\gamma$ -PGA-Arg)からなるナノ粒子の調製

れた両性電解質ナノ粒子の蛋白質キャリアの機能として、卵白アルブミン(OVA)の吸着挙動を評価した結果、Arg 導入率に依存した OVA 吸着挙動を示した。また、 $\gamma$ -PGA-Arg ナノ粒子、アニオンおよびカチオン性の両方の蛋白質、核酸等を担持することが可能であり、両性電解質ポリアミノ酸からなるナノ粒子はタンパク質のナノキャリアとしての応用が期待できると考えられる。

### 13) ポリ乳酸ステレオコンプレックス形成を駆動力としたナノ粒子の調製

ナノ粒子を蛋白質・ペプチド(ワクチン抗原)の徐放、細胞内デリバリーおよび体内での動態を制御するためのキャリアとして用いるためには、1) 生分解性および生体適合性、2) 粒子の生理環境下での安定性、3) 薬物固定化のための反応性官能基(COOH, NH<sub>2</sub>)の保持、4) 免疫細胞の取込みに適した粒径、5) 加水分解・酵素分解挙動の制御などが挙げられる。しかしこれらの条件を満たすナノ粒子は未だ報告されていない。 $\gamma$ -PGA-Phe ナノ粒子においても、粒子表面への薬物固定化率の向上や生分解性のコントロールによるさらなる機能化が期待される。

そこで、 $\gamma$ -PGA の側鎖にポリ(L-乳酸)(PLLA)およびポリ(D-乳酸)(PDLA)をグラフトした新規  $\gamma$ -PGA-g-PLLA および  $\gamma$ -PGA-g-PDLA 共重合を合成し、光学異性体である PLLA と PDLA からなるステレオコンプレックス(SC)形成を駆動力としたナノ粒子の調製を行った(図 12)。 $\gamma$ -PGA-g-PLLA と  $\gamma$ -PGA-g-PDLA の等モル混合した溶液から調製されたナノ粒子は、X 線回折測定により、粒子コア部に SC が形成されていることが確認された。ポリ乳酸の分解性は結晶化度や SC 形成率により異なることが知られており、また SC を粒子形成の駆動力に利用することで、ナノ粒子の動的・熱力学的安定性を向上できる。さらに、低分子の疎水性基の導入による両親媒構造制御に比べて、ポリ乳酸の場合では、より少ない導入率で粒子形成が可能であることから、本ナノ粒子は、上記条件を満たした応用性の高い薬物キャリアとしての利用が期待される。

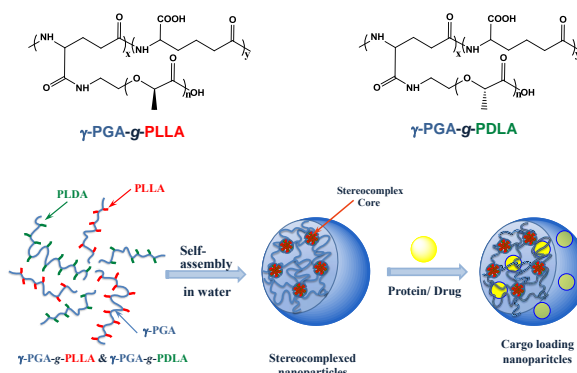


図 12. PLA SC 形成を利用したナノ粒子の調製

### 14) イオン液体を用いた粒子の細胞内取込み挙動の観察(阪大院工 桑畑教授との共同研究)

イオン液体(常温溶融塩)は、蒸気圧 0、高導電性の性質から、電子顕微鏡を用いた液中での生体試料観察に利用されている。そこで、細胞によるナノ粒子の取込み過程をイオン液体を用いて観察した。シリカ粒子(900 nm)をマクロファージに取り込ませ、細胞をホルマリンで固定化した。その後、0.5 vol%に希釈したイオン液体(EMI-BF<sub>4</sub>)に浸漬し、走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。イオン液体法では、従来のアルコール置換と比較して、細胞の変形が少なく、粒子の取り込み過程を直接かつ詳細に観察することができた。また、SEM 観察時の加速電圧を上げることで細胞の透過性が上がり、細胞内部に取り込まれた粒子を観察することができた(図 13)。これにより、細胞内での粒子の分解性や細胞内局在の観察に応用できると期待される。

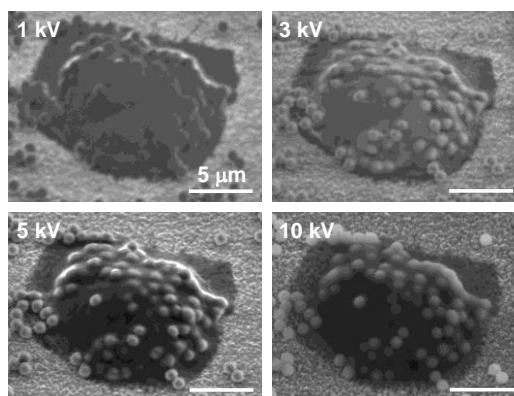


図 13. イオン液体を用いたシリカ粒子取り込み挙動の SEM 観察。イオン液体法を用いることで、脱水に伴う細胞変形を抑制することができ、粒子の取り込み過程を詳細に観察することができた。また、SEM 観察時の加速電圧(1~10 kV)の違いにより、細胞の透過性の違いが観察された。

次に  $\gamma$ -PGA-Phe からなるマイクロ中空粒子 (5  $\mu\text{m}$ ) のマクロファージ (RAW264) による取込み挙動を観察した。細胞にマイクロ粒子を与えて所定時間後、ホルマリンで固定化し、1% choline lactate の溶液に 15 秒間浸漬し、直接 SEM 観察を行った。通常のアルコール置換による脱水処理では、細胞や粒子の変性・凝集が起こり、詳細な粒子取込み挙動を観察することができなかった。一方、イオン液体を用いた方法では、細胞や粒子表面にイオン液体がコートされることで導電処理が行われ、また脱水処理なしに細胞を観察することができた。マイクロ粒子の細胞取込み過程を継時的に観察した結果、取込み初期において、粒子を取り囲むような偽足が観察され、時間経過とともに粒子全体が細胞膜で覆われ、細胞内に取り込まれる像が確認された (図 14)。イオン液体法を用いることで偽足のような細胞の微細構造を観察することが可能であった。本手法を用いることで、形状の異なるナノマイクロ構造体と細胞との相互作用をより詳細に観察可能であると期待される。疎水化  $\gamma$ -PGA は様々なナノマイクロ構造体を形成可能であることから形状と機能に関する評価および新たな材料設計指針の構築に有用であると考えられる。

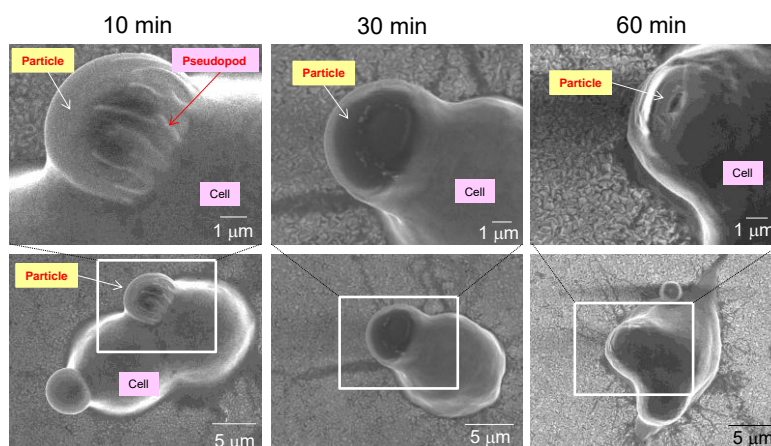


図 14. マクロファージによる疎水化  $\gamma$ -PGA マイクロ粒子取込みの経時観察の SEM 像。粒子取込み 10, 30, 60 分後にホルマリンで固定化し、イオン液体処理後、減圧乾燥処理してサンプルを調整した。

15) 粘膜免疫によるナノ粒子インフルエンザワクチンの有効性 ((独) 医薬基盤研究所 森先生、山西先生との共同研究)

これまでに、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子とインフルエンザ HA 抗原を混合 (HA + NPs) して皮下投与することで、ナノ粒子のアジュバント活性による高い免疫誘導効果と感染防御効果が示されている。しかしながら、免疫した HA 抗原と異なるサブタイプのインフルエンザウイルスに対する感染防御効果 (交差性) は認められなかった。そこで、ナノ粒子ワクチンの粘膜 (経鼻) 免疫による免疫誘導および交差感染防御効果について検討した。その結果、HA + NPs を経鼻免疫した群では、皮下免疫ではみられなかった鼻腔および肺洗浄液中に HA 特異的な IgA 抗体が検出され、中和活性も認められた。また、サブタイプの異なるウイルスチャレンジに対しても感染防御効果が認められ、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子が優れた粘膜アジュバントとして機能することが明らかとなった。また、HA + NPs による交差感染防御効果は、インフルエンザ不活化全粒子ワクチンの経鼻免疫と同等の効果であった。

16) ナノ粒子アジュバントを用いた日本脳炎ワクチンの開発 ((独) 医薬基盤研)

現行の日本脳炎 (JE) ワクチン (JEV) の問題点は、複数回の基礎免疫、さらに追加免疫を要することは不便かつ不快であり、JE の突然の大流行や JE 感染のリスクが高い地域への急な旅行のような緊急の状況で短期間で JE 予防を殆ど与えないことである。それゆえ、JE に対する有効な 1 回接種用ワクチンの開発が非常に必要とされている。そこで、既存の JEV、或いは日本脳炎ウイルスを使用せずに製造可能でワクチン効果を有する日本脳炎中空粒子 (JE-VPL) を用いて、ナノ粒子アジュバント併用による 1 回接種用ワクチンの評価を行った。JEV および JE-VPL にアジュバントとして疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を加えることにより、1 回接種で十分な感染防御免疫を誘導することが可能であり、ナノ粒子アジュバントの日本脳炎ワクチンに対する有用性を明らかにした。



17) ステロイド含有ナノ粒子を用いた網膜疾患に対する薬剤投与法の開発(東北大学大学院医学系研究科 中澤先生との共同研究)

抗炎症作用を持つデキサメタゾン(DEX)を含有した疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子を調製し、炎症性眼疾患に対する眼内 DDS の検討を行った。疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子に DEX を添加することで、粒子内部の疎水性ドメインとの相互作用により、DEX 吸着ナノ粒子(DEX-NPs)を調製することができた(DEX 50  $\mu$ g/ NP 1 mg)。ナノ粒子(粒径 200 nm)は、初代培養したマイクログリアやマクロファージに効率よく取込まれ(図 15)、DEX-NPs を作用させることで *in vitro* において、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、MCP1)の産生が抑制された。また、マウス NMDA モデル(網膜神経興奮毒性モデル)および網膜剥離モデルにおいて、DEX-NPs 投与による神経保護効果および視細胞保護効果を認め、網膜神経細胞の細胞死を効果的に抑制することができた。DEX-NPs がマクロファージ、マイクログリアへ選択的に取り込まれる特性を利用することで、薬剤をターゲットとする細胞のみに運搬し、副作用を抑えた新しい眼内薬剤投与法の開発が期待される。

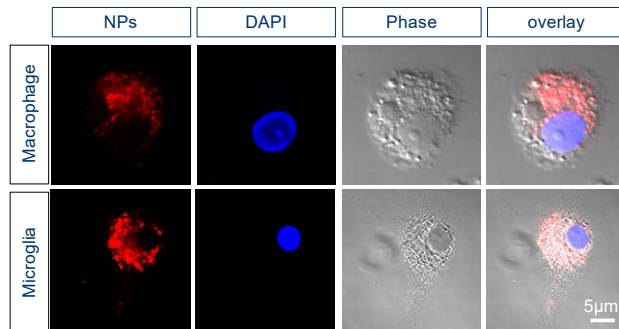


図 15. マクロファージ、マイクログリア細胞によるナノ粒子の取込み。赤が粒子、青が細胞核を示す。

18) ナノ粒子で活性化された樹状細胞のマイクロアレイ遺伝子発現解析(スウェーデン ルンド大学 Prof. Borrebaeck との共同研究)

ヒト全血や鼻腔組織より単離した樹状細胞を用いて、疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の遺伝子発現に与える効果を解析した。疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子を樹状細胞に添加することで、免疫系に関連するケモカインやサイトカイン関連の遺伝子発現の増強が認められ、粒子サイズや細胞種による遺伝子発現の違いも観察された。また、Ingenuity Pathways Analysis により、それら遺伝子発現のネットワークパスウェイを解析し、ナノ粒子による樹状細胞活性化のシグナル伝達系を明らかにすることができた。

19) ナノ粒子を用いたアレルギー性疾患に対する免疫療法の開発(スウェーデン ルンド大学)

花粉症患者の血液より樹状細胞および T 細胞を単離し、Phl p5 アレルゲン担持ナノ粒子で刺激した樹状細胞(DC)と T 細胞を共培養し、T 細胞増殖活性およびサイトカイン産生を検討した。花粉症患者の樹状細胞に対してもナノ粒子による DC 活性化(CD80, 86, HLA-DR 発現増加)が確認された。一方、Phl p5 刺激では DC 活性化は認められなかった。ナノ粒子刺激 DC と T 細胞の共培養の結果、ナノ粒子のみの刺激では T 細胞の増殖は確認されず、Phl p5 コンジュゲートナノ粒子群で高い T 細胞増殖活性を示した(図 16)。細胞内サイトカイン検出においては、Phl p5 コンジュゲートナノ粒子群で IL-4, 10, 13 などの Th2 タイプのサイトカイン産生の増加が認められ、ナノ粒子がアレルゲンデリバリーシステムとして機能し、アレルゲン特異的 T 細胞の活性化を誘導できることが明らかとなった。

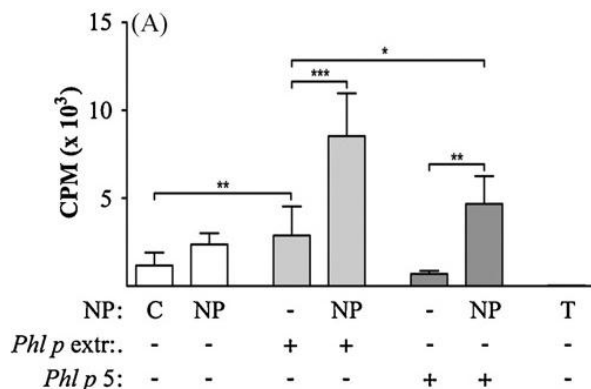


図 16. Phl p5 (grass pollen allergen) 内包ナノ粒子によるアレルゲン特異的 T 細胞の増殖活性。[横軸] C: 未刺激 DC, NP: ナノ粒子刺激 DC, T: T 細胞のみ, Phlp (+)(-): アレルゲン有無。[縦軸] T 細胞増殖活性, [<sup>3</sup>H]チミジンの取り込み(counts per minutes: cpm)

20) 抗体コンジュゲートナノ粒子による B 細胞活性化(スウェーデン ルンド大学)

抗 CD40 抗体をコンジュゲートした疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を調製し、ヒト PBMC より分離した B 細胞に添加後の細胞増殖活性を評価した。抗体コンジュゲートナノ粒子では、フリーの抗 CD40 抗体と比較して、B 細胞表面の CD40 のクラスター化を促進し、2~3 倍程度の細胞増殖活性を示した(図 17)。この作用は、他の生分解性ナノ粒子では認められず、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子に特異的な作用であった。これらの作用はアレルギーや癌疾患に対する抗体医薬療法への展開が期待される。

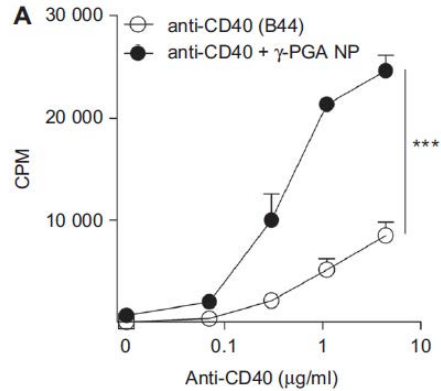


図 17. 抗 CD40 抗体コンジュゲートナノ粒子による B 細胞増殖刺激活性

21) ナノ粒子の体内動態イメージング

抗原を内包した疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子が、臨床応用されているアジュバントと比較して、強いワクチン効果が誘導されることを明らかにしているが、ナノ粒子および内包抗原の体内動態はこれまで明らかにされていない。そこで、ナノ粒子およびモデル抗原(OVA)に蛍光および放射同位体を修飾し、皮下投与後の動態・排出を蛍光イメージャーおよび種々の臓器の放射能強度定量により評価した。

まず、ナノ粒子を Alexa 633 (NPs-633)、OVA を Alexa 750 (OVA-750) で蛍光ラベル化し、それぞれラベル化されたサンプルを用いて OVA 内包ナノ粒子を調製した。得られたサンプルをマウス皮下に投与し、体内動態の変化(皮下局所での局在性)を蛍光イメージャーで観察した。結果、ナノ粒子は約 1 ヶ月、内包 OVA は約 2 週間で投与部から消失した。また、内包 OVA の局在性を臨床で用いられている Alum アジュバントと比較した結果、OVA のみを投与した場合は、2 日後に投与部位から検出されなくなったのに対して、Alum と OVA の混合液(Alum + OVA-750)では 1 ヶ月後でも約 20% の OVA が皮下に局在していた(図 18)。OVA 内包ナノ粒子(NPs/OVA-750)の場合、内包 OVA の局在は約 2 週間程度に対して、Alum アジュバントではより長期的なデポ効果が確認された。実際の免疫誘導効果では Alum よりもナノ粒子の方が高い効果が認められていることから、一般的に考えられている抗原の局在性が免疫誘導効果を支配しているのではなく、ナノ粒子が有する抗原デリバリーや細胞活性化能が免疫誘導に大きな働きをしていることが示唆された。

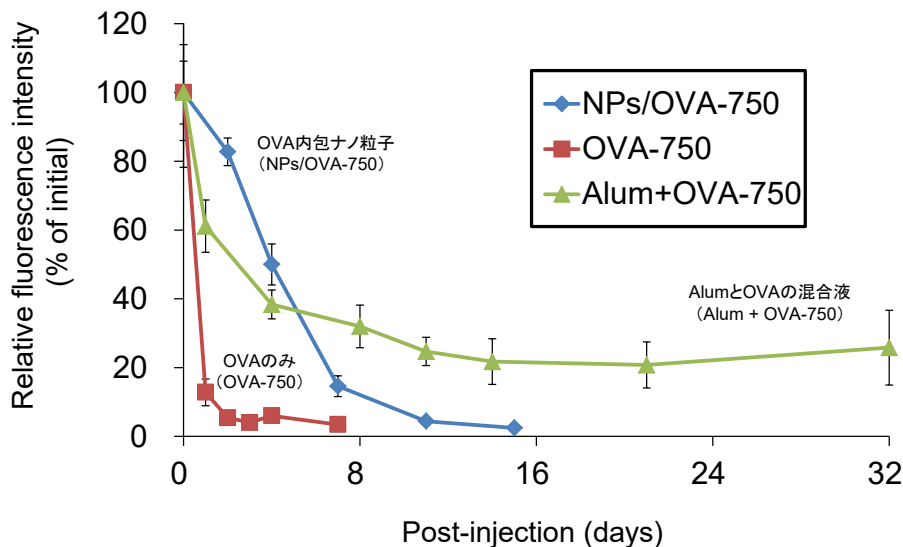


図 18. マウス皮下投与後の抗原局在性の比較。OVA-750 の皮下での局在性を蛍光イメージャーを用いて継続的に観察した。

次に  $^{125}\text{I}$  でラベル化したナノ粒子を調製し、マウス皮下投与後の動態を体内放射能分布により評価した。結果、皮下投与されたナノ粒子は各種臓器への特異的な蓄積は認められず、11日後には排泄物(糞尿)から投与量の約 75%が検出された(図 19)。これまでに本ナノ粒子がマウスやラットでの毒性試験において高い安全性が確認されており、粒子の体内動態・排泄の解析結果は、粒子の安全性を裏付ける結果となった。

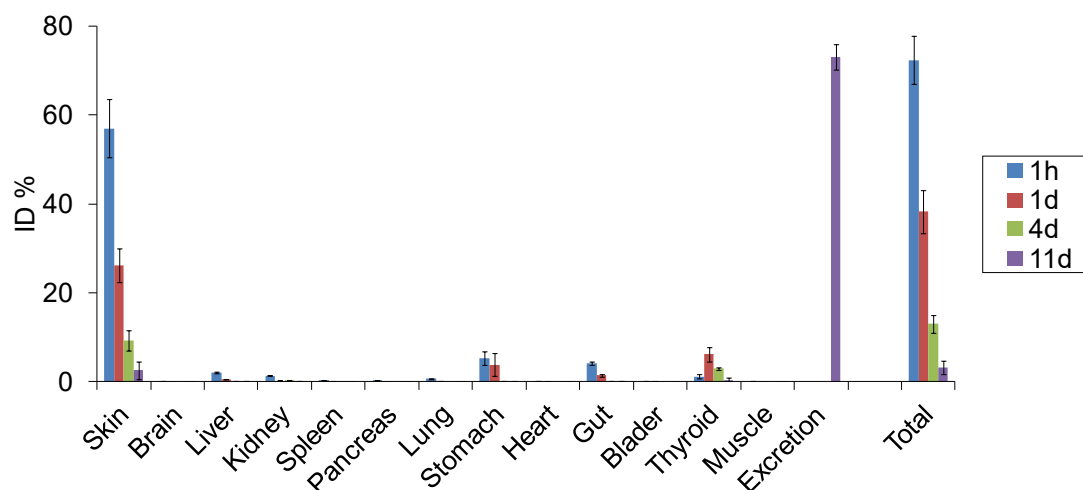


図 19.  $^{125}\text{I}$  ラベル化ナノ粒子を用いた体内動態・排泄の評価。RIラベルナノ粒子をマウス皮下に投与し、所定日数後(1 時間、1, 4, 11 日後)に各種臓器を採取し、放射線量を測定した。値(ID%)は、投与した放射線量(粒子量)を 100 として、各臓器に残存している量(%)を示している。Excretion(排泄物)は 11 日後のみ測定し、Total は所定日数後の各臓器で得られた値の総和(体内残存の総量)を意味する。

## (2)研究成果の今後期待される展開

高分子系ナノマイクロ構造体の調製には、高分子鎖の分子間および分子内での相互作用による自発的会合が構造体形成の駆動力として利用されている。そこで利用される相互作用としては、静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワースル力などがあげられる。中でも、両親媒性高分子は水溶液中において疎水性部の会合と親水性部の水への微視的な溶解に伴うマイクロ相分離によって様々な構造体を形成することが知られている。我々は、高分子間の相互作用を活用し、その会合体形成を制御することで新たな機能発現を導き、優れた高分子機能材料の開発、ドラッグ・ワクチンデリバリーシステム(DDS/VDS)への応用を基本コンセプトに研究を展開している。そこでこれまでに、親水性のポリアミノ酸であるポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)( $\gamma$ -PGA)の側鎖カルボキシル基を疎水性アミノ酸で修飾した両親媒性グラフト共重合体を合成し、その会合体形成挙動と薬物(ワクチン)担体として機能の評価してきた。中でも粒径 200 nm の疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子はワクチンアジュバントとして優れた機能を有しており、実用化のための研究開発も着実に進行しているが、このマテリアルの特徴を効果的に引き出し、DDS としての多様化を図るために、疎水化  $\gamma$ -PGA の会合制御に基づく新たな材料設計と構造制御、得られたナノマイクロ構造体と細胞間との相互作用の評価が重要であると考えられる。この疎水化  $\gamma$ -PGA は、疎水性アミノ酸の種類・導入率(疎水化度)や会合体調製時の条件(溶媒、濃度、温度等)により、高分子鎖の会合数、粒子サイズ、形状を巧みに制御することが可能であり、さらには 1 本の高分子鎖からなるユニマーナノ粒子の調製にも成功している。特に粒径制御されたナノ粒子は、そのサイズに応じた細胞内動態、細胞活性化挙動を示すことを見出した。高分子ナノ粒子ワクチンは、抗原提示細胞による抗原の取込み

促進、表面修飾によるナノ粒子の細胞特異的ターゲティング、抗原の細胞内分解・動態制御、粒子および併用アジュバントによる免疫細胞の賦活化、ナノ粒子の体内動態制御(リンパ節移行性等)、免疫応答制御(液性・細胞性免疫のバランス)を可能とするデバイスとして有用であると考えられ、工学的観点からの高安全性、高活性なナノ粒子アジュバントの開発は、次世代ワクチンの有望なツールになると期待される。

ウイルスや細菌などの感染症に対する予防と治療には、免疫系の人為的な制御に基づくワクチン療法が有用である。また、感染症以外にもがんや自己免疫疾患などに対するワクチンの研究開発が盛んに行われている。近年、遺伝子・蛋白質工学の進歩により、蛋白質、ペプチド、DNA等の様々な抗原が同定・設計されており、次世代ワクチンとしての利用が期待されている。しかしながら、これらのコンポーネントワクチンは抗原単独で用いた場合、免疫誘導効果が弱いといった問題が生じる場合が多く、免疫効果を高めるためにアジュバントとの併用が求められる。日本で臨床応用されているワクチンアジュバントは Alum(水酸化アルミニウム)のみであり、昨今の新型インフルエンザが流行した際の海外輸入ワクチンには、日本で未認可のアジュバントが含まれており、安全性の問題も含め社会的に大きく取り上げられた。現在、共同研究者として参画している、スーパー特区“次世代・感染症ワクチン・イノベーションプロジェクト”(代表者:山西弘一、医薬基盤研究所 理事長)においても、日本発世界初のワクチンアジュバント開発が大きくクローズアップされている。近年、大手製薬会社もワクチン開発に乗り出すところが増えており、臨床応用可能な Alum では十分な免疫誘導効果が得られないことから、安全かつ効果の高いアジュバントの技術シーズの有効利用が強く求められている。我々の開発したナノ粒子アジュバントのがんワクチンとしての臨床応用を達成することで、新たなアジュバントシーズを提供することが可能となり、がん以外にも様々な免疫疾患(感染症、自己免疫疾患等)にも応用できるものと確信しており、大きな社会的インパクトをもつと予想される。

がんワクチンは、がん細胞に対する特異的な免疫応答を誘導することで、宿主のもつ免疫力によってがんを治療および予防する免疫療法である。このがん免疫療法は腫瘍関連抗原の同定・解析の進展によって飛躍的な進歩をとげ、次世代のがん治療法として多くの期待が寄せられているが、期待通りの治療効果が得られない事例も多い。これは腫瘍関連抗原の多くは抗原性が低く、また抗原性を高めるための有効かつ安全なアジュバントがないことに起因している。これまでに様々なワクチンアジュバント候補となるシーズは研究開発されているが、これら候補物質が臨床開発、実用化まで進んだ例はほとんどない。これはワクチン開発が一般医薬品と異なり、開発後の市場予測、収益性の見通しの不確定要素が多いことにも起因している。本研究課題の成果をもとに、がんワクチンのトランスレーショナルリサーチを実施し、ナノ粒子アジュバントの安全性、有効性が証明できれば、癌疾患に対する新たな治療法の開発のみに留まらず、新たなワクチン産業の創出に波及するものと期待される。

これまでの CREST 研究で開発された基盤技術をもとに、大阪大学に「ナノ粒子アジュバント(武田薬品工業)共同研究講座」が設置された。本講座では、ナノ粒子アジュバントのシーズを活用し、武田薬品が有するワクチン抗原、研究開発基盤、製剤化技術、品質管理等のノウハウを融合させることで、臨床展開に向けたナノ粒子ワクチンの製造技術の確立、有効性・安全性評価を実施する。また、ナノ粒子のアジュバントとしての特性に関する技術研究をさらに進め、次世代アジュバントの実用化・産業化に向けた研究を推進していく。本研究の推進により、ワクチンアジュバント材料の新たな設計指針を提供できると共に、普遍的なアジュバントの創製と新たなワクチン開発の促進に繋がるものと期待される。

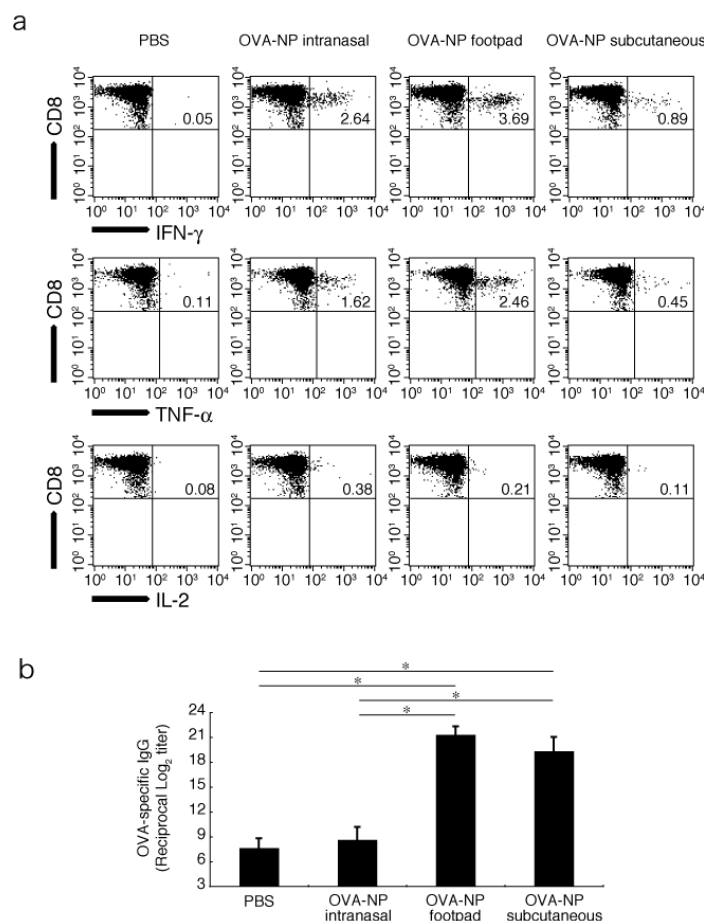
## 4.2 ナノ粒子ワクチンによる免疫応答と制御機構の解析(鹿児島大学 馬場グループ)

### (1)研究実施内容及び成果

#### 2-1)ナノ粒子ワクチンの投与経路、投与量の検討

$\gamma$ -PGA ナノ粒子による獲得免疫の誘導を詳しく解析することを目的として、抗原内包型  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の投与経路(経鼻, Footpad, 皮下)と投与量について調べることで、最も効果的な投与方法を検討した。その結果、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は Freund の完全アジュバントのような接種部位に対する炎

症反応をほとんど惹起しないこと、また、抗原特異的な免疫を最も強く誘導できるような、最適投与量が存在することが分かった。さらに、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンの接種ルートにより、優勢的に誘導される免疫応答の種類が異なることが明らかとなった。すなわち、抗原を保持している  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を皮下免疫すると、抗原特異的液性免疫および細胞性免疫の両方が誘導されるのに対して、経鼻免疫すると強い細胞性免疫だけが誘導されることが分かった。



**図 1. OVA 内包  $\gamma$ -PGA ナノ粒子 (OVA-NP) の投与経路の違いによる獲得免疫の誘導.** マウスの経鼻, footpad, もしくは皮下に OVA-NP を投与し, 脾臓細胞中の抗原特異的 CD8 細胞を細胞内サイトカイン染色により測定した。抗原特異的な抗体産生は ELISA により測定した。

## 2-2) 樹状細胞によるナノ粒子の貪食作用解析

これまでの研究において、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は *in vitro* および *in vivo* において、抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージに効率よく取り込まれることが分かっている。さらに、抗原を内包している  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は抗原単独での取り込みに比べ飛躍的に樹状細胞に貪食されることも明らかになっている。そこで本研究では、アジュバントによる抗原の取り込みの比較を目的として、水酸化アルミニウムと抗原を混合している状態、水酸化アルミニウムと MPL と抗原を混合している状態、もしくは抗原をナノ粒子に内包している状態での樹状細胞による取り込みを測定した。その結果、抗原と水酸化アルミニウムを混合した状態と比べて、ナノ粒子に抗原を内包している状態では、多くの抗原が樹状細胞の細胞内に取り込まれている像が共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察された。一方、抗原単独では樹状細胞による抗原の取り込みはほとんど観察されなかった。さらに、抗原と水酸化アルミニウムに MPL (3-*O*-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A) を加えて貪食の比較実験を行ったところ、抗原と水酸化アルミニウムを混合した状態に比べ、樹状細胞による抗原の取り込みは高くなったものの、ナノ粒子を用いた方が優位に高い値を示した。これらの結果から、樹状細胞



による抗原の取り込みは既存のアジュバントよりもナノ粒子を用いた方が有効であることが判明した。

次に、各種の貪食阻害剤を用いてナノ粒子の樹状細胞による取り込みの抑制について調べた。その結果、cytochalasin D が低濃度より効果を示し、エンドサイトーシスが抗原の取り込みに強く関与していると示唆された。また、ピノサイトーシスインヒビターである DMA も効果を示したことから、樹状細胞によるナノ粒子の貪食にはエンドサイトーシスとピノサイトーシスの両方が関与していることが示唆された。

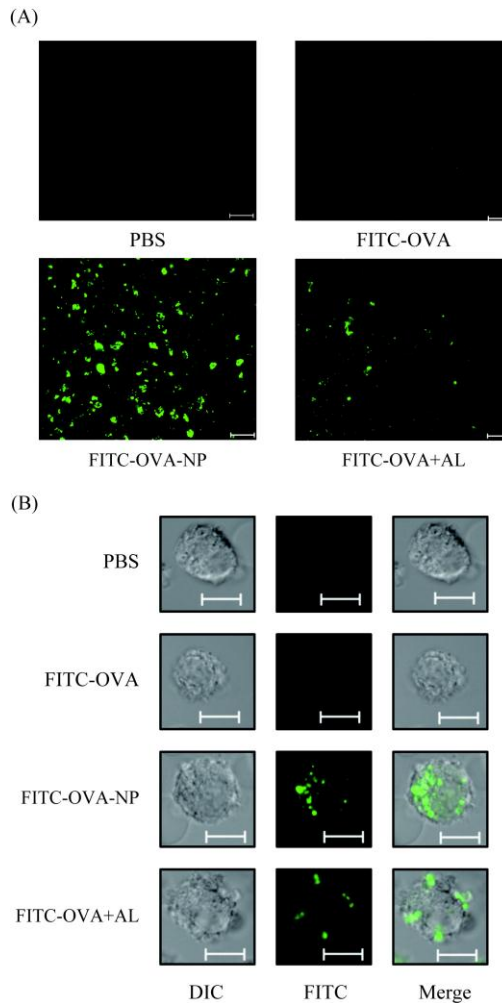


図2. 抗原の状態による樹状細胞による抗原の取り込み比較. 骨髄由来の樹状細胞に PBS, FITC-OVA, FITC-OVA 内包ナノ粒子, FITC-OVA と水酸化アルミニウムの混合したものを1時間取り込ませ、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。(A) FITC 蛍光の全体像, (B) 各細胞。

### 2-3) $\gamma$ -PGA ナノ粒子のアジュバント効果の比較検討

抗原内包型  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は、抗原担体の投与、もしくは実験用アジュバントである IFA (incomplete Freund's adjuvant) や結核死菌を含ませた CFA (complete Freund's adjuvant) と抗原の混合投与よりも優れた細胞性免疫を誘導することをこれまでに明らかにしてきた。一方、現在臨床で使用されているアジュバントとして、水酸化アルミニウムや水酸化アルミニウムに MPL を混合させたものなどが使用されている。そこで、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子のアジュバント効果をさらに詳しく比較検討するために、抗原内包型  $\gamma$ -PGA ナノ粒子、水酸化アルミニウムと抗原の混合、水酸化アルミニウムと MPL に抗原を混合、MPL と抗原の混合の各種免疫群を用いて比較実験を行った。その結果、

抗原内包型  $\gamma$ -PGA ナノ粒子では、他のアジュバント群と比較して有意に高い細胞性免疫を誘導した。この結果から、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は MPL や水酸化アルミニウムを用いたアジュバントよりも優れた細胞性免疫誘導能があることが分かった。

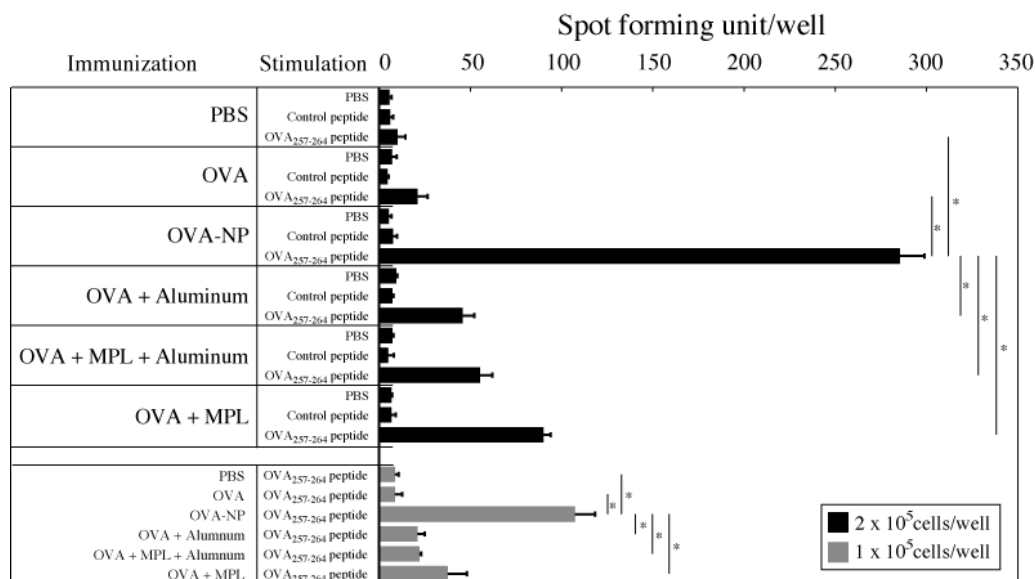


図3. 抗原(OVA)内包型  $\gamma$ -PGA ナノ粒子による細胞性免疫誘導の解析(1). マウスを、PBS, OVA, OVA-NP, OVA + 水酸化アルミニウム, OVA + MPL + 水酸化アルミニウム, もしくは OVA + MPL を皮下経路で1回免疫し、10 日目に脾細胞を回収した。得られた脾細胞を用いて抗原特異的細胞性免疫を IFN- $\gamma$  ELISPOT assay を用いて解析した。

#### 2-4) $\gamma$ -PGA ナノ粒子による免疫誘導メカニズムの解析 (in vitro, MyD88)

$\gamma$ -PGA ナノ粒子の抗原提示細胞への活性化の分子機構を詳しく解析するために、自然免疫に関するシグナル伝達に欠損を生じているマウスを用いて実験を行った。MyD88 野生型もしくは MyD88 ノックアウト(KO) マウスより、マクロファージもしくは樹状細胞を採取した。得られた抗原提示細胞に  $\gamma$ -PGA ナノ粒子や他の抗原を作用させ、サイトカインの産生や補助刺激分子の発現を調べた。その結果、MyD88 野生型由来のマクロファージと比較すると、MyD88 KO マウス由来のマクロファージにおいて、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子による炎症性サイトカインの産生誘導が有意に減少していた。また、MyD88 野生型由来の樹状細胞におけるサイトカインの産生や補助刺激分子の発現増加と比較して、MyD88 KO 由来の樹状細胞ではこれらが減少していた。これらの結果から、in vitro において  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は MyD88 シグナル伝達経路を介して、抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞を活性化させていることが示唆された。

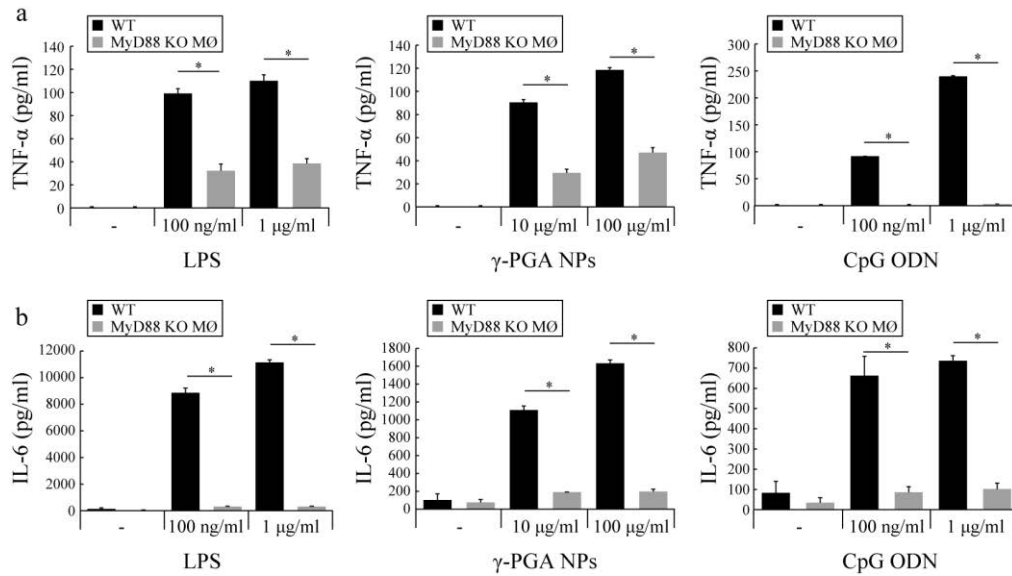


図4.  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の MyD88 野生型もしくは MyD88 KO マクロファージにおけるサイトカイン産生の誘導. マウスマクロファージに LPS,  $\gamma$ -PGA ナノ粒子, もしくは CpG ODN を作用させ, 産生されたサイトカインを ELISA により検出した。

#### 2-5) $\gamma$ -PGA ナノ粒子による免疫誘導メカニズムの解析 (in vivo, MyD88)

$\gamma$ -PGA ナノ粒子投与による獲得免疫誘導のメカニズムを解析するために, MyD88 野生型マウスもしくは MyD88 KO マウスの皮下に OVA-NP を投与し, 10 日後に脾細胞を単離した。得られた脾細胞を用いて細胞性免疫の誘導効果を解析した。その結果, MyD88 野生型マウスと比較して, MyD88 KO マウスでは抗原特異的な細胞性免疫の誘導が有意に減少していた。これらの結果から, in vivo においても  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は MyD88 シグナル伝達経路を介して, 抗原特異的な獲得免疫を誘導していると考えられた。



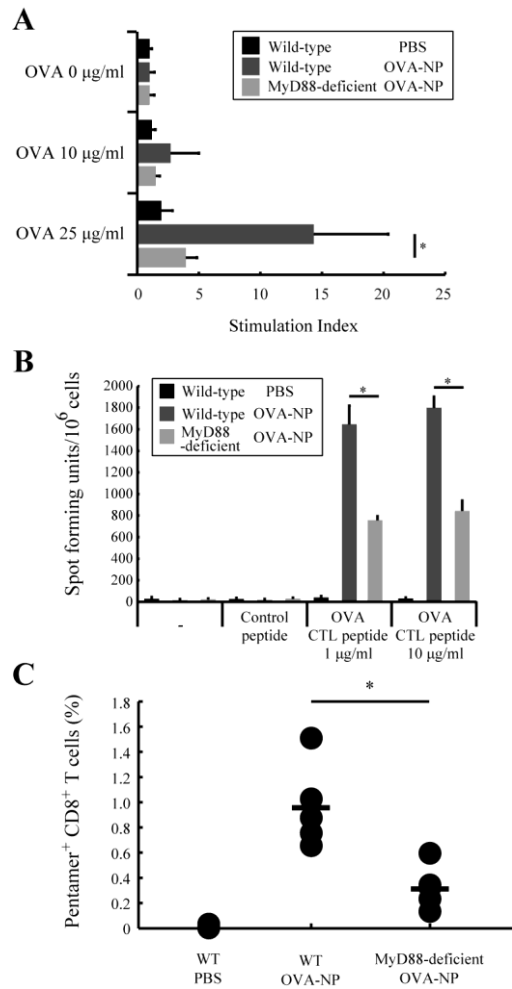


図5. OVA 内包  $\gamma$ -PGA ナノ粒子 (OVA-NP) による MyD88 野生型もしくは MyD88 ノックアウトマウスにおける細胞性免疫の誘導. マウス皮下に OVA-NP を投与し, 脾臓細胞中の抗原特異的細胞を (A) 細胞増殖試験, (B) ELISPOT, (C) テトラマーアッセイにより測定した.

#### 2-6) $\gamma$ -PGA ナノ粒子による免疫誘導メカニズムの解析 (in vitro, TLR4)

$\gamma$ -PGA ナノ粒子は樹状細胞に対し, 細胞内シグナル伝達経路である mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して NF- $\kappa$ B を活性化させることで, 各種遺伝子を発現し, 炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導する. また, 細胞表面の補助刺激分子や MHC Class I, MHC Class II の発現増加も誘導しており, ナノ粒子の刺激により樹状細胞は成熟化することが明らかになっている.

$\gamma$ -PGA 自身は微生物 (細菌) 由来の産物であるため, 自然免疫レセプターである Toll-like receptor (TLR) の関与が示唆される. 細菌由来の成分を認識する代表的な TLR に TLR4 が知られている. そこで, TLR4 が野生型である C3H/HeN マウスもしくは TLR4-deficient マウスである C3H/HeJ マウス由来のマクロファージおよび樹状細胞を用い, ナノ粒子による活性化の実験を行った. その結果, TLR4 野生型でのサイトカイン産生量や補助刺激分子の発現増加に比べ, TLR4-deficient ではそれらのレスポンスは低下していた. また,  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の作用によるシグナル伝達経路の活性化を解析した結果, TLR4-deficient マウス由来の樹状細胞では,  $\gamma$ -PGA ナノ粒子によるそれは著しく低下していた. 以上の結果より  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は TLR4/MAPK 経路を介して樹状細胞を活性化させていることが明らかになった.

これらの結果から, in vitro において  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は TLR4 シグナル伝達経路を介して, 抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞を活性化させていることが示唆された.

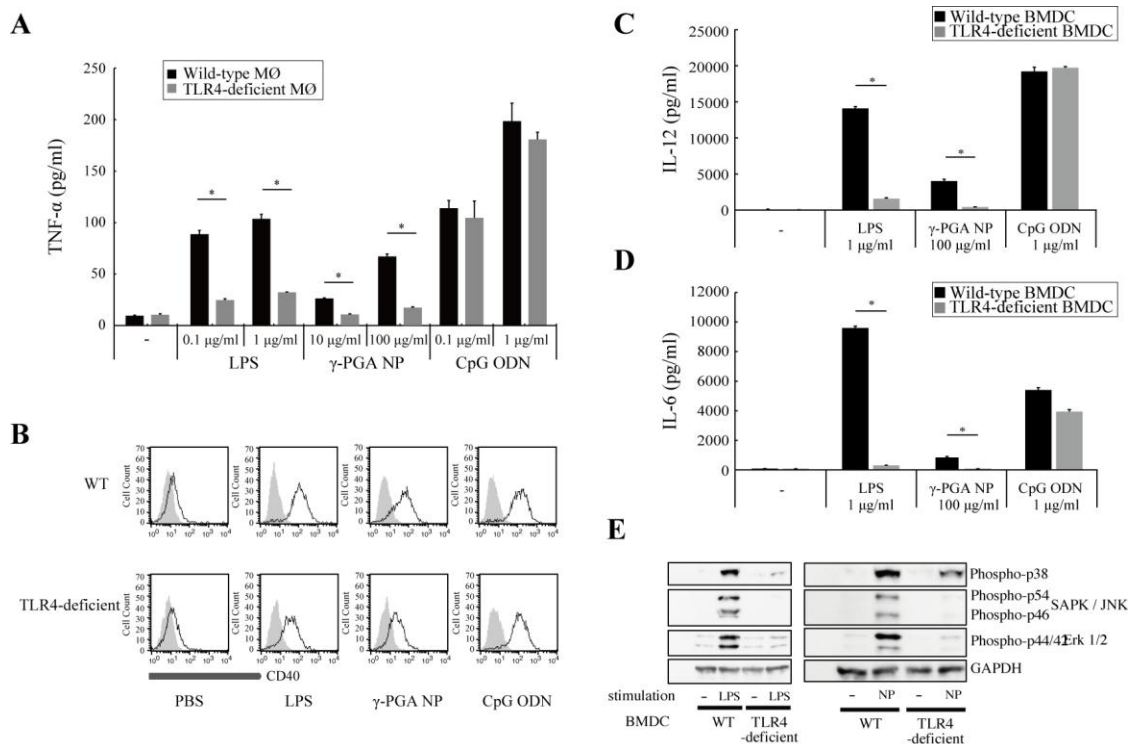


図6.  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の TLR4 野生型もしくは TLR4 KO マウス由来のマクロファージおよび樹状細胞に対する活性化能。PBS, LPS,  $\gamma$ -PGA ナノ粒子, もしくは CpG ODN を作用させ, (A) マクロファージによるサイトカイン産生, (B) 樹状細胞の補助刺激分子の発現, (C, D) 樹状細胞によるサイトカインの産生, (E) 樹状細胞へのシグナル伝達経路の活性化を調べた。

### 2-7) $\gamma$ -PGA ナノ粒子による免疫誘導メカニズムの解析 (in vivo, TLR4)

次に, TLR4 が欠損しているマウス個体を用いて, ナノ粒子投与による生体内での抗原特異的免疫の誘導を測定した。その結果, 野生型のマウスに比べ, TLR4-deficient マウスでは有意に抗原特異的な獲得免疫の誘導が低下していた。この結果より, ナノ粒子による生体内での抗原特異的な免疫応答の誘導においても TLR4 を介したシグナル伝達が重要であることが明らかになった。

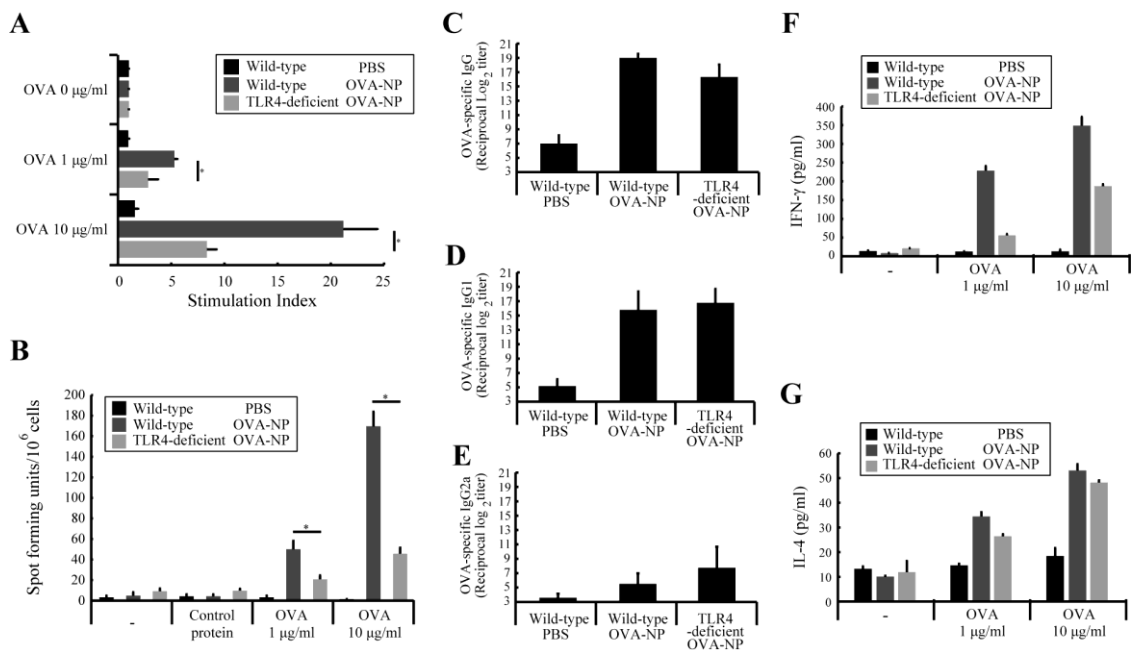


図7. OVA 内包  $\gamma$ -PGA ナノ粒子 (OVA-NP) による TLR4 野生型もしくは TLR4-deficient マウスにおける細胞性免疫の誘導. マウスの皮下に OVA-NP を投与し, 10 日後に血清および, 脾臓細胞を採取した。(A) 細胞増殖試験, (B) IFN- $\gamma$  ELISPOT アッセイ, (C-E) 抗原特異的抗体産生, (F, G) 抗原刺激によるサイトカイン産生を調べた。

### 2-8) エンドトキシン除去試薬の $\gamma$ -PGA ナノ粒子の活性化作用への影響

エンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS) を不活化する試薬のポリミキシン B を用いて  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を前処理し, C57BL/6 マウス由来の骨髄樹状細胞への活性化を調べたところ, 樹状細胞への活性化にはほとんど影響しなかった。一方, LPS をポリミキシン B で前処理して樹状細胞に作用させた実験では, ほぼ完全に LPS 活性が消失していた。この結果は,  $\gamma$ -PGA ナノ粒子中のエンドトキシンの混入を否定した結果に加え, 樹状細胞の活性化が  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の独自の作用によるものであることを示している。また, 粒子を形成していない  $\gamma$ -PGA では樹状細胞の成熟化は引き起こさなかったため,  $\gamma$ -PGA を粒子状にすることが重要であると思われた。

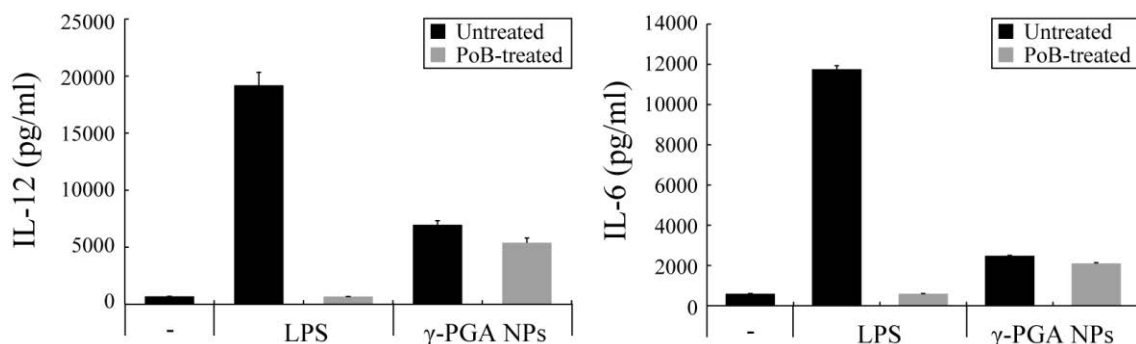


図8. エンドトキシン除去試薬による  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の樹状細胞活性化に対する影響. LPS もしくは  $\gamma$ -PGA ナノ粒子をポリミキシン B で前処理した後, 樹状細胞へ作用させ, 産生されたサイトカインを ELISA により検出した。

## 2-9) $\gamma$ -PGA ナノ粒子投与後の免疫細胞による取込みと動態

抗原を内包している  $\gamma$ -PGA ナノ粒子をマウス個体に投与すると、抗原に対する優れた獲得免疫を誘導することが明らかになっているが、投与後の動態は明らかになっていない。そこで  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の動態を解析するために、蛍光ラベルしたナノ粒子を用いて、投与後の免疫細胞による取込みや細胞内動態について解析した。FITC 標識された  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を皮下に投与し、3 日後に所属リンパ節と脾臓における FITC 陽性細胞をフローサイトメトリーにて検出した結果、FITC 陽性細胞は所属のリンパ節でのみ観察され、脾臓では観察されなかった。また、蛍光色素である FITC のみの投与では、所属リンパ節や脾臓において FITC 陽性細胞は観察されなかった。このことは皮下で抗原を取込んだ細胞が所属のリンパ節に移行していることを示唆し、粒子であることで免疫細胞に取込まれ易くなることを示している。経日的にマウスから所属リンパ節と脾臓を採取し、FITC 陽性細胞を検出した結果、投与後 3 日目をピークに、抗原提示細胞が所属リンパ節に移行していること、さらに 30 日後には FITC 陽性細胞がほとんど観察されなかった。ナノ粒子を取込んでいる細胞についてさらに詳しく調べた結果、樹状細胞のマーカーである CD11c 陽性細胞に効率良く取込まれていることが明らかになった。さらにナノ粒子を取込んでいる樹状細胞では、細胞表面の補助刺激分子やケモカインレセプターが高発現していたことから、これらは成熟化していることも明らかになった。以上の結果より、投与された  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は高い効率で樹状細胞に取込まれ、樹状細胞は所属リンパ節に移行するとともに成熟化し、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子に付随している抗原を分解・提示することで獲得免疫を誘導していると考えられた。

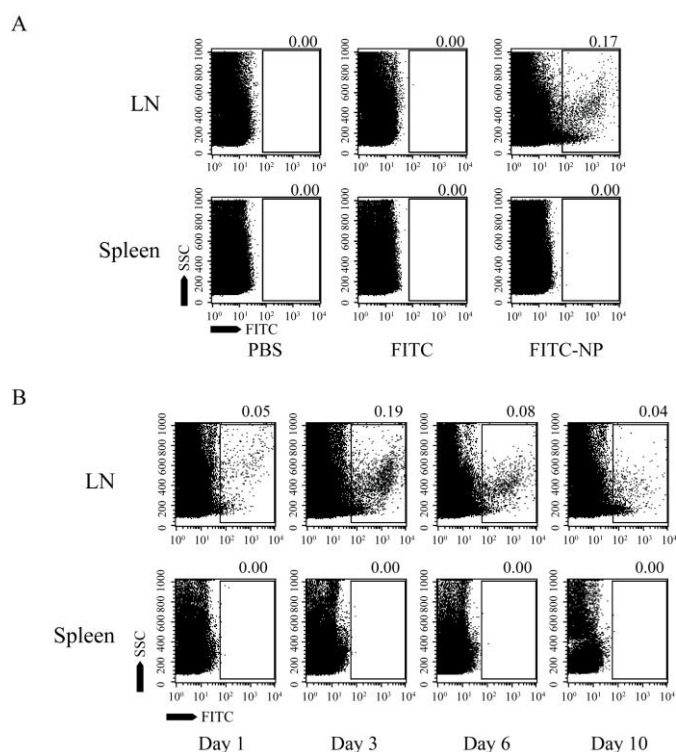


図9. FITC 標識  $\gamma$ -PGA ナノ粒子 (FITC-NP) を取込んだ細胞のリンパ節への移行. (A) マウスの皮下に PBS, FITC, FITC-NP を投与し、所属リンパ節および脾臓中の FITC 陽性細胞をフローサイトメーターにより測定した。(B) マウス皮下に FITC-NP を投与し経日的に所属リンパ節および脾臓中の FITC 陽性細胞を測定した。

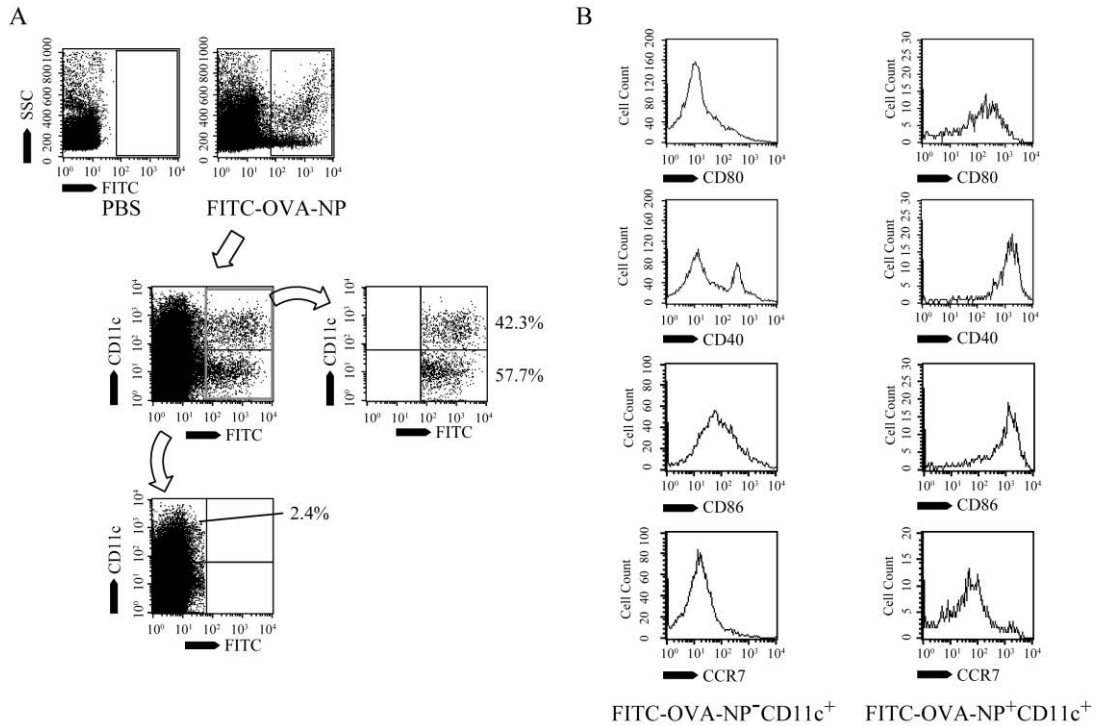
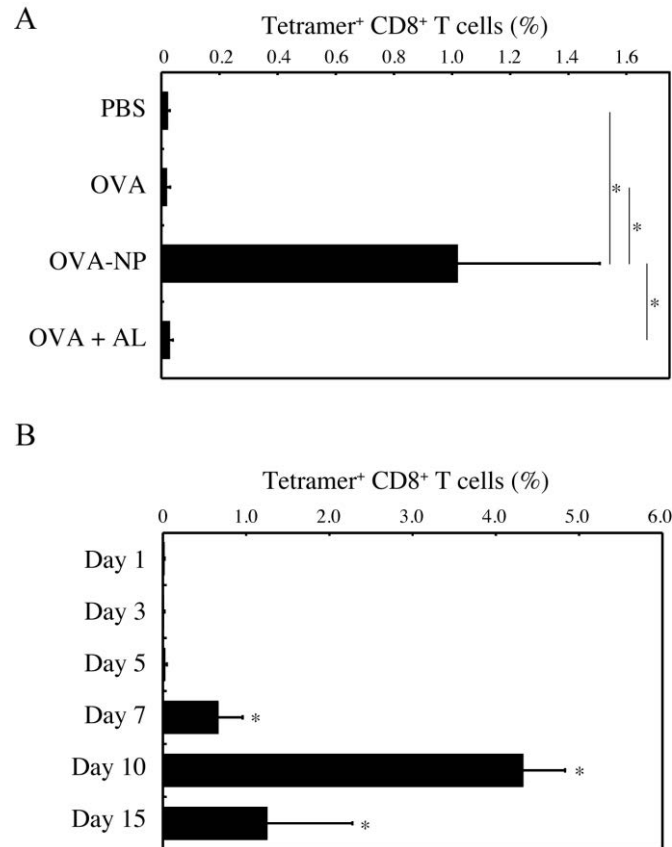


図10. FITC 標識  $\gamma$ -PGA ナノ粒子(FITC-NP)を取込んだ樹状細胞のリンパ節への移行. マウス皮下に FITC-NP を投与し, 所属リンパ節中の FITC 陽性細胞, 樹状細胞マーカー(CD11c), 補助刺激分(CD80, CD86), ケモカインレセプター(CCR7)をフローサイトメーターにより測定した。

#### 2-10) ナノ粒子を用いた獲得免疫誘導の解析

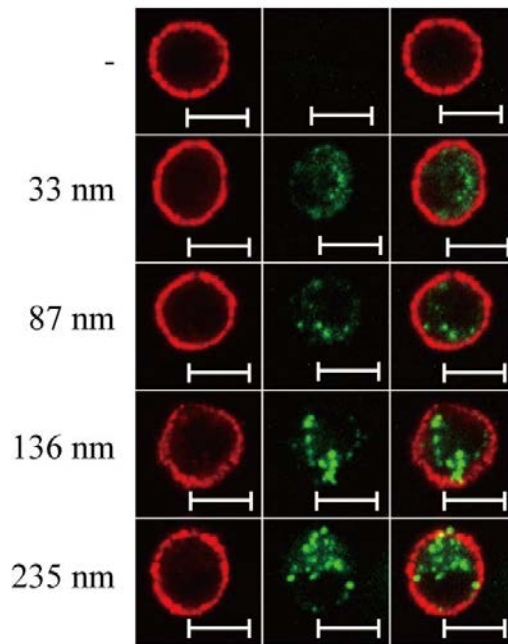
ナノ粒子を貪食した樹状細胞はリンパ節に移行し, 抗原特異的な免疫を誘導していると考えられるため, ナノ粒子投与後の抗原特異的な免疫の誘導時間を測定した。その結果, 抗原内包ナノ粒子を投与後7日目より抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞が観察され, 10 日目にピークを示した。この結果は, ナノ粒子を投与することで, 短期間に抗原特異的細胞性免疫を誘導することが出来ることを示している。他のアジュバントを用いると抗原特異的な細胞性免疫はほとんど誘導されないこと, ナノ粒子を用いると強い細胞性免疫を誘導すること, さらに1回の投与のみで短期間に誘導できることから, ナノ粒子は実用的なアジュバントとして非常に優れていると考えられる。また, 15 日目では抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞は減少を示したが, 一部の抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞はメモリー細胞として生体内で長期に生存することが分かっており, これまでの実験結果でも, ナノ粒子によるメモリー細胞の誘導が明らかになっている。



**図11. OVA 内包ナノ粒子による細胞性免疫の誘導.** (A) マウスに, PBS, OVA, OVA-NP, OVA + 水酸化アルミニウムを皮下経路で1回免疫し, 10日後に脾細胞を回収した後, 脾細胞中の抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T細胞についてテトラマーを用いて解析した。(B) マウスに OVA 内包ナノ粒子を皮下投与し, 経目的に脾細胞を回収した後, 脾細胞中の抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T細胞をテトラマーを用いて解析した。

#### 2-11) 粒子径の異なる新規 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の作用

$\gamma$ -PGA ナノ粒子はその作製条件を調節することにより, 粒径の異なる粒子を作り出すことが出来る。そこで粒径の異なる新規  $\gamma$ -PGA ナノ粒子(約 30–200 nm)を用いて樹状細胞への取込みや刺激作用について検討した。その結果, 樹状細胞への取込みは粒子径が大きくなるに従って増大することが, フローサイトメトリーや共焦点レーザー顕微鏡を用いた実験にて明らかになった。逆に, 樹状細胞の成熟化への作用は小さな粒子径の方が有利であることが分かった。



Green : FITC-NP, Red : anti-CD11c-PE

図12. 粒子径の異なる  $\gamma$ -PGA ナノ粒子 (FITC-NP) の樹状細胞への取込み. マウス樹状細胞に FITC 標識  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を取込ませ、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

(2)研究成果の今後期待される展開

当研究グループでは、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の免疫誘導メカニズムを解明することを主な課題として研究を進めている。その中で、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は自然免疫レセプターである TLR を介して抗原提示細胞を活性化させており、抗原特異的な獲得免疫を誘導していることを明らかにしてきた。また、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は粒子自身の抗原提示細胞への取り込み効率が非常に高いことに加えて、抗原のキャリアとしても優れた性質を持っており、生体内において、付随している抗原を効率よく樹状細胞に取り込ませ、活性化させることを明らかにした。これらのことは、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子を用いたワクチンは、標的としている抗原と粒子の組み合わせるだけで十分な免疫効果を期待することができることを示唆している。さらに、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の獲得免疫誘導の比較評価を行った結果、抗原のみや抗原と既存のアジュバント(水酸化アルミニウム、モノホスホリルリピッド A, コレラトキシン B サブユニット, CpG)と比べて、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は非常に高い免疫誘導が観察された。これらのことから、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は、現在使用されているアジュバントより高い進歩性が認められ、既存のアジュバントに代わる可能性がある。

4. 3 ナノ粒子-癌抗原ペプチドを用いた肝癌・消化器癌免疫治療法の開発 (大阪大学 巽グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本研究の目的は、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子による消化器癌免疫治療法の確立を目指した前臨床研究及び臨床研究を行うことである。具体的内容としては、1.マウス腫瘍モデルを用いて疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子と癌抗原ペプチドを用いた癌免疫治療の前臨床研究を行う、2.肝癌・消化器癌患者を対象としたナノ粒子-癌抗原ペプチドを用いた癌免疫治療の安全性・有効性を検討する臨床研究を行う以上 2 点である。

3-1) マウス腫瘍モデルにおけるナノ粒子-癌ペプチド療法の有用性の検討

癌抗原由来ペプチドを固定化した疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンのマウス肝腫瘍に対する抗腫瘍効果の評価した。癌抗原 EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンをマウスに行った後に、マウス脾細胞を採取し、IFN- $\gamma$ ELISPOT 法を用いて EphA2 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導を検討した。EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンは、強力なアジュバントである CFA を用いたペプチドワクチンに比較して、同等のレベルで EphA2 特異的 CTL が誘導されることを明らかにした(図 1)。

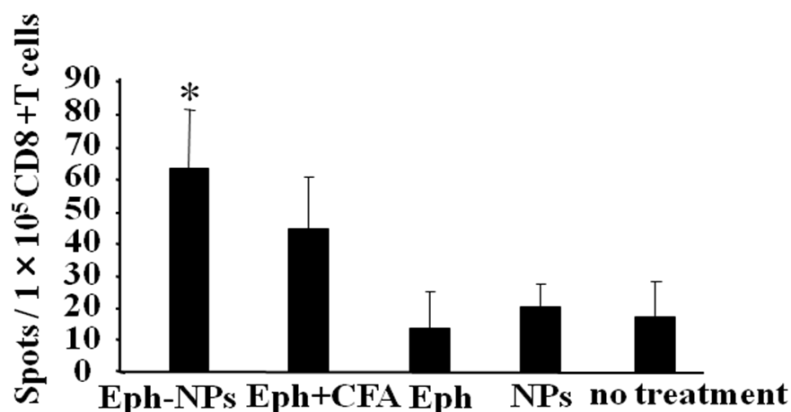


図 1. C57BL6 マウスに各ワクチン [Eph-NPs (EphA2 ペプチド表面固定ナノ粒子ワクチン群)、Eph+CFA (EphA2 ペプチド CFA 混合ワクチン群)、Eph (EphA2 ペプチド単独投与群)、NPs (疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子単独投与群)、PBS 群]を施行後、マウス脾細胞を採取し EphA2 ペプチドに対する CTL 誘導を IFN- $\gamma$ ELISPOT 法にて評価した。\* $p < 0.05$  vs. PBS 群

EphA2 を強発現するマウス大腸癌 MC38 を用いた肝腫瘍に対する EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンの抗腫瘍効果は、コントロール治療群に比して有意に高かった(図 2)。EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンの抗腫瘍効果は EphA2 を発現していない BL6 肝腫瘍には認められず、EphA2 特異的な CTL の誘導が示唆された。

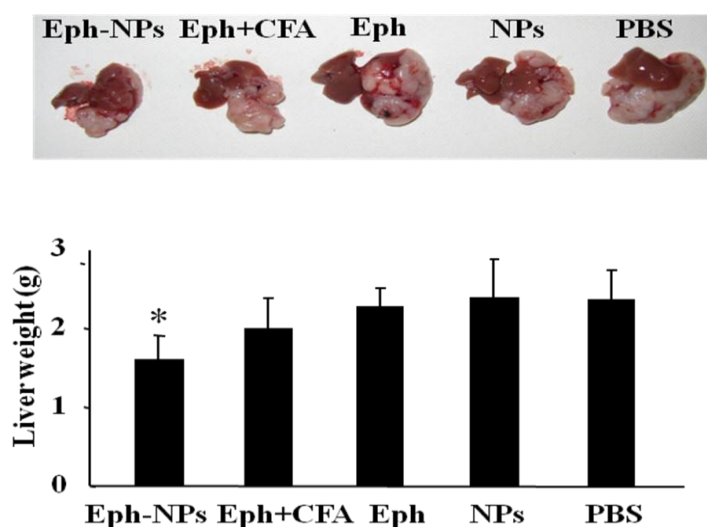


図 2. C57BL6 マウスに EphA2 を発現している MC38 大腸癌細胞を肝内投与し肝腫瘍を作成した。各ワクチン [Eph-NPs (EphA2 ペプチド表面固定ナノ粒子ワクチン群)、Eph+CFA (EphA2 ペプチド CFA 混合ワクチン群)、Eph (ペプチド単独投与群)、NPs (ナノ粒子単独投与群)、PBS 群]を施行 2 週間後、マウス肝を採取し肝重量を評価することで、EphA2-NPs ワクチンの有用性を検討した。上段は治療後の肝臓の macroscopic の像、下段は各治療群の肝重量 \* $p < 0.05$  vs. PBS 群



各種免疫細胞の depletion 実験においても、CD8 陽性 T 細胞の除去により、EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンの抗腫瘍効果が減弱したことから、CD8 陽性 CTL の関与が明らかとなった。しかしながら肝臓に比較的多く存在する NK 細胞は、本ワクチンの抗腫瘍効果においては、関与はないことが明らかとなった(図 3)。

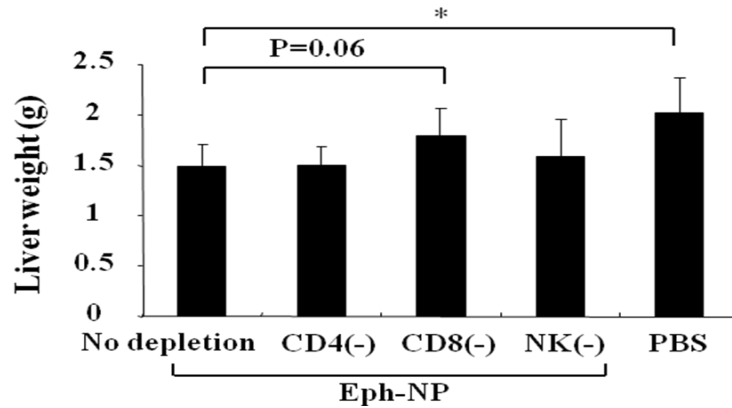


図 3. C57BL6 マウスに EphA2 を発現している MC38 大腸癌細胞を肝内投与し肝腫瘍を作成した。Eph-NP ワクチン施行の際、各免疫細胞を除去した (CD4(-):CD4 陽性細胞除去、CD8(-):CD8 陽性細胞除去 NK(-):NK 細胞除去)。コントロールとして PBS 治療群(PBS)をおいた。2 週間後、マウス肝を採取し肝重量を評価することで、抗腫瘍効果に関与する免疫細胞を評価した。\* p<0.05 vs. PBS 群

本ワクチンの安全性を評価する目的でワクチン後の ALT、総ビリルビン、アルブミン、クレアチニンを測定すると、CFA 治療を受けたマウスでは肝障害を認めしたが、EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンを受けたマウスでは肝障害、腎障害いずれも認めなかった(図 4)ことから、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンの安全性が示唆された。また Eph- $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンは、現在臨床応用されているアジュバントである IFA よりもつ強い抗腫瘍効果を示すことも明らかにした。

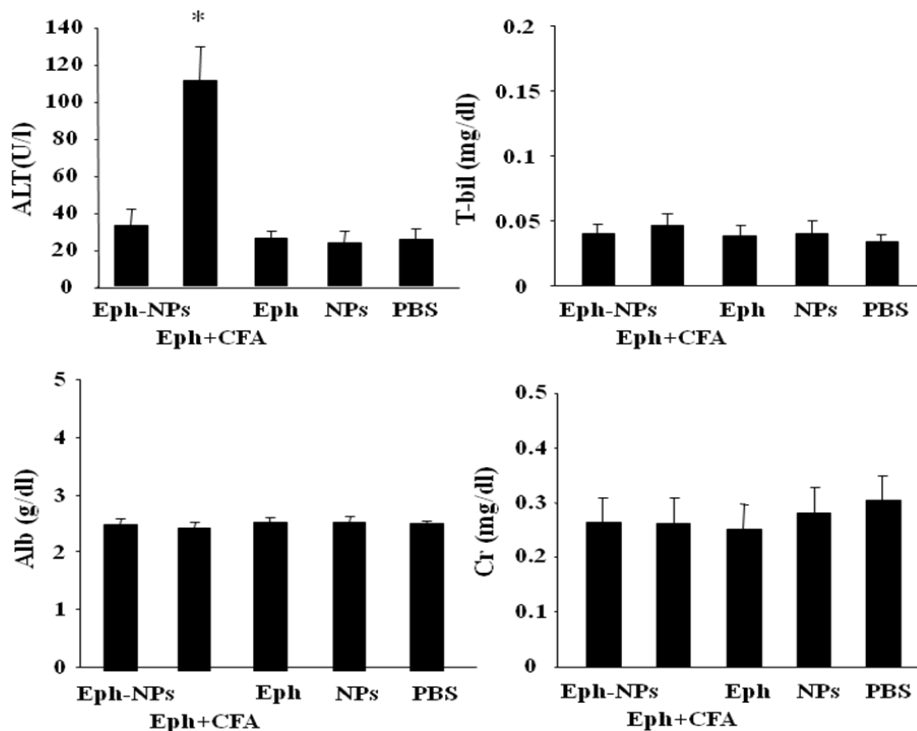


図 4. C57BL6 マウスに各ワクチン [Eph-NPs (EphA2 ペプチド表面固定ナノ粒子ワクチン群)、Eph+CFA (EphA2 ペプチド CFA 混合ワクチン群)、Eph (ペプチド単独投与群)、NPs (ナノ粒子単独投与群)、PBS 群]を施行後、マウス血清を採取し肝障害(ALT、TBil、Alb)および腎障害(Cr)を評価した。Eph+CFA 治療群で唯一有意な ALT 上昇をみとめ 肝障害が起こることが明らかとなった。一方 Eph-NPs 治療群では肝障害は起こらないことが明らかとなった。

以上の結果は、Eph- $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンは肝腫瘍に対して腫瘍特異的な CTL を誘導することで抗腫瘍効果を示し、肝障害や腎障害を認めず、安全な治療法であることが示された。

我々はこれまで  $\alpha$ -galatosylceramide( $\alpha$ -GalCer)を用いた肝先天免疫を標的とした癌免疫治療について多くの研究を報告してきた(Tatsumi T, et al. Hepatology 2007, J Hepatol 2008, Sasakawa A, J Hepatol 2009)。本研究において  $\alpha$ -GalCer+EphA2- $\gamma$ -PGA ペプチドを添加(パルス)した樹状細胞(DC)ワクチンの有用性について検討した。MC38 マウス大腸癌細胞を肝内投与し肝腫瘍を作成した。 $\alpha$ -GalCer+EphA2- $\gamma$ -PGA ペプチドをパルスした DC、 $\alpha$ -GalCer のみパルスした DC、EphA2- $\gamma$ -PGA ペプチドのみパルスした DC、DC のみ、PBS のみの 5 治療群をつくり、MC38 肝腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討した。コントロール群に比して  $\alpha$ -GalCer+EphA2- $\gamma$ -PGA ペプチドをパルスした DC 治療群、 $\alpha$ -GalCer のみパルスした DC 治療群で有意に肝重量が低かったが、EphA2- $\gamma$ -PGA ペプチドのみパルスした DC 治療群、DC のみ治療群では肝重量に有意な差を認めなかった(図 5)。

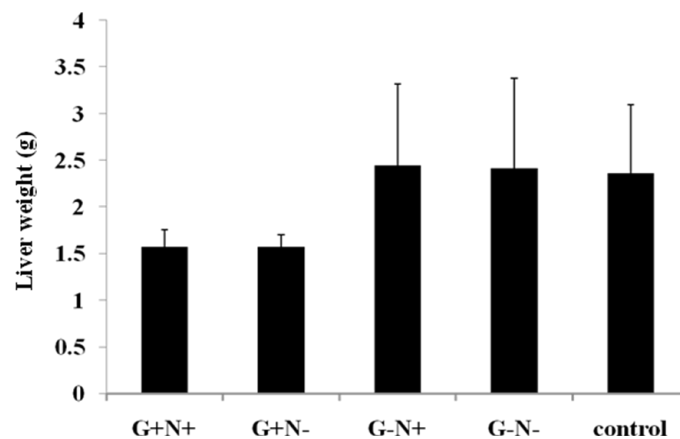


図 5. C57BL6 マウスに EphA2 を発現している MC38 大腸癌細胞を肝内投与し肝腫瘍を作成した。各ワクチン(G+N+:  $\alpha$ GalCer+ $\gamma$ PGA NPs pulsed DC, G+N-: $\alpha$ GalCer pulsed DC, G-N+: $\gamma$ PGA NPs pulsed DC, G-N-: DC only, control: PBS only)を施行 2 週間後、マウス肝を採取し肝重量を評価することで、各ワクチンの有用性を検討した。

本検討では、 $\gamma$ -PGA NPs の上乗せ効果は判然としなかったが、より大きな肝腫瘍に対しては、 $\gamma$ -PGA NPs の上乗せ効果が期待できる可能性がある。

## (2)研究成果の今後期待される展開

肝癌・消化器癌に対する治療としては外科的手術、Interventional Radiology (IVR)などの放射線治療、ラジオ波(RFA)や消化管内視鏡による局所療法、抗癌剤による化学療法など集学的治療により、癌患者の予後は著明に改善しつつあるが、依然これら治療法の適応外になる癌患者も多く、今後新たな治療法の確立は急務である。新たな治療法として免疫治療が期待されているが、まだ確立はしていない。 $\gamma$ -PGA ナノ粒子-癌抗原ペプチドによる癌ペプチドワクチンが新たな癌治療法として確立することができれば、これまで治療対象外となっている癌患者に治療適応が拡大され、その予後の改善が望まれる。そういった意味からも本研究の社会的意義は高いと考えられる。

## § 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 39 件)

1. 著者、論文タイトル、掲載誌 巻、号、発行年

- 1) Xin Wang, Tomofumi Uto, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Poly( $\gamma$ -glutamic Acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: potential for an anti-AIDS vaccine”, *J. Med. Virol.* **80**, 11-19 (2008).
- 2) Shigefumi Okamoto, Hironori Yoshii, Toyokazu Ishikawa, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Michiaki Takahashi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, “Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus”, *Vaccine* **26**, 589-594 (2008).
- 3) Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, “Time-modulated release of multiple proteins from enzyme-responsive multilayered capsules”, *Chem. Lett.* **37**, 238-239 (2008).
- 4) Tomonori Waku, Michiya Matsusaki, Suwabun Chirachanchai, Mitsuru Akashi, “One-step preparation of cationic sugar-peptide nanospheres using the water-soluble chitosan-initiated polymerization of L-phenylalanine N-carboxyanhydride”, *Chem. Lett.* **37**, 1262-1263 (2008).
- 5) Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, “Locally controlled release of basic fibroblast growth factor from multilayered capsules”, *Biomacromolecules* **9**, 2202-2206 (2008).
- 6) Tomofumi Uto, Xin Wang, Takami Akagi, Rika Zenkyu, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Improvement of adaptive immunity by antigen-carrying biodegradable nanoparticles”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 600-604 (2009).
- 7) Tomofumi Uto, Takami Akagi, Takayuki Hamasaki, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Modulation of innate and adaptive immunity by biodegradable nanoparticles”, *Immunol. Lett.* **125**, 46-52 (2009).
- 8) Hyungjin Kim, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, “Preparation of size tunable amphiphilic poly (amino acid) nanoparticles”, *Macromol. Biosci.* **9**, 825-932 (2009).
- 9) Shigefumi Okamoto, Masaaki Matsuura, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Takeshi Tanimoto, Toyokazu Ishikawa, Michiaki Takahashi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, “Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) nano-particles combined with mucosal influenza virus hemagglutinin vaccine protects against influenza virus infection in mice”, *Vaccine* **27**, 5896-5905 (2009).
- 10) Takami Akagi, Hyungjin Kim, Mitsuru Akashi, “pH-dependent disruption of erythrocyte membrane by amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles”, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **21**, 315-328 (2010).

- 11) Takami Akagi, Kazuki Watanabe, Hyungjin Kim, Mitsuru Akashi, "Stabilization of polyion complex nanoparticles composed of poly(amino acid) using hydrophobic interactions" *Langmuir* **26**, 2406-2413 (2010).
- 12) Shinjiro Yamaguchi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara, Akira Sasakawa, Masashi Yamamoto, Keisuke Kohga, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Norio Hayashi, "EphA2 derived peptide vaccine with amphiphilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles elicits antitumor effect against mouse liver tumor", *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 759-767 (2010).
- 13) Hyungjin Kim, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, "Preparation of CpG ODN-encapsulated anionic poly(amino acid) nanoparticles for gene delivery", *Chem. Lett.* **39**, 278-279 (2010).
- 14) Takayuki Imoto, Toshiyuki Kida, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, "Preparation and unique pH-responsive properties of novel biodegradable nanocapsules composed of poly( $\gamma$ -glutamic acid) and chitosan as weak polyelectrolytes", *Macromol. Biosci.* **10**, 271-277 (2010).
- 15) Takayuki Hamasaki, Tomofumi Uto, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, "Modulation of gene expression related to Toll-like receptor signaling in dendritic cells by poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles", *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 748-756 (2010).
- 16) Sissela Broos, Kristina Lundberg, Takami Akagi, Koji Kadowaki, Mitsuru Akashi, Lennart Greiff, Carl A.K. Borrebaeck, Malin Lindstedt, "Immunomodulatory nanoparticles as adjuvants and allergen-delivery system to human dendritic cells: Implications for specific immunotherapy", *Vaccine* **28**, 5075-5085 (2010).
- 17) Ai Himeno, Takami Akagi, Tomofumi Uto, Xin Wang, Masanori Baba, Kentaro Ibuki, Megumi Matsuyama, Mariko Horiike, Tatsuhiko Igarashi, Tomoyuki Miura, Mitsuru Akashi, "Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 human immunodeficiency virus", *Vaccine* **28**, 5377-5385 (2010).
- 18) Michiya Matsusaki, Masahiro Matsumoto, Tomonori Waku, Mitsuru Akashi, "Self-assembled structure of peptide nanospheres induces high stability against hydrolysis and sterilization", *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **22**, 1035-1048 (2010).
- 19) Hyungjin Kim, Tomofumi Uto, Takami Akagi, Masanori Baba, Mitsuru Akashi, "Amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles induce size-dependent dendritic cell maturation", *Adv. Funct. Mater.* **20**, 3925-3931 (2010).
- 20) Tomonori Waku, Masahiro Matsumoto, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, "Drastic surface control of peptide nanospheres with detachable and attachable polymer brush layers", *Chem. Commun.* **46**, 7025-7027 (2010).
- 21) Akihiro Nishiguchi, Hiroaki Yoshida, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, "Preparation of Reduction-Sensitive Nanogels with a Large Swelling Capacity

- by a Surfactant-Free Precipitation Method”, *Chem. Lett.* **39**, 1184-1185 (2010).
- 22) Morin Ryu, Toru Nakazawa, Takami Akagi, Tatsuhide Tanaka, Ryou Watanabe, Masayuki Yasuda, Noriko Himori, Kazuichi Maruyama, Toshihide Yamashita, Toshiaki Abe, Mitsuru Akashi, Kohji Nishida, “Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone”, *J. Controlled Release* **151**, 65-73 (2011).
  - 23) Takami Akagi, Fumiaki Shima, Mitsuru Akashi, “Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles”, *Biomaterials* **32**, 4959-4967 (2011).
  - 24) Tomofumi Uto, Takami Akagi, Keisuke Yoshinaga, Masaaki Toyama, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “The induction of innate and adaptive immunity by biodegradable poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles via a TLR4 and MyD88 signaling pathway”, *Biomaterials* **32**, 5206-5212 (2011).
  - 25) Keisuke Matsuo, Hayato Koizumi, Mitsuru Akashi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Naoki Okada, “Intranasal immunization with poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles entrapping antigenic proteins can induce potent tumor immunity”, *J. Controlled Release* **152**, 310–316 (2011).
  - 26) Tomofumi Uto, Yosuke Nishi, Masaaki Toyama, Keisuke Yoshinaga, Masanori Baba, “Inhibitory effect of cepharanthine on dendritic cell activation and function”, *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1932-1938 (2011).
  - 27) Donjian Shi, Michiya Matsusaki and Mitsuru Akashi, “Photo-tunable protein release from biodegradable nanoparticles composed of cinnamic acid derivatives”, *J. Controlled Release* **149**, 182-189 (2011).
  - 28) Tomofumi Uto, Takami Akagi, Keisuke Yoshinaga, Masaaki Toyama, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Comparative activity of biodegradable nanoparticles with aluminum adjuvants: Antigen uptake by dendritic cells and induction of immune response in mice”, *Immunol. Lett.* **140**, 36-43 (2011).
  - 29) Shigefumi Okamoto, Hironori Yoshii, Masaaki Matsuura, Asato Kojima, Toyokazu Ishikawa, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Michiaki Takahashi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, “Poly- $\gamma$ -glutamic acid nanoparticles and aluminum adjuvant used as an adjuvant with a single dose of Japanese encephalitis virus-like particles provides effective protection from Japanese encephalitis virus”, *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 17-22 (2012).
  - 30) Takami Akagi, Phassamon Piyapakorn, Mitsuru Akashi, “Formation of unimer nanoparticles by controlling the self-association of hydrophobically modified poly (amino acids)”, *Langmuir* **28**, 5249-5256 (2012).
  - 31) Takami Akagi, Tomoko Fujiwara, Mitsuru Akashi, “Rapid fabrication of polylactide stereocomplex using layer-by-layer deposition by inkjet printing”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5493-5496 (2012).
  - 32) Shigefumi Okamoto, Sumiko Matsuoka, Nobuyuki Takenaka, Ahmad Haredy,

Takeshi Tanimoto, Yasuyuki Gomi, Toyokazu Ishikawa, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Yoshinobu Okuno, Yasuko Mori, Koichi Yamanishi, “Intranasal immunization with formalin-inactivated human influenza A whole-virion vaccine alone or split-virion vaccine with mucosal adjuvants show similar cross-protection”, *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 979-990 (2012).

- 33) Sissela Broos, Linda C Sandin, Jenny Apel, Thomas H Totterman, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Carl A.K. Borrebaeck, Peter Ellmark, Malin Lindstedt, “Synergistic augmentation of CD40-mediated activation of antigen-presenting cells by amphiphilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles”, *Biomaterials*, **33**, 6230-6239 (2012).
- 34) Heyun Shen, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, “Polyampholyte nanoparticles prepared by self-complexation of cationized poly ( $\gamma$ -glutamic acid)”, *Macromol. Biosci.* **12**, 1100-1105 (2012).
- 35) Suja E. George, Christopher T. Elliott, Declan P. McLaughlin, Philippe Delahaut, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Terence L. Fodey, “An investigation into the potential use of nanoparticles as adjuvants for the production of polyclonal antibodies to low molecular weight compounds”, *Vet. Immunol. Immunopathol.* **149**, 46-53 (2012).
- 36) Fumiaki Shima, Koshi Kawakami, Takami Akagi, Eiko Mochizuki, Tetsuya Tsuda, Susumu Kuwabata, Mitsuru Akashi, “Simple observation of the interaction between nanoparticles and cells by scanning electron microscopy employing ionic liquid”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **86**, 153-158 (2013).
- 37) Tomofumi Uto, Masaaki Toyama, Yosuke Nishi, Takami Akagi, Fumiaki Shima, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Uptake of biodegradable poly ( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles and antigen presentation by dendritic cells in vivo”, *Results Immunol.* **3**, 1-9 (2013).
- 38) Ye Zhu, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, “Preparation and characterization of nanoparticles formed through stereocomplexation between enantiomeric poly ( $\gamma$ -glutamic acid)-*graft*-poly(lactide) copolymers”, *Polymer J.*, in press.
- 39) Masahiro Matsumoto, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, “Safe Control of Construction-Deconstruction of High-Density PEG Brushes on the Surface of Peptide Nanospheres by Thermally-Induced Shrinkage of PEG-SS-PEG”, *Chem. Lett.*, in press.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 赤木隆美, 明石 満, “ナノテクノロジーを利用したナノワクチン”, *分子細胞治療*, **7**, 10-17 (2008).
2. 赤木隆美, 明石 満, “第5章 ナノ粒子のバイオ・医療材料への応用, 3. 抗レトロウイルスワクチン”, 「*ナノ粒子の創製と応用展開*」(編集: 米澤 徹), フロンティア出版, 242-249 (2008).
3. 赤木隆美, 明石 満, “高分子を用いるドラッグデリバリーシステム”, *脳* **21**, **11**, 44-51 (2008).

4. 赤木隆美, 明石 満, “第2章 機能性 DDS キャリア素材の基本設計, 1. 高分子ナノキャリア”, 「機能性 DDS キャリアの製剤設計」(監修:岡田弘晃), シーエムシー出版, 24-33 (2008).
5. 松崎典弥, 明石 満, “微生物由来ポリアミノ酸を用いた機能材料の開発”, *機能材料*, **28**, 61-70 (2008).
6. Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, “Functional multilayered capsules for targeting and local drug delivery”, *Expert Opin. Drug Deliv.* **6**, 1207-1217 (2009).
7. 明石 満, “高分子ナノ微粒子を用いるワクチンの開発”, 第13回東京肝臓シンポジウム講演集 ナノメディスン—現状と展望—, 自然科学社, 21-30 (2009).
8. Takami Akagi, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, “Pharmaceutical and medical applications of poly- $\gamma$ -glutamic acid” (Chapter 7), Amino-acid homopolymers occurring in nature (Volume editor: Y. Hamano), *Microbiology Monographs (Springer)*, **15**, 119-153 (2010).
9. 和久友則, 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満, “第9章, コア-コロナ型ペプチドナノスフェアの機能”, コアシェル微粒子の設計・合成技術・応用の展開, シーエムシー出版, 226-236 (2010).
10. 赤木隆美, 明石 満, “6-3. ナノ粒子を応用したアジュバント開発研究の新展開”, 「アジュバント開発研究の新展開」(監修:石井健・山西弘一), シーエムシー出版, 186-192 (2011).
11. T. Akagi, M. Baba, M. Akashi, “Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine”, *Adv. Polymer Sci.* **247**, 31-64 (2012).

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 36 件、国際会議 23 件)

1. Mitsuru Akashi<sup>1,4</sup>, Takami Akagi<sup>1,4</sup>, Shinsaku Nakagawa<sup>2,4</sup>, Masanori Baba<sup>3,4</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, <sup>3</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, <sup>4</sup>CREST-JST), “Biodegradable Nanoparticles for Vaccine Delivery and Adjuvant”, Swiss-Japan Symposium on Nanobio 2007, 2007年10月10日, 東京大学 武田先端知ホール(東京都).
2. Mitsuru Akashi<sup>1,4</sup>, Takami Akagi<sup>1,4</sup>, Shinsaku Nakagawa<sup>2,4</sup>, Masanori Baba<sup>3,4</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, <sup>3</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, <sup>4</sup>CREST-JST), “Polymeric nanoparticles as vaccine delivery devices”, Hamano-Kobe International Symposium on “Laser and Nano/Bio Sciences”, 2007年10月19日, Crowne Plaza Kobe(兵庫県).
3. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ粒子を用いるワクチンの開発”, 近畿バイオインダストリー振興会議, フォローアップ勉強会, 2007年10月25日, 大阪科学技術センター(大阪府).
4. Mitsuru Akashi<sup>1,4</sup>, Takami Akagi<sup>1,4</sup>, Shinsaku Nakagawa<sup>2,4</sup>, Masanori Baba<sup>3,4</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, <sup>3</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, <sup>4</sup>CREST-JST), “Biodegradable Nanoparticles as Potential Vaccine Delivery and Adjuvant Systems”, Green

Sustainable Biological and Chemical Processes, 2007年11月16日, 大阪大学銀杏会館(大阪府).

5. 明石 満(阪大院工), “塗料の研究からバイオマテリアルへ”, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月27日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
6. 明石 満<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿大院医歯学, <sup>3</sup>CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチン”, 第51回材料工学連合講演会, 2007年11月29日, 京大会館(京都府).
7. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ粒子ワクチン ワクチン開発:工学からのアプローチ”, 新規事業研究会月例研究会, 2007年12月8日, 東工大 百年記念館(東京都).
8. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Self-organizing nano-biomaterials: Nano-particles and nano-films”, The 9th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, 2007年12月19日, The Westin Maui (Hawaii, USA).
9. 明石 満(阪大院工), “鹿児島大学が生んだ高分子ナノ粒子ワクチン”, 鹿児島大学産学官連携推進機構 特別講演会, 2008年1月30日, 鹿児島大学(鹿児島県).
10. 明石 満<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿大院医歯学, <sup>3</sup>CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチン”, 第6回遺伝子治療シンポジウム, 2008年2月1日, 千里阪急ホテル(大阪府).
11. 明石 満<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿大院医歯学, <sup>3</sup>CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチン”, 第3回DDS熊本シンポジウム, 2008年2月7日, 熊本大学(熊本県).
12. 明石 満<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿大院医歯学, <sup>3</sup>CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチン”, 高度医療都市を創出する未来技術シンポジウム, 2008年3月18日, 岡山国際交流センター(岡山県).
13. 赤木 隆美<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>CREST-JST), “高分子ナノ粒子を用いるワクチンの開発”, 「バイオナノテクノロジーとDDS」シンポジウム, 2008年3月26日, 神戸大学 瀧川記念学術交流会館(兵庫県).
14. 明石 満(阪大院工), “バイオマテリアルが拓く医療の世界”, 第51回春季日本歯周病学会学術大会, 2008年4月15日, 大宮ソニックシティ(埼玉県).
15. 明石 満(阪大院工), “高分子を高度に制御したナノバイオマテリアルとその応用”, 平成20年度特別講演, 2008年6月2日, 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県).
16. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ微粒子を用いるワクチンの開発”, 第13回東京肝臓シンポジウム「ナノメディスン—現状と展望—」, 平成20年6月21日, 経団連会館11階国際会議場(東京都).
17. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Design and Preparation of Nanostructured Functional Polymer”, Lecture, 25 June 2008, Jiang Nan University (China).
18. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Preparation of Biodegradable Polymer ( $\gamma$ -Glutamic Acid) Nanospheres and Their Application for Vaccine”, Lecture, 26 June 2008, Shanghai Jiao Tong University (China).
19. 馬場昌範(鹿大院医歯学, CREST), “ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)ナノ粒子による樹状細胞への抗原デリバリーとそれ自身のアジュバント効果:抗エイズワクチンへの応用について”, 第24回日本DDS学会ワークショップ「経粘膜DDSとナノテクノロジー」, 2008年6月30日, 六本木アカデミーヒルズ(東京都).



20. Mitsuru Akashi<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1</sup>, Tomofumi Uto<sup>2</sup>, Masanori BaBa<sup>2</sup>, Tomohide Tatsumi<sup>3</sup>, Shigefumi Okamoto<sup>4</sup>, Yasuko Mori<sup>4</sup>, Koichi Yamanishi<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Kagoshima University, <sup>3</sup>Graduate School of Medicine, Osaka University, <sup>4</sup>National Institute of Biomedical Innovation), “Polymeric Nanoparticles as Vaccine Delivery System”, 42nd World Polymer Congress Macro 2008, 2 July 2008, Taipei International Convention Center (Taiwan).
21. 明石 満(阪大院工), “ナノバイオマテリアル”, 第 28 期新工業材料ゼミナール(第 11 回), 平成 20 年 8 月 6 日, 京都リサーチパーク(京都府).
22. 明石 満(阪大院工), “ナノ構造制御高分子材料の開発”, 講演会, 平成 20 年 8 月 29 日, 三井化学(株)袖ヶ浦センター(千葉県).
23. Mitsuru Akashi<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1</sup>, Masanori BaBa<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Kagoshima University), “Intracellular delivery of antigen protein to dendritic cells using biodegradable nanoparticles”, France Japan 8<sup>th</sup> Drug Delivery Symposium, 7 October 2008, Hotel Gray d'Albion (France).
24. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Self-Organizing Nanobiomaterials : Design and Preparation of Nanostructured Functional Polymers”, Lecture, 9 October 2008, RWTH Aachen University (Germany).
25. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノスフェアによる抗ウイルスワクチンの開発”, 第 6 回関西若手高分子セミナー@花王, 平成 20 年 11 月 14 日, 花王株式会社和歌山事業所 厚生棟西ホール(和歌山県).
26. 明石 満(阪大院工), “材料化学が築く再生医療”, Handai-Asahi 中之島塾, 2008 年 11 月 22 日, 大阪大学中之島センター(大阪府).
27. 赤木 隆美(阪大院工), “ナノテクノロジーを用いた肝臓免疫療法の開発”, 第 9 回未来医療交流会, 2008 年 11 月 25 日, 大阪大学中之島センター(大阪府).
28. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ粒子ワクチンの開発”, 第 5 回ナノバイオ国際シンポジウム, 2009 年 2 月 18 日, 東京ビックサイト(東京都).
29. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Development of Nanostructured Biomaterials”, The annual international symposium of Polymer Gel Research Cluster Center (PGRCC), 13 March 2009, Yeungnam University, Polymer Gel Research Cluster Center (Korea).
30. 明石 満<sup>1</sup>, 船木隆文<sup>2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>ビーエムティーハイブリッド株式会社), “バイオマテリアルのナノ構造制御と実用化への展開”, 日本化学会第 89 春季年会(2009), 2009 年 3 月 30 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県).
31. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Fabrication of Prevascularized Cell-dense Tissue Constructs using Cell Sheet Stacking Manipulation System”, 8th Internations Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, 22 May 2009, TORAY Human Resources Development Center (Japan).
32. 明石 満(阪大院工), “還元分子応答分解性ハイドロゲルをテンプレートとした三次元組織の構築”, 平成 21 年度繊維学会年次大会, 2009 年 6 月 10 日, タワーホール船堀(東京都).
33. 明石 満(阪大院工), “高分子系の自己集合を用いる材料の創成と生医学領域への応用”, 近畿大学分子工学研究所特別講演会, 2009 年 8 月 19 日, 近畿大学分子工学研究所(福岡県).

34. 明石 満(阪大院工), “高分子系の自己集合を用いる材料の創成と生医学領域への応用”, 学内講演会, 2009年10月30日, 神奈川大学(神奈川県).
35. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Fabrication, characterization and application of novel multilayer films”, the 2nd International Congress on BIOHYDROGELS, 13 November 2009, Hotel Astor Viale Carducci Viareggio (Italy).
36. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Fabrication, characterization and application of novel multilayer films”, Lecture, 9 December 2009, Chulalongkorn University (Thailand).
37. Masanori Baba (Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, “Poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles as a novel vaccine adjuvant”, JUNBA 2010 Technology Fair, January 12, 2010, Burlingame, CA (USA).
38. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ粒子ワクチンの開発”, 第21回名古屋コンフェレンス「21世紀をブレークスルーする化学者達」, 2010年1月12日, 名古屋工業大学講堂会議室(愛知県).
39. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ粒子ワクチンの開発”, 機能性高分子セミナー, 2010年3月24日, 室蘭工業大学(北海道).
40. 明石 満<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1</sup>, 馬場昌範<sup>2</sup>, 巽 智秀<sup>3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿大院医歯, <sup>3</sup>阪大院医), “高分子ナノ粒子ワクチン:新しいアジュバントの開発”, 日本化学会第90春季年会(2010), 2010年3月27日, 近畿大学本部キャンパス(大阪府).
41. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ粒子ワクチンの開発”, 実践的化学知セミナー, 2010年5月7日, 早稲田大学(東京都).
42. 馬場昌範<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>2</sup>, 明石 満<sup>2</sup>(<sup>1</sup>鹿大院医歯, <sup>2</sup>阪大院工), “生分解性高分子を利用した新しいワクチンアジュバントとその作用”, 第12回白馬シンポジウム「最先端のエイズ研究を徹底討論する」, 2010年5月14日(徳島).
43. Mitsuru Akashi<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1</sup>, Masanori Baba<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup> Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University), “Novel Vaccine Delivery System: Biodegradable Nanoparticles for Protein and Delivery”, Particle 2010, 23 May 2010, Regal Sun Resort Hotel (USA). Regal Sun Resort Lake Buena Vista, Florida (USA).
44. Koji Kadowaki<sup>1</sup>, Michiya Matsusaki<sup>1</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University), “Three-dimensional Layered Tissues by Layer-by-Layer Technique”, 2nd International Symposium on Polymer Materials Science and Technology, 1 June 2010, Harbin Engineering University (Taiwan).
45. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ粒子ワクチンの開発”, 学内講演会, 2010年6月4日, 奈良県立医科大学(奈良).
46. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST, CREST), “高分子ナノ粒子を利用したワクチンアジュバントの開発と免疫応答制御”, 第26回日本DDS学会, 2010年6月17日, 大阪国際交流センター(大阪府).
47. 明石 満(阪大院工), “免疫制御能を有するナノ粒子ワクチンの製造”, 第47回薬剤学懇談会研究討論会, 2010年6月23日, 高山グリーンホテル(岐阜県).
48. Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Development of Three-dimensional Layered Tissues by Layer-by-Layer Technique”, International Research Training Group, “Selectivity in Chemo- and Biocatalysis” 3rd

- Aachen-Osaka Joint Symposium, 7 September 2010, RWTH Aachen (Germany).
49. Mitsuru Akashi<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1</sup>, Tomohide Tatsumi<sup>2</sup>, asanori Baba<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Medicine, Osaka University, <sup>3</sup> Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University), “Size-controlled Amphiphilic Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) Nanoparticles as an Efficient Delivery and Adjuvant System”, 9th France-Japan DDS Symposium, 27 September 2010, KKR Hotel Kumamoto (Japan).
  50. 明石 満(阪大院工, JST-CREST), “高分子系ワクチンアジュバントの開発”, 第 32 回バイオマテリアル学会大会, 2010 年 11 月 29 日, グランドプリンスホテル広島(広島県).
  51. 明石 満 (阪大院工, JST-CREST), “高分子ナノ粒子ワクチンアジュバントの開発”, 第 2 回次世代アジュバント研究会, 2011 年 1 月 11 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
  52. 明石 満(阪大院工), “高分子の自己集合により生まれるナノおよびマイクロ構造と形態” 第 60 回高分子学会討論会, 2011 年 9 月 30 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県).
  53. 明石 満(阪大院工), “高分子ナノ粒子を利用したワクチンアジュバント” 第 1 回 DDS 製剤臨床応用 FG 合宿討論会, 2011 年 11 月 12 日, 帝京大学セミナーハウス(神奈川県).
  54. 明石 満(阪大院工, JST-CREST), “高分子ナノ粒子を利用したワクチンアジュバント”, 第 33 回バイオマテリアル学会大会, 2011 年 11 月 22 日, 京都府民総合交流プラザ 京都テルサ(京都府).
  55. Mitsuru Akashi<sup>1,3</sup>, Takami Akagi<sup>1,3</sup>, Tomofumi Uto<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Kagoshima University, <sup>3</sup>JST-CREST), “Amphiphilic Poly(amino acid) Nanoparticles for Vaccine Delivery and Immune Adjuvants”, Biotechnology and Chemistry for GREEN GROWTH, JSPS Japanese-German Graduate Externship program, 14 March 2012, Senri Life Science Center, Osaka (Japan).
  56. Mitsuru Akashi<sup>1,4</sup>, Takami Akagi<sup>1,4</sup>, Tomohide Tatsumi<sup>2,4</sup>, Masanori Baba<sup>3,4</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Medicine, Osaka University, <sup>3</sup>Kagoshima University, <sup>4</sup>JST-CREST), “Biodegradable nanoparticle-based antigen delivery and immunostimulant for vaccine development”, 243rd ACS National Meeting, 26 March 2012, Manchester Grand Hyatt, San Diego, California (USA).
  57. Mitsuru Akashi<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1</sup>, Hiroharu Ajiro<sup>1</sup>, Tomoko Fujiwara<sup>2</sup>, (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>The University of Memphis), “Rapid Fabrication of Polymer Stereocomplex by Inkjet Printing”, 5th Symposium on Molecular Chirality of Chinese Chemical Society & International Chiral Meeting, August 3, 2012, Zhang Jia Jjie International Hotel (China).
  58. Mitsuru Akashi<sup>1,4</sup>, Takami Akagi<sup>1,4</sup>, Tomohide Tatsumi<sup>2,4</sup>, Masanori Baba<sup>3,4</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Medicine, Osaka University, <sup>3</sup>Kagoshima University, <sup>4</sup>JST-CREST), “Potent adjuvant activity of amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles for protein-based vaccines”, 10th France-Japan DDS Symposium, 10-13 October 2012, Bordeaux (France).
  59. Mitsuru Akashi, (Graduate School of Engineering, Osaka University, JST-CREST), “Potent Adjuvant Activity of Nanoparticles Composed of Amphiphilic Poly(amino acid) for Protein-based Vaccines”, Annual meeting polymer society, Taipei. 25 January 2013, National Chung Cheng University, Chiayi (Taiwan).

② 口頭発表 (国内会議 70 件、国際会議 10 件)

1. 馬場昌範<sup>1,3</sup>, 王 欣<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup> (鹿大院医歯学,<sup>2</sup> 阪大院工,<sup>3</sup>CREST), “ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子による樹状細胞への効率的な抗原デリバリーとアジュバント効果: 抗エイズワクチンへの応用について”, 第 21 回日本エイズ学会学術集会, 2007 年 11 月 28 日, 広島国際会議場(広島県).
2. 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “ペプチドナノスフェアの表面ブラシ密度変化を駆動力とする新しい細胞質デリバリーシステム”, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 26 日, 立教大学(東京都).
3. 和久友則<sup>1</sup>, 松崎典弥<sup>1</sup>, 明石満<sup>1,2</sup> (阪大院工,<sup>2</sup>JST-CREST), “表面ブラシ密度を制御可能な環境応答性ペプチドナノスフェアの DDS への応用”, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 28 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
4. 井本鷹行, 伊藤祐貴, 松崎典弥, 木田敏之, 明石 満(阪大院工), “酸性刺激に応答するキトサン-ポリ-γ-グルタミン酸中空カプセルの調製”, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 28 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
5. Takami Akagi<sup>1</sup>, Shinsaku Nakagawa<sup>2</sup>, Masanori BaBa<sup>3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1</sup> (Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, <sup>3</sup>Kagoshima University), “Immunostimulation of Dendritic Cells Using Amphiphilic Polymeric Nanoparticles for Vaccine Development”, 42nd World Polymer Congress Macro 2008, 3 July 2008, Taipei International Convention Center (Taiwan).
6. 井本鷹行, 伊藤祐貴, 松崎典弥, 木田敏之, 明石 満(阪大院工), “キトサン-ポリ-γ-グルタミン酸架橋膜からなる中空カプセルの調製”, 第 54 回高分子研究発表会, 2008 年 7 月 18 日, 兵庫県中央労働センター(兵庫県).
7. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 金 亨振<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup> (阪大院工,<sup>2</sup> 鹿大院医歯,<sup>3</sup>JST-CREST), “高分子ナノ粒子ワクチンによる免疫応答制御とサイズ効果”, 第 37 回医用高分子シンポジウム, 2008 年 7 月 29 日, 東京医科歯科大学 5 号館講堂(東京都).
8. 金亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 松崎典弥<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場 昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup> (阪大院工,<sup>2</sup> 鹿大院医歯,<sup>3</sup>JST-CREST), “抗原デリバリー型アジュバントとして機能する疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子の粒径制御”, 第 3 回日本バイオマテリアル学会 関西若手研究発表会, 2008 年 8 月 7 日, 関西大学第 4 学舎(大阪府).
9. Tomonori Waku<sup>1</sup>, Michiya Matsusaki<sup>1</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Stealthy and Functional Peptide Nanospheres with High-Density PEG Brush”, 236th ACS National Meeting, 2008 年 8 月 18 日, Sheraton Philadelphia City Center (USA).
10. 和久友則<sup>1</sup>, 松崎典弥<sup>1</sup>, 明石満<sup>1,2</sup> (阪大院工,<sup>2</sup>JST-CREST), “表面 PEG ブラシ密度を制御可能な環境応答性ペプチドナノスフェアの DDS キャリヤへの応用”, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 26 日, 大阪市立大学(大阪府).
11. 岡本成史<sup>1</sup>, 松浦正明<sup>1,2</sup>, 小島朝人<sup>3</sup>, 石川豊数<sup>2</sup>, 明石 満<sup>4,5</sup>, 高橋理明<sup>2</sup>, 山西弘一<sup>1</sup>, 森康子<sup>1,6</sup> (医薬基盤研,<sup>2</sup>(財)阪大微研,<sup>3</sup>国立感染研,<sup>4</sup>阪大院工,<sup>5</sup>JST-CREST,<sup>6</sup>神戸大院医), “アジュバントー日本脳炎ワクチンの 1 回接種での防御免疫応答の持続性と免疫学的機構”, 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 2008 年 10 月 28 日, 岡山コンベンションセンター(岡山県).

12. 岡本成史<sup>1</sup>, 松浦正明<sup>1,2</sup>, 石川豊数<sup>2</sup>, 明石 満<sup>3,4</sup>, 高橋理明<sup>2</sup>, 山西弘一<sup>1</sup>, 森 康子<sup>1,5</sup>(<sup>1</sup> 医薬基盤研, <sup>2</sup>(財)阪大微研, <sup>3</sup> 阪大院工, <sup>4</sup>JST-CREST, <sup>5</sup> 神戸大院医), “ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸ナノ粒子( $\gamma$ -PGA-NPs)とインフルエンザ-ヘマグルチニンワクチンとの併用経鼻接種によるウイルス交叉防御効果”, 第12回日本ワクチン学会学術集会, 2008年11月9日, 崇城大学市民ホール(熊本県).
13. 善久理加<sup>1,4</sup>, 宇都倫史<sup>1,4</sup>, 佐藤克明<sup>2</sup>, 明石 満<sup>3,4</sup>, 馬場昌範<sup>1,4</sup>(<sup>1</sup> 鹿大院医歯学, <sup>2</sup> 理研, <sup>3</sup> 阪大院工, <sup>4</sup>CREST), “マウスにおける $\gamma$ -PGA ナノ粒子による抗原抗原特異的IgE抗体産生の抑制”, 第38回日本免疫学会総会学術集会, 2008年12月1日, 京都国際会議場(京都府).
14. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 金 亨振<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> 鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “高分子ナノ粒子アジュバントを用いた免疫応答制御”, 第25回日本DDS学会, 2009年7月3日, 東京ドームホテル(東京都).
15. 金 亨振<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 松崎典弥<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> 鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化 $\gamma$ -PGA の会合制御によるナノ粒子の粒径制御及びワクチンアジュバントとしての機能評価”, 第55回高分子研究発表会, 2009年7月17日, 神戸県民会館(神戸市).
16. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> 鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “ナノ粒子を用いたアレルギー性疾患に対する免疫制御療法の開発”, 第38回医用高分子シンポジウム, 2009年7月28日, 東京大学先端科学技術研究センター(東京都).
17. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 金 亨振<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水化ポリアミノ酸を用いたポリイオンコンプレックスナノ粒子の調製と機能評価”, 日本バイオマテリアル学会 第4回関西若手研究発表会, 2009年8月7日, 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館(大阪府).
18. 松本匡広, 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “生体適合性ペプチドナノスフェアの加水分解試験”, 日本バイオマテリアル学会 第4回関西若手研究発表会, 2009年8月7日, 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館(大阪府).
19. 松本匡広, 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “PEG ブラシを有するペプチドナノスフェアの安定性評価”, 第58回高分子討論会, 2009年9月16日, 熊本大学黒髪キャンパス(熊本県).
20. 金 亨振<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> 鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)ナノ粒子の粒径制御によるワクチンアジュバントの最適化”, 第58回高分子討論会, 2009年9月17日, 熊本大学黒髪キャンパス(熊本県).
21. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 金 亨振<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水性相互作用を利用したポリイオンコンプレックスナノ粒子の安定化”, 第58回高分子討論会, 2009年9月17日, 熊本大学黒髪キャンパス(熊本県).
22. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 金 亨振<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> 鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “免疫応答制御を目指した高分子ナノ粒子ワクチンの開発”, 第58回高分子討論会, 2009年9月18日, 熊本大学黒髪キャンパス(熊本県).
23. 巽 智秀, 竹原徹郎, 山口真二郎, 林 紀夫(阪大院医), “疎水化ポリ  $\gamma$ -グルタミン酸( $\gamma$ -PGA)ナノ粒子を用いたペプチドワクチンの開発”, ナノ・バイオメディカル学会(第2回), 2010年2月22日(大阪府).

24. 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 鹿大院医歯学, <sup>2</sup> 阪大院工, <sup>3</sup> JST-CREST), “疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の生体内における動態の解析”, 平成 22 年度九州生化学会, 2010 年 5 月 22 日, 鹿児島大学(鹿児島).
25. 吉永圭介<sup>1,4</sup>, 宇都倫史<sup>2,4</sup>, 赤木隆美<sup>3,4</sup>, 明石 満<sup>3,4</sup>, 馬場昌範<sup>2,4</sup>(<sup>1</sup> 熊本高専, <sup>2</sup> 鹿大院医歯学, <sup>3</sup> 阪大院工, <sup>4</sup> JST-CREST), “疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子における樹状細胞の活性化シグナルの解析”, 平成 22 年度九州生化学会, 2010 年 5 月 22 日, 鹿児島大学(鹿児島).
26. 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 金 亨振<sup>1</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工<sup>1</sup>, JST-CREST<sup>2</sup>), “疎水化ポリアミノ酸ナノ粒子の遺伝子キャリアとしての機能評価”, 第 59 回高分子年次大会, 2010 年 5 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
27. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 金亨振<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> JST-CREST), “疎水性相互作用を利用したポリイオンコンプレックスナノ粒子の安定化と DDS キャリアとしての機能”, 第 59 回高分子年次大会, 2010 年 5 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
28. 松本匡広, 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “ポリマーブラシ密度を自在に制御可能なペプチドナノスフェアの調製”, 第 59 回高分子学会年次大会, 2010 年 5 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
29. 宇都倫史<sup>1,4</sup>, 赤木隆美<sup>2,4</sup>, 吉永圭介<sup>3,4</sup>, 明石 満<sup>2,4</sup>, 馬場昌範<sup>1,4</sup>(<sup>1</sup> 鹿大院医歯学, <sup>2</sup> 阪大院工, <sup>3</sup> 熊本高専, <sup>4</sup> JST-CREST), “生体内における疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の樹状細胞へのデリバリー”, 第 26 回 日本 DDS 学会, 2010 年 6 月 18 日, 大阪国際交流センター(大阪府).
30. 吉永圭介<sup>1,4</sup>, 宇都倫史<sup>2,4</sup>, 赤木隆美<sup>3,4</sup>, 明石 満<sup>3,4</sup>, 馬場昌範<sup>2,4</sup>(<sup>1</sup> 熊本高専, <sup>2</sup> 鹿大院医歯学, <sup>3</sup> 阪大院工, <sup>4</sup> JST-CREST), “疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子デリバリーにおける樹状細胞の活性化メカニズムの解析”, 第 26 回 日本 DDS 学会, 2010 年 6 月 18 日, 大阪国際交流センター(大阪府).
31. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> JST-CREST), “生理環境中で安定なポリイオンコンプレックスナノ粒子の設計と機能”, 第 56 回高分子研究発表会(神戸), 2010 年 7 月 16 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
32. 松本匡広, 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “ジスルフィド結合を有する PEG ブラシペプチドナノスフェアの表面構造制御”, 第 56 回高分子研究発表会, 2010 年 7 月 16 日, 神戸県民会館(兵庫県).
33. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 渡辺一輝<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> 鹿児島大院医歯, <sup>3</sup> JST-CREST), “疎水化ポリアミノ酸を用いたポリイオンコンプレックスナノ粒子の安定性と機能評価”, 第 39 回医用高分子シンポジウム, 2010 年 7 月 27 日, 東大先端研 4 号館 2 階大講堂(東京都).
34. 松本匡広, 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “ペプチドナノスフェア表面の PEG ブラシ密度制御による細胞膜破壊活性”, 日本バイオマテリアル学会 第 5 回関西若手研究発表会, 2010 年 8 月 6 日, 京都大学医学部芝蘭会館(京都府).
35. 島 史明<sup>1</sup>, 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> JST-CREST), “抗原内包両親媒性ナノ粒子の細胞内挙動に対する粒径効果”, 日本バイオマテリアル学会 第 5 回関西若手研究発表会, 2010 年 8 月 6 日, 京都大学医学部芝蘭会館(京都府).
36. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> JST-CREST), “疎水化ポリアミノ酸からなるユニマーナノ粒子の調製と薬物キャリアとしての機能”, 日本バイオマテリアル学会 第 5 回関西若手研究発表会, 2010 年 8 月 6 日, 京都大学医学部芝蘭会館(京都府).
37. 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 鹿大院医歯学, <sup>2</sup> 阪大院工,

- <sup>3</sup>JST-CREST), “生分解性高分子を利用したナノ粒子ワクチンの開発”, 第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2010 年 9 月 3 日 (宮崎県).
38. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “両親媒性ポリアミノ酸ナノ粒子のワクチンアジュバントとしての機能” 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9 月 15 日, 北海道大学(北海道).
  39. 松本匡広, 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “結合解離可能なポリマーブラシ層を有するペプチドナノスフェアの表面制御”, 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9 月 16 日, 北海道大学(北海道).
  40. 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “両親媒性ナノ粒子の取り込み機構解明とアジュバント機能”, 第 32 回バイオマテリアル学会大会, 2010 年 11 月 29 日, グランドプリンスホテル広島(広島県).
  41. Takami Akagi<sup>1</sup>, Hyungjin Kim<sup>1,3</sup>, Tomofumi Uto<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Kagoshima University, <sup>3</sup>JST-CREST), “Preparation of size-controlled amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles for vaccine delivery and adjuvant”, International Conference on Biomaterials Science 2011, 17 March 2011, Tsukuba International Congress Center (Japan).
  42. Masahiro Matsumoto, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Complete surface control of peptide nanospheres with detachable and attachable polymer brush”, SFB 2011 annual meeting & exposition, 14 April 2011, Contemporary Resort Convention Center, Florida (USA).
  43. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 蜂須賀 正紘<sup>2</sup>, 大西智之<sup>2</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 松岡秀樹<sup>2</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>京大院工, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水修飾ポリアミノ酸の両親媒構造制御によるユニマーナノ粒子の形成と安定性評価”, 第 60 回高分子年次大会, 2011 年 5 月 25 日, 大阪国際会議場(大阪府).
  44. 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “高密度ポリマーブラシを有するペプチドナノスフェアのブラシ密度評価”, 第 60 回高分子年次大会, 2011 年 5 月 25 日, 大阪国際会議場(大阪府).
  45. 岡本成史, 松岡須美子, Ahmad M. Haredy, 山田博司, 谷本武史, 五味康行, 石川豊数, 奥野良信, 赤木隆美, 明石 満, 森 康子, 山西弘一, インフルエンザ不活化全粒子ワクチンの経鼻接種による交叉防御効果と抗ウイルス中和抗体産生との関連性, 第 25 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム(2011 年 6 月 2-4 日 富山県富山市).
  46. 島 史明<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 西 庸介<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “両親媒性ポリアミノ酸からなるナノ粒子の細胞内および体内動態評価”, 第 27 回日本 DDS 学会, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学本郷キャンパス(東京都).
  47. 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 西庸介<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>鹿児島大院医歯学, <sup>2</sup>阪大院工, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子投与後の細胞性免疫誘導の解析”, 第 27 回日本 DDS 学会, 2011 年 6 月 10 日, 東京大学本郷キャンパス(東京都).
  48. 島 史明, 川上皓史, 赤木隆美, 望月衛子, 津田哲哉, 桑畑 進, 明石 満(阪大院工), “イオン液体を用いた電子顕微鏡観察による高分子ナノ粒子の取り込み挙動評価”, 第 57 回高分子研究発表会, 2011 年 7 月 15 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
  49. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 島 史明<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化ポリアミノ酸からなるナノ粒子ワクチンの細胞内および体内動態

- の評価”, 第 40 回医用高分子シンポジウム, 2011 年 7 月 26 日, 関西大学千里山キャンパス (大阪府).
50. 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “生分解性ポリマーからなるナノ粒子の細胞内及び生体内動態と粒径効果”, 日本バイオマテリアル学会第 6 回若手研究発表会, 2011 年 8 月 12 日, 国立循環器病センター(大阪府).
  51. 福本遼太<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST<sup>2</sup>), “両親媒性ポリアミノ酸からなるナノマイクロ構造体の形態制御”, 日本バイオマテリアル学会 第 6 回関西若手研究発表会, 2011 年 8 月 12 日, 国立循環器病研究センター(大阪府).
  52. Heyun Shen<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Polyampholyte Nanoparticles Prepared by Amphoteric Poly(amino acid) for Protein Nanocarrier”, 242nd ACS National meeting, 31 August 2011, Colorado Convention Center, Denver (USA).
  53. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> 鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “両親媒性ポリアミノ酸からなるナノ構造体の調製と機能”, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 28 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県).
  54. 申 鶴雲<sup>1</sup>, 赤木 隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “カチオン化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)からなる両性電解質ナノ粒子の調製と機能”, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 28 日, 岡山大学 津山キャンパス(岡山県).
  55. 島 史明<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> 鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “抗原内包ナノ粒子の細胞内・体内動態評価によるナノ粒子ワクチンの免疫誘導メカニズム解析”, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 28 日, 岡山大学(岡山県).
  56. 福本遼太<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST<sup>2</sup>), “両親媒性ポリアミノ酸からなる多孔質粒子の調製およびその形成メカニズム”, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 28 日, 岡山大学 津山キャンパス(岡山県).
  57. 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “高密度 PEG ブラシを有するペプチドナノスフェアの表面構造の精密制御と機能発現”, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 29 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県).
  58. 朱 葉, 赤木 隆美, 明石 満(阪大院工), “Preparation and Characterization of Nanoparticles Formation through Stereocomplexation between  $\gamma$ -PGA-*b*-PLLA/ $\gamma$ -PGA-*b*-PDLA Block Copolymers”, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 29 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県).
  59. 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 外山政明<sup>1,3</sup>, 西庸介<sup>1,3</sup>, 島史明<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup> 鹿児島大院医歯学, <sup>2</sup> 阪大院工, <sup>3</sup>JST-CREST), “Administration of antigen-carrying nanoparticles vaccine induce adaptive response in mice”, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011 年 11 月 28 日, 幕張メッセ(千葉県).
  60. 赤木隆美<sup>1</sup>, 藤原知子<sup>2</sup>, 明石 満<sup>1</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> メンフィス大), “インクジェットプリントによるポリ乳酸ステレオコンプレックスの作製”, 第 61 回高分子年次大会, 2012 年 5 月 29 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
  61. 島 史明<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup> JST-CREST), “CpG ODN 担持疎水化ポリアミノ酸ナノ粒子の調製及びアジュバント機能評価”, 第 61 回高分子年次大会, 2012 年 5 月 29 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
  62. 福本遼太<sup>1</sup>・赤木隆美<sup>1,2</sup>・明石 満<sup>1,2</sup>(阪大院工<sup>1</sup>・JST-CREST<sup>2</sup>), “両親媒性ポリアミノ酸からなる中空および多孔質粒子の調製と薬物担持能の評価”, 第 61 回高分子年次大会, 2012 年 5



- 月 29 日, 横浜パシフィコ(神奈川県).
63. Phassamon Piyapakorn<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Preparation of unimer nanoparticles composed of hydrophobized poly(amino acid) and their potential application for drug carriers”, 第 61 回高分子年次大会, 2012 年 5 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県).
  64. 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “Precise Control of PEG-Brush Density on The Surface of Biodegradable Peptide Nanospheres by Oxidation-Reduction Reactions”, 第 61 回高分子年次大会, 2012 年 5 月 30 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
  65. Fumiaki Shima<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,3</sup>, Tomofumi Uto<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST, <sup>3</sup>Graduate School of Medical and Dental, Kagoshima University), “Size effect on intracellular behavior and biodistribution of protein-encapsulated nanoparticles composed of amphiphilic polymer”, 9th World Biomaterials Congress, 2 June 2012, Century City International Convention Center, Chengdu (China).
  66. Phassamon Piyapakorn<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Preparation and characterization of unimer nanoparticles composed of hydrophobized poly(amino acid)”, 9th World Biomaterials Congress, 2 June 2012, Century City International Convention Center, Chengdu (China).
  67. Heyun Shen<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Nanostructured Amphoteric Poly( $\gamma$ -glutamic acid)s: Preparation by Self-Complexation and Their Functions”, 9th World Biomaterials Congress, 4 June 2012, Century City International Convention Center, Chengdu (China).
  68. Takami Akagi<sup>1</sup>, Tomoko Fujiwara<sup>2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>The University of Memphis), “Inkjet Printing of Layer-by-layer Assembled Poly(lactic Acid)s Stereocomplex”, 9th World Biomaterials Congress, 5 June 2012, Century City International Convention Center, Chengdu (China).
  69. Masahiro Matsumoto, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Surface control of biodegradable peptide nanospheres with detachable and attachable high-density PEG brush”, 9th World Biomaterials Congress, 5 June 2012, Century City International Convention Center, Chengdu (China).
  70. 赤木隆美, 福本遼太, 首藤真奈美, 島 史明, 明石 満(阪大院工, JST-CREST), “両親媒性ポリアミノ酸からなるナノマイクロ構造体の調製と細胞内取込み挙動の評価”, 第 41 回医用高分子シンポジウム, 2012 年 6 月 26 日, 東京大学先端科学技術研究センター(東京都).
  71. 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “ヘテロブラシ構造を有する生分解性ペプチドナノスフェアの調製と表面機能の制御”, 第 22 回バイオ・高分子シンポジウム, 2012 年 6 月 26 日, 東京大学先端科学技術研究センター(東京都).
  72. 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 宇都倫史<sup>1,2</sup>, 長尾将男<sup>2,3</sup>, 三輪哲生<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>武田共同研究講座, <sup>3</sup>武田 CMC 研究センター), “疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)を用いたナノ粒子アジュバントの開発と実用化研究”, 第 28 回 DDS 学会, 2012 年 7 月 4 日, 札幌コンベンションセンター(北海道).
  73. 島 史明<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “複数の Toll 様受容体を

- 刺激可能なナノ粒子アジュバントの調製及び免疫賦活化機能の評価”, 第 28 回 DDS 学会, 2012 年 7 月 4 日, 札幌コンベンションセンター(北海道).
74. 福本遼太<sup>1</sup>・赤木隆美<sup>1,2</sup>・明石 満<sup>1,2</sup>(阪大院工<sup>1</sup>・JST-CREST<sup>2</sup>), “疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)を用いたマイクロカプセルおよび多孔質粒子の調製と機能評価”, 第 58 回高分子研究発表会, 2012 年 7 月 13 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
  75. 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “ヘテロポリマーブラシ層を有する生分解性ペプチドナノスフェアの生体親和性評価”, 第 58 回高分子研究発表会, 2012 年 7 月 13 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
  76. 首藤真奈見<sup>1</sup>, 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 桑畑 進<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工,<sup>2</sup>JST-CREST), “顕微鏡観察による生分解性ナノ粒子の細胞内取り込み過程の視覚的評価”, 第 7 回日本バイオマテリアル学会 関西若手研究発表会, 2012 年 8 月 2 日, 甲南大学岡本キャンパス(兵庫県).
  77. 福本遼太<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(阪大院工<sup>1</sup>, JST-CREST<sup>2</sup>), “疎水修飾ポリアミノ酸からなる中空および多孔質粒子のワクチンキャリアとしての機能評価”, 第 61 回高分子討論会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋工業大学(愛知県).
  78. 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “高密度ヘテロポリマーブラシを有するペプチドナノスフェアのバイオイナート機能”, 第 61 回高分子討論会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋工業大学(愛知県).
  79. 赤木隆美<sup>1</sup>, 藤原知子<sup>2</sup>, 明石 満<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大院工,<sup>2</sup>メンフィス大), “インクジェットプリンタを用いたポリ乳酸の交互積層によるステレオコンプレックス形成”, 第 61 回高分子討論会, 2012 年 9 月 20 日, 名古屋工業大学(愛知県).
  80. 巽 智秀<sup>1,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 竹原徹郎<sup>2,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院医,<sup>2</sup>阪大院工,<sup>3</sup>JST-CREST), “肝臓に対する新規アジュバント疎水化ポリ γ-グルタミン酸ナノ粒子を用いたペプチドワクチン”, 2012 年 10 月 11 日, 第 20 回日本消化器関連学会週間, 第 16 回肝臓学会大会/第 54 回消化器病学会大会/第 10 回消化器外科学会大会(兵庫県).

③ ポスター発表 (国内会議 75 件、国際会議 24 件)

1. 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 王 欣<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 善久理加<sup>1</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>鹿大院医歯学,<sup>2</sup>阪大院工,<sup>3</sup>CREST), “マウスを用いたHIV抗原固定化ナノ粒子の経鼻投与による抗原特異的な細胞性免疫の解析”, 第55回日本ウイルス学会学術集会, 2007年10月22日, 札幌コンベンションセンター(北海道).
2. 赤木隆美<sup>1,4</sup>, 中川晋作<sup>2,4</sup>, 馬場昌範<sup>3,4</sup>, 明石 満<sup>1,4</sup>(<sup>1</sup>阪大院工,<sup>2</sup>阪大院薬,<sup>3</sup>鹿大院医歯学,<sup>4</sup>CREST), “免疫応答制御を有する高分子ナノ粒子の開発”, 大阪大学イノベーションセミナー2007, 2007年10月22日, 大阪大学(大阪府).
3. Takami Akagi<sup>1,4</sup>, Shinsaku Nakagawa<sup>2,4</sup>, Masanori Baba<sup>3,4</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,4</sup>(<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, <sup>3</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, <sup>4</sup>CREST-JST), “Immunostimulation of dendritic cells using amphiphilic polymeric nanoparticles for vaccine development”, Green Sustainable Biological and Chemical Processes, 2007年11月16日, 大阪大学銀杏会館(大阪府).
4. 赤木隆美<sup>1,4</sup>, 中川晋作<sup>2,4</sup>, 馬場昌範<sup>3,4</sup>, 明石 満<sup>1,4</sup>(<sup>1</sup>阪大院工,<sup>2</sup>阪大院薬,<sup>3</sup>鹿大院医歯,<sup>4</sup>

- JST-CREST), “ポリアミノ酸ナノ粒子による蛋白抗原の細胞内動態制御”, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月26日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
5. 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “反応性官能基を有するPEG ブラシペプチドナノスフェアへの蛋白質吸着特性”, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月27日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
  6. 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 松崎典弥<sup>1</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “細胞質内での抗原徐放を目的とした機能性疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)ナノ粒子の調製”, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月27日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
  7. Tomofumi Uto<sup>1,3</sup>, Xin Wang<sup>1,3</sup>, Rika Zenkyu<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Kagoshima University, <sup>2</sup>Osaka University, <sup>3</sup>CREST-JST), “Biodegradable nanoparticles induce antigen-specific T cell response through dendritic cell maturation”, Vaccine Congress, 2007年12月9日, Moevenpick Hotel Amsterdam City Center (Netherlands).
  8. Takami Akagi<sup>1,3</sup>, Xin Wang<sup>2,3</sup>, Tomofumi Uto<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Osaka University, <sup>2</sup>Kagoshima University, <sup>3</sup>CREST-JST), “Amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles as a carrier and adjuvant for protein-based vaccines”, Vaccine Congress, 2007年12月9日, Moevenpick Hotel Amsterdam City Center (Netherlands).
  9. 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 松崎典弥<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の粒径制御と免疫誘導効果”, 第57回高分子学会年次大会, 2008年5月29日, パシフィコ横浜(神奈川県).
  10. 赤木隆美, 明石 満(阪大院工, JST-CREST), “免疫制御能を有する高分子ナノ粒子ワクチンの製造”, 第24回日本DDS学会, 2008年6月29日, 六本木アカデミーヒルズ(東京都).
  11. 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 松崎典弥<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の粒径制御とそれらの免疫誘導効果”, 第54回日本高分子研究発表会, 2008年7月18日, 兵庫県中央労働センター(兵庫県).
  12. 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 松崎典弥<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場 昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “粒径制御された疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)ナノ粒子のワクチンアジュバントとしての機能評価”, 第57回日本高分子学会高分子討論会, 2008年9月25日, 大阪市立大学(大阪府).
  13. 井本鷹行, 伊藤祐貴, 松崎典弥, 木田敏之, 明石 満(阪大院工), “キトサン-ポリ $\gamma$ -グルタミン酸中空カプセルからの内包物の放出制御”, 第57回高分子討論会, 2008年9月25日, 大阪市立大学杉本キャンパス(大阪府).
  14. Shinjiro Yamaguchi<sup>1,2</sup>, Tomohide Tatsumi<sup>1,2</sup>, Tetsuo Takehara<sup>1,2</sup>, Akira Sasakawa<sup>1,2</sup>, Masashi Yamamoto<sup>1,2</sup>, Satoshi Shimizu<sup>1</sup>, Takahiro Kodama<sup>1</sup>, Hayato Hikita<sup>1</sup>, Keisuke Kohga<sup>1</sup>, Akio Uemura<sup>1</sup>, Ryotaro Sakamori<sup>1</sup>, Takuya Miyagi<sup>1</sup>, Hisashi Ishida<sup>1</sup>, Kazuyozhi Ohkawa<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>2,3</sup>, Norio Hayashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Medicine, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST, <sup>3</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University), “Efficacy of the immunotherapy with  $\gamma$ -polyglutamic acid nanoparticles in mouse liver tumor”, 59<sup>th</sup> The American Association for the Study of Liver Disease, 2008年11月3日, Moscone West Convention Center (San Francisco, USA).
  15. 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 松崎典弥<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場 昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “粒径制御による疎水修飾ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)ナノ粒子のワクチ

- ンアジュバント活性の制御”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008, 2008年11月17日, 東京大学本郷キャンパス(東京都).
16. 和久友則<sup>1</sup>, 松崎典弥<sup>1</sup>, 明石満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “表面PEGブラシ密度を可逆的に制御可能な環境応答性ペプチドナノスフェアのDDSへの応用”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008, 2008年11月17日, 東京大学本郷キャンパス(東京都).
  17. 山口真二郎<sup>1,2</sup>, 巽 智秀<sup>1,2</sup>, 竹原徹郎<sup>1,2</sup>, 清水 聡<sup>1</sup>, 甲賀啓介<sup>1</sup>, 植村彰夫<sup>1</sup>, 宮城琢也<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 林 紀夫<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院医, <sup>2</sup>JST-CREST, <sup>3</sup>阪大院工), “Immunotherapy with  $\gamma$ -poly-glutamic acid nanoparticles in mouse liver tumor”, 第38回日本免疫学会総会, 2008年12月1日, 京都国際会議場(京都府).
  18. 宇都倫史<sup>1,4</sup>, 善久理加<sup>1,4</sup>, 佐藤克明<sup>2</sup>, 明石 満<sup>3,4</sup>, 馬場昌範<sup>1,4</sup>(<sup>1</sup>鹿大院医歯学, <sup>2</sup>理研, <sup>3</sup>阪大院工, <sup>4</sup>CREST), “Induction of adaptive immunity by intranasal immunization using antigen-carrying biodegradable nanoparticles with potent adjuvant activity”, 第38回日本免疫学会総会学術集会, 2008年12月3日, 京都国際会議場(京都府).
  19. Takami Akagi<sup>1,3</sup>, Hyungjin Kim<sup>1</sup>, Tomofumi Uto<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,3</sup>, “Amphiphilic poly (amino acid) nanoparticles for vaccine delivery and adjuvants”, (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Kagoshima University, <sup>3</sup>JST-CREST), The 14 th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 2009年2月16日, Sheraton Hotel, Salt Lake City (Utah, USA).
  20. Hyungjin Kim<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,3</sup>, Michiya Matsusaki<sup>1</sup>, Tomofumi Uto<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,3</sup>, “Preparation of size tunable amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles and their potential applications as vaccine carriers”, (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Kagoshima University, <sup>3</sup>JST-CREST), The 14 th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 2009年2月16日, Sheraton Hotel, Salt Lake City (Utah, USA).
  21. 赤木隆美<sup>1</sup>, 金 亨振<sup>1</sup>, 巽 智秀<sup>2</sup>, 馬場昌範<sup>3</sup>, 明石 満<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>阪大院医, <sup>3</sup>鹿児島大院医歯学), “高分子ナノ粒子を用いたワクチン開発”, 第25回日本医工学治療学会, 2009年4月11日, 大阪国際会議場(大阪府).
  22. 金 亨振<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 松崎典弥<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “粒径制御された疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)ナノ粒子のタンパク質キャリアーとしての機能評価”, 第58回高分子学会年次大会, 2009年5月27日, 神戸国際会議場・神戸国際展示場(兵庫県).
  23. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 金 亨振<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)を用いたポリイオンコンプレックスナノ粒子の調製”, 第58回高分子学会年次大会, 2009年5月27日, 神戸国際会議場・神戸国際展示場(兵庫県).
  24. 山口真二郎<sup>1,2</sup>, 巽 智秀<sup>1,2</sup>, 竹原徹郎<sup>1,2</sup>, 笹川 哲<sup>1,2</sup>, 山本政司<sup>1,2</sup>, 清水 聡<sup>1</sup>, 小玉尚宏<sup>1</sup>, 疋田隼人<sup>1</sup>, 甲賀啓介<sup>1</sup>, 植村彰夫<sup>1</sup>, 阪森亮太郎<sup>1</sup>, 法水 淳<sup>1</sup>, 宮城琢也<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 石田永<sup>1</sup>, 大川和良<sup>1</sup>, 平松直樹<sup>1</sup>, 考藤達哉<sup>1</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 林 紀夫<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院医, <sup>2</sup>JST-CREST, <sup>3</sup>阪大院工), “ $\gamma$ -PGAナノ粒子を用いた癌免疫療法の基礎的検討”, “Immunotherapy with  $\gamma$ -poly-glutamic acid nanoparticles in mouse liver tumor”, 第45回肝臓学会総会, 2009年6月4日, 神戸国際展示場(兵庫県).
  25. 金 亨振<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)ナノ粒子の物性制御によるワクチンアジュバ

- ントとしての機能制御”, 第25回日本DDS学会, 2009年7月4日, 東京ドームホテル(東京都).
26. 金 亨振<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “粒径制御された疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)ナノ粒子の蛋白質キャリアとしての機能評価”, 日本バイオマテリアル学会 第4回関西若手研究発表会, 2009年8月7日, 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館(大阪府).
  27. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸)を用いたポリイオンコンプレックスナノ粒子のワクチンキャリアとしての機能評価”, 第31回日本バイオマテリアル学会, 2009年11月17日, 京都テルサ(京都府).
  28. 松本匡広, 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “PEGブラシペプチドナノスフェアの加水分解および滅菌処理への安定性評価”, 第31回日本バイオマテリアル学会, 2009年11月17日, 京都テルサ(京都府).
  29. 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 王 欣<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>鹿大院医歯学, <sup>2</sup>阪大院工, <sup>3</sup>JST-CREST), “ペプチド抗原(HIV-1 T26K)固定化ナノ粒子の経鼻投与による抗原特異的な細胞性免疫の誘導”, 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月26日, 都市センターホテル(東京都).
  30. Takami Akagi<sup>1,3</sup>, Hyungjin Kim<sup>1,3</sup>, Tomofumi Uto<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, <sup>3</sup>JST-CREST), “Preparation of size-controlled amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles for vaccine delivery and adjuvant”, Annual Meeting of the Society For Biomaterials, April 22-23, 2010, Washington State Convention Center, Seattle, Washington (USA).
  31. Masahiro Matsumoto, Tomonori, Waku, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Stability of Biodegradable Peptide Nanospheres with PEG Brush Layer for Hydrolysis and Sterilization”, 2010 Annual Meeting of the Society For Biomaterials, 22-23 April 2010, Washington State Convention Center, Seattle (USA).
  32. Tomofumi Uto<sup>1,3</sup>, Takami Akagi<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Kagoshima University, <sup>2</sup>Osaka University, <sup>3</sup>CREST-JST), “ $\gamma$ -PGA nanoparticles as an antigen carrier for delivery and vaccine adjuvant”, The 5th German-Japanese HIV Symposium, 10 May, 2010, Keio University (Japan).
  33. 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>鹿大院医歯学, <sup>2</sup>阪大院工, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の生体内における動態の解析”, 平成22年度九州生化学会, 2010年5月22日, 鹿児島大学(鹿児島県).
  34. 吉永圭介<sup>1,4</sup>, 宇都倫史<sup>2,4</sup>, 赤木隆美<sup>3,4</sup>, 明石 満<sup>3,4</sup>, 馬場昌範<sup>2,4</sup>(<sup>1</sup>熊本高専, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯学, <sup>3</sup>阪大院工, <sup>4</sup>JST-CREST), “疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子における樹状細胞の活性化シグナルの解析”, 平成22年度九州生化学会, 2010年5月22日, 鹿児島大学(鹿児島県).
  35. 島 史明<sup>1</sup>, 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “タンパク質を内包した両親媒性ポリアミノ酸ナノ粒子の細胞内動態の解析”, 第59回高分子学会年次大会, 2010年5月26日, パシフィコ横浜(神奈川県).
  36. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木 隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “両親媒性ポリアミノ酸からなるユニマーナノ粒子の調製と評価”, 第59回高分子学会年次大会, 2010年5月26日, パシフィコ横浜(神奈川県).

37. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水化ポリアミノ酸を用いたポリイオンコンプレックスナノ粒子の調製とDDSキャリアとしての機能評価”, 第26回日本DDS学会, 2010年6月17, 18日, 大阪国際交流センター(大阪府).
38. 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “抗原を内包した疎水化ポリアミノ酸ナノ粒子の細胞内動態の解析”, 第26回日本DDS学会, 2010年6月17, 18日, 大阪国際交流センター(大阪府).
39. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 赤木 隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “両親媒性ポリアミノ酸の会合制御による生分解性ユニマーナノ粒子の調製”, 第56回高分子研究発表会, 2010年7月16日, 神戸県民会館(兵庫県).
40. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子の免疫誘導効果”, 第5回関西若手研究発表会, 2010年8月6日, 芝蘭会館(京都大学医学部百周年記念施設)2階(京都府).
41. Takami Akagi, Phassamon Piyapakorn, Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Formation of Unimer Nanoparticles by Intra-polymer Association of Amphiphilic Poly(amino acid) in Aqueous Solution”, International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science (NCSS2010), 21 September 2010, Makuhari Messe (Chiba).
42. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水修飾ポリアミノ酸からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子の外部刺激応答性”, 第59回高分子学会討論会, 2010年9月15日, 北海道大学(北海道).
43. 島 史明<sup>1</sup>, 金 亨振<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “粒径制御された両親媒性ポリアミノ酸ナノ粒子の細胞内挙動の評価”, 第59回高分子学会討論会, 2010年9月15日, 北海道大学(北海道).
44. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 赤木 隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “両親媒性ポリアミノ酸からなるユニマーナノ粒子の構造解析”, 第59回高分子学会討論会, 2010年9月15日, 北海道大学(北海道).
45. Tomofumi Uto<sup>1,3</sup>, Takami Akagi<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Kagoshima University, <sup>2</sup>Osaka University, <sup>3</sup>CREST-JST), “The MyD88 pathway is critical for innate and adaptive immune responses to poly(γ-glutamic acid) nanoparticles in mice”, The 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress, October 2010, Vienna (Austria).
46. 渡辺一輝<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子の免疫誘導効果”, 第32回日本バイオマテリアル学会大会, 2010年11月30日, グランドプリンスホテル広島(広島県).
47. 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “両親媒性ポリアミノ酸ナノ粒子の取り込み機構解明とアジュバント機能”, 第32回日本バイオマテリアル学会大会, 2010年11月29日, グランドプリンスホテル広島(広島県).
48. 松本匡広, 和久友則, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “還元応答性ペプチドナノスフェアのPEGブラシ密度制御による細胞膜破壊活性”, 第32回日本バイオマテリアル学会, 2010年11月30日, グランドプリンスホテル(広島県).
49. Masahiro Matsumoto, Tomonori, Waku, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi

- (Graduate School of Engineering, Osaka University), “Surface control of peptide nanospheres with detachable and attachable polymer brush”, Japan-Taiwan 3 University Joint Seminar on Nanostructure and Advanced Materials, 26 November 2010, Kagoshima University (Japan).
50. Okamoto, S. Matsuoka S, Yamada H, Gomi Y, Okuno Y, Akagi T, Akashi M, Mori Y, Yamanishi K. Protective immune response by intranasal immunization with split-virion influenza A vaccine with adjuvant and whole-virion influenza A vaccine Cell Symposia: Influenza - Translating basic insights. December 2-4, 2010 (Washington DC, USA)
  51. Fumiaki Shima<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Intracellular degradation and distribution of size-controlled antigen-encapsulated biodegradable nanoparticles”, SFB 2011 annual meeting & exposition, 14 April 2011, Contemporary Resort Convention Center, Florida (USA).
  52. 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水化ポリ(γ-グルタミン酸) ナノ粒子の抗原提示細胞による取り込み・細胞内動態・分解挙動に対する粒径効果”, 第 60 回高分子年次大会, 2011 年 5 月 25 日, グランキューブ大阪(大阪府).
  53. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 渡辺一輝<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水修飾ポリアミノ酸からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子のワクチンキャリアとしての機能”, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 25 日, 大阪国際会議場(大阪府).
  54. 福本遼太<sup>1</sup>, 渡辺一輝<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (阪大院工<sup>1</sup>, JST-CREST<sup>2</sup>), “アジュバント活性を有する両親媒性ポリアミノ酸からなるナノマイクロ構造体の調製と形状制御”, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 25 日, 大阪国際会議場(大阪府).
  55. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水修飾ポリアミノ酸からなるユニマーナノ粒子の設計と評価”, 第 27 回日本 DDS 学会, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学本郷キャンパス(東京都).
  56. 西庸介<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 馬場昌範<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>鹿児島大院医歯学, <sup>2</sup>阪大院工, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化ポリアミノ酸ナノ粒子を利用した貪食細胞による抗原取り込みの解析”, 第 27 回日本 DDS 学会, 2011 年 6 月 10 日, 東京大学本郷キャンパス(東京都).
  57. 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “ペプチドナノスフェア表面における濃厚ポリマーブラシ層の形成メカニズムの解明”, 第 57 回高分子研究発表会, 2011 年 7 月 15 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
  58. 申 鶴雲<sup>1</sup>, 赤木 隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “カチオン化ポリアミノ酸からなる両性電解質ナノゲルの調製”, 第 57 回高分子研究発表会, 2011 年 7 月 15 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
  59. 松本匡広, 松崎典弥, 明石 満(阪大院工), “高密度 PEG ブラシ層を有するペプチドナノスフェアのブラシ密度に依存した生体適合性の発現”, 第 21 回バイオ・高分子シンポジウム, 2011 年 7 月 26 日, 関西大学千里山キャンパス(大阪府).
  60. 申 鶴雲<sup>1</sup>, 赤木 隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “両性電解質ポリアミノ酸からなるナノ粒子の調製と機能”, 第 40 回医用高分子シンポジウム, 2011 年 7 月 26 日, 関西大学千里山キャンパス(大阪府).
  61. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水修飾ポリ(γ-グルタミン酸)からなるユニマーナノ粒子の DDS キャリアとしての機能評価”, 日本バイ

オマテリアル学会 第6回関西若手研究発表会, 2011年8月12日, 国立循環器病センター(大阪府).

62. Takami Akagi<sup>1</sup>, Tomoko Fujiwara<sup>2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>The University of Memphis), “Fabrication of layer-by-layer poly(lactic acid)s stereocomplex using an inkjet printer”, 242nd ACS National Meeting, 29 August 2011, Colorado Convention Center, Denver (USA).
63. Okamoto S, Yamada H, Matsuoka S, Haredy AM, Tanimoto T, Gomi Y, Ishikawa T, Akashi M, Okuno Y, Mori Y, Yamanishi K. Intranasal Immunization With Formalin Inactivated Influenza A Whole-Virion Vaccine Alone Induces Sufficient Cross-Protection, Correlating With Cross-Reactive Neutralizing Antibody Production. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep 11 - Sep 16, 2011 (Sapporo, Japan).
64. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “Effect of molecular weight on unimer nanoparticles formation of hydrophobized poly(amino acid)”, 第60回高分子討論会, 2011年9月28日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県).
65. Tomofumi Uto<sup>1,4</sup>, Takami Akagi<sup>2,4</sup>, Keisuke Yoshinaga<sup>3,4</sup>, Masaaki Toyama<sup>1,4</sup>, Yosuke Nishi<sup>1,4</sup>, Mitsuru Akashi<sup>2,4</sup>, Masanori Baba<sup>1,4</sup>, (<sup>1</sup>Kagoshima Univ., <sup>2</sup>Osaka Univ., <sup>3</sup>Kumamoto nct., <sup>4</sup>JST-CREST) “Biodegradable nanoparticles induce innate and adaptive immunity via TLR4 signaling pathway”, 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, 4 October 2011, Seattle, (USA).
66. 明田寛史<sup>1,3</sup>, 巽 智秀<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 常松日奈子<sup>1</sup>, 山本政司<sup>1</sup>, 松本健吾<sup>1</sup>, 清水 聡<sup>1</sup>, 小玉尚宏<sup>1</sup>, 重川 稔<sup>1</sup>, 名和誉敏<sup>1</sup>, 疋田隼人<sup>1</sup>, 植村彰夫<sup>1</sup>, 法水 淳<sup>1</sup>, 宮城琢也<sup>1</sup>, 石田永<sup>1</sup>, 平松直樹<sup>1</sup>, 考藤達哉<sup>1</sup>, 林 紀夫<sup>1</sup>, 明石 満<sup>2,3</sup>, 竹原徹郎<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院医, <sup>2</sup>阪大院工, <sup>3</sup>JST-CREST), “疎水化ポリγ-グルタミン酸ナノ粒子の癌抗原ペプチドワクチンにおけるアジュバントとしての有用性”, JDDW2011(第19回日本消化器関連学会週間)第15回肝臓学会大会, 2011年10月21日, 福岡国際センター(福岡県).
67. 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 西 庸介<sup>3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST, <sup>3</sup>鹿児島大院医歯), “生分解性を有する両親媒性ポリアミノ酸ナノ粒子の体内動態及びアジュバント機能評価”, 第33回日本バイオマテリアル学会, 2011年11月21日, 京都府民総合交流プラザ 京都テルサ(京都府).
68. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)からなるユニマーナノ粒子の蛋白質キャリアとしての機能”, 第33回日本バイオマテリアル学会大会, 2011年11月22日, 京都府民総合交流プラザ 京都テルサ(東京都).
69. 福本遼太<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工<sup>1</sup>, <sup>2</sup>JST-CREST<sup>2</sup>), “疎水化ポリアミノ酸の会合制御によるナノ-マイクロ構造体の調製と機能評価”, 2011年11月22日, 日本バイオマテリアル学会大会, 京都府民総合交流プラザ 京都テルサ(京都府).
70. 申 鶴雲<sup>1</sup>, 赤木 隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工<sup>1</sup>, <sup>2</sup>JST-CREST<sup>2</sup>), “カチオン化ポリ(γ-グルタミン酸)からなるナノ粒子の調製と蛋白質キャリアとしての機能”, 2011年11月22日, 日本バイオマテリアル学会大会, 京都府民総合交流プラザ 京都テルサ(京都府).
71. 朱 葉<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “ポリ(γ-グルタミン酸)–ポリ乳酸グラフト共重合体のステレオコンプレックス形成によるナノ粒子の調製”, 第61回高分子学会年次大会, 2012年5月29日, パシフィコ横浜(神奈川県).
72. 首藤真奈見<sup>1</sup>, 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 桑畑 進<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST),



- “イオン液体を用いた SEM 観察による細胞のナノ粒子取り込み挙動の評価”, 第 61 回高分子学会年次大会, 2012 年 5 月 29 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
73. Tomofumi Uto<sup>1,2,3</sup>, Takami Akagi<sup>2,3</sup>, Masaaki Toyama<sup>1,3</sup>, Yosuke Nishi<sup>1,3</sup>, Fumiaki Shima<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>2,3</sup>, Masanori Baba<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Kagoshima University, <sup>2</sup>Osaka University, <sup>3</sup>JST-CREST), “Induction of immune responses by biodegradable nanoparticle vaccine”, 9th World Biomaterials Congress, 3 June 2012, Century City International Convention Center, Chengdu (China).
  74. 島 史明<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “核酸アジュバントを担持した疎水化ポリアミノ酸ナノ粒子の調製とアジュバント機能の評価”, 第 41 回医用高分子シンポジウム, 2012 年 6 月 25 日, 東京大学先端科学技術研究センター(東京都).
  75. 福本遼太<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水修飾ポリアミノ酸からなるナノおよびマイクロ構造体の形態制御と薬物担持能の評価”, 第 28 回日本 DDS 学会, 2012 年 7 月 5 日, 札幌コンベンションセンター(北海道).
  76. 宇都倫史<sup>1,2,3</sup>, 外山政明<sup>2,3</sup>, 西 庸介<sup>2,3</sup>, 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 明石 満<sup>1,3</sup>, 馬場昌範<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>鹿児島大院医歯学, <sup>3</sup>JST-CREST), “抗原内包型疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の皮下投与によるリンパ節への抗原移行の解析”, 第 28 回日本 DDS 学会, 2012 年 7 月 5 日, 札幌コンベンションセンター(北海道).
  77. Phassamon Piyapakorn<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Biodegradable unimer nanoparticles composed of amphiphilic poly(amino acid) : Effect of internal structures on their potential applications as drug carriers”, 第 58 回高分子研究発表会(神戸), 2012 年 7 月 13 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
  78. Ye Zhu<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Characterization of Nanoparticles composed of Enantiomeric Poly( $\gamma$ -glutamic acid)-*g*-poly(lactide) Copolymers for Drug Carriers”, 第 58 回高分子研究発表会(神戸), 2012 年 7 月 13 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
  79. 島 史明<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “抗原及び核酸アジュバント担持疎水化ポリアミノ酸ナノ粒子の調製と活性評価”, 第 58 回高分子研究発表会, 2012 年 7 月 13 日, 兵庫県民会館(兵庫県).
  80. 島 史明<sup>1,3</sup>, 赤木隆美<sup>2,3</sup>, 宇都倫史<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>阪大院工・<sup>2</sup>阪大院工 武田共同研究講座・<sup>3</sup>JST-CREST), “生分解性ナノ粒子を免疫増強剤に～安全かつ有効なワクチンアジュバントの実用化～”, 2012 年 7 月 18 日, 第 57 回高分子夏期大学, 琵琶湖ホテル(滋賀県).
  81. Takami Akagi, Fumiaki Shima, Manami Syudo, Eiko Mochizuki, Tetsuya Tsuda, Susumu Kuwabata, Mitsuru Akashi (Graduate School of Engineering, Osaka University, JST-CREST), “Observation of the cellular uptake behavior of nano/microparticles in wet condition by scanning electron microscopy using an ionic liquid”, NanoBio Seattle2012, 23-24 July 2012, Bell Harbor Convention Center, Seattle (USA).
  82. Fumiaki Shima<sup>1,2</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Tomofumi Uto<sup>1,2</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST, <sup>3</sup>Graduate School of Medical and Dental, Kagoshima University), “Biodistribution of size-regulated poly(amino acid) nanoparticles and its potential application for the nanoparticle-based vaccine adjuvants”, NanoBio Seattle2012, 23-24 July 2012, Bell Harbor Convention Center, Seattle (USA).

83. Ryota Fukumoto<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup>, (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Morphological control of nano- and microstructures composed of amphiphilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) and their potential application for drug carriers”, NanoBio Seattle2012, 23-24 July 2012, Bell Harbor Convention Center, Seattle (USA).
84. Ye Zhu<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup> JST-CREST), “Preparation and Characterization of Nanoparticles through Stereocomplexation between Enantiomeric Poly( $\gamma$ -glutamic acid)-poly(lactide) Graft Copolymers”, NanoBio Seattle2012, 23-24 July 2012, Bell Harbor Convention Center, Seattle (USA).
85. Tomofumi Uto<sup>1,2,3</sup>, Masaaki Toyama<sup>2,3</sup>, Yosuke Nishi<sup>2,3</sup>, Takami Akagi<sup>1,3</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,3</sup>, Masanori Baba<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>Osaka University, <sup>2</sup>Kagoshima University, <sup>3</sup>JST-CREST), “Biodegradable poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticle uptake by dendritic cells and induction of immune response in vivo”, NanoBio Seattle2012, 23-24 July 2012, Bell Harbor Convention Center, Seattle (USA).
86. 朱 葉<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “Self-assembled nanoparticles by stereocomplex formation of enantiomeric Poly( $\gamma$ -glutamic acid)-*g*-poly(lactide) copolymers as a drug carrier”, 日本バイオマテリアル学会 第7回関西若手研究発表会, 2012年8月2日, 甲南大学(兵庫県).
87. ピヤパコーン パッサモン<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “疎水修飾ポリアミノ酸からなるユニマーナノ粒子の DDS としての機能評価”, 日本バイオマテリアル学会 第7回関西若手研究発表会, 2012年8月2日, 甲南大学(兵庫県).
88. Phassamon Piyapakorn<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Stimuli-responsiveness of unimer nanoparticles composed of hydrophobically-modified poly( $\gamma$ -glutamic acid)”, 第61回高分子討論会, 2012年9月19-21日, 名古屋工業大学(愛知県).
89. 島 史明<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 宇都倫史<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “抗原及び核酸アジュバントを担持した疎水化ポリアミノ酸ナノ粒子の調製と免疫誘導制御の検討”, 第61回高分子討論会, 2012年9月19-21日, 名古屋工業大学(愛知県).
90. Ye Zhu<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Self-assembled nanoparticles by stereocomplex formation of enantiomeric poly( $\gamma$ -glutamic acid)-*g*-poly(lactide) copolymers as a drug carrier”, 第61回高分子討論会, 2012年9月19-21日, 名古屋工業大学(愛知県).
91. 首藤真奈見<sup>1</sup>, 島 史明<sup>1</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 桑畑 進<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>JST-CREST), “顕微鏡観察による生分解性ナノ粒子の細胞内取り込み過程の視覚的評価”, 第61回高分子討論会, 2012年9月19-21日, 名古屋工業大学(愛知県).
92. Masanori Baba<sup>1</sup>, Tomofumi Uto<sup>1,2</sup>, Takami, Akagi<sup>2</sup>, Mituru Akashi<sup>2</sup>, “Induction of potent cellular immunity by antigen-carrying biodegradable poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles: A potential candidate for an anticancer vaccine adjuvant”, (<sup>1</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, <sup>2</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University), 17th World Congress on Advances in Oncology and 15th International Symposium on Molecular Medicine, 12 October 2012, Crete (Greece).
93. Phassamon Piyapakorn<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>JST-CREST), “Preparation of stimuli-responsive

- unimer nanoparticles composed of hydrophobized-poly(amino acid) and their potential application”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012 年 11 月 26-27 日, 仙台国際センター(宮城県).
94. 福本遼太<sup>1</sup>, 宇都倫史<sup>1,2</sup>, 赤木隆美<sup>1,2</sup>, 明石 満<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>阪大院工<sup>1</sup>, JST-CREST<sup>2</sup>), “サイズ・形状の異なる疎水修飾ポリアミノ酸構造体のワクチンキャリアとしての応用”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012 年 11 月 26-27 日, 仙台国際センター(宮城県).
95. 赤木隆美, 島 史明, 宇都倫史, 明石 満(阪大院工, JST-CREST), “ナノ粒子アジュバントによる複数の Toll 様受容体刺激と相乗的な免疫誘導の実現”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012 年 11 月 26-27 日, 仙台国際センター(宮城県).
96. Ye Zhu<sup>1</sup>, Takami Akagi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup> JST-CREST), “Stereocomplex formation of enantiomeric poly( $\gamma$ -glutamic acid)-*g*-poly(lactide) ( $\gamma$ -PGA-*g*-PLA) copolymers: Effect of molecular weight of  $\gamma$ -PGA and PLA”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012 年 11 月 26-27 日, 仙台国際センター(宮城県).
97. Takami Akagi<sup>1,4</sup>, Tomofumi Uto<sup>1,4</sup>, Tomohide Tatsumi<sup>2,4</sup>, Masanori Baba<sup>3,4</sup>, Mitsuru Akashi<sup>1,4</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Medicine, Osaka University, <sup>3</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, <sup>4</sup>JST-CRSET), “Amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles as a carrier and adjuvant for protein/peptide-based vaccines”, The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), 14 December 2012, Kobe International Conference Center, Kobe (Japan).
98. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 長尾将男<sup>2,3</sup>, 三輪哲生<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3,4</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>武田薬品工業株式会社, <sup>3</sup> ナノ粒子アジュバント共同研究講座, <sup>4</sup>JST-CREST), “ナノ粒子アジュバント(武田薬品工業)共同研究講座～安全かつ有効なワクチンアジュバントの実用化に向けて～”, 第 5 回共同研究講座シンポジウム, 2012 年 12 月 17 日, 大阪大学中之島センター(大阪府).
99. 赤木隆美<sup>1,3</sup>, 宇都倫史<sup>1,3</sup>, 長尾将男<sup>2,3</sup>, 三輪哲生<sup>2,3</sup>, 明石 満<sup>1,3,4</sup>(<sup>1</sup> 阪大院工, <sup>2</sup>武田薬品工業株式会社, <sup>3</sup> ナノ粒子アジュバント共同研究講座, <sup>4</sup>JST-CREST), “生分解性ナノ粒子を用いたワクチンキャリア・アジュバントの開発”, 第 6 回次世代アジュバント研究会, 2013 年 1 月 16 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).

#### (4)知財出願

##### ①国内出願 (5 件)

[1] “フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント”, 森 康子, 岡本成史, 吉井洋紀, 山西弘一, 小島朝人, 赤木隆美, 明石 満, 石川豊数, 高橋理明, 独立行政法人医薬基盤研究所, 国立感染症研究所, 国立大学法人大阪大学, 財団法人阪大微生物病研究会, 2007 年 12 月 21 日出願, 特願 2007-330151.

[2] “平均粒径 100 nm 以下の疎水化  $\gamma$ -PGA 粒子、その製造方法、およびその用途”, 明石 満, 赤木隆美, 馬場昌範, 船木隆文, 国立大学法人大阪大学, 国立大学法人鹿児島大学, 株式会社ビーエムティーハイブリッド, 2008 年 5 月 22 日出願, 特願 2008-134422.

[3] “抗食物アレルギーワクチン”, 馬場昌範, 宇都倫史, 明石 満, 赤木隆美, 国立大学法人鹿児島大学, 2008 年 9 月 25 日出願, 特願 2008-245955.

[4] “疎水化ポリアミノ酸からなるポリイオンコンプレックスとその用途”, 馬場昌範, 宇都倫史, 明石 満, 赤木隆美, 国立大学法人鹿児島大学, 株式会社ビーエムティーハイブリッド, 2009 年 3 月 27 日出願, 特願

2009-079712.

[5] “ステレオコンプレックスポリマーの製造方法” 明石 満, 赤木隆美, 藤原知子,  
国立大学法人大阪大学, 2012年1月20日出願, 特願 2012-1038

②海外出願 (2件)

[1] “インフルエンザワクチン用アジュバントおよびインフルエンザワクチン”, 明石 満, 森 康子,  
岡本成史, 山西弘一, 高橋理明, 赤木隆美,  
国立大学法人大阪大学, 独立行政法人医薬基盤研究所, 財団法人阪大微生物病研究会,  
2007年10月2日出願, PCT/JP2007/069289

[2] “疎水化ポリアミノ酸からなるポリイオンコンプレックスとその用途”,  
馬場昌範, 宇都倫史, 明石 満, 赤木隆美, 野崎周英, 上仲一義, 国立大学法人鹿児島大学,  
株式会社ビーエムティーハイブリッド, 2010年3月26日出願, PCT/JP2010/55463

③その他の知的財産権

United States Patent: Polyamino acid for use as adjuvant. Inventors: Mitsuru Akashi, Masanori Baba. Assignees: Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., Mitsuru Akashi, Masanori Baba. Patent No.: US 7,785,612 B2. Date of patent: August 31, 2010.

(5)受賞・報道等

①受賞

[1] 明石 満, Fellow 表彰, International Union of Societies for Biomaterials Science and Engineering (2008年5月)

[2] 明石 満, 第4回モノづくり連携大賞・特別賞(日刊工業新聞社)「ナノ微粒子等を定量定点配置できる装置を応用した、産学官連携による多様なアプリケーション開発」(2009年11月13日)

[3] 朱 葉, 第58回高分子研究発表会 エクセレントポスター賞「Characterization of Nanoparticles composed of Enantiomeric Poly( $\gamma$ -glutamic acid)-*g*-poly(lactide) Copolymers for Drug Carriers」(2012年7月13日)

②マスコミ(新聞・TV等)報道

[1] 「インフルエンザ ワクチンにナノ粒子 医薬基盤研など免疫反応高める」,  
日本経済新聞(朝刊19面), 2007年11月19日

[2] 「日本脳炎ワクチン 1回で高い効果 動物実験で確認 医薬基盤研など」,  
日本経済新聞(朝刊・13面), 2008年6月23日.

[3] 「武田薬品—大阪大学による共同研究講座の設置について ～ナノ粒子ワクチンの実用化・産業化に向けた応用基盤の構築～」 News Release, 2012年1月6日

[4] 化学工業日報「武田薬品 阪大とワクチン共同研究 ナノ粒子を免疫増強剤に」, 2012年1月10日

[5] 日刊薬事「大阪大・武田 ナノ粒子ワクチン実用化へ共同研究講座」, 2012年1月10日

[6] 日経バイオテック「武田薬品工業、武田薬品—大阪大学による共同研究講座の設置について」,  
2012年1月10日

[7] 薬事日報(ウェブサイト)「【武田薬品と阪大】ナノワクチンで共同研究」, 2012年1月12日

③その他  
なし

#### (6)成果展開事例

##### ①実用化に向けての展開

・出願特許「アジュバントとしてのポリアミノ酸」(WO/2006/112477) のナノ粒子のアジュバント用途に関する内容が米国において登録査定となった。

・大阪大学と武田薬品工業(株)の間で、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子をアジュバントとしたワクチンの実用化・産業化に向けた応用基盤の構築を目的とする3年間(平成24年2月～)の共同研究講座が設置された。

##### ②社会還元的な展開活動

・高分子学会設立60周年記念展示会(Polymer Expo 2012)(2012年5月28～30日、パシフィコ横浜)にて、ワクチンアジュバントの紹介、CREST研究成果の紹介を行った。

## § 6 研究期間中の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H20年 4月23日	ナノ粒子 GMP 製造打合せ	大鵬薬品工業(株)徳島研究センター	10名	未来医療センターでのナノ粒子ワクチンの臨床応用に必要なプロセスを確認し、今後の役割分担について協議した。
H20年 8月6日	ナノ粒子 GMP 製造打合せ	阪大医学部附属病院未来医療センター	5名	未来医療センター内での GMP 準拠ナノ粒子の製造について議論した。
H21年 1月20日	ナノ粒子 GMP 製造打合せ	大阪大学医学部附属病院薬剤部	5名	薬剤部でのナノ粒子院内製剤の方向性について協議した。
H24年 2月15日	ナノ粒子アジュバント(武田薬品工業)共同研究講座 キックオフ講演会	大阪大学医学部 銀杏会館 3階大会議室	50人	ワクチンおよびアジュバント開発に関する講演会
H24年 10月25日	がんワクチンのトランスレーショナルリサーチへの展開に向けて	阪大医学部基礎研究棟 6階・消化器内科学	5名	巽先生より堀池総括に TR の概要を説明し、今後の臨床展開に向けて議論した。

## § 7 結び

本研究は、高分子科学やドラッグデリバリーシステム(DDS)を基盤技術とした安全かつ効果的な高分子ナノ粒子ワクチンの製造技術の開発と臨床応用を目的としている。臨床応用のための疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子製造の開発に関しては、高効率・高再現性の革新的なナノ粒子の大量製造技術(GMP 準拠)を確立することができた。また、疎水化  $\gamma$ -PGA の特徴を効果的に引き出し、DDSとしての多様化を図るために、疎水化  $\gamma$ -PGA の会合制御に基づく新たな材料設計と構造制御および機能評価を実施した。ナノ粒子ワクチンのメカニズム解析に関しては、樹状細胞に発現している

Toll-like receptor (TLR) が疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子のアジュバント活性に関与していることを明らかにし、このことは免疫学的にも非常に興味深い現象である。この結果は、従来の経験則に頼ってきたアジュバント開発から、分子レベルでの作用機序の解明、論理的なアジュバント設計・開発へと繋がるものと期待される。しかし、アジュバントの活性は複数の要因の結果であり、抗原との組み合わせによっても作用機序、免疫応答の質・量的なものが異なることが予想されるため、さらなる機能解析が必要であると考えられる。がんペプチドワクチンの開発においては、ペプチド固定化ナノ粒子の安全性、有効性を実証し、トランスレーショナルリサーチ (TR) 展開に向けてのデータを構築することができた。以上のように、疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の基礎的物性、GMP 準拠製造、ナノ粒子の細胞内での挙動、疎水化  $\gamma$ -PGA を応用した新たなキャリア素材の創製、マウスを用いた免疫誘導効果、メカニズム解析、がんワクチンとしての有効性に関しては、当初の戦略目標を着実に達成することができた。疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を用いたがんワクチンの TR 実施により、ヒトでの安全性、副次的な評価による有効性を明らかにすることができれば、癌疾患に対する新たな治療法の開発のみに留まらず、新たなワクチン産業の創出に波及するものと期待される。

アジュバントに求められる主な機能としては、免疫担当細胞の特異的・非特異的活性化(免疫賦活化)と、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞への抗原送達(抗原デリバリー)が挙げられる。高分子系ナノ粒子のドラッグデリバリーシステム(DDS)を応用したワクチン開発においては、抗原の標的細胞へのデリバリーとナノ粒子の材料設計による免疫賦活剤としての機能を付与することが可能であり、材料設計によりさらなる高機能・高活性なワクチンアジュバントの開発が可能であると期待している。

今後の研究の展開に向けては、平成 24 年 2 月より、大阪大学－武田薬品の疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子をアジュバントとしたワクチンの実用化・産業化に向けた応用基盤の構築を目的とする 3 年間の共同研究講座を設置された。本共同研究講座では、CREST 研究で開発されたナノ粒子の基盤技術をもとに、武田薬品が有するワクチン抗原、研究開発基盤、製剤技術、品質管理・規格化、特許管理等のノウハウを融合させることで、ナノ粒子ワクチンの実用化・産業化に向けた橋渡し研究を実施する。また、ナノ粒子のアジュバントとしての特性に関する基礎研究、技術研究をさらに進め、革新性の高い新規ワクチンの創出と既存のワクチンの価値を最大化する新規プラットフォーム技術の確立を目指す。本 CREST 研究で得られた基盤成果が、新たな医薬品創成に繋がり、近い将来実用化されることを確信している。