

Title	細胞治療・バイオ創薬のための高機能分離精製技術の開発
Sub Title	Development of high performance separation and purification technology for cell therapy and biopharmaceuticals
Author	金澤, 秀子(Kanazawa, Hideko) 綾野, 絵理(Ayano, Eri)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>近年、創薬・医療は、小分子薬からバイオ医薬品、遺伝子、細胞療法、再生医療へと変化しており、医療におけるこれらの変化に対応する新しい分離精製技術が求められている。細胞治療・再生医療の実用化には、治療に用いられるiPS細胞や幹細胞由来の特定細胞の効率的な分離の技術の開発が不可欠であり、バイオ医薬品製造コストの削減のためにも極めて重要である。本研究では、申請者らが開発した刺激応答性高分子を用いた新しい概念の分離システムを基盤とし、治療に必要な細胞の特性を保持したまま分離する技術、選択的細胞クロマトグラフィーシステム及びバイオ創薬のための抗体医薬分離精製システムを開発した。</p> <p>In recent years, the trends of drug discovery and medical care have changed, from small molecule drugs to biopharmaceuticals, genes, cell therapy, and regenerative medicine. New approaches and technologies need to be developed to respond to these changes in medical care. The development of a novel purification method for proteins, such as antibodies, under mild conditions is strongly needed. Cell separation method without modification of cell surfaces is strongly demanded for cell transplantation.</p> <p>In this study, we developed temperature-responsive separation system to purify a antibody drug and cells. The prepared column would be applicable to various types of protein and cell separation applications by optimizing the properties of modified polymers. Therefore, the developed temperature-responsive column has the potential to be an effective protein and cell separation tool for biomedical applications.</p>
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16H05083 研究分野：分離分析
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16H05083seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和元年6月10日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05083

研究課題名(和文)細胞治療・バイオ創薬のための高機能分離精製技術の開発

研究課題名(英文) Development of high performance separation and purification technology for cell therapy and biopharmaceuticals

研究代表者

金澤 秀子 (Kanazawa, Hideko)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：10240996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、創薬・医療は、小分子薬からバイオ医薬品、遺伝子、細胞療法、再生医療へと変化しており、医療におけるこれらの変化に対応する新しい分離精製技術が求められている。細胞治療・再生医療の実用化には、治療に用いられるiPS細胞や幹細胞由来の特定細胞の効率的な分離の技術の開発が不可欠であり、バイオ医薬品製造コストの削減のためにも極めて重要である。本研究では、申請者らが開発した刺激応答性高分子を用いた新しい概念の分離システムを基盤とし、治療に必要な細胞の特性を保持したまま分離する技術、選択的細胞クロマトグラフィーシステム及びバイオ創薬のための抗体医薬分離精製システムを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパクの分離精製については、本研究で新規に開発した温度応答性固相抽出カラムにより、抗体医薬品の生理活性を維持しながら精製できることが示された。また、可変部位の違いのみで抗体同士の分離が可能であることから、抗体のFc領域と結合するプロテインA担体とは異なる機構で選択的に分離できることが示された。本研究では安価なシリカビーズを用いており、ラボスケールの抗体精製用固相抽出カラムのみならず、スケールアップによってバイオプロセスにおける精製法として、さらには抗体医薬品のみならず様々なタンパク質製剤の精製への応用も期待できる。さらに細胞を温度制御のみで選択的に分離可能な細胞クロマトグラフィーに成功した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the trends of drug discovery and medical care have changed, from small molecule drugs to biopharmaceuticals, genes, cell therapy, and regenerative medicine. New approaches and technologies need to be developed to respond to these changes in medical care. The development of a novel purification method for proteins, such as antibodies, under mild conditions is strongly needed. Cell separation method without modification of cell surfaces is strongly demanded for cell transplantation.

In this study, we developed temperature-responsive separation system to purify a antibody drug and cells. The prepared column would be applicable to various types of protein and cell separation applications by optimizing the properties of modified polymers. Therefore, the developed temperature-responsive column has the potential to be an effective protein and cell separation tool for biomedical applications.

研究分野：分離分析

キーワード：機能性高分子 HPLC タンパク精製 抗体医薬品 細胞分離 温度応答性クロマトグラフィー

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変貌する医療に対応する新しい概念の分離技術創製の必要性: バイオテクノロジーの急速な発展により、ペプチド、タンパクなどの生理活性分子の大量生産が可能となり、バイオ医薬品として医療へ応用されている。さらに細胞や遺伝子を利用した細胞及び遺伝子治療も可能となってきた。一方、これまで医薬品として用いられてきた低分子化合物とは大きく異なり、これらは不均一な分子の集合体であるため医療へ用いる高品質の医薬品とするためには既存技術で対応できず高度な分離精製技術が必要となる。例えば抗体医薬品の場合製造コストの 60% 以上が精製プロセスに関連する経費であると言われている。したがって、バイオ医薬品の精製工程は直接医療費高騰へも繋がるため、目的とした細胞やバイオプロダクツの簡便で効率よく、かつ生理活性を損なわない分離精製技術が望まれている。

2. 研究の目的

細胞治療・再生医療の実用化には、治療に用いられる iPS 細胞や幹細胞由来の特定細胞の効率的な分離の技術の開発が不可欠であり、現実的な治療コストの実現のためにも極めて重要である。本研究では、申請者らが開発した刺激応答性高分子を用いた新しい概念の分離システムを基盤とし、標的選択性を有した機能性高分子の開発により、治療に必要な細胞の特性を保持したまま分離する技術、選択的細胞クロマトグラフィーシステム及びバイオ創薬のためのタンパク分離精製システム創製へと展開する。本研究課題の実現により、例えば従来用いられてきた細胞分離法と比較して、効率的に間葉系幹細胞を分離することも可能となる。本研究課題では、機能性高分子を修飾したソフト界面をナノサイズで制御する技術を応用し、温度などの外部刺激で分離選択性を自由に制御可能であることから、バイオ創薬や再生医療に必要とされる個々のタンパク・細胞の特性・機能に対応したテーラーメイドな精製に対応可能な技術システムの構築を図る。

3. 研究の方法

温度応答性高分子 PNIPAAm を含む機能性高分子の表面修飾によるナノ構造制御（高分子鎖長、密度、荷電など）に加え選択的リガンド結合により高度で複雑な細胞やタンパクとの相互作用制御に取り組む。これまで申請者らは、水のみを用いて温度変化により相互作用を制御するクロマトグラフィーとして 有機溶媒を使用せずに疎水性相互作用を制御 塩を使用せずに静電的相互作用を制御 温度変化によりアフィニティーを制御するクロマトグラフィーと段階的に本研究構想の基盤となる技術を発展させてきた。本申請では、バイオ創薬・再生医療のための分離技術開発を志向し、ナノ構造制御による細胞分離及びバイオセパレーション技術の確立を目指した。抗体精製用新規アフィニティークロマトグラフィー技術の創製 再生医療実用化のための細胞クロマトグラフィー技術の創製について検討した。

【実験方法】

抗体精製用新規クロマトグラフィー技術の創製: ゲル修飾法により、シリカゲルビーズ (粒径: 40-63 μm , 細孔径: 300 \AA) 表面に NIPAAm モノマー、疎水性モノマーとして butyl methacrylate (BMA), 陰イオン性モノマーとして acrylic acid または 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid (ATBS), 架橋剤として *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) を導入した温度応答性ハイドロゲル(架橋構造)表面を有するシリカゲルビーズ担体を作製し、プラスチック製カラムに充填したもの (100 mg) を固相抽出カラムとして実験に使用した。作製した担体を元素分析および窒素吸着で評価した。リツキシマブと夾雑物としてウシ血清アルブミン(BSA)またはハイブリドーマ細胞用培地との混合物をサンプルとして固相抽出カラムに負荷し、リツキシマブを精製した。40 $^{\circ}\text{C}$ に加温したサンプルを負荷した後、40 $^{\circ}\text{C}$ に加温した溶出溶媒で洗浄し、4 $^{\circ}\text{C}$ に冷却した溶出溶媒で溶出させた。また、精製前後のリツキシマブを細胞に添加し、精製後の生理活性を評価した。さらに、複数の抗体医薬品およびヒト血清内在性の Immunoglobulin G (IgG) からリツキシマブの分離を行った。

再生医療実用化のための細胞クロマトグラフィー技術の創製: シリカゲルビーズ表面に温度応答性の NIPAAm, 疎水性の BMA, カチオン性の *N,N*-dimethylaminopropyl acrylamide (DMAPAAm) の共重合体を修飾し、ポリエチレン製カラムに充填して固相抽出カラムとした。モデル細胞としてヒト骨髄性白血病細胞 (HL-60), ヒト急性 T 細胞性白血病細胞 (Jurkat) を用い、高温側の温度で細胞懸濁液をカラムに負荷した後、夾雑物を洗い流し、低温側の温度に変化させた。それぞれの条件で溶出した細胞培養液中に含まれる細胞数を計測し、各細胞溶出挙動を観察した。次にサンプルを 2 種細胞混合溶液として同様の操作を行い、溶出した各細胞培養液中に Jurkat に特異的な抗体 CD-28 を加え、フローサイトメトリーにより分離能を評価した。またカラム通過後の細胞にトリパンブルー色素排除試験や増殖試験を行うことで、生存率や増殖能の維持を確認した。

4. 研究成果

1) 固相抽出カラムの評価 シリカゲルビーズ表面への温度応答性高分子の修飾が、熱質量分析 (Thermo Gravimetry; TG) により確認された。次に、モデルタンパクを用い、作製した温

度応答性固相抽出カラムを評価した。カラム温度が高いときの方が静電的相互作用が強く働くことが明らかになり、温度によって充填剤表面の電荷密度を制御することで、タンパクの溶出挙動が制御可能であることが示唆された。

[2] **酵素の精製** 温度応答性高分子に陰イオン性モノマーとして acrylic acid を導入した Poly (NIPAAm-co-BMA-co-Acrylic acid) 修飾充填剤を用いて、卵白主成分であるオバルブミンとリゾチームの分離について検討した。充填剤の温度変化のみによって、pH 7.0 のリン酸バッファーという温和な条件でオバルブミンとリゾチームを分離・精製することができた。また、精製後のリゾチームの酵素活性について、基質である *Micrococcus luteus* の溶菌反応を行うことで測定したところ、精製後のリゾチーム活性が約 99%維持されており、タンパクの生理活性を維持したまま精製を行えることが確認された。

[3] **抗体医薬の精製** 現在、抗体精製においては、Protein A を用いたアフィニティークロマトグラフィーが多用されているが、pH 3 付近の溶媒による溶出を行うため、変性・凝集が起きてしまう抗体がある。そこで本研究では、温度応答性高分子を修飾した充填剤表面の性質を温度により変化させることで溶出制御を行い、さらに溶出溶媒として水系溶媒を用いることで、温和な条件での抗体精製の可能性について検討した。抗体医薬であるセツキシマブ (pI = 8.5) との吸着を強くするために、陰イオン性モノマーとして 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid (ATBS) を導入した Poly (NIPAAm-co-BMA-co-ATBS) 修飾充填剤を用いた。抗体医薬作製時における培養系由来の主要夾雑物を想定したウシ血清アルブミン (BSA) とセツキシマブを、温度変化を利用し pH 6.6 のリン酸バッファーという温和な条件で分離・精製することができた。ハイブリドーマ細胞用培地から温度変化のみでリツキシマブを精製し、60%以上回収した。加温時と低温時のイオン強度変化と組み合わせ、回収率が 85%以上に改善した。高温時に疎水性相互作用と静電相互作用でリツキシマブを吸着させて夾雑物を溶出し、低温にすることで疎水性相互作用が弱まり、吸着していたリツキシマブが溶出したと考えられる。精製したリツキシマブは標的細胞に対して精製前と同等の反応を示し、活性の維持を確認した。また、同様の手法を用いて、リツキシマブと IgG、ペバシズマブ、セツキシマブの分離を達成した(研究業績 7, *J. Chromatogr. A.* 2018)。以上、温度応答性固相抽出カラムにより、抗体医薬品の生理活性を維持しながら精製できることが示された。また、可変部位の違いのみで抗体同士を分離できたため、抗体の Fc 領域と結合するプロテイン A 担体とは異なる機構で選択的に分離できることが示された。本研究では安価なシリカビーズを用いており、ラボスケールの抗体精製用固相抽出カラムのみならず、スケールアップによってパイオプロセスにおける精製法としても期待できる。

[4] **細胞分離カラムの開発** カチオン性モノマーである DMAPAAm の組成比を 0%, 1%, 5%, 10%と変化させた 4 種類の充填剤 (それぞれ IBD-0, IBD-1, IBD-5, IBD-10 とする)で各細胞の保持・溶出を観察したところ、高温側において、正電荷を有する充填剤では正電荷のない充填剤と比較して、両細胞ともに強く保持することが確認できた。これは高温側では充填剤表面のポリマーが疎水性を示すこと・収縮により正電荷密度が増大したことから、疎水性相互作用・静電相互作用により強く保持したと考えられる。次に低温側へ変化させたところ、HL-60 は保持されたままなのに対し、Jurkat は HL-60 と比較して高い溶出率を示した。これは Jurkat の細胞膜表面の負電荷が HL-60 と比較して弱いことや、低温側では充填剤表面のポリマーが親水性を示すこと・伸長により正電荷密度が減少したことから、Jurkat の溶出が促進されたと考えられる。以上の結果から、IBD-1 の組成比が最大分離能を持つことがわかった(研究業績 1, *Colloids and SurfacesB: Biointerfaces*, 2019, 表紙掲載)。

次に IBD-1 による 2 種細胞混合溶液の分離能では、低温側への温度変化の際に顕著な溶出差を示した。またカラム通過後でさえも細胞生存率は 90%以上と高く、細胞活性を維持したまま分離が可能であることが示唆された。

これらの検討より、本研究で作製したカラムは、細胞活性を維持したまま温度変化のみで細胞の保持・溶出を制御でき、細胞の溶出挙動の差による細胞分離の可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

1) K. Nagase, D. Inanaga, D. Ichikawa, A.M. Akimoto, Y. Hattori, H. Kanazawa. Temperature-modulated cell-separation column using temperatureresponsive cationic copolymer hydrogel-modified silica beads. *Colloids and SurfacesB: Biointerfaces*, 査読有, 178, 2019, 253-262. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.057

2) R. Nemoto, K. Fujieda, Y. Hiruta, M. Hishida, E. Ayano, Y. Maitani, K. Nagase, H. Kanazawa. Liposomes with temperature-responsive reversible surface properties. *Colloids and SurfacesB:Biointerfaces*, 査読有, 176, 2019, 309-316. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.007

3) K. Nagase, M. Hasegawa, E. Ayano, Y. Maitani, H. Kanazawa. Effect of Polymer Phase Transition Behavior on Temperature-Responsive Polymer-Modified Liposomes for siRNA Transfection. *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 20, 2019, 430. DOI: 10.3390/ijms20020430

4) K. Nagase, T. Okano, H. Kanazawa. Poly(*N*-isopropylacrylamide) based thermoresponsive polymer

brushes for bioseparation, cellular tissue fabrication, and nano actuators. Nano-Structures & Nano-Objects, 査読有, 16, 2018, 9-23. DOI: 10.1016/j.nanoso.2018.03.010

5) A.M. Akimoto, E.H/ Niitsu, K. Nagase, T. Okano, H. Kanazawa, R. Yoshida. Mesenchymal Stem Cell Culture on Poly(*N*-isopropylacrylamide) Hydrogel with Repeated Thermo-Stimulation. International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 19, 2018, 1253. DOI: 10.3390/ijms19041253

6) M. Matsuura, M. Ohshima, Y. Hiruta, T. Nishimura, K. Nagase, H. Kanazawa. LAT1-targeting thermoresponsive fluorescent polymer probes for cancer cell imaging. International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 19, 2018, 1646. DOI: 10.3390/ijms19061646

7) K. Okubo, K. Ikeda, A. Oaku, Y. Hiruta, K., Nagase, H. Kanazawa. Protein purification using solid-phase extraction on temperature-responsive hydrogel-modified silica beads. Journal of Chromatography A, 査読有, 1568, 2018, 48. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.07.027

8) 長瀬 健一, 岡野 光夫, 金澤 秀子. 温度応答性高分子ブラシの精密設計とバイオセパレーションへの応用. 高分子論文集, 査読有, 75, 2018, 143-154 2018/02/16. <https://doi.org/>. DOI: 10.1295/koron.2017-0073

9) K. Nagase, M. Yamato, H. Kanazawa, T. Okano. Poly(*N*-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications. Biomaterials, 査読有, 153, 2018, 27-48. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.026

10) T. Mikuma, R. Uchida, M. Kajiya, Y. Hiruta, H. Kanazawa. The use of a temperature-responsive column for the direct analysis of drugs in serum by two-dimensional heart-cutting liquid chromatography. Anal. Bioanal. Chem., 査読有, 409, 2017, 1059-1065. DOI: 10.1007/s00216-016-0024-9

11) E. Hasuike, A.M. Akimoto, R. Kuroda, K. Matsukawa, Y. Hiruta, H. Kanazawa, R. Yoshida. Reversible conformational changes in parallel type G-quadruplex structure inside a thermoresponsive hydrogel. Chemical Communications, 査読有, 53, 2017, 3142-3144. DOI:10.1039/C7CC00279C

12) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, T. Okano. Protein separations via thermally responsive ionic block copolymer brush layers. RSC Advances, 査読有, 6, 2016, 26254-26263. DOI: 10.1039/c6ra01061j

13) Y. Hiruta, R. Kanazashi, E. Ayano, T. Okano, H. Kanazawa. Temperature-responsive molecular recognition chromatography using phenylalanine and tryptophan derived polymer modified silica beads. Analyst, 査読有, 141, 2016, 910-917. DOI:10.1039/C5AN01996F

14) A.M. Akimoto, E. Hasuike, H. Tada, K. Nagase, T. Okano, H. Kanazawa, R. Yoshida. Design of tetra-arm PEG-crosslinked thermoresponsive hydrogel for 3D cell culture. Anal. Sci., 査読有, 32, 2016, 1203. DOI: 10.2116/analsci.32.1203

15) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, T. Okano. Thermoresponsive Anionic Block Copolymer Brushes with Strongly Anionic Bottom Segment for Effective Interactions with Biomolecules. RSC Advances, 査読有, 6, 2016, 93169-93179. DOI:10.1039/C6RA20944K

16) Y. Hiruta, R. Kanazashi, E. Ayano, T. Okano, H. Kanazawa. Temperature-responsive molecular recognition chromatography using phenylalanine and tryptophan derived polymer modified silica beads. Analyst, 査読有, 141, 2016, 910-917. DOI: 10.1039/c5an01996f

17) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, T. Okano. Thermoresponsive Anionic Block Copolymer Brushes with Strongly Anionic Bottom Segment for Effective Interactions with Biomolecules. RSC Advances, 査読有, 6, 2016, 93169-93179. DOI: 10.1039/C6RA20944K

[学会発表](計 57 件)

1) H. Wakayama, K. Nagase, H. Kanazawa. Mixed polymer brush consisting of thermos 1st G'L'owing Polymer Symposium in KANTO, 2018 年.

2) 長瀬健一, 永田勇貴, 稲永大夢, 枝常吾郎, 秋元文, 金澤秀子. 固相抽出カラムを用いた温度制御型細胞分離カラムの開発. 第40回日本バイオマテリアル学会大会, 2018 年.

3) 太田歩, 長瀬健一, 金澤秀子. カチオン性/温度応答性ブロック共重合体高分子ブラシを用いた細胞分離技術の検討. 第40回日本バイオマテリアル学会大会, 2018 年.

4) 志村昌紀, 花屋賢悟, 蛭田勇樹, 長瀬健一, 金澤秀子. 細胞接着性ペプチドをリガンドとした温度制御型細胞分離. 第40回日本バイオマテリアル学会大会, 2018 年.

5) 若山暖乃, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性高分子とカチオン性高分子の混合ブラシによる温度制御型細胞分離. 第40回日本バイオマテリアル学会大会, 2018 年.

6) 志村昌紀, 花屋賢悟, 蛭田勇樹, 長瀬健一, 金澤秀子. ペプチド導入ガラス基板を用いた温度応答性細胞分離法の検討. 第29回クロマトグラフィー科学会議, 2018 年.

7) 池田幸司, 石井咲樹, 市川大樹, 服部豊, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性固相抽出カラムを用いた抗体医薬品の温和な精製法. 第29回クロマトグラフィー科学会議, 2018 年.

8) 長瀬健一, 永田勇貴, 枝常吾郎, 稲永大夢, 秋元文, 金澤秀子. 温度応答性高分子修飾ビーズ充填固相抽出カラムを用いた細胞分離. 第67回高分子討論会. 2018 年.

9) 枝常吾郎, 永田勇貴, 長瀬健一, 金澤秀子. 間葉系幹細胞精製を目的とした温度応答性固相抽出カラムの開発. 日本分析化学会 第67年会. 2018 年.

10) 岡本直也, 前川祐太郎, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性カラムを用いた CYP 基質薬物の

一斉分析の検討. 日本分析化学会 第 67 年会. 2018 年.

- 11) 北澤早紀子, 長瀬健一, 金澤秀子. カチオン性 - 温度応答性混合高分子ブラシを用いた温度制御によるタンパク質精製法の開発. 日本分析化学会 第 67 年会. 2018 年.
- 12) 岡本直也, 前川裕太郎, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性カラムを用いた CYP プローブ薬の一斉分析の検討. 第 16 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018). 2018 年
- 13) 太田歩, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度制御型細胞分離を目的とした正電荷を有するブロック共重合体高分子ブラシの作製. 第 16 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018). 2018 年
- 14) 志村昌紀, 花屋賢悟, 蛭田勇樹, 長瀬健一, 金澤秀子. 細胞接着性ペプチドを利用した温度応答性細胞分離法の検討. 第 31 回バイオメディカル分析科学シンポジウム. 2018 年.
- 15) 長瀬健一, 永田勇貴, 稲永大夢, 枝常吾郎, 秋元文, 金澤秀子. 幹細胞分離を目的とした温度制御型固相抽出カラムの作製. 第 31 回バイオメディカル分析科学シンポジウム. 2018 年.
- 16) M. Shimura, K. Hanaya, Y. Hiruta, K. Nagase, H. Kanazawa. Temperature-controlled cell separation with thermoresponsive polymer and cell-adhesive peptides. Biomaterials International 2018. 2018 年.
- 17) K. Nagase, Y. Nagata, D. Inanaga, G. Edatsune, A.M. Akimoto, H. Kanazawa. Temperature-responsive cell separation column using temperature-responsive cationic copolymer. Biomaterials International 2018. 2018 年.
- 18) 志村昌紀, 花屋賢悟, 蛭田勇樹, 長瀬健一, 金澤秀子. ペプチドをアフィニティーリガンドとした温度制御型細胞分離システム. 第 47 回医用高分子シンポジウム. 2018 年.
- 19) 長瀬健一, 永田勇貴, 稲永大夢, 枝常吾郎, 秋元文, 金澤秀子. 温度応答性高分子修飾シリカビーズを用いた細胞分離カラムの開発. 第 47 回医用高分子シンポジウム. 2018 年.
- 20) 若山暖乃, 長瀬健一, 金澤秀子. カチオン性高分子と温度応答性高分子の混合ブラシ修飾ガラス基板による細胞分離. 第 47 回医用高分子シンポジウム. 2018 年.
- 21) H. Kanazawa. Effective Separation of Proteins and Cells utilizing Temperature-Responsive Chromatography. 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Sciences (招待講演). 2018 年.
- 22) N. Okamoto, T. Mikuma, K. Nagase, H. Kanazawa. Development of Temperature-Responsive Chiral Column by Dynamic Coating Method. 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Sciences. 2018 年.
- 23) S. Kitazawa, K. Nagase, H. Kanazawa. Temperature Modulated Separation of Proteins using Mixed Thermoresponsive-Cationic Polymer Brush Grafted Silica Beads. 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Sciences. 2018 年.
- 24) 石井咲樹, 池田幸司, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性固相抽出カラムによる抗体精製条件の最適化. 第 25 回クロマトグラフィーシンポジウム. 2018 年.
- 25) 枝常吾郎, 永田勇貴, 長瀬健一, 金澤秀子. 間葉系幹細胞を温度変化で分離する固相抽出カラムの開発. 第 25 回クロマトグラフィーシンポジウム. 2018 年.
- 26) 長瀬健一, 岡野光夫, 金澤秀子. バイオ医薬品精製・再生医療への応用を目的とした温度応答性クロマトグラフィーの研究展開. 第 78 回分析化学討論会. 2018 年.
- 27) 稲永大夢, 長瀬健一, 岡野光夫, 金澤秀子. 正電荷を有する温度応答性高分子を用いた細胞分離法の開発. 第 27 回ライフサポート学会フロンティア講演会. 2018 年.
- 28) 永田勇貴, 長瀬健一, 秋元文, 金澤秀子. 温度応答性高分子ブラシ修飾シリカビーズを用いた細胞分離の検討. 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会. 2017 年.
- 29) 稲永大夢, 永田勇貴, 長瀬健一, 金澤秀子. 正電荷を有する温度応答性高分子を用いた細胞分離カラムの作製. 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会. 2017 年.
- 30) 永田勇貴, 長瀬健一, 秋元文, 金澤秀子. 温度応答性高分子ブラシ修飾シリカビーズを用いた細胞分離の検討. 第 28 回クロマトグラフィー科学会議. 2017 年.
- 31) 岡本直也, 芳川満輝, 三熊 敏靖, 長瀬 健一, 金澤 秀子. ダイナミックコーティング法による温度応答性キラルカラムの開発. 第 28 回クロマトグラフィー科学会議. 2017 年.
- 32) 長瀬 健一, 岡野 光夫, 金澤 秀子. 温度応答性高分子ブラシ修飾モノリスシリカ担体の作製とその評価. 第 28 回クロマトグラフィー科学会議. 2017 年.
- 33) H. Kanazawa. Effective Protein Purification Using Temperature-Responsive Chromatography. HPLC 2017 Jeju (招待講演). 2017 年.
- 34) K. Nagase, T. Okano, H. Kanazawa. Thermoresponsive polymer modified monolithic silica rods for high speed separation of biomolecules. HPLC 2017 Jeju. 2017 年.
- 35) D. Inanaga, Y. Nagata, K. Nagase, H. Kanazawa. Cell separation column using positively charged thermoresponsive polymer modified beads. HPLC 2017 Jeju. 2017 年.
- 36) 高口浩貴, 加治屋瑞貴, 内田亮, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性クロマトグラフィーを用いた新規 TDM 法の開発. 第 61 回日本薬学会関東支部大会. 2017 年.
- 37) 鈴木清香, 長瀬健一, 金澤秀子. 四級アミン構造を有する温度応答性カラムを用いたタンパク質の分離. 第 61 回日本薬学会関東支部大会. 2017 年.
- 38) 金澤秀子. 機能性高分子を用いた分離・分析システムの創製とその応用. 日本分析化学会第 66 年会 (招待講演). 2017 年.
- 39) 永田勇貴, 大阿久絢加, 蛭田勇樹, 長瀬健一, 秋元文, 金澤秀子. 温度応答性高分子ブラシ

- 修飾シリカビーズを用いた細胞分離の検討. 日本分析化学会 第 66 年会. 2017 年.
- 40) 長瀬健一, 小林純, 菊池明彦, 秋山義勝, 金澤秀子, 岡野光夫. 温度応答性高分子ブラシ修飾クロマトグラフィー担体の荷電官能基の影響. 日本分析化学会 第 66 年会. 2017 年.
- 41) 西本泰平, 長瀬健一, 金澤秀子. プロリン誘導体高分子ゲル修飾シリカゲルを用いた温度応答性クロマトグラフィーの検討. 日本分析化学会 第 66 年会. 2017 年.
- 42) 稲永大夢, 永田勇貴, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性高分子修飾シリカを充填剤とした細胞分離カラムの開発. 日本分析化学会 第 66 年会. 2017 年.
- 43) 池田幸司, 秋丸倫子, 大久保廣平, 大阿久絢加, 蛭田勇樹, 長瀬健一, 金澤秀子. 抗体の精製に応用した温度応答性クロマトグラフィーの評価. 日本分析化学会 第 66 年会. 2017 年.
- 44) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, T. Okano. Thermoresponsive Cationic Block Copolymer Brush on Porous Silica Beads For Thermally Modulated Separation of Milk Serum Proteins. ESB 2017. 2017 年.
- 45) D. Inanaga, Y. Nagata, K. Nagase, H. Kanazawa. Fundamental Study of Cell Separation System Using Temperature-responsive Column. RSC Tokyo International Conference 2017. 2017 年.
- 46) Y. Umemoto, K. Nagase, H. Kanazawa. Influence of pore size of silica gel on temperature responsive chromatography. RSC Tokyo International Conference 2017. 2017 年.
- 47) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, T. Okano. Thermoresponsive-Ionic Block Copolymer Brush Modified Stationary Phase for Thermally-Modulated Proteins Separation. HPLC2017 Prague. 2017 年.
- 48) K. Ikeda, M. Akimaru, Y. Hiruta, K. Nagase, H. Kanazawa. Development of purification method for proteins utilizing temperature-responsive affinity chromatography. HPLC2017 Prague. 2017 年.
- 49) T. Nishimoto, H. Kanazawa. Temperature-responsive molecular recognition chromatography using amino acid derived polymer modified silica beads. HPLC2017 Prague. 2017 年.
- 50) 志村昌紀, 秋丸倫子, 池田幸司, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性高分子と DNA アプタマーを用いたアフィニティー担体の開発. 第 24 回クロマトグラフィーシンポジウム. 2017 年.
- 51) 稲永大夢, 永田勇貴, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性カラムを用いた細胞分離システムの基礎検討. 第 24 回クロマトグラフィーシンポジウム. 2017 年.
- 52) 蛭田勇樹, 大久保廣平, 大阿久絢加, 金澤秀子. 温和な条件でのタンパク精製を可能にする温度応答性固相抽出カラムの開発. 第 77 回 分析化学討論会. 2017 年.
- 53) 池田幸司, 秋丸倫子, 三熊敏靖, 蛭田勇樹, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性アフィニティークロマトグラフィーを用いた抗体医薬品の温和な精製法の開発. 第 77 回 分析化学討論会. 2017 年.
- 54) 西本泰平, 安達亮, 三木厚, 蛭田勇樹, 金澤秀子. プロリン誘導体高分子を用いた温度応答性クロマトグラフィー. 日本薬学会第 137 年会. 2017 年.
- 55) 永田勇貴, 大阿久絢加, 蛭田勇樹, 秋元文, 長瀬健一, 金澤秀子. 温度応答性クロマトグラフィーを用いたタンパク精製, 細胞分離への応用. 日本薬学会第 137 年会. 2017 年.
- 56) 池田幸司, 秋丸倫子, 蛭田勇樹, 金澤秀子. 抗体医薬品の精製を目指した温度応答性アフィニティークロマトグラフィーの検討. 日本薬学会第 137 年会. 2017 年.
- 57) 池田幸司, 秋丸倫子, 蛭田勇樹, 金澤秀子. 抗体精製を目指した温度応答性アフィニティークロマトグラフィーの開発. ライフサポート学会 第 26 回フロンティア講演会. 2017 年.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：綾野 絵理

ローマ字氏名：Eri Ayano

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：薬学部(芝共立)

職名：研究員

研究者番号(8桁)：10424102