

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560707

研究課題名（和文）超臨界コーティング法による細胞ストレス可視化  
ナノデバイスの開発研究課題名（英文）Development of Nano Device to Detect Cellular Stress by Using  
Supercritical Coating method.

研究代表者

三島 健司 (MISHIMA KENJI)

福岡大学・工学部・准教授

研究者番号：40190623

研究成果の概要（和文）：我々は、マイクロカプセル化ペプチド合成法を応用して、高血圧を引き起こす原因物質の一つである ACE（アンジオテンシン II 合成酵素）を阻害するペプチドを探索する蛍光プローブとして、Abz（アミノベンゾイックアシッド）を含むペプチドを、超臨界二酸化炭素中で合成した。この蛍光ペプチドを利用することにより、細胞のストレス検出を試みた。さらに、細胞ストレス緩和効果のある物質を探索するために、豆乳、おから、湯葉などの大豆関連食品に含まれる高血圧抑制成分を分離・精製し、ペプシン、キモトリプシンなどの酵素により、豆乳、おから、湯葉などの大豆関連食品中の高血圧抑制成分の増殖を試みた。

研究成果の概要（英文）：In this work, we synthesized the peptides including an amino benzoic acid group as fluorescent probe in supercritical carbon dioxide in order to detect ACE inhibitor which reduces hypertension. The cellular stress detection was tried by using this synthesized fluorescent peptide. The effect of ACE inhibitor on the reduction of the cellular stress and blood vessel dilation was experimentally examined by means of cardiomyocyte. Furthermore, in order to search the hypertension control substances, separation and purification of target substances included in the soybean milk and the tofu (food related to the soybean) were carried out by using the synthesized fluorescent peptide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学工学

科研費の分科・細目：化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：薄膜・微粒子形成操作, 医療工学, 超臨界流体

## 1. 研究開始当初の背景

細胞ストレスは、ヒトの老化、代謝障害、ガンや神経変性といった細胞障害因子として注目されており、脳卒中や心筋梗塞などに代表される脳神経系および循環器系の疾患が、生活習慣やストレスと密接な関係があることなどから、高等生物の細胞ストレスに関する研究の重要性が指摘されている。理研の三浦らは、ショウジョウバエを用いた遺伝学的手法にて、ストレス刺激によって細胞死を引き起こす遺伝子を同定し、細胞死に関わる他の因子との作用を生化学的手法で解析した (E. Kuranaga et al., *Cell*, 126, 583-596, 2006)。また、ナノテクノロジーの進歩に伴い、PET (ポジトロン断層撮影)、MRI (磁気共鳴イメージング) 等の画像診断にマイクロデバイスを併用し、患部細胞の状態を観察する微小イメージング診断が検討され、ガン細胞や代謝障害の研究に利用されつつある (D. Songer et al., *Nuclear Medicine and Biology*, 34, 331-342, 2007)。しかし、従来の微小イメージング診断では、ガン細胞などの細胞障害が発現した場合には有効であるが、正常細胞内で起こる細胞ストレスに関しては、検出することが困難であった。細胞内の各小器官で起こる細胞ストレスを化学的に検出するためには、最小限の副作用で必要な薬物を送達するターゲティングナノデバイスの開発が望まれている。しかも、細胞は微量な各化学種自体がストレスとなる場合が多く、有害な化学種を用いないナノデバイス製造方法の開発と化学種の細胞内での分配挙動を予測する微小領域物性推算技術の確立が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ナノデバイス創製および微小領域物性推算技術の開発のために、既に本研

究代表者が科研費補助など公的補助により開発した超臨界ペプチド合成法、超臨界マイクロコーティング技術ならびに超臨界高速攪拌ナノ粒子分散法を基礎技術として、ナノメートルサイズの蛍光誘起複合ポリペプチド分子を内包する人工ウイルス模倣型の機能性ナノ・マイクロ高分子カプセルを、有害な化学種を用いない超臨界流体技術を用いて製造する方法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、ナノデバイス創製および微小領域物性推算技術の開発を目的とし、既に三島が科研費補助により開発した超臨界ペプチド合成法 (三島, 特開平 11-310594 ペプチド及びタンパク質の合成方法) ならびに超臨界マイクロコーティング技術 (三島, 特開平 11-197494 超臨界流体を用いた微小粒子コーティング) を基礎技術として、ナノメートルサイズの蛍光誘起複合ポリペプチド分子を内包する人工ウイルス模倣型の機能性ナノ・マイクロ高分子カプセルを、有害な化学種を用いない超臨界流体技術を用いて製造する方法を開発する。これらの開発に必要な不可欠な化学種の細胞内分配挙動を予測する微小領域物性推算技術の確立を以下のように行う。まず、本研究代表者が開発した超臨界二酸化炭素中でのペプチド合成法を応用し、蛍光誘起複合ポリペプチド分子の合成を行う。また、厚生省から認可されているアクリル系樹脂などを用いて、超臨界コーティングによる蛍光誘起複合ポリペプチド分子のマイクロカプセル化を行う。さらに、蛍光誘起複合ポリペプチド分子のマイクロカプセルの脂肪細胞への投与実験を行い、各化学種の細胞への分配を測定する。

#### 4. 研究成果

マイクロカプセル化ペプチド合成法を応用して、高血圧を引き起こす原因物質の一つであるACE（アンジオテンシンII合成酵素）を阻害するペプチドを探索する蛍光プローブとして、Abz（アミノベンゾイックアシッド）を含むペプチドを、超臨界二酸化炭素中で合成した。このペプチドの発光スキームを図1に示す。

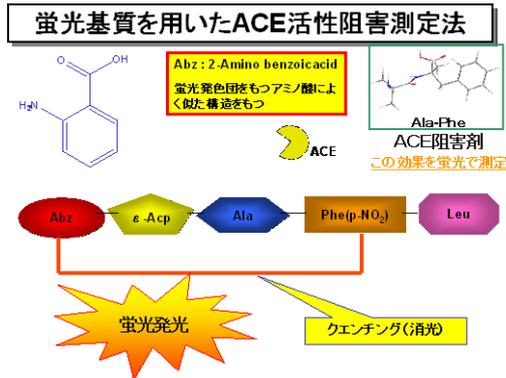


図1 ペプチドの発光スキーム

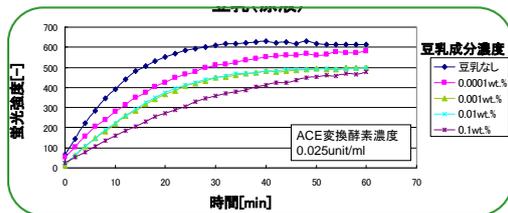


図2 阻害性測定

この蛍光ペプチドを利用することにより、細胞のストレス検出を試みた。心筋細胞を用いてアンジオテンシンII合成酵素の血管肥大とこれら抑制物質の効果について実験的に検討し、効果があることが確認できた。さらに、細胞ストレス緩和効果のある物質を探索するために、豆乳、おから、湯葉などの大豆関連食品に含まれる高血圧抑制成分を分離・精製し、ペプシン、キモトリプシンなどの酵素により、豆乳、おから、湯葉などの大豆関連食品中の高血圧抑制成分の増殖を試みたところ、優位な差がえられた。この知見をもとに、機能性食品としての特許を申請

した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計23件)

- 1) S.Higuchi, M.Ohji, M.Araki, R.Furuta, M.Katsuki, R.Yamaguchi, Y.Akitake, K.Matsuyama, K.Irie, K.Mishima, K. Mishima, K.Iwasaki, M.Fujiwara, Increment of Hypothalamic 2-Arachidonoylglycerol Induces the Preference for a High-fat Diet via Activation of Cannabinoid 1 Receptors, Behavioural Brain Research, (査読あり) 216/1,477-480(2011.1)
- 2) S.Higuchi, K.Irie, T.Nakano, Y.Sakamoto, Y.Akitake, M.Araki, M.Ohji, R.Furuta, M.Katsuki, R.Yamaguchi, K.Matsuyama, K.Mishima, K.Mishima, K.Iwasaki, M.Fujiwara, Reducing Acyl Migration during Purification of 2-Arachidonoylglycerol from Biological Samples before Gas Chromatography Mass Spectrometry Analysis, Analytical Sciences, (査読あり) 26/11,1199-1202 (2010.11)
- 3) K.Matsuyama, K.Mishima, T.Kato, K.Ohara, Preparation of Hollow ZnO Microspheres Using Poly(methyl methacrylate) as a Template with Supercritical CO<sub>2</sub>-Ethanol Solution, Ind.Eng.Chem.Res., (査読あり) 49 (18), 8510-8517(2010.9).
- 4) K. Matsuyama, K. Mishima, High-pressure Phase Behavior and FT-IR Study of Poly(methyl methacrylate) + Ethanol Systems with Addition of Supercritical CO<sub>2</sub>, J.Physics: Conference Series, (査読あり) 215, 012086(1-5)(2010.4)
- 5) M. Hazekawa, A. Kataoka, K. Hayakawa, T. Uchimasu, R. Furuta, K. Irie, Y. Akitake, M. yoshida, T. Fujioka, N. Egashira, R. Oishi, K.Mishima, K.Mishima, T. Uchida, K. Iwasaki, M.

Fujiwara, Neuroprotective Effect of Repeated Treatment with Hericium erinaceum in Mice Subjected to Middle Cerebral Artery Occlusion, J. Health Science, (査読あり) 56(3), 296-303(2010)

[学会発表] (計 21 件)

- 1) 松山清, 三島 健司, 高圧 CO2 中での超音波キャビテーションを利用した粒子の複合化と多孔質材料の合成, 化学工学会第 76 年会, 平成 23 年 3 月 22 日 D118 (2011.03) 東京・東京農工大
- 2) K.MISHIMA, Technology transfer and Commercialization of Environmentally Benign Supercritical Fluid Technology to Industry (タイ王国, バンコク) Invited Lecture in Rajamangala University of Technology Thanyaburi (RMUTT) (2010.12.3)
- 3) K.MISHIMA, Technology Transfer of Environmentally Benign Supercritical Fluid Technology to Industry (インドネシア共和国, ジャカルタ) Invited Lecture in State Islamic University Jakarta (2010.11.4)
- 4) K. Mishima, Environmentally Benign Commercialization of Supercritical Fluid Technology, The 3rd Introduction Fair of Advanced Technology (Seoul, Korea) (2010.9) the Seoul Coex INTERCONTINENTAL Hotel, 2010 年 9 月 2 日 (木) 招待講演
- 5) 三島健司, 松山清, 入江圭一, 三島健一, 藤原道弘, 超臨界二酸化炭素中での超音波を用いた再生医療用細胞外マトリックスの生成, 化学工学会第 75 年会, K316(2010.3) 3 月 20 日 鹿児島大 [図書] (計 1 件)
  - 1) 吉田昌弘, 三島健司, 他 29 名「若手研究者の大きな可能性を秘めた研究開発」、2009 年 12 月 化学工学会九州支部若手ケミ

カルエンジニア連絡会 (全 116 ; 17-23 ページ) 総頁数 116 頁中, 第 1 章第 4 節「CO2 膨張液体および超臨界 CO2 を用いたマイクロ・ナノ粒子の表面改質 (7 頁)」を担当

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

1) 名称: 生体組織再生用移植材及びその製造方法

発明者: 三島 健司

権利者: 学校法人福岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-70301

出願年月日: 2009 年 3 月 23 日

国内外の別: 国内

2) 名称: 多層構造を有する複合化粒子およびその製造方法

発明者: 三島 健司

権利者: 学校法人福岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-79279

出願年月日: 2009 年 3 月 27 日

国内外の別: 国内

3) 名称: コーティング絹微粒子およびその製造方法

発明者: 三島 健司

権利者: 学校法人福岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-81168

出願年月日: 2009 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内, 国外(WO/2010/113798)

4) 名称: ヤマブシタケ抽出物およびその製造方法

発明者: 三島 健司, 藤原道弘, 三島健一, 入江圭一

権利者: 学校法人福岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-82806

出願年月日: 2009 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内

5) 名称: 機能性ペプチドを内包するマイクロカプセル微粒子およびその製造方法

発明者: 三島 健司, 安東勢津子

権利者: 学校法人福岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-88545

出願年月日: 2009 年 3 月 31 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三島 健司 (MISHIMA KENJI)  
福岡大学・工学部・准教授  
研究者番号：40190623

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：