

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12102
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：26560041
研究課題名(和文)安全食品創出のためのマテリアルデザイン

研究課題名(英文)Materials Design for Safety Foods

研究代表者

長崎 幸夫 (Nagasaki, Yukio)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：90198309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：安全・安心な生鮮食物の生産、運搬等への関心がますます高まりつつある今日、様々な試みがなされつつある。本挑戦的萌芽研究では、様々な悪さをする悪玉活性酸素種を消去するナノマテリアルを設計し、放射線滅菌に対する食品ダメージ抑制効果を検討し、高いダメージ抑制効果を確認した。特に豚ひき肉における高分子抗酸化剤の添加は食物の安全性を維持しつつ、長期にわたり鮮度を保つという画期的成果が得られた。この結果は昨今問題となっているポストハーベスト問題に対して革新的な解決策を提供していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The globalization of food distribution has made it difficult for a single country to achieve food safety by itself. For example, post-harvest treatments of fruits and vegetables may loose our health although they are prohibited in our country. In order to improve new technologies on these issues, we have tried to develop new system by our newly designed materials. We have been investigating on design of new polymers and nanoparticles with possess elimination activity of reactive oxygen species (ROS). In this work have confirmed safety of our materials using zebra fish embryo. Using our redox-active polymer nanoparticles, we have also investigated protective effect of meats from radiation sterilization treatments. On the basis of these investigations, we have confirmed that our redox polymer nanoparticles prevented radiation damage of meat and suppression of bacterial infection effectively.

研究分野：機能性材料

キーワード：放射線滅菌 ポストハーベスト 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

収穫後の農作物に殺菌剤や防かび剤を使うポストハーベストは国内では禁止されているものの、諸外国から輸入する農作物では野放しの状況にあった。このような問題を解決するためには安全安心な食物処理の技術革新をすることが重要であった。

2. 研究の目的

安全・安心な生鮮食物の生産、運搬等への関心がますます高まりつつある今日、様々な試みがなされつつある。本挑戦的萌芽研究では、様々な悪さをする悪玉活性酸素種を消去するナノ材料を設計し、腐敗/腐食を効果的に抑えるのみならず、使用する薬剤自身の副作用をシャットアウトし、安全な食物の作製・供給を目指す。このナノ材料の設計に成功すれば、食物の放射線障害や家畜の感染症障害等にも有用であり、広く安全・健康社会の創出に資する。

申請者らはこれまで、細胞内の善玉活性酸素種を消去することなく、病気の原因となる悪玉活性酸素種を選択的に消去するナノメディシンの設計を進め、副作用の無い新しい治療薬の創出に関して研究し、その一部は開発段階に入りつつある。我々が開発してきたナノ材料はその分布や取り込み能を高度に制御することが出来るため、食物の表層のみに局在化させ、食物自身に悪影響を与えることなく、細菌感染の原因になる悪玉活性酸素種を消去することが期待出来る。このような材料設計を行うことは、食物科学をターゲットにした材料設計は今までになく独創的である。本研究では2年間の研究の中で材料合成、安全性の確認および放射線滅菌特性に関しての検討を行った。

3. 研究の方法

平成 26 年度は材料設計と作成した材料の安全性の確認を中心に検討を進めた。

(1)ニトロキシドラジカルを有する材料設計：

我々はこれまで、生体適合性が高く、水溶性のポリエチレングリコールと、電子線レジストなどに利用する疎水性高分子、ポリクロロメチルスチレンが結合したブロック共重合体の疎水性セグメントにニトロキシドラジカルを導入した反応性高分子をナノメディシンとして利用してきた(Biomacromolecules:10(3) 596-601 (2009))。この材料は汎用性材料を基盤としており、コスト的に問題が無いため、まずこの材料を中心に検討を行なった。重合はこれまで、メルカプト末端ポリエチレングリコールを開始剤としたクロロメチルスチレンのラジカル重合を中心に、進めてきたが、より材料設計の容易な RAFT 重合法にて合成の検討を行った。

(2)ナノ粒子の調製と物理化学的評価：このようにして合成するブロック共重合体は親

水性セグメントと疎水性セグメントが末端で結合しているため、水中で会合し、数十ナノメートルサイズのナノ粒子を与える。これらの組成とサイズに関する検討を光散乱を用いて行なった。また、表面の電位を表面電位計で測定した。

(3)ナノ粒子の安全性の確認：得られたナノ粒子(レドックスナノ粒子、RNP と略記する)の安全性を評価するため、生まれて5日目のゼブラフィッシュへ投与し、その生存率およびミトコンドリア障害の検討を行った。

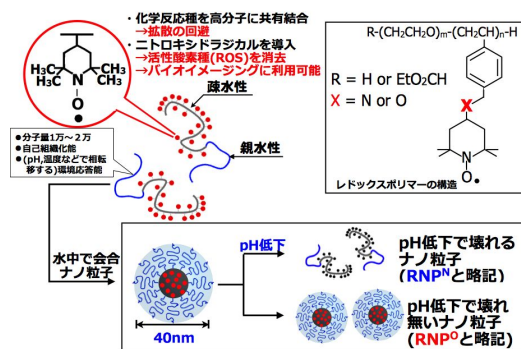


図1 悪玉活性酸素種を選択的に除去する新しいレドックス高分子の設計

平成 27 年度は前年度に設計した材料を食物の放射線滅菌に対する障害の評価を中心に以下のように検討した。

(1)放射線障害に対する影響

放射線滅菌に関する検討は、日本原子力研究開発機構高崎研究所の放射線照射装置を用い、処理食品への放射線の照射とダメージの相関に関して検討した。特に今回は挽肉に対する効果に関しての検討を行った。

4. 研究成果

4.1 ニトロキシドラジカル導入用ブロック共重合体(ポリ(エチレングリコール)-b-ポリ(クロロメチルスチレン) (PEG-b-PCMS)の新規合成):我々はこれまで、ニトロキシドラジカル導入用幹分子として PEG-b-PCMS を利用してきた。このブロック共重合体スルファニル基(SH)を末端に有する PEG を連鎖移動剤とし、クロロメチルスチレンをラジカル重合することにより合成してきた。しかしながら、この製造方法によると、重合中に再結合が起こり、トリブロック共重合体が混入することが避けられず、これが血中滞留性等の性能を低下させる原因になるだけでなく、反応が煩雑でコスト高につながるという欠点があった。そこでまず、ラジカル連鎖移動重合による製造に代え、可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合を応用することで、特に医療分野での用途に適する安定、かつ、狭い分子量分布をもつ、PEG にさらなる機能を付与した共

重合体を容易に製造できることを確認した(図2)。本方法によれば、トリブロック共重合体の生成を防ぎ、分子量分布の狭いPEG-b-PCMSの合成が可能となった。この材料から調製したナノ粒子(newRNP)は旧来型のRNPに比較して高い血中滞留性を示した(図3)。

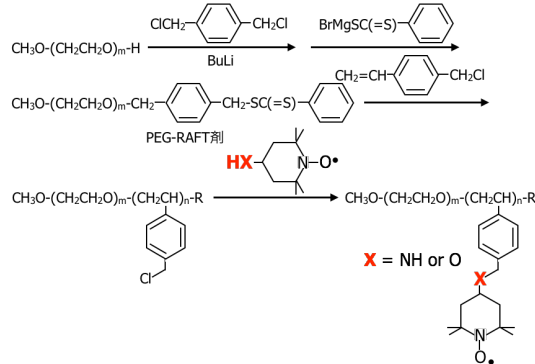


図2. PEG-RAFTからのレドックスポリマーの合成

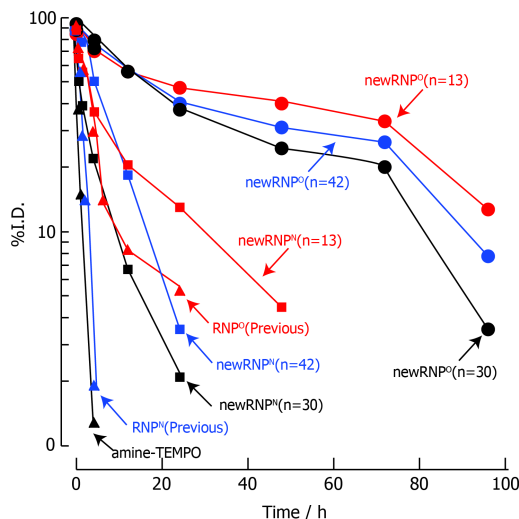


図3. RAFT重合で合成した材料によるレドックスナノ粒子newRNPの血中滞留性

4.2 図1に示すように、自己組織化能や環境応答性を有する高分子に触媒的に活性酸素消去能を有するニトロキシドラジカル(TEMPO)を導入したレドックスポリマーを設計した。これは中分子量のため、細胞膜やミトコンドリア膜を通りにくく、したがってミトコンドリア内の正規電子伝達系を阻害せず、マクロファージや好中球が過剰に産生する悪玉活性酸素種を選択的に消去するレドックスポリマーナノメディシンや環境保護ナノ粒子型高分子として機能する。このレドックスポリマーは水に溶ける部分と溶けない部分を併せ持つため水中で自己組織化してナノ粒子となる(レドックスナノ粒子、RNPと略記する)。低分子抗酸化剤(この場合TEMPOL)がゼブラフィッシュを100%死滅させてしまう濃度条件で、RNPは100%生存する驚異的安全性を示すことを確認した(図4)。また、マウスにおいて低分子TEMPOLを投与すると生存率0%のドーズ条件で、RNP投与では100%生存していること

を確認した(PLOS ONE, 10(5): e0126013 (2015))。

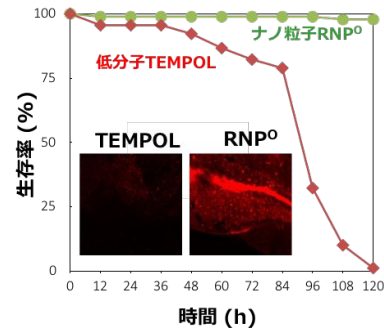


図4. ゼブラフィッシュに対する抗酸化剤の効果(低分子抗酸化剤によって5日後に100%死んでしまう条件で、ナノ粒子化するとほぼ100%生存している。図内の蛍光写真はミトコンドリアの健康状態(赤い蛍光は健康なミトコンドリア)を表す

4.3 レドックスインジェクタブルゲル(RIG)の設計と応用: 上述のナノ粒子の設計をさらに進めて活性酸素種を効果的に消去するレドックスインジェクタブルゲル(RIG)を作製した。図5に示すようにA-B型の親-疎水性ブロック共重合体に変えてニトロキシドラジカルを有するポリアミン-PEG-ポリアミン型のトリブロック共重合体を合成し、ポリアニオンと複合させることによりポリイオンコンプレックス(PIC)を駆動力とするフラワータイトタイプミセルを形成する。これは、温度上昇により親水性のPEGループが不安定化し、またイオン強度の上昇に伴ってPICが不安定化して一部壊れて粒子同士が架橋することでゲル化する。このようなゲル化材料はスプレーなどとして食品処理が可能であり、期待できる。

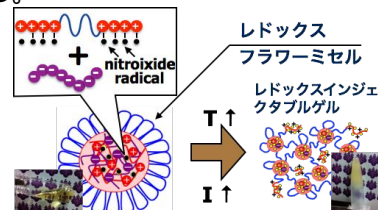


図5. 生体環境にตอบสนองして溶液からゲルに変化するゲル(RIG)による局所活性酸素消去

4.4 レドックス材料の食品放射線滅菌に対する効果

上述したようにポストハーベストは国内では禁止されているにもかかわらず、諸外国から輸入する農産物は野放しなのが現状である。このような問題を解決するためには安全安心な食物処理の技術革新をすることが重要である。我々は安価で大量な試料を処理することのできる放射線滅菌に着目した。放射線処理は高強度の放射線を短時間処理することにより殺菌・殺虫だけでなく、発芽なども同時に抑えることが可能であり、期待されている(図6)。しかしながら放射線そのものが試料にダメージを与えるため、その最適化が検討され

つつある。

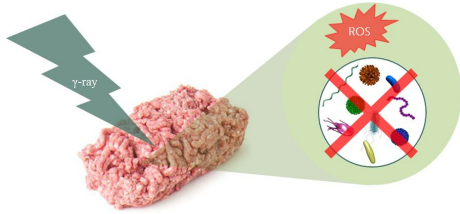


図6.放射線処理による殺菌・殺虫効果

細菌の増殖には活性酸素種(ROS)の産生が強く関与しているため、上記で合成した活性酸素消去型ナノ粒子(RNP)を試料に塗布し、放射線効果を調査した。図7に挽肉に対してRNP処理を行い、放射線処理効果を検討した結果を示す。放射線未処理試料では60日後に細菌数が大きく上昇しているのに対し、25kGy処理試料ではRNP処理およびROS消去能のないPCMSにおいても細菌上昇抑制効果が確認された。一方で、試料細胞膜の酸化レベルをMDA法により定量したところ20mg/kg RNPおよびROS消去能を持たないPCMSでは細胞膜酸化が有意に上昇しているものの、200mg/kg RNPおよび400mg/kg RNPでは著しい抑制効果が確認された。放射線による食品処理では菌・虫の遺伝子を破壊し、増殖を抑えるものであるが、同時に試料細胞の破壊をも生じるため問題があった。今回の結果ではRNP処理が殺菌・殺虫効果を妨げることなく、放射線による試料ダメージを低減することが可能であり、安全な食料の処理に高い期待を持たせるものである。

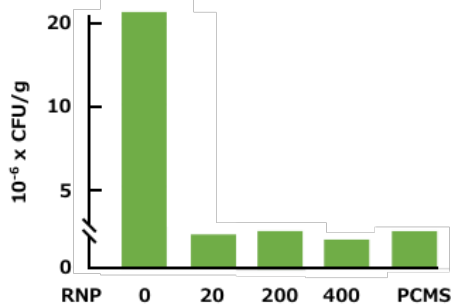


図7. RNP処理による挽肉への放射線処理効果

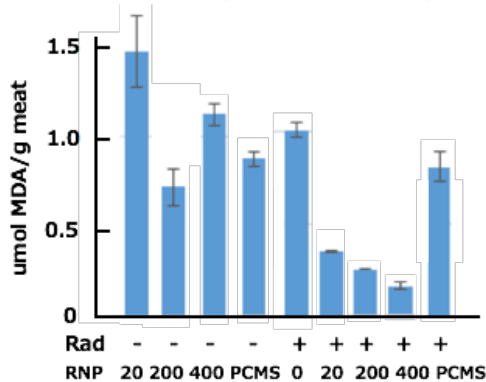


図8. RNP処理による挽肉細胞膜の酸化レベル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計32件)

- Long Binh Vong, Yukio Nagasaki, Combination treatment of murine colon cancer with doxorubicin and redox nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, in press. (doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00676)
- Shiro Ishii, Junya Kaneko, Yukio Nagasaki, Development of a long-acting, protein-loaded, redox-active, injectable gel formed by a polyion complex for local protein therapeutics, *Biomaterials*, Volume 84, page 210-218(2016) (doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.029)
- Makiko Saita, Junya Kaneko, Takenori Sato, Shun-suke Takahashi, Satoko Wada-Takahashi, Ryota Kawamata, Takashi Sakura, Masaichi-Chang-il Lee, Nobushiro Hamada, Katsuhiko Kimoto, Yukio Nagasaki, Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat periodontitis model: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption, *Biomaterials*, Volume 76, January 2016, Pages 292-301 (doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.077).
- Shinpei Kudo, Yukio Nagasaki, A Novel Nitric Oxide-based Anticancer therapeutics by Macrophage-targeted Poly(L-Arginine)-based Nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, Vol. 217, 256-262(2015) (doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.019)
- Shinpei Kudo, Yukio Nagasaki, Facile and Quantitative Synthesis of a Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly(L-Arginine) Block Copolymer and Its Use for the Preparation of Polyion Complex Micelles with Polyanions for Biomedical Applications, *Macromolecular Rapid Communications*, Volume 36, Issue 21, November 2015, Pages: 1916-1922 (doi: 10.1002/marc.201500224).
- Long Binh Vong, John Mo, Bertil Abrahamsson and Yukio Nagasaki, Specific accumulation of orally administered redox nanotherapeutics in the inflamed colon reducing inflammation with dose-response efficacy, *Journal of Controlled Release*, Volume 210, 28 July 2015, Pages 19-25 (doi: 10.1016/j.jconrel.2015.05.275).
- Akiko Eguchi, Toru Yoshitomi, Milos Lazic, Casey D. Johnson, Long Binh Vong, Alexander Wree, Davide Povero, Bettina G. Papouchado, Yukio Nagasaki, Ariel E. Feldstein, Redox nanoparticles as a novel treatment approach for inflammation and fibrosis associated with nonalcoholic steatohepatitis, *Nanomedicine*, Vol. 10, No. 17, Pages 2697-2708.(2015) (doi: 10.2217/nmm.15.87)
- Sindhu Thangavel, Toru Yoshitomi, Meena Kishore Sakharkar and Yukio Nagasaki, Redox nanoparticles inhibit curcumin oxidative degradation and enhance its therapeutic effect on

- prostate cancer, *Journal of Controlled Release*, Volume 209, 10 July 2015, Pages 110-119 (doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.025)
9. Hiroyuki Nakagawa, Yoko Matsumoto, Yu Matsumoto, Yoshihiro Miwa, Yukio Nagasaki, Design of high-performance anti-adhesion agent using injectable gel with an anti-oxidative stress function, *Biomaterials*, Vol. 69, 165-173 (2015) (doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.018).
 10. Shiro Ishii, Junya Kaneko, and Yukio Nagasaki, Dual stimuli-responsive redox-active injectable gel by polyion complex based flower micelles for biomedical applications, *Macromolecules*, 2015, 48, 3088-3094 (doi: 10.1021/acs.macromol.5b00305).
 11. M. Bednarowicz, B. Dobosz, R. Krzyminiewski, M. Hałupka-Bryl, Y. Nagasaki, ESR Studies of Redox-Active PMNT-PEG-PMNT Polymer, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 161, 1 July 2015, Pages 250-255 (doi: 10.1016/j.matchemphys.2015.05.045).
 12. Pennapa Chonpathompikunlert, Toru Yoshitomi, Long Binh Vong, Natsuka Imaizumi, Yuki Ozaki, Yukio Nagasaki, Recovery of Cognitive Dysfunction via Orally Administered Redox-polymer Nanotherapeutics in SAMP8 mice, *PLoS ONE*, 10(5): e0126013 (2015). (doi: 10.1371/journal.pone.0126013)
 13. Long Binh Vong, Toru Yoshitomi, Hirofumi Matsui, and Yukio Nagasaki, Development of an oral nanotherapeutics using redox nanoparticles for treatment of colitis-associated colon cancer, *Biomaterials*, Vol. 55, 54-63 (2015) (doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.03.037)
 14. Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Yukio Nagasaki, A novel biointerface that suppresses cell morphological changes by scavenging excess reactive oxygen species, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, Vol.103, Issue 9, 2815-2822(2015)(doi: 10.1002/jbm.a.35419)
 15. Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki, Development of Silica-containing Redox Nanoparticles for Medical Applications, *Biomaterials Science*, Vol. 3, 810-815(2015) (doi: 10.1039/C5BM00057B).
 16. Magdalena Hałupka-Bryl, Magdalena Bednarowicz, Bernadeta Dobosz, Ryszard Krzyminiewski, Tomasz Zalewski, Beata Wereszczyńska, Yukio Nagasaki, Doxorubicin loaded PEG-*b*-poly(4-vinylbenzylphosphonate) coated magnetic iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 384, 320-327(2015)(doi: 10.1002/jbm.a.35419).
 17. Mao Toyoda, Susumu Hama, Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Kentaro Kogure, Anti-cancer vaccination by transdermal delivery of antigen peptide-loaded nanogels via iontophoresis, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 483, Issue 1-2, 110-114(2015) (doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.024).
 18. Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki, ROS-scavenging Nanomedicine for Treatment of Oxidative Stress Injuries, *Advanced Healthcare Materials*, Vol.3, Issue 8, p.1149-1161(2014) (doi: 10.1002/adhm.201300576)
 19. Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Impacts of PEGylation on the gene-delivery system, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol.131, Issue 9, 40293 May 5 doi: (10.1002/app.40293).
 20. Madoka Shimizu, Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki, The Behavior of ROS-Scavenging Nanoparticles in Blood, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, Vol.54, No.3, 166-173(2014) (doi: 10.3164/jcbrn.13-85).
 21. Md. Amran Hossain, Mayo Yamashita, Long Binh Vong, Yutaka Ikeda and Yukio Nagasaki, Silica-installed redox nanoparticles for novel oral nanotherapeutics- Improvement in intestinal delivery with anti-inflammatory effects, *Journal of Drug Targeting*, Vol. 22, No. 7, Pages 638-647(2014) (doi:10.3109/1061186X.2014.928716).
 22. Magdalena Hałupka-Bryl, Kei Asai, Sindhu Thangavel, Magdalena Bednarowicz, Ryszard Krzyminiewski, Yukio Nagasaki, Synthesis and in vitro and in vivo evaluations of poly(ethylene glycol)-block-poly(4-vinylbenzylphosphonate) magnetic nanoparticles containing doxorubicin as a potential targeted drug delivery system, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, Vol. 118, 140-147(2014) (doi: 0.1016/j.colsurfb.2014.03.025)
 23. Thangavel Lakshmi Priya, Yukichi Horiguchi, and Yukio Nagasaki, Co-immobilized poly(ethylene glycol)-block-polyamines promote sensitivity and restrict biofouling on gold sensor surface for detecting Factor IX in human plasma, *Analyst*, Vol. 139(16), 3977-3985(2014) (doi: 10.1039/c4an00168k).
 24. Toru Yoshitomi, Kazuhiro Kuramochi, Long Binh Vong, Yukio Nagasaki, Development of nitroxide radicals-containing polymer for scavenging ROS from cigarette smoke, *Science and Technology for Advanced Materials*, 15, 035002(2014) (doi: 10.1088/1468-6996/15/3/035002)
 25. Long Binh Vong, Toru Yoshitomi, Kazuya Morikawa, Shinji Saito, Hirofumi Matsui, Yukio Nagasaki, Oral nanotherapeutics: Effect of redox nanoparticle on microflora in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis, *Journal of Gastroenterology*, Volume 49, Issue 5, Page

- 806-813 (2014) (doi: 10.1007/s00535-013-0836-8)
26. Yukichi Horiguchi, Naoki Nakayama, Naoki Kanayama, Yukio Nagasaki, Sulfobetaine-terminated PEG Improves the Qualities of an Immunosensing Surface, *Biomaterials Science*, Vol.2., No.6., 819-826(2014)(doi:10.1039/c3bm60212e)
27. Susumu Hama, Yuki Kimura, Aya Mikami, Kanako Shiota, Atsushi Tamura, Yukio Nagasaki, Kiyoshi Kanamura, Kazunari Kajimoto, Keitaro Kogure, Imperceptible electric stimulus opens intercellular spaces in skin, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 289 2450-2456(2014) (doi: 10.1074/jbc.M113.514414).
28. Chiaki Abe, Yoshihiro Uto, Ayaka Kawasaki, Chiho Noguchi, Ryo Tanaka, Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki, Yoshio Endo and Hitoshi Horia, Evaluation of the *in vivo* antioxidative activity of redox nanoparticles by using a developing chicken egg as an alternative animal model, *Journal of Controlled Release*, Vol. 182, 67-72(2014) (doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.15)
29. Hironobu Yasui, Ryo Takeuchi, Tohru Yamamori, Shunsuke Meike, Yoshinari Nakamura, Masaki Nagane, Yasuhiro Kon, Hiroki Murotani, Motoi Oishi, Yukio Nagasaki and Osamu Inanami, Radiosensitization of tumor cells through endoplasmic reticulum stress induced by PEGylated nanogel containing gold nanoparticles, *Cancer Letter*, Vol. 347,151-158(2014) (doi:10.1016/j.canlet.2014.02.005)
30. Yukio Nagasaki, Tatsuya Yaguchi, Takuma Matsumura, Toru Yoshitomi, Yutaka Ikeda, Atsushi Ueda, and Aki Hirayama, Design and use of silica-containing redox nanoparticles, siRNP for high-performance peritoneal dialysis, *Biomaterials Science*, Vol.2, No.4., 522-5298(2014) (doi: 10.1039/c3bm60236b)
31. Toru Yoshitomi, Sha Sha, Long Binh Vong, Pennapa Chonpathompikunlert, Hirofumi Matsui, and Yukio Nagasaki, Indomethacin-loaded redox nanoparticles improve oral bioavailability of indomethacin and suppress its small intestinal inflammation, *Therapeutic Delivery*, 2014, Vol. 5, No. 1, Pages 29-38 (doi:10.4155/tde.13.133).
32. Yukio Nagasaki, Tsuyoshi Yamazaki, Akihiko Kikuchi, Mariko Harada-Shiba, Elevated atherogenic index following oral administration of quaternized polyamine nanogels, *Colloid and Surface: B*, Vol. 113, No.1., 237-242(2014)(doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.016)

[学会発表](計 189 件)

- 1.2015.12.15 Yukio Nagasaki, Redox Injectable Gels for Local Inflammation

Treatments, Pacificchem2015, Honolulu, Hawaii, U.S.A.

他

[図書](計 6 件)

1. 長崎幸夫、「レドックスナノメディシンによる安全な抗酸化治療法の開発」、医歯薬出版医学のあゆみ、(2015),200(10)
2. Masao Kamimura, Yukio Nagasaki, PEGylated polymer micelles for anti-cancer drug delivery carrier, Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development, 1st Edition, Hiroyuki Ohshima, Kimiko Makino Edited, July, 2014, Elsevier.532(P285-P298) (ISBN; 9780444626141)

他

[産業財産権]

出願状況(計 5 件)

非公開出願につき、公表を控えます。

[その他]

ホームページ等

http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/index.htm

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長崎 幸夫 (NAGASAKI, Yukio)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：90198309