

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560913

研究課題名(和文)超音波を併用した超臨界二酸化炭素による新規バイオスカフォールド生体材料の創製

研究課題名(英文)Development of biologic scaffold materials composed of extracellular matrix by means of the supercritical fluid technology with ultrasonic irradiation.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体適合性の高い二酸化炭素を機能性溶媒として利用し、バイオスカフォールド(細胞外マトリックス)の生成を試みた。二酸化炭素雰囲気の下で、豚などの異種哺乳動物の組織に超音波照射することで、細胞成分を除去し、再生医療に利用できるバイオスカフォールドの製造法を開発し、臨床応用を検討することを目的とした。異種哺乳動物の組織から拒絶反応の原因となる細胞成分を除去し、高い細胞密度を実現するバイオスカフォールド生体材料を製造する超臨界二酸化炭素超音波分散法の開発に成功した。さらに、マイクロX線CTにて生成した脱細胞臓器の構造データを求めた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to generate biologic scaffold materials composed of extracellular matrix (ECM) from animal tissues or organs by means of the supercritical fluid technology. In order to obtain the biologic scaffold materials which may overcome a severe shortage of donor organs for organ transplant, the separation of cellular components leading to allograft rejection and decellularization of whole organs, such as kidneys livers, hearts of rats and pigs was achieved by ultrasonic irradiation in liquid carbon dioxide at high pressure condition. The structural data of decellularized organs were obtained by a micro-focus X-ray CT. These structural data of decellularized organs may lead to multi production of biologic scaffold materials composed of extracellular matrix for donor organs for organ transplant in an industrial scale.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：バイオスカフォールド 二酸化炭素 再生医療 超臨界流体 超音波

1. 研究開始当初の背景

山中教授らのiPS細胞開発以来、生体組織の再生技術の重要性が高まっている。ハーバード大のJoseph P. Vacantiらは、生分解性高分子のスcaffoldを、生体吸収性人工材料として利用することを提案し成果をあげている。国内でも、東京女子医科大学にて、生体吸収性材料を用いた血管スcaffoldに患者の骨髄細胞を組み込んで移植した臨床例がある。しかし、生体吸収性人工材料では複雑な形状の造形が容易でなく、生体よりも硬く、生体のような力学特性を持たせることが難しい。生体組織を利用する研究としては、生体組織から超臨界二酸化炭素抽出を利用して、リン脂質やDNAを除去する試みが、2006年に澤田らによって行われている。国立循環器病センターの岸田らは、超高压処理とマイクロ波照射を用いて、ミニブタの組織から細胞成分を除去し、異種脱細胞化組織を生成することを提案している。生体組織を用いることで、生体吸収性人工材料よりも柔軟性に優れた素材を提供することに成功している。しかし、マイクロ波照射を用いるため、細胞外マトリックスの損傷が多くなる欠点があった。さらに、生体内で分解したscaffoldの空間部分をどのように組織化するのかも課題となった。結合組織成分の多い組織になることから、細胞が密に詰まった機能を持つ組織をいかにして再生するかが重要となっている。心臓、肝臓などの細胞が密になった構造や厚い組織の再生に関しては、細胞外マトリックスに損傷を与えず、より穏和な操作で異種脱細胞化組織を作り出す技術の開発が望まれている。

既に、本研究代表者は、超臨界二酸化炭素による新規バイオ Scaffold 生体材料を開発するための準備として、**文部科学省科学研究費補助金** (基盤研究(C) 平成 20~22 年度課題番号 20560707) の補助を受け「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」、(基盤研究(C) 平成 16~18 年度課題番号 16560664) の補助を受け「超臨界流体中での高分子の自己組織化を利用した核酸ドラッグ用ナノデバイスの創製」、および (基盤研究(C) 平成 14,15 年度課題番号 14550743) の補助を受け「超臨界流体中での酵素反応を用いた DNA 増幅技術の開発 (研究代表者:三島健司)」に関する研究に取り組み、超臨界二酸化炭素中での超音波分散技術の開発「**生体組織再生用移植材及びその製造方法**」(三島健司、特許; **特願 2009 - 70301**) ならびに超臨界二酸化炭素中にて、ペプチド合成、DNA 合成に成功した (K.Mishima, Biotechnol. Prog.19, 281(2003)、三島健司、特許; 特開平 11-310594、特開平 11-206371、特開平 10-120345)。研究分担者入江は、(若手研究(B) 平成 22,23 年度課題番号 22790516) の補助を受け「2-アラキドノイルグリセロールによる抗菌ペプチド誘導作用の解析と応用法の確立」に関する研究に取り組み、細胞増殖因子の知見を得た。さらに、本研究代表者は、科学技術振興財団 (JST) 実用化のための育成研究の補助を受け、「超臨界流体を用いたナノ粒子の開発」平成 13-16 年度、補助金 110,000,000 円 (研究代表者:三島健司)」に関する研究に取り組み、超臨界二酸化炭素中にナノメートルサイズの粒子を高分子マトリックス中に均一に分散させることに成功した (特許「複合微粒子の製造方法」三島健司、特願 2004-344934)。さらに、**実用化**による技術の社会的適応性の求められていた超臨界流体技術の実用化研究として、平成 11 年度福岡県産業・科学技術振興財団地域開発促進拠点支援事業 (研究育成型)「有害な有機溶媒を用いないマイクロティングシステムの開発」(研究代表者:三島健司)、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 平成 13・14 年度産学連携実用化開発補助事業「超臨界二酸化炭素による繊維・産業資

材の染色加工技術実用化開発」(リーダー:三島健司)などの研究において、超臨界二酸化炭素を用いた技術の実用化に成功した。また、福岡大学と**花王㈱との共同研究として**、超臨界二酸化炭素を用いた無機マイクロ粒子のフッ素系樹脂コーティングの研究を行い(リーダー:三島健司)、100リットル反応装置での工業規模生産(商品名:ソフィーナファンデーション)を可能にし、**超臨界二酸化炭素コーティングの実用化に成功した**。花王㈱は、この技術に関し、**平成17年度化学工学会技術賞受賞**した。本研究代表者は、このように超臨界二酸化炭素を用いたナノデバイスの自己組織化制御および超臨界二酸化炭素中での生体関連物質反応制御に関する研究を行い、**医工融合領域分野および社会経済分野で最も大きな経済的波及効果が見込まれる超音波を併用した超臨界二酸化炭素による新規バイオスカフォールド生体材料の創製**を研究課題とすることに至った。

2. 研究の目的

本研究では、**細胞密度の高いバイオスカフォールド生体材料の創製**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**超臨界超音波分散法、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、超臨界高速攪拌ナノ粒子分散法**ならびに**超臨界分散抽出技術**を基礎技術として、**豚などの異種哺乳動物の組織に超音波照射することで、細胞成分を除去し、再生医療に利用できるバイオスカフォールド**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、既に三島が開発した超臨界二酸化炭素中での超音波分散技術の開発「**生体組織再生用移植材及びその製造方法**」(三島健司、特許;特願2009-70301)を基礎技術として、

ラットならびに豚の組織を利用して、有害な化学種を用いない超臨界流体技術を用いた超音波照射により、高密度生体組織再生に利用可能な**異種脱細胞化組織**の開発を以下のように行った。

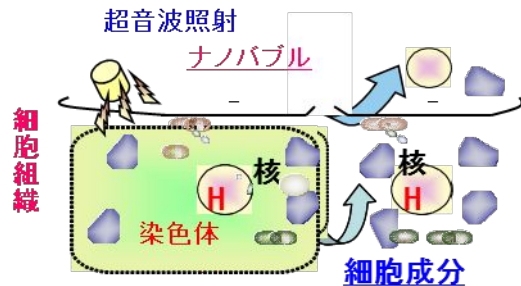


図1 超臨界超音波による脱細胞

再生医療に利用可能な異種脱細胞化組織の創製のために、超臨界二酸化炭素中で超音波照射によりラットならびに豚の組織から拒絶反応の原因となる細胞成分の除去を行い、異種脱細胞化組織調整実験を行う。超臨界二酸化炭素中での超音波や攪拌操作(Mishima, Advanced Drug Delivery Reviews, 60, 411-432(2008), .Mishima et al., Biotechnology Progress Vol.19, 281-284 (2003);特許有り)を応用し、「超音波併用型の超臨界二酸化炭素脱細胞化装置」(現有設備)を用いて、細胞浸透性の高いナノバブルを組織の細胞内に導入後、ラットならびに豚組織から、細胞成分を超音波照射により、超臨界二酸化炭素存在下で細胞成分を分離する。図1に示すように、ナノバブルは超臨界二酸化炭素中でも、超音波照射による細胞内でキャビテーションを引き起こし、細胞組成の抽出効率を高める。その際、リン脂質やDNAなど細胞成分の超臨界二酸化炭素に対する溶解度が問題となるが、流通型の超臨界二酸化炭素溶解度測定装置、超臨界クロマトグラフィー装置、FT-IR, UV併用型を用い、溶解度測定装置を利用して、溶解度を測定する。処理した組織については、組織検査用薄片試料を常法により調製し、ヘマトキシリン・エ

オシン染色した後、光学顕微鏡にて脱細胞率を評価する。二酸化炭素抽出により脱細胞化を行った異種脱細胞化組織(細胞外マトリックス)を対象として、ストレスプローブを用いて組織のダメージを測定する。また、調整した異種脱細胞化組織と市販の生体吸収性人工材料とを用いて、各種の細胞の培養実験を系統的に行い、再生医療用素材としての性能評価を蛍光分光光度計、実体顕微鏡ならびにマイクロプレートリーダーにて行った。

4. 研究成果

本研究では、生体適合性の高い二酸化炭素を機能性溶媒として利用し、バイオスカフォールド(細胞外マトリックス)の生成を試みた。二酸化炭素雰囲気の下で、豚などの異種哺乳動物の組織に超音波照射することで、細胞成分を除去し、再生医療に利用できるバイオスカフォールドの製造法を開発し、臨床応用を検討した。23年度~25年度の研究で、異種哺乳動物の組織から拒絶反応の原因となる細胞成分を除去し、高い細胞密度を実現するバイオスカフォールド生体材料を製造する超臨界二酸化炭素超音波分散法の開発に成功した。25年度研究にて、マイクロX線CTにて生成した脱細胞臓器の構造データを求めた。

超臨界二酸化炭素中での超音波ならびに攪拌操作を応用し、細胞浸透性の高いナノバブルを組織の細胞内に導入後、ラットならびに豚組織から超臨界二酸化炭素存在下で細胞成分を分離し、成分分析を行った。さらに、ラットの生体組織の脱細胞化組織を用いて行った細胞増殖の知見をもとに、異種脱細胞化組織(細胞外マトリックス)を用いて、ラットの組織再生実験を行った。また、脱細胞化した組織について、マイクロX線CTをもちいて組織構造の断面写真を積層データとして収集した。

以上のような実験から、CO₂を機能性溶媒として利用し、豚ならびにラットの異種哺乳

動物の組織に超音波照射することで、細胞成分を除去し、再生医療に利用できるバイオスカフォールド(細胞外マトリックス)の製造に成功した。さらに、これを市販装置とするために、脱細胞化した組織について、マイクロX線CTをもちいて組織構造の断面写真を積層データとして収集したことで、再生医療用装置としてプロトタイプを製作することは、目的の達成度として十分評価できる。

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 14 件)

T. Harada, T. Nakano, H. Moriyama, N. Tajima, H. Yokota, R. Kawakami, K. Mishima, A New method for separating configurational and constitutional chiralities by using diffuse reflectance circular dichroism (DRCD), *App. Spectro.* 67, 1210-1213 (2013), 査読有

T. Amako, N. Saito, T. Harada, K. Mishima, M. Fujiki, Y. Imai, Solid-State Circularly Polarised Luminescence and Circular Dichroism of Viscous Binaphthyl Compounds, *RSC Adv* 3, 23508-23513 (2013), 査読有

三島健司, 超臨界流体を用いたマイクロカプセルの調製と化粧品への応用, *COSMETIC STAGE* 3, 46-52 (2013), 査読無

Hiramatsu Y, Satho T, Irie K, Shiimura S, Okuno T, Sharmin T, Uyeda S, Fukumitsu Y, Nakashima Y, Miake F, Kashige N, Differences in TLR9-dependent inhibitory effects of H₂O₂-induced IL-8 secretion and NF-kappa B/I kappa B-alpha system activation by genomic DNA from five *Lactobacillus* species., *Microbes and Infection* 15(2), 96-104 (2013), 査読有

Kenji Mishima, Ryo Kawakami, Haruo Yokota, Takunori Harada, Takafumi Kato, Keiichi Irie, Kenichi Mishima, Michihiro Fujiwara, Kiyoshi Matsuyama, Salim Mustofa and Agus Salim, Extraction of Xanthenes from Pericarps of *Garcinia mangostana* Linn. with Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol, *Solvent Extr. Res. Dev.*, Jpn 20, 79-89 (2013), 査読有

Fukumitsu Y, Irie K, Satho T, Aonuma H, Dieng H, Ahmad AH, Nakashima Y, Mishima K, Kashige N, Miake F, Elevation of dopamine level reduces host-seeking activity in the adult female mosquito *Aedes albopictus*., *Parasite and Vectors* 5(92), (2012), 査読有

Fujioka M, Nakano T, Hayakawa K, Irie K,

Akitake Y, Sakamoto Y, Mishima K, Muroi C, Yonekawa Y, Banno F, Kokame K, Miyata T, Nishio K, Okuchi K, Iwasaki K, Fujiwara M, Siesjö BK, ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury, *Neurological Sciences* 33(5), 1107-1115 (2012), 査読有

松尾勝一, 中川朋子, 井上俊孝, 三島健司, 富田昌良, 志村英生, インメモリ型ビジネスインテリジェンス(BI)データ解析ソフトを利用した手術システムの解析 一手術室の利用状況の「可視化」-, *日本医療マネジメント学会雑誌* 13, 75-80 (2012), 査読有

三島健司, 次世代複合材料のための超臨界二酸化炭素技術, *工業材料* 60, 32-36 (2012), 査読無

松山清, 三島健司, 高圧二酸化炭素中の超音波キャビテーションを利用した微粒子の複合化技術の開発, *高圧力の科学と技術* 22, 22-26 (2012), 査読無

K. Matsuyama, K. Mishima, T. Kato, K. Irie, K. Mishima, Transparent Polymeric Hybrid Film of ZnO Nanoparticle Quantum Dots and PMMA with High Luminescence and Tunable Emission Color., *J. Colloid & Interface Sci.* 367, 171-177 (2012), 査読有

Kenji Mishima, Kiyoshi Matsuyama, Takafumi Kato, Tadashi Suetsugu, Shigeto Aramaki, Hiroaki Tanaka, Yasuki Higaki, Soichi Ando, Keiichi Irie, Sei Higuchi, Yoshiharu Akitake, Kenichi Mishima, Michihiro Fujiwara, Measurement of cerebral blood oxygenation during a verbal memory task by means of fNIRS, *IEEE Region 10 Conference (TENCON) 2011 1*, 1-2 (2011), 査読有

Kenji Mishima, Kiyoshi Matsuyama, Takafumi Kato, Tadashi Suetsugu, Shigeto Aramaki, Hiroaki Tanaka, Yasuki Higaki, Soichi Ando, Keiichi Irie, Sei Higuchi, Yoshiharu Akitake, Kenichi Mishima, Michihiro Fujiwara, Effect of rock-paper-scissors exercise on cerebral blood oxygenation during a verbal memory task measured by fNIRS, *2011 IEEE TENCON International Conference on Signal Processing, Communications and Computing (ICSPCC2011)1*, 1-2 (2011), 査読有

K. Matsuyama, K. Mishima, T. Kato, K. Ohara, Formation of Porous Glass via Core/Shell-structured Poly(methyl methacrylate)/Powder Glass Prepared by Ultrasonic Irradiation in Liquid CO₂., *J. Supercritical Fluids* 57, 198-206 (2011), 査読有

〔学会発表〕(計 23 件)

高本真、原田拓典、田島暢夫、森山広思、三島健司, 1,8-Dihydroxyanthraquinone 結晶のキラル光学スペクトル: 理論と実験による検討, *日本化学会第 94 春季年会* 2014, 2014 年 3 月 27-30 日, 名古屋

三島健司, 原田拓典, 超臨界二酸化炭素の圧力誘起法を用いた高分子マイクロコーティング, *化学工学会第 79 年会*, 2014 年 3 月 18-20 日, 岐阜

山下郁太、山口竜司、樋口聖、中野貴文、林稔展、松尾宏一、入江圭一、佐藤朝光、松山清、三島健司、桂林秀太郎、高崎浩太郎、窪田香織、三島健一、岩崎克典、藤原道弘 脂肪嗜好性に対する高脂肪食摂取期間が及ぼすカンナビノイドシステムの変化, *第 66 回日本薬理学会 西南部会*, 2013 年 11 月 16 日, 福岡

三島健司, 横田春生, 川上 亮, 原田拓典, 超臨界二酸化炭素を用いたナノ粒子を含む高分子複合体の生成, *第 54 回高圧討論会*, 2013 年 11 月 13-14 日, 新潟

K. Mishima, T. Harada, R. Kawakami Integrated Water Cycle Management in Japan 1st Seminar on Ecology, Sanitation and Integrated Water Resources Management (ESIWRM) 2013 年 10 月 21-22 日, Bali

三島健司、志村英生、井上俊孝, GPS データを併用したインメモリ型データ解析ソフトを利用した地域医療の可視化, *日本医療マネジメント学会 第 12 回九州・山口連合大会*, 2013 年 10 月 11 日, 山口

中林和輝、尼子智之、原田拓典、三島健司、藤木道也、今井喜胤, ジエチルエーテル鎖を有する軸不斉ピナフチル化合物の各種マトリックス中におけるキラル, *第 24 回基礎有機化学討論会*, 2013 年 9 月 5-7 日, 東京

尼子智之、原田拓典、鈴木望、三島健司、藤木道也、今井喜胤, 粘稠性軸不斉難澀る化合物の固体状態における円偏光発光特性, *第 24 回基礎有機化学討論会*, 2013 年 9 月 5-7 日, 東京

北山陽子、尼子智之、原田拓典、三島健司、黒田玲子、藤木道也、今井喜胤, 光学活性ナフタレン化合物の各種マトリックス中におけるキラルな光学特性, *第 24 回基礎有機化学討論会*, 2013 年 9 月 5-7 日, 東京

K. Mishima, R. Kawakami, H. Yokota, T. Harada, T. Kato, K. Irie, K. Mishima, M. Fujiwara, Complex Coacervation for Composites of ZnO Nanoparticles with a Fluoropolymer by Pressure-Induced Phase Separation of Supercritical Carbon Dioxide Solutions, *33rd International Conference on Solution Chemistry*, 2013 年 7 月 10-11 日, 京都

原田拓典、横田春生、川上亮、三島健司、高橋浩三、黒田玲子, Stokes-Mueller matrix 法に基づく次世代型円二色性 (CD) 分光計の開発, *光学シンポジウム*, 2013 年 6 月 27 日,

東京

原田拓典、横田春生、川上亮、三島健司、黒田玲子、栗原舞、森山広思、自己会合シンポジウム色素のキラリ光学特性, Molecular Chirality 2012, 2013年5月10-11日、京都
尼子智之、赤木冬駒、木本貴也、鈴木 望、原田拓典、三島健司、藤木道也、今井喜胤、粘稠軸不斉ピナフル化合物の外部環境による非古典的光学特性制御、Molecular Chirality 2012, 2013年5月10-11日、京都
N. Hatae, T. Suetsugu, X. Wei, T. Tsuruoka, S. Aramaki, T. Kato, H. Yokota, K. Mishima, Effect of simple exercise on cerebral blood oxygenation during a verbal memory task measured by fNIRS, The 25th International Symposium on Chemical Engineering, PA-14, 2012年12月15日、Okinawa, Okinawa Convention Center.

三島健司、川上亮、横田春生、原田拓典、超臨界二酸化炭素によるマンゴスチン果皮由来のマンゴスチンの抽出、溶媒抽出討論会、2012年11月16日~2012年11月17日、石川

K. Mishima, H. Yokota, R Kawakami, D Zhao, T. Harada, T. Kato, T. Suetsugu, X. Wei, Shape effect of core substance on coacervation micro-encapsulation by means of supercritical carbon dioxide, the 10th Japan-Korea Symposium on Materials and Interfaces, 2012年11月8日~2012年11月9日、京都

三島健司、横田春生、加藤貴史、川上亮、原田拓典、末次正、荒牧重登、超臨界二酸化炭素を用いた複合粒子の生成、第53回高压討論会、2012年11月7日~2012年11月9日、大阪

K. Mishima, H. Yokota, T. Kato, T. Suetsugu, X. Wei, K. Irie, K. Mishim, M. Fujiwara, H. Shimura, K. Matsuo, K. Matsuyama, T. Harada, Preparation of Extracellular Matrix from Animal Tissue by Ultrasonic Irradiation in Liquid CO₂, MTMS '12, 2012年9月25日~2012年9月27日、広島

K. Mishima, M. Honjo, H. Yokota, T. Kato, T. Suetsugu, X. Wei, K. Irie, K. Mishim, M. Fujiwara, T. Kakuda, K. Matsuyama, T. Harada, Formation of Microcomposites -Lipoic Acid and Hydrogenated Colza Oil by PGSS, MTMS '12, 2012年9月25日~2012年9月27日、広島

K. Mishima, Environmentally Benign Application of Supercritical Fluid Technology to Material Structure Control, International Conference of Application of Magnetic Materials in Defence & Security Systems for Supporting the Development of National Industry(招待講演), 2011年10月26日, Surabaya Indonesia (21)三島健司、次世代医療のためのナノ・マ

イクロ素材技術、第7回次世代医療システム産業化フォーラム 2011(招待講演), 2012年1月19日、大阪

(22)三島健司、三島健司、液体二酸化炭素中の超音波分散技術による微粒子の複合化と多孔質材料合成への応用、化学工学第43回秋季大会、2011年9月18日、広島

(23)三島健司、アジアの中の九州ケミカルエンジニア、第22回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会(招待講演)、2011年7月22日、鹿児島

〔図書〕(計 2 件)

志村英生、関基陽、月足俊博、三島健司、横田春生ら19名、QlikViewを使った医療情報の見える化 電子カルテ情報の見える化を自分でやってみよう、大道学館出版部、66-73 (2012)

今井浩三、三島健司ら、DDS製剤の開発・評価と実用化手法、技術情報協会、645-648 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

志村英生 (SHIMURA Hideo)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 80178996

入江 圭一 (IRIE Keiichi)

福岡大学・加齢脳科学研究所・ポストド

クター

研究者番号: 50509669

(削除:平成25年6月14日)

(3)連携研究者

なし