

## 高血圧自然発症ラットの血圧上昇に及ぼす リポソーム化クロレラエキスの影響

高橋 誠<sup>\*1,\*2</sup>, 島田ほしの<sup>\*2</sup>, 北本 大<sup>\*3</sup>, 高良健作<sup>\*4</sup>, 和田浩二<sup>\*4§</sup>

<sup>\*1</sup> 鹿児島大学大学院連合農学研究科生物資源利用科学専攻

<sup>\*2</sup> 金秀バイオ株式会社

<sup>\*3</sup> 産業技術総合研究所環境科学技術研究部門

<sup>\*4</sup> 琉球大学農学部生物資源科学科

### Effect of Liposome-Encapsulated Chlorella Extract on Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats

Makoto Takahashi<sup>\*1,\*2</sup>, Hoshino Shimada<sup>\*2</sup>, Dai Kitamoto<sup>\*3</sup>, Kensaku Takara<sup>\*4</sup> and Koji Wada<sup>\*4§</sup>

<sup>\*1</sup> The United Graduate School of Agricultural Science, Kagoshima University,  
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065

<sup>\*2</sup> Kanehide Bio Co., Ltd., 5-2-2 Nishizaki, Itoman, Okinawa 901-0105

<sup>\*3</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8565

<sup>\*4</sup> Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru,  
Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa 903-0213

We prepared liposome-encapsulated chlorella extract (LEC) using lecithin via combined mechanochemical method of homogenization and microfluidization. LEC was confirmed to comprise small unilamellar vesicles with a diameter of approximately 150 nm by freeze fracture electron microscopy. The bioactivity of LEC was examined for the suppressive effect of hypertension on blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). Continuous 10-week administration of LEC (3.6% (w/w) chlorella extract diet) showed a significant anti-hypertensive effect compared to the control administration for 8 and 10 weeks. Moreover, oral LEC administration showed much higher anti-hypertensive effect compared to non-capsulated extract administration. In addition, the active substance responsible for anti-hypertensive effect in the extract presumed to comprise the peptides was confirmed to have a strong ACE inhibitory activity (IC<sub>50</sub>: 0.014 mg/mL). However, the extract showed a decrease in its ACE inhibitory activity following enzymatic digestion. Consequently, encapsulation for oral administration of LEC prevented digestion of the chlorella extract allowing for its high anti-hypertensive effect on SHR. (Received Dec. 1, 2008 ; Accepted Jul. 21, 2009)

**Keywords** : liposome, chlorella, functional food, anti-hypertensive effect, angiotensin I-converting enzyme

**キーワード** : リポソーム, クロレラ, 機能性食品, 血圧上昇抑制作用, アンジオテンシン I 変換酵素

クロレラは、クロレラ属 (*Chlorella*) に分類される直径 5~20 μm の球形または楕円形の淡水性単細胞緑藻類であり、亜熱帯地域から熱帯地域の湖沼に広く分布している<sup>1)</sup>。藻体の約 60% (w/w) をタンパク質が占めており、その他にも糖タンパク質、必須アミノ酸、ビタミン類、ミネラル類が含まれているために、健康食品、食品素材および養殖魚等愛玩動物の飼料素材等として用いられている<sup>2)</sup>。また、食品における三次機能性としてこれまでに、血中脂質改善

作用<sup>3)</sup>、抗腫瘍作用<sup>4)5)</sup>、抗酸化作用<sup>6)</sup>、肝障害抑制作用<sup>7)</sup>などが報告されているが、一方でクロレラの更なる高機能化を目的として、プロテアーゼによって藻体タンパク質から低分子ペプチドの調製が試みられており<sup>8)</sup>、その特定のペプチドには強いアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE : Angiotensin I-Converting Enzyme, EC3.4.15.1) 阻害活性が確認されている<sup>9)</sup>。しかし、経口で摂取したペプチドは、消化酵素によってアミノ酸に分解されるものが多いため、ACE 阻害活性を有するペプチドが生体においても高血圧抑制作用を示すとは限らない<sup>10)</sup>。従ってこのような問題点の解決方法が緊急の課題となっていた。

そこで著者らが注目した 1 つの解決策が、有効成分をナ

<sup>\*1</sup> 〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24

<sup>\*2</sup> 〒901-0105 沖縄県糸満市西崎町 5-2-2

<sup>\*3</sup> 〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1

<sup>\*4</sup> 〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1

§ 連絡先 (Corresponding author), kojiwada@agr.u-ryukyu.ac.jp

ノサイズでリポソーム化する方法である。リポソームとは、両親媒性物質によるカプセル様小胞体<sup>11)</sup>であり、この内部には種々の成分を封入することが可能である。また、生体親和性が高く、多用途素材として利用されているが、特に薬物を目的の患部に送り込むドラッグデリバリーシステムのキャリアーとして用いる研究が盛んに行われている<sup>12)~15)</sup>。例えば中島ら<sup>16)</sup>は、リポソームを経口投与に用い、リポソーム化インシュリンが胃液、腸液内で安定であり、また糖尿病モデルラットに対して一定の治療効果があることを報告している。また、免疫抑制薬として知られるサイクロスポリン<sup>17)</sup>のリポソーム化による治療効果も報告されている。従って、プロテアーゼ処理を行ったクロレラのリポソーム化についても同様に、生体における血圧上昇抑制作用が期待されるが、これまでにプロテアーゼ処理を行ったクロレラエキス（以後、クロレラエキスと称する）のリポソーム化および食品として長期的に経口摂取した場合の血圧上昇抑制作用に関する報告はない。

そこで本研究では、著者ら<sup>18)</sup>が開発した食品用リポソームを調製できるメカノケミカル法によってリポソーム化クロレラエキス（LEC: Liposome Encapsulated Chlorella extract）の調製を試み、得られた LEC を含む飼料で高血圧自然発症ラット（SHR: Spontaneously Hypertensive Rats）を長期飼育し、その血圧上昇抑制作用について検討した。また併せて、消化酵素処理後のクロレラエキスにおける ACE 阻害活性についても検討を行ったので報告する。

## 実験方法

### 1. LEC の調製および形態評価

#### (1) クロレラエキスの調製

クロレラは八重山殖産(株)より提供された沖縄産のクロレラ藻体 (*Chlorella vulgaris*) を用いた。このクロレラに 9 倍量の蒸留水を加えて 95°C で 30 分間攪拌抽出を行った後、室温まで冷却した。この抽出液に、プロテアーゼ（プロテアーゼ N「アマノ」G, 150 000 U/g, 天野エンザイム(株)）を 0.5% (w/w) になるように加え、55°C, 3 時間酵素反応を行った後に、95°C で 1 時間攪拌した。その後、遠心分離 (7000×g, 4°C, 10 分) により上清を得た。上清は減圧濃縮した後、凍結乾燥し、クロレラエキスとして LEC の調製、動物試験および ACE 阻害試験に使用した。

#### (2) LEC の調製

LEC は高純度大豆レシチン (SLP-WHITE, 純度 98% (w/w), 辻製油(株)) を用いて、メカノケミカル法によって調製した。すなわち、大豆レシチン水溶液およびクロレラエキス水溶液をそれぞれ 5% (w/w) になるように混合した後、ホモミキサー (TK HOMO MIXER MARK II, プライミクス(株)) で回転数 3500 rpm, 35°C, 15 分間で攪拌処理を行った。得られたリポソームの乳化液は更に超高压ホモジナイザー (Microfluidizer M110-E/H, みづほ工業(株))

を用いて、処理圧力 100 MPa, 処理回数 1 パスの条件で乳化処理を行い、LEC とした。得られた LEC は動物試験に使用した。

#### (3) LEC の形態測定

上記で得られた LEC の粒子径は、動的光散乱 (DLS: Dynamic Light Scattering) 法によって測定した。すなわち、半導体レーザー (658 nm) をサンプルに照射し、散乱光を光子検出器 (FPAR-1000, 大塚電子(株)) で観測した。得られた散乱光から光子相関法によって拡散係数を求め、Stokes-Einstein の式に従って粒子径の平均値±標準誤差を算出した。また、LEC の形状は、凍結切断レプリカ法によって観察した。すなわち、液体窒素で凍結したリポソーム調製液に衝撃を加えて切断させたのち、切断面にカーボンおよびプラチナを蒸着させた。得られたリポソーム表面のレプリカは蒸留水、メタノールおよびクロロホルムで洗浄した後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1011, 日本電子(株)) を用いて観察した。

## 2. クロレラエキスの血圧に対する効果

以下の動物実験は、「実験動物の飼育および保管等に関する基準」(総理府告示第六号 (昭和 55 年 3 月), 平成 14 年 5 月一部改正) に従って実施した。

#### (1) LEC 粉末の調製

LEC 粉末は、LEC に対して 5% (w/w) になるようにデキストリン (パインデックス #1, 松谷化学工業(株)) を加えた後、スプレードライヤー (L-12, 大川原化工機(株)) で噴霧乾燥して調製した。なお、LEC 粉末の原料組成 (w/w) は計算値よりクロレラエキス 33.3%, 大豆レシチン 33.3% およびデキストリン 33.3% であった。

#### (2) 供試飼料の調製

各投与群 (対照群, クロレラエキス投与群および LEC 投与群) の供試飼料は、飼料重量の 85% (w/w) が粉末飼料 (MF, オリエンタル酵母(株)) になるように調製した。クロレラエキス投与群および LEC 投与群については、クロレラエキスが 3.6% (w/w) になるように、クロレラエキスおよび LEC 粉末をそれぞれ粉末飼料に混合した。また、各供試飼料では栄養素組成 (炭水化物, タンパク質および脂質) が異なるため、計算値より炭水化物 (デキストリン), タンパク質 (ツェイン, 小林香料(株)) および脂質 (大豆レシチン) を加えて組成を揃えた。それぞれの供試飼料の栄養素組成および総熱量を表 1 に示した。

#### (3) 実験動物と飼育条件

実験動物は 7 週齢の雄性 SHR/Izm (日本エスエルシー(株)) を搬入後、飼育環境および血圧測定操作に馴化させるため、試験前に 1 週間の予備飼育を行った。この間、ラットには粉末飼料および水道水を自由摂取させた。飼育条件は、室温 23±1°C, 湿度 50±10% とし、明暗 12 時間サイクル (明期 8:00~20:00) とした。

#### (4) 血圧の測定

表 1 対照群, クロレラエキス投与群および LEC 投与群の供試飼料における栄養素組成および総熱量

供試飼料	栄養成分 (g/100g)					総熱量 (kcal/100g)
	水分	タンパク質	脂質	炭水化物	灰分	
対照群	6.5	23.4	8.8	56.0	5.2	397
クロレラエキス投与群	7.0	23.0	8.8	55.7	5.5	394
LEC 投与群	7.0	23.1	8.6	55.5	5.8	392

血圧の測定には, ラット用非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A, ソフトロン(株)) を用いて tail-cuff 法により収縮期血圧の測定を行った. 測定は無麻酔下で3回行い, その平均値を測定値とした.

#### (5) 連続投与試験

試験には8週齢の SHR 15 頭を使用した. 平均血圧が等しくなるように5頭ずつ3群に分け, それぞれ対照群, クロレラエキス投与群および LEC 投与群とした. 試験期間は10週間とし, その間, 各供試飼料および水道水を自由に摂取させた. 試験期間中は収縮期血圧測定を2週間毎に, 体重および摂餌量の測定を毎週行った.

#### (6) 統計処理

各実験結果は, 平均値±標準誤差で示した. 連続投与試験における体重, 摂餌量および血圧値の有意差は, Bonferroni による多重多量比較検定により求め,  $P < 0.05$  をもって有意差ありと判断した.

### 3. クロレラ抽出物の ACE 阻害活性

#### (1) クロレラ熱水抽出物の調製

クロレラに9倍量の蒸留水を加えて95°Cで30分間攪拌抽出を行った後, 室温まで冷却した. その後, 遠心分離 (7000×g, 4°C, 10分) により上清を得た. 上清は減圧濃縮した後, 凍結乾燥し, クロレラ熱水抽出物として ACE 阻害試験に使用した.

#### (2) 人工消化液を用いたクロレラエキスの消化試験

クロレラエキスの人工胃酸および人工膵液を用いた消化試験は Sheih ら<sup>19)</sup> の方法に従って行った. すなわち, 0.1 mol/L KCl-HCl 緩衝液 (pH 2.0) に1% (w/v) ペプシン (ブタ胃粘膜由来, シグマアルドリッチジャパン(株)) および1% (w/v) クロレラエキスを加え, 液量が5mLになるように調製し, 37°C, 3時間, 酵素反応させた (人工胃酸処理). 反応後, 10分間の煮沸により反応を停止させ, 水酸化ナトリウムを用いて pH 7.8 に調整した. 調整後, 1% (w/v) パンクレアチン (ブタ膵臓由来, シグマアルドリッチジャパン(株)) を加え, 37°C, 3時間, 酵素反応させた (人工膵液処理). 反応後, 10分間の煮沸により反応を停止させ, 遠心分離 (4000×g, 4°C, 15分) 後, 上清を回収した. 上清は凍結乾燥し, 被消化クロレラエキスとして ACE 阻害試験に使用した.

#### (3) ACE 阻害活性の測定

Cushman ら<sup>20)</sup> の方法を一部改変して測定した. すなわち 1 mol/L の塩化ナトリウムを含む 125 mmol/L のホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で 0.25 U/mL となるように調整した ACE (ウサギ肺由来, シグマアルドリッチジャパン(株)) 50 μL に, 各試料溶液 15 μL を加え 37°C, 5分間予備加熱後, 上記と同様のホウ酸緩衝液に溶かした 7.6 mmol/L の Hip-His-Leu ((株)ペプチド研究所) 合成基質溶液を 125 μL 加え, 37°C, 30分間酵素反応させた. 酵素反応は 10% (v/v) トリフルオロ酢酸溶液を 20 μL 加えて停止させた. その後, 酢酸エチル 500 μL を加えて, 遊離した馬尿酸を抽出し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC: (株)島津製作所) で分析, 定量を行った. ACE 阻害活性は, 試料溶液の馬尿酸の HPLC ピーク面積を S, 試料溶液の代わりに脱イオン水を加えた時の面積を C として下記の式より算出した.

$$\text{ACE 阻害活性}(\%) = (1 - S/C) \times 100$$

なお, 上記の式により得られる ACE 阻害活性が 50% を示す時の反応液中の試料濃度を IC<sub>50</sub> 値と定義した.

## 実験結果

### 1. LEC の調製および形態評価

調製した LEC の粒子径分布および平均粒子径の測定を行った結果, LEC の粒子径分布は比較的狭く, 平均粒子径は 150 ± 32.1 nm であった (データ非掲載). そこで, この LEC の膜構造を電子顕微鏡によって観察したところ, 粒子径が 200 nm 以下の一枚膜構造であることが明らかになった (図 1).

### 2. クロレラエキスの連続投与試験

10 週間の試験期間中, 体重, 摂餌量ともに各群間で有意差は認められなかった. 試験終了時の体重は, 対照群 324.0 ± 8.3 g, クロレラエキス投与群 321.3 ± 5.1 g, LEC 投与群 321.1 ± 7.3 g であり, 試験期間中の平均摂餌量は, 対照群 21.0 ± 0.5 g/日, クロレラエキス投与群 21.9 ± 0.2 g/日, LEC 投与群 20.7 ± 0.3 g/日であった.

収縮期血圧の変化を図 2 に示した. 試験開始時の収縮期血圧は, 対照群 179.1 ± 11.3 mmHg, クロレラエキス投与群 179.9 ± 10.1 mmHg, LEC 投与群 180.7 ± 8.0 mmHg であった. 4 週目でクロレラエキス投与群および LEC 投与各群において一時的な収縮期血圧の上昇を示したが, 6 週目に

おいてほぼ試験開始時の収縮期血圧に戻った (対照群  $173.7 \pm 8.3$  mmHg, クロレラエキス投与群  $171.7 \pm 6.6$  mmHg, LEC 投与群  $171.9 \pm 8.9$  mmHg). しかしそれ以後, 対照群およびクロレラエキス投与群で収縮期血圧の上昇を示したが, LEC 投与群では 8~10 週目で対照群に対して有意に低値を示し, クロレラエキス投与群に対しても 10 週目に有意な低値を示した.

### 3. クロレラ抽出物の ACE 阻害活性

クロレラ熱水抽出物, クロレラエキスおよび被消化クロレラエキスの ACE 阻害活性から算出した  $IC_{50}$  値を表 2 に示した. クロレラを熱水抽出後, プロテアーゼによる処理を行ったクロレラエキスでは, クロレラ熱水抽出物に比べて強い ACE 阻害活性を示した. しかし, クロレラエキスを人工消化液処理した場合では, クロレラエキスに比べて ACE 阻害活性の著しい低下を示した.

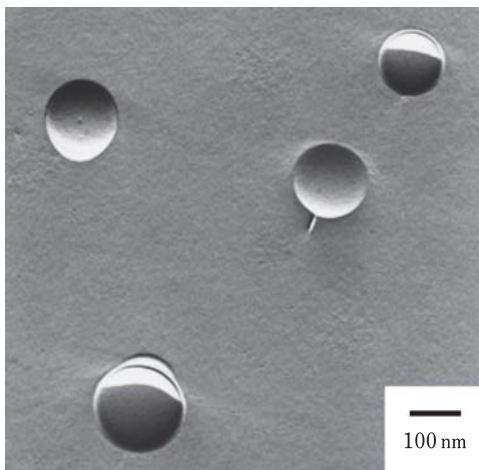


図 1 LEC の電子顕微鏡写真  
スケールバーは 100 nm を示す

## 考 察

食品用レシチンおよびクロレラエキスを用いて調製した LEC の膜構造は 1 枚膜であり, DLS 測定から平均粒子径が  $150 \pm 32$  nm であることが明らかとなった. そこで, 室温における LEC の 14 日間の静置観察を行ったところ, 相分離や沈殿は生じなかった (データ非掲載). 従って, メカノケミカル法によって調製した LEC は安定性に優れていることが明らかになった. 本研究では生体内におけるクロレラエキスの生体調節機能の維持を示す LEC の調製を目指しているが, このような機能性を期待する場合, リポソームの粒子径を 200 nm 以下に保つ必要があることが報告されている<sup>21)22)</sup>. 更に我々は, 水溶性蛍光物質 (カルセイン) を指標とした LEC の水溶性成分における内包率の測定を行った結果から, クロレラエキス成分の内封率は約 58% (データ非掲載) であることが推定された. よって今回調製された LEC についても生体利用率の向上が期待された.

そこで, クロレラエキスおよび得られた LEC の SHR に対する血圧上昇への影響について検討を行った.

本研究において, クロレラエキスを 3.6% (w/w) 含有する食餌を SHR に投与したところ, 試験開始から 6 週目までは各群間における収縮期血圧に有意な差は認められなかった. しかしながら, 8 週目以降は LEC 投与群では対照群に比べて収縮期血圧上昇が有意に抑制され, 10 週目で

表 2 クロレラ抽出物の ACE 阻害活性

	$IC_{50}$ (mg/mL)
クロレラ熱水抽出物	0.691
クロレラエキス	0.014
被消化クロレラエキス	4.578

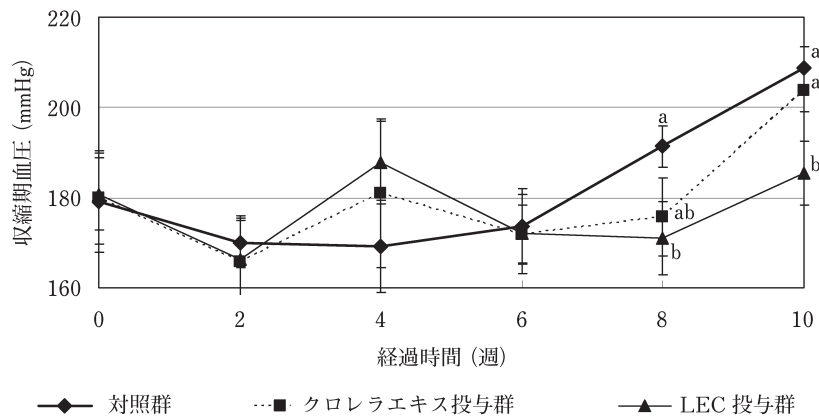


図 2 クロレラエキスおよび LEC の SHR に対する血圧上昇抑制効果

平均値 ± 標準誤差 ( $n=5$ )

各測定時において有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた群間には異なるアルファベットを付した



は、クロレラエキス投与群と比べても有意に収縮期血圧上昇が抑制された。一方、クロレラエキス投与群は対照群に比べて収縮期血圧に有意な差は認められなかった。以上の結果より、クロレラエキスの血圧上昇抑制に関与する成分は、腸管内において消化分解され易いまたは吸収性が悪いと考えられ、またクロレラエキスの活性は、LECによる成分のリポソーム化によって維持されたと推定された。そこで、クロレラエキス中の活性成分およびLECによる血圧上昇抑制の作用機序を推察するため、*in vitro*でのACE阻害活性の測定を行った。

まず、クロレラ熱水抽出物およびクロレラエキスについてACE阻害活性の測定を行った結果、クロレラ熱水抽出物およびクロレラエキスともにACE阻害活性が認められたが、特にクロレラエキスではクロレラ熱水抽出物に比べて1/49のIC<sub>50</sub>値を示した。また、本クロレラエキスは人工消化試験によって327倍のIC<sub>50</sub>値を示したため、クロレラエキス中のACE阻害物質は腸管内での消化酵素による分解を容易に受けるものと推察された。Suetsunaら<sup>8)</sup>は、クロレラ由来のタンパク質加水分解物からACE阻害ペプチド(Ala-Phe-Leu, Val-Val-Pro-Ala等)を同定している。よって、本クロレラエキス中のACE阻害物質は、この報告と同様にペプチドの可能性が高く、本試験におけるSHRへのクロレラエキスの単独投与では、クロレラペプチドが腸管内の消化酵素による分解を受け、本来の血圧上昇抑制作用を維持できなかつたと考えられた。一方、LECの摂取ではクロレラペプチドのリポソーム化によって消化酵素による分解が抑制され、SHRに対する血圧上昇抑制効果を示したと考えられた。このように、クロレラエキスのリポソーム化によって、血圧上昇抑制効果の維持が明らかになり、LECの有効性が確認された。今後は、クロレラエキス中のACE阻害物質として推定されたペプチドの同定を進めると共に、腸管内におけるLECの吸収機構を解析することが、LECのSHRにおける血圧上昇抑制の更なる作用機序の解明に重要であると考えられる。

## 要 約

新しいタイプの機能性食品の開発を目的として、食品用レシチンを用いて、クロレラエキスを内包するリポソーム(LEC)の調製を行った。得られたLECを含む飼料で高血圧自然発症ラット(SHR)を長期飼育し、その血圧上昇抑制作用について検討した。また併せて、クロレラエキス中の活性成分およびLECにおける血圧上昇抑制の作用機序を推察するため、ACE阻害活性の測定を行った。

(1) 超高圧ホモジナイザーの処理条件を100 MPa、1パスとして調製したLECの膜構造は1枚膜であり、リポソームの平均粒子径は150±32 nmであった。

(2) 連続投与試験において、クロレラエキス投与群では対照群と比べて収縮期血圧の有意な差を認めなかったが、

LEC投与群では有意な収縮期血圧上昇の抑制が認められた。

(3) クロレラエキス中の血圧上昇抑制に関与する成分はACE阻害活性を有するペプチドであると考えられた。また、クロレラエキスは人工消化液処理による著しい活性低下を示した。

以上の結果から、LECの摂取ではクロレラエキスのリポソーム化によって消化酵素による分解が抑制されたために、SHRに対する血圧上昇抑制効果を示したと考えられた。

本研究の一部は平成18~19年度地域新生コンソーシアム研究開発事業(経済産業省)の補助を受けて行ったものである。ここに記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) 石黒富行, クロレラ栄養補助食品, 特許出願2004-234066(2004.8.11).
- 2) Borowitzka, M.A., Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.*, **70**, 313-321 (1999).
- 3) Cherng, J.Y. and Shih, M.F., Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. *Life Sci.*, **76**, 3001-3013 (2005).
- 4) Jianchun, S., Fang, Y., Zhihong, X., Liyan, Z., Xiaojun, Z. and Qiuhui, H., Preparation, identification and their antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chem.*, **105**, 533-539 (2007).
- 5) Miyazawa, Y., Murayama, T., Ooya, N., Wang, L.F., Tung, Y.C. and Yamaguchi, N., Immunomodulation by a unicellular green algae (*Chlorella pyrenoidosa*) in tumor-bearing mice. *J. Ethnopharmacol.*, **24**, 135-146 (1988).
- 6) Qiuhui, H., Bishu, P., Juan, X., Jianchun, S. and Ying, S., Effects of supercritical carbon dioxide extraction conditions on yields and antioxidant activity of *Chlorella pyrenoidosa* extracts. *J. Food Eng.*, **80**, 997-1001 (2007).
- 7) Takekoshi, H., Suzuki, G., Chubachi, H. and Nakano, M., Effect of *Chlorella pyrenoidosa* on fecal excretion and liver accumulation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin in mice. *Chemosphere*, **59**, 297-304 (2005).
- 8) Suetsuna, K. and Chen, J.R., Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Mar. Biotechnol.*, **3**, 305-309 (2001).
- 9) Sheih, I.C., Fang, T.J. and Wu, T.K., Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem.*, **115**, 279-284 (2009).
- 10) Fujita, H., Yokoyama, K. and Yoshikawa, M., Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food protein. *J. Food Sci.*, **65**, 564-569 (2000).
- 11) Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252 (1965).
- 12) Roux, E., Passirani, C., Scheffold, S., Benoit, J.P. and Leroux, J.C., Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes. *J. Control Rel.*, **94**, 447-

- 451 (2004).
- 13) Yatsumura, Y. and Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986).
  - 14) Klibanov, A.L., Maruyama, K., Torchilin, V.P. and Huang, L., Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, **268**, 235-237 (1990).
  - 15) Allen, T.M. and Chonn, A., Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.*, **223**, 42-46 (1987).
  - 16) 中島健太郎, 宮城 誠, 後藤浩一, 松本陽子, 上岡龍一, 糖尿病モデルラットを用いたインシュリン含有複合脂質膜の経口治療に関する基礎的研究, 薬誌, **124**, 231-235 (2004).
  - 17) Mohamed, A., Meshal, S.H.A., Khidr, S.H., Mohsen, A.B., Abdulaziz, A. and Angary, A., Oral administration of liposomes containing cyclosporine : a pharmacokinetic study. *Int. J. Pharm.*, **168**, 163-168 (1998).
  - 18) Takahashi, M., Inafuku, K., Miyagi, T., Oku, H. Wada, K., Imura, T. and Kitamoto, D., Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *J. Oleo Sci.*, **56**, 35-42 (2007).
  - 19) Sheih, I.C., Wu, T.K. and Fang, T.J., Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour. Technol.*, **100**, 3419-3425 (2009).
  - 20) Cushman, D.W. and Cheeng H.S., Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648 (1971).
  - 21) Stuart, D.D. and Allen, T.M., A new liposomal formulation for antisense oligodeoxynucleotides with small size, high incorporation efficiency and good stability. *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 3219-3229 (2000).
  - 22) Nakamura, N., Timmermann, S.A., Hart, D.A., Kaneda, Y., Shrive, N.G., Shino, K., Ochi, T. and Frank, C.B., A comparison of in vivo gene delivery methods for antisense therapy in ligament healing. *Gene Ther.*, **5**, 1455-1461 (1998).
- (平成 20 年 12 月 1 日受付, 平成 21 年 7 月 21 日受理)
-