

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13315

研究課題名(和文) 酵素発電による細胞遊走制御と創傷治療パッチへの応用

研究課題名(英文) Accelerated wound healing on skin by electrical stimulation with a bioelectric plaster

研究代表者

西澤 松彦 (NISHIZAWA, Matsuhiko)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：20273592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酵素によるバイオ発電によって表皮細胞の遊走が制御できることを示し、この仕組みを皮膚パッチに搭載した。培養液や組織液に含まれる糖分と大気中の酸素を利用して、表皮細胞の遊走促進に適した電流(イオン流)を発生させるためには、酵素電極の性能向上に加えて、パッチ構造の最適化が必要である。本研究では、伸縮性を有する酵素電極を世界で初めて実現し、培養した表皮細胞の遊走に対する電流印加の効果を詳細に調べ、バイオ発電パッチの構造設計を行うことで、創傷治癒効果を確認することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Wound healing on skin is accelerated by ionic current driven by a plaster device with a built-in enzymatic biofuel cell. Cells in the skin respond to electric current during a wound healing process. Taking advantage of this phenomenon, a stretchable bioelectric plaster is developed to generate ionic current along the surface of the skin by enzymatic electrochemical reactions. The bioelectric plaster fits to the skin and generates electric current above the wound for 12 hours. The comparison between conditions with and without the bioelectric plaster suggested that ionic current in the hydrogel promotes the wound healing process. To the best of our knowledge, the present work is the first application of the enzymatically generated ionic current to direct manipulation of biological functions of a living body. The further improvement of bioelectric plasters will expand the use of electrical stimulation in wound healing for in vivo studies as well as clinical applications.

研究分野：バイオ電気化学

キーワード：酵素電池 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

生体組織への通電は、診断・治療・投薬に渡って有効である。治療法としての通電は、脳・神経や筋組織に対して広く行われ、また、創傷治癒や骨折治癒に対する促進効果も認められている。このような通電デバイスの低侵襲化・ウェアラブル化に向けて、生体親和性に優れたフレキシブルなシート状電極デバイスの開発が活発に行われており、これらデバイスの駆動に必須の“電源”に関して、小型化・シート化の検討が急ピッチで進められている。

研究代表者は、環境・生体親和性に優れた酵素電池の開発に取り組んできており、これは圧倒的に安全な電源として、その特徴を活かした応用が上記の生体通電に見出せると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、酵素発電の仕組みを皮膚貼付型のパッチタイプにデバイス化し、創傷治療の促進効果を実証する。そのためには、培養液や組織液に含まれる糖分と大気中の O_2 を利用して、表皮細胞の遊走促進に適した電流(イオン流)を安定して発生させる必要があり、酵素電極の性能向上に加えて、伸縮性の酵素電極を創出する必要がある。加えて、パッチの構成部品(内部抵抗など)にも、生体の動きに追従する柔軟性、およびディスプレイ環境安全性を有する有機材料で揃え、ストレッチャブルパッチを作製する。その結果として、パッチの通電寿命を改善し、創傷治癒促進効果を実証するのが目的である。

3. 研究の方法

(1) バイオ発電による遊走アッセイ

酵素電極の作製は、カーボン製の織物(ファブリック)に界面活性剤による親水化とCNTによる比表面積の拡大処理を施してから、グルコースの酸化酵素(GDH)もしくはフルクトースの酸化酵素(FDH)を修飾してアノードを調製する。 O_2 カソード用の酵素にはビリルビンオキシダーゼ(BOD)を使う。

市販の表皮細胞(角化細胞)をポリスチレン製のチップ上で培養し、細胞培養をしていないチップと組み合わせることで、細胞遊走の定量評価に有効なマイクロパターンを得る(チップの接合面が細胞遊走のスタートラインになる)。

透明で O_2 透過性にも優れたPDMSで作製するチャンネルでアノードとカソードのチャンバーを繋ぐ。負荷抵抗とチャンネルの高さによって細胞への通電密度を規定し、録画した細胞遊走の様子と対応づけて解析する。

(2) 伸縮性酵素電極の開発

培養液中の溶存 O_2 をカソードの基質とする前記システムに加えて、パッチ状デバイス

を想定し、大気中の O_2 を利用するタイプの実験系も構築する。BOD修飾カーボンファブリックを、ハイドロゲルに貼付して細胞培養系に組み込む。培養液を少量に留め、カソードの上面が接液しない構造とする。この気液界面へのカソード設置は、疎水化処理などによって電極上部への液漏れを防ぐなどの工夫を必要とするが、カーボンファブリックを用いて解決する。以上のシステムを用いて、負荷抵抗値と出力電流との関係を整理する。これにより、痛覚を与える電流密度 $0.5\text{mA}/\text{cm}^2$ 以下で、かつ細胞遊走の促進に有効な電流を発生させるための内部抵抗値を明らかにする。

(3) 表皮電位の計測

表皮細胞のイオン輸送がつくり出す電位差「表皮電位」がバリア機能などスキンヘルスの指標として有効であり、さらに創傷の治癒機構を支えているとの指摘がなされている。表皮電位が傷部にイオン流を生み出し、表皮細胞の電気走性を刺激して傷部への集合による構造再生を促すと考えられている。そこで、実際に表皮に発生している電位の計測手法の開発を行なう。マイクロニードルを塩橋に用いて計測する。

(4) 発電性能の経時安定性の向上

本研究で用いる酵素(FDH, GDH, およびBOD)の活性が、24時間後も殆ど低下しないことは確認している。しかし、パッチデバイスとして酵素発電システムを利用する場合には、パッチに搭載する燃料の枯渇、もしくは酵素反応によるpHシフトがもたらす酵素活性の変化などが性能低下の原因となり得る。これらの因子が発電寿命に与える影響を、ゲルシートに含ませる燃料(グルコース or フルクトース)の濃度、およびpH緩衝剤の種類と濃度を変えて詳細に調べ、短くとも6時間、目標としては12時間以上の安定な連続発電が可能な条件を探る。

(5) 創傷治癒効果の確認

マウスの背中の表皮を $8\text{mm} \times 4\text{mm}$ サイズで切り取り、実験用の傷とした。そこへパッチタイプのバイオ電池を貼付して、発電性能を最適化するための構造を探る。パッチを貼付して発電している状態を図1に示した。傷に対してこのような電極配置で、発電性能を、ゲルシートの厚み、内部抵抗の値、燃料(グルコース or フルクトース)の濃度、そして緩衝剤の種類と濃度を変えて計測する。

パッチを12時間ごとに貼りかえる際に傷形状とサイズを観察する。また、一週間後にマウスを安楽死させて、傷周囲の切片をマイクロトームで薄膜化し染色して観察した。以上のマウスを用いる実験は、東北大学の動物実験委員会へ実験計画書を提出し、承認を得てから行なっている。

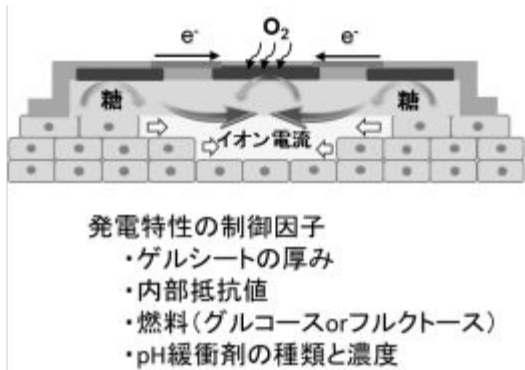


図1 創傷治癒実験の模式図

4. 研究成果

(1) 伸縮性酵素電極の開発

市販のストッキング片に対して2段階のCNT修飾を行った。先ず、界面活性剤で分散したスーパーグロスCNT (SGCNT) を塗布し乾燥させる。SGCNT は産総研の畠グループが開発した 200 μm 程度の長い単層CNT であり、結晶度も高いため導電性に優れる。さらに、酸処理して活性化した比較的短い(5 μm 程度)市販の多層CNT を修飾する。この第2のCNT 層は酵素修飾に適した表面構造を与えることがわかっている。CNT 修飾によって電極化したストッキングにフルクトースデヒドロゲナーゼ (FDH) を吸着させて酵素アノードを調製した。図2 に示すように、フルクトース 200 mM を含む McIlVaine 緩衝液中で約 5 mA cm^{-2} (0.6V) という電流密度値が得られている。この結果はCNT の2層構造によって初めて得られる。この電極を 10%もしくは 50%伸縮させて、酵素反応電流の変化を計測したところ、初回の伸長で電流低下が生じた後は30回の伸縮操作を通じて安定であった。SEM 観察の結果、初回の伸縮でストッキング繊維の交点においてCNT 層にヒビが生じていることが判った。しかし、繊維表面のCNT 層には全く破壊が起きておらず、その後は安定な性能を示す。

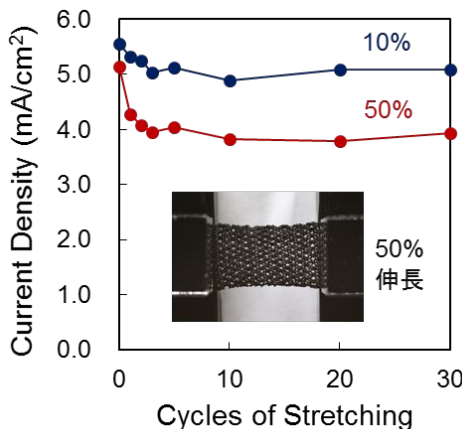


図2 伸縮性フルクトースアノード

図3にはカソード電極による O_2 還元特性を示す。酵素にはピリルビンオキシダーゼ (BOD) を使い、酵素修飾後に、さらに、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) とCNT の混合物を塗布して表面を撥水化するのがアノードとの違いである。この撥水化処理によって溶液の過度な浸透が抑制され、液相(溶液)、気相(空気)、固相(酵素電極)からなる三相界面の形成によって安定な特性が得られる。電極性能は、初回の50%伸長によって1 mA cm^{-2} 程度に低下し、その後 30 回の伸縮に対しては安定であった。

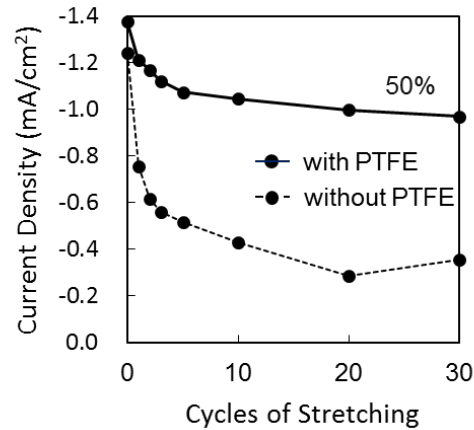


図3 伸縮性 O_2 カソード

(2) 表皮電位の計測

創傷治癒をドライブしていると考えられる表皮電位を低侵襲に計測する方法を開発した。表皮電位の計測のためには電極対を皮膚の表・裏に配置する外科的侵襲が必要である。それに対して我々は、皮膚局所の表皮電位を低侵襲に計測可能なプローブ型デバイスの開発に成功した。この研究のポイントは、電極を皮膚下へ低侵襲に配置する技術の開発であり、無痛注射針(テルモ)をガイドに利用した“ナノ塩橋”で実現した(図4a)。皮膚の表・裏に配置した塩橋(リンゲル液/アガロース)による銀/塩化銀電極(Ag/AgCl)の電位シフトによって表皮電位を定量する仕組みである。ブタ切除皮膚の表皮電位を測った結果(赤棒)の正当性を(表皮電位が測れていることを)、従来の皮膚を部分削除する侵襲法の結果(灰色棒)との同一性で確認できた(図4b)。図中のB領域はアセトンによる脱脂処理でバリア機能が低下しているが、これも表皮電位の低下として検出できている。この表皮電位プローブは、皮膚疾患全般の診断・治療に威力を発揮すると期待している。

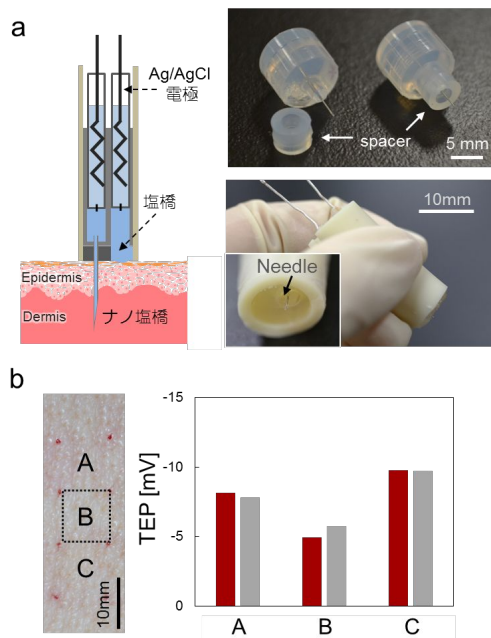


図4 (a)表皮電位の局所計測プローブ (b)ブタ皮膚の電位 (Bはアセトンで脱脂)

(3)創傷治癒効果の確認

メディカルテープ上で FDH アノード, BOD カソード, および PEDOT-PU による内部抵抗を用いて, 創傷治癒効果を有するバイオ発電パッチを組み立てた。これをマウスに貼付した状態でバイオ電流の経時変化を測定した結果が図 5a である。反応空間が $50 \mu\text{l}$ と微小であるため酵素反応による pH シフトを防ぐのが困難であったが, 緩衝液の種類や濃度の最適化によって (200 mM クエン酸緩衝液, pH5), 12 時間を越える安定性が得られた。図 5b は治癒促進効果を検証した結果の典型例である。ゲルシートのみを貼付した対照実験との比較により, バイオ電流の印加による創傷治癒の促進が確認できた。さらに, この促進効果が治癒の初期に顕著であるという結果も得ており, 創傷治癒プロセスが多段階で進行するという最近の知見と組み合わせると, 通電パッチの効果的な使用法の提案を行いたいと考えている。

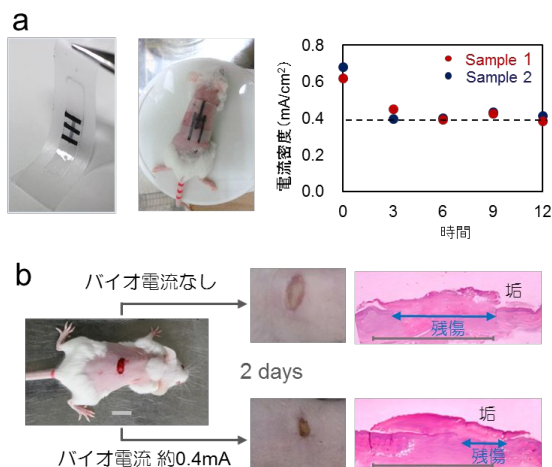


図5 創傷治癒の検証

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 2 件)

Yuina Abe, Kuniaki Nagamine, Mayu Nakabayashi, Hiroyuki Kai, Hirokazu Kaji, Takeshi Yamauchi, Kenshi Yamasaki, Matsuhiko Nishizawa, Minimally-Invasive Transepidermal Potentiometry with Microneedle Salt Bridge, Biomedical Microdevices, 査読有, 18, 2016, 1-6.

DOI: 10.1007/s10544-016-0080-0

Yudai Ogawa, Yuki Takai, Yuto Kato, Hiroyuki Kai, Takeo Miyake, Matsuhiko Nishizawa, Stretchable Biofuel Cell with Enzyme-Modified Conductive Textiles, Biosensors & Bioelectronics, 査読有, 74, 2015, 947-952.

DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.063

〔学会発表〕(計 2 件)

西澤松彦, ウェット電極で創る診断・治療パッチデバイス, 応用物理学会 M&BE 講習会, 2016 年 11 月 7 日, 東京理科大学

西澤松彦, 酵素修飾ナノカーボン電極によるバイオセンサ・バイオ電池の開発, 高分子討論会, 2016 年 9 月 14 日, 神奈川大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 松彦 (NISHIZAWA, Matsuhiko)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 20273592

(2) 連携研究者

山崎 研志 (YAMASAKI, Kenshi)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 40294798