

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05523

研究課題名（和文）細胞・組織表面でのオンサイト生体イオン回収・除去回転ロッドデバイスの開発

研究課題名（英文）Development of on-site rotary rod device for collection and removal of biogenic ions from surface of cells and tissue

研究代表者

服部 敏明 (Hattori, Toshiaki)

豊橋技術科学大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80198762

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生きた細胞を用いた実験は一般的には再度の繰り返し実験は難しいとされています。本研究では繰り返し実験が可能な生きた細胞研究を実現する手法として、局所での薬物放出と同時に、刺激薬物の回収・無害化技術を開発しました。金属イオンに対する回収する方法では、キレート樹脂が拡散以外のメカニズムでカルシウムイオン濃度を急激下げることを実測結果とシミュレーション結果により明らかにしました。これは、非常に興味深く、新しい発見でした。また、分解酵素を回転ロッドに強く固定できる方法を開発したことにより、刺激薬物を非刺激性化合物に変換して、刺激薬物濃度を即座に下げること（除去）に成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた細胞を用いた実験は、細胞の準備に専門的な技術と様々な注意が必要です。また、その準備にはかなりの時間と多くの労力が必要です。そのため、何度も繰り返して再現性のあるデータ（情報）を得るにはかなりの日数と手間がかかってしまいます。そこで、本研究では、繰り返し可能な生きた細胞実験を実現する手法としての刺激薬物の回収・除去技術を開発しました。この手法を発展させると、様々な生きた細胞に対する薬物実験が何度も繰り返してデータを得ることが容易になります。すなわち、本研究は生物の代謝機能を明らかにする実験、および、新たな創薬の開発のための実験を促進するのに役立つ研究です。

研究成果の概要（英文）：Experiments using living cells are generally considered hard to repeat. In this study, we developed a method to collect and detoxify stimulus compounds simultaneously with local drug release as a way to realize live cell studies that can be repeated experiments. As for the metal ion recovery method, actual measurements and simulation results show that chelating resins can significantly reduce calcium ion concentrations by mechanism other than diffusion. This was a very interesting and new discovery. In addition, by developing a method that allowed the degradative enzyme to be firmly fixed to the rotating rod, we succeeded in converting the stimulus compound to a non-stimulant compound and immediately lowering the concentration of the stimulus compound.

研究分野：分析化学

キーワード：生きた細胞実験 薬剤の回収・除去 繰り返しのできる生物実験 キレート樹脂の吸収特性 分解酵素の固定技術

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細胞・組織の働きを知るには、細胞を刺激してその動態を知る必要があり、そのための新しい機器と技術の開発が望まれている。細胞刺激法と動態観察法は、例えば、分光分析装置における摂動法と検出法に相当し、車の両輪である。動態観察においてはバイオイメージング技術が進歩して様々な方法が創出しているが、細胞刺激の開発は遅れている。このため、観察できる生物現象は限られたものになってしまっている。細胞の刺激法には、図1に示すように活性物質の投与による化学刺激、パルス電流による電気刺激、圧力・せん断・引っ張りなどの力学刺激、明暗を周期的に変化させる光学刺激さらに温度刺激などがある。この中で特定の受容体を刺激できる分子・イオンによる化学刺激は、生体応答機序を明確にできるため、他方比べて優位な方法である。一般的な化学刺激はマイクロインジェクターやナノインジェクターを用いた刺激剤の直接投与である。多様な刺激剤を簡単に添加できる利点があるが、マイクロスケールでの投与領域を限定して制御することは難しい。また、観察している対象全てに刺激剤が広がってしまうと、観察は一度だけの刺激投与しか許されなくなり、繰り返しの刺激に対する応答や刺激の伝播を観ることが難しい。一方、刺激剤を局所にだけ増加させる方法として、細胞内外にケージド化合物と機能性光増感剤を導入してピンポイントな開始光により局所に刺激剤を徐放することができる。しかし、対象生体に対してあらかじめの薬剤処理が必要で、また熟練技術が必要であり、生体への影響やダメージを排除することが困難で、適用が限られる。そこで、刺激剤の広がりを抑えた侵襲性の少ない局所的な刺激剤の投与技術は、細胞の様々な化学刺激挙動を理解する上で重要となる。申請者は、化学刺激法の一つとして微小電極を用いる局所的な電気化学イオン放出デバイスの開発を行ってきた。その中で、局所だけに刺激剤を増加させるには、回収・除去を併用することが効率的であると考えた。そこで、刺激後に刺激剤を除去するデバイスとして、回転ロッドを用いる局所生体イオンの除去デバイスを考案し、申請した。「生きた細胞に対して、ありのままに対象を測り、何度でも再現性のある実験法がほしい」という研究者のニーズに応える分析化学的研究である。

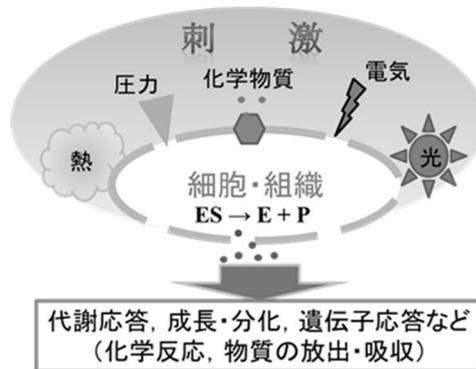


図 1

2. 研究の目的

研究の目的は、回転ロッドの対流による物質輸送を用いることで、局所に添加されて高濃度に存在する刺激イオンを効率的に回収・除去するデバイスを開発することにある。まず、図2に示すような形式で細胞から局所に放出された刺激剤を回収する方法を開発することを目指す。そのために、まず回転ロッドに吸収材や除去材を固定する材料の開発を行って、図2に示したように細胞の近傍から刺激剤の回収・除去を想起した。その際に、申請者らが開発した CCD 型イオンイメージセンサに置き換えることで、表面での濃度をリアルタイムにモニターし、センサ表面 (= 細胞表面) での濃度変化に着目して評価し、最適なデバイス条件を明らかにすることにした。ACh⁺を除去するデバイスでは、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) を固定化することで、コリンと酢酸に分解して除去するデバイスを作製した。

本研究では、ターゲットとする刺激イオンとしては Ca²⁺とアセチルコリン (ACh⁺) とした。生体金属イオンの中で Ca²⁺は、細胞内でかなり低濃度 (10⁻⁷ M 以下) に保たれており、筋肉細胞では収縮にかかわるトリガーイオンになっている。一方、ACh⁺は神経伝達物質として神経細胞の刺激伝播に深くかかわっているからである。ところが、当初目的であった Ca²⁺の回収については研究を進める中でキレート樹脂が拡散では説明できない素早い自己吸収力を持つことを、CCD 型 Ca²⁺イメージセンサを用いることで発見した。これは想定外であり、回転のような外部から攪拌のエネルギーを使わずに、刺激物を局所で素早く簡単に回収できることを知った。そこで、Ca²⁺の回収に関しては、回転ロッドを用いない方法で、1 粒のイオン交換樹脂とキレート樹脂を用いた局所 Ca²⁺の吸収について研究した。

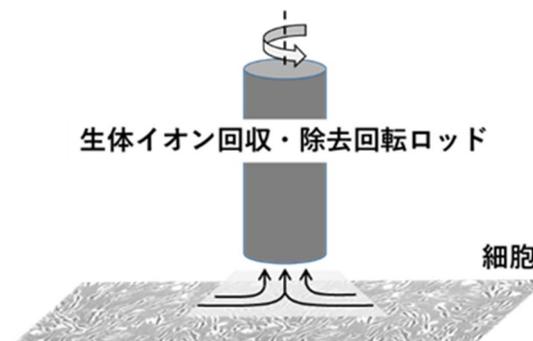


図 2

3. 研究の方法

(1) ACh⁺除去回転ロッドデバイス実験

アセチルコリンエステラーゼ(酵素)の3つの固定化法

CEST 法を用いた学固定は、先ずシランカップリング剤として Carboxyethyl silanetriol (CEST) でガラス・石英の基板にカルボキシル基を構築し、架橋剤として 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)と N-hydroxy succineimide(NHS)を用いて NHS エステルを形成し、最後に、冷蔵庫でアミド結合を介して第一級アミンにより酵素を結合させた。[1] ポリイオンコンプレックスを用いた包括固定はガラス・石英基板の上にもまずキトサン膜を作製し、その上に酵素を含むポリイオンコンプレックス(ポリリジン+ポリビニル硫酸)溶液を滴下し、冷蔵庫で 12 時間乾燥させて固定した。[2]ゾルゲル法を用いた包括固定は、石英・ガラス基板にオルトケイ酸テトラエチル(TEOS)とポリエチレングリコールを含むゾルゲル溶液にリン酸緩衝溶液に溶かした酵素を加えて室温で 1 日放置して固定した。

ACh⁺イメージセンサの作製

CCD 型 pH イメージセンサ上に、ACh⁺と TFPB⁻のイオン対塩を含む可塑性ポリ塩化ビニル THF 溶液を塗布することで ACh⁺膜を調製した。このイオン対は、塩化アセチルコリン水溶液と NaTFPB ジクロロメタン溶液を、ACh⁺と TFPB⁻のモル比が 1:1 となる濃度で調製した溶液にジクロロメタンを加えて抽出し、ジクロロメタン層を分離して真空乾燥させることで、白色固体を得た。

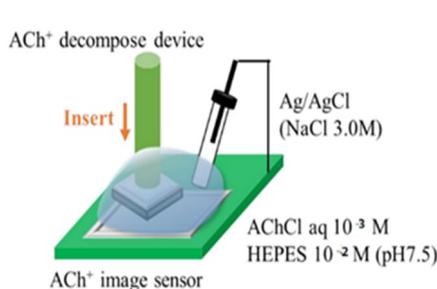


図 3

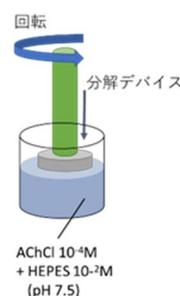


図 4

CCD 型 ACh⁺イメージセンサを用いた酵素固定化ロッドによる局所除去の計測

模式図 3 のようなシステムによって、デバイスをイメージセンサに近づけることで近傍の ACh⁺が局所で減少することを確認した。

回転ロッドを用いた ACh⁺の除去

回転させると酵素膜はいずれの膜もはがれやすい。そこで、酵素固定の成績のよいゾルゲル法を用いた酵素膜に作製する前に下地膜(ガラス・石英上に TEOS を酸触媒で 100 1 日乾燥)を構築した後に、先に示したゾルゲル膜を作製し、一定の回転速度が得られる機器に接続した。

(2) 1 粒樹脂を用いた Ca²⁺の局所回収実験

CCD 型カルシウムイメージセンサの作製

CCD 型 pH イメージセンサ上にカルシウムイオンフォアを用いる可塑性 PVC 膜を構築することでイメージセンサを作製した。

[3]

カルシウムイオンイメージセンサを用いた 1 粒のイオン交換樹脂の吸収の計測

1 粒の樹脂のカルシウムイオン吸収挙動は、図 5 に示すようなマイクロマンipュレータを用いて樹脂とイオンイメージセンサの距離をマイクロスケール制御して、50 μm 間で一定に保つ方法を検討した。

1 粒のイオン交換樹脂の Ca²⁺吸収のシミュレーション

MathWorks で開発された MATLAB を使用して溶液中の Ca²⁺ の拡散の様子を濃度拡散方程式でシミュレーションを行った。この濃度拡散シミュレーションでは、樹脂の近傍をゼロとして前進差分法によりマトリクスで仕切られた領域での Ca²⁺濃度を算出した。[4]

色素を用いたキレート樹脂浸漬における対流の有無

陰イオンとしてプロモクレゾールまた陽イオンとしてローダミン B を用いて、顕微鏡観察でキレート樹脂浸漬による対流の有無を確認した。

粒のキレート樹脂の内外の電位差計測

電位差計の両端を銀塩化銀電極にして、図 6 に示すような装置を作製し、イオン交換樹脂およびキレート樹脂の内外の電位差を測定した。樹脂内には小さな穴をあけ銀塩化銀電極を差し込んだ。

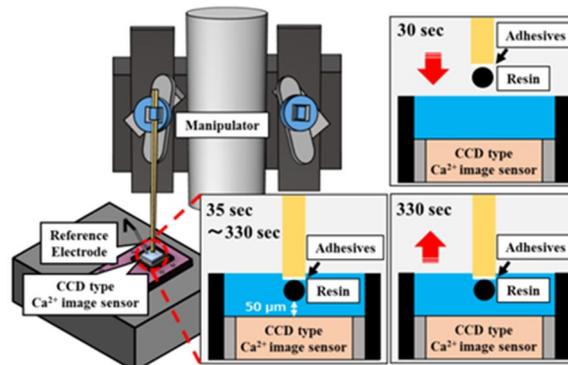


図 5

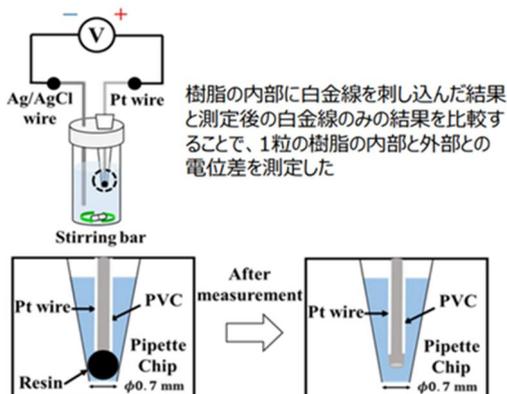


図 6

4. 研究成果

(1) デバイスの先端へのアセチルコリンエステラーゼ (酵素) の固定

デバイスの酵素固定は実験で重要な要素である。図7は、それぞれの3つの固定法を用いたデバイスが420秒間でどれだけ分解するかを示したもので、横軸は複数回のアセチルコリンの分解率を示している。CEST法とポリイオンコンプレックス法は、2回目以降の使用で大きく減少した。これは固定化された酵素がはがれて溶液中に漏出したことにより ACh⁺を分解できなくなったことを示している。一方で、ゾルゲル法は2回目以降も分解効果がそれほど落ちなかった。化学固定は酵素を共有結合するために強力に酵素を固定すると考えられたので、CEST法以外に3-APTESも検討したがよい結果は得られなかった。アセチルコリンエステラーゼの酵素固定には、化学固定よりもゾルゲル法が適することが分かった。

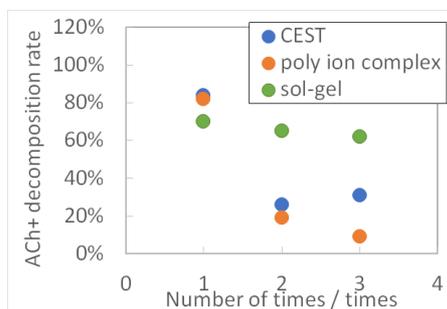


図 7

(2) CCD型 ACh⁺イメージセンサを用いるデバイスの評価

図8に除去デバイスの直下でのACh⁺減少を捉えた画像を示す。ACh⁺濃度の低下は四角のデバイスに沿って低下しており、局所での減少が確認された。図9にはデバイス直下にあるCCD型ACh⁺イメージセンサ一つのピクセルの時間応答プロファイルを示している。10⁻³Mの濃度が10⁻⁵Mまでおよそ7分間で減少していることが分かる。

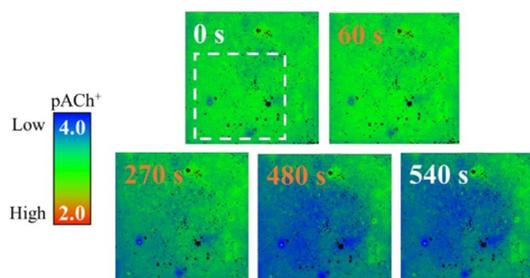


図 8 ACh⁺の濃度イメージ画像

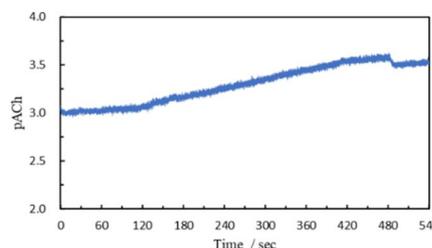


図 9 濃度 - 時間プロファイル

(3) 回転ロッドデバイスへの酵素固定と回転によるACh⁺濃度の除去挙動

回転ロッドデバイスは膜に遠心力が働くため、デバイスを回転しない場合と比べて酵素固定はより強い固定が必要になった。図10はデバイスを毎秒100回転させた時に同じデバイスを複数回用いた時の結果である。2つのデバイスとも2回目は1回目よりも分解除去が低下した。そこで、下地に強固なゾルゲル膜を構築した後で酵素固定した場合の結果を図11(30秒間溶液に漬けた場合)と図12(60秒間溶液に漬けた場合)に示す。毎秒300回の回転でも酵素膜が剥離していないことが確認された。図11と12で、回転させた場合と回転させないで分解除去を行った結果は、明らかに回転させることで分解率が増加することが示され、回転による攪拌で30秒という短時間でも分解量がほぼ限界に達したことが示唆された。ただし、1回目の分解除去率は低い。これは、酵素を強く固定したために酵素固定界面が十分な水を含みにくいために低下したものと考えられた。一方で、この問題は使用前に溶液に浸してコンディショニングしておくことで改善できる。以上のことから、ACh⁺除去回転デバイスが完成した。

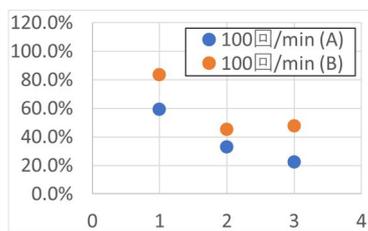


図 10

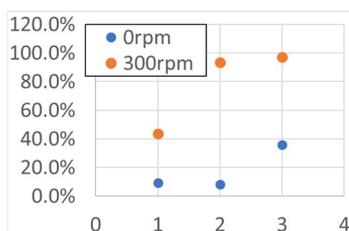


図 11

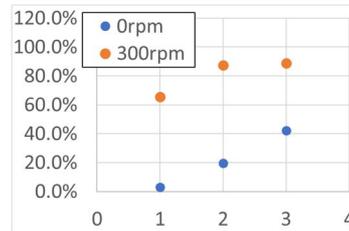


図 12

(4) CCD型 Ca²⁺イメージセンサを用いた1粒のイオン交換樹脂とキレート樹脂のCa²⁺回収挙動

実験を行う前に、直径1mm以下のイオン交換樹脂とキレート樹脂は、Ca²⁺を含まない緩衝溶液に1昼夜浸漬してコンディショニングを行った。図5で示した実験系を用いて、CCD型Ca²⁺イメージセンサで測定したそれぞれの結果を図13と図12に示す。図中の(a)は右肩の測定時間におけるCa²⁺イメージ像で(b)は樹脂直下のピクセルの濃度 - 時間プロファイルである。図13の(b)から、イオン交換樹脂ではCa²⁺濃度が比較的ゆっくり減少して、10⁻⁵Mで一度頭打ちになる。一方、図14の(a)で樹脂近傍の濃度減少が大きく、(b)の濃度 - 時間プロファイルからも、キレート樹脂ではイオンセンサの検出下限にまで急速にCa²⁺濃度が低下していることが確認できる。

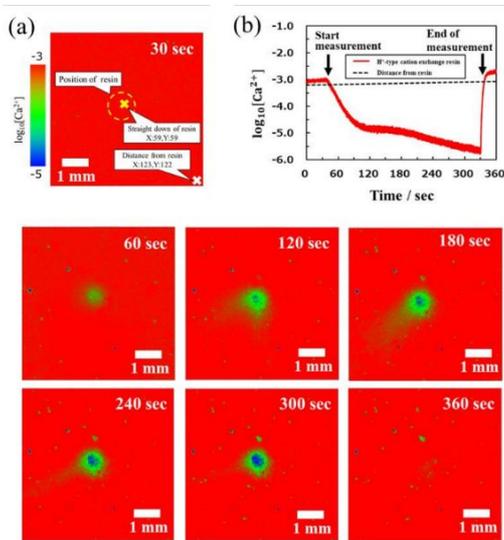


図 13 イオン交換樹脂の結果

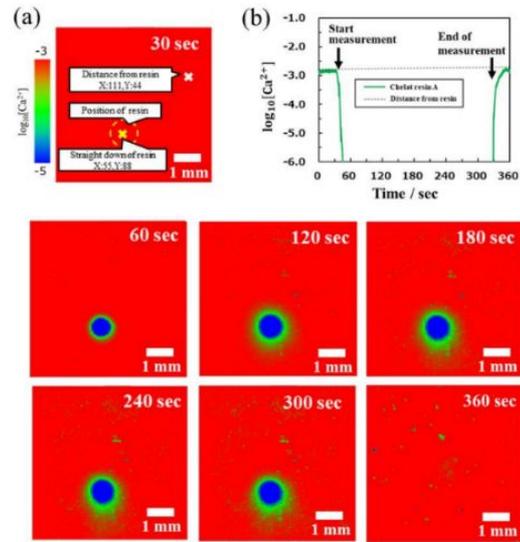


図 14 キレート樹脂の結果

(5) 1 粒のイオン交換樹脂の Ca^{2+} 回収挙動のシミュレーション

図 13 と図 14 の詳細に解析には、イオンの回収が濃度拡散で行われているかどうかを知る必要があるため、コンピュータシミュレーションを行った。図 15 は樹脂の近傍で吸収が行われてその濃度がゼロになると仮定して得られたシミュレーション結果である。図 16 はイオン交換樹脂の結果とシミュレーション結果が 10^{-5}M で頭打ちを考えると、イオン交換樹脂はほぼ濃度拡散に依存すること、キレート樹脂はそれよりはるかに濃度低下が著しいことが解説できる。

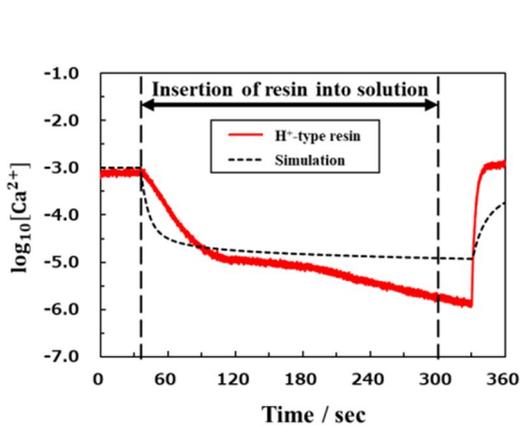
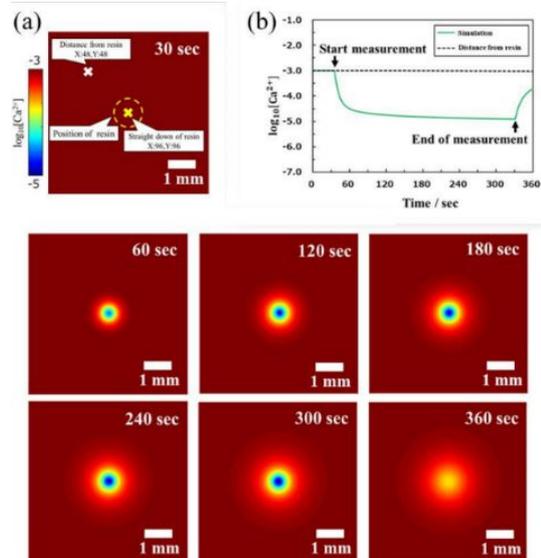


図 16 濃度 - 時間プロファイルの比較



(6) キレート樹脂の Ca^{2+} 異常回収挙動について

イオン交換樹脂はほぼ濃度拡散に依存して吸収が行われているが、キレート樹脂の挙動は異常である。図 15 シミュレーション結果通常、水溶液中でイオンに掛かる移動力は、濃度拡散以外には、電位差に基づく電気泳動力と対流である。キレート樹脂により電気泳動力が働いているかどうかを測定するために、図 6 に示した測定系で電位差を測定した。その結果、イオン交換樹脂とキレート樹脂ともに数十 mV の電位差があることが分かった。しかし、イオン交換樹脂とキレート樹脂間に大きな電位差を示さず、測定される電位差のオーダーでは大きなイオン泳動力は生まれない。一方、色素を用いた顕微鏡により対流の観察では、明らかなキレート樹脂に向かうような対流は観測されなかった。

現時点で異常な回収速さを示す現象を十分に説明できなかったが、キレート樹脂は Ca^{2+} を急速に回収する作用があることはイメージセンサ測定結果とシミュレーション結果の比較から明らかで、局所の Ca^{2+} 回収に適した材料であることが分かった。

引用文献

- [1] S. Endo et al., Bulletin of the Chemical Society of Japan 91(2) 304-310 (2018)
- [2] T. Iwata et al., SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL 239 800-806 (2017)
- [3] T. Hattori et al., Chemical Sensors, Supplement A 28 91-93 (2012)
- [4] 齋藤ら, 分析化学 70(4・5) 283-289 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 齋藤 裕史, Muhammad Syafiq Suhaimi Subramaniam, 加藤 亮, 澤田 和明, 服部 敏明	4. 巻 70
2. 論文標題 Ca ²⁺ イメージセンサと濃度拡散シミュレーションを用いた強酸性陽イオン交換樹脂一粒のCa ²⁺ 吸収特性の評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 283-288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/bunsekikagaku.70.283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumiya Nakamura, Taisei Nakayama, Itsuki Kageyama, Ryo Kato, Moeto Nagai, Takayuki Shibata, Kazuaki Sawada, Toshiaki Hattori	4. 巻 93
2. 論文標題 Characterization of Calcium Ion Release from a Polymer-Coated Electrode with a Plasticized PVC Membrane Containing Calcium Salts, and Its Contraction Examination of Vorticella Convallaria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 655-662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20200015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 齋藤裕史, Yang Sengbounchanh, 澤田和明, 加藤亮, 服部敏明
2. 発表標題 イオン交換およびキレート樹脂一粒のCa ²⁺ 吸収特性評価
3. 学会等名 第80回分析化学討論会 札幌教育大学（札幌市）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤裕史, Muhammand Syafiq Suhaimi Subramaniam, 澤田和明, 加藤亮, 永井萌土, 柴田隆行, 服部敏明
2. 発表標題 一粒のキレート樹脂を利用した生体環境からのCa ²⁺ の回収
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会 名古屋工業大学（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富永紳平, 山井裕斗, 影山樹, 加藤亮, 澤田和明, 服部敏明
2. 発表標題 ACh+放出デバイスの製作と放出量改善の検討
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第20回高山フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 MUHAMMAD SYAFIQ, SUHAIMI, 齋藤裕史, 澤田和明, 加藤亮, 服部敏明
2. 発表標題 イオン交換およびキレート樹脂のCa ²⁺ 回収シミュレーション
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第20回高山フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部敏明
2. 発表標題 高分子電解質の分析から高分子電解質を用いた電気化学デバイス
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会 名古屋工業大学(名古屋)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤裕史, Yang Sengbounchanh, 澤田和明, 加藤亮, 服部敏明
2. 発表標題 イオン交換およびキレート樹脂一粒のCa ²⁺ 吸収特性の評価
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 F. Nakamura, T. Watanabe, H. Doi, R. Kato, K. Sawada, T. Hattori
2. 発表標題 Fabrication and Characterization of A Glutamate Ion Releasing Device Based on Anion-Doped Poly(3.,4-ethylenedioxythiophene) , 8th International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices
3. 学会等名 8th International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Yamai, S. Yamada, R.Kato, K. Sawada, T. Hattori
2. 発表標題 Acetylcholine Release and Decomposition Small Devices to Control Its Local Concentration
3. 学会等名 Irago Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村文哉, 渡邊俊幸, 加藤亮, 服部敏明
2. 発表標題 グルタミン酸イオン放出電気化学デバイスの特性
3. 学会等名 2019年電気化学秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤裕史, 中村文哉, 中山泰誠, 渡邊俊幸, 澤田和明, 加藤亮, 服部敏明
2. 発表標題 PEDOT-PSS膜のCa ²⁺ 吸収とH ⁺ 吸収
3. 学会等名 第38回分析化学中部夏季セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山井裕斗, 山田秋一, 加藤亮, 澤田和明, 服部敏明
2. 発表標題 アセチルコリン分解デバイスの開発
3. 学会等名 第38回分析化学中部夏季セミナー
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関