

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560447

研究課題名（和文）広帯域誘電分光法による生物細胞膜の損傷と修復のモニター

研究課題名（英文）Monitoring of cell membrane disruption and recovery by broadband dielectric spectroscopy

研究代表者

浅見 耕司（ASAMI KOJI）

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：90127936

研究成果の概要（和文）：赤血球を水に懸濁すると、細胞膜に穴が開き、ヘモグロビンなどの内容物が放出される（溶血）。この穴のサイズや細胞当たりの数、穴の修復過程についてはまだ良く分かっていない。溶血した赤血球（ゴースト）懸濁液の誘電率を広い周波数領域に渡って測定すると、未損傷の赤血球では観測されない、誘電緩和過程（ α -緩和）が低周波側で見つかっている。しかし、電極分極現象のため低周波測定が困難となるため、 α -緩和についての追試報告はほとんどなく、詳細な性質やメカニズムは不明のままである。この研究では、電極分極の影響が少ない電極配置を考案して、ゴーストの α -緩和を詳しく調べた。測定された α -緩和の性質は、穴が一つ開いた球形細胞モデルによる数値計算結果と良く合い、穴が α -緩和を引き起こしていることが明確になった。また、穴のサイズを α -緩和から見積もった。

研究成果の概要（英文）：A suspension of erythrocyte ghosts obtained by hypotonic hemolysis shows dielectric dispersion termed α -dispersion below 10 kHz. The exact nature of the α -dispersion, however, has not been studied because of difficulty in low-frequency measurement due to electrode polarization, and therefore its origin has not been clearly understood. In this study, a new electrode configuration was designed to extend the available frequency region to a lower frequency side, making it possible to investigate the α -dispersion in detail. The occurrence of the α -dispersion correlated strongly with the presence of holes in the ghost membranes and its properties were exactly interpreted by the numerical simulation with the spherical membrane model with a hole. The numerical simulation provided a liner relation between the characteristic frequency of the α -dispersion and the hole radius, and thereby the hole radius being determined straightforwardly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：計測システム・誘電分光・細胞膜・赤血球・界面分極・溶血

1. 研究開始当初の背景

生物細胞は常に外部の環境からストレスを受けている。このため、しばしば細胞膜が損傷する。細胞膜の損傷は細胞にとって致命的であり、これによって細胞内環境が著しく乱されると、細胞死となる。そのため、再生が難しい細胞では細胞膜の修復は重要である。しかし、細胞膜の修復機構についてはまだ良く分かっていない。膜修復過程を探るためには、膜損傷をリアルタイムで定量的に評価することが不可欠である。

この研究では、誘電分光法を応用して、膜の損傷や修復をモニターする方法を開発する。誘電分光法は、交流電場を用いて、誘電率の周波数依存性（誘電スペクトル）を測定する方法。ここで提案する方法のアイデアは、溶血赤血球の誘電分散の研究がもとになっている。赤血球を真水に入れて溶血させると、低周波側に α -分散と呼ばれる誘電分散が現れることが報告されている。しかし、この α -分散についての追試報告は無く、分散を引き起こす分極機構は長い間不明のままであった。最近、申請者はこの誘電分散が膜に開いた一つの穴に因ることをモデル計算によって明らかにした。また、低周波の誘電分散から穴の径を見積もることが可能であることを示した。

誘電分光法は、系を乱さないような小さな外部電場を用いるため、非侵襲測定である。微小電極法のように電極を刺入して測定する必要がないことは、新たな損傷を回避する上で、細胞にとって望ましい。これらのことから、誘電分光法は

膜の損傷や修復を調べる有力な方法になると考えている。

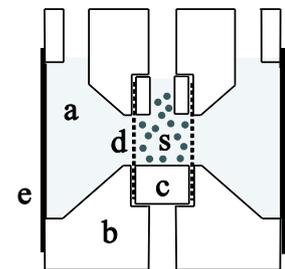
2. 研究の目的

本研究では、誘電分光法による細胞膜損傷と修復のモニターと解析法の確立を目指し、その基礎となる研究を実験と計算の両面から行う。動物の赤血球を低浸透圧処理したときに細胞膜にできる穴のサイズや寿命を制御する条件を検討して、穴のサイズと誘電緩和の関係を詳細に調べる。また、有限要素法を用いたモデル計算を行い、測定結果との比較を行う。

3. 研究の方法

ウマの赤血球を 150 mM NaCl を含む 5 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で洗った後、10–20 倍量の 0.01 mM $MgSO_4$ を含む 5 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中で溶血させる。溶血した赤血球は 0.1 mM EDTA を含む 5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗い、ヘモグロビンをほとんど含まないゴーストを得る。ゴーストの調製と保存はすべて 0–4°C で行った。

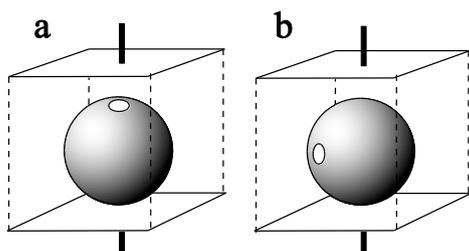
測定用のセルを右に示す。一对の電極(e)の間に、細胞懸濁液の入った試料室(s)とその両側に媒質の入った室(a)を配置してある。



試料室と両側の室を透析膜で仕切ることにより、細胞の流出を防いでいる。透析膜はイオンが自由に透過できるので、測定に影響を与えない。電極には白金黒電極を用いた。試料室のみを電極で挟んだ従来のセルに比べ、(a)室を設けた

セルでは、電極面積を大きくすることができる。電極分極の時定数は、電極界面の電気容量と試料の抵抗との積で決まるため、新しいセルでは電極分極の影響がより低周波側に移ることが期待できる。これによって、低周波側の α -緩和の測定が可能になる。測定は、インピーダンスアナライザ（HP-4192A）を用いて、周波数範囲 10 Hz~10 MHz の間で行った。

穴の開いた細胞の懸濁液の誘電スペクトルの数値計算は COMSOL MultiPhysics（有限要素法ソフト）を用いて行った。細胞モデルを下図に示す。立方体中に、一つの穴をもつ球形細胞を置き、上下の電極間に交流電場を与えた時の立方体の等価複素誘電率を計算する。穴の配置が(a)と(b)の場合について計算し、ランダム配向として平均をとる。



4. 研究成果

溶血していない球形赤血球懸濁液の誘電率の測定値を周波数に対してプロットしたものを図 1a に示す。従来の測定セルを用いた場合に比べ、電極分極の影響が約一桁低周波側に移動しているため、 β -緩和（特性周波数 ~ 3 MHz）の低周波側 1 kHz まで緩和が無いことは明らかである。このスペクトルは室温で安定である。一方、ゴースト懸濁液（低イオン強度溶液に懸濁）のスペクトルは室温（25 $^{\circ}$ C）で不安定で、時間とともに大きく変化する（図 1b）。0 $^{\circ}$ C に保っておいたサンプルを測定セルに入れて、25 $^{\circ}$ C で測定をすると、直後のスペクトルは二つの緩和を示し、10 kHz 付近に α -

緩和が現れる。しかし、時間経過に伴って、 α -緩和の強度（ $\Delta\epsilon_{\alpha}$ ）は急速に減少し、また高周波側に移動している。

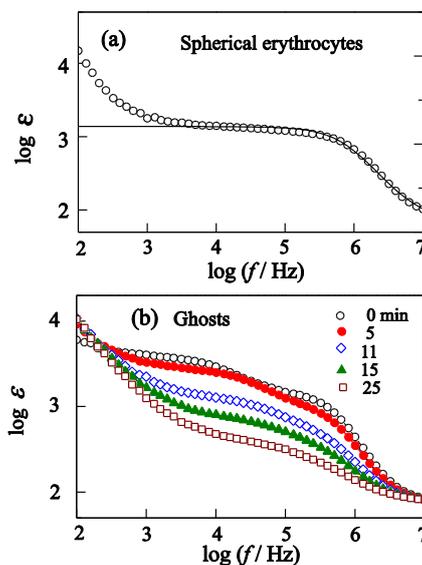


図 1 未損傷赤血球とゴーストの誘電スペクトル

ゴーストを 1% グルタルアルデヒド（0-4 $^{\circ}$ C）で固定すると、スペクトルは室温で安定となり、 α -緩和が正確に観測できるようになる。（グルタルアルデヒドは細胞の誘電スペクトルにほとんど影響を与えない。）

つぎに、媒質のイオン強度を上げて（15 mM NaCl）、異なる温度で一時間インキュベーションしたのち、ゴーストを固定して、スペクトルを測定した。この条件では穴のサイズは温度と共に縮小することが知られている。この結果、 α -緩和と β -緩和の特性周波数比（ f_{c2}/f_{c1} ）は温度と共に低周波側にシフトし、緩和強度比（ $\Delta\epsilon_2/\Delta\epsilon_1$ ）は温度に依らずに、1 に近い値を示した（図 2）。

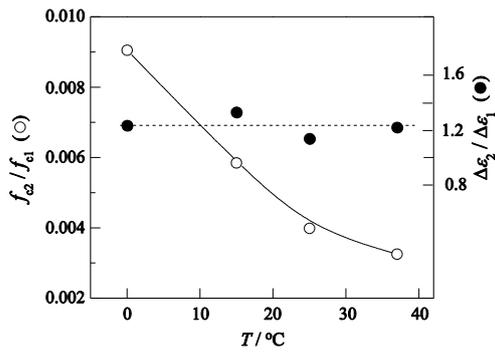


図2 緩和強度比、特性周波数比 vs. ゴースト処理温度
また、ゴーストを固定した後、媒質の導電率を変えた場合、 α -緩和と β -緩和の特性周波数の比(f_{c2}/f_{c1})は一定に保たれ、 α -緩和と β -緩和の緩和強度比($\Delta\epsilon_2/\Delta\epsilon_1$)は、ほぼ1となった(図3)。

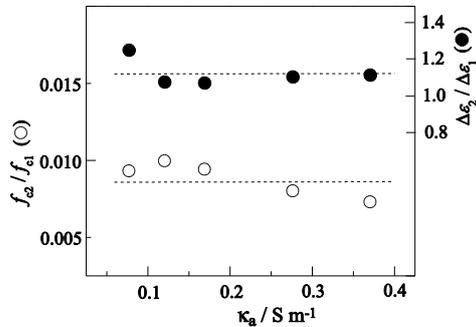


図3 緩和強度比、特性周波数比 vs. 媒質の導電率
つぎに、1個の穴が開いた球形細胞モデルで誘電スペクトルの数値計算を行った(図4)。

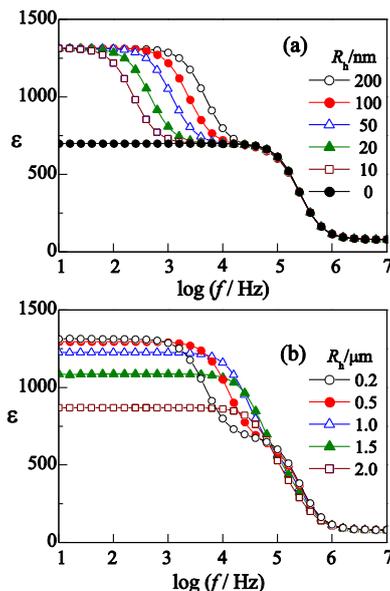


図4 誘電スペクトルの数値計算

計算結果をまとめると、(1) 穴の半径が 200 nm 以下では (図 4a)、 α -緩和と β -緩和の緩和強度比は1となる。穴が複数存在するときには、緩和強度比が1以下となる。また、 β -緩和に対する α -緩和の特性周波数比は穴の半径に比例する。これらの関係は媒質の導電率に依らない。(2) 穴の半径が 500 nm 以上では (図 4b)、 β -緩和に対する α -緩和の緩和強度比は穴の半径の増加に伴って減少し、 α -緩和の特性周波数は高周波側に移動する。

この誘電スペクトルの計算結果を踏まえて、測定結果を見ると、緩和強度比がほぼ1であることから、各ゴーストに穴が一個存在することが分かる。低イオン強度溶液中では、特性周波数比が増加し、緩和強度比が減少することから、穴は広がり 500 nm 以上になることを示している。同様の条件で穴が光学顕微鏡で観測できるような大きさになることはすでに報告されている。イオン強度を上げた場合に、特性周波数比が減少することは、穴のサイズが縮小していることを示している。生理的な塩類溶液中では、穴の縮小、修復が起こることはよく知られている。理論計算により得た特性周波数比と穴の半径の関係を用いて、測定結果から穴の半径を求めることができる。ゴースト調製 (0.1 mM EDYA を含む 5 mM リン酸緩衝液中、0-4 °C) の直後では、穴の半径は 30-50 nm と見積もられた。以上の結果は、誘電スペクトルスコーピーを用いて、細胞膜に開いた穴の数とサイズの見積もりが可能であることを示している。誘電スペクトルスコーピーは簡便、高速、非侵襲測定であることから、細胞膜損傷と修復のモニターに適した方法である。

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5件)

[1]. K. Asami, Dielectric spectroscopy reveals nanoholes in erythrocyte ghosts, *Soft Matter* 8 (2012) 3250-3257, 査読有 (DOI:10.1039/c2sm06306a)

[2]. K. Asami, Design of a measurement cell for low-frequency dielectric spectroscopy of biological cell suspensions, *Measurement Science and Technology* 22 (2011) 085801 (7pp), 査読有 (DOI:10.1088/0957-0233/22/8/085801)

[3]. K. Asami, Dielectric properties of microvillous cells simulated by the three-dimensional finite-element method, *Bioelectrochemistry* 81 (2011) 28-33, 査読有 (DOI:10.1016/j.bioelechem.2011.01.002)

[4]. K. Asami, Effectiveness of “thin-layer” and “effective medium” approximations in numerical simulation of dielectric properties of biological cell suspensions, *Jpn. J. Applied Physics.* 49 (2010) 127001-(1-5), 査読有 (DOI:10.1143/JJAP.49.127001)

[5]. K. Asami, Simulation of dielectric spectra of erythrocytes with various shapes, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 42 (2009) 135503(7pp), 査読有 (DOI:10.1088/0022-3727/42/13/135503)

[学会発表] (計 3 件)

[1]. 浅見耕司、赤血球ゴーストの誘電分散の観測と解析、日本膜学会 33 回年会、2011/5/12、東京 (産業技術総合研究所臨海副都心センター別館)

[2]. 浅見耕司、誘電スペクトロスコピーによるコロイド分散系の評価、コロイドおよび界面化学討論会、2011/9/9、京都 (京都大学吉田キャンパス)

[3]. 浅見耕司、低張処理により赤血球膜にできた穴の誘電分光法による観測、膜シンポジウム 2010、2010/11/20、京都 (京都大学吉田キャンパス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅見 耕司 (ASAMI KOJI)
京都大学・化学研究所・准教授
研究者番号：90127936

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし