

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19760526

研究課題名（和文） 擬似細胞と微粒子間の相互作用の直接観測とモデリング

研究課題名（英文） Interaction between a giant vesicle and a particle: Direct measurement and computational modeling

研究代表者

新戸 浩幸（SHINTO HIROYUKI）

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80324656

研究成果の概要： 巨大な脂質二分子膜小胞（ジャイアントベシクル）と固体粒子間の相互作用力について、原子間力顕微鏡による直接測定と計算機によるモデリングを行った。その結果、粒子の表面物性は粒子・ジャイアントベシクル間の相互作用力に大きく影響することが明らかになった。特に、疎水性表面をもつ粒子では、ジャイアントベシクル表面から粒子を引き離す時、階段状のフォースカーブが得られた。このようなフォースカーブは、生細胞・粒子間の相互作用力でも観察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

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： 脂質、表面・界面物性、走査プローブ顕微鏡、共焦点顕微鏡、計算物理、巨大ベシクル、コロイド粒子、表面間力

1. 研究開始当初の背景

細胞・微粒子間の親和性（または接着力）、および細胞膜を透過する粒子のサイズ・表面物性の理解は、薬物を標的細胞へ選択的に送達するDDS（Drug Delivery System）や遺伝子治療等における薬剤設計、並びに、今後問題になると予想されるナノ粒子材料の生体への暴露による健康影響評価等に極めて

重要である。

この微粒子・細胞表面間の相互作用力を正確に理解するためには、物理化学的な相互作用力および細胞膜の熱揺らぎと外部応力変形による影響に加えて、細胞外マトリックスと膜蛋白質の存在や飲食作用など複雑な細胞生物学的な諸因子を考慮する必要がある。このように、細胞・固体表面間接着は多種類

の相互作用が関与する極めて複雑な現象であり、その定量的な検討と詳細な理解は未だ不十分である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、擬似細胞の一つである巨大ベシクルに注目する。生体膜の主な構成物質であるリン脂質は、両親媒性分子の一種であるため水溶液中で自己会合し、脂質二分子膜小胞（リボソーム）と呼ばれるベシクル構造をとる。ベシクルは実際の細胞膜と類似した組成・構造を持ち、その大きさは数十 nm～数百 μm である。このうち、特に細胞と同じ大きさ（数 μm 以上）のものは、巨大ベシクルと呼ばれる。巨大ベシクルは、曲率的に安定であり、また光学顕微鏡によって一物体をリアルタイムで直接観察することが可能である。この巨大ベシクルを擬似細胞として用いて直接観測と計算機シミュレーションを行い、実際の細胞-微粒子間接着のメカニズムを考える上での物理化学的な基礎を確立しようとするのが、本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

(1) 原子間力顕微鏡による直接測定

リン脂質 phosphocholine, 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-L- α -lecithindioctanoyl (DOPC, SIGMA 製) と膜蛍光プローブ N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (フルロレシチン DHPE, invitrogen 製) の混合ベシクルを、静置水和法によって作成した。

AFM のカンチレバーの先端に、粒径 10～20 μm のカーボン粒子またはシリカ粒子またはカーボン粒子を、エポキシ樹脂で接着した。カバーガラス（松浪硝子製）上に、ベシクル溶液と超純水をそれぞれ 300 μL 滴下した。これらを、AFM (Asylum Research 製, MFP-3D) にセットし、Fig. 1 のように、ベシクルと粒子間の相互作用力を測定した。

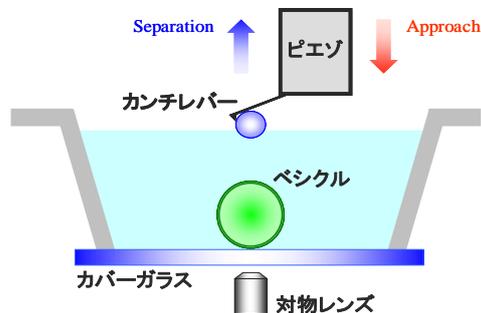


Fig. 1 AFM 測定の概略図

(2) 計算機によるモデリング

我々が世界に先駆けて開発した「陰溶媒モデルによる界面活性剤水溶液系の大規模な分子シミュレーション手法をさらに発展さ

せ、巨大ベシクル-微粒子間接着のモデリングを試みる。

4. 研究成果

(1) 原子間力顕微鏡による直接測定

カーボン粒子・ベシクル粒子間 Fig. 2 に、カーボン粒子・ベシクル間の典型的なフォースカーブを示す。接近時では斥力しか見られない。一方、後退時では、二つのステップが見られるため、引力的相互作用力が働いていると考えられる。探針・カーボン粒子間の AFM 測定結果は、ベシクル溶液中でカーボン粒子の表面に DOPC の単分子吸着層がつくられていることを示している。

これらの結果から考えられるモデルを、Fig. 3 に示す。接近時にベシクルと吸着層が融合する (①→②の変化)。後退時には、一つ目のステップでベシクルと粒子が離れ、その間にモノマーが詰まった架橋構造をとる (②→③)。さらに後退すると、架橋構造が伸び (③→④)、二つ目のステップで架橋構造が切れ (④→⑤)、ベシクルと粒子が完全に離れた状態になる。

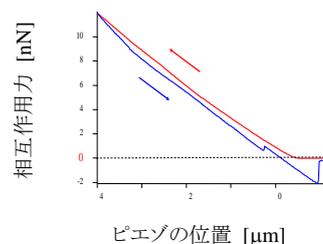


Fig. 2 カーボン粒子・ベシクル間の相互作用力 (ベシクル直径は 40 μm)

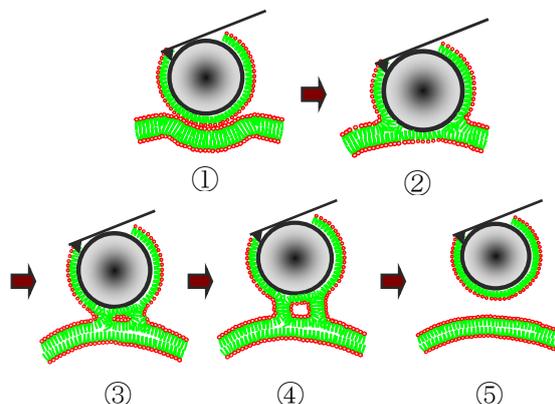


Fig. 3 カーボン粒子・ベシクル間相互作用のモデル

シリカ粒子・ベシクル間 Fig. 4 に、シリカ粒子・ベシクル間の典型的なフォースカーブを示す。接近時および後退時ともに、斥力しか計測されなかった。また、探針・シリカ粒子間の AFM 測定結果より、ベシクル溶液中でシリカ粒子表面には DOPC の単分子吸着層は形成していないと思われる。

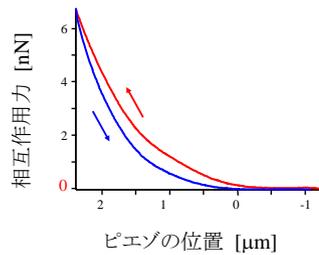


Fig. 4 シリカ粒子・ベシクル間の相互作用力 (ベシクル直径は 40 μm)

(2) 計算機によるモデリング

Fig. 5 に、二分子膜の計算結果の一例を示す。陰溶媒モデルにより、水分子を顕わに取り扱わなくても、二分子膜の構造が再現できることがわかる。今後は、上記の実験系と対応させるために、粒子と二分子膜との相互作用力をシミュレーション解析する予定である。

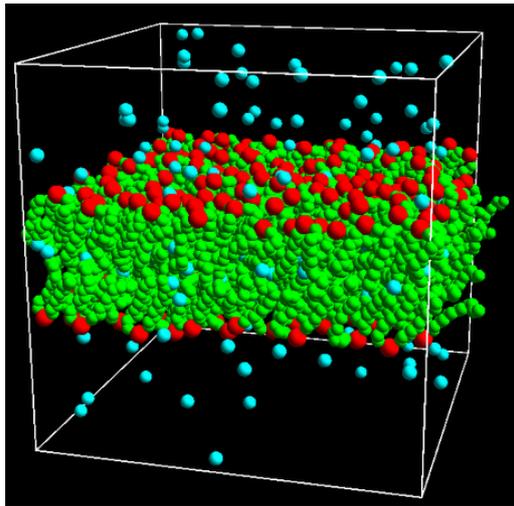


Fig. 5 陰溶媒モデルを用いた二分子膜の計算機シミュレーション

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 3 件)

- ① 新戸浩幸、固体表面の濡れと毛管力の計算機シミュレーション —分子モデリングと流体力学—、*粉体工学会誌*、**46**(1)、25-34 (2009)、査読無
- ② 森貞真太郎、新戸浩幸、両親媒性分子集合体の計算機シミュレーション、*化学工学シンポジウムシリーズ*、**80**、163-169 (2008)、査読無
- ③ 新戸浩幸、ナノ粒子の生細胞との相互作

[学会発表] (計 8 件)

- ① 宮川竜平、平田琢也、新戸浩幸、粒子・細胞表面間の接着力に及ぼす血清タンパクの影響、*粉体工学会 2009 年度春期研究発表会*、東京、2009 年 5 月 26 日
- ② 平田琢也、新戸浩幸、岡田正弘、古園 勉、藤井秀司、前田駿太、中村吉伸、細胞表面に対するアパタイト修飾ポリ乳酸粒子の接着力の AFM 測定、*化学工学会第 74 年会*、2009 年 3 月 18 日、横浜国立大学
- ③ 新戸浩幸、岩井 颯、太田善規、東谷 公、ジャイアントベシクルと粒子間の相互作用力の AFM 測定、*化学工学会第 40 回秋季大会*、2008 年 9 月 26 日、東北大学
- ④ 新戸浩幸、太田善規、伊藤雅浩、東谷 公、生細胞へのシリカ粒子の取り込みと細胞毒性に及ぼす諸因子、*化学工学会第 40 回秋季大会*、2008 年 9 月 25 日、東北大学
- ⑤ H. Shinto, Y. Aso, J. Tsujimura, Y. Ohta, M. Ito, K. Higashitani, Adhesion, Uptake, and Cytotoxicity of Engineered Particles for Living Cells, 5th International Conference of Interfaces Against Pollution 2008, 2-Jun-08, Kyoto, Japan
- ⑥ 伊藤雅浩、太田善規、新戸浩幸、東谷 公、生細胞によるシリカ粒子の取り込みと細胞毒性、*粉体工学会 2008 年度春期研究発表会*、2008 年 5 月 20 日、京都
- ⑦ 岩井 颯、太田善規、新戸浩幸、東谷 公、巨大ベシクルと粒子間の相互作用力の直接測定、*粉体工学会 2008 年度春期研究発表会*、2008 年 5 月 20 日、京都
- ⑧ 岩井 颯、太田善規、新戸浩幸、東谷 公、ベシクルと粒子間の相互作用力の AFM 測定、*化学工学会関西支部 第 10 回化学工学会学生発表会*、2008 年 3 月 1 日、関西大学

[図書] (計 3 件)

- ① 新戸浩幸 分筆、第 6 章 液相分散系の展開 (1. 工業素材産業, 4. 環境)、*液相中の微粒子分散・凝集と分離操作*、*粉体工学叢書 4 巻*、森 康維 編著、日刊工業新聞社 (発刊予定)
- ② 新戸浩幸 分筆、毛管力の発生メカニズム、*微小液滴の物性制御と吐出・衝突・蒸発メカニズム*、*挙動解析 事例集*、(2009 年 9 月発刊予定)
- ③ I. U. Vakarelski, Y. Kanda, H. Shinto, K. Higashitani, Adhesion of Particles to Surfaces in Aqueous and Non-Aqueous Media, *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, vol. 1:1, pp. 1-17

(DOI:10.1081/E-ESCS-120021199),
Marcel Dekker, NY (2007)

[その他]

ホームページ

<http://www-tph.cheme.kyoto-u.ac.jp/~shinto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新戸 浩幸 (SHINTO HIROYUKI)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：80324656

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし