

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19918

研究課題名（和文）白血球から学ぶ濃度勾配下でのマイクロ水中推進機構とドラッグデリバリーへの機能応用

研究課題名（英文）Underwater micro-propulsion mechanism by concentration gradient learned from leukocytes and the application to drug delivery system with the function

研究代表者

玉川 雅章（TAMAGAWA, Masaaki）

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号：80227264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、サイトカイン濃度勾配下での白血球の水中推進機構解明と新規DDS用マイクロ粒子開発を目的として、濃度勾配による水溶液中で白血球の運動に着目し、光学顕微鏡下での白血球移動と濃度輸送の2次元計測、白血球の回転運動計測、白血球表面での濃度勾配による白血球駆動機構の解明を行い、(1)白血球膜上の濃度分布計測から濃度勾配下での水中推進の際に白血球が半回転運動していること、(2)1次元簡易理論モデル解析やサイトカイン濃度輸送のCFDシミュレーション解析結果から、白血球の半回転運動が水中推進に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血球から免疫機構であるサイトカイン濃度勾配による水中推進の原理を学ぶことで、人体内の薬物搬送システム（ドラッグデリバリーシステム）への応用が可能となり、医療工学や製薬のみならずその移動の現象解明に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：In this investigation, to find out the mechanism by which neutrophil propel themselves through water under a cytokine concentration gradient and developing new microparticles for DDS, the motion of a neutrophil in water due to a concentration gradient was focused by two-dimensional measurements of the neutrophil motion and concentration transport around it under an optical microscope, and the rotational motion of the neutrophil was measured, and the mechanism by which neutrophil are driven by the concentration gradient on their surfaces was elucidated. It is concluded that (1) a neutrophil has a semi-rotary motion when propelling itself under a concentration gradient in water by concentration distribution measurements on the neutrophil membrane, (2) the semi-rotary motion of the neutrophil is contributed for the underwater propulsion by one-dimensional simplified theoretical model analysis and CFD simulation analysis of cytokine concentration transport.

研究分野：流体工学，生体医工学

キーワード：白血球 水中推進機構 濃度マランゴニ効果 走化性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人体中の血液に含まれる数マイクロメートルの大きさの好中球(以降まとめて白血球)は、免疫機能を持ち、細菌や炎症部へ向けて移動する“走化性”といった機能を持つ。走化性については、(a)表面から生成された偽足運動による壁面移動と(b)液中における泳動の2つがある。この走化性の機構のうち(b)については、(a)同様に生物学的には、白血球が炎症部より生成される誘因物質のサイトカイン濃度勾配を感知して移動すると考えられているが、偽足も使用せず泳動しているため、その水中推進機構は解明されていないのが現状である。一般に、液中に濃度勾配による微粒子の運動は、濃度マランゴニ効果、すなわち、膜表面での界面張力の勾配の変化によって駆動されていると考えられるが、白血球のサイトカイン濃度勾配による液中駆動についても同じ機構かどうか、白血球の膜構造も関係しているかどうかはいまだに不明である。すなわち、膜をとまなう濃度マランゴニ効果による白血球の水中での駆動機構原理が未解明な状況にある。一方で、この機構を解明し、濃度勾配から微粒子を制御できれば、人体内で人工的に炎症部位へ粒子を動かして薬物を搬送する、いわゆるドラッグデリバリーシステム(DDS)の発展やそのほかのMEMS応用技術となることが期待される。特に、モーターやエンジンなどの駆動源を搭載できないマイクロスケールでは有効である。したがって、MEMS分野の新たな発展という点でも、この機能の基礎的解明が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、サイトカイン濃度勾配下での白血球の水中推進機構解明と新規DDS用マイクロ粒子開発を目的として、濃度勾配による水溶液中で白血球の運動に着目し、光学顕微鏡下での白血球移動と濃度輸送の2次元計測、白血球の回転運動計測、白血球表面での濃度勾配による白血球駆動機構の解明を行う。また、この駆動原理を生かした微粒子の表面加工による新規DDS用の微粒子開発も試みる。

3. 研究の方法

方法については、倒立顕微鏡に取り付けられたCCDカメラを用いて、液体中に分散している白血球にサイトカインの(a)過渡的な濃度勾配を与えたとき、および(b)定常的濃度勾配を与えたとき白血球挙動を観察してその速度を計測し、その濃度分布をCCD上の蛍光強度により求め、これらの結果から過渡的・定常的濃度勾配と速度変化を調べる。これらから、白血球の運動の濃度勾配による依存性ならびに濃度分布と駆動機構の詳細について調べた。また、一方で、これらの速度計測から推定される白血球にはたらく力を推定し、その力と濃度勾配から白血球膜の界面張力の濃度依存性について求める。さらには、この原理を駆動源となる微小球の設計に生かすために、その微小球の表面を加工し、その微小球の運動を調べる。または、表面加工されたマクロな固体界面上での水滴の移動からスケールの変化に対する推進効率の変化を調べる。

まとめると、

- (1)溶液中白血球のサイトカイン濃度勾配による白血球の運動の観察と2次元濃度分布測定
- (2)3次元回転運動についての標識による計測
- (3)濃度駆動型推進微粒子の開発。

の項目について行うが、学問的問いである(1)、(2)を中心に、加えて(3)も試みる重みづけを行った。

(1)溶液中白血球のサイトカイン濃度勾配による白血球の運動の観察と2次元濃度分布測定

顕微鏡下で、誘因物質であるサイトカイン(IL-8)の濃度勾配をマイクロシリッジ等を用いて生成し、水溶液のセル内に浮遊している白血球に2次元的に作用させる。このときのセルの高さは1mm程度、縦横10x10mm程度である。セル中心部にある白血球の動きを、蛍光顕微鏡下の高感度CCDカメラで撮影し、各白血球の速度を粒子追跡計測(Particle Tracking Velocity Analysis)の画像処理から求めた。また、滴下した濃度と測定点での濃度勾配を求めるため、サイトカインに付着させた蛍光物質を顕微鏡下で観察し、膜上面や周囲流体での濃度分布(輝度分布)や濃度勾配(輝度勾配分布)を実験的に求めた。これらの条件により、サイトカインの滴下する場所、観察する白血球の位置の2点から、過渡的な濃度勾配が作用したときの白血球速度を平均的に求めた。一般に、界面張力の勾配が作用する界面エネルギー下での半径Rの微粒子(白血球)に働く力は、 $F = -2\pi R^2 d\sigma/dx$ で表せるが、界面張力が温度一定の下では濃度cの関数となるため、力は濃度勾配に比例することとなる。本研究では、速度Vと濃度勾配の関係を得て、界面張力の濃度勾配 $\partial\sigma/\partial c$ の膜特性も検討した。

次に過渡的な濃度勾配に対して、MEMS流路を用いて、流路上で定常的濃度勾配を生成させた。流入の1つのポートからは、濃度物質のサイトカイン、一方のポートには生理食塩水と単離している白血球、FITC蛍光物質を注入し、定常的濃度勾配の場の生成を行い、過渡的な濃度勾配と同様に、白血球の速度計測および濃度勾配の計測を顕微鏡下で同時に行った。

一方、濃度勾配に伴う界面張力勾配による推進力の発生を界面張力の影響を考慮した2次元

円柱周りの流れの解析を行うことにより調べた。支配方程式として、回転円柱周りの流れに対して、連続の式、Navier-Stokes 方程式、濃度の輸送方程式、さらに連成して、界面（円柱表面）での濃度（表面濃度）の輸送方程式も用いた。界面張力と表面濃度の関係を、流れの境界条件ならびに外部の濃度と表面での濃度の境界条件を与えてレイノルズ数 Re 、ペクレ数 Pe および濃度マランゴニ数 Ma による流れ場への影響を調べ、与えられた物理的界面の状態（表面での濃度拡散係数や吸着や吸収係数）による駆動力への影響を具体的に調べた。

(2) 3次元回転運動についての標識による計測

これまでの実験系と同じ環境で、蛍光顕微鏡を用いて、サイトカイン濃度勾配を与えるが、白血球の膜内部に修飾できるFura-2を用いて、上記と同様の観察実験を行う。この際、Fura-2のフィルターとサイトカイン蛍光粒子の波長のフィルターを交互に取得できるようにが画像取得を工夫し、サイトカイン濃度の蛍光取得とFura-2の2画面の画像を同時に取得し、膜上輸送現象と白血球の回転の同時測定を行った。

(3) 濃度駆動型推進微粒子の開発

白血球を観察した測定系において、比重が水と同程度のポリスチレン粒子（数ミクロン程度）に対し、フェムト秒パルスレーザを用いて、表面上のナノ微細孔を作ることを試みた。(1)と同様の速度の画像計測を行い、表面構造のカプセル輸送動力源としての可能性を調べた。

4. 研究成果

サイトカイン濃度勾配下での白血球のマイクロ水中推進機構解明とその機能応用を目的として、それぞれの項目について以下の成果が得られた。

(1) 溶液中白血球のサイトカイン濃度勾配による白血球の運動の観察と2次元濃度分布測定

顕微鏡下で、サイトカインの濃度勾配を白血球(好中球)に作用し、その移動速度と濃度分布、勾配を各時刻において同時に求めた。特に、濃度マランゴニ効果で重要な物理的要素となる膜上での“濃度勾配”、低速で移動する粒子に働く Stokes 力を生む白血球の“速度”の関係を求めた。その結果、(a)白血球の生と死の影響については、生の時には、初期濃度にも依存するが、マランゴニ効果で得られる速度/濃度勾配が直線的に得られ、この比が膜の感度を表すことも示された。また、(b)白血球の死の時には、濃度勾配に対して速度が生に比べてかなり小さく、感度も低くなっていることもわかった。これらにより、生物の膜機能が濃度マランゴニ効果をより効果的に高めていることが示唆された。

さらに、白血球膜での偽足の有無による速度への影響を高倍率の画像を用いて調べ、偽足の存在による速度の低下が示唆された。一方、この偽足の突起の程度を表面粗さや幾何学的特性量で表し、それらと移動速度について調べたが、カメラの画像精度の問題もあり十分定量的な相関が得られなかった。

(2) 3次元回転運動についての標識による計測

膜上での濃度勾配の変動履歴を調べ、白血球の回転速度を求めたが、回転数と移動速度に明確な相関は見られなかった。一方で、(a)好中球膜上のサイトカイン濃度勾配が正負と変化することから、180度の半回転運動を続けていることと、(b)膜上の濃度勾配の時間平均をとると周囲のサイトカイン濃度勾配とは反対の濃度勾配を持っており、濃度マランゴニ効果とみなせることがこれまでにわかっている。この半回転運動に伴う好中球内部のカルシウムイオン濃度の測定のため Fura-2 観測装置を組みこんだ。結果として、好中球膜内のカルシウムイオン濃度も膜上のサイトカイン濃度と同様に濃度勾配が正負と変化し、いずれも周期的に変化し、その周波数が同程度であることから、膜内のカルシウムイオンと膜上のサイトカインが連動して変化している可能性が示された。なお、測定の時間分解能の制約もあるため周囲流体の濃度勾配が好中球に到達するときの化学的刺激によるカルシウムイオンの急激な上昇については再現性がまだとれておらず、研究課題修了後も継続を行っている。

これらの計測実験とは別に1次元膜回転の理論モデルを新たに作成し、実験で得られたパラメータなどを代入することによって、好中球の回転運動、特に180度を境に往復を繰り返す半回転運動によって、重心移動がステップ的に変化することが定性的に予測された。実験で得られたサイトカイン濃度勾配が到達する時刻からの好中球の重心移動履歴も部分的にステップ的に変化することと傾向が一致していた。このことから、既に白血球膜上の濃度分布観察から考察されている白血球の半回転運動が水中推進に寄与していることが推察された。これと研究手法で記載のCFD解析を行ったところ、半回転を考慮した2次元数値シミュレーションにおいては、非回転のものに比べて、白血球膜上でのサイトカイン濃度が、実験で得られている“膜上の濃度勾配の時間平均をとると周囲のサイトカイン濃度勾配とは反対の濃度勾配を持つ”ことと対応することが確認できた。

(3) 濃度駆動型推進微粒子の開発

ポリスチレン粒子に対して熱的影響を下げるためポリスチレン分散水溶液において、フェムト秒パルスレーザーの集束レンズによる加工の試行を行ったが、光圧や水中衝撃波の影響が大きいため詳細な位置制御が難しく、粒子表面に想定しているサイズの穴の加工が未完了となっている。本課題については、研究期間終了後も、粒子の周囲環境設定の変更などを行って加工の試行を続けている。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Obana, R., Yamamoto, A., Tamagawa, M.	4. 巻 17-3, 22-00083
2. 論文標題 Effects of underwater plane shock waves on neutrophil propulsion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/jbse.22-00083	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 -

1. 著者名 Rintaro Obana, Masaaki Tamagawa	4. 巻 108-1
2. 論文標題 Experimental and Theoretical study of Propulsion Mechanism with Neutrophil Rotation by using Concentration Marangoni effect	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences	6. 最初と最後の頁 114-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.37934/arfmts.108.1.114125	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 尾花倫太郎, 玉川雅章
2. 発表標題 免疫治療を目指した好中球水中推進機構解明における好中球面上のカルシウムイオン濃度測定
3. 学会等名 第36回バイオメディカル・ファジィ・システム学会年次大会, B-2-2, 早稲田大学
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rintaro Obana, Masaaki Tamagawa
2. 発表標題 Evaluation of Neutrophil's Rotation on Transport Process of Membrane Concentration and its Underwater Propulsion by CFD Analysis
3. 学会等名 7th International Conference on Computational Methods in Engineering & Health Sciences (ICCMHE2023), ES018, Online (Malaysia)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾花倫太郎, 玉川雅章
2. 発表標題 マイクロ流路を利用した一様なサイトカイン濃度勾配下での好中球の運動観察
3. 学会等名 日本機械学会2023年度年次大会, J021-02, 東京都立大学
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾花倫太郎, 玉川雅章
2. 発表標題 サイトカイン濃度勾配下における膜機能の変化に基づく好中球の偽足の発生位置の推察
3. 学会等名 日本機械学会第34回バイオエンジニアリング講演会, IP4-09, 福岡国際会議場
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾花倫太郎, 玉川雅章
2. 発表標題 好中球の推進機構の回転運動やその周期による説明の試み
3. 学会等名 第35回バイオメディカル・ファジィ・システム学会年次大会(BMFSA2022), H-2, アクリエひめじ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rintaro OBANA and Masaaki TAMAGAWA
2. 発表標題 Experimental and Theoretical study of Propulsion Mechanism with Neutrophil's Rotating by using Concentration Marangoni Effect
3. 学会等名 ICCMEH2022 (International Conference on Computational Methods in Engineering & Health Sciences), S6-08, Online
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾花倫太郎, 玉川雅章
2. 発表標題 サイトカイン濃度勾配が好中球の推進機構へ及ぼす影響に関する研究-衝撃波による並進と回転運動への影響-
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾花倫太郎, 玉川雅章
2. 発表標題 サイトカイン濃度勾配が好中球の推進機構へ及ぼす影響に関する研究-膜特性を考慮したサイトカインの濃度輸送について-
3. 学会等名 日本機械学会2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾花倫太郎, 山本歩夢, 玉川雅章
2. 発表標題 衝撃波作用による好中球の幾何特性変化とその推進機構への影響について
3. 学会等名 第34回バイオメディカル・ファジィ・システム学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rintaro OBANA, Masaaki TAMAGAWA
2. 発表標題 Effects of Shock Wave on Neutrophil and It ' s Propulsion
3. 学会等名 9th International Symposium on Applied Engineering and Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rintaro OBANA, Masaaki TAMAGAWA
2. 発表標題 Effects of shock wave stimulus on rotation of neutrophil motion
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021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