

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23656489
 研究課題名（和文） 巨大ベシクル固定化プローブによるソフト界面の表面力測定と分子モデリング
 研究課題名（英文） Surface forces between soft interfaces using giant-vesicle-immobilized probes and their molecular modeling
 研究代表者
 新戸 浩幸 (SHINTO HIROYUKI)
 京都大学・大学院工学研究科・講師
 研究者番号：80324656

研究成果の概要（和文）：原子間力顕微鏡（AFM）のカンチレバーを化学的に表面修飾することにより、その先端に単一の巨大ベシクルを固定化することに成功した。この「巨大ベシクル固定化プローブ」を用いて、ソフト界面の表面力測定を行った。流体マイクロ・シミュレーション手法により当該現象の計算機シミュレーションを行い、AFM フォースカーブを定性的に再現することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have successfully immobilized a single giant vesicle onto the chemically modified surface of a cantilever for atomic force microscopy (AFM). The giant-vesicle-immobilized probes allowed us to measure the surface forces between soft interfaces. Additionally, we have carried out the simulations of the corresponding systems using the computational micro-fluid dynamics to reproduce successfully the force-distance curves, which were in qualitative agreement with those from the AFM measurements.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：巨大ベシクル、ソフト界面、表面間力、付着・脱着、機能性プローブ、原子間力顕微鏡、共焦点レーザー走査顕微鏡、分子モデリング

1. 研究開始当初の背景

細胞と人工材料の相互作用の理解は、医療を支えるバイオマテリアルの表面設計、薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) の要であるキャリアー粒子の表面設計、近年問題視されはじめたナノ粒子の人体影響の評価など、多くの分野において極めて重要である。しかし、実際の生体関連材料の開発研究は、基礎的な理解がなされないまま進められることが多い。この現状から脱却しなければ、今後の生体関連材料開発の飛躍的な発展は期待できない。

研究代表者は、特に基礎的で重要と思われる

る課題、すなわち、①細胞-粒子間の接着力、②細胞内部に取り込まれる粒子のサイズ・表面物性を、界面に注目した系統的かつ定量的な評価により、理解することを目指して研究を進めている。しかし、実際の細胞の接着・取り込み現象は、複数の物理化学的な相互作用力（電気二重層力、van der Waals 力、立体斥力、水和力など）ばかりでなく、細胞生物学的な諸因子も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（図1）。

2. 研究の目的

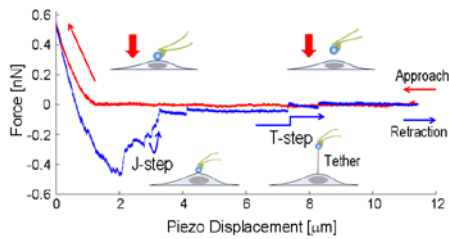


図1 アパタイト修飾ポリ乳酸粒子-マウス皮膚がん細胞表面間の相互作用力曲線

本研究では、擬似細胞の一つであり、リン脂質のみで構成される巨大ベシクルに注目する。巨大ベシクルがつくる「ソフト界面」の表面力について、新しい計測手法と分子モデリングによる特性解析を行い、ソフト界面が関与する不思議で複雑な現象・物性を分子レベルで解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究の方法を、以下に示す。

(1) 巨大ベシクル固定化プローブの作製技術の開発： 「ソフト界面」の表面力を対象として、原子間力顕微鏡 (AFM) に基づく新しい計測手法を開発するため、まず、AFM カンチレバーの先端に巨大ベシクルを固定化した「巨大ベシクル固定化プローブ」を作製した。

(2) 巨大ベシクル-固体基板間の表面力測定： 「巨大ベシクル固定化プローブ」を用いて、巨大ベシクル-固体基板間の相互作用力を直接 AFM 測定すると同時に、各種の光学顕微鏡法により巨大ベシクルの動的挙動を観察した (図 2)。

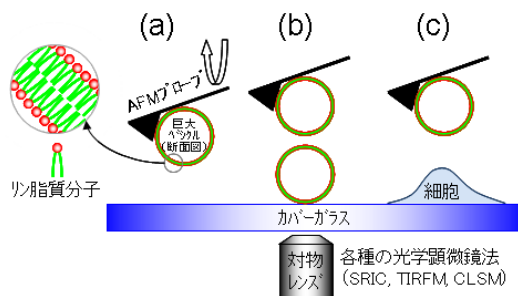


図2 巨大ベシクル固定化プローブによるソフト界面の表面力測定、光学顕微鏡観察の原理図

(3) 巨大ベシクル-固体基板間の接着・脱着の分子モデリング

応募者らが開発した分子モデル・手法をさらに発展させ、大規模な計算機シミュレーションを実行し、実験結果の検証および当該現象の予測モデルの構築を試みた。

4. 研究成果

得られた研究成果を、以下に示す。

(1) 巨大ベシクルの調製方法として、静置水和法 (F.M. Menger & N. Balachander, J. Am. Chem. Soc., **114**, 1992, 5862-5863)、エレクトロフォーメーション法 (T. Hamada et al., J. Am. Chem. Soc., **134**, 2012, 13990-13996)、急速蒸発法 (S. Pautot et al., Proc. Nat. Acad. Sci., **100**, 2003, 10718-10721) などを試した。10 μm 以上の安定な巨大ベシクルを短時間で簡便に数多く得るには、急速蒸発法が最も適していた。

(2) 巨大ベシクル 1 個を AFM カンチレバーの先端に固定化するために、カンチレバー表面を機能化する必要がある。いろいろと試した結果、当初考えていた手法 (金スパッタコートした後、その上に HS-(CH₂)₁₁-NH₂ 分子の自己集積膜を部分的に形成させる) よりも、簡便で安価な手法を見出した (図 3)。しかし、巨大ベシクルの固定化の成功率があまり高くなかったため (約 60%)、機能化に用いた表面修飾剤の至適な表面修飾密度などを見出すことなどが今後課題である。

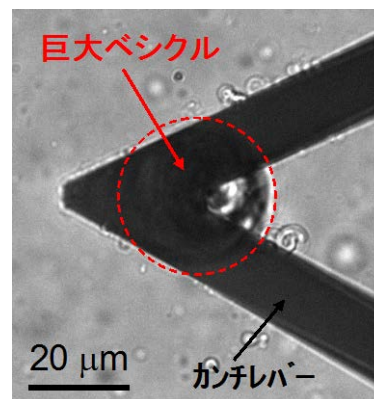


図3 巨大ベシクル固定化プローブ

(3) 「巨大ベシクル固定化プローブ」と固体基板間の相互作用力の直接測定を行ったが、安定して測定を行うことは困難であった。これは、カンチレバー表面と巨大ベシクルとの間の結合力がそれほど強くないためであり、今後改善が必要である。

(4) 当該現象の計算機シミュレーションについて、当初は分子モデリングを予定していたが、予想以上に計算コストを要したため、計算負荷の軽い流体マイクロ・シミュレーション手法を開発した。このシミュレーションにより、AFM フォースカーブを定性的に再現することに成功した。

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7件)

- ① 新戸浩幸, “分子動力学シミュレーション”, 色材協会誌, 86, 2013, 10月号に掲載決定, 査読無
- ② H. Shinto, T. Hirata, T. Fukasawa, S. Fujii, H. Maeda, M. Okada, Y. Nakamura, T. Furuzono, “Effect of Interfacial Serum Proteins on Melanoma Cell Adhesion to Biodegradable Poly(L-Lactic Acid) Microspheres Coated with Hydroxyapatite”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 108, 2013, 8-15, 査読有
doi:10.1016/j.colsurfb.2013.02.021
<http://hdl.handle.net/2433/173348>
- ③ H. Shinto, Y. Ohta, T. Fukasawa, “Adhesion of Melanoma Cells to the Microsphere Surface is Reduced by Exposure to Nanoparticles”, Advanced Powder Technology, 23, 2012, 693-699, 査読有
doi:10.1016/j.appt.2012.05.004
<http://hdl.handle.net/2433/160280>
- ④ H. Shinto, Y. Ohta, T. Fukasawa, “Adhesion of Melanoma Cells to the Surfaces of Microspheres Studied by Atomic Force Microscopy”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 91, 2012, 114-121, 査読有
doi:10.1016/j.colsurfb.2011.10.060
<http://hdl.handle.net/2433/152876>
- ⑤ H. Shinto, “Computer Simulation of Wetting, Capillary Forces, and Particle-Stabilized Emulsions: From Molecular-scale to Mesoscale Modeling”, Advanced Powder Technology, 23, 2012, 538-547, 査読有
doi:10.1016/j.appt.2012.06.003
<http://hdl.handle.net/2433/160279>
- ⑥ 新戸浩幸, “固体表面の濡れ, 粒子間毛管力, Pickering エマルジョンの流体シミュレーション”, オレオサイエンス, 12, 2012, 63-70, 査読無
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40019171354>
- ⑦ 新戸浩幸, 森貞真太郎, “分子スケールのシミュレーション”, 粉体工学会誌, 49, 2012, 291-301, 査読無
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10030575744>

[学会発表] (計15件)

- ① 新戸浩幸, “ナノ粒子による生体膜破壊の普遍性”, 微粒子科学技術研究センタ

ー「連携要素B ワークショップ」, 2013年5月18日, 京都

- ② 新戸浩幸, “動物細胞と粒子の相互作用に関する一考察”, 同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター「ナノ・バイオシステムにおける階層構造の構築と利用」, 2013年3月21日, 京都
- ③ 長田翔, 手塚幹人, 新戸浩幸, “非球形ヤスス粒子を含んだ液液二相流の直接数値計算”, 化学工学会第78年会, 2013年3月19日, 大阪
- ④ 深澤瀬健, 新戸浩幸, “界面活性粒子を含んだ二相系粘弾性流体の直接数値シミュレーション”, 化学工学会第78年会, 2013年3月19日, 大阪
- ⑤ 手塚幹人, 長田翔, 新戸浩幸, “巨大ベシクル—粒子間のソフト界面力のAFM測定と数値シミュレーション”, 化学工学会第78年会, 2013年3月17日, 大阪
- ⑥ 新戸浩幸, “ナノ粒子の生体膜への付着と膜損傷”, 粉体技術セミナー「ナノ粒子のリスクとその対策」, 2012年12月14日, 京都
- ⑦ 新戸浩幸, 太田善規, 深澤智典, “ナノ粒子への曝露によるメラノーマ細胞の接着力の変化”, 第50回粉体に関する討論会, 2012年10月31日, 京都
- ⑧ 吉末幸祐, 深澤智典, 新戸浩幸, “赤血球をモデルとしたナノ粒子由来の細胞毒性評価”, 粉体工学会2012年度春期研究発表会, 2012年5月23日, 京都
- ⑨ 新戸浩幸, “微粒子の生体膜への付着と膜損傷”, 粉体工学会2012年度春期研究発表会, 2012年5月23日, 京都
- ⑩ 新戸浩幸, 深澤智典, “ソフトマテリアルと微粒子との相互作用”, 粉体工学会2011年度秋期研究発表会, 2011年10月19日, 大阪
- ⑪ 森貞真太郎, 新戸浩幸, “電解質水溶液中における界面活性剤自己組織化の分子シミュレーション”, 化学工学会第43回秋季大会, 2011年9月16日, 名古屋
- ⑫ 深澤智典, 新戸浩幸, “各種顕微鏡法によるシリカ粒子暴露後の生細胞の形態観察”, 化学工学会第43回秋季大会, 2011年9月15日, 名古屋
- ⑬ 新戸浩幸, “微粒子と動物細胞との相互作用: 付着、取り込み、毒性”, 化学工学会第43回秋季大会, 2011年9月14日, 名古屋
- ⑭ 深澤智典, 新戸浩幸, “生細胞に対するシリカナノ粒子の付着と膜破壊”, 第63回コロイドおよび界面化学討論会, 2011年9月7~9日, 京都
- ⑮ 深澤智典, 新戸浩幸, “SEMによるシリカ粒子暴露後の動物細胞の形態観察”, 粉体工学会2011年度春期研究発表会,

2011年5月25日，東京

〔図書〕（計1件）

- ⑧ 新戸浩幸（分担執筆），“格子ボルツマン法”，粉体工学ハンドブック，朝倉書店（2013年発刊予定），pp. 305-306（第2.23.3.4目）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

深澤 智典 (FUKASAWA TOMONORI)
京都大学・工学研究科・研究員
研究者番号：00589187

森貞 真太郎 (MORISADA SHINTARO)
佐賀大学・工学系研究科・准教授
研究者番号：60401569