

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：50104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760019

研究課題名(和文) 電位変調反射率測定による赤血球表面の電気的特性の解明

研究課題名(英文) Study of red blood surface by potential modulation reflectance

研究代表者

兵野 篤 (Hyono, Atsushi)

旭川工業高等専門学校・物質化学工学科・助教

研究者番号：20554299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：電位変調反射法については、電極上へのヘモグロビンの固定化に手間取り、結果をまとめるまでにはいたらなかった。

派生した研究成果として、基板上への赤血球の足場材として検討していた親水性カーボンナノチューブをイオン液体で処理して電子顕微鏡観察し、イオン液体の濡れ性と電子顕微鏡観察結果との相関を明らかにし、論文を執筆した。

研究成果の概要(英文)：The results of potential modulation reflectance of red blood cells had not been summerized because we took much time for immobilization of cells onto electrodes.

As derived research, the hydrophilic carbon nanotubes examined as a scaffold material of red blood cells on a substrate was observed with scanning electron microscope by treatment with ionic liquids. We found clear correlation between the wettability and the electron microscopic observation of the ionic liquid.

研究分野：表面化学

キーワード：赤血球

1. 研究開始当初の背景

赤血球の表面構造

赤血球など生体細胞はその表面に荷電高分子層を有し、その振る舞いを制御している。近年では糖鎖など、高分子を構成する構造に着目した研究が盛んに行われている (Nishimura et al. (2011))。しかしながら、個々の分子に着目するだけでは細胞全体としての振る舞いを把握するのは困難である。申請者は以前に、赤血球の表面電荷層の構造を考慮した解析により、電気泳動法を電荷密度を用いて求め、赤血球間の相互作用を見積もった。これにより、細胞最外層の電気的特性とそれに基づく電気的な細胞間相互作用に関しては明らかになったものの、細胞膜まで含めた細胞表面を総体として捉え、その特性を理解するためには更に視点の異なる解析が必要とされている。

電位変調反射測定による表面解析法

電極に交流電場をかけた時、電極電位に依存して変化するパラメータが電位変調に伴って振動する。例えば水溶液中の酸化皮膜に交流電場をかけると、膜内の電子密度変化により反射率が周期的に変化する。この時、電極表面で光を反射させていれば反射光強度の変位が観測される。このシグナルは外部の様々な因子の変動やノイズが含まれたものであるが、この変位をロックインアンプで選択的に検出することによって、表面層内の電荷移動に関する情報を得ることが可能である。この手法は酸化皮膜をはじめとして液/液界面での分子吸着の挙動の観察にも応用されており (H. Nagatani (2007) など)、表面選択性の高い極めて高感度な分析法である。

2. 研究の目的

本研究では、電位変調反射測定法を用い、赤血球表面の電気的特性を明らかにするこ

とを目的とする。赤血球中に大量に存在するヘモグロビンは、内部の鉄イオンの酸化還元により吸収スペクトルが変化するため、反射率測定の対象としてこれを利用する。赤血球を電極上に固定して交流電位をかけ、細胞表面を通じた電子のやり取りを観測することでその電気的特性を解析する。電位変調反射測定法は、非破壊的、直接的で高感度な測定手法であり、生体分子などの界面での振る舞いを明らかにする手法としての応用が期待できる。

3. 研究の方法

まず、ヘモグロビン分子のみを用いて電位変調反射測定を行う。準備段階として、導電性ガラス上にヘモグロビンを固定し、直流電位をかけることで鉄イオンを還元し、スペクトル変化を確認する。

その後、金属基板上にヘモグロビン分子を固定して交流電位をかけ、反射光の変調を測定・解析する。

(1) ヘモグロビンの導電性ガラス上への固定化

ヘモグロビンを導電性ガラス基板上に固定する。ヘモグロビンは全体として正に帯電した高分子なので、ガラス基板上に直接吸着すると考えられるが、それでは吸着量の制御が困難である。そこで、負電荷を有し、なおかつガラス基板表面に吸着する吸着剤を探索する。

(2) 導電性ガラス上に固定したヘモグロビンの酸化還元に伴う吸光スペクトルの測定

その後、吸光スペクトルを測定しながら直流電圧をかけ、固定されたヘモグロビンにおいて鉄イオンの酸化還元に伴う吸光スペクトル変化を確認する。

(3) ヘモグロビンの金属基板上への固定化

続いて金属基板上にヘモグロビンを固定する。金属基板としては金電極を用い、ヘモグロビンを固定する吸着剤として、金属上に吸着する官能基をもち、なおかつ負電荷を有する分子を探しヘモグロビンを安定に基板上に固定する。吸着剤およびヘモグロビンの吸着量は QCM でモニタリングし、吸着量を制御する。吸着後、基板上をラマン分光、SEM-EDS などを用いて測定し、鉄イオンを検出することでヘモグロビンの吸着を確認する。

(4) 金属基板上に固定したヘモグロビンの電位変調反射測定

ヘモグロビンを固定した金属基板上で反射光の強度を測定し、交流電位をかけて電位変調反射測定を行う。まず入射波長を変化させて(2)の結果と比較し、ヘモグロビン分子中の鉄イオンの酸化還元に伴う吸光度変化の大きい波長でその後の測定を行う。続いて定波長で交流周波数を変化させ、測定を行う。

(5) 電位変調測定の結果解析

電位変調反射測定の結果を解析し、電極からヘモグロビン分子中の鉄イオンへの電子の移動過程を明らかにする。

4. 研究成果

金電極基板への脂質膜を介したヘモグロビンの固定と、その電気化学測定に予想以上に手間取り時間がかかってしまった。清浄な蒸着金電極の作成とヘモグロビンの固定化までは成功したが、その後の電気化学反応で安定した応答が得られず、途中での異動による装置の移転もあり結果をまとめ上げるまでに至らなかった。

しかしながら、派生研究として細胞の足場材として検討していた親水性カーボンナノチ

ューブ(CNT)を素材とした、イオン液体を用いた電子顕微鏡観察を行い、可視化剤としてのイオン液体の性能評価をまとめて報告を行った。疎水性カーボンナノチューブと親水化処理したカーボンナノチューブにそれぞれ、親水性・疎水性のイオン液体をかけて処理し、走査型電子顕微鏡で観察を行ったところ、親水性イオン液体 - 親水性 CNT、疎水性イオン液体 - 疎水性 CNT の組み合わせで非常によりコントラストが得られ、従来の金属スパッタリングによる処理法と同等の像を観察することができた。(図)

また、これは親水性基板、疎水性基板と親水性イオン液体、疎水性イオン液体との接触角と非常により相関を示しており、CNT のような微細試料においても、表面へのイオン液体の濡れ性が観察される像を大きく左右することが明らかになった。

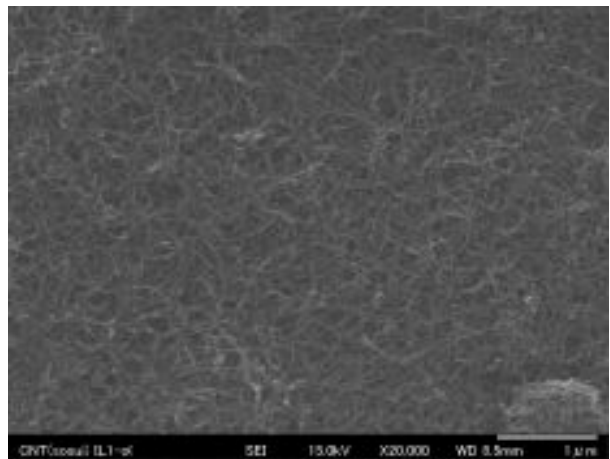


図. イオン液体処理によって観察した CNT

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)

研究者番号：

〔雑誌論文〕(計1件)

Atsushi Hyono, Shigeaki Abe, Koji Kawai, Tetsu Yonezawa,
Scanning Electron Microscope Observation of Carbon Nanotubes with Room Temperature Ionic Liquids: Effect of Their Hydrophilicities, Journal of Nanoscience and Nanotechnology (in press) 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

Atsushi Hyono, Shigeaki Abe, Koji Kawai, Tetsu Yonezawa,
Scanning Electron Microscope Observation of Carbon Nanotubes with Room Temperature Ionic Liquids: Effect of Their Hydrophilicities, Nano Korea 2014年7月2-4日, COEX, seoul

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵野 篤 (HYONO, Atsushi)
旭川工業高等専門学校・物質化学工学科・助教
研究者番号：20554299

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()