疑似細胞プローブによるソフト界面力測定と数値計算

Soft Interfaces of Giant Vesicles Studied by Atomic Force Microscopy and Computer Simulations

11107

研究代表者 京都大学大学院工学研究科 講師 新 戸 浩 幸 Hiroyuki Shinto

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.

研究目的

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(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。

筆者は、特に基礎的で重要と思われる課題、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の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。

そこで本研究では、疑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し、その「ソ

フト界面」の表面力について、新しい計測手法と分子スケール・メソスケールの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す。

研究成果の概要

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。

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 μ m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。

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1）。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1 巨大ベシクル固定化プローブ

2. 巨大ベシクルー固体材料間の表面力測定

「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（図2）、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。

巨大ベシクルーシリカ球間の表面力測定を行った（図3）。相互作用曲線において、接近時・脱離時ともに引力は計測されなかった。脱離時の斥力は、接近時の斥力よりも小さかった。これは、ベシクルの変形の緩和速度が粒子の走査速度よりも遅いためと考えられる。これらの結果は、溶媒として純水あるいはリン酸

図3 (上)コロイドAFM法による球ー巨大ベシクル間の相互作用測定の原理図、(下)水溶液中のシリカ球（直径10μm）と巨大ベシクル（中性リン脂質DOPC、直径40μm）の相互作用曲線

緩衝溶液（イオン強度は150mM相当）を用いた場合でも、同じであった。リン酸緩衝溶液中では、電解質の影響により電気二重層が遮蔽され脱離時に付着力が働くなど相互作用に変化が現れる可能性が予測されたが、実際の測定結果では、引力は計測されなかった。電気的中性なリン脂質DOPCで構成されるベシクル、シリカ粒子は、水溶液中でいずれも負に帯電し、これらの間には強い引力的相互作用は働かないと考えられる。

3. 巨大ベシクルー固体基板間の接着・脱着の分子モデリング

筆者らが開発したモデル・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。当初は分子モデリング（図4）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（図5）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（図3）を定性的に再現することに成功した。

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

図4 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

図5 メソスケールでモデル化された二分子膜とシリカ球：(上) スナップショット，(下) 相互作用曲線（ただし，流体抗力を除いてある）

発表論文

- 1) H. Shinto, Y. Aso, T. Fukasawa, K. Higashitani, Adhesion of Melanoma Cells to the Surfaces of Microspheres Studied by Atomic Force Microscopy, *Colloids Surfaces B*, **91**, pp.114-121 (2012).
- 2) 藤崎和也, 松岡佑樹, 太田賢, 深澤智典, 新戸浩幸, シリ

カ粒子-液状エポキシ樹脂分散系の固液界面構造, 表面間力およびレオロジー, *粉体工学会誌*, **49**(8), pp.599-607 (2012).

- 3) H. Shinto, Y. Ohta, T. Fukasawa, Adhesion of Melanoma Cells to the Microsphere Surface is Reduced by Exposure to Nanoparticles, *Adv. Powder Technol.*, **23**(5), pp.693-699 (2012).
- 4) 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 Surfaces B*, **108**, pp.8-15 (2013).

解説記事

- 5) 新戸浩幸, 固体表面の濡れ, 粒子間毛管力, Pickering エマルションの流体シミュレーション, *オレオサイエンス*, **12**(2), pp.63-70 (2012).
- 6) 新戸浩幸, 固体粒子を含んだ二相流体の計算機シミュレーション, *Colloid & Interface Commun.*, **37**(1), pp.9-11 (2012).
- 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**(4), pp.291-301 (2012).
- 8) H. Shinto, Computer Simulation of Wetting, Capillary Forces, and Particle-Stabilized Emulsions: From Molecular-scale to Mesoscale Modeling, *Adv. Powder Technol.*, **23**(5), pp.538-547 (2012).
- 9) 新戸浩幸, 分子動力学シミュレーション, *色材協会誌*, **86**(10), pp.380-385 (2013).

学会発表・依頼講演

- 10) 新戸浩幸, 細胞と粒子の相互作用に関する基礎的研究, 微粒子科学技術研究センター 講演会, 同志社大学, 2012年3月.
- 11) H. Shinto, T. Fukasawa, Interaction of Living Cells with Materials: What Can Colloid Engineers Do About It?, Emerging Leadership Australia-Japan Collaboration Workshop in Colloid and Materials Science, Sendai, Japan, 2012年5月.
- 12) 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, 京都, 2012年5月.
- 13) 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, 京都, 2012年5月.
- 14) 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, 京都大学, 2012年10月.
- 15) 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」, 京都, 2012年12月.
- 16) 手塚幹人, 長田翔, 新戸浩幸, 巨大ベシクルー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, 大阪大学, 2013年3月.
- 17) 深渡瀬健, 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, 大阪大学, 2013年3月.
- 18) 長田翔, 手塚幹人, 新戸浩幸, 非球形ヤヌ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, 大阪大学, 2013年3月.
- 19) 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 セミナー「ナノ・バイオシステムにおける階層構造の構築と利用」, 同志社大学, 2013年3月.
- 20) 新戸浩幸, ナノ粒子による生体膜破壊の普遍性, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「先進微粒子材料の科学と工学の融合」連携要素B ワークショップ「制限された状況で現れる微粒子の特性—制限環境が粒子に与える影響に普遍性は見出せるか?—」, 同志社大学, 2013年5月.
- 21) 吉末幸祐, 深澤智典, 新戸浩幸, シリカ粒子による動物細胞の膜破壊の普遍性, 化学工学会第45回秋季大会, 岡山大学, 2013年9月.
- 22) 長田翔, 手塚幹人, 深渡瀬健, 新戸浩幸, ヤヌス粒子に被覆された液滴のせん断流による変形挙動, 第64回コロイドおよび界面化学討論会, 名古屋工業大学, 2013年9月.
- 23) 深澤智典, 新戸浩幸, 材料の生体影響がAFM測定でわかる!?, APPIE 産学官連携フェア2013「シーズとニーズのマッチング—粉の技術—」, 大阪, 2013年10月.