17107

赤血球を鋳型とした機能性ソフト粒子の創製と応用

Fabrication and Application of Functional Soft Particles
Using Red Blood Cells as Template

研究代表者 Research leader: 新戸 浩幸 Hiroyuki SHINTO
 福岡大学工学部 教授
 Faculty of Engineering, Fukuoka University, Professor
 E-mail: hshinto@fukuoka-u.ac.jp

抄 録

赤血球を用いて、種々の形態をもつだけではなく、赤血球膜上に存在する血液型糖鎖の生物学的機能をも保持した機能性ソフト粒子の創製を目指した。主な成果として、パラホルムアルデヒドによる赤血球の化学固定によって、赤血球膜に対するウシ血清アルブミンの吸着は著しく低減されるが、血液型糖鎖の認識タンパク質であるレクチンの吸着は変化しないことがわかった。

ABSTRACT

Using red blood cells (RBCs), we have fabricated functional soft particles, which exhibit not only several kinds of shapes but also biologically functional sugar chains of ABO blood group on the RBC membrane even after chemical fixation. It was found that chemical fixation of RBCs with paraformaldehyde significantly reduces the adsorption amount of bovine serum albumin on an RBC, but hardly affects that of lectins (i.e., proteins that recognize blood type sugar chains).

研究背景と目的

生物には、その微細構造として、形や配列に特異性・規則性をもつ種が数多く存在する。近年、このような生物微細構造を鋳型として金属・半導体・高分子などに転写することより、新規機能性材料を創造しようとするバイオテンプレート法が注目されている。例えば、左巻きのらせん形状を示すスピリリナ(微細藻類の一種)の表面を金属メッキし、得られたマイクロコイルを円偏波用デバイスに応用する研究が報告さ

れている(Kamata K., 2014)。しかし従来の研究報告では、生物微細構造体は鋳型として使用されるだけで、その構成要素である生体物質(多糖、タンパク質など)が本来もつ生物学的機能を活用するという視点がない。

本研究では、赤血球を鋳型として用いることにより、種々の形態をもつだけではなく、赤血球膜上に存在する ABO 式血液型物質の生物学的機能(図1)をも保持した機能性ソフト粒子の創製を目指した。この血液型物質は単糖5～6個が結合した糖鎖であり、その末端に位置す

Fig. 1 Schematics of sugar chain structures of ABO blood group.

る糖 1 ～ 2 個の構造の違いによって血液型が決定される（奈良，2017）．創製した機能性ソフト粒子をカラムクロマトグラフィー用充填剤に応用することを見据えて，ABO 式血液型糖鎖 3 種を特異的に認識するタンパク質（レクチンなど）の赤血球に対する吸着挙動を検討した．

研 究 方 法

1. 赤血球の分離と固定化

ウサギ保存血液（日本バイオテスト研究所）またはヒツジ保存血液（日本バイオテスト研究所）から，遠心分離→上清液の除去→細胞ペレットの再懸濁を繰り返すことによって，赤血球を分離精製した．種々の形態をもつ赤血球を作製するため，薬物を添加した後，パラホルムアルデヒドによって細胞膜を温和に化学架橋した（八木，2007）．

2. 赤血球の血液型の決定

ヒツジの個体を ABO 式血液型として分類すると，B 型および O 型しかいないことがわかっていく．全 8 頭の個体のヒツジ保存血液（日本バイオテスト研究所）の血液型を判定するため，オモテ判定試薬である ABO スフィア（KTS502C；鎌倉テクノサイエンス）およびバイオクロン抗 A/抗 B/抗 A&B（111006/112003/113000；オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス），

ウラ判定試薬であるアフーマジェン（151002；オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス）を用いた．

3. 赤血球膜へのタンパク質の吸着

固定化赤血球膜上の ABO 式血液型糖鎖が生物学的機能を保持しているかどうかを検討するため，蛍光標識されたタンパク質（B 抗原認識レクチン GS-I，H 抗原認識レクチン UEA-I，またはウシ血清アルブミン（BSA））を最終濃度 5 ～ 50 mg/mL となるように赤血球懸濁液（ 1×10^6 cells/mL）に溶解させて，4℃で 60 分間のインキュベーションを行った．その後，遠心分離→上清液の除去→細胞ペレットの再懸濁を合計 3 回行い，未吸着のタンパク質を除去した．得られた赤血球サンプルをフローサイトメトリー解析した．これにより，化学固定の有無が血液型糖鎖などに対して及ぼす影響を検討した．

研 究 成 果

1. パラホルムアルデヒド固定化赤血球

通常の赤血球の形は円盤型（図 2 左）である．しかし，保存血液から分離精製して得られる赤血球は，ウニ型（図 2 中央）および球型（図 2 右）を示すものがほとんどであった．ウサギの場合はウニ型，ヒツジの場合は球型の赤血球が多く

Fig. 2 Scanning electron micrograph (SEM) images of chemically fixed rabbit-RBC with three different shapes: biconcave discocyte, spiculated echinocyte, and sphere, from left to right.

観察された。この主な原因として、赤血球内のアデノシン三リン酸 (ATP) の低下が指摘されている (水上, 1993)。

そこで、赤血球内 ATP を制御することにより、赤血球の形態制御を目指した。このため、リン酸緩衝生理食塩水にいくつかの濃度条件でグルコース、イノシン、およびアデニンを添加し、ヒツジ赤血球をインキュベーションした。この結果、赤血球内 ATP の制御によって赤血球の形態をある程度制御することが可能であることがわかった。

2. 赤血球膜へタンパク質の吸着

全 8 頭のヒツジの血液型判定を行ったが、オモテ判定における赤血球凝集反応の陰性・陽性の判断がしばしば困難であり、ある 1 頭を除いて 3 種類の判定法による結果がすべて同じとなる個体はなかった。総合的に検討し、全 8 頭のヒツジのうち B 型が 2 頭、O 型が 6 頭という結論に至った。

3. 赤血球膜へタンパク質の吸着

本実験項目の遂行直前に B 型のヒツジ 2 頭がともに死んでしまい、B 型赤血球の入手が不可能となってしまった。このため以下では、O 型赤血球のみを用いた実験結果を示す。

そのままの赤血球 (Intact RBC) または化学固定された赤血球 (Fixed RBC) に対する蛍光標識タンパク質 (GS-I, UEA-I, BSA) の吸着質量の相対値を図 3 に示す。Intact RBC では、BSA が高い吸着量を示し、GS-I および UEA-I の吸着量はほぼ同じで BSA の吸着量の 1/2 以

Fig. 3 Relative amount of proteins (GS-I, UEA-I, or BSA) adsorbed on an intact sheep-RBC (a) and a chemically fixed sheep-RBC (b) as a function of protein concentration.

下であった ($BSA > UEA-I = GS-I$)。用いた赤血球は O 型であったため、 $UEA-I > GS-I > BSA$ という吸着量の順序を予想していたが、実際の結果は違っていた。フローサイトメトリーによる解析結果をよく見ると、やはり H 抗原認識レクチンである UEA-I は O 型の赤血球どうしの凝集を引き起こしていたが、一方、GS-I および BSA による O 型赤血球の凝集はほとんど見られなかった。

Fixed RBC に対する GS-I および UEA-I の吸着量は、Intact RBC に対する吸着量とほぼ同じであった。一方、BSA の吸着量は赤血球の化学固定により著しく減少し、GS-I および UEA-I の吸着量とほぼ同じになった。これらのタンパク

質による Fixed RBC どうしの凝集は観察されなかった。

以上の結果は、(1) 赤血球のパラホルムアルデヒド固定により、赤血球膜上に存在するタンパク質の構造や赤血球膜自体の構造が変化すること、(2) 膜タンパク質に結合している血液型糖鎖は、パラホルムアルデヒドの影響を受けにくいこと、を示唆している。今後、血液型糖鎖の認識タンパク質（本研究では GS-I と UEA-I）を分離精製することを目的として赤血球を利用するためには、さらに詳細な検討が不可欠である。

参考文献

- Kamata K., Piao Z., Iyoda T., Biotemplating process for 3D structured materials, *Nippon Gomu Kyokaishi*, 87 (2014) 140-145. <https://doi.org/10.2324/gomu.87.140>
- 水上 茂樹, 赤血球の生化学 第2版, 東京大学出版会, 1993, pp. 5-6, ISBN: 4130632094.
- 奈良 信雄 (監修), ぜんぶわかる血液・免疫の事典, 成美堂, 2017, pp. 34-35, ISBN: 4415322646.
- 八木 史郎, “レクチン活性の測定法”, レクチン研究法, 学会出版センター, 2007, pp. 57-77, ISBN: 4762230545.

外部発表成果

論文発表

1. Seto H., Saiki A., Kamba S., Kondo T., Hasegawa M., Miura Y., Hirohashi Y., Shinto H., Amplification of sensor signals from metal mesh device with fine periodic structure, *Analytical Sciences*, 35 (2019) 619-623.
<https://doi.org/10.2116/analsci.18P498>
2. Shinto H., Fukasawa T., Yoshisue K., Tsukamoto N., Aso S., Hirohashi Y., Seto H., Effect of interfacial serum proteins on the cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, malignant melanocytes, and macrophages, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181 (2019) 270-277.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.067>
3. Shinto H., Fukasawa T., Yoshisue K., Seto H., Kawano T., Hirohashi Y., Effect of exposure temperature on the cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, and malignant melanocytes, *Advanced Powder Technology*, 31 (2020) 835-842.
<https://doi.org/10.1016/j.appt.2019.12.001>

口頭・ポスター発表

1. 新戸 浩幸, 瀧口 未歩, 泊 健人, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, “酵母細胞に対するナノ粒子の付着・取込と毒性のフローサイトメトリー解析”, 化学工学会第83年会 (Osaka, March 13-15, 2018) N117.
2. 新戸 浩幸, “界面プロセス工学から見た粒子・細胞間相互作用”, 化学工学会九州支部特別講演会 (Fukuoka, May 25, 2018).
3. 新戸 浩幸, “液相中の種々の細胞に対する粒子の付着, 取込, 毒性”, H30 年度東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究会微粒子-流体混成系がもたらす多様な機能性 (Sendai, Sept. 6, 2018).
4. 新戸 浩幸, 塚本 七海, 中島 可奈英, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, “フローサイトメトリーおよびコロイドプローブ原子間力顕微鏡法による細胞-粒子間相互作用の評価”, 第69回コロイドおよび界面化学討論会 (Tsukuba, Sept. 18-20, 2018) 2E01.
5. 熊谷 理奈, 増田 優太, 久保 幸毅, 東 将大, 深澤 智典, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, “シリカ粒子の溶血作用のメカニズム解明”, 化学工学会第84年会 (Tokyo, March 13-15, 2019) G317.
6. 兒玉 碧, 増田 優太, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一,

- 新戸 浩幸, “糖鎖修飾粒子のマクロファージへの付着・取込に対する単一粒子レベルでの観測”, 化学工学会第 84 年会 (Tokyo, March 13-15, 2019) PC232.
7. 東納 拓海, 永岡 亜季子, 山本 眞唯, 高寄 亜祐, 瀬戸 弘一, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, “触媒反応を利用した糖鎖高分子の作製およびタンパク質結合性評価”, 化学工学会第 84 年会 (Tokyo, March 13-15, 2019) PC258.
8. 新戸 浩幸, 塚本 七海, 麻生 早紀, 兒玉 碧, 増田 優太, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, “フローサイトメトリーおよびコロイドプローブ原子間力顕微鏡法による機能性粒子の細胞親和性の評価”, 粉体工学会 2019 年度春期研究発表会 (Tokyo, May 9-10, 2019) S-13.
9. 増田 優太, 熊谷 理奈, 久保 幸毅, 東 将大, 深澤 智典, 瀬戸 弘一, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, “シリカ粒子による赤血球の膜破壊のメカニズム解明”, 第 56 回化学関連支部合同九州大会 (Kitakyushu, July 13, 2019) CE-2-045.
10. 兒玉 碧, 増田 優太, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, “マクロファージに対する糖鎖修飾粒子の付着・取込のフローサイトメトリー解析”, 第 56 回化学関連支部合同九州大会 (Kitakyushu, July 13, 2019) CE-2-044.
11. 東納 拓海, 永岡 亜季子, 山本 眞唯, 高寄 亜祐, 瀬戸 弘一, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, “マクロファージに対する糖鎖修飾粒子の付着・取込のフローサイトメトリー解析”, 第 56 回化学関連支部合同九州大会 (Kitakyushu, July 13, 2019) CE-2-047.