

研究成果報告書

研 究 題 目		電気化学的手法を用いた生体成分の集積体の作製とその医療応用	実 施 年 度 H28～H29 年度
代 表 研 究 者	所 属	岡山大学 大学院自然科学研究科 生命医用工学専攻（申請時）	
	氏 名	吉 岡 朋 彦	印

1. 研究の目的・背景

本研究の目的

本研究では、電気エネルギーを使って生体成分（タンパク質や細胞）の安定な集積体を作製するプロセス開発を目的とした。生体成分を電気泳動で集積させるのと同時に、集積の足場となるシリカゲルを電気化学的に形成させる。このプロセスを変動電場（パルス、交流）下で行い、生体成分の安定な複合化を目指す。

研究の背景

シリカゲルの合成方法として、シリコンアルコキシドのゾル溶液に電場を印加し、水の電気分解反応によって発生する OH^- を触媒としてゾルーゲル反応を起こさせる手法が知られている（Shacham, 1999）。この電解ゾルーゲル反応を利用して電極表面にシリカゲルを形成させることができるが、ゾル溶液にタンパク質などの生体成分を共存させることでシリカゲルと生体成分の複合体を作製することも可能である（例えば Harrell, 2004）。このように電極上へ形成させた複合体は、シリカゲルが生体成分を安定に固定化できることを利用して、酵素固定化バイオセンサとして応用可能であることが考えられる。

この電解ゾルーゲル反応は、アルコキシドの縮合反応を酸やアルカリの触媒を添加することなく水の電解を利用して制御できるため、pH 変化で影響を受けやすい生体成分をシリカゲルと複合化させる方法として優位性があると考えられる。一方、従来、本反応は直流電場を用いて研究されてきた。しかし、直流電場では水の電解は連続的に進行するため、電極近傍で急激な pH 変化が起こり、生体成分に影響及ぼす可能性がある。さらに、水の電解では陰極で水素ガスを発生させるため、複合体の形成にも影響を及ぼす可能性がある。

そこで本研究では、水の電解による pH 変化・ガスの発生を穏やかにしつつ、シリカゲルの電解ゾルーゲル反応を進行させるため、パルス電場（矩形波）や交流電場を適用することに着目した。

2. 研究成果及び考察（申請時の計画に対する達成度合を織込む）

変動電場を用いたシリカゲルの電解ゾルーゲル反応制御

シリコンアルコキシドとしてテトラエトキシシラン（tetraethoxysilane; TEOS）、エタノール、硝酸カリウム、水および TEOS の加水分解の触媒として塩酸を混合し、室温で攪拌しながら TEOS を加水分解してゾル溶液を調製した。陰極にチタンシート、陽極に白金シートを用い、電極をゾル溶液に浸漬して電解ゾルーゲル反応を行った。

パルス電場（矩形波）を、電圧 7 V、周波数 0.1~100 Hz、デューティーサイクル 10~50%の条件で印加して、電解ゾルーゲル反応を行ったところ、100 Hz-10%を除く条件において、陰極表面にシリカゲルが形成することを見出した。電極を自然乾燥後に観察したところ、0.1 Hz の条件では形成したシリカゲル内に水の電解で発生する水素ガス由来の気孔が観察されたが、高い周波数では気孔の形成は観察されなかった。走査電子顕微鏡（SEM）観察から、パルス周波数の増加およびデューティーサイクルの減少に伴い、より密なシリカゲルの形成が明らかとなった。一方、低い周波数で高いデューティーサイクルの場合、シリカゲルの微粒子が凝集した形態が観察された。これはパルス条件により、水の電気分解反応の進行が異なるためと推察される。よって、パルス周波数とデューティーサイクルを調整することで、シリカゲルの形態を変えることができることが明らかとなった。

同様のゾル溶液を用いて、交流電場を印加して電解ゾルーゲル反応を行った。交流波形は矩形波とし、周波数 0.1 Hz~100 kHz、デューティーサイクル 50%の条件で、電圧はチタン電極において陰極反応が 10 V、陽極反応が 4 V で起こるよう周期的に出力した。調べたすべての交流条件でシリカゲルの形成が確認されたことから、交流電場を用いた電解ゾルーゲル反応によってシリカゲルの形成に成功した。しかしシリカゲルの形態は、0.1~100 Hz では微粒子が凝集した形態、1~100 kHz では微粒子は見られず緻密なシリカゲルの凝集体であり、交流電場条件により異なった。緻密なシリカゲルの凝集体は、電解ゾルーゲル反応後に凍結乾燥することで、三次元網目構造をもったシリカゲルであることがわかった。以上のことから、パルス電場や交流電場を用いることで、シリカゲルのゾルーゲル反応を制御して、シリカゲルの形態をコントロールできることを明らかにした。

当初の計画通り、交流電場においてもシリカゲルを形成させることができ、形態制御にも成功した。一方で、形態制御のメカニズムを明らかにすることができなかったため、達成度合は 70%である。

シリカゲルと集積させた生体成分（タンパク質）の構造評価

パルス電場を用いた電解ゾルーゲル反応で、モデルタンパク質としてウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) を使ってシリカゲルとの集積体の作製を試みた。TEOS、エタノール、硝酸カリウム、水および TEOS の加水分解の触媒として硝酸を混合し、室温で 3 時間攪拌してゾル溶液を調製した。このゾル溶液に水に溶解させた BSA を添加した。電解ゾルーゲル反応は、周波数 100 Hz、デューティーサイクル 50% の条件でパルス電場を印加して行った。反応後、形成したシリカゲルは液体窒素で凍結させた後、凍結乾燥した。さらに試料中の吸着水を完全に除去するために、室温・減圧下のデシケーター中で P_2O_5 とともに 2 週間保持して絶対乾燥させた。試料は、拡散反射法を用いて赤外分光 (FT-IR) スペクトルを測定した。試料に含まれる BSA の二次構造を解析するため、 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ の領域に検出されるアミド I のピークを、OMNIC ソフトウェア (バージョン 4.1a ; サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いてフーリエセルフデコンボリューションを行い、ピーク分離した。分離したピークはガウス関数でフィッティングし、既報 (Imamura, 2003) に従い BSA の各二次構造成分に帰属した。 α -helix に帰属されるピークの面積割合から、構造変化 (変性度) を見積もった。

パルス電場によって形成したシリカゲルには、FT-IR 測定によりシリカゲルに帰属されるピークに加え、BSA のアミド I とアミド II のピークが検出されたことから、パルス電場によってもシリカゲルと BSA の複合集積化が可能であることが明らかになった。

FT-IR スペクトルにおける BSA のピーク分析により、 α -helix のピーク面積割合を求めたところ、30% であった。BSA の凍結乾燥体の α -helix 割合は 31% であり (Imamura, 2003)、シリカゲルと BSA の複合集積体の α -helix 割合とほぼ一致していた。これは複合集積体中の BSA の変性度が、BSA 単体の凍結乾燥状態とほぼ等しいことを示している。複合集積体は FT-IR 測定前に凍結乾燥および絶対乾燥にさらされているため、パルス電場における電解ゾルーゲル反応およびシリカゲルとの複合化は、BSA の二次構造変化に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

当初の計画通り、変動電場においても生体成分であるタンパク質をシリカゲルと複合集積化でき、タンパク質の構造も安定に保つことができることを示した。一方で、生体成分として細胞の集積化には至ることができなかったため、達成度合は 60% である。

3. 経費の使用状況（申請時の計画に対する実績を記述）

設備備品費

当初計画通りブースト・アンプを購入した。一方、交流電場を用いた電解ゾルーゲル反応の検討をより効率的にすすめるため、2年目に追加でファンクションジェネレータを購入した。

消耗品費

電極用金属および試薬類を購入した。他の経費も併用したため、当初計画より執行金額は少額となった。

旅費

初年度に効率的に研究が進展したことと、消耗品費が計画より少額となったことから、当初計画より多くの国内学会に参加し、情報収集および成果発表を行った。

4. 将来展望（今後の発展性、実用化の見込み等について記述）

本研究では、変動電場（パルス、交流）印加による電解ゾルーゲル反応によって、シリカゲルが形成できることを明らかにし、さらに変動電場下で生体成分（モデルタンパク質）をシリカゲルと複合化した集積体を作することに成功した。電解ゾルーゲル反応はモデルタンパク質の変性（構造変化）に影響を及ぼさないことも示唆された。一方で、細胞集積への応用には検討が至らなかった。しかしながら、電気エネルギーを使った生体成分の安定な集積体作製の基盤技術は確立できたと考えられる。今後、さらに酵素のような他のタンパク質や細胞への適用を検討し、本プロセスの医療応用の可能性を探っていく予定である。

5. 成果の発表（学会での発表、学術誌への投稿等を記載。予定を含む）

【学会発表】

1. 吉岡朋彦、手塚友章、小西敏功、早川聡、“パルス電場を用いた電解ゾルーゲル反応によるシリカ膜の作製”、日本セラミックス協会第 29 回秋季シンポジウム、講演番号 1F18、2016.9.7、広島（広島大学）
2. Tomohiko Yoshioka, Tomoaki Tezuka, Toshiisa Konishi, and Satoshi Hayakawa, "Electrochemical preparation of silica gels as a platform for biosensing applications," IUMRS-ICYRAM2016 (International Conference of Young Researchers on Advanced Materials), No. ABS-415-ICYRAM, 2016.12.13, Bangalore, India
3. 下前真紀、小西敏功、吉岡朋彦、早川聡、“電解ゾルーゲル反応を用いてシリカと複合化したタンパク質の二次構造解析”、日本セラミックス協会基礎科学部会第 55 回セラミックス基礎科学討論会、講演番号 2D12、2017.1.13、岡山（岡山コンベンションセンター）
4. 北永達也、小西敏功、吉岡朋彦、早川聡、“交流矩形波を用いた電解ゾルーゲル反応によるシリカゲルの形成”、日本セラミックス協会 2017 年年会、講演番号 2K02、2017.3.18、東京（日本大学）
5. 吉岡朋彦、下前真紀、手塚友章、小西敏功、早川聡、“パルス電場を用いた電解ゾルーゲル反応によりシリカと複合化したタンパク質の二次構造解析”、日本セラミックス協会 2017 年年会、講演番号 3G09、2017.3.19、東京（日本大学）
6. Tomohiko Yoshioka, Maki Shimomae, Toshiisa Konishi, and Satoshi Hayakawa, "Characterization of secondary structure of protein in silica gel obtained by an electro-assisted sol-gel method," IUMRS-ICAM 2017, No. D5-O28-007, 2017.8.28, Kyoto, Japan
7. 岡本奈々、小西敏功、吉岡朋彦、Aldo R. Boccaccini、早川聡、“電解ゾルーゲル反応を用いたシリカゲルー疎水性タンパク質複合体の作製”、第 24 回ヤングセラミスト・ミーティング in 中四国、講演番号 K.59 (p.119)、2017.12.9、広島（広島大学）

【論文】

論文投稿予定。