

学 位 論 文 題 名

Influence of Shear Flow on the Diffusion and Binding of Ionic Surfactant to Oppositely Charged Gels

（流動場におけるイオン性界面活性剤の電解質ゲルへの拡散・吸着）

学位論文内容の要旨

血管内皮細胞は血管内腔と組織とのバリエーとして存在するほか、酸素、栄養、物質の選択的透過を行っている。近年内皮細胞は血流のずり応力によるさまざまな物質を生産し、血管内腔の抗血栓の維持や平滑筋の収縮・弛緩の調整にきわめて重要な役割を演じていることが明らかとなってきた。しかし、このような血流のずり応力による刺激を情報として受容・伝達することが、どのような機構で起こっているのかはまだ不明である。

血管内皮細胞の表面には糖衣(glycocalyx)という高分子膜が存在している。糖衣の構成成分であるプロテオグイカン(タンパク分子+多糖鎖)の高分子糖鎖が細胞外向かって伸びていることが知られている。プロテオグイカンは糖残基に多くの硫酸基またはカルボキシル基、あるいはその両方を持つため、高度に負電荷を帯びている。私たちは血流のずり応力で、帯電した細胞表面の対イオン分布が変化し、それによって生じた膜電位の変化が細胞の一連の生化学的な反応を引き起こっているのではないかと考えた。

ずり応力による血管中の細胞膜電位変化を直接実験的に測定するのは非常に難しい。本研究では、人工血管モデルとして負電荷を有する電解質ゲルを用い、ずり応力下における界面活性剤のゲルへの拡散・吸着挙動を評価した。これはずり応力によるゲルの表面静電ポテンシャルは界面活性剤の吸着挙動に反映されると考えたためである。

本論文は第1章の序論、第2章から第5章までの本論、第6章の結論で構成される。第2章は強電解質ゲルを用いて、イオン性界面活性剤の電解質ゲルへの拡散・吸着挙動で見たゲル表面電位変化を検討した。第3章は表面にグラフトを有するゲルを用いて、ゲル表面構造の違いに基づいた流動場の効果を検討した。第4章は弱酸電解質ゲルを用いることで、ずり応力における界面活性剤の弱酸電解質ゲルへの吸着挙動を調べた。第5章では、流動場による血管内皮細胞の合成高分子ゲル上の反応を調べるため、様々な合成高分子ゲルを培養マトリックスとして用いて血管内皮細胞の培養を試みた。

第2章では、強電解質ゲルを用いることで、流動場におけるイオン性界面活性剤の電解質ゲルへの拡散・吸着挙動を調べた。その結果、平衡吸着までゲル内部に取り込まれる界面活性剤のモル数(平衡吸着率)はずり応力には依存しないが、界面活性剤がゲル内部に拡散していく初期速度はずり応力に依存している、ずり応力が大きくなると界面活性剤の拡散速度が増加することをはじめて明らかにした。また、Nernst-Planck 方程式を用いて流動場におけるゲルの表面電位変化について検討した。ずり応力が大きくなるとゲル表面電位が低下すること

を明らかにした。これは、ゲル表面附近での対イオン(H^+) (電気二重層の分布)がずり応力の増加に伴って平衡状態から強くずれ、ゲル表面の静電ポテンシャルがさらにマイナスに大きくなり、正電荷を持つ界面活性剤のゲル膜中への拡散流束が加速したためであると考えられる。そして、界面活性剤のゲル内部への吸着速度は、ゲルの電荷密度と塩(NaCl)濃度に依存することを実験的に明らかにした。これらの結果から、ずり応力によるゲル表面の膜電位の変化が界面活性剤の吸着速度を促進すると考えられる。

第3章では、表面にグラフト鎖を持つゲル(graft ゲル)とグラフト鎖を持たないゲル(network ゲル)を用いて、ゲル表面構造の違いに基づいた流動場の効果に焦点を絞り、その検討を図った。その結果、(1) グラフト鎖表面を持つゲルへの界面活性剤の初期流束はグラフト鎖を持たないゲルのそれに比べて小さくなっている。(2) 塩濃度の増加に伴って、ずり応力に対するグラフト膜の応答性は小さくなっていく。さらに、塩濃度は高いときに、グラフト鎖を持つゲルとグラフト鎖を持たないゲルのずり応力に対する応答性はほぼ同じ値になっている。以上の結果から、ずり応力によるゲル表面電位の変化は表面グラフト鎖の存在によって抑制されることが初めて明らかとなった。このような知見は血管内皮細胞表面の糖鎖の割合を理解するのに大変重要であると筆者らは考えている。つまり、糖鎖が血流の変化(ずり応力)をセンシングするだけでなく、血管の機能を安定化するための役割も担っていると考えられる。

第4章では、弱酸電解質ゲルを用いることで、ずり応力における界面活性剤の弱酸電解質ゲルへの吸着挙動を検討した。その結果、(1) ずり応力の増加につれて、界面活性剤の弱酸電解質ゲルへの拡散流束が増加する。この結果とずり応力における界面活性剤の強電解質ゲルへの吸着傾向が一致している。(2) pH の増加につれて界面活性剤のゲルへの拡散速度が増加している。これは pH の増加に伴って弱酸電解質の解離度が増加し、ゲル表面の電気ポテンシャルが低くなる結果、正電荷を持つ界面活性剤のゲルへの拡散速度が増加したと考えられる。

弱電解質ゲルと強電解質ゲルとを比べてみると、界面活性剤のゲルへの拡散流束は弱酸電解質ゲルの方が遅い。この結果から、強電解質ゲルのずり応力応答性が弱電解質ゲルのそれより大きいことが分かった。その理由としては ① 界面活性剤がゲルとのコンプレックスを作る能力の違い。弱電解質ゲルの表面には、解離・未解離の残基が同時に存在している。このため弱酸電解質ゲル表面の電気ポテンシャルは強電解質ゲルのそれと比べて高く、従って、界面活性剤が弱酸基とのコンプレックスを作る能力は強電解質より低い。② 対イオンがゲル-界面活性剤相互作用の速度に及ぼす影響の違い。界面活性剤が弱酸電解質ゲルへ吸着するときに、コンプレックス形成⇄弱酸の解離⇄コンプレックス形成の過程の存在が予想される。この過程において弱酸電解質ゲルから対イオン(H^+)が徐々に放出されたため、界面活性剤が弱酸電解質ゲルの対イオンとのイオン交換速度は強電解質ゲルより遅いと予想される。

第5章では、様々な合成高分子ゲルを培養マトリックスとして用いて血管内皮細胞の培養を行った結果を検討した。その結果、中性のポリビニルアルコール(PVA)、強酸電解質のポリスチレンスルホンナトリウム(PNaSS) とポリ(2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホンナトリウム) (PNaMPS) 上で内皮細胞が非常に良く伸展・増殖することが分かった。さらに一つのゲル中に二重の独立した網目を有するダブルネットワークゲル(DN ゲル)を用いることで高い力学的強度を持ち、なおかつ高い細胞適合性を有する高分子ゲルの作成に成功した。また、細胞の伸展・増殖とゲルの架橋密度、表面電荷、細胞増殖タンパク質の吸着能力の関係を調べた。これらのことから、細胞の伸展・増殖はゲルの血清培地から細胞増殖タンパク質の吸着能力に

依存することが示唆された。

第6章では、本論の内容を総括して結論とした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	龔	劍	萍
副査	教授	長	田	義 仁
副査	教授	川	端	和 重
副査	助教授	佐々木	直	樹

学位論文題名

Influence of Shear Flow on the Diffusion and Binding of Ionic Surfactant to Oppositely Charged Gels

(流動場におけるイオン性界面活性剤の電解質ゲルへの拡散・吸着)

本論文は第1章の序論、第2章から第5章までの本論、第6章の結論で構成される。その要旨は以下の通りである。

ずり応力による血管中の細胞膜電位変化を直接実験的に測定するのは非常に難しいため、第2章は人工血管モデルとして負電荷を有する強電解質ゲルを用いることで、流動場におけるイオン性界面活性剤の電解質ゲルへの拡散・吸着挙動を検討することにより、ずり応力によるゲルの表面電位変化を評価した。その結果、(1) 平衡吸着までゲル内部に取り込まれる界面活性剤のモル数(平衡吸着率)はずり応力には依存しない。この結果からずり応力はゲルのバルクの性質に影響しないことがわかった。(2) 界面活性剤がゲル内部に拡散していく初期速度はずり応力の増加とともに線形的に増大する。そして、平衡吸着までの時間もずり応力の増加とともに短くなった。これらのことから、ずり応力が大きくなると界面活性剤の拡散速度が増加することをはじめて明らかにした。

更には、Nernst-Planck 方程式を用いてことで、流動場におけるゲルの表面電位変化について検討した。ずり応力が大きくなるとゲル表面電位変化の絶対値が増大することを明らかにした。これは、ゲル表面附近での対イオン (H^+) (電気二重層の分布) がずり応力の増加に伴って平衡状態から強くずれ、ゲル表面の静電ポテンシャルがさらにマイナスに大きくなり、正電荷を持つ界面活性剤のゲル膜中への流束が加速したためであると考えられる。そして、界面活性剤のゲル内部への吸着速度は系のイオン強度の増加とともに減少し、初期流束の傾きもイオン強度の増加とともに減少することを実験的に明らかにした。これはイオン強度の増加につれて、ゲル表面の電気二重層の厚さが減少し、ずり応力によるゲル表面の電荷分布の変化が難しくなり、ずり応力の効果が低下されると考えられます。このことより、ずり応力は界面活性剤とゲル間

の電気二重層に影響すると考えられる。これらの結果から、ずり応力によるゲル表面の膜電位の変化が界面活性剤の吸着速度を促進すると考えられる。

このように、ずり応力による電解質膜電位変化を界面活性剤のゲル内部へ拡散・吸着という現象でもって巨視的に観察されたことは非常に意義深い。

血管内皮細胞表面の glycocalyx という高分子のグラフト鎖はずり応力に応じて、血液中の物質の血管への拡散挙動にどのように影響するのかを調べるため、第3章では、表面にグラフト鎖を持つゲル(graft ゲル)とグラフト鎖を持たないゲル(network ゲル)を用いて、ゲル表面構造の違いに基づいた流動場の効果に焦点を絞り、その検討を図った。その結果、(1) 表面グラフト鎖を持つゲルへの界面活性剤の初期流束のずり応力応答性はグラフト鎖を持たないゲルのそれに比べて鈍感である。このことは二つの原因が考えられる。ひとつは、グラフト鎖は溶媒中の運動性が高いため、ずり応力に応じて、その周囲にある対イオンもグラフト鎖の運動に伴って動き、そのため対イオンがグラフト鎖で構成される粘性層中で平衡状態からずれるのが難しくなり、ずり応力に対する効果が小さくなると考えられます。もう一つの原因は、グラフトを持つゲル表面の電荷がグラフト鎖を持たないゲルに比べて均一ため、ずり応力によるゲル表面電場の変化が小さくなったからだと考えられます。(2) イオン強度の増加に伴って、ずり応力に対するグラフト鎖の応答性は小さくなっていく。さらに、高いイオン強度とき、グラフト鎖を持つゲルとグラフト鎖を持たないゲルのずり応力に対する応答性はほぼ同じ値になっている。この現象は、電解質グラフト鎖が塩の静電遮蔽効果を受けて、セグメントの静電的反発力が弱まり、グラフト鎖が収縮し、グラフト鎖を持つゲルはグラフト鎖を持たないゲルに近似した表面構造に転移し、グラフト鎖の効果が見えなくなったのではないかと考えられます。このようなゲル表面構造の変化がゲル表面摩擦係数の変化で証明された。以上の結果から、ずり応力によるゲル表面電位の変化は表面グラフト鎖の存在によって抑制されることが初めて明らかとなった。

細胞表面に存在している glycocalyx の構成成分である糖残基は多くの硫酸基持つ以外、カルボキシル基のような弱酸基も持っていることが知られている。第4章では、弱酸電解質ゲルを用いることで、ずり応力における界面活性剤の弱酸電解質ゲルへの吸着挙動を検討した。その結果、(1) ずり応力の増加につれて、界面活性剤の弱酸電解質ゲルへの拡散流束が増加する。この結果とずり応力における界面活性剤の強酸電解質ゲルへの吸着傾向が一致している。(2) pH の増加につれて界面活性剤のゲルへの拡散速度が増加している。これは pH の増加に伴って弱酸電解質の解離度が増加し、ゲル表面の電気ポテンシャルが低くなる結果、正電荷を持つ界面活性剤のゲルへの拡散速度が増加したと考えられる。この結果から、界面活性剤のゲルへの拡散速度はゲル表面の電気ポテンシャルによって支配されることが分かった。

これらの知見は血管機能を解明するために重要と考えられる。例えば、ひとつの例としてはずり応力が血管内皮への物質の取り込みを加速するか、イオン強度の増加に伴って物質の取り込み速度のずり応力の応答性が減少する。もひとつの例としては、

表面グラフト鎖を持つゲルはずり応力に鈍感であることから、血管表面の糖鎖が、血流の変化をセンシングするだけではなく、血管の機能を安定化する役割も果たしているのではないだろうかと考えられる。

著者は、これまで直接実験的に測定できなかったずり応力による電解質膜電位変化を実験的に見出した。そして、ずり応力における界面活性剤の電解質ゲルへの拡散・吸着挙動を系統的かつ独創的な実験を行ったことで、学術的に価値ある新知見を多く得るに至った。よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。