

背景

ツリガネムシの収縮

Ca²⁺ absorption

Ca²⁺ removal

特徴

- Zooid(個虫) : 20~40 μm
- Stalk(柄) : 0~200 μm
- 収縮時のCa²⁺濃度 : 10⁻⁸~10⁻⁵ M
- 収縮時ATP不要
- 死滅後も収縮可能

電気化学刺激電極の開発

- 電圧制御
- 刺激物質(イオン)のみを放出
- 細胞一個レベルでの局所刺激が可能

CCD型pHイメージセンサ

- イオン濃度を可視化
- リアルタイムで測定可能
- イオン感応膜の作製により様々なイオンに反応

Ca²⁺, K⁺, ACh⁺ etc...

90 sec 390 sec

電圧印加直前 電圧印加後

The Ca²⁺-releasing device

0 s 300 s

樹脂のCa²⁺回収

- 樹脂には多くの種類があり、樹脂によって特徴や特性が大きく異なる
- 工業分野で広く使用されている⇒各特性により、適する用途が分かれる

(用途)・純水・軟水製造の水処理・廃水処理・医薬品・食品の精製、触媒・塩水精製・薬液精製・ホウ酸除去 etc

強酸性陽イオン交換樹脂

H⁺型 Na⁺型

樹脂の分子中の-SO₃H基によりH⁺をNa⁺やCa²⁺に交換できる

イミノ酢酸型キレート樹脂

吸着前 吸着後

キレート(錯体)を形成して金属イオン(Ca²⁺)を捕縛する

目的

イオン交換およびキレート樹脂のCa²⁺回収特性を評価し、ツリガネムシでの試験を行う

樹脂によってCa²⁺回収挙動が異なる

樹脂のCa²⁺に対する動的特性を評価する

樹脂の評価方法

センサによる測定

CCD型pCaイメージセンサの作製

POSS下地膜の組成溶液I			Ca ²⁺ 感応膜の組成溶液II		
試薬	組成比	重量比	試薬	組成比	重量比
POSS	10.0 mg	30 wt%	PVC	16.0 mg	
トルエン	5 mL		DOPP	10.8 mg	
THF		70 wt%	HDOPP-Ca	1.2 mg	
			THF	2 mL	

105℃のホットプレート上で溶液Iを加熱しながら、30 μL (10 μL×3) pHセンサ上に滴下

溶液IIを50 μL (10 μL×3) pHセンサ上に滴下

12時間室温で乾燥

12時間コンディショニング

樹脂の設置

1. 樹脂一粒を測定溶液に24時間漬ける
2. 棒の先端に接着剤で固定
3. 高さ調節可能なマニピュレーターに固定
4. 測定開始から30秒でセンサに近づけ、測定開始から330秒でセンサから遠ざける

シミュレーション

実際の系との比較

	実験	シミュレーション
参照電極(センサ)	Ag/AgCl(sat.KCl)	-
樹脂サイズ	直径0.8 mm	-
計測時間	360 sec	-
樹脂の投下	開始: 30 sec 終了: 330 sec	-
測定溶液	CaCl ₂ 1 mM Tris-HCl 10 mM(pH7.4)	-
初期濃度(Ca ²⁺)	10 ⁻³ M	-
樹脂-センサ間距離	50 μm	56.2 μm
センサ長さ	4.8 mm × 4.8 mm	4.8 mm × 4.8 mm
ピクセル数(XY平面)	128 × 128	172 × 172
微小時間	0.035 sec	0.1 sec

拡散方程式 (前進差分法)

$$C_x^t = C_x^{t-1} + D\Delta t \frac{C_{x+1}^{t-1} - 2C_x^{t-1} + C_{x-1}^{t-1}}{\Delta x^2}$$

C:濃度/M, t:時間/sec, x:距離/m, D:拡散係数/m²s⁻¹

3D model

XZ Plane

XY Plane

格子点は立方体
Δx = Δy = Δz = 28.1 μm
CaCl₂の相互拡散係数 D = 1.3 × 10⁻⁹ m²s⁻¹
を用いて拡散方程式の計算を行う

結果

実測

イオン交換樹脂 (Na⁺型)

測定開始 測定終了

測定表示ピクセル
樹脂の直下 座標X: 69 Y: 106
樹脂の近傍 座標X: 63 Y: 111
樹脂から遠方 座標X: 24 Y: 11

シミュレーション

2Dイメージング

測定開始 測定終了

シミュレーションの条件は、Ca²⁺回収領域の濃度を常に0 (無限希釈) とした

測定表示ピクセル
樹脂の直下 座標X: 86 Y: 86
樹脂の近傍 座標X: 101 Y: 86
樹脂から遠方 座標X: 16 Y: 16

キレート樹脂

測定開始 測定終了

測定表示ピクセル
樹脂の直下 座標X: 55 Y: 88
樹脂の近傍 座標X: 50 Y: 84
樹脂から遠方 座標X: 95 Y: 124

イオン交換樹脂(Na⁺型)

Ca²⁺の吸収量: log₁₀[Ca²⁺] -3.2→-4.5
その到達時間: 265秒 (40→305秒)

キレート樹脂

Ca²⁺の吸収量: log₁₀[Ca²⁺] -3→検出下限(-7)
その到達時間: 11秒 (35→46秒)

両者の結果から
キレート樹脂はイオン交換樹脂よりCa²⁺の吸収速度が速く、その吸収量も多い

実測とシミュレーションの比較

樹脂の直下におけるCa²⁺濃度変化 (実測は樹脂から遠方での濃度変化を考慮)

シミュレーション

Ca²⁺の吸収量: log₁₀[Ca²⁺] -3→-4.5
その到達時間: 138秒 (30→168秒)

樹脂直下のピクセルでイオン交換樹脂の実測結果とシミュレーションの結果はおおよそ一致 (330秒後の不一致は、樹脂の引き上げ時の攪拌による影響)

しかし、キレート樹脂とは明らかに一致しないことからイオン拡散以外の現象が生じてCa²⁺を回収したと考えられる

ツリガネムシの実験

ツリガネムシへの処理

1. シャーレ中に24時間ほどかけて定着させる
2. 洗浄後、透膜処理を行う
3. Ca²⁺を含む洗浄液で柄を収縮させる

処理溶液	
	組成
培養液	小麦草粉末+純水(100 mg/L)
洗浄液	100 mM KCl 4 mM EGTA 50 mM Tris-malate (pH7.0)
透膜液	0.1% (w/w) saponin 0.1 M KCl 4 mM EGTA 50 mM Tris-malate (pH7.0)
収縮液	3 mM CaCl ₂ 100 mM KCl 4 mM EGTA 50 mM Tris-malate (pH7.0)
測定液	10 mM NaCl 50 mM Tris-malate (pH7.0)

樹脂の投下直前

柄の膨張の開始

柄の膨張の終了

ツリガネムシの柄の膨張は、樹脂の投下から約80秒後に確認された