

	みずのまや	
氏名	水野麻弥	
授与学位	博士(工学)	
学位授与年月日	平成18年3月24日	
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項	
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科(博士課程) 電気・通信工学専攻	
学位論文題目	ミリ波の吸収特性を利用した生体応用計測に関する研究	
指導教員	東北大学教授 松木 英敏	
論文審査委員	主査 東北大学教授 松木 英敏	東北大学教授 荒井 賢一
	東北大学教授 吉澤 誠	

論文内容要旨

1. はじめに

現在、医学研究等に用いられる動物細胞や組織の凍結保存では、氷結晶の生成による細胞の物理的破壊を防ぐためにDMSOやグリセロールなどの保護剤を使用している。しかし、このような凍結用保護剤の使用濃度や凍結速度は、細胞や培地の種類によって異なる。そのため、従来の凍結・解凍プロセスの最適化では、凍結解凍後の生存数を計測するなどして経験的にプロトコルを作成しており、非効率的であるうえに高い生存率の実現にも時間と労力を要するのが現状である。そこで、ミリ波(周波数30-300 GHz)の水・氷に対する吸収特性の違いを利用した非接触の凍結状態リアルタイムモニタリング技術を用いて、物理的な細胞破壊が最小となるような保護剤濃度や凍結解凍速度の定量的な決定を目指して研究を行った。

ミリ波・マイクロ波といった電波領域の電磁波は非金属物質に対して高い透過性を示し、様々なセンシングへの応用が検討されている。中でもミリ波は、波長が比較的短く良い空間分解能が得られるうえ、コンポーネントが小型で取り扱い易い。また、近年、車載衝突防止用レーダー等への実用化が進んだことで、コンポーネントの低価格化も進んでいる[1]。これらのミリ波機器の需要増加に伴うコンポーネントの高性能化、ユーザーフレンドリー化を背景に、我々は、農業・工業など様々な分野におけるミリ波の診断・検査応用の開拓を行っている。特に、上記のようなミリ波の水と氷の吸収特性[2][3][4]を利用した生体サンプルや冷凍食品の凍結解凍サイクル最適化などを目指したミリ波研究を進めている[5][6]。

本研究では、水に対して感度が良く、かつ、水と氷の吸収係数の差が大きい周波数35 GHzを用いて透過量測定装置を構築し、ミリ波の吸光度によってDMSOを添加した培地の凍結の様子をモニタリングできることを確認した。また、モニタリングに用いるミリ波の細胞への影響についても検討を行った。

2. ミリ波透過量測定装置

構築したミリ波透過量測定装置の概略図を図1に示す。光源にガン発振器(TERABEAM HGN 35.021022, パワー: 10 mW, 35 GHz)を使用し、矩形ホーンアンテナを用いてミリ波を空間伝搬させてサンプルに入射した。透過波は同型のホーンアンテナでパワーメータ(ANRITSU ML2438A)に集光して信号強度を検出している。また、送信側と受信側のホーンアンテナの間隔は波長以下(約8 mm)とし、外部へのロスを少なくした。また、サンプルの凍結状態を実現するために、ホーンアンテナ部分を冷凍庫内に設置した。これにより、約+20度から-17度の範囲でサンプルの温度を変化できる構成となっている。サンプルは、液体の状態ですべてのポリスチレン膜(膜厚100 μm)で挟まれたケース(SANYO Opti Cell)に10 ml挿入した。この時のサンプル厚は約2 mmである。また、サンプルの凍結・解凍は端から中心に向かって起こるため、凍結・解凍過程における水や氷の温度は測定領域(矩形5.5×4.5 cm)の端と中央とで約3℃の差が生じる。そこで本実験では、サンプル温度として測定領域の平均温度に近い値を取得するため、中心から約1.2 cm離れた位置の温度を熱電対により測定した。

3. 実験結果と考察

3.1. DMSOを添加した培地の凍結モニタリング

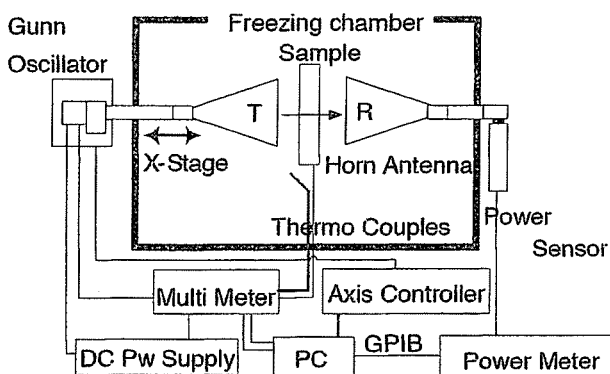


図1 ミリ波透過量測定装置

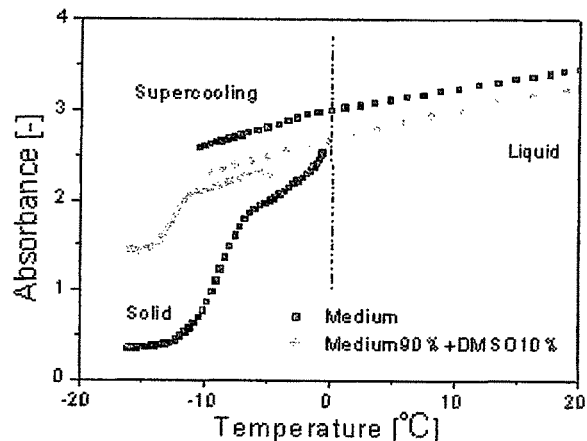


図2 培地と DMSO を添加した培地の相転移（液相→固相）のモニタリング

はじめに、DMSO を添加した培地が液体から固体へ転移する際のミリ波吸光度の変化を温度と共に観測した。培地は、粉末培地（RPMI1640）を純水で溶かし、それに血清（FBS 5%及び HS 10%）を加えたものを使用した。実験では、冷凍庫内にサンプルをセットした後、庫内を+20 °Cから-17 °Cまで冷却し、培地が凍結する様子をモニタリングした。

図2に、測定で得られた温度とミリ波吸光度の関係を示す。■が培地のみ、●が DMSO を添加した培地を示している。ここでミリ波吸光度 A は、入射強度を I_i 、透過強度を I として、

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_i}{I} \right) \quad (1)$$

で与えている。図からわかるように、冷却過程において、液相では温度低下に応じてミリ波の吸光度が緩やかに下降し、液体のまま約-10°Cまで過冷却した後、融点に戻り固相に移行している。培地の融点はそれぞれ約-0.5度、-4.8度であり、DMSO を添加した培地では転移温度が0°Cに比べ有意に低くなっていることが確認された。また、-13度付近までミリ波吸光度は緩やかに下がり続けており、この温度まで氷の結晶状態が変化し続けた様子を反映していると考えられる。DMSO を添加したサンプルの特徴として、転移温度以下で温度が低下する際、吸収の低下の傾きが緩やかになっていること、及び、完全凍結後の吸光度が大きいことが挙げられる。このことは、DMSO を加えたときの融点が-4.8°Cと低いために凍結濃縮によって氷結晶化が水に対して相対的に緩やかに進んだこと、また、DMSO 添加により格子の自由度が比較的大きい結晶が生成され、結果として氷結過程において細胞の破壊を防ぐ効果につながっていることを反映していると考えられる。以上より、ミリ波を用いた測定において、温度低下時の吸光度変化の傾き、及び、完全凍結時の吸光度のモニターにより、凍結保護剤添加による培地の氷結過程の違いをモニターできることを確認した。

次に、DMSO の濃度を広範囲に変化させ、完全凍結後のサンプルのミリ波吸光度を比較した結果を図3(a)に示す。各サンプルは、DMSO 濃度を調整した後、-80度の冷凍庫に投入して急激に凍結した。凍結開始から3時間後、サンプルを透過量測定装置に設置し、サンプル温度約-40度においてサンプルの吸光度を測定した。その結果、ミリ波の吸光度はDMSO 濃度60%付近において最大となることがわかった。さらに、ミリ波吸光度と結晶状態を比較するため、DMSO 濃度0%、60%、100%における結晶のクロスニコル写真をそれぞれ×1で撮影した(図3(b))。DMSO 濃度0%と100%の写真からは、結晶サイズや成長方向を確認することができたが、濃度60%においては結晶の存在を確認することができなかった。つまり、ガラス化に近い状態であったと考えられる。これらの結果から、ミリ波はDMSO を加えたことによる凍結後の結晶性の違いを識別し、さらに、細胞を凍結する上で最適と言われるガラス化に近い状態を判別できたと考えられる。

3.2. DMSO の凍結濃縮度計測

本実験では、前節の結果を踏まえて冷却速度によるDMSOの濃縮度の違いをミリ波の吸光度によって検出することを試みた。一般に、DMSOは緩慢凍結法において約10%濃度で使用されている。しかし、冷却速度によっては氷結過程でDMSOが凍結濃縮され、DMSO濃度が低い位置に存在する細胞は氷結晶によって物理的破壊を受けてしまう。これによる生存率の低下を事前に回避するため、我々はDMSOの濃縮度とミリ波吸光度の関係を調べ、吸光度によって濃縮度をモニタリングできることを確認した。サンプルとしてDMSO濃度10%の培地を使用した。

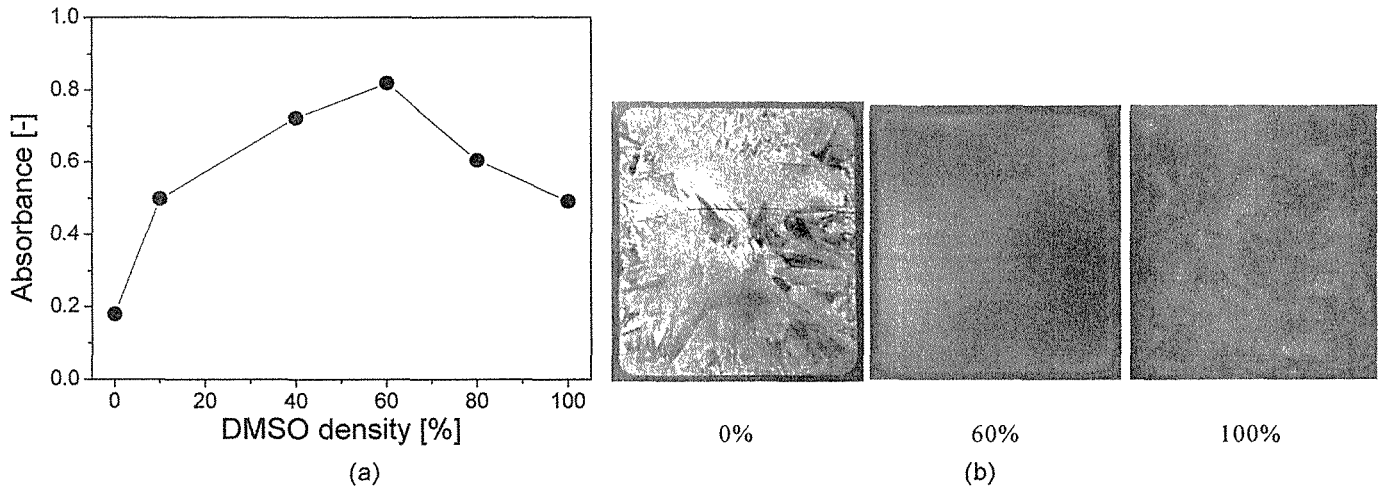


図3 DMSO濃度による結晶の吸収特性と状態

まず、約2時間かけて -80°C まで一度緩慢冷却した(約 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)サンプルと、約30分で同じ温度まで急速冷却したサンプルの濃縮度の判別を試みた。その結果、約 -30°C における吸光度はそれぞれ0.6、0.4となり、冷却速度が速いサンプルの吸光度が低くなる傾向を得た。これは、冷却速度が速いほど、DMSOや培地成分がサンプルの中央に濃縮され、測定範囲内にDMSO濃度の低い領域が増えたためと考えられる。実際に、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫(PC12)という細胞(約 2.5×10^4 個)を、培地と共にOpti Cellに注入し、上記と同じ条件で冷却して細胞の生存率を確認した。それぞれのサンプルを約 -80°C で4日間保存した後、自然解凍して細胞数をカウントした。解凍後の細胞は、10 mlの保存液と共に抽出し、遠心分離(3000 rpm, 2分)後、4 mlの培養液に浮遊させてから血球盤によりカウントを行った。緩慢凍結における生存率は約95%、急速凍結では約85%となった。この結果からも、細胞の凍結保存において濃縮度を定量的に観測し、制御することが必要であると考えられる。

さらに、視覚による判別が困難な濃縮度のモニタリングを試みた。サンプルの冷却速度を冷凍庫のコントローラーにより変化させ、各サンプルのミリ波吸光度の変化を観測した結果を図4に示す。サンプル温度は、 25°C から -14°C まで変化させた。図からわかるように、長い時間をかけて凍結したサンプルほど、完全凍結後の吸光度が大きいということが再度確認できた。これは、冷却速度に応じた濃縮度や結晶状態を反映していると考えられる。これらの結果から、ミリ波を用いて冷却速度による凍結濃縮の違いを判別できたと考えられる。また、長い時間をかけて凍結することにより、完全凍結後の吸光度が大きく、濃度が均一なサンプルを作成できることが確認できた。ただし、生体サンプルの場合、毒性のあるDMSO溶液中で長時間生きさせることは困難であるため、濃縮度と毒性による生存率のバランスが最も良い冷却速度を選択する必要がある。

以上の実験から、凍結用培地の凍結状態および濃縮度をミリ波吸光度によって観測することが可能であることがわかった。サンプルや凍結速度が異なることで、ミリ波の吸光度の変化に違いが生ずるが、各サンプルの特性をデータベース化することで凍結状態を非接触で定量的に判断することができると考えられる。これらの結果は、ミリ波凍結モニタリングにより、生体サンプルなどの凍結速度の最適化、冷凍保存中の品質管理が可能になることを示している。

3.3. ミリ波の細胞への影響

本実験では、1967年にドイツのフレーリッヒが提唱した細胞膜共鳴振動仮説[7]を基に、ミリ波の細胞への非熱的影響について調査した。具体的には、低出力($1\mu\text{W}$ 以下)のミリ波をラット副腎髄質由来褐色細胞腫(PC12)に照射し、ミリ波照射による静止膜電位(イオンの濃度勾配)の変動を観測した。陽イオン(Na^+)の勾配は、細胞の体積調節や糖・アミノ酸の細胞内への輸送の駆動力として利用されるなど生命活動において重要な役割を果たしており、細胞への影響を調べる大切なパラメータの一つと言える。ここでは、イオンチャネルや $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの働きによる陽イオンの細胞内外における分布の変化を、蛍光色素DiBAC₄(3)を用いて共焦点レーザー顕微鏡によりリアルタイムで測定した。照射するミリ波の周波数は、100GHzから10GHzまで10秒毎に0.1GHz変化させ、静止膜電位の周波数依存特性を調べた。PC12細胞は、液体培地(RPMI-1640, 5% FBS, 10% HS)を用いてインキュベーター(CO_2 濃度5%, 温度 37°C)で培養し、蛍光強度を測定する約7時間前、DiBAC₄(3)(0.2mM)を添

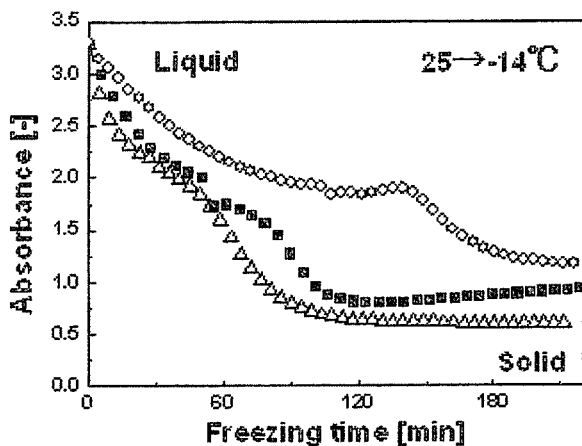


図 4. 冷却速度による吸光度の変化

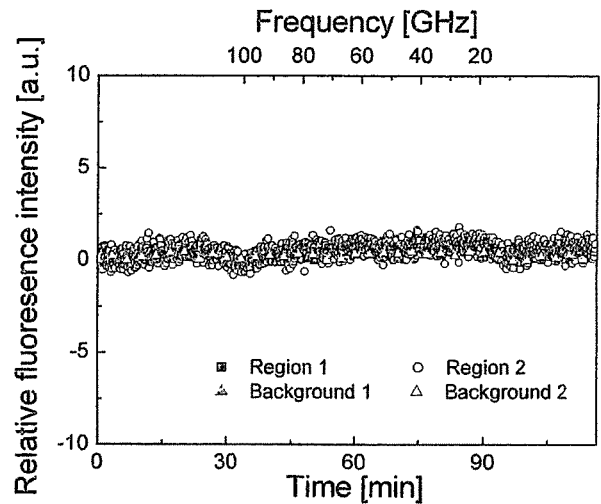


図 5. ミリ波照射による PC12 の膜電位変化

加した初期培養と同様の液体培地に交換して、培養を続けたものを使用した。膜電位計測時には、細胞の静止膜電位をできるだけ一定に保つため、CO₂および温度をそれぞれコントローラーにより、約 5%、 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に設定した。また、ミリ波の培地における吸収を考慮し、培地の厚さを約 1mm に減らして測定を行った。

細胞塊の平均的な蛍光強度変化を観測した結果を図 5 に示す。培地からの蛍光強度 (バックグラウンド) と同様の揺らぎが観測されたが、周波数に依存した大きな膜電位の変化は見られなかった。周波数 (30, 35, 40, 60, 76GHz) を固定して長時間照射した場合や、単細胞および分化後 (神経細胞) の膜電位の変化を観測した場合にも同様の結果が得られたことから、ミリ波が PC12 細胞の静止膜電位に大きな影響を及ぼす可能性は低いということが示された。

4. まとめ

本研究では、ミリ波透過量測定装置の構築を行い、細胞凍結用培地の凍結状態判別技術を提案し、その応用への可能性を実験により検討した。その結果、ミリ波吸光度の変化をモニタリングすることにより、DMSOを加えた培地のDMSO濃度による結晶性の違いを識別することが可能であるということが確認できた。また、この特性を利用して細胞の生存率に大きく関わる冷却速度によるDMSOの濃縮度の違いを判別することが可能であるということがわかった。さらには、モニタリングに使用するミリ波電磁波の細胞に対する安全性を照射実験により確認した。これらの結果から、ミリ波を用いた凍結モニタリング法を用いることより、細胞や組織の凍結プロトコルを定量的に作成できる可能性が示めされた。

今後、ミリ波を用いた凍結状態判別技術の実用化に向けて、測定装置の改良や定量性について検討を行う予定である。

文 献

1. H. H. Meinel, "Commercial Applications of Millimeterwaves History, Present Status, and Future Trends," IEEE Transactions on Microwave Theory & Techniques, Vol. 43, 1639-1653, 1995.
2. C. Zhang, K.-S. Lee, X.-C. Zhang, X. Wei and Y. R. Shen, "Optical constants of ice Ih crystal at terahertz frequencies," Appl. Phys. Lett., Vol. 79, 491-493, 2001.
3. S. G. Warren, "Optical constants of ice from the ultraviolet to the microwave," Appl. Opt., Vol. 23, 1206-1225, 1984.
4. M. R. Querry, D. M. Wieliczka and D. J. Segelstein, "Water (H₂O)," Handbook of optical constants of solids II, 1059-1077, 1991.
5. M. Mizuno, K. Shindo, Y. Ogawa, C. Otani, K. Kawase, "Monitoring of water content and frozen state by using millimeter wave absorption features," T. IEE Japan, Vol. 125-E, 229-233, 2005.
5. Maya Mizuno, Chiko Otani, Kodo Kawase, Yousuke Kurihara, Kenji Shindo, Yuichi Ogawa, Hidetoshi Matsuki, "Monitoring the frozen state of freezing media by using millimeter waves," Journal of Electromagnetic Waves and Applications, vol. 20, 341-349, 2006.
7. H.Fröhlich, "Further evidence for coherent excitations in biological systems", Physics Lett., 110A, 480-481, 1985.

論文審査結果の要旨

生体組織の凍結保存は次世代の再生医療にとっても必須の技術である。細胞や組織を高い生存率で凍結保存するためには、細胞種に最適な凍結プロトコルを作成することが不可欠であるが、従来の凍結プロセスでは、凍結解凍後の生存細胞数をカウントするなどして経験的にプロトコルを作成しており、非効率的であるうえに高い生存率の実現にも多大な時間と労力を要するのが現状である。また、氷結晶による細胞の物理的破壊と凍結状態との関係について未だ解析が不十分であるなどの問題があり、非接触で凍結状態を容易にリアルタイムモニタリングし、凍結プロトコル作成の定量化や凍結解析を行える技術が求められている。本論文は、定量的な細胞の凍結プロトコル作成を目的として行った、ミリ波の吸収特性を利用した培地や細胞等の凍結状態モニタリングに関する研究や、その使用周波数の細胞への影響調査についてまとめたものであり、全編7章よりなる。

第1章は総論である。

第2章では、誘電体に電磁波を照射したときの誘電分極と電磁波吸収の関係について述べ、水のミリ波吸収特性を利用した水溶液の相転移観察の可能性について考察した。その結果、ミリ波は極性分子である水に対して敏感であり、かつ、水と氷の吸収係数の差を利用してミリ波の吸光度測定によって水と氷を感度良く識別できることを明らかにした。このミリ波の吸収特性を用いた相転移観察方法は、非接触で簡便に行えるため、実用化に有利な手法であると言える。

第3章では、ミリ波の吸光度測定装置を構築し、水や凍結保護剤 Dimethyl sulfoxide (DMSO) を加えた水溶液などの相転移や凍結状態を観測できることを実験的に明らかにした。ミリ波によって物質の相転移をリアルタイムで観察した報告は今までに無く、この相転移モニタリングの結果は優れた成果と言える。

第4章では、細胞の凍結プロトコル作成を目的として、DMSO を加えた細胞凍結用培地の相転移モニタリングや凍結状態の計測を行った。その結果、DMSO 濃度や、冷却速度による凍結状態や濃縮の違いを、ミリ波の吸光度計測によって検出できることを明らかにした。また、凍結濃縮による細胞の生存率の違いを数値的に表すことができ、ミリ波による凍結モニタリングによって生存率を予測できる可能性を示すことができた。

第5章では、細胞膜共鳴振動仮説に代表されるミリ波暴露による細胞への非熱作用調査を行う必要性について検討を行った。その結果、仮説検証には信頼性の高い広帯域波長可変コヒーレントミリ波光源が不可欠であることを明らかにした。

第6章では、前章で得られた結果を基に、凍結モニタリングに用いた周波数 35GHz を中心に遺伝子発現や細胞膜電位に対して影響調査を行った。それぞれの照射実験において、10GHz から 100GHz の電磁波が細胞へ影響を与える可能性は低いということが示された。この結果は、ミリ波の産業応用を検討する上で必要となる安全性データの1つとして役立つといえる。

第7章は結論である。

以上要するに本論文は、細胞や組織の凍結保存における凍結状態計測法としてミリ波の吸光度測定が有効であることを示し、本手法による凍結プロトコルやサンプルの管理、状態評価への応用について述べたものであり、再生医療など次世代医療技術の進歩に貢献し、生体電磁工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。