

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03018

研究課題名(和文)MRマイクロスコピーによる細胞培養中のセルロースヒドロゲルと腐朽木材の観察

研究課題名(英文)Observation of cellulose hydrogel during cell culture and decaying wood by MR microscopy

研究代表者

和田 昌久(Wada, Masahisa)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40270897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核磁気共鳴分光装置用の超伝導磁石と分光計をもとにMRIシステムを構築した。セルロースヒドロゲルにおいて、緩和時間の違いが反映された撮像方法を確立した。木材においては、飽水状態で組織構造の違いが観察でき、また、画像の平均輝度値と含水率の関係性を明らかにし、繊維飽和点以上の木材の含水率推定を可能にした。腐朽木材の撮像にも成功し、X線CT法による観察と組み合わせることで、腐朽の進行を評価できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非破壊、非侵襲で試料内部の構造を観察する手法にMRI法がある。本研究では、自作した高磁場MRIシステムを用いて、セルロースヒドロゲルや木材の内部構造を観察可能にした。このシステムは観察対象を限定しないので、さまざまな生物材料へ適応可能である。また、木材では、高含水率状態で腐朽が進行しやすいことが知られている。本研究は、MRI法により、これまで困難であった高含水率状態の含水率の非破壊推定、腐朽木材の観察を可能にしたものであり、木質科学、セルロース科学、木材保存学の発展に寄与する。

研究成果の概要(英文)：In this study, a magnetic resonance imaging (MRI) system was constructed based on a superconducting magnet and a spectrometer for nuclear magnetic resonance spectroscopy. In cellulose hydrogel, an imaging method that reflects differences in relaxation time of the medium was established. In wood, differences in tissue structure could be observed in the water-saturated state, and the relationship between the mean brightness value of images and moisture content was clarified, enabling the estimation of moisture content in wood above the fiber saturation point. We also succeeded in imaging of decayed wood and found the possibility of evaluating the progress of decay by combining it with the X-ray computed tomography method.

研究分野：木質科学

キーワード：MRマイクロスコピー セルロースヒドロゲル 腐朽木材

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

試料内部の構造を非破壊で観察する手法に X 線 CT (コンピュータトモグラフィー) 法、MRI (核磁気共鳴画像) 法があり、医療分野にとどまらず様々な分野で利用されている。X 線 CT 法は、X 線の透過率 (試料密度) の違いが撮画像のコントラストに反映し、木質関連分野では、仏像などの内部構造の調査や、キクイムシなどの害虫による穿孔の観察などに用いられている。また、大型放射光施設に設置されている高分解能の X 線 CT では、微小木片からの樹種識別なども行われている。しかし、水を含んだ木材では、細胞壁と内腔部分の水との密度差が小さくなり、コントラストが付きにくい。一方、MRI 法は、磁場下におけるプロトン ( $^1\text{H}$ ) の核磁気共鳴現象を原理とする画像法であり、プロトン密度や構成成分の緩和時間の差によってコントラストが生じる。そのため、水を多く含んだ飽水状態の木材やセルロースのヒドロゲルも観察対象となりうる。

セルロースは地球上で最多量に存在する天然高分子であり、光合成産物であることから再生産可能な資源として注目されている。ヒドロゲルは水に不溶な三次元網目構造をもつ高分子材料およびその膨潤体であるが、セルロースのヒドロゲルは高い剛性、生体適合性、熱的安定性、汎用有機溶媒への耐性を有することに特徴がある。特に、生体適合性があることから、組織工学、薬物送達システムなどの医用材料としての利用に関心が集まっており、生体外で細胞を組織化して移植するための三次元足場材料としての報告もある。

一方、木材は古くから建築用材、家具、生活用品などとして様々に利用されてきたが、循環型社会や脱炭素社会の構築のため、より一層の高度有効利用が求められている。木材の三大欠点は、「燃える」、「狂う」、「腐る」であるが、このうち「狂う」は異方性のある木材が吸湿による膨潤と乾燥の過程で変形することによるものであり、木材に含まれる水分が影響している。また、「腐る」は、木材腐朽菌による生物劣化であり、重量減少とともに強度低下を引き起こすことが実用上の問題となっている。一般に腐朽材では含水率が高いことが知られており、含水率分布を知ることによって腐朽部位を特定できる可能性がある。これまでに MRI 法では、高含水率の木材における水分分布や腐朽の進行過程を観察した例があるが、そのほとんどは低磁場環境下で測定が行われているために分解能が低く、組織構造や局所的な水分分布、菌糸の分布を観察することはできていない。高磁場 MRI システム (MR マイクロスコーピー) の構築によって高分解能化が達成でき、より微細な構造を観察できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究では、既存の 7.05 T NMR (核磁気共鳴装置) 用超伝導ワイドボア磁石を用いて MR マイクロスコーピーを構築し、MR マイクロスコーピーによるセルロースヒドロゲル、木材の観察手法を確立する。そして、木材の MR 画像と含水率との関係を明らかにすることとした。また、腐朽木材を X 線 CT と MR マイクロスコーピーで観察し、腐朽の進行を評価することとした。

### 3. 研究の方法

MR マイクロスコーピーは、仕様が公開されていて自作が可能な OPENCORE NMR 分光計 (Takeda, J. Magn. Reson., 2008) を基盤に構築することとした。OPENCORE NMR 分光計には MRI 用の FPGA (Field-Programmable Gate-Array) を取り付けた。勾配磁場制御信号のゲインとオフセットを調整する基板を作製し、勾配磁場電源 (MR Technology 社製) と分光計の間に接続した。静磁場発生源には 300 MHz NMR 用のワイドボア超伝導マグネット (7.05 T) (Japan Magnet Technology 社製) を使用した。磁石に合わせて設計された勾配磁場 (G) コイルとソレノイド型 radiofrequency (RF) コイル (ボビン内径 = 12 mm × 20 mm) (MR Technology 社製) からなる MRI プロブを分光計に接続して使用した。シム調整は 0.1 mol/L 硫酸銅水溶液で満たした円筒形試料管 (外径 12 mm × 試料管長 23 mm) を用いて行った。また、この形状既知の試料 (ファントム) を用いて、撮像した際の各画素が等方性になるように、位相エンコードのステップ数、周波数エンコードのサンプリング数、勾配磁場強度を調整した。

セルロース試料には、市販の再生セルロース、ベンコット (旭化成社製) を使用した。セルロース (1 wt%) を 60 wt% LiBr 溶液に 120 °C で溶解し、ガラスビーズを分散させた。セルロース溶液を円筒形 (直径 10 mm、高さ 10 mm) の型に流し込み、冷却してゲル化させた後に水洗しセルロースヒドロゲルを調製した。さらに、様々な濃度のポリエチレングリコール (PEG) 400 (平均分子量: 360 ~ 400) 溶液に浸して、溶媒を水から PEG に置換した。木材試料として、直径約 10 mm (RT 方向) 高さ約 20 mm (L 方向) の円筒形に加工したスギ (*Cryptomeria japonica*) 材とブナ材 (*Fagus crenata*) を使用した。飽水状態にした後に、一定の時間乾燥させ、様々な含水率に調整した。セルロースヒドロゲル、木材試料は MR マイクロスコーピーの RF コイル内に挿入し、エコー時間 (TE) 6.4 ms、繰り返し時間 (TR) 4000 ms、スキャン回数 100 に設定したスピンエコー法により MR 画像を得た。MR 画像の輝度値を水の輝度値で規格化した後、木材の横断面の MR 画像の平均輝度値と全乾法によって算出した含水率との関係を調べた。

円筒形に加工したスギ、ブナ材を白色腐朽菌カワラタケ (*Trametes versicolor*)、褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) を用いて、強制腐朽させ、X線CT装置 (SMX-160CTS-SV3, SHIMADZU) にて撮影した。X線CTの横断面 (木口面) 画像の輝度値を空気と水の輝度値により規格化して密度に換算した。また、腐朽材は上記同様、スピンエコー法によりMRマイクロスコピーで撮像した。

#### 4. 研究成果

セルロースヒドロゲルとガラスビーズを充填させたセルロースゲルのMR画像の撮像視野 (FOV) は25 mmであり、画素数 (マトリックス) は256×256であることから、面内画素サイズは約100  $\mu\text{m}$  であることが分かった。分解能の高いMRマイクロスコピーが構築できたといえる。ガラスビーズを充填させたセルロースヒドロゲルでは、本来無信号 (黒) であるガラスビーズの部分にコントラストがついた。MR画像のスライス厚さ (1.8 mm) に完全にガラスビーズ (粒径: 710-900  $\mu\text{m}$ ) が含まれている場合は濃い灰色であったが、一部が含まれている場合はやや明るい灰色となった。媒体を水からPEG400に置換したセルロースヒドロゲルのMR画像の平均輝度値は、PEG400の割合が増加するにつれて高くなった。水とPEG400の緩和時間  $T_2$  にはほとんど差がないが、PEG400の緩和時間  $T_1$  は水より短く、この差が画像強度に違いを生じさせたといえる。この結果は、セルロースヒドロゲルを足場材料として用いる際に、分解能以上の大きさで脂肪などの組織が存在していればMRマイクロスコピーで観察可能であることを示している。

飽水状態のスギとブナの木口横断面のMR画像を表面の実体顕微鏡像とともに Fig. 1 に示す。スギ、ブナともに、早材部、特に年輪のはじめ部分の輝度が高く、晩材部への移行に伴って輝度が徐々に低くなった。これは、スギでは仮道管の直径、すなわち細胞内腔が早材から晩材へ移行するとともに小さくなり、それに伴って細胞内腔に含まれる自由水が少なくなることによって起きている。また、ブナは散孔材であるものの、道管は年輪の前半部分の方が大きく、孔圏外への移行に伴って数とサイズが小さくなるので、スギ同様、細胞内腔の自由水が年輪の外側へ行くにつれて少なくなることによって起きている。ブナは広放射組織を有することが組織学的な特徴であるが、MR画像において放射組織が観察できた。その輝度値が低いのは、自由水の絶対量が少ないからであるといえる。すなわちMRマイクロスコピーにより、木材の組織学的特徴が現れた木口断面像を撮影することができ、樹種識別などへの利用の可能性が示された。

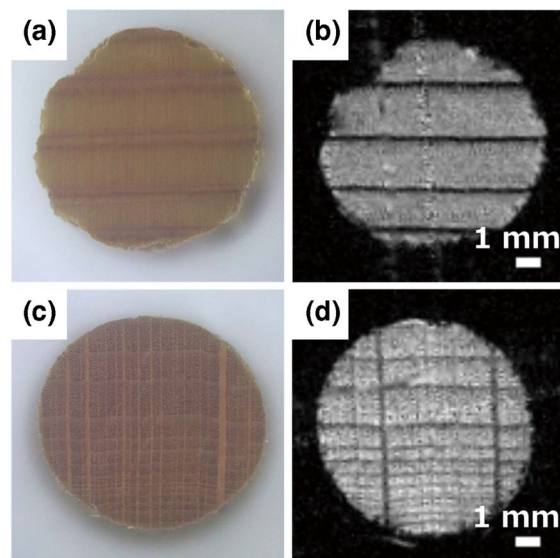


Fig. 1 飽水状態のスギ (上段 a, b) とブナ (下段 c, d) の横断面の実体顕微鏡像 (a, c) とMRI画像 (b, d)

飽水状態から乾燥させて含水率を調整したスギの木口横断面をMRマイクロスコピーで撮像した。放水状態では早材部の輝度が高く、明瞭に年輪が観察できていたが、含水率の低下に伴い、早材部のコントラストが徐々に低下した。また、同時に材の外側から輝度が低下する様子が観察された。すなわち、乾燥に伴って、材の周囲から水が抜けていくとともに早材部の含水率が低下していくことが明らかになった。次に、MR画像の平均輝度値と全乾させて算出した含水率との関係を調べた。その結果、繊維飽和点以上の含水率において、含水率が高くなると輝度値も高くなる直線関係があることが分かった。すなわち、MRI法を用いることで、従来法では評価が困難であった繊維飽和点以上の木材の含水率を非破壊で推定できることが明らかとなった。スギとブナを白色腐朽菌カワラタケと褐色腐朽菌オオウズラタケで強制腐朽させ、木口横断面のX線CT像を撮影した。X線CT画像から算出された密度より、腐朽日数が経過するにつれて木材試料全体の平均密度は低下し、腐朽が進行していることがわかった。また、腐朽菌によって分解の様子に違いが見られた。一方、腐朽材のMR画像は、腐朽初期において放射組織の輝度が高くなっているなど、X線CT画像と異なる特徴を示すことが明らかになった。すなわち、MRマイクロスコピーとX線CT法を組み合わせることで、非破壊的に腐朽の種類や段階を評価できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada Masahisa, Wakiya Sayuri, Kobayashi Kayoko, Kimura Satoshi, Kitaoka Motomitsu, Kusumi Ryosuke, Kimura Fumiko, Kimura Tsunehisa	4. 巻 28
2. 論文標題 Three-dimensional alignment of cellulose II microcrystals under a strong magnetic field	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 6757 ~ 6765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10570-021-03954-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagamine Ryo, Kobayashi Kayoko, Kusumi Ryosuke, Wada Masahisa	4. 巻 29
2. 論文標題 Cellulose fiber biodegradation in natural waters: river water, brackish water, and seawater	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 2917 ~ 2926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10570-021-04349-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 He Qinfeng, Kobayashi Kayoko, Kusumi Ryosuke, Kimura Satoshi, Enomoto Yukiko, Yoshida Makoto, Kim Ung-Jin, Wada Masahisa	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vitro Synthesis of Branchless Linear (1-6)-D-Glucan by Glucosyltransferase K: Mechanical and Swelling Properties of Its Hydrogels Crosslinked with Diglycidyl Ethers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 31272 ~ 31280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.0c04699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本吉生, 久住亮介, 小林加代子, 和田昌久, 武田和行
2. 発表標題 木質系バイオマスの非破壊観察に向けたMRIシステムの構築
3. 学会等名 第28回セルロース学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮地皇希, 小林加代子, 久住亮介, 和田昌久
2. 発表標題 セルロースとキチンの環境水中での生分解性評価
3. 学会等名 第28回セルロース学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦周平, 小林加代子, 久住亮介, 和田昌久
2. 発表標題 セルロースの分子量がセルロースヒドロゲルの力学特性に及ぼす影響
3. 学会等名 第28回セルロース学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青島里佳, 小林加代子, 久住亮介, 和田昌久, 吉田 誠
2. 発表標題 木材腐朽過程のX線CTによる観察
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本吉生, 久住亮介, 小林加代子, 和田昌久, 武田和行
2. 発表標題 強磁場MRIシステムの構築と木質系バイオマスへの適用
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦周平、小林加代子、久住亮介、和田昌久
2. 発表標題 リチウム塩水溶液を用いて調製したセルロースヒドロゲルの特性評価
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張陽陽、小林加代子、久住亮介、和田昌久
2. 発表標題 銅ナノ粒子担持セルロースヒドロゲルの触媒活性
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木彩奈、長峰亮、小林加代子、久住亮介、和田昌久
2. 発表標題 ヒノキ正常材およびあて材の固体NMR解析
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦周平、小林加代子、久住亮介、和田昌久
2. 発表標題 高濃度LiBr水溶液を用いて調製したセルロースヒドロゲルの力学特性
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉田 誠  (Yoshida Makoto)  (30447510)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授   (12605)	
研究 分担者	久住 亮介  (Kusumi Ryosuke)  (70546530)	京都大学・農学研究科・助教   (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------