

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656085

研究課題名(和文) テラヘルツ波による細胞の物理的特徴の非侵襲計測

研究課題名(英文) Noninvasive measurement of cell physical characteristics by terahertz waves

研究代表者

巨陽(Ju, Yang)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60312609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、次世代の構造材料である細胞の未だ解明されていない物理特性を工学的なアプローチで解明することにより、細胞の非侵襲計測を初めて実現するものである。本研究は、テラヘルツ波のスペクトルが物質のプラズマ周波数や電子散乱時間などに依存する特徴を利用して、細胞に透過するテラヘルツ波のスペクトルを計測し、細胞内物質のキャリア濃度、移動度、導電率、誘電率などを計測することにより、細胞固有の物理特徴をリアルタイムで特定する技術を開発した。生きたままの細胞の電気的な物性を定量的に評価することによって、細胞種類の判別および細胞機能の特定を非侵襲かつリアルタイムで実現することが期待できる。

研究成果の概要(英文)： In this research, the noninvasive measurement of cells to determine their physical characteristics with an engineering approach was carried out. The properties of terahertz wave spectrum which has a relationship with the plasma frequency and electron scattering time were utilized, and the carrier density, mobility, conductivity and permittivity of the intracellular material of cells were measured based on the transmission effect of terahertz wave spectrum. A method to determine the physical characteristics of cells was established. By evaluating the electrical properties of living cells it is possible to realize the real time and noninvasive discrimination of cell types and identification of cell functions.

研究分野：機械工学

科研費の分科・細目：機械材料・材料力学

キーワード：細胞 テラヘルツ波 非侵襲計測 誘電率

### 1. 研究開始当初の背景

科学技術の発展に伴い、材料力学の研究対象も従来の構造物から、半導体デバイス、さらにバイオ素子まで広がってきた。金属・半導体につづく細胞も、必ず次世代の新しい構造物として重要な役割を果たす。iPS 細胞の誕生により再生医療の発展に新しい光がさし、各種の生体機能を有する細胞の分化のみならず、人工組織の再生や生体器官の創成などの新しい生体構造物の研究開発が盛んに行われ始めてきた。本研究の代表者は、細胞伸展などの力学的刺激による骨髄幹細胞の増殖、細胞内力学信号の伝達経路の解析に成功した。一方、細胞特徴の特定や細胞種類の識別に関する研究は、従来、細胞生物学、生物化学の領域で精力的に研究されてきた。mRNA による細胞特徴の判別や、タンパク質による細胞機能の特定などの技術は既に実用化されている。しかしながら、これらの技術は、細胞計測において蛍光標識が必要であり被検査細胞に損傷、破壊を与える問題がある。また、検査のプロセスが複雑であり、時間がかかる問題がある。本研究では、これらの問題を解決し独自の発想に基づき、細胞全体の基礎物性を定量的に評価することによって、細胞の非侵襲識別技術を開発する。そして次世代生体構造物の開発、応用の基礎を構築する。

### 2. 研究の目的

本研究は、次世代の構造物材料である細胞の未だ解明されていない物理特性を工学的なアプローチで解明することにより、初めて細胞の非侵襲計測を実現することを目的とした。本研究は、テラヘルツ波のスペクトルが物質のプラズマ周波数や電子散乱時間などに依存する特徴を利用して、細胞に透過するテラヘルツ波のスペクトルを計測し、細胞内物質のキャリア濃度、移動度、導電率、誘電率などを同時に計測することにより、細胞固有の物理特徴を実時間で特定する技術を開発する。生きたままの細胞の電気的な物性を定量的に評価することによって、細胞種類の判別および細胞機能の特定を非侵襲かつリアルタイムで実現する。本研究は、従来の細胞生物学、生物化学領域における核酸、タンパク質レベルでの識別と異なって、非侵襲、実時間で計測できる特色を有しており、極めて独創である。本研究を推進することにより、ES 細胞、iPS 細胞、骨髄幹細胞から分化される角膜、心筋、軟骨、骨芽など各種の細胞の種類判別および機能特定の非侵襲計測が可能となり、再生医療の実用化への貢献が期待できる。

### 3. 研究の方法

物質の導電率や誘電率は物質の固有物理特徴であり、細胞でも例外なく一定の導電率および誘電率を有しており、細胞内物質およびその機能の違いによって細胞全体の導電

率および誘電率の値が異なる。一方、導電性を有する物質中は、キャリアが存在し、物質の特徴によってキャリアの濃度や移動度が異なる。また、誘電性を有する物質の場合、ほとんど電気分極が存在し、その特徴によってプラズマ周波数や緩和時間などが異なる。本研究は、細胞が一定の導電率および誘電性を同時に有している特性に注目して、細胞全体の各物理特徴を同時に特定することにより、細胞の種類および機能を総合的に判定する新しい手法を開発した。細胞を透過したテラヘルツ波の周波数スペクトルから、細胞内物質のキャリア濃度、移動度、導電率、誘電率などを計測することにより、細胞固有の物理情報を実時間、非侵襲で特定する技術を開発した。2年継続により、(1)細胞計測用テラヘルツ波スペクトル測定システムの開発、(2)固定された細胞の固有物理特徴の計測評価、(3)生きた細胞の固有物理特徴の計測評価、なる3項目の研究を推進し、目標を達成した。

### 4. 研究成果

#### (1)細胞計測用テラヘルツ波スペクトル測定システムの開発

時間領域分光法に基づくテラヘルツ電磁波の測定システムを構築した。フェムト秒パルスレーザを光伝導アンテナに照射することにより、パルス状のテラヘルツ電磁波の発生、検出を行い、電磁波の時間変化を測定し、その測定信号をフーリエ変換することによりテラヘルツ領域の電場スペクトルの振幅強度と位相の周波数成分を得た。このシステムの構成により、周波数0.1~2.5 THz帯域のテラヘルツ波スペクトルの計測を実現した。図1にテラヘルツ電磁波の時間変化を測定した結果を示す。

#### (2)細胞の固有物理特徴の計測評価

上記で開発したテラヘルツ波スペクトル測定システムを用いて、骨髄幹細胞および力学刺激により分化された腱細胞など生細胞のテ

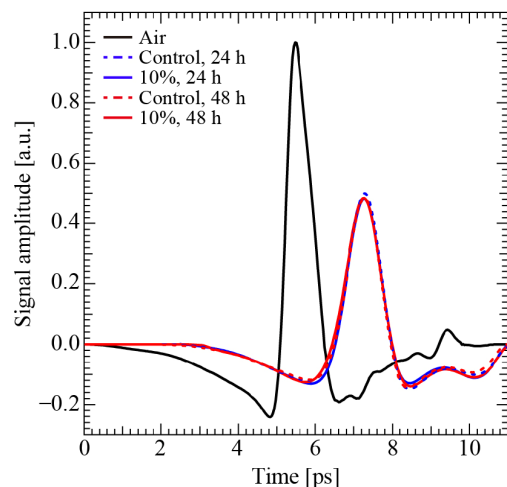


図1 テラヘルツ電磁波の測定例

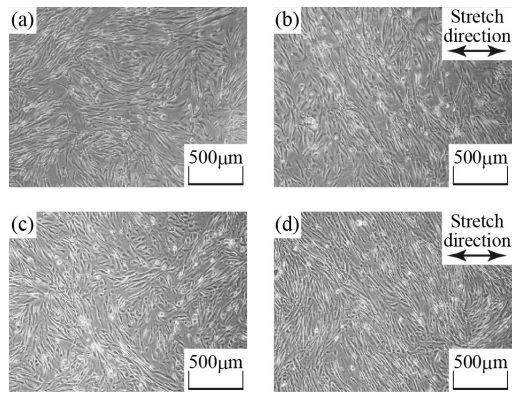


図2 力学刺激前後の骨髄幹細胞写真

ラヘルツ電磁波透過測定を行った。図2に力学刺激前後の骨髄幹細胞の写真を示す。テラヘルツ電磁波の伝播経路に配置して試料を透過したあとの電場の時間変化を測定し、試料がないときの電場と比較することにより、テラヘルツ電磁波のスペクトルの振幅および位相変化を算出した。スペクトルの振幅および位相変化は透過した試料の光学定数に依存するため、この測定値から生細胞の複素屈折率、複素誘電率を評価し、生細胞の固有物理特徴の定量評価を実現した。図3に刺激前後の骨髄幹細胞に対するテラヘルツ電磁波の計測結果を示す。

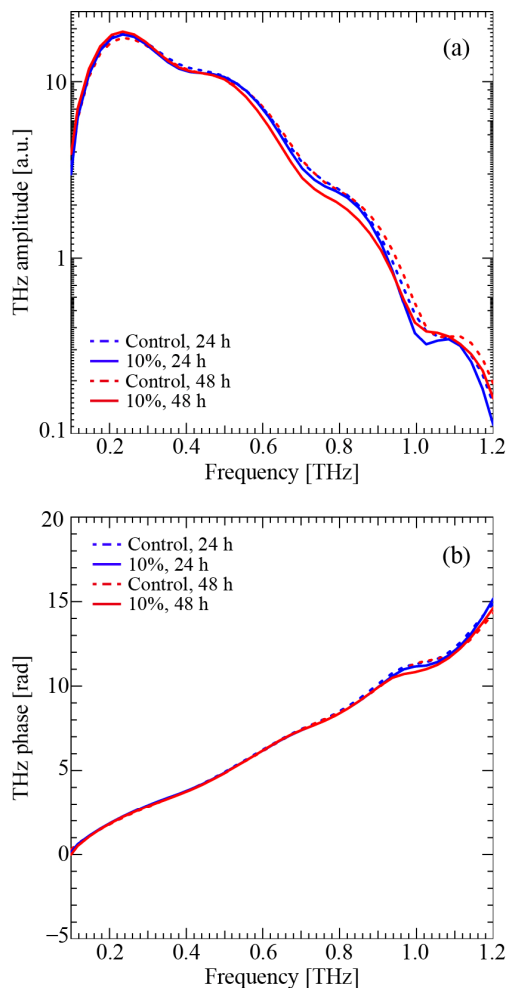


図3 骨髄幹細胞のテラヘルツ電磁波特性

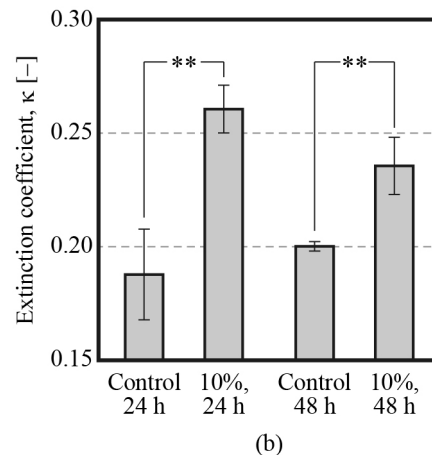
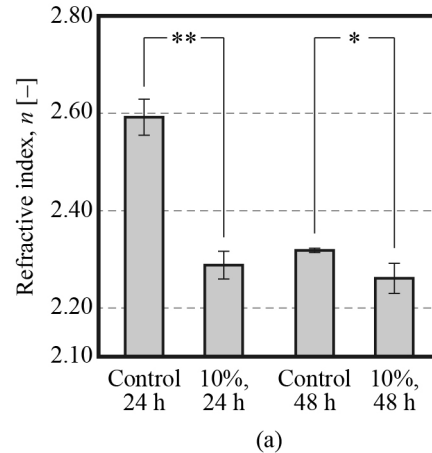


図4 に異なる骨髄幹細胞の評価結果

(3) 生きた細胞の固有物理特徴の計測評価  
培養液中生きたままの細胞のテラヘルツ電磁波透過測定を行い、導電率、誘電率、キャリア濃度、移動度、プラズマ周波数、緩和時間といった細胞の固有物性を計測した。さらに、分子構造に応じてテラヘルツ領域で吸収スペクトルが顕著に表れることを利用して、骨髄幹細胞に化学的、電気的、力学的な刺激を与えて、細胞周期の各段階における細胞核内部の構造変化を透過測定で得られたテラヘルツ波スペクトルにより解析し、細胞固有の物理的情報を実時間、非侵襲で特定する技術を実現した。図4に異なる骨髄幹細胞の評価結果を示す。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

Y. Song, Y. Ju, Y. Morita, B. Xu, G. Song, Surface Functionalization of Nanoporous Alumina with Bone Morphogenetic Protein 2 for Inducing Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, Materials Science & Engineering C, 査読有, 37, 2014, 120-126.

DOI:10.1016/j.msec.2014.01.004

Y. Morita, S. Suzuki, Y. Ju, N. Kawase, Differences between protein expression and extracellular matrix state on uniaxial stretching for tenogenic differentiation, *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, 査読有, 14, 2014, 1450025-1-13. DOI:10.1142/S0219519414500250

B. Zhang, Q. Luo, X. Mao, B. Xu, L. Yang, Y. Ju, G. Song, A synthetic mechano-growth factor E peptide promotes rat tenocyte migration by lessening cell stiffness and increasing F-actin formation via the FAK-ERK1/2 signaling pathway, *Experimental Cell Research*, 査読有, 322, 2014, 208-216. DOI:10.1016/j.yexcr.2014.01.005

B. Xu, Y. Ju, G. Song and Y. Cui, tLyP-1-conjugated mesoporous silica nanoparticles for tumor targeting and penetrating hydrophobic drug delivery, *Journal of Nanoparticle Research*, 査読有, 15, 2013, 2105-1-12. DOI:10.1007/s11051-013-2105-4

Y. Morita, S. Watanabe, Y. Ju, and S. Yamamoto, In vitro experimental study for the determination of cellular axial strain threshold and preferential axial strain from cell orientation behavior in a non-uniform deformation field, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 査読有, 67, 2013, 1249-1259. DOI:10.1007/s12013-013-9643-3

Y. Song, Y. Ju, G. Song and Y. Morita, In vitro proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on nanoporous alumina, *International Journal of Nanomedicine*, 査読有, 8, 2013, 2745-2756. DOI:10.2147/IJN.S44885

Y. Morita, S. Watanabe, Y. Ju, and B. Xu Determination of optimal cyclic uniaxial stretches for stem cell-to-tenocyte differentiation under a wide range of mechanical stretch conditions by evaluating gene expression and protein synthesis levels, *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 査読有, 15, 2013, 71-79. DOI:10.5277/abb130309

Y. Song, Y. Ju, Y. Morita, G. Song, Effect of the Nanostructure of Porous Alumina on Growth Behavior of MG63 Osteoblast-like Cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, 116, 2013, 509-515. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.04.007

Y. Morita, T. Mukai and Y. Ju and S. Watanabe, Evaluation of Cell-to-Tenocyte Differentiation By Atomic Force Microscopy to Measure Cellular Elastic Modul, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 査読有, 66, 2013, 73-80.

DOI:10.1007/s12013-012-9455-x

Y. Song, Y. Ju, L. Zhang, Y. Morita and G. Song, Fabrication of Cu nanowires and its effect on proliferation of mesenchymal stem cells, *Materials Science Forum*, 査読有, 750, 2013, 56-59.

DOI:10.4028/www.scientific.net/MSF.750\_56

B. Xu, Y. Ju and G. Song, Mechanical stretch-induced f-actin reorganization and tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 査読有, 18, 2012, 218-226.

B. Xu, G. Song, Y. Ju, X. Li, Y. Song and S. Watanabe, RhoA/ROCK, Cytoskeletal Dynamics, and Focal Adhesion Kinase are Required for Mechanical Stretch-Induced Tenogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, *Journal of Cellular Physiology*, 査読有, 227, 2012, 2722-2729. DOI:10.1002/jcp.23016

#### [学会発表](計13件)

山村直也, 佐藤俊博, 山本周平, 市岡和馬, 森田康之, 巨陽, 間葉系幹細胞の整列伸縮培養による腱細胞への効率的分化促進に関する研究, 日本機械学会東海支部 東海学生会第45回学生会卒業研究発表講演会, 大同大学(愛知県), 2014年3月1日

Yasuyuki Morita, Toshihiro Sato and Yang Ju, Experimental study for the relationship between cell differentiation and mechanical strain using a non-uniform deformation field, The 8th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (8th ISEM '13-Sendai), Sendai, Japan, 2013年11月6日

森田康之, 河瀬直樹, 巨陽, 細胞外マトリックスの力学場計測の実現に向けたDVC法の開発, 日本非破壊検査協会平成25年第2回応力・ひずみ測定部門講演会, 金沢大学(石川県), 2013年11月8日

河瀬直樹, 森田康之, 巨陽, 細胞周辺の力学場計測の実現に向けたDVC法の開発, M&M2013カンファレンス, 岐阜大学(岐阜県), 2013年10月14日

山本周平, 森田康之, 巨陽, 骨髄幹細胞と軟骨細胞の細胞間相互作用による接触共培養系の開発, 日本機械学会2013年度年次大会, 岡山大学(岡山県), 2013年9月9日

森田康之, 鈴木敏, 巨陽, 配向を制御した間葉系幹細胞の伸縮培養による腱細胞への分化および評価に関する研究, 日本実験力学会2013年度年次講演会,

由利本荘市文化交流館（秋田県），2013年8月22日

足土広祐，森田康之，鈴木敏，徐百耀，山本周平，巨陽，テラヘルツ電磁波による生細胞の誘電率の定量評価，日本機械学会東海支部第62期総会講演会，三重大学（三重県），2013年3月18日

佐藤俊博，森田康之，巨陽，非一様ひずみ環境下での伸縮刺激における間葉系幹細胞の腱細胞への分化特性，日本機械学会東海支部学生会第44回学生員卒業研究発表講演会，三重大学（三重県），2013年3月17日

河瀬直樹，森田康之，巨陽，デジタル画像相関法を用いた基板の変形計測による幹細胞の接着性評価に関する研究，日本機械学会東海支部学生会第44回学生員卒業研究発表講演会，三重大学（三重県），2013年3月17日

鈴木敏，森田康之，巨陽，配向を制御した間葉系幹細胞の伸縮培養による腱細胞分化に関する研究，第23回バイオフロンティア講演会，弘前文化センター（青森県），2012年10月6日

森田康之，渡邊早智，巨陽，ひずみ勾配を有する伸縮刺激下での間葉系幹細胞の配向・分化特性解析に関する研究，日本機械学会 M&M2012 材料力学カンファレンス，愛媛大学（愛媛県），2012年9月23日

森田康之，渡邊早智，巨陽，ひずみ勾配を有する伸縮刺激下での幹細胞の動態解析に関する研究，日本実験力学学会2012年度年次講演会，豊橋技術科学大学（愛知県），2012年7月15日

森田康之，渡邊早智，巨陽，ひずみ勾配を有する伸縮刺激下での間葉系幹細胞の配向挙動に関する研究，日本実験力学学会 The 11th Conference on Biomechanics in Niigata，新潟大学（新潟県），2012年4月28日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mech.nagoya-u.ac.jp/ju/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

巨陽 (JU YANG)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：60312609