

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26660205

研究課題名(和文) テラヘルツ帯における農産物・食品の物性評価

研究課題名(英文) Physical Property Evaluation of Agriproduct and Food at Terahertz Range

研究代表者

鈴木 哲仁 (Suzuki, Tetsuhito)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00723115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：テラヘルツ波帯の全反射減衰分光法(ATR法)と時間領域分光法を組み合わせた手法を用いて、タマネギの鱗葉やナスの表皮を測定した結果、水分量に応じて光学定数も系統的に変化することが確かめられ、農産物鮮度の評価可能性が示唆された。

また、動物細胞の酸化ストレス応答を非侵襲的に評価できるか検証するために、CSRR(微小な金属共鳴器を配列した構造物)を用いて増強電場を作り出し、そこにHeLa細胞を培養して反射測定した。その結果、複素誘電率を介し、酸化ストレスによる細胞内代謝の変化を経時的に計測することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Epidermal tissues of onion and eggplant were measured by combining attenuated total reflection method and time-domain spectroscopy at Terahertz range. With decreasing water content in the tissues, both refractive index and extinction coefficient decreased. In order to monitor response of cell to oxidative stress non-invasively, reflectance of Human cell cultivated on CSRR (Complementary Split-Ring Resonator), which enhances electric field near periodic metallic resonator, was measured. Oxidative stress performed gradual change in reflectance, resulting in success to evaluate metabolism change within the cell by complex dielectric constant.

研究分野：生物センシング工学

キーワード：非破壊計測 テラヘルツ波 細胞 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

電磁波は非侵襲で農産物や食品の品質を評価できることから、波長（周波数）の特性に応じたさまざまな利用法が実用化され、我々の暮らしに不可欠な技術となっている。未開拓電磁周波数帯のテラヘルツ（THz）帯も世界的に注目されており、特に近年、欧米のみならず韓国や中国でも THz 波のバイオ応用や生体計測に関する研究が国際競争の激しい研究分野の一つとなっている。THz 波は、電波の透過性と光の取り扱い性や分光情報を兼ね備えたユニークな特性を持つため、非破壊検査への応用が期待されている。しかし、農産物のような生物個体に対して、どの深さからどのような情報が得られるかは明らかになっていない。その理由は、水の吸収が大きいこの帯域において、水を多く含む細胞と THz 波との相互作用を評価することが困難であったためである。しかし近年、全反射減衰分光法（ATR 法）と THz 時間領域（TD）分光法を組み合わせた THz TD-ATR 法による水溶液の分光分析技術が確立され、THz 帯の複素誘電率を用いることで自由水の情報を直接評価できる事が明らかになってきた。

そこで報告者らは、THz TD-ATR 法を細胞評価に応用する技術を開発し、細胞内の水分子の挙動が純水とは大きく異なることを明らかにすることに成功した。さらにそれらの情報から、細胞の状態を評価できる可能性を示唆する結果を得てきた。しかし、農学分野においては未だ THz 波帯の物性が明らかになっておらず、農産物や食品の評価に用いられるまでには至っていない。

2. 研究の目的

生体（農産物や食肉）と THz 波の相互作用を理解し、THz 波の農産物評価や食品機能探索技術への応用可能性を探索するために、以下の2つの課題に分けて研究を実施した。

(1) THz 波帯の複素誘電率を用いた農産物・食品の評価を可能にするためには、対象物の光学定数を測る手法を検討し、さらにはそれらの物性値と品質との関係を評価する必要がある。そこで本研究では、農産物を用いて植物細胞の複素誘電率計測を実施し、それらの物性値と品質（水分含量）との関係を評価した。また、複素誘電率を算出するためには、屈折率と消衰係数の情報が必要であるため時間領域分光法が用いられるが、測定できる周波数帯域が狭いという課題がある。そこで、汎用的なフーリエ変換型分光器で複素誘電率を算出する方法を検討した。

(2) 機能性食品の開発において、機能探索技術への応用可能性を探索するためには、細胞にかかる酸化ストレス応答を評価する手法が求められる。細胞が酸化ストレスを受けると、その防御機構として細胞内代謝が変化する

ことが知られており、THz 波帯の物性にも変化が生じることが期待される。そこで本研究では、培養した動物細胞へ酸化ストレスを与え、フーリエ変換型分光器を用いてストレス応答の評価可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 農産物の THz 波帯物性評価

試料には5個の北海道産タマネギの表皮組織を供試した。各個体の外側から3層目及び4層目の鱗葉から計10種類採取した。試料を約30 mm×30 mmの切片に切り出し、THz 時間領域分光装置 (TAS7500, ADVANTEST 社)を用いて測定を行った。本装置は、試料に THz パルスを照射し、最終的に時間領域の波形を得ることができるため、位相情報を得ることができる。それにより、試料との相互作用による強度変化と位相変化の両方を得ることができ、試料の屈折率と消衰係数を算出できる。本研究では細胞1層からなる鱗葉表皮組織0.1 gを乳鉢ですり潰した状態で ATR 測定した。また同試料を実験室内で0~540秒間乾燥させ、含水率に差が出るよう調整したものについても同様に測定した。

続いて、試料には岡山県産千両ナス8個体を用いて、ナスの鮮度評価への可能性を検証した。各個体を0~7日間室内にて乾燥させた後、厚さ約1 mm、1.5 g程の表層の切片を6片切り取り、それぞれを乳鉢ですり潰したものを試料とした。5片は ATR 測定に、残った1片は含水率計測に用いた。

(2) 細胞の酸化ストレス応答評価

フーリエ変換型分光器 (FARIS-1S, 日本分光) の ATR プリズム上に、ヒト由来の細胞である HeLa 細胞を培養し、①培地のみ、②酸化剤入り培地、③HeLa 細胞+培地、④HeLa 細胞+酸化剤入り培地の4条件について0~12時間の間、1時間おきに ATR 測定した。測定領域は2.0~12 THz、周波数分解能は120 GHz、積算回数は500回とし、各試料37℃で二酸化炭素濃度5.0%に保ち測定を行った。再現性を確認するために、各試料につき3回の測定を行った。また、ATRによる測定法は、試料の厚みを把握していないと正しく物性を計測することができない。そこで、共焦点顕微鏡を用いて培養細胞の三次元画像を取得し、酸化ストレスの添加による厚み変化の有無を確かめた。

しかし、酸化ストレスによる THz 波帯の物性変化がごくわずかであることが予想され、後述するとおり ATR 法ではその変化を有意に識別できないことが予想された。そこで物性変化を高感度に検出するためのセンサとして、Complementary Split-Ring Resonator (CSRR)を用いた。CSRR はギャップと呼ばれる間隙を有する分割リングが基板上に並んだ周期構造物の中で、THz 波と共鳴を起

こし電場を増強・局在させることで CSRR 表面近傍の誘電率虚部の変化に応じて敏感に反射特性が変化する。CSRR は Si 基板上に金を蒸着し、C 型に金を溶解して Si を露出させることで作製した。また電場の局在領域は厚み数 μm となるよう設計しており、細胞内部の誘電率変化を反映するものと期待できる。CSRR 上に HeLa 細胞を培養し、ATR での測定と同様に酸化ストレスの有無による反射特性の変化を検証した。

4. 研究成果

(1) 農産物の THz 波帯物性評価

各手法で得られたタマネギやナスの各組織における屈折率及び消衰係数を水の場合と比較したところ、いずれも似た形状を示す一方、タマネギやナスの物性は水よりも低い値となった。THz 波帯においては水の光学定数が大きく支配的であるため、測定領域内の水がそれ以外の物質に置き換わる分、光学定数が水の場合より小さくなったと考えられる。1 THz における各試料の光学定数と含水率の関係を図 1 に示す。個体差の影響が見られるものの、水分量の変化に伴って各光学定数も系統的に変化することが確かめられ、農産物鮮度の評価可能性が示唆された。

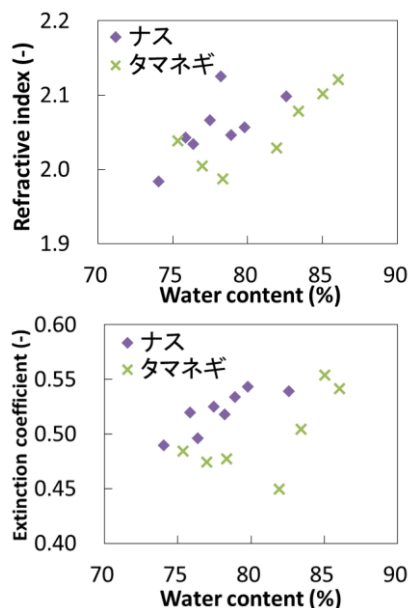


図 1. ナスとタマネギにおける屈折率(上)および消衰係数(下)と含水率の関係

上記実験でも用いた時間領域分光装置は、検出波形の位相情報から屈折率も計測できることを特長とする。一方、汎用的なフーリエ変換型分光器であっても、Kramers-Kronig (KK) 変換を用いることで複素誘電率を導出することが可能になるが、高周波帯域の実測データが必要となる。そこで、THz 波帯と中赤外領域の各々においてフーリエ変換型分光器で水溶液の測定を行い、それらをつなぎ合わせて KK 変換を行うことで、複素誘電率を導出することに成功した。

(2) 細胞の酸化ストレス応答評価

共焦点顕微鏡で取得した HeLa 細胞の三次元画像を図 2 に示す。この顕微鏡を用いることにより、細胞の断面画像から厚みを計測することができる。酸化ストレスを与えて 0, 3, 6, 9, 12 時間静置した培養細胞を各 2 検体用意し、それぞれ観察を行った。その結果、有意な厚み変化は認められず、平均 $6.83 \pm 1.35 \mu\text{m}$ で変化しないことが確かめられた。

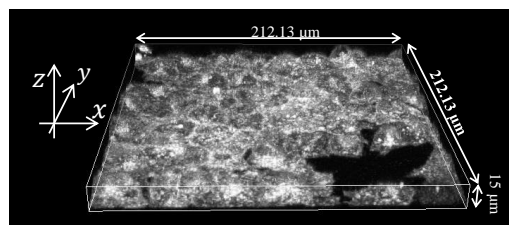


図 2. HeLa 細胞の三次元画像

培地、酸化剤入り培地、培養細胞に各培地を添加したものについて、ATR で測定した結果、いずれも水のスペクトルと同様の形を示すものの、培地、培養細胞と要素が加わるにしたがって値が低くなることが確かめられた。これは THz 波帯の ATR スペクトルでは水分子の動態が支配的であり、水が培地や細胞の生体分子に置き換わった影響が見られているものと考えられる。一方で、酸化ストレスの処理時間に対して有意なスペクトル変化は認められなかった。これは、本測定系の精度ではそのわずかな変化を評価することができなかったためであると考えられる。

CSRR の反射スペクトル中における共鳴ピークに着目し、その反射率について SRR 単体の場合と比較して算出した反射率変化と経過時間の関係を図 3 に示す。酸化ストレスによる変化であることを明確にするため、純粋な培地を滴下した HeLa 細胞の反射測定と、酸化剤入り培地のみの反射測定も行ったが、両者の場合には反射率変化は確認できなかった。一方で酸化ストレスを加えた HeLa 細胞の場合は時間とともに反射率変化が大きくなっていくことが確認された。別途 CSRR 上に培養した HeLa 細胞を用意し、12 時間の酸化ストレス処理の経過を顕微鏡で観察したが、細胞の変形や剥離していく様子は確認されなかった。よってこの反射率変化は形状等の変化によるものではないと考えられる。また、CSRR の反射率変化は誘電率虚部の変化と線形的な相関があることが別途明らかになっている。したがって、本実験で得られた CSRR の反射率変化は、酸化ストレスによって HeLa 細胞内の複素誘電率虚部が増加したことによるものと実証された。細胞から抽出した 1 つのストレスマーカーの単一反応経路に着目する従来の評価法とは異なり、本手法では細胞内全体の水の動態を評価できるため、機能性についてより詳細に検証できる

手法になると期待される。

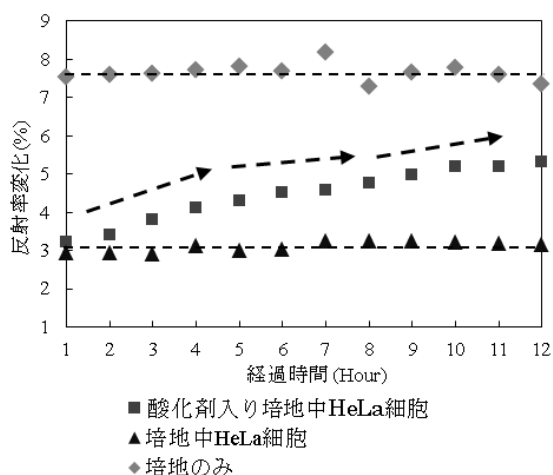


図3. 各実験条件での CSRR の反射率変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

①堀彩夏, 白神慧一郎, 足立絢, 服部建太, 近藤直, 小川雄一, 鈴木哲仁, テラヘルツ波全反射減衰分光法を用いた細胞の酸化ストレス応答評価のための基礎研究, 農業食料工学会関西支部報, 査読無, 118号, 2015, p.60

②K. Hattori, K. Shiraga, Y. Ogawa, N. Kondo, Sensing living cells using a terahertz split-ring resonator with reflection spectroscopy, 31st URSI General Assembly and Scientific Symposium (URSI GASS), 査読無, No. 14693160, 2014, pp.1-4, DOI:10.1109/URSIGASS.2014.6930086

[学会発表] (計3件)

①A. Hori, Sensing the Oxidative Stress in HeLa Cells by using Terahertz Complementary Split-Ring Resonators, The Second International Symposium on Frontiers in THz Technology, August 30 – September 2, 2015, ACT CITY (静岡県・浜松市)

②堀彩夏, テラヘルツ波全反射減衰分光法を用いた細胞の酸化ストレス応答評価のための基礎研究, 農業食料工学会関西支部第133回例会, 2015年3月3日, 京都大学(京都府・京都市)

③K. Hattori, Sensing for Living Cells using a Terahertz Split-Ring Resonator with the Reflection Spectroscopy, XXXI URSI General Assembly and Scientific Symposia of International Union of Radio Science, August 16-23, 2014, Beijing (China)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 哲仁 (SUZUKI, Tetsuhito)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 00723115

(2)研究分担者

小川 雄一 (OGAWA, Yuichi)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 20373285

佐藤 格夫 (SATO, Norio)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 30409205

平川 慶子 (HIRAKAWA, Keiko)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号: 32165162