

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13554

研究課題名(和文) 生体内水構造のin vivo広帯域誘電分光による健全性評価

研究課題名(英文) Evaluation of healthiness by in vivo broadband dielectric spectroscopy for water structures in living body

研究代表者

八木原 晋 (Yagihara, Shin)

東海大学・理学部・教授

研究者番号：40191093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：広帯域誘電分光(BDS)および相補的手法(核磁気共鳴や分子動力学法)を用い、標準液体やイオン水流、高分子ゲルやエマルジョンなどの生体モデル系の水構造解析を行った。フラクタルな水素結合ネットワークダイナミクスのBDS解析により、含水量、水分子やイオンの束縛・分散状態を知ることができた。さらに培養細胞やモデルマウス臓器、非侵襲in vivo生体計測を行ったところ、健全性と敗血症マウスの臓器を識別することができ、新たな生体計測・解析手法の有効性が示された。今後脳機能計測や医療分野、関連する広範な理工学領域まで、様々な分野での応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Water structure analysis was performed for biological tissue models, such as standard liquids, ionic water flow, polymer gels, and emulsions, using broadband dielectric spectroscopy (BDS) and complementary techniques such as nuclear magnetic resonance and molecular dynamic simulation. The fractal analysis of dynamic hydrogen bonding network by BDS offers the water content, restrictions and dispersion of water molecules and ions. Furthermore, applications to cultured cells, organs from model mice, and the noninvasive test make it possible to distinguish organs obtained from robust and septic mice, respectively, and suggest a possibility of new bioinstrumentations and analytical methods. In future, applications should be expected in various areas of brain functions, medical care, and extensive areas of natural science and technology.

研究分野：Biophysics

キーワード：Water structure Dielectric spectroscopy Broadband dynamics Living body in vivo Noninvasive testing free water Interfacial polarization

1. 研究開始当初の背景

水分子は25°Cの液体状態で8.3ピコ秒と0.1ピコ秒の特性時間の動的構造を有する。含水物質や生体中ではさらに高次の階層的水構造が注目され、国際誘電分光会議 (IDS, 2001 年以降) や電磁波と含水物質中の水との相互作用に関する国際会議 (ISEMA, 90 年代より) がこの20 年ほどで大きく発展し、生命・医学から土木・建築分野までの幅広い学問・技術分野をカバーしている。

本研究組織のオリジナルな広帯域誘電分光 (BDS : Broadband Dielectric Spectroscopy, 1μHz~65GHz) による水構造研究はこれらの学会でも注目され、受け入れられてきた。生体内の水は生体分子の多様な運動モードとカップルした動的な挙動をとり、その特性時間が構造形成に伴って増大するスローダイナミクスを示す。(図1) バルクな水はピコ秒域水素結合 (HB) ネットワークのフラクタル構造を有し、HB 数密度によって動的挙動が決定されていることがわかった。HB ネットワークとその分布は生体構造を反映し、機能を決定するので、緩和時間分布によるゆらぎの正しい評価の重要性を示している。[八木原, 新屋敷, 喜多, 生物物理, 依頼総説, 47, 302 (2007)]

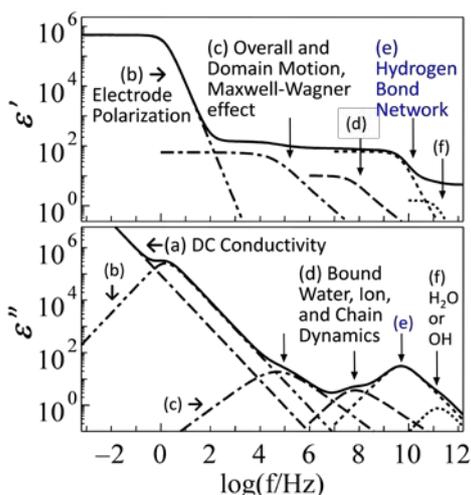


図1. 多様な水構造と時間・周波数域

多様な水構造は、観測時間スケールによって消失したり、違う種類に見えたりする観測問題によって混同され、混乱をきたしてきた。

[八木原, 新屋敷, 喜多, 日本バイオレオロジー学会誌, 依頼総説, 25(1), 2-11 (2011), 八木原晋, 喜多理王, 新屋敷直木, 福崎稔, 冷凍, 依頼総説, 87(1018), 21-27(2012)] 申請者らの BDS による研究から、リポソームでは脂質膜相転移による周囲の HB ネットワークがゆらぐことや、周囲界面のイオン挙動や、核磁気共鳴で得られる水分子の拡散係数が細胞膜界面によって束縛され、物性・機能の分子機構が影響される描像が得られた。

2. 研究の目的

しかしながら、BDS によるこれらの水構造解析の意味は重要であるにも関わらず、水構造の本質である水素結合ネットワークのフラクタルなダイナミクスや水分子の階層的な束縛の解析と理解が容易ではなく、特に生体への適用や医療への応用の可能性は未だに十分には追及されていない。

そこで本研究では、同軸開放端電極を利用した生体の *in vivo* 直接計測に挑む。電極を新たに工夫した BDS による血液や組織中の多様な階層的水構造の計測と緩和時間分布を含む緩和パラメータ解析にさらに核磁気共鳴や分子動力学法などの相補的解析を組み合わせ、フラクタルな水構造による物性・機能の描像を健全性評価につなげる新たな生体計測手法を構築する。

本研究で行われた生体の健全性や生体適合性評価手法の開発は、医療分野や医用・計測工学などへの応用に留まらず、広範な含水物質の評価システムに通じ、医学・薬学から土木・建築まで、産業界のほぼ全ての分野で応用が可能である。マイクロカプセル、DDS (ドラッグデリバリーシステム) の評価による医療行為への応用、化粧品や食品の特徴づけや安全性評価、土木・建築分野ではセメント構造解析によるダムや破壊されたビルや家屋の老朽化診断、環境汚染による高速道路などの劣化や健全性評価ができれば、建築物の修理・建て直しの判断、トンネル内コンクリート崩落リスク判断など、莫大な経済規模 (資金、時間、労働力) が必要な修理行程の是非を判断することもできる。また放射性廃棄物の地下封入対策での耐久性見積もりなど、社会貢献の需要や規模は大きい。

3. 研究の方法

本研究では、オリジナルな時間領域法 (TDR: Time Domain Reflectometry) を含む BDS (Broadband Dielectric Spectroscopy) の既存装置を用い、電極設計・製作によって、培養細胞やマウス臓器、さらに *in vivo* 計測まで考えた。

電極として様々な外径 (1 mm ~ 6 mm 程度) のマイクロ波同軸ケーブル (50 Ω) を用意し、TDR および BDS 電極に加工し、様々な物質・生体系に用いた。

まず標準液体試料 (水やアルコールなどの溶媒) 計測によって、計測限界や誤差の周波数特性を把握した。さらに相補的手法として NMR 拡散計測や分子動力学シミュレーションを組み合わせることで、水素結合ネットワークダイナミクスや流体力学的相互作用に関する特徴づけを行った。さらに、チューブに生理食塩水をポンプで流した血流モデルの計測を行い、計測結果の解析から、電極の改良を進めた。

細胞や生体組織のモデルとして用いる高分子-水系として高分子水溶液や高分子ゲル、さらにエマルション系の BDS 測定を行

い、組織の水構造や細胞分散系のイオン挙動の解析を行った。

ヒラ細胞や酵母（野生・ミュータント株）などの細胞混濁液を調製した。また、健常マウス、メタボリックマウスや敗血症マウスなどの疾患モデルマウスを用意し、摘出した様々な臓器を計測し、生体計測・解析上の問題点の抽出を行った。

生体の *in vivo* 計測として、前腕屈側部の組織計測や動脈上での血流計測の最適化を重ね、血流変化に伴う情報取得の可能性を検討した。

4. 研究成果

オリジナルな広帯域誘電分光（BDS：Broadband Dielectric Spectroscopy）装置を用い、*in vivo* 生体測定を目指し、*in vitro* 測定から各種成分測定を段階的に行った。径の異なるセミリッド同軸接触型（中心導体物理長がゼロ）電極および同軸型（中心導体物理長が非ゼロ）電極をそれぞれの計測系に適用して、水やアルコールなどの標準液体系を用いて確認した。

本研究の水構造解析では、主に5種類の分子ダイナミクス（mHz~kHz：電極周囲のイオン挙動を反映する電極分極、kHz~MHz：被測定系内の不均質構造界面近傍でのイオン挙動、MHz~100MHz：生体内分子の凝集構造ダイナミクスから分子内局所ダイナミクスまでの複数の双極子緩和、~100MHz：生体分子と協同的に相互作用している束縛水分子、~10GHz：水分子の水素結合ネットワークのダイナミクス）に対応する緩和過程を観測・解析した。いずれの緩和過程も水分子の相互作用の影響を受けることから、詳細な水構造解析が可能である。

そこで、標準液体試料、イオン水流、高分子-水混合系、エマルジョン、培養細胞、モデルマウスの摘出臓器、上腕屈側部を用いた生体計測の各系について予備測定を行ったところ、それぞれの物質・生体群で次の結果を得た。

- (1) 標準液体系：アルコールなどの水素結合液体や有機溶媒のファン・デル・ワールズ液体について、誘電分光と核磁気共鳴拡散計測を行ったところ、誘電分光による緩和時間と NMR による拡散係数との間に、1分子当たりの水酸基数による相関を見出した。この結果はストークス則や粘度を介した相関として分子レベルでの説明が必要である。
- (2) イオン水流系：ビーカー内攪拌およびチューブ内循環系で流速依存性を調べた。流速によって電極表面のイオン雰囲気の影響を受ける可能性を見出した一方で、再現性にはなお注意が必要である。
- (3) 高分子-水混合系：高分子水溶液を幅広い濃度範囲で BDS 計測した。とくに濃厚溶液領域で見出された水分子による可塑性効果は、最近の新しい考え方である水

素結合密度によるダイナミクスの解釈が有効であり、医用高分子の生体適合性の解釈とも関連している。また、高分子ゲルの体積相転移に伴う水構造のフラクタル解析によって、水構造の階層構造性を評価することが可能である。

- (4) エマルジョン系：W/O 系のエマルジョンにおける水分子の分布状態を緩和時間やその分布と組み合わせた新たなフラクタル解析から表現できる可能性が見出された。また NMR 拡散測定によって水分子が拘束されている空間情報を得る手順を構築しつつある。
- (5) 培養細胞系：イヌ腎尿細管細胞混濁液だけでなく酵母細胞希薄分散系でも界面分極を観測できた。エマルジョン測定の結果と対応させることで、誘電分光を細胞分散系の一般的な構造解析として用いられることが分かってきた。
- (6) モデルマウス系：（健常・メタボリック・敗血症）マウスの摘出臓器の水構造解析を行い、健常性や水素水飲水によって各臓器の含水量や分散状態に差があることが示唆された。また緩和時間 τ とそのブンプパラメータ β を用いたフラクタル解析（図2）によって、健常性や病態を識別することができる可能性を示した。
- (7) 生体（前腕屈側部）：BDS 測定によって、高周波領域における皮膚の状態を表す水構造だけでなく、低周波領域で血流を反映する情報を得られる可能性を見出した。

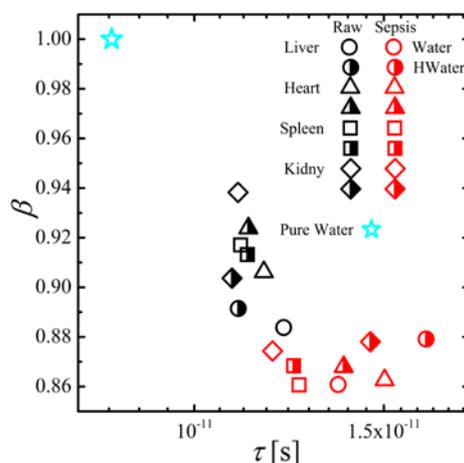


図2. 健常（黒）・敗血症（赤）マウスの各臓器の τ - β ダイアグラム

以上により、GHz 領域誘電分光を用いて、高分子ゲルやエマルジョンなどの生体モデル系の水素結合ネットワークダイナミクスを解析することによって、平均的な含水量や水分子の束縛状態を知ることができた。また、培養細胞やモデルマウス臓器の水素結合ネットワーク解析において、水分子ダイナミクスの平均特性時間と密度ゆらぎを反映する特性時間分布パラメータの関係を用いた水のフラクタル構造解析によって、健常マウス

臓器内水構造の分布が敗血症マウスでは変化して、水分子の凝集構造である水素結合ネットワークがより小さい空間スケールで分散するようになったことを見出した。さらにW/O エマルジョンの MHz 域界面分極の解析から、水滴サイズの成長に伴うイオンダイナミクス特性時間の増加を見出した。これら3種の相補的解析による新たな BDS 生体計測・解析手法の有効性を示した。

これらの BDS フラクタル水構造解析は、物質や生体の機能・健全性の非侵襲 in vivo 評価を可能にし、今後脳機能計測や医療分野など、関連する生物科学から医用・生体工学や医療、さらに広範な理工学領域まで含む幅広い分野での応用が期待される場所である。

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10件)

1. W. Yamamoto, K. Sasaki, R. Kita, S. Yagihara, and N. Shinyashiki, Dielectric study on temperature-concentration superposition of liquid to glass in fructose-water mixtures, *J. Mol. Liq.* 206, 39-46 (2015). doi:10.1016/j.molliq.2015.01.057
2. S. K. Kundu, S. Choe, K. Sasaki, R. Kita, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, Relaxation dynamics of liposomes in an aqueous solution, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17(28), 18449-55 (2015). doi: 10.1039/C5CP01334H
3. S. Sato, Y. Maruyama, H. Kamata, S. Watanabe, R. Kita, N. Shinyashiki, S. Yagihara, M. Egawa, and N. Kunizawa, Evaluation of Water Measurement Techniques for Human Skin by Dielectric Spectroscopy and Confocal Raman Spectroscopy, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan* 40(2), 133-136, 2015. doi.org/10.14723/tmrj.40.133
4. K. Maeda, N. Shinyashiki, S. Yagihara, S. Wiegand, and R. Kita, Soret effect of aqueous solutions of ethylene glycol oligomers, crown ethers, and glycerol: Temperature, molecular weight, and hydrogen bond effect, *J. Chem. Phys.* 143(12), 124504 (2015). Doi: 10.1063/1.4931115
5. K. Sasaki, R. Kita, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *Phys. Chem. B* 120(16) 3950-3953 (2016). doi: 10.1021/acs.jpcc.6b01218
6. Y. Hayashi and S. Yagihara, Elbow- and hinge-bending motions of IgG: Dielectric response and dynamic feature, *Biopolymers* 105(9) 626-32 (2016). doi: 10.1002/bip.22841.
7. T. Kawaguchi, R. Kita, N. Shinyashiki, S. Yagihara, and M. Fukuzaki, The Bi-modality Diffusion of Water Molecules in Liposome/Water Dispersion Systems Analyzed by Pulsed Field Gradient Spin Echo NMR Method, *J. Phys. Chem. B* 41(4), 359-362 (2016). doi: 10.14723/tmrj.41.359
8. S. Nishimura, T. Ohzono, K. Shoji, S. Yagihara, M. Hayashi, and H. Tanaka, Electrocapillary Phenomena at Edible Oil/Saline Interfaces, *J. Oleo Sci.* 66(3) 235-249, (2017). doi: 10.5650/jos.ess16182
9. F. Abe, A. Nishi, H. Saito, M. Asano, S. Watanabe, R. Kita, N. Shinyashiki, S. Yagihara, M. Fukuzaki, S. Sudo, Dielectric study on hierarchical water structures restricted in cement and wood materials, *Meas. Sci. Tech.* 28(4), 044008(pp.9) (2017).doi: 10.1088/0034-4885/76/4/046601
10. K. Sasaki, A. Panagopoulou, R. Kita, N. Shinyashiki, S. Yagihara, A. Kyritsis, and P. Pissis, Dynamics of Uncrystallized Water, Ice, and Hydrated Protein in Partially Crystallized Gelatin-Water Mixtures Studied by Broadband Dielectric Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 121(1), 265-272 (2017). doi: 10.1021/acs.jpcc.6b04756

[学会発表] (計13件)

1. 八木原晋, 高分子水溶液の誘電緩和と広帯域ダイナミクス (招待), 第37回高分子と水・分離に関する研究会講座, 東京, 2015年6月.
2. 田窪洸祐, 八木原晋, 新屋敷直木, 喜多理王, 佐藤駿介, 川口翼, 栗田太作, 福崎稔, 灰田宗孝, 大橋三男, フィリングインに対する前頭葉のNIRS測定, 第25回日本MRS年次大会, 横浜, 2015年12月.
3. 青山剛志, 川口翼, 齋藤徹哉, 清水健太, 庄司幸平, 八木原晋, 新屋敷直木, 喜多理王, 福崎稔, 増田治史, 敗血症および水素水がマウス臓器の水構造に与える影響, 第53回高分子と水に関する討論会, 目黒, 2015年12月.
4. 青山剛志, 齊藤宏伸, 川口翼, 清水健太, 八木原晋, 新屋敷直木, 喜多理王, 福崎稔, 浅見耕司, 懸濁液中の細胞構造に由来する誘電緩和過程, 第25回日本MRS年次大会, 横浜, 2015年12月.
5. 齊藤宏伸, 佐藤駿介, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 福崎稔, 望月明, 田中賢, 広域誘電分光法を用いた高分子生体素材中の水, 25th Annual Meeting of MRS-Japan 2015, 横浜, 2015年12月.
6. 川口翼, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 福崎稔, 傾斜磁場勾配法を用いた³¹P, ²H-NMRによるリポソーム/水分散系における拡散現象, 25th Annual Meeting of MRS-Japan 2015, 横浜, 2015年12月.
7. 八木原晋, 喜多理王, 新屋敷直木, 福崎稔, 水素結合している水分子の大規模挙動, 25th Annual Meeting of MRS Japan 2015, 横浜, 2015年12月.

8. S. Yagihara, F. Abe, A. Nishi, H. Saito, M. Asano, S. Watanabe, R. Kita, N. Shinyashiki, M. Fukuzaki, S. Sudo, and Y. Suzuki, Dielectric Study on Dynamics of Water Molecules and Ions Restricted in Cement and Wood Materials, 11th International Conference on Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substance (ISEMA) フィレンツェ, 2016年5月.
9. T. Kawaguchi, R. Kita, N. Shinyashiki, S. Yagihara, and M. Fukuzaki, Observation and Complementary Analysis for Water Dynamics of Tofu Gel using PFG-NMR and Dielectric Spectroscopy, 11th International Conference on Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substances (ISEMA), フィレンツェ, 2016年5月.
10. 八木原晋, 水構造とは何か—フラクタルな水素結合ネットワークのスケール依存性 (招待), 第65回高分子討論会, 横浜, 2016年9月.
11. 齋藤徹哉, 浅野晴香, 齊藤宏伸, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 非侵襲誘電分光法による生体測定における血液の影響評価, 第26回日本MRS年次大会, 横浜, 2016年12月.
12. 庄司幸平, 齋藤徹哉, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 福崎稔, 大園拓哉, 西村聡, 林正史, 田中久雄, 食用油の分子挙動と水との凝集構造形成への誘電分光法からの考察, 第26回日本MRS年次大会, 横浜, 2016年12月.
13. 青山剛志, 齊藤宏伸, 川口翼, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 福崎稔, 伊藤敦, 浅見耕司, 細胞分散系のPFG-NMRと誘電分光による膜損傷に伴う水とイオンの運動性の変化, 第55回NMR討論会, 広島, 2016年11月.

[図書] (計1件)

1. S. Yagihara, Dynamics of water, biomaterials, and skin investigated by means of dielectric relaxation spectroscopy, Chapter 8 in Nano/Micro Science and Technology in Biorheology: Principles, Methods, and Applications (Eds. T. Dobashi and R. Kita), Springer, 183-213 (2015).
doi: 10.1007/978-4-431-54886-7_8

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

1. 水—物質・生命のうつし絵—
http://www.sp.u-taokai.ac.jp/~ylab/aim_yagihara.htm
2. 水構造ダイナミクスの意味と現代科学
<https://sites.google.com/view/waterstructures>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木原 晋 (YAGIHARA, Shin)

東海大学理学部・教授

研究者番号: 40191093