

DNAおよび細胞のマイクロ分析への 誘電分光法の適用

勝本 洋一

目次

第1章 緒論	1
1.1 研究の背景	1
1.2 生体物質の誘電緩和とその応用に関する過去の知見	4
1.2.1 DNA水溶液の誘電緩和とDNA量・長さ計測への応用	4
1.2.2 細胞懸濁液の誘電緩和と電気物性計測への応用	8
1.2.3 単一細胞の誘電緩和と赤血球変形能計測への応用	9
1.3 本論文の構成	11
参考文献	14
第2章 誘電分光法	19
2.1 誘電体	19
2.1.1 誘電分極	19
2.1.2 誘電率と導電率	20
2.1.3 複素比誘電率と誘電緩和	21
2.2 誘電緩和スペクトルの解析	23
2.2.1 緩和関数と緩和パラメータ	23
2.2.2 同心多相球の界面分極	24
2.3 誘電分光測定	26
2.3.1 測定回路と測定セル	26
2.3.2 電極分極現象とその補正	28
参考文献	30
第3章 塩存在下における一本鎖DNAの対イオン雰囲気と分極機構の解明	31
3.1 概要	31
3.2 実験手法	31
3.3 結果と考察	32

3.3.1	誘電分散の定量的解析	32
3.3.2	純水中での ss-DNA の誘電緩和	36
3.3.3	塩存在下での ss-DNA の誘電緩和	41
3.4	結論	49
	参考文献	51
第 4 章	形状操作赤血球の電気物性の計測	55
4.1	概要	55
4.2	実験及び数値計算の手法	55
4.2.1	試料調製と幾何形状測定	55
4.2.2	誘電分光測定	57
4.2.3	細胞モデル	57
4.2.4	数値計算	58
4.3	結果と考察	63
4.3.1	細胞形状と誘電分散の対応	63
4.3.2	細胞膜と細胞質に関する電気物性の推定	67
4.3.2.1	球状赤血球	67
4.3.2.2	非球形赤血球	67
4.3.3	pH 操作による赤血球形状変化の過程に関する考察	71
4.4	結論	74
	参考文献	75
第 5 章	マイクロ流路内における単一赤血球の変形能の計測	77
5.1	概要	77
5.2	変形能計測手法	78
5.2.1	測定原理	78
5.2.2	等価回路モデルと測定周波数の選択	79
5.2.3	電極および流路構造	81
5.3	数値解析による検討	83
5.3.1	数値解析手法と条件	83
5.3.2	赤血球の通過高さおよびセンサ寸法のセンサ感度に及ぼす影響	84
5.3.3	赤血球通過に伴う抵抗値の時系列変化	89

5.4	実験による検証	90
5.4.1	流路と電極の作成	90
5.4.2	測定手法と実験条件	92
5.4.3	赤血球試料の作製	93
5.4.4	流動中の赤血球変形の観察	93
5.4.5	変形能計測手法の検証と考察	95
5.5	結論	97
	参考文献	99
第6章	結論	101
6.1	研究の総括	101
6.2	今後の研究展望	103
	記号表	105
	謝辞	111

第1章 緒論

1.1 研究の背景

1980年代以降，半導体作製プロセスを応用した機械要素のマイクロ・ナノ加工技術や，マイクロ流体技術（例えばポンプ，アクチュエータ，ミキサー等のデバイス制御技術）の研究開発が急速に発展してきた．一方，吸光度測定法，蛍光強度測定法，電気化学測定法，表面プラズモン共鳴法等による個々の化学物質の測定手法について，装置小型化と高感度・高精度化が進められてきた．1990年代になり，これらの成果は，電気泳動チップ [1] などのマイクロ化学分析法や，DNA チップ，マイクロ PCR(Polymerase chain reaction)[2] などのバイオセンサとして発展した．2000年代以降は，さらに医療・創薬への応用を視野に入れて，細胞の分離，培養，粉碎などの多くの前処理工程を包含した LOC(Lab-on-a-Chip) と呼ばれる統合検査システムに関する研究開発へと発展している．この LOC が測定の対象とする生体物質の代表例として，ここではデオキシリボ核酸 (DNA: Deoxyribonucleic acid) と細胞を挙げ，個別にその測定技術の発展を概観する．

DNA はヌクレオチドが連なったものであり，ヌクレオチドはデオキシリボース，リン酸，塩基から成る．塩基にはアデニン (A)，グアニン (G)，シトシン (C)，チミン (T) の4種類があり，その配列の順序により DNA は生体の遺伝情報を保持している．核内の DNA の配列は RNA(Ribo nucleic acid) ポリメラーゼによって RNA に転写され，さらに RNA は核外のリボソームでタンパクに翻訳される．そうしてできた多様なタンパク群は生命活動を司る．DNA はこのように生命活動の根幹をなしているため，測定対象としての重要性は高く，DNA の量，長さ，塩基配列は，既に今日では分子生物学，薬学，医学において日常的に測定され，活用される対象となっている．

DNA 量は，DNA が波長 260nm 付近に持つ固有の吸光特性を利用して測定される．また，DNA は高分子電解質の一種であり，DNA 鎖中の各リン酸基は水中で電離し負に帯電する．荷電量と DNA の鎖長が比例することから，電気泳動法を用いて DNA 鎖長が測定

される。DNA シーケンサでは、A、G、C、T の 4 種類の塩基を異なる色素で標識した上で、キャピラリー電気泳動により 1 塩基相当の長さの違いまで精密に分離して、光学的に DNA の塩基配列を解析する。DNA マイクロアレイでは、標的 DNA の一部と相補的に結合するプローブ DNA を固定したチップを用いて、標的 DNA を検出する。特異的に結合した 2 本鎖 DNA の検出には一般に蛍光色素を用いた蛍光測定法を使うが、表面プラズモン共鳴法を用いることもある。その他、表面プラズモン共鳴法を DNA のハイブリダイゼーションの検出に用いる場合などもあるが、それらも含めて、以上のように、DNA を対象とする場合、一般に光学的測定を伴う場合がほとんどである。これらの測定手法は、計測技術や精度の向上とともにそれぞれ小型化が進み、さらにはチップ化がなされてきた [3]。既に市販されているものもあり、今日では分子生物学研究の重要なツールとして広く認知されている。

一方、細胞については、その大きさ、形状や個数といった基本的な値の測定から、個々の細胞機能の測定まで、測定項目は非常に多岐に渡り、また関心の対象に依存して大きく異なる。ここでは血球細胞に限定し、医学研究・臨床検査への適用を念頭において、その測定手法の現状を概観する。

細胞の大きさと形状の測定は、光学顕微鏡を用いた観察によって行われる。例えば赤血球の形状観察により、破碎赤血球、球状赤血球、鎌状赤血球などが同定され、各種貧血症や臓器障害などが診断される。さらに細胞の内部構造の観察のために、様々な染色法が開発され、また位相差法や微分干渉法といった光学的技術が導入され、発展してきた。

細胞個数の算定は、基本的であるが生物学的に重要な技術である。例えば、細胞の増殖には細胞固有の適切な数密度条件があり、細胞培養にあたっては適宜細胞個数を測定し、その数密度が増殖好適条件範囲内にあるように培養液量を調整する必要がある。一般的には、細胞計数盤と呼ばれる専用スライドガラス中に細胞懸濁液を入れ、顕微鏡を用いて目視により単位溶液体積当たりの個数を数える。また、臨床検査に用いられる自動血球計数装置では、電極間に微細な穴のあいた遮蔽板を置き、赤血球や白血球がこの穴を通過するときの抵抗の変化を捉えてそれぞれの個数を算出する。より多機能な装置においては、抵抗変化率を赤血球径に換算することにより大きさの情報も得られる。さらにはその際に各赤血球の吸光度も同時に調べることにより、赤血球中に含有されるヘモグロビンの定量を行うことも可能である。

白血球は免疫機構に重要な役割を果たす細胞である。白血球は分化・成熟化の過程を経て、対象細胞を限定した攻撃や援護といった特異的機能を獲得する。この特異性は、白血

球細胞膜の表面抗原の違いに起因しており、個々の細胞の形態からは判別できない。そこで、この表面抗原の特異性を逆に利用し、各抗原に対応する磁気ビーズ抗体を用いて対象細胞を単離したり、各抗原に対応する蛍光色素付き抗体を用いて白血球を標識することにより白血球数の機能別カウントを行ったりすることができる。特にこの技術は蛍光フローサイトメトリーと呼ばれる。

DNAに関する測定技術の発展と同様に、以上述べたような血球数のカウントや分析の技術も、測定原理はそのままに、MEMS技術を利用したマイクロチップ上での細胞培養や、光学計測のための装置の小型化技術の進展により、少量の試料や試薬で多数の被検体を同時に調べられるようになり、実用化が進んでいる。さらには、医療、環境、薬品開発などへの応用を見据え、細胞の前処理、移動操作、染色、光学測定、DNA抽出、DNA配列測定などのいくつかをLOC上で完結させるような研究開発が行われており、今後順次実用化されるであろう[4]。

このように、DNAや細胞を測定する技術や装置は、それぞれ出発点であるマクロスコピックな系から、マイクロスコピックな系、さらにはLOCへと発展してきている。しかしながら、上述のマイクロ化装置類は、主に反応器のマイクロ化による反応効率向上、試薬必要量の低減を意図して開発されたものであり、その測定原理は概ね既存のマクロ系化学的手法に立脚したもので、新しい計測原理の確立には至っていない。もちろん、化学的手法は対象物質の特異性（例えば、ある特定の機能を持つタンパクのみを定量する等）を調べる点で大きな長所を有し、場合によっては唯一の手法であるが、その一方で、化学的手法ゆえに不可逆反応であったり、被検体に損傷を与えることが多く、測定後の被検体を再利用したり、薬剤添加に対する被検体の応答の経過を追跡したり、さらに究極的には被検体を生体に戻す、などの用途には向かない。また、化学的手法を用いる場合は、試薬の希少性のため一般に高価な測定となる。

ところで、DNAや細胞に関する測定法・検査法の歴史的経緯を別にして考えると、如何なる測定技術がより本質的にLOCとの親和性を持っているであろうか。本論文ではそうした視点に立ち、必ずしも化学的特異性が不要でない測定対象について、現状の化学的手法に立脚したマイクロ化測定法の短所を克服し、それを代替し得る物理的手法としての、電気測定手法について論じる。物理計測には、他にも、力学測定（化学的手法を伴わない）光学測定、等が挙げられるが、特に、周辺装置の小型化、および、測定スループットの短縮化、の可能性を考えると、電気測定こそ、マイクロデバイスにおける計測手段として本質的に有望と考えられる。また、LOCにおける流体駆動やDNA、細胞輸送の手段

として電気力が頻繁に用いられるので，装置の統一性の観点からも有益である．

電気測定に基づく細胞測定のひとつの有力な手法として，単一のイオンチャンネルを流れる電流を測定するパッチクランプ法 [5] が挙げられる．これは，直径 $1\mu\text{m}$ 程度の細いガラスピペットの先端に細胞を吸いつけ，ガラスピペット内の電極と細胞外の参照電極との間の電位差を固定してチャンネル電流を測定するものである．この手法により，例えばチャンネル開閉のための分子機構等が明らかになってきており，細胞膜特性の基礎研究に役立っている．しかしながら，パッチクランプ法では，人の手により顕微鏡下で1つ1つの細胞を選択して操作する必要がある，一般的な計測用デバイスとしての応用性に乏しいこと，また，非破壊とは言い難いことから，化学的手法を代替するという目的に合致しない．

もう1つの有力な電気測定手法として誘電分光法がある．この手法では，まず，対象となる物質の複素比誘電率の周波数特性を測定する．そして，適切な物理モデルを立てて，得られた複素比誘電率の周波数分散を解析することにより，対象を構成する物質の状態や電気物性を推定する．被検体に関する多くの情報が取得可能であれば，誘電分光法は LOC における化学的手法の一部を代替する，あるいは新規測定法として成立する可能性がある．

そこで，以下の節において，冒頭で着目した計測対象である DNA および細胞について，誘電分光法によって具体的にどのような物理量が計測可能であるかを検討する．そのために，それぞれの物質において，どういった原理で誘電分極が発生し，その特性はどのようなものであるか，その特性が計測にどのように応用されたか，過去の研究を概観する．その上で，DNA と細胞に関する既存の測定法・検査法を代替するに至る上で学問的に未解明な点や工学的に未実施である点を指摘し，それらを本論文において如何に扱うか述べる．

1.2 生体物質の誘電緩和とその応用に関する過去の知見

1.2.1 DNA 水溶液の誘電緩和と DNA 量・長さ計測への応用

核酸配列測定を担う DNA シーケンサや DNA マイクロアレイでは，前処理工程において DNA を数 10 から数 100 塩基（対）の長さに断片化する（以下，DNA の重合度を塩基数，base で表わす．二本鎖では base-pair とする．）そこで，その程度の長さの DNA，あるいはより広く高分子電解質の分極に関する知見を概観する．

図 1.1 は水中における一本鎖 DNA(ss-DNA) とイオン雰囲気の様式図である．負に帯電

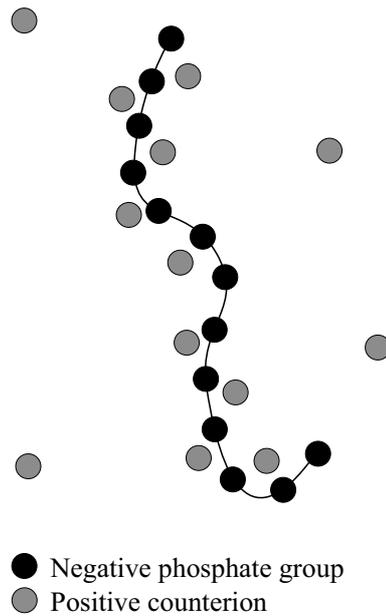


Figure 1.1: Ion atmosphere around a ss-DNA.

したリン酸基を，実線で示す高分子骨格が接続しており，正の電荷を持つ対イオンがそれらの周囲を取り囲んでいる．過去の研究 [6] によれば，DNA，あるいは高分子電解質は，溶液中において2つの要素，すなわち凝集相と散漫相からなるイオン雰囲気に含まれている．すなわち，図 1.1 に示すように，高分子骨格上のリン酸基の負電荷によって形成される強い静電場を遮蔽するべく，高分子電解質はイオン雰囲気を形成している．Manning[7] によると，十分長い高分子電解質の1分子を考えたとき，すなわち遮蔽半径に相当する Debye 長が高分子上の電荷（DNA であればリン酸基）同士の間隔よりも十分大きい場合，棒状高分子電解質の電荷密度がリン酸基の負電荷同士の静電反発力によるエンタルピー増加と対イオン凝集によるエントロピー低下のバランスによって定まる臨界値を超えると，対イオン凝集による安定化が起こる．このような Manning の結果は，鎖長が無限大であり，Debye 長に対して高分子上の電荷の間隔が無視できるという条件の下に得られているが，実際の高分子電解質においても，対イオン凝集は実験的に観測されている [8]．DNA 分子の場合，1 価の電解質溶液中では約 76% のリン酸基に対イオンが強く結合し，その割合は塩濃度に依存しない．この凝集対イオンのさらに外側には，凝集対イオンによって遮蔽し切れなかったリン酸基の残りの電荷を遮蔽すべく，弱く束縛された対イオンが分布し，散漫相を形成する．

図 1.2 上段に示したように，対イオンを伴う DNA に外部電場を印加すると，DNA 分子は陽極側に，凝集相内および散漫相内の対イオンは陰極側に，それぞれ移動する．ただ

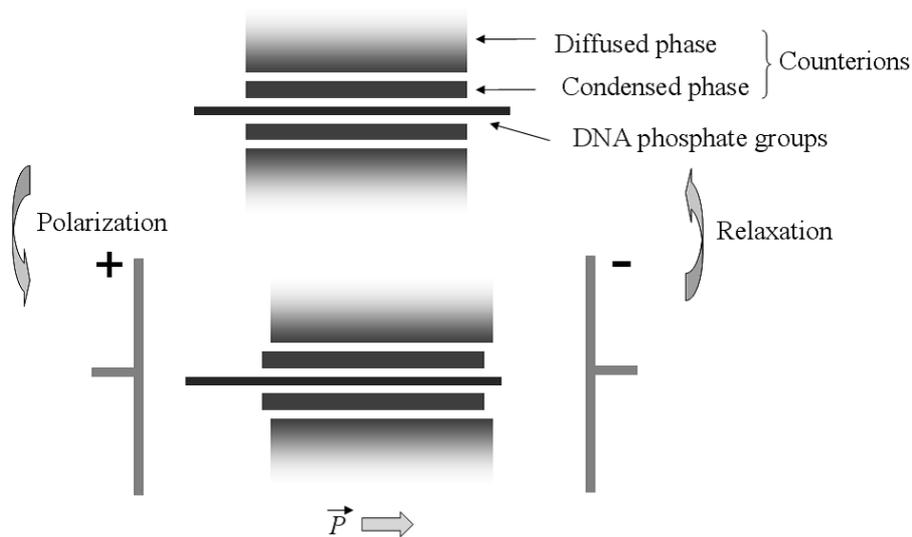


Figure 1.2: Counterion polarization of a short ss-DNA.

し，DNA と対イオンとの間には引力が働くので，それぞれの重心がある程度変位した状態で平衡に達し，図 1.2 下段のような状態になる．このとき，DNA のイオン雰囲気は，電場方向と同じ向きに分極を生じていることになる．この現象を対イオン分極という．

さらに，外部電場を交流電場とすると，電場方向の入れ替わりの周波数が十分低いときには，その変動に追従して，常に図 1.2 下段のような状態を発現する．しかし，DNA と対イオンの移動度は有限であるので，周波数を高くしていくと，ついには電場の変動に追従できなくなり，電場の方向に無関係に，図 1.2 上段のような状態になって，分極はゼロとなる．従って，DNA の分極量は周波数の関数となる．

このような溶液中の DNA とイオン雰囲気に分極は，実験的には誘電率として測定され，その誘電率もまた周波数の関数となる．このことを，誘電分散，特にそのメカニズムから誘電緩和といい，これを計測する手法が誘電分光法である．

分極や誘電緩和の特性を理論的に調べる手段は 2 つある．ひとつは物理モデルを仮定して行う理論解析であり，もうひとつは数値解析である．

前者の理論解析のアプローチは次のようなものである．まず，外部電場印加時の分極率は，揺動散逸定理 [9] を通して，外部電場のない状態における双極子モーメントの時間相関関数に関係付けられる．そこで，Oosawa[10]，Minakata[11]，Warashina[12] は，それぞれ誘電緩和の強度を，凝集相のみの熱揺らぎに基づく双極子モーメントの 2 乗平均から求めた．その他，Fixman[13,14] は，高分子電解質における対イオンの分極率の長軸・短軸成分をイオン雰囲気全体にわたって計算した．また，Rau ら [15] は，高分子電解質鎖

の外側の Debye-Hückel イオン雰囲気を薄層で近似し，その分極率を計算した．しかしながら，これらの研究は連成した複数の非線形偏微分方程式を解くという複雑な計算を伴うため，大胆な近似抜きには解析的表式を得られないという難点があった．

後者の数値解析的方法として，Washizu ら [16,17] はモンテカルロシミュレーションによりイオン雰囲気全体にわたる双極子モーメントを計算し，揺動散逸定理を用いて，64-base-pair の二本鎖 DNA(ds-DNA) の対イオン分極を詳細に調べた．まず，対イオンの分布は凝集相，散漫相，およびその外側にあるバルク相の3つの相に分けられることを示した．次に，DNA から距離の近い順に n 個の対イオンの双極子モーメントの和を計算することにより電気分極率テンソルを n の関数として求め，高分子電解質溶液の対イオン分極に対するイオン雰囲気内の各相の寄与を明らかにし，少なくとも 0 から 4.8 mmol/L の塩濃度条件の下では散漫相の寄与が支配的であることを示した．

次に，本論文で対象とする短い DNA や，それに類似の高分子電解質に関する誘電緩和の計測結果を概観する．実験的には，無限希釈域での測定は不可能であって，溶質である高分子電解質の分子間相互作用の影響は，溶質濃度依存性として現れる．Ito ら [18] は，87 から 3,800 までの複数の重合度を持つ NaPSS (sodium polystyrene sulfonate) に対して，希薄領域と準希薄領域において純水中で誘電測定を行った．さらに，それらの結果を，誘電緩和が散漫相内の対イオンの運動に起因すると仮定した上で，セルモデル [19] と隣接高分子電解質同士の平均間隔との関係性をオーダー解析により評価し，誘電緩和の鎖長依存性及び溶質濃度依存性が良く説明できることを示した．

ところで，誘電分光法の DNA 濃度や DNA 長さの測定への適用を考えた場合，塩の共存を考慮した上で鎖長依存性や DNA 濃度依存性を把握する必要がある．前述の Ito ら [18] の検討は，対イオンの運動の長さスケールの決定が幾何学的考察のみによっており，散漫相が十分に大きいときに成り立つ．しかしながら，塩濃度に依存して散漫相の広がり大きく変化するるので，塩の共存を考慮した場合にはこの議論は十分でなく，溶質濃度で定まる仮想的なセルサイズと Debye 長の大小関係を考慮しなくてはならないはずである．

まとめると，モンテカルロシミュレーションの結果から，短鎖 DNA の誘電緩和に関しては，空間的に広がった散漫相の寄与が大きいことが明らかになったにも関わらず，前述のように過去の理論は凝集相の変位のみ [10–12] ，もしくは薄層近似による散漫相の分極のみ [13,14] を扱っており，空間的に広がった散漫相の寄与に関する実験的検証は行われていない．また，具体的に高分子電解質として DNA を用いた実験結果，特に，応用において重要である短鎖 DNA の結果は不足しており，誘電緩和の特性に対して，DNA の鎖

長や濃度，あるいは塩濃度がどのように関わっているかについて，決定的な知見が存在しないのが現状である．

1.2.2 細胞懸濁液の誘電緩和と電気物性計測への応用

誘電分光法を用いた生物細胞の研究の歴史は古く，1900年代の初めから行われている．生物細胞が厚さ約3nmの脂質膜（細胞膜）で覆われていることも，誘電分光法により初めて明らかにされた．

Schwan[20]によると，生物細胞の懸濁液は3つの誘電緩和を示す．1kHz以下の周波数領域にある α -緩和と，1kHz～100MHzの周波数領域にある β -緩和はそれぞれ細胞の不均質構造に起因し，マイクロ波オーダーの周波数領域における γ -緩和は自由水の配向に起因する．

一般に生物細胞懸濁液のような電解質を含む試料では，後に述べる電極分極現象のため，低周波での測定は困難である．このため， α -緩和の解析は進んでおらず，生物細胞については， β -緩和，すなわち界面分極の解析が中心となっている．

β -緩和は，界面分極，すなわち電気的性質（誘電率，導電率）の異なる物質が接している界面に電荷がたまることに起因して生じる．例えば，図1.3のような細胞モデルを考えると，左図のように低周波交流電場の下では，細胞質中のイオンは外部電場により泳動し，絶縁体である細胞膜の界面近傍に停留する．これは分極していることを意味する．一方，高周波では，電場の反転に追従できず，イオンは全体としてはその重心位置をほとんど変えない．従って，分極の程度は低周波のときに比べて小さい．あるいは，高周波では，細胞膜の交流インピーダンスが小さくなるために，電流が細胞を貫通して流れると考えることもできる．

従って，界面分極は細胞形態の変化や細胞の凝集に敏感である．これを利用して，過去には細胞分裂過程のモニタリング[21]，赤血球の連鎖形成[22]などの研究例がある．しかしながら，医学研究・臨床検査を念頭においた誘電分光法の適用事例は殆ど見当たらない．

臨床検査において，もっとも頻度の高い検査項目は血液検査である．すでに述べたように，赤血球や白血球の計数は自動測定が可能であるが，一方で形状異常の確定診断は現在でも目視観察による．また，裏打ちタンパクを含む赤血球の膜異常や細胞質の異常の検査は，一般的には行われていない．しかしながら，体の状態や疾病により，血球の形状は敏感に変化することが知られており[23–27]，誘電分光測定を行うことにより，血球を含む

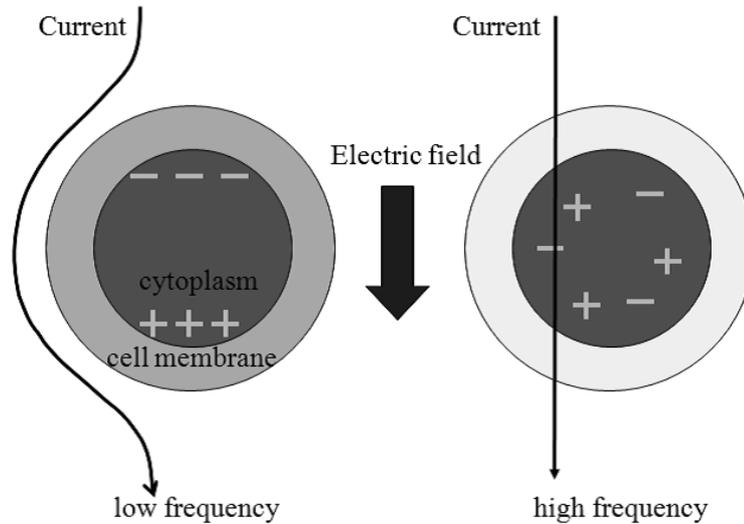


Figure 1.3: Interfacial polarization.

溶液に関する複素比誘電率の周波数分散が得られれば，結果として血液の状態に関する情報を簡便に知ることができるであろう．

球状血球については，実験的に得られた誘電分散に対して解析式 [28] を用いることにより，細胞質導電率や細胞膜キャパシタンス等の，細胞を構成する各相の物理量に変換でき，非破壊的に血球の状態を知ることが出来る [29] ．

しかし，それらの物理量算出に用いられる解析式は，球状，あるいは楕円体形状の細胞については得られているが，実際に興味のある正常形，突出形等の赤血球に対しては厳密には適用できない．界面分極は形状の影響を大きく受けるため，これらの形状の血球に対しては，非破壊的に物理量を正確に知ることは困難であった．

近年，細胞懸濁液やコロイド懸濁液の誘電分散を得るために，境界要素法 [30]，有限差分法 [31]，有限要素法 [32] などを用いた数値解析的手法が開発されている．しかしながら，臨床的に生じる種々の具体的な赤血球形状に対しての数値解析は未だ行われておらず，また，逆に実験的に得られた誘電分散から膜や細胞質の物性を得るための現実的な逆解析手法は皆無である．

1.2.3 単一細胞の誘電緩和と赤血球変形能計測への応用

マイクロ流路はその寸法効果により，低流速であっても高いせん断場が生じる．そこを流れる細胞は，当然大きなせん断力を受けることになる．従って，マイクロ流路中では，適切な形状測定手段を用いれば，その大きなせん断力を活用して比較的容易に変形能を

計測できる可能性がある。実際、マイクロ流路を用いた赤血球変形能の光学的測定に関する研究 [33] が報告されている。以下に、赤血球変形能計測の臨床的意義と従来法を概観する。

赤血球の変形能は、循環器病を念頭に置いた流体力学的要素研究の対象であるのみに留まらず、血液疾患や感染症の病理学的な直接指標としても重要な対象たり得る [34]。例えば、マラリア原虫の寄生した赤血球は、正常な場合と比較して著しく変形能が低下する事が知られており [35]、赤血球の細胞個体の変形能が計測できれば、これにより感染診断が可能であると考えられる。また、赤血球の変形能計測は物理的手法であり、免疫学的手法を用いた場合等と比較して安価となる可能性があり、流行地における多人数を対象とした初期診断手法としても有効であると考えられる。

赤血球変形能計測は、赤血球を含む溶液のバルク測定によるもの、または赤血球の個別測定によるもの、の2つに大別される。前者として、粘度計により赤血球懸濁液のバルク粘度を測定する方法 [36]、懸濁液がフィルターを通過する際のバルク速度を測定する方法 [37] 等がある。一方、後者には、レオメータを用いたせん断流れ中において個々の赤血球の伸張を画像処理により測定する方法 [38]、ガラスマイクロピペットを用いて単一赤血球を吸引し、圧力と吸い込み量から膜弾性率を推定する方法 [39] などが提案されている。マラリア感染の初期診断への応用などを考えた場合、感染細胞数は全赤血球数に対して相対的に少ないため、バルク測定ではなく、個々の赤血球の変形能を多数サンプリングして調べる必要があると考えられる。しかし、前述の従来法は高い水平方向空間分解能の光学測定が必要であり、また、多数細胞の連続測定を行うには原理的に操作効率向上が望めない。さらに、現場検査を指向した場合、少量の試料での迅速かつ安価な測定技術が求められるであろう。そのような要求は、マイクロ流路での電氣的計測法がより適すると考えられる。

前節で概観したように、細胞形状や細胞物性の非破壊測定が誘電分光法によって可能である。しかしながら、誘電分光法に用いる計測器の感度上の問題と、電極を小型化する際の電極上の電気二重層キャパシタンスの顕在化の問題のために、物性解析を行う上で必要となる精度の高い実験データを得るには、一般に細胞体積分率が 10% 程度以上の細胞懸濁液を 100 μ L 程度以上必要とする、それゆえ、数千万個の細胞群の平均的情報を得ることしかできなかった。すなわち、現状では単一細胞計測による感染細胞の初期診断用途等に誘電分光法を適用することは困難である。また、医学研究・臨床の場では、同様に多数の細胞中にまれに存在する異常細胞を検出する需要が多く存在するが、そういった用途に

も現在の誘電分光法は適用できない。

ごく最近になり，Morgan ら [40] により，単一細胞のインピーダンス測定が提案された。この技術は，誘電分光法と類似の手法であり，マイクロ流路中を流れる単一細胞の複素インピーダンスを数点の周波数に対して取得し，細胞の物性情報を推定しようとするものである。しかし，電極間に細胞が存在する電極対と，参照電極対としての細胞が存在しない電極対とをホイートストンブリッジの中に組み込んで測定するため，回路が平衡に達するまでの時定数が遅いことが予想される。実際，誘電分散を解析するに足るような多数の周波数にわたっての測定は行われていない。高速な高周波インピーダンスアナライザの開発や，電気二重層の影響を排除する電極構造の開発等が行われるならば，この分野は今後の発展が期待される。

一方，分極の測定という観点からは少し外れるが，細胞は絶縁性の高い細胞膜を持つため，単一周波数での測定であっても，懸濁液の導電度変化，あるいは抵抗変化から，流路中を流れる細胞のカウンティングは可能であり，すでに述べたとおり，血球計数装置に應用されている。この手法をマイクロ流路と組み合わせた研究については多数の報告がなされている。

1.3 本論文の構成

本研究論文における各章の構成とその目的を述べる。

本章における，DNA や細胞の物理量計測を対象とした誘電分光法の適用に関する現状の概観と問題点の提起に続き，第 2 章では，まず一般論として誘電体の分極や複素比誘電率，誘電緩和現象に関して概説する。前節までに，DNA は対イオン分極，細胞は界面分極によって誘電緩和が起こることを述べたが，特に多層同心球の界面分極理論については，本論文の各所で用いるので詳述する。次に，それらの誘電緩和の計測法および得られたデータの解釈法を，実際に用いたものに即して論じる。

第 3 章においては，DNA 量や長さの電氣的計測法の開発に必要となる，短い DNA の誘電緩和に関する物理的メカニズムを解明する。DNA の定量的な電氣的測定を行うにはまず，その対イオン雰囲気や対イオン分極のメカニズムを理解する必要がある。しかしながら，前節で概観した通り，生体環境である塩共存下での短い DNA の対イオン雰囲気，あるいは塩濃度変化によりその対イオン雰囲気がいかに変化するか，については未だ決定的な知見は得られていない。そこで，特に短い一本鎖 DNA 溶液の濃度と塩濃度を変化さ

せることにより、イオン雰囲気空間的広がりを制御し、それらが DNA の誘電緩和に与える影響を調べる。その上で、過去の電解質高分子の緩和理論の拡張を行い、塩共存下での DNA の分極機構に関する新たな知見を提示する。さらに、それらの知見を基に、DNA 量や長さの電氣的検出の可能性について述べ、また、連続流の中での DNA の定量手法の可能性を示す。

なお、生体内に目を移せば、ゲノム DNA は核内に高度に折り畳まれて存在しており、遺伝子発現時や複製時には解きほぐされ、その情報が読み取られる。従って、DNA 対イオン雰囲気構造変化に関する定量的知見は、生体内で高度に制御された反応調節機構の解明に不可欠な情報である。また、それは DNA を標的物質とした薬剤開発のための基礎的知見としても有用であろう。

第 4 章では、赤血球を構成する細胞質や細胞膜の電気物性を、誘電分光法によって定量的に計測する方法について検討する。前節で議論したように、赤血球は病態により、ウニ状、鎌状、扁平状、など、様々な不定形状を取り得るので、 β -緩和の誘電分散は赤血球の形状に依存して変化すると考えられるが、実際に系統的な実験は行われていない。さらに、球体・楕円体以外については、よく知られている正常系である両凹型についてさえも、 β -緩和に関する解析解が存在しないので、例え誘電分散が実験により得られたとしても構成相の電気物性を定量的に知ることは現状では出来ない。そこで、本論文では、まず、細胞外環境を変化させたときの赤血球の形状変化や内部変化について、誘電緩和スペクトルを測定し、各赤血球のスペクトル形状の違いについて議論する。その上で、スペクトルから赤血球の電気特性を求める数値解析法を開発する。具体的な手順は以下のとおりである。まず、懸濁液の pH を変化させて赤血球形状を様々に変え、その誘電分散を実験的に得る。次に、有限差分法による数値解析的手法を用いて、まず各構成相の電気物性値を仮定することにより、非等方的な細胞形状を含む系の誘電分散を計算する。さらに、数値計算によって得られた誘電分散の波形を数値化したデータベースを構築し、これを用いた電気物性値の算出法を提案する。最後に、上述の pH 調製によって形状が変化した赤血球懸濁液の誘電分散に、本法を適用して各構成相の電気物性値を決定し、その妥当性を議論する。

誘電分光法を LOC 上で実現し、多数の単一血球あるいは単一細胞の誘電分散が得られるようになれば、その医学・臨床応用は大いに発展すると推察される。しかしながら、前節にて指摘したように、その実現のために必須となる高速インピーダンスアナライザや多周波数複素誘電率計測機は、現在のところ未だ製品化されていない。そこで第 5 章では、誘電分光法を個別の細胞に適用するための先駆的研究として、マイクロ流路中に 1 つずつ

赤血球を流し，周波数一定条件の下での溶液コンダクタンス変化，すなわち抵抗成分の変化に着目し，個別赤血球の変形能を計測するセンサを検討する．その手順は次の通りである．まず，マイクロ流路内付設型電気センサを用いた，個別赤血球の変形能のコンパクトで簡便かつ迅速な計測法を提案し，原理と構造について詳述する．次に，球形細胞に関する解析解の中間表式を応用してマイクロ流路中の赤血球懸濁液に関する有限要素法三次元調和電場解析を実施し，上記センサの計測原理を検証する．さらに，数値計算結果から得た設計指針に基づいて薄膜電気センサを作製し，変形能の異なる赤血球サンプルを用いて本手法の有効性を実験的に検証する．

第6章においては，本論文を総括して，その結論を述べるとともに，得られた知見の応用先や今後の研究の展望を論じる．

参考文献

- [1] Jacobson, S.C., Hergenroder, R., Moore, A.W.Jr. and Ramsey, J.M., *Anal. Chem.*, Vol.66, No.23(1994), pp.4127-4132.
- [2] Kopp, M.U., Mello, A.J. and Manz, A., Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip, *Science*, Vol.280, No.5366(1998), pp.1046-1048.
- [3] Burns, M.A., Johnson, B.N., Brahmasandra, S.N., Handique, K., Webster J.R., Krishnan, M., Sammarco, T.S., Man, P.M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C.H. and Burke, D.T., An integrated nanoliter DNA analysis device, *Science*, Vol.282(1998), pp.484-487.
- [4] Nevill, J.T., Cooper, R., Dueck, M., Breslauer, D.N. and Lee, L.P., Integrated microfluidic cell culture and lysis on a chip, *Lab on a Chip*, Vol.7(2007), pp.1689-1695.
- [5] Neher, E. and Sakmann, B., Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature*, Vol.260(1976), pp.799-802.
- [6] Bordi, F., Cametti, F. and Colby, R.H., Dielectric spectroscopy and conductivity of polyelectrolyte solutions, *J. Phys. D App. Phys.*, Vol.16(2004), pp.R1423-R1463.
- [7] Manning, G.S., The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides, *Q. Rev. Biophys.*, Vol.11, No.2(1978), pp.179-246.
- [8] Fenley, M.O., Manning, G.S. and Olson, W.K., Approach to the limit of counterion condensation, *Biopolymers*, Vol.30, No.13(1990), pp.1191-1203.
- [9] Kubo, R., Statistical-Mechanical Theory of Irreversible Processes. I. General Theory and Simple Applications to Magnetic and Conduction Problems, *J. Phys. Soc. Jpn.*, Vol.12, No.6(1957), pp.570-586.
- [10] Oosawa, F., Counterion fluctuation and dielectric dispersion in linear polyelectrolytes, *Biopolymers*, Vol.9, No.6(1970), pp.677-688.

- [11] Minakata, A., Imai, N. and Oosawa, F., Dielectric properties of polyelectrolytes. II. A theory of dielectric increment due to ion fluctuation by a matrix method, *Biopolymers*, Vol.11, No.2(1972), pp.347-359.
- [12] Warashina, A. and Minakata, A., Dielectric properties of polyelectrolytes. IV. Calculation of dielectric dispersion by a stochastic model, *J. Chem. Phys.*, Vol.58(1973), pp.4743-4749.
- [13] Fixman, M., Charged macromolecules in external fields. I. The sphere, *J. Chem. Phys.*, Vol.72(1980), pp.5177-5186.
- [14] Fixman, M., Charged Macromolecules in External Fields. 2. Preliminary Remarks on the Cylinder, *Macromolecules*, Vol.13(1980), pp.711-716.
- [15] Rau, D.C. and Charney, D., Polarization of the ion atmosphere of a charged cylinder, *Biophys. Chem.*, Vol.14(1981), pp.1-9.
- [16] Washizu, H. and Kikuchi, K., Concentration dependence of the anisotropy of the electrical polarizability of a model DNA fragment in salt-free aqueous solution studied by Monte Carlo simulations, *Colloids Surf. A*, Vol.148(1999), pp.107-112.
- [17] Washizu, H. and Kikuchi, K., Electric Polarizability of DNA in Aqueous Salt Solution, *J. Phys. Chem. B*, Vol.110(2006), pp.2855-2861.
- [18] Ito, K., Yagi, A., Ookubo, N. and Hayakawa, R., Crossover behavior in high-frequency dielectric relaxation of linear polyions in dilute and semidilute solutions, *Macromolecules*, Vol.23(1990), pp.857-862.
- [19] Katchalsky, A., Polyelectrolytes, *Pure Appl. Chem.*, Vol.26, No.3-4(1971), pp.327-374.
- [20] Foster, K.R. and Schwan, H.P., Dielectric properties of tissues, *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, Vol.17(1989), pp.25-104.
- [21] Asami, K. and Yonezawa, T., Dielectric behavior of non-spherical cells in culture, *Biochim Biophys Acta*, Vol.1245(1995), pp.317-324.

- [22] Irimajiri, A., Ando, M., Matsuoka, R., Ichinowatari, T. and Takeuchi, S., Dielectric monitoring of rouleaux formation in human whole blood: a feasibility study, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1290, No.3(1996), pp.207-209.
- [23] Hebbel, R.P., Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology, *Blood*, Vol.77(1991), pp.214-237.
- [24] Zachee, P., Boogaerts, M., Snauwaert, J. and Hellemans, L., Imaging uremic red blood cells with the atomic force microscope, *Am. J. Nephrol.*, Vol.14(1994), pp.197-200.
- [25] Costa, L.D., Mohandas, N., Sorette, M., Grange, M.J., Tchernia, G. and Cynober, T., Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia, *Blood*, Vol.98(2001), pp.2894-2899.
- [26] Agroyannis, B., Kopelias, I., Fourtounas, C., Paraskevopoulos, A., Tzanatos, H., Dalamangas, A. and Mallas, E., Relation between echinocytosis and erythrocyte calcium content in hemodialyzed uremic patients, *Artif. Organs*, Vol.25(2001), pp.486-502.
- [27] Suresh, S., Mechanical response of human red blood cells in health and disease: some structure-property-function relationships, *J. Mater. Res.*, Vol.21(2006), pp.1871-1877.
- [28] Pauly, H. and Schwan, H.P., The impedance of a suspension of spherical particles surrounded by a shell, *Z. Naturforsch.*, Vol.14b(1959), pp.125-131.
- [29] Kaneko, H., Asami, K. and Hanai, T., Dielectric analysis of sheep erythrocyte ghost. Examination of applicability of dielectric mixture equations, *Colloid Polym. Sci.*, Vol.269(1991), pp.1039-1044.
- [30] Sekine, K., Watanabe, Y., Hara, S. and Asami, K., Boundary-element calculations for dielectric behavior of doublet-shaped cells, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1721, No.1-3(2005), pp.130-138.

- [31] Asami K, Dielectric dispersion in biological cells of complex geometry simulated by three-dimensional finite difference method, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, Vol.39(2006), pp.492-499.
- [32] Salou, P., Mejdoubi, A. and Brosseau, C., Modeling of the dielectric relaxation in eukaryotic cells, *Journal of applied physics*, Vol.105, No.11(2009), 114702.
- [33] Korin, N., Bransky, A. and Dinnar U., Theoretical model and experimental study of red blood cell (RBC) deformation in microchannels, *Journal of Biomechanics*, Vol.40(2007), pp.2088-2095.
- [34] Hardeman, M.R. and Goedhart, P.T., Interrelationship of changes in hemorheological parameters induced by low osmolar radiocontrast media, *Clinical Hemorheology*, Vol.12(1992), pp.381-392.
- [35] Suresh, S., Spatz, J., Mills, J.P., Micoulet, A., Dao, M., Lim, C. T., Beil M. and Seufferlein T., Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria, *Acta Biomaterialia*, Vol.1(2005), pp.15-30.
- [36] Chien, S., Biophysical behavior of red cells in suspension, *In the Red Blood Cell (Ed.: Surgenor, D.M.)*, Vol.2(1975), pp.1031-1133, Academic Press, New York.
- [37] Shiga, T., Maeda, N. and Kon, K., Erythrocyte rheology, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol.10(1990), pp.9-48.
- [38] Schmid-Schonbein, H., Wells, R. and Schildkraut, R., Microscopy and viscometry of blood flowing under uniform shear rate (rheoscopy), *Journal of Applied Physiology*, Vol.26(1969), pp.674-678.
- [39] Hochmuth, R. M. and Waugh, R. E., Erythrocyte membrane elasticity and viscosity, *Annual Review of Physiology*, Vol.49(1987), pp.209-219.
- [40] Morgan, H., Sun, T., Holmes, D., Gawad, S. and Green, N.G., Single cell dielectric spectroscopy, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, Vol.40(2007), pp.61-70.

第2章 誘電分光法

2.1 誘電体

2.1.1 誘電分極

真空中に置かれた1対の平行平板電極を考える．電極間に電圧 V を加えると，電極上には面密度 σ_0 の電荷が蓄えられる．電極上に蓄えられる電荷の総量 Q は電圧に比例し， $Q = CV$ と表わされる．比例定数 C は電気容量（キャパシタンス）であり，電極面積 S に比例し，電極間距離 d に反比例する．すなわち，

$$C = \epsilon_0 \frac{S}{d} \quad (2.1)$$

である．ここで，比例定数 ϵ_0 は真空の誘電率であり，電極間の電場 E は $E = V/d = \sigma_0/\epsilon_0$ である．

次に，電極間に絶縁体を挿入する．絶縁体は電場が加えられていないときは正と負の電荷が同じ密度で一様に分布しており，巨視的な意味での電気双極子モーメントを持たない．しかし，絶縁体を電場中に置くと正負の電荷の中心がずれて誘電分極を起こす．このような意味で絶縁体を誘電体と呼ぶ．分極によって極板付近には電源から供給される電荷とは逆符号の面密度 σ_P の分極電荷が生じる．分極電荷による電気双極子モーメントの大きさは分極電荷の総量 $\sigma_P S$ に電極間距離 d をかけた $\sigma_P S d$ である．ここで Sd は誘電体の体積である．このことから，双極子モーメントの大きさは体積に比例し，単位体積あたりでは σ_P に等しいことが分かる．ここで，単位体積あたりの分極ベクトルを P とすると，

$$P = |\mathbf{P}| = \sigma_P \quad (2.2)$$

である．このとき，分極が加えられた電場に比例すれば，

$$P = \chi \epsilon_0 \mathbf{E} \quad (2.3)$$

であり，その大きさは σ_P に等しい．ここで， χ を電気感受率という．

一方，電極間電圧 V を維持するためには，分極電荷によって見かけ上打ち消された電荷の分を電源から供給しなければならない．そのため，誘電体を挿入したときに極板に蓄えられる電荷の面密度 σ は，

$$\begin{aligned}\sigma &= \sigma_0 + \sigma_P \\ &= (1 + \chi)\epsilon_0 E \\ &\equiv \epsilon\epsilon_0 E\end{aligned}\tag{2.4}$$

となり，式中の ϵ を比誘電率という．また，

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}\tag{2.5}$$

$$= \epsilon\epsilon_0 \mathbf{E}\tag{2.6}$$

なるベクトルは，電気変位を与える．

2.1.2 誘電率と導電率

直流において，電極間の媒質が導電性を持つ場合を考える．平行平板電極に挟まれたコンダクタンス G の媒体に電圧 V を印加したとき，媒質中を流れる伝導電流 I_G はオームの法則により，

$$I_G = GV\tag{2.7}$$

で表される．また，前節の通り，平行平板電極に挟まれたキャパシタンス C の媒体に電圧差 V を印加したとき，媒質両端に溜まる電荷 Q は

$$Q = CV\tag{2.8}$$

で表される．導電性のある媒体における電氣的現象は，以上2つの式により独立に記述される．電極面積 S ，電極間距離 d の平行平板電極に挟まれた媒体の導電率と比誘電率をそれぞれ κ, ϵ とすれば

$$G = \kappa \frac{S}{d}\tag{2.9}$$

$$C = \epsilon\epsilon_0 \frac{S}{d}\tag{2.10}$$

である．

この関係は交流へと拡張できる． $V^* = V_0 e^{j\omega t}$ で表わされる角周波数 ω の交流電圧 V^* を電極間に引加することを考える．なお， t は時間， j は虚数単位である．いま，変位電流は

$$I_C = \frac{dQ}{dt} \quad (2.11)$$

$$= \frac{d}{dt}(CV^*) \quad (2.12)$$

$$= j\omega CV^* \quad (2.13)$$

であることに注意すれば，交流においては，全電流 I^* は式 (2.7) および式 (2.13) を用いて次のようにまとめられる．

$$I^* = I_G + I_C \quad (2.14)$$

$$= (G + j\omega C)V^* \quad (2.15)$$

ここで $Q^* = C^*V^*$ なる複素キャパシタンス C^* を定義すると， $dQ^*/dt = d(C^*V^*)/dt = j\omega C^*V^* = I^*$ であるから，

$$C^* = C - j\frac{G}{\omega} \quad (2.16)$$

となる．

2.1.3 複素比誘電率と誘電緩和

DNA 溶液や細胞懸濁液が電極間にある場合には，外部電場により，1.2 節で述べたように対イオン分極や界面分極が生じる．これらはマイクロ波領域より低周波側の周波数領域で誘電緩和現象を示す．これらも広義の誘電体として考えることにし，以下，マイクロ波領域以下の周波数域に現れる緩和現象を対象として議論を進める．

誘電体の動的な性質を議論するためには，複素比誘電率を導入すると便利である．今，誘電体に $E(t) = E_0 e^{j\omega t}$ で表わされる周期的電場を加えると，電気変位 D は電場に対して位相の遅れ θ を示して周期的に変化する．

$$D = D_0 e^{j(\omega t - \theta)} \quad (2.17)$$

$$= D_0 (\cos \theta - j \sin \theta) e^{j\omega t} \quad (2.18)$$

一般に D_0 は E_0 に比例するので， ω の関数である ε' , ε'' を用いて，

$$D_0 \cos \theta = \varepsilon' \epsilon_0 E_0, \quad (2.19)$$

$$D_0 \sin \theta = \varepsilon'' \epsilon_0 E_0 \quad (2.20)$$

と表せる．ここで，複素比誘電率 ε^* を，

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'', \quad (2.21)$$

で表すことにすると，

$$\mathbf{D} = \varepsilon^* \varepsilon_0 \mathbf{E}, \quad (2.22)$$

となり，これらの拡張形式は，静的誘電率の場合と同形となる．実部 ε' は誘電分散，虚部 ε'' は誘電吸収を表し，どちらも角周波数 ω （あるいは周波数 f ）の関数である．誘電分光法は，入力電場 \mathbf{E} に対する応答として電気変位 \mathbf{D} を検出し，その周波数応答関数 ε^* を求めることに相当する．

また，電場に対する観測周波数に比べて十分速い，瞬間的な分極（電子分極等）に対応する比誘電率を ε_h とすれば，

$$\mathbf{D} = \varepsilon^* \varepsilon_0 \mathbf{E} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} = \varepsilon_h \varepsilon_0 \mathbf{E} + \Delta \mathbf{P} \quad (2.23)$$

となる．このうち， $\Delta \mathbf{P}$ は分極の変化分であり，誘電体を構成する個々の単位物質について，入力電場によって誘起される電気双極子を p とし，その数を N とすると，複素電気分極率 α^* と $\Delta \mathbf{P}$ とは次のような関係にある．

$$\Delta \mathbf{P} = N \mathbf{p} = N \alpha^* \mathbf{E} \quad (2.24)$$

従って，複素比誘電率 ε^* は

$$\varepsilon^* = \varepsilon_h + \frac{N \alpha^*}{\varepsilon_0} \quad (2.25)$$

のように表わされる．つまり， ε^* を知れば，複素電気分極率 α^* を通して，対象の情報を得ることができる．

対象が 1 次線形応答系であれば，つまり，対象に働く慣性力が弾性力に比べてはるかに小さいならば， α の周波数応答 $\alpha(j\omega)$ は次のように表わされる．

$$\alpha^*(j\omega) \simeq \frac{\Delta \alpha}{1 + j\omega\tau} \quad (2.26)$$

従って，式 (2.25) に代入すると， ε^* に関して次のような形式が得られる．

$$\varepsilon^* = \varepsilon_h + \frac{\Delta \varepsilon}{1 + j\omega\tau} \quad (2.27)$$

この式を Debye の式という．この式によって与えられる複素比誘電率は，実数部が比誘電率の周波数分散，虚数部が誘電吸収を表す． $\Delta \varepsilon$ は誘電緩和強度， τ は誘電緩和時間である．これらの緩和パラメータと，Debye の式を含む緩和関数については次節で説明する．

ところで、 D の E に対する位相遅れの成分を表す $\varepsilon''(\omega)$ は、振動電場のエネルギーの一部が Joule 熱となって物質に吸収される誘電損失の度合いを与える。単位体積当たり単位時間に発生する熱量損失の割合は、電場 E により電気変位 D が dD だけ変化したときの仕事率 $E dD$ を考えることにより求まり、

$$L = \frac{\omega}{2\pi} \int_0^{2\pi/\omega} E \frac{\partial D}{\partial t} dt \quad (2.28)$$

$$= \frac{1}{2} \varepsilon''(\omega) \epsilon_0 \omega E^2(\omega) \quad (2.29)$$

となる。一方、電束電流は $\partial D / \partial t = i = \kappa E$ であるので、単位時間あたりに発生するジュール熱を計算すると、

$$L = \frac{\omega}{2\pi} \int_0^{2\pi/\omega} E i dt = \frac{1}{2} \kappa E^2(\omega) \quad (2.30)$$

となる。これらの式を比較することにより、 $\kappa = \varepsilon''(\omega) \epsilon_0 \omega$ であることが分かる。従って、式 (2.21) は次のようにも書ける。

$$\varepsilon^* = \varepsilon - j \frac{\kappa}{\omega \epsilon_0} \quad (2.31)$$

この式の両辺に S/d を掛けると、式 (2.16) が得られる。実験的に複素キャパシタンス C^* を測定するにより、複素比誘電率 ε^* が求まることは、この関係により理解できる。

2.2 誘電緩和スペクトルの解析

2.2.1 緩和関数と緩和パラメータ

前節で示したように、1 次線形応答系である場合、複素比誘電率 ε^* は Debye の式に従う。Debye の式を比誘電率の実部 ε' と虚部 ε'' に分離して記述すると次のようになる。

$$\varepsilon' = \varepsilon_h + \frac{\Delta \varepsilon}{1 + j\omega^2 \tau^2} \quad (2.32)$$

$$\varepsilon'' = \frac{\omega \tau \Delta \varepsilon}{1 + j\omega^2 \tau^2} \quad (2.33)$$

対象が対イオン分極の場合であれば、緩和時間は対イオンの移動度の目安であり、緩和強度は誘起される双極子モーメントの大きさや分子数を示す。また、球形細胞などの界面分極を対象とした場合にも、同様に誘電分散は Debye 型となり、緩和時間と緩和強度は細胞の電気物性と密接に結びつくことが知られている [1]。このように、Debye の式によって、様々な試料の緩和過程を記述することができる。

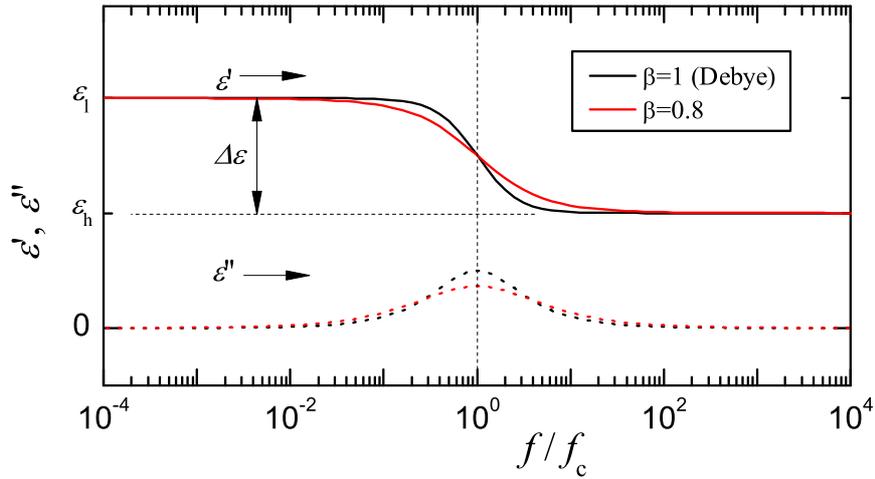


Figure 2.1: Dielectric dispersions described by a Cole-Cole function.

しかし，誘電測定結果の中には，Debye の式ではうまく記述できないものも多い．そこで，Cole, K. S. と Cole, R. H. は拡張した経験的緩和関数として次のような式を導入した [2] ．

$$\varepsilon^* = \varepsilon_h + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + (j\omega\tau)^\beta}, \quad 0 \leq \beta \leq 1 \quad (2.34)$$

この式は Cole-Cole の式と呼ばれ，また式中の β は周波数領域における緩和の広がりを表す緩和パラメータとして Cole-Cole パラメータと呼ばれている．Debye 式と Cole-Cole 式によって表現される誘電分散を，周波数 f/f_c ($f_c = 1/2\pi\tau$) に対して図示すると，図 2.1 のようになる．Cole-Cole 式において $\beta = 1$ としたものが Debye の式に相当し， β の低下とともに分散の広がりが Debye 型緩和よりも大きくなる．また，異なる緩和時間を持つ複数の Debye 緩和の和も Cole-Cole 式で記述できる [3] ．生体由来試料は，多くの場合，試料を構成する物質の物性や形状にばらつきを有するが，それゆえに緩和時間に分布が生じ，本来 Debye 緩和を示す対象も，一般に Cole-Cole 式によってよく表現される．誘電分光測定で得られる誘電分散は，これらの緩和関数にフィッティングさせることにより，その特徴を定量的にとらえることができ，また，適切な物理モデルを構築することにより，対象を構成する要素の構造や物性について解釈を行うことができる [4] ．

2.2.2 同心多相球の界面分極

前節までに，細胞の誘電緩和は界面分極に起因すると述べた．球形細胞については，本節で説明する薄殻絶縁球モデルを用いて，解析的に構成相の電気物性を推定することがで

きる .

Wagner[5] は , 球形粒子がまばらに分散した系に電場を与えたときの電位分布を考察して , 系全体の誘電率の理論式を導いた . 複素比誘電率 ε_2^* の連続媒質中に直径 d_2 の球形領域を考え , この領域内に直径 d_1 , 複素比誘電率 ε_1^* の小球が N 個あるとする . このとき , 球形領域の複素比誘電率は , Wagner の式と呼ばれる次式で表わせる .

$$\frac{\varepsilon^* - \varepsilon_2^*}{\varepsilon^* + 2\varepsilon_2^*} = \frac{\varepsilon_1^* - \varepsilon_2^*}{\varepsilon_1^* + 2\varepsilon_2^*} \phi_{12} \quad (2.35)$$

$$\phi_{12} = \frac{d_1^3 N}{d_2^3} \quad (2.36)$$

この式は , ε^* について解けば , 次式となる .

$$\varepsilon^* = \varepsilon_{12}^* = \varepsilon_2^* \frac{2(1 - \phi_{12})\varepsilon_2^* + (1 + 2\phi_{12})\varepsilon_1^*}{(2 + \phi_{12})\varepsilon_2^* + (1 - \phi_{12})\varepsilon_1^*} \quad (2.37)$$

Pauly と Schwan[6] は , さらに球の外側にもう 1 つの相が存在する系 , すなわち同心球の希薄分散系に関する一般式を得た . Irimajiri ら [7] は , これらの式をさらに多相の系にも拡張した . いま , 同心 2 相球について , 図 2.2 に示すように , 内相 1 及び外相 2 における比誘電率 , 導電率がそれぞれ ε_1, κ_1 及び ε_2, κ_2 であり , 内直径が d_1 , 外直径が d_2 であるとする . 内相 1 が外相 2 で包まれた球全体の等価複素比誘電率 $\varepsilon_{12}^* = \varepsilon_{12} - j\kappa_{12}/\epsilon_0\omega$ は , Wagner 式と同じ表式で表わせる . ただし , 体積分率については , $\phi_{12} = (d_1/d_2)^3$ と読み替える . また , この同心 2 相球が複素比誘電率 $\varepsilon_3^* = \varepsilon_3 - j\kappa_3/\epsilon_0\omega$ の媒質に体積分率 ϕ_{23} で懸濁している時 , 懸濁液の複素比誘電率 $\varepsilon_{23}^* = \varepsilon_{23} - j\kappa_{23}/\epsilon_0\omega$ は Wagner 式で表せる .

$$\varepsilon_{23}^* = \varepsilon_3^* \frac{2(1 - \phi_{23})\varepsilon_3^* + (1 + 2\phi_{23})\varepsilon_{12}^*}{(2 + \phi_{23})\varepsilon_3^* + (1 - \phi_{23})\varepsilon_{12}^*} \quad (2.38)$$

このようにして得た表式は , Laplace 方程式を厳密に解いたものと一致する .

さらに ,

$$\frac{\kappa_1}{\varepsilon_1} \sim \frac{\kappa_3}{\varepsilon_3} \quad (2.39)$$

という関係が成り立つ生体細胞のような対象の場合 , 式 (2.38) で示した ε_{23}^* は 1 つの Debye 緩和を示し , 次式で表わされる .

$$\varepsilon_{23}^* = \varepsilon_h + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + j\omega\tau} + \frac{\kappa_1}{j\omega\epsilon_0} \quad (2.40)$$

また , 体積分率 ϕ_{23} , 外相 2 の単位面積当たりキャパシタンス C_2 , 内相 1 の導電率 κ_1 は , 誘電緩和の測定結果から得られる $\varepsilon_h, \Delta\varepsilon, \kappa_1, \tau$ の各値と , 次の一連の式で関係づけら

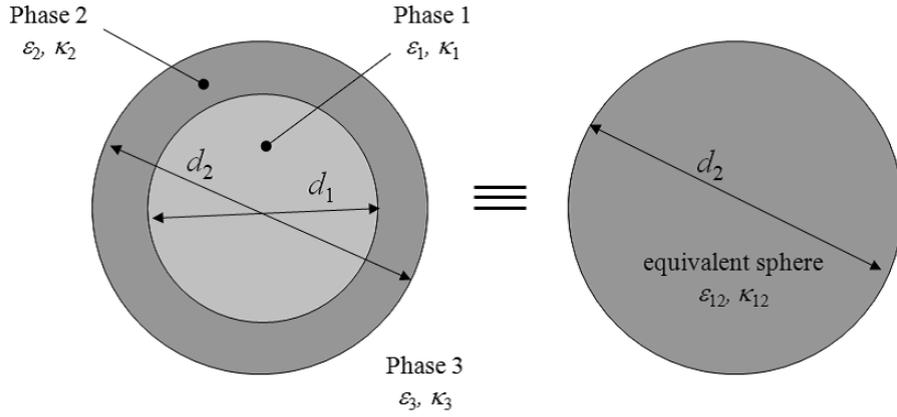


Figure 2.2: Multiphase model of the sphere with shell.

れる .

$$\phi_{23} = \frac{2(\kappa_3 - \kappa_1)}{\kappa_3 + \kappa_1} \quad (2.41)$$

$$\Delta\varepsilon = \frac{9\phi_{23}}{(2 + \phi_{23})^2} \frac{C_2 d_2}{2\varepsilon_0} \quad (2.42)$$

$$\tau = C_2 d_2 \left(\frac{1}{\kappa_1} + \frac{1 - \phi_{23}}{2 + \phi_{23}} \frac{1}{\kappa_3} \right) \quad (2.43)$$

$$C_2 = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_2}{d_2 - d_1} \quad (2.44)$$

以上の解析法により，誘電分散から，対象物の電気物性を知ることができる．逆に，対象物の電気物性が既知であれば，懸濁状態での誘電分散を推定することができる．

2.3 誘電分光測定

本節では，本論文第3章及び第4章で用いた，溶液の誘電分光に関する測定法を述べる．なお，第5章の測定法に関しては単一細胞の測定手法開発そのものが考察の対象となるため，独立して同章中で述べる．

2.3.1 測定回路と測定セル

前節までに述べたように， (ε, κ) と (C, G) は電極固有の定数 S/d を介して変換できる．誘電分光法は (ε, κ) あるいは $(\varepsilon', \varepsilon'')$ の表式を用いて解析を行うものの，実験的には (C, G) の周波数依存性を測定して，電極形状によらない (ε, κ) に変換後，理論解析をすることになる．

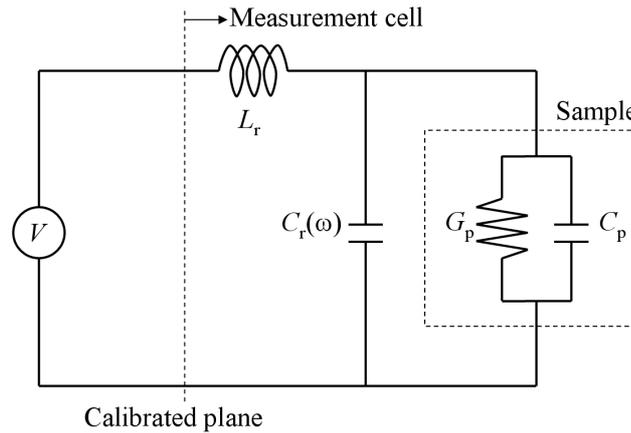


Figure 2.3: Equivalent circuit for dielectric spectroscopy measurement.

図 2.3 に，測定系の等価回路を示す．この回路を用いて，測定値した交流インピーダンスから試料の電気容量 C_p とコンダクタンス G_p を得ることができる．

誘電緩和現象を調べるためには電気容量 C_p とコンダクタンス G_p を広い周波数領域にわたって測定することが必要である．測定法は周波数域法 (frequency domain method) と時間域法 (time domain method) に分類できる．周波数域法は，各々の周波数に対して電気容量とコンダクタンスを測定する方法である．時間域法は，パルス，疑似雑音，または周波数の異なる正弦波の合成波を電圧として試料に与え，その応答電流を時間の関数として測定し，これをフーリエ変換して周波数依存性を調べる方法である．本論文では，すべて周波数域法を採用した．誘電分光測定には，インピーダンスアナライザ (4294A, Agilent) を用いた．

水溶液試料を保持し誘電分光測定を行うために，図 2.4 に示す平行平板型セルを製作した．溶液を保持する材料としては，誘電率の周波数依存性の少ない，絶縁性の高いものがよい．アクリル樹脂はわずかに誘電率に周波数依存性があるが，透明であり加工が容易であることからこれを用いた．試料は試料注入口よりピペットを用いて試料室に入れる．測定セルは，恒温槽から送出される循環水により熱的に制御され，各実験に至適の一定温度に保たれる．セルの測定領域部の寸法は，直径 8 mm，電極間距離 3.5 mm とした．この構造においては，アクリルの厚みが電極間距離を決定している．

セル定数 $C_1 = \epsilon_0 S/d$ は，セルの寸法からは正確に計算することができないため，実験的に求めた．試料を入れたセルの電気容量とコンダクタンスは，次式で表せる．

$$C = \epsilon C_1 + C_r \quad (2.45)$$

$$G = \kappa C_1 / \epsilon_0 \quad (2.46)$$

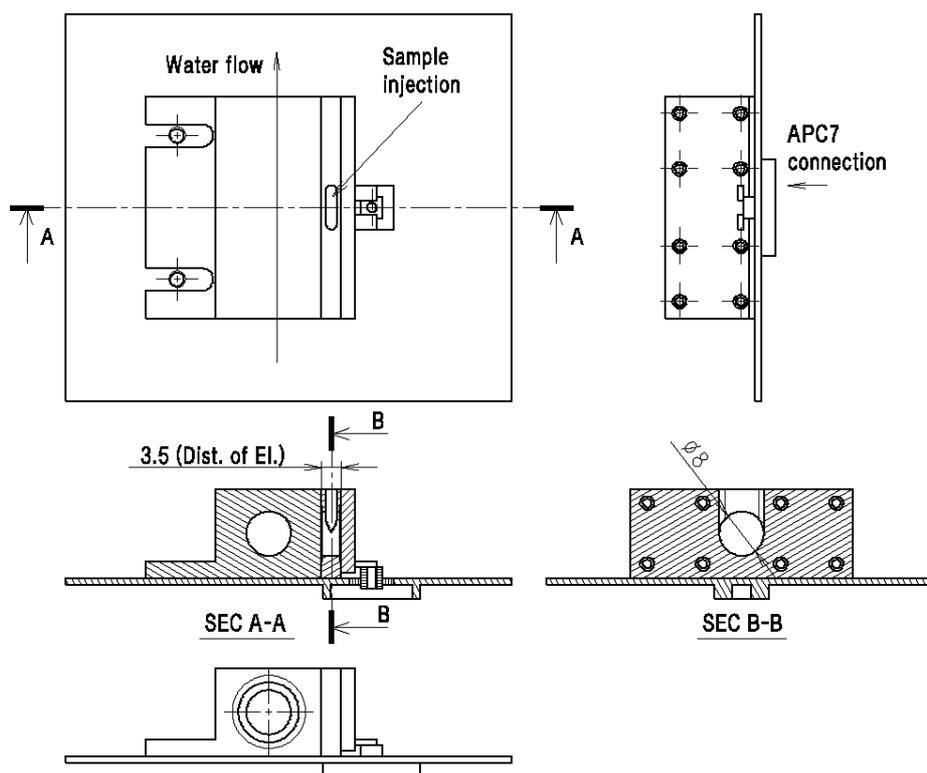


Figure 2.4: The cell for dielectric spectroscopy measurement.

ただし， $\epsilon_0 = 8.8542 \times 10^{-12} \text{F/m}$ であり， C_r は浮遊容量である． C_1 や C_r は空のセル ($\epsilon = 1$) と蒸留水 (25 °C のとき $\epsilon = 78.3$) を入れたセルの電気容量の測定値より C_1 と C_r を決定した．

一方，図 2.3 において，電気的校正面以降にも，最小限であるものの測定セルの物理的大きさによって残留インダクタンス L_r が発生する．これらの校正は Asami らの方法 [8] に基づいて行った．

2.3.2 電極分極現象とその補正

溶液に電極が接すると，電極表面には電気二重層が形成され，等価回路的には非常に大きなキャパシタンス成分として溶液のバルク部に対し直列に結合される．この現象を，電極分極という．溶液の緩和現象が観測される周波数領域に電気二重層キャパシタンスの影響が存在すると，正確な測定ができない．電極分極は未だ完全に解明されない複雑な現象であり，一般に導電性の高い生体試料懸濁液に対して誘電分光法を適用する際の，難点の 1 つでもある．この影響を排除するために，これまでにいくつかの実験上のテクニックが提案されているが，本研究では，次の 2 つの手法を用いた．

まず、白金黒メッキを行い、マイクロスケールでの電極表面積を増やして、電気二重層キャパシタンスを増加させた。これにより、電気二重層キャパシタンスの誘電緩和の起こる周波数を低周波化させることができる [4]。

さらに、低周波導電率の等しい試料であれば、同じ測定セルを用いる限り、電気二重層キャパシタンスはほぼ等しいという仮定の下に、 ϵ^* の差分を取って試料溶液の ϵ^* を求めた。具体的には次のようにしてデータ処理を行った。まず、測定対象試料が溶解した溶液を測定した後、この溶液の導電率と \pm 数 % の違いを持つ 2 つの溶媒を作製し、測定を行った。次に、この 2 つの溶媒の測定データから、試料溶液と導電率が正確に等しい仮想的な溶媒の ϵ^* のデータを線形補間により作成した。その上で、試料溶液の ϵ^* から、導電率の等しい仮想溶媒の ϵ^* を差し引いた。DNA の測定のように、緩和強度が相対的に小さい場合には特に厳密に行う必要がある。

参考文献

- [1] Hanai, T., Electric properties of emulsions, *In Emulsion Science (Ed.: Sherman, P.)*, (1968), pp.353-478 , Academic Press, London.
- [2] Cole, K.S. and Cole, R.H., Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics., *J. Chem. Phys.*, Vol.9(1941), pp.341-351.
- [3] Boettcher, C.F., *Theory of electric polarization*, (1978), Elsevier Science, London.
- [4] Asami, K., Irimajiri, A., Hanai, T., Shiraishi, N. and Utsumi, K., Dielectric analysis of mitochondria isolated from rat liver I. swollen mitoplasts as simulated by a single-shell model, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.778(1984), pp.559-569.
- [5] Wanger, K.W., Erklärung der dielektrischen Nachwirkungsvorgänge auf Grund maxwellscher Vorstellungen, *Arch. Electrotech.*, Vol.2(1914), pp.371-387.
- [6] Pauly, H. and Schwan, H.P., The impedance of a suspension of spherical particles surrounded by a shell, *Z. Naturforschung*, Vol.14b(1959), pp.125-131.
- [7] Irimajiri, A., Hanai, T. and Inouye, A., A dielectric theory of "multi-stratified shell" model with its application to a lymphoma cell, *J. Theor. Biol.*, Vol.78, No.2(1979), pp.251-269.
- [8] Asami, K., Irimajiri, A., Hanai, T. and Koizumi, N., A method for estimating residual inductance in high frequency A.C. measurements, *Bulletin Ins Chem Res Kyoto Univ.*, Vol.51(1973), pp.231-245.

第3章 塩存在下における一本鎖DNAの 対イオン雰囲気と分極機構の解明

3.1 概要

本章では、電気的手法である誘電分光法により DNA の定量を行うことを目的として、その基礎であり、かつ未解明である、溶媒中での短い一本鎖 DNA (ss-DNA) の対イオン雰囲気と分極機構について検討する。

第1章で述べたように、モンテカルロシミュレーションの結果 [1,2] から、短い ss-DNA 溶液の誘電緩和現象に対して、空間的に広がった散漫相の寄与が大きいことが明らかになったにもかかわらず、先に述べたように過去の理論は凝集相の分極のみ [3-5]、もしくは薄層近似による散漫相の分極のみ [6,7] を扱っており、空間的に広がった散漫相の寄与に関して実験的検証は行われていない。

そこで本章では、特に短鎖 ss-DNA 溶液の濃度と塩濃度を変化させることにより、対イオン雰囲気の空間的広がりを制御し、それが分極率、すなわち誘電率に与える影響を調べる。

3.2 実験手法

生体から採取した DNA は、過去の実験的研究で多用されているが、一般に切断・精製の処理の後にも、鎖長のばらつきを持つ。本研究では、この鎖長分布に由来する実験結果の不確定性を排除するために、重合度 $N=30, 59, 90, 120$ bases の化学的に合成された ss-DNA (オペロンバイオテクノロジー社) を用いた。また、ss-DNA の分子内および分子間相補鎖が構成されるのを防ぐために、4 種類の塩基のうち、チミンのみが連続した配列 (poly-T) を選択した。なお、高速液体クロマトグラフィ (Waters 600, Waters 社) または飛行時間型質量分析器 (Axima-LNR, 島津製作所) を用いて、各試料がそれぞれ単一の分子量を有していることを確認した。

凍結乾燥を経たこれらの試料を超純水に溶解し、波長 260 nm の紫外光の吸光度から初期濃度を決定した。その後、実験に用いる質量濃度 $c_w = 0.25, 0.50, 1.0, 2.0$ g/L になるように、さらに超純水でそれぞれ希釈した。

本研究ではさらに塩濃度 c_s の影響を検討するために c_s を変えた試料を用意したが、その際に、試料間で ss-DNA の c_w が異なっていると、実験誤差を生じる。そこで、 c_w の調整誤差を最小限にするために、前述のようにして超純水中に ss-DNA を c_w の濃度で溶解させた各試料に対して、適切に調整した濃厚 NaCl 溶液をそれぞれの試料に 1 μ L 程度ずつ加えていくことにより、 c_s を 0.0 から 30 mmol/L まで順次変化させ、一連の測定を行った。この方法による c_w の調整誤差は、各ステップ間で 0.5% 以下に、また全体でも 3% 以下に抑えることができたので、 c_w が緩和パラメータに及ぼす影響を議論する 3.3.1 節においては、調整誤差の影響を無視した。

複素比誘電率の測定には、インピーダンスアナライザ (4294A, アジレントテクノロジー社) を使用した。アクリル製の平行平板型セルは、3.5 mm 間隔で対向する一对の白金黒メッキされた直径 8 mm の白金電極で構成される。セル内部の溶液は、水を周囲に循環させることにより 298.0 ± 0.1 K に保たれた。測定は 40 Hz から 1.1×10^8 Hz までの周波数範囲にわたって、印加電圧 0.3 V (ピーク電圧差) で行った。複素比誘電率変化 $\Delta\epsilon^*$ を求めるにあたっては、その電極分極効果の補正は、 $c_s=0.1$ から 50 mmol/L の NaCl 溶液の誘電率と導電率を測定し、それぞれの DNA 溶液の導電率と同じ値の導電率をもつ仮想的な NaCl 溶液の誘電率を補間により算出し、両者を差し引くことによりおこなった。

3.3 結果と考察

3.3.1 誘電分散の定量的解析

実験によって得られた、 $c_s=0.0$ mmol/L、 $c_w=1.0$ g/L における 30 bases と 120 bases の ss-DNA 溶液の誘電分散 ϵ^* の実部と虚部を、それぞれ図 3.1(a) 及び (b) に示す。なお、同図 (a) の縦軸において、 $\epsilon_{h,eq}$ は低周波極限における ss-DNA 溶液の導電率 κ_1 と等しい導電率を持つ塩水の、高周波極限における比誘電率である。120 bases の ss-DNA 溶液については、図 3.1(b) の誘電損失 ϵ'' の曲線に特に良く反映されているが、 10^5 Hz から 10^6 Hz 付近に存在する低周波側緩和と、 10^6 Hz から 10^8 Hz 付近に存在する高周波側緩和の 2 つの緩和が見られる。一方で、30 bases の ss-DNA 溶液では、緩和は高周波側に 1 つしか見られない。これは、もう一方の低周波側の緩和が相対的に無視できるほど小さいためである。

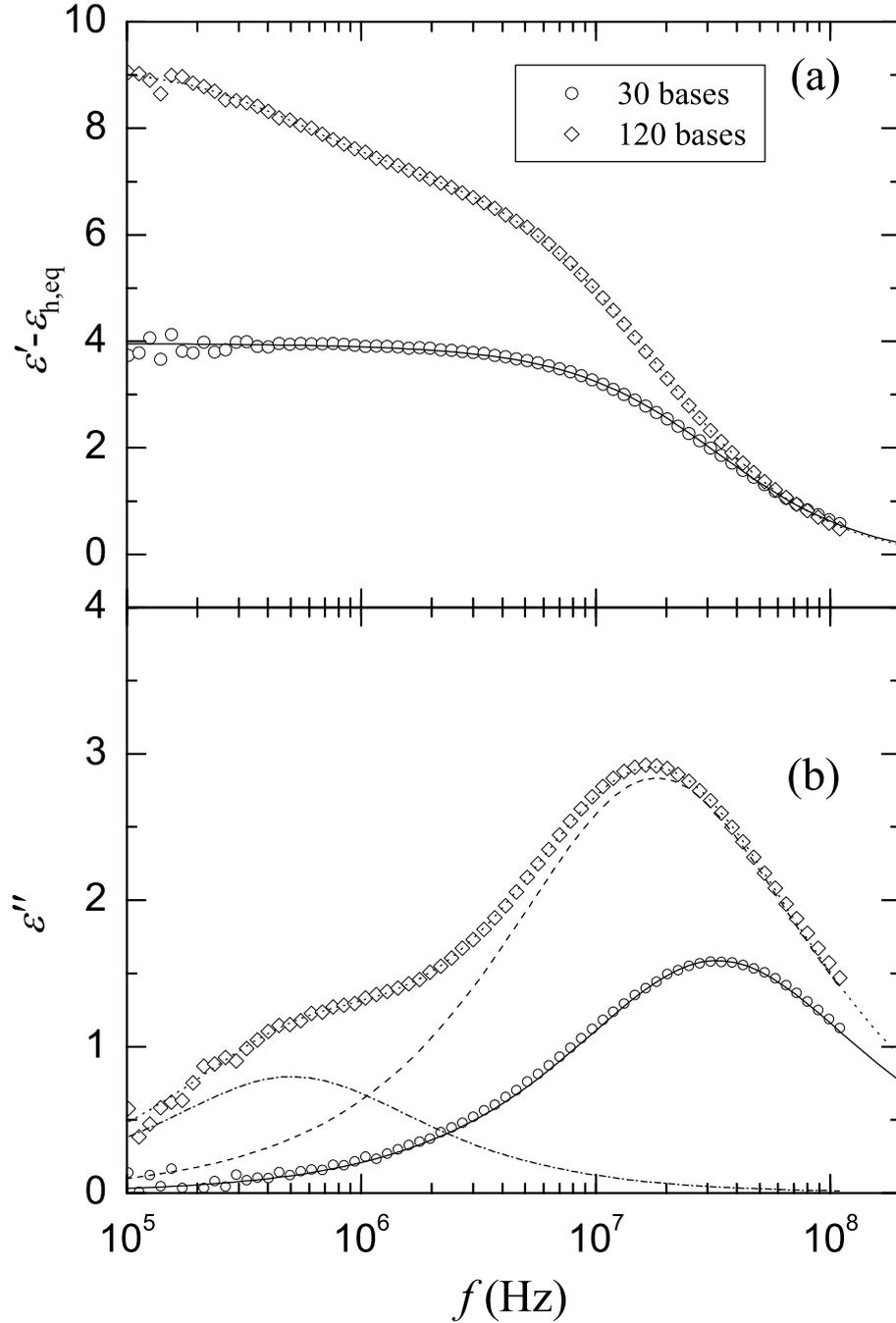


Figure 3.1: The real (a) and imaginary (b) parts of the complex dielectric constants for salt-free ss-DNA solutions with the length of 30 (\circ) and 120 (\diamond) bases at the weight concentration of 1.0 g/L. The solid and dotted curves for the real and imaginary parts are theoretical curves calculated from one or two Cole-Cole functions with the fitted parameters for 30 and 120 bases, respectively. The loss spectrum for 120 bases in (b) can be decomposed into dash-dotted and dashed curves corresponding to low- and high-frequency relaxations, respectively.

と考えられる．

以上の知見から，ss-DNA 溶液の誘電分散 ε^* は 2 つの Cole-Cole 関数で表現されると仮定して，超純水に溶解した試料について得られた実験結果に対して，非線形フィッティングを実行した．このとき，複素比誘電率の周波数変化は，次のように表される．

$$\varepsilon^*(\omega) = \frac{\Delta\varepsilon_{\text{LF}}}{1 + (j\omega\tau_{\text{LF}})^{\beta_{\text{LF}}}} + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + (j\omega\tau)^{\beta}} + \frac{\kappa_1}{j\epsilon_0\omega} + \varepsilon_h \quad (3.1)$$

ここで， ε_h は高周波極限における ss-DNA 溶液の比誘電率であり， κ_1 は低周波極限における ss-DNA 溶液の導電率である．また， $(\Delta\varepsilon_{\text{LF}}, \tau_{\text{LF}}, \beta_{\text{LF}})$ と $(\Delta\varepsilon, \tau, \beta)$ の組み合わせは，それぞれ，低周波側，および高周波側の緩和を特徴付ける緩和強度，緩和時間，および緩和の広がりを示す Cole-Cole パラメータである．なお，一方の緩和が無視できるほど小さい場合と，2 つの緩和が分離できないほど緩和時間が近接している場合には，低周波側の緩和強度をゼロとした．

その結果， $N=59, 90, 120$ bases の ss-DNA 溶液については，緩和は明瞭に二つに分離された．図 3.1 に，120 bases の ss-DNA 溶液の結果を線分で示す．一方で， $N=30$ bases の ss-DNA については緩和が 1 つしか同定できなかった．

質量濃度 $c_w=1.0$ g/L における，式 (3.1) によって求めたこれら 2 つないし 1 つの緩和の緩和強度と緩和時間を，重合度 N に対してプロットしたものが，図 3.2 である．

同図から，低周波側の緩和に関する $\Delta\varepsilon_{\text{LF}}$ と τ_{LF} は N^2 に比例し，高周波側の緩和に関する $\Delta\varepsilon$ と τ は $N^{2/3}$ に比例していることが分かる．この $\Delta\varepsilon_{\text{LF}}$ と τ_{LF} が低周波側で N^2 に比例するという実験結果は，はるかに長い DNA に関してではあるものの，Takashima ら [8] によってすでに報告されており，凝集対イオンに関する分極理論 [3–5,9,10] の予想ともよく一致する．したがって，本実験によって得られた結果のうち，低周波側の緩和については，凝集相の分極によるものであると考えられる．一方， $\Delta\varepsilon$ と τ が高周波側で $N^{2/3}$ に比例するという実験結果も，希薄濃度条件下での NaPSS について，Ito ら [11] により類似の結果が観測されており，次節にて詳述する．Ito らによれば，準希薄条件下では $\Delta\varepsilon$ と τ は N に依存しないとされるので，本研究で用いたすべての試料は希薄濃度条件であるとして扱うことができる．

低周波側の緩和時間 τ_{LF} が N^2 に比例するために， N が小さくなるに連れて高周波側の緩和から数値的に分解し難くなるのが，図 3.2(b) から推察される．しかしながら，図 3.2(a) から， $\Delta\varepsilon_{\text{LF}}$ の $\Delta\varepsilon$ に対する比も N に連れて小さくなり， $N=30$ bases では 0.03 程度になることが期待され，数値的分解は行わずとも，低周波側の緩和は $N=30$ bases の ss-DNA については無視してよいことが分かる．従って，次節において ss-DNA 溶液中に

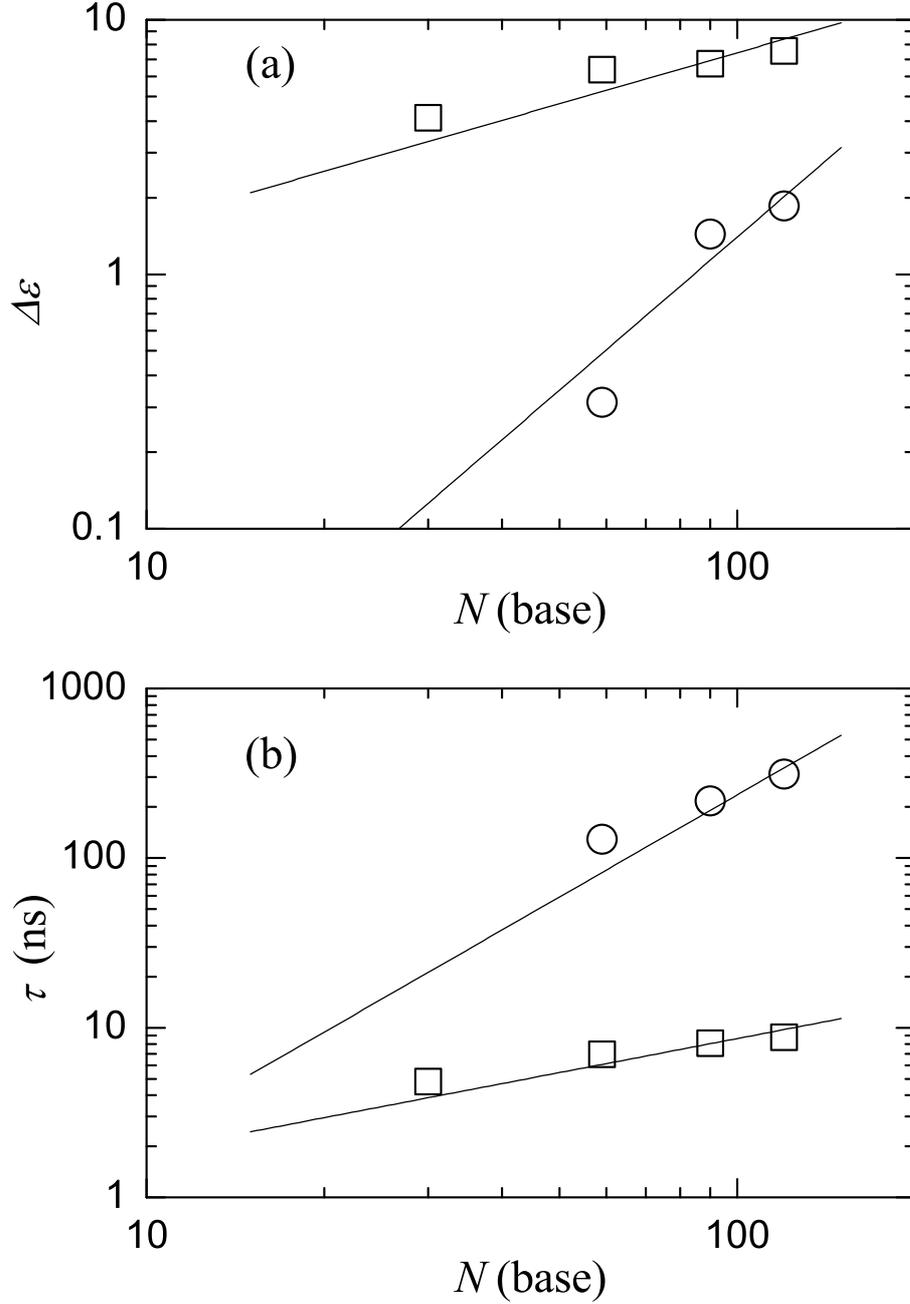


Figure 3.2: The dielectric increments (a) and the relaxation times (b) of low- and high-frequency relaxations (\circ and \square , respectively) as a function of base number at the weight concentration of 1.0 g/L in double logarithmic plots. The solid lines are the least-square fits to the experimental data with the fixed gradients of 2 and $2/3$ for the low- and high-frequency relaxations, respectively, and the correlation coefficients are 0.940 and 0.943 for $\Delta\epsilon_{LF}$ and $\Delta\epsilon$, and 0.888 and 0.839 for τ_{LF} and τ , respectively.

塩を添加しないときの高周波側緩和の塩濃度依存性について議論する際には，すべての N ($=30, 59, 90, 120$ bases) について実験結果を考察した．

一方，塩の添加によって塩濃度 c_s が上昇するに従い，試料の導電率が上昇するために，電極分極の影響が相対的に大きくなり，低周波側の緩和が明瞭でなくなる．このことは，図 3.3 において， $c_w=1.0$ g/L での $N=30$ bases の ss-DNA 溶液の誘電分散について顕著に見られる．加えて， c_s の増加に伴い，高周波側緩和の緩和時間 τ はより低周波に移ることも見て取れ，実験条件のうちで c_s が比較的高い条件下では 2 つの緩和の分離はさらに難しくなる．従って，第 3.3.2 節において塩を添加した ss-DNA 溶液における高周波側緩和の塩濃度依存性を議論する際には，高周波側緩和が図 3.2(a) から分かるように明らかに支配的であり，低周波側の緩和を無視できるために数値的分解をしなくてよい， $N=30$ base および 59 bases の ss-DNA 溶液のみに議論の的を絞ることにする． $N=90$ bases および 120 bases の ss-DNA 溶液については，塩濃度が高い条件では数値的分解ができず，高周波側の項を独立に抽出できないため，結果を議論しない．

以上の考察をまとめると，純水中における溶質濃度依存性については， $N=30$ bases から 120 bases まですべての試料の実験結果について， $N=30$ bases 以外については 2 つの緩和を分離した上で，高周波側の緩和を用いて議論する．一方，塩を添加してその依存性を見るためには， $N=30$ bases と 59 bases の結果のみを用いて議論する．

3.3.2 純水中での ss-DNA の誘電緩和

前節で述べたように，本研究で行った実験条件に限れば， $\Delta\epsilon$ と τ の N に対する依存性は，塩を添加しないときの ss-DNA 溶液はすべて希薄領域にあることを意味している．従って，ss-DNA の最近傍にある ss-DNA との間の平均距離で定義される相関長は，高分子の長さ L よりも大きい．

Ito ら [11] は，NaPSS を用いて高分子電解質の希薄領域における高周波緩和の緩和時間の濃度および鎖長依存性を，散漫相内対イオンの揺らぎに起因するとして次のように見積もった．対イオンが感応する高分子電解質周りの静電ポテンシャルは，溶液空間内で周期的な相関長を持つ．この相関長は，対イオンの揺動に関する特性長さ ξ に等しく，溶質の数密度 n_p ($\propto c_w/N$) に依存する．従って，次のように書ける．

$$\xi \sim n_p^{-\frac{1}{3}} \quad (3.2)$$

$$\propto (c_w/N)^{-\frac{1}{3}} \quad (3.3)$$

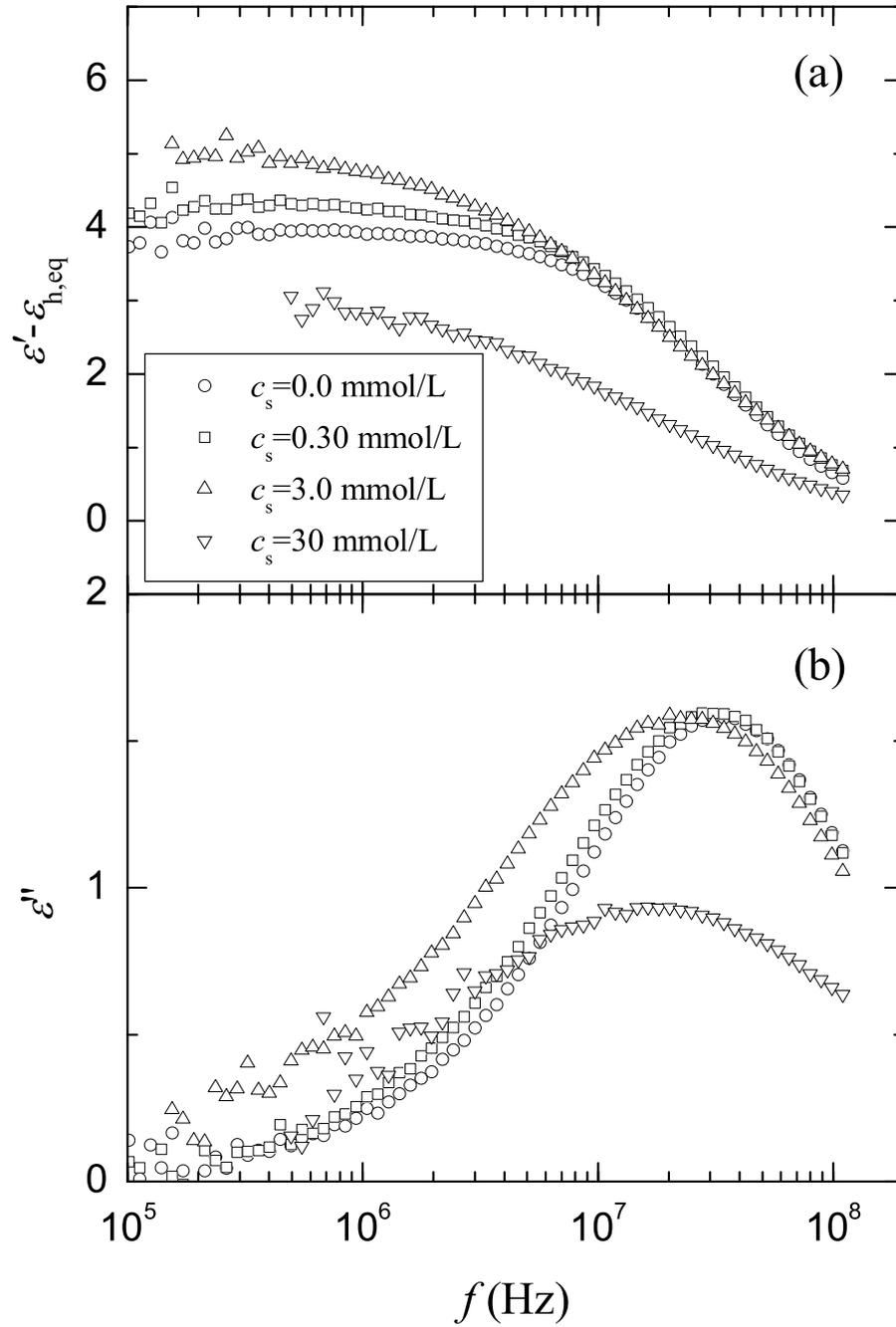


Figure 3.3: The real (a) and imaginary (b) parts of the complex dielectric constants for 30 bases ss-DNA solutions with the salt concentrations of 0.0 (\circ), 0.30 (\square), 3.0 (\triangle) and 30 (∇) mmol/L at the weight concentration of 1.0 g/L.

ここで、 ξ はデバイの遮蔽長 λ^{-1} によって特徴づけられるパラメータではないことを付記しておく。結果として、高分子電解質を中心にしたイオン雰囲気は、 $\xi \leq L$ でない限りは等方的に広がっていると理解できる。散漫相内を形成している弱く束縛された対イオンは、 ξ で大きさが規定されるポテンシャルの井戸の中で揺動するので、対イオンの拡散定数を \mathcal{D} とすれば、緩和時間は次式で与えられる。

$$\tau \sim \frac{\xi^2}{2\mathcal{D}} \propto \xi^2 \propto c_w^{-\frac{2}{3}} N^{\frac{2}{3}} \quad (3.4)$$

そこで、図 3.4 に、塩を添加しない ss-DNA 溶液の τ を $c_w^{-2/3} N^{2/3}$ に対してプロットした。式 (3.4) への回帰係数は 0.988 であり、実験結果においては、同式の関係が非常に良く満たされていることが分かる。

また、Ito ら [11] によれば、この物理モデルにより、 n_c を高分子電解質に随伴する凝集相内の対イオンの数（高分子一本当たり）として、また、 e 、 k_B 、 T 、 ϵ_0 を、それぞれ電荷素量、ボルツマン定数、絶対温度、真空の誘電率として、緩和強度 $\Delta\epsilon$ は次のように得られる。

$$\Delta\epsilon \sim \frac{n_c e^2 \xi^2}{\epsilon_0 k_B T} \propto n_c \xi^2 \quad (3.5)$$

式 (3.4) と式 (3.5) から、 n_c は τ と $\Delta\epsilon$ に対して次のような関係にある。

$$n_c \propto \frac{\Delta\epsilon}{\tau} \quad (3.6)$$

準希薄領域においては、 n_c は c_w に比例することが理論的に示されている [12,13] が、Ito ら [11] は、純水に溶解した NaPSS を用いて、この線形性が希薄領域においても成立することを実験的に示した。純水中の ss-DNA の $\epsilon_0 \Delta\epsilon / \tau$ を、 c_w に対してプロットしたものが図 3.5 である。両者を線形回帰させたときの相関係数は 0.996 であり、本研究に用いた濃度・鎖長の ss-DNA においても、高分子電解質である NaPSS と同様に、

$$n_c \propto c_w \quad (3.7)$$

の関係が満足されることが分かる。

従って、式 (3.4)、(3.5)、(3.7) から、Ito らの希薄領域における $\Delta\epsilon$ の c_w と N に対する次の関係が、ss-DNA に対しても同様に成立する。

$$\Delta\epsilon \propto c_w^{\frac{1}{3}} N^{\frac{2}{3}} \quad (3.8)$$

本節の議論をまとめると、塩を添加しない $N=30$ bases から 120 bases の短い ss-DNA 溶液の高周波側の緩和は弱く束縛された対イオンの分極に支配されていること、そして、

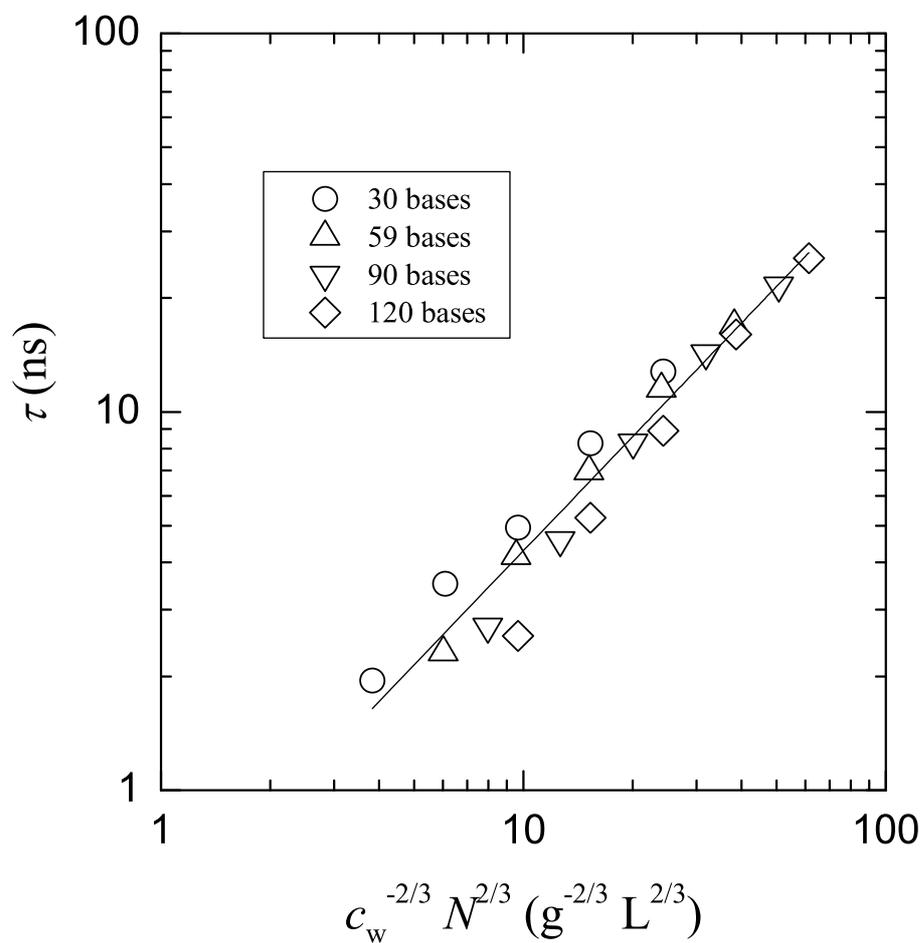


Figure 3.4: The relaxation time τ for ss-DNA with $N=30$ (\circ), 59 (\triangle), 90 (∇) and 120 (\diamond) bases in solution without salt as a function of $c_w^{-2/3} N^{2/3}$ for all the weight concentrations c_w employed in the experiments in a double logarithmic plot. The solid line is the least-square fit to the experimental data with the gradient of unity, and the correlation coefficient is 0.988.

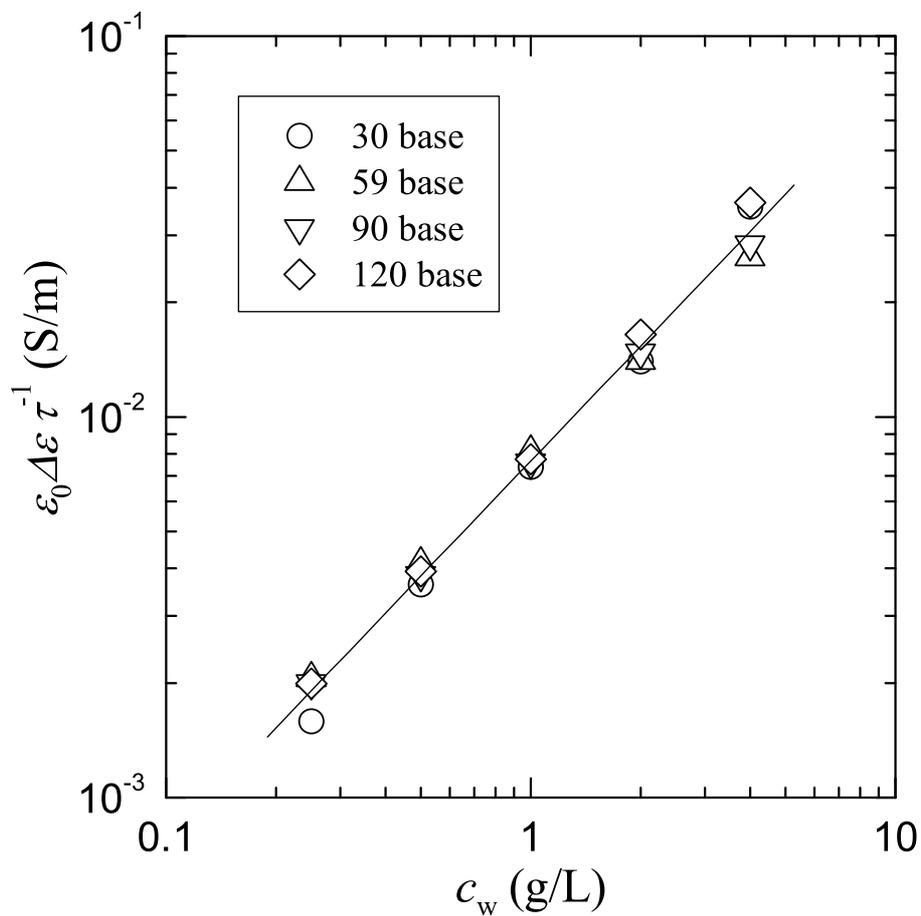


Figure 3.5: The quantity $\epsilon_0 \Delta \epsilon / \tau$ proportional to the number of counterions associated with a single polyon for ss-DNA with 30 (\circ), 59 (\triangle), 90 (∇) and 120 (\diamond) bases in solution without salt as a function of weight concentration c_w in a double logarithmic plot. The solid line is the least-square fit to the experimental data with the gradient of unity, and the correlation coefficient is 0.996.

分極の大きさは、溶質濃度 c_w に直接関係する相関長 ξ によって規定される周期的な静電ポテンシャルの井戸の大きさに依存すること、が分かった。

以上のように、本章で行った全ての実験結果は、希薄領域下の高分子電解質に関する物理モデルによって良く解釈できることが分かったので、次節では希薄領域下で成立するこの物理モデルを、塩を添加した系に拡張することを試みる。

3.3.3 塩存在下での ss-DNA の誘電緩和

図 3.3(b) から分かるように、ss-DNA の緩和強度と緩和時間は、鎖長・濃度一定の下で、 c_s の上昇に際し、ある塩濃度まではほとんど変化せず、その後低下する。

前節で用いたセルモデルは、以下の式で与えられる λ^{-1} に比例する散漫相の直径が式 (3.2) で規定される相関長に比べてはるかに大きいような、純水中、あるいは塩の存在が無視できるときに限って適用できる。

$$\lambda^{-1} = \left(\frac{\varepsilon \epsilon_0 k_B T}{2 N_A e^2 I} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.9)$$

ここで、 ε 、 N_A 、 I は、それぞれ水の比誘電率、アボガドロ数、イオン強度であり、NaCl のような 1 価の塩については、 $I = c_s$ である。しかしながら、いま議論の対象としている緩和現象は弱く束縛された対イオンの分極によるものであり、揺動散逸定理によってそれは平衡状態における対イオンの揺らぎに関連付けられるために、対イオンの分布を適切に考察しさえすれば、セルモデルはさらに塩を添加した場合にも拡張可能であるはずである。そこで、対イオンの分布に関して、塩濃度 c_s によって散漫相の直径がどのように変化するかの考察を行うことにする。

純水中においては、前節で議論したように、相関長 ξ は ss-DNA 分子が排他的に占めるセルの大きさと同程度である（式 (3.2) を参照）。一方で、散漫相の直径はデバイ長 λ^{-1} にある定数を掛けたものと同程度であり、純水中、あるいは極めて塩濃度の低い環境では、先ほどの体積から算出される $n_p^{-1/3}$ よりはるかに大きい。いま、塩濃度 c_s を増していくと、 $n_p^{-1/3}$ は一定のまま、散漫相の直径のみが縮小していき、ある臨界塩濃度 $c_{s,cr}$ で両者は等しくなる。さらに塩濃度 c_s を増していくと、散漫相の直径は、 $n_p^{-1/3}$ ではなく、今度は Debye-Hückel の静電ポテンシャルの空間的広がりによって決定されるようになる。以上の概念を図 3.6 に示す。

小さなイオンについては、中心イオンの電荷を遮蔽している対イオンの存在確率が最大となる距離であるデバイの遮蔽長 λ^{-1} は、中心イオンからの半径と等しいことが知られ

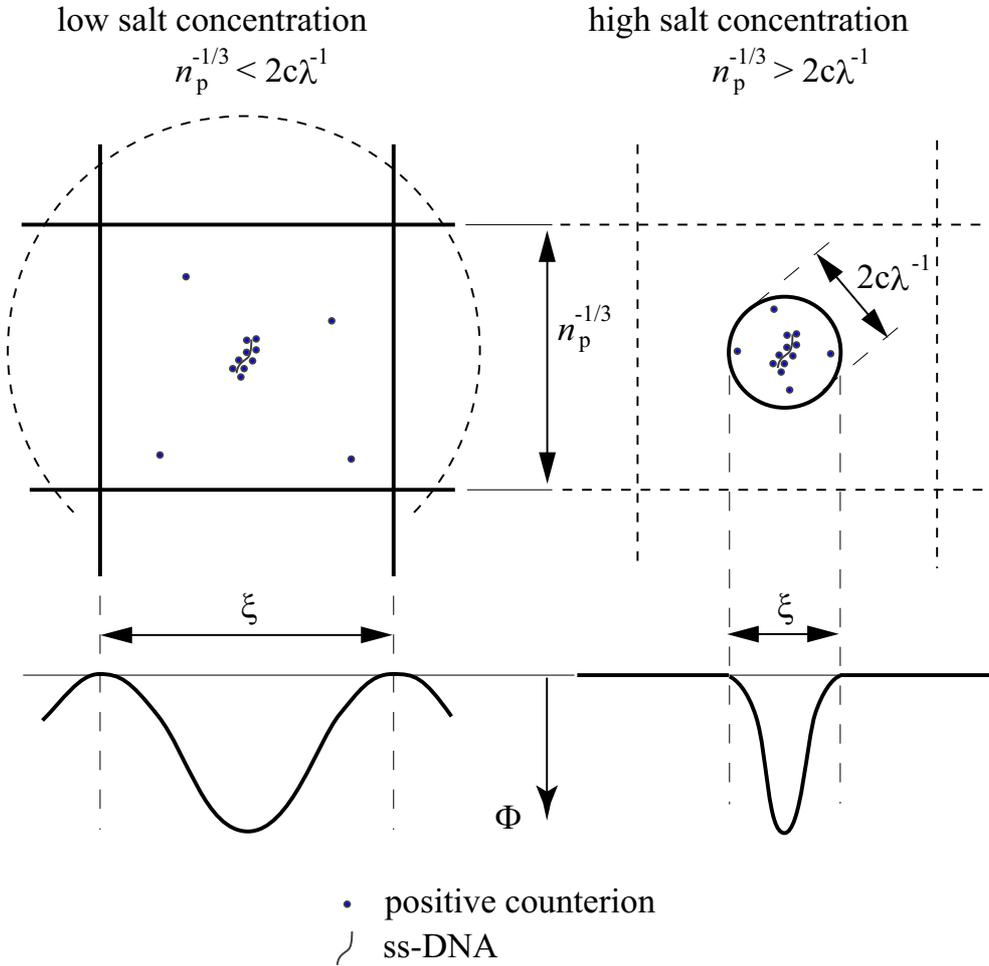


Figure 3.6: Schematic of the proposed cell model. The extent of the diffused phase around a single polyion in the center, where loosely bound counterions are distributed within the electrostatic potential well of Φ , is shown as the solid lines. The characteristic length for the counterion fluctuation ξ is equal to the side length of the cubic cell in which a polyion occupies exclusively at a low salt concentration (the left-hand side) and the diameter of the diffused phase $2c\lambda^{-1}$ at a high salt concentration (the right-hand side), respectively, where λ^{-1} is the Debye screening length and c is the proportional constant.

ている．一方で，中心イオンが作るポテンシャルと，Debye-Hückel 近似を用いた単純な計算により求めたものとを比較すると，高分子電解質については対イオン凝集が起こるので，散漫相内の対イオンはより弱いポテンシャルを感じるはずである．従って，デバイの遮蔽長を用いてイオン雰囲気境界を定義する上で，なんらかの倍率が必要となる．

そこで，高塩濃度条件に対しては， ξ として， $n_p^{-1/3}$ の代わりに $2c\lambda^{-1}$ を採用した．ここで， c は比例定数である．64 base-pairs の二本鎖 DNA について，モンテカルロ法を用いた研究の結果 [14] によれば，DNA を中心とするイオン雰囲気内の対イオンを中心から外側へと順に数えたとき，順序の上でリン酸基の個数（この場合 128 個）分の電荷をちょうど中和する対イオンは，約 $4\lambda^{-1}$ の動径方向位置においてその存在確率密度関数が c_s に関わらず最大となる．この例は完全に同一の条件ではないものの，現在において比例定数 c に関する唯一の研究例と思われるので，本研究ではイオン雰囲気境界について，この定義を用いることにし，以下の議論では $c = 4$ とした．

さらなる定式化に先立って，図 3.6 に示す高分子電解質のモデルにおいて，高分子電解質の剛性に関する重要なパラメータである持続長（persistence length） l_{per} について言及する必要がある．もし $\xi = 2c\lambda^{-1}$ が高分子の長さ L （高分子電解質の先端から末端までの距離）よりも小さければ，高分子電解質周りのイオン雰囲気は異方性が高く，結果として分極も異方性が高くなる．従って，高分子電解質の長軸方向と，それに直交する方向との，2つの緩和が別々に考慮されなければならない．実際，長い ss-DNA，例えば 3.3.2 節で述べた理由により本節で議論しない $N=90$ bases あるいは 120 bases の ss-DNA については，そのような考察が必要になる可能性がある．一方で，以下に示すように， $N=30$ bases や 59 bases の ss-DNA に関しては，解析を行う際にイオン雰囲気の異方性の影響は顕在化しない．

λ^{-1} は $l^{1/2}$ すなわち $c_s^{1/2}$ に反比例（式 (3.9)）し，本章の実験条件における最小値は 1.8 nm ($c_s=30$ mmol/L において) であるので， $2c\lambda^{-1}$ は 14.4 nm となり， c_s が減少するにつれて増大する．一方で，過去の研究 [15] によれば， $N=10$ bases から 70 bases のチミンが連なった ss-DNA について， $c_s=25$ mmol/L において l_{per} は約 3 nm である．これは，最も簡単なミミズ鎖モデルを用いて，高分子鎖長を $l_{\text{per}}(Nl_b/l_{\text{per}})^{1/2}$ で見積もると， $N=30$ bases と 59 bases の ss-DNA について，高分子長さ L はそれぞれ，7.5 nm および 10.6 nm であることを示唆している．なお， l_b はリン酸基間の平均距離であり，本研究では 0.63 nm [15] とした．従って，イオン雰囲気は $c_s=30$ mmol/L においても等方的であるとして扱ってよいことが分かる．

高分子電解質の持続長に関する様々な理論 [15–17] の中で，Odijk[18] および Skolnick ら [19] の先駆理論によると， l_{per} は，定数部と，イオン強度に比例する変数部との和によって与えられると予測している．従って， c_s が低下するに従い l_{per} は上昇し， l_{per} が静電的小塊のサイズ（純水中の ss-DNA については約 3 nm）に達したところで一定となる [20]．一方で， c_s の減少に伴って $2c\lambda^{-1}$ は上昇し続ける．以上のような理由により，本章で検討したすべての塩濃度範囲に渡って，イオン雰囲気径の直径は高分子の長さよりもはるかに大きいことが分かる．

以上を総括すると，相関長 ξ は以下のようなになる．

$$\xi \sim n_p^{-\frac{1}{3}} \text{ (dilute region, low salt concentration, } L < n_p^{-\frac{1}{3}} < 2c\lambda^{-1}\text{)} \quad (3.10)$$

$$\xi \sim 2c\lambda^{-1} \text{ (dilute region, high salt concentration, } L < 2c\lambda^{-1} < n_p^{-\frac{1}{3}}\text{)} \quad (3.11)$$

従って，式 (3.4)，(3.5)，(3.7) を参照することにより， $\Delta\varepsilon$ と τ は以下の式のように，各パラメータに依存することが導かれる．

$$\Delta\varepsilon \propto n_c(n_p^{-\frac{1}{3}})^2 \quad (3.12)$$

$$\propto c_w^{\frac{1}{3}} N^{\frac{2}{3}} I^0 \text{ (dilute region, low salt concentration)} \quad (3.13)$$

$$\Delta\varepsilon \propto n_c(2c\lambda^{-1})^2 \quad (3.14)$$

$$\propto I^{-1} \text{ (dilute region, high salt concentration)} \quad (3.15)$$

$$\tau \propto (n_p^{-\frac{1}{3}})^2 / 2\mathcal{D} \quad (3.16)$$

$$\propto c_w^{-\frac{2}{3}} N^{\frac{2}{3}} I^0 \text{ (dilute region, low salt concentration)} \quad (3.17)$$

$$\tau \propto (2c\lambda^{-1})^2 / 2\mathcal{D} \quad (3.18)$$

$$\propto I^{-1} \text{ (dilute region, high salt concentration)} \quad (3.19)$$

ここで，低・高塩濃度領域の両者が交差する塩濃度においては，次式が成り立つ．

$$2c\lambda^{-1} = n_p^{-\frac{1}{3}} \quad (3.20)$$

従って，臨界イオン強度 I_{cr} （1 価の塩については $c_{s,\text{cr}}$ に等しい）は次のように定まる．

$$I_{\text{cr}} = 2c^2 \frac{\varepsilon \varepsilon_0 k_B T c_w^{\frac{2}{3}}}{N_A^{\frac{1}{3}} e^2 M_w^{\frac{2}{3}}} \quad (3.21)$$

ただし， M_w は高分子電解質の分子量である．最後に， $\Delta\varepsilon$ と τ の I_{cr} に対する連続性から，次式が求まる． $I < I_{\text{cr}}$ のとき，

$$\Delta\varepsilon = A c_w^{\frac{1}{3}} N^{\frac{2}{3}} I^0 \quad (3.22)$$

$$\tau = B c_w^{-\frac{2}{3}} N^{\frac{2}{3}} I^0 \quad (3.23)$$

$I > I_{cr}$ のとき ,

$$\begin{aligned}
 \Delta\varepsilon &= Ac_w^{\frac{1}{3}} N^{\frac{2}{3}} \frac{I_{cr}}{I} \\
 &= 2Ac^2 \frac{\varepsilon\epsilon_0 k_B T}{N_A^{\frac{1}{3}} e^2} c_w \left(\frac{N}{M_w}\right)^{\frac{2}{3}} I^{-1} \\
 &= 2A \frac{c^2}{m^{\frac{2}{3}}} \frac{\varepsilon\epsilon_0 k_B T}{N_A^{\frac{1}{3}} e^2} c_w^1 N^0 I^{-1}
 \end{aligned} \tag{3.24}$$

$$\begin{aligned}
 \tau &= Bc_w^{-\frac{2}{3}} N^{\frac{2}{3}} \frac{I_{cr}}{I} \\
 &= 2B \frac{c^2}{m^{\frac{2}{3}}} \frac{\varepsilon\epsilon_0 k_B T}{N_A^{\frac{1}{3}} e^2} c_w^0 N^0 I^{-1}
 \end{aligned} \tag{3.25}$$

ただし, m は単量体の分子量であり, A と B は任意定数である .

図 3.7 に, 様々な c_w における $N=30$ bases および 59 bases の ss-DNA の $\Delta\varepsilon$ を, 式 (3.22) に基づいて $c_w^{1/3} N^{2/3}$ で規格化し, c_s に対して両対数グラフとして示す . 実線は $c_s=0.1-1$ mmol/L の範囲のすべての実験データに対して求めた回帰直線である . この回帰直線が非常によくデータ点を再現しており, かつその傾きはほぼゼロであることは, c_s が 1 mmol/L よりも小さい領域においては $\Delta\varepsilon/c_w^{1/3} N^{2/3}$ がほとんど一定であること, また, 3.3.2 節において提示した無塩条件におけるモデルが, $c_s=0$ のみでなく, 式 (3.22) で示したように c_s が小さい低塩濃度領域においてもよく高周波緩和を表現できていること, の 2 つを示している . また, $\Delta\varepsilon$ は $I > I_{cr}$ において I に反比例することを示唆している式 (3.24) に基づいて, $c_s=30$ mmol/L における 30 bases の ss-DNA のデータ点を通り -1 の傾きを持つ直線を, それぞれの c_w に対応した 4 本の破線により示す . 限られた実験数であり完全な確証には至らないものの, 実験データは, 高塩濃度領域において, 塩濃度の上昇と共にそれらの破線に漸近する傾向を示しており, 予測と合致している . 残念ながら, $c_s=30$ mmol/L 以上の領域, あるいは $c_w=0.25$ g/L 以下の領域では, 塩濃度の上昇とともに顕在化する電極分極の影響に起因した測定ノイズの上昇に対して $\Delta\varepsilon$ が小さく, 信頼性のある定量的なデータを得ることができなかった . この問題に対処するためには, c_s の測定可能範囲を拡大するために, 電極分極に関するより精緻な検討 [21] が必要となる .

本章において提案したモデルを, 実験結果を用いてさらに細かく検証するため, $N=30$ bases および 59 bases の ss-DNA について式 (3.21) を用いて臨界塩濃度 $c_{s,cr}$ を算出し, 図 3.7 において実線と破線の交点として得られる臨界塩濃度の実験値と比較した . その結果を表 3.1 に示す .

結果として, 式 (3.21) から得られる $c_{s,cr}$ の各計算値は, 図 3.7 から求まる各値と比較的良好く一致している . このことは, 図 3.7 に見られるような遷移的ふるまいは, 図 3.6 で示

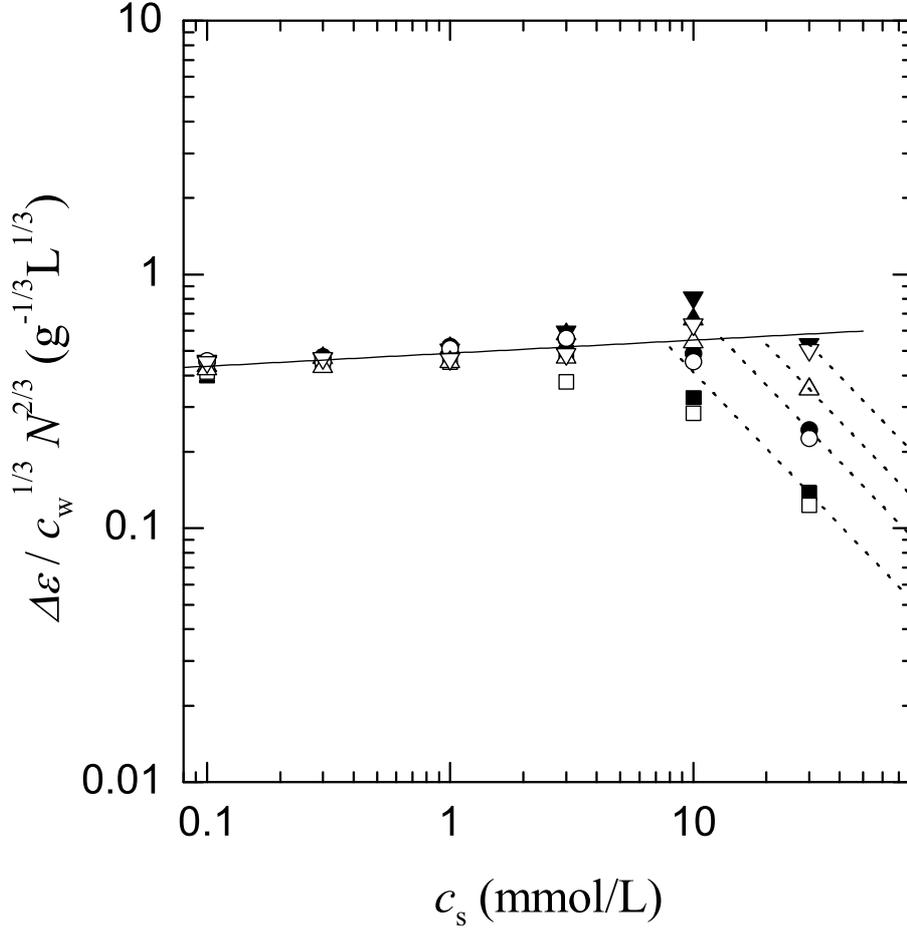


Figure 3.7: The normalized dielectric increment $\Delta\varepsilon/c_w^{1/3}N^{2/3}$ for ss-DNA with $N=30$ (open symbols) and 59 (filled symbols) bases in solution with the weight concentrations c_w of 0.25 (\square), 0.50 (\circ), 1.0 (\triangle) and 2.0 (∇) g/L as a function of salt concentration c_s in a double logarithmic plot. The solid line is the regression line to the experimental data for c_s from 0.10 to 1.0 mmol/L, and each dotted line has a negative unity gradient and passes through the data point for 30 bases ss-DNA at $c_s=30$ mmol/L. The increment remains almost constant but slightly increases with increasing c_s below 1 mmol/L and decreases along the dotted lines. The salt concentrations at the crossover points of the solid and dotted lines agree well with the critical salt concentrations as calculated by $2c\lambda^{-1} = n_p^{-\frac{1}{3}}$.

Table 3.1: Critical salt concentrations $c_{s,cr}$ calculated by Eq. (3.21) and those calculated from the experimental results for the 30 and 59 bases ss-DNA solutions with added salt.

c_w [g/L]		0.25	0.50	1.0	2.0
Theoretical $c_{s,cr}$ [mmol/L]	30 bases	9.8	16	25	39
	59 bases	6.3	9.9	16	25
Experimental $c_{s,cr}$ [mmol/L]	30 bases	7.6	13.1	18.6	27.4
	59 bases	6.8	12.2	18.6	26.2

したような対イオンの揺動に関する特性長さの遷移によるためであるとする本モデルを支持する結果と言える。

図 3.8 に、様々な c_w の $N=30$ bases および 59 bases の ss-DNA に対し、式 (3.23) に基づき規格化した緩和時間 $\tau/c_w^{-2/3} N^{2/3}$ を、 c_s に対して両対数グラフとして示す。図から、式 (3.23) および式 (3.25) から予測されるように、 c_s が $c_{s,cr}$ に到達するまでは緩和時間もほぼ一定であり、 $c_s > c_{s,cr}$ の範囲では c_s に反比例するが如く減少していることが分かる。この緩和時間の c_s に対するふるまいは、本研究で提示したモデルによってよく理解されるが、 $c_s < c_{s,cr}$ の範囲では、式 (3.23) の予測と異なって、規格化された緩和時間は緩やかではあるものの上昇しており、理論と実験の一致は図 3.7 における $\Delta\varepsilon$ で見られたほど良いものではない。

これは、おそらく次のような理由による。すなわち、3.3.2 節で述べたように、純水中では外部電場の考察をしなくとも、揺動散逸定理を通して対イオンの熱ゆらぎを考察するのみで $\Delta\varepsilon$ は算出できる。しかし、その一方、弱く束縛された対イオンの拡散緩和機構は、より正確な緩和時間の解析を行う必要があるからであると考えられる。本研究のモデルは、 $2c\lambda^{-1}$ がセルのサイズに比べてはるかに大きく、セル内の拡散定数 \mathcal{D} がほぼ一定である、純水中においては実験とよく一致する。一方で、本節での検討で示したように $2c\lambda^{-1}$ が c_s の関数として変化する系へ拡張する場合には、 \mathcal{D} が散漫相内の位置に依存することを考慮する必要がある。つまり、散漫相の収縮に伴い、対イオンが中心イオンである高分子電解質に近づいて、リン酸基から受ける静電的な引力が増加して対イオンの動きを妨げ

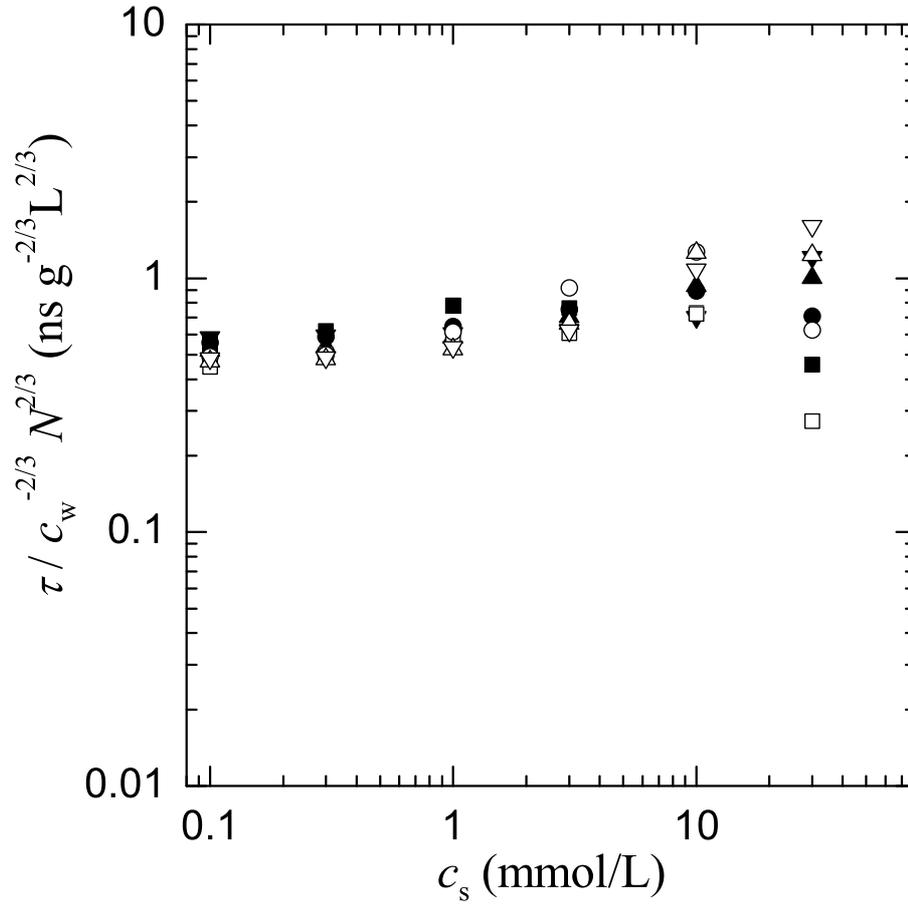


Figure 3.8: The normalized relaxation time $\tau/c_w^{-2/3} N^{2/3}$ for ss-DNA with $N=30$ (open symbols) and 59 (filled symbols) bases in solution with the weight concentrations c_w of 0.25 (\square), 0.50 (\circ), 1.0 (\triangle) and 2.0 (∇) g/L as a function of salt concentration c_s in a double logarithmic plot.

るために、弱く束縛された対イオンの拡散定数 \mathcal{D} は、 $2c\lambda^{-1}$ の低下に伴って小さくなる。

実際、コロイド溶液に関する初期の分極理論 [22,23] は、高分子電解質からの距離に応じて異なる移動度を持つ対イオン全体の寄与分として、表面導電率という概念を用いている。そして、内相の移動度は静電引力のために外相のそれに対して数分の 1 に低下させている。 c_s の上昇に伴い、弱く束縛された対イオンの拡散定数 \mathcal{D} は低下して凝集対イオンの \mathcal{D} に近づくというこの考え方を参考にすれば、 c_s の関数として規格化された緩和時間は上昇することが予測され、図 3.8 に見られるような結果と定性的には合致している。

以上の知見から、予め誘電分散が同定可能なくつかの周波数点（高周波緩和の特徴を捉えるために、100 kHz から 100 MHz 程度の範囲が望ましい）を選んでおき、対向電極を設けたマイクロ流路に ss-DNA 溶液を流し、誘電分散を連続的に測定することにより、DNA 量と鎖長のいずれか一方を検出することが可能であると考えられる。より実際的には、ゲル電気泳動法と併用する。すなわち、マイクロ流路中で試料 DNA をゲル電気泳動させて通過時間や緩和強度、緩和時間を求め、校正用のラダー DNA の各値と比較することにより、DNA 量や鎖長を計測することなどが考えられよう。なお、塩濃度は、溶媒の導電率と溶液の導電率がほとんど同じであるので、誘電分散を計測する際に求まる溶液の導電率から算出することが可能である。

3.4 結論

本章では、短い ss-DNA 溶液の誘電緩和と分極機構について、以下の結論を得た。

まず塩を添加しない状態において、高周波緩和の特徴は、凝集対イオンの分極理論には従わないこと、希薄高分子電解質の濃度および鎖長への依存性と類似していること、を示した。また、この依存性は臨界塩濃度以下の領域である限り、塩が存在しても引き続き成立することを示した。

次に、その誘電緩和の特徴は、高分子電解質濃度で規定される相関長を、対イオンが揺動しうる周期的な静電ポテンシャルの井戸の長さスケールに取った、セルモデルによりよく説明されることを示した。その結果として、短い ss-DNA 溶液の高周波緩和は、弱く束縛された対イオンの分極によるものであることが結論付けられた。

さらに、臨界塩濃度以下の塩濃度域では、緩和強度と緩和時間は塩濃度に無関係であり、一方で、臨界塩濃度以上の塩濃度域では、塩濃度に反比例して低下することが分かった。このような臨界塩濃度は、相関長に代わる対イオン揺動に関する長さスケールとし

て、塩濃度依存性を持つ散漫相の直径を取った、拡張セルモデルによって説明できること、また、実験的に得られた臨界塩濃度ともよく一致することを示した。

最後に、これらの知見を基にして、DNA 量と長さを検出するための具体的な構成・方法を提案した。

参考文献

- [1] Washizu, H. and Kikuchi, K., Concentration dependence of the anisotropy of the electrical polarizability of a model DNA fragment in salt-free aqueous solution studied by Monte Carlo simulations, *Colloids Surf. A*, Vol.148(1999), pp.107-112.
- [2] Washizu, H. and Kikuchi, K., Electric Polarizability of DNA in Aqueous Salt Solution, *J. Phys. Chem. B*, Vol.110(2006), pp.2855-2861.
- [3] Minakata, A., Imai, N. and Oosawa, F., Dielectric properties of polyelectrolytes. II. A theory of dielectric increment due to ion fluctuation by a matrix method, *Biopolymers* Vol.11, No.2(1972), pp.347-359.
- [4] Warashina, A. and Minakata, A., Dielectric properties of polyelectrolytes. IV. Calculation of dielectric dispersion by a stochastic model, *J. Chem. Phys.*, Vol.58(1973), pp.4743-4749.
- [5] Szabo A, Haleem M, Eden D, Theory of the transient electric birefringence of rod-like polyions: Coupling of rotational and counterion dynamics, *J. Chem. Phys.*, Vol.85, No.12(1986), pp.7472-7479.
- [6] Fixman, M., Charged macromolecules in external fields. I. The sphere, *J. Chem. Phys.*, Vol.72(1980), pp.5177-5186.
- [7] Fixman, M., Charged Macromolecules in External Fields. 2. Preliminary Remarks on the Cylinder, *Macromolecules*, Vol.13(1980), pp.711-716.
- [8] Takashima, S., Dielectric Dispersion of Deoxyribonucleic Acid. II, *J. Phys. Chem.*, Vol.70, No.5(1966), pp.1372-1380.
- [9] Mandel, M., The electric polarization of rod-like, charged macromolecules. *Mol. Phys.*, Vol.4, No.6(1961), pp.489-496.
- [10] Manning, G.S., A condensed counterion theory for polarization of polyelectrolyte solutions in high fields, *J. Phys. Chem.*, Vol.99, No.1(1993), pp.477-486.

- [11] Ito, K., Yagi, A., Ookubo, N. and Hayakawa, R., Crossover behavior in high-frequency dielectric relaxation of linear polyions in dilute and semidilute solutions, *Macromolecules*, Vol.23(1990), pp.857-862.
- [12] Gueron, M. and Weisbuch, G., Polyelectrolyte theory. II. Activity coefficients in Poisson-Boltzmann and in condensation theory. The polarizability of the counterion sheath, *J. Phys. Chem.*, Vol.83, No.15(1979), pp.1991-1998.
- [13] Gueron, M. and Weisbuch, G., Polyelectrolyte theory. I. Counterion accumulation, site-binding, and their insensitivity to polyelectrolyte shape in solutions containing finite salt concentrations, *Biopolymers*, Vol.19, No.2(1980), pp.353-382.
- [14] Washizu, H., Counterion Polarization of Polyelectrolytes in Solution studied by Computer Simulation. *Ph.D. thesis*, (2000), University of Tokyo.
- [15] Murphy, M.C., Rasnik, I., Cheng, W., Lohman, T.M. and Ha, T., Probing single-stranded DNA conformational flexibility using fluorescence spectroscopy, *Biophys. J.*, Vol.86, No.4(2004), pp.2530-2537.
- [16] Fixman, M., The flexibility of polyelectrolyte molecules, *J. Chem. Phys.*, Vol.76, No.12(1982), pp.6346-6353.
- [17] Bret, M.L., Electrostatic contribution to the persistence length of a polyelectrolyte, *J. Chem. Phys.*, Vol.76(1982), pp.6243-6255.
- [18] Odijk T, Polyelectrolytes near the rod limit, *J. Polym. Sci. B, Polym. Phys.*, Vol.15(1977), pp.477-483.
- [19] Skolnick, J. and Fixman, M., Electrostatic Persistence Length of a Wormlike Polyelectrolyte, *Macromolecules*, Vol.10, No.5(1977), pp.944-948.
- [20] Bordi, F., Cametti, F. and Colby, R.H., Dielectric spectroscopy and conductivity of polyelectrolyte solutions, *J. Phys. D App. Phys.*, Vol.16(2004), pp.R1423-R1463.
- [21] Feldman, Y., Polygalov, E., Ermolina, I., Polevaya, Y. and Tsentsiper, B., Electrode polarization correction in time domain dielectric spectroscopy, *Meas. Sci. Technol.*, Vol.12(2001), pp.1355-1364.

- [22] Schwarz, G., A theory of the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution, *J. Phys. Chem.*, Vol.66, No.12(1962), pp.2636-2642.
- [23] Schurr, J.M., On the Theory of the Dielectric Dispersion of Spherical Colloidal Particles in Electrolyte Solution, *J. Phys. Chem.*, Vol.68, No.9(1964), pp.2407-2413.

第4章 形状操作赤血球の電気物性の計測

4.1 概要

本章では，電気的手法による細胞の機能解析を目的とした，誘電分光法による細胞電気物性の非破壊計測法において，未解決である点を検討する．

細胞の β -緩和は界面分極によるものであることを，既に2章において示した．また，球状細胞については，解析的に細胞を構成する各相の電気物性を算出できることを述べた．しかしながら，実際の各種生体細胞はそれぞれ固有の様々な形状を有している．例えば，赤血球について言えば，良く知られた円盤形状に始まり，病態や環境によって様々な形状を取り得ることが知られている．しかしながら，そういった様々な細胞の誘電分散がそれぞれどのように異なるかについて，系統的に調べた研究例はない．さらに，そのような細胞について，実験結果から電気物性を算出する手法はこれまで提案されていない．

そこで，本章では，まず，由来を一にする赤血球を用いて，pHを変えて形状を変化させたときに，その懸濁液の誘電分散が如何に変化するかを実験的に調べる．その上で，数値解析を援用した電気物性の算出法を提案し，それを形状変化赤血球の実験結果に適用して実際に電気物性を算出し，評価する．

4.2 実験及び数値計算の手法

4.2.1 試料調製と幾何形状測定

健常な兎の全血 (*Oryctolagus cuniculus*, 生後約15週, コージンバイオ社, 等容積のアルセバー氏液と混合状態で入手, 採血後1日経過) を500gにて10分間遠心処理(本章では以下すべて同一条件)した後, 沈殿物をリン酸緩衝液(PBS:phosphate buffered saline, pH 7.4, 298K)中に再分散させた．この懸濁液中には90%以上の赤血球がウニ状赤血球(echinocyte)の状態で存在していたが, これは恐らく正常赤血球が保存状態の下で一時的

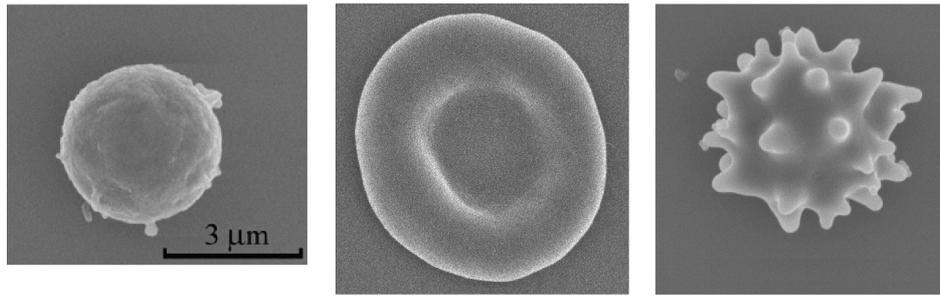


Figure 4.1: Scanning electron microscope images of the spherocyte (left), the discocyte (center) and the echinocyte (right).

に形態変化を起こしたことによると推察される．球状赤血球 (spherocyte) と円盤型赤血球 (discocyte) の懸濁液を準備するために，このウニ状赤血球を pH 5.3 と pH 8.5 の PBS 中で約 30 分間，298K でそれぞれ保持した．なお，光学顕微鏡 (Axio Imager M1, Carl Zeiss 社) により所望の形状であることを確認した．一方，正常ヒト赤血球 (normocyte) 懸濁液については，全血を健常な成人男性より採取し，pH 7.4 の PBS による遠心・再懸濁による洗浄を 2 回行うことにより得た．

これらの赤血球懸濁液の体積分率 ϕ はヘマトクリット法を用いて測定した．但し球状赤血球の ϕ は，誘電分光実験によって得られた ϵ^* に 2.2.2 節の同心多相球に関する式 (2.41) を適用して決定した．

各赤血球形状の特徴を詳しく見るために，走査型電子顕微鏡 (SEM)(S-3000N, 日立ハイテク社) を用いて赤血球を観察した．その観察結果を図 4.1 に示す．赤血球は 277K において 1% のグルタルアルデヒドで 2 時間処理して固定した後，希釈系列 (体積比 50%, 70%, 90%, 95%, 無水エタノール) のアルコール溶液を用いて脱水処理を行った．以上の操作を 277 K で行った後，298K に戻してカバーガラス上に塗末し，乾燥させた後，白金をスパッタコーティングして観察用試料とした．赤血球は固定と脱水処理の過程でかなりサイズが小さくなるので，赤血球の幾何パラメータを定量的に抽出する際には，SEM ではなく光学顕微鏡を用いた．

球状赤血球，円盤型赤血球，ウニ状赤血球を特徴づける形状パラメータとして，球状赤血球については直径を，ウニ状赤血球については突起先端間距離と突起谷間距離とを，円盤型赤血球と正常ヒト赤血球については長軸長さと厚さとを，それぞれ光学顕微鏡により測定した．その結果を表 4.1 に示す．

Table 4.1: Geometrical parameters of the erythrocytes.

Erythrocyte	Sample	parameter 1	parameter 2
spherocyte	rabbit	diameter, $6.1 \pm 0.45\mu\text{m}$	-
echinocyte	rabbit	top to top, $7.8 \pm 0.47\mu\text{m}$	bottom to bottom, $5.4 \pm 0.57\mu\text{m}$
discocyte	rabbit	diameter, $8.0 \pm 0.59\mu\text{m}$	thickness, $2.1 \pm 0.29\mu\text{m}$
normocyte[1]	human	diameter, $8.0 \pm 0.59\mu\text{m}$	thickness, $2.1 \pm 0.29\mu\text{m}$

4.2.2 誘電分光測定

赤血球の各形状を作成する際に用いたものと同じ PBS 中に懸濁した赤血球懸濁液について、インピーダンスアナライザ (4294A, Agilent Technologies 社) を用いて誘電分散を測定した。測定に際し、周波数範囲は 1.0×10^4 から 1.1×10^8 Hz, 印加電圧は 0.3V とした。測定セル等に関しては、第 2 章の方法を用いた。

4.2.3 細胞モデル

円盤型赤血球あるいは正常赤血球の形状は Evans らの経験式 [1] がよく用いられる。しかしながら、同式には長軸方向の縁に曲率に関する非連続点が存在するため、電場解析の際にポテンシャル分布が正確でなくなる可能性がある。従って、連続性を満たす形状として、 $z-x$ 平面内において、図 4.2 の実線で示されるような接線を共有する 2 つの円弧をつないだ線分を考え、それを z 軸を中心に回転して得られる物体をウサギ円盤型赤血球とヒト正常赤血球の細胞モデルとして用いた。図中の各パラメータは、Evans の代表値を満たすように、 $r_1 = 3.09\mu\text{m}$, $r_2 = 1.28\mu\text{m}$, $z_1 = 6.58\mu\text{m}$, $x_2 = 2.63\mu\text{m}$ とした。

また、ウニ状赤血球の 3 次元形状は、突起数、形状等様々であるが、光学顕微鏡像での測定結果を基に、次式のように球表面を \sin 関数で修飾した数式 [1] によって表現した。

$$r = u \cos(2w\varphi_x) \cos(2w\varphi_y) \cos(2w\varphi_z) + v \quad (4.1)$$

ここで、 u は突起の高さ、 v は球の半径、 w は $x-y$ 断面上第 1 象限内における突起の数

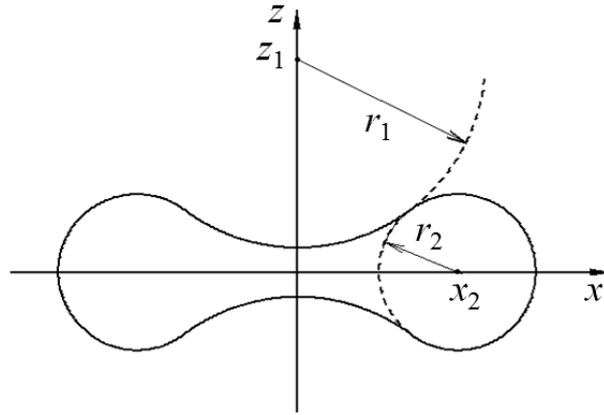


Figure 4.2: Illustration of a biconcave-discoid model. One quarter of the contour of the cross-section (solid line) is represented by the parts of attached two circles of radii r_1 and r_2 . The center of the former circle is located at x_2 on the x-axis. The z-axis is the rotational one. respectively.

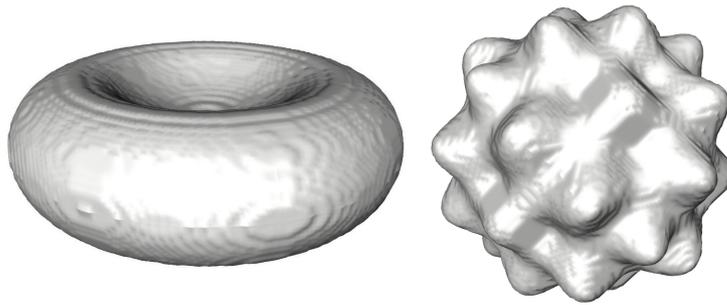


Figure 4.3: The three-dimensional models of the discocyte (left) and the echinocyte (right) for FDM simulation.

であり, $\cos \varphi_x, \cos \varphi_y, \cos \varphi_z$ はそれぞれ $x-, y-, z-$ に関する方向余弦である. 光学顕微鏡による測定の結果, $u = 0.611 \mu\text{m}, v = 3.30 \mu\text{m}, w = 3$ と決定した. 計算に用いたモデルを図 4.3 に示す.

4.2.4 数値計算

計算領域を 6 面体とし, 境界面の一部をなしている上部と下部の平板電極に挟まれたキャパシタに懸濁液が存在する系を考える. 計算資源節約の観点から, 細胞及び媒質を含む系のうちの 1 つの赤血球に注目し, 赤血球形状の対称性を用いて, 原点に形状中心をおいた $1/8$ 形状を対象とした. 円盤型赤血球を例として, 具体的に設定した解析領域を図

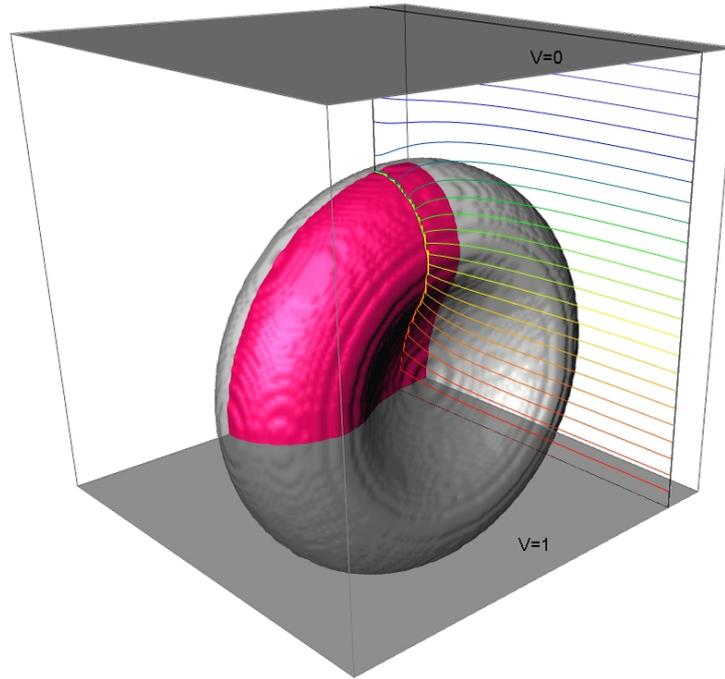


Figure 4.4: The one-eighth part (highlighted red) of the discocyte model used for the FDM simulation and the calculated isopotential lines at 1.0×10^5 Hz.

4.4 に示す．なお，図には，参考のため解として得られる 1.0×10^5 Hz における等電位線を併せて描いた．この系の ε^* を，Asami の方法 [2,3] に従って，3次元有限差分法 (FDM) により求める．系を $100 \times 100 \times 100$ の立方体要素に分割し，その一辺はすべての条件を通して約 $70 \mu\text{m}$ とした，各要素は細胞質あるいは媒質の複素比誘電率を保持し，かつ，それら要素の中心には格子点を備える (図 4.5 参照)

隣り合う格子点間の複素アドミッタンスは，それらの間に均質な電場が存在すると仮定することにより与えられる．一方，細胞質と媒質の界面において複素アドミッタンスは，図 4.5(d) に示すように，細胞質，細胞膜，媒質に対応した3つのキャパシタンス，コンダクタンス並列要素を接続した等価回路により表わされる．キルヒホッフの法則により，1つの要素に対して，6つの隣り合う要素から流入する正味の電流はゼロである．従って，すべての格子点について，静電ポテンシャルに関する連立方程式を定式化することができる．これらの連立方程式は，外部境界において，電極に相当する上下面については電位を，また，残りの4つの側面については電氣的絶縁条件を与えた上で，SOR法 (successive over-relaxation method) により数値的に解くことができる．結果として，静電ポテンシャル分布，電極を貫く複素電流，系の複素アドミッタンスを得ることができ，それらから最

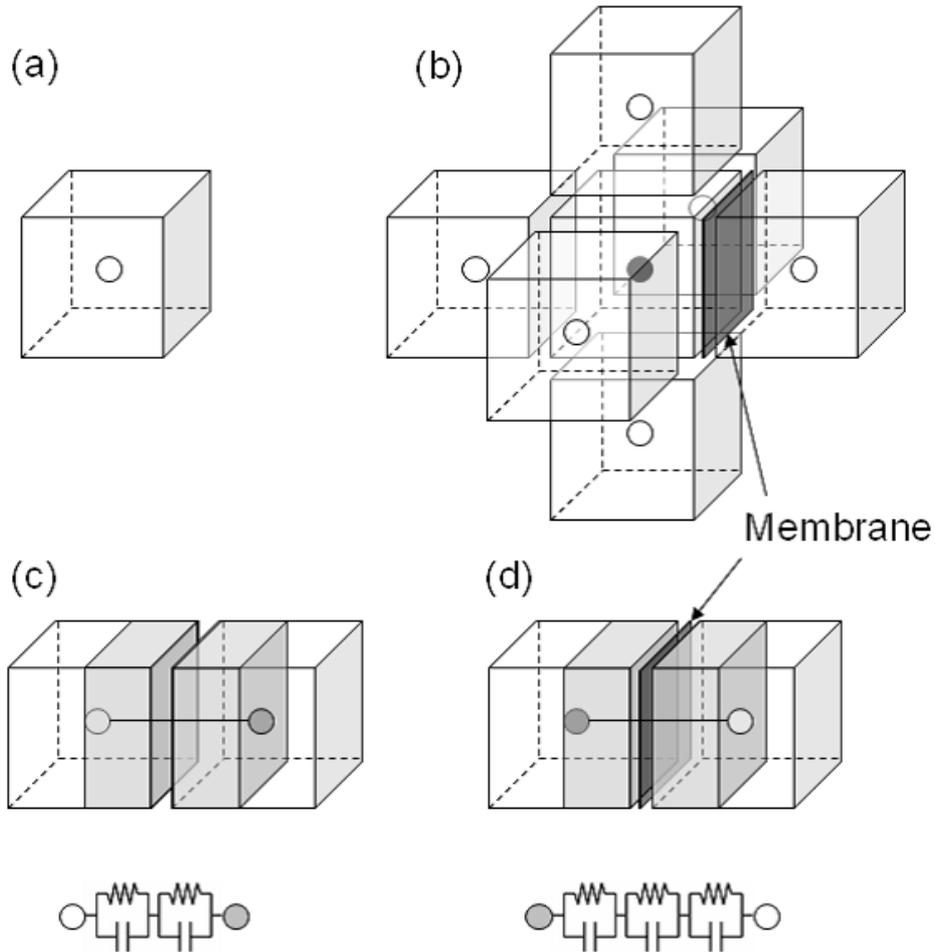


Figure 4.5: (a) Cubic element with unique complex permittivity for FDM simulation, in which a grid point for potential calculation is located at the center. (b) The element surrounded by six cubic elements to derive the potential at the center grid point. The figure exemplifies the case where cell membrane exists between the center element and the rightmost one. (c) Equivalent circuit model with two parallel capacitance and conductance components that represents the current path between the center element and the leftmost one in (b). (d) Equivalent circuit model for the center element and the rightmost one with additional capacitance and conductance components for the cell membrane.

最終的に ϵ^* が求まる。

ここで、離散化にあたり細胞膜に沿った接線方向の導電率を考慮しなくてよいことを、2.2.2 節において説明した同心多相球希薄懸濁液の複素比誘電率に関する解析式を用いて示す。ここでいう接線方向の導電率は、細胞膜表面にある糖鎖の負電荷によって形成された、電気二重層内の余剰イオンによるものである。電気二重層の厚みと、バルク相に対する電気二重層内の余剰イオンの量は、Guoy-Chapman[4]によれば、理論生理食塩水中の赤血球のゼータ電位 [5] を測定することにより求められ、実際に計算するとそれぞれおよそ 0.8 nm と 17% である。これらのパラメータを用い、イオンの移動度は電気二重層とバルク相で等しいと仮定した上で、同心多相球希薄懸濁液の複素比誘電率に関する解析式を 4 相に拡張 [6] して計算した。すなわち、内側より、細胞質、細胞膜、電気二重層、媒質の構成として、誘電分散を計算した。

その結果を、図 4.6 に示す。図から、表面導電率がゼロ、すなわち電気二重層の導電率 $\kappa_3=0$ S/m とした場合と、Guoy-Chapman 理論を用いて求めた導電率 $\kappa_3=1.95$ S/m (= $1.17 \times \kappa_2$) とした場合とでは、得られた誘電分散は図上では全く同一であることが分かる。また、 $\kappa_3=1000$ S/m のときによく $\kappa_3=0$ S/m のときとの差が明白となっている。これらのことから、比較的イオン強度の高い生理条件の下では、イオンの移動度がバルク相に対して 3 桁以上高いといった異常な条件が満たされない限り、誘電分散は電気二重層の影響を受けないことが分かる。従って、以上の議論の結果から、膜接線方向の表面導電率は離散化にあたって考慮しなくてよい。

両凹型の細胞モデル（すなわち正常形および円盤形）については、等方的に分散した懸濁液状態における誘電分散を求めるために、予めその回転軸に平行方向、および垂直方向についての誘電応答を別個に計算し、それらをそれぞれ 1 対 2 の重みを付けて平均化した。この平均化操作は細胞間相互作用が無視できる希薄懸濁液において成立する [7]。

なお、数値計算にあたっては、単位面積当たりの膜キャパシタンス C_{cm} および細胞質導電率 κ_{cp} をパラメータとして与える。ところが、本節で設定したように立方格子で自由曲面を近似する場合、離散化モデルの表面積 S_1 は、細胞モデルの真の表面積 S_2 より増加してしまい、膜全体のキャパシタンスを過剰に見積もってしまう。そこで、この影響を排除するため、単位面積当たりの膜キャパシタンスを計算する際には、 C_{cm} に表面積比 S_2/S_1 を乗じて補正した上でパラメータを入力し、数値計算を行った。

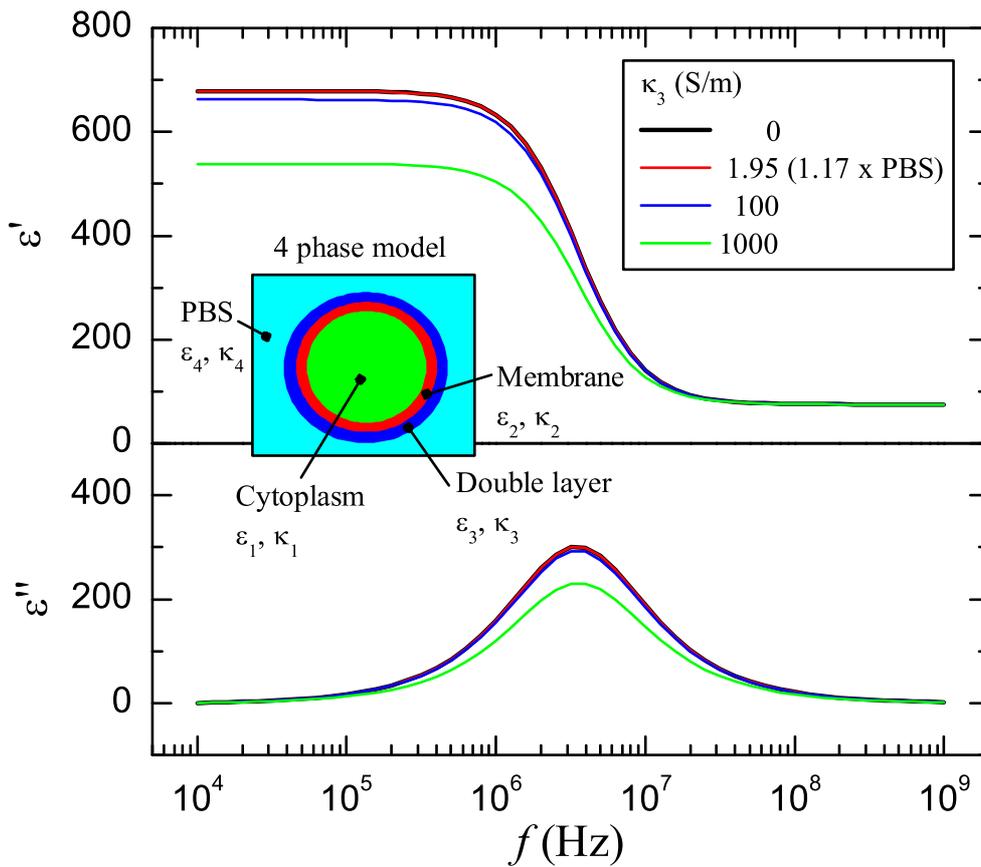


Figure 4.6: Dielectric spectra of 4-phase system considering the surface conductivity of erythrocyte.

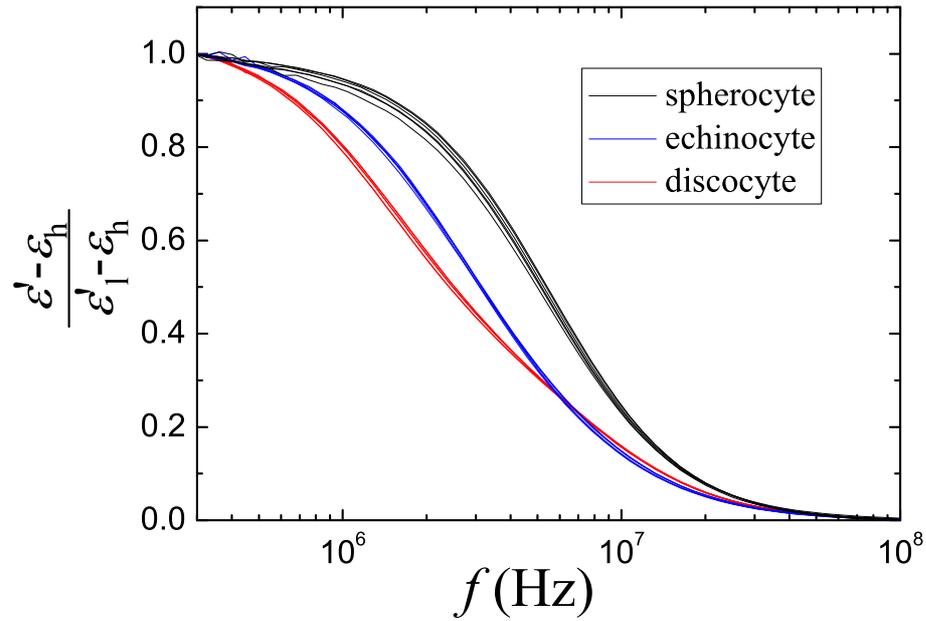


Figure 4.7: Total of 18 dielectric spectra (6 for each erythrocyte) measured in this study and normalized by the dielectric permittivity at lower limiting frequency.

4.3 結果と考察

4.3.1 細胞形状と誘電分散の対応

図 4.7 に、各赤血球形状ごとに様々な体積分率 ϕ について実験を行い、得られた誘電分散 ϵ' を示す。図では、細胞形状と体積分率が異なる誘電分散スペクトルを比較するために、懸濁液の比誘電率の低周波極限值 ϵ'_1 と高周波極限值 ϵ_h を用いて、 $(\epsilon' - \epsilon_h)/(\epsilon'_1 - \epsilon_h)$ で規格化した。図から、 $\phi < 0.25$ の範囲では体積分率によらずに、形状の異なる赤血球はそれぞれ固有の誘電分散スペクトルを示していることが分かる。特に、球形赤血球の緩和周波数に比べて、ウニ状赤血球と円盤形赤血球の緩和周波数は低周波側に移動していることが分かる。また、円盤形赤血球の誘電分散は他の赤血球に比べてスペクトルの幅が最も広がっていることも分かる。

そこで、これらの情報を定量的に表すために、実験で得られた ϵ^* を誘電関数に回帰させ、誘電分散を特徴づける誘電パラメータを求めた。すなわち、電極分極の影響を受けず、かつ β -緩和の分布範囲を包含する 0.1 ~ 110 MHz の周波数範囲において、実験により得られた ϵ^* を Cole-Cole 関数 (次式) によってフィッティングした。

$$\epsilon^* - \epsilon_\infty = \frac{\Delta\epsilon}{1 + (j\omega\tau)^\beta} + \frac{\kappa_1}{j\epsilon_0\omega} \quad (4.2)$$

但し、フィッティングに際しては実部 ε' のみを使用した。ここで、 ω は角周波数、 $\Delta\varepsilon$ は緩和強度、 τ は緩和時間、 β は緩和関数の広がりを示す Cole-Cole パラメータ、 κ_1 は懸濁液導電率の低周波極限值、 ε_0 は真空の誘電率である。

図 4.8 に、誘電分散と最適フィッティング曲線について、各赤血球形状ごとの代表例を 1 つずつ示す。さらに、フィッティング結果の良好さを、次式で示す標準偏差 (SD) により判定した。

$$SD = \left[\sum_{i=1}^n \{ \varepsilon'(f_i) - \varepsilon'_{\text{cal}}(f_i) \}^2 / (n - m_{\text{fit}}) \right]^{1/2} \quad (4.3)$$

ここで、 n は誘電分散のデータ点数、 m_{fit} はフィッティングパラメータの数、 $\varepsilon'_{\text{cal}}(f_i)$ は周波数 f_i におけるフィッティング関数の示す値である。球形赤血球については、 $SD = 3.2$ であり、各形状に対する結果のうちで最も小さい値であった。これは、図 4.8 においてフィッティング結果がよくデータを再現していることを定量的に示すものである。また、ウニ状赤血球については $SD = 6.3$ であり、フィッティング結果は比較的良い。一方で、円盤型については $SD = 22.2$ であり、Cole-Cole 式は相対的に実験結果をあまりよく再現しないことが分かる。円盤型赤血球は回転体であり、細胞厚みに対する回転直径の比は 3.8 であるから、円盤型赤血球は構造異方性を持つ。従って、それに対応して回転軸に垂直及び水平である 2 方向に対応した 2 つの界面分極 [8] が起こるはずである。しかしながら、誘電分散としては、明確には 2 つの緩和を分離できていない。これは、2 つの緩和周波数が接近しているためと考えられる。このように、本質的には円盤型赤血球の誘電分散は緩和過程を 2 つ内包しているので、緩和過程を 1 つだけ用いた式 (4.2) によるフィッティングは、データの再現性が悪いと考えられる。

Cole-Cole 関数にフィッティングすることによって得られた誘電パラメータ $\Delta\varepsilon$ 、 τ 、 β を図 4.9 に示す。図から、本章で扱った ϕ の範囲では、 $\Delta\varepsilon$ は ϕ にほぼ比例することが分かる。その一方で、 τ と β は ϕ にはほとんど無関係であることが分かる。このように、球形細胞以外では式 (4.2) の適用可能性に理論的背景は存在しないが、実際には、 $\Delta\varepsilon$ 、 τ 、 β といった誘電パラメータはそれでもなお大まかに誘電分散を特徴づけることができる。従って、少なくとも本章で扱った形状に関する限り、これらの誘電パラメータを用いることで、赤血球形状を区別することが可能であるといえる。

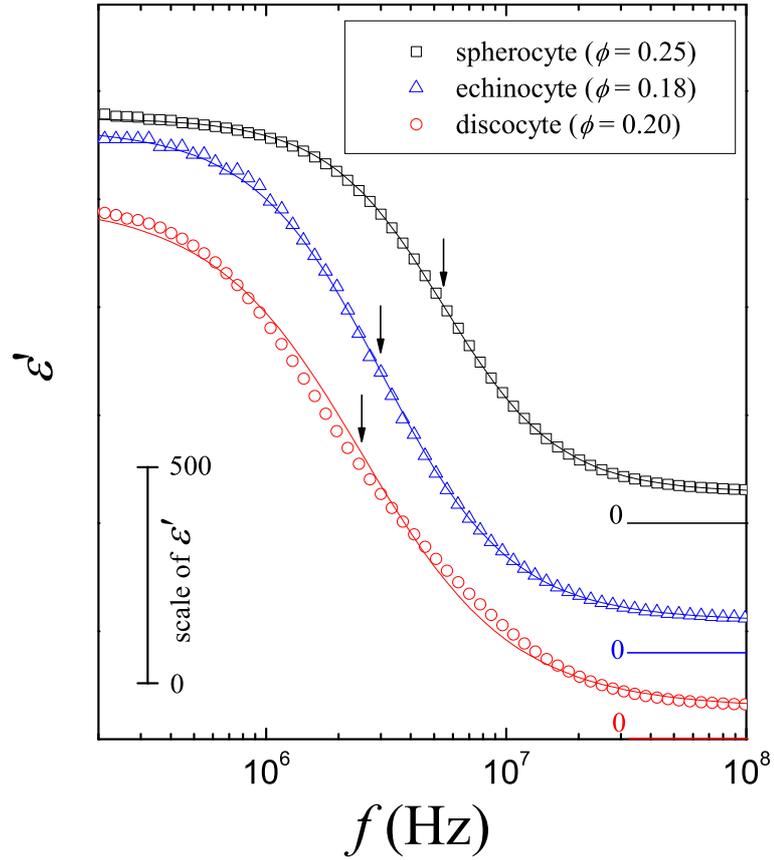


Figure 4.8: Experimental dielectric spectra for the erythrocyte suspensions. The solid curves are the best-fit Cole-Cole functions. The data sets corresponding to the echinocyte and spherocyte have been shifted upward along the y-axis for easier visual inspection (the amount of shifts are shown by the horizontal lines). Arrows show the characteristic frequencies of $(2\pi\tau)^{-1}$, where τ is the relaxation time.

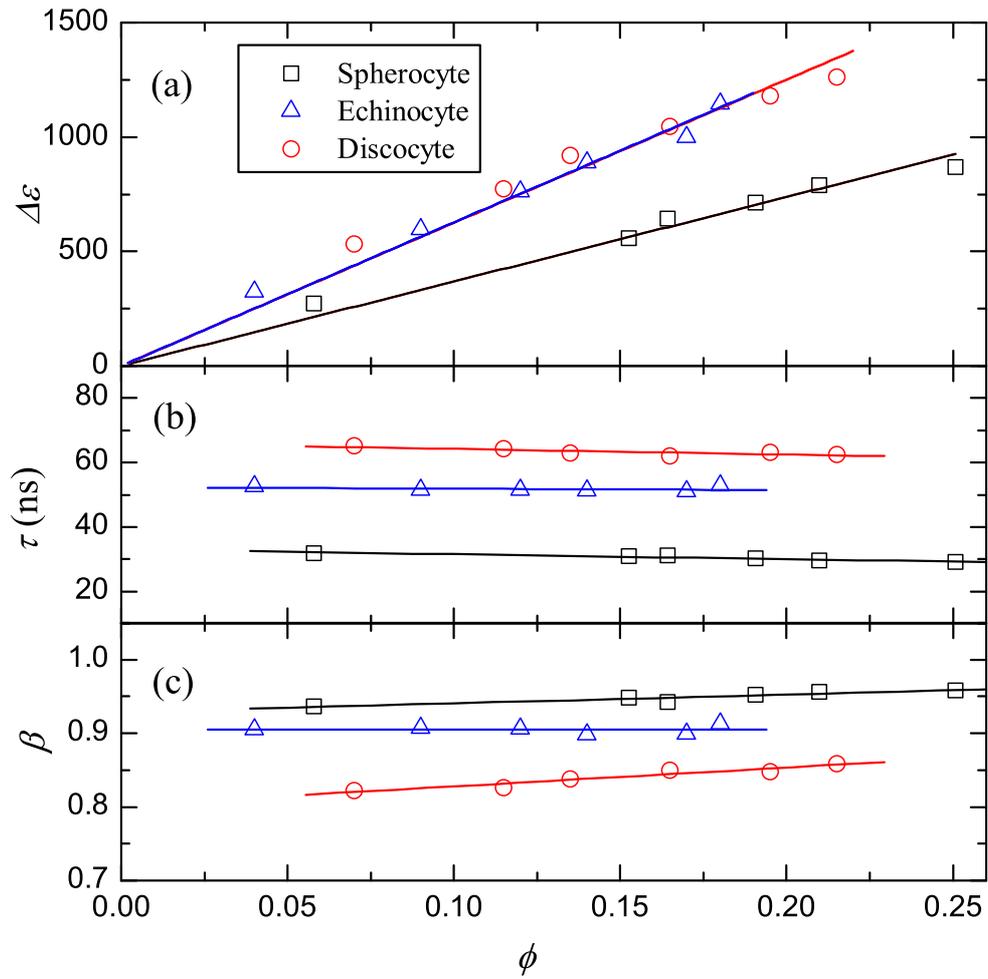


Figure 4.9: Dielectric relaxation parameters obtained by Cole-Cole functions ((a) relaxation strength, (b) relaxation time and (c) Cole-Cole parameter) for the discocyte, echinocyte and spherocyte.

4.3.2 細胞膜と細胞質に関する電気物性の推定

4.3.2.1 球状赤血球

本節では、2.2.2 節で説明した同心多相球懸濁液の界面分極に関する理論を球形赤血球に適用 [9,10] し、前節で抽出した誘電パラメータと細胞膜や細胞質の電気物性とを関連づける。

細胞膜の比誘電率 ε_{cm} および厚さ t_{cm} と、膜キャパシタンス C_{cm} との関係は $C_{cm} = \varepsilon_{cm}/t_{cm}$ となっているので、 ε_{cm} と t_{cm} は独立に決めることが出来ない。従って、本節で求めるべき球状赤血球の電気物性は、膜キャパシタンス C_{cm} 、細胞質比誘電率 ε_{cp} 、細胞質導電率 κ_{cp} の3つである。

入力値として、まず赤血球の直径については光学顕微鏡で求めた値を用いた。また、細胞膜導電率は 0.0 S/m とした。さらに、媒質の比誘電率と導電率はそれぞれ 78.3 、 1.67 S/m とした。

以上の各相の物性値を 2.2.2 節における各相の物性値に対応させ、代表例として $\phi = 0.058$ での実験結果についての解析結果を表 4.2 に示す。表において、入力した値は下線で示した。結果については、非球形の場合と併せて後に検討を加える。なお、 C_{cm} 、 ε_{cp} 、 κ_{cp} は、 ϕ の異なる実験結果について算出しても、大きくは変化しなかった。

4.3.2.2 非球形赤血球

次に、球形でない赤血球について、数値解析モデルを用いて、その構成相の電気物性を算出する。

まずはじめに、実験によって得られた赤血球懸濁液の誘電分散から、未知の電気物性、すなわち細胞膜キャパシタンス C_{cm} と細胞質導電率 κ_{cp} を、どのようにして求めるかを議論する。最も直接的な求め方として、体積分率で整理した ε^*/ϕ の誘電分散を、多くの C_{cm} と κ_{cp} の組み合わせ条件に対して予め数値解析により得ておき、実験結果が最もフィットするものを選ぶ方法が考えられる。しかしながら、この方法は数値解析、フィッティングの両面で、計算資源の負担が大きく、特に多数のデータを処理する必要があるような実際の応用に当たっては、現実的でない。

そこで、次のような効率的な算出手順を提案する。まず、 C_{cm} と κ_{cp} の計 25 個の組み合わせを選び、円盤型赤血球、ウニ状赤血球に関してそれぞれ数値計算を行い、 ε^*/ϕ を得る。次に、 ε^*/ϕ を誘電パラメータによって特徴づけるために、 ε^*/ϕ の実部を式 (4.2) の

Table 4.2: Parameters for estimating the electric property of the spherocyte.

property	symbol	symbol in Sec. 2.2.2	value
cytoplasm relative permittivity	ε_{cp}	ε_1	50
cytoplasm conductivity	κ_{cp}	κ_1	0.713 S/m
<u>cytoplasm diameter</u>	d_{cp}	d_1	6.1 μm
<u>cell membrane relative permittivity</u>	ε_{cm}	ε_2	-
<u>cell membrane conductivity</u>	κ_{cm}	κ_2	0.0 S/m [11,12]
<u>cell membrane thickness</u>	t_{cm}	$(d_2 - d_1)/2$	5 nm [11,12]
specific membrane capacitance	$C_{\text{cm}} = \varepsilon_{\text{cm}}\varepsilon_0/t_{\text{cm}}$	$2\varepsilon_2\varepsilon_0/(d_2 - d_1)$	6.33 mF/m ²
<u>solvent relative permittivity</u>	ε_{a}	ε_3	78.3
<u>medium conductivity</u>	κ_{a}	κ_3	1.67 S/m
volume fraction	ϕ	ϕ_{23}	0.058

Cole-Cole 式でフィッティングし，各相の定数条件に対応した $\Delta\varepsilon$ および τ の 2 つの緩和パラメータ (β も求まるが，本算出手順では用いない) を算出する．

細胞の分極の本質は界面分極であるから， $\Delta\varepsilon$ および τ の C_{cm} と κ_{cp} への依存性は，形状の影響を大きく受けてはいるものの，2.2.2 節で述べた， ϕ が小さいときに薄殻絶縁球について成り立つ式 (2.44) および (2.43)[7] と同様の関数形を成すはずである．そこで，次のような関係を設定し，定数 c_1, c_2, c_3, c_4 を，計 25 計算条件の結果に対して重回帰分析を行い決定した．

$$\Delta\varepsilon/\phi = \frac{c_1 C_{cm}}{1 + c_2 \kappa_{cp}} \quad (4.4)$$

$$\tau = C_{cm} \left(\frac{c_3}{\kappa_{cp}} + c_4 \right) \quad (4.5)$$

その結果，円盤型赤血球については， $c_1 = 1.10 \times 10^6 \text{ m}^2/\text{F}$ ， $c_2 = 2.86 \times 10^{-2} \text{ m/S}$ ， $c_3 = 4.52 \times 10^{-6} \text{ m}$ ， $c_4 = 1.19 \times 10^{-6} \text{ m}^2\text{S}/\text{F}$ となった．また，ウニ状赤血球については， $c_1 = 1.01 \times 10^6 \text{ m}^2/\text{F}$ ， $c_2 = 1.10 \times 10^{-4} \text{ m/S}$ ， $c_3 = 4.39 \times 10^{-6} \text{ m}$ ， $c_4 = 1.15 \times 10^{-6} \text{ m}^2\text{S}/\text{F}$ であった．

C_{cm} および κ_{cp} に対して，円盤型赤血球およびウニ状赤血球それぞれの式 (4.4) および式 (4.5) で表わされる回帰曲面を，図 4.10 に示す．数値解 (青丸) はよく回帰曲面上に載っており，回帰式は各赤血球の誘電パラメータから物性を推定するために用いることが可能であることが分かる．

同じように，実験で得られた誘電分散に Cole-Cole 式 (4.2) を当てはめ，実験試料に関する緩和パラメータ $\Delta\varepsilon_{\text{exp}}$ および τ_{exp} を求める．さらにこの $\Delta\varepsilon_{\text{exp}}/\phi$ と τ_{exp} を式 (4.4) と式 (4.5) に代入することにより， C_{cm} および κ_{cp} が求まる．これらの値を表 4.3 に示す．

希薄分散系においては，細胞質比誘電率 ε_{cp} の変化に対して誘電分散の変化は鈍感である [13] ので，4.3.2.1 節において得られた球状赤血球の値と同等であるとし， ε_{cp} は 50 で固定した．細胞膜の導電率については，過去に微少電極法により直接測定されており，膜コンダクタンスは $100 \text{ S}/\text{m}^2$ より小さい値が得られている．したがって，細胞膜の導電率は $1.0 \times 10^{-6} \text{ S}/\text{m}$ 以下としてよい．モデル計算によると，細胞膜導電率は， $1.0 \times 10^{-6} \text{ S}/\text{m}$ よりも小さければ，その変化が誘電分散に与える影響は小さく無視できるため，細胞膜導電率もまた， $1.0 \times 10^{-7} \text{ S}/\text{m}$ で固定した．細胞質導電率に関するこの条件は，生細胞について広く一般に成立していることが知られている [14]．媒質の比誘電率と導電率はそれぞれ 78.3 および $1.67 \text{ S}/\text{m}$ である．

さらに，実験の誘電分散スペクトルを再現できるかを確認するため，表 4.3 に記載の算

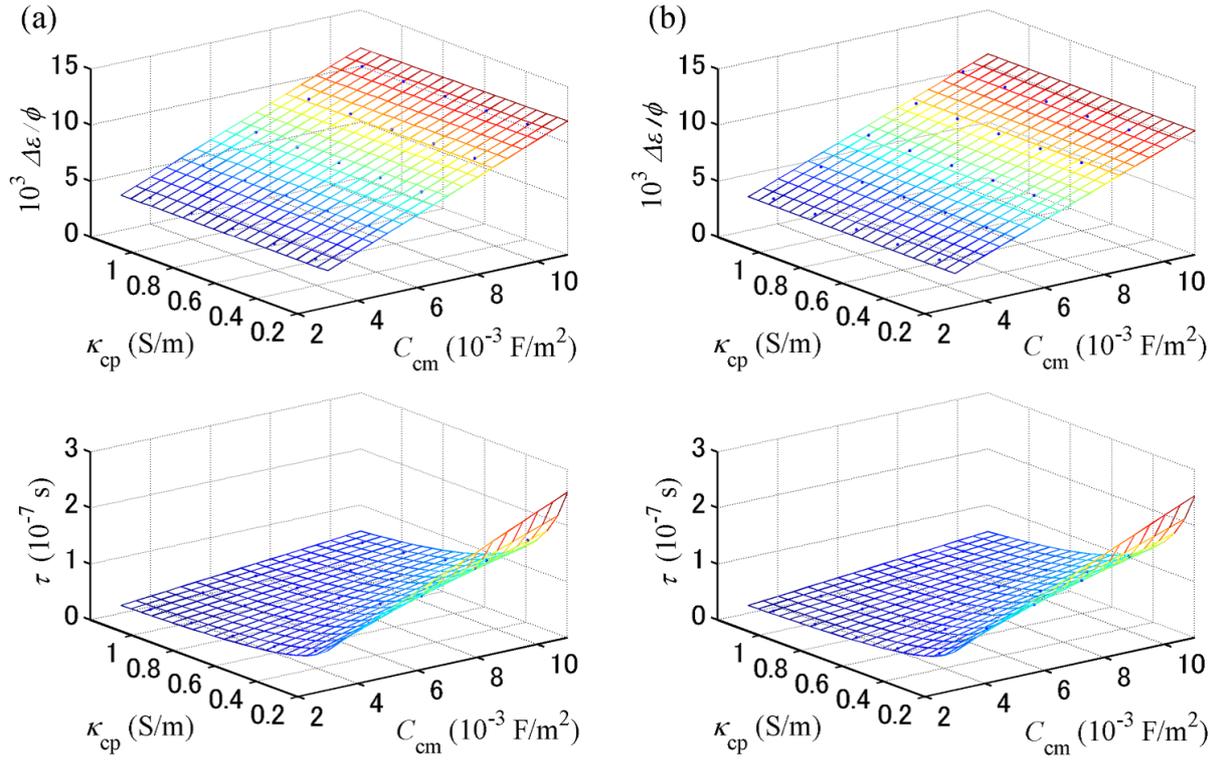


Figure 4.10: Three-dimensional renderings of the normalized relaxation amplitude $\Delta\varepsilon/\phi$ and the relaxation time τ calculated by Eqs. (4.4) and (4.5) as functions of the specific membrane capacitance C_{cm} and the cytoplasm conductivity κ_{cp} for (a) the discocyte and (b) the echinocyte. Also plotted as blue solid circles are the data obtained by fitting Eq. (4.2) to the simulated dielectric dispersion curves.

Table 4.3: Volume fractions and the electric parameters of the four types of erythrocytes as determined from the experimental dielectric dispersion curves by the analytical approach (the spherocyte) and the numerical approach (the other three types).

		Volume fraction	Membrane capacitance	Cytoplasm conductivity
		ϕ	C_{cm}	κ_{cp}
Erythrocyte	Sample		(mF/m ²)	(S/m)
spherocyte	rabbit	0.058	6.33	0.713
discocyte	rabbit	0.072	6.68	0.539
echinocyte	rabbit	0.090	6.53	0.651
normocyte	human	0.098	8.79	0.666

出値を用いて、有限差分法により誘電分散スペクトルを計算した。その結果を、実験結果と併せて図 4.11 に示す。図から、ウサギの円盤型赤血球およびウニ状赤血球のどちらの計算結果についても、実験結果をよく再現していることが分かる。特に円盤型については、Cole-Cole 式でも表せない歪んだスペクトルであるが、それでもなお計算結果は実験をよく再現しており、これまでに述べたような簡便な電気物性の推定法が良好に機能することを示している。なお、図中の実験値のうち、 10^5 Hz 以下の周波数域の値は電極の電気二重層キャパシタンスの影響を排除しきれないために生じる実験誤差であり、考察の対象から外した。

4.3.3 pH 操作による赤血球形状変化の過程に関する考察

次に、表 4.3 の電気物性について議論する。ウサギ赤血球のすべての形状について、 C_{cm} はほとんど一定である。このことは、媒質の pH が変わったことに伴う赤血球形状の変化過程においても、脂質や膜タンパクに顕著な変化を生じなかったことを示している。さら

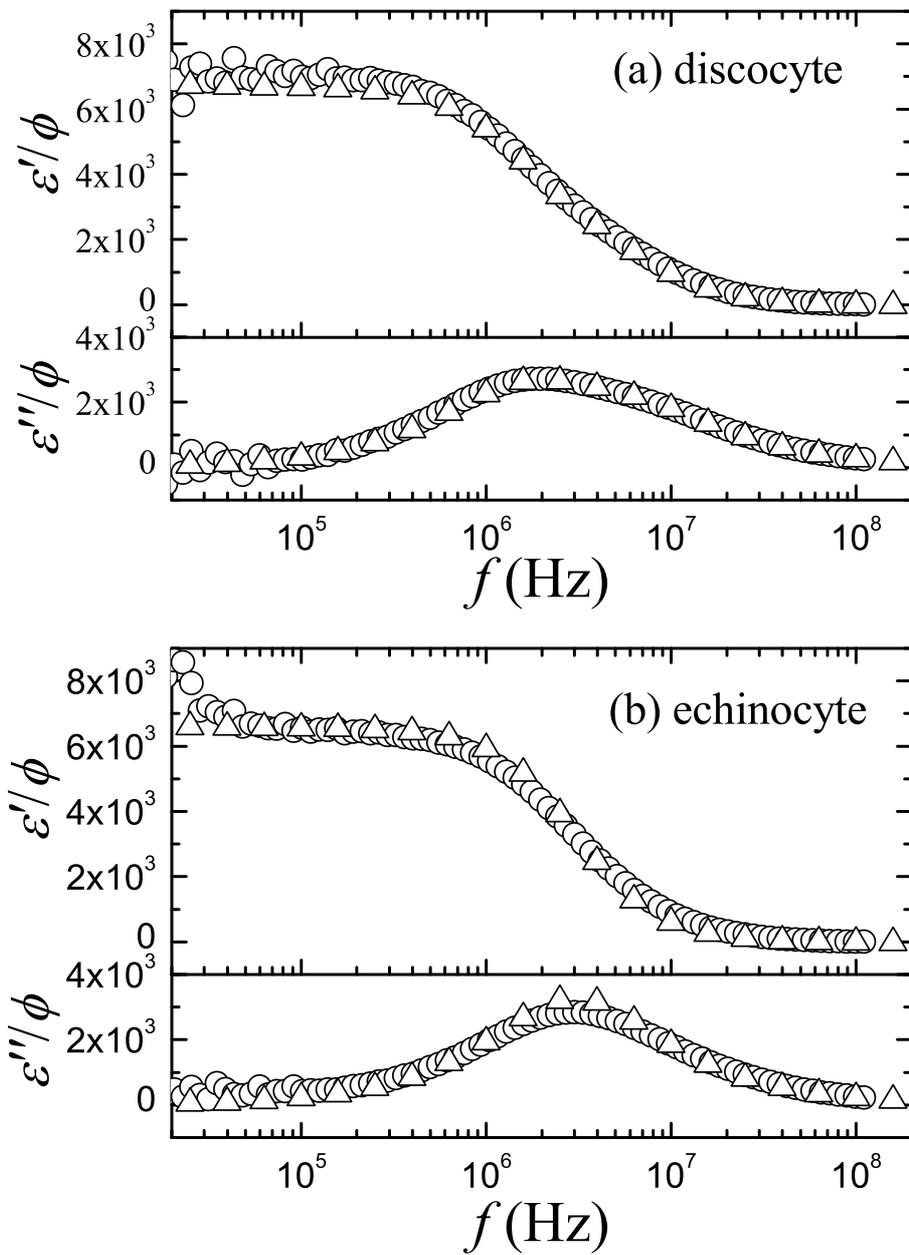


Figure 4.11: Complex permittivities calculated with the optimized membrane capacitance and cytoplasm conductivity (Δ) compared to the experimental ones (\circ) for (a) the discocyte and (b) the echinocyte. Discrepancy between simulation and experiment in the lower-frequency region below 10^5 Hz is due to incomplete elimination of electrode-polarization effects from the experimental data.

に、これらの値は、媒質の浸透圧を下げることにより膨張させたマウス赤血球についての文献値 ($C_{cm} = 7.2 \text{ mF/m}^2$) [15] や、羊赤血球ゴーストについての文献値 ($C_{cm} = 6.0 \sim 8.0 \text{ mF/m}^2$) [16]) と一致している。

一方、球状赤血球の細胞質導電率 κ_{cp} は円盤型赤血球のそれに比べて、32% も大きい。細胞膜は半透膜であるので、円盤型赤血球が膨潤して球形になると考えた場合、その過程においては、細胞外の媒質からは水のみが細胞質内に流入し、結果として細胞質におけるタンパク濃度と電解質濃度は低下するはずである。従って、 κ_{cp} の増分は、タンパク濃度上昇による細胞質粘性 μ_{cp} の低下と、細胞質内電解質濃度 c_{cp} の低下のトレードオフとして定まる。媒質中の電解質が流入しなければ、明らかに、 c_{cp} は細胞体積 V_c に反比例する。pH 調整によって V_c を変化させた、ヒト赤血球についての電子スピン共鳴法を用いた研究 [17] によれば、 γ を円盤型に対する細胞体積比とすると、 μ_{cp} は $\exp(1.215/\gamma)$ に比例する。従って、円盤型 ($V_c = 118 \mu\text{m}^3$) を基準にした c_{cp} と μ_{cp} は、円盤型赤血球 ($V_c = 94.1 \mu\text{m}^3$) に対して、それぞれ 0.80 倍および 0.78 倍になると見積もられる。さらに、 κ_{cp} は c_{cp}/μ_{cp} に比例するので、結局、球状赤血球の κ_{cp} は円盤型赤血球のそれとほぼ等しいはずである。

しかし、この見積りは、表 4.3 に示す結果と矛盾する。一方、もし c_{cp} の変化がなく、 μ_{cp} のみが 0.78 倍に低下したと仮定するならば、 κ_{cp} の上昇は 28% となり、同表から得られた 32% という値と良く一致する。従って、pH 変化により細胞膜の透過性が増し [18]、電解質も細胞質内に流入したために、 c_{cp} がほぼ一定に保たれたことが推察される。

κ_{cp} に関するこの仮説を立証するため、KCl と PBS を含むヘモグロビン溶液の導電率を測定した。ウシ全血から抽出したヘモグロビン (H2500, Sigma-Aldrich 社) を、一般的な赤血球中の濃度である 340mg/mL の濃度で 80 mmol/L の KCl 溶液に溶解し、10kHz における導電率を測定したところ、導電率は 0.594 S/m であった。これは、表 4.3 中の円盤型赤血球の κ_{cp} に近い。さらに、円盤型から球形へと形状変化を起こした際の V_c の上昇率は 25% であるので、ヘモグロビン溶液の 1/4 量の PBS を混合した。この希釈の結果、導電率は 33% 上昇した。これは、形状変化の前後で起きた κ_{cp} の上昇率と整合している。Pauly と Schwan [19] は、細胞膜のインピーダンスが十分小さくなる約 100 MHz において、様々な種類の赤血球について、 κ_{cp} を測定した。そして、無限希釈時の構成イオンの限界導電率の和として得られる仮想的な細胞質導電率は、彼らの実験結果よりも約 3 倍大きいことを見出した。彼らは、濃厚タンパク溶液中では、流体力学的相互作用と静電的相互作用が顕在化するために、低分子電解質イオンの移動度が低下するためであると結論づけた

が、彼らの実験結果は、本章で得られた実験結果に対する考察を補強するものである。

4.4 結論

本章では、まず pH を変化させることにより、赤血球形状を様々に変えた。次に、それぞれの赤血球懸濁液の誘電分散を測定したところ、その波形は互いに異なること、またそれらを Cole-Cole 式に回帰させて得られる誘電パラメータにより特徴づけられることが分かった。さらに、上述の赤血球についての誘電分散については解析式が存在しないものの、各形状の赤血球に対して有限差分法を適用し、細胞膜キャパシタンス及び細胞質導電率を簡便に計測する手法を提案した。また、推定した値を用いて計算した誘電分散は元のサンプルの誘電分散を、よく再現することを示した。

なお、この手法をさらに高度化することにより、如何なる形状の細胞の細胞膜キャパシタンス及び細胞質導電率をも知ることが出来ると考えられる。本章では扱わなかったが、例えば、構成する相を増やせば、白血球等の有核細胞への適用も可能である。また、誘電パラメータの1つである β を用いて、例えばさらに形状パラメータも陰として演算の次元を増やすことで、ある程度形状推定も可能である。ただし今回解析対象としている実験のような多数の細胞の懸濁液を対象とする場合、それぞれの細胞で大きさや形状にばらつきが少なからずあり、それゆえに誘電分散もブロードになるため、両者の β への寄与の切り分けが出来ず、厳密な議論ができない。もし単一細胞の誘電分散が実験的に得られれば、電気物性の算定と併せてそのような形状推定ができると考えられる。また、本章で示したような効率的な物性計測法は、以上の方法を総合することで白血球も含め単一細胞を高いスループットで次々に測定することを可能にするので、最も一般的な臨床検査である血球数算定装置を代替することも可能になると考えられる。

なお、本章後半において構築した電気物性の計測法は、赤血球に限らずいろいろな形を持つ様々な細胞について適用可能であり、マイクロバイオテクノロジーと組み合わせることで、さらに広い応用が考えられる。例えば、マイクロアレイの手法と複合化して、電気物性の変化を経時的に測定することにより、多種の薬剤に対する細胞の応答を並列解析することが可能であると考えられる。

参考文献

- [1] Evans, E. and Fung, Y.C., Improved measurements of the erythrocyte geometry, *Microvasc. Res.*, Vol.4(1972), pp.335-347.
- [2] Asami, K., Simulation of dielectric relaxation in periodic binary systems of complex geometry, *J. Col. Int. Sci.*, Vol.292(2005), pp.228-235.
- [3] Asami, K., Dielectric dispersion in biological cells of complex geometry simulated by the three-dimensional finite difference method, *J. Phys. D Appl. Phys.*, Vol.39(2006), pp.492-499.
- [4] Bard, A.J. and Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications (2nd ed.)*, (2001), Wiley, New York.
- [5] Jan, K.M. and Chien, S., Role of surface electric charge in red blood cell interactions, *J. Gen. Physiol.*, Vol.61(1973), pp.638-654.
- [6] Irimajiri, A., Hanai, T. and Inouye, A., A dielectric theory of "multi-stratified shell" model with its application to a lymphoma cell, *J. Theor. Biol.*, Vol.78, No.2(1979), pp.251-269.
- [7] Asami, K., Hanai, T. and Koizumi, N., Dielectric approach to suspensions of ellipsoidal particles covered with a shell in particular reference to biological cells, *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol.19(1980), pp.359-365.
- [8] Asami, K. and Yonezawa, T., Dielectric behavior of non-spherical cells in culture, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1245, No.3(1995), pp.317-324
- [9] Takashima, S., *Electric Properties of Biopolymers and Membranes*, (1989), Hilger, Bristol.
- [10] Kaneko, H., Asami, K. and Hanai, T., Dielectric analysis of sheep erythrocyte ghost. Examination of applicability of dielectric mixture equations, *Colloid Polym. Sci.*, Vol.269(1991), pp.1039-1044
- [11] Pauly, H. and Schwan, H.P., The impedance of a suspension of spherical particles surrounded by a shell, *Z. Naturforschung*, Vol.14b(1959), pp.125-131.

- [12] Hanai, T., Electric properties of emulsions, *In Emulsion Science (Ed.: Sherman, P.)*, (1968), pp.353-478, Academic Press, London.
- [13] Polevaya, Y., Ermolina, I., Schlesinger, M., Ginzburg, B. and Feldman, Y., Time domain dielectric spectroscopy study of human cells II. Normal and malignant white blood cells, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1419(1999), pp.257-271.
- [14] Asami, K., Takahashi, Y. and Takashima, S., Frequency domain analysis of membrane capacitance of cultured cells (Hela and myeloma) using the micropipette technique, *Biophys. J.*, Vol.58(1990), pp.143-148.
- [15] Asami, K., Takahashi, Y. and Takashima, S., Dielectric properties of mouse lymphocytes and erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1010(1989), pp.49-55.
- [16] Kaneko, H., Asami, K. and Hanai, T., Dielectric analysis of sheep erythrocyte ghost. Examination of applicability of dielectric mixture equations, *Colloid Polym. Sci.*, Vol.269(1991), pp.1039-1044.
- [17] Herrmann, A. and Muller, P., Correlation of the internal microviscosity of human erythrocytes to the cell volume and the viscosity of hemoglobin solutions, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.885, No.1(1986), pp.80-87.
- [18] Gedde, M.M., Davis, D.K. and Heustis, W.H., Cytoplasmic pH and human erythrocyte shape, *Biophys. J.*, Vol.72(1997), pp.1234-1246.
- [19] Pauly, H. and Schwan, H.P., Dielectric properties and ion mobility in erythrocytes, *Biophys. J.*, Vol.6(1966), pp.621-639.

第5章 マイクロ流路内における単一赤血球の変形能の計測

5.1 概要

第4章において、同じ赤血球であっても、形状が異なれば、それらの誘電分散は異なること、あるいは、緩和強度や緩和時間が異なることが分かった。また、数値解析を援用した回帰式係数データベースを作成・参照することにより、物性を同定できることを示した。もしマイクロ流路内を流れる個々の赤血球、さらには赤血球に限らず個々の一般的な細胞について、誘電分散が逐次得られれば、これらのことを用いて、試料である細胞集団に属する個々の細胞の物性解析・計数を行うことが可能となるはずである。

しかし、原理的には上記のようなことは可能であるものの、高速に多数の周波数における複素誘電率を測定するためには、細胞の β -緩和が存在する周波数域における高速なインピーダンスアナライザ（例えば1,000 scan/sのオーダーの掃引が可能なもの）の開発が必須であり、現状の市販品では不可能である。そこで、本章では、現在可能な方法として、単一の周波数を用い、コンダクタンス変化、あるいは抵抗変化のみに注目して、赤血球の形状を捉えるセンサを開発する。このセンサは、マイクロ流路内の高せん断流れ場により変形した赤血球を含む溶液の電気抵抗を、流路下壁に設けた薄膜電極対を用いて逐次測定し、その時系列波形を解析することで単一赤血球の変形能を求めるものである。

本章の前半では、電極間を通過する赤血球周りの電場に関する数値解析を行い、変形能に対応する計測指標を検討する。また、赤血球の通過高さ、流路高さ、電極形状等の条件を変化させた計算を行い、計測感度に与えるそれらの影響について検討すると共に、センサ形状の最適化を行う。後半では、数値解析で得られた知見をもとにセンサを製作し、赤血球を用いた実験を行う。この場合、正常赤血球の結果と硬化操作処理済みの赤血球の結果とを比較することで、本センサの有用性について検討を行う。

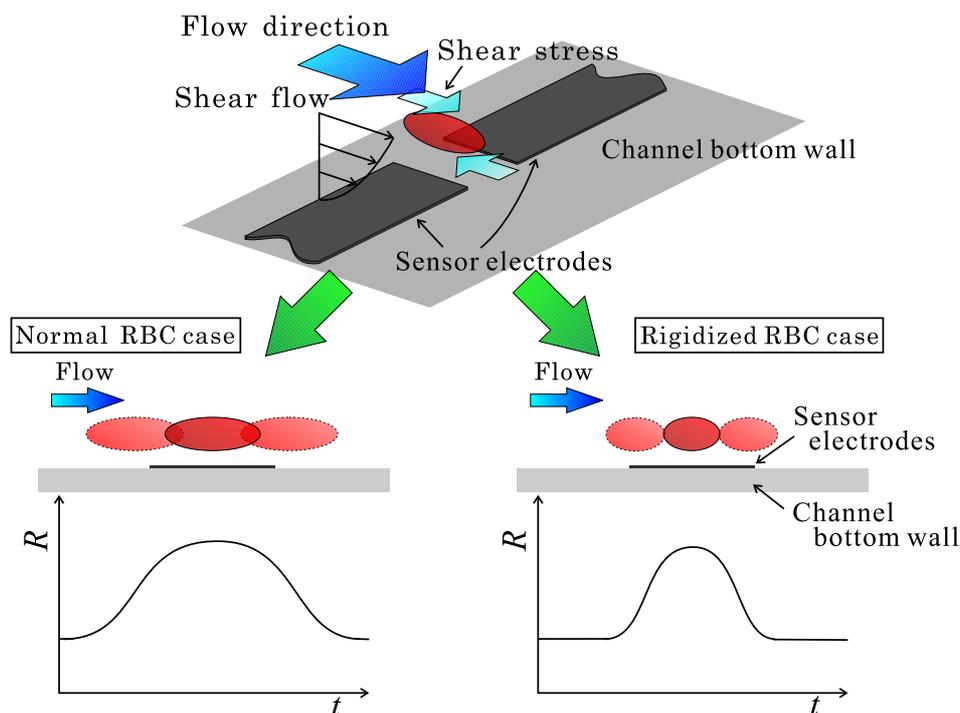


Figure 5.1: Concept of the measuring method of RBC deformability.

5.2 変形能計測手法

5.2.1 測定原理

赤血球を含む一般的な生細胞の細胞膜導電率は、前章でも述べたように約 $1 \times 10^{-6} \text{S/m}$ 以下であり、細胞質や生理条件を満たす媒質に対しては絶縁体と見なせる。従って、細胞に外部電場を印加した場合、伝導電流は、十分に電場の周波数が低い限りにおいて細胞膜を通過せず、電流密度は細胞形状に沿った分布形状を示すと考えられる。従って、電極を通して測定される抵抗値は細胞形状に依存すると考えられ、測定原理はこの点に立脚する。

図 5.1 に本測定法の概念図を示す。マイクロ流路内の速度勾配に伴う高せん断流れによって変形した赤血球が流路底面に設置した薄膜電極対の間を通過すると、赤血球の形状に応じて電極間の電気抵抗 R が変化する。刻々と変化する赤血球位置に応じた R を経時的に測定すれば、 R は時間 t の関数 $R(t)$ となる。さらに通過事象に対応する適切な観測時間を選べば、個々の赤血球の電極間通過は極値を有する $R(t)$ の波形と対応し、その関数形は、赤血球の通過位置、大きさ、流路と赤血球の形状に依存すると考えられる。したがって、赤血球の通過位置を適切に制御すれば、 $R(t)$ の波形を解析することで、せん断流れ場により変形を受けた赤血球の形状、すなわち変形能の測定が可能であると考えられる。

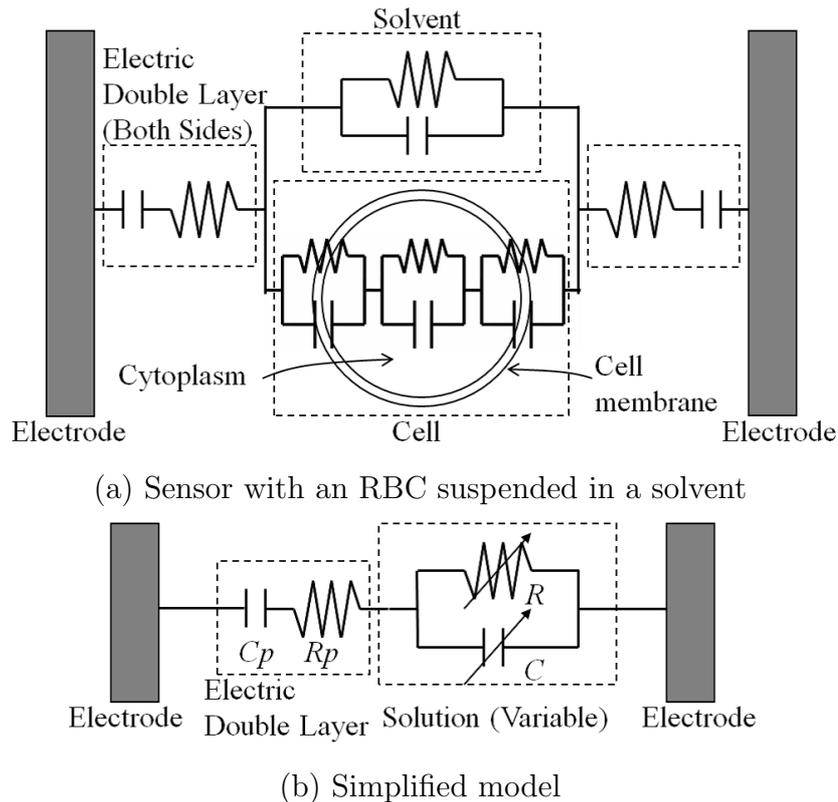


Figure 5.2: Equivalent circuit model.

5.2.2 等価回路モデルと測定周波数の選択

図 5.1 に示す電極対により赤血球懸濁液に電圧を印加する場合，電極間の等価回路は，細胞質，細胞膜，媒質，電極表面の電気二重層，をそれぞれ代表する抵抗性および容量性の回路要素で構成される．図 5.2(a) はその回路を表している [8]．また，この回路は，図 5.2(b) に示すように，赤血球の移動に伴って変化する可変抵抗の値 $R(t)$ と可変キャパシタの容量 $C(t)$ とで構成される並列要素と，赤血球位置に無関係の電気二重層の要素（種々のモデルが存在するが，最も単純な概念として抵抗 R_p ，容量 C_p の直列回路）との，直列接続回路として簡略化した等価回路と見なせる．本章ではこの可変抵抗値 $R(t)$ の時系列データをもとに変形能計測を行った．

ここで，電気二重層の静電容量は図 5.2(a) に示す他の要素と比較して非常に大きい．これは赤血球の浸透圧を保つために必要となる生理条件媒質はイオン強度が高いためである．このため，直流～低周波交流では，電圧を印加しても電流がこの容量の充電に費やされてしまうため， R の正確な測定が不可能である．この場合，高い周波数を用いて電気二重層のインピーダンスを下げ，この影響を低減，あるいは無視できるようにする工夫が必要である．しかし，周波数が高すぎると，絶縁性の高い赤血球膜においても細胞膜イ

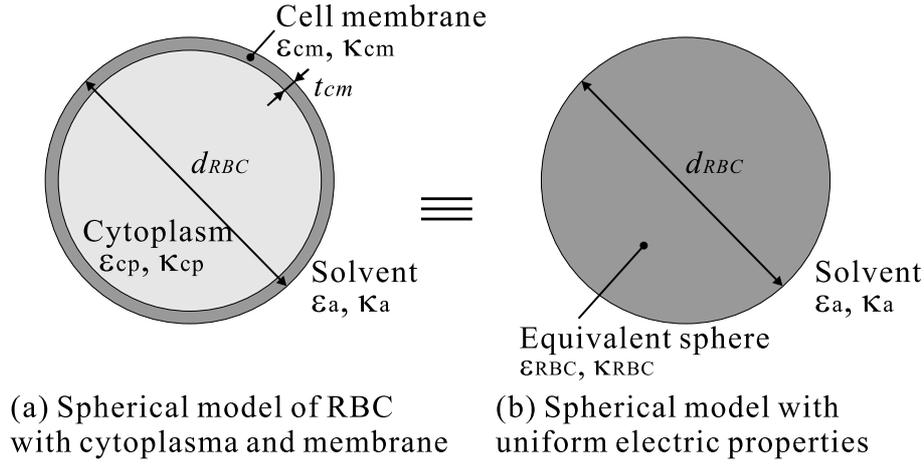


Figure 5.3: RBC model.

ンピーダンスが低下し容量性の電流が流れてしまう．このため，赤血球の形状を反映した抵抗値を測定するという観点からは，逆に直流～低周波数交流を用いることが望ましい．従って，測定周波数の適切な選択が必要となる．

そこで，赤血球の膜形状を反映した R が測定できる交流周波数の上限を，2.2.2 節の内相と外相を持つ同心球モデルを用いて見積もることとする．

いま，赤血球を図 5.3(a) のような同心球と考え，細胞質と細胞膜の比誘電率と導電率をそれぞれ ε_{cp} , κ_{cp} , ε_{cm} , κ_{cm} ，膜厚を t_{cm} ，直径を d_{RBC} とする．球形赤血球の等価複素比誘電率 $\varepsilon_{RBC}^* = \varepsilon_{RBC} - j\kappa_{RBC}/\varepsilon_0\omega$ は，次式のように表される．

$$\varepsilon_{RBC}^* = \varepsilon_{cm}^* \frac{2(1-\nu)\varepsilon_{cm}^* + (1+2\nu)\varepsilon_{cp}^*}{(2+\nu)\varepsilon_{cm}^* + (1-\nu)\varepsilon_{cp}^*} \quad (5.1)$$

$$\nu = \left(\frac{d_{RBC} - 2t_{cm}}{d_{RBC}} \right)^3 \quad (5.2)$$

ここで， ν は細胞全体に占める細胞質の体積割合である．また，この赤血球が比誘電率 ε_a ，導電率 κ_a である媒質に体積分率 ϕ にて希薄懸濁された時の系全体の複素比誘電率 $\varepsilon_{sus}^* = \varepsilon_{sus} - j\kappa_{sus}/\varepsilon_0\omega$ は，次式により解析的に求められる．

$$\varepsilon_{sus}^* = \varepsilon_a^* \frac{2(1-\phi)\varepsilon_a^* + (1+2\phi)\varepsilon_{RBC}^*}{(2+\phi)\varepsilon_a^* + (1-\phi)\varepsilon_{RBC}^*} \quad (5.3)$$

球形を仮定したヒト赤血球をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に希薄懸濁した場合 ($\phi=0.05$) について，式 (5.1) ~ (5.3) を用いて懸濁液の比誘電率 $\varepsilon_{sus}(f)$ と導電率 $\kappa_{sus}(f)$ を求めた．その結果を，図 5.4 にそれぞれ実線と点線で示す．ここで，ヒト赤血球および PBS の各定数は，第 4 章で求めた表 4.3 中のヒト正常赤血球についての値を用いて， $\varepsilon_{cp} = 50$, $\kappa_{cp} = 0.67\text{S/m}$, $\varepsilon_{cm} = 5.0$, $\kappa_{cm} = 1.0 \times 10^{-7}\text{S/m}$, $t_{cm} = 5.0\text{nm}$, $d_{RBC} = 6.7\mu\text{m}$ ，および $\varepsilon_a = 78.3$,

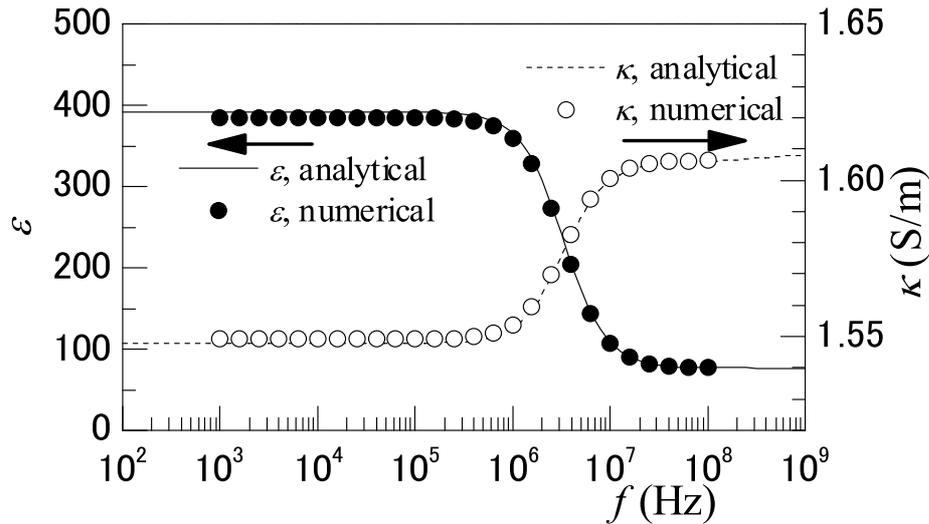


Figure 5.4: $\varepsilon_{\text{sus}}^*(f)$ of spherical RBCs suspended in PBS for $\phi=0.05$.

$\kappa_a = 1.67\text{S/m}$ とした．図から，懸濁液の比誘電率と導電率は2 MHz 付近を中心に変化し，誘電緩和現象を示していることが分かる．懸濁液の導電率は周波数の増加に伴って増加しているが，これは低周波数域では細胞膜は絶縁体として作用し，細胞形状が R に強く反映される一方，高周波域では膜インピーダンスが低下し細胞質の抵抗値が直接測定され，低周波域の場合のように R に形状が反映されないことを意味している．この知見を基に，本章では10kHz を測定周波数として選択した．電気二重層の影響排除という観点からのこの周波数選択の妥当性は，後に議論する．

5.2.3 電極および流路構造

前節までの検討に基づき，設計・製作した流路および電極の概観図を5.5に示す．電極は，電圧印加・電流検出用のセンサ電極，センサ電極と同電位のガード電極，そしてグラウンド電極，の3種類から成る．3つの電極は3端子構成になっており，センサー電極の両端での電場の広がり（フリッジ成分）をガード電極を配することにより抑えることができる．これにより，測定を狭い領域に限定することができるため，S/N比が向上する．電極部上流の流路入口には3つの流入口が設けられ，中央流路から赤血球を含む溶液が，両側の流路から媒質のみが供給される．マイクロ流路の小寸法効果によりレイノルズ数は小さく，流れは層流であるため，中央流路から供給される流体の周囲流体への能動拡散は小さい．したがって，中央および両側流路から供給される流量を適切に制御することにより，赤血球を電極間中央に安定して導くことが可能である．

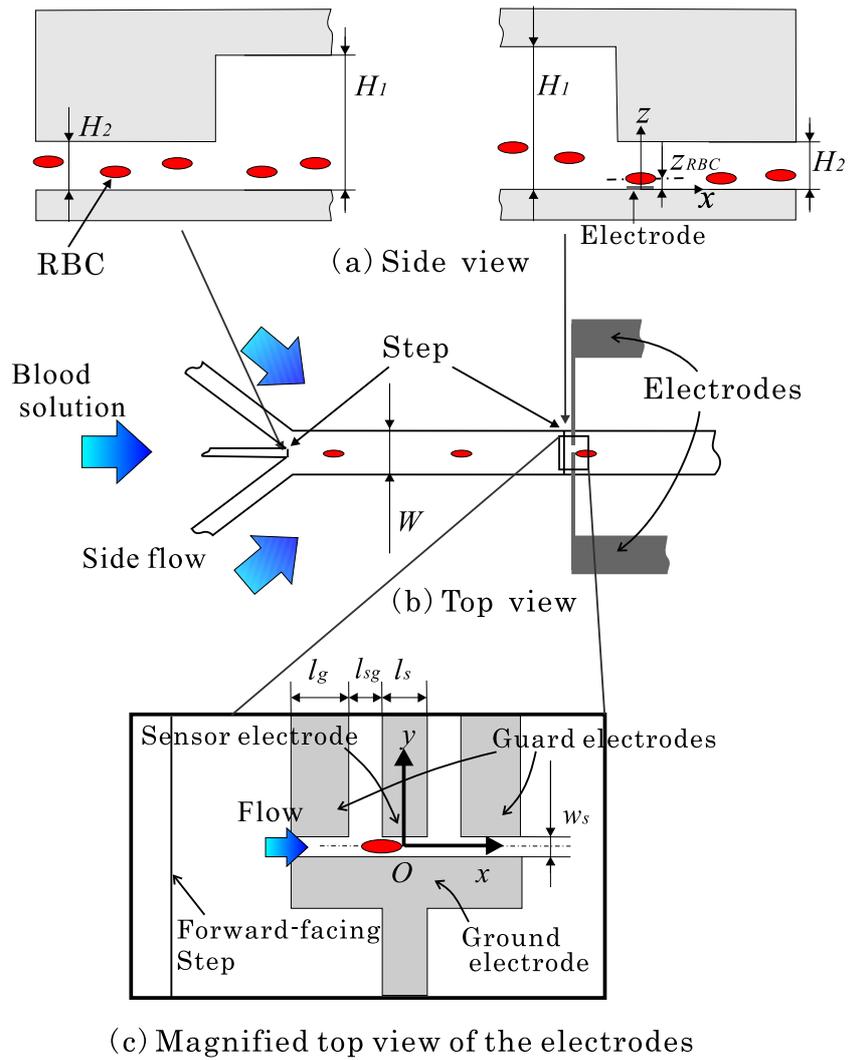


Figure 5.5: Schematic of the micro-channel and electrodes of the sensor.

ところで、赤血球は Fåhræus 効果 [9] に関連し、流動するにつれて流路高さ方向中心へと向かい、流路壁面すなわち電極から離れてしまう。そこで、入口では中央流路高さを両側流路と比較して低く設定し、さらに電極部のすぐ上流には前向きステップを付設して縮流を形成させることで、強制的に赤血球を電極部において流路下壁近傍に一定高さ z_{RBC} で通過させるようにした。また、流路幅 W は 1mm であり、流路高さ H_1 及び H_2 と比較して十分に大きいため、電極部付近の流れは 2 次元流れと見なし得る。したがって、赤血球は高さ方向の速度勾配によるせん断応力のみを受けて変形し、電極部を通過する。

Table 5.1: Fixed parameters in computations (μm).

L_{CD}	W_{CD}	H_{PDMS}	H_{Glass}	W	l_{sg}	l_{g}
800	700	100	100	1000	5	15

5.3 数値解析による検討

5.3.1 数値解析手法と条件

前章で述べた計測原理を数値的に検証するため，市販の有限要素法解析ソフトウェア (ANSYS Ver.11, ANSYS 社) を用いて次式に示す電位 V の支配方程式を解き，3次元定常調和電場について数値解析を行った．

$$\nabla \cdot \left(\left(\varepsilon - j \frac{\kappa}{\epsilon_0 \omega} \right) \nabla V \right) = 0 \quad (5.4)$$

赤血球中心は常に $x - z$ 面内にあり， $x - z$ 面に関する電場の対称性が成立すると仮定して，計算領域を，図 5.6 に示すように，センサ電極及びガード電極を含む長さ L_{CD} ，幅 W_{CD} ，高さ $H_{\text{PDMS}} + H_2 + H_{\text{Glass}}$ の矩形領域内に設定した．座標原点はセンサ電極とグラウンド電極間の中心とし， x 軸を流路主流方向として右手系の座標軸を設定した．領域下側には厚み H_{Glass} のガラス，上側には厚み H_{PDMS} の PDMS (Polydimethylsiloxane) を想定し，各々の誘電率と導電率をそれぞれ， $\varepsilon_{\text{Glass}}=3.4$ ， $\kappa_{\text{Glass}}=1.0 \times 10^{-12} \text{ S/m}$ ， $\varepsilon_{\text{PDMS}}=2.5$ ， $\kappa_{\text{PDMS}}=1.0 \times 10^{-12} \text{ S/m}$ とした．表 5.1 に数値計算にあたって固定して用いたパラメータを示す．また，計算時に用いた z_{RBC} ， H_2 ，センサ電極幅 l_{s} ，センサ電極とグラウンド電極間の距離 l_{sg} の値を各結果図に明示した．周波数は 10kHz とした．境界条件として， $y = 0$ 全面の電位を 0V (対称条件) とした．また，その他の計算領域最外面を電位 0V とした．電極厚さは零とし，その電極面上に電位 $V_{\text{add}}(\text{V})$ を与えた．この電極面上の節点解として得られる複素電流を $2V_{\text{add}}$ で除することにより複素アドミタンスを求め，さらに図 5.2(b) の並列要素のうちの電極間抵抗 R を算出した．なお，電気二重層は数値解析において考慮しない．

数値解析時の赤血球形状は主流方向に回転軸を持つ回転楕円体 (軸長さ a ，回転直径 b) として扱った．赤血球の変形度は，次式で定義される変形指数 DI [7] により表現した．

$$DI = \frac{a - b}{a + b} \quad (5.5)$$

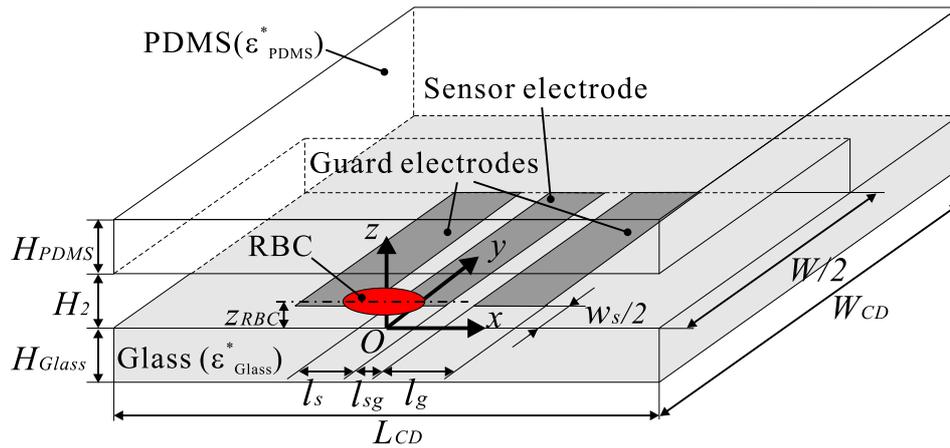


Figure 5.6: Computational domain.

ただし，赤血球表面積は保存される．従って， a 及び b は表面積が文献値 [10] $141\mu\text{m}^2$ を満たすという制約を加える．なお， $DI=0$ のときは球形を意味するが，このとき $a = b = d_{\text{RBC}} = 6.7\mu\text{m}$ とした．同じせん断応力値の下では， DI が大きいほど変形能が大きいことを意味する．

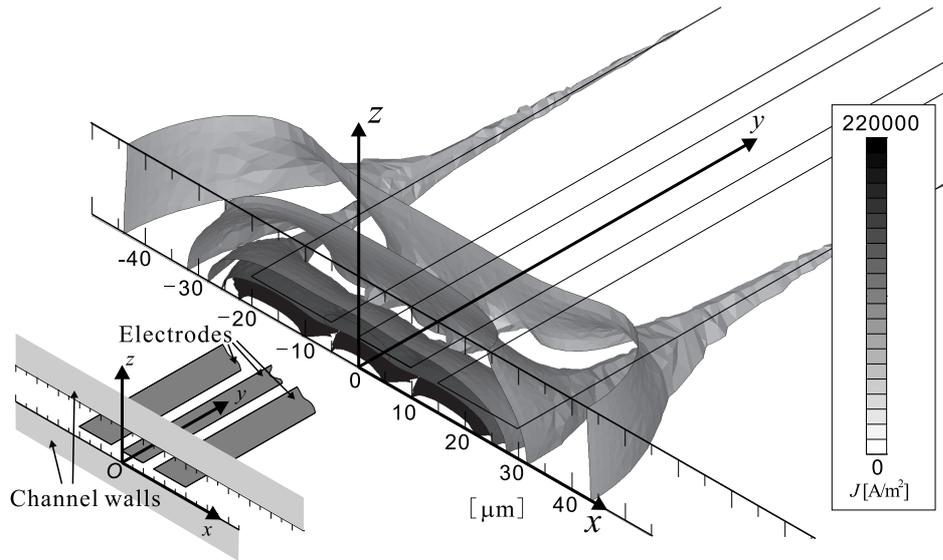
ところで，細胞膜の膜厚は nm オーダであり，流路や細胞質と比較して極めて薄く，計算において赤血球膜をも実構造に忠実に扱う場合，そこに十分な計算格子を設けることは困難である．また，ここでは赤血球内部の電位分布を詳細に知りたい訳ではない．そこで，2.2.2 節と同様にして図 5.3(b) で示したように，細胞質および細胞膜を含めた細胞全体が式 (5.1) で表される均質な複素比誘電率 ϵ_{RBC}^* を持つとして計算を行った．

本解析手法の妥当性を検証するために，平行平板対向電極間に球形細胞を $\phi=0.05$ にて懸濁した場合について数値計算を行い，系全体の比誘電率および導電率の周波数特性について式 (5.3) の解析解と比較を行った．その結果を，前掲の図 5.4 に比誘電率を ● 印，導電率を ○ 印を用いてプロットした．同図において，計算結果は実線および点線で示される解析解と良く一致しており，本解析手法の妥当性が確認できた．

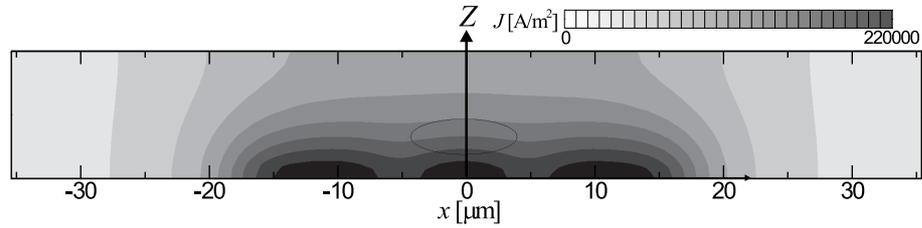
5.3.2 赤血球の通過高さおよびセンサ寸法のセンサ感度に及ぼす影響

本節では，球状赤血球が電極部を通過する際の通過高さ，流路高さ，電極形状が抵抗の測定値に与える影響についてそれぞれ検討を行い，センサ感度向上の指針を得る．

いま，主流方向赤血球中心位置が x_{RBC} にあるときの測定抵抗値を R_x と定義し，さらに， $x_{\text{RBC}} = 0$ においては R_0 ，電極部から十分赤血球が離れた位置では R_∞ と書くことにする．1つの赤血球が一定の高さを保って電極間を通過する場合を考えると，抵抗値は，



(a) Bird's eye view



(b) x - z plane at $y = 0$

Figure 5.7: Isosurfaces of the current density.

赤血球が電極間中心にあるとき極大値 R_0 を示し，十分電極から離れた位置にあるとき，すなわち計算領域内には媒質のみが存在するとき最小値 R_∞ （ベース抵抗値）を示すので，抵抗値の最大変化量は $\Delta R_0 = R_0 - R_\infty$ となる．センサ感度を向上することは，ベース抵抗値に対する相対的な抵抗変化 $\Delta R_0/R_\infty$ を大きくすることに相当する．

$\Delta R_0/R_\infty$ を増大させるためには，相対的に電流密度の大きな空間を赤血球が通過すればよい．より正確には，センサ電極から発生する電流束のうち，赤血球の存在のために排除される電流束の，それ以外の全空間を貫く電流束に対する比を，増大させればよい．電流密度分布の描像を把握するため，本節で最終的に決定された各寸法における，赤血球を含まない場合の電流密度（電圧に対する位相は 0）分布を図 5.7 に示す．図 (b) 中の中央には仮想的に赤血球の位置を描いた．図から，電流束は主に電極の端部及び角部から発生し，電流密度はセンサ電極端部で特に高く， z 軸に沿って急激に低下することが分かる．

次に，センサ寸法の最適化手順を示しながら，各パラメータがセンサ感度 $\Delta R_0/R_\infty$ に与える影響を検討する．センサに関する初期パラメータとして，センサ電極幅 $l_s = 15\mu\text{m}$ ，

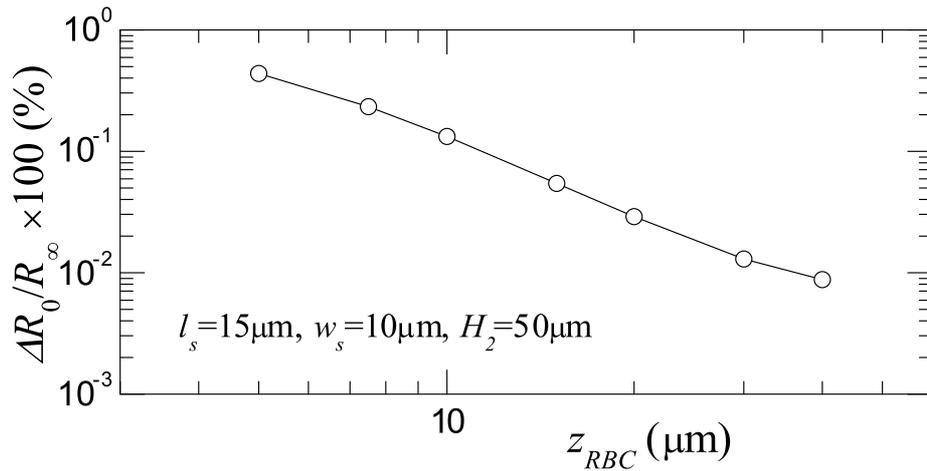


Figure 5.8: The effect of the height locations of the cell center on the sensor sensitivity.

センサ電極間距離 $w_s = 10\mu\text{m}$, 流路高さ $H_2 = 50\mu\text{m}$, ガード電極なしの状態を選んだ .

まず最初に , 赤血球通過高さ z_{RBC} が抵抗変化に及ぼす影響を検討した . これは , 均質な媒質中に存在する 2 つの異なる点電位があるとき , 空間の任意の点における電流密度ベクトルが , 各電位点を結ぶ距離の 2 乗に反比例する大きさを持つベクトル同士の和で表されることを想起すれば , 赤血球通過高さが抵抗値変化に及ぼす影響は非常に大きいはずであり , まず z_{RBC} の決定が最重要と考えたからである . 図 5.8 に z_{RBC} と $\Delta R_0/R_\infty$ の関係を示す . 同図では , z_{RBC} が減少するにつれて , $\Delta R_0/R_\infty$ は単調に増加しており , 確かに前述の予想に沿った依存性を示す . z_{RBC} が小さいほどセンサ感度は上昇するが , 赤血球の直径 d_{RBC} は $6.7\mu\text{m}$ であり , 物理的な限界がある . 従って , $z_{RBC} = 5\mu\text{m}$ を採用し , 以降の計算に用いた .

次に , 各センサ寸法パラメータがセンサ感度に与える影響を順に検討した (図 5.9(a) ~ (c) 参照) . 流路高さ H_2 の影響を示した図 5.9(a) では , H_2 の減少に伴って $\Delta R_0/R_\infty$ が単調に増大することが分かる . これは , 流路高さが小さくなるに従い , 電流密度の相対的に小さい部分の面積が減少し , 赤血球に排除される電流束以外の部分の電流束が減少する一方 , 赤血球により遮断される電流束の変化はほとんどないためであると考えられる . ところで , 流路高さが赤血球直径程度になると , 赤血球はパラシュート型に変形することが知られている . 楕円体変形を本研究では対象とするので , 以上の考察から , $H_2 = 15\mu\text{m}$ を採用した .

センサ電極間距離 w_s の影響を示す図 5.9(b) では , 数値解析を行った $10\mu\text{m} \leq w_s \leq 150\mu\text{m}$ の範囲で w_s の減少に伴って $\Delta R_0/R_\infty$ が単調に増大している . これは , センサ電極とグラ

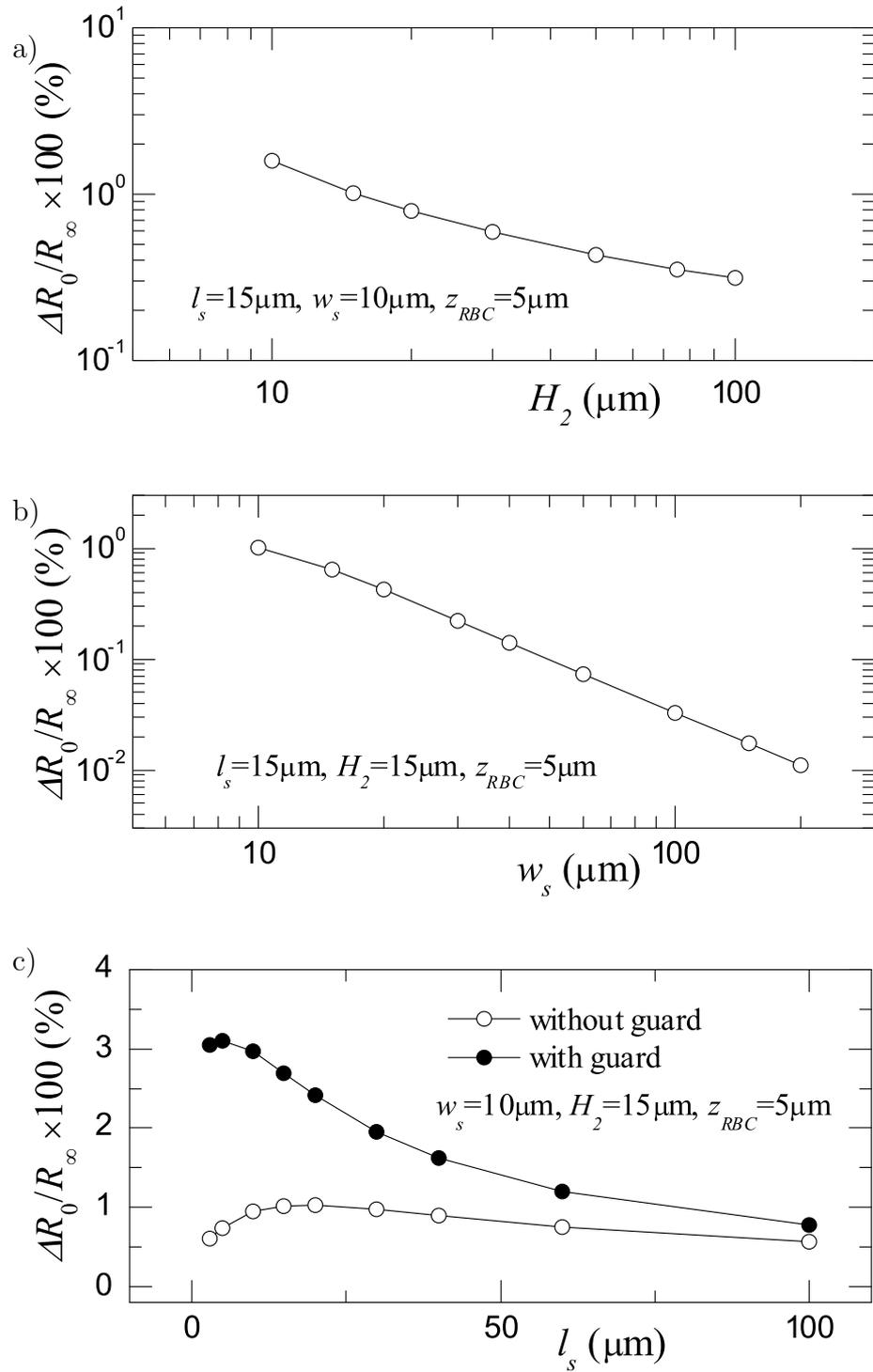


Figure 5.9: The effects of (a) the channel height, (b) the gap width between the electrodes, and (c) the width of the sensor electrode, on the sensor sensitivity.

Table 5.2: Optimized parameters (μm).

H_2	w_s	l_s	z_{RBC}
15	10	10	5

ウンド電極との距離が小さくなると、電極間における赤血球近傍の電流密度が増加するためと考えられる。従って、赤血球直径を踏まえ $w_s = 10\mu\text{m}$ を採用し、以下の計算に用いた。

最後に、センサ電極幅 l_s の影響を検討した結果を、さらにガード電極を設置した場合の結果と併せて、図 5.9(c) に示す。なお、この場合でも複素電流はセンサ電極上のみの電流値節点解の和を取ることで求まる。ガード電極がない場合、 $\Delta R_0/R_\infty$ は $l_s = 20\mu\text{m}$ 付近で極大値を示す。これは、次のように解釈される。すなわち、 l_s が赤血球直径よりも十分に大きい場合、高電流密度の領域は主流方向に相対的に広い範囲に亘って分布するため、赤血球により遮断される電流束の、それ以外の部分を貫く電流束に対する比率が小さい。この比率は l_s の低下と共に増加するため $\Delta R_0/R_\infty$ も増加する。一方、 l_s が赤血球直径に比べて極端に小さい場合を考えると、そもそも高密度電流束の存在する部分は電極近傍に限られ、かつ、フリンジ成分は変化しないため、赤血球により遮断される電流束の全体に占める割合は小さくなるので、 $\Delta R_0/R_\infty$ は小さくなる。以上のことから、 l_s に対して $\Delta R_0/R_\infty$ は極大値を有することになる。

これに対して、 $l_{\text{sg}} = 5\mu\text{m}$ を隔ててガード電極を付設した場合は、 x 正負方向に発生する等ポテンシャル場のためにフリンジ成分は小さく、センサ電極から発生する電流束の $x-z$ 面を貫く面積は l_s の低下と概ね同じ割合で小さくなる。すなわち、より小さい l_s で $\Delta R_0/R_\infty$ は極大となる。また、同時に、赤血球により排除される電流束はガード電極がないときとほとんど変わらず、それ以外の部分を貫く電流束のみガード電極を付設した場合には小さくなる。従って、図から分かるように、 $\Delta R_0/R_\infty$ の極大値はガード付設により3倍以上に増加している。そこでガード電極を併設し、 $l_s = 10\mu\text{m}$ とした。以上の最適化手順により決定したパラメータを表 5.2 に示す。前出の図 5.7 はこの寸法に対応した結果である。

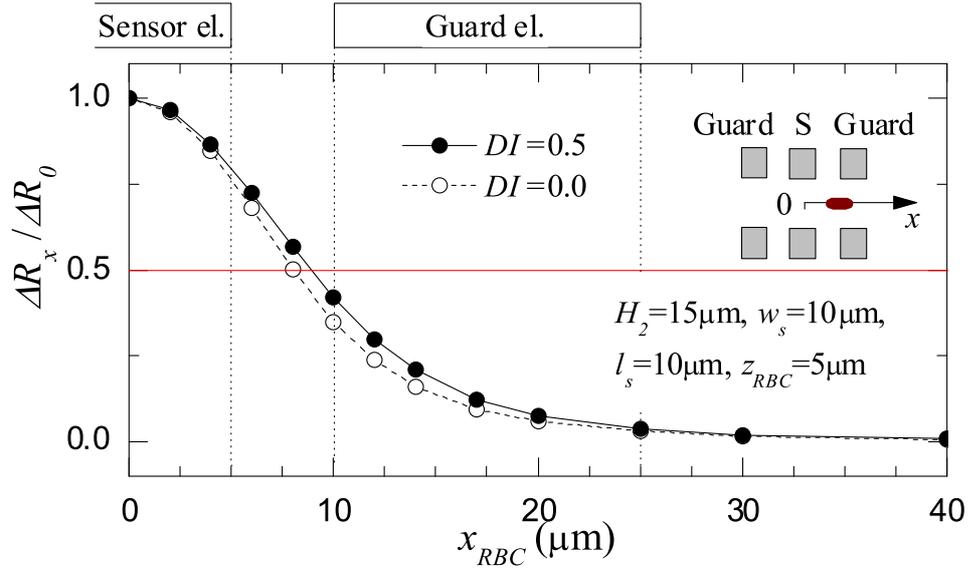


Figure 5.10: Normalized ΔR_x in relation with streamwise position of RBC (Simulation).

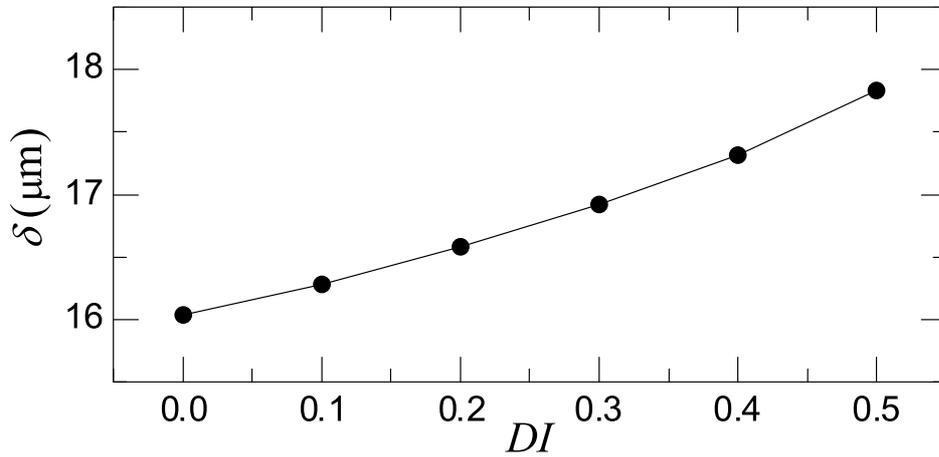


Figure 5.11: Relation between δ and DI .

5.3.3 赤血球通過に伴う抵抗値の時系列変化

本節では、 DI の異なる赤血球について、その主流方向位置 x_{RBC} を変化させて電場分布を計算することにより、赤血球が電極部を通過する場合の抵抗値の時系列変化を模擬的に検討する。計算には、前節において決定した寸法を用いた。なお、結果は $y-z$ 平面に関して対称となるため、 $x_{\text{RBC}} \geq 0$ についてのみ計算を行った。

$DI = 0$ および 0.5 における赤血球中心の主流方向位置 x_{RBC} と抵抗変化の関係を図 5.10 に示す。なお、この図では、半値幅の理解のため、 $\Delta R_x = R_x - R_\infty$ を全値 $\Delta R_0 (= R_0 - R_\infty)$ で規格化して縦軸に取った。どちらの DI においても、 $\Delta R_x / \Delta R_0$ は $x_{\text{RBC}} = 0$ で極大値を取り、 x_{RBC} が増加するにつれて減少する。また、 DI が増加すると $\Delta R_x / \Delta R_0$ は x 軸方

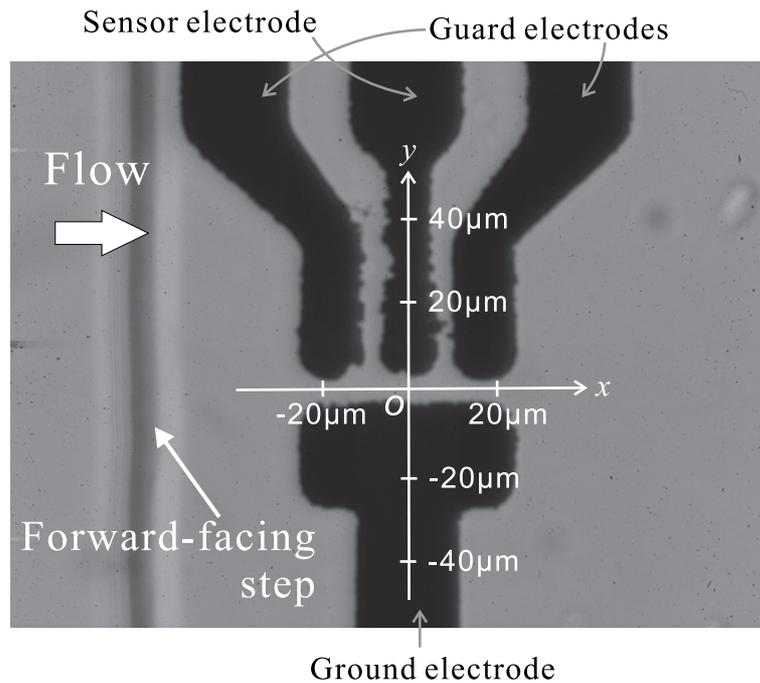


Figure 5.12: Snapshot of the sensor electrodes.

向への分布がより広くなることが分かる．これは， DI の増加により楕円体の x 方向長さ a が増加するためと考えられる．

そこで，分布特性を表す長さスケールとして， $\Delta R_x / \Delta R_0$ 分布の半値幅 δ を定義し，同様の計算を複数の DI に対して行い， δ との関係性を求めた．図 5.11 がその結果である． δ は $0 \leq DI \leq 0.5$ の範囲で DI に対して単調増加し，赤血球の変形能 DI に対して一意に定まる．したがって，赤血球の電極部通過時の $\Delta R_x / \Delta R_0$ を測定し， δ を用いて評価すれば，赤血球の変形能を測定することが可能であると考えられる．

5.4 実験による検証

5.4.1 流路と電極の作成

実験に際し，図 5.5 に示すマイクロ流路は，マスクおよびソフトエッチングによりパターンニングした SU-8 を鋳型にして作製した PDMS に，流路下壁としてあらかじめスパッタリングにより Pt 薄膜電極がパターンニングされたスライドガラスを永久接着することにより作製した．電極部の拡大像を， $x - y$ 座標と併せて図 5.12 に示す．電極端に細かい凹凸が見られるのは，後述する白金黒メッキ処理のためである．

次に，測定値に与える電気二重層の影響を調べるため，この流路に PBS を流した上で，

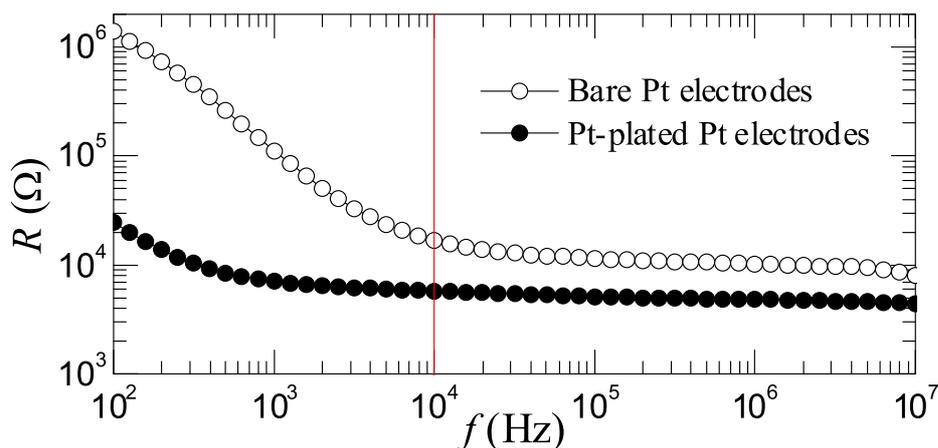


Figure 5.13: AC frequency effects on resistance.

Table 5.3: Experimental parameters (μm).

W	H_1	H_2	w_s	l_s	l_{sg}	l_g
1000	52	10	5.2	14.8	2.3	14.6

インピーダンスアナライザ (4294A, Agilent 社) を用いて, 抵抗・容量並列回路を仮定した時の電極間抵抗値 R の周波数特性を調べた (図 5.13 参照). 図中において, \circ 印は Pt 薄膜電極をそのまま用いた場合の測定値であり, \bullet 印は電極表面を白金黒メッキ処理した場合の測定値である. なお, 白金黒メッキは, マイクロ流路内にヘキサクロロ白金 (H_2PtCl_6) 30 mg/mL, 酢酸鉛 ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$) 0.3 mg/mL の混合液を流しながら, 2V 程度の電圧を電極間に印加することで行った. 本来ならば溶液抵抗は周波数に依存しないはずであるが, 図の結果は, 白金黒メッキの有無に関わらず周波数依存性を示している. これは, 図 5.2(b) における電気二重層容量 C_p のために, 低周波側では電極間抵抗の正確な測定が妨げられているためである. しかし, 白金黒メッキを施して多孔質状に電極表面積を増加させ, C_p を大きくした結果, 抵抗値が一定となる周波数はより低周波域にシフトしていることが図から分かる. そのため, 10 kHz の低周波数でも溶液抵抗値が正しく測定できている. すなわち, メッキ処理した電極を用いることにより, 既に 5.2.2 節で見込んだ 10 kHz での計測について, 電気二重層の影響排除という観点からも, 妥当性が確認された. なお, 図中ではメッキ処理した場合の方が周波数に依らず R が小さいが, これは, 電極表面を等方的にメッキ処理するため, 電極間隔が約 $1\mu\text{m}$ 狭くなったことに起因すると考えられる. 最終的に作成した流路及びメッキ処理した電極寸法を表 5.3 に示す.

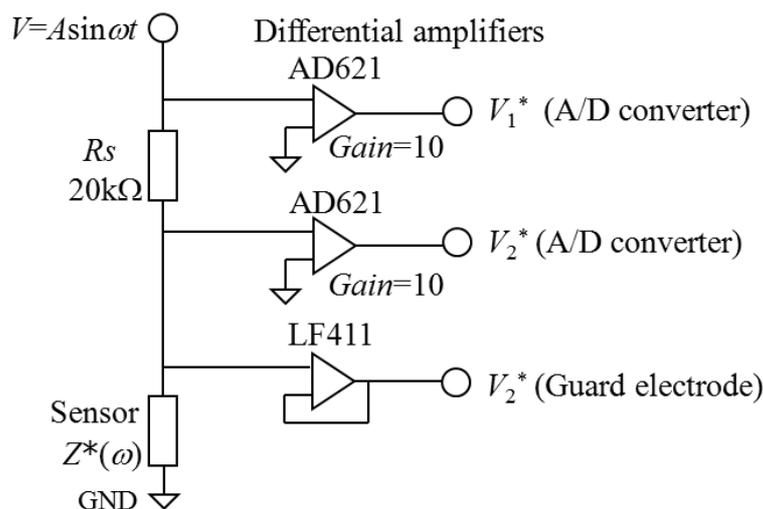


Figure 5.14: Schematic of the sensor circuit.

5.4.2 測定手法と実験条件

R の測定のために用いたインピーダンス計測回路を図5.14に示す．センサ電極には，電流検出用のシャント抵抗 $R_{\text{shunt}}=20\text{k}\Omega$ が直列に接続され，信号発生装置 (WF-1973，NF回路設計社) により，振幅1V，周波数10kHzの交流電圧が印加された．基準電位 V_1 及びセンサ電極電位 V_2 は，それぞれオペアンプ (AD621，Analog Devices社) によりインピーダンス変換された．さらに，それらはA/D変換ボード (PCIe-6251，National Instruments社) により600kHzのサンプリング周波数でデジタル信号化され，バッファメモリを介してコンピュータに記録された．また，ガード電極は，ボルテージフォロア構成としたFET入力オペアンプ (National LF411，Semiconductor社) を介してセンサ電極と接続されることにより，測定電流に影響を与えずにセンサ電極と常に同電位に保たれた．この測定回路におけるセンサ電極 グラウンド電極間の複素インピーダンス Z^* は，次式のように求まる．

$$Z^*(\omega) = R_s \frac{V_2^*}{V_1^* - V_2^*} \quad (5.6)$$

電極間抵抗 R は，コンピュータにより測定終了後 Z^* からオフラインにて求めた．一方，電極部を通過する際の各赤血球の変形量，主流方向速度及び通過位置を測定するため，上述の電氣的測定と同時に電極部透過画像の撮影を行った．画像撮影には，倍率100倍の長作動距離型対物レンズを搭載した倒立型光学顕微鏡 (IX-71，オリンパス社) と，高速度カメラ (Phantom V7.3，Vision Research社) を用いた．光学系の水平分解能は $0.21\mu\text{m}$ であり，焦点深度は $1.7\mu\text{m}$ である．焦点内で得られた赤血球画像から DI の算出を行った．

図5.5で示した流路において，中央流路からの赤血球懸濁流体及び両側流路からの流体は，

それぞれ個別にシリンジポンプを用いて流路へ供給される．流量はそれぞれ $0.02\mu\text{L}/\text{min}$, $1.0\mu\text{L}/\text{min}$ とした．ただし，両側流体の流量は赤血球の y 方向位置を制御するために， $\pm 0.2\mu\text{L}/\text{min}$ の幅で左右個別に調整した．

Korin ら [7] によれば，正常赤血球が $DI = 0.5$ 程度変形するために要するせん断応力は約 15 Pa である．作動流体が水の場合，電極部の流れを平行平板間流れと仮定し，流路寸法と上述の流量から通過高さにおける流れのせん断応力を見積もると，およそ 1 Pa である．この場合，十分なせん断応力が得られないため赤血球は変形せず，回転等不安定な動作を示しながら流れる．せん断応力を増加するには，流量の増大に伴う速度勾配の増加，もしくは流体粘性の増加が考えられる．しかし，赤血球速度を上昇させると，抵抗値測定及び高速度カメラ撮影の時系列サンプル数の不足を招くため，好ましくない．そこで，作動流体である PBS に分子量 $3.6 \times 10^5\text{ g/mol}$ の PVP (Polyvinylpyrrolidone, K-90, ナカライテスク社) を約 $10\text{ wt}\%$ 添加し流体の粘性を 100 倍程度増加させることで，赤血球の変形に十分なせん断応力を得た．

5.4.3 赤血球試料の作製

異なる変形能を有する 2 種類の赤血球懸濁液を得るために，同一健康人の全血を用いて，正常赤血球及び硬化赤血球 [11] を次に示す手順により作製した．まず，全血を PBS に懸濁し， $1000g$ にて 5 分間の遠心沈降後，血漿や血小板，白血球を含む上澄みを取り除いたものを，再度 PBS に懸濁した．この操作を 2 回行った上で，この溶液に終濃度 $8\text{ wt}\%$ となるよう PVP を加え，これを正常赤血球懸濁液とした．次に，グルタルアルデヒド $0.025\text{ wt}\%$ が溶解した PBS を，先ほどの沈降物に加えて室温で 30 分間懸濁させることにより赤血球を弱く硬化させた． $1000g$ での 5 分間の遠心沈降と，上澄みの除去，PBS への再懸濁を 2 回行い，PVP の終濃度が $8\text{ wt}\%$ としたものを，硬化赤血球懸濁液とした．

5.4.4 流動中の赤血球変形の観察

電極部を通過中の正常赤血球の一連の画像を図 5.15(a) ~ (d) に示す．図中では，正常赤血球の輪郭は，背景と同化して不鮮明となるため，その輪郭を白線で示した．流れは，図中左から右へ向い，太い縦の直線は前向きステップである．各図の撮影時刻 t は，電極部中心を通過した時刻を $t = 0\text{ s}$ として表示した．

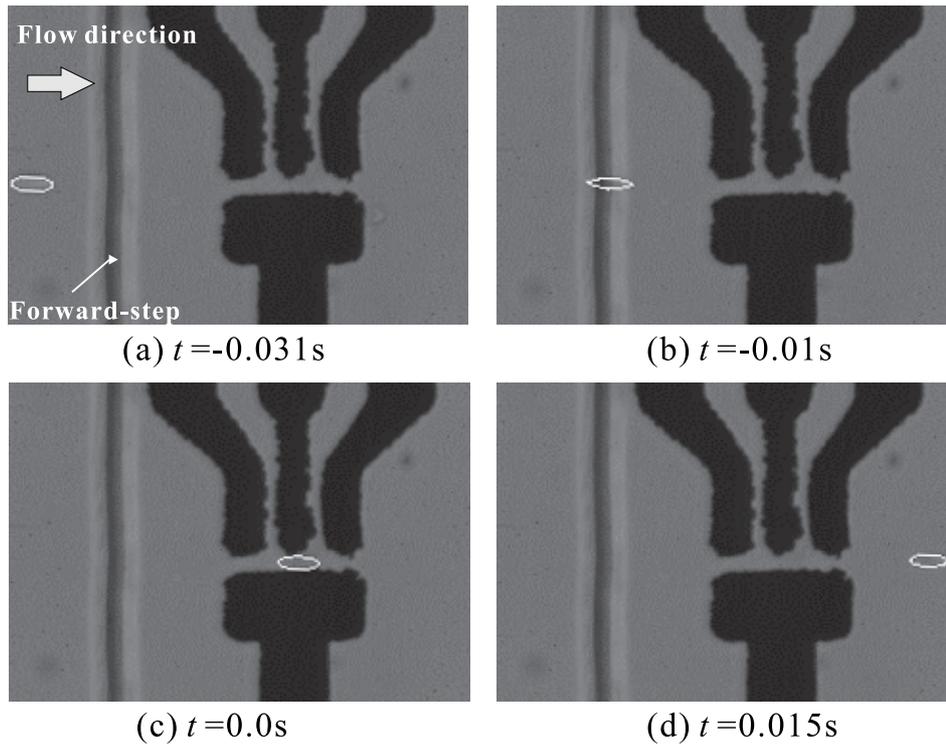


Figure 5.15: Snapshots of a normal RBC passing between the electrodes.

図から、赤血球は主流方向に引き伸ばされた形を保持しながら流れており、また、図 5.15(b) に示すステップ通過時にその変形量が最大となり、その後変形量を徐々に減少させつつ、下流へ流れる様子が見て取れる。このような変形は、前向きステップにおける吹き下ろし流により赤血球は下壁へと押しつけられ、縮流による流速上昇と相まってせん断応力の増加で伸長すること、また逆にステップ下流では、Fåhræus 効果に関連して赤血球は壁面から離れ、せん断応力の低下で収縮すること、に因ると考えられる。一方、硬化赤血球では、このような変形過程はほとんど見られなかった。なお、赤血球はスパン方向に変動せずに、電極間中心を通過していることから、両側の流れによる赤血球のスパン方向通過位置制御が良好に機能していることが確認できる。

数値解析での赤血球モデルと実験で用いた赤血球との形状を比較するために、撮影画像から $x_{\text{RBC}} = 0$ における各赤血球の a (x 軸方向長さ)、 b (y 軸方向長さ) を求めた。表 5.4 に、正常赤血球と硬化赤血球それぞれの場合の a 、 b 、及び DI の平均値を、数値計算モデルと比較して示す。実験結果からは、正常赤血球では a は b の 3 倍程度である一方、硬化赤血球では a と b の値はほぼ等しく、 $x - y$ 断面内ではほとんど変形していないことが分かる。これに対し、同程度の DI を持つ数値計算モデルの a と b は、何れも実験値と比較して小さい。これは、数値計算モデルでは赤血球を表面積一定の回転楕円体と見なし

Table 5.4: Averaged sizes of RBCs .

	Experiment		Numerical analysis	
	Normal	Rigidized	$DI = 0.5$	$DI = 0$
a [μm]	14.5	7.4	12.8	6.7
b [μm]	4.7	7.4	4.3	6.7
DI	0.52	0.00	0.50	0.00

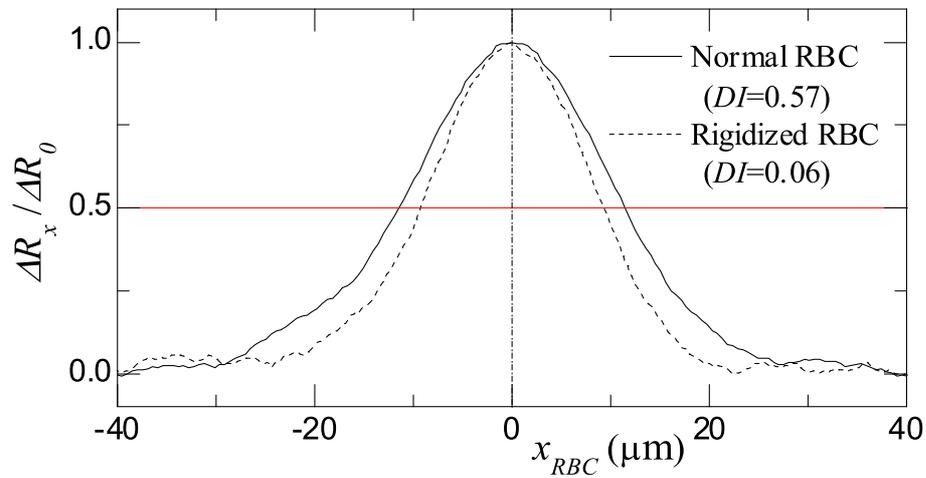


Figure 5.16: Normalized ΔR_x in relation with streamwise position of RBC (Experiment).

たが、実際に流路を流れる赤血球は回転楕円体ではなく、 z 方向 (高さ方向) の厚みが b よりもやや小さい扁平型形状を示しているためと推察される。

5.4.5 変形能計測手法の検証と考察

本節では、赤血球が電極部を通過する際の抵抗変化と、そこから得られる変形能評価指標としての半値幅 δ を各赤血球に対して算出した結果について考察する。そのためにまず、実験により得られた $R(t)$ に対し、平滑化操作を行った上で、各赤血球通過事象に対応する $R(t)$ の部分集合を抜き出すとともに、各赤血球の電極間通過時の主流方向速度 u_{RBC} を画像処理により算出して、時刻 t を x_{RBC} へ変数変換し、 R_x を求めた。さらに R_x の極大値 R_0 を得た位置から前後に十分離れた位置における R_∞ を求め、 $\Delta R_x / \Delta R_0$ と δ を決定した。図 5.16 に、正常赤血球と硬化赤血球の通過時の抵抗変化の代表例をそれぞれ

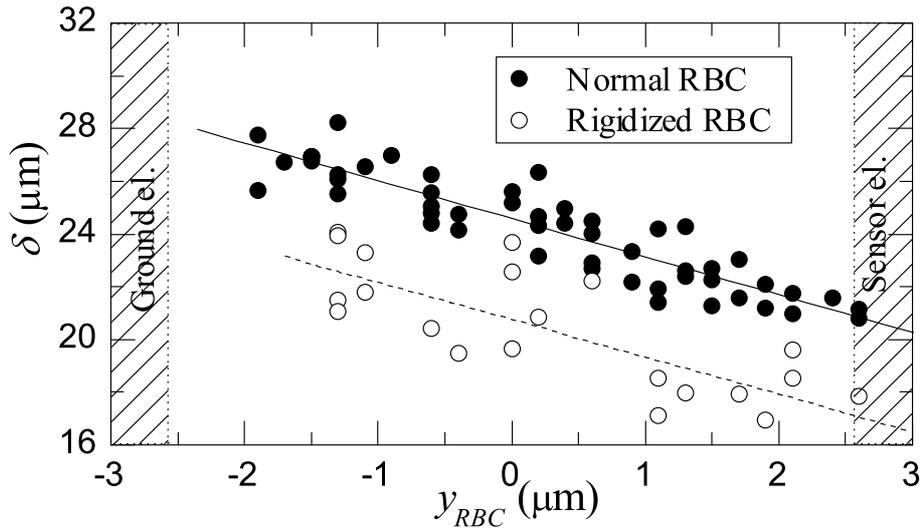


Figure 5.17: Distribution of δ against spanwise location.

れ示す．図では，正常赤血球と硬化赤血球との違いが見られ，変形の相対的に大きい正常赤血球で分布が広がり，半値幅が大きくなることが分かる．また，このことは数値計算による予測（図 5.10 参照）と定性的によく一致している．

次に，こうして得た δ と，赤血球の撮影画像から求めた DI との関係を考察する．ここで，まず，スパン方向の赤血球通過位置 y_{RBC} と δ の関係を調べた．なぜなら，本測定手法では，前述のとおり，赤血球のスパン方向通過位置を微調整するものの，上流部入口流路の幅は製造制約上 $50\mu\text{m}$ と電極間隔 w_s に比して広く，各赤血球の電極部到達時のスパン方向通過位置 y_{RBC} には数 μm の分散は避けられないからである．その結果を図 5.17 に示す．図中の \bullet 印は正常赤血球， \circ 印は硬化赤血球を示し，また，実線及び破線は，それぞれの結果に最小 2 乗法を適用した近似直線である．この 2 つの近似直線は，ほぼ同じ傾きを持つことが分かる．これは，実験に用いた電極対が $x-z$ 面に関して相似形でなく（図 5.12 参照），ガード電極はあるものの，センサ電極からグラウンド電極に向かって y 方向に電場が広がりを持つことを示していると考えられる．

そこで，この広がりを補正（正常及び硬化赤血球に対し，図 5.17 に示す近似直線をそれぞれ用いて，各赤血球の δ を赤血球のスパン方向位置に応じて電極間中心 $y = 0$ での値に換算する．）して図 5.11 の数値計算結果と比較した．画像処理により求めた各赤血球の DI と，補正後の半値幅 δ の関係を，図 5.18 に示す． $DI = 0.5$ 及び $DI = 0$ 付近における赤血球の半値幅は互いに異なり，画像解析による赤血球変形状を反映した DI と，電氣的測定によって得られた δ との間に相関が見られる．また， DI 値の大きい正常赤血球の場合， δ も大きくなっており，数値計算の結果と定性的に一致することが分かる．定量的

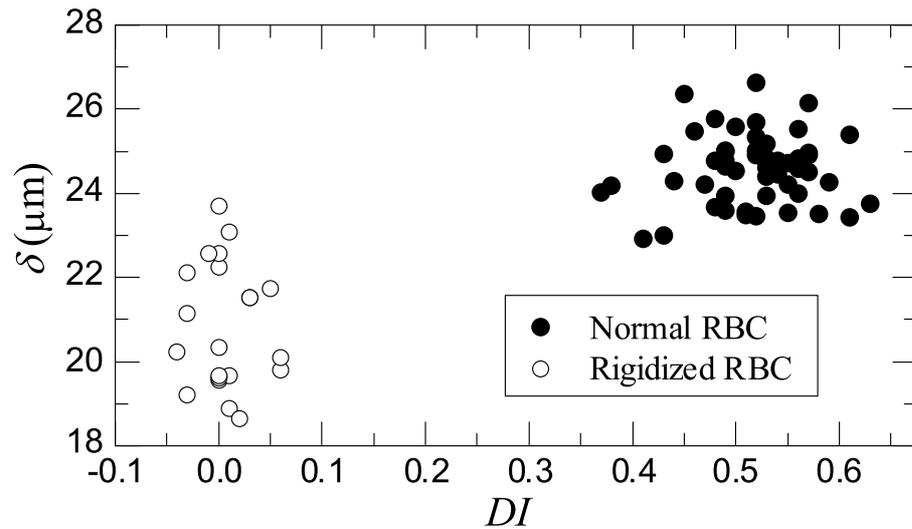


Figure 5.18: Relation between δ and DI .

には，正常赤血球の場合，実験で得られた δ の平均値は数値計算の値に比べて $6.3\mu\text{m}$ 程度大きくなっているが，この差は，センサ電極幅 l_s が数値計算での条件に対して $4.8\mu\text{m}$ 広いことや，実際の赤血球形状にはモデルとの乖離が存在することに起因すると考えられる．一方，正常赤血球と硬化赤血球間の δ の差は $2\mu\text{m}$ 程度であり，数値解析の結果とよく一致する．以上の考察により，本研究で提案したセンサの有用性が示された．なお，赤血球の力学特性を考慮した流体解析と電場解析をカップリングさせることにより， δ はさらに定量的に評価できると考えられる．

5.5 結論

マイクロ流路内高せん断流れ中にある赤血球が流路底面に付設されたセンサ部を通過する際の抵抗値変化を測定し，その結果を解析することによる，個別赤血球の変形能の簡便な計測手法を提案した．また，数値計算及び実験によりその有用性を検証した．以下に得られた主な知見を示す．

まず，細胞を含むセンサ内部の3次元調和電場解析を行い，電極間抵抗値を求めた．その上で，赤血球の中心がセンサ電極の主流方向中心に位置する場合について，赤血球中心と下壁面間距離，電極間距離，流路高さ，センサ電極幅，そしてガード電極の有無，それぞれの影響を数値的に検討し，測定感度向上の指針を得た．

次に，赤血球の主流方向位置を変化させて計算を行い，赤血球の通過に伴う抵抗変化についての結果を得た．さらに，その半値幅は変形指数 DI に対して単調増加し，変形能を

表す指標として有用であることを示した．最後に，上記の知見に基づいて電極付設マイクロ流路を作製し，正常赤血球とグルタルアルデヒド処理による硬化赤血球について，画像撮影と同時に抵抗測定を行った．また，抵抗変化から算出した半値幅 δ を比較すると，正常赤血球と硬化赤血球との間には有意な差が認められ，さらに，画像処理により求めた DI と δ との対応関係は，数値解析によって得られたものと定性的に一致した．以上のことから，提案したセンサの赤血球変形能計測についての有用性が示された．

参考文献

- [1] Hardeman M. R. and Goedhart P. T., Interrelationship of changes in hemorheological parameters induced by low osmolar radiocontrast media, *Clinical Hemorheology*, Vol.12(1992), pp.381-392.
- [2] Suresh, S., Spatz, J., Mills, J. P., Micoulet, A., Dao, M., Lim, C. T., Beil M. and Seufferlein T., Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria, *Acta Biomaterialia*, Vol.1(2005), pp.15-30.
- [3] Chien, S., Biophysical behavior of red cells in suspension, *In the Red Blood Cell (Ed.: Surgenor, D. M.)*, Vol.2(1975), pp.1031-1133, Academic Press, New York.
- [4] Shiga, T., Maeda, N. and Kon, K., Erythrocyte rheology, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol.10(1990), pp.9-48.
- [5] Schmid-Schonbein, H., Wells, R. and Schildkraut, R., Microscopy and viscometry of blood flowing under uniform shear rate (rheoscopy), *Journal of Applied Physiology*, Vol.26(1969), pp.674-678.
- [6] Hochmuth, R. M. and Waugh, R. E., Erythrocyte membrane elasticity and viscosity, *Annual Review of Physiology*, Vol.49(1987), pp.209-219.
- [7] Korin, N., Bransky, A. and Dinnar U., Theoretical model and experimental study of red blood cell (RBC) deformation in microchannels, *Journal of Biomechanics*, Vol.40(2007), pp.2088-2095.
- [8] Morgan, H. and Green, N. G., *AC Electrokinetics: colloids and nanoparticles*, (2003), p.100, Research Studies Press.
- [9] Goldsmith, H. L., Cokelet, G. R. and Gaehtgens, P., Robin Fåhræus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology, *The American journal of physiology, Heart and Circulatory Physiology*, Vol.257, No.3(1989), pp.1005-1015.
- [10] Fung, Y. C. and Tong, P., Theory of spherizing of red blood cells, *Biophysical Journal*, Vol.8, No.2(1968), pp.175-198.

- [11] Simchon, S., Jan, K. M. and Chien, S., Influence of reduced red cell deformability on regional blood flow, *The American journal of physiology*, Vol.253, No.4(1987), pp.898-903.

第6章 結論

6.1 研究の総括

本研究論文を結ぶにあたり，各章の結論および全体の総括を述べる．

第1章では，DNA や細胞を扱うマイクロ分析の既存手法の一部を代替すべく，マイクロ分析，あるいはLOC と親和性が高いと考えられる電気的手法の一つである誘電分光法を用いることを提案した．続いて，DNA や細胞のマイクロ分析への誘電分光法の適用に関して，過去の知見の概観と問題点の提起を行った．

第2章では，まず一般論として誘電体の分極や複素比誘電率，誘電緩和現象に関して概説した後に，誘電緩和の計測法および得られたデータの解析法を，測定対象ごとに詳述した．

第3章では，誘電分光法を DNA 量や鎖長の計測へ応用することを目的として，その基礎であり，かつ未解明である，溶媒中での短い ss-DNA の対イオン構造とその分極機構について検討した．まず，塩を添加しない状態において，高周波誘電緩和は，その特徴として凝集対イオンの分極理論に従わないこと，および，希薄高分子電解質の濃度および鎖長に対する依存性と類似していること，を示した．また，この依存性は臨界塩濃度以下の領域では，塩の存在の有無に依らず成立することを示した．次に，このような誘電緩和の特徴は，対イオンが揺動しうる周期的な静電ポテンシャルの井戸の長さスケールに高分子電解質濃度で規定される相関長を選んだ場合のセルモデルによって，よく説明されることを示した．その結果として，ss-DNA 溶液の高周波緩和は，弱く束縛された対イオンの分極によるものであることが結論づけられた．さらに，緩和強度と緩和時間はともに，臨界塩濃度以下の塩濃度領域では塩濃度に無関係であり，一方で，臨界塩濃度以上の塩濃度領域では塩濃度に反比例して低下することが分かった．このような臨界塩濃度は，相関長に代わる対イオン揺動の長さスケールとして塩濃度依存性を持つ散漫相の直径を取る拡張セルモデルによって見積もることができ，また，実験的に得られた臨界塩濃度ともよく一致

することを示した．これらの知見を基にして，DNA 量と鎖長を検出するための具体的な測定系の構成・測定方法を提案した．

第4章では，誘電分光法による細胞電気物性の非破壊計測において未解決である，解析式の存在しない形状の細胞について具体的に電気物性を算出する方法を提案し，その妥当性を検証した．まず pH を変えることにより，形状の異なる赤血球を調製して，赤血球懸濁液の誘電分散を測定した．その結果，誘電分散は形状によって異なるスペクトル波形を示した．これらのスペクトルは Cole-Cole 式にフィッティングさせて得られる誘電パラメータにより特徴づけられることが分かった．次に，誘電分散についての解析式が存在しない形状を持つ赤血球について，有限差分法を適用して細胞膜キャパシタンス及び細胞質導電率を簡便に計測できる手法を提案した．この手法により算出した電気物性をもとに，有限差分法により赤血球の誘電分散スペクトルを再度算出したところ，元のサンプルの誘電分散を非常によく再現し，算出結果の妥当性が示された．

第5章では，単一赤血球の変形能を簡便に調べる手法の理論的検討と実験による検証を行った．始めに，マイクロ流路内高せん断流れ中において，赤血球が流路底面に付設されたセンサ部を通過する際の抵抗値変化を測定し，その結果を解析して変形能を見積もる手法を提案した．次に，細胞を含むセンサ内部の3次元調和電場解析を行い，電極間抵抗値を求めた．その上で，赤血球の中心がセンサ電極間の中央断面内に位置する場合について，赤血球中心と下壁面間距離，電極間距離，流路高さ，センサ電極幅，および，ガード電極の有無，それぞれについての電極間抵抗値に及ぼす影響を数値的に検討し，測定感度向上の指針を得た．さらに，赤血球の主流方向位置を変化させて計算を行い，赤血球の通過に伴う電極間抵抗値変化を調べた．その結果，得られた抵抗値の半値幅 δ が変形指数 DI に対して単調増加し，変形能を表す指標として有用であることを示した．これらの知見に基づいてセンサ電極付設マイクロ流路を作製し，正常赤血球とグルタールアルデヒド処理した硬化赤血球について，画像撮影と同時に抵抗値測定を行った．また，抵抗値変化から算出される δ を比較すると，正常赤血球と硬化赤血球との間には有意な差が認められ，さらに，画像処理により求めた DI と δ との対応関係は，数値解析によって得られたものと定性的に一致した．以上のことから，ここで提案したセンサの有用性が示された．

以上，各章における考察および得られた結論から，冒頭に掲げた DNA や細胞のマイクロ分析法として，誘電分光法そのもの，あるいは，適切な流体力の作用する場を設け得るマイクロ流路との組み合わせによる誘電分光法は有用な手法であり，これを利用したマイクロ計測システムの医学・生物学や臨床検査への応用，実用化は有望であると結論づけら

れる．今後さらなる研究の進展が望まれる．

6.2 今後の研究展望

本研究論文では，LOC と親和性の高い物理的計測手法として，誘電分光法に着目し，それを DNA の定量や赤血球の物性解析に応用するべく，基礎的側面の解明に重きを置いた．今後は，このような基礎的な研究の進展とともに，そこで得られた知見を基にした LOC への応用展開が望まれる．

応用については，対向電極を設けたマイクロ流路中で試料 DNA をゲル電気泳動させてその通過時間や緩和強度，緩和時間を求め，DNA 量や鎖長を計測することが可能と考えられ，これを前段の DNA 抽出等と組み合わせた LOC の研究等が期待される．

細胞の誘電分光についても応用研究が今後重視されよう．本研究論文の第 4 章で提案した電気物性の算出法は赤血球に限らず様々な形状の細胞にも適用できる可能性があり，流路中における浮遊細胞の連続的な物性解析や，マイクロアレイの手法と複合化して多種の薬剤に対する経時的な細胞応答の解析などへの応用が考えられる．ここで検討した誘電分光法をより高度化して LOC 上で実現し，多数の単一血球あるいは単一細胞の誘電分散が得られるようになれば，その医学・臨床検査への応用も含め幅広い応用展開ができるものと推察され，さらなる応用研究の進展が望まれる．

個々の細胞の変形能測定法はこれまでに実用に供されたものが皆無であるため，変形能と疾病等の関連については全くと言っていいほど医学的知見の蓄積が無い状態である．本研究論文の第 5 章で提案したマイクロ流路内流れを利用する手法で，個々の細胞の変形能が簡便に測定できるようになれば，変形能と疾病に関する基礎医学の発展が期待できる．また，変形能と疾病に関する知見の広がりや相俟って，細胞形状や変形能の測定に基づいた疾病の迅速診断用 LOC の具体的な研究発展も期待できる．

記号表

a	赤血球の x 軸方向長さ
b	赤血球の y 軸方向長さ
C	静電容量, キャパシタンス [F]
C^*	複素キャパシタンス [F]
C_{cm}	単位面積当たりの膜キャパシタンス [F]
C_{ep}	電気二重層キャパシタンス [F]
C_p	並列キャパシタンス [F]
C_1	測定用誘電セルの静電容量 [F]
C_r	測定用誘電セルの浮遊容量 [F]
c	イオン雰囲気境界を規定するための比例定数
c_1, c_2, c_3, c_4	回帰式中の係数
c_{cp}	細胞質の電解質濃度 [mol/L]
c_w	溶質質量濃度 [g/L]
c_s	塩濃度 [mol/L]
$c_{s,cr}$	臨界塩濃度 [mol/L]
D	電気変位 [C/m ²]
DI	変形指数
\mathcal{D}	対イオンの拡散定数 [m ² /s]
E	電場 [V/m]
e	電気素量 [C]
f	周波数 [1/s]
G	コンダクタンス [S]
g	重力加速度 [m/s ²]
H_1	流路高さ [m]
H_2	流路高さ [m]

H_{Glass}	ガラスの厚み [m]
H_{PDMS}	PDMSの厚み [m]
I	イオン強度 [C/s]
I_{cr}	臨界イオン強度 [C/s]
i	電流 [C/s]
i_{G}	伝導電流 [C/s]
i_{C}	変位電流 [C/s]
j	虚数単位, $j^2 = -1$
k_{B}	ボルツマン定数
L	高分子の長さ [m]
L_{CD}	計算領域の幅 [m]
l_{b}	DNA鎖中の隣り合うリン酸基間の平均距離 [m]
l_{per}	高分子電解質の持続長 [m]
l_{g}	ガード電極の幅 [m]
l_{s}	センサ電極の幅 [m]
l_{sg}	センサ電極とガード電極の間の距離 [m]
M_{w}	高分子電解質の分子量
m	単量体の分子量
m_{fit}	フィッティングパラメータの数
N	重合度
N_{A}	アボガドロ定数
n_{p}	数密度 [1/m ³]
n_{c}	対イオンの個数 [1/m ³]
P	分極 [C/m ²]
Q	電荷 [C]
R	電極間の電気抵抗 [Ω]
R_{p}	電極間の並列電気抵抗 [Ω]
R_0	主流方向赤血球中心位置が $x = 0$ にあるときの測定抵抗値 [Ω]
R_x	主流方向赤血球中心位置が x_{RBC} にあるときの測定抵抗値 [Ω]
R_{∞}	赤血球が電極部から十分離れた位置にあるときの測定抵抗値 [Ω]
ΔR_0	$= R_0 - R_{\infty}$

ΔR_x	$= R_x - R_\infty$
r	赤血球の長さスケール [m]
S	電極面積 [m ²]
S_1	格子展開時の細胞表面積 [m ²]
S_2	理論的細胞表面積 [m ²]
T	絶対温度 [K]
t	時間 [s]
V	静電ポテンシャル, 電位 [V]
V_{add}	印加電圧 [V]
V_c	細胞体積 [m ³]
W	流路幅 [m]
W_{CD}	計算領域の幅 [m]
x	流れ方向座標
x_{RBC}	流れ方向赤血球位置
y	スパン方向座標
y_{RBC}	スパン方向赤血球位置
z	高さ方向座標
z_{RBC}	高さ方向赤血球位置

ギリシャ文字

α	分極率
$\Delta\alpha$	分極率強度 (低周波極限值から高周波極限值を引いたもの)
β	Cole-Cole パラメータ
β_{LF}	低周波緩和の Cole-Cole パラメータ
γ	細胞全体に占める細胞質の体積割合
χ	電気感受率
δ	半値幅, 変形度を示す長さスケール [m]
ε	比誘電率
ε^*	複素比誘電率
$\varepsilon_{\text{RBC}}^*$	球形赤血球の複素比誘電率
ε'	複素比誘電率の実部, 誘電分散

ε''	複素比誘電率の虚部，誘電吸収
ε_0	真空の誘電率 [F/m]
ε_{cp}	細胞質の比誘電率
ε_{cm}	細胞膜の比誘電率
ε_h	高周波極限における比誘電率
ε_l	低周波極限における比誘電率
ε_{RBC}	球形赤血球の比誘電率
ε_{sus}	細胞懸濁液の比誘電率
$\Delta\varepsilon$	緩和強度
$\Delta\varepsilon_{LF}$	低周波側緩和の緩和強度
μ_{cp}	細胞質粘度 [Pa s]
ν	細胞全体に占める細胞質の体積割合
σ	単位面積当たり全電荷 [C/m ²]
σ_0	単位面積当たり真電荷 [C/m ²]
σ_P	単位面積当たり分極電荷 [C/m ²]
τ	緩和時間 [s]
τ_{LF}	低周波緩和の緩和時間 [s]
κ	導電率 [S/m]
κ_a	溶媒の導電率 [S/m]
κ_l	低周波極限の導電率 [S/m]
κ_{cp}	細胞質の導電率 [S/m]
κ_{cm}	細胞膜の導電率 [S/m]
κ_{RBC}	球状赤血球の導電率 [S/m]
κ_{sus}	細胞懸濁液の導電率 [S/m]
λ^{-1}	Debye の遮蔽長 [m]
ω	角周波数 [rad/s]
θ	位相差 [rad]
ξ	対イオンの揺動の長さスケール [m]
Φ	静電ポテンシャル [V]
ϕ	体積分率

下付文字

a	溶媒
cp	細胞質
cm	細胞膜
cr	臨界値
dp	散漫相
ep	電極分極
exp	実験値
pg	リン酸基
RBC	赤血球

上付文字

*	複素量
---	-----

謝辞

指導教官である京都大学工学研究科中部主敬教授には、私の博士課程入学の希望を快くお引き受け頂き、また本研究論文をまとめるにあたり丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。ここに深く感謝御礼を申し上げます。巽和也助教には、マイクロ流路作成などの苦勞の多い実験に関する御助力と、論文作成における丁寧な御指導を頂きました。厚く御礼申し上げます。また、実験に際して多大なる努力を払って頂きました土井立樹氏、西谷幸祐氏、藤原良治氏、その他研究室の皆様には感謝致します。

本論文を完成するにあたり、京都大学工学研究科小寺秀俊教授ならびに田畑修教授には、多くのご助言を賜りました。深く感謝の意を表します。

京都大学化学研究所浅見耕司准教授には、本論文の主題であり、かつ私の研究の1つの柱となっている誘電分光法を紹介頂き、また、先生が長年培ってこられた実験法や解析法について丁寧に御教授頂きました。また論文指導も賜りました。心より厚く御礼申し上げます。

ソニー株式会社先端マテリアル研究所の安田章夫博士、岸井典之博士、大森真二博士、林義人博士、山本大介氏、大重郁也氏には、本研究を行うにあたって様々な御支援、御協力を頂きました。心より感謝申し上げます。その他、研究チームの皆様には日頃より様々な点で相談に乗って頂きました。厚く御礼申し上げます。

最後に、幼少より学問を志す私を常に暖かく励ましてくれた両親と祖父母に、そして社会人となった後も大学に通い研究を行うことを応援してくれた妻子に、感謝致します。