

令和元年6月14日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06019

研究課題名(和文) 単一細胞温度計測でみられる異常発熱の物理学的解明

研究課題名(英文) Physical studies for abnormal temperature increase detected by single-cell thermometry

研究代表者

大山 廣太郎(OYAMA, Kotaro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 先端機能材料研究部・主任研究員(任常)

研究者番号：70632131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 24,350,000円

研究成果の概要(和文)：近年の細胞温度の計測技術の発展により、単一細胞の発熱に伴う1 オーダーの温度上昇が明らかにされつつある。しかしながら、この温度上昇は熱量測定の知見から計算される温度上昇より数桁も高いことが、世界的な論争となっている。この問題を解決するべく、本研究では細胞内外の局所温度を顕微イメージング・光操作する手法を駆使することで、細胞の発熱と温度上昇をつなぐ物理学的研究基盤となる顕微システムを構築、細胞内の熱伝導や熱物性、温度勾配に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は多種多様なタンパク質や構造物が高密度に存在する細胞内環境において、「熱はどのように伝わるのか」、「どのくらいの温度勾配が形成されるのか」、を検証するための顕微解析システムを開発し、細胞内熱伝導の非線形性や熱伝導率の不均一性、細胞発熱時の局所温度勾配を評価したものであり、単一細胞レベルで起こる発熱と温度上昇をつなぐ物理学的研究基盤を構築したことに学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In recent years, advanced single-cell thermometry has detected temperature increase higher than 1 degree Celsius in living cells. However, the temperature increase is much larger than that calculated from heat production of single cells. To bridge the gap between the measurement and calculation, we developed microscopic systems combining optical thermometry and microheating, and obtained experimental data related to heat transfer, thermal properties, and temperature gradient in a single cell.

研究分野：生物物理

キーワード：細胞温度計測 熱伝導 熱物性 顕微解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ヒトは食事によってエネルギー源を取り入れ、体温を維持するために熱へ変換している。このエネルギー変換は単一細胞レベルでも同様であり、細胞内のさまざまな化学反応に伴う発熱吸熱反応は細胞内部の局所的な温度を変化させる。一方、化学反応速度が温度によって変化するように、細胞内の酵素反応も温度に依存する。そのため、細胞内の化学反応による局所的な温度変化が、その反応自身や他の反応を促進・制御している可能性が高い。研究代表者らは、この“Thermo-Chemical Signaling”という新しい視点に基づき、「細胞が局所的な熱をいかに生み出し、有効利用しているか」を顕微鏡実験から解明することを目指している。

近年の細胞温度計測技術の向上により、単一細胞内では1°Cオーダーの温度分布が形成されており、その温度は細胞の活動に伴って同程度上昇することが明らかとなってきた。しかしながら、単一細胞の発熱量を考えると、1°Cオーダーの温度上昇は理論値より数桁高い「異常な発熱」であることが、世界的な論争となっている[Baffou et al., *Nat Methods* 11(9):899–901, (2014)]。従来のカロリーメーターで測定される単一細胞の発熱量は、大きい場合で数十 pW～数 nW 程度であるが、単一細胞と同体積の水が周囲より 1°C 温かい状態を維持するために必要な熱量は、 μW オーダーの熱量が必要であると計算される。この桁違いなギャップ問題（ 10^5 ギャップ問題）は、計測結果の信頼低下を招くものであり、早急な解決が求められる。

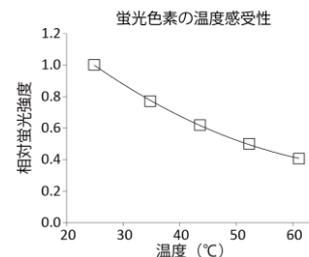
2. 研究の目的

本研究は細胞の発熱と温度上昇をつなぐ物理学的研究基盤の構築を目指すものである。具体的には、 10^5 ギャップ問題の解決策として研究代表者らが提案[Suzuki et al., *Nat Methods* 12(9):802–3 (2015)]してきた①細胞内熱伝導・熱物性の特異性と②温度上昇の局所性を実験検証することを目的とした各研究テーマを遂行した。また、細胞の生理的な電気的興奮に伴う細胞温度変化やイオン流入に伴う細胞膜局所の温度変化など、新しい発熱機構の発見も目指した。

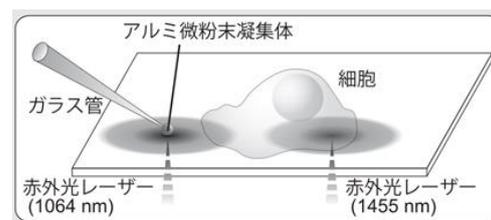
3. 研究の方法

本研究では、細胞スケールの局所温度を顕微イメージングする蛍光温度測定法を用いた。また、赤外光レーザーによる局所光加熱法と組み合わせることによって、細胞内熱伝導・熱物性解析を行った。それぞれの具体的な手法は以下の通りである。

(1) 蛍光温度測定法：温度が高くなると蛍光色素の明るさが暗くなる（蛍光強度が下がる）性質を持つ蛍光色素を用い、蛍光顕微鏡観察から細胞内外局所の温度変化をイメージングする手法。本研究では蛍光デキストラン [Oyama et al., *Biophys J* 109(2):355–64 (2015)] や蛍光温度計シート [Itoh et al., *BIOPHYSICS* 10:109–19 (2014)] を用いた温度計測法を、本研究テーマに合わせ改良した。



(2) 局所熱パルス法：赤外光レーザーを金属微粒子 [Suzuki et al., *J Neurosci Methods* 139(1):69–77 (2004)] や水・細胞に集光 [Oyama et al., *Lab Chip* 12(24):5155–9 (2012)] することで、細胞内外に局所的な温度勾配を形成する手法。レーザー光照射はメカニカルシャッターで制御することで、パルス状の温度上昇を細胞に与えることができる。



4. 研究成果

(1) 細胞内熱伝導解析

10^5 ギャップ問題を議論する上で、細胞内熱伝導は線形方程式で記述されてきた。しかしながら、多種多様なタンパク質・構造物が高密度に存在する細胞内環境は、希薄な溶液とは異なる熱伝導を示す可能性が高い。多孔質溶媒における拡散方程式 (Porous medium 方程式) に基づく非線形な熱伝導過程は、線形過程にくらべ局所的に大きな温度上昇を引き起こすため、単一細胞内熱伝導の非線形性を実測することは、細胞内温度変化を正確に予測するのに必須であり、異常発熱の原因解明に直結すると考えた。

そこで本研究では、局所熱パルス法と蛍光温度測定法を組み合わせた細胞内熱伝導イメージング顕微システムを用いて、細胞内熱伝導の非線形性を評価した。細胞を局所加熱するために、ガラス管先端に凝集させた金属微粉末を電動マニピュレータで顕微操作し細胞近傍に設置、赤外光レーザー(波長 1064 nm)を集光する手法を用いた。温度感受性蛍光色素を細胞内に導入し、その蛍光強度の時間変化を高感度高速カメラを用いて毎秒 2000 フレームの撮像速度で撮影、加熱後の温度減衰過程から、細胞内熱伝導の非線形性を求めた。本計測結果から推定される細胞内熱伝導の非線形性は、水の熱伝導率の温度依存性に起因する非線形性と同程度であり、細胞内温度上昇に与える寄与は無視できる程度であることを明らかにした(Biothermology Workshop 2016 にて発表)。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

① 大山廣太郎

「細胞の温度を計測・操作する光技術」
第6回両国フォトニクスサロン 2019

② 大山廣太郎

「蛍光温度計シートを用いた細胞温度マッピング」
Biothermology Workshop 2018

③ Tomomi Arai, Makito Miyazaki, Kotaro Oyama

“FLUORESCENCE THERMOMETRY OF CELL-SIZED LOPOSOMES DURING THE COURSE OF ION FLUX ACROSS LIPID BILAYER”
The 3rd Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC) 2017

④ 大山廣太郎

「細胞内 Ca²⁺制御システムにおける発熱・感温機構の一細胞顕微解析」
Biothermology Workshop 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。