

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K06211

研究課題名(和文) 単一個体の活動性を調べるナノワットバイオカロリメータの開発

研究課題名(英文) Development of nanowatt class bio-calorimeter for individual activity analysis

研究代表者

中別府 修 (Nakabeppu, Osamu)

明治大学・理工学部・専任教授

研究者番号：50227873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、単一個体の代謝熱量を調べるナノワット級のバイオカロリメータの開発を目的とし、熱量センサの高感度化、増幅回路の低ノイズ化、多重恒温槽の安定性向上を行った。センサでは、MEMS技術を用いた高感度サーモパイルセンサを製作し、差動上下センサ構造を採用した。増幅回路には、4個の計装アンプを並列した低ノイズ回路を導入した。恒温槽は4重構造とし、温度制御にデジタルPI制御を実施した。結果として、酵母菌の増殖過程、ブラインシュリンプの単一卵の孵化過程に対して連続100時間を超える安定した計測が可能であることを示し、10nWレベルから10μWレベルの範囲で、代謝熱計測が可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のバイオカロリメトリでは、計測下限が100nWレベルであり、昆虫個体の代謝熱を測れる程度であり、微生物や細胞の計測には多数個体の平均的な挙動を計測していた。本研究では10ナノワットレベルに計測下限を拡張することができ、微生物個体の代謝熱を計測できるレベルを達成し、例えば、ブラインシュリンプの単一個体の孵化過程を代謝熱変化で捉えることが可能となった。この技術の少し先には、単一卵の受精や卵割など生物の発生過程を代謝熱から調べることが可能となり、また、少数細胞を用いたアレルギーや薬効の試験という生物学や医療への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a nano-watt grade bio-calorimeter which measures the metabolic heat of a single individual bio sample. Following three development has been performed, improvement of sensitivity of the heat sensor with the MEMS technology, a noise reduction of the amplifier circuit with four parallel instrumentation amplifiers, and improvement of stability of a four layer thermostatic chambers with a digital PI control technique. As a result, it was shown that the growth process of yeast and the hatching process of a single egg of brine shrimp can be measured continuously for more than 100 hours, and the heat of metabolism can be measured in the range of 10 nano-watt level to 10 miro-watt level.

研究分野：熱工学

キーワード：バイオカロリメトリ MEMS 代謝熱 高感度熱測定 単一個体 温度制御

1. 研究開始当初の背景

バイオカロリメトリは生体の活動を代謝熱量から調べる分析方法であり、その始まりは Lavoisier(1780)による小動物の発熱量計測、Rubner(1892)による犬の発熱量と O₂ 消費量、CO₂ 発生量の測定に遡る。当時は、生命活動が化学反応に強く結びついていることを示す画期的な発見とされ、今日では、小動物から微生物、細菌類に至る生体の活動性や増殖特性、種々の環境要因の影響評価などに用いられている。

生物個体の発熱量はその重量に強く相関し、例えば、ヒトの 100W、マウスの 100mW、蝶の 100 μ W、ミジンコの 50nW、酵母菌の 20pW、赤血球の 10pW、大腸菌の 100fW となっている。従来、ペルチェ素子を熱流センサとしたバイオカロリメータ(1)では、熱量分解能は 1 μ W~10 μ W と昆虫個体の代謝レベルであり、微生物や細胞の分析においては、多数の個体の発熱を測ることで平均的振る舞いを調べている。もし、新技術の導入で究極的に 1pW 分解能のカロリメータを開発すれば、人体の細胞の代謝特性や異常を直接計測し、細胞活動の研究、病気による異常発熱、アレルギー、薬効等を調べることに貢献できると期待される。

生命活動を高感度化した熱量計で捉える試みは、半導体微細加工技術から発展した MEMS 技術の導入が重要な役割をすると期待されている。例えば、Johannessen ら(2)は微小薄膜サーモパイルを制作し 10 個の褐色脂肪細胞の薬剤に対する代謝応答を観察できること、Higuera-Guisset ら(3)は薄膜サーモパイルで測った大腸菌の増殖特性を報告し、著者ら(4)は薄膜サーモパイルと多重恒温槽でバイオカロリメータを制作し、酵母菌の増殖試験等で 100nW から代謝熱計測ができることを示している。

2. 研究の目的

バイオカロリメトリ(生物熱測定)に関し、MEMS 技術と高度熱制御・計測技術を組み合わせ、1ナノワットレベルから吸発熱を測定できるバイオカロリメータを開発し、単一個体の活動性をエネルギー代謝の視点で調べる技術を提供することを目的とした。究極的には、単一細胞の代謝熱計測には 1pW レベルの計測能力が求められるが、本研究では、生物個体の代謝が観察でき、実現性のある 1nW レベルのバイオカロリメータの開発を目標とした。

3. 研究の方法

高感度バイオカロリメータを実現するため、サーモパイルセンサの高感度化、増幅回路系の低ノイズ化、恒温槽の高安定化を実施した。カロリメータの性能は、少数酵母菌の増殖曲線計測を通じて評価し、単一個体の計測実験としてブラインシュリンプの乾燥卵からの孵化過程の代謝熱計測を実施した。

4. 研究成果

4.1 サーモパイルセンサの開発では、22mm 角のガラス基板上に、MEMS 技術で 248 組の Ni/Cr 熱電対を直列に接続したサーモパイルセンサを開発した(図 1 左)。中央には、感度校正用のヒータを備えている。センサは銅板製ホルダーへ 2 辺を接着して取付け(図 1 右)、1 枚の銅板に試料側と参照側の 2 つのセンサを取り付けたものを 2 枚製作した。最終的に、4 枚のサーモパイルセンサを用い、試料セル側の上下、参照セル側の上下に配置する差動上下センサとした。

サーモパイルセンサの感度は平均で 2 V/W 程度、時定数は 13 秒であった。市販の 1cm 角のペルチェ素子による熱流計測では、感度は 0.2V/W レベル、時定数が 20 秒程度であることと比べ、高感度で応答性の早いセンサを得た。

4.2 サーモパイルセンサの出力信号を増幅し計測する信号処理系として、低ノイズ計装アンプ(LTC1100)を 1 サーモパイルセンサ当り 4 個並列接続し、4 個の加算平均をとることで、増幅回路内で発生するノイズを抑え、同相信号を計測する改良を行った。図 2 は 4 つのサーモパイルセンサの信号を増幅する 4 つの増幅回路(総計 16 個の計装アンプ)を示している。この回路で増幅した信号は、データロガーで記録した。

単一計装アンプによる増幅回路と 4 アンプ並列増幅回路のノイズを計測し、FFT 解析を実施した結果を図 3 に示す。5mHz から 100mHz の範囲で並列化によりノイズが 1/2 に低減され、ノイズレベルは 10 秒毎のサンプリングで 100 分間の計測の RMS は 4 μ V レベルとなった。これは、センサ出力端で 1nV レベルのノイズであり、発熱量換算では 0.5nW となる。この結果は、増幅回路系でのノイズに関してはナノワット熱量計測に対して十分に低いノイズでの増幅

が可能なことを示すものである。

4.3 恒温槽の開発では、アルミ合金製の3重の恒温槽を製作し、恒温槽は市販のインキュベータ内へ設置した。図4右に示す3重恒温槽は、センサホルダーを第1層とし、第2層は気密構造容器、第3層はインキュベータ内の空気と熱交換器で熱の出入りを行う容器である。この各層の温度は、測温抵抗体で計測した温度信号にPI制御演算を行い、ペルチェ素子で熱の出入りを制御する線形制御を採用した。PI制御には、Arduinoを用いたデジタル制御を導入し、以前のアナログ制御回路と比べ、パラメータ調整が迅速に行えるように改善された。

恒温槽の温度制御特性として、各層の整定時間を調べると、第3層では約60分、第2層で約18分、ホルダーは約12分となった。また、各層の温度安定性を70時間の連続計測データの標準偏差(RMS)として調べると、表1となった。昼夜の室温変動のRMSは640mV，最内層のセンサホルダー温度のRMSは1.5mVとなり、室温変動は2/1000程度に減衰できることが分かった。

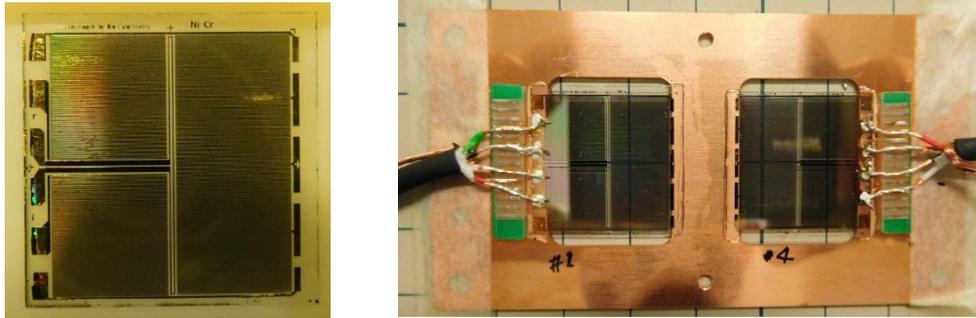


図1 MEMSサーモパイルセンサ(左)と銅製ホルダーへ設置された試料側、参照側センサ(右)



図2 4アンプ並列増幅式のアンプ4回路

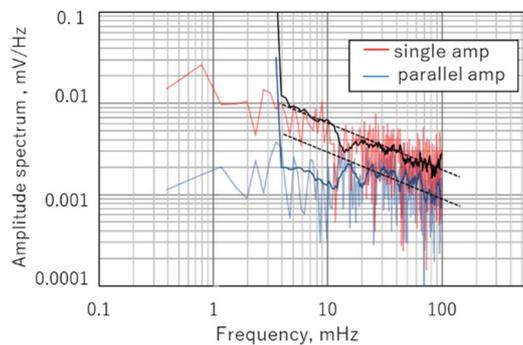


図3 増幅回路のノイズのFFT評価

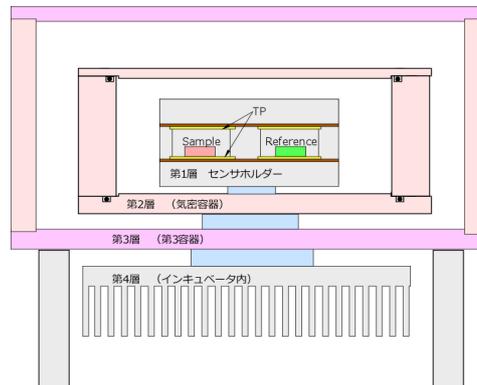
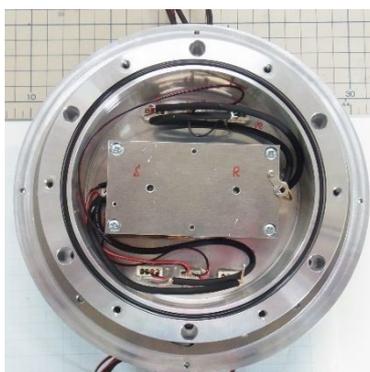


図4 恒温槽 左：第1層センサホルダーと第2層気密槽，右：3重恒温槽の模式図

表1 恒温槽各層の平均温度・変動・変動減衰率

槽	センサホルダー	第2層	第3層	インキュベータ	室温
平均温度, °C	26.511	26.485	25.599	23.706	23.893
標準偏差, mV	1.464	2.148	3.823	79.26	640.1
減衰率	68%	56%	4.8%	12.4%	
総合減衰率	0.23%				

4.5 酵母菌の増殖過程を80時間連続計測した一例を図5に示す。センサホルダー温度は26.5°Cの設定に対して±10mV以内の変動レベルで制御できている。試料はM-green培養液10μlに少数

の酵母菌（図6）を入れたものをガラスセルに密封した。薄い青線のデータは20秒毎の計測データであり、赤線は5分間移動平均データである。移動平均データを見ると、計測開始後2時間以内に40nWレベルまで計測値が低下し、その後14時間程度まで緩やかに発熱量が低下し、その後は20nWレベルから指数関数的増加を観察できる。10時間程度までの緩慢な発熱量の低下は、試料セルの密封に使用した接着剤の発熱と見られる。今後、改善が必要である。対数増殖を示す16~24時間のデータを用い前方補外すると、計測開始時には50pWレベルの発熱から始まると推定される。酵母菌の平均代謝熱量は20pW/Cellであり、初期細胞数は2~3個となる。この計測では、ノイズレベルが10nW程度であったため、個数換算で500個相当からの酵母菌の増殖活動を捉える可能性を示したことになる。増殖曲線は、35時間で最大値9 μ Wを示し、低下に転じる。これは、計測セル内の環境が悪化し、細胞の代謝活動が減衰したことを示している。その後40時間まで指数関数的減衰を示した後、300~140nWレベルで代謝は緩やかに低下していく。この挙動は、細胞個数を観察する増殖曲線では捉えることができないもので、酵母菌が環境の悪化に対して活動を完全に停止するのではなく、省エネモードの活動に変更することを示すものと推測される。

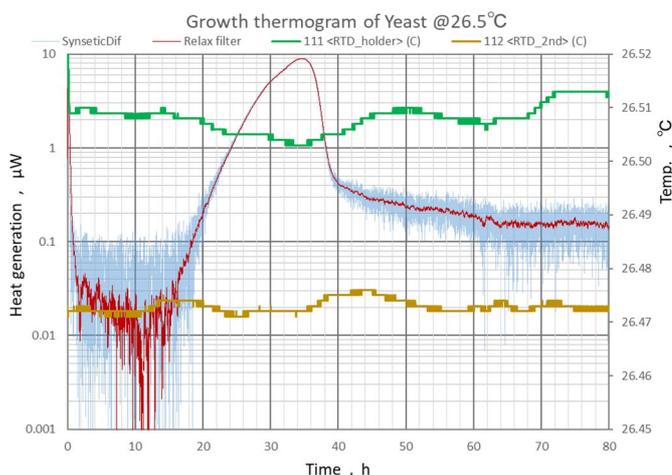


図5 酵母菌の増殖サーモグラム

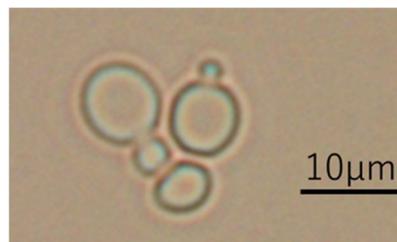


図6 酵母菌の顕微鏡写真

図7には、ブラインシュリンプの乾燥卵を人工海水と共に試料セルに入れ、孵化過程の代謝熱を計測した結果である。開始後10時間程度は、試料セルの密封に使用した接着剤の発熱が減衰する様子が見られ、その後、ブラインシュリンプの代謝活動が28時間をピークとして表れている。1個の卵が発する熱量は最大160nWレベルであり、その後、発熱は140時間まで徐々に低下する。140時間以降の10nWレベル以下の領域は、孵化したブラインシュリンプの幼生が栄養不足で活動を停止したものと推測される。計測後の試料セル内には、活動を停止したブラインシュリンプの幼生を観察している。また、ブラインシュリンプは約24時間で孵化し、100時間までには一度脱皮をする。計測中の観察はできていないが、孵化と脱皮には通常以上のエネルギーを必要とすると考え、ピーク発熱量を示す約28時間で孵化し、30nW程度の小さなジャンプを示す75時間付近が脱皮のタイミングでないかと推測される。120時間付近、150時間付近に発熱ピークが見れるが、これらは外部からのノイズが計測に混入したものと考えられる。開発したバイオカロリメータでは、10nWから10 μ Wレベルの生体の代謝活動を計測できることが示され、この例のように、微生物の個体の代謝を直接計測可能なことが示された。

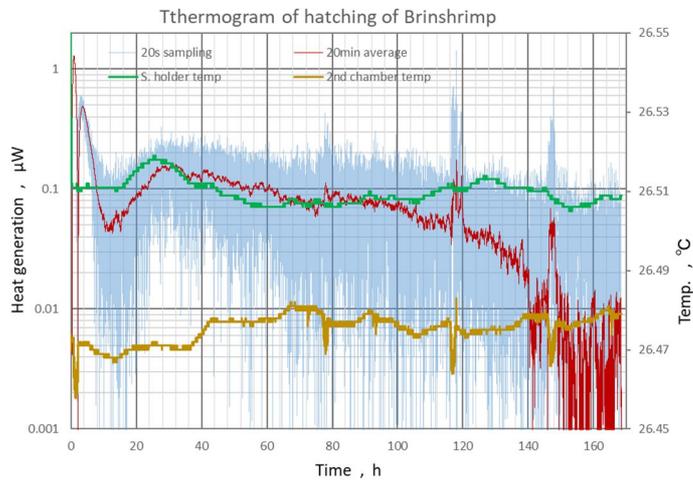


図7 プラインシュリンプの孵化過程のサーモグラム

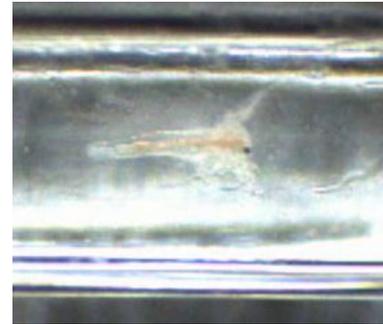


図8 ガラス管内で孵化したブラインシュリンプ

まとめ

個体生体試料の代謝挙動を測る微小発熱を検出するバイオカロリメータを開発し、酵母菌の増殖過程、ブラインシュリンプ卵1個の孵化過程のサーモグラムを計測した。

バイオカロリメータは4重恒温槽構造、熱量センサにはMEMSサーモパイルセンサを4枚使う差動上下センサ構成とし、起電力の増幅回路に4アンプ並列増幅回路を導入した。総合的に、10nWレベルからの100時間レベルの長時間熱量計測が可能な装置とすることができた。

酵母菌計測では、数個の細胞からの対数増殖の様子を10nW~10 μ Wレベルで捉え、死滅過程では100nWレベルの省エネモードが存在することを示した。

ブラインシュリンプ計測では、100nWレベルの発熱をピークに150時間程度まで代謝活動が徐々に低下する様子が見られ、孵化、脱皮における発熱の高まりが検出できる可能性を示した。

参考文献

- (1) 高橋克忠, Netsu Sokutei Vol.18, No.1 pp.9-18, (1991)
- (2) E. A. Johannessen, et al., Analytical Chemistry Vol.74, No.9, (2002)
- (3) J. Higuera-Guisset, et al., Thermochemica Acta 427, pp.187-191, (2005)
- (4) 中別府修, 坂寄純一, Thermal Science & Engineering, Vol.14, No.4, pp.115-120, (2006)
- (5) Y. Nagano, J. Thermal analysis and Calorimetry, 85, pp.581-584, 2006

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中別府修
2. 発表標題 MEMSサーモパイルを用いたバイオカロリメータの高感度化
3. 学会等名 日本機械学会熱工学コンファレンス
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------