

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560210

研究課題名(和文) 組織・臓器ファクトリーを目指した熱物性による非侵襲全数モニタリング手法への挑戦

研究課題名(英文) Challenges to non-invasive total inspection by thermal property measurement towards tissue and organ factory

研究代表者

森島 圭祐 (Morishima, Keisuke)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60359114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：熱の輸送は生命現象解明に極めて重要である。熱耐性の異なることが知られるがん細胞と正常細胞の熱物性の違い、体温調整の中心的な役割を果たす血管壁面伝熱構造の加齢による変化など興味は尽きない。 μm オーダー構造寸法を有し、数 μs の温度上昇が変性を引き起こしてしまう可能性がある生体細胞・組織の、伝熱物性計測が可能となる新しい手法の実証を目指した。目標としていた $1\mu\text{s}$ の過渡現象に対する 0.001K オーダーでの計測安定性を原理的に実証できた。10日間の長期評価においても 50ppm 以内であり、細胞培養期間に相当する長期のモニタリングへの適用も視野に入る。

研究成果の概要(英文)：Heat transportation plays important role in life phenomenon. Many researches and applications have been reported, including the difference of heat resistance between cancer and normal cell, the aging of blood vessel wall as the thermal conductive structure which makes human body homeothermic control. This research had intended to construct novel thermal property estimation technique which can manage living cell or tissue. The targeted numerical goal, $1 \times 10^{-3} [\text{K}]$ temperature change detection in $1 \times 10^{-6} [\text{s}]$ time response have been principally realized. Lower than 50ppm fluctuation in 10 days long term stability test results indicate its applicability for monitoring of cell culturing.

研究分野：生体医工学

キーワード：細胞培養 モニタリング 熱物性 精密計測 組織工学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) リプログラミング現象の発見は、移植用臓器を大量に製造するという夢にリアリティを与えた反面、その厳密な品質管理という緊急の課題を突き付けている。細胞から個体までの複数階層内で営まれている生命活動の全貌がまだ解明されていない中で応用が先行してしまう現状に対し、本研究では熱を観察用のプローブとして利用し、細胞や組織内での生命活動の観察を行うという全く新しい方法論に挑戦した。

(2) 熱の輸送は生命現象解明に極めて重要である。生体内で起こっている複雑なエンタルピー変化の影響が、伝熱的に生体ミクロ構造内においてどのように輸送され、利活用されているのかについてはいまだに謎に包まれている。熱耐性の異なることが知られるがん細胞と正常細胞の熱物性の違い、体温調整の中心的な役割を果たす血管壁面伝熱構造の加齢による変化など興味は尽きない。

(3) 伝熱物性は、材料の内部にある原子・分子から空孔のオーダーにわたる構造状態を反映して値を変化させることが知られている。計測による温度上昇を最小限に抑えた上で、高精度に微小な伝熱物性の変化を検出することが可能となれば、我々は来るべき組織・臓器ファクトリー時代に必要とされる、まったく新しい非侵襲組織状態モニタリングツールを手にする事となる。

2. 研究の目的

(1) μm オーダー構造寸法を有し、数の温度上昇が変性を引き起こしてしまう可能性がある生体細胞・組織の、伝熱物性計測が可能となる新しい手法の実証を目指す。センシングの原理検証、試料のハンドリングを含む計測システムとしての実現可能性について検討する。新計測法の妥当性を実証したうえで、生体工学分野における新しい観察ツールとなり得ることを示す。

(2) 組織工学・BioMEMSなどの分野では従来の医療応用における、生体の、生体としての利用のみならず、生体-機械の融合といった全く新しい未来的技術の検討が着手され始めている。生化学・生体物質の熱物性計測は、単なる基礎科学への寄与のみならず、このような将来的ニーズを見据えた提案でもある。生体材料・組織の飛躍的な応用を阻んでいる本質的原因は、生体内で起きている生化学的メカニズムの複雑さと、材料自身の繊細さとに尽きる。近年の生物学の発展により前者への理解が加速度的に進展している中で、工学的には後者の問題が突きつけられている。小さくてやわらか、繊細で機械的にも熱的にも脆弱なこれらの物質群を、従来の工学的手法を援用して大規模に扱っていくことができるような世界を実現するための、

基礎的観察ツールともなりうる。

3. 研究の方法

(1) 計測系の構築

検討する計測法は完全に新規の方法であるため、基本となる計測用電気回路自体から構築することが必要となる。センサとなる金属電極(Pt製)の抵抗温度係数から 0.001 K の温度分解能を実現するには約 4 ppm の抵抗計測分解能が必要となる。一方で $1\text{ }\mu\text{s}$ パルス幅に対する安定性も同等程度が必要となることから、 4 ps のジッタ特性に相当する。これらのことから、時間幅を決定するパルス発生器と、高分解能A/D変換に導入するプリアンプは市販のものが利用できず、それぞれ独自のものを設計した。

パルス幅自体は $1\text{ }\mu\text{s}$ オーダー(1 MHz)と現在のデジタル回路技術で考えれば容易な領域である一方で、要求される ps オーダーのジッタ特性は、 GHz 領域の最新通信技術の世界で利用され始めているレベルである。逆に言えばこれらの低ジッタ発振子が利用できる技術的環境が、本手法の実現を可能にしたといえる。

(2) センサ設計に関する検討

計測によって得られたパルス積分信号は、センサと試料の幾何学的形状に応じた境界条件に基づく、熱伝導方程式の解に照らし合わせて解析される。この分野には数値解析法が広まる前の時代に確立された、多くの厳密解に関する蓄積がある。特に矩形発熱体のステップ加熱応答の解は、現在の半導体加工技術によって容易に形成することが可能な薄膜電極をよく表現できており、本研究における検討の開始点とできる。

熱過渡応答の計測データから熱物性を算出するには、一次元熱流では熱伝導率と熱拡散率の完全な分離ができず、これらが組み合わされた定数しか抽出できない。ミクロな領域であっても、二次元熱流を形成できるような、適正なセンサ形状・励起波形を検討した。また回路を通して得られる積分出力と、温度過渡応答の解の積分値が理論通り整合しているかを検証した。

(3) 細胞への熱刺激に関する温度-時間応答に関する検討

細胞培養と温度との関係は古くからよく研究がされているが、本法が提案している極短時間($1\text{ }\mu\text{s}$)及び極微温度上昇(1 K)に関してはほとんど知見がない。これはこれまでの研究が、Heat Shock Proteinなどを主要な作用機序とする、温度に対する保護的応答に集中していたことが原因と考えられる。

本法はこのような生体保護メカニズムが発動する前段階の領域での作動を企図しており、ここにおける基礎的なデータ取得が重要と考えられた。

4. 研究成果

(1) 計測系の構築

原理検証機の構築とこれを利用した必要性能実現可能性の検証であるが、目標としていた $1 \mu\text{s}$ の過渡現象に対する 0.001K オーダーでの計測安定性を原理的に実証できた。(図1) 既存の市販機器では応答速度と温度分解能とは排他的にしか実現できず、本計測手法の原理的優位性を示すことができたと考えている。ロックインアンプを利用するような方法と比較しても、DC的な温度上昇を極小化できることから、細胞への熱ダメージを最低限に抑制することができる。

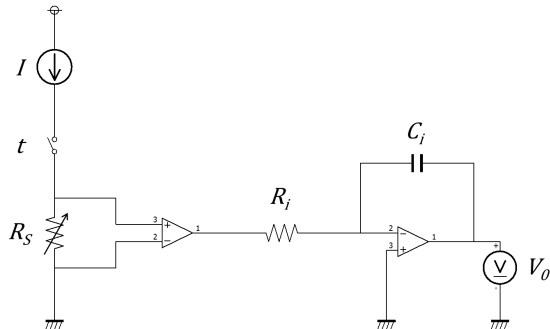


図1 計測系基本回路図

また計測によって得られた電気的なパルス積分信号から、温度変化信号を取り出すアルゴリズムについての基礎検討を行った。従来は回路でアナログ的に相殺していた、温度変化に関係しない加熱用電流に関する信号を、ソフトウェア処理によるデジタル的に実施できる方法を考案した。これにより、回路からセンサに至る経路から余分なインピーダンス成分を排除することが可能となり、回路の持つ高速性能を最大限に活用することが可能となった。当初の想定以上に回路インピーダンスによる影響が大きいことが明らかとなり、従来法で相殺のために採用されるブリッジ回路を削減できる目途が立った。

(2) センサ設計に関する検討

模擬的なセンサを用いて原理検証から実際の試作システム構築まで行った。 $10 \mu\text{s}$ という極めて短いパルス加熱に対して数時間の短期間で 5ppm の計測安定性を確認できた。(図2) これは 1mK を下回る分解能の可能性を示している。 10 日間の長期評価においても 50ppm 以内であり、細胞培養期間に相当する長期のモニタリングへの適用も視野に入る。また当該手法で熱物性の異なる物質の判別が可能であることも実証できた。

提案当初の発想では、熱伝導方程式の厳密解が示す熱の散逸特性(次元の上昇とともに散逸速度が速くなる)を利用するものであったが、数値シミュレーションを実施することによって構想の妥当性を確認できた。(図3)

またこれらの検討結果から、原理検証機の設計パラメータを具体的に検証することができた。

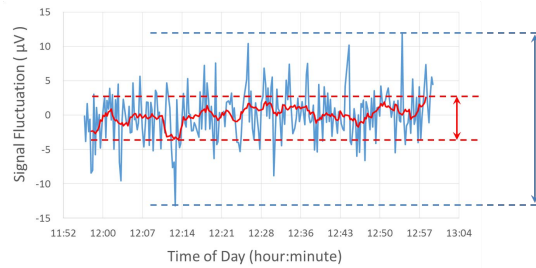
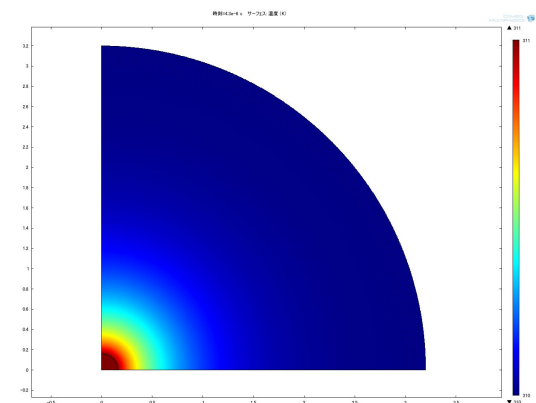
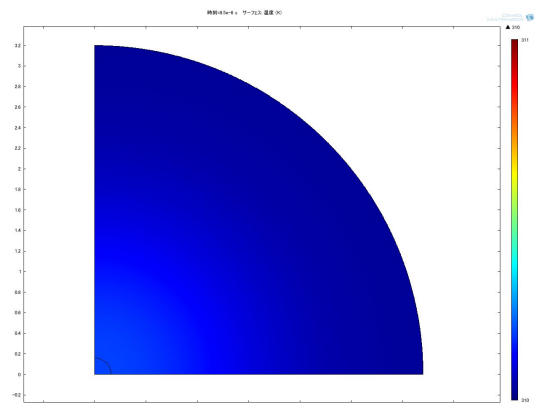


図2 模擬センサを利用したシステム安定性評価結果



(a) $5 \mu\text{s}$ 加熱停止直前



(b) 加熱停止後 $4 \mu\text{s}$ 経過後

図3 $5 \mu\text{s}$ パルス加熱による $0.3 \mu\text{m}$ 円筒熱源近傍における温度上昇と散逸過程

(3) 細胞への熱刺激に関する温度 - 時間応答に関する検討

マウス繊維芽細胞 3T3 をモデルとした温度刺激評価について評価を実施した。細胞に対する温度刺激に関しては 80 年以上の

歴史があるが、分子生物学的には 1962 年の Ritossa による報告が嚆矢とされる。以降 Heat Shock Protein としてその発現のメカニズムと、分子シャペロンとしての機能解析が集中的に行われている。本研究では当該メカニズムが発動する前段階において、生物にとって温度外乱を認識せず、生命活動として許容できる温度変動域が存在することを想定した低侵襲計測法の構築を企図しており、この領域に関する詳細の実験的観察が必要であった。通常の培養至適温度 37 °C に対し 8 K 程度の温度上昇では数分でも致死的事であることは常識的に知られていたが、本研究における実験によって 3 K では 1 日で致死性的、1 K では 2 日培養後も影響は見られなかった。これらの結果は、至適温度域近傍に、細胞にとっての温度不感帯が存在することを示唆しており、本研究が 1 K・1 μs という領域での熱的な計測を可能としたことは、本手法の低侵襲性を傍証できたものと判断できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：

<http://www-live.mech.eng.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森島圭祐 (Morishima Keisuke)