The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	高速熱応答マイクロプローブ法の開発と培養細胞試料への適用
Author(s)	片山, 貴志
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/70753
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　片山　貴志　　）	
論文題名	高速熱応答マイクロプローブ法の開発と培養細胞試料への適用

論文内容の要旨

本研究では、微小でソフト・内部に緻密な構造とダイナミクスを包含している試料と、従来的な硬く静的な機械部品との界面における状態観察方法について検討した。現在細胞研究の場において主要な観察法として採用されている光学顕微鏡を補完できるモニタリング手段として、高速熱応答を利用するプローブ法を提唱した。センサ・試料界面近傍における熱拡散について古典的な熱伝導方程式の範囲のもとに検討し、実用的な条件下において熱源寸法がμmを下回る領域まで適用可能な近似解析解を導出した。微細加工技術を応用してセンサを試作、高速・高精度検出が可能な回路方式の提案・実装と合わせて、その検出性能を検証した。最後に具体的な対象試料として、培養細胞に対する状態観察を実現したので報告する。

第一章では生物学が達成してきた研究成果を背景にして生み出されてきた生物と機械が融合した新しいシステムの概念をまとめ、そこに内在する計測問題について論じた。また本研究が提唱する熱の散逸現象の利用法と、これを実現するために取り組んだ本研究の目的を述べた。第二章では二層界面近傍の瞬間点熱源に対する古典熱伝導方程式の解の詳細な分析を行い、本論文で構築を目指すプローブ法の設計指針を得た。第三章では前章で分析した基本解をもとにして、プローブの動作を記述できる近似解を導出した。この解は測定試料として水と等しい物性を想定した場合、矩形熱源の長辺方向長さがおよそ3×10^{-7}[m]までの微小寸法領域まで適用可能であり、一般的な細胞一つの寸法を下回る。また試料に対する加熱による影響を抑制することを目的として、投入した熱が散逸するために必要な時間を評価した。第四章では前述の解析モデルを実現できる、高速・精密な駆動・検出回路方式を提案し、実装した回路の性能を評価した。10[μs]の短時間加熱における温度変化を0.0007[K]で検出できることに相当する安定性を確認した。微小熱源を実現できる構造のセンサ・デバイスの試作を行い、回路と組み合わせることでプローブとした。組み合わせたシステムによる測定性能を試料の熱伝導率換算で評価した結果、Δ0.001[W/(m・K)]の分解能を具えていることを示した。前章で議論したモデルと実際の測定結果との比較検証を行い、良好な一致を得た。第五章では前章までに確立した高速熱応答マイクロプローブ法の、培養細胞試料への適用について検討した。センサ上で接着細胞の培養を実現するため、センサの表面上に対して、良好な電気絶縁性を持ち生体親和性にすぐれた材料であるpoly(p-xylylene)の被覆を実施、被覆による検出感度への影響を評価した。次にマウス胎児由来の、標準的な接着性細胞であるNIH/3T3のセンサ表面における培養とプローブによる評価を行った。その結果、培養液と比較して、細胞試料の方が高いプローブ出力となることを確認した。これは現象を熱物性のみに置き換えて考えると、細胞の熱伝導あるいは体積当たりの比熱が、培養液と比較して小さな値であることを示唆している。この結果は組織レベルや単一細胞に対する既存の測定事例と一致する。さらに、細胞の状態変化検出の可能性を確認するために、人工的な操作で培養液の濃度を調整した時の、細胞への影響の検出を試みた。その結果、培養液が低濃度になると検出値が一定方向にドリフトし、その後培養液濃度を標準的な濃度に戻すと検出値も回復するが、完全には元の状態に戻らないことが確認された。細胞内部を含む、センサ感応部近傍で発生した状態変化をとらえたものと考える。第六章では本研究の総括を行い、熱の散逸現象を利用した、細胞や微小生体組織のモニタリング法に関する今後の展望や課題について述べた。

以上本論文では、細胞に代表される分子レベルのダイナミクスを内包した微小で柔らかい試料に対する、高速熱応答を利用した新しい観察法実現を目指して研究を行った。サブμmまでの微小寸法に適用できるプローブの古典伝熱モデルを提示した。このモデルを実装したセンサ出力の時間的変動は、試料内部のダイナミクス存在を示唆することになる。実際のセンサ及び検出回路を試作してその性能を検証、これが培養細胞の状態観察に利用できることを示した。本研究で得られた成果は、今後期待される細胞や微小生体組織、そしてこれらに触発されて研究が進められている分子モータ技術などのバイオアクチュエータが実現する社会において求められる高度なモニタリング実現に向けて大きな意義があると考える。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　片山貴志　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
主査	教授	森島　圭祐
副査	教授	津島　将司
副査	准教授	東森　充

論文審査の結果の要旨

生物と機械の融合を目指す Wet Robotics 分野において、生物と無生物の界面である、Biotic-Abiotic Interface の状態計測と解明は、本質的な課題と想定される。本論文は、細胞およびミクロ構造組織内に存在するダイナミクスをその指標とした新しい計測法を提唱し、その可能性を実証することを目的としている。

そこで本論文では、細胞表面に、MEMS 技術によって形成した微小金属電極を接触させ電流を印加し、ヒータとして用いて局所温度分布を発生させる。これは生物学の計測で頻繁に用いられる物質特異的なラベリングに対して、時空間に特異的にラベリングすると表現することができる。無生物で、内部に物質移動などのダイナミクスがない場合は、熱伝導方程式の示す解に従って温度分布は散逸する。内部に物質移動がある場合は、ダイナミクスを反映した特徴的な変化をすることが期待される。

本研究の独創的な点は、１）生物・無生物界面におけるバイタル計測の必要性に着目した点、２）ミクロ生体のダイナミクス観察に熱輸送現象を利用することを試みる発想、３）生体に熱的負荷をかけることなく、十分な時間・温度分解能を確保できる新しい手法を提唱している点、に集約される。その主な成果は以下のとおりである。

（１）　微小で柔らかい試料である細胞に対する新しい観察法として、新たに高速熱応答マイクロプローブ法を提案している。

（２）　提案しているプローブの動作を記述した古典的な伝熱モデルを導出することによって、測定時に投入した熱の空間的な広がりに基づいた計測の空間分解能を評価している。また投入した熱が十分に散逸するために必要な時間を定式化することによって、高温にさらされることに耐性のない生体試料に対する低侵襲測定を実現するための指針を示している。

（３）　導出した解析モデルに基づき、実際の細胞寸法を想定した実験が可能となる、高速・精密な駆動・検出回路方式とセンサデバイスを提案し、その性能を評価している。組み合わせたシステムによる測定性能を試料の熱伝導率換算で評価した結果、Δ0.001[W/(m・K)]の分解能を具えていることを示し、議論したモデルと実際の測定結果との比較検証を行い、良好な一致を得ている。

（４）　高速熱応答マイクロプローブ法の、培養細胞試料への適用について検討している。マウス胎児由来の、標準的な接着性細胞である NIH/3T3 のセンサ表面における培養とその高速熱応答プローブによる評価を行い、その結果、培養液と比較して、細胞試料の方が高いプローブ出力となることを確認している。これは現象を熱物性のみに置き換えて考えると、細胞の熱伝導あるいは体積当たりの比熱が、培養液と比較して小さな値であることを示唆している。この結果は組織レベルや単一細胞に対する既存の測定事例と一致する。さらに、細胞の状態変化検出の可能性を確認するために、人工的な操作で培養液の濃度を調整した時の、細胞への影響の検出を試みており、その結果、培養液が低濃度になると検出値が一定方向にドリフトし、その後培養液濃度を標準的な濃度に戻すと検出値も回復するが、完全には元の状態に戻らないことが確認されている。これは、細胞内部を含む、センサ感応部近傍で発生した状態変化をとらえた可能性を示している。

以上のように、本論文は、微小で柔らかい試料である細胞に対する新しい観察法として、新たに高速熱応答マイクロプローブ法を提案して、その適用性について古典伝熱モデルを用いて検証しており、このモデルを実装したセンサ及び検出回路を試作してその性能を検証、これが培養細胞の状態観察に利用できることを示した。

本論文が想定している生体・機械融合システムは近未来的な革新的応用であるが、具体的に取り組む生物・無生物界面の問題は生物工学・生体医工学などの領域における普遍的な問題と考える。本論文で問題提起し、具体的アプローチを提案した成果が、これらの分野にも積極的な刺激を与えるものと考える。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。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。