

博士論文（要約）

局所温度制御デバイスの製作および  
熱ショック反応の計測

上野 遼平

本研究の目的はマイクロチャンバーとマイクロヒーターを集積化した局所温度制御デバイスを製作し、チャンバー内に培養された細胞に対して局所的な熱ショック反応の誘導、観察および計測を行うことである。さらに細胞集団中で局所的に致死的な熱ダメージを与えた場合にアポトーシスやネクローシスを示した死細胞と熱ショック反応を示した生細胞の間の細胞間相互作用の研究に応用することである。

熱ショック反応とは細胞が様々な外的ストレスを受けた場合に示す、防衛反応の一つである。哺乳動物細胞の培養における通常の温度は約37℃である。しかし細胞が42℃程度まで高温にさらされると熱ショック反応を示すようになる。44℃を超えて加熱されると細胞は過剰なダメージを受けて、やがて死に至る。

従来の生物学的実験において細胞培養環境はディッシュやフラスコ単位で制御されてきた。つまり培養液中の構成成分や薬剤を投与する場合、その変化はディッシュ内の細胞全体へ影響を及ぼすと考えられる。化学物資だけでなく、ディッシュ内の温度も恒温槽によって一様な温度に保つように制御されている。そのため同一の細胞培養系において部分的な温度変化を与えて、細胞に対して局所熱刺激を与えるようなことは不可能であった。

局所的な温度変化を与えて、細胞の研究を行う場合、培養系における温度分布変化を測定、評価する手法が必要不可欠である。マイクロスケールにおける温度分布測定手法は赤外線サーモグラフィ、蛍光温度測定、ラマン分光温度測定、近赤外線分光温度測定などいくつか研究されている。しかしどの手法も測定誤差や再現性に関して課題を残している。また光学系のセットアップが必要であるので細胞培養実験と同時に行うことは困難である。特に温度測定の再現性に関しては重要な課題である。なぜなら生物学的実験においては結果に関して厳しく再現性が求められる。このとき細胞加熱時の温度測定の再現性が担保されなければ、実験をいくら重ねても有意なデータとならない。

本研究では局所温度制御デバイスの製作に先立って、有限要素法による熱解析をデバイスの3次元モデルに対して行い、デバイスの設計、加熱特性および温度分布の確認を行った。まず、NIH-3T3細胞が熱ショック反応を示す温度を $42\pm1^{\circ}\text{C}$ と仮定してデバイスの設計を行った。熱解析は設計段階だけでなく、局所温度制御デバイスの実際の温度分布を求めるためにも使用されたので、デバイスの忠実なモデルを構築した。ヒーターの温度変化は抵抗値の変化からリアルタイムに測定された。チャンバー内の温度分布は加熱温度の測定結果を熱解析の3次元モデルに入力し、再計算することによって求められた。抵抗温度計による温度測定は再現性があり、その測定結果をもとにチャンバー内の温度分布を計算によって求めるので温度測定の再現性は確保されると考えた。

熱解析および設計に基づいて製作された局所温度制御デバイスに対して熱式フローレイトセンサーとして特性評価を行った。さらにPID制御器を実装して、細胞培養における外部環境に依存しない安定した加熱制御を目指した。

最後にマイクロチャンバー内でNIH-3T3細胞培養を行い、マイクロヒーターによるジ

ジュール加熱によって、細胞の局所的な熱ショック反応の誘導を行った。熱ショック反応の検出にはレポーターアッセイという技術を用いた。つまり、熱ショック反応と同時に緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) が細胞内で合成されるように遺伝子組換えを行い、細胞内のGFPの観察によって熱ショック反応の検出を行った。マイクロヒーターに印加する電流値を15, 17.5, 20 mAとした。このときの加熱温度はそれぞれ41.5, 43.5, 45.5°Cであった。上述のように、これらの測定結果を熱解析に用いることでチャンバー内の温度分布を再計算して求めた。熱ショック反応の分布に関しては加熱終了から8, 24時間後にチャンバー内の細胞を蛍光観察し、GFPの蛍光強度を場所ごとに算出することでチャンバー内の熱ショック反応の強度分布を定量化した。そして再計算によって求められたチャンバー内の温度分布と熱ショック反応の分布を比較することで細胞に対する熱刺激と熱ショック反応の関係に関して論じた。

上述の三つの異なる電流値を用いて加熱した場合、どの場合も40-42°Cに加熱された細胞が加熱から8時間後に熱ショック反応を示した。42.5°C以上に加熱された範囲では8, 24時間後に熱ショック反応を示すことはなく、細胞は死に至った。しかし24時間後に死細胞と隣接するような範囲でのみ、あとから熱ショック反応が観察された。遅れて熱ショック反応が観察された範囲の加熱温度は17.5, 20 mAのどちらの場合も41.5-42°Cであった。8, 24時間後に蛍光強度のピークを示した地点の加熱温度も両者で等しく、それぞれ41.8°Cと42°Cであった。つまり加熱温度が0.2°C高いために、遅れて熱ショック反応が発現するのではないかと考えられる。

このように本研究で製作した局所温度制御デバイスを用いてチャンバー内に培養された細胞に対して熱ショック反応を局所的に誘導することに成功した。また熱ショック反応だけでなくアポトーシスやネクローシスも含めた局所熱刺激に対する細胞の反応の変化を空間的かつ時間的に観察することに成功した。細胞内の熱ショック反応とアポトーシスやネクローシスといった細胞死などの異なる反応を同一培養系において観察した例はなく、本デバイスが生細胞と死細胞の間の細胞間相互作用の研究に応用可能であることが示めされた。