

# [A28] 近赤外光を用いた微小領域の温度測定技術の開発

知能機械工学専攻

山田研究室

0434081

李 富国

## 1. 緒言

細胞の発熱現象は、細胞内での生化学反応を反映している。発熱量は細胞の種類によって様々であるが、物理的および化学的刺激に対して顕著な発熱反応を示す細胞も多く、このような熱反応の測定により、新たな生理学的知見の獲得が期待される。また、腫瘍などの異常細胞の検出、薬剤試験、壊死組織の判定、培養・移植組織の活性度・生着性などへの医療応用も考えられる。一方、近年の MEMS 作製技術の進展とともに、微細流路内の液体流量の測定および制御や、そこでの化学反応の検出方法などが盛んに研究されている。温度変化を測定することは、化学反応検出の 1 つの有効な手段である。

我々は、このような微小領域の温度変化の測定を目的として、近赤外光を用いた非接触式の温度測定技術の開発に取り組んできた<sup>(1), (2)</sup>。この測定方法は、水分子の光吸収スペクトルが温度によって変化することを原理としたものである<sup>(3)</sup>。最終的には培養細胞・組織のリアルタイム温度測定やマイクロ領域での熱発生を伴う化学反応への計測などへの応用を目指した研究と位置付けている。

本研究では、生物顕微鏡と分光計を主要な構成とした測定装置を試作し、温度制御された純水の吸光度スペクトルを測定して、回帰分析による温度推定を行った。また、測定方法を改良し、100  $\mu\text{m}$  と 500  $\mu\text{m}$  厚さの純水に対する温度予測精度の向上を目指した。さらに、純水以外を対象とし、各種水溶液に対する本方法の有効性を検証するために、生体成分の 1 つであり、近赤外域に吸収バンドを有するグルコース水溶液と、工業的によく使用されるエタノール水溶液の温度推定を行った。最後に、試料の空間温度差を測定するために、温度差を生じさせた同一試料内の 2 点間の吸光度スペクトルの測定について述べ、その可能性について議論する。

## 2. 原理

水分子間には水素結合が働き、常温では多くの水分子が会合していることが知られている。水素結合の有無により水分子の吸収バンドのピーク波長や吸収強度は異なるが、水素結合によるピーク波長の変化は小さいため、測定されるスペクトルでは両者が重なり合っ一つのピ

ークを形成しているように見える。温度が上昇すると、水素結合が解け単体の水分子増加するため、単体水分子のピーク側にスペクトルのピークが移動するよう見える<sup>(4)</sup>。このシフト量を計測することにより、水の温度変化を検出することができる。水は、大多数の細胞および組織内において高い体積分率で含有しているため、水の温度変化を測定することで、対象とする生体の温度変化を求めることができる。近赤外光は波長全体としては生体透過性が高いため、生体へダメージをほとんど与えない。さらに、試料内部を透過した光の吸収スペクトルは光路全体の情報を反映しているため、測定した温度は内部の温度情報を含むという利点をもつ。この点は、表面温度しか測定できないサーモグラフィと大きく異なる。本研究では上記の原理を利用し、顕微鏡下の試料を透過した光のスペクトルを分析することで、その試料の温度変化を推定する。

## 3. 方法

### 3.1. 実験装置

正立型生物顕微鏡 (BX-51WI, オリンパス) の光学系を近赤外光を透過できるように改良した。具体的には、対物レンズ、三眼鏡筒、ランプハウス内カットフィルタ、コレクターレンズ等を赤外透過タイプに変更した。本研究では、波長 1300~2000 nm の近赤外光を測定するため、ショートパスフィルター (SP-2000, Spectrogon) を試料前に挿入し、2000 nm 以上の赤外光をカットすることで、試料の光吸収による熱ダメージを極力抑えた。

図 1 に示すように、三眼鏡筒部には光ファイバーを取り付け、分光計 1 (AIST-2850, 相馬光学) を設置した。これにより、試料を透過した近赤外光のスペクトルを取得できる。さらに、試料の空間温度差を測定するため、分光計 2 (SOMA-2710, 相馬光学) を追加し、光ファイバークラウドで接続し、同時測定を行った。

### 3.2. 純水の温度校正方法

まず、測定試料には純水を用いた。光の吸収スペクトル変化から回帰分析等により温度校正を行うためには、純水の実際の温度を測定しなければならない。ここでは、

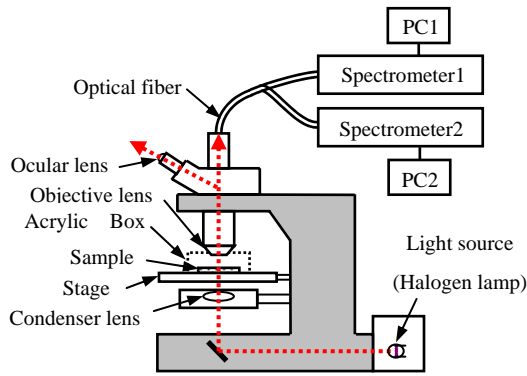


図1 装置全体図

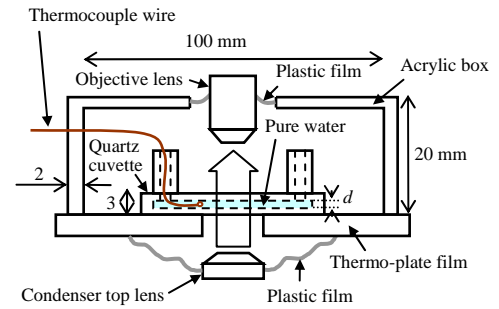


図2 試料の温度制御装置

図2に示すように、シース型の微細熱電対(K型,  $\Phi 0.15$ , 岡崎製作所)を石英フローセルの中に入れて、温度の連続測定を行った。顕微鏡ステージには温度制御可能なサーモプレート(MATS-55RA20, Tokai Hit)を取り付けた。試料温度が一定になるように、アクリル製ボックス、プラスチックフィルムで試料を囲んだ。また、周囲光の影響を受けないように、実験中は暗幕で装置全体を覆った。試料温度が設定温度に達し、十分安定していることを確認し、光吸収スペクトルの測定を開始した。

#### 4. 試料の温度推定結果

##### 4.1. 厚さ 500 $\mu\text{m}$ 純水の測定結果

図3は、厚さが 500  $\mu\text{m}$  の純水の吸光度差スペクトルである。サーモプレートの温度を 26.0~42.0 $^{\circ}\text{C}$  の範囲で変化させ、温度毎の吸光度スペクトルの差を示した。この場合、吸光度差 $\Delta A$  は以下の式で定義される。

$$\Delta A = -\log_{10}(I_s / I_r) \quad (1)$$

ここで、 $I_s$  はサンプル光強度、 $I_r$  はリファレンス光強度を表し、図3は、基準を 26.0 $^{\circ}\text{C}$  のスペクトル、すなわち  $I_r$  を 26.0 $^{\circ}\text{C}$  の時の透過光強度とした場合である。なお、分光計の露光時間は 10 ms、積算回数は 100 回を設定し、表示した差スペクトルは、移動平均 (10 点) によりスムージングしている。図3より、水の吸収ピークがある 1450 nm の前後の 1413 nm と 1487 nm で、吸光度差が温度によって明瞭に変化していることが分かる。なお、図中の矢印は温度が上昇する方向を表す。

##### 4.2. 厚さ 200 $\mu\text{m}$ 純水の測定結果

測定方法は厚さ 500  $\mu\text{m}$  の実験と同様である。厚さ 200  $\mu\text{m}$  の純水に対して、実験を行った。2つの吸収バンドの温度依存性が現れ、1410 nm、1490 nm 及び 1900 nm 付近の吸光度差が温度によって明瞭に変化している(図4)。1900 nm の吸収バンドは、厚さ 500  $\mu\text{m}$  の場合では、吸収が大きいため観察することができなかったが、一方、200  $\mu\text{m}$  のような薄い試料では測定でき、解析に用いることが可能となった。

##### 4.3. 厚さ 100 $\mu\text{m}$ 純水の測定結果

同じ方法で、30.0 $^{\circ}\text{C}$  を基準とした吸光度差スペクトルを測定した。2つの吸収バンドの温度依存性が明確に現

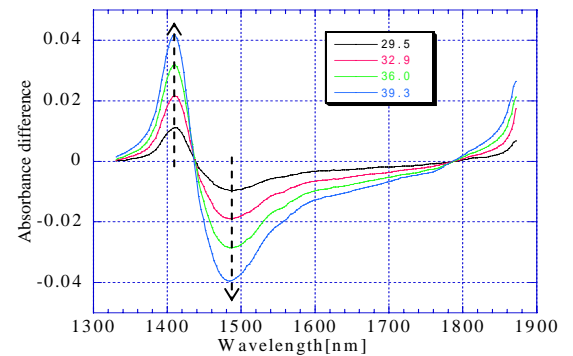


図3 26 $^{\circ}\text{C}$ を基準とした水の吸光度差スペクトル (光路長 500  $\mu\text{m}$ )

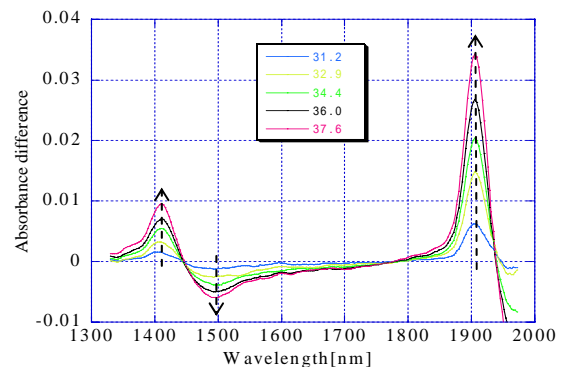


図4 30 $^{\circ}\text{C}$ を基準とした水の吸光度差スペクトル (光路長 200  $\mu\text{m}$ )

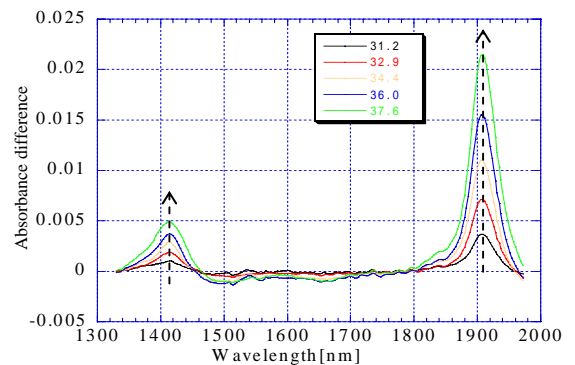


図5 30 $^{\circ}\text{C}$ を基準とした水の吸光度差スペクトル (光路長 100  $\mu\text{m}$ )

れている (図 5)。

#### 4.4. 厚さ 500 μm グルコース水溶液の測定結果

実験条件は純水の場合と同様であり、グルコース濃度を 5 mg/ml (水の体積分率 99.69%)とした。温度による吸光度変化は純水とほぼ同じ結果となり、1413 nm と 1487 nm の変化が大きかった。

#### 4.5. 厚さ 100 μm グルコース水溶液の測定結果

厚さ 100 μm の純水と同様、1900 nm の吸収バンドの温度依存性は明瞭に現れたが、吸収が弱い 1450 nm 付近の吸収バンドでは純水と異なり、温度依存性が認められなかった。

#### 4.6. 厚さ 500 μm エタノール水溶液の測定結果

工業的によく使用されるエタノール水溶液の温度推定も行った。実験方法は厚さ 500 μm の純水と同様であり、エタノール濃度はそれぞれ 100% 及び 80% である場合の吸光度スペクトルの測定を行った。図 6 は 30℃ のときのエタノール濃度が 100% と 80% での吸光度スペクトルを示す。100% のエタノールの吸収は弱く、水を入れることによって、80% のエタノール水溶液では、水の吸収により、1450 nm と 1900 nm 付近に吸収ピークが現れた。図 7 は 30.0℃ を基準とした吸光度差スペクトルを示し、2 つの吸収バンドの温度依存性も明確に現れている。

#### 4.7. 回帰分析結果

表 1 は単回帰分析による純水の校正結果である。SEC (校正標準誤差) は、全体として厚さ 500 μm の方が 100 μm よりも若干小さくなり、500 μm における波長 1413 nm の吸光度を用いた SEC が 0.07℃ と最も小さくなった。ただし、前述したように 500 μm と 100 μm では解析に用いた波長が異なるため単純な比較はできない。

表 2 はグルコース水溶液の校正結果である。厚さ 500 μm では、SEC は純水の値よりも僅かに大きくなっているが、100 μm では逆に小さくなっており、これらの実験だけでは、純水とグルコース水溶液で予測精度に有意差があるかは結論づけられなかった。

表 3 は厚さ 500 μm のエタノール水溶液の単回帰分析による校正結果である。SEC はそれぞれ 0.18 と 0.08 となった。この実験を通じ、純水の結果よりも若干精度が落ちるものの、生体以外の試料の温度測定が可能であることを示した。

### 5. 空間温度差の測定

試料の空間温度差を測定するために、温度差を生じさせた同一試料内の 2 点間 (直径Φ80μm 円領域が中心間隔 220 μm で 2 個。図 8) の吸光度スペクトルの測定を行った。実験方法としては、微細なニクロム線 (直径Φ0.05 mm) を図 9(a) のように石英フローセルの中を通し、石英セル内の純水を電気加熱ができるように工夫し、温度分布を形成させた。また、ニクロム線と加熱点との距離を測定するために、顕微鏡にマイクロメーター (10 ミリ 100 等分) を

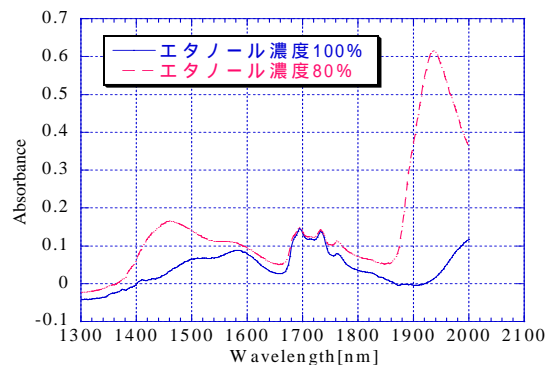


図6 エタノール濃度100%と80%の吸光度スペクトル (光路長500 μm, 温度30 )

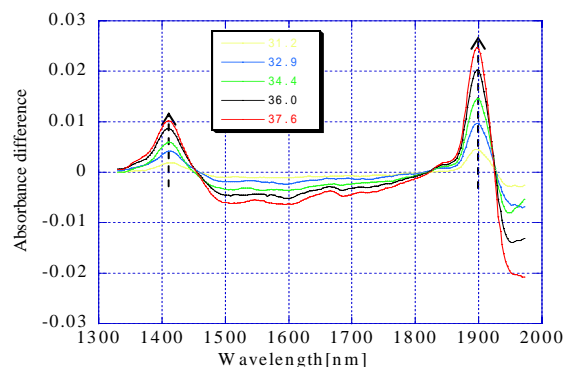


図7 30℃を基準としたエタノール濃度80%の吸光度差スペクトル

表 1 純水の単回帰分析による校正結果

厚さ [μm]	500		100	
波長 [nm]	1413.4	1487.1	1413.4	1905.8
要素数	4	4	5	5
回帰係数 [-]	330.1	-329.1	1650.7	357.9
SEC [ ]	0.07	0.17	0.15	0.28

表 2 グルコース水溶液の単回帰分析による校正結果

厚さ [μm]	500		100
波長 [nm]	1413.4	1487.1	1905.8
要素数	4	4	4
回帰係数 [-]	302.8	-366.1	437.6
SEC [ ]	0.20	0.27	0.12

表 3 エタノール水溶液の単回帰分析による校正結果

厚さ [μm]	500	
波長 [nm]	1410.4	1897.2
要素数	5	5
回帰係数 [-]	742.51	312.11
SEC [ ]	0.18	0.08

取り付けた。測定に際しては、2台の分光計を図8のような並列型2光路の光ファイバプローブで接続するなどの測定装置の改良を行った。また、この2台の分光計で、共通な測定波長範囲の1300nm~1600nmを分析に使用した。実験では、分光計1の露光時間は10ms、積算回数は100回を設定し、分光計2の露光時間は1ms、積算回数は1000回を設定した。また分光計1は測定点1と対応し、分光計2は測定点2と対応することを確認した。まず、図9(b)に示すように、石英フローセルをステージに置き、顕微鏡のステージを動かして、ニクロム線を測定点2の左側0.15mm離れたところに置く(図10)。サーモプレートの温度を32℃に設定し、温度が安定したら、純水を透過する光の強度をそれぞれ2台の分光計のリファレンス光とする。それからニクロム線を4秒間加熱させて(電圧は5V、電流は0.09A)、この際の純水の透過光の強度をサンプル光とした。

式(1)により、計算される吸光度差は図11のようになった。ニクロム線の位置を逆に測定点1の右側から0.1mm離れたところに置いて加熱した場合の吸光度差スペクトルを図12に示す。温度変化が大きい測定点(測定点2あるいは1)の吸光度スペクトルは、温度変化が小さい点よりも、その変化が大きくなり、温度差を測定できる可能性が示された。

## 6. 結言

吸光度が異なる水の近赤外光における2つの吸収バンドを、厚さによって選択的に使用することにより薄い水溶液の温度を非接触で測定できることを示した。温度測定精度には、通常の接触式温度計でも可能な0.1℃程度となった。外乱などを極力抑えて吸光度差が正確に測定された場合は、0.1℃よりも良い精度を得ることができると考えられる。

本実験でのグルコース濃度は、実際の生体と同程度の濃度レベルを設定したが、多種成分が含有する生体組織で測定を可能にするためには、今後、他の試料でも測定を行い、データを収集していく必要があると思われる。一方で、生体試料の測定のためには、温度以外の要素の影響をキャンセルできるような測定システムの工夫も必要といえる。

最後に、試料の空間温度差を測定することで、同一試料内での温度差を測定し、2次元的なイメージングの可能性も示された。

### 参考文献

- (1) 李・角田・山田, 日本機械学会年次大会講演論文集 7, 59-60, 2005.
- (2) Kakuta, Li, and Yamada, Proc. 27th Ann. Intl. Conf. IEEE EMBS, 2226, 2005.
- (3) 桃木・有本・角田・山田, 電気学会論文誌 C, 124 (9), 1725-1730, 2004.
- (4) 尾崎・河田: 「近赤外分光法」, 学会出版センター, 1996.

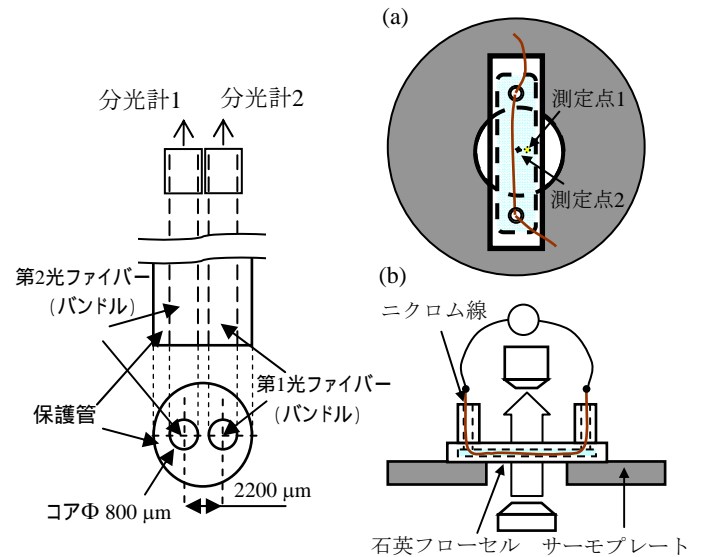


図8 並列型2光路の光ファイバプローブ

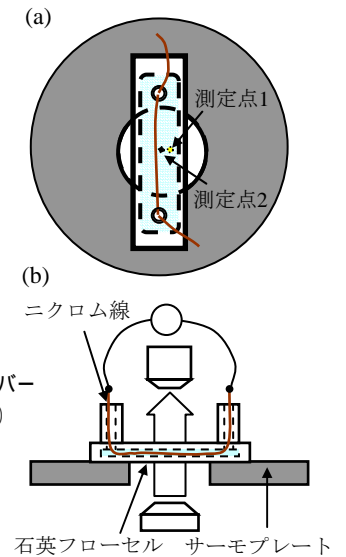


図9 ニクロム線による加熱の模式図

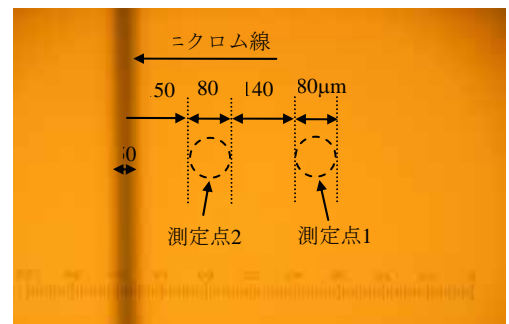


図10 顕微鏡観察図

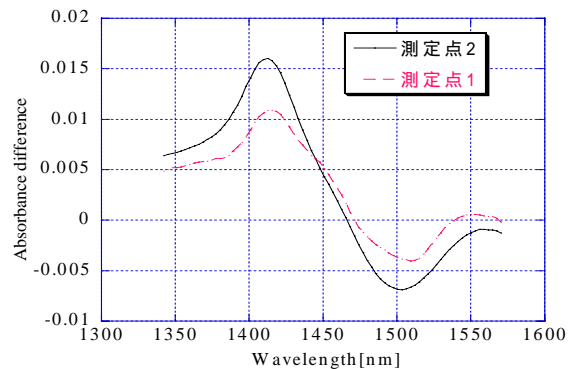


図11 測定点2の左側にニクロム熱がある場合の吸光度差スペクトル

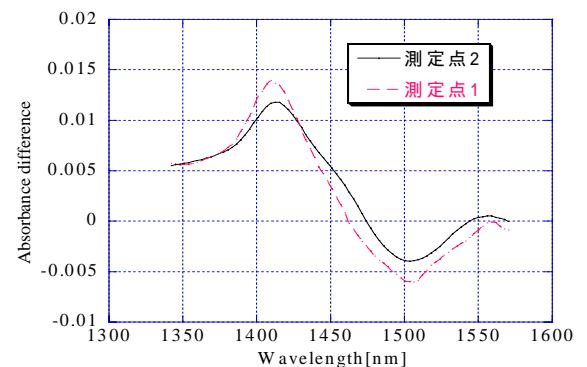


図12 測定点1の右側にニクロム熱がある場合の吸光度差スペクトル