

(様式5)

指導教員 承認印	主	副	副
	Ⓜ	Ⓜ	Ⓜ

学 位 （ 博 士 ） 論 文 要 旨

論文提出者	生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻 (博士課程) 平成 24 年度入学 氏名 佐伯 達也 Ⓜ				
主指導教員 氏 名	田中 剛	副指導教員 氏 名	竹山 春子	副指導教員 氏 名	
論文題目	広域一括撮像技術に基づく簡易・迅速な細胞検出システムの開発				
論文要旨 (2,000 字程度)					
<p>本研究では、簡易・迅速な細胞検出システムの構築を目的として、広域一括撮像により多数の細胞を同時並列に検出する技術の開発を行った。本手法は、従来の顕微鏡法と異なり、広域の自動撮像に電動ステージなどの外部装置を使わないこと、また、血球回収などのプロセスを光検出系に統合したシステムを提供できることから、普及に有利な簡易小型の細胞検出システムを実現するものである。</p> <p>高密度に配列したカラー検出素子を有する二次元フォトセンサである CMOS センサを利用し、そのセンサ表面近傍に配置した細胞に光照射する検出系を構築した。透過照明下でのイメージング実験において、センサ表面から細胞までの距離に依存して、得られる細胞由来光シグナルが変動することがわかった。まず、センサ表面から一定距離離れた細胞は、細胞における照射光の吸光に由来する黒色パターンとして認識される (シャドウイメージング方式)。一方で、センサ表面に最も近傍の細胞は、その細胞内部透過光に由来する白色パターンとして認識される (透過光検出方式)。この方式において、死細胞を選択的に染めるトリパンブルー染色を行った細胞懸濁液に対するイメージングを行ったところ、細胞の色情報を判別可能であった。これより、透過光検出方式が生死判別などの細胞計測に応用可能であることが示された。また、同じくセンサ表面近傍に細胞を配置した条件では、細胞表面抗原に対する免疫染色に基づき、一細胞レベルの化学発光シグナルが検出可能であった。</p> <p>ディッシュやフラスコといった容器内で接着培養中の細胞集団に対しては、細胞の剥離回収を経ずにその挙動を解析できることが望ましい。さらに、移植用幹細胞培養過程での品質検査の効率化を目的とした場合、より広い領域を迅速に計測可能であることが求められる。そこで、ライン型フォトセンサを用いた広域一括透過光検出系を構築した。ラインセンサによる走査平面に対して平行に光入射することで、細胞培養面全体の透過光を一括検出可能となることが示された。このとき、光源を点光源とすることで、センサから離れた位置の細胞に由来する散乱光シグナルの取得が可能であった。構築した広域一括透過光検出系を用いて、直径 35 mm 培養ディッシュ上で培養中の HeLa 細胞のモニタリングを行ったところ、その増殖過程をコンフルエンスを指標として追跡することが可能であった。このように、ライン型フォトセンサを用いることで、</p>					

計測領域を飛躍的に拡張し、培養ディッシュ全面の接着培養細胞からシグナルを取得可能となることが示された。

浮遊細胞懸濁液の計測を想定した場合、二次元フォトセンサにより迅速に細胞を検出するためには、細胞を効率的に二次元フォトセンサ上に配置する機構が必要となる。さらに、細胞-センサ間距離に依存して、センサで検出される一細胞由来シグナルが変動することがわかっている。そこで、細胞吸引捕捉機構「マイクロキャビティアレイ」を統合した二次元フォトセンサを用いたセルカウントシステムの構築を行った。マイクロキャビティアレイを利用することで、低濃度の細胞懸濁液中から少量の細胞を効率的にCMOSセンサ上へ捕捉回収することが可能となった。また、捕捉細胞からCMOSセンサ表面までの距離を均一に制御することで、個々の細胞から均一な黒色パターンを取得可能となった。細胞アレイ領域  $30\text{ mm}^2$  全域に対する広域一括撮像により、非常に低濃度なサンプル ( $2.5 \times 10^1$  cells/ml) からのセルカウントを数分以内で実施することが可能であった。さらに、平面状にアレイ化した血球集団に対して、特定の表面抗原を蛍光標識した後に、集団全体に対する広域一括蛍光検出を行うことで、簡易・迅速な血球解析システムが構築可能であると考えられた。そこで、実際に後天性免疫不全症候群の治療開始判断指標として用いられるCD4/CD8 比の計測システムの構築を行った。マイクロキャビティアレイ上  $64\text{ mm}^2$  のアレイ全域の細胞を二次元フォトセンサにより 2 s で一括撮像可能となった。さらに、微量全血中に含まれる白血球をアレイ上に回収し、Tリンパ球のCD4/CD8 比をデュアルカラーイメージングに基づき計測可能であった。

本研究では、二次元フォトセンサ表面近傍に配置した細胞を検出する手法の光学シグナル特性を明らかにした。その成果として、細胞集団全体を対象とした広域一括撮像により、細胞由来の各種光シグナル（透過光、化学発光、蛍光）を一細胞ごとに分離して同時多並列に検出できる技術を得た。また、シグナル取得のための構成や撮像条件の検討により、撮像領域の拡大や浮遊細胞回収技術との適合が可能であった。これにより、簡易セルカウンター、細胞生存率アッセイ、血球解析装置、幹細胞増殖追跡評価装置への適用が可能であることが示唆された。本技術に基づく細胞集団解析プロセスの簡易化・迅速化には、細胞検査にかかる物的・人的コストを低減し、感染症治療の普及や先端医療の産業化を促進する波及効果が期待される。以上のことから、本研究で得られた知見は、オンサイト利用可能な簡易・小型細胞解析装置の提供を通じて、万人への医療普及という理念の実現に貢献するものであり、学術的・社会的に意義のあるものである。