

(様式11)

論文審査の要旨（課程博士）

生物システム応用科学府長 殿

審査委員 主査 田中 剛 (印)

副査 竹山 春子 (印)

副査 宮浦 千里 (印)

副査 中村 史 (印)

副査 吉野 知子 (印)

学位申請者	平成_24_年度入学 学籍番号_12702103_ 氏名 佐伯 達也
申請学位	博士(生命科学)
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

論文審査要旨 (2,000字程度 or 500words)

本論文では、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ている。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。

第2章では、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ている。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を明らかとした。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散乱減衰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。

第2章ではさらに、より広い領域を迅速に計測可能とすることを目指し、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ている。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、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。

第 3 章では、浮遊細胞懸濁液の計測を想定して、細胞を効率的に二次元フォトセンサ上に配置し、迅速に検出することを目指し、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ている。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 mm² 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 × 10⁴ 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。

さらに第 4 章では、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ことを実証した。具体的には、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 mm² 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。

本論文は、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ものである。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。