

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 11480 号
------	---------------

氏 名 劉 恒君

論 文 題 目

Fluorescence-based Multi Responsive Micro-sensor for Local
Single Cell Analysis
(局所細胞計測のためのマルチ蛍光センサ)

論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	新井 史人
委員	名古屋大学	教授	長谷川 泰久
委員	名古屋大学	教授	福澤 健二
委員	名古屋大学	准教授	丸山 央峰
委員	名古屋大学	准教授	加地 範匡

論文審査の結果の要旨

劉 恒君君提出の論文「Fluorescence-based Multi Responsive Micro-sensor for Local Single Cell Analysis (局所細胞計測のためのマルチ蛍光センサ)」は、細胞解析における複数の生理環境を計測するための蛍光センサに関する研究であり、複数の生理環境計測時の蛍光の干渉を防ぐための蛍光センサのデザイン、及び複数の計測信号を用いた計測結果の補正法、及び蛍光センサの選択的・高速細胞導入法の提案及び評価を行うと共に、応用例の一つとして単一インフルエンザウイルスが感染した特定細胞の生理状態変化計測について述べている。各章の概要は以下の通りである。

第1章では、本博士論文の学術的背景及び関連する従来技術、本論文の目的及び概要について述べている。単一細胞解析におけるpHや温度などの複数の生理環境計測の重要性について説明した後、従来のセンサ技術と、本論文で用いた生理環境計測に適した蛍光物質の蛍光強度の環境依存性を利用した蛍光計測法の特徴、センサビーズ及びセンサピラー、及び細胞内導入等の関連技術について述べ、最後に研究目的及び論文の構成について述べている。

第2章では、pHと温度の2つの生理環境を対象として、ポリマービーズに蛍光物質を導入した蛍光センサビーズについて述べている。温度感受性を有するRhodamine B(蛍光波長: 590 nm)をセンサ内部に導入し、pH及び温度感受性を有するFITC(蛍光波長: 515 nm)をビーズ表面に修飾し、それぞれの蛍光物質をセンサの異なる場所に配置することで、蛍光の干渉を防止する構造となっており、Rhodamine Bで得られた温度情報を用いて、FITCによるpH計測の補正を行うように設計されている。作製された蛍光センサビーズを用いて温度及びpHを変化させた環境で評価した結果、設定温度と計測温度の差が $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、設定pHと計測したpHの差が温度補正を行うことで ± 0.2 に低減することに成功している。以上のことから、複数の生理環境を単一の蛍光センサビーズを用いて計測するための蛍光物質の干渉を抑制するセンサの構造設計、センサの計測結果の補正法について有用な知見が得られている。

第3章では、第2章で作製した蛍光センサビーズを用いて、インフルエンザウイルスに感染した細胞のウイルス増殖に伴う温度及びpHの変化を細胞膜上で計測を行っている。計測対象の細胞は、インフルエンザウイルスの増殖の解析においてモデル細胞として用いられる犬の腎臓細胞(MDCK細胞)を用いて行った。1個のウイルスが感染した細胞膜表面に蛍光センサビーズを固定し、感染後の細胞膜上での蛍光ビーズの蛍光強度と、細胞培養シャーレのガラス上の細胞の存在しない場所に固定した蛍光ビーズの蛍光強度の経時変化を比較することで、ウイルス感染細胞の細胞膜上での生理環境変化を計測している。感染細胞と非感染細胞で比較した結果、ウイルス感染細胞では感染後2時間30分ほどからpHの低下と温度の上昇が生じ、そのpH低下は約0.56、温度上昇は約 4.2°C であった。従来技術ではウイルス感染細胞の生理状態変化を単一細胞レベルで計測することは困難であったが、ウイルスの増殖過程における細胞の生理状態解析における重要な知見を得ているとともに、マイクロ・ナノ工学技術を用いた単一細胞解析における有用な知見が得られている。

第4章では、特定の細胞内に蛍光センサビーズを低侵襲かつ選択的・高速に導入するための細胞膜上での振動刺激を利用した蛍光センサビーズの細胞導入法について述べている。従来はエンドサイトーシスやリポフェクション等の細胞活性を利用することで低侵襲な細胞導入が行われていたが、導入には数時間を要していた。本提案手法は、直径 $1\ \mu\text{m}$ の蛍光センサビーズの表面を、フォトクロミック材料のスピロピランを導入したアニオン型リポソームでコートしている。スピロピラン導入リポソームは紫外光の照射により表面電位が増加しリポソームがカチオン型となることで、負の表面電位の細胞膜への選択的固定を制御できる。加えて細胞膜上に固定した蛍光センサビーズに対して、光ピンセットで振幅 $4\ \mu\text{m}$ で1 Hzの振動を印加することで、振動無しでは3時間要していたのが30分で導入(成功率: 80%)できることが確認された。また、 $5\ \mu\text{m}$ 程度離れた場所に設置されたビーズにおいても、振動を印加したビーズのみが細胞内に短時間で導入されることが確認された。これは、蛍光センサビーズの細胞膜への選択的固定と、マイクロマニピュレーション技術を用いて短時間で細胞内に導入する新しい手法であり、細胞内計測において有用な知見が得られている。

第5章では、マイクロ流体チップ内における、細胞と環境の相互作用を解析するための蛍光センサとして、複数の異なるサイズのマイクロピラー型の蛍光センサについて述べている。骨芽細胞を活性化させる働きがあるオクタリン酸カルシウム(OCF)と骨芽細胞間の相互作用におけるOCF-細胞間のカルシウムイオン濃度、pH、温度の計測を目的として、マイクロ流体チップ内の細胞エリアとOCFエリアの間に複数の異なるサイズの蛍光センサピラーを作製している。サイズごとに温度計測用の量子ドット、pH計測用のFITC、カルシウム濃度計測用のFluo-3が導入されており、蛍光計測時の干渉が防止されている。それらの蛍光波長は同じ波長域であり、同じ蛍光波長のセンサを用いることで、複数の生理環境の同時計測が可能である。また、計測パラメータ数は

論文審査の結果の要旨

センサピラーの形状設計により増やすことが可能である。蛍光センサピラーを配置したマイクロ流体チップにおいて、OCPがリン酸に転換する際に生じるカルシウムイオン濃度、pH、温度の経時変化の同時計測に成功した。細胞と環境の相互作用時の環境計測法としての有効性が示されており、細胞-環境間相互作用解析手法に関する有用な知見である。

第6章では、本研究の結論を与えている。

以上のように本論文では、細胞解析時に必要となる、細胞内外の複数の生理環境計測に適した蛍光センサの干渉を防ぐデザイン、計測精度を向上させる補正方法、蛍光センサの細胞内への選択的・高速導入法を提案・評価し、その応用例として、インフルエンザ感染細胞の細胞膜上でのpH及び温度の計測を実現した。これらの評価方法並びに得られた結果は、単一細胞解析への応用を実現するために重要であり、工学の発展に寄与するところが大きいと判断できる。よって、本論文の提出者である劉恒君君は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格があると判断した。