

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 13166 号
------	---------------

氏 名 Hairulazwan Bin Hashim

論文題目

Measurement System of Cellular Environment Using Fluorescence
Microsensor
(蛍光マイクロセンサを用いた細胞環境の測定システム)

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	松本 健郎
委員	名古屋大学	准教授	丸山 央峰

論文審査の結果の要旨

Hairulazwan Bin Hashim君によって提出された論文「Measurement System of Cellular Environment Using Fluorescence Microsensor (蛍光マイクロセンサを用いた細胞環境の測定システム)」は、細胞内外における温度等の細胞環境の測定を目的とし、1) 環境応答性の蛍光色素を導入した蛍光マイクロセンサの微細操作技術を用いた細胞導入、2) 蛍光マイクロセンサを用いた細胞環境の長期計測のための蛍光退色補償、について説明している。

第1章では、本論文の背景である単一細胞解析の重要性、単一細胞解析における要素技術の従来研究、及び本論文の目的が示されている。単一細胞解析において非接触計測が可能な蛍光マイクロセンサの有用性ととも、センサの操作、細胞導入、及びセンサを用いた細胞環境計測の重要性を示している。マイクロ粒子の微細操作や細胞導入の従来研究及びそれらの課題を明らかにし、最後に本論文の目的及び構成を示している。

第2章では、マイクロマニピュレータを用いた金属ナノ粒子を含んだ蛍光マイクロセンサの操作と、レーザ加熱によるセンサの細胞導入について示している。直径20 nm ~ 40 nmの酸化鉄ナノ粒子を内包した直径750 nmのポリスチレンビーズを温度感受性蛍光色素のRhodamine Bで染色することで蛍光マイクロセンサを作製した。紫外光照射による光異性化でゼータ電位が上昇するフォトクロミック材料である1,3,3-trimethylindolino-6'-nitrobenzopyrylospiranを混合したリン脂質のDOPCで蛍光マイクロセンサをコーティングした(膜厚: 約170 nm)。作製した蛍光マイクロセンサの蛍光強度と温度の関係を校正した。蛍光マイクロセンサの操作は、水中で負に帯電しているガラスプローブをマイクロマニピュレータで操作し、プローブ先端に紫外光照射により正に帯電したセンサを静電力で付着させることで行った(成功率: 75%)。目的の細胞(犬の腎臓細胞: MDCK細胞)への搬送後、細胞上でセンサを固定後(成功率: 64%)、センサに28 mW、1064 nmのレーザを照射することでセンサを細胞室内へ導入した(成功率: 80%)。また、センサを導入した細胞の生存率を蛍光色素Calcein-AMを用いて評価した結果、生存率は100%であり、本章で提案したマイクロマニピュレータによる操作とレーザ加熱による細胞導入の有効性が示されている。

第3章では、1064 nmのレーザによる蛍光マイクロセンサと808 nmのレーザによるセンサの波長選択的加熱を用いた細胞導入法について説明している。直径1 μ mのポリスチレンビーズを、温度感受性蛍光色素のRhodamine Bと808 nmの波長を選択的に吸収する色素FDN-002で染色し、蛍光マイクロセンサを作製した。作製した蛍光マイクロセンサの蛍光強度と温度の校正を行うとともに1064 nmのレーザによる光ピンセットでセンサを捕捉した状態で、808 nmのレーザで加熱しセンサの加熱特性を評価した結果、40 mWで10秒の加熱によりセンサの温度が15°C上昇した。蛍光マイクロセンサを1064 nmのレーザによる光ピンセットで操作し、対象の細胞(MDCK細胞)の細胞膜上へ搬送後、808 nmのレーザ(40 mW)により10秒加熱した結果、70%の細胞においてセンサの細胞質内への導入を確認した。また、センサを導入した細胞の生存率は蛍光色素Calcein-AMにより確認されており、本章で提案した複数の波長のレーザを用いた蛍光マイクロセンサの細胞導入の有効性が示されている。

第4章では、ハイドロゲルを用いた蛍光マイクロセンサを提案し、ハイドロゲル中での蛍光色素の拡散により生じる蛍光回復を用いて、長期間安定な温度計測について説明している。ハイドロゲル材料として、親水性光硬化性樹脂のPolyethylene glycol diacrylate 575 (PEG-DA 575)の水溶液を用いた。温度感受性蛍光色素のRhodamine B及び光開始剤のOmnirad 1173をPEG-DA 575溶液と混合し、ミネラルオイル中で攪拌し紫外光で重合させることでハイドロゲル製の蛍光マイクロセンサを作製した。20倍の対物レンズ(焦点深度: 4.7 μ m)での観察下において、PEG-DA575の濃度、励起のインターバル時間、Omnirad 1173の濃度、センササイズと蛍光回復による光退色補償の関係を評価した結果、PEG-DA575濃度9%、励起インターバル9秒、センササイズ10 μ m以上の条件では、900回の励起後の蛍光強度低下が3%未満となった。また、温度制御機能付きマイクロチャンバ内で36°C~40°Cの間で温度を変化させ、チャンバ内の熱電対と蛍光マイクロセンサでの温度計測結果を比較した結果、270回の計測(5,400秒、励起1秒、インターバル19秒)において、熱電対と蛍光マイクロセンサの計測結果の差の最大値と標準偏差はそれぞれ0.8°Cと0.3°Cであった。以上の結果より、本章で提案した蛍光回復を用いた蛍光マイクロセンサの光退色補償による長期温度計測の有効性が示されている。

第5章では、本論文の結論と今後の課題を示している。

以上のように、本論文では、単一細胞環境の非接触計測が可能な蛍光マイクロセンサに対して、1) 光ゼータ電位制御を用いた蛍光マイクロセンサのガラスプローブによる搬送とレーザ加熱による細胞導入、2) 複数の波長のレーザを用いた蛍光マイクロセンサの操作と加熱による細胞導入、及び3) ハイドロゲル製蛍光マイクロセンサにおける蛍光回復を用いた光退色補償に関する操作・計測手法が提案され、それらの有効性が実験的に実証されている。これらの蛍光マイクロセンサによる細胞環境計測手法は、ウイルス感染細胞内の温度、pH、酸素濃度等の計測に応用可能で、ウイルス増殖メカニズムの解明など、今後広く応用が期待され、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Hairulazwan Bin Hashim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。