

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 高橋一憲

本論文は、微細加工技術を生物学研究に応用することで、従来存在していなかった一連の 1 細胞レベルセロミクス計測のための要素技術を開発した研究に関して報告したものである。本論文では、一般の細胞が外部環境の変化に対して応答し適応や分化などの独特の現象を起こすとき、この変化がゲノム情報だけで説明できるものではなく、むしろ後天的な外部環境との相互作用の履歴を反映するものであることに着目し、細胞間での情報のやりとりを、従来の生物学的アプローチではなく、構成的に精製した細胞を組み合わせることで、細胞集団の持つコミュニティーエフェクト等の後天的情報の解明を目指している。

本論文の第 1 章では、本研究に至った背景を述べるとともに、上記、新しい構成的 1 細胞レベル細胞情報計測技術「オンチップ・セロミクス計測技術」の概念と、そのために必要な要素技術を説明している。この中で、開発に必要な要素技術は、大別して、以下の 3 つの要素技術となることが述べられている。すなわち、培養するための細胞を精製するオンチップセルソーター技術、精製された細胞の環境、細胞集団のサイズ・ネットワーク形状を制御しながら培養するオンチップ細胞培養技術、そして培養している細胞内の発現情報を細胞単位で計測することが可能なオンチップ発現解析技術である。そして、本論文では、特に、上記の技術について、その成果が報告されていることが述べられている。

第 2 章では、本研究全般で用いられたマイクロ加工技術について、その技術の位置付けと、本研究で用いられた手法の詳細な説明がなされている。特に、本研究において論文提出者が最適条件を見出し確立したシリコン系高分子ポリマー(PDMS)の表面を酸素プラズマによって活性化し、ガラス基板表面上のシラノール基とシランカップリングさせる技術の開発は、このPDMSを用いたマイクロ流路での液漏れを防ぐためには必須の技術である。

第 3 章では、第 2 章で述べたPDMSを用いたセルソーターシステムの開発について報告されている。これは従来のセルソーターとは異なる、細胞培養のための細胞精製技術との位置付けであり、そのための細胞に損傷を最小限に抑える独自のプロトコルなど様々な工夫が凝らされている。本システムで開発した技術は、PDMSを用いたチップの開発のみならず、このチップ内のマイクロ流路を流れる細胞の微細構造を位相差/蛍光像として同時に高速カメラで取得するための自作光学系の開発、および、毎秒200コマの高速カメラで取得した画像データをリアルタイムで解析する画像処理ソフトウェアの開発および画像解析結果に基づくリアルタイムフィードバックによるチップ内細胞のソーティング技術の開発までの多岐に渡っている。これは、従来のマイクロ加工技術者の技術開発の範囲を超えており、実際にマイクロ加工技術をバイオ計測に応用するために、マイクロ加工技術のみならず光学

系の自作技術、ソフトウェアの開発技術などを有機的に結び付けてシステムとして完成させたものであり、高い技術力と独自性を示すものである。また、特に、本論文で検討されている、ゲル電極のマイクロチップ電極としての利用は、定量的結果の評価を含めて、マイクロチップ分野では初めての試みである。さらに、本システムの細胞精製プロセスが与える細胞への影響についても、細胞精製後の培養実験から、細胞への損傷は識別不能なほど小さいことが報告されている。以上の結果より、本セルソーティングシステムの開発に成功したことが結論付けられている。

第4章では、マイクロ加工技術を用いた運動性細胞培養技術に関する報告がなされている。ここでは、PDMSの柔軟性を利用して、これでバルブ構造をマイクロ流路中に2点作成することで、このバルブに挟まれた領域を、細胞培養領域（マイクロチャンバ）としている。本技術で特筆すべきことは、このバルブ構造の駆動に空気溜めに導入する空気の圧力を陽圧あるいは陰圧にすることで、自在にバルブ部分の隙間の幅を調節し、これによってマイクロチャンバ内の細胞の出入りを調節することができる技術を確立したことである。また、このとき、バルブの配置を工夫することによって、顕微鏡観察によって、直接バルブの開閉の程度をフィードバック制御することが可能となっていることも特徴である。以上の結果より、マイクロ流路中に開閉の程度を光学的にフィードバックできる複数のバルブを容易に導入することが可能となる基礎技術を確立することができたと結論付けている。

第5章では、マイクロ加工技術によって作成したマイクロ構造物と、電極アレイを組み合わせることで、神経細胞ネットワークの構成的配置を行う技術に関する報告がなされている。ここでは、肉厚数 $\mu\text{m}$ から数十 $\mu\text{m}$ の光硬化性フォトレジストを立体構造として用い、さらにその表面にシリコンをスパッタリングすることで、半透膜をマイクロ構造物の上に蓋となるように固定することを可能としている。これによって、大腸菌などの不純物が混入しない状態で、長期にわたって神経細胞ネットワークの形状を維持することが可能となっている。また、このチップ上の神経細胞の発火を計測するための計測システムについても試作を行っている。以上の結果より、新たに細胞を培養しているマイクロ構造体上に半透膜の蓋をすることで長期に細胞を培養する技術についても基礎技術の検討ができたことと結論付けている。

第6章では、上記開発した要素技術のオンチップ・セラミクス計測技術における位置づけと、今後の研究展開について述べられている。

いずれの技術も半導体微細加工で利用されてきた技術を独自の研究によってバイオ用に最適化し、1細胞単位でスクリーニングすることに初めて成功したものである。特に、開発した要素技術のうち、オンチップセルソーティングシステムおよびオンチップマイクロ培養はすでに原理実験を終えており、実用化に向けた展開がすでに開始されている。このこと自体が、その研究水準の高さを示すものと考えられる。

したがって本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。