

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 徳山 孝仁

細胞応答を計測することにより、生物活性を持った物質を評価するシステムであるバイオアッセイは幅広い分野で用いられている。近年では少細胞数でのアッセイや迅速高効率なアッセイなどが求められているが、従来のウェルを用いたアッセイではこれらのニーズに対応するには限界があった。本論文はマイクロ空間を利用することにより、これらのニーズを満たす新しいシステムが完成するとの考えに基づいた、新規マイクロバイオアッセイシステムの開発に関する研究をまとめたもので、6章からなっている。

第1章の緒言では、現在のバイオアッセイに要求されている点や問題点を明らかにし、その解決策として細胞を用いたバイオアッセイを行う空間をマイクロ化することが提案されている。またマイクロシステム化する上で必要な要素を検討し、細胞の保持および細胞の発したシグナルの評価系をマイクロチップ上に構築することによるマイクロバイオアッセイシステムの開発という指針を打ち出している。

第2章では、バイオアッセイを行う上で、検出系も含めたマイクロチップシステムに要求される性能を検討し、基本的なマイクロチップシステムの構築を行った。ここではマイクロチップ基材や造形、検出システムなどについて検討を行い、PDMSを基材とした柔軟な設計が可能な、マイクロフルイディクスチップを得た。また検出システムとして空間分解能が高く、高感度検出を行うことのできる蛍光顕微鏡を採用し、検出器として波長分解機能をもつ冷却 CCD 検出器を接続して使用した。これにより直接観察と放出物測定をシームレスに行うことのできる、マイクロチップシステムの構築を行っている。

第3章では、細胞を用いたバイオアッセイを行う上で基本となるマイクロチップ上への細胞保持法として、濾過膜を用いた新たなシステムを開発した。濾過膜をチップ層間に挟み込むことにより、フィルタリングにより細胞を流路上に保持するものである。これによって接着のための前培養を必要とせず、浮遊細胞も保持可能な細胞保持機構が構築できた。細胞の観察のために透明なスポンジ状濾過膜である Omnipore を用いて白血病細胞 HL-60(浮遊細胞)の保持を行った結果、細胞の濾過面積と流速を調整することにより、少なくとも数万以下の細胞を数時間に渡って生存したまま保持することに成功した。

第4章では、前章で構築した細胞保持機構に加え、評価系を集積することによりバイオアッセイシステムをマイクロチップ上に構築した。評価系には直接観察による評価と放出物測定があると考え、それぞれ Calcein-AM と Ethidium homodimer による生死細胞染色、レサズリンを用いた生存活性測定を行うことのできるバイオアッセイシステムを構築した。生死細胞染色においては、必要量の染色液を導入するだけで染色液と培地を連続的に交換できる染色システムの構築に成功し、染色された細胞を良好に観察することができた。生存活性測定においては流路上で蛍光測定を行い、細胞の数に応じた生存活性を測定するこ

とに成功した。得られたデータは従来型アッセイでは不可能であった、測定開始直後から拡散の影響をほぼ受けない経時測定値として得ることができた。少細胞数(500 cells)使用時においてはアッセイ時間が十数時間から操作に必要な時間のみ(数十秒)へと数千分の一に短縮された。さらにこれらを基本的なバイオアッセイである毒性試験へ応用し、複合的な評価を行うことができる毒性試験マイクロチップを開発した。

第5章では、より汎用的な利用が可能となるよう、化学反応を集積し、蛍光を持たない一般の放出物を蛍光誘導体化することにより高感度検出が行えるマイクロバイオアッセイシステムを開発している。ここではモデルとしてヒスタミン遊離試験をチップ上に集積し、チップ内に保持された初代肥満細胞が刺激を受けることにより放出するヒスタミンを、チップ上で蛍光誘導体化することによって検出を行うアッセイシステムを構築した。従来法に比べ使用細胞数は約 1/1000 に、アッセイ時間は 1/2 に短縮され、マイクロチップ化によって大幅な効率化を達成できた。また生物反応部は下流の化学反応部の影響を受けないため、従来では不可能であった反応開始直後からヒスタミン遊離の経時測定が可能となった。

第6章では、本研究のまとめと今後の展望が述べられている。

以上本論文は、従来型の細胞を用いたバイオアッセイでは限界のあった、少数の細胞を用いた、迅速高効率なアッセイを目指し、新規マイクロバイオアッセイシステムを開発したものであり、学術上、および実用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。