

氏 名	むなか たつや 務 中 達 也
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 4 3 8 号
学位授与の日付	平成 18 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	Development of a Cellular Analysis System Based on a Microfluidic Device (マイクロ流体デバイスを用いた細胞機能解析システムの開発) (主査)
審 査 委 員	教授 村上 章 教授 遠藤泰久 教授 田嶋邦彦

論文内容の要旨

遺伝子の塩基配列情報が明らかにされ、プロテオームならびにセローム解析が極めて重要な課題になってきている。これらの解析の研究成果は様々な疾患の態様解明ならびに創薬・新治療法の開発に有効であると期待されている。しかし、特定の遺伝子の発現が細胞系に与える影響を解析する手法、特に経時的に解析する手法の研究はあまり進んでいない。一方、近年 μ TAS (micro total analysis systems) と呼ばれる微小空間における分析システムの開発が盛んに行われており、この技術を適用したマイクロ流体デバイスを用いることで、微量しか得ることのできない生体サンプルの測定、並列化によるハイスループット分析、多数の細胞の平均値ではない細胞個々の機能解析等が可能となると期待されている。

本論文では、数 10 個から数 100 個程度の少数細胞の微小空間における振舞いについて解析することが可能な、新しい細胞機能解析システムの開発を行った。具体的には、マイクロ流体デバイスを用いることにより、(1)微小空間における初代培養細胞を含む少数細胞の培養、(2)刺激物質を含む微量流体の導入による細胞刺激、(3)刺激された少数細胞の産生物質の時間分解蛍光偏光解消法による経時的検出、が可能であることを示し、システムを完成させている。

Chapter 1 では、本システムを用いた微小培養室内での細胞培養ならびに微量刺激物質に対する細胞応答の経時的検出について述べている。具体的には、マイクロ流体デバイス中の微小培養室(240nL)で細胞培養が可能なることを、ラットマスト細胞を用いて示している。続いて、刺激物質を含む微量流体の導入によるマスト細胞の顆粒放出現象を経時的検出を行った結果、微量流体導入口に近い細胞の顆粒放出が早く開始されることが判り、本システムによる刺激物質を含む微量流体による刺激が、対流の影響を受けずに主に拡散によって行われていることを明らかにしている。このことは、実際の組織における細胞周辺環境を模擬していると考えられ、拡散によるシグナル伝達物質の伝播現象の再現や、細胞個々の機能解析への応用可能性が示された。

Chapter 2 では、本システムを用いた時間分解蛍光偏光解消法による少数細胞の産生物質の経時的検出について述べている。具体的には、細胞がサイトカイン類や抗体等のタンパク質を産生する現象のモデルとして、ハイブリドーマ細胞が抗体を産生する系を選び、血清等から発生する短寿命の夾雑蛍光の影響を除去し、かつ産生抗体量を定量するために、時間分解蛍光偏光解消法

を採用している。この手法を新規に構築した高感度顕微蛍光検出システムを用いて検証した。結果、50-100nsec の領域における時間分解蛍光異方性の測定により IgG 濃度の定量が可能であることを明らかにするとともに、IgG の最少検出量 24 fmol を達成している。以上のことから、少数細胞から産生される微量可溶性物質の経時的検出が本システムにより可能であること、並びに細胞－タンパク質間相互作用等の細胞機能解析への本システムの応用可能性を明らかにしている。

Chapter 3 では、本システムを用いた微小空間における血球細胞の初代培養ならびに微量刺激物質に対する初代培養細胞産生物質の経時的検出について述べている。具体的には、ヒト末梢血から採取したリンパ球をモデル細胞として、微小培養室での初代培養が可能であることを実証している。微量刺激物質の導入については **Chapter 1**、産生抗体の経時的検出については **Chapter 2** で示した手法を用いている。これらの結果は、生体等から採取した少数細胞に対する適用可能性と、少数細胞の刺激応答による産生物質の経時的解析が可能であることを明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

申請者は、ポストゲノムプロジェクトの重要課題のひとつである、遺伝子発現と細胞機能発現との相関を明らかにするための、新規システムの開発に取り組んでいる。とりわけ極少数しか入手できないような細胞の機能を解析することが今後の細胞を用いた病気診断・病気治療法開発に重要であると考え本研究を遂行している。微少数細胞の培養には従来法が適用できず、新たなシステム開発が必要である。そこで申請者は新しいシステムに近年進展の目覚ましい μ TAS (micro total analysis systems) と呼ばれる微小加工技術に基づいて開発されたマイクロ流体デバイスを採用している。240nL 程度の微小空間を有するこのデバイスを利用し、本論文では、少数細胞の微小空間における振舞いについて解析することが可能な、新しい細胞機能解析システムを開発している。本論文では数 10 個から数 100 個程度の細胞を効果的に培養するシステムの構築を行い、そのシステムを用いて細胞機能解析が可能であることを実証している。その際、少数細胞の産生物質の経時的検出に時間分解蛍光偏光解消法を採用し、高感度検出ならびに検出操作の簡略化にも成功している。微小空間での細胞培養とその機能解析システムは、実際の組織における細胞周辺の環境を模擬していると考えられ、シグナル伝達物質の伝播現象の再現や、細胞個々の機能解析への応用可能性を示唆している。このようなシステムは、今後より重要になってくる幹細胞研究にも多大な貢献をするものと評価できる。極めてシンプルに構築されたこのシステムは、今後、産業界への貢献も期待できる。

本論文は、審査を経て掲載された、いずれも申請者が筆頭著者である以下の 2 編の論文と投稿準備中の 1 編の論文をもとに構成されている。

(1) Tatsuya Munaka, Hirohisa Abe, Masaki Kanai, Takashi Sakamoto, Hiroaki Nakanishi, Tetsuji Yamaoka, Shuichi Shoji and Akira Murakami. “Real-time monitoring of antibody secretion from hybridomas on a microchip by time-resolved luminescence anisotropy analysis” *Analytical Biochemistry*, 353, 1-6 (2006)

(2) Tatsuya Munaka, Hirohisa Abe, Masaki Kanai, Takashi Sakamoto, Hiroaki Nakanishi, Tetsuji Yamaoka, Shuichi Shoji and Akira Murakami. “Monitoring cellular events in living mast cells stimulated with an extremely small amount of fluid on a microchip” *Japanese Journal*

of Applied Physics, 45(24), L634-L637. (2006)

(3) Tatsuya Munaka, Hirohisa Abe, Masaki Kanai, Takashi Sakamoto, Hiroaki Nakanishi, Shuichi Shoji, Shinya Kimura, Taira Maekawa and Akira Murakami. “Real-time monitoring of antibody secretion from B-cells on a microchip stimulated with a small amount of the mitogen” to be submitted.

さらに以下に示した国際会議においても発表され、その内容は高い評価を受けている。

(4) Tatsuya Munaka, Masaki Kanai, Hirohisa Abe, Yoichi Fujiyama, Takashi Sakamoto, Atsushi Mahara, Asako Yamayoshi, Hiroaki Nakanishi, Shuichi Shoji and Akira Murakami “In situ cell monitoring on a microchip using time-resolved fluorescence anisotropy analysis”
Proceedings of μ TAS 2003. 1th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems, 1, 283-286. (2003)

以上、本論文は μ TAS に基づく新規の分析デバイスの開発と従来達成が困難であった微小環境における細胞培養を達成しており、学術的価値が高いことを各審査委員が認めた。