

論文審査の結果の要旨

氏名 近藤 栄太郎

本論文は5章からなり、1章では研究全体の概要、2章では簡便な細胞培養用マイクロ流体デバイスの開発について、3章ではマイクロ流体デバイスをもちいた接着細胞の凍結保存法の開発について述べている。4章では開発した凍結保存法をもちいた **Ready-to-Use** な細胞試験マイクロ流体デバイスの実証実験について記述している。最後に5章で研究全体を総括している。

第2章では、これまでに報告されている細胞培養用マイクロ流体デバイスが複雑であり、生物系の研究者に広がっていないという問題に対して、小型で簡便なマイクロ流体デバイスのコンセプトを提唱し実際に開発した。重力によるかん流を行える **35mm** の細胞培養皿に収まるマイクロ流体デバイスを考案し、作製した。作製したマイクロ流体デバイスを用いて、細胞を実際に培養した。細胞増殖曲線と細胞生存率を用いて細胞培養環境の評価を行い、細胞が対数的に増殖し、コンフルエントに達した後も高い生存率を保っていることを示した。本研究成果は原著論文としてまとめられている。

第3章では、マイクロ流体デバイスを用いた接着状態の細胞の凍結保存技術について述べている。4種類の細胞株を用いて、マイクロ流体デバイスと培養皿において接着状態の細胞凍結保存効率の評価を行い、全ての細胞株においてマイクロ流体デバイスによって凍結保存効率が改善されていることを見出した。凍結保存が細胞の分化能にあたえる影響を調べるために、**PC12** 細胞を用いて分化能試験を行い、分化能に影響を与えていないことを明らかにした。これにより、マイクロ流体デバイス内で細胞の機能を損なうことなく接着状態の細胞を凍結保存できることが示唆された。さらに、マイクロ流路の高さが凍結保存に与える変化を調べた。マイクロ流路の高さによる影響は明らかではなかったが、高さ **18 ~ 60 μm** のマイクロ流路において凍結保存が行えることを示した。この結果より、接着状態の凍結保存においてマイクロ空間が重要であることが示唆された。マイクロ空間がどのようにして凍結保存効率の改善に結びついたのかを明らかにするために、氷晶の形成を観察した。マイクロ空間においては、氷晶のサイズが小さくなっていることが確認された。この氷晶の縮小化が凍結保存効率の改善につながっていると推測している。

第4章では、マイクロ流体デバイスを用いた接着状態の細胞の凍結保存技術に基づく **Ready-to-Use** な細胞試験について述べている。従来の細胞実験では、凍結保存している細胞を解凍し、播種して接着を待つ必要があったが、第3章で開発した細胞凍結保存技術を用いることによって操作が簡略化できるのではないかと考え、2つの実証実験を行っている。1つ目はマイクロ流体デバイス内で凍結保存した細胞を用いた細胞毒性試験であ

る。シスプラチンの HeLa 細胞に対する半数成長阻害濃度を算出し従来法との比較を行っている。その結果、マイクロ流体デバイスを用いても、従来法と変わらない結果を得ている。2つ目は1細胞ごとに画像を解析することによる HeLa 細胞の細胞周期の推定である。HeLa 細胞をパクリタキセルに暴露することによって、細胞周期に変化が見られた。この変化は従来法の結果とも一致しているが、変化量が小さかった。その理由として、凍結保存による影響とマイクロ流体デバイスによる影響を考察している。これら2つの実証実験を通じて、マイクロ流体デバイスを用いた細胞凍結保存技術に基づく Ready-to-Use な細胞試験の可能性を示している。

以上のように、本論文において新規に開発したマイクロ流体デバイスは小型で簡便であり、生物系の研究者にも利用が見込めるものである。本マイクロ流体デバイスを利用して、接着状態の細胞の凍結保存技術の開発及び応用へと展開した。これらの手法はマイクロ流体デバイスを用いた細胞生物学への新たな可能性を切り拓き、今後の発展に大きく寄与するものと期待される。

本論文のうち、第2章、第3章、第4章は（独）理化学研究所の細川和生、和田健一、前田瑞夫との共同研究であり、第3章の一部は東京工業大学 岡田・火原研究室との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験遂行および分析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（科学）の学位を授与できると認める。

以上 1806 字