



Title	培養細胞の非侵襲評価を目的とした非線形光学的計測システムの開発
Author(s)	前原, 鈴子
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34534
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (前 原 鈴 子)

論文題名

培養細胞の非侵襲評価を目的とした非線形光学的計測システムの開発

論文内容の要旨

細胞機能を精密に評価するためには、時間的に変化する細胞動態と細胞外基質を個々の細胞スケールで非侵襲的に計測する新規手法が必要である。そこで本研究では、非線形光学現象である第二高調波発生 (SHG) を応用したコラーゲン基質の非染色イメージング手法と、無菌的顕微観測や細胞近傍の環境制御が可能な微小流体デバイスを用いた計測システムを開発した。

まずSHG顕微画像とコラーゲン構造との関連を調査するため、コラーゲンの線維形成過程をSHGタイムラプスイメージングした。太い線維は画像上で線維模様として認識可能であり、強いSHG光を発した。一方、細かい線維の形成は線維模様の出現として認識することはできなかったが、SHG光強度の上昇として確認できた。以上から、SHGイメージングにより、模様として認識できるマクロなコラーゲン構造だけでなくサブピクセルスケールのマイクロなコラーゲン構造についても情報を得られることが明らかになった。

次にコラーゲン可視化による細胞機能評価の可能性を検討するため、軟骨細胞を包埋培養したコラーゲンゲルをSHGイメージングした。その結果、軟骨基質を産生する細胞集団のみが明確な縁を持つ球状の空洞を形成した。したがって、SHGイメージング法でコラーゲンを可視化することで、軟骨細胞の基質産生能を非侵襲的に評価できることが明らかになった。

さらに同一試料の経時変化を観察するため、軟骨細胞の培養用に設計した微小流体デバイスを作製した。微小流体デバイス内では個々の細胞を容易に認識することができ、それぞれの細胞が培養過程で示した分裂、遊走、脱分化などの細胞動態の履歴をSHGイメージングや位相差像観察により記録することができた。

本計測システムは非侵襲な光学的手法を用いて細胞機能の高空間分解かつ経時的な評価を実現するものであり、細胞生物学・医学分野の基礎研究や再生医療への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (前 原 鈴 子)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 荒木 勉
	副 査	教 授 三宅 淳
	副 査	教 授 田谷 正仁

論文審査の結果の要旨

細胞生物学や医学研究，組織工学において，細胞培養は必須の技術である．従来広く行われてきた平面足場上での単独培養は培養も観察も容易なモデルであり，細胞の基本的な機能を理解するためには十分な培養法である．しかし，実際の生体内では異種の細胞が共存しており，細胞は3次元的な足場に囲まれて存在している．そこで近年は，生体内の細胞を取り巻く環境をより精密に再現するため，共培養や3次元培養を取り入れた複雑な細胞培養手法が開発されている．本研究は，複雑化した培養系において細胞ごとの動態を非侵襲的に観測することのできる非侵襲的評価法を開発することを目的とした．

第二高調波発生（SHG）顕微イメージングは代表的な細胞外基質であるコラーゲンの非侵襲的可視化が可能であり，コラーゲンをを用いた細胞培養系の評価に有用である．また，微小流体デバイスはMEMS（micro electro mechanical system）技術を細胞培養器に応用したものであり，細胞の微小培養環境を制御できる点，環境勾配を無菌下で容易に光学観察できる点で優れている．以上より，本研究では非線形光学現象であるSHGを応用したコラーゲン基質の非染色イメージング手法と，無菌的顕微観測や細胞近傍の環境制御が可能な微小流体デバイスをを用いた計測システムを考案した．

まず，SHG顕微画像とコラーゲン構造との関連を調査した．その結果，マクロなコラーゲン構造はSHG画像上で模様として認識でき，サブピクセルスケールのミクロなコラーゲン構造についてはSHG光強度から線維構造を推測可能であることが示された．次に，コラーゲン可視化による細胞機能評価の可能性を検討するため，軟骨細胞を包埋培養したコラーゲンをSHGイメージングし，SHG顕微イメージングにより基質産生能をもつ軟骨細胞の分布の非侵襲計測が可能であることを示した．最後に，軟骨細胞培養が可能な微小流体デバイスを作製し，デバイス内で細胞を容易に認識可能であること，それぞれの細胞が培養過程で示した細胞動態の経時光学観察が可能であることを確認した．

以上より，SHGイメージングと微小流体デバイスを組み合わせた計測システムを用いれば，基質の構造変化を介して個々の細胞の動態を非侵襲に評価できることが示された．本計測システムは非侵襲的な光学的手法を用いて細胞機能の高空間分解かつ経時的な評価を実現するものであり，細胞生物学・医学分野の基礎研究や再生医療への応用が期待される．

このように本研究で得られた成果の工学的意義は大きく，また学術的にも高いレベルの内容を有しているため，博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める．