【117】

氏名（本籍）	藪崎克己（千葉県）
学位の種類	博　士（農　学）
学位記番号	博甲第 2825 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	光学的手法を用いた生体微粒子の新たな計測技術に関する研究
主査	筑波大学教授　工学博士　國府田悦男
副査	筑波大学教授　工学博士　向高祐邦
副査	筑波大学教授　農学博士　馬場忠
副査	筑波大学教授　農学博士　黒田健一

論文の内容の要旨

輸血製剤に混入する白血球や大気中の浮遊花粉などの生体微粒子は，顕微鏡による目視観察で，粒子の形状，種類，濃度（数）などを計測・判別する場合が多い。目視観察には顕微鏡の他に特殊な装置を必要としない利点がある反面，観察者の技能が求められ，尚且つ測定に要する人的・時間的コストが大きいなどの欠点がある。従って，生体微粒子の観測を日課的業務とする分野では，顕微鏡観察の欠点を補った新しい計測技術が望まれている。他方，生体微粒子が凝集し，その凝集塊の形態と数が経時的に変化する系を取り扱う場合は，顕微鏡観察では十分な精度が期待できず，凝集反応の科学的な解明を遅らせている。

本研究では，（1）輸血製剤中に極微量に混入する白血球の濃度計測，（2）大気中の浮遊花粉の濃度計測，さらに（3）血小板の凝集過程の時間的動態解析を事例として取り上げ，粒子から発生する散乱光や蛍光を解析する光学的手法を用いて，それぞれの粒子系に関する情報（形状，種類，濃度など）を高精度で測定する技術の開発と確立を目的とした。それぞれの研究成果を以下に述べる。

1．輸血製剤に混入する極微量の白血球の高感度簡易計測について

輸血製剤に混入する極微量の白血球は，輸血時に副作用を起こすために，その濃度を高感度・短時間で決定する必要がある。ここでは，輸血製剤の中の全ての血球を界面活性剤で溶解した後に，細胞核を蛍光色素で標識し，微少な観察面に遠心・濃縮して，画像解析により白血球濃度を自動計測する技術（遠心－粒子画像解析法）を確立した。本解析法では，細胞数が1個から128個の範囲で，計測値と理論値の間に高い直線性が認められ，濃度分布はポアソン分布に従った。また，定量限界（変動係数が10％を超える濃度）は200個/ml，最小検出個数は2個/mlであった。本法とナジェット法（顕微鏡下の目視観察では最も高い感度を持ち広く用いられている）を比べると，測定感度は50倍，測定の簡便性（測定にかかる時間で評価）も10倍向上した。従って，本研究で開発した，遠心－粒子画像解析法に基づく高感度簡易計測装置は，今後の輸血製剤の品質管理の分野において有用な手段になることが期待される。

2．大気中の浮遊花粉の種類別個数濃度計測について

大気中の浮遊花粉の計測においては，数と種類を同時に決定する必要がある。ここでは，花粉の種ごとに蛍光

の色調が異なることを見出した。そこで，蛍光色調を赤，緑，青の3成分に分け，青赤比を求めて数値化する方法を確立した。さらに，この数値と粒子の大きさを組み合わせると，多くの花粉を識別できることが画像解析法により明らかとなった。この花粉の識別法を発展させ，花粉をエアロゾルのままフローセルを通過させ，個々の粒子から発生する蛍光の色比と散乱光強度（粒子の大きさを反映）を解析する方法を研究し，花粉・非花粉の区別ならびに花粉の種類を識別できる計測装置を開発した。この方法では，顕微鏡下で個々の粒子を観察して花粉の種類と数を調べるダーラム法（従来法）と異なり，大気中に存在する花粉の種類と濃度（体積当りの個数）を同時に決定でき，即時性のあるデータを得ることが可能になった。

3．血小板凝集過程の凝集塊粒径分布の時間分解計測について

血小板の凝集機構は，血栓の形成を理解するための重要な課題である。ここでは，レーザー光散乱法を利用した高感度血小板凝集能測定装置の開発を試みた。そこで，ミー散乱理論により凝集塊の粒径を求め，粒径分布を時系列的に比較する方法を確立した。本装置を用いて，エピネフリンによる血小板凝集過程を解析したところ，エピネフリン濃度には臨界値（1.5 ± 0.5 μ M）があり，それ以上の濃度では単体血小板全体の8割が2分以内に凝集して小凝集塊を形成することがわかった。小凝集塊の粒径は時間に対して収束し，最終的には数平均粒径が15 μ m程度になる。他方，アスピリンは小凝集塊の形成には影響しなかったが，小凝集塊が互いに凝集して大凝集を形成する過程を阻害した。これらの測定結果は，生化学的メカニズムと関係づけて説明することができ，本測定装置は血栓形成を防止するための薬や医用手段の開発に有効であると期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

我々の身の周りには，形状や性状が異なる多くの生体微粒子が存在する。従って，生体微粒子の計測においても，対象とする微粒子によって目的も手法も異なる。例えば，花粉が飛散する季節に，花粉症の予防を目的として行われる計測では，一般にダーラム法が用いられており，花粉の種類と数に関する情報が求められる。また，輸血製剤の品質管理では，混入する極微量の白血球数（濃度）をナジェット法で測定することが一般的である。しかしながら，これらの従来法では，熟練された観測者が顕微鏡を用いて目視計測することを基本としており，精度及び人的・時間的コスト面からも新たな機器計測技術の開発が求められている。そこで，本研究では，以下に述べる三つの事例を取り上げ，生体微粒子から発生する散乱光や蛍光を解析する光学的手法を用いて，粒子の濃度や種類及び粒子径の経時変化を高い精度で測定するための技術開発を目的としている。具体的には，（1）輸血製剤に混入する極微量の白血球数の計測，（2）大気中を飛散する花粉の種類と数の計測，（3）ヒト血小板の凝集過程で形成する凝集塊（血栓）の数とサイズの時間分解計測に関して，基本技術の研究とその応用を行った。その結果，何れも実用可能なレベルまで開発を進めており，研究の目的は十分に達成されていると判断できる。特に，コンピューターを用いた画像解析法や時間分解法の研究過程では，基礎実験を繰り返した後に得られた成果が応用されているが，この過程で学術的にも新規な知見が数多く得られている。

以上のように，本研究は，農学（特に生物工学）分野において，極めて重要な知見を与えるものと判断できる。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。