

論文内容の要旨

博士論文題目

FPGA-based system development for high-throughput single-cell detection and sorting from micro to nanoscale

FPGA システム開発に基づいたハイスループット・マルチスケールな細胞計測と分取の実現

氏名 Tang Tao

(論文内容の要旨)

Cells are considered as the basic units of life, performing a multitude of complex functions and readily changing their program in response to environmental changes. Each cell type is specifically tuned to the specific tissue, in which it resides, and owns a different morphology and internal structure. For analyzing and sorting different types of cells, this dissertation introduced a lab-made single cell detection system and also sorting system.

First, in this dissertation, we provided a method for constructing a field-programmable gate array (FPGA) – based impedance flow cytometry. This system enables a high-throughput and label-free detection for the cell population, and also the study of bio-properties of various cell. With the proposed impedance cytometry, we first pioneered the discovery that the impedance cytometry works without the use of optical setups for assessing cell shape. Besides, it is also possible to perform intracellular analysis through increasing the detection frequencies (i.e., > 1 MHz). For example, in the case of *Euglena gracilis* (*E. gracilis*) cells analysis, the intracellular distribution within single cells can be correlated with the tilting level of high frequency impedance pulses (e.g., 6 MHz). The cell interior biomass can also be monitored through tracing the changes in the magnitude of high frequency impedance pulses.

Second, in terms of single bacteria cells detection and analysis, we optimized the design of the microfluidic devices, so that to improve the detection sensitivity to the nanoscale. Our work presents a novel impedance cytometry system, called parallel impedance cytometry, for real-time calibration of the impedance signals. Parallel dual microchannels allow simultaneous detection of reference and target particles in two separate microchannels, without the pre-mixing of reference and target suspension. Experiments on antibiotic-treated *Escherichia coli* cells demonstrated that our system can be used for quantitative assessment of the morphology change of individual cells, as well

as for the proportion of sensitive cells in real time. Additionally, a machine learning-based impedance system is provided to score the phenotypic response of bacterial single cells to antibiotic treatment, with a high throughput of more than one thousand cells per min. As the intelligent impedance system can perform all impedance-based characterization and recognition of particles in real time, it can free operators from the post-processing and data interpretation.

Last, based on the one of the highest throughput cell sorting technologies (i.e., femtosecond laser-based cell sorting), we optimized the sorting control system via a FPGA board. With the control system, a femtosecond-laser-assisted multi-selective system is available, which has the capability to efficiently manipulate the streamline of individual cells/beads with varying fluorescence intensities into three different exit ports. The experimental results on cells and polystyrene beads also supported that this method has the potential to separate arbitrary subpopulations by altering the number of femtosecond laser pulses, and also takes the first step toward developing a single-step multi-selective system.

氏名	Tang Tao
----	----------

(論文審査結果の要旨)

本研究は、マイクロ流体デバイスの流路に配置した微細な電極間に複数の異なる周波数の交流電圧を印加し、その電場に進入した生体試料によるインピーダンス信号の変化を計測し、その信号の特徴（信号の振幅、位相、周波数、偏心率）と細胞の特徴（形状・サイズ・体積・内部成分の含有量変化）を結びつけ、さらに定量化できるリアルタイム計測システムの原理検証、設計と構築を行い、指定した特徴を有する試料だけ分取できるシステムを開発し、下記の成果を得た。

これまで、大量の細胞の内外変化を高速に識別するには、顕微鏡を用いたカメラ撮像や、蛍光イメージング、ラマン散乱やミー散乱等の光散乱を用いる光学的な観察手法が開発されている。これらの手法は、複雑な光学システムが必要になり、装置そのものが大型でコストもかかる。そこで、本研究は、複雑な光学系が不要な電氣的な方法で細胞の内外変化の識別が実現可能な、電極と小さな回路基板からなる超小型の高速形状識別装置の開発を目指した。

まず、非対称型電極と採用した細胞インピーダンス計測システムを開発し、細胞（ミドリムシ）の形態を簡便に識別に成功した。既存の方法では、対称且つ規則な形状を持つものを計測対象とし、サイズは電場を通過する時間を持って測定可能だが、ミドリムシのような、対称性が低く、不規則な形状を持つ細胞のサイズ・形態の測定は実現できなかった。本研究は、通常の間電極間に傾斜電極を追加し、電場に進入した対象の流路中の位置情報を信号の振幅、大きさを信号幅、形状を信号の立ち上がりと立下りのズレ、すなわち偏心率(Tilt index)として計測し、電気インピーダンス測定だけで細胞形状を得ることに成功した。

また、複数の周波数の電場を利用することによって、異なる細胞の部位（細胞膜、細胞質、細胞小器官）をそれぞれ判別できるようにした。例えば、500 KHzの信号は細胞膜を通過できないため、信号の特徴は細胞の形状・サイズと相関関係がある。10 MHzの信号は、細胞膜を通過できるが、2重膜構造の葉緑体、結晶構造のパラミロンなど細胞小器官で減衰するため、葉緑体・パラミロンの含有量・分布と相関関係がある。結果として、インピーダンスを測定するだけで、細胞特徴（形状・サイズ・体積・内部成分の含有量変化）の定量化を実現した。

さらに、提案したインピーダンス計測手法の原理を用いて、より小さい大腸菌

など細菌類に向けたリアルタイム計測システムも実現した。

上記のとおり、本論文には、電気信号の特徴から細胞の特徴を定量化できるリアルタイム計測・分取システムの原理検証、設計と開発に成功した結果が示されている。本システムを利用することによって、細胞の内外変化の高速計測が実現可能になり、高まっている藻類産業への展開をはじめ、創薬、疾病治療、生命科学の質や効率の向上が期待される。その成果は、学術的に新しい知見を見出していると判断され、審査委員一同は、本論文が博士（工学）の学位論文として価値あるものと認めた。