

2023 年度  
創発的研究支援事業 年次報告書

研究担当者	八幡 穰
研究機関名	筑波大学
所属部署名	生命環境系
役職名	准教授
研究課題名	生と死を瞬時に可視化するイメージング AI で解明する細胞死の意味
研究実施期間	2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日

**研究成果の概要**

**複数の微生物種の死細胞の一細胞自家蛍光シグネチャーの大量取得とそのための条件検討、手法開発** 培養プレートリーダー (Biotek Cytation 5) とマルチウェルプレートを用いて生育をモニタリングしながら各種菌株を培養し、対数期の細胞に対してエタノールを各種濃度で添加する実験系の構築が完了した。また細胞観察用マイクロウェルデバイスの改良を行い、さらに多連での観察を同時に行えるようにした。また、Plan Apo  $\lambda$  100x 対物レンズに替えて 60 倍-40 倍対物レンズによる自家蛍光撮影の実証に成功した。現在さらに 20 倍程度の低倍対物レンズによるさらなるスループットの向上を検討している。また自家蛍光画像の視野内に記録された数百の死細胞の自家蛍光シグネチャーをカタログ化する画像処理プログラムを MATLAB (Mathworks) で作成し、死細胞と生細胞の自家蛍光のカタログ化を可能にした。

**取得した複数種の自家蛍光シグネチャーから死細胞に共通する特徴を抽出するためのデータ処理法の検討** 上記で構築した実験系を用いて、複数の微生物種において生細胞と死細胞それぞれの細胞の一細胞自家蛍光パターンの多変量解析を行った。現在この観察結果に基づき、細胞生死を判別できる機械学習モデルの構築に取り組んでいる。

**細胞死の過程での自家蛍光変化の経時観察** 細胞死の過程における、自家蛍光パターンの変化を観察することを目標としている。この実験では、マイクロ流路内にポリ-L-リシンコーティングにより固定した細胞に対し、エタノールへの暴露を行う計画であったが、細胞が観察中に剥離する問題が発生した。この問題については、ガラス洗浄方法の変更 (エタノール→アセトン)、使用する試薬の変更 (粉状→溶液)、洗浄用エアの見直し (オイルフィルタの設置) などの対策により解決を見た。この手法を用いて UV および抗生物質 (オフロキサシン) 暴露後に自家蛍光パターンが連続的に変化する様子を同一視野で観測することに成功した。