

公益財団法人

中谷医工計測技術振興財団

年 報

vol. 31

Annual Report 2017

Nakatani Foundation for Advancement of Measuring Technologies in Biomedical Engineering

31号



公益財団法人

中谷医工計測技術振興財団

年 報

31 号

目	次
設立の趣意	2
役員・評議員および事業の概要	3
平成 28 年度事業概要	4
I 技術開発助成事業	5
II 表彰事業（中谷賞）	8
III 技術交流助成事業	9
IV 調査研究助成事業	10
V 医工計測技術に関する情報の収集及び提供	10
VI 科学教育振興に対する助成	10
VII 技術交流助成対象者一覧	12
VIII 科学教育振興助成対象施設一覧	20
IX 国際学生交流プログラム助成対象者一覧	31
平成 28 年度贈呈式	32
平成 27 年度（第 8 回）中谷賞研究概要	36
研究成果報告	63
平成 26 年度特別研究助成成果報告	64
平成 27 年度開発研究助成成果報告	108
平成 27 年度奨励研究助成成果報告	195
表彰ならびに助成実績一覧	245
中谷賞の表彰状況	246
技術開発に対する助成状況	249
技術交流に対する助成状況	276
調査研究に対する助成状況	303

設 立 の 趣 意



中谷太郎初代理事長

わが国経済社会の高度化は、1970年代以降急速に進展しています。これは、わが国の唯一の資源でもある恵まれた頭脳資源を、十分に活用することで達成されたものです。特にコンピュータを始めとするエレクトロニクス技術の発展が重要な役割を果たしてきました。

これらのエレクトロニクス技術の発展は、優れた電子計測技術の基盤の確立が無くしてはありえません。今後わが国のエレクトロニクス技術の一層の発展を実現する上で、電子計測技術基盤の一層の強化が大切であります。電子計測機器がエレクトロニクスのマザー・ツールであるといわれる所以でもあります。

政府におかれましても、その重要性を十分認識され、電子計測技術基盤の確立のためいろいろな施策を展開されております。

このような客観的諸情勢から東亜医用電子株式会社（現シスメックス株式会社）の創立者、故中谷太郎初代理事長は、電子計測技術の発展を推進し、産業基盤の確立に貢献することを強く念願され、昭和59年4月に財団法人「中谷電子計測技術振興財団」が設立されました。

当財団は、技術開発・技術交流の推進、技術動向等の調査研究等を行うことにより、電子計測技術の基盤の確立に微力をつくす所存でございます。このような趣旨をご理解の上、当財団にご指導、ご協力を賜りますようお願い申し上げます。

財団法人 中谷電子計測技術振興財団

設立年月日 昭和 59 年 4 月 24 日

役員

理事長

軽部 征夫 東京工科大学学長 東京大学名誉教授

専務理事

家次 恒 シスメックス株式会社 代表取締役会長兼社長

理事

浅野 茂隆 東京大学名誉教授 早稲田大学名誉教授/招聘研究教授

熊谷 俊一 社会医療法人神鋼記念会総合医学研究センター長 神戸大学名誉教授/客員教授

朝長 万左男 日本赤十字社長崎原爆病院名誉院長 長崎大学名誉教授

西川 伸一 NPO 法人オール・アバウト・サイエンス・ジャパン代表理事 京都大学名誉教授

林 正好 シスメックス株式会社 特別顧問

監事

國生 肇 國生肇法律事務所（弁護士）

森川 寛行 森川寛行公認会計士・税理士事務所（公認会計士・税理士）

評議員

山村 博平 医療法人財団兵庫錦秀会西神看護専門学校校長 神戸大学名誉教授

戸川 達男 早稲田大学人間総合研究センター 招聘研究員

渡邊 清明 NPO 法人東京臨床検査医学センター理事長 慶應義塾大学名誉教授

佐藤 俊輔 大阪大学名誉教授 藍野大学名誉教授

神保 泰彦 東京大学大学院工学系研究科教授

中島 幸男 シスメックス株式会社 取締役専務執行役員

立花 健治 シスメックス株式会社 取締役専務執行役員

事業の概要

本財団は、医工計測技術分野における先導的技術開発、技術の交流等を促進し、また人材を育成することによって、医工計測技術の広汎な発展を推進し、我が国ならびに国際社会の発展及び生活の向上に寄与することを目的として、次の事業を行います。

■医工計測技術分野における技術開発に対する助成

医工計測技術分野における先導的技術開発活動を促進するため、これに助成します。

■医工計測技術分野における技術開発に顕著な業績をあげた研究者の表彰

医工計測技術分野における技術開発の飛躍的な発展を期して、顕著な業績をあげた研究者を表彰します。

■医工計測技術分野における技術交流に対する助成

医工計測技術分野における技術の交流を推進するため、内外の研究者等の交流に対して助成します。

■医工計測技術分野における技術動向等の調査研究に対する助成

医工計測技術分野における技術の発展を推進するため、技術動向等に関する調査研究に対して助成します。

■医工計測技術分野の学生及び研究者に対する奨学金の給付

医工計測技術分野における将来の研究者として活躍できる優秀な人材を育成することを目的として、医工計測技術分野の学生及び研究者に奨学金を給付します。

■医工計測技術に関する情報の収集及び提供

医工計測技術に関する情報文献、資料等を収集整理し、その広汎な利用を図るための種々の活動を行います。

■科学教育振興に対する助成

科学技術者の裾野拡大を目的として、中学・高校等における科学教育振興のために助成します。

また、将来グローバルに活躍する研究者を育成するため、学生の国際交流プログラム助成を行います。

■その他この法人の目的を達成するために必要な事業

平成 28 年度事業概要

平成28年度 事業概要

新たな先導的産業を創出する科学技術の重要性がますます高まる中、医工計測技術分野における基盤技術の開発促進はたいへん重要なテーマのひとつです。公益財団法人中谷医工計測技術振興財団は、昭和59年の設立以来、計測技術における先導的技術開発、技術の交流、将来の理系研究者育成に向けた教育助成事業を実施してまいりました。平成28年度からは、小学生や小学校の先生の理科教育をサポートする助成プログラムと理系大学学部生の海外体験をサポートする国際学生交流プログラムを新たに開始した。また、次年度に向けて、新たに大学院博士課程前期・後期の学生に対する奨学金給付や長期大型の研究助成を実施できるプログラムを企画し、さらに充実した事業活動を行えるようプログラムを改訂する準備を進めている中、本年度は以下の諸事業を実施いたしました。

I. 技術開発助成事業

医工計測技術は基盤技術であり、その先導的技術開発を促進することは極めて重要です。医工計測技術に対する技術開発助成事業は、当財団の中核事業であり、本年度もこの事業に力点を置いて実施いたしました。また平成26年度からは卓越した成果が期待でき、かつ実用化が見込まれる研究成果の創出に資する研究に対して、2年間で最大 3,000 万円を助成する「特別研究助成」を実施しています。

1. 募 集

医工計測技術は極めて広汎な分野にわたりますが、健康で明るい人間社会を築くために重要な役割を果たすと考えられる技術開発分野として、理・工学と医学・生物学の境界領域にあり、学際的研究として社会的ニーズが高まっております「生体に関する医工計測技術」を対象研究課題として、大学およびこれに準ずる研究機関に対して助成対象研究テーマの募集を行いました。前年度と同様、文書送付により募集案内を行ったほか、当財団のホームページに募集案内を掲載するなど、広範な方々へ募集内容が周知されるよう努めました。

【募集方法】平成 28 年 7 月 1 日⇒募集案内発送先 281 件、ホームページ掲載

【応募締切】特別研究助成 (8 月 31 日締切、応募数 33 件)

開発・奨励研究助成(9 月 05 日締切、応募数 開発研究 83 件、奨励研究 32 件)

2. 審 査

公益財団法人中谷医工計測技術振興財団内に設置した審査委員会(梶谷委員長他 12 名で構成)の委員により、各大学等から応募のあった 157 件の研究テーマに対して、公正にして厳正なる審査を実施し、医工計測技術の先導的技術開発に寄与するものと考えられる 30 件(開発研究 17 件、奨励研究 8 件、特別研究 5 件)を選出いたしました。

【審査方法】一次審査⇒特別研究(9/17～8/31)、開発・奨励研究(10/2～11/4) 書面審査

二次審査⇒特別研究(10/15～11/6)、開発・奨励研究(11/10～12/4) 書面審査

三次審査⇒特別研究(12/2)、面接審査

最終審査⇒12 月 10 日開催の審査委員会にて審査

3. 技術開発助成金の贈呈式

平成 29 年 2 月 24 日(金)マンダリンオリエンタル東京において、平成 28 年度中谷賞及び研究助成金の贈呈及び研究発表を実施いたしました。技術開発助成金は以下の 30 名の研究者に昨年度の特
別研究助成対象者 7 名への支給(8,771 万円)を加えた総額 2 億 3,588 万円(平成 28 年度)を贈呈
いたしました。

平成 28 年度 技術開発研究助成金贈呈者(敬称略・順不同)

【 技術開発研究助成 】

開発研究助成

単位：万円

氏名	所属機関・職	研究題目	助成金額
山中 真仁	名古屋大学大学院 工学研究科 助教	生体組織深部の構造・機能解析を 目的とした高空間分解能マルチモ ーダル顕微鏡の開発	298
バルマ・プラ ブハット	大阪大学大学院 工学研究科 教授	細胞膜機能解明のための液中観 察可能な先端増強超解像ラマン顕 微鏡の開発	300
河原 行郎	大阪大学大学院 医学系研究科 教授	人工核酸プローブを用いた RNA メ チル化効率定量法の開発	300
笹川 清隆	奈良先端科学技術大学院大 学 物質創成科学研究科 助教	超低侵襲かつ高感度な生体埋植 用蛍光イメージングデバイスの開 発	296
浜田 俊幸	北海道大学大学院 医学研究科 特任准教授	新規動物追跡技術をもちいた癌発 生機構解析装置およびプログラ ムの開発	300
牛田 多加志	東京大学大学院 工学系研究科 教授	生体組織非侵襲計測のためのテラ ヘルツ波分光・偏光分光複合化技 術の開発	300
ニラウラ・マダ ン	名古屋工業大学工学部 電気・機械工学科 准教授	CdTe 成長層を用いた医療用高感 度大面積X線画像検出器アレイの 開発	300
荒川 玲子	東京女子医科大学附属 遺伝子医療センター小児科 講師	脊髄性筋萎縮症における次世代 型診断薬の開発：SMN 蛋白質測 定系の構築	300
宮内 雄平	京都大学 エネルギー理工学研究所 准教授	カーボンナノチューブの近赤外ア ップコンバージョン蛍光を用いた生 体イメージング	300
今村 博臣	京都大学 生命科学研究所 准教授	蛍光バイオセンサーを用いた分岐 鎖アミノ酸の生細胞内イメージング	298

氏名	所属機関・職	研究題目	助成金額
香月 康宏	鳥取大学染色体工学研究センター バイオモデル動物開発部門 准教授	染色体工学技術を用いた薬物代謝酵素誘導を経時評価可能なシステムの開発	300
通山 由美	姫路獨協大学 薬学部医療薬学科 教授	好中球の NETs 成分の解析による血栓性疾患の早期検出法の開発	300
宮本 和英	姫路獨協大学 薬学部 准教授	人工ユビキチンリガーゼを活用したユビキチン化の簡易検出システムの構築	300
道上 達男	東京大学大学院 総合文化研究科 教授	多重 FRET 張力プローブを利用した、次世代細胞張力計測技術の開発	300
松浦 宏治	岡山理科大学 工学部生命医療工学科 准教授	Dynamic Culture System で培養される受精卵のシグナル伝達解析	300
田中 一生	京都大学大学院 工学研究科 准教授	19F MRプローブによる超微量生体物質計測法の開発	300
大橋 俊朗	北海道大学大学院 工学研究院 教授	力学環境負荷および細胞牽引力計測が可能ながん細胞遊走解析システムの開発	300

17件 小計 5,092万円

奨励研究助成

単位：万円

氏名	所属機関・職	研究題目	助成金額
相良 剛光	北海道大学 電子科学研究所 助教	インテグリンが生み出す力の定量評価を目指した超分子メカノプローブの開発	150
熊本 康昭	京都府立医科大学大学院 医学研究科 助教	無髄神経を検出する多点ラマン散乱計測法	150
ゲン・タン・ヴィン	東京大学 IRT 研究機構 特任研究員	ピエゾ抵抗型力センサによる微量血液の粘度計測	150
渡辺 彰吾	岡山大学大学院 保健学研究科 講師	3次元 CT 画像ガイド下インターベンションを実現するための血管治療用デバイスの開発	150
渡邊 裕之	京都大学大学院 薬学研究科 助教	アミリンを標的とした近赤外/2光子励起蛍光プローブの開発と糖尿病病態解明への応用	150
榛葉 健太	東京工業大学 日本学術振興会 特別研究員 (PD)	膜タンパク質を材料とした新規細胞内電位計測法の開発	150
永安 一樹	京都大学大学院 薬学研究科 特定助教	新規脳深部イメージング手法の開発と応用	150
永井 萌土	豊橋技術科学大学 大学院工学研究科 助教	超並列単一細胞プリンタの開発ーハイスループット細胞機能計測に向けて	150

8件 小計 1,200万円

特別研究助成:複数年(最大2年間)

単位:万円

氏名	所属機関・職	研究題目	助成金額
小林 哲生	京都大学大学院 工学研究科 教授	超高感度な光学的磁気センサモジュールで神経磁場を捉える新たな脳機能計測への挑戦	2,000 1,000
道上 宏之	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 助教	BNCT 応用へ向けた即発γ線分析による非観血的生体内ホウ素薬物動態測定技術の開発	1,500 1,500
矢作 直也	筑波大学 医学医療系臨床検査医学 准教授	ニュートリゲノミクスの新手法によるエネルギー代謝制御シグナルの核内計測	1,500 1,500
尾藤 晴彦	東京大学大学院 医学系研究科 教授	次世代カルシウム指示タンパク質を活用した記憶長期化機構の全光学的探索法開発	2,000 1,000
竹中 繁織	九州工業大学大学院 工学研究院 教授	がん診断電気チップの開発	1,525 1,440

平成28年度 8,525万円
平成29年度 6,440万円

5件 小計 14,965万円

II. 表彰事業(中谷賞)

生体に関する医工計測技術分野における技術開発の飛躍的な発展を期し、顕著な業績をあげた研究者の功績を讃えることを目的とした中谷賞は、公募のうえ推薦頂いた9件の中から厳正に審査を行って、表彰候補者を決定し、贈呈式にて中谷賞大賞ならびに中谷賞奨励賞を授与いたしました。

【募集方法】平成28年 7月13日⇒募集案内発送先281件、ホームページ掲載

【応募締切】平成28年10月14日⇒推薦応募数:8件

【審査方法】一次審査⇒10月16日～11月27日にて書面審査
最終審査⇒12月10日開催の審査委員会にて審査

平成 28 年度(第 9 回)中谷賞受賞者(敬称略、順不同)

【中谷賞】

大 賞

単位：万円

氏名	所属機関・職	研究題目	表彰金額
杉浦 清了	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 特任教授	生体の多階層の計測データを統合し新たな情報を生み出す心臓シミュレータ”UT-Heart”の開発	500

小 計 500万円

奨 励 賞

単位：万円

氏名	所属機関・職	研究題目	表彰金額
竹内 昌治	東京大学生産技術研究所 教授	マイクロ流体デバイス技術を利用した膜タンパク質センサの開発	250
柳澤 琢史	大阪大学国際医工情報センター 臨床神経医工学・寄附研究部門 講師	ECoG/MEG-BMI 義手による重度麻痺患者の運動機能再建と幻肢痛治療への応用	250

小 計 500万円

Ⅲ. 技術交流助成事業

近年におけるナノテクノロジーやバイオテクノロジーなどの発展に伴って、技術開発研究を行う場合に関係する学術領域は益々複雑多様化しつつあり、内外における研究者の技術交流を推進する重要性が増してきております。平成28年度は、技術交流に関して「海外派遣」「日本招聘」「海外研修」「海外留学」「日本留学」のプログラムを実施し、助成を行いました。

【募集方法】ホームページ掲載

【募集期間】年間を4期に分けて随時募集(海外留学、日本留学は年2回募集)

【審査方法】交流助成審査委員による審査

【審査結果】

単位：万円

	助成件数	助成金額
海外派遣	31	567
日本招聘	4	131
海外研修	7	954
海外留学	7	1,000
日本留学	3	300

小計:52件 2,952万円

平成 28 年度技術交流助成対象者は「Ⅶ 技術交流助成対象者一覧」のとおり。

IV. 調査研究助成事業

生体に関する医工計測技術分野には様々な課題が存在しており、その調査研究を実施して得た成果を広く社会で活用するための助成事業は重要な意義を有しております。技術開発助成事業と同様に審査を行い、以下の研究に助成が決定されました。

【募集方法】平成28年7月13日⇒募集案内発送先281件、ホームページ掲載

【応募締切】9月30日締切、応募数 3件

【審査方法】一次審査(10/2～11/4)、12月10日の審査委員会にて最終審査

調査研究助成

単位:万円

氏名	所属機関・職	研究題目	助成金額
梅澤和夫	東海大学 医学部外科学系救命救急医学 講師	皮膚揮発性物質分析による農薬中毒の 診断法の実用化に向けた検証	300
小林康毅	東京大学大学院 医学系研究科公衆衛生学分野 教授	非侵襲的動脈硬化指標 AVIと認知機能 の関連についての研究	300

小計 600万円

V. 医工計測技術に関する情報の収集及び提供

生体に関する医工計測技術関連の情報について広汎な利用をはかるため、当財団の研究助成事業および技術交流事業による成果等、財団の事業活動を取りまとめて「年報30号」を作成し、広く関係機関に提供しました。また当財団の発行する年報を医工計測技術データベースとしてホームページ上で公開しています。検索機能を付与しており、研究者に有用な情報をフィードバックすることができます。

【発行物】年報30号 Vol-1、30号 Vol-2

・Vol-1 は平成28年12月20日発行

・Vol-2 は平成29年 5月20日発行予定

・作成部数:各800部

・発送先 :関係各位 208件、各大学 117件、関係企業 155部 計480部

・年報についてはすべて無償提供です。

VI. 科学教育振興に対する助成

将来を担う子どもたちの論理的思考力や創造性を涵養することが、科学技術の発達はもとより我が国の発展に資するものと考え、中学・高校における科学教育振興を目的とした取組みに対する科学教育振興助成を平成26年度より実施しています。

VI-1 科学教育振興助成

第3回(平成28年度)科学教育振興助成

助成対象

【個別】中学・高校等の教育機関における生徒の科学に対する関心を高めるような授業やクラブ活動等の企画と実施(1件最大30万円)

【プログラム】広く科学教育を振興するため、複数の学校等の教育機関や博物館、科学学習センター、大学等の研究機関、教育委員会等が共同で企画・運営する活動プログラム(1件最大100万円/2年間限度)

【小学生の先生を支援するプログラム】

子どもたちの理科の力を向上させるための指導法の改善や学習法の開発などに取り組む意欲的な小学校の先生方を支援する活動(1件最大100万円/2年間限度)

助成プログラム	件数/助成金額
個 別	57件/ 1,688万円
プログラム(初年度) (含 追加分8件)	27件/ 2,557万円
(2年目)	12件/ 1,185万円
小学校の先生を支援するプログラム助成(初年度)	6件/ 378万円

小計:102件 5,808万円

各プログラムの助成対象施設は「Ⅷ 科学教育振興助成対象施設一覧」のとおり。

Ⅵ-2 国際学生交流プログラム

第1回(平成28年度)国際学生交流プログラム(日米学生交流)

国際学生交流プログラム助成(中谷 RIES フェローシップ)は、日本および海外の大学学部生を対象とした夏休み等を利用した短期留学により、大学の研究室に属して最先端の研究活動に触れると同時に、研修や交流活動を通して他の国の言語や文化を学ぶ機会を提供し、将来グローバルに活躍できる研究者の育成を図ることを目的とする。平成28年度は第一弾として日米国際交流プログラムを実施した。

初代・中谷 RIES フェローとなる米国人学生 14名、日本人学生 8名がそれぞれ日本、米国の大学でリサーチ・インターンシップを行うと同時に異文化を体験した。文化面でも研究面でも、将来の研究活動の大きな糧となる経験を積み、研究者としてグローバルに大きく羽ばたいていただくきっかけを作ることができたと考える。

参加メンバーとホストラボは「Ⅸ 国際学生交流プログラム助成対象者一覧」のとおり。

Ⅶ. 技術交流助成対象者一覧(敬称略、順不同)

平成 28 年度技術交流(海外派遣)

氏名	所属機関・職	会議名	開催地	時期
木竜 徹	新潟大学 自然科学研究科 電気情報工学専攻 人間支援科学コース 教授	XXI Congress of the International Society of Electrophysiology and Kinesiology 第 21 回 国際電気生理運動学会大会	アメリカ シカゴ	平成 28 年 7 月
伊藤 健一	新潟工科大学 工学部工学科 准教授	The 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'16) 第 38 回国際 ME 学会議	アメリカ オーランド	平成 28 年 8 月
龍 進吾	豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 情報・知能工学専攻 博士前期課程	The 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'16) 第 38 回国際 ME 学会議	アメリカ オーランド	平成 28 年 8 月
臼井 健二	甲南大学 フロンティアサイエンス学部 生命化学科 准教授	The 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium 第 34 回ヨーロッパペプチドシンポジウム・第 8 回国際ペプチドシンポジウム	ドイツ ライプツィヒ	平成 28 年 9 月
吉田 光輝	慶應義塾大学大学院 理工学研究科 総合デザイン工学専攻 (機械系)	The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science 化学と生命科学のための微小システムに関する国際会議	アイルランド ダブリン	平成 28 年 10 月
林 裕晃	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 助教	Annual Meeting of Radiological Society of North America 北米放射線学会年次大会	アメリカ シカゴ	平成 28 年 11 月
浜田 俊幸	北海道大学大学院 医学研究科 放射線医学分野 特任准教授	Neuroscience 2016 北米神経科学会 2016	アメリカ サンディエゴ	平成 28 年 11 月

氏名	所属機関・職	会議名	開催地	時期
近藤 泰成	豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 情報・知能工学専攻 博士前期課程 1年	24th Color Imaging Conference 色画像化会議	アメリカ サンディエ ゴ	平成 28 年 11 月
鈴木 南羽	東京農工大学 工学府 生命工学専攻	Pacific rim meeting on electrochemical and solid-state science 2016 2016 年電気化学会 (ECSJ) 秋季大 会	アメリカ ホノルル	平成 28 年 10 月
空田明日香	東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻	Pacific rim meeting on electrochemical and solid-state science 2016 2016 年電気化学会 (ECSJ) 秋季大 会	アメリカ ホノルル	平成 28 年 10 月
上村圭亮	大阪大学大学院 医学系研究科 運動器医工学治療学	ISTA 2016 第 29 回国際人工関節技術会議	アメリカ ボストン	平成 28 年 10 月
NGUYEN THANH VINH	東京大学 IRT 研究機構 下山研究室 特任研究員	THE 69th ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYSICAL SOCIETY- DIVISION OF FLUID DYNAMICS アメリカ物理学会 流体力学部門 第 69 回年次会合	アメリカ ポートラン ド	平成 28 年 11 月
皿上 順英	大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専 攻	The 17th International Congress on Neutron Capture Therapy 第 17 回国際中性子捕捉療法学会 学術大会	アメリカ コロンビア	平成 28 年 10 月
小林 美菜	大阪大学 工学研究科 環境エネルギー工学専攻	ICRS-13&RPSD-2016 第 13 回放射線遮蔽国際会議・第 19 回米原子力学会放射線防護 遮蔽部会会合	フランス パリ	平成 28 年 10 月
平谷 萌恵	東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻 修士1年	The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 化学と生命科学のための微小シス テムに関する国際カンファレンス	アイルラン ド ダブリン	平成 28 年 10 月

氏名	所属機関・職	会議名	開催地	時期
紀本 夏実	徳島大学 大学院保健科学教育部 保健学専攻	SPIE Medical Imaging 国際光学学会 医用画像分野	アメリカ オーランド	平成 29 年 2 月
熊本 康昭	京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞分子機能病理学 助教	SPIE Photonics West 国際光工学会フォトニクスウエスト	アメリカ サンフランシスコ	平成 29 年 1 月
藤本 和也	京都大学大学院 工学研究科 マイクロエンジニアリング 専攻 特定研究員	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第 30 回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成 29 年 1 月
岡谷 泰佑	東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士 2 年	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第 30 回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成 29 年 1 月
松田 信彦	東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士 2 年	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第 30 回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成 29 年 1 月
佐藤 龍	慶応義塾大学 理工学研究科 総合デザイン工学専攻	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第 30 回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成 29 年 1 月
海保 実則	東京大学 生産技術研究所 竹内昌治研究室	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第 30 回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成 29 年 1 月
松本 昌泰	岩手医科大学大学院 医学研究科 外科系専攻(脳神経外科学)	28th Symposium on Cerebral Blood Flow Metabolism and Function (B erlin Brain 2017) 第 28 回国際脳循環代謝学会学術 大会	ドイツ ベルリン	平成 29 年 3 月

氏名	所属機関・職	会議名	開催地	時期
及川 公樹	岩手医科大学大学院 医学研究科 脳神経外科学講座	28th Symposium on Cerebral Blood Flow Metabolism and Function 第28回国際脳循環代謝学会	ドイツ ベルリン	平成29年 3月
永井 智大	公立ほこだて未来大学 システム情報科学部 情報アーキテクチャ学科	Computer Assisted Radiology and Surgery 2017 カーズ 2017	スペイン バルセロナ	平成29年 6月
南波 孝昌	岩手医科大学 医学部 脳神経外科学講座 助教	25th Annual Meeting of International Society for Magnetic Resonance in Medicine 第25回国際磁気共鳴医学会学術大会	アメリカ ホノルル	平成29年 4月
岡本 浩明	山口大学大学院 創成科学研究科 工学系学域 准教授	14th European Conference on Liquid Crystals 第14回 液晶に関する欧州会議	ロシア モスクワ	平成29年 6月
野村 秀成	大阪大学 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 博士前期課程1年	65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics アメリカ質量分析会議	アメリカ インディアナポリス	平成29年 6月
木村 公一	大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻	65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics アメリカ質量分析会議	アメリカ インディアナポリス	平成29年 6月
鶴本 侑万	大阪大学大学院 工学研究科 環境エネルギー工学専攻	65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics アメリカ質量分析会議	アメリカ インディアナポリス	平成29年 6月
芹田 和則	大阪大学 レーザーエネルギー学 研究センター テラヘルツフォトニクス 研究部門 特任研究員	Conference on Lasers and Electro-Optics 2017 (CLEO2017); THz Mansion Meeting クレオ2017;テラヘルツマンションミーティング	アメリカ サンノゼ ニューポート	平成29年 5月

平成 28 年度技術交流(海外留学)

氏名	所属機関・職	研究テーマ	留学先機関名	時期
飛田哲朗	名古屋大学 医学系研究科整形外科 医員	加齢性筋量減少症(サルコペニア)診断の為に超音波法を用いた簡便かつ無侵襲の筋量測定法の開発	アメリカ San Diego Spine Foundation サンディエゴ脊椎疾患 財団	平成 29 年 4 月
堀松徹雄	兵庫医科大学 循環器内科 助教	動脈硬化病変における血流変化と血管周囲脂肪組織の関連の解析	アメリカ Medical College of Georgia at Augusta University ジョージア医科大学 (オーガスタ大学)	平成 28 年 9 月
田崎雅義	熊本大学大学院 生命科学研究部 保健学系構造機能解析 学分野 助教	質量分析によるアミロイドーシスの新規診断技術の開発および新たなアミロイド原因蛋白質の同定	イタリア University of Pavia パヴィア大学	平成 29 年 3 月
大浅 翔	北海道大学大学院 先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室 博士研究員	多点蛍光相関分光法を用いた細胞膜上 GPCR の空間依存的な動態と機能の定量解析	スウェーデン Karolinska Institutet カロリンスカ研究所	平成 29 年 7 月
望月研太郎	東北大学 加齢医学研究所 医用細胞資源センター 助教	ヒストン修飾クロストークを介した、生殖細胞運命を規定するエピゲノム動態の解明	カナダ The University of British Columbia ブリティッシュコロンビ ア大学	平成 30 年 3 月
上村 圭亮	大阪大学大学院 医学系研究科 運動器医工学治療学 大学院生	Dual fluoroscopy を用いた Femoroacetabular impingement の解析	アメリカ University of Utah Department of Orthopaedics ユタ大学整形外科	平成 29 年 4 月
長嶋雅子	自治医科大学 医学部 小児科 助教	機能的近赤外分光分析法を用いた小児注意欠如多動症の新規治療法の確立	ドイツ Department of Psychiatry and Psychotherapy Psychophysiology and Optical Imaging チュービンゲン大学 精神科 心理生理学・ 光学イメージング部門	平成 29 年 5 月

平成 28 年度技術交流(日本招聘)

申請者	所属機関・職	会議名	開催地	被招聘者	時期
山本義春	東京大学大学院 教育学研究科 総合教育科学専攻 教授	8th International Workshop on Biosignal Interpretation (BSI2016)	大阪市 (大阪国際交 流センター)	Thomas Penzel Charité Universitä tsmedizin Berlin 教授	平成 28 年 11 月
				Patrice Abry Ecole Normale Supérieure de Lyon 教授	
				Fabio Babiloni University of Rome Sapienza 教授	
相澤健一	自治医科大学 医学部 薬理学講 座 臨床薬理学部門 准教授	2016 年 度 AMED 成果報 告会 「疾患克服へ の挑戦 ライフ サイエンスの 現状と未来へ の展望」他	東京都 (よみうり大手 町ホール)	鈴木亨 レスター大学医学部 循環器内科 教授	平成 29 年 2 月
狩野方伸	東京大学大学院 医学研究科 神経生理学分野 教授	第 40 回日本 神経科学大会	千葉 (幕張メッセ)	Mark Hubener Max Planck Institute of Neurobiology	平成 29 年 7 月
				Zhigang He Harvard Medical School	
藤田克昌	大阪大学大学院 工学研究科 精密科学・応用物 理学専攻 准教授	日本分光学会 年次講演会・ 国際シンポジ ウム 2017	東京都 早稲田大学	Karen Faulds The University of Strathclyde Glasgow	平成 29 年 5 月
				Duncan Graham The University of Strathclyde Glasgow	
				Wei Min Columbia University	

平成 28 年度 技術交流(海外研修)

氏名	所属機関・職	研究テーマ	研修先機関名	時期
宇治彰人	京都大学大学院 医学研究科 感覚運動系外科学 眼科学 助教	高解像度3次元血流 イメージング法の開発	アメリカ Doheny Eye Institute University of California Los Angeles カリフォルニア大学 ドヘニー眼研究所	平成 28 年 4 月
榎本詢子	横浜国立大学大学院 工学府 福田研究室 大学院生	細胞培養マイクロデバイス に非侵襲的な光酵素セン サを組み込み、連続的に 細胞呼吸活性を on chip モ ニタリングする。さらに、マ イクロ流路内での流体シミ ュレーションを取り入れ、 細胞評価において重要と なる均一な細胞導入を実 現できるマイクロデバイ スを設計する。	イタリア Laboratory of Biological Structure Mechanics, Department of Structural Engineering, Politecnico di Milano, Milan, Italy ミラノ工科大学 電子・情報・生物工学部	平成 28 年 6 月
牧功一郎	京都大学 再生医科学研究所 バイオメカニクス研究 室 博士後期課程 3 回生	マイクロ力学計測によるプ ライマリーシリアの流れ刺 激感知メカニズムの解明	アメリカ Department of Biomedical Engineering, Columbia University コロンビア大学 生体医工学科	平成 28 年 8 月
釘宮章光	広島市立大学 情報科学研究科 医用情報科学専攻 准教授	アミノ酸の新規計測法の 開発	アメリカ Department of Electrical & Computer Engineering, The University of Florida フロリダ大学 電子・コンピューター学科	平成 28 年 6 月
齊藤亮平	電気通信大学大学院 情報理工学研究科 基盤理工学専攻 牧研究室 博士後期課程 1 年	生体内標識材料の開発	アメリカ University of California Berkeley カリフォルニア州立大学 バークレー校	平成 28 年 10 月
奥知左智	京都大学 医学部附属病院 放射線診断科 医員	GlucoCEST 法による脳腫 瘍、脳変性疾患の診断・ 治療に資する画像指標の 研究	イギリス University College London ユニヴァーシティ・カレッ ジ・ロンドン	平成 29 年 1 月

氏名	所属機関・職	研究テーマ	研修先機関名	時期
杉本至健	山口大学 医学系研究科 脳神経外科 助教	広汎性脱分極(CSD) 発生時の DC 脳波の記録手法および Laser speckle flowmetry を用いた脳表の血流計測の手法の研修	アメリカ Department of Neurology and Radiology Neurovascular Research Laboratory ハーバード大学、マサチューセッツ総合病院	平成 29 年 4 月

平成 28 年度 技術交流(日本留学)

申請者	所属機関・職	被留学者・留学先		研究テーマ	時期
宮地勇人	東海大学 医学部 基盤診療学系臨床検査学 教授	Bayarbat Tsevegjav	東海大学 医学部	難治性白血病細胞における抗がん剤耐性の分子機序の解明と抗がん剤耐性の評価法の開発	平成 28 年 4 月
津川若子	東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻/産業技術専攻 准教授	李 仁榮	東京農工大学大学院 工学府	人工臓器への応用に向けた自律型グルコース連続計測システムの開発	平成 29 年 4 月
徐 岩	宮崎大学医学部 機能制御学講座物質科学分野 教授	鮑 宏亮	宮崎大学大学院 医学獣医学総合研究科	19F-NMR によるヒトテロメア RNA 細胞内構造の解明	平成 29 年 4 月

VIII. 科学教育振興助成対象施設一覧

平成 28 年度 科学教育振興助成 対象校一覧

【個別助成】

学校名	実務担当者 (職名)	都道府県	申請題目	助成 金額 (千円)
北海道有朋高等学校	西出雅成 (教諭)	北海道	イネ科植物を使ったファイトレ メディエーションの研究	260
北海道稚内高等学校	磯 清志 (教諭)	北海道	都市環境を考えさせる野外生 態実習教材の開発	300
北海道湧別高等学校	上田浩人 (教諭)	北海道	地域に根ざしたバイオマス発 電の構想	300
北海道釧路江南高等学校	佐藤革馬 (教諭)	北海道	簡易USBクリッカーを用いた 高校理科の双方向型授業方 法の研究	280
宮城県古川黎明中学校	齋藤弘一郎 (教諭)	宮城県	現有の理科教育設備で観察・ 実験を効果的に行うための実 践研究	300
宮城県東松島高等学校	佐々木敦 (教諭)	宮城県	なぜだろう？各教室における アサガオの花芽形成及び成 長の違い ～日長及び温度条 件、照度条件などの栽培条件 が植物に与える影響～	299
宮城県気仙沼高等学校	三嶋廣人 (教諭)	宮城県	鳴砂を題材にした科学的思 考力育成	300
山形県立鶴岡南高等学校	猪口俊二 (教諭)	山形県	山形県水産試験場、山形県 立加茂水産高等学校と連携 した「鶴南ゼミSS探究(鮮度 測定)」	299
山形県立鶴岡南高等学校	笹木覚 (教諭)	山形県	統計学で高校野球を科学す る「セイバーメトリクス」	278
福島県南相馬市立石神 中学校	稲葉真二 (教諭)	福島県	「観察、実験の結果を分析し て解釈する力を育てる学習活 動の工夫」	300
つくば桜並木学園 つくば市立並木中学校	市原猛 (教諭)	茨城県	理科におけるアクティブラー ニングの実践ーICT の活用を 通してー	300

学校名	実務担当者 (職名)	都道府県	申請題目	助成 金額 (千円)
佐野日本大学高等学校	谷津潤 (教諭)	栃木県	プラナリアに対する古典的条件付けの研究と教材化	300
栃木県立栃木農業 高等学校	嗟峨俊介 (教諭)	栃木県	土のうを利用した農業用ため池のビオトープ化並びに緊急時用水としての利用	300
栃木県立宇都宮中央女子 高等学校	滝沢宏之 (教諭)	栃木県	タナゴ亜科魚類を通しての異校種交流2	300
埼玉県立浦和西高等学校	坂江隆志 (教諭)	埼玉県	高校物理における分光分野での観察実験・観測用低分散分光器の開発と応用	300
学校法人立教学院 立教 新座中学校・高等学校	古田 豊 (教諭)	埼玉県	富士山頂の自然に学ぶ教材開発～教員と高校生の参画型探究学習手法の創発	300
千葉市立高浜中学校	伊藤拓也 (教諭)	千葉県	理科好きな生徒を育てる理科室作り	300
東京都立八王子盲学校	丸山裕也 (教諭)	東京都	視覚特別支援学校における物理・化学実験の充実 ～安全な探求的科学実験を目指して～	300
駒場東邦高等学校	松岡雅忠 (教諭)	東京都	拡散の様子を可視化できる化学実験教材の開発	300
上越市立板倉中学校	土屋 泉 (教諭)	新潟県	進化学習に生かすトンボ類の視覚と生態の進化	300
岐阜県立岐山高等学校	鹿野知幸 (理数科主任)	岐阜県	電析法による色素増感太陽電池負極作製方法の研究	300
星陵中学校・高等学校	鈴木崇司 (教諭)	静岡県	BDF バスで人と資源を循環しよう！プロジェクト	300
名城大学附属高等学校	吉川靖浩 (教諭)	愛知県	庄内川における生物調査および図鑑・標本作成	300
愛知県立豊野高等学校	足立敏 (教頭)	愛知県	生徒が実験計画を立てる化学の授業 ～ 論理的思考力の育成を目指して	300

学校名	実務担当者 (職名)	都道府県	申請題目	助成 金額 (千円)
愛知県立名古屋南 高等学校	臼井俊哉 (教諭)	愛知県	アダンソンハエトリグモ卵を用いた胚発生過程の研究	300
三重県立四日市南 高等学校	中村陽明 (教諭)	三重県	化学を問題解決型の集団思考で理解することの分析～リフレクションシートから授業改善点を把握する～	300
守山市立守山北中学校	中西亮平 (教諭)	滋賀県	校内の生態系学習のプログラム開発 ～ICT機器を活用した観察および協同学習を目指して～	298
守山市立守山中学校	高井あゆみ (教諭)	滋賀県	ICTを活用した学習環境データの収集と科学的考察を通じた環境学習への取り組みー校舎改築時の学校環境を活かした環境学習モデルケースの提案を目指してー	299
滋賀県立米原高等学校	森野泰行 (教諭)	滋賀県	最終氷期の古環境復元	300
龍谷大学附属平安 中学校・高等学校	牧野正明 (進路部長)	京都府	クラブ活動(ネイチャー部)における小型動物の透明骨格標本および様々な樹脂封入標本の作製	300
京都府立鴨沂高等学校	星原庸平 (教諭)	京都府	京蠟燭を科学する	299
大阪府立桜塚高等学校	根岩直希 (教諭)	大阪府	定時制高等学校における抗体の有用性と応用面を理解するための教材開発	271
清風中学・高等学校	池永明史 (教諭)	大阪府	アオコの毒性物質(マイクロシスチン:MC)の分解細菌の発見と毒性分解メカニズムの予想	300
追手門学院大手前中学校	福田哲也 (教頭)	大阪府	最先端のロボット教育の推進～世代をこえた学びの構築～	296
大阪府立茨木工科 高等学校	清水至中 (教諭)	大阪府	高大連携による宇宙の”ものづくり”と”ひとづくり”の実践	300
大阪府立春日丘高等学校 定時制の課程	久好圭治 (教諭)	大阪府	磁性に関する研究 (反磁性/常磁性物質を対象とした磁化率測定法の開発, 磁場中での化学反応など)	300

学校名	実務担当者 (職名)	都道府県	申請題目	助成 金額 (千円)
大阪府立伯太高等学校	東 照晃 (首席)	大阪府	伯太高校みつばちプロジェクト	300
神戸大学附属 中等教育学校	瀧本家康 (教諭)	兵庫県	高等学校地学基礎と総合的 学習を活用した六甲山麓に おける山風冷気流をテーマと した探究活動の実施	300
兵庫県立三田祥雲館 高等学校	谷川智康 (教諭)	兵庫県	自作望遠鏡による小惑星測 光観測	300
兵庫県立篠山東雲 高等学校	菊川裕幸 (教諭)	兵庫県	地域資源としての竹有効利用 法(再生可能エネルギー、飼 料化)の研究	260
兵庫県立東灘高等学校	松本誠司 (教諭)	兵庫県	地域連携による神戸層群の 化石調査	300
兵庫県立姫路工業 高等学校	市川宏之 (教諭)	兵庫県	セルラーゼ分泌菌の単離培 養とセルロースの糖化	300
兵庫県立農業高等学校	南早矢香 (高等学校教諭)	兵庫県	光合成細菌を活用したトマト 栽培の実証試験	290
兵庫県立舞子高等学校	穂積正人 (高校教諭)	兵庫県	天体観測用教材開発と天文 教育の普及	300
兵庫県立御影高等学校	太多和光一 (教諭)	兵庫県	脱、電気回路のブラックボッ クス化。回路カードを用いた生 徒実験の開発。	298
奈良県立桜井高等学校	早川純平 (教諭)	奈良県	フラーレンを使った墨作り～ 膠を活用したフラーレン C60 の水溶化～	300
奈良県立青翔高等学校	水本祐之 (教諭)	奈良県	教育と地域振興をつなぐ日本 の古典園芸「変化アサガオ」	300
岡山県倉敷市立玉島東 中学校	山本芳幸 (教諭)	岡山県	アクティブラーニングで学ぶ 意欲を高める～発見, 追求, 討論, 分析, 整理を通して～	300
広島県福山市立城北 中学校	久保木淳士 (教諭)	広島県	理科授業における探究学習 の創造・実践と育てたい資質 能力を設定した単元作りの開 発	250

学校名	実務担当者 (職名)	都道府県	申請題目	助成 金額 (千円)
学校法人 山口高川学園 高川学園中学高等学校	村田満 (指導教諭)	山口県	生徒実験におけるPCR法の導入と、それによる希少生物の保護に向けた研究	300
愛媛県立今治西高等学校	中川和倫 (教諭)	愛媛県	生物部を地域のサイエンスコミュニケーターとして育成する活動	300
愛媛県立小松高等学校	高橋遼介 (教諭)	愛媛県	ダイコンにおけるファイトレメディエーション能力の検証	300
福岡県立糸島農業高等学校	近藤雅典 (教諭)	福岡県	糸島の自然を守りたい！～小さなハエからの警鐘～	299
福岡県立宗像高等学校	羽生禎伸 (教諭)	福岡県	自律型サッカーロボットの製作と研究	300
福岡県立福岡高等学校	跡部弘美 (教諭)	福岡県	生物部による土壌から単離した放線菌の抗生物質の研究	300
小城市立芦刈中学校	水田昌子 (教諭)	佐賀県	「有明海から学ぼう」～ムツゴロウを活用した発展的学習の取り組み～	300
鹿児島県立大島北高等学校	樋之口仁 (教頭)	鹿児島県	離島小規模校におけるICT機器を用いた気象・宙象現象への理科課題研究と授業改善の工夫	300

小計： 57 件

16,876 千円

【プログラム助成】

申請機関名	実務担当者(職名)	都道府県	共同実施機関	テーマ	助成金額(千円)
宮城県仙台第一高等学校	小松原幸弘(教諭)	宮城県	宮城県気仙沼高等学校 宮城県古川黎明高等学校 宮城県石巻好文館高等学校 宮城県白石高等学校 福島県立福島高等学校 石川県立小松高等学校 秋田県立秋田南高等学校	宮城県に生息するメダカのルーツを探る -高校生による高校生のための分子生物学特講-	1,000
宮城県仙台二華高等学校	米本慶央(教諭)	宮城県	東北大学大学院工学研究科 東北大学大学院情報科学研究科 東北大学大学院農学研究科 東北大学大学院理学研究科 東北大学大学院法学研究科 東北工業大学工学部 宮城教育大学大学院 株式会社健康予防政策機構	日本の水問題に関する調査研究	1,000
秋田県立大曲農業高等学校	大沼克彦(教諭)	秋田県	秋田県立大曲農業高等学校 立命館大学陸水学 信州大学物質循環学 秋田大学環境資源学	電気分解による田沢湖の中性化にともなうバイオマスと生態系の解明	1,000
秋田大学教育文化学部	川村教一(教授)	秋田県	関東学園大学経済学部 城西大学理学部 東洋大学経済学部 秋田大学教育文化学部 東京学芸大学附属高等学校 茗溪学園高等学校 秋田大学教育文化学部	「フューチャー・アース」世代育成のための地球科学教育プログラムの開発、実践と評価	916
山形大学大学院教育実践研究科	今村哲史(教授)	山形県	山形大学地域教育文化学部 山形市教育委員会総合学習センター	科学技術イノベーション人材を育成するためのSTEM教育プログラムの開発	1,000
山形県立米沢興譲館高等学校	熊坂克(教諭)	山形県	山形県教育庁高校教育課 山形県立山形南高等学校 山形県立鶴岡南高等学校	小中高大・医を工学と医療で繋ぐサイエンス・ネットワーク構築	1,000

申請 機関名	実務担当者 (職名)	都道 府県	共同実施機関	テーマ	助成 金額 (千円)
福島県立福 島高等学校	橋爪清成 (教諭)	福島県	福島県立相馬高等学校 福島県立磐城高等学校 宮城県古川黎明高等学校 宮城県仙台第一高等学校 宮城県仙台第二高等学校 秋田県立秋田中央高等学 校 山形県立鶴岡南高等学校 County Upper School Hinchley Wood School UCL Academy Seven Kings High School St Mary Redcliffe & Temple School Thomas Hardye Academy Rikkyo School in England	日英サイエンスワー クショップを通じた 国際的な交流	1,000
東京都立戸 山高等学校	田中義靖 (指導教諭)	東京都	新宿区立富久小学校 新宿区余丁町小学校 新宿区小学校理科教育研 究会 新宿区西早稲田中学校 新宿区立牛込第三中学校	生徒の主体的な活 動の場としての実 験観察体験におけ る小中高大連携の チームの編成とカリ キュラムの開発	950
岐阜県立八 百津高等学 校	貝川友子 (実習教諭)	岐阜県	岐阜大学応用生物科学部 岐阜県立加茂高等学校	生態系に悪影響を 及ぼすアルゼンチ ンアリの防除法	1,000
静岡科学館	長澤友香 (館長)	静岡県	静岡サイエンスミュージアム 研究会 静岡市理科同好会 科学の祭典静岡大会実行 委員会 静岡市教育委員会	理科授業のアクティ ブラーニングを支 援する教材プログラ ムの開発と活用	999
星陵中学 校・高等学 校	鈴木崇司 (教諭)	静岡県	東北大学農学研究科	次世代型「環(わ)」 の文化の提案	1,000
愛知県立稲 沢高等学校	長谷川光隆 (教諭)	愛知県	愛知文教女子短期大学 生 活文化学科 愛知県尾張農林水産事務 所 内藤記念くすり博物館 富山県薬事研究所 愛知県立佐屋高等学校 愛知県立安城農林高等学 校	地元特産薬用植物 とそれを用いた料 理の研究と普及	1,000

申請機関名	実務担当者 (職名)	都道府県	共同実施機関	テーマ	助成 金額 (千円)
愛知教育大学	児玉康一 (教授)	愛知県	富山県立富山視覚総合支援学校 石川県立盲学校 静岡県立静岡視覚特別支援学校 静岡県立沼津視覚特別支援学校 静岡県立浜松視覚特別支援学校 愛知県立名古屋盲学校 愛知県立岡崎盲学校 岐阜県立岐阜盲学校 三重県立盲学校 愛知県総合教育センター 日本福祉大学社会福祉学部 岐阜大学教育学部	視覚障害のある児童生徒に対する科学教育プログラム「科学ヘジャンプ・イン・東海(仮称)」の企画、実施と評価	900
滋賀県立高島高等学校	小林泰彦 (教諭)	滋賀県	高島市立今津中学校 高島市立マキノ中学校 滋賀県立大学 滋賀県農政水産部水産課	源流域と琵琶湖をつなぐ流域環境の探究 -奥山・里山・里湖-	1,000
同志社中学校	沼田和也 (教頭)	京都府	桃山学院中学校 滋賀大学教育学部附属中学校 奈良市立登美が丘中学校	アジアを中心とした科学技術キャンプの実施	808
山口県立下関工科高等学校	春日貴江 (教諭)	山口県	山口県立下関中央工業高等学校 山口大学大学院・理工学研究科	高校生による地域に科学の楽しさを伝える活動	900

申請 機関名	実務担当者 (職名)	都道 府県	共同実施機関	テーマ	助成 金額 (千円)
高等教育コ ンソーシウム 久留米	越地 尚宏 (久留米高専 教授(兼)高等 教育コンソー シウム久留米 小中高連携部 会長)	福岡県	久留米大学(含:医学部) 久留米工業大学 聖マリア学院大学 久留米信愛女学院短期大 学 久留米工業高等専門学校 久留米市 福岡県立青少年科学館 【参画/協力依頼予定校・ 機関】 久留米市内及び近郊小中 学高校 久留米市教育委員会 久留米市理科教育センター 福岡県教育委員会 佐賀県教育委員会 鳥栖市教育委員会 小郡市教育委員会 八女市教育委員会 久留米市近郊各企業	くるめ子どもキャン パス ー出前授業 や講座とサイエンス イベントで見て・考 え・体験してみよう ー	995
熊本高等専 門学校八代 キャンパス	上土井幸喜 (教授)	熊本県	熊本高専 熊本高専 沖縄高専 鹿児島高専 都城高専 有明高専 大分高専 佐世保高専 久留米高専 北九州高専 北九州高専	高専生による「小・ 中学生向け理科教 育支援」～高専サ イエンス支援ネット を利用したアイデア 募集と実施～	900
熊本県高等 学校教育研 究会地学部 会	淀川壮之典 (教諭)	熊本県	天草市立御所浦白亜紀資 料館 熊本大学大学院自然科学 研究科 熊本博物館ネットワークセン ター	大学や博物館等と 連携したジオパー クでのフィールドワ ークと成果発表の 取組 ～高校生ア ースサイエンスセミ ナー～	554

小計: 19件 17,922千円

平成28年度 科学教育振興 追加募集

1)小学生を巻き込んだ活動【プログラム】

学校名	実務担当者 (職名)	都道府県	共同実施機関	申請題目	助成金額 (千円)
宮城県石巻工業高等学校	佐光克己 (教諭)	宮城県	石巻市内小学校2校以上 石巻市内中学校2校以上	河川の災害に対して自分たちができることを考える	908
福島成蹊高等学校	山本剛 (理科教諭)	福島県		微小生物を活用した高校生(自然科学部員)による理科実践～自分たちで採集した微小生物を使った観察教室～	1,000
和洋国府台女子中学校高等学校	植田幹男 (教諭)	千葉県	和洋女子大学(予定) 千葉縣市川市近隣の小学校(予定)	小学生対象実験講座「放課後 Science Team」の企画・運営	1,000
台東区立忍岡小学校	吉藤玲子 (台東区立忍岡小学校校長)	東京都	台東区立上野中学校	わたしたちの海について知ろう!学ぼう!体験しよう!	925
たつの市立揖保川中学校	糸井香代子 (校長)	兵庫県	たつの市立龍野東中学校 たつの市立御津中学校 たつの市立誉田小学校 兵庫県立龍野高校 兵庫県立龍野北高校 たつの市教育委員会 たつの市青少年館 こどもサイエンスひろば	中高生が教える小学生のためのかがく教室	1,000
島根県立益田高等学校	福満晋 (教諭)	島根県	島根県益田市教育委員会 島根県教育委員会	益田市すべての小学校へのアウトリーチ活動「出前授業」・「理科読を楽しむ会」	1,000
北九州工業高等専門学校	山本和弥 (准教授)	福岡県		小学生への理科教育を通じた理系キャリア教育(特に女子生徒にむけて)	817
坊津学園	西村太希 (教諭)	鹿児島県	希望が丘学園鳳凰高等学校 鹿児島大学教育学部 坊津歴史資料センター 南さつま市商工会	科学的探求心を持ち、問題解決力を高め、未来を切り拓く児童生徒の育成	1,000

小計 8件: 7,650千円

2) 意欲的な小学校の先生方を支援する活動

学校名	実務担当者 (職名)	都道府県	共同実施機関	申請題目	助成金額 (千円)
新宿区立富久小学校	由木正浩 (主幹教諭)	東京都	新宿区立天神小学校 新宿区立余丁町小学校 新宿区立四谷第六小学校 新宿区立落合第四小学校	都心部の小学校に通う児童の科学的な見方や考え方を育む小学校連携	988
京都市野外教育研究会(京都市立第四錦林小学校)	橋本英敏 (代表幹事 (小学校教諭))	京都府		京都市野外教育研究会 自然観察プログラムおよび野外教育活動	713
兵庫県立尼崎北高等学校	吉田英一 (教諭)	兵庫県		ものづくり都市の子ども達と科学するペーパークラフト	150
兵庫県立西脇高等学校	川勝和哉 (教諭)	兵庫県	神戸大学他	西脇高校の生徒と近隣地域の小学校教員が共同で野外調査書や実験書を作成し授業を実施	1,000
安芸太田町教育委員会	沖本直樹 (学校教育課主幹)	広島県	東京大学 CoREF 新しい学びプロジェクト参加団体(21 団体) 日本技術士会中国本部 広島県立加計高等学校 安芸太田町立加計小学校 安芸太田町立筒賀小学校 安芸太田町立上殿小学校 安芸太田町立戸河内小学校 安芸太田町立加計中学校 安芸太田町立筒賀中学校 安芸太田町立戸河内中学校	アクティブラーニング(協調学習)による主体的・協動的に学ぶ科学教育プログラム	430
飯塚市立図書館(指定管理者:株図書館流通センター)	大石俊一 (飯塚市立図書館長 (指定管理者))	福岡県	福岡大学	公立図書館が地域で展開する新形式の読み聞かせー「理科読」への挑戦	500

合計 6件: 3,781 千円

IX. 国際学生交流プログラム助成対象者一覧

日本学生 参加メンバーとライス大学ホストラボ

	氏名	大学	専攻	学年	ホストラボ
1	平松 信義	東京大学	応用物理	3年生	Electrical & Computer Engineering
2	栗花 卓弥	筑波大学	気候学・気象学	4年生	Computational & Applied Mathematics
3	三輪 宏海	慶應大学	応用化学	4年生	Bioengineering
4	三好 壮哉	東北大学	電気物理情報工学	2年生	Electrical & Computer Engineering
5	高田 俊宏	立命館大学	環境システム工学	4年生	Materials Science & NanoEngineering
6	田中 達也	早稲田大学	機械工学	4年生	Mechanical Engineering
7	汪 雨濃	豊田工業大学	物理工学	3年生	Civil & Environmental Engineering
8	吉田 彩花	早稲田大学	総合機械工学	3年生	Mechanical Engineering

米国学生 参加メンバーとホストラボ

	氏名	大学	専攻	学年	ホストラボ
1	Ronald Ballouz	University of Texas, Austin	Electrical Engineering	Sophomore	慶應大学 理工学部
2	Brianna Garcia	Rice University	Chemical & Biomolecular Engineering	Freshman	東京大学大学院 工学系研究科
3	Daniel Gilmore	Purdue University	Computer Engineering & minor in Math	Sophomore	大阪大学 レーザーエネルギー学術研究センター
4	Mayssa Gregoire	St. Joseph's College New York	Undeclared – Intended Engineering	Freshman	大阪大学大学院 工学研究科
5	Benjamin Kaiser	Bethel University	Physics with minor in Math	Sophomore	信州大学 工学部
6	Erica Lin	Brown University	Applied Math & Biology with minor in East Asian Studies	Freshman	大阪大学大学院 工学研究科
7	Haihao Liu	Rice University	Materials Science & Nanoengineering with minor in Math	Sophomore	東北大学大学院 理学研究科
8	Shweta Modi	Cornell University	Biomedical Engineering	Freshman	千葉大学大学院 融合科学研究科
9	Brinda Malhotra	Carnegie Mellon University	Mechanical Engineering and Engineering & Public Policy	Sophomore	豊田工業大学 エネルギー材料研究室
10	Chandni Rana	University of Florida	Biomedical Engineering	Sophomore	東京大学大学院 工学系研究科
11	Donald Swen	Willamette University	Physics with minor in Math	Sophomore	大阪大学 産業科学研究所
12	Youssef Tobah	University of Texas	Austin, Electrical & Computer Engineering	Sophomore	東北大学 電気通信研究所

平成 28 年度贈呈式

主催者挨拶



軽部理事長

審査報告



梶谷審査委員長

贈呈書の授与



中谷賞大賞 杉浦氏



中谷賞奨励賞 竹内氏

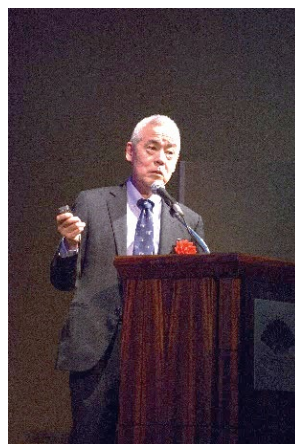


中谷賞奨励賞 柳澤氏

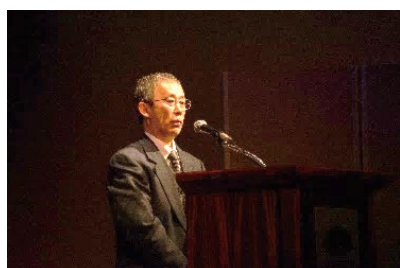
集合写真



受賞者、受領者のご挨拶とご講演



中谷賞大賞 杉浦氏



特別研究助成 小林氏



特別研究助成 山中氏



特別研究助成 相良氏

平成 26 年度特別研究助成の成果発表



日比野氏



田中氏



山名氏



矢田氏



西澤氏



石井氏

情報交換会・懇親会



ご挨拶 軽部理事長



乾杯のご発声 浅野理事



中締めご挨拶 家次専務理事

平成 27 年度(第 8 回)中谷賞研究概要

平成 27 年度（第 8 回）
中谷賞 研究概要

1. 大賞

ナノ・マイクロデバイスを用いたバイオセンサーの実用化に関する先導的研究

（大阪大学大学院工学研究科 教授 民谷 栄一） ----- 38

2. 奨励賞

標的に結合解離する蛍光プローブを用いた超解像蛍光顕微鏡法の開発

（京都大学大学院医学研究科 准教授 木内 泰） ----- 47

脳運動機能の回復を支援する BMI の開発

（慶應義塾大学理工学部 准教授 牛場 潤一） ----- 55

注 1 所属等は助成研究実施時または執筆された当時のものです。

平成27年度（第8回） 中 谷 賞 研 究 概 要

ナノ・マイクロデバイスを用いたバイオセンサーの実用化に関する先導的研究



大阪大学 大学院工学研究科
ナノバイオ工学研究領域
教授 民谷 栄一

1. はじめに

生体の有する優れた分子認識機能に着目し、この分子認識反応を的確に検知できる物理化学デバイスから構成されるバイオセンサーは、生化学診断マーカー分子を直接測定できる装置として種々開発され、医療診断分野への貢献は大きい。たとえば、世界市場数千億円にも及ぶとされる自己血糖値診断装置をはじめ、代謝低分子、酵素活性、抗原抗体反応、特定遺伝子などの診断を行なう装置が種々開発されている。こうしたバイオセンサー開発において、採取する少量の生体試料からできるだけ多くの生体情報を簡便かつ効果的に入手することやパーソナル POCT 診断に向けた操作性の良い装置開発に向けた課題解決が求められている。特に、非標識、マルチ計測、操作性（迅速、小型化、簡便性）などを実現する技術開発が大きな課題となっている。こうした課題を解決する上で、我々は、ナノ構造の特性に基づいて非標識での計測やマルチ計測可能なバイオセンシングなどを開発した。さらに、マイクロ流体デバイスや操作性の良い印刷電極を用い、ナノ機構に基づく新たな遺伝子診断、免疫センシングの手法を開発し、パーソナル診断に向けた道筋を

検討した。

2. ナノデバイスを用いた非標識・マルチバイオセンサーの開発

バイオセンシングでは、酵素や蛍光標識を用いて生体の分子認識反応を計測する手法がもちいられているが、蛍光性の有機分子や量子ドットなど高価な標識剤を用いたり、標識反応操作に伴う煩雑さやそれに伴うアーティファクトなどの問題点を有していた。そこで、ナノ金属構造の光特性である局在表面プラズモン共鳴現象に着目したナノデバイスを用いたバイオ分析に取り組み、ナノキャップ周期構造、光干渉とカップリングするナノ構造、ナノピラーアレイ構造などの独自の金ナノ構造を創成し、局在表面プラズモン共鳴現象を用いた非標識バイオセンサーの開発に成功している。とくに、金薄膜上にシリカナノ粒子を単層に配列させ、その粒子にスパッタ法を用いて金をナノ被覆することにより、金ナノキャップ構造の周期配列を形成させたチップ上に数百種類の抗体分子を配置した非標識なマルチ抗体センサーを開発した。また、ナノデバイスとして一本のカーボンナノチューブを用いた FET デバイス

に、アプタマー分子を直接配置した ナノ機能材料としてカーボンナノチューブ(CNT)を用いた Single CNT-FET デバイスに着目し、これにペプチド核酸 やアプタマー分子を分子認識素子として FET ゲート部位に配置し、特定配列を有する DNA や抗原分子との結合をソース・ドレイン電流として捉える標識剤不要なナノバイオセンサーの開発も行った。

2.1 局在表面プラズモン共鳴型ナノデバイスを用いた非標識・マルチバイオセンサー(1-6)

ナノ構造の特性を生かしたバイオ分析の手法を種々開拓しているが、その中でもナノ領域の近接場光を積極的にバイオ分析に活用すべく、ナノ金属構造の光特性である局在表面プラズモン共鳴現象に着目したナノデバイスを用いたバイオ分析に取り組んでいる。図1に示すように、ナノキャップ周期構造、光干渉とカップリングするナノ構造、ナノピラーアレイ構造などの独自の金ナノ構造に着目し、局在表面プラズモン共鳴現象を用いた非標識バイオセンサーの開発を行った。当初、金薄膜上にシリカナノ粒子を単層に配列させ、その粒子にスパッタ法を用いて金をナノ被覆することにより、金ナノキャップ構造の周期配列を形成させた。この上に種々の認識分子を固定化し、

それらに応じた測定分子が結合する際に生ずる局在表面プラズモン共鳴に基づく吸収波長の変化を指標として非標識な分析を可能とした。このナノデバイスは、集積化が可能で、金属ナノ構造を300個配置したアレイ集積センサーで多項目の生体分析 (IgE, IgG, IgA, IgD, フィブリノーゲン、CRP など)を1滴の試料から同時測定可能なハイスループットバイオセンサーを実現した。この成果が局在表面プラズモン共鳴のバイオ分析分野への応用として評価され、このナノバイオデバイスにより変異遺伝子、ペプチド、RNA アプタマー、tau タンパク、細胞が放出するサイトカイン、感染菌遺伝子などの分析を可能とした。さらに、PCR のリアルタイム計測を短時間で行うことや細胞膜の糖鎖分子を識別分子に用いてペロ毒素、コレラトキシンの分析も可能で本法の適用性の広さを示すことができた。LSPR チップ上で電気化学計測を同時に行い、脂質膜とペプチド毒素との相互作用解析にも応用展開している。また、ナノインプリント法に着目し、アルミナ電解により形成されたナノホールアレイ構造を鋳型として量産可能な COP (サイクリックオレフィン樹脂)製のナノピラー構造の局在表面プラズモン共鳴デバイスの作成にも成功しており、より実用的なバイオセンサーの開発も進めている。

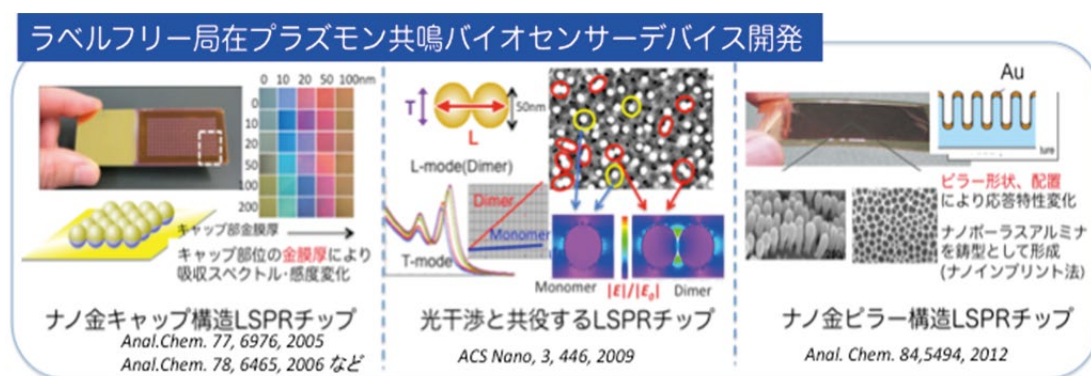


図1 開発した局在プラズモン共鳴型デバイス

2.2 CNT-ナノデバイスを用いた非標識バイオセンサー(7,8)

次に、ナノ機能材料としてカーボンナノチューブ(CNT)を用いた Single CNT-FET デバイスに着

目し、これにペプチド核酸 (PNA)を分子認識素子として FET ゲート部位に配置し、特定配列を有する DNA との結合をソース・ドレイン電流として検知する非標識分析法を開発した。PNA は、

通常の核酸が負の電位を示すのに対して電荷を持たないため、相補 DNA との結合による電位変化が顕著となり、より高感度に分析ができることが示された。また、Single CNT-FET デバイスでは、分子認識領域が CNT 表面からのデバイ長として理解されるため、認識部位がデバイ長と比べて大きな抗体分子より小さい DNA アプタマー分子の優位性が示され、ナノ構造デバイスによって分子認識ナノ領域の設計指針が異なることも明らかとした。さらに、CNT アレイを用いる電流型バイオセンサーの開発も行った (図 2)。

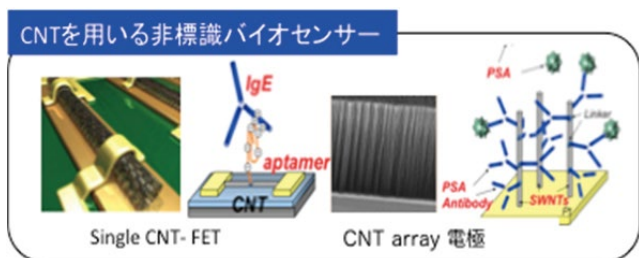


図2 開発した CNT を用いるバイオセンサー

3. 電気化学活性を指標とするナノセンシング機構の創成と印刷電極を用いたバイオセンサー

3.1 金ナノ粒子の電気化学活性を用いた免疫センサー (9,10)

金ナノ粒子の有する電気化学活性や触媒活性を利用した免疫アッセイ法の創成を行った。まず、金ナノ粒子を用いた新たな免疫アッセイを創案した。この方法は、GLEIA (Gold Linked Electrochemical Immuno Assay) と称するもので、印刷電極の作用電極上に抗体を固定し、金ナノ粒子標識抗体と抗原でサンドイッチを形成させ、電極上に結合した金ナノ粒子を塩酸溶液中での電解電流値として測定する (図 3)。これを用いてヒト絨毛性ゴナドトロピンを 6.2 pg/mL の高感度測定が可能であった。グラフェンを印刷電極の作用電極に用いることにより感度の向上も行った。また、金ナノ粒子上にアプタマー分子を認識分子として配置固定化し、これらが認識するトロンピンや IgE との結合に伴う金ナノ粒子の還元電流の変化量として分析できる可能性も示した。臨床医学研究者との共同により、POCT 診断を指向したイン

シュリンと血糖値を測定する携帯型の HOMA センサー開発にも成功している。

3.2 DNA—電気化学活性分子のナノ集合体を用いた遺伝子センサー (9,10)

特定の DNA を分析するために、DNA 結合性の電気化学活性分子に着目し、ビスベンゾイミド誘導体が DNA との相互作用より大きな電気化学応答変化を与えることを見いだしている。これは、DNA とビスベンゾイミド誘導体が約 10nm のナノ集合体を形成し、電極への電子移動速度に影響を与えるため、酸化電流減少量が遺伝子量と相関することを明らかにした。この方法は電極に DNA を固定化する操作も不要で実用性が高い (図 3)。すでにこの独自の測定原理をもとに、病原性を有するサルモネラ菌、大腸菌、歯周病菌、肝炎ウイルス、インフルエンザ RNA ウイルスや ApoE (アルツハイマーリスク因子) などの SNPs (1 塩基多型)、遺伝子組み換え食品や食用肉種の判定など種々応用展開できた。さらにこの遺伝子診断センサーの実用化を計るために印刷電極、迅速遺伝子増幅マイクロ流体チップ、ポータブル小型ポテンシオスタット装置を独自に開発し、POCT (ポイントオブケア診断) をめざしたバイオセンサーへの展開を行った。

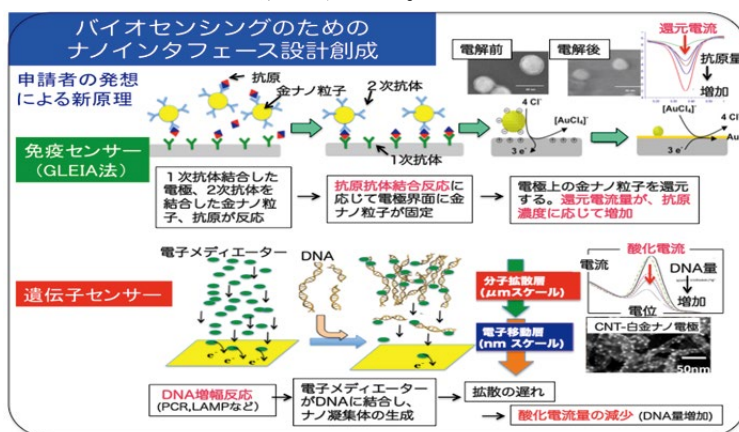


図3 電気化学ナノバイオセンシング

3.3 マイクロ流体デバイスを用いる迅速遺伝子センシング (11, 12)

ベッドサイドやその場検出を目的とし POCT を目指した遺伝子検出のためには、迅速な計測が

求められる。そこで、ソフトリソグラフィー技術を用いて作製した **Microfluidic RT-PCR チップ** によるインフルエンザ遺伝子の迅速増幅、及び小型印刷電極を用いた電気化学測定による検出を行った (図4)。結果として、新型ヒトインフルエンザ RNA からの RT-PCR を 10 分ほどで可能とし、また電気化学測定においても増幅の有無のみならず定量的な評価を可能とした。また、すでに実用化されている金ナノ粒子を用いたイムノクロマト法においては、抗体が標識された金ナノ粒子が抗原と結合し、ペーパー担体上の抗体との結合により金ナノ粒子が集積し、プラズモン共鳴による発色として検知した。このイムノクロマトと RT-PCR マイクロ流体チップを組み合わせたシステムでインフルエンザウイルスの遺伝子を検知できる方法にも展開できた。

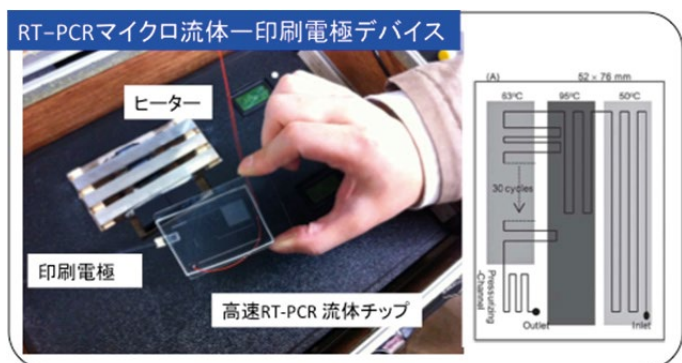


図4 マイクロ流体-印刷電極型遺伝子センサー

4. マイクロ流体デバイスを用いたシングル細胞機能解析(13-15)

近年、マイクロチップテクノロジーの発展によって、緻密でかつ複雑な構造を有する様々なチップデバイスが可能となり、DNA チップに代表されるマイクロアレイだけでなく、流路 (フロー) 型のチップデバイスも盛んに研究開発されている。その理由としては、流路型チップの特徴として、アレイ型チップとは異なり溶液交換などが容易であるため、細胞分離、細胞破壊、検出などを一枚のチップ上ですべて行おうとすること (ワンチップ化) が可能である。すでに流路型チップを作製し、独自のセルソーティング技術と連携させ、一細胞レベルでの網羅的細胞解析システムの開

発を進めている。開発されたマイクロ流路型細胞チップは、オイル溶液と細胞溶液を別々の流路から送液し、二相液が合流したフローチャンネル中でピコリッターレベルの二相液のコンパートメント流体を交互に作成し、細胞溶液をオイル溶液によって一細胞ごとに分離する従来にはない原理を用いて、流路内で多数の単一細胞を同時に検出するシステムを開発している。さらに、遠心回転操作により細胞を分離、1細胞毎に配置できる遠心型マイクロ流体チップを作成した。具体的には図5に示すような1細胞トラップサイトを流路内に多数形成させ、これに心筋細胞をトラップさせた。その後、培養液を移送し、細胞培養を継続させながら、細胞形態の変化や拍動状態を画像解析により行った。これによりシングル細胞レベルで拍動を捉えることに成功した。拍動数が培養時間とともに変化し、72-96時間後に最大の拍動数を示した。心筋細胞は心房性細胞、心室性細胞、結節性細胞などヘテロであり、これらに由来して拍動状態の相違が観測されると考えられた。また、培養過程で複数の心筋細胞が連結することにより拍動周期が同調する現象も捉えられている。

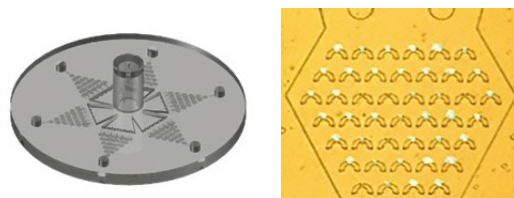


図5 遠心マイクロ流体型シングル細胞デバイス

5. 電気化学発光バイオセンシング

発光には、電気エネルギーから光へと変換する物理的な方法と化学反応を用いる方法がある。すなわち、物理的な方法として固体やガスを用いて熱輻射フィラメント (ジュール熱)、蛍光灯 (ガス放電)、発光ダイオード (半導体 pn 接合) などがある。また、ホタルの発光反応やケミカルライトに用いられるように反応中間体の結合の開裂を伴って起こる化学発光が知られている。電気化学発光とは、電極上で起こる電気化学反応により、

反応中間体が生成し、誘起される発光反応である。電極上での電位制御により発光反応の開始をコントロールできるため、通常に化学発光法に比べて正確な計測が可能である。ここでは、ルミノール電気化学発光を用いた。すなわち、+0.2~+0.3V付近で電極表面において、ルミノールが酸化され、ラジカルやジアゾキノンとなる。それらが、 O_2^- や H_2O_2 などの活性酸素種 ROS(Reactive Oxygen Species)と反応し、励起状態になった後、基底状態になる際に光を発する。-1~-0.5 Vを印加することにより電極上に ROS を生成させれば、外部から ROS を加える必要もなく発光を誘発できる。

5.1 活性酸素の検出と好中球の活性酸素生成能の診断 (16,17)

すでに前述したように活性酸素の検出に電気化学発光のシステムを利用できる。すなわち、プラスの電位を印加すれば、ルミノールが酸化され、溶液中に活性酸素があれば、反応し、発光を生成する。そこで、電位を 0~700 mV まで走査し、その発光がピークとなる電位での発光量を計測した。そこで、過酸化水素を用いて測定を行なったところ、0.1~100 μ M の範囲での測定が可能であった。電気化学のみでの測定では、10~100 μ M 程度の測定感度であるため、電気化学発光を指標にすれば、過酸化水素を 100 倍程度高感度に測定できることが示された。測定時間も数秒程度で良く、迅速な測定が可能であった。

そこで、この原理を利用して細胞が生成する活性酸素の測定を行なった。ここでは、好中球細胞に着目した。好中球細胞は、ヒト末梢血 1 μ L のなかに、2000~7500 個程度含まれており、生体防御に深くかかわっており、生体内に入り込んだ細菌を貪食殺菌する働きを担っている。好中球は遊走し、炎症部分に集まり細菌に接触すると表面のレセプターの働きによって、それらを異物とみなし接着結合し、殺菌を行うが、その方法として、活性酸素の一種であるスーパーオキシドアニオン O_2^- や過酸化水素を生成する。特に、NADPH

オキシダーゼ(NOX)によりスーパーオキシドアニオンが生成し、これがスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)により過酸化水素となる。また、ミエロペルオキシダーゼ (MPO)によって、HOCl も生成される。好中球の産生する活性酸素は、生体内の免疫機構において重要な働きをしているが、過剰な活性酸素は血管炎を引き起こすことが知られている。そこで、好中球の活性酸素の生成活性について調べることは診断上も意義がある。ここでは、好中球を活性化させ、その際に生成する活性酸素を電気化学発光により検出を試みた。まず、電極上に活性酸素を生成した好中球の試験液を配置し、電圧を印加することで生じる発光を検出し、好中球が生じる活性酸素を定量的に検出した。電極表面上に絶縁体で形成された ϕ 200 μ m の微小孔を多数有する電極を用い、活性化好中球が生成する活性酸素を測定した。好中球細胞の電極上のマイクロチャンバーでの測定構築したプリンタブル電極を用いた電気化学発光システムにより、ルミノールが過酸化水素と反応し生じた発光量を、高感度フォトマル検出装置を用いて定量化できた。健常者の血液から好中球を分離し、活性酸素の生成を誘導する試薬である PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)を添加した後、高感度フォトマル検出装置を用いて発光測定を行った。その結果、好中球の濃度が大きくなるにつれ、発光強度が大きくなった。さらに PMA の濃度を変化させて実験を行い、得られた発光強度から活性酸素の量を算出すると、PMA が 25 μ M のときに最大 25 μ M(過酸化水素換算)であった。さらに、構築した活性酸素イメージングシステムにより、電極上にチャンバー構造を設けた電極を用いて好中球が生成する活性酸素をイメージングした。その結果、好中球に PMA を添加した場合は、添加していない好中球と比べ強く発光している様子がみられ、好中球由来の活性酸素のイメージングに成功した。1つのチャンバーに存在する好中球の数は、計算上 1 または 2 個であり、新規に構築した本システムは、ハイス

ループットアッセイや単一細胞解析への応用が可能である。(図6)

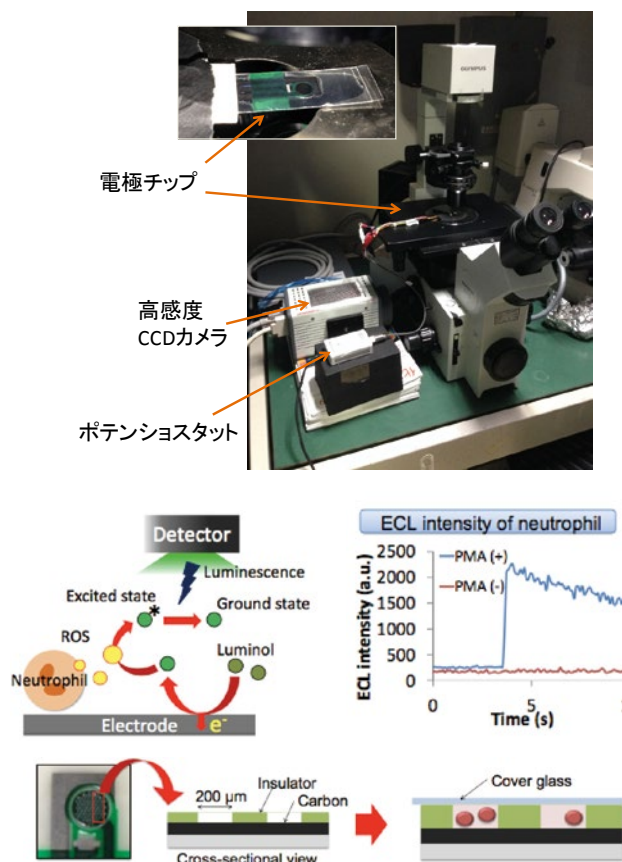


図6 マイクロチャンバーアレイ電極を用いた電気化学発光システムと活性化好中球の活性酸素生成の検出

5.2 酵素反応とリンクした電気化学発光バイオセンサー

(1) グルコース、尿素センサーへの応用 (18,19)

次に、金ナノ粒子上にルミノール誘導体を形成させ、これにグラフェンナノリボン (GONR) を被覆した電極上に配置した。この電極は、所定電位を印加することにより、ルミノールが酸化され、電気化学発光を示したが、GONR を被覆しない場合と比較して酸化電位が低下するとともに高い発光活性を示した。このことは、GONR が、金ナノ粒子-ルミノール複合体の電気化学発光活性種の生成を触媒するものと推察された。そこで、これを酸化酵素と連動させてグルコース測定を検討したところ、11~25 μ M で測定が可能であった。

さらに血清を用いた実用試料についても測定が可能であることが示された。さらに、この金ナノ粒子-ルミノール複合体を被覆した電極の pH 特性を調べたところ、アルカリ側に移行するに連れて高い発光量が示された。そこで、これを活用するためにウレアーゼ酵素を用いて尿素の測定を行った。尿素濃度の増加に伴い、酵素反応溶液がアルカリ側へと変動することが明らかとなり、その結果、発光活性の増大が認められた。発光活性と尿素濃度 2~20mM の範囲で相関が認められた。

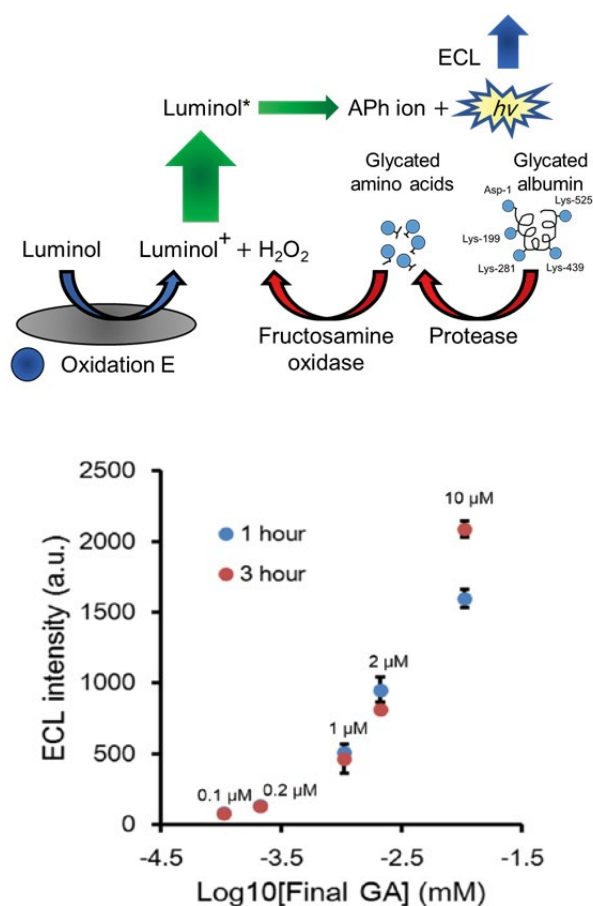


図7 糖化アルブミンの測定原理(上)と検量線(下)

(2) 糖化ヘモグロビンの高感度計測への応用 (20)

次に、血清中の糖化アルブミンの測定にこの電気化学発光システムを用いた。ここでは、タンパク分解酵素により糖化アルブミンを分解し、生成する糖化アミノ酸を酸化酵素を用いて過酸化水素を生成させ、電気化学発光により計測した(図7)。その結果、血清中の糖化アルブミンを検出

下限 0.1 μM で検出できた。これは、従来法と比較して100倍程度の感度向上を達成できた。また、高感度であることから唾液中の糖化アルブミンの測定も可能であることも示された。

6. まとめ (21)

以上のように、金ナノ構造や CNT の有するナノの特性に着目したナノデバイスを用いて非標識なバイオセンシングを可能とするナノバイオセンサーを開発した。また、金ナノ粒子やバイオ分子が有するナノ機能に基づいてバイオ分子認識に寄与するナノ機構を種々設計創成し、これらを電気化学活性を指標とするバイオセンサーに応用した。とくに印刷電極とポータブルな小型電気化学測定装置を用い、マイクロ流体デバイスの迅速な遺伝子増幅デバイスとも連携して感染菌・ウイルス、がんマーカー、ホルモン、生菌数などのバイオセンシングを可能とした。このように、ナノデバイス、マイクロ流体デバイス、バイオ分子認識を行うインタフェースが連携することにより、非標識、マルチ計測、POCT 計測のための操作性などを考慮したバイオセンサー研究を推進した (図 8)。一方、すでに医学系の研究者との連携で実際の臨床試料を用いた検討も積極的に進めており、その成果はこうした臨床診断・治療、創薬分野での展開はいうまでもなく、食の安全や環境保全などにも貢献できるもので、幅広く期待される。

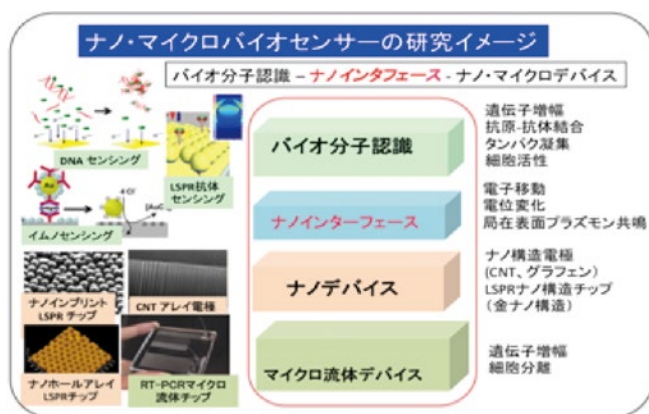


図 8 ナノ・マイクロバイオセンサー研究の構成

参考文献

- 1) Multiple label-free detection of antigen-antibody reaction using localized surface plasmon resonance based core-shell structured nanoparticle layer nanochip, Tatsuro Endo, Kagan Kerman, Ha Minh Hiepa, Do-Kyun Kim, Yuji Yonezawa, Koichi Nakano, Eiichi Tamiya, *Analytical Chemistry*, 78(18) 6465-6475 (2006)
- 2) Excitation of localized surface plasmon resonance using core-shell structured nanoparticle layer substrate and its application for label-free detection of the biomolecular interactions, Tatsuro Endo, Kagan Kerman, Naoki Nagatani, and Eiichi Tamiya, *The Journal of Physics Condensed Matter* 19(21), 215201 (2007)
- 3) Label-free detection of melittin binding to a membrane using electrochemical-localized surface plasmon resonance, Ha Minh Hiep, Tatsuro Endo, Masato Saito, Miyuki Chikae, Do Kyun Kim, Shohei Yamamura, Yuzuru Takamura, Eiichi Tamiya, *Analytical Chemistry*, 80(6) 1859-1864 (2008)
- 4) An interference localized surface plasmon resonance biosensor based on the photonic structure of Au nanoparticles and SiO₂/Si multilayers, Ha Minh Hiep, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito, Eiichi Tamiya, *ACS Nano*, 3 (2), 446-452 (2009)
- 5) Novel gold-capped nanopillars imprinted on a polymer film for highly sensitive plasmonic biosensing, Masato Saito, Akito Kitamura, Mizuho Murahashi, Keiichiro Yamanaka, Le Quynh Hoa, Yoshinori Yamaguchi, Eiichi Tamiya, *Analytical Chemistry*, 84(13) 5494-5500 (2012)
- 6) Pressure free nanoimprinting lithography using ladder-type HSQ material for LSPR biosensor chip, Shu Jiang, Masato Saito, Mizuho Murahashi, and Eiichi Tamiya, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 242, 47-55 (2017)
- 7) Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors, Kenzo Maehashi, Taiji

- Katsura, Kazuhiko Matsumoto, Kagan Kerman, Yuzuru Takamura, Eiichi Tamiya, *Analytical Chemistry*, 79(2), 782-787(2007)
- 8) Label-free immunosensor for prostate specific antigen based on single-walled carbon nanotube array modified microelectrodes, Jun Okuno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kagan Kerman, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (9,10) 2377-2381, (2007)
- 9) Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes, Minhaz Ahmed, Mohammad Hossain, Mohammad Safavieh, Yen Wong, Ibrahim Rahman, Mohammed Zourob and Eiichi Tamiya, *Critical Reviews in Biotechnology* 36(3) 495-505 (2016)
- 10) 民谷栄一 : ポイントオブケア型バイオセンサーの開発とその展開、*臨床化学* 44, 126-134 (2015)
- 11) Rapid detection for primary screening of influenza A virus: microfluidic RT-PCR chip and electrochemical DNA sensor, Keiichiro Yamanaka, Masato Saito, Kenji Kondoh, Mohammad Mosharraf Hossain, Ritsuko Koketsu, Tadahiro Sasaki, Naoki Nagatani, Kazuyoshi Ikuta and Eiichi Tamiya, *Analyst*, 136, 2064-2068 (2011)
- 12) Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip, Naoki Nagatani, Keiichiro Yamanaka, Hiromi Ushijima, Ritsuko Koketsu, Tadahiro Sasaki, Kazuyoshi Ikuta, Masato Saito, Toshiro Miyahara and Eiichi Tamiya, *Analyst* 137, 3422-3426 (2012)
- 13) Single Cell Trapping and Cell-Cell Interaction Monitoring of Cardiomyocytes in a Designed Microfluidic Chip, Wilfred Espulgar, Yoshinori Yamaguchi, Wataru Aoki, Daiki Mita, Masato Saito, Jong-Kook Lee, Eiichi Tamiya, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207, 43-50 (2015)
- 14) Centrifugal microfluidic platform for single-cell level cardiomyocyte-based drug profiling and screening, W. Espulgar, W. Aoki, T. Ikeuchi, D. Mita, M. Saito, J.-K. Lee and E. Tamiya, *Lab Chip*, 15, 3572-3580 (2015)
- 15) デジタルバイオデバイス—網羅的 1 分子・1 細胞解析に向けて— 民谷栄一、*分析化学* 64, 397-411(2015)
- 16) Rapid sensing of antioxidant capacity based on electrochemiluminescence induced by electrochemically generated reactive oxygen species, Naoki Nagatani, Yuki Inoue, Akiko Araki, Hiromi Ushijima, Gen Hattori, Yasuhiro Sakurai, Yutaka Ogidou, Masato Saito, and Eiichi Tamiya, *Electrochimica Acta*, 222, 680-686 (2016)
- 17) Quenched Electrochemiluminescence Imaging using Electro-Generated Substrate for Sensitive Detection of Catalase as Potential Enzyme Reporter System, Inoue, Masato Saito, Hiroyuki Yoshikawa, Eiichi Tamiya, *Electrochimica Acta*, 240, 447-455 (2017)
- 18) Enhanced Electrochemiluminescence of N-(aminobutyl)-N-(ethylisoluminol) Functionalized Gold Nanoparticles by Graphene Oxide Nanoribbons, Nur Syakimah Ismail, Quynh Hoa Le, Quamrul Hasan, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito and Eiichi Tamiya, *Electrochimica Acta* 180(20) 409-418 (2015)
- 19) Electrochemiluminescence Based Enzymatic Urea Sensor Using Nanohybrid of Isoluminol-gold Nanoparticle- graphene Oxide Nanoribbons, Nur Syakimah Ismail, Le Quynh Hoa, Vu Thi Huong, Yuki Inoue, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito, and Eiichi Tamiya, *Electroanalysis*, 9, 938 - 943(2017)
- 20) Sensitive Detection of Glycated Albumin in Human Serum Albumin Using Electrochemiluminescence", Yuki Inoue, Mikako Inoue, Masato Saito, Hiroyuki Yoshikawa and Eiichi Tamiya, *Anal. Chem.*, 89 (11), pp 5909-5915(2017)

21) Nanobiosensors and Nanobioanalyses (Eds. Vestergaard, M.C., Kerman, K., Hsing, I.-M., Tamiya, E.) *Springer (2015)*

平成27年度（第8回） 中谷賞研究概要

標的に結合解離する蛍光プローブを用いた超解像蛍光顕微鏡法の開発



京都大学大学院医学研究科
神経・細胞薬理学
准教授 木内 泰

1. はじめに

蛍光顕微鏡による細胞内タンパク質の観察は、多種のタンパク質によって制御される生命現象（分裂や移動など）を理解する上で極めて重要である。しかし、1873年にAbbeによって示された蛍光顕微鏡の分解能の理論的な限界（約200 nm）は、わずか数ナノメートルの大きさのタンパク質の観察において長い間障壁となってきた¹⁾。この分解能の限界は、2000年頃から新しい励起方法や照明方法を導入した顕微鏡法の開発によって打ち破られていった²⁾。これらは、超解像蛍光顕微鏡と呼ばれ、代表的な方式としてSTED（誘導放出制御顕微鏡法：Stimulated emission depletion microscopy）、SIM（構造化照明顕微鏡法：Structured illumination microscopy）、PALM/STORM（光活性化局在性顕微鏡法／確率的光学再構築顕微鏡法：Photoactivated localization microscopy/Stochastic optical reconstruction microscopy）の3つがある^{3),4)}。STEDとPALM/STORMでは、蛍光ラベルされた2つの物体を分離識別できる距離は、従来の蛍光顕微鏡の限界より一桁小さい距離まで到達している。これらの超解像蛍光顕微鏡法を用いて、

従来は観察できなかった微小領域でのタンパク質の分布が観察されている^{5),6)}。2014年のノーベル化学賞は、STEDの開発者Hell博士とPALMの開発者Betzig博士に授与されている。現在、これらの超解像蛍光顕微鏡は、主要な顕微鏡メーカーから販売され、急速に世界中に広まっている。

しかし、分解能が高くなったために逆に抗体染色の不均一さや蛍光タンパク質でラベルした標的タンパク質の密度の低さが露になりやすくなっている。このため、超解像顕微鏡法で得られる画像が標的タンパク質の分布を必ずしも正確に反映していないことが問題になっている^{7),8)}。蛍光顕微鏡で得られる画像の分解能は、蛍光ラベルされた2つの標的物が分離識別できる間隔だけでなく、標的物のラベル率によっても影響を受ける。例えば、2つの蛍光ラベルを分離識別できる距離が20 nmの超解像顕微鏡法で、20 nmに1個の密度で蛍光ラベルした一本のアクチンフィラメントを可視化する。その場合、アクチンフィラメントは、連続的な物体ではなく、20 nm毎に隙間のある物体として画像化されてしまう。2点間の分離識別距離が20 nmの顕微鏡法ならば、ラベル密度は少なくとも10 nmに1個でなければ、

アクチンフィラメントを連続的な物体として画像化できない。これは、ナイキストのサンプリング定理と呼ばれ、ラベルされた物体の間隔の2倍以下の範囲では、物体の分布や形状は正確に捉えられないことを示している⁷⁻¹⁰。STED や PALM/STORM では、2点間の分離識別距離は10~20 nm に到達しているが、標的のラベルを5~10 nm に1個入れることは非常に難しい。蛍光抗体を用いた場合、抗体自体の大きさが10 nm 以上もあるため、抗体同士が狭い範囲で物理的に干渉してしまうため、標的のラベル率は制限される。また蛍光タンパク質を用いる場合、蛍光タンパク質を融合した標的タンパク質と内在性の標的タンパク質の発現量比によってラベル率は低下してしまう。さらに多重染色する場合、蛍光色素の種類に限られているだけでなく、狭い範囲にある複数の標的分子をラベルすることはより難しい。以上のことから2点間の分離識別距離がより小さくなった超解像蛍光顕微鏡法では、より均一かつ高効率なラベル方法が必要とされている。このラベルにおける問題を解決するため、私は、標的に結合解離する蛍光プローブを用いた新しいラベル方法を開発した。そして標的のラベル率と観察できるタンパク質の種類数に理論上の上限のない超解像顕微鏡法 IRIS (Image Reconstruction by Integrating exchangeable Single-molecule localization) を構築した¹¹。

IRIS は、PALM や STORM といった蛍光単分子の位置の高精度計測に基づく超解像顕微鏡法の原理を応用している。PALM/STORM では、標的に強く結合している蛍光抗体や蛍光タンパク質を光スイッチングや光活性化によって疎らに発光させ、標的分子の位置を蛍光単分子として画像を取得する (図 1 A)^{12, 13}。個々の蛍光単分子の蛍光強度分布をガウス分布でフィッティングし、各分子の位置を光の回折限界以下の分解能で決定する。この蛍光単分子画像を $10^3 \sim 10^5$ 枚取得し、各蛍光プローブの位置情報を得る。それらを積算することで、蛍光ラベルされた標的分子の空間分布の高分解能な画像が再構築される。しかし、位置精度が高いにも関わらず、蛍光抗体や蛍光タンパク質によるラベル率の限界のために 20 nm 以下の範囲で標的タンパク質の分布を忠実に可視化することは難しい。一方、IRIS では、標的に強く結合している蛍光抗体や蛍光タンパク質に代わり、標的に素早く結合解離する蛍光プローブを用いる (図 1 B)¹¹。標的に結合している時の IRIS 蛍光プローブは、蛍光単分子画像として取得される。プローブは繰り返し結合 (つまりラベル) するので、取得する蛍光単分子画像の枚数に増やせば、標的のラベル率を上限なく高めることができる。そして結合したプローブの高精度な位置情報を積算することで、高密度にラベルされた標的分子の空間分布の高分解能画像を得る。さらに結

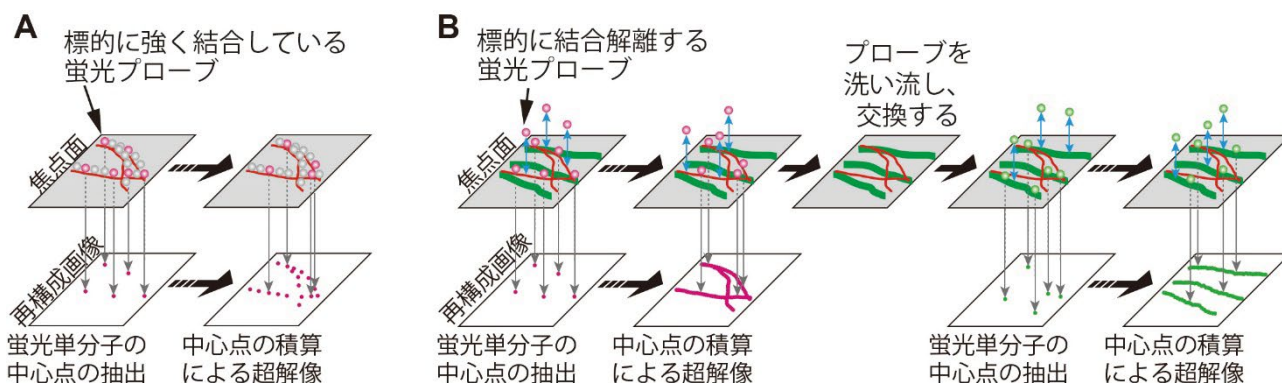


図1 超解像顕微鏡法 PALM/STORM と比較した IRIS の優位性。PALM/STORM (A) では、標的に蛍光抗体や蛍光タンパク質を結合させ、それらをまばらに発光させる。IRIS (B) では、標的に結合解離する蛍光プローブを用いて標識する。PALM/STORM では標識密度に限界があるが、IRIS では取得する画像枚数を増やすことで標識密度を上限なく高めることができる。さらにプローブを交換することで、多種類の標的を画像化できる。

合解離プローブは、簡単に洗い流して次の標的に対する蛍光プローブと交換できる (図 1 B)。標的 A に対する蛍光プローブで多数枚の蛍光単分子画像を取得した後、プローブを洗い流し、標的 B に対するプローブと交換する。この蛍光単分子画像の取得とプローブの交換を順次行うことで、複数の標的を連続的に高密度ラベルし、多重染色超解像画像を得ることができる。

私は、この IRIS の高密度ラベリングのコンセプトの検証をアクチン結合ペプチドである Lifeact で行った。Lifeact は、酵母のアクチン結合タンパク質である Abp140 のアクチン結合ドメイン (17 アミノ酸) であり、アクチンのマーカーとして広く使われている¹⁴⁾。私は、蛍光色素 Atto488 でラベルした Lifeact のアクチン線維上での結合解離を蛍光単分子可視化法^{15, 16)}を用いて計測した。Lifeact は、アクチン線維上で素早く結合解離を繰り返しており、その結合の半減期

は 23 ミリ秒であった。私は、試験管内で重合させたアクチン線維を Lifeact でラベルし、20 万枚の蛍光単分子画像を取得した。アクチン線維に結合した Lifeact の中心位置をコンピュータプログラム DAOSTORM¹⁷⁾によって決定し、多数の位置情報を積算することで、アクチン線維の再構築画像が得られた (図 2 A)。1 本のアクチン線維の平均半値幅は 23 nm で可視化され (図 2 B)。また固定、膜を可溶化した細胞に Lifeact を加えて、アクチン細胞骨格の可視化も行った (図 3 A)。その再構築画像では、50 nm 離れて並んでいる 2 本の細いアクチン線維が識別できた (図 3 B, D)。Lifeact の蛍光単分子画像を足し合わせた画像 (従来の蛍光顕微鏡像と同等の分解能の画像) ではこのような細いアクチン線維は観察できなかった (図 3 C)。これらの結果から結合解離プローブを用いても PALM/STORM に匹敵する高分解能な画像が得られることが示された。

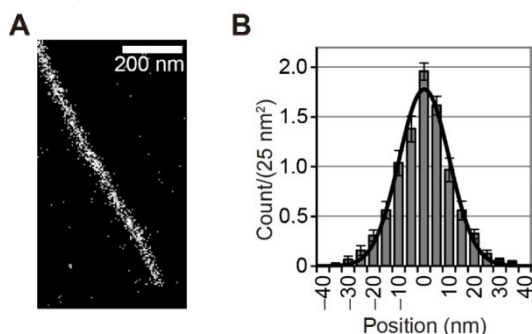


図2 IRISによるアクチン線維の超解像画像化 (A)Atto488-Lifeactで標識したアクチン線維1本の再構築画像。(B)1本のアクチン線維の横断面の強度分布。10本のアクチン線維の平均値。黒い曲線は、半値幅23nmのガウシアン分布でフィッティングした結果を示している。文献11を改変。

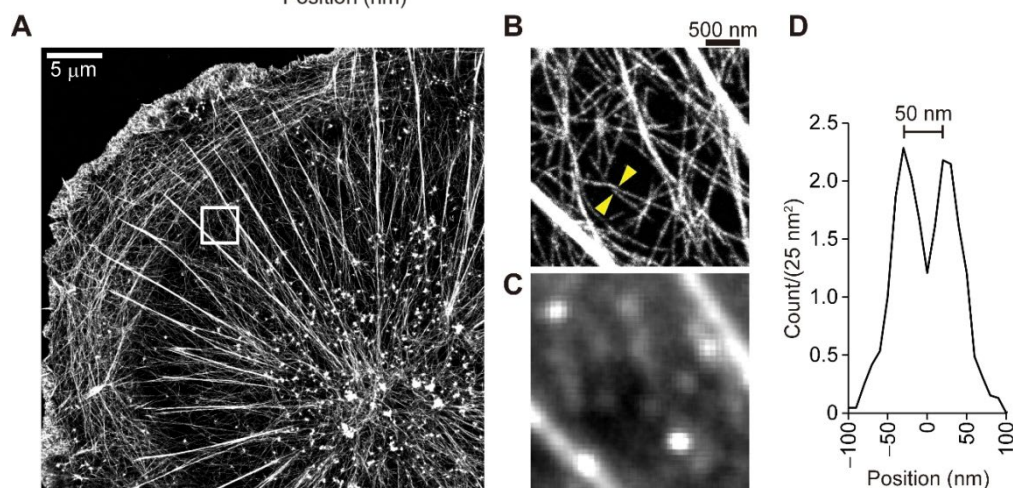


図3 IRISによるアクチン細胞骨格の超解像画像化

(A) Atto488 - Lifeactで標識したアクチン細胞骨格の再構築画像。(B)Aで白枠で囲まれている場所を拡大した再構築画像。(C)Bと同じ場所で蛍光単分子の輝度分布を積算した画像。(D)Bで矢じりで挟まれた場所の横断面の強度分布。50nmの間隔に二つのピークが見られる。文献11を改変。

次に再構築される超解像画像の画質に及ぼす標的タンパク質のラベル率の影響を調べた。アクチン線維は、1 μm あたりに 360 個のアクチン単量体 (直径 6 nm) で構成される。仮に抗体 (直径約 12 nm) でアクチン線維をラベルした場合、アクチン線維 1 μm あたり最大で 180 個の抗体しか物理的に結合できない。そこで試験管で重合させたアクチン線維を **Lifect** でラベルし、ラベル密度毎に超解像画像を再構築した (図 4)。抗体の最大ラベル密度と同程度の密度 (2×10^2 / μm)

でラベルされた再構築画像では、アクチン線維は不連続な構造として可視化されてしまった (図 4 A)。その 6.5 倍のラベル密度 (1.3×10^3 / μm) では線維構造が確認できた (図 4 A)。60 倍のラベル密度 (1.2×10^4 / μm) では均一にラベルされた線維構造が可視化できた (図 4 A, B)。以上の結果から結合解離プローブによるラベル密度の増大は、再構築される超解像画像の画質を著しく改善し、標的タンパク質の分布をより忠実に可視化できることが示された。

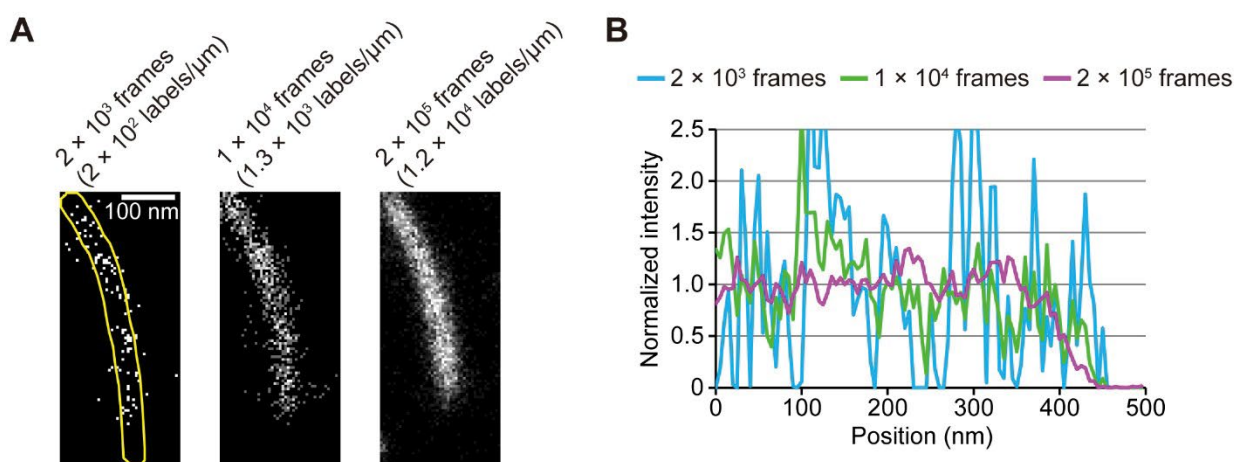


図4 ラベル密度に応じた超解像画像の画質の改善

- (A) Atto488 - Lifect でラベルしたアクチン線維 1 本のラベル密度に応じた再構築画像。
 (B) 1 本のアクチン線維に沿ったラベル分布のラベル密度に応じた変化。文献 11 を改変。

次に私は、IRIS 超解像顕微鏡法の多重染色への応用を試みた。結合解離プローブは洗い流すことができるため、別のプローブと入れ替えられる。**Lifect** はアクチン結合タンパク質のドメインであることから、私は、標的に結合するタンパク質の断片の中に標的に結合解離する分子があるのではないかと予想した。そこで微小管や中間径フィラメント、接着斑に局在する 15 種類のタンパク質やその断片を作製し、標的に結合解離するかスクリーニングを行った。スクリーニングには、HEK-293F 細胞に EGFP を融合させたプローブ候補分子を発現させ、その細胞溶解液の上清を用いた。固定、膜可溶化した細胞にその上清液を加えて、プローブ候補分子が標的構造に対して結合

解離するかどうか蛍光単分子可視化法で調べた。プローブ候補分子は、以下の基準に基づいて選別された。1) 候補分子の蛍光単分子画像を多数枚取得し、それらを足し合わせた画像で標的構造が観察できる。2) 蛍光単分子画像を取得後、候補分子が洗い流せる。3) 標的に結合後、候補分子は、20 ms~500 ms の半減期で解離する。4) 取得した蛍光単分子画像から標的の画像が再構築できる。これらのスクリーニングの結果、細胞骨格や接着斑に局在する 15 種類のタンパク質の 46 個の断片から、18 個の結合解離プローブを得ることができた。

これらの選別されたプローブと **Lifect** を用いて、同一細胞でアクチン線維と微小管、中間径フ

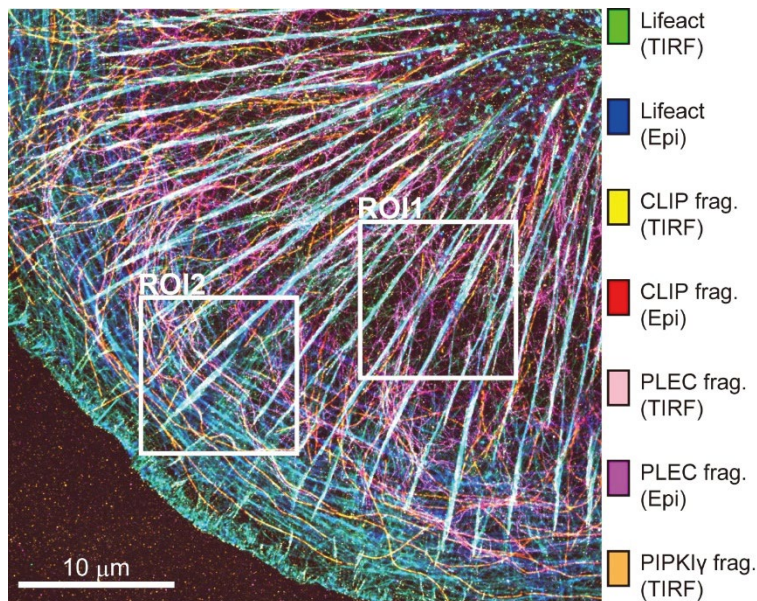


図5 IRIS による 3 つの細胞骨格と接着斑の多重染色超解像画像

アクチン線維、微小管、中間径フィラメント、接着斑の多重染色超解像。アクチン線維、微小管、中間径フィラメント、接着斑は、それぞれ Lifeact、CLIP-170 のフラグメント、Plectin のフラグメント、PIPキμ のフラグメントを用いてラベルされた。細胞骨格の標識プローブは、全反射照明(TIRF)と落射照明(Epi)で交互に励起された。そして全反射照明と落射照明で得られたそれぞれの蛍光単分子画像から細胞底面と細胞全体の超解像画像を再構築した。文献 11 を改変。

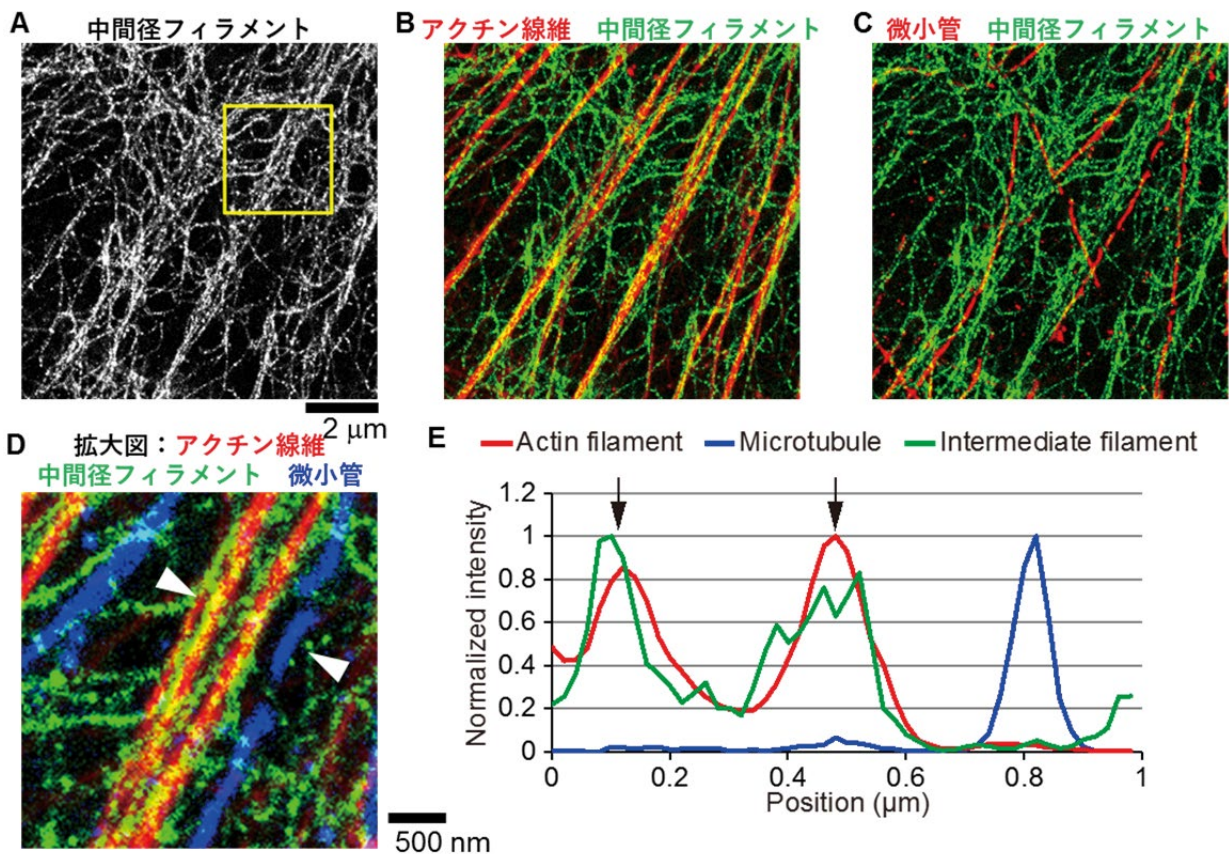


図6 細胞の中心に近い領域での細胞骨格間の近接の超解像可視化

図5で示されたROI1の白い枠内を拡大した3つの細胞骨格の超解像画像。(A)中間径フィラメント、(B)中間径フィラメントとアクチン線維の重ね合わせ画像。(C)中間径フィラメントと微小管の重ね合わせ画像。(D)Aの黄色枠内を拡大したアクチン線維と中間径フィラメント、微小管の重ね合わせ画像。(E)Dの矢印で挟まれた領域の各細胞骨格の強度分布。細胞の中心部に近いところでは、中間径フィラメントはアクチンストレスファイバーに絡みついているが、微小管には絡まっていない。

文献11を改変。

イラメント、接着斑の多重染色超解像画像が得られた(図5)。微小管、中間径フィラメント、接着斑は、CLIP-170の断片、Plectinの断片、phosphatidylinositol(4)-phosphate 5-kinase type I γ -90(PIPKI γ)の断片を用いて可視化された。これらの超解像画像を拡大すると細胞骨格間の近接領域での位置関係が見えてきた。例えば、細胞の中心部に近い領域では、中間径フィラメントは、アクチンストレスファイバーに絡みついている様子が観察された(図6A, B, D, E)。一方、同じ領域では中間径フィラメントは、微小管には絡みついていなかった(図6A, C, D, E)。また細胞の周辺部では、中間径フィラメントは、アクチンストレスファイバーとは絡み合っていない(図7A, B, D, E)。一方、同じ領域では、中間径フィラメントは、微小管に沿って伸びている様子が観察された(図7A, C, D, E)。このように

IRISならば、光の回折限界以下の領域に存在する複数種の分子の配置を正確に捕捉することを可能にしている。

3. まとめ

標的に素早く結合解離する蛍光プローブを用いることで、原理的に上限のない高密度ラベリングとプローブの交換が可能になった。このラベル方法と超解像顕微鏡法を組み合わせることで、高密度ラベリングによる高精細な画質と連続ラベリングによる多重染色を実現したIRIS超解像顕微鏡法が開発できた。IRISは、様々なタンパク質によって制御されている生命現象を解明するための強力な手段となる。さらにはがん遺伝子の転写産物や神経変性疾患など病気に関係する異常なタンパク質の蓄積を高分解能で捉える革新的な病理診断・病態解明への発展も期待できる。

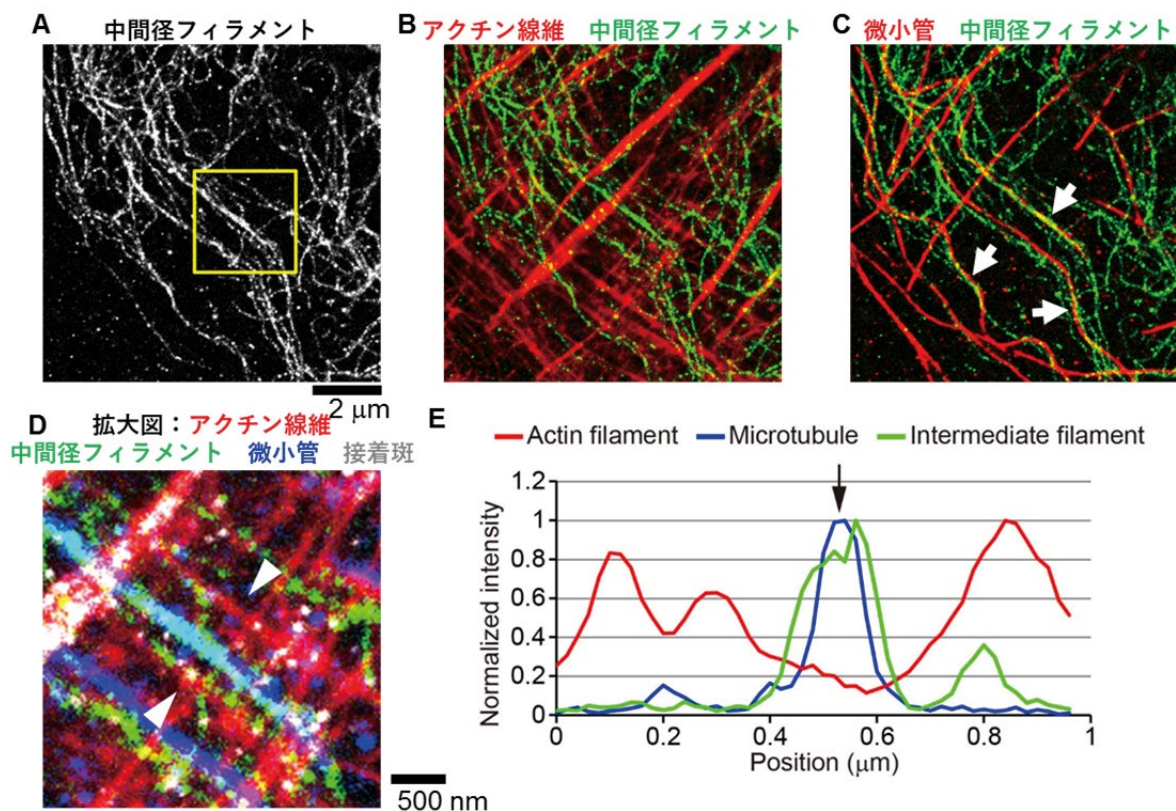


図7 細胞の周辺部での細胞骨格と接着斑間の近接の超解像可視化

図5で示されたROI2の白い枠内を拡大した3つの細胞骨格と接着斑の超解像画像。(A)中間径フィラメント(B)中間径フィラメントとアクチン線維の重ね合わせ画像。(C)中間径フィラメントと微小管の重ね合わせ画像。(D)Aの黄色枠内を拡大したアクチン線維と中間径フィラメント、微小管、接着斑の重ね合わせ画像。(E)Dの矢印で挟まれた領域の各細胞骨格の強度分布。細胞の周辺部では、中間径フィラメントは微小管に絡みついているが、アクチンストレスファイバーには絡まっていない。文献11を改変。

謝辞

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科（同大学院医学研究科兼担）の渡邊直樹教授と渡邊研究室のメンバーと共に完成させた成果です。また公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団から中谷賞奨励賞を頂きました。深く感謝致しますとともに、今後も精進して参ります。

参考文献

- 1) Abbe E. Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. F. Mikr. Anat.* 1873 ; 9 : 413-18. (in German)
- 2) Fernandez-Suarez M, Ting AY. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008 ; 9 : 929-43.
- 3) Hell SW. Far-field optical nanoscopy. *Science* 2007 ; 316 : 1153-58.
- 4) Huang B, Babcock H, Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* 2010 ; 143 : 1047-58.
- 5) Liu KS, Siebert M, Mertel S, *et al.* RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science* 2011 ; 334 : 1565-69.
- 6) Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* 2013 ; 339 : 452-56.
- 7) Huang B, Bates M, Zhuang X. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* 2009 ; 78 : 993-1016.
- 8) Sauer M. Localization microscopy coming of age: from concepts to biological impact. *J. Cell Sci.* 2013 ; 126 : 3505-13.
- 9) Shroff H, Galbraith CG, Galbraith, JA, *et al.* Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat. Methods* 2008 ; 5 : 417-23.
- 10) Kanchanawong P1, Waterman CM. Localization-based super-resolution imaging of cellular structures. *Methods Mol Biol.* 2013 ; 1046 : 59-84.
- 11) Kiuchi T, Higuchi M, Takamura A, *et al.* Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes. *Nature methods* 2015 ; 12 : 743-46.
- 12) Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006 ; 313 : 1642-45.
- 13) Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* 2006 ; 3 : 793-95.
- 14) Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, *et al.* Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 2008 ; 5 : 605-7.
- 15) Watanabe N, Mitchison TJ. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 2002 ; 295 : 1083-86.

- 16) Higashida C, Miyoshi T, Fujita A, *et al.*
Actin polymerization-driven molecular
movement of mDia1 in living cells. *Science*
2004 ; 303 : 2007-10.

- 17) Holden SJ, Uphoff S, Kapanidis AN.
DAOSTORM: an algorithm for high-
density super-resolution microscopy. *Nat.*
Methods 2011 ; 8 : 279-280.

平成27年度（第8回） 中谷賞研究概要

脳運動機能の回復を支援する BMI の開発



慶應義塾大学 理工学部
生命情報学科
准教授 牛場 潤一

1. まえがき

我が国では年間30万人が新たに脳卒中となり、患者数は300万人を超える¹⁾。また、介護保険制度における要介護者のうち、約24%が脳卒中で、寝たきり患者の40%は脳卒中後遺症によると考えられている。このように、脳卒中後の後遺症は、患者本人の自立的な生活レベルと生活の質を著しく低下させるほか、介護者や国民皆保険制度を支える納税者に、広く負担を強いる要因となっている²⁾。こうした問題を解決するために、脳卒中後遺症に対する効果的な治療体系の開発と確立が急務である。

しかしながら、脳卒中後の主要な後遺症である片麻痺に対する現行の治療は、麻痺した手足の動作に対して療法士が手動的に介助をおこなうものが主流であり³⁾、麻痺の原因である脳に残存した神経ネットワークを再構成する手法の開発は途上であった。また、リハビリテーション医療は経験や流儀によって多様な治療プロトコルが独自に作られ、科学水準に課題があった⁴⁾。特に重度片麻痺に対しては、機能回復のための有効なアプローチが存在せず、治療は不可能だと考えられていた。

一方、基礎神経科学分野では、脳が環境や経験に対して適応的に機能を変容させる「可塑性」の基本的性質に関する科学的発見が1990～2000年代に相次いだ⁵⁾が、単一の神経細胞レベルあるいは特定の脳領域に限定した原理実証研究が主流で、ヒトの行動レベルまでをも変容させうるような応用性はなかった⁶⁾。

更に医工学研究分野は、脳活動に応じて機械が動くBMI技術の研究が2000年ごろから急速に流行してきたが、それらは麻痺肢をロボットで置換するものが主流で、脳をリハビリする発想が無かった⁶⁾。

このような中であって私たちは、脳卒中重度片麻痺患者の脳機能を再構成するブレイン・マシン・インターフェース技術（Brain-Machine Interface; BMI）の開発をおこない、これまでの医療では困難とされていた運動機能の回復を誘導することに成功した。このBMIでは、患者が麻痺手を動かそうと努力しているときの運動関連脳領域の活動状態を頭皮脳波から読み出して、運動機能の回復に必要な代償脳領域の興奮性が高まったと判断されたときだけ、麻痺手に取り付けられたロボティクスが駆動して運動を介助する。脳

卒中患者がこれを反復的に利用することで、麻痺手の運動機能の回復に必要な脳活動が獲得されていく、いわば脳のトレーニングデバイスである。

2. 内容

2.1 脳活動バイオマーカーの同定

私たちはまず、大脳皮質運動野の活性レベルを頭皮脳波から非侵襲的に実時間推定する技術の開発をおこない、その推定結果が生理学的に妥当であることを、脳電磁気刺激法による電気生理学的検証実験により証明した。具体的には、体性感覚運動野の近傍に位置する頭皮上に、複数の脳波電極を配置して空間フィルタを構成し、半径 3cm 程度の範囲に局限した脳領域の電気活動を取得した。これにより、皮質-視床ループの活動によって生成される「ミュー律動」とよばれる脳波成分を実時間的に抽出した。その後、運動野にある特定の細胞群を強制発火させてその興奮性をプローブする「経頭蓋電磁気刺激法」等によって、脳波の「ミュー律動」の振幅低下が、次の生理現象をともなうことを実証した。

- ▶GABA 作動性抑制ニューロンの脱抑制⁷⁾
- ▶錐体ニューロンの活性化^{8),9)}

更に、脊髄運動ニューロン軸索束を電気刺激して神経活動電位を発生させ、逆行性に細胞体へ到達した後に再び軸索を下行する成分を計測することによって脊髄運動ニューロンの興奮性をプローブし、脳波の「ミュー律動」の振幅低下が、次の生理現象をともなうことを実証した。

- ▶脊髄運動ニューロンの活性化¹⁰⁾

更に、脳波を計測しながら機能的磁気イメージングを同時に実施する計測系を構築し、「ミュー律動」の振幅変調が体性感覚運動皮質の血中酸素濃度依存信号に対して相関することを確認した(図1)¹¹⁾。

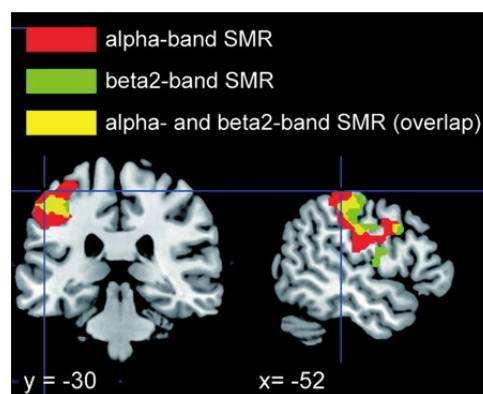


図1 「ミュー律動」の振幅変調に相関する血中酸素濃度依存信号を呈した脳領域の同定 (図中カラー表示されている部位が体性感覚運動皮質に相当)

2.2 脳活動バイオマーカーの実時間計測技術と脳制御用 BMI システムの確立

私たちはさらに、課題1で発見した脳活動バイオマーカーに関して、日常環境下で卓上サイズにて実時間計測する技術を確立した(特許第5283065号)。具体的には、頭皮に接触する脳波電極面の形状を検討。電気インピーダンスの高い毛髪や角質を短時間かつ高効率に回避して、電極先端部が頭皮に安定接触するための「ブラシ型電極」を開発し、電極と頭皮のあいだの電氣的接触面積の改善と利便性を両立させた「ハイドロシート」を開発した(図2A, B)。また、電極ホルダ部については、板バネとジンバルによる支持機構を開発し、多様な頭部局面に対して、適切な押し当て力と垂直軸を保証することに成功した。頭部に対する電極配置に関しては、環境ノイズを最小化する空間フィルタ構成を検討し、電極ホルダ部への実装をおこなった。アンプ部は、電極側とのインピーダンス整合を加味して設計し、ボタン電池で連続8時間以上動作する、手のひらサイズのものを開発した(図2C)。候補者はその後、脳活動バイオマーカーが示す「運動野の活性レベル」に呼応して電動装具が麻痺手運動をアシストするBMIシステムを開発した(特開2012-217721(特許査定済))。

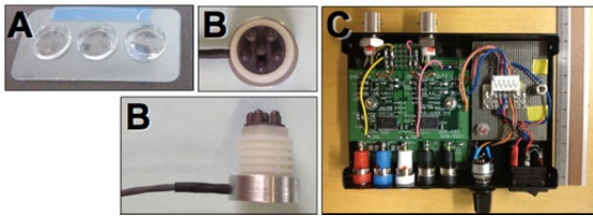


図2 脳活動計測技術

A 水分含有ポリマーを成形したハイドロシート (3個)。プラスチックケースから外し、電極面に乗せて使用する。

B ブラシ型電極 ($\phi=10\text{mm}$)。頭皮表面に対して効果的に接触する。

C 手のひらサイズのアンプ。

2.3 臨床研究による治療効果の実証

私たちはその後、医学部との共同研究を通じて、前掲 2.2 項で確立した BMI システムを使った臨床試験を実施。現在の医療では治療が困難だった脳卒中慢性期重度片麻痺の脳機能を正常化させ¹²⁾、運動回復させることに成功した^{13), 14)}。

次に臨床試験に関わった患者を対象として、脳イメージングや電気生理学検査を活用して、脳内の回復メカニズムを分析した^{13), 15)}。その結果、本研究で発見した脳活動バイオマーカー (前掲 2.1 項) を、独自開発した卓上サイズの BMI 機器 (前掲 2.2 項) によって日常環境下で計測してもなお、正確に大脳皮質運動野の活性レベルが実時間的に読み取れており、脳の活性化を設計通りに誘導できていることが示された。

3. 成果

医学部との緊密な共同研究の下に実施した臨床研究群により、臨床的有効性や機器運用性などが次の通り示された。すなわち、従来の医療では回復が困難な脳卒中片麻痺患者に、2~4 週間にわたる BMI リハビリを毎日 1 時間試行した (図 3 ①)。脳卒中患者 8 名での臨床研究¹⁴⁾、脳卒中患者単一症例 ABAB デザインによる詳細な機能

回復メカニズムの探索研究¹³⁾、および進行中のランダム化比較試験 (現在までに 44 名実施済み、論文投稿準備中) の結果から、損傷のある脳の活性化が生じて機能再構成が進み (図 3 ②)、筋への運動指令が送出されるようになることが明らかになった (図 3 ③)。

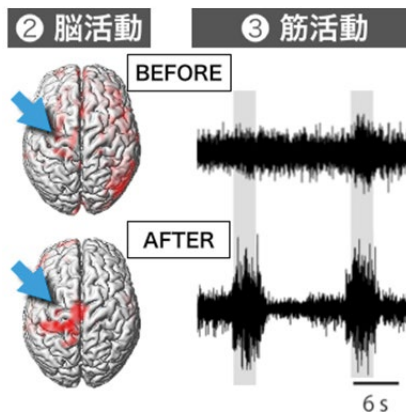


図3 BMI による機能回復

① BMI 訓練の様子: 私たちの開発した BMI を脳卒中患者 (左麻痺) が装着している。ヘッドフォン型をしたアンプによって頭皮脳波が計測され、PC 上に実装したアルゴリズムによって運動野の活性レベルが推定される。活性レベルに応じて、左手に装着した電動装具が指先の運動をアシストし、積み木を掴んだり離したりする訓練がおこなわれる。

② 脳活動: 脳機能イメージング法を用いて脳の活性レベルを調べると、訓練前 (BEFORE) には麻痺手の運動を発現させるために必要な脳部位 (青矢印) が不活性であり、そのほかの部位に代償的な活動が生じていた。これに対して BMI 訓練後

(AFTER)には、適切な脳部位に活性が集中していることが分かる(文献 12 より一部改変)。

③ 筋活動: 麻痺側の手指を伸ばす筋(総指伸筋)の電気活動を計測すると、訓練前(BEFORE)には訓練前指を伸ばそうとしている時間帯(グレーハッチ区間)に応答が見られない。これに対して BMI 訓練後(AFTER)には、積み木の把持動作も可能なほど、著明な筋活動の上昇が観察される。臨床で用いられる機能評価スケール上も、有意な改善が認められる(文献 14 より一部改変)。

このように、BMI リハビリテーションの施行にともなって、運動企図時における障害半球体性感覚運動野の興奮性が可塑的に高まることを、頭皮脳波や機能的磁気共鳴画像によって確認したほか¹²⁾、安静時における障害側一次運動野の興奮閾値が低下すること、麻痺側総指伸筋における随意筋電図上の所見が改善すること、手指の随意運動が改善し、臨床スコアが上昇することなどを症例集積研究により見いだしている¹⁴⁾。ABAB デザインによる一症例研究では、開ループ型 BMI に治療効果は認められず、脳活動に応じたリアルタイムフィードバック要素が機能回復に重要な役割を果たしていることが示され¹³⁾、非ランダム化比較試験による検討からは、視覚的なフィードバックよりも体性感覚フィードバックが効果的であることが示唆された¹⁵⁾。また、損傷半球一次運動野の興奮性を高める経頭蓋直流電気刺激法を併用することで、BMI による機能改善効果の持ち越し量が改善するアジュバント効果も確認されたほか¹⁶⁾、BMI によって随意筋活動の再出現が認められた場合には、筋電図トリガ型神経筋電気刺激と軟性装具を組み合わせた HANDS 療法へ移行する新規臨床パスでは、MCID を大きく越えた治療効果を認めた¹⁷⁾(図 4)。現在、関東にある 4 つの病院との連携により医師主導治験を開始した。知見を通じて BMI リハビリテーションの有効性と安全性を検証するとともに、医療機器としての実用化に関して医療機器製造販売企

業との共同研究を推進する計画である。

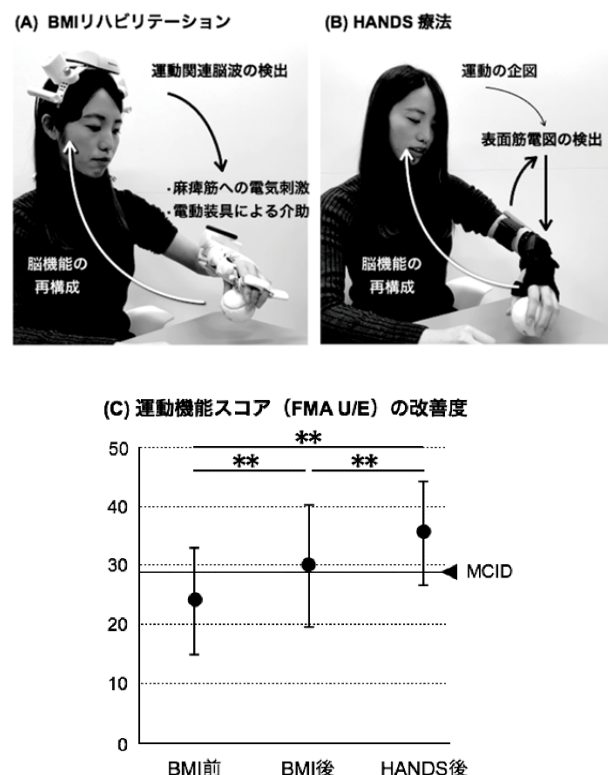


図4 BMI リハビリテーションと HANDS 療法を組み合わせた臨床パスの治療成績

(A) BMI リハビリテーションの概要。表面筋電図上では随意的な信号変化が認められない重度症例に対して、運動関連脳波を検出し、その信号強度に応じて麻痺筋(総指伸筋)へ機能的電気刺激を与える。電動装具による手指伸展運動の介助も併せておこなう。(B) HANDS 療法の概要。表面筋電図上で随意的な信号変化が得られるようになった場合には、筋電図強度に比例した電気刺激を同名筋に与える HANDS 療法へ移行する。HANDS 療法の場合は BMI よりも安定して生体信号を計測することができるほか、小型で完全ウェアラブル仕様のため、日中長時間にわたって装着したまま日常生活を送ることが可能であり、訓練量の飛躍的な増加が望める。(C) 運動機能スコア(FMA U/E)の改善度。この例のように、症状に応じて神経リハビリテーション手技を段階的に切り替えていくことで、運動機能回復の相加効果が期待できる。

大脳皮質体性感覚運動野の興奮レベルを BMI

によってモニタリングしながら訓練することは、脳卒中後に残存する神経回路の再構成を促す上で重要だと考える。以下は文献 18 に寄稿した筆者の論考の一部を抜粋したものである。

なんの手がかりも与えず単に運動イメージをさせただけでは、被験者の脳内に正しい神経活動を誘導できない可能性がある。例えば Mukaino & Ono ら¹³⁾は、BMI 介入時と同じように能動的な手指進展企図と安静を反復させ、手指進展企図を行っている時間帯に対象筋（総指伸筋）へ神経筋電気刺激を与える「擬似的 BMI」を行った場合には、頭皮脳波、機能的脳イメージング、総指伸筋の表面筋電図の所見が増悪することを示している。すなわち、脳卒中片麻痺患者が麻痺手の運動をしているつもりになっていて、本人にもその自覚があり、術者にその様子を言語的に伝えることができてもなお、障害半球体性感覚運動野の興奮性が正しく上昇しているとは限らず、したがって認知的な運動の企図自体にタイミングを合わせて体性感覚刺激を中枢神経系へフィードバックしても、適切な機能再構築は進まないようである。Mukaino & Ono ら¹³⁾はまた、同じ脳卒中片麻痺患者に BMI 介入を実施し、能動的な手指進展企図にともなって SMR の振幅が低下した試行のときだけ神経筋電気刺激を与えた結果、頭皮脳波、機能的脳イメージング、総指伸筋の表面筋電図、Fugl-Meyer スコア、Modified Ashworth Scale の改善があったことを報告している。つまり被験者本人が自覚している「手の運動イメージ」そのものではなく、その運動イメージに伴って確実に障害半球体性感覚運動野の興奮性が上昇したときだけ体性感覚刺激を中枢神経系へフィードバックすることが、脳内運動生成機構の再構築につながると言える。この例が示すように BMI は、頭皮脳波を介して障害半球体性感覚運動野の興奮性をモニタリングすることで、脳卒中片麻痺患者本人の運動自覚には頼らない、神経生理学的コンプライアンスの高い運動訓練を実現していると考えられる。

しかしその一方で、BMI リハビリテーションの背後で駆動する神経可塑性原理ならびに運動学習則については、不明な点も多い。ここでは可能性として考えられている幾つかのメカニズムを提示する¹⁹⁾。脳の可塑性を引き出すこうした仕組みを同定し、定式化することが、脳機能の改善を促すデバイスのサステナブルな開発にとって今後重要になっていくと思われる。ただし、これらは生理学や心理学などの異なる研究領域でそれぞれに発展してきた概念であるため、一方が他方の一部を内含している可能性もある。ここに示したコンセプトは、お互いが完全に独立な事象ではないかもしれない点に留意が必要である。

・使用頻度依存的可塑性

特定の神経経路が選択的、反復的に活動することによって、シナプス伝達効率が長期的に増強されること。このときの神経細胞活動は、随意的に発生したものでよいし、外部から与えられた電気刺激などによって強制的に誘発されたものであってもよい。

・タイミング依存的可塑性

物理的に離れた神経細胞集団が同期的に活動することで、両者間をつなぐシナプスの信号伝達効率が変化すること。このときの神経細胞活動は、随意的に発生したものでよいし、外部から与えられた電気刺激などによって強制的に誘発されたものであってもよい。タイミング依存的可塑性は、異なる 2 つの神経細胞集団の間に生じる活動時間差に対して鋭敏な特性を有しており、一定以上の時間差があると、シナプス伝達効率は変化しない。また、活動の順番も大切である。生理学的に自然な順番で神経細胞集団が時間遅れをもって活動すると両者の間のシナプス伝達効率は高まるが、逆順で神経活動が生じるとシナプス伝達効率は逆に低下していく。

・報酬系を介した強化学習

ある行動をとったとき、その結果が当初予見し

ていた以上の報酬を得ることに繋がった場合、選択したその行動を次もまた選択する傾向が強くなる。逆に、行動の結果が予想よりも低い報酬にしか繋がらなかった場合は、その行動選択を避けるようになる。「どのようにしたら最適な行動パターンが学習できるか?」という学習戦略を持っていなくても、こうした試行錯誤と報酬信号の存在によって、結果的には最適な学習パターンを獲得できる場所に特徴がある。

・誤差学習

ある運動を実行した後、視覚や体性感覚を通じて運動誤差を検出し、次に同じ運動をする時にできるだけこの誤差を減らせるように、あらかじめ運動計画を修正しておく過程のこと。誤差の認識や修正は意識的に行われる場合もあれば、意識に上らないまま自動的に行われる場合もある。

4. まとめ

本研究は、医療ニーズが高いものの、有効な治療法がなかった疾患に対して、非侵襲脳活動計測技術の確立と緊密な医工連携を通じて、脳機能そのものの治療ができるデバイスの開発に成功し、臨床有効性を複数の臨床試験により立証した。

また、基礎開発の早い段階から医療機器製販企業への技術移管がスムーズに行われ、現在は独立行政法人 医薬品医療機器総合機構による助言を受けながら、医療機器としての認可を得るための医師主導治験を実施中である(図5、日本経済新聞(2015年6月13日(土)13面))。



図5 製品プロトタイプ(パナソニック製)

最後に、本研究の医学分野におけるインパクトを述べる。本研究は脳卒中を対象に、「脳の活性状態を実時間推定し、運動機能が回復するように脳へフィードバックを与える BMI 技術」によって、高齢・慢性期・重度な病態脳であっても脳を治療することができることを、世界に先駆けて実証した。脳が病的な状態に陥ることによって生じる運動障害は、脳卒中にとどまらず、脊髄損傷、ジストニア、ALSをはじめとした神経筋難病など、多岐にわたっている。したがって、本研究で実証された脳機能治療の原理は、今後5~10年の間に、脳卒中以外の疾患に対しても広く応用が進むと予想される。たとえば、私たちはすでにジストニア症例に対して、本研究で開発した BMI を適用して脳の過剰興奮状態を実時間計測し、患者自身にその状態を視覚提示するシステムを考案。脳からの過剰出力を抑制することに成功し、著しい書字動作の改善を認めている²⁰⁾。さらに現在は、国際電気通信基礎技術研究所と昭和大学のグループが、BMIによる精神疾患治療の開発を進めているほか²¹⁾、大阪大学やデンマークオルボー大学では、BMIによる難治性疼痛の治療を行なっている^{22), 23)}。このように、これまでの医療では治療介入に限界のあった各種精神神経疾患に対して、本研究結果が広く応用され、新しい治療技術が確立していくものと予想される。

工学に対して予想されるインパクトとしては、これまで、電磁シールド室という特殊環境下で検査技師が計測していた「頭皮脳波」が、本研究を契機として、ウェアラブルかつユビキタスに計測可能になると予想される。脳機能のモニタリングや、脳機能のトレーニングを目的とした機器が、リハビリテーション医学にとどまらず、ヘルスケアやスポーツトレーニング、労務支援などに利用されていくと考えられる。

学問的には、脳の動作原理が定量的、定式的に理解されるとともに、その理解に基づいて、脳の内部状態を変容させるための制御方式が確立していくことが期待される。その結果、脳を対象と

した制御理論、制御技術が学問的に構築されていく。また、そのアプリケーションとして、これまでは診療科が異なっていたさまざまなタイプの精神神経疾患に対する、統一論的な医学体系が整備されることが期待される。これにより、学問としては「リハビリテーション神経科学」、医療としては「ニューロリハビリテーション」とよばれる、新学問領域と新医療領域が創成されると予想される。

謝辞

本研究は、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構「脳科学研究戦略推進プログラム」「未来医療を実現する医療機器・システム研究開発事業」「医療機器開発推進研究事業」の助成を受けて行われました。また本研究は、慶應義塾大学医学部リハビリテーション医学教室 里宇明元教授、水野勝彦特任講師、川上途行専任講師、西本敦子研究員、平本美帆研究員、奥山航平研究員、順天堂大学医学部リハビリテーション医学教室 藤原俊之教授、慶應義塾大学工学部生命情報学科 リハビリテーション神経科学研究室 春日翔子助教、同研究室に在籍する学生諸氏の多大なる協力の下に行われました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- [1]公益社団法人 日本リハビリテーション医学会 ウェブサイト (http://www.jarm.or.jp/civic/rehabilitation/rehabilitation_01.html) , 2017年9月6日アクセス。
- [2]清家篤 (編著)「金融ジェロントロジー」第4章 高齢社会を支えるテクノロジーはどうあるべきか (牛場潤一)、pp. 98-121, 2017年。
- [3]日本脳卒中学会 脳卒中ガイドライン委員会 (編集)「脳卒中治療ガイドライン 2015」2-1 運動障害・ADL に対するリハビリテーション, pp. 286-287, 2015年。
- [4]日本脳卒中学会 脳卒中ガイドライン委員会

- (編集)「脳卒中治療ガイドライン 2015」2-3 上肢機能障害に対するリハビリテーション, pp. 292-294, 2015年。
- [5]Dimyan MA, Cohen LG. Neuroplasticity in the context of motor rehabilitation after stroke. *Nat Rev neurol* 7(2):76-85, 2011.
- [6]Andersen RA, Kellis S, Klaes C, Aflalo T. Toward more versatile and intuitive cortical brain-machine interfaces. *Curr Biol* 24(18):R885-97, 2014.
- [7]Takemi M, Masakado Y, Liu M, Ushiba J. Event-related desynchronization reflects downregulation of intracortical inhibition in human primary motor cortex. *J Neurophysiol* 110(5):1158-66, 2013.
- [8] Kasashima Y, Fujiwara T, Matsuchika Y, Tsuji T, Hase K, Ushiyama J, Ushiba J, Liu M. Modulation of event-related desynchronization during motor imagery with transcranial direct current stimulation (tDCS) in patients with chronic hemiparetic stroke. *Exp Brain Res* 221(3):263-8, 2012.
- [9]Matsumoto J, Fujiwara T, Takahashi O, Liu M, Kimura A, Ushiba J. Modulation of mu rhythm desynchronization during motor imagery by transcranial direct current stimulation. *J Neuroeng Rehabil* 7:27, 2010.
- [10]Takemi M, Masakado Y, Liu M, Ushiba J. Sensorimotor event-related desynchronization represents the excitability of human spinal motoneurons. *Neuroscience* 297:58-67, 2015.
- [11]Tsuchimoto S, Shibusawa S, Mizuguchi N, Kato K, Ebata H, Liu M, Hanakawa T, Ushiba J. Resting-State Fluctuations of EEG Sensorimotor Rhythm Reflect BOLD Activities in the Pericentral Areas: A Simultaneous EEG-fMRI Study. *Front Hun Neurosci* 11:356, 2017.

- [12] Ono T, Tomita Y, Inose M, Ota T, Kimura A, Liu M, Ushiba J. Multimodal sensory feedback associated with motor attempts alters BOLD responses to paralyzed hand movement in chronic stroke patients. *Brain Topogr* 28(2):340-51, 2015.
- [13] Mukaino M, Ono T, Shindo K, Fujiwara T, Ota T, Kimura A, Liu M, Ushiba J. Efficacy of brain-computer interface-driven neuromuscular electrical stimulation for chronic paresis after stroke. *J Rehabil Med* 46(4):378-82, 2014.
- [14] Shindo K, Kawashima K, Ushiba J, Ota N, Ito M, Ota T, Kimura A, Liu M. Effects of neurofeedback training with an electroencephalogram-based brain-computer interface for hand paralysis in patients with chronic stroke: a preliminary case series study. *J Rehabil Med* 43(10):951-7, 2011.
- [15] Ono T, Shindo K, Kawashima K, Ota N, Ito M, Ota T, Mukaino M, Fujiwara T, Kimura A, Liu M, Ushiba J. Brain-computer interface with somatosensory feedback improves functional recovery from severe hemiplegia due to chronic stroke. *Front Neuroeng* 7:19, 2014.
- [16] Kasashima-Shindo Y, Fujiwara T, Ushiba J, Matsushika Y, Kamatani D, Oto M, Ono M, Ono T, Nishimoto A, Shindo K, Kawakami M, Tsuji T, Liu M. Brain-computer interface training combined with transcranial direct current stimulation in patients with chronic severe hemiparesis: Proof of concept study. *J Rehabil Med* 47(4):318-24, 2015.
- [17] Kawakami M, Fujiwara T, Ushiba J, Nishimoto A, Abe K, Honaga K, Nishimura A, Mizuno K, Kodama M, Masakado Y, Liu M. A new therapeutic application of brain-machine interface (BMI) training followed by hybrid assistive neuromuscular dynamic stimulation (HANDS) therapy for patients with severe hemiparetic stroke: A proof of concept study. *Restor Neurol Neurosci* 34(5):789-97, 2016.
- [18] 牛場潤一, 神経科学の立場からリハビリテーションへ, カレントセラピー 35(6):510-515, 2017.
- [19] Ushiba J, Soekadar SR. Brain-machine interfaces for rehabilitation of poststroke hemiplegia. *Prog Brain Res* 228:163-83, 2016.
- [20] Hashimoto Y, Ota T, Mukaino M, Liu M, Ushiba J. Functional recovery from chronic writer's cramp by brain-computer interface rehabilitation: a case report. *BMC Neurosci* 15:103, 2014.
- [21] 川人光男, 精神疾患のバイオマーカーと治療に対する計算論的神経科学のアプローチ, 日本生物学的精神医学会雑誌 25(2):61-64, 2014.
- [22] Yanagisawa T, Fukuma R, Seymour B, Hosomi K, Kishima H, Shimizu T, Yokoi H, Hirata M, Yoshimine T, Kamitani Y, Saitoh Y. Induced sensorimotor brain plasticity controls pain in phantom limb patients. *Nature Comm* 7:13209, 2016.
- [23] Mrachacz-Kersting N, Yao L, Gervasio S, Jiang N, Palsson TS, Nielsen TG, Falla D, Dremstrup K, Farina D. A brain-computer-interface to combat musculoskeletal pain. *Brain-Computer Interface Research In: Part of the SpringerBriefs in Electrical and Computer Engineering book series*, 123-130, 2016.

研究成果報告

平成 26 年度(第 31 回) 特別研究助成
平成 27 年度(第 32 回) 開発研究助成
平成 27 年度(第 32 回) 奨励研究助成

平成 26 年度（第 31 回）
特別研究助成 研究成果報告

ダイヤモンド微小電極を駆使した内耳薬物動態の計測基盤の開発 (新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授 日比野 浩)	65
ヒト角膜内皮細胞注入治療のためのマルチスケール細胞標準化技術の確立 (京都大学物質・細胞統合システム拠点 特定拠点教授 田中 求)	74
マイクロ RNA の超高感度電気化学検出法の開発 (兵庫県立大学大学院工学研究科 教授 山名 一成)	83
近赤外線蛍光顕微鏡による冠動脈側副血行路と心内膜側微小血管の評価 (川崎医科大学応用医学 講師 矢田 豊隆)	86
皮膚系細胞の機械刺激応答を解析するための高伸縮性表皮電位計測システムの開発 (東北大学大学院工学研究科 教授 西澤 松彦)	92
マイクロ RNA 分子内メチル化修飾を一細胞内で計測する高精細技術の開発 (大阪大学大学院医学系研究科 特任教授 石井 秀始)	100

注1 顔写真は研究責任者です。

注2 本成果報告は平成 26 年度の助成金の贈呈に基づき、平成 27-28 年度に実施され、平成 29 年 7 月までに執筆された研究成果です。所属等は助成研究実施時または執筆された当時のものです。

ダイヤモンド微小電極を駆使した内耳薬物動態の計測基盤の開発



研究責任者 新潟大学大学院 医歯学総合研究科
分子生理学分野
教授 日比野 浩

1. はじめに

難聴は、我が国で1,000万人以上が罹患する深刻な疾患である。その中で、利尿薬・抗生剤・抗がん剤などによる“薬剤性難聴”は、しばしば難治性であり、臨床医学の現場で大きな問題となっている。外界からの音は、外耳・中耳を経由したのち、機械的刺激として内耳の「蝸牛」に達し、この臓器により電気信号に変換された上で脳へと伝えられる。薬剤性難聴の障害部位は、蝸牛である。この副作用の克服には、第一に、生きた動物の内耳において、様々な局所の薬物動態をリアルタイムに測定し、同時にそれを蝸牛機能の挙動と比較する基礎実験が必須である。本課題では、今まで成し得なかった、この困難な目的を達成するための『局所生体内計測の基盤技術』を、医工連携により開発した。

内耳蝸牛(図1)は、外リンパ液・内リンパ液と呼ばれる2種類の体液で満たされる。通常の細胞外液である外リンパ液は、5 mMの低カリウム(K^+)と150 mMの高ナトリウム(Na^+)を含み、血液と類似する。一方、内リンパ液は、150 mMの高 K^+ 濃度と5 mMの低 Na^+ 濃度、そして外リンパ液や他の体液に比して+80 mVの高電位を常に示す特殊な細胞外液である(図1)¹⁾。聴覚の感覚細胞である有毛細胞(図1)は、無音状態で

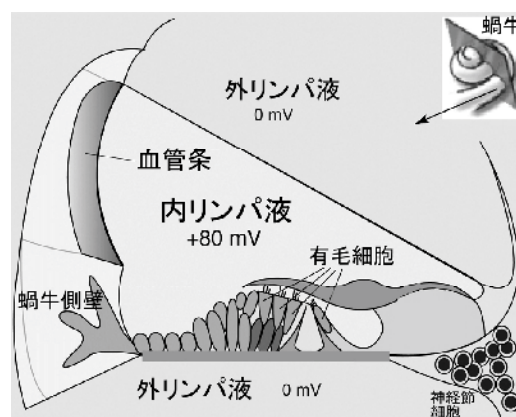


図1 内耳蝸牛の模式図

渦巻き状の蝸牛(右上)を縦切りにした断面図。

は-60 mVである。この細胞は、感覚毛を有する頂上膜のみを内リンパ液に浸す。音刺激により、まず基底板(図1)が振動する。続いて有毛細胞の感覚毛が屈曲すると、その頂部のチャンネルが開口し、内リンパ液の K^+ が流入することで細胞は電気興奮する。この際に、内リンパ液の高電位は、有毛細胞との間の電位差を増大することで K^+ 流入を加速し、聴覚の鋭敏性に大きく寄与する。我々は、微小ガラス電極を用いた生体内計測により、内リンパ液に接する上皮組織「血管条」(図1)の K^+ 濃度動態に基づき、内リンパ液の高電位が成立することを、これまでに見出してきた^{1)~3)}。このように、有毛細胞・血管条の働きや内リンパ

液環境の維持は聴覚に必須であり、それらの破綻は難聴を惹起する。

高血圧の治療や抗がん剤の腎障害防止に頻用されるループ利尿薬は、耳毒性を有する。経口または静脈投与されたこの薬物は、血液に入って主に血管条内の血管へ達する。そして、血管条の K^+ 運搬で中心的な役割を担っている $Na^+,K^+,2Cl^-$ 共輸送体(図1)を阻害することで内リンパ液の電位を低下させ、難聴を誘引する⁴⁾。同時に、薬は血管条の細胞を透過して内・外リンパ液へ漏出する。できるだけ副作用を軽減し、最大の薬効を得るには、基礎的な解析として、生きた動物の蝸牛の様々な局所での薬物の分布と濃度動態をリアルタイム測定し、内リンパ液や血管条・有毛細胞の活性などの蝸牛機能の変化と同時に比較する必要がある。今までの内耳の薬物濃度測定では、リンパ液を採取し、それを体外でクロマトグラフィーなどの分析器にかけていた。しかし、この方法では、数 μl 以下と微量なリンパ液を、繊細な構造を持つ蝸牛から頻回に得ることができない。したがって、同一個体で約20分ごとの測定を3~4度程しか行えず、経時的な薬物測定は困難であった。さらに、分析装置の構造上、蝸牛機能の変化を同時に比較するための装置を組み合わせることは不可能であり、これらを包括的に解決する新たな測定系の開発が切望されてきた。

一般に化合物の測定には、電気化学的手法が利用でき、炭素やプラチナなどの一般的な電極は微小化が可能である。しかし、反応が遅く不安定であり、生体内で刻々と変化すると予想される薬物を長時間に渡り観測するには不向きである。一方、先端素材である“導電性ダイヤモンド”は、反応が速く安定性に優れている⁵⁾。以上を踏まえ、本研究では、薬物を追尾するためのダイヤモンドマイクロセンサと、蝸牛の電気現象を捉える微小ガラス電極を搭載した画期的な計測基盤を構築した。そして、この系を活用することで、生動物の蝸牛外リンパ液におけるループ利尿薬の濃度動態と、それに伴って変化する内リンパ液電位の同時リ

アルタイム測定を実行した。さらに、脳や他の薬物を用いて解析し、この計測系の汎用性も示した。

2. 方法

1) ダイヤモンドから成るマイクロセンサと平板電極の作製

1%のホウ素を含有したダイヤモンドマイクロセンサは、以前の方法により製作した⁶⁾。炭素源のアセトンとホウ素源のトリメトキシボランガスを充滿させたマイクロ波プラズマ装置内に、芯となる先端直径15 μm のタングステン針を留置し、それにプラズマ放電した。その結果、大きさ2-5 μm のダイヤモンドの結晶が針の表面に付着し、先端径が約40 μm のマイクロセンサが得られた。ラマン分光により、非ダイヤモンド成分が含まれていないことを確認した。その後、センサを微細ガラス管に挿入し、先端を数百 μm 露出させた。固定のため、センサ表面とガラス管の間に絶縁物質を充填した。

平板電極は、マイクロセンサとほぼ同様な行程により、シリコン板の上に導電性ダイヤモンドの皮膜を付着させることで作製した。

2) 参照電極と対極の作製

電気化学測定には、作用電極(本研究の場合はダイヤモンド電極)の他に参照電極と対極を備える必要がある。ダイヤモンドマイクロセンサの対となる生体内計測用のこれら2種類の電極は、以下のように作製した。最初に、市販のガラス2連管をプレーで先鋭化させた。両方の管の内部は、phosphate-buffered saline (PBS) 溶液で溶解したアガーで充填した。PBSの組成は、137 mMのNaCl、8.1 mMの Na_2HPO_4 、2.68 mMのKCl、1.47 mMの KH_2PO_4 (pH 7.4)とした。対極としてプラチナ線を、参照電極としてAg/AgCl線をそれぞれの管に挿入した。その上で、対極をPBSで、参照電極を3MのKClで浸した。

3) in vitro 電気化学測定

全てのin vitro電気化学測定は、ポテンシオスタットHZ-7000(北斗電工社製)により、室温(摂

氏 25 度)のファラデーケージ内で行った。マイクロセンサやダイヤモンド平板電極は、PBS 溶液中において、掃引の範囲-1 V から+1.5 V、速度 100 mV/秒で電圧をかけることにより、実験前にクリーニングした。それぞれの薬物に対する電圧印加プロトコルは、“3. 結果”の項目で詳述する。ダイヤモンドマイクロセンサの比較として用いた炭素電極は、市販品を購入した。

4) 実験動物

本研究における動物実験は、新潟大学動物実験倫理委員会の指針に従って計画し、同委員会の承認を受けて実行した。動物の取り扱いは、ARRIVE ガイドラインに基づいた⁷⁾。生体内計測には、雄の Hartley 系モルモット(体重 250 – 420 g)、または雄の Wister ラット(体重 90 – 300 g)を用いた。モルモットはペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル：64.8 mg/kg)、ラットはウレタン(1.5 mg/kg)の腹腔内投与により麻酔した。麻酔の深度は、足指への刺激、角膜反応、呼吸数を指標にして、慎重に判断した。十分な麻酔状態を確認したのち、気管切開を施行し、切開口を人工呼吸器と接続することで呼吸を維持した。実験中は、ヒートパッドを用いて動物の体温を 37°C に維持した。また、心拍数をモニターしながら、1 時間から 1 時間半ごとに麻酔を追加投与した。実験後、使用動物は、麻酔薬の過剰投与により安楽死させた。

5) 蝸牛での生体内計測

モルモットの腹側から内耳を露出し、蝸牛の 3 回転半のうち、第 2 回転の骨壁に内リンパ液電位の測定を目的とした微小ガラス電極(先端径：約 1 μm)を挿入するための穴(直径：約 200 μm)を開けた。さらに、蝸牛の基底回転の骨壁には、ダイヤモンドマイクロセンサおよび対極・参照電極を含む 2 連管を共に挿入するための穴(直径：約 500 μm)を作った。内リンパ液電位は、FD223a Electrometer (WPI, USA)を介して、我々の過去の方法に従って測定した²⁾。その際、3 M KCl 寒天で塩橋された銀塩化銀を参照電極として腹部

に配置した。FD223a の信号は、A/D コンバータ (Power Lab/4s; Power Lab, Australia)を介してコンピュータに記録した。

6) 脳での生体内計測

頭蓋骨に直径 2 mm の穴を開けたのち、31 G の注射針で硬膜を切開した。この開口部を介して、ダイヤモンドマイクロセンサとその参照電極・対極、および脳の神経活動を測定するための微小ガラス電極を近接して挿入した。神経活動は、電位測定用差動性 AC アンプ (EX-1; Dagan Corporation, USA)を介して記録した。その際には、頭部皮下に配置した Ag/AgCl を参照電極とした。アンプからの信号は、A/D コンバータを介してコンピュータに記録した。

3. 結果

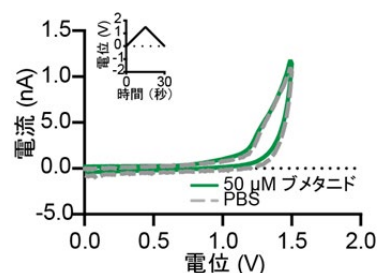


図2 炭素電極によるブメタニド測定

CV の電圧プロトコルを左上に示した。ブメタニドの有無で電流はほとんど変わらなかった。1.2 V 以上の反応は水の電気分解による酸化電流。

1) *in vitro*での薬物測定

本研究では、最も強い利尿効果を発揮するブメタニドを主な測定対象薬物とした。最初に、市販の微小炭素電極が PBS 溶液に溶けたブメタニドを認識するかを、*in vitro* 実験系により検討した。電極に 0 V から+1.5 V の電圧を連続的に印加し、サイクリックボルタモグラム (CV) を観測すると、ブメタニドを含んだ溶液でも PBS のみの場合と、電流はほとんど変わらなかった (図 2)。したがって、通常炭素では、この利尿薬を測定できないと結論づけた。

そこで、先端径が約 40 μm のダイヤモンドマイクロセンサを試した。電極に -1 V から +1.5 V の電圧を速度 0.1 V/秒で与えるプロトコルで CV を検討すると、PBS のみの場合には、水の電気分解に由来する -1 V 付近と 1.5 V 付近の電流が得られた。ブメタニドを含む PBS 溶液では、PBS のみの場

合の電流に上乗せして、0.71 V から立ち上がり、0.95 V でピークを示す酸化電流を観測した (図 3 A)。次に、電圧を 0.8 V に固定して様々な濃度のブメタニドを含んだ PBS 溶液を測定した。良好な濃度依存性電流、すなわち、検量線を得た (図 3 B)。

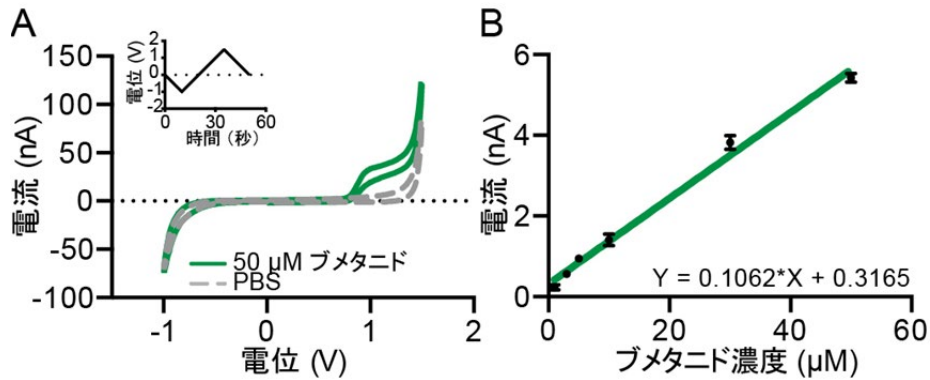


図3 ダイヤモンドマイクロセンサによるブメタニド測定

(A)ブメタニドと PBS 溶液のみの CV。電圧プロトコルを左上に示した。(B)検量線。各濃度において、0.8 V の電流値をプロットした。

2) 生体内計測基盤の構築と蝸牛を用いた実験

予備実験において、蝸牛の外リンパ液の CV を実施すると、内因性タンパク質の影響により、かなり大きな背景電流が観測された。様々な検討により、この背景電流の影響を最小限に抑えてブメタニドを感度良く測定するため、0.6 V を 2 秒、0.8 V を 2 秒、そして -1.0 V を 1 秒、連続して印加する「コンビネーション電位プロトコル」が適

していることを見出した。このプロトコルでは、0.6 V と 0.8 V で得られた酸化電流の差を、薬物濃度検出に活用する。結果として、5 秒に 1 度の時間分解能で反応を得ることができる。再び *in vitro* において様々な濃度のブメタニドを測定すると、良好な検量線を得た。最小検出濃度は 0.1 μM であった。

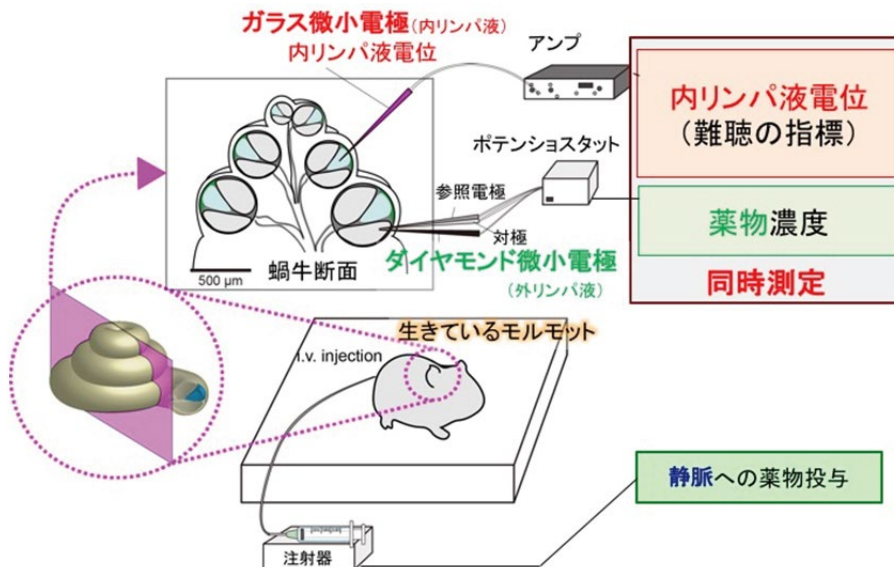


図4 蝸牛を対象にした生体内計測基盤

図4に示すとおり、ダイヤモンドマイクロセンサにガラス微小電極を組み合わせ、両者をコンピュータで同期させることで、生きた動物の蝸牛を測定対象とするための計測基盤を構築した。そして動物実験を進めた。モルモットに十分な麻酔をかけ、人工呼吸器につないだのちに、薬物を投与するための微細チューブを頸静脈に留置した。そして、内耳蝸牛の外リンパ液腔に挿入したダイヤモンド電極により薬物濃度を測定しながら、内リンパ液腔においてガラス微小電極で聴力の指標である内リンパ液電位を同時にモニターした(図4)。

ある個体の計測結果を図5に示す。ブメタニド 30 mg/kg を静脈投与すると、マイクロセンサ電流が急激に上昇した。この反応に呼応して、当初、+81 mV を示していた内リンパ液電位が大きく低下した。この実験例では、薬物投与後、約5分を経過した時点でマイクロセンサ電流の量が最大となった。一方、内リンパ液電位は、10分を経過した頃に最低値を示した。すなわち、ブメタニド濃度と、聴力の指標である内リンパ液電位が、異なった時間経過で推移していった。事前に得ていたマイクロセンサの検量線より、図5の例ではブメタニドの最大濃度は4.0 μM と見積もられた。バリエーションはあるが似た結果が、複数のモルモット個体で観察された。また、測定中、ブメタニド濃度を反映するマイクロセンサ電流がピークを迎えてから徐々に減衰していく例が、より多く観察された。

3) *in vivo* 測定におけるダイヤモンドマイクロセンサの定量性の検討

先述したとおり、蝸牛の外リンパ液には内因性のタンパク質を始め、多彩な生体物質が含まれている。したがって、イオンで組成されている PBS 溶液で得られた *in vitro* の検量線が、*in vivo* の実験条件ではどの程度適正かを調査する必要がある。そこで、蝸牛の生体内計測の最後の時点で、微量の外リンパ液を微細ガラス管で採取し、このサンプルを体外の質量分析計にかけてブメタニ

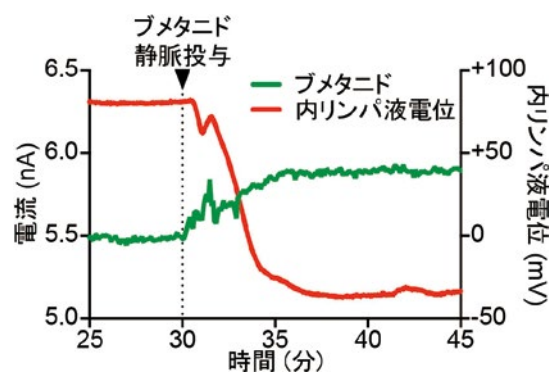


図5 蝸牛内のブメタニド動態と内リンパ液電位の推移

ダイヤモンドマイクロセンサ電流を緑で、内リンパ液電位を赤で示す。モルモットの頸静脈からブメタニドを注入した。横軸は測定開始からの時間。

ド濃度を絶対定量した。そして、その結果を、ダイヤモンドマイクロセンサで見積もった蝸牛局所の外リンパ液のブメタニド濃度と比較した。検討した10例のうち、全例において、両者はほぼ一致した。この解析から判明したダイヤモンドセンサの *in vivo* 定量限界は、0.4 μM であった。この値は、ブメタニドの $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ 共輸送体に対する IC_{50} 値 (0.5–0.6 μM)^{8), 9)} より低い。一般に、薬物が、臓器や組織に薬効や副作用を誘引する際には、構成細胞周囲の濃度は IC_{50} 値の近辺かそれ以上になるはずである。よって、我々のダイヤモンドマイクロセンサは、いわゆる“clinically relevant”な濃度に対応できると言える。臨床的なブメタニドの有効血中濃度は、1–4 μM に達することからも、臨床への橋渡し研究への活用が示唆された。

4) 脳におけるブメタニドの測定

本課題の研究対象は、当初、内耳蝸牛のみであったが、創出した生体内計測基盤の汎用性を試すため、次に脳を解析した。ブメタニドは、脳グリア細胞の $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ 共輸送体に作用することで、神経活動を低下させる。近年、新生児の癲癇をはじめとしたいくつかの脳疾患への投与が試行されている。

センサの先端が浸される脳の間質液には、蝸牛

の内リンパ液と同様、タンパク質などの物質が含まれている。事前の検討にて、脳間質液での CV は、概して内リンパ液と類似していることがわかった。したがって、生体内計測では、蝸牛の場合と同じコンビネーション電位プロトコルを使うことに決した。ラットに十分な麻酔を施し、人工呼吸器に載せたあと、頭蓋骨に小さな穴を開けた。この穴を通じて、脳実質の表面にダイヤモンドマイクロセンサと微小ガラス電極を近接して共に挿入した。後者では、神経活動の指標である局所電場電位 (local field potential : LFP) をリアルタイムで追尾した。ラットの尾静脈からブメタニドを投与すると、マイクロセンサ電流は急激に上昇し、投与後、約 2 分で最大値に達した。そして、徐々に減衰していった。マイクロセンサ電流がピークになる頃から LFP はゆっくりと低下した。以上の結果より、我々の生体内計測基盤は、脳へも適用可能であることが示された。

5) 他の薬物の検討

さらに、我々の生体内計測基盤が他の薬物にも使用できるかを検討した。最初に、臨床診療でしばしば用いられる抗癲癇薬のラモトリギンを試した。生体内計測に先立ち、*in vitro* でダイヤモンドマイクロセンサを用いて CV を測定すると、 -0.4 V から -1.0 V の負の電圧印加により、明瞭な還元電流を観察した。薬物が未投与のラットの脳間質液では、負の電圧印加でほとんど還元電流が惹起されないことを見出していた。この結果に基づき、電圧プロトコルを、 1.4 V で 2 秒、 -0.6 V で 2 秒、 -1 V で 1 秒と設定し、 -0.6 V の際の電流値を薬物動態モニタリングに活用することにした。様々な濃度のラモトリギンを *in vitro* で測定したところ、良好な検量線が得られた。検出限界は $0.1\text{ }\mu\text{M}$ であった。これらの結果を踏まえ、動物実験を行なった。ブメタニドの脳での動態を測定した時と同様に、麻酔をかけたラットの脳実質表面へダイヤモンドマイクロセンサと微小ガラス電極を挿入した。尾静脈からラモトリギンを投与すると、8 分後にマイクロセンサ電流が上昇し

始め、15 分後に最大値に達した。薬物動態の時間経過は、明らかにブメタニドよりも遅かった。また、ラモトリギンでは、電流の上昇開始に伴い LFP が強く低下したが、その時点で薬効はプラトーになり、20 分以上、同じ状態が続いた。

薬物が元々標的としている組織・臓器以外の部位に副作用が生じないことを確認することは、臨床医学上、極めて重要である。この視点から、抗がん剤であるドキソルビシンを生動物の蝸牛にて検討した。この薬物は、広く悪性腫瘍の治療に使われているが、耳毒性を有するという報告はない。したがって、内リンパ液電位への影響も殆どないと予想された。予備実験として、*in vitro* でドキソルビシンの CV を検討したところ、 -0.3 V で惹起し始め -0.6 V でピークを示す還元電流を観察した。このデータに基づき、生体内計測用の電圧プロトコルは、 0 V で 2 秒、 -0.6 V で 2 秒、 -1 V で 1 秒とし、 -0.6 V の電流値でドキソルビシンを検出することにした。そして、*in vitro* において検量線を求めたところ、電流と薬物濃度に関して直線の関係が得られた。ドキソルビシンの検出限界は 1 nM であった。他の薬物に比較して、極めて高感度な反応が得られたことになる。以上の結果を踏まえて、再び生きたモルモットの蝸牛を対象に実験を施行した。ブメタニドの際と同様に、ダイヤモンドマイクロセンサを外リンパ液に、微小ガラス電極を内リンパ液に挿入した。麻酔下の動物の頸静脈にドキソルビシンを注入すると、3 分ほどでピークを示すマイクロセンサ電流を認めた。予想通り、測定開始時に約 $+80\text{ mV}$ を示していた内リンパ液電位は、ドキソルビシンを投与しても殆ど変化しなかった。

最後に、我々の生体内計測基盤の標的になる薬物をさらに検索するため、導電性ダイヤモンドで構成された平板電極を用いて、約 10 種類の化合物の CV を *in vitro* で測定した。ここでは、難聴を誘引しうると報告がある薬物を中心としてスクリーニングした。抗生剤のゲンタマイシンは、おおよそブメタニドに似た電流を示した。また、

抗マラリヤ薬のキニーネは、ラモトリギンやドキシソルピシンと同様に、負の電圧印加で還元電流を示した。ゲンタマイシンは、感覚細胞である有毛細胞のイオンチャンネルを不活性化することで、蝸牛の電気現象に影響する。キニーネの阻害標的の一つは、内リンパ液高電位の成立に必須なイオンチャンネルである。したがって、両薬物による蝸牛局所への効果は、我々の計測基盤に搭載されている微小ガラス電極の対象となる。以上から、ゲンタマイシンとキニーネの薬物動態とその効果は蝸牛で追尾可能であることが強く示唆された。

4. 考察

本研究において、我々は、生きた動物の内耳蝸牛の局所において、ブメタニドの濃度動態とその薬理効果を、リアルタイムで同時に追尾する計測基盤を構築した。前者の時間分解能は過去のどの分析法よりも速かった。ダイヤモンドマイクロセンサは、ブメタニドを半定量的に測定できた。また、本計測基盤は、蝸牛のみならず、脳においても使用可能であった。さらに、この系は、ブメタニドのみならず、ラモトリギンやドキシソルピシンの薬物にも感受性を示した。ゲンタマイシンやキニーネの実験結果も鑑みると、我々の計測系は、多彩な臓器・組織において、様々な薬物を検討できる汎用性を持ったものであると結論づけられた。

冒頭にも述べたが、従来の分析手法の多くでは、薬物濃度の推移を調べるために標本の採取が必要であり、時間分解能に限りがある。また、採取の際に血液や細胞が混じることもあり、局所測定の観点からは正確性を保証できない。特に、内耳蝸牛のような小型かつ繊細な臓器は困難を極める。我々の計測基盤では、ダイヤモンドマイクロセンサと微小ガラス電極の先端径がマイクロメートルオーダーであり、5秒に一度の薬物検出プロトコルを採用したため、異次元の局所計測が可能となった。プロトコルやセンサをさらに改良していけば、今までに謎であった“真の”薬物動態と

薬効のプロファイルを明らかにできるのみならず、難聴を最小限に抑えて薬効を最大限に発揮させる薬物投与方法の創出につながると期待される。

一方で、我々の生体内計測基盤には、いくつかの限界もある。第一に、*in vitro* で得た検量線を用いて *in vivo* のダイヤモンドマイクロセンサ電流を濃度換算する際には、注意が必要である。理由の一つとして、時に体内で発生した薬物の代謝物が本来の化合物と同じような電流特性を示すことが想定され、その場合、後者の定量性は不確実となる。また、体液に含まれている内因性のタンパク質がマイクロセンサ表面に付着し、その感度を下げる可能性もある。この点を評価するには、本研究のブメタニドの実験のように質量分析で決定された絶対定量の値と比較すること、代謝物が手に入ればそれらのマイクロセンサ電流を調査すること、などが必要である。第二は、対象薬物が導電性ダイヤモンドで電気化学的に測定できる化合物に限られることである。溶液中の反応において水の電気分解により酸素と水素が発生するのは避けられない。したがって、この範囲内で酸化もしくは還元反応を呈する薬物のみが測定対象となる。また、化合物からの電流が小さすぎる場合、もしくは、*in vivo* で測定する際には内因性タンパク質からの背景電流が大きすぎる場合も、シグナル/ノイズ比が悪くなり正確な薬物濃度が追尾できない。しかし、これらの問題点の一部は、ダイヤモンドマイクロセンサの表面を適切に化学修飾することで対応可能と考えている。第三の問題点は、薬効を観測する手法として、我々の現在の計測系は電気現象を捉える微小ガラス電極のみが搭載されていることである。よって、薬効が計測できる化合物は、細胞や組織の電気現象が立脚するイオンチャンネル・輸送体を標的にしたものに限定されている。しかし、これらの機能タンパク質に対する活性化剤や阻害剤が、臨床の現場で使われている承認薬に占める割合は比較的大きい(約 16%)¹⁰⁾。ダイヤモンドマイクロセン

サは、例えば種々のイメージング技術と組み合わせることも可能であり、より多くの薬物とその効果を観察できると期待される。

5. 将来展望

本研究で構築した生体内計測基盤を、既存の化合物のみならず、これから創出される薬物に適用することにより、副作用が少なく薬効が最大となる「安心・安全・有効」な創薬や投薬法の開発が可能となってくる。今回は、内耳蝸牛を第一の標的臓器としたが、脳を用いた解析の例でも明らかな通り、工夫をすれば多様な臓器や組織での測定が現実的になり、応用範囲も格段に拡大する。

さらに、導電性ダイヤモンドセンサのみを使った用途にも将来性がある。近年、医療の現場で注目され、その開発が加速している新薬のいくつかは、患者ひとりひとりの臨床症状や状態に関係なく、一定量から投薬を開始する。そして、副作用の出現や重症度を指標にしなが、投与量を調節していく。治療中の患者から通常の方法で採取した血中の薬物濃度をダイヤモンドセンサでモニターすれば、薬効や副作用との定量的な関係が、日単位のタイムスケールで診療の現場において追尾できることになり、より堅固な根拠を持ったきめ細かい投薬量の調節が可能となる。また、血糖値計のような小型薬物センサの創製を通じて、より簡便かつ綿密な検査ができるようになる。さらに研究が進めば、まさに、今まで標的とならなかった薬物に対して、患者個人に対する画期的な「オーダーメイド医療」を提供できる日が、そう遠くはないかもしれない。

謝辞

特別研究助成によりご支援いただいた中谷医工計測技振興財団に厚く御礼申し上げます。ダイヤモンドマイクロセンサおよびダイヤモンド平板電極は、研究分担者である慶應大学工学部の栄長泰明教授からご提供いただきました。同じく研究分担者である東京大学工学部の高井まどか

教授からは、電圧印加プロトコルのご指導をいただきました。質量分析によるブメタニド定量を実施してくださった東京大学薬学部の楠原洋之教授に感謝いたします。

なお、本研究の成果は、現在、論文に投稿中のため、この紙面上で詳しく報告することができません。さらなるお問い合わせは、研究代表者へお願いします。

参考文献

- 1) Nin F, Yoshida T, Sawamura S, Ogata G, Ota T, Higuchi T, Murakami S, Doi K, Kurachi Y, Hibino H (2016). The unique electrical properties in an extracellular fluid of the mammalian cochlea; their functional roles, homeostatic processes, and pathological significance. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **468**, 1637-1649.
- 2) Nin F*, Hibino H*, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y (2008). The endocochlear potential depends on two K⁺ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 1751-1756. [*: equal contributors]
- 3) Nin F, Hibino H#, Murakami S, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y# (2012). Computational model of a circulation current that controls electrochemical properties in the mammalian cochlea. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 9191-9196. [#: equal corresponding authors]
- 4) Kusakari J, Kambayashi J, Ise I, Kawamoto K (1978). Reduction of the endocochlear potential by the new "loop" diuretic, bumetanide. *Acta Otolaryngol* **86**, 336-341.
- 5) Fujishima A, Einaga Y, Rao TN, Tryk DA (2005). Diamond Electrochemistry.

(Elsevier-BKC, Tokyo, Japan).

- 6) Suzuki A, Ivandini TA, Yoshimi K, Fujishima A, Oyama G, Nakazato T, Hattori N, Kitazawa S, Einaga Y (2007). Fabrication, characterization, and application of boron-doped diamond microelectrodes for in vivo dopamine detection. *Anal Chem* **79**, 8608-8615 (2007).
- 7) Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* **8**, e1000412.
- 8) Frelin C, Chassande O, Lazdunski M (1986). Biochemical characterization of the Na⁺/K⁺/Cl⁻ co-transport in chick cardiac cells. *Biochem Biophys Res Commun* **134**, 326-331.
- 9) van Mil HG, Geukes Foppen RJ, Siegenbeek van Heukelom J (1997). The influence of bumetanide on the membrane potential of mouse skeletal muscle cells in isotonic and hypertonic media. *Br J Pharmacol* **120**, 39-44.
- 10) Bakan A, Lazo JS, Wipf P, Brummond KM, Bahar I (2008). Toward a molecular understanding of the interaction of dual specificity phosphatases with substrates: insights from structure-based modeling and high throughput screening. *Curr Med Chem* **15**, 2536-2544.

ヒト角膜内皮細胞注入治療のためのマルチスケール細胞標準化技術の確立

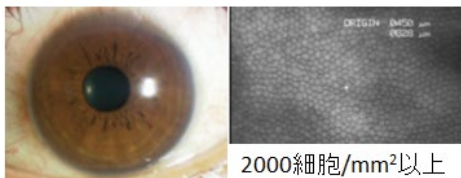


研究責任者 京都大学 物質-細胞統合システム拠点
教授 田中 求
研究協力者 京都府立医科大学 眼科教室
助教 上野 盛夫

1. はじめに：角膜再生医療の現状

角膜は眼球の最前面に位置する透明な組織で、前面から上皮層・実質層・内皮層の3層の構造を有している。角膜内皮は単層細胞層で、角膜内皮細胞がバリア機能とポンプ機能を有することによって角膜実質の含水率を一定に保ち、角膜の透明性を維持している。

正常角膜



角膜内皮障害(水疱性角膜症)

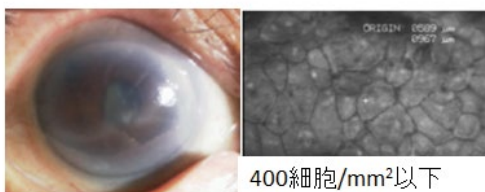


図1 正常角膜(上)と角膜内皮障害(下)

角膜の機能不全の6割以上を占める角膜内皮の機能不全(内皮細胞密度の減少、それによって引き起こされる水疱性角膜症)は、欧米で20万人以上の患者(日本では約1万人)がいると推定さ

れ、今後の超高齢化社会におけるQOL維持のための最重要課題の一つである。正常角膜における角膜内皮細胞の平面密度は1平方ミリメートル当たり2000もしくはそれ以上であるが、加齢や損傷によってその密度が5分の1以下に減少すると角膜の白濁による失明にいたる¹⁾。

ヒトを含む霊長類の角膜内皮細胞は生体内では増殖能がきわめて低く、一度減少した角膜内皮細胞密度を上げることは不可能である。ゆえに現時点では、唯一の治療法は角膜移植である。しかしながら角膜移植は大きな切開創などの手術侵襲が非常に高い治療法であり、視力改善が限定的であること、また術後合併症などの問題が生じやすい。さらには移植後、継続的に細胞密度が減少し再移植が必要となるケースも少なくない。このような状況にあって、我が国で行われている角膜移植は年間約800件に留まっているというのが現状である。

2. 角膜再生医療の新たな流れ：細胞移入治療

共同研究機関である京都府立医科大学眼科学教室は、ROCK阻害剤等を用いて従来不可能であった臨床応用可能な正常な形質を維持したヒト角膜内皮細胞を培養することに世界に先駆けて成功した^{2)・3)}。この技術成果を元に、培養増殖し

た高機能の角膜内皮細胞を眼内への注入し自己組織化によって角膜組織を再生する（図2）という、細胞ベースの新たな再生医療の研究と開発を行ってきた。

平成25年12月に厚生労働省の承認を受け、ヒトを対象とした世界初の臨床研究を開始した。平成29年3月時点までに33例の臨床実験を行い、6月からはいよいよ医師主導の治験を開始した。こういった「患者の負担を最小限に抑えつつ高機能性角膜内皮を再生する」という新たな試みは、これからの高齢化社会においてさらなる増加が見込まれる角膜内皮障害の解決策として、実用化に向けたさらなる研究が必要である。

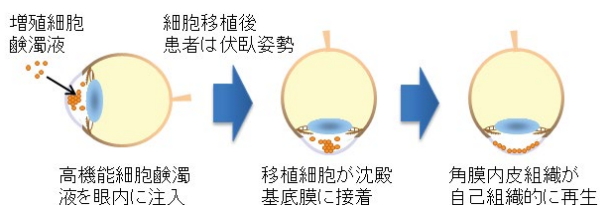


図2 細胞注入治療の流れ

3. 解決すべき課題：再生医療の現場で求められる「定量指標」の確立

細胞移植による角膜再生治療の実現には、高機能性の細胞を選択的に患者に移植することが望ましいので、移植前段階での培養細胞の品質管理は最も重要なステップである。

研究をデザインした当時用いられていた増殖細胞の中には、高い薬理効果を発揮する高品質細胞（エフェクター細胞）と薬理効果の低い低品質細胞が混在していた。この二種類の細胞亜種の識別は、細胞生物学の見解をもとに細胞表面抗原をマーカーとしてフローサイトメトリー（注：細胞などの微小な粒子を溶液中に分散し、抗体等でラベリングしたものを光学的に分析・選択回収する技術）で行われていたが、その機能的な根拠（基底膜への接着能、移植後の内皮組織の構造秩序）や識別の基準（分別に最適なタンパク発現量）、そしてこれらの細胞が集団としてどのような秩

序構造を形成するか、といった機能評価基準はいまだに確立されていなかった。

そこで本研究では、高機能性のエフェクター細胞を選択的に増殖培養しこれを患者に移植するため、従来型の分子生物学的アプローチによる機構解明と相補的な新たな「細胞の定量的な規格標準」を確立するための新しい流れを提唱した。

このゴールに向け、再生医療の現場に立つ臨床医である京都府立医科大学・上野と、ソフトマター物理・生命物理の専門家である京都大学・田中のグループが分野の壁を越えて密に連携し（1）移植前の細胞品質管理と（2）移植後の組織の予後評価の双方を行えるような定量指標を確立することに挑戦した。

4. 角膜内皮再生に必要な細胞機能とは

ここで細胞注入による角膜内皮再生治療に必要な移植する培養細胞の機能、また移植後の再生角膜が満たすべき機能とは何かについて考察するために、正常角膜内皮と病的角膜内皮を改めて比較してみたい。

In vivo の角膜の細胞レベルの構造は、接触型広域スペキュラー顕微鏡（図3a）によって可視化することができる。撮影した画像（図3b）の中からRegion of Interestを切り出し、細胞同士の境界を2値化情報（図3c）として取り出すことができる。

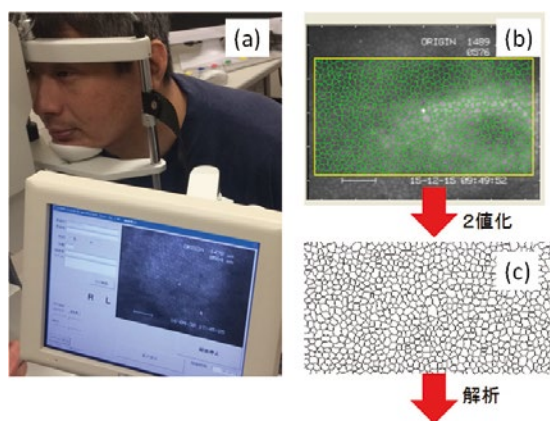


図3 (a)スペキュラー顕微鏡による *in vivo* での角膜組織の可視化 (b)実際のモニター画像 (c) 2値化後の画像

図4に示すように正常な角膜内皮（左）と病的な角膜内皮（右）を比較すると、正常角膜組織ではサイズの揃った小さい細胞が高密度で基底膜にしっかり接着していることがわかる。ゆえに再生医療の現場のニーズに応えるには、単一細胞レベルの機能（基底膜への接着強度）と、組織内の細胞の集団秩序（自己組織化）を評価するマルチスケールな指標が必要となる。

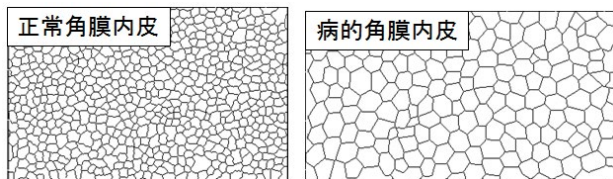
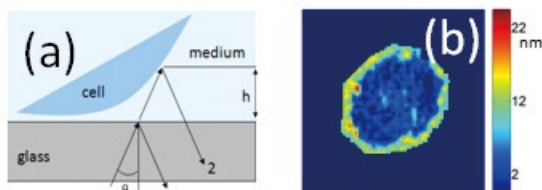


図4 (a)正常角膜内皮と (b)病的角膜内皮の比較

5. 単一細胞レベルでの機能：基底膜への接着機能の精密計測

本研究の第一段階では、研究代表・田中が世界で先導的な役割を果たしている、Supported Membrane⁴⁾をラミニンで精密に機能化した基底膜の精密モデルと独自の二つの計測・解析技術を有機的に組み合わせて、単一細胞レベルの接着機能を定量評価した。



$$I(h) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(2kh - (\delta_1 - \delta_2))$$

図5 (a)反射干渉顕微鏡(RICM)の原理と(b)ラベルフリーで解析した細胞の支持基板近傍での高さプロファイル(ここで用いた細胞はヒト造血幹細胞)

細胞接着面積の精密計測

第一に用いた計測技術は、反射干渉顕微鏡(Reflection Interference Contrast Microscopy, RICM)である⁵⁾。図5が模式的に示すように、本技術では円偏光した淡色光が屈折率のコントラ

ストの大きい界面(固体基板/水、水/細胞膜など)で行う多重反射の干渉光強度から基板と細胞の距離を超高感度でラベルフリーで計測することが可能である(図5b)。例えば、細胞が表面近傍にあるとき(h が非常に小さいとき)は相殺的干渉により強度はゼロとなるため、接着面積を高感度で検出することを可能にする⁶⁾。

これまでに研究代表・田中らは、この技術で得られた画像データのモード解析やパワースペクトル解析によって、転移性と非転移性のすい臓がん細胞に特徴的な変形の時空間パターンの抽出⁷⁾や、健康なヒト造血幹細胞と白血病患者の芽球の骨髄モデル上への接着機能の識別⁸⁾といった目的に活用してきた。

また、RICMの持つ高さ方向の非常に高い分解能($\Delta h \sim 4 \text{ nm}$)を活用すると、基板近傍での細胞サイズの微粒子や細胞接着面そのものの高さゆらぎの分布関数 $P(h)$ から界面相互作用のポテンシャル $V(h)$ を $V(h) \sim -kT \ln P(h)$ の空間分布を計算することも可能である⁹⁾。

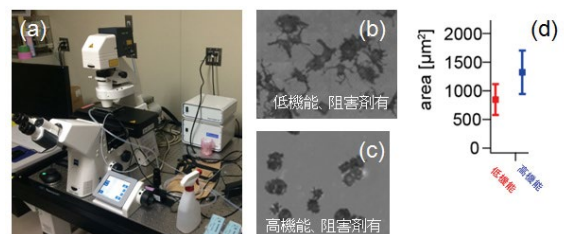


図6 (a)本研究助成で確立した微量の角膜内皮細胞接着の長時間追跡用プラットフォーム(b)表面マーカーで分類した低機能亜種と(c)高機能亜種のRICM画像(どちらもラミニン分子間距離 60 nm、ROCK 阻害剤有)(d)細胞接着面積の比較

本研究助成の支援を受け、田中研究室では貴重なヒト角膜内皮細胞のロスを最小限に抑えつつ、安定にその接着機能を追跡できる計測プラットフォームを確立した(図6a)。これを用いて、異なる細胞亜種の接着面積が基底膜モデル表面のラミニン密度や ROCK 阻害剤の有無にどのように影響を受けるかを計測・解析した。例えばラミ

ニン間の分子距離を 60 nm にそろえ ROCK 阻害剤を与えた場合、表面マーカーで分別した低機能細胞亜種 (図 6 b) と高機能細胞亜種 (図 6 c) は明らかに異なる接着挙動を示した。低機能亜種は多くのスパイク上のフィロポディアを細胞周縁へ伸ばすのに対し、高機能亜種の接着面の周縁はスムーズで、真円度など形状指数でも大きな差を示した。

さらにピクセル強度による閾値で認識した細胞接着面積を各 30 細胞程度ずつで得られたデータから比較すると、高機能エフェクター細胞の接着面積は低機能亜種よりも明らかに大きな値をとった (図 6 d)。また、ラミニンの分子間距離を 10 nm から 60 nm まで大きくしても両細胞亜種とも接着面積に大きな変化を示さなかったことから、基底膜への接着はラミニンの密度がおちても大きく影響を受けないということが示唆された。これは実際の細胞移植治療において、基底膜に損傷があっても細胞が安定に接着するという知見と一致する。しかしながら、細胞接着面積は実験ごと (ロットごと) の差異が無視できないほど大きく、これを細胞亜種の品質評価指標として用いることは統計的には不可能であるとの結論に至った。

細胞接着の力学強度計測

第二に用いた計測技術は、田中研究室が独自に開発した、細胞接着の力学的強度を定量する圧力波装置である (図 7 a) ¹⁰⁾。計測装置の中核はピコ秒レーザー ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) を倒立顕微鏡と組み合わせたもので構成される。図 7 b にその作動原理を模式図で示す。強力なレーザー光を細胞培養チャンバーの溶液中に集光すると、多光子吸収により局所的に水が沸騰する。この際に生じる気泡の成長・破裂に伴って超音速で伝播する強力な圧力波 (衝撃波) が生じる。この圧力を細胞の断面積と掛け合わせた力は、光トラップといった生物物理分野で広く用いられている装置が生み出す力と比較すると、焦点から 2 mm 離れた地点に

おいてさえおよそ 100 万倍という強力な力を生み出せる。実際にこの圧力波は、細胞を非常に接着性の強い表面から細胞を殺すことなく非破壊的に脱離させるに十分な強度である。この圧力の大きさがパルスエネルギーと焦点からの距離で検量可能であるという利点を活かして、われわれは「細胞が脱離する圧力の閾値」を細胞接着の力学強度の指標として用いることを提唱してきた。この計測技術を用いることにより、広く用いられている原子間力顕微鏡やマイクロピペットと比較して、約数百倍高いスループットでの細胞接着力計測を実現した。

これまで本技術は、弾性率を自在に操れるヒドロゲルや組織工学用材料上への筋芽細胞 ¹⁰⁾、¹¹⁾ や骨芽細胞 ¹²⁾ の接着強度といった生体材料科学分野だけでなく、マラリア感染赤血球の胎盤表面での濃縮と寄生虫の成長の相関 ¹³⁾ や、ケモカインや臨床薬剤の存在下でのヒト造血幹細胞の骨髄表面への接着強度の変化 ⁷⁾ といった臨床医学にも応用されてきた。

本研究においては、異なる細胞亜種の接着強度を、ラミニン密度や ROCK 阻害剤が与える影響を計測・解析した (図 7 c)。ここでは、圧力波にさらされた後の細胞の接着率 (脱離せず表面に残存している細胞の割合) を圧力波の強度 (焦点か

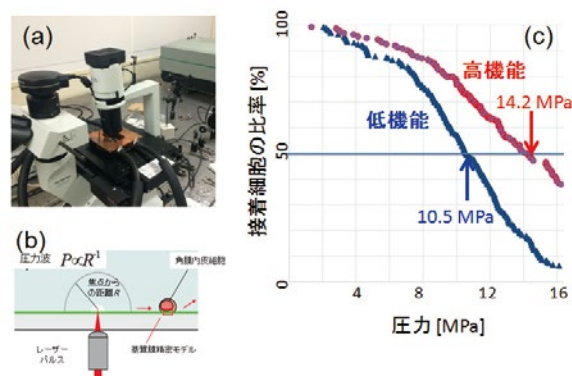


図7 (a)細胞接着の力学強度計測プラットフォーム(b)作動原理の模式図(c)ラミニン密度をそろえて ROCK 阻害剤の存在下で細胞の半分を脱離させる圧力の閾値を比較すると、高機能細胞のほうが強い接着をすることが定量的に示された。

らの距離から換算)の関数としてプロットしている。接着面積の結果(図6d)と同様、角膜内皮細胞の接着強度はラミニン分子間距離を10 nmから60 nmに変えても顕著な変化を示さなかった。この結果は、接着面積だけでなく力学的な強度も分子間距離依存性を示さないほど角膜内皮細胞の接着が強いことを示唆している。

また図7cが示すように50%の細胞が脱離する圧力強度を高機能エフェクター細胞(赤)と低機能亜種(青)とで比較すると、やはり高機能細胞亜種のほうが1.5倍近く強い閾値を示した。しかしながら、各細胞亜種の中でのデータの分布の幅が大きいため、これを様々な細胞亜種の混在下で品質評価指標として用いることは統計的には不可能であるとの結論に至った。

6. 細胞集団レベルでの機能:細胞の「そろい方」の定量指標

ここまでの一細胞レベルで得られた結果は、「角膜内皮組織の安定性を決定するのは、個々の細胞が基底膜に接着する強度の違いよりも、むしろ集団としての細胞のそろい方ではないか?」ということを示唆している。

実際に気道上皮など単層上皮系の組織を見ると、大きさのそろった細胞が2次元における最密充填構造である六角格子を形成することで安定した構造を維持していることがわかる。現在診断の現場では、細胞密度¹⁾と六角形細胞率という二つの数値が用いられている。しかしながら、細胞密度は細胞サイズの平均値の情報であり「そろい方(秩序)」に関する情報を含まない。また六角形細胞率を決める元となる「この細胞は何角形か」という基準は角がはっきりしない細胞や長軸方向に進展した細胞では誤差が大きだけでなく、「ある形態の割合」と「集団秩序」とには定量的な相関がない。最近いくつかの論文でボロノイ分割(各母点の最近隣領域を分割する手法)が隣接細胞数を決める手法として活用¹⁴⁾されているが、これも六角形細胞率と同様細胞同士の相互

作用を反映しておらず、集団秩序を定量的に記述する指標としては使えない。

ここで細胞や生物といった系の特殊性を離れ、より一般的な視点から見れば「大きさのそろった細胞が2次元における最密充填構造(六角格子)を形成する」という現象は、2次元でのコロイド結晶の形成^{15), 16)}とまったく等価である。そこで本研究では上皮組織とコロイド結晶の共通点に着目し、コロイド結晶として普遍化した角膜内皮のための新指標を確立することを目指した。

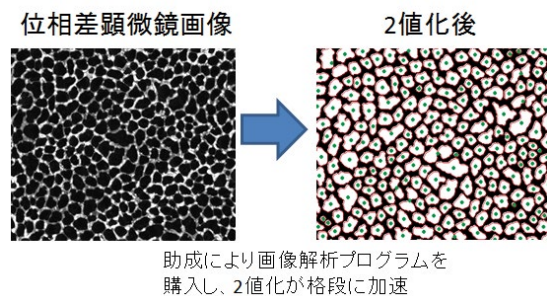


図8 画像の2値化(右が2値化後の画像)とそれから求められた各細胞の重心位置(緑)

具体的には、顕微鏡画像(移植前の培養角膜内皮細胞の場合は位相差顕微鏡画像、移植後の再生角膜内皮の場合はスキャナー顕微鏡画像)を市販の画像プログラム(研究助成で購入)を用いて2値化し、その後の解析は本研究申請の中で開発した独自のプラットフォームを用いて解析した。以下に今回取り入れた二つの新たな定量指標について紹介する。

六角格子秩序変数

*In vitro*培養中の移植前細胞集団や細胞注入後の再生角膜内皮が、理想的な六角格子と比較してどれだけ「ずれ」ているかを評価する指標として、2次元結晶の欠陥誘起型相転移の理論¹⁷⁾を応用して、六角格子秩序変数

$$Q_6 = \left| \frac{1}{6} \sum_{j \in N(i)} e^{i\theta_{ij}} \right|^2 \in [0,1]$$

を計算した。 Q_6 は0と1の間の数値を取り、完璧な六角格子は $Q_6 = 1$ の値をとる。

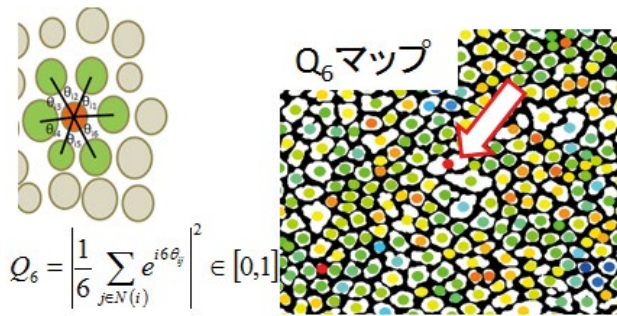


図9 六角格子秩序変数の定義(左)と計算によって得られた Q_6 マップ(右)

図9に六角秩序格子の定義と計算によって得られた Q_6 マップ (青: $Q_6 = 1$, 赤: $Q_6 = 0$) を示す。図で示したように Q_6 マップを用いれば、六角形細胞率といった従来型の定性的な記述では得られなかった「局所的に六角格子から外れている点」=「欠陥や自己組織化がうまく行っていない箇所」に関する空間的な情報を新たに得ることができる (例: 図中の矢印で示した箇所)。角膜内皮細胞集団は結晶性がそれほど高くないので、現時点で Q_6 だけで培養皿上の細胞亜種の品質や移植後角膜の予後を明確に評価することはできていないが、この解析手法は Q_4 , Q_5 , Q_7 など六角形以外の形についても適応可能であるので、現在これらの組み合わせを検討中である。

動径分布関数解析

本節のはじめでも述べたように、現在角膜内皮障害の診断で主に使われている指標の一つである細胞密度 ρ には細胞の集団秩序の情報が欠落している。一方、角膜内皮組織は「ばらばらの細胞がただ空間分布している」のではなく、各細胞同士が相互作用する力のバランスによってその集団秩序を安定させている。この原理はコロイド結晶においても同じであり、粒子間の相関長は多くの場合粒子のサイズを大きく超える。

そこで個々の細胞・粒子に働く力を個別に計測するかわりに多体の相関を表す指標として動径分布関数^{18), 19)}

$$g(r) = \frac{dN(r+dr)/N}{dA(r+dr)/A}$$

を用いる。図10で模式的に示したように、 $g(r)$ は粒子 (細胞) の密度をある距離の分布関数としてあらわしたものである。式からも明らかであるが、先ほどの六角格子秩序変数 Q_6 が角度 (方向) の秩序を表している (距離情報は含まない) のに対し、 $g(r)$ は系を等方的に扱っている (方向に関する情報を含まない) ことに注目されたい。ここで採用した、系が等方的であるという近似は上皮組織や2次元コロイド結晶において有効である。

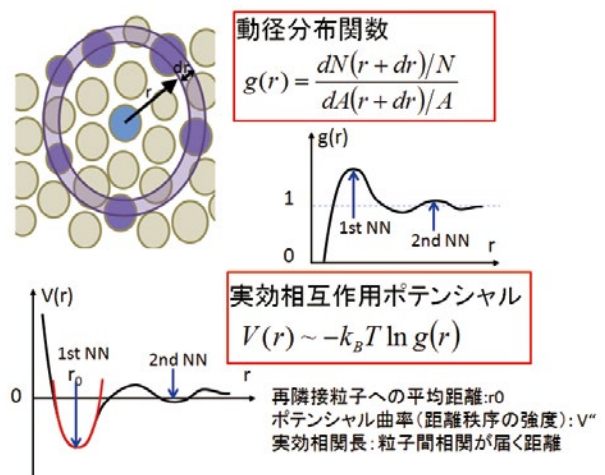


図10 動径分布関数 $g(r)$ と実効相互作用ポテンシャル $V(r)$ を用いた集団秩序評価の概念

$g(r)$ のはじめのピークは最近接粒子 (1st nearest neighbor, 1st NN) との距離に対応し、相関が強い場合には2番目、3番目の近接粒子のピークが出ることもある。このような高次のピークは粒子が最近接粒子とだけでなく、離れた位置にある粒子とも相互作用していることを示す。すなわち、再隣接だけでなくすべての粒子間の多体相互作用を含む $g(r)$ で得られる情報は、一般に用いられている細胞面積 A の分布関数では得られない、より上位の情報を含む ($2 \times \sqrt{A}$ は再隣接粒子との平均距離 r_0 に対応するが、高次の相互作用は検出できない)。さらに $g(r)$ から実効相互作用ポテンシャル (potential of mean force)

$$V(r) = -kT \ln g(r)$$

が求められる (k はボルツマン定数) ¹⁹⁾。図 10 に示すように $g(r)$ における r_0 や高次のピークはそれぞれ相互作用ポテンシャルの井戸に対応しており、このポテンシャル井戸が何次の隣接粒子 (n th NN) まで検出できるか、あるいはポテンシャル井戸がどれだけ遠くまで及ぶかの情報は、「細胞間の相関長(correlation length)」として定量できる。さらに、ポテンシャルの最小値近傍は調和振動子 (図中赤線) で近似できるので、その二次微分 (曲率) は 1st NN、2nd NN の位置にある細胞の位置がどのくらいシャープに固定されているかを定量的に表す「ばね定数」となる。

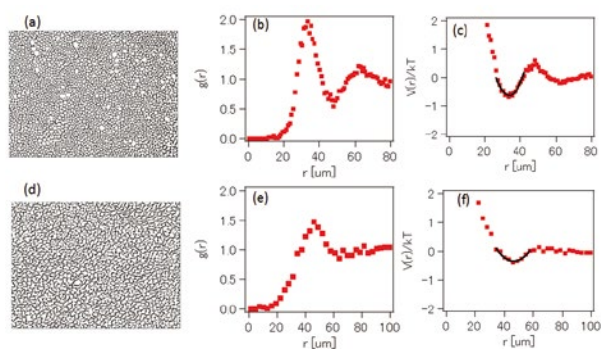


図 11 $g(r)$ と $V(r)$ を用いた培養皿上での角膜内皮細胞集団の秩序解析の流れ (*in vitro*)。 (a-c) 高機能亜種の比率 100% (d-f) 高機能亜種の比率 0%

図 11 に培養皿上の高機能亜種 100% のサンプルの位相差顕微鏡画像を 2 値化したもの (a) を例にとって、動径分布関数 (b) と実効相互作用ポテンシャル (c) の解析の流れを示す。対比のため、高機能亜種 0% (低機能亜種 100%) のデータを (d - f) に示した。高機能細胞亜種 100% の 1st NN への距離 $r_0 = 34 \mu\text{m}$ に比べて低機能細胞の値 ($47 \mu\text{m}$) は明らかに大きく、また高機能亜種のポテンシャル曲率 V'' は低機能のそれよりも 3.5 倍大きかった。さらに、 $g(r)$ の 2 次のピークが高機能亜種においてははっきり見られるなど、相関長の違いも明確に検出できた。

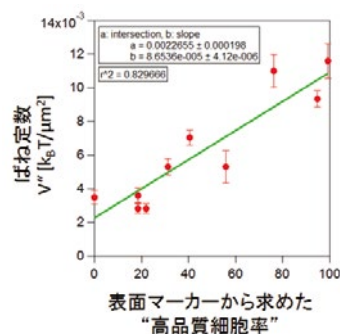


図 12 V'' とフローサイトメトリーから求めた高品質細胞率の相関。この結果から、位相差画像のみから検出可能な V'' を用いた品質管理によってフローサイトメトリーによる細胞のロスを回避できる可能性が示唆された。

そこでさらにさまざまな割合で高機能細胞亜種を含むサンプルの画像を同様に解析したところ、 V'' は表面マーカーで分別した高機能細胞の割合と正の相関を示した (図 12)。ゆえに本研究で確立した動径分布関数を用いた解析手法は、フローサイトメトリーのように貴重な細胞を失うことなく、培養皿上の細胞の顕微鏡画像だけから培養細胞の品質を非破壊的に管理する可能性を大きく広げた。

7. 移植角膜組織評価の定量指標

前節で述べた細胞集団の秩序評価は、細胞の重心位置のみをインプットとして用いるため、スペキュラー画像で可視化した *in vivo* の角膜組織画像を 2 値化したもの (図 3・4) にもそのまま適用可能である。

そこで *in vitro* の培養角膜内皮細胞に行った (図 10) のとまったく同じ解析を、全層角膜移植症例も含めた様々な *in vivo* スペキュラー画像について行った (図 13)。ここでは、移植細胞の中で高品質細胞の比率が極めて高い症例 (a-c) と臨床実験初期の段階で高機能性細胞亜種の比率が充分に高くない細胞を注入した角膜の画像 (d-f) を比較した。

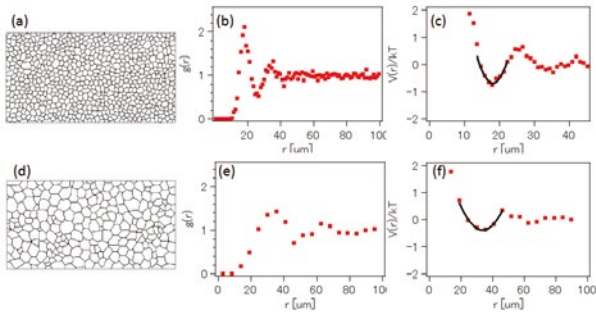


図13 $g(r)$ と $V(r)$ を用いた再生角膜内皮の中での細胞集団秩序解析の流れ(*in vivo*)。(a-c)注入細胞中の高機能細胞の比率が高い症例と(d-f) 低い症例を比較

高品質細胞が多い角膜(a-c)は *in vitro* の培養皿上よりもさらに密な構造を形成し、1st NN への距離も $r_0 = 17 \mu\text{m}$ とおよそ半分の値を示した。これは 1 mm^2 あたりの細胞密度に換算して3000以上に対応する。これは一方、高機能細胞の含有率が少ない角膜では $r_0 = 34 \mu\text{m}$ という値を示したが、それでも 1 mm^2 あたりの細胞密度は約1000程度であり、この症例でも細胞の脱離などは観測されていない。ばね定数に注目すると、高品質細胞が多い角膜のばね定数は少ないものに比べて10倍以上高い値を示した。

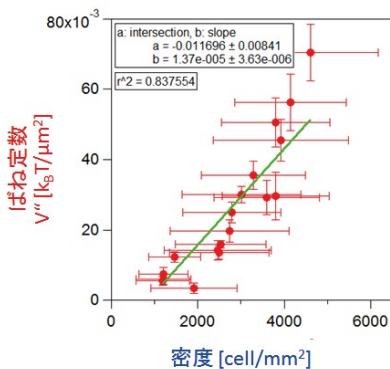


図14 細胞移入治療の他の症例から計算した V'' と細胞密度の正の相関

また、その他の細胞移入治療の症例についても V'' と細胞密度 ρ との相関を調べたところ(図14)、明確に正の相関を示した。この結果から *in vivo* の角膜組織の評価にも同じ解析プラットフォームが適用できることが証明された。

8. 今後の展開：予測可能な診断技術へ

角膜移植治療における根本的な問題の一つとして、移植後の角膜組織の安定性が挙げられる。せっかく全層角膜移植などを行っても、長期的に細胞数が安定するケースと細胞密度が1年後あたりから急激に減少し再移植が必要となるケースがある(図15a)。しかしながら、例として術後3ヶ月のデータ(矢印)を見ると、この段階で24ヵ月後の予後を現在用いられている細胞密度だけから予測することは不可能である。

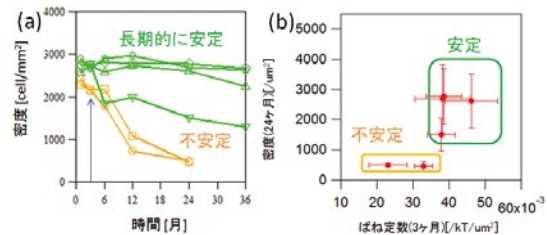


図15 (a)全層角膜移植の予後データ。術後3ヵ月(矢印)の段階では細胞密度から24ヵ月後の予後を言い当てることは不可能(b)実効ポテンシャル曲率 V'' を用いれば予後の安定な群と不安定な群を3ヶ月時点で見分けることが可能

ゆえに本研究課題の今後の展開として、角膜移植後できるだけ早い段階で予後を予測できる技術の開拓が期待される。その第一歩として、すでに長期予後のデータが豊富にある全層角膜移植後の角膜画像を本研究で開発した動径分布関数を用いて解析してみた(図15b)。図に示すように、実効ポテンシャル曲率(ばね定数)を用いると、細胞密度からは見分けられなかった長期予後が安定な群と不安定な群を明確に識別できることがわかった。

今回得られた成果を元に、さらに計測・解析の精度をあげ、これまで不可能であった早期予後診断を用いた先攻医療技術の基盤としたい。

謝辞

物理学と臨床医学の分野の壁を超えての連携という、非常に挑戦的な本研究をご支援いただい

た中谷医工計測技術振興財団に心より感謝いたします。

また、本研究課題の遂行にあたって、実験と解析を中心となって推進して下さった、山本暁久博士（京都大学）と田中寛博士（京都府立医科大学）に深く感謝いたします。さらに、研究立案時から貴重なご助言をいただいた、京都府立医科大学の木下茂教授、羽室淳爾教授、外園千恵教授、そして同志社大学の吉川研一教授（京都大学名誉教授）に深く感謝いたします。

参考文献

- 1)木下茂、天野史郎、井上幸次、大橋裕一、高橋浩、坪田一男、西田幸二 日眼会誌, 118, 81 (2014)
- 2)N. Okumura, M. Ueno, N. Koizumi, Y. Sakamoto, K. Hirata, J. Hamuro, S. Kinoshita, IOVS, 50, 3680 (2009).
- 3)M. Toda, M. Ueno, A. Hiraga, K. Asada, M. Montoya, C. Sotozono, S. Kinoshita, J. Hamuro, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 58, 2011 (2017).
- 4)M. Tanaka and E. Sackmann, Nature, 437, 656 (2005).
- 5)A. Albersdoerfer, T. Feder and E. Sackmann, Biophys. J., 73, 245 (1997).
- 6)O. Purruicker, S. Goennenwein, A. Förtig, R. Jordan, M. Rusp, M. Bärmann, L. Moroder, E. Sackmann, M. Tanaka, SoftMatter, 3, 333 (2007).
- 7)T. Kaindl, H. Rieger, L. Kaschel, U. Engel, A. Schmaus, J. Sleeman, M. Tanaka, PLoS ONE, 7, e42991 (2012).
- 8)A. Burk, C. Monzel, H. Yoshikawa, P. Wuchter, R. Saffrich, V. Eckstein, M. Tanaka A.D. Ho, Sci. Rep., 5, 9370 (2015).
- 9)Y. Higaki, B. Fröhlich, A. Yamamoto, R. Murakami, M. Kaneko, A. Takahara, M. Tanaka, J. Phys. Chem. B, 121, 1396 (2017).
- 10)H. Yoshikawa, F. Rossetti, S. Kaufmann, T. Kaindl, J. Madsen, U. Engel, A. Lewis, S.

Armes, M. Tanaka, J. Am. Chem. Soc. 133, 1367 (2011).

11)H. Yoshikawa, T. Kawano, T. Matsuda, S. Kidoaki, M. Tanaka, J. Phys. Chem. B, 117, 4081 (2013).

12)H. Yoshikawa, J. Cui, T. Matsuzaki, S. Nakabayashi, A. Marx, U. Engel, A. Lendlein, M. Tanaka, J. Phys. Chem. B, 116, 8024 (2012).

13)H. Rieger H. Yoshikawa, K. Quadt, S., M. Nielsen, C. Sanchez, A. Salanti, M. Tanaka, M. Lanzer, Blood, 125, 383 (2015).

14)K. Chiou, L. Hufnagel, B. Shraiman, PLoS Comput. Biol. 8, e1002512 (2012).

15)H. Wickman, J. Korley, Nature, 393, 445 (1998).

16)L. Ramos, T. Lubensky, N. Dan, P. Nelson, D. Weitz, Science, 286, 2325 (1999).

17)D. Nelson, E. Halperin, Phys. Rev. B, 19, 2457 (1979).

18)M. Quesada-Perez, , A. Moncho-Jorda, F. Martinez-Lopez, R. Hidalgo-Ivarez, J. Chem. Phys. 23, 10897 (2001).

19)J. Oelke, A. Pasc, A. Wixforth, O. Kononov, M. Tanaka, Appl. Phys. Lett. 93, 213901 (2008).

マイクロ RNA の超高感度電気化学検出法の開発



研究責任者 兵庫県立大学 大学院工学研究科
応用化学専攻
教授 山名 一成

1. はじめに

マイクロ RNA (microRNA, miRNA) は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、真核生物において遺伝子の発現調節に関与する。miRNA が関わる遺伝子発現抑制は、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスまたは代謝といった広範な生物学的プロセスで重要な役割を担うことが知られている。さまざまな検討結果から、miRNA が疾患診断の新規バイオマーカーや予後マーカーとして機能する可能性や、miRNA を用いた、あるいはそれらをターゲットにした遺伝子治療の可能性が示されている。特に、癌遺伝子として機能する onco miRNA と呼ばれる miRNA を含め、癌において特徴的な miRNA プロファイリングが報告されている。また、miRNA はエクソソームを使って血中に出ており、血液から癌の診断、治療経過、薬の効果、予後などがわかるようになると期待されており、そのため簡便かつ安価に miRNA を検出する技術の確立が求められている。

電気化学遺伝子 (DNA および RNA) 検出法は、蛍光法と比較して、低コスト、高価な装置を必要としない、標識不要、蛍光法では不可能な血中のバイオ分子 (RNA を含む) の直接検出が可能、など多くの長所が有る。しかしながら、今まで報

告されている電気化学検出法は低感度 (サンプル検出下限濃度~ナノモルレベル) であることが問題であった。したがって、電気化学法の超高感度化 (文献 1) は、生体内にごく微量存在する miRNA (トータル RNA の 0.01 %, 10~10⁷ コピー) の検出に適用する上で、きわめて重要な検討課題である。

本研究では、MEMS 技術を駆使して三次元ナノ構造を持つ電極デバイスを作製し、マイクロ RNA の超高感度電気化学検出の実現を目指した。

2. 結果

2.1 電気化学モレキュラービーコンプローブ

本研究で用いた電気化学応答遺伝子プローブ

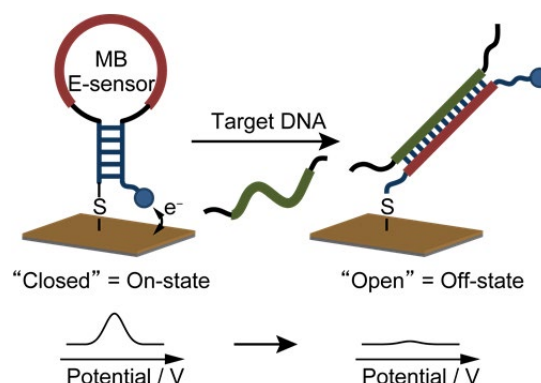


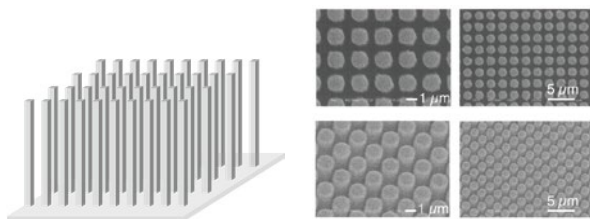
Fig. 1 電気化学応答モレキュラービーコンによる遺伝子検出原理

MB E-sensor I: 5'-AQ-GCGAGGTA AAAACGACGGCCAGTCCTCGC-C3SH-3'
 Target I: 3'-TTTCTCATTTTGCTGCCGGTCATTTTT-5'
 MB E-sensor II: 5'-AQ-GCGAGGTTATGGGACGCGGTATCCTCGC-C3SH-3'
 Target II-1: 3'-TTTCTCAATACCCTGCGCCATATTTTT-5'
 Target II-2: 3'-TCTCTAAATATTTTCTCAATACCCTGCGCCATATTTTT-5'
 Target II-3: 3'-TGACATTTCTTCTCTAAATATTTTCTCAATACCCTGCGCCATATTTTT-5'
 MB E-sensor III: 5'-AQ-GCGAGGATTTTAGTTTTATACCCACCT CGC-C3SH-3'
 Target III: 3'-TTGATGTAAAATCAAAATATGGGTTTT-5'

Fig. 2 電気化学応答モレキュラービーコンおよび遺伝子ターゲットの塩基配列

(モレキュラービーコン)の遺伝子検出原理及びそれらの配列を、それぞれ Fig.1 および Fig.2 に示した。ビーコンプローブの 5'-末端にアントラキノン、3'-末端に炭素鎖 3 のアルカンチオールを化学合成法により導入した。

2.2 ナノピラー構造を持つ金電極の作成



シリコンウエハー表面に光リソグラフィ技術を用いて高さの異なる種々のナノピラー構造を作成した。その後、表面に金蒸着を行い、シリコンナノピラーに電気伝導性と核酸プローブの固定化能の付与を行なった。

2.3 電気化学 DNA/RNA センサーの作成

アルカンチオールを有する電気化学応答モレキュラービーコンを、金-チオール反応を用いて、電極表面に固定化し DNA/RNA センサーを作成した。ターゲット遺伝子が存在しない場合、アントラキノンレドックス中心が電極表面に接近しているためセンサーはシグナル ON 状態で、ターゲット遺伝子とハイブリダイゼーションによりビーコン構造の変化を誘起しその結果シグナル OFF となる。(文献 2)

2.4 ナノピラー構造のセンサーシグナルに与える影響

Table 1 に、種々のピラー電極を用いて作成したシグナル ON 状態の遺伝子センサーの電気化学応答の比較を示した。電極表面の拡大に伴い電気化学シグナル強度が飛躍的に増大した。ナノピラー構造が金-チオール反応によるモレキュラービ

Table 1. 種々のナノピラー電極を用いて作成した遺伝子センサー(MB E-sensor I)の電気化学応答の比較

電極	形状/ピラー高さ*	非表面積	SWV 電気化学シグナル強度比**
1	Flat	1	1
2	3 μm	3.4	13
3	6 μm	5.9	15
4	8 μm	8.0	20
5	9 μm	8.6	22

*ピラー間隔: 0.5 - 0.7 μm **SWV: Square Wave Voltammetry

ーコンの固定化効率に大きな影響を与えることを示している。さらに、センサーそのものの電気化学シグナル強度増大は、遺伝子センサーを微細化し多数集積する上できわめて有効であることを示している。

2.5 DNA/RNA センサーによる遺伝子検出

Fig.3 に、8μm ピラー電極を用いて作成した MB E-sensor I の遺伝子検出性能を示した。ターゲット DNA 量の増加に応じて SWV 応答シグナルの減少が観測された。Fig.4 に、ピラー電極お

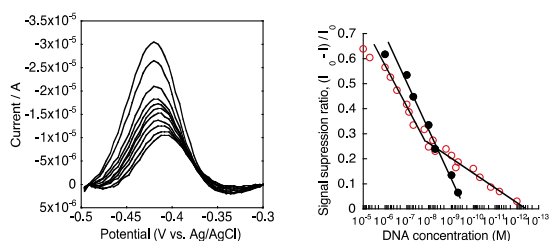


Fig. 3 左:種々の濃度のターゲット DNAI 存在下における 8 μ m ピラー電極上に作成した MB E-sensor I の SWV 電気化学測定結果
右:8 μ m ピラー電極上(赤)およびフラット電極(黒)に作成した MB E-sensor I のターゲット I 濃度に依存した電気化学応答

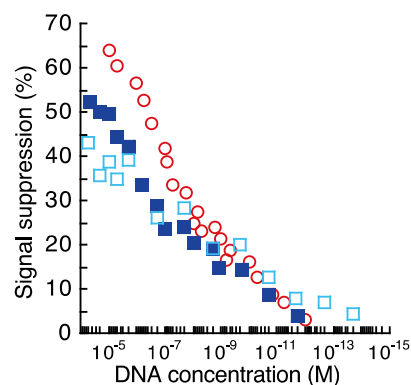


Fig. 4 8 μ m ピラー電極上に作成した MB E-sensor I (赤)、II(ブルー)、および III (スカイブルー) のターゲット DNA(30 量体)濃度に依存した電気化学応答

よび平型電極を用いて作成した MB E-sensor I の DNA 濃度に対する電気化学応答を比較して示した。ピラー電極センサーは、平型電極に比べて 500–1000 倍以下の濃度の遺伝子を検出できることが分かった。具体的な分子機構は明らかではないが、平型センサーは DNA 濃度の対数に比例した応答を示すのに対し、ピラー電極センサーは異なる応答を示した。

2.6 種々のモレキュラービーコン (MB) を用いた DNA/RNA センサー

塩基配列の異なるターゲットに対応するモレキュラービーコンを用いて DNA/RNA センサーを 8 μ m ピラー電極上に作成しそれらの性能を比較した。結果を Fig. 4 に示す。MB E-sensor III では、DNA 検出のダイナミックレンジが広く (10^{-5} M – 10^{-15} M)、検出下限が平型電極センサーと比較しても 10000 倍以上まで到達することが分かった。MB E-sensor III とターゲット DNA III の結合親和性が低い、すなわち 2 重螺旋構造の安定性が低いことが、他の二つのビーコンセンサーと比較して特徴的である。

MB E-sensor II を用いてターゲット遺伝子の鎖長の影響を調べた。30–40 量体の DNA 遺伝子では問題なく低濃度のサンプルを検出可能であることが分かった。

3. まとめ

以上のように、電気化学遺伝子 (DNA および RNA) 検出法の超高感度化のひとつの方法を提示できた。われわれの方法は、電気化学プローブ (文献 3) のデバイス化と基盤電極のナノ構造化を含んでおり、いずれも遺伝子検出の高感度化に向けて改善改良の余地が十分有る。したがって、近い将来に実用的な RNA 電気化学検出法が実現できるものと考えている。

謝辞

共同研究者である高田忠雄准教授 (兵庫県立大学院工学研究科) および前中一介教授 (兵庫県立大学院工学研究科) に深謝いたします。

参考文献

1. Labib, M.; Sargent, E. H.; Kelly, S. O. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9001-9090.
2. Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *100*, 9134-9137.
3. Hasegawa, Y.; Takada, T.; Nakamura, M.; Yamana, K. *Bioorganic. & Medicinal Chem. Lett.* **2017**, in press.

近赤外線蛍光顕微鏡による冠動脈側副血行路と心内膜側微小血管の評価



研究責任者 川崎医科大学 生化学
講師 矢田 豊隆

1. まえがき

内皮由来弛緩因子(EDRF)は、一酸化窒素(NO)、プロスタサイクリン(PGI₂)、内皮由来過分極(EDH)からなる。EDHとしての内因性過酸化水素(H₂O₂)の世界的第一人者で連携研究者の東北大学循環器内科下川宏明教授らは、EDHの本体として考えられているH₂O₂が、NO合成(NOS)時、血管内皮で産生される superoxide(O₂⁻)を分解するCu,Zn-superoxide dismutase (SOD)から産生され、最終的に血管平滑筋でK_{Ca}チャネルを開口し、弛緩する事を明らかにした^{1),2)}。最近、マウス腸間膜動脈の実験において、caveolin-1が、EDH/H₂O₂の作用の場である微小血管に多く分布し、EDH/H₂O₂の作用を促進し、小動脈以上の大きな血管に多く分布するNOを抑制する事が明らかになった³⁾(図1)。内因性H₂O₂は、比較的濃度(100μM以下)でヒト摘出冠細動脈を拡張する事が知られている⁴⁾。NOS以外の endothelial oxidaseから産生されるNADPH等(血管障害性H₂O₂)とは、産生ルートが異なり、唯一NOSを介したCu,Zn-SOD由来H₂O₂のみが血管拡張作用(血管拡張性H₂O₂)を持つ事が知られている。EDRFの主な作用の場として、イヌの心臓では、冠自動調節能作動時⁵⁾、心筋梗塞時⁶⁾、代謝性冠血管拡張時⁷⁾にNOが主に小動脈(100μm以上)に作用し、EDH

は細動脈(100μm未満)に作用する事から、冠微小循環領域の評価が重要である。冠動脈狭窄後の末梢血管へ冠動脈バイパス術施行時、術前冠動脈造影による側副血行路等の冠微小血管を評価するには、低解像度のため限界があった。また、心内膜側冠微小循環の血流動態の評価は、心筋虚血の発症メカニズムを理解する上で極めて重要であるが、方法論的に生体内評価は困難であった。唯一、当教室が開発した非蛍光可視型CCD生体顕微鏡により、拍動下生体内心内・外膜側微小血管の直接的観察に成功した⁸⁾。しかし、非蛍光顕微鏡は血管描出時、コントラスト増強のためにグリーン(赤血球の赤色の補色)フィルターを装着しており、心内膜側微小血管は深緑色に見え、血液充満の左室内検出が困難であった。閉鎖空間の左室心内膜側冠微小血管の観察には、腹腔鏡等で用いられる近赤外線蛍光直視鏡の方が蛍光試薬インドシアニングリーン(ICG)を用いる事によって、観察が容易と思われる。同直視鏡は、近年外科的手術時画像、腹腔鏡による閉鎖空間の胆管描出、乳癌リンパ流描出等に応用されているが、レンズ部分に対物レンズが含まれておらず、未だ、生体内心内膜側冠微小血管の観察は、実現していない。ICGを用いた対物レンズを含む近赤外線白色蛍光顕微鏡による観察が有用と思われ、当教室で応用

開発に至った⁽⁹⁻¹¹⁾。

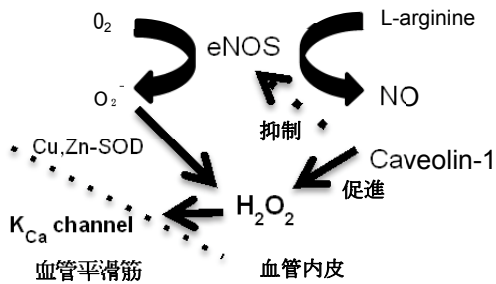


図1 血管内皮 H₂O₂ 産生経路

2. 内容

近赤外線蛍光生体顕微鏡導入と冠微小循環観察システム確立

(1) 近赤外線蛍光生体顕微鏡の精度の評価

1) 光学系：生体内心内膜側微小血管観察時、左心耳から、左心室までのレンズ部分の長さが必要なため先端直視鏡レンズを150倍と110倍の対物レンズを含む生体顕微鏡の先端に取り付ける。光源はキセノンでハイビジョン高感度CMOS型カメラおよびICG用蛍光フィルターを取り付けることにより、蛍光像の観察を可能とし、蛍光像と可視像が切り替えにより観察が可能とする。同じ血管を蛍光像と可視像から画像で血管径特に血管壁の血漿部分の解像度比較を行う。

2) シース：顕微鏡先端の長いレンズにフィットする厚さ数ミリの側溝付きで、血管圧迫防御のため先端にバルーン付き外套を作製し、長いレンズとシースの間を灌流液及びsuperfusion用の薬剤を流す事を可能にする。材質は、バルーンが接着し易いシリコン製で、以前作製した技術を応用し試作する。

(2) 近赤外線蛍光生体顕微鏡システムの測定精度の評価

1) 分解能評価：空間分解能を非蛍光可視像で評価する。

2) 近赤外線蛍光生体顕微鏡の in vivo 実験への応用：

人工呼吸器装着後、麻酔開胸し、近赤外線蛍光生体顕微鏡をイヌ正常冠微小循環の心外膜側の表面及び心内膜側に長時間挿入し、血行動態に影響ないか、確認する。

冠血管予備能評価のため、冠血管拡張薬（内皮依存性血管拡張薬：アセチルコリン 1μg/kg 冠動脈内投与(IC)による心筋内冠微小血管に対する血管拡張反応を EDHF 阻害薬（Ca⁺⁺感受性 K チャンネル(K_{Ca} channel)拮抗薬：Apamin+Charybdotoxin 1μmol/L, 100nmol/L, IC)、および cyclooxygenase blocker (ibuprofen 12.5mg/kg IV)投与前後で観察し、作用部位の異なる血流調節因子 NO と EDHF の役割を評価する。また、心内膜側微小血管の蛍光顕微鏡による観察評価を行う。

(3) 近赤外線蛍光生体顕微鏡安全性評価：

計測の安定性と組織への障害を検討する。シース先端のバルーンを用いて拍動に伴う心臓の動きを制御し、計測中のイメージを安定化させる。また、シース先端のバルーンはクッションの役目をしており、レンズによる組織損傷を防ぐ。長時間（30分）前後の血行動態への影響、心筋への損傷がないか観察する。

近赤外線蛍光生体顕微鏡を用いた一過性虚血後反応性充血反応時冠微小側副血行路評価

(1) 近赤外線蛍光生体顕微鏡による反応性充血反応時冠微小側副血行路拡張反応の評価

麻酔気管挿管後開胸し、ペースメーカーで心拍数固定したビーグル犬（7匹）を対象に、腹腔鏡の先端レンズに対物レンズを導入した近赤外線（励起760nm、発光830nm）蛍光顕微鏡を開発する。

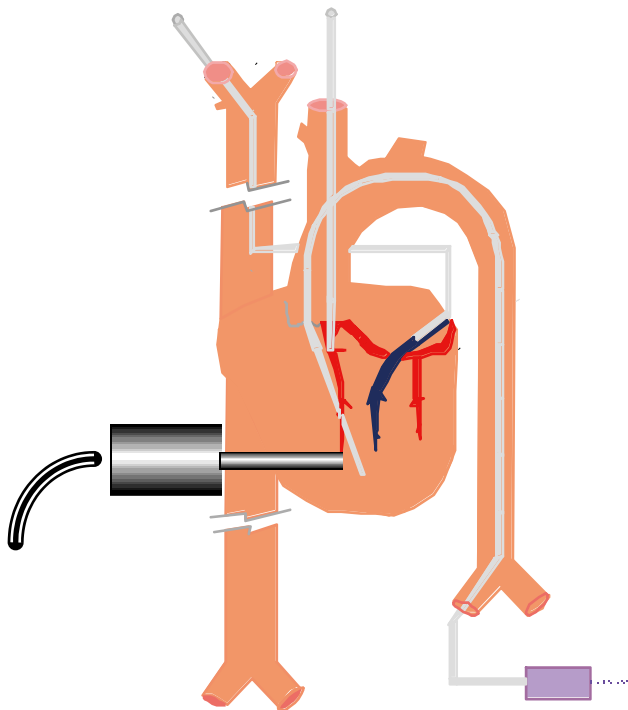


図2 実験のセットアップ

レンズ先端には、バルーン付きシースを作成し、装着する。蛍光色素は、ICGを用いて、左冠動脈前下行枝(LAD)末梢から、注入ポンプを用いて冠動脈内投与(0.5mL/min)する。反応性充血は、LAD中枢側に冠動脈閉塞用の糸をかけ、20秒間の閉塞を行う。LAD末梢の左冠動脈回旋枝(LCX)との間の側副血行路においてK_{Ca} channel拮抗薬投与前後で血管径の計測を行う(図2)。

3. 成果

(1) 近赤外線蛍光生体顕微鏡の精度の評価

1) 光学系：近赤外線蛍光生体顕微鏡導入と冠微小循環観察システム確立

近赤外線蛍光顕微鏡精度評価として、血管を蛍光像と可視像から血管径の解像度比較を行った所、蛍光像の方が少し大きい傾向を示したが、ほぼ同等であった。通常使用濃度でICGを蒸留水またはアルブミンを用いて、視認可能であった。蒸留水のみでは、ICGは、完全に溶解しなかった(図3a)。一方、ICGを蒸留水とアルブ

ミンで溶解した場合、白色蛍光の輝度増加を認めた(図3b)。ICGは、血中アルブミン、 α リポ蛋白質と結合して、白色蛍光を示すことが知られている¹²⁾。



図3a 1mL容量のツベルクリン用注射器にICGを蒸留水で溶解した溶液をいれた場合



図3b. 3aと同様の注射器を用いてICGを蒸留水とアルブミンで溶解した場合

蛍光時と非蛍光時の冠微小血管径の相関を見たが、両者は、良好な正相関を認め、蛍光時の方が大きい傾向を示した。

2) シース：顕微鏡先端の長いレンズにフィットする厚さ数ミリの側溝付きで、血管圧迫防御のため先端にバルーン付き外套を作製した。材質は、バルーンが接着し易いシリコン製で、以前作製した技術を応用し試作した。

(2) 近赤外線蛍光生体顕微鏡システムの測定精度の評価

1) 分解能評価：空間分解能は、150倍の対物レンズで1ピクセル=2.6 μ mであった(図4)。

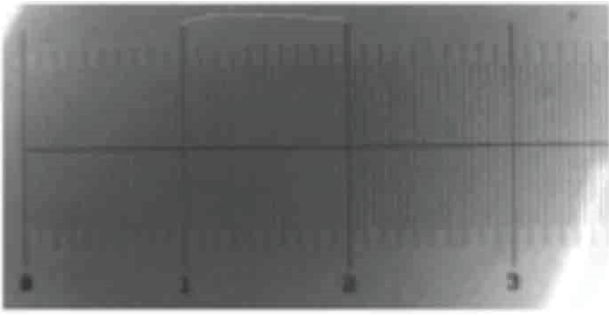


図4 空間分解能 (大柵 1000 ミクロン)

2) 近赤外線蛍光生体顕微鏡の in vivo 実験への応用 :

冠血管予備能評価のため、内皮由来血管拡張薬 (アセチルコリン冠動脈内) 投与により、血管拡張を認めた。その反応は、EDHの阻害薬により抑制されたことから、小動脈においては、NOが、細動脈においては、内皮由来過分極/過酸化水素が拡張反応に関与することが窺われた。計測時の安定性と組織への障害をみたが特に問題なかった。また、心内膜側微小血管においてもアセチルコリンによる有意拡張を認めた。



図5a 心外膜側微小細動静脈の白色蛍光像



図5b 心内膜側細動脈

近赤外線蛍光生体顕微鏡をイヌ正常冠微小循環の心外膜側表面 (図 5 a) 及び心内膜側 (図 5 b) を観察したが、血行動態に影響は、なかった。

(3) 近赤外線蛍光生体顕微鏡安全性評価 :

左室血管外圧迫力により、心内膜側細動脈血管径は拡張末期から収縮末期に縮小を認めた (図 6 a, b)。同様に心内膜側細静脈においても、同様の結果が得られた。一方、左室血管外圧迫力の弱い心外膜側細動脈においては、収縮末期にほとんど変化しなかった。これは、我々の以前の結果⁽⁸⁾と同様であった。

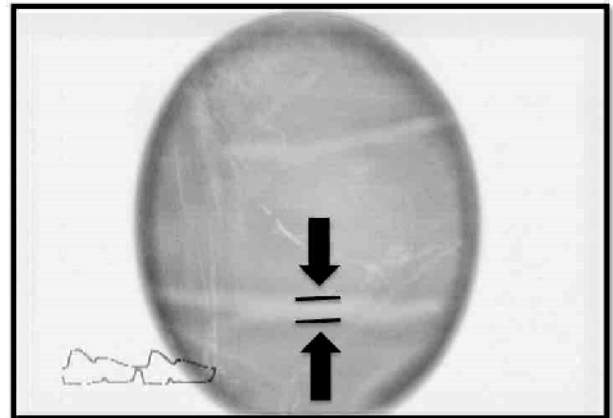


図6a 心内膜側細動脈拡張末期血管径 96 μ m

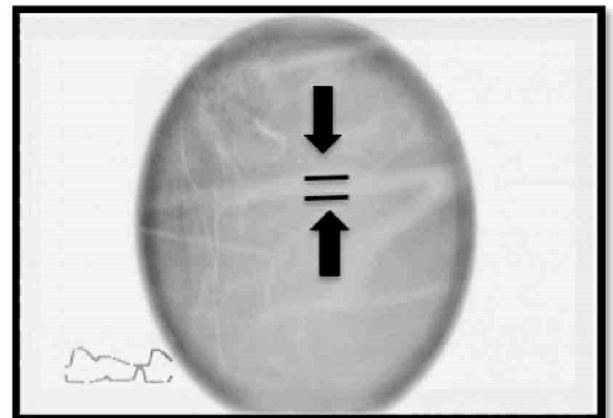


図6b 心内膜側細動脈収縮末期血管径 84 μ m

近赤外線蛍光生体顕微鏡を用いた一過性虚血後反応性充血反応時冠微小側副血行路評価

(1) 近赤外線蛍光生体顕微鏡による反応性充血反応時冠微小側副血行路拡張反応の評価

虚血部 (LAD) と非虚血部 (LCX) の間の側副血行路における反応性充血時に細動脈における血管拡張を認め、その反応がK_{Ca} channel拮抗薬により阻害されたことから、EDH/K_{Ca} channelが、関与することが窺われた。

4. まとめ

新たに応用開発した近赤外線蛍光顕微鏡によりイヌ生体内心内・外膜側微小血管の観察が可能であった。蛍光試薬の ICG の溶解液には、蒸留水単独よりアルブミン混注の方が有用であり、ICG と結合することにより輝度は上昇した。蛍光と非蛍光の血管径の相関は良好であり、蛍光の方が非蛍光に比べ、血管径が大きい傾向を示し、血漿層を評価する上で有用と思われた。心内膜側微小血管での血管径は、左室血管外圧迫力の影響で拡張末期から収縮末期にかけて大きく縮小した。一方、左室血管外圧迫力の弱い心外膜側細動脈においては、収縮末期にほとんど変化しなかった。内皮由来血管拡張薬投与時及び反応性充血反応時冠微小側副血行路拡張反応は、小動脈においては、NO が、細動脈においては、内皮由来過分極/過酸化水素が拡張反応に関与することが窺われた。

近赤外線蛍光顕微鏡は、側副血行路や心内膜側微小血管の生体内観察に有用と思われた。

5. 謝辞

本研究に際し、ご支援いただきました公益財団法人中谷医工計測技術振興財団には、深く感謝致します。

6. 参考文献

1. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. *J Clin Invest*,106:1521-1530, 2000
2. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, Talukder MA, Hatanaka M, Fujiki T, Maeda H, Takahashi S, Takeshita A. Morikawa K, Shimokawa H. *J Clin Invest*,112:1871-1879, 2003
3. Mechanisms for enhanced endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in microvessels in mice. Ohashi J, Sawada A, Nakajima S, Noda K, Takaki A, Shimokawa H. *Circ J*. 76(7):1768-1779, 2012
4. H₂O₂ is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. Liu Y1, Bubolz AH, Mendoza S, Zhang DX, Gutterman DD. *Circ Res*. 4; 108(5): 566-573, 2011
5. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. *Circulation*,107: 1040-1045, 2003
6. Cardioprotective role of endogenous hydrogen peroxide during ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Haruna Y, Morita Y, Kashihara N, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(3):H1138-1146, 2006.
7. Important role of endogenous hydrogen peroxide in pacing-induced metabolic coronary vasodilation in dogs in vivo. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. *J Am Coll Cardiol*. 25;50(13):1272-1278, 2007.
8. In vivo observation of subendocardial microvessels of the beating porcine heart using a needle-probe videomicroscope with a CCD camera. Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, Yamamori S, Ohno K,

Hosaka H, Kajiya F. *Circ Res.*72:939-946, 1993

9. 近赤外線蛍光顕微鏡による冠血管バイパス術前側副血管と心内膜側微小血管の評価 , 矢田豊隆, 公益財団法人中谷医工計測技術振興財団平成 26 年度特別研究助成成果報告集, 131-138, 2017
10. Important Role of Endogenous H₂O₂ during Reactive Hyperemia in Dogs in Vivo -An Infrared Fluorescence Microscope Study-. Yada T, Shimokawa H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. *Circulation J.* 第 80 回日本循環器学会学術集会 CD-ROM, 2016
11. Role of Endogenous H₂O₂ during Bradykinin-induced Vasodilatation of Canine Subepicardial and Subendocardial Arterioles in Vivo -An Infrared Fluorescence Microscopic Study-. Yada T, Shimokawa H. *Circulation J.* 第 81 回日本循環器学会学術集会 CD-ROM, 2017
12. Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography. Flower RW, Hochheimer BF. *Johns Hopkins Med J.*;138(2):33-42, 1976

皮膚系細胞の機械刺激応答を解析するための高伸縮性表皮電位計測システムの開発



研究責任者 東北大学 大学院工学研究科
ファインメカニクス専攻
教授 西澤 松彦

1. はじめに

生体は外環境と物質やエネルギーを交換し、情報をセンシングする一方、内部の恒常性を維持しながら活動している。生体内外の界面に位置する皮膚は、生体の最前線として重要な役割を担う組織といえる。

皮膚に加わる機械刺激として、外力によるひずみや搔破、身体の動きに伴う伸縮などが挙げられる。皮膚の異常や疾患の中には、胼胝（たこ）、アトピー性皮膚炎、機械刺激性じんましん、褥瘡（床ずれ）など、機械刺激に関わるものもある。慢性的な痒み・痛みなどは QOL を低下させるため、メカニズム解明や予防・治療法の開発が望まれる。また、機械刺激によって細胞の増殖を制御し、皮膚の治療に応用する手法（皮膚組織伸展法、圧迫療法）が行われており、さらなる治療効果向上のための研究が望まれる。その一方、圧迫刺激が培養皮膚細胞層の生理活動に変化を与え、肥厚を促したとする報告¹⁾や、手術創付近の張力を相殺することで瘢痕化が低減されたとする報告²⁾などがあるものの、皮膚組織が機械刺激に応答する機序については未解明の部分が多い。こうした背景から、本研究では皮膚の組織および細胞レベルでの応答を研究するための計測デバイスの開発を目指した。

皮膚は大きく分けて3種類の組織からなり、体表面側から表皮、真皮、皮下組織とよぶ。構造の模式図を図1に示す。

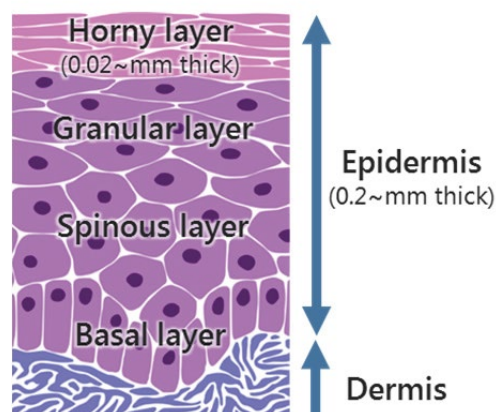


図1 皮膚断面構造模式図

表皮は主にケラチノサイト（表皮細胞）により構成され、積層構造をもつ。ケラチノサイトは最深部の基底層で増殖し、分化しつつ有棘層、顆粒層へと移行していき、最表面の角質層へ至る。角質層は厚さ約20 μm の薄膜であるが、硬い角化細胞とその間隙を満たす細胞間物質による緊密な構造を有し、物理的な刺激や外的な物質から内部を保護し、また内部からの水分蒸散を抑えるバリアの役割を担う。角質層の下、表皮生細胞層には厚み方向全体にわたってイオン濃度勾配による

電位差（表皮電位）が生じていることが指摘されている³⁾。表皮電位は創部や角質層のバリア機能が破壊された部分で減少・消失することが報告されており、皮膚機能との関連が考えられる。さらに、表皮には光によるビタミンDの生合成を行う機能、また免疫機構などが備わり、単純な防御膜にとどまらない多様な役割を担っているとの知見が集まっている。

表皮の下に存在する真皮はコラーゲン等の膠原繊維やエラスチンなどの弾性繊維が組み合わされた、強靱かつ弾力性に富む結合組織である。皮膚を構造的に支えるとともに、血管から栄養の供給を受けて、これを自身の上層にある表皮に拡散し送達する重要な足場として働く。結合組織の産生および代謝は真皮中の線維芽細胞が中心となって行う。

本研究では、こうした複合的な皮膚の応答を詳しく解析するため、主として表皮組織およびケラチノサイトに焦点を当て、*in vitro*系での評価を行った。表皮は外的刺激を最初に感知するセンシング組織であり、またケラチノサイトの分化には機械刺激が影響すると考えられていることから、これらのメカニズムを分子・細胞レベルで解析するシステムを構築する意義は大きい。

2. 伸縮性を有する細胞培養ゲルの開発

ケラチノサイトを用いて生体様の三次元組織を培養する場合、図2に示す培養系を用いて、組織を気相に暴露する気液界面培養を行った。図中の例ではケラチノサイトの足場をコラーゲンゲルとし、表皮構造を支え栄養を送達する生体真皮と同様の機能をもたせている。ケラチノサイトの積層した組織と培養基板との両者を合わせて、生体皮膚の構造を模したものであるといえる。

このような組織に機械刺激を与える場合、培養基板には支持や栄養送達に加え、機械刺激に耐える強度が必要となる。一般的に用いられるコラーゲンゲルは脆いため、生体皮膚様の機械刺激を与えることができなかった。細胞への伸展刺激用に

シリコンゴム製の培養基板が市販されているが、物質透過性に乏しく、気液界面培養には不向きである。本研究ではこれらに代わるものとして、伸縮性ハイドロゲルを用いた培養基板を開発した。ハイドロゲルは一般に脆く壊れやすいが、強度を向上させるための様々なアプローチがなされてきた。本研究では、2種類の高分子ネットワークが相互に侵入した構造によって高強度・高弾性を実現した Double Network (DN) ゲル⁴⁾に、細胞接着性を付与するための3つ目のネットワークを付加した Triple Network (TN) ゲル⁵⁾の構造を参考にして、高い細胞接着性と機械的強度を併せ持つ培養基板の作製方法を確立した。

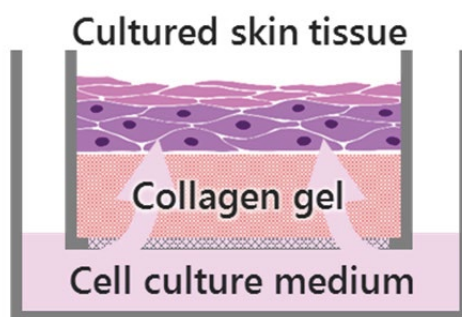


図2 表皮気液界面培養系模式図

2.1 実験方法

2.1.1 細胞接着性 DN ゲルの作製

はじめに、2-Acrylamido-2-methyl-propane sulfonic acid sodium salt (NaAMPS) と N,N-Dimethylacrylamide (DMAAm) を用いた DN ゲルを作製した(図3)。まず 1M NaAMPS 水溶液に架橋剤と光重合開始剤を添加して UV により光重合し、高分子ネットワークを形成した。同じく架橋剤 N,N'-methylene-bis-(acrylamide)と光重合開始剤 2-オキシソグタル酸を添加した 3M DMAAm 溶液をしみこませて光重合し、2種類の高分子の複合ネットワークを形成した。

NaAMPS は十分な濃度があれば細胞接着性を示す。そこで DN ゲル表面に、架橋剤と光重合開始剤を添加した 2M NaAMPS 水溶液を触れさせて染み込ませ(図4(a))、ただちに光重合し(図4(b))、表面付近のみ TN ゲル化したものを回収した(図

4(c)(d)。以下、これを細胞接着性 DN ゲルとよぶ。

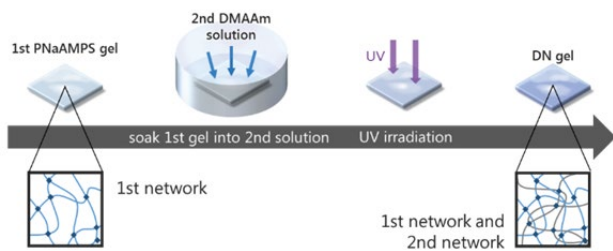


図 3 DN ゲル作製手順模式図

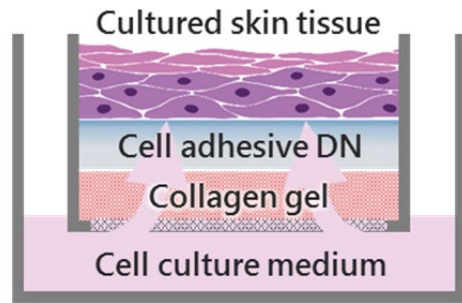


図 5 三次元組織培養実験系模式図

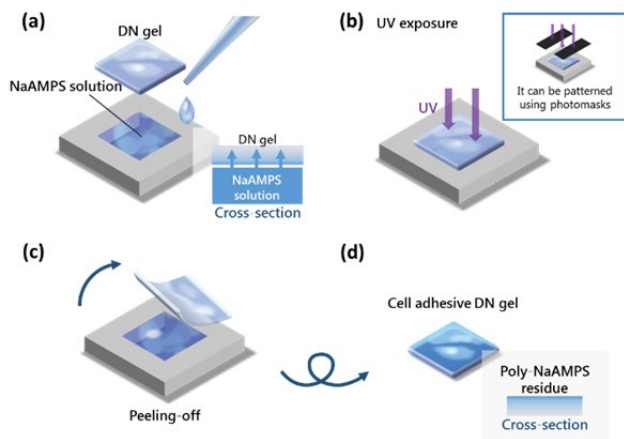


図 4 細胞接着性 DN ゲル作製手順模式図(a)DN ゲルと修飾溶液の接触(b)光重合(c)ゲルの回収(d)細胞接着性 DN ゲル

2.1.2 ケラチノサイト培養実験

比較のため、DN ゲルに細胞接着性を付与する最後の光重合でフォトマスクを用い、細胞接着部をライン状にパターニングした。細胞接着性をさらに向上させるため、細胞接着性 DN ゲル表面に FITC 蛍光コラーゲン溶液を滴下した。ここに正常ヒトケラチノサイト (HEKa) を播種し、細胞接着性を確認した。

さらに、既存の気液界面培養系に細胞接着性 DN ゲルを導入し、三次元組織の培養実験を行った。培養系の模式図を図 5 に示す。従来培養基板として用いられてきた、真皮線維芽細胞を含むコラーゲンゲルの上に細胞接着性 DN ゲルを載せ、その表面に HEKa を培養した。

2.1.3 引張強度試験

引張圧縮試験機により、細胞接着性 DN ゲルおよび DN ゲル、TN ゲルの機械的特性測定を行った。短冊状のゲル試験片を治具に固定し、荷重と変形量を計測しながら、破断するまで引張荷重を加え続けた。

2.1.4 ケラチノサイトへの機械刺激実験

培養細胞へ機械刺激が与える影響を、 Ca^{2+} イオンの濃度変化を利用して評価した。健全な生体表皮中において、 Ca^{2+} イオンは生体表皮の厚み方向に対して偏在しており、培養表皮細胞へ機械刺激を印加すると一過性の濃度上昇を示す^{6,7)}。

細胞接着性 DN ゲルに、蛍光標識のないコラーゲンを吸着し、株化ヒトケラチノサイト (HaCaT) を播種した。細胞を生存させたまま蛍光指示薬 Fluo-4 を用いて細胞内 Ca^{2+} イオンを染色した。図 6 に示す実験系によって細胞に培養基板ごと引張刺激を加え、その応答を共焦点顕微鏡により蛍光観察した。

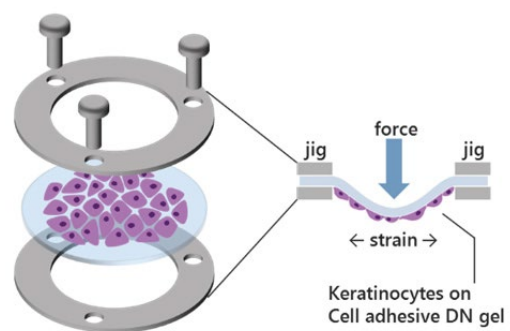


図 6 機械刺激実験系模式図

2.2 結果と考察

作製した細胞接着性 DN ゲルは図 7 の写真に示す無色透明の、伸縮性を有するハイドロゲルであった。その表面で、ケラチノサイト培養実験を行った。気液界面での三次元培養によって得られた組織切片の写真を図 8 に示す。組織は生体皮膚の角質層に似た積層構造が認められた。

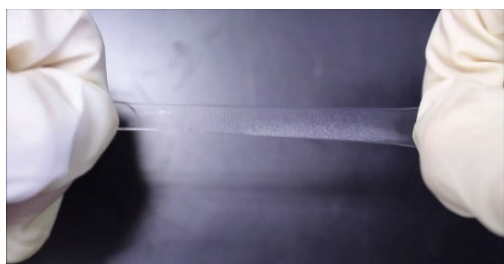


図 7 細胞接着性 DN ゲル

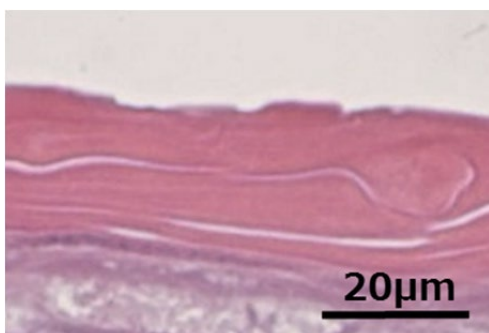


図 8 気液界面における三次元培養組織切片

これらの結果から、追加で重合した NaAMPS がゲル表面の特性を変化させ、分子吸着性や細胞接着性を向上させたものと考えられ、表面付近のみへの分子修飾でも表皮の細胞および組織培養に十分な効果を得られたといえる。また、ゲルは気液界面培養系で細胞に栄養を送達可能な物質透過性を有していることが確認できた。

引張試験によって得られた応力-ひずみ曲線、およびひずみ 10%以内の弾性領域から算出したヤング率を図 9 に示した。TN ゲルがひずみ 50%程度で破断したのに対し、細胞接着性 DN ゲルは 250%、DN ゲルは 400%程度まで伸展することができた。ヤング率については DN ゲルが最も小さく、ついで細胞接着性 DN ゲル、TN ゲルという順となり、各ゲル中における NaAMPS の割合の大

きさに準じる結果となった。

この結果から、DN ゲルへの NaAMPS 追加重合はゲルの物性をより硬く脆いものへと変化させるが、重合部を表面付近のみに限定したことで、その影響を小さく抑えられたものと考えられる。

培養ケラチノサイトへの機械刺激実験の結果を図 10 に示す。細胞内 Ca^{2+} イオン濃度によって変わる蛍光強度を色分けしてあり、機械刺激前の画像(a)と比べて機械刺激直後の画像(b)では蛍光強度が増大することが観察された。また、刺激後もケラチノサイトは基板に接着しており、剥落などはみられなかった。

この結果より、細胞接着性 DN ゲルを用いて、機械刺激に対するケラチノサイトの応答を簡易な実験系で観察可能であることが示された。

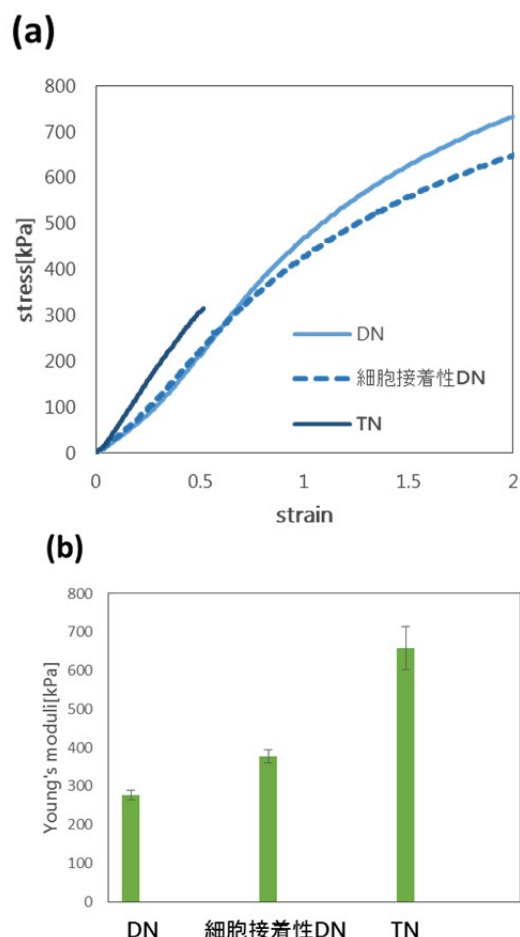


図 9 細胞接着性 DN ゲル、DN ゲル、TN ゲルの引張試験結果(a)応力-ひずみ曲線(b)ヤング率(n=3)

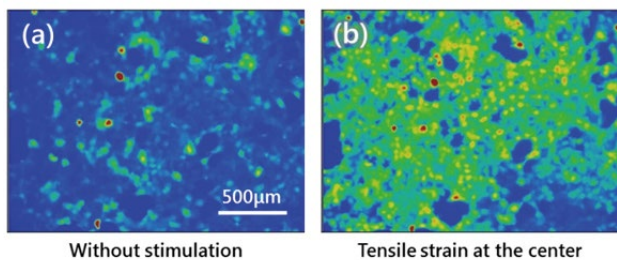


図10 機械刺激時の細胞内 Ca^{2+} イオン観察結果
(a)機械刺激前 (b)機械刺激後

3. 無痛針を用いる表皮電位測定系の開発

生体表皮中のケラチノサイト層に生じる表皮電位は、創傷やバリア破壊で変化することが知られ、診断や医療への応用を期して研究が行われている^{8,9)}。本研究でもこれを細胞応答の評価に利用することを目指し、表皮電位測定系の開発に取り組んだ。

表皮電位は表皮の厚み方向に生じており、測定のためには電極を表皮の表と裏に接続する必要がある。従来は表皮に傷をつけて真皮層を露出させる侵襲的な手法がとられてきたが^{3,10)}、*in vivo*実験系、ヒト被験者などへも測定範囲を広げて応答を比較検討するためには、測定の定量性を保ったまま侵襲性を低減することが必要となる。

ここで、表皮電位測定系では、電位の安定したAg/AgCl電極と測定サンプルを塩橋により接続する(図11a)。本研究のアプローチでは、この塩橋部分に市販の無痛針(ナノパス34G、テルモ)を用いることで、皮膚に創傷をつけず、侵襲性を最小限に抑えて表皮の裏側に導通をとることを目指した(図11b)。

3.1 実験方法

3.1.1 無痛針塩橋の導通確認

注射針塩橋は内部の電解液を含むゲルと、表皮下の真皮組織の中の組織液とが接触することでイオニックな導通を形成する。そこで、針にオゾンプラズマ処理を施し、表面を親水化してより素早く組織液を吸い上げられるようにした。さらに、針が真皮下の皮下組織内に到達して脂肪分が導

通を妨げないように、シリコーンゴムのストッパーを取り付けて針が刺さる深さを調節した。内部のゲルは、組織液と近い組成をもつリンゲル液を保持したアガロースゲルとした。これを従来使用されてきたチューブ塩橋の先に取り付けて使用した。

皮膚組織のサンプルとしてブタ皮膚を使用し、無痛針塩橋を真皮内に刺入して測定電位が安定するまでの時間を確認した。親水化やストッパー取付けの効果を確認するため、これらの操作を行っていない針塩橋と安定性を比較した。

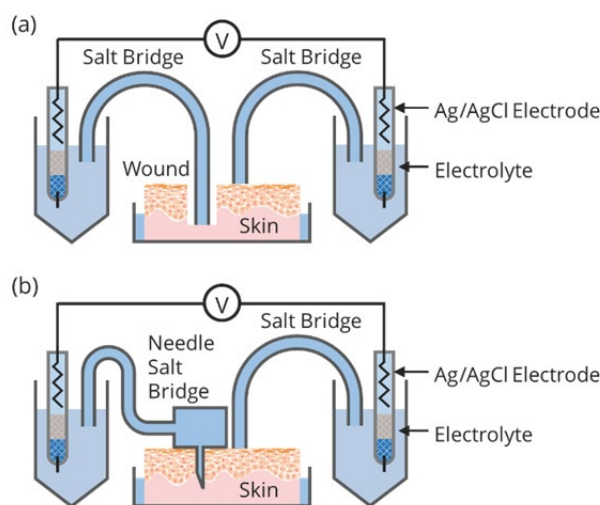


図11 表皮電位測定系模式図(a)従来法(b)無痛針塩橋を用いる方法

3.1.2 表皮電位測定実験

ブタ皮膚サンプルの真皮に針塩橋、表皮表面の測定点に従来の塩橋をそれぞれ接続し、表皮電位を測定した。針の刺入が表皮電位に与える影響を評価するため、刺入位置を測定点に近づけて電位の変化を観察した。

また、生体表皮のサンプルとしてヘアレスマウスを使用し、無痛針塩橋を用いて表皮電位測定を行った。この際、バリア機能破壊処理として、粘着テープによる角質層剥離と、アセトンによる角質層内脂質の除去を行い、表皮電位変化を観察した。また測定値の確認のため、従来法でも同時に電位測定を行うとともに、一般的なバリア機能評価基準である経皮水分蒸散量(TEWL)¹¹⁾を測定

し、表皮電位変化と比較した。

3.1.3 表皮電位測定プローブの作製

ここまでに構築した表皮電位測定系を簡易的に小型プローブにまとめ、ハンドリング性の向上を図った。構造の模式図を図 12 に示した。プローブには塩橋から Ag/AgCl 電極までを搭載した。

ブタ皮膚組織サンプルの一部に、アセトンによる局所的なバリア破壊処理を施し、周囲の健常部分と表皮電位を比較した。測定値の確認のため、従来法でも同時に測定を行い、比較した。

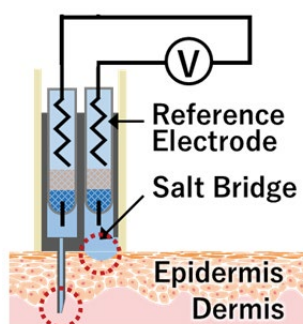


図 12 小型表皮電位測定プローブ構造模式図

3.2 結果と考察

作製した無痛針塩橋の写真を図 13 に示した。ストッパーを取り付けた様子を(a)に、チューブ塩橋を取り付けた様子は(b)に示した。針の先端部分を顕微鏡で確認したところ、(c)のように刃面が斜めに研磨された部分には寒天塩橋がとどまっていないことが観察された。これをブタ皮膚サンプルの真皮内に刺入したところ、測定値が速やかに安定したのは、親水化処理とストッパーの取付けをともに行った針塩橋を用いた場合であった。

ブタ皮膚サンプルの表皮電位測定結果を図 14 に示した。針塩橋、従来法でそれぞれ測定を行った結果、(a)に示した通り、得られた電位は約-15mVと互いに同等であり、時間に対して安定した。また針塩橋の刺入位置を変化させた場合、測定電位は(b)に示した通り、針の刺入位置によらず、また時間に対して安定した。

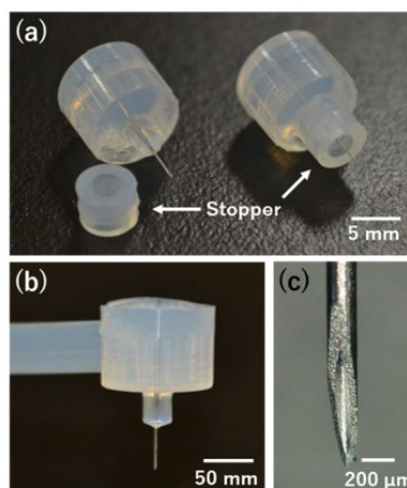


図 13 無痛針塩橋(a)ストッパーの取付け(b)チューブ塩橋の取付け(c)針先端拡大図

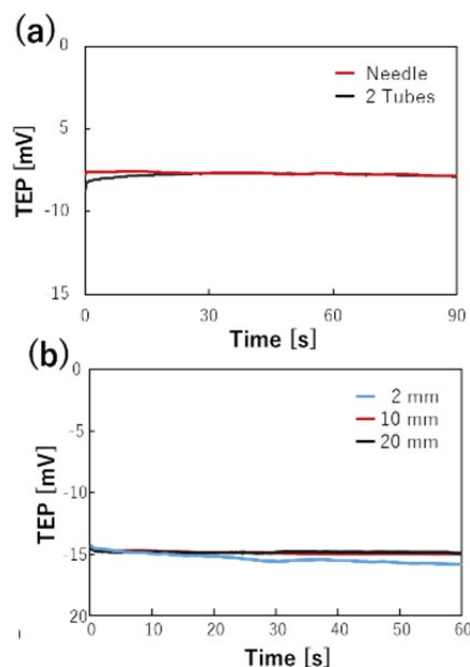


図 14 ブタ皮膚サンプル表皮電位測定結果(a)針塩橋を用いた場合と従来法との測定値の比較(b)針塩橋の各刺入位置に対する表皮電位測定値

ヘアレスマウスの表皮電位測定の様子を図 15 に示した。測定は麻酔下で行った。TEWL 測定値の試行間平均値と、表皮電位測定値の時間平均値を示した。(a)はテープストリッピング、(b)はアセトン処理によってバリア破壊を行った場合の測定値である。TEWL 測定値はバリア破壊後に増加し、表皮電位はバリア破壊処理後に減少した。これは既知の傾向と矛盾せず、生体皮膚の応答を正しく

観察できたものと考えられる。また、表皮電位の測定値については針塩橋を用いた場合と従来法を用いた場合とで同等であった。これらの結果から、無痛針塩橋を用いる本測定法では、侵襲性を最小限に抑えながら従来法と同様に定量的な測定が可能であると考えられる。

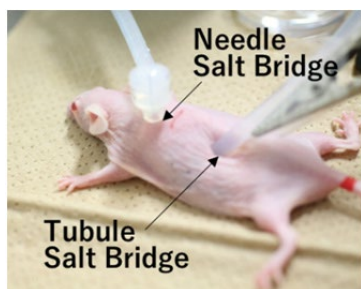
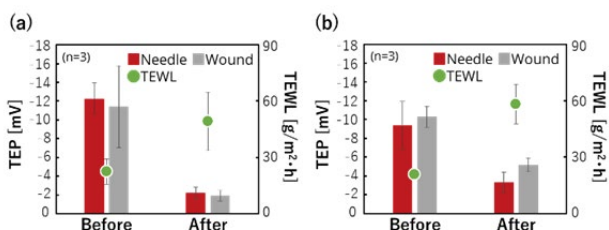


図15 ヘアレスマウスの表皮電位測定(a)テープストリップングでバリア機能を破壊した場合(b)アセトン処理でバリア機能を破壊した場合



作製した小型表皮電位測定プローブの写真を図16に示した。(a)が全体像、(b)がプローブ前端的拡大図である。プローブ前端的のほぼ全面を円盤状の寒天塩橋が覆い、その辺縁部にあけた穴からストッパーをつけた針塩橋を通した。後端からはAg/AgCl電極のリード部分を出し、電圧計に接続する構造とした。

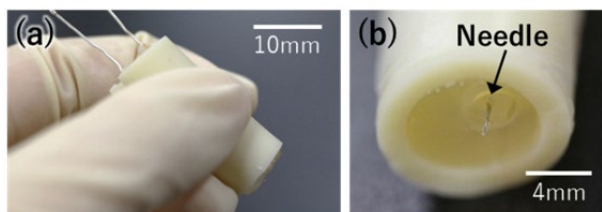


図16 表皮電位測定プローブ(a)全体像(b)前端的の拡大図

ブタ皮膚片サンプルについて、測定領域の写真と表皮電位測定値の時間平均値を図17に示した。写真中央のバリア機能破壊処理部は、その両隣の健常部と比較して、見た目には明らかな変化を示さなかった。小型測定プローブを用いて得られた測定値は、従来法のチューブと傷を用いて得られた測定値と同等であった。また、バリア破壊処理を施した部分で局所的に表皮電位が減少した。小型測定プローブを用いた表皮電位測定実験でも、従来法と同等の測定値を得ることに成功した。これらの結果から、無痛注射針塩橋はプローブ型デバイスに搭載しても信頼に足る表皮電位を測定可能であり、また、表皮電位の局所的な変化を検知することが可能であると示された。表皮電位測定がより簡便になり、今回の実験で模擬したような局所的な刺激に対する応答を調べる場合などに有用であると期待できる。

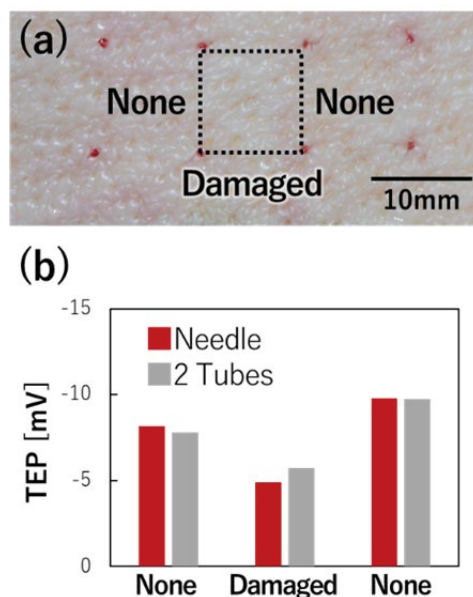


図17 小型表皮電位測定プローブによるブタ皮膚サンプル表皮電位測定結果(a)局所的にバリア機能を破壊したブタ皮膚サンプル写真(b)表皮電位測定値の時間平均

4. まとめ

本研究では、皮膚最表面である表皮層の機械刺激に対する応答を観察するためのシステム開発に取り組んだ。培養細胞への機械刺激のための伸縮性ゲル培養基板の作製法を確立し、ケラチノサイトの培養と機械刺激実験が可能であることを確認した。また、評価基準として表皮電位を取り上げ、新たな測定系を構築して低侵襲測定を可能にした。

これらは今後強力な研究ツールとなりうるものであり、医療応用研究への寄与が期待できる。

謝辞

中谷医工計測技術振興財団によるご支援、および本提案を採択して下さった審査委員の先生方に深謝いたします。

発表論文

[ゲルシート上の細胞培養]

Kuniaki Nagamine, Yuina Abe, Hiroyuki Kai, Hirokazu Kaji, and Matsuhiko Nishizawa
“Highly Stretchable Cell-Cultured Hydrogel Sheet” *RSC Advances*, vol. 5, 66334-66338, 2015.

Kuniaki Nagamine, Takuya Hirata, Kohei Okamoto, Yuina Abe, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa
“Portable Micropatterns of Neuronal Cells Supported by Thin Hydrogel Films” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol 1, 329-334, 2015.

[表皮電位の局所計測]

Yuina Abe, Kuniaki Nagamine, Mayu Nakabayashi, Hiroyuki Kai, Hirokazu Kaji, Takeshi Yamauchi, Kenshi Yamasaki, Matsuhiko Nishizawa
“Minimally-Invasive Transepidermal Potentiometry with Microneedle Salt Bridge” *Biomedical Microdevices*, vol. 18, 1-6, 2016.

参考文献

- [1] F. E. Görmär, a. Bernd, J. Bereiter-Hahn, and H. Holzmann, “A new model of epidermal differentiation: Induction by mechanical stimulation,” *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 282, pp. 22–32, 1990.
- [2] V. W. Wong, B. Beasley, J. Zepeda, R. H. Dauskardt, P. G. Yock, M. T. Longaker, and G. C. Gurtner, “A Mechanomodulatory Device to Minimize Incisional Scar Formation,” *Adv. Wound Care*, vol. 2, no. 4, pp. 185–194, 2013.
- [3] A. T. Barker, L. F. Jaffe, and J. W. Vanable Jr., “The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery,” *Am. J. Physiol.*, vol. 242, no. 3, pp. R358–

R366, 1982.

- [4] J. P. Gong, Y. Katsuyama, T. Kurokawa, and Y. Osada, “Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength,” *Adv. Mater.*, vol. 15, no. 14, pp. 1155–1158, 2003.
- [5] M. C. Yong, J. P. Gong, M. Tanaka, K. Yasuda, S. Yamamoto, M. Shimomura, and Y. Osada, “Tuning of cell proliferation on tough gels by critical charge effect,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 88, pp. 74–83, 2009.
- [6] S. Koizumi, K. Fujishita, K. Inoue, Y. Shigemoto-Mogami, M. Tsuda, and K. Inoue, “Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y₂ receptor activation,” *Biochem. J.*, vol. 380, pp. 329–338, 2004.
- [7] M. Tsutsumi, K. Inoue, S. Denda, K. Ikeyama, M. Goto, and M. Denda, “Mechanical-stimulation-evoked calcium waves in proliferating and differentiated human keratinocytes,” *Cell Tissue Res.*, vol. 338, pp. 99–106, 2009.
- [8] M. Denda, Y. Ashida, K. Inoue, and N. Kumazawa, “Skin surface electric potential induced by ion-flux through epidermal cell layers,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 284, no. 1, pp. 112–117, 2001.
- [9] R. Nuccitelli, “A Role for Endogenous Electric Fields in Wound Healing,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 58, pp. 1–26, 2003.
- [10] J. Dubé, O. Rochette-Drouin, P. Lévesque, R. Gauvin, C. J. Roberge, F. a Auger, D. Goulet, M. Bourdages, M. Plante, L. Germain, and V. J. Moulin, “Restoration of the transepithelial potential within tissue-engineered human skin in vitro and during the wound healing process in vivo,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 10, pp. 3055–3063, 2010.
- [11] J. Pinnagoda, R. A. Tupker, T. Agner, and J. Serup, “Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement,” *Contact Dermatitis*, vol. 22, pp. 164–178, 1990.

マイクロ RNA 分子内メチル化修飾を一細胞内で計測する高精細技術の開発



研究責任者 大阪大学 大学院医学系研究科
特任教授(常勤) 石井 秀始

1. はじめに

細胞に存在する RNA には、蛋白質をコードする RNA としない RNA がある。マイクロ RNA は非コード RNA の 1 つである。平均鎖長は 23 塩基程度でありヒトでは 2578 種である。種間で高度に保存されている。コード RNA (遺伝子) が平均 2500 塩基、22000 種あるのに比較してマイクロ RNA は短鎖かつ少数であり、集約的な計測技術の開発対象に最適である。

2. 研究開発の背景

- ① 機能：マイクロ RNA は、蛋白質をコードする RNA (メッセンジャー RNA) の一部に物理的に結合して、メッセンジャー RNA が蛋白質を翻訳する過程を抑制する。したがって、マイクロ RNA は抑制的な機能をもっている。したがって、標的のメッセンジャー RNA が重要な遺伝子である場合には、マイクロ RNA はその抑制を介して機能を発揮する。例えば、癌や生活習慣病等の多くの疾患で、マイクロ RNA の発現異常が知られている。iPS 細胞の誘導にも深く関わる。
- ② RNA メチル化研究： 現在までに知られている疾患に関連したマイクロ RNA の情報は、殆どがマイクロ RNA の発現の「総量的な多寡」

に関する情報であり、蓄積の結果を見ているに過ぎない。もちろん、発現の量が多ければ標的抑制効果が強いわけであり、疾患の診断に一定の有用性がある。しかし、RNA のような核酸分子は、容易に化学修飾を受けやすく、またその化学修飾 (メチル化等) は核酸分子の構造変化を介してその機能が左右される。類似の核酸分子として DNA の場合を考えると、メチル化 (化学構造上 5 位の位置のシトシン側鎖のメチル化) は癌を含む多くの疾患で異常である。したがって、RNA においてもメチル化修飾が機能的に重要な役割を担い、難治病などでの病態を修飾する原因であることが指摘されているが、現時点の技術では(1)RNA のメチル化修飾に複数の種類が存在しており一括して検出する技術が為されていないことや、(2)また頻用されているゲノムプロジェクトのシーケンシング技術 (サンガー法、次世代シーケンシング等) では複数のメチル化修飾を区別する事ができないなどの落とし穴があり、マイクロ RNA のメチル化修飾を一細胞一分子レベルで解析できる技術は現在までのところ実用化には至っていない。

3. 研究開発の内容

- ① チップ：半導体シリコンのチップ技術を生命

科学に応用したもので、1980年代に米国スタンフォード大学で開発された。サイズがマイクロン単位なので一細胞一分子レベルに適しており、焼き付けの光学技術を駆使できる先進国（米国、欧州、日本、最近は中国も）の最先端技術として資本投資の対象として注目されている。

- ② 質量分析計：質量分析計(Mass Spectrometer, MS)の嚆矢は19世紀後半であり、ガス放電中の陽極線に電場/磁場をかけた偏向距離が、そのガス気体分子の質量（正確には質量電荷比）に比例することの観察である。それ以来、様々な技術開発が積み重ねられ、イオントラップ法により比較的大きな質量数の粒子が測定可能になった（1989年ノーベル賞）。この技術は深まり、測定可能な分子として、種々のガス、イオン化金属元素（酸溶液を燃焼させる）、さらには低分子有機化合物へ拡大し、医薬領域における薬物・代謝分析などで幅広く用いられるようになった。1990年、蛋白質（ポリペプチド鎖）を破壊せずにイオン化させることが可能となった（この緩やかな条件でイオン化する技法は2002年ノーベル賞受賞：Electric Spray Ionization [ESI]; Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization [MALDI]）。この蛋白質をイオン化する技術の確立と高感度・多段階質量分析計の組み合わせにより、現在ではアミノ酸配列解析・同定が従来のエドマン分解シーケンサに比して数分の1から数十分の1量の試料で可能である。この革新的新技術は生命科学の発展に大きく寄与し、Genomeに並び立つProteomeの概念を一気に浸透させた。ESI法は揮発性溶媒中の物質を減圧室内にスプレーしてイオン化させ、変性を回避できる。またMALDI法はマトリックス（イオン化助剤）と測定対象分子の混合物にレーザーを照射、高レーザーでも測定対象物質の損傷（共有結合が切断）なくイオン化可能で、生体高分子の測定が可能で

ある。これらの技術は糖鎖付加やリン酸化等の「核酸」を含む生体高分子特有の修飾の解析への道を拓いた。質量分析計による核酸解析の大きなメリットに関しては、核酸の構成単位である塩基の質量数が大きいために長鎖の質量測定は困難であること、質量分析計による生体高分子解析技術の確立以前に「サンガー法・蛍光法」によるDNA配列解析法が普及し国際ゲノムプロジェクトでも基本技術として採用されたことなどから、現在でも核酸解析に質量分析計が用いられることは稀であり、これまでいくつかの基礎研究プロジェクトが行われるのみで耳目を集めることは無かった。またRNAについては直接PCRやサンガー法の適用は不可能であるが、逆転写によりcDNA化後の配列解析、あるいは相補的1本鎖核酸とのハイブリダイゼーション（雑種形成）による解析が行われてきた。しかし、マイクロRNAが特殊な機能を持つことに加えて、そのメチル化機能に注目が集まっていることを鑑みると、cDNAへの変換あるいは相補的な1本鎖核酸とのハイブリダイゼーションでは「転写後修飾」に依らない、メチル化等の化学修飾も応用可能な革新的新技術の新構築が必須である。本研究では、質量分析技術によるRNAの3要素（発現量・配列情報・化学修飾）の統合的なプロファイリング解析に、大容量の数理解析を融合させ、実現するべく開発研究を実施した。

- ③ 架橋型核酸：RNAやDNA等の核酸の2'4'分子内二重結合等を施した合成分子である。アミダイト等の原粉から化学合成する。架橋型核酸は天然型RNA等との結合力が強く、また質量分析の飛散・計測過程において天然型と人工合成を峻別できることから、本研究ではチップに応用した。チップに搭載しておく架橋核酸の選定（液層中の天然型マイクロRNAを補足）：質量差で同定できないmiRを捕捉する核酸(糖部架橋

型人口核酸 BNA を使用)を決定するにあたり、総スポット数を最小化するため、観測限界を超えた質量差を持つ核酸は同一捕捉核酸に吸着しても良いという環境下で吸着対象部位の配列探索プログラムを作成。miR 捕捉は少量で捉えられなければならないので、数理統計モデルは用いずに総当たりさせて取りこぼすことなく調査を実施した。この計算は 4^N ($N \geq 5$) という比較的大きな計算量であるが、MPI を用いた並列可能な高速化プログラムを作成、大規模計算機を用いて計算処理し実現する（講座内に装備、3週間程度の計算機の連続運用で可能）。プログラムは数理処

理に適した Fortran 言語を用いて実装、初期配列 5 個から始め、全組合せを順に探索した。これにより観測限界を超えた十分な質量差を持ち最短かつ最小組の捕捉核酸候補を選定した。また計算の高速化を図るため、存在しえなかった塩基配列組は探索ルーチンから随時省くことができる。この新構築された手法により、吸着対象配列に基づきそれに対応した有効な捕捉核酸の配列 (BNA) を決定することができた。

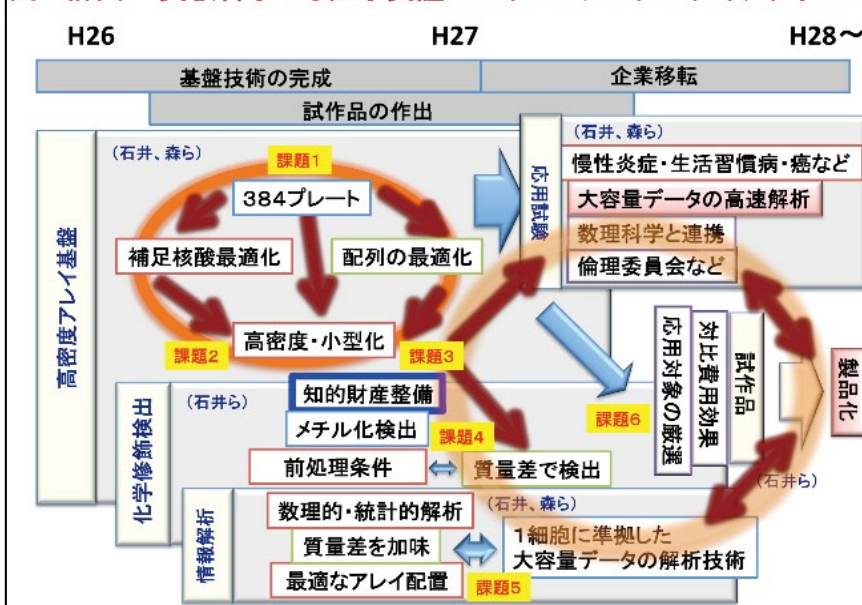
4. 方法と結果

① 研究の必要性

歴史的に鑑みて、2001 年ゲノムプロジェクトの完了、2002 年疾患マイクロ RNA の発見 (PNAS 2007)、2007 年マイクロ RNA が循環血液中に分泌されて疾患予測できる発見 (Nature 2007)、2013 年産学連携主導型で疾患マイクロ RNA の発現データベース構築へと、一連の系譜の流れがある。この経緯の

意味するところは、重要な疾患マーカーとしてのマイクロ RNA の量的なプロファイルングは世界的に大きな進捗が得られようとしているが、それはあくまで体内でのマイクロ RNA の蓄積の結果である。本計画では、質的な意味付けまで深化させ展開できる高精細チップを開発した。最先端技術を駆使してそこから得られるデータは一細胞一分子レベルのものであり、近未来のわが国において、国産スパコンを活用して大容量データを処理し、システム生物学的に疾患を理解し先制医療に展開できるなど、強いインパクトを期待できる。

図1 計画：実験科学から医学実証のバリューチェーン・ダイアグラム



② 基盤技術

- 1) 総マイクロ RNA (2578 種) の核酸配列情報に応じた類別化：全てのマイクロ RNA に関してゲノムデータベースから核酸配列情報の類別化は完了し、チップ基盤の設計として、約 1 ミリメートル平方の領域にスポットサイズ 20 マイクロメートル、間隔 10-20 マイクロメートルの規則で約 2600 種のマイクロ RNA スポットを作成まで進捗している。一細胞レベルの作動性である。
- 2) チップ：天然型マイクロ RNA をチップ上の補足核酸から質量分析により峻別する技術

架橋型補足核酸と天然型マイクロ RNA をハイブリダイズ（結合）させた後に、飛散・計測し、クロマトグラムで峻別できるための基本設計は取得した。

3) 補足核酸をチップ上に搭載する技術：従来から汎用されている DNA の光学的な焼き付け装置により、架橋型補足核酸を搭載できることを 10 個の試作品で確認した。

4) RNA メチル化の峻別する技術：1 分子量レベルで分離できる質量分析技術に、メチル化ドナーとしての化学修飾を組み合わせ、RNA における 5-me-C, 3-me-C, N1-me-A, N6-me-A を峻別できる基本技術を確立した。なお、一般

に DNA の化学修飾はシトシン (5-me-dC) のメチル化が 95%以上であるが、RNA では上記が様々な割合で疾患・細胞ごとに相違していることから一細胞一分子レベルの解析が必要であり、本計画で実現した。

5) 実試料を用いた作動性の確認：本計画の申請時点で、上記の試作品で実試料を用いた作動性の確認の前まで進捗している。作動性の確認は培養細胞では比較的簡便であるが、ヒトサンプルの場合は倫理委員会の申請と承認が必須である。代表者らの施設では未来型医療技術のシーズ開発が活発であり、円滑な審議が行われた。

6) 技術の企業移転・導出・展開：知財を整備し、産業化を目指し開発研究を実施した。

③ 試作品の作出

1) 検出デバイスの作出：迅速に試作品の完成に向けて開発を進め、ヒトサンプルを用いた作動性の確認（倫理委員会承認後）、さらに企業移転・導出・展開を経て産業化を目指した。

一細胞一分子レベルの解析により、ヒトの個体全体の状態をシステムとして把握した。高精細解析による高精度予測により、実証医学として難治病を制圧するのが意義であり目標とした。



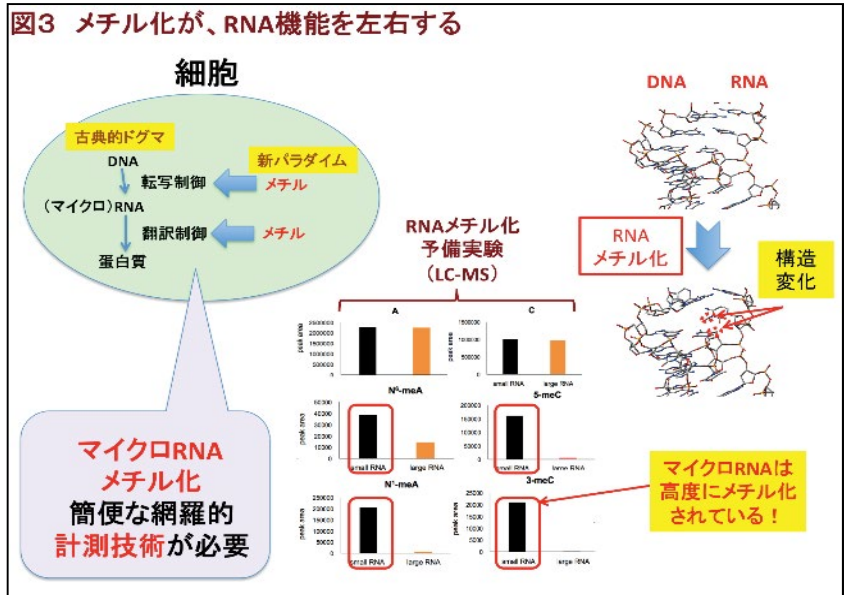
図 1、2 の如く、総マイクロ RNA (2578 種) の核酸配列情報に応じた類別化および天然型マイクロ RNA をチップ上の補足核酸から質量分析により峻別を実施した。類別化されたマイクロ RNA の作動性を調べる為には 384 プレートで特異性・感度を確認しながらサイズダウンしていき、高密度化・小型化を図った。また天然型マイクロ RNA と補足核酸（チップ上）を同時に質量分析装置で解析し、天然型マイクロ RNA として得られる情報を捕捉した。また補足核酸をチップ上に搭載する技術としてアレイ機でガラス基盤上に搭載し、高密度アレイ基盤の基本形を作成した（図 4）。この段階でマイクロ RNA のための質量分析前処理技術において知財整備（コア特許の申請）を行った。さらに、RNA メチル化の峻別する技術として、既に本計画の申請に向けて既に予備的段階の研究の段階で取得した結果（図 3、図 5）に加えて、種々の核酸（RNA、DNA、天然型に対する架橋型修飾の導入）により質量分析での分離デ

ータを取得、分離技術として知財整備（サテライト①特許の申請）を行った。さらに最適なアレイ配置等で試作品を作成し知財整備（サテライト②特許の申請）。倫理委員会の申請の審議・承認を得て研究を進めた。細胞株に関しては倫理委員会承認を必要としないので先行して実施した。ヒト材料としては、手術的に取得した余剰材料（病理診断等に際して使用せずに余った材料）を用いて実試料を用いた作動性の確認を実施した。データベースを構築して、従来の発現のみのマイクロRNA データベースと比較した。技術の企業移転・導出・

展開は大阪大学産学連携本部等を介して積極的に進めた。

- 仕様の概略：2578種のヒトマイクロRNAのうち、356種（14%）はサイズ分布が偏倚しており総質量数（親イオンの質量電荷比）のみで同定可能であるが、2222種（86%）は21-23鎖長に分布しており総質量数のみでは困難である。後者群を峻別するのを主目的として高密度アレイを構築するが、基盤構築上は高密度に特有のレーザー漏れ込みに依る隣接干渉を避ける為に、数理技術で（86%）の間に（14%）を配置し、全2578種を搭載した。約1ミリメートル平方の領域にスポットサイズ20マイクロメートル、間隔10-20マイクロメートルの規則で約2600種のマイクロRNAスポットを作成した。アミノ基導入スライドガラスを使用し、20マイクロメートル直径で 10^7 以上のアビジンを保持可能、この結合数が発現量のダイナミックレンジに対応した（ 10^7 ）。アビジン基盤に対して捕捉核酸（結合力の強固な架橋型核酸のビオチン化体）を数理技術で設計した。マイクロ

RNAの配列を参照して演算を繰り返し、吸着媒体を設計した（小関ら）。この高密度基盤からMALDI型質量分析を実施し、核酸配列情報を読み解くことができた。捕捉核酸は分

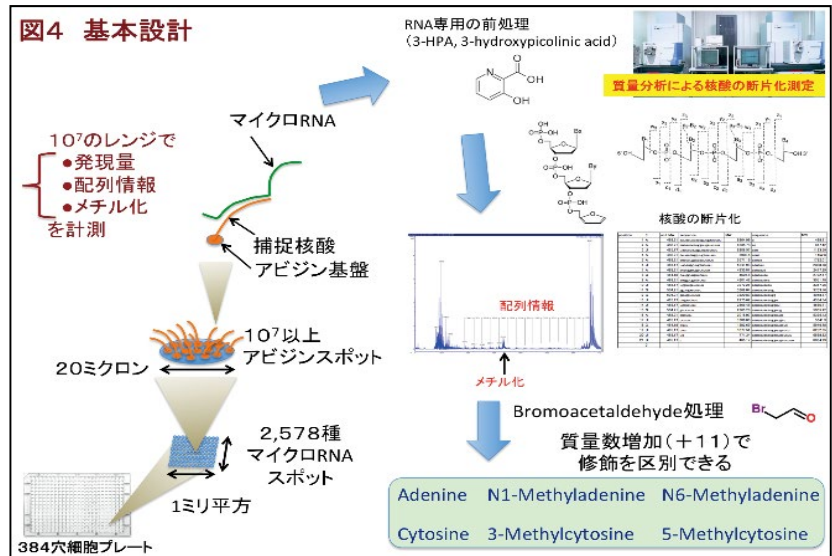


子数と配列が既知であることから、試料中の核酸のみの情報を数理的に抽出できた。短鎖RNA検出と配列決定は予備実験した（石井、大房ら）。特にメチル化修飾は、プロモアセトアルデハイドによる負荷体導入を採用した（アミン(-NH)とは作用するがアミンがメチル化されると作用しなくなる化学修飾）。これによりアデニン（質量数146.13）からN1メチル体(160.15)とN6メチル体(149.15)を区別し、またシトシン(122.10)から3-メチル体(125.13)と5-メチル体(136.13)を質量で区別出来た（図5）。この基盤は、384穴培養プレートで1細胞レベルの解析で実現するため、1枚のプレートの解析から、 $384 \times 2600 \times 10^7 \times 23 \times 4 = 10^{13}$ bit程度の大容量データが得られた。研究組織として、石井らは文部科学省新学術領域「システム癌（宮野悟総括）」の班員であり、九州大学数理研究院松井らと協力して数理モデルを進めた。小関が解析プログラムを担当した。応用では、慢性炎症（NFκB）・生活習慣病（PPARγ）・癌（TGFB）で1細胞の挙動が生命科学現象を

大きく修飾する場面に於いて実証を進めた。

- 3) チップデザイン:最終的な技術(製品)では、スポットサイズは最小で直径 20 マイクロメートルを目指すが、捕捉核酸としてビオチン化架橋型の配列設計を行い、最初は 384 ウェルプレートと同じサイズ、最大スポット直径 1 ミリメートルで実験を着実に開始した。捕捉核酸の数理設計では、各塩基の出現頻度からなる重みを用いた確率モデルを適用し、この確率が最大となるような配列パターンを同定した。基盤設計でアミノ基導入スライドガラスでは、表面のアミノ基の密度に依存した数のアビジンが保持可能。このタイプのスライドガラスには 1 ミリメートル平方あたり 10^{12} から 10^{13} 分子のアミノ基が導入され、384 ウェルプレートと同じサイズで、1 スポットあたり 10^{11} 分子以上確保可能。最終的に目指すサイズの 20 マイクロメートル直径でも 10^7 分子以上確保出来た。実際に、DNA マイクロアレイ (384 プレートと同じ外寸) の実績でも 1 スポットに 1-10 ng のオリゴ (20mer 程度) が塗布されるので、1 スポットあたり 10^{10} 分子以上のオリゴヌクレオチドが生えることになり、実現可能な数値であった。私達が最終的に目指すサイズの 20 マイクロメートル直径の円表面積は 1/2500 であり、チップ上核酸は 10^6 から 10^7 分子以上確保出来た。
- 4) 最適化: 現行の標準的アレイ機のスポットサイズと間隔は 10 ないし 20 マイクロメートル以上であり、そのまま搭載すると 1 辺が 2.06 ないし 1.55 ミリメートルの正方形もしくは 1.62 x 2.62 ないし 1.22 x 1.97 ミリメートルの長方形となる。しかし、マイクロ RNA では 2578 種の質量数が既知であるので、数理的に隣り合ったスポットに固定化される

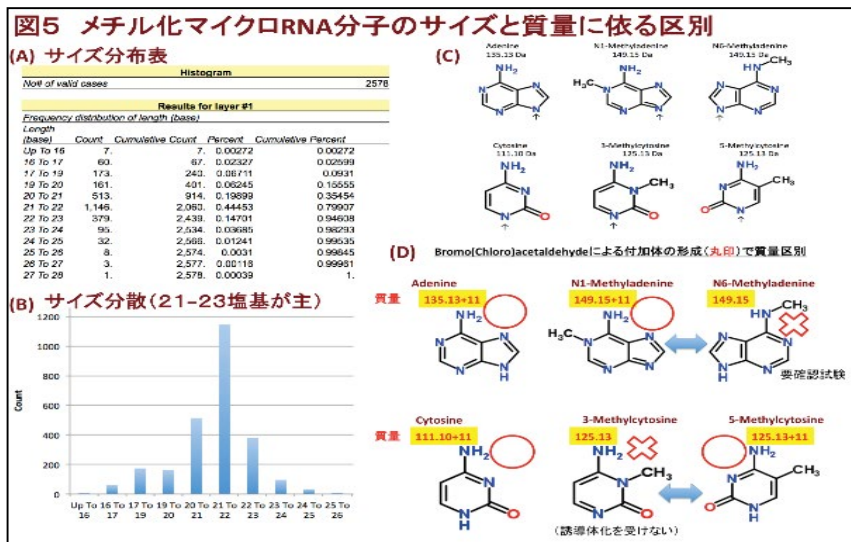
miRNA の質量数が異なるように配置することで、レーザー照射位置にいくらかの誤差があり隣接干渉が若干発生したとしても誤謬のないデータを得られた。更にスポット数の縮退を目指す為には、質量精度の観点から見て、その質量が 50 以上異なりかつ配列の類



似性が低い miRNA を 2 つ (あるいは 3 つ) 選び、同じスポットにて区別して検出することが可能。総スポット数は約 1300 (あるいは 900)、チップ面積は半分 (あるいは 1/3) となり、1 細胞レベルの解析に十分耐え得るプラットフォームである。そのために、標的配列の開始情報を潜在変数とみなして EM アルゴリズムを適用、計算機を利用した「マルコフ連鎖モンテカルロ法」(ランダムサンプリング) を適用し、最大確率値の配列パターンを探索した。

- 5) 装置作動: 分子内の異なる位置 1 カ所がメチル化されている分子 (N1 メチルアデニンと N6 メチルアデニン、3-メチルシトシンと 5-シトシン) は同質量のため、分子内のいずれの位置がメチル化を受けているか配列情報を保持しつつ確定するには技術革新を要する。そこで、一方のみに質量数を増加させる化学修飾法として、アミン(-NH)とは作用するがアミンがメチル化されると作用しなくなる化学修飾としてブロモ (クロロ) アセ

トアルデハイド負荷体を導入した。3-MeC には反応せず 5-MeC に質量数 11 を加えるために質量で区別が可能である。なお、類似の技術としては、抗体による免疫沈降による濃縮を挙げられるが、1つのマイクロ RNA 分子上に異なる位置がメチル化された残基が混在する場合には区別が出来ない。



④ 計測

難治性消化癌の患者の手術材料と末梢血から、手術前後、治療経過を経時的に追ってそれぞれ腫瘍と末梢血を採取した。手順に従って腫瘍からは mRNA とマイクロ RNA を抽出し、末梢血からは血清を分離してエクソソームを精製し、エクソソーム内に含まれているマイクロ RNA を抽出した。RNA のエピゲノム修飾に関しては、塩基特異的なメチル化などの修飾情報を得るために、核酸の相補性を利用した捕捉技術と質量分析法により計測した。結果は、大阪大学から知財化を進めている。知財化の整備と論文の公表の観点から許容される範囲内で概要を説明する。核酸を捕捉する技術としてはアビジン・ビオチン系を用いて標的分子以外の核酸は捕捉後に感度以下まで洗浄・除去して標的のみを精製し、標的となる RNA の内部配列を質量分析 MALDI/TOFMASS の In Source Decay を用いて計測した。難治性癌のサンプルでは、特異的なポジションのエピトランスクリプトームの修飾が顕著な特徴としてプロファイリングできた。これらは非癌例に比較して有意に高いレベルでメチル化が発生しており、癌のエピトランスクリプトームの活性を反映していると考えられた。現在、症例を蓄積して解析の範囲を広げ継続した。

5. まとめ

発生を含む生物学、慢性炎症・生活習慣病・癌を含むヒト疾患において、マイクロ RNA は重要な役割を担う鍵分子である。マイクロ RNA の機能は分子内のメチル化修飾で左右されることは指摘されているが、一細胞一分子レベルで正確に計測できる技術は未だない。私達は、総マイクロ RNA は少数 (2578 種) であることに着目して、質量分析で標的化する革新的な高精細チップを開発して網羅的に計測、もって疾患制御に向けた機能的な類別化を可能とする新技術を構築した。総マイクロ RNA が限定的であることから、一細胞レベルで捕捉できるサイズの高精細チップを開発した。特に、架橋型核酸をチップ基盤に搭載し、質量分析装置で網羅的に飛散・検出・数理的統計的解析により大容量データを処理するプラットフォームは世界初である。一細胞解析の必要性は、癌や iPS を含む細胞では個々の細胞が多様性に富むことを鑑みれば当然であり、そこから得られたデータベースの構築を通じて、難治性疾患の制御に向けた一筋の明るい見通しを描く事が出来た。

6. 謝辞

本研究開発にあたり助成金を賜りました、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団にこの場をおかりして深く感謝申し上げます。

7. 参考文献

- 1) Tsunekuni, K., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kobunai, T., Takechi, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., MicroRNA profiles involved in trifluridine resistance. *oncotarget.*, 2017. (in Press)
- 2) Sueda, T., Sakai, D., Kawamoto, K., Konno, M., Nishida, N., Koseki, J., Colvin, S. H., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. BRAF V600E inhibition stimulates AMPK-mediated autophagy in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:18949, 2016.
- 3) Colvin, S. H., Nishida, N., Konno, M., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Kawamoto, K., Asai, A., Tsunekuni, K., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncometabolite D-2-hydroxyglurate directly induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with distant metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:36289, 2016.
- 4) Ogawa, H., Wu, X., Kawamoto, K., Nishida, N., Konno, M., Koseki, J., Matsui, H., Noguchi, K., Gotoh, N., Yamamoto, T., Miyata, K., Nishiyama, N., Nagano, H., Yamamoto, H., Obika, S., Kataoka, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. MicroRNAs induce epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells. *PLoS One*, 10(5):e0127119, 2015.
- 5) Konno, M., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Matsui, H., Dewi, DL., Ozaki, M., Noguchi, Y., Mimori, K., Gotoh, N., Tanuma, N., Shima, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Embryonic microRNA-369 controls metabolic splicing factors and urges cellular reprogramming. *PLoS One*, 10(7): e0132789, 2015.
- 6) Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., Ochiya, T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat. Commun.*, 7;5:3591, 2014.
- 7) Hasegawa, S., Eguchi, H., Nagano, H., Konno, M., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Nishimura, T., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *B.r.J. Cancer*, 111(8):1572-1580, 2014.
- 8) Nishida, N., Nagahara, M., Sato, T., Mimori, K., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Ishii, H., Sugihara, K., Doki, Y., Mori, M. Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic microRNA clusters. *Clin. Cancer Res.*, 18(11):3054-3070, 2012.
- 9) Nishida, N., Mimori, K., Fabbri, M., Yokobori, T., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Ishii, H., Doki, Y., Mori, M. MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer, and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin. Cancer Res.*, 1;17(9), 2725-2733, 2011.
- 10) Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, DL., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., Saito, T., Nishimura, J., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*, 8(6), 633-638, 2011.
- 11) Miyoshi, N., Ishii, H., Nagai, K., Hoshino, H., Mimori, K., Tanaka, F., Nagano, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107(1), 40-45, 2010.

平成 27 年度（第 32 回） 開発研究助成 研究成果報告

ナノ電気化学顕微鏡の創成と単一細胞評価への応用 (金沢大学理工研究域 准教授 高橋 康史) -----	109
癌の転移リスクを超早期に診断するための高精度エクソソームマーカー検出法の開発研究 (神戸大学大学院医学研究科 助教 梶本 武利) -----	115
超高解像度光学顕微鏡の革新とアクチン線維切断分子コフィリンの結合の分析 (金沢工業大学バイオ・化学部 教授 辰巳 仁史) -----	120
超分子ヒドロゲルを支持体とした電気泳動による巨大 DNA 分離方法の開発 (静岡大学大学院理学領域 准教授 山中 正道) -----	125
血管壁損傷部位への動脈血流下における血小板細胞接着力の革新的計測技術の開発研究 (東海大学医学部 教授 後藤 信哉) -----	134
有機強誘電体を用いたカテーテル型高感度触覚センサの小型化と生体内触診方法の確立 (九州工業大学大学院生命体工学研究科 准教授 高嶋 一登) -----	141
マイクロダイアリス法を用いた心筋組織中 microRNA の計測技術の開発 (国立循環器病研究センター 上級研究員 清水 秀二) -----	151
光干渉断層画像化法を応用した次世代型卵巣機能評価システムの開発 (山形大学大学院理工学研究科 教授 阿部 宏之) -----	158
神経系免疫担当細胞ミクログリアの直接分化転換による新規脊髄損傷治療技術の開発 (九州大学大学院医学研究院 教授 中島 欽一) -----	165
常磁性金属酸化物ナノ粒子の創製と光超音波および磁気共鳴イメージングへの応用 (京都大学先端医工学研究ユニット 教授 近藤 輝幸) -----	169
ホルマリン固定組織へ応用可能な多重遺伝子発現解析に基づく乳癌の再発予測法の開発 (大阪大学大学院医学系研究科 助教 直居 靖人) -----	176
再生医療用細胞シートの磁気力負荷装置による新たな物性計測法の開発 (関西医科大学物理学教室 教授 影島 賢巳) -----	183
臨床応用を目指した酸化ストレス可視化プローブの開発 (金沢医科大学総合医学研究所 教授 岩脇 隆夫) -----	190

注1 顔写真は研究責任者です。

注2 本成果報告は平成 27 年度の助成金の贈呈に基づき、平成 28 年度に実施され、平成 29 年 7 月までに執筆された研究成果です。所属等は助成研究実施時または執筆された当時のものです。

ナノ電気化学顕微鏡の創成と単一細胞評価への応用



研究責任者 金沢大学 理工研究域
電子情報学系
准教授 高橋 康史

1. はじめに

電子顕微鏡の発展に伴い、細胞の微細な構造が明らかとなり、細胞の構造と機能をシームレスで結びつける研究が急務とされている。細胞のストレスに対する応答時間は、数 ms で起こる神経伝達物質の放出から、数日で生じる遺伝子レベルの変化まで幅広く、また細胞を構成する微小器官を経時的に評価するには、細胞の局所にストレスを与える“摂動技術”と、低侵襲かつ局所的な分析技術の融合が不可欠である。

走査型プローブ顕微鏡を利用した生細胞の機能マッピングは、蛍光測定では得られない生きた細胞のダイナミックな変化を捉えることができるため、学術的な関心にとどまらず、医療への貢献も期待できる。その中でも、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) は、生細胞のナノスケールの表面形状を非標識、非侵襲で計測可能であり¹⁾、これまで、Korchev らは、SICM を利用して、心筋細胞上のチャンネル²⁾や受容体のマッピング³⁾を実現している。これらは、免疫染色では得られないチャンネルや受容体の機能そのものを評価し、大きなインパクトを与えた。しかし、走査型電気化学顕微鏡 (SECM) による細胞表面の化学物質のマッピングはこれまで報告がない。そこで、走査型プローブ顕微鏡に化学物質を検出す

るための微小電極を搭載した、ナノ電気化学顕微鏡を開発し、“化学物質のマッピング”に挑戦した (図 1)。

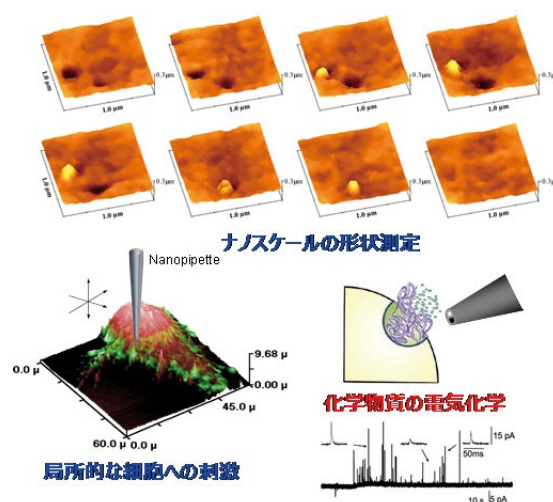


図1 本研究の概要微小電極による単一細胞

SECM の著名な研究者である Schuhmann、Unwin らも、電極を微細化し、細胞近傍の化学物質を計測する研究に取り組んでいるが、プローブの作成プロセスが複雑であり、また、生細胞表面に存在する微絨毛を可視化するレベルに達してない。我々は、半径 6.5nm の電極の作製と、電極に細工を施すことなく、高解像度の形状と電気化学イメージが可能な走査アルゴリズムを開発済みである⁴⁾。

2. 研究結果

2.1 プローブ型ケミカル FET の開発⁵⁾

独自開発した電極の微細化プロセスにより、ナノスケールの電極が簡便に開発可能となったが、感度の面で、ナノスケールの電極には課題がある。通常、微小電極を利用した計測では、ノイズ源となる容量電流の影響が電極の微細化とともに減少するため、高感度な計測が可能となる。しかし、ナノ電極では、電流そのものが小さくなりすぎて、一般的な微小電流計測器では、この微小電流をとらえることが困難なため、微小電流計測の感度の低下を引き起こす(図2)。そこで、微小電流計測ではなく、FET 型のケミカルセンサーの開発を行った。

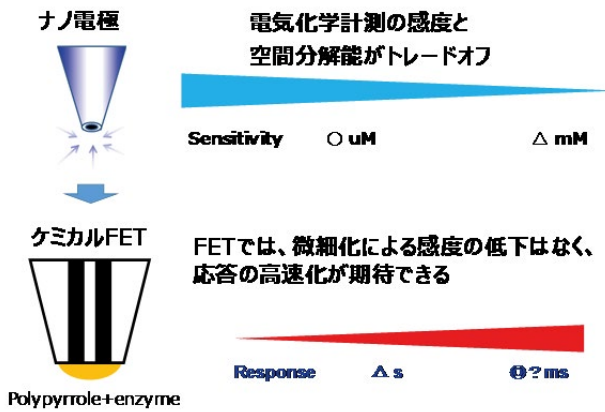


図2 ナノ電極による電気化学計測の課題

ケミカル FET センサーは、化学物質を酸化・還元した際の応答を捉えるのではなく、化学物質の濃度に依存して生じる導電性高分子の電子伝導度の変化をセンシングに利用する。そのため、ソースドレイン間に印加する電圧により、センシング信号を調整することが可能である。

θ 形状のクォーツキャピラリーをレーザープレーにより先鋭化し、キャピラリー内にブタンガスを充填した状態で先端部を加熱することで、ブタンガスを固体の焼成グラファイトとした。この焼成グラファイトをそれぞれソースドレイン電極として利用し、ゲート部分には、ポリピロールを利用した。ポリピロールは、ソースとドレインの電極に電圧を印加して、電界重合反応により形成

した。ポリピロールは、pH の変化とともに導電性が変化することが知られており、pH プローブとして利用できる。さらに、酵素反応により、化学物質の濃度に依存して局所的に pH を変化させることで、化学物質の濃度変化を pH の変化として計測することができる(図3)。

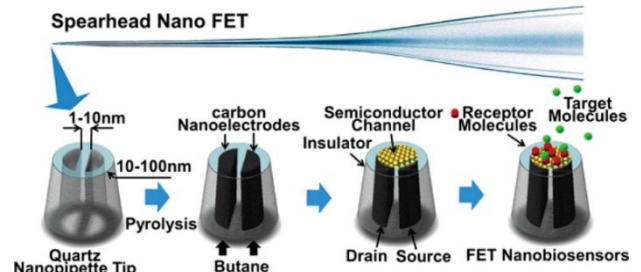


図3 ケミカル FET の作製方法

ATP を計測するために、ヘキソキナーゼをポリピロール上にグルタルアルデヒドを架橋剤として固定した。このケミカル FET を用いて、メラノサイト近傍の ATP や、心筋細胞内の ATP を計測したところ、ATP 由来の応答を捉えることができた。今後は、SICM と融合させてケミカルイメージングを行いたいと考えている。

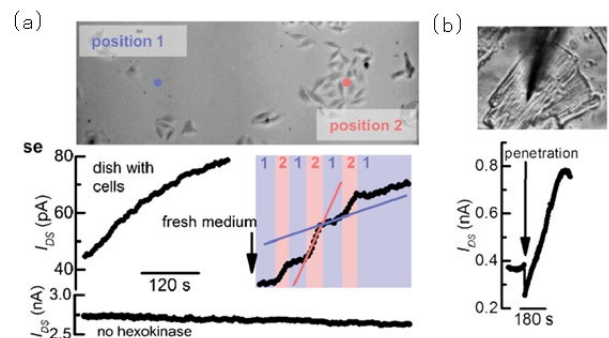


図4 ケミカル FET による(a)メラノサイト由来の ATP 計測、(b)心筋細胞内の ATP 計測

2.2 局所的な遺伝子回収・評価技術の開発⁶⁾

in situ ハイブリダイゼーション技術により、mRNA の分布を蛍光イメージングできるようになったが、生細胞内での mRNA の分布は時々刻々と変化しており、生細胞の刺激前後での mRNA の発現状態の変化を捉える技術が求められている。そこで、SICM による細胞の形状イメージの

位置情報を利用して、形状測定後に任意の点から細胞質を回収し、RT-RealTime PCRを行うことで遺伝子発現状態と位置情報をリンクさせた(図5)。



図5 SICMをベースとした局所細胞回収とプローブ先端の電子顕微鏡写真

細胞質の回収と形状イメージングを両立させるため、θ形状のガラスキャピラリーを伸長して、プローブを開発した。一方のバレルで計測されるイオン電流は距離制御に利用し、もう一方のバレルは細胞質の回収に利用した。細胞質の回収をナノスケールのピペットで行うことは、開口が小さいため、通常陰圧によるサクション法では困難である。そこで、電気化学的な原理を利用した細胞質の回収技術を開発した。この回収では、細胞回収用のバレルに有機溶媒を充填し、ピペット先端部に形成される有機溶媒(ピペット内)と水溶液(ピペット外)に電圧を印加した際に生じる界面張力変化を利用した。回収量は、印加電圧、電圧印加時間、溶液の粘性、溶液の導電性と密接に関連しており、PBSと細胞質の回収では、明らかな違いが見られた。

本手法により、3T3細胞のβアクチンをコードするmRNAである*ActB*の発現状態を評価した。まず、形状イメージをSICMにより取得したのちに、PC上から任意の点を指定し、細胞質の回収を行い、mRNAの発現状態を評価した。細胞体上と、細胞の縁部部分からmRNAを回収して評価を行ったところ、細胞の縁部部分から*ActB*の発現を確認することができた。このように、SICMによる細胞質の回収により、mRNAの発現状態を位置情報とリンクさせることができた(図6)。

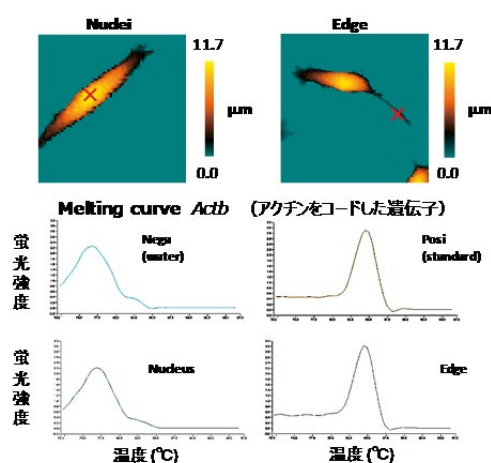


図6 SICMによる細胞の形状イメージとmRNA発現状態評価

さらに、SICMの位置情報を利用して、複数の箇所から細胞質を回収し、mRNAの評価を行うために、スループットの向上を図った。通常は、1つのピペットでは一カ所からの回収しかできなかったが、回収した溶液を有機溶媒の相で挟み込むことで、多層構造を実現した。また、各層にDNAバーコードを導入することで、位置情報と遺伝子情報をリンクさせることができ、また、各層がタグ付けされているため、別々に評価せずに、一度のPCRで評価することが可能である(図7)。

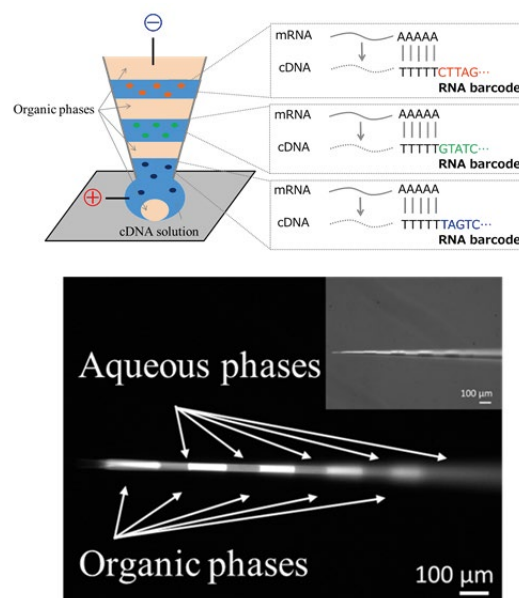


図7 遺伝子回収のスループット向上に向けた回収サンプルの多層化

2.3 高速 SICM の開発⁷⁾

SICM では、細胞表面のダイナミックな動きをナノスケールで捉えることが可能であるが、通常の SICM は1枚のイメージングに 20 min ほど時間がかかってしまう。エンドサイトーシスは、数十秒の時間スケールで生じており、このダイナミックな形状変化を捉えるには、測定の高速度化が不可欠である。

走査型プローブ顕微鏡では、 piezoアクチュエータに電圧を加え、その際に生じる形状変化を利用して、精度の高い位置合わせを行う。この piezoアクチュエータの変異は、電荷量と密接な関りがあるため、高速で駆動させるには、piezoアクチュエータに電圧を印加するためのドライバーの大容量化や、容量の小さな piezoアクチュエータを利用することが挙げられる。また、SICM では、凹凸の激しいサンプルの計測を実現するために、ホッピングモードと呼ばれる計測法が利用されている⁸⁾。

そこで、高速化を目指して、容量の小さな piezoステージの選定と、計測アルゴリズムの改良を行った。piezoアクチュエータは、XY 方向で、6.8 uF、Z 方向 1.4 uF の素子を利用した(図 8)。

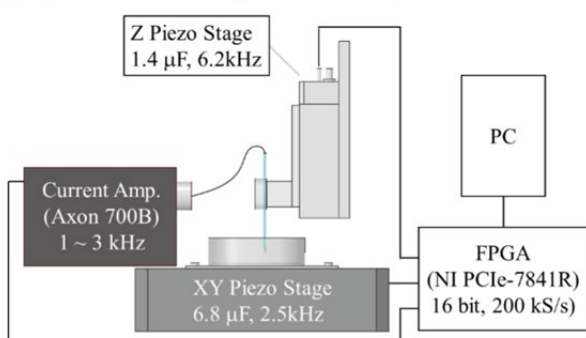


図8 高速 SICM の装置構成

さらに、計測アルゴリズムの改良では、通常問題となるホッピングの振幅をできるだけ小さくして (500 nm 以下)、細胞と水平方向の際に接触した場合に、ピペットの位置を戻し、接触が起こらない大きな振幅に一時的にすることで、試料との接触を回避した (図 9)。

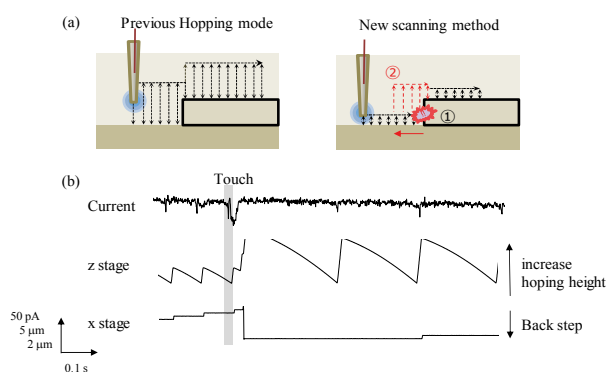


図9 計測時間の短縮化を目指したホッピングモードの改良

これらの改良により、1イメージ 15 秒で取得可能となり、細胞表面に存在する微絨毛のダイナミックな動きを可視化することができた。さらに、上皮成長因子(EGF)を加えると、微絨毛の形状が数分単位で変化することが分かった (図 10)。

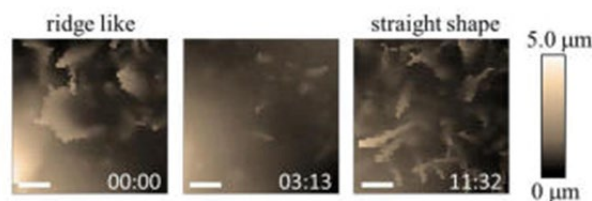


図10 EGF 添加後の細胞表面の変化

2.4 膜曲率変化の計測⁹⁾

SICM では、生細胞のナノスケールの形状測定が可能であり、試薬の添加前後での変化を捉えるのに大変有効である。特に、京都大学の二木史郎教授が進めている膜透過性アルギニンペプチドの細胞内移行では、細胞膜の曲率変化が透過性と密接に関わっていることが予想されている。

SICM により、膜曲率を変化させることが知られているピレンブチレートとアルギニンペプチドを加えると、微絨毛より微細なナノスケールの構造体が細胞表面に多数現れていることが SICM による形状測定から明らかとなった (図 11)。

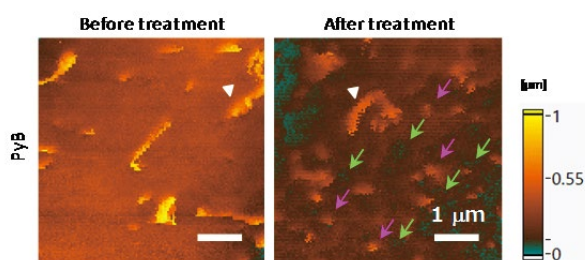


図11 ピレンブチレートを追加前後での細胞表面の SICM による形状イメージ

3. まとめ

SICM や SECM を利用した細胞のセンシングの空間・時間分解能の向上を行い、さらに mRNA の発現状態を細胞の位置情報とリンクさせるなどの機能マッピングへの可能性を報告した。SICM は、生細胞の形状測定に大変有効なだけでなく、細胞に局所的な刺激を加えることや、回収した細胞質を他の分析機器により評価できる。これまでの単一細胞レベルのオミックス解析のスケールを、オルガネラレベルまで向上させることが期待できる。

謝辞

公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団の平成 27 年度開発研究助成の支援を受けて行われました。ここに深く感謝申し上げます。本研究は、東北大学 環境科学研究科 末永智一教授、珠玖仁教授、梨本裕司博士（現京都大学助教）、井田大貴君（東北大学博士課程 2 年）、Imperial College London、医学部 Yuri Korchev 教授、京都大学 二木史郎教授、村山知さん（京都大学博士課程 3 年）、金沢大学 理工学研究域 福間剛士教授、周 縁殊博士研究員との共同研究の成果です。

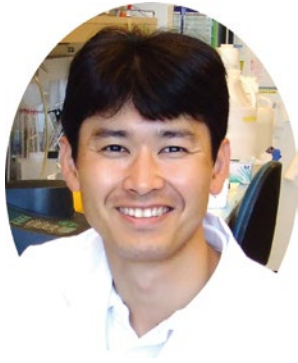
参考文献

- Hibino, H.; Takai, M.; Noguchi, H.; Sawamura, S.; Takahashi, Y.; Sakai, H.; Shiku, H., An approach to the research on ion and water properties in the interphase between the plasma membrane and bulk extracellular solution. *The Journal of Physiological Sciences* **2017**, *67*(4), 439-445.
- Korchev, Y. E.; Negulyaev, Y. A.; Edwards, C. R. W.; Vodyanoy, I.; Lab, M. J., Functional localization of single active ion channels can the surface of a living cell. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2* (9), 616-619.
- Nikolaev, V. O.; Moshkov, A.; Lyon, A. R.; Miragoli, M.; Novak, P.; Paur, H.; Lohse, M. J.; Korchev, Y. E.; Harding, S. E.; Gorelik, J., beta(2)-Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes cAMP Compartmentation. *Science* **2010**, *327* (5973), 1653-1657.
- Takahashi, Y.; Shevchuk, A. I.; Novak, P.; Babakinejad, B.; Macpherson, J.; Unwin, P. R.; Shiku, H.; Gorelik, J.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E.; Matsue, T., Topographical and electrochemical nanoscale imaging of living cells using voltage-switching mode scanning electrochemical microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (29), 11540-11545.
- Zhang, Y.; Clausmeyer, J.; Babakinejad, B.; Lopez Cordoba, A.; Ali, T.; Shevchuk, A.; Takahashi, Y.; Novak, P.; Edwards, C.; Lab, M.; Gopal, S.; Chiappini, C.; Anand, U.; Magnani, L.; Coombes, R. C.; Gorelik, J.; Matsue, T.; Schuhmann, W.; Klenerman, D.; Sviderskaya, E. V.; Korchev, Y., Spearhead Nanometric Field-Effect Transistor Sensors for Single-Cell Analysis. *Acs Nano* **2016**, *10* (3),

3214-21.

6. (a) Ito, H.; Tanaka, M.; Zhou, Y.; Nashimoto, Y.; Takahashi, Y.; Ino, K.; Matsue, T.; Shiku, H., Continuous collection and simultaneous detection of picoliter volume of nucleic acid samples using a mille-feuille probe. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (4), 961-969; (b) Nashimoto, Y.; Takahashi, Y.; Zhou, Y.; Ito, H.; Ida, H.; Ino, K.; Matsue, T.; Shiku, H., Evaluation of mRNA Localization Using Double Barrel Scanning Ion Conductance Microscopy. *Acs Nano* **2016**, *10* (7), 6915-22.
7. Ida, H.; Takahashi, Y.; Kumatani, A.; Shiku, H.; Matsue, T., High Speed Scanning Ion Conductance Microscopy for Quantitative Analysis of Nanoscale Dynamics of Microvilli. *Anal. Chem.* **2017**.
8. Novak, P.; Li, C.; Shevchuk, A. I.; Stepanyan, R.; Caldwell, M.; Hughes, S.; Smart, T. G.; Gorelik, J.; Ostanin, V. P.; Lab, M. J.; Moss, G. W. J.; Frolenkov, G. I.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E., Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat. Methods* **2009**, *6* (4), 279-281.
9. Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani-Nakase, T.; Ida, H.; Takahashi, Y.; Fukuma, T.; Ulrich, A. S.; Futaki, S., Loosening of Lipid Packing Promotes Oligoarginine Entry into Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (26), 7644-7647.

癌の転移リスクを超早期に診断するための高精度エクソソームマーカー検出法の開発研究



研究責任者 神戸大学 医学研究科
生化学・分子生物学講座
助 教 梶本 武利

1. はじめに

癌は日本などで未だ死因の1位であり、特に全身へ転移すると余命は著しく低下するため、癌撲滅に向け癌遠隔転移の克服が急務である。現在癌遠隔転移のメカニズム解明および遠隔転移を抑える薬の開発が精力的に進められており、近い将来、癌転移抑制薬を用いた癌転移の予防的治療の実現が予想される。その際有効な予防的治療には癌遠隔転移リスクの予測診断が不可欠であるが、癌遠隔転移リスクの早期診断法は未だ開発されていない。

本研究では、癌の増悪と関連の深いエクソソームに着目し、最近我々が開発した「エクソソーム積荷定量法」を用いて癌遠隔転移リスクの高精度な早期診断技術を実臨床レベルで開発することを目的とした。本研究課題期間中には「エクソソーム積荷定量法」の早期診断への応用に向け細胞レベルでの作動確認を行うとともに、実臨床における癌の増悪とエクソソームデータとの相関性の検証を行い、結果癌の増悪に対する「エクソソーム積荷定量法」を用いた新規診断法の有効性が確認された。また癌遠隔転移リスクとの相関関係については現在実臨床における経過観察中であり、引き続き検証を進める。

2. 研究の背景

癌細胞は様々な機能性タンパク質や RNA などを積荷として含んだ 50nm~100nm の微小膜小胞であるエクソソームを放出しており、このエクソソームが、液性因子として生体内を循環・拡散しエクソソームに含まれる積荷が免疫系の細胞や転移先のターゲット細胞に作用することで、癌細胞の転移を促進することが知られている(図1)^{1),2)}。この癌転移に関わるエクソソームの積荷としては、現在までに受容体型チロシンキナーゼである c-Met や各種 microRNA (miRNA) などが報告されている。これらの報告は、癌細胞が放出するエクソソームに含まれる c-Met や miRNA が癌転移を抑える予防的治療の新たなターゲットに

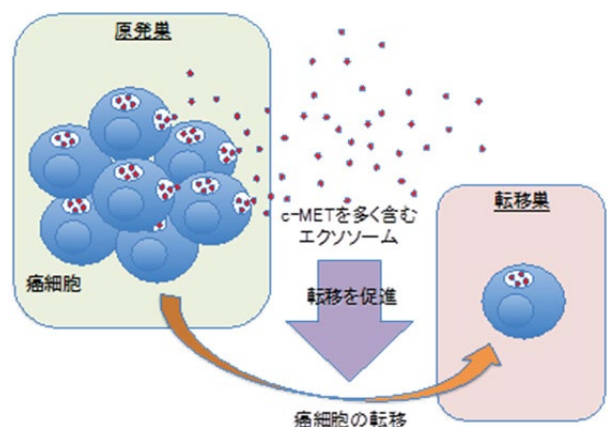


図1 エクソソームと癌細胞の転移

なることを示唆している。実際に現在これらのエクソソームの積荷を標的とした治療薬の開発が進められている。

癌転移抑制薬を用いた癌転移の効果的な予防治療には遠隔転移の前段階における癌転移リスク診断が不可欠である。癌遠隔転移リスクの予測には、遠隔転移のよいマーカーが必要になるが、ここでもエクソソームの積荷が注目されている。報告によると転移性の癌細胞が放出するエクソソームにはc-Metが積荷として多く含まれており、放出後このエクソソーム中のc-Metが免疫系の細胞などに直接作用することで癌細胞の遠隔転移を引き起こすことが知られている。また実臨床において、血中エクソソームに含まれるc-Metが遠隔転移の前段階で有意に増加してくることが明らかとなっている¹⁾。これらのことからc-Metは癌遠隔転移リスク超早期診断の良いマーカーとなることが期待される。

3. 研究戦略

血中エクソソームに含まれるc-Metの定量は従来のエクソソーム全体を対象としたマス解析で可能である²⁾。しかしながら癌転移抑制薬を用いた癌転移予防的治療に向けたより正確な転移リスク診断の実現には、高精度な転移リスク診断法の開発が望まれる。

癌細胞が放出するエクソソームはそれぞれに含まれる積荷の種類や量が様々でヘテロな集団

であると考えられている。そのため我々はエクソソームを標的とした高精度な転移リスク診断の実現に向け、マス解析ではなく個々のエクソソーム中のc-Met含有量の定量的解析による新たな転移リスク診断法を考案した。ただこれまでナノサイズのエクソソームに含まれるc-Metなどの積荷タンパク質を定量するためには電子顕微鏡を用いる必要があり、簡便な検出方法は存在しなかった。最近我々は、蛍光イメージング法を用いることでナノサイズ問題を解決し、エクソソームの積荷含有量を個々のエクソソーム単位で定量する「エクソソーム積荷定量法」の開発に成功した³⁾。

「エクソソーム積荷定量法」は、特殊な加工を施した基板に固定したエクソソームの膜およびエクソソーム中の積荷をそれぞれ蛍光標識し、個々のエクソソーム中の積荷の含有密度を共焦点レーザー顕微鏡などを用いて定量するものである(図2)。本手法の詳細は以下の通りである。

- 1) BSA-ビオチンを用いたガラス基板のビオチン化修飾
- 2) ガラス基板のアビジンコーティング
- 3) ビオチン化修飾脂質を用いたエクソソームのビオチン化修飾
- 4) 脂溶性カルボシアニン色素によるエクソソーム表面の蛍光標識
- 5) エクソソームのアビジンコーティングガラス基板への固定

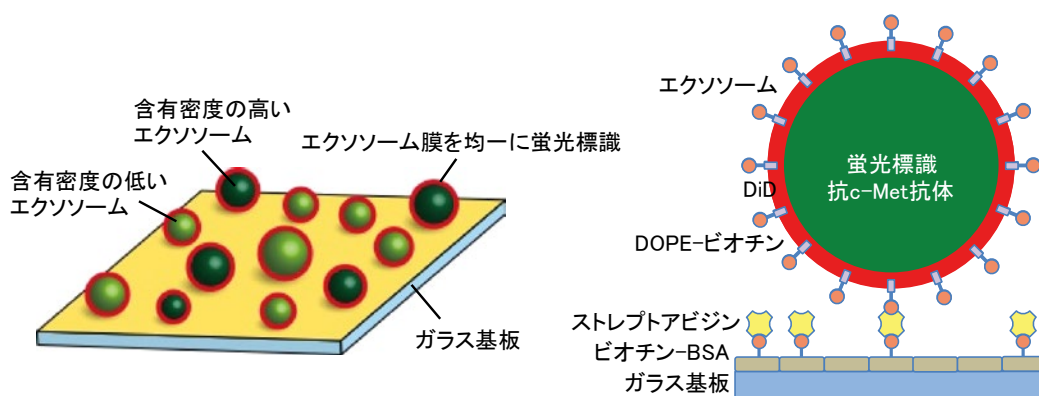


図2 エクソソーム積荷定量法

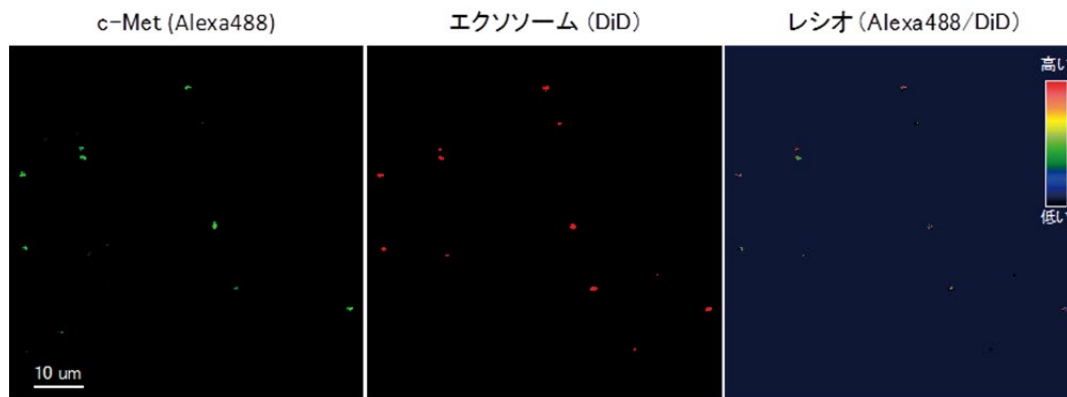


図3 「エクソソーム積荷定量法」によるメラノーマ細胞由来エクソソームに含まれる c-Met のイメージング

6) c-Met 抗体を用いたエクソソーム含有 c-Met の蛍光免疫染色

7) 共焦点レーザー顕微鏡などの蛍光顕微鏡による個々のエクソソーム中の c-Met 蛍光の観察および含有密度解析

実際に「エクソソーム積荷定量法」を用いて癌細胞由来の個々のエクソソーム中の c-Met 含有密度を検出した顕微鏡画像を図3に示す。細胞膜標識（赤色）で示される個々のエクソソームに含まれる c-Met の量（緑色の蛍光強度）が検出可能であることが分かる。さらに脂溶性カルボシアニン色素による細胞膜標識（赤色）の蛍光強度はエクソソームの表面積つまりエクソソームサイズを反映するため、横軸にエクソソームサイズ（赤色の蛍光強度）、縦軸に c-Met 含有量（緑色の蛍光強度）をグラフ上にプロットすることにより、個々のエクソソーム単位での c-Met 含有密度情報

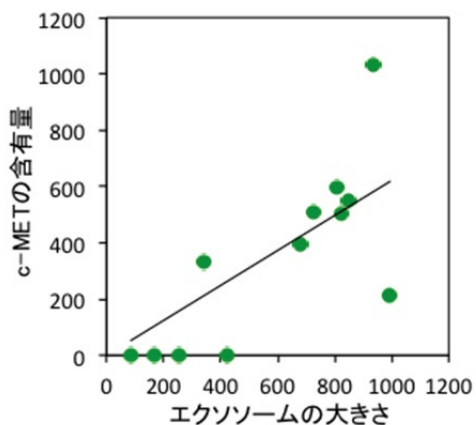


図4 c-Met 含有エクソソームのカテゴリライズ

（各プロットの傾き）のカテゴリライズが可能になる（図4）。この結果から、癌細胞が放出するエクソソームに含まれる c-Met の量は均一ではなく個々のエクソソーム間で大きなばらつきがあることが明らかとなり、ヘテロな集団であるエクソソームを対象とする診断には、個々のエクソソーム単位での検出・解析が不可欠であることが示された。

本研究では、「エクソソーム積荷定量法」を用いて個々のエクソソーム単位の積荷情報を検出し、ヘテロな集団であるエクソソームの積荷含有密度の不均一性をアルゴリズム化することで、予測精度の高い癌遠隔転移リスク超早期診断を実現する。

4. 研究内容

4.1 「エクソソーム積荷定量法」を用いた培養細胞レベルでのエクソソーム含有 c-Met の定量的密度解析

「エクソソーム積荷定量法」の細胞レベルでの動作確認として、転移性の高い癌細胞株と転移性の低い癌細胞株に対してエクソソーム含有 c-Met の定量的密度解析を行った。

転移性の高い癌細胞および転移性の低い癌細胞を、それぞれエクソソームを除去した血清入り培地中で 24 時間培養し、培養上清からエクソソーム単離キットを用いてエクソソーム画分を単離・精製し、脂溶性カルボシアニン色素（DiD）

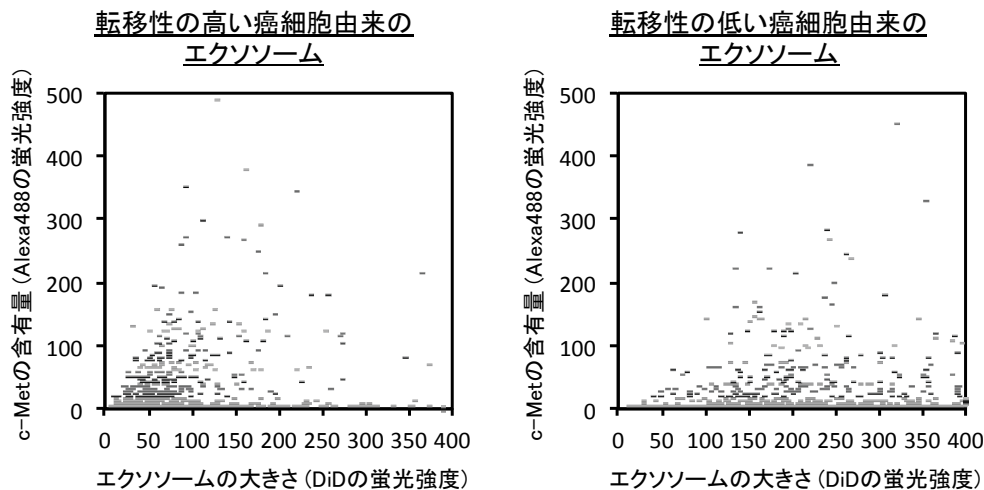


図5 「エクソソーム積荷定量法」による高転移性癌細胞および低転移性癌細胞由来のエクソソームに含まれる c-Met の定量的解析

で染色後、アビジン-ビオチン結合によりガラス基板上に固定し、さらにガラス基板上でエクソソーム癌遠隔転移マーカーである c-Met に対する免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により各エクソソーム中の c-Met 含有密度の測定および解析を行った (エクソソーム積荷定量法)。

結果、癌細胞由来のエクソソームに対して、「エクソソーム積荷定量法」を用いたエクソソーム含有癌遠隔転移マーカー (c-Met) の定量的密度解析が上手く適用できることが示された。図5に、転移性の高い癌細胞および転移性の低い癌細胞それぞれについて、「エクソソーム積荷定量法」

により得られた癌細胞由来の個々のエクソソーム中の c-Met 含有密度の情報をグラフ上にプロットした結果を示す。横軸はエクソソームサイズ (DiD の蛍光強度)、縦軸は c-Met の含有量 (Alexa488 の蛍光強度)、そして各プロットの傾きは個々のエクソソーム中の c-Met 含有密度を表している。このグラフからエクソソームに含まれる c-Met の含有量および含有密度は均一ではなく、癌細胞由来のエクソソームが不均一な集団であることが分かる。また図6は個々のエクソソームを c-Met 含有密度で分類した表であり、転移性の高い癌細胞と転移性の低い癌細胞の間で c-Met 含

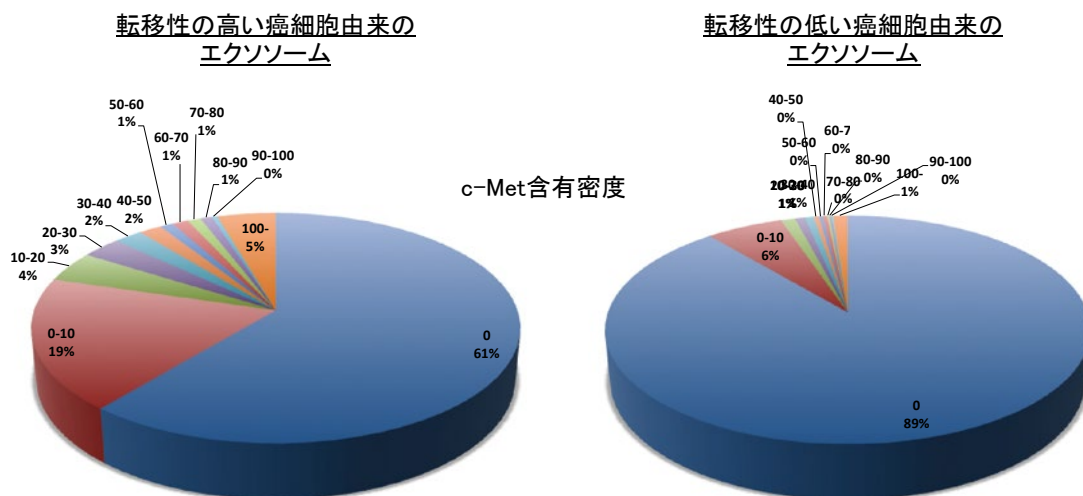


図6 高転移性癌細胞および低転移性癌細胞由来のエクソソームの c-Met 含有密度分類

有密度の分布が全く異なることが示された。この結果は、実臨床レベルにおいても転移性の高い癌細胞と転移性の低い癌細胞の間でc-Met含有密度分布に大きな違いが出る可能性を示唆しており、今後の研究開発を進める上で大変意義深い。

4.2 実臨床における c-Met 含有密度の不均一性と癌遠隔転移との相関関係の検証

本研究課題では、以下の方法により臨床講座と共同で実臨床におけるc-Met含有密度の不均一性と癌遠隔転移との相関関係の検証を行った。

- 転移所見を認めない癌患者の血液サンプルからエクソソームを単離・精製する。
- エクソソーム中の癌遠隔転移マーカー(c-Met)に対して「エクソソーム積荷定量法」を用いた含有密度解析を行い、結果をグラフにプロットする。
- 個々の患者について予後の状況をモニターする。
- プロットデータと予後の状況を比較し、高転移性のグループ、低転移性のグループそれぞれについてグラフパターンを解析し相関関係を見出す。
- 相関関係をアルゴリズム化し転移所見を認めない癌患者に対して遠隔転移リスク予測を行う。
- 予測後、予後の状況をモニターし、本診断法の有効性を検証する。

現在骨肉腫を中心に検証を進めており、これまでにあるパターンでのc-Met含有密度分布と癌の悪性度との間に相関関係があることが明らかとなっている。遠隔転移との相関関係については現在各患者の予後の状況をモニター中であり、今後も引き続き例数を増やしつつ検証を進めていく。

5. まとめ

本研究の成果により、「エクソソーム積荷定量法」による個々のエクソソーム単位の癌遠隔転移マーカー(c-Met)検出が細胞レベルおよび実臨

床レベルで動作することが確認され、さらにエクソソームのc-Met含有密度の分布と癌の悪性度との間に相関関係があることが初めて示された。

今後は引き続き実臨床におけるc-Met含有密度の不均一性と癌遠隔転移との相関関係の検証を進めるとともに、c-Met以外の癌遠隔転移マーカーや骨肉腫以外の癌についても検証を行う。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団「開発研究」およびJST「研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)」からの研究助成により行われたものです。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B. et al., Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET., *Nature Medicine* 18(6): 883-891 (2012).
2. Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Ochiya, T., Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis., *Journal of Biological Chemistry* 288(15): 10849-10859 (2013).
3. Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., Nakamura, S., Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes., *Nature Communications* 4:2712 doi: 10.1038/ncomms3712 (2013).

超高解像度光学顕微鏡の革新とアクチン線維切断分子コフィリンの結合の分析



研究責任者 金沢工業大学
バイオ・化学部
教授 辰巳 仁史

1. はじめに

溶液中で個々の生体高分子が自由に相互作用し働いている状態を詳しく調べることは長年の研究者の夢であり、このような測定が可能となれば生命科学への貢献は計り知れない。分子計測装置としての超解像光学顕微鏡を革新し、一分子反応の溶液中測定を改善することは科学技術の発展にとって重要である。本研究では空間分解能 10nm でタンパク質分子の状態変化を超解像分析できる実験系の研究開発を行った。

アクチン線維は筋肉細胞をはじめほぼ全ての細胞において細胞を支える骨格として働いている。アクチン線維は細胞では切断により適切な長さに調整されている。我々はアクチン線維一分子を切断することが知られている切断タンパク質分子コフィリン一分子のアクチン線維への結合を超高分解能で分析するための技術開発を行ってきた。そこでは全反射型近接場蛍光顕微鏡と超高解像顕微鏡 (PALM) 法を組み合わせることにより空間分解能 18 nm に到達している (図 1) (Hayakawa, Sakakibara, Sokabe, Tatsumi 2014 PNAS)。このような高解像の装置の応用のひとつは以下に述べる生体高分子の液中での機能解析である。

生体分子への分子の結合の研究で最も有名なものはヘモグロビン分子への酸素分子の結合である。この現象はアロステリック効果として知られている。一つの酸素分子の結合はさらなる酸素分子の結合を促進し、酸素を効率よく運搬できる分子的な基盤となっている。同様のアロステリック効果はアクチン結合タンパク質コフィリンのアクチン線維への結合でも知られている。我々は、超高分解能顕微鏡観察を用いてコフィリンの結合過程の一分子分析を行い、世界の研究をリードしている (Hayakawa, et al, 2014 PNAS)。超高解像顕微鏡については、顕微鏡の性能限界は背景ノイズや分子の揺らぎによって制限されており、通常の蛍光分子を用いた観察条件では 20nm 程度のあたりに限界があるとされている (図 2)。

超高分解能顕微鏡の現在の性能限界を押し上げることが世界的な研究開発目標のひとつとなっている。本研究開発では 3 つの方向から測定法の改良を行う。1 番目が測定対象の分子をセットする顕微鏡ステージの改良である。従来の顕微鏡ステージでは図 3 に示すように周囲の温度変化に影響されて x-y 方向に標本の移動が起きる。この移動 (ステージのドリフト) は超高解像顕微鏡の観察にとっては深刻な問題を生じることが研究開発の段階で明らかになった。通常の顕微鏡ス

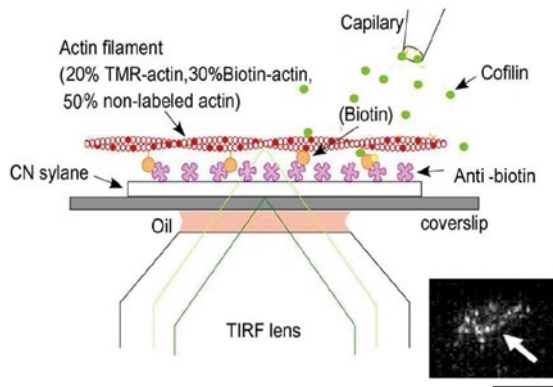


図1 観察系の模式図。アクチン線維はカバーガラスにビオチン抗体を介して緩やかに固定されている。コフィリンはピペットから拡散でアクチン線維に投与する。アクチン線維とそれに結合したコフィリンは TIRF lens(全反射用の対物レンズ)を介して照明される。全反射は標本が部分的に固定されているカバーガラスの表面で起きている。この全反射により形成されるエバネセント場はガラス面から約 100nm 程度の限られた空間にある蛍光分子を照らす。励起された蛍光分子が放出する光子は同じ対物レンズにより通常の顕微鏡の結像系で観察する。インセットはローダミンで標識したアクチン線維の蛍光画像(フィラメント数が見え、長いフィラメントを矢印で示す)。バー5 μ m

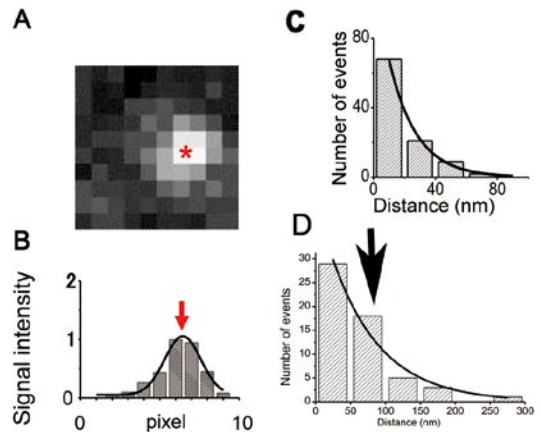


図2 図1の光学顕微鏡で記録されたコフィリン分子の画像の記録例を図 A に示す。蛍光画像は光の回折限界のために、実際の分子の大きさよりかはるかに大きくボケている。しかし、蛍光を発する分子はこの蛍光の広がりを中心に位置していることが分かっている(図 A の赤スター)、蛍光強度の分布をガウス分布で近似して分子の位置を推定する(図 B、赤矢印)。このデータでは画像取得 CCD のピクセルサイズは 85nm である(蛍光は 300nm 程度広がっている)。図 C はコントロール実験を示す。ガラス表面に固定した蛍光分子の位置測定を繰り返し行い測定誤差を推定した。大半の分子の位置は 18nm 以下の精度で測定が可能であった(空間時定数は 18nm、矢印)。図 D はアクチン線維に結合した2つのコフィリン分子の距離の分布である。ここから平均 65nm の空間距離で2つのコフィリン分子がアクチンに結合することが分かった。図 A の画像周辺の蛍光のまだらは背景雑音による。図は論文1を改変。

テージの場合には、5 分間に温度 1 度変化があった場合に観察される 1 秒毎の移動距離 (ドリフト) を計算すると 3 nm になってしまう (図 3)。細胞の中で働く比較的大きなタンパク質分子の大きさは nm 程度であるので、分子のコンフォメーション変化や構造の“ゆらぎ”のようなタンパク質分子にとっては重要な変化を分析しようとするときに上記のステージのドリフトは深刻な問題となる。一方で、資料の z 軸方向に対しても同様のドリフトが起きているが、イメージングの技術の革新により z 軸方向のドリフトについては、オートフォーカス機構によってある程度の解決が図られている。

我々は現状では未解決である x-y 方向でのドリフトを抑える工夫を行った。顕微鏡の対物レンズはそれ自身ではピントを合わせることができないが、図 3 に示すようにレボステージ (IX2-NPS:オリンパス光学工業株式会社)にセットすると、z 軸のみであるがピントの調節を行うことができるようになる。このレボステージにカバーガラス(24×50 mm:松浪硝子工業株式会社)を乗せることで、このカバーガラス上の標本を観察

することができる。今回の研究開発では、このカバーガラスにピエゾスピーカーをセットしてインパクトステージとして使用し、x-y および z 軸方向の可動ステージで装置のドリフトの分析を行った。

実験に当たり空間分解能を高めるために 100 倍開口数 1.65 (および 1.4) のレンズ (オリンパス社) を用いた。観察標本に直径 1 ミクロンのビーズあるいは Qdot (蛍光波長 655 nm) を用いた。CCD カメラ (浜松ホトニクス株式会社、CCD カメラの 1 pixel は 77 nm に対応) で 1 分間に 1 回のタイムラプス撮影を 61 回行った。その際、温度変化による試料ドリフトの影響を調べるために撮影開始時から撮影終了時まで、5 分ごとに顕微鏡付近の温度を測定した。

インパクトドライブステージの移動はピエゾスピーカー (圧電素子) に時間軸に非対称な信号 (ノコギリ波) を与えることで行った。インパクトステージでは標本を約 5 mm 程度移動すること

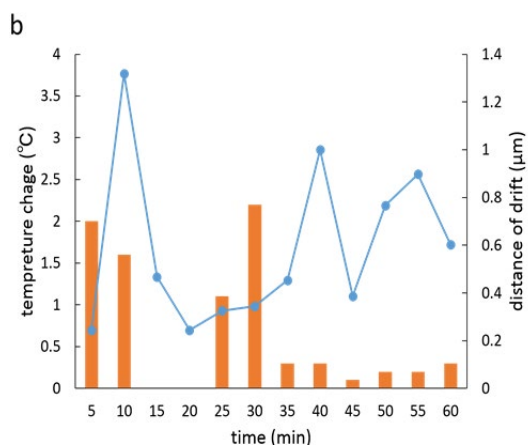


図3 通常ステージでの1 hの温度変化におけるx軸、y軸方向への移動距離から2点間の距離を示している。横軸は5 minごとの時間である。左の縦軸は温度変化であり、棒グラフに対応している。右の縦軸はx軸、y軸方向への移動距離からドリフトの距離であり、折れ線グラフに対応している。

ができた。ノコギリ波一ステップによるステージの移動の大きさは100 nm程度であった。

このような条件でステージのドリフトを測定すると図4に示すように、ドリフト量は著しく小さくすることができ、1度変化1秒あたり0.1 nm以下にすることができた。このような装置（ドリフトフリーステージ）の開発をすることで、超高解像イメージングを行う準備ができた。

2. 第2の課題

我々はアクチン線維に結合するコフィリン分子の位置を古典的な光学顕微鏡の空間分解能をはるかに超える分解能で観察するために超高解像度光学顕微鏡を開発し、この手法を用いてコフィリンの結合を分析してきた (PNAS, 2014)。ここではアクチン線維は赤い蛍光を発するローダミンで標識しておき、コフィリンは黄緑の蛍光分子で標識した (図1)。これら二つの色に対応する二種類の画像を低雑音高感度カメラで撮影する実験系を開発している (アクチン線維一本の蛍光画像は図1に示す)。

ここでの超高解像度光学顕微鏡は蛍光一分子画像の広がり (300 nm程度: 光の波長の約半分) の中心に蛍光分子が位置している原理に基づき、

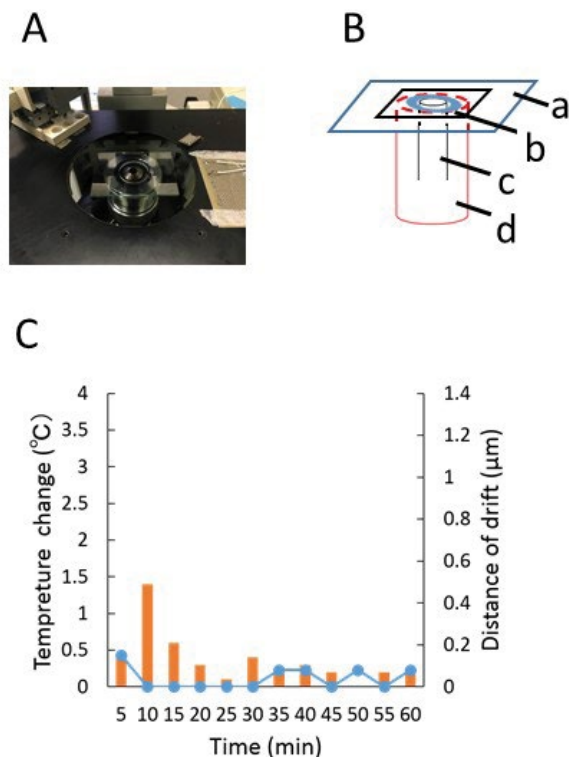


図4 ドリフトフリーステージの外観(A)とコンセプト図(B)およびドリフトフリーステージでの1 hの温度変化におけるx軸、y軸方向へのドリフト距離(C)を示している。(B)a(穴あきスライドガラス)、b(カバーガラス)、c(対物レンズ)、d(レボステージ)。図C、横軸は5 minごとの時間である。左の縦軸は温度変化であり、棒グラフに対応している。右の縦軸はx軸、y軸方向への移動距離からドリフトの距離であり、折れ線グラフに対応している。

画像処理によりその位置を推定して光学顕微鏡の解像度を著しく高める技術である (図2)。

アクチン線維の直径は約6 nmでありコフィリンは1 nm程度の大きさなので更に高い空間分解能で観察できるならばコフィリンの結合が折り重なって結合していく過程を詳細に解明することができると考えられる。

高い空間分解能を達成するには、分子が同じ場所にとどまっていること、蛍光分子からの光子数が十分であること、背景の雑音が少ないこと、分子の位置推定のアルゴリズムの改良などが必要である (Thompson, et al., Biophys J 2002)。

この課題の解決のために蛍光ローダミンに代わって蛍光量子ドット (QDOT) を用いる。蛍光量子ドットは通常の蛍光分子 (ローダミン) の数百倍あるいはそれ以上の光子の放出が期待され

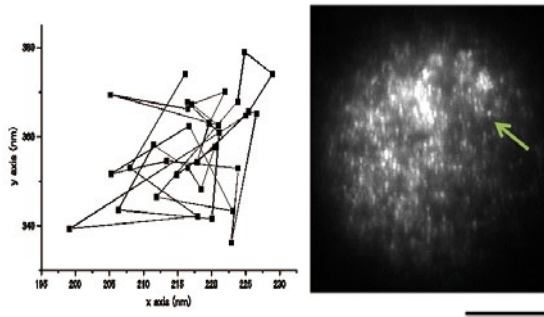


図5 ドリフトフリーステージに蛍光量子ドット(QDOT)をのせて、超解像イメージングを行って空間分解能を調べる。右の蛍光画像の矢印は測定した QDOT を示す。バーは $10\mu\text{m}$ 。グラフは 4.2 秒の間に観察された QDOT の位置推定の結果(測定は 150ms に一回)。この粒子は x 軸方向に 10nm 程度、y 軸方向に 15nm 程度の位置測定のゆらぎがある(この範囲に過半数の位置ゆらぎが入っている)。測定の時間分解能は 150ms である。

る。短い時間の蛍光励起光の照射でも十分な数の光子の放出と測定が期待される。光子数の平方根に依存して解像度は改善されるので 10 倍の光子数の場合には 3 倍の解像度の改善が見込まれる。

QDOT (蛍光波長 655nm) を図 1 の全反射型近接場照明で励起してその蛍光を観察した。その時の QDOT の位置変化を超解像観察した。観察を 150ms 間隔で行い QDOT からの蛍光の photon counts を記録したところ、QDOT 粒子の中心位置推定は 10nm 程度の精度で行うことができた。言い換えると QDOT を用いた超解像イメージングの空間分解度は 10nm 程度、その時の時間分解能は 150ms 程度であることが推定された。蛍光測定時間を長くした条件(言い換えると時間分解能を犠牲にした条件)では空間分解能がさらに上昇すると思われる。空間分解の位置精度は光の量の平方根に比例して改善するので 600ms の蛍光の蓄積を行うと上記の二倍程度の空間分解能 (5nm 程度) が出ると考えられる。また、その時のステージのドリフト量は 0.1nm 以下であると推定できるので測定時間の延長が超解像の性能を下げることがないと考えられる。このように分子の構造変化を研究するのに必要な超解像に到達しつつあることが分かった。

実験系の照明の明るさ、測定装置の温度や振動に起因する“ゆらぎ”の抑制などさらなる改善の余地は残されており、これらは今後の課題になると思われる。

3. 第3の実験

超解像像において、蛍光輝点の位置推定は測定画像に含まれる雑音に影響される。雑音レベルを下げることで位置推定の精度は飛躍的に高まることが数値解析で分かっている。我々は蛍光励起光で照射される標本体積を減少させることで雑音を減少できると考えて、実験体 (F バッファー液と蛍光タンパク質) を二枚のカバーガラスで挟むことで溶液の厚みを $1\mu\text{m}$ 程度に減少させた。カバーガラスは AFM の測定から数十 nm の振幅で緩やかに撓んでいる。そこで、カバーガラスのサイズを小さくして、この撓みの効果を抑えることができると思った。従来 (10mm 角) よりも小さい (5mm 角) のカバーガラスを用いて溶液を挟み込むことで溶液の体積減少を行うことができるかを試みた。その結果の画像は図 1 のインセットであるが背景雑音の減少の定量的な検討は今後に残されている。

4. 終わりに

我々は上記の技術を使ってアクチン線維一本に複数のコフィリン分子が結合してく過程を超高解像度光学顕微鏡を用いて観察する予定である。これまでの我々の研究から、長い時間のコフィリン分子のアクチン線維への結合はその近傍への別のコフィリン分子の結合の確率を数倍以上上昇させる。これら 2 つのコフィリン分子の結合は更なるコフィリン分子の結合を促すことが予想される。このような過程のもとでコフィリンのクラスターの形成が起きると考えられる。本研究で開発した超高解像度光学顕微鏡を用いることで上記の過程を世界に先駆けて観察分析できると考える。

このような基礎的な研究はコフィリンのクラ

スター形成の素過程を明らかにし、ひいては、アルツハイマー型痴呆症の脳神経細胞にみられるアクチン線維とコフィリンの集合体の形成メカニズムの理解にもつながっていくと考える

5. まとめ

生命現象を分子レベルでの相互作用から理解することは今後も重要性を増していくと思われる。タンパク質一分子のコンフォメーション変化を溶液中で観察する実験系が中心的役割を担っていくものであると確信している。近接場光や超高解像技術や画像分析技術が今後も発展していくことが求められるだろう。そのような研究のプラットフォームの一部を本研究で研究開発することができた。本研究開発の経験から装置のシンプルさ（図4概念図）が超解像を達成する秘訣であることが分かった。

謝辞

本研究は中谷医工計測技術振興財団の研究助成を受けて実施しました。感謝申し上げます。報告書の研究の一部は名古屋大学の早川公英先生、曾我部正博先生との共同研究に基づくものです。ドリフトデータは金沢工業大学の辰巳研究室の中浦皓太さん、青山真平さんとの共同研究の成果の一部です。謹んで感謝いたします。

参考文献

1)Hayakawa K, Sakakibara S, Sokabe M, Tatsumi H, 2014. Single-molecule imaging and kinetic analysis of cooperative cofilin-actin filament interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 9810-5.

2)Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M, 2011. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *J Cell Biol* **195**, 721-7.

3)Thompson RE, Larson DR, Webb WW, 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J* **82**, 2775-83.

超分子ヒドロゲルを支持体とした電気泳動による巨大 DNA 分離方法の開発



研究責任者 静岡大学 大学院理学領域
化学コース
准教授 山中 正道

1. はじめに

電気泳動は、生命科学の研究において日常的に行われる基盤的実験手法である。タンパク質電気泳動に関する研究は、19世紀中より散見されるが、1937年にティセリウスにより血清タンパク質の電気泳動法が発表されて以降、飛躍的な発展を遂げてきた。ティセリウスの開発した電気泳動法は、水溶液を用いる無担体電気泳動であったが、1950年代になると濾紙やゲルを支持体としたゾーン電気泳動法が開発された。現在のタンパク質電気泳動では、アクリルアミドと N,N' -メチレンビスアクリルアミド（ビス）の共重合により形成するポリアクリルアミドゲルを支持体とする方法が一般的である。特に、ポリアクリルアミドゲルを支持体とし、陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム（SDS）存在下、変性させたタンパク質試料を電気泳動する手法（SDS-PAGE）は、最も汎用なタンパク質の分析技術である。ポリアクリルアミドゲルは、1959年に初めてタンパク質電気泳動の担体として適用されて以降、半世紀以上に渡り中心的な役割を果たし続けている。アフィニティー電気泳動や二次元電気泳動など、新しい電気泳動技術は活発に開発がなされる一方で、電気泳動用の新規な支持体となるゲルの開発に関しては、ほとんど目にすることはなかつ

た。しかし我々は、電気泳動技術の不連続的な発展のためには、新規なゲル支持体の開発が不可欠であると考え、電気泳動の新規な支持体として用いることのできる新規なゲル材料の開発を行うこととした。

2. 超分子ゲル

ゲルといえば、ポリマーから構成されるものが一般的であるが、低分子量の有機化合物の中にも、自己集合によりゲル（超分子ゲル）を形成するものがある。この中でも特に水をゲル化する化合物を低分子ヒドロゲル化剤とよび、生成するゲルを超分子ヒドロゲルとよぶ^{1,2)}。超分子ヒドロゲルは、疎水性相互作用などの弱い相互作用を駆動力に形成することから、高い刺激応答性を有し機能性材料としての応用が活発に行われている。中でも、細胞培養やタンパク質貯蔵といった生命科学分野における応用展開が活発になされている。ところが、著者らが超分子ヒドロゲルを支持体としたタンパク質電気泳動法の開発に着手した2009年当時、類似した先行研究は全く存在しなかった。しかし、超分子ヒドロゲルの高い刺激応答性は、ポリアクリルアミドゲルを支持体とした電気泳動でしばしば問題となる、タンパク質試料の効率的な回収を可能にし、さらには新規な支持体を用

いることによる新規な分離様式の発現も期待できる。そこで、超分子ゲルを支持体とした電気泳動法（SUGE：SUpramolecular Gel Electrophoresis）の開発に着手することとした。

3. 超分子ゲルを支持体としたタンパク質試料の電気泳動

まず、SDS-PAGEの代替となる変性タンパク質の電気泳動（SDS-SUGE）を検討した。電気泳動の担体には、SDSなどのイオン性界面活性剤によりゲル形成が誘導される両親媒性トリスウレア化合物を用いることとした³⁾。この超分子ヒドロゲルを支持体とした変性タンパク質試料の電気泳動では、電気泳動後の超分子ヒドロゲルに緩衝液を加え遠心分離するという単純な操作で、タンパク質試料を効率よく回収することが可能となった。同様な抽出操作を、ポリアクリルアミドゲルに適用したところ、タンパク質試料はほとんど回収されなかった。さらには、既存のSDS-PAGEでは見られない特徴的な分離様式に基づくタンパク質試料の分離が観測された。SDS-PAGEでは、分子量の小さなタンパク質ほど電気泳動での移動距離が長くなるが、SDS-SUGEでは、分子量45 kDaを境に、分子量の小さなタンパク質ほど移動距離が短くなることを見出した⁴⁾。さらに、分離様式が変化する分子量は、超分子ヒドロゲルを調整する際の緩衝液中のSDS濃度により、制御できることも明らかにした⁵⁾。

SDS-SUGEの検討において、電気泳動後にタンパク質試料が効率的に回収できた。しかし、SDS-SUGE後に回収されるタンパク質は、変性したタンパク質である。そこで、SUGEの特性をより活用すべく、未変性のタンパク質試料の電気泳動（Native-SUGE）を検討することとした。SDS-SUGEに用いた両親媒性トリスウレア化合物は、未変性タンパク質の電気泳動（Native-PAGE）に用いられる緩衝液をゲル化しないため、まず新規低分子ヒドロゲル化剤を開発

した。これまでの知見より、低分子ヒドロゲル化剤を設計する際、疎水性と親水性のバランスが重要であることが明らかとなっていた^{3), 6)}。こうした知見に基づき、両親媒性トリスウレア化合物(1)を設計、合成した(図1)。両親媒性トリスウレア化合物(1)は、期待した以上に高いゲル化能を示し、純水や種々の緩衝液はもとより、酸性水溶液(8 M 塩酸)、塩基性水溶液(7 M 水酸化カリウム水溶液)、高塩濃度水溶液(飽和食塩水)など多様な水溶液をゲル化した⁷⁾。

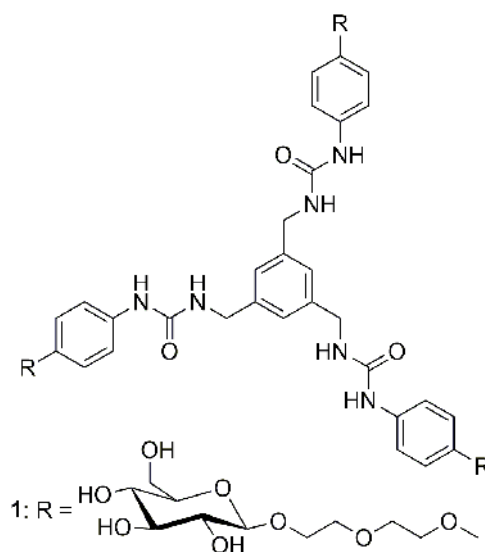


図1 両親媒性トリスウレア化合物(1)

両親媒性トリスウレア化合物(1)とトリス-グリシン緩衝液より形成する超分子ヒドロゲルを用い、酸性未変性タンパク質の電気泳動（Native-SUGE）を検討した。酸性未変性タンパク質試料としては、D-乳酸デヒドロゲナーゼ(146 kDa, pI = 4.0)、β-ガラクトシダーゼ(540 kDa, pI = 4.6)、オボアルブミン(45 kDa, pI = 4.7)を用いた。D-乳酸デヒドロゲナーゼとβ-ガラクトシダーゼの電気泳動においては、分子量および等電点の小さなD-乳酸デヒドロゲナーゼが、より陽極側に検出された。D-乳酸デヒドロゲナーゼとオボアルブミンの電気泳動では、分子量が大きく等電点の小さなD-乳酸デヒドロゲナーゼがより陽極側に検出された。β-ガラクトシダーゼとオボアルブ

ミンの電気泳動では、分子量が大きく等電点の小さな β -ガラクトシダーゼがより陽極側に検出された。以上の結果より、Native-SUGE において酸性未変性タンパク質試料は、分子量に影響される事無く、等電点により分離することが明らかとなった⁸⁾。また、緩衝液の pH を適切に選択することで、塩基性未変性タンパク質の Native-SUGE にも成功した⁹⁾。

4. DNA 電気泳動

DNA 電気泳動は、1966 年ゾーンにより報告されたアガロースゲルを用いたポリオーマウィルス DNA の電気泳動を端緒に、発展を遂げてきた。今日の DNA 電気泳動では、分離する DNA 断片のサイズに応じて、ゲル担体を使い分けるのが一般的である。500 塩基対 (bp: base pair) 以下と比較的サイズの小さな DNA 断片には、空孔サイズの小さなポリアクリルアミドゲルを担体として用いる。一方で、100 bp 以上の DNA 断片には、空孔サイズの大きなアガロースゲルを用いる。こうした DNA 電気泳動では、より小さな DNA 断片が陰極側から陽極側へと移動し、DNA 断片の分子サイズに応じた移動距離を示すことで分離が進行する。ところが、2 万塩基対 (20 kbp) を超える大きなサイズの DNA 断片においては、通常の電気泳動では移動距離に明確な差が生じにくくなり、分離が困難となる。こうした大きなサイズの DNA 断片の電気泳動による分離には、パルスフィールド電気泳動法を用いる必要がある。大きなサイズの DNA 断片の電気泳動は、微生物の染色体分析、感染症の疫学解析、巨大 DNA 断片のクローニングなどにおいて有用な実験技術である。しかし、パルスフィールド電気泳動は、専用の装置を必要とし、一般に長い分析時間を要する。Native-SUGE による酸性未変性タンパク質試料の電気泳動では、両親媒性トリスウレア化合物 (1) より形成する超分子ヒドロゲルの網目構造は粗く、用いたタンパク質試料の大きさでは、分子ふるい効果が十分機能しなかった。この結果

より、両親媒性トリスウレア化合物 (1) より形成する超分子ヒドロゲルでは、より大きな分子サイズの試料において、分子ふるい効果が発現すると考え、巨大 DNA 試料の電気泳動による分離を検討することとした (図 2)。

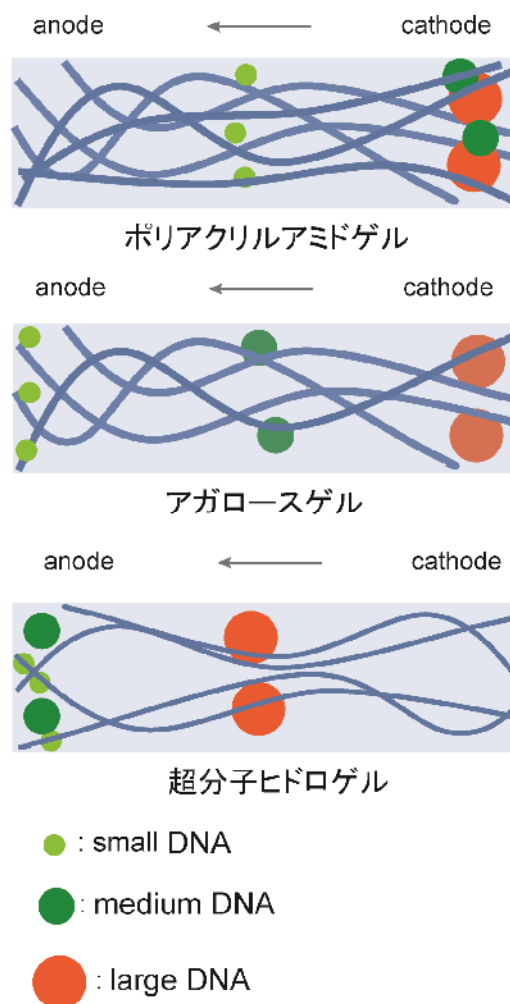


図2 巨大 DNA の超分子ヒドロゲル電気泳動

5. 超分子ゲルを支持体とした巨大 DNA 断片の電気泳動

両親媒性トリスウレア化合物 (1) は、DNA 電気泳動で広く用いられる、トリス-ホウ酸-EDTA 緩衝液をゲル化した。最少ゲル化濃度は、0.25 wt% と算出され、ゲル化剤濃度の上昇に伴い形成する超分子ヒドロゲルが白濁化した (図 3)。

この超分子ヒドロゲルを支持体とし、DNA 断片の電気泳動による分離を検討することとした。

種々の検討の結果、以下の実験手順を確立した(図4)。I. 両親媒性トリスウレア化合物(1)とトリス-ホウ酸-EDTA緩衝液を混合し、ホットプレート上で加熱する。直径2 mm長さ120 mmのガラス管で生じた溶液を吸い取る。室温にて一日静置した後、超分子ヒドロゲルの長さを80 mmに調整する。II. DNA試料をガラス管中の超分子ヒドロゲルの一端に吸着させる。ガラス管の両端をアガロースゲルで充填する。III. ガラス管をトリス-ホウ酸-EDTA緩衝液で満たされたサブマリン型電気泳動装置に沈める。25℃にて陰極側から陽極側へと電気泳動させる。IV. 電気泳動の後、超分子ヒドロゲルをガラス管から取り出し、8または20等分に分割する。陽極側から順に1~8(1~20)と番号付けする。V. 分割した超分子ヒドロゲルをそれぞれマイクロチューブに入れ、-20℃にて3時間冷却する。その後、それぞれのマイクロチューブに20 μL トリス-ホウ酸-EDTA緩衝液を加え、14,500 gにて10分間遠心分離する。VI. 上清を凍結乾燥した後、ローディングバッファ15 μLを加える。これら溶液を、アガロースHゲルを支持体とした電気泳動、続くエチジウムブロミドによる染色を行い、分離様式を解析する。

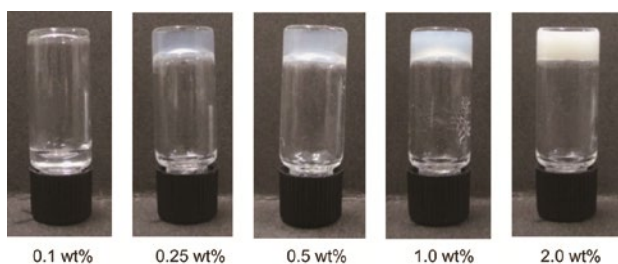


図3 超分子ヒドロゲル

今回、DNA-SUGEによる分離を検討する試料として、λ-Hind III digest、Lambda DNA-Mono Cut Mix、Marker 7 GTという三種類のDNAマーカーを用いることとした(図5)。λ-Hind III digestは六種類のDAN断片を含むマーカーで、それらのサイズは2.0、2.3、4.4、6.6、9.4、23.1 kbpである。Cut Mixは九種類のDAN断片を含

むマーカーで、それらのサイズは10.1、15.0、17.1、24.0、24.5、30.0、33.5、38.4、48.5 kbpである。Marker 7 GTは七種類のDAN断片を含むマーカーで、それらのサイズは10.1、17.7、21.1、23.5、41.8、50.3、165.7 kbpである。

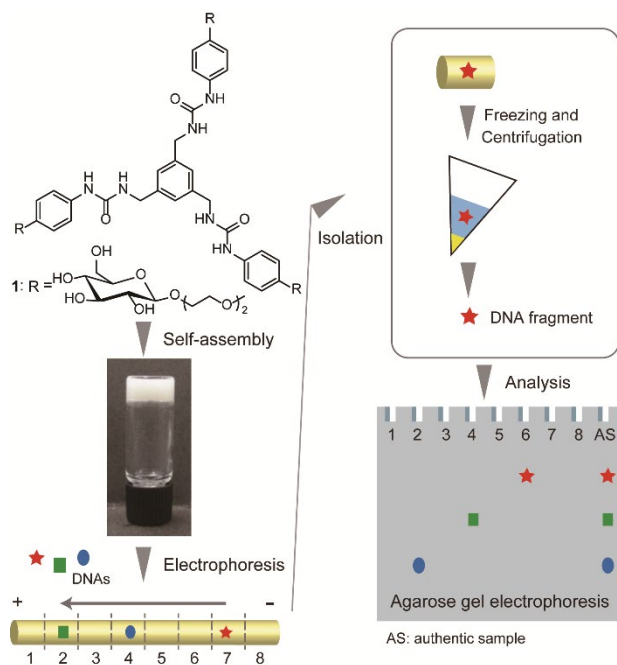


図4 DNA-SUGEの概略

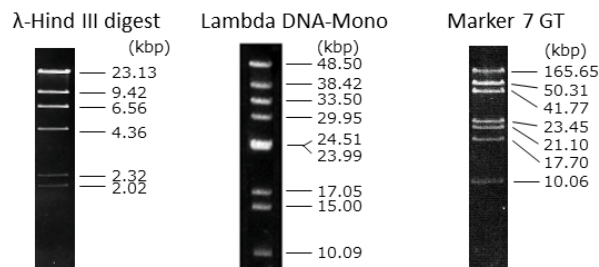


図5 DNA-SUGEに用いたDANマーカー

まず、DNA-SUGEによるλ-Hind III digestの分離を検討した。まず、2.0 wt%の超分子ヒドロゲルを支持体とし、150 Vで90分間電気泳動を行った。電気泳動前後で、超分子ヒドロゲルに顕著な収縮、膨潤、分散などの現象はみられず、ほぼその形状を保持していた(図6)。電気泳動後の超分子ヒドロゲルを8等分し、抽出操作を行った後に、アガロースHゲルを用いた電気泳動により、分離様式の解析を行った(図7)。DNA断

片の分離は、分子サイズに依存しており、小さな DNA 断片ほど陽極側に移動する傾向がみられた。もっとも小さな 2.0 kbp の DNA 断片は、最も陽極側の 2 レーンに検出された。2.3 kbp の DNA 断片は 3 レーンに、4.4 kbp の DNA 断片は 4 レーンに、6.6 kbp の DNA 断片は 5 レーンにそれぞれ検出された。9.4 kbp の DNA 断片と 23.1 kbp の DNA 断片は 6 レーンに検出された。この条件においては、9.4 kbp と 23.1 kbp の大きな DNA 断片の分離は達成されなかったが、2.0 kbp、2.3 kbp、4.4 kbp、6.6 kbp の DNA 断片が完全に分離できたことは特筆に値する。

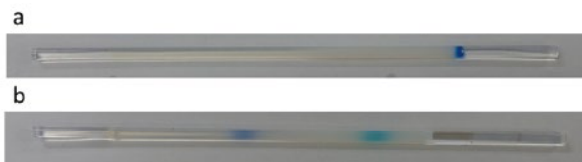


図6 DNA-SUGE 前後の超分子ヒドロゲル a) 電気泳動前、b) 電気泳動後

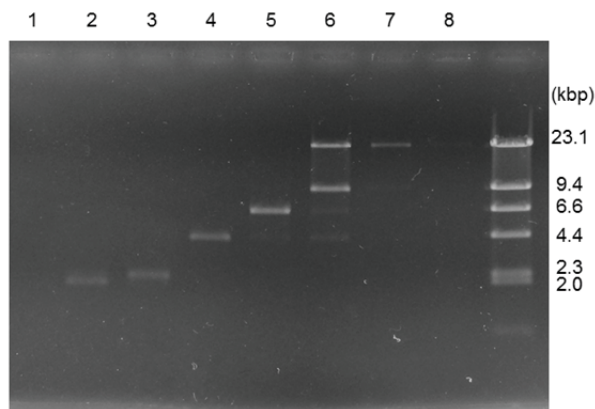


図7 λ -Hind III digest の DNA-SUGE (2.0 wt% of 1, 150 V, 90 min)

大きなサイズの DNA 断片の分離を目的に、電気泳動の条件を検討した。電圧を低めに設定し、泳動時間を延長することで、大きな DNA 断片の分離が効率的に進行すると考え、2.0 wt%の超分子ヒドロゲルを支持体とし、100 V で 150 分間電気泳動を行った。電気泳動後の超分子ヒドロゲルを 20 等分し、抽出操作を行った後に、アガロー

ス H ゲルを用いた電気泳動により、分離様式の解析を行った (図 8)。DNA 断片が分子サイズに依存して分離する傾向に変化はなかった。2.0 kbp の DNA 断片と 2.3 kbp の DNA 断片は 5~7 レーンに検出され、先の条件よりも明確な分離は達成されなかった。4.4 kbp の DNA 断片は 11 レーンに、6.6 kbp の DNA 断片は 13 レーンにそれぞれ検出された。9.4 kbp の DNA 断片は、14、15 レーンに検出され、14 レーンにより濃いバンドが観測された。23.1 kbp の DNA 断片は、15、16 レーンに観測された。電圧と電気泳動時間を調整することで、9.4 kbp と 23.1 kbp という、大きなサイズの DNA 断片の分離も達成することができた。

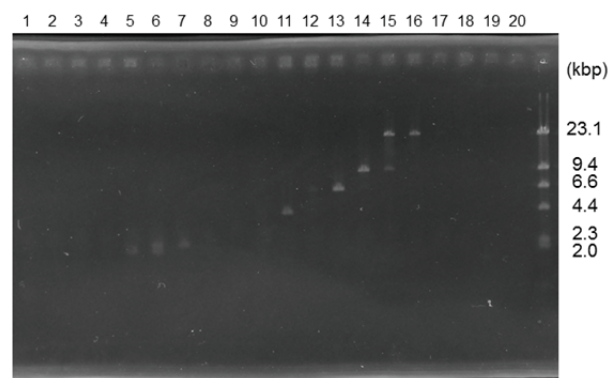


図8 λ -Hind III digest の DNA-SUGE(2.0 wt% of 1, 100 V, 150 min)

続いて、DNA-SUGE による Lambda DNA-Mono Cut Mix の分離を検討した。Lambda DNA-Mono Cut Mix には、 λ -Hind III digest よりも大きな DNA 断片を含んでおり、さらに含まれる DNA 断片の種類も多い。 λ -Hind III digest を分離した条件では、Lambda DNA-Mono Cut Mix の良好な分離は達成されなかった。適切な電気泳動の条件を探索する中で、低分子ヒドロゲル化剤の濃度を低減する方法を見出した。個々の DNA 断片の分解能に着目したとき、2.0 wt%の超分子ヒドロゲルを支持体とした方が良好であり、1.0 wt%の超分子ヒドロゲルを支持体とした場合には、バンドがブロード化する傾向がある。ところが、九種類の DAN 断片を含む Lambda

DNA-Mono Cut Mix では、分解能の高さゆえに十分な分離が観測できなかった。そこで、1.0 wt% の超分子ヒドロゲルを支持体とし、電圧、電気泳動時間の条件を検討した。また、特筆すべき事項として、Lambda DNA-Mono Cut Mix ほどのサイズの DNA マーカーになると、アガロース H ゲルを用いた通常の電気泳動では、明確な九種類の DNA 断片の分離は達成されない。

Lambda DNA-Mono Cut Mix を 50 V で 9 時間電気泳動を行った。電気泳動後の超分子ヒドロゲルを 8 等分し、抽出操作を行った後に、アガロース H ゲルを用いた電気泳動により、分離様式の解析を行った (図 9)。九種類の DNA 断片は、1 ~ 4 レーンに観測された。1 レーンには、10.1 kbp の DNA 断片のみが検出された。2 レーンには、15.0 kbp と 17.1 kbp の DNA 断片が検出された。3 レーンには、24.0 kbp と 24.5 kbp の DNA 断片が検出されていると思われる。3 レーンに検出された 24.0 kbp と 24.5 kbp の DNA 断片を含め、24.0 kbp から 48.5 kbp の DNA 断片は、4 レーンに検出された。

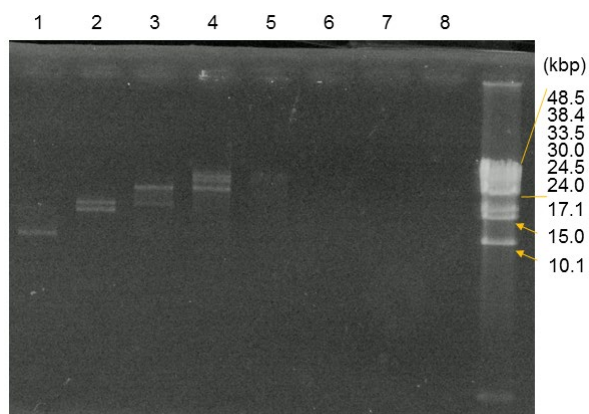


図 9 Lambda DNA-Mono Cut Mix の DNA-SUGE(1.0 wt% of 1, 50 V, 9 h)

電気泳動の条件を 50 V、6 時間とし、電気泳動後の超分子ヒドロゲルを 20 等分し、抽出操作を行った後に、アガロース H ゲルを用いた電気泳動により、分離様式の解析を行った (図 10)。その結果、高分子量の DNA 断片の分離がより明確に

観測することができた。10.1 kbp の DNA 断片は、主に 4 レーンに検出された。この条件では、15.0 kbp と 17.1 kbp の DNA 断片を分離することができた。15.0 kbp の DNA 断片は主に 7 レーンに、17.1 kbp の DNA 断片は主に 8 レーンに検出された。24.0 kbp から 48.5 kbp の六種類の DNA 断片は、10~13 レーンに検出された。アガロース H ゲルを用いた電気泳動ではこの領域の DNA 断片を明確に分離することができない。そのため、10 ~ 13 レーンのパンドが、それぞれ異なる DNA 断片を含んでおり、分離が進行していることは明らかであるが、その詳細を議論することは困難であった。しかしながら、20 kbp 以上の巨大な DNA 断片が、ごく一般的なサブマリン型電気泳動装置で分離できたことは明らかであり、巨大 DNA の電気泳動において、超分子ヒドロゲルが高い潜在性を有した支持体であることを示すことができた。

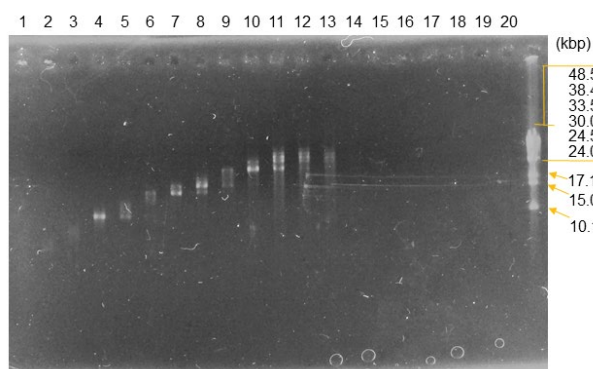


図 10 Lambda DNA-Mono Cut Mix の DNA-SUGE(1.0 wt% of 1, 50 V, 6 h)

DNA-SUGE による Marker 7 GT の分離を検討した。Marker 7 GT は、100 kbp を超える巨大な DNA 断片を含んでおり、パルスフィールドゲル電気泳動装置を用いず、一般的なサブマリン型電気泳動装置での分離は、挑戦的な課題である。まず、Lambda DNA-Mono Cut Mix の分離の際と同条件にて分離を試みた。すなわち、1.0 wt% の超分子ヒドロゲルを支持体とし、50 V で 9 時間電気泳動を行った。電気泳動後の超分子ヒドロゲ

ルを 20 等分し、抽出操作を行った後に、アガロース H ゲルを用いた電気泳動により、分離様式を解析した (図 11)。10.1 kbp の DNA 断片は、2 レーンにのみ検出された。17.7 kbp の DNA 断片は、4~7 レーンに検出された。5~7 レーンには、複数の DNA 断片が検出されているが、4 レーンは 17.7 kbp の DNA 断片のみ検出された。21.1 kbp の DNA 断片と 23.5 kbp の DNA 断片は 5~8 レーンに検出され、明確な移動度の差は観測されなかった。41.8 kbp の DNA 断片、50.3 kbp の DNA 断片、165.7 kbp の DNA 断片は 8~12 レーンに検出され、これらの DNA 断片についても、明確な移動度の差は観測されなかった。

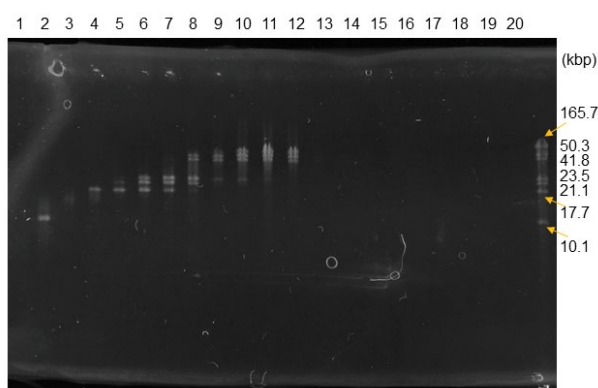


図11 Marker 7 GT の DNA-SUGE(1.0 wt% of 1, 50 V, 9 h)

先の電気泳動では、20 kbp 以上の DNA 断片のブロード化が顕著であった。これは、低分子ヒドロゲル化剤の濃度を上昇させることで改善が可能であると考えた。そこで、2.0 wt%の超分子ヒドロゲルを支持体とし、40 V で 9 時間電気泳動を行った。電気泳動後の超分子ヒドロゲルを 20 等分し、抽出操作を行った後に、アガロース H ゲルを用いた電気泳動により、分離様式を解析した (図 12)。1.0 wt%の超分子ヒドロゲルを支持体とした電気泳動と比較し、2.0 wt%の超分子ヒドロゲルを支持体とした電気泳動では、分解能が向上し、ブロード化を抑えることができた。10.1 から 165.7 kbp の七種類の DNA 断片は、9~15 レーンに検出された。10.1 kbp の DNA 断片は、9 レ

ーンにのみ検出された。17.7 kbp の DNA 断片は、主に 11 レーンに検出された。21.1 kbp の DNA 断片と 23.5 kbp の DNA 断片は、主に 12 レーンに検出された。41.8 kbp の DNA 断片、50.3 kbp の DNA 断片、165.7 kbp の DNA 断片は 13~15 レーンに検出された。この三つのレーンのバンドを詳細に解析すると、以下のことが明らかとなった。13 レーンには、一番分子量の小さい領域のバンドのみが観測されており、41.8 kbp の DNA 断片のみが検出されていると考えられる。14 レーンには、13 レーンに見られたバンドに加え、やや分離量の大きなバンドが検出された。これより、14 レーンには、41.8 kbp の DNA 断片と 50.3 kbp の DNA 断片が含まれていると思われる。15 レーンは、41.8 kbp の DNA 断片と思われるバンドはほとんど見られず、それよりも分子量の大きな DNA 断片のバンドが検出されている。すなわち、15 レーンには主に、50.3 kbp の DNA 断片と 165.7 kbp の DNA 断片が含まれていると思われる。この結果は、41.8 kbp の DNA 断片、50.3 kbp の DNA 断片、165.7 kbp の DNA 断片が、それぞれ異なる移動度をもって電気泳動されていることを意味している。通常このサイズの巨大 DNA 断片は、パルスフィールド電気泳動法以外では分離困難であり、ごく一般的なサブマリン型電気泳動装置のみで分離ができたことは、特筆すべき成果といえる。

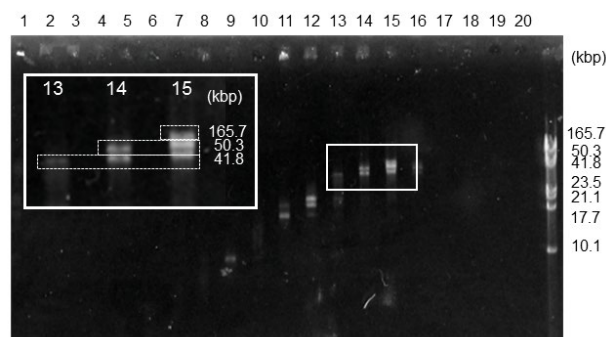


図12 Marker 7 GT の DNA-SUGE(2.0 wt% of 1, 40 V, 9 h)

6. まとめ

本研究では、超分子ヒドロゲルを支持体とした DNA 試料の電気泳動を検討した。超分子ヒドロゲルを支持体とする電気泳動法は、我々が独自に開発した技術であり、電気泳動技術の新機軸として発展する可能性を秘めている。これまで、変性タンパク質、未変性タンパク質の電気泳動を達成してきた。変性タンパク質の電気泳動では、ポリアクリルアミドゲルでは見られないユニークな分離様式が発現することを見出した。未変性タンパク質の電気泳動では、分子量に依存せず等電点により分離すること、糖認識タンパク質のアフィニティー電気泳動が可能であることを見出した。今回我々は、超分子ヒドロゲルを支持体とした DNA 試料の電気泳動を検討した。タンパク質電気泳動の検討結果より、超分子ヒドロゲルは一般には困難な巨大 DNA 断片の分離に適した支持体であると考えた。 λ -Hind III digest、Lambda DNA-Mono Cut Mix、Marker 7 GT という三種類の DNA マーカーを用い、2.0~165.7 kbp の DNA 断片の分離を検討した。その結果、2.0~23.1 kbp の DNA 断片を含む λ -Hind III digest を用いた電気泳動では、優れた分離を達成できた。10.1~48.5 kbp の DNA 断片を含む Lambda DNA-Mono Cut Mix を用いた電気泳動では、20 kbp を超えるサイズの DNA 断片であっても、分離が進行することを明らかにした。さらに 10.1~165.7 kbp の DNA 断片を含む Marker 7 GT を用いた電気泳動では、100 kbp を超える巨大 DNA 断片であっても、分離が進行することを見出した。今回開発した DNA-SUGE は、パルスフィールドゲル電気泳動に代わる新技術としての可能性を秘めている。しかし一方で、分解能の向上、支持体である超分子ヒドロゲルの安定性の向上、直接的検出方法の開発など、克服すべき課題も多い。今後更なる検討を継続し、超分子ヒドロゲルを支持体とする DNA またはタンパク質試料の電気泳動法が、生命科学研究の一般的ツールとして使用できるよう技術の成熟に努めてゆきたい。

謝辞

本研究は中谷医工計測技術振興財団の平成 27 年度技術開発研究助成のもと行われました。ここに深く感謝の意を表します。また、研究を力強く進めてくれた共同研究者である学生諸子に心より感謝いたします。

参考文献

- 1) M. Yamanaka, *Urea derivatives as low-molecular-weight gelators*. J. Inclusion Phenom. Macrocy. Chem., 2013, 77 (1-4), 33-48.
- 2) M. Yamanaka, *Development of C₃-symmetric tris-urea low-molecular-weight gelators*. Chem. Rec., 2016, 16 (2), 768-782.
- 3) Y. Jinno, M. Yamanaka, *Ionic surfactants induce amphiphilic tris-urea hydrogel formation*. Chem. Asian J., 2012, 7 (8), 1768-1771.
- 4) S. Yamamichi, et al., *Separation of proteins using supramolecular gel electrophoresis*. Chem. Commun., 2011, 47 (37), 10344-10346.
- 5) S. Tazawa, K. Kobayashi, M. Yamanaka, *Effect of sodium dodecyl sulfate concentration on supramolecular gel electrophoresis*. ChemNanoMat, 2016, 2 (5), 423-425.
- 6) M. Yamanaka, N. Haraya, S. Yamamichi, *Chemical stimuli-responsive supramolecular hydrogel from amphiphilic tris-urea*. Chem. Asian J., 2011, 6 (4), 1022-1025.
- 7) D. Higashi, M. Yoshida, M. Yamanaka, *Thixotropic hydrogel formation in various*

aqueous solutions through self-assembly of an amphiphilic tris-urea. Chem. Asian J., 2013, 8 (11), 2584–2587.

- 8) K. Munenobu, T. Hase, T. Oyoshi, M. Yamanaka, *Supramolecular gel electrophoresis of acidic native proteins.* Anal. Chem., 2014, 86 (19), 9924–9929.
- 9) K. Kobayashi, T. Hase, M. Yamanaka, *Supramolecular gel electrophoresis of basic native proteins.* Manuscript in preparation.
- 10) S. Tazawa, K. Kobayashi, T. Oyoshi, M. Yamanaka, *Supramolecular gel electrophoresis of large DNA fragments.* Submitted.

血管壁損傷部位への動脈血流下における血小板細胞接着力の革新的計測技術の開発研究



研究責任者 東海大学 医学部 内科学系・循環器内科学 教授
東海大学大学院医学研究科 代謝疾患研究センター センター長
後藤 信哉

1. はじめに

本邦の死因の第2位の心疾患、第4位の脳血管疾患は、心筋梗塞、脳梗塞などの動脈硬化・血栓性を含む。これらの疾患は働き盛りの世代に突然発症して死亡、長期に渡る Quality of Life の障害を惹起する¹⁾。心臓、脳などの重要臓器を灌流する直径数mmの血管を閉塞する血栓を病理組織学的に研究すると閉塞血栓の主成分は、血小板細胞、フィブリン、炎症性細胞である²⁾。血小板細胞の直径2-5 μm とサイズが小さいが、閉塞血栓形成には血管壁損傷部位に集積、活性化して閉塞血栓形成への主体的役割を演じる³⁾。

動脈硬化・血栓性疾患は、心臓、脳などの重要臓器を灌流する冠動脈、脳血管などの動脈硬化巣の破綻、血管内皮細胞の機能障害が発症の契機となる。血小板細胞の活性化を阻害する抗血小板薬、凝固系を阻害する抗凝固薬はいずれも心筋梗塞、脳梗塞の発症予防効果が臨床的に証明されている。動脈を閉塞する病的血栓と、怪我などにより血管が損傷された時の止血システムには基本的に差異がない。抗凝固、抗血小板薬は血栓イベントを予防できるが、効果に応じて重篤な出血合併症増加という副作用を避けられない¹⁾。病的血栓の形成における血小板細胞の働きを選択的に阻害できれば、出血リスク増加を伴わない抗血小板

薬の創薬を期待できる。しかし、病的血栓と止血血栓の形成メカニズムには重複が多く、両者の本質的な差異を見出すことは困難であった。

本研究では、冠動脈、脳血管などの動脈壁損傷部位に接着した血小板細胞が受ける流体力に注目する。血小板細胞の接着、活性化現象と血流の関係は過去におても定性的に研究されてきた。動脈系における速い血流により惹起される高いずり速度の条件では von Willebrand 因子 (VWF) と血小板膜糖蛋白 GPIbα の相互作用が血栓形成において主体的役割を果たすことが示された⁴⁾。血管内では大きく重い赤血球は血流の中心を流れ、血小板は血管壁近傍を流れる。赤血球の作り出すゆらぎにより、血小板細胞には常に血管壁方向に向うベクトルがある。

血管壁の器質的、機能的損傷部位では VWF が血流に曝露される。血小板細胞膜上には約1万5千分子の GPIbα が発現している。細胞活性化とともに構造と機能が変化する GPIIb/IIIa と異なり GPIbα 分子は VWF と接着可能な構造にて血小板細胞表面に発現している。血管に曝露された VWF を認識して速やかに血小板細胞は接着する。VWF を介する血小板細胞の血管壁損傷部位への初期接着は受動的物理現象と理解される。

本研究では、血管壁損傷部位への血小板細胞接

着の力学的定量理解を目指す。血管壁に接着した血小板細胞は動脈血流による流体力を受ける。流体力を受けた血小板細胞は受動的に変形する。変形と流体力の関係の定量理解を目指す。細胞が受ける流体力は、細胞接着を支える GPIIb/IIIa と VWF の分子間接着力に還元される。従来の X 線構造解析では静的条件における蛋白質構造解析のみが可能であった。外力による GPIIb/IIIa と VWF の接着構造変化のコンピューターシミュレーションによる予測計算を目指す。外力下にて選択的に出現する GPIIb/IIIa と VWF の接着構造を明らかにできれば、過去の X 線構造解析では予測できなかった革新的創薬標的を設定可能となる。動脈血流下の血小板細胞の血管壁の VWF への接着のみを選択的に阻害する薬剤を開発できれば、出血合併症を惹起しない抗血小板薬の開発も期待できる。

トロンビン、ADP などの化学物質により刺激されたときの血小板細胞活性化メカニズムについては多くの知識の集積がある。それらの刺激物質と血小板細胞の相互作用を標的とした抗血小板薬も開発されている。VWF に接着し、動脈血流による流体力を受けた血小板細胞は力学刺激により活性化する可能性がある。しかし、血小板細胞におけるメカノバイオロジーの理解は不十分である。制御された流体条件における血小板細胞の接着に関する実証実験、血小板細胞を構成する分子と血管壁破綻部位の分子の相互作用のシミュレーション計算、両者の連成により流体に抗して血管壁に接着する血小板細胞の接着力を計測し、「力」を指標としてマイクロメートルスケールの細胞現象とナノメートルスケールの生体構成分子、オングストロームスケールの原子の運動の統合的理解を目指す。

2. 流体下の VWF への血小板細胞接着形態計測とそのモデル化

健康ボランティアからヒト血液を採取した。実験中の血液の流動性維持のため、選択的トロンビン阻害薬アルガトロバンにより抗凝固処理した。

FITC にて蛍光標識したヒト血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa に対する特異的モノクローン抗体を個別血小板形態描出に用いた。GPIIb/IIIa は血小板細胞上に一様に分布しているため、GPIIb/IIIa の蛍光標識により偽足を含めた血小板細胞の形態描出が可能であることを確認済みである。血小板細胞の生物学的活性化を阻害するためにプロスタグランジン E1 を用いた。

ガラス板に純化精製したヒト VWF を固相化した。方法は既に確立している⁵⁾。平行平板 flow chamber を用いて VWF 上に 150 s^{-1} から $9,000 \text{ s}^{-1}$ の壁ずり速度にて血液を灌流した。高速共焦点顕微鏡とピエゾモーターを用いたイメージング装置により、VWF に接着する血小板細胞の形態を動的に 3 次元イメージングした。

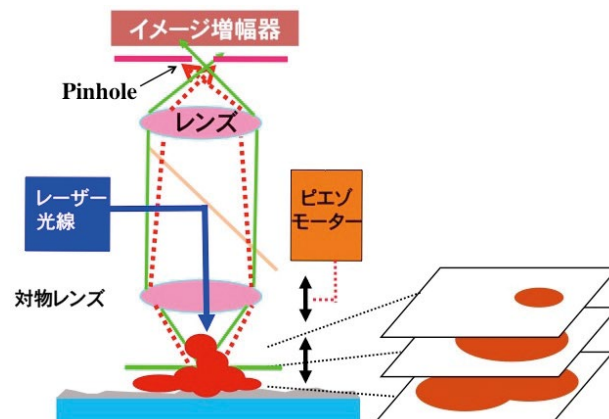


図1 流体下 VWF 上の血小板細胞接着動態の動的 3 次元イメージングを可能とする装置

図 1 に示した動的 3 次元イメージング法により VWF 面への血小板細胞接着動態を描出した。動画イメージングでは図 2 右のモデルに示すように、血小板細胞の一部にて接着した血小板が偽足を作るように変形し、図 2 右 2 の状態を経て、図 2 右 3 のように安定することを確認した。壁ずり速度 150 s^{-1} から $9,000 \text{ s}^{-1}$ の条件にて実験を行い、安定結合した血小板細胞の接着構造を図 2 左に示す。壁ずり速度が高い条件において偽足長が長い傾向であった。壁ずり速度と偽足長の間には定量的に正の相関関係を認めた。

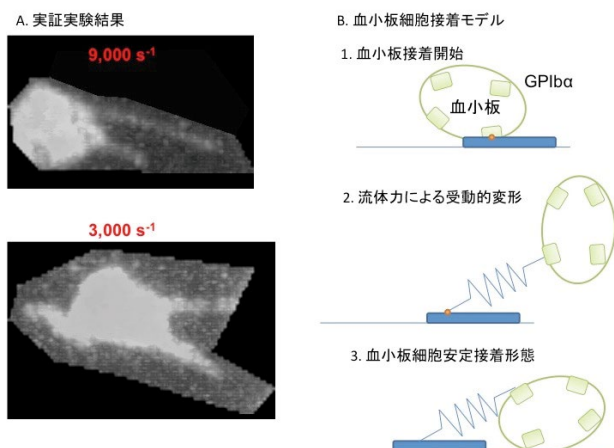


図2 VWFに安定接着した血小板細胞の3次元形態(A)と安定結合に至る接着モデル(B)

3. 単一 VWF 分子と単一 GPIIb α 分子の間の接着力の *in silico* 予測

動脈血流条件における血小板細胞の血管壁への接着には血小板細胞活性化の有無にかかわらず GPIIb α と VWF の結合が必須の役割を演じる[4]。公表されている VWF と GPIIb α の結晶構造解析から、両分子の結合部位を形成する VWF の A1 ドメインと GPIIb α の N 末端部位を両分子の結合に寄与する主要部位として選定した。周囲の水分子を含めた 172,934 原子を対象に分子動力学計算を施行した。大規模並列化計算には研究室内の 8 ノードコンピューターラックおよび東京大学の FX-10、理化学研究所の HOKUSAI、「京」を用いた。

分子動力学計算に用いる力場として CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics)力場を用いた。ヒトの目で認識できる物体の運動はニュートンの運動方程式(力 F =質量 M x 加速度 A)に従う。超微細な原子の運動には不確定を基本とする量子力学の寄与が必須である。しかし、量子力学の基礎方程式であるシュレディンガー方程式は多体問題としては解を得ることができない。そこで CHARMM 力場では図3に示すように炭素と酸素、炭素同士など化学結合している原子間の結合を簡易化した量子力学にて表現した。これらの化

学結合は予め伸縮、回転などが可能なバネとして表現されている。化学結合していない原子間の物理的相互作用を古典力学により解く。

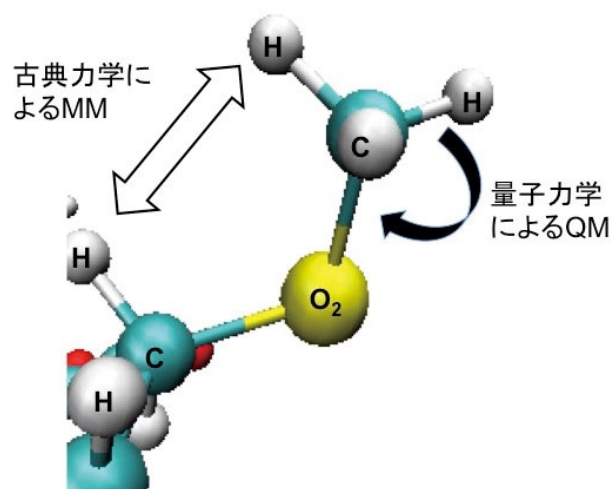


図3 古典力学と量子力学を連成するCHARMM力場の概念

GPIIb α と VWF の wild-type には安定な結合構造が見出されていない。そこで、解離速度の遅い 1 アミノ酸変異体を用いた結晶構造を初期構造とした。全ての原子の物理的相互作用を 10⁻¹⁵ 秒毎に解いた。分子動力学計算ソフトとして NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics)を用いた。絶対温度 310 度(摂氏 37 度)の条件では GPIIb α , VWF を構成する原子の位置は揺らいでいた。各原子の相対的位置の揺らぎを RMSD (root mean square deviation)にて定量計測した。200 ピコ秒以上の計算が進むと構造の揺らぎは RMSD 2Å 以内におさまった。GPIIb α と VWF の結合構造予測に CHARMM 力場を使用しても、計算上構造は収束することを確認した。

GPIIb α と VWF の結合解離動態の構成論的理解のために両分子の重心間距離を 0.5Å ごとに引き離して構造予測計算を行い、さらに各構造の有するエネルギー (Potential of Mean Force: PFM) を算出した。重心間距離と PFM の関係を Morse Fitting したのち、距離にて微分した。GPIIb α と VWF の結合力を 62.3 pN と予測した。

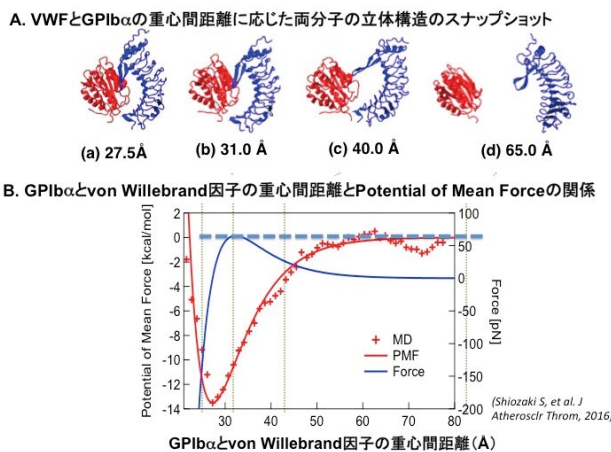


図4 CHARMM 力場を用いた GPIb α の N 末端部分と VWF の A1 ドメインの結合構造およびエネルギー(PFM)の予測計算

4. 動脈血流下による流体力を受けた血小板細胞に選択的に出現する GPIb α と VWF の結合構造を標的とした革新的創薬研究

VWF 上への血液灌流により単位時間当たりの血小板細胞接着数が最大となる条件は $1,500 \text{ s}^{-1}$ – $3,000 \text{ s}^{-1}$ であった。この条件にて直径 $2\text{--}5 \mu\text{m}$ の血小板細胞が動脈血流から受ける流体力は $100\text{--}200 \text{ pN}$ である。すなわち、血小板細胞上に約 1 万 5 千分子の GPIb α が発現しているも、実際の血小板細胞接着に寄与する分子は数分子に過ぎない。図 2 に示した血小板細胞の接着構造とモデルにて、偽足および血小板本体の GPIb α 分子が各 1-2 分子 VWF 分子との結合に寄与すれば血小板細胞は動脈血流に抗して血管壁損傷部位に接着可能である。

図 2 のモデルのように血小板細胞が VWF 上に接着したときに GPIb α と VWF の結合構造は図 4 の重心間距離 40Å のような形状をとる可能性がある。図 4 の条件は GPIb α 、VWF の重心が離れた場合であり、実際の動脈血流では GPIb α の血小板付着部位、VWF の血管壁結合部位に力が作用している可能性を否定できない。しかし、図 4 上に示したように分子の形態が外力により変化するのであれば図 4 の 40Å において、最後まで接着し続ける GPIb α と VWF アミノ酸として VWF の

GLY567、TYR600、ILE605 などが重要と想定される。これらのアミノ酸を含むアミノ酸配列を標的とすれば、血流条件下での血小板細胞の接着のみを選択的に阻害する革新的創薬が期待できる。

5. 研究の限界と今後の発展

VWF に接着する血小板細胞の形態を動的 3 次元イメージングすることにより、流体力を受ける血小板細胞の接着構造を明らかにした。安定した接着構造を図に示すことは可能であるが、動的 3 次元構造の図示は困難であった。そのため、図 2 右のようにモデル化した。血小板細胞が受ける流体力と接着蛋白の生み出す結合力の関係を定量化するためにバネモデルとした。バネは本来伸縮可能である。しかし、図 2 右のバネモデルと異なり、実証的実験では進展した偽足が縮むプロセスは確認できていない。われわれが作成したモデルは細胞スケールの力学現象と分子スケールの力学現象を連成するためには役立った。しかし、バネモデルは生命現象を再現するモデルとして十分ではない。非可塑性変形など高度のモデルの作成が今後の検討課題である。

GPIb α と VWF の接着力予測計算には CHARMM 力場を用いた。CHARMM 力場では多体問題として解くことのできないシュレディンガー方程式を用いた量子力学計算を、化学結合した原子間結合の結合、進展、回転などのバネとして簡易化して表現している。金属イオンの存在などにより分子軌道が変化する原子間結合があれば、CHARMM 力場の応用は困難である。GPIb α は血小板細胞活性化などにより影響を受けない強固な構造を持つ。分子内の金属イオンの存在は GPIb α /VWF 結合部位内では知られていない。CHARMM 力場を用いた計算により GPIb α /VWF 結合構造の揺らぎは RMSD として 2Å 以内に収束した。また、重心間距離と PFM の関係を微分して取得した 67.3 pN の結合力は原子間力顕微鏡による実測値 $54/107 \text{ pN}$ に近かった⁶⁾。CHARMM 力場は量子力学を簡易化している部分に理論的

不正確性がある。その不正確性を理解して施行した計算の結果が、原子間力顕微鏡による計測値、流体条件下の血小板細胞の受ける流体力に抗する接着分子の受ける外力予測に近かった。結果として *in silico* 予測計算には妥当性があるというのが本研究の論理である。今後、シュレディンガー方程式を多体問題として解くことが可能となり、量子力学的に精緻に GPIb α /VWF の結合構造が解明される日が来れば、われわれの研究成果の妥当性が理論的に確認されることになる。

CHARMM 力場を用いた研究であっても GPIb α /VWF の結合構造計算には膨大な計算資源を要した。本研究では GPIb α の VWF 結合部位と VWF の A1 ドメインの重心間が離れるモデルを用いた。しかし、血小板細胞が VWF に接着するときには、GPIb α と血小板細胞の結合部位と VWF の血管壁結合部位に、血小板細胞を支える流体力が作用している可能性がある (図 5)。本研究に基づいた創薬標的は、本研究における仮定が正しい場合のみ妥当となる。血小板細胞が高速にて血管壁に衝突するとき作用する外力は図 5 のようになる可能性もある。いずれのモデルがいずれの条件において妥当であるかを検討することが今後の検討課題である。

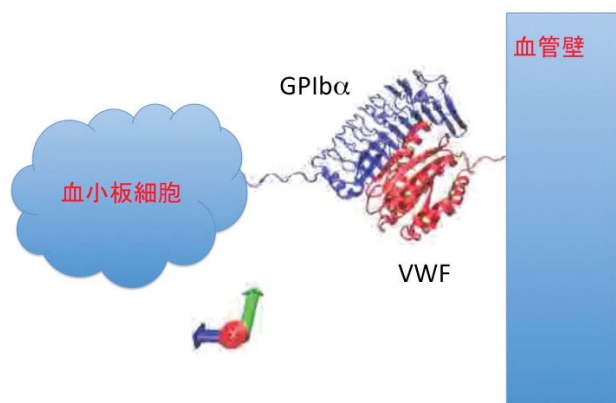


図5 VWF に接着した血小板細胞が受ける流体力を GPIb α の血小板結合部位と VWF の血管壁接着部位に作用する力に還元するモデル

予備的検討ではあるが図 5 のモデルであっても 100 pN 程度の外力により GPIb α と VWF の解

離が起こることを確認した。原子間力顕微鏡による計測結果⁶⁾は図 5 のモデルであっても妥当である。また、図 2 右の血小板細胞接着モデルにおける細胞接着力が数分子対の GPIb α /VWF 結合により担われるとの本研究の結論も、図 5 のモデルに生物学的妥当性がある場合にも大きく影響を受けることはない。

GPIb α の血小板細胞上の局在の不均一性に注目して図 6 の接着モデルを提案していた。過去のモデルにより、実証実験において観察される VWF に接着しながら回転する血小板細胞の動態などを説明できた。しかし、実際には 1 万 5 千分子存在する GPIb α を 5 つに凝縮させるモデルには定量性がなかった。

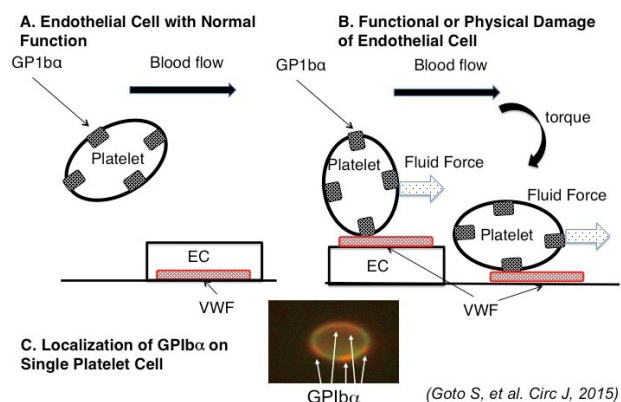


図6 過去に提案した血小板細胞接着モデル

本研究では実証的生物学的研究とコンピューターシミュレーションの連成により直径 2-5 μm の血小板細胞の接着機構をナノメートルスケールの GPIb α 、VWF 分子の接着動態から構成論的に理解することを可能とした。ナノメートルスケールの分子の動態予測はオングストロームスケールの原子の運動から構成論的に予測した。これらの研究は大規模並列化計算を可能とするスーパーコンピューターの出現によって可能となった。複雑な生命現象であっても生体を構成する物質の相互作用により担われる。物質の相互作用は物理、化学の諸原則に従う。スーパーコンピューターと情報工学の進歩は生命現象の構成論的理解を可能とした。本格的な医工連携の時代が到来した。

6. まとめ

血管壁損傷部位において血流に von Willebrand 因子 (VWF) が曝露されたときに受動的物理現象として起こる血小板細胞の接着動態を生物学的に精緻に観察した。血小板細胞の接着時には生物学的活性化とは無関係に血小板細胞が受動的に形態変化して偽足を形成することを示した。観察結果に基づいて、偽足による血小板細胞接着モデルを作成した。壁ずり速度を変化させて偽足長を計測し、偽足長と壁ずり速度の間の定量的相関関係を示した。

偽足の先端に存在すると想定される GPIIb α と血管壁の VWF の接着動態を *in silico* 予測計算した。両分子を構成する全原子の運動方程式を CHARMM 力場にて解いた。両分子の接着力を 67.3 pN と予測した。

オングストロームスケールの原子の運動からナノメートルスケールの分子の動的3次元構造と接着力を予測し、マイクロメートルスケールの血小板細胞の接着現象と力学的に定量的に連成した。血小板細胞局所に作用する外力を代謝、活性化などの細胞反応と連成させ、力学と細胞生物学を連成するメカノバイオロジーを血小板細胞の生理機能の理解に用いる基盤技術を確立した。

高速スーパーコンピュータと情報技術の進歩により、生体を標的とした医工連携が本格稼働できることを示した。

謝辞

公益財団法人中谷医工計測技術振興財団による平成 27 年度技術開発助成 (開発研究) の助成により本研究を遂行することができました。大変ありがとうございました。本研究は医工連携研究として東海大学医学部、東海大学大学院代謝疾患研究センター、東海大学総合医学研究所、理化学研究所、東京大学大学院工学研究科、慶應義塾大学工学部の密接な共同研究として成果につながりました。理化学研究所光エクストリーム部門の横田秀夫、須永康弘両博士に深謝致します。本研

究における *in silico* シミュレーション計算においては東京大学大学院工学研究科の高木周教授と、高木教授のご指導後東海大学医学部にいらして研究を遂行された塩崎聖治博士に深謝します。原子間力顕微鏡による実証計測を主導して頂いた慶應義塾大学工学部 (現早稲田大学) の谷下一夫教授に深謝します。

参考文献

1. 後藤信哉, 理屈がわかる 抗凝固・抗血小板療法. 2016, 東京: 中外医学社. 134.
2. Hoshiba, Y., et al., *Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelets with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(1): p. 114-20.
3. Goto, S., T. Hasebe, and S. Takagi, *Platelets: Small in Size But Essential in the Regulation of Vascular Homeostasis - Translation From Basic Science to Clinical Medicine.* Circ J, 2015. **79**(9): p. 1871-81.
4. Goto, S., et al., *Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions.* J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 479-86.
5. Goto, S., et al., *Functional significance of adenosine 5'-diphosphate receptor (P2Y₁₂) in platelet activation initiated by binding of von Willebrand factor to platelet GP I α induced by conditions of high shear rate.* Circulation, 2002. **105**(21): p. 2531-6.
6. Tobimatsu, H., et al., *Adhesive Forces between A1 Domain of von Willebrand Factor and N-terminus Domain of*

*Glycoprotein Ibalpha Measured by Atomic
Force Microscopy. J Atheroscler Thromb,*
2015. **22**(10): p. 1091-9.

有機強誘電体を用いたカテーテル型高感度触覚センサの小型化と生体内触診方法の確立



研究責任者 九州工業大学 大学院生命体工学研究科
生体機能応用工学専攻
准教授 高 嶋 一 登

共同研究者 神戸大学 大学院工学研究科
教授 石 田 謙 司

神戸大学 大学院工学研究科
学術研究員 堀 江 聡

九州工業大学 大学院生命体工学研究科
准教授 池 野 慎 也

香川県産業技術センター システム技術部門
主任研究員 竹 中 慎

1. はじめに

近年、脳梗塞や動脈瘤、狭心症などの治療において、カテーテル、ガイドワイヤ、コイルなどを用いることで患部の切開を最小限に抑える低侵襲手術が普及している。しかし、これらの機器を屈曲した管内の深部まで挿入することは非常に難しく、術者に高度な技術と熟練が要求される。このような背景から、血管壁との接触力測定による手術の操作性・安全性の向上や、生体組織表面の形状・剛性測定による病変部の検出などに応用可能な触覚センサの開発が望まれている。

そこで、我々は、安全で有効性の高い治療・診断を実現するため、狭い血管内を指でなぞるように「触診」できる有機強誘電体を用いたカテーテル型触覚センサを開発している^{1)~6)}。ポリフッ化ビニリデン (PVDF) や VDF オリゴマーなどの有機強誘電体は、高分子材料ならではの特性として以下に示す利点がある。

- (1) 軽量かつ柔軟である。
- (2) 圧電定数が大きい。
- (3) 共振が鋭くなく広範囲の周波数に応答する。

(4) 鉛を含有しない。

(5) 加わった応力の絶対値ではなく、微分値を出力する。

これまでの研究^{1)~3)}では、PVDF フィルムを用いた外径が 5mm のカテーテル型触覚センサを試作した。様々な方向からセンサ先端に錘を落下させる実験を行い、錘の力積の増加に伴うセンサ出力の増加を得られることなどが確認できた。また、動脈硬化などによって血管の表面がざらざらしたり、狭窄によって内径が細くなったりすることが考えられる。このような病変を想定して、突起や凹凸のあるチューブを作製し、そのチューブ内にセンサを挿入したときの出力をフィルタ処理や周波数解析することで突起位置や凹凸間隔に対応した出力が確認できた。しかし、外径が 5mm のカテーテル型センサは太く、実際に血管内で使用することは難しい。

一方、センサに生体親和性を持たせることや、病変部を検出することを目指して、試作センサに用いているシリコンゴム表面にビオチンを修飾し、表面の摩擦特性が変化することを確認した⁴⁾。

しかし、その摩擦状態の変化をセンサでどのように測定するかは検証していなかった。

以上の背景から、まず、2章では、従来より小型化した外径が2mmのカテーテル型触覚センサを試作し、これまでと同様に、錘の落下実験を行った。また、突起や凹凸のある血管モデルへの挿入実験を行い、開発しているカテーテル型触覚センサによるデータ取得・処理方法の確立を目指した。さらに、3章では血管内の摩擦測定の基本検討として、生体機能性分子(ビオチンおよびDNAアプタマー)の反応から発生した吸着力を試作したセンサで検出することができるか、摩擦力測定の実験を行った。4章ではそれ以外の検討結果についても簡単に記述した。

2. センサの小型化

2.1 実験

2.1.1 試作品および計測系

本研究で作製した、外径2mmの触覚センサの外観を図1に示す。これまでの研究^{1)~3)}と同様に3Dプリンタ(3D Systems, ProJet 3510 HDPlus)により型を自作し、その型を用いて母体を2液硬化型シリコンゴム(信越化学工業、KE-106)により作製した。その内部には、PVDFフィルム(クレハ、K0711-40AS-L20、PVDF厚み:40 μ m(2枚重ね)、幅:5mm、電極面積:48mm²)を幅が2mmになるように切断したものと、プラスチックフィルム(厚み:0.22mm)を弾性接着剤で貼り合わせ、埋め込んだ。また、フィルム電極は導電性接着剤を用いてシールドケーブル(外径:2mm)に接続した。ケーブルの另一端はBNC端子を接続し、電流プリアンプ(エヌエフ回路設計ブロック、LI-76)により電流-電圧変換を行い、A/D変換器(National Instruments、USB-6009)を介してPCに取り込んだ(サンプリング周波数:1kHz)。なお、アンプの利得は10⁸V/Aと設定した。センサの出力はセンサ先端が曲げられ、センサ中立面に対してPVDFフィルムが伸長されることで得られる。また、センサの出力電流は

加わった応力(またはひずみ)の微分に比例する。

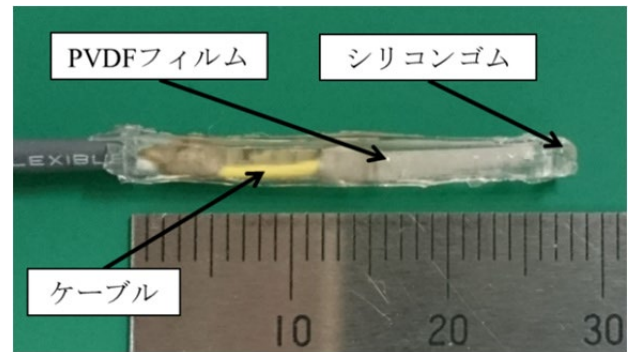


図1 触覚センサ試作品(外径:2mm)の外観

2.1.2 センサへの落下実験

図2のように、センサ先端から50mm根元側を治具で固定し、センサ先端に錘を自由落下させ、センサ先端がたわんだ際の出力とセンサ先端のたわみ量を測定した。錘接触点の鉛直方向のたわみ量はレーザ変位計(キーエンス、LK-G5000V)により測定した。今回の実験では質量、先端径がそれぞれ0.48g、 ϕ 5.0mmの円柱状の錘を使用し、錘は落下させた際の接触点がずれないように中空円筒形状のガイドを通して落下させた。錘の高さは5~25mmの範囲で5mm刻みで変え、実験は各錘高さにおいて5回ずつ行った。

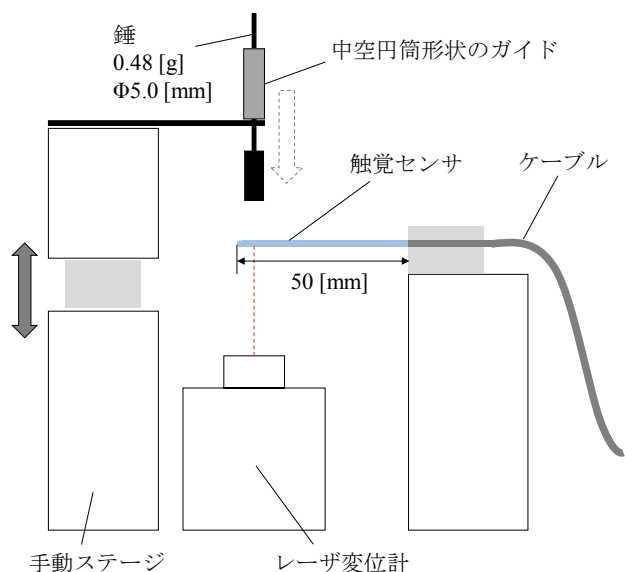


図2 センサ先端のたわみ量とセンサ出力の測定実験装置の概要

2.1.3 血管モデルへの挿入実験

図3に示すとおり、触覚センサ先端から150mm 根元側の部分を治具で固定し、自動ステージ（シグマ光機、SGSP26-200）を用いて、センサを血管モデルに挿入したときの出力を測定した。移動距離および速度の制御はステージコントローラ（シグマ光機、SHOT-102）によって行った。なお、PVDF フィルムは図3の紙面に垂直方向に固定した。血管モデルの中心線は半径100mm の円上にあり、内部には病変部を模擬した突起や凹凸を設けた。また血管モデルへの挿入時は表面摩擦係数の影響を小さくするため潤滑剤（エラストラト）を用いた。

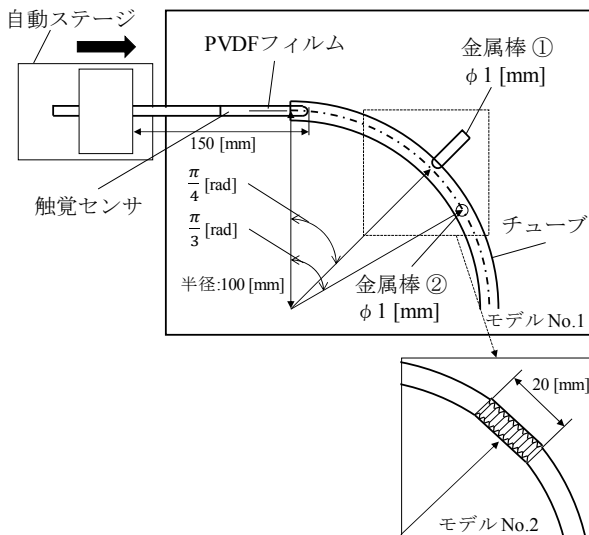


図3 血管モデルへの挿入実験の概要

(a) 突起位置の測定

図3上側に示すとおり、ウレタンチューブ（内径4mm、頸動脈を想定）の入口から45°の位置の外周側、60°の位置の下側にそれぞれ金属棒（先端が半球である直径1mmの円柱状）をチューブに差し込み、高さ0.5mmの突起をつけた。センサを40mm/sで挿入し、チューブ内を通り突起に当たったときの出力を測定し、突起位置の推定を行った。また、図3紙面垂直方向より、挿入の様子を高速ビデオカメラ（ディテクト、HAS-U1）で撮影した。取得したデータは、電源ノイズや衝突時に生じる周波数帯域の高い縦振動成分を除

去するため40Hzのローパスフィルタで処理した。

(b) 凹凸間隔の測定

図3下側に示すとおり、血管モデル入口から45°の前後10mmの部分が三角波形状の凹凸（高さ：1.0mm、凸間隔：0.5、0.67、1.0、2.0mm）である中空管（内径：8mm）を3Dプリンタにより作製した。凸間隔が異なる4種類のモデルを用いて、凹凸の間隔（空間周波数）のセンサ出力への影響を測定した。センサ移動速度を30～80mm/sの範囲で10mm/s刻みで変え、実験は各凹凸間隔、速度において5回ずつ行った。その後、STFT（短時間フーリエ変換：Short Time Fourier Transform）で処理した後、最大の振幅が出ている周波数値を求めた。そのとき、電源ノイズやDC成分、縦振動成分などの高い周波数成分を除去するため、10～55、65～180Hzの範囲でピークの周波数を求めた。

2.2 結果および考察

2.2.1 センサへの落下実験

今回の実験によって得られたセンサ出力値とセンサ先端のたわみ量の例を図4に示す（錘高さ：5mm）。これより、錘高さが最小の5mmであってもセンサ出力値が得られており、たわみ

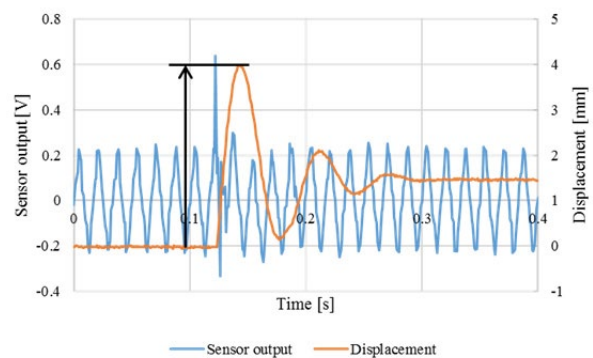


図4 センサ出力とセンサ先端のたわみ量の例（錘高さ：5mm）

量の推移からセンサの減衰振動が見て取れる。また、錘高さと最大たわみ量（図4中矢印の5回分の平均値）との関係を図5に示す。これより、錘

高さの増加に伴う最大たわみ量の増加が確認できた。

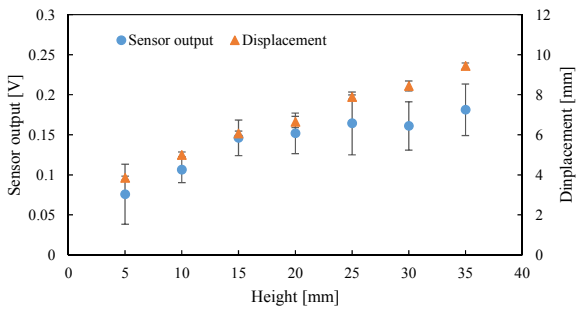


図5 センサ先端のたわみ量とフィルタ後のセンサ出力のピーク値の関係

さらに、センサ先端のたわみ量を STFT により周波数解析した結果を図 6 に示す。図 6 中の STFT スペクトルに 2 つの周波数成分 (図 6 (b) 中の①、②) が存在する理由は、錘を落下させた際に、錘とセンサが一体となって振動しているとき (図 6 中①) と、センサが上向きにたわむ際に、錘とセンサが離れて振動するとき (図 6 中②) の違いである。また図 6 より、錘の接触によってセンサは 30Hz 以下の周波数で変形していることが分かる。このことより、センサ出力を 30Hz のローパスフィルタ処理し、出力のピーク値を求めた。錘高さと同様に、センサ出力はセンサ先端のたわみ量と同様に、錘高さの増加に伴い出力が増加していることが分かる。

図 6 のようにセンサ出力とセンサ先端のたわみ量を STFT し、振幅が最大となる周波数値を求めた結果を図 7 に示す。図 7 より、センサ出力はセンサ先端のたわみ量と同様な周波数成分が出ていることが分かる。以上のことから、センサ先端のたわみ量に応じたセンサ出力の増加や、たわみに応じた出力の変化を確認できた。

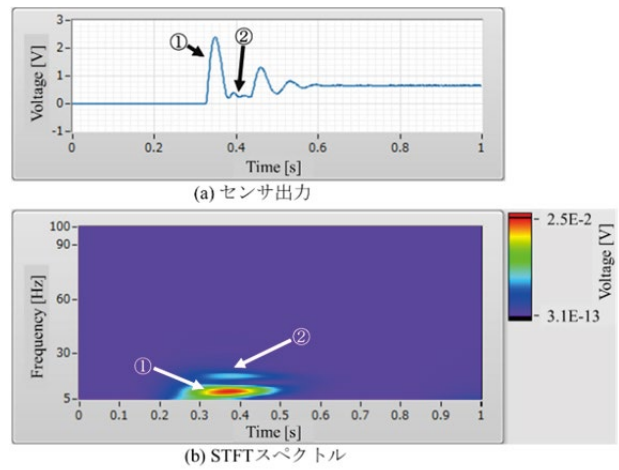


図6 たわみ量の STFT スペクトルの例 (錘高さ: 35mm)

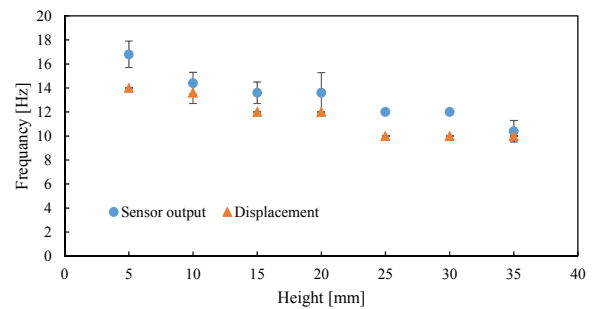


図7 振幅が最大となる周波数値

2.2.2 突起位置の測定

図 8 に、チューブ内の突起にセンサが当たったときに得られる出力の例を示す。それを 40Hz のローパスフィルタで処理し、電源ノイズや高い周波数成分を除去した結果を図 9 に示す。図 9 中の①が 1 つ目の突起に当たったときの出力であり、②が 2 つ目の突起に当たったときの出力である。また、①のときのセンサの動きの様子を図 10 に示す。図 10 (a) と (b) での時間差は 0.1s である。図 10 (a)、(b) より、センサ先端が金属棒の突起により曲げられ (図 10 (b) 矢印の方向)、その影響で PVDF フィルムがひずむことによりセンサの出力が得られた。

1 つ目の突起と 2 つ目の突起との距離は約 26mm であり、今回の移動速度の場合、通過時間は約 0.65s ずれると考えられる。図 9 より①と②の時間の差は 0.67s であるので、2 つの凹凸を検出できていることが分かる。同様に実際に血管が

狭窄している箇所を検出できると考えられる。

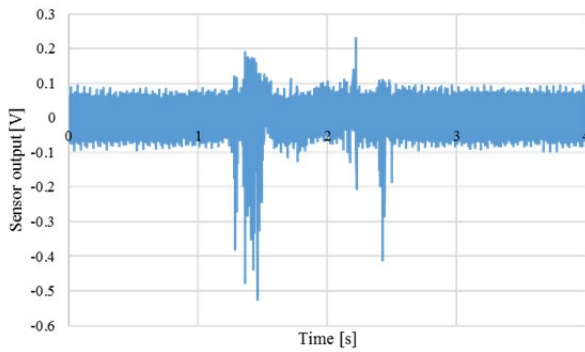


図8 センサ出力信号

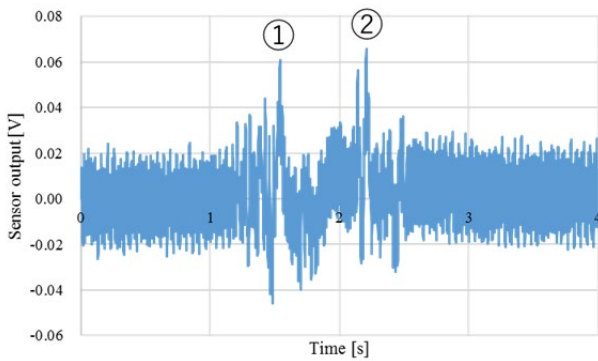


図9 ローパスフィルタ処理後の信号

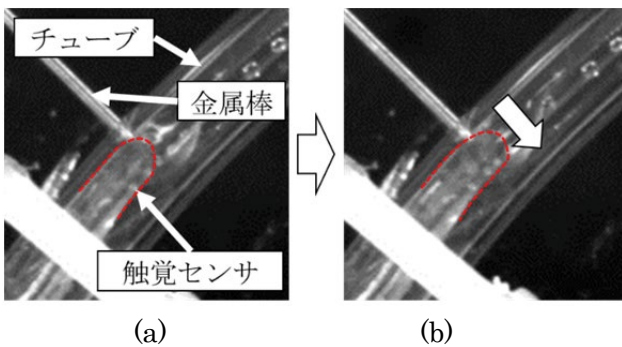


図10 センサの動きの様子
(センサの外形部分を破線で示す)

2.2.3 凹凸間隔の測定

凹凸箇所を通過したときに得られるデータを40Hzのローパスフィルタで処理した出力の例を図11に示す(挿入速度:30mm/s、凸間隔:1.0mm)。凸間隔が1.0mm、挿入速度が30mm/sのときは、0.033sごとに凸を通過する。図11(b)より、0.03s間隔で波形を確認でき、凹凸に応じてセンサ先端が横振動して出力していると考えられる。このこ

とより、それぞれの挿入速度、凸間隔でSTFTを行い、振幅が最大となる周波数値をまとめたものを図12に示す。周波数成分のピーク値の理論値は、速度を凸間隔で割った値とした。凸間隔が1.0mm以下の条件では、理論値に近い周波数値が確認できる。試作したセンサの出力は変形の微分に比例するため、凸間隔が2mmのときは、凹凸を通過した際の出力が小さくなるため、誤差が大きくなっていると考えられる。同様に実際の動脈硬化などによる血管内表面の異常箇所を粗さの変化として検出できると期待できる。

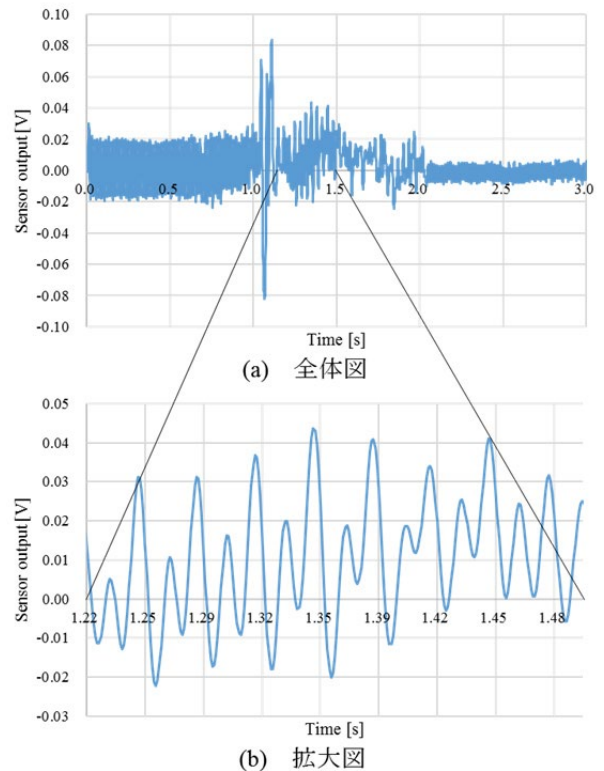


図11 ローパスフィルタ処理後の信号例
(挿入速度:30mm/s、凸間隔:1.0mm)

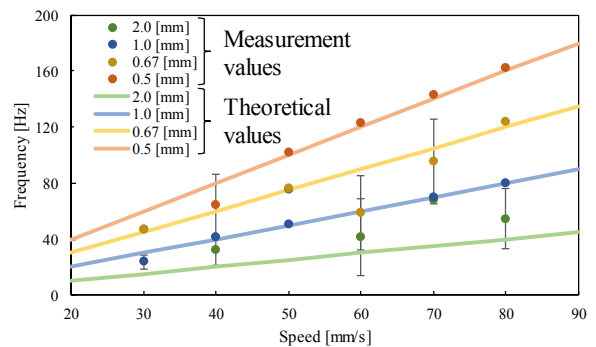


図12 振幅が最大となる周波数値

2.3 まとめ

本章では、PVDF フィルムを用いて従来より細い外径 2mm のカテーテル型触覚センサを試作し、センサへの錘の落下実験によりセンサ出力の特性を調べた。また、センサを病変部のある血管モデルへ挿入し、対象形状に応じた出力の確認を行った。錘の落下実験により、センサ先端のたわみ量の増加に対する出力電圧のピーク値の増加や、たわみ量の変位とセンサ出力の周波数成分が一致することが分かった。また、血管モデル内の突起位置や凹凸間隔に応じたセンサ出力が得られた。

3. 摩擦測定

3.1 実験

これまでの研究⁴⁾と同様に病変部検出の際の生体分子反応のモデルケースとして、ビオチン-アビジンの結合を利用した(図13)。今回はさらに、免疫性がないことなどに着目しアビジンに結合する DNA アプタマーを使用した。

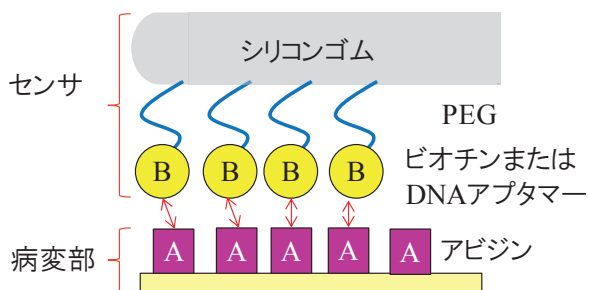


図13 分子修飾のモデル

3.1.1 サンプルへの分子修飾

3.1.1.1 シリコンゴム表面の親水化処理と分子修飾

まず、センサ作製に用いていた母体の材料であるシリコンゴムの直径 5mm の半円筒形状に成型した。センサを想定したサンプルとして、これまでの研究と同様に酸素プラズマドライエッチング装置を使用して、このシリコンゴム表面を親水化し、そこへ PEG 分子を修飾した。その後、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)/1-エチル-3-

(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 処理することにより、その表層に DNA アプタマーまたはビオチンを修飾した。なお、以下 DNA アプタマーを修飾したものをサンプル A、ビオチンを修飾したものをサンプル B とする。

3.1.1.2 ガラス基板表面の親水化処理と分子修飾

一方、病変部を想定したサンプルとして、シリコンゴムと同様にガラス表層の親水化を行った。その後、ホスホン酸誘導体を用いてガラス表面に自己組織化単分子膜を形成し、そこへ PEG 分子を修飾後、アビジン修飾を行った。以下、アビジンを修飾したものを サンプル C、していないものを サンプル D とする。

3.1.2 試作品および計測系

試作した触覚センサの外観を図14に示す。以前までのセンサ¹⁾をセンサ I (図14上)、今回新しく作製したセンサをセンサ II (図14下) とする。いずれも母体はシリコンゴムとし、その中にプラスチックフィルムと PVDF フィルムを貼り合わせ、先端側と根元側に2枚が直交するように入れた(それぞれフィルム No.1、2)。センサ I では横方向 (Y、Z 方向) に加わった力を測定できていたが、センサ II は、フィルムを湾曲させて作製することで軸方向 (X 方向) の力を測定できるよう試みた。また、フィルム電極はケーブルに接続し、電流プリアンプ (利得: 10⁸V/A) により電流-電圧変換を行い、A/D 変換器を介して PC に取り込んだ (サンプリング周波数: 1kHz)。

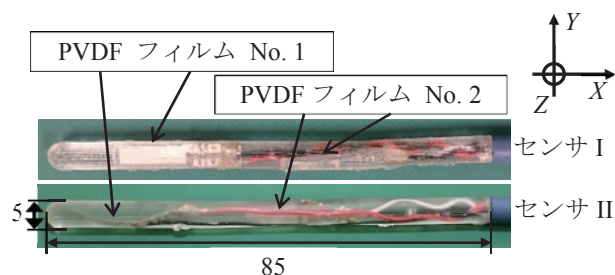
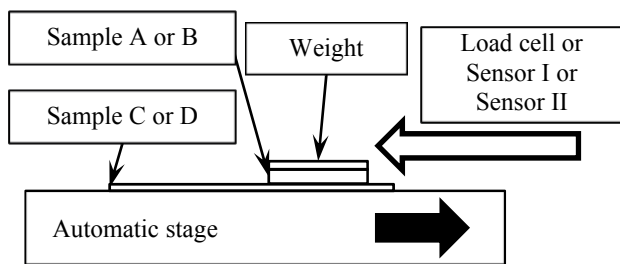


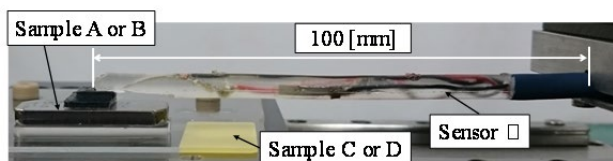
図14 試作品の外観(単位:mm)

3.1.3 実験方法

図15に示す実験装置によりサンプル間の摩擦力を測定した。まず、ステンレス板（10×30×1.4mm）にサンプルA、Bを接着した（重さ：7.5 [g]）。次にサンプルC、Dの上にサンプルAもしくはBを載せ、自動ステージを用いて、2～8mm/sの一定速度で移動させた。その際、固定したロードセル、センサI、センサIIのいずれかをサンプルA、Bに押し付けて、両サンプル間の摩擦力を測定した。



(a) 概略図

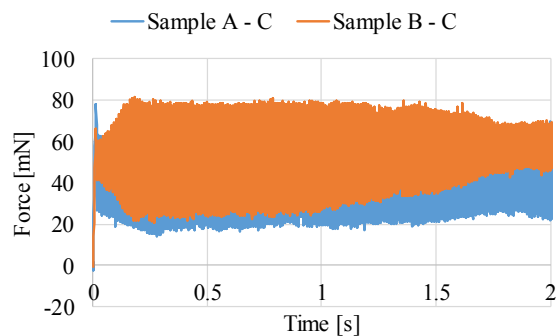


(b) 拡大写真

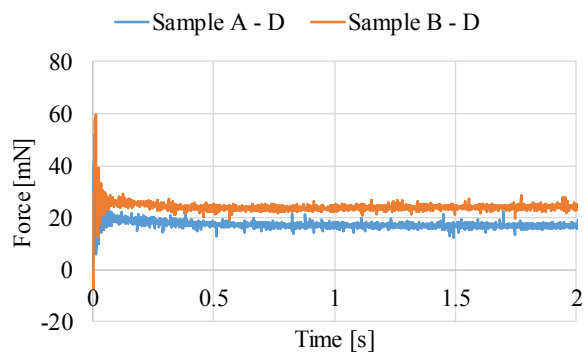
図15 摩擦試験装置

3.2 結果および考察

速度 4mm/s のときのサンプル A、B とサンプル C、D 間の摩擦力のロードセルによる測定例を図16に示す。図16より、サンプルA、BがいずれもサンプルCのときは振動し、サンプルDのときは振動していないことが分かる。これはDNA アプタマーまたはビオチンがアビジンに結合することで自励振動しているためと考えられる。また、センサIIで走査したときのフィルム No. 1 の出力例を図17に示す。センサ出力も摩擦力同様に振動していることが分かる。

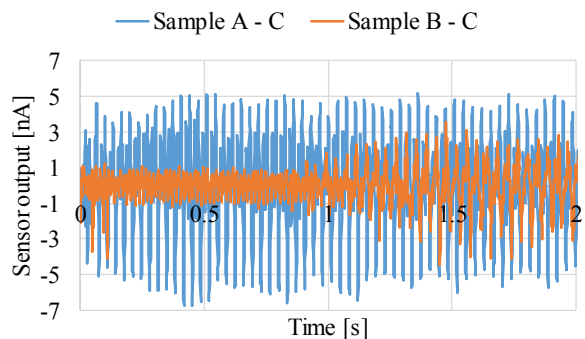


(a) サンプルC

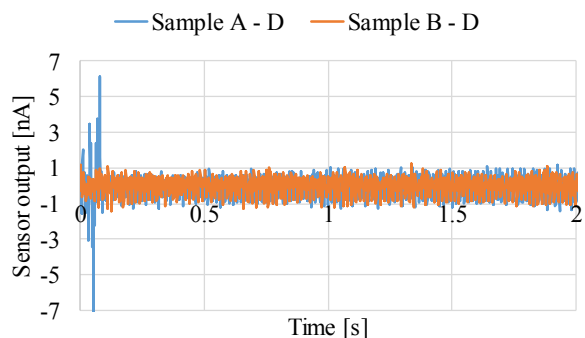


(b) サンプルD

図16 摩擦力の経時変化



(a) サンプルC



(b) サンプルD

図17 センサII(フィルム No.1)の出力

さらに、それぞれのサンプル、速度において摩擦係数、センサ II 出力 (フィルム No. 1, 2) を STFT し、ピークの周波数とそのときの振幅を調べた。例としてサンプル A-C、移動速度 4mm/s のときの STFT の結果を図 18 (摩擦係数)、図 19 (センサ II のフィルム No. 1 出力) に示す。特に摩擦係数の場合、図 18 のように 0Hz 付近の DC 成分が見られるので除去した。ただし、摩擦係数とセンサ II 出力共に周波数の範囲を 5~200Hz とした。それぞれのサンプル、速度において摩擦係数、センサ II 出力 (フィルム No. 1, 2) を STFT し、ピークの周波数の振幅をまとめたものを図 20 に示す。これよりサンプル速度による摩擦係数の振動の変化をセンサで検出できていることが確認できる。

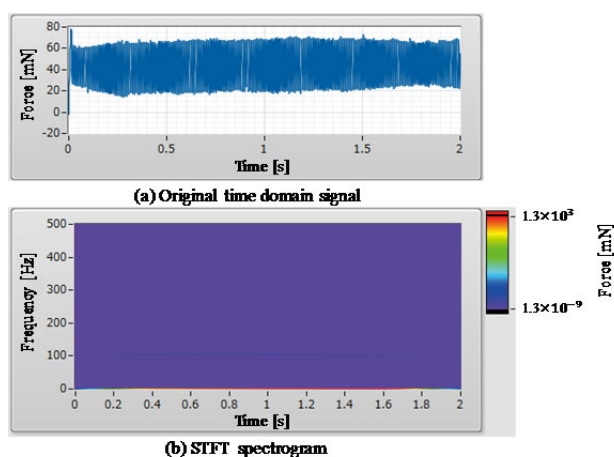


図 18 摩擦係数を STFT した結果 (4mm/s)

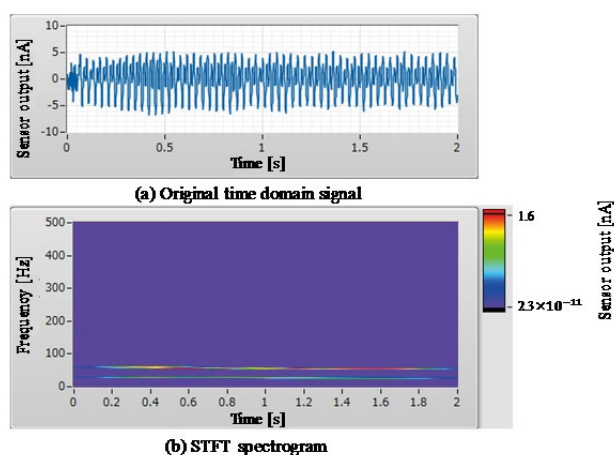


図 19 センサ II の出力を STFT した結果 (4mm/s)

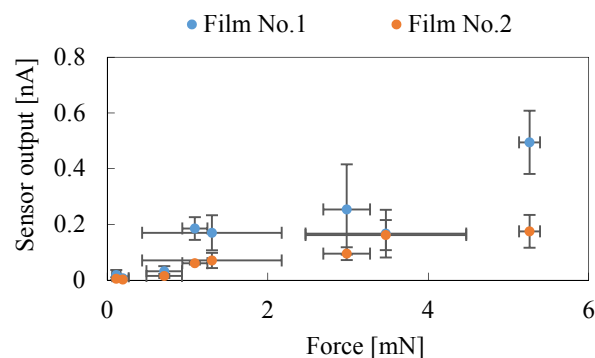


図 20 摩擦係数とセンサ II 出力の関係

一方、出力が最も大きくなると考えられる速度が 8mm/s のときのサンプル A-C のセンサ I 出力を STFT しても、電源ノイズ以外の周波数では顕著な出力が現れなかった (図 21)。このことより、PVDF フィルムを湾曲させることにより軸方向の力を検出しやすくなったことが分かる。

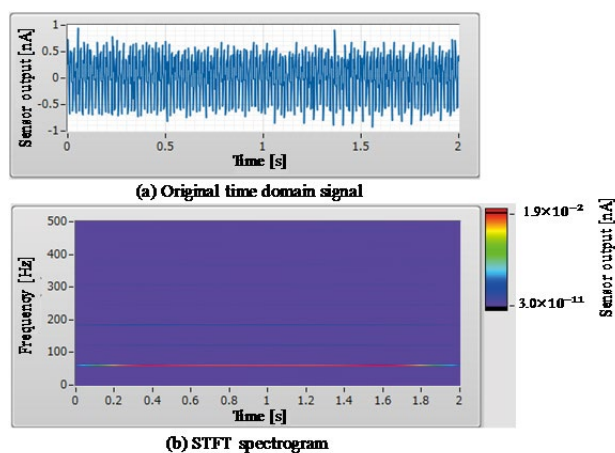


図 21 センサ I の出力を STFT した結果 (8mm/s)

3.3 まとめ

本章では、カテーテル型触覚センサでの摩擦測定の基本検討として、アビジンとアビジンに結合能を有する機能性分子との相互作用を試作したセンサで検出できるか評価した。センサ出力と摩擦係数との相関を確認できた。また、PVDF フィルムを湾曲させることで、軸方向の力を測定することが可能であることが分かった。

4. その他の検討結果

本研究で開発してきたカテーテル型触覚センサはこれまで臨床応用されておらず、新規のセンサを開発するにあたり、生体内で実際にどれくらいの力がセンサに加わるかなど、具体的な仕様は、実用的な試作品が実現できるまで求めることは難しい。そのため、我々はこれまで、血管内でのカテーテル型センサの評価にも利用できる、数値計算と血管バイオモデルを用いた実験を組み合わせた血管内治療デバイス留置シミュレータの開発を行ってきた^{5), 7)}。シミュレータによって、コイルを動脈瘤内に挿入する過程を数値計算した結果の例を図 22 に示す。本年度はこのシミュレータについても、実験装置の挿入機構や、数値計算手法の改良を行った。本シミュレータは、センサの評価のために有用である。

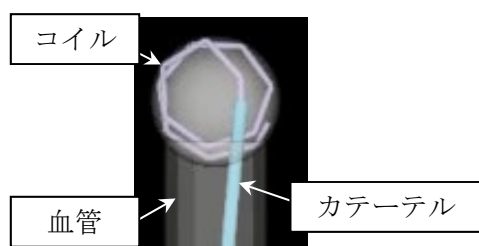


図22 シミュレータによる計算結果の表示例

一方、3章ではセンサ本体の小型化を行ったが、実際に臨床応用する際には周辺機器の小型化も必要である。本年度は金属表面の微小段差などを検出できる携帯式薄板型触覚センサの改良を通して、カテーテル型触覚センサにも転用できるアンプの小型化を行い、従来同様の測定が可能であることを確認した。医療分野だけでなく、自動化が進んだ産業分野においても、例えば、自動車鋼板の面不良検査などいまだに人間の手により行われている作業現場は数多く、本研究で得られた知見の幅広い応用が期待できる⁸⁾。

5. まとめ

本研究では、我々がこれまで開発してきた有機強誘電体を用いたカテーテル型高感度触覚セン

サの小型化およびデータ取得・処理方法の確立を目指した。まず、PVDF フィルムを用いて、従来より細い外径 2mm のカテーテル型触覚センサを試作し、錘の落下実験により基本特性を確認した。さらに、血管モデル内の突起位置や凹凸間隔に応じたセンサ出力が得られた。

一方、摩擦測定の基礎検討として、アビジンとアビジンに結合能を有する機能性分子との相互作用を試作したセンサで検出できることを確認した。また、その際、PVDF フィルムを湾曲させることで、軸方向の力を測定できることが分かった。

本研究結果を基に開発されたセンサによって、従来と比べて定量的かつ低侵襲な治療・診断が可能になると考えられる。今後は、センサ形状・測定回路の小型化・最適化を図りつつ、血管モデル内の様々な形状、硬さ、摩擦などを検出できるよう開発を進めていきたい。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の平成 27 年度技術開発研究助成を受けて行われました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 黒田大介, 高嶋一登, 竹中慎, 向井利春, 堀江聡, 石田謙司: “有機強誘電体を用いたカテーテル型触覚センサの改良”, 第 25 回バイオフロンティア講演会講演論文集, pp.83-84, 2014 年 10 月
- 2) 黒田大介, 高嶋一登, 竹中慎, 向井利春, 堀江聡, 石田謙司, 上田裕清: “有機強誘電体を用いたカテーテル型触覚センサに関する研究”, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp.55-56, 2014 年 1 月
- 3) 太田啓允, 高嶋一登, 竹中慎, 向井利春, 堀江聡, 石田謙司: “有機強誘電体を用いたカテーテル型触覚センサによるデータ取得・処理の基礎研究”, 第 28 回バイオエンジニアリング講

- 演会講演論文集, 5 pages (2F26), 2016年1月
- 4) 黒田大介, 高嶋一登, 池野慎也, 竹中慎, 向井利春, 堀江聡, 石田謙司: “有機強誘電体を用いたカテーテル型触覚センサの表面改質”, 第27回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp.95-96, 2015年1月
 - 5) 高嶋一登, 竹中慎, 向井利春: “有機強誘電体触覚センサを用いた生体内触診の数値解析—血管の特性のセンサ出力への影響—”, 日本ロボット学会誌, vol.30, no.2 (2012) pp.195-204.
 - 6) K. Takashima, S. Horie, T. Mukai, K. Ishida, K. Matsushige: “Piezoelectric properties of vinylidene fluoride oligomer for use in medical tactile sensor applications”, *Sensors & Actuators: A. Physical*, vol. 144 (2008) pp.90-96.
 - 7) K. Takashima, S. Tsuzuki, A. Ooike, K. Yoshinaka, K. Yu, M. Ohta, K. Mori: “Numerical analysis and experimental observation of guidewire motion in a blood vessel model”, *Medical Engineering & Physics*, vol.36, issue 12 (2014) pp.1672-1683.
 - 8) 竹中慎, 高嶋一登: “圧電ポリマーを用いた携帯式薄板型センサによる表面形状測定”, 日本ロボット学会誌, vol.34, no.9 (2016) pp.640-651.
- (ICCMEH-2016), Kitakyushu, Japan, p.55, 2016年12月
3. 太田啓允, 高嶋一登, 池野慎也, 竹中慎, 堀江聡, 石田謙司: “有機強誘電体を用いたカテーテル型触覚センサによる摩擦測定”, 第29回バイオエンジニアリング講演会, 2 pages (1D35), 2017年1月
 4. 猪原健史, 高嶋一登, 竹中慎: “圧電ポリマーを用いた携帯式薄板型触覚センサの改良”, 第29回バイオエンジニアリング講演会, 2 pages (1E11), 2017年1月
 5. 田中嵩大, 高嶋一登, 森浩二, 当麻直樹, 佐野貴則, 梅田靖之, 鈴木秀謙: “血管内治療デバイス留置シミュレータの開発 (動脈瘤コイル塞栓の数値シミュレーション)”, 第29回バイオエンジニアリング講演会, 2 pages (2B31), 2017年1月
 6. 林田典大, 高嶋一登, 葭仲潔, 于凱鴻, 太田信, 森浩二, 当麻直樹, 佐野貴則, 梅田靖之, 鈴木秀謙: “血管内治療デバイス留置シミュレータの開発 (血管バイオモデルを用いたコイルの変形挙動評価)”, 第29回バイオエンジニアリング講演会, 2 pages (2B32), 2017年1月

発表論文

1. 太田啓允, 高嶋一登, 竹中慎, 向井利春, 堀江聡, 石田謙司: “有機強誘電体を用いたカテーテル型触覚センサの小型化”, 第34回日本ロボット学会学術講演会, 4 pages (RSJ2016AC1B3-07), 2016年9月
2. A. Oike, K. Takashima, K. Yoshinaka, K. Yu, M. Ohta, K. Mori: “Evaluation of deformation behavior of catheter using PVA-H blood vessel biomodel”, 3rd International Conference on Computational Methods in Engineering and Health Sciences

マイクロダイアリシス法を用いた心筋組織中 microRNA の計測技術の開発



研究責任者 国立循環器病研究センター
循環動態制御部
上級研究員 清水 秀二

1. はじめに

近年、microRNA (miRNA, miR) を介した転写抑制が、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスや代謝といった広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが知られるようになってきた。そこで、各臓器に特異的な miRNA の発現や分泌をモニターすることは、病態を理解し、制御する上で、非常に重要であると考えられる。しかしながら、組織中の miRNA を定量化するには、組織（の一部）を摘出し、ホモジナイズすることにより total RNA を抽出する必要があったため、各組織での miRNA の動態を、in vivo で連続的にモニターすることは難しかった。また、ホモジナイズされたサンプルから測定された miRNA 量は、各組織での miRNA の含量を反映しているものの、組織での miRNA の分泌を反映しているわけではない。

そこで、本研究ではマイクロダイアリシス法を用いて心筋組織間質の miRNA を連続的に透析液中に回収し、qRT-PCR 法を用いて定量化することにより、心筋組織中の miRNA の動態を明らかにできる新しい計測技術を開発することを目的として、研究を進めた。

2. マイクロダイアリシス法

マイクロダイアリシス法は、中空糸状の透析ファイバーを組織中に植え込んで、リンゲル液などの灌流液で灌流することにより、半透膜の性質を利用して、細胞間隙に存在する様々な物質を単純拡散により透析液中に回収する方法である（図 1）。また反対に、薬物を含んだ灌流液で灌流することにより、細胞外に薬物を投与することも可能である（リバースマイクロダイアリシス法、図 1）。

我々は、世界に先駆けてマイクロダイアリシス法を心臓に導入し¹⁾、心筋間質での生理活性物質の動態をモニターすることにより、心臓自律神経機能の解析や心筋虚血などの病態の解明に寄与してきた。我々は、すでにマイクロダイアリシス法を用いて心筋間質中のカテコラミンとその代謝物^{1),2)}、アセチルコリン^{3),4)}、ミオグロビン^{5),6)}、セロトニンとその代謝物^{7),8)}、活性酸素⁹⁾などの定量化に成功しており、本研究では、これらで培った技術をもとに心筋組織での miRNA の in vivo での定量化を行った。

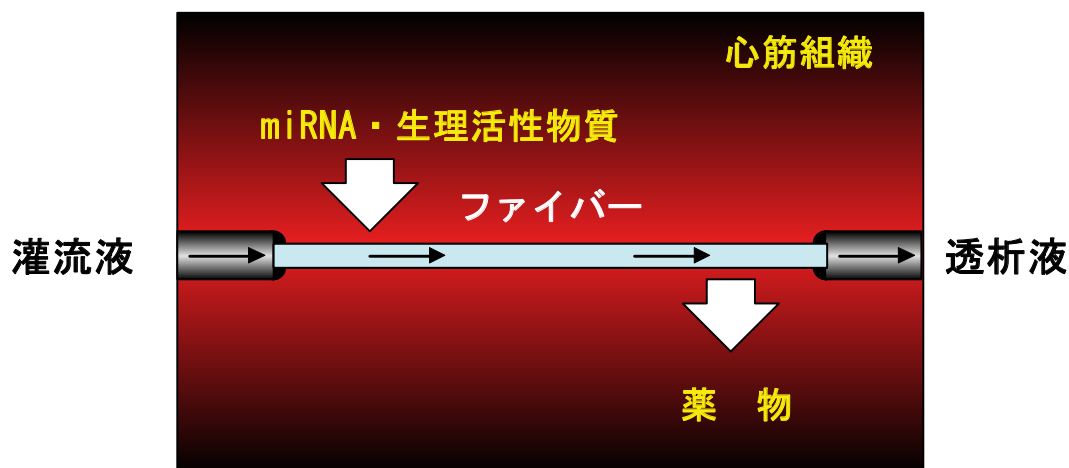


図1 心臓マイクロダイアリシス法

3. 実験方法

3.1 ダイアリシス・ファイバーの選択

我々の今までの研究では、測定する物質にあわせて2種類のダイアリシス・ファイバーを使い分けている。一つは、カテコラミン・アセチルコリンなどの小分子量の物質を測定するためのPAN-1200 (Ashahi Chemical) と呼ばれるカットオフ分子量が 50,000Da のファイバーであり、もう一つは、ミオグロビンなどの大分子量の物質を測定するために用いているポアサイズ 300Å の Evaflux type 5A (Kuraray Medical) ファイバーである。miRNA は、25塩基程度の大きさであり、分子量は 8,000Da 程度と推定されるため、どちらのファイバーを用いても透析液中に、miRNA を回収することが可能と考えられる。しかしながら、その後の定量化の過程において、どちらのファイバーから得られたサンプルが定量化に適しているかは不明である。そこで、動物実験を用いて、どちらのファイバーが miRNA の回収に適しているかを検討した。

αクロラロース・ウレタン麻酔下の Wistar ラットに気管挿管し、人工呼吸管理下に左開胸、心膜を切開し、心臓を露出した。左心室自由壁に PAN-1200 および Evaflux Type 5A を用いて作製したマイクロダイアリシス・ファイバーを植え込み、リンゲル液で灌流した。透析液をサンプリン

グし、透析液中の miRNA 量を、Qubit 3.0 フルオロメーター (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、どちらのファイバーを用いて回収されたサンプルが miRNA の定量化に適しているかを検討した。なお、本実験での灌流液の灌流速度は、 $2.0\mu\text{L}/\text{min}$ とし、サンプリング時間は 10 分とした。

3.2 灌流速度・サンプリング時間の最適化

我々は、今までの研究でカテコラミン・アセチルコリンを測定する場合には、 $2\mu\text{L}/\text{min}$ の速度でファイバーを灌流し、10~20 分間のサンプリングを行っており、ミオグロビンを測定する場合には、 $5\mu\text{L}/\text{min}$ にて灌流し、15 分間のサンプリングを行ってきた。しかしながら、マイクロダイアリシス法を用いて人で miRNA を測定した研究では、灌流速度は、 $0.3\sim 0.5\mu\text{L}/\text{min}$ で、サンプリング時間は 60~120 分と報告されている^{10,11)}。そこで灌流速度とサンプリング時間を変えて、miRNA の定量化が可能かを検討した。

3.1 と同様に麻酔下のラットの左心室にマイクロダイアリシス・ファイバーを植え込み、リンゲル液で灌流した。灌流速度を $0.5, 1.0, 2.0\mu\text{L}/\text{min}$ と変化させ、サンプリング時間を 10, 20, 40 分と変化させ、それぞれのサンプル中の miRNA 量を Qubit3.0 を用いて測定し、miRNA の定量化に

最適な灌流速度・サンプリング時間を決定した。

3.3 心筋虚血・再灌流モデルラットにおける miRNA 発現の経時的分析

全身麻酔・人工呼吸管理下の Wistar ラットを左開胸し、マイクロダイアリス・ファイバーを左前下行枝が灌流する左心室前壁に植え込み、リンゲル液で灌流した。左前下行枝に 5-0 silk 糸をかけ、結紮することで、30 分間の心筋虚血を行った。その後、結紮を解除し、30 分間の再灌流を行った。心筋虚血前・虚血中・再灌流中の各 30 分間、透析液をサンプリングした。

サンプリングされた透析液は、液体窒素にて直ちに凍結し、miRNA の抽出までの間、 -80°C の冷凍庫にて保管した。透析液中の miRNA の抽出は、mirVana™ PARIS™ kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。抽出された miRNA は、cDNA に逆転写、増幅した後、PCR での測定まで、 -20°C の冷凍庫に保管した。サンプル中の miRNA 量を TaqMan Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific) を用いた quantitative RT-PCR 法 (Applied Biosystems Quant Studio 7 Flex を使用) にて定量測定し、虚血・再灌流による心筋間質の miRNA 発現の経時的变化を観察した (図 2)。

なお、miRNA 量を絶対定量するために、測定するものと同じ miRNA をカスタム合成し、濃度既知の miRNA から、cDNA に逆転写・増幅した後、測定サンプルと同じプレートで qRT-PCR を行い、検量線を作製した。

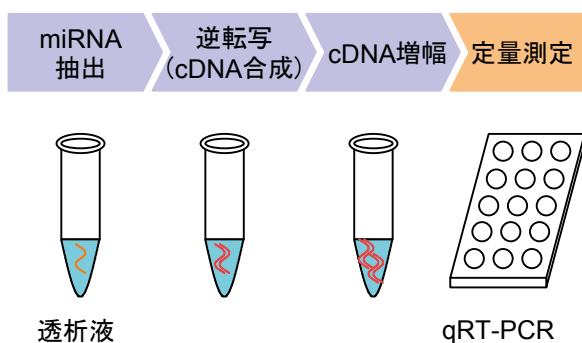


図2 サンプル処理のプロセス

本実験においては、まず循環器疾患や悪性腫瘍の進展に深くかかわっているとされる miR-21 をターゲットとして測定を行い、その後、虚血性心疾患の病態に関与しているとされる miR-1、-126a、-133a、-133b、-499 の測定を行った (図 3)。

- Myocyte
 - miR-1: UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUAU
 - miR-133a: UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
 - miR-133b: UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA
 - miR-208a: GAGCUUUUGGCCCGGGUUAUAC
 - miR-499: UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU
- Fibroblast
 - miR-21: UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
- Endothelial Cell
 - miR-126a: UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

図3 測定した microRNA の塩基配列

4. 実験結果

4.1 ダイアリス・ファイバーの選択

左室心筋間質よりサンプリングした透析液中の全 miRNA 量を、Qubit 3.0 にて測定した結果、PAN-1200 ファイバーを用いた場合の miRNA 量は 50 ng/mL 前後であったのに対し、Evaflux type 5A ファイバーを用いた場合は、200 ng/mL 前後と約 4 倍の濃度であることが分かった。この結果より、miRNA の回収率においては、Evaflux type 5A ファイバーの方が適していることが分かった。

4.2 灌流速度・サンプリング時間の最適化

前述の Evaflux type 5A ファイバーを用いて灌流速度・サンプリング時間を変えて実験を行った。灌流速度 $0.5\ \mu\text{L}/\text{min}$ 、サンプリング時間 40 分でサンプリングを行った場合の miRNA 量は、370 ng/mL であり、灌流速度 $1.0\ \mu\text{L}/\text{min}$ 、サンプリング時間 20 分でサンプリングした場合の miRNA 量 454 ng/mL と差は認めなかった。また、灌流速度 $2.0\ \mu\text{L}/\text{min}$ 、サンプリング時間 20 分でサンプリングを行った場合、miRNA 量は、238 ng/mL であった。

Seppd Period	0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$	2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$
10 min			290ng/mL
20 min		454ng/mL	238ng/mL
40 min	370ng/nL	216ng/mL	228ng/mL

図4 灌流速度とサンプリング時間が microRNA 濃度に与える影響

10 μL あたりの miRNA 量は、灌流速度 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の場合、平均 3.75 ng であり、2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の場合には、平均 1.95 ng であった。1 サンプルあたり 10 ng 程度の miRNA があれば、qRT-PCR 法での測定が可能であると考えられるために、以下の実験においては、灌流速度 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、サンプリング時間 30 分（サンプル量 60 μL ）でサンプリングを行うこととした。

4.3 心筋虚血・再灌流モデルラットにおける miRNA 発現の経時的分析

心筋虚血前、虚血中、再灌流中の各 30 分間にサンプリングされた透析液中の miRNA 量を qRT-PCR 法にて測定した(図 5)。各サンプルは、3 回法 (triplicate) にて測定し、平均値を測定値とした。

心筋虚血前、虚血、再灌流中の miR-21 濃度は、平均で 2.7、2.8、6.9fmol/L であり、虚血中には上昇せず、再灌流により有意に上昇することが分かった ($P < 0.01$)。同様に、miR-1、-126a、-133a、-133b も虚血時には上昇せず、再灌流時に有意に上昇することが判明した (いずれも $P < 0.01$)。一方で、miR-208a、-499 に関しては、透析液中に存在することは確認できたものの濃度が低く、有効な検量線が作製できなかったため、定量測定は不可能であった。

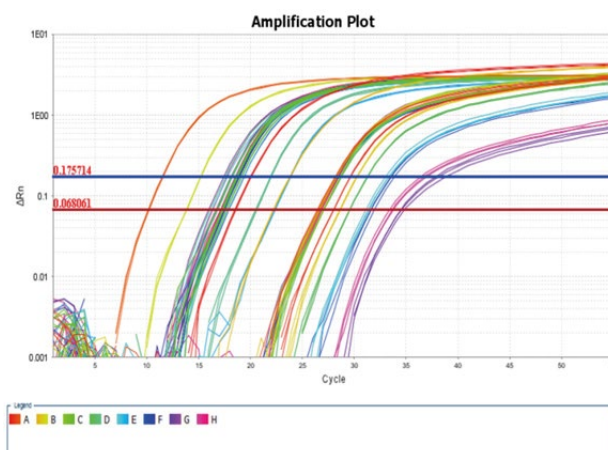


図5 qRT-PCR 法による microRNA 測定(検量線用サンプルも含む)

5. 考察

近年、miRNA を介した転写抑制が、広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが知られるようになり、miRNA を介した核酸医薬の開発が注目されている。最近では、Santaris pharma 社が開発した miR-122 阻害剤が、C 型肝炎患者に対する臨床治験で良好な成績を収めている¹²⁾。心臓においても、miRagen Therapeutics 社が慢性心不全に対して miR-208/499 の抑制、心筋梗塞後リモデリングに対し miR-15/195 の抑制、線維化に対して miR-21 の抑制などを試みている。一方で、今までの miRNA 研究の主体は、血漿・血清中 miRNA 量や摘出された組織中 miRNA 量を測定することで病態を解明しようというものであり、特定の臓器内での miRNA のダイナミクスを in vivo で把握することは困難であった。

最近になって、マイクロダイアリシス法を用いることで、組織中の miRNA を in vivo でモニターすることが可能であったとの報告が出てきている。Bache らは¹⁰⁾、クモ膜下出血患者に対して、脳マイクロダイアリシス法を施行し、in vivo での miRNA の定量化に成功している。さらに Abrahamsson と Dabrosin は¹¹⁾、乳癌患者において増加している miR-21 が、抗癌剤治療により低下することを in vivo マイクロダイアリシス法を用いて証明している。このようにマイクロダイアリ

シス法は、in vivo で miRNA を定量化する上で有用な手段となりつつある。

我々は、本研究においてマイクロダイアリス法を用いて心臓を摘出することなく、拍動下で心筋間質の miRNA をサンプリングすることに成功し、虚血・再灌流時の miR-1、-21、-126a、133a、-133b の動態を明らかにした (図6)。本法を用いて心筋虚血・再灌流時の miRNA のダイナミクスを明らかにすることとは、miRNA を介した心筋虚血・再灌流障害に対する新しい治療法を開発する上での第一歩となることが期待される。今後、本法を用いてより多くの miRNA の動態を明らかにすることで、100 万人とも言われる虚血性心疾患に対する新たな治療法を開発していきたいと考えている。

一方で、本法にもまだ課題が残されている。今回の qRT-PCR 法を用いた測定系では、一部の miRNA (miR-208a、-499) の定量化は不可能であった。これは、サンプル内の濃度があまりに低い場合、定量測定に必要な検量線の作製ができないことが原因である。しかしながら、miRNA の発現量が低いからと言って、その役割が小さいという

わけではない。そこで、このような低濃度の miRNA においても、定量測定が可能になるように新しい測定系を確立する必要がある。近年、検量線を用いずとも絶対定量が可能な Digital PCR 法が注目されており、これらの方法を用いることにより、より低濃度の miRNA を定量化することが可能になると考えられる。また、測定系の感度が上がることで、より少ないサンプル量 (サンプリング時間) でも分析が可能となり、心筋間質での miRNA 動態をより詳細に把握することができると考えられる。

6. まとめ

本研究においては、マイクロダイアリス法を用いることで、in vivo の拍動下の心筋組織間質から連続的に miRNA をサンプリングすることが可能であった。また、本法と qRT-PCR 法を組み合わせることにより、心筋間質の miRNA 量を定量することが可能であった。今後、Digital PCR 法などのより感度の高い測定系と組み合わせることにより、さらに微量なサンプルからの定量化が可能になると考えられる。

	Ischemia	Reperfusion
miR-1	→	↑
miR-21	→	↑
miR-126a	→	↑
miR-133a	→	↑
miR-133b	→	↑

図6 心筋虚血・再灌流時の心筋間質における各 microRNA の動態

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の平成 27 年度開発研究助成により行われました。ここに深く感謝の意を表します。

また、共同研究者として本研究の遂行にご協力頂いた国立循環器病研究センター・循環動態制御部の川田 徹室長・マイケル ターナー流動研究員、福満雅史流動研究員、心臓生理機能部の秋山剛室長、細胞生物学部の山崎 悟室長に、この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

1. Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I. In vivo monitoring of myocardial interstitial norepinephrine by dialysis technique. *Am J Physiol*. 1991;261:H1643-7.
2. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Shishido T, Mizuno M, Kamiya A, Yamazaki T, Sano S, Sugimachi M. In vivo direct monitoring of interstitial norepinephrine levels at the sinoatrial node. *Auton Neurosci*. 2010;152:115-8.
3. Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I. In vivo detection of endogenous acetylcholine release in cat ventricles. *Am J Physiol*. 1994;266:H854-60.
4. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Shishido T, Yamazaki T, Kamiya A, Mizuno M, Sano S, Sugimachi M. In vivo direct monitoring of vagal acetylcholine release to the sinoatrial node. *Auton Neurosci*. 2009;148:44-9.
5. Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, Sugimachi M, Sunagawa K, Mori H. Microdialysis separately monitors myocardial interstitial myoglobin during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H924-30.
6. Sakurai S, Kuroko Y, Shimizu S, Kawada T, Akiyama T, Yamazaki T, Sugimachi M, Sano S. Effects of intravenous cariporide on release of norepinephrine and myoglobin during myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. *Life Sci*. 2014;114:102-6.
7. Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M. Contribution of serotonin uptake and degradation to myocardial interstitial serotonin levels during ischaemia-reperfusion in rabbits. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;207:260-8.
8. Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Inagaki T, Shishido T, Shirai M, Pearson JT. Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312:H60-H67.
9. Inagaki T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Yoshimoto M, Shirai M. Monoamine oxidase-induced hydroxyl radical production and cardiomyocyte injury during myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res*. 2016;50:645-53.
10. Bache S, Rasmussen R, Rossing M, Hammer NR, Juhler M, Friis-Hansen L, Nielsen FC, Møller K. Detection and quantification of microRNA in cerebral microdialysate. *J Transl Med*. 2015;13:149.
11. Abrahamsson A, Dabrosin C. Tissue specific expression of extracellular microRNA in human breast cancers and normal human breast tissue in vivo. *Oncotarget*. 2015;6:22959-69.
12. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S,

Levin AA, Hodges MR. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med.* 2013;368:1685-94.

発表論文

【国際会議発表】

1. Shimizu S, Yamazaki S, Akiyama T, Kawada T, Pearson JT, Shishido T, Sugimachi M. Cardiac microdialysis enables us to monitor myocardial interstitial microRNA levels in an in-vivo beating rat heart during ischaemia/reperfusion. ESC Congress 2017, Barcelona. 2017年8月29日発表予定

光干渉断層画像化法を応用した次世代型卵巣機能評価システムの開発



研究責任者 山形大学 大学院理工学研究科
バイオ化学工学専攻
教授 阿部 宏之

1. はじめに

哺乳動物の卵巣は、卵子を作り出す生殖器官の一つであるとともに、性ホルモンなどを分泌する内分泌器官でもある。通常、卵巣の内部には卵胞と呼ばれる構造が多数存在し、それぞれの卵胞は1つずつの卵母細胞（卵子）を含んでいる。卵胞は、排卵が起こるときの機能的な単位であり、その発達段階により原始卵胞、1次卵胞、2次卵胞など異なる名称で呼ばれている¹⁾。

ヒトの場合、原始卵胞が発達を開始するのは月経期の直前で、その後、この卵胞は1次卵胞、2次卵胞になり発達を続け、次の排卵期に成熟卵胞になる。この卵胞の発達は、下垂体の卵胞刺激ホルモン(FSH)によって促される。最終的に排卵に至るサイズにまで発達するのは1個の卵胞のみである。残りの卵胞は、発達の過程のどこかで発達を止め、アポトーシスにより細胞が死滅し、吸収されてしまう。この現象を卵胞閉鎖と呼び、発達を止めて吸収されていく過程の卵胞を閉鎖卵胞と呼ぶ。卵胞閉鎖はFSH刺激不足などのホルモン異常や、加齢等が原因で卵胞数が減少していく。このように、卵巣内に存在する卵胞の動的変化を把握することは、女性の生殖能力を診断する上で極めて重要である。

現在、卵巣内の卵胞の観察には超音波画像診断

(エコー)が用いられている。しかしながら、超音波の空間分解能はおよそ110 μm であることから、主に卵胞腔を形成した機能的な大型卵胞の画像化に用いられ、直径50 μm 程度の小型の前胞状卵胞の画像化は不可能である。一方、血中性ステロイドホルモン濃度など生化学的指標により卵巣機能を評価する方法も行われているが、この方法ではホルモン産生能が低い前胞状卵胞の機能評価は不可能である。これら2つの方法は、基本的には機能的に成熟した卵胞の形態や機能を指標とするものである。したがって、卵巣に存在する卵胞の大部分を占める原始卵胞や前胞状卵胞の解析は極めて困難であることから、画像解析による卵巣の予備機能の診断は不可能な状況にある。そこで本研究では、超音波と比べて高解像度であり、組織表層領域の画像解析を可能とする低コヒーレンス光干渉を利用した光干渉断層画像化法(オプティカル・コヒーレント・トモグラフィ: OCT)に着目した。研究期間内に、マウス卵巣を材料に用い、OCT技術を応用した卵胞イメージングシステムの確立を試みた。

2. 研究の内容

OCTは、弱い近赤外光を生体に照射し、生体試料内部からの後方散乱光を高感度に検出するこ

とにより、生体試料の断層画像を撮影する技術であり、人体に害のない微弱な近赤外光を用いるため無侵襲計測であり、超音波画像診断と比べて高分解能を有する特長がある(図2)。OCTは、超音波エコー装置の“光版”と見なすことができる²⁾。近赤外領域の広帯域な光とその低い干渉性を利用した断層画像化法であり、十数ミクロンの高い空間分解能を持つ。生体に対して無侵襲、非接触に計測できることから、すでに眼底検査に利用されている。画像の深さ方向では、表面から2~3mmの範囲を10μm程度の精度で計測し、ガルバノスキャナにより横方向にプローブ光を走査することによって、非接触に二次元断層画像が得られる。近年、フーリエ変換により深さ情報を取得するフーリエ領域OCTは、従来のOCTに比べ、高速かつ高感度であることから、研究開発が盛んに行われている。

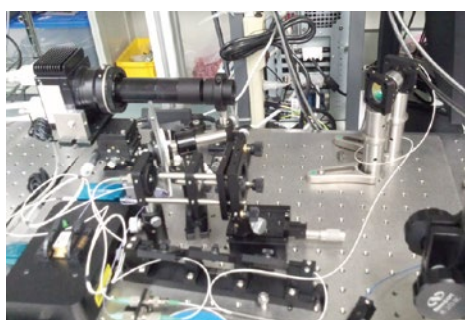
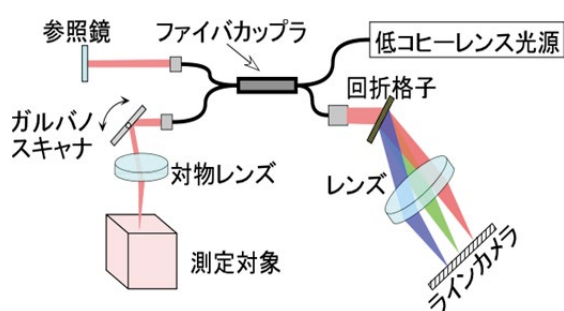


図1 ラインカメラを用いた光ファイバ型フーリエ領域OCT:光源から出力された光は、ファイバカップラにより2分割される。測定対象、参照鏡から反射した光が回折格子により波長ごとに分光され、ラインカメラで検出される。

本研究では、光干渉断層画像化法を応用した高感度卵巣機能評価システムの開発を目的とした。

具体的には、OCT技術を応用し、超音波画像診断などの従来技術では不可能である卵巣内の未成熟卵胞を高感度で画像撮影できる解析システムの開発を行った。さらに、画像撮影の解像度と解析能力を向上させたドップラーOCT技術を確立し、卵巣内の卵胞及び卵母細胞の画像撮影を可能とする高精度OCTシステムの開発を試みた。

3. 研究の成果

3.1 卵巣組織用OCTシステムの開発

本研究で使用したOCTシステムの概略図を図2に示す。SLD光源として、中心波長 $\lambda_0 = 841.1$ nm、半値全幅 $\Delta\lambda = 40.2$ nmを用いた。SLD光源から出射した光は、光源を保護するアイソレータ(OI)を通り、ファイバカップラにより参照光とプローブ光に50:50に分割される。プローブ光は、横方向へ走査するためのガルバノスキャナ(GS)を介し、対物レンズ($L_2, f = 30$ mm)により集光され、サンプルへ照射される。また参照アームには、分散補償のため、同じ対物レンズ(L_2)を配置する。サンプルからの後方散乱光と、参照ミラーで反射された参照光はファイバカップラで合波され、回折格子(1200本/mm)により分光される。波長分解された光は複合レンズ($L_1, f = 174$ mm)を介し、CMOSラインカメラ(Basler Vision Technologies, spL2048-140k, $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, 140kHz)で検出される。本実験では、水平ビンングを行い1024画素でスペクトルを検出した結果、深さ測定範囲は、2.4 mmであった。また分解能を評価した結果、深さ方向7.8 μmで、横方向分解能は21.4 μmであった。

本システムでは、リアルタイムに断層画像をモニタするため、安価で高速演算可能なGPU(Graphics Processing Unit)を用いた³⁻⁵⁾。GPUを用いた計算のフローチャートを図3に示す。 N_z (光軸方向) $\times N_x$ (横方向)の干渉画像データを測定し、これをGPUメモリへ転送する。GPUでは、まず背景成分の除去のため、スペクトルの平均を求める。次に干渉データから、この平均値を

差し引き、16bit 整数型から 32bit 単精度浮動小数型へ変換し、実部に干渉データ、虚部にゼロを代入する。GPU メモリに保持しておいた値を利用して線形補間を N_x 回実行する。さらに深さ信号を得るフーリエ変換 (N_z 点の逆 FFT を N_x 回) を実行し、 $N_z/2 \times N_x$ のサイズのデータに対して log スケーリングし、8bit グレースケールへ変換した計算結果を PC のメモリへ転送し、そしてホストコンピュータにて OCT 画像を表示する。

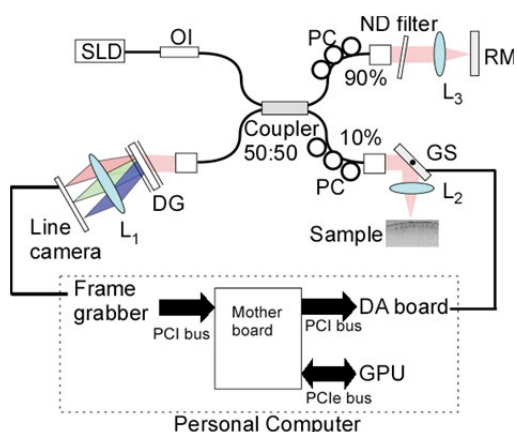


図2 OCT システムの概略

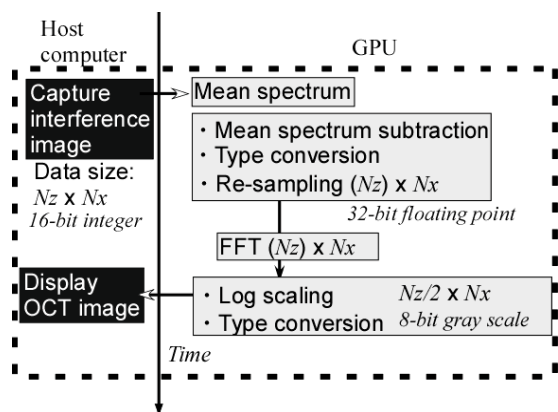


図3 GPU を用いた信号処理のフロー

3.2 OCT による卵胞の非接触・無侵襲・リアルタイム画像化

卵巣は生後 25.5 日齢の B6C3F1 雌マウスより採取した。生後 25.5 日齢マウスの卵巣には原始卵胞から胞状卵胞のほぼすべての発生ステージの卵巣が存在する (図 4)。以下に、発達段階の異なる卵胞の特徴を示す。本研究では、これら

すべての発達段階にある卵胞のイメージングが可能であるか調べた。

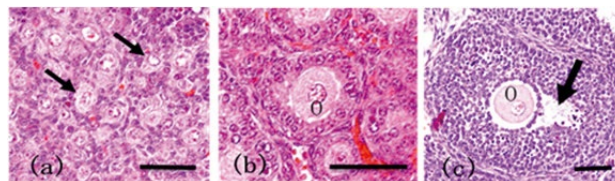


図4 マウス卵胞の組織像。(a)原始卵胞(矢印): 卵巣の表面近くに多数存在し、1 個の卵細胞とそれを囲む卵胞上皮細胞が 1 層の細胞層を形成している。(b)1 次卵胞: 原始卵胞が発達した発育卵胞である。卵母細胞を囲む卵胞上皮細胞が細胞分裂を繰り返す、卵細胞を囲む層が 2 層、3 層と増えていく。(c)2 次卵胞。1 次卵胞が発達し、排卵に至る最終発達段階までの成熟卵胞である。卵胞上皮細胞が増殖を繰り返す、卵胞腔(矢印)と呼ばれる空洞が現れ始める。この卵胞腔が大きくなり胞状卵胞へと発達する。O: 卵母細胞。スケールバーは、100 μm を示す。

採取した卵巣はすぐに測定を開始し、乾燥を防ぐためリン酸緩衝液で湿らせた状態で測定を行った。マウスの卵巣を OCT により 3 次元計測した結果を図 5 に示す。1 枚の OCT 画像 (512 \times 1024 画素) を 130 フレーム/秒で取得し、3 次元データ (1000 フレーム) は 7.7 秒で取得した。図 5 a-c は、横 2.2 mm、深さ 0.97 mm における OCT 画像 (縦断面) である。また図 5 d は、3 次元データの上方からの平均画像で、矢印は図 5 a-c に対応する。卵巣内の卵胞は、原始卵胞 (直径約 20 μm) から 1 次卵胞 (直径 50~130 μm)、2 次卵胞 (直径 290~310 μm)、卵胞液腔を形成する胞状卵胞 (直径 400~500 μm) へと発育を続け、成熟卵胞となる。成熟した胞状卵胞においては、卵胞腔と卵母細胞が明確に識別できた。それより小さい卵胞は、平均画像において、明確に識別することができた。画像よりその大きさを調べた結果、直径約 50 μm であり、1 次卵胞であると推測される。図 6 は、同様に 10 枚平均した OCT 画像を 50 μm 間隔で示したものである。

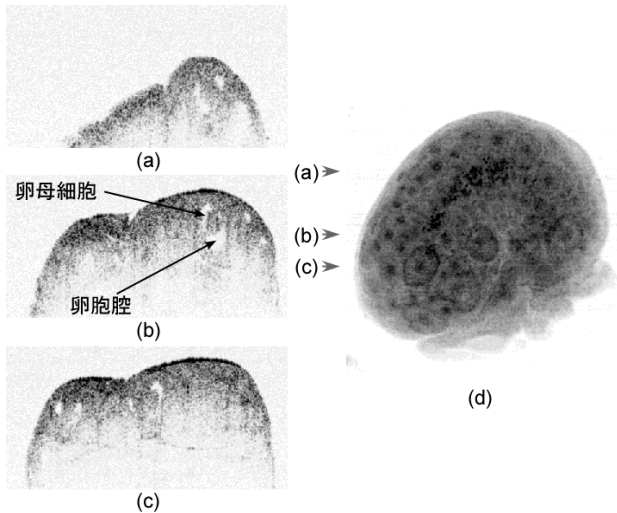


図5 25.5日齢マウスの卵巣の3次元OCTイメージング。(a)–(c) OCT画像(横2.2 mm、深さ0.97 mm)、(d)平均画像を示す。

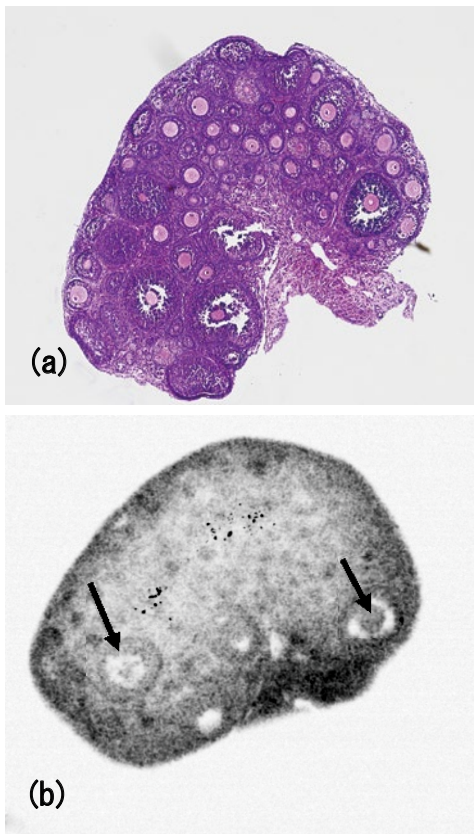


図6 (a) マウス卵巣の組織像(光学顕微鏡観察)と(b)同卵巣のOCT画像。胞状卵胞の構造が明確に識別できる(矢印)。黒色の点状に描写されているのは1次卵胞と考えられる。

次に、OCTで計測された卵胞様構造を特定するために、OCT計測したマウス卵巣の組織学的解析

を行った。OCT計測後のマウス卵巣を室温でブアン固定後、エタノールで脱水し、パラフィン置換後に包埋した。その後、マイクロトームを用いて、各卵巣すべてを5 μm の厚さで連続切片にし、ヘマトキシリン-エオシン(HE)で核および細胞質を染色した。図7に組織画像とOCT画像(横断面)を示す。ここでOCT画像は、深さ方向で10枚の平均を求めている。これらの比較より、本OCTシステムでは、卵胞液腔を形成する胞状卵胞から、約50 μm の大きさの1次卵胞までが画像化されていることがわかった。

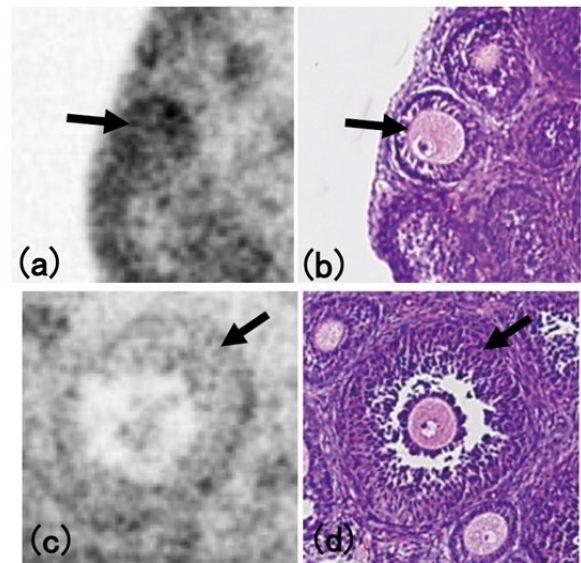


図7 (a,c)マウス卵巣のOCT画像と(b,d)同卵巣の組織像(光学顕微鏡観察)。1次卵胞は、OCT画像では全体的に濃色に描写される(b: 矢印)。胞状卵胞では、卵胞腔と卵母細胞が識別でき、卵胞膜の構造も明確に観察される(c: 矢印)。

3.3 卵巣の3次元画像解析による卵胞の定量化

OCTによりイメージングできた卵胞を定量化するため、25.5日齢のマウスの卵巣のOCT画像を基に3次元画像解析を行い、同じ卵巣の連続組織切片の解析結果と比較した。

図8aに25.5日齢のマウスの卵巣のOCT画像解析の一例を示す。ImageJ (National Institutes of Health, USA)を用いてOCTでイメージングできた卵胞の直径を計測した。図8bは卵巣の連

連続組織切片を基に1次卵胞以上を解析対象として卵胞の直径を計測した結果と OCT 画像解析の結果を示したヒストグラムである。組織学的解析により算出した卵巣全体に存在する卵胞数は 2,510 であり、OCT ではその 25.4%の 637 の卵胞を検出することができた。

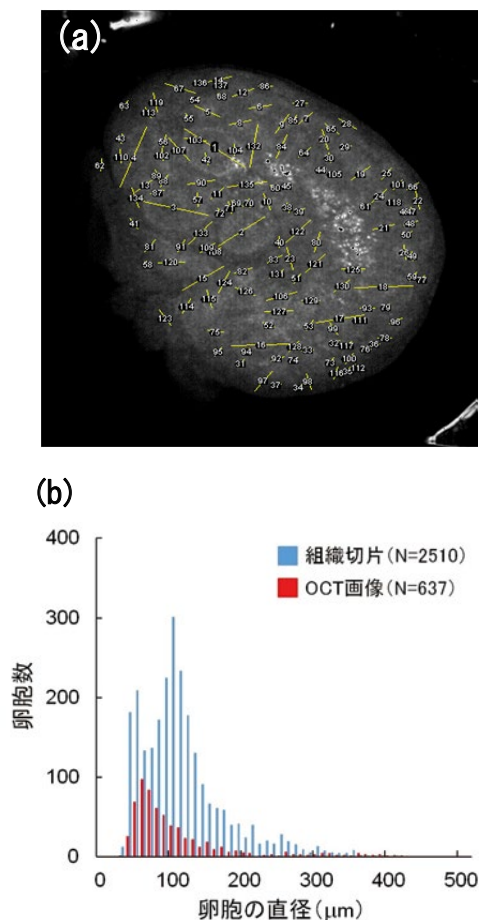


図8 (a)OCT 画像解析。平均画像より卵胞様構造の直径(番号付きの直線)を測定した。(b)組織学的解析(青)及び OCT 画像解析(赤)により検出された 25.5 日齢マウス卵巣内の卵胞の直径。組織学的解析では 1 次卵胞以上を解析対象とした。OCT でイメージングできた卵胞の数は卵巣全体の 25.4%だった。

OCT でイメージングできた領域を定量化するために、図 9 に示すように OCT 画像を閾値により二値化し、卵巣全体に対する OCT で画像化できた領域の割合を算出した。その結果、OCT 画像化領域は 25.2%であり、卵巣の約 4 分の 1 をイメージできていることがわかった (表 1)。さらに、

組織切片で検出された卵胞数と OCT 画像において検出された卵胞数を比較したところ、OCT 画像で検出された卵胞数は組織切片の約 4 分の 1 (25.4%) であった。これらの結果は、本 OCT システムは卵巣の約 4 分の 1 の領域に存在する 1 次卵胞、2 次卵胞及び胞状卵胞のほとんどを検出してことを示唆している。

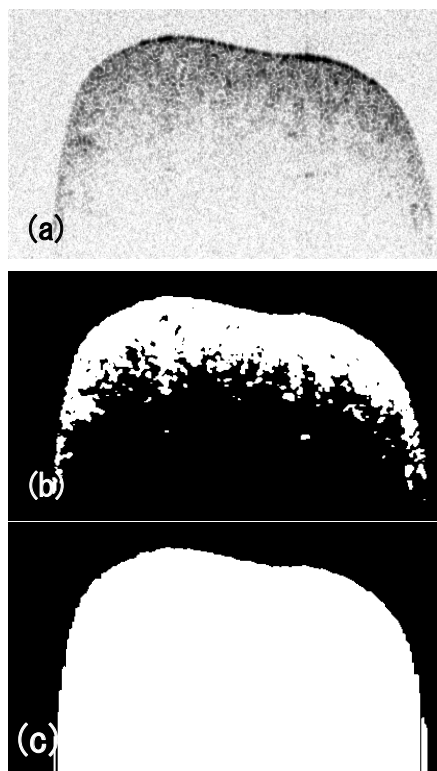


図9 (a)マウス卵巣の OCT 画像と(b)閾値により二値化した画像及び(c)卵巣表面以下の部分(卵巣のほぼ全体)を示す画像。(b)と(c)の画像より卵巣全体に対する OCT で画像化できた領域の割合を算出した。

表 1 組織学的解析結果を基準とした OCT による卵胞の検出率と OCT で画像化できた領域の割合

Sample No.	卵胞数(一次卵胞以上)		検出率(%) (b/a)	OCT画像化領域(%)
	組織切片(a)	OCT画像(b)		
1	554	137	24.7	25.9
2	506	122	24.1	26.0
3	526	124	23.6	24.1
4	459	114	24.8	26.3
5	465	140	30.1	23.7
合計	2510	637	25.4	25.2

3.4 ドップラーOCT 技術による卵胞のリアルタイム画像化

生きた卵胞および卵母細胞のサイズを正しく測るためには、短時間にボリュームデータを計測する必要がある。また、測定対象への光照射サイ

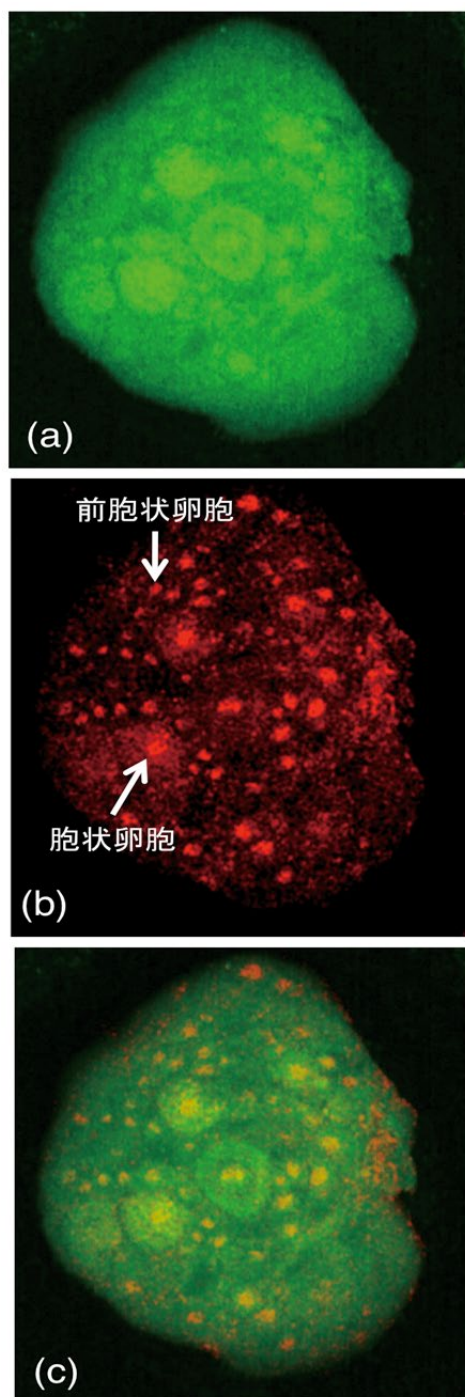


図10 ドップラーOCT 技術により観察したマウス卵巣。(a)平均化画像、(b)ドップラーOCT 画像、(c)平均化画像とドップラーOCT 画像のマージ画像を示す。(b)ドップラー効果により個々の卵母細胞が明確に描写されている。

ズは $10\ \mu\text{m}$ 程度とかなり小さいため、二次元の断層画像だけでは詳細な測定位置や卵胞のサイズを正しく判別するのは非常に困難であると考えられる。そこで、卵母細胞の細胞質に観察される散乱光のドップラー効果^{6,7)}を位相差計測することで、卵胞の3次元断層画像データの取得を試みた。具体的には、これまで使用してきたラインカメラより5倍速い超高速ラインカメラを導入し、3次元断層画像計測の時間短縮を図った。これによりボリュームサイズ(1024×500×500画素)が2秒以下で計測できるようになった。さらに、測定箇所をリアルタイムにモニタするためGPUによる超高速画像処理を行い、同一の断面を連続測定した断層画像からドップラー効果による信号強度の変動の大きさを算出した。

ドップラーOCT 技術を用いてマウス卵巣を観察した結果を図10に示す。従来の平均化画像と比べて大幅に解像度が向上し、前胞状卵胞と胞状卵胞に存在する卵母細胞の高解像イメージングが可能になった(図10a)。さらに、平均化画像とマージすることで、卵母細胞は他の細胞と比べて光の散乱が著しいことが確認できた(図10b)。

4. まとめ

本研究では、従来のOCTシステムにリアルタイムに断層画像をモニタするため高速演算GPUを導入することで分解の向上を図ることに成功した。これにより、マウス卵巣組織の断層撮影が可能となった。この新しいOCTシステムを用いてマウス卵巣の画像解析を行い、組織学的観察によるデータの有効性を検証した結果、胞状卵胞の構造が明確に観察できるとともに、これまで全く観察することができなかった1次卵胞のイメージングが可能であることが示された。また、断層撮影した画像を基に3次元画像解析を行い、各発達段階の卵胞の定量化を行った結果、OCTで検出できる領域に存在する1次卵胞より発達の進んだ卵胞のほとんどをイメージングできることが明らかになった。さらに、ドップラーOCT技術を取り入

れることで画像撮影の解像度とデータ解析能力を向上が可能となり、卵巣内に存在する卵母細胞のイメージングにも成功した⁸⁾。

本研究で開発したドップラーOCTシステムは、1次卵胞以降の卵胞を非接触・無侵襲・リアルタイムに画像化できる新しい卵巣機能評価システムの基盤として期待できる。本研究で開発を目指す新しいOCTシステムは、超音波画像診断では検出が不可能な前胞状卵胞の画像化を可能とし、卵巣機能を「生きた状態」で評価できる次世代の画期的診断システムとして期待できる。また、最近、OCTが卵巣に発生したガン腫瘍の検出に有効であると報告されている^{9,10)}。本OCTシステムは、生殖器官における病変組織の検出にも有効である可能性がある。

謝辞

本研究開発の一部は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の平成27年度技術開発研究助成の支援を受けて行われました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Fawcett D.W. (1986) "Female reproductive system," A Textbook of Histology (11th Ed.), pp. 851-900.
- 2) Huang D., Swanson E.A., Lin C.P., Schuman J.S., Stinson W.G., Chang W., Hee M.R., Flotte T., Gregory K., Puliafito C.A., and Fujimoto J.G. (1991) "Optical coherence tomography," *Science*, 254 (5035): 1178-1181.
- 3) Watanabe Y. and Itagaki T. (2009) Real-time display on Fourier domain optical coherence tomography system using a graphics processing unit. *J. Biomed. Opt.*, 14: 060506.
- 4) Watanabe Y., Maeno S., Aoshima K., Hasegawa H. and Koseki H. (2010) Real-time processing for full-range Fourier-domain

multiple graphic processing units. *Appl. Opt.*, 49: 4756-4762.

- 5) Watanabe Y., Tamahashi Y. and Numazawa H. (2014) Graphic processing unit accelerated intensity-based optical coherence tomography angiography using differential frame with real-time motion correction. *J. Biomed. Opt.*, 19: 021105.
- 6) Chen Z., Milner T.E., Dave D. and Nelson J.S. (1997) Optical Doppler tomographic imaging of fluid flow velocity in highly scattering media. *Opt. Lett.*, 22: 64-66.
- 7) Chen Z., Milner T.E., Srinivas S., Wang X., Malekafzali A., van Gemert M.J.C. and Nelson J.S. (1997) Noninvasive imaging of in vivo blood flow velocity using optical Doppler tomography. *Opt. Lett.*, 22: 1119-1121.
- 8) Watanabe Y., Takakura K., Kurotani R. and Abe H. (2015) Optical coherence tomography imaging for analysis of follicular development in ovarian tissue. *Appl. Opt.*, 54 (19): 6111.
- 9) Hariri L.P., Liebmann E.R., Marion S.L., Hoyer P.B., Davis J.R., Brewer M.A. and Barton J.K. (2010) Simultaneous optical coherence tomography and laser induced fluorescence imaging in rat model of ovarian carcinogenesis. *Cancer Biol. Ther.*, 10: 438-447.
- 10) Wang T., Brewer M. and Zhu Q. (2015) An overview of optical coherence tomography for ovarian tissue imaging and characterization. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 7: 1-16.

神経系免疫担当細胞ミクログリアの直接分化転換による新規脊髄損傷治療技術の開発



九州大学大学院 医学研究院
基盤幹細胞学分野
教授 中島 欽一

1. はじめに

我が国では年間約5千人の新規脊髄損傷患者が発生しており、その患者総数は10万人以上と言われるが、現在、損傷を受けた脊髄を直接治療する方法は存在しない。この状況を打開すべく、失われたニューロンのもとになる細胞である神経幹細胞を用いた移植法が盛んに研究されている^{1,2)}。しかし、脊髄にグリア瘢痕が形成される慢性期脊髄損傷患者への適応は困難であるとされている。

最近、単独あるいは複数の転写因子を線維芽細胞に遺伝子導入することで、意図した細胞を直接的に作製する直接分化転換法が開発された³⁾。申請者らは、この技術を利用して元々瘢痕部位に存在し、本来はニューロン様活動を行わない細胞をニューロンへと分化転換することができれば、自身の細胞であるため拒絶反応も起こらず、失った神経回路網の修復および後肢の効率的な機能回復が見込めると着想した。そこで本研究では、分化転換のメカニズム解析を行うとともに、瘢痕中心部に集積するミクログリア⁴⁾を標的として、機能的なニューロンへと直接分化転換することで、新しい神経疾患治療法開発を目指した。

2. 分化転換に伴う遺伝子発現の変化

はじめに、ニューロンへの分化転換を誘導する転写因子 NeuroD1(ND1)の過剰発現によって、ミクログリアではどのような遺伝子発現の変化が起こるのかどうかをRNA sequencingにより評価した(図1A)。Pearson 相関係数やPCA解析によって、分化転換したニューロンは、皮質ニューロンに近い遺伝子発現を示すことを見出した(図1B,C)。さらに、ND1の強制発現ミクログリアは徐々にニューロン様の遺伝子発現を獲得し、ミクログリア様の遺伝子発現は低下することも見出した(図1C-E)。

3. ND1 結合領域の同定

ND1がミクログリア分化転換を可能にするメカニズムを明らかにするため、ND1の結合領域を、クロマチン免疫沈降後のシーケンス(ChIP-seq)により同定した。その結果、ゲノム全体で、15998個のND1結合領域を同定し、その中の約40%が遺伝子近傍に位置していた。さらに、その中の11%では、ニューロン関連遺伝子の発現上昇が認められた。これらの結果は、ND1は、ニューロン関連遺伝子近傍領域に結合することでその転写を促進することを示していた。

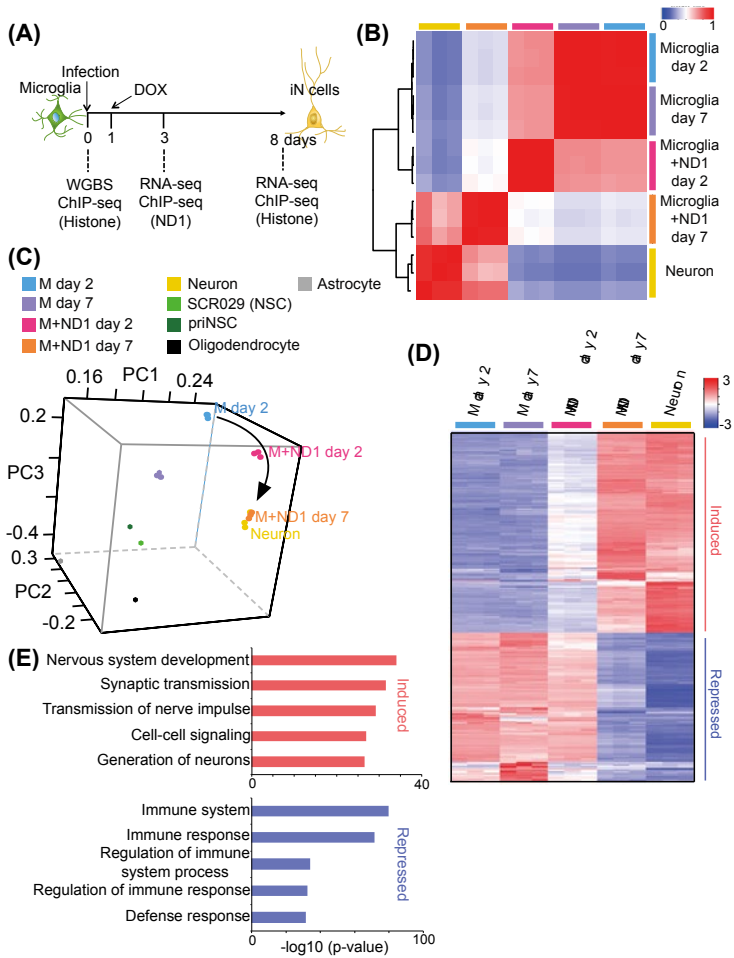


図1 分化転換後の細胞はニューロン様の遺伝子発現パターンを示す

- A) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析とエピジェネティクス解析.
- B) Pearson 相関係数を用いた全遺伝子発現パターンの類似度の比較.ND1 を発現してから7日後のミクログリアはニューロンと類似した遺伝子発現パターンを示す。
- C) ニューロン特異的遺伝子の発現パターンが ND1 を発現したミクログリアでどのように変化したのかを調べるために、各サンプルのニューロン特異的遺伝子発現に対する PCA 解析を実施した。ND1 を発現したミクログリアは徐々にニューロン特異的遺伝子の発現が誘導されることがわかった。
- D) ND1 を発現してから7日後のミクログリアとコントロールの遺伝子発現を比較して、8倍以上変化のあった遺伝子をヒートマップで表示した。
- E) D)で変化のあった遺伝子の GO 解析.

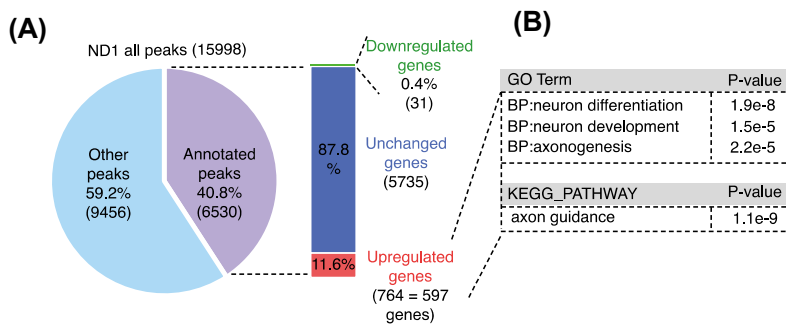


図2 ND1 結合領域の同定.

- A) FLAG-ND1 をミクログリアに強制発現させ、FLAG タグに対する抗体を用いた免疫沈降後、シーケンス反応を行った。その結果、15988 個の ND1 結合領域を同定し、597 個の遺伝子近傍領域では遺伝子発現の上昇も確認できた。
- B) 597 個の遺伝子にはニューロン特異的遺伝子が多く含まれていた。

4. ND1 はバイバレント領域に結合することで遺伝子発現を上昇させる

遺伝子発現は転写因子の転写調節領域への結合によって引き起こされるが、その際に、転写因子結合領域近傍のエピジェネティクス修飾状態も、遺伝子発現の上昇に関与していることがわかっている^{5,6)}。そこで、ND1 結合領域近傍のヒストン修飾状態を ChIP-seq により確認した。その結果、ND1 は、H3K27me3(遺伝子発現抑制)と H3K4me3(遺伝子発現活性化)の 2 つの相反するヒストン修飾が認められる領域⁷⁾へ結合することで、遺伝子発現上昇に寄与することがわかった(図3)。さらに、近傍にバイバレント領域を持つ ND1 標的遺伝子(Myt; Myt11, P; Prdm8, Bh; Bhlhe22, Br; Brn2, Mycn)をマイクログリアへ強制発現させると、例えば Brn2 と Prdm8 をマイクログリアに強制発現させるとニューロンへと分化転換することがわかった(図4)。

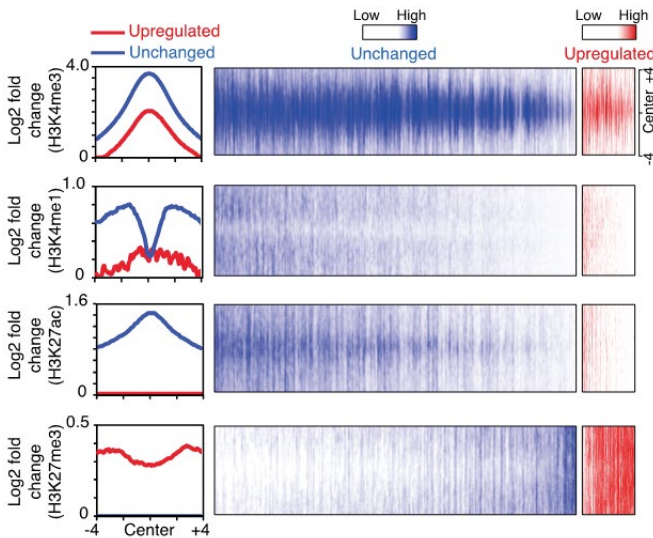


図3 ND1 結合領域近傍のヒストン修飾状態

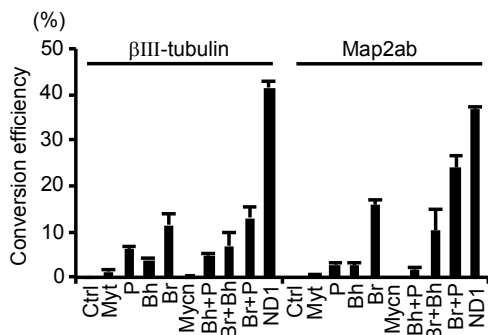


図4 ND1 標的遺伝子によるマイクログリアの分化転換

5. *in vivo*におけるマイクログリアからニューロンへの直接分化転換

*in vivo*においてマイクログリアからニューロンへの分化転換が可能であるのかどうかを検討するため、CD68 プロモーター制御下で ND1 を発現するレンチウイルス(CD68-ND1)を作製し、マイクログリアでND1が発現することを確認した(図5)。

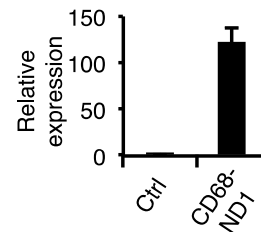


図5 CD68 プロモーター制御下での ND1 の遺伝子発現

このレンチウイルスを用いて、線条体に存在するマイクログリアがニューロンへと分化転換するかどうかを調べたところ、レンチウイルスの投与から 4 週間後に、DCX 陽性の未成熟ニューロンが観察された(図6)。

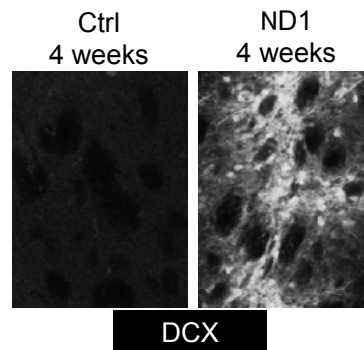


図6 線条体におけるマイクログリアからニューロンへの分化転換

6. まとめ

ND1 は、バイバレント領域(H3K27me3 と H3K4me3)に結合し、標的遺伝子の転写を促進することでマイクログリアからニューロンへの分化転換を誘導することがわかった。またこのような現象は、*in vitro*だけでなく、*in vivo*においても

観察された。今後は、実際に脊髄損傷を起こしたマウスの脊髄内にレンチウイルスを投与し、運動機能の回復が認められるのかどうかを評価する必要がある。

謝辞

本研究は、中谷医工計測技術振興財団の支援を受けて行ったものです。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human iPS cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. Fujimoto Y., Abematsu M., Falk A., Tsujimura K., Sanosaka T., Juliandi B., Semi K., Namihira M., Komiya S., Smith A., & Nakashima K. *Stem Cells* 30, 1163-1173, 2012.
2. Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. Abematsu M., Tsujimura K., Yamano M., Saito M., Kohno K., Kohyama J., Namihira M., Komiya S. & Nakashima K. *J Clin Invest* 120, 3255-3266, 2010.
3. Direct Lineage Reprogramming: Strategies, Mechanisms, and Applications. Xu J., Du Y. & Deng H. *Cell Stem Cell* 16, 119-34, 2015.
4. Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia. Annunziato L., Boscia F. & Pignataro G. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 969-82, 2013.
5. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Jaenisch R. & Bird A. *Nat Genet* 33, 245-54, 2003.
6. Modeling the relationship of epigenetic modifications to transcription factor binding. Liu L., Jin G. & Zhou X. *Nucleic Acids Res* 43, 3873-85, 2015.
7. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. Vastenhouw NL. & Schier AF. *Curr Opin Cell Biol*, 24, 374-86, 2012.

常磁性金属酸化物ナノ粒子の創製と光超音波および 磁気共鳴イメージングへの応用



研究責任者 国立大学法人 京都大学 大学院工学研究科
物質エネルギー化学専攻 基礎物質化学講座 先端医工学分野
教授 近藤 輝幸

1. はじめに

現在の医療現場では、直径 1 mm 程度の“微小がん”の早期診断と治療が目標であり、その最も有効な手段として、短寿命の放射性トレーサーを用いるポジトロン断層法 (PET および PET/CT) による画像診断が行われている。しかしながら、PET (Positron Emission Tomography) では、病院内に放射性トレーサーを作成するサイクロトロンを設置するスペースを確保すること、また装置が大型で高価であることが、地域医療の中心を担う小・中規模病院や診療所への導入を困難にしている。また、放射性トレーサー (から発生される γ 線) を用いる PET 診断では、1 回の検査で患者が受ける被曝量は、約 2.2 mSv と比較的少量と考えられる。しかしながら、健常者が自然界から受ける放射線量が年間約 1.5 mSv であることから、年 1 回、乃至半年に 1 回 (年 2 回) 程度の PET 診断による被曝は許容範囲と考えられる。一方、PET 撮像に関わる医療スタッフ (医師、看護師、および臨床検査技師 他) は、プロテクトをしているとはいえ、確実に被曝している。

そこで、研究責任者は、これらの問題点を解決するためには、特に、日本の医療機関への普及率が極めて高く、より安全かつ低侵襲性で人体深部

での形態と位置情報が得られる磁気共鳴イメージング (Magnetic Resonance Imaging : MRI) を、PET のレベルまで高感度化・高機能化することが最も有望な方法であると考えた。

従来の ^1H MRI では、生体内に膨大に存在する水や脂質中の ^1H 核由来のバックグラウンドノイズにより、分子プローブ (造影剤) のみの ^1H 核シグナルを選択的に検出することは不可能であった。一方、被曝ゼロで生体適合性に優れた“安定同位元素集積化高分子プローブ”を用いる“分子標的 MRI 法”では、例えば、 $^1\text{H}-^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ 配列において、磁化 (コヒーレンス) を $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ と移動させ、最終的に発生した ^1H シグナルを基に画像化する (図 1)。

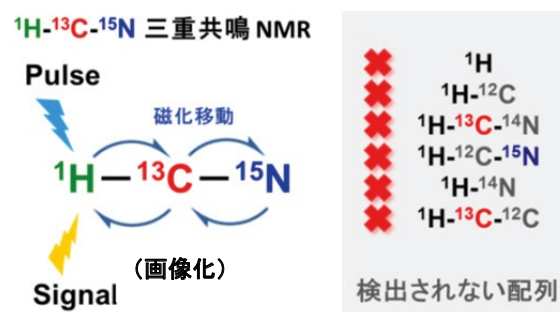


図1 三重共鳴 NMR/MRI の原理

$^1\text{H}-^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ 配列の天然存在比は 0.004% (25,000 分子に 1 分子)と極めて低いことから、“安定同位元素集積化高分子プローブ”を用いることにより、多核多重磁気共鳴 NMR 法を基盤とする“分子標的 MRI”法が実現する^{1,2)}。

研究責任者が開発した安定同位元素集積化高分子プローブは、同位体効果を除けば“天然に存在する元素”のみで構成され、細胞膜脂質の構成要素であるホスホリルコリンを基本骨格とする人工高分子プローブであり、生体適合性が極めて高い。以上の様に、研究責任者は、世界で初めて多核多重磁気共鳴 NMR 技術の MRI 法への応用に成功した (図 2)³⁾。

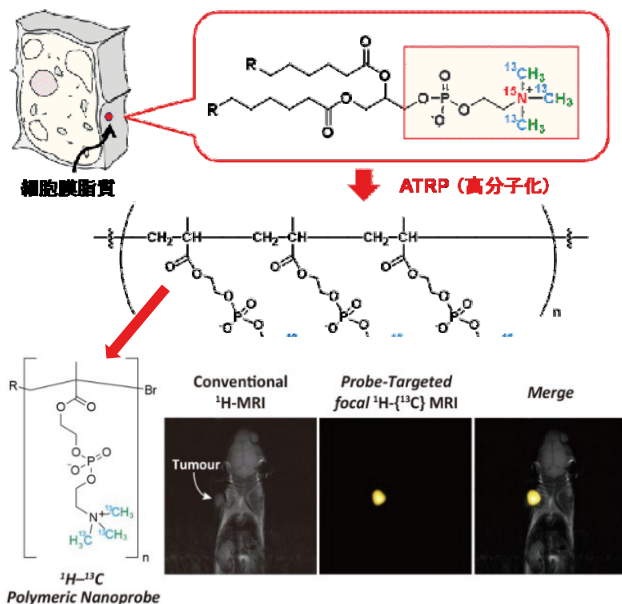


図 2 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC の合成と担癌マウスの分子標的 MRI 画像

一方、光学イメージングの中で、特に、蛍光イメージング (Fluorescence Imaging : FI) では、表層の組織を高い分解能とコントラストでの可視化が可能であり、同時に光に関わる生化学的な情報が得られる。しかしながら、光の生体組織内での強い散乱特性のため、生体深部の可視化は不可能である。また、超音波イメージング (Ultrasonography : US) では、超音波の高い集束

性と大きな侵速度により、体内組織の形態や動き、および血流等の機能画像が得られる。ただし、多くの場合、医師は、US の画像のみで疾病の確定診断を行うことはなく、MRI や CT による画像情報を総合的に評価し、疾病の確定診断を行う。

そこで、蛍光イメージング (FI) 技術と超音波イメージング (US) 技術とを融合することにより、双方の技術の限界を補い、さらに高機能の画像情報が得られる新たなイメージング技術の創出が急務である。現在、最も注目されている融合技術としては、近赤外パルスレーザー光照射により、ナノ粒子から発生した光音響信号 (Photoacoustic signal) を基に画像を構築する“光超音波イメージング (Photoacoustic imaging : PAI)”であり、2011 年に小動物実験用の装置の販売が始まり、医療用診断装置としては、被爆ゼロで撮像時に患者に痛みという苦痛を与えない乳癌診断用の光超音波マンモグラフィ (Photoacoustic mammography : PAM) がヒトでの臨床研究段階にある。

なお、PAI の原理を図 3 に示した。近赤外パルスレーザー光の照射により、生体内の光吸収体 (ナノ粒子プローブ) が光を吸収し熱膨張する熱弾性過程で発生した光音響信号 (疎密波) を超音波として観測し、画像構築する新しいイメージング法である。光と超音波の特長を併せ持ち、光学イメージングの欠点であった生体深部での形態情報と機能情報が得られることから、バイオメディカル分野への広範な応用が期待されている⁴⁾。

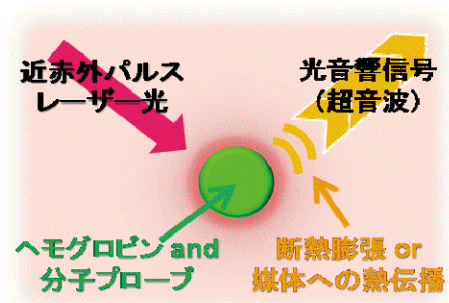


図 3. 光超音波イメージングの原理

2. PA-MR デュアルイメージングプローブとしてのゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子の合成と評価

以上の背景の下、研究責任者らは、まず、先駆的に独自の方法により、“PA-MR デュアルイメージング”のための生体適合性、および水への分散性に優れた常磁性金属酸化物ナノ粒子の合成に取り組み、ゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子の合成と、その PA-MR デュアルイメージングプローブとしての有効性を明らかにした。本ナノ粒子の透過型電子顕微鏡 (TEM) での撮像結果を図4に示した。また、*in vitro* での評価では、ハイドロフォンとオシロスコープを用いて、光超音波信号を電圧の変化として観測した。).

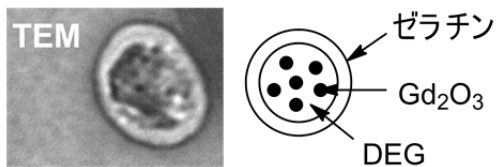


図4 ゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子の構造 (TEM、粒径 100 nm)

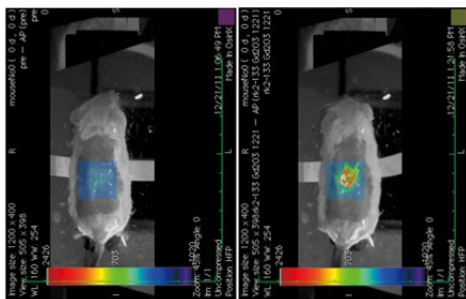


図5 Gd₂O₃ ナノ粒子投与前(左)、皮下投与後(右)の PA 画像。

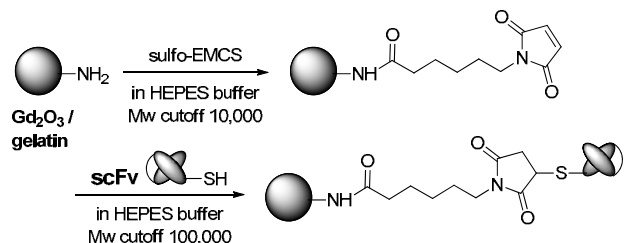
さらに、本ナノ粒子の粒径は Gd₂O₃ ナノ粒子合成後に、表面被覆用のブタ皮ゼラチン加えるタイミングを調節することで、20~200 nm の範囲で自在に粒径制御が可能であることを明らかにした。

そこで、EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) の発現による腫瘍への集積に適した粒径約 100 nm のゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ

粒子をマウスの背部皮下に投与し、PA イメージングを行った結果、本ナノ粒子が存在する部位のみを鮮明に可視化できることが明らかになった (図5)。

一方、濃度の異なるゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子の水分散液を調製し、小動物実験用 7T MRI 装置により 25 °Cでの T1 強調画像を撮像し、水の ¹H の T1 短縮能を表す緩和能 r_1 値を算出した。その結果、ゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子は、臨床用 MRI 造影剤である Magnevist[®] の約2倍の高い緩和能 (r_1 値) を示し、本ナノ粒子の MRI 造影剤としての有効性についても確認した。従って、ゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子が、PA-MR デュアルイメージングプローブとして有効であることを世界で初めて明らかにした⁵⁾。

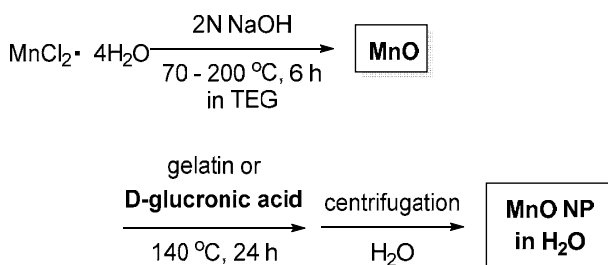
一方、ゼラチン上の NH₂ 基を利用し、乳がん特異的な HER2 抗原を認識する抗 HER2 人工抗体 (scFv) を導入することにより、乳がん細胞への能動的集積が可能であると考えた。すなわち、本研究では、scFv を導入したゼラチンを用いて表面被覆した Gd₂O₃ ナノ粒子を新規に合成し (スキーム1)、HER2 陰性腫瘍細胞 (SUIT2) と HER2 陽性腫瘍細胞 (N87) をそれぞれ両肩に担癌したマウスでの *in vivo* PAI および MRI 撮像を行った。その結果、本抗体修飾 Gd₂O₃ ナノ粒子が、HER2 陽性の N87 腫瘍細胞のみに高選択的に集積し、HER2 陰性の SUIT2 腫瘍細胞には全く集積しないことが PAI および MRI のいずれのイメージング法においても確認された⁶⁾。



スキーム1. ゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子への抗 HER2 人工抗体 (ScFv) 導入による高機能化

3. 糖誘導体で表面被覆した MnO および Mn₃O₄ ナノ粒子の合成と機能評価

さらに、PA 信号強度の増大と MRI 造影能としての機能向上を目指し、3 価のガドリニウム (Gd₂O₃)、および 2 価コバルト (CoO)⁷⁾ と同様、常磁性を有し、NMR 活性である 2 価マンガンを注目し、水に分散可能な 2 種類のマンガン酸化物ナノ粒子を合成した。まず、臨床現場において、経口用 MRI 造影剤として使用されている MnCl₂・4H₂O を選び、diethylene glycol (DEG) あるいは triethylene glycol (TEG) 中でのポリオール法により、マンガン酸化物ナノ粒子の合成を行った。また、スキーム 2 では、加熱中に表面被覆剤として糖誘導体である D-glucuronic acid (GA) を添加した。



スキーム 2. 糖誘導体被覆マンガン酸化物ナノ粒子の合成

合成した Mn-DEG ナノ粒子、および Mn-TEG-GA ナノ粒子について、エタノールおよび超純水での洗浄操作を繰り返し、0.10 μm のシリンジフィルターに通すことにより、粒径の揃ったナノ粒子の水分散液を得た。動的光散乱法 (DLS) により、Mn-DEG ナノ粒子の粒径は 97.8 nm、表面電位は -30.6 mV、また Mn-TEG-GA ナノ粒子の粒径は 122 nm、表面電位は -14.2 mV であった。いずれのナノ粒子も安定で、水中で 3 日間放置しても粒径は変化せず、凝集は全く起こらなかった。さらに、それぞれのマンガンナノ粒子の水分散液を凍結乾燥し、粉末 X 線回折 (XRD) による測定を行った結果、Mn-DEG ナノ粒子は Mn₃O₄ のみから、一方、Mn-TEG-GA ナノ粒子

は MnO のみから成ることが明らかとなった (図 6)

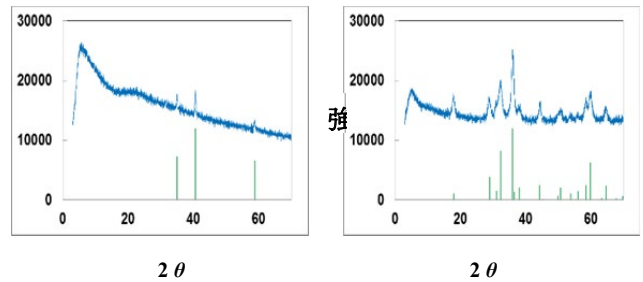


図 6 粉末 X 線回折測定 (XRD) の結果: a) Mn-DEG ナノ粒子、b) Mn-TEG-GA ナノ粒子

次に、合成した 2 種類のマンガン酸化物ナノ粒子について、それぞれ濃度の異なるナノ粒子の水分散液を調製し、小動物実験用 7T MRI 装置により 25 °C での T₁ 強調画像を撮像し (図 7)、水の ¹H の T₁ 短縮能を表す緩和能 r₁ 値を算出した。その結果、Mn-DEG (Mn₃O₄) ナノ粒子の r₁ 値は 2.80 mM⁻¹s⁻¹ と低い値であったのに対し、Mn-TEG-GA (MnO) ナノ粒子では、臨床用 Gd-MRI 造影剤である Magnevist[®] (r₁ = 4.50 mM⁻¹s⁻¹) の約 4 倍の大きな r₁ 値を示した (17.4 mM⁻¹s⁻¹)。

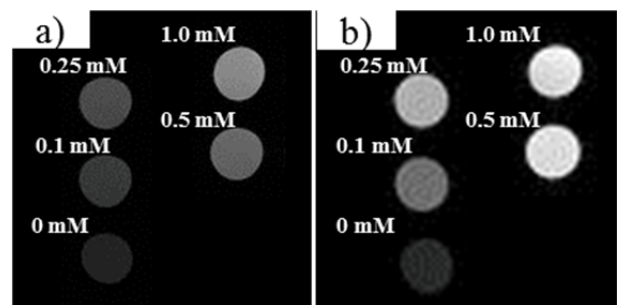


図 7 T₁ 協調 MRI 画像: a) Mn-DEG (Mn₃O₄) ナノ粒子、b) Mn-TEG-GA (MnO) ナノ粒子 (7T, 25°C)

続いて、当初 MnO ナノ粒子の表面被覆剤として用いた D-glucuronic acid (GA) に加え、8 種類の糖誘導体 (図 8) を用いて GA と同様に MnO ナノ粒子の合成を行った。いずれの糖誘導体を用いた場合にも、粒径約 100 nm の水に分散可能な

MnO ナノ粒子が得られ、それらの表面電位は $-10 \sim -20$ mV であった。

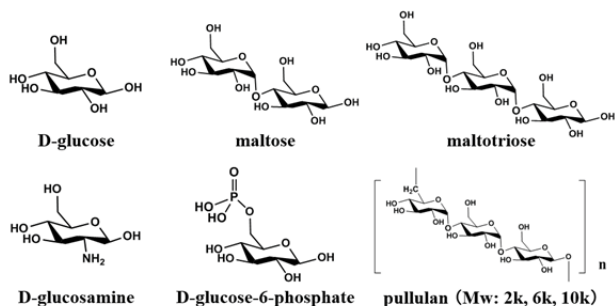


図8 MnO ナノ粒子の表面被覆剤として検討した糖誘導体

さらに、GA を含む9種類の糖誘導体で表面被覆した MnO ナノ粒子について、小動物実験用 7T MRI 装置により、 25°C での $T1$ 強調画像を撮像し、 r_1 値の算出を行うとともに、 710 nm の近赤外パルスレーザー光を照射した際に発生した PA 信号を (37°C)、オシロスコープを用いる電位差測定により評価した (図9)。

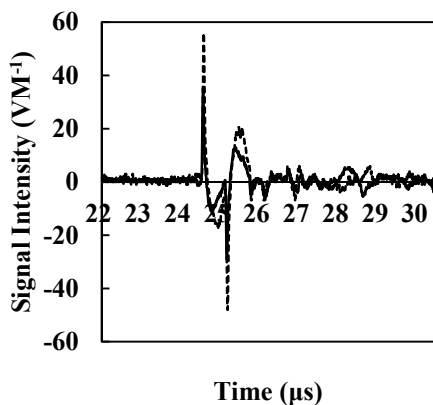


図9 光超音波信号の強度: Mn-DEG (Mn_3O_4) ナノ粒子 (実線)、Mn-TEG-GA (MnO) ナノ粒子 (点線) (710 nm, $100 \mu\text{J}$, 37°C)

いずれのマンガン酸化物糖誘導体で表面被覆した MnO ナノ粒子もゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子¹⁾ よりはるかに強い PA 信号を発生した (Mn-TEG (Mn_3O_4): 最大 35.0 VM^{-1} 、Mn-TEG-GA (MnO): 最大 55.4 VM^{-1})。

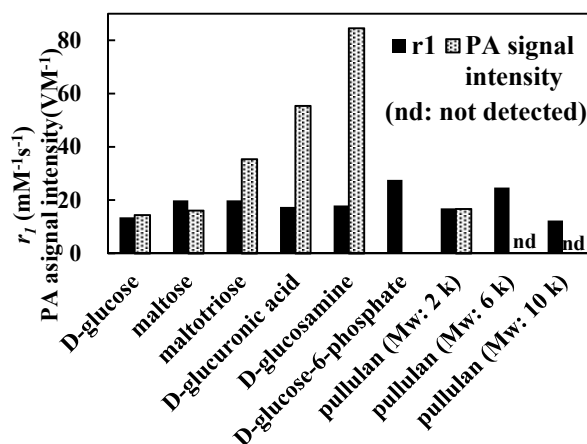


図10 糖誘導体で表面被覆した MnO ナノ粒子による ^1H の緩和能 r_1 と PA 信号強度

その結果、検討したすべての糖誘導体について、被覆した MnO ナノ粒子は、臨床用造影剤である Magnevist[®] よりはるかに大きい ^1H 緩和能 r_1 値を示した。特に D-glucose-6-phosphate で表面を被覆した MnO ナノ粒子の r_1 値 ($27.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) が最大であった。一方、PA 信号強度については、D-glucosamine で表面を被覆した MnO ナノ粒子の PA 信号強度が最大であった (84.6 VM^{-1})。

以上の結果を総合的に判断し、水分散性およびナノ粒子の安定性に加えて生体適合性と安全性を考慮し、D-glucosamine で表面被覆した MnO ナノ粒子を、以下の ddY マウスを用いる *in vivo* での PA-MR デュアルイメージングに用いた。

4. D-glucosamine で表面被覆した MnO ナノ粒子を用いたマウスの *in vivo* MR および PA イメージング

まず、D-glucosamine で表面被覆した MnO ナノ粒子を ddY マウスに尾静脈投与し (0.0455 mmol/kg)、小動物実験用 7T MRI 装置により、 25°C での $T1$ 強調画像を経時的に撮像し、ナノ粒子投与前後の血管、肝臓、および腎臓のコントラスト比を求めた。その結果、本ナノ粒子は、投与後、速やかに肝臓に集積し、胆汁排泄される一方で、腎臓からも排泄されることが明らかとなった (図 11)。また、血中滞留時間は極めて短く、

血管と肝臓のコントラストは、投与前の最大約3倍まで上昇、また、腎臓のコントラストは投与前の最大約2.5倍まで上昇することが確認され、投与後24時間で本ナノ粒子は完全に排泄されることも明らかとなった(図12)。

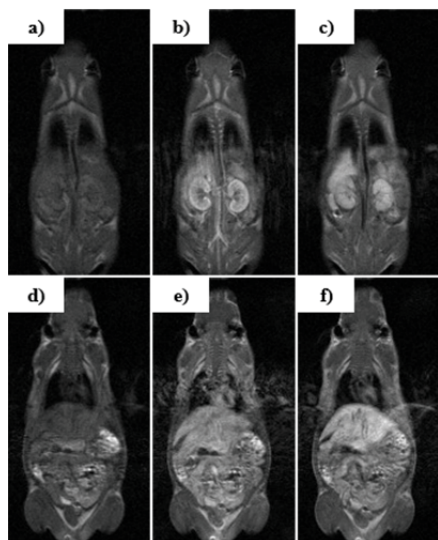


図11 D-glucosamine 表面被覆 MnO ナノ粒子を ddY マウスに尾静脈投与し、T1 強調 *in vivo* MRI 撮像結果: a) 投与前、b) 投与直後(0 min)、c) 投与後3分(肝臓側)、d) 投与前、e) 投与直後(0 min)、f) 投与後3分(腎臓側)

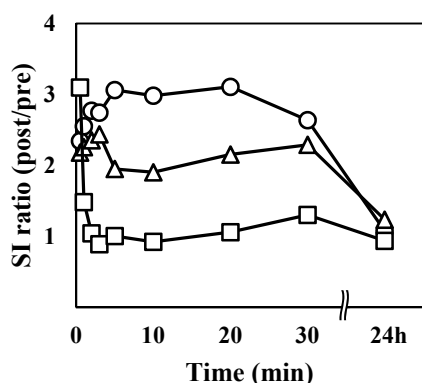


図12 D-glucosamine で表面を被覆した MnO ナノ粒子のマウスへの尾静脈からの投与後/投与前での MRI 撮像(信号強度(SI)の経時変化: 腎臓(○)、肝臓(△)、血液中(□))

同様に、本ナノ粒子を ddY マウスに尾静脈投与し(0.0455 mmol/kg)、小動物実験用 3D 光音響トモグラフィ装置(PAT、Endra 社製 NEXUS 128)により、*in vivo* PA イメージングを行った(図13)。その結果、PA イメージングにおいても、本ナノ粒子が投与後5分で肝臓に集積していることが明らかになり、肝臓造影用プローブとしての有効性が示唆された。

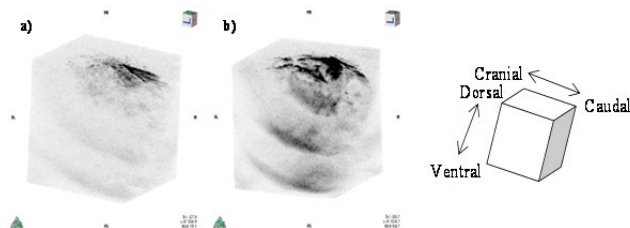


図13 D-glucosamine 表面被覆 MnO ナノ粒子のマウスへの尾静脈投与、および投与前後のマウス肝臓の PAI 画像: a) 投与前、b) 投与5分後(MnO (0.0455 mmol/kg)、ROI: $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$ 、accumulation: 20 回、observation angle: 120° 、z-Axis resolution: 0.3 mm.)

4. まとめ

本研究では、高い粒子安定性と生体適合性を併せ持つ9種類の糖誘導体被覆 MnO ナノ粒子の合成に成功した。合成した糖誘導体被覆 MnO ナノ粒子の中では、D-glucosamine で表面被覆した MnO ナノ粒子が Magnevist[®] の約4倍の ^1H 緩和能 r_1 値を示し、極めて有効な MRI の陽性造影剤であること、および近赤外パルスレーザー光の照射により、最も強い PA 信号を発生した。そこで、D-glucosamine で表面被覆した MnO ナノ粒子を ddY マウスに尾静脈投与し、*in vivo* での MR および PA イメージングを行った結果、いずれのイメージングも可能であり、D-glucosamine 表面被覆 MnO ナノ粒子が、PA-MR デュアルイメージングプローブとして有効であることが明らかになった。

一方、D-glucosamine 表面被覆 MnO ナノ粒子の血中滞留時間が極めて短いことも明らかとな

り、今後、ナノ粒子表面のアミノ基にポリエチレングリコール (PEG) 鎖の導入、および腫瘍抗原特異的抗体の導入を行い、血中滞留性の向上を目指すとともに、腫瘍部位への高選択的ターゲティング機能を有する新しい糖誘導体表面被覆 MnO ナノ粒子プローブを開発する。

謝辞

本研究開発は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の平成 27 年度技術開発研究助成の支援を受けて行われました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Hisatsugu Yamada,* Tetsuro Kameda, Yu Kimura, Hirohiko Imai, Tetsuya Matsuda, Shinsuke Sando, Akio Toshimitsu, Yasuhiro Aoyama,* and Teruyuki Kondo,* ¹³C/¹⁵N-Enriched L-Dopa as a Triple-Resonance NMR Probe to Monitor Neurotransmitter Dopamine in the Brain and Liver Extracts of Mice”, *ChemistryOpen* **2016**, 5, 125–128.
- 2) For a review, see: Teruyuki Kondo,* Yu Kimura, Hisatsugu Yamada, and Yasuhiro Aoyama, “Polymeric ¹H MRI Probes for Visualizing Tumor *In Vivo*”, *Chem. Rec.* **2017**, *in press* (DOI: 10.1002/tcr.201600144).
- 3) Hisatsugu Yamada, Yoshinori Hasegawa, Hirohiko Imai, Takayama, Buntoku Sugihara, Tetsuya Matsuda, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, Shinsuke Sando, Yu Kimura, Akio Toshimitsu, Yasuhiro Aoyama,* and Teruyuki Kondo,* *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 799–806.
- 4) For a book, see: Teruyuki Kondo, Yu Kimura, Hisatsugu Yamada, Akio Toshimitsu, “Magnetic Nanoparticles for Multimodal Bio-Imaging”, In *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Physico-chemical Properties and Roles in Biomedicine*, Nora P. Sabbas, Ed.; Nova Science Publishers: New York, pp. 69–93 (2014).
- 5) Yu Kimura, Ryota Kamisugi, Michiko Narazaki, Tetsuya Matsuda, Yasuhiko Tabata, Akio Toshimitsu, Teruyuki Kondo, “Size-Controlled and Biocompatible Gd₂O₃ Nanoparticles for Dual Photoacoustic and MR Imaging”, *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 7, 657–660.
- 6) For the related study, see: Hisatsugu Yamada, Yoshinori Hasegawa, Yuki Suzuki, Hirohiko Imai, Tetsuya Matsuda, Yu Kimura, Akio Toshimitsu, Yasuhiro Aoyama, Teruyuki Kondo, “Magnetic Resonance Imaging of Tumor with a Self-Traceable Polymer Conjugated with an Antibody Fragment”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 2675–2678.
- 7) Yu Kimura, Takuya Kurimoto, Hiroaki Sugii, Akio Toshimitsu, Tetsuya Matsuda, Hirohiko Imai, Hisatsugu Yamada, Teruyuki Kondo,* “Novel Biocompatible Cobalt Oxide Nanoparticles for Use in Dual Photoacoustic and Magnetic Resonance Imaging”, *JSM Biotech. Biomed. Eng.* **2014**, 2, 1043–1047.

ホルマリン固定組織へ応用可能な多重遺伝子発現解析に基づく乳癌の再発予測法の開発



研究責任者 大阪大学大学院医学系研究科
乳腺内分泌外科
助教 直居 靖人

1. はじめに

乳癌の再発予測法の開発は、術後補助化学療法の適応を決定する上で臨床現場のニーズが高く近年欧米では多重遺伝子診断法が開発され臨床応用されている。我々はこれら既存の診断法よりも更に再発予測の精度が高く、かつ、化学療法感受性やリンパ節転移等他の予測にも応用可能な多重遺伝子診断法として、網羅的遺伝子発現解析用マイクロアレイ（以下、アレイ）を用いた再発予測法「Curebest 95GC®」を開発し2013年に実用化した。しかしながら本法では生検体：RNAlater浸透組織や凍結乳癌組織（-80℃）を必要とするためその保存の煩雑さが普及の妨げとなっている。そこで、本研究の目的は、Curebest 95GC®をホルマリン固定パラフィン包埋組織検体（以下、FFPE 検体）にも応用可能なように改良し、日常診療でより利用し易い簡便な検査法としてその普及を図ることである。

2. 背景

国外においては、乳癌の再発予測のための多重遺伝子診断法（国内未承認）として、Oncotype DX®（Genomic Health 社）、MammaPrint®（Agendia 社）、Prosigna®（NanoStrings 社）が既に実用化され FFPE 検体にも応用可能である。

我々が開発した Curebest 95GC®は、2013年に実用化され乳癌診療ガイドライン 2015にも掲載されたが、FFPE 検体には未対応である。

診断法自体の特徴としては、現在臨床現場では米国を中心に、Oncotype DX®が最も汎用されているが、この方法は乳癌症例を再発リスクに基づいて、高リスク、中リスク、低リスクの3群に分類するため中リスク群の再発予測が不十分となる欠点がある。一方、Curebest 95GC®は我々が独自に開発した95個の遺伝子と解析アルゴリズムを使用し、再発リスクを高リスクと低リスクの2群に分類する点に特徴がある。また、既存の多重遺伝子診断法は、すべて少数の遺伝子発現のみが解析されるのに対して、Curebest 95GC®では、全遺伝子（約2万個）の発現を一度にアレイで解析するので、再発リスクの予測のみならず、我々が既に開発した他の多重遺伝子診断法（23GC/155GC：化学療法効果予測法、GNI：腋窩リンパ節転移予測法）等にも応用可能である。このように Curebest 95GC®は、独自の長所を有しているものの、FFPE 検体には未対応である点が短所であると考えられた。

従来 FFPE 検体においては、RNAが崩壊してアレイ解析やその後の予測モデル作成が困難とされてきたが、FFPE 制作過程の見直しや、FFPE

専用の遺伝子抽出プロトコールの作成、ランダムプライマーの使用、数学的フィルタリングによる低品質データの除去等の工夫をすればこれらの問題を克服することが可能であると考えられた。本研究によって FFPE 検体由来の RNA を解析する測定条件の最適化に加えて、アレイによる遺伝子発現情報の解析方法（バイオインフォマティクス）が確立されれば、Curebest 95GC®の FFPE 検体への応用が可能となるのみならず、将来的には他の多重遺伝子診断法（化学療法効果予測法（23GC/155GC）、腋窩リンパ節転移予測法（GNI））等への応用の可能性も開け、その波及効果は大きいと予測され、本研究を計画した。

3. 研究開始までの進捗状況

我々は 2013 年に、25 個の ER 陽性乳癌組織から隣り合う 2 切片をペアで採取して、片方を FFPE 検体にもう片方を凍結検体にして保存し、各々マイクロアレイデータを作成し互いに遺伝子発現値を比較した。そして Curebest 95GC®の 95 個遺伝子のうち FFPE 検体においても比較的安定して検出し得る 72 個遺伝子群を同定し、これを用いて FFPE 検体専用の再発予測モデル”72GC”を作成した。次に先の 25 個のサンプルペアのうち、FFPE 検体データには 72GC を適用し、凍結検体データには Curebest 95GC®を適用し、それぞれリスク判定（高リスク or 低リスク）を実施しその一致性を検討したところ、リスク分類の結果は 100%一致した。図 1 に FFPE 検体を用いた再発リスク分類と健存率を示す。FFPE 検体の解析では、17 例が低リスク、8 例が高リスクに分類されその予後には、2 群間で有意差が認められた ($P=0.007$) (文献 4)。

以上の検討結果は、症例数も少なくまだ preliminary ではあったが、FFPE 検体由来の RNA でもアレイ解析が可能であることを示唆していた。従って次に、FFPE 検体において安定して検出し得る遺伝子群の更なる選定や、臨床応用を見越して 1 例毎に正確に再発リスクを判定でき

る遺伝子発現データの正規化法（refRMA）を構築する必要があった。また、独立した多数例よりなる独立した Validation cohort を用いて予後予測能を検証する必要があった。

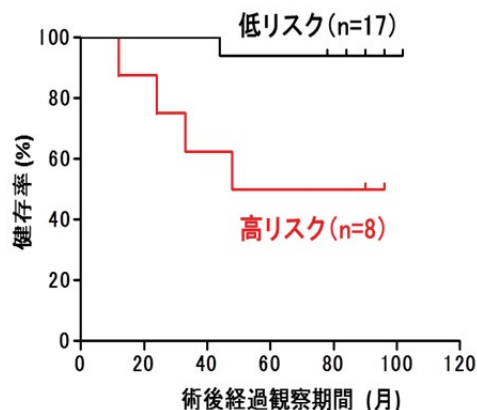


図1 乳癌組織 FFPE 検体を用いた FFPE 検体用多重遺伝子診断法”72GC”による予後予測

4. 対象と方法

このような経緯をふまえ、今回は新たに以下の検討を行った。

①FFPE 検体からの RNA 抽出条件の最適化

ホルマリン濃度や浸透時間の調整等によって FFPE 自体の制作過程を見直し、更に薄切切片の厚みによる脱パラフィンの条件や、検体破碎方式、カラム抽出時の試薬選択や反応時間等を検討し、FFPE 専用最適化した遺伝子抽出プロトコールを作成し、FFPE 検体から RNA を崩壊少なく抽出できる手法を確立した。また遺伝子を効率よく増幅し得るランダムプライマーの選定を行った。

②FFPE 検体由来の変性した RNA からの予測モデルの作成

前述のように我々は、凍結検体を対象とした多重遺伝子診断法として Curebest 95GC®、IRSN23（化学療法効果予測法）（文献 5）、GNI（腋窩リンパ節転移予測法）（文献 3）等を開発してきた。これらの多重遺伝子診断法に使用する数十～数百個程度の遺伝子群の中から、より多くの凍結検体/FFPE 検体ペアを互いに比較して、FFPE 検体

において RNA が崩壊しやすい遺伝子群を同定し、それらを引いた残りの遺伝子群を用いて改良・再構築を行い、新たに FFPE 検体専用の各種多重遺伝子診断法を作成することを試みた。詳細な検討の結果、Curebest 95GC®に関しては、崩壊しやすい遺伝子群を引く必要性に乏しく、95 個全ての遺伝子群を用いて FFPE 検体用の予測モデルを作成することにした。

③生物情報学 (Bioinformatics) における検討

低品質の遺伝子発現データを除去する数学的フィルタリングや、外れ値を検出する主成分分析図法等の研究開発によって、FFPE 検体においても凍結検体の予測結果を忠実に再現できるように、Bioinformatics の面からも調整を試み、独自の Quality control system を確立した。

④FFPE 検体専用のマイクロアレイデータ正規化法 refRMA の構築

データ正規化法 refRMA とは、学習用コホートで予め計算した全ての「係数」をファイルとして保存し (refRMA モデル)、学習用コホート以外の新たな 1 検体にその「係数」をあてはめる手法である。これは新たな 1 症例を正確に客観的に予測診断する際に必要な計算法である。Simon Katz らの論文 (BMC Bioinformatics 2006, 7:464) によると学習用コホートに 100~200 例、評価用に 50 例を用いた場合、RMA と相関が 0.99 以上となる refRMA モデルを構築できたと報告している。これを踏まえて、FFPE 保存検体 200 例程度の学習用コホートおよび 50 例程度の評価用コホートで発現マイクロアレイ測定を行い、実用化に向けた FFPE 検体用正規化法 (refRMA) を確立した。

⑤FFPE 検体用に改良した再発予測法 (改良型 Curebest 95GC®) の検証

①~④の検討を経て、FFPE 検体用に新たに改良した再発予測法 (改良型 Curebest 95GC®) の臨床的有用性をレトロスペクティブ研究で検証

した。具体的には、ER 陽性・リンパ節転移陰性乳癌で術後に補助療法としてホルモン療法のみが実施された症例 56 例 (経過観察期間は約 10 年) を対象に、新たにマイクロアレイ DATA を作成した。原発乳癌組織の FFPE 検体から RNA を抽出して上記の FFPE 検体専用の再発予測法を適応し、高リスク群と低リスク群に分類した。1st end point として、高リスク (H) 群と低リスク (L) 群の凍結/FFPE ペア検体 56 例における 95GC 判定一致率が 90% 以上であること。2nd end point として H 群と L 群の DRFS% (Distant recurrence free survival rate) を検定して統計学的に有意差があり、なおかつ術後 10 年後の L 群の DRFS% が 90% 以上であることを目標として検討した。

5. 結果

新たにマイクロアレイ DATA を作成した ER 陽性・リンパ節転移陰性乳癌で術後に補助療法としてホルモン療法のみが実施された凍結/FFPE ペア検体 56 例を対象に、Curebest 95GC® を適用した結果は次の図 2、3 の通りであった。

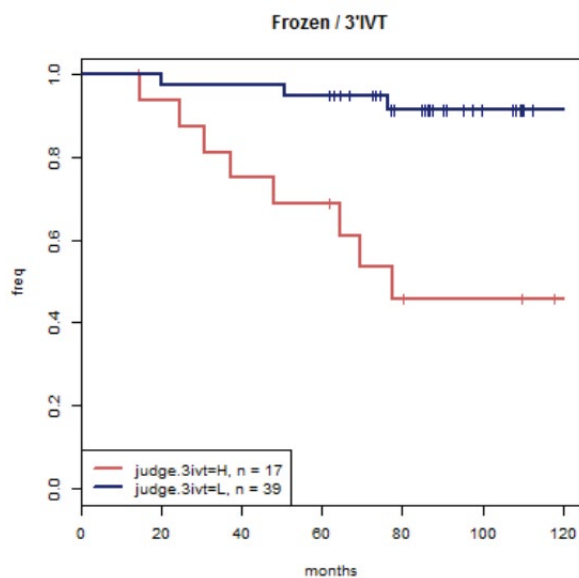


図2 乳癌組織凍結ペア検体を用いた凍結検体用多重遺伝子診断法”Curebest 95GC®”による予後予測

まず、凍結検体 56 例を対象に Curebest 95GC® を適用した結果、図 2 のように Low-risk/High-risk (L/H)群にそれぞれ 39/17 例が分類され、L 群の術後 5 年 DRFS (Distant recurrence free survival) %は 94.9%, 10 年 DRFS%は 91.4%と良好な結果を得た。一方、H 群の術後 5 年 DRFS%は 68.7%, 10 年 DRFS%は 45.8%であり、L 群と比して H 群の予後は有意に不良であった。凍結検体 56 例を対象に、Curebest 95GC®を適用した結果は、想定通りであった。

次に、凍結検体とペアとなる FFPE 検体 56 例を対象に FFPE 用の改良型 Curebest 95GC®を適用した結果、図 3 のように Low-risk/High-risk (L/H)群にそれぞれ 41/15 例が分類され、L 群の術後 5 年 DRFS (Distant recurrence free survival) %は 90.2%, 10 年 DRFS%は 83.4%という結果を得た。一方、H 群の術後 5 年 DRFS%は 78.6%, 10 年 DRFS%は 61.1%であり、L 群と比して H 群の予後は有意に不良であった。

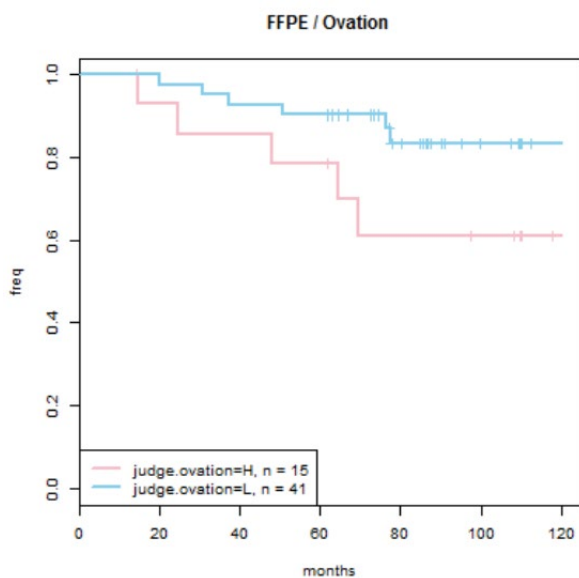


図3 乳癌組織 FFPE ペア検体を用いた FFPE 検体用多重遺伝子診断法”改良型 Curebest 95GC®”による予後予測

しかし、高リスク(H)群と低リスク(L)群の凍結/FFPE ペア検体 56 例における 95GC 判定一致率は $48/56=85.7\%$ に止まり目標の 90%を超えなかった。また、図 3 : FFPE 検体 56 例においては、図 2 : 凍結検体 56 例に比して L 群の予後が増悪し、術後 10 年の L 群の DRFS%は 83.4%であり目標の 90%以下であったことから、今回の検討では 1st end point、2nd end point とともに目標を達成することはできなかった。

その後、目標達成のために、組織量の少ない検体や、抽出時の RNA 量の少ない検体 9 例を対象より除き、凍結/FFPE ペア検体 47 例において再検討を試みた結果、判定一致率は 87.2%にまで上昇したものの、目標とする 90%は超えなかった。次に使用する試薬を同社製品の他 Lot 番号のものに変更したり、他社の別製品に変更して再検討を試みたものの、判定一致率は上昇しなかった。

今後の方向性として、予測モデルや refRMA の見直し(適した遺伝子群やアルゴリズム)、及びコホートの見直し(症例数や生物学的な偏りの有無)を進め、再検討していきたいと思う。

6. まとめ

今回、FFPE 検体用に改良した再発予測法(改良型 Curebest 95GC®)を新たに開発し、凍結/FFPE ペア検体 56 例に適用し、検討した。目標とした、高リスク(H)群と低リスク(L)群の凍結/FFPE ペア検体 56 例における 95GC 判定一致率 90%以上は達成できなかったが、最終的には判定一致率は 87.2%にまで高めることができた。

今回の検討を基にして、更なる FFPE 検体用の乳癌再発予測法の開発を進めていきたいと思う。

専門用語の説明

- 多重遺伝子診断法 (Multi-gene classifier)

マイクロアレイや RT-PCR 法等を用いて、一度に多数の遺伝子の発現値を測定して計算式に代入し、癌の種類や再発リスク、薬剤感受性等を診断・予測する方法。St.Gallen 2013, 2015 国際的ガイドラインでは乳癌の再発リスク予測法として推奨されている。我々が開発した Curebest 95GC®は国産の多重遺伝子診断法として初めて乳癌診療ガイドライン 2015 (日本乳癌学会編、金原出版) に掲載された。

- Oncotype DX®

米国 Genomix Health 社が提供している検査の名称。Curebest 95GC®が目標とするライバル。FFPE 検体から RNA を抽出し、21 遺伝子について RT-PCR で発現解析を行い、乳癌再発リスクを Low、Intermediate、High-risk の 3 段階で判定するが、約 40%もの症例が Intermediate-risk に分類されてしまうことが弱点とされる。しかし FFPE 検体に適応することで、米国を中心に世界で最も多く使用される多重遺伝子診断法になっている。

- MammaPrint®

オランダ国 Agendia 社が提供している検査の名称。凍結検体から RNA を抽出し、70 遺伝子についてマイクロアレイで発現解析を行い、乳癌再発リスクを Low、High-risk の 2 段階で判定する。近年 FFPE 検体にも対応を開始したことで、今後のシェア拡大が予想される。

- Prosigna®

米国 NanoStrings 社が提供している検査の名称。Oncotype DX®と同様に FFPE 検体から RNA を抽出し、50 遺伝子について

RT-PCR で発現解析を行い、乳癌再発リスクを Low、Intermediate、High-risk の 3 段階で判定する。Oncotype DX®に準じる再発予後予測能を有し、約 1/3 の症例が Intermediate-risk に分類されると報告された。

- FFPE : formalin-fixed paraffin-embedded:ホルマリン固定パラフィン包埋組織

謝辞

平成 27 年度 中谷医工計測技術振興財団の技術開発研究助成にて、FFPE 検体用の乳癌再発予測法の開発を進めることができた。今回得られた知見を基に、更なる研究開発を進めていきたいと思う。

参考文献

1. Tsunashima R, Naoi Y, Kagara N, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S. Construction of multi-gene classifier for prediction of response to and prognosis after neoadjuvant chemotherapy for estrogen receptor positive breast cancers. **Cancer Lett**, 2015 Sep 1;365(2):166-73.
2. Naoi Y, Noguchi S. Multi-gene classifiers for prediction of recurrence in breast cancer patients. **Breast Cancer**, 2015 Feb 21. [Epub ahead of print]
3. Nakauchi C, Naoi Y, Shimazu K, Tsunashima R, Nishio M, Maruyama N, Shimomura A, Kagara N, Shimoda M, Kim SJ, Noguchi S. Development of a

prediction model for lymph node metastasis in luminal A subtype breast cancer: the possibility to omit sentinel lymph node biopsy. **Cancer Lett**, 2014 Oct 10;353(1):52-8.

4. Nishio M, **Naoi Y**, Tsunashima R, Nakauchi C, Kagara N, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S. 72-gene classifier for predicting prognosis of estrogen receptor-positive and node-negative breast cancer patients using formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissues. **Clin Breast Cancer**, 2014 Jun;14(3):e73-80.

5. Sota Y, **Naoi Y**, Tsunashima R, Kagara N, Shimazu K, Maruyama N, Shimomura A, Shimoda M, Kishi K, Baba Y, Kim SJ, Noguchi S. Construction of novel immune-related signature for prediction of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer. **Ann Oncol**, 2014 Jan;25(1):100-6.

6. Uji K, **Naoi Y**, Kagara N, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S. Significance of TP53 mutations determined by next-generation "deep" sequencing in prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer. **Cancer Lett**, 2014 Jan 1;342(1):19-26.

7. **Naoi Y**, Kishi K, Tsunashima R, Shimazu K, Shimomura A, Maruyama N, Shimoda M, Kagara N, Baba Y, Kim SJ,

Noguchi S. Comparison of efficacy of 95-gene and 21-gene classifier (Oncotype DX) for prediction of recurrence in ER-positive and node-negative breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, 2013 Jul;140(2):299-306.

8. Tominaga N, **Naoi Y**, Shimazu K, Nakayama T, Maruyama N, Shimomura A, Kim SJ, Tamaki Y, Noguchi S. Clinicopathological analysis of GATA3-positive breast cancers with special reference to response to neoadjuvant chemotherapy. **Ann Oncol**, 2012 Dec;23(12):3051-7.

9. Tsunashima R, **Naoi Y**, Kishi K, Baba Y, Shimomura A, Maruyama N, Nakayama T, Shimazu K, Kim SJ, Tamaki Y, Noguchi S. Estrogen receptor positive breast cancer identified by 95-gene classifier as at high risk for relapse shows better response to neoadjuvant chemotherapy. **Cancer Lett**, 2012 Nov 1;324(1):42-7.

10. **Naoi Y**, Tanei T, Kishi K, Tsunashima R, Tominaga N, Baba Y, Nakayama T, Shimazu K, Kim SJ, Tamaki Y, Noguchi S. 70-Gene classifier for differentiation between paclitaxel- and docetaxel-sensitive breast cancers. **Cancer Lett**, 2012 Jan 28;314(2):206-12.

11. Oshima K, **Naoi Y**, Kishi K, Nakamura Y, Iwamoto T, Shimazu K, Nakayama T, Kim SJ, Baba Y, Tamaki Y,

Noguchi S. Gene expression signature of TP53 but not its mutation status predicts response to sequential paclitaxel and 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in human breast cancer. **Cancer Lett**, 2011 Aug 28;307(2):149-57.

12. **Naoi Y**, Kishi K, Tanei T, Tsunashima R, Tominaga N, Baba Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Prediction of pathologic complete response to sequential paclitaxel and 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide therapy using a 70-gene classifier for breast cancers. **Cancer**, 2011 Aug 15;117(16):3682-90.

13. **Naoi Y**, Kishi K, Tanei T, Tsunashima R, Tominaga N, Baba Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. High genomic grade index associated with poor prognosis for lymph node-negative and estrogen receptor-positive breast cancers and with good response to chemotherapy. **Cancer**, 2011 Feb 1;117(3):472-9.

14. **Naoi Y**, Kishi K, Tanei T, Tsunashima R, Tominaga N, Baba Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Development of 95-gene classifier as a powerful predictor of recurrences in node-negative and ER-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, 2011 Aug;128(3):633-41.

再生医療用細胞シートの磁気力負荷装置による新たな物性計測法の開発



研究責任者 関西医科大学 医学部医学科
物理学教室
教授 影島 賢巳

1. はじめに

単一細胞レベルの厚さの細胞シート^{1,2)}を体外で培養できるようになったことで、再生医療において新たなブレークスルーがもたらされることが期待されている。例えば、動脈壁の力学的負荷に対する物性に決定的な役割を果たす細胞外マトリックス中の弾性線維は、加齢などによって劣化すると体内での再生が不可能なため、各種の加齢性疾患の原因となってきた。これを体外で培養して移植することができれば新たな治療方法となる。しかし、弾性線維の形成メカニズム^{3,4)}においては不明な点が多く、これを解明するには、*in vitro*での培養条件の変更や、*in vivo*において遺伝子操作マウスの使用など、種々の条件下で、細胞が生成した細胞シートの物性を系統的に調べる必要がある。

細胞外マトリックスは、弾性線維やコラーゲンで構成され、構造的にも材質的にもヘテロな系であり、細胞シートになると、さらに細胞自身や各種の細胞接着分子まで含まれる非常に複雑な系である。これらの個々の構成要素の物性も重要である反面、臨床の観点からは、巨視的なシート全体としての物性も重要である。

膜状の生体試料の力学的特性を計測する方法はこれまでにいくつか提案されており、球状の錘を載せて変形量を測る方法^{5,6)}、機械的な圧子を用いる方法⁷⁾、気圧を用いる方法⁸⁾などがある。それぞれ利点があるが、ここで求められているような細胞シート物性の計測とはやや用途が異なると考えられる。*in vitro*で培養された細胞シートは、容易にミリメートルもしくはセンチメートルのスケールの広がりを持つ一方で、その厚みは基本的には単一細胞レベルであり、さらにその下地となるマトリックスシートになるとさらに薄い。このように極薄かつ大きな面積を持つ細胞シートは非常に繊細であり、力学的特性を計測する新たな手法を開発する必要があると考えた。

2. 鉛直負荷型装置の開発

2.1 開発の方針

開発を始めるにあたって、以下のような点を要請事項として考えた。

① 生理環境もしくはそれに近い状況に試料を置いたまま計測できること。そのためには液中の試料に力を及ぼし、またその変形量を観測できる必要がある。

② 試料に加える力の強さを任意に制御できること。

③ 動的な物性を計測できるよう、時間変化する波形の力を印加できること。これは、また、生体内での脈拍による血圧の変動や損傷などによる突発的な負荷変化状況を再現する用途としても重要である。

これらの要請事項を併せ考えると、遠隔的に微弱かつよく制御された力を及ぼせる磁気力を利用するのが有効である。

2.2 装置の概要

図1に開発した装置の模式図を示す。直径4mmの円形孔状に試料となるシートを担持し、その中央に直径0.8mmの着磁性金属球を置いて、下方から電磁石で磁気力を印加する方式を考案した。磁気力による球の鉛直変位を、光学式の変位計を用いて $1\mu\text{m}$ の分解能で読み取る。電磁石の駆動用に、電圧-電流変換回路を製作し、電磁石のインダクタンスの影響を受けずに正確な波形の電流を流すことができるようになっている。1-500 μm 程度の力のダイナミックレンジと100Hz以上の応答帯域を持っており、人間の脈拍周波数をカバーするほか、突発的な負荷など特異な負荷状況も再現できる。

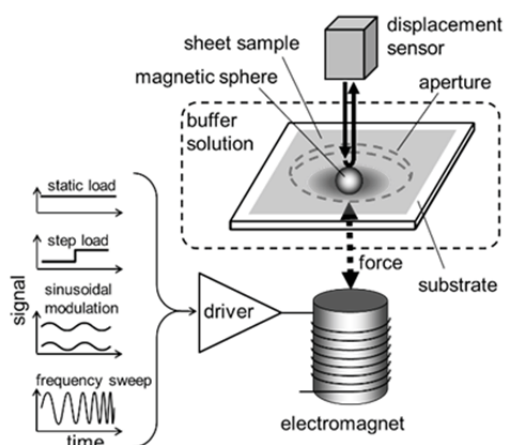


図1 鉛直荷重型装置の模式図

2.3 細胞シートおよびマトリックスシートの力学物性計測

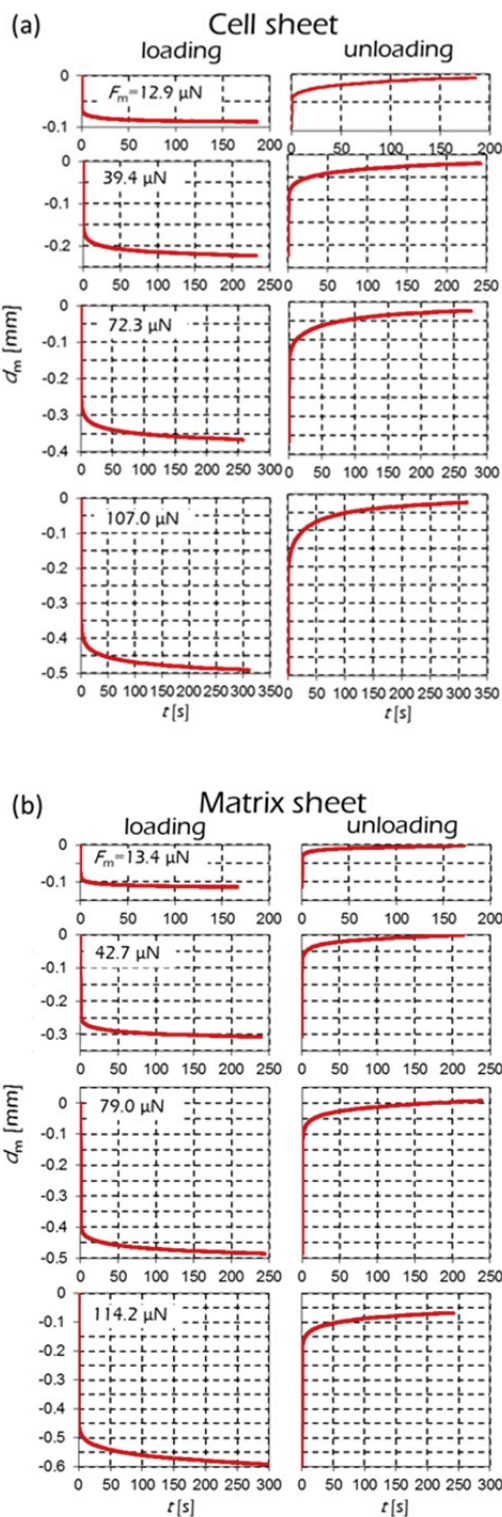


図2 ステップ状の荷重をオンオフした細胞シート(a)および細胞外マトリックスシート(b)の変形応答

この装置を用いて、ヒト繊維芽細胞を培養して作成した細胞シート、および培養後に細胞のみを除去したマトリックスシートの2種の試料について、ステップ応答による力学的特性の計測を行

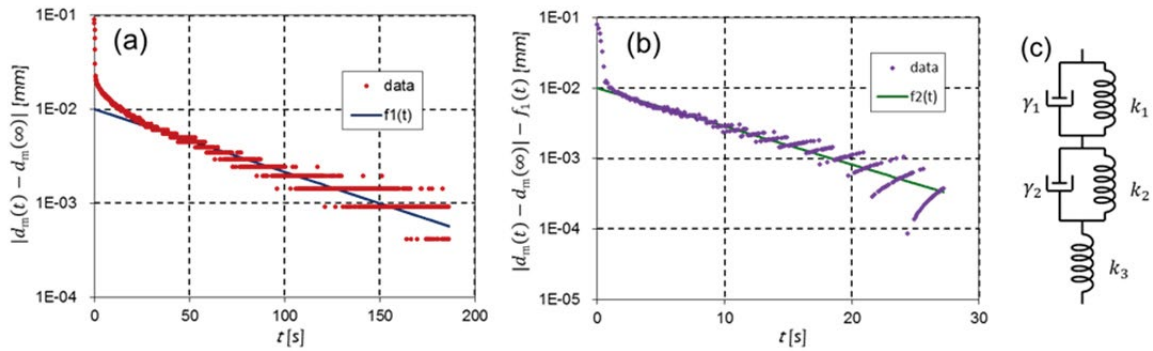


図3 図2(a)の左上のデータの変位量を漸近線でフィッティングした結果(a)、(a)のデータと漸近線の差をあらたにフィッティングした結果(b)、およびこれらから導いた力学的等価モデル(c)

った。段階的に負荷力の設定値を変えながら、負荷をステップ状にオンオフし、取得した変位量の時間依存プロファイルを図2に示す。どのデータも、負荷の切り替え直後の瞬間的な変位と、それに引き続く最終値への漸近的变化から成ることがわかる。

図3は、このデータ中、細胞シートの最小負荷オン時のプロファイルを用いた時定数解析の例である。変位量は、時定数およそ60秒の遅いクリープ過程(モード1)へと漸近していく(図3(a))のがわかる。この粘弾性モードを $f_1(t)$ とする。データからこの漸近関数を差し引いた量も、また時定数およそ7秒のより速いクリープ過程(モード2)へと漸近する(図3(b))。これよりも速い成分は、純弾性的な瞬間変位(モード3)で近似すると、試料全体の变形は、図3(c)のような3つのモードを持つ粘弾性モデルで表すことができる。モード1の時定数 τ_1 は、弾性定数 k_1 と粘性抵抗係数 γ_1 で決まる。モード2も同様である。この3つのモードから成る粘弾性モデルは、両方の試料に共通に当てはまり、負荷の大きさやオン/オフの違いによらないことがわかった。

このモデルを用いて、各モードによる変形量を外挿した極限值を d_1, d_2, d_3 とすると、これらは試料の純粋に弾性的な応答を表すため、ヤング率を算出することができる。ただし、正確なヤング率

の算出には試料の厚さを精度よく計測することが不可欠であるため、現時点では暫定的な値に留まっている。この問題は、次章で述べる水平負荷型装置の開発の必要性にも関連して来る。

図4は、これら3つのモードによって担われる変位量の値 d_1, d_2, d_3 および時定数 τ_1, τ_2 の、負荷力の大きさやオンオフについて比較したものである。時定数が負荷力に伴って、おおむね増加する傾向にある点は注目に値する。両方の試料についてこの特徴が表れていることから、細胞外マトリックスの特性と考えられる。高い負荷がかかるほど、弾性的応答に比しての粘性的応答の割合が増加していることを意味している。

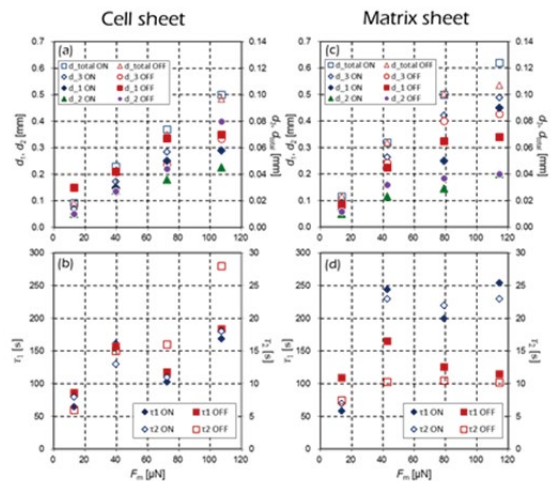


図4 各モードによる変形量 d_1, d_2, d_3 および時定数 τ_1, τ_2 の負荷力および負荷オン/オフによる変化

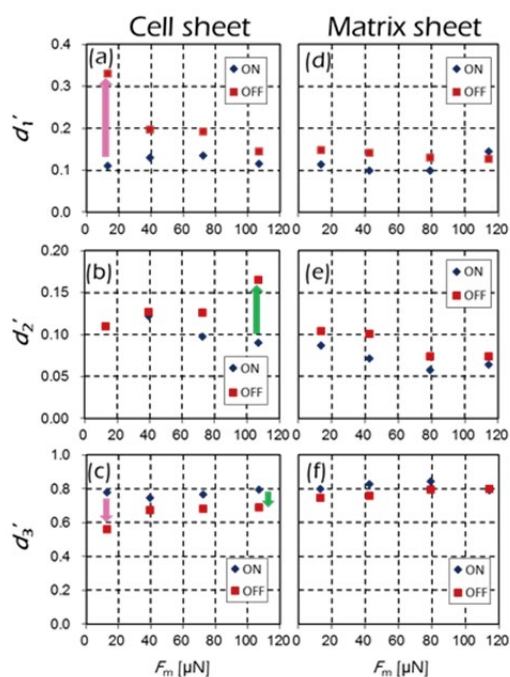


図5 全変位量に占める各モードの割合 d_1 , d_2 , d_3 の負荷力および負荷オン/オフによる変化

また、上記の3つのモードによって担われる変形量の比は一定ではなく、図5に示すように、負荷の大きさとオン・オフの別によって、また細胞シートとマトリックスシートの違いによって変わることが見いだされた。マトリックスシートでは負荷力によってモード間の変形量の比率に顕著な差が見られず、また負荷のオン・オフによる不可逆性も小さい。つまり、その力学負荷に対する反応はほぼ純粋に力学的であり受動的である。それに対し、細胞シートの場合は、負荷をオンにした際には瞬間的に変形した成分が、そのまま2〜3分の静的負荷を続けた後でオフした際に、粘性を増して粘弾性的に戻る様子が観測される。また、低負荷時には長い時定数をもつモード1に移行する割合が多いが、高負荷になるにつれて、短い時定数を持つモード2の方で戻るようになる傾向も見られる。これらの現象は、同時に培養して同じ日に計測を行った各1枚ずつの細胞シートおよびマトリックスシートについてもほぼ同様に観測されている。

以上のことから、生きた細胞は、無生物である

細胞外マトリックスと異なり、力学的負荷を検知して、それ自身の形態や力学的性質を変化させていることを示唆しているのではないかと考えられる。また、これら3つのモードは、互いに完全に別個なものではなく、少なくともそのうちの何割かは柔軟にその役割を変えているのではないかと推測される。細胞の生命活動によって、単純な物理法則からの逸脱が見られたと考えると非常に興味深い。これらの過程が生命活動のためにどのような意味を担っているのかは不明である。

3. 水平負荷型装置の開発

3.1 開発の方針

前章で述べたような鉛直負荷型の装置は、試料の上に磁性球体を載せるだけで測定でき簡便である反面、以下に示すような大きな制約を抱えていた。

① 磁性球体の自重が印加できる負荷力の下限となり、弱負荷領域の測定ができない。

② 試料の下方が電磁石で、上方が変位計で塞がれる形となり、負荷中の試料の光学顕微鏡などによる観察が困難である。これは、ヤング率などの算出に欠かせない試料の厚み計測においても障害となる。また、負荷中に他の刺激・侵襲手段を併用することも困難である。

③ 試料中の磁性体に接した点に強い応力が生じ、高負荷で試料の断裂が起こることがあるため、弾性線維の応答が非線形的になると考えられる高負荷領域の測定が十分にできない。

④ 試料に及ぼされる力の大きさを直接計測することができず、磁性球の位置と磁気力の関係をあらかじめ測定したチャートを用いて後から換算するしかない。

そこで、これらを解消できる、新たな方式の装置を開発することにした。水平に担持した試料シートに対して、水平方向に伸長力を及ぼす方式が、上記3つの問題をクリアするうえで最適であると考えた。

3.2 水平負荷型装置の実際

図6に試作した水平負荷型の装置の模式図を示す。試料のシートを可動式の2つのピースの間に架橋する。可動ピース1は、板バネによって容器の壁面に半固定され、可動ピース2には、磁気力を受けるパーマロイ片が取り付けられている。2つの可動ピースの変位を、それぞれ独立した光学変位計で読み取る。可動ピース1の変位量が試料に加わる張力に、可動ピース1と2の変位量の差が試料の伸長量に、それぞれ相当する。

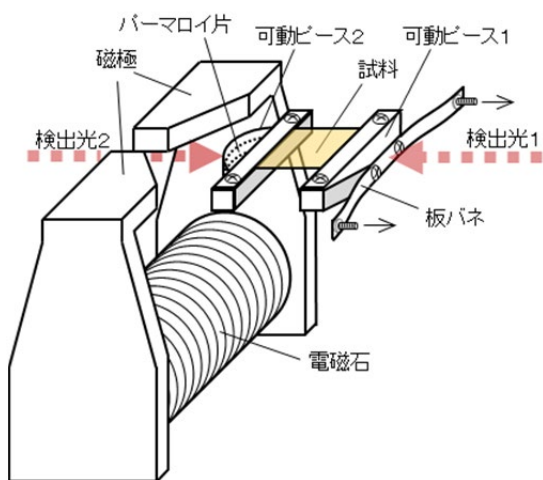


図6 水平負荷型装置の模式図

可動ピース1に取り付ける板バネには、微弱な力に反応できるだけのコンプライアンスを持つこと、変位量と力の間に線形性が成り立つこと、光学変位計が誤動作しないよう可動ピース1が完全に並進する形で動けること、負荷を印加しながらの長時間培養にも適すること、といった制約がある。そこで、金属バネの使用を避け、エンジニアリングプラスチックの1種である PEEK の 0.05 mm 厚の極薄板で板バネを製作した。この板バネで固定された可動ピース1に力を加えて変位量を測定した結果を図7に示す。全体では、高分子集合体の特徴である、上に凸な非線形性が見られるが、1 mN 以下のほぼ直線と見なせる部分の勾配より、弾性定数が 38 N/m と求められた。

可動ピース2は、電磁石の磁極から漏洩する磁場の勾配によって並進力を受け、磁極に引き付け

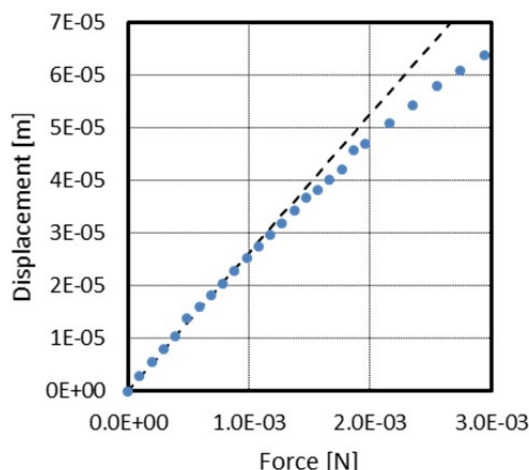


図7 可動ピース1への負荷力と変位の関係

られる。磁極には、可動ピース2の変位を検出する光のパスを確保するためギャップが設けられている。また、漏洩磁場を大きくするため、図8に示すように、可動ピースに面した側の角を斜めに切り落とした。磁気力を受けるため、当初は 45 パーマロイの平板状薄片を可動ピース2に貼りつけたが、磁場勾配中に置かれると、図8(a)のように、その端部により強い磁気力を受け、向きを変えてどちらかの磁極に引き付けられてしまう問題があった。そこで、図8(b)のように、パーマロイ薄片を半円筒状に湾曲させたところ、安定な並進運動を起こさせることが可能になった。

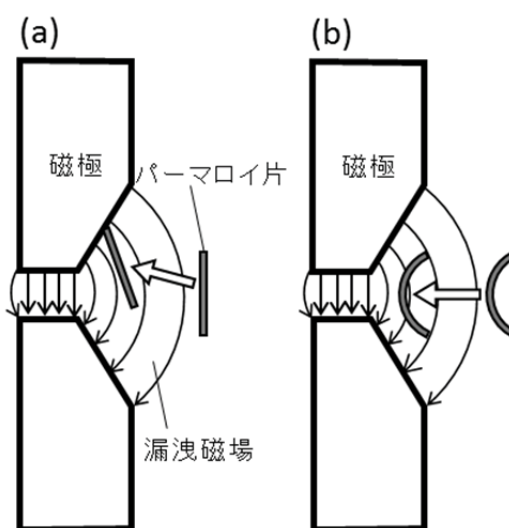


図8 磁極ギャップから平板状(a)および湾曲した(b)パーマロイ片に作用する引力

3.3 動作テスト

細胞シートは、一度の培養に2週間以上の時間とコストを要するうえに、保存期間も短い。また、極端に薄く損傷しやすい細胞シートを、損傷することなく確実に可動ピース間に懸架する技術も新たに別途開発する必要がある。そこで現時点での試験用の試料として、市販の医療用ポリウレタンシートのうち最も薄い7 μm 厚のものを用いた。ポリウレタンシートを幅5 mmに切断し、粘着剤を除去したうえで、2つの可動ピース間の5 mmの間に懸架し、その両端をそれぞれの可動ピースに樹脂製の押さえ板によって固定した。

図9に、静的な伸長力とそれに対する伸長量の関係を示す。およそ1.3 mNの負荷力まではほぼ線形な関係が得られているが、それ以上の伸長力だとほとんど伸長しなくなる性質が得られている。この特性は再現性があるので、この製品の特性であると考えられ、線形部分の勾配より2.4 MPaというヤング率が得られた。人体に直接貼付する医療用材料としてはおおむね妥当な値であり、この検出方式でシート状試料の静的物性計測が可能であることが確認できた。

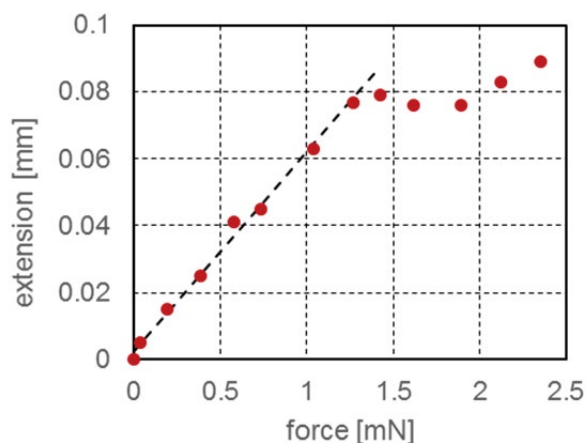


図9 医療用ポリウレタンシートに加えた伸長力と伸長量の関係

3.4 水平負荷型装置開発の今後について

上記のように、水平負荷型の装置は、シート状試料の静的な力学特性を取得できることまでは確認できた。より興味深い、動的な物性の計測に

向けて今後は開発を進める予定である。本装置の開発においては、可動ピース1の変位量は試料に加えられる伸長力と常に等しいというのが1つの前提となっているが、2つの可動ピースがそれぞれ別々に動いて全系の重心位置が変動するならば、可動ピース1と2に作用する力は厳密には一致しないはずであり。加えて、試料自身の粘性的応答も重畳されてくるため、厳密なデータの解釈は複雑になると考えられる。

また、前述のように、柔らかく極薄の細胞シート試料を可動ピースにどのように固定するかについては、各種の接着方法を試行する必要がある、さらには貴重な試料を損傷することなく確実に装置にマウントするための方法を見出すためにも試行錯誤が必要とされる。

4. まとめ

以上で述べたように、細胞シートの力学的物性を計測することによって、種々の新しい視点が拓かれる可能性を示すことができた。細胞シートは、細胞外マトリックス、細胞接着分子、細胞といった構成要素の階層的な複合体であり、これらがどのように作用しあって実際の力学物性を担っているのかを検証するには、単一の軸での力学計測だけではなく、より微視的な計測や、長時間の経時観測なども行う必要がある。新たに開発に取り組んだ水平負荷型装置は、種々の複合的分析への発展の可能性を持っている装置である。先に述べた、簡便に測定が可能な鉛直負荷型装置とは対照的な利点を多く有しており、今後も研究を継続して実用段階にまで持ち込みたい。

謝辞

本研究は、関西医科大学物理学教室の丸山敏朗博士、同大学薬理学講座の赤間智也准教授および中邨智之教授との共同研究です。研究の遂行にあたっては、中谷医工計測技術振興財団より助成を受けました。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells, N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki and Y. Sakurai, *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Comm.* 11, 571 (1990).
- 2) Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai and Y. Sakurai, *Biomaterials* 16, 297 (1995).
- 3) Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo, T. Nakamura, P.R. Lozano, Y. Ikeda, Y. Iwanaga, A. Hinek, S. Minamisawa, C.-F. Cheng, K. Kobuke, N. Dalton, Y. Takada, K. Tashiro, J. Ross Jr, T. Honjo and K.R. Chien, *Nature* 415, 171 (2002).
- 4) Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo, M. Hirai, T. Ohbayashi, M. Horiguchi, K. Okawa, A. Hagiwara, K.R. Chien, T. Kita and T. Nakamura, *J. Cell. Biol.* 176, 1061 (2007).
- 5) Characterizing viscoelastic properties of thin elastomeric membrane, B.F. Ju and K.-K. Liu, *Mechanics of Materials* 34, 485 (2002).
- 6) Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications, M. Ahearne, Y. Yang, A. J. El Haj, K.Y. Then, and K.-K. Liu, *J. R. Soc. Interface* 2, 455 (2005).
- 7) Mechanical characterization of biomimetic membranes by micro-shaft poking, M. Ahearne, E. Siamantouras, Y. Yang and K.-K. Liu, *J. R. Soc. Interface* 6, 471 (2009).
- 8) Apparatus for measuring the finite load-deformation behavior of a sheet of epithelial cells cultured on a mesoscopic freestanding elastomer membrane, J.C. Selby and M.A. Shannon, *Rev. Sci. Instrum.* 78, 094301 (2007).
- 9) Multi-scale mechanical characterization of a freestanding polymer film using indentation, K.-K. Liu and K.-T. Wan, *Int. J. Mat. Res.* 99, 1 (2008).

本研究に関する発表論文

- 1) Novel magnetic indenter for rheological analysis of thin biological sheet for regenerative medicine, Masami Kageshima, Toshiro Maruyama, Tomoya Akama, and Tomoyuki Nakamura, *Rev. Sci. Instrum.* 87 (2016) 074302 (1-12).

臨床応用を目指した酸化ストレス可視化プローブの開発



研究責任者 金沢医科大学 総合医学研究所
生命科学研究領域 細胞医学研究分野
教授 岩脇 隆夫

1. はじめに

地球をとりまく大気には約 21%の酸素が含まれている。多くの生物は酸素を取り込むことで呼吸しており、その酸素は生命を維持する上で必要不可欠なものと考えられている。しかし、その一方で酸素には有害な一面もある。体内に取り込まれた酸素の一部は不安定で多くの物質と反応しやすい活性酸素に変化する。この活性酸素は DNA やタンパク質、脂質などの生体分子を酸化し、それらの機能を奪うことが知られている。このような酸化による生体分子の機能障害（酸化ストレス）は我々の生活と非常に密接に関わっており、老化や癌さらには生活習慣病などの様々な疾患をもたらす重要な要因であることが最近の研究から分かってきた。例えば、糖尿病では糖が酸化されタンパク質と結合した異常な糖化タンパク質が増加している。また、動脈硬化を起こした血管では酸化脂質が溜まることにより血管の内径が狭くなり、結果として血液の流れが悪くなると言われている。これらの疾患に対する予防、診断あるいは治療法を開発する上で生体内の酸化ストレスを評価することは大変重要な課題である。これまで、酸化ストレスの評価には血液や組織のサンプルを用いたマーカー分子の測定が行われてきた。しかしながら、このような方法に

は煩雑な操作が必要であり、結果が判明するまで多くの手間と時間がかかっていた。また、抽出したサンプルを用いた場合、実際の生体レベルで酸化ストレスが「いつ」、「どこで」生じているのかを評価することは困難であり、生体イメージングの活用が求められている。

2. 酸化ストレス応答分子

前述した通り、生体分子の酸化は有害なことが多く、細胞には酸化ストレスを解消するような仕組みが備わっている。それを我々は酸化ストレス応答とよんでいる。酸化ストレス応答は非常によく研究されていて、かなり理解が進んでおり、大きな役割を果たすものの中には Keap1 と Nrf2 が知られている²⁾。Nrf2 は本来転写因子としての機能を持っていて、抗酸化応答エレメントとよばれる DNA 配列に結合し、抗酸化反応に重要な遺伝子群の活性化を引き起こす。一方、Keap1 はこの Nrf2 に対してポリユビキチン化を促進してプロテアソーム分解へ導くために働く分子として存在する。しかしながら、この Keap1 の活性は細胞の酸化ストレス状態によってコントロールされており、通常状態では高活性を維持し、酸化ストレス状態では不活性化する。つまり、非酸化ストレス状態の細胞では Nrf2 は積極的に分解され

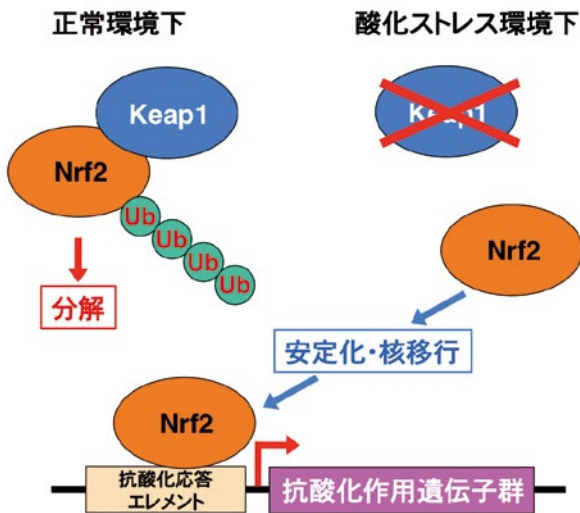


図1 Nrf2およびKeap1による酸化ストレス応答

るが、酸化ストレス状態の細胞では安定的に存在することができるのである（図1）。また eIF2α キナーゼも酸化ストレス応答には欠かせない分子であり、それらによって酸化ストレス時に eIF2α がリン酸化されると、ATF4 とよばれる転写因子の翻訳が活性化されるようになる。その ATF4 も Nrf2 同様に抗酸化反応に重要な遺伝子群の活性化を引き起こすと考えられている（図2）。ちなみに eIF2α キナーゼは4種類が知られており、その中でも GCN2 および HRI が酸化ストレス応答に貢献するようだ³⁾。

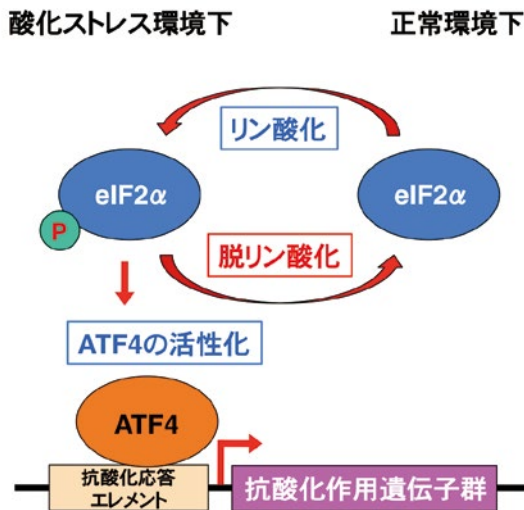


図2 eIF2α およびATF4による酸化ストレス応答

<Nrf2 を利用した酸化ストレスの可視化>

これまでに我々は Nrf2 および Keap1 機能を上

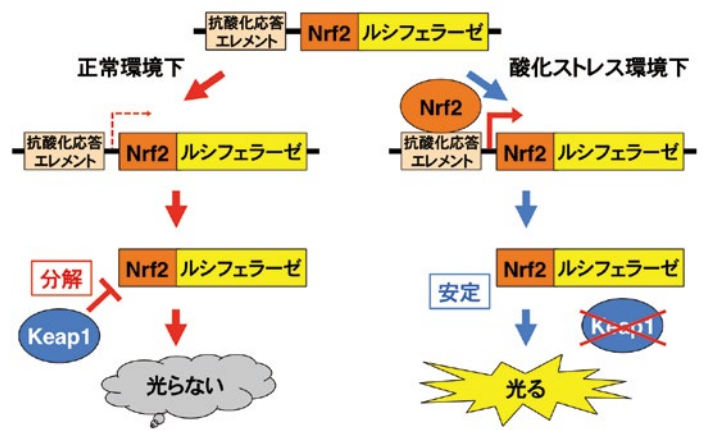


図3 Nrf2およびKeap1の機能を利用した酸化ストレス可視化機構

手く利用した人工遺伝子を作成することで酸化ストレスの可視化に成功している。実際の人工遺伝子はヒト由来の Nrf2 遺伝子とホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を融合し、それを抗酸化応答エレメントの制御下におくことで作成されている。この人工遺伝子を導入した細胞や動物では酸化ストレスに曝されていないとき、人工遺伝子の抗酸化応答エレメントに結合する Nrf2 が少ないため、融合ルシフェラーゼ遺伝子の活性化は本来の抗酸化作用遺伝子群と同様に低く抑えられる。また Nrf2 と融合したルシフェラーゼが合成されたとしても、それは Keap1 の働きにより分解されることになる。逆に酸化ストレスに曝されているときは、人工遺伝子の抗酸化応答エレメントに結合する Nrf2 が増加し、融合ルシフェラーゼ遺伝子の活性化は本来の抗酸化作用遺伝子と同様に強く促される。当然、この状態では融合ルシフェラーゼの Keap1 による分解は抑制される。このような酸化ストレスに応じてルシフェラーゼが作り出される仕組みと分解されにくくなる仕組みの二段構成とすることで、この人工遺伝子の発現は厳密にコントロールされる（図3）。この遺伝子を実際に導入されたトランスジェニックマウスでは日常レベルの紫外線で生じるような弱い酸化ストレスも可視化できた（図4）。また、このトランスジェニックマウスを用いれば、同一個体での連続的な酸化ストレスの評価も容易であり、実験の度ごとにマウスを犠牲にする必要性

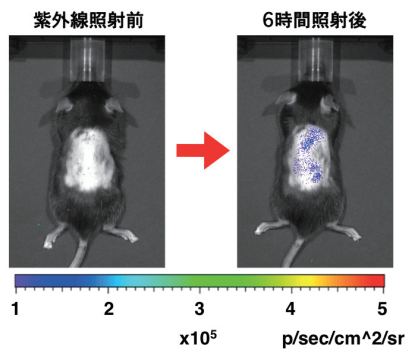


図4 紫外線で生じる酸化ストレスの生体イメージング像

はかなり減った⁴⁾。現在、このトランスジェニックマウスを用いて疾患や老化などの健康障害に伴われる酸化ストレスの状態や抗酸化物質による酸化ストレスの抑制作用などを調査しており、ある種の疾患治療薬や高機能性食品、化粧品の開発に繋げるためのデータを積み重ねつつある⁵⁾⁻⁷⁾。

3. 酸化ストレス可視化プローブ開発

ヒトへの遺伝子組換えには倫理上の問題があるため、先にマウスで成功した手法をそのまま応用することは難しい。つまり臨床の現場などで酸化ストレスを可視化するためには何らかの技術的進展を加えるなければならない。そこで我々は以下のような分子(Nrf2の分解に関わるドメインの一端に細胞膜透過性ペプチドとその逆側端に任意のリガンドキャリアタンパク質を連結した人工タンパク質)の設計を行った(図5)。この人工タンパク質は細胞外・生体外から作用させても細胞膜透過性ペプチドを持つために細胞内に浸透していくことが期待される。もし期待通り細胞内に浸透すれば、この人工タンパク質は内在性のNrf2と同様にKeap1の制御を受け、非酸化ストレス状況下では分解され、酸化ストレス状況下では安定化するはずである。更にそこへ任意のリガンドを融合した蛍光または発光色素を作用させれば、光シグナルとしてNrf2の分解および

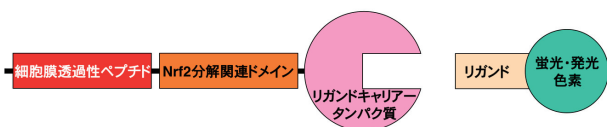


図5 Nrf2およびKeap1の機能を利用した酸化ストレス可視化プローブの模式図

安定性が観察できて、ひいては酸化ストレスの評価を非侵襲的に行うことができるはずで、実際にこのような分子プローブの開発を目指した。ちなみに同様の分子プローブはHIF1の機能特性を利用して低酸素ストレス可視化を目的として先行的に開発されている⁸⁾。さて、開発の第1段階では既知の細胞膜透過性ペプチドに変異を導入しながら数十種類の酸化ストレスレポーター発現遺伝子を作成した。具体的な遺伝子構成は順にタンパク質精製用タグ配列、膜透過性ペプチドのコード域、Nrf2の分解調節領域、ルシフェラーゼ遺伝子、蛍光リガンド結合領域である。第2段階では先に作成した遺伝子コンストラクトをタンパク質発現・精製用大腸菌に導入し、精製用タグ配列を利用してタンパク質精製を行った。第3段階では先に精製したレポータータンパク質を数種類の一般的な培養細胞の培地中に添加して、レポータータンパク質の膜透過性、つまり細胞への浸透性をウエスタンブロット解析にて評価した。またレポーター能に関しては薬剤誘導性の酸化ストレスを与えて実際のレポーター活性を評価した。第1および第2段階は計画通り進んだものの、第3段階の機能性評価では期待した結果が得られていない。作成した全てのレポータータンパク質が細胞内に殆ど浸透せず、レポーター活性もバックグラウンドと同レベルとなっている(図6)。開発の第4段階ではマウス生体レベルでの評価を予定していたが、第3段階でのトラブルのため中止した。現在は第一段階のレポーター構成から見直しを行っている。

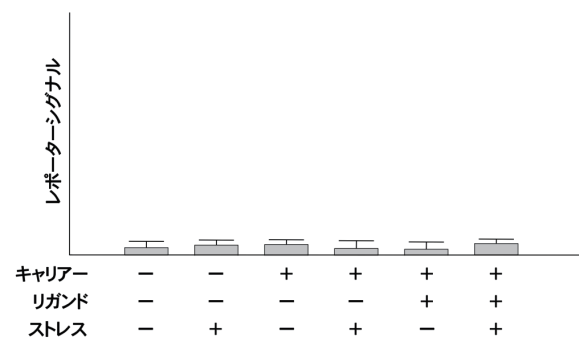


図6 酸化ストレス可視化プローブの評価結果

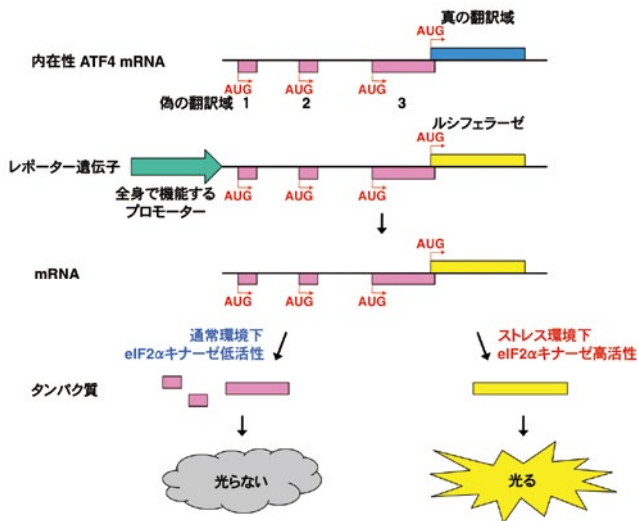


図7 eIF2 α およびATF4の機能を利用した酸化ストレス可視化機構

4. ATF4 を利用した酸化ストレスの可視化

先の酸化ストレス可視化プローブ開発のトラブルを受けて、Nrf2 依存性の酸化ストレスレポーターだけでなく、(申請書の計画外ではあるが)別の新たな酸化ストレスレポーターの開発も行うことにした。eIF2 α のリン酸化/脱リン酸化制御は酸化ストレスを含む様々な細胞ストレスに対して重要なものとなっている。eIF2 α は真核細胞の細胞質中に存在し、タンパク質の翻訳開始複合体形成で働いている。もう少し細かく言うと eIF2 α は eIF-2B によって GDP 型から GTP 型への転換を受ける分子であるが、eIF2 α の 52 番目のセリンがリン酸化されると、この eIF2B による機能は抑制され、一般のタンパク質合成にはブレーキがかかる。しかし ATF4 のタンパク質合成はユニークで以下のような仕組みが備わる。ATF4 遺伝子から転写される mRNA には真の翻訳開始点より上流 (5'側) に偽の翻訳開始点が存在する。ストレスがなく eIF2 α キナーゼがいずれも活性化しない場合には翻訳開始複合体の形成がスムーズに行われ、ATF4 遺伝子の翻訳は偽の開始点から優先して起こる。つまり、正常な環境下では機能的な真の ATF4 タンパク質は合成されない (されにくい) のである。逆にストレスに曝されている場合、eIF2 α はリン酸化され、翻訳開始複合体の形成に遅れが生じる。この遅れは ATF4mRNA の上流域からの偽翻訳を不可能また

は困難な状況にして、真の翻訳開始点からのタンパク質合成を起りやすくする⁹⁾。この ATF4 の翻訳制御は厳密に制御されていて生体イメージング技術に利用するには格好の分子メカニズムであり、我々は図7のように ATF4 遺伝子の真のタンパク質コード域をレポーター遺伝子のものに置換することで酸化ストレスを可視化できると考えた。置換した遺伝子をマウス全身で機能するプロモーターの支配下に置けば、カラダのあらゆる部位のストレスを評価できるはずである。そのような人工遺伝子を実際に作成してトランスジェニックマウスを得たところ、酸化ストレスに強く応答してレポーター活性を上昇させる性質が明らかとなった。加えてアミノ酸飢餓ストレス、ウイルス感染ストレス、および小胞体ストレスでもレポーター活性を上昇させた (図8)。この ATF4 依存的ストレス可視化マウスは内在性 eIF2 α のリン酸化/脱リン酸化制御および内在性 ATF4 タンパク質の発現状況を理想的に反映するので論文発表したところである¹⁰⁾。

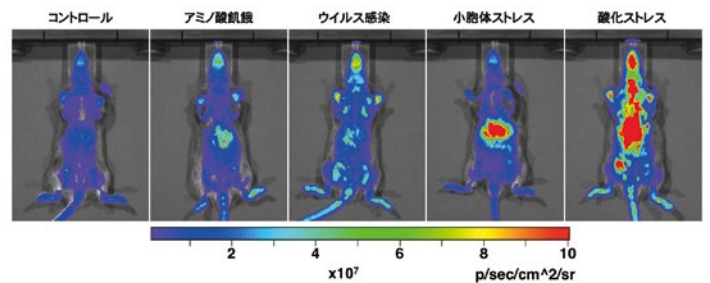


図8 各種ストレスの生体イメージング像

5. まとめ

Nrf2 依存的な酸化ストレス可視化マウスは開発から今日まで多くの研究で利用され、幾つかの成果を挙げつつあり、期待通りの働きをしている。一方、Nrf2 依存的な酸化ストレス可視化プローブ開発は未だ成功には至っておらず、今後の更なる研究が必要となっている。まずは問題点を洗い出し、解決策を探る試行錯誤を行わなければならないだろう。また申請計画実行途中で新たな課題を思い付き、ATF4 依存的な酸化ストレス可視化マ

ウスの開発に成功した。これは先の Nrf2 依存的な酸化ストレス可視化マウスと同様に医学・薬学研究において様々な有用性が期待できるので、多くの共同研究へと展開して面白い発見に繋がっていききたい。

謝辞

本研究は公益財団法人中谷医工計測技術振興財団より開発研究助成を受けて行われたものであり深く感謝したい。

参考文献

1. Adly AA“Oxidative stress and disease: an updated review”*Res J Immunol.*, 3, 129-145, 2015.
2. Suzuki T, Yamamoto M“Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system”*Free Radic Biol Med*, 88, 93-100, 2015.
3. Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali“A The eIF2 α kinases: their structures and functions”*Cell Mol Life Sci*, 70, 3493–3511, 2013.
4. Oikawa D, Akai R, Tokuda M, Iwawaki T“A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress”*Sci Rep*, 2, 229, 2012.
5. Takagi T, Kitashoji A, Iwawaki T, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H“Temporal activation of Nrf2 in the penumbra and Nrf2 activator-mediated neuroprotection in ischemia–reperfusion injury”*Free Radic Biol Med*, 72, 124-133, 2014.
6. Imai T, Iwawaki T, Akai R, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Hisaeda H“Evaluating experimental cerebral malaria using oxidative stress indicator OKD48 mice”*Int J Parasitol*, 44, 681-685, 2014.
7. Ohba T, Ishisaka M, Tsujii S, Tsuruma K, Shimazawa M, Kubo K, Umigai N, Iwawaki T, Hara H“Crocetin protects ultraviolet A-induced oxidative stress and cell death in skin in vitro and in vivo”*Eur J Pharmacol*, 789, 244-253, 2016.
8. Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka S, Ushiki T, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S“In vivo imaging of HIF-active tumors by an oxygen-dependent degradation protein probe with an interchangeable labeling system”*PLoS ONE*, 5, e15736, 2010.
9. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM“The integrated stress response”*EMBO Rep*, 17, 1374-1395, 2016
10. Iwawaki T, Akai R, Toyoshima T, Takeda N, Ishikawa T, Yamamura K“Transgenic mouse model for imaging of ATF4 translational activation-related cellular stress responses in vivo”*Sci Rep*, 7, 46230, 2017.

平成 27 年度 (第 32 回)
奨励研究助成 研究成果報告

細胞内 RNA 二重鎖構造を標的とした蛍光可視化プローブの開発 (東北大学大学院理学研究科 助教 佐藤 雄介) -----	196
細胞内小胞体ストレスを経時的、空間的に検出するための高感度プローブの開発 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 助教 小池 雅昭) -----	199
ユビキチンリガーゼの基質を細胞内で網羅的かつ定量的に計測する新規手法の開発研究 (北海道大学大学院医学研究科 助教 渡部 昌) -----	204
神経変性疾患の診断法開発を目指したエクソソームシャペロームの変容解析 (大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座講師 武内 敏秀) -----	211
蛍光型ホウ素センサーによる簡便なホウ素薬剤分析法の開発 (大阪府立大学地域連携研究機構 講師 服部 能英) -----	218
収縮力計測可能な神経支配骨格筋組織チップの開発 (名古屋大学大学院工学研究科 准教授 清水 一憲) -----	225
ナノ薄膜干渉基板を用いた多項目同時・蛍光増強イムノアッセイ (関西学院大学大学院理工学研究科 博士研究員 安田 充) -----	231
生きた動物の中で分子反応や細胞動態を解析するための分子イメージング法の開発研究 (国立循環器病研究センター研究所生化学部 流動研究員 西村 博仁) -----	240

注1 顔写真は研究責任者です。

注2 本成果報告は平成 27 年度の助成金の贈呈に基づき、平成 28 年度に実施され、平成 29 年 7 月までに執筆された研究成果です。所属等は助成研究実施時または執筆された当時のものです。

細胞内 RNA 二重鎖構造を標的とした蛍光可視化プローブの開発



研究責任者 東北大学大学院理学研究科
分析化学研究室
助教 佐藤 雄介

1. はじめに

ここ 15 年の間に RNA 干渉などの RNA サイレンシング機構やリボスイッチ配列による遺伝子発現調節など、RNA が関与する新規な生命現象の発見が相次いでいる。ここでは細胞内で RNA が多様な高次構造を伴うことで他の有機小分子や核酸・タンパク質との特異的な相互作用を可能とし、多彩な生物学的機能を発現している。このような RNA 機能を本質的に理解するためには、生細胞内で標的 RNA 構造をそのまま可視化（イメージング）し分析する技術の開発が必要不可欠である。

一方で、細胞内の RNA イメージングを可能とする技術のハードルは高く、特に細胞内の RNA 二重鎖構造を検出対象とする場合、その有効な方法論はいまだ確立されていないのが現状である。

本研究では、細胞内 RNA 二重鎖をイメージングしうる新規な分析技術の開発を目的として、RNA 二重鎖構造を強力かつ効果的に捕捉しうる蛍光性プローブの開発を目指した。これを実現するためのアプローチとして、RNA 二重鎖と配列選択的に三重鎖構造を形成しうるペプチド核酸（Peptide nucleic acid: PNA）に着目した¹⁾。ワトソククリック塩基対を形成しているグアニン、アデニンをフーグスティーン塩基対によりそれぞれ

プロトン化シトシン、チミンが認識し塩基三量体を形成することで、安定な三重鎖構造が形成される（図 1 A）。本研究ではこの三重鎖形成反応を蛍光シグナルとして読み出すために、核酸染色剤として使用されているチアゾールオレンジ（Thiazole orange: TO）を擬塩基として PNA 骨格に導入した（図 1 B）。これにより、PNA 部位による三重鎖形成に伴い、TO 部位が三重鎖構造内に挿入（インターカレーション）し、light-up 応答プローブとして機能することを期待した（図 1 C）。

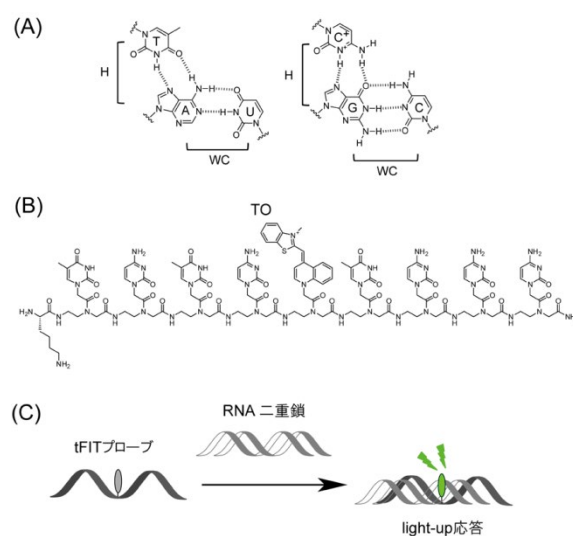


図1 (A)塩基三量体の形成 (WC: ワトソククリック塩基対, H: フーグスティーン塩基対). (B) tFIT プローブの構造式. (C) tFIT プローブによる RNA 二重鎖蛍光検出.

開発したプローブを tFIT (triplex-forming forced intercalation of thiazole orange) プローブと名付け、RNA 二重鎖に対する結合能・蛍光応答を評価し、RNA 二重鎖解析プローブとしての有用性を評価した^{2),3)}。

2. tFIT プローブによる RNA 二重鎖検出²⁾

tFIT プローブの PNA 部位と相補的な塩基配列を持つ RNA 二重鎖 (図 2 A) に対する蛍光応答を検討した (pH 5.5)。まずプローブ単体 (50 nM) ではほぼ無蛍光であるが、これは TO を構成するベンゾチアゾール環とキノリン環が自由回転していることに起因している⁴⁾。ここに等量の RNA 二重鎖 (50 nM) を添加すると蛍光強度が 120 倍も増加することが分かった (図 2 A)。このときの溶液の様子を示したのが図 2 B であり、tFIT プローブが RNA 二重鎖存在下で鮮やかな黄橙色の蛍光を示すことが分かる。一方で、中性条件 (pH 7.0) ではこのような light-up 応答は見られない (図 2 A)。従って、観測された蛍光応答が三重鎖形成に基づくものであると考えられる。事実、このプローブが標的 RNA 二重鎖と安定な三重鎖構造を形成することは融解温度測定からも示唆された。蛍光滴定法により、RNA 二重鎖との結合力を評価したところ、解離定数は 23 nM に達し、強力な結合能を有していることを見出した。また tFIT プローブは標的 RNA 二重鎖配列に対して高い選択性を有していることが分かった。RNA 二重鎖中にミスマッチ塩基対が存在した場合、三重鎖構造の熱安定性は顕著に低下する。この時、プローブの蛍光応答は完全相補配列のものとは比べて著しく小さい。したがって、標的 RNA 二重鎖配列の識別に適用することが可能である。

また、tFIT プローブは RNA 二重鎖に対して迅速に結合し、light-up 応答を示すという、有用なセンシング機能を持っていることを見出した。DNA 骨格に蛍光色素を連結した三重鎖形成プローブがいくつか報告されているが^{5),6)}、その応答には 8 時間以上も要する。これに対し、tFIT プローブ

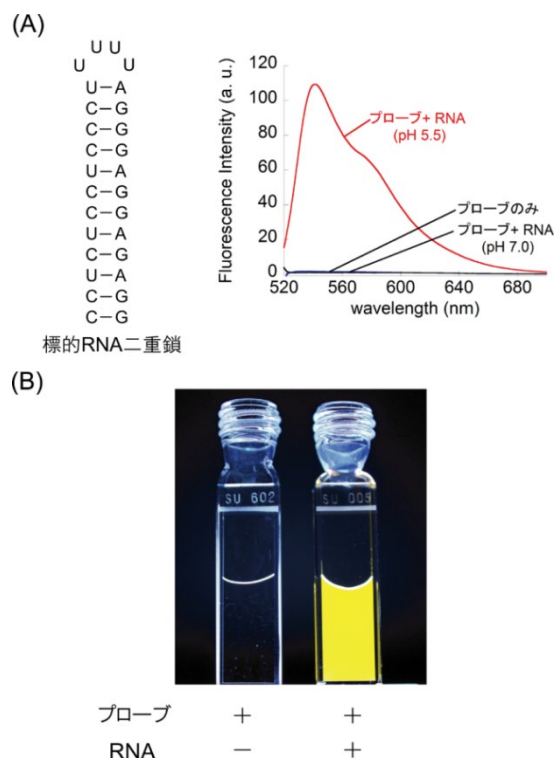


図 2 (A) tFIT プローブの標的 RNA 二重鎖に対する蛍光スペクトル変化. (B) 標的 RNA 二重鎖添加に伴う tFIT プローブの蛍光色変化 (励起波長: 302 nm).

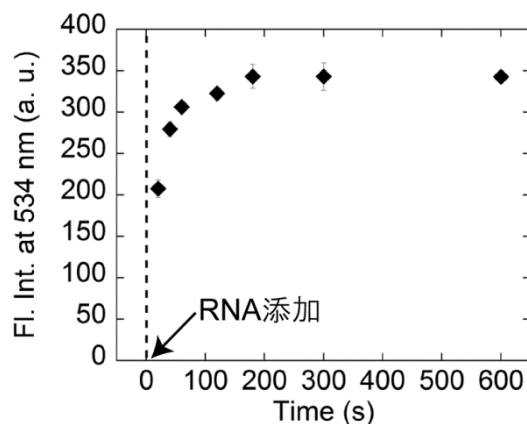


図 3 プローブの蛍光応答の経時変化

はわずか 180 秒で蛍光応答が最大値に達し (図 3)、極めて迅速な結合反応であることが示唆される。実際に、標的 RNA 二重鎖との三重鎖形成反応の会合速度定数を算出したところ、DNA を基本骨格とする三重鎖形成プローブと比較して 2 桁も大きな値であることが分かった。これは tFIT プローブの構造に用いている PNA が電荷中性であるためと考えられる。このような迅速な蛍光応答は RNA 分析に向けた有用なプローブ機能である。

3. tFIT プローブ構造の最適化³⁾

次に、TO 擬塩基の PNA 骨格への導入方法について検討を行った。ここでは、一連の異なる長さのアルキル鎖スペーサーを有する TO 擬塩基を導入した tFIT プローブを設計・合成し、プローブ機能の最適化を図った。その結果、RNA 二重鎖に対する結合能、蛍光応答が著しくスペーサー長に依存することを見出した。このうち、プロピルスペーサー（炭素数 3）を導入した場合、標的 RNA 二重鎖に対する結合力が 10 倍も強化されることが分かった。この三重鎖形成反応を等温滴定型熱量計 (Isothermal titration calorimetry) により解析したところ、観測された結合力強化がエンタルピー (ΔH) 獲得に起因することを見出した。これはプロピルスペーサーを介した場合、TO 部位が三重鎖構造内で核酸塩基と π -スタッキング相互作用が増加していることによるものであると考えられる。以上の結果は、細胞内 RNA 二重鎖イメージングの実現に向けた tFIT プローブ改良において重要な知見である。

4. まとめ

本研究では RNA 二重鎖との三重鎖形成反応を利用した新たな蛍光性プローブの開発に成功した。ここで得られた結果は、現在の分析技術では解析が困難な RNA 二重鎖を標的とした新たな分析方法論になるものと期待できる。一方で、先述した tFIT プローブは天然の核酸塩基（シトシン、チミン）のみを利用しているため、解析対象となる RNA 二重鎖はホモプリン塩基に限定されている。また、その反応条件は弱酸性条件に限定されているため、pH 中性条件で機能しうる tFIT プローブの開発が今後の実用的な分析を可能にするために重要な課題である。今後、「pH 中性条件でフグスティーン塩基対を形成しうるシトシン類縁体」⁷⁾ や「ピリミジン塩基を認識しうる人工核酸塩基」⁸⁾ を組み込むことで、tFIT プローブによる RNA 解析法の実用性の向上を目指す。これにより、RNA 二重鎖の機能解明を目的とした細胞

内イメージング技術の開発が可能になるものと期待できる。

謝辞

本研究の一部は、中谷医工計測技術振興財団奨励研究助成の支援のもとで行われました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

1. Li, M.; Zengeya, T.; Rozners, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 8676.
2. Sato, T.; Sato, Y.; Nishizawa, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 9397.
3. Sato, T.; Sato, Y.; Nishizawa, S., *Chem. Eur. J.*, **2017**, 23, 4079.
4. Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M., *Biopolymers*, **1998**, 46, 39.
5. Guther, N. G.; Alexandre, S. B.; Per, L.; Bengt, N.; Claude, H., *ChemBioChem*, **2002**, 3, 324.
6. Ikeda, S.; Yanagisawa, H.; Yuki, M.; Okamoto, A., *Artificial DNA: PNA&XNA*, **2013**, 4, 19.
7. Zengeya, T.; Gupta, P.; Rozners, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 12593.
8. Gupta, P.; Zengeya, T.; Rozners, E., *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 11125.

細胞内小胞体ストレスを経時的、空間的に検出するための高感度プローブの開発



研究責任者 奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究 動物細胞工学研究室
助教 小池 雅昭

1. はじめに

細胞は常に細胞内外から刺激を受けており、ある閾値以上の刺激に対しては細胞内ストレス応答機構が誘導される^{1) 2)}。なかでも小胞体ストレス応答「Unfolded Protein Response:以下 *UPR*」の分子機構については研究が進んでおり、*UPR*の破綻が神経変性疾患や糖尿病など様々な疾患の原因となることが知られている。*UPR*に関わる因子の機能調節が治療薬のターゲットとなる可能性もあり^{3) 4)}、*UPR*機構の解明は非常に重要な研究課題である。

小胞体はタンパク質合成やレドックス制御、そしてカルシウム濃度の調節を担う細胞内小器官であり、これらの調節機構に異常が生じると *UPR*が誘導される⁵⁾。*UPR*は小胞体ストレスを軽減するためのシャペロン分子やタンパク質分解に関わる因子の誘導、または細胞死シグナルを誘導する。この応答機構には複数の経路が存在するが、我々の研究室では、進化的に最も保存されている *IRE1α*-*XBP1* 経路に注目し研究を進めてきた⁶⁾。小胞体膜タンパク質である *IRE1α* は通常時 *BiP/GRP78* タンパク質 (以下:*BiP*) と結合している。*BiP* が小胞体内の異常を感知すると *IRE1α* から解離し、*IRE1α* は自己集合体を形成することで活性化する(図1)。活性化した *IRE1α* は *XBP1*

mRNA をスプライシングし、スプライシングを受けた *XBP1 mRNA* は翻訳後、小胞体内シャペロン等を誘導する転写因子として作用する。

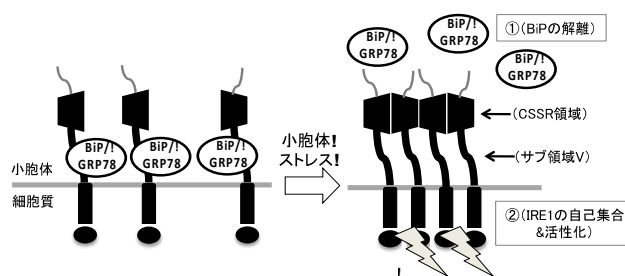


図1 *IRE1α* 活性化のメカニズム

IRE1α は通常時、小胞体内腔側で *BiP* と結合している。ストレス時には *BiP* の解離が生じることにより自己集合、活性化する。

我々は、この *IRE1α*-*XBP1* 経路と蛍光タンパク質を利用した小胞体ストレスバイオセンサー (ER stress Activator Indicator:以下 *ERAI* 法)を開発した⁷⁾。この *ERAI* 法を用いることで培養細胞のみならず、マウスの個体内においても小胞体ストレスを可視化することに成功している。非常に画期的なシステムである *ERAI* 法であるが、いくつかの問題点がある。1つ目は時間分解能が低いという点である。*ERAI* 法では「*IRE1α* による *XBP1* のスプライシング反応を介した蛍光タンパ

ク質の発現」を検出系として用いている。つまり小胞体ストレスを可視化できるまでに、IRE1αの活性化、XBP1のスプライシング、そして蛍光タンパク質の発現というステップを経るため、ストレス発生から検出までに比較的長い時間を要する。これは結果として、ストレスのON-OFFの切り替えといった、速い経時的変化を検出することができないという時間分解能の低さにもつながる。2つ目は空間分解能の低さである。ERAI法では、細胞全体に発現する蛍光タンパク質を検出系として用いているため、個々の細胞間でのストレスの有無を比較することは可能であるが、1細胞レベルでストレスの発生部位を詳細に検討することは不可能である。小胞体は細胞全体に網目状に広がっており、ストレスや細胞内環境によって細胞内の小胞体全体ではなく、小胞体のある特定部位が特異的にストレスに反応している可能性も十分に考えられる。これらの可能性を検討するためにも、時間分解能、そして空間分解能が高い新規プローブの開発が望まれる。そこで本研究では、「FRET システムを用いた新規小胞体ストレスバイオセンサーの開発」を研究目的とした。

2. 研究内容

2.1 バイオセンサーのデザイン

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)とは励起された、ある蛍光物質(ドナー)のエネルギーが、近傍に位置する他の蛍光物質(アクセプター)に無放射遷移する現象を指す。FRETの原理に基づくバイオセンサーはCa²⁺などの低分子や細胞内シグナル分子の活性をリアルタイムで観測する検出系として幅広く使用されている。一般的に、蛍光タンパク質を用いるFRETバイオセンサーは、ドナー蛍光タンパク質、アクセプター蛍光タンパク質、センサー、リガンド、そしてリンカー領域からなる(図2)。センサー領域には低分子の結合やリン酸化修飾により構造が変化する部位を、そしてその構造変化を識別して特異的に結合できる領域をリガンド領域として用いる。また、その

リガンド-センサー間をつなぐ領域をリンカー領域と呼ぶ(図2)。本研究ではこれらのリガンド-センサー領域にIRE1αの自己集合に必要なCSSR領域を、そしてリンカー領域にIRE1αとBiPの結合領域を利用することで新しいUPRバイオセンサーの開発を試みた。

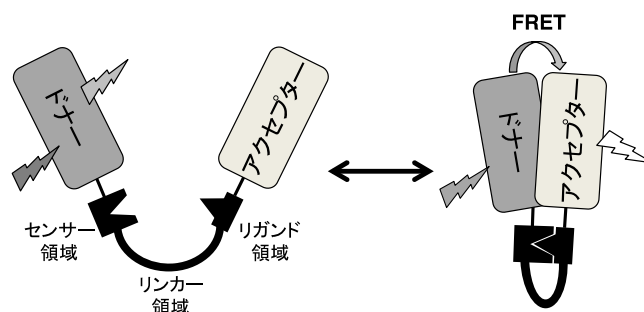


図2 1分子 FRET バイオセンサーのデザイン

一般的な1分子 FRET バイオセンサーは、2種類の蛍光タンパク質とセンサー、リガンド、そしてリンカー領域から構成される。

UPRにはIRE1α経路、PERK経路、そしてATF6経路という3つの経路が存在し、これまでの研究から小胞体ストレスによる各経路の制御機構が明らかにされている^{24, 26}。小胞体膜タンパク質IRE1αとPERKは通常時、BiPと結合しており小胞体内のストレスをBiPが感知するとIRE1α、PERKから解離する。その後、IRE1α、PERKは自己集合することで活性化し、下流にシグナルを伝える。ATF6も同様にBiPと結合しており、小胞体ストレスによりBiPが解離することでATF6はゴルジ体へと移行し、切断され、活性化体となる。このようにUPRには大きく3つの経路が存在するが、興味深いのは、そのどれもが小胞体内タンパク質BiPを介して機能制御を果たしているという点である。本研究ではこの点に注目し、BiPの結合-解離の変化を利用したFRETバイオセンサーの開発を行う。これまでの我々の研究結果より、IRE1αの小胞体内腔側のサブ領域VがBiPと直接結合し、また同じく内腔側のCSSR領域が自己集合に必要なことを明らかにしている²⁸。興味深いことに、IRE1αのサブ領

域 V と相同性の高い領域が PERK にも保存されており、PERK はこの領域を介して BiP と結合していることが明らかにされている。

培養細胞に薬剤で小胞体ストレスを誘導すると PERK と BiP の結合は 15 分以内に、また IRE1α と BiP の結合は 5 分以内に解離し、PERK、IRE1 は自己集合の後、活性化することが報告されている⁹⁾。また、細胞に薬剤で小胞体ストレスを誘導した後、薬剤を培地中から除去すると 10 分以内に IRE1α と BiP の結合が回復することも報告されている⁹⁾。これらの事実は、IRE1α と BiP の結合-解離は小胞体ストレスの ON-OFF をリアルタイムで検出する良いセンサーとなることを示唆している。このことより IRE1α のサブ領域 V、そして自己集合に必要な CSSR 領域をバイオセンサーに用いることで速いタイムスケールでの小胞体ストレスを検出することが可能となると考えた。また小胞体移行シグナルと小胞体保留シグナルを付加することで、小胞体内にとどまり小胞体内でストレスを感知する FRET バイオセンサーの開発を目指した (図 3)。

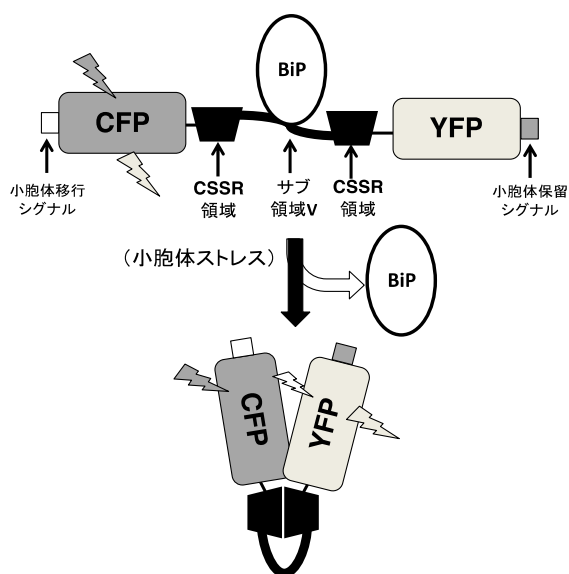


図3 小胞体ストレスバイオセンサーの概略図
本研究では1分子 FRET バイオセンサーのリガンド-センサー領域に IRE1α の自己集合に必要な CSSR 領域を、そしてリンカー領域に IRE1α と BiP の結合領域を用いた。

2.2 バイオセンサーの発現パターン

作製した小胞体ストレスバイオセンサーの発現と細胞内局在を検討するために、ヒト胎児腎細胞である HEK293T 細胞に一過性に発現させた後、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、細胞内における蛍光タンパク質の発現が確認できたことより、作製したバイオセンサーが発現していることが明らかとなった(図 4)。また、ウェスタンブロット法でバイオセンサーの分子量を検討した結果、目的とする位置にバンドが検出されたことより、作製したバイオセンサーが正常に発現していることが確かめられた(data not shown)。

しかし一方で、バイオセンサーの細胞内における発現パターンが小胞体様の網目構造の局在を示しておらず、凝集体様の構造物を形成していることが明らかとなった(図 4)。これは、作製したバイオセンサーが細胞内で不安定な構造を取っているために起きていると考えられる。

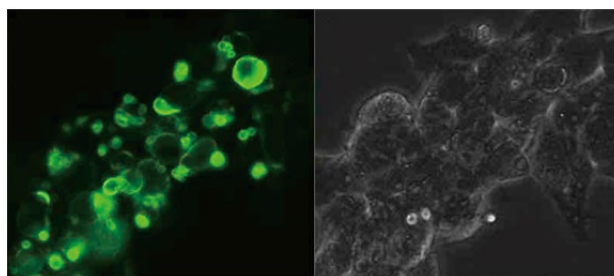


図4 作製したバイオセンサーの細胞内局在
蛍光タンパク質の局在を蛍光顕微鏡下で観察したところ凝集体様の構造物を形成していることがわかる(左図)。右図は明視野の像。

このままではバイオセンサーとして使用することは不可能であるため、次に、バイオセンサーの改変を試みた。図 4 の結果より、作製したバイオセンサーは凝集体様の局在を示すが、一方で単純に細胞質ではなく、(小胞体?) 膜上に局在している像が観察される。そこで、バイオセンサーの DNA 配列を詳細に調べたところ、バイオセンサーのリンカー領域に利用した IRE1α のサブ領域 V に疎水性のトランスメンブレン領域がわずかに含まれていることが明らかとなった。おそ

らくこのトランスメンブレン領域を介して何らかの形で小胞体膜上にトラップされるために、このような局在、発現パターンを示している可能性が考えられた。そこで、サブ領域 V を少しずつ短くしていくなどの改変を加え、凝集体を形成せず、かつ小胞体様の局在を示すバイオセンサーの作製を試みた。その結果、サブ領域の一部を欠損させ、かつ CSSR 領域との間にスペーサー配列を加えることで小胞体様の局在を示すバイオセンサーの開発に成功した(図 5)。今後、作製したバイオセンサーが小胞体ストレス刺激に応答するかを詳細に検討していく。

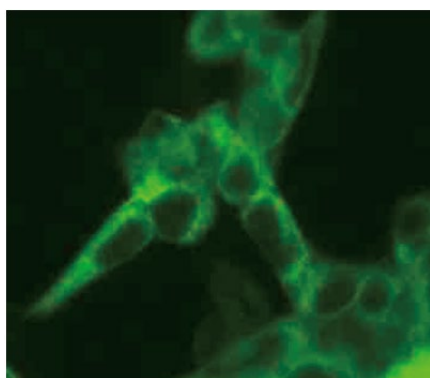


図5 改変型バイオセンサーの細胞内局在
蛍光タンパク質の局在を蛍光顕微鏡下で観察したところ小胞体様の局在を示した。

3. まとめ

小胞体はタンパク質合成やレドックス制御、そしてカルシウム濃度制御に重要な働きを果たし、これらの制御に異常が生じると小胞体ストレス応答が誘導される。この小胞体ストレス応答を可視化するバイオセンサーが数種類開発されているが、これらは小胞体ストレス応答の後期過程を検出系として利用しており、時間分解能や空間分解能が低いなどの問題点がある。本研究ではこれらの問題点を解決し得る新しい小胞体ストレスバイオセンサーの開発を目的とした。

本研究により、複数の改変型バイオセンサーを作製し、細胞内での発現パターンなどを検討したが、研究を遂行するにあたっていくつかの問題点

が生じた。それは、バイオセンサーを細胞内にトランスフェクションすることで一過性に発現させているが、調べてみると、トランスフェクション処理だけで小胞体ストレスが生じるということが明らかとなった。そのため、発現後のストレス刺激によるバイオセンサーの応答を検出することが非常に困難であった。そこで、バイオセンサーを恒常的に発現する細胞株の樹立を行い、現在、作製した細胞株を用いてバイオセンサーが小胞体ストレスなどの細胞内刺激に応答するかを検討している。今後、作製したバイオセンサーを用いることで、これまで明らかにされていない新規 *UPR* シグナル機構の解析を検討することが期待される。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の平成 27 年度奨励研究助成のもとに行われました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

1. Koike M, Fukushi J, Ichinohe Y, Higashimae N, Fujishiro M, Sasaki C, Yamaguchi M, Uchihara T, Yagishita S, Ohizumi H, Hori S, Kakizuka A. Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. *J Biol Chem.* 2010; 285:21736-21749
2. Kaufman RJ, Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest.* 2002; 110:1389-1398
3. Ikeda HO, Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, Yoshimura N, Kakizuka A. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. *Sci Rep.* 2014; 4:5970

4. Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2008; 3:399-425.
5. Mori K, Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*.2000 ;101:451-454
6. Kimata Y, & Kohno K, Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*.2011; 23:135-242.
7. Iwawaki T, Akai R, Kohno K, Miura M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med*. 2004 ;10:98-102.
8. Kimata Y, Oikawa D, Shimizu Y, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol*.2004;167:445-56.
9. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*.2000;2:326-32.

ユビキチンリガーゼの基質を細胞内で網羅的かつ定量的に計測する新規手法の開発研究



研究責任者 北海道大学 大学院医学研究院
生化学分野医化学教室
助教 渡部 昌

1. はじめに

ユビキチンによるタンパク質の可逆的修飾は様々な生命現象を支える極めて重要な翻訳後修飾の一つであり、ユビキチンリガーゼ(E3)が選択的に基質を認識することによって起こる反応である(図1参照)。したがって個々のE3に特異的な基質を計測しそのユビキチン化部位を決定することは様々な生命現象を理解する上で重要である。我々はこれまでにユビキチンリガーゼ(E3)と基質の結合力を利用した方法やレポーターア

ッセイを指標としたスクリーニング法により基質の計測を試み機能解析を行ってきた^{1)~5)}。しかしE3と結合力の強い分子はユビキチン化を受けないことが多いことや、偽陽性が多いことなどの特異度の低さが大きな問題であった。また近年では基質の半減期を指標とする方法などが報告されているが、プロテアソーム輸送シグナル以外のユビキチン化を受ける基質は計測できず、基質計測法の標準化には未だほど遠いのが現状であった。

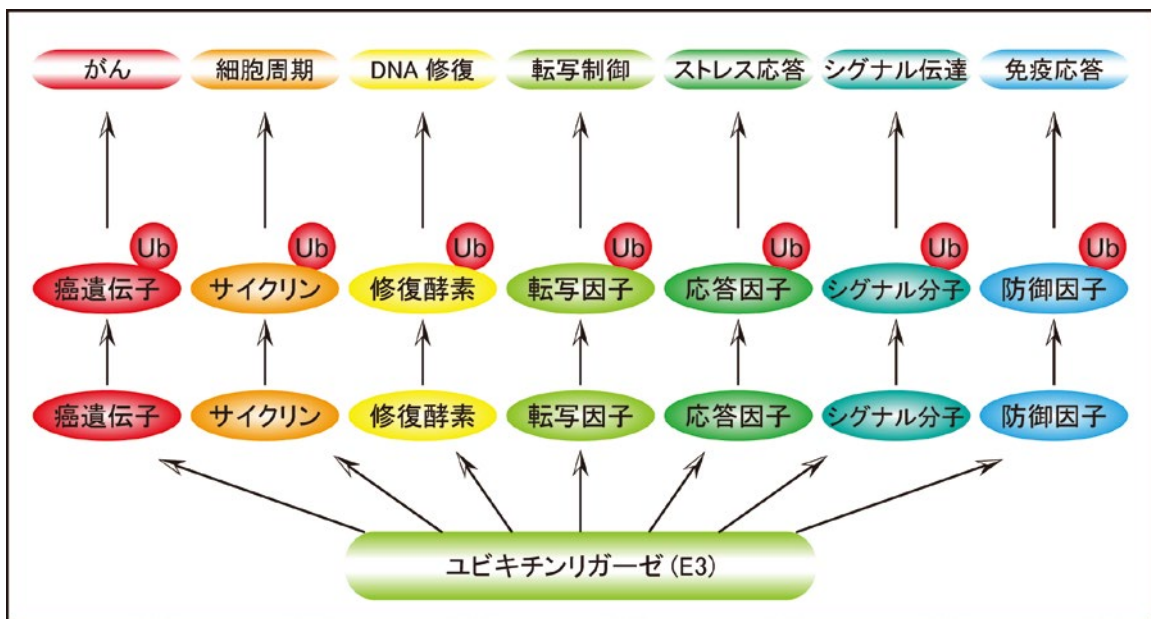


図1 ユビキチンリガーゼ基質同定の重要性

タンパク質レベルの分子の探索を行う場合、質量分析器を用いた解析が一般的となってきたが、質量分析器を用いて標的を同定する際に重要なことは、如何に同定したい標的基質のみを濃縮して精製することができるかという点にある。近年、ユビキチン化を受けた基質を精製する上で重要な2つの技術が開発された。1つはユビキチンレムナント(K-ε-GG)認識抗体であり、もう1つはユビキチン高親和性人工タンパク質(Tandem Ubiquitin Binding Entity (TUBE))である。

ユビキチンはカルボキシル末端(RGG)を介し基質のリジン側鎖のε-アミノ基にイソペプチド結合する。ユビキチン化修飾を受けた基質をトリプシンにより消化すると、塩基性アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合が切断されるため、ユビキチン化部位にユビキチンレムナント(K-ε-GG)が残ることとなる。近年になり、このK-ε-GGを認識する抗体がJaffrey SRらによって開発された⁶⁾。また一方でRodriguez MSらは、4つのユビキチン結合ドメインを直列に融合させた人工タンパク質(TUBE)が、真核生物の遺伝子中に見られるユビキチン結合ドメインの1000倍という高い親和性を持つことを見出し、ユビキチン化タンパク質の精製に用いることができることを発見した⁷⁾。

我々は以上を踏まえて、これらの技術を効果的に組み合わせることでユビキチン化を受けた基質を特

異的に精製し、Iontrap-Orbitrap型質量分析器で検出する方法を考案し、本研究を行った。

2. 方法と原理

本研究で検討した計測法は、FLAG タグ、ユビキチン高親和性人工タンパク質(TUBE)、解析したい任意のE3タンパク質の3つのドメインを融合したプローブを用いることに特徴がある。「細胞内で」E3がユビキチン化した直後の基質を「その場で」捕獲し、かつ「ユビキチン化ペプチドのみ」を精製し網羅的に検出する(図2参照)。ユビキチン化を受けたペプチドのみを再精製するため、ユビキチン化部位の同定も同時に可能である。E3が細胞内で実際に司る酵素反応を検出するため、偽陽性が少なく特異性が高い生理的な基質を定量的に計測できる。さらに、細胞内で直接に基質を計測する手法であるため、様々な成果や応用が期待できる。

本基質計測法の具体的な手順としては、TUBE-ユビキチンリガーゼ融合プローブを作製し、プローブを細胞に導入しプローブが捕獲するユビキチンリガーゼの基質を抗FLAG抗体で免疫沈降し、トリプシンによって消化し、ユビキチンレムナント抗体(K-ε-GG抗体)の利用によりユビキチン化を受けたペプチドのみ再精製を行い、Iontrap-Orbitrap型質量分析器にて検出、という手順からなる(図3参照)。

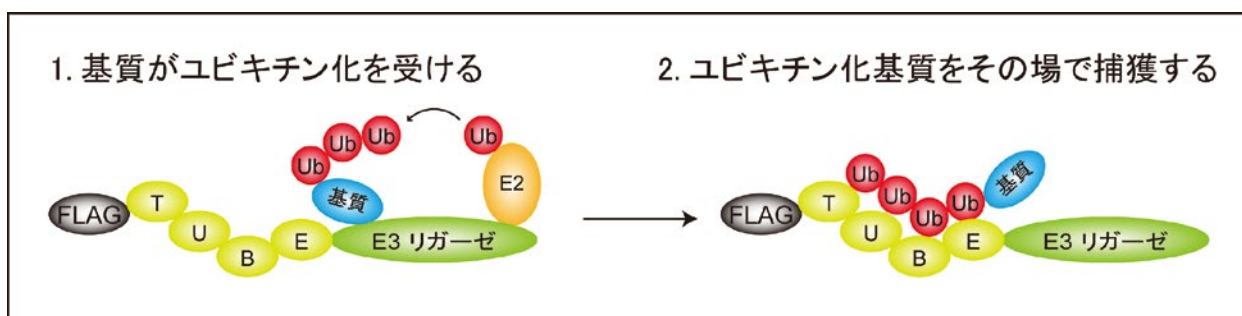


図2 E3に融合したユビキチン高親和性ドメイン(TUBE)がユビキチン化を受けた直後の基質を捕獲する。

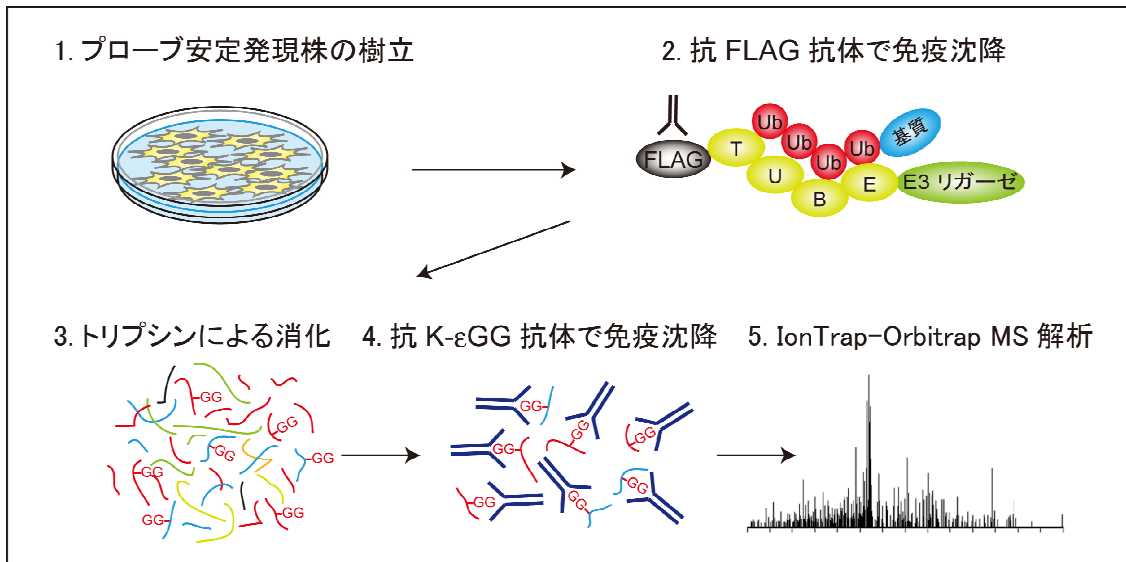


図3 基質同定法の手順

本計測法の有効性を検証するために、以下のよ
うな条件について検討を行った。

(1) TUBE とユビキチンリガーゼの融合による
感度の違い:ユビキチンリガーゼと TUBE の融合
によって感度が上昇するかどうかについて、
TUBE とユビキチンリガーゼを独立に細胞に導
入した群と融合させたプローブを細胞に導入し
た群の比較を行った。

(2) TUBE とユビキチンリガーゼの融合部位の
検討: 融合部位の違いによって感度が変動するか
どうかについて、ユビキチンリガーゼのアミノ末
端に TUBE を融合させたプローブとカルボキシ
ル末端に TUBE を融合させてプローブを作製し
比較を行った。

(3) プローブを細胞に導入する方法: プローブ
を細胞に導入する際に、一過性過剰発現系によ

て導入を行った群と安定発現株を作製した群に
ついて比較を行った。

以上の検討を行った後、最も感度の良い方法を
用いて複数のユビキチンリガーゼについて基質
同定の検討を行った。

3. 研究成果

(1) TUBE とユビキチンリガーゼの融合により
基質同定数が増加することを見出した(図4参照)。
まず初めに、TUBE とユビキチンリガーゼを融合
させたプローブが融合せずに用いた場合と比較
して有効であるかどうかを検証した。ユビキチン
リガーゼとして TRIM28、TRIM33 を用いて比較
したところ、非融合プローブではともに基質候補
の同定に至らなかった一方で、融合プローブでは
一定の基質候補の同定に至った。

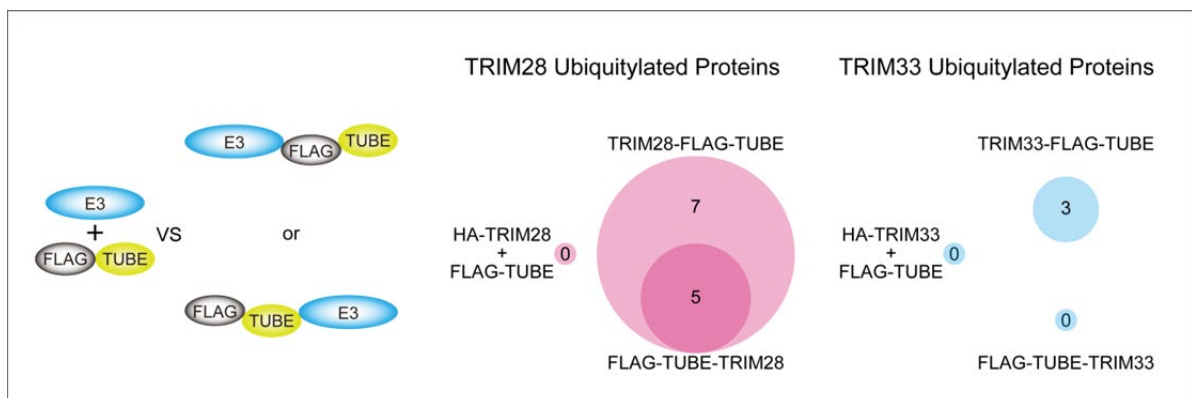


図4 TUBE とユビキチンリガーゼの融合により基質同定数が増加する。

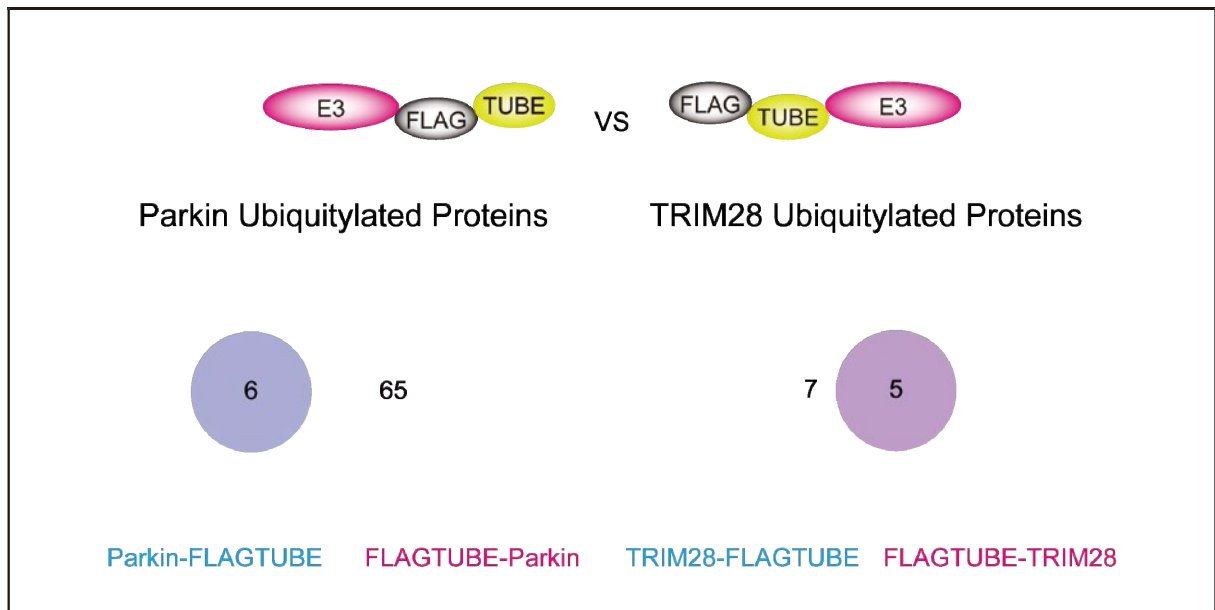


図5 TUBE 配列の融合部位の違いにより基質同定数が変動する。

(2) TUBE 配列の融合部位の違いにより基質同定数が変動することを見出した (図 5 参照)。次に、TUBE 配列の融合部位をユビキチンリガーゼのアミノ末端側とカルボキシル末端とで比較を行った。Parkin をユビキチンリガーゼとして用いた場合はアミノ末端に TUBE を融合させたプローブが効率よく基質候補を同定することができた。一方、TRIM28 をユビキチンリガーゼとして用いた場合は、カルボキシル末端に TUBE を融合させたプローブが比較的効率よく基質候補を同定することができた。このため、最適な融合部位はユビキチンリガーゼ毎に異なることが示唆された。

(3) プローブの安定発現細胞株を作製し用いることにより同定数が増加することを見出した (図 6 参照)。HEK293T 細胞を用いて、プローブを一過性に過剰発現させた系と安定に発現させた系の比較を行ったところ、安定発現細胞株を作製して行った系で基質同定数が増加した。

以上より、プローブは TUBE とユビキチンリガーゼを融合させることが望ましく、その融合部位はユビキチンリガーゼ毎に検討が必要であり、さらにプローブは安定発現細胞株を作製することが望ましいことが明らかとなった。

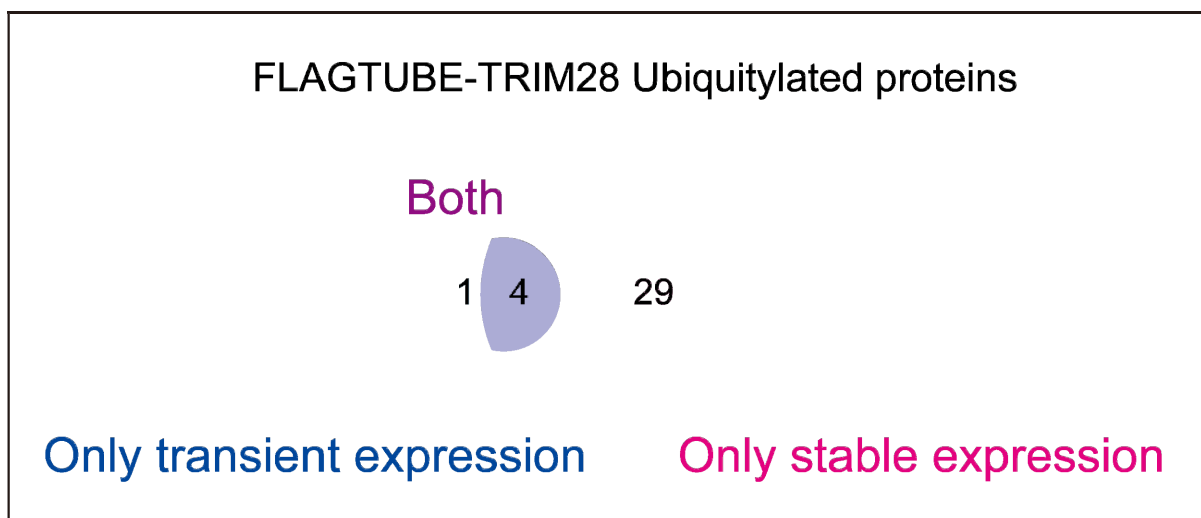


図6 プローブ安定発現株を作製することにより同定数が増加する。

(4) プローブの発現量が低い場合の対応：理論上プローブ1分子につき基質候補1分子を捕獲する実験系であるため、プローブの発現量が高いほど感度も高いと期待される。プローブ自身の細胞毒性によって発現量を高く保てない場合は、用いる細胞の量を増加させることで対応した。

(5) 他のユビキチンリガーゼへの応用：以上を踏まえて21のユビキチンリガーゼ遺伝子についてプローブを作製し、プローブを安定に発現する細胞株の作製を試みた。このうち、10のユビキチンリガーゼ遺伝子プローブの安定発現株取得に成功し、残りの11のプローブでは作製が困難であった。作製した細胞株を用いて基質の同定を試みたところ、6のユビキチンリガーゼ遺伝子プローブで特異的と思われる基質候補分子とそのユ

ビキチン化部位の同定に成功している。

(6) Parkin 基質の網羅的な同定：ユビキチンリガーゼ Parkin と TUBE の融合プローブを用いてミトコンドリア膜電位低下誘発剤 CCCP 投与により mitophagy を活性化し本方法を適用したところ、過去に報告されている基質を中心に、ミトコンドリア外膜に局在する分子を多数同定した(図7参照)。過去の報告では、Parkin のユビキチンリガーゼ活性は通常不活性化状態にあり、mitophagy 経路が駆動するとミトコンドリアにリクルートされて活性化し、近傍の基質をユビキチン化するとされているため、本研究の結果はこれに一致した妥当なものであると考えられた。

ユビキチン化 タンパク質	同定ペプチド数			ユビキチン化 タンパク質	同定ペプチド数		
	実験1	実験2	実験3		実験1	実験2	実験3
総ペプチド数	696	951	999				
総タンパク質数	49	47	42				
Ubiquitin	74	79	98	MCL1	12	9	4
TOMM70A	101	169	185	CYB5R3	10	7	5
MFN2	63	97	90	SLMAP	9	5	4
MFN1	45	107	101	ACSL1	4	10	2
FAF2	33	66	85	MAOB	4	5	7
HK1	48	65	64	DCAKD	6	4	5
CPT1A	33	50	59	NT5C3A	12	1	1
VDAC3	22	43	59	HSDL1	5	4	5
MARC2	30	26	32	TRIM4	4	6	4
ACSL4	25	23	24	POLR2A	13		
VDAC1	16	27	28	SLC25A5	5	3	2
VDAC2	13	29	25	ELMOD2	4	4	3
MARC1	19	22	21	ODR4	3	4	4
CISD1	14	18	27	ATAD1	4	6	
FKBP8	20	14	15	CYB5R1	8	2	
TRABD	13	13	21	TRIP12	3	4	3
GDAP1	15	17	16	HK2	5	2	2
HSD17B10	7	5	7	ATP5B	3	2	3
PTRH2	4	19	18	PSMC3	2	2	3
AGPAT5	6	14	17	FAM213A	4	2	
TOMM20	9	10	13	CISD2	4	1	
SSBP1	7	4	4	HSD17B7	2	3	
RHOT2	4	11	12	SLC25A6	3		1
FIS1	5	10	11	GPAM	2	2	
CPS1	11	3	6	TRIM5	2	1	1

図7 CCCP 刺激時の Parkin 基質の同定。(太字はミトコンドリア外膜タンパク質)

4. まとめ

本研究では、基質同定手法の有効性を確認し、いくつかの改良を施すことができた。定常条件のみならず、CCCP 刺激などの刺激依存的な基質候補の同定も可能であった。一方で、安定発現株作製効率が 50%未満という問題点も浮上している。これは、TUBE のみを安定発現させることができないことから、TUBE 自身に何らかの細胞毒性を持つためと思われた。本手法の適用範囲をさらに拡大する上で、誘導型のプロモーターを用いるなどの何らかの改良が必要であると思われる。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の多大なるご援助により行うことができました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Hatakeyama S, Watanabe M, Fujii Y and Nakayama K-i.: Targeted destruction of c-Myc by an engineered ubiquitin ligase suppresses cell transformation and tumor formation. *Cancer Res*, 65, 7874-7879, 2005
- 2) Bohgaki M, Tsukiyama T, Nakajima A, Watanabe M, Koike T and Hatakeyama S.: Involvement of Ymer in suppression of NF- κ B activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain, *BBA-MCR*, 1784, 826-837, 2008
- 3) Watanabe M, Tsukiyama T and Hatakeyama S.: TRIM31 interacts with p52Shc and inhibits Src-induced anchorage-independent growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 388, 422-427, 2009
- 4) Kikuchi M, Okumura F, Tsukiyama T, Watanabe M, Miyajima N, Tanaka J, Imamura M, Hatakeyama S.: TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a

bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells. *BBA-MCR*, 1793, 1828-1836, 2009

5) Kondo T, Watanabe M and Hatakeyama S: TRIM59 interacts with ECSIT and negatively regulates NF- κ B and IRF-3/7-mediated signal pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 422, 501-507, 2012

6) Xu G, Paige JS, Jaffrey SR: Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol.*, 28(8), 868-73, 2010

7) Hjerpe R, Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Lang V, England P, Rodriguez MS: Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep.*, 10(11), 1250-8, 2009

発表論文

- 1) Watanabe M and Hatakeyama S: TRIM proteins and diseases. *J. Biochem.*, 161, 135-144, 2017.
- 2) Watanabe M and Hatakeyama S: Ubiquitin-Conjugating Enzymes (E2s) *Advances in Medicine and Biology*. Volume 120, 2017, Nova Science Publishers
- 3) Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba I, Nagashima S, Yanagi S, Matsumoto M, Nakayama K, Tsutsui H, Hatakeyama S: The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 100, 43-53, 2016.
- 4) Anwar D, Takahashi H, Watanabe M, Suzuki M, Fukuda S and Hatakeyama S: p53 represses the transcription of snRNA genes by preventing the formation of little elongation complex.

Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech., 1859, 975-982, 2016

5) Suzuki M, Watanabe M, Nakamaru Y, Takagi D, Takahashi H, Fukuda S and Hatakeyama S: TRIM39 negatively regulates the NF κ B-mediated signaling pathway through stabilization of cactin. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73, 1085-1101, 2016

6) Watanabe M, Takahashi H, Saeki Y, Ozaki T, Itoh S, Suzuki M, Mizushima W, Tanaka K, Hatakeyama S: The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR γ . *eLife*, 4, e05615, 2015.

7) Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, Hatakeyama S: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. *Nat. Commun.*, 6, 5941, 2015

8) Yabe I, Tanino M, Yaguchi H, Takiyama A, Cai H, Kanno H, Takahashi I, Hayashi Y, Watanabe M, Takahashi H, Hatakeyama S, Tanaka S and Sasaki H: Pathology of frontotemporal dementia with limb girdle muscular dystrophy caused by DNAJB6 mutation. *Clin. Neurol. Neurosur.*, 127, 10-12, 2014.

9) Kanno Y, Watanabe M, Kimura T, Nonomura K, Tanaka S and Hatakeyama S: TRIM29 as a novel prostate basal cell marker for diagnosis of prostate cancer. *Acta. Histochem.*, 116, 708-712, 2014

神経変性疾患の診断法開発を目指したエクソソームシャペロームの変容解析



研究責任者 大阪大学大学院医学系研究科
神経難病認知症探索治療学寄附講座
講師 武内 敏秀

1. はじめに

神経変性疾患は、脳や脊髄の様々な領域の神経細胞が変性・脱落し、認知症や運動障害などの神経症状を呈する疾患である。代表的なものとして、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ポリグルタミン (PolyQ) 病 (ハンチントン病、脊髄小脳失調症などを含む9疾患) などが知られているが、いずれもいまだ有効な治療法に乏しい難病である。疾患ごとに強く障害される脳部位が異なっており、その違いにより、運動機能が障害されたり、認知機能が低下したり、あるいは自律神経症状を呈したりするなど多様な精神神経症状が認められる。

多くの神経変性疾患では、共通して原因タンパク質が不溶性のオリゴマーや凝集体を形成して蓄積し、神経変性を引き起こすと考えられている。例えば Amyloid β や Tau (AD)、 α -Synuclein (PD)、TDP-43 (ALS)、PolyQ タンパク質 (PolyQ 病) などといった神経変性疾患の原因タンパク質は、何らかの原因により異常構造へと変移 (ミスフォールディング) した後、互いに寄り集まって凝集し、神経細胞内 (あるいは細胞外) に蓄積する。一般に、神経変性疾患の原因タンパク質は、このような異常構造変移の過程において細胞毒性を獲得し、神経細胞死や神経機能障害を引き起こすとさ

れている。このことから、タンパク質のミスフォールディングや凝集は、神経変性疾患の発症や病態進行に中心的な役割を担うと考えられている。実際、タンパク質の凝集過程は、神経変性疾患の治療法開発における最も重要な創薬標的であり、例えばこれをターゲットとした凝集阻害化合物は疾患病態を効果的に抑制することが確認されている。

人口高齢化社会を迎え、我が国を含めて世界的に神経変性疾患患者数の大幅な増加が予想されており、その発症機構の深い理解とそれに基づく診断・治療法の開発は社会的急務である。特に、疾患状態の定量的評価を可能とするような病態診断法の技術開発は、新薬開発や早期治療介入による先制医療の実現に密接に結びつくため、疾患予防・治療の両側面から強く求められている。通常、神経変性疾患の患者は発症後に来院して診断を受ける。しかし、例えば AD では認知症状が見られる 10 年以上前からすでに脳内でアミロイド蓄積が開始しているといわれる。また、同様に PD でも運動症状が発症する 5~10 年以上前からすでに神経変性や脱落が始まっているといわれる。したがって、症状が現れるできるだけ前から発症を予測し、早期治療介入を可能とするようなバイオマーカーが必須である。また、一般に神経変性疾

患は患者によって病態進行や予後に大きな差が見られる。疾患状態を反映するバイオマーカーが開発されれば、各患者の臨床症状や進行度合いを定量的に評価できるようになる。これにより、疾患経過の均一な患者を対象にした臨床試験が可能となり、被験薬の正確な評価につながることを期待される。より早期から発症を予測し、疾患状態を反映するバイオマーカーの開発が強く求められている。

これまで神経変性疾患に対するバイオマーカー探索として、主に異常タンパク質やそのオリゴマー、凝集体などといった疾患関連分子に注目し、これらの髄液中濃度の変動を疾患状態と関連づける試みが進められている。例えば遺伝性ADでは、発症の10年以上前から髄液中A β の低下およびタウの増加が知られている。またPD患者では髄液中 α -Synの低下およびそのオリゴマーの相対的増加が報告されている。しかし、いずれも微量成分で個体差が大きく、高い精度で病態を予測できるまでには至っていない。また、発症前のスクリーニング診断としては、髄液を対象とするよりも、健康診断項目に組み込むことが期待できる血液や尿などが実際上望ましいが、これらに注目したバイオマーカー研究は未だ途上である。疾患状態を反映し、特に早期から実用的なバイオマーカーは開発されていないのが現状である。

最近、神経変性疾患に対し、タンパク質の恒常性（プロテオスターシス）維持機構の関与が示唆されている。これは、細胞内で異常タンパク質が現れてもそれらが凝集してしまうのを未然に防ぐタンパク質の品質管理機構であり、分子シャペロン、ユビキチン-プロテアソーム分解系、オートファジー分解系などが知られている。このうち分子シャペロンは、異常構造へと変移したタンパク質を正常な構造へとフォールディングするのを助けたり、オートファジーやプロテアソームといった分解系を介して分解するのを促進したりすることで、細胞内のプロテオスターシスを維持している。一般に、分子シャペロンや細胞内分解系

の機能低下や破綻は、異常タンパク質の凝集・蓄積を引き起こし、神経変性疾患の発症や経過に大きく影響を与えることが知られている¹⁾。また近年の研究から、高齢者やAD/PD患者の脳では分子シャペロンの発現レベルの変化によるプロテオスターシス維持機構の機能低下が報告されている²⁾。これらのエビデンスは、生体内プロテオスターシスと神経変性疾患の発症や経過が密接にリンクしていることを示唆するものであり、生体内プロテオスターシスが疾患状態を反映して変容している可能性が考えられる。

これまで私たちは、生体内におけるプロテオスターシス維持機構の全容解明を目指して研究を進めてきた。その過程で、個々の細胞でのみ働くと考えられていた分子シャペロンが、エクソソームという細胞外小胞の一種を介して細胞外に分泌され、遠隔組織で凝集性タンパク質の凝集形成を抑制するという、細胞非自律的なプロテオスターシス維持機構を発見した³⁾。エクソソームは、血液や尿中に豊富に存在し、タンパク質やmiRNAなど様々な生理活性分子を内包していることが知られている⁴⁾。上記の結果は、生体内のプロテオスターシスが個々の細胞だけでなく、血液や髄液を介した細胞間ネットワークによっても維持されており、その両者が神経変性疾患の発症や経過に影響を与えることを示すものである。特に血液中エクソソームの分泌状態や内包分子の変容とその分子基盤が明らかとなれば、生体内プロテオスターシスの変容として疾患状態を間接的に捉えることが可能となるだけでなく、エクソソーム分泌の生体防衛的役割に着目した初めての血液由来病態診断バイオマーカー開発の可能性が拓かれる。そこで本研究では、神経変性疾患モデルを用い、疾患におけるエクソソーム分泌の変容を明らかにすることを目的として実験を行った。

2. 方法および結果

本研究では、神経変性疾患としてポリグルタミン病（PolyQ病）に着目した。PolyQ病は、ほぼ

単一の遺伝的要因のみが大きく発症に関わることから、他の神経変性疾患と比較して、発症や病態進行における環境因子の影響が小さく、分子生物学的解析に適している。また PolyQ 病は、特定の遺伝子変異の導入によりヒト疾患病態を再現するノックインマウス（脊髄小脳変性症 1 型ノッ

クインマウス、SCA1-KI マウス）がすでに樹立されており、これを解析することでヒト病態に近い結果が期待できる⁵⁾。そこで本研究では、PolyQ 病の細胞およびマウスモデルを用い、疾患におけるエクソソームの分泌、内容物の変容を調べた。

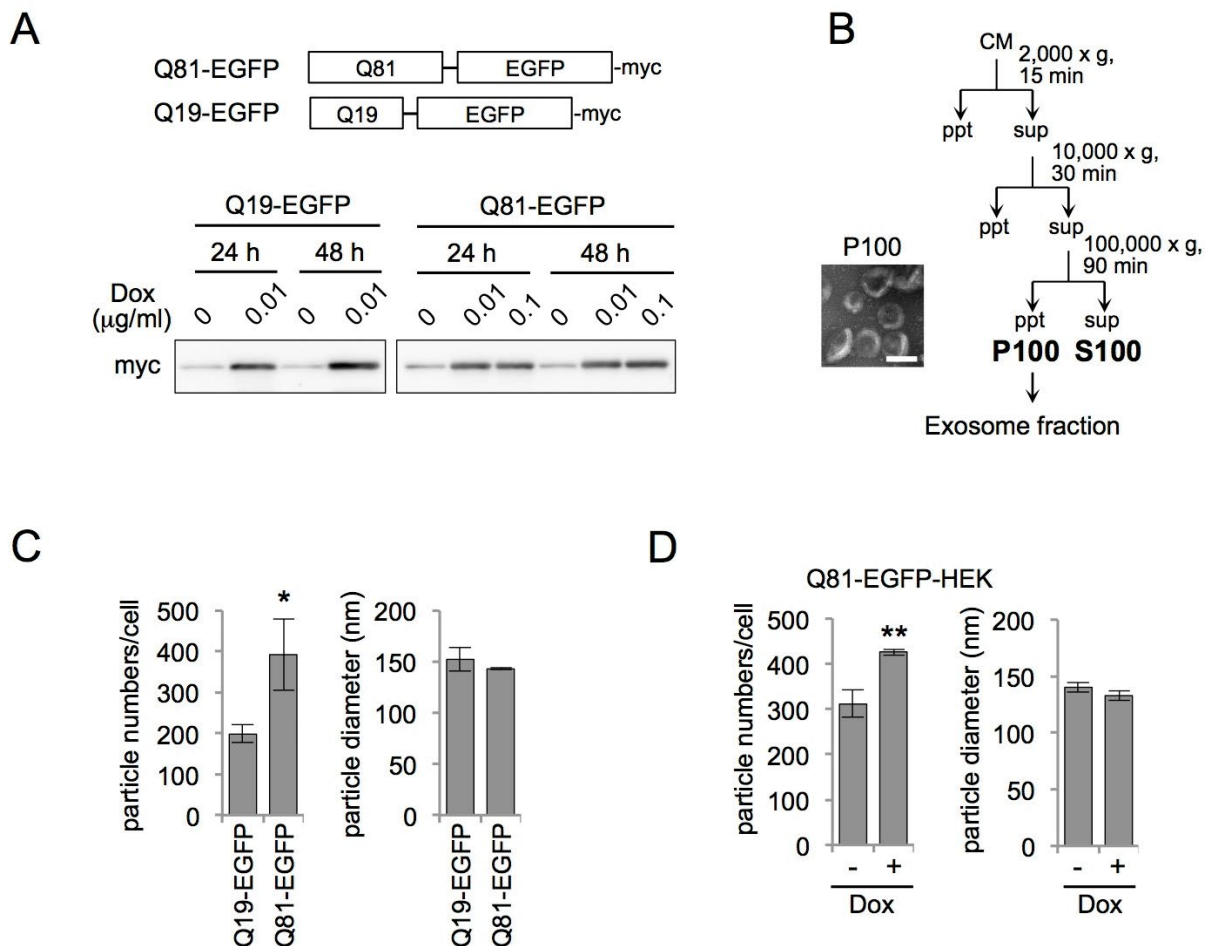


図1 エクソソーム分泌の解析

A)本研究で用いた PolyQ タンパク質を発現する PolyQ 病モデル細胞

B)超遠心法によるエクソソーム精製

C)PolyQ 病モデル細胞の培地から得られたエクソソーム画分のナノ粒子解析結果

D)PolyQ 病モデル細胞培地中の粒子数における Dox 添加の影響

2.1 PolyQ 病モデル細胞の樹立

Flp-In T-REx システム (invitrogen) を用い、ドキシサイクリン (Dox) の制御下に、グルタミンの 81 回繰り返し配列を EGFP のアミノ末端側に有する凝集性 PolyQ 融合タンパク質 (Q81-EGFP) を発現する Tet-On 型 HEK293 細胞

(Q81-EGFP-HEK 細胞) を樹立した (図 1 A)。また、コントロールとして、グルタミンの 19 回繰り返し配列を有する非凝集性 PolyQ 融合タンパク質 (Q19-EGFP) を発現する HEK293 細胞 (Q19-EGFP-HEK 細胞) を樹立した。これらの細胞に対し、Dox (0, 0.1, 0.01 μg/mL) を添加して

24 時間後または 48 時間後に細胞を回収し、1% TritonX-100 可溶性画分をウェスタンブロット法により解析した結果、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox 添加により Q81-EGFP および Q19-EGFP タンパク質が発現することが確認できた (図 1 A)。

2.2 エクソソーム分泌の解析

上記で樹立した PolyQ 病モデル細胞が分泌するエクソソームの解析を行った。Q81-EGFP-HEK 細胞および Q19-EGFP-HEK 細胞に Dox (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

を添加して 24 時間培養し、細胞培地を回収した。この培地に対して超遠心法によりエクソソーム画分を精製した (図 1 B)。超遠心後に得られる沈殿画分 (P100 と表記) にエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が多く含まれることが知られている。実際、この P100 画分に対して電子顕微鏡観察を行ったところ、およそ 100 nm 前後のカップ状の小胞が多数確認され、文献報告のエクソソームとほぼ同様の形態であることが確認された (図 1 B、左下写真)。

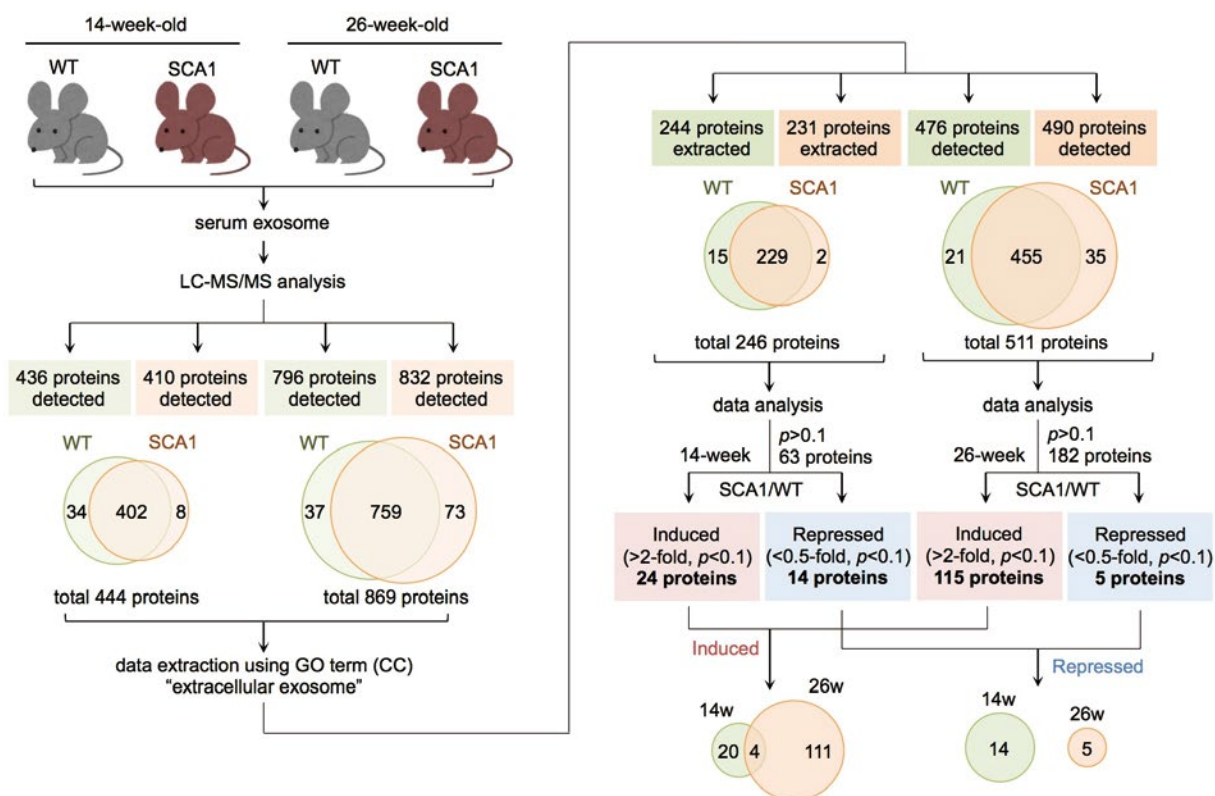


図2 エクソソームのプロテオーム解析手順

14 週齢または 26 週齢の野生型または脊髄小脳失調症1型ノックインマウス(SCA1-KI)から得られた血液由来エクソソームに対し、相対定量プロテオーム解析を行った。

次に、これらのエクソソーム画分に対し、ナノ粒子解析装置 NanoSight を用いて粒子数および粒子径の測定を行った。その結果、Q81-EGFP を発現する細胞の培地から得られたエクソソーム画分中には、Q19-EGFP 発現細胞と比較して、エクソソームに相当する粒子径の粒子がより多く検出された (図 1 C 左)。このとき、両者の細胞から

分泌される粒子径には違いは見られなかった (図 1 C 右)。

Q81-EGFP-HEK 細胞における分泌粒子数の増大についてさらに解析を行った。Q81-EGFP-HEK 細胞に対し、Dox を添加する群としない群に分け、両者から分泌される粒子数を測定したところ、Dox 添加した細胞の培地中には Dox 未添加細胞の

培地よりも多くの粒子が含まれていることが分かった (図 1 D 左)。Dox 添加は Q81-EGFP の発現を誘導することから (図 1 A)、凝集性 PolyQ タンパク質を発現する細胞ではエクソソーム分泌

が亢進することが示唆された。粒子径に関しては、Dox 添加の有無にかかわらず変化は見られなかった (図 1 D 右)。

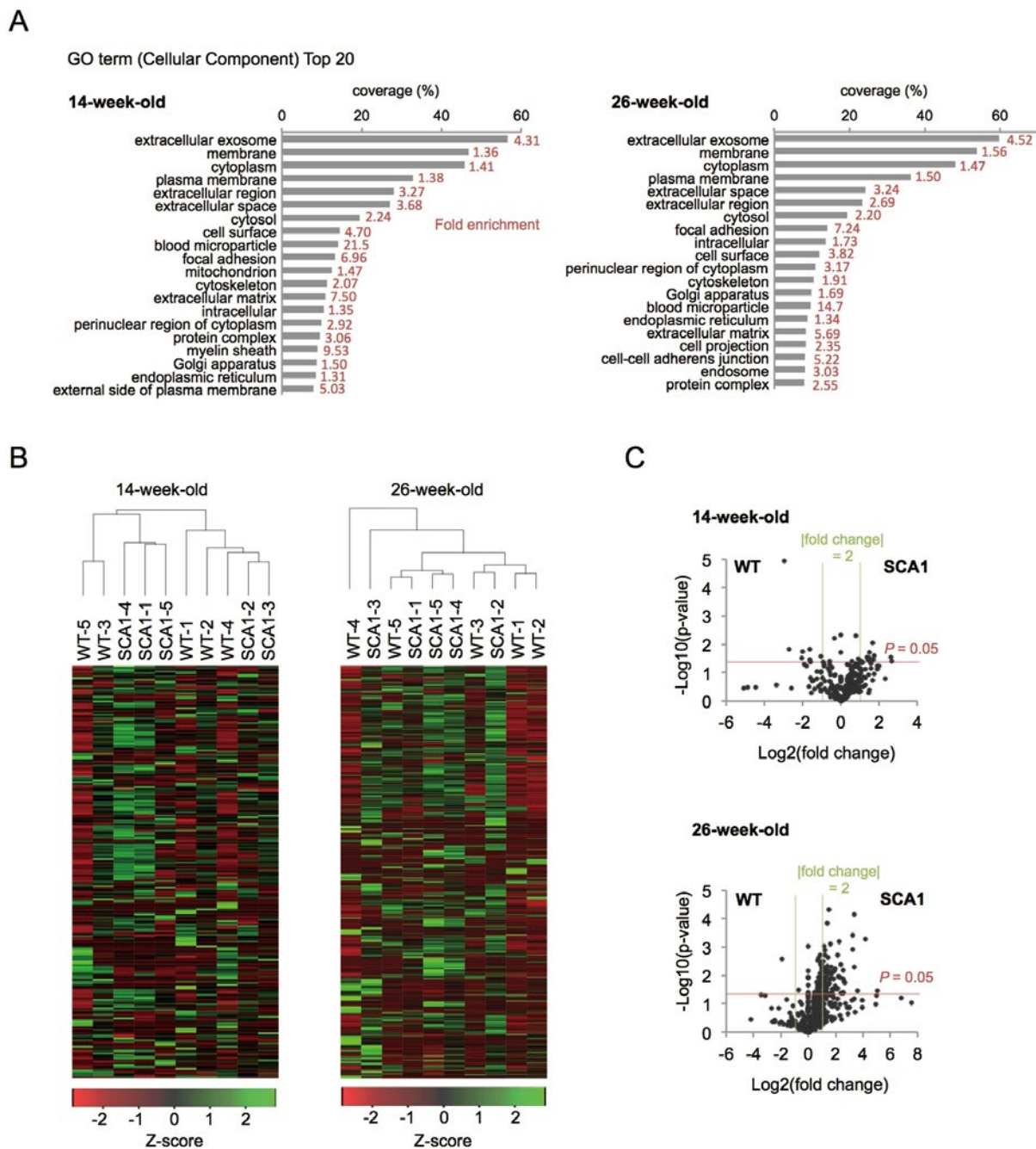


図3 エクソソームのプロテオーム解析結果

A)野生型および SCA1-KI マウス由来血液エクソソーム内で検出されたタンパク質の Gene Ontology 解析 (Cellular Component)

B-C)GO 解析で Extracellular exosome の GO term を有するタンパク質を抽出し、ヒートマップ解析(B) および volcano plot 解析(C)を行った

2.3 エクソソームのプロテオーム解析

PolyQ 病モデル動物の血液からエクソソームを精製し、そのプロテオーム解析を行った。PolyQ 病モデル動物として、脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウス (SCA1-KI) を用いた。このマウスは、生後およそ 5~7 週齢で運動障害を示し始めることが知られている⁵⁾。本研究では、発症後の SCA1-KI 雌マウス (14 週齢および 26 週齢) から血清を採取し、サイズ排除クロマトグラフィーカラム (EV Second) によりエクソソーム画分を精製した。同様に野生型マウスを用い、血清からエクソソーム画分を精製した。これらのエクソソーム画分に対し、LC-MS/MS 測定による定量プロテオーム解析を行った。その結果、14 週齢の野生型マウスでは 436 種、SCA1-KI マウスでは 410 種のタンパク質がそれぞれ検出され、合計 444 種のタンパク質のうち、402 種が共通していた。また、26 週齢では、野生型で 796 種、SCA1-KI で 832 種のタンパク質が検出され、合計 869 種のタンパク質のうち、759 種が共通していた (図 2 左側)。

同定されたタンパク質に対し、Gene Ontology 解析 (cellular component) を行った (図 3 A)。その結果、Extracellular exosome とタグづけされているタンパク質が一番多いことが確認されたが、その一方で明らかにエクソソームとは関連のないタンパク質も少なからず含まれていることが明らかとなった。そこで、プロテオーム解析の結果から Extracellular exosome とタグづけされているタンパク質を抽出して再度解析を行った (図 2 右側)。その結果、14 週齢の野生型マウスでは 244 種、SCA1-KI マウスでは 231 種のタンパク質が検出され、合計 246 種のタンパク質のうち、229 種が共通していた。また、26 週齢では、野生型で 476 種、SCA1-KI で 490 種のタンパク質が検出され、合計 511 種のタンパク質のうち、455 種が共通していた。これらのタンパク質に関し、ヒートマップ解析を行ったところ、いずれの週齢においても野生型マウス群と SCA1-KI マウス群の間に明確な差は見られなかった (図 3 B)。一方、Volcano

plot 解析からは、野生型マウスに対して SCA1-KI マウスで増加しているタンパク質が多数確認され、この傾向は特に 26 週齢マウスで顕著であった (図 3 C)。実際、野生型に比べて SCA1-KI マウスで 2 倍以上増加したタンパク質は、14 週齢では 24 種 (全体の 9.8%)、26 週齢では 115 種 (同 22.5%) であり、経時的な増加傾向が確認された。また、そのうち 4 種がいずれの週齢においても共通して増加していることが明らかとなった。一方で、SCA1-KI マウスで減少しているタンパク質も一部確認されたが、14 週齢および 26 週齢で共通するものは確認されなかった。

考察

PolyQ 病モデル細胞の解析から、凝集性 PolyQ タンパク質発現細胞におけるエクソソーム分泌数の亢進が明らかとなった。また、PolyQ 病モデルマウスの解析から、発症後個体における血清中エクソソームプロテオームの変容が確認された。以上の結果から、神経変性疾患において、エクソソーム分泌の変容が示唆された。今後、本研究で得られた基礎知見に基づいて、発症前個体も含めた解析、および疾患の重症度と変動因子との相関性などの詳細な解析を行うことにより、PolyQ 病におけるエクソソームの変容を詳細に解析するとともに、血液由来バイオマーカーの開発を進めていく予定である。

謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域の二木史朗教授と国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第四部の永井義隆室長 (現大阪大学大学院医学系研究科教授) である。最後に、本研究をご支援頂きました公益財団法人中谷医工計測技術振興財団に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Voisine C, Pedersen JS, Morimoto RI. Chaperone networks: tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiol Dis.* **40**, 12-20 (2010).
- 2) Brehme M, Voisine C, Rolland T, Wachi S, Soper JH, Zhu Y, Orton K, Vilella A, Garza D, Vidal M, Ge H, Morimoto RI. A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease. *Cell Rep* **9**, 1135-50 (2014).
- 3) Takeuchi T, Suzuki M, Fujikake N, Popiel HA, Kikuchi H, Futaki S, Wada K, Nagai Y. Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proc Natl Acad Sci USA.* **112**, E2497-506 (2015).
- 4) Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* **4**, 27066 (2015).
- 5) Watase K, Weeber EJ, Xu B, Antalffy B, Yuva-Paylor L, Hashimoto K, Kano M, Atkinson R, Sun Y, Armstrong DL, Sweatt JD, Orr HT, Paylor R, Zoghbi HY. A long CAG repeat in the mouse Sca1 locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron* **34**, 905-19 (2002).

蛍光型ホウ素センサーによる簡便なホウ素薬剤分析法の開発



研究責任者 大阪府立大学研究推進機構
BNCT 研究センター
講師 服部 能英

1. はじめに

ホウ素化合物は、Brown らによって報告された Hydroboration¹⁾や、鈴木らによって報告された鈴木-宮浦クロスカップリング反応²⁾などに用いられる合成中間体として広く利用されてきた。また、その特異な物性および反応性から、材料科学の分野でも応用研究が進んできており、有機発光体やハイドロゲルなどホウ素化合物の特性を活かした様々な合成素材が開発されてきている³⁾⁴⁾。

このように、ホウ素化合物に関する研究は長い間、合成化学や材料科学の分野が主流であった。しかし近年では、ホウ素含有化合物と生体関連分子との相互作用に関する研究が発展してきており⁵⁾、その研究成果から、ホウ素-中性子捕捉療法 (BNCT) に用いられる L-BPA⁶⁾や、PET トレーサーとして利用されている ¹⁸F BPA⁷⁾、多発性骨髄腫の治療薬である Bortezomib⁸⁾、爪真菌症の治

療薬として用いられる Tavaborole⁹⁾などのようなホウ素薬剤が見出され実際に臨床応用されている。このような背景から、ホウ素化合物は新たな可能性を秘めた薬剤として注目を集めている (図 1)。

一般に、生体内にはホウ素原子は殆ど存在しない。このため、通常の薬剤のように放射線標識や抗体作成をすることなく、生体中のホウ素原子を検出することによって、ホウ素薬剤の分布を評価することができる。しかし、一般的なホウ素原子の定量法は、中性子を利用したプロンプトγ¹⁰⁾や ICP-OES¹¹⁾などのような大型の研究設備や分析機器を必要とする上、検出限界濃度が 100 μM 程度とあまり感度が高くないなどの問題点がある。また、薬剤分布を可視化するためには、薬剤に応じて作成した抗体による免疫染色や、α オートラジオグラフィ¹²⁾などが利用されているが、これ

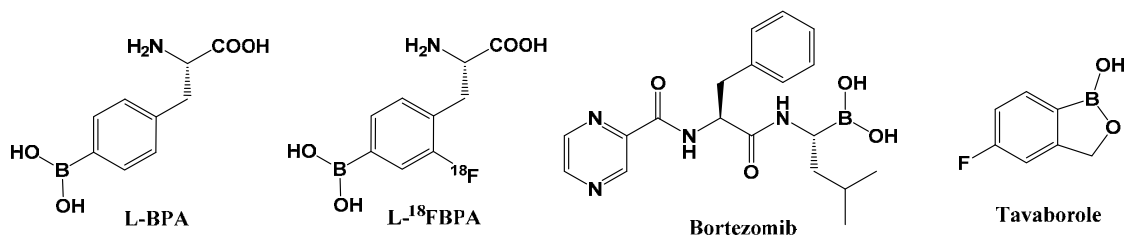


図1 ホウ素薬剤

らの方法では生細胞中の分布を可視化することは非常に困難である上、煩雑な前処理や高価な試薬あるいは大型の実験設備が必要となる。このような背景から、より簡便かつ高感度な分析法を確立することができれば、ホウ素薬剤の開発研究を促進することができると考えられる。

近年、4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene (BODIPY) などのような、ホウ素原子を含む有機蛍光色素が、材料科学の分野やケミカルバイオロジーなどの幅広い分野において注目を集めている¹³⁾。これらの蛍光分子は、その前駆体であるリガンド分子中の窒素あるいは酸素原子とホウ素原子の間で錯体を形成し、ホウ素(III)型ヘテロ環状構造を取ることで分子内の π 共役平面を安定化させ、蛍光を発するという特徴を持つ。さらに、リガンド分子とホウ素原子とのヘテロ環状構造形成反応は非常に選択性が高く、殆どの有機分子に邪魔されることなく、選択的かつ速やかにホウ素原子との間で蛍光性物質を形成する。このような特性から、これらの蛍光リガンドを、ホウ素を検出するためのプローブ分子として利用し、ホウ素の微量分析に応用する研究なども報告されている。

このような背景から我々は、生体内において、ホウ素薬剤と蛍光リガンドとの間で蛍光性の錯体を形成させることができれば、生体内のホウ素薬剤を可視化することが可能となり、ホウ素薬剤の分布を簡便に分析できる手法の開発につながるのではないかと考えた。そして、種々の蛍光リガンドを設計・合成し、生体内でホウ酸基を有するホウ素薬剤と蛍光性の複合体を形成する蛍光型ホウ素センサー DAHMI を見出した(図2)¹⁴⁾。さらに、この DAHMI を用いて、固定細胞中のホウ素薬剤を可視化することに成功している。また、DAHMI が細胞膜透過性を有することも確認しており、DAHMI を用いて生細胞中のホウ素薬剤を可視化することができるのではないかと期待される。

一方で、DAHMI の発光効率はあまり高くない

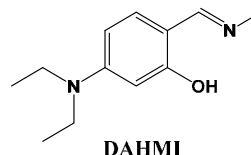


図2 蛍光型ホウ素センサー

(蛍光量子収率: 0.6%)。蛍光量子収率は、吸収(励起)によって蛍光分子に吸収された光子数と、蛍光によって放出された光子数の比を表した値であり、分子プローブの検出感度に直結する値である。ホウ素化合物の定量に用いるためには、DAHMI よりも量子収率が高く、より発光効率を高い新規ホウ素センサーの開発が必要であると考えられる。

そこで本研究では、DAHMI の生物学的特性を評価するとともに、ホウ素薬剤の Live-cell imaging について検討を行うこととした。さらに、DAHMI を基に、より発光効率を高めた新規ホウ素センサーの設計・合成を行い、複数の候補化合物の中から最も蛍光量子収率の高い化合物の絞り込みを行った。そして、見出した新規蛍光型ホウ素センサーを用いたホウ素薬剤の簡便な定量方法について検討を行うこととした。

2.1 DAHMI の細胞毒性

DAHMI を用いた試験を行うにあたり、まず種々の細胞腫に対する DAHMI の細胞毒性について WST-8 試験を用いて評価を行った(表1)。この結果、DAHMI は細胞に暴露後1時間程度では、殆ど毒性を示さない低毒性な化合物であることが確認できた。しかしながら、暴露後2時間以上経過すると、系中で加水分解してしまい、分解物である *N*-メチルアミンの影響から、細胞毒性が高くなってしまうという結果となった。しかしながら、DAHMI は、ホウ素化合物と錯体形成すると水中での安定性が向上し、加水分解をほぼ受けないことを先行研究にて確認している。そして、L-BPA を取り込ませた細胞に DAHMI を暴露した場合にも、細胞毒性が大きく低下したことから、

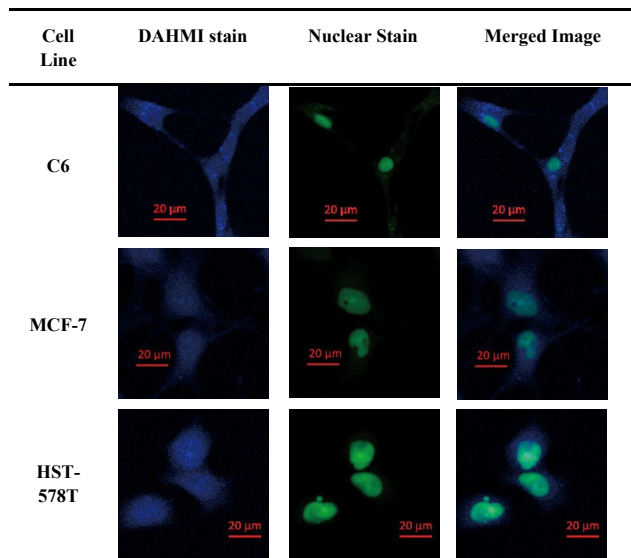
これを用いて生細胞中のホウ素薬剤を可視化することは十分に可能であると判断した。

表 1 種々の腫瘍細胞に対する DAHMI の細胞毒性

Cell Line	IC ₅₀ (暴露 1 時間後) ^[a]		IC ₅₀ (暴露 2 時間後) ^[b]	
	DAHMI	DAHMI +BPA ^[c]	DAHMI	DAHMI +BPA ^[c]
C6	> 1.0 mM	> 1.0 mM	0.46 mM	0.70 mM
B16	> 1.0 mM	> 1.0 mM	0.55 mM	> 1.0 mM
MCF-7	> 1.0 mM	> 1.0 mM	0.42 mM	> 1.0 mM
Hst-578T	> 1.0 mM	> 1.0 mM	0.37 mM	> 1.0 mM

[a] DAHMI 暴露 1 時間後の細胞毒性。 [b] DAHMI 暴露 2 時間後の細胞毒性。 [c] BPA をあらかじめ 1mM 取り込ませた細胞に対する DAHMI の細胞毒性。

表 2 各種腫瘍細胞内の L-BPA の分布



2.2 生細胞中のホウ素薬剤の可視化

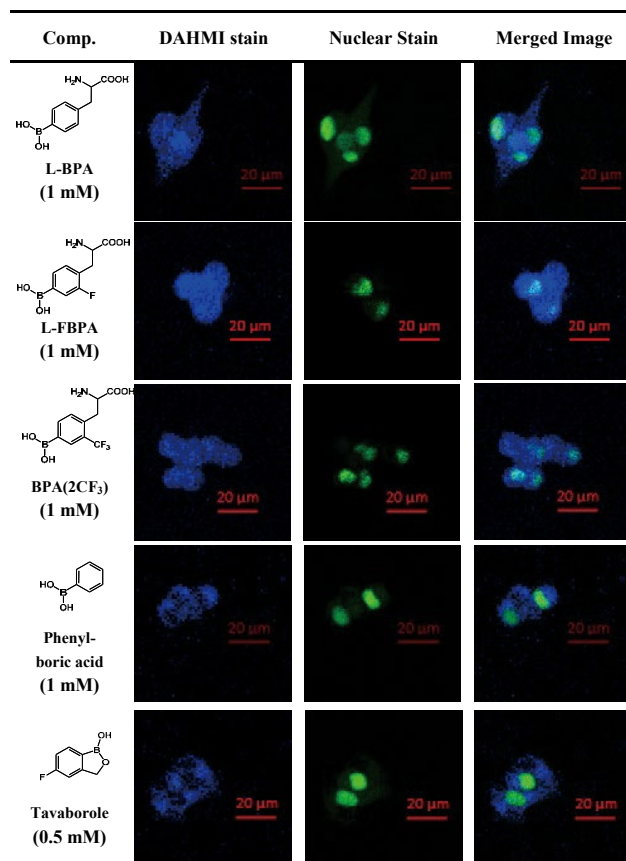
次に、DAHMI を用いて生細胞中のホウ素薬剤を可視化する方法について検討を行った。

まず、L-BPA (2mM) を取り込ませた各種腫瘍細胞に、DAHMI (1mM) を暴露し、30 分培養を行った後に共焦点レーザー顕微鏡での観察を行った (表 2)。この結果、DAHMI を生細胞に作用させることによって、細胞内の L-BPA の分布を可視化することに成功した。その、分布は固定細胞を染色した場合と同じで、細胞核を含む細胞全体に広く分布していた。

さらに、DAHMI を用いて L-BPA の誘導体や Tavaborole の腫瘍細胞内の分布を可視化する実験を行った。L-BPA の場合と同様に、B16 メラノーマ細胞に各ホウ素薬剤を取り込ませた後に、DAHMI を作用させ共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った (表 3)。この結果、DAHMI によって腫瘍細胞内の種々のホウ素薬剤分布を可視化することに成功した。その分布を解析すると、L-BPA の誘導体は全て細胞核を含む細胞内全体に広く分布していたが、フェニルホウ酸や Tavaborole は、細胞質のみに分布し、細胞核に入ることはないということが分かった。

以上のように、DAHMI を利用することによって、様々な腫瘍細胞内のホウ素化合物を可視化することに成功した。

表 3 ホウ素薬剤の B16 メラノーマ細胞内分布



3. 高効率な新規ホウ素センサーの設計

上述したように DAHMI は、非常に優れたホウ素センサーである。しかし、その発光効率はあまり高くなく、ホウ素分布を可視化するような定性試験には有用ではあるものの定量試験に用いるには検出限界濃度が低くセンサー自体の安定性が低いために、やや不向きであると考えられる。

そこで本研究では、より発光効率の高い蛍光型ホウ素センサーを開発することを目的とした。このために、ホウ素センサーが具備すべき性質として以下の5項目を挙げた。

- ① ホウ酸およびホウ酸保護誘導体と特異的に反応して蛍光を発する。
- ② ホウ素センサー自身は蛍光を発さない、あるいはホウ素と結合することで蛍光特性を大きく変化させる。
- ③ 室温下、PBS 中で（中性 pH 付近で）1 分以内に蛍光を発する。
- ④ ストークスシフトが大きい。
- ⑤ ホウ素化合物との錯体の蛍光量子収率が 10%以上。

本研究では、上記の4項目を満たすホウ素センサーを開発するために、先行研究から得られた知見を基に、種々の *N,O* 型キレートリガンドの設計・合成を行う。

3.1 新規ホウ素センサーの候補化合物

上記の5条件を満たすホウ素センサーの母核構造を絞り込むため、*N,O* 型、*N,O,O* 型キレートリガンドをリストアップすることにした。その結果、比較的安価に購入できるか、簡便に合成することができる化合物 **1~4** を選択し、これらの蛍光特性を比較することとした。

3.2 *N,O* 型キレートリガンドの蛍光特性リストアップした化合物 **1~4** と DAHMI について、化合物自体の蛍光特性と、各化合物とフェニルホウ酸との錯体の蛍光特性を測定した（表4）。化合物 **1~4** は、いずれもそれ自体は殆ど蛍光を発するこ

とのない無蛍光性の化合物である。この中で化合物 **1~3** は、室温下において 50%DMSO/ PBS 中でフェニルホウ酸と混合するだけで速やかに蛍光性の錯体を形成した。しかしながら、*N,O,O* 型の化合物 **4** は室温下でフェニルホウ酸と錯体を形成することはなく、ホウ素センサーとして利用できるのは、*N,O* 型キレートリガンドだけであることが確認できた。

蛍光性のホウ素錯体を形成した化合物 **1~3** は、いずれも DAHMI よりも大きなストークスシフト値を示し、いずれもホウ素化合物の定量に適したセンサー分子であることが確認できた。中でも化合物 **1** は、その蛍光波長がこれらの化合物の中で唯一 500nm を超え、緑色の蛍光を発するホウ素センサーであった。これらの化合物とフェニルホウ酸の錯体の蛍光量子収率を比較すると、ピリジルフエノール型の化合物 **3** が最も高い値を示し、その値も目標値である 10%に近い 9.3%と DAHMI の 15 倍程の高い値であった。

以上のことから、ピリジルフエノール型の化合物 **3** が、ストークスシフトおよび蛍光量子収率が高く、効率的なホウ素センサーとして有望な化合物であることが明らかとなった。この化合物 **3** は市販品として購入できるため、簡便なホウ素化合物定量法を確立するためのホウ素センサーとしては非常に有望な化合物であるといえる。さらに、このタイプの化合物は化学合成により様々な誘導体を合成することが可能であり、化合物 **3** より高い量子収率を示す化合物や、励起・蛍光波長のことなる化合物を合成し、カラーチューニングを行うことも可能であると考えられ、今後の新規ホウ素センサー開発においても有望な母核化合物であると言える。

4. ホウ素センサーによるホウ素薬剤の定量

上記の検討で見出した化合物 **3** を用い、水溶液中のホウ素薬剤を簡便に定量する方法について、L-BPA をモデル化合物として用いて検討を行った。なお、本研究ではより実用に近い状態で検討を行

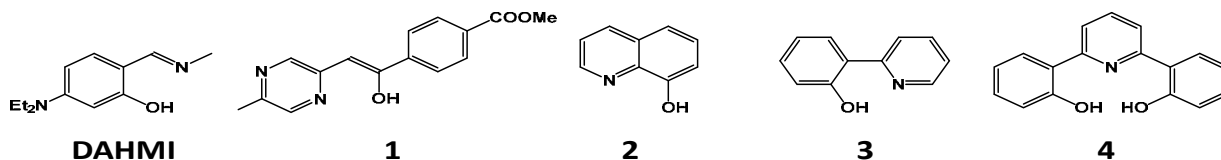


表 4. ホウ素センサーの蛍光特性 (1.0mM, 50%DMSO/PBS 溶液, 25°C)

Comp.	Boron-Sensor Only				Boron Sensor-BPA Complex			
	Ex max (nm)	Em max (nm)	Stokes shift (cm ⁻¹)	ϕ	Ex max (nm)	Em max (nm)	Stokes shift (cm ⁻¹)	ϕ
DAHMI	413	551	6064	-	408	430	1254	0.6%
1	419	477	2902	-	421	516	4373	3.3%
2	340	384	3370	-	352	433	5314	1.2%
3	376	483	5892	-	355	464	6617	9.3%
4	376	-	-	-	376	-	-	-

うため、L-BPA を臨床で用いられているように、フルクトース錯体 (L-BPA-Fc) として PBS に溶解した溶液を用いて検討を行った。

まず、蛍光測定用 96well プレートに種々の濃度に調整した L-BPA-Fc を加えた後に、化合物 3 の DMSO 溶液 (10mM あるいは 1mM) を加えた。次に、10 分間 37°C で混和させた後に、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光測定を行った (ex: 355nm, em 440nm)。そして、測定した蛍光強度と L-BPA-Fc の濃度を基に検量線を作成した (図 3)。この結果を見ると、化合物 3 の DMSO 溶液 (10mM) を用いることで、水溶液中の L-BPA-Fc を正確に定量することに成功した ($R^2 > 0.99$)。また、本方法は 0.5 μ M (0.005Bppm) と非常に低い濃度の L-BPA-Fc を定量することが可能であることも確認できた。上記の結果から、既存のホウ素化合物定量法よりも遥かに簡便で、低い濃度まで検出可能なホウ素薬剤の定量法を確立することができた。

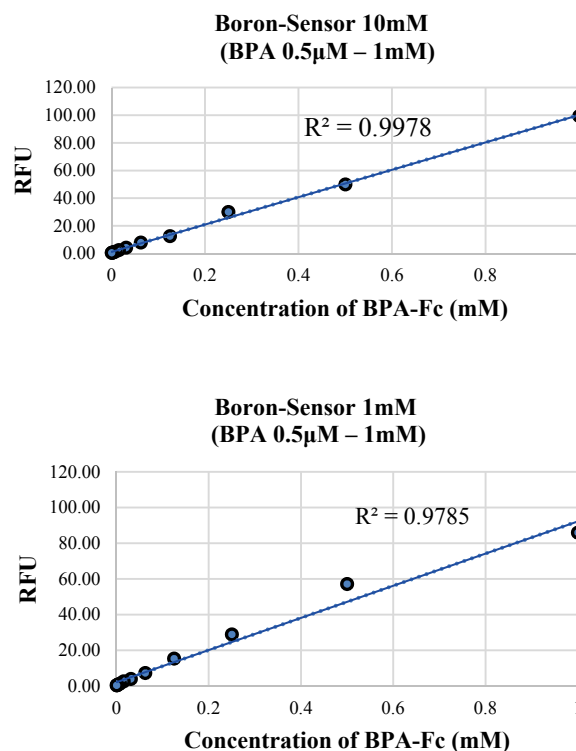


図3 蛍光型ホウ素センサーによる L-BPA-Fc の定量

5. まとめ

以上の結果より、蛍光型ホウ素センサー DAHMI を用いて生細胞中のホウ素薬剤分布を可視化することに成功した。さらに、DAHMI よりも発光効率が高い新規ホウ素センサーを新たに見出し、これを用いた簡便な測定法によってホウ素薬剤を定量分析することに成功した。

今後、これらの研究成果を基に、より発光効率が高く、種々の蛍光色を発するホウ素センサーを複数開発することができれば、ホウ素薬剤を簡便に定性・定量分析することのできる手法を確立できるものと期待できる。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団研究助成の支援の下で行われたものであり、ここに深く感謝申し上げます。また、蛍光特性の測定には近畿大学理工学部の山口教授にご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) H. C. Brown, P. K. Jadhav, A. K. Mandal, *Tetrahedron*, 1981, **37**, 3547.
- 2) N. Miyaoura, M. Suzuki, *Chem. Rev.* 1995, **95**, 2457.
- 3) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4891.
- 4) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 1184.
- 5) W. Yang, X. Gao, B. Wang, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 346.
- 6) Y. Mishima, M. Ichihashi, M. Tsui, M. Hatta, S. Ueda, M. Honda, T. C. Susuki, *Lancet*, 1998, **2**, 388.
- 7) K. Hanaoka, T. Watabe, S. Naka, Y. Kanai, H. Ikeda, G. Horitsugi, H. Kato, K. Isohashi, E. Shimosegawa, J. Hatazawa, *EJNMMI Res.*, 2014, **4**, 70.
- 8) V. J. Palombella, E. M. Conner, J. W.

Fuseler, A. Destree, J. M. Davis, F. S. Larous, R. E. Wolf, J. Huang, S. Brand, P. J. Elliott, D. Lazarus, T. McCormack, L. Parent, R. Stein, J. Adams, M. B. Grisham. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 15671.

- 9) S. Jinna, J. Finch, *Drug Des. Devel. Ther.* 2015, **9**, 6185.
- 10) C.P.J. Raaijmakers, M. W. Konijnenberg, L. Dewit, D. Haritz, R. Huiskamp, K. Philipp, A. Siefert, F. Stecher-Rasmussen, B. J. Mijnheer, *Acta Oncologica* 1995. **34**. 517.
- 11) Y. Hattori, S. Kusaka, M. Mukumoto, K. Uehara, T. Asano, M. Suzuki, S. Masunaga, K. Ono, S. Tanimori, M. Kirihata, *J. Med. Chem.* 2012, **55**, 6980.
- 12) H. Tanaka, Y. Sakurai, M. Suzuki, S. Masunaga, K. Takamiya, A. Maruhashi, K. Ono, *J. Radiat. Res.*, 2014, **55**, 373.
- 13) D. Frath, J. Massue, G. Ulrich, R. Ziessel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 2290.
- 14) Y. Hattori, M. Ishimura, Y. Ohta, H. Takenaka, T. Watanabe, H. Tanaka, K. Ono, M. Kirihata, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 6927-6930

本研究に関わる研究成果発表

【原著論文】

- 1) Y. Hattori, M. Ishimura, Y. Ohta, H. Takenaka, M. Kirihata, *ACS Sensors*, 2016, **1**, 1394.

【学会発表】

- 1) Y. Hattori, M. Ishimura, Y. Ohta, H. Takenaka, M. Kirihata, Detection of Boron-Pharmaceuticals in Live Cancer Cells Using Fluorescent Boron-Sensor, 17th International Congress on Neutron Capture Therapy, Missouri, USA.

- 2) 服部能英、石村美紀、大田洋一郎、竹中宏誌、切畑光統、新規蛍光型ホウ素センサーの設計・合成と L-BPA の定量分析への応用、第 13 回日本中性子捕捉療法学会、東京.
- 3) 服部能英、分子プローブを用いたホウ素薬剤の分布解析、第 10 回光生体超分子化学セミナー、大阪.
- 4) 服部能英、大垣拓也、ピリジルフェノール型ホウ素センサーの開発、BNCT なかもずセミナー、大阪.

収縮力計測可能な神経支配骨格筋組織チップの開発



研究責任者 名古屋大学 大学院工学研究科
化学・生物工学専攻
准教授 清水 一憲

1. はじめに

現在、医薬品開発の成功率が非常に低いことが問題であり、これを解決する新たな工学技術の開発が求められている。オンチップ臓器/組織は細胞周囲の微小環境をうまく制御し、臓器/組織特異的な機能を再現した細胞培養マイクロデバイスであり、医薬品開発のための有効性評価試験における新技術として非常に期待が大きい(1)。

我々はこれまでに筋組織解析用マイクロデバイスの開発を精力的に進めてきた(2-8)。筋組織の最も特徴的な機能は収縮して力を発揮することであるため、筋組織解析用マイクロデバイスでは収縮力測定機能が不可欠である(9)と考え、収縮力測定が可能なマイクロデバイスを開発し、人工的な電気刺激に応答して単一の培養筋細胞が収縮する力を測定することに世界で初めて成功した(8)。

しかし、生体内において筋組織の収縮は運動ニューロンに支配されていることから、より正確な有効性評価試験を行うためには、試験管内（インビトロ）で運動ニューロンと機能的に接合した筋組織、すなわち運動ニューロンに支配された筋組織を構築する必要があると考えられる。

本研究では、神経支配筋組織を解析するためのマイクロデバイスを開発することを目指した。

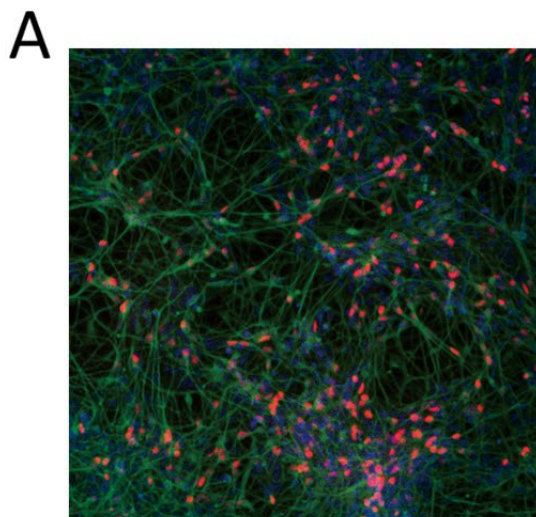
iPS 細胞から運動ニューロンを誘導し、iPS 由来運動ニューロン-神経筋接合部-三次元筋組織で構成される運動ニューロン支配筋組織をマイクロデバイス上で構築し、それぞれの構成要素への選択的な薬剤刺激が可能であり、運動ニューロンのシグナルで動く筋組織の収縮力変化を非接触・非破壊的に定量可能という特徴をもつ新しい細胞アッセイシステムの創製を目指した。

2. ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの分化誘導培養

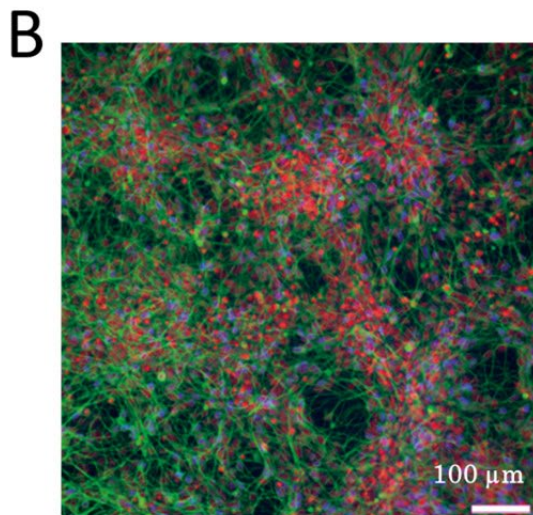
既報(10)を参考にして、ヒト iPS 細胞 201B7 株から運動ニューロンへの分化誘導を行った。約 2 週間分化誘導培養を行った細胞の免疫染色を行ったところ、運動ニューロンマーカーである HB9 と Isl-1 陽性の細胞が多く観察された(図 1A と B)。

3. ヒト iPS 由来運動ニューロンの三次元培養

本研究では、ヒト iPS 由来運動ニューロンと三次元筋組織を機能的に接合させる。そこで分化誘導したヒト iPS 由来運動ニューロンの三次元培養を検討した。骨格筋細胞の三次元培養に実績(11)のあるマトリゲルとフィブリンを用いた。それらの混合比を変えて、運動ニューロンの軸索伸長への影響を調べた。



HB9(運動ニューロンの核)
BIII tubulin(軸索)
DAPI (核)



Isl-1(運動ニューロンの核)
BIII tubulin(軸索)
DAPI (核)

図1 ヒト iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンの免疫染色

その結果、マトリゲルのみ、マトリゲル：フィブリン=2：1、マトリゲル：フィブリン=1：2の条件で軸索の伸長が観察された（図2 A, B, C）。混合比による顕著な差は観察されなかった。この結果より、以降の実験では、骨格筋細胞の三次元培養に実績(11)のある混合比（マトリゲル：フィブリン=1：2）を用いることとした。

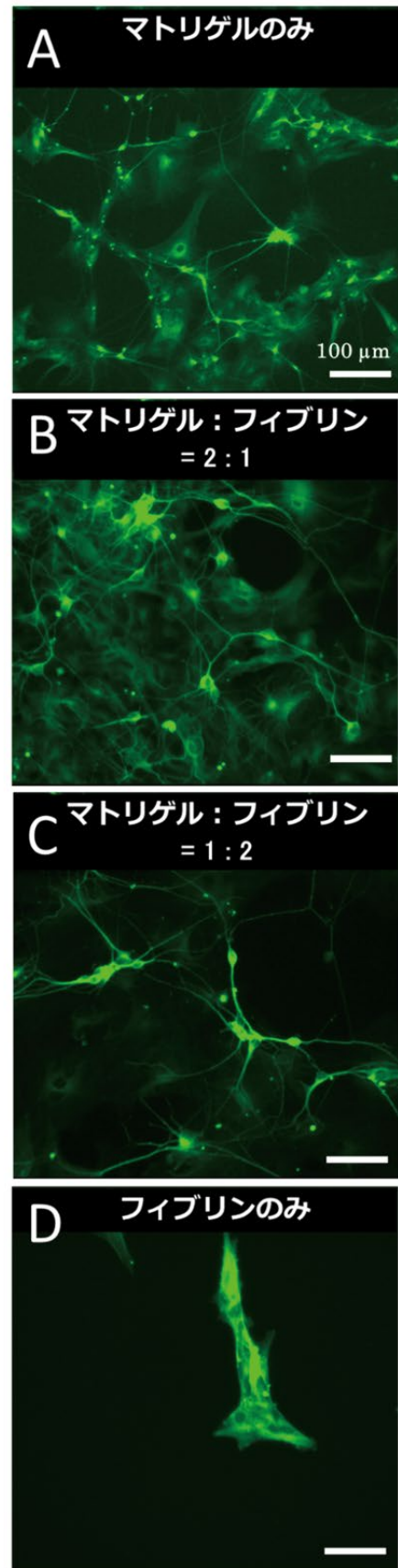


図2 ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの三次元培養の結果

4. ヒト iPS 由来運動ニューロンとマウス筋管細胞の平面共培養

次にiPS細胞から誘導した運動ニューロンがマウス株化筋芽細胞 C2C12 由来の筋管細胞と機能的に接合し、神経筋接合部を形成するかどうかを調べた。マトリゲルコートした培養皿上で筋芽細胞を培養し、筋管細胞に分化誘導した。分化誘導後、運動ニューロンを含む細胞塊を筋管細胞上に播種し、数日間培養を継続した後に、免疫染色を行った。その結果、軸索末端(赤)と筋管細胞(青)のアセチルコリンレセプター(緑)の重なりが観察された。このことから、iPS 細胞由来運動ニューロンはマウス C2C12 由来筋管細胞と神経筋接合部を形成することがわかった。



図3 平面共培養したヒト iPS 細胞由来運動ニューロンとマウス筋管細胞

5. ヒト iPS 由来運動ニューロンとマウス筋管細胞の三次元共培養と収縮力測定

平面共培養で、iPS 由来運動ニューロンとマウス C2C12 由来筋管細胞が神経筋接合部を形成する機能的に接合することがわかったため、次に三次元的な共培養を行い、運動ニューロンからのシグナルで収縮する三次元筋組織の構築を試みた。

本実験には三次元筋組織の収縮力を測定する

ことが可能なマイクロデバイス(11)を用いた(図4A)。シリコンゴム製のデバイスに、筋芽細胞と運動ニューロンを含むマトリックス(マトリゲル:フィブリン=1:2)を入れゲル化し、14日間共培養を行うことで、運動ニューロンを含む三次元筋組織を構築した(図4B)。

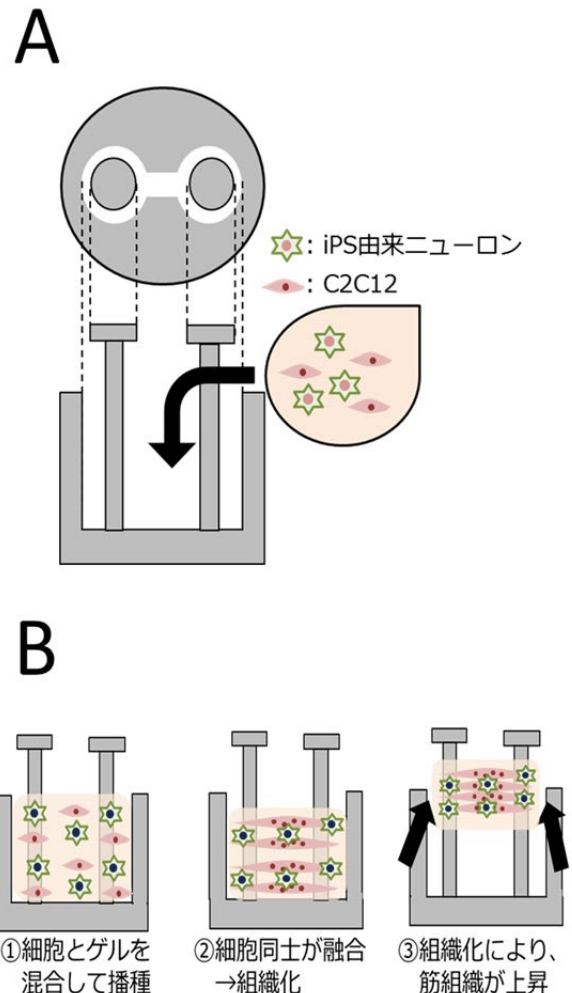


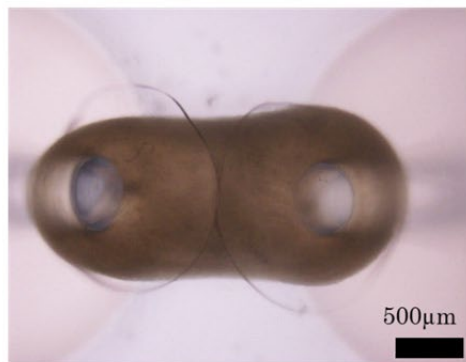
図4 収縮力測定マイクロデバイスを用いた三次元共培養の方法

共培養 14 日目に、ある化合物を加えて運動ニューロンを活性化させたところ、デバイス上で構築した三次元筋組織が非周期的に収縮する様子が観察された(図5AとB-i)。次に、その拮抗剤を添加すると、痙攣のような小刻みの収縮が引き起こされ、約 120 秒後には収縮が停止した(図5B-ii)。また、拮抗剤存在下で、再度活性化する化合物を添加したが、収縮がほとんど見られなかつ

た (図 5 B-iii)。

以上の結果より、三次元筋組織内で、運動ニューロンと筋管細胞が機能的に接合し、神経支配筋組織の構築に成功したと考えられる。

A



B

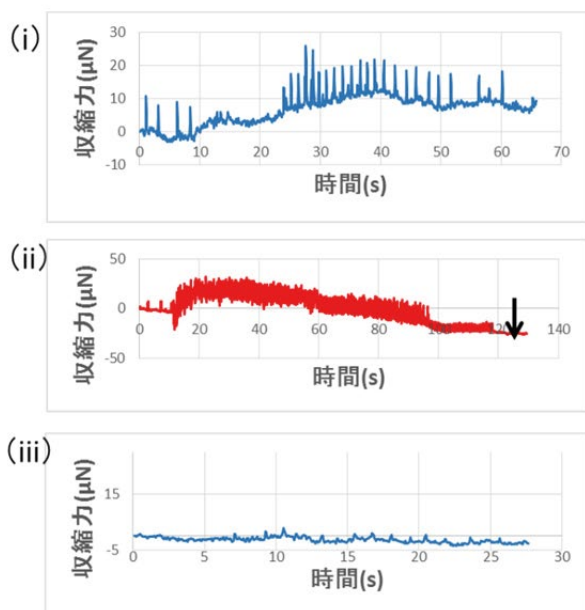


図5 三次元共培養した神経支配筋組織

A. 三次元組織の見た目

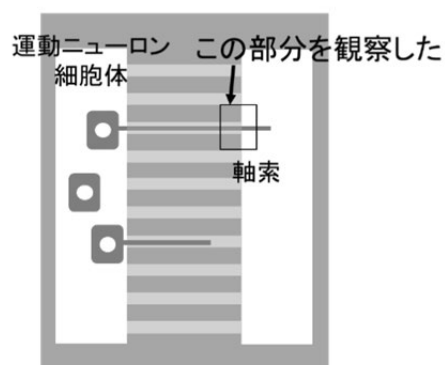
B. 収縮力測定結果

6. ヒト iPS 由来運動ニューロンの区画化培養

本研究では、運動ニューロンの細胞体と軸索に対して選択的に薬剤刺激を行うことを目指した。そこで、それらを分離培養するための機構を開発

した。分離培養機構は、フォトリソグラフィ技術を用いて作製した。シリコン基板とフォトレジストを用いて鋳型を作り、それをシリコンゴムに転写して作製した。細胞体培養部分に軸索だけが伸展できる幅 5 μm、高さ 5 μm の細いマイクロ流路を作製した (図 6 A)。開発した分離機構を用いて、ヒト iPS 由来運動ニューロンを培養したところ、細胞体と軸索を分離することに成功した (図 6 B)。

A



B

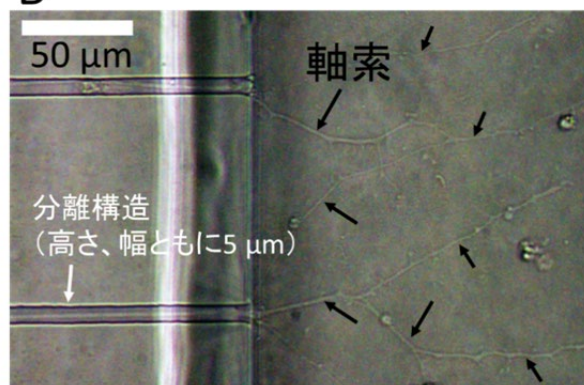


図6 マイクロデバイスを用いた運動ニューロンの区画化培養

A. 概要

B. 実際の結果

7. 区画化して培養したヒト iPS 由来運動ニューロンとマウス筋管細胞の三次元共培養

最後に、5 で使用した三次元筋組織構築機構と 6 で開発した区画化培養機構を組み合わせたマイクロデバイスを開発し、iPS 由来運動ニューロン-神経筋接合部-三次元筋組織で構成される運動ニューロン支配筋組織をマイクロデバイス上

で構築した。

約三週間共培養を行った後に、運動ニューロンの細胞体の培養部分にある化合物を加えて運動ニューロンを活性化させた。その結果、運動ニューロンからのシグナルで、デバイス上で構築した三次元筋組織が収縮した (図7)。

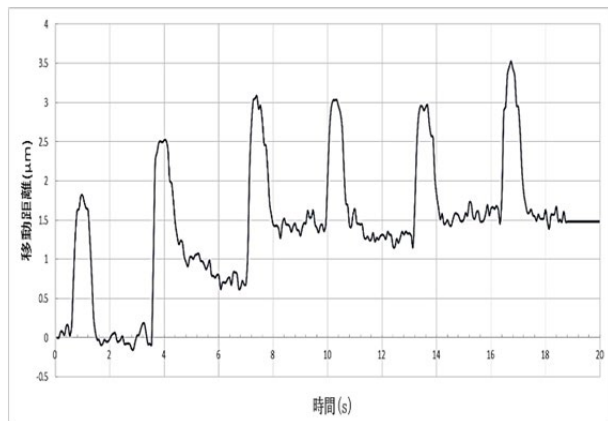


図7 ヒト iPS 由来運動ニューロンからの刺激で収縮する神経支配三次元筋組織

8. まとめ

本研究では、運動ニューロンに支配された三次元骨格筋組織の構築を行った。ヒト iPS 細胞から運動ニューロン細胞を分化誘導し、細胞体と軸索を分離培養するための技術を開発した。この分離培養技術とこれまでに開発した三次元筋組織構築技術を組み合わせることで、神経支配筋組織を構築した。構築した組織の運動ニューロンの細胞体に刺激を付加することで、三次元筋組織を収縮させることに成功した。今後は、培養条件の詳細検討や収縮力の定量化などを行い、医薬品開発のための有効性評価試験への応用を目指したい。

謝辞

本研究の一部は、公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団の奨励研究助成 (平成 27 年度) により行われました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

1. Huh, D., Hamilton, G. A. and Ingber, D. E.: From 3D cell culture to organs-on-chips, *Trends in cell biology*, **21**, 745-754 (2011).
2. Fujita, H., Endo, A., Shimizu, K. and Nagamori, E.: Evaluation of Serum-Free Differentiation Conditions for C2C12 Myoblast Cells Assessed as to Active Tension Generation Capability, *Biotechnology and Bioengineering*, **107**, 894-901 (2010).
3. Fujita, H., Shimizu, K. and Nagamori, E.: Novel Method for Fabrication of Skeletal Muscle Construct From the C2C12 Myoblast Cell Line Using Serum-Free Medium AIM-V, *Biotechnology and Bioengineering*, **103**, 1034-1041 (2009).
4. Fujita, H., Shimizu, K. and Nagamori, E.: Novel Method for Measuring Active Tension Generation by C2C12 Myotube Using UV-Crosslinked Collagen Film, *Biotechnology and Bioengineering*, **106**, 482-489 (2010).
5. Fujita, H., Hirano, M., Shimizu, K. and Nagamori, E.: Rapid decrease in active tension generated by C2C12 myotubes after termination of artificial exercise, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **31**, 279-288 (2010).
6. Fujita, H., Shimizu, K., Yamamoto, Y., Ito, A., Kamihira, M. and Nagamori, E.: Fabrication of scaffold-free contractile skeletal muscle tissue using magnetite-incorporated myogenic C2C12 cells, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **4**, 437-443 (2010).
7. Shimizu, K., Araki, H., Sakata, K., Tonomura, W., Hashida, M. and Konishi, S.: Microfluidic devices for construction of contractile skeletal muscle microtissues, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **119**, 212-216 (2015).
8. Shimizu, K., Sasaki, H., Hida, H., Fujita, H., Obinata, K., Shikida, M. and Nagamori, E.: Assembly of skeletal muscle cells on a Si-MEMS

device and their generative force measurement, *Biomedical Microdevices*, **12**, 247-252 (2010).

9. **Shimizu, K., Fujita, H. and Nagamori, E.:** Evaluation systems of generated forces of skeletal muscle cell-based bio-actuators, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **115**, 115-121 (2013).

10. **Shimojo, D., Onodera, K., Doi-Torii, Y., Ishihara, Y., Hattori, C., Miwa, Y., Tanaka, S., Okada, R., Ohyama, M., Shoji, M. and other X authors:** Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells, *Molecular Brain*, **8**, 79 (2015).

11. **Shimizu, K., Genma, R., Gotou, Y., Nagasaka, S. and Honda, H.:** Three-Dimensional Culture Model of Skeletal Muscle Tissue with Atrophy Induced by Dexamethasone, *Bioengineering*, **4**, 56 (2017).

ナノ薄膜干渉基板を用いた多項目同時・蛍光増強イムノアッセイ



研究責任者 関西学院大学 理工学部
研究特別任期制助教 安田 充

1. はじめに

多種類の抗体を固定化したガラスやプラスチックなどの基板からなるプロテインチップは、様々な腫瘍マーカータンパク質を同時に検出できる画期的な癌診断技術として注目を集めている。プロテインチップ技術では通常、基板上に固定化した抗体（捕捉抗体）と蛍光標識した抗体（検出抗体）で腫瘍マーカータンパク質を挟むサンドイッチ法を用いて腫瘍マーカータンパク質を検出する。しかし、この方法では高価な抗体をいくつも使用するため、膨大なコストが実用化への大きな障害となっていた。

この問題を打開する一つのアプローチとして、検出抗体からの蛍光を増強する方法が考えられる。一般に、腫瘍マーカータンパク質の多くは蛍光を増強しなくても既存の手法で検出できる。しかし、蛍光を増強すれば、少量の抗体でも蛍光が検出できる、つまり蛍光が増強した分だけ抗体の使用量を減らすことができ、プロテインチップ技術が抱えるコストの問題を解決できる。本研究では蛍光を増強する技術として、ガラス基板上にAg薄膜、その上に透明な誘電体のナノ薄膜を形成したナノ薄膜干渉基板に着目した（図1）。

ナノ薄膜干渉基板では一般的なガラス基板に比較し、蛍光分子からの蛍光を100倍以上増強で

きる¹⁾。研究責任者は過去に誘電体として Al_2O_3 からなるナノ薄膜干渉基板を作製し、この基板を用いることで蛍光を200倍増強することに成功した²⁾。ここでの増強は主に Al_2O_3 層内での励起光と蛍光両方の光学干渉によって起きる³⁾。この高い蛍光増強効果をバイオ分析へ適用すれば、疾病関連因子、例えばDNAやタンパク質などの高感度な分析が期待できる。

そこで、ナノ薄膜干渉基板の蛍光増強効果をモデルタンパク質Avidin/Streptavidinの検出へ適用したところ、蛍光を50倍以上増強することに成功した⁴⁾。また、サルモネラ菌遺伝子のDNAマイクロアレイ検出でも50倍以上の増強⁵⁾、GFPを発現する大腸菌の観察では2桁までの増強を達成した⁶⁾。さらに、ナノ薄膜干渉基板の光学干渉と金属ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴を利用した新たな蛍光増強基板の開発や⁷⁾、蛍光の増

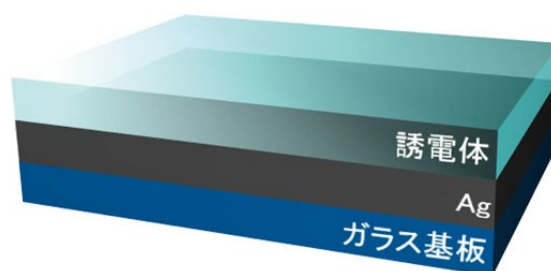


図1 ナノ薄膜干渉基板の構造

強と背景光の抑制を同時に実現する高コントラスト蛍光イメージング技術の開発^{8,9)}など、多様な研究へと展開してきた。

一方、ナノ薄膜干渉基板を医療診断用ナノバイオチップとして実用化するには、病気と関連する因子の検出例を示す必要がある。様々な疾病関連因子のなかでも、癌になると血中濃度が上昇する腫瘍マーカータンパク質は、血液検査で癌の診断に利用されており、医療診断における具体的な検出例となりうる。そのため、腫瘍マーカータンパク質を高感度に検出できれば、ナノバイオチップとしてのナノ薄膜干渉基板の実用化に近づく。

そこで本研究では、腫瘍マーカータンパク質として肝臓癌に関連する α -Fetoprotein (AFP) に着目し、ナノ薄膜干渉基板上で AFP を高感度に検出することで、ナノ薄膜干渉基板を用いた具体的な疾病関連因子の検出例を実証することを目的とした。この検出例を端緒とし、将来的には腫瘍マーカータンパク質の多項目同時・蛍光増強イムノアッセイにつなげる。

2. 実験方法

本研究では最初に、洗浄したガラス基板上に多層膜構造を有するナノ薄膜干渉基板を作製した。つぎに、作製したナノ薄膜干渉基板の表面改質を行い、Biotin-Streptavidin 系を利用して表面改質の確認を行った。さらに、腫瘍マーカータンパク質を基板上に吸着させて検出抗体を結合させる直接吸着法を用いた抗原抗体反応の特異性の確認、ついで腫瘍マーカータンパク質の一般的な検出法であるサンドイッチ法を用いて、肝臓癌に関連する腫瘍マーカータンパク質 AFP を検出した。最後に、ナノバイオチップとしてのナノ薄膜干渉基板の実用性について評価した。

2.1 ガラス基板の洗浄

顕微鏡用スライドガラスなどのガラス基板表面に付着した比較的大きな汚れを除去するため、ガラス基板を超音波用洗浄剤に浸漬し、超音波洗

浄した。30分後、ガラス基板に付着した超音波用洗浄剤を水道水で洗い流し、超純水で濯ぎ、60°Cで乾燥させた。つぎに、微小な汚れを落とすため、ガラス基板をエタノールに浸し、30分間の超音波洗浄、超純水での濯ぎに続けて、今度は超純水に浸漬して30分間超音波洗浄し、超純水でよく濯いだ後、ガラス基板を60°Cで乾燥させた。最後に、プラズマ洗浄を行い、原子レベルで基板表面の洗浄を行った。

2.2 ナノ薄膜干渉基板の作製

スパッタリング装置 (CFS-4ES-231, 芝浦メカトロニクス) を用いて、洗浄したガラス基板上に可視光が透過しない厚みをもつ 500 nm の Ag 膜、その上に透明な Al_2O_3 の薄膜を形成したナノ薄膜干渉基板を作製した。Ag はガラスと直接、接着しにくいため、Ag 膜とガラス基板の間に接着層として 10 nm の Cr 膜を成膜した。Cr と Ag の膜厚は触針型表面形状解析装置 (DekTak8, Veeco) で、 Al_2O_3 の膜厚はエリプソメータ (ESM-1T, ULVAC) で測定した。

2.3 最適な Al_2O_3 膜厚の設計

ナノ薄膜干渉基板上の蛍光分子からの蛍光は、 Al_2O_3 膜厚の増加に伴い、明るくなったり暗くなったりと周期的に変化する^{2,3)}。また、蛍光分子の励起波長・蛍光波長が長いほど、最大蛍光増強をもたらす Al_2O_3 膜厚 d は厚くなる³⁾。これらの特性から、ナノ薄膜干渉基板での蛍光は、主に Al_2O_3 層内での励起光と蛍光両方の光学干渉によって増強する。この光学干渉に基づき、図2に示す光学モデルと単純な干渉理論より、 d を以下に示す式 (1) で算出できる。

$$n_2 d \cos \theta_2 = (2m + 1) \lambda / 4 \quad (1)$$

屈折角 θ_2 を Snell の法則 $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$ により算出し、空気の屈折率 $n_1 = 1$ 、 Al_2O_3 の屈折率 $n_2 = 1.62$ 、最初に強め合う干渉 $m = 0$ と仮定したとき、使用

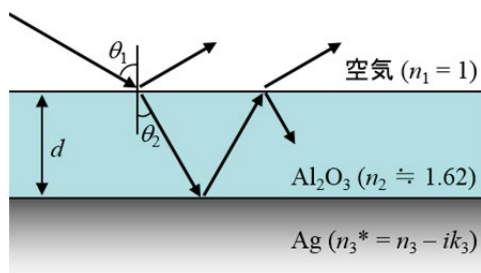


図2 光学モデル

した蛍光分子 Cy3 (励起波長 : 550 nm, 蛍光波長 : 570 nm) の蛍光波長 λ に対する d を算出した。Cy3 に対する d は約 88 nm であったため、実験では 90 nm の Al_2O_3 膜厚をもつナノ薄膜干渉基板を使用した。

2.4 基板の表面改質

ナノ薄膜干渉基板と比較用のガラス基板は表面状態が異なる。そこで、これらの基板表面の状態を同じ条件にするため、シランカップリング剤を用いて基板表面にアミノ基を修飾した。超純水で希釈した 1% の 3-Aminopropyl trimethoxysilane (APTMS) 溶液にナノ薄膜干渉基板とガラス基板を浸漬し、1.5 時間後、超純水で 5 分間洗浄し、110°C で乾燥させることで、基板表面へのアミノ基の修飾を達成した。

2.5 基板表面へのアミノ基修飾の確認方法

基板表面へのアミノ基修飾の確認方法として、Cy3 標識したモデルタンパク質 Streptavidin を検出

する Biotin-Streptavidin 系を採用した。Streptavidin の検出プロトコルを図 3 に示す。アミノ基を修飾したナノ薄膜干渉基板とガラス基板上に、超純水で希釈した 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Sulfo-NHS Biotin derivative (NHS-activated Biotin) を 1 μL スポットした。スポット溶液の乾燥後、超純水で希釈した 10 mg/mL の Bovine Serum Albumin (BSA) 溶液に基板を浸すことでブロッキング処理を行った。ブロッキングとは、あらかじめ基板表面に BSA などのタンパク質を吸着させておくことで、標的タンパク質が基板表面に非特異的に吸着するのを抑制する処置を指す。BSA 溶液への 2 時間の浸漬後、基板を超純水で 10 分間洗浄し、室温で乾燥させることで、基板表面への Biotin の固定化とブロッキング処理を同時に達成した。

最後に、Tris-HCl バッファー (pH 7.4) で希釈した 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy3 標識 Streptavidin 溶液に基板を 1 時間浸漬し、基板表面に固定化した Biotin に Cy3 標識 Streptavidin を結合させた。基板を Tris-HCl バッファーと超純水でそれぞれ 10 分間洗浄後、室温で乾燥させ、Cy3 からの蛍光を正立型蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) で検出した。同様の実験を、NHS 活性をもたない Non-activated Biotin で行った。濃度とスポットの液量はそれぞれ NHS-activated Biotin と同じ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 μL であった。得られた結果を NHS-activated Biotin と比較することで、ナノ薄膜干渉基板とガラス基板表面へのアミノ基の修飾を実証した。

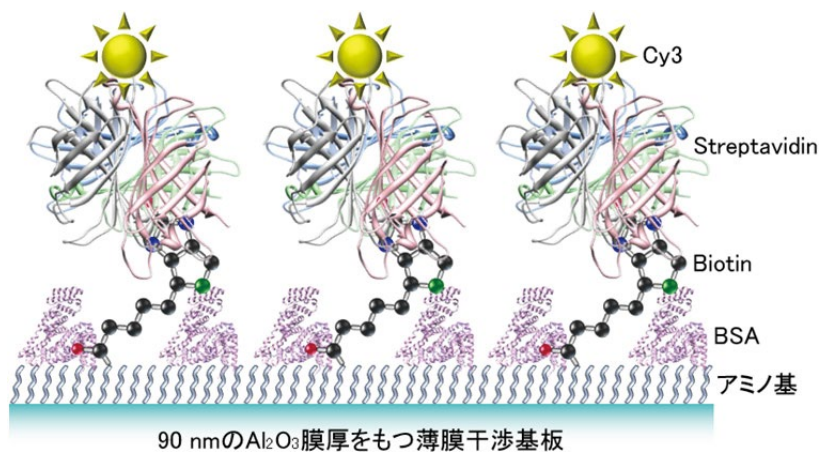
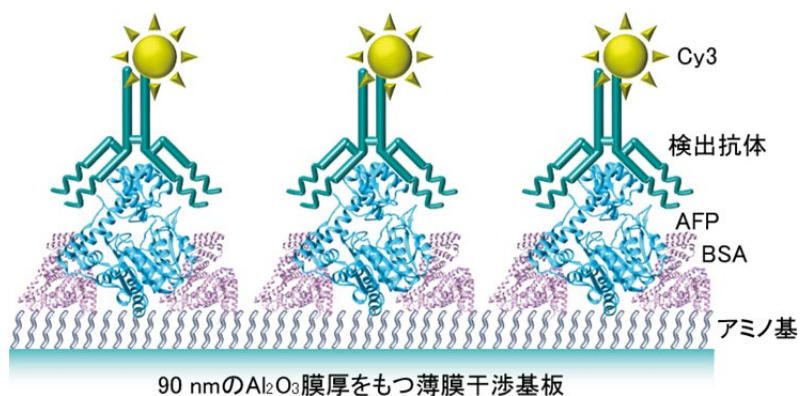


図3 Streptavidin の検出プロトコル



90 nmのAl₂O₃膜厚をもつ薄膜干渉基板
図4 直接吸着法を用いた AFP の検出プロトコル

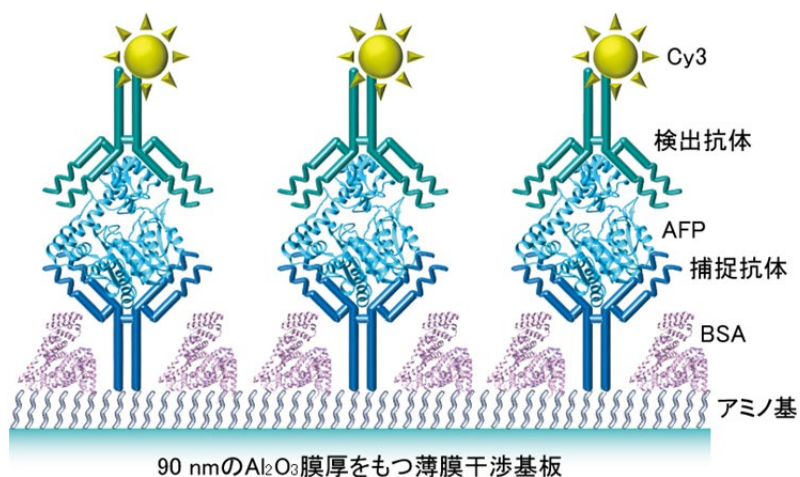
2.6 直接吸着法を用いた AFP の検出方法

腫瘍マーカータンパク質の検出で一般的に用いられるサンドイッチ法を行う前に、直接吸着法を用いて基板表面への検出抗体の非特異的吸着量の評価、および AFP と抗体が抗原抗体反応により特異的に結合するかを確認した。直接吸着法とは、基板の上にタンパク質を直接吸着させ、そのタンパク質に検出抗体を結合させる手法である。直接吸着法を用いた AFP の検出プロトコルを図4に示す。

アミノ基を修飾したナノ薄膜干渉基板とガラス基板上に、超純水で希釈した 1 μg/mL の AFP を 1 μL スポットして乾燥させ、基板表面に AFP を物理吸着させた。ブロック処理を行うため、Phosphate-Buffered Saline (PBS(-), pH 7.4) で希釈した 10 mg/mL の BSA 溶液に基板を 2 時間浸漬後、リン酸バッファー (pH 7.4) で数回洗浄、続けて超

純水で数回洗浄し、室温で乾燥させた。つぎに、PBS(-) で希釈した 10 mg/mL の BSA を含む 1 μg/mL の Cy3 標識検出抗体溶液に基板を浸した。1 時間後、基板をリン酸バッファー (pH 7.4) と超純水でそれぞれ数回洗浄し、室温で乾燥させた。Cy3 からの蛍光を正立型蛍光顕微鏡 (BX51, OYMPUS) で検出した。

この方法により、基板表面への検出抗体の非特異的吸着量を評価した。抗原抗体反応の特異性の確認に対しては、アミノ基を修飾した基板の上に、蛍光分子を標識していない未標識の Streptavidin を 1 μL スポットした。希釈液と濃度はそれぞれ AFP のスポット条件と同じ超純水、1 μg/mL であった。スポット溶液の乾燥後は AFP と同じ実験を行い、AFP の結果と比較することで、ナノ薄膜干渉基板とガラス基板両方に対して、抗原抗体反応の特異性を確認した。



90 nmのAl₂O₃膜厚をもつ薄膜干渉基板
図5 サンドイッチ法を用いた AFP の検出プロトコル

2.7 サンドイッチ法を用いた AFP の検出方法

サンドイッチ法を用いた AFP の検出プロトコルを図5に示す。アミノ基を修飾したナノ薄膜干渉基板上とガラス基板上に、超純水で希釈した 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の捕捉抗体を 1 μL スポットして乾燥させ、基板表面に捕捉抗体を物理吸着させた。つぎに、基板を Phosphate-Buffered Saline (PBS(-), pH 7.4) で希釈した 10 mg/mL の BSA 溶液に 2 時間浸し、PBS(-) で数回洗浄後、超純水で濯ぎ、室温で乾燥させた。基板表面に固定化した捕捉抗体に AFP を結合させるため、PBS(-) で希釈した 10 mg/mL の BSA を含む 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の AFP 溶液に基板を浸漬した。1 時間後、PBS(-) で数回洗浄し、超純水で濯ぎ、室温で乾燥させた。

最後に、PBS(-) で希釈した 10 mg/mL の BSA を含む 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy3 標識検出抗体溶液に基板を 1 時間浸し、PBS(-) で数回洗浄後、超純水で濯ぎ、室温で乾燥させることで、AFP を捕捉抗体と Cy3 標識検出抗体でサンドイッチした。Cy3 からの蛍光を正立型蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) で検出した。得られた結果を基に、ナノバイオチップとしてのナノ薄膜干渉基板の実用性について評価した。

3. 結果・考察

サンドイッチ法を用いた AFP の検出を実証するため、本研究では最初に、基板表面へのアミノ基の修飾の確認、直接吸着法を用いたときの基板表面への検出抗体の非特異的吸着量の評価および抗原抗体反応の特異性の確認を行う。つぎに、AFP 検出におけるナノ薄膜干渉基板での蛍光強度とガラス基板での蛍光強度の比較を行い、最後にサンドイッチ法を用いた AFP の検出を実証する。

3.1 基板表面へのアミノ基修飾の確認

Biotin と Streptavidin は抗原抗体反応に基づくタンパク質と抗体の結合よりも強固に結合することが知られ、タンパク質のモデル実験として広く

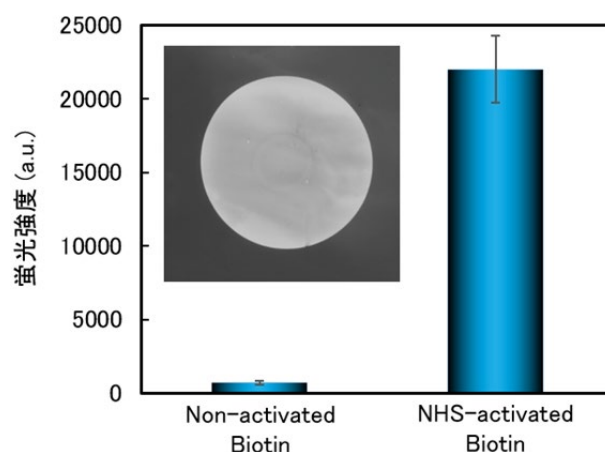


図6 アミノ基の修飾の確認

利用されている。この Biotin-Streptavidin 系を用いて基板表面へのアミノ基の修飾を確認した。そのために、ナノ薄膜干渉基板とガラス基板上の NHS-activated Biotin をスポットした領域と Non-activated Biotin をスポットした領域からの Cy3 標識 Streptavidin の蛍光を検出した。ナノ薄膜干渉基板で得られた結果を図6に示す。挿入図は NHS-activated Biotin をスポットした領域からの蛍光像である。

蛍光像からも明らかのように、NHS-activated Biotin をスポットした領域からの蛍光をはっきりと観察することができた。一方、Non-activated Biotin をスポットした領域からの蛍光は、NHS-activated Biotin をスポットした領域の蛍光強度に比べ、僅か 3%程度であった。本研究で使用した NHS-activated Biotin は基板表面のアミノ基とアミド結合を介して結合するため、基板表面に Biotin が固定化され、その Biotin に Cy3 標識 Streptavidin が結合したことで高い蛍光強度を示した。一方、NHS-activated Biotin を 1 日以上室温で放置して、加水分解により NHS 活性を失わせた Non-activated Biotin は基板表面のアミノ基と結合しない。つまり、Non-activated Biotin をスポットした領域には基板表面に Biotin が固定化されず、Biotin に結合できる Cy3 標識 Streptavidin が基板表面にほとんど存在しないため、低い蛍光強度を示したと考えられる。

同様の結果がガラス基板でも得られた。以上から、材質が異なるナノ薄膜干渉基板とガラス基板は基板の表面状態が異なるが、両方の基板に対して表面にアミノ基を修飾することができ、表面状態を同じ条件にすることができた。これにより、AFP の検出を定量的に評価できる。

3.2 検出抗体の非特異的吸着量の評価

基板表面へのアミノ基の修飾が確認できたため、つぎに抗原抗体反応の実験へと移行する。抗原抗体反応に基づいて AFP の検出を実証するには、観察されるスポットからの蛍光が Cy3 標識検出抗体の非特異的吸着によるものでないこと、および AFP と検出抗体が特異的な抗原抗体反応によって結合していることを実証する必要がある。ここでは前者の基板表面への検出抗体の非特異的吸着量を直接吸着法を用いて定量的に評価する。ナノ薄膜干渉基板で得られた結果を図 7 に示す。挿入図は蛍光像である。

蛍光像から、AFP をスポットした領域からの蛍光をはっきりと観察することができる。AFP をスポットした領域には、AFP が基板表面に物理吸着し、吸着している AFP に Cy3 標識検出抗体が結合したことで、高い蛍光強度が観測されたと予想される。一方、AFP をスポットしていない領域からの蛍光強度は、AFP をスポットした領域からの蛍光強度に比較し、約 6%であった。この 6%という数字は BSA によるブロッキング効果が働き、

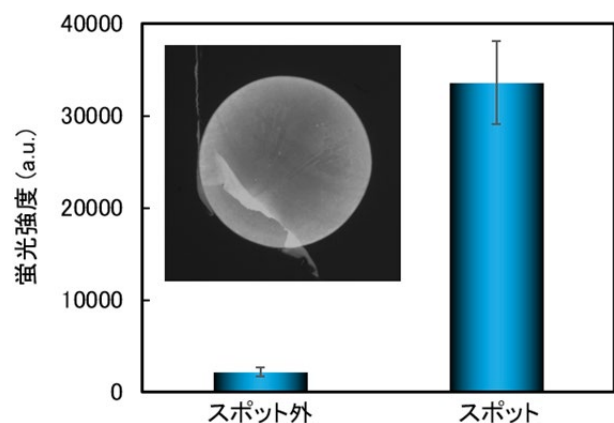


図7 検出抗体の非特異的吸着量

基板表面への Cy3 標識検出抗体の非特異的吸着が著しく抑制されたことで、AFP をスポットしていない領域が低い蛍光強度を示した。同様の結果がガラス基板でも得られた。これらの結果は、観察される蛍光が検出抗体の非特異的吸着によるものでなく、AFP と検出抗体の特異的な抗原抗体反応によるものであることを示唆している。

3-3 抗原抗体反応の特異性の確認

前節で AFP と検出抗体が抗原抗体反応により特異的に結合していることが示唆されたため、ここではこの結合が特異的であることを直接吸着法を用いて実証する。AFP をスポットした領域からの蛍光強度と未標識の Streptavidin をスポットしたときの蛍光強度の比較を図 8 に示す。

今回使用した検出抗体は AFP 抗体であるため、AFP をスポットした領域からは、AFP と結合した Cy3 標識検出抗体により、高い蛍光強度が観測されると予想されるが、Streptavidin と AFP 抗体は結合しないため、Streptavidin をスポットした領域には Cy3 標識検出抗体が存在せず、ほとんど蛍光が観測されないと予想される。実際、Streptavidin をスポットした領域からの蛍光強度は、AFP をスポットした領域からの蛍光強度に比べ、その割合は僅か 3%程度であった。Streptavidin と検出抗体が非特異的に結合していれば、3%よりも高い蛍光強度が観測されるが、AFP に比べて Streptavidin をスポットした領域からの蛍光強度が 3%という

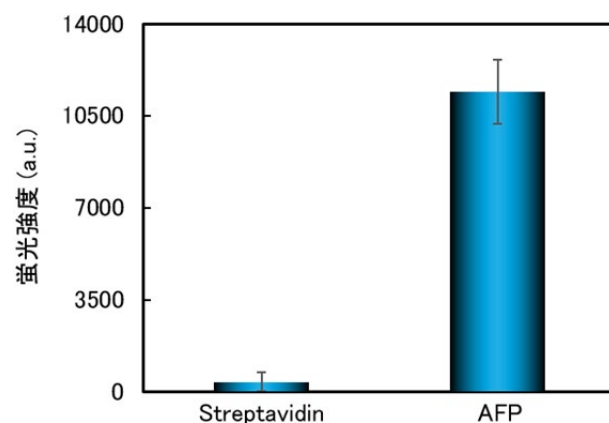


図8 抗原抗体反応の特異性

極めて低い数字は、AFP と検出抗体が抗原抗体反応により特異的に結合したことを意味している。したがって、本研究では観察されるスポットからの蛍光が基板表面への Cy3 標識検出抗体の非特異的吸着によるものでなく、AFP と検出抗体が抗原抗体反応により特異的に結合していることを実証することができた。

3.4 蛍光増強度の評価

これまでの結果で、AFP と検出抗体が抗原抗体反応により特異的に結合していることが確認できたため、直接吸着法を用いた AFP 検出におけるナノ薄膜干渉基板とガラス基板での蛍光強度の比較を行った。その結果を図 9 に示す。挿入図はナノ薄膜干渉基板とガラス基板での AFP 検出における蛍光像である。

蛍光像から明らかなように、ガラス基板ではスポットをほとんど観察できないが、ナノ薄膜干渉基板ではこの基板がもつ高い蛍光増強効果によって、はっきりとスポットを観察できる。そこで、これらスポットからの蛍光強度を比較したところ、ナノ薄膜干渉基板ではガラス基板に比較し、

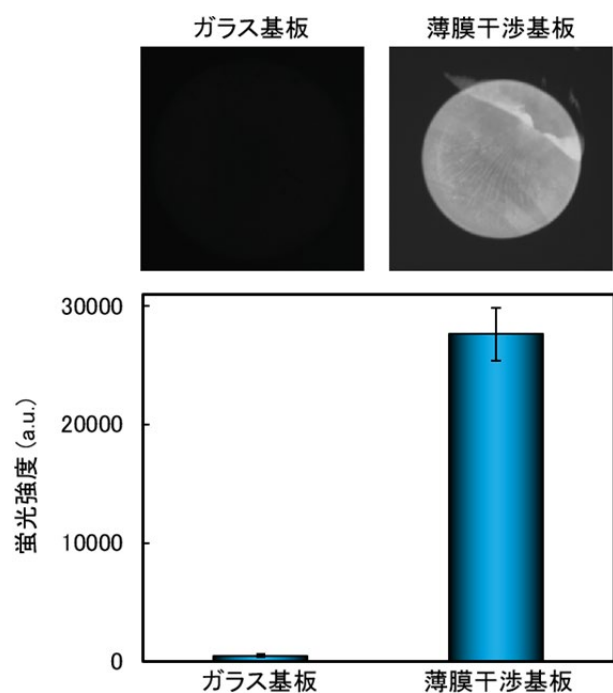


図9 蛍光強度の比較

蛍光が約 62 倍の増強に達した。この高い蛍光増強度は、研究責任者が過去に報告した Biotin-Streptavidin 系を用いて、蛍光標識したモデルタンパク質 Streptavidin を検出したときの結果とよく一致している。このときの蛍光増強度も Cy3 標識 Streptavidin の検出に対して約 62 倍であった⁴⁾。そのため、本研究で得られた 62 倍という蛍光増強度は過去の成果を踏まえても妥当であると考えられる。さらに、この高い蛍光増強度は、ナノ薄膜干渉基板をナノバイオチップとして、とりわけプロテインチップとして実用化することが十分可能であることを示唆している。

3.5 サンドイッチ法を用いた AFP の検出

直接吸着法は実際の医療診断を想定した場合、血液サンプルを直接スポットすることになる。この手法では標的タンパク質ごとに基板表面への吸着度合いが異なるため、臨床検査の方法としてはあまり推奨されない。医療診断への実用化を目指す場合は、標的タンパク質を捕捉抗体と検出抗体で挟むサンドイッチ法で検出する必要がある。そこで、サンドイッチ法を用いてナノ薄膜干渉基板とガラス基板で AFP を検出した。ナノ薄膜干渉基板で得られた蛍光像を図 10 に示す。

ナノ薄膜干渉基板ではスポットからの蛍光が

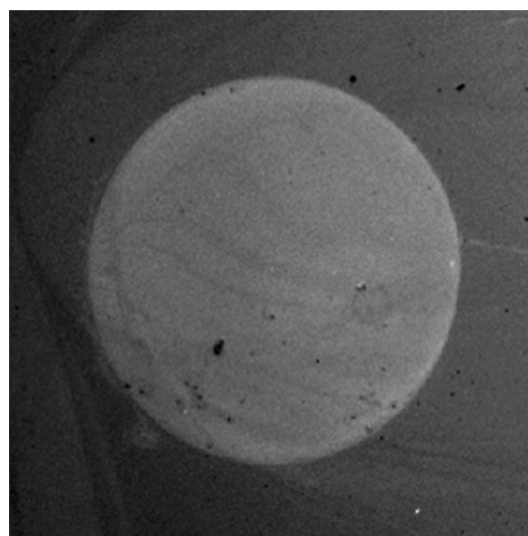


図10 サンドイッチ法を用いた AFP 検出におけるナノ薄膜干渉基板での蛍光像

増強したことで、蛍光を検出することができた、すなわちサンドイッチ法により AFP を検出することができた。一方、ガラス基板ではスポットからの蛍光を観察することができなかった。これは、捕捉抗体と AFP の結合が弱かったことが原因と考えられる。全体的な蛍光強度の低下はガラス基板のみならず、ナノ薄膜干渉基板でも観測された。

一般に、タンパク質とその抗体は必ず結合すると思いがちだが、実際、その結合力は運によるところが大きい。タンパク質や抗体を取り扱っているどのメーカーのウェブサイトにも、結合するかどうかは自身で検証する必要があると書かれているほどである。ナノ薄膜干渉基板の実用性を評価するには、ガラス基板との比較が必要不可欠であるため、今後は別の捕捉抗体で AFP を検出することで、蛍光増強度の比較、さらには検出感度の比較を行う予定である。

一方、別の視点から考えると、ナノ薄膜干渉基板では蛍光を観察でき、ガラス基板では観察できなかったという事実は、ナノ薄膜干渉基板ではガラス基板よりも低濃度の AFP を検出できることを暗に示している。つまり、ナノ薄膜干渉基板をプロテインチップへ適用した場合、より高感度な腫瘍マーカータンパク質の検出が期待できる。

以上より、本研究ではナノ薄膜干渉基板を用いることで AFP 検出における蛍光強度を 2 桁増強することに成功しただけでなく、腫瘍マーカータンパク質のさらなる検出感度の向上が大いに期待される良好な成果が得られた。助成期間内に多種類の腫瘍マーカータンパク質を同時に検出する部分までは進まなかったが、高い蛍光増強は今後を期待させるものであった。今後は、腫瘍マーカータンパク質の多項目同時・蛍光増強イムノッセイにつなげていく。

4. まとめ

本研究では、直接吸着法を用いた抗原抗体反応に基づく AFP の検出において、60 倍以上の蛍光増強を達成した。しかし、医療機関での血液検査

を考慮した場合、この手法では血液に含まれるタンパク質ごとに基板表面への吸着率が異なるため、腫瘍マーカータンパク質の種類によっては検出することが困難となる。そこで、実際の臨床検査を想定し、腫瘍マーカータンパク質を捕捉抗体と検出抗体で挟むサンドイッチ法を用いて AFP を検出した。現時点では、ガラス基板での蛍光を確認できていないため、蛍光強度を比較することはできないが、ナノ薄膜干渉基板では蛍光が観測されたことで、サンドイッチ法を用いて AFP を検出することができた。

1 年という助成期間を通して得られたこれらの成果は、ナノ薄膜干渉基板がもつ蛍光増強効果により、低濃度の腫瘍マーカータンパク質を検出できる可能性が示唆され、今後の進展が期待されるものであった。また、腫瘍マーカータンパク質検出の高感度化のみならず、高価な抗体の使用が実用化への障害となっていたプロテインチップにおいても、ナノ薄膜干渉基板で蛍光を増強すれば、より微弱な蛍光を観察できるようになる、すなわち少量の抗体でも腫瘍マーカータンパク質が検出できるようになり、膨大なコストの削減も実現できる。このように、高感度・低コストなプロテインチップを開発すれば、年 1 回の血液検査で全身の様々な癌を同時に調べることができ、QOL の向上、さらなる長寿社会の実現等、多くの面で貢献することが期待される。

そのためには、まず低濃度域での腫瘍マーカータンパク質の検出を実証し、次のステップとしてプロテインチップを想定した腫瘍マーカータンパク質の多項目同時検出、さらに動物の血液に腫瘍マーカータンパク質を加えた血中タンパク質濃度の測定、少量の抗体での腫瘍マーカータンパク質の検出へと展開していく必要がある。これらの段階を経て研究を進めていけば、将来的にはナノ薄膜干渉基板を医療診断用ナノバイオチップとして実用化できる日が訪れるかもしれない。

本研究成果は今後、日本化学会や日本分析化学会等で発表する予定である。

謝辞

本研究の一部は、公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団の技術開発研究助成 (奨励研究) により行われた。ここに深く感謝の意を表す。

参考文献

- 1) W. R. Holland and D. G. Hall, "Waveguide mode enhancement of molecular fluorescence," *Opt. Lett.* 10, pp414–416 (1985).
- 2) T. Akimoto, M. Yasuda, and I. Karube, "Effect of the polarization and incident angle of excitation light on the fluorescence enhancement observed with a multilayered substrate fabricated by Ag and Al₂O₃," *Appl. Opt.* 47, pp3789–3794 (2008).
- 3) T. Akimoto and M. Yasuda, "Fluorescence enhancement and reflection of the excitation light observed with a multilayered substrate," *Appl. Opt.* 49, pp80–85 (2009).
- 4) M. Yasuda and T. Akimoto, "Highly sensitive fluorescence detection of avidin/streptavidin with an optical interference mirror slide," *Anal. Sci.* 28, pp947–952 (2012).
- 5) M. Yasuda and T. Akimoto, "Enhanced fluorescent DNA microarray using an optical interference mirror slide," *Sensor. Mater.* (accepted).
- 6) H. Etoh, M. Yasuda, and T. Akimoto, "Signal enhancement by a multi-layered substrate for mutagen detection using an SOS response-induced green fluorescent protein in genetically modified *Escherichia coli*," *Anal. Sci.* 27, pp1179–1183 (2011).
- 7) T. Harashima, M. Yasuda, and T. Akimoto, "Enhanced fluorescence using an optical interference mirror overlaid with silver island film," *Anal. Lett.* 47, pp2731–2739 (2014).
- 8) M. Yasuda and T. Akimoto, "High-contrast fluorescence imaging based on the polarization dependence of the fluorescence enhancement using an optical interference mirror slide," *Anal. Sci.* 31, pp139–143 (2015).
- 9) M. Yasuda and T. Akimoto, "High-contrast fluorescence microscopy for a biomolecular analysis based on polarization techniques using an optical interference mirror slide," *Biosensors* 4, pp513–522 (2014).



国立研究開発法人 国立循環器病研究センター研究所
生化学部 情報伝達研究室
特任研究員 西村 博仁

1. はじめに

生体内では多数の分子や細胞が協同的に相互作用して、多様な機能を効果的に発揮している。従来、それらの機能は、細胞・組織・個体レベルのそれぞれ独立した実験系において評価されてきた。しかし、多くの分子反応が互いに関連して常に変化している場合においては、従来の評価方法に加え、生体内でそれらの分子反応をリアルタイムかつ空間的に評価する必要がある。近年の光学系や蛍光物質の開発によって蛍光物質を用いた分子イメージングを用いると、生体内のダイナミックな変化を簡便かつリアルタイムに観察することができる。そのため、固定した組織切片標本では評価することのできなかつた生体内でのリアルな分子反応を詳細に調べることが可能となってきた。しかし、生きた動物の中での分子反応を、感度よく、かつリアルタイムに時間を追って観察することはまだまだ容

易なことではない。

そこで本研究では、生きた動物の中での反応をリアルタイムかつ容易に評価するための分子イメージング法を開発し、これを利用することで、循環・代謝機能などの生体機能を対象とした分子反応を生きた動物の中で評価することを目的とし、循環器臨床に貢献することを目指し研究を行った。

2. 内容

2.1 蛍光性量子ドットを用いた生体分子の汎用性の高い蛍光標識法の確立

近年の光学系や蛍光物質の開発により、厚みのある臓器中の血流や細胞動態を観察することが可能となってきた。しかし、厚みのある生体組織の内部を観察するためには、多光子励起レーザー顕微鏡などの高価な装置が必要である。そこで、厚みのある臓器中の血流を容易に通常（単一光子）

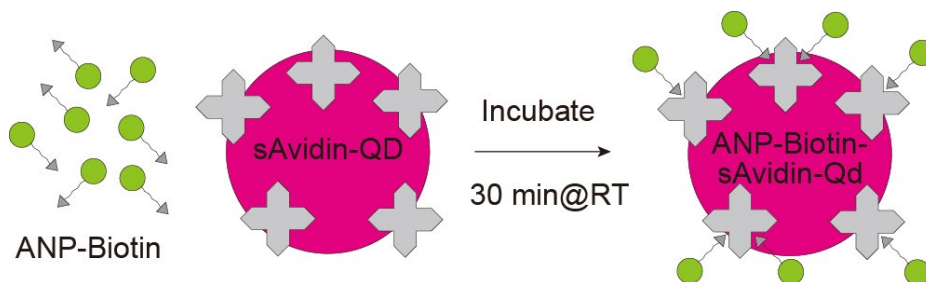


図1 ANPと蛍光性量子ドットの複合体(ANP-Biotin-sAvidin-Qd)の作製方法

の共焦点レーザー顕微鏡で観察することができるようにするため、高輝度、長い蛍光寿命などの優れた蛍光特徴をもった蛍光性量子ドットを用いることとした。しかし、生体内での分子反応を観察する場合、蛍光性量子ドットのような大きな物質を目印として付けると、観察対象の分子自体の性質が変化してしまう可能性がある。さらに、観察対象の分子を無機化合物の蛍光性量子ドットで複合化する場合、この両者の相互作用によって構造変化を起こし、その機能を失う可能性もあり、分子レベルでの複合化を制御することは、しばしば困難を伴うことがある。

そこで、本研究では、研究用や検査用試薬などよく用いられるアビジン・ビオチンシステムを利用し、蛍光性量子ドットと生体分子を安定的に複合化することとした。モデル分子として、当研究室で発見された心臓から産生・分泌されるペプチドホルモンの心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) ¹⁾を用いた。まず初めに、N末端のα-アミノ基をビオチンで標識した ANP (ANP-Biotin) を合成・精製した。この ANP-Biotin と市販のアビジン-蛍光性量子ドット (sAvidin-Qd) を室温で 30 分間反応させ、複合化させた (図 1)。

複合化しなかった ANP-Biotin の有無を確認す

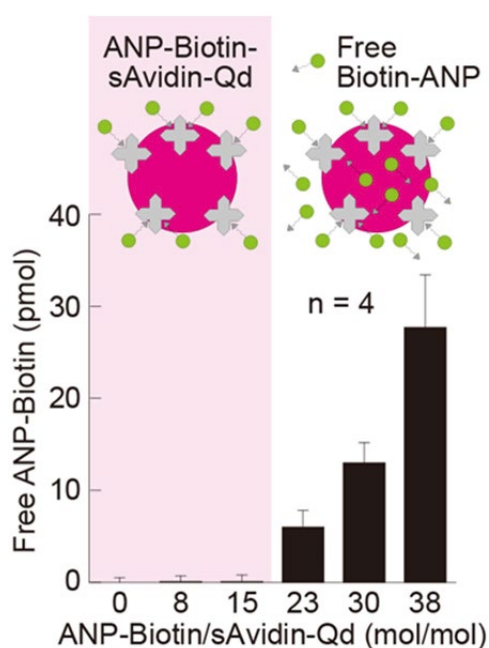


図2 複合化しなかった ANP の有無の確認

るため、30 分間反応後の反応液中のビオチンを定量した (Fluorescence Biotin Quantitation Kit, Thermo)。その結果、最大で ANP-Biotin : Avidin-Qd=15 : 1 (mol/mol) の反応条件において、未反応の ANP-Biotin が存在しないことが確認された。以上の結果から、ANP と蛍光性量子ドットの複合体 (ANP-Biotin-sAvidin-Qd) を作製することに成功した (図 2)。

2.2 蛍光性量子ドットと生体分子複合体の分子標的性および生理活性評価

ANP は、Guanylyl Cyclase-A (GC-A) 受容体に結合することで生理活性を発揮する²⁾。そこで、ANP-Biotin-sAvidin-Qd の分子標的性および生理活性について、培養細胞を用いた *in vitro* 実験により評価した。

培養ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) の培養液中に作製した ANP-Biotin-sAvidin-Qd を添加して、37°C、5%CO₂ 存在下で蛍光観察を行った (OLYMPUS 社製 IX81)。同様に、未標識の ANP を用いた競合阻害実験によって蛍光性量子ドットによる細胞膜への非特異的な吸着の有無も評価した。その結果、ANP-Biotin-sAvidin-Qd を添加した細胞において、蛍光強度は有意に高く、さらに 1μM の未標識の ANP 存在下において、蛍光強度は有意に低かった (図 3)。すなわち、作製した ANP-Biotin-sAvidin-Qd は特異的に細胞表面に結合していると考えられ、ANP の分子標的性が維持されていることを確認した。

また、ANP-Biotin-sAvidin-Qd の生理活性については、ANP が細胞膜上の GC-A 受容体に結合し、細胞内へと情報を伝達するセカンドメッセンジャーとして働くサイクリック GMP (cGMP) 産生量を定量することで評価した。37°C、5% CO₂ で培養した HUVEC の培養液中に未標識の ANP、ANP-Biotin および ANP-Biotin-sAvidin-Qd をそれぞれ添加して、産生された cGMP を ELISA (Cyclic GMP XP® Assay Kit, CST) により定量した。その結果、未標識の ANP、ANP-Biotin

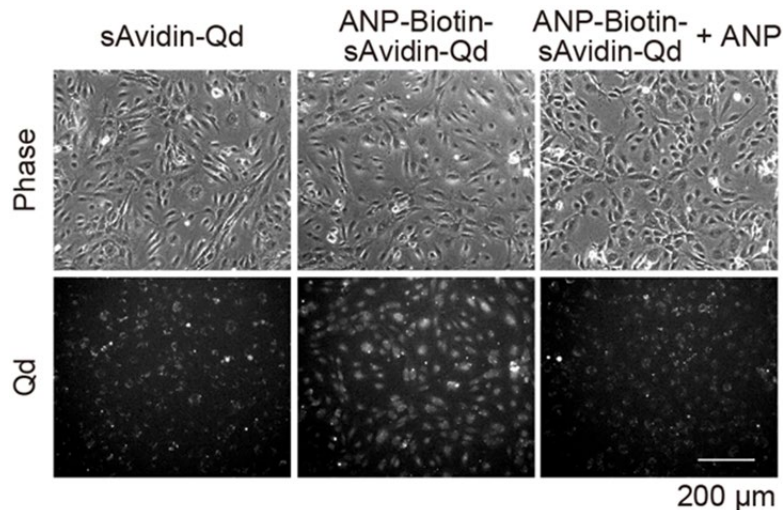


図3 ANP-Biotin-sAvidin-Qd の標的性の蛍光顕微鏡による評価

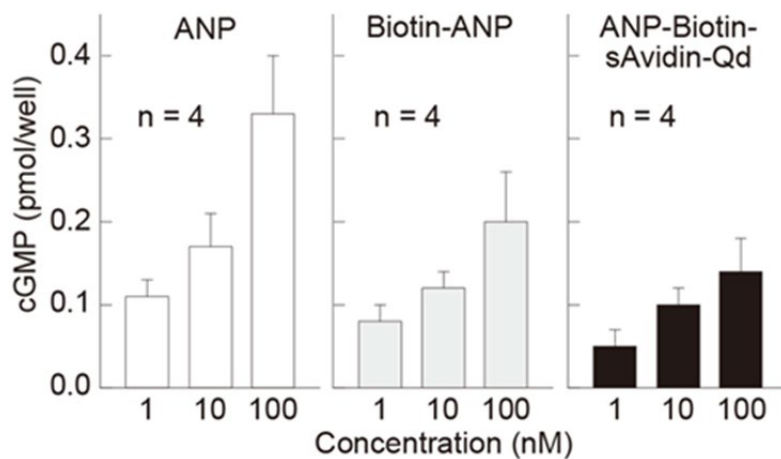


図4 ANP-Biotin-sAvidin-Qd の生理活性(cGMP 生産量)の評価

および ANP-Biotin-sAvidin-Qd を添加した細胞において、濃度依存的な cGMP 産生量の増加が観察され (図 4)、ANP-Biotin-sAvidin-Qd においても ANP の生理活性は維持されていることを確認した。生理活性の低下 (cGMP 産生量: 未標識の ANP > ANP-Biotin > ANP-Biotin-sAvidin-Qd) は ANP へのビオチンの導入および蛍光量子ドットによる立体障害によるものと考えられ、ANP-Biotin-sAvidin-Qd の生理活性は、未標識の ANP の生理活性の約半分程度であると考えられた (図 4)。

2.3 ANP・蛍光量子ドット複合体を用いた

ANP による血管拡張反応のメカニズム解析

ANP は急性心不全治療薬として臨床応用されており、日本におけるシェアは第一位である。ANP の生理作用として、血管拡張作用・利尿作用・血管新生促進作用などがこれまでに明らかにされているが、意外にも、その分子メカニズムについては不明な点が多い^{2), 3)}。

ANP の血管拡張作用については、大動脈から毛細血管までの、どのサイズの血管に作用するのか、どの血管細胞への作用なのか、など循環器臨床で汎用されている薬剤にもかかわらず、解明すべき薬理作用が多く残されている。これらの疑問を解決するため、当研究室では以前より基礎的研

究を積み重ねており、内皮依存性に血管を拡張させることを強く示唆する結果を得ている。そこで、作製した ANP-Biotin-sAvidin-Qd を用いて ANP による血管拡張反応が内皮依存性であるか確認した。

野生型マウスは、麻酔後に気管内挿管して人工呼吸器管理下とし、体温はヒートパッドと連動した体温計を直腸内に挿入して 37°C に保った。次に右大腿静脈・右頸動脈を剥離してカニューレシヨ

ンし、ANP-Biotin-sAvidin-Qd または sAvidin-Qd (vehicle 投与群) を右大腿静脈から 1 μ g/kg/min で 30 分間投与した。投与中は右頸動脈から挿入した圧・容積測定カテーテル (Miller 社製 1.5Fr) にて血圧を持続測定し、血圧低下の程度を vehicle 投与群と比較検討した。その結果、vehicle 投与群では有意な血圧変化を認めなかったが、ANP-Biotin-sAvidin-Qd 投与群では顕著な血圧低下を認められた (図 5)。

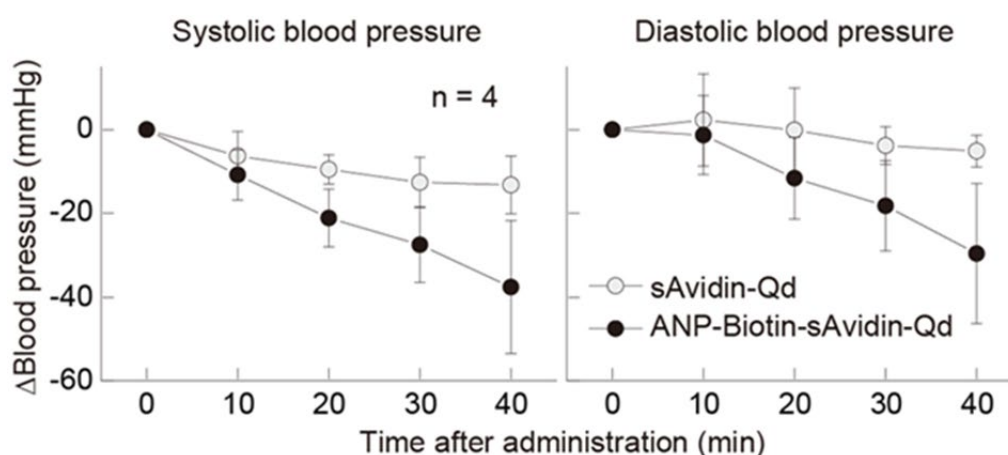


図5 ANP-Biotin-sAvidin-Qd 投与による野生型マウスの血圧の時間変化

また、ANP-Biotin-sAvidin-Qd の投与直後および投与後 40 分後の腸管膜動脈ならびにその分岐血管周辺の蛍光画像をニポウディスク方式高速レーザー共焦点顕微鏡 (Olympus IX81 に横河電機 CSU X1 をセットアップ) で取得し、ANP-Biotin-sAvidin-Qd が血管外に漏出していないかどうかを確認した。その結果、ANP-Biotin-sAvidin-Qd の投与直後および投与後 40 分後の血管周辺組織において蛍光強度に有意な変化が認められず、ANP-Biotin-sAvidin-Qd は血管外に漏出することなく、血管内皮細胞上の GC-A 受容体のみを ANP で刺激していることを確認した。以上のことから、血管内皮の GC-A が ANP 急性投与による血圧低下作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。

現在、本研究で開発した ANP-Biotin-sAvidin-Qd および構築したイメー

ジングシステムを用いて、比較的太い血管として大腿動脈およびその分岐血管、細動脈 (抵抗血管) として腸管膜動脈およびその分岐血管の拡張過程を可視化することで、ANP がどのサイズの血管を主に拡張させるのか、さらに、ANP の作用有効時間ほどの程度かについても評価を行っている。

3. まとめ

本研究により、生きた動物内での反応を、通常 (単一光子) の共焦点レーザー顕微鏡で観察することが可能となり、その反応をリアルタイムかつ容易に評価できるシステムを開発した。そして、急性心不全治療として臨床応用されている ANP の生理作用のひとつである血管拡張作用が内皮依存的事であることを明らかにした。ANP の血管拡張作用については作用する血管の種類、作用有

効時間などさらなる検討は必要であるものの、その評価システムの構築および確立など。本研究によって一定の成果を得ることができた。

今後、ANPによる血管拡張作用を詳細に調べ、その分子メカニズムを明らかにすることで、ANPをより安全、かつ効果的に使用するにあたって重要な情報を提供するとともに、開発したシステムを用いて、病態メカニズムの解明や新しい治療法の開発へと展開していきたいと考えている。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団からの研究助成により行われたものであり、ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1)Sudoh, T., et al. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* **332**, 78-81 (1988).
doi:10.1038/332078a0
- 2)Kishimoto, I., et al. Natriuretic peptide signaling via guanylyl cyclase (GC)-A: an endogenous protective mechanism of the heart. *Curr. Cardiol. Rev.* **5**, 45-51 (2009).
doi:https://doi.org/10.2174/157340309787048068
- 3)Tokudome, T., et al. Impaired recovery of blood flow after hind-limb ischemia in mice lacking guanylyl cyclase-A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Arteriosclerosis Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1516-1521 (2009).
doi:https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.216770

表彰ならびに助成実績一覧

中谷賞の表彰状況（金額単位：万円）

第1回（平成20年度）中谷賞表彰対象

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
金井 浩	東北大学大学院工学研究科 電子工学専攻 教授	超音波マイクロスコープの開発と生体組織性 状診断への応用に関する研究	300

第2回（平成21年度）中谷賞表彰対象

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科 機能創成専攻生体工学領域 准教授	コヒーレントラマン散乱顕微鏡による生体分 子の無染色な高解像・高速観測	300

第3回（平成22年度）中谷賞表彰対象

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
足立 善昭	金沢工業大学 先端電子技術応用研究所 准教授	生体磁場計測と空間フィルタ法による非侵襲 脊髄機能イメージングの開発	300

第4回（平成23年度）中谷賞表彰対象

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
松元 亮	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 システム部門制御分野 准教授	トランジスタによる非破壊細胞診断法の開発 と“デバイ長フリー”な信号変換機序の実証	300

第5回（平成24年度）中谷賞表彰対象

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
百生 敦	東北大学 多元物質科学研究所 教授	生体軟組織を可視化するX線位相イメージ ング技術の開発とその医用画像機器への応用展 開	300

第6回（平成25年度）中谷賞表彰対象

大賞

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
川田 善正	静岡大学電子工学研究所 生体計測研究部門 教授	電子線励起微小光源を用いた超解像光学顕微鏡の開発	500

奨励賞

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
藤田 克昌	大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 准教授	ラマン顕微鏡の開発：細胞内無染色分子イメージングの実現	250
花岡健二郎	東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室 准教授	新たな赤色蛍光団の開発と蛍光プローブへの応用	250

第7回（平成26年度）中谷賞表彰対象

大賞 該当無し

奨励賞

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
野地 博行	東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻 教授	バイオ分子の1分子デジタル計数技術の創成とその応用	250
齊藤 博英	京都大学 iPS 細胞研究所 初期化機構研究部門 教授	人工 RNA スイッチによる標的細胞の精密な識別及び運命決定技術の開発	250
関谷 毅	大阪大学産業科学研究所 第1研究部門(情報・量子科学系) 教授	究極の柔らかさと薄さを持つ生体センサシートの開発と極低侵襲医療機器への応用	250

第8回（平成27年度）中谷賞表彰対象

大賞

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
民谷 栄一	大阪大学大学院工学研究科 教授	ナノ・マイクロデバイスを用いたバイオセンサーの実用化に関する先導的研究	500

奨励賞

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
木内 泰	京都大学大学院医学研究科 准教授	標的に結合解離する蛍光プローブを用いた超解像蛍光顕微鏡法の開発	250
牛場 潤一	慶應義塾大学理工学部 准教授	脳運動機能の回復を支援する BMI の開発	250

第9回（平成28年度）中谷賞表彰対象

大賞

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
杉浦 清了	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 特任教授	生体の多階層の計測データを統合し新たな情報を生み出す心臓シミュレータ”UT-Heart”の開発	500

奨励賞

氏名	所属機関・職名	受賞テーマ	表彰金額
竹内 昌治	東京大学生産技術研究所 教授	マイクロ流体デバイス技術を利用した膜タンパク質センサの開発	250
柳澤 琢史	大阪大学国際医工情報センター 臨床神経医工学・寄附研究部門 講師	ECoG/MEG-BMI 義手による重度麻痺患者の運動機能再建と幻肢痛治療への応用	250

技術開発に対する助成状況（金額単位：万円）

（敬称略・順不同）

第1回（昭和59年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
中谷 一	大阪厚生年金病院眼科部長 大阪大学医学部非常勤講師	眼底の定量立体計測法の開発に関する研究	400
神津 忠彦	東京女子医科大学 消化器内科 助教授	臨床医学分野における電子計測技術に関する基礎的研究	350
志賀 健	愛媛大学医学部 第二生理 教授	TV画像処理による血小板凝集反応の数値解析	150
神野 耕太郎	東京医科歯科大学医学部 第二生理学講座 教授	オプトエレクトロニクスを活用した活動電位の光学的超多部位同時測定装置の研究開発	200
西原 浩	大阪大学工学部 電子工学科 教授	光IC技術を用いたファイバ血流速度計測システムの小型化に関する研究	200
梶谷 文彦	川崎医科大学 医用工学 教授	Walsh変換による64チャンネル高周波超音波パルスドプラ血流速度信号の実時間計測処理システムの開発とその応用	300

第2回（昭和60年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
七里 元亮	大阪大学医学部 第一内科 助教授	Field Effective Transistor を用いたインスリン免疫センサーの開発	280
杉江 昇	名古屋大学工学部 電気工学第二学科 教授	音声合成方式発声代行システムのための電子計測技術に関する研究	300
菊地 眞	防衛医科大学校 医用電子工学講座 教授	パラメトリックアレーを用いた超音波非線形パラメータCTによる生体組織性状診断に関する研究	200
船久保 熙康	東京大学工学部 精密機械工学科 教授	心臓用人工弁機能の電子計測技術システムの開発	230
赤澤 堅造	大阪大学工学部 電気工学科 助手	データ圧縮による生体信号の長時間計測と痙性の定量的評価への応用	200
三木 吉治	愛媛大学医学部 皮膚科 教授	高周波超音波診断装置の開発	250
中根 央	東京理科大学工学部 電気工学科 助手	運動時における連続血圧測定装置の開発研究	200
高橋 隆	東海大学医学部 教授	水晶体混濁度測定装置の研究開発	220
村田 計一	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授	内耳よりの音放射に関する基礎的研究と臨床検査法への応用	220

第3回（昭和61年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
北島 顕	大阪大学医学部 第一内科 講師	心臓・血管内血流速度ベクトル分布イメージング装置の開発	250
戸川 達男	東京医科歯科大学 医用器材研究所 教授	基礎体温自動計測システムの開発	250
奥山 雅則	大阪大学基礎工学部 電気工学科 助教授	サーモグラフィ用室温動作赤外線撮像素子の開発	250
尾崎 幸洋	東京慈恵会医科大学 共同利用研究部分析機器室 助手	レーザーラマン分光法に基づく白内障予知システムの基礎的研究	150
武者 利光	東京工業大学 大学院総合理工学研究科 教授	磁性体微粒子によって散乱される光の偏波面ゆらぎを利用した免疫反応の超高感度検出に関する研究	200
古幡 博	東京慈恵会医科大学 医用エンジニアリング研究室 助教授	超音波位相追従法による血管追跡型超音波パルスドプラ血流計の開発	220
八木 直人	東北大学医学部 第一薬理 助手	生体内における筋活動のX線回折法による計測技術の開発	230
矢崎 義雄	東京大学医学部 第三内科 講師	レーザー顕微蛍光分光測定法による単一細胞内カルシウムイオン濃度測定法の開発	300
片山 芳文	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 自律生理学部門 教授	超高感度カメラと画像処理技術を用いた細胞内カルシウムイオンの動態・解析システムの開発	200

第4回（昭和62年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
堀 正二	大阪大学医学部 第一内科 助手	微小循環解析のための超音波の圧依存性音響特性変化に基づく新しい非侵襲的圧計測	230
横地 高志	福井医科大学医学部 微生物学講座 助教授	レーザーフローサイトメトリーによる細菌の分類・同定システムの開発とその臨床応用	180
岡本 卓爾	岡山大学工学部 情報工学科 教授	反射評価システムに関する開発	230
軽部 征夫	東京工業大学資源化学研究所 教授	半導体集積技術を利用した埋め込み型バイオセンサーの開発	230
大西 昇	名古屋大学工学部 電気工学第2学科 講師	盲人用図面認識支援システムの研究開発	200
新妻 博	東北大学脳疾患研究施設 脳神経外科 講師	SQUID 磁束計を用いた脳磁波計測システムの臨床検査法への応用	200
巽 典之	大阪市立大学医学部 臨床検査医学教室 講師	網赤血球計数の標準化に関する研究	180
滝島 任	東北大学医学部 第一内科 教授	伝達関数法に基づく開心術中の心筋保護効果監視装置の開発	250
吉村 武晃	神戸大学工学部 計測工学科 助教授	格子像投影方式定量立体計測法による眼底診断装置の試作研究	250

第5回（昭和63年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
星宮 望	東北大学工学部 通信工学科 教授	中枢神経損傷による運動筋麻痺患者の機能再建のための計画・制御に関する研究	300
鈴木 直樹	東京慈恵会医科大学 医用エンジニアリング研究室 助手	冠動脈疾患の無侵襲的三次元的診断装置の開発	150
河盛 隆造	大阪大学医学部 第一内科 講師	長期生体内連続測定を可能とする植え込み型ブドウ糖センサの開発	250
辻岡 克彦	川崎医科大学 医用工学 助教授	術中局所心機能評価のための超音波ドプラトラッキング層別厚計の開発	250
鈴木 良次	東京大学工学部 計数工学科 教授	手の動作の計測・評価システムに関する研究—三次元空間での手の運動の最適制御問題への応用—	300
鳥脇 純一郎	名古屋大学工学部 情報工学科 教授	CT画像に基づく人体組織の三次元計測技術の基礎的研究	200
山下 安雄	東海大学医学部 ME学教室 助教授	超音波による生体組織の硬さの画像化に関する研究開発	200
喜多村 直	九州工業大学情報工学部 教授	携帯用の人工心臓調動装置のための血圧血流量間接計測技術の開発	230

第6回（平成元年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
富川 義朗	山形大学工学部 電気工学科 教授	がん温熱療法における非侵襲的患部温度計測法の研究	150
中鉢 憲賢	東北大学工学部 電気工学科 教授	心臓疾患の音響的精密診断のための心音計測技術・時系列分析法の開発に関する研究	240
上野 照剛	九州大学工学部 電気工学科 教授	脳磁図計測と脳機能局在性推定に関する研究	220
七里 元亮	熊本大学医学部 代謝内科学講座 教授	フーリエ変換赤外分析法を応用した血糖値の非侵襲的計測法の開発	230
藤居 仁	九州工業大学情報工学部 電子情報工学教室 教授	レーザースペックル法による眼底血流画像化装置の開発	200
立川 光	香川医科大学医学部 一般教育物理学 教務職員	連続画像の自動識別による動態機能解析	200
千原 國宏	大阪大学基礎工学部 制御工学科 助教授	超音波による瞬時三次元情報可視化装置の開発	250
赤塚 孝雄	山形大学工学部 情報工学科 教授	放射光を用いた冠動脈診断のための高速画像採取解析システム	220
渡邊 瞭	東京大学医学部 医用電子研究施設 助教授	振戦の機械的励振解析による運動制御情報の計測評価のシステム	200
升島 努	広島大学医学部 総合薬学科 教授	レーザ—光音響・蛍光法による多項目同時イムノアッセイシステムの開発	200

第7回（平成2年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
今井 洋	九州工業大学情報工学部 電子情報工学科 助教授	スーパールミネッセントダイオードを用いた多粒子流体速度測定システムの開発	230
久米 章司	山梨医科大学医学部 検査部 教授	血小板の細胞内カルシウムイオン、細胞内pHおよび凝集能の同時測定が可能な蛍光分光光度計の開発	170
清水 孝一	北海道大学工学部 生体工学専攻 助手	光による生体内の構造および機能情報計測法の開発	180
藤村 貞夫	東京大学工学部 計数工学科 教授	符号化開口CTを用いた生体組織内RI分布の三次元計測	200
都甲 潔	九州大学工学部 電子工学科 助教授	脂質膜をトランスデューサとするマルチチャンネル味センサ	180
今坂 藤太郎	九州大学工学部 工業分析化学講座 助教授	半導体レーザー分光分析法による生理活性物質の微量分析の研究	200
馬場 一憲	東京大学医学部 医用電子研究施設 講師	超音波像高速三次元表示システムの開発と新しい胎児診断法への応用	250
早川 徹	大阪大学医学部 脳神経外科 教授	インテリジェントニューロサージカルマイクロスコプの開発	220
吉原 治正	大阪大学医学部 生理学第一講座 助手	組織の酸素圧と酸化還元電位の二次元・時系列マッピングシステムの開発	180
尾辻 省吾	鹿児島大学医学部 臨床検査医学講座 教授	電子スピン共鳴法による血管内皮細胞の膜流動性およびフリーラジカルの測定と病態における変動	200

第8回（平成3年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
岡田 正彦	新潟大学医学部 検査診断学教室 教授	動脈硬化症診断のための血管モデルの構築と計測技術の研究開発	220
大坂 武男	東京工業大学大学院 総合理工学研究科 助教授	極微小電極ボルタンメトリーを用いる in vivo カテコールアミンセンサの開発	220
酒井 清孝	早稲田大学理工学部 応用化学科 教授	電気化学発光法を用いた生体内物質の連続計測技術の開発	220
臼井 支朗	豊橋技術科学大学工学部 情報工学系 教授	瞳孔筋系の逆モデルに基づく無重力環境下の自律神経活動推定に関する研究	200
石原 謙	国立大阪病院臨床研究部 医用工学研究室 室長	超解像超音波断層法の開発と不可視情報の可視化	250
菅 弘之	岡山大学医学部 第二生理学教室 教授	心室容積計測用コンダクタンスカテーテルの絶対容積キャリブレーション法の開発	200
信太 克規	佐賀大学理工学部 電気工学科 教授	脳内温度分析観測のための誘電率精密測定	200
宮保 進	福井医科大学医学部 第三内科 教授	マイクロ波を用いた非接触生体微小変位測定装置の開発と臨床応用	200
荒木 勉	徳島大学工学部 機械工学科 助教授	時間分解顕微蛍光ファイバースコープの開発とヒト歯牙診断への応用	180

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
豊岡 了	埼玉大学工学部 応用物理学講座 教授	部分空間法による顕微分光画像解析	180
稲田 紘	国立循環器病センター研究所 研究機器管理室 室長	長時間血圧・心電図・身体活動度同時モニタリング装置の開発	180
八幡 義人	川崎医科大学 内科学 教授	赤血球異常症診断プロトコールの研究開発	180

第9回（平成4年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
澤田 嗣郎	東京大学工学部 工業化学科 教授	圧電性材料を用いたキャピラリー電気泳動(CZE)の高感度検出法の開発とDNAシーケンサへの応用	200
江刺 正喜	東北大学工学部 機械電子工学科 教授	超小形集積化圧力センサの医用計測への応用	200
濱崎 直孝	九州大学医学部 検査部 教授	赤血球内酵素の自動分析システムの開発	200
竹中 繁織	九州工業大学情報工学部 生物化学システム工学科 助教授	遺伝子検出における電子計測技術の開発	200
森田 龍彌	大阪大学工学部 電気工学科 助教授	相関スペクトル解析法による局部微小網膜電位の計測	200
出口 光一郎	東京大学工学部 計数工学科 助教授	内視鏡画像による三次元形状計測	200
宮川 道夫	新潟大学工学部 情報工学科 教授	マイクロ波による体内温度の断層撮像技術に関する研究	200
渡辺 清明	慶応義塾大学医学部 中央臨床検査部 講師	血栓形成における血管内皮細胞の制御機構の解明 ― 一ざり応力負荷装置を用いた流体力学的アプローチ ―	200
谷口 郁雄	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 情報医学研究部門 教授	光学的多点計測による大脳皮質聴覚領の神経活動の画像化	180
南戸 秀仁	金沢工業大学工学部 電子工学科 教授	生体のX線回折用高感度二次元イメージセンサシステムの開発	150

第10回（平成5年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
尾崎 由基男	山梨医科大学医学部 臨床検査医学講座 助教授	散乱光による粒子計測法を用いた血小板凝集能計測器の開発	250
金井 浩	東北大学工学部 電気工学科 助教授	超音波による動脈壁上の微小振動の計測に基づく早期動脈硬化症の非侵襲的診断装置	220
松田 甚一	長岡技術科学大学工学部 教授	光音響分光法による高次生体機能の非侵襲的観測・評価に関する研究	200
橋本 大定	東京警察病院 外科部長	超音波CTの開発と医用画像三次元再構成による三次元計測	200

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
丸山 征郎	鹿児島大学医学部 臨床検査医学講座 教授	キャピラリー電気泳動法によるアポトーシス時の断片化したDNAの測定	200
赤澤 堅造	神戸大学工学部 情報知能工学科 教授	骨格筋の粘性・弾性係数計測システムの開発と収縮特性評価への応用	200
桐野 高明	東京大学医学部 脳神経外科 教授	脳神経外科手術における運動機能のモニタリングの開発	200
黒田 輝	大阪市立大学工学部 電気工学科 助手	核磁気共鳴による体内温度分布の無侵襲画像化法に関する研究	180
野口 義夫	佐賀大学理工学部 電気工学科 教授	スリット・スキャン・フローサイトメータによるDNA診断法の開発	150
増山 理	大阪大学医学部附属病院 第一内科 医員	血管内超音波法を用いた生体内での動脈硬化病変性状の定量的診断法の開発	150
辰巳 仁史	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 助手	光ピンセットを用いて細胞膜蛋白分子間の相互作用力を計測する技術	150

第11回（平成6年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
太田 茂	川崎医療福祉大学医療技術部 医療情報学科 教授	心電図の無意識的計測を行うための入力機構と信号処理システムの開発	220
高橋 幸郎	埼玉大学地域共同研究センター 助教授	筋電制御式完全埋め込み型機能的電気刺激装置の開発	180
前田 瑞夫	九州大学工学部 応用物質化学科 助教授	DNAの電極への効率的固定化と化学センサへの応用	200
相沢 義房	新潟大学医学部 第一内科学教室 講師	不整脈発生源からの微小電位記録法の開発と応用に関する研究	180
三神 大世	北海道大学医学部附属病院 循環器内科学講座 助手	三次元超音波法による心臓の動態評価と機能計測	200
田中 志信	東京医科歯科大学 医用器材研究所 有機材料部門 助手	高生体適合性血管内留置型酸素分圧センサの開発	200
河田 聡	大阪大学工学部 応用物理学科 教授	レーザー・トラッピングされたプローブを用いたニアフィールド光学顕微鏡による生体細胞内のナノメトリック観察に関する研究	200
佐藤 正明	東北大学工学部 機械電子工学科 教授	血液および血管壁の自己蛍光分析による動脈硬化診断装置の開発に関する基礎的研究	200
来 関明	静岡大学工学部 電気電子工学科 助教授	電子線干渉計測と生物構造解析への応用	200
井須 尚紀	鳥取大学工学部 知能情報工学科 助教授	動揺病発症における半規管、耳石器、および頸部体性感覚の関与に関する研究	180
上野 照剛	東京大学医学部 医用電子研究施設 教授	磁気刺激による生体機能測定に関する研究	200

第12回（平成7年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
辻 隆之	国立循環器病センター研究所 実験治療開発部 部長	植え込み型水晶体温センサによる移植臓器の遠隔期拒絶反応の無侵襲検知に関する研究	250
井口 学	大阪大学工学部 材料開発工学科 助教授	動的画像解析法による生体細胞の同定と個数の迅速測定に関する研究	200
須川 秀夫	京都大学大学院医学研究科 臨床生体統御医学講座 講師	電子計測技術を用いた血液中甲状腺悪性腫瘍特異抗原定量系の開発	200
中村 収	大阪大学大学院工学研究科 物質・生命工学専攻 助教授	多光子過程による紫外高分解能走査型レーザー顕微鏡とその生物学への応用	250
松本 博志	東京大学大学院工学系研究科 精密機械工学専攻 教授	音響学的方法による冠動脈狭窄検出装置の開発に関する研究	180
岡田 徳次	新潟大学工学部 情報工学科 教授	頸の傾斜、回転、および回旋角測定装置の研究開発	200
野崎 修	近畿大学医学部 臨床病理学講座 講師	微小電極法による遊離細胞膜表面電位の測定	180
川上 憲司	東京慈恵会医科大学 放射線医学教室 教授	新しいガンマ線用検出器カドニウム亜鉛テロライドを応用した循環・呼吸計測用ポータブル装置の開発	180
小林 淳	三重大学工学部 分子素材工学科 助手	水晶振動子の電極表面に直接結合する遺伝子組替え抗体の作製と免疫センサーへの応用	180

第13回（平成8年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
春名 正光	大阪大学医学部 保健学科 教授	低コヒーレンス光干渉計測による生体表皮組織の構造検出と計測系の小型化に関する研究	230
小澤 孝一郎	広島大学医学部 総合薬学科 講師	細菌解析フローサイトメーターの開発と実用検査手法の確立	200
松田 信義	川崎医科大学 検査診断学 教授	コンピュータ支援による尿検査バリデーションシステムの研究	200
井街 宏	東京大学医学部 医用電子研究施設 教授	体内埋め込みが可能な微小循環観察プローブの開発	200
津田 孝雄	名古屋工業大学工学部 応用化学科 助教授	全血試料および毛細管内細胞交叉電気泳動法を用いた血液型およびクロスマッチ判定	160
松尾 裕英	香川医科学 第二内科学 教授	超音波ドプラ法による局所脈波速度計測法の新開発	180
民谷 栄一	北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 教授	医療用マイクロマシン型バイオセンサーシステム	200
竹内 俊文	広島市立大学情報科学部 情報機械システム工学科 教授	バイオミメティック有機素子を用いた血中コレステロール計測用センサーの開発	200
田畑 勝好	京都大学医療技術短期大学部 衛生技術学科 助教授	バイオリアクターを中核とするFIA法による糖尿病関連物質の高感度化学発光分析法の開発に関する研究	200
入交 昭彦	高知医科大学 生理学講座 教授	全血の交流アドミッタンス計測による赤血球凝集（連鎖形成）計の試作	150

第14回（平成9年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
鈴木 喜隆	国立水産大学校 食品化学科 教授	一重項酸素および一酸化窒素の特異的検出法としての高感度近赤外域発光分光装置の開発	200
川田 善正	静岡大学工学部 機械工学科 助教授	共焦点型偏光顕微鏡の開発と生物細胞の偏光解析への応用	200
柴田 政廣	東京大学大学院医学系研究科 生体物理医学専攻 講師	微量試料による組織酸素消費率の燐光測定法の開発	200
黒田 輝	大阪市立大学工学部 電気工学科 助手	プロトン磁気共鳴画像化法を用いた生体内温度分布の非侵襲画像計測の研究	170
松本 健郎	東北大学大学院工学研究科 機械電子工学専攻 助教授	ピペット吸引法を応用した生体組織微小領域弾性率計測システムの開発に関する研究	180
相津 佳永	室蘭工業大学工学部 機械システム工学科 助教授	高感度フォトダイオードアレイを利用した実時間眼底計測法の開発	180
横山 憲二	北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 助教授	イニファーター重合法を利用したインテリジェントバイオセンサーの開発	170
佐々木 一正	北海道工業大学 応用電子工学科 教授	光ファイバ形センサ方式による発ガン関連酵素センシングシステムの開発	170
松田 哲也	京都大学医学部附属病院 医療情報部 助教授	Burst パルスを用いた超高速MRI法の実用化	100
松原 広己	岡山大学医学部 循環器内科 助手	コンダクタンス法を用いた血管内径および血管壁性状評価の試み	100

第15回（平成10年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
南谷 晴之	慶応義塾大学理工学部 物理情報工学科 教授	マイクロチャンネル微小血管モデルのマイクロマシーニングと血球細胞の変形・凝集能の画像解析システムに関する研究	200
石田 英之	東海大学医学部 生理科学 講師	超高感度4倍速テレビカメラの開発と心筋細胞内カルシウムイオン動態の高速三次元画像解析	180
清水 章	大阪医科大学 病態検査学教室 教授	蛋白質構造異常症のソフトイオン化質量分析による臨床検査技術の開発	180
片山 佳樹	九州大学大学院工学研究科 材料物性工学専攻 助教授	遺伝子結合性タンパク計測のためのバイオセンサーの研究・開発	150
田中 拓男	大阪大学大学院基礎工学研究科 物理系専攻 助手	表面プラズモン共鳴と2光子励起蛍光を用いた高感度単一生体有機分子イメージング	160
楠岡 英雄	国立大阪病院 臨床研究部 部長	カルシウム依存性蛋白分解酵素活性とカルシウム濃度の細胞内同時測定システムの開発	180
今井 清博	大阪大学大学院医学系研究科 情報伝達医学専攻 助教授	携帯型酸素解離曲線自動解析装置の開発	140
野入 英世	東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科 助手	電気的細胞接着度解析法を用いた癌細胞浸潤度に関する定量的検討	160
鈴木 政登	東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 講師	ラット用運動負荷時エネルギー代謝測定装置の開発およびその適用—糖尿病性腎症に対する運動処方に関する研究—	170

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
長倉 俊明	鈴鹿医療科学技術大学 医用工学部医用電子工学科 助教授	糖尿病治療のための自律型微小インスリン注入システムの研究	180

第16回（平成11年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
佐藤 勝重	東京医科歯科大学医学部 生理学第二講座 助手	脱分極誘発色素を用いた laser photo-stimulation システムの開発と応用	210
石山 陽事	杏林大学保健学部 臨床生理学教室 教授	無拘束型心電図導出用パット電極センサの開発	200
辻 千鶴子	東海大学医学部 生理科学2 講師	デュアルコントラスト肺微小血管造影法の開発	180
栢田 晃司	愛媛大学医学部 医療情報部 助手	マイクロカプセルによる臓器の自動抽出と薬物ターゲッティングを兼ねた新しい超音波診断・低侵襲治療システムの開発	200
熊谷 俊一	神戸大学医学部 臨床検査医学講座 教授	血球計数器による抹消血および採取幹細胞分画での幹細胞簡便計測法の確立	170
田中 三郎	豊橋技術科学大学工学部 エコロジー工学系 助教授	乳癌にともなうリンパ節生検用トレース装置の開発	180
大城 理	奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究調査センター 助教授	超高速超音波立体イメージングに関する研究	160
萩原 正敏	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授	細胞内におけるリン酸化依存的蛋白質間相互作用のイメージング	150
橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科 システム人間系専攻 講師	コヒーレントアンチストークスラマン散乱顕微鏡による生体組織の三次元局所空間分子分光分析	180
岩田 哲郎	徳島大学工学部 機械工学科 助教授	ワンチップ時間分解分光分析システムの開発と生体計測への応用	150

第17回（平成12年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
石田 昭人	大阪大学産業科学研究研究所 機能分子科学研究部門 助手	微小空間内に局在する増強電場を用いる超高密度・高感度蛍光分析	200
近江 政雄	金沢工業大学 人間情報システム研究所 教授	視線追従により手術者の意図を計測し内視鏡術野を提示するシステムの開発	200
梶川 浩太郎	東京工業大学大学院総合理工学 研究科 物理情報システム創造 専攻 助教授	超小型表面プラズモン光ファイバ生化学センサの作製	200
小池 卓二	東北大学大学院工学研究科 機械電子工学専攻 講師	マイクロマシン技術を応用した術中使用可能な耳小骨可動性測定装置の開発	200

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
末廣 純也	九州大学大学院システム情報科学研究院 電気電子システム工学専攻 助教授	誘電泳動インピーダンス計測による細菌活性のリアルタイムモニタリング法の開発	200
庭野 道夫	東北大学電気通信研究所 物性機能デバイス研究部門 教授	多重内部反射赤外分光による生体分子計測システムの構築	200
日野田 裕治	山口大学医学部 臨床検査医学講座 教授	癌の臨床検査を目指した質量分析機による遺伝子多型解析法の開発	200
山越 憲一	金沢大学工学部 人間・機械工学科 教授	携帯型循環動態連続計測システムの開発研究	200
山名 一成	姫路工業大学工学部 応用化学科 助教授	アントラキノン-DNA修飾電極によるDNAセンシング	200

第18回（平成13年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
中村 真人	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 生体システム分野 助教授	無侵襲血糖計測の新手法—ハイスピード・エリプソメトリーによる生体偏光脈波の計測	250
安井 武史	大阪大学大学院基礎工学研究科 システム人間系専攻 助手	THz時間領域分光法を用いた高機能皮膚診断法の開発 —角質層の水分量と厚さの同時測定—	220
北島 勲	富山医科薬科大学医学部 臨床検査医学講座 教授	転写因子NF- κ B活性化測定DNAチップ開発によるエンドトキシンショック迅速診断	200
船津 高志	早稲田大学理工学部 物理学科 助教授	シャペロンによるタンパク質折れたたみ機構の1分子蛍光イメージング	200
六車 仁志	芝浦工業大学工学部 電子工学科 助教授	真空一貫プロセスで作製する銀を利用した表面プラズモン共鳴バイオセンサー用チップ	200
高松 哲郎	京都府立医科大学 第2病理学教室 教授	多層観察型リアルタイム共焦点蛍光顕微鏡の開発	180
鈴木 隆文	東京大学国際・産学共同研究センター 医用分野 助手	自律神経系信号による人工心臓制御システムの開発	180
熊谷 正朗	東北大学大学院工学研究科 機械電子工学専攻 助手	回転磁界と差動磁界を用いた生体運動計測装置の開発	100
山本 克之	北海道大学大学院工学研究科 システム情報工学専攻 教授	近赤外分光法を用いた筋組織酸素濃度の実時間イメージングと筋代謝の定量評価	150
正宗 賢	東京電機大学理工学部 生命工学科 講師	三次元医用画像投影システムにおける精度評価のための計測手法に関する研究	150
秀 道広	広島大学医学部 皮膚科学講座 教授	表面プラズモン共鳴バイオセンサ(SPR)による細胞機能測定技術の開発	150

第19回（平成14年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
伊藤 聡志	宇都宮大学工学部 情報工学科 助教授	回折理論を応用した磁気共鳴映像法の研究	220

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
山田 憲嗣	広島市立大学情報科学部 情報機械システム工学科 助手	複眼光学系を利用した超小型・薄型三次元内視鏡の開発と三次元表示系への展開	250
染谷 隆夫	東京大学先端科学技術研究センター 物質デバイス大部門 極小デバイス分野 助教授	カーボン・ナノチューブを用いたバイオセンサによる単一生体分子の検出	200
稲垣 正司	国立循環器病センター研究所 循環動態機能部 機能評価研究室 室長	拍動心臓での記録が可能な光学的心筋活動電位マッピングシステムの開発	200
坂口 浩司	静岡大学電子工学研究所 画像電子システム部門 助教授	生体ナノスケール電気計測技術の開発と応用	200
石原 美弥	防衛医科大学校 医用電子工学講座 助手	関節軟骨の新しい非侵襲的粘弾性計測システムの開発	200
前川 真人	浜松医科大学医学部 臨床検査医学講座 教授	AP-PCR-SSCP法による遺伝子多型の網羅的探索法の研究	200
灰田 宗孝	東海大学医学部 生体構造機能系生理科学 助教授	眼球情報の定量的解析に基づく脳・神経系疾患の診断技術に関する研究	200
白木 賢太郎	北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 助手	アミロイド型疾患因子となるタンパク質線維への誘導とその定量システムの構築	150
井出 英人	青山学院大学理工学部 電気電子工学科 教授	運動関連脳電位による意図・情動伝達代行システム	150

第20回（平成15年度）技術開発助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
和田 英夫	三重大学医学部 臨床検査医学講座 助教授	網血小板判定による血小板減少症の鑑別	250
黒川 隆志	東京農工大学工学部 電気電子工学科 教授	周波数コム発生による光コヒーレンス・トモグラフィの研究	220
丸尾 昭二	横浜国立大学大学院 工学研究院システムの創生部門 助教授	光駆動マイクロ流体制御素子の開発とバイオチップ応用	200
大西 五三男	東京大学医学部 整形外科・脊椎外科 専任講師	エコートラッキングによる超音波定量診断法の骨癒合判定への応用に関する基礎的研究	200
吉田 靖弘	岡山大学大学院医歯学総合研究科 生体材料学分野 助教授	表面プラズモン共鳴のためのリン酸カルシウムおよび各種金属センサーの開発	200
橋本 秀樹	大阪市立大学大学院理学研究科 生体物性物理学 教授	多光子励起型3次元超高速分光計測システムの開発	200
田村 安孝	山形大学工学部 情報科学科 教授	高速超音波3次元動態計測用演算システム	200

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
望月 修一	東京大学大学院医学系研究科 医用生体工学講座 助手	センサー機能を付加した人工弁の開発	180
木竜 徹	新潟大学大学院自然科学研究科 情報理工学専攻 教授	機能分散型健康増進支援システムのためのウェアラブル生体情報計測・制御ユニットの開発	180
南 和幸	山口大学工学部 機械工学科 助教授	MEMS技術を用いた低侵襲組織診断のためのMRS用マイクロプローブの開発	170

第21回（平成16年度）技術開発助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
小島 英理	東京工業大学大学院生命理工学研究科 生命情報専攻 助教授	環境応答型高感度細胞バイオセンサの開発	200
谷下 一夫	慶應義塾大学理工学部 システムデザイン工学科 教授	生体組織への極低侵襲計測を目的とする極微小一酸化窒素電極の開発	200
竹下 明裕	浜松医科大学医学部 臨床検査医学 助教授	糖鎖結合を利用したリガンドのラベルと非放射性受容体定量法の確立	200
和田 佳郎	奈良県立医科大学 生理学第一講座 講師	動体視力トレーニング法の確立を目指した頭部一眼球運動計測システムの開発	200
杉浦 清了	東京大学大学院新領域創成科学研究科 環境学専攻 教授	心筋細胞内の細胞骨格の力学特性の評価法の開発	200
戸津 健太郎	東北大学大学院工学研究科 ナノメカニクス専攻 助手	集積化3軸MIセンサを用いた低侵襲検査治療ツール用3次元ナビゲーションシステムの開発	200
久富 信之	国立循環器病センター研究所 放射線医学部医薬品機構 派遣研究員	O-15 標識化合物を使った脳酸素代謝・血流超迅速PET検査法の確立	200
合田 典子	岡山大学医学部 保健学科 助教授	イオン感応性電界効果トランジスタ (ISFET) を用いた迅速・簡便な細胞活性測定システムの開発	150
山家 智之	東北大学加齢医学研究所 病態計測制御研究分野 教授	熱電子局所冷却装置と術中脳波マッピングを用いた脳外科手術局所機能診断	150

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
田邊 匡生	東北大学大学院工学研究科 知能デバイス材料学専攻 助手	半導体テラヘルツ電磁波光源を用いた生体内組織観察システムの開発	100
野村 英之	金沢大学大学院自然科学研究科 電子情報科学専攻 助手	音声障害診断を目的とした声帯の力学的特性評価システムの開発	100
福島 修一郎	大阪大学大学院 基礎工学研究科 機能創成専攻生体工学領域 助手	時間分解蛍光測定用カプセル化センサーチップの開発	100

第22回（平成17年度）技術開発助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
石原 康利	長岡技術科学大学電気系 情報・通信システム工学講座 助教授	完全非侵襲がん治療を目的とした温度測定法に関する研究	200
早崎 芳夫	徳島大学工学部 光応用工学科 助教授	2波長低コヒーレンス位相シフトデジタルホログラフィ	200
吉信 達夫	東北大学大学院工学研究科 電子工学専攻 教授	半導体センサによるマイクロ化学チップ内部のイメージングに関する研究	200
太田 善浩	東京農工大学大学院共生科学 技術研究部 生命機能科学部 門 助教授	単一ミトコンドリアの密度・体積変化の光計測	200
酒井 康弘	東邦大学理学部 物理学科 助教授	イオン付着飛行時間法を用いた万能型呼気分析装置の開発	200
和田 仁	東北大学大学院工学研究科 バイオリボティクス専攻 教授	新生児中耳疾患スクリーニングのための診断装置の開発	200
下村 美文	東京工科大学バイオニクス学 部 軽部研究室 助手	生体内のダイオキシン類測定のための携帯用表面プラズモン共鳴バイオセンサの開発	200
遠藤 恒介	川崎医科大学 生理学 助手	生体内使用のカテーテル型実時間連続計測スーパーオキサイドセンサの開発	100
三谷 博子	杏林大学保健学部 臨床生理学教室 講師	SSR 検出電極を内臓した指先センサによる SAS の型判定検出装置の開発	100

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
宮田 昌悟	九州工業大学大学院 生命体工 学研究科生体機能専攻 助手	MRI による陰性電荷イメージングを用いた再生軟骨の非侵襲機能評価システム	100
長谷川 英之	東北大学大学院 工学研究科 電子工学専攻 講師	広帯域超音波 RF 信号を用いた動脈壁ひずみ・弾性率分布の高精度計測	100
富崎 欣也	東京工業大学大学院 生命理工 学研究科 生物プロセス専攻 助手	金の異常反射特性を利用した分子間相互作用検出法に関する研究	100
細川 賀乃子	弘前大学医学部附属病院 リハビリテーション部 助手	嚥下圧測定のための、多チャンネルでの圧同時測定センサーの開発	100

第23回（平成18年度）技術開発助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
戸田 真志	公立はこだて未来大学システ ム情報科学部 情報アーキテ クチャ学科 助教授	耐ノイズ性を考慮した高精度な表面筋電位計測システムの研究	198
岩坂 正和	千葉大学工学部 メディカル システム工学科 助教授	磁気トルク負荷を用いた細胞活性の低侵襲診断法の開発	200

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
小沢田 正	山形大学工学部 機械システム工学科 教授	圧電マイクロ3次元振動デバイスによる生体細胞の内部ストレス計測と損傷治療法	200
仁井見 英樹	富山大学附属病院 検査部 助手	real-time PCR 法を用いた迅速な敗血症起因菌同定システムの構築に関する研究	200
椎名 毅	筑波大学大学院システム情報工学研究科 コンピューターサイエンス専攻 教授	超音波による組織粘弾性3Dマイクロ스코ープの開発	200
桑原 義彦	静岡大学工学部 電気電子工学科 教授	マイクロ波イメージングによる初期乳癌検診法の確立	170
金 郁喆	京都府立医科大学大学院医学研究科 運動器機能再生外科学 助教授	インピーダンス測定法を用いた新しい骨癒合判定法の確立と携帯型測定器の開発	200

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
関野 正樹	東京大学大学院新領域創成科学研究科 先端エネルギー工学専攻 助手	MR I を用いた生体インピーダンスの非侵襲・高分解能画像計測	100
世良 俊博	独立行政法人理化学研究所中央研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット協力研究員	SPring-8 放射光を用いた小動物用4次元CTシステムの開発	100
吉武 康栄	大分県立看護科学大学 人間科学講座 助手	レーザー変位計を用いた皮膚表面振動測定による力調節能力評価	100
平田 伊佐雄	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 生体材料学研究室 助手	医用材料の迅速評価に用いる表面因子アレイチップの作製とその測定システムの開発	100
田代 健太郎	東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 助手	磁性フラーレンと dendroliマーポルフィリンの複合化による高機能MR I 造影剤の設計	100
工藤 寛之	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 システム研究部門 助手	ウェアラブル化学センサを用いた非侵襲生体情報モニタリングに関する研究	100

第24回（平成19年度）技術開発助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
岡 浩太郎	慶應義塾大学理工学部 生命情報学科 教授	FRET 型蛍光タンパク質プローブに特化した新規イメージング装置の開発	200
栗津 邦男	大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 教授	赤外分光による非侵襲的細胞解析装置の開発	200
上村 和紀	国立循環器病センター研究所 先進医工学センター循環動態機能部血行動態研究室 室員	動脈圧波形と電気的コンダクタンスを用いた心拍出量・左心房圧連続測定システム	179

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
堀中 博道	大阪府立大学大学院工学研究科 電子・数物系専攻 電子物理工学分野 教授	光アシスト超音波速度変化イメージング法による生体深部における薬剤分布モニター	178
鳥越 秀峰	東京理科大学理学部第一部 応用化学科 准教授	糖尿病発症関連遺伝子の一塩基多型の電気化学的検出方法の開発	200
守本 祐司	防衛医科大学校 分子生体制御学講座 講師	金ナノ粒子を用いた非蛍光細胞標識による生体分子動態測定	200
南 哲人	独立行政法人情報通信研究機構・未来ITC研究センター 認知科学 専攻研究員	マルチモーダル脳計測手法を用いた脳情報コーディング技術の開発	197

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
大森 努	防衛医科大学校 医用工学講座 助教	過渡回折格子法による組織診断測定とイメージング技術の開発	100
有光 小百合	大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学(整形外科学) 講座 大学院生	3次元バーチャルリアリティ装置による病的関節の動態解析	100
永岡 隆	静岡県立静岡がんセンター 研究所 診断技術開発研究 研究員	がんの超早期診断に資するマルチスペクトラルカメラの開発	100
小野 宗範	京都大学大学院医学研究科 神経生物学 研究員	動物個体脳の単一神経細胞からの電気および光学シグナルの同時計測	99

第25回(平成20年度)技術開発助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
桂 進司	群馬大学大学院工学研究科 環境プロセス工学専攻 教授	DNA修復反応の1分子観察系の構築	200
富永 昌人	熊本大学大学院自然科学研究科 複合新領域科学専攻 助教	細胞内活性評価のための酵素固定化ナノセンサ電極の開発	200
角田 直人	九州大学大学院工学研究院 エネルギー量子工学部門 准教授	細胞への物質注入と電位測定のためのマイクロピペット電極の作製と応用	200
木竜 徹	新潟大学大学院自然科学研究科 人間支援科学専攻 教授	マルチ時間スケールな自律神経調整機能から観た一人称視点映像効果の評価	200
丸 浩一	群馬大学大学院工学研究科 電気電子工学専攻 助教	石英系ガラス平面光波回路を用いた生体計測用反射型屈折率センサの開発	200
吉見 靖男	芝浦工業大学工学部 応用化学科 准教授	分子インプリント高分子を用いた血糖値監視用グルコースセンサ	100
飯室 勇二	兵庫医科大学 消化器外科・肝胆膵外科 准教授	流体シミュレーションとドップラーエコーからの肝循環圧測定法の開発	100
西山 道子	創価大学工学部 情報システム工学科 助教	ヘテロコア光ファイバによる脈拍や呼吸の無拘束・無意識生体計測	100

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
伊野 浩介	東北大学大学院環境科学研究科 自然共生システム学講座 助教	誘電泳動を用いたマイクロロッド回転による腫瘍マーカー検出用小型デバイスの開発	100
荒船 龍彦	独立行政法人産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門治療支援技術グループ 特別研究員	低温除細動における点電極通電刺激誘発興奮伝播現象の解析	100
吉本 則子	山口大学工学部 応用化学科 助教	水晶振動子によるヒドロキシアパタイト粒子の環境応答型生体分子認識機構の解析	100
中山 仁史	高松工業高等専門学校 電気情報工学科 助教	加速度センサを用いた騒音に頑健な骨伝導一音声マイクロフォンの開発	100
富丸 慶人	大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座消化器外科学 大学院生	蛍光蛋白標識による骨髄由来幹細胞の発癌および癌幹細胞ニッチ形成への関与の同定	100

第26回（平成21年度）技術開発研究助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
上原 宏樹	群馬大学大学院工学研究科 応用化学・生物化学専攻 准教授	伸縮性を有するシリコーン・ナノポーラス膜の創製と生体デバイスへの応用	200
藤田 克昌	大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 准教授	細胞内タンパク機能の無標識イメージング	200
萩山 満	東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野 大学院生	フェムト秒レーザーと原子間力顕微鏡の応用による細胞間接着力測定法の開発	200
武田 淳	横浜国立大学大学院工学研究院 知的構造の創生部門 教授	反射型エシロンを用いた生体光反応の時間・周波数実時間マッピング装置の開発	200
片山 建二	中央大学理工学部 応用化学科 准教授	マイクロチップ用動的散乱法を用いたリポソームの反応速度解析法の開発	200
長谷川 寛雄	長崎大学大学院医歯薬総合研究科 病態解析・診断部門 臨床検査医学 助教	フローサイトメトリーによる細胞死識別マーカー計測系の確立	200
尾野 恭一	秋田大学大学院医学系研究科 細胞生理学講座 教授	新生児用ピエゾセンサー方式心拍呼吸モニターシステムの開発	200

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
吉木 啓介	兵庫県立大学大学院工学研究科 機械系工学専攻 助教	3次元立体配向SHG顕微鏡を用いた応力負荷に伴う繊維状タンパク質のマイクロ力学試験	100
崔 森悦	新潟大学工学部 電気電子工学科 助教	光コムと正弦波位相変調法による光コヒーレンス・トモグラフィーの開発	100
田中 一生	京都大学大学院工学研究科 高分子化学専攻 助教	MRIによる定量性を持った機能イメージング剤の開発	100

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
西村 智	東京大学大学院医学系研究科 循環器内科学 システム疾患生命科学による先端医療技術開発 拠点 特任助教	二光子生体分子イメージングを用いた生活習慣病の病態解析	100

第27回（平成22年度）技術開発研究助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
吉田 祥子	豊橋技術科学大学大学院工学研究科 環境・生命工学系 講師	神経組織からの情報伝達分子の放出分布を観測する近接光励起デバイスの開発	200
香川 景一郎	大阪大学大学院情報科学研究科 情報数理学専攻 特任准教授	極めて深い被写界深度を有する高機能照明内臓型3次元マルチスペクトル内視鏡の開発	200
斎木 敏治	慶應義塾大学理工学部 電子工学科 教授	金ナノロッドの回転運動観察を利用した高速・高感度ホモジニアスアッセイ法の開発	200
高橋 宏知	東京大学先端科学技術研究センター 生命・知能システム分野 講師	培養神経回路に嗅覚受容体たんぱく質を遺伝子発現させた匂いセンサー	200
安川 智之	兵庫県立大学大学院物質理学研究科 化学分析学分野 准教授	変換濃縮ストリッピング法を利用した単一細胞の活性評価システムの構築	200
内山 剛	名古屋大学大学院工学研究科 電子情報システム専攻 准教授	超高感度マイクロ磁気センサによる細胞活動電流シグナルのリアルタイムマッピング	200
阿部 宏之	山形大学大学院理工学研究科 バイオ化学工学専攻 教授	電気化学イメージング技術を応用した超高感度細胞呼吸機能診断装置の開発	200

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
吉川 元起	独立行政法人物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクニクス研究拠点 ICYS-MANA 研究員	超高感度自己検知膜型表面応力センサーによる広帯域細胞ナノ振動解析手法の開発	100
小山 大介	東京工業大学 精密工学研究所 極微デバイス部門 助教	超音波 DDS 用センサ型マイクロカプセルの開発とその血管内トレーサビリティ	100
曾和 義幸	法政大学生命科学部 生命機能学科 専任講師	細胞内高速三次元分子追跡顕微鏡の構築	100
石井 克典	大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 助教	近赤外分光イメージングによる動脈硬化プラークの血管内透視診断技術の開発	100

第 28 回（平成 23 年度）技術開発研究助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
小池 卓二	電気通信大学大学院情報理工学研究科 知能機械工学専攻 教授	非接触型中耳可動性測定装置の開発と実用化	200
藪上 信	東北学院大学工学部 電気情報工学科 教授	室温で動作する生体磁気計測用集積化薄膜磁界センサの開発	200
本多 裕之	名古屋大学大学院工学研究科 化学・生物工学専攻 教授	磁気細胞パターンニングによる 1 細胞機能画像解析システムの開発	198
長谷川英之	東北大学大学院医工学研究科 計測・診断医工学講座 准教授	心臓の高速超音波イメージング法の開発	200
田中 栄一	北海道大学病院 消化器外科 助教	近赤外線イメージングを用いた切除後残肝機能診断システムの開発	200
渡辺 哲陽	金沢大学理工研究域 機械工学系 准教授	把持力可視化による力覚提示可能な脳外科手術用マニピュレータの開発	200
加藤 大	独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 ナノバイオデバイス研究グループ 研究員	ナノカーボン電極を用いた高感度 LPS 検出法の開発	200

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
西野 智昭	大阪府立大学 21 世紀科学研究機構 ナノ科学・材料研究センター 特別講師	分子探針による DNA 単分子検出技術の開発	100
新潟 宏彦	大阪大学ナノサイエンスデザイン 教育研究センター 特任助教	カソードルミネッセンス顕微鏡による細胞内蛋白質のマルチカラーナノイメージング	100
須藤 亮	慶應義塾大学理工学部 システムデザイン工学科 専任講師	微小培養環境の制御による毛細血管の再生と血管透過性による機能評価	100
藤田 敏次	大阪大学微生物病研究所 感染症学免疫学融合プログラム推進室 助教	ゲノム結合分子の網羅的同定方法の開発	100

第 29 回（平成 24 年度）技術開発研究助成対象

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
藤田 秋一	鹿児島大学共同獣医学部 教授	膜脂質の微細分布を解析するための基盤技術の開発	200
守本 祐司	防衛医科大学校 准教授	スペクトルアンミキシング機構を搭載した高感度リアルタイム蛍光内視鏡システム	200
志村 清仁	福島県立医科大学医学部 教授	タンパク質医薬投与患者の投与後アイソフォーム解析を可能にする APCE 法の開発	200

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
山本 正道	群馬大学先端科学研究指導者育成 ユニット 助教	生体内での細胞外 ATP 検出システム構築	200
田中 俊行	信州大学医学部 産学連携特任研究員	多色化蛍光磁性ビーズを利用した多項目疾患マーカーの同時免疫測定法の研究開発	200
鬼村謙二郎	山口大学大学院理工学研究科 准教授	共役高分子蛍光プローブによる細胞イメージング法の開発	100

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
横川 隆司	京都大学大学院工学研究科 准教授	モータタンパク質運動を利用した疾患センサの製作	100
柳谷 隆彦	名古屋工業大学大学院工学研究科 助教	在宅予防を目的とした非侵襲小型質量センサによる抗原抗体反応マーカー検査システム	100
田中 利恵	金沢大学医薬保健研究域 助教	動く軟組織 X 線動画像を対象とした肺換気・血流・コンプライアンス計測の試み	100
有戸 光美	聖マリアンナ医科大学 助教	末梢リンパ球の表面タンパク質の網羅的かつ定量的な測定系の確立	100
福原 学	大阪大学大学院工学研究科 助教	水溶液中における超分子糖センシング：2型糖尿病治療薬の精密センサー開発	100

第30回（平成25年度）技術開発研究助成金贈呈者

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
任 書晃	新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子生理学分野 助教	内耳の微小振動現象の計測を指向した三次元断層撮影装置の開発と最適化	300
平野 愛弓	東北大学大学院医工学研究科 医工学専攻計測・診断医工学講座 准教授	hERG チャネル組込シリコンチップに基づく薬物副作用評価に関する研究	291
黒尾 誠	自治医科大学分子病態治療研究センター ゲノム機能研究部 教授	血中 C P P 高感度測定系の開発と慢性腎臓病の臨床検査への実用化	300
佐々木 裕次	東京大学大学院新領域創成科学研究科 基盤科学研究系物質系専攻 教授	X線による細胞内でのタンパク質 1 分子内部高精度高速動態計測の実現	300
高橋 忠伸	静岡県立大学大学院薬学研究院 生化学分野 講師	ウイルス酵素に対する新規高感度蛍光プローブによる感染情報の画期的検出技術	200
西村 智	自治医科大学分子病態治療研究センター 分子病態研究部 教授	生活習慣病リスクを予測する生体光イメージングシステムの開発	300
河合 秀幸	千葉大学大学院理学研究科 基盤理学専攻物理学コース 准教授	高性能低価格な PET 用 γ 線検出器の開発	299
董 金華	東京工業大学資源化学研究所 プロセスシステム工学部門 助教	アルツハイマー病早期診断のための Quenchbody の開発	286
仁木 清美	東京都市大学工学部 医用工学科 教授	画像処理とスペクトルトラッキング法を用いた頸動脈微量血管径変化の計測	249

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
鈴木 宏明	中央大学理工学部 精密機械工学科 准教授	臨床応用に向けたがん細胞薬剤排出スクリーニングチップの開発	300
山澤徳志子	東京慈恵会医科大学 分子生理学講座 助教	カルシウムイメージングを用いた悪性高熱症の病態解析	300
松井 康素	独立行政法人国立長寿医療研究センター 先端診療部 関節科 医長	筋電図と加速度センサーを兼ね備えた運動時筋肉活動量の経時的測定記録装置の開発	200

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
坂口 怜子	京都大学 物質-細胞統合システム拠点 特定拠点助教	単一細胞内情報伝達物質の濃度変化を計測する細胞内蛍光センサーの開発	150
関 倫久	慶應義塾大学医学部 循環器内科学教室 助教	T細胞受容体遺伝子領域を用いたiPS細胞由来移植細胞の識別技術の開発	150
田畑 美幸	東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 バイオエレクトロニクス分野 特任助教	エクソソームセンシングによる低侵襲・簡易がん検査デバイスの創製	150
柴田 綾	岐阜大学工学部 化学・生命工学科 テニユア・トラック 助教	生細胞内遺伝子検出を目的とした自己切断型検出プローブの開発	150
臼井 健二	甲南大学フロンティアサイエンス学部 生命化学科 講師	アミロイドペプチドの線維化を規格化し細胞毒性測定が可能な光リンカー細胞アレイ	150
飯田 琢也	大阪府立大学 21世紀科学研究機構 ナノ科学・材料研究センター 物理系専攻 テニユア・トラック 講師	光による分子認識制御と高感度バイオセンサ応用	150
寺本 高啓	立命館大学理工学部 電気電子工学科 助教	超短パルスレーザーによるインパルスプラマン散乱顕微鏡の開発	150
遠藤 求	京都大学大学院生命科学研究科 統合生命科学専攻 助教	特定組織での遺伝子発現を非侵襲的かつリアルタイムで測定する方法の開発	150

第31回（平成26年度）技術開発研究助成金贈呈者

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
小野 正博	京都大学大学院薬学研究科 病態機能分析学 准教授	アルツハイマー病の診断・治療に資するアミロイドSPECTイメージング法の開発	300
合田 達郎	東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 バイオエレクトロニクス分野 助教	細胞トランジスタを用いた細胞膜ナノ空孔形成の計測	300
西山 雅洋	京都大学白眉センター 生物物理 特定准教授	生きた細胞内で働くタンパク質超分子機械の力学変調イメージング	300
鈴木 郁郎	東北工業大学大学院工学研究科 電子工学専攻 講師	ヒト由来神経細胞の新規薬効評価系を目指したオンチップニューロシナプス機能計測技術の開発	300

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
保川 清	京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻 教授	新規cDNA 合成技術の開発とマイクロアレイへの応用	300
パヴィヨン コロ PAVILLON Nicolas	大阪大学免疫学フロンティア研究センター 物理学 特任研究員	非標識マルチモーダル顕微鏡法を用いた細胞状態計測法の開発	292
吉川 裕之	大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 助教	集光レーザーで反応を捉える高感度マイクロ ELISA チップの開発	262
関谷 敬	東京大学大学院医学系研究科 細胞分子薬理学教室 助教	細胞外 ATP の蛍光計測による脳梗塞の梗塞巣拡大メカニズムの解明	300
東 隆	東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 特任准教授	超音波CT(Computed Tomography)を用いた血流計測技術の開発	300
鳥光 慶一	東北大学大学院工学研究科 バイオリボティクス専攻 教授	フレキシブルシルク電極を用いた chip on clothes 生体活動モニタリング	300
藤原 俊朗	岩手医科大学 脳神経外科学講座 助教	拡散強調 MRI に基づく完全無侵襲脳循環代謝測定法の開発	300
塚田 孝祐	慶應義塾大学理工学部 物理情報工学科 准教授	組織低酸素イメージングセンサの開発と造影剤投与不要な初期がん検出への実用	240
芳賀 洋一	東北大学大学院医工学研究科 生体機械システム医工学専攻 教授	隠れ糖尿病診断のための皮下微小還流を用いた局所糖負荷試験装置の開発	300
明石 真	山口大学時間学研究所 時間生物学 教授	自由行動下における遺伝子発現の長期リアルタイムモニタリング法の開発	300
久原 篤	甲南大学理工学部 生物学科/統合ニューロバイオリ ロジー研究所 神経科学 准教授	細胞集団の超速自動追尾とアクティビティ可視化による定量化	300
南 和幸	山口大学大学院理工学研究科 システム設計工学系専攻 教授	多数の単一細胞の力学刺激応答の計測・観察に使用可能な分散型細胞刺激マトリックスデバイスの開発	293
舘野 高	北海道大学大学院情報科学研究科 生命人間情報科学専攻 教授	耳鳴りを抑制制御する閉ループ型の神経系刺激および活動記録装置の開発とその評価	300

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
異島 優	熊本大学薬学部 薬剤学分野 助教	高分子抗癌剤の腫瘍移行性増大を意図した腫瘍内環境制御ナノ粒子の開発	150
吉田 亘	東京工科大学応用生物学部 バイオテクノロジーコース 助教	MBD-ルシフェラーゼ融合蛋白質を用いたグローバル DNA メチル化レベル測定法の開発	150
大谷健太郎	国立循環器病研究センター研究所 再生医療部 超音波医科学研究員	血管内分子を標的とした造影超音波法による非侵襲的分子イメージングの開発	150
高田 英昭	大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 助教	生細胞でのゲノム DNA の可視化による染色体異常検出システムの開発	140

特別研究：複数年（2年）

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
日比野 浩	新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子生理学分野 聴覚生理学・薬理 学 教授	ダイヤモンド微小電極を駆使した内耳薬物 動態の計測基盤の開発	1,486
田中 求	京都大学 物質-細胞統合システム 拠点 生命物理学 特定拠点教授	ヒト角膜内皮細胞注入治療のためのマルチ スケール細胞標準化技術の確立	1,500
山名 一成	兵庫県立大学大学院工学研究科 物質系工学専攻 生体機能関連化 学 教授	マイクロRNAの超高感度電気化学検出法 の開発	1,500
矢田 豊隆	川崎医科大学 応用医学 医用工学 講師	近赤外線蛍光顕微鏡による冠動脈バイパス 術前側副血行路と心内膜側微小血管の評価	1,500
西澤 松彦	東北大学大学院工学研究科 バイオロボティクス専攻 教授	皮膚系細胞の機械刺激応答を解析するた めの高伸縮性表皮電位計測システムの開発	1,500
石井 秀始	大阪大学大学院医学系研究科 癌創薬プロファイリング学 特任教授	マイクロ RNA 分子内メチル化修飾を一細 胞内で計測する高精細技術の開発	1,500

第32回（平成27年度）技術開発研究助成金贈呈者

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
高橋 康史	金沢大学理工研究域電子情報学系 准教授	ナノ電気化学顕微鏡の創成と単一細胞評価 への応用	300
梶本 武利	神戸大学大学院医学研究科 生化学分子生物学講座 助教	癌の転移リスクを超早期に診断するための 高精度エクソソームマーカー検出法の開発 研究	280
辰巳 仁史	金沢工業大学バイオ・化学部 教授	超高解像度光学顕微鏡の革新とアクチン線 維切断分子コフィリンの結合の分析	261
山中 正道	静岡大学大学院理学領域（理学部 化学科） 准教授	超分子ヒドロゲルを支持体とした電気泳動 による巨大DNA分離方法の開発	300
後藤 信哉	東海大学医学部内科学系循環器内 科学 教授	動脈血流下における血管壁損傷部位への血 小板細胞接着力の革新的計測技術の開発研 究	300
高嶋 一登	九州工業大学大学院生命体工学研 究科生体機能応用工学専攻 准教授	有機強誘電体を用いたカテーテル型高感度 触覚センサの小型化と生体内触診方法の確 立	300
清水 秀二	国立循環器病研究センター 上級研究員	マイクロダイアリス法を用いた心筋組織 中 microRNA の計測技術の開発	300
阿部 宏之	山形大学大学院理工学研究科 バイオ化学工学専攻 教授	光干渉断層画像化法を応用した次世代型卵 巣機能評価システムの開発	300
中島 欽一	九州大学大学院医学研究院 基盤幹細胞学 教授	神経系免疫担当細胞ミクログリアの直接分 化転換による新規脊髄損傷治療技術の開発	300
近藤 輝幸	京都大学先端医工学研究ユニット 教授	常磁性金属酸化物ナノ粒子の創製と光超音 波および磁気共鳴イメージングへの応用	300

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
直居 靖人	大阪大学大学院医学系研究科 乳腺内分泌外科 助教	ホルマリン固定組織へ応用可能な多重遺伝子発現解析に基づく乳癌の再発予測法の開発	300
影島 賢巳	関西医科大学物理学教室 教授	再生医療用細胞シートの磁気力負荷装置による新たな物性計測法の開発	255
岩脇 隆夫	群馬大学大学院医学系研究科附属 教育研究支援センター 講師	臨床応用を目指した酸化ストレス可視化プローブの開発	300

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
佐藤 雄介	東北大学大学院理学研究科 化学専攻 助教	細胞内 RNA 二重鎖構造を標的とした蛍光可視化プローブの開発	150
小池 雅昭	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 助教	細胞内小胞体ストレスを経時的、空間的に検出するための高感度プローブの開発	150
相田 知海	東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子神経科学分野 准教授	個体で自在に生体情報を計測・操作するための遺伝学ツールノックイン技術の開発	150
渡部 昌	北海道大学大学院医学研究科 助教	ユビキチンリガーゼの基質を細胞内で網羅的かつ定量的に計測する新規手法の開発研究	150
武内 敏秀	大阪大学大学院医学系研究科 神経難病認知症探索治療学寄附講座 寄附講座講師	神経変性疾患の診断法開発を目指したエクソソームシャペロームの変容解析	150
服部 能英	大阪府立大学地域連携研究機構 講師	蛍光型ホウ素センサーによる簡便なホウ素薬剤分析法の開発	150
清水 一憲	名古屋大学大学院工学研究科 化学・生物工学専攻 准教授	収縮力計測可能な神経支配骨格筋組織チップの開発	150
吉田 慎哉	東北大学大学院工学研究科 特任准教授	基礎代謝時の深部体温を日常的に測定するための胃酸駆動飲み込み型体温計の開発	150
安田 充	関西学院大学大学院理工学研究科 博士研究員	ナノ薄膜干渉基板を用いた多項目同時・蛍光増強イムノアッセイ	150
西村 博仁	国立循環器病研究センター研究所 生化学部 流動研究員	生きた動物の中で分子反応や細胞動態を解析するための分子イメージング法の開発研究	150

特別研究：複数年（2年）

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
藤田 克昌	大阪大学 大学院工学研究科 准教授	無染色組織診断のための高速ラマン分光顕微鏡の開発研究	3,000
齊藤 博英	京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門 教授	人工 RNA スイッチによる標的細胞の計測・運命制御技術の開発	3,000
松田 道行	京都大学大学院医学研究科 教授	タンパク質分子活性を実時間で計測する埋植型 FRET 用 CMOS センサーの開発	3,000
金城 政孝	北海道大学大学院先端生命科学研究院 教授	蛋白質相互作用に基づく細胞内薬物動態解析のための多細胞蛍光相関分光装置の開発研究	3,000
上田 宏	東京工業大学資源化学研究所 教授	高性能なクエンチ解消原理に基づく免疫センサーの選択法に関する研究	2,990
佐藤 守俊	東京大学大学院総合文化研究科 准教授	ライブセル超解像イメージングを実現する蛍光プローブの創製	2,820
矢富 裕	東京大学大学院医学系研究科 臨床病態検査医学 教授	臨床検査への応用を可能にするための還元型・酸化型アルブミン測定系の開発研究	2,800

第33回（平成28年度）技術開発研究助成金贈呈者

開発研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
山中 真仁	名古屋大学大学院工学研究科 助教	生体組織深部の構造・機能解析を目的とした高空間分解能マルチモーダル顕微鏡の開発	298
バルマ・プラブハット	大阪大学大学院工学研究科 教授	細胞膜機能解明のための液中観察可能な先端増強超解像ラマン顕微鏡の開発	300
河原 行郎	大阪大学大学院医学系研究科 教授	人工核酸プローブを用いた RNA メチル化効率定量法の開発	300
笹川 清隆	奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 助教	超低侵襲かつ高感度な生体埋植用蛍光イメージングデバイスの開発	296
浜田 俊幸	北海道大学大学院医学研究科 特任准教授	新規動物追跡技術をもちいた癌発生機構解析装置およびプログラムの開発	300
牛田 多加志	東京大学大学院工学系研究科 教授	生体組織非侵襲計測のためのテラヘルツ波分光・偏光分光複合化技術の開発	300
ニラウラ・マダン	名古屋工業大学工学部 電気・機械工学科 准教授	CdTe 成長層を用いた医療用高感度大面積 X 線画像検出器アレイの開発	300
荒川 玲子	東京女子医科大学附属 遺伝子医療センター小児科 講師	脊髄性筋萎縮症における次世代型診断薬の開発： SMN 蛋白質測定系の構築	300
宮内 雄平	京都大学エネルギー理工学研究所 准教授	カーボンナノチューブの近赤外アップコンバージョン蛍光を用いた生体イメージング	300
今村 博臣	京都大学生命科学研究科 准教授	蛍光バイオセンサーを用いた分岐鎖アミノ酸の生細胞内イメージング	298
香月 康宏	鳥取大学染色体工学研究センター バイオモデル動物開発部門 准教授	染色体工学技術を用いた薬物代謝酵素誘導を経時評価可能なシステムの開発	300

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
通山 由美	姫路獨協大学 薬学部医療薬学科 教授	好中球の NETs 成分の解析による血栓性疾患の早期検出法の開発	300
宮本 和英	姫路獨協大学薬学部 准教授	人工ユビキチンリガーゼを活用したユビキチン化の簡易検出システムの構築	300
道上 達男	東京大学大学院総合文化研究科 教授	多重FRET 張力プローブを利用した、次世代細胞張力計測技術の開発	300
松浦 宏治	岡山理科大学 工学部生命医療工学科 准教授	Dynamic Culture System で培養される受精卵のシグナル伝達解析	300
田中 一生	京都大学大学院工学研究科 准教授	19F MR プローブによる超微量生体物質計測法の開発	300
大橋 俊朗	北海道大学大学院工学研究院 教授	力学環境負荷および細胞牽引力計測が可能ながん細胞遊走解析システムの開発	300

奨励研究

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
相良 剛光	北海道大学電子科学研究所 助教	インテグリンが生み出す力の定量評価を目指した超分子メカノプローブの開発	150
熊本 康昭	京都府立医科大学大学院 医学研究科 助教	無髄神経を検出する多点ラマン散乱計測法	150
グエン・タン・ヴィン	東京大学 IRT 研究機構 特任研究員	ピエゾ抵抗型力センサによる微量血液の粘度計測	150
渡辺 彰吾	岡山大学大学院保健学研究科 講師	3次元CT画像ガイド下インターベンションを実現するための血管治療用デバイスの開発	150
渡邊 裕之	京都大学大学院薬学研究科 助教	アミリンを標的とした近赤外/2光子励起蛍光プローブの開発と糖尿病病態解明への応用	150
榛葉 健太	東京工業大学 日本学術振興会 特別研究員(PD)	膜タンパク質を材料とした新規細胞内電位計測法の開発	150
永安 一樹	京都大学大学院薬学研究科 特定助教	新規脳深部イメージング手法の開発と応用	150
永井 萌土	豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 助教	超並列単一細胞プリンタの開発ーハイスループット細胞機能計測に向けて	150

特別研究：複数年（2年）

氏名	所属機関・職名	研究題目	助成金額
小林 哲生	京都大学大学院工学研究科 教授	超高感度な光学的磁気センサモジュールで 神経磁場を捉える新たな脳機能計測への挑 戦	3,000
道上 宏之	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 助教	BNCT 応用へ向けた即発 γ 線分析による非観 血的生体内ホウ素薬物動態測定技術の開発	3,000
矢作 直也	筑波大学医学医療系臨床検査医学 准教授	ニュートリゲノミクスの新手法によるエネ ルギー代謝制御シグナルの核内計測	3,000
尾藤 晴彦	東京大学大学院医学系研究科 教授	次世代カルシウム指示タンパク質を活用し た記憶長期化機構の全光学的探索法開発	3,000
竹中 繁織	九州工業大学大学院工学研究院 教授	がん診断電気チップの開発	2,965

年 度	贈呈式年月日	助成件数	助成金総額
昭和 59 年度	昭和 60 年 2 月 28 日	6 件	1,600 万円
昭和 60 年度	昭和 61 年 2 月 25 日	9 件	2,100 万円
昭和 61 年度	昭和 62 年 2 月 27 日	9 件	2,050 万円
昭和 62 年度	昭和 63 年 2 月 26 日	9 件	1,950 万円
昭和 63 年度	平成元年 2 月 10 日	8 件	1,880 万円
平成元年度	平成 2 年 2 月 23 日	10 件	2,110 万円
平成 2 年度	平成 3 年 2 月 22 日	10 件	2,010 万円
平成 3 年度	平成 4 年 2 月 28 日	12 件	2,430 万円
平成 4 年度	平成 5 年 2 月 26 日	10 件	1,930 万円
平成 5 年度	平成 6 年 2 月 25 日	11 件	2,100 万円
平成 6 年度	平成 7 年 3 月 24 日	11 件	2,160 万円
平成 7 年度	平成 8 年 2 月 23 日	9 件	1,820 万円
平成 8 年度	平成 9 年 2 月 28 日	10 件	1,920 万円
平成 9 年度	平成 10 年 2 月 27 日	10 件	1,670 万円
平成 10 年度	平成 11 年 2 月 26 日	10 件	1,700 万円
平成 11 年度	平成 12 年 2 月 25 日	10 件	1,780 万円
平成 12 年度	平成 13 年 2 月 23 日	9 件	1,800 万円
平成 13 年度	平成 14 年 2 月 22 日	11 件	1,980 万円
平成 14 年度	平成 15 年 2 月 21 日	10 件	1,970 万円
平成 15 年度	平成 16 年 2 月 27 日	10 件	2,000 万円
平成 16 年度	平成 17 年 2 月 25 日	12 件	2,000 万円
平成 17 年度	平成 18 年 2 月 23 日	13 件	2,000 万円
平成 18 年度	平成 19 年 2 月 23 日	13 件	1,968 万円
平成 19 年度	平成 20 年 2 月 29 日	11 件	1,753 万円
平成 20 年度	平成 21 年 2 月 27 日	13 件	1,800 万円
平成 21 年度	平成 22 年 2 月 26 日	11 件	1,800 万円
平成 22 年度	平成 23 年 2 月 25 日	11 件	1,800 万円
平成 23 年度	平成 24 年 2 月 24 日	11 件	1,798 万円
平成 24 年度	平成 25 年 2 月 22 日	11 件	1,600 万円
平成 25 年度	平成 26 年 2 月 28 日	20 件	4,525 万円
平成 26 年度	平成 27 年 3 月 12 日	27 件	11,716 万円
平成 27 年度	平成 28 年 2 月 26 日	30 件	19,981 万円
平成 28 年度	平成 29 年 2 月 24 日	30 件	21,257 万円
累計		407 件	112,958 万円

技術交流に対する助成状況

1. 派遣

昭和60年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
巽 典之	大阪市立大学 医学部講師	国際血液学標準化委員会・ ヨーロッパ臨床検査学会 19 年次総会	ベルギー・ルーベン フランス ツールース	昭和 60 年 4 月
堀 原一	筑波大学 臨床医学系教授	第 3 回アジア太平洋心臓ペ ーシング・電気生理シンポ ジウム	オーストラリア メルボルン・シドニ ー	10 月
黒川 一郎	札幌医科大学 教授	国際血液標準化委員会	イギリス ブライトン・ロンド ン	10 月
八幡 義人	川崎医科大学 教授	日米学術交流セミナー	アメリカ ミネアポリス	昭和 61 年 1 月

昭和61年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
柴田 昭	新潟大学医学部 教授	第 21 回国際血液学会	オーストラリア シドニー	昭和 61 年 5 月
新谷 和夫	関東通信病院 血液研究部長	第 21 回国際血液学会	オーストラリア シドニー	5 月
屋形 稔	新潟大学医学部 教授	1986 年度米国臨床化学会学 術集会	アメリカ シカゴ・サンフラン シスコ	7 月
江刺 正喜	東北大学工学部 助教授	第 1 回米日医生物工学シン ポジウム	アメリカ ボルチモア	9 月
信太 克規	電子技術総合研究所標 準計測部 主任研究官	国際度量衡委員会電気諮問 委員会他	フランス・パリ イギリス・ロンドン	9 月
瀬口 靖幸	大阪大学基礎工学部 教授	第 8 回 IEEE 医用生体工学国 際会議	アメリカ ヒューストン	11 月
鈴木 良次 他 8 名	大阪大学基礎工学部 教授	中日双方向医用生体工学シ ンポジウム〔阪大 7, 川崎医 大 1, 東京医歯大 1〕	中国 上海	12 月
田村 安孝	山形大学工学部 助手	医用画像処理とパターン認 識及び音響映像法に関する 国際シンポジウム	アメリカ ニューポートビーチ	昭和 62 年 2 月

昭和62年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
渡辺 清明	慶應義塾大学 医学部講師	第 11 回国際血栓止血学会	ベルギー ブラッセル	昭和 62 年 7 月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
喜多 悦子	奈良県立医科大学 助教授	第11回国際血栓止血学会	ベルギー ブリッセル	7月
三輪 史朗	(財)沖中記念成人病研 究所 所長	第6回国際血液学アジア太 平洋域会議	インド ボンベイ	12月

昭和63年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
杉江 昇	名古屋大学工学部 教授	国際神経回路網会議	アメリカ サンディエゴ	昭和63年 7月
吉村 武晃	神戸大学工学部 助教授	国際ME学会	アメリカ サン・アントニオ	8月
安藤 繁	東京大学工学部 助教授	システム人間およびサイバ ネティックスに関する国際 会議	中華人民共和国 北京・瀋陽	8月
浅野 茂隆	東京大学医科学研究所 助教授	造血と分化因子に関する国 際シンポジウム	オーストラリア メルボルン	8月
山口 延男	神戸大学医学部 教授	第22回国際血液学会	イタリア ミラノ	8月
関根 松夫	東京工業大学大学院総 合理工学研究科 助教授	第18回ヨーロッパ・マイク ロ波国際会議	スウェーデン ストックホルム	9月
荒井 恒憲	防衛医科大学校 医学教育学助手	第4回医学における光学フ ァイバーの応用国際会議	アメリカ ロスアンゼルス	平成元年 1月

平成元年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
志賀 健	大阪大学医学部 教授	第7回国際バイオレオロジ ー学会総会	フランス ナンシー	平成元年 6月
川上 憲司	東京慈恵会医科大学 助教授	第17回国際医学放射線学会	フランス パリ	7月
幸道 秀樹	東京大学医科学研究所 講師	国際実験血液学会総会	フランス パリ	7月
菊池 眞	防衛医科大学校 教授	第2回国際医用生体工学学 会(汎太平洋シンポジウム)	オーストラリア メルボルン	7月
只野 寿太郎	佐賀医科大学 教授	第2回国際健康と生命化学 領域における質量分析学会	アメリカ サンフランシスコ	8月
八幡 義人	川崎医科大学 教授	赤血球膜および代謝に関す る国際シンポジウム	東ドイツ ベルリン	8月
岡田 正彦	新潟大学医学部 助教授	第11回 IEEE 医用生体工学国 際会議	アメリカ シアトル	11月
大西 昇	名古屋大学工学部 助教授	第11回 IEEE 医用生体工学国 際会議	アメリカ シアトル	11月

平成2年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
松本 元	電子技術総合研究所 超分子部長	生物化学系における波動と パターンに関する国際会議	ソビエト モスクワ	平成2年 5月
尾辻 省吾	鹿児島大学医学部 教授	第24回世界スポーツ医学会 会議	オランダ アムステルダム	5月
作間 英一	計量研究所 量子計測 研究室長	精密電気磁気測定国際会議	カナダ オタワ	6月
大城 巖	和歌山県立医科大学中 央検査部 主任技師	国際臨床化学総会	アメリカ サンフランシスコ	7月
桐生 昭吾	電子技術総合研究所基 礎計測部 研究員	応用超電導国際会議	アメリカ アスペン	9月
山本 徳則	川崎医科大学医用電子 工学	超音波血流計測による動脈 硬化のメカニズムの解析に 関する共同研究（インペリアル 大学）	イギリス ロンドン	平成3年 2月

平成3年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
鈴木 宏治	三重大学医学部 教授	第13回国際血栓止血学会	オランダ アムステルダム	平成3年 6月
屋形 稔	新潟大学医学部 名誉教授	第16回世界病理・臨床病理 学会	カナダ バンクーバー	6月
犬塚 貴	新潟大学医学部 助手	第13回国際神経化学会	オーストラリア シドニー	7月
樋口 哲也	電子技術総合研究所 情報アーキテクチャ部 主任研究官	国際人工知能会議	オーストラリア シドニー	8月
増田 俊久	電子技術総合研究所 エネルギー基礎部 主任研究官	第2回欧州宇宙用電源会議	イタリア フィレンツェ	9月
石原 謙	国立大阪病院臨床研究 部医用工学研究室 室長	第6回世界超音波学会	デンマーク コペンハーゲン	9月
北風 政史	大阪大学医学部 医員	第64回米国心臓病理学会	アメリカ アナハイム	11月
小澤 敬也	東京大学医科学研究所 助教授	第33回アメリカ血液学会総 会	アメリカ デンバー	12月
原田 裕一	東京工業大学大学院総 合理工学研究科	第3回北欧超伝導シンポジ ウム	デンマーク ナイボルグ	平成4年 3月

平成4年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
相沢 義房	新潟大学医学部 講師	国際不整脈アブレーション 会議	アメリカ ノースカロライナ	平成4年 5月
黒田 新一	電子技術総合研究所 凝縮物性研究室長	第6回コロイドおよび界面 科学における磁気共鳴に関 する国際シンポジウム	イタリア フィレンツェ	6月
八木 康之	電子技術総合研究所 エネルギー基礎部 主任研究員	第14回プラズマ物理および 制御核融合に関する国際会 議	ドイツ ヴェルツブルグ	9月
小笠原 康夫	川崎医科大学 講師	第14回 IEEE 医用生体工学国 際会議	フランス パリ	10月
三戸 章裕	計量研究所熱物性部 主任研究官	第15回レーザとその応用に 関する国際会議	アメリカ ビューストン	12月
中村 収	計量研究所力学部 研究員	共焦点顕微鏡と3次元画像 処理に関する国際会議	オーストラリア シドニー	平成5年 2月

平成5年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
河盛 隆造	大阪大学医学部 講師	インシュリンに関する Banting and Best シンポジウ ム	カナダ トロント	平成5年 6月
猪狩 淳	順天堂大学医学部 教授	第18回国際化学療法学会	スウェーデン ストックホルム	7月
柴田 昭	新潟大学 医学部長	第27回マレーシア・シンガ ポール医学総会	マレーシア クアラルンプール	8月
佐藤 俊輔	大阪大学基礎工学部 教授	IMIA - IFMBE 生体信号の解釈 に関する研究集会	デンマーク アールボー	8月
濱崎 直孝	九州大学医学部 教授	ゴードン研究国際会議	アメリカ ニューハンプシャー	8月
鈴木 淳	電子技術総合研究所材 料部 研究員	第15回アモルファス半導体 国際会議	イギリス ケンブリッジ	9月
鈴木 康	昭和大学医学部 助教授	第17回世界解剖、臨床病理 学会連合会議	メキシコ アカプルコ	10月
木村 総	昭和大学医学部臨床病 理学 助手	第17回国際臨床病理学会総 会	メキシコ アカプルコ	10月
清水 章	大阪医科大学医学部 教授	第15回国際臨床化学会議	オーストラリア メルボルン	11月
岡部 紘明	熊本大学医学部 教授	第15回国際臨床化学会議、 第6回アジア・太平洋臨床化 学会議	オーストラリア メルボルン	11月
佐々木 匡秀	高知医科大学医学部 教授	第15回国際臨床化学会議	オーストラリア メルボルン	11月
河野 均也	日本大学医学部 教授	第15回国際臨床化学会議	オーストラリア メルボルン	11月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
大垣 英明	電子技術総合研究所 量子放射部 主任研究官	1993年原子核科学及び医用 画像に関する合同会議	アメリカ サンフランシスコ	11月
中山 貫	計量研究所 主席研究官	アボガドロ定数およびシリ コンによるモルの表示に関 する国際研究集会	イタリア トリノ	平成6年 3月

平成6年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
関口 進	防衛医科大学校 教授	第72回米国臨床病理学会春 期大会	アメリカ シアトル	平成6年 4月
森 徹	京都大学医学部 教授	第76回米国内分泌学会議	アメリカ アナハイム	6月
伊藤 順司	電子技術総合研究所 電子デバイス部 主任研究官	第7回国際真空マイクロエレ クトロニクス会議	フランス グルノーブル	7月
加藤 吉彦	電子技術総合研究所 光技術部 主任研究官	電磁精密測定国際会議	アメリカ ボルダー	7月
望月 精一	川崎医療短期大学 講師	医用物理生体工学世界会議	ブラジル リオデジャネイロ	8月
菅原 基晃	東京女子医科大学 教授	医用物理生体工学世界会議	ブラジル リオデジャネイロ	8月
佐野 雅之	佐賀医科大学輸血部 講師	接触因子異常症とその臨床に 関する集会	アメリカ ベセスダ	9月
櫻井 晃洋	信州大学医学部 助手	第68回米国甲状腺学会議	アメリカ シカゴ	9月
津田 展宏	計量研究所量子部 精密測定研究室長	第4回ジョイントナノテクノ ロジーシンポジウム及び国際 自動制御会議	イギリス ロンドン	9月
熊野 和雄	北里大学医学部 講師	第15回国際腹膜透析学会	アメリカ ボルチモア	平成7年 2月

平成7年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
星野 高伸	東京警察病院 外科副部長	第3回国際先端外科手術学会	ドイツ ルクセンブルグ	平成7年 6月
菅野 剛史	浜松医科大学医学部 教授	第11回IFCCヨーロッパ臨床 化学会議	フィンランド タンペレ	7月
橋本 琢磨	金沢大学医学部 教授	第11回IFCCヨーロッパ臨床 化学会議	フィンランド タンペレ	7月
立花 博之	川崎医療短期大学 助手	地中海医用物理生体工学会議	イスラエル エルサレム	9月
堀 原一	筑波大学 名誉教授	第10回世界心臓ペーシン グ・電気生理会議	アルゼンチン ブエノスアイレス	10月

平成 8 年度技術交流（派遣）助成対象

氏 名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
大島 哲也	広島大学医学部 助教授	第 16 回国際高血圧学会学術 集会	イギリス グラスゴー	平成 8 年 6 月
村山 泰	電子技術総合研究所 基礎計測部 主任研究官	精密電磁気計測会議	ドイツ ブラウンシュバイ ク	6 月
西村 敏博	大分大学工学部 助手	アメリカ電気電子工学学会パ ワーエレクトロニクススペシ ャリスト	イタリア バベノ	6 月
杉浦 清了	東京大学医学部 助手	ゴードンリサーチ会議	アメリカ ニューハンプシャ ー	7 月
井上 武海	電子技術総合研究所 光技術部 主任研究官	国際電波科学連合第 25 回総 会	フランス リール	8 月
熊谷 俊一	神戸大学医学部 教授	第 60 回アメリカリウマチ学 会	アメリカ オーランド	10 月

平成 9 年度技術交流（派遣）助成対象

氏 名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
中澤 博江	東海大学医学部 教授	第 1 回国際パーオキシナイト ライト会議	スイス アスコナ	平成 9 年 5 月
上塚 芳郎	東京女子医科大学 講師	第 16 回国際血栓止血学会議	イタリア フローレンス	6 月
山田 俊幸	自治医科大学 講師	第 49 回米国臨床化学会議	アメリカ アトランタ	7 月
豊田 英嗣	川崎医科大学 大学院生	国際医用物理生体工学会議	フランス ニース	9 月
秋山 修二	電子技術総合研究所 超分子部 主任研究官	第 4 回神経情報処理国際会議	ニュージーランド ダニーデン	11 月

平成 10 年度技術交流（派遣）助成対象

氏 名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
岡田 徳次	新潟大学工学部 教授	ロボティクスと自動化に関す る電気電子学会国際会議	ベルギー ルーベン	平成 10 年 5 月
橋本 大定	東京警察病院 外科部長	第 6 回世界内視鏡外科学会 腹膜鏡下手術シンポジウム	イタリア・ローマ ドイツ・トリットリ ンゲン	6 月
松本 健志	川崎医療短期大学 助教授	第 71 回米国心臓学会学術集 会	アメリカ ダラス	11 月

平成 11 年度技術交流（派遣）助成対象

氏 名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
石田 英之	東海大学医学部 講師	第 44 回米国生物物理学会	アメリカ ニューオリンズ	平成 12 年 2 月

平成 12 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
片岡 則之	川崎医療短期大学臨床 工学科 講師	実験生物学会 2000	アメリカ サンディエゴ	平成 12 年 4 月
岩佐 章夫	電子技術総合研究所 基礎計測部 主任研究官	電磁気精密計測国際会議	オーストラリア シドニー	5 月
ハッサン M Dモイヌディ ン	東京医科歯科大学生体 材料工学研究所 大学院生	国際医用物理生体工学会議シ カゴ 2000	アメリカ シカゴ	7 月
谷口 慶治	福井大学 名誉教授	IEEE 信号処理部会 2000 年度 画像処理に関する国際会議	カナダ バンクーバー	9 月
清島 満	岐阜大学医学部 臨床検査医学 教授	第 73 回米国心臓学会学術集 会	アメリカ ニューオリンズ	11 月
入部 玄太郎	岡山大学大学院医歯学 総合研究科システム循 環整理学 助手	実験生物学会 2001	アメリカ オーランド	平成 13 年 3～4 月

平成 13 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
井出 利英	明治大学大学院理工学 研究科 大学院生	第 4 回窒化物半導体国際会議	アメリカ デンバー	平成 13 年 7 月
清岡 崇彦	岡山大学大学院医歯学 総合研究科システム循 環生理学 大学院生	左心室 - 容積ループ (PV- LOOPS) 国際シンポジウム	オランダ マーストリヒト	平成 14 年 1 月

平成 14 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
田中 三郎	豊橋技術科学大学 助教授	超伝導応用国際会議 (ASC 2002)	アメリカ ヒューストン	平成 14 年 8 月
柴田 政廣	東京大学大学院 医学系研究科 講師	第 22 回欧州微小循環学会議	イギリス エクスター	8 月

平成 15 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
稲垣 正司	国立循環器病センター 研究所 循環動態機能部機能評 価研究室 室長	World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2003	オーストラリア・シ ドニー	平成 15 年 8 月

平成 16 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
井内 洋介	岡山大学医学部 保健学科放射線診療技 術学講座 助手	American Heart Association Scientific Sessions 2004 (米国心臓学会)	アメリカ ニューオリンズ	平成 16 年 11 月

平成 17 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
森本 太郎	岡山大学医学部歯学部付 属病院 総合診療内科 内科医師	American Heart Association (米国心臓学会)	アメリカ ダラス	平成 17 年 11 月

平成 18 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
前川 真人	浜松医科大学医学部臨床 検査医学 教授	American Association for Clinical Chemistry, Annual Meeting(米国臨床化学会)	アメリカ シカゴ	平成 18 年 7 月
片岡 則之	川崎医療短期大学 講師	5th World Congress of Biomechanics (第 5 回生体力学世界会議)	ドイツ ミュンヘン	平成 18 年 7 月

平成 20 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
望月 精一	川崎医療福祉大学・医療 技術学部・臨床工学科 教授	第 13 回国際バイオレオロジ ー学会・第 6 回国際臨床ヘモ レオロジー学会	米国 ペンシルベニア州	平成 20 年 7 月

平成 21 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
有光 百合子	Biomechanics Laboratory Mayo Clinic	2009 年アメリカ手の手術の 外科・ハンドセラピー学会	アメリカ合衆国 サンフランシスコ州	平成 21 年 9 月

平成 23 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
金 性勲	東北大学大学院工学研究 科 電気通信工学専攻 博士課程後期 3 年	IEEE 国際磁気学会	カナダ バンクーバー	平成 24 年 5 月

平成 24 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
岡島 亜希子	三重大学 工学研究科 博士前期課程 2 年	第 25 回真空ナノエレクトロ ニクス国際会議	韓国 済州島	平成 24 年 7 月
堀 正峻	東京大学大学院 情報理工学系研究科 博士課程	MEMS2013	台湾 台北	平成 25 年 1 月
須藤 健太	宇都宮大学 工学研究科 博士前期課程 2 年	フォトニクス・ウエスト 2013, バイオス	アメリカ カリフォルニア州	平成 25 年 2 月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
銭 昆	東京大学工学部 精密工学科 学部学生	第27回 CARS 2013 放射線医学及び外科学におけるコンピュータ支援国際会議	ドイツ ハイデルベルク	平成25年 6月～7月
加藤 峰士	東京大学大学院 工学系研究科 博士課程1年生	第27回 CARS 2013 放射線医学及び外科学におけるコンピュータ支援国際会議	ドイツ ハイデルベルク	平成25年 6月～7月

平成25年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
藤田 敏次	大阪大学微生物病研究所 感染症学免疫学融合プログラム推進室 助教	第15回国際免疫会議	イタリア ミラノ	平成25年 8月
荻 智成	豊橋技術科学大学 大学院工学研究科 機械工学専攻 博士前期課程1年	IEEE SMC 2013	イギリス マンチェスター	平成25年 10月
岩崎 友哉	名古屋工業大学大学院 工学研究科 未来材料創成工学専攻 博士前期課程1年	第4回アジア錯体化学会議	韓国 済州島	平成25年 11月
西尾 瑞穂	神戸大学大学院医学研究科 内科系講座放射線医学分野 特命助教	第99回北米放射線学会	アメリカ シカゴ	平成25年 12月
長尾 亮	大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 博士前期課程1年	BiOS 2014, part of Photonics West	アメリカ カリフォルニア・サンフランシスコ	平成26年 1月～2月
法野 祐規	名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻 博士前期課程2年	SPIE Medical Imaging 2014 国際光工学会	アメリカ カリフォルニア・サンディエゴ	平成26年 2月
田中 利恵	金沢大学医薬保健研究域 保健学系 助教	SPIE Medical Imaging 2014 国際光工学会	アメリカ カリフォルニア・サンディエゴ	平成26年 2月
金子 智則	東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士課程	The27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems	アメリカ カリフォルニア・サンフランシスコ	平成26年 1月
ディン ホ アンジャン	東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士課程	The27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems	アメリカ カリフォルニア・サンフランシスコ	平成26年 1月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
鈴木 崇大	東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士課程	The27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems	アメリカ カリフォルニア・サンフランシスコ	平成26年 1月
ファン クアンカン	東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士課程	The27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems	アメリカ カリフォルニア・サンフランシスコ	平成26年 1月
グッドウィン・ジョナサン	北海道大学病院 放射線診療科 特任助教	国際磁気共鳴学会・欧州医学生物学磁気共鳴合同会議	イタリア ミラノ	平成26年 5月
セーボレー那沙	東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻 博士後期課程2年	The24th Anniversary World Congress on Biosensors	オーストラリア メルボルン	平成26年 5月～6月

平成26年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
金 潤河	東京大学大学院 工学系研究科 電気系工学専攻 博士課程3年	第5回 IEEE RAS & EMBS バイオメディカル・ロボティクスとバイオメカトロニクスに関する国際会議	ブラジル サンパウロ	平成26年 8月
内藤 佳菜子	東京大学大学院 工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 修士課程	第7回医療用ロボット技術に関するハムリンシンポジウム	イギリス ロンドン	平成26年 7月
豊田 峻輔	大阪大学大学院 生命機能研究科 時空生物学講座 特任研究員	FENS 第9回欧州神経科学会議	イタリア ミラノ	平成26年 7月
草苺 大輔	大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻	バイオス2015 フォトニクス ウェスト	アメリカ カリフォルニア	平成27年 2月
金子 智則	東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士課程	第28回微小電気機械システムに関する IEEE 国際会議	ポルトガル エストリル	平成27年 1月
青木 亮	東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士課程	第28回微小電気機械システムに関する IEEE 国際会議	ポルトガル エストリル	平成27年 1月
鈴木 智絵	東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士課程	第28回微小電気機械システムに関する IEEE 国際会議	ポルトガル エストリル	平成27年 1月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
風間 涼平	東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士課程	第28回微小電気機械システムに関するIEEE国際会議	ポルトガル エストリル	平成27年 1月
吉野 鉄大	慶應義塾大学医学部 漢方医学センター 助教	第10回国際代替医療研究会	大韓民国 済州	平成27年 5月
有田 龍太郎	慶應義塾大学医学部 漢方医学センター 助教	第10回国際代替医療研究会	大韓民国 済州	平成27年 5月

平成27年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
森山 敏文	長崎大学大学院 工学研究科 電気・情報工学科学部門	電磁気研究推進シンポジウム	チェコ共和国 プラハ	平成27年 7月
槇田 諭	佐世保工業高等専門学校 電子制御工学科 講師	第25回国際バイオメカニクス学会大会	イギリス グラスゴー	平成27年 7月
小山 稔生	金沢大学大学院 自然科学研究科機械科学専攻 人間機械創造研究室	The 2015 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics	韓国 釜山	平成27年 7月
田中 幸美	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻	IEEE 医療・生理部会	イタリア ミラノ	平成27年 8月
白松 知世	東京大学 先端科学技術 センター 生命知能シス テム分野 特任研究員	脳のエラーシグナル-第7回 ミスマッチネガティビティカ ンファレンス	ドイツ ライプツィヒ	平成27年 9月
真鍋 正伸	大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネ ルギー工学専攻	中性子捕捉療法国際学会	イタリア パピア	平成27年 9月
吉見 靖男	芝浦工業大学 工学部応用化学科 教授	第14回治療薬モニタリング および臨床毒性学国際会議	オランダ ロッテルダム	平成27年 10月
荒船 拓也	群馬大学大学院 理工学 専攻 電子情報・数理教 育プログラム	第11回IEEE主催 ASIC国際会議	中国 成都	平成27年 11月
梶本 武利	神戸大学大学院 医学研究科生化学分子生 物学講座 助教	2015年アメリカ細胞生物学 会年会	アメリカ サンディエゴ	平成27年 12月
安藤 潤	大阪大学大学院 工学研究科 精密科学・応用物理学専 攻 特任研究員（常勤）	環太平洋国際化学会議 2015	アメリカ ホノルル	平成27年 12月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
吉田 悟	慶應義塾大学大学院 理工学研究科	第 29 回 MEMS 国際会議	中国 上海	平成 28 年 1 月
鈴木 規之	慶應義塾大学大学院 理工学研究科 総合デザイン工学専攻	第 29 回 MEMS 国際会議	中国 上海	平成 28 年 1 月
岡谷 泰佑	東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻	第 29 回 MEMS 国際会議	中国 上海	平成 28 年 1 月
大西 航	東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻	第 29 回 MEMS 国際会議	中国 上海	平成 28 年 1 月
朴 熙俊	東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻	第 29 回 MEMS 国際会議	中国 上海	平成 28 年 1 月
白石 祐大	東京農工大学大学院 工学府 機械システム工学専攻	物理生物学会年会	アメリカ ロサンゼルス	平成 28 年 2 月
金澤 裕樹	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 医用画像情報科学分野 助教	欧州放射線会議	オーストリア ウィーン	平成 28 年 3 月
寺崎 健人	九州大学大学院 医学系学府 保健学専攻 医用量子線科学分野	第 14 回国際放射線防護学会 国際会議	アフリカ ケープタウン	平成 28 年 5 月
濱口 卓也	慶應義塾大学医学部 漢方医学センター 助教	第 11 回国際代替医療研究会	アメリカ ラスベガス	平成 28 年 5 月
井口 泰成	大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻	アメリカ質量分析会議	アメリカ サン・アントニオ	平成 28 年 6 月

平成 28 年度技術交流（派遣）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
木竜 徹	新潟大学 自然科学研究科 電気情報工学専攻 人間支援科学コース 教授	XXI Congress of the International Society of Electrophysiology and Kinesiology 第 21 回 国際電気生理運動学 会大会	アメリカ シカゴ	平成 28 年 7 月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
伊藤 健一	新潟工科大学 工学部工学科 准教授	The 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC' 16) 第38回国際ME学会議	アメリカ オーランド	平成28年 8月
龍 進吾	豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 情報・知能工学専攻 博士前期課程	The 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC' 16) 第38回国際ME学会議	アメリカ オーランド	平成28年 8月
臼井 健二	甲南大学 フロンティアサイエンス 学部 生命化学科 准教授	The 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium 第34回ヨーロッパペプチド シンポジウム・第8回国際ペ プチドシンポジウム	ドイツ ライプツィヒ	平成28年 9月
吉田 光輝	慶應義塾大学大学院 理工学研究科 総合デザイン工学専攻 (機械系)	The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Ch emistry and Life Science 化学と生命科学のための微小 システムに関する国際会議	アイルランド ダブリン	平成28年 10月
林 裕晃	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 助教	Annual Meeting of Radiological Society of North America 北米放射線学会年次大会	アメリカ シカゴ	平成28年 11月
浜田 俊幸	北海道大学大学院 医学研究科 放射線医学分野 特任准教授	Neuroscience 2016 北米神経科学会 2016	アメリカ サンディエゴ	平成28年 11月
近藤 泰成	豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 情報・知能工学専攻 博士前期課程 1年	24th Color Imaging Conference 色画像化会議	アメリカ サンディエゴ	平成28年 11月
鈴木 南羽	東京農工大学 工学府 生命工学専攻	Pacific rim meeting on electrochemical and solid-state science 2016 2016年電気化学会 (ECSJ) 秋季大会	アメリカ ホノルル	平成28年 10月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
空田明日香	東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻	Pacific rim meeting on electrochemical and solid-state science 2016 2016年電気化学会 (ECSJ) 秋季大会	アメリカ ホノルル	平成28年 10月
上村圭亮	大阪大学大学院 医学系研究科 運動器医工学治療学	ISTA 2016 第29回国際人工関節技術会議	アメリカ ボストン	平成28年 10月
NGUYEN THANH VINH	東京大学 IRT研究機構 下山研究室 特任研究員	THE 69th ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYSICAL SOCIETY- DIVISION OF FLUID DYNAMICS アメリカ物理学会 流体力学 部門 第69回年次会合	アメリカ ポートランド	平成28年 11月
皿上 順英	大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻	The 17th International Congress on Neutron Capture Therapy 第17回国際中性子捕捉療法 学会学術大会	アメリカ コロンビア	平成28年 10月
小林 美菜	大阪大学 工学研究科 環境エネルギー工学専攻	ICRS-13&RPSD-2016 第13回放射線遮蔽国際会議・第19回国原子力学会 放射線防護遮蔽部会会合	フランス パリ	平成28年 10月
平谷 萌恵	東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻 修士1年	The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 化学と生命科学のための微小 システムに関する国際カンフ アレンス	アイルランド ダブリン	平成28年 10月
紀本 夏実	徳島大学 大学院保健科学教育部 保健学専攻	SPIE Medical Imaging 国際光学学会 医用画像分野	アメリカ オーランド	平成29年 2月
熊本 康昭	京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞分子機能病理学 助教	SPIE Photonics West 国際光工学学会フォトニクスウ エスト	アメリカ サンフランシスコ	平成29年 1月
藤本 和也	京都大学大学院 工学研究科 マイクロエンジニアリン グ専攻 特定研究員	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第30回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成29年 1月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
岡谷 泰佑	東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士2年	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第30回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成29年 1月
松田 信彦	東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 修士2年	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第30回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成29年 1月
佐藤 龍	慶応義塾大学 理工学研究科 総合デザイン工学専攻	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第30回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成29年 1月
海保 実則	東京大学 生産技術研究所 竹内昌治研究室	The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017) 第30回 MEMS 国際会議	アメリカ ラスベガス	平成29年 1月
松本 昌泰	岩手医科大学大学院 医学研究科 外科系専攻（脳神経外科 学）	28th Symposium on Cerebral Blood Flow Metabolism and Function (B erlin Brain 2017) 第28回国際脳循環代謝学会 学術大会	ドイツ ベルリン	平成29年 3月
及川 公樹	岩手医科大学大学院 医学研究科 脳神経外科学講座	28th Symposium on Cerebral Blood Flow Metabolism and Function 第28回国際脳循環代謝学会	ドイツ ベルリン	平成29年 3月
永井 智大	公立はこだて未来大学 システム情報科学部 情報アーキテクチャ学科	Computer Assisted Radiology and Surgery 2017 カーズ 2017	スペイン バルセロナ	平成29年 6月
南波 孝昌	岩手医科大学 医学部 脳神経外科学講座 助教	25th Annual Meeting of International Society for Magnetic Resonance in Medicine 第25回国際磁気共鳴医学会 学術大会	アメリカ ホノルル	平成29年 4月
岡本 浩明	山口大学大学院 創成科学研究科 工学系学域 准教授	14th European Conference on Liquid Crystals 第14回 液晶に関する欧州 会議	ロシア モスクワ	平成29年 6月

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
野村 秀成	大阪大学 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 博士前期課程1年	65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics アメリカ質量分析会議	アメリカ インディアナポリス	平成29年 6月
木村 公一	大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻	65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics アメリカ質量分析会議	アメリカ インディアナポリス	平成29年 6月
鶴本 侑万	大阪大学大学院 工学研究科 環境エネルギー工学専攻	65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics アメリカ質量分析会議	アメリカ インディアナポリス	平成29年 6月
芹田 和則	大阪大学 レーザーエネルギー学研 究センター テラヘルツフォトニクス 研究部門 特任研究員	Conference on Lasers and Electro-Optics 2017 (CLEO2017); THz Mansion Meeting クレオ2017; テラヘルツマン ションミーティング	アメリカ サンノゼ ニューポート	平成29年 5月

2. 招聘

昭和 60 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
	財団事務局で招聘	Reinhard Thom 教授（西独）	血液電子計測研究会	東京	昭和 60 年 11 月

平成 12 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
神谷 暲	日本大学本部グローバルビジネス研究科 教授	Sun I. Kim 教授 他 3 名（韓国）	第 39 回日本エム・イー学会大会日韓合同セッション、他	東京	平成 12 年 5 月
望月 精一	川崎医療短期大学臨床工学科 助教授	Walter H. Chang 教授（台湾）	第 39 回日本エム・イー学会大会日韓合同セッション、他	東京、神戸、他	5 月
巽 典之	大阪市立大学医学部臨床検査医学教室 教授	13 名（内訳、インドネシア 2 名、韓国 5 名、フィリピン 2 名、シンガポール 1 名、タイ 3 名）	臨床検査の標準化に関する第 2 回アジア会議	神戸	10 月

平成 13 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
戸川 達男	東京医科歯科大学生体材料研究所 教授	Piotr Foltynsky バイオサイバネティクス医用生体工学研究所高等研究員（ポーランド）	発汗計測ワークショップ、第 9 回日本発汗学会総会、他	東京	平成 13 年 7～9 月
齋藤 正男	東京電機大学工学部 教授	王明時 天津大学 ME 研究所所長 他 1 名（中国）	第 15 回日本エム・イー学会秋季大会、TDU 日中 ME 学術交流懇談会、他	東京	11～12 月

平成 14 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
前川 真人	浜松医科大学医学部 教授	Steven Shoei-Lung Li 教授（台湾）	国際酵素学会浜松会議	浜松	平成 14 年 10 月
浅野 茂隆	東京大学医科学研究所 教授	Suthat Fucharoen 教授（タイ）他、シンガポール 1 名、中国 5 名、韓国 4 名、台湾 5 名	アジア血液連合第 1 回総会及びシンポジウム	神戸	平成 15 年 3 月

平成 16 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
山越 憲一	金沢大学大学院自然科学研究科 教授	Niilo Saranummi 教授（フィンランド）、Haldun Karagoz 博士（トルコ）	第 43 回日本エム・イー学会	金沢	平成 16 年 5 月

平成 18 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
熊谷 俊一	神戸大学大学院医学系研究科生体情報医学講座臨床病態免疫学分野教授	Dr. Hardjoeno (Indonesia) 他、Indonesia 4 名、Korea 2 名、Mongolia 5 名、Taiwan 3 名	第 9 回 アジア臨床病理学会	神戸	平成 18 年 10 月

平成 20 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
浅野 茂隆	早稲田大学理工学部先端システム医生物工学研究室教授	Willem Fibbe 欧州血液連合会長(オランダ) 他、ドイツ 1 名、シンガポール 1 名、タイ 1 名、韓国 2 名	第 5 回 アジア血液学連合総会	神戸	平成 21 年 2 月

平成 21 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
福井 康裕	東京電機大学理工学部 電子情報工学科 教授	Rita Paradiso Ph.D. R&D Manager, Smartex	第 48 回 日本生体医工学会	東京	平成 21 年 4 月
倉智 嘉久	大阪大学大学院医学系研究科分子・細胞薬理学講座 教授	Denis Noble Ph.D	第 36 回 国際生理学会世界大会	京都	平成 21 年 7 月～8 月

平成 22 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
土肥 健純	東京大学大学院情報理工学系研究科 教授	Niilo Saranummi Ph.D Oivind Lorentsen M.Sc Robert M. Nerem Ph.D	第 50 回日本生体医工学会大会	東京	平成 23 年 4 月～5 月

平成 24 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
高橋 伯夫	関西医科大学臨床検査医学講座 教授	[マレーシア] Aziz Baba [シンガポール] Tien Sim Leng [台湾] 唐 季祿	第 12 回アジア臨床病理・臨床検査学会	京都	平成 24 年 11 月～12 月

平成 25 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
尾崎 由基男	山梨大学医学部臨床検査医学講座 教授	[ネパール] Nirmal Baral [中国] Wei Cui	第 9 回チェリーブロッサムシンポジウム 2014	横浜	平成 26 年 4 月

平成 26 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
岩田 彰	名古屋工業大学大学院工学研究科教授	[韓国] Minho Lee Jong Hyo Kim [中国] David Zhang	第 54 回日本生体医工学会大会	名古屋	平成 27 年 5 月

平成 27 年度技術交流（招聘）助成対象

氏名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
木竜 徹	新潟大学大学院自然科学研究科教授	Roberto Merletti トリノ工科大学電子工学科 教授	① 第 16 回日本電気生理運動学会大会 ② 生体計測の標準化	名古屋 東京	平成 27 年 7 月
高田 則雄	慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室特任講師	Lee, Jin Hyung スタンフォード大学医学部助教授	第 38 回日本神経科学大会	神戸	平成 27 年 7 月
望月 精一	川崎医療福祉大学医療技術学部臨床工学科学科長教授	Ms. Maria Siebes Associate Professor, University Amsterdam	第 10 回国際微小循環学会	京都	平成 27 年 9 月
上原 弦	金沢工業大学先端電子技術応用研究所所長教授	①Prof. Ovid Tzeng, Academia Sinica and National Yang Ming University	台湾中央研究所・台湾中央大学・金沢工業大学 合同脳磁計応用研究会	金沢工業大学	平成 27 年 10 月
同上	同上	②Dr. Denise Hsien Wu, National Central University, Taiwan	同上	同上	平成 27 年 10 月
木村 和子	金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授	①Mom Bun Heng, Minister, Ministry of Health, Royal Government of Cambodia	第 30 回日本国際保健医療学会学術大会	金沢大学	平成 27 年 11 月
同上	同上	②Patrick Lukulay, Vice President, Global Health Impact Programs (GHIP)	同上	同上	平成 27 年 11 月
安藤 正海	東京理科大学総合研究院教授	①黎剛(LI Gang) 中国科学院高能物理研究所・放射光施設 副教授	第 10 回アジア放射光生物学・医学画像研究会	山形	平成 28 年 2 月
同上	同上	②金鐘基(KIM Jong-Ki) 大邱カソリック大學校 医学部医学科教授	同上	同上	平成 28 年 2 月

同上	同上	③銭相勲(JHEON Sanghoon) ソウル国立大学医学部 主任教授	同上	同上	平成 28 年 2 月
村上 旬平	大阪大学歯学部 付属病院 障害者歯科治療部 助教	第 1 回トウレット症候群 治療推進学会 学術総会	Dr. Anthony B. Sims Maryland Center for Craniofacial TMJ and Dental Sleep Disorders	大阪大学	平成 28 年 5 月

平成 28 年度技術交流（招聘）助成対象

氏 名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時 期
山本 義春	東京大学大学院 教育学研究科 総合教育科学専攻 教授	Thomas Penzel Charité Universitä tsmedizin Berlin 教授	8th International Workshop on Biosignal Interpretation (BSI2016)	大阪市 (大阪国 際 交 流 セ ン タ ー)	平成 28 年 11 月
同上	同上	Patrice Abry Ecole Normale Supérieure de Lyon 教授	同上	同上	同上
同上	同上	Fabio Babiloni University of Rome Sapienza 教授	同上	同上	同上
相澤 健一	自治医科大学 医学部 薬理学講座 臨床薬理学部門 准教授	鈴木亨 レスター大学医学部 循環器内科 教授	2016 年度 AMED 成果報告 会「疾患克服への挑戦 ライ フサイエンスの現状と未来 への展望」他	東京都 (よみうり 大手町 ホール)	平成 29 年 2 月
狩野 方伸	東京大学大学院 医学研究科 神経生理学分野 教授	Mark Hubener Max Planck Institute of Neurobiology	第 40 回日本神経科学大会	千葉 (幕張メ ッセ)	平成 29 年 7 月
同上	同上	Zhigang He Harvard Medical School	同上	同上	同上
藤田 克昌	大阪大学大学院 工学研究科 精密科学・応用物理 学専攻 准教授	Karen Faulds The University of Strathclyde Glasgow	日本分光学会 年次講演会・国際シンポ ジウム 2017	東京都 早稲田 大学	平成 29 年 5 月
同上	同上	Duncan Graham The University of Strathclyde Glasgow	同上	同上	同上
同上	同上	Wei Min Columbia University	同上	同上	同上

3. 海外研修

平成 26 年度技術交流（海外研修）助成対象

氏名	所属機関・職名	研究内容	研修先	時期
渡辺 梢	大阪大学大学院 工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 応用物理学コース	超解像ラマン顕微鏡の開発	ドイツ ライプニッツフォトニクステクノロジー研究所	平成 27 年 4 月～ (3 ヶ月)
寺本 高啓	立命館大学工学部 電気電子工学科 助教	2次元振電分光法の開発	アメリカ University of California Berkeley	平成 27 年 7 月
三輪 秀樹	群馬大学大学院 医学系研究科 遺伝発達行動学 助教	GABA 作動性ニューロンの睡眠振動波発生との関連性	アメリカ Harvard Medical School VA Boston Healthcare System	平成 28 年 4 月
大黒 達也	東京大学大学院 医学系研究科内科学専攻 臨床病態検査医学分野 客員研究員	反復経頭蓋磁気刺激法と脳機能イメージング計測技術を用いた、ヒトの感覚運動制御機能の神経生理学的評価法の開発	イギリス Experimental Psychology, University of Oxford	平成 28 年 4 月
李 鎮熙	東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻	DNA マイクロアレイ技術及び酵素融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた、多数の標的二本鎖 DNA の同時検出	フランス Universite Lyon 1 -Claude Bernard	平成 28 年 4 月
磯村 拓哉	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻	人の無意識的推論を再現する機械学習モデルの構築と精神医学への応用	イギリス Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, University College London	平成 28 年 4 月

平成 28 年度技術交流（海外研修）助成対象

氏名	所属機関・職名	研究内容	研修先	時期
宇治 彰人	京都大学大学院 医学研究科 感覚運動系外科学 眼科学 助教	高解像度3次元血流イメージング法の開発	アメリカ Doheny Eye Institute University of California Los Angeles カリフォルニア大学ドヘニー眼研究所	平成 28 年 4 月

氏名	所属機関・職名	研究内容	研修先	時期
榎本 詢子	横浜国立大学大学院 工学府 福田研究室 大学院生	細胞培養マイクロデバイスに非侵襲的な光酵素センサを組み込み、連続的に細胞呼吸活性を on chip モニタリングする。さらに、マイクロ流路内での流体シミュレーションを取り入れ、細胞評価において重要となる均一な細胞導入を実現できるマイクロデバイスを設計する。	イタリア Laboratory of Biological Structure Mechanics, Department of Structural Engineering, Politecnico di Milano, Milan, Italy ミラノ工科大学 電子・情報・生物工学 部	平成 28 年 6 月
牧功 一郎	京都大学 再生医科学研究所 バイオメカニクス研究室 博士後期課程 3 回生	マイクロ力学計測によるプライマリーシリアの流れ刺激感知メカニズムの解明	アメリカ Department of Biomedical Engineering, Columbia University コロンビア大学 生体医工学科	平成 28 年 8 月
釘宮 章光	広島市立大学 情報科学研究科 医用情報科学専攻 准教授	アミノ酸の新規計測法の開発	アメリカ Department of Electrical & Computer Engineering, The University of Florida フロリダ大学 電子・コンピューター 学科	平成 28 年 6 月
齊藤 亮平	電気通信大学大学院 情報理工学研究科 基盤理工学専攻 牧研究室 博士後期課程 1 年	生体内標識材料の開発	アメリカ University of California Berkeley カリフォルニア州立大 学 バークレー校	平成 28 年 10 月
奥知 左智	京都大学 医学部附属病院 放射線診断科 医員	GlucoCEST 法による脳腫瘍、脳変性疾患の診断・治療に資する画像指標の研究	イギリス University College London ユニヴァーシティ・カレッジ・ロンドン	平成 29 年 1 月
杉本 至健	山口大学 医学系研究科 脳神経外科 助教	広汎性脱分極 (CSD) 発生時の DC 脳波の記録手法および Laser speckle flowmetry を用いた脳表の血流計測の手法の研修	アメリカ Department of Neurology and Radiology Neurovascular Research Laboratory ハーバード大学、マサ チューセッツ総合病院	平成 29 年 4 月

4. 海外留学

平成 26 年度技術交流（海外留学）助成対象

氏名	所属機関・職名	研究テーマ	留学先機関名	時期
永井 萌土	豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 機械工学系 助教	超高速単一細胞機能解析のためのオプトフルイディックシステムの開発	アメリカ カリフォルニア大学 ロサンゼルス校	平成 27 年 9 月
森澤 大祐	兵庫医科大学医学部 内科学(冠疾患科) 助教	超音波およびシミュレーターを用いた粒子イメージング速度測定法による右心室内血液の渦流形成の流体力学的解析	アメリカ カリフォルニア大学 アーバイン校 工学部	平成 27 年 9 月
中川 大地	東京大学大学院 医学系研究科 脳神経外科学	・生体内の動脈瘤内塞栓後のコイルの正確な計測技術の確立 ・コンピュータグラフィックスを用いた高精細なコイルの 3 次元モデルの作成他	アメリカ アイオワ大学 脳神経外科	平成 28 年 8 月

平成 28 年度技術交流（海外留学）助成対象

氏名	所属機関・職名	研究テーマ	留学先機関名	時期
飛田哲朗	名古屋大学 医学系研究科整形外科 医員	加齢性筋量減少症(サルコペニア)診断の為に超音波法を用いた簡便かつ無侵襲の筋量測定法の開発	アメリカ San Diego Spine Foundation サンディエゴ脊椎疾患財団	平成 29 年 4 月
堀松徹雄	兵庫医科大学 循環器内科 助教	動脈硬化病変における血流変化と血管周囲脂肪組織の関連の解析	アメリカ Medical College of Georgia at Augusta University ジョージア医科大学 (オーガスタ大学)	平成 28 年 9 月
田崎雅義	熊本大学大学院 生命科学部 保健学系構造機能解析学 分野 助教	質量分析によるアミロイドーシスの新規診断技術の開発および新たなアミロイド原因蛋白質の同定	イタリア University of Pavia パヴィア大学	平成 29 年 3 月
大浅 翔	北海道大学大学院 先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室 博士研究員	多点蛍光相関分光法を用いた細胞膜上 GPCR の空間依存的な動態と機能の定量解析	スウェーデン Karolinska Institutet カロリンスカ研究所	平成 29 年 7 月

氏名	所属機関・職名	研究テーマ	留学先機関名	時期
望月研太郎	東北大学 加齢医学研究所 医用細胞資源センター 助教	ヒストン修飾クロストークを介した、生殖細胞運命を規定するエピゲノム動態の解明	カナダ The University of British Columbia ブリティッシュコロンビア大学	平成 30 年 3 月
上村 圭亮	大阪大学大学院 医学系研究科 運動器医工学治療学 大学院生	Dual fluoroscopy を用いた Femoroacetabular impingement の解析	アメリカ University of Utah Department of Orthopaedics ユタ大学整形外科	平成 29 年 4 月
長嶋雅子	自治医科大学 医学部 小児科 助教	機能的近赤外分光分析法を用いた小児注意欠如多動症の新規治療法の確立	ドイツ Department of Psychiatry and Psychotherapy Psychophysiology and Optical Imaging チュービンゲン大学 精神科 心理生理学・光学イメージング部門	平成 29 年 5 月

5. 日本留学

平成 26 年度技術交流（日本留学）助成対象

氏名	所属機関・職名	留学者名	国籍	時期
吉田 亘	東京工科大学 応用生物学部応用生物学科 助教	Annika Busch アニカ・ブッシュ	ドイツ	平成 26 年 4 月
宮地 勇人	東海大学医学部 基盤診療学系 教授	Lkhaasuren Nemekhbaatar ラハースレン ネメフバートル	モンゴル	平成 26 年 8 月

平成 28 年度技術交流（日本留学）助成対象

氏名	所属機関・職名	留学者名	留学先	研究テーマ	時期
宮地勇人	東海大学 医学部 基盤診療学系臨床検査学 教授	Bayarbat Tsevegjav	東海大学 医学部	難治性白血病細胞における抗がん剤耐性の分子機序の解明と抗がん剤耐性の評価法の開発	平成 28 年 4 月
津川若子	東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻/産業技術専攻 准教授	李 仁榮	東京農工大学 大学院 工学府	人工膵臓への応用に向けた自律型グルコース連続計測システムの開発	平成 29 年 4 月

氏名	所属機関・職名	留学者名	留学先	研究テーマ	時期
徐岩	宮崎大学医学部 機能制御学講座物質科学 分野 教授	鮑宏亮	宮崎大学大学院 医学獣医学総合研 究科	19F-NMR による ヒトテロメア RNA 細胞内構造の解 明	平成 29 年 4 月

6. 会議等

昭和 62 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
吉本 千禎	北海道大学 名誉教授	極東医用生体工学会議国際準備委員会	東京	昭和 62 年 8 月

平成 2 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
吉本 千禎	北海道大学 名誉教授	第 1 回極東医用生体工学会議	東京	平成 2 年 10 月

平成 13 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
原 宏	兵庫医科大学輸血部 教授 細胞移植部長	第 43 回日本臨床血液学会総会	神戸	平成 13 年 11 月
内山 明彦	早稲田大学理工学部電子情報 通信学科 教授	第 15 回日本エム・イー学会秋 季大会	東京	12 月
上野 照剛	東京大学大学院医学系研究科 教授	第 6 回 ME フォーラム	東京	平成 14 年 1 月
軽部 征夫	東京大学先端科学技術研究セ ンター 教授	バイオエレクトロニクス及び バイオテクノロジーに関する 国際会議	東京	3 月

平成 14 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
土肥 健純	東京大学大学院情報理工学系 研究科 教授	第 5 回医用画像工学及びコン ピュータ外科国際会議	東京	平成 14 年 9 月
前川 真人	浜松医科大学医学部 教授	国際酵素学会浜松会議	浜松	10 月
野瀬 善明	九州大学大学院医学研究院 教授	第 16 回日本エム・イー学会秋 季大会	神戸	11 月

平成 15 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
千原 國宏	奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 教授	第 6 回日本-ポーランド医用 生体工学シンポジウム	京都	平成 15 年 10 月
梶谷 文彦	岡山大学大学院医歯学総合研 究科システム循環生理学 教授	岡山国際シンポジウム:循環フ ィジオーム	岡山	平成 15 年 12 月

平成 17 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
辻岡 克彦	川崎医科大学生理学教室 教授	第 6 回アジア太平洋生体医工 学会	筑波	平成 17 年 4 月

平成 18 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
前川 真人	浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授	第 57 回日本電気泳動学会	静岡県 浜松市	平成 18 年 10 月

平成 19 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
日野田 裕治	山口大学大学院医学系研究科 臨床検査医学分野 教授	第 58 回日本電気泳動学会	山口県 宇部市	平成 19 年 11 月

平成 20 年度技術交流（会議等）助成対象

氏名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
前川 真人	浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授	第 48 回日本臨床検査化学会年 次学術集会	静岡県 浜松市	平成 20 年 8 月

調査研究に対する助成状況

昭和61年度調査研究助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
戸川 達男	東京医科歯科大学 医用器材研究所 教授	無拘束生体電子計測に関する調査研究	昭和61～63年度

平成2年度調査研究助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
赤澤 堅造	神戸大学 工学部情報知能工学科 教授	生体電子計測技術における可視化・知能化に関する調査研究	平成2～4年度

平成14年度調査研究助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
松浦 成昭	大阪大学大学院 医学系研究科保健学専攻機能診断科学講座 教授	再生医療分野における電子計測技術の利用に関する調査研究	平成14～15年度

平成20年度調査研究助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
野口 眞三郎	大阪大学大学院医学系研究科乳腺内分泌外科 教授	OSNA 法による乳癌センチネルリンパ節転移診断の臨床的意義に関する調査研究	平成20～23年度

平成26年度調査研究助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
八木 直美	京都大学大学院医学研究科神経内科 特定研究員	非拘束生体データ計測における嚙下障害の調査研究	平成27～28年度

平成27年度調査研究助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
陳 文西	会津大学生体情報学講座 教授	無意識生体信号計測に関する調査研究	平成28～29年度
和田 英夫	三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻 准教授	止血系マーカーによる過凝固（前血栓）状態の検討	平成28年度
相澤 健一	自治医科大学医学部 准教授	冠動脈狭窄症の低侵襲診断法の開発と臨床応用に関する調査研究	平成28年度

平成28年度調査研究助成対象

氏名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
梅澤 和夫	東海大学医学部外科学系救命救急医学 講師	皮膚揮発性物質分析による農薬中毒の診断法の実用化に向けた検証	平成29～30年度
小林 康毅	東京大学大学院医学系研究科公衆衛生学分野 教授	非侵襲的動脈硬化指標 AVI と認知機能の関連についての研究	平成29～30年度

公益財団法人

中谷医工計測技術振興財団 年報

31号

平成 30 年 3 月 20 日 発行

公益財団法人

発行所 中谷医工計測技術振興財団

〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目 2 番 2 号
アートヴィレッジ大崎セントラルタワー8階

TEL (03) 5719-2125 FAX (03) 5719-2135

URL : <https://www.nakatani-foundation.jp/>

編集・
発行人 寶田 馨

印刷 (有)盛光印刷所