ISSN 0914-2487

公益財団法人
中谷医工計測技術振興財団

年　報　vol. 30 -2

Annual Report　2016

Nakatani Foundation for Advancement of Measuring Technologies in Biomedical Engineering

30 号 補刷

公益財団法人
中谷医工計測技術振興財団

年　報

30 号補刷

目　　次

設立の趣意 …… 2
役員・評議員および事業の概要…… 3
平成 26 年度（第 31 回）技術開発助成成果報告…… 4
平成 27・28 年度技術交流助成成果報告…… 157
中谷賞の表彰状況 …… 256
技術開発に対する助成状況…… 258
技術交流に対する助成状況…… 283
調査研究に対する助成状況…… 302

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
輕　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
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
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　取締役
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　社会福祉法人博由社理事長　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関する助成
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。

平成 29 年 6 月 20 日現在

平成２６年度（第３１回）
技術開発研究助成成果報告

１．開発研究助成

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
（京都大学大学院薬学研究科　病態機能分析学 准教授　小野 正博）―――――――――――――――――――― 6

細胞トランジスタを用いた細胞膜ナノ空孔形成の計測
（東京医科歯科大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　合田 達郎）―――――――――― 15

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
（京都大学白眉センター生物物理 特定准教授　西山 雅祥　）―――――――――――――――――――――――― 25

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
（東北工業大学大学院工学研究科電子工学専攻 准教授　鈴木 郁郎）―――――――――――――――――――― 34

新規 cDNA 合成技術の開発とマイクロアレイへの応用
（京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 教授　保川 清）―――――――――――――――――――――― 40

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
（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　PAVILLON Nicolas）―――――――――――― 48

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
（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　吉川 裕之）―――――――――――――――― 54

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
（東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学教室 助教　関谷 敬）―――――――――――――――――――― 64

超音波ＣＴ(Computed Tomography) を用いた血流計測技術の開発
（東京大学医学部疾患生命工学センター　教授　東　隆）―――――――――――――――――――――――――― 70

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
（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　鳥光 慶一）―――――――――――――――――― 77

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
（岩手医科大学脳神経外科学講座 助教　藤原 俊朗）―――――――――――――――――――――――――――― 83

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
（慶應義塾大学理工学部物理情報工学科 准教授　塚田 孝祐）―――――――――――――――――――――――― 89

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
（東北大学大学院医工学研究科生体機械システム医工学分野 教授　芳賀 洋一）―――――――――――――― 97

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
（山口大学時間学研究所時間生物学研究室 教授　明石 真）―――――――――――――――――――――――105

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
（甲南大学理工学部生物学科/統合ニューロバイオロジー研究所 准教授　久原 篤） ―――――――――― 109
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
（山口大学大学院創成科学研究科機械工学分野 教授　南 和幸） ―――――――――――――――――――― 116
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
（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　舘野 高） ―――――――――――――― 123

２．奨励研究助成

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
（徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授　異島 優） ―――――――――――――――――――――――――― 132
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
（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　吉田 亘） ―――――――――――――― 138
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
（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 上級研究員　大谷 健太郎） ―――――――― 145
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
（大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 助教　髙田 英昭） ―――――――――――――――――― 152

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 年度に実施され、平成 29 年 3 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。

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



研究責任者　京都大学　薬学研究科
病態機能分析学分野
准教授　　小　野　正　博

1. はじめに

近年、本邦における急速な高齢化に伴い、アルツハイマー病(AD)患者の増加が大きな社会問題のひとつになっている。しかし、AD の確定診断は患者剖検脳の病理学的所見に委ねられており、重篤な脳障害が生じる前の早期段階で AD を診断することは困難となっている。また、AD は有効な治療方法が確立されていない、アンメットメディカルニーズの高い代表的疾患であり、その診断・治療方法の開発が強く望まれている。AD 発症までの特徴的な脳病変として、βアミロイドタンパク質(Aβ)凝集体を主成分とする老人斑の沈着と異常リン酸化タウタンパク質凝集体を主成分とする神経原線維変化が知られている。なかでも、Aβの脳内蓄積は AD 発症過程の最も初期段階より始まることから、Aβの生体イメージングは AD の早期・予防診断や病状進行の判定、治療法の開発支援につながると期待されている。

老人斑アミロイドは、アミロイド前駆蛋白質(APP) から分解酵素であるβ-セクレターゼ、γ-セクレターゼにより順次切り出された Aβ(1-40)、Aβ(1-42)が凝集、線維化することにより生成する。この老人斑を体外より画像化するためには、透過性の高い放射線を利用したプローブが有用である。この放射性プローブに求められる性質としては、①血液脳関門の透過性、②老人斑アミロイドへの選択的結合性、③非結合分子の脳からの速やかな消失性が挙げられる。老人斑アミロイドの画像化は、老人斑に結合したプローブから放出される放射線を positron emission tomography (PET)、single photon emission computed tomography (SPECT) 装置を用いて体外より検出するという原理に基づいている。

現在までに、アミロイド染色試薬であるチオフラビン T やコンゴーレッドなどから派生した多くのアミロイドイメージングプローブが開発され、PET 用プローブである[^{11}C]PIB、[^{11}C]SB-13、[^{18}F]BAY94-9172、[^{11}C]BF-227、[^{18}F]FDDNP による臨床研究が行われ、最近では３つの化合物が FDA の認可を受けている[1)]。一方、世界を見渡すと、日本においてさえ PET が使用可能な施設は少なく、Aβの生体イメージングにより AD の予防を広く進めるためには、半減期の短い PET 製剤ではなく、広く普及している SPECT 装置で撮像可能なイメージングプローブの開発が望まれる。しかし、主要な SPECT 用核種である ^{99m}Tc を標識核種とする実用的な Aβイメージングプローブの報告はこれまでにない。日本で使用される全放射性医薬品の核種別放射能の割合は、^{99m}Tc だけでおよそ 80%を占めており、^{99m}Tc を標識核種とする SPECT

製剤の開発は Aβイメージングによる AD 診断を普及するためにも喫緊の課題である。

筆者らは、コンゴーレッドおよびチオフラビン T とは異なる Aβ イメージングプローブの基本骨格の探索研究の中で、キノキサリン誘導体が Aβ 凝集体への高い結合性を示し、Aβ イメージングプローブとして機能することを報告してきた [2]。そして今回、これらの化合物を母核とする SPECT 用放射性核種である ^{99m}Tc で標識した新たな Aβ イメージングプローブの開発を計画した。

^{99m}Tc は画像診断に適した半減期 (6.01 時間) と放射線の体外計測に適したエネルギー (141 keV) のγ線のみを放射し、さらに ^{99}Mo との放射平衡を利用したジェネレータシステム (^{99}Mo/^{99m}Tc ジェネレータ) で容易に入手できることから、現在、核医学画像診断に最も汎用されている放射性核種である。しかし一般的に、遷移金属である ^{99m}Tc は ^{18}F や ^{123}I などの放射性核種とは異なり、同一化合物の中に、標的分子との結合部位および ^{99m}Tc 錯体形成部位が必要であるなど、非常に高度な分子設計が必要となる。これまでに各国の研究グループにより数種の ^{99m}Tc 標識 Aβ イメージングプローブが開発されてきたが [3-11]、臨床研究が行われたプローブは未だ報告されていない。

本研究では、臨床診断上汎用性の高い Aβ イメージングプローブの開発を目的として、Aβとの結合部位としてキノキサリンを基本骨格に選択し、血液脳関門の透過性を考慮して、^{99m}Tc と電気的に中性な錯体を形成することが知られている錯体形成部位である monoamine-monoamide dithiol (MAMA) および bis-amino-bis-thiol (BAT) [12] を導入したキノキサリン誘導体を設計・合成した。さらに、インビトロにおける結合実験、正常マウスを用いた体内放射能分布実験、Tg2576 マウス脳切片を用いた蛍光染色実験を行い、それらの化合物の Aβ イメージングプローブとしての基礎的評価を行った。本研究では、筆者が開発した SPECT 用 Aβ イメージングプローブである、^{99m}Tc 標識カルコン誘導体 [9]を比較化合物として用いるため、その合成および評価結果に関して紹介する。

２．実験方法

2.1 ^{99m}Tc 錯体形成部位の合成

2-(Tritylthio)ethanamine hydrochloride (**1**)

2-Mercaptoethylamine hydrochloride (1.14g, 10 mmol) と triphenylmethyl chloride (2.79 g, 10 mmol) を DMF (10 mL)に溶解し、室温で 72 時間反応させた。溶媒を減圧留去した後、酢酸エチルに再溶解し、氷冷下で 5% $NaHCO_3$ 水を加えた。析出した白色固体を吸引濾過によって回収し、化合物 **1** を得た。収量 3.50 g (収率 98%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.31 (t, J = 6.8 Hz, 2H)、2.60 (t, J = 6.8 Hz, 2H)、7.18–7.31 (m, 9H)、7.43 (d, J = 7.2 Hz, 6H)。

2-(2-(Tritylthio)ethylamino)-*N*-(2-(tritylthio)ethyl)acetamide (Tr-MAMA) (**2**)

化合物 **1** (2.50 g, 7.02 mmol) をクロロホルム (20 mL)とトリエチルアミン (5 mL) に溶解した。氷冷下で bromoacetyl bromide (0.5 mL, 5.76 mmol) をゆっくりと加え、0°C で 3 時間反応させた。希硫酸 (pH 3)、飽和 $NaHCO_3$ 水、飽和 NaCl 水で順次洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、クロロホルムを溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付して粗精製後、酢酸エチルを溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **2** を得た。収量 1.39 g (収率 58%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.35 (q, J = 6.6 Hz, 4H)、2.45 (t, J = 5.9 Hz, 2H)、3.02 (s, 2H)、3.07 (q, J = 6.3 Hz, 2H)、7.18–7.29 (m, 18H)、7.38–7.42 (m, 12H). MS *m/z* 679 (MH^+)。

tert-Butyl-2-(2-(tritylthio)ethylamino)ethyl2-(tritylthio)ethylcarbamate (Tr-BAT) (**3**)

N^1,N^2-Bis(2-(tritylthio)ethyl)ethane-1,2-diamine (3.33 g, 5 mmol) をジクロロメタン (80 mL)と DIPEA (0.86 mL, 5 mmol) に溶解した。氷冷下でジクロロメタン (20 mL) に溶解した di-*t*-butyl

dicarbonate (1.09 g, 5 mmol) を滴下して加え、0°C で 1 時間反応させた。溶媒を減圧留去した後、クロロホルム-メタノール混液 (99:1) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **3** を得た。収量 3.59 g (収率 94%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.37 (s, 9H)、1.54 (s, broad, 1H)、2.46–2.28 (m, 8H)、2.96 (s, broad, 4H)、7.17–7.30 (m, 18H)、7.37–7.43 (m, 12H)。

2.2 カルコン誘導体の合成

(*E*)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (**4**)

p-Hydroxyacetophenone (1.36 g, 10 mmol) と *p*-dimethylaminobenzaldehyde (1.49 g, 10 mmol)をエタノール(15 mL)に溶解した。10% KOH (30 mL) を撹拌しながら徐々に加え、100°C で 12 時間加熱還流させた。酢酸エチルと 1 M HCl で分液し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、クロロホルム-メタノール混液 (49:1) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **4** を得た。収量 1.86 g (収率 70%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.05 (s, 6H)、6.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)、6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)、7.34 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H)、7.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)、7.79 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H)、7.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)。

(*E*)-1-(4-(5-Bromopentyloxy)phenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-en-1-one (**5**)

化合物 **4** (1.51g,5.64mmol) および 1,5-dibromopentane (1.54 mL, 11.4 mmol)、炭酸カリウム (1.5 g)を、アセトニトリル (15 mL)に懸濁させ、4 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、クロロホルムと水で分液し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣を DMSO とヘキサンで分液し、DMSO 層を濃縮後、得られた残渣を、クロロホルムを溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **5** を得た。収量 1.48 g (収率 63%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.62–1.70 (m, 2H)、1.83–1.90 (m, 2H)、1.91–2.01 (m, 2H)、3.05 (s, 6H), 3.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H)、4.06 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)、6.70 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)、6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)、7.36 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H)、7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)、7.79 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H)、8.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)。

(*E*)-1-(4-(3-Bromopropoxy)phenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-en-1-one (**6**)

化合物 **4** (890 mg, 3.33 mmol) および 1,3-dibromopropane (0.679 mL, 6.66 mmol) と炭酸カリウム (1 g) をアセトニトリル (25 mL)に懸濁させ、4 時間加熱還流した．溶媒を減圧留去した後、クロロホルムと飽和 NaCl 水で分液し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、DMF とヘキサンで分液し、DMF 層を濃縮後、クロロホルム-メタノール混液 (199:1) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **6** を得た。収量 981 mg (収率 76%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.35 (quin, *J* = 6.1 Hz, 2H)、3.04 (s, 6H)、3.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H)、4.18 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H)、6.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)、6.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)、7.35 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H)、7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)、7.79 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H)、8.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)。

化合物 **7** (Tr-MAMA-C5-CH)

化合物 **5** (485 mg, 1.13 mmol) と化合物 **2** (830 mg, 1.22 mmol) を DMF (10 mL)と DIPEA (1 mL) に溶解し、12 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、クロロホルムと水で分液し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後，溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、クロロホルム-メタノール混液 (199:1) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **7** を得た。収量 330 mg (収率 29%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.39 (s, 4H)、1.69–1.71 (m, 2H)、2.27–2.41 (m, 8H)、2.87 (s, 2H)、2.95–3.01 (m, 2H)、3.04 (s, 6H)、3.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H)、6.70 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)、6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)、7.14–7.27 (m, 18H)、7.32–7.39 (m, 13H)、7.55 (d, *J* =

9.0 Hz, 2H)、7.79 (d, J = 15.6 Hz, 1H)、7.99 (d, J = 9.0 Hz, 2H)。MS *m/z* 1014 (MH^+)。

化合物 **8** (MAMA-C5-CH)

少量の化合物 **7** に TFA (200 mL)とトリエチルシラン(10 mL)を順に加えて混和後、窒素気流下で溶媒を留去し、化合物 **8** を得た。MS *m/z* 530 (MH^+)。

化合物 **9** (Re-MAMA-C5-CH)

化合物 **7** (82 mg, 0.081 mmol) に TFA (4 mL)とトリエチルシラン (0.2 mL)を順に加えて混和後、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をジクロロメタン-メタノール混液 (10:1, 22 mL)に溶解し、trichlorooxobis(triphenylphosphine)rhenium (135 mg, 0.162 mmol) と 1 M 酢酸ナトリウムメタノール溶液 (4 mL)を加えて、6 時間加熱還流した。室温に冷却後、酢酸エチル (60 mL)を加えて濾過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、クロロホルム-メタノール混液 (49:1) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付して粗精製後、アセトニトリル-水混液 (4:1) を溶出溶媒とする高速分取液体クロマトグラフィーに付し、化合物 **9** を得た。収量 20 mg (収率 35%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.60–1.67 (m, 2H)、1.89–1.92 (m, 4H)、2.82–2.91 (m, 1H)、3.05 (s, 6H)、3.14–3.27 (m, 3H)、3.33–3.42 (m, 1H)、3.52–3.65 (m, 1H)、3.95–4.16 (m, 6H)、4.56–4.62 (m, 1H)、4.67 (d, J = 16.5 Hz, 1H)、6.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、6.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.35 (d, J = 15.6 Hz, 1H)、7.55 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、7.79 (d, J = 15.6 Hz, 1H)、8.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H)。HRMS *m/z* $C_{28}H_{37}N_3O_4ReS_2$ found 730.1748、calcd 730.1783 (MH^+)。

化合物 **10** (Tr-BAT-C5-CH)

化合物 **5** (630 mg, 1.51 mmol) と化合物 **3** (855 mg, 1.12 mmol) を DMF (20 mL)と DIPEA (2 mL) に溶解し、12 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、得られた残渣を、クロロホルムを溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付して粗精製後、酢酸エチル-ヘキサン混液 (1:2) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **10** を得た。収量 126 mg (収率 10%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.32-1.37 (m, 12H)、1.70–1.77 (m, 2H)、2.20-2.35 (m, 10H)、2.85–3.01 (m, 4H)、3.04 (s, 6H)、3.98 (t, J = 6.5 Hz, 2H)、6.69 (d, J = 9.3 Hz, 2H)、6.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.15–7.29 (m, 18H)、7.33–7.42 (m, 13H)、7.55 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.79 (d, J = 15.6 Hz, 1H)、8.01 (d, J = 9.0 Hz, 2H)。MS *m/z* 1100 (MH^+)。

化合物 **11** (BAT-C5-CH)

少量の化合物 **10** に TFA (200 mL)とトリエチルシラン (10 mL)を順に加えて混和後、窒素気流下で溶媒を留去し、化合物 **11** を得た。MS *m/z* 516 (MH^+)。

化合物 **12** (Re-BAT-C5-CH)

化合物 **10** (110 mg, 0.1 mmol) に TFA (4 mL)とトリエチルシラン (0.2 mL)を順に加えて混和後、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をジクロロメタン-メタノール混液 (10:1, 22 mL)に溶解し、trichlorooxobis(triphenylphosphine)rhenium (167 mg, 0.2 mmol) と 1 M 酢酸ナトリウムメタノール溶液 (4 mL)を加えて、6 時間加熱還流した。室温に冷却後、酢酸エチル (60 mL)を加えて濾過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を，クロロホルム-メタノール混液 (49:1) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付して粗精製後，アセトニトリル-水混液 (4:1) を溶出溶媒とする高速分取液体クロマトグラフィーに付し、化合物 **12** を得た。収量 44 mg (収率 61%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.60–1.73 (m, 2H)、1.87–1.92 (m, 4H)、2.72–2.78 (m, 1H)、2.96–3.00 (m, 2H)、3.05 (s, 6H)、3.21–3.41 (m, 4H)、3.53–3.63 (m, 1H)、3.76–3.92 (m, 3H)、4.06–4.17 (m, 5H)、6.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、6.96 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、7.36 (d, J = 15.6 Hz, 1H)、7.56 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、7.79 (d, J = 15.6 Hz, 1H)、8.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H)。HRMS *m/z* $C_{28}H_{39}N_3O_3ReS_2$

found 716.1990, calcd 716.1990 (MH^+)。

化合物 **13** (Tr-MAMA-C3-CH)

化合物 **6** (981 mg, 2.53 mmol) と化合物 **2** (1.72 g, 2.53 mmol) を DMF (30 mL)と DIPEA (3 mL)に溶解し、12 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、クロロホルムと水で分液し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、酢酸エチル-ヘキサン混液 (3:2) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **13** を得た。収量 714 mg (収率 29%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.80–1.87 (m, 2H)、2.28 (t, J = 6.3 Hz, 2H)、2.33–2.43 (m, 4H)、2.51 (t, J = 6.9 Hz, 2H)、2.91 (s, 2H)、2.99–3.03 (m, 2H)、3.05 (s, 6H)、3.99 (t, J = 5.9 Hz, 2H)、6.70 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、6.86 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、7.14–7.27 (m, 18H)、7.29–7.38 (m, 13H)、7.54 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.78 (d, J = 15.3 Hz, 1H)、7.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H)。MS *m/z* 986 (MH^+)。

化合物 **14** (MAMA-C3-CH)

少量の化合物 **13** に TFA (200 mL) とトリエチルシラン (10 mL) を順に加えて混和後、窒素気流下で溶媒を留去し、化合物 **14** を得た。MS *m/z* 502 (MH^+)。

化合物 **15** (Re-MAMA-C3-CH)

化合物 **13** (99 mg, 0.1 mmol) に TFA (4 mL)とトリエチルシラン (0.2 mL)を順に加えて混和後、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をジクロロメタン-メタノール混液 (10:1,22 mL) に溶解し、trichlorooxobis(triphenylphosphine)rhenium (167 mg, 0.2 mmol) と 1 M 酢酸ナトリウムメタノール溶液 (4 mL)を加えて、6 時間加熱還流した。室温に冷却後、酢酸エチル (60 mL)を加えて濾過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、クロロホルム-メタノール混液 (49:1) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付して粗精製した後、さらに、アセトニトリル-水混液 (4:1) を溶出溶媒とする高速分取液体クロマトグラフィーに付し、化合物 **15** を得た。収量 20 mg (収率 29%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.65–1.75 (m, 1H)、2.32–2.37 (m, 2H)、2.90–2.98 (m, 1H)、3.05 (s, 6H)、3.15–3.34 (m, 3H)、3.40–3.52 (m, 1H)、3.81–3.86 (m, 1H)、4.09–4.19 (m, 5H)、4.58–4.64 (m, 1H)、4.74 (d, J = 16.2 Hz, 1H)、6.70 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、6.96 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.40 (d, J = 15.3 Hz, 1H)、7.56 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.79 (d, J = 15.3 Hz, 1H)、8.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H)。HRMS *m/z* $C_{26}H_{33}N_3O_4ReS_2$ found 702.1476、calcd 702.1470 (MH^+)。

化合物 **16** (Tr-BAT-C3-CH)

化合物 **6** (243 mg, 0.626 mmol) と化合物 **3** (479 mg, 0.626 mmol) を DMF (10 mL)と DIPEA (1 mL) に溶解し、12 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、クロロホルムと飽和 NaCl 水で分液し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、クロロホルムを溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付して粗精製した後、さらに、酢酸エチル-ヘキサン混液 (1:2) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 **16** を得た。収量 128 mg (収率 19%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.37 (s, 9H)、1.73 (t, J = 6.0 Hz, 2H)、2.24–2.38 (m, 10H)、2.88–2.95 (m, 4H)、3.04 (s, 6H)、3.97 (t, J = 6.2 Hz, 2H)、6.70 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、6.89 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.15–7.31 (m, 19H)、7.37–7.41 (m, 12H)、7.54 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、7.78 (d, J = 15.6 Hz, 1H)、7.96 (d, J = 8.7 Hz, 2H). MS *m/z* 1072 (MH^+)。

化合物 **17** (BAT-C3-CH)

少量の化合物 **16** に TFA (200 mL) とトリエチルシラン (10 mL)を順に加えて混和後、窒素気流下で溶媒を留去し、化合物 **17** を得た。MS *m/z* 488 (MH^+)。

化合物 **18** (Re-BAT-C3-CH)

化合物 **16** (104 mg, 0.097 mmol) に TFA (4 mL)と

トリエチルシラン (0.2 mL)を順に加えて混和後、窒素気流下で溶媒を留去した。得られた残渣を、ジクロロメタン-メタノール混液 (10:1, 22 mL)に溶解し、trichlorooxobis(triphenylphosphine)- rhenium (167 mg, 0.200 mmol) と 1 M 酢酸ナトリウムメタノール溶液 (4 mL)を加えて、6時間加熱還流した。室温まで冷却した後、酢酸エチル (60 mL)を加えて濾過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、クロロホルム-メタノール混液 (49:1) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付して粗精製した後、さらに、アセトニトリル-水混液 (4:1) を溶出溶媒とする高速分取液体クロマトグラフィーに付し、化合物 **18** を得た。収量 44 mg (収率 66%) ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.75–1.85 (m, 1H)、2.31–2.38 (m, 2H)、2.76–2.82 (m, 1H)、2.91–3.08 (m, 2H)、3.05 (s, 6H)、3.24–3.49 (m, 4H)、3.76–4.00 (m, 3H)、4.12–4.33 (m, 5H)、6.70 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、6.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、7.35 (d, J = 15.3 Hz, 1H)、7.56 (d, J = 9.0 Hz, 2H)、7.79 (d, J = 15.3 Hz, 1H)、8.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H)。HRMS m/z $C_{26}H_{35}N_3O_3ReS_2$ found 688.1631, calcd 688.1677 (MH^+)。

３．結果および考察

3-1-1　錯体形成部位の合成

図１に錯体形成部位の合成経路を示す。化合物 **2** (Tr-MAMA) は、2-mercaptoethylamine hydrochloride を出発原料としてチオール基を trityl 基で保護した後、bromoacetyl bromide を介したカップリング反応により合成した。化合物 **3** (Tr-BAT) は N^1,N^2-bis(2-(tritylthio)ethyl)ethane -1,2-diamine の一方のアミンを di-*t*-butyl dicarbonate を用いて Boc 基で保護することにより合成した。

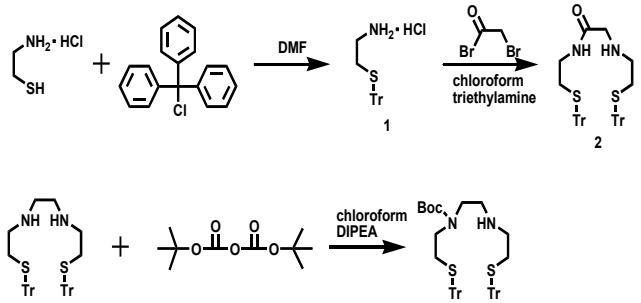


図１．MAMA および BAT の合成経路[3]

3-1-2　カルコン誘導体の合成

Tc に安定同位体が存在しないことから、^{99m}Tc 錯体化合物の構造を推測するためには、同族元素のレニウム(Re)が汎用される。本研究においても、^{99m}Tc 化合物に対応する Re 化合物を合成し、構造決定を行うことで、^{99m}Tc 錯体の構造を推測した。図２にカルコン誘導体の合成経路を示す。カルコン骨格の形成はアルドール縮合反応を用いて行った。カルコン誘導体のアルキル鎖の置換、錯体形成部位の導入には以前報告された方法を用いた[5,6]。Re 錯体は、前駆体を TFA とトリエチルシランを用いて脱保護した後、ジクロロメタンとメタノール混合溶媒中、塩基性条件化で trichlorooxobis(triphenylphosphine)rhenium と反応させることにより調製した。

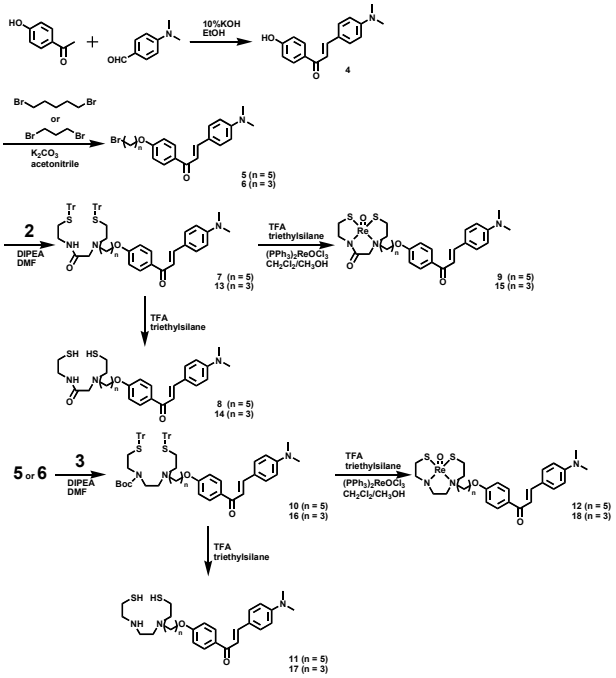


図２．カルコン誘導体の合成経路

3-1-3　^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の作製

図３にカルコン誘導体の ^{99m}Tc 標識経路を示す。^{99m}Tc を $SnCl_2$ により 7 価から 5 価に還元した後、比較的弱い配位子である glucoheptonate と錯体(^{99m}TcGH)を形成させた。^{99m}Tc 標識体は、酸性条件下、^{99m}TcGH との配位子交換反応により調製した。得られた ^{99m}Tc 標識体[^{99m}Tc]**8** および[^{99m}Tc]**11**、[^{99m}Tc]**14**、[^{99m}Tc]**17** の逆相 HPLC における保持時間は、それぞれ 14.2 および 20.3、9.3、12.4 分であった。一方、対応する Re 錯体 **9** および **12**、**15**、**18** の保持時間は、それぞれ 13.5 および 18.4、8.6、11.2 分であった。このように、^{99m}Tc 標識体の保持時間が Re 錯体のそれに近似していることから、これらの ^{99m}Tc 標識体は Re 錯体と同様の化学構造であると推測された。また、これらの ^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の放射化学的収率は 46–95%であり、逆相 HPLC で精製した後の放射化学的純度は 97%以上であった。

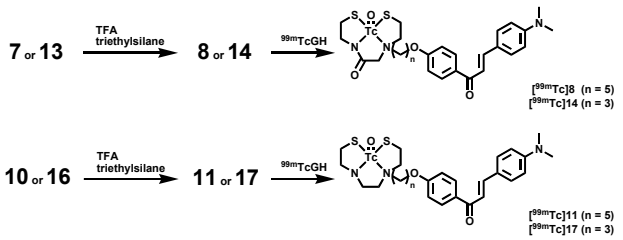


図３．カルコン誘導体の ^{99m}Tc 標識

3-1-4　逆相 HPLC による ^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の分析

^{99m}Tc 標識カルコン誘導体[^{99m}Tc]**8**、[^{99m}Tc]**11**、[^{99m}Tc]**14**、[^{99m}Tc]**17** の保持時間は、それぞれ 14.2、20.3、9.3、12.4 分であった。導入するアルキル鎖の炭素数が 3 の[^{99m}Tc]**14** および[^{99m}Tc]**17** よりも、炭素数 5 の[^{99m}Tc]**8** および[^{99m}Tc]**11** の方が高い脂溶性を有し、また、^{99m}Tc-MAMA 錯体[^{99m}Tc]**8** および[^{99m}Tc]**14** よりも、^{99m}Tc-BAT 錯体，[^{99m}Tc]**11** および[^{99m}Tc]**17** の方が高い脂溶性を有することが示された。

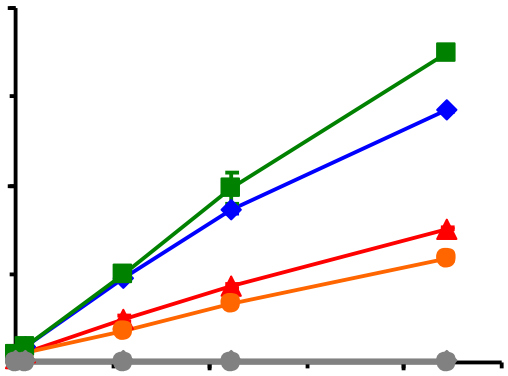


図４．^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の Aβ凝集体への結合性（◆[^{99m}Tc]8，■[^{99m}Tc]11，▲[^{99m}Tc]14，●[^{99m}Tc]17，●^{99m}Tc-MAMA，◆^{99m}Tc-BAT）

3-1-5　^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の Aβ(1-42)凝集体に対する結合親和性

得られた ^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の Aβ凝集体に対する結合親和性を検討するため、Aβ(1-42)凝集体を用いたインビトロ結合実験を行った（図４）。縦軸には吸引濾過後にフィルターに残った放射能の割合を、横軸には Aβ(1-42)溶液の濃度を示す。

錯体部位のみの ^{99m}Tc-MAMA および ^{99m}Tc-BAT は Aβ(1-42)凝集体の濃度変化に伴う結合率にほとんど変化はなかった。一方、得られた全ての ^{99m}Tc 標識カルコン誘導体は Aβ(1-42)凝集体の増加に伴い、結合率が上昇したことから、Aβ 凝集体に対する結合親和性を有することが確認された．また、導入するアルキル鎖の炭素数が 3 の[^{99m}Tc]**14** および[^{99m}Tc]**17** よりも、炭素数 5 の[^{99m}Tc]**8** および[^{99m}Tc]**11** の方が高い結合親和性を示したのに対し、^{99m}Tc-MAMA 錯体[^{99m}Tc]**8** および[^{99m}Tc]**14** と ^{99m}Tc-BAT 錯体 [^{99m}Tc]**11** および[^{99m}Tc]**17** との間に結合親和性の大きな差異は観察されなかった。炭素鎖の長さにより Aβ への結合親和性が変化した一因として、錯体部位のかさ高い構造が Aβ 凝集体に対する結合親和性に影響したためであると考えられた。

3-1-6　^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の正常マウスにおける体内放射能分布

インビトロ結合実験において、Aβ 凝集体に結合親和性を示した ^{99m}Tc 標識カルコン誘導体を正常マウスの尾静脈から投与した後、体内放射能分布を経時的に追跡した。脳内放射能推移を図５に示した。[^{99m}Tc]**8** は投与 10 分後に最大値 0.32±0.14 %ID/g、[^{99m}Tc]**11**、[^{99m}Tc]**14**、[^{99m}Tc]**17** は、投与 2 分後に、それぞれ最大値 0.78±0.16、0.62±0.27、 1.48±0.44 %ID/g の放射能が脳に分布し、速やかな脳移行性を示した。また、導入するアルキル鎖の炭素数が 3 の[^{99m}Tc]**14** および[^{99m}Tc]**17** は、炭素数 5 の[^{99m}Tc]**8** および[^{99m}Tc]**11** よりも高い脳移行性を示した。さらに、^{99m}Tc-BAT 錯体を導入した[^{99m}Tc]**11** および[^{99m}Tc]**17** は、^{99m}Tc-MAMA 錯体を導入した[^{99m}Tc]**8** および[^{99m}Tc]**14** に比べ高い脳移行性を示した。これは、^{99m}Tc-BAT 錯体が ^{99m}Tc-MAMA 錯体に比べ、高い脂溶性を有することに起因するものと考えられた。カルコン誘導体[^{99m}Tc]**17** は、最も高い脳移行性を示すとともに、投与 60 分後に脳に残存した放射能の投与 2 分後に対する割合が 11.5%であり、他の 3 化合物と比べ速やかな消失性を示したことから、Aβ イメージングプローブとして望ましい性質を有していた。

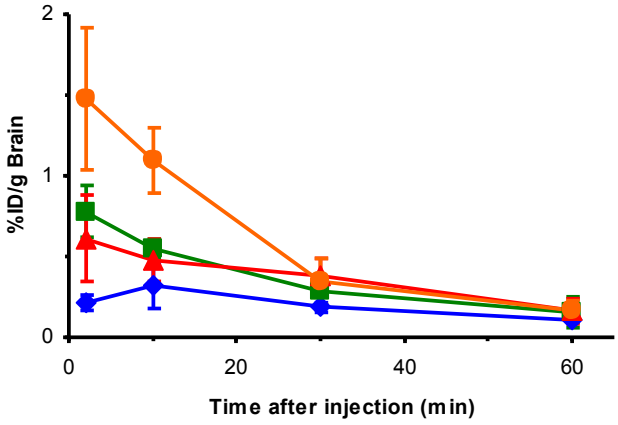


図５．^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の脳移行性
(◆[^{99m}Tc]8, ■[^{99m}Tc]11, ▲[^{99m}Tc]14, ●[^{99m}Tc]17)

3-1-7　Tg2576 マウス脳切片上のアミロイド斑に対するカルコン誘導体の結合選択性

カルコン誘導体のマウス脳切片上のアミロイド斑に対する結合親和性を評価するために、Re 錯体 **9** および **12**、**15**、**18** を用いて Tg2576 マウス脳切片の蛍光染色を行った（図６）。いずれの Re 錯体の場合にも、マウス脳切片上にカルコン由来の蛍光が観察された。それぞれの隣接切片を、アミロイド蛍光染色試薬として用いられているチオフラビン S で染色すると、Re 錯体により染色された箇所とほぼ一致する箇所にチオフラビン S の蛍光が観察された。これらの結果より、^{99m}Tc 標識カルコン誘導体も、マウス脳切片上のアミロイド斑に対する選択的結合性を有することが示唆された。

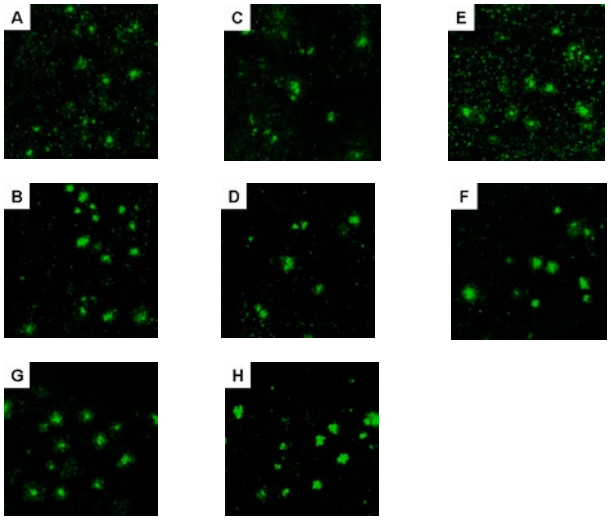


図６．カルコン誘導体の Tg2576 マウス脳切片における蛍光染色(9 (A), 12 (C), 15 (E), 18 (G)) **および隣接脳切片におけるチオフラビン S での染色**(B, D, F, H).

４．まとめ

^{99m}Tc と電荷のない錯体形成部位を有し，Aβとの結合部位としてカルコン骨格を有する 4 種類の新規化合物を合成した。また、^{99m}TcGH との配位子交換反応を行うことにより、^{99m}Tc 標識体を得て、対応する Re 錯体との HPLC での分析結果より、

得られた ^{99m}Tc 標識体[^{99m}Tc]**8** および [^{99m}Tc]**11**、[^{99m}Tc]**14**、[^{99m}Tc]**17** は目的とする構造をとることが推測された。^{99m}Tc 標識カルコン誘導体の逆相 HPLC 分析の結果より、その脂溶性には、導入するアルキル鎖の長さや錯体形成部位による影響が認められた。Aβ(1-42)凝集体を用いたインビトロ結合実験から、4 種類の ^{99m}Tc 標識カルコン誘導体は、いずれも Aβ凝集体に対する結合親和性を有することが示された。その結合親和性には、導入するアルキル鎖の長さによる影響が認められた。正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、^{99m}Tc 標識カルコン誘導体は投与後速やかな脳へ移行と、その後の消失を示した。中でも、カルコン誘導体[^{99m}Tc]**17** は、最も良好な脳内放射能推移を示した。Tg2576 マウス脳切片を用いた蛍光染色実験における Re 結合カルコン誘導体の染色結果から、^{99m}Tc 標識カルコン誘導体はアミロイド斑への選択的結合性を有することが示唆された。

研究では、さらにキノキサリンを基本骨格とする ^{99m}Tc 標識プローブの開発を行っており、上記、カルコン誘導体と同様の検討から、^{99m}Tc 標識キノキサリン誘導体の有用性の評価を行った。^{99m}Tc 標識キノキサリン誘導体の合成および評価実験の結果に関しては、別途論文により報告する予定である。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団平成 26 年度研究助成の支援とともに、日本学術振興会科学研究費の研究助成を受けて実施しました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

1) Ono M. et al., *Med Chem Comm*, **6**, 391-402 (2015).
2) Yoshimura M. et al., *ACS Med Chem Lett*, **4**, 596-600 (2013).
3) Han C. et al., *J Am Chem Soc*, **118**, 4506–4507 (1996).
4) Dezutter N. A. et al, *Eur J Nucl Med*, **26**, 1392–1399 (1999).
5) Zhuang Z. P. et al., *Nucl Med Biol*, **32**, 171–184 (2005).
6) Serdons K., et al., *Bioorg Med Chem Lett*, **17**, 6086–6090 (2007).
7) Chen X. et al., *Bioorg Med Chem Lett*, **18**, 1442–1445 (2008).
8) Sagnou M. et al., *Inorg Chem*, **50**, 1295–1303 (2011).
9) Ono M. et al., *ACS Chem Neurosci*, **1**, 598–607 (2010).
10) Ono M., et al., *Bioorg Med Chem Lett*, **20**, 5743–5748 (2010).
11) Oya S. et al., *Nucl Med Biol*, **25**, 135-140 (1998).
12) Ono M. et al., *Bioorg Med Chem*, **17**, 2069-2076 (2009).
13) Ono M. et al., *Biochem Biophys Res Commun*, **361**, 116-121 (2007).

細胞トランジスタを用いた細胞膜ナノ空孔形成の計測



研究責任者　東京医科歯科大学　生体材料工学研究所
バイオエレクトロニクス分野
助　教　　合　田　達　郎

１．はじめに

近年、細胞治療への応用を目指した薬剤送達システムや遺伝子導入技術についての研究が盛んに行われている [1)-3)]。これらは、薬剤や遺伝子を直接がん細胞や腫瘍細胞に送り込んで治療する方法であるが、薬剤を細胞内へ送達するためには細胞膜のバリア性を回避しなければならない。そこで、薬剤や遺伝子を運ぶキャリアとしてナノ材料が多く用いられている [4)-6)]。しかし、ナノ材料が細胞膜に対してどのような障害を与えるのかを正確に測定する方法が確立していない。また、ナノ材料の細胞毒性は、i) 細胞膜に対するもの、ii) 細胞骨格に対するもの、iii) 核に対するものに分類される [7)]。細胞死に至るプロセスの違いを系統的に調べるためにも、細胞に対する作用機構を区別できる新しい測定法の開発が必要である (Fig.1)。

既存の生物学的な細胞膜障害性測定法として赤血球溶血試験・LDH assay・Calcein release assay、細胞毒性測定法として WST-8 assay・Live cell assay が挙げられるが、細胞膜から漏出するバイオマーカーを検出するため、バイオマーカー

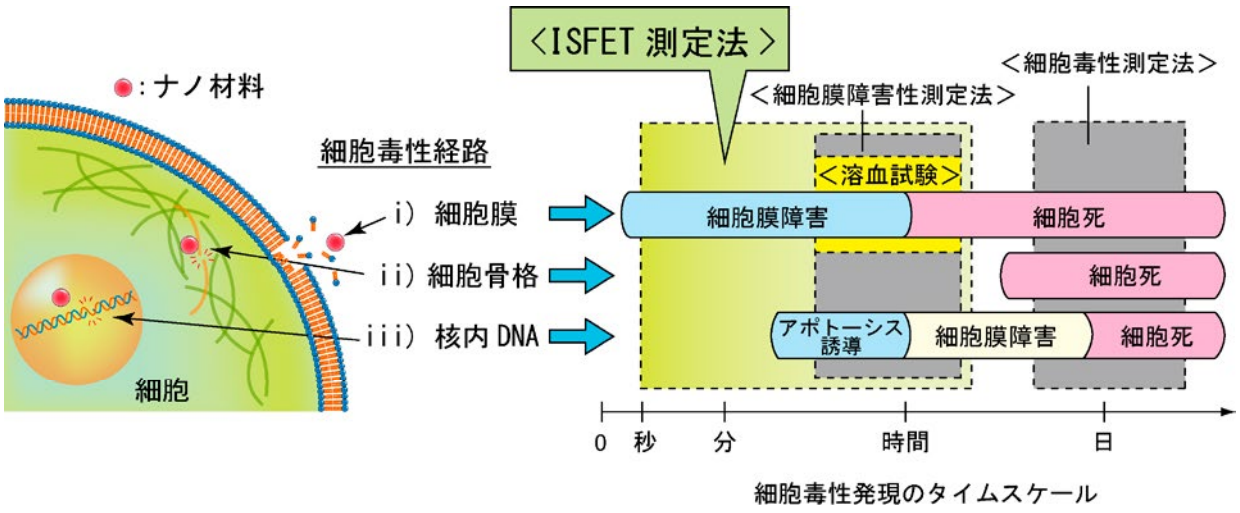


Fig.1　ナノ材料による細胞毒性経路と各測定法の検出可能領域

分子より小さい空孔の検出は不可能である。さらに、既存法は光学検出系と煩雑な前処理が必要である、経時的な膜障害性の測定には応用できない、といった問題を抱えている。

近年、半導体技術を生体分子の認識や細胞の解析に応用したバイオトランジスタを用いることで、高感度・ラベルフリー・リアルタイムな測定法が提案されている[8)-12)]。例えば半導体型 pH センサーである ISFET (Ion-Sensitive Field-Effect Transistor) を用いて、卵母細胞膜上に発現する細胞膜トランスポーター活性のリアルタイム測定を実現したという報告例があり[13)]、バイオトランジスタを用いることで非侵襲的にトランスポーター活性の計測を可能にしている。

そこで本研究では、ISFET を用いた細胞膜近傍微小環境 pH の測定による細胞膜障害性評価法を考案した。指標分子を最小分子であるプロトンにすることで細胞膜障害性測定法としての高感度化を目指した。さらに、ISFET を用いてリアルタイムな細胞膜障害性の評価を行い、細胞が正常な状態から細胞死に至るまでの細胞膜の恒常性を評価することで、従来法には観測できなかった細胞毒性経路の識別を可能とした。

2．実験方法

2.1　ISFET を用いた細胞膜障害性測定系（ISFET 測定法）の構築

細胞外微小環境 pH 測定のために、ISFET/細胞測定システムを新たに構築した（Fig. 2(a)）。ドレイン-ソース間の電流を 0.4 - 0.5 mA、電圧を 0.5 - 1.0 V に調節し、参照電極として Ag/AgCl ペレット電極を用いることでゲート絶縁膜/溶液間の界面電位変化を測定した。ISFET のゲート部分（10 μm × 340 μm）の周辺に、内径 5 mm の円筒ガラスを熱硬化性エポキシ樹脂で固定した（Fig. 2(b)）。Poly-L-lysine でゲート表面を修飾したのち、HepG2 細胞（1 × 10^5 cells）をセンサー上に播種し、37 °C、5% CO_2 条件下で一晩培養した。ISFET

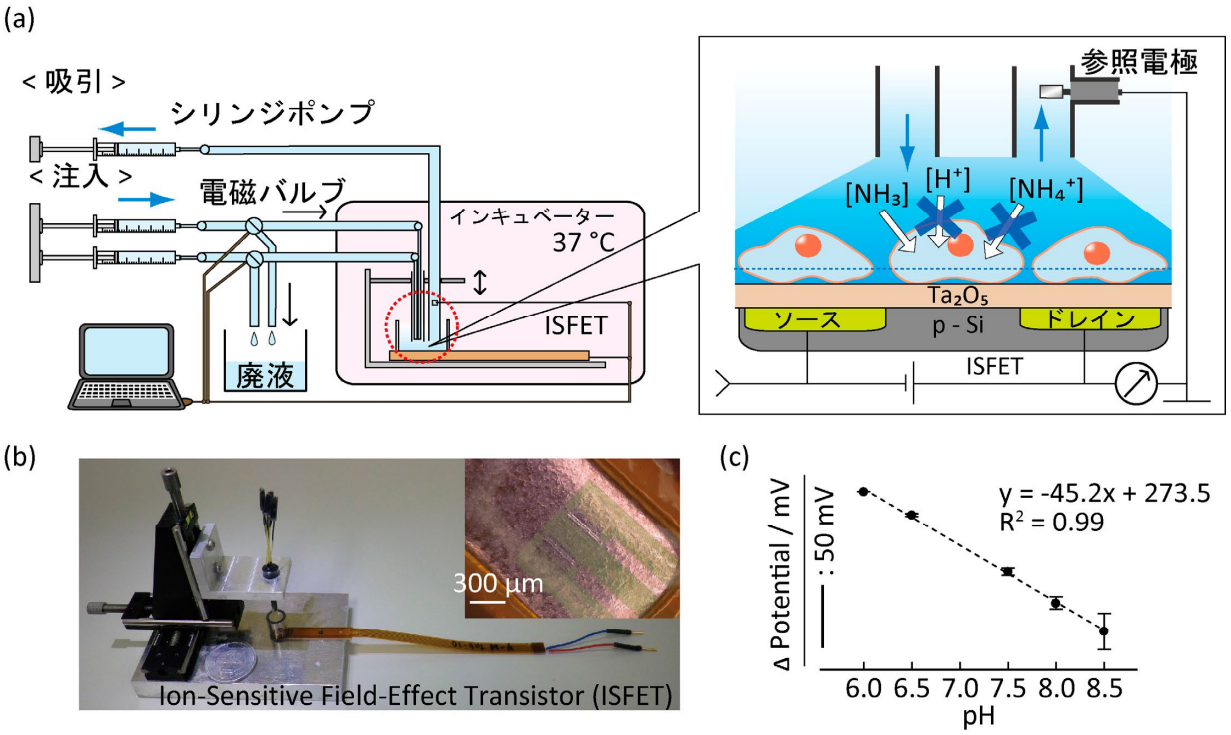


Fig.2　ISFET/細胞系をもちいた細胞膜障害性測定システム。(a) 細胞外 pH 測定システムの概要図、(b) ISFET 写真と細胞存在時の ISFET 表面の写真、(c) 細胞存在下での ISFET の pH に対する電位応答（pH 6.0 – 8.5）

は細胞培養時にも−45.2 mV/pH の電位応答を示した（Fig. 2(c)）。ISFET/細胞測定システムの時間分解能は 0.2 秒、電位分解能は 0.01 mV であり、Δ pH では 2.2×10^{-4} の変化が測定できる。細胞の洗浄および電位の安定化には、BTP buffer (1 mM Bis-Tris-Propane（BTP）、140 mM NaCl、4 mM KCl、1 mM $MgCl_2$、20 mM Sucrose ; pH 7.4) を用いた。BTP buffer はバッファー領域が pH 6.0 - 9.5 と広く、生理学の研究において広く用いられている。NH_4Cl buffer （pH 7.2）には 20 mM Sucrose の代わりに 20 mM NH_4Cl を加えたものを用いた。溶液は 50 - 120 μL/min の流速で細胞に作用させ、溶液を供給するチューブと細胞との距離を約 80 μm とすることで迅速な溶液交換を可能にした。

2. 2　ISFET 測定法による細胞膜障害性評価

化合物の膜障害性を測定する際には BTP buffer に化合物を適当濃度加えた Sample buffer (pH

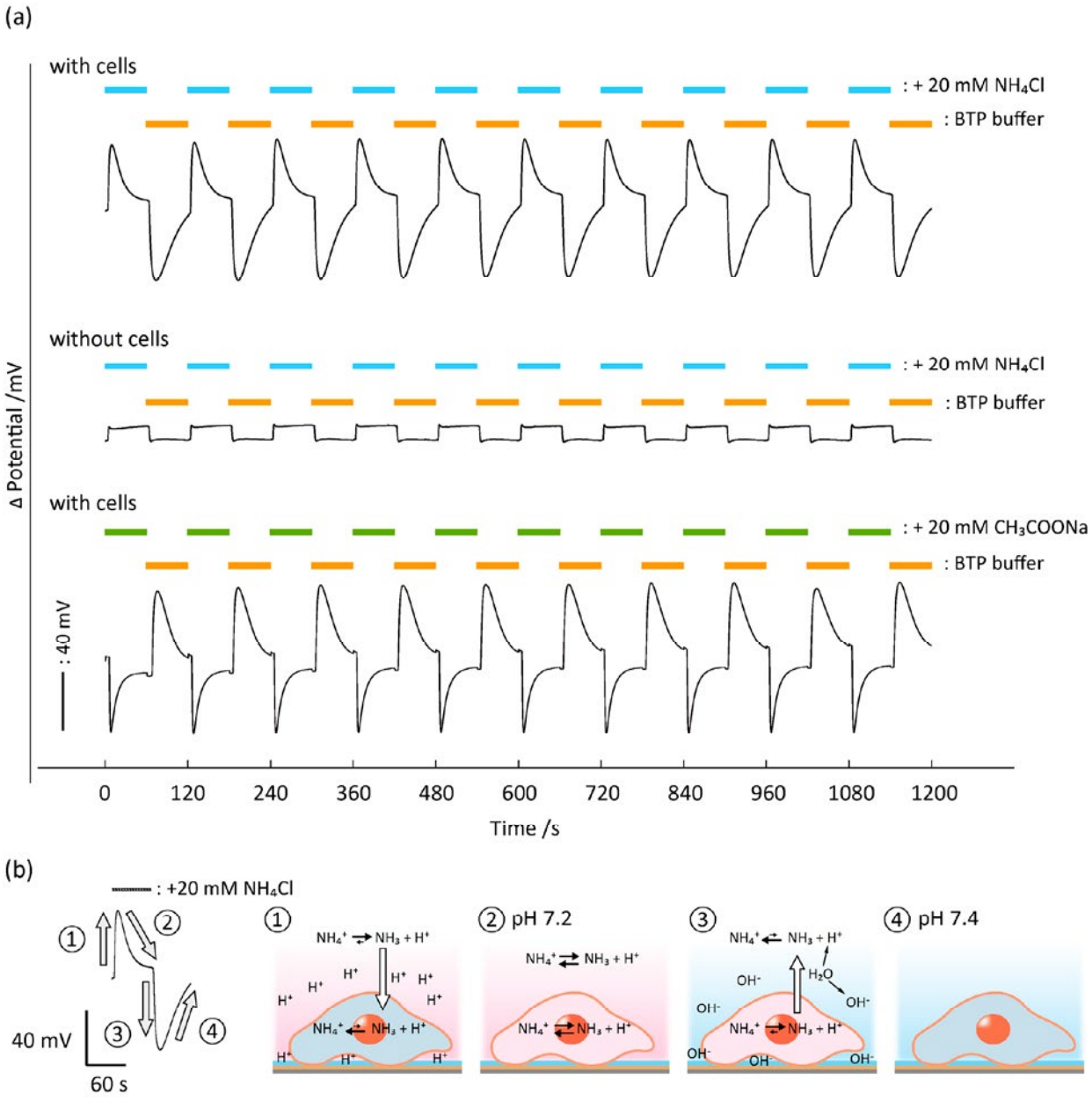


Fig.3　溶液交換による電位変化とその概念図。(a)上段: 20 mM NH_4Cl（細胞有り）、中段: 20 mM NH_4Cl（(細胞なし)、下段: 20 mM CH_3COONa（細胞有り）、 (b)電位変化に関与する物質移動と平衡反応

7.4) を用いた。BTP buffer と NH_4Cl buffer を交互に 1 分間ずつ ISFET 上の細胞に暴露し、細胞内外の pH を一時的に変化させた。溶液を Sample buffer に交換することで、化合物を細胞に作用させた。この測定系では流速 120 μL/min で一定にし、常に細胞周辺を新しい溶液に置換して行っている。測定は 37 °C で行った。比較として従来法の細胞膜障害性試験である赤血球溶血試験を行った。赤血球は日本バイオテストから購入した緬羊脱繊維血液から分離して、溶血試験に用いた。

2.3　従来法による細胞毒性パスウェイの評価

LDH assay は Wako より購入した LDH-Cytotoxicity test Wako を用いて行った。Calcein release assay に用いた Calcein-AM solution は DojinDo より購入した。細胞毒性試験である WST-8 assay ・ Live cell assay を行った。Live cell assay に用いた Calcein-AM solution、また、WST-8 assay に用いた Cell counting kit-8 はともに DojinDo より購入した。アポトーシス検出試験として Caspase-3 assay を行った。Caspase-3 assay は Abcam より購入した。プレートリーダーは TECAN の Infinite 200 PRO を用いた。

3．実験結果と考察

3.1　溶液交換による電位応答

ISFET/細胞測定システムを用いて、1 分間ごとに BTP buffer (pH 7.4) と NH_4Cl buffer (pH 7.2) の溶液交換を行った場合と、BTP buffer (pH 7.2) と CH_3COONa buffer (pH 7.4) の溶液交換を行った場合の電位変化を測定した（Fig. 3(a)）。細胞周辺の溶液を NH_4Cl buffer に交換すると、電位は急激に+50 mV 変化するが 1 分後には NH_4Cl buffer (pH 7.2) の電位に収束する。次に、BTP buffer に溶液を交換すると、電位は−60 mV 変化し、その後 BTP buffer の pH 7.4 の電位に収束する。溶液交換時の特徴的なピークは 10 回の溶液交換を行っても形や大きさに変化はなく、相対標準偏差は

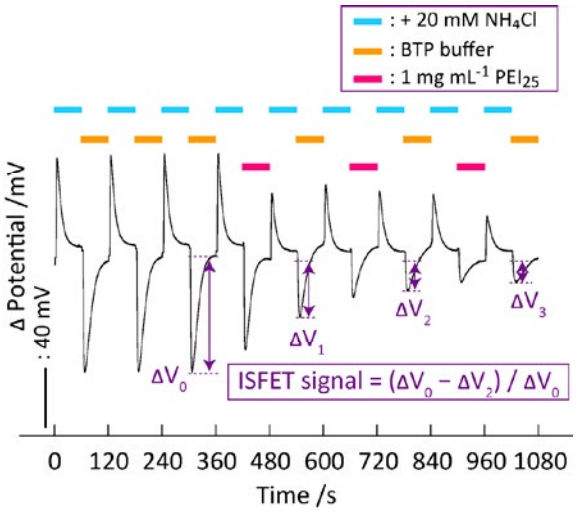


Fig.4　膜障害による溶液交換時の電位変動の縮小

NH_4Cl buffer 添加時のピークで 2.5 % (1.3 mV / 52 mV)、BTP buffer 添加時のピークで 2.5 % (1.5 mV / 60 mV)であり、再現性の高いことが分かった (n = 10)。この特徴的な電位変化は、細胞存在下のみ観察された。また、NH_4Cl の代わりに CH_3COONa を細胞に作用させた場合は、電位応答が反転した（Fig. 3(a) 下段）。

NH_4Cl 溶液は $NH_3 + H^+ \leftrightarrow NH_4^+$ という平衡状態がなりたっており（$Ka = [NH_3][H^+]/[NH_4^+] = 13.05 \times 10^{-7}$ mM at 37 °C）、Fig. 3 で示す溶液交換によって発生する特徴的な電位変化は、NH_3 の細胞膜透過によるものである。まず NH_4Cl を加えた瞬間、NH_3 のみ溶液中から細胞膜を透過し細胞質へ受動拡散する。その結果、細胞外では NH_3 の平衡状態が崩れるため、H^+濃度が上昇する (Fig. 3(b) ①)。細胞内へ NH_3 が充てんされると、細胞内外で NH_3 が平衡状態になるため、細胞外では溶液の pH に安定する(Fig. 3(b) ②)。次に、BTP buffer に溶液交換をすると、細胞内に充てんされた NH_3 が細胞外へ拡散し、再度 NH_3 の平衡状態が崩れるため、H^+濃度が減少する(Fig. 3(b) ③)。細胞外への NH_3 の拡散が終了すると、溶液の pH に安定する(Fig. 3(b) ④)。このようにして、NH_4Cl の溶液交換によって大きな電位変化を誘導することができる。一方、CH_3COONa を溶液交換した場合、細胞膜を透過できる分子は CH_3COOH であるため、

NH_4Cl とは逆の振る舞いになる（$CH_3COOH \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+$）。以上、溶液交換に伴う電位応答の変化は酸・塩基解離反応と物質移動から説明できる。溶液交換にともなう過渡的な pH 変動では、細胞膜イオントランスポーターによる影響は無視できるため、本手法は細胞膜のイオンバリア性に焦点を当てることができる。

3.2　ISFET 測定法による化合物の細胞膜障害性測定

溶液交換によって発生する過渡的なピークは、細胞膜のバリア性によって生じる。そこで、化合物による細胞膜障害や細胞毒性によって細胞膜のバリア性が損なわれた場合、このピーク変化を観察することで細胞膜バリア性を評価できると考えた。そこで、NH_4Cl buffer を曝露したのち、強い膜障害性をもつカチオン性高分子として知られる 1 mg mL^{-1} polyethylenimine (Mw: 25,000) (PEI_{25}) 溶液を細胞に対して曝露したところ、溶液交換時の電位変動が小さくなった（Fig. 4）。こ

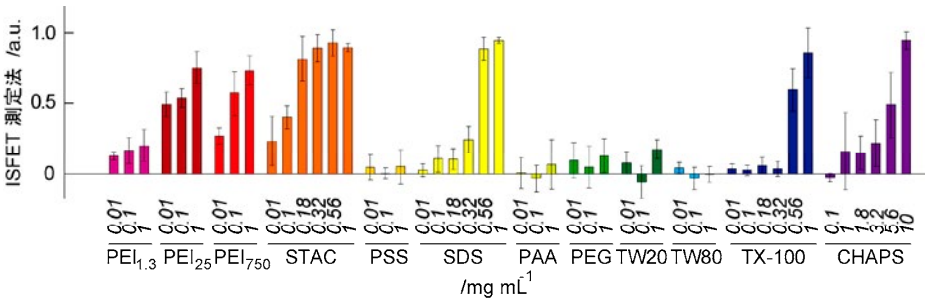


Fig.5　ISFET 測定法の各化合物測定結果

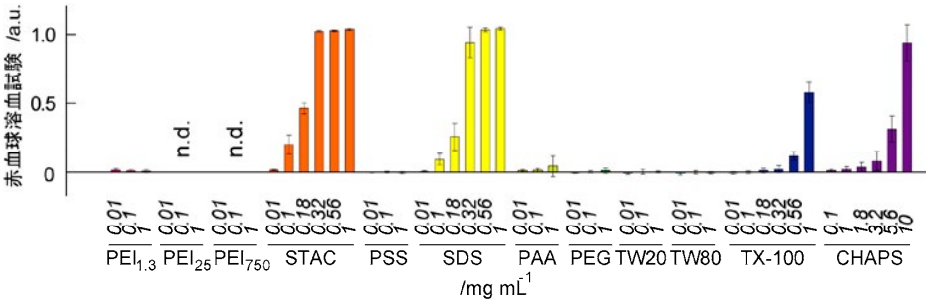


Fig.6　赤血球溶血試験の各化合物測定結果

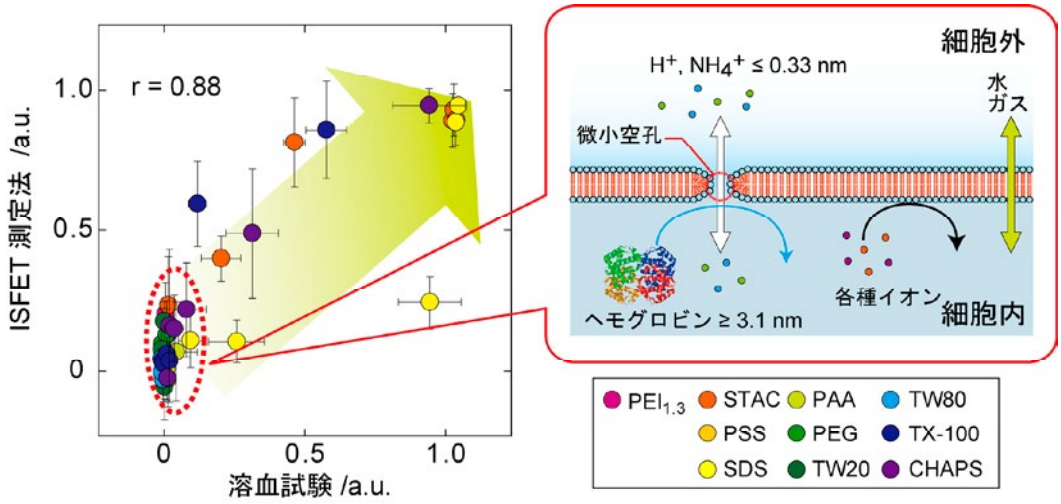


Fig.7　ISFET 測定法と溶血試験の相関図

れは、PEI_{25} によって細胞膜が傷ついたことで、NH_4^+や H^+などのイオン透過性が増大し、平衡反応の乱れが縮小したことに起因する。電位変動率 $[(\Delta V_0 - \Delta V_2)/\Delta V_0]$ を指標とし、各種化合物に対する細胞膜障害性を評価した（Fig. 5）。カチオン性高分子として polyethylenimine (Mw: 1300) ($PEI_{1.3}$)、PEI_{25}、polyethylenimine (Mw: 750000) (PEI_{750})、Trimethylstearylammonium chloride (STAC)、アニオン性高分子として Polysodium 4 - styrenesulfonate (PSS)、Sodium dodecyl sulfate(SDS)、Polyacrylic acid (PAA)、非イオン性高分子として Polyethylene glycol (PEG)、

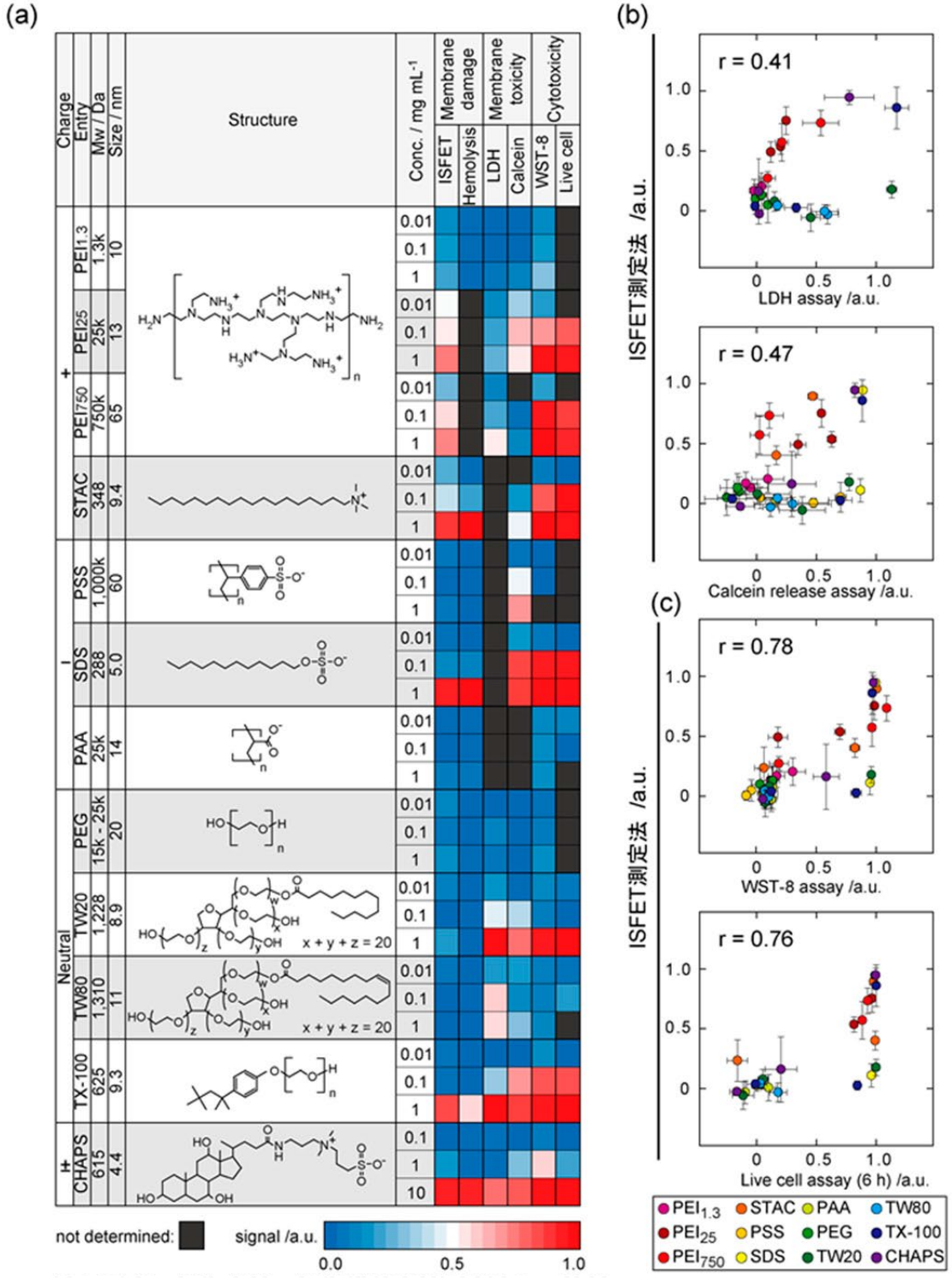


Fig. 8 ISFET 法と既存の細胞毒性・細胞膜障害性測定法との比較

Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (TW20)、Polyoxyethylene sorbitan monooleate (TW80)、Polyethylene glycol mono-p-isooctylphenyl ether (TX100)、 両イオン性高分子として 3 - [(3 - cholamidopropyl) dimethyl - ammonio] propanesulfonate (CHAPS)を用いた。結果、PEG や PAA のような一般的に細胞毒性の低いといわれている化合物においては膜障害性が見られなかった。一方、PEI、STAC、SDS、TX-100、CHAPS などの細胞毒性をもつとされる化合物においては濃度依存的に電位変動が観測された。この ISFET 測定法の測定時間は合計で 20 分間（化合物の作用時間：2 分間）であり、リアルタイムな測定が可能である。さらに水溶性化合物であれば測定が可能であることを示した。

3.3　既存の赤血球溶血試験法との比較

ISFET 測定法を検証するため、従来法である赤血球溶血試験をおこなった（Fig. 6）。赤血球溶血試験においても STAC、SDS、TX-100、CHAPS においては濃度依存的にヘモグロビンの漏出が検出された。その他の化合物では、溶血性は見られなかった。PEI_{25}、PEI_{750} においては赤血球が凝集してしまったため、正確な測定を行えなかった。

ISFET 測定法と溶血試験の結果と比較し、相関係数を求めたところ、r = 0.88 と高い相関性が示された（Fig. 7）。特に、溶血試験でほとんど違いの識別できない領域（Fig. 7 赤丸内のプロット）においても ISFET 測定法では識別可能であることが分かった (例：$PEI_{1.3}$)。これはそれぞれの測定法の指標であるヘモグロビンの流体力学半径 (≥ 3.1 nm)と、H^+や NH_4^+イオンの水和半径 (≤ 0.33 nm)の差に起因する測定感度の差である（Fig. 7）[14)、15)]。つまり、ISFET 法では、従来法では見落とされていたナノメートルサイズの空孔をも検知することが可能であることがあきらかとなった。以上、ISFET 測定法は、アッセイ時間の短縮（約 2 時間→20 分間）、様々な化合物への適応性、高感度膜障害測、が可能であった。アニオン性界面活性剤である SDS（Fig. 7 の黄色プロット）は低濃度領域において、細胞膜のバリア性を損なうことなくヘモグロビンの漏出を引き起こす（疑陽性）ことが示された。

3.4　既存の細胞毒性・細胞膜障害性測定法との比較

培養細胞を用いた従来法においても各化合物の細胞膜障害性・細胞毒性を測定した（Fig. 8）。細胞膜障害性測定法として LDH assay、Calcein release assay をおこなった。LDH assay はアニオン性化合物が測定溶液に反応してしまい、測定が正確に行えなかった。さらに、溶血性を示さない TW80 は LDH の漏出を引き起こし、擬陽性を示すことがわかった。また、既存法はカチオン性高分子（PEI_{25}、PEI_{750}）に対して感度が低く、ISFET 法は SDS、TX-100

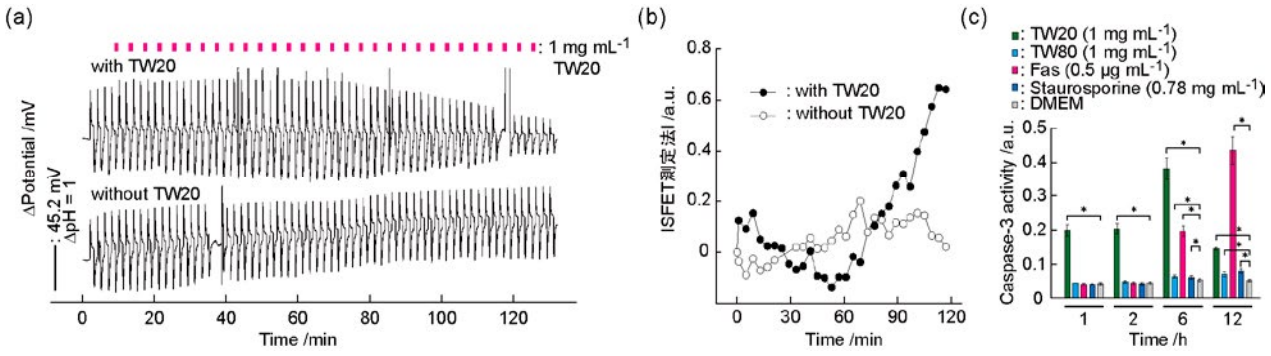


Fig.9　TW20 のアポトーシス誘導による膜障害性の検出. (a) ISFET 測定法の長時間測定結果、(b)ISFET 測定法のピーク強度プロット結果、(c) カスパーゼ-3 アッセイ結果

に対して感度が低かった。結果、ISFET 測定法と既存法との相関係数はそれぞれ r = 0.41 (vs LDH)、0.47 (vs Calcein release assay)と低かった（Fig. 8(b)）。

細胞毒性測定法として WST-8 assay, Live cell assay をおこなった。これらの測定法は測定時間が最低 6 時間と長いため、化合物の毒性を明確に識別することができるが、毒性の強弱を細かく識別するのが難しい。ISFET 測定法との相関係数はそれぞれ r = 0.78 (vs WST-8 assay), 0.76 (vs Live cell assay)である。各測定法の曝露時間は、ISFET 測定法が 2 分間、溶血試験は 20 分間、LDH assay, Calcein release assay は 15 分間、WST-8 assay, Live cell assay は 6 時間である。ISFET 測定法以外のアッセイはエンドポイントアッセイであることから細胞死の種類を識別できなかったが、ISFET 測定法はリアルタイム測定をおこなうことができるため、膜障害を引き起こすまで時間を比較することで細胞死の種類を識別することができた。

3.5　TW20 のアポトーシス誘導による細胞膜崩壊の検出

ISFET 測定法、溶血試験では TW20 の細胞膜障害性が検出されなかったのに対し、その他のアッセイにおいては細胞毒性が検出された。TW20 はアポトーシスを誘導することが知られており [16]、結果として細胞膜組成が変化したものと推察される。実際、赤血球は核を持たないため、溶血試験では TW20 の膜障害性は検出されなかった。ISFET 測定法は測定時間が短いため、細胞膜障害性を示さなかったと考えられる。実際、TW20 の細胞膜障害性を調べるために ISFET 測定法の測定時間・曝露回数を増やした測定を行ったところ、測定開始から約 1 時間後からピーク強度は減少し、細胞膜障害性が生じることがわかった（Fig. 9(a-b)）。TW20 を曝露しない場合は、ピーク強度は変化せず、細胞に膜障害性は見られなかった。カスパーゼ-3 アッセイをおこなったところ、TW20 によるアポトーシス誘導は 1 時間後には発現しており、コントロールとして用いた Fas やスタウロスポリンよりも早いことがわかった（Fig. 9(c)）。また、TW80 はアポトーシスを誘導しないことがわかった。

４．まとめ

本研究では ISFET を用いた新たな細胞膜障害性測定法を確立した。この測定法は短時間測定にも関わらず、溶血試験よりも高感度であり、ナノ材料の細胞毒性評価に有効であると考えられる。さらに細胞に対して非侵襲でリアルタイムな測定であり、従来法では識別できなかった細胞死の種類を識別可能であることがわかった。また、十数個の細胞に相当する微小なゲート電極上に存在する局所的な細胞応答を測定するため、センサーを小型化・集積化することで細胞集団中の単一細胞の多並列同時計測が見込まれ、新たな細胞毒性評価系ツールとして化粧品や創薬における高感度・ハイスループットな化合物毒性スクリーニング法としての応用も考えられる。

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援助のもとで行われました。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

1) Allen, T. M. & Cullis, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* **303**, 1818-1822 (2004).
2) Gao, X. H., Cui, Y. Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K. & Nie, S. M. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **22**, 969-976 (2004).
3) Kam, N. W. S., O'Connell, M., Wisdom, J. A. & Dai, H. J. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents

for selective cancer cell destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11600-11605 (2005).

4) Panyam, J. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 329-347 (2003).
5) Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* **53**, 283-318 (2001).
6) Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release* **65**, 271-284 (2000).
7) Wu, Y. L. *et al.* Biophysical Responses upon the Interaction of Nanomaterials with Cellular Interfaces. *Accounts of Chemical Research* **46**, 782-791 (2013).
8) Lehmann, M. *et al.* Non-invasive measurement of cell membrane associated proton gradients by ion-sensitive field effect transistor arrays for microphysiological and bioelectronical applications. *Biosensors and Bioelectronics* **15**, 117-124 (2000).
9) Lehmann, M. *et al.* Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET. *Biosens Bioelectron* **16**, 195-203 (2001).
10) Schöning, M. J. & Poghossian, A. Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs). *The Analyst* **127**, 1137-1151 (2002).
11) Sakata, T. & Miyahara, Y. Noninvasive monitoring of transporter-substrate interaction at cell membrane. *Anal. Chem.* **80**, 1493-1496 (2008).
12) Brittinger, M. & Fromherz, P. Field-effect transistor with recombinant potassium channels: fast and slow response by electrical and chemical interactions. *Applied Physics A* **81**, 439-447 (2005).
13) Schaffhauser, D. F. *et al.* An Integrated Field-Effect Microdevice for Monitoring Membrane Transport in Xenopus laevis Oocytes via Lateral Proton Diffusion. *Plos One* **7**, 8 (2012).
14) Winzor, D. J. & Wills, P. R. Allowance for thermodynamic non-ideality in the characterization of protein self-association by frontal exclusion chromatography: hemoglobin revisited. *Biophysical Chemistry* **104**, 345-359 (2003).
15) Nightingale, E. R. Phenomenological Theory of Ion Solvation - Effective Radii of Hydrated Ions. *J Phys Chem-Us* **63**, 1381-1387 (1959).
16) Eskandani, M., Hamishehkar, H. & Dolatabadi, J. E. N. Cyto/Genotoxicity Study of Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20). *DNA and Cell Biology* **32**, 498-503 (2013).

発表論文

1) Schaffhauser, D., Fine, M., Tabata, M., Goda, T., Matsumoto, A., Miyahara, Y. Measurement of Rapid Amiloride-Dependent pH Changes at the Cell Surface Using a Proton-Sensitive Field-Effect Transistor. *Biosensors* **6**, 11, (2016)

2) Imaizumi, Y., Goda, T., Matsumoto, A., Miyahara, Y. Non-destructive analysis of cell membrane injury using proton-sensitive field-effect transistor. *Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology* 2016, Kanazawa, Japan, June, (2016)

3) Imaizumi, Y., Goda, T., Toya, Y., Matsumoto, A., Miyahara, Y. Oleyl group-functionalized insulating gate transistors for measuring extracellular pH of

floating cells. *Science and Technology of Advanced Materials*, In press, Doi: 10.1080/14686996.2016.1198217 (2016)

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



研究責任者　京都大学　白眉センター
特定准教授　　西　山　雅　祥

1. はじめに

代表的なモデル生物である大腸菌は、生命活動を営むため、わずか 1 μm 程度しかない小さな体のなかに約 4,000 種類ものタンパク質を発現させている。実際の発現量は数個～数千個とばらつきが多いとはいえ、そのちっぽけな体のなかはタンパク質やそのほかの生体分子でいっぱいに満たされていることになる。ただし、細胞内に含まれる物質のうち、約 70%は水である。細胞内の水は、タンパク質の周囲をぐるりと取り囲んでいる。水分子は、タンパク質の表面や内部で水素結合を形成することで複雑な立体構造を形成し、酵素活性をはじめとする生命活動に必須な化学反応を生みだしている。

では、このタンパク質と水分子の相互作用が変わるとどうなるだろうか？ おそらく、タンパク質の構造や機能も変化するに違いない。うまく使えば、細胞の生命活動もコントロールできるかもしれない。そこで着目したのが高圧力技術である

高圧力は、化学分野にとってなじみの深い技術である。人工ダイヤモンドをはじめとする新物質の合成や溶媒和などの研究分野に加えて、タンパク質構造の研究にも利用されてきた [1]。私たちが日々生活している大気圧環境では（1 気圧＝0.1 MPa）、タンパク質は分子間相互作用により複合体を形成し、酵素活性をはじめとする機能発現を行っている（図 1）。これが 100 MPa 程度の圧力環境下では、おもにタンパク質表面の水和状態が変化し、タンパク質分子間の結合に寄与する静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合などが弱められてしまう [2]。その結果、オリゴマーが解離しはじめる。さらに 500 MPa 以上の圧力になると、タンパク質内部の隙間（キャビティー）にまで水分子が侵入してしまうため、立体構造は崩壊し機能活性も失われてしまう。研究責任者らは、100 MPa 程度の圧力領域において、タンパク質は変性しないまでも構造や機能が変化することに着目した。

ここで、研究責任者らが注目する 100MPa 程度の圧力について考えてみたい。大気圧を pN と nm を単位として記述すると、0.1 MPa = 0.1pN nm^{-2} となる。仮にタンパク質分子間の結合部位の面積を～1 nm^2 とすると、この面積には 0.1 pN の力が加わることになる。それに対して、100MPa の静水圧環境では 100pN の力と計算されるので、確かに分子間の結合力は弱まり、分子構造や機能活性は変わりそうである。

従来までの研究では、高圧力技術を組み合わせる検出法として、紫外可視分光や蛍光分光、NMR といった分析法を組み合わせる事例が多かった。

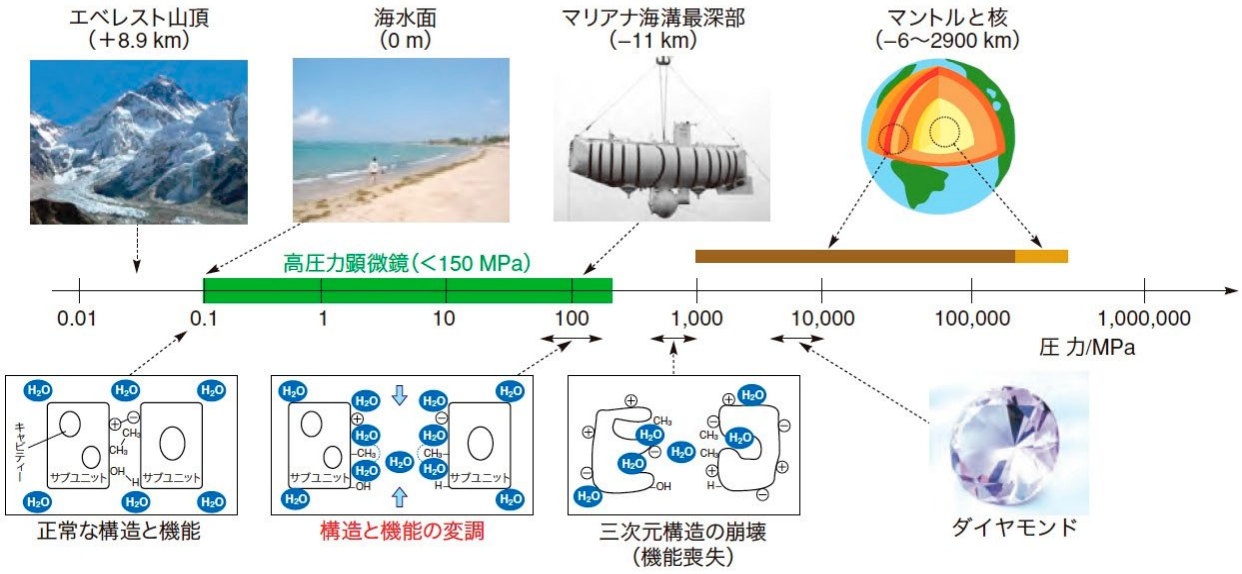


図1　高圧力とタンパク質構造（文献 2 から転載）

したがって、タンパク質の懸濁液を測定対象として実験を行うことになる。しかしながら、生き物は多様である。また、タンパク質分子においても個々の分子の動態は構造により一意に決まるのではなく、異なる状態間をダイナミックに遷移していることが知られている。タンパク質懸濁の液には膨大な数の分子集団が含まれるため、検出されるのは分子集団の平均値となる。したがって、得られた結果は個々の分子のふるまいがかき消されてしまっているので、ダイナミックに変化するバンズに動態を演繹するのは非常に困難を伴ってしまうことになる。もし、なんらかの形で分子集団にトリガーをかけて、全ての分子を同時に駆動させることが可能ならば、ある程度の情報を得ることは可能であろう。しかしながら、多くの場合、トリガーをかけることも困難であるのが実情である。

そこで研究責任者は光学顕微鏡に注目した。他の分光手法とは異なり、光学顕微鏡を用いると水溶液中に分散した細胞や分子を個別に観察することは原理的に可能となる。研究責任者は高圧力下にある分子や細胞といった活性のある生物試料を高い解像度で観察できる新しい分析手法の開発に取り組んだ。

２．高圧力顕微鏡の設計

光学顕微観察用の高圧力チャンバーは、当然ながらこれまでから報告例はある。しかしながら、後述するようにその多くは耐圧性能を確保するため顕微鏡としての光学性能を犠牲にしてきた経緯がある。これは高圧容器一般に言えることだが、観測窓（および，その周辺）は加圧時に破損しやすい場所であり、装置全体の耐圧性能を左右する重要な部位となっている[3)]。設計者にとっては腕の見せ所でもあり、泣き所でもある。顕微観察用の高圧力チャンバーの場合、観測窓とその周辺の制約はとりわけシビアであると言えよう。実はその要因を生み出しているのは顕微観察の要となる対物レンズなのである。

対物レンズは光学顕微鏡の中でも最も重要な部品である。多くの生物顕微鏡用の対物レンズは通常のカバーガラス（厚さ~0.17mm）に近接させて使うことを前提に設計されており、その作動距離（対物レンズの先端からカバーガラス表面（外側）までの長さ）は 1mm 以下のものが多い。そのため、カバーガラスを高圧力チャンバーの観察窓として考えると、窓剤自体の強度不足に加えて観察窓をチャンバー外部から支持することの困難さにも直面することになる（観察窓を支持する

部位が対物レンズと干渉する)。要するに、ほとんどの生物用顕微鏡の対物レンズは高圧力チャンバーと相性が悪いことになる。選択肢はそう多くはないので、観察時の光学性能を満たす対物レンズにあわせて、顕微観察用の高圧力チャンバーをデザインすればよい。選定条件として，1) 作動距離が長く，2)（少なくとも）カバーガラスよりも厚い窓剤に対応可能であり, 3) 開口数もそれなりに高い、などが挙げられる。

このような状況において、研究責任者は CFI S プランフルオールシリーズの 40 倍対物レンズ（ELWD ADM40×C, NA=0.60,WD=3.6-2.8 mm,カバーガラスの厚み=0-2 mm,ニコン）を選択した（ちなみに，オリンパスからも同様の対物レンズは市販されている)。光学窓の厚みを 0~2 mm までの範囲で自由に選択可能であり、作動距離も 3 mm 程度確保できる。開口数については十分とは言えないものの、十分に明るく光れば蛍光観察も可能である。この対物レンズの内部には位相リングが内挿されており、細胞の形態観察などには多用される位相差観察も実施できる。

この対物レンズの選択については特に目新しさはないかと思われる。何故なら過去の研究においても似たような対物レンズが採用されてきたからである。しかしながら、これまで発表されてきた高圧力チャンバーでは、高圧力容器の窓剤としてよく採用されている強度の高い材質（ダイヤモンド（*ne* =2.424)、サファイヤ（*ne* =1.771)、石英（*ne* =1.458)）が使われることが多かった。これらの材質の光学基板（厚さ 1 mm）にビーズ（直径 0.2 μm）を固定し上述の対物レンズを使ってその蛍光像を取得し、通常のスライドガラスを使った観察結果と比較した。その結果、観察時の波長領域によって異なるので一概には言えないものの、概してダイヤモンドでは解像度が顕著に低下し、またサファイヤや石英においても解像度が少し低下した。これは、通常の対物レンズはカバーガラスやスライドガラス（*ne*=1.515~1.530）を前提として設計されているため、屈折率の違いが結像能の低下を招いているのである。ちなみに、対物レンズの開口数が高くなるほど、両者の屈折率のミスマッチが顕著に解像度を低下させてしまう。したがって、観察に必要な解像度を考慮した上で、光学基板の屈折率や厚さ（厚みがますと対物レンズの設計値からのズレが顕著となる）を選択する必要がある。研究責任者はこれまでから光学顕微鏡の開発に従事してきたこともあり、耐圧性能よりも光学性能を優先し、今回は対物レンズとの相性が最も良いガラス基板（BK7,*ne*=1.519）を光学窓に採用した。

３． 高圧力顕微鏡の装置構成

図２に研究責任者らが開発した顕微観察用の高圧力チャンバーの断面図と写真を示す [4-5]。チャンバーはニッケル合金（Hastelloy C276）を用いて製作し(笹原技研、京都)、本体(60×50×20 mm)と照明(コンデンサー)側のウィンドウ支持台(φ=20 mm,*t*=5 mm）から構成されている。ウィンドウ支持台をねじ込むことで、O-ring（P10）とバックアップリング（PEEK）で簡便に圧力シールを施せる仕様とした（注記：バックアップリングは無くても可)。加圧装置などをチャンバー本体につなげるため高圧配管の接続ポートを２つ設けた。

高圧力チャンバー内を観察するために Poulter 型の高圧光学窓を設けた [3]。対物レンズ側の開口径は 1.5 mm、テーパー角は 76°、深さは 2.5 mm、コンデンサー側の開口径は 2 mm、テーパー角は 67°、深さは 4 mm とした（図２)。これらの開口部には、ガラス製（BK7）の光学窓（対物レンズ側，φ=6 mm， *t*=1.5 mm，コンデンサー側，φ=6 mm，*t*=2.0 mm，笹原光学，京都）をエポキシ系樹脂で固定した。光学特性として、チャンバー中央部では、対物レンズ側の開口数は NA=0.60、コンデンサー側は NA=0.55 となる。このように両側の開口数を拡げたことで、従来までの高圧力チャンバーでは難しかった位相差像の取得も可能にした。

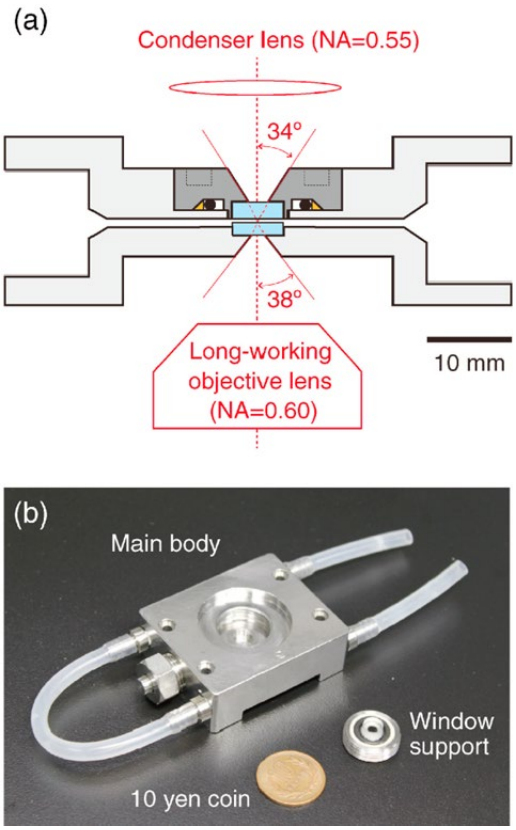


図2 光学顕微観察用の高圧力チャンバーの断面図（a)と写真(b)（文献 6 から転載）

高圧力チャンバーの内容積は~50μL 程度であり、光軸に沿って約 0.2 mm の隙間をもうけてある。この隙間を利用すれば、カバーガラスの小片（ダイヤモンドペンで~3 mm 四方に切断）と両面テープを使って、チャンバー内にフローセルを構築できる。これにより、通常の生体試料の調整の際によく行う緩衝液（バッファー溶液）の交換作業を行える。以前に実施した ATP 合成酵素 F_1-ATPase の回転計測では [5-6]、Ni^+-NTA で修飾したガラス小片でフローセルを構築して、F_1-ATPase を流し込みしばらく待ち、その後、溶液交換を行うことで未吸着の F_1-ATPase を取り除くことができた。このように高圧力チャンバー内部で溶液交換を繰り返すことにより、観察に適した実験系を構築できるのが重要な点と言えよう。なお、フローセルを構築しない場合は、コンデンサー側の窓剤を厚くして水溶液の厚さを薄くすることで（現時点で~50 μm を達成）バックグラウンドを下げることもできる。顕微観測用の高圧力チャンバーにもとめられるのは耐圧性能や開口数といった基本スペックのみではない。観測対象をチャンバーに封入してフタをしめるだけではなく、チャンバー内でサンプルを調整し、本当に見たい現象をより見やすく配置させることが重要なのである。

研究責任者らが開発した高圧力顕微鏡の概念図と写真を示す（図 3a,b)。装置は研究対象となるサンプルを封入し圧力をかける高圧機器と光学顕微鏡からなる。前者の機器は、顕微観測用の高圧チャンバー（図 2, 3b)、圧力変換器（セパレーター）（図 3c)、加圧装置（図 3d）から構成される。

まず、加圧装置として、蒸留水を圧力媒体として用いる小型高圧ハンドポンプ（HP-150，シンコーポレーション）を用いた。ハンドポンプの吐出要量は 1 ストロークあたり約 500 μL であり、最大 150 MPa まで使用できる。蒸留水の静水圧は圧力ゲージ（PG-2TH，Max 200MPa，共和電業）と表示器（WGI-400A，共和電業）で計測した。これらの加圧装置は防振台から分離して設置し、コイル状に丸めた長い 1/16 インチ高圧配管でセパレーターに連結することで、ポンプ操作の度に顕微鏡に機械振動が伝わるのを防いだ。

次に、セパレーターを搭載させることで、圧力ライン内に充填するバッファー溶液の総量を減らした。というのも、タンパク質や細胞などの生体試料の実験では pH やイオン強度などをはじめとする溶液組成の調整が必要不可欠であり、実験内容に応じて頻繁に交換しなければならない。時として高価な試薬を使うことも考慮すると、効率的（経済的）な実験系の構築が望ましいと言えよう。図 3c にセパレーターの写真を示す。セパレーター本体は円筒形状（SUS630（熱処理後に加工)、ϕ=50 mm, L=94mm）であり、その内部は厚さ 0.2 mm のテフロン製のキャップで 2 つの空間に分離してある（図 3a)。キャップの内部はバッファー溶液、外部は蒸留水で満たされている。加圧時には蒸留水がセパレーターへと流入し、テフロンキ

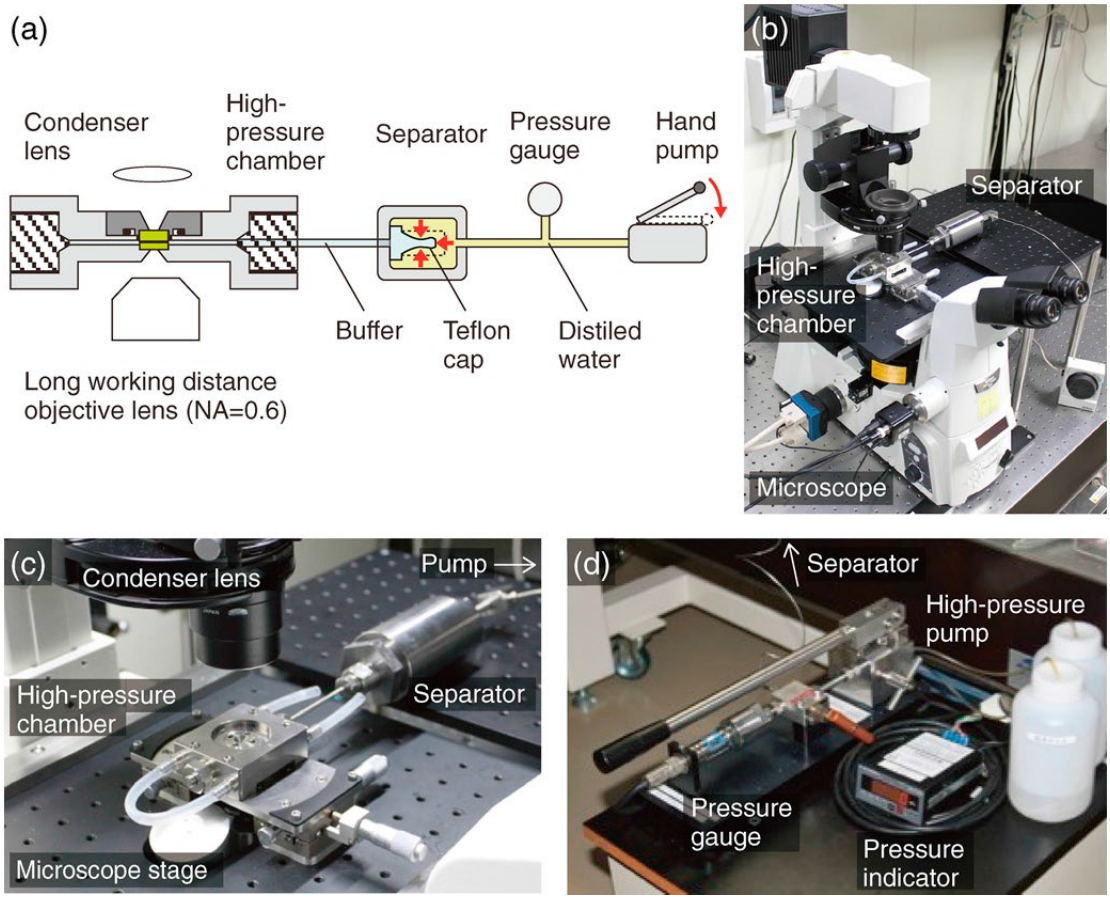


図3 高圧力顕微鏡.（a）装置構成の概念図.（b）装置の全体像.（c）高圧力チャンバーとセパレーター.（d）ハンドポンプと圧力計.（文献 6 から転載）

ャップの変形を介してバッファー溶液の圧力へと適切に変換される（図 3a）。高圧容器内に充填されるバッファー溶液の大部分はテフロンキャップ内に存在するため、実験時には~7 mL 程度のバッファー溶液を毎回用意すればよいことになる。

これらの高圧機器を市販の倒立型電動顕微鏡（Ti-E，ニコン）と組み合わせて、防振台（AS-II 1809TM，日本防振工業）に据え付けた[4–5]。高圧力チャンバー内部の観察には、上述の長作動距離の対物レンズ（ELWD ADM40×C，ニコン）を用いた。高圧力チャンバーの固定と操作を自由に行うため、チャンバーの位置決めを行える自作ステージを作製した。この光学顕微鏡にＣＣＤカメラ（WAT-120N+，撮像素子 1/2 インチ，WATEC）を搭載させると、高圧チャンバー内の 150×100 μm 程度の領域を録画できた。当然ながら、対物レンズとカメラの間に中間変倍レンズなどを内挿することで倍率は変更できる。チャンバーを XY 方向に動かすことで観察場所は変えることはできるが、チャンバー開口部の機械的な制約により位相差観察が可能な範囲はおおよそ直径 700μm 程度であった。

４．高圧力顕微鏡の性能評価

これまで開発してきた装置の高圧容器としての性能評価を行った。まず、高圧力チャンバー内に蒸留水を充填し、ハンドポンプの圧力上限値となる 150 MPa まで加圧した所、圧力漏れが生じることなく、長時間にわたって安定して高圧力環境を維持できた。この耐圧性能は、地球上で最も深い場所である太平洋のマリアナ海溝チャレンジャー海淵最深部（10,924 m，日本の海上保安庁の観測船による測定）の静水圧~110 MPa よりも高い値となっている。つまり、JAMSTEC が保有する

有人潜水艇しんかい 6500 や、無人潜水艇かいこうなどにより深海底から採取された微生物を対象にして、生息環境を概ね実験室で再現できることになる[7]。

次に、光学顕微鏡としての性能評価を行った。高圧力チャンバーの観測窓に直径 1 μm のビーズを吸着させ、圧力を変化させながらその像を取得した。加圧による高圧力器具の変形に伴い、結像位置が変化した。ただし再現性がある事から、

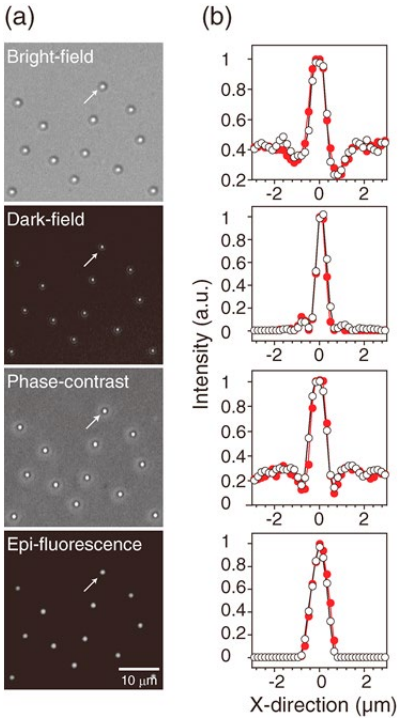


図4　高圧力顕微鏡の解像度評価。(a)100MPa 圧力条件下での各種顕微観測像。(b)ビーズの光強度プロファイル（●, 100MPa, ○, 0.1MPa）。図 a において矢印で示したビーズを画像解析し、ピーク強度で規格化を行った。

あらかじめ予測される位置にフォーカスをあわせておくことで、圧力変化直後から画像を取得できた。さらに、加圧時における結像能を精査するため、100 MPa でビーズの各種観察像を取得した（図 4a)。矢印で示したビーズの強度プロファイルをもとめたところ、常圧力下の結果とほぼ一致した（図 4b)。これは、研究責任者らが開発した顕微鏡の結像能は圧力値に依存しないことを意味する。

５．高圧力下での微小管の重合・脱重合反応イメージング

冒頭でふれたように、高圧力をかけると、一般にタンパク質間の相互作用が弱まることが知られている。それでは「百聞は一見に如かず」との諺が示すように、開発した高圧力顕微鏡を利用して、「見る」ことは可能だろうか？タンパク質モノマーの大きさはせいぜい 10nm 程度でしかなく、現状の装置では分子構造のわずかな変化をみるのは簡単ではない。そこで研究責任者らは、代表的な細胞骨格である微小管に着目し、高圧力顕微鏡を利用して 2 つの実験を行った。

微小管は全ての真核生物に存在する細胞骨格であるチューブリン分子間の非共有結合により数珠つながりに結合することで、直径約 25 nm の細長い管状のフィラメント構造を形成している。その長さは、(精製した系であれ, 細胞内であれ) 数十マイクロメートルにもおよぶため、比較的簡単に顕微鏡下で観察できる。つまり、高圧力下で分子間相互作用が弱まるのであれば、そのフィラメント長の変化として検出できるはずである。現に Salmon らは加圧時に卵母細胞の紡錘体が消失することを観察し、減圧後に元に戻る様子を報告している[8]。生細胞では無く *in Vitro* の系を用いれば、微小管構造に対する圧力の影響をより直接的に検証できるだろう。

まず、豚脳から精製したチューブリンで微小管を調製した。あらかじめ、高圧力チャンバーの窓剤にキネシン分子を吸着させておき、代表的な有糸分裂阻害剤（10μM paclitaxel）と 100 μM AMP-PNP 存在下で微小管を固定した[9]。これにより同一微小管のフィラメント構造を追跡できるようになる。常温常圧力環境下では、paclitaxel により微小管の脱重合反応は抑制されるため、フィラメント長に大きな変化は見られなかった。しかしながら、150 MPa の圧力下において、同じ微小管の蛍光観察を実施したところ、微小管の両端

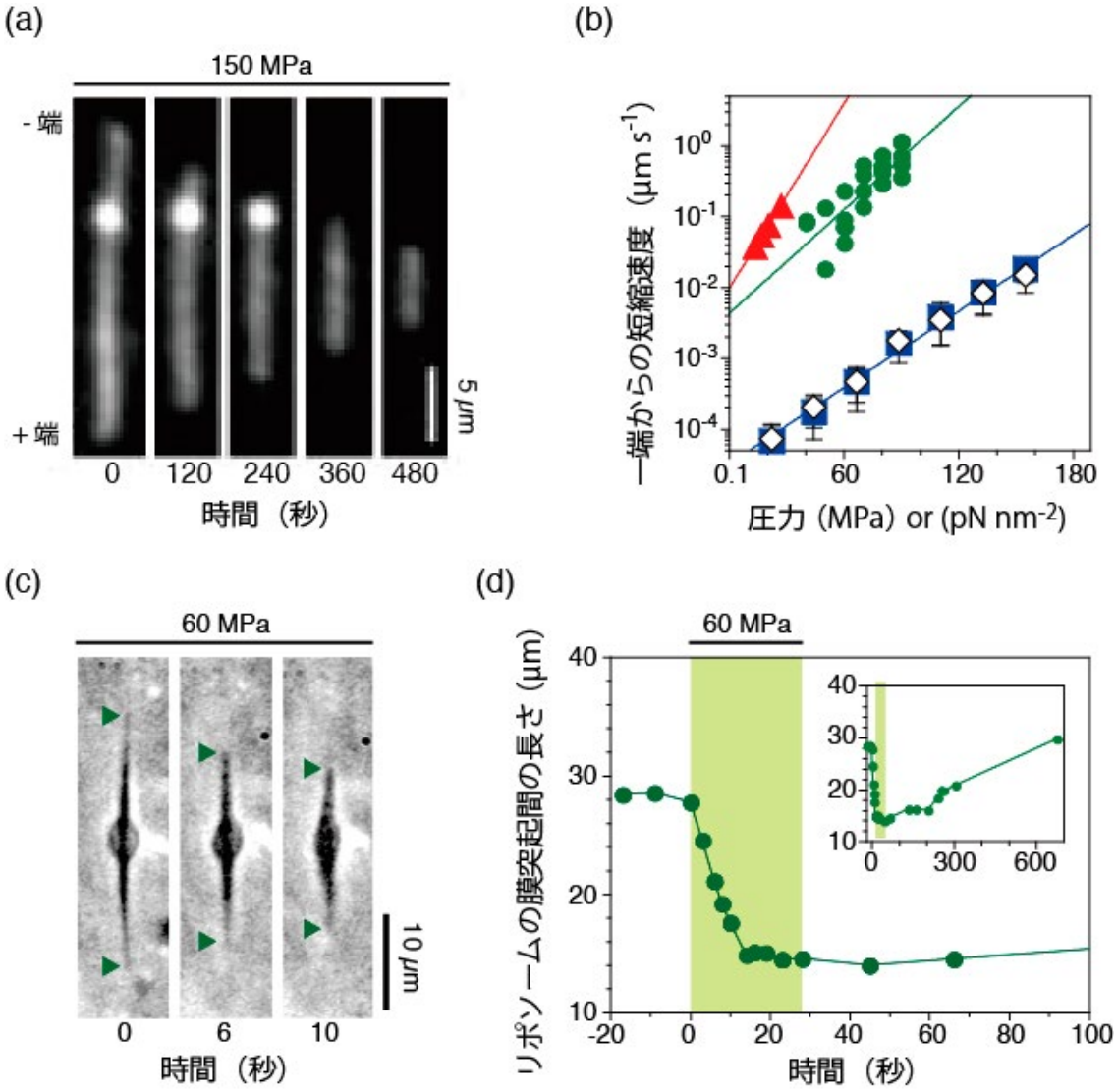


図5　微小管の動態観察（a）微小管の蛍光観察像（150 MPa）。強く蛍光標識した微小管断片を“Seed（種）”として調製した。弱く標識したチューブリンが種から長く伸張した方が+ 端、他方が– 端として識別。（b）微小管短縮速度の圧力依存性。微小管の短縮速度 14）（■:+ 端,◇:– 端,+10 μM paclitaxel, 活性化体積 $\Delta V^{\ddagger} = -0.17$ nm^3）。リポソームの膜突起 17）（●,–Paclitaxel, $\Delta V^{\ddagger} = -0.23$ nm^3）と卵母細胞の紡錘体 7）（▲,–Paclitaxel, $\Delta V^{\ddagger} = -0.41$ nm^3）の短縮速度は、両端の長さ変化を 2 で割って算出した。（c）微小管を封入したジャイアントリポソームの位相差像（60 MPa）。膜突起の先端をやじりで示す。（d）単一リポソームの膜突起間の長さ変化。60 MPa に加圧した領域は色づけした。

から同じ速度で短縮する様子を捉えることができた 9）（図 5a）。微小管の短縮速度に異方性はみられず、圧力増加と共に短縮速度は指数関数的に増加した（図 5b）。この系では、減圧後に再重合反応は観測されなかったが、これは脱重合したチューブリン分子が高圧力容器内に拡散し大幅に濃度が低下したからであろう。

次に、人工細胞系を用いて実験を行った[10]。初め球状に近い形状をしていたリポソームの内部で微小管を重合させると（0.1 MPa,25°C）、膜の内

側から押す力で膜突起が形成された（図 5c)。これらの突起は、方向性が揃わない微小管数十本程度から構成されていると考えられる。この膜突起をもつリポソームを加圧したところ（60 MPa)、わずか数十秒で突起が短縮してしまった。その後、すぐに減圧して大気圧に戻し、同じリポソームの観察を続けたところ、膜突起はほぼ同じ位置から伸長しはじめ、約 10 分後には元の長さに戻った（図 5d)。なお、この膜突起の短縮速度も圧力と共に増加した（図 5b)。これら 2 つの系の結果を生細胞の結果[8] と比べてみると、圧力に対する短縮速度の増加率は似ていることが見て取れる（図 5b)。これらの結果から、高圧力は微小管を構成するチューブリン分子間の相互作用に直接作用していることが示唆された。

以上のように、開発した高圧力顕微鏡を利用して、2 つの異なる実験系で微小管の重合・脱重合反応をコントロールできることを示すことができた。高圧力下では、チューブリン分子間の結合部分に水分子が侵入しやすくなり、解離反応が進行すると考えられる。この水分子による微小管脱重合メカニズムは、連なったチューブリン分子の MD 計算を併用することで明らかにできるであろう。計算機実験の場合、チューブリンと水分子を入れる箱を小さくすると高圧力環境をつくりだすことができる。高圧力顕微鏡を使って得られた結果と、MD 計算から示唆された水分子の動きを照らし合わせることで、微小管の重合・脱重合の制御機構が明らかにできると期待される。また、研究責任者らの高圧力顕微鏡法を応用すれば、常圧力下よりも速い速度で微小管の解離反応がすすむため、新しい抗がん剤のスクリーニングの迅速化にも貢献できそうである。

６．今後の展望

近年、培養細胞系の実験を元にして、様々な細胞が外から与えた力を感知し、応答することが明らかとなりメカノバイオロジーとして注目を集めている[1]。例えば、応答の例として細胞膜を介したシグナル伝達過程、タンパク質発現量の変化などが挙げられよう。このような知見の多くは、細胞を基板に貼り付けて固定し、その後、水流によるズリ力を与える手法や、基板を動かし細胞を伸張させる手法から得られてきたものである。しかしながら、これらの手法には生体試料の形状や固定方法により刺激の強さが変わってしまう問題があり、幹細胞の分化が細胞を支える基質の硬さで変化してしまうことも知られている。

それに対して、研究責任者らは、生体試料に力学的な刺激を与える新しい手法として、静水圧の優位性に着目してきた。静水圧を利用すれば、1）そもそも、細胞や組織を基板などに固定する必要がなく、2）生体試料の形や固定方法に因らず、どの方向からも一様な力学刺激を与えることが可能であり、3）生体試料を入れる容器を大きくすることでスケールアップを図りやすい。これらの特長は基礎研究のみならず、将来的な医療応用を見据えた場合にも大きなメリットになる。今後もメカノバイオロジーの新潮流として発展させていきたい。

謝辞

本研究を助成していただいた公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団に深く感謝します。また、常日頃からご支援を頂いている京都大学の原田慶恵 教授（現職：大阪大学 教授）に謝意を表します。本研究の遂行にあたりご協力いただきました名古屋大学の林真人 博士、瀧口金吾 博士にお礼申し上げます。

参考文献

1） 毛利信男 編、『新しい高圧力の科学』、講談社(2003)。
2) 西山雅祥&曽和義幸。 細胞内の水で生命活動を操る！−高圧力下で観るタンパク質水和変調イメージング *化学* **68**: 33-38 (2013)。
3） 網田富士嗣、 梶本興亜 編著、『高圧力実験装置の設計と工作』、京都大学物理化学研究

会 (2005)。

4) Nishiyama M. & Sowa Y. Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. *Biophys J.* **102**: 1872-1880 (2012).
5) Nishiyama M.: *in* Akasaka K. & Matsuki M. (Eds.), High Pressure Bioscience—Basic Concepts, Applications and Frontiers, *Springer*, 593–611 (2015).
6) 西山雅祥、高圧力顕微鏡の開発と生物ナノマシンの運動観察、*高圧力の科学と技術* **25**: 126-135 (2015)
7) 加藤千明 他編著『深海と地球の事典』丸善（2014）
8) Salmon ED, Pressure-induced depolymerization of spindle microtubules. I. Changes in birefringence and spindle length. *J Cell Biol.* **197**: 603-614 (1975).
9) Nishiyama M., Kimura Y., Nishiyama Y. & Terazima M. Pressure-induced changes in the structure and function of the kinesin-microtubule complex. *Biophys J.* **96**: 1142-1150 (2009).
10) Hayashi M., Nishiyama M., Kazayama Y., Toyota T., Harada Y. & Takiguchi K. Reversible Morphological Control of Tubulin-Encapsulating Giant Liposomes by Hydrostatic Pressure. *Langmuir* **32**: 3794-3802 (2016).

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



研究責任者　東北工業大学　大学院工学研究科
電子工学専攻
准　教　授　　鈴　木　郁　郎

１．はじめに

ヒト幹細胞の各細胞への分化技術の発展により、ヒト細胞を用いた疾患メカニズムの解明や創薬スクリーニング・毒性検査における動物実験を代替えする評価モデルとしての応用が期待されている。ヒト iPS 細胞から分化させた神経系においても、その潜在需要は非常に高く、国内外で細胞機能評価が行われているものの、培養ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能に着目した評価系が未確立である点および培養したヒト iPS 細胞由来ニューロンは未成熟である点が大きなボトルネックとなっている。我々は、これまで、神経ネットワークの活動を非侵襲かつ長期多点同時計測が可能な平面微小多電極アレイ法とヒト iPS 由来ニューロンを成熟化させるためのグリア細胞（アストロサイト）共培養法の開発により、活動電位を指標とした薬効評価を提案し、その実現可能性を示してきた [1-4]。今後、神経ネットワークの機能解析や薬効評価の精度を向上させる為には、神経ネットワークの情報伝達場である「シナプス機能」を「非侵襲かつリアルタイムに計測する技術」が有効である。シナプス機能とは、プレシナプスに於ける神経伝達物質の放出とポストシナプスに於けるシナプス後電流（電位）であり、神経伝達物質の放出異常やポストシナプス電流の異常で起こる疾患はパーキンソン病やアルツハイマー病など多数存在する。このような背景から、本研究は、ナノエレクトロニクス技術と神経３次元培養技術を駆使して、培養細胞であるヒト iPSC 由来ニューロンのシナプス機能である『神経伝達物質』、『シナプス後電位』を非侵襲かつリアルタイムに定量計測できる新しい機能評価系の開発を目的とした。

２．方法

ドーパミンの放出異常は多くの神経疾患で見られる現象であり、ドーパミンは電気化学反応を示すことからドーパミン検出にターゲットを絞って開発を行った。具体的には微小電極上に神経細胞を培養し、電気化学計測にてリアルタイム検出する手法に着目した。細胞から放出される微量な神経伝達物質をリアルタイムに計測するためには、高感度な電極を作製する必要がある。我々は、電極材料としてカーボンナノチューブ、電極構造として 50×50 μm² サイズの微小電極が 64 電極並んだ ITO 平面微小電極アレイを用いて、独自に開発したカーボンナノチューブ電解めっき法を用いて電極の開発を行った。作製した微小電極のド

ーパミンに対する計測感度は、サイクリックボルタメトリー法（CV 法）およびクロノアンペロメトリー法（CA 法）にて評価した。開発したカーボンナノチューブ平面微小電極アレイ上にヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンを培養し、リアルタイム計測を実施した。

シナプス後電位計測については、培養細胞の応答が微弱であるため、培養細胞から非侵襲、長期間、リアルタイムに計測できる技術は確立されていない。そこで、培養細胞を３次元の集団にすることによって、微弱な単一シナプスの応答を加算した集合シナプス後電位を発生させ、細胞外で取得する方法論の開発を行った。具体的には細胞積層化技術[5,6]、細胞シート化技術、脱細胞脳組織を足場とした３次元細胞集団の作製法の検討および、平面微小電極アレイに３次元細胞集団をマウントさせて細胞外記録にてシナプス後電位計測を試みた。

３．結果

電解めっき条件を検討し、ITO 微小電極上に多層カーボンナノチューブをコーティングした結果、電子顕微鏡観察により、チューブ形状を維持した状態でめっきされていることが確認された（図１）。

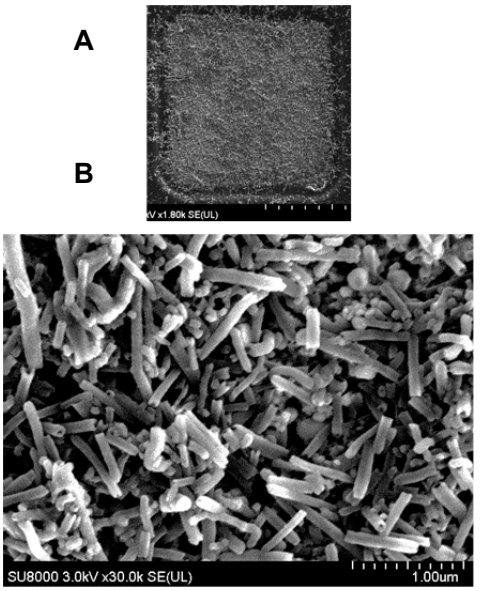


図１　カーボンナノチューブをめっきした 50×50 μm² 微小電極の電子顕微鏡画像。(A)微小電極の全体像。(B)電極表面の電子顕微鏡画像。

ドーパミンの電気化学計測をしたところ、0.3V 付近でドーパミンの酸化ピーク電流が検出され（図２）、開発したカーボンナノチューブ微小電極で電気化学反応を示すことがわかった。

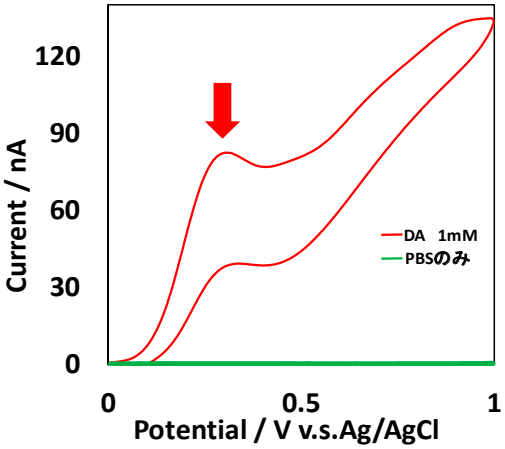


図２　カーボンナノチューブ微小電極を用いたドーパミン 1mM のサイクリックボルタモグラム。

次に、開発した微小電極を用いて、検出感度測定を CA 法にて行った。検出限界濃度は数 nM 程度であることがわかった。定量的に検出できる濃度域は数 10 nM から 100 nM 程度であった。

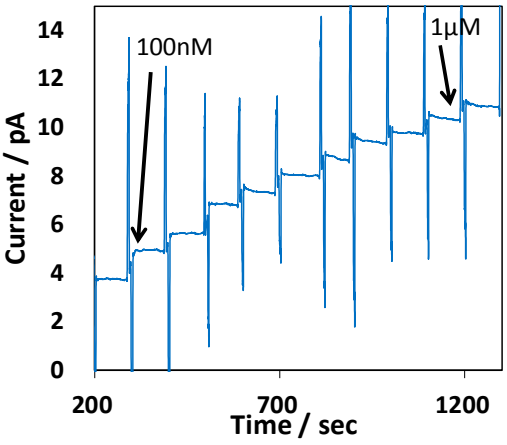


図３　ドーパミン 100nM の順次投与による電流値変化。印加電圧 0.3V の CA 計測。

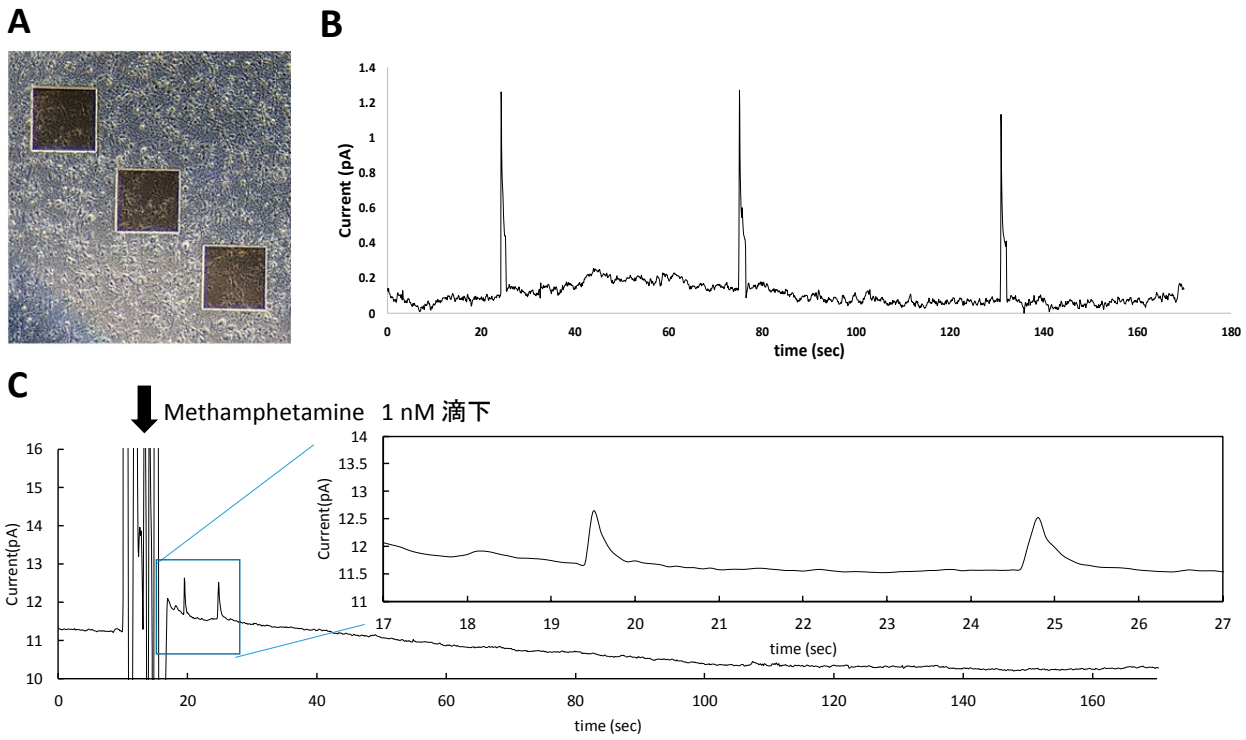


図４ カーボンナノチューブ微小電極上に培養したヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンから放出されるドーパミンのリアルタイム計測。(A)カーボンナノチューブ微小電極に培養した培養 41 日目のヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン。(B)自発活動時におけるドーパミン放出の検出波形。(C)メタンフェタミン 1nM 投与後のドーパミン放出の応答。

図３は、100nM ドーパミンを順次投与した際の電流値の上昇を示している。著しい電流値の減少は観察されず、細胞を用いたリアルタイム計測可能であることが確認された。50×50 μm² サイズの微小電極において、本研究で得られた低濃度を検出できる電極は報告されておらず、高感度微小電極の開発に成功したと言える。但し、同条件のめっき条件であっても作製電極毎にバラつきが生じた。バラつきの改善が今後の課題である。

次に開発したカーボンナノチューブ微小電極にヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンを培養した。カーボンナノチューブ微小電極アレイとヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの親和性は高く、神経ネットワークの形成および１か月以上の培養を確認し、また、電極表面を避けることなく、無毒性で培養できることが確認された（図４A)。培養 41 日目のサンプルを用いて、ドーパミンの酸化電位である 0.3V に固定して電流値の変化を計測したところ、自発活動において細胞から放出されたドーパミンを電気化学的にリアルタイム検出することに成功した（図４B)。また、ドーパミン放出を促す薬剤であるメタンフェタミン 1nM を投与したところ、投与直後にドーパミン放出のレスポンスが観察された。同量のバッファー滴下時には観察されず、また、電位固定を 0V にした際にもドーパミンの応答は観察されなかったことから、得られた波形がドーパミンのレスポンスであることが確認された。培養細胞であるヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンから電気化学的にリアルタイム計測した初めての報告である。ドーパミン放出のリアルタイム計測による薬剤応答評価やヒト神経疾患由来のドーパミンニューロンの放出特性の評価などへの応用が大いに期待できる成果である。

培養細胞からのシナプス後電位計測法の開発として、３次元組織モデルの構築技術の検討を行

った。ヒト iPS 細胞由来大脳皮質ニューロンを用いて細胞積層化法で 3 次元組織体を作製したところ、50 μm 以上の厚みを持った 3 次元組織体が形成されていることを HE 染色によって確かめた（図 5)。内部にも細胞体が存在していたことから、酸素と栄養が行きわたっていることがわかった。また、神経突起が配向している様子が観察された。これらの結果から 3 次元組織モデルとして細胞積層化法は有効であることが示唆された。

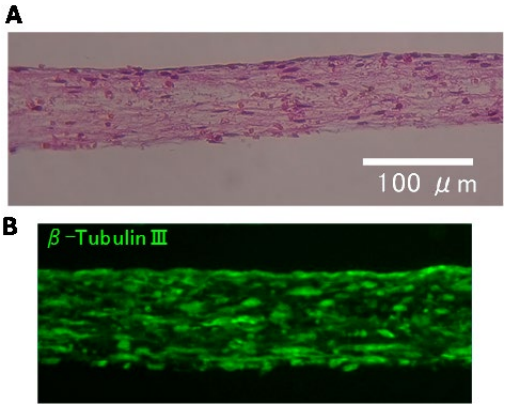


図5　細胞積層化によって作製したヒト iPS 細胞由来大脳皮質ニューロンの 3 次元組織モデル。

温度変化により、基板に接着してる細胞を剥離する技術を用いて、神経細胞シートの作製を試みた。図 6 はラット初代神経細胞をシート状に剥離した様子を示している。その後、基板上への再接着および神経突起の伸長を確認したことから、任意のタイミングで神経細胞シートを作製できることがわかった。

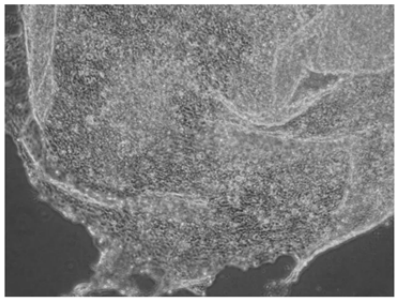


図6　神経細胞シートの作製。剥離した神経細胞シート。

次に、ブタの脱細胞脳組織を作製し、脱細胞組織を足場とした 3 次元神経組織モデルの構築を行った。脱細胞化組織内でヒト iPS 細胞由来ニューロンが培養されていることが確認された（図 7）。

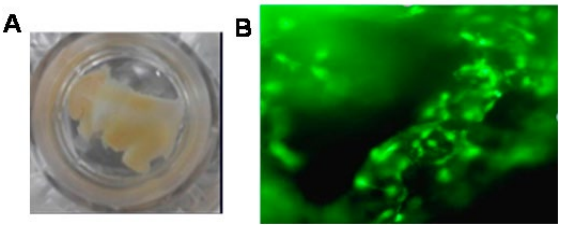


図7　脱細胞組織を足場とした3次元培養。(A)ブタ脱細胞脳組織。脱細胞組織を足場としたヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養。緑 : 神経細胞マーカー ß-tubulinⅢ。

培養細胞から構築した 3 次元神経組織モデルからのシナプス後電位計測の評価として、コラーゲンゲル内にラット海馬初代培養細胞を培養した 3 次元細胞集団（人工脳スライスモデル）を用いた。図 8 は、平面微小電極アレイ上にマウントした人工脳スライスモデルと自発活動波形を示している。

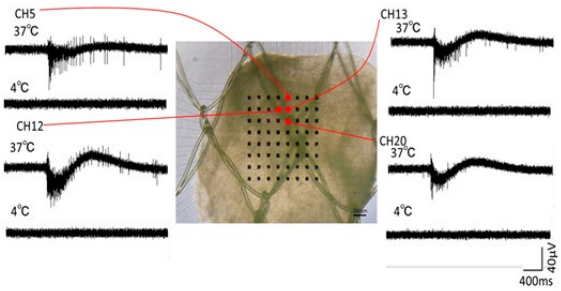


図8　平面微小電極アレイにマウントした人工脳スライスモデルと得られた自発活動波形。

37℃インキュベータ下において、自発活動波形が検出された。スパイク成分とは異なるゆったりと変化する波形が観察された。４℃下では観察されなかったため、細胞由来の波形であることが確認された。図 9 は、単発電気刺激に対する応答を示したものである。37℃下において、刺激直後に自発活動と同様のゆったりとした誘発応答が観

察された。４℃では観察されなかったことから、自発活動同様に細胞由来の波形であることが確認された。これらの結果から、脳スライスで見られるようなゆったりとした集合シナプス電位を検出することに成功した。現在、得られた波形がシナプス後電位によるものであるかの検証実験を行っている。

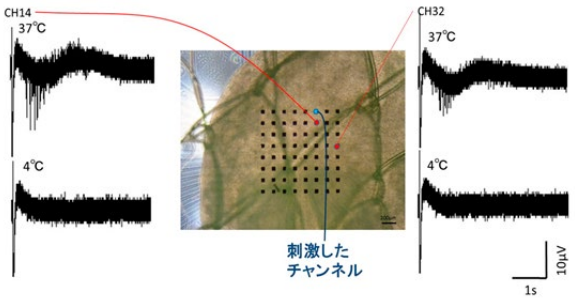


図9　人工脳スライスからの電気刺激誘発応答。

４．まとめ

カーボンナノチューブ平面微小電極アレイ基板の開発により、50×50 μm² サイズの微小電極において数 10nM の低濃度ドーパミンを顕著に検出した。更に、ヒト iPSC 由来ドーパミンニューロンからドーパミン放出をリアルタイムに検出できたことから、ヒト iPSC 由来ニューロンの神経伝達物質の放出を指標とした神経疾患の解明研究や薬効評価への応用が期待できる。また、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた３次元組織モデルの構築に成功し、シナプス後電位波形様のシグナルを人工脳スライスモデルを平面微小電極アレイにマウントすることにより検出できた。培養細胞からシナプス後電位を非侵襲リアルタイム計測する手法としての応用が期待される。

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平成 26 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。

参考文献

(1) Odawara, A., Katoh H., Matsuda N., and Suzuki, I. Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Scientific Reports.* 2016 6:26181.

(2) Odawara, A., Katoh H., Matsuda N., and Suzuki, I. Induction of long-term potentiation and depression phenomena in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 469(4):856-62.

(3) Alhebshi, AH., Gotoh, M., and Suzuki. I. Thymoquinone protects cultured hippocampal and human induced pluripotent stem cells-derived neurons against α-synuclein-induced synapse damage, Neuroscience letters 2014, 570: 126-131,

(4) Odawara, A., Gotoh, M., and Suzuki, I. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response in human induced pluripotent stem cell derived neuron and astrocyte co-culture" Biochem Biophys Res Commun. 2014 443(4):1176-81.

(5) Matsusaki M, Ajiro H, Kida T, Serizawa T, Akashi M. Layer-by-layer assembly through weak interactions and their biomedical applications. Adv Mater. 2012 24; 24(4) :454-74.

(6) Nishiguchi A, Matsusaki M, Miyagawa S, Sawa Y, Akashi M. Dynamic nano-interfaces enable harvesting of functional 3D-engineered tissues. Adv Healthc Mater. 2015 3;4(8):1164-8.

発表論文

(1) N. Matsuda, A. Odawara, M. Fukuda , H. Jiko , I. Suzuki. "Carbon nanotube multi-electrode arrays for high sensitive

extracellular measurements in cultured human iPSC derived neurons” ,Neuroscience2015, Chicago, USA, Oct 17-22, 2015

(2) 松田直毅, 原田将, 小田原あおい, 鈴木郁郎, “ヒト iPS 細胞由来ニューロンから放出されるドーパミンセンシング技術の開発”第 37 回日本バイオマテリアル学会大会（京都）,2015 年 11 月

(3) 松田直毅，原田将，小田原あおい，鈴木郁郎 “ヒト iPSC 由来ニューロンの高感度活動電位・神経伝達物質を可能とするカーボンナノチューブ微小電極アレイの開発”電気化学会第 83 回大会（大阪） 2016 年 3 月

(4) 松田直毅, 原田将, 小田原あおい、鈴木郁郎. “In vitro ヒト iPSC 由来ニューロンの活動電位及び神経伝達物質高感度計測を実現する平面微小電極アレイの開発” 医用・生体工学研究会　神経工学，2016 年 3 月,東京

(5) 船橋祐貴，青木俊輔，小田原あおい，鈴木郁郎：３次元人工脳スライスモデルの用いたシナプス後電位計測技術の開発，H27 年度東北地区若手研究者研究発表会（福島），2015 年

新規 cDNA 合成技術の開発とマイクロアレイへの応用



研究責任者　京都大学　大学院農学研究科
食品生物科学専攻　酵素化学分野
教　授　　保　川　　清

共同研究者　京都大学　大学院農学研究科
食品生物科学専攻　酵素化学分野
助　教　　滝　田　禎　亮

１．はじめに

産業用酵素は高い活性と安定性が求められるケースが多い。タンパク質工学は合理的設計やランダム変異を用いて、機能が改変されたタンパク質を創製する技術である。これまで各種の産業用酵素に適用され、洗剤で使用されているプロテアーゼやリパーゼを筆頭に、商業的に多くの成功を収めた。「タンパク質工学（Protein engineering）」という用語は 1983 年、Ulmer によって提唱されたとされている [1]。 その論文には、高機能なタンパク質が次々創製されていくことが予言されており、その重要な役割を担う X 線検出器と DNA 合成機の写真が添えられている。

我々の調査では、2010 年に発表されたタンパク質工学による酵素の耐熱化についての 53 報の論文のうち、合理的設計に基づく部位特異的変異導入によるものが 42 報（79%）でランダム変異によるものが 11 報（21%）であった。この 53 報の論文で報告された耐熱化の要因はさまざまである（図 1)。これは、これまで知られている耐熱化の各種理論の有効性を示すものの、一方では、耐熱化手法の決め手がないことをも示す。実際、T4 ファージリゾチームで行われた広範な研究では、全 164 アミノ酸残基中、N 末端のメチオニン以外のすべての残基について 13 個以上の単変異酵素が作製されたが、約 2000 個の変異のうち安定性を上げたものはわずか（約 80 個）であり、しかもその効果は小さいものであった（融解温度（T_m）の上昇が約 2℃）[2]。タンパク質工学による酵素の高機能化には、多重変異導入が不可欠な要件であると言える。

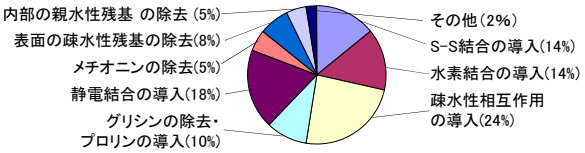


図1　酵素の耐熱性を上げる要因

２．逆転写酵素の耐熱化

逆転写酵素（RT）は cDNA 合成酵素として、分子生物学的研究や臨床診断において必要不可欠である。今日、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)RT が実用化されている。cDNA 合成反応は RNA の二次構造をなくし、反応効率を向上させるために高温で行うことが望まれ、そのために MMLV RT の耐熱化が求められてきた。我々[3] および他のグループ [4, 5] は合理的設計あるいはランダム変異により耐熱性が向上した MMLV RT を作製し、これらが実用化された。しかし、それらは 60℃では急速に失活し、PCR に使用されている耐熱型 DNA ポリメラーゼと比較すると耐熱性は著

しく低い。従来のタンパク質工学ではこれ以上の耐熱化は困難と思われる。

我々は、タンパク質工学による酵素の機能改変が今後新たに伸展していくためには、「酵素の特定領域へのランダム変異導入によるライブラリー作製」および「ハイスループットなライブラリーの発現と性能評価」が鍵になると考え、技術開発を進めている。本研究ではその一環として、新規 cDNA 合成技術の開発に焦点を置き、MMLV RT を無細胞タンパク質合成系で発現させ、その性状を解析した。また、近年開発されたサンプル移送が可能なマイクロアレイ MMV（Microarray with Manageable Volume）で cDNA 合成反応を行うことで、マイクロアレイを用いたハイスループットな性能評価の実現についても検討した。

３．材料と方法

3.1　MMLV RT の大腸菌での発現

C 末端に$(His)_6$ が付加された野生型酵素（WT）あるいは耐熱型酵素 E286R/E302K/ L435R/D524A（MM4）の遺伝子が pET22b(+)に挿入された発現プラスミド（pET-MRT、pET-MM4）[3)] を大腸菌 BL21(DE3)に導入し、形質転換菌を得た。これを LB 培地で培養し、IPTG で誘導後、30℃で 4 時間培養し、菌体を回収した。菌体を超音波で破砕後、可溶性画分を回収し、トヨパール DEAE 650-M（東ソー）を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、硫安分画および HisTrap HP 1 mL（GE ヘルスケア）を用いたニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

3.2　MMLV RT の昆虫無細胞タンパク質合成系での発現

C 末端に Strep-tag（WSHPQFEK）が付加された WT あるいは MM4 遺伝子が pTD1-Strep（島津製作所）に挿入された発現プラスミド（pTD1-WT-Strep、pTD1-MM4-Strep）を作製した（図 2）。これを鋳型として、T7 プロモーターと MMLV RT 遺伝子を含む DNA 断片を、プライマー 5′-GCAGATTGTACTGAGAGTG-3′ および 5′-GGAAACAGCTATGACCATG-3′ を用いた PCR により増幅させた。この断片からインビトロ転写反応（37℃、3 時間）により MMLV RT RNA を合成した。さらに、この RNA から、Transdirect Insect Cell （島津製作所）を用いた無細胞タンパク質合成反応（25°C、5 時間）により MMLV RT を合成した。反応液を Strep-Tactin Sepharose Column（IBA）により部分精製したものをウエスタンブロッティングおよび活性測定に、MagStrep "type2HC" beads（IBA）で部分精製したものをマイクロアレイでの cDNA 合成にそれぞれ用いた。

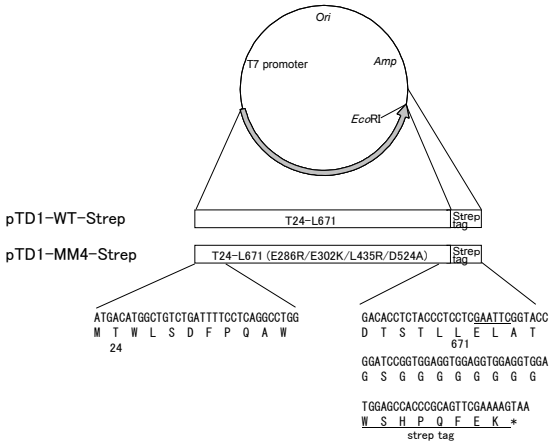


図2　無細胞タンパク質合成系で MMLV RT を発現させるために作製したプラスミドの構造. 24と671は残基の番号、アスタリックは終止コドンを示す。

3.3　poly(rA)-$p(dT)_{15}$ への dTTP 取込み

反応を 25 μM poly(rA)•$p(dT)_{15}$（T/P）、0.4 mM [^{3}H]dTTP 存在下で行い、継時的に反応液を採取し、ガラスフィルターにスポットした。これを 5%(w/v) トリクロロ酢酸につけて、poly(rA)-$p(dT)_{15}$ へ取り込まれなかった ^{3}H 標識 dTTP を除いた後、ガラスフィルターに残った放射能の量を測定し、反応速度を求めた。

3.4　cDNA 合成

Bacillus cereus の *cesA* 遺伝子 (GenBank accession number DQ360825)の 8,353－9,366 に相当する RNA（1,014 塩基長）をインビトロ転写で

合成し、モデル RNA として用いた。cDNA 合成反応を PCR チューブあるいは MMV チップを用いて、160 pg/μL 本 RNA 存在下で、45℃で 30 分間行った。その後、PCR を行い、増幅産物を電気泳動で解析した。

3.5　RNase H 活性

3’-fluorescein 修飾 18 塩基の RNA（5’-GAUCUG AGCCUGGGAGCU-3’ ）と 5’-Dabcyl 修飾 18 塩基の DNA（5’-AGCTCCCAGGCTCA GATC-3’ ）から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として反応を 37℃で 30 分間行った。EDTA を添加して反応を停止させた後、反応液の 490～590 nm の蛍光スペクトル（励起波長：490 nm）を測定した。

４．結果

4.1　MMLV RT の昆虫無細胞タンパク質合成系での発現

WT と MM4 の合成反応の反応液およびそれを部分精製したものを 10%ポリアクリルアミド電気泳動にかけた後、ウエスタンブロッティングを行った（図 3）。75 kDa のバンドが検出されたことから、目的物が発現したことが示された。

4.2　DNA 合成活性と RNase H 活性の比較

WT と MM4 について、無細胞タンパク質合成系で発現させたものと大腸菌で発現させたものの活性を比較するために、これらの DNA 合成活性と RNase H 活性を調べた。モデル RNA を用いた cDNA 合成反応では、いずれの系で発現させた酵素を用いた場合でも、PCR の増幅産物を電気泳動にかけると目的物のバンド（601 bp）が見られた（図 4A）。また、蛍光物質および消光物質が標識された RNA/DNA 二本鎖を基質とした RNase H 反応では、いずれの系で発現させた酵素を用いた場合でも、WT は活性を有し、触媒残基 D524 に変異を有する MM4 は活性をもたなかった（図 4B）。これらのことから、MMLV RT の活性について両発現系で差がないことが示された。

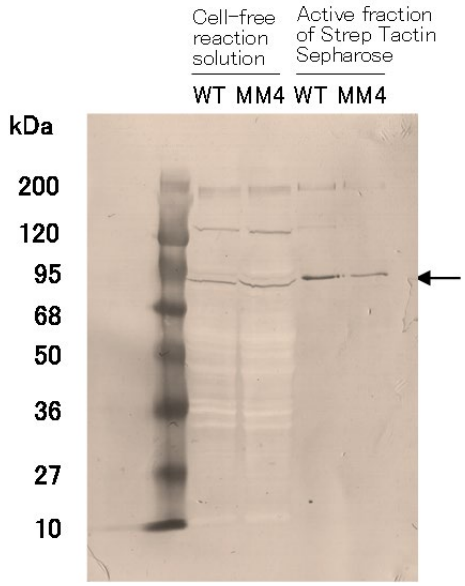


図３　ウエスタンブロット．膜は Sequi-Blot PVDF（Bio-Rad）、酵素標識抗体は Precision Protein Strep Tactin-HRP（Bio-Rad）、基質は Peroxidase stain kit for immune-blotting（ナカライテスク）を用いた。矢印は MMLV RT のバンドを示す。

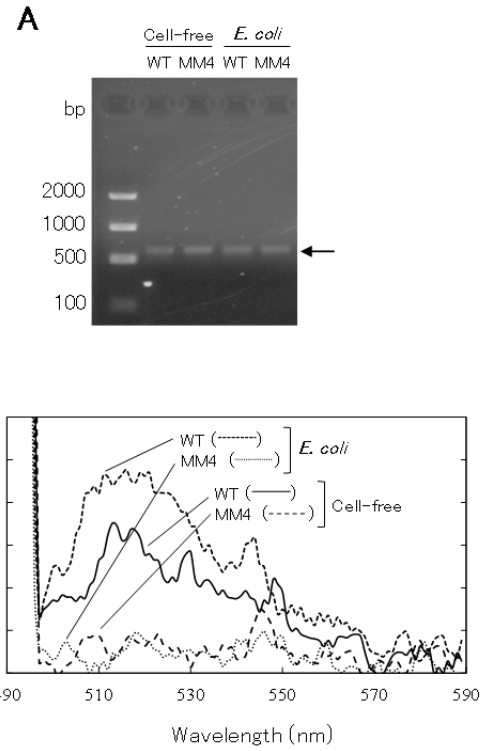


図4　無細胞タンパク質合成系および大腸菌で発現させた MMLV RT の活性の比較．（A）DNA 合成活性．PCR 産物を 1%アガロース電気泳動にかけ、ゲルを臭化エチジウムで染色した結果を示す。矢印は 601 bp のバンドを示す。（B）RNase H 活性．反応液の蛍光スペクトルを示す。

4.3　耐熱性の比較

WT と MM4 について、無細胞タンパク質合成系で発現させたものと大腸菌で発現させたものの耐熱性を比較するために、これらを 45−60℃で 10 分間熱処理した後、DNA 合成活性を 2 種類の方法で測定した。poly(rA)-p(dT)$_{15}$ への dTTP 取込み活性については、MM4 はいずれの発現系でも 60℃での熱処理後でも活性を有したが、WT は無細胞合成系では 48℃、大腸菌発現系では 45℃の熱処理で活性を消失した（図 5A）。cDNA 合成活性については、MM4 は無細胞合成系では 60℃、大腸菌発現系では 57℃の熱処理後でも活性を有したが、WT はいずれの発現系でも 54℃の熱処理で活性を消失した（図 5B）。これらのことから、MMLV RT の活性について両発現系で差がないことが示された。

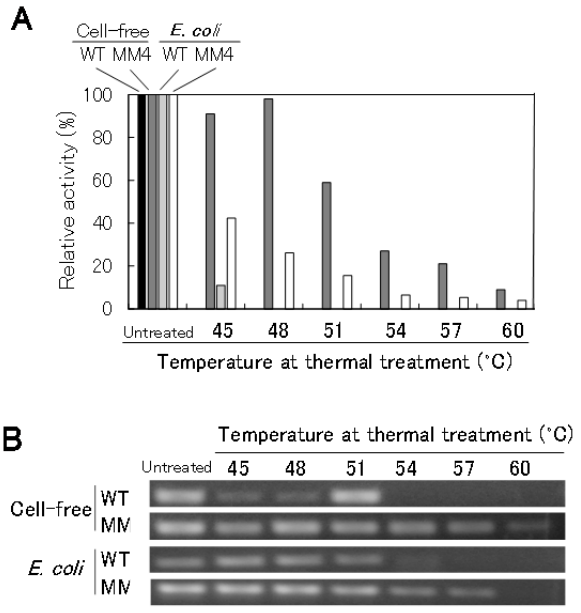


図5　無細胞タンパク質合成系および大腸菌で発現させた MMLV RT の耐熱性の比較.（A）poly(rA)-p(dT)$_{15}$ への dTTP 取込み活性. Relative activity（相対活性）は熱処理前の活性を 100%としたときの熱処理後の活性を示す。（B）cDNA 合成活性. PCR 産物を 1%アガロース電気泳動にかけ、ゲルを臭化エチジウムで染色したときの 601 bp のバンドを示す。

4.4　移送式マイクロアレイを用いた耐熱性の比較

上記検討では PCR チューブを用いて cDNA 合成反応を行ったが、ここでは MMV を用いて cDNA 合成反応を行い、両発現系での耐熱性を比較した。MMV チップは西垣らにより開発されたチップで 0.5 μL のウエルを 1024 個もつ（図 6A）[6, 7]。チップ間のサンプル移送は、2 個のチップを重ねて遠心することにより、すべてのウエルに対して同時に行える。また、専用の分注機（図 6B）を用いると、ひとつの MMV チップの任意のウエルから同じあるいは別の MMV チップの任意のウエルへ移送できる。

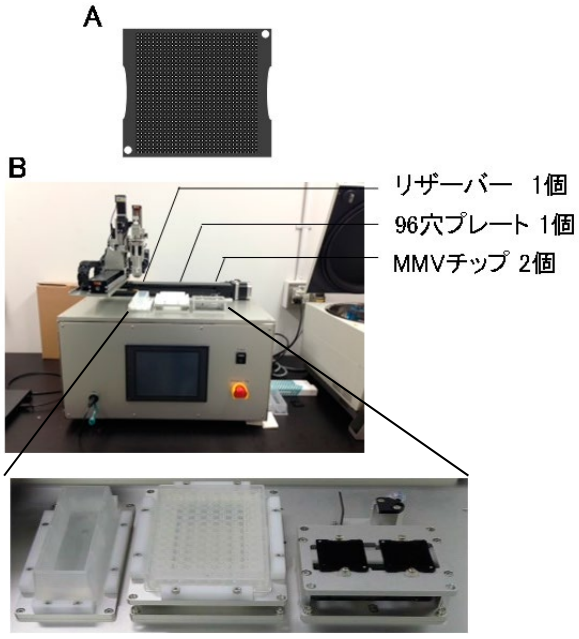


図6　MMV システム.（A）MMV チップ.（B）専用分注機.

WT と MM4 について、無細胞タンパク質合成系で発現させたものと大腸菌で発現させたものを 45−60℃で 10 分間熱処理した後、MMV チップ上で RNA 量を変えて cDNA 合成活性反応を行った（図 7A）。その後、反応液を MMV チップから回収し、通常の PCR チューブで PCR を行い、反応物をアガロース電気泳動で解析した。RNA 量が 4.8 pg/well のとき、WT では 51℃の熱処理で活性が消失した（図 7B、D）

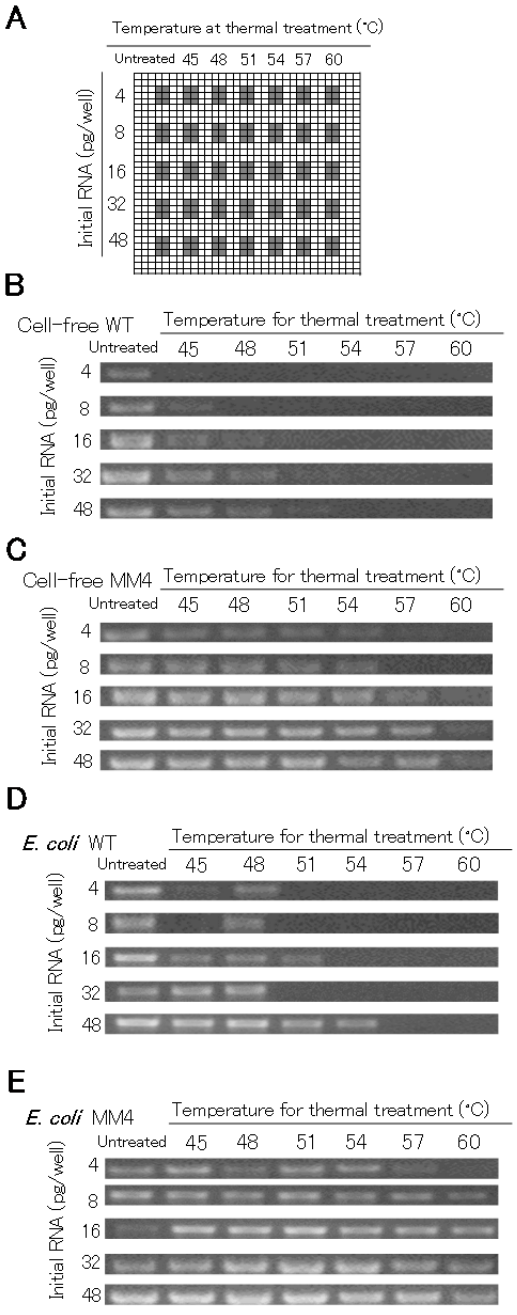


図 7　MMV チップを用いた、無細胞タンパク質合成系および大腸菌で発現させた MMLV RT の耐熱性の比較. 無細胞タンパク質合成系（B, C）あるいは大腸菌（D, E）で発現させた WT（B, D）および MM4（C, E）を熱処理後、MMV チップで cDNA 合成反応を行った。（A）MMV チップでのサンプルのレイアウト.（B–E）PCR 産物を 1%アガロース電気泳動にかけ、ゲルを臭化エチジウムで染色したときの 601 bp のバンドを示す。

が、MM4 は 54℃の熱処理後でも活性を有した（図 7C、E）。また、RNA 量が 16、32、48 pg/well のとき、WT は 54℃あるいは 57℃の熱処理で活性が消失した（図 7B、D）が、MM4 は 60℃の熱処理後でも活性を有した（図 7C、E）。これらのことから、MMLV RT の活性について両発現系で差がないことが示された。

５．考察

5.1　無細胞タンパク質合成系での MMLV RT の発現

無細胞タンパク質合成系を大腸菌等の微生物や動物細胞を宿主とした発現系と比較した場合、その長所は迅速性である。一方、短所は大量スケールの合成が困難であることと、合成されたタンパク質が正しい構造をとりうるかが不明な点である。逆転写酵素は、レトロウイルスが感染した細胞内では、前駆体タンパク質が、レトロウイルスのプロテアーゼによる切断を受けて生成するため、複雑な立体構造をとる。今回、WT と MM4 について、無細胞タンパク質合成系で発現させたものと大腸菌で発現させたものが同程度の活性と耐熱性を有した。このことから、無細胞タンパク質合成系で発現させた MMLV RT は、本来の構造をとっていると考えられる。

5.2　MMLV RT の耐熱化における移送式マイクロアレイの利用

今回の検討では、cDNA 合成反応だけに移送式マイクロアレイである MMV チップを用いた。しかし、既に MMV チップで、RNA 合成、無細胞タンパク質合成、PCR が進行することが報告されている[6, 7]。今後、T7 プロモーターが結合した MMLV RT の遺伝子ライブラリーを作製し、これを MMV チップに広げる（例えば 1 ウエルあたり 10 遺伝子）。これを MMV チップ間でサンプルを移送させることにより、PCR、RNA 合成、無細胞タンパク質合成、精製、熱処理、cDNA 合成、PCR を順に行う（図 8）。最後に MMV チップを蛍光イメー

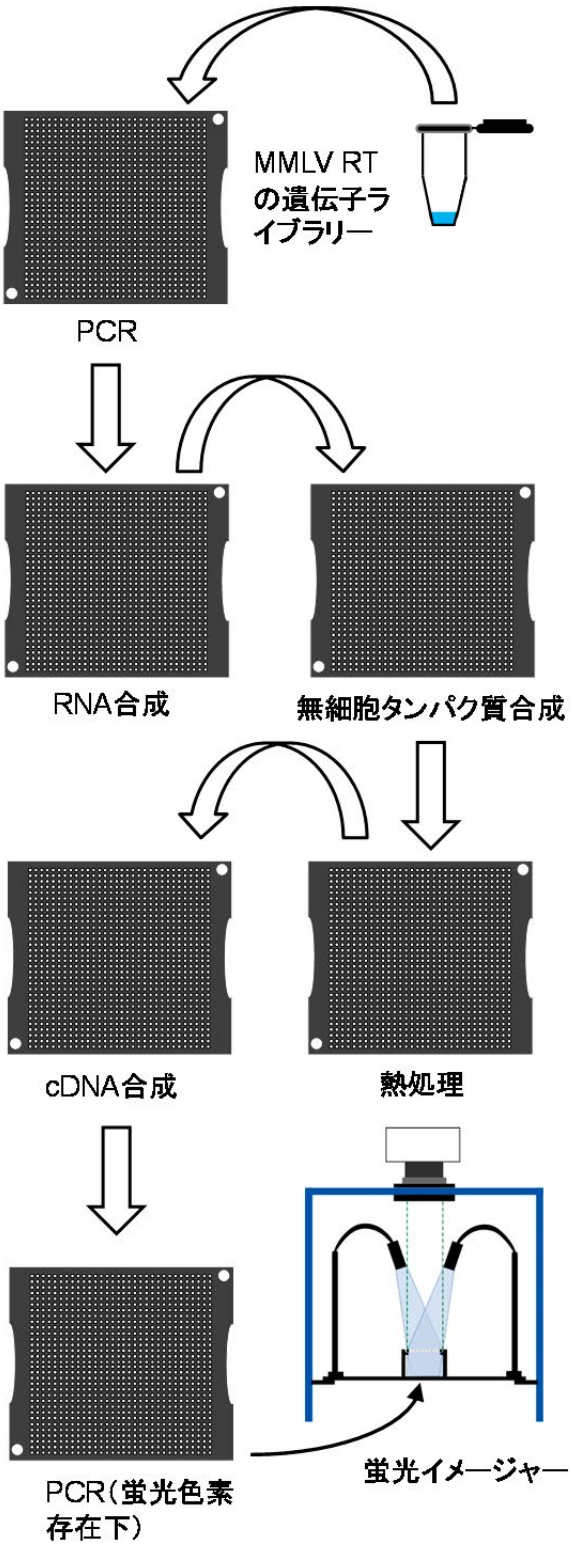


図8　移送式マイクロアレイを活用した、ランダム変異を導入したMMLV RTの遺伝子ライブラリーからの耐熱型 MMLV RT のスクリーニング。

ジャーで観察することで、蛍光を発するウエルの位置を同定する。そして、MMLV RT 遺伝子のライブラリーを広げたMMV チップの同じ位置のウエルから目的の性質を有するMMLV RT の遺伝子を回収することが可能と考えている。

5.3　遺伝子ライブラリーの作製

従来のランダム変異導入はerror-prone PCR により行われてきた。これは反応液の組成（主に $MgCl_2$ 濃度）を調節することで、DNA ポリメラーゼの読み間違いを誘発し、変異を導入する方法である。この方法では、遺伝子の特定領域に変異を導入することができない。また、終止コドンの導入など本来望まない変異も導入されるという問題点を有する。

MMLV RT は分子質量 75 kDa のモノマーで、Fingers、Palm、Thumb、Connection、RNase H の 5 個のドメインを有する（図 9）[8]。このうち、DNA 合成活性の活性部位は Fingers、Palm、Thumb ドメインに、RNase H 活性の活性部位は RNase H ドメインに存在する。DNA 合成活性の改変を考える場合は、Fingers、Palm、Thumb ドメインに集中的にアミノ酸変異を導入することが望まれる。



図9　MMLV RT の 5 個のドメイン. Fingers を赤、Palm を青、Thumb を緑、Connection を黄、RNase H を紫で示す。

近年、アレイを用いてオリゴ DNA のライブラリーを作製し、これをプライマーとしてQuikChange 法を行うことにより、大規模な変異導入が行える方法が開発された [9]。今後、このよう

な技術も組み合わせていくことも可能と考えている。

これまで多くの酵素でタンパク質工学による機能改変がなされてきた。例えば、キシラナーゼはバイオエタノール生産への応用が期待されており、これまで多くの変異型酵素が開発されてきた[10]。しかし、実用化レベルには達していない。新しい技術の組み合わせにより、タンパク質工学の新たな発展が期待される。

６．まとめ

野生型 MMLV RT と耐熱型の 4 重変異体 E286R/E302K/ L435R/D524A（MM4）について、無細胞タンパク質合成系で発現させたものと大腸菌で発現させたものが同程度の活性と耐熱性を有した。また、MMLV RT の耐熱性の評価において、移送式マイクロアレイ MMV が有効であった。無細胞タンパク質合成系と移送式マイクロアレイは、MMLV RT のさらなる耐熱化および各種酵素の改変に有用であると考えられる。

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 26 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。また、埼玉大学西垣功一名誉教授、沖縄工業高等専門学校伊東昌章教授、京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻酵素化学分野修士課程 1 回生片野裕太氏に感謝いたします。

参考文献

1) K. M. Ulmer. Protein Engineering. *Science*, **219**, 666 (1983)
2) W.A. Baase, L. Liu, D.F. Tronrud, B.W. Matthews. Lessons from the lysozyme of phage T4. *Protein Sci.*, **19**, 631-641 (2010)
3) K. Yasukawa, M. Mizuno, A. Konishi, K. Inouye. *J. Biotechnol.*, **150**, 299-306 (2010)
4) B. Arezi, H. Hogrefe. Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 473–481 (2009)
5) A. Baranauskas, S. Paliksa, G. Alzbutas, M. Vaitkevicius, J. Lubiene, V. Letukiene, S. Burinskas, G. Sasnauskas, R. Skirgaila. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Eng. Des. Sel.*, **25**, 657–668 (2012)
6) Y. Kinoshita, T. Tayama, K. Kitamura, M. Salimullah, H. Uchida, M. Suzuki, Y. Husimi, K. Nishigaki. Novel concept microarray enabling PCR and multistep reactions through pipette-free aperture-to-aperture parallel transfer. *BMC Biotechnol.* **10**, 71 (2010)
7) H. Sharma, Y. Kinoshita, S. Fujiu et al. Establishment of a reborn MMV-microarray technology: realization of microbionme analysis and other hitherto inaccessible technologies. *BMC Biotechnol.* **14**, 78 (2014)
8) D. Das, M.M. Georgiadis. The crystal structure of the monomeric reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus, *Structure*, **12**, 819–829 (2004).
9) 田谷敏貴．BMB2015（日本生化学会・日本分子生物学会合同大会）フォーラム「核酸関連酵素とマイクロアレイシステムの技術進化」(オーガナイザー:保川清、藤原伸介) 2015 年 12 月 3 日　神戸国際会議場
10) 中村聡．糖質加水分解酵素の耐アルカリ性機構の解明と耐アルカリ性の向上．生化学 第 81 巻、第 12 号、pp. 1101–1108、2009 年

本研究に関する発表

1) 片野裕太、久好哲郎、久世郁実、岡野啓志、伊東昌章、西垣功一、滝田禎亮、保川清. MMLV 逆転写酵素の無細胞タンパク質合成系での発

現．BMB2015（第88回日本生化学会大会、第38回日本分子生物学会合同大会）（2015年12月1日　神戸国際展示場）

2) 片野裕太、久好哲郎、久世郁実、岡野啓志、伊東昌章、西垣功一、滝田禎亮、保川清. MMLV逆転写酵素の無細胞タンパク質合成系の構築とマイクロアレイへの応用．日本農芸化学会2016年度大会（2016年3月28日、札幌コンベンションセンター）

3) 片野裕太、久好哲郎、久世郁実、岡野啓志、伊東昌章、西垣功一、滝田禎亮、保川清. MMLV逆転写酵素の無細胞タンパク質合成系の構築とマイクロアレイへの応用．第63回日本生化学会近畿支部例会（2016年5月21日、神戸薬科大学）

4) Y. Katano, T. Hisayoshi, I. Kuze, H. Okano, M. Ito, K. Nishigaki, T. Takita, K. Yasukawa. Expression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in a cell-free protein expression system. *Biotechnol. Lett.*, in press (2016)

非標識マルチモーダル顕微鏡法を用い細胞状態計測法の開発

Label-free multimodal microscopy for cellular state investigation



研究責任者　大阪大学　免疫学フロンティア研究センター
生体フォトニクス研究部
特任助教　　PAVILLON　Nicolas

1. Introduction

Many techniques designed to observe cellular state or responses to known stimuli rely on the use of chemical labels, which are employed to target specific molecules which are thought to be involved in the studied process. These methods consist for instance in staining histologic tissue sections to enhance contrast, or the insertion of fluorescent dyes into cells to observe the spatio-temporal features of molecules of interest.

We are focusing in this project on immune cells, and in particular macrophages. In the context of immunology, there is often a need for studies based on large populations, due to the wide diversity of cells and interaction mechanisms involved in the immunological responses. For this reason, analysis methods such as flow cytometry are often employed, providing analyzes based on large samples for strong statistical significance. Furthermore, methods based on fluorescent dyes require that a known molecule of interest and a specific marker which bonds to it are necessary to perform the analysis. In the context of immunology, for example in the case of macrophage stimulation, there are not many markers known to efficiently discriminate activated and resting cells. However, as immune cells are known to communicate through secreted molecules such as cytokines, it is often more efficient to assess the activation of cells by detecting the presence of specific cytokines in the extracellular medium [1]. This is classically performed through enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA), which selectively bonds to the cytokine with antibodies. While this approach is very sensitive, it only provides an indication of activation at population level, without indications of the state of individual cells.

While these different methods provide very sensitive ways to assess the activation state of cells, they require knowing and selecting target molecules to analyze beforehand. Furthermore, most of these techniques do not make it possible to relate the results to individual cells that could be targeted for further analysis.

The purpose of this project is to evaluate the possibility of employing label-free microscopy to assess the activation state of macrophage

cells *in situ* and non-invasively, enabling further analysis on the measured cells which can be maintained in an unperturbed environment. We also focus on high-throughput data acquisition, to make it possible to measure a large amount of cells rapidly enough to retrieve statistically significant results. We employ for this purpose a multimodal system comprising several imaging methods that are described below.

Quantitative phase microscopy (QPM) is a full-field imaging method which provides contrast based on the optical density of the specimen. Contrarily to more well-known techniques such as Zernike's phase contrast or differential interference contrast, QPM provides quantitative information about the local intracellular content, and in particular proteins [2]. We employ here a QPM technique based on digital holography, which provides one-shot recovery of the phase images based on laser illumination.

Raman spectroscopy is an optical method in which the resonant response of the intracellular chemical content to an excitation beam is recorded. As each molecule possesses specific vibrational modes, it is possible to derive an optical signature that provides insight about the molecular content in a non-invasive way. While this approach can provides very specific information, it has the disadvantage of being relatively slow, making it not very suitable for high-throughput imaging. We employ here a method we developed previously, denoted as hybrid scanning [3], that can provides a relevant Raman spectrum of the cell based on point measurements, which can be acquired much faster.

While fluorescence commonly requires the insertion of labels in order to enable imaging, it is also possible to image the inherent autofluorescence of biomolecules. It is known that activated macrophages secrete reactive oxygen species (ROS) such as nitric oxide which has a cytotoxic effect against pathogens [4]. As ROS have a strong autofluorescence, imaging this response provides an additional contrast for analysis, which is based on the concentration of molecules naturally occurring during activation.

2. Technical developments

The measurement setup we developed is based on an existing system that had been developed to enable simultaneous measurement of Raman imaging and QPM [2, 3]. The system has been then modified to include a standard wide-field fluorescence system (see Fig.1), which can be used to image the same field of view as with the Raman and QPM modalities by employing flip mirrors that insert the illumination and detection elements of an epi-fluorescence system. This approach provides a simple way to measure the autofluorescence in parallel to the two other channels that can be measured simultaneously, as shown in Fig.1.

The measurement procedure has also been improved in terms of speed and responsiveness. In order to retrieve the phase images, a reconstruction algorithm must be applied to the measurements, which leads to typical frame rates in the range of 5 frames per second for live reconstructions. We developed a new reconstruction code which relies on graphical processing units, that can reach reconstruction rates up to 50 frames per second, enabling real-time monitoring during measurements.

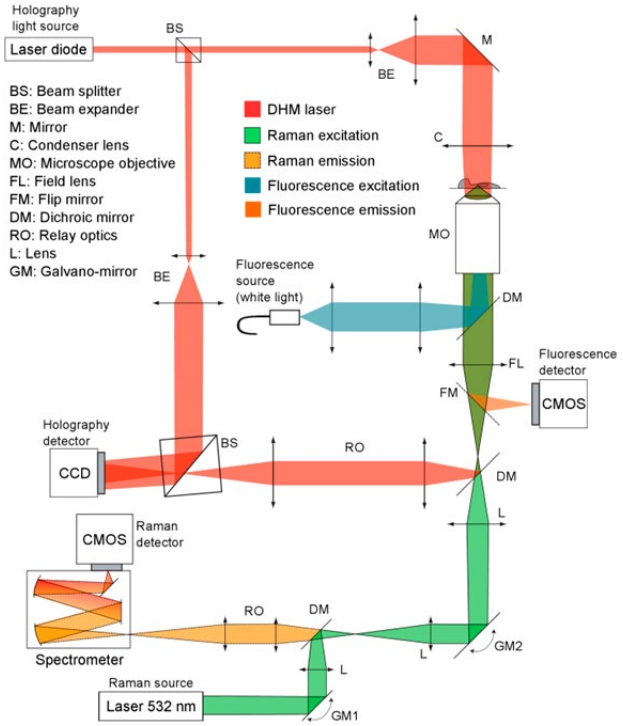


Figure 1: Experimental setup, enabling measurements of QPM, Raman and fluorescence (adapted from [2]).

After measurement, the images of both QPM and autofluorescence can be combined through a registration procedure for further analysis (see Fig.2). One can see that the two modalities show rather different contrasts, with QPM (green) highlighting the overall cell shape, with nucleoli and some cytoplasmic structure visible. On the other hand, autofluorescence (red) provides contrast mainly in the cytoplasm, with more structure within cells. The two images clearly possess complementary information.

Based on the recorded data, we then developed a protocol to analyze the registered images and segment the cells to extract morphological parameters for further analysis. This has been performed through the *CellProfiler* program, which is distributed as an open source code [5].

Several parameters can then be extracted from the cell images based on the cellular regions, either from the quantitative values from QPM images, or from autofluorescence images, whose intensity is related to ROS concentration. On the other hand, Raman spectra can be processed to be representative of the whole cell content and comparable for further analysis [6].

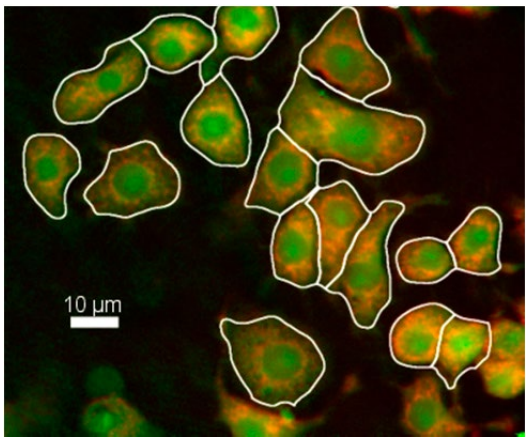


Figure 2: Live Raw264 macrophage-like cells, measured both in QPM (green) and autofluorescence (red). The white outlines show the result of segmentation for the cell located in the field of view.

3. Validations

We first ensure that the experimental setup can detect the elevation of ROS levels upon standard stimulations. To this end, we measure the fluorescence from cells after exposure to lipopolysaccharide (LPS), which simulates bacterial infection. We compare the autofluorescence signal with the fluorescence from the CellROX® dye, which measures the oxidative stress level.

As shown in Fig.3, the overall signal is significantly higher in stimulated cells, as expected from the ROS concentration increase under activation. One can note that autofluorescence has a larger difference,

probably due to the larger amount of endogenously emitting molecules. However, this difference is not sufficient to provide a satisfactory classification, as shown by the large variation.

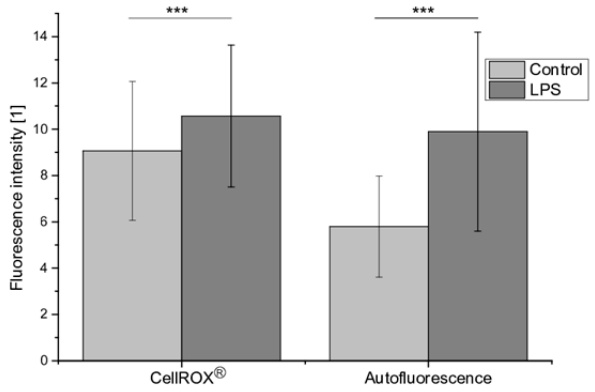


Figure 3: Comparison of fluorescence signals emitted from stimulated cells by an oxidative stress detection dye and autofluorescence.

We also validated the algorithmic approach, by first testing various methods to segment the cells. Interestingly, the QPM images provide much reliable results than fluorescence, thanks to their signal representing the overall shape of the cell, and the possibility of largely compensating for background artifacts in phase images, while autofluorescence images led to a large amount of sub-divisions. The result of segmentation is shown in Fig.2, where white outlines represent the selected regions.

We also tested different approach to develop the statistical model based on the extracted parameters from label-free images and signals, ranging from linear methods (linear discriminant analysis, logistic regression) to non-linear ones (polynomial regression, support vector machine) [7]. We found that linear classifiers combined with assisted variable reduction to reduce the amount of employed parameters provided the most stable results.

4. Single cell classification

We then applied the measurement and analysis protocols described above to develop a statistical model of stimulated macrophage cells which could then reliably predict the activation state of single cells. To prepare and test the model, we measured Raw264.7 cells, which is a macrophage-like mouse cell line derived from lung-residing macrophages. We measured cells plated on several dishes to account for culture differences, and stimulated them with LPS to simulate a bacterial infection. We then extracted a statistical model based on hundreds of cells explaining the difference between stimulated and control dishes. To validate our approach, we then applied our statistical model to other batches of cells, which were measured in similar conditions, but on different days throughout weeks following the initial measurements, to account for possible differences in cell health conditions, or calibration issues in the experimental system. The results show that we can consistently reach around 85–90% prediction accuracy between the expected cell activation state and the presence of the stimulus. Furthermore, the results are very consistent between cross-validated training and testing data, a strong indication of a stable model. Practically, the prediction yields a probability of being activated for each single cell, where the difference between control and LPS dishes can clearly be seen from the cells scores distributions within dishes (see Fig.4A). The results also lead to population densities (see Fig.4B), where the two main groups can be clearly identified. These results are also

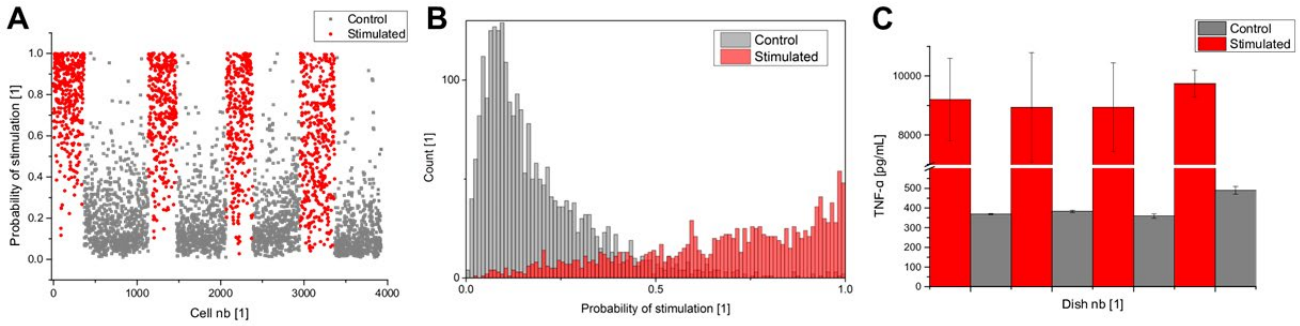


Figure 4: Results of single cell classification of activate state. Single cell activation probability, (A) plotted for each cell, where the different dishes (alternating stimulation and control) can be identified, and (B) plotted as population densities. (C) ELISA assay for TNF-α production for each dish (adapted from [8]).

confirmed with ELISA assays performed on the supernatant of the culture medium after measurements, where TNF-α levels, a secreted cytokine known to be released by activated macrophages, show that the cells, as a population, are activated in LPS dishes as shown in Fig.4C.

It is also possible to employ the spectral data to study the molecular content of cells, as shown in Fig.5A with a typical cell spectrum, and to employ the Raman spectra for developing a model enabling the recognition of the activation state of macrophage cells, even though the use of continuous data like a spectrum requires more steps than for discrete parameters. This can be seen in Fig.5B, where cells from control and stimulated dishes are clearly separated in different populations through the analysis of spectral features. Interestingly, the morphological and spectral features are highly complementary. While one can imagine that morphological features can be dependent on cells conditions, Raman measurements are rather stable in regards to cell health, but can depend on the substrate quality, as shown in Fig.5C. Combining the two types of information can then contribute to derive more stable predictors.

5. Discussion

The approach proposed here enables the possibility of assessing a complex biological behavior such as macrophage activation based on label-free indicators, so that cells can be observed directly in culture without any preliminary preparation protocol.

As the technique is based on imaging, it is possible to extract the parameters and derive the estimator for each cell in the field of view, leading to high-throughput single-cell estimators. Based on a combination of morphological, structural and chemical parameters derived from QPM and autofluorescence, it is possible to derive a statistical model which can reliably predict the activation state of cells measured several days or weeks apart, despite the fact that the changes induced by stimulation with LPS on macrophages cells are expected to be small, as it consists in a reversible change within a cell type known for its plasticity.

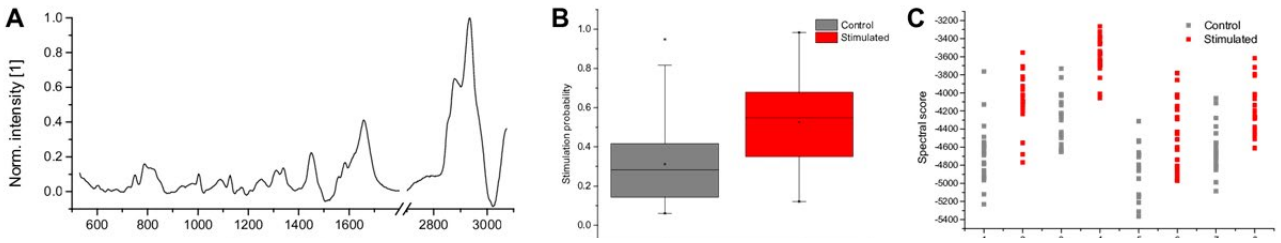


Figure 5: (A) Typical averaged spectrum of cells. (B) Probability of being stimulated based on spectral features, showing distinct populations. (C) Individual cell scores extracted from multivariate analysis, showing dependency on dish number.

Interestingly, as the method is purely based on label-free measurements, so that all signals are generated by endogenous content, it implies that the same approach can be applied to other targets, provided that training data is available. As the statistical model is developed based on existing measurements, another model could readily be developed to suit the objective target for further predictions.

Acknowledgments

This research has been supported by the Nakatani Foundation for Advancement of Measuring Technologies in Biomedical Engineering through a grant for research development (31st edition), and by the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) World Premier International Research Center Initiative Funding Program.

References

[1] D.M. Mosser and R.Gonçalves, "Activation of Murine Macrophages," In *Curr. Protoc. Immunol.* vol. 111, pp. 14.2.1–14.2.10. John Wiley & Sons, Inc. (2015).

[2] N.Pavillon, A.J. Hobro, and N.I. Smith, "Cell Optical Density and Molecular Composition Revealed by Simultaneous Multimodal Label-Free Imaging," *Biophys. J.* **105**(5), pp. 1123–1132 (2013).

[3] N.Pavillon and N.I. Smith, "Maximizing throughput in label-free microspectroscopy with hybrid Raman imaging," *J. Biomed. Opt.* **20**(1), p. 016,007 (2015).

[4] H.-Y. Hsu and M.-H. Wen, "Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression," *J. Biol. Chem.* **277**(25), pp. 22,131–22,139 (2002).

[5] E. Carpenter, T.R. Jones, *et al.*, "CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes," *Genome Biol.* **7**(10), pp. 1–11 (2006).

[6] N.Pavillon and N.I. Smith, "Higher Raman throughput by hybrid spectroscopy and imaging measurements," In *Focus on Microscopy*, Vibrational & Nonlinear Microscopy III: Raman microscopy, p. TU–MO–PAR–E. Göttingen, Germany (2015).

[7] T.Hastie, R. Tibshirani, and F.Jerome, *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*. Springer Series in Statistics, Springer-Verlag, New York, 2nd ed. (2009).

[8] N.Pavillon and N.I. Smith, "Detection of Macrophage Inflammatory Response through Label-free Microscopy," In *Focus on Microscopy*, Vibrational, Non-linear, p. P2–E/74. Taipei, Taiwan (2016).

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



研究責任者　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　　吉　川　裕　之

１．はじめに

血液、尿、唾液中などに含まれ、疾病や健康状態の指標となるバイオマーカー分子を高感度かつ安価・簡便に検出できれば、早期診断や予防医療に役立ち、医療費の増加などの社会問題の解決につながる。予防医療の観点からは、多くの一般の人々が、高度なバイオマーカー検査を、かかりつけの診療所や職場・学校・自宅などでも日常的に実施できる体制が重要であり、装置の小型化や検査コストの低価格化が切望される。一方、急性心筋梗塞ではバイオマーカーに基づく迅速な診断が重要であり [1]、このように急性期の医療現場においても、安価で小型の装置を用いたバイオマーカーの迅速高感度検出の必要性は極めて高い（図１）。

ELISA 法は、血液、唾液、尿などに含まれる極微量のバイオマーカー分子を極めて特異的かつ高感度に測定する手法であるが、専用の装置を用いるため、その利用は検査機関や研究機関、一部の総合病院などに限定され、誰もが日常的に利用

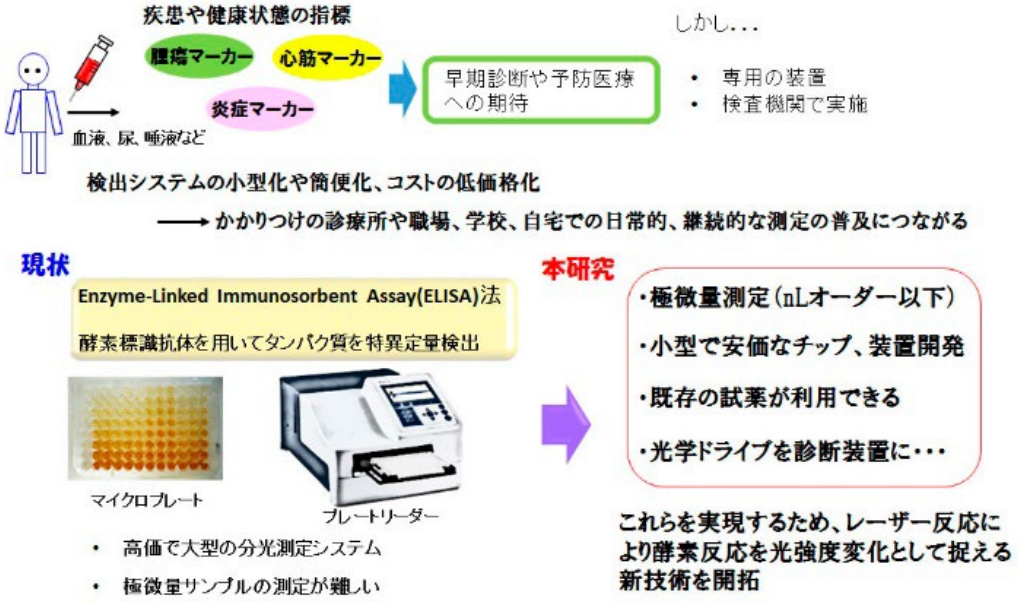


図1　研究背景

できる検査手法ではない。また、有用なバイオマーカーは現在も次々に研究・発見されており、今後、検査項目が増えれば必要なサンプル（血液）量も増加し、それに比例して必要な検査試薬の量、コストも増加する。肉体的負担と検査コストの両方の面において、必要サンプル量の微量化は極めて重要である。

マイクロウェルやマイクロ流路を利用したバイオセンサーチップは、サンプルの微量化だけでなく、反応・測定時間の短縮の面でも有用である[2)]。しかし、ELISA 法に広く用いられている吸光度測定は、サンプル量（光がサンプルを通過する光路長）を必要とするため、微量試料の測定には不適である（図 2a）。図 2b は同じ着色溶液の吸収スペクトルを、光路長 1cm と 20 ミクロンの光学セルを用いて測定した結果であるが、後者の吸光度はランバート・ベール則に従い前者の 500 分の 1 になり、測定できない。このような微量測定には蛍光測定が主に用いられるが、励起光をカットするための光学素子や高価な高感度光検出器を必要とするため、測定システムが大型で高価になる。

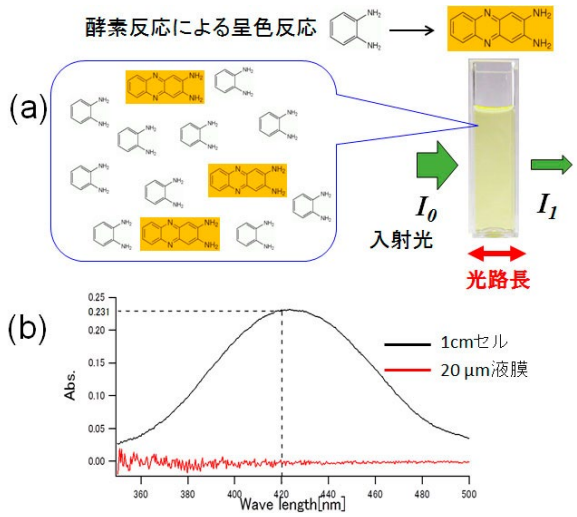


図2　比色定量測定の問題点

その他、バイオセンシングに関する研究の現況において、最先端のナノテク技術を駆使して、チップ上に微小な流路、電極、ナノ構造などを作り込み、高機能化、高感度化を実現する研究開発も盛んである[3, 4)]。しかし、このような技術は、最先端の研究や一部の高度な医療現場では有用であるが、コストや操作の複雑性の面から一般的な普及は見込めない。

o-フェニレンジアミン分子はペルオキシダーゼ酵素によって酸化重合して二量体（ジアミノフェナジン）を形成し、オレンジ色に呈色するため、酵素反応検出薬（発色基質）として用いられる[5)]。我々独自の研究により、o-フェニレンジアミン溶液にレーザーを集光すると自己触媒的に酸化重合が進み、集光点にナノ構造体が形成してレーザー反射光が変化することを見出した[6, 7)]。レーザーを集光し、その反射光を測定するという仕組みは、CD や DVD などの光学ドライブにおける“光ピックアップ”測定と同様であり、装置の小型化も期待できる。本研究ではこの独自技術を実用化に近づけ、有用性を具体的に示すため、以下の技術開発を行った。①グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼをガラス基板上に固相化した小型センサーチップを作製し、グルコースの定量測定を行った。②抗原抗体反応を特異定量検出するため、ELISA チップと小型測定システムの開発に取り組み、その特性を評価した。③マイクロウェルチップを作製し、約 10nL の極微量試料の測定を実施した。

２．実験

2.1　実験システム

用いた光ピックアップ型測定システムの概略図を図 3 に示す。レーザー光源には波長 532 nm の YAG レーザー(DPGL-2100F、PHOTOP)を用いた。レーザー光をビームエキスパンダーで拡げた後、ND フィルターを通し、倒立型顕微鏡（IX70-S1F2、OLYMPUS）へと導入した。レーザー光はハーフミラー(70 %反射、30%透過)で反射され、対物レンズ(UPlanFLN、60x、OLYMPUS)を用いて顕微鏡のステージ上にセットした基板上面(基板-溶液界面)へ集光させた。反

射光は光ファイバーを通り、光電子増倍管(R1166、Hamamatsu Photonics)で検出され、反射光強度（出力電圧）の時間変化を PC で記録した。顕微鏡のステージには XY 自動ステージ(BIOS-302T、SIGMA KOKI)を用い、レーザーの光路上には外部入力で開閉を制御できるシャッターを置き、これらを PC で自動制御することにより、複数個所、複数回の実験を自動的に行った。

また、レーザー光源、光検出器、メカニカルシャッター等を一体化し、持ち運びが可能な小型測定システムを構築した（図 4)。レーザーには波長 532nm の DSPP グリーンレーザー(SDL-532-020TL、Shanghai Dream Lasers)を用いた。レーザー光はシングルモードファイバーを通して導入した。レーザー光はビームスプリッタで反射され、対物レンズ(UPlanFLN、60x、OLYMPUS)を用いて試料ステージ上にセットしたガラス基板(基板－溶液界面)に集光させた。反射光は CCD カメラ(UI-2410SE-M-GL、iDS)で検出され、リアルタイム映像としてコンピュータに出力される。ND フィルターを上下させるサーボモータ及びソレノイドシャッターはマイコンボード(UNO R3、ARDUINO)を介してコンピュータからプログラムで自動制御した。

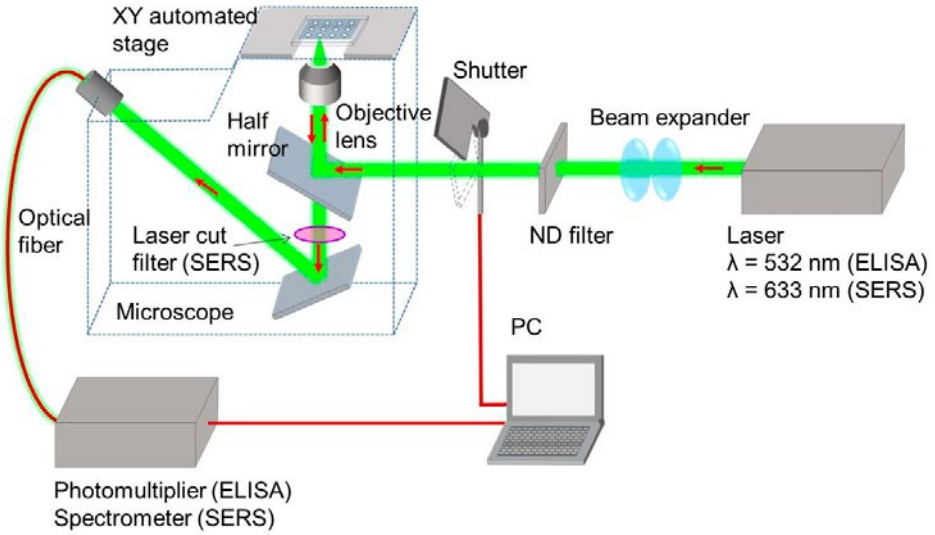
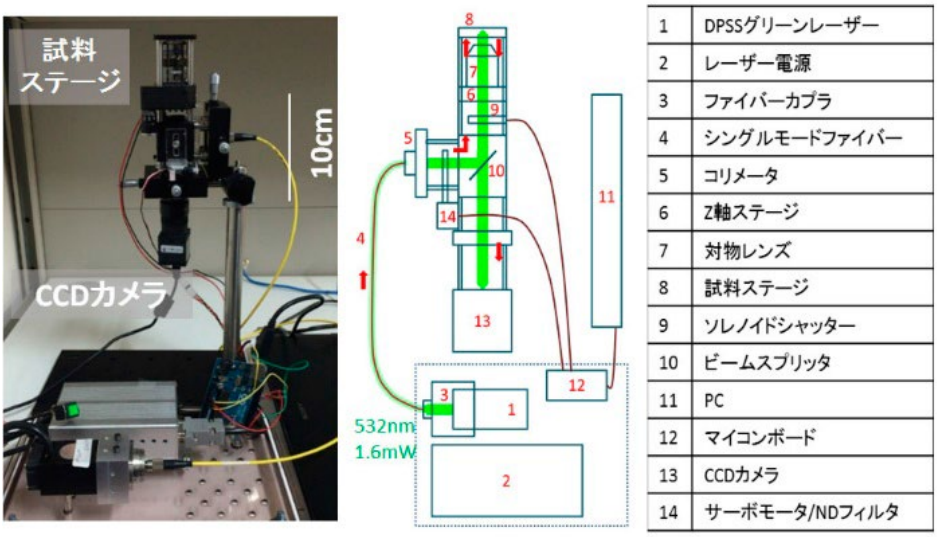


図3　測定システムの概略図



1	DPSSグリーンレーザー
2	レーザー電源
3	ファイバーカプラ
4	シングルモードファイバー
5	コリメータ
6	Z軸ステージ
7	対物レンズ
8	試料ステージ
9	ソレノイドシャッター
10	ビームスプリッタ
11	PC
12	マイコンボード
13	CCDカメラ
14	サーボモータ/NDフィルタ

図4　小型（可搬型）測定システムの概略図

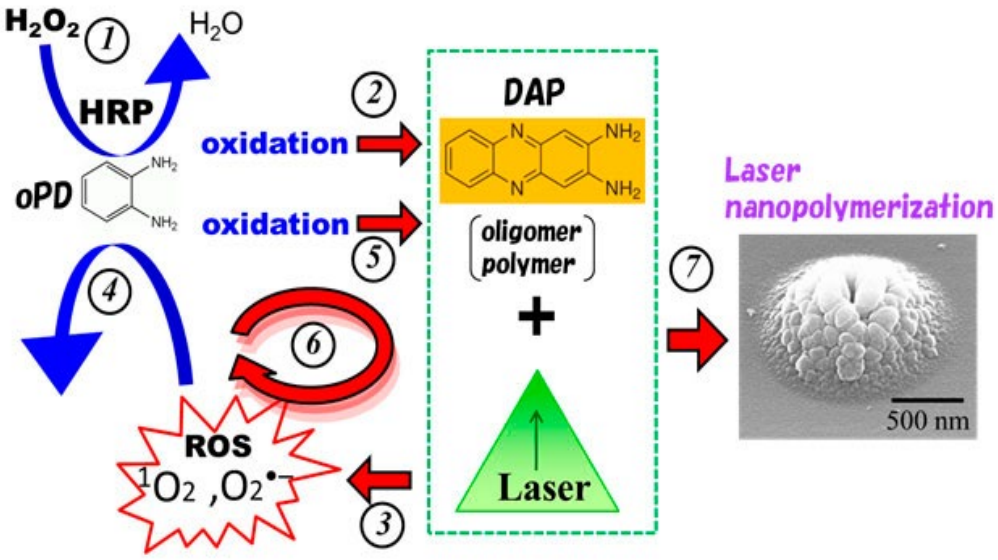


図5　測定原理

2.2　測定原理

図 5 を元に、o-フェニレンジアミン(oPD)分子の自己触媒的酸化重合反応について説明する。①西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応によって、過酸化水素(H_2O_2)が水に還元されると共に、②o-PD が酸化され、二量体の DAP が生成される。③ レーザーを照射すると DAP がレーザー光を吸収し、活性酸素が生成する。④ 活性酸素の強い酸化力によって、oPD が酸化され、⑤ DAP 濃度が増加する。⑥ 生成した DAP がレーザーを吸収し、③～⑤の過程が自己触媒的に進行する。⑦光強度の高いレーザー集光点に、DAP や重合の進んだポリフェニレンジアミンからなるナノ構造体が形成される。レーザー集光点にこのようなナノ構造が形成されると、レーザー光は強く散乱され、反射や散乱光の強度が増加する。すなわち、レーザーを集光し、集光点から戻ってくる反射光強度をモニターすることにより、この反応を捉えることができる。また、反応速度は初期の酵素反応で生成される DAP 濃度に依存するため、ナノ構造が形成されるまでの時間、すなわちレーザー反射光強度が変化するまでの時間を計測することにより、過酸化水素や HRP の濃度を求めることができ、グルコースセンサーや EIISA 測定に利用できる。図 6 に示すように、実際にはレーザー反射光強度は、ナノ構造の成長に伴い増加と減少を繰り返す複雑な時間変化を示す。これは、光の波長程度の構造物の光散乱が、形状や屈折率に依存することを反映しており、どのような時間変化を示すか予測することは困難である [8]。しかし、グルコースやタンパク質の測定には、時間変化曲線を長時間測る必要はなく、

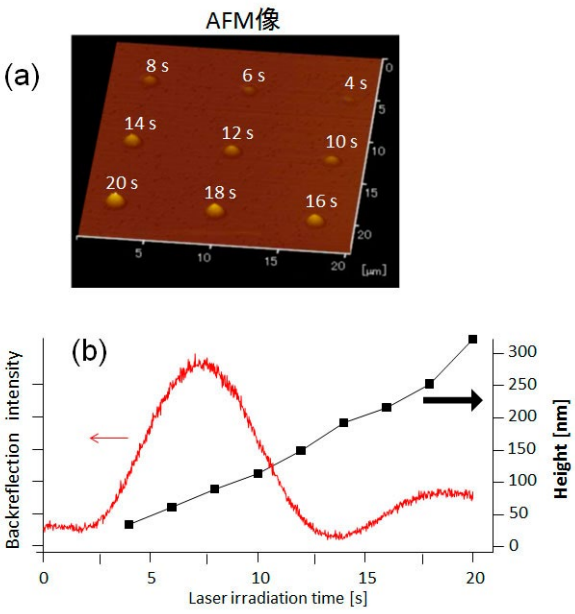


図6（a)異なるレーザー照射時間で形成したナノ構造の AFM 像(b)反射光強度（赤）とナノ構造の高さ(黒)の時間変化

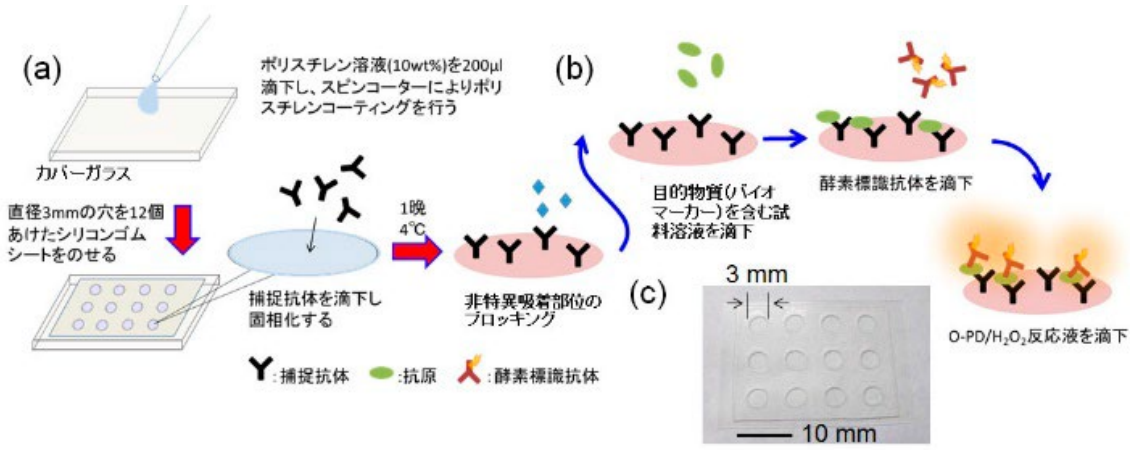


図7 (a)小型 ELISA チップの作製手順 (b)目的物質(バイオマーカー)および酵素標識抗体との抗原抗体反応と、反応試薬(発色剤 oPD/H_2O_2)の添加 (c)作製したチップの写真

反応速度、すなわちレーザー照射を開始してから反射光強度が変化するまでの時間が測定できればよい。実際には、反射光強度変化が明瞭な極大（あるいは極小）点を持つ場合には、その点までの時間をもとめ、不規則な反射光強度変化を示す場合には、照射開始直後（0 s）の反射光強度からの変化量の時間積分を測定した。

2.3 小型 ELISA チップの作製

ELISA において従来用いられてきたマイクロタイタープレートでは、一つの測定スポットで100～200 μL 程度の試料溶液が必要であった。本測定においては、1 ミクロン以下の点に集光されたレーザー光の反射光強度を検出する。したがって、1 回の測定に必要な基板の面積および試料の体積を従来法に比べ極めて小さくできることから、独自の小型 ELISA チップを作製した(図 7)。顕微鏡用カバーガラス(厚さ 0.12 -0.17 mm、24-36mm、MATSUNAMI)にポリスチレン溶液を 200 μL 滴下し、スピンコートした。この上に、直径 3mm の穴を 12 個あけたシリコンゴムシートをのせ、測定スポット（ウェル）を作製した。また、極微量測定のため、直径 500 μm の穴の開いた、厚さ 50 μm の PDMS シートを作製し、同様に基板上に貼り付けてマイクロウェルチップとした（図 8）。各ウェルに捕捉抗体の固相化とブロッキング処理を行い、ELISA チップとした。測定の際には、抗原となるタンパク質バイオマーカーを含む溶液を滴下し、1～2 時間インキュベート後、酵素標識抗体を反応させた。最後に oPD/H_2O_2 反応液を滴下し、30 分ほど反応させ、レーザー反射光強度測定を行った。

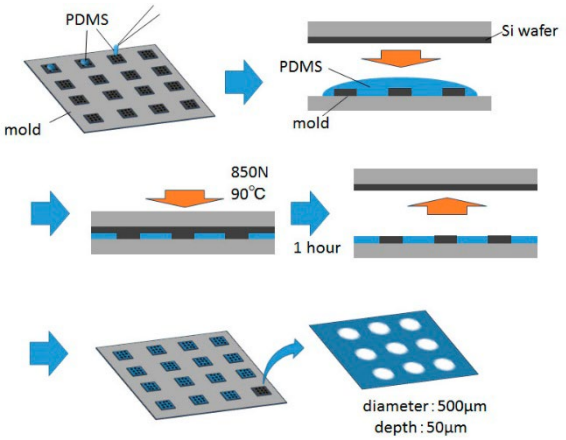


図8 マイクロウェルチップの作製

2.4 小型グルコースセンサーチップの作製

本手法の汎用性を示すため、酵素と oPD をドロップキャスト法により簡便に基板に固定化し、グルコースセンサーチップを作製した（図 9)。前節の ELISA チップと同様のシリコンゴムシートをガラス基板上に貼り付け、各ウェルに oPD、グ

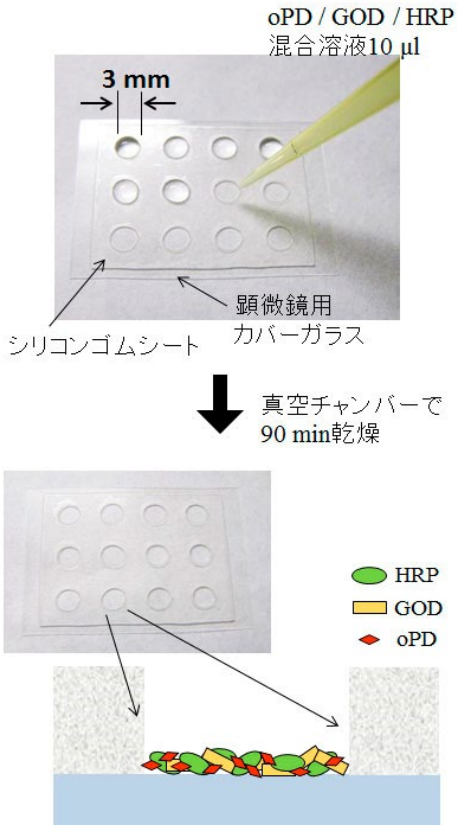


図9 ドロップキャスト法によるグルコースセンサーチップの作製

ルコースオキシダーゼ（GOD）、ペルオキシダーゼ（HRP）の混合溶液を滴下し、真空チャンバーで乾燥させた。測定の際にはグルコース溶液を滴下し、レーザー反射光強度を測定した。

３．結果と考察

3.1　グルコースの測定

2.4 節のセンサーチップの各測定スポットに、グルコース溶液を 10 µL 滴下し、基板と溶液の界面にレーザーを集光して反射光強度変化を測定した（図 10a）。グルコース溶液を滴下したウェル内では、GOD の酵素反応により、溶液中のグルコース濃度に応じた過酸化水素が生じる。oPD はこの過酸化水素と HRP により二量化し、DAP が生成する。従来法ではこの DAP 濃度を吸光度測定により比色定量するが、本研究では 2-2 節で述べたレーザー集光点における自己触媒的酸化重合反応によりナノ構造を形成させ、反射光強度変化を検出する。図 10b に、各グルコース濃度における反射光強度の時間変化を示す。グルコース濃度が高いほど、短い照射時間で反射光強度の増加が始まることが分かる。そこで、レーザー照射直

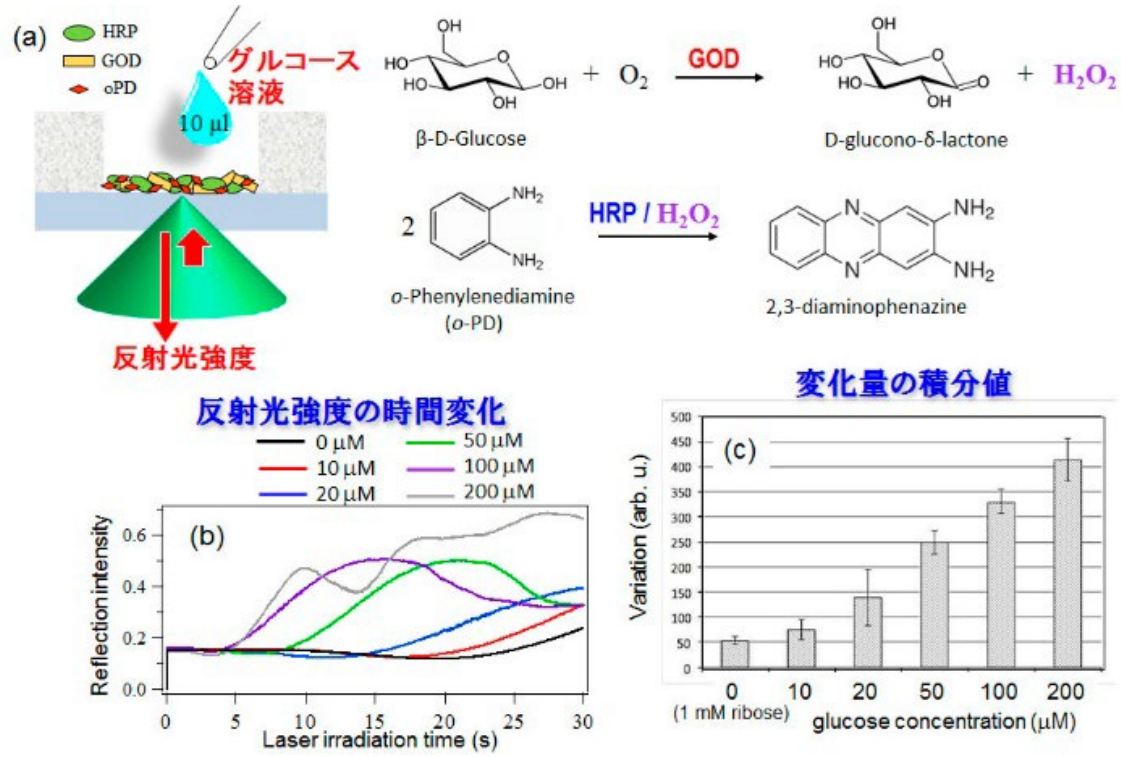


図10 (a)グルコースの測定原理と(b)測定結果

後（0 s 付近）における反射光強度からの変化量を、30 秒間積分した値を計算し、グルコース濃度に対してプロットした（図 10c）。10～200 μM の範囲で、グルコース濃度との相関を示し、本手法によってグルコースが定量出来ることが示された[9]。また、グルコース濃度 0 M の溶液中には、リボースが 1 mM 含まれているが、変化量が小さく、他の単糖においても同様の測定をした結果、グルコースを特異的に検出できることが示された。

3.2 心筋バイオマーカーの測定

自作の ELISA チップでの測定結果との比較のため、市販の ELISA 用抗体固相化プレートを用いて反応・呈色した oPD 溶液を、レーザー反射光強度測定で検出し、従来型の比色定量測定と比較した結果を示す。図 11 は心筋マーカーである C 反応性タンパク(CRP)とアディポネクチンを測定した際の、レーザー反射光強度変化と濃度の関係を示している。両者とも、タンパク質濃度が高いほど、短いレーザー照射時間で反射光強度が変化している。反射光強度変化が極大値をとる時間（ピーク時間）をタンパク質濃度に対してプロットすると、良好な相関関係がみられ、各タンパク質を本手法で定量出来ることが分かる。このような測定から、各種バイオマーカーを本手法と、従来型比色定量測定を用いて測定した結果を、表 1 にまとめる。比色定量法と同程度の感度と濃度範囲が得られており、アディポネクチンでは一ケタ以上低濃度まで測定可能であった。この結果は抗

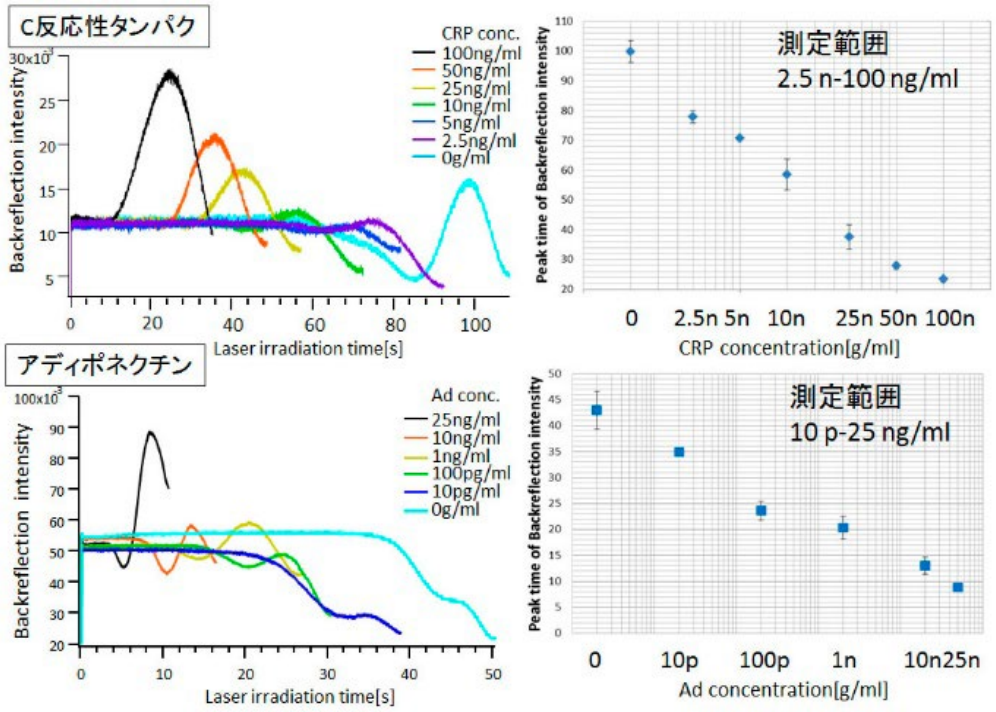


図11 CRP とアディポネクチンの測定結果

	C反応性タンパク	アディポネクチン	クレアチンキナーゼMB
吸光度測定(o-PD)	10 n-100 ng/ml	500 p-25 ng/ml	50 n-200 ng/ml
吸光度測定(TMB)	5 n-50 ng/ml	1 n-25 ng/ml	2.5 n-200 ng/ml
本手法	2.5 n-100 ng/ml	10 p-25 ng/ml	2.5 n-200 ng/ml

	ミオグロビン	トロポニンI
吸光度測定(o-PD)	25 n-1 μg/ml	100 p-10 ng/ml
吸光度測定(TMB)	10 n-1 μg/ml	100 p-5 ng/ml
本手法	10 n-1 μg/ml	500 p-10 ng/ml

表1 各種バイオマーカーの測定結果：従来法（プレートリーダーによる比色定量測定）と本手法の比較

体が固相化された市販のマイクロプレートを用いて反応させたものであり、各ウェルから反応溶液を 10 μL 程度とり、ガラス基板上に滴下することによりレーザー反射光測定を実施した。従って、本手法の有用性・実用性を明確に示すため、小型の ELISA チップを自作し、抗原抗体反応と反射光強度測定を行った。

3.3　ELISA チップによる測定

2-3 節で述べた手順で、ガラス基板に抗インターロイキン 6（IL-6）抗体と抗 CRP 抗体を固相化した小型 ELISA チップを作製し、本手法を用いた IL-6 と CRP の定量測定を行った。反応試薬として o-PD/H_2O_2 反応液を各ウェルに 12.5μL 滴下し、レーザーを集光して反射光強度変化を測定した。図 12 a に IL-6、図 12b に CRP を測定した際の、反射光強度の時間変化および濃度とピーク時間の関係を示す。これまで同様、ターゲットのタンパク質濃度が高いほど、ピーク時間が早くなり、IL-6 ではおよそ 5~500 pg/mL、CRP ではおよそ 5～100 ng/mL の濃度範囲で測定可能であることが示された。この結果は、市販の ELISA キットを用いた場合と同程度の感度及び測定範囲であり、作製した ELISA チップとレーザー反射光強度測定の実用性を示すことができた。

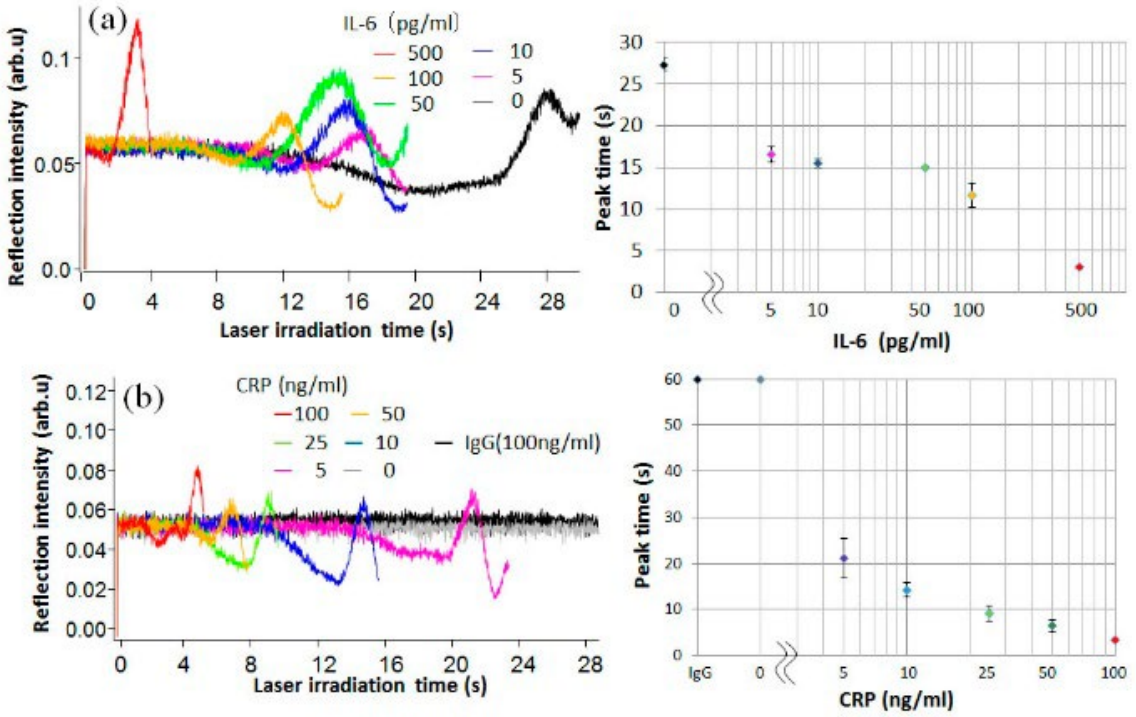


図12　自作の ELISA チップを用いたバイオマーカーの測定結果

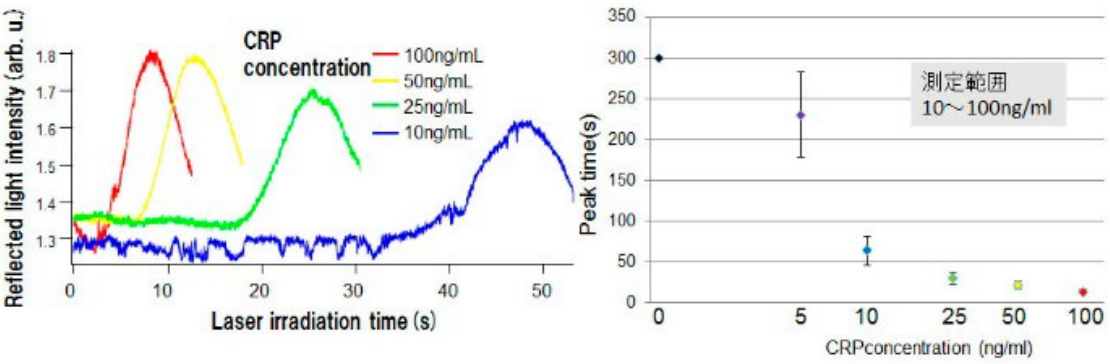


図13　小型測定システムを用いた CRP の測定結果

3.4　小型測定システムの評価

図 4 で示した小型の測定システムを用いて、CRP の測定を行った。反射光強度の時間変化が、CRP の濃度に対して依存し、10～100 ng/mL の濃度範囲での測定が可能であった（図 13）。図 12b と比較し、検出限界濃度が少し高いが、これは反射光強度変化に要する時間が長くなっているためである。図 12b と小型測定システムを用いた図 13 は、レーザー強度などの測定条件は同じであるが、小型システムでは光ファイバから射出したレーザー光を対物レンズで集光するコンパクトな光学系としたため、光学顕微鏡を利用したシステムに比べ集光スポットサイズが大きいと考えられる。そのため、小型システムでは単位面積当たりのレーザー強度が低く、酸化重合反応によりナノ構造体が形成して反射光強度が変化するまでに時間を要する。この点に関しては、システムの改良により解決できると考えられる。

3.5　極微量サンプルへの応用

最後に、本手法の最大の利点である極微量測定を実証するため、マイクロウェルチップを用いて CRP の測定を行った。1 つのウェルの体積は 10 nL である。図 14 に示すように、CRP 濃度に依存した明瞭な反射光強度変化が得られ、およそ 5～100 ng/mL の濃度範囲で測定可能であることが示された。このような極微量測定は、従来型の比色定量法では難しく、代わりに蛍光検出が利用される。しかし、蛍光測定に対応したプレートリーダーは、励起光源や高感度光検出器を利用するため高価である。また、試料からの自家蛍光などにより、感度や精度が落ちる場合もある。レーザー反射光を利用する本手法により、極微量 ELISA 測定におけるこのような問題点を克服できる可能性が示された。

4．まとめ

本研究ではレーザー反射光変化を測定するオリジナルな手法でタンパク質バイオマーカーを測定するための ELISA チップを作製し、各種バイオマーカーの特異定量測定を実施してその特性を評価し、実用性・有用性を示した。また、小型の測定システムを構築して自作のチップを用いた測定を行い、レーザーを集光して反射光強度を測定するというシンプルな光学系で動作し、安価でコンパクトな測定システムが構築できることも示した。さらに容量１０nL のマイクロウェルチップを作製し、極微量サンプル中のタンパク質バイオマーカー測定に成功した。最後に今後の課題と展望について述べる。さらなる感度向上のための課題としては、チップ作製における抗体の固相化法の改良が挙げられる [10]。本研究ではポリスチレンをコートした表面に抗体を物理吸着させたが、表面を構造化することにより吸着面積を向上させる手法、化学結合により抗体を固相化する手法などにより、より低濃度まで測定できると期

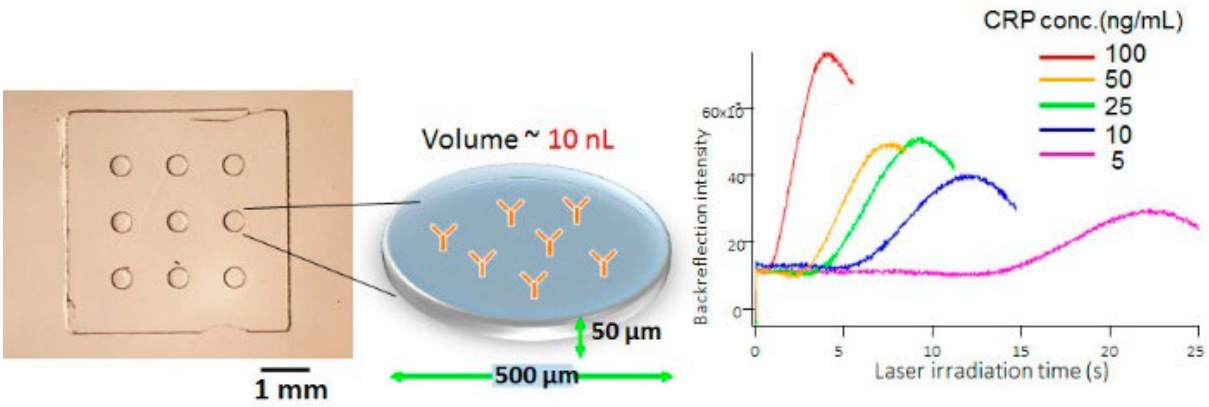


図14　マイクロウェルチップを用いた CRP の測定結果

待できる。現状においても、集光スポット内に形成される 1 ミクロン程度のナノ構造を検出しているため、実際に測定している分子数は、従来測定よりも 3 桁程度少なく、絶対量としては高感度に検出できているといえる。また、10 nL よりも少ない溶液量でも十分測定可能であるが、サンプル、酵素標識抗体、発色剤等の滴下、洗浄などが通常のピペッティングでは困難になる。これらを解決するためのマイクロ流路や MEMS 技術との融合による、さらなる極微量測定への展開も期待できる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援賜り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いたします。

参考文献

1) Anjum Qureshi, Yasar Gurbuz, Javed H. Niazi, Sensors and Actuators B, 171-172, 62-76, (2012)
2) Seokheun Choi, Michael Goryll, Lai Yi Mandy Sin, Pak Kin Wong, Junseok Chae, Microfluid Nanofluid, 10, 231-247 (2011)
3) 吉川裕之、斉藤真人、民谷栄一, ナノフォトニックバイオセンサー, ぶんせき, 11, 619-627, (2012)
4) 民谷栄一　監修, ナノ融合による先進バイオデバイス, シーエムシー出版（2011）
5) Sara Fornera, Peter Walde, Analytical Biochemistry, 407, 293-295, (2010)
6) Hiroyuki Yoshikawa, Shuhei Imura, Eiichi Tamiya, Analytical Chemistry, 84, 9811-9817 (2012)
7) Hiroyuki Yoshikawa, Novel nanobiosensing using a focused laser beam, in NANOBIOSENSORS AND NANOBIOANALYSES, Springer, Berlin, 167-168 (2015).
8) H. C. v. d. Hulst, Light Scattering by Small Particles, Dover Publications, New York, (1981)
9) Hiroyuki Yoshikawa, Shuhei Imura, Eiichi Tamiya, RSC Advances, 5, 56423-56429 (2015)
10) Asta Makaraviciute, Almira Ramanaviciene, Biosensors and Bioelectronics, 50, 460-471 (2013)

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



研究責任者　東京大学大学院　医学系研究科
細胞分子薬理学教室
助　教　　関　谷　　敬

１．はじめに

脳梗塞は、死亡原因の上位に位置し、死に至らなくても麻痺や言語障害をはじめとする重篤な後遺症が残る疾患で、社会に対する負荷も重大である。脳梗塞は、脳の血管内に血栓などが塞栓し、一部の脳血流が途絶えることにより引き起こされる。血流低下に伴い、神経細胞死が起き、様々な脳機能が障害され後遺症となる。この後遺症からの回復には、長期にわたるリハビリなどを強いられる上、完全な回復は難しい。これまで、脳梗塞について多くの研究が行われてきた。しかし、脳梗塞は急速に進行する病態であることや、梗塞の状態や合併症が症例ごとに著しく異なることなどから、臨床におけるヒトを対象とした研究は非常に困難である。そのため、脳梗塞における神経細胞死に対し、病態を踏まえた有効な治療法は十分には開発されていない。現在でも、脳梗塞発症から数時間以内の急性期に血栓溶解薬を投与するという再灌流療法のみが、主な治療法である。

近年、この再灌流療法の広まりとともに、脳梗塞の新たな病態モデルが提唱されている。脳梗塞では、脳血管に塞栓が起きる。血流が途絶えた領域では、直ちに神経細胞死が引き起こされ、梗塞巣となる。一方、梗塞巣の周辺領域は、直ちには神経細胞死に至らないが、血流低下により一時的に正常な神経活動が停止した、ペナンブラと呼ばれる領域となる（図１）。この血流の低下したペナンブラでは、神経細胞死には至らないものの、

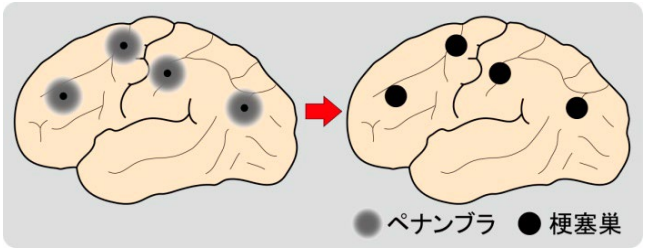


図1　梗塞巣とペナンブラ

神経細胞は非常に脆弱な状態である。このペナンブラに、梗塞巣外縁から伝播する異常神経活動(Periinfarct Depolarization)が引き起こされることで、大きなエネルギー消費を強いられ、神経細胞死を起こして梗塞巣へ移行してしまう。現在、このペナンブラへ拡大してゆく梗塞巣が、初期の梗塞巣より結果的に大きくなり、脳損傷の大きな割合を占めていることが示唆されている。このため、この梗塞巣拡大を止めることが、脳梗塞の非常に有効な治療と考えられている。

この梗塞巣拡大に対し、基礎医学研究に基づき、様々な治療法が提案されてきたが、有効なものはほとんどない。その理由として、ヒトでの病態を十分に反映した動物モデルがないことがあげられる。現在の脳梗塞モデルは、中大脳動脈を永続

的または一時的に遮断することにより、梗塞巣を作製する。これらのモデルは、梗塞が形成される脳部位や領域などにばらつきの少ない、研究に適した梗塞巣を作製できるなど、非常に優れた特徴を数多く備えている。しかし、梗塞巣が大きくペナンブラが生成されないといった問題や、一時的な虚血と再還流により作製されたペナンブラは実際の病態と異なっているなどの問題もある。このため、動物モデルで有効性を示した新しい治療法が、臨床試験において無効であることが多く見られた。

このため、ヒトでの病態を忠実に反映した動物モデルが切望されている。そこで我々は、これまでの動物モデルの問題点を克服すべく、新しい動物モデルの作製を考えた。脳血流の低下は、脳内の微小血管での血栓塞栓により局所的に実現され、その他の領域への血流供給が保たれることが望ましい。そのため、マウスの血液から作製した血栓を、外頚動脈を逆行させて内頚動脈へ注入することを行った。外頚動脈へ血栓注入ラインを留置することで、総頚および内頚動脈を傷つけることなく、脳内に梗塞巣を作ることができる。血管の損傷は、脳梗塞とは異なる脳血流低下の原因となるため、脳梗塞病態の忠実な反映には、非常に重要だと考えられる。このような逆行性の血栓注入法により、脳への血流を保ったまま脳血管に血栓塞栓を起こし、病態を忠実に再現するモデルの実現に取り組んだ（図２）。さらに、この血栓塞

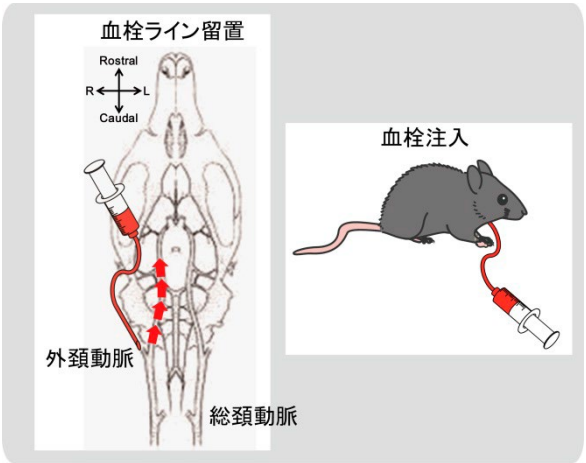


図2　外頚動脈からの血栓注入

栓モデルにおいて、脳内の神経細胞やグリア細胞といった多様な細胞の、活動の時空間動態や、細胞間のシグナル動態を可視化してとらえ、脳梗塞の複雑な病態を解明し、治療法開発へつなげることを目的とした。

我々はこれまでに、KENGE-tet 法という新しいマウス遺伝子改変技術を用いて [1]、生きた動物の脳内で、神経細胞やアストロサイトの活動を詳細にとらえる可視化法を実現している（図３）[2]。

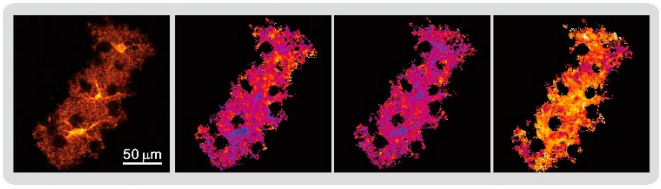


図3　アストロサイト活動の可視化

また、細胞外シグナル分子であるグルタミン酸の生体内可視化にも成功しており（図４）[3]、これらの可視化法を発展させ、脳梗塞モデルマウスへ応用することを考えた。そこで本研究では、

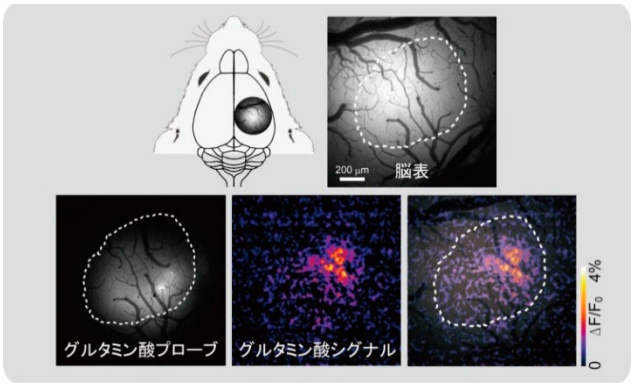


図4　細胞外グルタミン酸動態可視化

KENGE-tet 法を脳梗塞モデルへ応用し、脳梗塞急性期において、梗塞巣拡大に深く関与する異常神経活動と、その時のアストロサイトの活動の可視化解析を行なった。さらに、シグナル分子の可視化法を発展させ、神経細胞およびアストロサイトの細胞外シグナル分子である ATP の生体内可視化法を新しく確立し、脳梗塞急性期における神経細胞－アストロサイト間相互作用を捉え、脳梗塞の梗塞巣拡大メカニズムの解明に取り組んだ。ATP は、生理的状態において、神経活動の抑制に関与することが知られており [4]、脳梗塞の病態生理においても重要な働きを持つと考えられる。

２．脳梗塞モデルの作製と評価

2.1　血栓塞栓モデルの作製

忠実な病態再現のため、血液から作製した血栓を用い、梗塞を作製する。この際、血栓注入のためのライン留置操作などにより、血流途絶や血管内皮損傷が内頚動脈に起こると、脳血流が低下し、実際の脳梗塞病態とは異なってしまう。このため、外頚動脈から逆行性に血栓を導入する手法を開発し、血栓塞栓による脳血流低下を実現した。

2.2　血栓塞栓モデルの MRI による確認

外頚動脈経由での血栓注入後、脳内に目的とする梗塞巣が完成したことを、小動物用 MRI を用いて確認した。血栓注入による梗塞巣作製後、2 時間以内に血流低下領域が検出（図５：赤矢頭）され、10 日後には虚血領域の中心部に梗塞巣の完成が確認できた（図５：黄矢頭）。生理食塩水を注入したコントロールでは、梗塞巣は見られなかった。

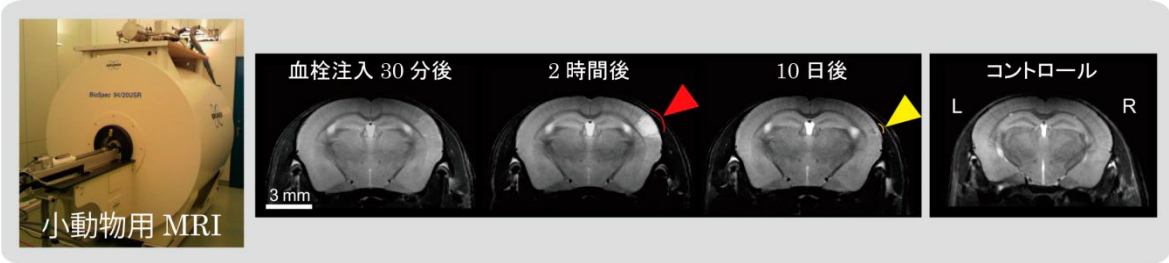


図5 MRI による梗塞巣評価

2.3　血栓塞栓モデルにおける細胞形態

さらに、脳透明化法及び共焦点顕微鏡を用い、梗塞巣周辺の神経細胞及びアストロサイトの形態変化を検出した。梗塞外の正常領域（図６：左）

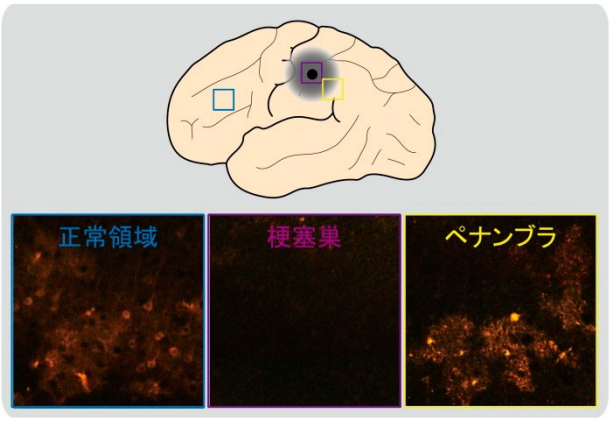


図6 脳透明化による梗塞巣評価

では、神経細胞及びアストロサイトの正常な形態が確認できた。梗塞巣中心（図６：中）では、細胞が脱落していた。梗塞巣に隣接するペナンブラ（図６：右）では、神経細胞の脱落とアストロサイトの微細突起の膨潤という形態変化が認められた。これらより、外頚動脈経由での血栓注入法を用いて、ペナンブラのある脳梗塞モデルマウスを作製できた。

３．脳梗塞急性期における細胞活動の可視化

梗塞モデルの作製に成功したので、次は脳梗塞急性期において、Ca^{2+}イメージング法を用いて異常神経活動をとらえ、さらにその際のアストロサイト活動の時空間動態の可視化も行った。

3.1　血栓塞栓直後の神経活動

神経細胞特異的なプロモータを用いて、Ca^{2+}インジケータを神経細胞に発現させ、二光子励起顕微鏡を用いて Ca^{2+}活動を可視化した（図７：上段左）。血栓注入後より、神経細胞は周期的な活動を示した（図７：上段右）。図７の下段は、神経細胞の Ca^{2+}シグナルの強調画像で、神経活動は周期的かつウェーブ状の伝播を示した。

3.2　血栓塞栓直後のアストロサイト活動

神経細胞と同様に、アストロサイト特異的なプロモータを用いて、Ca^{2+}インジケータをアストロサイトに発現させ、二光子励起顕微鏡を用いて Ca^{2+}活動を可視化した（図８：上段左）。血栓注入後、神経細胞と同様に、アストロサイトも周期的な活動を示した（図８：上段中）。血栓注入による梗塞の前後で、アストロサイトは、微細突起の膨潤などの形態変化が確認できた（図８：上段

右)。図８の下段は、アストロサイト Ca^{2+}シグナルの強調画像で、周期的かつウェーブ状の時空間動態を示した。

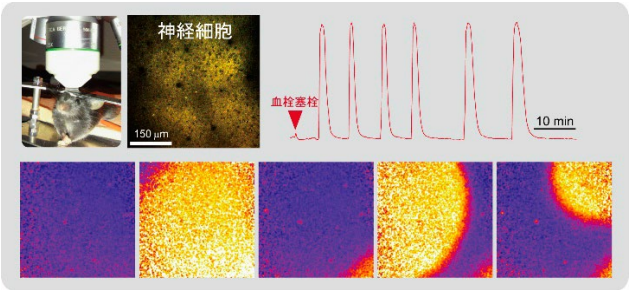


図7 血栓塞栓後の周期的な神経活動

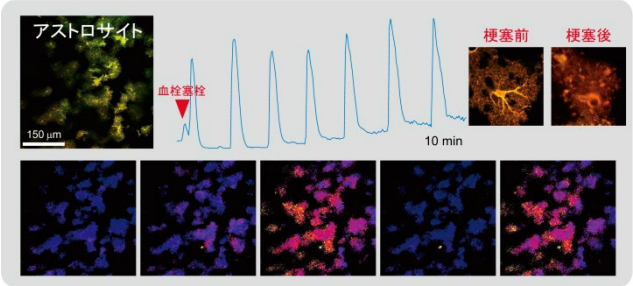


図8血栓塞栓後の周期的なアストロサイト活動

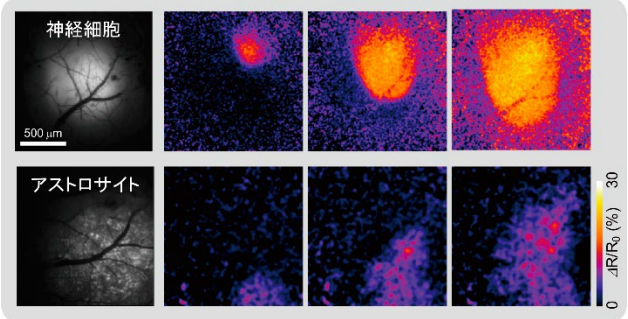


図9 神経およびアストロサイト活動の伝播

3.3 神経・アストロサイト活動の伝播

血栓注入後、神経細胞及びアストロサイトともに周期的な活動を示したことから、この活動が大脳皮質の広い範囲へ伝播するかについて、可視化解析を行った。蛍光実体顕微鏡を用いて、数 mm 四方の広い脳表の範囲を観察し、血栓を注入した。神経細胞（図９：上段）及びアストロサイト（図９：下段）ともに、周期的に見られる活動が、大脳皮質の広い範囲をウェーブ状に伝播することを可視化できた。

４．生体内での細胞外 ATP 可視化法の開発

脳梗塞モデルにおいて、神経細胞及びアストロサイトが共に、ウェーブ状の伝播する活動を示すことを可視化できたため、続いて、神経細胞－アストロサイト間の細胞外シグナル分子である ATP の蛍光イメージングを行い、神経細胞－アストロサイト間の細胞間相互作用の解析を行った。

4.1 ATP 可視化に用いる蛍光プローブ

ATP イメージングには、ATP 結合タンパクと赤色蛍光色素を融合させた、ハイブリッド型の蛍光プローブを作製し、使用した。このプローブは、ATP と結合することで最大2倍の蛍光強度変化を示した（図 10：上段）。また、ATP への選択性も高く、pH に対する安定性も高いことも確認された。

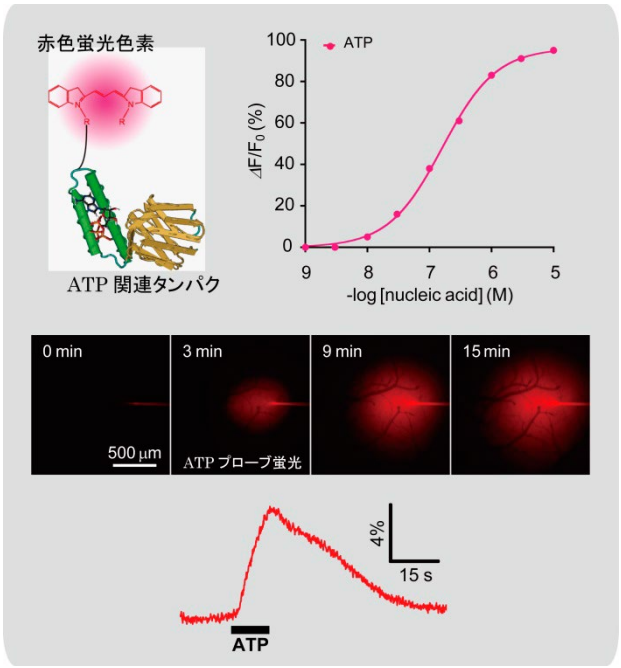


図10 ATP プローブ

4.2 生体内での ATP 可視化

この ATP プローブを in vitro にて合成した後、マウス大脳皮質に微小ガラス管を用いてインジェクションし、細胞外スペースに導入した（図 10：中段）。プローブ導入後、ATP 溶液の注入により、約 10%の蛍光強度増加を示した（図 10：下段）。このように、生体内での細胞外 ATP シグナルの可視化に成功した。

５．脳梗塞急性期における ATP 動態と作用

ATP 可視化法を確立できたため、脳梗塞急性期へ応用した。ATP プローブを導入したマウスに対し、外頚動脈から血栓を注入し、脳梗塞急性期における ATP 動態を可視化した。

5.1　血栓注入直後の ATP 動態

Ca^{2+}インジケータでとらえた神経細胞及びアストロサイトのウェーブ状の活動伝播と同様に、ATP動態もウェーブ状の伝播を示した。図11に、大脳皮質へ導入された ATP プローブの蛍光画像（図 11：左端）と、ATP シグナルの差分強調画像を示す。差分強調画像においては、異常神経活動に伴う ATP ウェーブの進行波面が確認できる（図 11：右端・矢頭）。

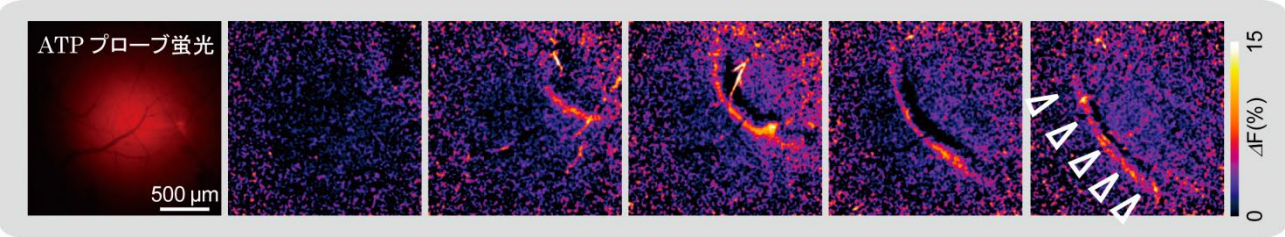


図11 血栓注入直後の伝播する ATP シグナル

5.2　脳における細胞外 ATP の作用

脳梗塞急性期には、細胞外 ATP 濃度がウェーブ状に上昇することが示された。この ATP シグナルがどのような作用を持つかを調べるため、大脳皮質細胞外スペースに微小ガラス管を用いて ATP をインジェクションした際の、神経細胞とアストロサイトの活動を可視化した（図 12）。ATP インジェクションにより、細胞外 ATP 濃度が上昇し、ATP プローブの蛍光強度が増加した（図 12：上段）。一方、ATP 濃度上昇時に、神経活動は抑制された（図 12：中段）。また、アストロサイトは ATP 濃度上昇により、活動が増加した（図 12：下段）。これらより、細胞外 ATP は神経活動を抑制し、アストロサイトの活動を引き起こすと考えられる。

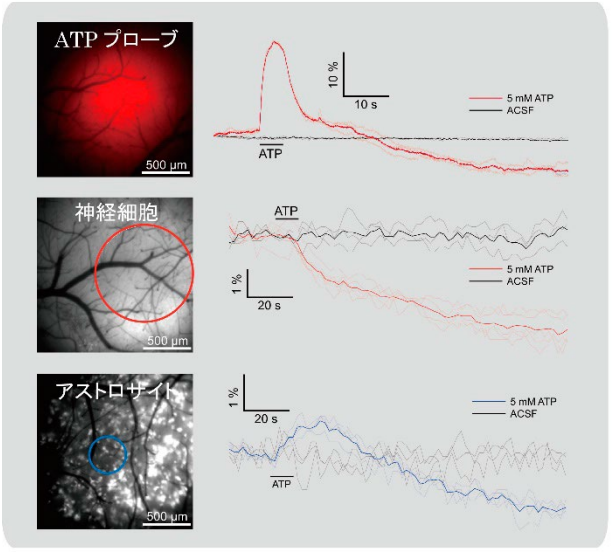


図12 細胞外 ATP の作用

5.3 ATP による異常神経活動抑制モデル

脳梗塞急性期には、梗塞領域外にて、神経細胞やアストロサイトの活動、及び細胞外 ATP シグナルが、ウェーブ状に伝播する。また、細胞外 ATP は神経細胞に対して抑制性に、アストロサイトに対して興奮性に働く。これらより、神経細胞の異常活動の伝播（図 13：上段・中段）に対してアストロサイトが反応し、ATP を放出することで周囲のアストロサイトを活動させるとともに、神経活動を抑制する（図 13：下段）と考えられる。

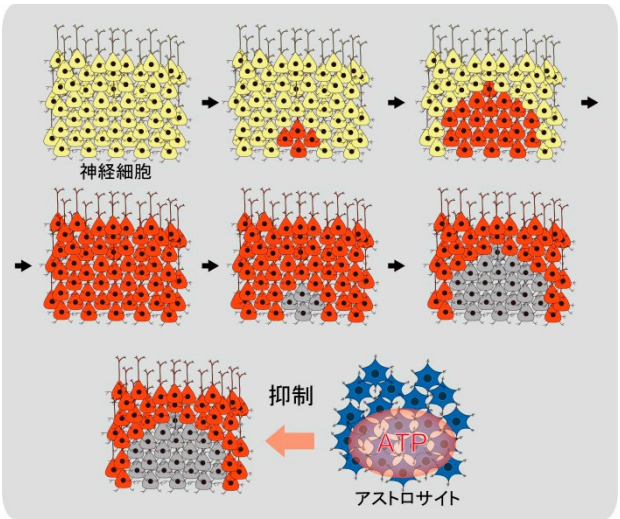


図13 ATP による神経活動抑制モデル

６．まとめ

本研究では、ペナンブラを再現できる新しい脳梗塞モデルを確立した。このモデルの梗塞巣を、MRI 及び細胞形態で評価し、ペナンブラの形成を確認した。動物モデルにおいて、臨床でもデータを取得できる MRI での梗塞巣評価ができたことは、ヒトでの病態を解明するために、非常に有用である。また、脳梗塞急性期における神経細胞とアストロサイトの活動動態の可視化を行い、Periinfarct Depolarization 様の異常神経活動をとらえた。

さらに、細胞外 ATP 可視化法の確立により、脳梗塞急性期における ATP シグナルの可視化に成功した。大脳皮質における細胞外 ATP の、神経細胞・アストロサイトへの作用と合わせ、アストロサイトが、異常神経活動に反応し、ATP シグナルにより周囲のアストロサイトを活性化するとともに、ATP シグナルを介して異常神経活動を抑制するという可能性が示唆された。

脳梗塞のような複雑な病態では、治療効果を見込んだ薬物が、脳に本来備わっている保護作用などを抑制することで、狙った効果が相殺されることなどが懸念されてきた。今回構築した脳梗塞モデルマウスと、細胞外 ATP イメージング法により、脳梗塞のより詳細な病態が解明され、治療標的の提案や、適切な薬物投与法などの新しい脳梗塞治療法の開発につながることが十分に期待される。

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第 31 回開発研究助成による支援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) Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A. **Cell Rep.** 2(2), 397-406, 2012.

2) In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca^{2+} indicator. Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, Okubo Y, Sasaki T, Moritoh S, Hasuwa H, Mimura M, Horikawa K, Matsui K, Nagai T, Iino M, Tanaka KF. **Cell Rep.** 8(1), 311-318, 2014.

3) Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. Okubo Y, Sekiya H, Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Yamasaki M, Watanabe M, Hirose K, Iino M. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 107, 6526-6531, 2010.

4) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S. **Neuron** 40(5), 971-982, 2003.

超音波 CT（Computed Tomography）を用いた血流計測技術の開発



研究責任者　東京大学　医学部疾患生命工学センター
医療材料・機器工学部門
教　授　　東　　隆

1. はじめに

現在の医用超音波撮像においては、パルスエコー法が主流であるが、医用超音波撮像の黎明期においてはパルスエコー法と並んで、X 線 CT（Computed Tomography）のように、撮像対象を取り囲むように素子を配置して、透過波を用いて撮像を行う超音波 CT も研究されていた[1-3]。その手法の一つとして、リング状のアレイトランスデューサを構築し、電子制御によりリング内の断層像を取得する方法がある。リングアレイを用いることにより、1)反射成分と透過成分の同時取得、2)全方位からの超音波送受信により伝搬方向に垂直な方位方向への回折を抑制した理想的な点応答関数の実現、3)減衰率や反射率の高い領域より奥の、従来の撮像法では影となる領域を極小化する無影撮像の実現、4)多方向からの撮像による多方向ドップラ計測の実現など、様々な新規な撮像方法が実現する可能性がある。

しかし、X 線 CT と異なり超音波 CT においては、生体と超音波の相互作用量が大きいため、伝搬経路の直線性が仮定できないために、透過成分を用いた再構成アルゴリズムが極めて複雑なものとなる。そのため研究当初の 1970 年代や 80 年代の計算機の性能では実用化することが困難であり、一旦その研究開発は下火を迎えることとなった。再構成のための計算コストが大きいことと並んで、伝搬路の媒質の音響特性において一定の均質性が必要であることも、撮像可能部位を乳がん撮像などに限定することとなったため、パルスエコー法では産科、循環器、腹部、体表など様々な臨床科で有用であることに比べた時に不利になったことも重要である。

しかし、近年欧米における乳がん患者の増大と、その検診への関心の高まっている[4,5]。このような背景から、改めて乳がん計測専用機として超音波 CT が注目を集めている[6,7]。本研究では超音波 CT の実用化の時代を見据えて、前記の 3)多方向計測に基づいた無影計測と 4)多方向ドップラ計測の可能性に関する検討を行う。

２．本研究の内容

本研究では以下の検討を行う。

１）直径 20cm のリングトランスデューサの試作と、その動作性能の評価

２）多方向ドップラの特性確認のための点応答関数の数値計算

３）多方向無影計測（手や足など撮像領域に骨を含む例）

３．実験システム

まず、実験に用いた試作リングトランスデューサと駆動システムの説明を行う。

・リングアレイトランスデューサ

本研究で用いた試作トランスデューサは、2048 素子から成る直径 200 mm のリング型振動子である。8 つの凹面型振動子を組み合わせることで、リング形状の振動子を製作した。それぞれの凹面型振動子は 256 個の短冊型圧電素子から成っており、一般的に用いられる超音波診断プローブ(コンベックス型探触子)と同様の製作工程によって製造される。リングをふくむ平面内にビームを収束させるため、短軸方向に中心が凸な表面形状となっている。このような音響レンズを形成することで、振動子の撮像平面内に超音波を収束させる働きをする。また共振周波数は、2 MHz に設計されている。

・駆動回路システム

リングアレイトランスデューサは、Verasonics とスイッチング回路で駆動される。つまり、リングアレイトランスデューサは、スイッチング回路 (2048 to 256 multiplexer) を介して、Verasonics に接続される。振動子に対する信号は、PC (MATLAB からのコマンドに従い Verasonics から与えられる。

Verasonics は、MATLAB によってその挙動を制御できる超音波診断装置である。本システムでは、図１のコネクタ部にスイッチング回路を接続、スイッチング回路を Verasonics に接続する。

続いてスイッチング回路について説明する。スイッチング回路は、それぞれの素子に対して Verasonics の信号を与える役割を果たす。本システムで利用する Verasonics は、256 素子のプローブを駆動できるシステムである。それに対して、試作型リングアレイは、2048 素子から成っている。そこでスイッチング回路は、Verasonics から与えられる 256 素子に対する信号を、2048 素子のうち任意の 256 素子に対して分配する役割を担っている。この回路を用いて、順次 Verasonics への接続素子を切り替えていくことにより、リングアレイを構成する 2048 素子の駆動が実現する。それぞれの切り替えは、数 ms のオーダーで行われるため、ほぼリアルタイムにデータの収集が行われる。リングは 2048 素子から成るが、Verasonics は 256 素子を同時に駆動できると説明した。そのため、スイッチング回路を用いて動作すべてのデータを収集する。

システムが正常に動作するためには、スイッチング回路による駆動素子の切り替えのタイミングと、Verasonics による信号の送受信及び音圧データの記録のタイミングをそろえる必要がある。Verasonics には、信号を受けるまで次のシーケンスを実行せず、待機するコマンドがある。また、シーケンスの途中で自らトリガ信号を出力することもできる。これを利用したスイッチング回路と Verasonics 間の同期を行っている。トリガを受信するまで Verasonics は待機する。トリガ受信後、リングアレイの各素子から超音波の送受信を行う。このとき、受信のタイミングで、Verasonics からトリガ信号が発せられる。スイッチング回路は、この信号を受けることで、送受信のモードを切り替える。順次信号を受けることによって駆動素子が切り換えられていく。このように自動的にリング内を網羅するデータを収集することができる。

図２にリングトランスデューサ用いた開口合成の撮像方式を説明する。選択された１素子で送信を行い、他の全素子で受信、送信素子の切り替え、これを全素子で送信が終わるまで繰り返すことで、リング中の任意の 2 素子のペアで送受信を行った全データの収集が可能となる。

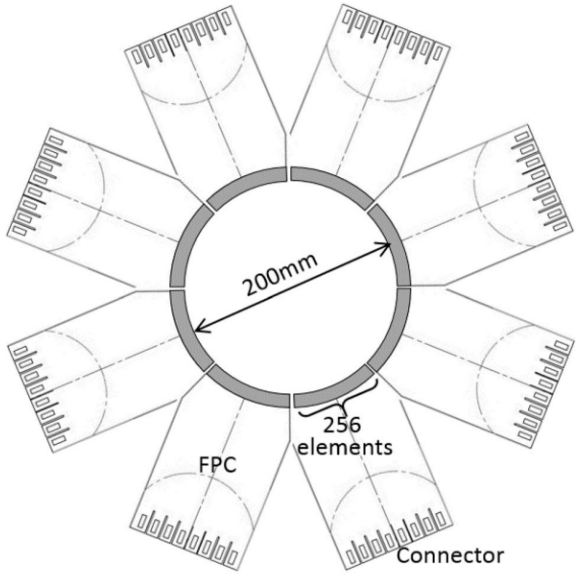


図1　リングアレイトランスデューサと配線

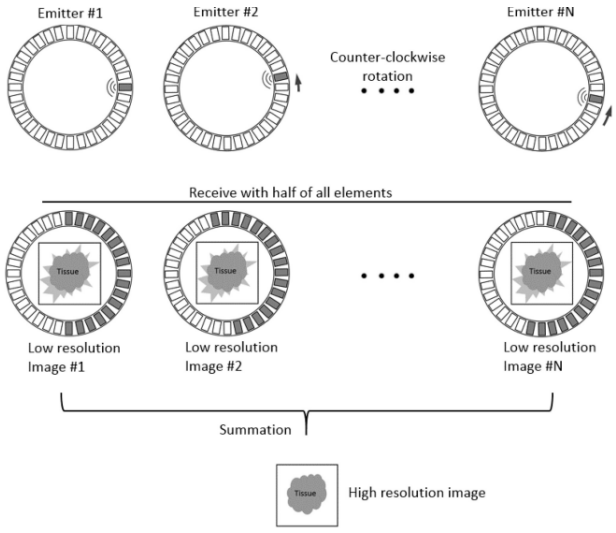


図2　リング開口合成の撮像方式

4．撮像結果

試作システムの性能を評価するために、まずワイヤの撮像と、生体組織の代表例として摘出した豚の心臓の撮像を行った[8]。

図3に太さ 150μm のワイヤの撮像結果を示す。リングアレイの撮像の性能を調べるために、口径の全体を使った場合に加えて、口径の 1/4、1/8、1/16 を使った場合に関しても検討を行った。

口径の一部を使った場合には、送信及び受信のビーム集束精度が低下する。これは従来のリニアやコンベックス型のプローブを用いた撮像に相当する。その結果、フル開口を用いた場合には、従来のパルスエコー法では実現困難であった等方的な点応答関数を実現出来ることが確認できた。（つまり、点が点として撮像できる）

方位方向の半値幅で比較すると口径の 1/16 の場合及び 1/8 の場合は、それぞれフル開口の場合に対して、3 倍と 1.5 倍であった。

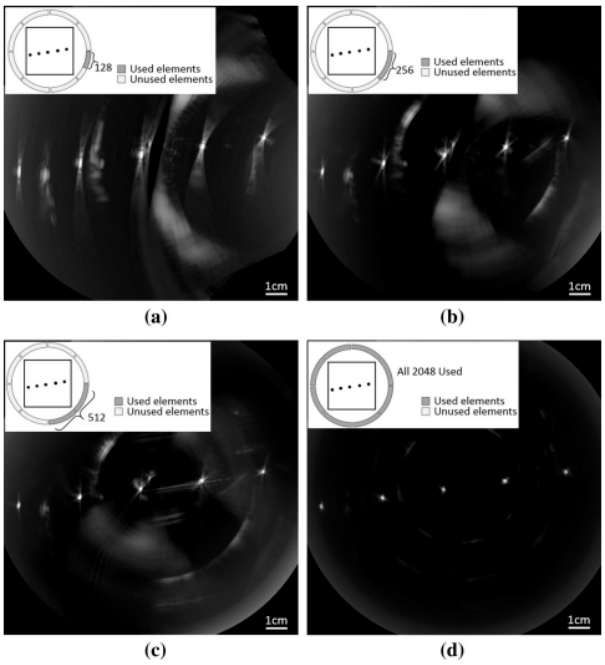


図3　ワイヤの撮像結果（左上から順に口径の 1/16、1/8、1/4、全開口を用いた結果）

次に摘出豚心臓を撮像した結果を図4に示す。従来法相当の撮像条件では送受信の素子がある近傍ではスペックルも細かくなっているが、送受信素子から離れるにつれて空間分解能が低下しているのが分かる。一方、全素子を用いた場合には撮像領域全域に渡って高い解像度が実現できていることが確認できる。

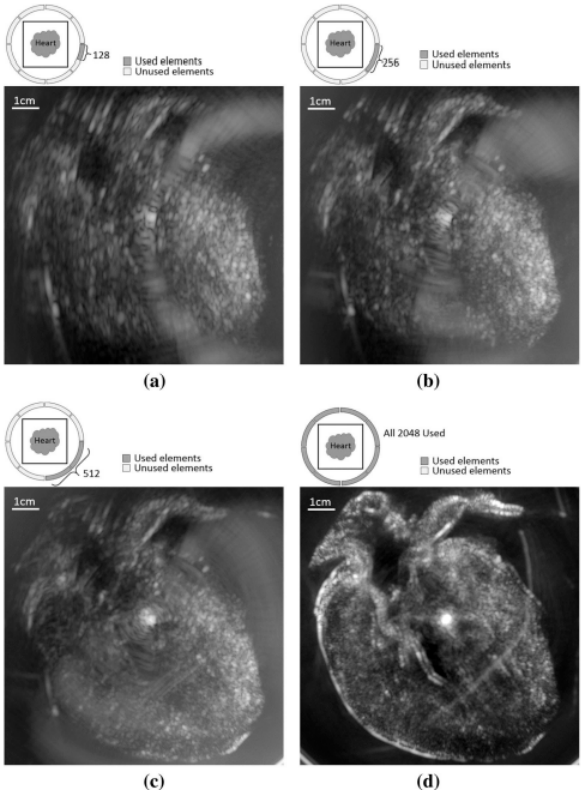


図4　摘出豚心臓の撮像結果（左上から順に口径の 1/16、1/8、1/4、全開口を用いた結果）

５．多方向ドップラ計測の基礎的な検討結果

冒頭に記載したように、リングアレイを用いることで、任意の方向に超音波を伝播させることが可能となる。従来のエコー法では伝搬方向の方が点応答関数の位相の空間勾配が大きいため、伝搬方法に対してのみ対象物の動きに対する感度が高かった。しかしリングアレイを用いることで、任意の方向の動きに対して感度を高く検出するように構成することが可能となる。

この特徴を活用するために、リングアレイの開口の一部を用いた撮像における点応答関数の計算を行った。結果を図５及び６に示す。

まず図５は、口径の 1/8 を用いて互いに直交する位置に存在する二つの開口それぞれでの送受信の点応答関数の撮像結果である。次に図６では受信開口は直交するが送信開口は共通の場合である。二つの受信開口の真ん中に送信開口を配置した。まず図５は、点応答関数を任意の方向に回転可能であることを示している。また図６の方法では、一回の送信に対して、受信の条件のみを変えることで点応答関数を回転できることをしめしている。この結果フレームレートを低減させることなく、動きや流れの二成分を計測可能であることを実証した。

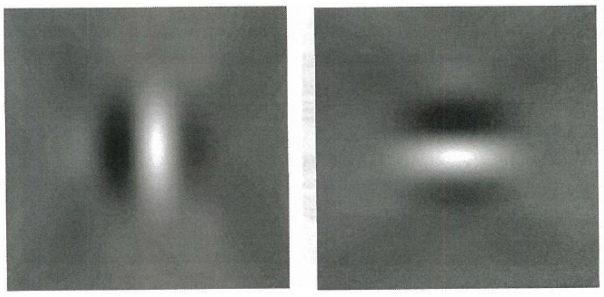


図5　直交する二つの開口を用いた点応答関数の計算結果

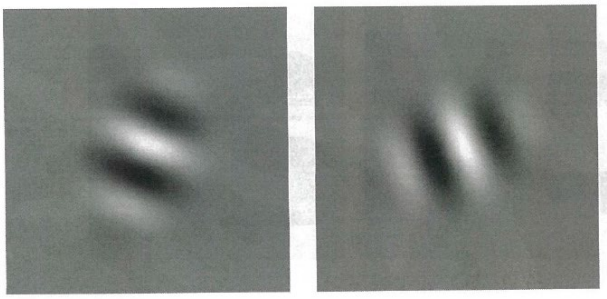


図6　共通する送信開口を用いて受信開口のみ直交する場合の二つの点応答関数の計算結果

６．多方向送受信による無影撮像

本節では測定領域に骨を含む例として手及び足（脹脛と踵）を撮像対象として計測を行った。図７では手の平が撮像面に平行になるように設置して撮像した結果を示す。無影撮像の例を示すために６つの異なる開口部を用いた撮像結果を独立して示す。

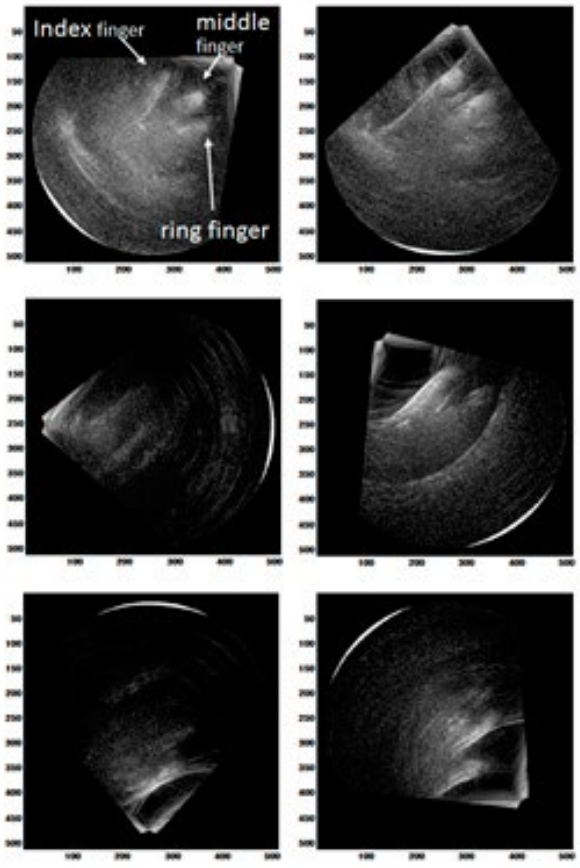


図7　異なる送信開口を用いた手の平の撮像結果

中指の延長方向に位置する送信開口を用いた場合（図の左上）が最も影が出来にくい条件であったため、比較的広い視野で撮像が出来ているが、この条件でも手の形の全貌を掴むのは難しい。他の送信開口を用いた場合では、撮像対象が何であったかを理解するのも難しい状況である。

一方、図８は全ての送信素子、つまり全ての伝搬方向を用いた撮像結果を示す。図７と異なり、手の形状が明瞭に観察出来ていることが確認できる。

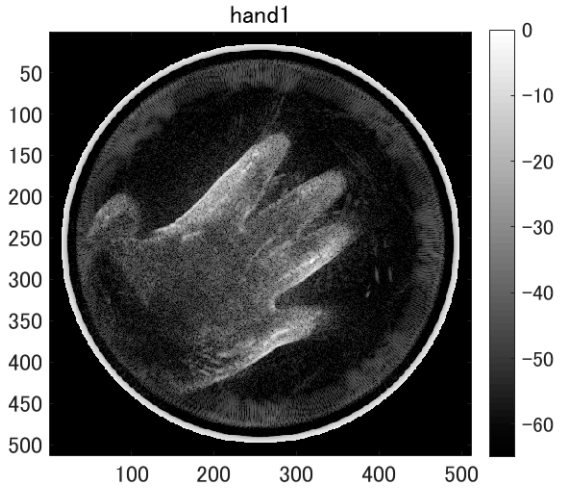


図8　全ての送信開口を用いた手の撮像結果

図９と 10 はそれぞれ脹脛と踵の断層像である。従来のエコー法では骨より後ろ側は後方陰影を引く為に観察することは困難であった。しかしリングアレイを用いることで、他の送信開口位置では陰になる撮像範囲に関しても、異なる送信開口取得した情報が補うために、影の影響が無い、もしくは極めて少ない撮像が実現出来ていることが確認できた。

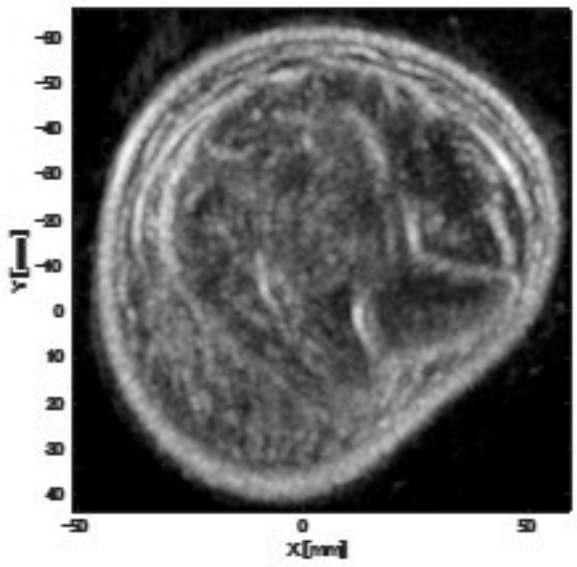


図9　脹脛の撮像結果

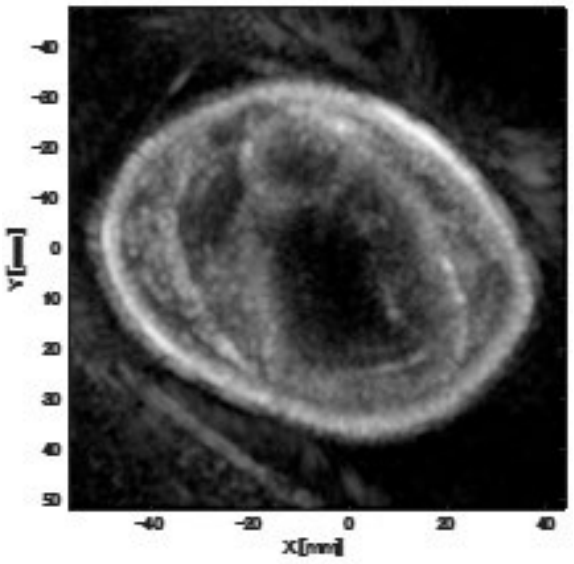


図10 踵の撮像結果

７．今後の展望

本助成の研究開発では、断層像撮像と血流計測に関する検討を行った。血流計測に関しては現在特許申請中のため、ここでは詳細の記述を省略した。一方、提案手法の多方向計測は多方向血流撮像のみでなく、影を作らない新規な計測方法として、整形外科用途などでも有望であることが確認できた。従来整形外科ではＸ線を用いて骨を計測するのが一般的であるが、整形外科の治療対象となる外傷においては、骨の周囲の軟部組織における障害が疾患の原因となることが多い。しかし軟部組織の変化に関しては、Ｘ線撮像は必ずしも好適な撮像方法とは言えない。リングアレイを用いることで骨の周囲の軟部組織を高い画質で撮像可能であることが分かった。今回は撮像領域に骨がそれほど複雑に広がらない部分を撮像対象とした。今後、膝や肘などより骨の形状が複雑な場合に、関節などに存在する軟部組織がそのように撮像可能であるかを検証する予定である。

８．まとめ

試作したリングアレイと接続駆動回路を用いて、以下の検討を行った。

１）直径 20cm のリングトランスデューサの試作と、その動作性能の評価

２）多方向ドップラの特性確認のための点応答関数の数値計算

３）多方向無影計測

まず１）の検討より、対象に対して全方向からの送受信を行うことで、分解能が等方的に高く、スペックルの極めて少ない撮像が可能であることを実証した。また２）の検討により使用する開口条件を変えることで、点応答関数が回転可能であり、この結果任意の方法の動きを検出するドプラ計測が可能であることを示した。更に３）の検討により、従来は後方陰影に埋もれて撮像が困難であった、骨周囲の軟部組織の撮像が超音波を用いて実現可能であることを初めて実証した。

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平成 26 年度技術開発研究助成の支援を受けて行われました。ここに深く感謝いたします。

参考文献

1) Carson PL, Meyer CR, Scherzinger AL, Oughton TV. “BREAST IMAGING IN CORONAL PLANES WITH SIMULTANEOUS PULSE ECHO AND TRANSMISSION ULTRASOUND”, *Science* **214**, 1141-3, 1981.

2) Schreiman JS, Gisvold JJ, Greenleaf JF, Bahn RC. “ULTRASOUND TRANSMISSION COMPUTED TOMOGRAPHY OF THE BREAST”, *Radiology* **150**, 523-30, 1984.

3) Scherzinger AL, Belgam RA, Carson PL, et al. “ASSESSMENT OF ULTRASONIC COMPUTED-TOMOGRAPHY IN SYMPTOMATIC BREAST PATIENTS BY DISCRIMINANT-ANALYSIS”, *Ultrasound Med. Biol.*, **15**, 21-8, 1988.

4) Ohuchi N, Suzuki A, Sobue T, et al. “Sensitivity and specificity of mammography and adjunctive ultrasonography to screen for breast cancer in the Japan Strategic Anti-cancer Randomized Trial (J-START): a randomized controlled trial”, *Lancet*. **387**, 341-8, 2016.

5) Berg W, Bandos A, Mendelson E, et al. “Ultrasound as the primary screening test for breast cancer: analysis from ACRIN 6666”. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**: 1-8, 2016.

6) Andre MP, Janee HS, Martin PJ, Otto GP, Spivey BA, Palmer DA. “High-speed data acquisition in a diffraction tomography system employing large-scale toroidal arrays”, *Int. J. Imag. Sys. Tech.*, **8**, 137-47, 1997.

7) Duric N, Littrup P, Poulo L, et al., “Detection of breast cancer with ultrasound tomography: First results with the Computed Ultrasound Risk Evaluation (CURE) prototype”, *Medical Physics*, **34**, 773-85, 2007.

8) Qu X., Azuma T., Yogi T., Azuma S., Takeuchi H., Tamano S., Takagi S., “Synthetic aperture ultrasound imaging with a ring transducer array: preliminary ex vivo results”, *J. Med. Ultrasonics*, **43**, 461-71, 2016.

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



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　　鳥　光　慶　一

1. はじめに

近年、高齢化社会とともに遠隔医療や在宅ヘルスケアが注目されるようになってきた。従来の動態監視に加え、未病の観点からも個々人の健康状態／病態などの生体情報を継続的に長期にわたってモニタリングする必要性が高まっている。昨今の技術発展に伴い、計測器そのものや解析技術などは高精度・高機能化が著しく進んだ。しかしながら、このようなモニタリングにおいて重要なのは、生体と計測器をつなぐインターフェイス、すなわち生体からの情報を取り出すための電極である。これまでに、カーボンやカーボンナノチューブを利用した電極、変形可能なゲル状のハイドロゲル電極、フィルム状の回路基板を有するフィルムエレクトロニクスなどの他、金属を織り込んだ、あるいは塗布した繊維を用いた e-テキスタイルと呼ばれる新たな計測法が注目を浴びている。また、腐食やアレルギーなどの問題から金属に変えて導電性高分子を用いた様々な計測法／電極が報告され始めている[1-10]。

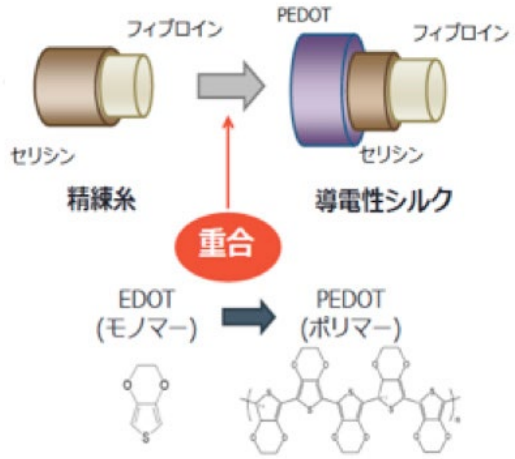
一方で、長期継続的に情報を取得する際には、センシングする機器との間で、掻痒感やアレルギーなどを生じ易いことから、装着していることが気にならない、邪魔にならないというのが極めて重要な点である。いくら性能が良くても装着することで違和感を覚えるのでは、計測に支障をきたす。そのような観点から無意識に装着できるアンコンシャスなセンシングが必要である。

また、健康管理の観点から健常時のセンシング／モニタリングだけでなく、生体機能に異常があった場合に筋電等の生体信号を介してフィードバックさせることで異常を知らせ、機能制御を行うことが求められる。

本研究のフレキシブルシルク電極は、金属電極に見られる金属アレルギーを引き起こす心配がないこと、医療用電極と同等の S/N を有すること、シルク特有の優しい肌触り、柔軟性（フレキシビリティ）があり掻痒感が極めて低いこと、ジェルフリーでの計測が可能であることなどの点で優れており、この電極を用いた心電・筋電・脳波、SpO2 等の統合化による生体状態の把握は健康状態を把握する上で重要である。本研究では、この電極を利用した糸・布型電極による生体情報モニタリングに取り組むと共に、異常時や機能障害に対する電気的フィードバック機構を構築することで、糸・布型生体情報モニタリング機器(chip on clothes)の開発につなげ、生体活動の把握と制御を最終的な目標とするものである。

２．フレキシブルシルク電極

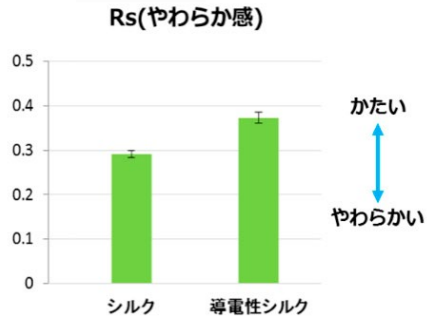
導電性高分子を繊維と組み合わせることで、導電性を有する繊維を作製することができる。本研究では、基材繊維となるシルク（絹）に対し、導電性高分子であるポリ（3,4ーエチレンジオキシチオフェン-パラトルエンスルホン酸、poly(3,4-ethylenedioxythiophene)　p-toluene sulfonate: PEDOT-pTS:）を重合させることで導電性を付与している。繊維を EDOT を含む重合液に浸した後、加熱洗浄することで導電性シルクが形成される。シルクはセリシンとフィブロインという二つのタンパク質から構成されているが、導電性高分子は、この二つのタンパク質のうち、主としてセリシン側に取り込まれる。

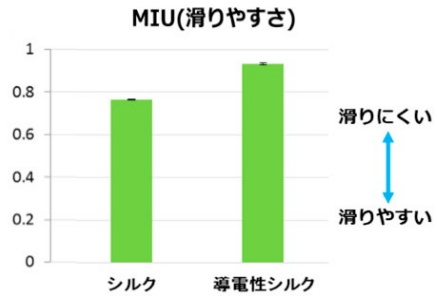


布型電極は、重合した糸電極を編み込んで布にする場合と、絹布を直接重合する場合の二通りあるが、本研究では主に絹布を直接重合することで電極化を行った。抵抗値は、布型電極の場合、数百Ω／cm 程度であり、糸型電極は太さにもよるが、その約 10 倍程度である。電極は、重合後洗浄を行った後に使用しているが、数回程度の繰り返し洗浄による抵抗値の変化はほとんど観測されなかった。

３．電極の特性

フレキシブルシルク電極は、導電性化しても素材（基材）の特性を失わないことが特徴である。肌触りの良いしなやかな素材は、その肌触りの良さはそのままでほとんど導電性高分子が付与されていることを感じさせない。実際、触感感性計測システム[(11)]を用いて、シルク電極の風合いを計測を行うと、柔らか感は２割程度堅めになるものの、ウェット感は１割程度の変化である。また、摩擦感テスター（カトーテック社、KES-SE）による計測でも同程度の変化である。

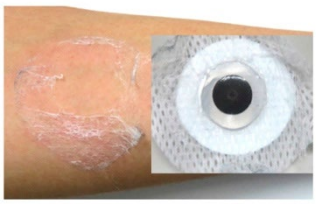




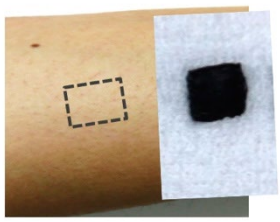
一方、インピーダンス特性は布状と糸状で特に 50kHz 付近の高周波において大きく異なり、位相遅れが顕著になる。基本的には糸状シルク電極では、キャパシタンスの影響が大きい。

４．肌への影響

シルク電極は、肌への影響が極めて少ない特徴がある。ゲル及びシルク電極を腕の内側に貼付し、24h 後に各電極を剥離した際の肌表面の状態を比べてみたのが次の写真である。ゲル電極では、電極貼付部全体が発赤し、接着部剤の残りがあることが分かる。一方、シルク電極の方は全く発赤がなく、電極を装着していた痕跡も不明なほどである。本実験は 24h での比較であるが、48h の連続着用でも肌表面の変化は殆どなく、掻痒感を伴わない。



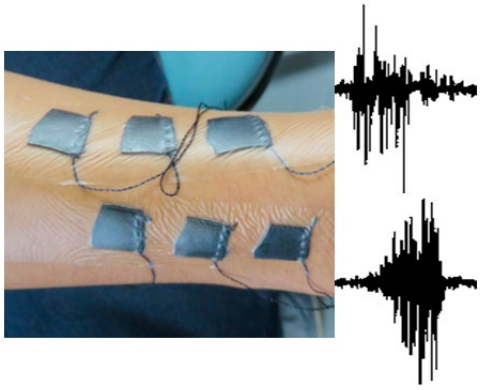
ゲル電極



シルク電極

５．フレキシブルシルク電極による筋電計測

フレキシブルシルク電極を利用した多点での筋電計測の 1 例を示す。電極は腕の内側に貼付し、計測を行った。右側に電極からの筋電波形の一例を示す。



場所により筋電パターンが異なることが明らかとなり、パターンを利用した筋肉活動と相関性を解析することで運動時における筋肉の使用状態の把握、筋活動評価が可能となった。本研究では、本手法によるテニス等の運動時における筋肉活動評価を行い、最適な運動となるよう効率的な筋肉活動のためのフィードバックを設定した。





６．フレキシブルシルク電極による心電計測

布状の電極は、筋電位だけでなく、心電計測にも最適である。特にジェルフリーであることから、肌着のように直接電極を肌につけるだけで心電計測が可能となる。実験では、密着性の高いシャツの内側にシルク電極を縫い付け、ワイヤレス心電計と接続することで、心電の連続観察を行った。布状電極からの配線は糸状電極で行い、ワイヤレス心電計のスナップにつけ、心電計からは、スマホ経由でサーバーにデータを送信することで心電データを確認することができた。

今後、電極形状と配置を精査することでより効率的に計測可能な条件を探索し、既存の心電計とは異なる機能を有する心電計として一体化を進める。

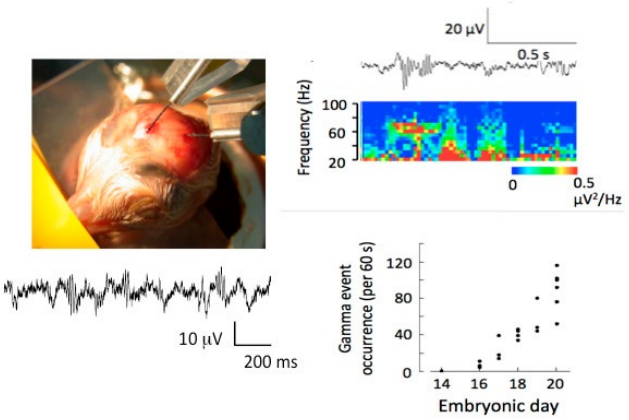


７．フレキシブルシルク電極による脳活動計測

糸状のフレキシブルシルク電極は、前述のように布状に比べてキャパシタンスの影響を受けやすいインピーダンス特性を有する。しかしながら、フレキシビリティが極めて高いために皮膚表面への貼付の他に、体内に埋め込むことが可能である。特に脳などの柔らかくデリケートな組織に対し有効で、本研究ではニワトリ胚の脳に対する刺入、留置実験を実施し、脳活動計測を試みた。

受精後 15–20 日までのニワトリ胚を開頭し、露出した脳組織に対し、糸状電極を 2 本刺入、留置した。 1 本は基準電極として使用し、もう一本で脳活動を計測すると、16 日目以降ガンマ波の出現が顕著となり、その割合は、生まれるまで増加す

る傾向が見られた。本実験は麻酔下で実施しているため、ガンマ波の出現が観測され、その周波数は出現率と同様に日数と共に増加する傾向が観察された。



一方、電極を刺入した状態で視覚刺激を行うことで、光刺激に対する脳活動の反応を調べたところ、ガンマ波の出現と光の感受性には相関関係がある結果が得られた。すなわち、光の ON、OFF に対しては、ガンマ波の出現頻度が高い時期である孵化に近づくにつれ応答性が発現することが明らかになった。ガンマ波の発現と脳の発達、視覚系の発達との間の相関性については、さらに研究する必要があるものの、この解析法がこれらの解明に有効であることが示せた点で意義深い成果である。

また、手術針を使って筋肉に刺入、留置することで筋肉活動に伴う筋内電位の計測が可能となり、筋肉表面からのいわゆる筋電位とともに筋内電位計測を行うことで、筋電位からどの筋肉がどのように活動しているかといった筋肉活動の様子を細かく解析することができるようになった。

このように、フレキシブルシルク電極は、布状の電極を用いることでバイタル情報を中心とした生体活動計測に対し有効であり、糸状の電極は、脳や筋肉組織に刺入、留置することで、内部の情報を入手することに適していると考える。これらの特性をうまく生かすことで従来困難であった活動解析ができるようになり、新たな解析ツールとしての可能性が大きく広がった。

８．まとめ

本研究は、従来絶縁体としてとらえられていた絹（繊維）素材に対し、導電性高分子を導入することで導電性を持たせ、その素材特性を生かした今までに無い特徴を有する新たな電極として活用するとともに、その先の回路一体化の糸・布型生体情報モニタリング機器(chip on clothes)の開発につなげるための基盤作りとして研究を進めてきた。シルクが生体素材（タンパク質）であるため優れた生体適合性を有することは、ヘルスケアにおけるバイタル計測だけでなく、将来、医療／治療分野においてもその有効性が発揮されるものと期待している。特に神経系との相性が良い特性を生かし、ダイレクトに神経制御可能な義肢の開発や、パーキンソン病治療用の脳深部刺激電極、あるいは経頭蓋直流刺激（tDCS）などへの応用を念頭に置いている。

今回、シルク電極に対し、主に筋電、心電計測への適用を検討し研究を進めた。各計測の統合化はできなかったが、各計測に関する基盤は確立できつつあることから、今後、シルク電極を介したデータ統合のためのプラットフォーム基盤の整備と、解析に向けた総合的システム構築を目指し、研究を進めて行く予定である。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、様々な方に御支援いただきましたことに心から感謝致します。まず、この研究をご理解いただき御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御礼申し上げます。そして研究に際し様々な議論、ご助言を賜りました東北大学大学院医学系研究科荒井陽一教授、香取幸夫教授、医工学研究科永富良一教授、工学研究科西澤松彦教授はじめ共同研究者の先生方、研究を陰で支えていただきました高橋秀幸氏、大学院生、園部達真氏、瀧澤勇介氏、エーアイシルク(株)岡野秀生氏、東北撚糸(株)金井史郎氏に感謝致します。

参考文献

(1) S. Tsukada, H. Nakashima, K. Torimitsu, Conductive polymer combined silk fiber bundle for the bioelectrical signal recording, *PLoS ONE*, **7**, e33689-1-10, 2012

(2) Y. Furukawa, A. Shimada, K. Kato, H. Iwata, K. Torimitsu, Monitoring neural stem cell differentiation using PEDOT-PSS based MEA, *BBA Gen. Sub.*, **1830**, 4329–4333, 2013

(3) M. Kaltenbrunner, T. Sekitani, J. Reeder, T. Yokota, K. Kuribara, T. Tokuhara, M. Drack, R. Schwoediauer, I. Graz, S. Bauer-Gogonea, S. Bauer, and T. Someya, An ultra-lightweight design for imperceptible plastic electronics, *Nature*, **499**, 458‑463, 2013

(4) D. Takahashi, M. Sasaki, K. Nagamine, K. Torimitsu, and M. Nishizawa, Electroporation of adherent cells by direct lamination of hydrogel-based microelectrode substrates, *Chem. Letters*, 43, 444-446, 2014

(5) M. Sasaki, B. C. Karikkineth, K. Nagamine, H. Kaji, K. Torimitsu and M. Nishizawa, Highly Conductive Stretchable and Biocompatible Electrode–Hydrogel Hybrids for Advanced Tissue Engineering, *Advanced Healthcare Materials*. doi: 10.1002/adhm.201400209

(6) K. Torimitsu, H. Takahashi, T. Sonobe, Y. Furukawa, PEDOT-PSS modified silk electrode for neural activity measurement, E. *J. of Neurology*, **21**, 190

(7) K. Torimitsu, H. Takahashi, T. Sonobe, Y. Furukawa, Activity measurement using conductive polymer flexible electrode, *Proceedings ISBS 2014 St Petersburg_Russia, Stress, Brain and Behavior,* **1**, 23

(8) 鳥光慶一、フレキシブルシルク電極、ウェアラブルデバイスの小型、薄型化と伸縮、柔軟性の向上技術、第 8 章 13 節、技術情報協会、2015.12.25

(9) T. Sonobe, Y. Takizawa, H. Takahashi, S. Watanabe, M. Nishizawa, and K. Torimitsu, Conductive novel silk electrode based PEDOT-pTS for bioelectrical signal measurement, *Int. J. Robotics Res. And Develop.*, submitted.

(10) S. Watanabe, H. Takahashi, K. Torimitsu, Electroconductive polymer-coated silk fiber electrodes for neural recording and stimulation in vivo, *Neurosci. Lett,* submitted.

(11) Mami Tanaka, Yu Numazawa, Rating and valuation of human haptic sensation, *International Journal of Applied Electromagnetics and Mechanics*, vol.19, 573–579, 2004

(12) K. Torimitsu, Y. Furukawa, N. Kasai, S. Tsukada, K. Sumitomo, M. Nishizawa, PEDOT-PSS based neural interface, *2013 JSAP-MRS Joint Symposia*, Kyoto, Japan, 2013.9.16-9.20

(13) K. Torimitsu, Y. Furukawa, A. Shimada, S. Tsukada, K. Sumitomo, M. Nishizawa, K. Kato, H. Iwata, Neural activity measurement using PEDOT-PSS based electrode, *Neuroscience 2013 - Society For Neuroscience*, San Diego, USA, 2013.11.9-11.13

(14) K. Torimitsu, S. Watanabe, H. Takahashi, T. Sonobe, Y. Furukawa, Cell activity measurement using PEDOT-PSS based flexible electrode, 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, 2014.7.5-9

(15) 鳥光慶一　他３名：導電性高分子繊維、導電性高分子繊維の製造方法及び製造装置、生体電極、生体信号測定装置、体内埋め込み型電極、および生体信号測定装置 PCT/JP2012/079805、2012.11.16

(16) 鳥光慶一　：導電性材およびその製造方法、ならびに生体電極、特願 2014-173595、2014.8.28

(17) 鳥光慶一　：電極素子の生産方法と当該方法

で生産される電極素子、及び、当該電極素子を用いる電極、特願 2015-053942、2015.3.17

(18) 鳥光慶一　：生体電極、及び、これを用いた測定システム、特願 2015-053945、2015.3.17

(19) 鳥光慶一　：導電性材及びその製造方法、ならびに生体電極、特願 2016-036496、2016.2.28

(20) 鳥光慶一　：導電性材およびその製造方法、ならびに生体電極、PCT/JP2015-74057、2015.8.26

(21) 鳥光慶一　：電極素子及び電極の生産方法、並びに、当該電極を用いる測定システムの作製、PCT/JP2016/58557、2016.3.17

(22) K. Torimitsu, T. Sonobe, Y. Takizawa, H. Takahashi, S. Watanabe, Developmental chick neuronal activity measurement using silk flexible electrode, the First Congress of the European Academy of Neurology, Berlin, 2015.6.20-23

(23) K. Torimitsu, H. Takahashi, T. Sonobe, Y. Takizawa, S. Watanabe, M. Nishizawa, Y. Furukawa, S. Tsukada, K. Sumitomo, Silk flexible electrode using conductive polymer for activity measurement, 8th Int. Symp. On Flexible Organic Electronics, Thessaloniki, Greece, July 6-9, 2015

(24) K. Torimitsu, Bioactivity measurement using conductive silk electrode, 37th Ann. Int. Conf. of the IEEE Eng. In medicine and Biology Society EMBC 2015 Milano, August. 25-29, 2015

(25) K. Torimitsu, H. Takahashi, Y. Takizawa, S. Watanabe, Conductive polymer based silk electrode for cell activity measurement, 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Neuroscience 2015, Chicago, October 17-21, 2015

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



研究責任者　岩手医科大学　脳神経外科学講座
助　教　　藤　原　俊　朗

１．背景と目的

我が国における 3 大疾病であるがん、脳卒中、心臓病の患者数は年々増加傾向[1)]にあり、特に超高齢化社会における後遺症の重篤化やリハビリテーション期間の長期化を避けるためには脳疾患の早期診断と迅速な治療方針決定が必須といえる。そのうち、ア）慢性脳虚血における脳虚血発作再発予知、イ）急性期脳梗塞に対する r-tPA 静注血栓溶解療法適応判断は重要なテーマであり、その診断能の高精度化は急務である。

頭部診断に欠かせない代表的な装置としては、computed tomography（CT）や magnetic resonance imaging（MRI）、positron emission tomography（PET）、single photon emission computed tomography（SPECT）などの画像診断装置が挙げられる。そのうち、PET は高精度に脳循環代謝量を定量可能である一方、^{15}O gas の生成にサイクロトロンが必要となり利用できる施設は限られる。本邦では、その簡便さから SPECT が代用されているが精度は必ずしも高くなく、定量化は困難とされている。また近年脳循環予備能（cerebrovascular reactivity：CVR）評価に用いられる acetazolamide の重篤な副作用が問題視されている。さらに、脳虚血急性期の病態では、迅速な治療適応判断が求められることから、核種投与や CT・MRI 撮影装置からの移動を避ける事が好ましく、可能であれば一度の検査で治療方針を決定できることが望ましい。その実現のためには、救済可能脳虚血領域の存在を、非侵襲的に、一度に特定可能な新たな検査法の確立が必須となる。

MRI は他の装置と異なり非侵襲的でかつ一つの装置で解剖構造から神経機能まであらゆる情報を得ることが可能であり、現在脳虚血性疾患の診断に欠かせない装置となっている。本邦では、1.5 Tesla （テスラ、以下 T）MRI に加え 3T MRI（2003 年薬事認可）がすでに 300 台以上稼働しており、MRI 大国といっても過言ではない。特に、拡散強調像（diffusion weighted imaging：DWI）は、生体内水分子拡散現象を捉えることが可能な唯一の撮像法[2)]として知られ、その高感度な急性期脳梗塞検出能によって r-tPA 療法を推進する大きな役割を果たした。現在 DWI は新たな局面を迎え、開発時より提唱されていた IVIM[3)]という灌流を含む概念に基づき、肝臓がん[4)]、乳がん[5)]における血管床の評価を可能とし、悪性度鑑別法として注目されている。他方、装置の発展も目覚ましく、超高磁場ヒト用 7TMRI 装置が登場し、本邦でも 2016 年 8 月現在当施設を含めて 5 機稼働している。しかし、超高磁場 MRI での IVIM-DWI の検証は重要な課題であるにも関わらず、gold

standard である PET や SPECT といった核医学的検査との比較も十分に行われていない [6]。特に、IVIM-DWI では脳血液量（cerebral blood volume：CBV）を無侵襲に評価可能となるため、副作用を伴う可能性がある CVR 検査数を低減することが期待できる。

そこで、本研究では、超高磁場 MRI における IVIM-DWI に基づく完全無侵襲脳循環代謝測定法の開発を目指し、1）両側総頸動脈閉塞（bilateral common carotid artery occulusion：BCCAO）ラット[7]における CBV 上昇、2）慢性脳虚血患者における CBV 上昇を検出可能か検証することとした。

2．対象と方法

2.1 動物用超高磁場 11.7TMRI を用いた BCCAO ラット CBV 上昇の検出

(ア) BCCAO ラットの作成

一般に、BCCAO ラットは、一側総頸動脈閉塞後、1 週間程度後に、反対側の総頸動脈を閉塞することで作成する。本研究では、ラットにおける側副血行路発達の影響を低減するために、右側閉塞後 4 日目に左側を閉塞し、作成することとした。BCCAO は、Wistar ラットにて行うこととした。

(イ) 11.7TMRI における IVIM-DWI 撮像

ラットの IVIM-DWI は、閉塞処置前、両側閉塞処置 1 時間後に実施した。撮像は、動物用縦型 11.7TMRI（AVANCE II 500WB、Bruker）を用いて、multi-shot spin-echo echo-planar imaging sequence にて撮像した（面内解像度：0.2 × 0.2 [mm^2]、スライス厚：0.8 [mm]、b 値：0 - 3000 [s/mm^2]における 13 個、motion probing gradient（MPG）軸数：6 方向）。

(ウ) IVIM-DWI データ解析

IVIM-DWI の信号変化は以下のように定義することができる：

$$S = S_0[f_{ivim}\exp(-bD^*) + (1-f_{ivim})\exp\{-bD+K(bD)^2/6\}]$$

ただし、S: 計測値、S_0: 基本信号強度、f_{ivim}: 灌流部割合、b [s/mm^2]、D* [mm^2/s]: 疑似拡散係数、D [mm^2/s]: 拡散係数、K: 拡散尖度とし、S_0、f_{ivim}、D*、D、K を IVIM パラメータとする。データ解析では、異なる b 値で取得される画像それぞれに配置した興味領域（region of interest：ROI）内の平均信号値 13 個に対して、上記関数の当てはめ処理（fitting）を行うこととした。また、pixel by pixel にて fitting を行うことで IVIM パラメータの各マップも作成することとした。

2.2 ヒト用超高磁場 7TMRI を用いた慢性脳虚血患者 CBV 上昇の検出

(ア) ヒト用 7TMRI における IVIM-DWI 撮像

健常者および脳主幹動脈狭窄・閉塞性病変を有する慢性脳虚血患者の IVIM-DWI をヒト用 7TMRI（Discovery MR950、GE Healthcare）にて実施した。撮像パラメータは、一般的な臨床においても撮像可能な時間にて設定することとした（面内解像度 2×2 [mm^2]、スライス厚 2 [mm]、b 値：0 - 3000 [s/mm^2]における 9 個、MPG 軸数：3 方向）。

(イ) 慢性脳虚血患者の ^{15}O gas PET 撮像

患者については、脳循環代謝評価のため、サイクロトロンを併設する日本アイソトープ協会 PET 施設にて、^{15}O gas PET を撮像し、CBV に加え、脳血流量（cerebral blood flow：CBF）、脳酸素消費量（cerebral metabolic rate of oxygen：CMRO2）、脳酸素摂取率（oxygen extraction fraction：OEF）を撮像した。

(ウ) IVIM-DWI データ解析

データ解析は、動物実験のデータ同様に、9 個の異なる b 値で取得される画像それぞれに配置した ROI 内の平均信号値に対して、前述の信号関数を fitting し、IVIM パラメータを推定することとした。また、pixel by pixel での fitting により IVIM パラメータマップの作成も行うこととした。

図１に、上記動物実験およびヒト撮像実験の流れ
を示す。

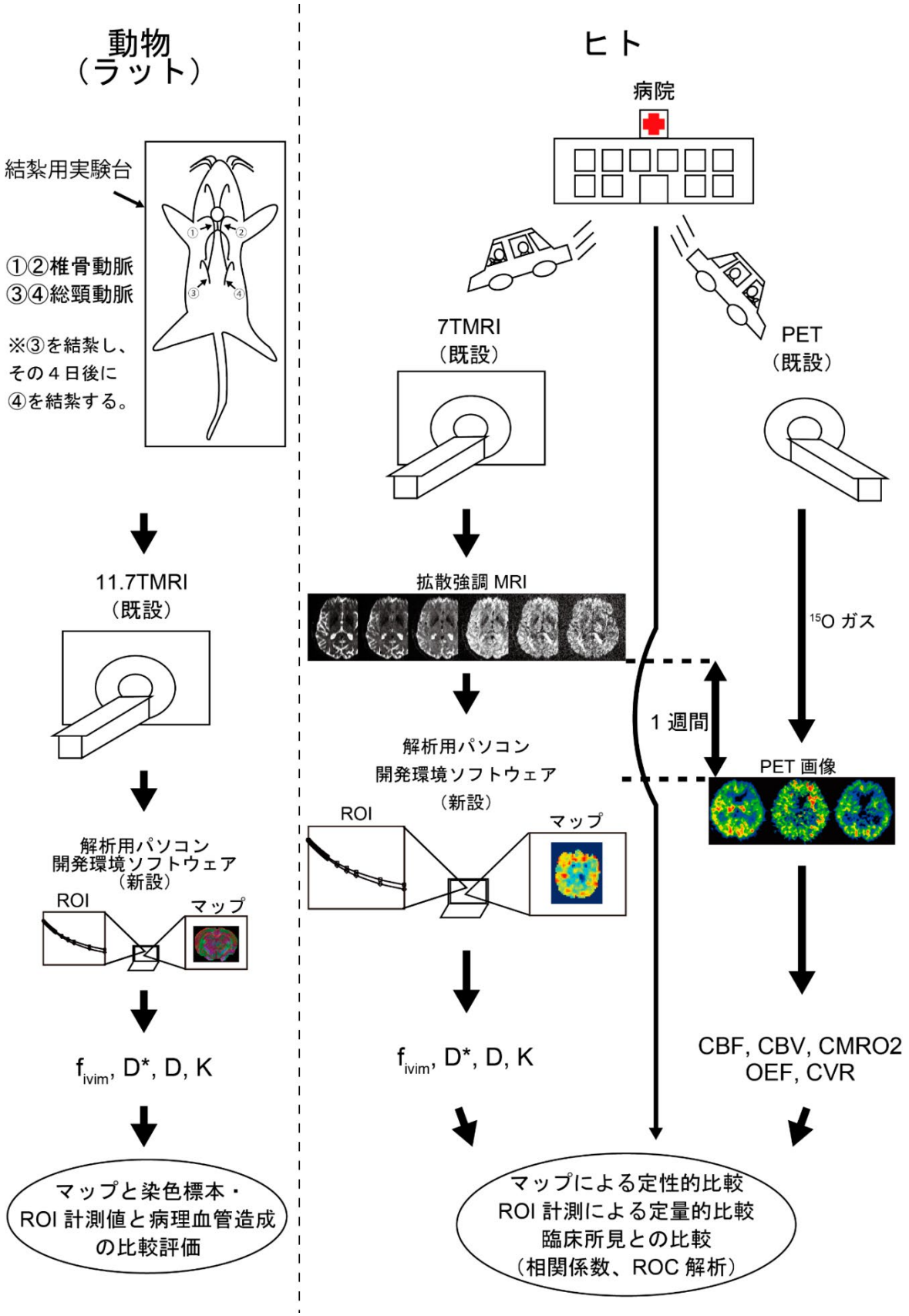


図1　動物実験およびヒト撮像実験の流れ

３．結果と考察

3.1　動物実験

総頸動脈閉塞処置前の Wistar ラット 16 匹に対して、11.7TMRI にて IVIM-DWI を実施した。次に、右総頸動脈閉塞し、その 4 日後左総頸動脈を閉塞した。両側閉塞 1 時間後に 13 例にて IVIM-DWI の撮像が可能であった。13 例中 1 例は、画質不良であったため、12 例にて解析を実施した（動物の処置・撮像は大阪大学・森勇樹助教が担当）。

本研究では、データ解析高速化のために、これまでに開発した IVIM 解析ソフトウェアのプロトタイプ（共同研究者であるフランス原子力庁 MRI 研究所 Neurospin の Denis Le Bihan 所長と共同開発）をさらに高速化し、全自動処理によって、雑音除去、全脳領域抽出、皮質への ROI 配置の機能を追加した（図２）。本解析ソフトウェアによって、各ラットデータの左右それぞれの皮質 ROI から取得された平均信号値に対して、fitting 処理を実施する IVIM パラメータ推定処理が可能となった（図３）。また、pixel by pixel 処理によって、各パラメータのマップも取得できた（解析ソフトウェアの開発・解析は藤原が担当）。

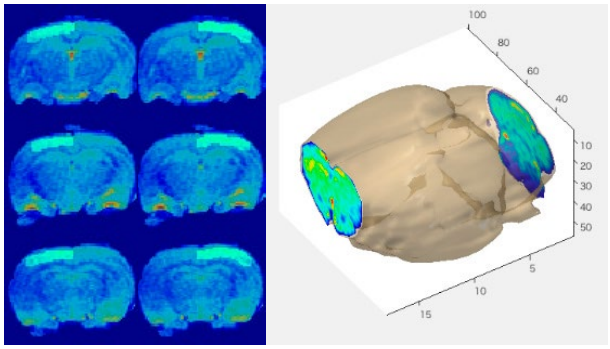


図2　IVIM 解析ソフトウェア
動物用 11.7TMRI にて取得された IVIM-DWI データより全自動にて抽出・配置された脳領域における皮質上の ROI（左）と 3D 表示（右）。

解析の結果、閉塞処置前と BCCAO 処置後で、CBV を表す f_{ivim} の有意な上昇は認められなかった（p=0.91）。一方で、D*および D は有意に低下していた（それぞれ p<0.05、p<0.01）。K に有意な変化はみられなかった（p=0.50）。D*は、原理的に血流の平均通過時間（mean transit time：MTT）の逆数と相関することが知られている [8]。したがって、BCCAO 後の D*の低下は、ラット皮質の血流低下に起因した MTT 延長を示唆している。また、虚血の程度を示す D の低下は、BCCAO によって皮質に強い虚血が生じていることを示している。

今回は、BCCAO 処置 1 時間後に IVIM-DWI 撮像を実施したことから、今回得られた結果は、主として急性脳虚血の病態を示していると考えられる。一般に、ヒトであれば CBV 上昇がみられるが、今回の実験では、CBV の有意な上昇はみられなかった。これは、１）事前に一側のみ閉塞させる、２）一側閉塞後、4 日経過してから反対側を閉塞させる、といった BCCAO ラット作成手順が側副血行路の発達に影響した可能性がある。また、D の有意な低下からも、残りの一側を閉塞させること自体が、急激な重度の虚血をもたらすと考えられる。そのため、慢性脳虚血とは異なり CBV が上昇している時間が極端に短く、一部の領域ではすでに乏血状態であった可能性がある。乏血領域が解析に含まれた場合、CBV は処置前より低下する。そのため、今回の解析では CBV 上昇が捉えられなかったと考えられた。今後、動物用 PET などによるさらなる検証も必要と考えられた。

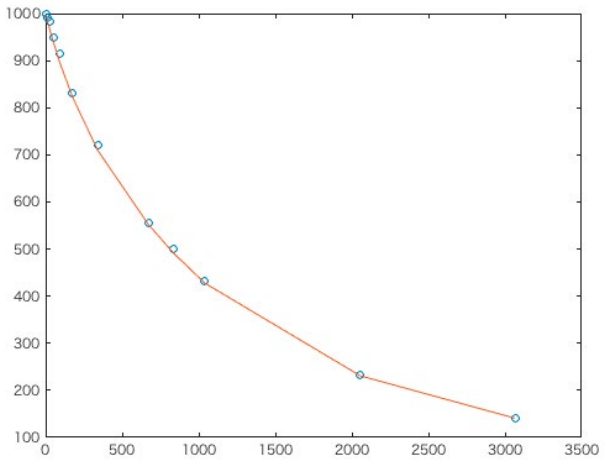


図3　IVIM-DWI で取得された信号値（丸印）と fitting された関数（赤線）.

3.2　ヒト撮像実験

ヒト撮像では、これまでに健常者 9 例、慢性脳虚血患者 46 例に対して、ヒト用 7TMRI にて IVIM-DWI を実施した。画像歪みおよび信号雑音比は十分解析に耐えうる画質であった（図４）。また、患者については同時期に ^{15}O-gas を用いた PET 撮像も実施し、良好な画像が取得された。一方、ヒトで取得された IVIM-DWI データは、ラットに比べデータサイズが約 7 倍となるため、ソフトウェアのさらなる高速化または処理の簡略化が必要となる。そのため、現在は解析ソフトウェアのさらなる改変を行っている。解析ソフトウェアの改変が終了次第、IVIM 解析を実施し、PET で取得された結果と比較する予定である。

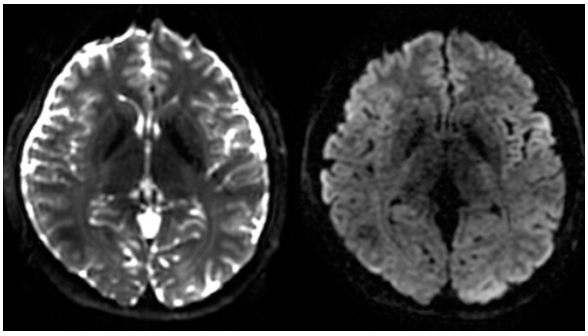


図4　健常者 7TMRI-DWI 画像
b = 0 [s/mm^2]（左）、b = 2000 [s/mm^2]（右）ともに、歪みの少ない良好な画像が得られている。

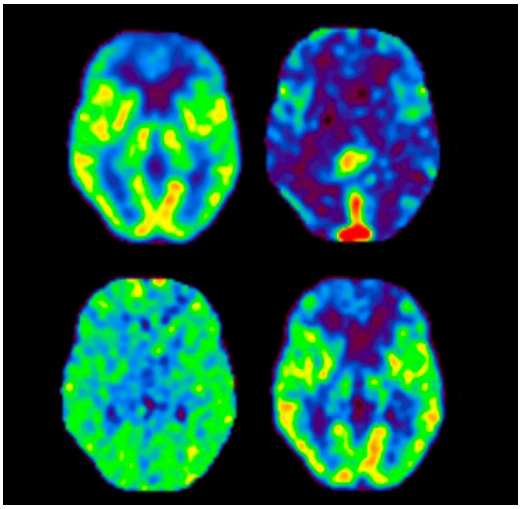


図5　もやもや病患者の ^{15}O-gas PET 画像
前頭葉に脳血流量（左上）の低下をみとめ、同部位ではすでに脳酸素代謝量（右下）の低下もみられる。CBV（右上）と脳酸素摂取率（左下）に有意な所見はみられない。

４．結論

本研究では、超高磁場 MRI における IVIM-DWI によって、BCCAO ラット脳虚血急性期における MTT 延長と拡散能低下を捉えることができた。本結果については、現在論文投稿準備中である。また、今後は慢性脳虚血患者の解析を進め、臨床応用可能かどうか検証を行う。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団・平成 26 年度開発研究助成によって実施された。この場を借りて、中谷財団および関係者の皆様に厚く御礼申し上げる。

参考文献

1) http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/seikatu/nousottyu/
厚生労働省：『脳卒中ホームページへようこそ』:

2) Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. Radiology 1986;161:401-7.

3) Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. Radiology 1988;168:497-505.

4) Joo I, Lee JM, Han JK, et al. Intravoxel Incoherent Motion Diffusion-weighted MR Imaging for monitoring the therapeutic efficacy of the vascular disrupting agent CKD-516 in Rabbit VX2 Liver Tumors. Radiology 2014;272:417-26.

5) Liu C, Liang C, Liu Z, et al. Intravoxel incoherent motion (IVIM) in evaluation of breast lesions: comparison with conventional DWI. Eur J Radiol 2013;82:e782-9.

6) Federau C, Sumer S, Becce F, et al. Intravoxel incoherent motion perfusion imaging in acute stroke: initial clinical experience. Neuroradiology 2014;56:629-35.
7) Choy M, Ganesan V, Thomas DL, et al. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. Journal of cerebral blood flow and metabolism. J Cereb Blood Flow Metab 2006;26:1066-1075.
8) Le Bihan D, Turner R. The capillary network: a link between IVIM and classical perfusion. Magn Reson Med 1992;27:171-178.
9) Jensen JH, Helpern JA. MRI quantification of non-Gaussian water diffusion by kurtosis analysis. NMR Biomed 2010;23:698-710.

発表論文等

1) Fujiwara S, Mori Y, de la Mora D.M, Ogasawara K, Yoshioka Y. Detection of abnormal cerebral hemodynamic change by intravoxel incoherent motion (IVIM) analysis in bilateral carotid artery occlusion (BCAO) rat. 2016 Asia Pacific Stroke Conference, Brisbane, Qld, Australia, 15-17 July, 2016.
2) 藤原俊朗、森勇樹、de la Mora D.M、小笠原邦昭, 吉岡芳親. IVIM を用いた両側総頸動脈閉塞ラットにおける脳血行動態異常の検出. 第 44 回日本磁気共鳴医学会大会（9 月 9－11 日、口頭発表予定）.
3) 藤原俊朗、森勇樹、de la Mora D.M、小笠原邦昭, 吉岡芳親. 両側総頸動脈閉塞ラットを用いた IVIM-DWI 脳循環代謝測定法の検証. 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会（9 月 29 日－10 月 1 日、口頭発表予定）.

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



研究責任者　慶應義塾大学理工学部
物理情報工学科
准教授　　塚　田　孝　祐

１．はじめに

がんの早期発見は罹患後の生存率向上だけでなく国の医療費削減につながるため、医学的・技術的にも重要な課題である。最近の CT や MRI の空間分解能の向上によって初期がんの早期発見が期待されるが、ミリ単位の超初期がんを検出することは未だ困難であり、また機器が大型で長い検査時間を要するため、集団検診に適応するには至らない。一方、内視鏡検査は胃、食道、大腸、気管、胸腔などに限定されるが、機材も小型で広く普及しているため、集団検診における腫瘍の早期発見に適している。しかし、直径数ミリメートル程度の上皮性初期がんは正常組織とのコントラストが低く、発見は困難である。最近では腫瘍に特異的に蓄積する発光薬剤を投与して可視化する研究が報告されているが [1, 2]、健診を受ける全ての被検者に静脈内投与することは安全性や検査時間を考慮すると非現実的である。以上を勘案し、①多くの被検者に適用可能、②投薬不要、③初期の腫瘍検出率や診断確度を向上させる、以上を実現する技術開発が新たに必要である。

これまで著者らは腫瘍の低酸素を改善することで放射線効果が増大することを報告した [3]。また短パルスレーザによるリン光色素の光化学反応を用いて腫瘍組織の酸素分圧を in vivo で連続計測する光学系を開発し、直径数ミリの初期がん表層の低酸素状態を定量的に解析した [4]。有機 EL の発光にもリン光材料が用いられており、同じ酸素消光の原理を用いることで酸素センシングが可能となる。造影剤を投与せずに将来的に初期がんを検出する新たな手法として、有機 EL 型の酸素センサを開発し、将来的には内視鏡などに搭載することで腫瘍の低酸素情報を可視化し、がんの超早期発見に応用することを目的とした。本法は従来の酸素電極法には無い特徴を有しており、将来的に有機 EL デバイスの電極パターン、受光素子回路、波形処理回路などを同一基板上に配線することにより、装置全体の大幅な小型化が可能になる。例えば在宅医療におけるハンディタイプの呼気ガス計測器への応用や、さらなる小型化により携帯電話等のモバイルデバイスにセンサを組み込むことも期待できる。

本報告では、センサ素子の試作を行い、酸素センサとしての特性を明らかにするための光学系の構築、培養細胞を用いた実測実験を行い、有効性を検討した。

２．有機 EL 型酸素センサデバイスの作製

有機材料として可視光域に 647 nm～波長の赤色発光スペクトルを持つポルフィリン錯体である

Platinum(II) 2,3,7,8,12,13,17,18 -octaethyl-21H, 23H-porphyrin (PtOEP)をリン光ゲスト材料として用いた。ホスト材料としてPoly(9-vinylcarbazole, PVCz)を用いた[5]。本研究で作製したデバイスは電子注入層と発光層が兼用であり、PVCz と PtOEP の最低空軌道(LUMO, Lowest Unoccupied Molecular Orbital)はそれぞれ 2.2 eV、3.2 eV、そして Al の仕事関数は 4.2 eV である（図 1)。

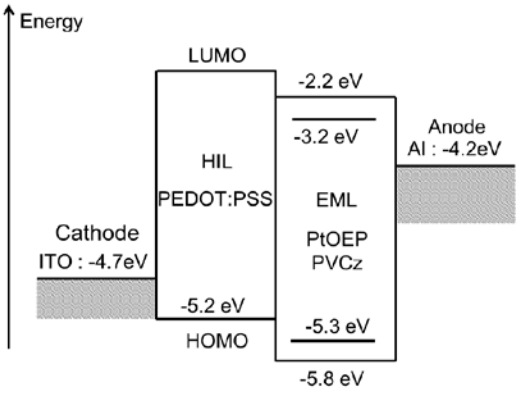


図1　有機 EL 素子のエネルギーバンド

ダイヤモンドカッターを使用し市販の ITO ガラス基板を 30 mm×30 mm の大きさに切断した。幅 4 mm にマスキングテープを貼り、王水に 5 分間浸してマスキングテープの貼られていない箇所の ITO を溶解させた。次に、スピンコート法を用いて正孔注入層及び発光層を積層した。基板上に正孔輸送層である PEDOT:PSS を 0.25 mL 滴下し、スピンコーター (SC200、 ナノテック)を用いて、500 rpm×5 秒、2500 rpm×30 秒間回転させ、塗布した。その後、発光層である PtOEP と PVCz の混合液を同様にスピンコートした（図 2)。

真空蒸着装置 (VPC-260F、アルバック)を用いて、有機層を塗布した基板上に Al を蒸着した。その際に用いた蒸着用メタルマスクは陰極幅 2 mm と 100 μm の 2 種類作製した。陰極の膜厚は真空蒸着装置内に水晶振動子センサを設置し、センサを水晶振動式成膜コントローラ (CRTM-6000、アルバック)に接続して測定した。陰極の膜厚は 150 nm とした。

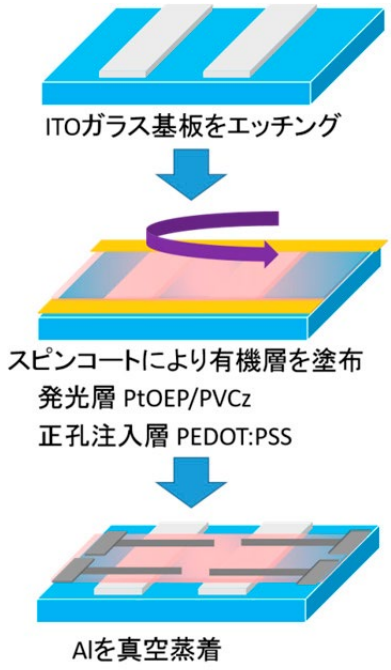


図2　有機 EL 型酸素センサの作製フロー

作製した 2 種類の有機 EL デバイスの写真を図 3 に示す。青い点線で囲まれた部分が陽極、赤い点線で囲まれた部分が有機層である。

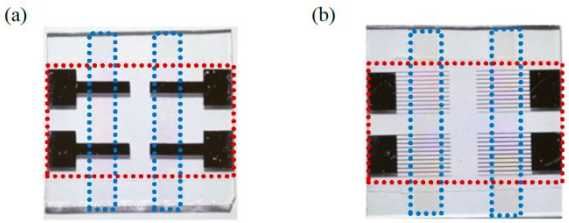


図3　有機 EL の電極パターン

有機 EL デバイスは酸素濃度および温度を自在に制御できるアクリルチャンバー内に設置した。チャンバーには N_2 ガス及び Air (大気、N_2: 80 vol%-O_2: 20 vol%)を流入させ、混合比を流量計(RK-1450、KOFLOC)で調整することで任意の酸素分圧環境を設定した。天板には M4 用のねじ穴と気体の inlet/outlet のための穴を、底板には導線を導入するための穴をそれぞれ設けた（図 4)。

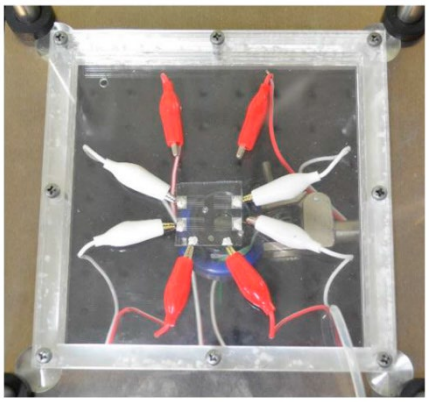


図4　作製したガスタイトチャンバー

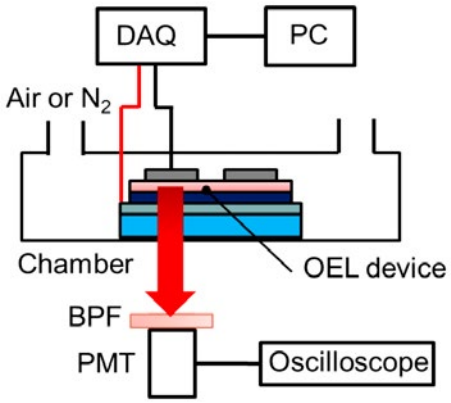


図6　リン光受光系のシステム略図

３．光学系の構築

有機 EL デバイスの励起源となるパルス電圧は LabVIEW DAQ (USB-6229 、 National Instruments)を用いて生成した。励起条件はパルス電圧 18 V、パルス幅 10 μs、周波数 10 Hz とした。発光した有機 EL の様子を図 5 に示した。

パルス電圧を有機 EL デバイスに印加した際に放出されるリン光は、BPF (Band Pass Filter)を通して PMT (光電子増倍管、H5784-01、 浜松ホトニクス)で受光した。この PMT の受光波長は 300 - 850 nm であり、可視光から近赤外までの波長に対応可能である。取得した波形は Oscilloscope (DL9140、 横河電機)にデジタルデータとして出力した。リン光の減衰時間を測るサンプリング周波数は 625 MHz とした。測定環境は気相で、密閉容器内に N_2 ガスと Air ガスを流入することで、0 mmHg から 160 mmHg までの酸素分圧を設定可能とした（図６）。



図5　有機 EL の発光

４．発光特性と有効性の検討

図 7 に陰極の幅 100 μm の有機 EL デバイスを用いて無酸素下 (pO_2=0 mmHg) と大気下 (pO_2=160 mmHg)における 2 つのリン光波形を表示した。チャンバー内の酸素分圧によってリン光寿命が変化しており、酸素センサとして機能していることが分かる。

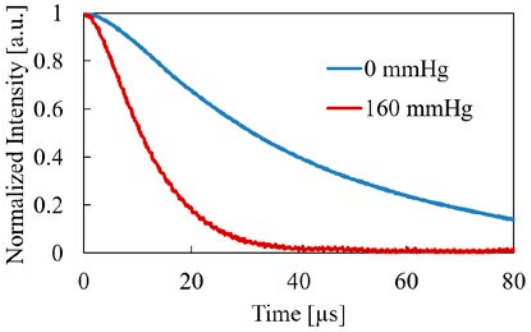


図7　酸素濃度に依存した発光寿命変化

次に、室温下で有機 EL デバイスを設置したアクリルチャンバーを酸素分圧で 0 mmHg から 160 mmHg まで 40 mmHg 刻みで変化させた。酸素分圧変化は N_2 ガスと Air の混合比を変更することで行い、その総流量は 0.4 L/min で固定した。図 8 の Stern-Volmer プロットは線形性を示すことから [6]、酸素センサとして有効な計測が可能であることが示された。しかし、低酸素に比べて高酸素条件ではリン光寿命が短くなることから、寿命の測定不確かさが大きくなるために測定精度に課題が残る結果となった。

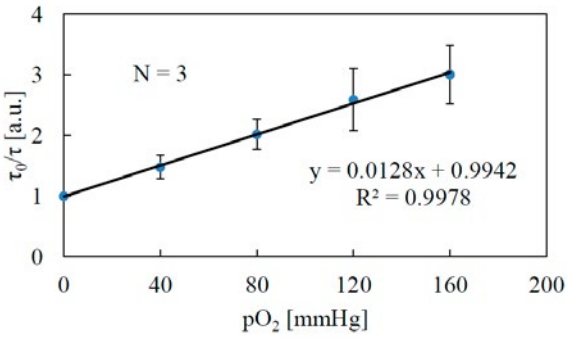


図8　Stern-Volmer プロット

リン光消光反応は、周囲の酸素分圧変化に伴いリン光寿命だけでは無くリン光強度も変化することが知られている。リン光強度の変化により酸素分圧を測定する方法は、測定の高速化や CCD による二次元領域の測定など広範囲の測定に優れている。実際に、本研究で作製した有機 EL デバイスからも酸素分圧の変化によりリン光強度の大きな変化が見られた（図９）。しかし、後述する非発光点であるダークスポットの発生などの原因から、酸素分圧以外の原因に依存したリン光強度の変化は大きい。また、連続駆動することでリン光強度は徐々に減少していくため、酸素分圧変化に伴うリン光強度の変化との区別をしにくいという欠点もある。これらの観点から、有機 EL 型酸素センサはリン光強度では無くリン光寿命を利用した酸素分圧測定の方が好ましいと言える。

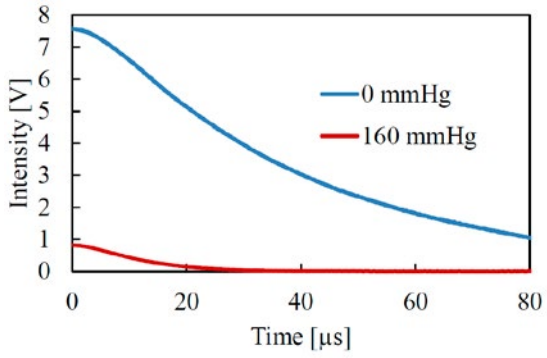


図9　リン光発光強度の変化

５．細胞培養実験への応用

作製した有機 EL デバイスはセンサ面の封止を行っていないため、蒸着した陰極が剥き出しの状態となっており、生体計測を行う際に培地や組織の接触により陰極が剥離してしまう（図 10）。また、剥離した金属陰極が細胞や組織に対する侵襲性を有する可能性も考えられた。そこで、酸素透過性が高いポリマーである Polydimethylsiloxane（PDMS)を有機 EL デバイス表面に塗装し、センサ面の保護および細胞毒性を低減させることを行った。PDMS は光学的に透明であり、可視光領域において吸収が少なく、自家蛍光も小さい。さらに、細胞や組織に接触する際、材料そのものが細胞や組織に刺激与えないことが条件となるが、PDMS は生体適合性の高い材料であり、細胞培養に適している。

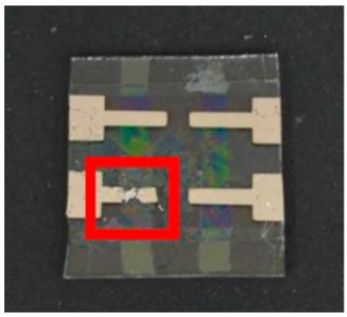


図１０　液体による電極の剥離

まず、液状の PDMS 樹脂（SILPOD184、東レダウコーニング）と PDMS 用重合剤(SILPOD184、 東レダウコーニング)を質量比 10:1 で混合し、脱泡後、液状の PDMS 樹脂をセンサ基板に均一に塗布し、スピンコーターを用いて PDMS を塗布した基板を 500 rpm×5 秒、1000 rpm×30 秒回転させ、薄膜化した。その後、75℃のホットプレート上で 1 時間加熱することで、PDMS の重合反応を促進し、硬化させた。厚みはおよそ 70 μm に調整した。培養液を満たす培養槽を同様に PDMS の素材で作製し、図 11 に示すようにセンサ面に細胞を培養できるように設計した。

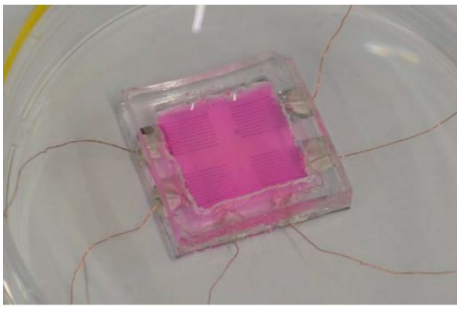


図11　細胞培養用チャンバーの作製

ヒト肝癌細胞（HepG2)を 10cm ディッシュを用いて培地 DMEM にて confluent な状態まで培養した。センサ面に貼付した PDMS 薄膜をコラーゲンコートし、HepG2 を 5.0×105 cells/cm² で有機 EL デバイス上に播種した。播種後、37 ℃インキュベーター内で 24 h 培養し、Calcein-AM (Ex. 488 nm/Em. 515 nm)により染色した細胞像を図 12 に示す。

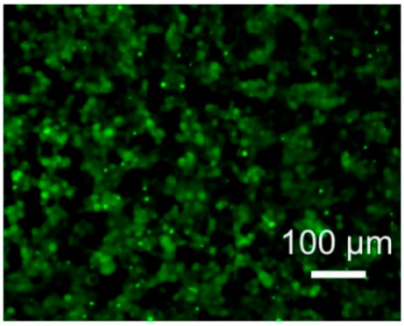


図12　センサ面への細胞培養

有機 EL デバイスは透明ガラスヒーター(S101, BLAST)で構成されるガラスチャンバー内に設置し、培地温度を 37℃に維持した [7]。酸素分圧の測定は、細胞の播種直前と播種 6 h 後に行った。その後、細胞呼吸を阻害する試薬である Antimycin A を培地内に添加し、1 h 後に再び酸素分圧の測定を行った。

図 13 に示した培養前後の酸素分圧値は培養 6 h 後の細胞周囲の酸素分圧は培養前と比較して 68 mmHg 減少した。また、Antimycin A を添加した 1 h 後には細胞周囲の酸素分圧値は培養前とほぼ同じ値を示し、酸素分圧値の変化は細胞呼吸により細胞周囲の酸素が消費されたことが原因であることが示された。

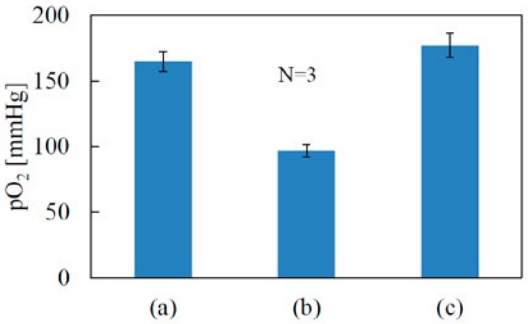


図13　培養細胞による酸素分圧変化

６．問題点と今後の展開

試作した有機 EL 素子からの発光強度は素子間のばらつきが大きく、一定しない問題点が残った。この原因として作製行程におけるゴミや埃などの異物の接触が非発光点になることが考えられた。有機 EL 素子の膜厚は電極部分を含めても 200-300 nm 程度であるため、製造工程で 1 μm 程度の埃が基板上に付着すると、ダークスポット発生の原因となる。本研究では、清浄度 ISO クラス 4 を有するクリーンベンチ内で蒸着までの作業を行った。この清浄度は精密電子部品や半導体の製造では明らかに不十分であると言え、有機 EL デバイスもそれらと同等の清浄度の空間で製造すべきであると考えられる。実際に CCD カメラを用いて、有機 EL デバイスの発光面を観測するとダークスポットが観測され、さらに同一条件で作製したデバイスにも関わらず発生量が異なることが分かる（図 14 a,b)。

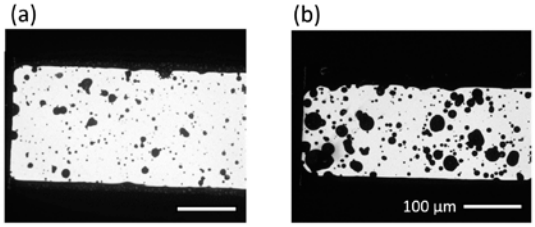


図14　ダークスポットの発生

これまで電極素材には仕事関数と作製の容易さを考慮して Al を用いてきた。しかし、高感度化や医療応用を考える上で、陰極素材の選定は今後の課題としてあげられた。まず、Al 陰極の酸素透過性は極めて低い。酸素分子は陰極と発光層の

境目から発光素子内部にわずかに侵入し、センシングに寄与していると考えられるが、酸素の測定感度を上げるためには陰極幅をより矮小化する必要がある。一方、陰極幅を狭くすると、強度の低下、ダークスポットへの耐性の低下、それによる断線率の増加といった問題が発生すると考えられる。よって、電極自体が酸素を透過できる物質を陰極に採用することが求められる。また、Al は周囲の酸素により容易に酸化し、さらには水への耐性も低く、先行研究においても Al 陰極のデバイスからの剥離が見られた。液相における実験では、水による腐食を防ぐために PDMS コーティングを行い、ある程度の効果が見込めたが、PDMS はガス透過性を持つ物質である以上、水蒸気の侵入は避けられない。

本センサのメリットとして、酸素濃度を絶対値計測可能な点にある。臨床現場において幅広く使用されているパルスオキシメータは酸化・還元ヘモグロビンの吸光度の差を利用し酸素飽和度の測定をしている。しかし、パルスオキシメータで用いられる 660 nm の波長における一酸化炭素ヘモグロビンと酸化ヘモグロビンの吸収スペクトルが類似するため、この酸素センサでは一酸化炭素中毒による組織低酸素の検出は極めて困難であるのが現状である。また、測定部位も血液が豊富な部位に限定されてしまう。一方、有機 EL 型酸素センサは生体に貼付して酸素分圧値を直接測定出来るため、迅速な一酸化炭素中毒の判別が可能になると考えられる。

また、冒頭で述べたように、有機 EL をセンサに用いる利点として、フレキシブルな素材による作製が可能であることである。曲げ伸ばしが自由にできる素材であれば、生体のあらゆる箇所に密着でき、センサとしての応用性が広がる [8]。フレキシブルな有機 EL の素材として金属を用いている例も存在するが、本研究の陰極は微小な幅であるため、曲げ伸ばしに弱いと考えられる。よって、今後の応用を考える上で、陰極として用いる素材は、それ自体が酸素を透過し、酸素や水蒸気への耐性が高く、かつ曲げ伸ばしに強い性質を持つことが望まれる。例えば、Ag ナノワイヤは導電性を持つナノオーダーの金属ファイバーであり、近年様々な種類のものが作製されている。これは液体中に存在できるため、有機物質と同様に、スピンコートやドロップキャスト法による成膜が可能であり、様々な基板にパターニングできることが知られており [9]、将来的なフレキシブル基板への応用が期待できる（図 15）。

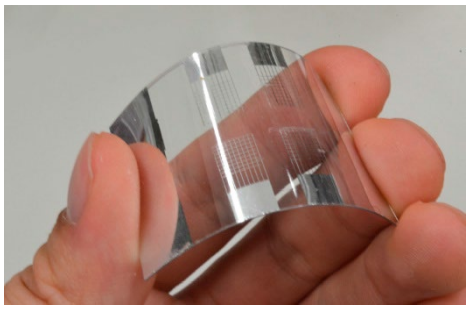


図15 フレキシブル素材への応用

本研究で提案する技術は、将来的に生体組織の低酸素情報を基に悪性腫瘍を検出するという従来法と全く異なる点で特徴的である。また、造影剤や光感受性色素の静脈内投与が不要である点、既に普及している内視鏡などに付加価値的に組み込むことによって健康診断に容易に応用され、多くの人々に技術を還元することが期待できる点があげられる。有機 EL 型酸素センシング技術は悪性腫瘍検出以外にも様々な応用が可能である。柔軟性のあるフィルム型にすることで 3 次元的な形状を有する臓器表面に貼付することで、術中の酸素代謝モニタに応用が考えられる（図 16）。さらに、有機 EL デバイスの電極パターン、受光素子回路、波形処理回路などを同一基板上に配線することにより、装置全体の大幅な小型化が可能になる。例えば在宅医療におけるハンディタイプの呼気ガス計測器への応用や、将来的にはさらなる小型化により携帯電話等のモバイルデバイスにセンサを組み込むことも期待できる。

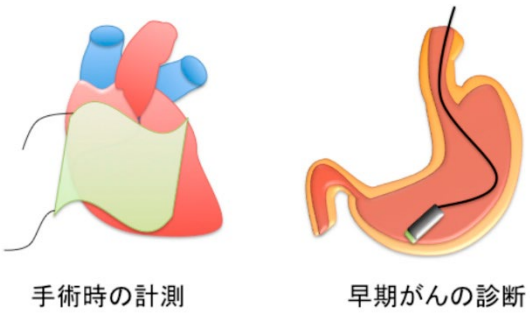


図16 フレキシブル酸素センサの応用

7．まとめ

本研究では、医学・生物学分野における新しい酸素センサの開発を目指し、酸素分圧を測定可能な有機 EL デバイスの作製を行った。電極間の発光層への酸素拡散性を向上させるようなデバイス構造として、陰極幅の狭小化を提案した。作製した有機 EL デバイスの酸素分圧測定精度を検証した結果、酸素分圧変化に伴うリン光寿命の変化を観測することが出来、また、作成した Stern-Volmer プロットが線形性を示したことから、本デバイスを用いて酸素分圧測定が可能であることが示された。作製した有機 EL デバイスを細胞培養実験に応用し、基板表面を高ガス透過性の PDMS で封止することによって、気液両相で酸素センシング可能な有機 EL デバイスへと改良した。センサ上で細胞を培養しながら酸素分圧測定を行った。その結果、細胞呼吸による細胞周囲の酸素分圧値の低下を捉えることに成功した。

今後、発光素子のサイズを小さくしてセンサ面に複数配列することで低酸素をイメージング可能なデバイスに発展させることが可能となる。また、フレキシブルな有機 EL の特性を活かす設計の改良を行うことで、皮膚や臓器に貼付可能なセンサに発展させることが期待される。

謝辞

本研究の一部は中谷医工計測技術振興財団（第 31 回研究助成）による支援によって行われました。ご支援・ご協力に感謝申し上げます。

参考文献

1) Luo S. et al, A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging, Biomaterials, 32, 7127-38, 2011.

2) Yi X. et al, IR-780 dye for near-infrared fluorescence imaging in prostate cancer, Med. Sci. Monit., 21, 511-7, 2015.

3) Kashiwagi S. et al, Perivascular nitric oxide gradients normalize tumor vasculature, Nature Medicine, 14(3), 255-7, 2008.

4) Yamada R. et al, Optical scanning of tissue oxygen tension and hypoxia imaging in solid tumors, Advanced Biomedical Engineering, 3, 65-71, 2014.

5) Noh Y.Y. et al, Energy transfer and device performance in phosphorescent dye doped polymer light emitting diodes, Chemical Physics, 118, 2853-2864, 2003.

6) Stern O., Volmer M., Uber die Abklingungszet der Fluoreszenz, Physics Z, 20, 183-188, 1919.

7) Sato A. et al, An in vitro hepatic zonation model with a continuous oxygen gradient in a microdevice, Biochemical and Biophysical Research Communications, 453, 767-71, 2014.

8) Someya S., et al, An ultra-lightweight design for imperceptible plastic electronics, Nature, 499, 458-463, 2013.

9) Cui, H.F et al, Flexible organic

light-emitting devices with a smooth and transpar ent silver nanowire electrode, Optical Engineering, 53, 077102-077102, 2014.

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



研究責任者　東北大学大学院医工学研究科
医工学専攻ナノデバイス医工学分野
教　授　　芳　賀　洋　一

１．はじめに

近年、日本における糖尿病や糖尿病予備軍の人数は 2000 万人に及んでおり、国民の 5 人に 1 人が該当する程に患者数の多い疾患である。しかし、この該当数は健康診断等で糖尿病が疑われると診断された人数であり、この他に、健康診断では見つけられない隠れ糖尿病の人が数多くいる。この背景には、健康診断では空腹時血糖値から糖尿病の疑いを判断するため、空腹時は正常な血糖値でも食後に高血糖となる場合は見逃してしまう可能性が挙げられる。より正確に診断するために糖負荷試験等を行うが、最低３回の採血が必要であり、被検者への負担が大きいことから一般の健康診断では行われていない。そのため、隠れ糖尿病患者を発見するための、より侵襲性の低い計測装置が求められている。

２．局所糖負荷試験の提案

糖尿病は、血糖値の調整を行うインスリンが分泌されなくなるインスリン分泌障害、もしくはインスリンは分泌されるが効かなくなるインスリン抵抗性亢進などの、インスリン作用不足により細胞に糖が正常に取り込めなくなり、慢性の高血糖となる疾患である。特に複数の遺伝因子に過食・運動不足・ストレスなどの環境因子（生活習慣の不良）や加齢が加わり発症するⅡ型糖尿病では、インスリン分泌障害とインスリン抵抗性の増大が様々な程度で生じ、慢性の高血糖状態となる。本研究では、低侵襲で隠れ糖尿病を発見する診断方法として極細径の針１本のみで行う局所糖負荷試験を行うデバイスを開発した。本デバイスは、局所に少量のグルコースを注入し代謝の様子を計測することで、極低侵襲でインスリン抵抗性を計測することができると期待される。

局所糖負荷試験のシステムを図１に示す。細径（外径 200 μm 程度）の針表面にグルコース注入用及びグルコース計測用の流路を作製した針を用いる。皮下にこの針を留置し、少量のグルコースを注入し、その後の針周辺のグルコース濃度を計測する。局所的に糖負荷試験を行うことで、食後の血糖値を局所的に再現でき、経口で服用するグルコースよりも少量の投与での計測が可能となると予想されるため、被検者への負担が小さく、高血糖の患者のグルコース抵抗性の診断にも使用できる。また、針表面に形成した流路を用いて微小還流を行うことで、非観血的に体内グルコース濃度をモニタリングする。微小還流とは、穴付き膜で覆われた流路に還流液を流すと、皮下で濃度拡散によって還流液内に皮下の物質が拡散する。この還流液を体外まで流し、体外に設置した



図1　システムのイメージ

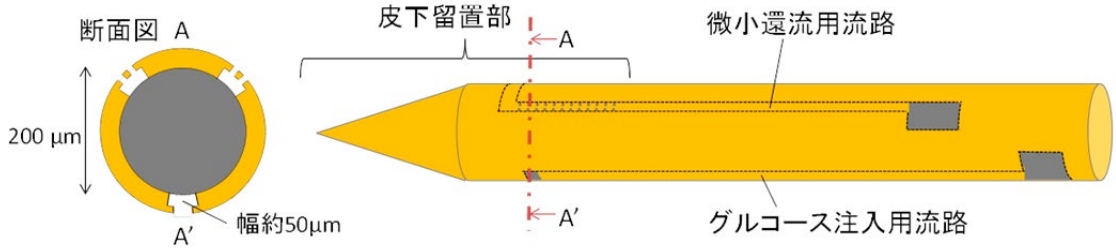


図2　局所糖負荷試験用針のデザイン

物質濃度センサで計測することにより皮下の物質濃度を計測する手法である（図 1）。皮下組織におけるグルコース等の低分子量の物質濃度は血中濃度とほぼ同じであることが知られており、採血の代わりに用いられることが期待できる。これにより、これまでの糖負荷試験で行ってきた採血が必要なくなり、被検者への負担を軽減することができる。

本デバイスで用いる針のデザインを図 2 に示す。針の片面には皮下に留置される部分に 1 個の穴があるグルコース注入用流路を、もう片面には皮下を流れて体外まで流路が続いており、皮下に留置される部分に複数の微小穴があるグルコース計測用流路を作製する。市販の鍼灸針上にポリイミドを積層する形で流路を作製することで、鍼灸針の皮膚への刺入性が良好で痛みなく刺入できる特徴を生かしつつ、注入・還流機能を付加する。

3．従来の皮下微小還流を用いたマウス皮下からのグルコース計測

これまで本研究室では開発してきた微小還流針 [1]を用いたマウス皮下からのグルコース回収実験を行ってきた。用いた針は図 3 のように鍼灸針先端部を 2 往復する流路デザインの針を用いている。マウス背部の皮膚に微小還流針を刺入・留置した状態で経口糖負荷試験を行い、血中グルコース濃度と微小還流により回収したグルコース濃度との関係を計測した。血中グルコース濃度は尾静脈採血により計測し、還流液中グルコース濃度は蛍光染色を行って溶液中のグルコース濃度を計測した。2 匹のマウスに対して本実験を行ったところ、血中グルコース濃度と還流液中グルコース濃度は有意に（$P<0.01$）相関を示し、相関係数は $R=0.74$ であった（図 4）[2]。本実験により、微小還流により皮下からのグルコース回収が可能であることが示された。

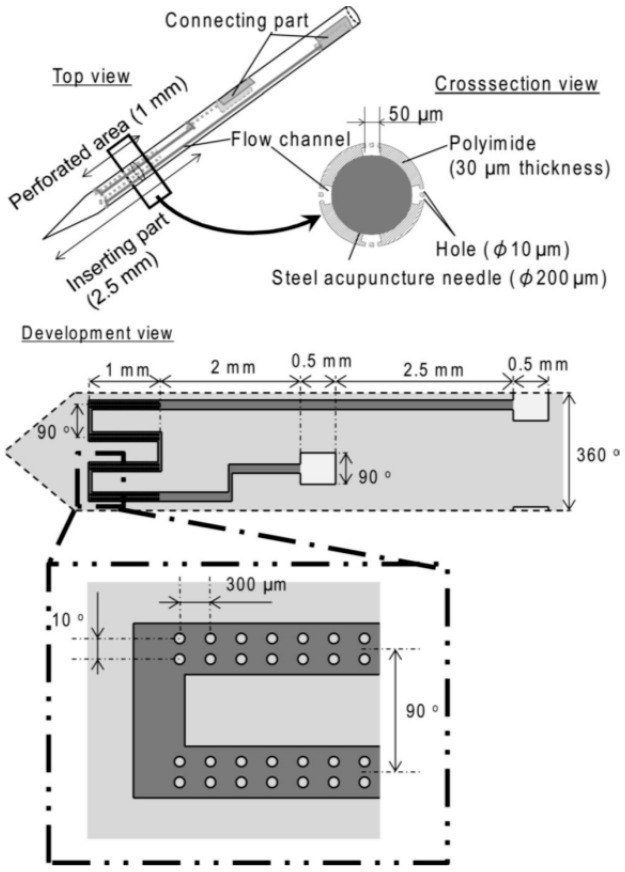


図3　従来の皮下微小還流針のデザイン [2)]

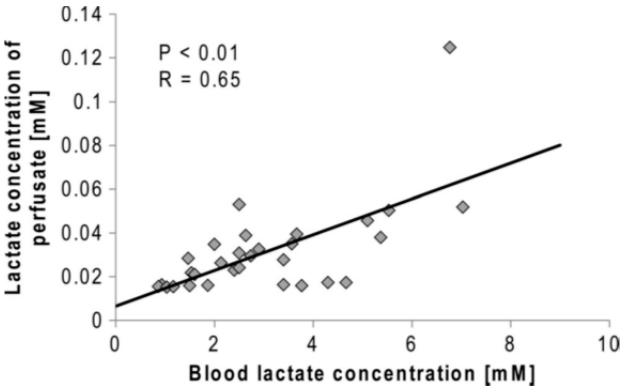


図4　血中グルコース濃度と還流液中グルコース濃度の関係 [2)]

４．皮下刺入針の改良

局所糖負荷試験用デバイスに適した針を作成するため、皮下微小還流針のセミ量産プロセスの開発と、ヒトへの応用を視野に入れた生体適合性材料を用いた針の作製プロセスを開発した。

（ア）　セミ量産プロセス

従来の針上流路作製プロセスでは、鍼灸針上に製膜したポリイミドを Nd-YAG レーザーと自動ステージを組み合わせた非平面アブレーションシステム [3)]を用いて加工していた。しかし、本システムは針を１本ずつ位置合わせして加工する必要があり量産は難しい。

そこで本研究では、量産が難しかったレーザーアブレーションを、図 5 のように並べた針に直上から行い、その他のプロセスについても同時に行う作製プロセスを提案する。本研究で開発する局所糖負荷試験用デバイスは表面と裏面で機能が違う 2 種類の流路を作成する（図 2)。そのため、このように針を並べて固定し上面から加工し、その後裏返して同じように加工することで、量産化が可能となる。従来の 1 本ずつ作製していたプロセスでは、レーザーアブレーション前に時間がかかる軸合わせを 1 本ずつ、全ての針に行う必要があった。しかし、本研究で提案するセミ量産プロセスでは、並べた針は固定されており位置関係が変化することは無いので、1 回の位置合わせのみで並べてあるすべての針に対してアブレーションを行うことができ、工程数及び作製時間を低減することができる。

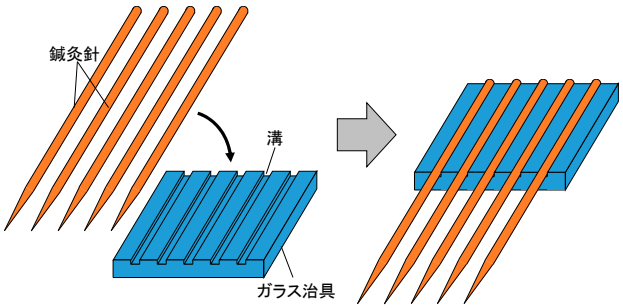


図5　量産プロセスのコンセプト

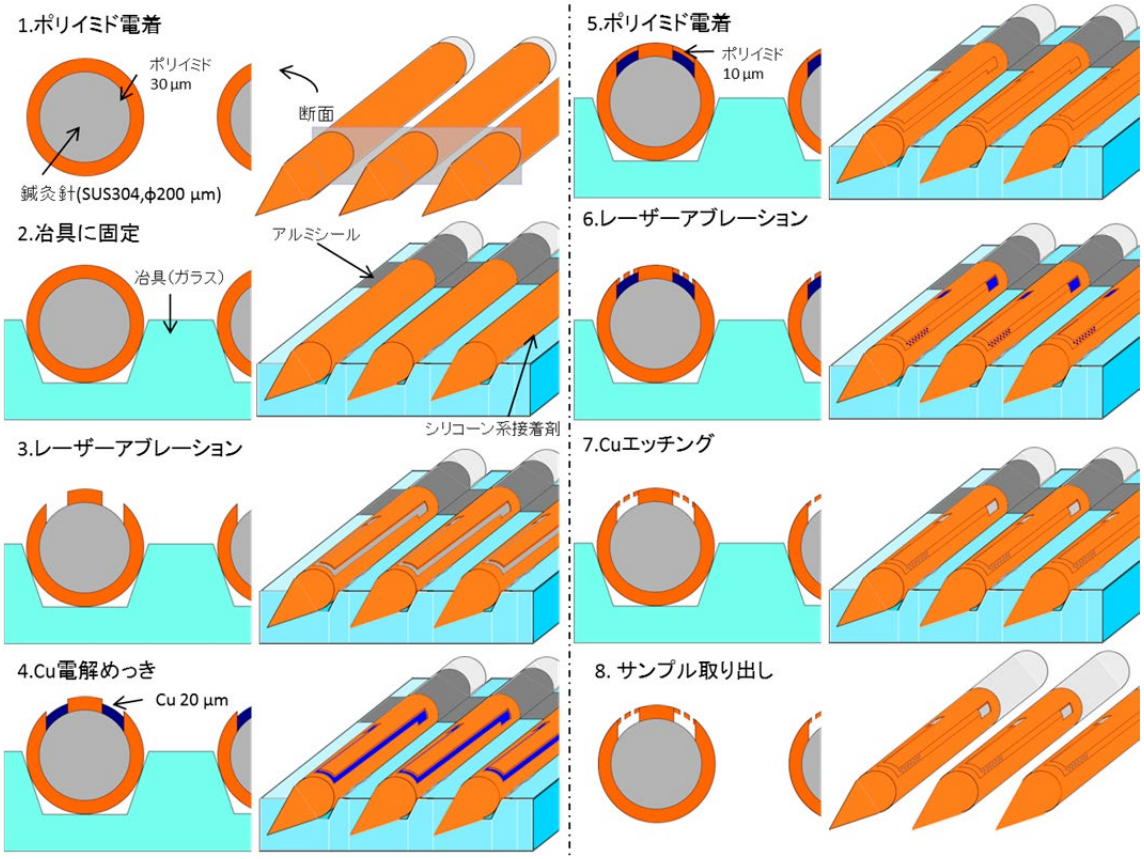


図6　セミ量産プロセス

本デバイスの作製プロセスを図 6 に示す。まず 200 μm の鍼灸針（株式会社カナケン）の表面に電着ポリイミドを 30 μm 成膜した。次にガラスを切削加工して作った冶具に、ポリイミドを成膜した鍼灸針をシリコーン系接着剤（東レ･ダウコーティング株式会社, Sylgard）で固定した。そして Nd-YAG レーザーを用いてレーザーアブレーションを行うことで流路をパターニングし、流路パターン部分の鍼灸針をむき出しにした。むき出しになった部分に犠牲層となる銅を硫酸銅めっき液（日本エレクトロプレイティング・エンジニヤース株式会社、ミクロファブ Cu520）で膜厚 20 μm 電解めっきした。その電解めっきした銅の上にポリイミドを膜厚 10 μm 程度電着した。そのポリイミド上にレーザーアブレーションを行うことで微小穴部もしくは薬液吐出口とチューブ接続部分を作製した。次に犠牲層である銅を約 40 % の硝酸でエッチングすることで流路を作製した。最後にサンプルを冶具から取り外し、流路とチューブをシリコーン冶具で接続した。

本プロセスで作製した針上流路を図 7 に示す。流路を一括で加工するため、治具と針との位置ずれが加工精度に大きく影響するが、治具形状とアライメント手法の工夫により、3 本一括で加工を行ってもずれることなく流路を作製することができた。

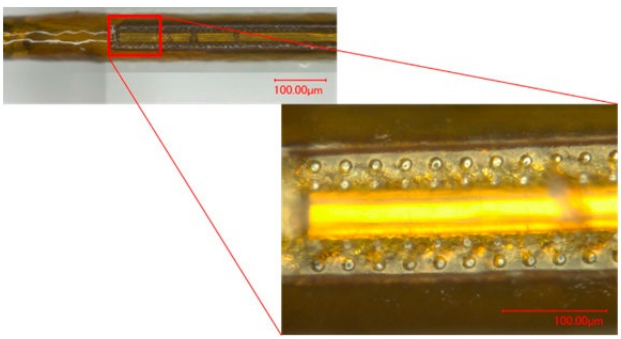


図7　セミ量産プロセスにより作製したグルコース回収用流路（bar = 100 μm）

（イ）　生体適合性ポリイミドを用いた流路形成

従来の針表面に形成した流路は、ポリイミドを電着することにより極細径の針でも均一なポリイミド厚膜を成膜できた。しかし、本デバイスを健康診断等で用いることを想定した場合、流路を形成しているポリイミドも皮膚に留置されるため、生体適合性材料を用いることが求められる。そこで本研究では従来の電着ポリイミドではなく、生体適合性が担保されたポリイミド材料（VTEC 851-PI、R. Blaine Industries, Inc.）を用いた流路作製プロセスを開発した。

作製方法は図 6 で示したものとほぼ同じであるが、用いるポリイミドが電着できないため、ポリイミドの製膜はディップコートで行う。細径針上に均一な厚膜を形成するため、1 回のディップコートで 1~2 μm ずつ複数回製膜することで、均一な薄膜を重ね塗りし、所望の膜厚（20 μm 以上）を得た。

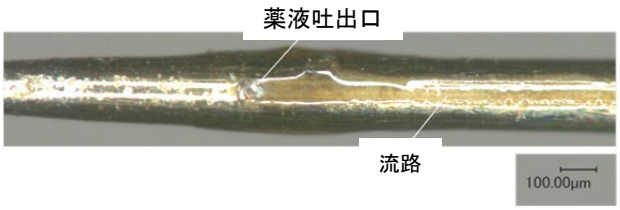


図8　生体適合性ポリイミドを用いて作製したグルコース注入用流路

５．グルコース溶液注入部分の検討

皮下へのグルコース注入の際の注入液量は皮内注射の量を参考に 20μL 程度と考えられる。この量を 1 分以内で注入することが望ましいため、本流路を通した溶液の注入は 20μL/min 以上の流量で流せることが望ましい。そこで、この流量での薬液注入が可能かの確認を行った。

用いた針はグルコース注入用流路のみを作製したもので、流路にポリエチレンチューブを、シリコーン製治具を用いて接続した（図 9）。このチューブをシリンジポンプに設置した純水を満たしたシリンジに接続し、一定流量で液を流した際に破損がないかどうかを調べた。はじめに 5 μL/min の流量で流路付き針に純水を流し、30 秒ごとに流す流量を 5 μL/min ずつ増やしていった。この方法を用い、目標である 65 μL/min の流量で流すことができるか、また、サンプルが破損してしまう場合は何 μL/min で破損してしまうかを評価する。本試験では計 3 本のサンプルを用いて評価した。

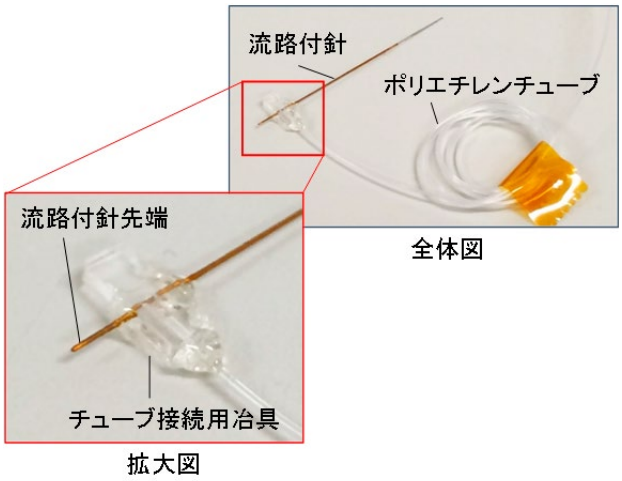


図9　チューブを接続したグルコース注入用流路付き針

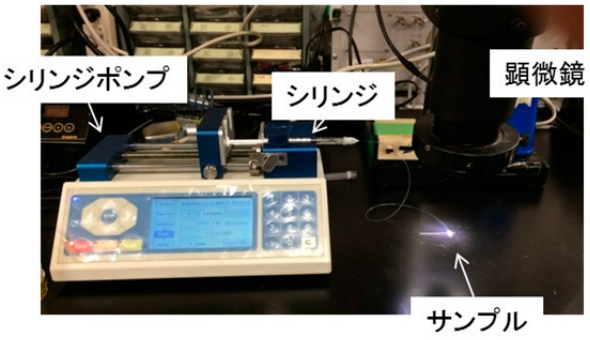


図10　実験セットアップ

実験の結果、2 本は 40μL/min で流し始めた時点で、1 本は 50μL/min で流し始めた時点で、シリコーン製治具とチューブとの接続部から水漏れが起こった。目標である 20μL/min では問題なく注入が可能であったため、作製したグルコース注入用流路を用いた糖負荷が可能であることが確認できた。ただし、実際の使用の場合は針先が組織に留置された状態となるため、今回の実験よ

りも注入圧を高くする必要がある。この場合はチューブと治具との接続部の強度をより高くする必要があると考えられる。

６．グルコース回収部の評価

セミ量産プロセスで作製したグルコース回収用流路を用いた経口糖負荷試験を行った。従来の微小還流針に比べ、本研究で用いるグルコース回収用流路は長さが半分になるため、回収率が低下することが予想される。その場合でも、血中濃度と相関したグルコース濃度を皮下から得られるかどうかをマウスを用いて動物実験により確認した。

（ア）　実験方法

本実験では、作製した針上の流路にポリエチレンチューブを、シリコーン製治具を用いて接続した針を用いた（図 11）。実験手順を図 12 に示す。本試験は、6~10 時間程度の絶食後に行った。小型動物用吸引麻酔装置を用いたイソフルラン吸引麻酔下で行った。はじめに、マウス背部にグルコース回収用流路を作製した針の刺入・固定を行った。この状態で 10 分間還流を行い、還流終了時に尾静脈から採血を行った。血糖値は簡易血糖計測センサ（ニプロ株式会社、Free style Freedom Lite）を用いて計測した。その後、40 mg（2 g/kg）のグルコースを経口投与した。投与直後から還流を開始し、10 分ごとにグルコース投与後 120 分まで、回収液側シリンジの交換及び回収を行った。還流速度は 5 μL/min とした。血中グルコース濃度についてはグルコース投与後 20 分までは 5 分ごと、その後は 10 分ごとに計測した。その後、回収液中グルコース濃度は市販のグルコースアッセイキット（BioVision、Inc.、Glucose Assay Kit）を用いて蛍光染色してグルコース濃度を計測した。

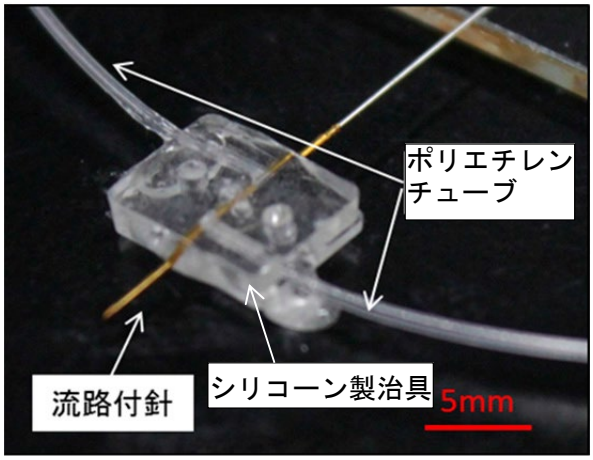


図11　チューブを接続したグルコース回収用流路付き針

（イ）　実験結果

今回は 1 匹のマウスに本試験を行った。実験中にチューブと針の接続部より還流液が漏れてしまったが、還流液の回収自体は行えていたため、実験は続行した。血中と回収液中グルコース濃度の時間変化を図 13 に示す。また、血中と回収液中グルコース濃度の関係を図 14 に示す。血中グルコース濃度は、還流開始時と終了時の 2 点の平均値を用いた。回収液中にグルコースが含まれて

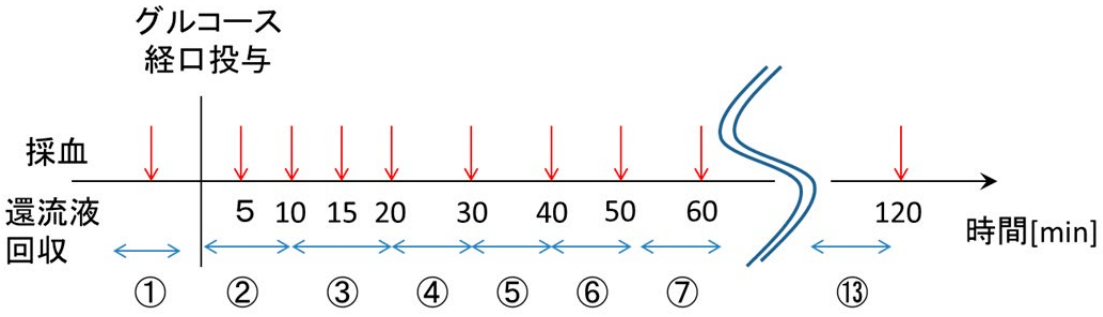


図12　糖負荷試験の実験手順

いたことから、作製したグルコース回収用流路を用いることで、マウスの皮下からグルコースを回収することができることは確認できた。しかしながら、図 13 より、回収液中のグルコース濃度には大きなばらつきがあった。また、図 14 から、血中と回収液中グルコース濃度の間に有意な相関を得ることはできなかった。回収率に関しては、従来の針先を 2 往復する微小還流用流路では 0.6 %程度であったのに対して、今回の実験結果では式（1）を用いて計算すると、100 %を超える異常に高い数値を示す場合があった。

$$\mathrm{Recovery} = \frac{C_p}{C_b} \qquad \cdots(1)$$

Recovery：回収率

Cp：回収液中グルコース濃度

Cb：血中グルコース濃度

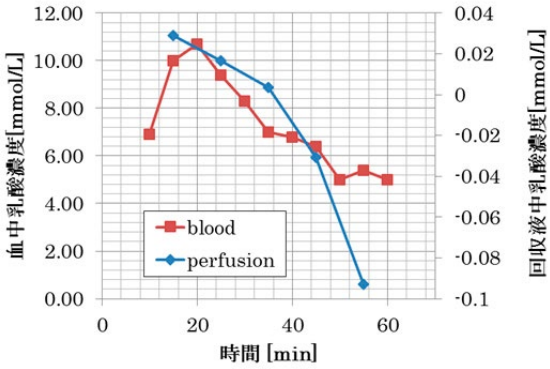


図13　血中及び回収液中のグルコース濃度の時間変化

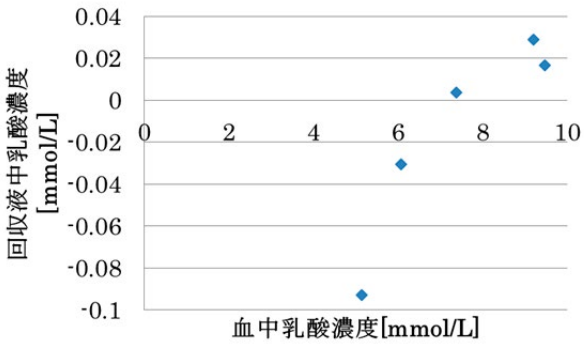


図14　回収液中グルコース濃度と血中グルコース濃度との関係

（ウ）　考察

本章では、セミ量産プロセスで作製した微小還流用流路を搭載した微小還流針の評価を行った。マウスの皮下からグルコースを回収することが可能であることは確認できたが、回収率が 100 %を超える異常に高い値を示すことや、回収したグルコース濃度に大きなばらつきが出てしまった。微小還流では、皮下の生体成分濃度と還流液中濃度との差を利用し濃度拡散で流路内に生体成分を拡散させ物質を回収していることから、100 %以上の回収率を示すことは起こることは通常では起こりえない。

原因を考えると、皮膚表面の付着物の影響や、還流速度にばらつきがあったこと、還流液が漏れていたことが考えられる。まず、皮膚表面の付着物が回収液中に混入してしまった可能性について考える。マウスの皮膚表面に付着しているものとして汗が考えられる。汗中のグルコース濃度は血中グルコース濃度と相関することが知られており、もし付着していた汗が揮発してグルコースが皮膚上に残っていた場合は異常に高い回収率を示した理由になり得る。また、本実験ではマウスに針を固定する前に除毛剤を塗布し、固定する部位付近の除毛を行っており、皮膚表面に除毛剤が残存している可能性がある。今回使用した除毛剤には粘度調整剤が含まれており、粘度調整剤の中にはグルコースを含む種類も存在する。実験中に還流液が漏れてしまっていたことから、漏れだした液中に除毛剤の成分が溶け出し、その液を計測したために回収率が異常に高かった可能性がある。

次に還流速度のばらつきについて考える。本実験では、シリンジポンプを用いて一定の流量（5 μL/min）で還流させている。今回のプロトコルでは 10 分ごとにシリンジにたまった還流液を回収しているので、1 回で 50 μL 程度の還流液を回収することができる計算になる。しかし、今回は還流液の漏れなどの影響で還流速度を一定にすることはできず、回収液の量も時間によって違う結

果になってしまった。微小還流の原理から、還流速度の違いは物質の回収率に影響するので、この還流速度のばらつきが回収液中グルコース濃度の大きなばらつきに影響した可能性がある。

以上より、本実験では除毛剤の影響や水漏れによる還流速度のばらつきが問題となった可能性がある。除毛剤をきちんと洗い流すことや、数日前に除毛しておき除毛剤の残留を低減すること、還流液の水漏れ対策を行うことが必要と考えられる。

7．まとめ

隠れ糖尿病の早期診断のための極低侵襲診断方法として、局所糖負荷試験を提案した。本研究では、この実現のためにグルコース注入用流路とグルコース回収用流路とを持つ針の作製と評価を行った。針の作製では、これまでの１本ずつ作製していたプロセスから複数本同時にプロセスを進められるセミ量産プロセスの開発と、皮下に留置されるポリイミド材料を生体適合性ポリイミドに変えたプロセスの開発を行った。

グルコース注入用流路では、目標である 20μL/min での注入が可能であることを確認したが、今後、組織へ針を留置した状態で注入する際には注入圧をもっと高くする必要があると予想されるため、チューブと針との接続部の強度を高める必要があると考えられる。

グルコース回収用流路では、従来の微小還流針に比べ流路長さが半分になることから、グルコースの回収に十分な長さであるか、血中濃度との相関がとれるかどうかの確認を行った。マウスを用いた経口糖負荷試験を行った結果、作製した針を用いた微小還流によりグルコースが回収可能であることを確認できたが、途中で流路接続部の破損が見られたため、血中グルコース濃度との相関は得られなかった。今後は、接続部の強度を強くすることが必要である。

以上より、隠れ糖尿病診断のための局所糖負荷試験デバイスの開発を行った。本試験に用いる注入・還流の 2 つの機能を持つ針の作製方法を確立し評価を行った。今後は、本デバイスの診断の有効性を確認していくことが必要である。

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第 31 回技術開発研究助成（開発研究）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) N. Tsuruoka, K. Ishii, T. Matsunaga, R. Nagatomi, and Y. Haga, “Development of minimally invasive microdialysis needle for continuous monitoring of biological substances,” The 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Paris, France, 29 Jan - 2 Feb, pp. 941-944, 2012.
2) Tsuruoka N, Ishii K, Matsunaga T, Nagatomi R, Haga Y. Lactate and glucose measurement in subepidermal tissue using minimally invasive microperfusion needle. Biomed Microdevices. 2016 Feb;18(1):19. doi: 10.1007/s10544-016-0049-z.
3) S. Goto, T. Matsunaga, J. J. Chen, W. Makishi, M. Esashi, Y. Haga, “Fabrication Techniques for Multilayer Metalization and Patterning, and Surface Mounting of Components on Cylindrical Substrates for Tube-Shaped Micro-Tools,” in Proceedings of 2006 International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology, Okinawa, May, 2006, pp. 297-300

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



研究責任者　山口大学　時間学研究所
時間生物学研究室
教　授　　明　石　　真

１．要旨

組織における遺伝子発現を長期間（数週間）にわたって高い時間分解能で連続測定することは、現状の技術では難しい。例えば、従来の生化学的手法によって実行するには、夜間にも及ぶ一定時間間隔の生体組織の採取を連日にわたって継続しなければならず、加えて、大量の組織サンプルを生化学分析にかけるために要する時間と労力がきわめて大きい。また、このような実験アプローチでは、例えば薬物投与などによる遺伝子発現変化を長期モニタリングする場合には、膨大な数の実験動物の犠牲が必要になる。私たちは、この問題を解決するために、個々のマウスの組織における遺伝子発現の経時変化を、半自由行動下において長期（数週間）にわたり簡易にリアルタイム測定するためのシステム開発を目指した。マウスの体表面に小型の光電子倍増管を直接密着させる単純な方法で測定を試みたところ、最大で３週間に及ぶ時計遺伝子発現リズムの連続測定に成功した。私たちの方法は簡易で安価であり、改良によってさらに測定の成功率が上昇すれば、ハイスループットの測定システムの構築も難しくないため、遺伝子発現に及ぼす薬物スクリーニング等への応用が可能である。

２．序文

個体における生命現象を分子レベルで解明する際には、関与する遺伝子の発現量の変化を測定することが不可欠である。臓器等を採取してRNAやタンパク質を対象とした生化学的な定量解析や、細胞および組織化学的手法による検出など、さまざまなアプローチが存在している。しかし、これらのような従来法には弱点がある。例えば、２日間に渡って遺伝子発現の連続変化を生化学的に観察したい場合、以下のような大掛かりな実験が必要になる。３時間ごとに組織採取を行う場合は、１６回におよぶ組織採取を４８時間にわたって行う必要があり、各時間に３匹ずつマウスを使うならば合計で４８匹が必要になる。夜中にも及ぶ組織採取を終了した後、回収した大量の組織を１つずつホモジナイズにより粉砕し、RNA を精製してリアルタイム PCR を行ったり、抽出タンパク質をウエスタンブロッティングで解析したりすることで、ようやく結果を得ることができる。残念なことに、途中経過観察から判断して、実験条件を急遽変更するような柔軟な対応は望めない。このような従来の実験法を用いて、コントロール群と薬剤処理群を比較するような実験を行う場合はさらに困難を極める。例えば、コントロールに加えて薬剤を２種類試す場合は、４８

匹の３倍の頭数で実験を行う必要がある。したがって、時間分解能を上げるために細かな時間間隔で組織採取を行うのは非現実的であり、組織採取期間が一週間にも渡る場合は研究室総出で取り組む必要がある。

インビボイメージングシステムを導入することで、上記の問題のいくつかは解決する。目的の遺伝子が発現すると発光を放つ遺伝子改変マウスを麻酔で眠らせて、高感度カメラで撮影することにより遺伝子発現を光シグナルとして検出できる。これにより、動物の犠牲も大幅に減らすことができる。上記の例の場合では４８匹が必要だった実験が、わずかに３匹で実験ができる。抽出や定量が必要ないのでランニングコストもお幅に減らすことができる。リアルタイムで実験結果が得られるという利点もある。興味深いのは、従来の生化学的手法では安楽死させたマウスの平均的な変化を捉えることしか出来なかったが、この測定系では個々のマウスを生かしたまま経時変化を観察できるため、個体差の検出が可能である。しかし、この方法でも高い時間分解能で長期測定を行うには限界がある。数時間ごとに実験者がマウスに麻酔をかけたまま撮影しなければならないので、撮影間隔を狭めて時間分解能をあげることは難しい。度重なる麻酔が動物に及ぼす影響は無視できない。測定期間が２日間や３日間に及んでくると、生化学実験ほどではないが、度重なる夜間測定が実験者に負担が大きいことに変わりはない。したがって、例えば、遺伝子発現の日内変動パターンを一週間にわたって変化を調べるような実験では、インビボイメージング法によってもなお問題を解決できないのである。

本研究では、概日時計（約 24 時間周期の体内時計）の分子的本体である時計遺伝子の発現をマーカーとして技術開発を行った。時計遺伝子の自律的発現リズムこそが概日時計の本体機構であり、概日時計の評価には時計遺伝子の発現リズムを観察するのが定石である。ただし、本研究が目的とするように、時計遺伝子プロモーター制御下で発現するルシフェラーゼを標的とした発現モニタリング法はすでに報告がある。まず、光ファイバーをマウスの脳内に挿入して、視交叉上核（概日時計中枢）からの発光を測定する極めて挑戦的な方法が発表されている[1)]。しかしながら、手術が難しいだけでなく、脳組織の大きな部分を破壊するために侵襲性が高く、長期の測定に耐えうるのか不明である。一方、ごく最近、高感度カメラや PMT を用いた方法が報告されている[2)]。この方法では多くの問題を解決することができており、肝臓の時計遺伝子発現の 10 日間のモニタリングに成功している。しかしながら、高価で大掛かりな装置が必要であるため、高スループットの実験を実施するのは困難である。そのため、本研究ではスループットの向上が可能な方法を開発することを目的として研究を進めた。

３．結果

本研究では、動物組織における遺伝子発現の長期リアルタイム測定法を確立するために、Period2 にルシフェラーゼを融合したタンパク質が発現するマウスを使用した[3)]。時計遺伝子の自律的発現こそが概日時計の本体である。本開発のゴールとして、私たちは、自由行動に近い状態のマウスにおいて、この発現リズムの長期データを得ることを目指した。概日時計は細胞自律的なシステムであるので、ほとんどの細胞種において時計遺伝子の発現リズムを刻んでいる。したがって、どの臓器を対象としても測定可能であるが、本実験ではまず最も強いシグナルが検出できる肝臓を標的として開発することにした。

最初のトライとして、フォトンの侵入を防ぐことができる暗箱内で、マウスを自由行動可能な条件下で飼育し、高感度カメラによる視野全体のリアルタイム連続撮影を試みた。浸透圧ポンプをマウス皮下あるいは腹腔に埋め込むことで、一定期間継続的にルシフェリンを供給することができる。しかしながら、マウスが視野の中を盛んに動き回る為に、微弱発光の積算時間を長く設定する

ことができず、信頼性の高い十分なシグナルを得ることが難しかった。加えて、マウスとカメラの直線距離などが頻繁に変化して検出値に大きなゆらぎが生じることでデータの信頼性がさらに低下した。画像からシグナルを定量化する作業も膨大である。そして、マウス１匹に測定のために、大型の高感度カメラが設置された測定システムが１台必要になるため、私たちの到達目標である「高スループット化」の実現が難しい。例えば、多種類の薬剤を用いて遺伝子発現に及ぼす影響を比較するような実験にこの測定系は適さない。

次に、私たちはまず、マウスの体内に光ファイバーを挿入する方法を試みた。マウスをイソフルランの麻酔下で開腹後、肝臓に光ファイバーを差し込んだ。生体ボンドでファイバーと肝臓を固定した後に、筋膜および皮膚を縫合した。長期の測定中にファイバーが抜けてしまわないように、ファイバーをしっかり固定した。マウスの水と餌へのアクセスは自由である。マウスはフォトンカウティング仕様の暗箱の中で飼育され、ファイバーを伝わってくる発光シグナルを PMT で検出して、2 時間のシグナルを積算してデータとしている。以上の測定系によって、約 24 時間周期の発光リズムを検出することに成功した。PER2 タンパク質の発現量は ZT15-18 で最大となることが既に報告されているが、今回の発光リズムの位相と矛盾しない。コサインカーブフィッティングにより頂点時刻を算出したところ、位相が安定に推移していることが確認できた。このように、光ファイバーを用いて肝臓における時計タンパク質 PER2 の発現量をリアルタイムでモニタリングすることに成功したが、現時点ではいくつかの大きな問題点がある。まず、臓器へファイバーを直接挿入しているために侵襲性は高いと言わざるを得ない。さらに、手術は難しくはないが、１時間程度の時間を要してしまうため、多くのマウスで測定を実施するにはそれなりの労力と時間を要する。それにもかかわらず、本手法による発光リズムの検出の成功率は２割程度と低かった。しかも、概日振動を検出できる期間が数日である場合が多く、最大でも７日間程度であるため、実験処置による位相変化を見る場合には測定期間が十分ではない。今後実験系が改善されて測定の成功率が上昇することは考えられるが、それでも私たちが目指すハイスループットなシステムには合致しないと考えた。

そこで私たちは別の方法を考案することにした。インビボイメージングによるこのマウスの背面画像によると、肝臓のシグナルを拾うことはできず、かわりに腎臓からの強い発光シグナルを得ることが可能であった。したがって、私たちは、マウスの腎臓近辺の体表面に小型の PMT を直接あて、発光シグナルを連続検出することにした。小型 PMT の重量は 10G 程度であるため、庫内の天井より PMT を吊るすことでマウスにのしかかる重量負担を減らした。マウスにジャケットを着せて PMT を固定しているため、マウスの行動範囲は制限されるが、餌と水へのアクセスは自由に可能である。ルシフェリンの供給方法については、発光量の増強と測定期間の延長を優先してシリンジポンプによる皮下への継続投与に変更した。この測定法の実験操作は、カテーテルの皮下への挿入手術の後に、マウスにジャケットを着せて PMT を接続するのみであり、極めて簡便に遺伝子発現をモニタリングすることできる。そのような実験系を導入することによって、明瞭な発光シグナル強度の概日リズムを検出できた。光ファイバーのデータと同様に、過去の生化学実験で明らかになっている PER2 タンパク質の発現リズム位相と合致する。頂点時刻を算出して位相の経時変化を調べると、定常招待では一定の周期長を維持している様子がわかる。測定の成功率はファイバーよりもずっと高く、現状では５割以上のマウスで一週間程度の測定が可能であり、最長で６週間以上におよぶ測定に成功した。長期測定の高い成功率の実現には今後も改良が必要ではあるが、ハイスループットな測定系の実現にもっとも近い測定系であると考えている。

４．考察

従来ルーチンで行われてきた動物の組織における遺伝子発現測定では、遺伝子発現を高い時間分解能で長期間にわたってモニタリングを続けることは困難である。私たちが知る限り、このような測定をハイスループットで可能にした手法は今のところ存在していない。本研究ではその実現のために、光電子増倍管をマウスの体に密着することで、半自由行動下において、遺伝子発現をリアルタイム長期測定するシステムを構築した。操作が極めて簡便であり、手術により侵襲性が低く、また麻酔による影響も排除することができ、さらに数時間ごとに測定者が夜中に研究室にやってくる必要もなくなる。今後の課題はノイズをさらに下げることや、測定の成功率を上げるためにシステム全体の最適化が課題である。この装置は小型で安価であるため、測定ユニットの量産化が容易に可能である。したがって、スループット性の向上を目指したシステムの拡大に適している。発光や蛍光の強度をあげたり、組織特異的なプロモーターを利用したりすることで、アプリケーションが広がる。

私たちの実験法が改良および確立されて実用化されれば、医学生物学研究のさまざまな場面で貢献できる。例えば、ある遺伝子が胎児発生のどの時期に活性化するのか調べる際に、本手法を導入することで生きたままの妊娠マウスで容易に調べることができるかもしれない。また、ストレスなどの環境刺激を受けた際に標的遺伝子がどのように応答するのか調べるために、長期間に及んでリアルタイムモニターし続けることが可能になる。そして、薬剤開発には大いに利点が発揮される。薬物投与による標的遺伝子発現の経時変化を長期モニタリングする必要がある場合、本来ならば膨大な数のマウスで実験をプランしなければならないが、本手法では簡易にデータを得ることができる。 しかも、スループット性にすぐれているので、同時に多種類の薬剤の効果を見ることも可能である。さらに、本手法は概日リズム研究の発展に大きく貢献する可能性がある。概日リズムの研究では遺伝子発現の日内変動を観察する必要がある。また、刺激などによる時計遺伝子発現リズムの位相変化を調べるためには、24時間周期の発現リズムを数日間にわたって観察し続ける必要がある。このような実験では、私たちのシステムが大きく貢献するはずである。

謝辞

Per2::luc マウスと *Bmal1-Eluc* マウスは、それぞれ Joseph Takahashi 博士と Yoshihiro Nakajima 博士より分与いただいた。本研究に対する松村律子研究員と佐藤美穂特命助教の多大な貢献に心より感謝したい。また、本研究へ御支援いただいた中谷医工計測技術振興財団に厚くお礼申し上げる。

参考文献

1) View of a mouse clock gene ticking. Yamaguchi S, Kobayashi M, Mitsui S, Ishida Y, van der Horst GT, Suzuki M, Shibata S, Okamura H. Nature. 2001; 409(6821): 684.

2) Real-time recording of circadian liver gene expression in freely moving mice reveals the phase-setting behavior of hepatocyte clocks. Saini C, Liani A, Curie T, Gos P, Kreppel F, Emmenegger Y, Bonacina L, Wolf JP, Poget YA, Franken P, Schibler U. Genes Dev. 2013; 27(13): 1526-36.

3) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(15): 5339-46.

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



研究責任者　甲南大学理工学部生物学科/
統合ニューロバイオロジー研究所
准教授　久　原　篤
共同研究者　甲南大学大学院自然科学研究科/
統合ニューロバイオロジー研究所
特別研究員　太　田　茜
大学院生　五百蔵　誠

1.　はじめに

高速で自由に動き回る細胞集団の活動を、超高速にかつ詳細に顕微鏡下でとらえることができれば、多くの微細な動的細胞を扱う先端医療分野の発展に大きく寄与できる。本研究では、最新の超高速オートトラッキング装置とそのコンピューター制御装置を利用し、自由に運動している細胞集団を超高速でとらえ、その際の細胞活動を 1 細胞レベルで捕らえることを将来的な最終目的としている。

本申請者はこれまでに、神経疾患等の原因解明に向けて、認識や記憶学習の脳神経メカニズムの解析を行ってきた。特に、シンプルな神経回路を実験モデルにもちいて、温度感覚と記憶の分子レベルでの新しい概念が見つかってきた [2),4),6)]。しかし、従来の分子生理学的手法だけでは限界を感じたため、新たに最新の装置の開発から開始し、これまで困難であった解析を実現した。具体的には、細胞集団の自動追尾と神経細胞活動のイメージング技術を導入し、神経回路の情報処理の基盤解析系の創出をおこなってきた [3),7)]。それらの過程で開発した装置は民間企業から販売され、得られた解析技術の基盤は、将来的に人間の脳情報処理の計測や、ブレインマシーン インターフェイスの開発や、人工神経回路の開発も応用されることが期待されている。そのような背景のもと本研究では、未だ発展途上である、自由運動状態の細胞集団を超高速にとらえる画像制御と顕微鏡ステージ制御システムと、最先端のニポウディスク型の共焦点装置を駆使して、高速で自由に動き回る細胞の細胞活動を、超高速にかつ 3D で記録するシステムを構築するための基盤をつくる。

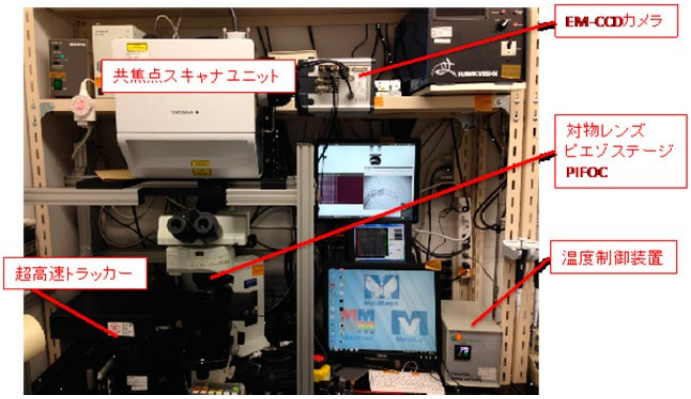


図1　ディスク共焦点システムと高速トラッキングシステムを取り付けた正立顕微鏡
ディスク共焦点システムは上部に装着。XYZ ステージは電動モーターで動作可能な状況でその上に、温度制御が可能な小型ステージが装着されている。専用のアダプタをもちいて、温度制御ステージを装着した後に顕微鏡のステージに固定されている。

２．方法

2.1　実験系に用いた生態材料である *C. elegans*

材料として、神経細胞集団を用いるために、培養細胞ではなく生きた状態の細胞集団を利用するために、生命化学の研究で良く使用されている線虫 *C. elegans* を利用した[1)]。イギリス ブリストル産の N2 株が野生株として、世界中の研究室で広く使用されているため用いた。また、本研究においては、神経系におけるメモリーの定量化についても検討するため、高等動物から下等動物まで広く記憶に関わることが知られている CREB 遺伝子の変異体を用いた。

2.2　イエローカメレオンを発現するカルシウムイメージング用系統作成

神経活動を測定するためのプローブとして遺伝子によってコードされるカルシウムインディケーターであるカメレオンタンパク質を利用した[5)]。カメレオンは N 末側に藍色蛍光タンパク質 CFP を、C 末側に黄色蛍光タンパク質 YFP をもつ。CFP と YFP の間には、カルモジュリンのカルシウム結合ドメインである EF ハンドドメインと、カルモジュリンが結合することができるミオシン軽鎖キナーゼ M13 のカルモジュリン結合ドメインが挿入融合されているキメラ構造を取っている。カメレオン遺伝子である *yc3.60* を野生株などの ASJ 感覚ニューロンに導入した。その際にトランスジェニックマーカー遺伝子として *ges-1p::taqRFP* を同時にマイクロインジェクションした。遺伝子導入できたものは、ASJ 感覚ニューロンにカメレオンの青色の蛍光が観察され、同時に腸に RFP の蛍光も見られる。得られた個体 F_1 を 1 個体ずつ NGM プレートに移し、15°C で飼育した。F2 以降に染色体外遺伝子が遺伝した個体を系統化した。

2.3　カルシウムイメージングのための方法

10%アガロースパッドを 24×24 カバーガラスの上に作成した。その上に直径 0.1μm ポリエチレンマイクロビーズを約 1μL ピペットマンで吸い、0.5μL 位ずつ、アガロースパッドの上に数点で置いた[8)]。前述のとおり作成した ASJ 感覚ニューロンでカメレオンの蛍光を放っている線虫を、カルシウムイメージング用の系統として、各点に 1～数匹置き、やさしくカバーガラスを掛けた[9)]。カルシウムイメージング中は、温度制御装置により、11℃から 26℃の範囲内で温度変化刺激を与えて、ASJ 感覚ニューロンの細胞体内のカルシウム濃度の変化を測定した。細胞内カルシウム濃度の変化は、カメレオンタンパク質の YFP と CFP の蛍光の比として計測した。カルシウムイメージングの定量解析はメタモルフ（ソフトウェア）を用いて行った。

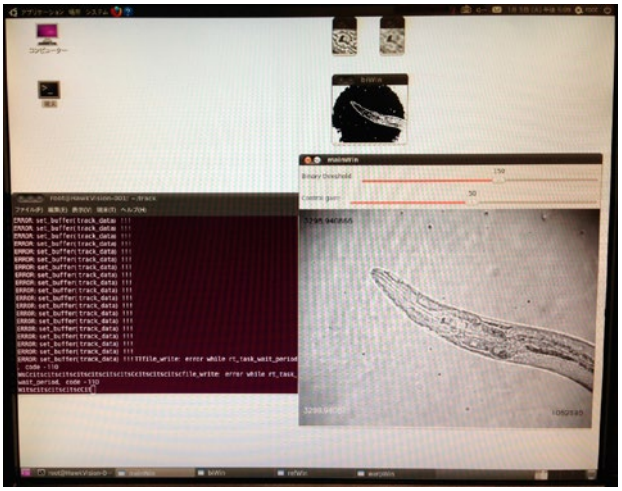


図2　オートトラッキングシステムによる *C. elegans* の追尾の一例
ホークビジョン社による独自開発ソフトウェアをトラッキングに用いることで、画像パターン認識をおこない、常に初期設定画像が画面の中央になるようなプログラムをトラッキングの原理として用いた。

３．結果

3.1　細胞集団のオートトラッキングシステムの構築

自由運動状態の細胞集団を超高速にとらえる画像制御と顕微鏡ステージ制御システムと、最先端のニポウディスク型の共焦点装置を融合する装置の構築を進めた。自動追尾システムに関しては、ホークビジョン社と共同で作成した高速トラ

ッキングシステムを利用して細胞集団のオートトラッキングを進めた(図１)。正立顕微鏡(オリンパス BX61)をベースとして、BX61 の XY ステージとコンデンサを取り外し、その場所に、ホークビジョン社と共同で作成したオートトラッキング装置を装着した。この高速トラッキング装置では、高速 CCD カメラ（グラスホッパー）で顕微鏡画像を観測し、ステージを X,Y,Z 3 軸自動制御することにより、細胞集団の動きをリアルタイムで超高速で自動追尾できる。ハードリアルタイムソフト処理と高精度アクチュエータによる高速、高精度追尾を行っており、制御コンピューター装置に画像処理機能、ステージ制御機能を取り入れ、リアルタイムでの自動処理とステージの X,Y,Z 3 軸自動制御をおこなうことができた。XY については、細胞集団の解析に使用できるレベルに達している(図２)。Z の自動フォーカシングに関しては、微細な温度条件変化による焦点面の大きなズレに対する Z の自動補正のプログラムの開発を進めている。ニポウディスク型の共焦点装置の導入においても、ステージの Z のズレは問題であるため、さらなる開発を行う必要がある。

3.2　膨張の少ない透過型温度制御装置の構築

温度は細胞の活動や運動に大きな影響を与える要因である。そのため、顕微鏡下で細胞集団の温度を一定に保つことや温度刺激を適切に与えることは重要である。そこで、運動中の細胞集団の温度を一定にするために、電動モーターで動作可能な XYZ ステージ上に、温度制御が可能な小型ステージを装着した。従来のペルチェ金属を用いた装置では、金属膨張により Z のフォーカスのズレが顕著であるだけでなく、金属のため、光の透過率がゼロであるため、顕微鏡の透過光をもちいることができなかった。そこで、液晶テレビなどにも使用されている塩化インジウムスズを素材として、透明で膨張率の低い温度制御装置を東海ヒット社と開発を進めた。温度制御装置は塩化インジウムスズを含むガラス素材に電圧をかけ、その下面を冷却水で冷やすことで適切な温度に保つことができるように試作機を作成した。温度制御ステージの装着のために専用のアダプタを作成し固定し、それを顕微鏡ステージに組み込んで、細胞群の温度調節を行いながら、超高速トラッキングと細胞活動のイメージングに用いた。対物レンズの高さとステージまでの距離を調整するために、高速トラッキングシステムの下部に 15mm の金属製のアダプタを作成して挿入固定した。塩化インジウムスズで作成された温度制御装置は、表面が透明なガラス状の素材である。そのため、電動ステージによる Z 軸のフォーカシングの際に、対物レンズが接触することによりヒビが入り、割れる状態となったしまった。そこで、電動ステージ内に赤外線検出器を内蔵させた物理的なリミッターを駆使して、ワーキングディスタンスのリミッターを設定した。この設定により、塩化インジウムスズで作成された温度制御装置の表面に傷を付けることがなくなった。電圧と流水温の調整でおおよそ一定の温度に保持することが可能となったが、一方で、温度変化を与える場合には適切なプログラムを組むための方法が必要である。また、プレート内部に空気が混入することがあり、温度変化によりその部分から亀裂が入ることがあったため、ガラスプレートの厚みを検討する必要がある。

3.3　ディスク共焦点によるデュアル画像と自動追尾画像の同時取得に用いる光路

カルシウムインディケーターであるイエローカメレオンを用いた FRET 画像の測定には、CFP の蛍光像と YFP の蛍光像を同時に取得する必要がある。その測定をディスクコンフォーカルシステムで行う光学系を前述の顕微鏡装置に導入した(図３)。具体的な光路とバンドパスフィルターやダイクロイックミラーを、図３を使い説明する。光源には固体レーザー（YOKOGAWA）を使用しており、励起光として使用する 445nm のレーザー光がファイバーを通って共焦点スキャナユニ

ット内に照射され、ミラーによって反射されることでディスクユニットへと誘導される(図３)。誘導されたレーザー光は２枚のディスクのうち上方のマイクロレンズアレイディスクによって集光され、①ファーストダイクロイックミラーを透過し、下方のピンホールアレイディスクのピンホールを通過することで共焦点スキャナユニット下部の BX61 へと進む。BX61 内の②ダイクロイックミラーを透過したレーザー光がサンプルに照射されることで、サンプル内の CFP の蛍光 480nm、YFP の蛍光 535nm が生じる。これら２種の蛍光は先ほどレーザー光が透過した②ダイクロイックミラーを逆の方向に透過し、共焦点スキャナユニットへと進む。ピンホールアレイディスクを通過した２種の蛍光は①ファーストダイクロイックミラーによって反射され、その先の④セカンドダイクロイックミラーによって波長の違いにより別の光路へと分けられる。２種の蛍光はそれぞれの波長域に合ったエミッションフィルターを透過し、余計な波長の光を除外した状態で、再度④セカンドダイクロイックミラーによって少し位置がズレた状態で同一光路に戻され、EMCCD カメラ（ANDOR iXon Ultra 888）によって受け取られる。これにより CFP の蛍光像と YFP の蛍光像を同時に取得することができる。

また、解析に用いるディスク共焦点によるデュアル画像とは別に、オートトラッキングシステムに用いる画像を取得するために、BX61 下部のハロゲンランプを別光源として用いている。ランプ光は③赤外光以上を透過するフィルターにより可視光以下のランプ光は反射され、赤外光以上のランプ光が透過されサンプルを通過する。サンプルを通過した赤外光は変倍デュアルポート(オリンパス WI-DPMC)の②ダイクロイックミラーによって反射され、0.25 倍レンズと４倍レンズを透過し、グラスホッパーによって受け取られる。しかし、現状③赤外光以上を透過するフィルターが可視光未満のランプ光を若干量透過しており、②ダイクロイックミラーも可視光未満の光を若干量反射していることがわかっている。さらに、現在使用しているグラスホッパーは赤外光を認識することが出来ておらず、漏れ込んでくる可視光未満の光を受け取り画像を得ている状態である。

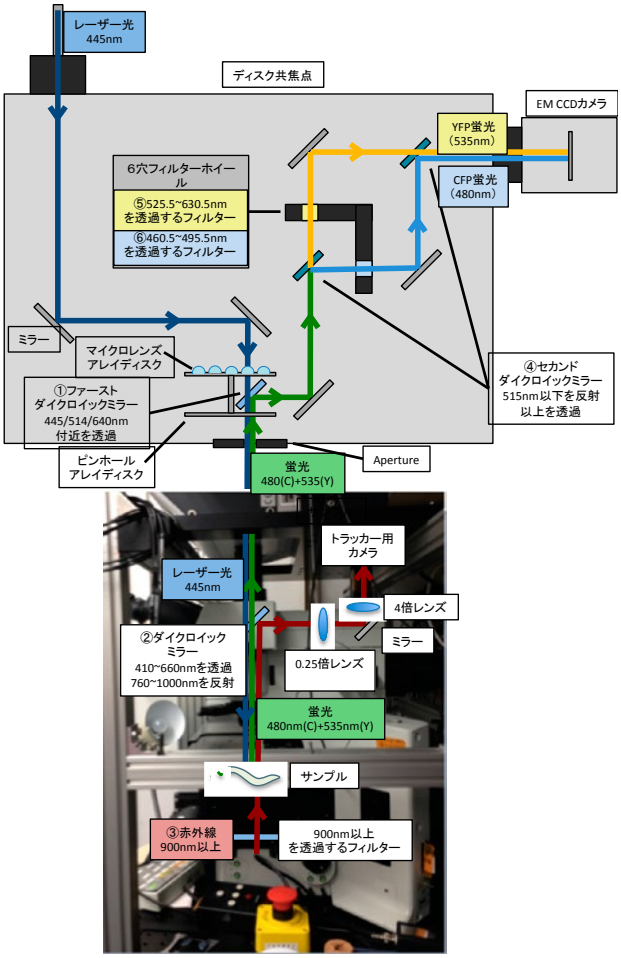


図３　ディスク共焦点によるデュアル画像の取得と、自動追尾による画像の取得に用いる光路とフィルターセット

最上部のレーザー光を光源として細胞個体のカルシウム濃度をイエローカメレオンで測定する光学系。同時に個体の自動追尾のために、下部から赤外光を照射している。

3.4　自動追尾画像とカルシウムイメージングの Z 軸方向での画像の取得

トッラキングに問題点がなかったため、同時に ASJ 感覚ニューロンにおけるカメレオンタンパク質を用いた神経活動のカルシウムイメージングを行った。ピエゾをもちいて、運動中の個体の Z 軸のスキャン画像を取得したところ、運動に伴

い焦点面が合う画像と、焦点面から外れるものも得られたため、焦点面が適切な画像のみを解析に主に使用した(図４)。運動中の個体の Z 軸スキャンによる ASJ ニューロンのカルシウムーメージングに関しては、Z 軸をピエゾを使い複数焦点面でのカルシウムイメージング画像を取得した。カルシウムインディケーターであるカメレオンのシグナルを検出し、カメレオンタンパク質のシグナルを行動時の ASJ 感覚ニューロンから取得することで、神経活動のカルシウムイメージングを行った。生物学的なデータとしては今後検討する必要があるが、行動時のカメレオンタンパク質のシグナルを捉えることが可能となった(図５)。また、将来的に神経活動の光操作を行うことを見越して、実際に励起光の適切な照射が可能であるかも検討した。

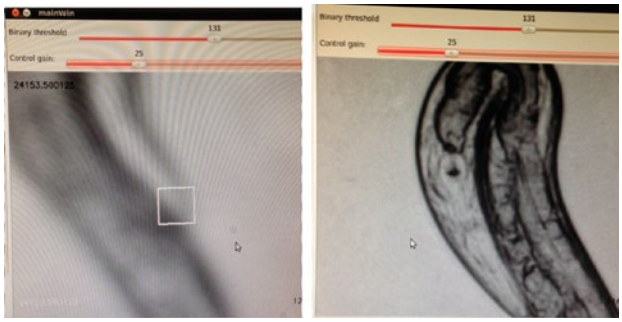


図4　Z 軸のピエゾでのスキャン画像
追尾個体に関して、Z 軸をピエゾを使い複数焦点面での画像を取得。焦点面が適切な画像のみを解析に主に使用する。

４．まとめ

本研究では高速とラッキングシステムとディスクタイプ共焦点システムをもちいて、運動する細胞集団における細胞内のカルシウムイメージングを行った。それに加えて温度制御装置をトラッキング装置のステージ上で使用するための条件検討も行った。温度は材質の膨張や収縮を引き起こすため、それに伴う高速トラッキングシステムのカメラの焦点のズレの補正が今後の課題になると考えられる。従来のピエゾシステムなどを対物レンズによる高速なフォーカシングだけでなく、専用のソフトウェアを作成し、温度変化と膨張性の補正なども必要であると考えられる。これらの導入が今後は必要であると考えられる。

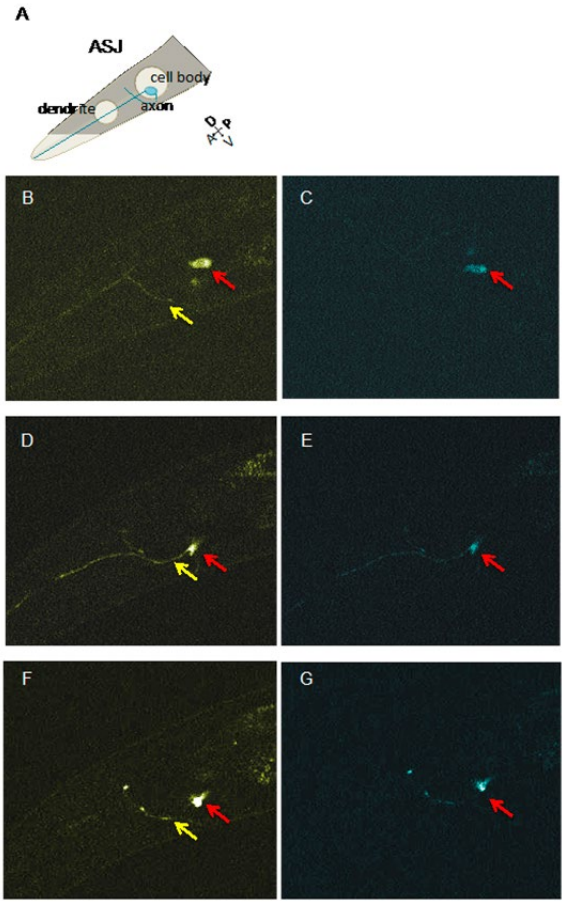


図 5　運動中の個体の Z 軸スキャンによる ASJ ニューロンのカルシウムーメージング
追尾個体に関して、Z 軸をピエゾを使い複数焦点面でのカルシウムイメージング画像を取得。カルシウムインディケーターであるカメレオンのシグナルを検出。カメレオンタンパク質のシグナルを行動時の ASJ 感覚ニューロンから取得し、神経活動のカルシウムイメージングを行った画像。A は個体内の ASJ 感覚ニューロンの模式図。細胞体から軸索と樹状突起が出ている。B, D, F は YFP のシグナルであり、C, E, G は CFP のシグナル。各写真の赤矢印が ASJ ニューロンの細胞体、黄色矢印は樹状突起。

謝辞

この度は本研究を進めるにあたりまして、助成を頂きました公益財団法人　中谷医工計測技術振興財団に心より感謝申し上げます。

参考文献

1)Brenner, S. The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).

2)Kodama, E. *et al.* Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in C. elegans. *Genes Dev* **20**, 2955-2960 (2006).

3)Kuhara, A., Ohnishi, N., Shimowada, T. & Mori, I. Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in Caenorhabditis elegans. *Nat Commun* **2**, 355, doi:10.1038/ncomms1352 [pii] (2011).

4)Kuhara, A. *et al.* Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of C. elegans. *Science* **320**, 803-807 (2008).

5)Miyawaki, A. *et al.* Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887 (1997).

6)Ohta, A. & Kuhara, A. Molecular mechanism for trimeric G protein-coupled thermosensation and synaptic regulation in the temperature response circuit of Caenorhabditis elegans. *Neuroscience research* **76**, 119-124, doi:10.1016/j.neures.2013.03.008 (2013).

7)Ohta, A., Ujisawa, T., Sonoda, S. & Kuhara, A. Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in Caenorhabditis elegans. *Nature communications* **5**, 4412, doi:10.1038/ncomms5412(2014).

8)Ujisawa, T., Ohta, A. & Kuhara, A. Long-term calcium imaging of ASJ sensoryneuron controlling cold tolerance in C. elegans. *Protocol Exchange*, doi:doi:10.1038/protex.2014.034 (2014).

9)Ujisawa, T., Ohta, A., M., O., S., S. & Kuhara, A. Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in C. elegans. *Protocol Exchange*, doi:doi:10.1038/protex.2014.032 (2014).

本研究に関する学会発表

1) 久原篤、宇治澤知代、太田茜
線虫から探る温度応答と記憶のエッセンス
動物学会近畿支部会　秋期講習会 / 統合ニューロバイオロジー研究所第3回シンポジウム
神戸、2015.12.5

2) 五百藏誠、太田茜、井上朋香、久原篤
線虫C.elegansの温度受容ニューロンにおける温度メモリーの解析　分子生物学会　神戸、2015.12.1-4

3) Makoto Ioroi, Akane Ohta, Tomoka Inoue and Atushi Kuhara
CREB regulates plasticity of temperature response in thermo-sensoryneuron of C. elegans
CompBiol 2015
Hiroshima、2015.12.11-13

4) 久原 篤、宇治澤知代、太田 茜
線虫から学ぶ温度に対する生体調節
Regulatory system for temperature response in nematode C. elegans
動物学会　ホメオスタシスバイオロジーシンポジウム　新潟、2015.9.18

5) Tomoyo Ujisawa, Kohei Ohnishi, Tohru Miura, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
Temperature experience-dependent cold acclimation in nematode C. elegans
線虫 C. elegans における経験に依存した低温馴化機構　生物物理学会　金沢、2015.9.13

6) Atsushi Kuhara, Tomoyo Ujisawa, Tohru Miura, Misato Uda, Akane Ohta
Temperature experience-dependent cold habituation in C. elegans
Neuroscience2015
Kobe、2015.7.28-31

7) Makoto Ioroi, Akane Ohta, Tomoka Inoue, Shiori Sakai, Atsushi Kuhara
Temperature memory for cold acclimation in nervous system of C. elegans
Neuroscience2015
Kobe、2015.7.28-31
8) Akane Ohta, Makoto Ioroi, Natsune Takagaki, Atsushi Kuhara
CREB facilitates a replacement of temperature experience-linked cold tolerance
20th C. elegans International meeting
Los. Angels、2015.6.24-28
9) 五百藏誠、太田茜、高垣菜式、井上朋香、坂井 詩織、久原篤
カルシウムイメージングを用いた線虫における温度適応メモリーの解析
バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ　九州大学、2015.6.19
10) 五百藏誠、太田茜、井上朋香、坂井 詩織、久原篤
線虫C.elegansにおける温度メモリーをつかさどる神経細胞　動物学会近畿支部会　奈良女子大学、2015.5.16

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



研究責任者　山口大学　大学院創成科学研究科
機械工学分野
教　授　　南　　和　幸

1. はじめに

細胞は周囲の変形や力学的刺激を、接着斑を通して感知し、それに対応して様々な応答をしていると考えられている[1)]。周囲の環境に対する細胞応答の解明は、純粋に生物学的な細胞機能の理解という視点からだけではなく、医学的には再生医療における細胞から組織・臓器を再構築するための手法の開発、工学的には生体を真似たバイオミメティックな機械の実現などの視点からも切望されている課題である。これまで変形可能なフィルム上で細胞を培養して引張変形を与えたり、さらに変形が容易なシリコーンゴム製の微小柱の２次元配列上で細胞を培養し、微小柱の傾きから接着斑に発生する細胞の牽引力を測定するなどの試みが行われているが、リアルタイムで細胞内の変化を捉えるには実験手法が不十分であり、実験手法ならびに実験装置の高機能化が望まれている。

筆者らは、細胞を培養し、引張変形を与えて細胞刺激を行う細胞伸展マイクロデバイスを開発している[2)]。これは、培養ディッシュの底に細胞培養用のシリコーン製マイクロチャンバーを6個配列したものであり、細胞に伸展刺激を与えた際の細胞内 Ca^{2+}の変化を捉えることに成功している。しかし、アクチンフィラメントの形成状態を観察する研究においては、遺伝子導入法による蛍光標識を行っているため、遺伝子が発現している細胞が面積の小さいマイクロチャンバー上に存在する確率が低いという問題がある。そこで、本研究ではディッシュ上に培養した多数の細胞に対して、それぞれ伸展刺激を与えた際の細胞応答を顕微鏡観察により計測することを可能にするため、ディッシュ底面上に伸展可能なマイクロチャンバーと伸展機構をマトリックス状に配置した細胞伸展マイクロデバイスの開発を試みた。新たな構造を設計し、製作プロセスを開発して試作を行い、 試作したデバイスで培養細胞の観察を行って試作デバイスの機能の確認を行った。

２．マイクロチャンバーアレイを備えた細胞伸展マイクロデバイス[3)]

2.1　デバイスの概要

図１に本研究で製作するデバイスの概略図を示し、図２に細胞伸展マイクロチャンバーアレイの断面図を示す。図１に示すように、カバーガラス上に134個の細胞培養用マイクロチャンバーがマトリックス状に並んでおり、そのカバーガラスが細胞培養用ディッシュ底面に貼り付けられている。細胞を培養するチャンバー部は、シリコーン製であるため伸縮性を持っている。そのため、

可動部を動かすことによりチャンバーを引っ張ることでチャンバー部に接着した細胞に伸展刺激を与えることができる。図２に示すように、チャンバー部を引っ張る際に使用する構造体は、マイクロチャンバーが接続されると共にカバーガラスに固定された固定部と、マイクロチャンバーにのみ接続された可動部からなり、透明な厚膜レジスト SU-8 で製作される。チャンバーは透明であるため、ディッシュの底面から倒立型光学顕微鏡によりチャンバー上の伸展刺激を受けた細胞をリアルタイムで観察することが出来る。

2.2　作動方法

図３に、細胞に伸展刺激を与える際の細胞伸展マイクロデバイスの作動方法を示す。(a)が伸展前のマイクロチャンバーである。伸展させる時には、(b)のように SU-8 構造体の可動部にプローブを接触させ、プローブにより可動部を横方向にスライドさせて、片方のマイクロチャンバーを伸展させる。

2.3　デバイスの製作

これまでの細胞伸展マイクロデバイスのシリコーン製マイクロチャンバーの製作には、シリコーンの鋳型を用いたモールディング技術を用いていた。間隔の離れた 6 個程度のマイクロチャンバーであれば、このモールディング技術で製作可能であるが、134 個を密に配列したマイクロチャンバーの製作は不可能で有り、新たな製作プロセスの開発が不可欠であった。そこで通常の微細加工で用いられるフォトリソグラフィ技術を応用することを試みた。図４にマイクロチャンバーの製作も含んだ細胞伸展マイクロデバイス全体の製作プロセスを示す。本デバイスは、シリコーンエラストマー(KE-106、信越化学工業(株))と厚膜フォトレジスト(SU-8 3050、日本化薬(株))を用いて製作する。詳細を以下に述べる。まず、洗浄したカバーガラスに犠牲層となる厚さ 2000Å の Ge をスパッタで成膜し、フォトリソグラフィでパタ

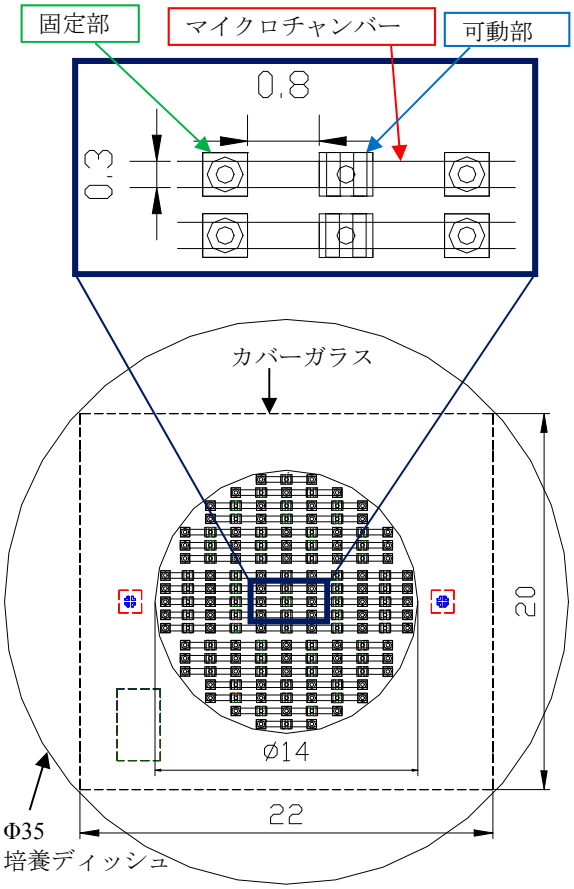


図１　細胞伸展マイクロデバイス(上面図)

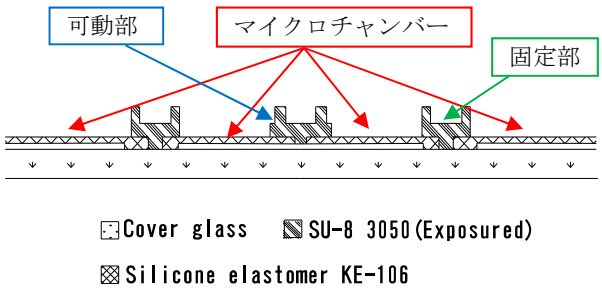


図２　細胞伸展マイクロチャンバーアレイ(断面図)

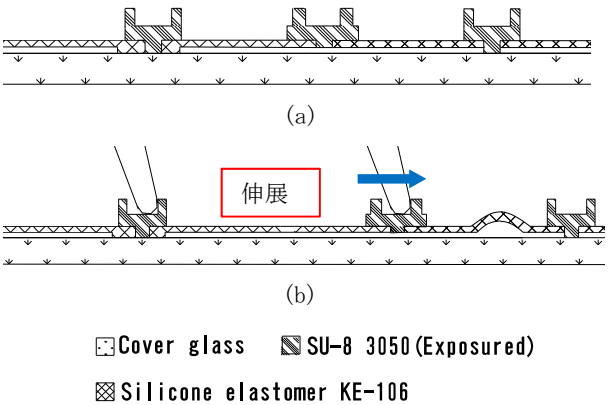


図３　マイクロチャンバーの伸展方法

ーニングする(図４(1))。次に膜厚 10μm のポジレジスト OFPR-800(東京応化工業(株))をスピンコートにより塗布し、チャンバー部を露光する(図４(2))。続いて、チャンバー部以外の OFPR については、チャンバー部の外側に幅 50μm の壁が残るパターンのマスクを用いると共に、露光時間を短くして底面を未露光部として残しておく(図４(3))。これは、チャンバー部のシリコーンとチャンバー外に塗布された不必要なシリコーンとのつながりを切断し、不必要なシリコーンを OFPR と共にリフトオフによって除去するためである。次に、OFPR を現像・リンスし、スピンドライする。これにより OFPR の鋳型が出来上がる(図４(4))。シリコーンを OFPR の鋳型の上にスピンコートによって塗布し、硬化させる(図４(5))。シリコーンの設計膜厚は 5μm である。その後、OFPR を除去するとともに、不要なシリコーンをリフトオフで除去する(図４(6))。プローブを当てる厚膜フォトレジスト SU-8 構造体は、まず膜厚 50μm の SU-8 をスピンコートで塗布し、構造体の土台部となる部分を露光する(図４(7))。続けて膜厚 50μm の SU-8 を前回塗布した SU-8 上にスピンコートで塗布し、プローブを押し当てる構造体となる部分を露光する(図４(8))。その後、SU-8 を現像・リンスする(図４(9))。次に、底面に直径 14mm の丸穴があいた直径 35mm のポリスチレン製培養ディッシュに、チャンバーアレイを製作したカバーガラスをシリコーン KE-441-T(信越シリコーン、信越化学工業(株))を用いて、水漏れが無いように接着する。最後に Ge 犠牲層のエッチングを行い、シリコーン製マイクロチャンバーと可動部の SU-8 構造体を浮かせることで細胞伸展マイクロデバイスが完成する(図４(10))。なお、シリコーン製マイクロチャンバーの厚さ制御のため、スピンコート条件とシリコーン原液の粘度を下げるためのキシレン混合比を検討した。シリコーン膜の硬化後の厚さと不要なシリコーンを除去するための段切れ易さを評価した結果、シリコーンとキシレンの混合は重量比 1:1、スピンコート条件は回転数 600 rpm×時間 10 sec+回転数 3500 rpm×時間 40 sec を用いることにした。

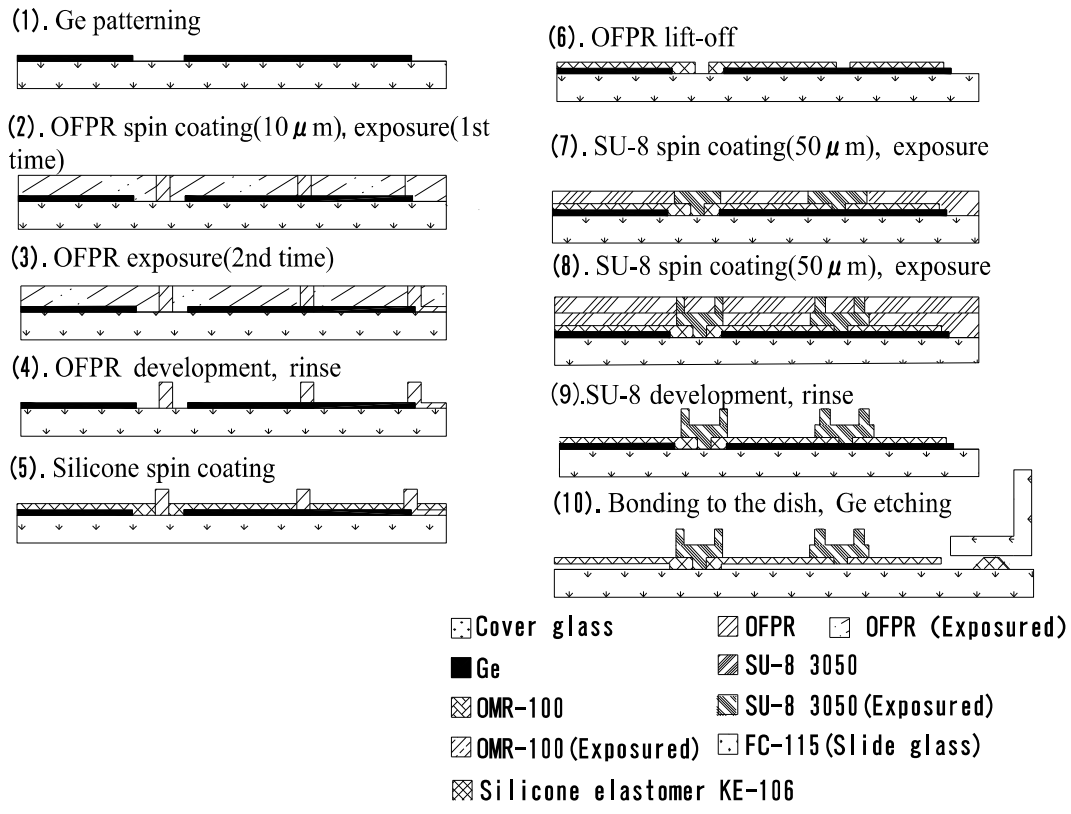


図4 製作プロセス

３．マイクロチャンバー製作結果

図５にマイクロチャンバー製作後のマイクロチャンバーの光学顕微鏡写真を示す。ポジレジスト OFPR のリフトオフにより、不要なシリコーン膜が除去され、Ge 膜状に短冊状のマイクロチャンバーが形成されていることが分かる。

マイクロチャンバーの加工精度は、細胞に伸展刺激を与えたり、光学顕微鏡で観察する際に影響するため、製作後のチャンバーの立体形状・寸法の評価が必要である。シリコーンは非常に柔らかいため、非接触で形状を測定できなければならない。そこで、レーザ顕微鏡（LEXT OLS4000、OLYMPUS）を使用してチャンバーの断面プロファイルを測定した。なお、レーザ光の反射率を高くするため、製作後のチャンバーに Al を 500Å 堆積させてから測定した。図６にマイクロチャンバー上におけるレーザ顕微鏡用いた断面プロファイル測定箇所を示す。各測定箇所における断面

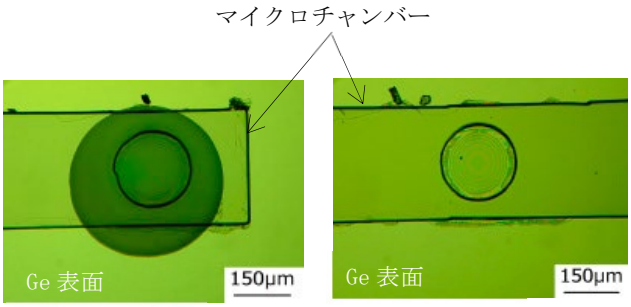


図5　マイクロチャンバー製作後の光学顕微鏡写真

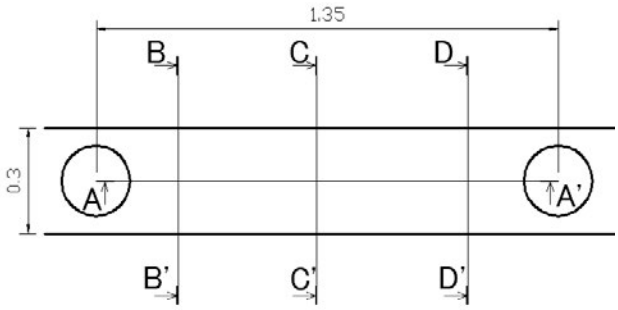


図6　マイクロチャンバー上の断面プロファイル測定箇所

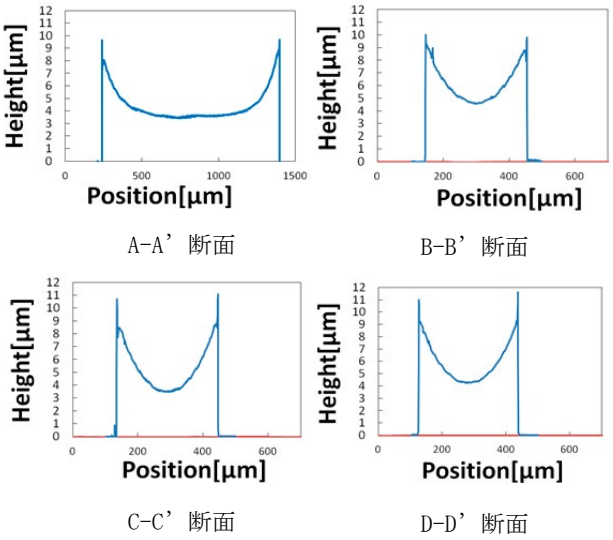


図7　断面プロファイル測定結果

プロファイルの測定結果を図７に示す。図７より、縦横のどちら方向にも OFPR の鋳型の壁付近ではシリコーンの膜厚が厚くなっていることがわかった。これは、硬化前のシリコーン原液が、表面張力によって OFPR の壁に引き寄せられて壁を這い上がったことが原因と考えられる。今後はこの形状が実際の細胞観察に及ぼす影響を明らかにすると共に、表面張力の影響を抑制したプロセスの開発を進める予定である。

マイクロチャンバー製作の均一性を評価するため、製作したデバイス全体に分布するマイクロチャンバー部の膜厚を測定した。図８に測定位置を示す。134 個のチャンバーから 13 個を選択し、図６に示す A-A’断面の平坦になっている最小膜厚の値を断面プロファイルより求めた、その結果を表１に示す。表１より、膜厚のバラツキが大きいことが分かる。今回測定した 13 個のチャンバー中、目標膜厚 5μm から±1μm 以内に入る物が 5 個であり、全体の 40%であった。バラツキ発生の原因として、シリコーンをスピンコートによって OFPR の鋳型に塗布するため、鋳型内にシリコーンが多く残る箇所と残らない個所が存在してしまい、基板上に配置したチャンバー部の膜厚分布に差が生じたと考えられるが、中心部と外周部の違いなどの傾向は見られなかった。スピンコート

表１　マイクロチャンバーの最小膜厚測定結果（A–A’断面）

位置番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
厚さ[μm]	3.9	2.7	2.8	5.1	5.3	2	4.2	9.3	4.1	4.9	6.5	3.2	3.7

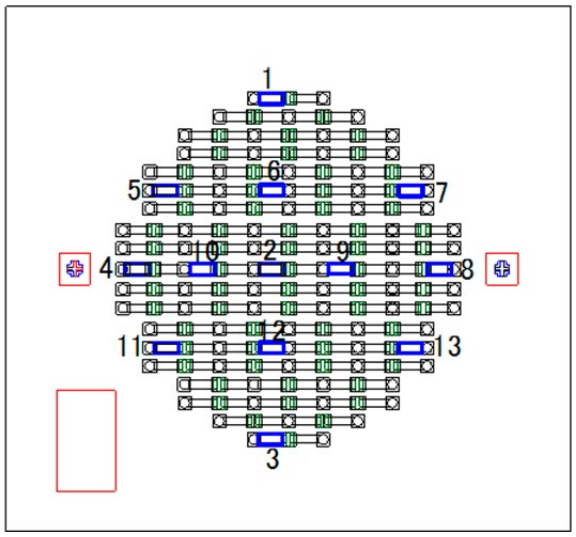
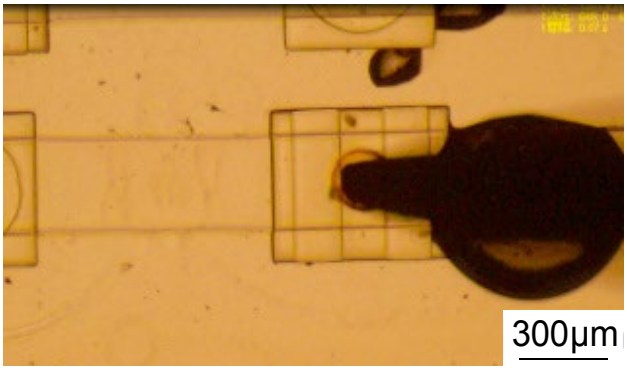


図8　膜厚測定位置番号

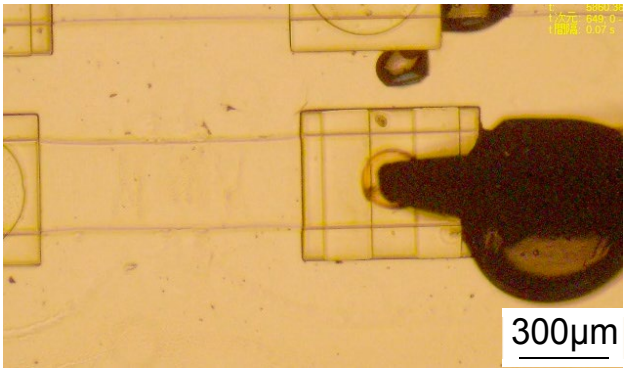
時の気泡の巻き込みが疑われたため、脱泡などのプロセスを追加して製作を試みたが、明確な改善は得られなかった。設計値の膜厚 5μm から外れたマイクロチャンバーでも実際の細胞観察には支障は出ない可能性があるが、信頼性の高い製作プロセスの確立はやはり必要であり、さらなるプロセス条件の検討が今後の課題である。

４．マイクロデバイスの試作と駆動実験

前章で目標膜厚に近いマイクロチャンバーが製作できたため、SU-8 を用いて可動部、固定部をチャンバー部に製作し、ディッシュに貼り付けて細胞伸展マイクロデバイスを完成させた。マイクロチャンバーの伸展動作の確認を行うため、ディッシュ内に純水を入れた状態で倒立型位相差顕微鏡（CKX-41、OLYMPUS）によって観察しながら駆動実験を行った。チャンバーの可動部の駆動には、プローブ（針）を可動部に位置決めした後、微動させる必要がある。このため、ピエゾ素子を用いる微動装置を備えた XYZ ステージを使用した。XYZ ステージの調整によりプローブの先端を細胞伸展マイクロデバイスの可動部に接触させた後、ピエゾ素子に電圧を印加することでプローブを横方向へ動かした。観察写真を図９に示す。図９の(a)に伸展前の観察写真を示し、(b)にプローブによってマイクロチャンバーを伸展させた後の観察写真を示す。図９の観察写真より、可動部をプローブにより動かすことで、チャンバー部が約 80 μm（ひずみ 10%）伸展することを確認した。



(a)　伸展前

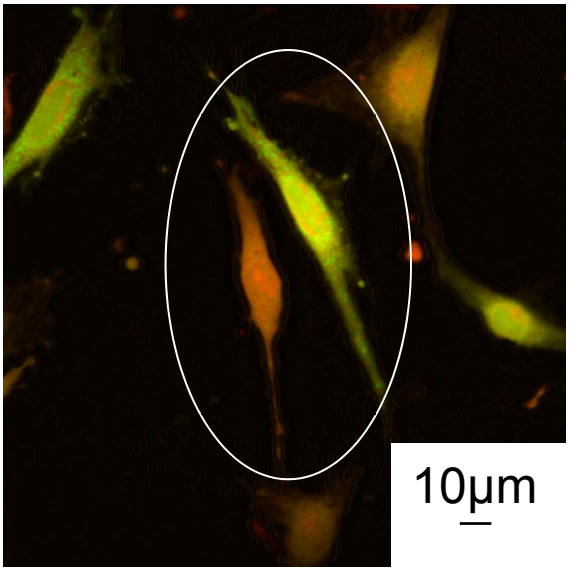


(b)　伸展後

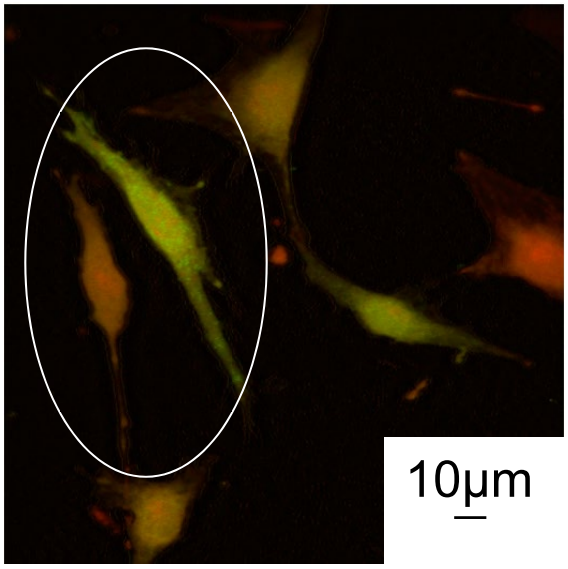
図９　マイクロチャンバーの伸展動作

次に実際に細胞培養を行い、細胞のマイクロチャンバーへの接着性や細胞観察像の鮮明さなどの検証を行った。使用した細胞は、MC3T3-E1（マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞）である。細胞をα-MEM 液体培地に FBS(ウシ胎児血清)を 10%濃

度で添加したものと共に細胞伸展マイクロデバイス上に播種した後、95% Air–5% CO2 濃度、湿度 100%、温度 37℃に保った CO2 インキュベーターにて培養を行った。また、細胞内の Ca^{2+}の変化を観察するための二波長測光を行うため、蛍光指示薬として Fluo 8H（AAT Bioquest 社製）と Calcein Red-Orange（Molecular Probes 社製）を使用した。蛍光観察には A1R レーザ共焦点蛍光顕微鏡システム（ニコン製）を使用し、細胞に励起光（488nm および 561nm レーザによる二波長励起）を照射し、Fluo 8H 観察用に 525nm（中心±25nm の幅）、Calcein Red-Orange 観察用に 595nm（中心の±25nm の幅）の透過波長を持つフィルターを用いて細胞観察を行った。図 10 に細胞伸展実験を行った際の蛍光観察写真を示す。図 10(a)の伸展前の写真より、細胞が仮足を伸ばしてマイクロチャンバーに接着している様子が分かる。図 10(b)は伸展後の観察写真であり、細胞にはチャンバーの伸展によって約 15%のひずみを与えた。図 10(b)より細胞の形状が変形し、蛍光輝度値が変化していることが確認された。細胞の蛍光輝度値が変化したことから、伸展刺激により細胞の形状が変化することにより、細胞内の Ca^{2+}濃度が変化していると考えられる。よって、本研究で製作したデバイスを使用することで、細胞に伸展刺激を与えると同時に、細胞内の Ca^{2+}濃度の変化を観察できることが確認できた。



(a) マイクロチャンバー伸展



(b) マイクロチャンバー伸展後

図10 細胞の蛍光観察写真

５．まとめ

伸展により刺激を与えられた単一細胞の応答の観察・計測実験を効率よく行うため、134 個のシリコーン製マイクロチャンバーがマトリックス状に並んだ細胞伸展マイクロデバイスの開発を試みた。これにより以下の結果を得た。

(1) マトリックス状に並んだシリコーン製マイクロチャンバーアレイの製作のために、OFPR の鋳型の利用とリフトオフプロセスを組み合わせることにより、チャンバー内外のシリコーンのつながりを切断し、チャンバー部のみにシリコーンを残すプロセスを開発した。これにより再現性良くマイクロチャンバーを製作できた。

(2) 厚さ 5μm±1μm を持つチャンバー部の製作においては、シリコーンとキシレンを重量比 1：1 で混合したものをスピンコート（600rpm×10 sec+3500 rpm×40 sec）することにより歩留まり約 40%で製作できた。

(3) 製作したデバイスを用いて動作確認を行った。可動部をプローブによって動かすことにより、マイクロチャンバーを伸展できることを確認した。

(4) 蛍光指示薬を用いた細胞観察実験では、約 15%ひずみに対する細胞の変形と細胞内の Ca^{2+}濃

度の変化を観察できることを確認した。

一方で、マイクロチャンバーの膜厚のバラツキ、および膜厚の不均一性の問題があることが分かった。いずれも製作プロセスに起因する問題である。今回の細胞観察実験では明確な不具合は観察されなかったが、観察像の焦点ずれや観察像の鮮明度の相違などの問題を生じる可能性が考えられる。今後も製作プロセスの再現性向上の検討を進め、寸法精度の高いデバイスの実現を目指す予定である。

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平成26年度第31回技術開発研究助成の支援を受けて実施されました。また、細胞の蛍光観察においては、徳島大学大学院理工学研究部 佐藤克也講師のご協力をいただきました。ここに記して深く感謝の意を表します。

参考文献

1) Dennis E.D, Paul J., Yu-li W., Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate, Science, Vol. 310, No. 5751(2008), 1139-1143.

2) 中島雄太、門司 亮、佐藤克也、南 和幸、高精度細胞伸展マイクロデバイスの開発と引張りを受ける細胞のその場観察、電気学会論文誌 E、Vol.133、No.12(2013)、350-357.

3) 林 達也、中原 佐、佐藤克也、南 和幸、マイクロチャンバーアレイを備えた細胞伸展マイクロデバイスの開発、日本機械学会 IIP2016 情報・知能・精密機器部門(IIP 部門)講演会 講演論文集、No.16-12 (CD-ROM)、講演番号 E-2-5、東京、2016.

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



研究責任者　北海道大学　情報科学研究科
生命人間情報科学専攻
教　授　　舘　野　　高

1. まえがき

平成 25 年の厚生労働省「国民生活基礎調査」によると、「耳鳴り」がすると答えた人口の割合は、調査対象に対して 3.0%であり、65 歳以上の年齢では 6.6%にも及ぶ。その中の約 43%が「なんら治療をしていない」と回答している。耳鳴りは、従来、不快に思っていても加齢現象として扱われることが多く、積極的な治療が行われてこなかった背景がある。また、近年の米国における同様の調査では日本の 4~5 倍程度の統計的数字となっており、その数字が日本でも年々増加傾向にあることから、高齢化が進むに従って急速に米国の調査結果に近づくと予想される。

耳鳴りの原因は、聴覚末梢系（特に内耳）に原因があると考えられてきた（末梢起源説）。実際に、耳鳴りを発症する患者の約 8 割には難聴がみられ、約 5 割は内耳の治療によって耳鳴りが抑制される。しかし、近年、耳鳴りには、中枢神経系が深く関与していることが次第に明らかになってきた（中枢起源説）。特に、耳鳴りは音情報処理に係る感覚神経系のみではなく、生体のリズムや恒常性を司る自律神経系、および、情動を司る大脳辺縁系の関与を強く示唆する研究結果が報告され始めた [1]。こうした背景から、耳鳴りの発生機序を解明するには、聴覚系とその他の中枢神経系との関係を明らかにし、発生源の神経活動を抑制および制御する必要がある。

耳鳴りの発生機序は複雑であることから、決定的な治療法は現時点では知られていない。現在は、主に、(a)薬物療法、(b)音響療法、(c)電磁気刺激療法の 3 つが有用であるとされ、その 2 つ(a,b)が実際に臨床応用されており、第 3(c)が研究段階にある。電磁気刺激療法には、磁気刺激を用いる経頭蓋磁気刺激療法と、電気刺激を用いる直流電気刺激療法の 2 つ [2]が臨床応用に近い段階にはあるが、いくつかの問題点があり、日米両国で現在は認可されていない。

本研究課題の実施者は、これまでに多電極配列基板 [3]を応用し、電気生理学的研究を行ってきた経緯 [4]がある。本研究では、その経験を基に電気計測技術の応用として、従来の大型の磁気刺激装置とは異なる、マイクロサイズの新たな磁気刺激法の開発に取り組んだ結果について報告する。本研究課題の背景として、従来の刺激療法は、耳鳴りの発生部位とされる聴覚皮質に対して、一過性に、あるいは、繰り返し比較的強い強度で刺激するパターンを用いた単純な刺激方法であった。一方、本研究が提案する方法は、大脳皮質や皮質下で検知した耳鳴り関連神経活動に基づき、聴皮質で耳鳴り活動が生起する直前に、聴知覚を誘発し

ない微弱な電流刺激で神経組織の一部に不応期を誘起し、耳鳴り活動を事前に抑制する方法を目指している。

この方法の根拠となる生理学的現象は、Chungらによって既に報告されている現象に基づいている[5]。また、本研究課題が目指す方法が従来法と大きく異なる点は、閉ループ型構成の実時間処理と予測モデルを目指している方法論[6]であり、それを実現する装置（刺激電極と制御系）を独自に開発する点である。上記の実現に向け、その研究基盤となる諸課題を研究助成期間中に達成した内容を以下では簡単に述べる。

２．内容

2.1　耳鳴りの発生機序に関する生理学実験

研究期間前半では、薬剤投与（サルチル酸ナトリウム）による耳鳴りモデル動物を利用して、聴覚中枢系音情報処理における耳鳴り様現象の機序の解明を試みた。

まず、in vivo モデル動物の聴覚皮質に記録用電極を刺入し、耳鳴り関連神経活動を多点記録した。しかし、麻酔投与後の時間によって、神経活動が大きく変化したために、安定した神経活動を長時間に渡って得ることができなかった。

そこで、次に、in vivo モデル動物の聴覚皮質の計測よりも安定して神経活動が得られる in vitro の脳スライス実験によって、サルチル酸ナトリウムの聴覚皮質における影響を実験的に詳細に解析することにした。実験では、マウスの聴覚皮質を 400 μm の厚さにスライスした後に、平面型多電極配列基板（図 1 A）で電気的刺激による神経細胞の誘発細胞外電位を計測した。正確な聴覚皮質部位を特定するために、in vivo 実験において、音刺激に対して神経活動が見られると思われる部位を蛍光物質で染色した後に、脳切片を作成した。電気的刺激を印加後に、その部位から 64 チャンネルで細胞外電位を記録した。特に、聴覚皮質（6 層構造）を対象にして、各層におけるサリチル酸投与前後における耳鳴り様の神経活動とその伝搬様式を詳細に観察し、誘発応答波形を計測した。シナプス電流に相当する電流成分を得るために、電流源密度(current source density, CSD)解析を行い、電流の沸出し(source)と沈込み(sink)の位置を特定することにした。

また、単一細胞レベルでの発火頻度を知るために、whole-cell patch-clamph 法[4]による細胞膜計測を聴覚皮質第 4 層から行った。この方法によって、集合電位ではなく、単一神経細胞種毎の活動変化を知ることができるために、個々の細胞の特徴を考慮して解析を行うことができる。

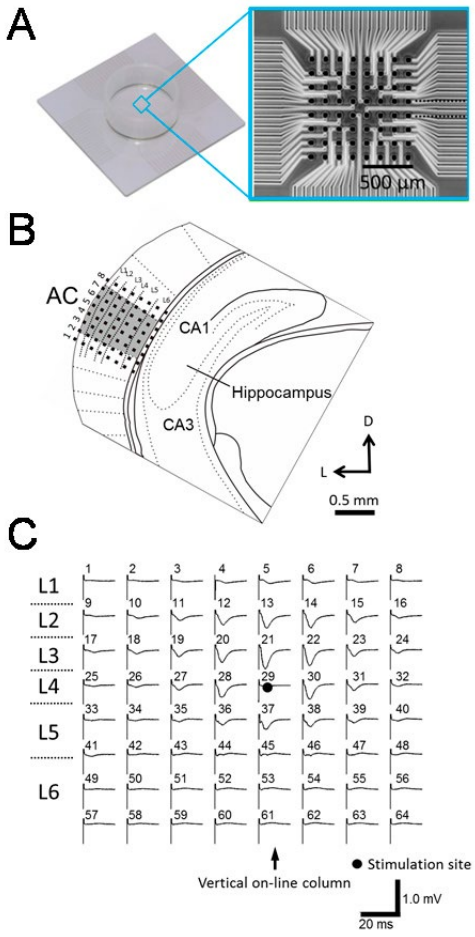


図1　多点電位計測とその記録。A, 多電極配列基板、B、脳切片における聴覚皮質部位、C、64 チャンネルの細胞外記録波形。記録点は 29 チャネル（黒丸）。

2.2　マイクロコイル実験装置の開発

研究期間の後半では、マイクロ磁気刺激(micro magnetic stimulation, μMS)法の開発を目指して、単一ソレノイドの μMS 法の特徴を理解するため、数値計算、試作インターフェース実験、および、動物脳への磁気刺激実験を行った。次に、それらの結果を基に、多チャネル μMS 法の刺激強度（磁束密度）と耳鳴り抑止のための神経誘発刺激に対する可能性について検討した。

まず、μMS 法を実際に行うために、刺激装置の作成に取り組んだ。市販されているサブミリサイズの単一ソレノイド(ELJ-RFR10GFB, Electronic Devices Corporation)[8]を利用して、μMS インターフェースを独自に作成した。次に、数値計算 [9]により、単一および多チャンネルのソレノイド周辺に生じる磁束密度の最大値 B_n を推定した。

さらに、単一磁気刺激インターフェースの最大磁束密度 B_e を実験的に得るために、半径 b=0.75 mm、巻数 N=100 のサーチコイルを作成した（図２B 右端)。そのサーチコイルの両端に生じる誘導起電力を計測し、得られた磁束密度の理論値 [9]と実測値を比較した。

最後に、実験動物（マウス）の聴覚皮質にμMS インターフェースを近づけ、刺激による誘発活動が生じるかについて、検証実験を行った。特に、μMS による刺激効果の検証は、刺激インターフェースを実験動物の脳表面に接触、および、刺入させて磁気刺激を印加し、刺激前後の神経活動を自家蛍光フラビンタンパク質蛍光イメージング (flavoprotein fluorescence imaging, FFI) 法により計測した。さらに、聴覚皮質から 1 mm 程度深部に磁気刺激インターフェースを刺入して、視床に相当する部分に磁気刺激を行った。視床は、聴覚神経経路における聴覚皮質に投射する部位（神経核）に相当する。

このように、齧歯類動物の生体脳を用いて、実際に単一ソレノイドの磁気刺激の誘発刺激効果を検証した結果を基に、多チャンネルソレノイドの刺激強度と脳深部刺激の可能性を最後に検討する。

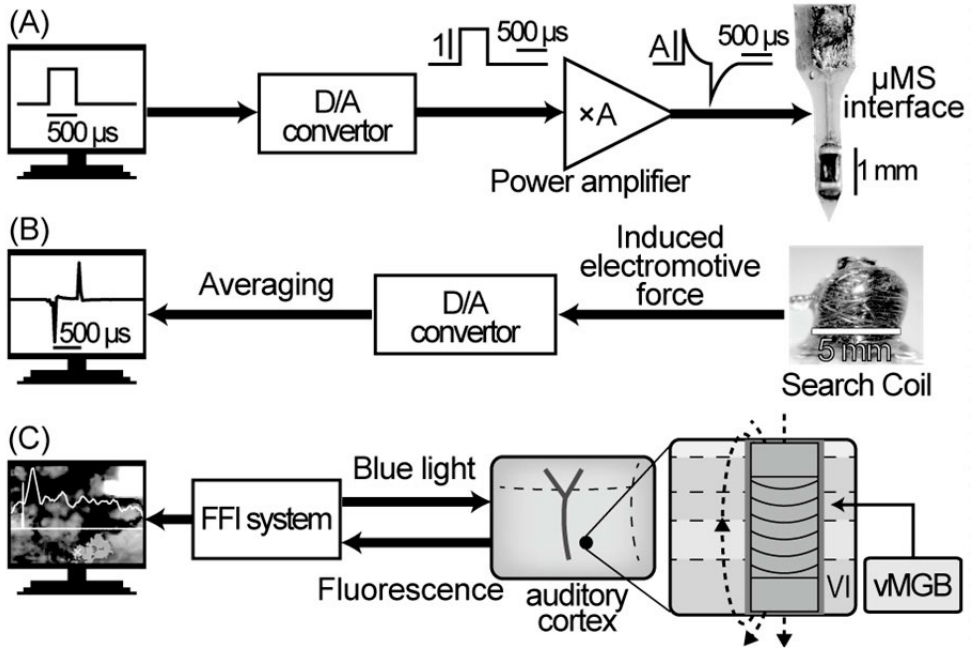


図2　(A) マイクロ磁気刺激(μMS)システム概略。(B)サーチコイルによる磁束密度の計測。 (C). 自家蛍光フラビンタンパク質蛍光イメージング (flavoprotein fluorescence imaging, FFI) **法の概略。青色光を照射して、神経活動に関連する緑色光を記録する。**

３．成果

3.1　耳鳴りの発生機序に関する生理学実験

本研究課題期間の前半では、サリチル酸ナトリウムを用いた耳鳴りモデル動物を利用して、耳鳴りの発生機序に関する in vitro 生理学実験を行った（図１）。先行研究の知見では、in vivo 生理学実験において、サリチル酸投ナトリウム投与下では、一般に、聴覚皮質における神経活動が増加することが知られている[1)]。

そこで、まず、in vitro でも同様の現象を観察できるかを確認するために、通常の生理食塩水と 1.4 mM のサリチル酸ナトリウムを含む実験液の 2 つの潅流実験条件下で、弱い電流刺激をマウス聴覚皮質切片に印加した際の神経活動を記録し、その誘発応答の特徴を比較した。電気刺激の位置は、聴覚皮質第 4 層とした。

その結果、サリチル酸ナトリウムを含む実験液下では、誘発応答の振幅が小さくなる結果が得られた（図３A）。この結果は、従来、in vivo 動物実験において観察されている神経活動が増加する現象[1)]とは異なり、モデル動物（マウス）における新たな知見を得た。In vivo 実験では、音刺激が聴覚経路の各神経核を経由して、最終的に聴覚皮質に入力が至り、誘発応答が観察されるために、皮質下での応答が増加すれば、聴覚皮質の応答も増加すると考えられる。

一方、本研究で用いた in vitro の脳スライスでは、皮質下の神経経路は切り離されているために、聴覚皮質のみの神経応答を観察できる。この理由より、従来研究とは異なる結果が得られたと考えられる。

また、上記の結果は、誘発応答が減少したことから、その神経メカニズムとして、中核皮質への神経投射である、興奮性のシナプス入力の減少、もしくは、抑制性の入力の増加の 2 通りの可能性が考えられる。このために、抑制性神経細胞の働き（シナプス伝達）を強める薬剤($GABA_A$ 受容体の促進剤)の一つである muscimol (MUS)を潅流液に投与して、サリチル酸ナトリウムの実験と比較することで、そのメカニズムを検証した。

その結果、サリチル酸ナトリウムが誘発応答に与える現象と類似の誘発応答を示す結果が得られた（図３B)。これらの結果から、耳鳴りの動物モデルとして利用される薬剤下では、抑制性入力が増強し、その結果として、聴覚皮質の活動が増加するのではなく、むしろ、減少している事が示唆された。また、この結果は、皮質下における神経回路網に依存して、耳鳴り関連活動が生じる可能性を強く示唆している。

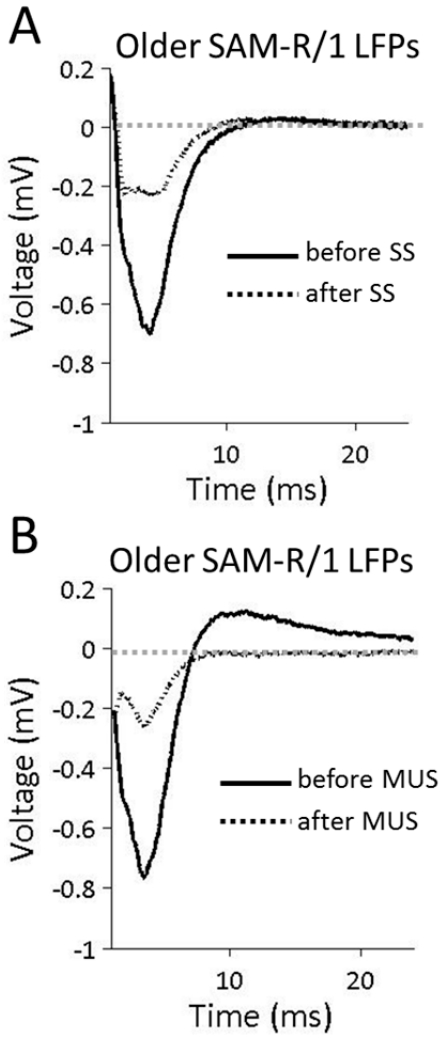


図3　多点細胞外電記録による電位波形。記録部位は聴覚皮質 6 層構造における第 2/3 層に相当する。刺激点は第 4 層にある。A、対照とサリチル酸ナトリウム（SS）潅流下での電気的誘発応答波形、B、抑制性シナプス受容体 $GABA_A$ の促進剤ムシモール(muscimol, MUS)下での誘発応答。サリチル酸ナトリウムの応答に類似している。

さらに、単一神経細胞レベルでのサリチル酸ナトリウムの影響を知るために、マウス聴覚皮質第4 層の興奮性錐体細胞から膜電位を計測した。その結果、サリチル酸ナトリウム投与下では、発火頻度が減少する結果が得られた。この結果は、上記の多電極配列基板を利用した集合電位の結果と一致し、単一細胞レベルでも、サリチル酸ナトリウムは神経活動を減少させる事が判明した。

また、CSD 解析の結果から、サリチル酸ナトリウムと MUS の効果は、誘発応答の発生 20 ms 程度までは同様であるが、その後，MUS では CSD の減少がゆっくりとした時定数でベースラインに戻っていく様子が観察された．上記の２つの条件下では、この現象から、誘発応答の時間推移が完全に一致しているのではなく、その機序に違いがあることを示唆している。

なお、上記で得られた結果については、研究会等で外部発表[2,3]を行っており、現在、投稿論文を準備中である。

3.2 マイクロコイル実験装置の開発

実際の μMS インターフェースを試作する前に、まず、どの程度の磁束密度を出力可能かについて、計算機上で数値計算を行った。具体的には、図２A 右端の微小単一ソレノイド（長さ L=0.6 mm，半径 a=0.22 mm，巻数 n=21）に準定常電流(I=2.0 A)が流れる場合の磁束密度 $B(r, z)$の r-z 空間分布(r は中心軸からの距離、z は中心座標軸を表す)を数値計算によって推定した。このとき、数値計算の結果から微小コイル近傍の磁束密度は 20-30 mT であると推定された。磁束密度分布をサーチコイルの内径と厚さに基づき、半径方向の$|x| \leqq 0.75$ mm、および、垂直軸方向の$-1.5 \leqq z \leqq 2.0$-3.0 mm の範囲で空間平均した磁束密度の推定値 B_n は 4.64-5.93 mT となった。

次に、試作した複数のサーチコイル間では、半径 r=0.75 mm、巻数 N=100 のコイル（図２B 最右端）が、刺激インターフェースの誘導起電力を磁気刺激信号として、最も SN 比よく計測できた。このとき、サーチコイルの厚さは 3.5-4.5 mm であった（図２B 右端）。実験から得た誘導起電力を数値積分し、磁束密度を得た。実測した磁束密度の最大値は B_e=5.18±0.56 mT (平均±標準偏差)であった。

さらに、試作した刺激インターフェースは、ラット脳表（聴覚皮質）および脳内（内側膝状体）を標的とした。μMS 下での FFI 法による測定により、聴覚応答時の神経活動とは異なる様相の誘発神経活動が刺激印加に 20 ms 程度遅れて計測された。この結果は、脳表面からのμMS 刺激法が実際の脳活動を誘発可能であることを示している。

続いて、同様の FFI 法を用いて、マウスの聴覚皮質のサブ領域 A1 と吻側聴覚皮質(anterior auditory field, AAF)において、純音刺激に対する誘発応答を計測した（図３A)。その結果、音刺激後の 0.8 s 後に大きな蛍光強度変化のピークが A1 と AAF の両方で現れた。

さらに、磁気刺激が脳組織内で十分に応答を誘発できるかを検証するために、マウス脳の視床付近に磁気刺激インターフェースを刺入して、磁気刺激の印加実験を行った。脳領域 A1 を目印として、その周辺から磁気刺激インターフェースを約 1mm 程度の深さで刺入させ、視床に到達する位置にインターフェース先端部を配置した。その後、単相性の電圧パルス刺激（500 μs 幅）をインターフェースに印加して磁束密度を急激に変化させた（図２A，B)。その瞬間の神経活動を FFI 計測によって A1 と AAF を中心にして、応答を観察した。このとき、特に、音刺激および μMS 法によって誘発された脳活動の FFI 計測結果を比較した。図３では、5 kHz の刺激音に対する誘発応答例を示す。図３A2 では、一過性に蛍光強度が増加し、数 100 ms 後に減少する様子が判る。図３A2 中の破線の楕円は、聴覚皮質のサブ領域である A1 と AAF を示している。

一方、5.0 V μMS（右）に対する誘発応答の FFI 計測の結果は、同様の記録位置において、異なる蛍光強度変化を示した。μMS インターフェースの

置かれた場所は、脳表情で白く見える位置に相当する(図３B2)。図３C では、図３A に対応する 5 kHz の音刺激に対する, site a および b におけるフラビンタンパク質の蛍光強度の変化を示している（下の 2 つの青色曲線)。画像を取得するプロセスは、刺激開始の 400 ms 前から始まるものとした。図３C 中の点 A1 と A2 は開始から各々 0.4 秒と 0.8 秒後をしている（図３A1,2 に対応)。

さらに、図３D では、μMS 刺激法に対する蛍光強度変化を示す。磁気刺激インターフェース近くの部位 site d (cross mark) は負の蛍光変化を示した。これに対して、他の部位(site c and e)では、音刺激と同様に正の誘発応答変化を示した。図３D 中の点 B1 と B2 は開始から各々0.4 秒と 0.8 秒後を示している（図３B1,2 に対応)。

一方、単一ソレノイドの数値計算結果から、線形重ね合わせの原理によって、多チャネル μMS 法の刺激強度（磁束密度）は、ソレノイドを平面的に配置する個数を増加させるに従って単調に増加し、最大で 1.1-1.2 倍程度に及ぶ推定値が得られた。この結果から、脳表面から 100μm 程度の深さにある神経組織に誘発活動を十分に誘起できると予想される。また、多チャンネル化することによって刺激する領域が増加し、誘起させる脳領域の増加により、神経活動が伝搬しやすい。また、今回推定された微小コイル近傍の磁束密度は、経頭蓋磁気刺激法で脳表に生じると推定されている 7.02 mT よりも大きい[10]。したがって、脳表面および脳に刺入すれば、コイルの近傍では μMS で神経活動誘発が十分に可能であると推察される。しかし、経頭蓋 μMS 刺激により、脳深部の誘発活動が得られるかについては、今回の実験のみからでは必ずしも明らかではないために、今後の実証実験が必要である。

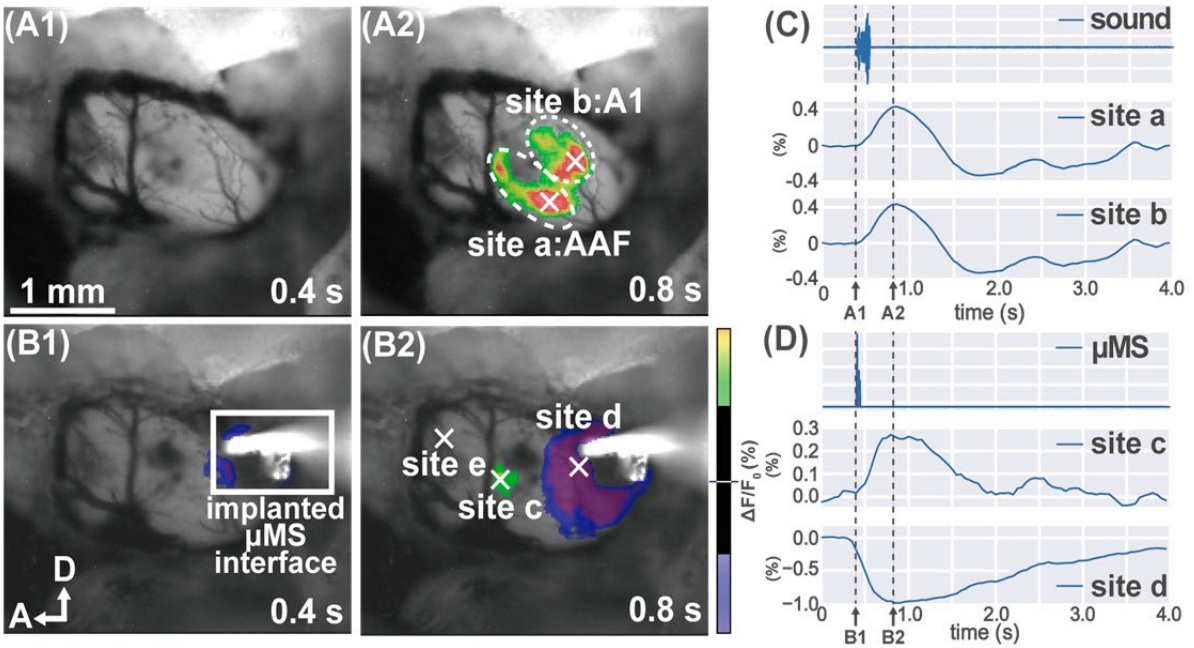


図3　音刺激およびμMS法によって誘発された脳活動のFFI計測。(A) 5 kHz純音の刺激音に対する誘発応答（右A2）。破線の楕円は、聴覚皮質のA1とAAFを示す。また、site a and bは各々記録部位を示す。刺激開始時刻からの経過時間を右下に記す (B) 5.0 V μMS (右) に対する誘発応答のFFI法による計測結果。μMS インターフェースの置かれた場所は脳表情で白く見える位置に相当。(C) Aに対応する 5-kHzの音刺激に対する、フラビンタンパク質の蛍光強度の変化をsites a および b で示。画像を取得するプロセスは、刺激開始の400 ms前から始まる。図中の点A1 とA2は開始から各々 0.4 秒と 0.8 秒後を示す。(D) μMS 刺激に対する蛍光強度変化を示す。 磁気刺激インターフェース近くの部位 site d (cross mark) は負の蛍光変化を示。これに対して、他の部位other sites (a, b, and c)では, 音刺激と同様に正の誘発応答変化を示。図中の点B1 とB2は開始から各々 0.4 秒と 0.8 秒後を示す。

本研究の実験では、磁束密度の実測値 B_e と推定値 B_n とは概ね一致していた。従来、計測が困難であった μMS 法の磁束密度について、比較的単純な計測系で磁束密度が得られた点は本課題の成果である。マルチコイルの評価にも応用できると考えられる。

また、本研究課題では、実際のラットの脳表および脳内にコイル先端部を刺入して μMS の有効性を評価した。磁気刺激の印加によって聴覚応答とは異なる様相の神経活動が計測でき、磁気刺激の有効性を確認できた。今後、耳鳴り誘発剤と併用することにより、神経活動の興奮および抑制に磁気刺激が及ぼす影響を詳細に検討したい。今回は、マルチコイルの μMS 基板の試作のみを行ったが、実際のマルチコイルによる磁気刺激には到らなかった。単一ソレノイドの数値計算から予測されるマルチコイル μMS は、コイル近傍で凡そ 1.1-1.2 倍の磁束密度が得られる試算となった。今後は、実際の動物実験によってマルチコイル μMS 法の効果を評価したいと考えている。

最後に、試作した多チャンネルの μMS 法の刺激効果の可能性と今後の展望について簡単に触れる。磁気刺激には、比較的大きな電流(mA のオーダー)が必要であり、多チャンネル化によって、増幅器で消費される電力が大きくなると共に、磁気刺激インターフェースが脳と接触する先端部では、熱が発生して、インターフェースその物を劣化させる。このため、慢性的に長期間の磁気刺激を行うには、適切な刺激強度や刺激間隔などのパラメータ値を最適化する必要があり、今後の課題である。ただし、インターフェースの多チャンネル化自体は非常に容易に実現可能であることが判明し、多チャンネルシステムは早期に実現可能であると予想している。

４．まとめ

本研究課題では、耳鳴りの発生機序と磁気刺激を利用したその抑制システムの構築を目指して、実際の動物実験による検証を試みた。

研究期間前半では、薬剤投与（サルチル酸ナトリウム）による耳鳴りモデル動物を利用して、聴覚中枢系音情報処理における耳鳴り様現象の機序の解明を試みた。まず、in vivo モデル動物の聴覚皮質に記録用電極を刺入し、耳鳴り関連神経活動を多点記録した。しかし、麻酔投与後の時間によって、神経活動が大きく変化したために、安定した神経活動を長時間に渡って得ることができなかった。そこで、次に、in vitro の脳スライス実験によって、サルチル酸ナトリウムの聴覚皮質における影響を実験的に詳細に解析することにした。さらに単一細胞レベルでも、同様にサリチル酸ナトリウムの影響を実験的に計測し、神経発火が抑制される結果を得た。これらの結果から、耳鳴りの動物モデルでは、聴覚皮質を単離した系では、その活動が抑制されることが示唆される。

また、期間後半では、単一チャネルの μMS インターフェースを試作した。また、その刺激効果の検証には、実際に、刺激インターフェースを実験動物の脳表面に接触させて、神経誘発応答が計測できることを確認した。

本研究課題では、全体として、サブミリサイズの単一ソレノイドを用いたマイクロ磁気刺激(μMS)法の特徴を理解するために、磁束密度の数値計算、試作インターフェース製作と評価実験、および、動物脳への磁気刺激実験を行った。さらに、その結果を基に、多チャネル μMS 法の刺激強度（磁束密度）と耳鳴り抑止に利用する神経誘発刺激の可能性について議論した。

最後に、試作した多チャンネルの μMS 法の刺激効果の可能性と本研究課題の今後の展望について述べた。閉ループ型のシステムへの展開は、この期間中には十分に検討を行うに至らなかったが、その基盤となる技術や耳鳴りの生理学的なメカニズムに関する新たな知見を得ることができた。貴財団の助成金によって得られた基礎的な結果を基に、今後の課題として、さらに、本研究課題の研究開発を発展させたいと考えている。

謝辞

本研究は中谷医工計測技術振興財団の補助を受けて実施したものである。

参考文献

1) Eggermont JJ. The auditory cortex and tinnitus – a review of animal and human studies. Eur J Neurosci. 41(5):665-76 (2015).

2) Dayan E, Censor N, Buch ER, Sandrini M, Cohen LG. Noninvasive brain stimulation: from physiology to network dynamics and back. Nat Neurosci. 16(7):838-844 (2013)

3) Tateno T, Jimbo Y, and Robinson HP. Spatio-temporal cholinergic modulation in cultured networks of rat cortical neurons: spontaneous activity. Neuroscience. 134(2):425-37 (2005).

4) Tateno T and Robinson HP. The mechanism of ethanol action on midbrain dopaminergic neuron firing: a dynamic-clamp study of the role of I(h) and GABAergic synaptic integration. J Neurophysiol. Oct;106(4):1901-22 (2011).

5) Chung S and Ferster D. Strength and orientation tuning of the thalamic input to simple cells revealed by electrically evoked cortical suppression. Neuron. 20(6):1177-89 (1998).

6) Potter SM, El Hady A, Fetz EE. Closed-loop neuroscience and neuroengineering. Front Neural Circuits.23:8:115 (2014).

7) Wang HT, Luo B, Zhou KQ, Xu TL, Chen L. Sodium salicylate reduces inhibitory postsynaptic currents in neurons of rat auditory cortex. Hear Res., 215(1-2):77-83 (2006).

8) Bonmassar G, Lee SW, Freeman DK, Polasek M, Fried SI, and Gale JT. Microscopic magnetic stimulation of neural tissue. Nat Commun. Jun 26;3:921 (2012).

9) Derby N and Olbert S, Cylindrical magnets and ideal solenoids, American Journal of Physics **78** (3), 229-235 (2010).

10) Yang S, Xu G, Wang L, Chen Y, Wu H, Li Y, and Yang Q. 3D realistic head model simulation based on transcranial magnetic stimulation. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. Suppl:6469-72 (2006).

外部発表および発表論文等

1) M. Noto, J. Nishikawa, and T. Tateno, An analysis of nonlinear dynamics underlying neural activity related to auditory induction in the rat auditory cortex, Neuroscience, Vol. 318, No. 24 March 2016, pp 58-83 (2016).

2) A. Sano and T. Tateno, Sodium salicylate and muscimol differently regulate inhibitory synapses in the senescence-accelerated mouse auditory cortex, Oral Sessions : Auditory System (No. 2O-10-2-3), 2015/07/29, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience2015), July 28-31, 2015, Kobe, Japan.

3) T. Tateno and A. Sano, Spatial distribution patterns of short term potentiation induced by microelectrode stimulation in the mouse auditory cortex in vitro, Program#/Poster#: 596.09/J22, October 20, 2015; Abstracts of the 45st Annual Meeting of Society of

Neuroscience, Chicago, IL, USA, October. 17-21, 2015.

4) 岩城遼、村上修一、佐藤和郎、舘野高、齧歯類動物の聴覚中枢神経刺激に向けた周波数選択的音響センサの開発とその特性評価、電子情報通信学会、ニューロコンピューティング研究会、信学技報, vol. 115, no. 514, NC2015-100, pp. 179-184, 2016年3月23日

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



研究責任者　徳島大学　大学院医歯薬学研究部
准教授　異　島　　優
共同研究者　崇城大学　薬学部
教　授　小田切　優　樹
崇城大学　DDS 研究所
特任教授　前　田　　浩

1. はじめに

癌化学療法において、抗癌剤の『腫瘍ターゲティング』は欠かせない技術であり、能動的または受動的ターゲティングが試みられている。中でも、今日の受動的ターゲティング理論の礎である Enhanced permeability and retention (EPR)効果は、高分子が腫瘍選択的に集積する効果であり、この効果を利用した高分子抗癌剤は今後ますます開発されることが予想される。事実、ドキソルビシン内封 PEG 化リポソーム製剤であるドキシル®をはじめ、スマンクス®やアブラキサン®などの高分子抗癌剤がすでに上市され、さらに数多くの高分子抗癌剤が臨床治験段階にある。こうした状況下において、近年ドキシル®などの臨床データが蓄積されたことにより、治療効果における限界点も見えてきた。具体的には、①腫瘍の種類やサイズによって、治療効果に差異が認められる点、②腫瘍内の不均一性などによる送達性の差異が認められる点、③EPR 効果を利用しても、腫瘍への高分子抗癌剤の移行量は投与量の 30%程度である点などである。これは、動物モデルという前臨床試験での画一的な実験モデル系と臨床における腫瘍組織の間に大きな差異があることに加え、副作用により減薬や休薬が余儀なくされている現状から鑑みて、高分子抗癌剤の腫瘍部位移行性を制御している内因的な EPR 効果を過大評価した可能性が考えられる。そこで我々は、受動的ターゲティング理論の礎である EPR 効果の『制御』を目指した。これまでの検討結果から、一酸化窒素（NO)を腫瘍選択的に供給できれば、EPR 効果が増強することが示唆されているため、今回新たに開発した一酸化窒素付加型ヒト血清アルブミン二量体（SNO-HSA-Dimer)の腫瘍内環境制御ナノ粒子としての有用性を評価した。

２．方法

SNO-HSA-Dimer の作製：HSA-Dimer は、pPIC9K ベクター上に、ポリペプチドリンカー$(GGGGS)_2$で融合した HSA ダイマーの cDNA を挿入し、HSA Dimer の cDNA を組み込んだ発現ベクターを *Pichia pastoris* に形質転換を行った。この株を BMGY 培地、BMMY 培地で培養後、その上清を、陰イオン交換及び疎水性相互作用クロマトグラフィーで処理後、ゲルろ過カラムで分離して目的とする HSA-Dimer を精製した。本来の NO 付加部位である Cys-34 への *S*-二トロソ化(SNO)化は、有機ニトロソ化剤（イソアミル亜硝酸）による緩和な条件下で行い、その NO 抱合率は HPLC を用いた Flow-reactor system で定量した。

SNO-HSA-Dimer の体内動態解析：健常及び担癌モデルマウスに放射ラベル化である ^{111}In 体を静脈内投与し、その体内動態及び腫瘍蓄積性を検討した。同時に、NO や内封・結合している抗癌剤の血中動態、腫瘍組織蓄積性を評価した。

高分子抗癌剤(ドキシル®)と SNO-HSA-Dimer の *in vivo* 抗腫瘍活性評価：C26 担癌マウスは、BALB/c マウス（雌、8 週齢)を、実験に供した。マウスをエーテル麻酔下で、C26 細胞懸濁液(2×10^6 cells/100 μL saline)を背中側皮下に投与し、C26 担癌マウスを作製した。

B16F10 担癌マウスは、C57BL6 マウス(雌を、8 週齢)使用した。マウスをエーテル麻酔下懸濁液(2×10^6 cells/100 μL saline)を背中側皮下に投与し、B16F10 担癌マウスを作製した。

In vivo での抗腫瘍活性は 1)腫瘍サイズ、2)血液生化学分析により評価した。なお、腫瘍体積(v)については腫瘍の短径(a)と長径(b)を計測し、$v=0.4 \times a^2 b$ 式にて算出した。

３．結果

担癌モデルマウスにおける SNO-HSA-Dimer の体内動態を解析した結果、低分子の NO 供与剤では、腫瘍内に NO を輸送することが出来ない一方で、SNO-HSA-Dimer では、有意に高い NO の腫瘍内への蓄積が明らかとなった（Figure１）。このことから、SNO-HSA-Dimer は、腫瘍選択性を兼ね備えた NO の供与剤になり得ることが示唆された。そこで *in vivo* にて、EPR 効果増強における SNO-HSA Dimer の影響を検討したところ、EPR 効果の指標であるエバンスブルーの蓄積の有意な増大が認められた（Figure２）。次に、以前報告されたニトログリセリンとの EPR 効果増強における比較検討実験を行ったところ、EPR 効果増強作用は、SNO-HSA Dimer で、より顕著であった。次に、SNO-HSA-Dimer と高分子ミセル抗がん剤との併用による癌治療を行ったところ、SNO-HSA-Dimer の併用群において最も高い抗腫瘍作用が認められた。その際、高分子抗癌剤の

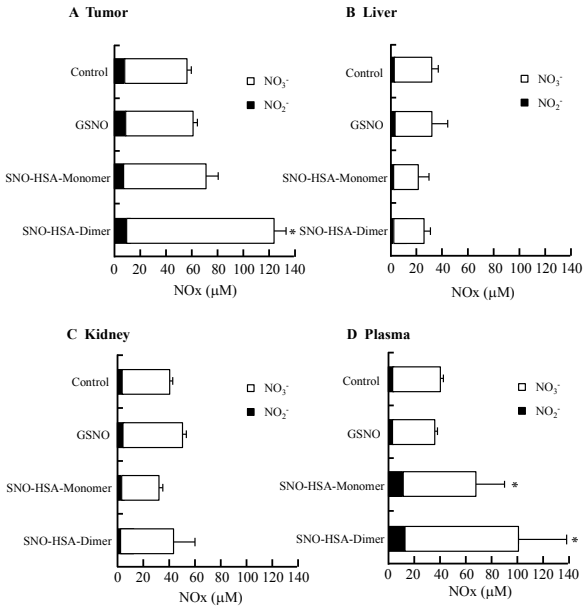


Figure 1. NOx levels in tumor tissue (A), liver (B), kidney (C) and plasma (D) at 6 h after administration of GSNO, SNO-HSA-Monomer or SNO-HSA-Dimer (40 nmol NO/mouse) were determined by the HPLC flow-reactor system. Controls were mice which had not been treated with a NO-containing compound. Results are means ± SD (n = 3-11). * P < 0.05 compared with control.

Figure1　各 NO 供与剤投与後の臓器中 NO 濃度

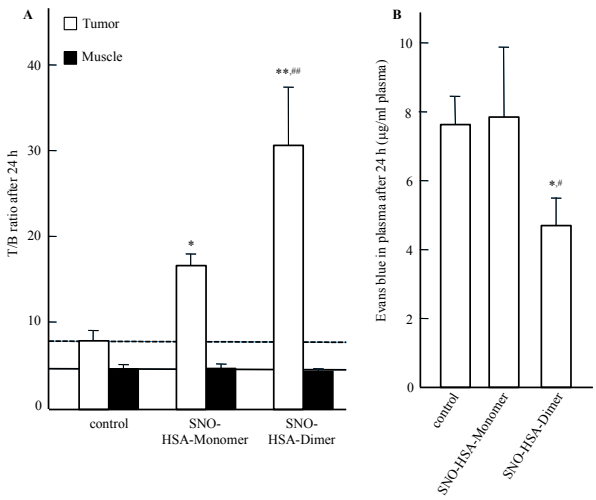


Figure 2. Extravasation of Evans blue induced by SNO-HSA-Monomer and SNO-HSA-Dimer. 1 × 10^6 C26 cells were subcutaneously inoculated into the dorsal skin. The mice were kept for 10 days until the tumor had reached a certain volume. Six hours after administration of the different solutes, Evans blue dye was injected i.v. at a dose of 10 mg/kg into three of the four groups of the tumor-bearing mice. Twenty-four hours later, the mice were assessed. (A) Tissue-blood ratio at 24 h after intravenous injection of Evans blue dye in the C26 tumor-bearing mice. (B) Plasma concentrations of Evans blue in the mice at 24 h after i.v. injection. Results are means ± SD (n = 6-8). * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with control, # P < 0.05, ## P < 0.01 compared with SNO-HSA-Monomer.

Figure ２ SNO-HSA-Dimer による EPR 効果増強作用

移行性も約 3 倍増大していた。

そこで、すでに臨床で使用されているドキシル®おいても、その腫瘍移行性の増大が認められるかを検討した。その結果、腫瘍移行性は 3-4 倍上昇し、それと良く一致して、腎臓や肝臓へのドキシ

ル®分布量は、有意に低下していた。その移行性増大により、高い抗腫瘍効果を発揮し、腫瘍サイズと肺への転移数の著しい低下が観察された（Figure３）。

また、興味深いことに、この EPR 増強効果は、SNO-HSA Dimer 投与後、直後から 6 時間程度までは持続しており、SNO-HSA Dimer 投与後 12 時間以降は、その効果は認められなかった。このことは、EPR 効果の増強による血流増大に伴う腫瘍細胞の増殖といった副作用の観点からも、非常に望ましい作用時間であると考えられる。

ここまでは、C26 細胞株で実験を行ったが、C26 細胞は、内因的な EPR 効果が大きい細胞であるため、SNO-HSA Dimer による EPR 効果の増大も比較的観察されやすかった可能性がある。そこで、内因的な EPR 効果が小さい B16 細胞株を用いて、同様の実験を行った。

その結果、C26 細胞を用いた実験と同様に、SNO-HSA Dimer による EPR 効果の増大が観察された[1,2]。現在、さらに難治性モデルである膵臓癌同所移植モデルマウスでの実験を行っている状況であり、臨床に即したモデルでの検討を詳細に詰めて行く予定である。

４．考察

我々は、腫瘍選択的に NO を運搬する SNO-HSA-Dimer を遺伝子工学的手法により作製した。今回作製した SNO-HSA-Dimer の分子径は、20-30 nm である。興味深いことに、片岡らの報告によると、EPR 効果を示しやすい担癌モデルでは、30、50、70、100 nm のサイズのいずれのミセルも抗癌効果を示したが、EPR 効果を示しにくい膵臓癌モデルでは、30 nm のミセルのみが奏効した。すなわち、50、70、100 nm のミセルは、送達しないということを示唆している。このことを踏まえても、SNO-HSA-Dimer は、EPR 効果が低い癌種においても送達可能な 20-30nm というサイズであり、効率的に NO を送達し、EPR 効果を増強する結果、高分子抗癌剤の有用性

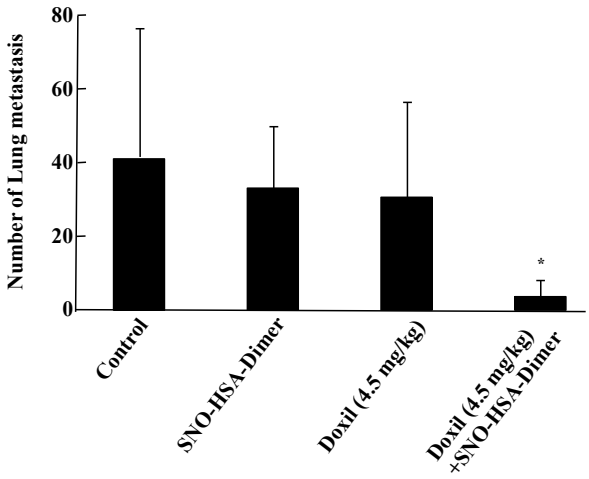


Figure 3. Effect of Doxil, without and with SNO-HSA-Dimer, on lung metastasis.
C26 tumor-bearing mice were divided into cohorts (n = 4-5) and treated i.v. with saline (control), Doxil (4.5 mg (DOX)/kg), SNO-HSA-Dimer (1.3 µmol NO/kg) or Doxil combined with SNO-HSA-Dimer on day 0, 7 and 14 and then followed for 14 days. Afterwards, the numbers of black metastatic colonies in the lungs were counted. Results are means ± SD. *P < 0.05 as compared with control.

Figure ３ 肺転移数における SNO-HSA-Dimer の効果

を向上させることが期待される。現在、ドキシル®以外の上市されている高分子抗癌剤でも SNO-HSA-Dimer の併用による EPR 効果増強効果を検討中であるが、当研究室で作製した高分子抗癌剤もドキシル®においても、その腫瘍移行性を 3 倍以上に増大させていることから、EPR 効果を利用している薬剤においては、今回の EPR 効果増強効果を介した腫瘍移行性の増大が認められる可能性が高いと推察される。また、今回は、Colon 26 細胞という比較的内因的な EPR 効果が高い癌種と B16 細胞である比較的内因的な EPR 効果が低い癌種を使用した。結果的には、どちらの癌種でも SNO-HSA-Dimer による EPR 効果の増強は認められた。ただ、皮下への腫瘍移植モデルでは，実臨床の腫瘍での血管密度や、血流量などに違いが指摘されている。従って、今後、膵臓癌同所移植モデルという極めて送達性の低いモデルでの検討を行っていく予定である。また近年では、高分子製剤が増加してきたことに伴い、その薬効を発揮した後の生体蓄積性と安全性を検討する必要性がクローズアップされてきている。この点から考察しても、本研究で作製した

SNO-HSA-Dimer は、薬効を発揮した後、HSA-Dimer となることを確認している。この HSA-Dimer は、もともと多量に存在する HSA の二量体であり、生体分解能を有するため、蓄積性はなく、速やかに分解される。実際、内因的な HSA の一部は、二量体化しているものもあり、SNO-HSA-Dimer は、構成成分すべてが、内因的な物質から合成されているといっても過言ではない。これらのことから、非常に生体適合性・生体分解能に優れている高分子製剤である点も本研究のメリットである（Figure４）。

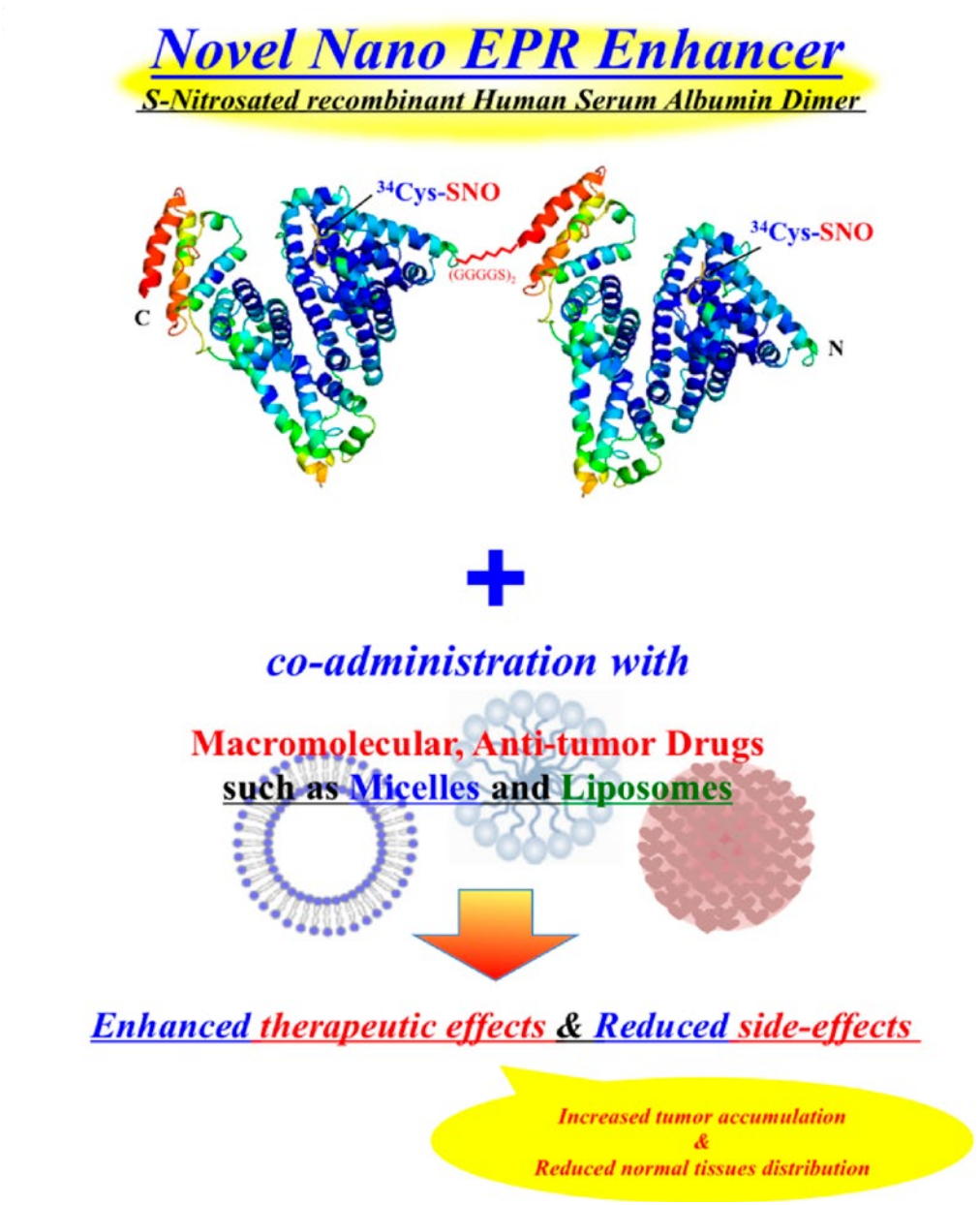


Figure ４ EPR 増強剤としての SNO-HSA-Dimer

５．まとめ

SNO-HSA Dimer は幅広い既存の高分子抗癌剤や今後益々開発されてくる新規な高分子抗癌剤に対する EPR 効果増強剤としての有用性が期待されるとともに、内因的な物質である NO や HSA を用いて作製した SNO-HSA Dimer は、生体適合性に優れ、蓄積性や安全性の観点からも非常に有望な製剤になり得ると考えられる。また、近年上市された抗 PD-1 抗体は、効果の高い薬であるが、その一方で高い薬価が問題視されている。近い将来、高分子製剤などの高い薬価は、治療をできる患者を制限するだけでなく、国の財政すら圧迫しかねない状況になることが予想されている。まさに、こういった医療経済的側面からも、SNO-HSA Dimer 併用投与するだけで投与量を 1/3 にすることが出来れば、まさに「福音」となりえる。

我々は、SNO-HSA-Dimer にさらなる付加価値を付けるべく、様々な NO 付加方法を模索した。その結果、Ploy-SNO 化という方法により NO を付加させることで、難治性がんに見られる低酸素誘導性の p-糖タンパク質による耐性化やオートファジーによる耐性化に対し、非常に高い耐性克服効果を有することを突き止めた [3]。まだまだ、発展の余地がある研究であることを再認識させられるとともに、一刻も早く、医療への貢献を果た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。

また、実験を遂行するにあたり、ご協力して頂いた熊本大学薬学部薬剤学分野の木下　遼君はじめ、多くの学生の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. ◯Ishima Y, Maruyama T. Human Serum Albumin as Carrier in Drug Delivery Systems. Yakugaku Zasshi. 2016;136(1):39-47.
2. ◯Ishima Y, Kinoshita R, Ikeda M, Kragh-Hansen U, Fang J, Nakamura H, Chuang VT, Tanaka R, Maeda H, Kodama A, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano-EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes. J Control Release. 2015;217:1-9.
3. ◯Ishima Y, Inoue A, Fang J, Kinoshita R, Ikeda M, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. Poly-S-nitrosated human albumin enhances the antitumor and antimetastasis effect of bevacizumab, partly by inhibiting autophagy via the generation of nitric oxide. Cancer Sci. 2015 106:194-200.

成果発表

1. ナノ EPR 増強剤である NO 付加アルブミンダイマーは 難治性癌における高分子抗癌剤抵抗性を改善する, 木下　遼、◯異島　優、池田真由美、中村　秀明、方　軍、前田　浩、小田切優樹、丸山　徹, 日本薬剤学会　第 31 回年会（2016）
2. UW SOLUTION IMPROVED WITH HIGH ANTI-APOPTOTIC ACTIVITY BY S-NITROSATED HUMAN SERUM ALBUMIN, ○ Yu Ishima, Takuya Shinagawa, Shinji Yoneshige, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (2015)
3. S-Nitrosated human serum albumin dimer as a novel nano EPR enhancer applied to nanotechnology-based anticancer drug, Ryo kinoshita, ◯Yu Ishima, Mayumi Ikeda, Jun Fang, Hiroshi Maeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and

Therapeutic Applications of Nitric Oxide (2015)

4. Anti-tumor effect of Poly-S-nitrosated Human Serum Albumin is enhanced by phosphodiesterase 5 inhibitors,
   Mayumi Ikeda, ○ Yu Ishima, Ryo Kinoshita, Hiroshi Watanabe, Tsuyoshi Ikeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (2015)
5. Poly-S-二トロソ化ヒト血清アルブミンの HIF-1alpha 抑制効果, ○異島 優、井上 亜希、小田切 優樹、渡邊 博志、丸山 徹, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会 (2015)

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



研究責任者　東京工科大学　応用生物学部
助　教　　吉　田　　亘

１．はじめに

本研究ではがん細胞のバイオマーカーであるゲノム全体の DNA メチル化レベルを簡便に測定する方法を開発する事を目的とした。日本人の死因の第 1 位はがんであるが、がんを早期に診断し、適切な治療を行えばがん患者の死亡率を低減できる。現在のがん診断は病院や検査機関で実践されているため、がんを診断するためには医師の診断が必要である。つまり、医師の診断を定期的に受けていない患者は早期にがんを発見することが困難である。そのため、がん診断を在宅で簡便に行うことができれば、がんの超早期診断が可能になると考えた。そこで、本研究ではがんのバイオマーカーとしてメチル化 DNA に着目した。

DNA メチル化とは、ゲノム DNA 中のシトシン(C)とグアニン(G)の連続した塩基配列(CpG)中のシトシンの 5 位がメチル化される現象である [1]。このメチル基は、S-アデノシルメチオニンから DNA メチルトランスフェラーゼにより転移される [2]。哺乳類では DNA メチル化酵素として DNMT1, DNMT3A, DNMT3B が同定されている。哺乳類の発生において細胞の分化に伴いゲノムの多くの領域で DNA のメチル化または脱メチル化が起こり、各細胞に特異的な DNA メチル化パターンが形成される [3]。DNA メチル化は遺伝子発現制御において重要な役割を果たしており、プロモーター中の CpG 配列がメチル化されるとその遺伝子の発現は抑制される [4]。またヒトゲノムの 45%を構成する Transposable elements はその活性を抑制するために、正常細胞では高度にメチル化されている。そのため、ゲノム全体のメチル化レベルは Transposable elements のメチル化レベルと相関がある。一方、がん細胞では Transposable elements のメチル化レベルが低下しているため、ゲノム全体のメチル化レベルが低下していることが報告されている [5), 6)]。つまり、ゲノム全体の DNA メチル化レベルはがんのバイオマーカーとして期待されている。

ゲノム全体の DNA メチル化レベルを測定する方法としては、high-performance liquid chromatography (HPLC)法、バイサルファイト法、enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法が挙げられる [7]。HPLC 法はゲノム DNA を分解し、HPLC で解析することによりメチル化シトシン量を定量する方法である。バイサルファイト法はバイサルファイト変換したゲノムを鋳型とし、LINE などの反復配列を PCR で増幅し、その配列を解析することによってゲノム全体のメチル化レベルを測定する方法である。これらの方法では検出までに煩雑な操作が必要であるため、より

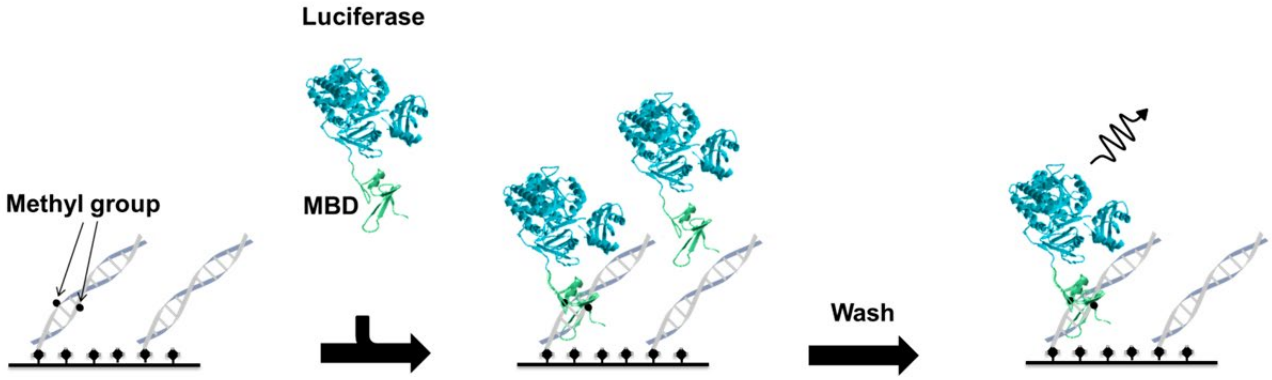


図1　MBD-luciferase を用いたメチル化 2 本鎖 DNA 検出方法

簡便にゲノム全体のメチル化レベルを検出する方法が求められている。抗メチル化抗体を用いた ELIZA 法が開発されているが、抗メチル化抗体は二本鎖 DNA 中のメチル基を認識できないため、本手法では一本鎖 DNA を調製する必要がある。また、ゲノム DNA 中にはヘミメチル化 CpG も存在するため、ELISA 法は DNA メチル化レベルの定量性にも問題がある。

そこで、本研究ではメチル化 2 本鎖 DNA を特異的に認識する蛋白質である methyl-CpG binding domain (MBD)[8]に luciferase を融合させた蛋白質(MBD-luciferase)を用いれば、簡便に 2 本鎖 DNA のメチル化レベルを測定できると考えた。想定した検出原理を図 1 に示す。MBD とはヒト由来の二本鎖 DNA 中のメチル化 CpG を特異的に認識する蛋白質である。そのため、ゲノム中のメチル化 CpG に結合した MBD-luciferase 量を luciferase の発光量を測定することにより定量すれば、簡便にゲノム全体のメチル化レベルを測定できると考えた。そこで、MBD-luciferase の発現ベクターを構築し、MBD-luciferase を組換え生産し、MBD-luciferase を用いたてゲノム全体のメチル化レベルを簡便に測定できる方法を開発することを試みた。

2．実験方法

2.1　*MBD-luciferase* 発現ベクターの構築

*Nde*I サイトと精製用の *Streptag* 配列を付加したフォワードプライマー(5'-TCTCATATGTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAGGCTGAGGACTGGCTGGACT-3')と、*Eco*RI サイトを付加したリバースプライマー(5'-GTTGAATTCGCTGGCAACCGCCACGG-3')を合成した。これらプライマーと KOD DNA ポリメラーゼ(Toyobo)を用い *MBD* 遺伝子発現ベクター(pGEX-2TX-*MBD*)[9]を鋳型として *MBD* 遺伝子を PCR 増幅した。この PCR 産物を制限酵素 *Nde*I(NEB)と *Eco*RI(Nippon Gene)で切断した。*Zif268-luciferase* 発現ベクター(pET30c-*Streptag-Zif268-luciferase*)[10]を制限酵素 *Nde*I (NEB)と *Eco*RI (Nippon Gene)で切断し *Zif268* 遺伝子配列を除いた。その後、制限酵素処理した *MBD* 遺伝子と発現ベクターを Ligation High Ver.2(Toyobo)を用いてライゲーションした。このライゲーション産物を用いて *Escherichia coli*(*E.coli*) DH5α を形質転換し、培養後、プラスミド抽出を行った。得られた pET30c-*Streptag-MBD-luciferaseiferase* の DNA 配列を 3730xl DNA analyzer (Thermo Fisher Scientific)で解析した（図２）。

2.2　MBD-luciferase の組換え生産

Streptag-MBD-luciferaseiferase 遺伝子発現ベクター(pET30c-*Streptag-MBD-luciferaseiferase*)を用いて、*E.coli* BL21[DE3](Biodynamics)を形質転換した。その後、形質転換させた *E.coli* BL21

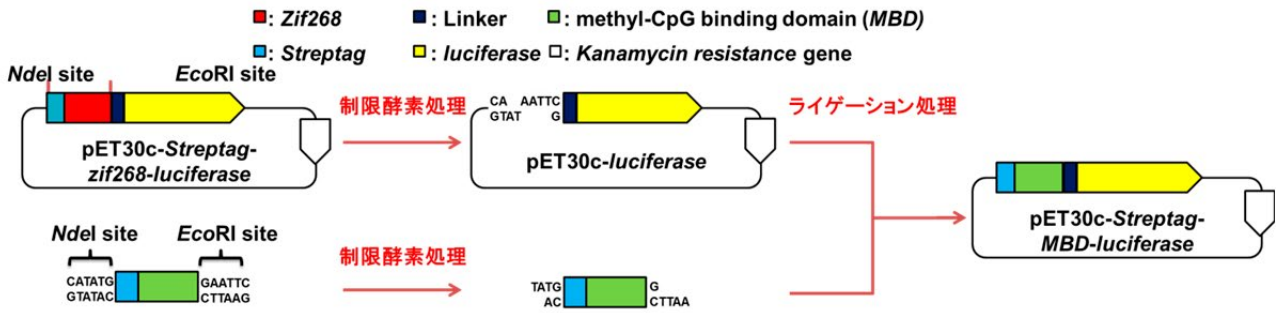


図2　*MBD-luciferaseiferase* 遺伝子発現ベクター構築方法

[DE3]を 1.5mL Lysogeny Broth (LB)液体培地(pH7.2、20 ug/mL Kanamycin (Wako))の中に入れ、振盪培養(37°C、16h、180r.p.m.)を行った。培養したサンプル全量に 150mL LB 液体培地(pH 7.2、20 ug/mL Kanamycin)を加え、振盪培養(37°C、180 r.p.m.)を行い、OD_{600}値が 0.7 の時に、0.5 mM IPTG (Wako)を加え、振盪培養(20°C、16 h、140 r.p.m.)を行った。培養後、50mL の遠心管 4 つに培養したサンプルを約 35 mL ずつ入れ、集菌を行った。まず 0.85% NaCl を加えて重さをすべて合わせ、遠心分離(4°C、10 min、2500×g)した。上澄みを取り除き、0.85% NaCl を加えて重さをすべて合わせ、遠心分離(4°C、10min、2500×g)を行った。この操作をもう一度行った。その後、上澄みを取り除き、0.85% NaCl を加えて 25 mL にし、遠心分離(4°C、10 min、2500×g)を行った。最後に上澄みを取り除き、集菌サンプルを-80°C で保存した。

-80°C で保存した集菌サンプルに 1g の沈殿物あたり 5mL の BugBuster® Protein Extraction Reagent (Millipore)を加えて懸濁し、ローテーター(5 r.p.m.)を用いてインキュベート(37°C、5min)した。その後、遠心分離(4°C、20min、16000×g)を行うことによって、水溶性画分を調整した。また、不溶性画分は 1%sodium dodecyl sulfate (Wako)で可溶化した。

得られた水溶性画分は 1×PBS (Thermo Fisher Scientific)を加えて 10 倍希釈した後、0.45 μm フィルター(Millipore)でろ過した。ろ過したサンプルから Strep-Tactin® Superflow カラム(Qiagen)を用いて MBD-luciferase を精製した。具体的な操作方法は、Buffer NP (50 mM NaH_2PO_4、300 mM NaCl、pH 8.0)で平衡化した Strep-Tactin® Superflow カラム(Qiagen)に 10mL ろ過したサンプルを充填した(流速 1mL/min)。次に、10mLBuffer NP (50 mM NaH_2PO_4、300 mM NaCl、pH 8.0)で洗浄した(流速 1 mL/min)。最後に、10 mL Buffer NPD (50 mM NaH_2PO_4、300 mM NaCl、10 mM desthiobiotin、pH 8.0)で溶出した(流速 1mL/min)。全ての操作で各画分は 1mL ずつ回収した。

各精製段階の画分の luciferase 活性を検討した。具体的には、各画分の 10 μL に対して、luciferase の基質である 100 μL Pica Gene (Toyo Ink)を混合し、マイクロプレートリーダー(Spark 10M、Tecan)を用いて luciferase 活性測定を行った。次に、不溶性画分を可溶化したサンプルと各精製段階の画分を 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Tefco)で蛋白質の発現を確認した。具体的には、500mL Running Buffer (30mM Tris base (Nacali Tesque)、30 mM BES (Dojindo)、0.1% SDS (Wako))を調整した後、200mL Antioxidant mixture (0.05% Sodium Thiosulfata Pentahydrate (Wako)、0.025% N, N-Dimethyl formamide (Wako)、Up to 200 mL with Running Buffer)を調整した。また、Loading buffer (200μL Tris BES sample buffer (TEFCO)、1.85 mg DTT (Wako)、10μL ß-Mercaptoethanal (Sigma Aldrich))を調整後、Loading サンプル(7μL 各画分、7μL Loading

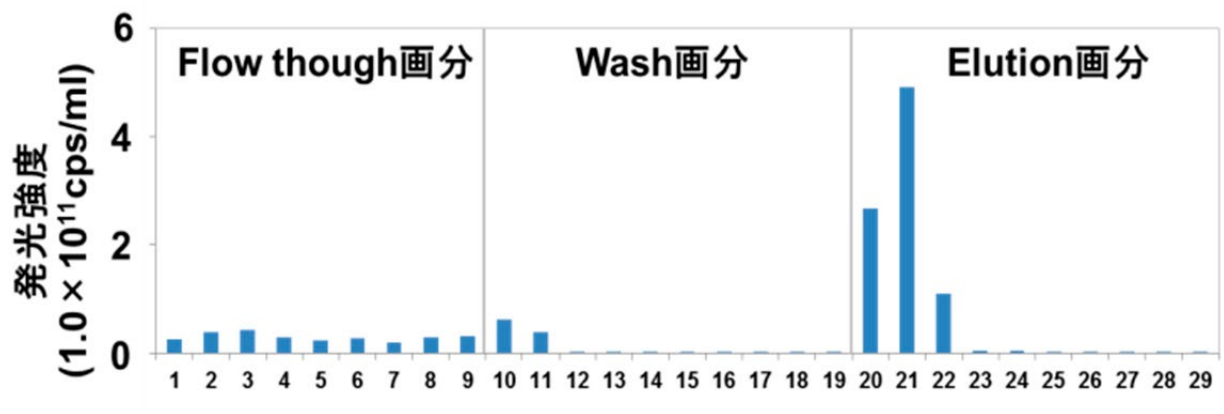


図3　MBD-luc の精製における各画分の luciferase の活性

Flow though 画分(1～9)、Wash 画分(10～19)、Elution 画分(20～29)の luciferase 活性を測定した。

buffer)と Loading marker(12μL marker (APRO)、12μL Loading buffer)を調整した。次に、電気泳動層に 12% SDS-PAGE をセットし、外側の層に 300 mL Running Buffer および内側の層に 200 mL Antioxidant mixture を入れた。各 well に調整した Loading サンプルと Loading marker を 10 μL ずつアプライし、電気泳動を行った(40 mA、165 V)。電気泳動後、20mLCBB 染色液(Bio Craft)にゲルを入れ、シーソーシェーカー(30r.p.m.)で振盪しながら染色した(60min)。脱染色するために MQ を用いて余分な CBB 染色液を取り除いた。その後、蛋白質発現の解析を行った。最後に、DC™ protein assay kit(Bio-Rad)のスタンダードアッセイ法に従って、マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)を用いて各画分の蛋白質濃度を測定した。

2.3　メチル化 DNA 検出方法の検討

20-bp のビオチン修飾されたメチル化または非メチル化 2 本鎖 DNA(Top:5'-Biotin-AAAAAACAGGATXGACGACGTACCCT-3'(X=methylated cytosine),Bottom:5'-AGGGTACGTCGTXGATCCTG-3'(X=methylated cytosine))を合成した(Tsukuba Oligo Service)。各 2 本鎖 DNA (250pmol)をそれぞれストレプトアビジン修飾 96well プレート(Tefco)に結合させた(30r.p.m、室温、30min)。その後、各 Well に入っている反応液を除去した。洗浄液(PBS、0.05% Tween)を 200μL 加えた後、洗浄液を除去した。この洗浄の操作を 5 回行った後、biotin 水溶液(PBS、500pmol biotin)を入れ、各 well をブロッキングした(30 r.p.m.、室温、30 min)。その後、洗浄液(PBS、0.05% Tween)を用いて、上記と同様の操作で洗浄を 3 回行った。各 well に 34nM MBD-luciferase を加え 30 分室温でインキュベートした。その後、洗浄液(PBS、0.05% Tween)を用いて、上記と同様の操作で洗浄を 3 回行った。最後に、100μL Pica Gene (Toyo Ink)を混合し、マイクロプレートリーダー(Spark 10M、Tecan)を用いて luciferase 活性測定を行った。

3．結果

3.1　*MBD-luciferase* 発現ベクターの構築

MBD 遺伝子発現ベクター(pGEX-2TX-*MBD*)を鋳型に *MBD* 遺伝子を PCR 増幅した結果、目的の大きさの PCR 産物を得ることができた。また、pET30c-*Streptag-Zif268-luciferase* を *Nde*I と *Eco*RI で切断し、制限酵素処理産物を電気泳動で解析した結果、目的の位置で切断されていることが確認できた。そこで、制限酵素処理した PCR 産物とベクターをライゲーションした。シークエンス解析の結果 MBD-luciferase 発現ベクター(pET30c-*Streptag-MBD-luciferaseiferase*)

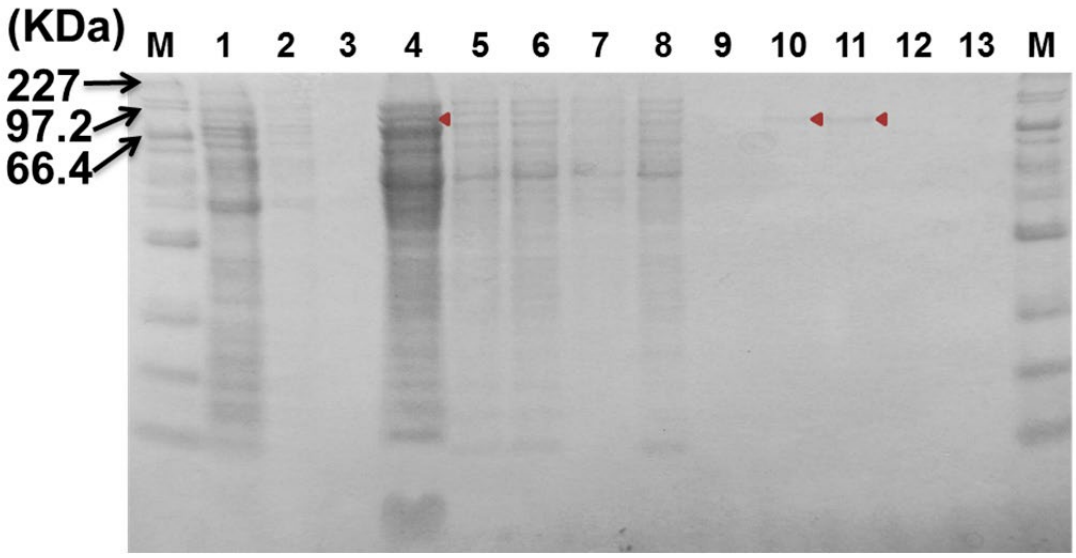


図4　精製した MBD-luciferase (71 kDa)**の** SDS-PAGE **解析**

M: **蛋白質マーカー**; 1: **不溶性画分**; 2: **不溶性画分**(10 **倍希釈サンプル**); 3: **不溶性画分**(100 **倍希釈サンプル**); 4: **水溶性画分**; 5: **水溶性画分**(10 **倍希釈サンプル**); 6:**フィルターろ過後水溶性画分**; 7: Flow though **画分**#9; 8: Wash **画分**#10; 9: Wash **画分**#19; 10: Elution **画分**#20; 11: Elution **画分**#21; 12: Elution **画分**#22; 13: Elution **画分**#23.

が構築できたことを確認した。

3.2　MBD-luciferase **の組換え生産**

MBD-luciferase 遺伝子発現ベクターを用いて、*E. coli* BL21 (DE3)を形質転換し、IPTG を用いて、MBD-luciferase の発現誘導を行った。IPTG を用いて培養を行った結果、培養液 150mL あたり約 1.26 g の湿菌体が得られた。湿菌体を破砕し、水溶性画分を調製後、Strep-Tactin が固定化されたカラムを用いて、ストレプトタグが付加されている MBD-luciferase を精製した。各画分の luciferase の活性測定、SDS-PAGE 解析、及び蛋白質濃度測定を行った。各精製段階での luciferase 活性を測定した結果を図 3 に示す。Flow through 画分 9 では luciferase の活性は約 3.0×10^{10} cps/mL であった。洗浄画分の Wash 1 で、6.2×10^{10} cps/mL であったが、wash 10 では luciferase 活性は 5.8×10^{8} cps/mL 程度にまで低下した。一方、溶出画分の Elution2 で luciferase 活性は 4.9×10^{11} cps/mL であり、Elution 3～10 にかけて luciferase 活性は下がっていった。つまり、Flow through から洗浄画分にかけて、カラムに MBD-luciferase が結合し、溶出画分で MBD-luciferase が溶出できたことが示された。SDS-PAGE の結果(図４)、溶出画分で luciferase 活性か高かった Elution2 で目的の位置(71 kDa)にシングルバンドが観察された。luciferase 活性が 1 番高い Elution 2 のタンパク質濃度は 0.2 mg/mL であった。これらの結果から、精製段階で luciferase 活性能は、保持されていることが示された。また、溶出画分で目的の MBD-luciferase が精製されたことが示された。

3.3　メチル化 DNA **検出方法の検討**

ビオチン修飾メチル化 2 本鎖 DNA または、ビオチン修飾非メチル化 2 本鎖 DNA を固定したプレートを調整し、そこに MBD-luciferase を加え、インキュベートした。各 well を洗浄後、luciferase の発光基質を混合し、マイクロプレートリーダーを用いて luciferase による発光強度を測定した。

その結果、非メチル化 DNA を固定化したプレートと比較して、メチル化 DNA を固定したプレートでは 3.8 倍高い発光強度が観察された(図５)。つまり、MBD-luciferase を用いることにより、メチル化二本鎖 DNA を迅速に測定できることが示された。以上の結果より、MBD-luciferase を用いることによりゲノム全体のメチル化レベルを簡便に測定できることが示唆された。

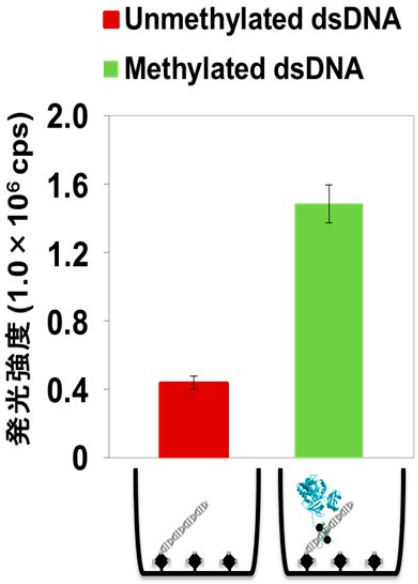


図5　MBD-luciferase を用いたメチル化２本鎖 DNA 検出結果
赤: 非メチル化二本鎖 DNA; **緑: メチル化二本鎖** DNA (n=4±SD).

４．まとめ

本研究ではがんのバイオマーカーであるゲノム全体のメチル化レベルを簡便に測定する方法を開発することを目的とした。まず *MBD-luciferase* 発現ベクターを構築し、*E. coli* BL21(DE3)を用いて MBD-luciferase を組換え生産した。組換え生産した MBD-luciferase は Strep-Tactin 固定化カラムを用いることのより精製することができた。精製した MBD-luciferase はメチル化二本鎖 DNA 結合能と luciferase 活性を保持しており、MBD-luciferase を用いることにより簡便に二本鎖中のメチル化 DNA を検出できることを示した。以上結果より、ゲノム全体のメチル化レベルを MBD-luciferase を用いることにより簡便に測定できることが示唆された。

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研究助成により行われました。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

1) Chen, T., Li, E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 301: 179-201. 2006
2) Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., Jeltsch, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem.* 12: 206-222. 2011
3) Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16:6-21. 2002
4) Daura-Oller, E., Cabre, M., Montero, M. A., Paternain, J. L., Romeu, A. Specific gene hypomethylation and cancer: New insights into coding region feature trends. *Bioinformation* 3: 340-343. 2009
5) Taby, R., Issa, J. P. Cancer Epigenetics. *Ca-Cancer J. Clin.* 60: 376-392. 2010
6) Toraño, E. G., Petrus, S., Fernandez, A. F., Fraga, M. F. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50: 1733-1742. 2012
7) Kremer, D., Metzger, S., Kolb-Bachofen, V. Quantitative measurement of genome-wide DNA methylation by a reliable and cost-efficient enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Anal. Biochem.* 422:

74-78. 2012

8) Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Jee, J., Ikegami, T., Nakao, M., Shirakawa, M. Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell* 105: 487-497. 2001

9) Hiraoka, D., Yoshida, W., Abe, K., Wakeda, H., Hata, K., Ikebukuro, K. Development of a method to measure DNA methylation levels by using methyl CpG-binding protein and luciferase-fused zinc finger protein. *Anal Chem.* 84: 8259-82646. 2012

10) Yoshida, W., Kezuka, A., Abe, K., Wakeda, H., Nakabayashi, K., Hata, K., Ikebukuro, K. Detection of histone modification by chromatin immunoprecipitation combined zinc finger luciferase-based bioluminescence resonance energy transfer assay. *Anal Chem.* 85: 6485-6490. 2013

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



研究責任者　国立循環器病研究センター研究所
再生医療部
上級研究員　　大　谷　健太郎

１．はじめに

造影超音波法は、肺の毛細血管をも通過可能な直径数μm の微小気泡を静脈内投与し、血流トレーサとして利用する非侵襲的な造影検査法であり、理論的には全身の末梢微小循環の非侵襲的評価が可能である。近年、微小気泡を単に血流トレーサとして用いるだけでなく、表面に生体内抗原に特異的な抗体やペプチド・タンパクを化学的に結合させ(分子標的気泡)、炎症性血管病変や血栓、動脈硬化巣、新生血管等に特異的に集積させることによる、造影超音波法を利用した分子イメージングの開発が進んでいる[1)]。

これまでに様々な分子標的気泡が基礎研究において開発されており、近年その一部は治験へと進行中であるが、現時点で臨床応用可能なものは皆無に等しい。造影超音波法による分子イメージングの普及には、何よりも臨床応用可能な分子標的気泡の開発が必要不可欠である。また、通常分子標的気泡作製時には洗浄・遠心分離操作が行われるが、実際の臨床現場においてこれらの操作を行う事は困難であり、より簡便かつ手順が少ない分子標的気泡の作製法の開発が望まれる。

我々はこれまでに、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤 Sonazoid を基盤とした分子標的気泡作製の可能性について検討を行ってきた[2)、3)]。しかし、使用した試薬の生物学的安全性や気泡の品質安定性に問題があり、現時点で直ぐに臨床応用することは難しい。ところが先般、これらの問題点を克服する方法として、生体内タンパク MFG-E8 (Lactadherin)を用いる事で RGD (Arg-Gly-Asp)配列を Sonazoid 表面に付与できる事を見出し、Sonazoid-lactadherin 複合体のインテグリンαvβ3 に対する分子標的性を in vitro 実験により明らかにした[4)、5)]。

一方、近年 RGD 配列が糖タンパク GPIIb/IIIa に対しても特異的に結合する特性を利用した、RGD 含有ペプチドを用いた新鮮血栓に対する分子イメージングの開発が核医学の領域で進められている。

本研究では、Sonazoid-lactadherin 複合体を用いた超音波分子イメージングの臨床応用を見据え、①混合するだけで Sonazoid-lactadherin 複合体の作製が可能な簡便な作製法の確立および②in vitro/in vivo 実験系を用いた Sonazoid-lactadherin 複合体の新生血管(腫瘍血管)および新鮮血栓に対する分子標的性の評価を目的として検討を行った。

２．内容

2.1　簡便な Sonazoid-lactadherin 複合体作製法の開発

混合するだけで Sonazoid-lactadherin 複合体が作製可能な、簡便な作製法を確立するために、Sonazoid と Lactadherin の最適な混合比率の算出を試みた。Alexa488 にて蛍光標識した Lactadherin と Sonazoid (10μL)を 10 分間室温で反応させた後、FACSCalibur(BD)による計測および FlowJo を用いた解析により、Sonazoid の蛍光強度および Sonazoid の蛍光標識率を算出した。

2.2　新生血管に対する分子標的性の評価

Sonazoid-lactadherin 複合体の新生血管に対する分子標的性について、担癌モデルマウスを用いて検討を行った。4 週齢の雄性ヌードマウスの右腹部皮下にヒト卵巣腺腫細胞(SK-OV-3)細胞を 5×10^6 個移植し、移植 8 日あるいは 9 日目に造影超音波法による評価を行った。腫瘍組織の長軸像を診断用超音波装置 Aplio80(東芝)の PLT-1202s プローブにて描出し、造影剤投与前(Baseline)の画像を音圧 Mechanical index 0.4 (AP 9%)、フレームレート 1/sec にて撮像した。視野深度は 1cm とし、焦点位置は腫瘍組織の中心からやや深部に設定した。Baseline 画像の取得後、超音波照射を停止し、右頸静脈に留置したカテーテルより Sonazoid あるいは Sonazoid- lactadherin 複合体を 5×10^6 個(/100μL)投与した。造影剤投与 10 分後に超音波照射を再開し、造影画像を 3 枚取得した(10 minutes)。最後に、高音圧超音波照射(AP 100%)にて新生血管に接着した微小気泡を崩壊させた後に、血管内を浮遊する微小気泡のみの撮像を行った(After destruction)。Sonazoid と Sonazoid-lactadherin 複合体の投与順はランダムに行った。画像輝度解析には ImageJ を用い、10 mintes と After destruction の輝度差(ΔVI)を Sonazoid と Sonazoid- lactadherin 複合体群で比較検討した。組織学的評価として、腫瘍組織内における新生血管を、CD31 に対する免疫染色により確認した。

2.3　ヒト新鮮血栓に対する分子標的性の評価

健常人より採取した全血を 37℃で 2 時間放置し、血液凝固を惹起した。形成された血餅と Sonazoid あるいは Sonazoid-lactadherin 複合体(6×10^6 個)をマイクロプレート内で 15 分間反応させた。生理食塩水にて血餅に接着していない気泡を洗浄除去し、血餅を超音波診断装置 Aplio80 にて画像化した。撮像条件は担癌モデルマウスと同様に、音圧 Mechanical index 0.4 (AP 9%)、フレームレート 1/sec とした。最後に、作製した血餅内における Sonazoid-lactadherin 複合体の標的分子 GPIIb/IIIa (CD41/CD61)の発現を、CD41 に対する免疫染色により確認した。

2.4　マウス頸動脈血栓モデルを用いた分子標的性の評価

Sonazoid-lactadherin 複合体の新鮮血栓に対する分子標的性を検証するための in vivo 実験系として、マウス頸動脈血栓モデルの確立を行った。実体顕微鏡下にて C57BL/6j マウスの右頸動脈を周囲組織より剥離し、パラフィルム(4mm×5mm)及びろ紙(3mm×4mm)を頸動脈下に潜らせた。ろ紙に 6%塩化鉄(III)溶液を 4μL 浸透させ、3 分間頸動脈と反応させた。ろ紙を回収後、頸動脈を生理食塩水で洗浄し、30 分後に頸動脈を摘出した。形成された血栓内における Sonazoid-lactadherin 複合体の標的分子 GPIIb/IIIa の発現を CD41 に対する免疫染色により検討した。

次に、腫瘍組織と同様に、直径わずか 0.4mm 程度のマウス頸動脈においても超音波分子イメージングが施行可能か否かを検証するため、造影超音波法を用いてマウス頸動脈血流が評価可能か否か検討を行った。雄性 C57BL/6j マウス(日本エスエルシー)の右大腿静脈に挿入したカテーテルより Sonazoid を静脈内投与し、頸動脈が鮮明に描出されるか否かについて、診断用超音波装置 Aplio80 の PLT-1202s プローブを用いて検討を行った。音圧は上述の動物実験と同様に、Mechanical

index 0.4 (AP 9%)、視野深度は 1cm、焦点位置は頸動脈のやや深部に設定した。

３．成果

3.1　簡便な Sonazoid-lactadherin 複合体作製法の開発

Sonazoid (10μL) と混合する Alexa488 標識 Lactadherin の量を増加させることにより、Sonazoid から得られる蛍光強度は有意に上昇した（図１）。一方、Sonazoid の蛍光標識率は Lactadherin 添加量を 1μg から 10μg へ増量しても、大きな変化は認めなかった（図２）。これらの結果から、我々は Sonazoid 10μL に対し、Lactadherin 1μg を添加することで、余剰の Lactadherin の除去が不必要な、ひいては洗浄・遠心分離操作を省略した分子標的気泡の作製が可能ではないかと仮説を立てた。そこで次に、Sonazoid 10μL と Lactadherin 1μg の混合後、従来通りの洗浄・遠心分離操作の有無によって Sonazoid からの蛍光信号や Sonazoid の蛍光標識率に違いが認められるか否かについて検討を行った。その結果、Sonazoid 10μL に Lactadherin 1μg を添加する系では、洗浄・遠心分離操作を省略しても従来法と同等の Sonazoid-lactadherin 複合体の作製が可能であることが明らかとなった（図３）。

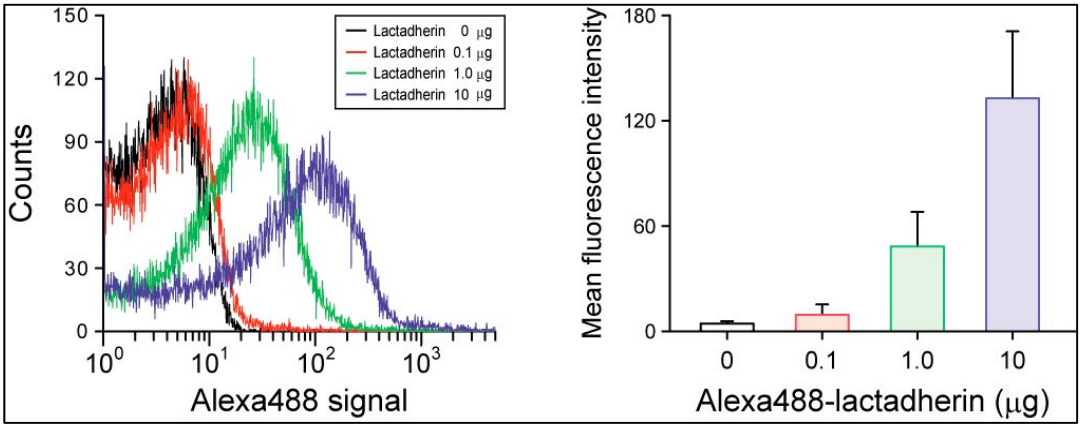


図1　Alexa488 標識 Lachadherin の添加量に依存した Sonazoid からの蛍光強度の変化

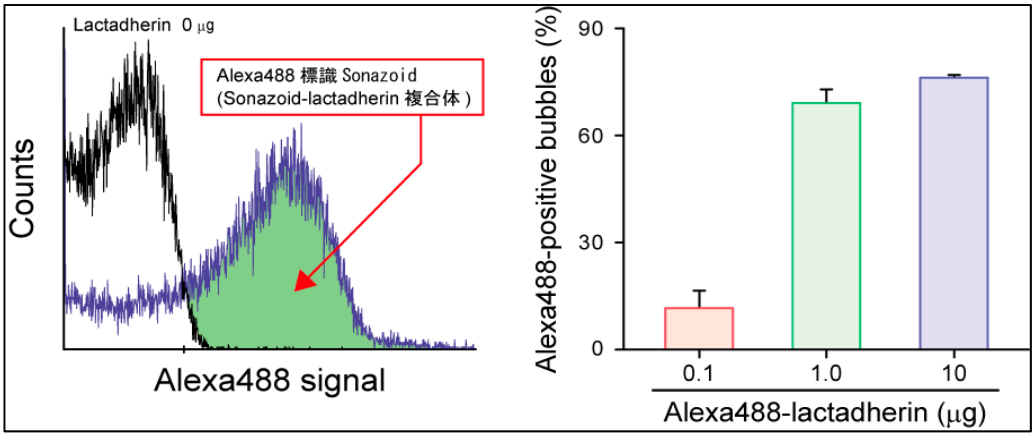


図2　Alexa488 標識 Lactadherin の添加量の違いによる Sonazoid の Alexa488 標識率の変化

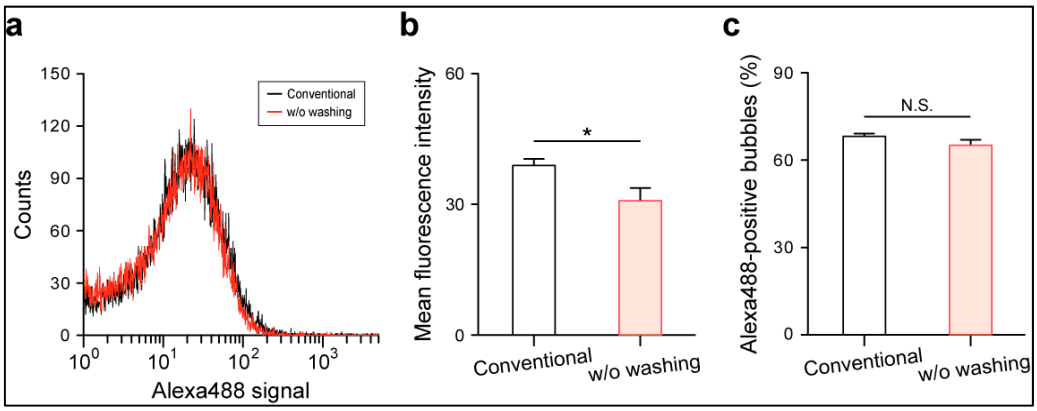


図3　洗浄･遠心分離操作の有無による Sonazoid-lactadherin 複合体の比較

3.2　新生血管に対する分子標的性の評価

担癌マウスにおける超音波分子イメージングの代表例を図４a に示す。Baseline および高音圧超音波照射による気泡崩壊後(After destruction)の輝度は Sonazoid 投与群と Sonazoid-lactadherin 複合体投与群で差を認めなかった（図４a, ４b)。しかし、造影剤投与 10 分後の輝度は Sonazoid-lactadherin 複合体投与群で有意に高く(n=7)、その結果ΔVI は Sonazoid-lactadherin 複合体投与群で有意に高値となった（図４c)。この事から、Lactadherin 修飾が Sonazoid の腫瘍血管への集積を亢進する事、ひいては Sonazoid-lactadherin 複合体の新生血管に対する分子標的気泡としての有用性が示唆された。最後に、SK-OV-3 腫瘍組織内における新生血管を CD31 に対する免疫染色にて評価したところ、移植７日目の腫瘍組織においても数多くの新生血管が確認できた（図５）。

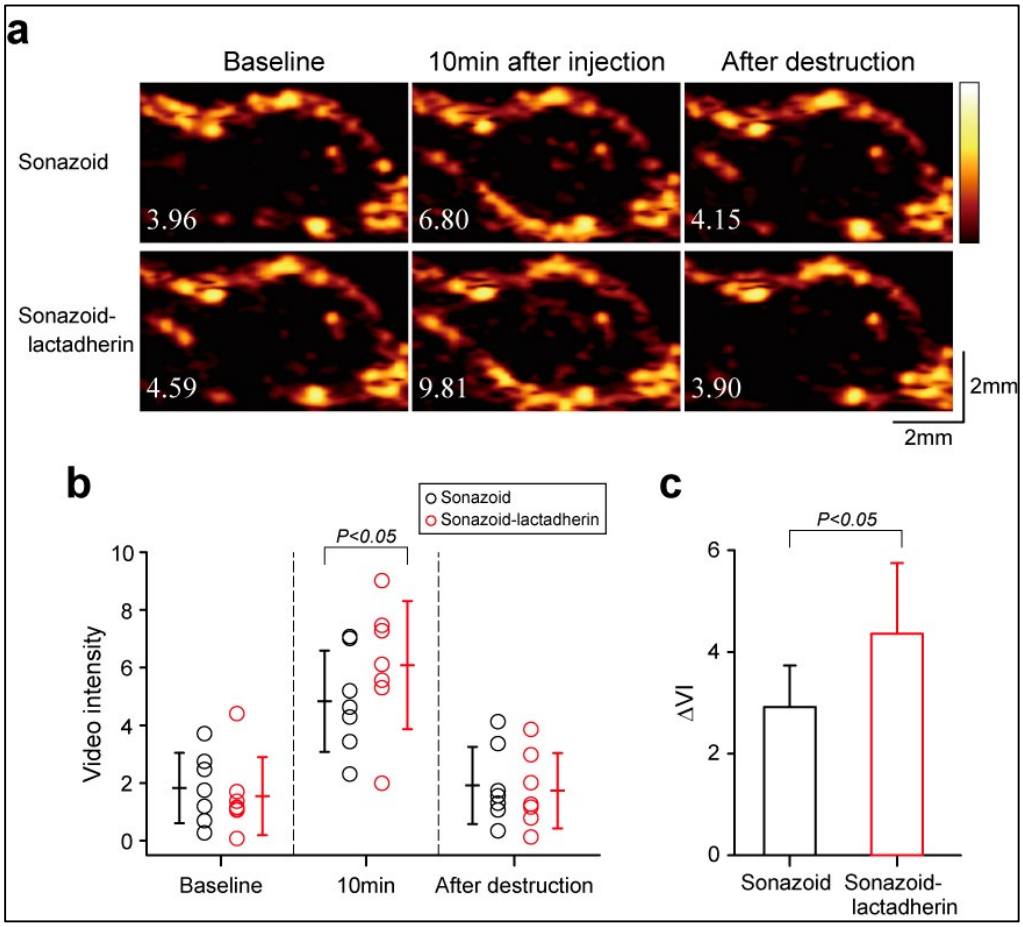


図4　担癌マウスを用いた Sonazoid-lactadherin 複合体の分子標的性の検討

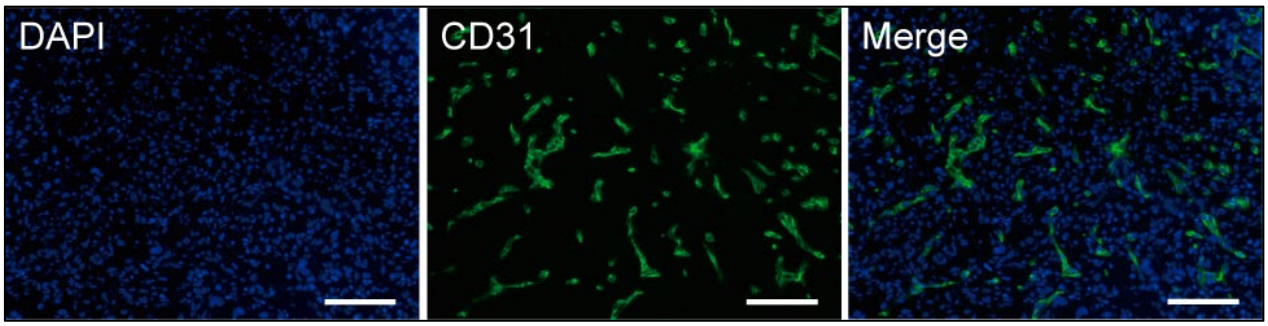


図5　SK-OV-3 腫瘍組織における新生血管の分布

3.3　ヒト新鮮血栓に対する分子標的性の評価

ヒト新鮮血栓(血餅)と Sonazoid/Sonazoid-lactadherin 複合体の接着性について検討を行ったが、血餅に対する Sonazoid の非特異的な接着が予想以上に多く（図６a）、Sonazoid と Sonazoid-lactadherin 複合体の群間での違いを検討するには、実験系を見直す必要があることが明らかとなった。非特異的な接着が多く認められた理由としては、①マイクロプレート内での反応時に血餅の下敷きとなった気泡の影響、②過量な気泡の添加など、いくつか考えられるため、今後これらの点を改善した実験系により再度検討を行う予定である。一方、ヒト血餅内の GPIIb/IIIa の発現については、CD41 に対する免疫染色にて確認することができた（図６b）。

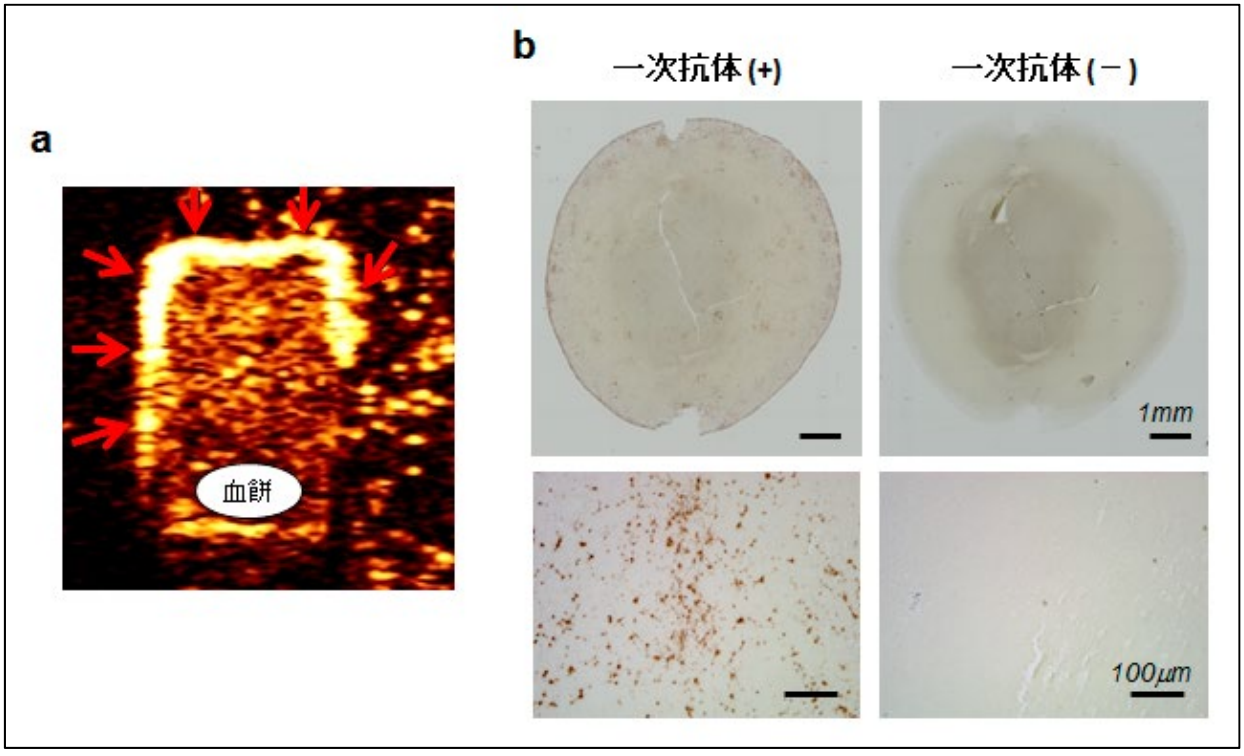


図6　ヒト血餅を用いた分子標的性の検討

3.4　マウス頸動脈血栓モデルを用いた分子標的性の評価

6%塩化鉄(III)を 3 分間マウス頸動脈に反応させることにより、反応後 30 分で頸動脈血流を遮断し得るほど巨大な血栓の作製が可能であった。また、形成された血栓には Sonazoid- lactadherin 複合体の標的分子である GPIIb/IIIa(CD41)の発現が認められた（図７ａ）。

次に、直径わずか 0.4mm 程度のマウス頸動脈においても造影超音波画像の取得が可能か否か検討したところ、Sonazoid 投与によって明瞭に線状の染影像が確認できた（図 7 b)。

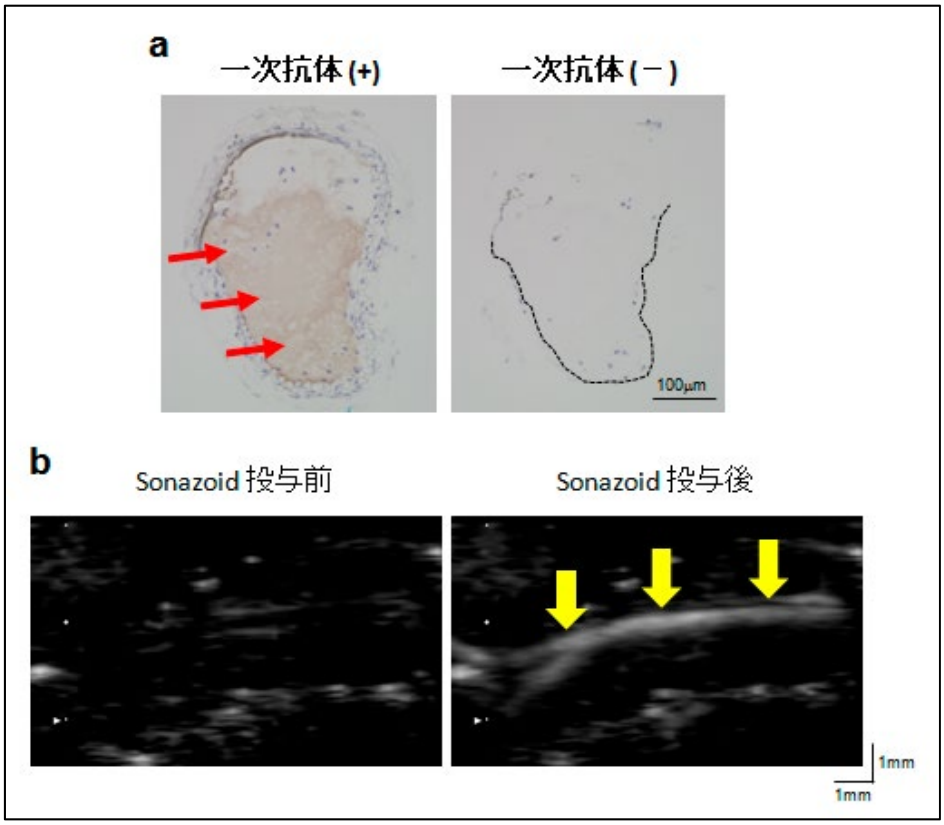


図7　マウス頸動脈血栓モデルを用いた分子標的性の検討

４．まとめ

本研究により、分子標的気泡作製において従来必須であった洗浄・遠心分離操作を用いることなく、本邦で臨床使用されている超音波造影剤 Sonazoid を基盤とした分子標的気泡 (Sonazoid-lactadherin 複合体)の作製法を確立した。また、担癌モデルマウスを用いた検討から、Sonazoid-lactadherin 複合体の新生血管に対する分子標的性を確認した。新鮮血栓に対する Sonazoid-lactadherin 複合体の分子標的性については更なる検討が必要だが、その実験評価系を確立する等、一定の成果を得ることができた。

従来、超音波と微小気泡の併用による細胞内への遺伝子・薬剤導入法(GDS・DDS)の開発が盛んに行われており、我々もこれまでに Sonazoid と超音波の併用による細胞内核酸導入法を確立してきた [6]。近い将来、分子標的気泡を薬剤や核酸で修飾(内包あるいは表面に付与)する技術を開発することにより、体内の特定部位(病巣)に薬剤・核酸搭載型分子標的気泡を集積させ、超音波照射で局所選択的に気泡を破壊し、薬剤や核酸分子を放出・細胞内導入するといった今までにない全く新しい DDS や GDS の開発へとつなげて行きたいと考えている。

謝辞

本研究の実施に際し、研究助成を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致します。

参考文献

1) Kaufmann BA, Lindner JR. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound. **Curr Opin Biotech** 2007;18:11-6.
2) Sontum PC. Physicochemical characteristics of Sonazoid, a new contrast agent for ultrasound

imaging. **Ultrasound Med Biol** 2008;34:824-33.

3) Otani K, Yamahara K. Development of antibody-carrying microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent for targeted molecular imaging: a preliminary chemical study. **Mol Imaging Biol** 2011;13:250-6.
4) Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. **Nature** 2002;417:182-7.
5) Otani K, Yamahara K. Feasibility of lactadherin-bearing clinically available microbubbles as ultrasound contrast agent for angiogenesis. **Mol Imaging Biol** 2013;15:534-41.
6) Otani K, Yamahara K, Ohnishi S, Obata H, Kitamura S, Nagaya N. Nonviral delivery of siRNA into mesenchymal stem cells by a combination of ultrasound and microbubbles. **J Control Release** 2009;133:146-53.

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



研究責任者　大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻細胞動態学領域
助　教　　髙　田　英　昭

１．はじめに

染色体は、すべての真核生物に見られる構造体で、細胞分裂時に、複製された長い DNA を、2 つの娘細胞に均等かつ安全に分配するために必要である。このため、染色体の構造の欠陥は生物にとっては致命的であり、ゲノム情報を正しく伝えることができなくなる。

染色体異常は染色体数の異常と染色体構造の異常に大別される。染色体数の異常としては、21 番染色体が 1 本余分に増えて 3 本となることで生じるダウン症などが挙げられる。染色体構造の異常としては、染色体の一部が他の染色体に移る転座による白血病や流産の増加、染色体の一部が無くなることによる遺伝子の欠損等が挙げられる。こうした染色体異常は、セントロメアやテロメアといった染色体構造の欠陥が原因となる場合が多く、他にも未知の構造異常が疾患に関与している可能性が考えられるため、染色体構造に対する理解を深める必要がある。

我々の研究グループは、これまでに顕微鏡や X 線を用いたアプローチにより、分裂期染色体は DNA がヒストンと呼ばれる塩基性タンパク質に巻きついてできるヌクレオソーム繊維が不規則に折り畳まれて構築されるというモデルを提唱した（図１）[1)~3)]。また、このような、ヌクレオソームの不規則な折り畳みによる DNA の凝縮は、DNA が放射線などから損傷を受けることを防ぐ効果があることが明らかとなった[4)、5)]。このことから、DNA の凝縮状態の変化や染色体構造の変化を捉えるシステムの開発は、疾患のメカニズムを明らかにするに留まらず、構造異常を早期に検出することで疾患の予防にもつながると期待できる。そこで、本研究では最近開発されたゲノム DNA 可視化技術を応用し、生きた細胞内でゲノム DNA をターゲットとして特定の染色体構造を可視化し、染色体異常を検出する技術の確立を行うことを目的とした。

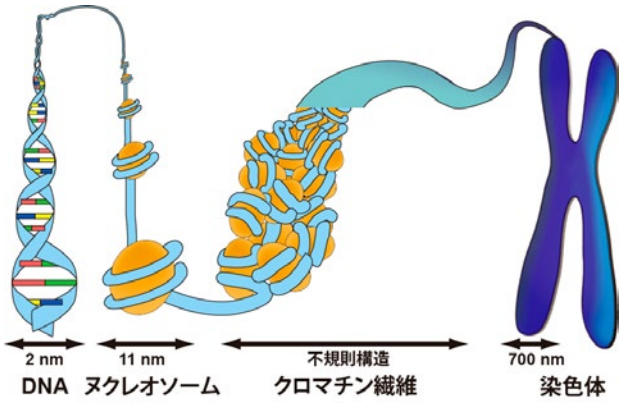


図1　染色体構造のモデル

２．ヒト正常細胞株の核型解析

本研究では、がん細胞と正常細胞を比較することで、がん細胞に特異的な染色体異常を検出する。そこで、まず、正常細胞として用いるテロメラーゼ活性型ヒト網膜色素上皮細胞（hTERT-RPE1 細胞）の核型解析を行った。

2.1　実験材料・方法

hTERT-RPE1 細胞は 10％FBS を含む Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM)を用いて培養した。本細胞株はテロメラーゼを不活性化しているため、正常細胞でありながら分裂回数に制限が無いため、扱いやすいという利点がある。核型分析を行なうため、細胞を分裂期に同調する必要がある。このため、20%コンフルエントで播種した細胞に対し、チミジンを最終濃度が 5 mM になるように DMEM (+10% FBS)に添加し、16 時間培養することで、細胞周期を G1/S 期に同調した。同調した細胞を 2 回 Phosphate buffered saline (PBS)で洗浄を行った後、DMEM (+10% FBS)を加えて 6 時間の培養を行なった。その後、再びチミジンを最終濃度が 5 mM になるように添加し、16 時間の培養を行なった。細胞は 2 回 PBS で洗浄を行った後、DMEM (+10% FBS)中で 4 時間培養した。細胞周期を分裂期で停止させるため、nocodazole を最終濃度が 200 ng/mL になるように添加し、さらに 3 時間培養した。

分裂期に同調した hTERT-RPE1 細胞は、shake off により回収し、細胞を PBS で洗浄した後、75 mM KCl による低調処理を 37℃で 15 分間行なった。カルノア液（メタノール:酢酸=3:1）による細胞固定後、細胞を poly-L-lysine でコーティングしたスライドガラス上に展開し、Multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH)による解析を行った。 M-FISH では、ヒトの全染色体を識別可能なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行なうことで、各染色体の識別同定ならびに転座や欠失といった染色体異常を検出することができる。

2.2　結果・考察

hTERT-RPE1 細胞を M-FISH により解析したところ、65%の細胞で 12 番染色体が 2 本の常染色体に加え、一部が欠損した 12 番染色体をさらに 1 本持つトリソミーになっていることが分かった。細胞株の入手である American Type Culture Collection (ATCC)では、このトリソミーについては報告していないため、研究室で継代を重ねる間に生じた変異と考えられる。12 番染色体のトリソミーに加えて、hTERT-RPE1 細胞では X 染色体の 1 本に Telomere Reverse Transcriptase (TERT)に由来する付加配列が存在する。以上のように、hTERT-RPE1 細胞は 2 つの染色体異常を有しているが、他の染色体については FISH で検出できる異常は有しておらず、がん細胞の染色体の比較対象として使用可能であると判断し、以降の実験で用いることにした。

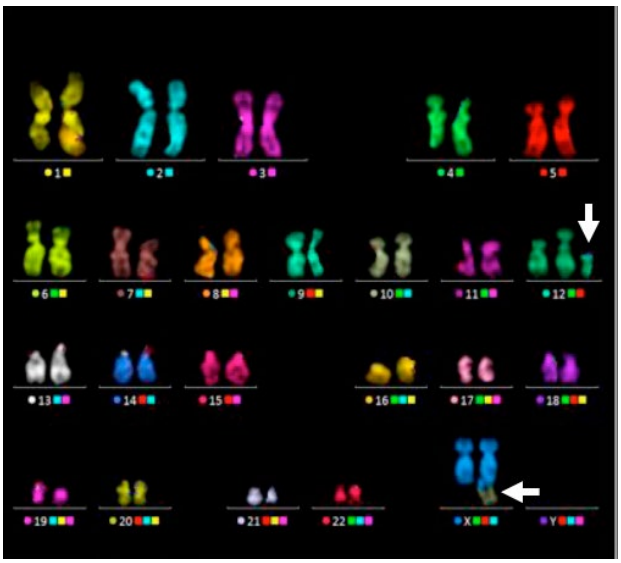


図2　M-FISH で明らかになった hTERT-RPE1 細胞の染色体異常
12 番染色体のトリソミーと X 染色体に付加配列が存在する(矢印)。

３．DNA 可視化に必要なベクターの構築ならびに安定発現細胞株の取得

本研究では染色体構造を観察するために、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas システムを応用した、*in vivo* でゲノム DNA の可視化を行う手法

を用いる[6]。CRISPR/Cas システムで用いる Cas9 蛋白質は、標的ゲノム DNA と相補的な配列を含む guide RNA (gRNA)と複合体を形成する。Cas9 はヌクレアーゼ活性を持ち、gRNA を介して標的配列に結合することで標的配列の DNA を切断する。しかしながら、Cas9 のヌクレアーゼ活性を欠損した変異体を用いることで、Cas9 を標的配列に結合させたままにすることができる。この変異型 Cas9（dCas9）に蛍光蛋白質 EGFP を融合することで、特定のゲノム DNA を可視化することが可能になる。そこで、dCas9-EGFP を安定発現するヒト正常細胞株を作製し、gRNA 発現ベクターを導入することで任意の DNA 配列を簡便に可視化できる系を確立する（図３）。

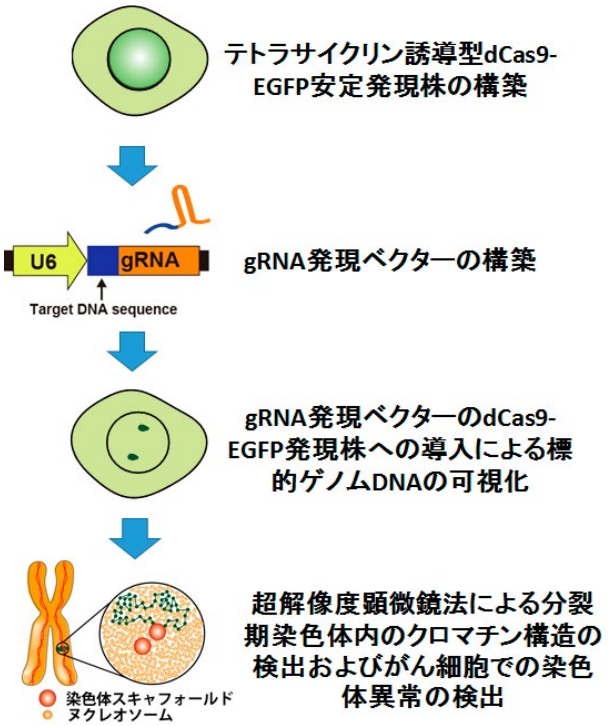


図3　dCas9 を用いた DNA 可視化手順

3.1　実験材料・方法

生細胞でのゲノム DNA の可視化を行うために、ヌクレアーゼ活性欠損変異 Cas9 に EGFP を融合した蛋白質(dCas9-EGFP)の安定発現株を構築する。この dCas9-EGFP がクローニングされたベクター(pSLQ1658)は Addgene 社より購入した。しかしながら、dCas9-EGFP の過剰発現は細胞の成長を阻害する恐れや過剰発現によるバックグラウンドシグナルの増加の恐れがあるため、Clontech 社より Tet-On 3G 発現誘導システムを入手し、テトラサイクリンによる発現誘導が可能なベクターを構築した。pTRE3G を *Eco*RV で切断後、アルカリホスファターゼによる脱リン酸化を行った。また、pSLQ1658 を *Eco*RI と *Nco*I で切断し、インサートである dCas9-EGFP 遺伝子の切り出しを行なった後、T4 DNA ポリメラーゼによる平滑化を行なった。pTRE3G と dCas9-EGFP の平滑末端ライゲーションを行なうことで Tet 応答型 dCas9-EGFP 発現ベクター(pTRE3G -dCas9-EGFP)を構築した。

本研究では、正常細胞として hTERT-RPE1 細胞、染色体異常を示す細胞として HeLa 細胞と HEK293 細胞を用いる。これらの細胞株に pCMV-TET3G をリポフェクションにより導入し、G418 による選抜を行なうことで、Tet 応答因子の安定発現株を構築した（図４）。次に、これらの細胞株に対して、pTRE3G-dCas9-EGFP と puromycin 耐性遺伝子プラスミドをリポフェクションにより導入し、puromycin による選抜を行なった。さらに、得られたコロニーに対して Dox (doxycycline)を終濃度が 100 ng/mL になるように添加し、dCas9-EGFP の発現誘導を蛍光顕微鏡により確認した。

3.2　結果・考察

HeLa 細胞と HEK293 細胞については、Tet 応答因子と、Tet 応答型 dCas9-EGFP の安定発現細胞株を取得できた。Dox 添加から 24 時間後に観察を行なったところ、核内での GFP シグナルが検出できた。GFP シグナルは核小体で強く検出される傾向が見られた（図５）。また、細胞によっては、細胞質からシグナルが観察されるものや、シグナルが観察されないものも存在した。一方、hTERT-RPE1 細胞については安定発現株を取得できなかった。原因としては、hTERT-RPE1 細胞が正常細胞であるため、他の細胞株よりもトラ

ンスフェクション効率が低く、また、ゲノム DNA にベクターが組み込まれ難いことが考えられる。このため、hTERT-RPE1 細胞については、ウイルスベクターを用いた形質転換を行なうことで、安定発現株の取得する予定である。

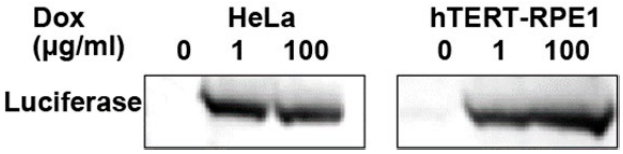


図4 ウェスタンブロッティングによる Dox 添加によるルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導確認

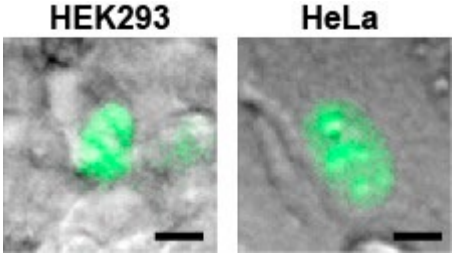


図５ 顕微鏡観察による、Dox 添加による dCas9-EGFP の発現確認
EGFP シグナル（緑）が核内から検出されている。スケールバーは 10μm を示す。

４．gRNA による DNA 配列の可視化

次に、CRISPR/Cas システムを利用して、標的 DNA 配列を検出するために、gRNA の配列の設計を行う必要がある。gRNA の長さは 23 塩基であることから、標的配列がこれより長い場合、複数の gRNA を導入する必要があるが、導入する gRNA の数が多くなればなるほど標的配列全長の可視化は困難になる。そこで、構築したシステムが機能することを確認するために、検出が容易なテロメアリピート配列をターゲットとした。テロメアは染色体腕の末端に位置することから、検出された場所がテロメアかどうかの確認も容易である。さらに、テロメア以外のリピート配列を標的とすることで、染色体内での特定のクロマチン構造の検出も試みる。

4.1 実験材料･方法

設計した gRNA をヒト細胞で発現させるために、Addgene 社より入手可能な gRNA 発現ベクター (Plasmid# 41824)、もしくは pSLQ1651-sgTelomere(F+E)を用いた。後者は、dCas9 を用いた可視化に適した構造を持つ RNA を発現するベクターであり、既にテロメアを標的とする gRNA の配列が導入されている。テロメアを標的とする gRNA の配列として TTAGGGTTAGGGTTAGG を用いた。標的配列を導入した gRNA 発現ベクターを、Tet 応答因子と、Tet 応答型 dCas9-EGFP を発現する HeLa 細胞と HEK293 細胞にリポフェクションによりトランスフェクションした。dCas9-EGFP の局在を蛍光顕微鏡により確認した。

4.2 結果･考察

gRNA を発現させることで、核内全体で検出されていた dCas9-EGFP のシグナルが、強い輝点として観察されるようになった（図６）。これは、gRNA によって、dCas9-EGFP がテロメアに結合したため、テロメア領域の dCas9-EGFP 密度が高くなったためと考えられる。しかしながら、現時点では分裂期染色体における dCas9-EGFP シグナルを検出することができておらず、この輝点がセントロメアに由来するものかどうかを確認するために、テロメアに対するプローブを用いた FISH で検出されるシグナルとの共局在を確認する。

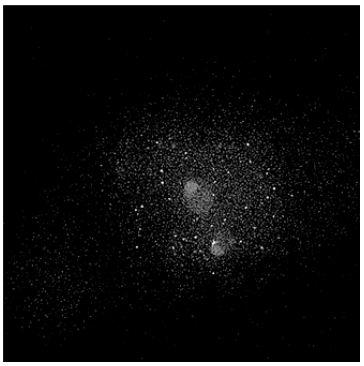


図6 HeLa 細胞での dCas9-EGFP の gRNA によるテロメアへのターゲッティング
EGFP シグナルの輝点が多数核内から検出される。

５．まとめ

本研究により、dCas9 に蛍光蛋白質を結合させることで、ゲノム DNA の特定配列を可視化できる可能性が示された。染色体異常を示す HeLa 細胞と HEK293 細胞については、Tet 応答因子と Tet応答型dCas9-EGFPを安定発現する株が得られているため、標的配列の gRNA 発現ベクターをトランスフェクションするだけでゲノム DNA の標的配列を可視化できる。このため、染色体異常と関連する可能性が高い配列の探索が容易となる。例えば、染色体構造の構築に重要と考えられている、染色体スキャフォールド蛋白質の結合配列を検出することで、染色体異常を示す染色体特有の DNA 配置、あるいはクロマチン構造の検出につながると期待している。

謝辞

本研究の一部は、中谷医工計測技術振興財団の平成 26 年度技術開発研究助成のもとに行なわれました。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

1) Nishino,Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., Takahashi, Y., Hihara, S., Frangakis A.S., Imamoto, N., Ishikawa, T., and Maeshima, K. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 31, 1644-1653. (2012)
2) Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., and Maeshima, K. Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. *Nucleus* 3, 404-410. (2012)
3) 前島一博, 城地保昌, 西野吉則, 髙田英昭, 鎌田福美, 日原さえら. ヒトゲノム DNA の不規則で柔軟な収納原理. *生物物理* 53, 4-10. (2013)
4) Takata, H.*, Hanafusa, T., Mori, T., Shimura, M., Iida, Y., Ishikawa, K., Yoshikawa, K., Yoshikawa, Y., and Maeshima, K. Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage. *PLoS One* 8, e75622. (2013)
5) 髙田英昭, 前島一博. クロマチンの凝縮が生み出す放射線耐性. *Isotope News* 719, 2-6. (2014)
6) Chen, B., Gilbert, L.A., Cimini, B.A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.W., Park, J., Blackburn, E.H., Weissman, J.S., Qi, L.S., Huang, B. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 155, 1479-1491. (2013)

技 術 交 流 助 成 成 果 報 告

１．海外派遣

新潟大学大学院 自然科学研究科　木竜　徹 ―― 159
新潟工科大学 工学部　伊藤　健一 ―― 166
豊橋技術科学大学大学院 工学研究科　龍　進吾 ―― 168
甲南大学 フロンティアサイエンス学部　臼井　健二 ―― 170
慶應義塾大学大学院 理工学研究科　吉田　光輝 ―― 173
徳島大学大学院 医歯薬学研究部　林　裕晃 ―― 176
北海道大学大学院 医学研究科　浜田　俊幸 ―― 178
豊橋技術科学大学大学院 工学研究科　近藤　泰成 ―― 182
東京農工大学大学院 工学府　鈴木　南羽 ―― 184
東京農工大学大学院 工学府　空田　明日香 ―― 186
大阪大学大学院 医学系研究科　上村　圭亮 ―― 188
東京大学 IRT 研究機構　Nguyen Thanh Vinh ―― 190
大阪大学大学院 工学研究科　皿上　順英 ―― 193
大阪大学大学院 工学研究科　小林　美菜 ―― 196
東京農工大学大学院 工学府　平谷　萌恵 ―― 199
徳島大学大学院 保健科学教育部　紀本 夏実 ―― 202
京都府立医科大学大学院 医学研究科　熊本　康昭 ―― 204
京都大学大学院 工学研究科　藤本 和也 ―― 206
東京大学大学院 情報理工学系研究科　岡谷 泰佑 ―― 208
東京大学大学院 情報理工学系研究科　松田 信彦 ―― 211
慶応義塾大学大学院 理工学研究科　佐藤　龍 ―― 214
東京大学大学院 情報理工学系研究科　海保　実則 ―― 217

２．日本招聘

東京大学大学院 教育学研究科　山本　義春 ―― 219
自治医科大学 医学部　相澤　健一 ―― 222

３．海外研修

群馬大学大学院 医学系研究科　三輪　秀樹 ―――― 226
東京大学大学院　医学系研究科　大黒　達也 ―――― 229
東京農工大学大学院 工学府　李　鎭熙 ―――― 231
東京大学大学院 新領域創成科学研究科　磯村　拓哉 ―――― 235
横浜国立大学大学院 工学府　榎本　詢子 ―――― 238
京都大学大学院 工学研究科　牧　功一郎 ―――― 241
広島市立大学大学院 情報科学研究科　釘宮　章光 ―――― 243

４．海外留学

豊橋技術科学大学大学院 工学研究科　永井　萌土 ―――― 246

５．日本留学

Tokai University, School of Medicine　Lkhaasuren Nemekhbaatar　（モンゴル） ―――― 249

本成果報告は平成 29 年 3 月までに実施・執筆された技術交流助成の成果報告です。

所属等は助成実施時または執筆された当時のものです。

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



新潟大学大学院　自然科学研究科　電気情報工学専攻

木竜　徹

会議等名称　　第21回 国際電気生理運動学会大会

開 催 地　　Hyatt Regency、Chicago、Illinois、USA

時　　期　　平成 28 年 7 月 5 日～7 月 8 日

１）会議又は集会の概要

電気生理学的運動学の観点から、健康・スポーツ、リハビリテーション、動作解析・制御などの場面で、筋活動機能の計測・評価を探求する。”Bridges to Innovation” をテーマとし、基盤技術に関わる神経筋系の電気生理学的解明（旧 Boston 大学神経筋研究所：Delsys）、 センサや義肢などの研究（Northwestern 大学、 RIC（リハビリテーション研究所）、応用技術に携わる企業（Noraxon, Delays, OT Bioelettonica）から革新的事例の報告があった。企業は大学での研究から生まれ、現在は研究機関としても重要な役割（基盤技術で裏付けられた応用技術開発）を担う迄に成長した：リオオリンピック 2016 開幕のひと月前であった為か、競技スポーツへの活用例を展示していた。誰でも使ってみたくなる場を競技スポーツとし、分野の認識を高めることで販路を拡大しようとする戦略が見られた。これは、必須だが狭い市場へ成果の還元を図る場面で有効と思われる。この際、基盤技術を ubiquitous とし、wireless, wearable, multi-channel センサ開発、計測した場での結果の feedback が実用化された。その結果、これまで局在していた技術を日常に展開する段階となり、”Bridges to Innovation”に位置付ける応用技術の成果が見られた。また、若手研究者の発表に加えて、シニアや女性研究者の参加が目立った：発表は 401 件、 参加者 489 名（US 130、 Canada 57、 Japan 46、 Australia 24、 他）であった。

２）会議の研究テーマとその討論内容

【シンポジウム】日本の電気生理運動学の実際:現状と課題：S, 17, Practical Application of Electrophysiology and Kinesiology, 1:30pm–3:00pm,08-Jul.

1. Application of multi-channel surface EMG technique to researches of aging and life-style diseases.

Q. 海外の研究者：多チャンネル電極による単一筋内での活動の部位差を検証する上で、その妥当性、特にダイナミックな動作での妥当性はどうか？A. 2012 年の我々の研究では多チャンネル電極と共にワイヤ電極を用いて筋電図を記録し、妥当性を確認している。また、対象とする大腿直筋は筋束長が短い羽状筋であるため関節角度の変化などに伴う筋電図への影響が比較的小さい筋であること、また、その

様な変化は筋電図に影響を及ぼしている可能性は十分あるが、大腿直筋で観察される劇的な活動部位差はこのような影響では説明できない。Q. 日本の研究者：高齢者の運動単位発火頻度と最大筋力との関係について、その生理学的意義は？ A. データ提示の方法が好ましくなかったため、私の質問の解釈がうまくいかず、フロアで再討論させていただいた。その結果、「運動単位の発火頻度と高齢者の最大筋力が強い直線関係にあるということは、運動単位の動員数なども関係している可能性がある」という議論に落ち着き、今後は「運動単位の発火頻度」とともに他のパラメータとの関係性も見ていく必要がある。Q. 日本の研究者：若年者と高齢者において、発揮筋力と運動単位発射頻度との関係が異なっている。若年者では両者の相関が低いが高齢者では非常に高く、確か相関係数 r=0. 8 程度かと記憶している。原因は？ A. 高齢者で最大筋力が低いことには運動単位の発射頻度というものが神経学的要因としては関与している。Q. 日本の研究者：発射頻度と筋力の r が高いということは、逆に最大筋力の決定要因は発射頻度ではなく、他の要因にあるということを示しているのではないか？A. もちろん他のファクター、筋量や他の神経学的要因もあるとは考えるが、今回の結果からは発射頻度が関与していると解釈した。Q. 座長：多点電極の有用性についてのコメントは？ A. これまで詳細な運動単位活動を記録するために使用されてきた侵襲的な方法と比べて、非侵襲的にそれらの情報を得ることができるため、高齢者や疾患者など幅広く利用できる点が強みである。C. 座長コメント：発表者は 2016-18 の ISEK 理事に選出された。

2. Rehabilitation robot using muscle activity and neural decoding. Q. 座長：実用化においてどのような問題が考えられるか？ A. 信号源推定による筋活動推定に関して、例えば動作によるアーティファクトの影響が未検証であり、それを今後検証する必要がある。しかしリハビリテーションなど応用の一部においては、この問題が大きくならない可能性がある。C. 座長コメント：リハビリテーションでは、アーティファクトの問題は非常に重要である。A.（現在の多くのリハビリロボットの様に）機器が床などに固定された状態であれば、問題になるような動作アーティファクトは入らない可能性がある。C. 発表者コメント：筋電義手の様に日常で使うことまで含めると、動作アーティファクトの問題はかなり重要になってきますが、運動中の脳波を安定して計測する技術も開発が進んでいる様で、これができれば、実際への応用もさらに広がると考えている。C. 座長コメント：ISEK の日本支部として JSEK があり、今回のシンポジウムを提案し、議論をしている。コメントや質問は？

3. Ubiquitous approach for health and sport. Q. 座長：“いつでも、どこでも”はよく分かったが、“だれでも”を実現する戦略は？ A.「いつでも、どこでも、だれに対しても」健康管理が理想かもしれませんが、「だれにでも」は最も難しい問題だと思います。特別な戦略は立ててない。Q. 発表者 4：パラメータの値によって推定値が変わると思うが、どの様に考えるか？A. パラメータの値によって推定値は、真値との誤差が生じるが、日々の血圧の変化が健康管理には役立つと思うので、少々の誤差は気にしていない。Q. 座長：発表 4. との相違点で強調すべき点をお知らせ下さい。A. 相違点をあえて挙げれば、「座るだけ」という点です。日常生活で普通に使う道具なので、継続的な計測に対する障壁が低いと思う。

4. A Remote and non-contact monitoring system of physiological indices to cope with visually Induced motion sickness. Q. 海外の研究者：この方法は外部の周辺光の影響が大きいと思うがどうか？A. 血圧変動推定に関しては、遠位部と近位部間の脈波伝搬時間差を利用しているため、周辺光の照度の絶対値には依存しない。周辺光が存在して 2 か所の波の形が明確である（雑音が少ない）限り、周辺光の精度への影響は少ない。Q. 座長：発表 2. と同じような目的や方法だと思うが、相違はどん

なところにあるのか？A. 血圧変動の推定には脈波伝搬時間差・心拍数・脈波の立ち上り時間などを入力とする重回帰モデルを用いているところが異なる。重回帰モデルによる血圧の絶対値の推定の例を（新たな図として）示す。推定した時と同じ係数を使ったモデルで、推定時には用いなかった。別のテストデータに対して推定しても、うまく推定できる。しかし、これは最もよかった例であって、他のデータに対して常によいというわけではない。すなわち、カフ式血圧計で 1 度は更生をかけない限り、変動成分は推定できても、絶対値成分は推定が困難だと思われる。C. 座長コメント：自律神経活動を加えたことで、"Bridges to Innovation"での新たな局面と課題が浮かび上がった。

5. Brain-muscle-machine interface: controlling a prosthetic hand. Q. 海外の研究者：マルチモーダルセンシングによる電動義手の制御において、距離センサを用いて把持のタイミングを決定しているが具体的にどの様に決定しているのか？（C. 質問者が遠く、英語による質問が聞き取れなかったため、回答ができなかった。発表後に個別の討論を促した）。Q. 座長：義手研究において日本研究と海外研究における特色の違いは？ また、センサが少ないほうがよいのはコストの問題か？ A. 特に大きな違いはないが、日本の研究では、できるだけ少ないセンサで多くの手指動作を操作可能にする推定手法が多いと感じる。後者は、コストの問題もあるが、多数センサである場合、配線故障や電極接触の問題などロバスト性の問題も大きいと考えている。Q. 海外の研究者：前腕切断者と健常者では、制御に用いる表面筋電位に違いがあるのか？ A. 切断者における筋配置は健常者と異なる場合が多いので表面筋電位は異なるが、機械学習を取り入れており、個人差が吸収可能である様に設計されている。

座長まとめ：ISEK2020 の日本開催に向けて、若手研究者の発表とシニアの研究者の組み合わせでシンポジウムを企画した。日本の参加者の印象：聴衆が少なく（約 20 名）、特に海外の研究者の方が少なかった: 最終日の午後は全体でも参加者が少なかった様に感じたので、プログラム編成に恵まれなかったことの影響か？

【ポスター（一般）発表】自由ビーズ中敷が歩行に与える効果に関する予備調査： Poster Session I. P1-G-73. Feasibility study on effects of free bubble insole for walking. 5:00-6:30pm. 06-Jul。発表：筋シナジーで計測すべき筋、2D 表面電極で貼付位置を決定した。ここでは、足裏刺激はバランス感度を高める期待があり、転倒が危惧される高齢者向けに日常的な足裏刺激で屋外での歩行バランス調整力を高める効果を狙っている。なお、中敷きはマジックテープで取り付けるので取り外し可能である。また、手頃な価格で提供できる。Q. S. 10 で歩行、転倒、バランスでの口頭発表者数名、特に、足裏刺激で皮膚感覚を高める効果のポスター発表者（P2-C-20）から様々な質問があった。素材に関して。Q. ビーズと中敷き内での構造: 散らばる様子は平面か立体か？ビーズ間の間隔はどれ位離れているのか？ など構造への質問。A. ビーズの直径は 2mm で、中敷の体積は一定である。そのため、自由に動けるビーズの密度は異なり、密度の高い場合は裸足に近い結果が得られている。Q. 密度が低い場合の感触は？ A. 多少痛みを感じる。また、バランスを採り難い。Q. メーカーは？ A. 海外に外注している。反省点：試作品でありメーカの許可を受けていないが、持参すべきであった。まとめ。 自由に動くビーズをスリッパの中敷とすることで日常的な足裏刺激が得られ、“確率共振による姿勢制御”を高める効果を期待している。今後、さらに研究を進める価値があると考えている。

【注目した口頭発表】

DELSYS WORKSHOP: 1. Rethinking Research in the Era of Wearable Sensors: Quality of Movement Measurement. 2. Research-grade Instruments and Realities: Era of Wearable Sensors. 3. Using Trigno (EMG and IMU) sensors: Looking at the data behind the skeletal models and its

clinical/practical application. 4. Utilization of dEMG for assessing motor unit action potential morphology: Assessment and intervention strategies：人間を中心とした電気生理運動学での計測・評価をポートフォリオで説明した。MATLAB（行列演算を基礎とする数値計算やシステム関数のシミュレーション)、 Labview（計測データ収集機器設定・制御やそのシミュレーション）などを主たる開発ソフトウエアに位置づけ、高学歴の社員構成と教育の重要性を明示していた。Boston 大学神経筋研究所の成果を引き継いだ先駆的メーカーが電気生理運動学の成果を社会還元しようとする意欲と戦略が印象的であった。

PARALLEL SESSIONS:

S. 6. Stepping out of the lab: EMG in daily life（Northwestern Univ. , RIC）: 1. Fully-Integrated Stretchable Epidermal Electronics and Biosensors. 2. A Wireless Surface EMG System for Daily Activity Measurement. 2. Tattoo-like, long-term electromyography sensors for quantifying muscle fatigue and recovery. 3. EMG-based Online Intent Recognition for a Powered Lower Limb Prosthesis: wireless, wearable センサは表皮や入れ墨の様なものとなり、電磁界による給電を実現し、まさにユビキタスセンサであった。日本は太刀打ちできないレベルか？

S. 10. Neural mechanisms underlying falls and impaired balance: an introspective from animal to patient: 1. Are Hypermetric Stretch Reflexes Significant Contributors to Falls in Stroke Survivors? 3. New rehabilitation tools and technologies to improve balance and mobility. 4. Balance reactions following perturbations to touch are more pronounced when standing on an unstable surface. 5. Basic insights in tripping responses can assist in designing appropriate fall prevention programs. 6. Altered sensorimotor transformations for balance in Parkinson's disease：歩行時のバランスやつまずきへの応答を解析して、転倒予防プログラムの開発を進めている。この際、路面や障害物、そして筋疲労を加えた議論であった：ポスター（一般）発表で質問してきたグループのシンポジウム。

さらに、以下のセッションに参加したが、応用場面の報告であり、課題から派生する innovation と言える程の様な議論は無かった。S. 11. EMG Signal Analysis in Clinical Applications, S. 12. Spastic muscle and its treatment using botulinum toxin: new viewpoints with major implications, S. 13. Prosthetics to Orthotics: Transferable Expertise, S. 14. Clinical applications of muscle synergies, S. 15. Multichannel EMG: decomposition and other applications, S. 16. Mobilizing Data: Research at the Intersection of Data Science and Biomechanics, S. 17. Practical Application of Electrophysiology and Kinesiology. S. 11. EMG Signal Analysis in Clinical Applications,S. 13. Prosthetics to Orthotics: Transferable Expertise, S. 14. Clinical applications of muscle synergies, S. 15. Multichannel EMG: decomposition and other applications, S. 16. Mobilizing Data: Research at the Intersection of Data Science and Biomechanics, S. 17. Practical Application of Electrophysiology and Kinesiology

【注目したポスター発表と討論】

P1-G-74 Mitigating the effect of wrist kinematics on pattern recognition control, RIC：Q. 非線形的なニューラルネットなどを識別に使っているが、通常の線形判別分析で不十分な理由は？表面筋電図計測は十分か？十分な計測・評価が期待できないので、非線形モデルを導入したのか？筋疲労の影響は？ A. 非線形判別が実用的であった。

P2-C-20 The skinny on vibration detection; how to generate skin feedback from the soles of the feet：足裏では固有な触覚刺激の特徴に敏感で姿勢や歩調の制御支援への異なる機能的きっかけを与え

る可能性を提示。

P2-J-72 Estimating Expert-Based Functional Assessment Scores Using Sensor Data：Q. 動的運動時の表面電極と筋の相互移動による影響は従来の結果に影響を与えるのか？ A. 大きな問題であり、超音波診断などで解剖学的組成を事前に調査すべきである。

P3-A-1 An innovative modular wireless system for the acquisition of surface EMG signals: OT Bioeletronica の研究発表 : Q. Trigno（Delsys の wireless センサ）に類似しているが違いは？ A. 類似の機能を手頃な価格帯で提供している。

【写真説明】: Pic1. ポスター発表会場風景、Pic2. ポスター発表（P1-F-72)。Pic3. 足裏刺激で皮膚感覚を高める効果のポスター発表（P2-C-20)。Pic4. 入れ墨型表面電極（Northwestern 大学と RIC)。Pic5. シンポジウム（S. 17）会場風景。

３）出席した成果

"Is it time to update surface EMG recommendations ?"との討論が ISEK2014 であり、ISEK2016 での"Bridges to Innovation"に向けて、日本での電気生理運動学分野の現状と課題を討論するシンポジウムを開催した。シンポジウムへの海外研究者の参加は少なかったが、ISEK2020 の日本開催を提案する事を宣言できた。特に、意欲ある若手研究者の参加が大いに期待できた。ポスター発表では、日常的な課題に対する基礎研究の現状と健康・スポーツを戦略的に進めている欧米の企業動向の情報共有がとれ,新ためて戦略を見直す糸口が見られた。この点は、JSEK2016 で更に報告を踏まえた議論を進める予定である。

なお、一連の活動は 2015 年度技術交流プログラム【日本招聘】事業のおかげで、日本電気生理運動学会年次大会（JSEK2015）で EU プロジェクトの成果と今後の日本が目指すべき助言 ”研究成果が現場で利活用されていない状況に対応するには教育が必要”から始まったものである。助言への回答を ISEK2016 で議論すべくシンポジウムを提案し、現状と課題を共有できた。また、一般発表では,バランスの観点から日常的に歩行を管理する中敷効果の可能性を議論することができた。

４）その他

以上の成果は、JSEK2016（http://www。sice．or．jp/org/le-ek/JSEK/2016/）で報告・議論する。さらに、ISEK2016 を受けての次のステップとして、専門家の立場から”電気生理運動機能の正しい利活用を促すポータルサイト開発”に向けた課題を議論し､情報共有によるプラットホームの底上げを促せればと考えている。



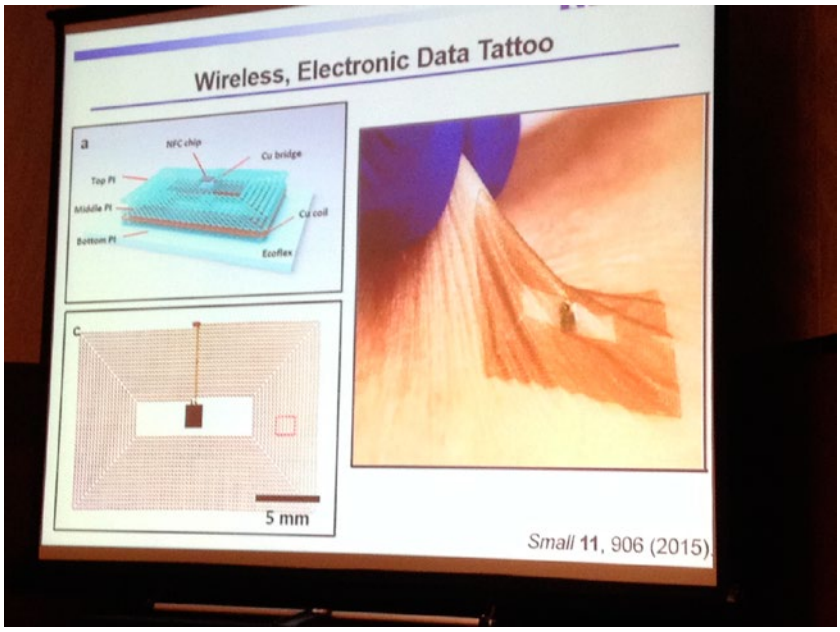
Pic1. ポスター発表会場風景



Pic2. ポスター発表（P1-F-72）



Pic3. 足裏刺激で皮膚感覚を高める効果のポスター発表（P2-C-20）



Pic4. 入れ墨型表面電極（Northwestern 大学と RIC）



Pic5. シンポジウム（S. 17）会場風景

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）

新潟工科大学工学部情報電子工学科

准教授　　伊藤　建一



会議等名称	38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'16)
開　催　地	Disney's Contemporary Resort、 Lake Buena Vista (Orlando)、 Florida USA
時　　期	平成 28 年 8 月 16 日～8 月 21 日

１）会議又は集会の概要

国際会議 EMBC'16 は、アメリカの学会 IEEE の Medicine and Biology Society が主催する生体医工学系の研究集会で、毎年定期的に開催されています。隔年でアメリカ国外でも開催され、何度か日本でも開催されています。生体医工学系の最大規模の国際会議で、毎回 2,500 件を超える投稿があります。発表数が多いだけでなく、査読も厳密に行われており、各発表のクオリティが高く保たれているのが特徴です。

今回の会議の全体テーマは「Empowering Individual Healthcare Decisions through Technology」であり、生体医工学の高度な技術を通じて個人のヘルスケア決定を促進することに焦点を当てています。会議のプログラムは、知名度の高い本会議/基調講演、シンポジウム、ワークショップ、招待セッション、口頭およびポスターセッション、展示会で構成され、内容も大変充実したものとなっています。

２）会議の研究テーマとその討論内容

今回の国際会議では、" Signal Path-Loss Simulation for Galvanic-Coupling Intra-Body Communication that Uses Insulating Electrodes at the Transmitting and Receiving Sides"というタイトルで、19日午後のポスターセッションPoster Session IIIの中の" Biomedical Sensors and Wearable Systems "で発表を行いました。写真1にポスター会場の様子を示します。研究内容は、電流方式人体通信システムの信号伝送損失特性の評価です。比較的多くの研究者から興味を持っていただき、一定の反応・評価を得られたものと考えております。また、特に興味を持っていただいた方々には、最近掲載された関連研究のジャーナルの情報を提供しました。

３）出席した成果

自分の発表セッション以外では、口頭セッションの"Physical Sensors and Sensor

Systems”,”Wearable Physiological Monitoring I”,”Wearable Sensor Systems I”、ポスターセッション Poster Session I を聴講・質問しました。口頭セッションではカフレス血圧計測や呼吸計測の興味深い研究を聞くことができました。また、ポスターセッションでは、新しい研究テーマの立ち上げや現在の研究テーマを進めるための良い情報収集の場となりました。写真 2 に口頭セッション会場の様子を示します。聴講していたほとんどの会場が満員の状態でした。

４）その他

会議の歓迎レセプションでは、知り合いの日本人研究者から、他の研究者の方々を紹介していただき、人脈を広げることができました。発表、情報収集、人脈づくりなど充実した渡航となりました。次回の会議（EMBC’17、韓国）でも新たな研究成果が発表できるように頑張っていきたいと考えております。

最後に、本国際会議参加のため旅費の一部を助成いただいた公益財団法人中谷医工計測技術振興財団に深く御礼申し上げます。



写真 1:ポスター発表会場の様子



写真 2:口頭セッション発表会場の様子

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



豊橋技術科学大学大学院 工学系研究科 情報・知能工学
修士1年次　　龍　進吾

会議等名称	Engineering in Medicine and Biology Society
開　催　地	アメリカ合衆国フロリダオーランド ディズニーリゾート
時　　期	平成 28 年 8 月 16 日～8 月 20 日

１）会議又は集会の概要

生体医学的なヘルスケア技術、臨床応用技術、生体信号処理などをテーマとした IEEE 主催の国際会議である。一般論文はオーラル発表か、ポスター発表のいずれかに分けられ、研究テーマについて議論を行った。また、ポスター発表者は自身のテーマについて 2 分間のショートオーラルを行った。

２）会議の研究テーマとその討論内容

Spatial smoothing of canonical correlation analysis for steady state visual evoked potential based brain computer interfaces

上記のテーマについてポスター発表を行った。

ヒトの脳活動を用いて機器の制御を行うインターフェースをブレインコンピュータインターフェース（BCI）と呼ぶ。この BCI の判別手法として正準相関分析（CCA）が多く用いられている。しかし、この手法は入力された脳波信号が十分な信号長であれば高い判別率を得ることができるが、短い信号を入力した場合は判別率が低下する。私は、レーリー商で定式化された空間フィルタの最適化問題における空間フィルタの空間的平滑化を応用し、電極配置情報を用いた空間的平滑化による正則化を行う CCA を提案した。

発表の際には、提案手法のアルゴリズムを中心に説明した。質問は提案手法の数式に関するものもあったが、その内容よりもそのアルゴリズムがどのような理由づけの下で考えられたか、妥当としたのかという質問が多かった。例えば、なぜ空間フィルタの平滑化が、短い信号長に対して有効であるのか、そもそも BCI の判別手法として CCA が有効である理由などである。また、本研究では頭皮上に取り付けた全電極の電極配置情報を使用しているが、視覚刺激を用いるのであれば視覚野の電極情報に対して重みをつければよいのではないかという意見もあった。これに関しては指導教官を交えて検討する予定である。

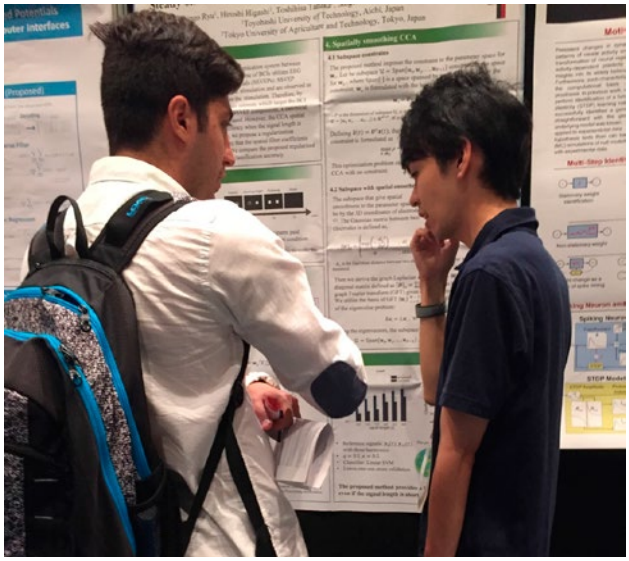
３）出席した成果

国際会議は初めてだったが、自分の英語力不足を痛感した。特にヨーロッパとは発話の速度が大きく違っていたため、会話の内容を聞き取ることができないことが多かった。今後はヒアリングを重点的に練習して次の機会に備えたい。

ショートオーラルは 2 分間という短い時間であったため、結論から入ることと、自分が最も優れていると考えている部分に重点を置いて説明した。オーラル後の反省点としては、アルゴリズムについて深く理解しなくてもダイレクトに伝わるような説明足りなかったことが挙げられる。また、2 時間のポスター発表は休憩の時間があまりとれない程度に参加者が訪れた。発表ではアルゴリズムを中心に説明したが、質問の内容はそのアルゴリズムの意味についてのことが多かったため、次にポスターを作製する際にはその背景も書くことを心がけていきたい。

４）その他





平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



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　　臼井　健二

会議等名称　The 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium

開　催　地　ドイツ連邦共和国ライプツィヒ

時　　期　平成 28 年 9 月 4 日～9 月 10 日

１）会議又は集会の概要

このたび貴財団の技術交流助成（海外派遣）を賜り、平成 28 年 9 月 4 日～9 月 10 日までドイツ連邦共和国ライプツィヒで開催された"The 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium"に参加し、研究発表をさせて頂いた。本国際会議は、The European Peptide Society が主催し、口頭発表 80 件ほど、ポスター発表 400 件近く、世界各国から 500 名以上が参加している、ペプチド科学・工学における研究・開発のための国際的な学会である。タンパク質の小型版であるペプチドの生理活性、詳細解析から、立体構造計算、機能予測、機能改変、新規分子構築など基礎から応用まで幅広く討論される。日本にも日本ペプチド学会があり、The European Peptide Society と密接な関係にあり、日本人研究者も多数参加していた。また、学会が発行する Journal of Peptide Science 誌はペプチド研究において重要な雑誌の一つとなっている。

２）会議の研究テーマとその討論内容

会議において私は"Monomerization and fibrillation methods for fibrosis peptides using SPPS microbeads"という題目でポスター発表を行った。アミロイドタンパク質・ペプチドに代表されるような線維化タンパク質・ペプチドは凝集性が高いことで知られており、詳細な解析研究を行う際にはこれらをモノマー化する過程も必要となる。しかし、現在のモノマー化法及び線維化法は簡便でないものが多く、各研究室で統一されておらず、実験条件が異なり再現性も得にくいため、研究の進展が遅れているのが現状である。そこで本研究では光切断リンカーや温和な条件で化学的に切断できるリンカーなどを介して樹脂ビーズにアミロイドペプチドを直接合成することで、合成と同時にモノマー化を達成させる方法を考えた。さらに、線維化開始法としては、固定化されていたペプチドを簡便な方法でリンカー部分を切断することで、樹脂ビーズからペプチドを遊離させ、線維化を開始させるといった方法の構築を目指した。始めに光によるリンカー切断条件や温和な化学物質添加条件によるリンカー切断条件の最適化を行った。次にゲル濾過によるモノマー化の確認を行い、従来法とも比較した。その結果、本法は

従来法よりも簡便かつ確実にモノマー化が達成できる手法であることが判明した。また、本法及び従来法による線維化及びその状況を比較、検討も行った。さらに本法を用いて細胞毒性試験を行い、簡便かつ正確にアミロイドの毒性評価が可能であることも示した。本研究では今後、様々なアミロイドペプチド配列を簡便に切断できるリンカーを介して樹脂ビーズに配置し、いつでも誰でも簡単に同一の測定が可能なアミロイドペプチドの線維化評価・毒性評価が可能なツールの構築を目指す。本装置は、基礎医学、薬学分野から臨床まで幅広い分野で活躍が期待できる、医工学装置となると考えられる。

本研究のポスター発表（写真１）は、発表時間を超過した後も、質問を受け議論を行うほど、活発かつ有意義に行えた。質問・コメントも多数いただいたが、その中でも、ペプチドは精製や実験の際に、溶解しないなどの調製が難しい配列がどうしてもあり、本手法でその問題を解消できすばらしいというコメントや、構築手法を是非教えてほしいというコメントなどポジティブなものが数多くあったことが印象的であった。本技術は、応用分野に直結して寄与することはおそらく少なく、基礎研究段階で大いに活躍が期待できる方法論的な要素が強い内容であるが、その重要性はペプチドを専門に扱っている研究者の皆さまに、理解・評価いただけたようであった。また、構築手法を教えてほしいというコメントを戴いた研究者とは今後、共同研究を模索することを提案していただいた。今後、ぜひ本技術を起点にして研究の幅を広げていければと思う。

３）出席した成果

ペプチド（小型タンパク質）を中心とした研究を行っている、欧州、アメリカ、オーストラリアの第一線の研究者や学生、若手研究者との技術交流が深められ、我々の最新の成果と彼らの最新の研究成果とを共有することができた。特に、メルボルン大 Akhter Hossain 博士、ドイツ国立ガン研究所 Ruediger Pipkorn 博士と面会し、彼らの研究成果と我々の持っている技術について議論を行うことができ、新テーマ開拓、共同研究のきっかけとなった。さらに、Ruediger Pipkorn 博士のお知り合いの研究者の方たちとも交流でき（写真２）、今後の自分の研究を進めていく上での大きな糧となった。

４）その他

以上のように、今回の学会参加は、様々な交流が行え、今後の私の研究の発展において重要な礎となる有意義なものとなりました。また、今回の発表は貴財団の平成 25 年度奨励研究助成に採択された研究が進展し、その成果の発表ということでご支援のご理解をいただけたのだと認識しております。このような本国際会議への参加に際して多大なるご支援を賜りました中谷医工計測技術振興財団に心より御礼申し上げます。



写真1　ポスター発表の様子



写真２　ドイツ国立ガン研究所　Ruediger Pipkorn 博士（中央）らと技術交流の様子

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



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

修士2年　　吉田　光輝

会議等名称　　MicroTAS2016

開　催　地　　アイルランド、ダブリン

時　　期　　平成 28 年 10 月 9 日～10 月 13 日

１）会議又は集会の概要

MicroTAS2016 はマイクロ・ナノスケールにおける流体デバイス・材料・化学・生物に関連する最も権威ある国際学会の一つであり、全世界から最先端の研究に従事する研究者達が集まる会議である。今回はアイルランドのダブリンにある Convention Center Dublin で開催された。今年度も 1000 件を超えるアブストラクトが投稿されており、その関心の高さが伺える。特に、細胞やマイクロ流体デバイスなどを用いた医療・バイオ技術の発表が多く、医療や医工計測への貢献も期待されている。パラレルセッション形式で行われ、数多くの発表が行われる本会議は多くの研究者とのやりとりの機会が豊富にあり、アジア、欧米諸国をはじめとする世界中から集まる研究者間の技術交流を大いに促進している。

２）会議の研究テーマとその討論内容

本会議は大きく分けて 9 つの研究テーマに分類される。

・Cell Separation and Analysis
・Cells, Organisms, and Organs on Chip
・Commercialization
・Diagnostics, Theranostics, and Translational Medicine
・Fundamentals in Microfluidics and Nanofluidics
・Integrated Microfluidic Platforms
・Micro- and Nanoengineering
・Sensor & Actuators, and Detection Technologies
・Separations, Reactions, and Other Applications for Microfluidics

私の発表は、Micro- and Nanoengineering セクション内の Novel,Smart, and Responsive Materials に分類され、”FUNCTIONALIZED CORE-SHELL HYDROGEL MICROSPRINGS FABRICATED WITH BEVEL-TIP MICROFLUIDIC CAPILLARY”という研究題目でポスター発表を行った。自然界にはコアシェル型スプリング構造によって魅力的な機能を有している微生物が数多く存在し、それらを

模倣するためにハイドロゲルで機能性スプリングを構築する手法を提案した。スプリングは竹槍状先端から液体を射出しながらゲル化することで構築する。機能の付与のために、射出する前の微細管内で機能性材料との二重同軸層流を形成することで、機能性材料を内包したスプリングを構築した。
2 時間半の発表の時間内に様々な質問があった。一例として、
・スプリングはどうして構築できるのか
　→先端の異方性によるゲル化の時間差に依存する
・伸縮機能を付与することができるのか
　→磁性ナノ粒子内包及び磁場印加によって可能である
・使用できる材料に制限はあるのか
　→疎水性の材料だと層流が形成できず、難しい
といった議論を行った。

３）出席した成果

多くの学会参加者との議論に加えて今回ポスター賞にノミネートされていたためこの分野で権威のある研究者数名に発表、質疑応答する機会を得ることができた。賞を受賞することはできなかったが、緊張感のある中でポスター発表することができ、今後の発表に活かす上で貴重な経験を得ることができた。また、他の学会参加者の発表を聴き、議論することで、最新の研究に関する情報やマイクロ・ナノスケール分野の知見を深めることができた。毛細管現象を応用することで簡便な医工計測を実現するデバイスの研究や、振動を用いた細胞のマニピュレートの研究などが興味深かった。自身とは異なる領域の研究者も多く、自身とは違う視点からの物事の捉え方や知識を吸収することができ、非常に価値のある機会であった。このような機会は国際会議に出席しなければ得ることができないため、本会議に参加した成果は大きいと考える。

４）その他

学会主催の懇親会にも積極的に参加し、台湾の学生を始め様々な研究者との交流を図り、研究以外の事も話すことができ、有意義な時間を過ごすことができた。

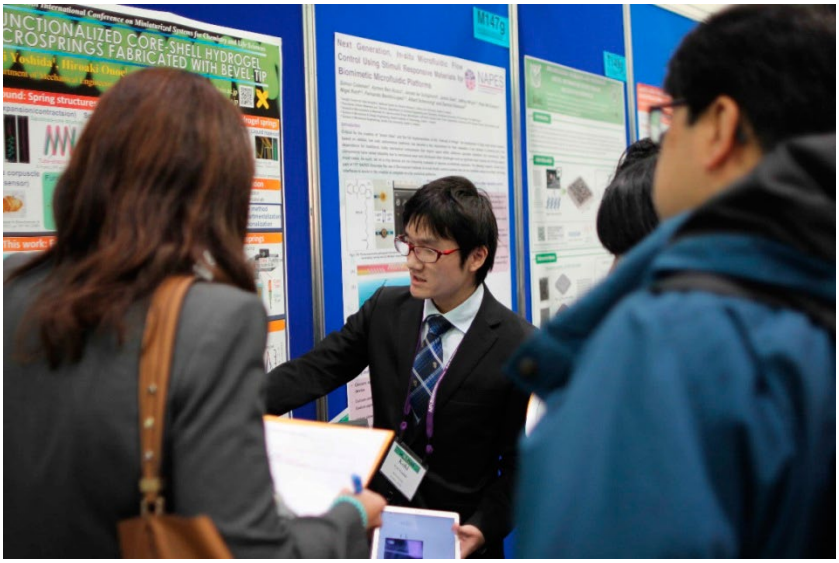


図 1 発表の様子



図 2 ポスター会場の様子

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



徳島大学大学院 医歯薬学研究部 保健科学部門

林　裕晃

会議等名称　RSNA2016

開 催 地　McCormick Place, Chicago, Illinois, USA

時　　期　平成 28 年 11 月 27～12 月 2 日

１）会議又は集会の概要

RSNA（Radiological Society of North America）は毎年 11 月末に北米で開催される放射線の医療利用に関する非常に大きな学会で、多くの医療関係者（医師、診療放射線技師、医学物理士）や企業関係者、そして大学関係者が参加しています。科学研究発表に加えて、企業展示や教育コースなどが充実しており、幅広い層の参加者のレベルに合わせた勉強の機会が提供されていることも特徴です。平成 28 年度は 425 の教育コース、1728 の科学研究発表、そして 659 の企業展示がありました。

２）会議の研究テーマとその討論内容

私は Educational Poster（4 m wide hard copy poster）で、2 演題の発表を行ってきました。学会が指定したプレゼンテーションの時間は無かったので、毎日のようにポスターの前に立ち、興味を持ってくれた人と議論を行いました。用意した論文別刷・名刺は全て無くなるという盛況ぶりでした。

1 つの目の演題は”Convenient measurement method using small-type OSL dosimeters for evaluation of doses in CT scans: uncertainty evaluation, entrance-skin dose of phantom, and organ dose of cadaver”というタイトルで、小型 OSL 線量計（放射線検出器）を用いて、X-ray Computed Tomography(X 線 CT)検査における被曝線量測定の測定手法に関する内容です。現状では X 線 CT 検査時の患者の被曝線量は実測されていないので、独自の手法を用いて実測することを見越して、予想される問題点と測定精度、将来の波及効果をまとめました。臨床画像を提示したこともあり、特に医師に対して反響がありました。

2 つ目の演題は”Universal calibration curve for a small-type OSL dosimeter to be used for direct dose measurements of direct, scattered and penetrating X-rays in the diagnostic region”というタイトルで、レントゲン撮影（単純 X 線撮影）に対して、小型 OSL 線量計を用いて被曝線量測定を提案する内容です。物理学的な基礎実験やシミュレーション計算などを駆使して線量計の基礎特性を評価し、この線量計があらゆる医療用途に対して被曝線量測定ができることを実証しました。この演題に関しては特に医学物理士の方々に興味を持ってもらい、激励の言葉を多く貰いました。

３）出席した成果

Universal calibration curve に関する演題で、Certificate of merit（RSNA）と CIRMS Ribbon award（Council on ionizing radiation measurements and standards）を受賞することができました。後者の賞は、ポスタープレゼンテーションに対して授与される賞ですが、審査員と知らずに非常に白熱した議論をした後に、“You are winner!”と言われ、非常に驚きました。

４）その他

今回の RSNA は、2 回目の参加です。昨年とは全く違う反響で、1 年間の工夫や研究の進捗が国際会議の充実感にそのまま反映されることを実感しました。英語能力の向上、研究レベルの向上、…など、様々な課題がありますが、一つ一つを着実にレベルアップさせて、毎年のように RSNA で発表したいと思っています。最後になりましたが、旅費のご支援をいただき、本当に有難うございました。



写真：受賞した演題のポスターと共同研究者

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



北海道大学保健科学研究院

浜田　俊幸

会議等名称　　Neuroscience 2016

開　催　地　　アメリカ　サンディエゴ

時　　期　　平成 28 年 11 月 12 日～11 月 16 日

１）会議又は集会の概要

アメリカ　サンディエゴで開催された Neuroscience 2016 (11/12-11/16) は神経科学分野で世界最大規模の学会であり、今年は 80 の国々から 3 万 353 の人の参加があった。557 の企業による展示会、1 万 4020 のポスター発表、850 以上のセッションがあった。対象となる生物は微生物からヒトまで、研究分野も基礎的生理機能から機器製作まで幅広い。

２）会議の研究テーマとその討論内容

研究発表題目は「自由行動マウスの複数組織における時計遺伝子発現の *in vivo* 追跡定量化」であり、我々は、動体追跡技術と光イメージング技術を融合したシステムで、個体レベルで連続的に複数部位の遺伝子発現を追跡定量する装置を独自に開発しました。

発表内容：

（背景）高度情報社会になり人々の夜型化やスマートフォンやゲームなどによる子供の夜型化が進む現代社会において睡眠の乱れによる体調不良およびそれに伴う体内時計の乱れが惹起する様々な疾患が大きな問題になっています。昼夜の区別なく 24 時間活動することが体内時計の乱れ（恒常性維持機構の乱れ）を誘発し，様々な疾患の発症に関係することが報告されています。そこで体内時計の乱れを精査できるシステムが望まれていました。体内時計の乱れは，生体各組織の時計遺伝子発現リズムを光イメージングの技法を用いて，同時計測することが可能です。これまでの研究では，遺伝子発現を長期間連続計測するには，組織を培養して観察する方法しかなく，この方法では，疾患の発症や治療効果を個体レベルで検討することはできませんでした。今回，自由に行動する動物の遺伝子発現リズムを 2 つのカメラを用いて長期間連続測定する新しい方法を開発し，異なる組織でみられる時計遺伝子リズムが外界の刺激に対して異なる反応を示すことを個体レベルで初めて実証しました。この発見は，体内時計の乱れから疾患発症に至る過程を解明する手がかりとなるものです。

（研究手法と成果）個体レベルで長期間、各組織の活動リズムを計測するにあたり、光イメージングの技術は有効であります。全身に発現している時計遺伝子の発現リズムを各組織毎に計測することで各組

織の神経活動リズムの活動マーカーとして使用でき、全身の各組織の活動リズムが計測可能になります。時計遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの発光を超高感度 CCD（EM-CCD）カメラで測定することで、遺伝子発現リズム計測は可能でありますが、現在の研究では麻酔処理をした後、マウスなどを動かない状態にして計測するため、時間分解能および測定期間が限定され、かつ麻酔の影響も考慮する必要があります。また自由行動しているマウスでの遺伝子発現定量では、カメラからの距離と角度が常に変化するため（カメラがとらえる発光量は距離の２乗に反比例するため３次元空間内での発光量の補正が必要)、技術的に困難でありました。

今回、我々は臨床放射線癌治療に用いているステレオ撮影とパターンマッチングによる追跡技術を軸として、新たな動体追跡技術を開発し、３次元空間内で不規則な動きをするマウスの各組織における発光量（遺伝子発現を示す）を長期間、自動認識し、自動追跡、自動発光量を補正することに成功しました。この技術により予測不能な自由行動しているマウスの生体各組織の時計遺伝子発を長期間 追跡定量することが可能となりました。そして環境変化に対するマウスの各組織の時計遺伝子発現を連続的に定量解析することで、体内時計関連疾患のリスクファクターである生体内脱同調現象の形成過程の可視化に成功しました。このことは体の健康状態の可視化（健康状態の基準化）がリアルタイムで可能となることを示しています。

今回の結果は、生物発光を利用した時計遺伝子の 4D 解析により、体内時計の乱れる過程を個体内で観察した世界最初のものであり、今後この技術を用いることにより、脳にある体内時計の中枢が内分泌や免疫機能を支配する末梢組織のリズムをどのように調節しているのか、また、体内時計の乱れがそれらにどのような影響を与え、疾患へと進展させるのかの理解につながります。

討論内容：

今までに全くない、自由行動中のマウスを個体レベルで遺伝子発現を定量する原理と装置であるため、それらの説明し、システムを多くの研究者に知ってもらえるよう時間をかけプレゼンテーションを行った。ポスターにはプログラミング、画像処理、体内時計研究、イメージング研究、行動解析など様々な分野の研究者らが、昼の１時から５時まで（ポスター掲示の全時間)、来てくれて大きく計測装置のアピールはできたと思います。

遺伝子発現定量に関して、今まで問題であった麻酔や拘束ストレスの影響が無視でき生理学的条件下で計測できること、長期の間自動で複数部位の遺伝子発現を追跡定量できること、薬理実験や他の計測システムと融合でき生体の機能解析が、遺伝子発現から行動解析まで連結して行えることは、様々な研究分野の研究者が非常に興味を持っており　装置の商品化をとの声が多かった。商品化で問題になる２台の超高感度 CCD（EM-CCD）カメラは、計測目的（高発現遺伝子から低発現遺伝子、発光と蛍光）に応じて、いろいろカメラを変えればいいとの意見もあった。１台のカメラでシステムを製作できないかとの質問もあったが、３次元空間での Z 軸方向の正確な位置決めとトラッキングには、２台のカメラによるシステムが必要であると説明した。

３）出席した成果

予測不能な動きをする生物の各組織の遺伝子発現を、無麻酔・無拘束条件で、長期間計測するシステムは、様々な分野および生物・植物の研究および治療薬開発において必要とされている技術だと実感しました。

本学会では自由行動下での身体機能計測が、企業が出店している展示ブースにおいて多くみられまし

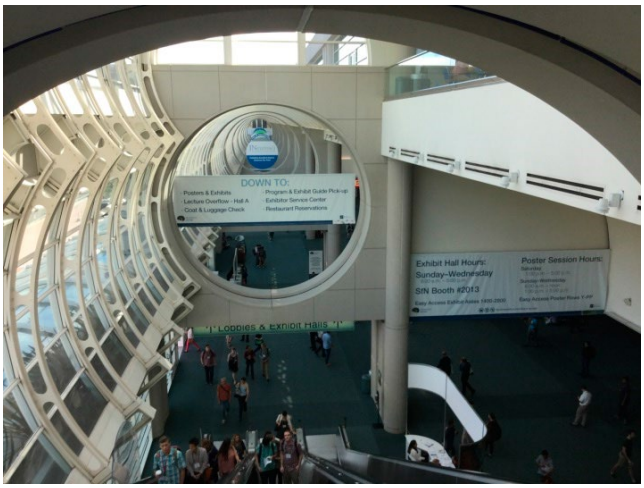
た。我々の装置に関するところでは、人の様々な箇所にマーカーを付けて動きを解析するモーションキャプチャーのより簡素化したシステムやマウス上に取り付けたマーカーで動きを追うシステムは、現在の我々の装置の改良に参考になりました。我々の装置に取り付け可能な電気生理学的手法をもちいた自由行動下での脳機能解析において、マウスやラットの頭蓋骨に計測機器（電極）を取り付け、脳深部細胞活動するものでは、より小型軽量計測機器の開発が進んでおり、データもクラウドシステムを使うことで、自宅でデータをリアルタイムチェックできるシステムは参考になりました。ただ体内時計研究のように長期間の計測には適切な小型取り付けバッテリーが無くバッテリー開発の必要さを実感しました。ドイツの企業はマウスケージの下にボードを置き常にマウス体内にある計測機器を充電できるシステムを販売しており、我々の装置にも応用可能だと思いました。

将来的に我々の装置に取り付けようと考えている小型 CMOS センサーにより自由行動マウス個々の細胞活動の可視化技術では GRIN レンズを取り付け、脳神経活動が個々の細胞レベルで観察できており、より小型化した計測システムになれば体内時計研究の長期間計測に応用できると思いました。自由行動中の生物の生体機能解析では、上記のような、非常に限定された極小領域のみの遺伝子発現あるいは電気活動計測（オプトジェネティクス、光ファイバーによる計測、脳神経細胞計測など）が主流であり、かつ脳をターゲットとしたものが多いが、我々が開発した個体レベルで、体全体をイメージングしながら脳中枢と抹消組織の機能を同時に解析するシステムに目的毎に既存のシステムを取り入れることで、目的の疾患毎に、より詳細な解析ができ、疾患発症機構解析および治療薬開発に大きく貢献できると考えられた。

４）その他



学会会場であるコンベンションセンター



コンベンションセンター入口





コンベンションセンター前にはガスランプ・クォーターの繁華街と MLB サンディエゴ・パドレスのホーム球場が広がる。

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



豊橋技術科学大学大学院　工系研究科 情報・知能工学専攻

近藤　泰成

会議等名称　24th Color and Imaging Conference

開　催　地　アメリカ合衆国　サンディエゴ

時　　期　2016 年 11 月 7 日～11 月 11 日

１）会議又は集会の概要

CIC24 (24th Color and Imaging Conference)は、色、光技術やイメージング技術に関する国際会議である。一般論文はオーラル発表か、ポスター発表のいずれかに分けられ、研究テーマについて議論を行った。また、ポスター発表者は研究内容について 2 分間のショートオーラルを行った。

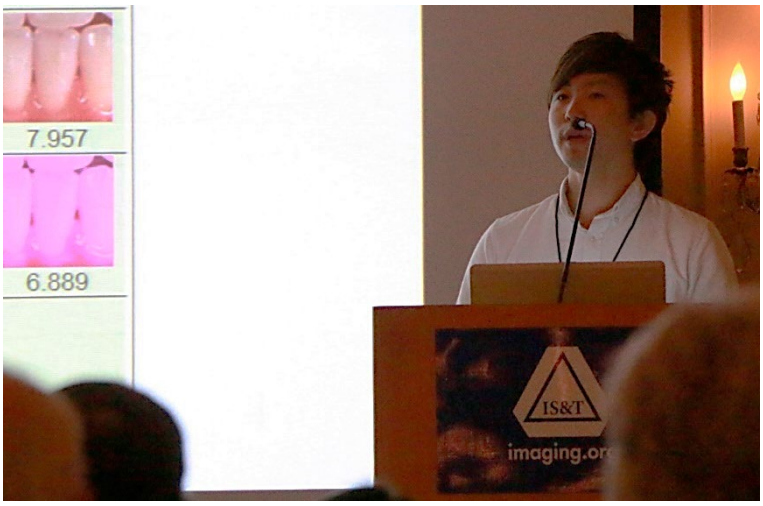
２）会議の研究テーマとその討論内容

CIC では、「Functional illumination supporting the visual detection of plaques」という題目についての研究発表を行った。本研究では、照明のスペクトルを最適化することによって、歯垢検出を補助する光源を設計した。本会議では、色、イメージングのプロフェッショナルが集まっており、手法、結果に対して深い議論を行うことができた。特に、歯垢ではない汚れなどはどう対処するのかなどの質問を多く受けた。また、歯科医に助言を受けることや共同に研究を行うことなど歯の専門家と協力することを多く勧められた。

３）出席した成果

本国際会議は私にとって、2 回目の国際会議であった。前回は情報系の学会であり、研究結果について、深く議論することが出来なかったが、本会議は、色、イメージング技術における有名な学会であり、研究内容、結果に対して多く議論することが出来た。また、初めてのポスターセッションであり、オーラルに比べ多くの研究者と話し、議論することができた。ただ、相手の意見を理解できない場面、言いたいことが伝えられない場面があり、英語力不足を痛感した。今後の課題として英語力を向上させていきたい。ポスター発表では途切れなく参加者が訪れ、セッション時間である 1 時間半を超え、発表を行った。ポスターでは結果をメインに図を多く用いたため、より視覚的に結果を訴えることが出来たのではないかと思う。本会議に参加することによって本研究の新たな課題を発見するなど、研究に対する刺激を受けることができ、私の研究生活においてとても有意義だったと考えている。

４）その他





平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻

鈴木　南羽

会議等名称	Pacific rim meeting on electrochemical and solid-state science 2016(PRiME2016)
開　催　地	アメリカ合衆国（ハワイ）
時　　期	平成 28 年 10 月 2 日～10 月 7 日

１）会議又は集会の概要

日本電気化学会、米国電気化学会、韓国電気化学会が主催している国際学会であり、電気化学分野における産業技術や学術文化の発展を目的としている。分野としては燃料電池、腐食科学、誘電科学、半導体、電子材料、バイオセンサー等、電気化学における様々な分野を対象としている。環境・エネルギー等の諸問題の改善に向けて、これらの分野の学術・技術面の推進を行うことを役割とした会議である。

２）会議の研究テーマとその討論内容

私が発表したセクションは”ORGANIC AND BIOELECTROCHEMISTRY: Bioengineering Based on Electrochemistry” である。講演題目は” Investigation of Intra- or Inter-Electron Transfer Pathway of Multiheme Electron Transfer Subunit of Iron Sulfur Flavo Cytochrome Type Glucose Dehydrogenase Complex” であり、グルコースセンサー素子として有用な、電極との電子伝達が可能なグルコース脱水素酵素複合体における分子内および分子間における電子伝達経路について発表した。

本酵素複合体における電子伝達経路の予測は、より高性能なグルコースセンサーを構築するために重要であり、このことを周知することでグルコースセンサーに関わる技術の向上につなげることができると考える。

３）出席した成果

”ORGANIC AND BIOELECTROCHEMISTRY: Bioengineering Based on Electrochemistry”のセクションでは、私の取り扱っているセンサー素子に限らず、センサー素子と電極をつなぐ様々な電子材料の検討も為されており、より効率の良いセンサーを作るために素子側、電極側、その二つをつなぐ材料側といった多方面からの改善が試みられていると感じた。

特に近年話題になっているウェアラブルなセンサーの開発に関しては小型化も進み、生体内での研究も行われており技術が向上していると感じ、近年のバイオセンサーについての知見を深めることが出来た。

４）その他





発表の様子

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



東京農工大学大学院　工学府　生命工学専攻
博士前期課程2年　　空田　明日香

会議等名称　　PACIFIC RIM MEETING 2016
開　催　地　　アメリカ合衆国（ハワイ）
時　　期　　平成 28 年 10 月 2 日～10 月 7 日

１）会議又は集会の概要

PACIFIC RIM MEETING 2016 (PRiME 2016)では電気化学分野、再生エネルギー分野、生体医療分野、生物工学分野、衛生分野と多岐にわたる分野の研究についての発表が行われた。

２）会議の研究テーマとその討論内容

本会議の研究テーマは Bioengineering Based on Electrochemistry であり、医療分野およびスポーツ分野において用いられる様々なセンサー機器の最新の技術について情報を共有し討論した。また、私の発表のタイトルは“Identification of substrate binding site of fungus derived FAD dependent glucose dehydrogenase”であった。カビ由来のフラビンヌクレオチド(FAD)依存型グルコース脱水素酵素(FADGDH)はグルコースの脱水素化反応を触媒するため、現在市販の血糖自己測定(SMBG)機器のセンサー素子として注目されている。しかし、本酵素が用いられている SMBG 機器を利用できる糖尿病患者は限られており、消化吸収試験を受ける糖尿病患者の場合は誤測定が生じるため使用することが出来ない。その原因は FADGDH のグルコースへの特異性があまり高くないことである。そのため、FADGDH のグルコースへの特異性を向上させ、全ての糖尿病患者が利用できる SMBG 機器の開発が求められている。

今回は、グルコースへの特異性が向上した FADGDH の変異体酵素に注目し、グルコースと他の糖を識別することが出来るようになった、つまりグルコースへの特異性が向上した理由を探る研究について発表を行った。

３）出席した成果

血糖測定機器への応用が期待される酵素の研究について発表し、自身の研究内容を周知することができた。また、様々な分野の研究者の発表を聞くことで、センサーに用いられている酵素を電極への固定する方法、センサーとしての形態、センサーの感度の向上させる方法など、多種多様なセンサー機器の最新の技術の情報を得ることが出来た。今回の学会で得られた情報や考え方を糧として、今後の自身の

研究をより前進させていきたいと考えている。

４）その他



図１　PRiME2016 の看板前にての集合写真（右：本人）





図２　口頭発表中の写真

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



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　　上村　圭亮

会議等名称　　第29回国際人工関節技術会議
開　催　地　　アメリカ合衆国　ボストン
時　　期　　平成 28 年 10 月 5 日～10 月 10 日

１）会議又は集会の概要

人工関節の普及に伴い、より機能的かつ長期耐用性のある人工関節の開発、普及を行うことを目標として ISTA（国際人工関節技術会議）は設立され、第一回学術集会は 1988 年にドイツのデュッセルドルフで開催された。以後年に 1 回学術集会が開催されており、毎年 2000 人を超える研究者が世界各国から参加している。

２）会議の研究テーマとその討論内容

会議では股関節、膝関節をはじめとする人工関節の治療成績や今後のよりよい成績を求めるための手術計画などの臨床的な面からの報告が医療サイドから行われ、新たなインプラントの開発や、解析装置の開発、という側面から技術者側や企業側からも発表がなされた。

３）出席した成果

今回、Change in Pelvic Sagittal Inclination From Supine to Standing Position Before Hip Arthroplasty という題名にて一般論文の発表を行った。内容は、股関節手術の際に重要である仰臥位、立位における骨盤傾斜を CT 画像、レントゲン画像から全自動で計測するシステムを共著者とともに開発し、そのシステムを用いて過去に類をみない規模で仰臥位、立位における骨盤傾斜を測定した、というものであった。過去に同様の計測は多くの報告においてなされているものの、manual input を多量に要するため計測手技が煩雑であったのに対し、今回の手法では全自動で行うことができるため、その先進性や意義が評価され、Student biomechanics award を受賞させていただき、他の表彰された先生方とともに Award session で発表を行った。非常に多くの聴衆の前で討議を行うことができ、非常に有意義なものとなった。

今回の発表により、非常にハイレベルな討議をし、新しい知見を得ることができたことで、今後の研究、論文作成にフィードバックしていきたいと考える。

４）その他

今回発表の機会を与えていただきました指導教授の菅野伸彦先生、ならびに技術的協力をしていただいた共著者の先生方に深く感謝いたします。

また、発表に際し助成していただいた中谷医工計測技術振興財団様に厚く御礼申し上げます。ありがとうございました。



Fig.1 学会場の様子



Fig.2 Gala dinner での表彰式にて

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



東京大学　IRT研究機構

特任研究員　　グェン　タン ヴィン

会議等名称	The 69th Annual Meeting of The American Physical Society –Division of Fluid Dynamics
開　催　地	ポートランド、オレゴン州、アメリカ
時　　期	2016 年 11 月 20 日～11 月 22 日

１）会議又は集会の概要

今回参加した「69th Annual Meeting of the APS Division of Fluid Dynamics」は、アメリカ物理学会流体力学部門の第 69 回年次会合であった。この会議は流体力学の分野における最大規模の学会であり、米国だけではなく、アジア・欧州各国から多くの研究者が参加している。今年はオレゴン州のポートランド市に 11 月 20 日から 22 日まで開催されていた。来年はコロラド州のデンバー市で開催される予定である。

２）会議の研究テーマとその討論内容

会議の発表テーマ

今回の会議では、約 3000 件の研究発表が行われており、それらの内容は流れ、液滴の力学、バイオ流体力学、航空力学といった幅広い分野に関するものであった。液滴力学の中でも、液滴の振動、滑り、衝突などの様々テーマに関する研究成果が発表されていた。会議での発表形式は口頭発表が主となり、同時に約 40 セッションがパラレルで行われていた。招待講演として、マイクロ流体の分野のプリンストン大学の Howard Stone 先生、流体と生物ロコモーションの分野のジョージア大学の David Hu 先生、NASA の Don Pettit 氏などの発表が行われていた。また、ポスターセッションとともに、ビデオコンテストが行われており、約 75 件のビデオが提出された。

討論内容

発表題目：Direct measurements of the pressure distribution along the contact area during droplet impact
（和文：液滴衝突における接触面における圧力の直接計測）

会議で発表した研究成果は微小液滴と固体平面との衝突時における、液滴の接触面の圧力分布の直接計測に関するものであった。液滴と固体表面との衝突は自然界でよく観察される現象にも関わら

ず、未解明な部分が多い。また、液滴の衝突はインクジェットプリンティング、3D 細胞プリンティングやスプレーといった様々な産業応用も試みられている。このため、液滴と固体表面との衝突のメカニズムを解明することは学術的に重要であるのみならず、産業応用としても期待されている。

固体表面に衝突する液滴のダイナミクスを決定する最も重要なパラメータは、液滴と固体表面との接触面における圧力分布である。したがって、液滴の衝突のメカニズムを解明するためには、接触面にどのような圧力分布が発生し、それが時間とともにどのように変化するかを明らかにすることが何よりも重要である。我々は、固体表面に微小な力センサアレイを形成し、液滴衝突時の接触面における圧力分布を直接計測できる手法を初めて実現した。計測結果から、液滴が固体表面に接触した直後に圧力が接触面の中心で最大となることがわかった。また、その圧力の最大値は、古典力学から予想される動圧($=\rho v^2$, ρ は液体の密度、v は衝突速度)よりも 10 倍以上も大きいことが明らかになった。この結果は、直径の数 mm という小さな液滴の衝突でも、ウォーターハンマー効果が大きな圧力を発生させることを示唆していた。

３）出席した成果

今会議で研究発表を行ったことにより、私の研究成果を流体力学の分野の研究者に発信できたとともに、新しい研究の展開についてのディスカッションも充実にできた。発表した研究成果に関して多くの研究者が関心を持ち、発表の後に直接に質問しに来てくれた。今回の会議でいただいた質問及びそれらに対する答えを下記にまとめる。

質問１：計測した力の定義について：計測した力は接触面に積分したものか？

答え：いいえ、それぞれの各場所での力である。

質問２：ウォーターハンマーの効果だと、圧力が接触面のエッジで最大となると予測されていたが、なぜ計測した力は接触面のエッジに最大にならなかったか？

答え：エッジのおける表面張力による引っ張りの力が発生するので、センサに働く合力が小さくなるためである。

質問３：なぜ液滴がセンサと接触し始めると、力がマイナスになったか？

答え：液体の表面張力による引っ張りの力が発生したためである。

質問４：力センサはどうやってキャリブレーションしたか？

答え：キャリブレーション専用のフォースプローブを製作して、ピエゾアクチュエータを用いてセンサに押し付ける。

４）その他

今回の学会参加を助成していただいたことに、心より感謝する。本学会で得た成果を生かして、今後はより発展的な研究成果をあげ、論文誌等への投稿にもつなげてゆきたい。


東京大学
THE UNIVERSITY OF TOKYO
Direct measurements of the pressure distribution along the contact area during droplet impact
Nguyen Thanh-Vinh, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama
The University of Tokyo
University of Tokyo, Shimoyama Lab.

会議での発表の様子

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）

大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻

皿上　順英



会議等名称	17th International Congress on Neutron Capture Therapy(ICNCT17)
開　催　地	アメリカ合衆国・ミズーリ州・コロンビア ミズーリ大学コロンビア校
時　　期	平成 28 年 10 月 2 日～10 月 7 日

１）会議又は集会の概要

第 17 回国際中性子捕捉療法学会学術大会（17th International Congress on Neutron Capture Therapy(ICNCT17)）は 2016 年 10 月 2 日から 7 日までの 5 日間、米国・ミズーリ州・コロンビアで、中性子捕捉療法に関連する最新の技術や臨床結果を議論し、中性子捕捉療法の継続的な発展に貢献することを目的に開催された。本会議は偶数年毎に開催され、今年で第 17 回目を迎える中性子捕捉療法の分野における世界最大の国際会議である。化学、物理、生物、臨床の 4 つのセッションで構成され、臨床医学、放射線生物学、中性子工学などの諸領域を専門とする世界的に著名な医学及び工学の研究者が集い、中性子捕捉療法に関する国際的な研究の進展と進捗状況を共有することを目指している。

２）会議の研究テーマとその討論内容

報告者は「Gadolinium effect estimation of GAGG for BNCT-SPECT」という題目でポスター発表を行った。

近年、ホウ素中性子捕捉療法（BNCT: Boron Neutron Capture Therapy）の実用化に向けた研究が世界各国で進められている。BNCT の実用化において、どの程度の治療効果があるのかを治療中に知ることは重要であるが、その計測は非常に困難であることが知られている。そのため我々は BNCT において、治療中にリアルタイムで治療効果を 3 次元的に見ることができる BNCT 用 SPECT 装置（BNCT-SPECT）の開発を行っている。

本研究では GAGG と呼ばれるシンチレータを計測素子として用いることを提案した。GAGG シンチレータは近年開発されたシンチレータで、BNCT-SPECT 装置に応用可能なほどの高い性能を有することが分かったからである。昨年度の研究により、基礎的な特性については BNCT-SPECT 装置を実現する要件を満たすことが確認された。

しかし問題点は GAGG に Gd（ガドリニウム）が含まれていることであった。Gd は非常に強力な中性子吸収材であり、その吸収反応により大量のガンマ線が放出されることが知られている。そのため、本報

告では Gd の中性子捕獲反応による寄与がどれほど含まれるのかを 3 次元モンテカルロシミュレーション計算によって数値的に評価した。その結果、Gd による影響は少なく、Gd が含まれていても十分に BNCT の治療効果の計測が可能であることを確認した。今後は、GAGG を BNCT-SPECT の要素検出器として実際に装置開発を行っていく。

３）出席した成果

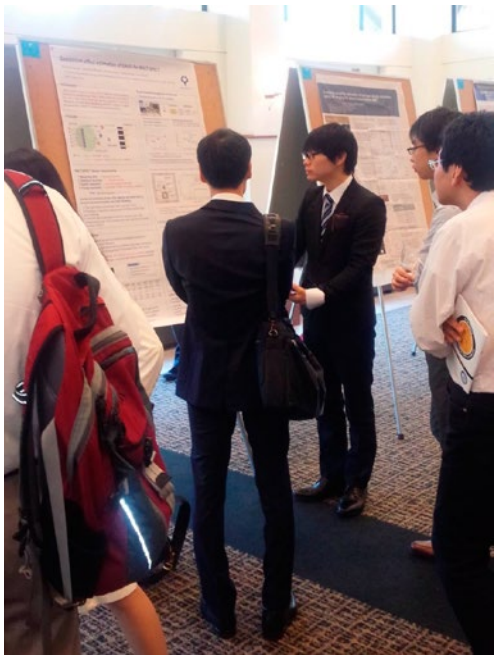
我々の研究が世界で注目されていること、また BNCT の研究は日本が世界をリードしていることを再認識した。今回のセッションでは 1 時間のコアタイムでの討論だったが、コアタイム外でも多くの研究者とディスカッションすることができた。特に本研究と同様の目的で、違ったアプローチで研究されている報告があり、その研究者から装置開発に対する助言を頂いた。

初めての国際会議の出席で、英語で研究者とディスカッションをするという非常に刺激的な経験ができた。さらに自分の英語力を鍛え、スムーズに英語でのディスカッションが出来るように精進したいと感じた。

４）その他

本会議が開催されたコロンビアはミズーリ州の学術の中心地で、いわゆる大学町だった。そのため若者が多く、海外の学生の生活風景を見ることが出来て新鮮だった。また学会日程中の excursion ではオザーク湖を観光し、クルージングをしながら海外の研究者と交流する機会が得られ、非常に有意義な時間を過ごせた。

最後に、このような有意義な発表と国際会議への参加の機会を与えて頂いた中谷医工計測技術振興財団様に深く御礼申し上げます。



《発表の様子》



《発表会場の様子》



《オザーク湖》

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）

大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻

小林 美菜



会議等名称　13th International Conference on Radiation Shielding (ICRS-13) & 19th Topical Meeting of the Radiation Protection & Shielding Division of the American Nuclear Society-2016 (RPSD-2016)

開 催 地　フランス、パリ

時　　期　平成 28 年 10 月 3 日～10 月 6 日

１）会議又は集会の概要

本会議は、(1)放射線遮蔽に関わる国際的な研究の進展の総括、(2)今後の研究動向と重点領域についての専門家間の議論、(3)放射線遮蔽を基軸とした研究の促進、および、(4)世界における原子力エネルギー・放射線利用の発展に資すること、を目的に開催されている。4 年ごとに欧州・米国・日本で順に開催され、この分野における世界最大の国際会議である。会議は OECD/NEA が中心となって取りまとめ、今回の会議には 26 か国、303 人が参加した。従って、放射線計測、放射線遮蔽設計、放射線管理、放射線安全評価、放射線治療などについて、その分野の専門家と包括的な議論ができる非常に良い機会を提供してくれる会議である。

２）会議の研究テーマとその討論内容

本会議では、原子力エネルギー利用に関わる原子炉、核燃料サイクル施設、放射性廃棄物施設や、放射線利用に関わる加速器施設、医療施設、工業施設等に関する放射線遮蔽・安全・防護を対象とした設計コードや関連データの開発・応用、遮蔽実験研究、放射線計測技術開発、線量評価等をテーマとして議論が進められる。放射線遮蔽・防護は、原子力の平和利用及びその安全確保と発展のために特に重要な分野であり、会議にて各国の放射線利用の動向と現状が紹介され、課題についての討議が行われる。

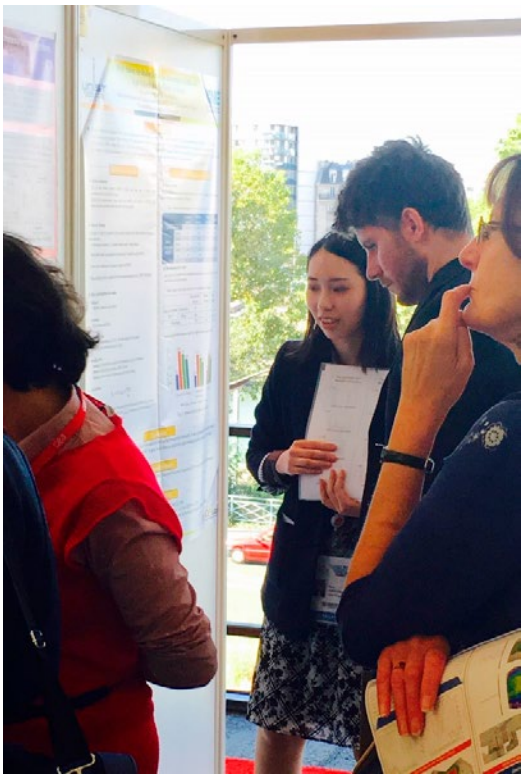
本研究は、近年の放射線治療の普及に伴い、医療従事者の被ばくが問題になっていることを背景に、その被ばくを出来るだけ低減することを目指し、放射線のその場計測(可視化)装置を開発することを目的とし、その成果を発表した。会議では、上記の分野の専門家と本研究の結果や現状の問題点について議論した。

３）出席した成果

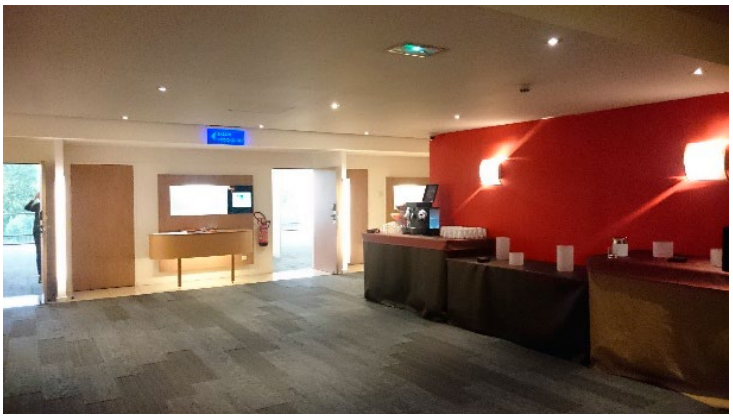
様々な口頭発表やポスター発表、コーヒーブレイク等の交流を通じて放射線遮蔽の現状を知ることができた。また、本会議ではポスター発表の時間が会期中に連日設けられていたため、様々な方と話しをする機会に恵まれた。そこで同様の研究を行っている研究者から話を伺い、研究内容や今後の方針、課題についての議論をすることができた。また、それに加えて研究についてのアドバイスもいただいた。今後はそこで得た知見を活用し、研究を進めていこうと考えている。

４）その他

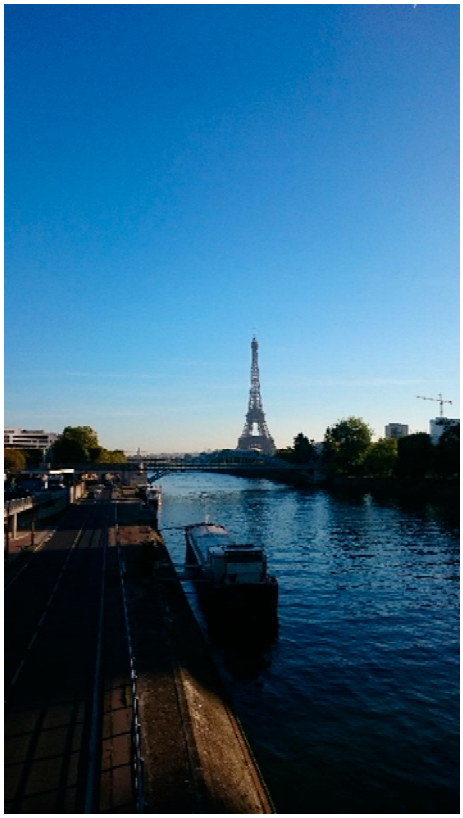
以下は本会議の写真である。1 枚目はポスター発表の様子で、今回 66 件のポスター発表があり、そのうち 17 件が学生であった。また 2 枚目は会場の様子であり、ここでコーヒーブレイクなど研究者間の交流が行われていた。3 枚目は最寄り駅から会場までの風景の 1 つである。この写真を見てもわかるようにパリには空を遮る電線や高い建物がなく、パリ市内のどこからでもエッフェル塔が見ることができた。またパリ市内の建造物は色調が揃っているため、朝昼晩、どの瞬間を切り取っても統一感のある美しい街並みを味わうことができる素晴らしい土地であった。今回の訪問を通じ、日本とは全く異なるパリの文化に実際に触れ、勉強することができたことは、かけがえのない経験となった。



1 枚目:ポスター発表の様子



2 枚目:会議会場



3 枚目:会場付近の風景

最後に、本会議への参加にあたり、多大なご支援をいただいた貴財団に心より感謝申し上げます。

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻

博士前期課程１年　　平谷　萌恵

会議等名称	The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (MicroTAS 2016)
開　催　地	アイルランド、ダブリン
時　　期	平成 28 年 10 月 9 日～10 月 13 日

１）会議又は集会の概要

本国際会議は、生命科学・化学分野におけるマイクロ流路、マイクロ加工、ナノテクノロジー、表面材料、分析合成、検出技術に関する研究発表を行う世界最高峰の国際学会であり、様々な分野の研究者が最新の研究成果に関して活発に議論を行う。申請者が参加した MicroTAS 2016 は、本年度が 20 周年という節目にあたる。本年度は 10 月 9 日～13 日の 5 日間、アイルランドのダブリンで開催された。会議は主にオーラル発表とポスター発表からなり、本年度の会議では 1116 件の投稿論文中、採択数がポスター702 件、オーラル 102 件と 72%の採択率であった。さらに Latest News として追加で採択された分を合計するとポスター発表は 724 件にのぼり、学会にはアジア、欧州、アメリカの各国から 1124 人の研究者らが集まった。

２）会議の研究テーマとその討論内容

本会議における研究テーマの区分を以下に列挙する。

・Cell Separation and Analysis

→マイクロ流路などを用いた細胞収集・集計・選別技術や、血中循環腫瘍細胞の分析、リポソームや小胞の分離、単一細胞解析などに関する発表が行われた。

・Cells, Organisms, and Organs on Chip

→生体模倣・擬生物・バイオハイブリッドデバイスに関する発表が行われた。

・Commercialization

→商業化に成功したマイクロ流路を基盤とした製品についての発表が行われた。

・Diagnostics, Theranostics, and Translational Medicine

→癌研究や臨床化学、次世代シーケンス等の核酸解析、ドラッグデリバリーに関する発表が行われた。

・Fundamentals in Microfluidics and Nanofluidics

→ドロップレットシステム、多重フェーズシステム、ナノチャネルやナノポアなどのナノ流体工学に

関する発表が行われた。

・Integrated Microfluidic Platforms

→遠心力を利用したマイクロ流体デバイスや、電動性のマイクロ流体デバイスに関する発表が行われた。

・Micro- and Nanoengineering

→接着・接合技術や、ナノバイオテクノロジー、ナノスケールでの製作に関する発表が行われた。

・Sensors & Actuators, and Detection technologies

→バイオセンサー、化学・電気化学センサー、物理センサーなどに関する発表が行われた。

・Separations, Reactions, and Other Applications for Microfluidics

→化学・粒子合成、電気泳動を利用した分離、環境解析などに関する発表が行われた。

3）出席した成果

本会議では、”Recognition of microRNA expression in serum using programmable droplet system for cancer diagnosis”という題目でポスター発表を行った。本研究では、DNA コンピューティング技術と生体ナノポアを用いることで、癌特異的に発現する microRNA (miRNA)のパターンを自律的に認識するドロップレットシステムを構築した。miRNA は初期の癌細胞においても異常に発現し、その発現パターンも癌ごとに異なることが知られており、小細胞肺癌では miRNA-20a と miRNA-17-5p が過剰発現し、同時に血中へ放出されるため、小細胞肺癌の診断にはこの 2 種の miRNA を同時に検出する必要がある。そこで、二種の miRNA が存在する場合にのみ Four-way junction 構造をとるようプログラムした DNA をドロップレット中に組み込み、生体ナノポアを用いることで診断の出力分子をラベルフリー・リアルタイムに検出できるシステムを構築した。その結果、血清中の 2 種の標的 miRNA を同時に検出し、SCLC の診断を行うことに成功した。

質疑応答では、「人工脂質膜はどのくらいの時間保持できるのか」「用いた miRNA は精製したものなのか」「miRNA 特異性はどの程度なのか」といった質問がされた。また、私のポスターがポスター賞の審査対象として選ばれており、16 人ほどの審査員の前で発表する機会を得た。英語はたどたどしく、発音に難があったが、大きな声で、身振り手振りを交えながら発表することを意識して臨んだ。その結果、3 日間のポスター発表の中で各日ごとに最も優れた発表を行った人(計 3 人)に授与される Young Researcher Poster Award という名誉ある賞をいただくことができた。日本人での受賞は３年ぶりで、修士学生での受賞は６年ぶりとなる。審査対象に選ばれた時は自分が賞をとれるはずなんてないと思っていたが、何事にも一生懸命最大限の力で挑むことが重要であるということを学ぶことができた。

4）その他

会議日程の 4 日目夜にバンケットが開催された。現地の料理や音楽を楽しみながら、世界各国の研究者および、日本の他研究室の方たちと交流を深めることができた。特に、各国の研究者たちが音楽に合わせて踊っている姿が印象的であった。本バンケットを通じて様々な人たちと交流を深められたことも、会議参加の意義であったと思う。

最後に、貴重な機会を与えてくださった中谷医工計測技術振興財団様にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

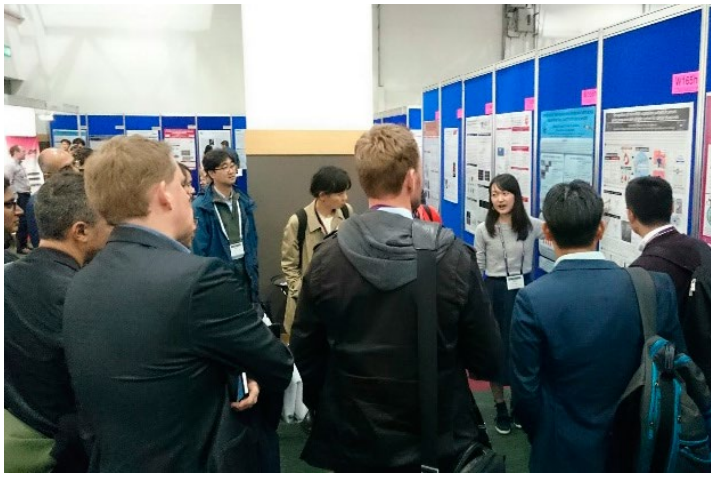


写真 1. 大勢の審査員を前に発表する申請者。

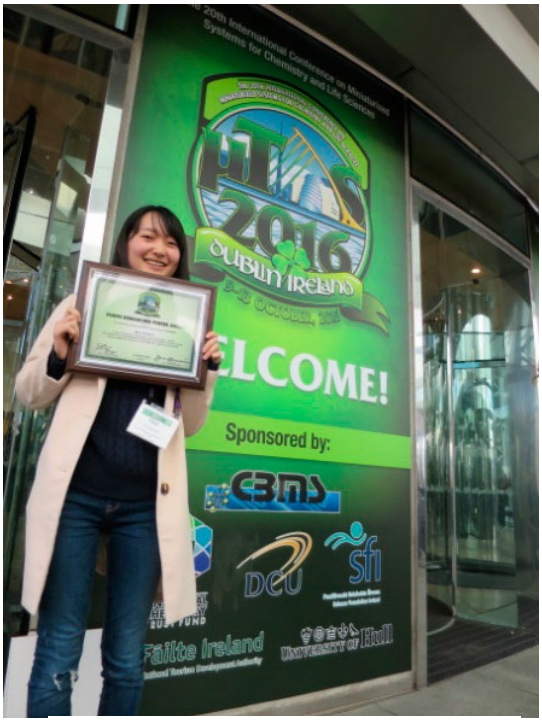


写真 2. 会場前で賞状と記念撮影。

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）

徳島大学大学院 保健科学教育部 保健学専攻

１年　　紀本　夏実



会議等名称　　SPIE　Medical Imaging

開　催　地　　フロリダ州オーランド

時　　期　　平成 29 年 2 月 11 日～2 月 16 日

１）会議又は集会の概要

SPIE (The International Society for Optical Engineering)は、世界的に歴史ある画像工学に関するフォーラムで、多くの医療関係者や企業関係者、研究機関や教育機関に所属する教員や学生が出席しています。出席者が分野を超えて情報交換できるように、科学研究発表に加えて、教育プログラム・講演プログラムなどが整備されています。平成 28 年度は 9 つの研究トピックスから構成されており、995 の科学研究発表がありました。

２）会議の研究テーマとその討論内容

私は Physics of Medical Imaging の研究トピックスで、ポスター発表を行いました。100 枚以上のポスターが並んだ非常に賑わいのある会場で、ポスターの前に立ち、興味を持ってくれた方と議論を行いました。

発表テーマはフォトンカウンティング技術に基づく新しい X 線画像の提案に向けた基礎研究です。物質の原子番号を同定するための新しい物質同定手法の理論的な検討や実証実験などを通して提案手法を評価し、医療応用に向けた実現可能性とその波及効果をまとめました。発表では特に企業関係者の方に興味を持っていただき、今後の研究の発展に向けた有意義な議論を行うことができました。

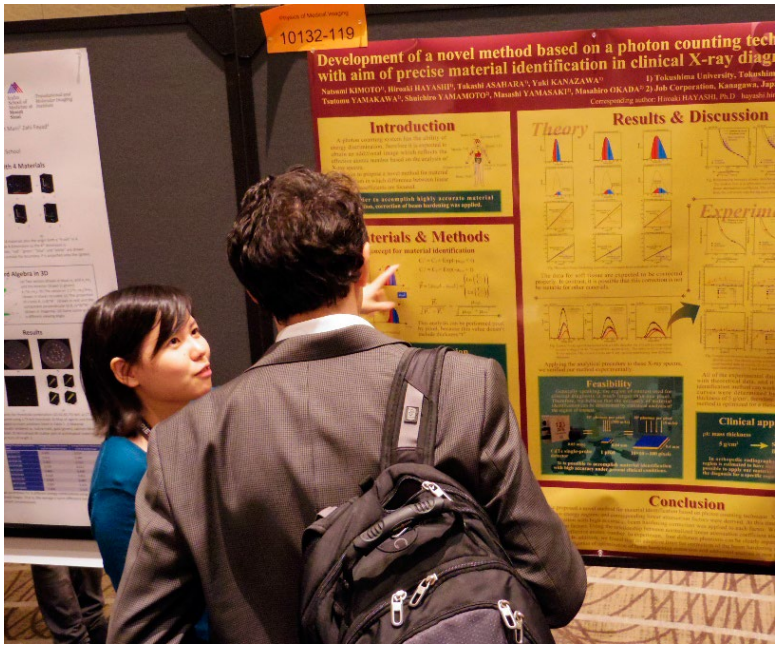
３）出席した成果

発表時間は 90 分と非常に長い時間だったので、多くの方と議論をすることができ、また用意していた別刷りの資料はほとんど無くなるなどの反響を得ることができました。また世界で名立たる企業や病院の非常にレベルの高い発表を聞いて圧倒させられると同時に、自分の知見を広げることができ、今後の研究発表の参考になりました。

４）その他

今回初めて SPIE に参加してみて、異なる価値観の方との英語での議論や、世界最先端の研究を聞く

ことで非常に充実した時間が過ごせました。英語能力の向上や研究レベルの向上など、様々な課題はありますが、日々レベルアップに努め、再びこのようなレベルの高い国際学会で発表したいと思っています。最後になりましたが、旅費の支援をしていただき、本当にありがとうございました。



ポスター発表での議論の様子

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



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　　熊本　康昭

会議等名称　SPIE Photonics West BIOS
開　催　地　Moscone Center, San Francisco, CA, US.
時　　期　平成 29 年 1 月 27 日～2 月 3 日

１）会議又は集会の概要

2017年1月28日～2月2日の期間に、生体医用光学の6分野（Photonics Therapeutics and Diagnosis; Neurophotonics, Neurosurgery, and Optogenetics; Clinical Technologies and Systems; Tissue Optics, Laser-Tissue Interaction, and Tissue Engineering; Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging; Nano/Biophotonics）で合計 46 の会議が開催され、2275 件の口頭・ポスター講演（主催者発表）が行われた。会場に併設された企業展示「BIOS EXPO」及び「Photonics West EXPO」では、大小 200 以上の光学機器・素子メーカーによる最新技術の紹介が行われた。

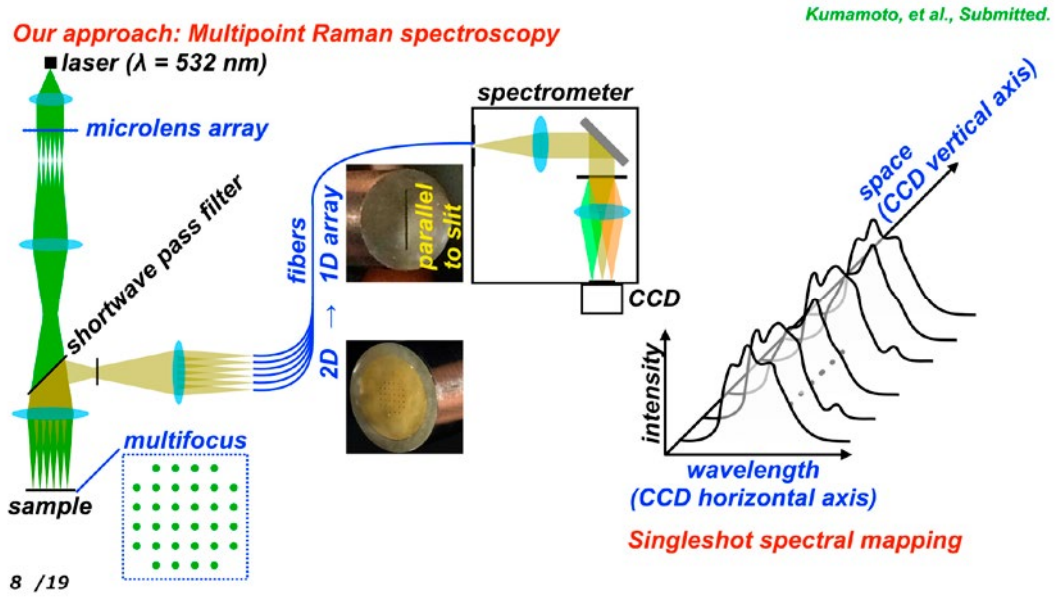
２）会議の研究テーマとその討論内容

Clinical Technologies and Systems の Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic and Surgical Guidance Systems XV において、Rapid and Accurate peripheral nerve detection using multipoint Raman imaging の講演を行った。

本発表では、まずラマン散乱光により末梢神経を無標識・低侵襲・正確に検知できることを示した後、開発した多点ラマン散乱同時計測技術を利用する末梢神経迅速検出・可視化法を紹介した。この手法では、計測視野内の 3.5 mm × 3.5 mm 領域の 32 点にレーザー光を同時集光し、各点から発するラマン散乱光を 32 本のファイバーにより別々に収集し分光器に入射する光学系を構築することによって、神経を含む生体組織の複数箇所のラマンスペクトル迅速取得を実現した(図)。測定時間 5 秒で得られたスペクトルを解析することにより、ラット摘出神経を 97.5%の正確度で検知・可視化できるようになった。

質疑応答では、ラマンスペクトルの多点同時測定光学系の詳細、神経測定における光照射パワー、および臨床応用に向けた今後の取り組みについて、聴講者らと活発に討論を行った。

自身の講演以外では、非染色生体光計測法の組織分析応用、従来の光計測技術の発展（高速化、低収差化、広視野化、３次元化など）、及び最新の非染色生体光計測法に関する講演を聴講し、これらの研究成果の今後の可能性について議論を行った。



図：多点ラマン散乱同時計測技術を利用する神経迅速検出法（発表資料一部の抜粋）

３）出席した成果

生体医用光学分野の世界最高峰の国際会議の１つである SPIE Photonics West BIOS において講演を行うことによって、密度の高い討論を行うことができた。これにより、ラマン散乱による迅速かつ正確な神経検知・可視化技術の臨床応用における課題および今後の改善策について考えを深めることができた。

自身の講演以外では、ラマン散乱や自家蛍光などを利用する非染色生体組織分析・判別技術の講演を多数聴講し、非染色神経検出法の改善につながる計測技術およびデータ解析技術を学ぶことができた。また、企業展示では、非染色生体光計測に不可欠であるレーザー光源技術について、技術開発動向を把握できた。

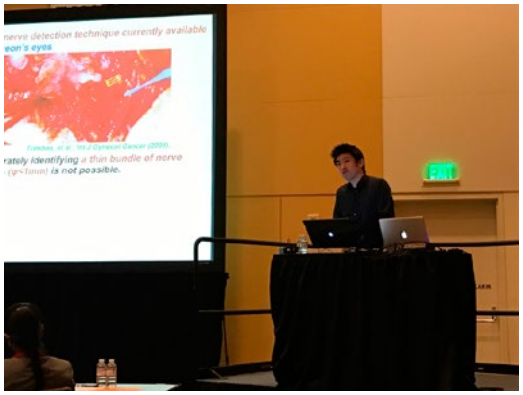


写真１：発表の様子



写真２：会場の様子

４）その他

本開議の参加にかかる渡航費及び滞在費をご助成下さった公益財団法人中谷医工計測技術振興財団には心より感謝申し上げます。

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



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

藤本　和也

会議等名称　　MEMS 2017

開　催　地　　アメリカ合衆国　ネヴァダ州　ラスベガス

時　　期　　平成 29 年 1 月 22 日～1 月 26 日

１）会議又は集会の概要

The 30th IEEE Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017)は微小電気機械(MEMS) に関連する研究分野における最新の研究・技術開発に関する情報交換を目的として米国電気電子学会（IEEE）が主催する、関連分野において最大規模の国際学会です。今回は 876 件の投稿から 86 件の口頭発表および 262 件のポスター発表が採択され、4 日間に渡って発表・討論が行われました。また、分野を代表する研究者による招待講演も行われ、研究分野の現状、今後の展望についての議論が行われました。

２）会議の研究テーマとその討論内容

本会議のテーマは微小電気機械システム（MEMS）の設計、製作および応用に関する研究分野であり、関連する広範な分野の研究が報告されます。特に近年では、微細加工を利用して生体分子の検出や計測を行うことや、微小デバイス内で制御された環境を細胞の研究に利用することが注目され、多くの研究が報告されています。臨床検査に関する研究では、原理の実証にとどまらず実際の検査、運用まで射程として研究が行われています。また、物理・化学的な原理に基づくセンサーの研究・開発や微細加工技術、材料特性の評価などの広く医工計測に関連する分野の研究についても多数の報告がなされました。これらの内容に関して、異なるバックグラウンドを持った研究者によって口頭発表・ポスター発表それぞれについて討論が行われました。

３）出席した成果

報告者が発表した内容に関して、多くの研究者とディスカッションすることができました。本学会の特徴の一つは、ナノ・マイクロデバイスに関する研究を基調として、ナノスケールでの物理・化学現象を専門とする研究者から細胞・タンパク質などの生体物質に関する研究を専門とする研究者など広い分野の研究者が参加していることであり、それぞれに異なる背景に基づいた議論から、実験手法の改善点

や将来的な応用に関して新たな考えを得ることができた点で大きな成果を得ることができました。

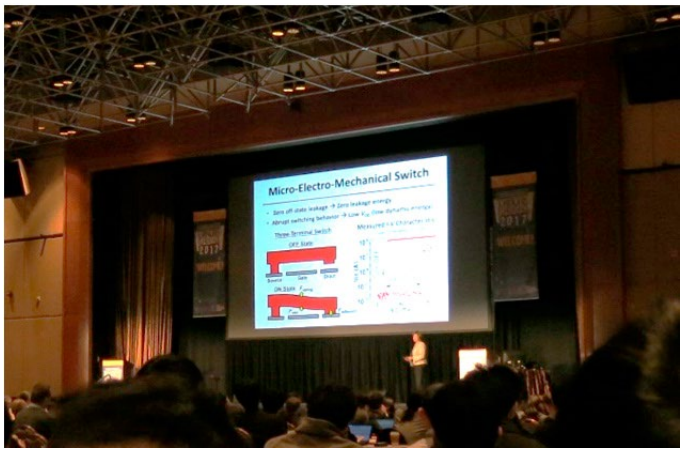
また、現在各国で進んでいるマイクロ・ナノデバイスに関する研究について広範な知見を得ることができました。特に医工学に関連する内容に関しては、病原体やバイオマーカーの検出などの臨床的な用途と、細胞機能の詳細な解析や生体器官の再生・形成過程に関する研究などより基礎科学・将来的な応用を目指した方向性との 2 つに大別することができます。前者ではすでに現場で使用されている例が複数報告されており、試料量の低減や所要時間の短縮が可能であることから、今後も多くの用途で開発が進むことが期待できます。また後者に関しても、1 細胞・1 分子レベルでの生物学的な知見を背景として、微小な試料を扱うことが可能なマイクロ・ナノデバイス技術の利用は今後極めて重要な分野となると考えられます。このような研究をより進展させるために、医学・生物学に深い理解と微細加工や微小環境における物理現象に関して異なるバックグラウンドをもつ研究者が緊密に協力することの重要さを実感しました。

４）その他

本会議に出席することで、報告者の研究内容を発展させていくために有益な議論を行えました。また、多くの研究者と面識を得ることができ、研究者として成長するために大きな経験を得ることができました。この場を借りてこの機会を与えていただいた中谷医工計測技術振興財団に謝意を表します。



報告者による口頭発表



Tsu-Jae King Liu 教授による基調講演

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学

岡谷　泰佑

会議等名称　第 30 回微小電気機械システムに関する
アイ・トリプル・イー国際会議

開 催 地　ラスベガス（アメリカ合衆国）

時　　期　2017 年 1 月 22 日～1 月 26 日

１）会議又は集会の概要

The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems は微小電気機械システム（Micro Electro Mechanical Systems；MEMS）分野において最も規模の大きい国際学会である。生体計測用のマイクロセンサや化学量分析用のセンサ・マイクロ TAS デバイスなど幅広く医工計測分野に応用可能なマイクロデバイスに関して多くの発表が行われている。例年アジア、欧州、アメリカから 1000 件近い応募があり、採択率 3 割という厳しい審査が行われるため、発表される研究のレベルは非常に高い。今回参加した国際学会は MEMS という分野に対して非常に強い影響力を持った学会だと言える。

２）会議の研究テーマとその討論内容

人口高齢化に伴い、リハビリテーションを手助けする歩行支援ロボットの研究が進められている。安全な歩行支援のためには、様々な路面状況に対応したロボットの制御が必要になる。しかし、路面の滑りやすさが評価できないため、路面で転ばない最適な歩行速度の制御ができていない。そこで、路面の滑りやすさを評価する手法が求められている。

本研究では、MEMS 滑り覚センサを足底に取り付けることで、歩行運動中に路面の滑りやすさを推定できる手法を実現した。この手法を歩行支援ロボットに適用することで、スリップを未然に防ぐ歩行支援が可能になる。

センサチップは、上面及び側面にピエゾ抵抗層を形成した 5 対の両持ち梁から構成されている。これらの抵抗変化率から、路面の滑りやすさを評価することができる。センサチップの大きさは、3mm×3mm×0.3 mm と靴裏に配置可能なほど小型である。

さらに、提案する手法の評価実験を行った。まず、試作したセンサをオイルが付着した路面と付着していない路面に押し付けたときの出力を比較し、センサ出力から路面の滑りやすさを判別できることを

確認した。次に、足底にセンサを取り付けた二足歩行ロボットを歩行させ、歩行中においても路面の滑りやすさを評価しつつ、ロボットを制御できることを確認した。

３）出席した成果

今回参加した国際会議（MEMS2017）において本研究に関するポスター発表を行った。終始、多くの方々に対して本研究について説明させていただく機会を得ることができ、2 時間という限られた時間ではあるものの有用なディスカッションを行うことができた。そこで興味を持っていただいた多くの方々からの貴重な質問およびコメントの一部を紹介する。

まず、「柔らかい素材でもセンサを実現することができるか」という質問をいただいた。本研究で製作したセンサは、靴底のようなゴム素材の中にシリコンチップが埋め込まれた構造になっている。シリコンは曲げや衝撃に弱いため、実際の応用時には故障の原因になる可能性がある。一方、近年カーボンブラックを混合した導電性エラストマーなどを用いた柔らかいセンサが注目されている。センサ全体を柔らかい素材で作ることができれば、これまでのセンサにおける物理的な弱点をひとつ克服できる可能性があると考えている。

次に、「オイルが付着した路面にセンサを押し付けたときの出力と、オイルが付着していない路面にセンサを押し付けたときの出力の差はどのくらいあればよいのか？」という質問をいただいた。滑りやすい路面と滑りにくい路面を判別するためには、センサが路面に接触するときの接触角度や、センサに伝わる振動などのノイズに対してロバストな性質を持つ必要がある。現在のところ、センサの接触時の角度が変わるとセンサ出力に誤差が生じることから、この誤差を考慮した評価を行う必要がある。開発したセンサの特徴は、接触した瞬間に接触対象の滑りやすさを評価できるというところにある。今後の課題として、あらゆる路面環境に対応し、接触時の条件によらず正しく滑りやすさを評価できるようにセンサを改良していく必要があるだろう。

最後に、「このセンサにはどのような応用先があるか」という質問をいただいた。まさに、今回我々が開発したセンサはロボットハンドやヒューマノイドロボットに応用することで滑りを回避できることが期待される。一方で、日本における急速な高齢化を考えると、医療費の増大は大きな社会問題になっている。高齢者による転倒・骨折などの不慮の事故の増加は、身体機能の低下と関連している。ロボット技術は高齢者の身体機能を支えるツールとして期待されており、我々が開発したセンサと従来のロボット技術を組み合わせることで、高齢者を滑りによる転倒から未然に防ぐことができるようになると考えている。

以上は頂いた質問やコメントの一部であるが、他にも今後の研究に大いに役立つ多くの有用なご意見をいただくことができた。これは今回の会議に参加することで得られた貴重な成果である。今回の会議への参加に助成してくださった中谷医工計測技術振興財団様に心より感謝いたします。

４）その他



ポスター発表の様子。多くの方々から貴重なご意見を頂くことができた。

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学

松田　信彦

会議等名称　The 30th IEEE International Conference on Micro electro Mechanical Systems (MEMS2017)

開 催 地　Las Vegas Hotel，Las Vegas，United States

時　　期　平成 29 年 1 月 22 日～1 月 26 日

１）会議又は集会の概要

本会議は米電気電子工学会(IEEE)が主催する微小電子機械システム(以下 MEMS)における最も権威ある包括的・横断的な国際学術会議の第 30 回会議である。採択率が 4 割であるこの学会では MEMS 分野における厳選された最新の研究成果を参照でき、また最前線の気鋭の研究者と交流することができる。 総投稿数は 874 件、採択数は 348 件、事前参加登録者数は 600 名以上であった。

２）会議の研究テーマとその討論内容

本会議は MEMS 分野における包括的な会議であり、その討論内容は多岐に亘った。例えばポスターセッションのテーマには Biological & Medical MEMS、MEMS Physical Sensor、Micro-&Nano-fluidics、MEMS Actuators 等があった。Biological & Medical MEMS の分野では例えば神経に電極テープを固定するためにマジックテープのようなフープと鉤状の構造を利用した研究、脳神経に電極を挿入するための微細針アレイを製作した研究、細い流路を振動させて赤血球などの微細粒子の質量を高い精度で推定した研究などがあった。

３）出席した成果

会議に出席し、「MEMS 多軸音響センサ」に関する研究発表を行った。The University of California、The Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology などの 30 名近い研究者と研究の意義、製作したセンサの性能、原理、作成方法、性能の改善の余地について議論を交わした。また、同じく音響を計測対象としている研究の発表を聴き、研究の目的意識、立脚している原理の相違、得られた成果などを確認した。さらに、(2)で述べたような MEMS の異なる専門領域における最新の動向に触れた。

４）その他

今回発表した研究において開発したセンサの医学応用の可能性について述べる。

本研究の主眼は橋梁や高層建築物などの構造物の疲労を音響振動を通じて非侵襲的に計測することであるが、この振動による非侵襲計測というコンセプトは人体に対しても転用が可能である。現在、医療現場において振動の伝達速度を介して生体組織の弾性を推定する超音波エラストグラフィの技術が利用されている。この技術はびまん性肝疾患の程度推定や肝発癌のリスク評価に資するとされている。特に、生体内で超音波を収束させた際に微弱な力が発生する現象(Acoustic Radiation Force Impulse、ARFI)を利用して生体内イメージングを行う技術がすでに臨床で利用されている。この技術は生体内部で発生させた力が伝播し体表が振動する様子を超音波プローブ等で観察することで波速の分布を求め、体内組織の硬度分布を推定している(Shear wave imaging)。ここで、本研究が提案する多軸センサを用いることで、疎密波と剪断波を同時同地点で計測することができるようになり、それらの速度の差から直接弾性率を算出したり、剪断波・弾性波を総合した立体的な振動の振幅を比較することで組織の粘弾性に影響されるエネルギー透過率を算出することができるようになると考えられる。さらに、本研究が提案するセンサは MEMS 加工技術とピエゾ抵抗効果に立脚しており、半導体素子上に電子回路とともに高密度に集積することが可能である。これにより、高精細かつ多面的な計測を可能とする超音波プローブが実現され、非侵襲生体計測技術の更なる発展につながると期待される。

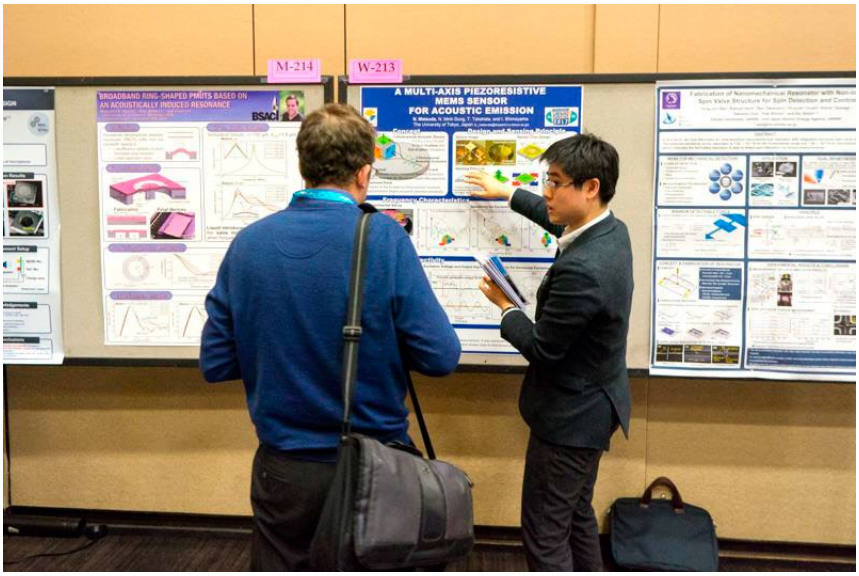
今回は中谷医工計測技術振興財団のご支援を賜ったことで会議への出席が叶い、修士課程学生の身ながら世界の舞台で研究成果を発表し、また最前線の研究者らと技術交流を行うことができました。この場をお借りして厚く御礼申し上げるとともに、貴財団の今後益々のご清栄を心よりお祈り申し上げます。



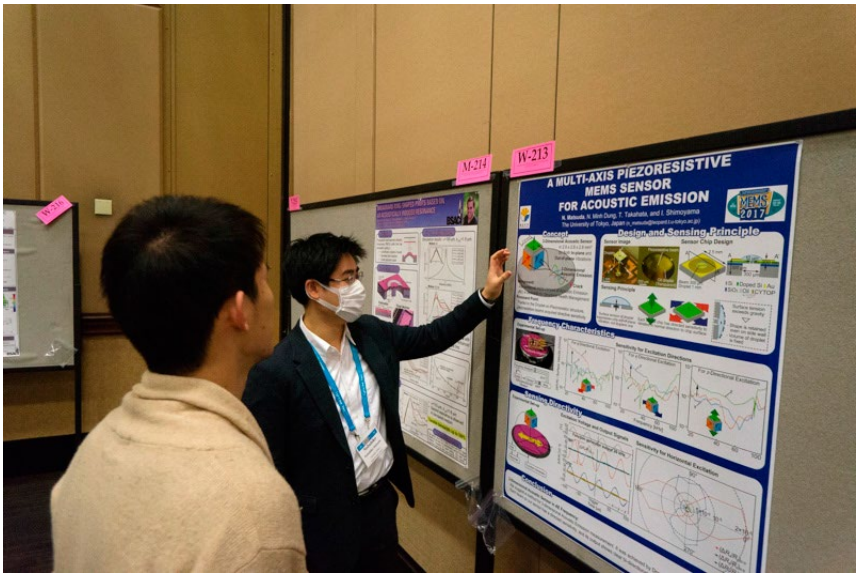
会場写真



技術交流 1



技術交流 2



技術交流 3

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



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

修士一年　　佐藤　龍

会議等名称　　MEMS2017

開　催　地　　アメリカ、ラスベガス

時　　期　　平成 29 年 1 月 22 日～1 月 27 日

１）会議又は集会の概要

MEMS2017 は微小電気機械システムの技術を基盤に、流体デバイス、化学、医療の分野に関する最も権威ある国際学会の一つであり、アメリカ、アジア、ヨーロッパと全世界から多くの研究者たちが集まる会議である。今回が 30 回目の開催となる本学会はアメリカ、ラスベガスの Rio Las Vegas Hotel and Casino で開催された。今年度も 900 件近くのアブストラクトが投稿されており、研究者からの関心の深さが伺える。その中でも、流体センサーやバイオメディカルに向けた微小機械技術などに関する研究が半数近くを占めており、医療や医工計測への貢献も期待される。本会議はポスター、オーラルの方式で行われ、どちらのセッションでも研究者同士のやり取りが盛んにおこなわれており、技術交流が促進されている。

２）会議の研究テーマとその討論内容

本会議は大きく分けて 10 の研究テーマに分類される。

・Mechanical、 thermal、 and magnetic sensors and actuators、 and system
・Opto-mechanical microdevices and microsystems
・Fluidic microcomponents and microsystems
・Microdevices for data storage
・Microdevices for biomedical engineering
・Micro chemical analysis systems
・Microdevices and systems for wireless communication
・Microdevices for power supply and energy harvesting
・Nano-electro-mechanical devices and systems
・Scientific microinstruments

私の研究は Manufacturing for BioMEMS に分類され、”FIBER-SHAPED ARTIFICIAL TISSUE

WITH MICROVASCULAR NETWORKS FOR BOTTOM-UP TISSUE RECONSTRUCTION”という研究題目でオーラル発表を行った。再生医療の分野で、三次元的な組織を人工的に構築する際に組織内部に栄養や酸素を運搬するための血管網を構築する技術が必要になっており、そのための単位構造として血管網を内包したひも状肝組織の構築を行った。本研究では、組織の径や細胞の比率を調整することにより、血管網構築のための条件の最適化を行った。また、組織同士を組み合わせて培養することにより、組織間での血管網のつながりを観察した。
発表後の質疑応答において多くの議論を行った。一例として、
・血管網をより長く維持するためにはどうすればよいか。
→間葉系幹細胞と共培養を行う。
・血管網内に流れを作ることはできるのか。
→組織を培養したのちにマイクロ流体デバイスと組み合わせることよって試みる。
・ほかの細胞による組織内に血管網を構築することは可能か。
→組織を構築する際の細胞を変えることにより可能。
といった議論を行った。

３）出席した成果

オーラル形式での発表だったため、非常に多くの研究者の前で発表することができ、自分の研究を広く周知させることができた。また、質疑応答でも多くの意見を交換することができ、今後の自分の研究に対して非常に有益な情報を得ることもできた。また、他の研究者が発表しているセッションに参加することで、多岐にわたる分野における最新の研究についての知見を深めることができた。その中でも、リソグラフィ技術を用いて神経組織から直接信号を検知するデバイスや、プリンタ技術とボトムアップ組織工学を組み合わせた組織構築のためのプリンティング技術の研究などが興味深かった。本会議で得た経験や、他の研究者たちとの交流は本会議に参加しなければ得ることができなかったものであり、非常に有意義な成果を得ることができたといえる。

４）その他

懇親会の場やほかの研究者たちと食事を共にすることなどにより、研究についてや、それ以外のことについても交流を図ることができ、非常に有益な経験をすることができた。

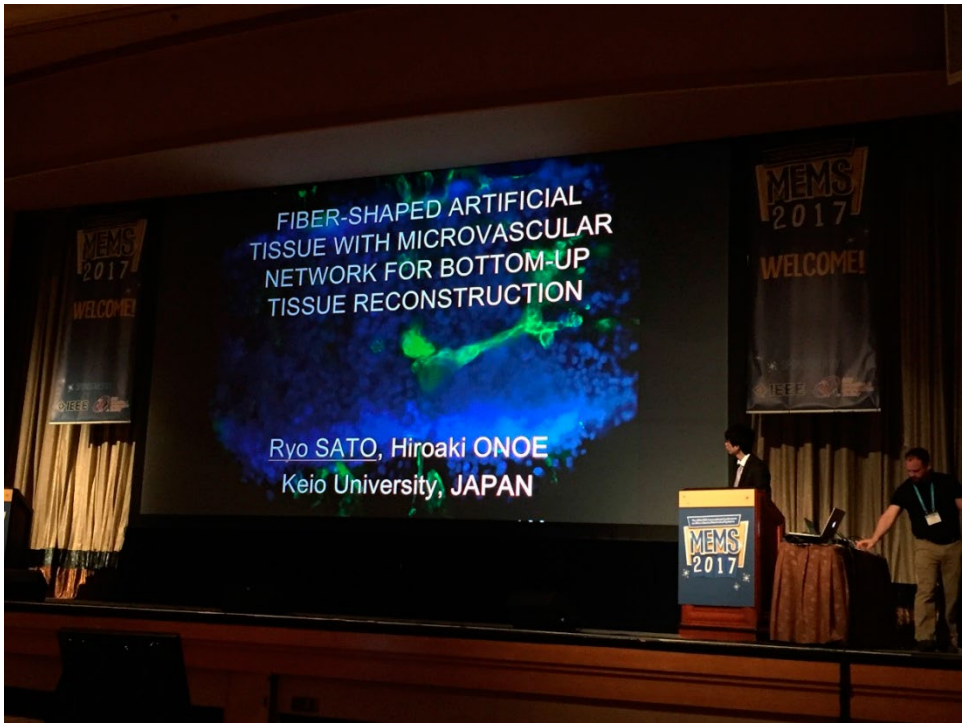


図 1 発表の様子



図 2 会場の様子

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外派遣）



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1年　　海保　実則

会議等名称　IEEE MEMS 2017

開　催　地　Las Vegas

時　　期　平成 29 年 1 月 22 日～1 月 26 日

１）会議又は集会の概要

本会議は半導体微細加工技術をベースに小型のセンサーやアクチュエータなどの素子を構築する MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)および、それをバイオ・化学分野に転用した Micro Fluidics の研究者が一同に介する本分野最大の国際会議である。本会議は bio & medical MEMS, Physical Sensor、MEMS Actuator, Micro Fluidics などのセッションに分かれており、MEMS 技術の応用範囲の広さが伺える。

２）会議の研究テーマとその討論内容

私は本会議において「Parylene based Flexible Glucose Sensor Using Glucose-Responsive Hydrogel(血糖値応答性ゲルを用いたパリレンフレキシブル血糖値センサー)」という題で発表を行った。本研究では今まで固い PCB で作っていた血糖値応答性ゲルベース血糖値センサーを 10μm ほどの薄くて柔らかいパリレンを用いて作製し、埋め込まれた動物が動き回っても組織へのダメージが小さくなるようなデバイスを形成した。こうした埋め込み型の血糖値センサーは、患者の血糖値計測の手間を省くと共に組織へのダメージを減らし、命にかかわるような急な血糖値の変化を測定できる点で重要であることを主張した。

３）出席した成果

2 時間のポスターセッションの中で、30 人ほどの研究者や企業の方々が私のブースを訪れてくれ、かなりの手ごたえを感じた。同じくパリレンを用いたデバイスを作っている方から、より簡便な作製プロセスについてのアドバイスを頂いたり、メディカルデバイスを作っている方から、プロセスの残留物(レジスト等が残っていると埋め込んだときに毒性がある)の評価の方法などについてのアドバイスを頂くなど、今後のデバイス改善の参考になった。小型のデバイスを材料の製膜から始めて自前で作れ、かつ埋め込み実験までできている研究室はまだまだ少なく in Virto での実証実験に留まっている医療デバイ

スも多いということが分かった。

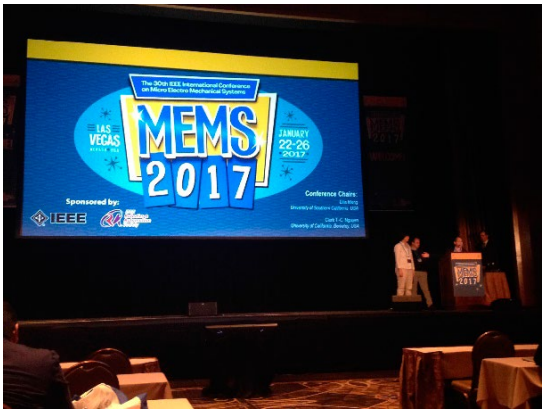
また、他の研究者のポスター発表も積極的に聞きに行くことでも様々な知見が得られた。センサーを作っている人が出していたデータから、繰り返し使用可能回数や、耐久性、電気特性の評価など、今後行うべき実験の目処が立ったり、自分の実験系に使える素材が他にあることを確認したりなど、有意義な情報を得ることができた。

４）その他

国際会議に参加し、世界中の MEMS の研究者と交流を持ち、この業界の最先端のトピックに触れるとともに自分の研究の立ち位置がよくわかりました。自分のポスター発表を見に来てくれた人には「面白い研究内容だった。続きを楽しみにしている」という旨の言葉をかけて貰え、今後の研究に対する意欲が高まりました。海外渡航並びに宿泊費を助成してくださった中谷医工計測技術振興財団様に、この場を借りて感謝の意を表明させていただきます。ありがとうございました。



現地のポスター発表会場のようす。250 ほどのポスターが立ち並ぶ



口頭発表会場。ここでは各研究者の口頭発表を始め、招待講演や優秀者の発表なども行われた

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（日本招聘）



東京大学大学院教育学研究科身体教育学コース
教授　　山本　義春

会議等名称　8th International Workshop on Biosignal Interpretation (BSI2016)
開　催　地　大阪国際交流センター
時　　期　平成 28 年 11 月 1 日～11 月 3 日

１）はじめに（招聘の概要）

国際ワークショップ BSI2016 の招待講演者として、Patrice Abry 教授、Fabio Babiloni 教授ならびに Thomas Penzel 教授の 3 名を招聘し、招待講演をお願いした。

２）被招聘者の紹介

Patrice Abry 教授は物理学、信号解析、および医工学が専門であり、現在の主な研究テーマはウェーブレット変換を応用した生体信号時系列の解析である。生体信号時系列の新たな解析法を開発するとともに、その医学的応用についても研究している。

Fabio Babiloni 教授は脳科学および計算工学が専門であり、現在の主な研究分野は脳計測データ解析である。皮質脳波データの結合性の分析およびブレイン・コンピュータ・インターフェイスの開発を行っている。

Thomas Penzel 教授は物理学者および生理学者であり、現在の主な研究分野は睡眠科学および睡眠医学である。Penzel 教授は睡眠障害の診断と睡眠時呼吸障害の病態生理について、国際的な研究プロジェクトを多数推進している。当該分野における重要な成果として、睡眠時呼吸障害と循環器疾患の因果関係の解明、睡眠時呼吸障害の新しい治療法の開発、経頭蓋電気刺激が睡眠および覚醒に与える影響の解明などがある。

３）会議または集会の概要

本ワークショップは国際医療情報学連盟（IMIA）、国際医用生体工学連合（IFMBE）が共催する国際ワークショップで原則 3 年に 1 度開催され、今回で第 8 回目を数える。本ワークショップは、生体機能の解明や医療診断精度の向上に資する生物医療データのモデリング、解析、評価に関する研究発表の場を提供し、当該分野での国際的な人的交流を促すことを目的とする。

今回のワークショップは、大阪国際交流センターを会場として、平成 28 年 11 月 1 日～3 日の 3 日間開催された。参加者総数は 118 人であり、そのうち海外 12 ヵ国からの 34 人の参加があった。論文発表は、合計 81 件（口頭発表 47 件、ポスター発表 34 件）であった。

４）会議の研究テーマとその討論内容

本ワークショップでは、以下のセッションを開催した。

11 月 1 日（火）

8:30-10:30 最新の信号解析手法の生体医工学応用

11:00 - 13:00 心電図および心拍変動

14:30 - 16:30 結合性と因果性

17:00 - 18:30 ポスター・セッション

11 月 2 日(水)

8:30 - 10:30 睡眠ダイナミクスの解析

11:00 - 13:00 人間行動の信号処理

14:30 - 16:30 医療判断

16:30 - 18:00 ポスター・セッション

11 月 3 日（木）

9:30 - 12:00 シンポジウム“From dynamical disease to disease dynamics: Predictive medicine in the era of data science”

13:30 - 15:30 ブレイン・コンピュータ・インターフェースのための信号処理

16:00 - 18:00 脳信号解析

11 月 1 日の「最新の信号解析手法の生体医工学応用」のセッションにおいて、Patrice Abry 教授に「分娩時の胎児心拍変動解析」と題するご講演をいただいた。この講演では、胎児心拍数モニタリングの最新の解析技術についてお話いただいた。

11 月 2 日の「睡眠ダイナミクスの解析」のセッションにおいて、Thomas Penzel 教授に「睡眠研究における信号記録と非線形信号処理」と題するご講演をいただいた。この講演では、睡眠研究における計測技術および信号処理技術についてお話いただいた。

11 月 3 日の「脳コンピュータインターフェースのための信号処理」のセッションにおいて、Fabio Babiloni 教授に「認知脳科学の工学応用のためのブレイン・コンピュータ・インターフェイス」と題するご講演をいただいた。この講演では、ブレイン-コンピュータ（ブレイン-マシン）・インターフェイスの応用の可能性についてお話いただいた。

５）招聘した成果

世界的に著名な 3 名の研究者にご講演いただき、国内外の研究者とともに活発な議論が行われた。さらに、これらの講演に関連した一般演題の発表を通じて、我が国の技術や研究成果を被招聘者ならびに海外の研究者に知っていただくことができた。今回のワークショップは、国内の研究者、特に、学生を含む若手研究者に素晴らしい刺激を与えた。

６）その他

Thomas Penzel 教授は 10 月 31 日に名古屋市立大学で開催された講演会 Leading-Edge Biosignal Processing for Sleep Science に参加し、特別講義を行った。



BSI2016 の記念写真（11 月 1 日大阪国際交流センターにて撮影）。最前列の左から 5 番目が Patrice Abry 教授、7 番目が Thomas Penzel 教授、8 番目が Fabio Babiloni 教授。





平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（日本招聘）



自治医科大学　医学部　薬理学講座臨床薬理学部門

相澤　健一

会議等名称　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

開　催　地　よみうり大手町ホール 東京大学本郷キャンパス

時　　期　平成 29 年 2 月 24 日～2 月 25 日

１）はじめに（招聘の概要）

平成 29 年 2 月 24 日　よみうり大手町ホールで 2016 年度 AMED 成果報告会発表

平成 29 年 2 月 25 日　東京大学で疾患プロテオーム／メタボローム解析の技術支援

２）被招聘者の紹介

鈴木亨先生は東京大学で循環器病研究について基礎から臨床、またトランスレーション研究まで幅広い領域で顕著な成果を上げられ、2014 年に英国レスター大学循環器内科教授に就任された。15 年以上前から先駆的に質量分析技術を疾患機序の解析に応用し、細胞や分子レベルの機序解析（JBC 2003, 2009; MCB 2003, 2008 等）から、バイオマーカーの開発（BBRC 2006, Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2008）に至るまで幅広く応用した。具体的な例として、心不全のバイオマーカーとして広く臨床応用されている B 型利尿ペプチド（BNP）のプロセシング産物を質量分析計で測定し、冠動脈再狭窄の診断に有用なバイオマーカーになることを示した（Clin Chem 2013）。レスター大学では、心血管疾患症例の代謝物 2,500 例以上を測定し、世界最大の疾患代謝物のデータベースを構築した実績を有する。その成果の一例として、心不全症例においてホスフォチジルコリンの代謝物であるトリメチアルミン N-オキシド（TMAO）が急性心不全の予後予測マーカーであることを報告した（Heart 2016）。TMAO の代謝過程を解析することにより、腸管細菌により生成されるパスウェイを明らかにし、腸内細菌と心不全病態の関係を解明する等、日英にわたりグローバルに活躍され、質量分析計を用いた臨床プロテオーム、メタボローム解析の多数の実績を有す。

３）会議または集会の概要

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」は国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED）が主催する研究報告会であり、循環器疾患・糖尿病等

生活習慣病対策実用化研究事業、腎疾患実用化研究事業、免疫アレルギー疾患等実用化研究事業（移植医療技術開発研究分野）、慢性の痛み解明研究事業の 4 事業からなり、生活習慣病などを抱える人々に届ける新たな研究成果についての最先端の報告会である。AMED 発足以来、毎年開催されている。

４）会議の研究テーマとその討論内容

近年、今後の医学研究の方向性のひとつとして精密医療ないし層別化医療が注目されているが、その中で人種間の疾患成因の比較研究は重要な役割を果たすと考えられる。今回の講演では、日英の医学、医療の違いやプレシジョン医療を中心に、グローバルな視点から最新の動向を講演して頂いた。日本における将来の医療政策や医学研究の動向を知る貴重な機会になった。

また、鈴木先生は既に、レスター大研究所内のバイオインフォマティシャンとともに、研究室内で解析手法を開発中し、そのプロトタイプを完成させた。具体的な代謝物測定の方法論は、収集した血清を HILIC カラム（疎水性カラム）ならびに逆相カラムで処理の後、Waters 社製の Synapt G2S の ESI 型質量分析計で測定するものである。データは Progenesis 解析ソフトを経て、統計解析ソフト Simca へと移し、群間解析ならびにノード解析を行い、病態の関連物質を特定する。これを用いて、臨床情報と照合し、心血管疾患の病態ならびに予後との関連を解析する。さらに、特定物質に対し、それを選択的に測定するための S/MRM 法（single/multiple reaction monitoring）を開発し、島津製作所製 LC-8050 超高速トリプル四重極型質量分析計でも測定できるような測定プロトコールも開発した。日本のコホートにおける測定と比較検討を実施可能とするものであり、今後日本のプレシジョン医療の実践に資するものになると期待される。

５）招聘した成果

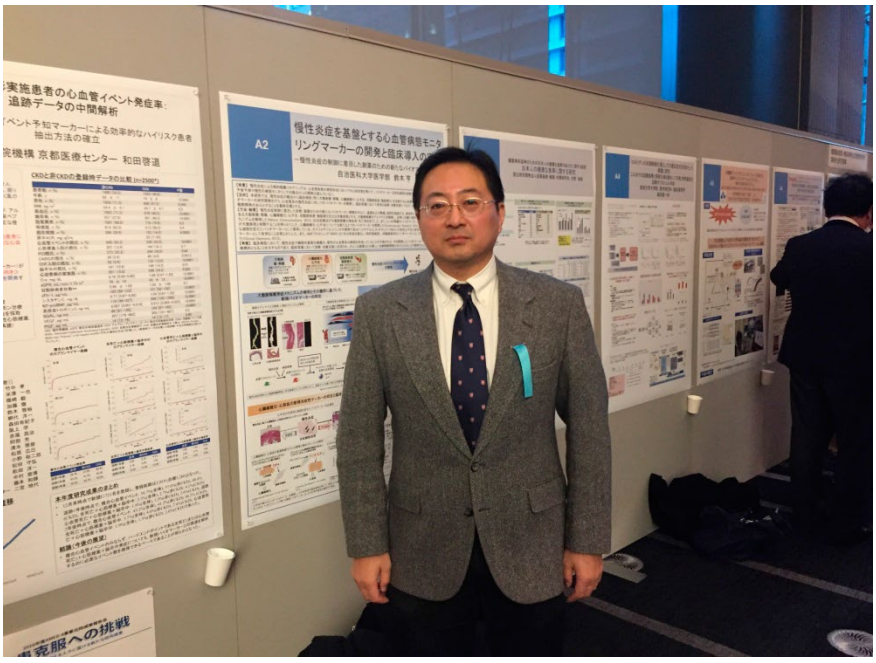
病因の研究手法は多岐にわたる。動物や細胞の実験を用いた疾患モデルを中心に心不全研究は進んできたが、実際の患者試料（組織等）を用いたヒトを対象とした研究は限られている。ゲノム研究以外の生体試料を用いた研究はほとんど進んでいない。これまで心血管疾患の臨床研究は欧米を中心に疫学研究や画像研究（MRI 等）を中心に進められてきた。一方、近年の測定技術（質量分析）の発達は、血液からも循環内の微量の生体物質（蛋白質、代謝物）の包括的な測定を可能にした。蛋白質は個体・病態の変化を正確に反映するが、経時的な質的（プロセシング、修飾、相互作用等）・量的変化を測定し、情報を処理できるまでの技術的な成熟には至っていない。現時点で最も期待されている技術は生体物質の最終生成物である代謝物（メタボローム）の測定である。代謝物は小分子が中心であり、細胞膜を透過し、生体反応・細胞内反応の制御に関わるものが多く、病態機序や標的物質の特定に繋がる期待がある。重要なことは、代謝物は約 40,000 個程度に限られていることである。さらに、これらの限られた代謝物の量的変化を解析することにより、病態過程に関わった代謝経路を推測することが可能なことである。

今回の招聘による技術交流により、世界最先端かつ最高水準の疾患プロテオーム／メタボローム解析の技術とノウハウを鈴木先生から直接伺い、技術指導を受けることが可能となった。このことは、我が国の医工計測技術の発展に大きく寄与する。

６）その他



会場入り口（写真①）



発表の様子（写真②）



技術支援の様子（写真③）

謝辞

この度はこのような貴重な助成を頂戴し、公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団に心より御礼を申し上げます。なお、本技術交流助成は疾患プロテオーム／メタボローム解析の技術支援を目的としたものであり、AMED 成果報告会に対するものでありません。

平成２７年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外研修）

群馬大学大学院 医学系研究科 遺伝発達行動学

三輪　秀樹



研修先名称　Harvard medical school
VA Boston Healthcare System

研　修　地　1400 VFW Parkway
West Roxbury MA 02132 USA

期　　間　平成 28 年 4 月 1 日～6 月 30 日

１）研修中に実施した研究テーマ

GABA 作動性ニューロンの睡眠振動波発生との関連性

２）研修期間中の研究成果

統合失調症などの精神疾患と睡眠障害との関連性が近年報告されてきている。申請者は、統合失調症死後脳解析結果をもととした統合失調症の病因に関する GABA 仮説に関して、新たな統合失調症モデルマウス[パルブアルブミン(PV)ニューロン特異的 GAD67 欠損マウス(PV-GAD67 KO マウス)。PV-Cre マウスと GAD67 flox マウスを交配させることで作製]を開発した(Miwa et al., 2015)。さらに、この遺伝子改変マウスはケタミン麻酔下で脳波リズム（特に低周波帯域）の形成・維持に異常があることを観察している。ケタミン麻酔下の脳波リズムは徐波睡眠時の脳波リズムとの類似性が多く指摘されており（Steriade M et al., 1993)、さらには統合失調症患者および自閉症患者が不眠症や概日リズム障害などの睡眠障害と強い関連性をもつ（Wulff K et al., 2010)ことから、申請者は、GABA ニューロンの睡眠覚醒リズムの形成・維持機構との関連性の解明に興味を抱いたが、睡眠機能の解析技術は所属研究室には持ち合わせていない。従って、現在所属する研究室を主宰する柳川右千夫教授が以前から共同研究を行っている米国 Robert W. McCarley 研究室（McKenna JT, Yanagawa Y, McCarley RW et al, 2013; Brown RW, Yanagawa Y, McCarley RW, et al., 2008)に技術研修を行うことを目的とした。研修期間中には複数の実験を行ったが、ここでは「視床網様核（thalamic reticular nucleus; TRN)の GABA 作動性ニューロンの機能障害によるスピンドル発生異常の検討」について報告を行う。

上記の統合失調症 GABA 仮説にもとづく新規マウスモデルの更なる詳細な研究として、統合失調症と睡眠障害との関連性を調べることにした。申請者が開発した新規統合失調症モデルマウスを 24 時間自由行動下で、活動量を計測した結果、異常を示唆する結果を得られている。さらに、近年ノンレム睡眠中に観察されるスピンドル波発生密度と統合失調症との関連が報告されているため(Pinault D et al.,

2011)、新規統合失調症モデルマウスを用いて、スピンドル発生密度の異常の解析を検討した。視床網様核はスピンドル発生に重要な神経核であることが示唆されている（Luthi A et al., 2014)。しかしながら、研修先研究室の研究室主宰者 PI である McCarley 博士から、「TRN 特異的 GABA 伝達欠損マウスの作製」を提案され、当初の研究計画を変更して、DNA 組換え酵素 Cre を組み込んだアデノ随伴ウィルス（AAV）を脳定位固定装置下で GAD67 flox マウス(GAD67 : GABA 合成酵素の一つ)の TRN に限局させて注入することで作出することを試みている。この計画変更に伴い、AAV の作製および注入量の検討、AAV 注入後 GAD67 タンパク質が欠損する時間過程（Cre が発現することで GAD67 遺伝子が欠損し GAD67 タンパク質は以後発現しないことになるが、細胞内にはそれまで転写、翻訳されていた mRNA とタンパク質が存在し、それらが自然分解されて消失するまで待つ必要がある）など予備実験を要している。したがって、当初の研究計画どおりに進んでおらず、計測した動物個体数が少ないが、AAV を GAD67 flox マウスに注入し、脳波ネジ電極を埋め込んだ後、脳波を記録して、脳波による睡眠・覚醒リズム（ノンレム睡眠・レム睡眠・覚醒）の異常およびスピンドル波発生の異常が観察できており、当初の仮説の通り、統合失調症と睡眠障害との関連性を細胞レベルの基礎過程で説明することできると考えている。今後は急性 TRN 脳スライス標本を用いたシナプス伝達の異常など詳細な解析を行う予定である。データ解析が終わり次第、国際的な学術雑誌への投稿を予定している。

またスピンドル計測技術に関しては、マウス個体でスピンドル波を検出するのは困難を要し、研修先研究室にて、研修期間中にスピンドル波をソフトウェアでの自動検出プログラムの開発に参加することができた。これは、市販の解析ソフトウェアでは解析できない内容であり、これを機にプログラミング言語 Matlab によるプログラム作成を実践的に習得すること機会に恵まれ、「未知の生体反応を計測する技術の開発」を身近に感じることができたことは大変よかったと考えている。また、このスピンドル波解析プログラムと現在作成している統合失調症モデルマウスを用いて、新規統合失調症治療薬のスクリーニングにも応用できると考えている。この場をお借りして、この研修をサポートしていただいた貴財団に感謝申し上げます。また、貴財団のますますのご発展を祈念いたします。

３）その他

上記のように、視床網様核はスピンドル発生に重要な神経核であることが示唆されている。スピンドルというリズム生成に重要なメカニズムの 1 つとして、視床網様核に発現している低閾値型 T タイプ電位依存性カルシウムチャネル Cav3.3 の特性が挙げられる（Lee at al., PNAS 2014)。派遣先研究室では、他の研究室との共同研究から、統合失調症患者からのサンプル解析から、Cav3.3 の SNP（single nucleotide polymorphism; 一塩基多型)を発見し、それを模倣した遺伝子改変マウスを作製し、スピンドル発生を含む脳波解析を行っており、良好な結果を得ている。この結果をもとに、更なる詳細な解析を行うため、TRN 特異的に Cav3.3 遺伝子を欠損させる研究計画を立て、進行中である。前述の遺伝子改変マウスは、全身の細胞の Cav3.3 遺伝子を欠損させたため、正確には、スピンドル発生異常が視床網様核に由来するものか、それとも他の脳部位に由来するものかはわからない。実際、脳の大脳皮質のある種の細胞は Cav3.3 遺伝子を発現しており、脳波自身が大脳皮質の電位活動を反映するものなので、そのスピンドル発生異常は大脳皮質に発現する Cav3.3 遺伝子の欠損に由来するという可能性は否定できないままである。そこで、TRN 特異的に Cav3.3 遺伝子を欠損させる手法として、最近新たなに開発されたゲノム編集技術として、CRISPR/Cas9 を利用するため、sgRNA の設計およびそれらを組み込んだアデノ随伴ウィルス(AAV)ベクターのコンストラクトを設計している段階である。この AAV を Cas9

を Cre 依存的に発現する遺伝子ノックインマウス（Jackson #024857）と視床網様核に Cre を発現するパルブアルブミン(PV)-Cre マウスを交配させたマウスに対して、視床網様核に注入することで、TRN 特異的に Cav3.3 遺伝子を欠損させる予定である。このマウスを用いて、スピンドル発生の分子基盤を解明し、さらに睡眠リズムや認知機能に関する行動実験を行うことで、睡眠の生理的意義の解明および将来的にはそれにもとづいた睡眠による QOL 改善の一助となるヒトを対象とした研究を進めたいと考えている。

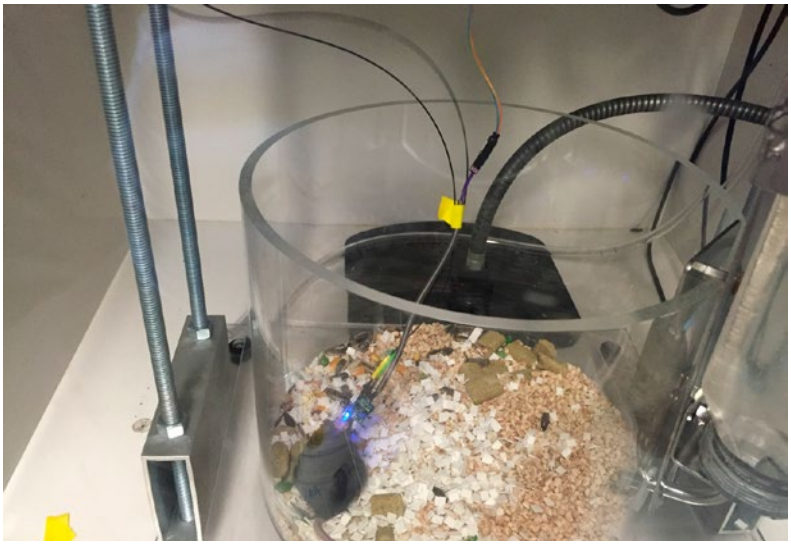


図 1 脳波記録とオプトジェネティクスによる光刺激法.青色に光っているのはレーザー光を光ファイバーを通して光刺激している様子を示す。これにより、チャネルロドプシンなど光感受性タンパク質を活性化させることで細胞を脱分極することで細胞を活性化させ、時空間的に細胞活動を制御することが可能となる。



図 2 研修先研究所付属動物施設における実験動物飼育。日本の多くの大学付属動物実験施設とは異なり、ケージ交換サービスや手術道具・設備を動物施設が提供してくれる。そのおかげで、飼育動物の様子を気にして週末出勤する必要がない。このような研究支援体制の相違も大変参考になった。

平成２７年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外研修）



東京大学大学院 医学系研究科 病態診断医学講座

客員研究員　　大黒　達也

研修先名称　　オックスフォード大学

研　修　地　　Department of Experimental Psychology、Tinbergen Building、 9 South Parks Road、Oxford、 OX1 3UD England

期　　間　　平成 28 年 6 月 1 日～10 月 26 日

１）研修中に実施した研究テーマ

反復経頭蓋磁気刺激法と脳機能イメージング計測技術（EEG、MEG、EMG、MRI）を用いた、ヒトの感覚運動制御機能の神経生理学的客観評価法を習得する。

２）研修期間中の研究成果

まず、本研究プロジェクトに合わせて、グループ長の Dr. Riikka Mottonen が新しい機器を購入した。研修先の計測技術を用いている研究室は世界的にも非常に少なく、特に私の研究分野であるヒトの認知機能の研究において、この計測技術を習得するためには、研修先の研究室が最も適していた。しかし、解析評価法などは、未だ他の分野に比べて確立されておらず、試行錯誤を繰り返しながら研究を行った。申請者が主に、使用方法や解析法を学び、それを研究室のメンバーに報告する仕事を行った。

これまでは、事象関連電位（ERP）を用いた報告しか行われていなかったが、私は周波数解析に注目した結果、新しい所見が得られた。現在、その結果をもとに第一筆者として論文提出準備中である。

本研究プロジェクトは英国でニュースになり Web でも公開されている（http://rogue-resolutions.com/news/new-integrated-tms-eeg-system-installed-university-oxford/）。さらに新しく取得した実験データに関しては、今後も共同研究として継続していくことになっている。

３）その他

英国就労ビザの期間終了日 11 月 9 日にて任期は切れるが、研究グループ長の Dr. Riikka Mottonen と今後も共同研究を続けて行くことなどを話し合っていた。そして、オックスフォード大学での任期中にドイツのマックスプランク研究所からお話しを頂き、12 月から博士研究員として 3 年間ドイツへ渡

ることになり、オックスフォード大学との本研究プロジェクトに関する共同研究は物理的に実現可能となった。

現在、解析が終わったデータに関しては、論文提出準備中である。また、それとは別に新しく取得した実験データに関しては、被験者数がまだ足りないことから、今後は共同研究として徐々にデータを取っていくつもりである。



図 1. オックススフォード大学

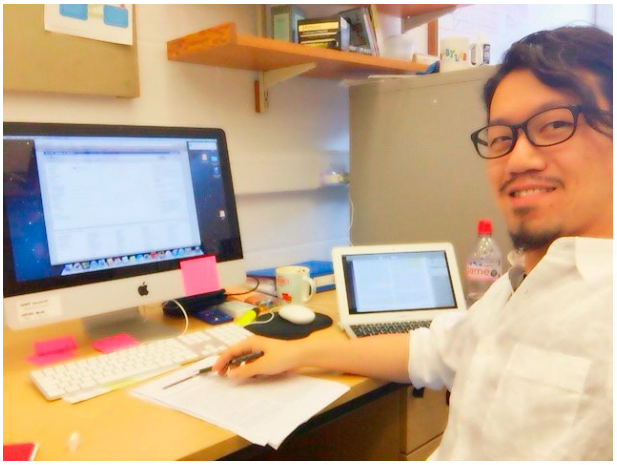


図 2. オックススフォード大学の研究室にて解析中の様子

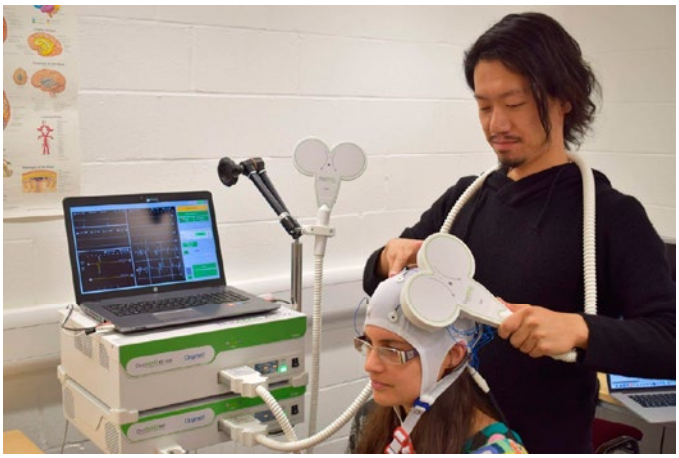




図 3. TMS、EEG、EMG を組み合わせた実験の様子

平成２７年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外研修）



東京農工大学大学院　工学府　生命工学専攻

李　鎭熙

研修先名称　Université Lyon 1 - Claude Bernard

研　修　地　Bâtiment CPE 43, bd du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne, Cedex, France

期　　間　平成 28 年 6 月 18 日～10 月 16 日

１）研修中に実施した研究テーマ

本研究では、より簡便にヒトゲノム中の DNA メチル化の検出を行うことを目的に、複数 DNA の同時検出技術の開発を試みた。

近年、特定遺伝子領域のメチル化レベルが、特定の疾患と関連していることが分かってきており、早期かつ正確な疾患の診断を可能にする、新たな診断指標として着目されている。我々はこれまでに、DNA 結合蛋白質（ジンクフィンガー蛋白質）に標識酵素を融合した人工蛋白質を用いることで、標的遺伝子領域のメチル化を検出するシステムを構築してきた。一方で、研修先である Blum 教授の研究室では、プレートにスポットした DNA プローブを用いて、複数の標的 DNA を同時に検出する技術を有している。今回はこの２つの技術を組み合わせることで、多数の遺伝子領域における DNA のメチル化を、一度の測定で同時に検出する技術の開発を目指した。

２）研修期間中の研究成果

今回の研修ではジンクフィンガー蛋白質及び DNA スポット技術を用いて、複数 DNA の同時検出技術開発を進め、以下の２点について達成することができた。

１．アルカリフォスファターゼを融合したジンクフィンガー蛋白質の作製・調製

２．スポット DNA プローブを用いた合成オリゴヌクレオチド DNA の検出

１．ジンクフィンガー蛋白質としてはマウス由来の Zif268 を用い、標識する酵素として大腸菌由来のアルカリフォスファターゼ（ALP）をその C 末端にペプチドリンカーを介して融合されるようデザインした。作製した人工蛋白質（Zif268-ALP）は大腸菌 BL21(DE3)を用いて組換生産を試みた。

37 ºC で 24 h 培養後、菌体を超音波によって破砕、遠心分離した後の上清にアルカリフォスファターゼ活性を確認することができた。この破砕液及び、Strep-tag II を介したアフィニティークロマトグラフィーによる精製後の蛋白質の状態をポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で確認したとこ

ろ、目的の蛋白質（約 59 kDa）のバンドが観察された（図）。精製後蛋白質はアルカリフォスファターゼの活性を 51 U/mg 程度維持していた。

２．異なる配列を有する DNA プローブをプレート上にスポットし、そのスポットした各プローブ、及び Zif268-ALP を用いて標的一本鎖 DNA の検出を試みた。

まず各スポットが 10^{13} コピー程度のプローブを含むようにプレート上にスポットした。配列としては、Zif268 の認識する配列（5′-GCGTGGGCG-3′）を含むものと含まないもの、そしてそれぞれの相補鎖の、計４種類を用いた。

各プローブがスポットされているプレートのウェルに検出対象の一本鎖 DNA を含む溶液を加え、95 ºC に熱した後、室温まで冷ますことでプローブと標的 DNA をハイブリダイズさせた。その後、Zif268-ALP を含む溶液を加え、プローブと二本鎖を形成した DNA に結合させた。またコントロールとしてはストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼ複合体（SA-ALP）を用いた。SA-ALP は Zif268-ALP と異なり、配列特異性を有さないため、標的一本鎖 DNA に修飾されているビオチンに、配列に関係なく結合する。Zif268-ALP 及び SA-ALP の DNA への結合は、発色基質である BCIP/NBT を用いることで可視化した。

結果を図２に示す。一本鎖 DNA を加えなかった場合は Zif268-ALP 及び SA-ALP いずれの場合においても ALP の酵素反応由来の発色が観察されなかった。このことから Zif268-ALP 及び SA-ALP は一本鎖状態のプローブ DNA には結合しないことが分かった。そして、標的の一本鎖 DNA を加えた場合は、それに対応する DNA プローブがスポットされている箇所で発色が観察された。一方で、SA-ALP を用いた場合、Zif268-ALP の認識配列が存在しない DNA プローブ上でも発色が観察された。このことから、DNA のハイブリダイズだけでは見分けられない場合でもジンクフィンガー蛋白質を用いて再度配列をチェックすることで、より正確に標的 DNA の検出が行えることが分かった。

しかし一方で、スポットした DNA プローブ、または加える標的 DNA のいずれか一方に Zif268 の認識配列が存在する場合でも Zif268-ALP が結合し、スポットが観察されてしまった。つまり、二本鎖のうち、どちらか一方の鎖だけに認識配列が存在している場合でも Zif268-ALP が結合していることが分かった。これは DNA プローブの配列や長さの調節、Zif268 を二本鎖 DNA に結合させるときの温度や緩衝液の組成を最適化することで改善できると考えている。

また、標的一本鎖 DNA の検出下限を調べたところ、10^{10} コピーの DNA を加えた際でもスポットの発色を観察することができた。10^{10} コピーの DNA を検出することができれば、PCR による増幅を利用することで 10^{6}-10^{7} コピー程度のゲノム DNA におけるメチル化を検出することが可能である。10^{6}-10^{7} コピーの DNA とは 1 mL の血液や直径 1 mm の腫瘍から得られるヒトゲノム DNA 量であり、これは実際の診断の場面を考えた場合に実用的な感度であると考えている。

３）その他

メチル化 DNA の検出については、グルコース脱水素酵素を標識酵素として融合したジンクフィンガー蛋白質を用いた測定法の開発に成功しており、結果については本留学中に米国で開催された学会である、Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science 2016 (PRiME 2016)にて口頭発表を行った。また、Blum 教授のグループとの国際共著論文として、*Biosensors and Bioelectronics* に投稿し、受理された*。

また、国立成育医療研究センターと共同で DNA メチル化の迅速簡便計測の開発を行っており、現在実施中の AMED 先端計測プロジェクトの基盤技術の一つとして本研究成果を応用展開する予定である。

*「J. Lee *et al.* (2016). Development of an electrochemical detection system for measuring DNA methylation levels using methyl CpG-binding protein and glucose dehydrogenase-fused zinc finger protein. *Biosensors and Bioelectronic*, 1–6.」

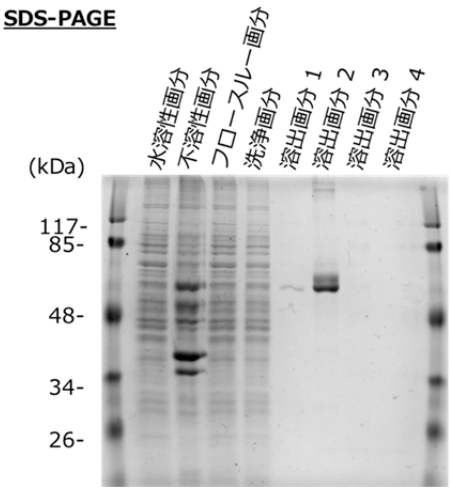


図1　精製後の Zif268-ALP の SDS-PAGE 解析結果

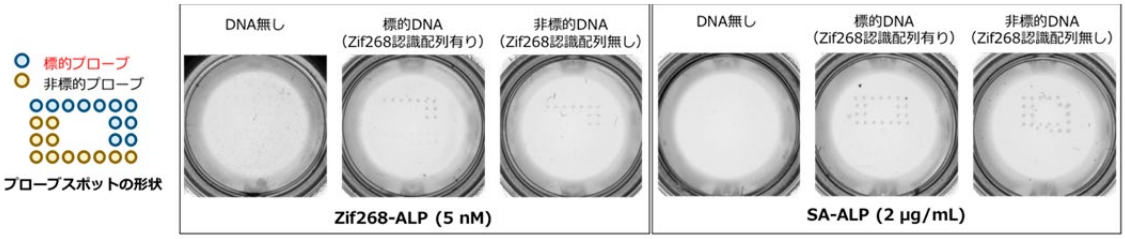


図 2　スポットした DNA プローブを用いた一本鎖 DNA の検出結果

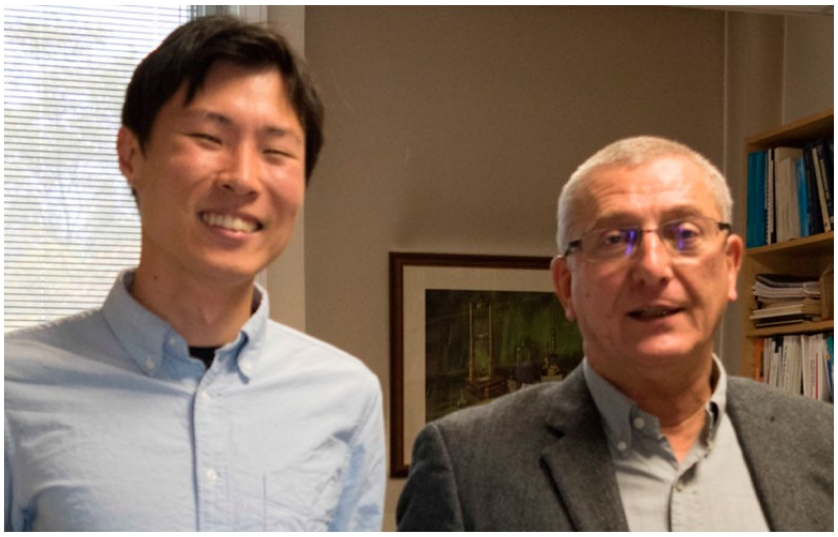


写真1　右が受け入れ責任者の Loïc J. Blum 教授、左が筆者

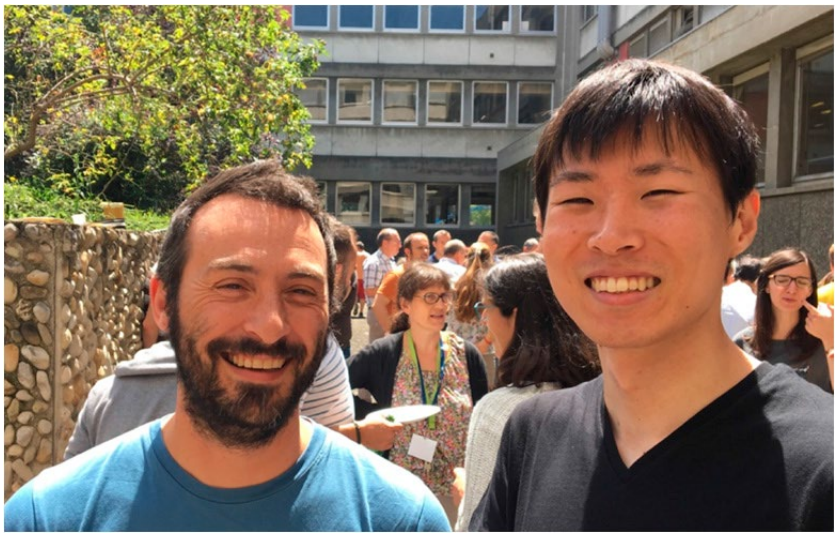


写真２　左はスポット等の実験に関て主にお世話になった Dr. Christophe A. Marquette

平成２７年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外研修）



東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻

磯村　拓哉

研修先名称　University College London

研　修　地　London, United Kingdom

期　　間　2016 年 4 月 2 日～2016 年 6 月 2 日

１）研修中に実施した研究テーマ

自然現象を数理的に説明する試みはこの数世紀の間大きな成功を収めてきました。一方で、人の知能を数理的に説明可能かは未だ良く分かっていません。19 世紀の物理／生理学者 Hermann von Helmholtz は、“人は常に知覚入力のダイナミクスを予測し、背後にある原因を推論している”と考え、この仮説を無意識的推論と名付けました。Helmholtz の仮説は、脳高次機能の機能的側面を“推論”のモデルとして統一的に説明することを可能にしましたが、実際の神経回路網がどのように無意識的推論を実装しているかは未だ分かっていません。さらに、複数の人がお互いにコミュニケーションを取り合う様な複雑な状況においても、脳の高次機能を無意識的推論のモデルで説明可能かどうかはこれまで議論されてきませんでした。

複数の人が存在する状況は、社会的相互作用の障害の神経メカニズムを考える上で重要です。神経科学においては、かねてより精神障害のメカニズム解明が望まれており、近年では、精神障害の数理モデルが数多く提案されています。しかし現在、鬱病や統合失調症、自閉症による社会性相互作用の障害は特に理解が遅れている症状であり、神経回路網のレベルにおける障害の発生メカニズムは良く分かっていません。

そこで本研究では、社会的相互作用における無意識的推論の神経メカニズムを説明し、それを計算機上で再現可能な、生物学的に妥当な新しい機械学習モデルを構築します。さらに、提案モデルのパラメータを調節することで精神障害のモデルとして利用できることを示し、新たな早期診断方法の開発への応用可能性について議論します。

２）研修期間中の研究成果

【Songbird の相互作用の数理モデルの解析】

共同研究者の Karl J Friston は近年、脳の高次機能を説明する統一理論である自由エネルギー原理を

提唱しました。自由エネルギー原理は、脳を構成する神経活動の変化、神経細胞間のシナプス結合の変化、および神経修飾物質の濃度変化は全て自由エネルギーを最小化させる様に変化するとする原理です。自由エネルギーが最小化されたとき、脳は外界の生成モデルを脳内に再構築し、外界のダイナミクスを推論することが可能となります。つまり、自由エネルギー原理は、無意識的推論を数理的に表現するための目的関数になっています。

本研究では簡単のため、人の代わりに songbird の相互作用を考えました。Songbird は他の songbird の歌を真似することで歌い方を学習することが知られています。Friston は 2 羽の鳥の脳内状態が学習の結果 1 つの共通な状態に収束した場合、原理的には、2 羽の鳥はお互いの歌の続きを予測可能になり、従って、予測誤差（自由エネルギー）を最小化できると考えました。我々はまず、複数の鳥が共通の 1 つの歌を歌っている場合は、この数理モデルは鳥の数が 3 羽以上の場合でも相互作用を上手く説明できることを確認しました。

しかし、鳥 A と鳥 B がそれぞれ異なる歌を交互に歌い、鳥 C が歌を学習する状況を考えた場合、従来の数理モデルでは鳥 C はどちらの歌も学習することができませんでした。これは、鳥 C の脳内に 1 つの外界のモデルしか仮定していないためです。そこで我々は、鳥 C が脳内に複数の外界のモデルを有する様にモデルを拡張しました。そして、複数のモデルによる推論を同時に実行し、その中で最も予測精度が高いモデルのパラメータのみを最適化するという学習アルゴリズムを提案しました。提案モデルの性能を評価するためシミュレーションを行ったところ、鳥 A が歌うときにはモデル 1 の、鳥 B が歌うときはモデル 2 の最適化が行われ、その結果、2 つの歌を別々に学習できることを発見しました。

【精神医学モデルへの応用】

さらに、シミュレーションパラメータの設定を変更すると推論できなくなることも分かりました。計算論的精神医学の分野においては、数理モデルのパラメータを変化させることで、病変モデルの作成が行われています。そのため提案モデルが推論を失敗するパラメータ条件を調べることで、社会的相互作用の障害の神経メカニズムの理解に繋がると考えられます。他者の脳内モデルを推論しコピーする能力は、人が他者の思考・精神状態・感情を推論し理解するために不可欠です。提案モデルは、精神障害の中でも特に理解が遅れている社会性相互作用の障害の、神経回路網レベルの発生メカニズムを説明する初めてのモデルになると期待されます。

実験では、具体例として、提案モデルが自閉症の診断方法の 1 つである自分の思考と他者の思考を区別し推論できるかを問う課題（サリーとアン問題）を解決できるかを調べました。シミュレーションの結果、既存モデルは常に自分と他者の思考を区別できませんが、提案モデルは自他の区別が可能であること、さらにパラメータに変化を加えると、今までできていた他者の思考の推論ができなくなることが分かりました。

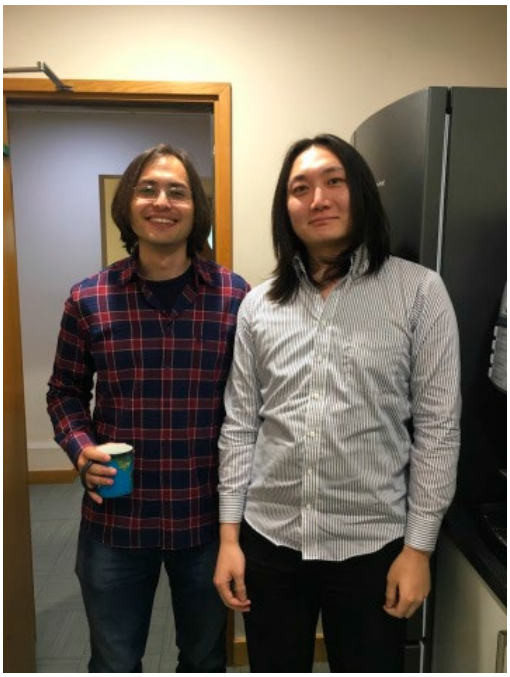
さらに、脳計測結果をこのモデルに当てはめパラメータ推定することで、新たな早期診断法を構築できると考えられます。機能的核磁気共鳴画像法（functional magnetic resonance imaging; fMRI）や脳磁図（magnetoencephalography; MEG）の解析手法に dynamic causal modeling（DCM）という手法が有ります。DCM では脳の部位間の結合をモデル化し、計測データから計測できない隠れた活動を統計推定することが可能です。つまり DCM により、精神障害に関連する脳領域とそれらの間の結合構造を推定することができます。しかし従来の DCM では、精神障害患者がどのように外界を認識しているかまでは分かりませんでした。我々が構築した無意識的推論の数理モデルを用いると、患者の脳が外界

を推論するモデルをコンピュータ内に再構築することで、脳計測データから、患者が外界をどのように認識しているのかを推定できる様になると考えられます。さらに、外界の認識の仕方を健常者と患者で比較することで、精神障害が認知機能に及ぼす影響を定量的に評価可能になると思われます。提案モデルは、社会的相互作用の障害の神経メカニズムを、“推論能力の異常”として統一的な説明を可能にし、早期診断方法、治療方法の確立に繋がると期待されます。これは、患者の生活の質（Quality of Life）向上に直結する点において，社会的インパクトは非常に大きいと考えられます。

３）その他

現在、本成果をまとめた学術論文を執筆中であり、近日中に国際誌に投稿する予定です。また本成果を基盤として、さらなる無意識的推論の数理モデルの拡張を行うため、来年度にも再び Friston の下を訪れ継続的に共同研究を行う予定です。

末筆ながら、今回の海外研修の実施にあたり多大なるご協力を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の理事の方々ならびに財団事務局を初めとする関係者の方々に深く御礼を申し上げます。





博士課程の大学院生 Berk（左）と短期滞在の大学院生 Franz（右）。研修先にて。

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外研修）



横浜国立大学大学院 工学府

博士課程後期　　榎本　詢子

研修先名称	Laboratory of Biological Structure Mechanics, Department of Structural Engineering, Politecnico di Milano
研　修　地	Piazza Leondaro da Vinci, 32 - 20133 Milano, Italy
期　　間	2016 年 6 月 16 日～9 月 12 日

１）研修中に実施した研究テーマ

細胞培養において最も重要な律速因子は酸素であり、適切な酸素濃度環境下での培養が細胞の活性や機能を維持する上で重要である。そこで本研究では、光酸素センサをマイクロデバイスに組み込み、非侵襲的に酸素濃度をモニタリング可能な新規マイクロデバイスの開発を目的とした。細胞培養マイクロデバイスに非侵襲的な光酸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。さらに電気化学センサをマイクロデバイスに搭載し、細胞活性評価も組み込んだマイクロデバイスを設計する。また、酸素濃度を制御するために、酸素透過性の高いシリコーンゴムを用いてマイクロデバイスを作製する。

２）研修期間中の研究成果

本研究では、**細胞の増殖活性と酸素濃度を非侵襲的に測定・評価可能なマイクロデバイスを開発**した（図１）。このマイクロデバイスの開発のポイントは、微小な培養チャンバ内に効率よく**均一に細胞を導入**できること、そして、そのチャンバ内でそのまま**細胞増殖活性**および**酸素濃度**を非侵襲的にモニタリングできることである。そこで、まずはナノリットルオーダーの全てのマイクロチャンバ内に同数の細胞を均一に素早く導入する方法として、**界面自由**

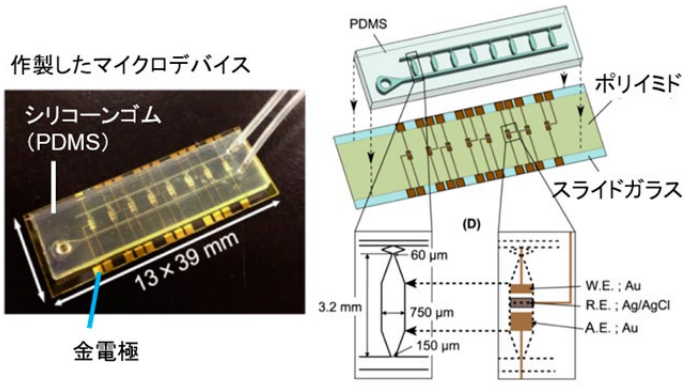


図１　センサ機能を有するマイクロデバイス

エネルギー変化に着目した独自の溶液操作技術を考案した（図２）。すなわち、チャンバ出口に菱型構造を付与し、大きなエネルギー上昇が生じるように設計することで、出口部につながるマイクロ流路内を減圧するのみで、独立したすべてのチャンバに溶液が素早く細胞を均一に導入できることを確認した。

次に、デバイスに微小電極を組み込み、電気化学インピーダンス測定によって細胞の増殖評価を行った。あらかじめチャンバ内に濃度の異なる種々の抗生物質を塗布し、その後細胞をチャンバ内で培養した。その結果、添加した抗生物質の濃度に依存した細胞の増殖と、インピーダンス値に相関があることを示した（図３）。このことから、電極上に接着した細胞のインピーダンスを測定するのみで、非侵襲的に細胞の増殖を測定できることがわかった。

また、マイクロデバイス底面に、酸素センサ材料として白金ポルフェリンを含むシリコーンゴムを塗布し、パルスレーザの照射により生じるリン光を測定することで酸素濃度を測定した。白金ポルフェリン上で細胞を培養しても影響がないこと、さらに 0～20%濃度範囲の酸素を測定できることを確認した。さらに、細胞数に依存した酸素消費量を測定できることもわかった。

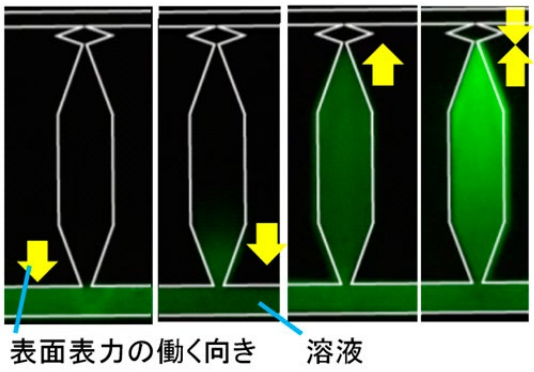


図２ 表面張力を用いた細胞懸濁液の導入

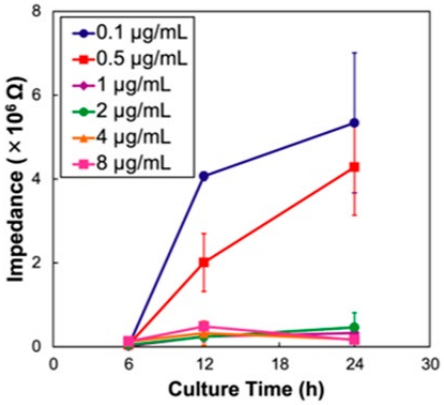


図３ インピーダンス測定による細胞増殖評価

以上のことから、酸素濃度とインピーダンス値を測定することで、非侵襲的にチャンバ内の細胞数および活性を非侵襲的に測定できることが示唆された。作製したマイクロデバイスは、一度に 100 個の独立したマイクロデバイスに均一に細胞を導入することが可能であり、経時的に細胞数や活性を定量的に評価できることから、細胞生物学などの基礎的な研究から創薬や再生医療などの応用まで幅広い波及効果が期待できる。

３）その他

今後も留学先の研究室との共同研究を継続し、作製したデバイスを iPS 細胞の培養や分化誘導の評価デバイスとして応用していく予定である。

４）謝辞

本研究は、多くの方々のご協力、ご支援の元に成し遂げられました。この場を借りて、感謝申し上げます。

海外研修活動費について、公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団からのご支援を頂戴いたしました。このような貴重な経験をさせていただけたことに、感謝御礼申し上げます。



図4 電極作製の様子図



５ 受け入れ研究室メンバーとの集合写真

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外研修）



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
牧　功一郎

研修先名称　　コロンビア大学生体医工学科 研修

研　修　地　　米国・ニューヨーク

期　　間　　平成 28 年 8 月 12 日~10 月 9 日

１）研修中に実施した研究テーマ

A. AC6 分子の過剰発現による培養骨細胞上プライマリーシリアの流れ刺激感知機能の変化

B. ICC 染色によるプライマリーシリア基部のアクチン細胞骨格の観察

２）研修期間中の研究成果

A. AC6 分子の過剰発現による培養骨細胞上プライマリーシリアの流れ刺激感知機能の変化

細胞のアンテナであるプライマリーシリア（一次繊毛）は、生体組織内に生じる流れ・振動･圧力などの力学刺激を感知し､種々のシグナル経路を制御する機能的構造体である。プライマリーシリアは､流れの作用下で湾曲しCa^{2+}イオンを流入させることが知られている。本研究では、細胞内のCa^{2+}イオンと結びつき､cAMP 濃度を調節すると考えられている AC6 分子に着目し､培養骨細胞に対してAC6 分子の過剰発現を行った｡その結果､AC6 分子を過剰発現させた培養骨細胞においては､コントロールと比べ、マイクロ流路を用いた流れ刺激下における細胞内 cAMP の濃度が有意に高い値を示した。さらに、AC6 分子はプライマリーシリアに局在していることが ICC 染色から明らかとなった。このことから、AC6 分子はプライマリーシリアを介して細胞内に流入したCa^{2+}イオンに応答して細胞内の cAMP 濃度を調整していることが示唆された。

B. ICC 染色によるプライマリーシリア基部のアクチン細胞骨格の観察

プライマリーシリアの刺激感受性は、その曲げ剛性および基部の弾性により調節されることが示唆されている。本研究では、プライマリーシリア基部に存在するアクチン細胞骨格が基部の弾性に寄与している、との仮説を立て、ICC　染色によりアクチンフィラメントを観察した。その結果、プライマリーシリアの基部では、他の領域と比べてアクチンフィラメントの濃度が低いことが明らかとなった。このことから、プライマリーシリア基部の柔軟性はアクチン細胞骨格の局所的な解体により維持されて

いる可能性が示唆された。

３）その他

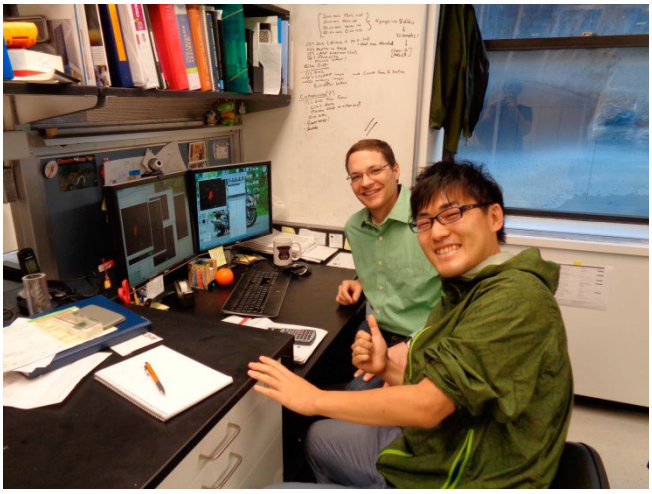
米国・コロンビア大学での研修におきまして多大なご支援を賜り、心より御礼申し上げます。指導教官であるChris Jacobs 教授とは、私の現在の受入れ研究室である京都大学ウイルス・再生医科学研究所バイオメカニクス研究室（教授：安達泰治先生）に海外客員教授として着任された際、初めてお会いする機会を得ました。事前に私の研究の方向性についてご理解頂いていたこともあり、研究計画について研修の直前まで丁寧に議論くださっていました。当初の研究計画の着想「プライマリーシリアが流れ刺激を感知する分子メカニズムの解明」をベースとして、現場で正に盛り上がっているトピックを加えた 2 つの実験計画を遂行いたしました。博士後期課程の学生さん 3 人と、修士課程の学生さん 3 人の小規模の研究室（写真）でしたが、各自、忙しい中でも実験技術を丁寧に伝えてくれ、毎日着実に種々の実験技術を習得することができました。実験量はかなり多く、失敗した実験も多々ありましたが、確立された実験手法と仮説を信じて、地道に、かつ丁寧に実験と向き合うことの大切さを学びました。日々のミーティングでは、細胞内の分子メカニズムに医工学的観点からアプローチするための新しい技術開発に関しても多くの議論を交えました。複雑な生命現象を理解するための基盤技術開発はますます求められており、機械工学出身の一技術者として、継続して取り組んでゆく所存であります。オフィスワークとしても、Jacobs 先生が執筆に参加されている教科書の第二版出版のための編集作業にも関わることができ、共著者に入れて頂けることとなりました。週末にはニューヨーク生活の色々な楽しみ方を伝授してもらい、充実した日々を過ごすことができました。

今後の研究に関しましても、Jacobs 教授より継続的な共同研究のお話を頂いております。博士課程修了後は、世界的な共同研究を自ら広げてゆけるよう努力いたします。

この度は誠にありがとうございました。今後とも常により広い視野で、大きな目標を掲げて研究に邁進し、いつの日か医工計測分野に貢献したいと願っております。



AC6 を発現したバクテリアの培養



アクチン染色画像の解析

平成２８年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外研修）



広島市立大学大学院　情報科学研究科　医用情報科学専攻

釘宮　章光

研修先名称　　フロリダ大学　電子・コンピューター学科

研　修　地　　アメリカ合衆国　フロリダ州ゲインズビル市

期　　間　　平成 28 年 6 月 15 日～9 月 15 日

１）研修中に実施した研究テーマ

アミノ酸の新規計測法の開発

２）研修期間中の研究成果

アメリカ合衆国のフロリダ大学電子コンピューター学科（Department of Electrical & Computer Engineering）、および多機能集積システム技術センター（Multi-functional Integrated System Technology Center）に所属し、我々がこれまで研究を進めてきた酵素を用いる 20 種類のアミノ酸濃度の計測法について、より簡便に検出し、将来的には装置化を目指すための方法について検討を行った。

本プログラムでは、2 通りの方法でアミノ酸を検出する方法の検討を行った。1 つは、酵素を固定化したろ紙を反応流路に用いてアミノ酸を検出する Paper fluidic device を用いる方法（同学科、同センター　Hugh Fan 教授）、もう 1 つは半導体素子を用いて検出する方法（同学科、同センター　Toshikazu Nishida 教授）である。

1.　Paper fluidic device によるアミノ酸検出法の開発

まず、酵素を固定化したろ紙を反応流路に用いてアミノ酸を検出する方法（Paper fluidic device）においては、市販のろ紙から図 1 のような形状のものを、パソコンのプログラムに従いマイクロクラフトカッターで切り出して得た。また、ラミネートフィルムに全く同形状の流路をマイクロクラフトカッターで切り出し、そこに同形状のろ紙を入れ込んだ後、未加工のラミネートフィルムで挟み込んでラミネータ装置を用いて 100℃で加工して、図 2 のような Paper fluidic device を得た。そして四隅の正方形の部分に、各アミノ酸結合性酵素（HisRS; ヒスチジン結合性酵素、LysRS;リジン結合性酵素、 TyrRS; チロシン結合性酵素）、および発色剤のトリンダー試薬等の試薬を滴下して乾燥させた。完成した Paper fluidic device の中央の菱形部分にサンプルのアミノ酸溶液を滴下し、サンプル溶液が各反応部へ浸透して 15 分後に発色剤により赤紫色に変化した度合いを計測することで反応の

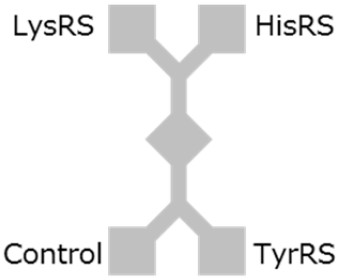


図１　ろ紙で作製した流路

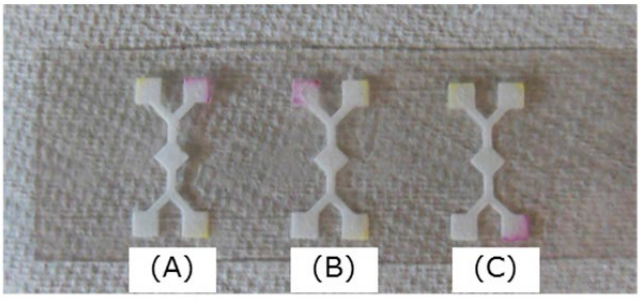


図２　3種類の酵素を固定化したPaper fluidics
(A) ヒスチジン、(B) リジン、(C) チロシン滴下

評価を行った。図２(A) は 100 μM ヒスチジンを滴下、(B) は 100 μM リジンを滴下、(C) は 100 μM チロシンを滴下したものを示す。その結果、ヒスチジン結合性酵素の HisRS はヒスチジンと、リジン結合性酵素の LysRS はリジンと、チロシン結合性酵素の TyrRS はチロシンと、それぞれ基質のアミノ酸と特異的に反応し、写真のように各対応する酵素を固定化した反応部のみが赤紫色に変化した。これにより、3 種類のアミノ酸を同時に検出できる可能性を示した。

今回反応に用いたアミノ酸結合性酵素の HisRS、LysRS、TyrRS は好熱生由来の大腸菌から発現させて得られたものであり、酵素反応における最適温度は 60～70℃程度であるため、今回行ったような室温での反応においては反応性が少し低く、数μM 程度の低濃度域の定量までは至らなかった。今後は、室温程度でも活性を有する酵素を用いて検討を行う予定である。

2.　半導体素子を用いるアミノ酸検出法の開発

Nishida 教授は、新しい半導体素子の開発をめざしており、それらをセンサー素子や低電力デバイスとして応用することを目的に研究を行っている。従来、半導体素子は二酸化ケイ素（SiO_2）を用いて作製されているが、Nishida 教授のグループは酸化ハフニウム（HfO_2）を素材として用いて半導体素子の開発を行っている。酸化ハフニウムは、誘電率が二酸化ケイ素の 6 倍以上あるため、トランジスタのゲート絶縁膜の有力な素材であると期待されているということである。

図３にフロリダ大学ナノスケール研究所のクリーンルーム内での半導体チップ作製の様子を示す。なお、本プログラムにおいては時間の都合で半導体チップを用いるアミノ酸検出法について検討するまでは至らなかった。今後は Nishida 教授とも連携して、半導体素子を用いるアミノ酸計測法について検討を行いたいと考えている。

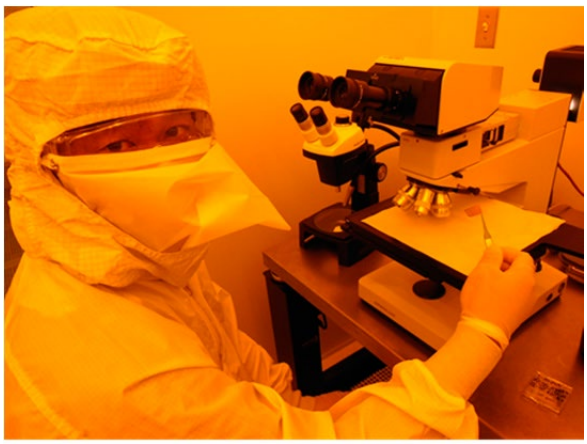


図３　ナノスケール研究所にて

３）その他

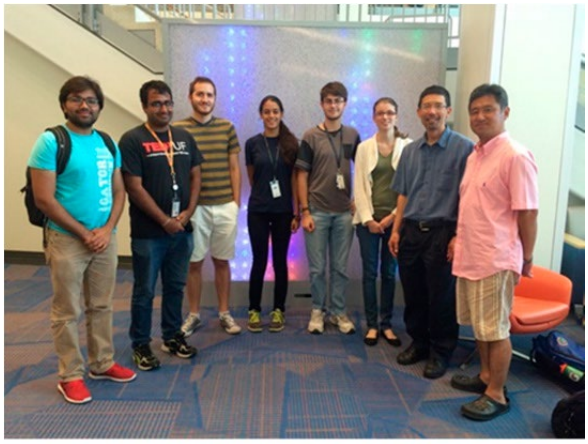
本プログラムにおいては、酵素を固定化したろ紙を反応流路に用いてアミノ酸を検出する Paper fluidic device を用いる方法と、半導体素子を用いて検出する方法の 2 通りの方法で簡便にアミノ酸濃度を検出する方法について検討した。

今後は、Paper fluidic device を用いる方法については、室温において活性を有するアミノ酸結合性酵素を用いて高感度にアミノ酸を検出する装置の開発を行いたい。また、今回は 3 種類のアミノ酸結合性酵素を固定化した流路を用いて 3 種類のアミノ酸を同時検出するデバイスの作製を行ったが、本方法を用いると 20 種類のアミノ酸濃度を同時検出可能なデバイスの開発も可能であると考えられるため、今後も引き続き検討を行う予定である。

Nishida 教授とは今後も連携し、酸化ハフニウムで作製した半導体チップを素子として用い、その上に化学修飾してアミノ酸結合性酵素と基質アミノ酸との相互作用によって生成される化合物を検出するシステムを構築する予定である。

Nishida 教授とご家族、研究室のメンバー、また多機能集積システム技術センターのメンバーにはたいへん親切にしていただき、快適な環境で研究を進めることができた。

公益財団法人中谷医工計測技術振興財団からは、技術交流助成（海外研修）の助成も受けた。この場をかりて、厚くお礼を申し上げます。



Nishida研究室のメンバーと

平成２７年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（海外留学）



豊橋技術科学大学大学院 工学研究科　機械工学系

永井　萌土

留学先名称　　カリフォルニア大学ロサンゼルス校

留　学　地　　米国カリフォルニア州ロサンゼルス

留 学 期 間　　平成 27 年 9 月 2 日～8 月 31 日

１．留学中に実施した研究テーマ

細胞動態の計測と制御に向けた超並列細胞核内デリバリー技術の開発

２．留学期間中の研究成果

カリフォルニア大学ロサンゼルス校（UCLA），Mechanical and Aerospace Engineering Department, Pei Yu Chiou 教授の研究室に 1 年間滞在して技術交流を実施した。

渡航前に「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」を計画した。さらに渡航後、Chiou 教授と 1 ヶ月近く議論した結果、具体的には、超並列に細胞核内へ物質をデリバリーする技術を開発することに決めた。本技術は細胞に物質を導入した後、超並列での細胞動態の計測と制御を可能にする。1 年の滞在期間の中では、Chiou 研究室が確立した技術をベースにした方が良いという判断であった。

主な共同研究者は、細胞内デリバリーでは Dr. Tuhin Subhra Santra（現インド工科大学マドラス校）、マイクロスタンプ作製では Dr. Yu-Chun Kung である。他にも技術的な不明点は、Chiou 研究室のメンバーを中心に問い合わせて解消した。

従来の細胞内デリバリー法では、①オルガネラレベルでの位置選択、②一定量の物質輸送、③大量の細胞を扱うことは困難であった。導入される結果にはばらつきがあり、細胞動態も分布が大きくなる。このばらつきを解決し、より均一にデリバリーする手法として、超並列に単一細胞の核内にデリバリーを行う技術（図 1）を開発することにした。

続く 2.1 節ではこの原理を説明し、2.2 節以降では個別の内容を説明する。

2.1　超並列単一細胞核内デリバリー技術の原理提案

細胞の核内に選択的にデリバリーする提案する方法は、パルス光を利用した超並列細胞内デリバリーの原理をベースにする。これは Chiou 研究室で開発された手法である（*Nature Methods* Vol. 12, pp. 439–

444 (2015))。

内皮細胞や線維芽細胞は、接着タンパク質のパターンに依存して細胞骨格を形成し、細胞核を中心部に移動させる。この現象を利用すれば、細胞内器官の位置を固定できるという着想を得た。

より具体的には、(図 1)に示すステップにて行うものである。①対応するマイクロチップを作製、②接着タンパク質の形成、③細胞の接着培養、④パルス光の照射、⑤物質の細胞内輸送、という流れで実施するのが、提案手法の全体像である。

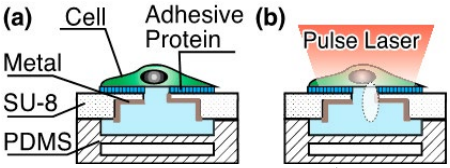


図 1 超並列単一細胞核内デリバリーの模式図

① 微細加工技術により、シリコン基板上に直径 3μm の開口を設ける. 続けて側壁に Ti や Au などの金属薄膜を選択的に堆積させる。
② 接着タンパク質のパターンをマイクロスタンプで形成する。
③ 作製したチップ上に細胞を培養し、パターン上に接着させる。
④ チップにナノ秒パルスレーザを 1〜2 パルス照射する。その際に光エネルギーを吸収した金属がプラズマ化し，微細な気泡が発生・消失する。このときに起きる圧力波にて細胞膜の一部を穿孔する。
⑤ 細胞膜が開いた状態で、シリコンチップにある開口から目的の物質を含む液体を輸送する。このときの輸送は，強制的に流れを作り出すものである。拡散では輸送が難しい物質を導入する。

2.2 ウエハレベルでのチップ作製の実現

実験に使用するマイクロチップをスケールアップして作製した。これまで Chiou 研究室では、装置の安定性の関係や技術的な問題で、チップサイズでの微細加工プロセスが行われた。

ここでは自身の技術協力により、4 インチのウエハで微細加工プロセスが実現できるようにした。一つの具体的な工夫点は、シリコンの深掘り加工後にも個別のチップが連結し、離れないようにした点である。ここではフォトマスクの設計と使用する工程を変更した。一度に 4x4 チップの量産ができるように改良して、これを実現させた。

2.3 細胞パターニングのための新規マイクロコンタクトプリンティング法の開発

細胞核に対して位置選択的にデリバリーするために、Polydimethylsiloxane (PDMS)製のマイクロスタンプを使い、細胞接着タンパク質の選択的な配置を実現する。今回はチップと大面積に位置あわせ（アライメント）をする必要がある。今回の用途に対して、従来のマイクロコンタクトプリンティング法では機能を満たさず、使用するのが難しかった。そこでまずは新しいマイクロコンタクトプリンティング法を実現させることにした。

アライメントが可能なように、レリーフの位置を移動させて保護する点が第 1 の工夫点である。また第 2 の工夫点は、個別のレリーフに対して独立の駆動力を設けて、転写圧を一定に保つ点である。この新しい方法を用いて、蛍光分子で修飾したタンパク質をガラス基板に転写することに成功した。

2.4 パルス光の照射と物質の細胞内輸送

既設のパルス光照射装置を利用して、これを理解するとともに、細胞内デリバリーに使用した。ガルバノミラーを利用してビームをスキャンするものであり、10 mm 角の領域を 10s 程度でスキャンさせた。

本システムを用いて、物質（FITC-dextran）の細胞内輸送を実施した。穿孔の前に、チップの裏側である貫通穴にデリバリーする溶液を満たしてある。細胞の穿孔後に、連続して空圧を印加して、細胞膜に穿孔された部分に物質を輸送した。デリバリー後の細胞を顕微鏡評価すると、分子量の高い FITC でも導入直後に蛍光輝度の上昇が見られた。

３．その他と謝辞

今回の留学では、研究室のメンバー（図 2、図 3）の協力があって、技術交流がうまく実施できた。あえて学生の居室に自分のデスクを設置して、距離を近くしてのコミュニケーションを実現させた。これにより光学技術を中心とした多くの技術を導入し、派遣者が持つ技術も提供できた。現地での体験により原理からの理解をし、これにより日本に帰国した際も同様の装置が立ち上げられるレベルに到達した。

全体的には、超並列の細胞核内デリバリー技術を提案し、個別要素の開発を開始した。今後もこの立ち上げた結果を元にして、目標である技術開発を進めていく。また学術的な成果として、学会や論文という形での発表実施を行う。

留学は研究プロジェクト面でも、新しい展開を生むことにつながっている。留学中における研究成果から提案した内容にて、科研費　若手研究(A)「超並列単一細胞操作技術に基づく均一・安定細胞集団構築システムの開発」、文部科学省　卓越研究員「超並列単一細胞加工：基盤技術と集積システムの開発」に採択されている。

今回の留学にあたり、ご協力と援助をいただいた方々に感謝の意を表します。特に中谷医工計測技術振興財団、豊橋技術科学大学の方々に感謝を申し上げます。

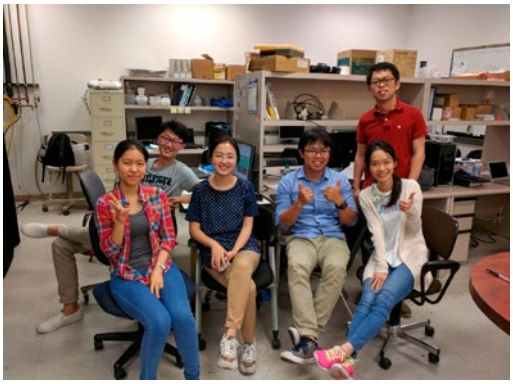


図 2　Chiou 研究室メンバーと技術交流を行った様子。自分の使用していたデスクの前で撮影。研究室は、アジア系の学生が多い特徴がある。



図 3　Chiou 研究室メンバー3 名と技術交流を行った様子。日本食レストランで撮影。

平成２６年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告
（日本留学）

東海大学医学部　医学研究所

ラハースレン・ネメフバータル

留学者氏名	Lkhaasuren Nemekhbaatar
所属機関名及び職名	Tokai University, School of Medicine Lkhaasuren Nemekhbaatar
国　　名	モンゴル
留 学 期 間	平成 26 年 8 月 1 日～平成 28 年 7 月 30 日

Study Subject:

FN1 induces Ara-C resistance of the leukemia cells with *FLT3*-ITD

Purpose

We aimed to study an involvement of the molecules of the extracellular matrix (ECM), fibronectin (FN1) and collagen 4 (COL4), in the *FLT3*-ITD-induced chemotherapy resistance of the leukemia cells in the bone marrow microenvironment (BM-ME).

Objectives

1. To investigate the effects of the ECMs (FN1 or COL4) on chemotherapy resistance of leukemia cells.

2. To study the involvement of *FLT3*-ITD mutation on chemotherapy resistance of leukemia cells in presence of ECMs.

3. To clarify the molecular mechanism and to determine the candidate genes for drug resistance of leukemia cells in presence of ECMs.

Background

Acute myeloid leukemia (AML) is a group of genetically heterogeneous hematological malignancies [1]. Cytarabine (Ara-C) is the main cytotoxic agent used in the chemotherapy of AML. Although the most of the patients show good response after the initial course of treatment based on Ara-C, a part of the patients with a certain cytogenetics relapse [2] [3]. One of such common mutations is an internal tandem duplication of the juxta-membrane domain of the FLT3 *(FLT3*-ITD), found in 30-40 % of cases with cytogenetically normal AML (CN-AML). *FLT3*-ITD mutation constitutively activates multiple downstream signalling pathways such as STAT3/5, MAPK/ERK and PI3K/AKT [4] [5].

The bone marrow microenvironment was previously found to mediate a resistance of the leukemic cells against the cytotoxic agents, by providing a safe niche with numerous cytokines/growth factors (i.e., PDGF, VEGF, etc.) and cell-cell surface contact molecules (i.e., CXCR4, VCAM1, etc.) [6, 7, 8, 9, 10, 11]. This phenomenon of cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is mediated by β1 integrins, which connect with FN1, COL4 and other extracellular matrix molecules (ECMs) [12]. Also, the chronic myelogenous cells become resistant to drug-induced apoptosis when adhered to FN1 [12].

On the other hand, BM-ME and *FLT3*-ITD mutation both mediate an Ara-C resistance in the leukemic cells [12]. But the detailed molecular mechanism of this phenomena are still unclear. In this study, we studied effects of the ECMs (FN1 or collagen 4 (COL4)) on chemotherapy resistance of leukemia cells, and examined a potential role of $p21^{cip1}$ as downstream signalling pathway of *FLT3*-ITD in inducing cell adhesion-mediated drug resistance in leukemia cells in presence of ECMs (FN1, COL4). We also confirmed that the inhibition of p21 sensitises the leukemia cells to chemotherapy.

Methods

1.1.Cell lines and reagents

Human leukemia cells K562, MOLM-14 [13] and MV4:11 (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in RPMI-1640 medium (Wako, Osaka, Japan) containing 10% Fetal bovine Serum (FBS; Corning, USA) and 1% Penicillin/Streptomycin (PC/SM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37^{o}C and 5% CO_2.

Stock solutions of 5 mM cytosine arabinofuranoside (cytarabine, Ara-C; Wako), 2 mM doxorubicin (doxorubicin, DOX; Wako) and 5 mM vincristine (VCR; Wako) were prepared with physiological saline solution. Methotrexate (MTX; Wako) and idarubicin (IDR; Wako) were diluted with RPMI-1640 and ethanol to prepare 20 mM and 2 mM stock solutions, respectively. Stock solutions of p21 inhibitors UC2288 (5 mM, EMD Millipore, USA) was prepared in DMSO.

1.2. Generation of FLT3-ITD

The pMY-puro-*FLT3*-ITD plasmid was kindly provided by Dr. Tetsuya Nosaka (Mie University, Tsu, Japan) [14]. pMY-puro plasmid and pMY-puro-*FLT3*-ITD plasmid were transfected into K562-parent cells, respectively, using Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific, Inc., Japan). K562-parent cells transfected with these plasmids were selected using 2 μg/ml of puromycin.

1.3. Total RNA extraction, RT-PCR and real-time PCR

Total RNA was extracted using Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan), and cDNA was generated from 500 ng of RNA using the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA). PCR was performed using TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Otsu Japan), and real-time PCR (RT-PCR) was performed with SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara Bio, Otsu, Japan) on LightCycler 2.0 thermal cycler (Roche Diagnostics USA, Indianapolis, IN, USA).

The transcript levels of *FN1* and *P21^{cip1}* were determined and expressed as the relative ratio to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). The primer sequences were: *FN1* forward 5'-TGAAAGACCAGCAGAGGCATAAG-3', reverse 5'- CTCATCTCCAACGGCATAATGG-3'; P21^{cip1} forward 5'- CAGGGGAGCAGGCTGAAG -3', reverse 5'- GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA -3'; *GAPDH* forward 5'-TTGCCATCAATGACCCCTTCA-3', reverse 5'-CGCCCCACTTGATTTTGGA-3'. The primer sequences for *FLT3* were as previously described [15].

1.4. Cellular proliferation and sensitivity to the cytotoxic agents

Ten thousand cells were cultured with different concentrations of the cytotoxic agents in 200 μl in 96-well plates in absence of FN1 or COL4 at 37^{o}C for 3 days. An MTT assay was done as previously described [16]. In presence of FN1 or COL4, 4 × 10^{4} cells were cultured in 800 μl in 24-well plates with FN1 or COL4 coated plates for 2 hrs., then added various concentrations of the cytotoxic agents at 37 ^{o}C for 70hrs, totally 72 hrs. The 50% inhibitory concentration for cellular growth (IC50) was determined as compared to the untreated controls. Each experiment was performed in double, and three independent experiments were performed.

Results

2.1. FN1 induced Ara-C resistance in the K562/FLT3-ITD cells

Both IC$_{50}$ of K562/mock and K562/*FLT3*-ITD cells for Ara-C, DOX, MTX, VCR and IDR were confirmed similar to our previous report [15]. In the presence of FN1, IC$_{50}$ for Ara-C resistance of both K562/mock and K562/*FLT3*-ITD were increased as compared with that in absence of FN1 (4.2- and 1.9-folds, respectively). In contrast, there were no changes in IC$_{50}$ for DOX and MTX.

2.2.The FN1 and p21^{cip1} expression were upregulated in the K562/FLT3-ITD cells

We have focused on the expressional changes of the ECM genes in the K562/mock and K562/*FLT3*-ITD cells. We compared the expression of CDK2 and P21 genes, chosen from the cDNA microarray analysis, which were reported to be related to the environment mediated-drug resistance. Both FN1 and p21^{cip1} showed over two-fold upregulation in K562/*FLT3*-ITD cells compared to mock cells, confirmed by real-time RT-PCR.

2.3.*The p21^{cip1} expression was upregulated in the K562/FLT3-ITD cells in the presence of FN1*

We have set to clarify whether ECMs upregulate p21^{cip1} expression in K562/mock and K562/FLT3-ITD cells. The expression of p21 ^{cip1} in K562/*FLT3*-ITD cells was peaked at 4 hrs in presence of FN1, but not in COL4.

2.4. *FN1 induced Ara-C resistance in the K562/FLT3-ITD cells was reversed by the inhibition of p21^{cip1}*

Twenty-four-hour pre-treatment of the leukemia cells with the p21^{cip1}-inhibitor (500nM) before applying to FN1 coated plate resulted in the rescued sensitivity to Ara-C to the same levels as in without FN1 supplement.

Discussion

The presence of the FLT3-ITD mutation in the leukemic cells leads to the relapse of the AML after the first remission with Ara-C treatment. In addition to FLT3-ITD, in this study we have found that FN1 is able induce Ara-C resistance in leukemic cells irrespective of the *FLT3*-ITD mutation. Furthermore, we have confirmed that p21^{cip1} participates in Ara-C resistance to *FLT3*-ITD-expressing leukemic cells in the presence of FN1, which was abolished when co-cultured with the p21^{cip1} inhibitor.

In this study we used the human leukemia cell line K562, which endogenously expresses tyrosine kinase BCR-ABL1 fusion protein. It was found that *BCR-ABL1*-expressing leukemic cells express p21^{cip1} naturally. In current study the expression of *FLT3*-ITD in the leukemic cells in the presence of FN1 leads to upregulation of p21^{cip1}. Recent studies have revealed that p21^{cip1} can adopt both pro- and anti-apoptotic functions in response to anti-tumour agents depending on cell type and cellular context [17] [17]. The upregulation of p21^{cip1} in the presence of FN1 in K562/*FLT3*-ITD and subsequent increased resistance against Ara-C has a rationale as it is line with the previous findings. The other studies have found that p21^{cip1} inhibits cell growth when expressed at a peak level and induces cell growth when expressed at inferior levels [18] [19].

Also we have found that p21^{cip1} may play a major role in the *FLT3*-ITD-induced Ara-C resistance in presence of bone marrow micro-environment factor. These results of this study would suggest that the leukemic cells with FLT3-ITD can reside in the bone marrow microenvironment, gaining refractory to the Ara-C treatment with the support by of FN1. Further study will be necessary to focus on interference of p21^{cip1} of *FLT3*-ITD signalling pathway and FN1 on Ara-C resistance in leukemia.

Presentations (during Nakatani fellowship program)

A part of the above study was presented at national congresses as follow:

- Lkhaasuren Nemekhbaatar, Anar Damdinsuren, Masatoshi Ito, Hideo Tsukamoto, Satomi Asai, Hiromichi Matsushita, Hayato Miyachi “Comparative analysis of proteome and transcriptome in *FLT3*-ITD transfected leukemia cells”, 22nd Annual Meeting of the Japanese Society Gene Diagnosis and Therapy. 2015, Yokohama, Japan.
- Lkhaasuren Nemekhbaatar, Anar Damdinsuren, Masatoshi Ito, Hideo Tsukamoto, Satomi Asai, Hiromichi Matsushita, Hayato Miyachi “Differential expression analysis of proteome and transcriptome in *FLT3*-ITD positive leukemia cells”, 62nd National Congress of the Japanese Society of Laboratory Medicine. 2015, Gifu, Japan.

References

[1] R. Kansal, "Acute myeloid leukemia in the era of precision medicine: recent advances in diagnostic classification and risk stratification," *Cancer Biol Med,* vol. 13, pp. 41-54, 2016.

[2] Grimwade D, Hills RK. , "Independent prognostic factors for AML outcome.," *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology, American Society of Hematology Education Program,* pp. 385-95, 2009.

[3] Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al., "The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties.," *Blood,* vol. 92, pp. 2322-33, 1998.

[4] M. Mizuki, R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C.Muller, W. Gruning, K. Kratz-Albers, S. Serve, C. Steur, T.Buchner, J. Kienast, Y. Kanakura, W.E. Berdel, H. Serve,, "Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways.," *Blood,* vol. 96, pp. 3907-14, 2000.

[5] S. Meshinchi, F.R. Appelbaum, , "Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia,," *Clin. Cancer Res.,* vol. 15, pp. 4263-4269, 2009.

[6] Xiaochuan Yang, Amy Sexauer and Mark Levis, "Bone marrow stroma-mediated resistance to FLT3 inhibitors in FLT3-ITD AML is mediated by persistent activation of extracellular regulated kinase," *British Journal of Haematology,* vol. 164, pp. 61-72, 2014.

[7] Wilson, A. & Trumpp, A. , "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches.," *Nature Reviews Immunology,* vol. 6, pp. 93-106, 2006.

[8] Manabe, A., Murti, K.G., Coustan-Smith, E., Kumagai, M., Behm, F.G., Raimondi, S.C. & Campana, "Adhesion-dependent survival of normal and leukemic human B lymphoblasts on bone marrow stromal cells," *Blood,* pp. 758-766, 1983.

[9] Weisberg, E., Wright, R.D., McMillin, D.W., Mitsiades, C., Ray, A., Barrett, R., Adamia, S., Stone, R., Galinsky, I., Kung, A.L. & Griffin, J.D., " Stromal-mediated protection of tyrosine kinase inhibitor-treated BCR-ABL-expressing leukemia cells," *Molecular Cancer Therapeutics,* vol. 7, p. 1121–1129, 2008.

[10] Zeng, Z., Shi, Y.X., Samudio, I.J., Wang, R.Y., Ling, X., Frolova, O., Levis, M., Rubin, J.B., Negrin, R.R., Estey, E.H., Konoplev, S., Andreeff, M. & Konopleva, M., "Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML.," *Blood,* vol. 113, p. 6215–6224, 2009.

[11] Sison, E.A. & Brown, P. , "The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting," *Expert Review of Hematology,* vol. 4, p. 271–283, 2011.

[12] JS Damiano, LA Hazlehurst and WS Dalton, "Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic lyelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and γ-irradiation," *Leukemia,* vol. 15, pp. 1232-39, 2001.

[13] Matsuo Y, MacLeod RA, Uphoff CC, Drexler HG, Nishizaki C, Katayama Y, et al, "Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14)," *Leukemia,* vol. 11, pp. 1469-77, 1997.

[14] Wang CQ, Krishnan V, Tay LS, Chin DW, Koh CP, Chooi JY, "Disruption of Runx1 and Runx3 leads to bone marrow failure and leukemia predisposition due to transcriptional and DNA repair defects," *Cell reports,* vol. 8, pp. 767-82, 2014.

[15] Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, et al, "FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression," *Biochemical and biophysical research communications,* vol. 390, pp. 1001-6, 2009.

[16] Miyachi H, Ma L, Takemura Y, Kobayashi H, Hirahara I, Sonehara H, et al, "Microsatellite instability and clonal heterogeneity of MDR1 messenger RNA expression in trimetrexate-resistant human leukemia MOLT-3 cells developed in thymidine," *International journal of cancer,* vol. 82, pp. 63-9, 1999.

[17] Suxing Liu, W.Robert Bishop, Ming Liu, "Differential effects of cell cycle regulatory proteins p21waf1/cip1 on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy," *Drug resistance update,* vol. 6, pp. 183-195, 2003.

[18] Shinichiro Takahashi, Hideo Harigae, Mitsuo Kaku, Takeshi Sasaki, and Jonathan D. Licht, "Flt3 mutation activates p21WAF1=CIP1 gene expression through the action of STAT5," *Biochemical and Biophysical Research Communications ,* vol. 316, pp. 85-92, 2004.

[19] Hande CANPINAR, Günefl ESENDA⁄LI, Emin KANSU, Ayflen GÜNEL ÖZCAN, Dicle GÜÇ, "Adhesion of Beta1 Integrin to Fibronectin Regulates CAM-DR Phenotype via p21WAF1/cip1 in HL60 Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells," *Turk J Med Sci,* vol. 38, no. 2, pp. 97-104, 2008.

[20] James W. Vardiman, Jüergen Thiele, Daniel A. Arber, Richard D. Brunning, Michael J. Borowitz, Anna Porwit, Nancy Lee Harris, Michelle M. Le Beau, Eva Hellström-Lindberg, Ayalew Tefferi and Clara D. Bloomfield, "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes," *Blood,* vol. 114, pp. 937-951, 2009.

[21] Ohno R, Kobayashi T, Tanimoto M, Hiraoka A, Imai K, Asou N et al, "Randomized study of individualized induction therapy with or without vincristine, and of maintenance-intensification therapy between 4 or 12 courses in adult acute myeloid leukemia. AML-87 Study of the Japan Adult Leukemia Study Group.," *Cancer ,* vol. 71, p. 3888–3895, 1993.

[22] 2 Hann IM, Stevens RF, Goldstone AH, Rees JK, Wheatley K, Gray RG et al, " Randomized comparison of DAT versus ADE as induction chemotherapy in children and younger adults with acute myeloid leukemia. Results of the Medical Research Council's 10th AML trial (MRC AML10).," *Blood,* vol. 89, no. Adult and Childhood Leukaemia Working Parties of the Medical Research Council, pp. 2311-2318, 1997.

[23] Perry, J.M., Li, L., , "Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil.," *Cell,* vol. 129, pp. 1045-47, 2007.

[24] Anindita Dutta, Triparna Sen, Amitava Chatterjee, "Culture of K562 human myeloid leukemia cells in presence of fibronectin expresses and secretes MMP-9 in serum free culture medium," *Int J Exp Pathol,* vol. 3, no. 3, pp. 288-302, 2010.

Acknowledgements:

This research was performed by Lkhaasuren Nemekhbaatar who was financially supported by Grant Program for Technology Exchanges for study program in Japan from the Nakatani Foundation for Advancement of Measuring Technologies in Biomedical Engineering. We deeply thank the Nakatani Foundation for this financial support in this research.

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

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　煕康	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
北畠　　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	サーモグラフィー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
輕部　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	携帯用の人工心臓駆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	フーリェ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	レーザー光音響・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ープの開発	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　―ず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、および頚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ト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（連銭形成）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	デァルコントラスト肺微小血管造影法の開発	１８０
枡田　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イ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	アントラキノンー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－κＢ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	シャペロニ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エ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
小畠　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ー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
久冨　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
田邉　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 バイオロボティクス専攻 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浸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マイクロスコープの開発	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	ＭＲＩ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　生体力学シミュリ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	磁性フラーレンとデンドリマーポルフィリンの複合化による高機能ＭＲＩ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	ウエ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
粟津　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デ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
冨永　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ー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	反射型エシェ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光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トニクス研究拠点　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
曽和　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
薮上　　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
新岡　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ＣＰＰ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	画像処理とスペック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
山澤德志子	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　テニュア・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　テニュア・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シブ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　雅祥	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
ﾊﾟｳﾞｨﾖﾝ ﾆｺﾗ 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 バイオロボティクス専攻　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
髙田　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	静岡大学学術院理学領域（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	マイクロダイアリシ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生細胞の計測･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
矢冨　　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

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
累計		377 件	91,701 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 ブラッセル	7月
三輪　史朗	(財)冲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	弟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	弟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	弟 18 回国際化学療法学会	スェーデン ストックホルム	７月
柴田　　昭	新潟大学 医学部長	第 27 回マレーシヤ・シンガポール医学総会	マレーシヤ 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二クス会議	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 ダニーデイン	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　MD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･ハンドラセラピー学会	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 クァンカン	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・ロボティックスとバイオメカトロニッ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
草苅　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 パビア	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

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　瞭	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、ｲﾝﾄﾞﾈｼｱ 2 名、韓国 5 名、ﾌｨﾘｯﾋﾟﾝ 2 名、ｼﾝｶﾞﾎﾟｰﾙ 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、ｼﾝｶﾞﾎﾟｰﾙ 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（ﾌｨﾝﾗﾝﾄﾞ）、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、Indonesia4 名、Korea2 名、Mongolia5 名、Taiwan3 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	早稲田大学理工学術院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(ｵﾗﾝﾀﾞ)他、ﾄﾞｲﾂ１名､ｼﾝｶﾞﾎﾟｰﾙ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 PhD	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 [ｼﾝｶﾞﾎﾟｰﾙ] Tien Sim Leng [台湾] 唐　季祿	第 12 回ｱｼﾞｱ臨床病理･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	[ﾈﾊﾟｰﾙ] 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	第 10 回アジア放射光生物学・医学画像研究会	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	山形	平成 28 年 2 月
同上	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	平成 28 年 2 月
同上	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	平成 28 年 2 月

氏　名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時　期
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

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 ライブ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	立命館大学理工学部 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　鎭熙	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

４．海外留学

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	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

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～ （7 ヶ月）
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 ネメフバータル	モンゴル	平成 26 年 8 月～ （2 年）

５．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嚥下障害の調査研究	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

公益財団法人
中谷医工計測技術振興財団　年報

30 号　補刷

平成 29 年 6 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