

平成 27 年度～平成 31 年度
文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

医療技術の革新に貢献する
バイオ機能材料開発の研究拠点形成
(事業番号：S1511019L)

平成 28 年度 研究成果報告書

平成 29 年 8 月

研究代表者 小池 あゆみ
(神奈川工科大学)

文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
『医療技術の革新に貢献するバイオ機能材料開発の研究拠点形成』
平成 28 年度 研究成果報告書

目 次

テーマ 1 : バイオ機能材料の開発とその有効性検証

- ① タンパク質性ナノカプセルを用いた細胞内局所送達・・・・・・・・・・・・・1
-薬物の時空間的制御を可能にする **DDS** 技術の開発-
(神奈川工科大学 応用バイオ科学科) 小池あゆみ
- ②先端成長をターゲットとした新規抗真菌剤探索法の開発とその応用・・・・・・・・・・・・・3
(神奈川工科大学 応用バイオ科学科) 飯田 泰広
- ③ δ -トコフェロール含有リボソーム投与によるマウスの体内分布について・・・・・・・・・・・・・5
(神奈川工科大学 栄養生命科学科) 清瀬 千佳子
- ④医療系材料に対するナノ粒子処理による抗菌加工法の開発・・・・・・・・・・・・・7
(神奈川工科大学 栄養生命科学科) 澤井 淳
- ⑤光線力学療法への展開応用を目指したフラレン誘導体の構造と活性評価・・・・・・・・・・・・・9
(神奈川工科大学 応用化学科) 高村 岳樹

テーマ 2 : 情報メディアによるバイオ機能材料開発の高度化

- ①高臨場感仮想空間での標的分子の設計システムの研究・・・・・・・・・・・・・11
-設計支援ユーザインタフェースの構築-
(神奈川工科大学 情報ネットワーク・コミュニケーション学科) 上平 員丈
- ②分子設計への仮想空間技術応用-標的分子の設計支援・・・・・・・・・・・・・13
(神奈川工科大学 情報ネットワーク・コミュニケーション学科) 井上 哲理
- ③小核抽出および細胞の蛍光観察システムについての検討・・・・・・・・・・・・・15
(神奈川工科大学 電気電子情報工学科) 武尾 英哉, 安倍 和弥
- ④微小な固体群が液体の流れで搬送される現象の数値計算シミュレーション
・・・・・・・・・・・・・17
(神奈川工科大学 情報メディア学科) 服部 元史

タンパク質性ナノカプセルを用いた細胞内局所送達 -薬物の時空間的制御を可能にする DDS 技術の開発-

小池 あゆみ

神奈川工科大学応用バイオ科学科教授

1. 背景と目的

薬物の薬理効果は、特定の標的部位に薬物分子が結合し、作用することによって発現されるため、必要な量を望みの時間に標的部位に送達すること（時間的・空間的制御）が重要である。しかし、薬物自身にそれらの性質を持たせることは難しく、脂質や高分子を用いたキャリアに放出制御性や標的指向性を付与する手法が試みられている。

薬物送達システム（DDS）用に用いられるキャリアとしては、細胞のエンドサイトーシス機能を利用して、薬剤を封入したリポソームを取り込ませる研究例が多く行われている。リポソームを DDS キャリアとして使用するためには、膜受容体へ結合するリガンド、細胞表面に露呈するタンパク質を認識する抗体を備えるなど、細胞に認識させる部分はタンパク質に担わせる手段が挙げられる。薬物送達キャリアは、毛細血管を通過できるサイズであり且つ均一な大きさであることが望ましいところ、リポソームは粒径を均一に調整することが困難であるという課題がある。また、受容体を認識担体として結合すると粒径が大きくなり、効率的な受容体結合も簡単ではないため、リポソームに代わる DDS キャリアの技術開発が求められている。

大腸菌のシャペロニン（GroEL/GroES）は、細胞内に存在する膜タンパクを除く約 2500 種の可溶性タンパク質の 10~15%のフォールディング助けるタンパク質である。GroEL は、57kD のサブユニット 7 つからなるリングが 2 つ重なった 14 量体構造をしており、リング内部にはそれぞれ直径約 5nm の空洞がある。ATP 加水分解を伴う構造変化によって、GroES を蓋のように結合し、閉鎖された空洞内に変性ポリペプチドを閉じ込めて、凝集を防ぎながらフォールディングさせ、ATP 加水分解が終了すると、内包物と GroES を解離する。GroEL の ATP 加水分解に関わるアミノ酸である Asp52 および Asp398 を Ala に置換した GroEL (D52A/D398A) 変異体は、空洞内に基質タンパク質を閉じ込めた反応中間体の半減期が 6 日であった（最長で 12 日）。ATP 加水分解時間はシャペロニンカプセルの開閉を制御するタイマーとして機能するため、基質タンパク質の代わりに薬物等を内包できれば、望みの時間で加水分解が終わる変異体を用いて必要なときに放出すること

ができる。すでに、透過型電子顕微鏡観察で基質タンパク質の代わりに金属ナノ粒子（直径 5 nm の FePt）を 2 つの空洞に内包した GroEL/GroES が作製できることを示した（図 1）。以上のことから、GroEL/GroES は不安定なゲスト分子を分解から保護しながら運び、必要なときに放出する、均一な大きさのタンパク質性ナノカプセルとして DDS キャリアに応用できると考えた。

平成 28 年度は、望みの時間で加水分解が終わる GroEL 変異体ライブラリーの作製を検討した。

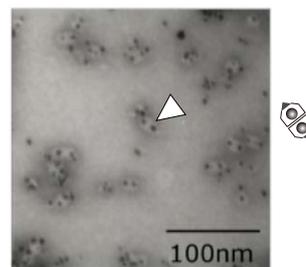


図 1 金属粒子内包 GroEL/GroES

2. 研究方法

2.1 GroEL 変異体作製とタンパク質の精製

GroEL の Lys51 を Asp、Ala に、Asp52 を Asn、Ser、Lys、Glu に、Asp87 を Ala に、Asp495 を Ala にそれぞれ置換した各種変異型 GroEL の発現ベクターを作製し、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。培養菌体から、Butyl Toyopearl (TOSOH)、Sephacrose CL-4B (GE Healthcare) を用いて各種 GroEL 変異体を精製した（図 2）。

2.2 GroEL 変異体の ATP 加水分解活性の測定

ATP 加水分解活性は、ATP 再生法及び GroEL/GroES 複合体に結合したヌクレオチドの経時的な定量法の 2 種の方法で測定した。ATP 再生法では、0.2 μ M GroEL、5 mM phosphoenol pyruvate、pyruvate kinase (100 μ g/ml)、0.2 mM NADH、lactate dehydrogenase (100 μ g/ml)、5 mM DTT を HKM Buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、100 mM KCl、5 mM MgCl₂) に加えた反応液に、1mM ATP を添加し、加水分解を開始した。150 秒後に 0.6 μ M GroES を加え、NADH の減少に起因する Abs₃₄₀ の傾きから ATP 加水分解活性を算出した。

GroEL/GroES 複合体結合ヌクレオチド定量法では、2 μ M GroEL、6 μ M GroES、5 mM DTT、1 mM

ATP を HKM Buffer に加え、TSK-GEL G3000 SW_{XL} ガードカラム (TOSOH) 3 連結ゲルろ過クロマトグラフィー (25 mM HEPES/KOH (pH7.0)、100 mM Na₂SO₄、5 mM MgSO₄) で GroEL/GroES 複合体を単離し、一定時間毎に 24 % PCA を加えた。その上清を 0.5 M K₂CO₃ で中和し、TSK-GEL ODS-80Ts (TOSOH) 逆相クロマトグラフィー (100mM リン酸ナトリウム (pH6.9)) で ATP と ADP に分離し、Abs₂₆₀ のピークを解析した。

2.3 GroEL 変異体の GroEL/ES 複合体形成

HKM Buffer に 0.5 μM GroEL 変異体、Cy3 ラベルした 0.25 μM GroES (GroES^{Cy3})、5 mM DTT、1 mM ATP を加えて複合体を形成させた後、G3000SW_{XL} カラム (TOSOH) を用いて、20 mM HEPES - KOH (pH 7.4)、10 mM KCl、5 mM MgCl₂、100 mM Na₂SO₄ の条件で GroES^{Cy3} の溶出時間を分析した。

3. 結果および考察

作製したすべての変異体は、野生型と比較して ATP 加水分解活性が低下していた (図 3)。特に GroEL (D52K) は、複合体結合ヌクレオチド定量の結果から、GroEL (D52A/D398A) よりも半減期が長い (6 日以上) ことがわかった。一方、GroEL (D87A)、GroEL (D495A) を除いたすべての変異体は GroES と複合体を形成することができ、GroEL (K51D)、GroEL (D87A)、GroEL (D495A) を除いたすべての変異体は Rhodanese のフォールディング活性も保持していた。このことから、ATP 加水分解の 1 サイクルの時間は遅延したが、それ以外の活性に影響はなく、開閉時間の異なる GroEL 変異体が作製できたといえる。GroEL (D87A) および GroEL (D495A) は、ATP の結合が確認できず、GroES の結合も見られなかったことから、ATP の加水分解ではなく、ATP 結合に重要なアミノ酸残基であることがわかった (表 1)。

今後は、ATP 加水分解時間を望みの時間に調整した GroEL 変異体を作製するために、各種変異を組み合わせた変異体を作製し解析すると共に、GroEL の ATP 加水分解における Lys51、Asp52、Asp87、Asp398、Asp495 の役割を解明する。

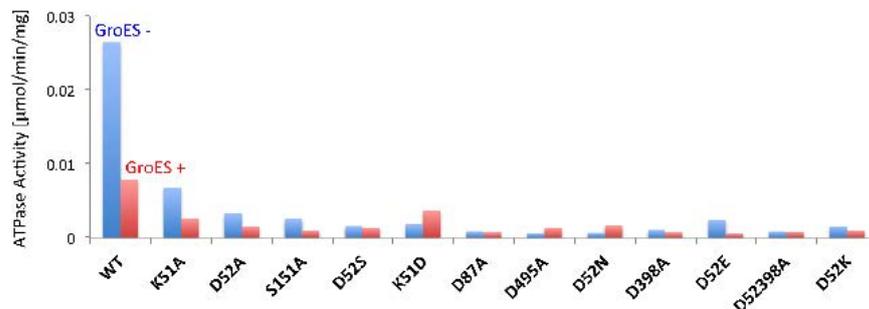


図 3 GroEL 変異体の ATP 加水分解活性 (ATP 再生系)

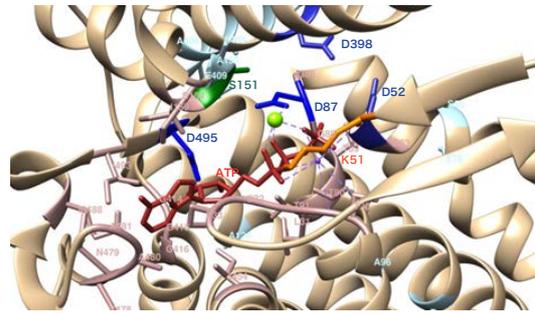


図 2 GroEL の ATP 結合部位の構造^[1]

表 1 GroEL 変異体のシャペロン活性

mutants	ATPase	reaction time	ES binding	folding activity
wild type	+++	8sec	+++	+++
K51A	+++	70sec	++	+++
K51D	+++	240sec	++	-
D52A	+++	70sec	++++	++++
D52N	++	40min	++++	++++
D52E	++	200min	++++	++++
D52S	+++	150sec	++++	++++
D52K	+	>12days	++++	++++
D87A	-	-	-	-
S151A	+++	180sec	++++	++++
D398E	++	240min	++++	-
D398N	+++	270sec	++++	-
D495A	-	-	-	-
D52/398A	+	12days	++++	++++
D52E/S151A	++	360min	++++	-

4. 参考文献

- [1] Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi H, Shimamura T, "Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL-GroES2 complex determined at 3.8 Å reveals rearrangement between two GroEL rings", *J. Mol. Biol.*, 426 (21), pp. 3634-3641, 2014.

先端成長をターゲットとした新規抗真菌剤探索法の開発とその応用

飯田泰広

神奈川工科大学応用バイオ科学科教授

1. 背景と目的

近年、HIV/AIDS、抗がん剤や、臓器移植のために投与される免疫制御剤の使用などによって、真菌がヒトに感染する深在性真菌症が問題となっている。この真菌症に対する薬剤は、国内では4クラス9製剤あるが、副作用のために長期にわたって使用できないものがあり、また一部の薬剤では耐性菌が出現しており、新規の抗真菌薬の開発が必要であると考えられる。そこで、本研究では、新規抗真菌薬開発のために、先端成長を指標とした評価系を構築することを目的とした。先端成長は、細胞壁のある1点での分解と合成を繰り返しながら成長していく方法で、ヒトには見られず真菌に特異的であるため、この先端成長をターゲットとすることで、真菌にのみ作用する、選択毒性の高い薬剤開発につながると考えた。今回、この成長時に輸送される β -glucanase(Bgl2p)と蛍光タンパク質 EmGFP を利用した評価系を構築することで、視覚的に先端成長の様子を観察することができ、薬剤スクリーニングに応用できるのではないかと考えた。

2. 研究方法

酵母の発現ベクターである *pYES2* に *Bgl2* を組み込み、*pYES2-BGL2* を構築、更に *Bgl2* の下流に *EmGFP* を挿入し、先端成長時の小胞輸送評価系ベクター *pYES2-BGL2-EmGFP* を作成した。酵母 (*S.cerevisiae* INVSc1) に組み込み、当該形質転換体を誘導培地(SC-Ura 培地(2%ガラクトース、1%ラフィノース))で培養し、*Bgl2* と *EmGFP* の複合タンパク質(Bgl2-EmGFP)を誘導発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で局在を観察した。また、輸送阻害の指標として、微小管重合阻害剤であるノコダゾールを用い、先端への局在を観察できなくなることを評価した。また、既存の4クラスの抗真菌剤においても、同様に局在に与える影響の評価を行った。生薬のスクリーニングでは、生薬抽出物をDMSOで溶解し、終濃度100 $\mu\text{g/mL}$ になるように培地で希釈し作用させ、局在に与える影響を評価した。

3. 結果および考察

共焦点レーザー顕微鏡にて酵母内での観察を行ったところ、DAPIとBgl2-EmGFPのそれぞれの蛍光と共局在している様子が確認できた。さらに、Bgl2-EmGFP蛍光の局在は、酵母の出芽部分と母

細胞と娘細胞の間のNeck部分に集中している様子が確認できた (Fig.1-A)。また、既往の知見では、Bgl2の局在は液胞であることが報告されているため、その確認を行ったところ、液胞にも存在していることが示されたが、先端部でより強い蛍光が観察された (Fig.1-B)。蛍光が先端に局在していることから、Bgl2-EmGFPが先端部分へ輸送されていることが示唆された。そのため、Nocodazoleを添加し、Bgl2-EmGFPの局在を観察した。Nocodazoleを添加することで、出芽部分への蛍光の局在が見られなくなり、細胞全体の蛍光と蛍光の顆粒の様なものが確認された。これらのことから、Bgl2-EmGFPが先端成長中に小胞輸送によって輸送されていることが示唆された。更に、既存

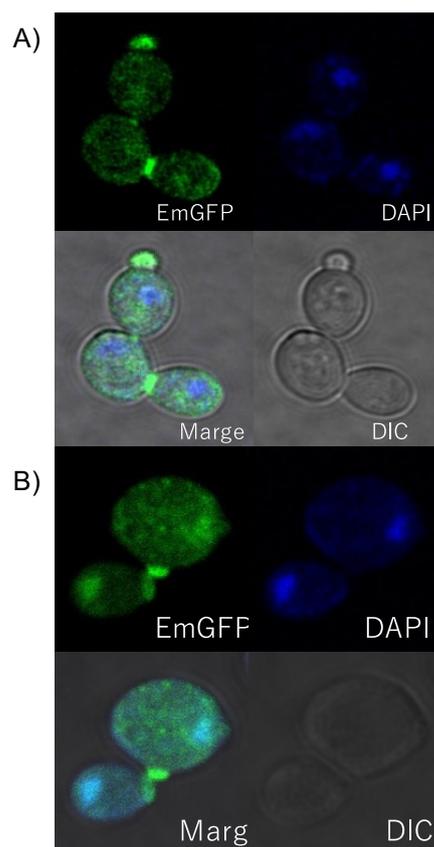


Fig.1 Observation of localization of BGL2-EmGFP
A) Green:BGL2-EmGFP, Blue:DAPI
B) Green:BGL2-EmGFP, Blue:Vacuole

の抗真菌剤で評価した結果、局在に影響を及ぼさなかったため (Fig.2)、当該評価系を用いて蛍光局在を指標とするにより、先端成長を作用機作とした薬剤スクリーニングを行うことが可能であると考えられた。

100種類の生薬抽出物を対象にスクリーニングを行った結果 (Table1)、生薬溶液を添加したもの

Table1 Results of Screening					
生薬名	局在率	生薬名	局在率	生薬名	局在率
アイソウ	92	イレイセン	96.1	エンゴサク	94.7
アガリスク	97.2	イズイ	95.8	エゾウコギ	92.3
アシタバ	95.2	イチョウハ	76.5	オウギ	93.8
アマチャ	50	インテンコウ	40	オウレン(唐)	88
アキョウ	91.4	ウイキョウ(小)	93.3	オウヒ	85
アスナロ	88.6	コウイカ	97.2	オウゴン	93.8
アマチャズル	85	ウラジロガシ	95.2	オウフルギョウ	96
アカメガシワ	78.9	ウイキョウ(大)	96.2	オトギリソウ	64.7
アザミネ	96.8	ウバイ	5.9	オウハク	17.3
アセンヤク	91.5	ウワウルシ	66.7	オウレン(和)	65.4
イカリソウ	94.4	ウヤク	77.3	オンジ	88.4
カキノシテイ	90	エイジツ	97.3	カイカ	69
カシ	9.5	エイメイソウ	86.4	カイバ	95.7
カッコウ	0	キョウカツ	86.4	クロモジ	0
カミツレ	81.6	キンオウシ	73.3	ケイガイ	11.7
カンキョウ	90.9	キンセンソウ	77.8	ケイケツトウ	0
シャカンゾウ	37.5	キコク	80	ゴボウシ	88.5
キキョウ	95.7	コウキクカ	51.7	ゲンジン	70.4
キジツ	88.9	キササゲ	92.3	ケイヒ	82.3
キツピ	82.1	クマサザ	89.5	ゲンノシヨウコ	93.8
キバン	80.8	クワノハ	83.3	ケツメイシ	0
キンギンソウ	93.3	クコシ	73.4	ケツジツ	96
キゲシ	93.3	クセキ	88.2	ゴウイ	100
キクカ	89.3	クマヤナギ	82.6	ゴウカンヒ	96.7
コウジュ	88.9	クチナシ	61.2	コウホン	100
カシュウ	80.6	ガジュツ	87.5	コウジン	86.7
カッコン	85.7	カロニン	81.5	ウルチ	100
カロコン	85.7	カンゾウ	86.7	コウボク	89.3
カントウカ	89.7	ガイヨウ	96.3	ゴシツ	96.4
カイキンシャ	91.7	ガイハク	96	ゴミシ	0
カキノハ	96.8	ウコギ	90.9	ゴウカイ	95.7
カゴソウ	96.8	ベニバナ	78.6	コウシ	87.5
クバク	75	ゴボウシ	83.3	コウブシ	75

未満が7種、70%以上が84種という結果となった。30%未満の8種は、ウバイ、オウハク、カシ、カッコウ、クロモジ、ケイガイ、ケイケツトウ、ゴミシであった。ケイガイ抽出物を作用させた際の蛍光顕微鏡像をFig.3-Aに示す。GFPの蛍光が点在しており、先端部やNeck部に輸送されていないことが示唆された。また、他の7種でも同様に点在しているように観察されるか、全体に分布しているように観察されるか (Fig.3-B, クロモジ) であり、本来の位置に輸送されている状態を観察できなかった。これらのことから、先端成長を抑制する効果のある化合物を含んだ生薬をスクリーニング出来たと考えている。今後、スクリーニングを続けていくとともに、化合物を分離・精製し、

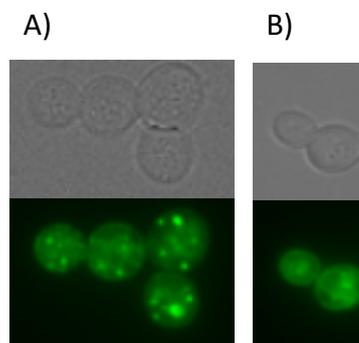


Fig.3 Observation of the localization by treatment with extract of *Schizonepeta tenuifolia*(A) and *Lindera umbellata*(B). 構造を解明して行く予定である。

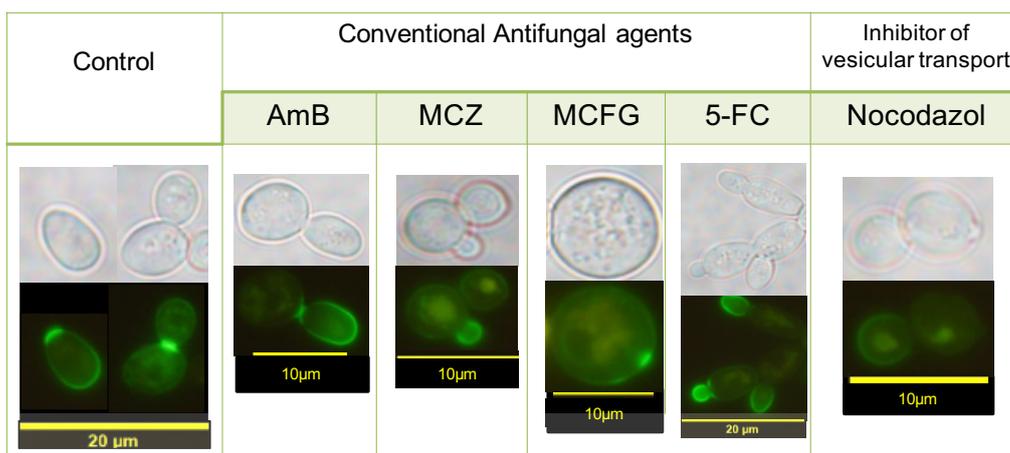


Fig.2 Evaluation of localization of BGL2

では、先端蛍光個体が30%未満が8種、30%以上70%

δ-トコフェロール含有リポソーム投与によるマウスの体内分布について

清瀬 千佳子

神奈川工科大学 応用バイオ科学部 栄養生命科学科 教授

1. 背景と目的

本人の健康増進への技術革新は重要な課題の一つである。その中でバイオ機能材料の開発は今後のバイオメディカル産業の発展には欠かせない。特に、ナノバイオテクノロジーとバイオインフォマティクスの連携することで革新的な医用技術を生み出す事が期待できる。本事業は医療技術の革新に貢献するバイオ機能材料開発を目的として、新たなバイオ機能材料の開発と医療基盤技術を創出したいと考えている。日本人の死亡原因で最も多いのは「がん」であり、男性では肺がん、胃がん、女性では大腸がんや胃がん、また女性特有な乳がんや子宮がんでの死亡率が年々増加してきている。それゆえ、がんに対する新たな医薬品の開発や治療技術の確立が益々期待されている。がん治療応用が期待される物質には磁性ナノ粒子や、直接DNAの断片化が期待できる8-methoxypsoralenなどがあるが、その中で、天然物であるビタミンE同族体にも発がん抑制効果が報告されている。ビタミンEは脂溶性ビタミンの一種で、天然にはクロマン環に飽和型の側鎖が結合したトコフェロール類と不飽和型の側鎖が結合したトコトリエノール類が存在する。さらに、クロマン環のメチル基の位置と数の違いにより、α-, β-, γ-, δ-の4種類があり、合計8種類が存在する。最近、トコトリエノール類が発がん抑制効果など、がんとの関係が検討され、報告されつつある。例えば、ヒト胃腺がん細胞であるSGC-7901細胞にγ-トコトリエノールを添加すると細胞周期のG(0)/G(1)期を時間依存的に阻止し、さらに、caspase-3の活性化を誘導する事が報告されている¹⁾。また、乳がん細胞においても、そのマーカーであるCD133/CD44の発現を抑制すると言われている²⁾。さらに、δ-トコトリエノールは、HepG2細胞において、他のトコトリエノール類よりも抗増殖効果が高く、アポトーシスを誘導し、S期の阻止を引き

起こすと報告されている³⁾。このように天然物であり、なおかつ、発がん抑制作用の報告があり、さらに、その安全性の面からも迅速な実用化が必要である。ビタミンEは経口摂取すると、脂質と同様に小腸上皮細胞より吸収され、リポタンパク質輸送にて各組織に運搬される。肝臓に取り込まれたビタミンEはα-トコフェロール輸送タンパク質(α-TTP)⁴⁾によって識別され、α-トコフェロールを優先的に膜間輸送し、最終的にはVLDLに組み込ませる。トコトリエノールなどのα-トコフェロール以外のビタミンE同族体は肝臓内で一時うっ滞し、その後代謝されると推察されている。従って、γ-トコトリエノールやδ-トコトリエノールは肝臓以外の組織に到達する量が少なく、細胞内の濃度もほとんど検出できない。それゆえ、先程記述したように、発がん抑制効果が期待できても経口投与では、ターゲットとなる組織に一定以上の濃度のδ-トコフェロールやトコトリエノール類を取り込ませる事が出来ない。それゆえ、特別な輸送システムが必要となる。そこで、δ-トコフェロール等の生理活性物質を輸送するバイオ機能素材を開発する事で、細胞内局所送達が行えればがん治療に画期的な効果をもたらす事が期待できる。今年度はδ-トコフェロール含有ナノリポソームを作製し、マウス尾静脈より投与し体内分布への経時的変化について研究を行う事にした。

2. 研究方法

(1) δ-トコフェロール含有ナノリポソームの作製

今回は、リポソーム簡易作製装置Mini-Extruder (Avnati Poloar Lipids, INC.)を用いて、リポソーム作製を試みた。Egg-PCを100%エタノールに溶解後、N₂下にて試験管壁に乾固させた後、滅菌済の生理食塩水を加え、Egg-PCの相転移温度である27°Cに設定したソニケーターを用いて分散させた。これをコントロール用とした。一方、δ-トコフェロール含有

リポソームの場合は、Egg-PCを100%エタノールにて溶解する際に δ -トコフェロールも同時に添加し、後はコントロール用と同様の方法にて作製を行った。作製したリポソーム溶液をMini-Extruderに入れ、100nm用メンブレンに11回通して、粒子径を均一化した。

(2) δ -トコフェロール含有リポソームのマウス尾静脈投与による体内分布について

7週令BALB/c雄マウス31匹を4日間予備飼育後、体重差がないように次の群に分けた。

- ① 何も投与しない群 (0)
- ② 投与 30 分後に解剖する対照群 (30m-C)
- ③ 投与 30 分後に解剖する実験群 (30m-E)
- ④ 投与 1 時間後に解剖する対照群 (1h-C)
- ⑤ 投与 1 時間後に解剖する実験群 (1h-E)
- ⑥ 投与 2 時間後に解剖する対照群 (2h-C)
- ⑦ 投与 2 時間後に解剖する実験群 (2h-E)
- ⑧ 投与 4 時間後に解剖する対照群 (4h-C)
- ⑨ 投与 4 時間後に解剖する実験群 (4h-E)

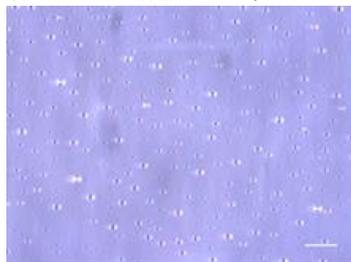
なお、0 群と各時間の対照群は一群 3 匹とし、実験群は一群 4 匹とした。

実験①の方法により作製した δ -トコフェロール含有リポソームを δ -トコフェロール量として、1.4 μ g/g BWになるように尾静脈より投与した。対照群には δ -トコフェロールが含有されていないリポソームのみを投与した。投与後、イソフルラン麻酔下にて心臓採血を行い、血液を採取、その後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、辜丸周囲脂肪、辜丸も採取した。血液は3,000rpmで10分間遠心分離を行い、血漿を得て、各組織と共にビタミンEの定量分析まで-80 $^{\circ}$ Cにて保管した。ビタミンEの定量分析はuedaらの方法⁵⁾を基に分析を行った。

3. 結果および考察

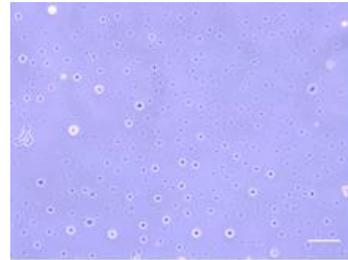
1) δ -トコフェロール含有リポソーム及びコントロールリポソームの粒子径について

図1にコントロールリポソームを、図2に δ -トコフェロール含有リポソームの粒子の顕微鏡下での画像を示した。



(スケール：5 μ m)

図1.コントロールリポソーム



(スケール：5 μ m)

図2. δ -トコフェロール含有リポソーム

画像からは球形が形成されているが、粒子径にばらつきが見られ、また、100nmより大きい事が推察された。

2) マウス血中 δ -トコフェロールの経時変化

図3には δ -トコフェロール含有リポソームをマウス尾静脈より投与した際の血中 δ -トコフェロール濃度の変動について示した。投与30分後で δ -トコフェロール濃度は上昇したものの、その後の血中濃度は維持されたままであった。この結果は尾静脈投与が正確に行われていない可能性を示唆している。今後は、マウス静脈投与についてのさらなる検討が必要であると思われる。

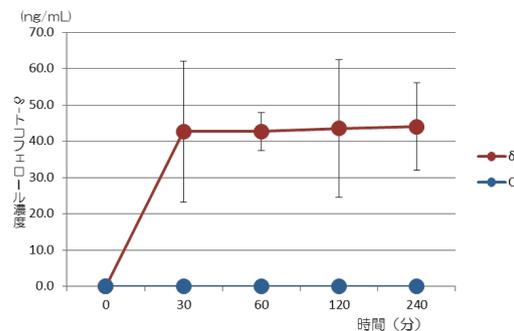


図3. 血中 δ -トコフェロール濃度の経時変化

4. H29年度の予定

H29年度は δ -トコフェロール含有ナノリポソームを均一に作成し、またマウスへの尾静脈投与についてさらなる検討を進めていきたいと考えている。

<参考文献>

- 1) Sun W, Xu W, Liu H, Wang Q, Zhou J, Dong F and Chen B. *J Nutr. Biochem.*, 20, 276-284 2009.
- 2) Samant GV, Wali VB and Sylvester PW. *Cell Prolif.* 43, 77-83, 2010
- 3) Wada S, Satomi Y, Murakoshi M, Noguchi N, Yoshikawa T and Nishino H. *Cancer Lett.*, 229, 181-191, 2005.
- 4) Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H and Inoue K. *A FEBS Lett.* 409, 105-108, 1997.
- 5) Ueda T and Igarashi O. *J.Micromutr.Anal.*, 7, 79-96, 1990

医療系材料に対するナノ粒子処理による抗菌加工法の開発

澤井 淳

神奈川工科大学 栄養生命科学科 教授

1. 背景と目的

シリコン材料は器具・容器、水回りやパッキン等での利用に加え、その高い生体適合性を生かし、医療器具（カテーテル等）、形成外科分野（人工乳房、ティッシュエクspanダー等）、創傷治療分野（人工皮膚）、さらに DDS への応用が幅広く行われている[1-3]。DDS の分野では、シリコンの気体透過性および薬剤透過性も重要な機能を担っている[1]。しかしシリコン材料は、その高い生体適合性ゆえに、表面に微生物が繁殖しやすく、バイオフィルムを形成し、感染症の一因ともなる。そのため、高い抗微生物活性を有し、かつ抗菌剤の溶出の危険性がなく、優れた抗菌持続性を有するシリコン材料の開発が求められている。

本研究では、抗微生物活性を有する金属をヨウ化物として、簡便な含浸処理によりシリコン膜に形成させ、抗微生物活性とその持続性、および膜透過性の維持が期待できる抗菌性シリコン素材の開発を目的とした。昨年度は、常温でのヨウ素溶液、硝酸銀水溶液へのシンプルな 2-step 浸漬処理で AgI/シリコン膜を作製した。その抗菌活性値は、高い耐久性および耐酸性を示し、機械的強度も未処理膜と変化がなかった。また、AgI/シリコン膜の物質透過特性も、抗菌表面処理後であっても未処理膜から 20%程度の低下に止めることができた。今年度は、AgI/シリコン膜が真菌には活性を示さなかったことから、新たに Cu を導入した CuI/シリコン膜を作成し、その特性を評価した。

2. 研究方法

2.1 Ag および Cu 処理シリコン膜の調製

シリコン膜（50×50 mm, ASONE）を I₂-KI 溶液（I₂: 0.15 M, KI: 3.3 M）に 6 h 浸漬後、0.25 M-AgNO₃ 溶液に 12 h、あるいは 0.5 M-CuSO₄ 溶液に 24 h 浸漬し、AgI/シリコン膜および CuI/シリコン膜を調製した。

2.2 抗菌活性評価

Escherichia coli NBRC 3306, *Staphylococcus aureus* NBRC13276, *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 1060, *Aspergillus niger* NBRC 4067, *Rhizopus*

stolonifer NBRC 4781 を供試菌として用いた。ここでは細菌との比較のために、真菌も JIS Z 2801[4] に準じて AgI/シリコン膜および CuI/シリコン膜の抗菌活性値を求めた。

2.3 力学的強度、SEM 観察および耐久性試験

調製した CuI/シリコン膜の応力-ひずみ曲線よりヤング率を求め、膜の力学的強度を評価した。

CuI/シリコン膜の表面観察は、走査電子顕微鏡（SEM: 株式会社日立ハイテクノロジーズ, SU 9000）により行った。

また、CuI/シリコン膜の耐久性は、ストマッカー処理(60 s)を 10 回繰り返した後、2.2 の方法で抗菌活性を評価した。

2.4 溶出量の測定

純水中に CuI/シリコン膜を浸漬し、マグネチックスターラーで攪拌した。24 h まで溶出 Cu²⁺を測定した。

3. 結果および考察

3.1 CuI/シリコン膜の調製

Fig. 1 にヨウ素処理、そして硫酸銅処理後のシリコン膜の写真を示す。シリコン膜の膜厚は 300 μm であり、最初は半透明である。ヨウ素処理後では、シリコン膜の色が褐色に変化しており、膜中にヨウ素が浸透・蓄積していることが分かる。その後の CuSO₄ 処理では、膜は白色となった。CuI は白色であることから、CuI がシリコン膜表面上に形成していることが推定される。

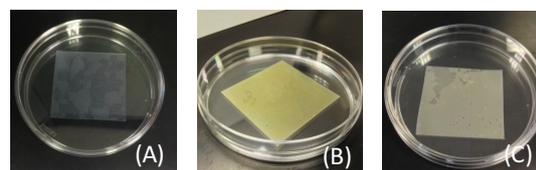


Fig. 1 CuI/シリコン膜の調製 (A) 未処理のシリコン膜, (B) I₂-KI 溶液浸漬後, (C) CuSO₄ 溶液浸漬後

Table 1 抗菌活性値

微生物	抗菌活性値	
	AgI/シリコン膜	CuI/シリコン膜
<i>E. coli</i>	>6.0	>4.0
<i>S. aureus</i>	>6.0	1.8
<i>S. cerevisiae</i>	0.5	>3.7
<i>A. niger</i>	0	2.3
<i>R. stolonifer</i>	0	2.5

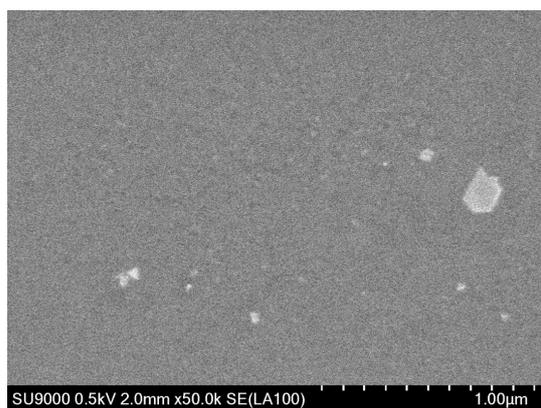


Fig. 2 CuI/シリコン膜の SEM 写真

3.2 抗菌活性

Table 1 に CuI/シリコン膜の抗菌活性値を示す。抗菌活性値は2以上で有効と判定される。AgI/シリコン膜は細菌には優れた活性を示すが、真菌には効かない。一方、CuI/シリコン膜は、酵母、カビに対しても2以上の活性値を示し、抗真菌活性を示した。さらに細菌に対してもほぼ2以上の値を示しており、幅広い抗菌スペクトルを有していると言える。また、機械的ストレスであるストマッカー処理(60s×10)後でも、CuI/シリコン膜の活性値は維持された。

3.3 SEM 観察

Fig. 2 に CuI/シリコン膜の SEM 写真を示す。白いコントラストで数10nm~200nm程度の粒子の存在が確認できた。粒子間の距離は比較的広く数100nm程度あいていた。

3.4 力学的強度

未処理膜と処理膜において応力-ひずみ曲線に殆ど差異はなく、ヤング率を求めた結果、未処理膜では 7.9 ± 1.2 MPa、Cu/シリコン膜では 8.9 ± 1.1 MPa であり、統計的に有意な差はなかった($P > 0.05$)。したがって、2stepのCu処理によるシリコン膜の機械的強度の変化は認められなかった。

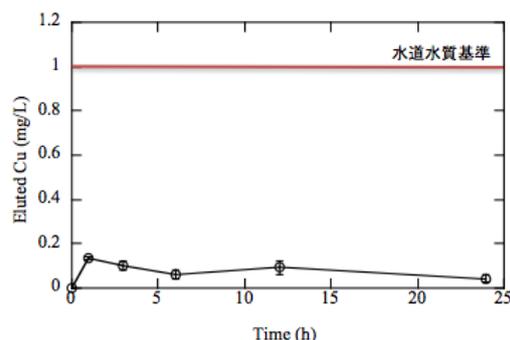


Fig. 3 CuI/シリコン膜からのCu²⁺の溶出

3.5 銅の溶出量

Fig. 3 に CuI/シリコン膜をた蒸留水に浸漬、攪拌ときの溶出Cu濃度の経時変化を示す。Cu濃度は1hでほぼ一定となった。24h後も溶出Cuは0.1mg/L程度であった。

現在、厚生労働省の「水道水質基準」および「食品別規格基準の清涼飲料水の製造基準」においては、銅の基準値は共に1ppm以下と定められている。今回の結果では、すべての溶出時間で銅濃度は1ppmよりかなり低い値であった。CuI/シリコン膜は、真菌にも高い抗菌活性を有し、耐久性および低溶出性も備えたシリコン材料であることが示唆された。

また、本研究で示したシリコン膜に対する抗菌処理方法は、特別な装置が不要、さらに室温での実施が可能な浸漬処理であり、膜以外のシリコン材料に対しても適用が可能な手法といえる。

4. H29年度の予定

- CuI/シリコン膜の抗菌真菌活性をより詳細に調べるため、ISO13629-1のトランスファー法に準拠し評価を行う。
- 抗菌性金属ナノ粒子の微生物細胞への送達においてシャペロニンタンパク質を利用する新たな抗菌技術開発の検討を行う。

5. 文献

- [1] Mashak, A., Azam, R., "Silicone polymers in controlled drug delivery systems: a review", *Iran Polym. J.*, 18, pp. 279-295 (2009).
- [2] Shit, S.C., Pathik, S., "A review on silicone rubber", *National Academy Science Letters*, 36, pp. 355-365 (2013).
- [3] Goveas, R., Puttipisitchet, O., Shrestha, B., Thaworanunta, S., Srithavaj, M. T., "Silicone nasal prosthesis retained by an intranasal stent: A clinical report", *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 108, pp. 129-132 (2012).
- [4] JIS Z 2801: 抗菌加工製品・抗菌性試験方法。

光線力学療法への展開応用を目指したフラレン誘導体の構造と活性評価

高村 岳樹

神奈川工科大学応用化学科教授

1. 背景と目的

フラレンやカーボンナノチューブは光による増感作用を利用した薬理作用や、それ自身の薬物輸送担体として着目されている。しかしながら、それ自身は生理的条件下では溶解せず、生体内の局所伝達は極めて困難である。そのため、水溶性を確保しつつ、薬理作用を示す新規炭素ナノマテリアルを提案することが本研究の目的である。本研究では、とくに、フラレンに「DNA に共有結合できる化合物」を結合させ、DNA の近傍にフラレンを配置させたのちに、光増感作用を施し DNA を高効率で切断させ、標的細胞を死滅させることを狙っている。またフラレン等のナノ構造物質の局所輸送を可能とするタンパク質性ナノカプセルであるシャペロニン変異体を用いた合成したフラレンのシャペロニンカプセルへ内包化と核への局所送達を検討する。タンパク質を用いたナノマテリアル輸送はこれまでに報告例はなく、今後、病巣などへの局所伝達実現に向け、新たな内包薬剤の開発、生体（細胞、個体）におけるカプセルの動態（局在、内包物の放出）を明らかにすることを目的とする。とくに本研究では、まずフラレンに DNA 結合性化合物であるソラレンを結合した化合物 **1** の合成をおこなった。本化合物 **1** は、光照射下において活性酸素の発生が確認されたが、同様の条件で光照射時においても $0.2 \mu\text{M}$ の濃度では細胞障害性が確認されなかった。これは化合物自身の水溶性が低いことに起因することが推定されたため、水溶性の官能基を有した化合物 **2** について合成を行い、活性酸素の発生

能力、細胞障害性について検討を行った。その結果、合成した化合物 **2** は一重項酸素の発生量が他のフラレン化合物と比較して、低いことがわかった。フラレンからの活性酸素発生は、フラレン自身の構造に由来するものであり、今回合成した化合物と他のフラレン誘導体のフラレン部位による差異はほぼないことを考えると、化合物 **2** 中のフェノール基の存在による一重項酸素の吸収も考慮に入れる必要があることがわかった。そこで、今回フェノール基を有さない、化合物 **3** の合成を試みた。

2. 研究方法

通常のフラレン誘導体の合成方法に基づき、対応するグリシネート体を合成し、それをアルデヒドと反応させる方法論を用いた。

3. 結果および考察

化合物 **3** の合成は以下のように行った。まずメトキシソラレンを脱メチル化後、プロモブタンを用いて、ソラレンからアルキル鎖を伸張し、得られたソラレン-プロモブタン誘導体をアミノ体へと置換し、アミノ酢酸エチル誘導体へ変換し、最終的にフラレンと結合させるルートで検討した。まず、化合物 **4** にジプロモブタンを反応させ、得られた化合物 **5** について、グリシンのエステル体との反応を試みたが、メチルエステル体およびブチルエステル体のいずれにおいても生成物を得ることができなかった。そこで、プロモ体を一度、アジド **7** に変換し、さらにアミノ体 **8** に変換

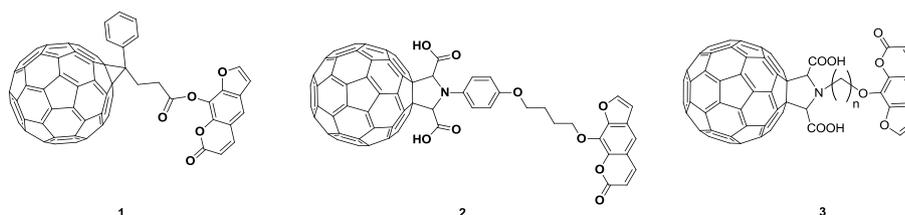


図1： 化合物 **1**、**2** および **3** の化学構造

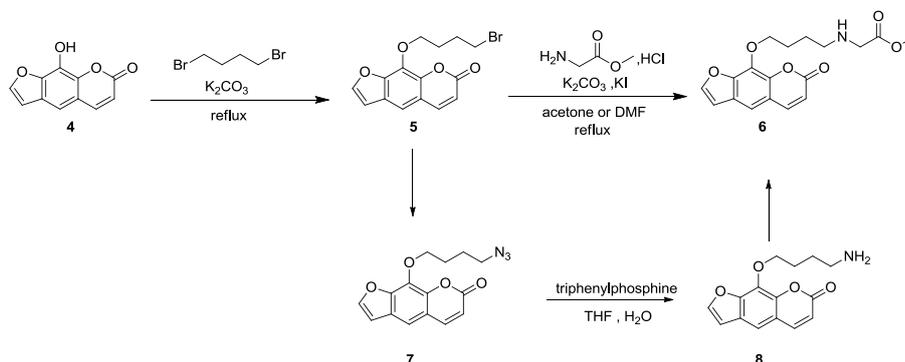


図2 ソラレングリシネート体の合成ルート

するルートを検討した。化合物 **6** から **7** への変換は DMF/水溶媒中、アジ化ナトリウムを作用させることで、効率よく反応が進行した。アジドの還元は NaBH_4 や Pd/H_2 を用いた場合には目的化合物を得ることができず、トリフェニルフォスフィンによるシュタウディンガー反応により得ることができた。得られたアミノ体はプロモ酢酸メチルを反応させ、目的とする化合物 **6** を得ることができた。しかしながら得られた化合物 **6** は少量であったため、別途合成ルートの検討を行うこととした。別ルートとして、市販の BOC 保護したプロモプロピルアミンをもちいて、検討をおこなった。ヒドロキシソラレンに炭酸カリウム存在下で BOC 保護のプロモプロピルアミンと反応させた。その後 BOC 基は TFA により脱保護させた。得られた誘導体 **9** はさらにプロモ酢酸メチルと反応させ、化合物 **10** を得ることができた。しかしながら得られた、化合物 **10** を用いてフラレンとの反応を試みたが、この反応は進行しなかった。今後、反応

しなかった原因を探るとともに新たなルートによる反応を計画する。

4. H29 年度の予定

今回、合成ができなかったため、さらに別ルートの合成をおこなう予定である。また現有の化合物については、生物試験を含めた DNA 損傷試験を現在計画中である

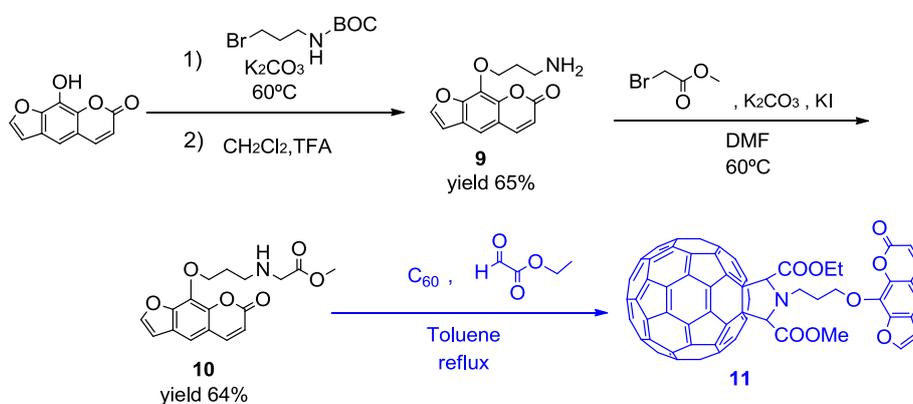


図3 フラレン誘導体の合成ルート

高臨場感仮想空間での標的分子の設計システムの研究 - 設計支援ユーザインタフェースの構築 -

上平 員丈

神奈川工科大学 情報ネットワーク・コミュニケーション学科 教授

1. 背景と目的

本研究課題では、薬物分子の設計などにおいて、だれでも簡単に利用できる分子モデルのシミュレーションツールの実現を目的とし、バーチャルリアリティ(VR)技術を用いて高臨場感仮想空間でシミュレーション結果を人間サイズで3次元的に可視化できる設計支援ユーザインタフェースを検討する。特に、表示対象に触れながら操作ができるインタラクティブ性を備え、直感的な理解や操作が可能なユーザインタフェースの実現を目指す。

H28年度は、没入型ヘッドマウントディスプレイ(HMD)に分子モデルを3DCG表示するプログラムを作成して、その中で簡易型の操作インタフェースを実装した。この作成した仮想空間内のインタフェースの動作、操作性について調べ、H29年度以降の直感的インタフェース実装時の検討課題を調べることを目的とした。

2. 研究方法

没入型HMDとしてHTC社製VIVEを用いた。このHMDは2160x1200画素で視野角110度の高精細・広視野ディスプレイを備えている。また、手にもって使用するコントローラが2つ付属しており、仮想空間内の操作を行うことができる(図1)。



図1. 使用したHMD
(手にもっているのがコントローラ)

表示プログラムは、Unity Technologies社製の仮想空間構築ソフトUnity3Dで作成した。読み込みデータとしてProtein Data Bank(たんぱく質構造データベース:PDB)の構造データファイルを用いて、HMD内に分子モデルを3DCGとして表示するプログラムを作成した。

プログラムでは、分子の選択操作、分子モデルの回転移動、モデル表現の変更などを行えるようにした(図2)。



図2. コントローラ操作

3. 結果および考察

(1) アイコン型メニュー

操作に関するメニュー類は仮想空間上にアイコンとして表示させるインタフェースとした。手に持ったコントローラと連動するCGモデル(コントローラモデル)を仮想空間内に設定して、ここから指示用の線を出して、その指示線を動かすことでメニューを選択することができる。(図3)



図3. メニューアイコンと指示線(緑の線)

(2) PDBファイルの選択と読み込み

PDBサイト(<https://www.rcsb.org/pdb/>)からPCにダウンロードした蛋白質分子構造データファイルを、仮想空間内のファイル選択画面から選択するようにした(図4)。指定されたデータが読込

まれ、解析処理の後、3次元モデルが空間に表示される。モデルが複雑な場合は表示までに時間がかかるが、その場合は処理中であることを示す画像を表示した。

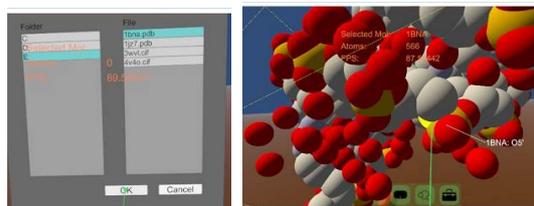


図 4. PDB ファイルの選択と表示の様子

(3)分子の選択・把握

コントローラの先から表示される指示線を分子内の原子に当てると原子名が表示される(図4)。また、コントローラボタンを押すと操作対象の分子を選択できて、分子を掴んで動かすことができるようにした。

(4)分子モデルの回転・移動・拡大縮小

表示した分子モデルを回転・移動・拡大縮小できるようにした。これらの操作は、メニューから操作を選択する方法と、コントローラのダイヤルを回すことで回転量等を変える方法を用意した。(図5, 6)

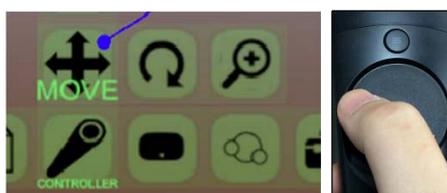


図 5. 回転移動のメニューとダイヤル操作

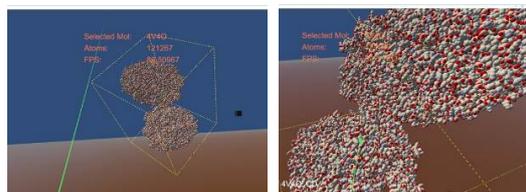


図 6. モデルの操作例 (拡大・縮小)

(5) 分子の表現形状の変更

分子モデルの表現形状を変更できるようにした。原子の形状としてボールやドット、スティックなどを、またリボンやチューブ形状での表示などを可能としている。これらの形状変更は、対象となる分子モデルを選択したのち、メニューから形状を選ぶことで実行されるようにした。(図7)

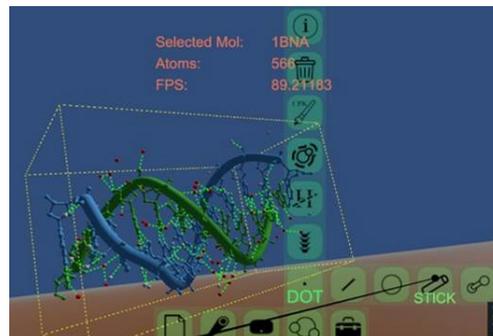


図 7. モデルの形状変更メニューと形状例

(6)考察

今回のインターフェースは、3次元空間内のモデルやメニューを、空間内の指示線で選択して、手で持ったコントローラで操作するものである。これは、仮想空間のインターフェースとして一般的なものであり、比較的広く利用されている。

研究プロジェクトメンバー等の複数名に使用してもらったところ、比較的短時間で操作に慣れることがわかった。特に回転・移動・拡大縮小操作は直感的であるとの感想であった。一方で、PDBデータの選択、形状変更操作等は難しかったが、これらは3次元空間内でメニュー表示や選択操作をする必要性がないことを考慮するとインターフェース面で検討が必要と考える。

4. H29年度の予定

没入型ディスプレイとして、マルチスクリーン型と今回のHMDの双方で、表示された分子モデルを移動、加工できるインタラクションシステムを作成する。ユーザインターフェースについてはH27、28年度の研究成果を反映していく予定である。特に、ユーザの手の動きを取得して操作に反映する直感的インターフェースの導入をめざす。また、我々は通常の3次元ディスプレイ用にユーザの身体運動から知覚奥行を精度よく求める方法を開発したが[1]、この方法の適用可能性についても検討する。

5.文献

[1] Masahiro Suzuki and Kazutake Uehira, "New technique of obtaining visually perceived positions of 3-D images using movements of users' bodies", Displays, Vol. 42, pp. 19-24, 2016

分子設計への仮想空間技術応用 - 標的分子の設計支援 -

井上 哲理

神奈川工科大学 情報ネットワーク・コミュニケーション学科 教授

1. 背景と目的

今日バーチャルリアリティ (VR) 技術の発展とともに、さまざまな分野への応用が提案されている。本研究は、VR 技術のひとつである仮想空間表現をバイオ機能材料創出の支援に応用することをめざしたものである。具体的には、没入型ディスプレイで、分子モデルを人間サイズで表示して、標的分子の設計を直感的に行えるシステムの開発を目的としている。そのための分子モデルの表現方法やデータ変換、3次元CG処理の高速化ならびにデータ共有について研究を行う。

H27年度は、市販のCGソフトウェアを複数種類用いて、蛋白質構造データバンク PDB (Protein Data Bank : <http://www.rcsb.org/>) の構造データから3次元CGモデルデータを生成して、マルチスクリーン型立体ディスプレイ (CAVE) への表示を行った。人間サイズの表示は可能であったが、分子構造が複雑な高分子ではデータ変換に時間がかかり、表示ができないなどの課題もわかった。

H28年度は、本研究プロジェクトでも扱う、構造が複雑な分子モデルの表示を高速化する方法を検討して、プログラムを作成して、没入型ディスプレイに表示を行う。作成プログラムの実行状況から、表示に関する課題を抽出して、H29年度以降のインタラクションシステム構築時の検討課題を調べることを目的とした。

2. 研究方法

(1)表示用プログラム

PDBの構造データを読み込み、没入型ディスプレイへ表示するプログラムを作成した。プログラムはデータ変換部と空間表示部から成る。(図1)

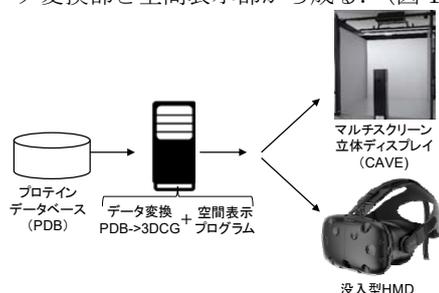


図1 分子モデル 3D 表示の流れ

プログラムは Unity Technologies 社製の仮想空間構築ソフト Unity3D で作成した。データ変換部は PDB 構造データから 3次元 CG モデル描画用データを生成する。空間表示部は CG モデルデータをもとに没入型ディスプレイへの 3次元空間描画を行う。没入型ディスプレイとして、マルチスクリーン型立体ディスプレイ (CAVE) とヘッドマウントディスプレイ (HMD) に表示を行う。HMD には HTC 社製 VIVE を用いた。なお、今回は操作インターフェース処理の関係でディスプレイ毎にプログラムを作成した。

(2)モデル表示 -ポイントスプライト処理

通常、3次元CGでは形状モデルをポリゴン処理により描画・表示するケースが多い。H27年度では市販ソフトウェアで分子構造の原子をポリゴンに基づく球体やリボン状に表現した。しかし、この加工処理では、1つの原子の描画に時間がかかり、また記憶領域も多く必要なため、結果として多数の原子で構成される分子モデルを描画することができなかった。

そこで、今回のプログラムでは分子モデルの表示加工処理にポイントスプライト処理を用いた。ポイントスプライトとは、3次元CGでの“点”にテクスチャをマッピングする機能である。この処理により、多数の原子モデルを高速に描画・表示することが期待できる。

(3)ヘッドトラッキング処理

本年度のプログラムでは、表示処理にヘッドトラッキング処理を組み込んだ。これはユーザ (観察者) の頭部の動きを計測して、3DCG描画の視点位置と同期させる処理である。これにより、ユーザは比較的自由に動くことができ、また自然な立体映像の表示が期待できる。CAVEディスプレイでは、3Dメガネに位置センサを取り付けて、頭部運動を計測した。(図2)



図2. ヘッドトラッキング用位置センサ

3. 結果および考察

(1)高分子モデルの表示

分子構造が複雑な高分子モデルの表示を試みた。CAVEディスプレイ、HMDでの表示例を図3、4に示す。いずれのディスプレイでも表示が可能であり、回転・移動・拡大縮小の操作もスムーズに実行できた。図3、4に表示されている分子(PDB ID:4V4O)はH27年度の処理では変換・表示ができなかったものであり、今年度採用した描画高速処理が有効なことがわかった。

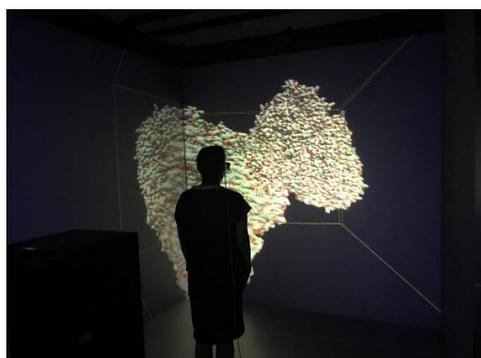


図3. 高分子蛋白質のCAVE表示例 (V4VO)

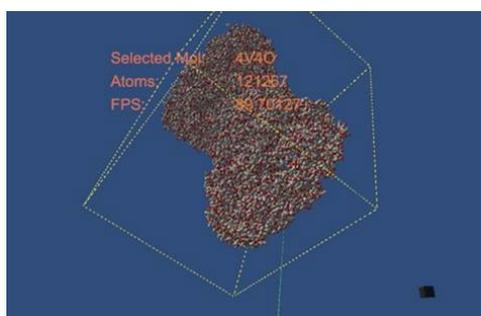


図4. 高分子蛋白質のHMD表示例 (V4VO)

(2)ヘッドトラッキングの効果

今年度、CAVEディスプレイ表示では、ヘッドトラッキング機能を追加した。図5に示すようにユーザ(観察者)の動きに合わせて描画がかわっていることがわかる。この機能があると、無い場合と比較して、特に手元近くでの立体感が増すことがわかった。



図5. ヘッドトラッキング機能により描画状況

(3)分子モデルの表現形式

分子モデルの表現形式を複数用意した。例えば、原子の表現ではドット、ボール、スティックなど、また分子モデル全体をリボン形状やチューブ形状で表現可能とした。図6に例を示す。形状を変えた際に処理時間がかかる場合もあったので、処理の見直しを行う予定である。

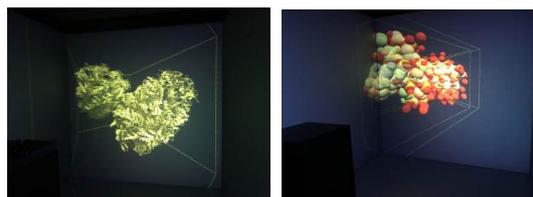


図6. 分子モデルの表現形式の違い

(4)分子モデルのグループ色付け

分子モデルの表現では、原子の種類、残基など分子内の関連するグループ毎に色を付ける機能を付けた。(図7)

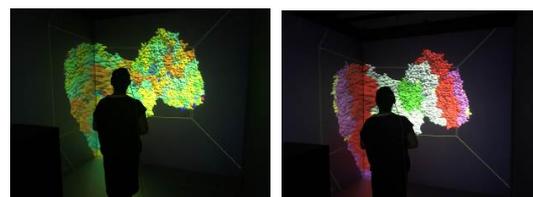


図7. 分子内のグループによる色分け

(5)まとめ

今年度は、データ変換と空間表示を行えるプログラムを作成した。空間表示プログラムでは、表示の高速化とヘッドトラッキングによる立体感向上をめざした。実行結果からは、H27年度には表示できなかった高分子蛋白質の表示が実行できた。また、CAVEディスプレイでは立体感向上が確認できた。一方で、複数の分子モデルを表示させる機能も持たせたが、分子モデル同士が重なり、操作対象モデルの指定が難しいなど、分子モデルの加工操作の表示には課題も確認された。

4. H29年度の予定

没入型ディスプレイで表示された分子モデルを移動、加工できるインタラクションシステムのプログラムを試作する。その中でH27、28年度の結果を反映したユーザの手の動きの取得、モデルへの高速な反映について最適化を行う。また操作性についてはバイオ系の研究者と共同で開発を行う。

小核抽出および細胞の蛍光観察システムについての検討

武尾 英哉, 安倍 和弥

神奈川工科大学 工学部 電気電子情報工学科

1. 背景と目的

体内の病変に直接薬剤を届けるドラッグデリバリーシステム、その誘導支援としてカプセルの追跡システムの開発を行う。薬剤カプセルに X 線を吸収する素材を付与し、X 線 CT を用いカプセルのリアルタイム動的画像解析を行う。体内においてカプセルや薬剤がどのように動くかを解析することで誘導管理を行う。

本年度は、コンピュータ支援画像診断 (CAD) 技術を用いて、細胞検出を行い画像内における小核の有無および個数の計測システム、細胞の蛍光画像より正常な細胞と異常な細胞を判別するシステムの研究を行う。

2. 研究方法

本年度は、初年度に開発した細胞抽出システムを基に実際に培養した細胞での画像解析と培養を行う際の異常細胞の抽出の観点から 2 テーマについてのシステム開発を行った。

2.1 小核の抽出処理[1][2][3]

小核とは、細胞中に普通の核とは別に存在する小型の核のことをいう (図 1)。通常は存在しない病的な核である。細胞分裂の際に一部の染色体が正常に分配されず、本来の核に取り込まれずに残ることで生じる。この小核の個数を計測することにより、細胞の培養状況を数値的に検討できる。

小核は、他の細胞近隣に発生するものであるため、細胞核の抽出を行った上で大きさおよび近隣細胞との距離関係などから小核と誤検出を分離し、個数計測を行った。

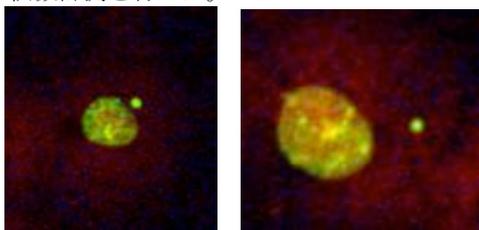


図 1 小核

2.2 細胞の蛍光観察処理

蛍光を使用することにより、明視野顕微鏡のみを使用して試料を観察する場合と比較して、より優れたコントラストが得られる。

培養した細胞に蛍光をつけ撮影し (図 2)、それが正常に培養されているかを判別する処理の

開発を行う。培養状況や異常の種類の種類に利用ができる。

画像の RGB 情報より、細胞領域、蛍光領域、自家蛍光の領域を判別し情報の提供を行う。

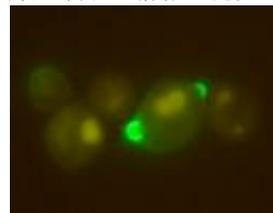


図 2 細胞の蛍光画像

3. 結果および考察

開発した各システムの結果について述べる。

3.1 小核抽出システム

作成した検出システムを図 3 に示す。図 4 左のアプリ名に使用する exe、画像名に処理する元画像を設定し実行を行うと自動で細胞核数と小核数を検出する (図 4 右)。元画像と検出した小核を円で囲み示した画像を横並びで表示し結果を見やすくした。実際の小核の抽出部を拡大したものを図 5 に示す。

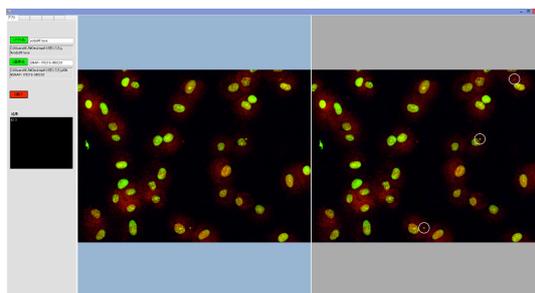


図 3 小核検出システム



図 4 ユーザーインターフェイスと検出結果

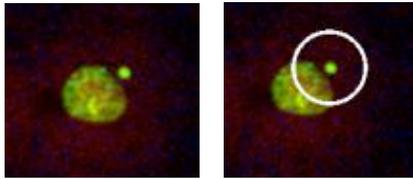


図5 小核の検出結果

3.2 細胞の蛍光観察システム

作成した蛍光観察システムを図6に示す。抽出結果を細胞領域(青)、蛍光領域(緑)、自家蛍光領域(黄)として着色し表現している(図8)。しかし現状では先に述べた細胞内の判別を行うに過ぎず、正常、異常の分類まで到達していない。これが後に述べる今後の課題である。

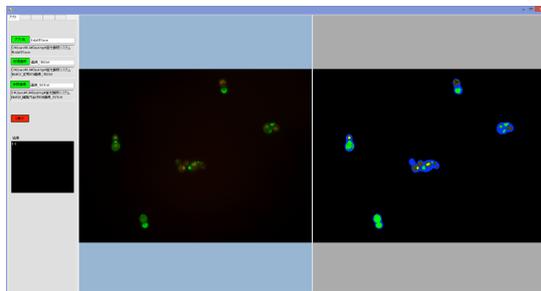


図6 蛍光観察システム



図7 ユーザーインターフェイス

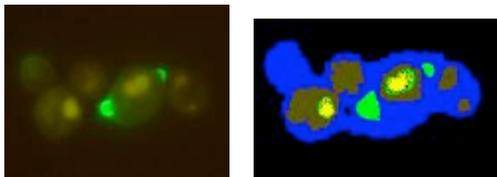


図8 蛍光の識別結果

4. H29年度の予定

4.1 小核検出システムの改良

サンプルデータでは小核の検出が行えていた。しかし、細胞の重なったような部位の個数計算などがまだ不十分であるため、この点は改良が必要である。また、細胞核ではなく細胞数が確認できないかとの意見があり、これに関しても検討を行っていく。

4.2 細胞の蛍光観察システムの改良

まずは、先に述べた通り正常な細胞と異常な細胞を判別する処理の開発を行う。まずは異常と正常の区別、ついで異常の内容についての判別も要望としていただいております、これらについても検討を行う。画像のクラス分類には機械学習によるものが有効ではないかと考えており現在研究を行っている。また、細胞の形状抽出については現在、図9右のような撮影画像より細胞の境界形状を検出することにより正確な抽出を行う手法を検討している。

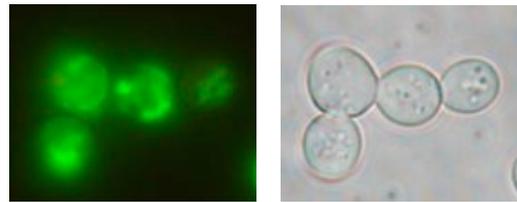


図9 培養画像を用いた細胞の境界抽出の検討

3.3 動的画像解析に対する基礎研究

本プロジェクトの主軸となるカプセルの追従システムの基礎研究として X 線画像の動的解析手法の基礎研究を行う。X 線透視画像の動的解析自体は既に行われているものもあり、小型カプセルの追従という本目的においても有効性が期待できる。

参考文献

- [1] 堂之前義文, 武尾英哉, ”細胞培養画像の画質改善の試み”, 2010 年度映像情報メディア学会年次大会, 10031, 16-10, 2010
- [2] 加藤竜司, 清田泰次郎, 備瀬竜馬, ”培養中の幹細胞品質評価: 画像を用いた評価技術とその貢献”, 生物工学会誌 92(9), pp495-499, 2014
- [3] 日本バイオアッセイ研究センター, ”小核試験の豆知識”, <https://www.johas.go.jp/Default.aspx?TabId=1062>

微小な固体群が液体の流れで搬送される現象の数値計算シミュレーション

服部 元史

神奈川工科大学情報メディア学科教授

1. 背景と目的

液体の流れを数値計算でシミュレーションしてCG可視化しながら解析・検討するにあたり、流体運動を表す Navier-Stokes 偏微分方程式を離散化して数値計算する必要がある。

Navier-Stokes 偏微分方程式を空間的に離散化する手法として、有限差分法 FDM・有限体積法 FVM・有限要素法 FEM などの「抽象的な流速の場を数値計算する諸手法」よりも、「流体粒子たちの移動という物理的な直観に依拠して流れという運動を分かり易く解釈できる」粒子法 Moving Particle Simulation に著者は注目し、Navier-Stokes 偏微分方程式に対して蓄積された数学理論の立場から、粒子法 MPS を検討する研究を実施して来た。

このように研究・検討を実施して来た粒子法 MPS を改良して、「微小な固体群が液体の流れで搬送される現象」を効果的に数値計算できることを可能とし、物理的な実験結果と比較できるようにする事を本研究の目的としている。

2. 研究方法

微小な固体群が液体の流れで搬送される現象を粒子法 MPS と個別要素法 Discrete Element Method との連成で数値計算する。

流体粒子たち (fluid particles) で液体を空間離散化する。流体粒子は質量と位置 (X 座標, Y 座標, Z 座標) だけを有している。従って流体粒子は姿勢を表現する回転角度 (roll, pitch, yaw) の情報は有さない。一種の計算点として流体粒子はモデル化されている。

微小な固体群を個別要素たち (discrete elements) でモデル化する。質量と位置 (X 座標, Y 座標, Z 座標) と共に姿勢を表現する回転角度 (roll, pitch, yaw) の情報も個別要素は有している。

2-1. 液体の運動をモデル化する

時刻 t で位置 \mathbf{r} に居る流体粒子の速さを $\mathbf{v}(t, \mathbf{r})$ で表す。圧力を $p(t, \mathbf{r})$ で表し、質量密度を $\rho(t, \mathbf{r})$ で表す。流体の運動は

$$\frac{D\mathbf{r}}{Dt} = \mathbf{v} \quad (1)$$

$$\rho \frac{D\mathbf{v}}{Dt} = -\nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{v} + \mathbf{f} \quad (2)$$

で表され、流体の質量保存は

$$\frac{D\rho}{Dt} + \rho \nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (3)$$

で表される。ここで、空間変数 $\mathbf{r} = (r_x, r_y, r_z)$ による空間偏微分を表す作用素として ∇ は

$$\nabla = (\partial r_x, \partial r_y, \partial r_z) \quad (4)$$

のように定義されている。

2-2. 微小な固体群の運動をモデル化する

時刻 t で位置 \mathbf{q} に居る個別要素の速度を $\mathbf{u}(t, \mathbf{q})$ で表す。ひとつの個別要素の質量を m で表す。それぞれの個別要素の運動は

$$\frac{D\mathbf{q}}{Dt} = \mathbf{u} \quad (5)$$

$$m \frac{D\mathbf{u}}{Dt} = \mathbf{F}_{\text{pressure}} + \mathbf{F}_{\text{damp}} \quad (6)$$

で表される。ここで、液体の圧力の空間的な勾配が個別要素に与える力を $\mathbf{F}_{\text{pressure}}$ で表しており

$$\mathbf{F}_{\text{pressure}} = (-1)(\text{Constant})\nabla p \quad (7)$$

とモデル化している。個別要素が液体から受ける抵抗力を \mathbf{F}_{damp} で表しており、液体の速度 \mathbf{v} から個別要素の速度 \mathbf{u} を差し引いた $\mathbf{v} - \mathbf{u}$ の norm の 2 乗に比例する大きさを持つ力

$$\mathbf{F}_{\text{damp}} = (\text{Constant})|\mathbf{v} - \mathbf{u}|(\mathbf{v} - \mathbf{u}) \quad (8)$$

としてモデル化している。

2-3. 液体の圧力を数値計算する

時刻 t で位置 \mathbf{r} に居る流体粒子の圧力を $p(t, \mathbf{r})$ を粒子法 MPS で数値計算するにあたり、下記のように陰解法 MPS と陽解法 MPS と 2 種類の手法がある。

液体の運動を非圧縮な流れとして数学的に近似すれば、Poisson 偏微分方程式

$$\nabla^2 p(t, \mathbf{r}) = -\frac{\rho_0}{(\Delta t)^2} \frac{\rho(t, \mathbf{r}) - \rho_0}{\rho_0} \quad (9)$$

を求解して圧力 $p(t, \mathbf{r})$ を得る。ここで、液体の平均的な質量密度を定数 ρ_0 で表している。このように Poisson 偏微分方程式を求解して圧力 $p(t, \mathbf{r})$ を得る数値計算法は、陰解法 MPS と呼ばれる。

液体の運動を圧縮な流れのまま物理的に考えれば、状態方程式

$$p(t, \mathbf{r}) = c^2 \rho_0 \frac{\rho(t, \mathbf{r}) - \rho_0}{\rho_0} \quad (10)$$

によって圧力 $p(t, \mathbf{r})$ を得る. ここで液体の音速を c で表している. このように状態方程式から圧力 $p(t, \mathbf{r})$ を得る数値計算法は, 陽解法 MPS と呼ばれる.

3. 結果および考察

流体粒子 (fluid particle) 達で液体を空間離散化し 微小な固体群を個別要素 (discrete element) 達でモデル化したうえで, 粒子法 MPS で数値計算シミュレーションを実施している. それら数値計算の結果の一例を可視化して図に示す. これらの図において, 流体粒子 (fluid particle) は白色で描画され, 個別要素 (discrete element) は赤色で描画されている.

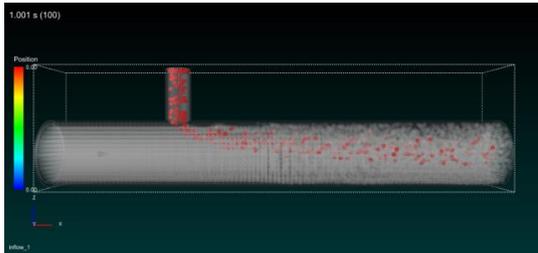


図 1: 陰解法 MPS 流体粒子(白色)と個別粒子(赤色)の質量密度が等しい場合

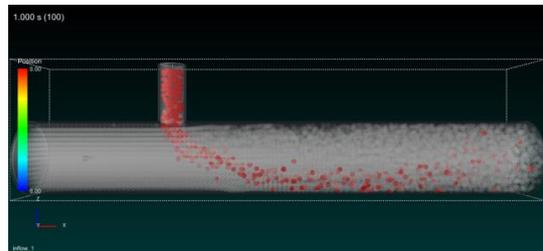


図 2: 陰解法 MPS 流体粒子(白色)と個別粒子(赤色)の質量密度の比が 1:10 の場合

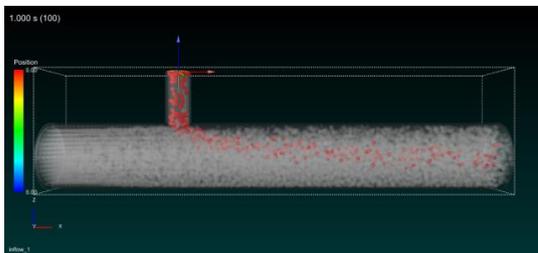


図 3: 陽解法 MPS 流体粒子(白色)と個別粒子(赤色)の質量密度が等しい場合

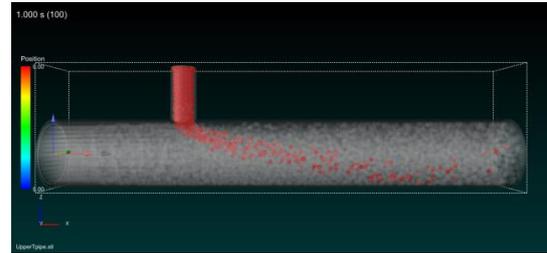


図 4: 陽解法 MPS 流体粒子(白色)と個別粒子(赤色)の質量密度の比が 1:10 の場合

陰解法 MPS で数値計算した結果と陽解法 MPS で数値計算した結果は殆ど同様な結果が得られる. 陰解法 MPS で Poisson 偏微分方程式を求解する計算は, 陽解法 MPS で状態方程式を計算するよりも遥かに計算コストを要する. それにもかかわらず Courant 条件を満たすための sampling time Δt については, 陰解法 MPS の方が陽解法 MPS よりも大きく設定することが可能であるため, total な計算時間は殆ど同じに成っている.

しかしながら, 微小な固体群を搬送する液体が流れて行く管の形状が複雑に成れば, 陰解法 MPS で Poisson 偏微分方程式を求解する計算コストは膨大に成り, 余りにも複雑な形状の管では Poisson 偏微分方程式を求解でき無い場合も想定される. この理由から, 陰解法 MPS と陽解法 MPS の双方を今後とも検討して行く必要がある.

液体粒子の質量密度と個別要素の質量密度の比を変化させると, 数値計算の結果は大きく異なっている.

4. H29 年度の予定

流体領域が分離と融合とを繰り返すような複雑に変形する流体现象を粒子法 MPS は数値計算する事ができる. この数値計算シミュレーションの大域的な時間領域を 流体領域の topology が一定である局所的な時間領域に分割すれば, それぞれの局所的な時間領域においては Navier-Stokes 偏微分方程式に関する現行の数学理論で粒子法 MPS による数値計算を理論保証できる事を平成 28 年度に探求した.

「微小な固体群が液体の流れで搬送される現象」を本稿に記した方針で粒子法 MPS で数値計算した結果も Navier-Stokes 偏微分方程式の数学理論から保証できるよう, 計算手法と数学理論と双方の研究を進めて行く. 特に液体の圧力を数値計算する方法へ理論的な保証を強化する事で, 粒子法 MPS そのものを改善する糸口が得られるものと期待している.