

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 27 年度～平成 29 年度 研究成果報告書

平成 30 年 5 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 27 年度～平成 29 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表面金属ナノ処理およびナノ金属粒子の輸送担体として
シャペロニンを用いた新規抗菌技術の開発・・・・・・・・・・・・・5
(神奈川工科大学 栄養生命科学科) 澤井 淳
- ③光線力学療法 (PDT) への展開応用を目指したフラーレン誘導体の構造と活性評価・・・・8
(神奈川工科大学 応用化学科) 高村 岳樹
- ④新規バイオセンサの開発とバイオ機能材料探索への応用・・・・・・・・・・・・・11
(神奈川工科大学 応用バイオ科学科) 飯田 泰広
- ⑤*In vivo* における細胞内局所送達輸送体の有効性の検証・・・・・・・・・・・・・14
－ビタミン E 含有リポソームを輸送体としての基礎研究－
(神奈川工科大学 栄養生命科学科) 清瀬 千佳子

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画像工学技術および AI を利用したバイオ機能開発・・・・・・・・・・・・・17
(神奈川工科大学 電気電子情報工学科) 武尾 英哉, 安倍 和弥
- ②高臨場感仮想空間での標的分子の設計システムの研究・・・・・・・・・・・・・21
(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
(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
- ③タンパク質カプセル群を輸送する血液ながれシミュレーション・・・・・・・・・・・・・24
(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

大腸菌のシャペロニン (GroEL/GroES) は、細胞内の可溶性タンパク質の約 15% のフォールディングを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 5 nm の空洞がある。GroEL は 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する。ATP 加水分解が終了すると、内包物 (ADP、フォールディングしたタンパク質) と GroES を解離し、この一連の反応サイクルを繰り返す。ATP 加水分解にかかる時間はシャペロニン反応サイクルを制御するタイマーとして機能しており、野性型 GroEL では 8 秒だが、GroEL の ATP 加水分解に関わる Asp52 および Asp398 を Ala に置換した GroEL^{D52A/D398A} 変異体は 12 日であることを我々は見いだした^[1, 2]。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 複合体の透過型電子顕微鏡観察像をすでに示しており^[3]、薬物等を内包す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ときに放出することが可能となる。

本研究では、GroEL/GroES による「閉じ込め、保護し、放出する」反応サイクルを薬物キャリアに適するよう制御し、さらに局所に「届ける」ための機能付与を行う。作製したシャペロニンカプセルに薬物を内包し、標的部位に送達したことを、生理活性の評価で検証することを目的とする。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 (ドラッグデリバリーシステム) キャリアに応用できる。

2. 研究方法

2.1 開閉時間を変化させた GroEL 変異体の作製

GroEL の ATP 結合部位近郊のアミノ酸残基 (Lys51、Asp52、Asp87、Asp398、Asp495) を置換した変異体を作製した (図 1)。GroEL の Lys51 を Ala、Asp に、Asp52 を Ala、Asn、Ser、Lys、Glu に、Asp87 を Ala に、Asp398 を Ala、Asn、Ser、Glu に、Asp495 を Ala にそれぞれ置換した各種変

異体および、それらの組合せでの変異型 GroEL の発現ベクターを作製し、大腸菌 BL21 (DE3) を組換えた。培養菌体から Butyl-Toyopearl (TOSOH)、SephacroseCL-4B (GE Healthcare) を用いて、各種 GroEL 変異体を精製した。

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 HPLC による経時的な定量法の 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 野性型 GroES (GroES^{WT}) 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 複合体の結合ヌクレオチド定量法では、2 μ M GroEL、6 μ M GroES^{WT}、5mM 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 (100 mM 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。

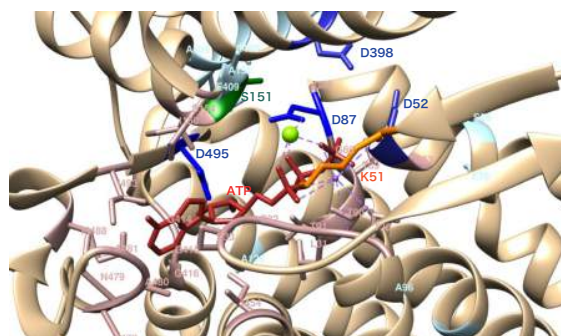


図1 GroEL の ATP 結合部位の構造

2.2 シャペロニン複合体の細胞内局所送達

GroEL/GroES 複合体の核への送達ために、GroES^{WT} の N 末端に Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) のアミノ酸配列の 12～38 に位置するシグ

ナル配列 (RKRKRPVQKTVKPIPAEGIKSNPSKRH) を融合した発現ベクター pETGroES-NAS を構築した。pETGroES-NAS を BL21 (DE3) に組換え、培養菌体から Butyl-Toyoppearl M650、SP-Toyoppearl M650 (共に TOSOH) を用いて核移行シグナル融合 GroES (GroES^{NAS}) を精製した。

次に、シャペロニン複合体の細胞膜透過性の向上のために GroES^{WT} の C 末端に膜透過ペプチド (protein transduction domain, PTD) として知られるオリゴアルギニンを融合して発現させるためのベクター pETGroESC-PTD を構築した。Butyl-Toyoppearl 650M、SP-Toyoppearl 650M、MonoQ (GE Healthcare) を用いて組換え大腸菌から膜透過ペプチド融合 GroES (GroES^{C-PTD}) を精製した。

さらに、核移行シグナル配列と膜透過ペプチドをタンデム付加するために、GroES^{NAS} の N 末端に、HIV-1 Tat タンパク質のアミノ酸配列の一部を融合して発現させるためのベクター pETGroESN-PTDAhR を構築し、同様に核移行シグナル/膜透過ペプチド融合 GroES (GroES^{N-PTD/AhR}) を精製した。

シャペロニン複合体の哺乳類細胞への導入試験に先立ち、各 GroES 変異体の細胞膜透過性及び細胞内局所送達性を検証した。GroES^{WT}、GroES^{NAS}、GroES^{N-PTD/AhR}、GroES^{C-PTD} を Cy3 で蛍光標識し、NAP5 カラム (GE Healthcare) を用いて遊離の蛍光色素を除去した。Cy3 標識した GroES^{WT}、GroES^{NAS}、GroES^{N-PTD/AhR}、GroES^{C-PTD} は 0.45 μ m メンブレンフィルターで濾過滅菌し、MEM 培地と共に 35 mm ガラスボトムディッシュに播種した CHL 細胞 (チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞) に添加した (GroES 換算で終濃度 0.2 μ M)。37°C、5% CO₂ 条件にて培養し、インキュベータ蛍光顕微鏡 LCV110 (OLYMPUS) を用いて細胞の経時変化を 3 時間ごとに撮影し、LCV110 へのディッシュ設置後 1 時間から 22 時間までの観察時間を比較した。

2.3 シャペロニンの自己重合

3~6 mM のヌクレオチドを含む HKM Buffer に GroEL^{WT}、GroEL^{D398A} または GroEL^{D52A/D398A} を 5 μ M となるよう添加し、記載がある場合は 10 μ M GroES を添加して試料を調製した。Zetasizer Nano ZSP (Malvern) を用いて各試料の粒子直径を測定した。また、同じ試料を 0.5 % リンタングステン酸 (pH 4.0) でネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡 (TEM) JEM2100 にて加速電圧 100 kV で観察した。

3. 結果および考察

3.1 GroEL 変異体ライブラリー

作製した変異体のシャペロニン活性 (ヌクレオ

チド結合、ATP 加水分解、基質結合、GroES 結合、基質フォールディング) を測定し、各アミノ酸残基のシャペロニン活性における役割が解明されてきた。Asp52 と Asp398 は、ATP の γ リン酸の引き抜きに重要なアミノ酸であるため、その二重変異体は ATP 加水分解が著しく遅くなるが、ATP 結合や GroES 結合、基質フォールディングなどのシャペロニン活性には影響は無い^[1]。それに対し、Asp87、Asp495 は ATP 結合に重要であるため、その変異体はシャペロニン活性のすべてを失う。Lys51 は、ATP 結合に関わるが Asp87、Asp495 よりは重要性が低い (図 2)。

Asp52 と Asp398 の各種アミノ酸への変異体、さらにそれらの二重変異体を作製し、1 サイクル時間が 8 秒から 12 日以上までの各種変異体を得られた。特に、GroEL^{D52K} は、複合体結合ヌクレオチド定量の結果から、12 日以上複合体を維持することがわかった。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、これにより様々な時間で加水分解が終了し蓋が開く GroEL 変異体ライブラリーをデザインし、作製することができた (図 3)。

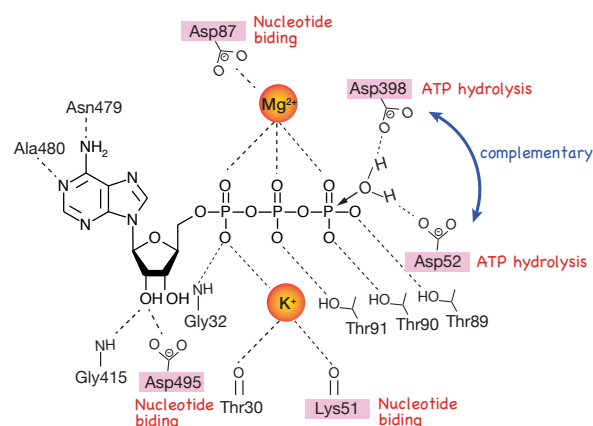


図 2 GroEL の ATP 結合部位のアミノ酸の役割

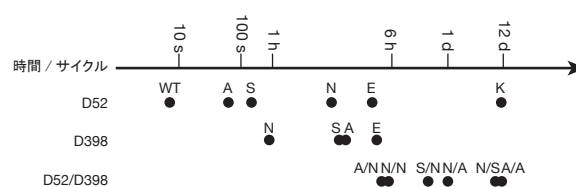


図 3 GroEL 変異体のサイクル時間

3.2 シャペロニン複合体の細胞内局所送達

シャペロニンを薬物担体とする DDS 技術の開発のため、GroEL^{D52A/D398A} / GroES^{NAS} の組み合わせの複合体に内包した薬物を細胞内局所送達するこ

とをすでに検討した^[4]。変性 GFP を結合させた Cy5-GroEL^{D52A/D398A} と Cy3-GroES^{NAS} を ATP 存在下で混合し、形成したシャペロニン複合体を CHL 細胞に添加したところ、各蛍光シグナルが細胞質内で観察され、さらに、Cy3、GFP、および Cy5 の蛍光が、同じ地点で三重に重複したシグナルが核内において検出された。経時的観察結果から、12~24 時間で細胞質に到達し、36~48 時間で核内に到達していると認められた。コントロールとして、GroES^{NAS} の代わりに GroES^{WT} を含む複合体を添加して培養した場合でも、各蛍光シグナルが細胞質内で観察されたことから、細胞膜を透過したと考えられたが、核内には到達しなかった。

次に、GroES の N または C 末端に PTD 配列を付加した膜透過ペプチド融合 GroES の膜透過効率を検証した (図 4)。Cy3-GroES を添加しない (コントロール) 画像は検出するシグナルがないため、相対的にハイバック画像になった。Cy3- GroES^{WT} を添加した CHL 細胞では、培地への Cy3- GroES^{WT} の分散が良く、観察時間を通して視野全体に弱いシグナルが認められ、添加 16 時間後から細胞質に Cy3- GroES^{WT} が集積した顆粒が生じたが、細胞核には到達しなかった。Cy3- GroES^{NAS} を添加した CHL 細胞では、添加 1 時間から Cy3- GroES^{NAS} は局

所的に細胞へ付着した。添加 7-10 時間後では細胞分裂に乗じて Cy3- GroES^{NAS} は細胞質へ拡散して進入したように見え、添加 22 時間後に細胞核を覆ったように見えた。Cy3- GroES^{N-PTD/AhR} を添加した CHL 細胞では、Cy3- GroES^{N-PTD/AhR} は細胞に付着するというより、細胞を避けて落下したように見えた。細胞の遊走により、添加 13 時間後には Cy3- GroES^{N-PTD/AhR} が基材上で集約されたように見え、添加 19 時間後では細胞がその上を通過しているように見えた。Cy3- GroES^{N-PTD/AhR} が細胞質や細胞核に侵入したかは不明確である。Cy3- GroES^{C-PTD} を添加した CHL 細胞では、添加 1 時間後から細胞膜に添うように付着しており、添加 10-19 時間後では細胞質に存在し細胞核を覆っているように見えた。添加 22 時間後では細胞内側で細胞質よりも細胞膜に Cy3- GroES^{C-PTD} が集積していた。また、Cy3- GroES^{C-PTD} の添加に関わりなく CHL 細胞は増殖し、毒性が低い可能性を示した。

以上のことより、GroES^{WT} は効率は良くないが細胞質に入ることができること、GroES^{NAS} は早期の局所的な細胞膜付着から細胞質、細胞核へ進入できること、GroES^{C-PTD} は早期から広範に細胞膜に付着して細胞質に侵入でき、細胞増殖を妨げないことが明らかとなった。

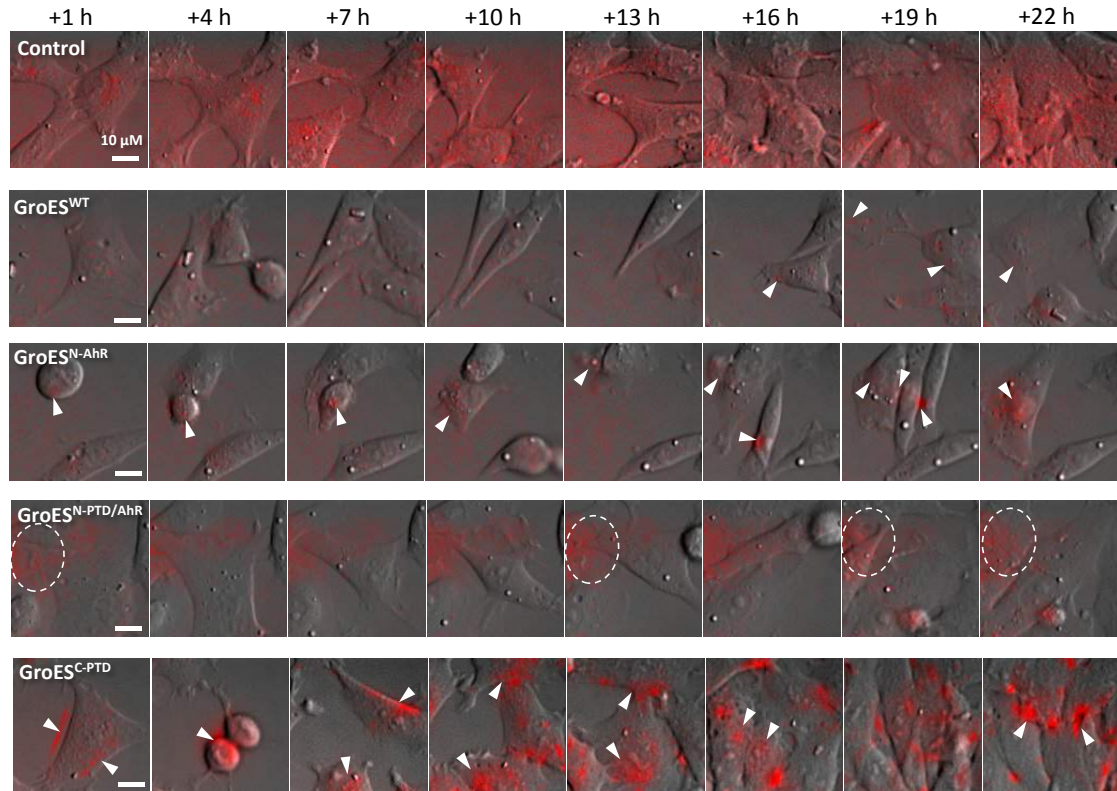


図 4 膜透過ペプチド融合 GroES の CHL 細胞膜透過の経時変化

3.3 自己重合した GroEL によるナノチューブ形成

研究過程で、GroEL が濃い ATP 濃度下で自己会合して幅 20 nm、長さ数百 nm のチューブ構造を可逆的に形成できることを発見した^[5]。重合している個々の GroEL 分子内に薬物を内包させることで、薬剤カプセルの局所集積、取り込み濃度のチューブ長さによる制御、複数種類の薬剤をも併せ持つ薬剤ナノチューブとして細胞周囲に配置、などの応用が考えられる。粒子径分析では、GroEL の平均粒径は約 20 nm で、結晶構造解析による 1 分子の大きさと一致していた。しかし、高濃度 ATP 存在下では GroEL^{wt}、GroEL^{D398A}、GroEL^{D52A/D398A} はいずれもより大きな粒子径を示した。透過型電子顕微鏡観察により、この粒子径の増大は、GroEL の 1 次元的な自己重合によるものであることが分かった (図 5)。また、この現象は ATP 加水分解が遅い変異体ほど顕著であった。GroES 共存下では GroEL/GroES 複合体形成が優勢であり繊維化せず、繊維形成後の GroES 添加で脱重合した。この GroEL チューブは 4 mM ATP では見られず、5 mM 以上で形成された。生体内 ATP 濃度はおよそ 3 mM であるため、GroEL は通常は生体内ではチューブは形成しないと考えられるが、細胞の状況や局所の ATP 濃度が異なる報告もあるため、生理的な意義のある可能性もある。

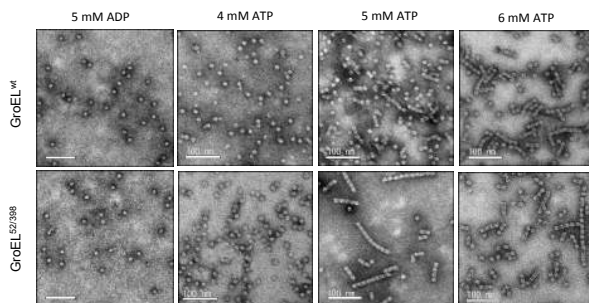


図 5 高濃度 ATP で形成する GroEL ナノチューブ

4. 今後の予定

本研究結果から、GroES への PTD 配列の融合がシャペロニン複合体の膜親和性を向上させることがわかった。核移行シグナル配列と膜透過ペプチドを併せ持つ GroES をさらに改良し、シャペロニン複合体としての膜透過及び核送達効率を検証するとともに、動物実験への展開を予定している。

また、GroEL ナノチューブは、複数種類の薬剤内包チューブとしての応用が期待できるため、内包物を閉じ込めて細胞への取り込みを検討する。

5. 参考文献

- [1] Koike-Takeshita A, Mitsuoka K, Taguchi H, “Asp52 in combination with Asp398 plays a critical role in ATP hydrolysis of chaperonin GroEL”, *J. Biol. Chem.*, **289** (43), pp. 30005-30011, 2014.
- [2] 小池あゆみ, 田口英樹, “シャペロニン変異体およびこれをコードする DNA”, 特許第 5540367 号, 2010.
- [3] 小池あゆみ, 山本修, 依田ひろみ, “シャペロニン複合体及びその製造方法”, 特許第 6099069 号, 2013.
- [4] 小池あゆみ, 依田ひろみ, 高村岳樹, “変異型シャペロニン複合体及び薬物送達システム用ナノカプセル”, PCT 公開番号 W02016185955/特願 2017-519141, 2016.
- [5] 小池あゆみ, 前田理帆, グミラル, 依田ひろみ, “GroEL 含有液、その製造方法及びその使用方法”, 特願 2017-210088, 2017.

表面金属ナノ処理およびナノ金属粒子の輸送担体として シャペロニンを用いた新規抗菌技術の開発

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

無機ナノ材料の表面処理による医療系材料への抗菌活性付与方法の開発、およびタンパク質ナノカプセルであるシャペロニンをナノ金属粒子の輸送担体として用いた新たな抗菌技術の開発を試みた。

2. 表面金属ナノ処理 [1]

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спанダー等）、創傷治癒分野（人工皮膚）、さらに DDS への応用が幅広く行われている[2-4]。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[2]。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ナノ粒子を常温常圧における簡便な2ステップの含浸処理によりシリコン膜表面に形成させ、抗微生物活性とその持続性・耐久性、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。

2.1. 研究方法

a) Ag および Cu 処理シリコン膜の調製

シリコン膜（膜厚：300 μm , ASONE）を I_2 -KI 溶液（ I_2 : 0.15 M, KI: 3.3 M）に 6 h 浸漬後、0.25 M- AgNO_3 溶液に 12 h、あるいは 0.5 M- CuSO_4 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。

b) 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[5] 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

c) 力学的強度、SEM 観察および耐久性試験

調製した AgI/シリコン膜および 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。

AgI/シリコン膜および 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、AgI/シリコン膜および CuI/シリコン膜の耐久性は、ストマッカー処理(1 min)を 10 回繰り返した後、b)の方法で抗菌活性を評価した。

d) 金属溶出量の測定

純水中に AgI/シリコン膜あるいは 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 Ag^+ あるいは Cu^{2+} を測定した。

e) 透過速度測定

モデル透過物質としてペンタクロロフェノール（PCP）を使用した。この物質のシリコン膜に対する透過特性は、既往の研究[5]で測定済みである。調製した Ag 処理シリコン膜を測定用モジュールに挟み、供給側に 0.04 mM の PCP 水溶液（pH 2）、回収側に 20 mM 水酸化ナトリウムを入れ、スターラーで攪拌した。一定時間毎にサンプリングし、HPLC で供給液及び回収液中の PCP 濃度を測定し、透過速度を算出した。

2.2. 結果及び考察

a) 金属ナノ処理シリコン膜の調製

未処理のシリコン膜は半透明である。ヨウ素処理後では、シリコン膜は褐色に変化し、膜中にヨウ素が浸透・蓄積していることが分った。その後の AgNO_3 あるいは CuSO_4 処理では、膜は共に白色となった。AgI および CuI は白色であることから、AgI あるいは CuI がそれぞれシリコン膜表面上に形成していることが推定された。

b) 抗菌活性

Table 1 に AgI/シリコン膜および 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、真菌には効力を示さなかった。一方、CuI/シリコン膜は、細菌に対しては AgI/シリコン膜に劣るものの、酵母、カビに対しても 2 以上の活性値を示し、高い抗真菌活性を示した。細菌に対してもほぼ 2 以上の値を示し

Table 1 抗菌活性値

微生物	抗菌活性値	
	AgI/シリコーン膜	CuI/シリコーン膜
<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

ており、幅広い抗菌スペクトルを有していると言える。

c) SEM 観察

Fig. 1 に AgI/シリコーン膜および CuI/シリコーン膜の SEM 写真を示す。AgI/シリコーン膜では 10 nm 程度、CuI/シリコーン膜では数 10 nm～200 nm 程度の粒子が、シリコーン表面上にアイランド状に形成していることが分かる。AgI/シリコーン膜を EDX 観察により元素分析をしたところ、AgI のナノ粒子がシリコーン表面上に形成していることが確認された。

d) 力学的強度および耐久性

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：7.9±1.2 MPa、AgI/シリコーン膜：8.3±1.5 MPa、および Cu/シリコーン膜：8.9±1.1 MPa であり、統計的に有意な差はなかった ($P>0.05$)。

また、機械的ストレスであるストマッカー処理 (1 min ×10) 後でも、AgI/シリコーン膜および CuI/シリコーン膜の抗菌活性値は維持された。本処理は、素材の機械的強度を低下させず、物理的なストレスにも耐久性を持つ処理法であることが示唆された。

e) 金属の溶出量

Fig. 2 に AgI/シリコーン膜を蒸留水に浸漬、攪拌したときの溶出 Ag 濃度の経時変化を示す。Ag 溶出量は、10 時間程度で一定となり、24 h 後も USEPA の飲料水 Secondary Standard である 0.1 mg/L を下回っていた (日本の水道水質基準には Ag の規制値はない)。

また、Cu 濃度は 1 h でほぼ一定となり、24 h 後も溶出 Cu は 0.1 mg/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 1 mg/L 以下と定められており、溶出銅濃度は 1 mg/L よりかなり低い値であった。

f) AgI/シリコーン膜の分離能

AgI/シリコーン膜に対する PCP の総括透過速度係数 (K_{OL}) の値は $(1.8 \pm 0.1) \times 10^{-5}$ m/s であった。一方、未処理膜の K_{OL} は $(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ m/s で約 20% の低下に止まり、統計的に有意な差はなかつ

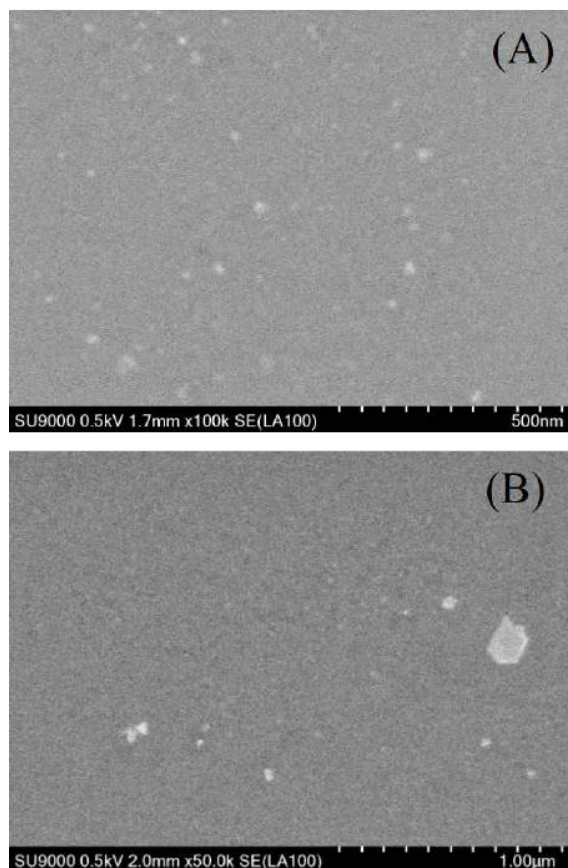


Fig. 1 金属ナノ処理したシリコーン膜のSEM写真. (A) Ag, (B) Cu

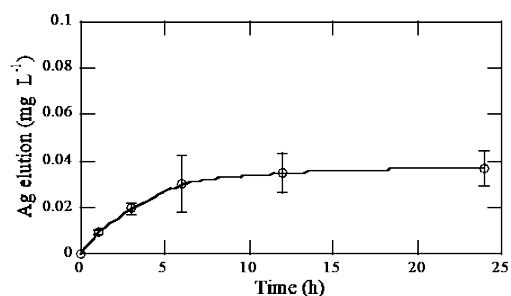


Fig. 2 AgI/シリコーン膜からのAgの溶出

た ($P>0.05$)。AgI/シリコーン膜は透過・拡散膜として十分な能力を保持していた。

以上より、本研究で示したシリコー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、膜以外のシリコーン材料に対しても適用が可能な手法といえる。

3. タンパク質ナノカプセル (シャペロニン) を利用した新たな抗菌技術の開発

銀は抗菌活性を有し、繊維やプラスチックに練り込んで利用されている。近年は、銀ナノ粒子が製造されているが、その抗菌活性は銀イオンと比較して著しく低い。これは微生物細胞への取込み効率が低下するためと考えられている。近年、GroEL/GroES (シャペロニン複合体) が有するナノサイズの空間に、金属ナノ粒子を高効率で内包できることが報告されている[6]。そこで本研究ではシャペロニン複合体をキャリアとして用い、銀ナノ粒子を内包させることで細胞送達効率を上げる新しい抗菌技術の開発を目的とする。

3.1. 研究方法

a) 銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体の調製

銀ナノ粒子懸濁液 (10 nm, 0.02 mg/mL) を遠心分離 (14,500 rpm, 10 min) し、その上清を使用した。銀ナノ粒子と脱塩処理した GroEL を一夜混合 (25 °C、400 rpm) 後、GroES と ATP を加え、銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体を調製した。

b) Minimum Bactericidal Concentration(MBC)測定

供試菌として *E. coli* NBRC 3972 を用い、約 10^6 CFU/mL に調製した菌液 20 μ L と希釈した銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体あるいは銀ナノ粒子の懸濁液をマイクロプレートに 200 μ L ずつ分注した。培養 (37 °C, 24 h) 後、各ウェルから 50 μ L ずつ抜き取り、普通ブイヨン培地を 150 μ L 分注した別のプレートに移した。再び培養 (37 °C, 24 h) 後、培養液の濁りを目視にて観察し、*E. coli* の増殖の有無を判定した。

3.2. 結果および考察

a) 銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体

シャペロニン複合体は器の役割をもつ GroEL、蓋となる GroES からなり、その形成には、ATP を必要とする。透過型電子顕微鏡で観察したところ、

銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体を確認することができた。よって、シャペロニン複合体に銀ナノ粒子を内包することが可能であった。

b) MBC

E. coli NBRC 3972 に対する銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体の MBC を調べた。銀ナノ粒子のみでは、0.02 mg/mL の濃度においても増殖が確認され、殺菌効果は得られなかった。しかしシャペロニン複合体に銀ナノ粒子を内包することにより MBC が大幅に低下し、銀ナノ粒子の抗菌活性が著しく上昇した。

以上の結果より、シャペロニン複合体が銀ナノ粒子を内包することにより、銀ナノ粒子のキャリアとして働き、細菌の細胞内に効率的に取り込まれている可能性が示唆された。

4. 今後の予定

銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体の細菌細胞への取り込みおよび細胞内での動態解析による抗菌機構の検討を行う。

参考文献

- [1] Aoki, S., Yamakawa, K., Kubo, K., Takeshita, J., Takeuchi, M., Nobuoka, Y., Wada, R., Kikuchi, M. and Sawai, J., "Antibacterial properties of silicone membranes after a simple two-step immersion process in iodine and silver nitrate solutions", *Biocontrol Science*, (in press).
- [2] Mashak, A., and Azam, R., "Silicone polymers in controlled drug delivery systems: a review", *Iran Polym. J.*, 18, pp. 279-295 (2009).
- [3] Shit, S.C., and Pathik, S., "A review on silicone rubber", *National Academy Science Letters*, 36, pp. 355-365 (2013).
- [4] Goveas, R., Puttipisitchet, O., Shrestha, B., Thaworanunta, S., and Srithavaj, M. T., "Silicone nasal prosthesis retained by an intranasal stent: A clinical report", *Journal of Prosthetic Dentistry*, 108, pp. 129-132 (2012).
- [5] JIS Z 2801: 抗菌加工製品・抗菌性試験方法.
- [6] 依田ひろみ、小池あゆみ, "シャペロニン GroEL への金属ナノ粒子の高効率内包", 神奈川工科大学研究報告, 38, pp. 49-53 (2014)

光線力学療法（PDT）への展開応用を目指したフラー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

フラー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、フラーレンに「DNAに共有結合できる化合物」を結合させ、DNAの近傍にフラー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。

またフラー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ー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。

これまでの研究でフラーレン誘導体 **2** が細胞傷害性を有することを明らかとし、さらに蛍光性官能基を有した化合物 **2** に類似した化合物 **3** で細胞核内へも存在していることを明らかとした。

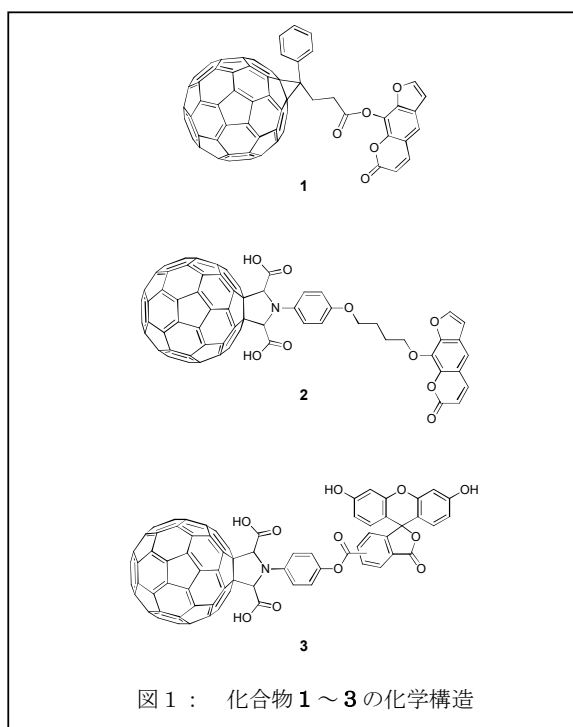
2. 研究方法

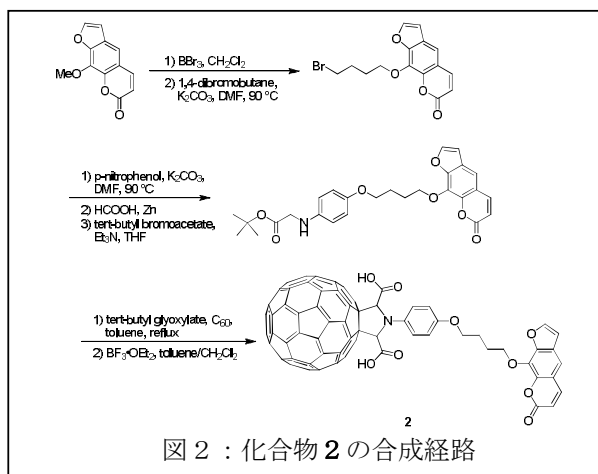
まずフラーレンに DNA 結合性化合物であるソラレンを結合した化合物 **1** の合成をおこなった。本化合物 **1** は、光照射下において活性酸素の発生が確認されたが、同様の条件で光照射時においても $0.2 \mu\text{M}$ の濃度では細胞障害活性が確認されなかった。これは化合物自身の水溶性が低いことに起因することが推定されたため、水溶性の官能基を有した化合物 **2** について合成を行い、活性酸素の発生能力、細胞障害性について検討を行った。またフラーレンに DNA 結合性化合物であるソラレンを結合した化合物 **2** の類縁体として末端にフルオレセインを結合させた化合物 **3** の合成をおこなった。この化合物 **3** の蛍光特性および細胞内取り込みについて検討をおこなった。

3. 結果および考察

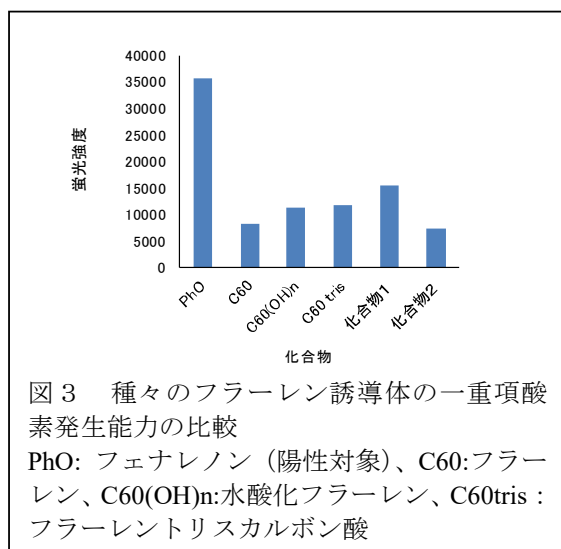
化合物 **2** の合成は以下のように行った。まずメトキシソラレンを脱メチル化後、プロモブタンを用いて、ソラレンからアルキル鎖を伸張し、得られたソラレンープロモブタン誘導体とニトロフェノールを炭酸カリウム存在下で反応させた。得られた化合物のニトロ基を亜鉛を用いて還元後、グリシン誘導体とカップリングさせた。この化合物を定法によりフラーレンと反応させ目的とする化合物を得た。この反応の全収率は 2%であった。得られた化合物については MS およびプロトン NMR で構造の確認を行った。

化合物 **2** の光照射下における一重項酸素の発生を、一重項酸素検出試薬である Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) を用いて、他のフラーレン化合物と比較して、その発生量の比較を行った。図 3 に示すように、今回合成した化合物 **2** は一重項酸素の発生量が他のフラーレン化合物と比較して、低いことがわかった。フラーレンからの活性酸素発生は、フラー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ーレン





誘導体のフラー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。

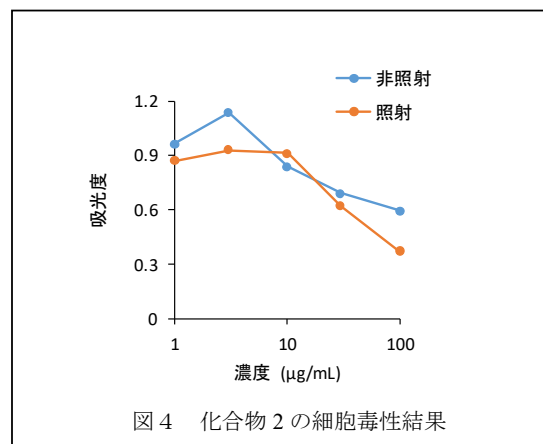


得られた化合物 2 についてさらに、培養細胞を用いた毒性試験を行った。使用した細胞は貧食作用を有するハムスター肺由来細胞の CHL/IU である。化合物を 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで細胞に処理し、細胞播種後すぐに可視光照射 (20 J/cm^2) を行い、24 時間培養後、生細胞測定試薬を用いて生細胞数の比色定量を行った。その結果、化合物 2 は光非照射下においても、細胞毒性を示し、さらに光照射により、100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においては、非照射時にくらべて約 30% 程度、細胞をより死滅させることが明らかとなった。非照射時における細胞障害性については、そのメカニズムは不明である。

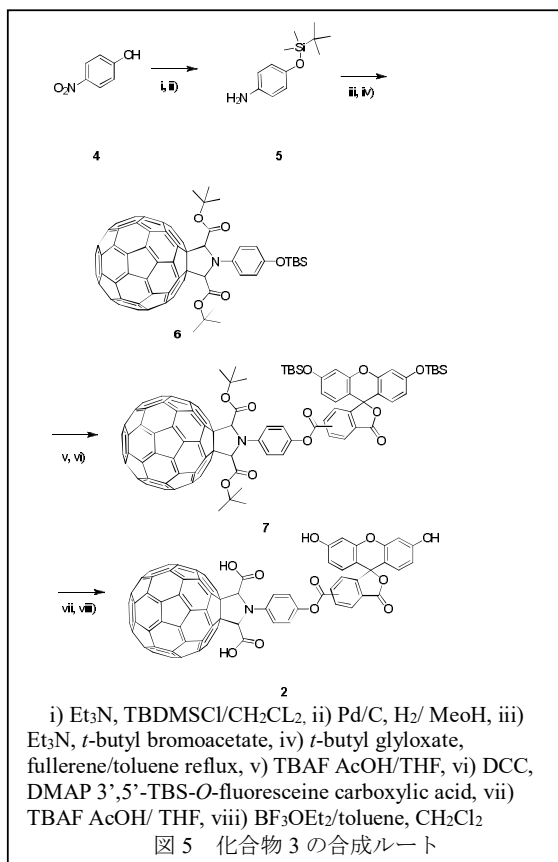
本化合物 2 の細胞への取り込み等について、蛍光性の化合物 3 を用いて検討した。化合物 3 の合成は以下に行った。ニトロフ

エノールを原料として、まず水酸基をシリル保護を行い、水素添加によって Pd 触媒存在下ニトロ基の還元を行った。プロモ酢酸ブチルを用いて、アミノ基に酢酸ブチル基を導入した。得られた化合物は、ブチルグリオキシレートとフラーレンと反応させ、化合物 6 とした。シリル基を脱保護後、フルオレsein 誘導体とカップリングさせ、更に脱保護を行い、目的とする化合物 3 とした。得られた化合物の $^1\text{H-NMR}$ の化学シフト値は DMSO- d_6 溶媒中で測定した結果予測と一致しており、TOF/MS による解析では $m/z = 719.97$ $[\text{C60}]^+$, 1212.06 $[\text{M}-2\text{COOH}]^+$, 1303.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ が観察されたため、目的とする化合物 3 が合成されていることが確認できた。この反応の全収率は 3% であった。

得られた化合物について蛍光特性について検討を行った。化合物 3 については蛍光波長がもとの 513nm から 517nm まで長波長シフトしており、さらに蛍光強度はフルオレsein の約 20% 程度であった。アルカリ処理により、蛍光の復活が観測された。この蛍光の復活は蛍光団がフラーレンから切り出された事も考えられるが、物質環境の変化に依存するものと推定される。フラーレン-蛍光物質の複合体では過去の研究では、トリプシンによる蛍光の復活が指摘されている。今回トリプシンの処理による蛍光の復活を検討を行ったが、蛍光の復活は観察されなかった。一方、化合物 2 はエステル結合を有するため、エステラーゼに対する耐性の検討を行った。高濃度のエステラーゼ処理では、エステラーゼ自身の発色の影響で、蛍光が十分に観察されない現象が確認され

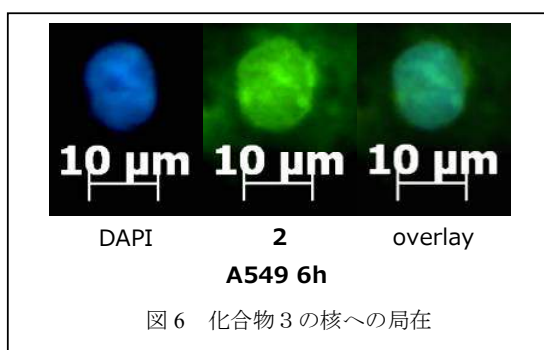


たが、エステラーゼの 0~40 unit/ml の濃度範囲ではフルオレsein ジアセテート (陽性対照) は脱アセチル化して蛍光復活が観測されたが、化合物 2 を用いた時では、蛍光の復活は低濃度では観察されなかった。ただし高濃度投与のときは若干の



蛍光強度の上昇が観察された。

また、細胞内の局在を調べるため、化合物2を細胞に処理を行った。100 μMの濃度で各種細胞株 CHL, A549, Hela に処理後、一定時間培養し、蛍光顕微鏡で観察を行った。このとき核についても DAPI を用いて同様に染色した。化合物は蛍光が減弱されてはいないが、細胞内での蛍光を観察することが出来た。細胞株はいずれも1時間後から化合物2の核への集積が観察された。(図6) 細胞質も蛍光が観察されることから、細胞質、核のいずれにもこの化合物は存在しうることが示された。また染色体がよく染色されていることから、DNA へ集積している可能性も示唆された。同様の



細胞内局在試験を化合物3についても行ったが、蛍光を観察することが出来なかった。蛍光の減弱が大きいためと思われた。

4. 参考文献

- [1] Misaki K, Takamura-Enya T, Ogawa H, Takamori K, Yanagida M., Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives. *Mutagenesis*, 31, 2, pp. 205-13, 2016.
- [2] Takamura-Enya T, Tokutake M., Novel speciation analysis of copper in river water: observation of soluble anionic copper-ligand complexes *Limnology*. 17, pp. 117-125, 2016
- [3] Hashimoto, A., Yamanaka, T., Takamura-Enya, T. Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution propertie, *J Nanopart Res*, 19, 402, 2017
- [4] Someya K, Nakatsukasa H, Ito M, Kondo T, Tateda KI, Akanuma T, Koya I, Sanosaka T, Kohyama J, Tsukada YI, Takamura-Enya T, Yoshimura A. Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation. *Int. Immunol*, 29, 65-375, 2017
- [5] 高村岳樹、環境汚染物質による DNA 損傷の新たな検出法の開発、日本環境変異原学会第44回大会(福岡 2015)
- [6] 益谷美都子、Rafiqul Islam, 藤森浩彰、佐々木由香、小泉史明、井上謙吾、松野研司、石川吉伸、高村岳樹、大川原正、がん治療の分子標的候補としての PARG の検討 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会(2015 神戸)
- [7] 高村 岳樹、小笠原楓、益谷 美都子、DNA 損傷マーカーとしてのリボシルアデノシンの検出、日本薬学会第136年会 (2016 横浜)
- [8] 橋本亜紀子、高村岳樹、ソラレン結合型水溶性フラーレンの合成と *in vitro* における評価 日本化学会 第96春季年会 (2016 京都)
- [9] 山中岳寛、高村岳樹、デオキシグアノシンの酸化損傷を検出する蛍光-消光プローブの合成と評価 日本化学会 第96春季年会 (2016 京都)
- [10] 八木 孝司、藤川 芳宏、福本 航大、炬口 茜、高村 岳樹、川西 優喜 各種損傷乗り越え DNA ポリメラーゼとヌクレオチド除去修復を欠損した細胞を用いた付加体誘発突然変異の解析」. 日本環境変異原学会第46回大会(東京)
- [11] 森 みずき、高村 岳樹 ナノダイヤモンド-臭化エチジウム複合体の細胞毒性評価 日本化学会第98春季年会.(船橋)
- [12] 橋本 亜紀子、山中 岳寛、高村 岳樹 蛍光フラーレンの合成と評価. 日本化学会第98春季年会.(船橋)

新規バイオセンサの開発とバイオ機能材料探索への応用

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

バイオセンサは、測定対象を混合物の中から分離することなく定量するシステムのことであり、迅速、簡便、小型など多くのメリットがある。測定対象を基質とする酵素を識別素子に用いる酵素センサや、測定対象の生理活性を表現型で評価する細胞センサなど、測定対象の特性に合わせた様々な取り組みが行われてきている。

通常、対象物質の定量に用いられることが多いが、本研究では、新規なバイオセンサの構築と、そのバイオセンサを生理活性物質の探索へ応用することを目的とした。具体的には、1) マイクロフローシステムの構築とフローインジェクション法、固定化酵素を組み合わせたβ-セクレターゼ活性評価法の開発とその阻害剤の探索、2) シャペロニンを応用した長期安定型バイオセンサの開発、3) 先端成長評価法の開発と抗真菌活性物質の探索、4) Survivin 機能阻害評価法の開発と抗腫瘍活性物質の探索 である。1) および 2) は酵素センサに属するものであり、3) および 4) は細胞センサに属するものである。

2. 研究方法

2-1) 新規β-セクレターゼ活性評価法の開発と阻害剤探索への応用

β-セクレターゼ(β-secretase)はアルツハイマー病治療におけるキラー酵素として認識されており、その阻害剤は当該疾患を低減すると期待されているため、その評価法と阻害剤探索に取り組んだ。配向性を有する固定化を行うために、β-secretase と streptavidin を融合させたタンパク質をデザインし、当該融合タンパク質を大腸菌で産生させた。得られた融合タンパク質は、Au プレート上に 2-aminoethanethiol を用いてアミノ基を導入後、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin を用いてビオチンを導入、Au プレート上に SAM を形成させ、そのビオチンと融合タンパク質の streptavidin を結合させることによって配向性を持たせた固定化を行った。固定化β-secretase を作製したマイクロフローシステムに組み込み、基質や阻害剤を注入バルブよりインジェクションして活性評価を行った(図1)。また、β-secretase がプロテアーゼであることから、当該酵素の認識配列と FRET を示す CFP (青色蛍光タンパク質) と YFP (黄色蛍光タンパク質) を組み合わせたベクターを構築、

新規セクレターゼ活性評価用基質の開発を行った(図2)。

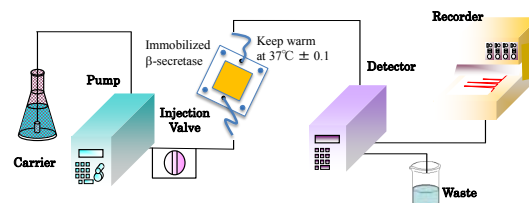


図1. 固定化β-secretaseを具備したフローインジェクションシステムの概要図

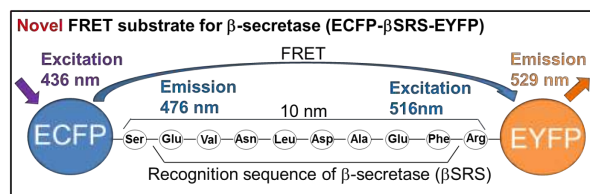


図2. 新規β-secretase活性評価用FRET基質の概要図

2-2) シャペロニンを用いた長期安定型バイオセンサの開発

固定化酵素センサは使い捨て型と連続使用のものに大別されるが、前者であれば保存安定性が、後者であれば使用安定性が重要であり、いずれにせよ長期の安定性はデータの精度を考慮した際大切な問題である。本研究では、反応産物として過酸化水素を発生する酵素が多く、過酸化水素を基質とするペルオキシダーゼと組み合わせることにより様々な基質の検出が可能になる観点から、ペルオキシダーゼを対象に、シャペロニンを組み合わせることによる安定性の可能性を検討した。

2-3) 先端成長評価法の開発と抗真菌活性物質の探索

現在、日本人の死因の3位は肺炎とされている。このうち、深在性真菌症は罹患すると重篤化し死亡率が高いため問題となっている。一方、上梓されている抗真菌剤は5種と抗菌剤と比べて圧倒的に少なく、新たな薬剤が望まれている。しかし、真菌がヒトと同じ真核生物であるため、選択毒性を得ることが難しく、開発が進んでいないことが現状である。本研究では、真菌独自の先端成長を評価する手法を開発し、その阻害剤の探索を試みた。

2-4) Survivin 機能阻害評価法の開発と抗腫瘍活性物質の探索

Survivin は正常細胞ではほとんど発現しておらず、腫瘍細胞において高発現しているタンパク質であり、XIAP や HBXIP などのタンパク質と複合体を形成しアポトーシスの抑制を行っていることが知られている。本研究室においても、survivin の発現を抑制することにより悪性黒色腫細胞にアポトーシスを誘導できることを見出している。しかし、survivin はアポトーシスのみならず、有糸分裂においても必須であることが知られているため、その後者には影響を与えず、前者のみを抑制する物質の探索は、副作用の少ない新たな抗腫瘍活性物質として期待できる。本研究では、酵母 Two hybrid 法をベースに survivin のアポトーシス関連領域のみをクローニングし、複合体を形成するタンパク質と結合すると呈色するシステムを構築、その機能阻害剤の探索を試みた。

3. 結果および考察

3-1) 新規 β -セクレターゼ活性評価法の開発と阻害剤探索への応用

組換え β -secretase を Au プレート上に固定化し、マイクロフローシステムに組み込んで計測した結果、従来の CPG 上に固定化しリアクター型のセンサと比較し、微小化、迅速計測、高感度計測を達成することができた。また、新たに構築した新規 β -secretase 活性評価用基質を大腸菌に産生させ、評価を行った結果、 β -secretase 未処理と処理により蛍光波長が異なることが示され (図3)、計測に利用できることが示された¹⁾。

更に、構築したシステムを用いて阻害活性物質の探索を行った結果、図4.に示す、5つの新規化合物において、 β -secretase 活性阻害能を有していることを見出した。

3-2) シャペロニンを用いた長期安定型バイオセンサの開発

シャペロニンのフォールディング能は酵素の

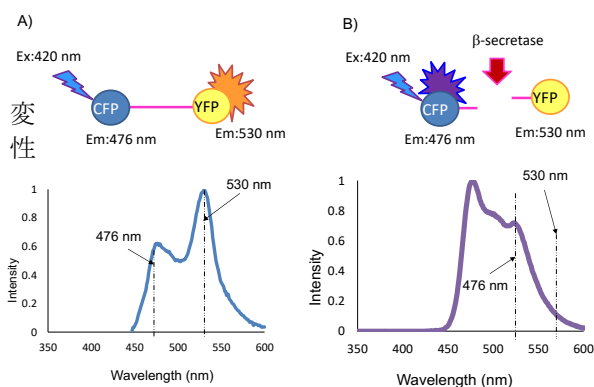
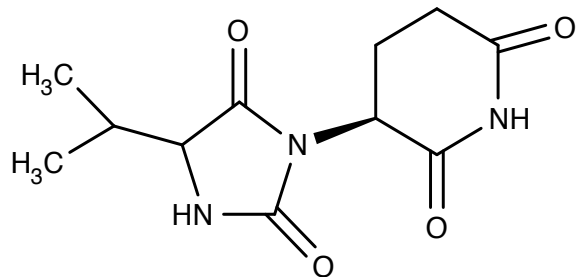


図3. 新規 β -secretase活性評価用FRET基質の評価



を防ぐことが期待でき、また、シャペロニン内に酵素を保持することができれば、変性を与える物質から保護することが期待できる。そのため、ペルオキシダーゼを対象にその安定性に与える影響を評価した(図5)。その結果、シャペロニンはATPの有無によらず、また、保持時間が通常(Wild type)よりも長い変異型(Mutant)においても、安定性に寄与しなかった。詳細に検討した結果、ペルオキシダーゼの活性の低下は、フォールディングによらず、タンパク質の切断によることが示唆されたため、今後、他の酵素において安定性を向上させるか検討していく予定である。

3-3) 先端成長評価法の開発と抗真菌活性物質の探索

先端輸送されることが知られている酵素である β -グルカナーゼ(BGL2)にGFPを融合したタンパク質を発現できるようにした酵母を作製、GFPの蛍光を指標に、当該酵母におけるBGL2の局在を評価できるシステムを構築し、既存の抗真菌剤での特性含め先端成長阻害剤探索法を開発した²⁾。当該システムを用いて生薬抽出物163種類を対象にスクリーニングを行った結果(表1)、生薬抽出物を添加したものにおいて、先端蛍光個体が30%未満が9種、30%以上70%未満が25種、70%以上が129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、

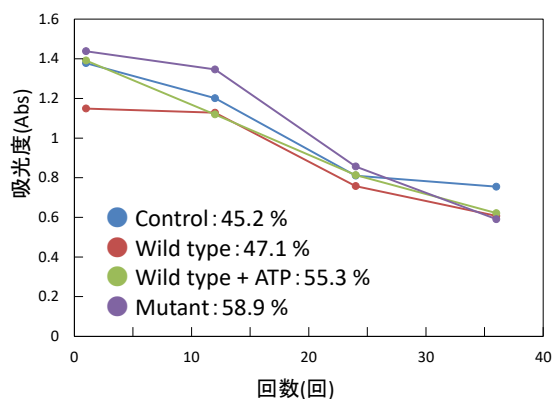


図5. シャペロニンの有無による固定化ペルオキシダーゼの安定性の評価

ケイガイ、ケイケツトウ、ゴミシ、シンギョウであった²⁾。ウバイを対象に抗真菌活性物質の分離精製を行い、単一化合物を得ることができた。また構造解析の結果、2,3-dihydrobenzofuranの構造を有する化合物であることが示唆され、今後同定していく予定である。

表1. 先端成長阻害スクリーニングの結果

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
アンタバ	95.2	イチヨウハ	76.5	オウギ	93.8
アマチャ	50	インチンコウ	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	ウラジログシ	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	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
カクコウ	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
シャカンソウ	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
キツビ	82.1	クマサザ	89.5	ゲンノショウコ	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
キグシ	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
カクコン	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
サイコ	90	ジオウ	57.1	柘榴実皮	82.1
サフラン	84.8	ジコッピ	69	椒目	74.6
サンザシ	80	シュクシャ	77.8	セッコク	78.4
サンシャ	77.5	ショウマ	85	センキュウ	77
サンソウニン	93.5	コブシ	75.3	センタイ	66.1
サンヤク	86.7	シンビ	80.8	センブリ	74.4
サヨウ	32.1	スギナ	76.3	セイヒ	83.3
サンザニク	74	シオン	76.8	センカクソウ	69.3
サンシュユ	79.3	シャクヤク	76.3	ゼンコ	61.7
サンショウ	94.2	ジャシヨウシ	64.5	センナ	83.3
サンシシ	68.2	シャチュウ	75	ニワトコ	66.2
サンズコン	73.3	コムギ	89.7	ソウカ	68.6
サンリョウ	65	スイテツ	85.4	シコン	40.8
ジオウ	53.5	セキシヤク	63.9	地膚子	63.3
シカジチョウ	80.3	セキショウコン	75.9	ジョテイシ	77.8
シツレイシ	77.5	ゼンカツ	73.8	ソウジシ	47.2
シャジン	73.5	コウホネ	76.5	続断	71.1
ジュウヤク	76.1	センブツカ	73.8	ソヨウ	42.7
シュロヨウ	75	側柏葉	71.2	桑葉鱗	67
菖蒲根	63.6	蘇木	71.4	ソウハクヒ	42.3
ジリュウ	76.1	大葉	75.6	皂角刺	61.9
シンギョウ	19.4	Control	89.8	ノコダゾール	21.5

3-4) Survivin機能阻害評価法の開発と抗腫瘍活性物質の探索

Survivinのアポトーシスに関与する領域をコードしたプラスミドとsurvivinと複合体を形成してアポトーシスを誘導するHBXIPをコードするプラスミドを酵母に導入し、Two Hybrid法をベースとした活性評価法を構築、複合体を形成することにより誘導される β -ガラクトシダーゼの活性をortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranosideを基質として生じるortho-nitrophenolの量を吸光度法で計測することにより評価した(図7)。生薬抽出物を添加することにより、生薬無添加(コントロール)の値と比べ吸光度が減少する度合いにより阻

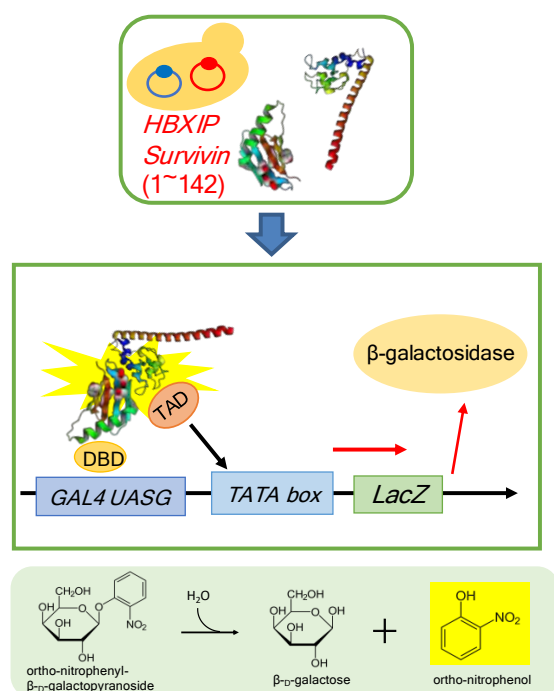


図7. 酵母ツーハイブリッド法を用いたsurvivin機能阻害活性物質評価法の開発の概念図

害活性を評価した結果、スクリーニングに用いた90種類の生薬中7種から60%以上の相互作用阻害が見られた。今後、スクリーニングを進めるとともに、活性を有する生薬から当該活性物質の単離・精製を行っていく予定である。

参考文献

- 1) Y. Iida, M. Adachi, N. Daikuhara, T. Masaki, "Construction and evaluation of novel FRET substrate for β -secretase", Proceedings of the Chemical Sensor Sym., 60, 48-50 (2016)
- 2) 飯田泰広、喜田亜由美、堤杏子、「抗真菌剤のスクリーニング方法」特願2017-183494

In vivo における細胞内局所送達輸送体の有効性の検証 -ビタミンE含有リポソームを輸送体としての基礎研究-

清瀬 千佳子

神奈川工科大学栄養生命科学科 教授

1. 背景と目的

日本人の健康増進に必要な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はより革新的な医療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の開発を目的として、新たなバイオ機能材料を作出し、それを用いた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、また女性特有の乳がんや子宮がんでの死亡率も年々増加している。それゆえ、がんに対する新たな創薬の開発や治療技術の確立が益々期待されている。がん治療への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 があるが、それらをどのようにして体内のターゲットとなる組織に送達するかが1つの問題である。そこで、ドラッグデリバリーシステム(DDS)に有効な局所送達輸送体が必須となる。本事業にて現在、その輸送体としてのシャペロニンの有効性を検討している。分担研究者は5年間の本事業においての最終段階である有効製剤含有シャペロニンが実験動物の体内にてどのような挙動を示し、またどのように各組織に到達するかを検討する予定となっている。従って、H27～H29 年度はその準備としての基礎実験を行った。そこで、これまでに行った①細胞送達輸送体のマウス投与の予備検討、②ビタミンE含有リポソームのマウス尾静脈投与による体内動態について報告する。

2. 研究方法

①細胞送達輸送体のマウス投与実験

H27 年度は、ICR 雌マウスを用いて、腹腔内投与及び尾静脈投与を行い、24 時間観察する事にした。今回用いた細胞送達輸送体として、シャペロニンおよびフラレンをそれぞれ、または両方を足したものを投与し、観察を行った。フラレンとは、炭素原子のみで出来た閉殻空洞状になったクラスターで、1985 年に炭素数 60 個の C60 フラレンが発見されたのが最初である¹⁾。フラレンには強い抗酸化作用²⁾などが見つかっており、

また、内包フラレンとして DDS のキャリアとして期待できるものもある。そこで、まず、フラレンならびにシャペロニンを投与してマウスの状況を観察する事にした。ICR 雌 10 匹を1週間予備飼育後、腹腔投与 5 匹と静脈投与 5 匹にわけ、さらに、それぞれコントロール(溶媒のみ)投与、フラレンのみ投与、シャペロニンのみ投与、フラレン+シャペロニン(シャペロニン濃度を 2 種類)、それぞれ 1 匹ずつ投与した。なお、フラレンはすべて 10mg/kg BW にした。投与 24 時間観察した。

②ビタミンE含有リポソームのマウス尾静脈投与による体内動態

次に、DDS に内包するものの1つとしてビタミンEに着目し、検討を行う事にした。ビタミンEは脂溶性ビタミンの1つで、天然にはトコフェロール類 4 種類、トコトリエノール 4 種類の合計 8 存在する。最近、トコトリエノール類に発がん抑制効果があることがいくつか報告されている。例えば、ヒト胃腺がん細胞の培養細胞である 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³⁾。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事も報告されている⁴⁾。このように天然物であり、かつ、発がん抑制作用も示唆できる事から実用化が期待できる。しかし、ビタミンEの中で、 α -トコフェロール以外の同族体は、肝臓内に存在する α -トコフェロール輸送タンパク質⁵⁾によって識別され、末梢組織には輸送されにくい事が明らかとなっている。そこで、ビタミンE同族体をDDSを介してターゲットとなる組織に輸送する事が出来れば、新たな発がん抑制の創薬になる可能性が期待できる。そこで、 δ -トコフェロール含有リポソームを作製し、それをマウスの尾静脈より投与し、体内にどのように分布するか検討を行った。

②-1. δ -トコフェロール含有ナノリポソームの作製

リポソーム簡易作製装置である Mini-Extruder

(Avanti Polar Lipids, INC.)を用いて、リポソーム作製を行った。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℃ 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。

②-2. 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、睾丸周囲脂肪、睾丸も採取した。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℃ にて保管した。ビタミン E の定量分析は Ueda らの方法⁹⁾を基に分析を行った。

③ 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

前回の結果より、マウスへの投与が静脈より漏れていた可能性が示唆されたので、再度尾静脈投与実験を行うことにした。Egg-PC 86.3mg に δ -トコフェロール 5mg、エタノール 3.65mL 加えてよく攪拌し、その後一部を別試験管に移して、N2 下にて乾固した。乾固後、生理食塩水を 6mL 加え、27℃ で 20 分ソニケートし、リポソームを作製した。コントロール用リポソームはビタミン E を除

いたものを同条件で作製した。このリポソームを②-2 と同様の群分けで投与した。なお、 δ -トコフェロール投与量も前回と同様にした。

3. 結果および考察

①細胞送達輸送体のマウス投与実験

静脈投与では、フラーレンのみ投与したマウス、フラーレン+シャペロニン投与したマウス (2 濃度とも) は 24 時間生存した。しかし、シャペロニン (1.24 μ L を 0.29mL 投与) のみ投与したマウスは即死だった。一方、腹腔内投与では、すべてのマウスが 24 時間生存した。以上の結果より、フラーレンは静脈投与及び腹腔内投与とも輸送体として利用できる可能性が示唆された。一方、シャペロニンはフラーレンと混合した場合、マウスが生存していたことから、フラーレン+シャペロニン混合物だと輸送体として活用できる可能性が示唆された。

②-1 δ -トコフェロール含有リポソームについて

図 1 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. 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。

②-2. マウス血中 δ -トコフェロールの経時的变化

図 2 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。

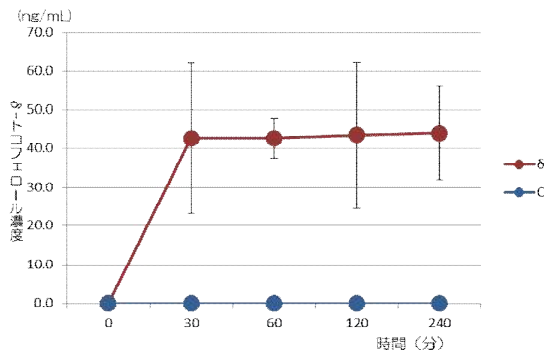


図 2. 血中 δ -トコフェロール濃度の経時変化

③ 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

図 3 に血中の δ -トコフェロール濃度の経時変化を示した。投与 30 分後が最も高く、時間が経過する毎に減少し、2 時間後ではほとんど消失していた。以上の結果より、投与 2 時間で、ほとんどの δ -トコフェロールは体内の各組織へ分布されると考えられる。

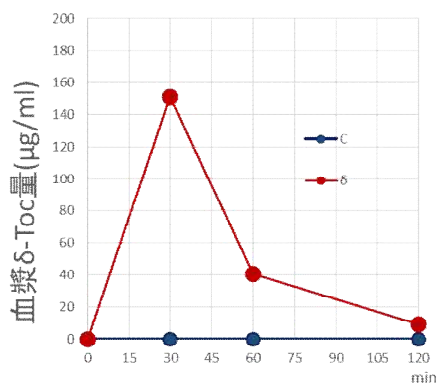


図 3. 血中 δ -トコフェロール濃度の経時変化

一方で、肝臓中の δ -トコフェロール量は投与 60 分後が最も高く、その後急速に減少した(図 4)。以上の結果、肝臓内へのリポソームとして一旦取り込まれるが、取り込まれた δ -トコフェロールは素早く代謝されるものと推察される。また、末梢組織の 1 つとして脂肪組織を分析した結果、右と左でその変化に少し違いはあったものの、投与 60 分で肝臓の 2 倍近く取り込まれており、静脈注入した一部の δ -トコフェロールは肝臓を経ることなく、直接脂肪組織に取り込まれている可能性が示唆された(図 5)。

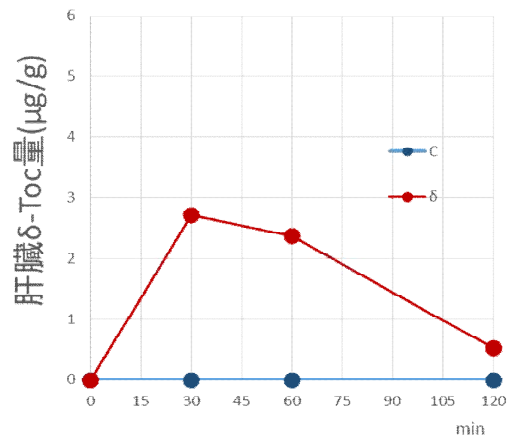


図 4. 肝臓中 δ -トコフェロール量の経時変化

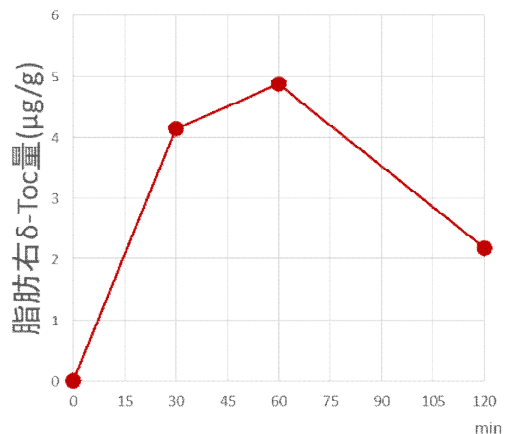


図 5. 睾丸周囲脂肪中 δ -トコフェロール量の経時変化

今回の結果は確実に静脈注入が成功したマウス各 1 匹分のデータを示しており、体内への分布を評価する上での数が確保できていない。今後は、その点も踏まえて検討を進めていきたいと考えている。

4. 参考文献

- 1) Kroto HW, et al. *Nature*, **318**, 1620163, 1985
- 2) Wang IC et al., *J. Med. Chem.*, **42**, 4614-4620, 1990
- 3) Sun W et al., *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 276-284, 2009
- 4) Wada S et al., *Cancer Lett.*, **229**, 181-191, 2005,
- 5) Hosomi A et al., *FEBS Lett.*, **409**, 105-108, 1997,
- 6) Ueda T et al., *J. Micronutr. Anal.*, **7**, 79-96, 1990

画像工学技術および AI を利用したバイオ機能開発

武尾 英哉^{*1}, 安倍 和弥^{*2}

神奈川工科大学電気電子情報工学科教授^{*1}, ポスドク^{*2}

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, 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ことを最終目的とする.

まず H27,28 年度は, プレスタディとして, コンピュータ支援画像診断 (CAD: Computer Aided Diagnosis) 技術を用いて, 抗がん剤を投与したがん細胞を顕微鏡画像レベルで画像解析を行い, 経時的变化から薬効などを判定するシステムの研究を行う. また H29 年度は, 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. そして H30 年度～, 蓄積した CAD 技術を利用して前述のカプセルの動的解析および誘導支援システムの開発を目指す.

2. 研究方法

2.1 細胞核とがん細胞の抽出処理の開発[1]-[3]

がん細胞の検出処理の開発にあたり, 前段として細胞核の抽出処理の開発を行った. 細胞核を抽出することにより画像内の細胞数の計測することや核の形状に特徴を持つがん細胞の判別などが可能となる. その上で, がん細胞は形状が不安定である点に着目し, 形状特徴よりがん細胞の抽出を行った.

2.2 小核の抽出処理の開発[4]

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.

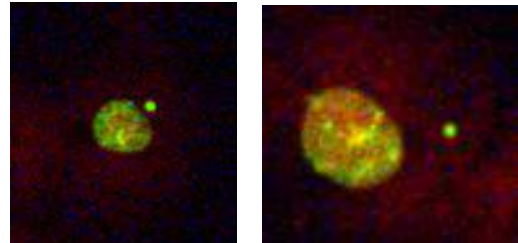


図 1 小核

2.3 細胞の蛍光観察処理の開発[4]

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った. 培養状況や異常の種類の検討に利用できる. 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った.

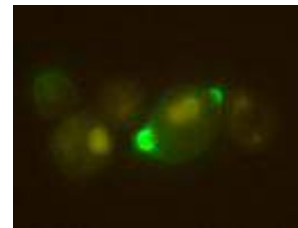


図 2 細胞の蛍光画像

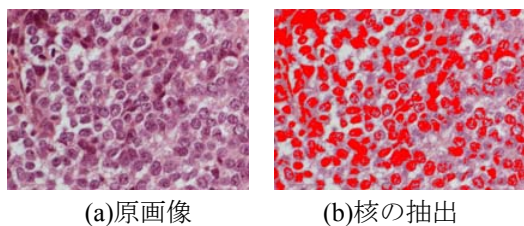
2.4 CAD 処理の高度化[5]-[17]

医療向けに, CT を中心とする医用画像を用いて, 肝腫瘍, 骨腫瘍, 乳がん腫瘍陰, 乳がん石灰化の検出を対象とした CAD システムの開発を行った. 特に, 人工症例画像を作成し, AI の学習に用いた点が, 症例データを収集しづらい現状の問題の一つの解決策とした.

3. 結果および考察

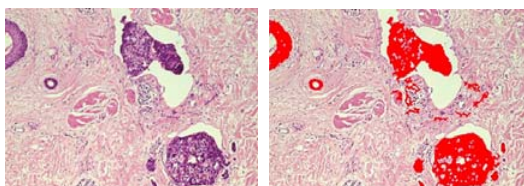
3.1 細胞核とがん細胞の抽出処理結果

細胞核の抽出結果を図 3 に, がん細胞の抽出結果を図 4 に示す. 概ね正確に抽出できていることがわかる. さらに今後, 経時変化を考慮した位置合わせの考慮, 細胞境界検出による高精度な細胞抽出などの改良を目指したい.



(a)原画像 (b)核の抽出

図3 細胞核の抽出結果



(a)原画像 (b)がん領域の抽出

図4 がん領域の抽出結果

3.2 小核抽出システム

作成した検出システムを図5に示す. 原画像を指定し実行すると自動で細胞核数と小核数を検出する. 原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6に示す. 実際に小池教授に使っていただき, 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, この点を改良した. また, 細胞核ではなく細胞数がカウントできるように改良した.

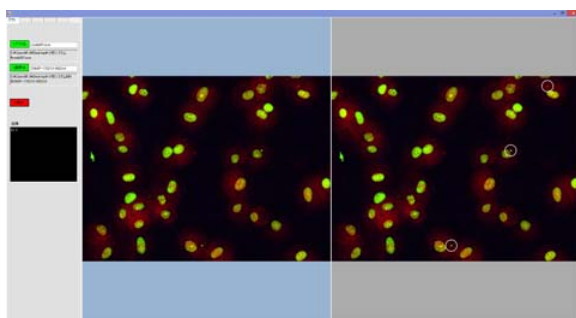


図5 小核検出システム

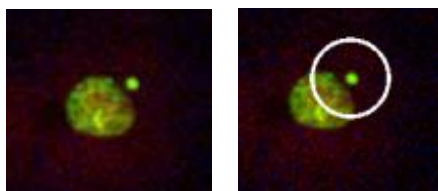
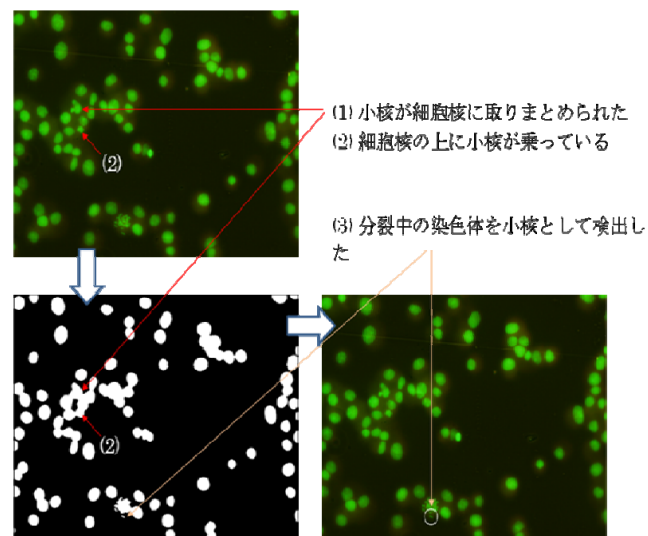


図6 小核の検出結果

開発した小核抽出システムを実際にテーマ1のメンバーに使っていただいた. 従来, 細胞・

小核をカウントするには, ひとつは顕微鏡視野下で目視で数える方法, もうひとつは画像解析ソフトを用いる方法がある. 前者は, 染色直後は全体的に暗く黄緑色に見え, 染まり過ぎると全体的に赤橙色に見える, アクリジンオレンジ(劇物)の使用量を控えると染色ムラが生じやすい, 顕微鏡視野下で小核を数えるのに時間を要するため, 観察できるスライドガラスの枚数に制限が生じるなどの問題点がある. 一方, 後者は, 1枚の画像を処理するのに最短5分を要するため画像枚数が多く, 画面酔いするなどの問題点がある. しかし本手法は, 染色ムラがあっても細胞核と小核のサイズを見分けることができる, 細胞数のカウントは概ね合っている, 作業としては顕微鏡画像をきれいに撮ればよいだけであるといった利点が多く, 高い有用性が評価された. しかし課題として, 分裂中の染色体の一部を小核として数えることがある(図7の(3)), 小核に似たサイズのコンタミを小核として数えることがある, 細胞核に極近接している小核を判別できない(図7の(1)や(2)), 倍率が変わっても同じように検出できるのか?(倍率が低いほど一視野に見える細胞数が増え, $n > 1000$ のノルマまでの枚数が減る)といった点を指摘された. また, 細胞個数のカウント精度の向上, 小核自動検出後に手動で個数増減できる機能追加, インターフェイスの表示破綻の修正などの改良をの要望を受けた.



- (1) 検出できなかった例①
- (2) 検出できなかった例②
- (3) 小核でないものを誤検出した例

図7 小核検出の失敗例

3.3 細胞の蛍光観察システム

開発した蛍光観察システムを図8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9)。

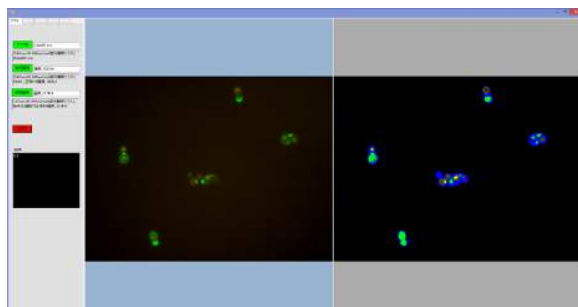


図8 蛍光観察システム

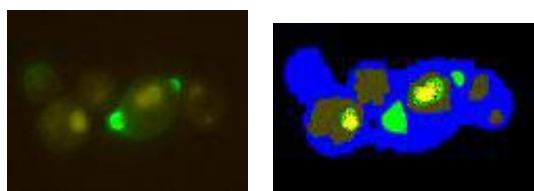


図9 蛍光の識別結果

また、正常な細胞と異常な細胞(複数の種類存在)を判別する処理の開発を行った。画像のクラス分類には、AI技術を用いた。具体的には、CNN(畳み込みニューラルネットワーク)によるDeep Learning(深層学習による機械学習)を適用した。CNNは、一般的なニューラルネットワークの入力層、中間層、出力層における中間層において「畳み込み層」と「プーリング層」を持っていることが最大の特徴である。畳み込み層は、フィルタ処理して「特徴マップ」を得ることで、画像の局所的な特徴を抽出している。一方、プーリング層は、特徴マップをさらに縮小処理することで画像の位置移動に対する普遍性を得て、局所的な特徴をまとめあげる処理をしている。よって、CNNは画像の特徴を維持しながら画像の持つ情報量を大幅に圧縮している。すなわち、画像の「抽象化」を行っている。また、CNNは従来の認識システムと異なり、自動的に特徴を取得し、その特徴を用いて識別を行っている点である。

本研究では、初めに2分類(正常・異常)で評価を行った後、6分類(正常・スポット・蛍光强度高・細胞の輪郭・細胞全体・細胞全体&スポ

ット)で行った。

まず、蛍光画像を正常と異常の2分類として処理した時の結果を示す。正常例12例、異常例35例で学習を行い、24例の未知データで評価した分類結果の一例を図10に示す。全細胞数71個に対し検出細胞数52個、正常判定31個、異常判定21個であった。

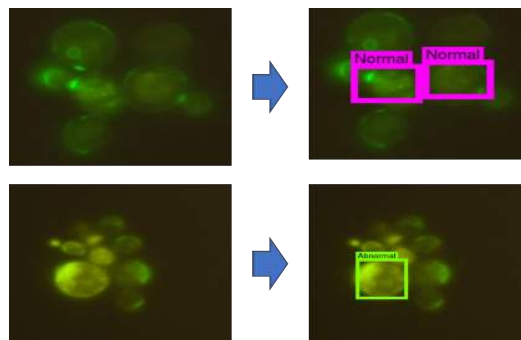


図10 細胞分類の結果(2分類)

次に蛍光を6分類として評価を行った。分類結果の一例を図11に示す。全細胞数71個に対し検出細胞数49個、正常判定29個、スポット判定4個、强度高判定4個、全体&スポット判定12個であった。概ね、検出の成功率は80%、そのうち分類の正解率は90%であった。今後、CNNの分析を進め改良を図っていく。

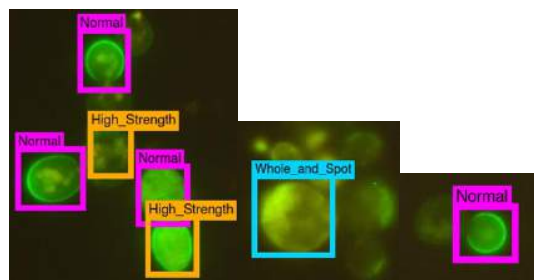


図11 細胞分類の結果(6分類)

3.4 CAD処理の高度化

本研究は、人体の多部位におけるCAD技術を開発し、それにより培った技術をバイオ機能の認識システムへ活かしている。多部位におけるCAD技術の研究成果の詳細(結果や考察等)は、紙面の都合上、文献[5]-[17]を参照されたい。

4. 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] "病理内視鏡医の育つまで", <http://blog.livedoor.jp/colorectan/>
- [4] 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>
- [5] 安倍和弥, 武尾英哉, 畠山拓也, 黒木嘉典, 永井優一, "肝腫瘍 CAD 開発における人工症例画像の有用性の検討", Medical Imaging Technology, Vol.34, No.1, pp.38-42, 2016.
- [6] 小林涼, 武尾英哉, 永井優一, "胸部 CT 画像を用いた骨格左右比較による肋骨原発性骨腫瘍の検出と体積計測", Medical Imaging Technology, Vol.34, No.2, pp.116-122, 2016.
- [7] 安倍和弥, 武尾英哉, 黒木嘉典, 永井優一, 縄野繁, 北坂孝幸, "人工症例画像の CAD 開発への有効性検証と客観的評価基準としての活用の提案", 第 35 回日本医用画像工学会大会 (JAMIT2016), OP7-7, July, 2016.
- [8] K. Abe, H. Takeo, Y. Kuroki, Y. Nagai, "Proposal for a novel CAD development technique using artificially created case images", Computer Assisted Radiology and Surgery 30rd International Congress and Exhibition, CARS2016, pp.S273-S274, 2016 June, Heidelberg.
- [9] 安倍和弥, 武尾英哉, 黒木嘉典, 永井優一, 縄野繁, 北坂孝幸, "人工症例画像の CAD 開発への有効性検証と客観的評価基準としての活用の提案", Medical Imaging Technology, Vol.35, No.2, pp.110-120, 2017.
- [10] 安倍和弥, 武尾英哉, 永井優一, 黒木嘉典, 縄野繁, "乳がんを対象とした新しい人工石灰化陰影の作成と実症例を全く用いない CAD 開発手法の有効性検証", Medical Imaging Technology, Vol.35, No.5, pp.268-272, 2017.
- [11] K. Abe, H. Takeo, Y. Kuroki, S. Nawano, "Study of a method for building a learning database for use in the development of CAD systems that use artificially created case images", Computer Assisted Radiology and Surgery 31rd International Congress and Exhibition, CARS2017, pp.S276-S278, 2017 June, Barcelona.
- [12] 安倍和弥, 武尾英哉, 永井優一, 黒木嘉典, 縄野繁, "乳がんを対象とした新しい人工石灰化陰影の作成法と実症例を全く用いない CAD 開発手法の有効性検証", 第 36 回日本医用画像工学会大会 (JAMIT2017), OP3-2, July, 2017.
- [13] 松尾希, 武尾英哉, 安倍和弥, "黄斑部を重視した網膜症の診断支援処理の開発", 信学技報, vol.117, no.518, MI2017-69, pp.25-26, 2018.
- [14] 野元章, 武尾英哉, 安倍和弥, 縄野繁, 永井優一, 黒木嘉典, "乳がんを対象とした人工石灰化陰影の開発", 信学技報, vol.117, no.518, MI2017-70, pp.27-28, 2018.
- [15] 武尾英哉, "医用画像診断支援システムの開発と医用画像工学における最新の AI の応用", 北里大学・本学の医工連携キックオフシンポジウム, 北里大学, 2018.
- [16] K. Abe, H. Takeo, Y. Kuroki, S. Nawano, "Creation of new artificial calcification shadows for breast cancer and verification of effectiveness of CAD development technique that uses no actual cases", Computer Assisted Radiology and Surgery 32rd International Congress and Exhibition, CARS2018, 2018 June, Berlin. (公開予定)
- [17] K. Abe, H. Takeo, Y. Kuroki, S. Nawano, "Creation of new artificial calcification shadows for breast cancer and verification of effectiveness of CAD development technique that uses no actual cases", Elizabeth Krupinski et al. ed., Proc. of IWBI2018, July, 2018, Atlanta. (公開予定)

高臨場感仮想空間での標的分子の設計システムの研究

井上 哲理

神奈川工科大学情報学部教授

上平 員丈

神奈川工科大学情報学部教授

1. 背景と目的

本研究課題は、高臨場感表示が可能な没入型映像ディスプレイを用いて、分子モデルをライフサイズ（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開発を目的としている。標的分子の3次元構造や構造変化の理解度を向上させて、新しい分子の設計へと結びつけることが目標である。

近年のバーチャルリアリティ技術の発展にともない、ユーザ視野を広く覆う映像表示が可能となった。このようなディスプレイを没入型と呼ぶが、仮想空間に入り込んだ感覚を高める有効な表示方式である。没入型ディスプレイ表示により、仮想空間への臨場感が増すことで、対象の3DCGモデルに対するリアル感が向上して、結果としてモデルの立体構造の詳細な理解が期待できる^[1]。

化学分子をCGで表示することは、以前から広く行われていて、PC上で稼働するさまざまなソフトウェアが存在する。例えば、分子CGツールPyMOL^[2]はフリーウェアであるが3DCGによる分子構造が比較的高速に表示されて、多機能で使いやすいこともあり、多くの研究者に利用されている。しかし、表示はPC画面上のみで、そのため立体感の乏しい表示であり、タンパク質分子のような複雑な構造の分子では、内部構造が十分に観察できない、構造内での相対的な大きさや距離の感覚が得にくいなどの課題がある。

本研究では、分子モデル表示に没入型ディスプレイを用いて、ライフサイズで表示することで、これらの課題が解決できて、分子の設計に有用なツールになると考えた。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、

仮想空間内での入力インターフェース、空間データ共有について研究を行うこととなった。

2. 研究方法

タンパク質分子モデルの没入型仮想空間表示システムの開発において、本研究では

(1) 分子モデルの表示技術

(2) 分子モデル操作のインターフェース技術

の2つのテーマに分けて研究を開始した。

研究用の構造データ（CGモデル用データ）として、タンパク質構造データベースPDB^[3]にあるものを用いて研究を進めた。

研究用の表示システムの構成図を図1に示す。仮想空間表示のための没入型映像ディスプレイとして、マルチスクリーン立体ディスプレイ（図2）と広視野表示が可能な没入型ヘッドマウントディスプレイ（HMD）を用いることとした。なお、研究の2年目（2016年度）後半以降からは、高性能HMDを用いる表示方式を主に使用することにした。これは、映像品質の高さ、装置の軽量さ、低価格性などから、将来的な実用化の点で有利と考えたためである。

研究は表1のように進めることとした。

表1. 開発の進め方

1年目：既存ソフトウェアを用いた課題検討
2年目：タンパク質分子の没入型表示ソフト試作
3年目：分子モデルとのインタラクション機能導入
4年目：分子設計への応用の検討
5年目：開発したシステムの総合的な評価

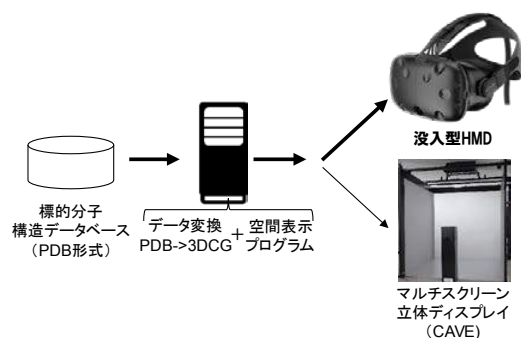


図1. 研究用表示システム構成図



図2. マルチスクリーン立体ディスプレイでのタンパク質 (V4VO) のライフサイズ表示

3. 結果および考察

3.1 課題検討と試作

表示技術については、ゲームエンジンソフトウェア Unity3D (Unity Technologies 社製) を用いて、マルチスクリーン立体ディスプレイ用の 3 次元構造表示プログラムを作成した。最初の段階では PDB 形式データにもとづく 3 次元構造において、タンパク質分子を球体や棒状の 3 次元ポリゴンで表現した。実行結果から、没入型ディスプレイに表示することはできたが、分子の複雑さにともない表示速度が非常に遅くなることがわかった。そこで、3 次元 CG のレンダリングプロセスをポリゴン処理からポイントスプライト処理に変更した。その結果、本研究プロジェクトでも扱うシャペロニンのような複雑な構造のタンパク質分子でも大きな遅延なく表示可能となった。

インタフェースについては、従来から研究してきた 3D 仮想物体をユーザの手で直接操作する方式を本開発システムでも用いることを検討した。その基礎研究として、ユーザが知覚している仮想物体の位置をユーザの手の挙動から推定する方法を提案した^{[4][5]}。この方法の使用環境としては、マルチスクリーン立体ディスプレイやシースルー型 HMD を想定した。

3.2 PyMOL の高機能 HMD 表示と体験時の感想

現在、広く利用されている分子 CG ツール PyMOL の 3DCG を、高機能 HMD 上で表示することを可能とするソフトウェアを導入して、タンパク質分子の HMD 表示の有用性、適切な表示方法、インタフェースについて検討を行った。使用したソフトウェアは、3DCG キャプチャソフト AVR (株) フィアラックス製) であり、PyMOL の 3DCG 描画処理をキャプチャして、HMD 型に変換・表示するソフトウェアである。もとの PyMOL 自体は全く変更なく HMD 表示が行える点が特徴

であるが、ソフトウェアの機能変更・追加はできないので機能拡張性は低い。

PyMOL 画像の HMD 表示をバイオサイエンス系学生に体験してもらい、使用感などを述べてもらった。図 3 に学生の体験風景を示した。学生からの感想や意見としては、

- ・ 構造観察は PC 画面上で操作して確認するより綺麗で分かりやすい。
- ・ 表面の凸凹の様子を見て取れるため部位の所在が分かりやすい。
- ・ 内側から見ることはできるのは面白い。

などがあり、PC 画面上での観察と比較して、HMD 型仮想空間表示で観察することで、構造が一層分かりやすくなるとともに、興味ある映像提示となっていることが示唆された。一方で、分子モデルの移動・回転操作の難しさといった操作性の課題、目の前に見えている構造を撮影できる仮想カメラ機能、複数名で体験を共有できる空間共有機能といった、機能追加の要望も多数あった。

本研究の目標達成には、PyMOL+AVR による表示では能力が十分でないと言えるが、この試行を通して、本研究課題で検討している、仮想空間での分子モデルライフサイズ表示の可能性と、その際の必要な機能を知ることができた。

3.3 没入型表示ソフトの試作(1)

PyMOL の機能を参考に、高機能 HMD を用いた 3 次元構造表示ソフトウェアを Unity3D ベースで開発しなおした。このソフトウェアでは、タンパク質分子の 3 次元構造をボール状、リボン状、チューブ状の複数の表現形式で表示できるようにした。また、インタフェースとして市販 HMD (HTC 製 VIVE) に付属している手持ち型コントローラーを用いて、仮想空間内に表示されるメニューやアイコンを操作するものを作成した (図 4)。今回も、バイオサイエンス系研究者や



図 3. PyMOL 画面 HMD 表示とその体験の様子

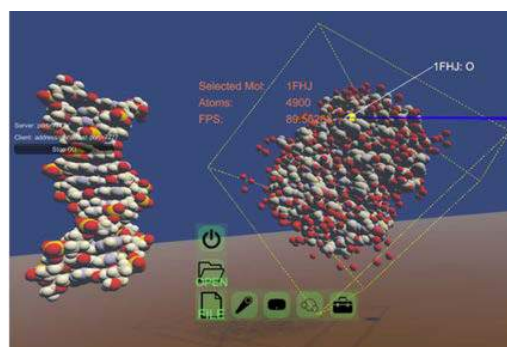


図 4. Unity3D ベースの表示ソフトの操作画面

学生に体験してもらったところ、3次元構造の理解の点ではPyMOL同様の評価であった。操作性ではPyMOLよりは評価が高かったが、満足のものではなく、多くの課題を指摘された。また、分子構造の変化を連続表示できるようなアニメーション機能等の表示機能高度化への注文もいくつかあった。

3.4 没入型表示ソフトの試作(2)

これらの評価を参考に、表示機能の拡張性、インタフェース作成の柔軟性を考慮して、表示ソフトウェアをこれまでのUnity3Dベースから、VR表示コアソフト（株）フィアラックス社製）をベースとしたソフトウェアを開発することとなった。当初開発したソフトウェアと同等の表示機能に加えて、分子モデルを複数名で多方向から観察可能とするネットワーク型仮想空間共有機能、分子の3次元構造変化の時系列データに基づくアニメーション機能、PC画面上的の2次元的インタフェースの併用による簡易操作機能を追加したソフトウェアを現在開発中である（図5）。

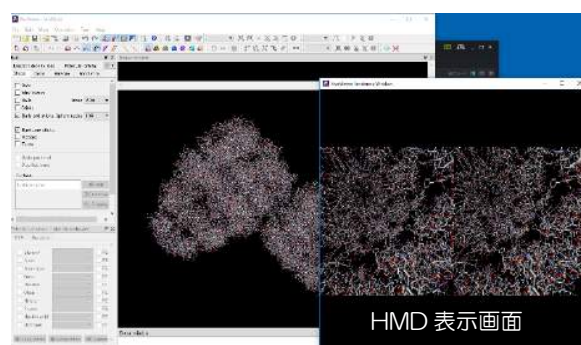


図5.現在開発中のソフトウェア画面
(右下はHMDで見えている画面)

3.5 考察

(1) これまでの研究成果

分子の3次元構造のHMD表示に関する研究はこれまでも報告があるが、その多くは低分子が対象であった。本プロジェクトで開発しているソフトウェアでは、分子モデルの3DCG処理を工夫することで、タンパク質分子、特にシャペロニンのような複雑な高分子でも大きな遅延なく表示できるものとなった。分子構造内部からの構造観察等のPC版表示ソフトウェア（PyMOLなど）では難しい表示方法が可能となった点は大きい。

そして、HMD型ライフサイズ表示により、タンパク質分子の構造理解が促進されることが示唆されたことは、研究開発の当初の方向性が適切であると言える。また、アニメーション機能、入力インタフェース、ネットワーク共有機能など、付加機能を工夫することで、さらに有効なツールとなりえることも示唆された。

(2) 計画の進捗状況と課題

当初の3年間計画は、タンパク質分子の3次元構造を仮想空間に表示して、その分子モデルの移動・加工も可能なシステムを構築することであった。このうち、表示ソフトウェアについてはおおむね完成して、ソフトウェアの拡張性も含めて計画通りに進んでいると言える。一方、加工機能については適切な操作インタフェースや処理と方法と合わせて検討中であり、すでに開発したユーザの3次元知覚位置推定手法を改良すること、またグローブ型デバイスを用いてこの問題を解決する予定である。

また、開発したソフトウェアの有用性、操作性については、バイオサイエンス系研究者や学生のソフトウェア使用感のみで評価している点が問題である。今後は、教育学や人間工学の評価手法も取り入れて定量的評価を進める予定である。

(3) 今後の研究方針

当初の計画のとおり、本プロジェクトのバイオ機能材料開発グループと協同でソフトウェア改良を進めて、標的分子の設計に役立つシステム開発を方針として研究を進める。具体的には、分子構造に関する新たな発見につながるような表示方法の改善、インタフェースの開発を行う計画である。

4. 参考文献

- [1] Takashi Shibata and Tetsuri Inoue, "Sense of Height and Virtual Body in Head-Mounted Display Environments", International Display Workshops 2015, pp.804-807, Kyoto, Japan (2015)
- [2] PyMOL- user-sponsored molecular visualization system (<https://pymol.org/2/>)
- [3] RCSB Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/>
- [4] M. Suzuki and K. Uehira, "New technique of obtaining visually perceived positions of 3-D images using movements of users' bodies", Displays, Vol. 42, pp. 19-24, 2016
- [5] K.Uehira and M.Suzuki, "Depth Perception for Virtual Object Displayed in Optical See-Through HMD", 11th International Conference on Advances in Computer-Human Interactions, Rome, Italy (2018)

タンパク質カプセル群を輸送する血液ながれシミュレーション

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

Drug Delivery System において薬剤を運搬するタンパク質カプセル群が血液によって輸送され、複雑に枝分かれしている血管を巡って行くにあたり、どのような場所に集中して行くのかを数値計算シミュレーションできるならば治療の効果を予測できて有益である。

そこで本研究では、質量の大きな粒子としてタンパク質カプセルをモデル化し、質量の小さな粒子として血液をモデル化し、粒子法 Moving Particle Simulation によってタンパク質カプセル群が血液によって輸送される現象を数値計算シミュレーションしている。

2. 研究方法

大きな質量の粒子達

$$\mathbf{r}_i = (r_{ix}, r_{iy}, r_{iz}) \quad (i = 1, 2, \dots, 100)$$

でタンパク質カプセルを表し、

小さな質量の粒子達

$$\mathbf{r}_j = (r_{jx}, r_{jy}, r_{jz}) \quad (j = 101, 102, \dots)$$

で血液を表して、粒子法 Moving Particle Simulation によって、タンパク質カプセルを血液が輸送する現象を数値計算シミュレーションする。

時刻 t で位置 $\mathbf{r} = (r_x, r_y, r_z) \in$ 流体領域 Ω に居る粒子の加速度を $\mathbf{a}(t, \mathbf{r})$ で表し、速度を $\mathbf{v}(t, \mathbf{r})$ で表し、圧力を $P(t, \mathbf{r})$ で表し、質量密度を $\rho(t, \mathbf{r})$ で表す。空間偏微分作用素を

$$\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} = \left(\frac{\partial}{\partial r_x}, \frac{\partial}{\partial r_y}, \frac{\partial}{\partial r_z} \right) \quad (1)$$

で表す。流体の粘性を表す Laplace 空間偏微分作用素は

$$\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} = \frac{\partial}{\partial r_x} \frac{\partial}{\partial r_x} + \frac{\partial}{\partial r_y} \frac{\partial}{\partial r_y} + \frac{\partial}{\partial r_z} \frac{\partial}{\partial r_z} \quad (2)$$

で表される。

タンパク質カプセルと血液の運動は、Navier-Stokes 偏微分方程式

$$\frac{D\mathbf{r}}{Dt} = \mathbf{v}(t, \mathbf{r}) \quad \text{for } \mathbf{r} \in \text{Int } \Omega \quad (3)$$

$$\rho \mathbf{a}(t, \mathbf{r}) = \rho \frac{D\mathbf{v}}{Dt} = \quad (4)$$

$$(-1) \frac{\partial P}{\partial \mathbf{r}} + \mu \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \mathbf{v}(t, \mathbf{r}) + \rho \mathbf{g}$$

と境界条件

$$0 = \mathbf{v}(t, \mathbf{q}) \quad \text{for } \mathbf{q} \in \partial\Omega \quad (5)$$

$$0 = \mathbf{a}(t, \mathbf{q}) \quad \text{for } \mathbf{q} \in \partial\Omega \quad (6)$$

で駆動される。

タンパク質カプセルが占める領域は、血液が占める領域よりも遥かに小さいので、非圧縮性

$$\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \mathbf{v}(t, \mathbf{r}) = 0 \quad \text{for } \mathbf{r} \in \text{Int } \Omega \quad (7)$$

を仮定する。

Navier-Stokes 偏微分方程式の両辺に $\partial/\partial \mathbf{r}$ を施して、Poisson 偏微分方程式

$$\rho \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \mathbf{a}(t, \mathbf{r}) = (-1) \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} P(t, \mathbf{r}) \quad (8)$$

つまり

$$(-1) \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} P(t, \mathbf{r}) \quad (9)$$

$$= f(t, \mathbf{r}) = \rho \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \mathbf{a}(t, \mathbf{r})$$

を得る。

血管の壁面の点 $\mathbf{q} \in \partial\Omega$ における内向きの(血液側の)法線ベクトルを $\mathbf{n}(\mathbf{q})$ で表す。この法線ベクトル $\mathbf{n}(\mathbf{q})$ と Navier-Stokes 偏微分方程式 (4) との内積を考えて

$$\rho \mathbf{a} \cdot \mathbf{n} = \quad (10)$$

$$(-1) \frac{\partial P}{\partial \mathbf{n}} + \left(\mu \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \mathbf{v} \right) \cdot \mathbf{n} + \mathbf{g} \cdot \mathbf{n}$$

つまり

$$\frac{\partial P(t, \mathbf{q})}{\partial \mathbf{n}(\mathbf{q})} = h(\mathbf{q}) \quad (11)$$

$$= \mathbf{g} \cdot \mathbf{n} + (-1) \rho \mathbf{a} \cdot \mathbf{n} \quad (12)$$

$$+ (-1) \left(\mu \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \mathbf{v} \right) \cdot \mathbf{n}$$

という non-homogeneous な

Neumann 境界条件を得る。

血管の枝分かれが有限である限り Poisson 偏微分方程式が Green 関数を持つことに平成 28 年度までは気付か無かったため、統計物理学の状態方程式に基づいて圧力 $P(t, \mathbf{r})$ を計算していた(図1 図2)。

血管の枝分かれが有限個であるならば、homogeneous な Neumann 境界条件に対する Poisson 偏微分方程式の Green 関数 $K(\mathbf{r}, \mathbf{q})$ を構成できる事に平成 29 年度に気付いた [6] [7]。つまり 偏微分方程式

$$\delta(\mathbf{r} - \mathbf{q}) = (-1) \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) \quad (13)$$

for $\mathbf{r}, \mathbf{q} \in \text{Int } \Omega$

と homogeneous な Neumann 境界条件

$$\frac{\partial}{\partial n(\mathbf{r})} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) = 0 \quad (14)$$

for $\mathbf{r} \in \partial\Omega$ for $\mathbf{q} \in \text{Int } \Omega$

を満たす Green 関数 $K(\mathbf{r}, \mathbf{q})$ を構成できる事に平成 29 年度に気付いた[6] [7]。

non-homogeneous な Neumann 境界条件(11)を持つ Poisson 偏微分方程式(9)の解 $P(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ は、上記の Green 関数 $K(\mathbf{r}, \mathbf{q})$ を用いて

$$P(\mathbf{t}, \mathbf{r}) = \int_{\mathbf{q} \in \Omega} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) f(\mathbf{t}, \mathbf{q}) d\mathbf{q} + \int_{\mathbf{q} \in \partial\Omega} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) h(\mathbf{q}) d\sigma(\mathbf{q}) \quad (15)$$

で表すことができる。

$\partial\Omega$ を台とする delta 関数を $\delta(\mathbf{q})$ で表すと

$$P(\mathbf{t}, \mathbf{r}) = \int_{\mathbf{q} \in \Omega} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) f(\mathbf{t}, \mathbf{q}) d\mathbf{q} + \int_{\mathbf{q} \in \Omega} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) h(\mathbf{q}) \delta(\mathbf{q}) d\mathbf{q} \quad (16)$$

$$= \int_{\mathbf{q} \in \Omega} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) (f(\mathbf{t}, \mathbf{q}) + h(\mathbf{q}) \delta(\mathbf{q})) d\mathbf{q} \quad (17)$$

このように non-homogeneous な Neumann 境界条件 $h(\mathbf{q})$ を source 項に吸収する形で 圧力 $P(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ を求める事ができる [1]。

以上のように 血管の枝分かれが有限個であるならば 圧力 $P(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ が Poisson 偏微分方程式(9)の解として数値計算することができる。圧力 $P(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ が求解できたならば、Navier-Stokes 偏微分方程式(4) の解として 加速度を $\mathbf{a}(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ 、速度 $\mathbf{v}(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ 、位置 $\mathbf{r}(\mathbf{t})$ を数値計算することができる。これらの手順を各時間 Step で繰り返す。

Poisson 偏微分方程式(9)を求解して圧力 $P(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ を数値計算したり Navier-Stokes 偏微分方程式(4)を求解して加速度を $\mathbf{a}(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ 、速度 $\mathbf{v}(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ 、位置 $\mathbf{r}(\mathbf{t})$ を数値計算したりするにあたり、粒子法 Moving Particle Simulation では 流体領域 Ω 内に空間分布している粒子達 $\mathbf{r}_i$ を効率よく探索する必要がある。

たとえば圧力 $P(\mathbf{r})$ の gradient を表す空間偏微分作用素は

$$\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} P(\mathbf{r}_i) = \frac{d}{n^0} \sum_{j \neq i} \left[\frac{P_j - P_i}{|\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i|^2} (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i) w(|\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i|) \right] \quad (18)$$

のように空間離散化していて、Poisson 偏微分方程式における Laplace 空間偏微分作用素は

$$\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} P(\mathbf{r}_i) = \frac{2d}{\lambda^0 n^0} \sum_{j \neq i} (P_j - P_i) w(|\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i|) \quad (19)$$

のように空間離散化して数値計算する。

このように、粒子法 MPS における空間偏微分作用素を計算するにあたり 重み関数 w を乗じている。そのため 重み関数 w が zero 0 となる粒子同士の相互作用は計算する必要が無い。この時に重み関数 w が有効となる範囲は近傍粒子のみに限定される。この近傍粒子を探索することで不要な粒子間の探索を省くことができ、計算時間を短縮することができる。

粒子と粒子どうしの平均的な距離の 0.2 倍を重み関数 w の影響半径に加えた値を一辺の長さとする立方体を格子状に敷き詰めて流体領域 Ω 全体を覆い、それぞれの立方体に所属する粒子達を求め リストで管理する。立方体の一辺の長さを上記のように定める理由は、圧力を計算する過程で粒子を移動させても同じ立方体に粒子が居続けるためである。この配慮のお陰で、それぞれの粒子が所属する立方体を計算する処置を 1 time step ごとに一度だけ行えば良く成る。近傍粒子の探索は 重み関数 w の値が有効となる範囲のみを対象とするためのものである。重み関数 w が有効となる範囲が粒子の属する領域と隣接する領域のみとなるように立方体の一辺の長さを定めているため、粒子が属する領域と隣接する領域のリストを網羅するだけで足りる事に成り、計算不要な粒子を探索せずに済む。

「立方体を網羅し、立方体に所属する粒子達を網羅し、近傍粒子を網羅して行く」Algorithm を本研究で提案した [2]。

3. 結果および考察

統計物理学の状態方程式によって 圧力 $P(\mathbf{t}, \mathbf{r})$ を数値計算していた頃のシミュレーション結果の一例を 図 1 と図 2 に示す。タンパク質カプセルの粒子を赤色で描画し 血液の粒子を白色で描画している。

Poisson 偏微分方程式(9)を求解することによって圧力 $P(t, \mathbf{r})$ を数値計算しているシミュレーション結果の一例を図3と図4に示す。

数値計算の精度を向上させるべく粒子径を小さくして行っても数値計算を継続できるように試行錯誤している。

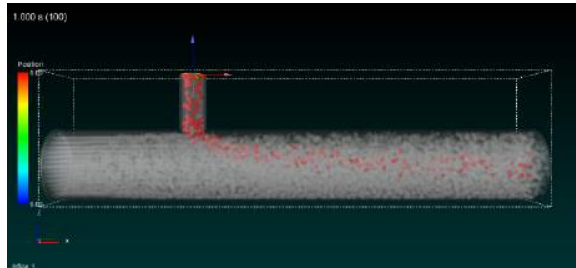


図1：状態方程式で圧力を計算 血液粒子(白色)とタンパク質カプセル粒子(赤色)の質量密度が等しい場合

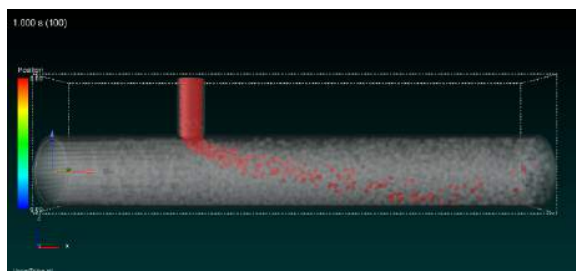


図2：状態方程式で圧力を計算 血液粒子(白色)とタンパク質カプセル粒子(赤色)の質量密度の比が1:10の場合

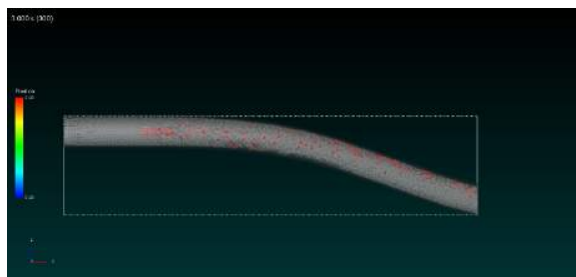


図3：Poisson 偏微分方程式で圧力を計算

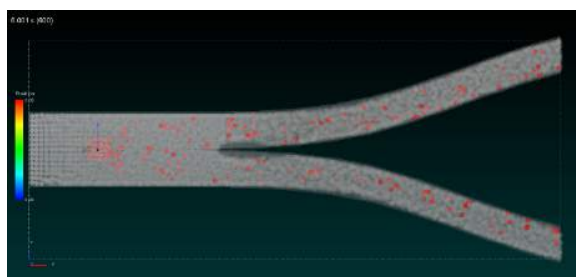


図4：Poisson 偏微分方程式で圧力を計算

謝辞

粒子法 Moving Particle Simulation をプログラム開発するにあたり 平素から御指導いただいている Prometec Software Inc. の加瀬啓之室長殿と澤田朋樹博士殿に 深く感謝いたします。

4. 参考文献

- [1] Motofumi Hattori and Seiichi Koshizuka
"An Interpretation of the Boundary Condition for Pressure Poisson Partial Differential Equation in Moving Particle Semi-implicit Method"
World Congress on Computational Mechanics 2018 7/22
- [2] 服部 元史, 桂畑 司
「粒子法 MPS による流体力学シミュレーションを高速化する試み」
Asia Digital Art and Design Association japan
第4回 学術大会 2017 11/3
- [3] Motofumi Hattori and Seiichi Koshizuka
"A mathematical interpretation for spatial differential operators in Moving Particle Simulation"
World Congress on Computational Mechanics 2016 7/26
- [4] 服部 元史, 越塚 誠一
自由境界 Navier-Stokes 方程式の厳密解を構成できる条件から粒子法 MPS を検討する
計算工学講演会 第21回 2016 5/31
- [5] 越塚誠一, 柴田和也, 室谷浩平
粒子法入門
(流体シミュレーションの基礎から並列計算可視化まで)
丸善出版 2014
- [6] 坂和愛幸
最適システム制御論 第11章
コロナ社 機械工学体系 45 1972
- [7] 伊藤清三
拡散方程式 第4章
紀伊國屋 数学叢書 17 1979