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 30 年度 研究成果報告書

令和元年7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 30 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

- ③ 光線力学療法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・・・・・・7 (神奈川工科大学 応用化学科) 高村 岳樹
- ⑤ 新規バイオセンシングシステム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)

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

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

本研究では、シャペロニン GroEL/GroES のも つ、「物質を閉じ込め、保護し、一定時間後に放出 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 与を行うことを目的としている。H29 までに以下 のことを行った。

- GroEL の反応サイクル時間を8秒から12日 までの間で変化させた変異体ライブラリーを 作製した^[1]。
- (2) GroESのN末端に膜透過ペプチドおよび核移 行シグナル配列を融合した GroES 変異体ライ ブラリーを作製した。
- (3) (1)(2)を組み合わせた複合体は、動物細胞に 投与すると内包物を細胞質、核へ送達した^[2]。
- (4) GroEL は高濃度 ATP 存在下で、可逆的に自己 組織化し、ナノチューブ構造を形成することを 見出した^[3]。

H30年度は、新規シャペロニンカプセルによる 細胞送達時間の短縮、動物実験(清瀬の稿で報告)、 血液中での安定性試験を行った。また、大腸菌 GroEL/GroESの臨床的抗原性の問題を解決する ために、真核生物がミトコンドリアに保有するバ クテリア型シャペロニンのカプセルとしての利 用に関する基礎的評価を行った。

2. 研究方法

2.1 AhR/PTD 融合シャペロニン複合体の細胞内 局所送達

Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) のアミノ 酸配列の 12~38 に存在する核移行シグナル配列

(RKRRKPVQKTVKPIPAEGIKSNPSKRH)を GroES^{WT}のN末端に融合したGroES^{N-AhR}の発 現ベクター*pETGroES-NAS*をすでに構築してい る。そこで、GroES^{N-AhR}のN末端またはC末端 にPTD (RKKRR、RRRRRR)を付加した4種の 膜透過ペプチド融合GroES発現ベクター (*pETESC-PTD*, *pETESN-PTDAhR、pETESN-AhRC-PTD*, *pETESN-PTDAhRC-PTD*)をPCR 法で構築した。*pETGroES-NASと pETESN-AhRC-PTD*は*Escherichia coli* BL21(DE3)株に、 それ以外は*E. coli* Rosetta(DE3)株に組換え、

Butyl-Toyopearl、SP-Toyopearl (TOSOH)を用い

て、GroES^{N-AhR}、GroES^{C-PTD}、GroES^{N-PTD/AhR}、 GroES^{N-AhR,C-PTD}、GroES^{N-PTD/AhR,C-PTD}の精製タ ンパク質を調製した。

各種 GroES 変異体は、Cy3 で蛍光標識した GroES^{WT}と1:6 で混合して4°C で一晩静置した。 FITC で蛍光標識した GroELD^{52/398A} と各々の Cy3-GroES 変異体を、0.5 μ M GroEL、1 μ M GroES、1 mM ATP となるように HKM (20 mM HEPES-KOH (pH7.4)、100 mM KCl、5 mM MgCl₂)中で混合して1時間反応後、限外濾過に よりシャペロニン複合体を精製した。ø35 mm デ ィッシュに播いたチャイニーズハムスター肺由 来腺維芽細胞 (CHL 細胞) に、シャペロニン複合 体を GroEL 換算で終濃度 0.05 μ M となるように 添加し、37°C、5% CO₂条件下でインキュベータ 蛍光顕微鏡 LCV110 (OLYMPUS) を用いて経時 観察をした。

2.2 マウス血清におけるシャペロニンの安定性

GroES^{N-AhR} または GroES^{N-PTD/AhR} を HKM Buffer 中で GroES^{WT} と 6:1の濃度比で混合して 4°C で一晩静置し、7 量体 GroES として用いた。 4 µM GroES と 2 µM GroEL^{D52/398A} を 1 mM ATP 存在下で HKM Buffer に加え、10 分間室温で静 置した。Amicon Ultracel 100 kDa(メルク)で 限外濾過し、シャペロニン複合体を調製した。

ヘパリンナトリウム注射液 (味の素)で抗凝固 処理を施したシリンジ針を用いて採取したマウ ス血液を、遠心分離 (3,000 rpm、15 min、4°C) し血球と血清に分画した。血清 1.0mg/ml (原液 のタンパク濃度は 63.7mg/ml) と、0.2mg/ml シ ャペロニン複合体を HKM Buffer (50mM KCl) に加え、37°C で 2、6、12、18、24 時間反応させ た後、SDS-PAGE で分離し、抗 GroEL、抗 GroES 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

2.3 酵母ミトコンドリアシャペロニンの変異体作 製と複合体形成

シグナル配列 (N 末端から 21 番目まで) を除 去した酵母ミトコンドリアの mt-Cpn60 (以後は 変異体に対し mt-Cpn60^{WT} とする) の発現ベクタ ー*pET21c(+)yeast mt-Cpn60(22S-)*を鋳型とし、 QuikChange site-directed mutagenesis 法を用 いて Asp73 と Asp420 を Ala に置換した mtCpn60^{D73A/D420A}の発現ベクター*pET21c(+) mt-Cpn60(D73A,D420A)*を作製した。

mt-Cpn60^{WT}は Rosetta(DE3)で発現させ、ラ イセート上清を Butyl-Toyopearl、Sephacryl S-300 (GE Healthcare)、MonoQ (GE Healthcare) で分離して精製した。mt-Cpn60^{D73A/D420A}は mt-Cpn60^{WT} と同様に発現させ、Butyl-Toyopearl、 SepharoseCL-4B (GE Healthcare)、MonoQを 用いて精製した。野生型 Cpn10 (mt-Cpn10^{WT}) は、*pET21c(+)yeast mt-Cpn10 full-length* で Rosetta(DE3)を組換え、培養菌体のライセート上 清を DEAE-Toyopearl、SP-Toyopearl(共に TOSOH)で分離し、精製した。

mt-Cpn60^{WT}とmt-Cpn60^{D73/420A}のATP加水 分解活性は、ATP再生法で測定した。 0.2μ Mmt-Cpn60、5 mM phosphoenol pyruvate、pyruvate kinase (100 µg/ml)、0.2 mM NADH、lactate dehydrogenase (100 µg/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 µM mt-Cpn10を加え、NADHに起因するAbs340 の減少からATP 加水分解活性を算出した。

mt-Cpn60 $^{D73/420A}$ とATP または mt-Cpn10^{WT} の分子間相互作用解析のため、25 °C に設定した 恒温セルに 2.5 μ M mt-Cpn60 $^{D73/420A}$ のみ、また は 2.5 μ M mt-Cpn60 $^{D73/420A}$ と 1 mM ATP を充填 し、滴定シリンジから 1 mM ATP、または 45 μ M mt-Cpn10^{WT} と 1 mM ATP の混合液をそれぞれ 滴 下 して、結合熱を MicroCal PEAQ-ITC Automated (Malvern) で測定した。

3. 結果および考察

3.1 シャペロニン複合体の細胞内送達時間の短縮 Cv5-GroEL^{D52/398A}/Cv3-GroES^{N-AhR} 複合体に GFP を内包した三者複合体を CHL 細胞に投与 すると、24時間以内で細胞質に、48時間以内で 核に到達することをすでに報告した[1]。さらに細 胞膜透過効率を向上する目的で、今回は PTD を GroES^{N-AhR}の N/C 末端に融合し、複合体安定性 と細胞膜透過性を比較した(図1A)。精製した PTD 融合 GroES 変異体はいずれも単独では凝 集性が高く、7 量体構造が不安定であることが HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーでわかった。 そこで、GroESWT と混合し 4°C で一晩静置後に ゲル濾過クロマトグラフィーで分析したところ、 GroESWT の混合比が 4/7 以上で安定なヘテロ7 量体を形成し、ATP 存在下で GroEL^{D52/398A} と複 合体を形成できた。FITC- GroELD52/398A/ Cy3-GroES 変異体の複合体を CHL 細胞に添加したと ころ、GroES^{N-PTD/AhR}は、細胞添加後5時間以内 に細胞質に、4~7時間で核に到達したことが顕微 鏡観察で確認できた(図1B)。また、GroES^{N-AhR} も細胞添加後7時間以内に細胞質に、7~10時間 で核に到達しており、GroES^{WT}とのヘテロ7量体 にすることで複合体が安定になり、細胞透過速度 と効率が上がったと考えた。以上より、輸送シグ ナル配列と PTD を組み合わせることで、簡便に 効率的局所送達が可能になると示唆された。







図1 AhR/PTD 融合シャペロニン複合体の細胞 送達

(A)GroES 変異体の設計 (B)複合体投与後の細胞の蛍光顕微鏡像

3.2 血清中でのシャペロニン複合体の安定性

GroES^{N-AhR} 複合体は、タンパク質濃度で 5 倍 量あるいは 10 倍量の血清中で 18h まで変化はな く、24h でも検出バンドが若干スメアになったも ののほとんど変化はなかった。GroES^{N-PTD/AhR} 複 合体では、タンパク質濃度で 5 倍量あるいは 10 倍量の血清中で 2~48h までほぼ変化がなく、血 清中で安定であった。シャペロニン複合体の血液 投与の際の安定性は問題ないと考えられた。

3.3 ミトコンドリアシャペロニンの複合体形成

真核細胞は、細胞質に II 型シャペロニンの CCTをもち、ミトコンドリアには I 型シャペロニ ンをもつ。酵母のミトコンドリアのシャペロニン mtCpn60と mtCpn10は、大腸菌の GroEL、 GroES に対してそれぞれ 52%、35%の相同性を 示し、ヒトミトコンドリアシャペロニンの結晶構 造から GroEL/GroES と似たカプセル構造を形成 すると考えられる(図2A)^[4]。臨床的抗原性を考 慮したタンパク質ナノカプセルの材料として、 mtCpn60/mtCpn10の応用を検討するために、

GroEL^{D52/398A}に相当する mtCpn60 ^{D73/420A} を作 製した。mtCpn60 ^{D73/420A} は、14 量体の 1 分子に ATP を 10 分子以上結合することが、mtCpn60 ^{D73/420A}に ATP を滴下した ITC 測定により確認で きた。一方、結合した ATP の加水分解活性は mt-Cpn60^{WT} と比べて 1/10 以下に低下しており(図 2 B)、ATP が結合し mtCpn10 との複合体は形成 されるが、加水分解が終わらないため複合体維持 時間が長くなったと判断した。引き続き、複合体 に結合したヌクレオチドの経時変化の解析から、 詳細な加水分解時間を測定している。また、1 mM ATP存在下で mtCpn60 ^{D73/420A} に mtCpn10 を滴 下した ITC 測定から、1 分子の mtCpn60 ^{D73/420A} に2分子の mtCpn10 が結合することが示せたた め(図2C)、大腸菌の GroEL/GroES で進めてき た成果は mtCpn60/mtCpn10 に置き換えること 可能であると期待できる。核輸送シグナルと PTD を融合した mtCpn10 を作製し、細胞内送達時間 を検証する計画である。

4. 参考文献

[1] 増田恵, 依田ひろみ, 小池あゆみ "様々な反応 サイクル時間をもつ GroEL 変異体のデザイン", 神奈川工科大学研究報告. B, 理工学編, 43, 21-26, 2019.

[2] 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を利用した細胞内への局所 的薬物送達システム用ナノカプセル",特許第 6454008 号,2016.

[3] 小池あゆみ,前田理帆グミラール,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.

[4] Nisemblat S., Yaniv O., Parnas A., Frolow F., Azem A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 112(19), 6044-9, 2015.





(A)大腸菌とヒトミトコンドリアのシャペロニンのフットボール複合体 (B)大腸菌と酵母ミトコンドリアの シャペロニンの ATP 加水分解活性 (C) mt-Cpn60 に mt-Cpn10 を ATP 存在下で滴下したときの ITC 解析

シャペロニン複合体のマウス脳内移行の可能性について

清瀬 千佳子¹⁾、依田ひろみ²⁾、小池あゆみ³⁾ 神奈川工科大学¹⁾栄養生命科学科教授、²⁾バイオメディカル研究センター 技術職員、

3)応用バイオ科学科教授

1. 背景と目的

バイオ機能材料の開発は日本人の健康増進に 対して必要不可欠な技術であり、今後のバイオメ ディカル産業の発展には欠かせない。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。特に、ドラッグデリバリーシステム(DDS) に使用可能なバイオ機能素材を作り出す事は疾 病治療を急速に発展させる事が示唆できる。本プ ロジェクトでは新たなバイオ機能素材としてシ ャペロニン複合体にターゲットを当てて開発を おこなってきた。

DDS は血液を介して標的となる組織に輸送体 を運ぶのが1つの経路であるが、血液を介しての 輸送が困難な組織の1つに脳がある。脳への物質 輸送には血液脳関門(Blood-brain barrier)が脳内外 への物質の輸送を厳格に制御しており、血液を介 してシャペロニン複合体を脳内へ輸送するのは 極めて困難であると推察される。しかし、脳内へ の薬物送達技術が開発できれば画期的な医療技 術の発展につながる事が推察できるので、血液を 介さないで脳内に目的物質を到達できる技術開 発が求められている。

今回用いたシャペロニンタンパク質は GroEL/ GorES 複合体で、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、リング内は空洞となっている。また GroES は GroEL の蓋の役割をし、その結合には ATP 加水分解反応が伴う。この GroEL の ATP 加 水分解に関わるアミノ酸を Ala に置換した GroEL^{D52A/D398A} 変異体の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日である事 が報告され^[1,2]、この結果より、GroEL^{D52A/D398A} 変異体が細胞内または組織間の輸送体になりう る可能性が示唆された。

そこで、本研究では金ナノ粒子を内包し、芳香 族炭化水素受容体 AhR^[3]の核移行シグナルの一 部を付加した GroES^{NAS} 複合体と細胞膜を透過し て細胞内にタンパク質を直接導入できる機能を 持つアミノ酸配列があるタンパク質形質導入ド メイン PTD^[4]の後ろに AhR を結合した GroES^{N-PTD/AhR} 複合体の 2 種類をそれぞれマウス の大脳表面へ直接散布する事で脳内へ移行でき るかどうか検討を行う事にした。

2. 研究方法

2-1. シャペロニン複合体の調整

0.01 mg/mL の ϕ 4 nm 金ナノ粒子存在下で、 Cy3 標識した GroEL^{D52,398A, noCys 535C}と GroES^{NAS}を 混合後、ATP を加え、終濃度 1 µM GroEL/2 µM GroES/2 mM ATP の試料を調製した (Cv3-GroEL^{D52,398A, noCys 535C}/GroES^{NAS} 複合体)。室 温で1時間静置後、MWCO 100 kD のアミコンウ ルトラ-0.5 (メルクミリポア)と、8,000 rpm、4℃ の卓上遠心機を用い、50 mM KCl、5 mM MgCl₂ を含む20 mM HEPES/KOH (pH 7.5) で試料を溶媒 置換した。その後、クリーンベンチ内で、試料を ポアサイズ 0.22 µm のシリンジフィルタで濾過滅 菌した。濾過した試料のタンパク質定量を行った。 Cy3-GroEL^{D52,398A, noCys 535C}/GroES^{NAS} 複合体のタン パク質濃度が 0.3 mg/mL であったことから、マウ ス臓器への投与量は 200 µL とし、使用まで 4℃暗 所保存した。一方、野生型 GroES と 6:1 の比率 で混合した GroES^{N-PTD/AhR}は、一夜4℃で安定化さ せた(以後、GroES^{N-PTD/AhR}の呼称は、野生型 GroES と混合済みであるものを指す)。Cy3 標識した GroEL^{D52,398A, noCys 535C}と GroES^{N-PTD/AhR}を混合後、 ATP を加え、終濃度1 µM GroEL/2 µM GroES/2 mM ATP の試料を調製した (Cy3-GroEL^{D52,398A, noCys} ^{535C}/GroES^{N-PTD/AhR} 複合体)。フィルタ滅菌後のタ ンパク質定量にて、Cy3-GroEL^{D52,398A, noCys} ^{535C}/GroES^{N-PTD/AhR} 複合体のタンパク質濃度は 0.6 mg/mL であったことから、マウス臓器への投与量 を 100 µL とし、使用まで 4℃暗所保存した。

2-2. 実験動物

C57BL/6J♂マウス(13週齢)を飲料水及び固形 飼料にて飼育したものを実験に使用した。イソフ ルランによる麻酔下にて、頭がい骨周りの皮膚を 剥離し、軟骨の一部分を切開した。切開部より、 シャペロニン溶液2種類(上記に記載)ならびに 対照群として Buffer を注射器を用いて注入した。 注入後5分または60分経過したら、心臓より採 血を行い、その後大脳を採取した。対照群は Buffer を注入してから5分後に採血を行った。な お、対照群の血漿については、シャペロニン複合 体の安定性評価に用いる事にした。

2-3.マウス大脳の組織切片の作製

採取した大脳は組織体積の10倍以上のPBSで よく洗浄し、余剰のシャペロニン複合体を除去し た。その後、組織マーキングダイにて大脳表面の 中心部(頭頂部付近)の4点をスポットし、3~5 分室温で放置し、色素を乾固させた。その後、大 脳は組織固定用10%ホルマリン溶液に浸漬した。 凍結切片作成に関しては外部委託し、4点の色素 で囲まれた範囲内を中心に、正中矢状線から左右 に7枚ずつ、厚さ10μmの組織切片を作製しても らった。

2-4. マウス大脳切片の組織免疫染色

マウス大脳の凍結切片はデシケータ---内にて 平衡化した後、組織免疫染色を行うために PBS 浸 漬を行った。内在性ビオチン、内在性ペルオキシ ダーゼをそれぞれブロッキングした後、非特異的 ブロッキングとして 5%スキムミルクを用いた。ブ ロッキングが終了後、一次抗体として、ウサギ抗 GroEL 抗体 (抗 Tcpn60 抗体) を加えて低温室で一 晩放置した。PBS 浸漬を行った後、Dako LSAB2 System-HRP 検出キットを用いて二次抗体反応を 行った。PBS 浸漬を再度行った後、DAB 発色基質 溶液をのせ、8~10分放置し発色させた。反応中 呈色の進行を確認し、スライドガラスを PBS 浸漬 する事で呈色反応を停止した。次に対比染色とし て核をヘマトキシリンで染色した。その後、エタ ノールとキシレンを用いて脱水し、マリノールに て封入した。

3. 結果および考察

図1は GroES^{NAS} と GroES^{N-PTD/AhR} をそれぞれマ ウス大脳表層に散布して5分たったものを組織免 疫染色した結果である(薄い紫色の点はヘマトキ シリンにより染色された核である)。GroES^{NAS} は ネガティブコントロールよりも DAB 呈色が強い 箇所 (矢印) が見受けられた。一方、GroES^{N-PTD/AhR} の方も若干ではあるが、呈色が強い箇所が見受け られた。しかし、GroES^{NAS} の方が強い事から、 GroES^{NAS} の方が GroES^{N-PTD/AhR} よりも早くに大脳 漿膜に結合する可能性推察された。



図 1. 大脳表層におけるシャペロニン複合体の 組織免疫染色像(散布5分後)



図 2. 大脳表層におけるシャペロニン複合体の 組織免疫染色像(散布 60 分後)

図2は2つの複合体を散布してから60分たったものを図1と同様に組織免疫染色したものである。 GroES^{NAS}は60分経過すると膜表層近くの呈色は薄 くなり、部分的ではあるが凝集している可能性が示 唆された。一方、GroES^{N-PTD/AhR}の方は呈色した部分 (矢印)が表層から内部へ広がっているように観察 出来た。図1の5分後と比較すると表層から内部へ の広がりが大きくなっているように見受けられる事 からGroES^{N-PTD/AhR}の方がGroES^{NAS}よりもゆっくり ではあるが、細胞膜を透過している可能性が示唆さ れた。しかし、上記の図に示されていない部分も観 察すると、ネガティブコントロールでも呈色してい る部分が見られる事からシャペロニン複合体が確実 に細胞膜を通過したとは現段階では断定できない。 今後は、60分以上置いた時にはどのような局在を示 すか再度試みたいと考えている。

さらに、今年度(最終年度)は、マウスまたはラッ トを用いて、それぞれのシャペロニン複合体が腹腔 内投与および静脈投与によって、その他の組織(肝 臓、腎臓など)内へ移行できるかどうか検討する予 定である。

4. 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, 30005-30011, 2014
- [2] Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi H, Shimamura T, "Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL_Gro5ES2 complex determined at 3.8 Å reveals rearrangement between two GroEL rings" J. Mol. Biol. ,426, 3634-3641, 2014.
- [3] Ikuta T, Eguchi H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K,"Nuclear localization and export signals of human aryl hydrocarbon receptor" *J.Biol.Chem.*, **30**, 2895-2904, 1998.
- [4] Ain QUI, Lee JH, Woo YS, Kim YH, "Effects of protein transduction domain (PTD)selection and position for improved intracellular delivery of PTD-Hsp27 fusion protein formulations." *Arch.Pharm.Res.*, **39**, 1266-1274, 2016

光線力学療法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。

そこで本研究ではまずフラーレンに 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 照射時においも 0.2 µM 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ーレン化合物と比較して、 低いことがわかった。こうした様々な背景がある ため,今回,いくつかのフラーレン誘導体を合成, または調達し,それぞれの活性酸素発生能力,遺 伝毒性の有無についてさらなる検討を行った。

2. 研究方法

合成方法は通常のフラー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。活 性酸素の発生能力については、それぞれの活性酸 素検出試薬(SOSG(一重項酸素)、APF, HPF(そ れぞれ水酸化ラジカル)、Bes-SO(スーパーオキサ イド))を用いて検討をおこなった。また遺伝毒性 試験にはバクテリアを用いる光照射下での umu 試験を用いて行った(1)。

3. 結果および考察

これまでに合成された化合物のそれぞれの活性 を相互比較する目的で、いくつかの化合物をよ る活性酸素発生能力について検討した。用いた 化合物はフェナレノン (PhO),メトキシソラレン (8-MOP),フラーレン (C60),水酸化フラーレン (C60 (OH) n),C60 トリスカルボン酸 (C60 tris) お よび、ソラレンを結合したフラーレン誘導体1及 び水溶性をました化合物2,また比較対象のため のフェニルC61 ブチリックアシッドメチルエス テル 3 (PCBM) およびその脱メチル体4を 用いた。それぞれの活性酸素発生能力について、



 \boxtimes 2 Results of ROS-producing ability using several detection reagents. (a), (b): SOSG, (c), (d): APF, (e), (f): HPF, (g), (h): BES-so. †: p<0.05 in student's t-test vs a value at 0 μ M.

活性酸素種の存在で蛍光に発光する試薬を用い て試験を行った。その結果を図2に示す。 C₆₀(0H)nやC₆₀trisでは一重項酸素およびヒドロ キシラジカルの生成が顕著であった。一方,ソラ レンが結合した化合物1や化合物4ではどうよ うの傾向が現れたが,化合物2に関しては,濃度 依存的な上昇が確認されなかった。またスーパ ーオキサイドについてはいずれの化合物も生成 は確認されなかった。

一方,光照射下でのumu試験では,標準物質であるPhOは強力な活性酸素種誘導剤のため,DNA損傷を容易に引き起こすことがわかる。また、8-MOPに関しても,活性酸素を誘引することはないが,DNAのピリミジン塩基と反応することにより, DNA損傷を引き起こすために強い遺伝毒性活性を有していることがわかった(図3(a))。これらの化合物は,生細胞数についても減少している(図3(c)).一方,C₆₀(OH)nは,若干の遺伝毒性を示しているが,殺菌作用のほうが強く働く(図3(a),(c))事がわかる。DNAそのものより,細胞構成成分に対して,強く作用していることが伺 える。一方, 化合物 1~4 に関しては, 明確な細胞死を誘導することは確認されなかった(図3(d))。しかしながら化合物 2 に関しては DNA 損傷性を有することがわかった。化合物 2 に関しては,活性酸素の発生が大きくないため, DNA へのソラレン分子の結合能により, DNA 損傷を引き起こしていることが推定される。類似の化合物 1 はソラレンとフラーレンの距離が近いため, DNA を有意に攻撃できないことが推定される。

4. H29 年度の予定

現在,生物活性試験を更に深めるために,小核 試験等をもちいた細胞試験を継続中である。一方, 動物に投与するために,より高効率な反応が望ま れる。現在,大量合成用の反応を行っているが, キーとなる反応で,副反応の生成物が多く困難を 極めている。今後,新たなルートの開発と効率的 な合成方法,新たな化合物の提案を行っていく予 定である。

5. 参考文献

 Takamura-Enya T, Ishii R, Oda Y, Evaluation of photo-genotoxicity using the umu test in strains with a high sensitivity to oxidative DNA damage Mutagenesis. 2011 499-505.



● PhO ■ 8-MOP ◆ C60 ▲ C60(OH)n × C60 tris × 1 - 2 - 3 + 4

 \boxtimes 3 Result of *umu* test. These graphs represent (a), (b) LacZ units, and (c), (d) OD_{595 nm}.

Cul/シリコーン・コンポジット膜の抗カビ菌活性の評価

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

シリコーン素材は医療分野や食品に関連する 様々な器具・容器,水回りやパッキン等に使用さ れており,直接食品と接触する場合も多い^[1,2].そ の表面には,微生物が繁殖しやすくバイオフィル ムを形成し,食中毒を引き起こす危険性もある. そのため高い抗菌活性をもち,かつ抗菌剤の溶出 の危険性が低く,優れた抗菌持続性を有するシリ コーン素材の開発が求められている^[3].

金属イオンには微生物を死滅させる働きを有 するものがあり、特に銀イオンや銅イオンに関し ては、高い抗微生物活性を有している.既往の研 究において、AgI/シリコーン膜を簡便な2ステッ プの浸漬処理により調製し,細菌に対して高い抗 菌活性を示した^[4]. しかしながら, AgI/シリコーン じた、一般日・カビに対しては活性が低いため、真 菌に対して抗菌活性が高い Cu を用いて CuI/シリ コーン膜を調製した. 簡易的に JIS Z 2801^[5]により Cul/シリコーン膜の抗真菌活性を測定した.ただ し、JIS Z 2901 は細菌を対象としたものである. カビの抵抗性試験 JIS Z 2911^[6]による抗菌試験は, 定性試験であり、本研究では JIS L1921^[7]により、 Cul/シリコーン膜の抗カビ活性の検討を行うこと とした.本研究では、Cul/シリコーン膜の抗カビ 活性の評価を行うことを目的とした.

2. 研究方法

2.1 試料片の調製

シリコーン膜(33±2 mm, 膜厚 300 µm)を I₂-KI 溶液(0.5 M) に 24 h 浸漬後, CuSO₄溶液 (0.5 M) に 24 h 浸漬し, CuI/シリコーン膜を調 製した.

2.2 トランスファー法による抗菌活性の測定(JIS L 1921)^[7]

供試菌として, Aspergillus niger NBRC 105649 およ び Penicillium citrinum NBRC 6352 を用いた.サブロ ード寒天培地の上に試験胞子液を塗布し,5 分間静 置した.各試験片をのせ,あらかじめ消毒した分銅 をのせ,1 分間静置した (図 1).胞子液との接触面 を上に別のシャーレに移した.保湿条件下で培養 (25°C,42 h)培養し,ルミノール測定を行った.以下 の式を用いて抗カビ活性値を求めた.

抗カビ活性値=(logC₁-logC₀)-(logT₁-logT₀) logC₁: 無加工試験片の 0 h の発光量の算術平均 の対数

- logC₀: 無加工試験片の 42 h の発光量の算術平均 の対数
- log*T*₁: サンプルの0hの発光量の算術平均の対数 log*T*₀: サンプルの 42 h の発光量の算術平均の対 数

カビの発育値 $F = \log C_1 - \log C_0$

試験成立の条件は F ≥ 1.5 であり, 抗カビ活性値が 2.0 を超えた場合, 有効と判定する.

2.3 フィルム密着法による抗菌活性の測定(JIS L 1921 の修正)

本研究では 1/20 濃度で調製したグルコースペプト ン培地で試験胞子液を調製した.試験胞子液を試験 片に滴下し,滴下した試験胞子液の上に酸素透過性 のあるシリコーン膜を被せた.さらに通気性のよい ウレタンフォーム(厚み 1 cm,(㈱創和)の上に置き, 25℃で 42h 培養後,ルミノール測定を行った.カビ の発育値および抗カビ活性値の算出は 2.2 と同様に 行った.

3. 結果および考察

3.1 Cul/シリコーン膜の調製

シリコーン膜の膜厚は 300 µm であり,最初は 半透明である.ヨウ素処理後では,シリコーン膜 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 がシリコーン膜表面上に形成して いることが推定される.

SEM 観察の結果,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.

3.2 JIS L 1921 トランスファー法による測定 ^[7]

JIS L 1921 には, 疎水性のサンプルについて図 1 に示すように, 菌液を塗布した寒天平板面に試 験サンプルを分銅で押しつけるトランスファー 法を推奨している.

トランスファー法で行った際のカビの発育値 Fは 0.9 となり, 試験の成立条件 $F \ge 1.5$ を満たさ



図1 JIS L1902 のトランスファー法

なかった.原因として、シリコーン膜は撥水性が 非常に強く、トランスファー法では増殖に必要な 試験胞子液及び培地成分の量を表面に付着でき ないためと考えられた.以上より評価方法の検討 が必要であると考えた.

3.3 評価方法の検討

トランスファー法では、試験胞子液と培地成分 がシリコーン膜に付着しなかったため、試験片に 試験胞子液を滴下した. それでもシリコーン膜の 疎水性が強く, 胞子液が水滴となってはじかれ, 操作性が悪いため, JIS Z 2801 のフィルム密着法 を参考に試験胞子液の上にフィルムを被せた.た だし、カビの発育には酸素が必要であり、JIS Z 2801 におけるポリエチレンフィルムでは酸素透 過性が極めて低い (11~59 cm³/m²)^[8]. そのため, 酸素透過性がポリエチレンの約100倍を有するシ リコーン膜(1000~6000 cm³/m²)^[8]を用いた. さ らに通気性の良いウレタンフォームの上に置き, 培養を行った. また JIS Z 2801 のフィルム密着法 では, 細菌用の増殖培地として 1/20 普通ブイヨン 培地を用いている.本研究では真菌用の培地とし て 1/20 グルコースペプトン培地を用いたところ, カビの発育値は 1.8~2.0 となり,試験成立の条件 を満たした(表 1). また, 抗カビ活性値は2以上と 算出され、Cul/シリコーン膜の抗カビ効果が認め られた.

Cu イオンのカビに対する最少発育阻止濃度 (MIC)は200 mg/L 程度である事が報告されている^[9].本研究で作製した Cul/シリコーン膜を蒸留 水に浸漬,撹拌して溶出 Cu 濃度を調べると,Cu 濃度は1hでほぼ一定となった.24h後も溶出 Cu は 0.1 mg/L 程度であり,報告されている MIC を 比較すると著しく低い値となっている.鈴木らも Cu 含有スレンレス鋼において,Cu 溶出量は20~ 40 mg/L でありながらも高い抗菌活性を得ている ^[10].私共も鈴木らも溶出試験は生菌を含んでいな い条件で行っている.生菌は自ら帯電しているこ と,液中で酸素を消費する など,金属イオン溶出 挙動に影響を及ぼすことも考えられ,今後,その 相互作用について検討を加える必要がある.

4. R1 年度の予定

- Cul/シリコーン膜の抗菌真菌活性な詳細およ び他の高分子素材への応用
- 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.



図2 修正法による Cul/シリコーン膜の抗カビ性の評価

表1 修正法によるカビ発育値と抗カビ活性値

菌株	カビ発育 値 F	抗カビ活性値
Aspergillus niger NBRC 105649	1.8	2.2
Penicillium citrinum NBRC 6352	2.0	2.0

5. 参考文献

- 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).
- [2] 平原英俊, 森克仁, 工藤孝廣, 松野祐亮, 森 邦夫. "架橋シリコーンゴムの接着."日本ゴ ム協会誌, 86, pp. 327-332 (2013).
- [3] Vaterrodt, A., Thallinger, B., Daumann, K., Koch, D., Guebitz, G.M., and Ulbricht, M. "Antifouling and antibacterial multi-functional polyzwitterion/enzyme coating on silicone catheter material prepared by electrostatic layerby-layer assembly." *Langmuir*, **32**, pp. 1347–1359 (2016).
- [4] 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*, 23, pp. 7-105 (2018).
- [5] JIS Z 2801: 抗菌加工製品抗菌性試験方法・ 抗菌効果
- [6] JIS Z 2911 抗菌加工製品--抗菌性試験方法・ 抗菌効果
- [7] JIS L 1921: 繊維製品の抗カビ性試験方法及 び抗カビ効果
- [8] Zhang, H., Cloud, A. "The permeability characteristics of silicone rubber." In Proceedings of 2006 SAMPE Fall Technical Conference, pp. 72-75, 2006.
- [9] 松村吉信, 土戸哲明"重金属に対する細菌の 耐性・相互作用とその利用."高温学会誌, 27, pp. 35-41 (2001).
- [10]鈴木聡, 宮楠克久, 佐藤嘉洋, 菊地靖志, 川 上洋司. "Cu 含有ステンレス鋼の抗菌性." 鉄 と鋼, 100, pp. 1021-1028 (2014).

新規バイオセンシングシステム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

バイオ機能材料を探索するためには、対象とな る物質を適切に評価するセンシング法が必要で ある。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。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、新規なバイオセンシングシス テムの構築と、その方法を生理活性物質の探索へ 応用することを目的としている。具体的には、1) 微量な流路を用いて計測するための送液方法の 開発、2) Survivin 機能阻害評価法の開発と抗腫瘍 活性物質の探索、3) エピジェネティック評価用 の素子の開発とその応用である。1)は酵素セン サのみならず、バイオチップや半導体チップに応 用が期待でき、2)は細胞センサに属するもので あり、3) はセンシング系として構築できれば短時 間での診断などに期待が持てる。

2. 研究方法

2-1)電気浸透流ポンプを用いたマイクロフローシ ステムの検討

現在、Lab-on-a-chip や Body-on-a-chip に見られ るように分析デバイスの集積化が進んでいるが、 そのための送液システムはプランジャーポンプ やシリンジポンプを使用しており、装置自身の小 型化は進んでおらず流路自体や検出部が小型化 されていることと対照的である。本研究では、シ リカ等の表面の負電荷により正電荷の分子が表 面に集合している担体に負電荷をかけることに より分子が周囲ごと引き寄せられて生じる流体 の移動現象である電気浸透流を利用したポンプ のフローシステムへの応用を試みた。

電気浸透流を用いて細胞を吸引する装置であ るピコピペットを利用し、ピコピペットに電流を 印可・制御できるユニットを構築した。この制御 ユニットはピコピペットを3つまで独立に制御で きるようになっている。本研究で用いた FIA(Flow Injection Analysis)システムを図1に示す。本シス テムでは、モデル酵素として尿素を基質とする酸 性ウレアーゼを用いている。キャリアーには電気 浸透流ポンプの下流にチューブに満たした10 mM グリシン塩緩衝液 pH 3.0 を用い、当該ポンプ の上流の純水を用いて押し出す形で送液を行っ た。呈色液である OPA (オルトフタルアルデヒド) 溶液も同様にして送液した。基質である尿素はイ ンジェクションバルブ(試料導入部)より注入、固定化酸性ウレアーゼの触媒反応により生じたアンモニアを OPA 試薬と混合、反応させることにより生じるイソインドール化合物の蛍光を計測した。



図1 FIAシステム図

2-2) Survivin 機能阻害評価法の開発と抗腫瘍活 性物質の探索

多くのがん細胞ではアポトーシス機能が抑制 されており、無限に増殖し浸潤や転移等の悪影響 を及ぼすー因となっている。Survivin は IAP(inhibitor of apoptosis protein)ファミリーに属す るタンパク質で、IAP ファミリーの特徴である BIR(baculovirus IAP repeat)ドメインを1つ持つ。 がん細胞では、この BIR ドメインにおいて Survivinと HBXIP が相互作用し、複合体を形成す ることによってアポトーシスを抑制することが 知られている。そこで Survivin と HBXIP の複合 体形成を阻害することによって副作用の小さな 抗がん剤の開発へ結びつけることができると考 える。本研究の目的は酵母ツーハイブリッド法を 利用し、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する生薬 を探索することである。

Survivin と HBXIP のベクターを導入した形質転 換体酵母を用いて、スクリーニングを行った。本 システムでは、Survivin と HBXIP が結合するとレ ポーター遺伝子である β -galactosidase が発現する ようになっている。実験方法としては 5 mL の SC-Leu,-Trp,-His 液体培地で形質転換酵母を 24 h 培養した。培養した菌液を 5 mL の SC-Leu,-Trp,-His 液体培地に加え、25 時間培養し た。培養した菌液に生薬抽出物を終濃度 100 µg/mL になるように添加し、12 時間暴露した。培 養した菌液を集菌、洗浄後 ONPG 溶液を加え、 30 ℃で加温して 30 分間反応させた。その後、反 応を停止し、吸光度を測定して、酵素 (β -galactosidase) 活性を算出した。

Survivin と HBXIP の結合抑制効果が見られた生 薬に対して、アポトーシス誘導能を確認するため、 悪性黒色腫(メラノーマ)細胞に対して TUNEL 染色を行った。培養したメラノーマ細胞を 24 ウ ェルプレートに継代を行い、24h 培養した。生薬 を終濃度 150、100、75、50、25 μ g/mL になるよ うに添加し、24h 培養した。培養後、トリプシン 処理を行い、TdT enzyme と Labeling Safe Buffer で染色を行い、対比染色として PI を滴下して観察 を行った。

2-3) エピジェネティック評価用の素子の開発と その応用

エピジェネティックな修飾である DNA メチル 化は、遺伝子発現の制御に密接に関与し、この修 飾の異常は発ガンの原因となるなど、DNA メチ ル化を解析することは重要である。現在主流の DNA メチル化解析法はバイサルファイトシーケ ンシング(BS-seq)であるが、脱メチル化の中間体 (ヒドロキシメチル化,hmCG) についてもメチ ル化(mC)として検出してしまうことから、純粋な DNA メチル化解析ができないといった問題点が ある。本研究では、この問題点を改善するために DNA メチル化模様を維持する酵素 DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1(Dnmt1)の活 性と DNA polymerase による新生鎖合成時の修 飾の除去を組み合わせた新規法(図 2)を開発する ことを目的とした。また、Dnmt1の野生型は、 維持型活性の他に軽微ながら de novo 活性も示し てしまうため、当該活性を改善する組換え体を作 製し、機能評価を行った上で新規法への応用も試 みた。

酵母発現ベクターにアフィニティータグを付加 し pYES2-tags を構築後、HepG2 細胞から Dnmt1 を クローニングし、pYES2-tags-hDnmt1 およびシーム レスクローニングにより hDnmt1 の deletion mutant を作製し、これらを S. cerevisiae INVSc1 株へ導入し、





ガラクトース含有培地で発現誘導後、抽出、精製を 行った。次に、組換え hDnmt1 のメチル化活性を調 べるために片鎖のみ修飾 (CG/mCG, CG/hmCG)した 基質に対するメチル化活性を MTase-Glo Methyltrans-ferase Assay を用いて測定した。そして、 メチル化維持を評価するために、HeLa gDNA から MLH1(MutL Homolog 1)をpMD20にクローニングし、 M.SssI を 37 ℃, 4 hr 反応させベクターの CpG 配列 をメチル化し、メチル化 plasmid を M13 RV primer と混ぜ熱変性後急冷し、T4 DNA polymerase で伸長 し、Exonuclease I で未反応の ssDNA を分解後、精製 しhDnmt1を37 ℃,1hr反応させ、BS-seqを行った。 そして、実サンプルへの適用として、B16 melanoma 細胞のメラニン形成における律速酵素である tyr (tyrosinase) promoter を対象とし、従来の BS-seq と新 規法を適用した BS-seq を行い比較した。

3. 結果および考察

3-1)電気浸透流ポンプを用いたマイクロフローシ ステムの検討

電気浸透流ポンプを用いた送液システムの検 証を行った結果を図3に示す。プランジャーポン プでは2 μL/min以下の流量の制御ができなかった のに対して、当該ポンプでは0.1 μL/minの流速を 制御できることが示された(図3)。また、当該シス テムを用いた尿素濃度の分析においても尿素濃 度とピーク面積に良好な相関が得られた(図4)。本 実験では、固定化担体にシリカゲルを微小カラム



図4 FIAシステムを用いた尿素の分析

に充填した場合と流路の一部にシリカキャピラ リーチューブを用いその内壁に固定化して比較 したが、シリカゲルを用いた方が酵素量を担保で き、低濃度まで計測できた。今後も微量でかつ感 度よく分析できるシステムの検討を行っていく 予定である。

3-2) Survivin 機能阻害評価法の開発と抗腫瘍 活性物質の探索

構築した酵母ツーハイブリットシステムを用いて、生薬135種類の抽出物に対するスクリーニングを行った。その結果、生薬を添加せずに培養した菌液の β -galactosidase 活性を1としたとき、生薬抽出物を添加することにより、 β -galactosidase 活性を70%以上阻害したものは紫根などを含む8種類であった。

次に、これらの結果を基に、効果が見られた生 薬をB16メラノーマ細胞に滴下し、アポトーシス 誘導の確認を行った。その結果、コントロールで はPIによって0.125%の細胞が染色されていたが TUNELによって蛍光染色されている細胞は存在 しなかった。一方、本実験で効果の得られた8種 類すべての生薬において、8~38%の割合の細胞 がTUNEL染色されており、また、PIによっても約 20%の細胞が染色されていることが示され、メラ ノーマ細胞にアポトーシスを誘導できることが 示された。

3-3)エピジェネティック評価用の素子の開発と その応用

DnmtIのメチル化活性特性を評価するため、図 5に示すように、DnmtIのサブクローニングを行い、 活性を比較した(図6)。図6より、DnmtI全長では維 持型メチル化活性についても確認できたが、低い ながらde novo活性も確認できた。一方、646-1616 の変異体においてde novo活性が約1/25まで低下し た。次に、646-1616の変異体を用いたメチル化の 維持を新規法を適用しBS-seqにより行った結果、 図7-a)に示す様に、メチル化plasmidを鋳型とし た場合100%のメチル化を確認でき、図6の結果も 考慮すると新規法はヒドロキシメチル化を除去 し、メチル化のみを維持できている可能性がある



ことが示唆された。また、実サンプル評価に適用 した結果図7-b)、tyr promoterのCpGは従来の BS-seqでは4 箇所すべてがメチル化状態であった が、新規法では部分的にメチル化を受けていない 部分が確認でき、脱メチル化を受けている可能性 が示唆された。以上のことから、組換えDnmt1を 用いた新規法を適用することで、BS-seqの問題点 であったヒドロキシメチル化を除去し、純粋に DNAメチル化が評価でき、実サンプルにおける新 たな知見を得ることに繋がると期待できる^[1,2]。





図7 新規メチル化解析法によるメチル化評価

4. 参考文献

- [1] 飯田泰広, 菅原啓亮, 前田翔大, "メチル化 酵素及びそれを用いた組換えベクターの製 造方法", 特願 2018-43660
- [2] 飯田泰広,前田翔大, "メチル化酵素及びそれ を用いたメチル化解析方法", 特願 2019-27858

細胞分類システムの開発および DDS 評価のための 人工カプセル画像の作成と利用法についての検討

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(DDS)[1]. 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, AI 技術である CNN(畳み込みニュ ーラルネットワーク)を用いて,細胞判別処理の 開発,および人工的に体内にカプセルを埋め込ん だ画像を基にしたカプセルの動的検出処理の開 発を行う.

2. 研究方法

本年度は、昨年度までに開発した細胞抽出シス テムの発展として、抽出を行った細胞の正常・異 常の分類について、CNN を用いての分類システ ムの開発を行った.また、最終年度に向けて DDS の検証を行うためのカプセルの動的検出を目的 として、CT 画像に人工的にカプセルを埋め込ん だ画像を作成し、検出システムの開発への利用を 検討した.

2.1 細胞の異常分類システム[2-4]

細胞の正常・以上を分類するシステムとして CNN を用いる手法を検討する. 今回は CNN の ライブラリである yolo を使用して細胞の分類を 行った. CNN は, あらかじめ与えた学習用の画 像セットからコンピュータが独自に学習を行い weight データを作成, これを基に与えられた未知 のデータについて分類を行うものである.

図1はyoloの基本的な学習の流れを示した画像 である.画像を細かい領域に分け各領域ごとに画 素値やエッジを基にした特徴を作成,事前に学習 を行ったクラスごとの特徴と照らし合わせるこ とでクラスの特定を行う.



図1 yoloの検出処理の流れ

2.2 人工カプセル画像の作成

現状では、ドラッグデリバリーの実症例を撮影 するのが困難であったため、CT 画像に人工的に カプセルを埋め込んだ画像を作成した.はじめに 血管座標を指定し、血管内にカプセル(を模した球 体)を埋め込む.これを1スライスごとに作成し 3D 画像を作成、それらを結合することで血管内 を流れるカプセルと見立てた.図2が実際に埋め 込んだカプセルの1例である.最大径5ピクセル で埋め込んでいるため、実寸では3mm 程度のサ イズである.



図2 カプセルの埋め込み

人工カプセルを埋め込んだ画像を 3D にしたものを図3に示す.この3D 画像を結合することによって3次元的に血管内をカプセルが流れる動画を作成した.



図 3 3D 画像

3. 結果および考察

3.1 細胞の異常分類システム 検出対象となる細胞の1例を図4に示す.



(a) 正常(b) 異常図 4 検出対象の細胞

はじめに正常・異常細胞の2分類,後に異常細胞を5種類に分けて計6種類での分類を行った. 検出画像の1例を図5に示す.



図5 検出結果

現状では全細胞数の7割の検出数,検出した細胞の分類精度は目視評価ながら約8割といった結果となった. CNN は画像の学習枚数により判別性能が変化する特性があり,今回6分類のうち2つのクラスは画像数が極端に少なかったため検出できなかったものと考えられる.

3.2 カプセルの動的検出処理・特徴量の検討

作成した人工カプセルの画像および動画より 以下の特徴量の作成を検討した.

- ① 血管内のカプセル集簇度
- ② 血管内のカプセル群の位置
- ③ 血管分岐点での目標病変方向のカプセル 流入数
- ④ 病変近辺での病変への浸透量
- ⑤ 血管内や他臓器での不要吸収率

この中で分岐したカプセルについての人工画 像を図6に示す.分岐路では100%のカプセルが 病変側へと流れているかを分岐前と後でのカプ セル量から算出しその比率を特徴として用いる. 他にも,病変周辺でのカプセル量の変遷や血中の カプセルの減少率なども特徴量として用いるこ とで,必要なカプセル量の算出なども可能となる.



図6 分岐路でのカプセルの流れ

現在は、2.1 節で述べた yolo を用いたカプセル 検出を検討しているが、実際に検出器を作成する と極小領域であるカプセルを検出できない場合 が多い.現状での作成画像は、心臓近辺から太も も上部程度の範囲で作成しており,画像サイズ的 にカプセルの検出が難しい.

新たな検出法として血管領域を部分ごとに分け,拡大した形で画像を作成する手法を検討している.領域を区分けすることにより,画像内の検出目標が相対的に大きくなり検出が容易になると考えられるためである.実際に DDS の撮影では,より極小のカプセルを使用することが明白であり,その対処でもある.

4. 最終年度の課題

4.1 開発した各検出・分類システムの改良

ここまでに作成した小核検出システム・細胞核 数の計測システム・細胞の異常分類システムなど の実用化を視野に入れた改良を行う.実際に使用 しての問題点の解決,検出・分類精度の向上,CNN における学習数増加による性能向上などを行う.

4.2 小型カプセルの検出法の確立

現在は CNN を用いる手法を検討しているが, 現状の 3mm 程度の人工カプセルでも検出が困難 である場合も多い.実画像でのカプセルの CT 値 も未知数である.これらを鑑みると,血管に着目 して画像を拡大し,それを基にしてカプセルを検 出する手法など,小型カプセルに適したの検出方 法の開発を行う.

4.3 実画像を用いた DDS の動的追従システムの 開発

今年度は人工カプセルでの検討に過ぎなかった.今後は実画像での検出システムの検討,人工 カプセルで開発中の特徴量の実評価などを基に カプセルの動的追従システムの開発を目標とす る.

参考文献

[1] 瀬崎仁, "ドラッグ・デリバリー・システム", 薬学図書館 41(1), pp1-5, 1996

[2] 加藤竜司,清田秦次郎,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] Joseph R, Santosh D, Ross G et al: You Only Look Once: Unified, Real-Time Object Detection. Computer Vision and Pattern Recognition, arXiv:1506.02640, 2015

[4] 藤田一弥,高原歩:実装ディープラーニン グ.オーム社,東京, 2016, pp150-167

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

1. 背景と目的

本研究課題の目的は,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)で表示することで,高臨場感な仮想環境で標 的分子の設計を直感的に行えるシステムを開発 することである.本設計システムを用いて,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,それらを新しい分子の設計へと結びつけるこ とが目標である.

本課題の研究開発の進め方を表1に示す.研究 は、(1) 分子モデルの表示技術、(2) 分子モデル操 作のインタフェース技術の2つのテーマに分けて 進めた.最終年度には仮想空間での分子設計に結 び付くシステムの作成を目標としている.

表1.研究開発の進め方の計画

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

これまでに、表示については PDB(タンパク質 分子立体構造データベース)のデータを3次元 CG モデルで表示するソフトウェアを試作した^[1]. 没 入型映像ディスプレイとしてマルチスクリーン 型(CAVE)と頭部搭載型(HMD)で動作するも のである.使用感,動作速度および将来性の観点 から本課題では HMD 型のシステムを構築するこ とを決めた.分子モデルの表示技術については, おおむね計画通りの進捗である. 上平 員丈

神奈川工科大学情報学部教授

一方,操作インタフェースについては,HMDデ バイス用コントローラを使ったものを開発した. 分子モデルを移動・回転させることや,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.しかし,当初計画のユーザの手 を利用する直感的な入力インタフェースの導入 には至っていない.

今年度は分子構造表示方法の改善、直感的イン タフェースの開発を加速させる開発環境の構築 をめざした.

2. 研究方法

表示ディスプレイとして高機能 HMD (HTC 社 製 Vive) を用いて, Window10 で動作する表示ソ フトウェアを作成する. ソフトウェアは PDB の 分子構造データを読込み, HMD に 3DCG モデル として表示するとともに, それらモデルを操作す る機能を有する. 今年度の実施内容は次のとおり である.

①表示ソフトウェアの機能追加 昨年度から作成している独自の VR 表示コア ソフトをベースとした表示ソフトウェアに各 種機能を追加する.

 ②表示用ソフトウェアのパッケージ化 仮想空間制作統合環境 Unity3D (Unity Technologies 社製) 用の分子モデル表示ライ ブラリパッケージを作成する.

③ソフトウェアの使用感調査 本ソフトウェアを実際使用した際の印象をバ イオサイエンス系の研究者等を対象に調べる.



(a)HMD 装着での使用の様子 (背景はユーザが見ている映像)



(b)ソフトウェアの操作画面 図 1. 開発中のソフトウェアの実行例



(c)表示される映像の例

3. 結果および考察

3.1 没入型表示ソフトの改良

今後の操作インタフェース追加を考慮して, 当初の Unity3D ベースの表示ソフトウェアを VR 表示コアソフト (Fiatlux 社製) ベースのソ フトウェアとして再作成した (図 1).分子モデ ルの表示機能に加えて、ネットワーク型仮想空 間共有機能、構造変化アニメーション機能を実 装した.現在,ハンドモデルを用いた入力イン タフェースの実装途中である.

3.2 表示機能のパッケージ化

表示ソフトウェアの PDB データ入力,分子モ デル 3D 表示機能のみを Unity3D 上での開発に利 用できるパッケージを作成した.これにより, Unity3D 上での簡易表示ソフトウェア試作が可能 で,入力インタフェースの導入試験を容易に行え るようになった.図2に本パッケージを使った開 発の様子と,ハンドモデル型インタフェースの試 作例を示した.今後,このライブラリを用いてイ ンタフェース開発を加速する計画である.

3.3 使用感の調査

作成した表示ソフトウェアを国内で開催され たバイオ系の学会^{[2][3]}でデモ展示した.その際に 同分野の研究者に使用してもらい使用感等の調 査を行った.



図 3. 学会でのデモ展示の様子

「面白い」との感想に加えて、分子モデルの重 ね合わせ、構造の編集、化合物とのドッキングシ ミュレーション機能などの機能への要望も多数 あった.本ソフトウェアが対象とする分野の多数 の研究者からの意見を得ることができた.今後も 機会があれば実施することとしている.

3.4 考察

(1)計画の進捗状況と課題

当初計画に対して、タンパク質分子の3次元構 造を仮想空間表示については、ソフトウェアを再 作して、おおむね計画通り進んだ.一方、インタ フェースについてはコントローラを使用した方 法は実装できたが、当初計画の直感的インタフェ ースの導入が未達である.また分子設計への応用 に至っていない.

(2)今後の研究方針

開発が遅れている直感的インタフェースのシ ステムへの導入を最優先課題として取り組む.そ して,分子設計への応用につなげるためのシステ ム評価実験をバイオ機能材料開発グループと協 同で実施する.

4. 参考文献

- T. Inoue, K. Uehira, A. Koike, "Immersive Visualization of 3D Protein Structures for Bioscience Students", 20th Congress of the International Ergonomics Association (IEA2018), AISC827, pp.432-439, Firenze, Italy, 2018.
- [2] 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会 (2018.11 Tokyo), http://www.saaaj.jp/
- [3] 日本分子生物学会第 41 回年会(2018.11 Yokohama), https://www.mbsj.jp/



(b)ユーザの手と連動する 入力インタフェース作成例

(a)ライブラリを利用してソフトウェアを開発している様子

図 2. ライブラリを用いた実験用ソフトの開発

タンパク質カプセル群を拡散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拡散されながら血液に 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、「質量密度 ρ が大きく純度 β が大きい粒子」としてタンパク質カプセルをモ デル化し、「質量密度 ρ が小さく純度 β が小さい 粒子」として血液をモデル化し、粒子法 Moving Particle Simulation (MPS)[5]によって タンパク質 カプセル群が拡散されながら血液によって輸送 される現象を数値計算シミュレーションする。質 量密度 ρ だけで拡散現象を数値計算する試みは 途上であるが、下記の如く純度 β を導入すること で拡散を数値計算できつつある。

タンパク質カプセル群を血液が輸送する現象 をシミュレーションするために Navier-Stokes 偏 微分方程式でモデル化する。

タンパク質カプセル群が血液で拡散される現 象をシミュレーションするために、純度 β が拡 散する偏微分方程式(8)でモデル化する。

2. 研究方法

純度 β_i が大きな値を持っている粒子達 $r_i = \left(r_{i_x}, r_{i_y}, r_{i_z} \right) (i = 1, 2, \cdot \cdot \cdot, 1000)$ でタンパク質カプセルを表し、 純度 β_i が小さな値を持っている粒子達

 $r_{j} = (r_{j_{x}}, r_{j_{y}}, r_{j_{z}}) (j = 1001, 1002, \cdot \cdot \cdot)$ 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 $\mathbf{r} = (r_x, r_y, r_z) \in 流体領域 \Omega$ 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

$$\frac{\partial}{\partial r} = \left(\frac{\partial}{\partial r_{\rm x}}, \frac{\partial}{\partial r_{\rm y}}, \frac{\partial}{\partial r_{\rm z}}\right) \quad (1)$$

で表す。流体の粘性を表す Laplace 空間偏微分 作用素は

$$\frac{\partial}{\partial r} \cdot \frac{\partial}{\partial r} = \qquad (2)$$

$$\frac{\partial}{\partial r_{r}} \frac{\partial}{\partial r_{r}} + \frac{\partial}{\partial r_{r}} \frac{\partial}{\partial r_{r}} + \frac{\partial}{\partial r_{r}} \frac{\partial}{\partial r_{r}}$$

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

$$\frac{D\mathbf{r}}{Dt} = \mathbf{v}(t, \mathbf{r}) \quad \text{for} \quad \mathbf{r} \in \text{Int} \ \mathbf{\Omega} \quad (3)$$
$$\rho \ \mathbf{a}(t, \mathbf{r}) = \rho \frac{D\mathbf{v}}{Dt} = \qquad (4)$$

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

と境界条件

 $0 = \boldsymbol{v}(t, \boldsymbol{q}) \quad \text{for} \quad \boldsymbol{q} \in \partial \Omega \quad (5)$ $0 = \boldsymbol{a}(t, \boldsymbol{q}) \quad \text{for} \quad \boldsymbol{q} \in \partial \Omega \quad (6)$

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

$$\frac{\partial}{\partial r} \cdot \boldsymbol{\nu}(t, \boldsymbol{r}) = 0$$
 for $\boldsymbol{r} \in \text{Int } \boldsymbol{\Omega}$ (7)
を仮定する。

タンパク質カプセルを血液が拡散する効果 を、純度 β が拡散する偏微分方程式

$$\frac{\partial \beta}{\partial t} = c \frac{\partial}{\partial r} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \beta(t, r) \qquad (8)$$

でモデル化する。ここで 定数 c > 0 は拡散係数 である。純度 β_i の値が閾値より大きい粒子 r_i はタンパク質カプセルとみなされ、純度 β_i の 値が閾値より小さい粒子 r_i は血液とみなされ る。

Navier-Stokes 偏微分方程式の両辺に ∂/∂r を内積させて、Poisson 偏微分方程式

$$\rho \frac{\partial}{\partial \boldsymbol{r}} \cdot \boldsymbol{a}(t, \boldsymbol{r}) = (-1) \frac{\partial}{\partial \boldsymbol{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \boldsymbol{r}} P(t, \boldsymbol{r}) \quad (9)$$

$$\Im \sharp \vartheta$$

$$(-1)\frac{\partial}{\partial r} \cdot \frac{\partial}{\partial r} P(t, r) \qquad (9)$$
$$= f(t, r) = \rho \frac{\partial}{\partial r} \cdot a(t, r)$$

を得る。

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

$$\rho \, \boldsymbol{a} \cdot \boldsymbol{n} \,= \tag{10}$$

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

$$\supset \sharp \boldsymbol{\psi}$$

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

 $\frac{\partial n(q)}{\partial r} = \mathbf{g} \cdot \mathbf{n} + (-1)\rho \, \mathbf{a} \cdot \mathbf{n}$ (12) +(-1) $\left(\mu \frac{\partial}{\partial r} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \, \mathbf{v}\right) \cdot \mathbf{n}$

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(r,q) を 構成できる [6] [7]。

つまり 偏微分方程式

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

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

と homogeneous な Neumann 境界条件 <u> ∂ </u> $K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) = 0$ (14)

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

for $r \in \partial \Omega$ for $q \in Int \Omega$ を満たす Green 関数 K(r,q) を構成できる。 non-homogeneous な Neumann 境界条件(11) (12) を持つ Poisson 偏微分方程式(9)の解

P(t,r) は、上記の Green 関数 K(r,q) を用い て

$$P(t, \mathbf{r}) = \int_{\mathbf{q} \in \Omega} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) f(t, \mathbf{q}) d\mathbf{q}$$

$$+ \int_{\boldsymbol{q}\in\partial\Omega} K(\boldsymbol{r},\boldsymbol{q}) h(\boldsymbol{q}) d\boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{q}) \quad (15)$$

で表すことができる。

*∂*Ω を台とする delta 関数を **δ**(*q*) で表 すと

$$P(t, \mathbf{r}) = \int_{\mathbf{q} \in \Omega} K(\mathbf{r}, \mathbf{q}) f(t, \mathbf{q}) d\mathbf{q}$$

$$+ \int_{\boldsymbol{q}\in\Omega} K(\boldsymbol{r},\boldsymbol{q})h(\boldsymbol{q})\,\boldsymbol{\delta}(\boldsymbol{q})\,d\boldsymbol{q} \qquad (16)$$
$$= \int_{\boldsymbol{q}\in\Omega} K(\boldsymbol{r},\boldsymbol{q}) \quad (f(t,\boldsymbol{q}) + h(\boldsymbol{q})\,\boldsymbol{\delta}(\boldsymbol{q}) \,)\,d\boldsymbol{q} \qquad (17)$$

このように non-homogeneous な Neumann 境 界条件 h(q) を source 項に吸収する形で 圧力 P(t,r) を求解する事ができる [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(t,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(t,r)が求解できたならば、Navier-Stokes 編 微分方程式(4)の解として加速度をa(t,r),速 度v(t,r),位置r(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で繰り返すこと で、数値計算シミュレーションを遂行できる [1]。

非圧縮な流れをモデル化している Navier-Stokes 偏微分方程式(3)(4)(5)(6)(7)の数学理論に よる厳密解を 粒子法 MPS による数値計算で近 似できる事を研究成果[3] [4] で検討した。粒子 法 MPS を高速に計算するべく研究成果[2]に取 り組んだ。

3. 結果および考察

Poisson 偏微分方程式(9)を求解することによっ て圧力 P(t,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。

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:分岐した血管で圧力偏微分方程式を求解



図 2: 分岐した血管で圧力偏微分方程式を求解

タンパク質カプセルを血液が拡散す現象を数 値計算するべく導入された「純度 β に関する拡 散の偏微分方程式(8)」の単独の近似解を粒子 法 MPS で数値計算した結果の一例を、図3,図4, 図5 に示す。拡散現象を最も数値計算し易い流体 領域 Ω に対して数値計算している。大きな値 1000 を純度 β が持つ粒子(タンパク質カプセル に相当する粒子)を赤い粒子で描画し、小さな値 0を純度βが持つ粒子(血液に相当する粒子)を 青い粒子で描画している。時間が経過するにつれ て、赤い粒子達が青い粒子達へ拡散されて行く様 子を確認できる。

最も数値計算し易い流体領域 Ω に対して拡 散現象を数値計算できる技法を確立してから、一 般の流体領域 Ω に対して拡散現象を数値計算 できるように拡張し、輸送現象をモデル化してい る Navier-Stokes 偏微分方程式と連立させて数値 計算する事で、「タンパク質カプセル群を拡散さ せながら血液が輸送する現象」を数値計算シミュ レーションできるように技法を確立して行く。

Navier-Srokes 偏微分方程式と拡散偏微分方程 式を連立するモデルよりも、Navier-Srokes 偏微 分方程式に拡散効果も取り込んで「移流拡散の偏 微分方程式」にモデル化する方が数学理論として 明解であるので、数値計算に成功してから数学 理論を整備して行く。

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. の澤田朋樹博士殿と 高倉浩守殿に 深く感謝いたします。

並列計算へ長年に渡り取り組んできた 瀬田陽平研究員によって本研究の数値計算は遂 行されている。

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



図3:赤い粒子と青い粒子 初期条件



図4:赤い粒子群から青い粒子群へ拡散が始まる



図5:赤い粒子群から青い粒子群へ拡散が進む