

平成 27 年度～令和元年度
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～令和元年度 研究成果報告書

令和 2 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～令和元年度 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
(神奈川工科大学 バイオメディカル研究センター) 依田 ひろみ, 増田 恵
- ② 生体を用いた目的物質の組織内到達および
細胞内局所送達における輸送体の有効性検証・・・・・・・・・・・・・7
(神奈川工科大学 栄養生命科学科) 清瀬 千佳子
- 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・・・・15
(神奈川工科大学 応用化学科) 高村 岳樹
- ④ 表面無機抗菌材料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・・・・・・・・・・・・・19
(神奈川工科大学 栄養生命科学科) 澤井 淳
- ⑤ FIA を用いた酵素活性評価法の構築と天然化合物のスクリーニング・・・・・・・・・・25
(神奈川工科大学 応用バイオ科学科) 飯田 泰広

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 細胞培養状態観察システムおよび DDS 開発を目的とした
血管内カプセルの動的検出システムに関する研究・・・・・・・・・・・・・27
(神奈川工科大学 電気電子情報工学科) 武尾 英哉
(神奈川工科大学 バイオメディカル研究センター) 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・・・・・・・・・・・・・33
(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
(神奈川工科大学 情報ネットワーク・コミュニケーション学科) 井上 哲理
- ③ 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・・・・・・・・・・・・・39
(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^{†1}, 依田 ひろみ^{†2}, 増田 恵^{†2}

^{†1} 神奈川工科大学 応用バイオ科学科 教授

^{†2} 神奈川工科大学 バイオメディカル研究センター 研究支援員

1. 概要

GroEL (シャペロニン, Cpn60, Hsp60) は真正細菌の可溶性画分に存在するシャペロニンファミリータンパク質で、真核生物のミトコンドリア、植物の葉緑体などに存在する Cpn60 とともにグループ I 型シャペロニンに分類される。熱などのストレスに応答して発現が誘導されるが、通常の生育環境の細胞においても量の多いタンパク質である。その機能は、補助因子 GroES (コシャペロニン, Cpn10, Hsp10) とともに、新生ポリペプチドや変性したポリペプチドの凝集を阻止し、正しい立体構造形成 (フォールディング) の介助をすることである。

大腸菌の GroEL/GroES は、細胞内に存在する膜タンパクを除く約 2500 種の可溶性タンパク質の 10～15% を基質とする。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、ATP 加水分解を伴う構造変化によって GroES を蓋のように結合すると、リング内部に直径約 4.5 nm の閉鎖空間ができる (図 1A、B)。GroEL のリング入り口に結合した変性ポリペプチドをこの空洞内に閉じ込めて、凝集を防ぎながらフォールディングし、ATP の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、GroEL は新たな変性ポリペプチドを捕捉して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、野生型 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]。また、GroEL/GroES 複合体は基質タンパク質以外に例えば金属ナノ粒子を 2 つの空洞に高効率 (90%以上) で内包させることも可能であることがわかった^[2] (図 2)。GroEL/GroES に薬物等を内包し、望みの時間で加水分解が終わる GroEL 変異体を用いることで、必要なときに薬物を放出することが可能になると考えた。

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 (3. 1)、さらに局所に「届け

る」ための機能付与を行った^[3] (3. 2)。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した (3. 3)。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) キャリアへの応用が期待できる。そこで、動物実験 (清瀬との共同研究)、マウス血清中での安定性試験を行った (3. 4)。また、この研究期間中に我々は、GroEL が高濃度 ATP 存在下で自己会合して、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^[4] (3. 5)。重合している個々の GroEL 分子の 2 つの空洞内に薬物を内包させることで、複数種類の薬剤を併せ持つ薬剤ナノテープとしての応用が期待できる技術となるだろう。

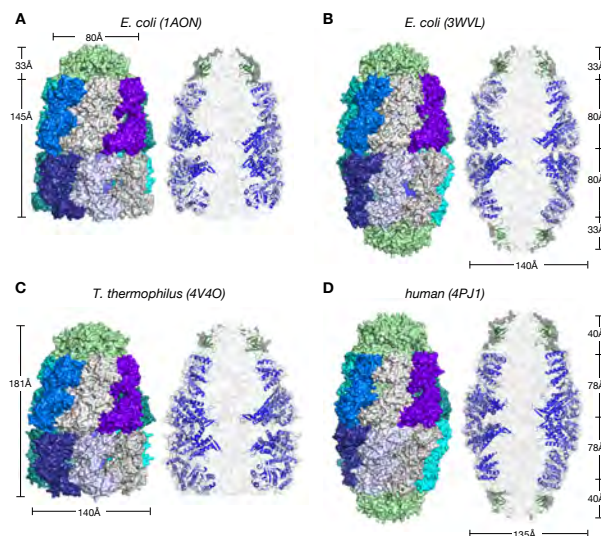


図 1 シャペロニン複合体の X 線結晶構造

(A) *Escherichia coli* GroEL/GroES (1AON), (B) *E. coli* GroEL/2GroES (3WVL), (C) *T. thermophilus* Cpn60/Cpn10, (D) Human mitochondrial Cpn60/2Cpn10.

2. 研究方法

2.1 開閉時間制御型 GroEL 変異体の作製

GroEL の ATP 加水分解に重要な Asp52/Asp398 を別のアミノ酸に置換した変異体の発現ベクターを QuikChange site-directed mutagenesis 法で作製した (図 3A)。*Escherichia coli* BL21 (DE3)

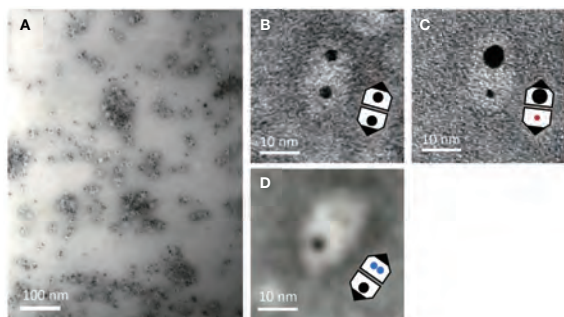


図2 金属ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体

(A) FePt 内包 GroEL^{D52A/D398A}/GroES 複合体 (内包率>90%)、(B) 2つの空洞のそれぞれに FePt を内包した GroEL/GroES 複合体、(C) FePt と Au 粒子を内包した複合体、(D) FePt と Pt を内包した複合体

を組換え、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。

ミトコンドリアの Cpn60 として X 線構造解析が報告されている Human においても、ATP 結合部位近郊の構造は GroEL とよく似ている (図 3B)。また、アミノ酸アライメントからも相同アミノ酸が保存されていることがわかる (図 4)。そこで、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 Cpn60 (mtCpn60^{WT} とする) の発現ベクターを鋳型とし、QuikChange 法を用いて Asp73 と Asp420 を Ala に置換した mtCpn60^{D73A/D420A} の発現ベクターを作製した (図 4)。*E. coli* Rosetta (DE3) で発現させ、ライセート上清を Butyl-Toyopearl、SephacroseCL-4B、MonoQ (ともに GE Healthcare) を用いて精製した。

各種 GroEL (Cpn60) 変異体の ATP 加水分解活性は、2 種類の方法で測定した。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) に加えた反応液を光路長 1 cm の石英セルに入れて、1mM ATP を添加して加水分解を開始し、Abs₃₄₀ を連続的に計測した。150 秒後に 0.6 μ M 野生型 GroES (GroES^{WT}) をセル中に追加し、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。300 秒の計測で変化が見られないような ATP 加水分解反応の遅い変異体には、GroEL/GroES 複合体の結合ヌクレオチド定量法を行い、より正確な加水分解活性を測定した。2 μ M GroEL、6 μ M GroES^{WT}、5mM DTT、1 mM ATP を HKM Buffer に加え、10 分間室温で反応させた後、3 個の TSK-GEL ガードカラム (TOSOH) を連結した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 複合体を分取し、一定時間毎に複合体溶液の一部を抜き取り、24% PCA を加えた。遠心上清を 0.5 M K₂CO₃ で中和し、TSK-GEL ODS-80Ts (TOSOH) による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 のピークを濃度既知のヌクレオチドのピークから定量した。

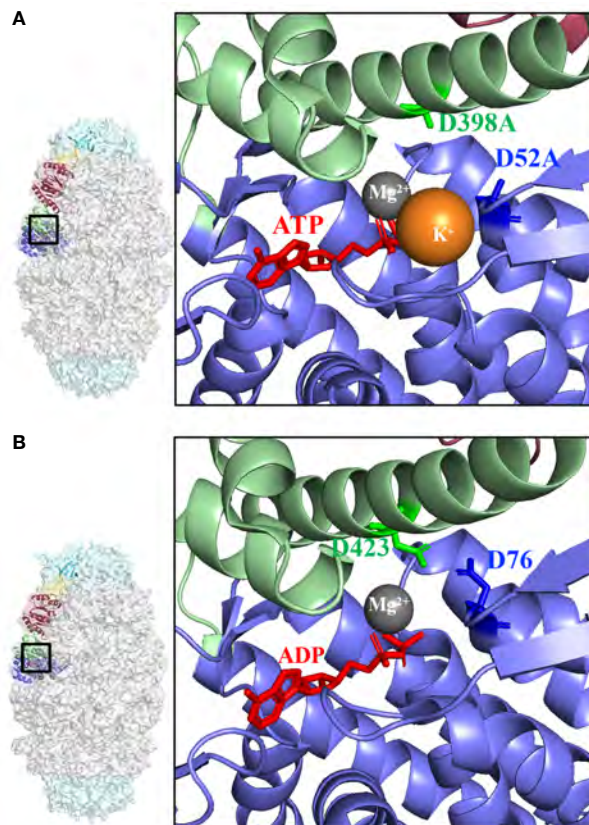


図3 GroEL (Cpn60) のヌクレオチド結合部位の構造

(A) *E. coli* GroEL^{D52A/D398A} / 2GroES 複合体 (3WVL) の ATP 結合部位、(B) Human mtCpn60 / 2mtCpn10 複合体 (4PJ1) の ADP 結合部位。GroEL (Cpn60) のモノマーをリボン表示し、頂点ドメインを赤色、中間ドメインを緑色、赤道ドメインを青色で示した。拡大図中の赤色はヌクレオチドを示す。

2.2 GroEL/GroES 複合体の細胞内局所送達

GroEL/GroES 複合体を細胞核へ送達するために、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 (RKRRKPVQKTVKPIPAEGIKSNPSKRH) を融合した発現ベクター pETGroES-NAS を構築した。pETGroES-NAS を *E. coli* BL21 (DE3) に組換え、培養菌体から Butyl-Toyopearl、SP-Toyopearl (共に TOSOH) を用いて核移行シグナル融合 GroES (GroES^{N-AhR}) を精製した。次に、GroES^{N-AhR} の N 末端または C 末端に、膜透過ペプチド (protein transduction domain, PTD) として知られる HIV-

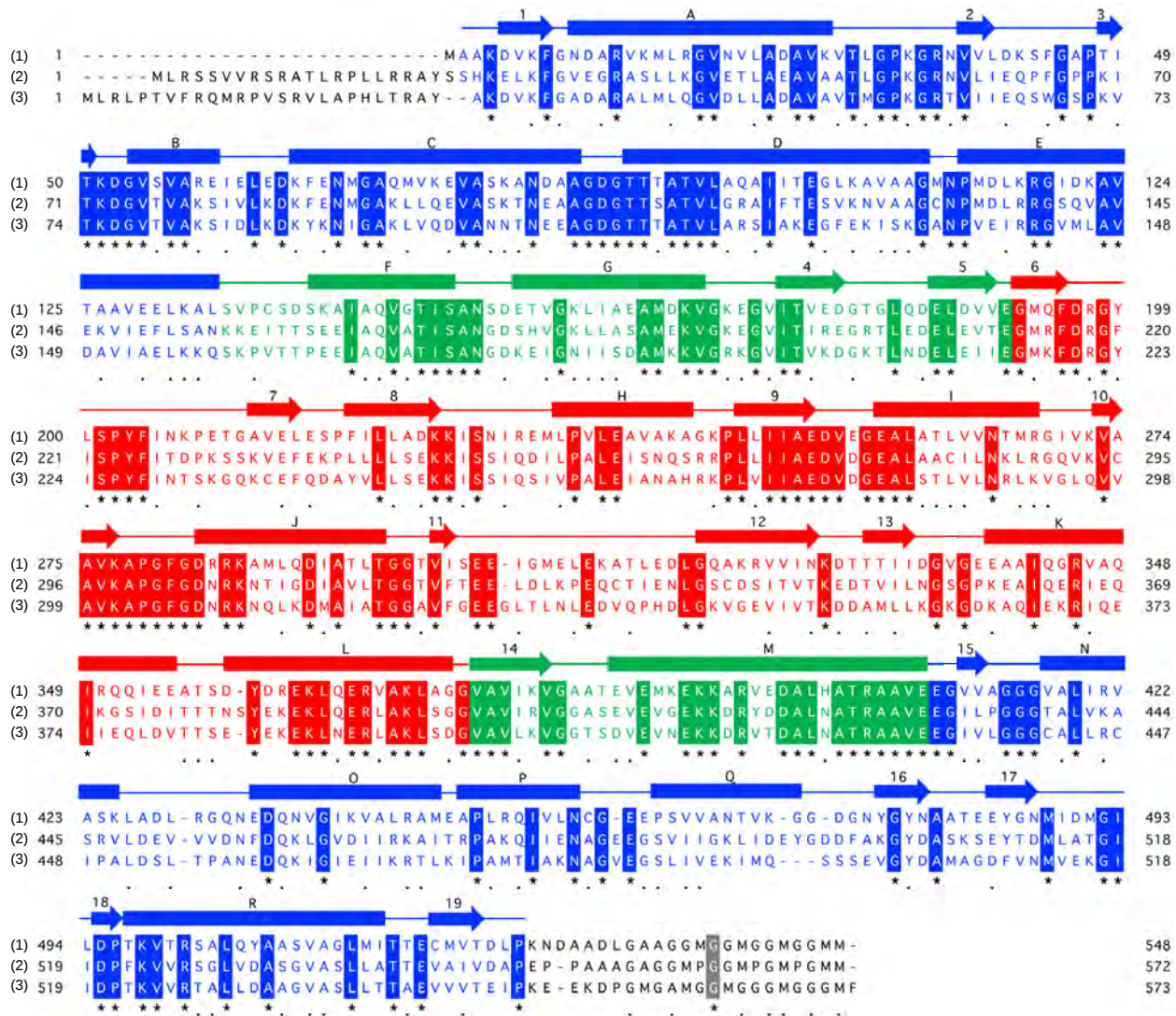


図4 GroEL (Cpn60) のアミノ酸配列アライメント

(1) *E. coli* GroEL, (2) Yeast mtCpn60, (3) Human mtCpn60. GroEL の二次構造を最上部に記し、頂点ドメインを赤色、中間ドメインを緑色、赤道ドメインを青色で示した。他の Cpn60 はアミノ酸配列の相同性から同様に着色した。

Tat1 タンパク質の 49～53 に位置する配列 (RK₂R₂) またはオリゴアルギニン (R₆) 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。形質転換した *E. coli* BL21 (DE3) 株または Rosetta (DE3) 株でタンパク質を発現させ、Butyl-Toyopearl、SP-Toyopearl で分離してそれぞれ精製タンパク質を得た。

GroES^{WT} 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。各種 GroES 変異体 (GroES^{mut}) と Cy3-GroES^{WT} を 1:6 で混合し、4℃ で一晩おいた。GroEL^{D52A/D398A} は Cy5 または FITC で蛍光標識した。0.5 μM FITC (Cy5)-GroEL、1 μM Cy3-GroES^{WT}/GroES^{mut} (Cy3-GroES^{mut})、

1 mM ATP を HKM buffer 中で混合して室温で 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、0.45 μm メンブレンフィルターで濾過滅菌した。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)、および A549 (細胞ヒト肺基底上皮腺癌細胞) に対して、GroEL/GroES 複合体を GroEL 換算で終濃度 0.05 μM となるように添加し、1 時間インキュベーションをしたのちに培地交換をして余剰の複合体を除いた。その後、37℃、5% CO₂ 条件下でインキュベータ蛍光顕微鏡 LCV110 を用いて、細胞の経時的な蛍光観察を行なった。

GroEL/GroES 複合体の内包物として、変性した GFP タンパク質、フラーレン (C₆₀) を用いた。2 μM

GroEL^{D52/398A}と2 μ M GFPを混合し、60°Cで15分間加熱した(GFP結合GroEL^{D52A/D398A})。1 mM ATP存在下でCy3-GroES^{mut}とGFP結合GroEL^{D52A/D398A}を2:1のモル比で混合し、その後、限外濾過を行いGroEL^{D52A/D398A}/Cy3-GroES^{mut}/GFP三者複合体を調製した。CHL細胞に、GroEL換算で終濃度0.02 μ Mまたは0.1 μ MとなるようにGroEL^{D52A/D398A}/Cy3-GroES^{mut}/GFPを添加し、生細胞中のGroEL/GroES複合体の局在を蛍光顕微鏡下で経時観察した。100 μ M C₆₀を10 μ M GroEL^{D52A/D398A}と混合後、20 μ M GroES^{mut}と1 mM ATPを加えて複合体を調製し、CHL細胞にGroEL換算で終濃度0.5 μ Mとなるように添加した。C₆₀の生理活性測定は、複合体添加し24時間の培養後に45 mJ/cm²のUVAを細胞に照射し、細胞固定と蛍光染色を経て小核発生率をコンピュータ支援画像診断(CAD)で算出した。

2.3 マウス血清におけるシャペロニンの安定性

4 μ M GroES(またはmtCpn10)と2 μ M GroEL^{D52/398A}(またはmtCpn60^{D73A/D420A})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、遠心分離し(3,000 rpm, 15 min, 4°C)、血球と血清に分画した。血清1.0 mg/ml(原液のタンパク濃度は63.7 mg/ml)と、0.2 mg/ml シャペロニン複合体をHKM Buffer(50 mM KCl)に加え、37°Cで2~24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解析を行った。

2.4 GroELの自己重合ナノチューブの形成

5 μ M GroEL^{D52A/D398A}を含むHKM Bufferに5 mM ATPを添加して試料を調製した。FePtナノ粒子含有GroELチューブは、20 mM HEPES/KOH(pH 7.4)にFePtナノ粒子(10 mg/mL)を加えて1分間ピペティングしたのち、100 mM KCl、5 mM MgCl₂を加え、最後に5 mM ATPを添加して調製した。GroEL single-ring(SR)変異体(R452E、E461A、S463A、V464A)にさらに加水分解遅延となる変異を導入したSR^{D52A/D398A}をGroEL^{D52A/D398A}: SR^{D52A/D398A}=10:1となるように加え、同様にGroELチューブを調製した。ATP添加後、10分静置してから、試料をTEMグリッドに滴下し、0.5%リンタンゲステン酸(pH 4.0)でネガティブ染色後、加速電圧100 kVの透過型電子顕微鏡JEM2100(日本電子)で観察した。チューブの長さ分布は、imageJによる画像解析で測定した。

3. 結果および考察

3.1 GroEL変異体ライブラリーの作製と評価

作製した一連のGroEL加水分解遅延型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を明らかにした。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。作製した一連のGroEL加水分解遅延型変異体のATP加水分解時間を測定したところ、1サイクル時間が8秒から12日以上までの各種変異体が得られた。特に、GroEL^{D52K}は、複合体結合ヌクレオチド定量的結果から、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5)。また、mtCpn60^{D73A/D420A}変異体は、GroELのAsp52とAsp398に相当すると推測した酵母mtCpn60のAsp73とAsp420をAlaに置換した変異体であるが、1サイクル時間が4日に遅延し、それ以外のシャペロニン活性(ヌクレオチド結合、基質結合、GroES結合、基質フォールディング)は正常であった。したがってGroEL/GroESで進めてきた成果はmtCpn60/mtCpn10に置き換えることも可能であり、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適用が期待できる。

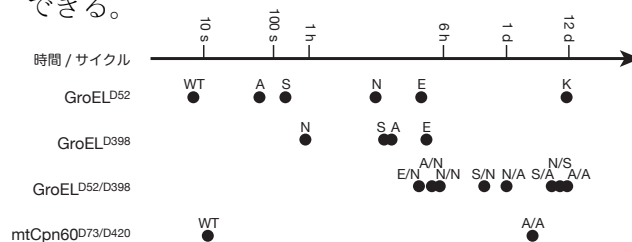


図5 GroEL変異体の反応サイクル時間

時間/サイクルの単位はs(秒)、h(時間)、d(日)。

3.2 GroEL/GroES複合体の細胞内局所送達

各種GroES変異体(図6A)は、単独では凝集しやすい傾向にあったが、GroES^{WT}と1:6の混合比で4°Cで7時間以上静置することでヘテロ7量体(GroES^{mut})を形成し、このGroES^{mut}はいずれも1 mM ATP存在下でGroEL^{D52A/D398A}と結合して安定な複合体を形成した。GroES変異体とGroES^{WT}を混

合してヘテロ 7 量体を形成させるこの手法は、複数種類の特徴を各種組合せで GroES に付与する際に、新たな遺伝子操作を必要とせず簡便に多彩な特徴を併せ持つ GroES を形成できるため、大変に有効である。

Cy3-GroES^{mut} と FITC-GroEL^{D52A/D398A} の複合体を投与した CHL 細胞の蛍光顕微鏡観察より、GroES^{N-AhR}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体は投与から 1 時間までに細胞膜表面に付着し、4.5 時間で細胞質に到達、7 時間までには細胞核に到達していた (図 6B)。作製した変異体中で最も核送達時間が短かったのは GroES^{N-PTD/AhR}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体で、細胞に投与後 1 時間以内に細胞質への到達、4.5 時間までに核への到達が確認できた。PTD 配列の効果で、細胞膜付着から膜透過までの時間が短縮できたためと考えられる。一方、C 末端への PTD 融合変異体はタンパク質の凝集を引き起こしやすく有効では無かった。また、A529 細胞への送達は CHL 細胞より遅く、送達時間には細胞依存性があることが示唆された。

3.3 GroEL/GroES 複体内包薬剤の局所送達

シャペロニン薬物担体とする DDS 技術の開発のため、GroES^{N-AhR}/GroEL^{D52A/D398A} 複体内に包した物質を細胞内局所送達することを検討した。変性 GFP を内包し Cy3-GroES^{N-AhR}/Cy5-GroEL^{D52A/D398A} 複合体を CHL 細胞に添加したところ、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 (36~48 時間) [3]。GFP を内包 GroES^{WT}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体では、各蛍光シグナルが細胞質内でいくらか観察されたが、核には到達しなかった。さらに、GFP 内包 GroES^{N-PTD/AhR}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体は、最も早いものでは細胞投与から 4.5 時間で GFP および Cy3 蛍光が核へ到達したことを確認でき、内包物の有無は複合体の細胞膜透過性、膜透過時間に影響しないと分かった。また、細胞に投与する複合体濃度を 0.02 μ M から 0.1 μ M に増加したところ、顕微鏡観察視野内の複合体核送達細胞率は 4% から 29% に上昇した。

次に、C₆₀ を内包物にして、GroEL/GroES 複合体によって核に送達した C₆₀ が UV 照射によって活性酸素を発生させゲノム DNA を切断する効果を、小核発生率を計測することで比較した (高村との共同研究)。C₆₀ 内包 GroES^{N-AhR}/GroEL^{D52A/D398A} または GroES^{N-PTD/AhR}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体を CHL 細胞に投与した 24 h 後に UV を照射して、小核数をコンピュータ支援画像診断システム (CAD) を用いて自動計測した (武尾との共同開発)。その結果、C₆₀/GroES^{N-AhR}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体は C₆₀ 単独で細胞投与したものと比較して小核発生率が 1.5 倍に

増加し、C₆₀/GroES^{N-PTD/AhR}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体は 1.4 倍に増加した (図 6C)。C₆₀ はシャペロニン複合体に内包することで細胞核近傍まで到達可能になり、DNA 損傷効率が上昇したと考えられた。

これらの結果から、GroES の N 末端に PTD と AhR を融合することによって、GroES/GroEL 複合体に内包した物質を凝集や分解から保護しながら細胞核に送達することが可能であり、内包物の生理活性効果を向上させる可能性を示した。

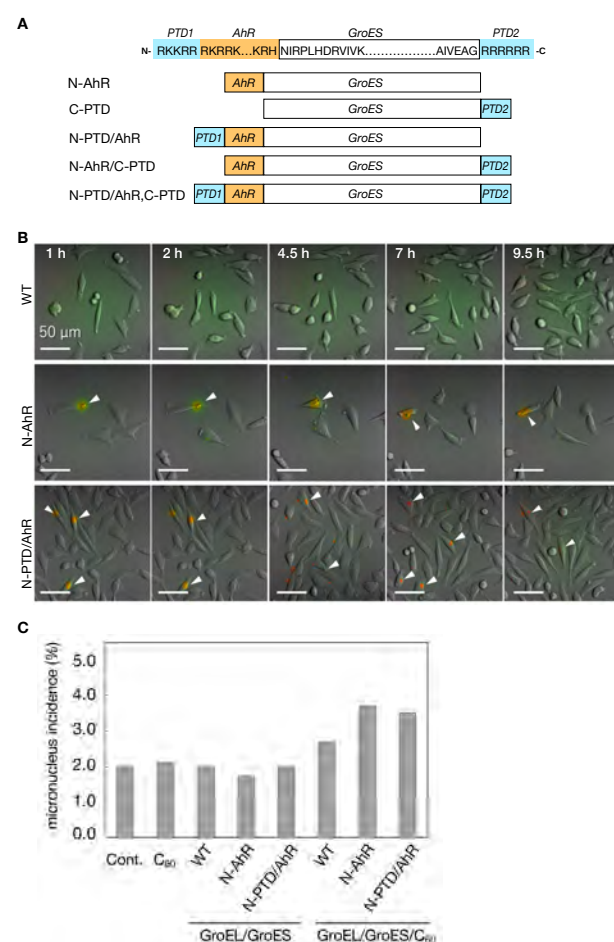


図 6 GroES 変異体/GroEL 複合体の細胞膜透過

(A) 作製した GroES 変異体の構築。
(B) GFP/GroES 変異体/GroEL^{D52A/D398A} 複合体を CHL 細胞に投与後の各時間毎の蛍光観察像 (GFP/Cy3/FITC の merge)。
(C) C₆₀/GroES^{mut}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体を投与した CHL 細胞の小核発生率。Cont. は C₆₀、複合体の代わりにバッファーを投与したもの。

3.4 血清中でのシャペロニン複合体の安定性

GroES^{N-AhR} または GroES^{N-PTD/AhR}/GroEL^{D52A/D398A} 複合体を、マウス血清タンパク質の 10-20% の濃度で混合し 37 °C に静置したとき、電気泳動でそれぞれのタンパク質は 18 h までは変化は無かった。mtCpn10/mtCpn60^{D73A/D420A} 複合体においても同様に、12 h までは検出バンドに変化はなかった。このことから、血液投与の際のシャペロニン複合体の安定性は 12 h までは問題ないと考えられた。

3.5 金属粒子内包 GroEL テープの形成と制御

GroEL が高 ATP 濃度で自己会合して幅 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、本研究過程で発見した^[4]。GroEL の平均粒径は粒子径分析で約 20 nm (X 線結晶構造と一致) だが、5 mM 以上の ATP 存在下では GroEL^{WT}、GroEL^{D398A}、GroEL^{D52A/D398A} のいずれも、より大きな粒子径を示した。この粒子径増大は、TEM 観察により 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 7A)。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 (GroEL^{WT} < GroEL^{D398A} < GroEL^{D52A/D398A})。一方、GroES 共存下では自己重合は見られず、GroEL/GroES 複合体を形成した。また、線維形成後の GroEL に GroES を添加することで、可逆的に迅速に脱重合した。

GroEL チューブ形成の原理は次のように考えられる。ATP を結合した GroEL のリング入り口には疎水性アミノ酸が並び、細胞内では変性タンパク質を捕捉する。変性タンパク質が少なく、ATP が高濃度で存在すると、その GroEL リング入り口の

アミノ酸同士が互いに疎水性相互作用で結合し、GroEL がダブルリング構造であるために自己重合的に 1 次元線維構造を形成すると予想される。GroES の GroEL への結合の方が強い場合、GroES の共存により線維構造は壊れ、GroES/GroEL 複合体形成が優先される。

次に、重合している個々の GroEL 分子内に薬物を内包させることができるかを検討した。FePt ナノ粒子を GroEL と混合し、ATP を添加して線維構造を形成させ、FePt 内包 GroEL テープをつくることに成功した (図 7B)。この GroEL チューブは、ATP 濃度を下げることでも脱重合することがわかったため、細胞内の生理条件では脱重合して内包物を放出することができる。

最後に、GroEL の 2 つのリング界面の変異体でリング間が解離することがわかっている SR 変異体 (R452E、E461A、S463A、V464A) の加水分解活性を遅くした SR^{D52A/D398A} を混合して、線維末端をキャップすることで線維長を制御できるか検討した。その結果、5 μ M GroEL^{D52A/D398A} のみでチューブ形成した場合に平均 145.06 $\pm$ 74.76 nm であったのに対し、GroEL^{D52A/D398A}:SR^{D52A/D398A} = 10:1 の試料では平均 70.58 $\pm$ 36.51 nm だった (図 7CD)。線維長が平均で 1/2 程度に短くなりキャップ効果が観察されたが、SR^{D52A/D398A} の混合比を変えることによる長さの制御には至っていない。しかし、SR^{D52A/D398A} のみでは 5 mM ATP 存在下でも線維構造は形成されないことから、ダブルリング構造が線維形成に必要であることは明らかとなった。

GroEL ナノテープは、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、複数種類の薬剤を併せ持つ薬剤ナノテープとして細胞周囲に配置するなどの応用が考えられる。

4. 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.

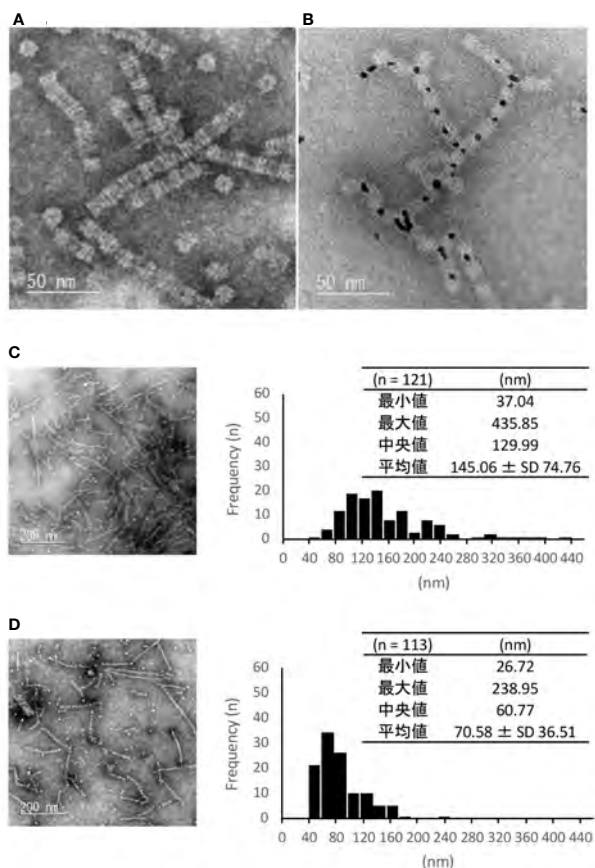


図 7 GroEL ナノテープ形成と長さの制御

(A) 5 mM ATP 存在下で形成した自己重合 GroEL^{D52A/D398A} チューブの TEM 観察像。(B) FePt ナノ粒子内包 GroEL^{D52A/D398A} チューブの TEM 観察像。(C) GroEL^{D52A/D398A} チューブの TEM 像 (左) を imageJ で解析した線維長ヒストグラム (右)。(D) GroEL^{D52A/D398A}:SR^{D52A/D398A}=10:1 の混合比で形成したチューブ構造の TEM 像 (左) を imageJ で解析した線維長ヒストグラム (右)。

生体を用いた目的物質の組織内到達および細胞内局所送達における 輸送体の有効性検証

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

日本人の健康増進への技術革新は重要な課題の一つである。その中でバイオ機能素材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を連携する事で革新的な医療技術を生み出す事が期待できる。本プロジェクトは医療技術の革新に貢献するバイオ機能素材開発を目的として、新たなバイオ機能材料の開発と医療基盤技術を創出したいと考えている。特に、生体での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行う事にした。生体を用いてシャペロニン複合体の輸送体としての有効性と実際送達したい物質の1つとしてビタミンE同族体の生体内動態について一連の研究を行う事にした。

ビタミンEは脂溶性の栄養素である。天然にはクロマン環に飽和型のフィチル側鎖が結合したトコフェロールと不飽和型の側鎖が結合したトコトリエノールがあり、クロマン環のメチル基の数と位置の違いにより、 α 、 β 、 γ 、 δ の4つがそれぞれ存在するので合計8種類ある。ビタミンEは小腸上皮細胞より吸収されるとリポタンパク質に組み込まれ、リポタンパク質と共に体内輸送されると言われている。血中に放出されたリポタンパク質は肝臓に入ると肝臓にある α -トコフェロール輸送タンパク質^{[1],[2]}により α -トコフェロールを優先的に体内循環へと導き、それ以外の非 α -トコフェロール(δ -トコフェロールやトコトリエノール類)は肝臓内でうっ滞し、その後速やかに代謝されると報告されている^[3]。しかし、近年、トコトリエノール類においては抗血管新生作用^[4]、抗酸化作用^[5]、非アルコール性脂肪性肝炎予防効果^[6]などが、また δ -トコフェロールには抗肥満作用^[7]などが報告され、 α -トコフェロール以外のビタミンEに注目が集まっている。しかし、ビタミンE同族体の体内動態を考えると非 α -トコフェロールの目的組織への到達は経口摂取だとかなり難しいと推察される。そこで、シャペロニン複合体等のDDSキャリアに乗せる事で目的の組織へと到達させられることが可能ではない

かと考えた。

一方、キャリアとなるシャペロニンはGroEL/GroES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^{[8],[9]}、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。さらに、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^[10]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^[11]の後ろにAhRを結合したGroES^{N-PTD/AhR}複合体の2種類を用いる事にした。

本研究は、組織および細胞内局所到達輸送体としての上記のシャペロニン複合体の有効性と、その中に入る目的物質の1つとして非 α -トコフェロールとして δ -トコフェロールの体内動態について検討を行う事にした。H27年度は「In vivoにおける細胞内局在送達輸送体の有効性の検証」としてシャペロニンタンパク質と強い抗酸化作用を持つフラベンをマウスに投与し、安全性を確認した。H28年度は「 δ -トコフェロール含有リボソーム投与によるマウスの体内分布について」、H29年度は「In vivoにおける細胞内局在送達輸送体の有効性の検証 - ビタミンE含有リボソームの輸送体としての基礎研究」と題して、 δ -トコフェロール含有リボソームを作製し、マウス尾静脈より投与し、体内分布を検討した。一方、H30年度は「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」として、上記に記載した2つの複合体を用いて脳内への移行について検討した。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も求められている。そこで、今回は脳に直接添加する事で脳内に移行できるかどうか検討した。最後に、R1年度は「 δ -トコフェロールの経口摂取による体内分布について」と題して、静脈注入ではなく、経口投与した場合の体内動態を検討し、H28~H29年度の研究と比較することにした。

2. 研究方法

2.1 H27年度：In vivoにおける細胞内局在送達輸送体の有効性の検証

ICR雌マウス10匹を1週間予備飼育した後、5匹に静脈投与、5匹に腹腔内投与を行った。静脈投与、腹腔内投与とも1匹ずつコントロールとして溶媒のみを投与し、残りの4匹はフラーレンのみ、シャペロニンタンパク質のみ、フラーレン+シャペロニン(シャペロニンの濃度は2種類)それぞれ投与した。なお、フラーレンはすべて10mg/kgBWとした。投与後24時間観察を行った。

2.2 H28年度： δ -トコフェロール含有リボソーム投与によるマウスの体内分布について

ビタミンEは脂溶性物質であることからそのまま静脈投与することができない。そこで、 δ -トコフェロール含有リボソームを作製する事にした。リボソーム作製はリボソーム簡易作製装置であるMini-Extruder (Avnati Poloar Lipids, INC)を用いてEgg-PCと δ -トコフェロールとでリボソームを作製した。7週令BALB/c雄マウス31匹を4日間予備飼育後、体重差が出ないように次の9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分実験群(30m-E)、④投与1時間対照群(1h-C)、⑤投与1時間実験群(1h-E)、⑥投与2時間対照群(2h-C)、⑦投与2時間実験群(2h-E)、⑧投与4時間対照群(4h-C)、⑨投与4時間実験群(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。 δ -トコフェロール含有リボソームは δ -トコフェロール量として、1.4 μ g/gBWになるように尾静脈

より投与した。投与後イソフルラン麻酔下にて心臓採血を行い、血液を採取した。血液は3,000rpm 10分遠心分離(4 $^{\circ}$ C)し血漿を得た。その後、Uedaらの方法^[12]を基本としたHPLCによるビタミンE定量を行った。

2.3 H29年度：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含有リボソームの輸送体としての基礎研究-

H28年度の実験を再度行う事にした。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、一部を別の試験管に移して、N₂下にて乾固させた。乾固後、生理食塩水を6mL加え、27 $^{\circ}$ Cで20分間ソニケートしリボソームを作製した。コントロール用はビタミンEを除いたEgg-PCのみで作製した。群分け等実験方法はH28年度と同様であるが、今回は血漿、肝臓および脂肪組織のビタミンE量も分析した。

2.4 H30年度：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

シャペロニン複合体の調整は、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 μ M GroEL/2 μ M GroES/2 mM ATPの試料を調製した(Cy3-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 $^{\circ}$ C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 μ m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 μ Lとし、使用まで4 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 μ M GroEL/2 μ M 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 μ Lとし、使用まで4 $^{\circ}$ C暗所保存した。

次に投与する実験動物はC57BL/6J μ 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(上に記載)ならびに対照群として Buffer を注射器にて注入した。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。次に、マウス大脳の切片作製についてだが、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 10 μ m の組織切片を作製してもらった。

マウス大脳の凍結切片はデシケーター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 Tcnp60 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 LSAB 2 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。

2.5 H31 年度： δ -トコフェロールの経口摂取による体内分布について

3 週齢の C57BL/6J 雄マウス 31 匹は 1 週間予備飼育後、各群間の平均体重に差が出ないように次の 6 群分けした。①コントロール群 (C)、②コントロール食 + α -トコフェロール添加群 (C α) ③コントロール食 + δ -トコフェロール添加群 (C δ 群)、④高脂肪・高ショ糖食群 (H 群)、⑤高脂肪・高ショ糖食 + α -トコフェロール添加群 (H α 群)、⑥高脂肪・高ショ糖食 + δ -トコフェロール添加群 (H δ 群)。餌は AIN93G を基本としてラボ内で作成した。コントロール群は脂肪エネルギー比 16%、ショ糖エネルギー比 10%を基準にし、また高脂肪・高ショ糖食は脂肪エネルギー比 50%、ショ糖エネルギー比を 25%で調整した。さ

らに C 群、H 群のビタミン E 添加量は餌 1kg 当たり α -トコフェロール、イーミックス-D とも 800mg とした。なおイーミックス-D は α -トコフェロール 0.5%、 β -トコフェロール 0.1%、 γ -トコフェロール 3.9%、 δ -トコフェロール 86.7%の混合物で三菱ケミカルフーズ(株)より供与して頂いた。このイーミックス-D を δ -トコフェロールとして使用することにした。

4 週間飼育後、解剖前 16 時間絶食とし、イソフルラン麻酔下にて解剖を行った。血液および脳、心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓、睪丸、睪丸周囲脂肪、骨格筋を採取した。血液は 3,000rpm で 10 分間遠心分離機 (4 $^{\circ}$ C) にかかけ、血漿を得た。血漿および各組織は HPLC 分析まで -80 $^{\circ}$ C で保管した。ビタミン E 分析は上記で示した方法と同様で HPLC を用いて定量分析を行った。なお、すべての動物実験は神奈川工科大学動物実験委員会での承認を受けたものである。

3. 結果および考察

3.1 H27 年度：In vivo における細胞内局在送達輸送体の有効性の検証

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 + シャペロニンを投与したマウス (シャペロニンの 2 濃度とも)は 24 時間生存していた。しかし、シャペロニン (1.24 μ M 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 時間生存していた。

以上の結果より、フラーレンは静脈投与およ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。シャペロニンに関しては、フラーレンとの混合物の場合、マウスが生存していた事からフラーレンとの混合物だと利用できる可能性が示唆された。しかし、なぜフラーレンとの混合物だと生存できたのかについては現時点ではわからない。2つの物質がどのような形態で血液中に存在するのか検討する必要があるだろう。

3.2 H28 年度： δ -トコフェロール含有リポソーム投与によるマウスの体内分布について

図 1 にコントロールリポソームを、図 2 に δ -トコフェロール含有リポソームの粒子の顕微鏡下での画像を示した。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。図 3 には δ -トコフェロール含有リポソームをマウス尾静脈より投与した際の血中 δ -トコフェロール濃度の変動について示した。投与 30 分後で δ -トコフェロール濃度は上昇したものの、その後の血中濃度は維持されたままであった。この結果は尾静脈投

与が正確に行われていない可能性を示唆している。

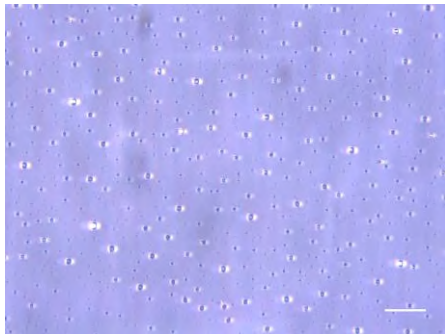


図 1. コントロール用リポソーム
(スケール: 5 μ m)

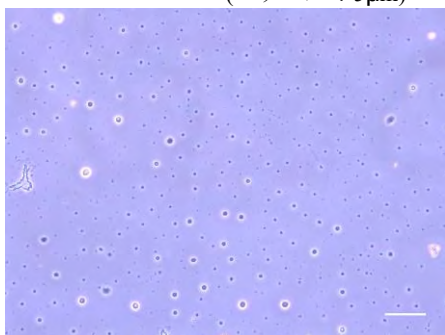


図 2. δ -トコフェロール含有リポソーム
(スケール: 5 μ m)

今後は、マウス静脈投与についてのさらなる検討が必要であると思われる。

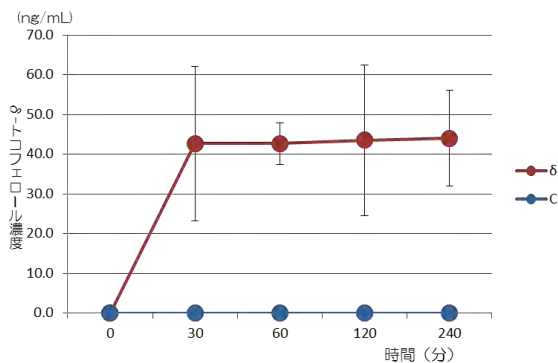


図 3. 血中 δ -トコフェロール濃度の経時変化

3.3 H29 年度 : 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 含有リポソームの輸送体としての基礎研究 -

図 4 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ことが考えられる。

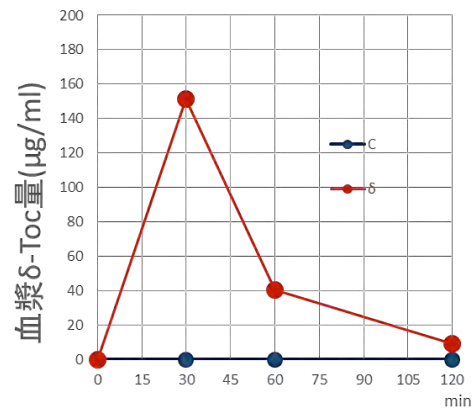


図 4. 血中 δ -トコフェロール濃度の経時変化

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 5)。以上の結果より、肝臓内へは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事なく、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 6)。

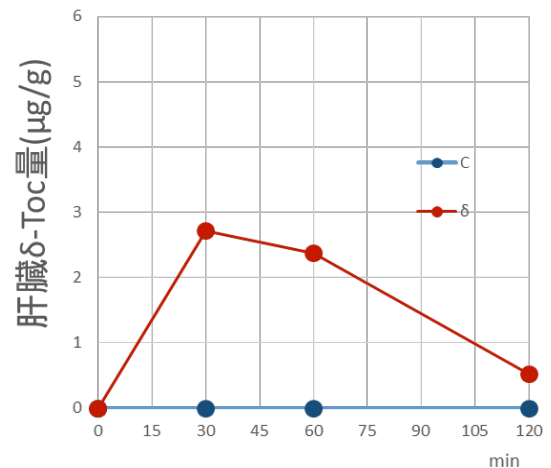


図 5. 肝臓中 δ -トコフェロール量の経時変化

今回の結果は確実に静脈注入が成功したマウス各 1 匹分のデータをお示ししており、体内への分布を評価する上での数が確保できていない。今後その点も含めてさらなる検討が必要である。

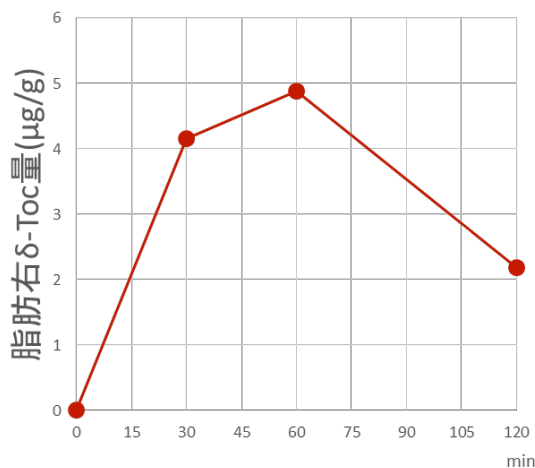


図 6. 睪丸周囲脂肪中δ-トコフェロール量の経時変化

3.4 H30 年度：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

図 7 は $\text{GroES}^{\text{NAS}}$ と $\text{GroES}^{\text{N-PTD/AhR}}$ 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）。 $\text{GroES}^{\text{NAS}}$ はネガティブコントロールよりも DAB 呈色強い箇所（矢印）が見受けられた。一方、 $\text{GroES}^{\text{N-PTD/AhR}}$ の方も若干ではあるが、呈色強い箇所が見受けられた。しかし、 $\text{GroES}^{\text{NAS}}$ の方が強いことから、 $\text{GroES}^{\text{NAS}}$ の方が $\text{GroES}^{\text{N-PTD/AhR}}$ よりも早くに大脳漿膜に結合する可能性推察された。

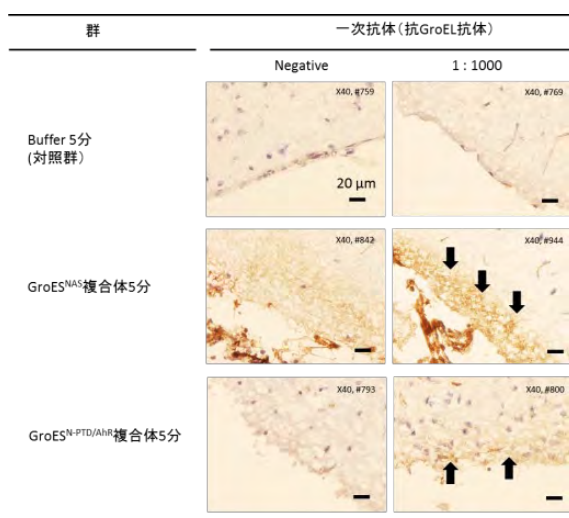


図 7. 大脳表層におけるシャペロニン複合体の組織免疫染色像(散布 5 分後)

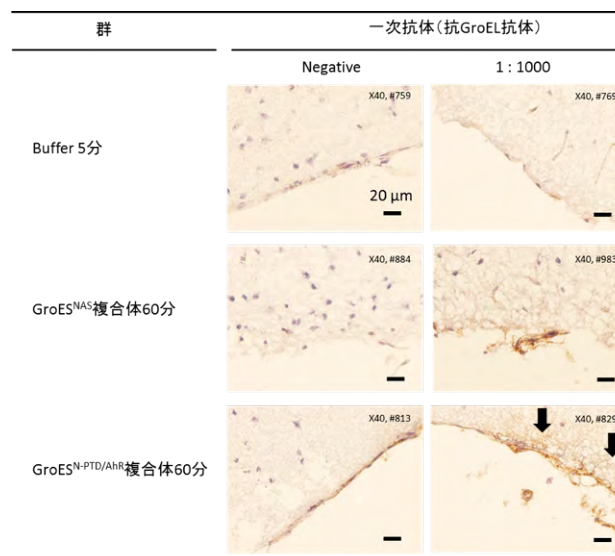


図 8. 大脳表層におけるシャペロニン複合体の組織免疫染色像(散布 60 分後)

図 8 は 2 つの複合体を散布してから 60 分たったものを図 7 と同様に組織免疫染色したものである。 $\text{GroES}^{\text{NAS}}$ 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、 $\text{GroES}^{\text{N-PTD/AhR}}$ 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 7 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ことから $\text{GroES}^{\text{N-PTD/AhR}}$ の方が $\text{GroES}^{\text{NAS}}$ 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こと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。

3.5 H31 年度；δ-トコフェロールの経口摂取による体内分布について

最終体重は C 群、C α 群、C δ 群に比べて、高脂肪・ショ糖食を投与した H 群、H α 群、H δ 群で有意に高くなったが、ビタミン E 摂取による影響は見られなかった。また、組織の中で睪丸周囲脂肪重量は C 群、C α 群、C δ 群に比べて H 群、H α 群、H δ 群で有意に重かったが、ビタミン E 摂取による影響はなかった。

図 9 に C α 群と H α 群での各組織中の α -トコフェロール量を比較した。C α 群および H α 群とも肝臓に最も多く蓄積していた。

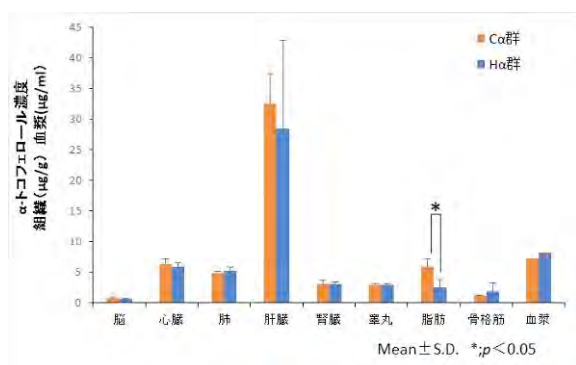


図 9. Cα 群と Hα 群での各組織中の α-トコフェロール濃度の比較

この結果はこれまでの多くの研究報告と一致している。一方、脳を除いては同程度の量が分布されており、脳については非常に少なかった。これもこれまでの多くの研究報告と一致している。血漿は 1 サンプルしか分析できなかったのが参考値である。また、C 群と H 群を比較した場合、脂肪組織において高脂肪・高ショ糖食と一緒に摂取した方が有意に低下していた。

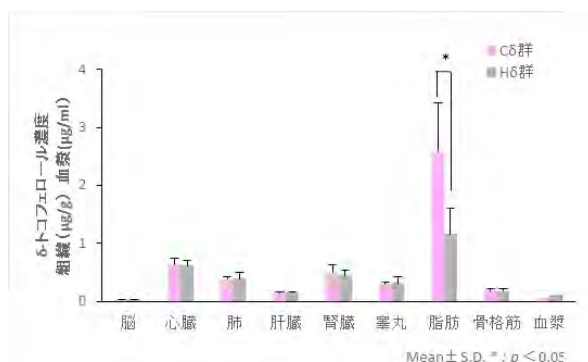


図 10. Cδ 群と Hδ 群における各組織中の δ-トコフェロール濃度の比較

図 10 は Cδ 群と Hδ 群の各組織中の δ-トコフェロール量を比較した。図 9 に示した α-トコフェロール量に比べれば 1/10 程度とかなり低いものの、すべての組織中に δ-トコフェロールが存在した。その中でも脂肪組織に多く取り込まれていたことから脂肪組織に蓄積しやすい事が示唆できる。肝臓の δ-トコフェロールがかなり低かったことから代謝が進んでいる事が推察できるので、それを考えると脂肪組織への蓄積は特異性があると示唆された。一方、α-トコフェロール、δ-トコフェロールとも C 群に比べて H 群で有意に低下していたが、組織 1g あたりではなく、全体量で比較すると差はなかった。

以上の結果より、δ-トコフェロールは静脈注入でも経口投与でも血液を介して輸送されると脂

肪組織に蓄積しやすい事が明らかとなった。なぜ特異的に脂肪組織に分布するかについては全くわかっていない。脂肪の細胞膜に何か特異的な認識物質が存在するのか、今後検討を続けたい。また、輸送体としてのシャペロニン複合体は培養細胞を用いての核内への到達は可能であるが、生体内での血液循環系、腹腔内投与による粘膜吸収、さらには脳などに直接添加する事で体内移行については結論を出す事が出来なかったが、このシャペロニン複合体をマウスへの静脈注入する事でどのようにして分布されていくのか、内包した金ナノ粒子を追う事で動態を明らかにできる可能性が考えられるので今後検討を続けたい。

4. 参考文献

- [1] Sato Y., Arai H., Miyata A., Tokita S., Yamamoto K., Tanabe T., and Inoue K., "Primary structure of alpha-tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde binding protein", J. Biol. Chem., 288, pp.17705-17710, 1993.
- [2] Hosomi A., Arita M., Sato Y., Kiyose C., Ueda T., Igarashi O., Arai H., and Inoue K., "Affinity for α-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs", FEBS Lett., 409, pp.105-108, 1997.
- [3] Kiyose C., Saito H., Kaneko K., Hamamura K., Tomioka M., Ueda T., and Igarashi O., "α-Tocopherol affects the urinary and biliary excretion of 2,7,8-trimethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxylchroman, γ-tocopherol metabolite, in rats", Lipids, 36, pp.467-472, 2001.
- [4] Nakagawa K., Shibata A., Yamashita S., Tsuzuki T., Kariya J., Oikawa S., and Miyazawa T., "In vivo angiogenesis is suppressed by unsaturated vitamin E, tocotrienol", J. Nutr., 137, pp.1938-1943, 2007.
- [5] Yoshida Y., Niki E., and Noguchi N., "Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects", Chemistry and physics of lipids, 123, pp.63-75, 2003.
- [6] Yachi R., Muto C., Ohtraka N., Aoki Y., Koike T., Igarashi O., and Kiyose C., "Effects of tocotrienol on tumor necrosis factor-α/D-galactosamine-induced steatohepatitis in rats", J. Clin. Biochem. Nutr., 52, pp.146-153, 2013.
- [7] Tanaka-Yachi R., Shirasaki M., Otsu R., Takahashi Muto C., Inoue H., Aoki Y., Koike T., and Kiyose C., "δ-Tocopherol promotes thermogenic gene expression via PGC-1α upregulation in 3T3-L1 cells", Biochem. Biophys. Res. Comm., 56, pp.53-59, 2018.
- [8] Koike-Takeshita A., Mitsuoka K., Taguchi H., "Asp-52 in combination with Asp-398 plays a

critical role in ATP hydrolysis of chaperonin GroEL”, *J. Biol. Chem.*, 289, pp.30005-30011, 2014.

- [9] Koike-Takeshita A., Arakawa T., Taguchi H., Shimamura T., “Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL: GroES₂-ATP₁₄ complex determined at 3.8 Å reveals rearrangement between two GroEL rings”, *J. Mol. Biol.*, 426, pp.3634-3641, 2014.
- [10] Ikuta T., Eguchi H., Tachibana T., Yoneda Y., Kawajiri K., ”Nuclear localization and export signals of human aryl hydrocarbon receptor”, *J. Biol. Chem.*, 30, pp.2895-2904, 1998.
- [11] 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, pp.1266-1274, 2016.
- [12] Ueda T., and Igarashi O., “Deteminatino of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC-pretreatment of samples and extraction of tocopherols”, *J. Micronutr. Anal.*, 7, pp.79-96,1990.

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下では溶解せず、生体内の局所伝達に極めて困難である。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（図1）。本化合物 **1** は、光照射下において活性酸素の発生が確認されたが、同様の条件で光照射時においても $0.2 \mu\text{M}$ の濃度では細胞障害性が確認されなかった。これは化合物自身の水溶性が低いことに起因することが推定され

たため、水溶性の官能基を有した化合物 **2** について合成を行い、活性酸素の発生能力、細胞障害性について検討を行った。その結果、合成した化合物 **2** は一重項酸素の発生量が他のフラ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、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^[1]。

さらに、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なったため、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 **5**（図2）の類縁体で細胞核内へも存在していることを明らかとした^[2]。

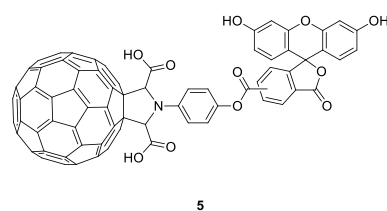


図2 蛍光性フラーレンの構造

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。

それぞれの化合物についての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（スーパーオキシド））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）。

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 **5** の合成をお

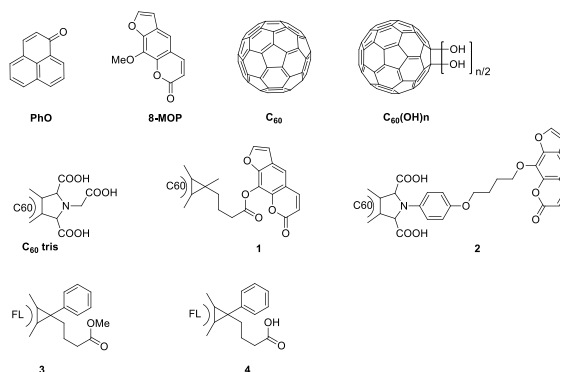


図1： 被験物質の化学構造

こなった。この化合物 **5** 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 (図 3)。まずメトキシソラレンを脱メチル化後、ブ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ブ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。

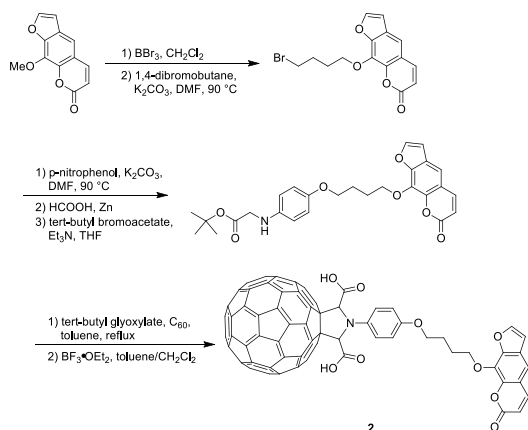


図 3：化合物 **2** の合成経路

化合物 **2** の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 4 に示すように、今回合成した化合物 **2** は一重項

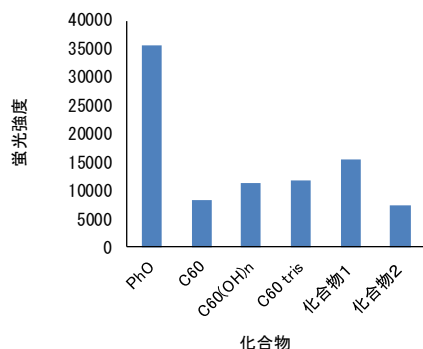


図 4 種々のフラーレン誘導体の一重項酸素発生能力の比較

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 (図 5)。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、非照射時に比べて約 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。

一方、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、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 6 に示す。C60(OH)n や C60 tris 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。

C60(OH)n や C60 tris では一重項酸素およびヒド

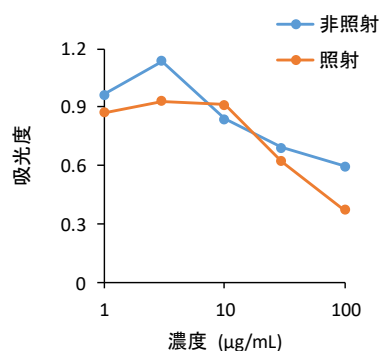


図 5 化合物 **2** の細胞毒性結果

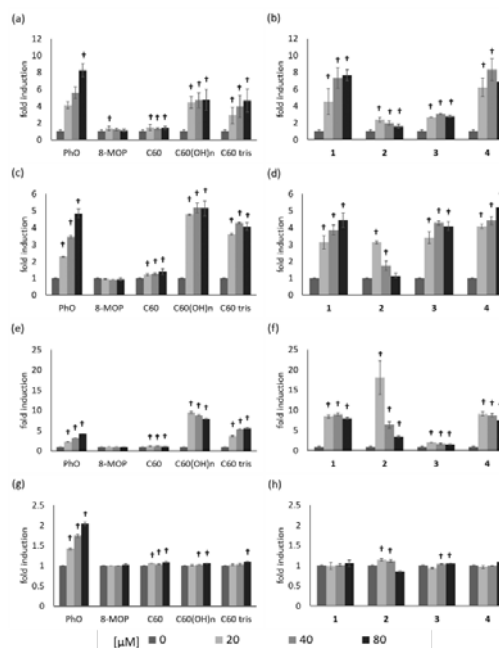


図6 Results of ROS-producing ability using several detection reagents. (a), (b): SOSG, (c), (d): APF, (e), (f): HPF, (g), (h): BES-so. †: $p < 0.05$ in student's t-test vs a value at $0 \mu\text{M}$.

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では同様の傾向が現れたが、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。またスーパーオキシ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。

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^[3]。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7(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7(c))。一方、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$ 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7(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7(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いいため、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いため、DNAを有意に攻撃できないことが推定される。

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5を用いて検討した。

化合物5の合成は以下に行った(図8)。ニトロフェ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。ブromo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9とした。シリル基を脱保護後、フルオレセイン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5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 $m/z = 719.97$ [C_{60}] $^+$, 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5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。

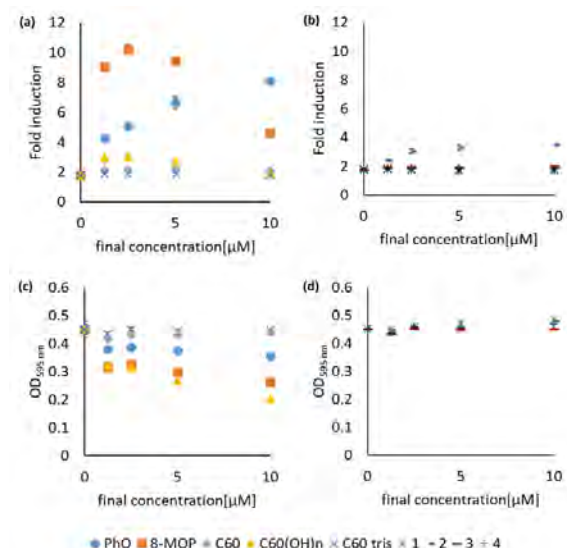
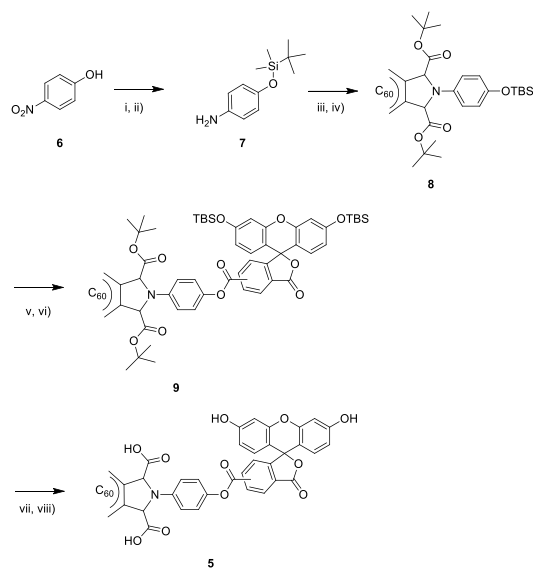


図7 Result of umu test. These graphs represent (a), (b) LacZ units, and (c), (d) $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$.

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5については蛍光波長がもともとの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セインの約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5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



i) Et₃N, TBDMSCl/CH₂Cl₂, ii) Pd/C, H₂/MeOH, iii) Et₃N, *t*-butyl bromoacetate, iv) *t*-butyl glyoxalate, fullerene/toluene reflux, v) TBAF AcOH/THF, vi) DCC, DMAP 3',5'-TBS-*O*-fluoresceine carboxylic acid, vii) TBAF AcOH/THF, viii) BF₃OEt₂/toluene, CH₂Cl₂

図 8 化合物 5 の合成ルート

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 0~40unit/ml の濃度範囲ではフルオレセインジアセテート（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 6 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 6 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いるが、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 6 の核への集積が観察された。（図 9）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

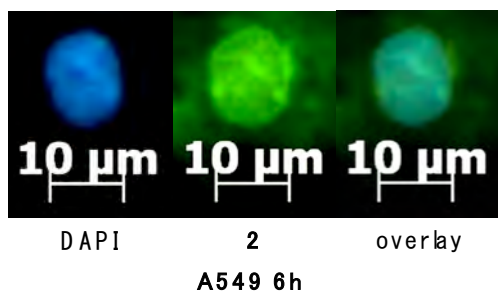


図 9 化合物 5 の核への局在

細胞内局在試験を BODIPY 蛍光団を有するフラーレン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と思われる。

4. 達成したこと

種々のフラーレンを合成し、それらの細胞傷害性を明らかにした。特に蛍光フラーレンの合成に成功し、それらが細胞核内へ以降する可能性を示すことができた。また種々のフラーレンの活性酸素種の発生と遺伝毒性試験を行い、それぞれの化合物の特徴を明確とし、今後の類縁体合成についての知見を得ることができた。一方で、動物を用いた実験は現在まだ進行中である。合成の収率の低さがネックとなり現時点で大量合成できる道筋がまだ得られていない。今後、大量合成できる合成ルートを確認することが必要である。

5. 参考文献

- [1] Hashimoto A, Takamura-Enya T, Oda Y. "Synthesis and In Vitro Biological Evaluation of Psoralen-Linked Fullerenes", Photochem. Photobiol., 95, pp.1403-1411, 2019.
- [2] Hashimoto, A., Yamanaka, T. & Takamura-Enya, T. "Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties", J. Nanopart. Res., 19, 402, pp.1-13, 2017.
- [3] 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, 26, pp.499-505, 2011.

表面無機抗菌材料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/I および Cu/I 処理シリコン膜の調製

シリコン膜（50×50 mm, 膜厚 0.3 mm, ASONE）を異なる濃度の I₂-KI 溶液（I₂: 0.030～0.15 M, KI: 3.3 M）に浸漬後、AgNO₃ 溶液（0.25～1.0 M）に浸漬し、Ag/I および Cu/I 処理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 Ag/I シリコン膜および Cu/I シリコン膜の抗菌活性値(R)を以下の式で求めた。

$$R = \log(B/A) - \log(C/A) = \log(B/C)$$

R: 抗菌活性値

A: 無加工試験片の接種直後の生菌数 (CFU)

B: 無加工試験片の 24 h 後の生菌数 (CFU)

C: 抗菌加工試験片の 24 h 後の生菌数 (CFU)

c) 力学的強度、SEM 観察および耐久性試験

調製した Ag/I シリコン膜および Cu/I シリコン膜をダンベルカッターで定型に切り取り試験片（平行部長さ: 3.7 mm）とした。引張速度 100 mm/min で一軸延伸し、応力-ひずみ曲線を作成し、初期勾配よりヤング率 *E* を求め、膜の力学的強度を評価したの応力-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。

Ag/I シリコン膜および Cu/I 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、Ag/I シリコン膜および Cu/I 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 Ag/I シリコン膜あるいは Cu/I 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 Cu²⁺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。

f) 加湿器への応用

2 つの同型の加湿器を用い、一方の加湿器には付属の除菌剤を、もう一方には作成した Ag/I シリコン膜を加湿器内部に置いた。2 週間おきにフィルターと接触している部分における水中の生菌数を求め、付属除菌剤と Ag/I シリコン膜の抗菌作用を継続的に比較した。

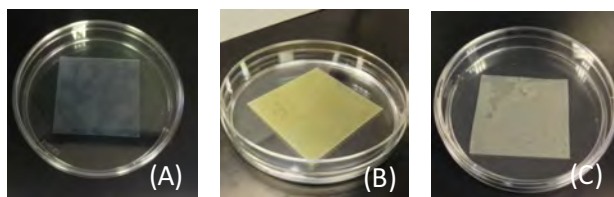


図 1 CuI/シリコン膜の調製 (A) 未処理のシリコン膜, (B) I_2 -KI 溶液浸漬後, (C) $CuSO_4$ 溶液浸漬後

表 1 $AgNO_3$ および $KI-I_2$ の処理濃度の影響

I_2 [M]	$AgNO_3$ [M]	24h後の生菌数 [CFU/サンプル]	抗菌活性値 [-]
0.15		N.D	>6.0
0.12	1.0	2.5×10^2	5.6
0.080		1.35×10^3	4.9
0.030		5.19×10^4	1.3

	0.75	N.D	>6.0
0.15	0.50	N.D	>6.0
	0.25	N.D	>6.0

(コントロール 9.85×10^7 CFU/サンプル)

表 2 $AgNO_3$ および $KI-I_2$ の処理時間の影響

$KI-I_2$ [h]	$AgNO_3$ [h]	24h後の生菌数 [CFU/サンプル]	抗菌活性値 [-]
12		N.D	>6.0
6		N.D	>6.0
3	24	5.50×10^2	4.9
2		2.72×10^6	1.3
1		2.65×10^7	0.26

	12	N.D	>6.0
	6	1.33×10^4	2.6
24	3	6.80×10^5	1.8
	2	4.70×10^5	2.0
	1	4.60×10^5	2.0

(コントロール 4.80×10^7 CFU/サンプル)

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 は白色であり、EDX 分析により AgI および CuI の存在が確認された (図 1)。

表 1 にシリコン膜への $AgNO_3$ および $KI-I_2$ の浸漬処理濃度が *S. aureus* に対する抗菌活性値に及ぼす影響を示す。抗菌活性値は 2 以上で有効と判定される。 I_2 濃度が高くなるにつれて抗菌活性値は上昇し、0.15 M で *S. aureus* は検出限界以下 ($<10^2$ CFU) となった。よって $KI-I_2$ は 0.15 M- I_2 を以後の調製条件とした。 $AgNO_3$ 濃度を変えても抗菌活性値は >6.0 以上であり、シリコン膜への I_2 の含浸量が抗菌活性を決定することが分かった。

表 2 に $AgNO_3$ 及び $KI-I_2$ の処理時間の抗菌活性値に及ぼす影響を示す。 I_2 処理時間を変化させた所、6h で検出限界以下 ($<10^2$ CFU) となった。次に $AgNO_3$ 処理時間を変化させた所 12 h で検出限界以下 ($<10^2$ CFU) となった。CuI/シリコン膜

表 3 抗菌活性値

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

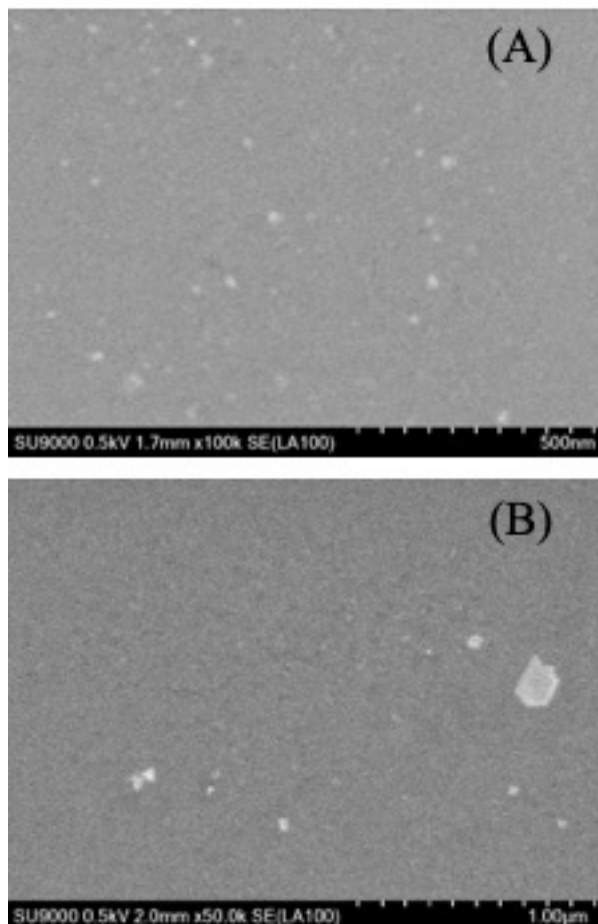


図 2 金属ナノ処理したシリコン膜の SEM 写真. (A) AgI シリコン膜, (B) CuI シリコン膜

についても同様に決定した。以上の結果より、より短時間で簡便な製膜条件を見出す事ができた。

b) 抗菌活性

表 3 に a) において決定した条件で調製した 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

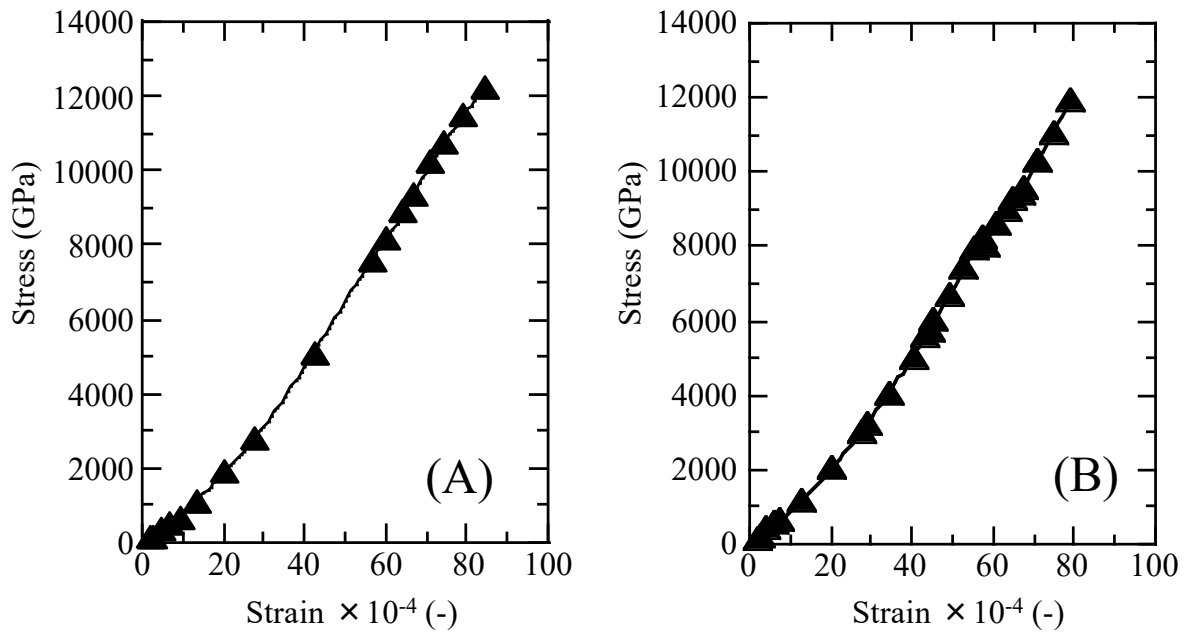


図3 応力-ひずみ曲線 . (A)未処理シリコン膜, (B) AgI/シリコン膜

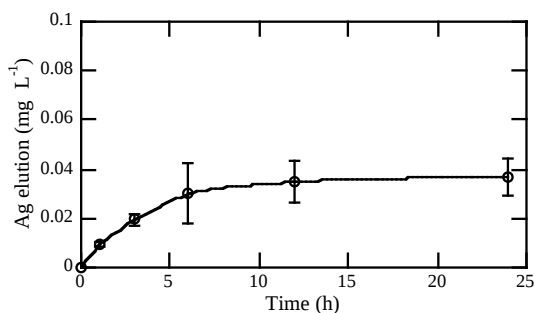


図4 AgI/シリコン膜からのAg⁺の溶出

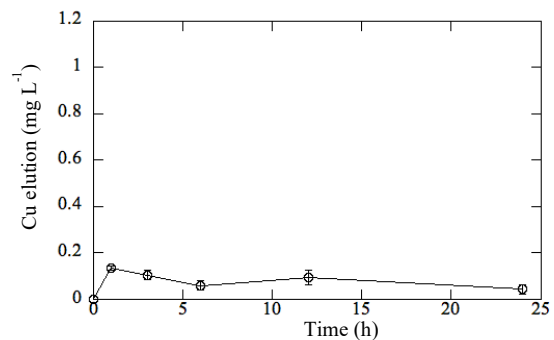


図5 CuI/シリコン膜からのCu²⁺の溶出

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

図2にAgI/シリコン膜およびCuI/シリコン膜のSEM写真を示す。AgI/シリコン膜では10 nm程度、CuI/シリコン膜では数10 nm～200 nm程度の粒子が、シリコン表面上にアイランド状に形成していることが分かった。

d) 力学的強度および耐久性

未処理シリコン膜とAgI/シリコン膜の応力-ひずみ曲線を図3に示す。応力-ひずみ曲線に殆ど差異はなく、曲線の初期勾配より求めたヤング率を求めた結果、未処理膜： 7.9 ± 1.2 MPa、AgI/シリコン膜： 8.3 ± 1.5 MPa、およびCuI/シリコン膜： 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/シリコン膜およびCuI/シリコ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

図4にAgI/シリコ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後でも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(図5)。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/シリコン膜の分離能

AgI/シリコン膜に対する 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った ($P > 0.05$)。AgI/シリコン膜は透過・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ン膜に対する抗菌処理方法は、特別な装置が不要、さらに室温での実施が可能な浸漬処理であり、膜以外のシリコン材料に対しても適用が可能な手法といえる。

g) 加湿器への応用

加湿器への応用として継続実験を行った。表 4 に加湿器におけるフィルター部の水中の生菌数変化を示す。2 および 4 週間後の結果において、AgI/シリコン膜を使用した加湿器は付属の除菌剤を使用した加湿器より、フィルター接触部の水中の生菌数は約 2 オーダー少なく抑制され、AgI/シリコン膜は加湿器等の微生物制御において使用できる可能性が見出された。

3. CVD 法により各種基材表面に合成した ZnO 薄膜の抗菌特性^[6]

近年、高機能材料としての酸化亜鉛(ZnO)が注目されている。特に抗菌活性については、ZnO ナノ粒子による繊維やガラス、プラスチック類への加工に関する報告が多くなされている。本研究では、化学気相成長 (Chemical Vapor Deposition, CVD) 法により各種基材表面上に ZnO 薄膜を合成し、抗菌活性を評価すると共に、その特性を比較した。

3.1. 研究方法

$Zn(C_2H_5)_2$ と H_2O を原料に用いた減圧 CVD 法により、シリコンおよびガラス表面上に ZnO 薄膜を形成させた。シリコン膜では 160°C で膜厚 200 nm および 1600 nm、ガラス基板では 160°C で膜厚 100, 200, 500, 1600 nm, 180°C で 1600 nm の試料を作製した。

抗菌性の評価は JIS Z 2801 に準じ、一部改変して行った。作製した試験片と菌液を 24 時間接触させた後、抗菌活性値を評価した。

3.2. 結果及び考察

CVD 法により作製した ZnO/シリコン膜の抗菌活性を評価した。抗菌活性値は 2.0 以上で有効と判断する。フレキシブルで耐熱性が低い (<160 °C) 基材表面上においても、CVD 法により

表 4 加湿器内の水の生菌数変化

抗菌剤	加湿器内の水の生菌数(CFU/mL)		
	3 日	2 週間	4 週間
AgI/シリコン	3.0×10^3	5.0×10^3	5.8×10^3
付属除菌剤	2.0×10^5	3.3×10^5	2.0×10^5

0 日目：水道水のため検出限界以下 < 10^2 CFU/mL

ZnO 薄膜の作製が可能であった。XRD による評価では、シリコン膜上の 200 nm 膜はランダム配向の傾向が強く、膜厚が厚くなる(1600 nm)につれて、(001)配向が選択されていくように見えた。

この ZnO 膜厚 200 nm と 1600 nm の ZnO/シリコン膜を用いて、*S. aureus* に対する抗菌活性値を評価した。いずれの膜厚に対しても十分な抗菌活性値(>4.3)が認められた。ZnO については、グラム陰性菌よりもグラム陽性菌に対して強く作用することが報告されているが、本研究において作製した ZnO 薄膜では、グラム陰性菌である *E. coli* に対しても高い活性を発揮した。

ZnO/ガラスでは、160°C と 180°C で形成した膜(1600 nm)と比較すると、低温(160°C)で作製する方が ZnO 結晶のランダム配向の傾向が強くなった。*S. aureus* に対する抗菌活性値も 160°C の方が高くなり、ZnO 結晶のランダム配向の傾向が強いほど、抗菌活性が高くなる傾向は、シリコン膜の場合と一致した。また、160°C で形成した ZnO 薄膜では、すべての膜厚で十分な抗菌活性値 (> 2.0) が認められたが、膜厚 (0.1~1.6 μ m) を厚くするにつれて抗菌活性値が大きくなり、膜厚依存性が認められた。この膜厚依存性の原因は現在のところ不明である。

以上により、CVD 法により、シリコンやガラス表面上に抗菌性 ZnO 薄膜を、比較的低温で合成することが可能であった。ZnO 薄膜のランダム配向性の強い方が抗菌活性が高く、低温で成膜する方が有利である可能性が示唆された。

4. 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^[7]。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。

4.1. 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。

4.2. 結果および考察

a) 銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体

図 6 に、透過型電子顕微鏡で観察した空のシャペロニン複合体と銀ナノ粒子内包シャペロニン複合体を示す。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。図 6(B)において白頭矢の部分に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

表 5 に *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 を示す。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 ATP 添加ありで 0.0025 mg/mL、添加なしでは 0.00125 mg/mL まで 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。

5. まとめ

微生物細胞は容易にシリコン材料表面に付着し、バイオフィルムを形成するため、シリコーン

ン膜への抗菌活性の付与が強く求められている。本研究では、常温・常圧でのヨウ素溶液、金属塩水溶液への浸漬処理というシンプルな 2 ステップの操作で、シリコーン膜の機械的特性、透過特性を維持し、AgI/シリコーン膜および CuI/シリコーン膜を作製が可能であった。本研究で示したシリコーン膜に対する抗菌処理方法は、特別な装置も不要であり、膜以外のシリコーン材料に対しても適用が可能である。

ZnO についても、シリコーン膜などの素材表面

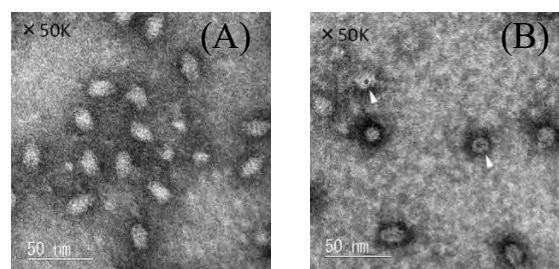


図 6 シャペロニン複合体(A)および Ag ナノ粒子内包シャペロニン複合体(B)

表 5 *E. coli* に対する Ag ナノ粒子内包シャペロニンの抗菌活性

試料 / 濃度(mg/mL)	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.00125	0.000625
Agのみ	ATPあり	+	+	+	+	+
	ATPなし	+	+	+	+	+
GroEL + Ag	ATPあり	N.D.	—	—	+	+
	ATPなし	N.D.	—	—	—	+

への抗菌性薄膜合成が求められている。本研究では CVD 法を用いることにより、従来より低い合成温度で、シリコーン膜のようなフレキシブルで耐熱性が低い基材表面上においても、高い抗菌性を有する ZnO 薄膜を形成することが可能であった。この内容は企業との共同研究により特許[6]を取得した。

また、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、新たな抗菌処理法としての可能性が見出された。

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*, 23, pp. 97-105, 2018.
- [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] 座間秀昭、澤井淳：「シリコン基材に酸化亜鉛の薄膜を形成させる新しい製造方法」特許第 6564994 号.
- [7] 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.

FIA を用いた酵素活性評価法の構築と天然化合物のスクリーニング

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配向性を持たせた酵素固定化法を組み合わせた 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、5) エピジェネティック評価用の素子の開発とその応用について取り組んだ。

2. マイクロフローシステムの構築と配向性を持たせた酵素固定化法を組み合わせた β -セクレターゼ活性評価法の開発とその阻害剤の探索

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^[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^[2]。固定化後、SPM により観察を行い、ストレプトアビジンを融合させることにより配向性を持たせられることが確認できた。また、微小化させたため、拡散を防ぎかつ短時間での活性評価を来な得ることが示された(感度で 4 倍、時間にして 1/10)。また、当該計測システムを用いて阻害剤探索を行った結果、図 1 に示す新規化合物 5 種において β -セクレターゼの阻害能があることを見出した。

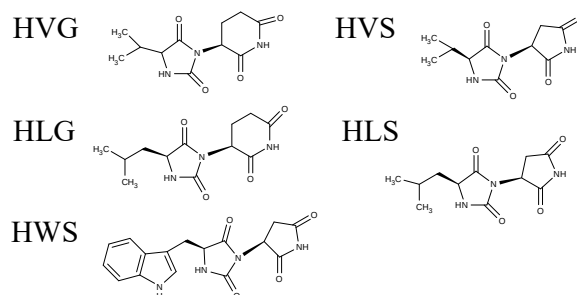


図1 Novel compounds obtained β -secretase inhibition activity.

3. 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

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評価した。

4. 先端成長評価法の開発と抗真菌活性物質の探索

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が、上市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、真菌の先端成長に必須なグルカナー

ぜを対象に輸送系を評価する手法を開発し^[3]、その阻害剤の探索を試みた。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、輸送されずに小胞の状態で留まるもの(図 2-A))や、先端に局在せず全体に分散しているもの(図 2-B))など 9 種の抽出物(ウバイ、オウハク、カシ、カコウ、クロモジ、ケイガイ、ケイケツトウ、ゴミシ、シンギョウ)から有意な阻害活性を得た^[4]。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 であることが示唆された。

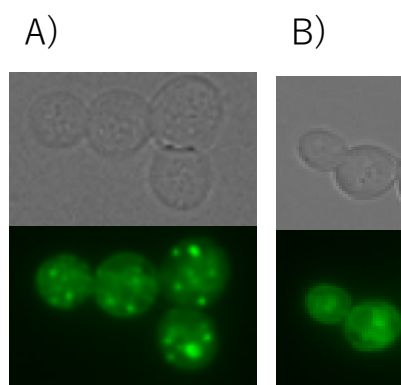


図2 Observation of the localization by treatment with extract of *Schizonepeta tenuifolia*(A) and *Lindera umbellata*(B).

5. 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。135 種類の生薬抽出物を対象にスクリーニングを行った結果、8 種類の生薬抽出物(ジンギョウ、シコン、ジブチ、スギナ、タラコンピ、ヒカイ、モッコウ、ラブシ)に有意な阻害活性を見出すことができた^[5]。これらの抽出物を悪性黒色腫由来のメラノーマ細胞に作用させた結果、全ての生薬抽出物においてアポトーシスを誘導する結果を得ることができた。当該方法を用いて、遠志に含まれるアポトーシス誘導物質の単離・同定を試みた結果、カウレンおよびカジレンである可能性が示唆された。

6. 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 DNA メチル化を塩基ベースで解析できる方法はバイサルファイトシーケンシング(BS-seq)のみであるが、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 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分析法の開発を行った。Dnmt1 のサブクローニングを行い、646-1616 番目までのアミノ酸残基で構成した組換え Dnmt1 より *de novo* 活性がなく維持型の活性のみを有する結果が得られた。当該酵素を用いてチロシナーゼのプロモーターのメチル化評価に本法を用いたところ、従来の BS-seq では 4 箇所すべての CpG がメチル化状態であったが、本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、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^[6-8]。

7. 参考文献

- [1] Y. Iida, “Flow injection analysis of β -secretase activity by using of immobilized recombinant fusion β -secretase and application of the system for the inhibitor” PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, USA, 2015.
- [2] 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, pp.48-50, 2016.
- [3] 喜田亜由美、池田貴幸、瀬戸大貴、飯田泰広, “既存抗真菌剤の β -1, 3-グルカンナーゼ過剰発現組換え酵母 への影響評価”, 薬学雑誌, 138, pp.837-842, 2018.
- [4] 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.
- [5] 飯田泰広、齋藤宇伸、長谷部佑亮、濱幸菜、城本春菜, “被験物質が有するサバイビンとサバイビン以外のタンパク質との複合体形成阻害作用の評価方法及び複合体形成阻害剤”, 特願 2019-205065.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 飯田泰広、吉川僚汰、前田翔大, “改変型 DNA メチル化酵素及びそれを用いた DNA メチル化解析法”, 化学工業, 71, in press.

細胞培養状態観察システムおよび DDS 開発を目的とした血管内カプセルの動的検出システムに関する研究

武尾 英哉^{†1}, 安倍 和弥^{†2}

^{†1} 神奈川工科大学 電気電子情報工学科 教授

^{†2} 神奈川工科大学 バイオメディカル研究センター ポスト・ドクター

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.

DDS 開発支援にあたり, 薬剤政策における細胞培養に対する開発支援として, コンピュータ支援画像診断 (CAD) 技術を用いて, 細胞検出を行い画像内における小核の有無および個数の計測システム, 細胞の蛍光画像より正常な細胞と異常な細胞を判別するシステムの研究を行った.

また, 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 CT 画像を基にしたカプセルの動的検出処理の開発を行った.

2. 研究方法

2.1 小核・細胞検出システムの開発^[2-4]

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.

開発した小核・細胞数検出の流れを図 2 に示す.

初めに 24bit のカラー画像から Green 要素のみを抽出しグレースケール化を行う. その後, 階調変換処理により細胞核の周辺領域を除去する. この画像に対し二値化処理を行い, 細胞のみを抽出した画像を作る. 小核は, 他の細胞の近隣に発生するものであることを利用し, サイズおよび近隣細胞との距離から小核の個数計測を行う. その後, モフォロジー処理の収縮処理を用いて結合した細胞の分離を行う. 収縮処理とは, 抽出した領域を一回り小さく縮小する処理である. 結合した細胞核が団子状になっている場合などでは, 数度の収縮を行うことにより分離することができる.

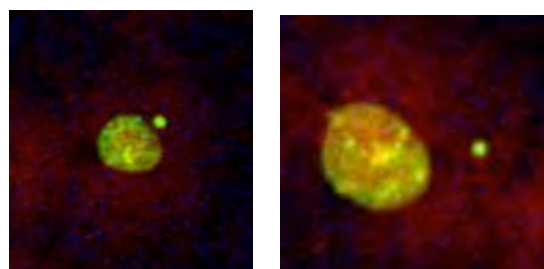


図 1 小核

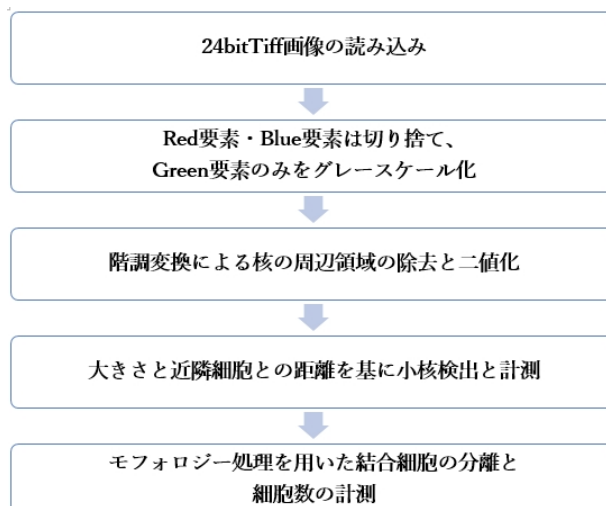


図 2 開発した小核・細胞検出システムの流れ

2.2 小核・細胞検出システムの改良^[5]

2.1 節で開発した検出システムでは, モフォロジー処理の収縮処理を用いる手法で結合した細胞の分離を行っていた. しかし, 細胞同士が完全に結合してしまった場合や 3 つ 4 つの細胞が接合した場合などで分離がうまく行えない問題や, 複数回の処理が必要であり画像当たりの処理時間が長いという問題を抱えていた. よって, 新手法においては細胞の分離精度の向上による検出精度の向上と高速化に主眼を置き開発を行う.

今回開発した手法では, ハフ変換を応用した形状抽出手法を取り入れ, 複数の細胞が結合してしまったものに対して, 円形で抽出することにより個々の細胞を分離する手法を用いる. ハフ変換とは, 図形のエッジを特徴点として, その特徴点を通る最適な線を決定するものである. 今回は円検

出を用いたため、特徴点に最適な円を検出することができる。これにより結合した細胞のままだでも円形状の切り出しにより細胞同士を分離しての計測が可能となる。

小核・細胞数検出の流れを図3に示す。

初めに24bitのカラー画像よりRed要素を切り捨て、Green要素とBlue要素を基にグレースケール化を行う。その際、Blue要素はノーマライズを行う。ノーマライズとは、ヒストグラムを引き延ばすことにより画像全体の明るさを調整する手法である。これにより元画像内ではGreen要素に比べて微量であるBlue要素が強調され細胞核のみが強調されたグレースケール画像が作成できる。その後、階調変換処理により細胞核の周辺領域を除去する。この画像に対し二値化を行い、ハフ変換を用いた円形状の検出を行う。また、同じ二値化画像に細線化を行い、細線化画像を作成する。この2枚を重ねることにより小核の検出を行う。これにより、画像上にて他の細胞核と結合してしまった小核を分離して計測することが可能となる。細胞数のカウントは、二値化画像から検出した小核の領域を除外したものを作成、その画像に対し再度ハフ変換を行う。円の検出結果から重なり合った検出領域を除外した検出数が細胞の検出数となる。

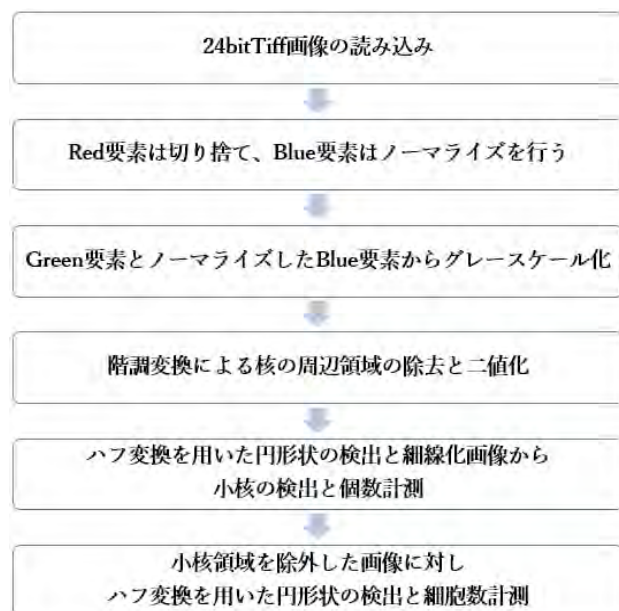


図3 改良した小核・細胞検出システムの流れ

2.3 細胞の蛍光観察処理

蛍光染色を行うことにより、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4)、それが正常に培養されているかを判別する処理の開

発を行う。培養状況や異常の種類の検討に利用ができる。画像のRGB情報より、細胞領域、蛍光領域、自家蛍光の領域を判別し情報の提供を行う。

入力画像をRGBの各要素に分離し、Green要素とGreenとRed要素からなるYellow要素とに分けて領域の検出を行う。蛍光は緑に発色し、自家蛍光は黄色(黄土色)になる点を利用して分離を行う。

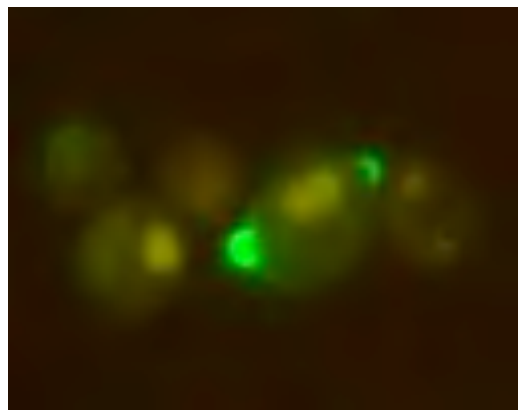


図4 細胞の蛍光画像

2.4 培養細胞の異常分類システム^[6,7]

細胞の正常・異常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って判別器を作成する。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5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特定を行う。

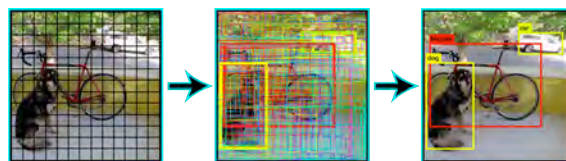


図5 yoloの検出処理の流れ

分類は初めに2分類(正常・異常)で評価を行った後、今度は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。

検出の流れを、図6を用いて説明する。先に述べた通り、事前に各分類(画像では6分類)にてCNNに学習を行わせて判別器を作成する。その判別機に評価対象として画像を与える。その際に

CNN は学習結果を基に候補検出画像を作成する。マスクごとに CNN が確信度のスコアを出力するため閾値を超えたもののみを残すことで結果画像を作成する。

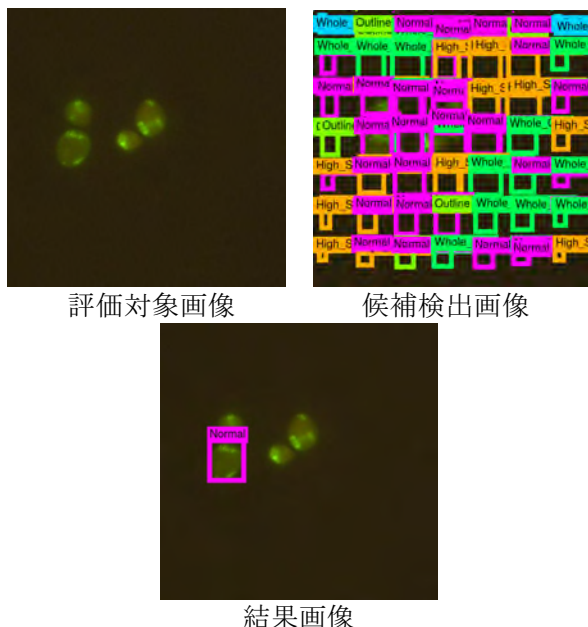


図 6 CNN による検出の流れ

2.5 単体の人工カプセル画像の作成^[8,9]

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 7 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 7 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 8 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 8 人工カプセルの 3D 画像

動的検出処理には CNN の Single Shot MultiBox Detector (SSD) を基に開発を行った。これは自動運転で良く見るようなリアルタイムの物体認識を行うことができ、流れるカプセルの検出に適したものといえる。

2.6 群体の人工カプセル画像の作成

2.5 節では 3mm の単体のカプセルと仮定して埋め込みを行った。しかし、実際では極小カプセルの集合体であり、ばらつきがあることが想定される。そこで、埋め込み対象の領域内に乱数を用いて 1 ピクセル(実寸では約 0.6mm)のカプセルをランダムに埋め込み作成を行う。動的検出の手法については 2.5 節で開発した手法を応用し、学習のデータを群体のものと差し替えて学習を行う。群体の人工カプセルを埋め込んだ画像を 3D にしたものを図 9 に示す。



図 9 群体の人工カプセルの 3D 画像

3. 結果および考察

開発した各システムの結果について述べる。

3.1 小核・細胞検出システム

作成した検出システムを図 10 に示す。図 11 左のアプリ名に使用する exe、画像名に処理する元画像を設定し実行を行うと自動で細胞核数と小核数を検出する(図 11 右)。元画像と検出した小核を円で囲み示した画像を横並びで表示し結果

を見やすくした。実際の小核の抽出部を拡大したものを図 12 に示す。

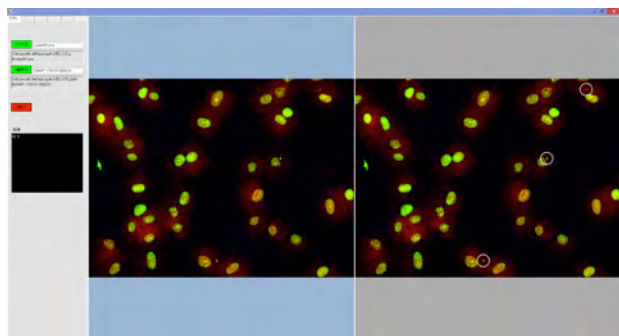


図 10 小核検出システム



図 11 ユーザインターフェイスと検出結果

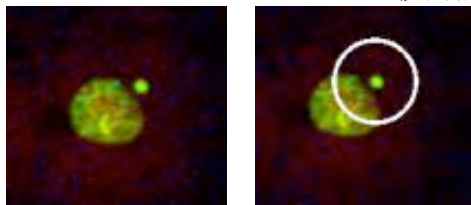


図 12 小核の検出結果

3.2 小核・細胞検出システムの改良

改良したシステムの UI を図 13 に示す。旧版は画像ごとの処理であったが、フォルダを指定(図 14)し一括で処理を行うことで、使用の簡易化を図った。また、表示倍率のより細かい変更や、連続表示機能などを追加し使用感の向上を図った。

細胞の検出結果を図 15、小核の検出結果を図 16 に示す。

2.2 節で述べたように検出処理の見直しを行ったことにより、複数結合してしまった細胞の個数計測という問題が解決できた。

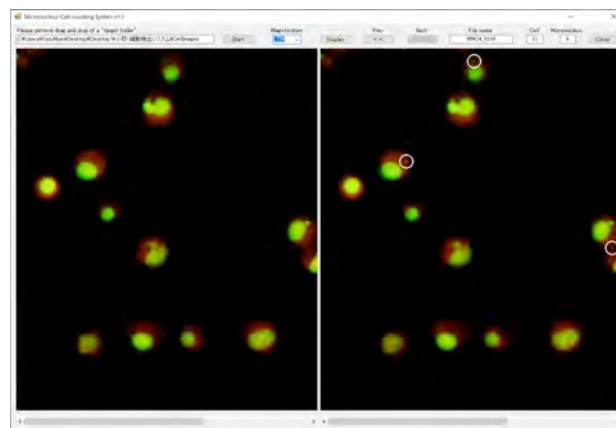


図 13 改良型小核・細胞検出システム



図 14 ユーザインターフェイスと検出結果

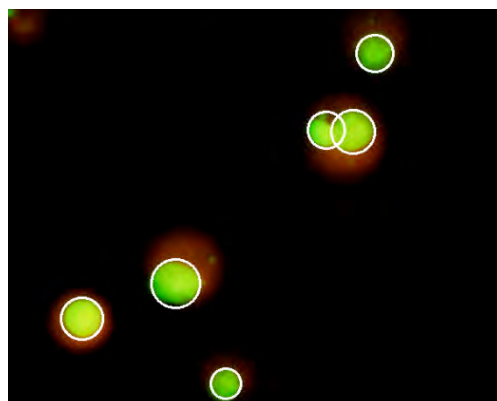


図 15 細胞の検出結果

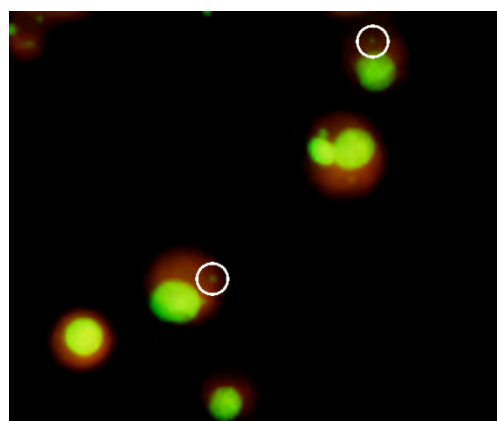


図 16 小核の検出結果

3.3 細胞の蛍光観察システム

作成した蛍光観察システムを図 17 に、拡大した UI 部分を図 18 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 19)。

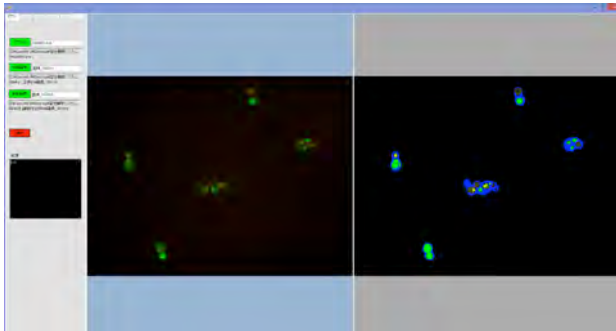


図 17 蛍光観察システム

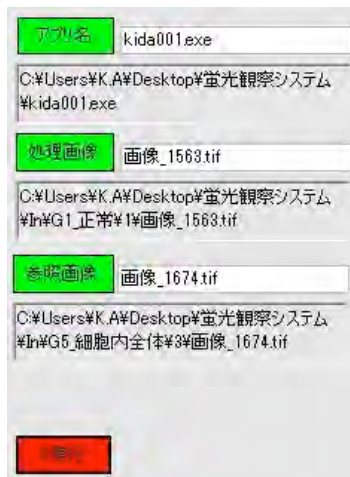


図 18 ユーザインターフェイス

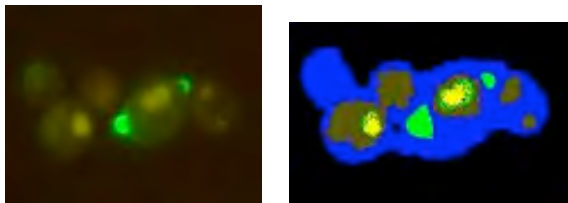
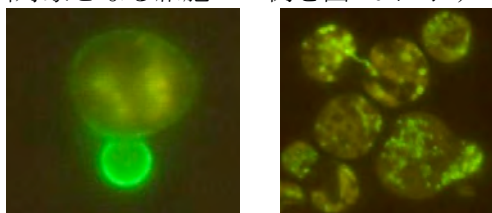


図 19 蛍光の識別結果

3.4 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 20 に示す。



正常 異常
図 20 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。6 分類の検出画像の 1 例を図 21 に示す。

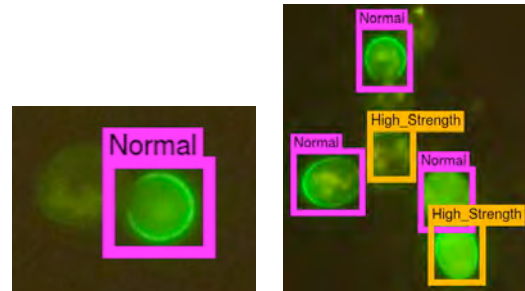


図 21 検出結果

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。

3.5 単体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 22 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 22 分岐路でのカプセルの流れ

3.6 群体カプセルの動的検出処理

3.5 節で検討を行った特徴量について群体カプセルの人工画像を作成し検討を行った。

群体カプセルの検出結果を図 23 に示す。乱数

を用いてランダムな形状に作成した群体のカプセルにおいても機械学習により動的に検出することが可能であった。

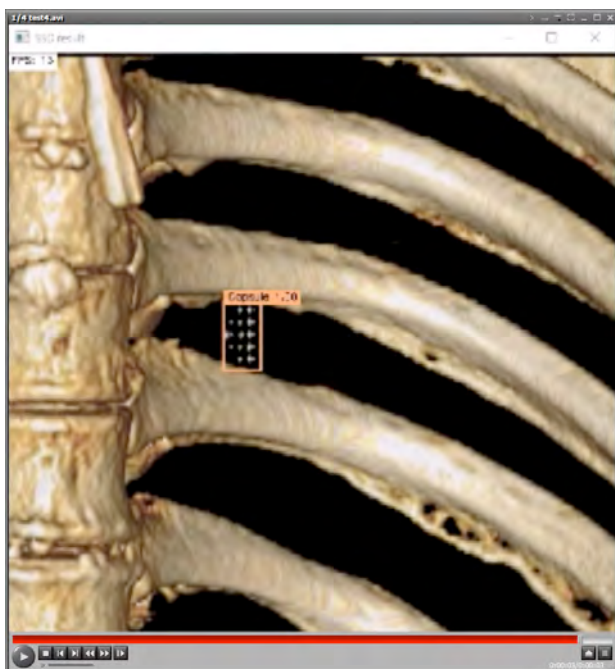


図 23 群体カプセルの動的検出

4. まとめ

本研究では、DDS 開発の支援を目的として細胞の培養状況の観察に関するシステム並びに人工カプセルを用いての血管内カプセルの動的検出システムについての研究を行った。

細胞培養の観察としては、小核検出システムの開発と培養細胞の正常・異常判別システムの開発を行った。小核検出に関しては、旧版と改良版の 2 種類のシステムをリリースし、特に後者では結合した細胞の分離制度の向上などから有効性が確認できた。また、正常・異常細胞の分類においても学習症例の少なさから検出が難しい分類もあったが、CNN による細胞分類の有効性が確認できた。

人工カプセル画像を用いた血管内の動的検出については、単体・群体での人工カプセル画像にともに動的検出が可能であった。特に単体のカプセルでは、枝分かれした血管の流れを再現して埋め込んだ場合においても問題なくカプセルを検出できた。群体カプセルにおいては、乱数を用いたランダム形状で埋め込んだ場合でも問題なく検出が行えることが確認できた。

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), pp. 1-5, 1996.
- [2] 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, pp. 16-10, 2010.
- [3] 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, 92(9), pp. 495-499, 2014.
- [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] Adrian K, Gary B: 詳解 OpenCV3. O'REILLY, 東京, 2018.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 安倍和弥, 武尾英哉, 黒木嘉典, 他, ”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”, Med Imag Tech, 35, No.2, pp.110-120, 2017.
- [9] Wei L, Dragomir A, Dumitru E et al: SSD: “Single Shot MultiBox Detector”, Computer Vision and Pattern Recognition, arXiv: 1512.02325, 2015.

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^{†1}, 上平 員丈^{†2}

^{†1} 神奈川工科大学情報 ネットワーク・コミュニケーション学科 教授

^{†2} 神奈川工科大学情報 ネットワーク・コミュニケーション学科 教授

1. 背景と目的

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」の中で、本研究課題ではバーチャルリアリティ（VR）技術を活用した分子設計支援システムの開発をめざした。具体的には、高臨場感表示が可能なディスプレイを用いて、分子モデルの3次元表示を行った。これにより標的タンパク質分子の3次元構造の理解度を向上させて、それを新しい分子の設計へと結びつけることを目標とした。

バイオ機能材料素材であるタンパク質分子の機能は、その分子の立体構造と密接に関係している。そのため、タンパク質分子の立体構造を解析して作用機作を理解することは、現在のバイオサイエンスの研究では基本的で重要なテーマである。例えば、疾病に関わるタンパク質の構造情報をもとに薬を設計する創薬戦略は新しい研究基盤技術として期待されている。

これまでは、X線結晶構造解析などで明らかになった3次元構造データを3DCG（3次元コンピュータ・グラフィックス）でパソコン画面上に表示することで構造理解を進めてきた。例えば、分子CGツールPyMOL^[1]は高速・多機能な3DCG表示ツールとして多くの研究者に利用されている。しかし、PC画面上での表示では、分子構造の立体感が乏しく、特に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を得にくいなどの課題があった。

VR技術は3DCGで表示された仮想空間を、まるでそこに実物があるように感じさせる情報メディア技術である。特に近年発展した没入型ディスプレイでは、ユーザ視野を広く覆う映像表示により、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ようになった。

本研究課題では、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（人間サイズ）で表示することで、分子の設計に有用なツールになると考えた。そして、このソフトウェアツールを実現するための、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

2.1 表示システム基本構成

研究用の表示システムの基本構成図を図1に示す。本システムは、タンパク質分子3次元構造データを読み込み、3DCGとして没入型映像ディスプレイに表示するものである。

分子モデルデータにはタンパク質構造データベースPDB^[2]の形式を想定して、クラウド上データベース（例えば、PDBサイト（Protein Data Bank：<http://www.rcsb.org/>））、または研究室内のローカルPCから構造データを取得するものとした。

データ変換部はPDB構造データから3次元CGモデル描画用データを生成する。空間表示部はCGモデルデータをもとに没入型ディスプレイへの3次元空間描画を行う。

仮想空間表示のための没入型映像ディスプレイとして、研究計画段階では、マルチスクリーン立体ディスプレイ（CAVE型ディスプレイ）と広視野没入型ヘッドマウントディスプレイ（HMD）を予定した。

2.2 研究計画

表示システムの開発において、本研究では次の3つのテーマに分けて研究を開始して、3年目後半以降はこれらの研究成果を統合したシステムでの研究を進めた。

- (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
- (3) 空間共有による共同研究技術

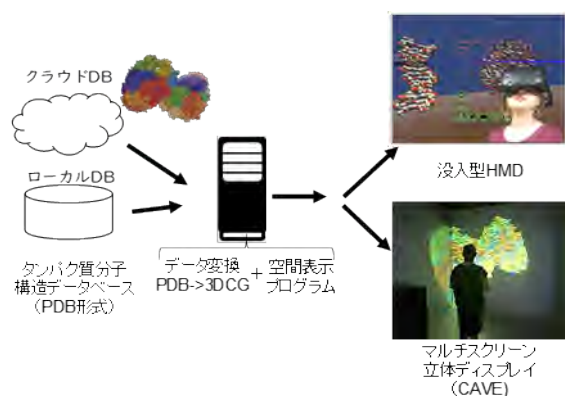


図1. 研究用表示システム基本構成図

研究の年次計画は表 1 のように予定した。

研究を進める際には、テーマ 1 のバイオメディカル・エンジニアリングのメンバー等、バイオ系研究者の意見を取り入れるようにした。そのため、試作されたソフトウェアのテスト・評価実験の共同実施 (図 2)、バイオ系研究会でのソフトウェアデモ展示などを積極的に行った。

表 1. 研究開発の進め方の当初計画

H27 年度: 既存ソフトウェアを用いた課題検討
H28 年度: タンパク質分子の没入型表示ソフト試作
H29 年度: 分子モデルとのインタラクション機能導入
H30 年度: 分子設計への応用の検討
H31 (R1) 年度: 開発したシステムの総合的な評価



図 2. 試作ソフトの評価風景

2.3 没入型ディスプレイの選定

表示システムとして、CAVE 型ディスプレイ (図 3) と広視野 HMD の両方に対応することで研究を開始した。しかし、研究 2 年目 (H28 年度) 後半以降は、高性能 HMD を用いるシステムのみを研究対象にした。

CAVE 型ディスプレイは、分子モデル CG を実際に人間サイズで表示できるため、実在感が大きい点が最大の特長で、また複数名の同時観

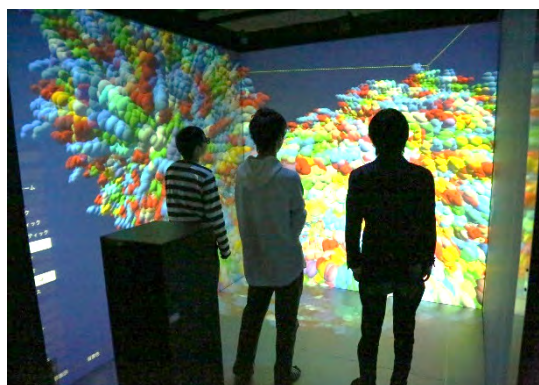


図 3. CAVE 型ディスプレイでの表示
(複数名同時観察が可能)

察が可能な点も利点である。一方でディスプレイシステムが非常に大きいために使用場所が固定されること、映像解像度が低いことが欠点であり、没入型ディスプレイとして大きな発展をしばらくは期待できないと判断した。

広視野・高性能 HMD は、研究開始の H27 年度から市販品での機能向上が図られ、映像品質の高さ、装置の軽量さ、低価格性などが飛躍的に発展した。これらは本システムがめざす方向と一致しており、将来的な実用化の点で有利と考えた。

3. 結果および考察

3.1 表示ソフト機能検討(PyMOL の HMD 表示)

PyMOL を HMD 表示可能なソフトウェア (図 4) を用いて、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。PyMOL は、現在、化学・バイオサイエンス分野の研究教育で広く利用されている分子 CG ツールである。これを高性能 HMD 上で表示することで、HMD 表示にどのような有用性があるかを PC 画面表示と比較して検討できると考えた。

使用したソフトウェアは、3DCG キャプチャソフト AVR (Fiatlux 社製) 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。

PyMOL 映像の 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。学生からの感想や意見としては、次のものが多かった。

- ・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。

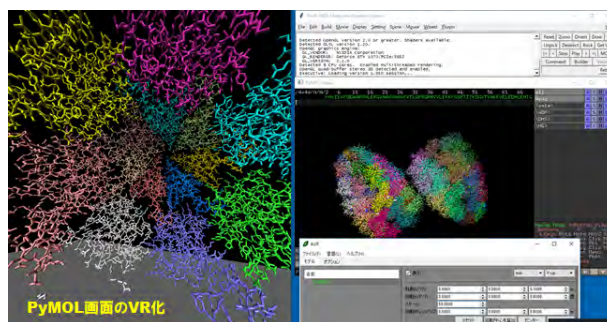


図 4. PyMOL の HMD 表示ソフトウェア
左: HMD に表示される映像
右: PyMOL の PC 画面

これら感想、意見からは、HMD 型仮想空間表示では、PC 画面上での観察と比較して、タンパク質分子の 3 次元構造が一層分かりやすくなること、また学生には興味ある映像提示となっていることがわかった。

一方で課題・要望としては、分子モデルの移動・回転操作の難しさ（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（機能要望）があった。その他の機能追加の要望も複数あった。

この有用性検討を通して、本研究課題で開発をめざす仮想空間での分子モデルの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。なお、ここで使用した PyMOL+AVR ソフトウェアでは、表示能力が十分でなく、また機能拡張性がなく、新たなソフトウェア開発の必要性も認識された。

3.2 表示ソフトの開発

(1)Unity3D ベースの MolCollabo 改良版

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 Unity Technologies 社製 Unity3D ベースで開発した。これは Fiatlux 社製ソフトウェア MolCollabo を改良する形で開発された。HMD としては、HTC 製 VIVE を想定したものとした。

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、インターフェースとして HMD に付属している手持ち型コントローラを用いて、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。

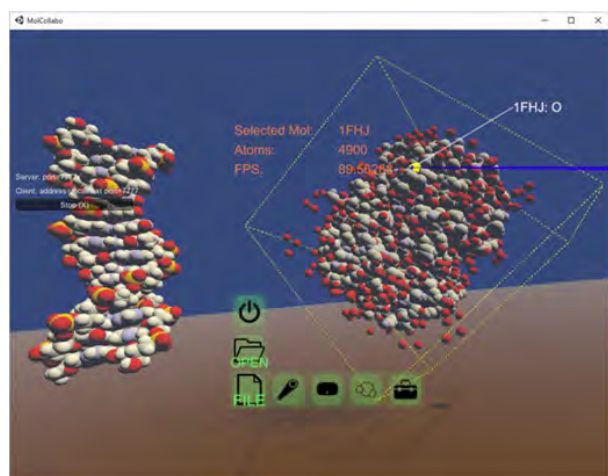


図 5. MolCollabo の画面表示例

- ・ユーザは HMD にて鑑賞する
- ・中央下部の緑色アイコンは操作メニュー

作成されたソフトウェアでは、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でデータサイズも大きいタンパク質分子でも遅延なく VR 空間表示が可能となった。（図 5）

本ソフトウェアについても、テーマ 1 のバイオ系メンバーや学生に体験してもらった。その結果、3 次元構造の理解の点では HMD 版 PyMOL (3.1 参照) と同様の評価であり、操作性では HMD 版 PyMOL よりは評価が高いことがわかった。ただし、操作性については満足はいくものではなく、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。

これらの意見を参考に改良を行った。具体的には、主に次の点で改良、機能追加をした（図 6）。

- ・操作メニューをコントローラと一体で表示するようにした（操作性向上）
- ・ファイル操作、モデル表現の変更など、一部を PC 画面上からも実行できるようにした（利便性、操作性向上）
- ・時系列データをアニメーション表示する機能を追加した。（実用性向上）
- ・空間共有機能を追加して、複数名での観察を可能とした（実用性向上）

これらの機能改良についてもバイオ研究グループに試用してもらったが、おおむね肯定的な意見であった。なお、使いやすさの点で、PC 画面でできる操作を増やしてほしいとの要望があった。



図 6. MolCollabo 改良版の画面

- ・インターフェースの見直し
- ・機能の追加など

(2)VR 表示コアソフトベースの MolDives

MolCollabo の機能を検討して、さらなる表示機能の拡張性、インタフェース作成の柔軟性を進めることとした。そのために、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 (Fiatlux 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。当初開発の MolCollabo 改良版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 画面上での 2 次元的インタフェースの併用による簡易操作機能を改良・追加したソフトウェアを開発した (図 7)。

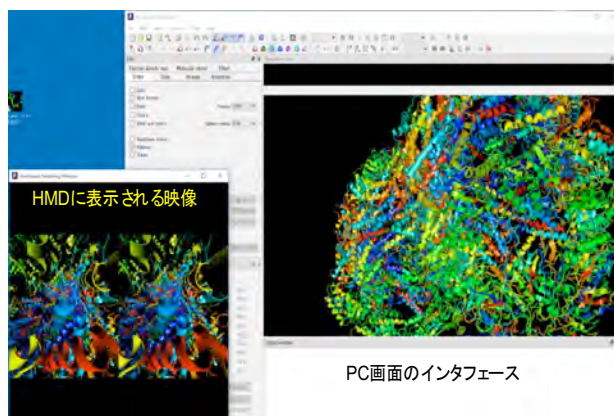


図 7. MolDives の実行画面

3.3 表示機能の開発用パッケージ化 MolAsset

Unity3D ベースで作成した MolCollabo のなかで、PDB データ読み込み機能と分子モデルの 3D 表示機能を抽出して、Unity3D 上での開発に利用できるパッケージ (Unity3D アセット MolAsset) を作成した。(図 8)

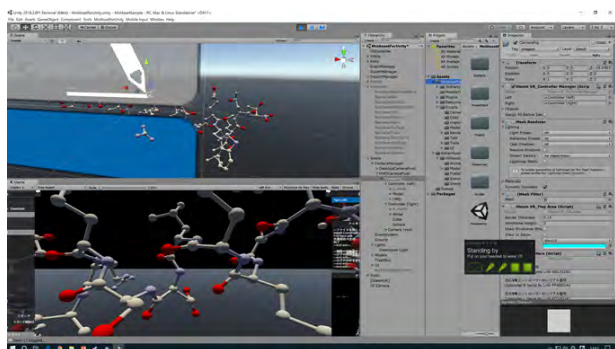


図 8. 表示機能パッケージを用いた開発用の様子 (Unity3D 上で利用)

これにより、本研究で作成した MolCollabo と同様のタンパク質分子表示ができるソフトウェアを Unity3D 上で迅速に作れるようになる。

この開発用パッケージの目的は、実験的なソフトウェアの開発を容易にすることである。例えば、分子表示ソフトウェアへの新たな入力インタフェース導入や、新たな分子モデル表現形式を試す実験用ソフトウェアの前処理部分を本パッケージが担うことで、開発期間の短縮が期待できる。本プロジェクトでもハンドモデル等の入力インタフェース実験に利用している。

3.4 簡易型 HMD 用表示アプリ開発 GearProtein

スマートフォンを利用した簡易型 HMD 向けのタンパク質分子表示アプリ GearProtein を開発した。簡易型 HMD としては、Samsung 社製 GearVR および Oculus 社製 OculusGo を想定した。アプリは Android OS を搭載するスマートフォン用に作成した (図 9,10)。なお、このアプリ作成には 3.3 で説明したパッケージを利用している。

このアプリの目的はタンパク質分子の VR 表示を手軽に体験できるようにすることである。本研究で用いている MolCollabo, MolDives と同様に、表示計算のために高速な PC を必要とする。また、使用する HMD には、高性能・高速表示が可能なタイプが必須であり、使用環境が限定される。

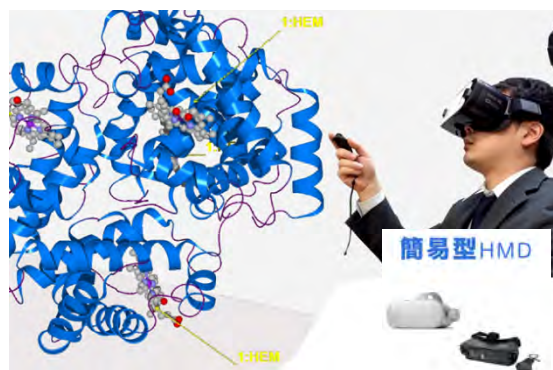


図 9. 簡易 HMD 表示を使っている様子 (左の VR 映像が見えている)

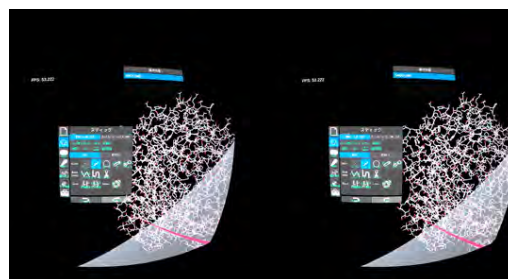


図 10. 装着するスマートフォンに表示されている映像例

今回作成した簡易型 HMD 用表示アプリであれば、実行時に PC を必要とせず、可搬性も高い。利用方法として、

- ・外部（学会，研究会）でデモをする場合
 - ・授業などで複数の学生に閲覧させる場合
- などが考えられる。

3.5 使用感の調査（外部でのデモ）

作成した表示システム（高機能版，簡易版）を国内で開催されたバイオ系の学会等^{[3][4][5]}でデモ展示した（図 11）。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。

HMD を用いた VR 映像鑑賞自体の体験が初めての場合もあり、驚きや「面白い」との感想が多かった。タンパク質分子構造の VR 表示については、多くの体験者に興味を持ってもらえた。また、専門的な観点から、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への要望も多数あった。

感想を中心とした調査ではあったが、本研究で開発した表示システムは、対象とするバイオ系の研究分野でも広く活用ができるものと言える。

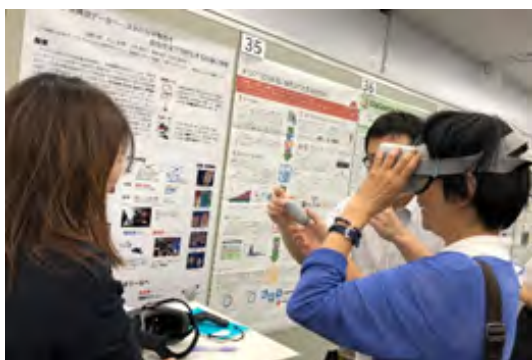


図 11. 簡易型 HMD アプリのデモ

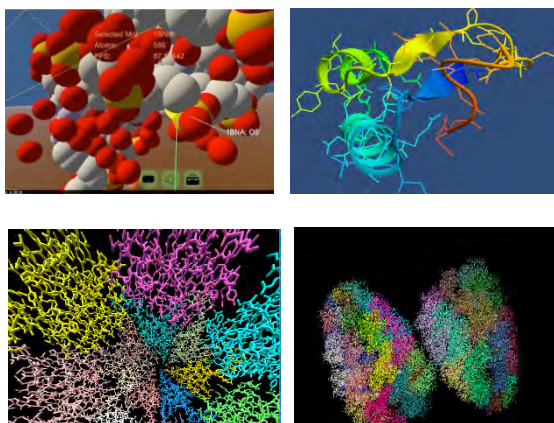


図 12. 分子モデルの表示形式例

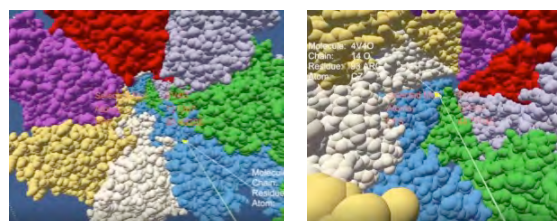
3.6 考察

(1) 研究成果 1：標的分子 3 次元構造の VR 表示

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た表示システム・ソフトウェアでは、シャペロニンのような複雑な高分子でも遅延なく表示できるものとなった。

分子モデルの標準的な表示形式（ボール，リボン等）を利用可能として（図 12），また移動・回転（分子モデル及びユーザ視点）も仮想空間上で実施できる。これらにより PC 版表示ソフトウェア（PyMOL）と同等の表示が達成できた。

これらに加えて、開発した VR 表示システムでは、分子構造の内部から構造観察ができる点は、従来の PC 版表示ソフトウェアには無い優れた機能を実現できた（図 13）。バイオ系研究者からもこの点での評価は高かった^[6]。



外から観察

中から観察

図 13. 分子内部からの観察例

(2) 研究成果 2：研究ツールとしての評価

開発した表示システムでは、タンパク質分子構造がライフサイズ（人間サイズ）で表示される。そのため分子モデル自体の实在感が PC 画面表示よりも高く、実際に分子に近づいて観察することも、分子内部から観察することもできる。また、仮想空間上で 2 つ以上の分子を表示して、構造を比較することも可能である。（図 14）

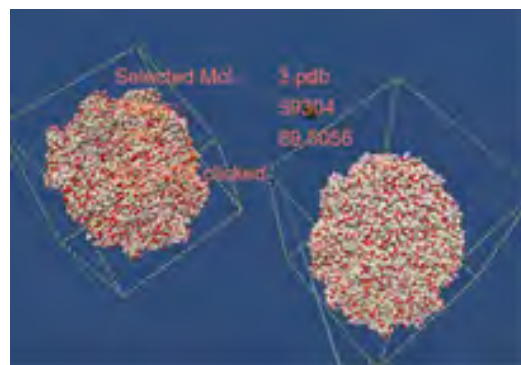


図 14. 仮想空間上で、2 つ以上の分子を比較できる

バイオ系研究者の使用感についての意見からは、この表示機能により標的分子の構造理解が促進されることが示唆された。そして、時系列変化のアニメーション機能、ネットワーク共有機能など、付加機能を工夫することで、さらに有効な研究用ツールとなりえることも示唆された。

(3)研究成果3：操作インタフェース

操作については、HMD 用コントローラを用いて空間上の操作を行う方式を開発した。移動・回転・拡大縮小など3次元空間操作、分子モデルの表示形式の変更など、表示に必要な機能をコントローラで制御する方式を実現できた。

また、PC 画面上での操作の方がやりやすい機能について、PC 用マウス・キーボードでの操作も可能とした。これらは、バイオ系メンバーからの意見を取り入れたものです。

当初計画では、ユーザの手（ハンドモデル）を直接用いる直感的なインタフェースの実現を目指した。4～5年目（H30～31年）に実験的な導入を行った（図15）。しかし、最終的な実装には至らなかった。理由として、手の動きを取得する適当なデバイスが選定できなかったことと、手（ハンドモデル）を使ってどのような操作をするかを十分検討できなかったことがあげられる。

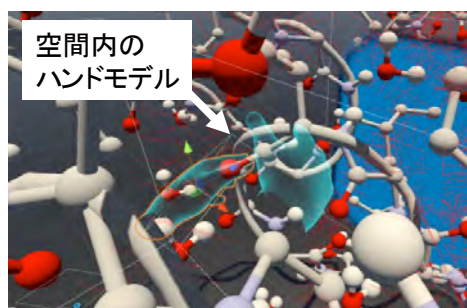


図15 空間内に表示したハンドモデル

(4)研究成果4：その他の成果

当初の計画には無かったが、研究課題に関連して、今後の研究の発展に寄与する次の2つのプログラムを研究期間内に開発した。

①表示機能の開発用パッケージ（3.3 参照）

②簡易型 HMD 用表示アプリ（3.4 参照）

特に②については、バイオ系の学習・教育用のアプリとして実用化を検討している。

(5)当初計画と実績

当初計画のタンパク質分子の3次元構造表示システム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だ。

一方、標的分子設計に必要となる、分子モデルの加工機能として、分子構造の編集や化合物とのドッキングシミュレーション機能を計画していたが、研究期間内に実現できなかった。実現のためには、分子構造変化計算やドッキング計算など必要であり、今回の表示システムだけでは実現が難しい。専用計算機との接続など、システムの拡張が今後の課題となる。

また、開発したシステムを分子設計における有効性の観点で評価することをめざしたが、研究期間内には、ソフトウェア使用感評価のみ実施できた。有用性や効果についての評価も今後必要と考える。

(6)今後の研究計画

当初計画にあった、直感的インタフェースのシステムへの導入、分子構造の編集機能の開発を進めて、分子設計への応用につなげることをめざす。また、開発システムの実際の研究場面での利用を促して、有用性評価に基づくシステム改良を進める予定である。

4. 参考文献

- [1] PyMOL- user-sponsored molecular visualization system (<https://pymol.org/2/>)
- [2] RCSB Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/>
- [3] 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会(2018.11 Tokyo), <http://www.saaaj.jp/>
- [4] 日本分子生物学会第 41 回年会(2018.11 Yokohama), <https://www.mbsj.jp/>
- [5] 増田恵, 井上哲理, 上平員丈, 棚橋航, 小池あゆみ, "タンパク質構造データベースから分子構造を仮想空間で可視化する技術の開発", トーゴの日シンポジウム 2019 (2019.10 Tokyo), <https://biosciencedbc.jp/event/symposium/togo2019/>
- [6] 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.

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、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、粒子法 Moving Particle Simulation (MPS)^{[6][7]}で数値計算シミュレーションする。

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 偏微分方程式で流れをモデル化する。タンパク質カプセル群も粒子で空間離散化し 血液も粒子で空間離散化するため、それらを区別するために純度 β を導入する。純度 β が大きな値を持っている粒子達でタンパク質カプセルを表し、純度 β が小さな値を持っている粒子達で血液を表す。

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 を導入し純度 β の拡散偏微分方程式と連立することで、拡散まで再現できる数値計算を試行している^[1]。

2. 研究方法

＜2-1 粒子 $\mathbf{r} = (r_x, r_y, r_z)$ による空間離散化＞

純度 β_i が大きな値を持っている粒子達
 $\mathbf{r}_i = (r_{ix}, r_{iy}, r_{iz})$ ($i = 1, 2, \dots, 10000$)
 でタンパク質カプセルを表し、
 純度 β_j が小さな値を持っている粒子達
 $\mathbf{r}_j = (r_{jx}, r_{jy}, r_{jz})$ ($j = 10001, 10002, \dots$)
 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

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

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

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

と境界条件

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

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

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

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

を仮定する。

＜2-2 圧力 $P(t, \mathbf{r})$ を求解する

Poisson 偏微分方程式＞

Navier-Stokes 偏微分方程式の両辺に $\partial / \partial \mathbf{r}$ を内積させて、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 $K(\mathbf{r}, \mathbf{q})$ を構成できるので [8][9]、Poisson 偏微分方程式(9)の厳密解 $P(t, \mathbf{r})$ を数学的に構成できる。よって数値計算でも安定して求解できる。

圧力 $P(t, \mathbf{r})$ 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 $\mathbf{a}(t, \mathbf{r})$ 、速度 $\mathbf{v}(t, \mathbf{r})$ 、位置 $\mathbf{r}(t)$ 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[2]。

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[4][5]で検討した。

＜ 2-3 並列計算による高速化 ＞

粒子法 MPS を高速に計算するべく、研究成果[3]を踏み台にして並列計算による高速化に取り組んでいる。

血液という液体を振動しながら進行する音の速度(液体の音速)よりも遥かに遅い流れを本研究では扱っているため、流れに非圧縮性を仮定し式(7)に基づいて圧力 $P(t, \mathbf{r})$ を求解する Poisson 偏微分方程式(9)を <2-2> では使用している。この手法では、圧力 $P(t, \mathbf{r})$ を求解するために流体領域 Ω 全体に渡る情報を必要とすることになり、並列計算を駆使する高速化を望めない。

液体の音速 c よりも遥かに遅い流れにおいても厳密には僅かに圧縮しているため、液体の質量密度 ρ_i を各粒子 $\mathbf{r}_i = (r_{ix}, r_{iy}, r_{iz})$ について正確に計算するならば、状態方程式から圧力 $P(t, \mathbf{r})$ を陽的に数値計算できる。

統計力学から導出される「流体の状態方程」のうち最も簡単なものは

$$P(t, \mathbf{r}) = c^2 \{ \rho(t, \mathbf{r}) - \rho_0 \} \quad (13)$$

である[10][11]。ここで、液体の音速を c とおき、静止状態における標準の質量密度を ρ_0 としている。

<2-2> に示した数値計算アルゴリズムにおいて、Poisson 偏微分方程式(9)の代わりに、流体の状態方程式

$$P(t, \mathbf{r}_i) = c^2 \{ \rho(t, \mathbf{r}_i) - \rho_0 \} \quad (14)$$

を用いて圧力 $P(t, \mathbf{r})$ を陽的に数値計算する。この数値計算法では各粒子 $\mathbf{r}_i$ について局所的に数値計算できるため、並列計算による高速化が可能になる。

しかし、この素朴な状態方程式(14)をそのまま用いて圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ を陽的に数値計算された値は、時間的にも空間的にも不安定に成ってしまう。

圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ の計算値が不安定に成ってしまう一つ目の理由は、液体の音速を c の値が(気体に比較すると)極めて大きいため、質量密度の値が誤差を含んでいるとその誤差が c^2 で拡大され状態方程式(14)から圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ が計算されるからである。

圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ の計算値が不安定に成ってしまう二つ目の理由は、個々の粒子の位置 $\mathbf{r}_i$ ごとに局所的に圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ を数値計算するためである。<2-2>の如く Poisson 偏微分方程式(9)を求解して圧力 $P(t, \mathbf{r})$ を陰的に数値計算するならば、流体領域 Ω 全体に渡って空間的に平均化した計算が遂行されるため、個々の粒子の位置 $\mathbf{r}_i$ ごとの局所的な誤差が平均化される。しかし状態方程式(14)では、個々の粒子の位置 $\mathbf{r}_i$ ごとの局所的な誤差がそのまま圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ の計算結果の誤差に反映されてしまう。

これら2つの理由による誤差を防ぐために、時間 t についても空間 $\mathbf{r}$ についても平均化しながら状態方程式(14)で圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ を数値計算している。

時間 t について平均化しながら状態方程式(14)を数値計算するために

$$P(t, \mathbf{r}_i) = 0.9 c^2 \{ \rho(t, \mathbf{r}_i) - \rho_0 \} \quad (15)$$

$$+ 0.1 c^2 \{ \rho(t, \mathbf{r}_i) - \rho_0 \} / (\Delta t)^2$$

$$+ 0.1 2 c^2 \{ \rho(t - \Delta t, \mathbf{r}_i) - \rho_0 \} / (\Delta t)^2$$

$$+ 0.1 c^2 \{ \rho(t - 2\Delta t, \mathbf{r}_i) - \rho_0 \} / (\Delta t)^2$$

にて圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ を数値計算している。

空間 $\mathbf{r}$ について平均化しながら状態方程式(14)を数値計算するために、上記の式(15)で求めた圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ ($i = 1, 2, 3, \dots$) から次のように計算し直している。

実数 r について単調に減少する重み関数 $g(r)$ を選ぶときに、

$r = 0$ において最大値 $g(0) = 1$ を取り

$r \geq 3x$ (粒子の直系) で最小値 $g(0) = 0$ を取るように選択する。

粒子 $\mathbf{r}_i$ の近傍に存在する粒子達

$\mathbf{r}_j$ ($j = 1, 2, 3, \dots$) について重み付き平均

$$\left\{ \sum_j P(t, \mathbf{r}_j) \mathbf{g}(|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|) \right\} / \sum_j \mathbf{g}(|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|) \quad (16)$$

によって 圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ を求め直している。

以上のような数値計算を並列計算で遂行するために、図3の如く流体領域 Ω をバケット達に分割し、バケットに所属する粒子達を図4、図5の如く求めておく。

圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ を並列計算で求めるには、図6、図7の如く各バケットごとに計算する。

空間 $\mathbf{r}$ について平均化しながら 重み付き平均の式(16)によって 圧力 $P(t, \mathbf{r}_i)$ を計算し直す場合も 図4の如く計算している。

＜ 2-4 純度 β が拡散する偏微分方程式を連立 ＞

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

$$\frac{\partial \beta}{\partial t} = c_2 \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \beta(t, \mathbf{r}) \quad (17)$$

でモデル化する^[1]。ここで 定数 $c_2 > 0$ は拡散係数である。純度 β_i の値が閾値より大きい粒子 $\mathbf{r}_i$ 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 $\mathbf{r}_i$ は血液とみなされる。

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 $P(t, \mathbf{r})$ 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。

純度 β が拡散する偏微分方程式と連立させたシミュレーション結果の一例を 図8 に示す。

計算結果の精度を保ちながらも より高速に数値計算できることを目指して 並列計算を試行錯誤している。

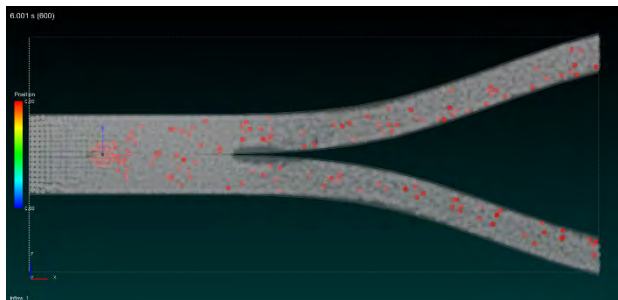


図1：分岐した血管で圧力偏微分方程式を求解

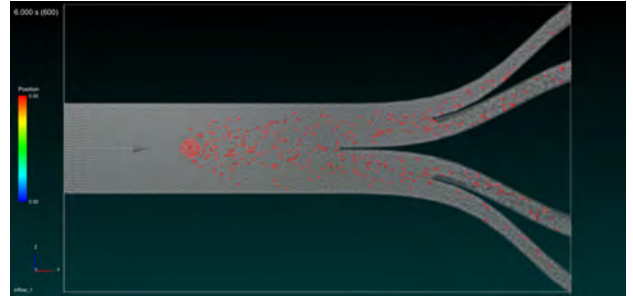


図2：分岐した血管で圧力偏微分方程式を求解

54	55	56	57	58	59	60	61	62
45	46	47	48	49	50	51	52	53
36	37	38	39	40	41	42	43	44
27	28	29	30	31	32	33	34	35
18	19	20	21	22	23	24	25	26
9	10	11	12	13	14	15	16	17
0	1	2	3	4	5	6	7	8

図3：流体領域 Ω をバケット達に割する

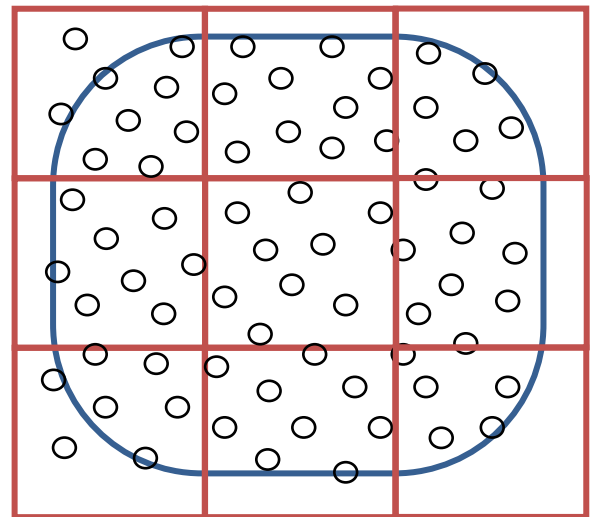


図4：各バケットに属する粒子達を求める

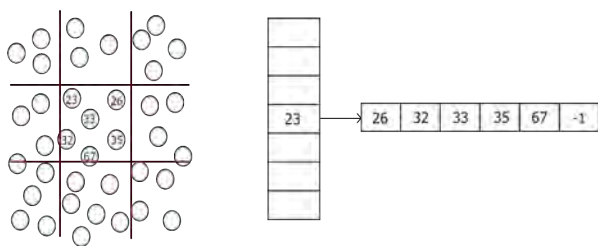


図 5: 各バケットに属する粒子達をリスト構造化

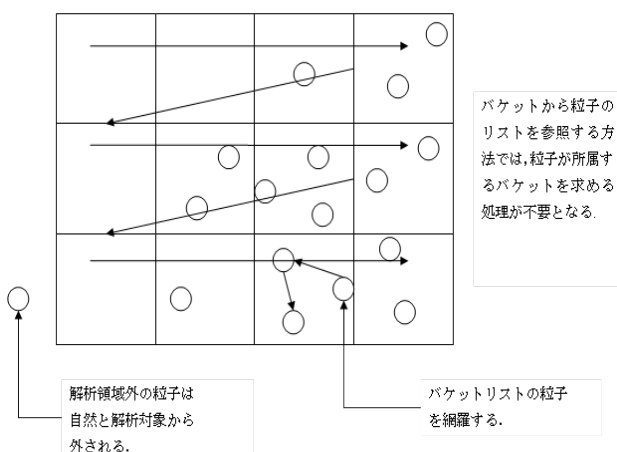


図 6: バケットごとに並列計算する

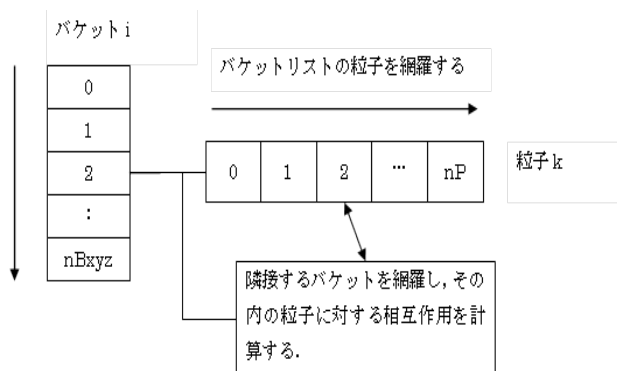


図 7: バケットごとに並列計算する

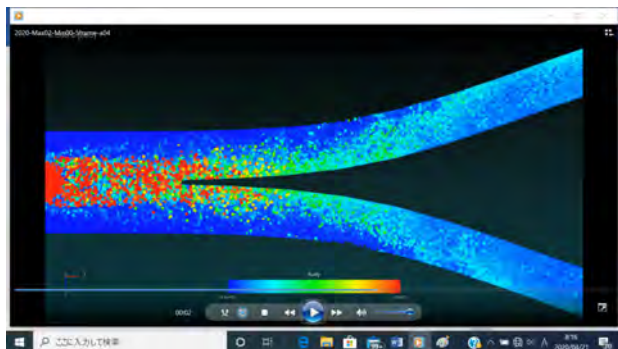


図 8: 純度の拡散偏微分方程式と連立

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] Yohei. Seta, M. Makino, Y. Bannai, M. Hattori, "Moving Particle Simulation for diffusion in transportation flow", Asian Symposium on Visualization 2019 (2019.9)
- [2] 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 (2018.7)
- [3] 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)
- [4] Motofumi Hattori and Seiichi Koshizuka, "A mathematical interpretation for spatial differential operators in Moving Particle Simulation", World Congress on Computational Mechanics 2016 (2016.7)
- [5] 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)
- [6] Seiichi Koshizuka, Kazuya Shibata, Masahiro Kondo, and Takuya Matsunaga, "Particle Semi-implicit Method 1st Edition(A Meshfree Particle Method for Fluid Dynamics) ", ISBN: 9780128127797, 2018
- [7] 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, 2014
- [8] 坂和愛幸, “最適システム制御論”, コロナ社, 機械工学体系 45, 第 11 章, 1972
- [9] 伊藤清三, “拡散方程式”, 紀伊國屋, 数学叢書 17, 第 4 章, 1979
- [10] 香取眞理, “非平衡統計力学”, 裳華房, テキストシリーズ 物理学, 第 3 章, 1999
- [11] 戸田盛和, 松田博嗣, 樋渡保秋, 和達三樹, “液体の構造と性質”, 岩波書店, 第 3 章、第 4 章, 1976