

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 有望シーズ展開事業

「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト	1
「光スイッチ医療創出」プロジェクト	15
「次世代合成生物基盤」プロジェクト	26
「革新的インダストリアルマルチスケールセンサ」プロジェクト	39

## 実用化実証事業

「人工細胞膜システム」グループ	52
「次世代医療福祉ロボット」グループ	69
「腸内環境デザイン」グループ	82
「次世代半導体用エコマテリアル」グループ	94
「毛髪再生医療実証」グループ	113

## ライフサイエンス評価法開発研究

「次世代ライフサイエンス技術開発」プロジェクト	124
-------------------------	-----

## 戦略的研究シーズ育成事業

研究テーマ：光ファイバーベース高感度テラヘルツオシロスコープの実現	140
研究テーマ：Beyond5G対応のナノセルロース製電子機材の創製	145
研究テーマ：徐脈性不整脈の革新的細胞移植治療開発	150
研究テーマ：未知を知るAI搭載型ハードウェアの開発	155
研究テーマ：超高感度質量分析に向けたマイクロ流体技術の開発	161
研究テーマ：内在性因子による造血幹細胞増幅法の開発	166

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 有望シーズ展開事業

「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト

◆ 統括	2
◆ 分子集合体医薬の創生	5
◆ 分子集合体材料の創生	8
◆ 業績	11

# 有望シーズ展開事業「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト

プロジェクトリーダー 味岡 逸樹

## 【基本構想】

国内死因の第3位となっている脳血管障害のうち、脳梗塞は全体の75%以上を占め、一命をとりとめた場合でも後遺症が残る場合が多く、我が国の「寝たきり」原因の25%を占めている。脳機能発揮の中心的役割を担う神経細胞（ニューロン）は、皮膚や肝臓の細胞とは異なり増殖能に乏しく、脳組織がほとんど再生しないため、手足の麻痺や言語障害などの後遺症が残ることが多く、患者や家族のQOLを著しく低下させる社会問題となっている。

一方、医師の側にも悩みがある。脳梗塞発症後4.5時間以内であれば血栓溶解治療薬を投与できるが、2%程度の患者にしか治療効果が得られていない。発症8時間以上の患者に対しては安定期まで見守ることしかできず、医師もまた、亜急性期の重度脳梗塞患者に効果のある何らかの治療法を求めているのが現状である。

戦略的研究シーズ育成事業（「脳梗塞治療のためのスキャフォールド材料」）では、生体適合性が高く、脳内投与に適した硬さに分子設計した16アミノ酸からなる両親媒性ペプチド (RADA)<sub>3</sub>-RADGを開発した。

本プロジェクトでは、この超分子ペプチドを革新的な医薬品へと開花させるため、低免疫原性の短いアミノ酸からなる両親媒性ペプチドを開発し、「分子集合体医薬」への展開を実現する。また医薬品展開に加えて、細胞の足場材料となる「分子集合体材料」への展開を目指す。

超分子ペプチドの概念を含め、生体組織を構成する分子の配列・集積構造とダイナミクスを模倣した材料が、破綻した生体内生命反応システムを修復し、生体が本来持つ再生能力を賦活化させることで、疾患治療に役立つと私達は考える。その実現には、「生体内環境」で生体分子と同様の集積構造やダイナミクスを持つ合成機能分子を「設計（計算科学）」し、「開発（有機化学）・評価（分析化学）」し、「適合化（生物学）」する学術基盤が求められる。その基盤構築に向け、「生体内をフィールドとする物理学、化学、生物学の融合」を目指し、関連する研究を第一線で行っている研究者を招いて議論する「生体内超分子システム研究会」を立ち上げ、生体分子の変性や生体組織の損傷修復を制御するための学術基盤構築を目指す。

## 1. 2024年度の研究目的

### (1) 基本技術の紹介と研究開発のねらい

2021年度までに、短いアミノ酸からなり、中性でゲル化し、生理活性タンパク質の取り込みと徐放を達成する新規11アミノ酸からなるペプチド(Ac-RIDARMRADIR-NH<sub>2</sub>) JigSAPを開発した(図1a-d)。JigSAPは、凹凸を持つ組木状の疎水面を有しており、合致する凹凸部との選択的疎水性相互作用と、水素結合によるβシート形成によって自己選択的に一次元集積する。凹凸状疎水面は、グリコホリンAなどのホモ二量体蛋白質に広く見られる構造であり、その特徴的な構造モチーフであるAXXXA配列やGXXXG配列は、αヘリックスからβストランドへとコンフォメーション変化することが知られている。実際にJigSAPは、水中でヘリックスからβシートへの構造変化を示してゲル化し、この動的変化と並行して粘弾性も増加した(図1e-h)。JigSAPはこの動的特性のため、溶解直後に脳内投与しやすい柔らかさを有している点が特徴である。

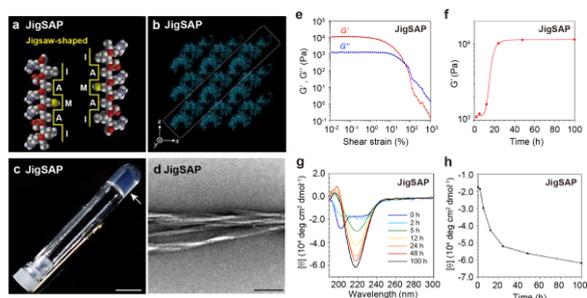
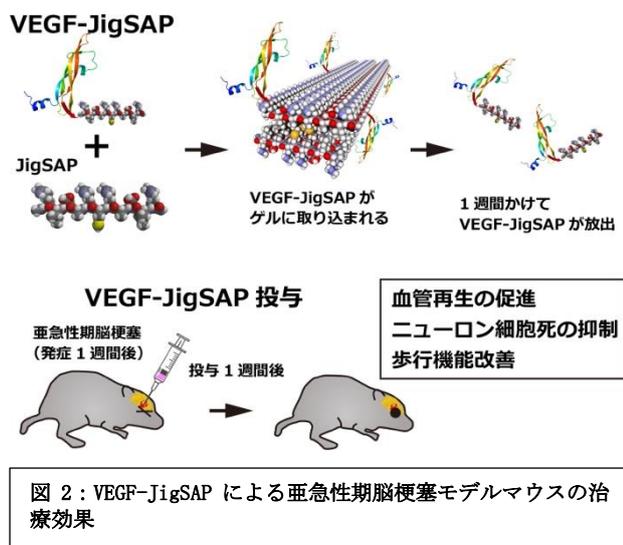


図1: JigSAPによるハイドロゲル形成  
a, Ac-RIDARMRADIR-NH<sub>2</sub> (JigSAP)の空間充填モデル。凹凸状の疎水性表面を示す。b, MDシミュレーションにより得られたJigSAPの水中超分子構造のスナップショット。c, 37°Cで48時間培養したJigSAPの写真(ペプチド濃度: 1.0 wt%, pH 7.4)。矢印はハイドロゲルを示す。d, JigSAPの透過型電子顕微鏡写真。e, f, JigSAPの貯蔵弾性率( $G'$ , 赤)と損失弾性率( $G''$ , 青)の時間変化。g, h, JigSAPの円二色性(CD)スペクトル。h, JigSAPのCDシグナル強度の時間変化(217.6 nm)。

JigSAP を使って脳梗塞後の血管新生を促進させるために、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の C 末端に JigSAP 配列を付加し、約 1 週間かけて徐放させる技術を確立し、マウス中大脳動脈遠位部梗塞 (dMCAO) モデルと光化学反応誘発性血栓形成 (PT) モデルの 2 種類の脳梗塞モデルマウスを用いて、VEGF-JigSAP の治療効果を検討し、脳梗塞発症 1 週間後の脳内単回投与で歩行機能改善を認めた。また、血管内皮細胞の増殖促進と数の増加、および、ニューロン数減少の抑制を認め、VEGF-JigSAP による亜急性期脳梗塞モデルの治療効果は血管新生とニューロン細胞死抑制効果の影響によるものと示唆された (図 2: Yaguchi et al., Nat Commun 2021)。



我々は独自開発した本技術を基盤に、抗体医薬治療や核酸医薬治療などの既存の治療モダリティ「分子治療」とは異なり、分子が集合化して機能を発揮する新しい治療モダリティ「分子集合体治療」を創出する。具体的には、分子医薬を投与局所で徐放させる「分子集合体医薬」と、移植細胞や培養細胞の足場材料として機能する「分子集合体材料」を開発する。「分子集合体治療」では様々な疾患が対象となり得るが、初期段階では特にアンメットメディカルニーズが多い中枢神経系疾患に焦点を当てる。

## (2) 分子集合体医薬の創生

我々は VEGF-JigSAP にマウス脳梗塞モデルの治療効果があることを見出したが、VEGF による血管透過性亢進という副作用もあることから、VEGF 自体が臨床応用されていない。また、化学合成では製造できない分子量の大きいタンパク質のため、臨床応用に向けて莫大な製造費用を要するという問題点もある。そこで今年度は臨床応用に適した化学合成可能な生理活性物質 X を用いて、臨床応用を目指した研究開発として展開した。

研究開発と並行して、本技術を基盤とした大学発スタートアップ起業を視野に入れ、事業開発の準備を進める。「分子集合体医薬」はパイプライン型を想定して準備を進める

(図 3)。主要なパイプラインとなる脳梗塞では、第 1 相臨床試験または第 2 相臨床試験段階まで自社開発を進め、それ以降は製薬企業へ導出し、一時金、開発マイルストーン収入、ロイヤリティ収入を得る。公的研究機関との連携によって有望な対象疾患を見出されれば、パイプラインの追加を検討する。

### 「分子集合体医薬」



**図 3: 分子集合体医薬のパイプライン型ビジネスモデル**

## (3) 分子集合体材料の創生

中枢神経系オルガノイドを用いた再生医療や創薬研究が注目を浴びている。一般的なオルガノイド作製時には、その 3 次元構造形成を補助して維持するために、細胞外マトリックス (ECM) が用いられる。オルガノイド作製に用いる ECM は、細胞接着性や、オルガノイドを立体的に支えるための機械強度等、様々な特性を備えていることが必要である。従来のオルガノイド作製技術では、マウス肉腫細胞に由来するマトリゲルや、動物組織から抽出されるコラーゲン等の天然 ECM がゲル化剤として主に用いられている。しかしながら、動物由来のゲル化剤は、分子量分布や成分組成が必ずしも均一ではなく、製造ロットごとの品質に差がある。また、生体内に導入される場合には、抽出物中に混入する微量成分やコンタミネーションによってアレルギーや未知の感染症を生じるリスクも避けることができない。また、異なる脳領域オルガノイドを組み合わせさせて結合させるアセンブroid培養や移植用組織として使用する場合には、オルガノイド形成後に ECM を除去する必要がある。マトリゲルやコラーゲンの場合にはプロテアーゼ処理によりゲルを分解できるが、プロテアーゼ処理はオルガノイドの表面も同時に損傷してしまうことが避けられない。一方で、人工 ECM でもあるペプチドゲルは、アミノ酸側鎖の異なる特性を生かすことで分子集合体の構造制御が可能であり、精密かつ合理的な分子設計によりハイドロゲルの物理・化学的特性、すなわち、電荷状態、疎水性、細胞接着性、粘弾性、刺激応答などを調整することができる。

そこで、2023 年度までに、中枢神経系のオルガノイド培養に適した Culture (C)-JigSAP を開発することを目的とした。さらに、JigSAP ゲルを分解する 11 アミノ酸からなる Degradation (D)-JigSAP を開発した。2024 年度は、マウス ES 細胞由来の脳オルガノイド培養の培養基質としての応用可能性を検討した。

研究開発と並行して、事業開発の準備を進める。「分子集合体材料」はプラットフォーム型を想定して準備を進める (図 4)。JigSAP ペプチドを細胞足場として活用するビジネスであり、国内外の細胞治療を開発する再生医療スタートアップ企業や細胞培養スタートアップ企業等のニ

#### 「分子集合体材料」



図4：分子集合体材料のプラットフォーム型ビジネスモデル

ズに合わせた分子集合体材料を開発して提供する。スタートアップ企業等の対象に応じた培養・動物モデルでの評価までの初期開発を、それら企業との共同研究開発として行うことで、短期的には、共同研究開発契約による契約一時金、研究開発マイルストーン収入を得る。非臨床試験以降は共同研究開発パートナーの企業が主体となって実施し、それら企業へライセンスアウトを行う。長期的には、ライセンス契約に伴う開発マイルストーン収入、ロイヤリティ収入を得る。細胞治療の発展・普及とともに事業規模を拡大していき、国外を含めた複数の共同研究開発を同時並行で進める。

## 2. 2024 年度の研究成果

### (1) 分子集合体医薬の創生

本項の詳細は常勤研究員・原による研究成果にて記載するが、我々は齧歯類脳梗塞モデルにおいて、X-JigSAPの最適な投与条件を確立した。また近年、ニューロンの光遺伝学的操作が注目されているが、チャンネルロドプシンなどの光応答性タンパク質は青色光に応答するため、従来は脳内への光源設置が必要であり、高い侵襲性が課題であった。そこで、東京大学・楊井教授との共同研究により、生体組織に透過しやすい近赤外～赤色光を青色光へ変換するフォトンアップコンバージョン材料を開発し、生体内における非侵襲的な光遺伝学操作に成功した。

今後は、X-JigSAPの作用機序の解明に加え、JigSAP単独での安全性・毒性評価を進め、臨床応用に向けた研究開発を加速する予定である。

### (2) 分子集合体材料の創生

本項の詳細は常勤研究員・秋本による研究成果にて記載する。従来、脳オルガノイドの培養にはマウスがん細胞由来の基底膜抽出物である Matrigel が不可欠であったが、ヒトへの臨床応用を阻む免疫原性や、ロット間差などによるオルガノイドのばらつきが課題となっていた。これに対し、人工合成ペプチドゲル C-JigSAP を用いた新たな培養系の開発に取り組み、マウス ES 細胞由来の脳オルガノイド培養系において、Matrigel と同等の分化効率を示す実験系の確立に成功した。

今後は、中枢神経系以外の細胞種における足場材料としての C-JigSAP の有用性についても検討を進める。

# 分子集合体医薬の創生

「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト

常勤研究員 原 央子

## 1. はじめに

損傷した組織の再生において、細胞外マトリックス (ECM) は、細胞間基質接着のみならず分泌タンパク質の吸着/放出や増殖の制御などの様々な役割を担っている。損傷組織へ人工 ECM を移植することで、修復細胞の足場機能に加えて、修復促進因子の放出源として機能すれば、損傷組織の再生や機能回復に有用と期待される。我々が開発した 11 アミノ酸からなる両親媒性ペプチド JigSAP (Jigsaw-Shaped Self-Assembling Peptide) は、膜貫通タンパク質グリコフォリン A の二量体形成ドメインを模倣した分子設計となっており、ペプチドの疎水面が凹凸形状を示す分子である。JigSAP は生理的 pH かつ炭酸イオン存在下で自己組織化して超分子ナノファイバーを形成し、ハイドロゲルとなって細胞足場として機能する。さらに、JigSAP を共有結合させた生理活性物質と過剰量の JigSAP を混合することで、JigSAP 結合物質はゲルに取り込まれた後、徐々に放出される性質を持つことから、投与した局所で生理活性物質を徐放する革新的ペプチドゲルである (Yaguchi et al., Nat Commun 2021 ; 17/999,313 (米国) ; EP21850578.2 (欧州) ; 特願 2022-539576 (日本))。

本プロジェクトでは、重度の脳梗塞発症から 1 週間程度経過した亜急性期の脳梗塞に対する革新的治療法開発を目指している。有望シーズ展開事業において、血管新生能を持つ血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) と JigSAP を混合した VEGF-JigSAP を、脳梗塞発症 1 週間後のモデルマウス脳内に単回注入することで、歩行機能の改善を見出した (Yaguchi et al., Nat Commun 2021)。しかしながら、VEGF による血管透過性亢進という副作用もあることから、いまだ VEGF が臨床応用されていない。また、VEGF が化学合成では製造できない分子量の大きいタンパク質のため、臨床応用に向けて莫大な製造費用を要するという問題点もある。そこで今年度は昨年度に引き続き、臨床応用に適した化学合成可能な生理活性ペプチド X を用いて、臨床応用を目指した研究開発として展開した。

## 2. 実験と結果

### (1) X-JigSAP の開発

血管新生能を持つ生理活性ペプチド X は N 末端側に活性

ドメインを持つため、既に報告済みの C 末端に JigSAP を共有結合した VEGF-JigSAP とは異なり、C 末端側に JigSAP を共有結合させた。データは割愛するが、X-JigSAP は JigSAP を結合していない生理活性ペプチド X と同等の活性を持つことを確認した。そこで、我々が確立済みの中大脳動脈遠位部梗塞 (dMCAO) モデルの発症 1 週間後に X-JigSAP を図 1 に示す経路で投与し、投与 1 週間後に歩行機能を解析した。その解析の結果、脳皮質内投与で顕著な歩行機能改善効果が認められた (図 1)。

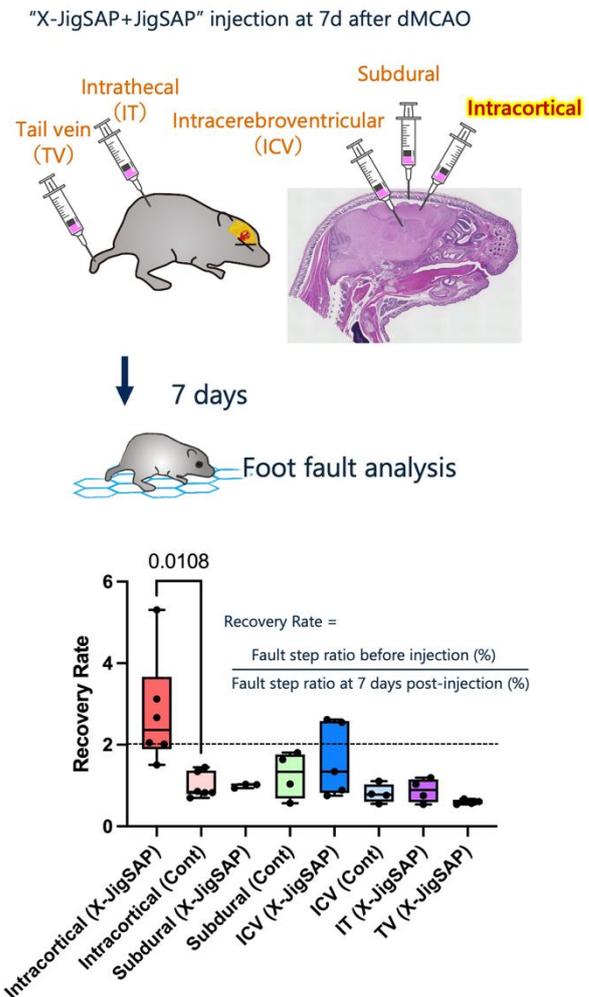
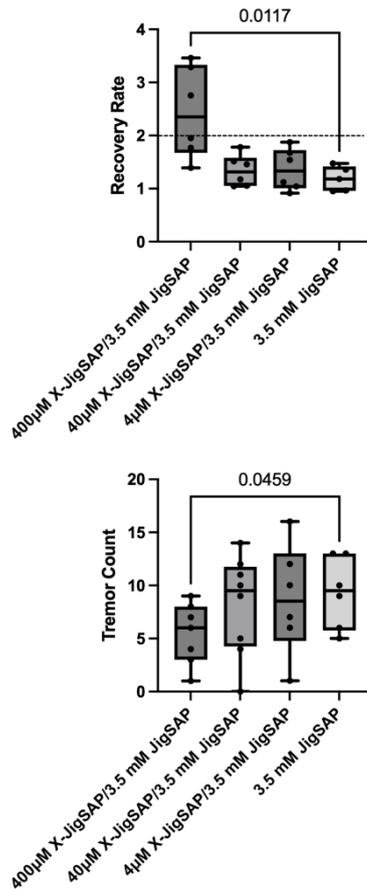


図 1 : 投与部位の検討  
dMCAO モデル作製 7 日後に X-JigSAP (投与濃度は投与部位によって異なるため総量を一定にした) を過剰量の JigSAP と混合し図に示す箇所へ投与した。投与前および投与 7 日後に歩行解析を行い、回復率を算出した結果、脳皮質内への投与で顕著な歩行機能改善効果があることを見出した。

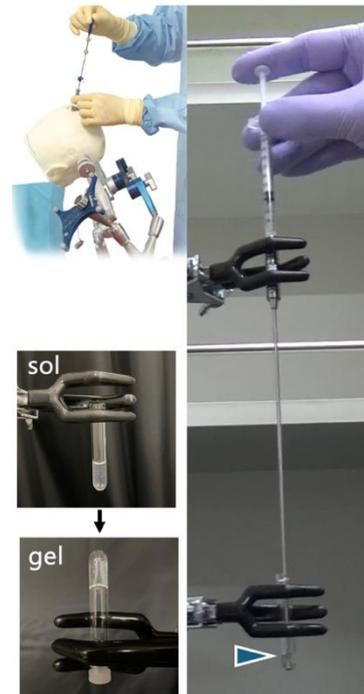


**図 2：投与量の検討**  
dMCAO モデル作製 7 日後に、グラフに示す濃度の X-JigSAP と JigSAP を皮質内に投与した。投与前および投与 7 日後に歩行解析を実施し、あわせて前肢の振戦回数を評価した。これらのデータから回復率および振戦の程度を算出した結果、400 µM の X-JigSAP 投与 (1 µL) により有意な歩行機能の改善効果が認められた。

続いて、最適投与量の検討も行った。図 2 に示すような濃度で皮質内に投与した結果、400 µM X-JigSAP を 1 µL 投与することで有意な歩行機能の改善効果が認められた。

また、未発表データのため詳細な記載は控えるが、実験室レベルにおける JigSAP ゲルの調製には、多数のステップを踏む必要があり、臨床現場、とくに手術室での応用には大きな制約があった。そこで、手術室で利用できるように新規調製法および適切な溶媒条件の確立を目的とした。各種条件を検討し、最適化した条件にて JigSAP を手術中に実際に投与可能かどうかを検討した。具体的には、医療機器として認可を受けている投与器具は、ミズホ社製インジェクションニードル（製造販売承認番号：224ALBZX00031000）のみであった。このニードルは内径約 300 µm と非常に細く、投与対象である JigSAP 溶液を通過させることが可能か、さらに投与後適切にゲル化が起るかを検証し、投与可能であることを確認し

た (図 3)。



**図 3：投与溶媒の検討**  
溶解条件と溶媒を最適化し、ミズホ社製インジェクションニードルを介した投与を検討した。

## (2) オプトジェネティクス技術の開発

オプトジェネティクス技術の創出によって、特定の神経機能の発揮あるいは回復時に関与する神経回路の同定が高精度で行えるようになってきた。実際我々もこの技術を活用して脳梗塞の機能回復に必要な不可欠となる神経回路の同定を試みることを計画している。しかしながら、オプトジェネティクスは光を使って細胞機能を制御する技術だが、500nm 以下の波長の可視光は生体組織で散乱・吸収されやすいため、光ファイバーを脳に挿入する侵襲的な方法が使われてきた。すなわち、侵襲性の高い介入操作となる。そこで、生体透過性に優れた赤色光や近赤外光を青色光に変換するフォトン・アップコンバージョン (UC) 材料が低侵襲性オプトジェネティクスの技術として注目されている。そこで今年度は、東京大学・楊井教授との共同研究で、重金属を含まない有機フォトン・アップコンバージョンナノ粒子を開発し、生体適合性や水分散性に優れた UC ナノ粒子を用いた非侵襲的なオプトジェネティクスツールを開発した。さらに、東京大学・佐藤教授が開発した PA-Cre 技術を使い、新生仔マウス的大脑皮質神経細胞で青色光応答性の遺伝子発現誘導に成功した (図 4-6)。

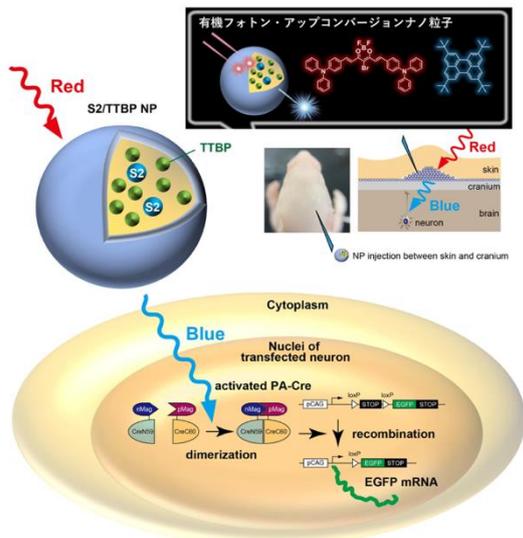


図 4：重金属フリーの UC ナノ粒子による in vivo 光遺伝学操作  
PA-Cre を発現する神経細胞を赤色蛍光タンパク質 TurboRFP で可視化し、青色光で活性化される光応答性 Cre (PA-Cre) の活性化で発現誘導される EGFP を指標に in vivo 光遺伝学操作を行った。

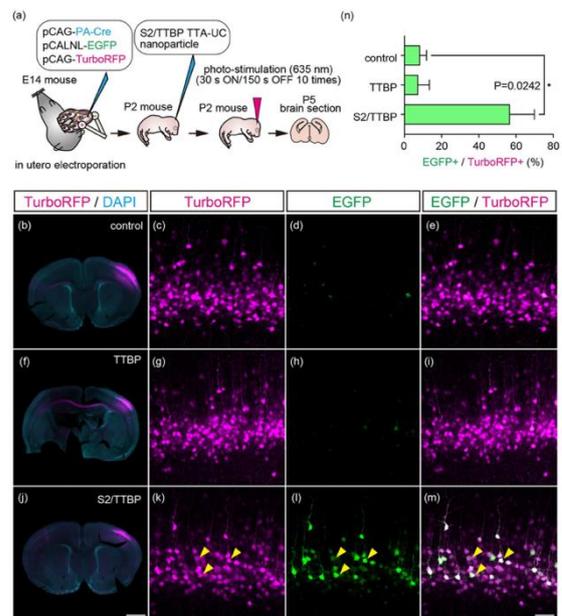


図 6: TTA-UC ナノ粒子を用いた in vivo 光遺伝学操作。E14 マウス胎仔の脳室にプラスミドを注入後、子宮内胎仔電気穿孔法により遺伝子導入した。生後 2 日目に脳上部皮下へ S2/TTBP ナノ粒子を投与し、635 nm レーザーで 10 回照射した。その 3 日後に灌流固定を行い、脳切片を作製した。TurboRFP で遺伝子導入細胞を同定し、EGFP 発現を指標に Cre 活性化の有無を評価した。PBS、TTBP、S2/TTBP の 3 条件で比較し、EGFP と TurboRFP の二重陽性細胞を定量した。

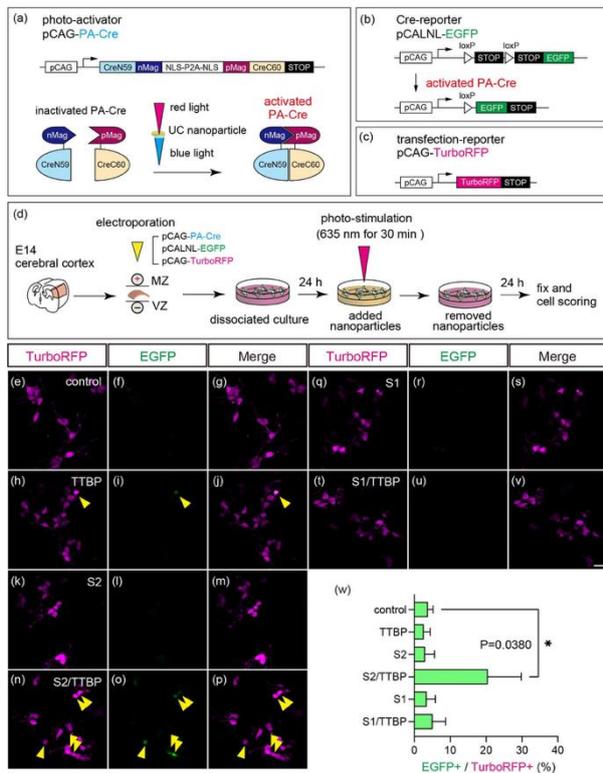


図 5：TTA-UC ナノ粒子を用いた in vitro 光遺伝学操作。TTA-UC ナノ粒子を用いた in vitro 光遺伝学実験。PA-Cre により、EGFP 発現を誘導する実験系を構築し、大脳皮質細胞にプラスミドを電気穿孔法で遺伝子導入後、TTA-UC ナノ粒子を添加し、635 nm レーザー照射によって Cre を活性化した。TurboRFP で遺伝子導入細胞を同定し、EGFP との二重陽性細胞を定量することで、光遺伝学操作の効率を評価した。

### 3. 今後の展望

本プロジェクトはAMED 橋渡し研究シーズ A および JST・D-Global プログラムの支援を受け進めてきたが、来年度以降も JST・D-Global プログラムが継続することを受け、引き続き、臨床応用に適した化学合成可能な生理活性ペプチド X を用いて、臨床応用を目指した研究開発として展開する。具体的には血中動態や毒性・安全性試験を行う。

# 分子集合体材料の創生

「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト

常勤準研究員 秋本 沙織

## 1. はじめに

中枢神経系オルガノイドを用いた再生医療や創薬研究が注目を浴びている。一般的なオルガノイド作製時には、その3次元構造形成を補助して維持するために、細胞外マトリックス (ECM) が用いられる。オルガノイド作製に用いる ECM は、細胞接着性や、オルガノイドを立体的に支えるための機械強度等、様々な特性を備えていることが必要である。従来のオルガノイド作製技術では、マウス肉腫細胞に由来するマトリゲルや、動物組織から抽出されるコラーゲン等の天然 ECM がゲル化剤として主に用いられてきた。しかしながら、動物由来のゲル化剤は、分子量分布や成分組成が必ずしも均一ではなく、製造ロットごとの品質に差が問題点となっている。また、生体内に導入される場合には、抽出物中に混入する微量成分やコンタミネーションによってアレルギーや未知の感染症を生じるリスクも避けることができない。また、異なる脳領域オルガノイドを組み合わせるアセンブroid培養や移植用組織として使用する場合には、オルガノイド形成後に ECM を除去する必要がある。マトリゲルやコラーゲンの場合にはプロテアーゼ処理によりゲルを分解するが、プロテアーゼ処理はオルガノイド自体も同時に損傷してしまうことが避けられない。一方で、人工 ECM でもあるペプチドゲルは、アミノ酸側鎖の異なる特性を生かすことで分子集合体の構造制御が可能であり、精密かつ合理的な分子設計によりハイドロゲルの物理・化学的特性、すなわち、電荷状態、疎水性、細胞接着性、粘弾性、刺激応答などを調整することができる。最近我々は、世界に先駆けて、吸着したタンパク質をゲル局所で放出するペプチドゲル JigSAP を開発し、JigSAP を共有結合した VEGF との融合タンパク質 VEGF-JigSAP を脳内に投与することで、マウス亜急性期脳梗塞モデルの機能回復効果があることを見出した (Yaguchi et al., Nat Commun 2021 ; 17/999,313 (米国); EP21850578.2 (欧州); 特願 2022-539576 (日本))。本発明の特徴は、11 個のアミノ酸 JigSAP 配列を共有結合した機能性タンパク質に過剰量の JigSAP と混合して体内投与すると機能性タンパク質が 1 週間程度かけて放出される点である。

昨年度までの研究において、脳内投与の実験では溶媒を加えてからゲル化するまでの時間が短すぎると投与しにくいという問題点があったが、ゲル培養では、ゲル化までの時間が短い方が好都合である。そこで我々は、培養用

JigSAP として 2 時間程度で硬くなる 11 アミノ酸からなる改変型 JigSAP を開発し、Culture-JigSAP (C-JigSAP) と名付けた。

そこで本研究では、今後は多能性幹細胞由来の脳オルガノイド培養にて解析を進めた。また、常勤研究員・原が中心となって進めたフォトン・アップコンバージョン (UC) ナノ粒子の機能評価に先立って、生体適合性評価を行った。

## 2. 実験と結果

### (1) マウス ES 細胞由来脳オルガノイド培養の確立

多能性幹細胞由来の脳オルガノイド培養では通常マトリゲルを用いて培養するが、ロット間差が大きく、品質管理のばらつきが問題とされている。実際、代表的な研究においても実験方法欄に「Only organoids that passed quality control—namely, …and outgrowth and development of defined buds in Matrigel without massive cyst formation or premature differentiation—were selected for transplantation.」(Mansour et al., Nat Biotech, 2018; PMID: 29658944) のような記述があり、出芽形成や過剰なロゼット構造の出現が均一なオルガノイド選別の妨げとなっている。具体的な実験方法は未発表のため記載を省くが、我々が独自に開発した培養方法では、C-JigSAP を用いた培養系では、出芽形成およびロゼット構造の形成がほとんど認められなかった (図 1)。

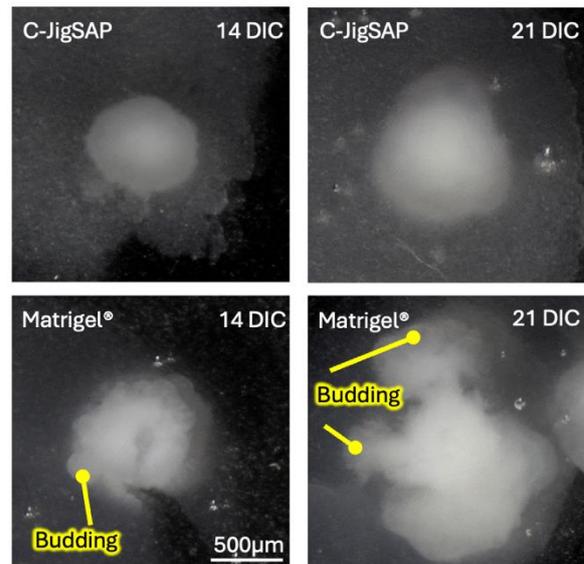


図 1 : C-JigSAP を用いた脳オルガノイド培養

さらに、シングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) 解析により、マトリゲル培養と同等の分化状態に進行していることが確認された (図 2)。これらの結果から、C-JigSAP はマトリゲルと比較して高い均一性をもつ脳オルガノイド培養を可能とする細胞足場材料であることが示唆された。

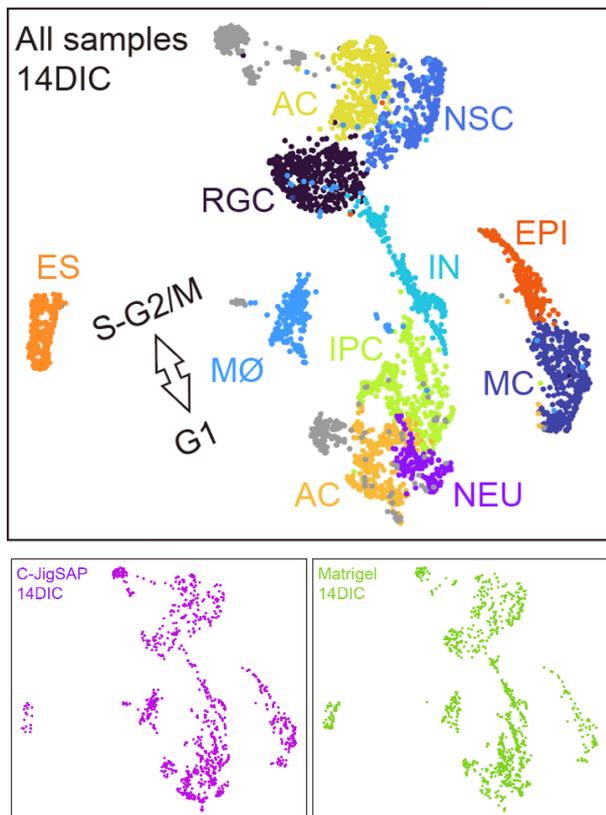


図 2 : C-JigSAP およびマトリゲルで培養した脳オルガノイドの scRNA-seq 解析  
培養条件等は未発表のため割愛するが、培養 14 日後の scRNA-seq 次元圧縮データから、C-JigSAP 培養細胞はマトリゲル培養細胞と同等の分化状態に推移することが明らかとなった。

## (2) UC ナノ粒子の生体適合性評価

オプトジェネティクスは、光を使って細胞機能を制御する技術だが、500nm 以下の波長の可視光は生体組織で散乱・吸収されやすいため、光ファイバーを脳に挿入する侵襲的な方法が使われてきた。これに対し、赤色光や近赤外光を青色光に変換するフォトン・アップコンバージョン (UC) 技術が注目されている。東京大学・楊井教授との共同研究で、重金属を含まない有機フォトン・アップコンバージョンナノ粒子を開発し、生体適合性や水分散性に優れた UC ナノ粒子を用いた非侵襲的なオプトジェネティクスツールを開発してきた。今年度は、東京大学・佐藤教授が開発した PA-Cre 技術を使い、新生仔マウスの大脳皮質神経細胞で青色光応答性の遺伝子発現誘導に成功した。本研究では、UC ナノ粒子の生体適合性評

価を行った。はじめに、ドナー (S1 および S2 分子) やアクセプター (TTBP) の細胞障害性を検討したところ、動物内に投与する濃度 7 mg/mL では障害性は認められなかった (図 3)。

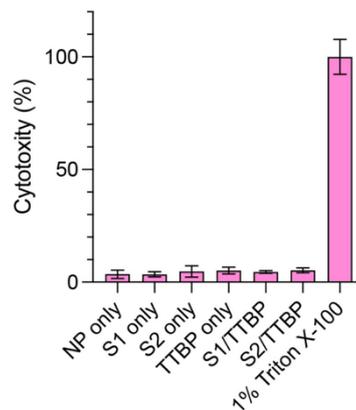


図 3 : UC ナノ粒子の細胞障害性解析  
UC ナノ粒子 (7 mg/mL) を 293T 細胞に 1 時間添加後、培地を除去し、さらに 24 時間培養してから LDH アッセイを行い、細胞毒性を評価した。  
NP : ナノ粒子のみ、S1 only : S1 ドナーのみ、S2 only : S2 ドナーのみ、TTBP only : TTBP アクセプターのみ、S1/TTBP : S1 ドナーと TTBP アクセプターの組み合わせ、S2/TTBP : S2 ドナーと TTBP アクセプターの組み合わせ

次に、脳内に投与した場合の UC ナノ粒子の動態を検討したところ、ミクログリアに取り込まれることが明らかとなった (図 4)。

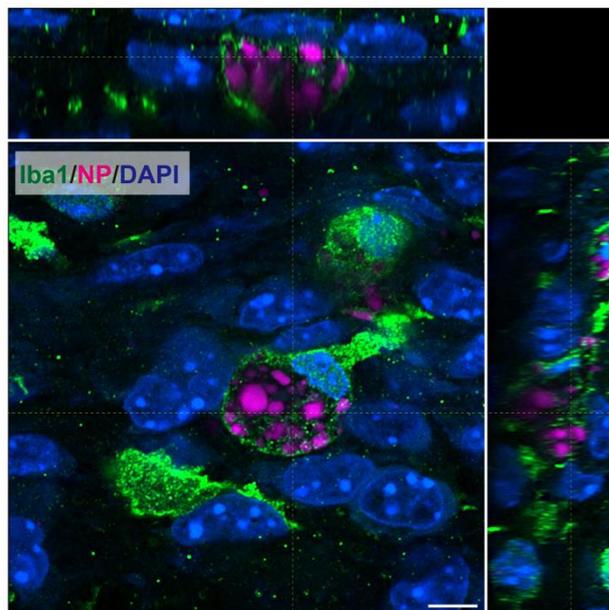


図 4 : UC ナノ粒子の脳内動態  
UC ナノ粒子の脳内分布を評価するため、S2/TTBP/TA-UC ナノ粒子を脳実質に直接注入した。注入 3 日後に灌流固定を行い、脳切片を作製。抗 Iba1 抗体で免疫染色、DAPI で核を染色した結果、ナノ粒子は Iba1 陽性ミクログリア細胞内に集積していた。

さらに、635nm レーザー照射による傷害性を検討するため、HE 染色にて評価したところ、レーザーによる傷害性は認められなかった (図 5)。

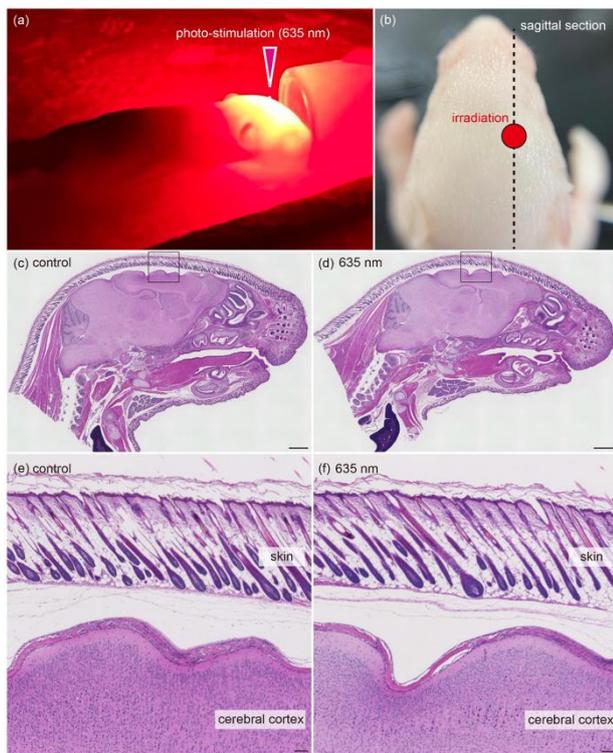


図 5 : UC ナノ粒子の脳内動態

光照射による脳への影響を評価するため、P2 マウスに 635 nm レーザーを 10 回照射し、P5 で灌流固定後、右半球中央から矢状断を作製した。照射の有無による組織変化は認められなかった。

### 3. 今後の展望

今後は、中枢神経系以外の細胞種における C-JigSAP の足場材料としての効果も検討する。

# 業績

## 【原著論文】

### （投稿掲載）

01. Qiming Liu, Tianyue Zhang, Yuka Ikemoto, Yudai Shinozaki, Go Watanabe, Yuta Hori, Yasuteru Shigeta, Takemi Midorikawa, Koji Harano, Yoshimitsu Sagara, "Grinding - Induced Water Solubility Exhibited by Mechanochromic Luminescent Supramolecular Fibers", *Small* (2400063), 2024
02. Tomoya Enjou, Shimpei Goto, Qiming Liu, Fumitaka Ishiwari, Akinori Saeki, Taro Uematsu, Yuka Ikemoto, Sora Watanabe, Go Matsuba, Kouichiro Ishibashi, Go Watanabe, Satoshi Minakata, Yoshimitsu Sagara, Youhei Takeda, "Water-Dispersible Donor-Acceptor-Donor  $\pi$ -Conjugated Bolaamphiphiles Enabling Humidity-Responding Luminescence Color Change", *Chemical Communications* (Vol.60), 3653-3656, 2024
03. Tomoyuki Hamachi, Koki Nishimura, Keita Sakamoto, Yusuke Kawashima, Hironori Kouno, Shunsuke Sato, Go Watanabe, Kenichiro Tateishi, Tomohiro Uesaka, Nobuhiro Yanai, "Triplet dynamic nuclear polarization of pyruvate via supramolecular chemistry", *Chemical Science* (vol. 14), 13842-13850, 2023
04. Shunsuke Okada, Yosuke Matsumoto, Rikana Takahashi, Kenta Arai, Shingo Kanemura, Masaki Okumura, Takahiro Muraoka, "Semi-Enzymatic Acceleration of Oxidative Protein Folding by N-Methylated Heteroaromatic Thiols", *Chemical Science* (Vol.14), 7630-7636, 2023
05. Go Watanabe, Akane Yamazaki, Jun Yoshida, "The Missing Relationship between the Miscibility of Chiral Dopants and the Microscopic Dynamics of Solvent Liquid Crystals: A Molecular Dynamics Study", *Symmetry* (Vol. 15), 1092, 2023

## 【総説・概論】

### （投稿掲載）

01. 味岡 逸樹, 村岡 貴博, "超分子ペプチドゲルの分子設計と分子集合体医薬への応用", *細胞* (vol. 56), 98-102, 2024
02. Takashi Kato, Junya Uchida, Yoshiki Ishii, Go Watanabe, "Aquatic Functional Liquid Crystals: Design, Functionalization, and Molecular Simulation", *Advanced Science* (vol. 11), 2306529, 2023
03. Noriyuki Uchida and Takahiro Muraoka, "Self-assembling materials functionalizing bio-interfaces of phospholipid membranes and extracellular matrices", *Chemical Communications* (Vol.59), 9687-9697, 2023

## 【口頭発表】

01. 原 良佳, 矢口 敦也, 平松 弘嗣, 村岡 貴博  
両親媒性ペプチドのメチオニン酸化に応答するゲルゾル転移と物質放出制御への応用  
第72回高分子学会年次大会, 2023年05月, 高崎
02. 山下 有希乃, 三浦 恵理香, 馬淵 拓哉, 村岡 貴博  
液液相分離を利用したタンパク質フォールディングの促進  
第72回高分子学会年次大会, 2023年05月, 高崎
03. 矢口 敦也, 内田 紀之, 味岡 逸樹, 村岡 貴博  
生体接着性を光制御する螺旋状ファイバー形成ペプチドの開発  
第72回高分子学会年次大会, 2023年05月, 高崎
04. Noriyuki Uchida, Yuichiro Takagi, Takahiro Muraoka  
Design of Phospholipid Membrane Supramolecular Nanosheets and Their Applications to Blood Administration  
第72回高分子学会年次大会, 2023年05月, 高崎
05. 矢口 敦也, 内田 紀之, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博  
らせん状繊維へと自己組織化する生体接着性ゲル化ペプチドの開発  
2023年繊維学会年次大会, 2023年06月, 江戸川区
06. Kaito Nitta, Yoshiaki Shoji, Takanori Fukushima, Go Watanabe  
Molecular Dynamics Simulation of Highly Ordered and Oriented Triptycene Thin Films  
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023年06月, シンガポール
07. Ryosuke Ito, Shunsuke Sato, Takuya Seki, Jun Takeya, Toshihiro Okamoto, Go Watanabe  
Accurate Crystal Structure Prediction of Organic Semiconductors  
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023年06月, シンガポール
08. Daiki Miura, Noriyuki Uchida, Takahiro Muraoka, Go Watanabe  
Molecular Dynamics Simulation Study on the Self-assembly Structures of Amphiphilic Peptides  
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023年06月, シンガポール
09. Saburo Kurihara, Hiroya Nishikawa, Fumito Araoka, Go Watanabe  
A Molecular Dynamics Simulation Study to Investigate the Microscopic Behavior of Ferroelectric Nematic Liquid Crystals  
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023年06月, シンガポール

10. Shunsuke Sato, Barun Dhara, Daigo Miyajima, Go Watanabe  
Structure Prediction of Organic Crystals Using Molecular Dynamics Simulation  
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023 年 06 月, シンガポール
11. Go Watanabe, Ryosuke Ito, Shunsuke Sato, Takuya Seki, Jun Takeya, Toshihiro Okamoto  
Computational Prediction of Dynamics and Structure of Organic Semiconductor Crystals  
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023 年 06 月, シンガポール
12. Atsuya Yaguchi, Noriyuki Uchida, Hirotsugu Hiramatsu, Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka  
Development of a Helix-Forming Photoresponsive Peptide for Controlling Bioadhesion Property  
The 16th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
13. Ken Yoshizawa, Noriyuki Uchida, Takahiro Muraoka  
Membrane-contracting Molecular Machine for Intracellular Delivery with Membrane Fusion  
The 13th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
14. Yoshika Hara, Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu, Takahiro Muraoka  
Kinetics Control of Gel-Sol Transition and Cargo Release of Oxidation Responsive Peptides  
The 15th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
15. Yukino Yamashita, Erika Miura, Mabuchi Takuya, Takahiro Muraoka  
LLPS materials for protein capturing and manipulation  
The 14th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
16. 喜多村 真衣  
Thiol Compounds Bearing Cationic Units Promote Oxidative Protein Folding  
The 16th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
17. 原 央子, 味岡 逸樹, 村岡 貴博  
Brain regeneration by Jigsaw-shaped Self-Assembling Peptide hydrogel (JigSAP)  
第 46 回日本神経科学大会, 2023 年 08 月, 仙台
18. 喜多村 真衣  
濃縮条件でタンパク質フォールディングを促進するミセル形成チオール材料の開発  
第 17 回バイオ関連化学シンポジウム, 2023 年 09 月, 野田
19. 森 圭太, 村岡 貴博  
環状ポリアミン修飾チオール分子を利用した酸化的タンパク質フォールディング促進  
第 17 回バイオ関連化学シンポジウム, 2023 年 09 月, 野田
20. 矢口 敦也, 味岡 逸樹, 平松 弘嗣, 村岡 貴博  
亜急性性脳梗塞治療を目指した新規自己集合性ペプチドの開発と集積構造解析結果に基づくゲル化速度制御  
第 17 回バイオ関連化学シンポジウム, 2023 年 09 月, 野田
21. 佐藤 俊輔, 前田 大光, 渡辺 豪  
分子動力学シミュレーションによるノルコロール誘導体が形成するカラムナー液晶の構造解明  
2023 年日本液晶学会討論会, 2023 年 09 月, 東京
22. 伊藤 良将, 佐藤 俊輔, 關 拓和, 竹谷 純一, 岡本 敏宏, 渡辺 豪  
計算科学を基盤とした有機半導体結晶の高精度な構造予測手法の確立  
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
23. 佐藤 俊輔, Barun Dhara, 宮島 大吾, 渡辺 豪  
有機結晶の構造予測に向けた分子動力学計算による構造安定性の評価  
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
24. 篠崎 雄大, 佐藤 俊輔, 關 拓和, 伊藤 良将, 竹谷 純一, 岡本 敏宏, 渡辺 豪  
分子シミュレーションを用いた p 型有機半導体結晶の集合体構造予測  
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
25. 新田 海統, 庄子 良晃, 福島 孝典, 渡辺 豪  
分子動力学シミュレーションによる高秩序・高配向性を有するトリプチセン薄膜の形成機構解明  
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
26. 森 圭太, 村岡 貴博  
修飾チオール化合物による酸化的タンパク質フォールディング促進: 環状ポリアミン配位子の導入効果  
錯体化学会第 73 回討論会, 2023 年 09 月, 水戸
27. 三浦 大輝, 村岡 貴博, 渡辺 豪  
分子動力学シミュレーションによる両親媒性ペプチドの自己組織化構造に関する研究  
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
28. 味岡逸樹  
超分子ペプチドゲルによる人工足場創製と損傷脳再生  
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
29. 喜多村 真衣  
濃縮環境での酸化的タンパク質フォールディング促進を目指した材料開発  
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
30. 近藤 詩織, 内田 紀之, 村岡 貴博  
超分子ファイバーを用いた液液相分離ドロプレットの安定化および光制御  
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川

31. 山下 有希乃, 三浦 恵理香, 馬淵 拓哉, 村岡 貴博  
液液相分離によるタンパク質の凝集抑制及びフォールディング促進  
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
32. 矢口 敦也, 内田 紀之, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博  
構造可変性により生体分子を脱着制御する低分子ペプチドゲル化剤の開発  
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
33. 鈴木 洗希, 野尻 涼矢, 村岡 貴博  
凝集抑制効果を有するチオール化合物のタンパク質フォールディング促進効果  
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
34. Go Watanabe  
A Computational Approach for Predicting Dynamics and Structure of Organic Crystals  
The 6th International Conference on Molecular Simulation, 2023 年 10 月, 台湾
35. 矢口 敦也, 内田 紀之, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博  
螺旋構造形成により生体接着制御する新規自己集合性ペプチドの開発と応用  
第 13 回 CSJ 化学フェスタ 2023, 2023 年 10 月, 東京
36. 篠崎 雄大, 佐藤 俊輔, 關 拓和, 伊藤 良将, 竹谷 純一, 岡本 敏宏, 渡辺 豪  
計算科学を用いた p 型有機半導体の集合体構造予測  
第 13 回 CSJ 化学フェスタ, 2023 年 10 月, 東京
37. 馬場 ひとみ, 菱田 真史, 渡辺 豪  
タンパク質の熱変性ダイナミクスに関する分子動力学的研究  
第 13 回 CSJ 化学フェスタ, 2023 年 10 月, 東京
38. 村岡 貴博  
損傷脳を再生する自己集合性ペプチド材料  
第 96 回日本生化学会大会, 2023 年 10 月, 福岡
39. Itsuki Ajioka  
Supramolecular Biomaterials for Injured Brain Regeneration  
The 10th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress, 2023 年 11 月, 韓国
40. 喜多村 真衣, 村岡 貴博  
疎水性空間を有する酸化的タンパク質フォールディング促進剤の開発  
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
41. 吉澤 憲, 内田 紀之, 村岡 貴博  
光応答性膜融合ベシクルの開発と細胞内物質輸送への応用  
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
42. 近藤 詩織, 内田 紀之, 村岡 貴博  
光選択的な液液相分離ドロプレットの安定性制御を可能にする自己集合性ペプチドファイバーの開発  
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
43. 原 良佳, 矢口 敦也, 平松 弘嗣, 村岡 貴博  
メチオニン含有ペプチドのゲルゾル転移と物質放出の速度制御  
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
44. 山下 有希乃, 三浦 恵理香, 馬淵 拓哉, 村岡 貴博  
液液相分離を用いた熱による酸化的タンパク質フォールディング促進  
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
45. 矢口 敦也, 内田 紀之, 味岡 逸樹, 村岡 貴博  
成長因子徐放性を有する超分子ゲル化ペプチドの開発と亜急性期脳梗塞治療応用  
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
46. 佐藤 俊輔, Barun Dhara, 宮島 大吾, 渡辺 豪  
分子動力学シミュレーションを用いた有機結晶の構造安定性評価  
第 37 回分子シミュレーション討論会, 2023 年 12 月, 福井
47. 石橋 広一朗, 石井 佐和, 露木 弘美, 芹澤 武, 渡辺 豪  
分子動力学計算による結晶性セルロース集合体の生体分子吸着特性の解析  
第 37 回分子シミュレーション討論会, 2023 年 12 月, 福井
48. 喜多村 真衣, 村岡 貴博  
高濃度タンパク質の酸化的フォールディングを促進する両親媒性チオール化合物の開発  
第 46 回日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月, 神戸
49. 味岡 逸樹  
Molecular design and development of supramolecular peptide hydrogels promoting angiogenesis after ischemic brain stroke  
第 46 回日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月, 神戸
50. Shiori Takayama, Saori Akimoto, Atsuya Yaguchi, Takahiro Muraoka, Chikako Hara-Miyauchi, Itsuki Ajioka  
Viscoelastic Control of Tissue Culture Hydrogels and Their Application to Retinal Explant Culture  
第 46 回日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月, 神戸
51. 内田 紀之, 笠 勇之助, 松原 輝彦, 佐藤 智典, 安楽 泰孝, 村岡 貴博  
ウイルスなどの巨大生体高分子の高効率封入・無毒化を可能にする膜変形リポソーム  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
52. 矢口 敦也, 味岡 逸樹, 村岡 貴博  
生体組織の立体培養と回収を可能にする高強度と選択的分解性を兼ね備えた超分子ペプチドゲルの開発  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋

53. Keita Mori, Takahiro Muraoka  
Oxidative Protein Folding Driven by Disulfide Compounds  
Containing Cyclic Polyamine Ligands  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
54. 渡辺 豪  
機能性ソフトマテリアルの構造・物性解明: 計算科学  
とデータ科学によるアプローチ  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 千葉
55. 山下 有希乃, 三浦 恵理香, 馬淵 拓哉, 村岡 貴博  
酸化還元活性を付与した液液相分離材料によるタンパ  
ク質フォールディング促進  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
56. 樋口 元気, 内田 紀之, 村岡 貴博  
液-液相分離を安定化するグラフトポリマーの開発と  
生体分子の高感度検出  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
57. 原 良佳, 矢口 敦也, 平松 弘嗣, 村岡 貴博  
メチオニン含有ペプチドでのゲルゾル転移と物質放出  
速度制御  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
58. 喜多村 真衣, 村岡 貴博  
ミセル形成チオール化合物による高濃度でのタンパク  
質フォールディング促進  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
59. 鈴木 洗希, 野尻 涼矢, 齋尾 智英, 村岡 貴博  
寛容なタンパク質認識特性を持つ酸化的フォールディ  
ング促進剤の開発  
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
60. 村岡 貴博  
損傷脳機能回復を促す自己集合ペプチド分子技術  
日本薬学会第 144 年会「中分子創薬に資する次世代分  
子技術」, 2024 年 03 月, 横浜
61. 村岡 貴博  
レドックス制御によるタンパク質フォールディング促  
進  
日本薬学会第 144 年会「構造薬科学 — “分子” 構造  
を見る、知る、操る—」, 2024 年 03 月, 横浜
62. 森 圭太, 齋尾 智英, 村岡 貴博  
環状ポリアミン誘導体の金属配位によるタンパク質凝  
集抑制と酸化的フォールディング促進  
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜
63. 吉澤 憲, 内田 紀之, 村岡 貴博  
可視光に応答して膜融合を発現するリボソームの開発  
と細胞内物質輸送への応用  
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜
64. 原 良佳, 矢口 敦也, 平松 弘嗣, 村岡 貴博  
超分子ペプチドゲルのゾル化転移速度を合理的に制御  
する分子設計  
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜
65. 内田 紀之, 石坂 龍, 河北 杏樹, 奥村 正樹, 村岡 貴  
博  
リン脂質膜上におけるペプチド受容体の自己集合によ

り誘導される熱力学的安定なチューブ状リン脂質膜の  
作成と応用

日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜

66. 矢口 敦也, 味岡 逸樹, 村岡 貴博  
選択的分解能を持つ高強度超分子ペプチドゲルの開発  
と三次元組織培養への応用  
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜

#### 【特許】

国内特許出願 2 件

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 有望シーズ展開事業

### 「光スイッチ医療創出」プロジェクト

◆ 統括	16
◆ 光スイッチ細胞医薬のための近赤外光スイッチタンパク質の開発	19
◆ 光スイッチ遺伝子医薬の開発	22
◆ 業績	24

# 「光スイッチ医療創出」プロジェクト

プロジェクトリーダー 佐藤 守俊

## 【基本構想】

本プロジェクトは、光操作に基づいて新たな医療技術を創出することを目的としている。医薬品として用いられる分子（化合物、ペプチド、抗体、酵素など）や細胞、ウイルス等は、いったん生体の中に入ってしまうと、その働きを生体の外からコントロールするのが極めて困難である。このことが、薬効が高く副作用が低い優れた医薬品を開発する上での大きなハードルとなっている。本プロジェクトでは、乗用車に取り付けられたアクセルやブレーキのように、生体の中に入った医薬品の働きを光で、特に、生体組織の透過性が極めて高い長波長の光で自由自在に操作するための、一般性・汎用性の高い基盤技術を開発する。さらに、この基盤技術を用いて、ゲノムの働きを光刺激でコントロールしたり、がん細胞を光刺激で破壊することで、革新的なゲノム治療やがん治療を実現する新たな技術を開発する。ゲノム治療については、生体組織に光を照射して変異遺伝子の塩基配列を正確に書き換えることができるようになったり、生体組織の遺伝子の発現を自由自在に光照射でコントロールできるようになれば、今までに治療法がなかった様々な難病（遺伝子疾患）の治療に大きく貢献し、アンメット・メディカル・ニーズに応えることが可能になる。DNA を標的とした光操作技術に加えて、RNA を標的とした光操作技術（RNA の転写レベルの光操作技術）を開発できれば、ゲノム治療の安全性をさらに高めるだけでなく、ゲノム治療の適用範囲を大幅に拡張できる。このような生体（in vivo）におけるゲノムの光操作だけでなく、例えば、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）のゲノム DNA の塩基配列を、光で正確に書き換えることができるようになれば、遺伝子疾患を有する患者への再生医療にも大きく貢献できると考えている。またがん治療についても、本プロジェクトで開発する技術は、光照射を施した部位でのみ薬効を発揮させることができるため、従来のがん治療技術よりも大幅に薬効を高めるためのアイデアを導入しても安全性を担保できるのが大きな特長である。本プロジェクトで開発する技術により、今まで治療法がなかった難病の治療に加えて、長波長の光照射による革新的ながん治療が実現すれば、医療分野へのインパクトは非常に大きく、関連産業の振興に大きく貢献することが期待される。

## 1. 2024 年度の研究目的

生命現象の光操作を実現する上で、佐藤 P が最も重要と考えたのは、操り人形で言えばヒモとか棒に相当する基盤技術の開発である。植物や菌類のように光を利用して生きている生物は、光受容体と呼ばれるタンパク質を持っている。光受容体は、光を吸収すると大きく構造変化したり、別のタンパク質と結合したりすることにより情報を伝えている。つまり光受容体は、光による入力をタンパク質の構造変化や結合といった力学的シグナルとして出力できるのだ。しかし、野生型の光受容体は、反応速度が遅いなどの問題を抱えていることが多い。佐藤 P は糸状菌の一種であるアカパンカビ（*Neurospora crassa*）が持っている光受容体に着目し、これに対して様々なアミノ酸変異を導入してその性質を大幅に改良したり、新しい機能を付与したりするなどして、Magnet システムと名付けた光スイッチタンパク質を開発した（参考文献 1）。Magnet システムは、青色の光を照射すると互いに結合し、光照射をやめると解離するタンパク質のペアである。Magnet システムにタンパク質 A とタンパク質

B を連結すれば、A と B の結合・解離を青色光のオン・オフでコントロールすることができる。この Magnet システムの特長を利用することで、光で指令を与えて、酵素などのあらゆるタンパク質の働きを私たちの意のままに操作できるようになった。

佐藤 P では先行研究によって、Magnet システムを様々なゲノムエンジニアリングツール（ゲノム編集で利用される CRISPR-Cas9 システムなど）と組み合わせて、多様な光操作技術を開発してきた。これにより、光が得意とする高い空間・時間制御能に基づいて、生体組織の中の狙った部位や狙ったタイミングで、ゲノム DNA の塩基配列を書き換えたり（参考文献 2、3）、ゲノムにコードされた遺伝子の組換えを実行したり（参考文献 4、5、6）、ゲノム遺伝子の発現を自由自在に操作できるようになった（参考文献 7）。さらに最近では、ゲノムエンジニアリングツールに限らず、がん治療に応用可能なタンパク質の光操作にも Magnet システムを展開している（参考文献 8）。このような佐藤 P の一連の研究は、基礎生命科学を革新するリサーチツールを提供するとともに、既存

の治療技術とは全く異なる、次世代の治療技術（ゲノム治療、がん治療など）につながる可能性を秘めている。

上述のゲノムの光操作技術や光駆動型の腫瘍溶解性ウイルスはいずれも、佐藤 P が開発した光スイッチタンパク質“Magnet システム”に立脚している。Magnet システムは、光操作のためのツールを我々が制御するための「アクセル」や「ブレーキ」であり、様々な生命現象の光操作を実現する極めて汎用性の高い基盤技術として位置付けることができる。本プロジェクトでは、Magnet システムに代わる新たな基盤技術として、生体組織透過性が極めて高い長波長の光照射でコントロール可能な光スイッチタンパク質を創出し、これを新たなゲノム治療技術とがん治療技術に展開することを目的とする。プロジェクト 3 年目となる 2024 年度は、以下の(1)から(3)の各項目を重点項目として開発研究を実施した。

- (1) 光合成細菌の相互作用タンパク質に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発
- (2) 進化分子光学的手法に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発
- (3) 新たなコンセプトの光スイッチタンパク質の開発

## 2. 2024 年度の研究成果

以下に、2024 年度の具体的な研究成果を挙げる。

- (1) 光合成細菌の相互作用タンパク質に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

青色光はヘモグロビンに吸収されてしまうため、生体組織での透過性が低い。一方、650 nm から 800 nm の光はヘモグロビンに吸収されず、生体組織透過性が高いことが知られている。このため、この波長領域で利用できる光スイッチタンパク質の開発ニーズは極めて高い。この観点から、光合成細菌が有する近赤外光受容体とその結合タンパク質が、近赤外光スイッチタンパク質として注目を集めている。佐藤 P は、前述のゲノム遺伝子の光活性化システム（参考文献 7）において、Magnet システムをこの既存の近赤外光スイッチタンパク質で置き換えてみた。その結果、この近赤外光スイッチタンパク質には暗所でのリーク活性という致命的な欠点があることが明らかになった。このリーク活性は光操作の基盤技術としては致命的な欠点である。

佐藤 P は近赤外光スイッチタンパク質にアミノ酸変異を導入することで暗所でのリーク活性を低減させることを目的に研究を行なっている。さまざまな変異体を作製し、それぞれの変異体をゲノム遺伝子の光活性化システムに導入して、光照射条件と暗所条件での比較を行った。その結果、暗所リーク活性を大幅に低減させることに成功している。このように近赤外光スイッチタンパク質の改良版を導入した遺伝子活性化システムを NIR-CPTS（CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system by near-infrared light）と名付けた。まず培養細胞での評価を行い、近赤外光の照射によって、NIR-CPTS が非常に効率よくゲノム遺伝子の発現を活性化できることを明らかにした。さらに、マウスの生体（in vivo）での

NIR-CPTS の評価を行った。マウスの肝臓に NIR-CPTS を導入して、生体外から LED パネルを使って光照射を行ったところ、NIR-CPTS がマウスのゲノムにコードされた遺伝子を生体外からの非侵襲的な光照射で活性化できることが明らかになった。現在、より複雑な遺伝子の働きを自在に操作するための新たな技術開発を実施している。加えて、近赤外光スイッチタンパク質の作動メカニズムを解明し、その機能をさらに向上させるきっかけを掴むことにも成功している。

- (2) 進化分子光学的手法に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

研究項目 (1) の光スイッチタンパク質は、光合成細菌の細胞の中で実際に使われている天然のタンパク質を改変して開発する光スイッチタンパク質である。研究項目 (2) では、研究項目 (1) とは全く異なり、進化分子工学的手法に基づいて、全く新しい長波長の光スイッチタンパク質を開発することを目標とする。進化分子工学的手法に基づいて、全く新しいタンパク質相互作用に基づいて光スイッチタンパク質を開発することにより、天然のタンパク質相互作用のデメリットを克服するような、新たな光スイッチタンパク質が開発できるとの期待を持ってこの研究項目 (2) を遂行している。

さまざまなバクテリアが持つ赤色光受容体タンパク質のバクテリオフィトクロム（BphP）の中で、特に放射線抵抗性細菌（*Deinococcus radiodurans*）が有する BphP

（DrBphP）に着目した。DrBphP は哺乳類細胞に内在する色素のビリベルジン（BV）を補因子として結合し、赤色光（～660 nm）に応答して構造が大きく変化する性質を持っている。この DrBphP の構造変化を認識して結合するタンパク質（以下、バインダー）を開発することで、赤色光スイッチタンパク質を開発できると考えた。この DrBphP とアフィボディ（バインダー）からなる光スイッチタンパク質は、本研究グループが先行研究で開発した青色光スイッチタンパク質“Magnet”（マグネット）の赤色バージョンという意味を込めて“MagRed”（マグレッド）と名付けた（参考文献 9）。

さらに、MagRed を用いてゲノムにコードされた遺伝子を発現の赤色光で操作する技術（Red-CPTS）を開発したところ、暗環境下で遺伝子発現の活性がほとんど検出されず、赤色光照射で非常に効率よく遺伝子発現を誘導できることから、MagRed が極めて高い光制御能を有することがわかった。Red-CPTS を研究項目 (1) のケースと同様に、マウスの肝臓に導入して評価を行った。生体外から LED パネルを使って光照射を行ったところ、Red-CPTS がマウスのゲノムにコードされた遺伝子を生体外からの非侵襲的な光照射で非常に効率よく活性化できることが明らかになった。加えて、暗所でのリーク活性はほとんど観察されなかったことから、MagRed が生体内でも極めて高い光制御能を示すことが明らかになった。

さらに MagRed を用いた新たな光操作技術の研究にも着手している。これは MagRed がさまざまなタンパク質の

働きを光操作できる高い一般性を有しているためである。MagRedは、生体深部における生命現象の解明や、遺伝子疾患や細胞治療など生命科学・医学分野を含む幅広い研究分野において役立つことが期待される。現在、MagRedに対してさらにプロテインエンジニアリングを施し、その機能を向上させる研究に取り組んでいる。

### (3) 新たなコンセプトの光スイッチタンパク質の開発

佐藤 P では先行研究で、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) が持っている光受容体に着目し、これに対して様々なアミノ酸変異を導入してその性質を大幅に改良したり、新しい機能を付与したりするなどして、光スイッチタンパク質の Magnet システムを開発してきた。この Magnet システムを用いることで、光で指令を与えて、酵素などのあらゆるタンパク質の働きを私たちの意のままに操作できるようになり、PA-Cas9 や PA-Cre といった光操作ツールが佐藤 P によって生み出されている。佐藤 P では現在、この Magnet システムの改良を進めている。この研究の過程で、単なる改良にとどまらず、今までの光スイッチタンパク質とは異なる、新たなコンセプトの光スイッチタンパク質を開発しつつある。

Magnet システムは光刺激で 2 量体を形成する相互作用型の光スイッチタンパク質であるが、現在、この Magnet システムに対して、「concatenation」と名付けたアプローチでの改良を進めている。このアプローチによって、光照射で極めて効率よく分割タンパク質を活性化でき、かつ暗所ではほとんど活性を持たない、新たな構造変化型の光スイッチタンパク質を開発しつつある。加えて、この光スイッチタンパク質を、PA-Cas9 や PA-Cre といった佐藤 P がこれまで開発してきた光操作ツールに導入することで、これらのパフォーマンスを大幅に向上させることが明らかになりつつある。このアプローチをさらに継続して、新たな光スイッチタンパク質の開発を完結させるとともに、佐藤 P で開発を進めている新たな光操作ツールに導入し、特に光スイッチ遺伝子医薬としての開発を進めて、細胞レベルや動物レベルでの検証研究を実施していく予定である。例えば、PA-Cre について、その光応答性を大幅に向上させるとともに、暗所での活性（リーク活性）を大幅に低減させ、光照射による制御能を大幅に向上させることに成功している。本研究の光スイッチタンパク質は、これまでの相互作用型の光スイッチタンパク質にはない特長を有しているため、これまでの相互作用型の光スイッチタンパク質では困難だった新たな光スイッチ医薬の創出が可能になると考えている。これについても開発研究をスタートさせ、すでに有望な候補物質の創出に成功している。

なお、Magnet システムを用いた応用研究にも積極的に取り組んでおり、例えば、Magnet システムと制限酵素を組み合わせた新たなツールを設計・開発し、光刺激によって細胞内の染色体の再編成を誘導することにも成功している。

### 3. まとめと今後の展望

上述のように、2024 年度までの研究によって、研究項目

(1)、(2)、(3) の新たな光スイッチタンパク質を開発することができた。最も重要なのは、光スイッチタンパク質が極めて一般性が高く、様々な光操作技術を実現できる基盤技術になり得ることである。佐藤 P は、光スイッチタンパク質によって、幅広い創薬モダリティを大きく革新できると考えている。この観点から、遺伝子医薬や細胞医薬を含めた様々な創薬モダリティに光操作技術を導入するための研究を実施している。2025 年度以降は、この様に幅広く展開する探索研究の結果を踏まえて、事業としてより大きな価値を持つ医療技術と光操作技術を組み合わせ、社会実装に向けた研究を進めていくことが重要と考えている。さらに、光スイッチタンパク質は、医療技術としてのみならず、幅広い分野に応用可能と考えており、バイオものづくり等の先端分野への光スイッチタンパク質の応用に向けて研究を実施している。

#### 【参考文献】

1. F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, "Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins" *Nat. Commun.*, 6, 6256 (2015).
2. Y. Nihongaki, T. Otabe, Y. Ueda and M. Sato, "A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation" *Nat. Chem. Biol.*, 15, 882-888 (2019).
3. K. Morikawa, K. Furuhashi, C. de Sena-Tomas, A. L. Garcia-Garcia, R. Bekdash, A. D. Klein, N. Gallerani, H. E. Yamamoto, S.-H. E. Park, G. S. Collins, F. Kawano, M. Sato, C.-S. Lin, K. L. Targoff, E. Au, M. Salling and M. Yazawa, "Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for in vivo mouse applications" *Nat. Commun.*, 11, 2141 (2020).
4. Y. Koganezawa, M. Umetani, M. Sato and Y. Wakamoto, "History-dependent physiological adaptation to lethal genetic modification under antibiotic exposure" *eLife*, 11, e74486 (2022).
5. Y. Kuwasaki, K. Suzuki, G. Yu, S. Yamamoto, T. Otabe, Y. Kakihara, M. Nishiwaki, K. Miyake, K. Fushimi, R. Bekdash, Y. Shimizu, R. Narikawa, T. Nakajima, M. Yazawa and M. Sato, "A red light-responsive photoswitch for deep tissue optogenetics" *Nat. Biotechnol.*, 40, 1672-1679 (2022).
6. T. Okura, M. Tahara, N. Otsuki, M. Sato, K. Takeuchi and M. Takeda, "Generation of photocontrollable recombinant bovine parainfluenza virus type 3" *Microbiol. Immunol.*, 67, 166-170 (2023).
7. Y. Aono, T. Nakajima, W. Ichimiya, M. Yoshida and M. Sato, "Highly efficient fluorescent probe to visualize protein interactions at the superresolution" *ACS Chem. Biol.*, 19, 1271-1279 (2024).
8. T. Nakajima, Y. Kuwasaki, S. Yamamoto, T. Otabe and M. Sato, "A red light-activatable endogenous gene transcription system" *Methods Mol. Biol.*, 2840, 45-55(2025).

# 光スイッチ細胞医薬のための 近赤外光スイッチタンパク質の開発

「光スイッチ医療創出」プロジェクト  
中嶋 隆浩

## 1. はじめに

光操作技術・オプトジェネティクスは、淡水性プランクトンであるクロミドモナスが有するチャンネルロドプシンというタンパク質の発見により始まった。チャンネルロドプシンは、光を受容することで活性化し、構造変化をして陽イオンを透過するようになる光活性化型の陽イオンチャンネルである。マウスの培養神経細胞にチャンネルロドプシンを異所性に発現させると、光照射依存的に活動電位を発生させられることが示された（参考文献1）。さらに、マウスの脳にチャンネルロドプシンを発現させて、光ファイバーを脳に埋め込むことで、光によってマウスの行動をコントロールできることも示された（参考文献2）。このように、チャンネルロドプシンを用いた光操作技術は、神経科学の分野に革命をもたらした。

しかし、チャンネルロドプシンは細胞内の陽イオン濃度を操作することしかできない。より一般的に、例えばタンパク質や酵素の活性を光で操作できるようになったり、遺伝子の発現を光で操作できるようになれば、神経細胞だけでなく様々な細胞・生物に対して光操作技術を用いることができる。そのような目的のために、佐藤プロジェクトは、光スイッチタンパク質と呼ばれる光操作の基盤技術の開発を行っている。光スイッチタンパク質とは、光によって結合・解離をコントロールできるタンパク質ペアのことである。佐藤プロジェクトの先行研究では、Magnet システムという青色光スイッチタンパク質を開発した（参考文献3）。Magnet システムを用いることで、光操作技術は、細胞内の様々なタンパク質や酵素の活性を光で自在に操作できる時代に突入した。

しかし、青色の光はヘモグロビンに吸収されてしまうため、生体組織透過性が比較的低い。そのため、生体外からの青色光照射で効率よく操作できる部位は、皮膚や筋肉、肝臓の腹側など、生体表面から近い組織・器官に限定されてしまい、青色光が届きにくい生体深部に位置する臓器や骨の中の骨髄、あるいは頭蓋骨に覆われた脳などの操作は困難であることが明らかになりつつある。したがって生体深部で光操作を行うためには、ヘモグロビンに吸収されず生体組織透過性が高い650 nm から800 nm の近赤外光を用いることが望ましい。近年、赤色光（660 nm）による光スイッチタンパク質は、いくつか報告されてきている。しかし、そのいずれもが汎用性や一般性が無いという課題や、光照射に関係なく作動してし

まい光制御能が著しく低いといった課題、また、哺乳類細胞内には無い光合成生物由来の色素の添加が必要といった課題を抱えていた。そこで、我々はこれらの既存の技術の問題を克服できる、新たな赤色光スイッチタンパク質（MagRed：マグレッド）を開発した（参考文献4、5）。MagRed は、外来性の色素の添加を必要とせず、赤色光のON・OFFによる極めて高い制御能を有する。また、MagRed は、高い汎用性を持ち、赤色光による遺伝子発現やDNA組換え反応の光操作を実現した（参考文献4、5）。

今回我々は、さらに長波長の光で作動する近赤外光スイッチタンパク質の開発を行った。この目的のために我々は、さまざまなアミノ酸変異体やドメインの欠失変異体、あるいはドメインを人工的に並び替えた変異体を作製して評価した。このようにして得られた近赤外光スイッチタンパク質は、MagRed の活性化光である660 nm よりさらに100 nm以上長波長の800 nmで作動する。したがって、これを用いることで、さらに生体の奥深くでの光操作が可能になる。

## 2. 実験と結果

### (1) 近赤外光スイッチタンパク質の開発

近赤外光スイッチタンパク質の開発は、光合成細菌が有する天然の近赤外光受容体とその結合タンパク質を出発物質として用いた。まず、我々はこの天然の近赤外光スイッチタンパク質が、致命的な欠点を持つことを明らかにした。この性質を評価する系として、佐藤プロジェクトで開発したゲノム遺伝子の光活性化システムを用いた。以下にその詳細を述べる。

このゲノム遺伝子の光活性化システムは、CRISPR-Cas9 システムを利用しており、次のような動作原理となっている（図1）。Cas9 の10番目のアミノ酸と840番目のアミノ酸位変異を導入してDNA切断活性を欠損させた変異体（Cas9<sup>D10A/H840A</sup>；dCas9）とガイドRNAの複合体を、ゲノム遺伝子上流に結合させておく。ガイドRNAには、MS2タンパク質が結合するアプタマー配列が挿入してある。MS2タンパク質と光スイッチタンパク質の一方を繋ぎ、もう一方の光スイッチタンパク質には転写活性化因子を繋いでおく。こうすることで、光照射によって光スイッチタンパク質を結合させた時のみ、転写活性化因子をゲノム遺伝子直上に近接させて、遺伝子活性化を誘起させる

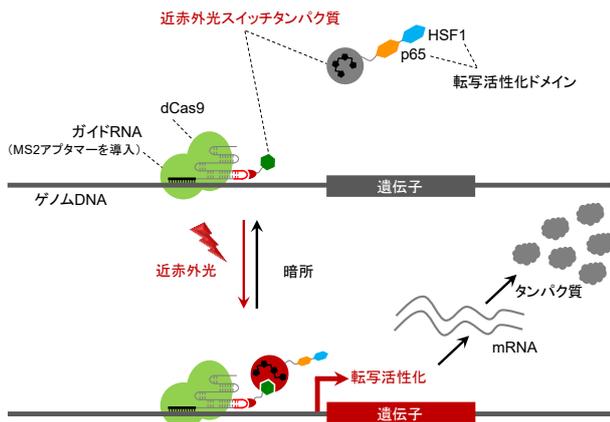


図1. ゲノム遺伝子の光活性化システム (CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system; CPTS) の原理図。

ことができる (図1)。ここに近赤外光スイッチタンパク質を導入したところ、光照射を行なった場合のみならず、暗所に保持した場合においても遺伝子活性化を誘起してしまうことがわかった。Magnet や MagRed を利用した場合にはこの暗所での活性化は観察されなかったことから、近赤外光スイッチタンパク質を導入した場合に観察された活性化は、近赤外光スイッチタンパク質の暗所での結合活性 (リーク活性) に原因があると考えられる。このリーク活性は非常に高いため、光照射を行なっても、僅かにしか遺伝子活性化を誘起できない。このように、暗所でも高いリーク活性を持つことは、光照射を行う前から活性化が起こっていることを意味しており、光操作の基盤技術としては致命的な欠点となる。

そこで、我々は近赤外光スイッチタンパク質にさまざまな変異を導入することで、この暗所のリーク活性を低減させられるかを検討した。我々の変異導入は複数のアプローチからなる。まず、天然の近赤外光受容体のさまざまなアミノ酸残基を1つずつアラニンに置換して、どのアミノ酸残基が結合活性に影響を与えるかを調べていった。この結果、暗所下の結合に影響を与えるアミノ酸残基と近赤外光照射下の結合に影響を与えるアミノ酸残基が存在することがわかり、アミノ酸残基のアノテーション付けに成功した。次に、そのうちのいくつかのアミノ酸残基を選択して、20種類のアミノ酸すべての置換体を作製し、暗所下の結合活性が低い性質や近赤外光照射下の結合活性が高い性質を持つものを選び出した。次に、天然の結合パートナーについても同様に、アラニン置換体によるアノテーション付けと、アミノ酸残基の最適化を行った。また、天然の結合パートナーは5つのドメインからなっており、これらのドメインの順番を入れ替えたり (ドメインシャッフリング)、欠失させたり (ドメイン欠失変異体) することで暗所リーク結合活性が変化するかどうかを調べた。その結果、天然では存在しない順番のドメイン連結体が、暗所でのリーク活性を抑えることを見出した。以上に述べてきた変異体は、それぞれ組み合わせることが可能である。我々は、

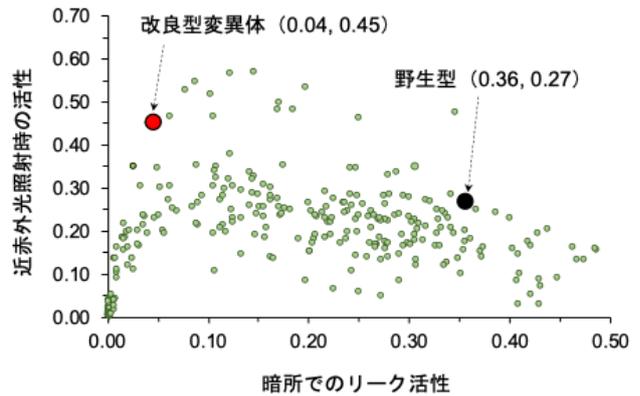


図2. 各アプローチを組み合わせ、さまざまな変異体を作製することで、暗所下リーク活性を大幅に低減させることに成功した。

さまざまな変異体の組み合わせを作製し、その結果、図2に示すように、暗所リーク活性を野生型の10分の1に低減させ (図2、野生型 0.36 に対して改良型変異体 0.04)、近赤外光照射時の活性を野生型よりも向上 (図2、野生型 0.27 に対して改良型変異体 0.45) させた変異体を作製できた。そして、このようにして開発した近赤外光スイッチタンパク質を導入した遺伝子活性化システムを NIR-CPTS (CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system by near-infrared light) と名付けた。

## (2) マウス生体 (in vivo) における近赤外光照射依存的なゲノム遺伝子の活性化

先に述べたように、650 nm から 800 nm の光は生体組織透過性が高い。我々の開発した近赤外光スイッチタンパク質の波長依存性を、NIR-CPTS の遺伝子活性化を指標として調べたところ、当該システムは、780 nm が最適の波長であり、800 nm でも十分な遺伝子活性化を誘導できることがわかった (図3)。そこで我々は、NIR-CPTS を用いてマウスの生体 (in vivo) で遺伝子活性化を制御できるかどうか調べた。まず、hydrodynamic tail vein injection 法でマウスの肝臓に NIR-CPTS を導入した (図4)。マウスへの近赤外光照射は、生体外から LED パネルを使って行なっ

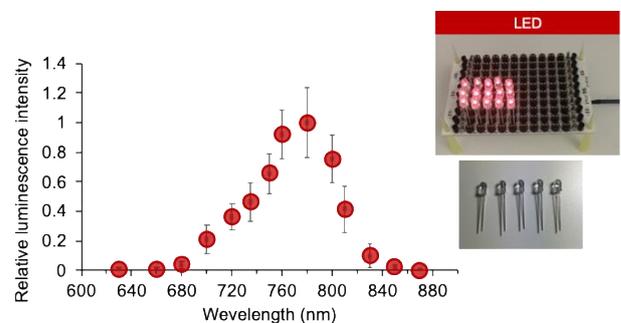


図3. NIR-CPTS の活性の波長依存性。800 nm 以上の長波長光でも光活性化できる。各波長で図右上のような LED を用いて光照射した。

た(図5)。このような非侵襲的な光照射方法でも、マウス肝臓において、レポーター遺伝子の活性化を誘起することができた。さらに、NIR-CPTS を用いて、マウスのゲノムにコードされた遺伝子 (*ASCL1* を例に) を非侵襲的な光照射で活性化できることも明らかになった。このように、我々は開発した近赤外光スイッチタンパク質の特性を、NIR-CPTS というゲノム遺伝子の活性化技術として評価した。その結果、開発した近赤外光スイッチタンパク質は生体内でも光操作の基盤技術として利用できることがわかった。

現在、より複雑なゲノム遺伝子の働きを自在に操作できるようにするために、複数の波長の光照射で操作する新たな技術の開発を行っている。また、それに加えて、近赤外光スイッチタンパク質の作動メカニズムの解明も行った。この知見を用いて、さらなる機能向上も開始している。

### 3. 今後の展望

生体組織透過性が極めて高い近赤外光でコントロール可能な光スイッチタンパク質を開発し、これを用いて、近赤外光照射によってゲノム遺伝子を活性化する光操作ツール (NIR-CPTS) の開発を行った。今後は、がんを治療する細胞医薬に NIR-CPTS を搭載させて、光スイッチ細胞医薬を開発する。これは、光照射を施した部位でのみ薬効を発揮させることができるため、従来のがん治療に比べて、正常組織への副作用を抑えて安全性を担保しながら、薬効を大幅に高めることが可能である。長波長の光照射による革新的ながん治療が実現すれば、医療分野へのインパクトは非常に大きく、関連産業の振興に大きく貢献することが期待される。

#### 【参考文献】

1. M. Hausser and S. Smith, "Controlling neural circuits with light" *Nature*, **446**, 617-619 (2007).
2. F. Zhang, V. Gradinaru, A. Adamantidis, R. Durand, R. Airan, L. Lecea and K. Deisseroth, "Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nature Protocols*, **5**, 439–456 (2010).
3. F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, "Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins" *Nature Communications*, **6**, 6256 (2015)
4. Y. Kuwasaki, K. Suzuki, G. Yu, S. Yamamoto, T. Otabe, Y. Kakihara, M. Nishiwaki, K. Miyake, K. Fushimi, R. Bekdash, Y. Shimizu, R. Narikawa, T. Nakajima, M. Yazawa and M. Sato, "A red light-responsive

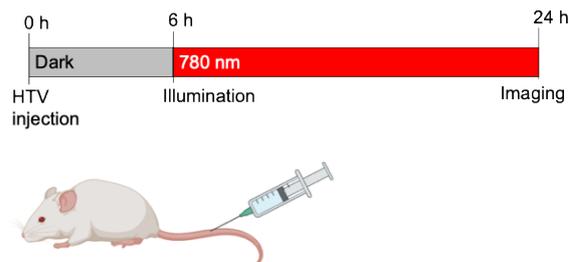


図4. Hydrodynamic tail vein injection 法を用いて、マウス肝臓に NIR-CPTS を遺伝子導入する。図上部に実験のタイムスケジュールを記した。

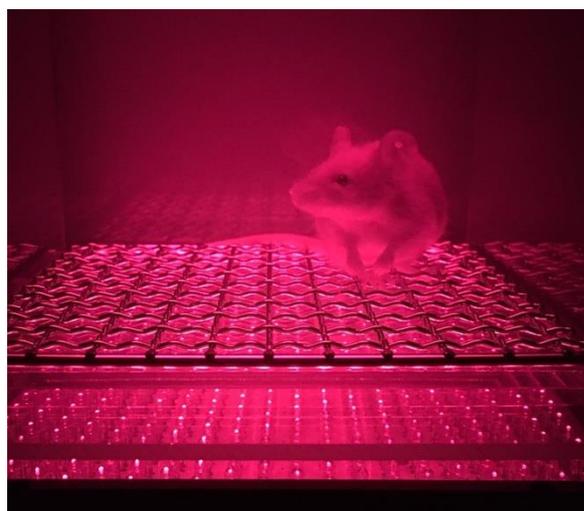


図5. LED アレイを用いてマウスの生体外から光照射。

- photoswitch for deep tissue optogenetics" *Nature Biotechnology*, **40**, 1672-1679 (2022)
5. T. Nakajima, Y. Kuwasaki, S. Yamamoto, T. Otabe and M. Sato, "A red light-activatable endogenous gene transcription system" *Methods Mol. Biol.*, **2840**, 45-55 (2025).

# 光スイッチ遺伝子医薬の開発

「光スイッチ医療創出」プロジェクト

小田部堯広

## 1. はじめに

近年、ゲノム編集をはじめとする遺伝子治療技術の臨床応用が急速に進展している。しかし、ゲノム編集技術では酵素活性の制御が難しく、意図しない組織や細胞においても編集が行われてしまうリスクがあり、安全性の確保が大きな課題となっている。そこで本プロジェクトでは、我々の研究グループが独自に開発した光スイッチタンパク質を組み込んだゲノム編集の光操作技術を活用し、安全性と有効性を高めた新しい概念の光スイッチ遺伝子医薬の創出を目指している。我々は、糸状菌の一種である赤パンカビ (*Neurospora crassa*) が有する光受容体タンパク質に着目し、そこに多様なアミノ酸変異を導入して性質を改良するとともに新たな機能を付加することで、光スイッチタンパク質「Magnet システム」を開発した (参考文献 1)。Magnet システムは、青色光を照射すると互いに結合し、光を止めると解離する一対のタンパク質からなる。これらに任意のタンパク質 A および B を結合させることで、青色光の照射によって A と B の相互作用を制御できる。Magnet システムの特性を利用することで、興味のある酵素をはじめとするさまざまなタンパク質の機能を、光を介して自在に調節することが可能となった。

これまで我々は、Magnet システムを基盤技術として活用し、さまざまなゲノム編集ツールと組み合わせることで、多様な光操作技術を開発してきた。

まず一つ目の例として、CRISPR-Cas9 システムの光操作技術の開発が挙げられる。この技術により、標的となるガイド RNA を設計するだけで、光による高い時空間的な制御性を活かし、生体組織内の特定の部位やタイミングでゲノム DNA の塩基配列を書き換えることが可能となった (参考文献 2)。さらに、これを応用することで、遺伝子発現のオン・オフを自由に、かつ繰り返し制御することも実現している (参考文献 3)。

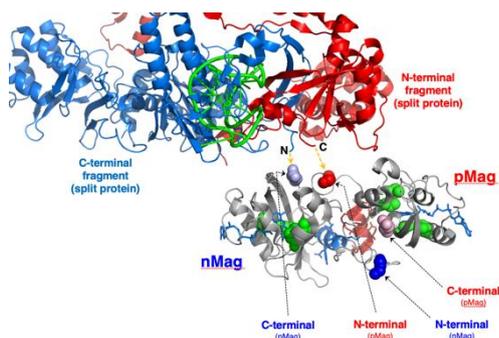


図 1: 構造情報をもとにした Magnet システムの改良

二つ目の例としては、バクテリオファージ由来の DNA 組換え酵素 Cre による DNA 組換え反応を、青色光の照射によって誘導可能とした光活性化型 Cre (PA-Cre) の開発がある (参考文献 4, 5, 6, 7)。この PA-Cre の技術により、特定の生体組織や細胞を標的にして遺伝子機能を制御できるようになった。これにより、疾患に関わるさまざまな遺伝子の機能解明への貢献が期待されるとともに、現在では治療に必要な遺伝子発現を調節する遺伝子医薬としての応用も検討を進めている。

さらに、我々はこの Magnet システムをゲノム編集ツールにとどまらず、その他の多様なタンパク質へと応用展開してきた (参考文献 8)。前述の通り、Magnet システムは 2 分子間の結合と解離を青色光によって制御できる優れた光スイッチタンパク質である。しかし一方で、改良すべき課題も存在する。それは、2 分子間の相互作用を前提としているため、細胞内に導入した際の濃度に性能が大きく依存しやすい点である。具体的には、細胞内で 2 分子が出会う確率が低いと反応効率が低下し、遺伝子治療薬として応用する際には十分な治療効果を発揮しにくくなる可能性がある。そこで我々は、この課題を克服すべく Magnet システムの改良に取り組み、新たな基盤技術の開発を進めてきた。

## 2. 実験方法

### (1) Magnet システムの改良

従来の Magnet システムには、2 分子間の相互作用に依存するため、細胞内濃度に大きく影響を受けやすいという課題があった。そこで我々は、構造情報に基づく

「concatenation」アプローチを導入し、この課題を克服する新たな Magnet システムを開発した (図 1)。この改良により、青色光照射時の反応効率の向上が期待される。さらに、開発した新しい Magnet システムを既存の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) に適用し、DNA 組換え反応効率を評価した。

### (2) 改良型 PA-Cre の評価

改良型 PA-Cre の評価は、loxP サイトで挟まれた停止配列 (ストップカセット) をレポーター遺伝子の upstream に配置した評価系を用いて行った。この系では、通常、ストップカセットによってレポーター遺伝子の発現は阻害される。しかし、青色光を照射して改良型の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) が作動すると、ストップカセットが除去され、レポーター遺伝子の発現が可能と

なる。一方、青色光を照射しない暗所下ではストップカセットは残存し、レポーター遺伝子の発現は起こらない。この暗所下でわずかに見られるレポーター発現を「リーク活性」と呼ぶ。今回の実験では、レポーター遺伝子として生物発光タンパク質のホタルルシフェラーゼ (Fluc) を用いた。具体的には、まず2枚の96ウェルプレートに細胞を播種し、24時間後にリポフェクション法により各プラスミドDNAを細胞に導入した。プラスミド導入後は24時間、プレートを暗所に置き、さらにその後、青色光を照射するグループと暗所下に置くグループの2群に分け、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。青色光の照射にはLEDアレイを使用した(図2A)。24時間後、暗所下および青色光を照射したプレートの培地を、ホタルルシフェラーゼ(Fluc)の基質であるルシフェリンを含む培地に交換し、その発光シグナルを検出した。

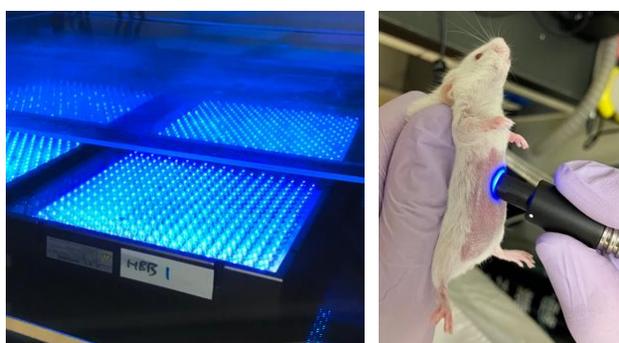


図2:(A)細胞への光照射に用いた青色LEDアレイ(波長:470±20nm,光強度:1.0Wm<sup>2</sup>), (B)マウスへのLEDポイント照明装置による局所的な光照射の様子

### 3. 実験結果と考察

「concatenation」アプローチをMagnetシステムに適用した結果、暗所下でのリーク活性をほとんど増加させることなく、青色光照射時の活性を従来のPA-Creと比べて顕著に向上させることに成功した。これは、細胞内における濃度依存性の課題を「concatenation」により克服できたためである。現在、改良型PA-Creについては、分割位置や細胞内での局在、さらにCreとMagnetシステム間の距離といったパラメータの最適化を進めており、暗所下でのリーク活性をさらに低減しつつ、青色光照射時の活性を一層高めたPA-Creの開発を目指している。

### 4. 今後の展開

本研究では、既存のMagnetシステムに「concatenation」アプローチを導入し、従来を凌駕する新たな基盤技術の開発に成功した。この改良型MagnetシステムをPA-Creに適用し、その有効性を検証した。今後は、遺伝子治療ベクターとして広く利用されているアデノ随伴ウイルス(AAV)に改良型PA-Creを搭載し、マウスを用いた動物実験へと展開することで、光スイッチ医療の実現に向けた実証研究を進める予定である(図2B)。

さらに、遺伝子医薬としての実用化を見据え、近年AAVベクターへの搭載が可能となったCRISPR-Casシステムに、本研究で開発した新しいMagnetシステムを組み合わせた光スイッチ遺伝子医薬の開発も進めている。今回開発した光スイッチタンパク質は、従来の相互作用型光スイッチタンパク質にはない特長を備えており、これまでの技術では困難だった新たな光スイッチ医薬の創出を可能にすると考えている。これについても研究開発を進めている。

また、我々が開発した光スイッチ技術は、医療分野への応用にとどまらず、微生物を利用した有用物質の生産への応用にも着手している。

### 【参考文献】

1. F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, “Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins” *Nat. Commun.*, **6**, 6256 (2015).
2. Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima, and M. Sato, “Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing” *Nat. Biotechnol.*, **33**, 755-760 (2015).
3. Y. Nihongaki, Y. Furuhashi, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto, and M. Sato, “CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation” *Nat. Methods*, **14**, 963-966 (2017).
4. F. Kawano, R. Okazaki, M. Yazawa and M. Sato, “A photoactivatable Cre-*loxP* recombination system for optogenetic genome engineering” *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 1059-1064 (2016).
5. T. Takao, Y. Hiraoka, K. Kawabe, D. Yamada, L. Ming, K. Tanaka, M. Sato, and T. Takarada, “Establishment of a tTA- dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **526**, 213-217 (2020).
6. K. Morikawa, K. Furuhashi, C. de Sena-Tomas, A. L. Garcia-Garcia, R. Bekdash, A. D. Klein, N. Gallerani, H. E. Yamamoto, S.-H. E. Park, G. S. Collins, F. Kawano, M. Sato, C.-S. Lin, K. L. Targoff, E. Au, M. Salling and M. Yazawa, “Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for in vivo mouse applications” *Nat. Commun.*, **11**, 2141 (2020).
7. K. Yoshimi, Y. Yamauchi, T. Tanaka, T. Shimada, M. Sato and T. Mashimo, “Photoactivatable Cre knock-in mice for spatiotemporal control of genetic engineering in vivo” *Lab. Invest.*, **101**, 125-135 (2021).
8. M. Tahara, Y. Takishima, S. Miyamoto, Y. Nakatsu, K. Someya, M. Sato, K. Tani, and M. Takeda, “Photocontrollable mononegaviruses” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 11587-11589 (2019).

# 業績

## 【原著論文】

1. Y. Aono, T. Nakajima, W. Ichimiya, M. Yoshida, and M. Sato, "A highly efficient fluorescent probe to visualize protein interactions at the super-resolution" *ACS Chemical Biology*, 19, 1271-1279 (2024)
2. T. Nakajima, Y. Kuwasaki, S. Yamamoto, T. Otabe and M. Sato, "A red light-activatable endogenous gene transcription system" *Methods in Molecular Biology*, 2840, 45-55 (2025).

## 【総説】

1. 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」*細胞*, Vol.56 No.9 p4-8(2024)
2. 佐藤守俊「生体イメージング研究への応用が期待される光操作技術の創出」*実験医学*, Vol.42 No.19 p2979-2984(2024)

## 【書籍】

なし

## 【口頭発表】

1. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
サイエンステクノフロンティアフォーラム、2024年4月6日、東京
2. 佐藤守俊  
「光スイッチによる物質生産プラットフォームの開発」  
GX 実現に向けた異分野連携シンポジウム、2024年4月15日、東京
3. HE JIXUAN、佐藤守俊  
「Enhancing the Photoactivated Heterodimerization "Magnet" by Directed Evolution」  
東京大学生命科学シンポジウム、2024年6月22日、東京
4. 河田紗弥、小田部堯広、佐藤守俊  
「Development of light-controllable bacteria」  
東京大学生命科学シンポジウム、2024年6月22日、東京
5. Cai Dewen、Kawano Fuun、Sato Moritoshi  
「Split-protein-based efficient and enhanced degradation (SPEED) approach for chemogenetic engineering with no leakiness」  
東京大学生命科学シンポジウム、2024年6月22日、東京
6. 佐藤守俊  
「ゲノムの光操作技術の創出」  
第30回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2024年7月18日、横浜
7. Dewen Cai、Fuun Kawano、Moritoshi Sato  
「Split-protein-based efficient and enhanced degradation (SPEED) for Chemogenetic Engineering in Mammalian Cells with no Leakiness」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
8. 小田部堯広、大木悠翔、橋本講司、佐藤守俊  
「ゲノムの光操作技術の開発」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
9. Yuki Aono, Takahiro Nakajima, Wataru Ichimiya, Mayumi Yoshida and Moritoshi Sato  
「Highly efficient fluorescent probe to visualize protein interactions at super-resolution」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
10. 中舘尚人、青野侑基、橋本講司、佐藤守俊  
「バイオものづくりの商用化の鍵となる光操作型 T7RNAP の開発」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
11. 中嶋隆浩、佐藤守俊  
「近赤外光によるゲノム遺伝子の活性化システム」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
12. 展天騏、青野侑基、河野風雲、佐藤守俊  
「赤色光スイッチング抗体様分子の開発」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
13. 鈴木彩音、中嶋隆浩、佐藤守俊  
「赤色光で制御可能な photoactivatable Flp (RedPA-Flp) の創出」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
14. 河田紗弥、小田部堯広、佐藤守俊  
「光操作可能な細胞医薬 (オプトバクテリア) の開発」  
第64回生命科学夏の学校、2024年8月30日、長崎
15. 河田紗弥、小田部堯広、駒大輔、大橋博之、山中勇人、佐藤守俊  
「光スイッチによる物質生産プラットフォームの開発」  
第76回日本生物工学会大会、2024年9月8日、東京
16. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
第55回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2024年11月2日、名古屋
17. 青野侑基、中嶋隆浩、一宮航、吉田まゆみ、佐藤守俊  
「タンパク質間相互作用を超高解像度で可視化する蛍光プローブ」  
第97回日本生化学会大会、2024年11月6日、横浜
18. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
第97回日本生化学会大会、2024年11月7日、横浜
19. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
第34回日本光線力学学会学術講演会、2024年11月9日、京都
20. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
メディカルトランスフォーメーション研究センターワークショップ、2024年11月18日、神戸

21. 佐藤守俊  
「Optical manipulation of the genome」  
第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 27 日、  
福岡
22. 青野侑基、中嶋隆浩、一宮航、吉田まゆみ、佐藤守俊  
「タンパク質間相互作用を超高解像度で可視化する蛍光  
プローブ」  
第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 29 日、  
福岡
23. 野田昌生、甲州亮太、滝野直美、伊藤美加、小田部堯  
広、伊藤真人、佐藤守俊、村松慎一  
「AAV ベクターによる難聴の遺伝子治療開発」  
第 7 回 JMU-CGTR シンポジウム 2025、2025 年 2 月  
20 日、栃木
24. 佐藤守俊  
「光スイッチ技術の開発と応用」  
日本農芸化学会 2025 年度大会、2025 年 3 月 6 日、  
札幌
25. 小田部堯広、佐藤守俊  
「ゲノムの光操作技術の開発」  
核酸の生物有機化学ミニシンポジウム、2025 年 3 月 8  
日、大阪

#### 【特許】

- (1) 国内特許出願 0 件
- (2) 国際特許出願 1 件

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 有望シーズ展開事業

### 「次世代合成生物基盤」プロジェクト

- ◆ 統括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
- ◆ ヒトiPS細胞におけるアレル選択的ゲノム改変技術の開発・・・・・・・・ 30
- ◆ がんモデルiPS細胞ライブラリの構築・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
- ◆ 長鎖DNA合成スキームの高速自動化・・・・・・・・・・・・・・・・ 35
- ◆ 業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

# 「次世代合成生物基盤」プロジェクト

プロジェクトリーダー 相澤 康則

## 【基本構想】

本プロジェクトでは、独自の iPS 細胞ゲノム構築技術群を活用することにより、創薬分野での革新的イノベーションを生み出すプラットフォーム技術を開発しつつ、それら技術をさらに活用して創薬研究の基盤となる iPS 細胞リソースを開発しています。具体的なテーマとしては、神経変性疾患を模した疾患モデル iPS 細胞の開発とその医学的活用を進める一方で、さらに、多くの現代人の健康寿命を脅かしている疾患であるガンに対する創薬研究技術基盤の構築を推進しています。後者では、がん患部組織にて高頻度で見つかる数百種類の変異遺伝子変異を人工的に発現することができる iPS 細胞株のコレクションを開発しています。またこの膨大な iPS 細胞株コレクションに対する細胞機能解析をハイスループット評価できる自動化システムも導入しました。これら創薬研究基盤となるハード（細胞評価自動化システム）とソフト（iPS 細胞ライブラリー、変異と細胞表現形の対応ビックデータ）の技術リソースを有機的に活用することで、「遺伝子変異ががん化を引き起こすメカニズム」をより深く理解できるようになると期待されます。さらに 2024 年度は、この iPS 細胞ライブラリーを活用し、川崎殿町にある国立医薬品食品衛生研究所との連携を開始しました。再生医療で安全に使える iPS 細胞の品質を評価するための研究を共同で推し進めています。以上のように、研究リソースを最大限活用し、がん治療や再生医療の基盤となり得る国内外の研究機関や企業との連携を助け、神奈川県における創薬研究開発支援の拠点形成に資することを目指しています。

## 1. 2024 年度の研究目的

2024 年度は、5つの項目について以下のように目標を設定して研究を実施した。

### （1）がんモデル iPS 細胞ライブラリーの構築

がんは遺伝子の病気だと言われている。摘出された癌組織のゲノムを解析すると、1つの遺伝子ではなく、複数遺伝子での変異（塩基配列が変わってしまった部位）が認められる。変異の蓄積によってガン化が進行するというモデルは 30 年以上も前から提唱され現在定着している。臨床の現場では、抗がん剤の投与によって一時的に腫瘍が小さくなくても、抗がん剤の効果を回避するような新たな変異をもつ細胞集団が増え、腫瘍が再拡大してしまうケースが多い。本研究では、このような複数変異の相乗効果や、変異が蓄積されていくメカニズムをより深く理解するための研究基盤を開発している。

その研究基盤の一つとして、がん臓器でよく見られる遺伝子変異を人工的に発現誘導できるヒト iPS 細胞を作製している。米国 NIH 主導の研究によって明らかになっている「ガンで高頻度変異を受けている上位 30 種類のヒト遺伝子」の上で、実際にかん臓器で発生している変異をもつ遺伝子を合成したのち、それら変異遺伝子をヒト iPS 細胞株内で人工的に発現誘導できる実験系の開発を進めている。このような変異遺伝子の合成や遺伝子発現誘導系の開発は、これまで当グループが培ってきたヒトゲノム構築技術を活用している。

### （2）がん抑制遺伝子 TP53 の変異体を発現誘導する iPS 細胞の開発とその再生医療への活用

前項で開発しているがんモデル iPS 細胞は、がん発症やがん進行の理解に資するだけでなく、再生細胞医療の実現においても有用である。2024 年度は、国立医薬品食品衛生研究所の再生・細胞医療製品部との共同研究を開始した。ここでは、再生医療の現場で使える iPS 細胞かどうかを判断するためのゲノム品質評価法や評価基準を作ることを目的とし、我々の変異遺伝子発現誘導系を活用することとなった。将来的には、iPS 細胞で自然発生する遺伝子変異のなかで、iPS 細胞の腫瘍化を誘発しやすい変異と、腫瘍化しにくい変異を見極める実験を進めていく計画である。2024 年度はその第一歩として、がん化を誘発することが知られている TP53 遺伝子の野生型と変異体をそれぞれ人工的に発現誘導できる iPS 細胞株の開発を進めた。

### （3）ヒト iPS 細胞におけるアリル特異的ゲノム改変技術の完成

本研究課題では、ヒト iPS 細胞でのゲノム改変技術をさらに向上させ、様々な疾患での遺伝子変異を模倣する iPS 細胞を作成できることを目指している。2024 年度は、1 細胞あたり 2 コピー（アリル）存在する遺伝子のうち、一方のアリルにだけ変異を効率よく導入する技術の完成を目指した。父由来のアリルと母由来のアリルの

いずれかのみで変異は入ることで発病する疾患（顕性疾患）が多いので、一方のアリルにだけ変異を効率よく導入できる技術の汎用性は高い。我々は、1アリル変異だけで発病することが知られている神経変性疾患ハンチントン病のモデル iPS 細胞の作成を通して、本技術開発を進めてきた。2024 年度はこの技術の完成と、その論文発表を目標とした。

#### （４）アリル特異的 iPS 細胞ゲノム改変技術を活用した神経性疾患 X のモデル細胞作成

前項で完成したゲノム改変技術を活用し、新たに 2024 年度はハンチントン病と別の脳神経系疾患のモデル細胞の作成を目指した。

#### （５）長鎖 DNA 合成スキームの高速自動化

2023 年度から本グループは、JST/GteX（革新的 GX 技術創出事業）のバイオものづくりグループに参画し、長鎖 DNA を効率よく作成するための研究拠点（ゲノム構築拠点；図 1）の発足や発展に寄与するための技術開発をしている。本拠点にてすでに試運転を始めているゲノム構築スキームをさらに高速自動化するために、本グループは 2024 年度、スキームの律速段階の一つである DNA 精製ステップのプロトコルを再設計することとした。



図 1 JST/GteX ゲノム構築拠点。東京科学大学すずかけ台キャンパスに設置。バイオ技術によってカーボンニュートラルに貢献するべく、微生物や植物のゲノム構築をするための長鎖 DNA 合成をハイスループットに実施可能とするための技術開発とその運用を進めている。

#### （６）長鎖 DNA の細胞導入技術の確立

「ゲノム構築による感染症対策技術の開発研究」のなかで、ウイルスなどの長鎖 DNA を異なる細胞間で効率よく移動させる技術開発をこれまで進めてきたが、2024 年度はその完成を目指した。

## 2. 2024 年度の研究成果

当初の計画よりも時間がかかったが、この過程では新しい課題を見出すことで、より良いゲノム構築技術や遺伝子発現細胞を開発できた。研究成果の詳細は、倉澤氏や赤瀬氏からの報告に譲り、ここではその特筆すべき内容だけを述べる。



原がん遺伝子	作製したガン遺伝子数/目標数
<i>PIK3CA</i>	83/83
<i>KRAS</i>	36/36
<i>FBXW7</i>	36/36
<i>NRAS</i>	21/21
<i>HRAS</i>	14/14
<i>IDH1</i>	6/6
<i>NFE2L2</i>	22/22
<i>BRAF</i>	24/24
<i>ERBB2</i>	14/14
<i>AKT1</i>	4/4
<i>PIK3R1</i>	30/30
<b>計290/290(作成完了)</b>	

図 2 がんモデル iPS 細胞で発現誘導するがん遺伝子。米国国立がんセンター (NCI) が公開している癌臓器における遺伝子変異のデータベース (Genomic Data Commons Data Portal ; 上) から、最も癌誘発能の高い原がん遺伝子 (11 種) の全変異データを取得し、それら遺伝子にて高頻度で報告されている全変異 (290 種類) をリスト化した (下)。これら変異をもっている原ガン遺伝子 (すなわちガン遺伝子) をコードする DNA 断片を、290 種類全て本年度合成し、これらを iPS 細胞のゲノムに組み込んだ iPS 細胞株を樹立している。

#### （１）がんモデル iPS 細胞ライブラリーの構築

2023 年度に動作確認できた「薬剤による発現誘導型プロモーター」を用い、図 2 にある 290 種類のがん遺伝子を安定に発現誘導させるためのプラズミドは全て完成した。

これらプラズミドは iPS 細胞に導入後、我々が定めたゲノム領域に組み込まれ、かつ薬剤を培地に添加した場合に限り安定に発現できるような構造になっている。これによりプラズミドが細胞にトランスフェクションされた直後から発現することがないため、薬剤添加までの間、iPS 細胞の表現形に不必要な影響を及ぼさない、という大きなメリットがある。このような工夫を施した遺伝子発現系のもと、290 種類ものがん遺伝子の影響を調べられる細胞実験系は前例がない。2025 年度はこの優位性を活かし、すでに導入されている自動細胞解析システムも用いて、癌遺伝子の機能解析を体系的に進めていく。この機能解析のために 2024 年度は、iPS 細胞を様々な組織細胞に分化させるための分化誘導プロトコルの導入も完了している。

#### （２）がん抑制遺伝子 TP53 の変異体を発現誘導する iPS

## 細胞の開発とその再生医療への活用

がん臓器において最も変異頻度が高い遺伝子が *TP53* である。2024 年度は、*TP53* にて高頻度で発生している上位 20 種類の点変異体を、(1) で述べた薬剤誘導発現系によって iPS 細胞内で誘導発現させるためのプラズミドを作成した。また、そのうち高頻発する上位 5 つの変異体プラズミドをゲノムに導入した iPS 細胞株も 5 種類樹立した。*TP53* のプラズミドは、変異体ごとに異なる配列を持つ DNA バーコードを載せてある。このため、複数の異なる *TP53* 変異体を発現する iPS 細胞を混合しても、それぞれの変異体の細胞増殖スピードを定量 PCR によってモニターできるようになっている。

今回作製した 5 種類の *TP53* 変異体と、野生型 *TP53* をそれぞれ発現する iPS 細胞を混ぜたのち、薬剤で発現誘導し、各細胞の数を経時的に定量したところ、期待通りの細胞増殖の結果が得られた。このことから、本 DNA バーコードによる細胞数モニターの実験系も実用可能であることが実証された。これにより、多種類の細胞の解析を、1 つの培養容器内で実施できることとなった。2025 年度以降の細胞解析がさらに効率的に実施可能となったといえる。

上述のように、これら *TP53* 誘導発現 iPS 細胞コレクションは再生医療における細胞品質評価法の確立において有用であることから、2025 年度はこれら細胞を国立医薬品食品衛生研究所の再生・細胞医療製品部に提供し、細胞評価に供する計画である。

## (3) ヒト iPS 細胞におけるアレル特異的ゲノム改変技術の完成

2022 年に発表したヒト両アレル改変技術 UKiS (*Nature Comm.*, 13(1), 4219, 2022) を改良し、それぞれのアレルに異なる変異を導入する技術 asUKiS を確立させた

(*Genes Genet Syst* 100, 25-00016, 2025)。asUKiS 確立までの技術開発では、一方のアレルのみ変異が起ることによって発症する神経性疾患ハンチントン病 (HD) のモデル iPS 細胞を作製した。現在この HD モデル細胞は共同研究先で解析中であるため、その結果の詳細は伏せるが、これまでの長い HD 研究で明らかになっている細胞表現型が本 HD モデル細胞でも確認されている。また本細胞を用いた新薬開発も進んでおり、本細胞の有用性が示されつつある。

一方、本グループでも、HD モデル細胞の解析は別途進めている。2025 年度内での論文発表を目指している。

## (4) アレル特異的 iPS 細胞ゲノム改変技術を活用した神経性疾患 X のモデル細胞作成

前項の HD モデル細胞の有用性が示されたことから、別の脳神経性疾患のモデル iPS 細胞の開発の打診があったため、同細胞の開発も 2024 年度に開始した。「基本構想」でも述べたように、本事業は「神奈川県に創薬研究開発支援の拠点を形成すること」を目指しているが、本研究テーマは、このミッション実現に資するかたちで、

順調に発展しているといえるだろう。

## (5) 長鎖 DNA 合成スキームの高速自動化

JST/GteX バイオものづくり事業で発足したゲノム構築拠点での長鎖 DNA 合成スキームのなかで、「PCR 産物の精製」および「プラズミド精製」の 2 ステップが、従来の手動での作業のままであったため、全スキームの中で律速段階となっていた。2024 年度は、これらステップを半自動化するプロトコルを確立した。詳細は赤瀬氏からの報告に譲るが、作業時間がほぼ半分になり、かつ扱えるサンプル数も飛躍的に増えたことは大きな進歩である。本グループのゲノム構築力は、GteX 事業にも貢献している。

## (6) 長鎖 DNA の細胞導入技術の確立

50kb を超える長鎖 DNA は物理的に弱く、それを含む溶液を混ぜるといった作業だけでも切断してしまう。そのため例えば、微生物 A 内で連結させた長鎖 DNA を別の微生物 B に移して、さらなる DNA 改変を施すといった作業において、微生物 A から長鎖 DNA を一度精製して微生物 B に導入するという従来法ではなく、微生物 A から微生物 B へ直接 DNA を移動させる方法が求められていた。この方法は、本事業の 3 テーマの 1 つ、「ゲノム構築による感染症対策技術の開発研究」において長鎖ウイルスゲノムを合成するための技術開発としてこれまで続けてきたが、2024 年度になり、枯草菌から大腸菌や酵母へ、精製を介さずに長鎖 DNA を移動させる技術を確立することができた。ここではデータの一例のみを示すが、長鎖 DNA をもつ枯草菌の溶解液 (Lysate) と、大腸菌の量比を調節することで、効率よく長鎖 DNA を持つ大腸菌のコロニーを数多く得ることのできるようになった (図 3)。この成果は現在、論文掲載予定である (*J Mol Biol*, 2025)。

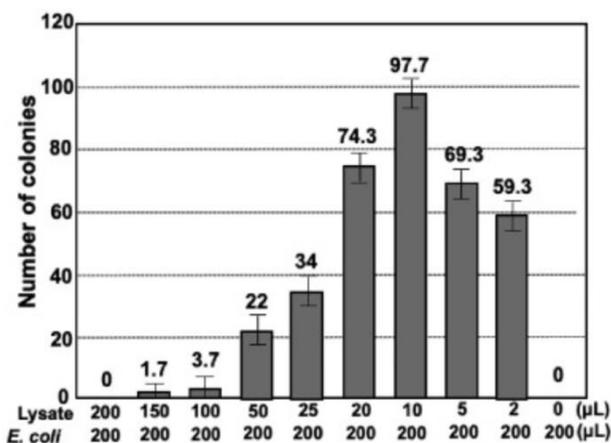


図 3 長鎖 DNA を保持する枯草菌の溶解液をつかった大腸菌形質転換実験。枯草菌溶解液 10μL と大腸菌懸濁液 200 μL を用いた場合で、長鎖 DNA を受け取った大腸菌の数が最大数となった。

# ヒト iPS 細胞におけるアリル選択的ゲノム改変技術の開発

「次世代合成生物基盤」プロジェクト  
倉澤 光

## 1. はじめに

本プロジェクトは、「神奈川県に創薬研究のための技術基盤を構築すること」を中核的なミッションとして掲げ、ゲノム改変技術の高度化に取り組んでいる。我々は戦略的研究シーズ育成事業から「ヒト iPS 細胞におけるアリル選択的ゲノム改変技術」の開発を進めてきた。ヒト iPS 細胞は、種々の細胞種へと分化可能な多能性幹細胞であり、疾患モデルの構築や創薬スクリーニングにおいて有用なプラットフォームである。我々のゲノム改変技術と組み合わせることで、ヒト iPS 細胞に自在に変異を導入し、病態が顕著に現れる細胞種へと分化させることで、発症に至る分子経路を明らかにできる。このプロセスを標的とした治療法の開発や、病態の進行を緩和する創薬への展開が期待される。

なかでも、一方のアリル（対立遺伝子）を選択的に改変できる技術は、遺伝性疾患のモデル化や治療標的の探索において極めて重要である。多くの遺伝性疾患では、一方のアリルのみに変異があるからである。しかしそれを既存のゲノム編集技術で再現しようとすると、両方のアリルが同時に改変されやすく、片アリルのみを改変した細胞を得るのが難しい。したがって、ヘテロ接合性の先天性遺伝疾患において、より精密な疾患モデル細胞を構築するにはアリル選択的ゲノム改変技術が必要である。本研究期間では、この課題を解決するべく、ハンチントン病 (Huntington's Disease, HD) をモデルケースとし、この顕性疾患を再現するようなモデル iPS 細胞の創出を試みた。

HD は、第 4 染色体短腕上に位置するハンチントン遺伝子 (*HTT*) 内の CAG 繰り返し配列が異常に伸長することによって発症する、常染色体優性遺伝形式の神経変性疾患である。健常者における CAG リピート数は通常 6-30 程度に収まっているが、40 以上になると発症リスクが生じ、リピート数が増加するほど若年での発症リスクが高まるというリピート数依存的な発症スペクトラムを示す。この CAG の伸長は、HTT タンパク質中のポリグルタミン

(polyQ) 配列を異常に長大化させ、この変異 HTT タンパク質が毒性を獲得することで、主に線条体における神経細胞死を引き起こし、運動障害などの症状を呈する。HD 患者の大多数は、正常リピート数を有する健常アリルと、異常に伸長した変異アリルのヘテロ接合状態にある。したがって、HD モデル細胞を構築する際には、片方のアリルのみ CAG 伸長を導入できるようなアリル選択的ゲノム改変技術が求められている。

そこで我々は、この課題を解決するべく、既報の

「Universal Knock-in System (UKiS 法)」<sup>1</sup> をもとにした改良型スキームを構築した。本技術により、モデル細胞創出の高精度化が期待される。

## 2. 実験と結果

### 2-1. 三段階ゲノム改変スキームの開発

既報の UKiS 法<sup>1</sup> では目的のゲノム領域の両アリルを 1 種類の蛍光タンパク質マーカーで置換し、それらをドナー DNA と置換することでゲノム改変を達成していた。この方法では、1 種類の蛍光タンパク質マーカーしか用いていないため、導入したドナー DNA がどちらのアリルに導入されるかは確率に依存していた。つまり、特定のアリルに変異を導入するという方法はなかった。その解決策として、今回我々は「allele-specific UKiS, asUKiS」という三段階の置換を主軸としたスキームをデザインした (図 1)。本スキームでは GFP と RFP の 2 種類の蛍光タンパク質マーカーを用いている。GFP マーカーと RFP マーカーの置換を別々のアリルで実施することで、狙ったアリルに異なる変異を導入することが可能となる。

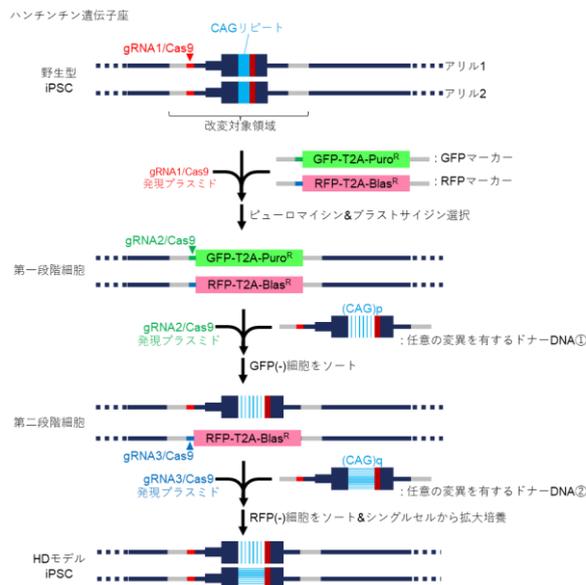


図 1 asUKiS 法の概要。野生型細胞が有する 2 つの対立遺伝子 (アリル) を、それぞれ GFP マーカーと RFP マーカーで置換する。その後、GFP マーカーのみを任意のドナー DNA①で置換し、続いて RFP マーカーのみを任意のドナー DNA②で置換することで、どちらのアリルにどのような変異を導入するかを制御することができる。文献<sup>2</sup>より一部改変。

## 2.2 HD モデル細胞の取得

図1のスキームに従い、種々のリピート長を有するHDモデル細胞株のセットを作製した。asUKiSの第一段階では、GFP マーカーと RFP マーカーをそれぞれ、*HTT* 遺伝子の CAG リピートを含み両アリルと置換した iPS 細胞を創出した。並行して、10Q、55Q、99Q の CAG リピートを有するドナーDNAを用意し、第一段階細胞に対して図2に示しているような流れで二段階目および三段階目の置換を実施することで、以下の5系統のモデル iPS 細胞株群を樹立した。

- ・健全モデル (10Q/10Q)：どちらも健全者の範囲内のリピート数を持つ iPS 細胞
- ・成人発症型モデル (55Q/10Q)：片方のアリルに、成人～壮年期に発症するリスクをもたらす 55Q をもつ iPS 細胞
- ・成人発症型モデル (ホモ) (55Q/55Q)：両方のアリルに、55Q をもつ iPS 細胞
- ・若年発症型モデル (99Q/10Q)：片方のアリルに、若年期に発症するリスクをもたらす 99Q をもつ iPS 細胞
- ・若年発症型モデル (ホモ) (99Q/99Q)：両方のアリルに 99Q をもつ iPS 細胞

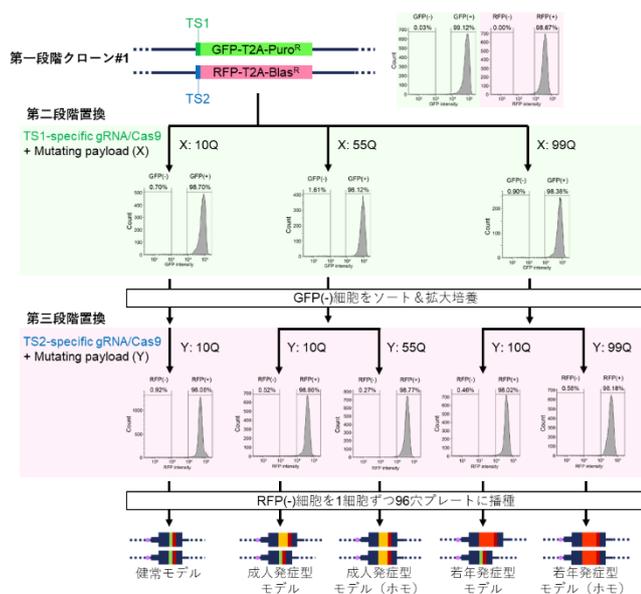


図2 asUKiSによる*HHT* 遺伝子座に対する第二および第三段階置換のスキームとその結果。第一段階細胞が有する GFP マーカーを、それぞれ 10Q、55Q、99Q のリピート数を有するドナーDNAで置換した。置換が起きた細胞では GFP マーカーが消失する(=GFP シグナルが消失する)ため、GFP 陰性の細胞を蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) により取得した。続いて、RFP マーカーについても同様に、それぞれ 10Q、55Q、99Q リピート数を有するドナーDNAで置換し、RFP 陰性の細胞を FACS により取得・クローン化した。文献<sup>2</sup>より一部改変。

一般的な HD 患者は、55Q/10Q あるいは 99Q/10Q に相当するヘテロ接合型である。しかし極めて稀ではあるものの、両アリルに CAG リピート伸長を伴うホモ接合型の症例も報告されている。そこで本研究では、各ヘテロ接合型モデルに対するカウンターパートとして、対応するホモ接合型のモデル細胞株もあわせて創出している。

また HD は上述のように、CAG リピート数に応じて連続的に病態が変化する疾患であり、ホモ接合型モデルはより重篤な病態を再現するものと期待される。そこで本研究では CAG リピート数と発症リスク・重症度の関係を評価できるようにするため、各 CAG リピート数に対してヘテロ接合型およびホモ接合型の細胞株を系統的に創出した。この細胞群を比較することで、軽度から重度に至るまでの病態をある程度細胞レベルで解析できるようなモデル系が確立したと考えられる。

## 3. 総括

本研究では、既報の UKiS 法を改良し、アリルごとの改変を制御できる asUKiS 法を開発した。このスキームを用いることで、ヒト iPS 細胞に CAG リピートを導入し HD モデル細胞を創出することができた。55Q および 99Q の CAG リピート配列を、対立遺伝子ごとに導入することで、55Q/10Q および 99Q/10Q といったヘテロ接合型モデルのほか、稀ながら報告されている 55Q/55Q および 99Q/99Q といったホモ接合型モデルも構築することができた。これらの細胞株は、今後の表現型解析や薬剤スクリーニングに応用できる細胞リソースとなることが期待される。

## 【参考文献】

1. Ohno, T., et al., *Nat. Commun.*, 13, 4219(2022)
2. Kurasawa, H., et al., *Genes Genet. Syst.*, 100, 25-00016 (2025)

# がんモデル iPS 細胞ライブラリの構築

「次世代合成生物基盤」プロジェクト  
倉澤 光

## 1. はじめに

がんは、細胞のゲノムに蓄積される変異に起因する疾患である。健全な体細胞ががん化に至るまでには、通常、長い年月をかけて複数の変異を段階的に獲得する。その結果として、異常な増殖性、薬剤耐性、部分的な未分化性、浸潤・転移能力といった「がん特有のふるまい（表現型）」が形成される。この表現型は、がん組織がどのような変異を獲得してきたかによって大きく異なる。例えば、「大腸がん」と分類されるような同じ原発臓器由来のがんであっても、がん化を駆動する主要な変異（ドライバー遺伝子）が異なれば、がん細胞が示す表現型は変化する。複数の患者でまったく同じ変異セットを持つがんは確率的には存在せず、このユニーク性、すなわち腫瘍ごとの個別性こそが、がん治療の難しさを際立たせている。「2人に1人ががんになる時代」と言われるように、がんはもはや他人事ではない。私自身にとっても、家族や友人を含め、身近な脅威として実感している。だからこそ、がんの発症と進行を支える分子機構の解明は、単なる学術的興味だけではなく、喫緊の課題だとも感じている。

近年、次世代シーケンサーの進展により、数万例規模のがんゲノム解析が行われるようになり、The Cancer Genome Atlas (TCGA) などの国際コンソーシアムの下で、腫瘍組織の変異プロファイルが膨大なデータ数蓄積されてきた。その結果、「大腸がんで高頻度に観察される変異」や「よく共存する変異ペア」などが、網羅的かつ包括的に整理されつつある。

しかしその一方で、情報量が膨大であるがゆえに、解釈の難しさも顕在化している。ゲノム解析で得られるのは、特定時点における変異の静的なスナップショットに過ぎず、それも腫瘍細胞が長期にわたる進化や淘汰の過程を経て生き残った「結果」を反映している。そのため、「がん化初期はどのようなドライバー遺伝子が寄与したのか」「がん進行の過程でどのような選択圧を受けたか」「途中過程の変異が細胞にどのような影響を与えたか」、さらには「今後どのような変異を受けやすく、どのような表現型を獲得し得るか」といった動的な情報を予測することはできない。細胞の進化過程を読み解き、予測しながら、各患者にオーダーメイドの治療方針を立てるという次世代がん治療には、変異情報の蓄積だけでは不十分であり、がん進行に伴って変異がもたらす細胞への影響を調べる実験的アプローチとの統合が求められる。

我々は、これまでに培ってきたゲノム改変技術を活用

し、健常者由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）をプラットフォームとした、ドライバー遺伝子の機能評価系を構築した。がん組織で頻発しているドライバー遺伝子を、1つずつ、2つずつ…と段階的に導入し、それにより生じる細胞表現型を体系的に解析することができる評価系である。同一の iPS 細胞株を用いるため、遺伝的背景の差異を排除することができ、変異単独の影響および複数変異間の相互作用を精緻に評価することが可能となる。以下に、2024 年度実施の研究開発のうち、公開可能なものを報告する。

## 2. 実験と結果

### 2-1. ドライバー遺伝子の選定とライブラリ構築

先行研究<sup>1</sup>で報告された 299 種類のがんドライバー遺伝子の中から、特に複数のがん種で高頻度に変異が報告されている 11 種類の原がん遺伝子を選定した。TCGA がんゲノムデータベースを基に、それぞれの遺伝子で頻発しているアミノ酸変異を解析し、全 290 種類のドライバー遺伝子ライブラリの構築を行った（相澤の項・図 1 参照）。本ライブラリは、有望シーズ展開事業の 2 年間にわたる活動の中で設計・構築が完了しており、すべてのドライバー遺伝子が利用可能な状態にある。

### 2-2. 薬剤誘導式 Landing pad 細胞株の作製

2-1 で作製したドライバー遺伝子を任意のタイミングで発現誘導できる薬剤応答型の発現システムを整備した。具体的には、Clontech 社の Tet-On システム<sup>2</sup>を利用し、ドキシサイクリン（Dox）添加によりドライバー遺伝子の発現が誘導されるようなゲノム改変スキームを実装した（図 1）。

まず、iPS 細胞の特定の遺伝子座に対して、「Landing pad (LP)」をノックインした。この Landing pad は強力なプロモーターとポリ A 付加配列（pA）の間に、インテグラーゼが認識する配列を持つ（橙色）。この Landing pad を iPS 細胞にあらかじめゲノムに導入したのち、このその iPS 細胞にドライバー遺伝子を搭載した「Dox 誘導式プラスミド」を環状 DNA として導入し、インテグラーゼを介して LP への配列特異的な組換えを行い、プラスミドを挿入する。結果として、LP に組み込まれた DNA 配列から、Dox に応答して転写活性を獲得する転写因子

（Dox 応答転写因子）が強力なプロモーターの下で発現する。実験者の任意のタイミングで培地に Dox を添加することで、Dox 応答転写因子と複合体を形成し、Dox 応答プロモーター（Dox\_p）での転写を活性化するので、ドラ

イパー遺伝子が発現するという構成になっている。このスキームにより、同一の iPS 細胞株上で、多数の変異の影響を、発現タイミングを制御しながら比較評価できる実験基盤が整備された。

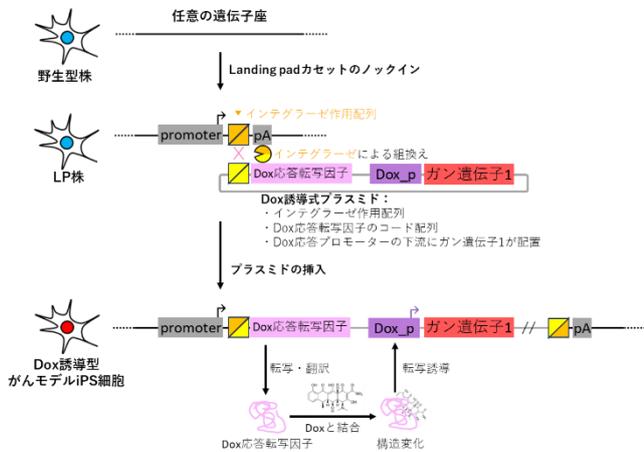


図1 Dox 誘導型ドライバー遺伝子発現システムの作製工程。第1ステップで、導入遺伝子が安定に発現するゲノム領域に対して、プロモーターとポリ A 付加配列に挟まれたインテグラーゼ作用配列を組み込む。第2ステップで、起こる別のインテグラーゼ作用配列を搭載した Dox 誘導型がん遺伝子プラスミドを細胞内導入することで、インテグラーゼ作用配列間で組換えが起き、Dox 誘導型がん遺伝子がゲノムに組み込まれる。第1ステップまで終わった iPS 細胞があれば、異なるがん遺伝子プラスミドを細胞導入することで、異なるがん遺伝子発現 iPS 細胞株を作ることができる。

### 2-3. TP53 遺伝子薬剤誘導式 Landing pad 細胞株の作製

TP53 遺伝子は「がん抑制遺伝子」として広く知られており、細胞の増殖・停止・死を適切にコントロールする中心的な役割を担っている。多くのがん組織において TP53 にはさまざまな変異が見られ、全がん症例の約半数でその機能が失われているとされる。そこでがん臓器で最も高頻度で発見されている上位 20 種類の TP53 変異体を NIH のデータベース（相澤の項で紹介；Genomic Data Commons Data Portal）を解析し、TP53 に変異を有する症例を抽出した。その中でも頻度が高いミスセンス変異およびナンセンス変異 20 種を選定した（表 1）。

近年、TP53 変異の多くを占めるミスセンス変異は、単なる機能喪失（loss-of-function, LOF）、つまり「ブレーキの破損」のみならず、がん化を積極的に促進するように寄与するアクセルのような別の機能を獲得する（機能獲得；gain-of-function, GOF）側面もあることが示唆されている。実際、今回選ばれたがんにおける高頻度変異上位 20 には、LOF ではなく GOF を誘発することが予想される変異体が含まれている。

次に、これらの 20 種類の変異をもつ TP53 遺伝子のコード配列 DNA を合成し、上述の誘導型ドライバー遺伝子発現システム（図 1）で解析できるよう「Dox 誘導式プラスミド」として構築した。そして、各 TP53 変異体を薬剤により発現誘導できる iPS 細胞株セットを構築している。これにより、同一遺伝的背景下で 20 種類の変異がも

たらす影響を調査できる基盤が完成した。

#	Genomic pos	DNA change	AA change	Consequence
1	chr17:7675088	C>T	R175H	Missense
2	chr17:7674220	C>T	R248Q	Missense
3	chr17:7673803	G>A	R273C	Missense
4	chr17:7673802	C>T	R273H	Missense
5	chr17:7674221	G>A	R248W	Missense
6	chr17:7673776	G>A	R282W	Missense
7	chr17:7674894	G>A	R213*	Stop Gained
8	chr17:7674872	T>C	Y220C	Missense
9	chr17:7674945	G>A	R196*	Stop Gained
10	chr17:7674230	C>T	G245S	Missense
11	chr17:7675076	T>C	H179R	Missense
12	chr17:7670685	G>A	R342*	Stop Gained
13	chr17:7673704	G>A	R306*	Stop Gained
14	chr17:7674953	T>C	H193R	Missense
15	chr17:7675143	C>A	V157F	Missense
16	chr17:7675124	T>C	Y163C	Missense
17	chr17:7674947	A>G	I195T	Missense
18	chr17:7673802	C>A	R273L	Missense
19	chr17:7674957	G>A	Q192*	Stop Gained
20	chr17:7674216	C>A	R249S	Missense

表 1 本研究にて Dox 誘導型ドライバー遺伝子発現システムで発現できる TP53 変異体。米国国立がんセンター（NCI）が公開している癌臓器における遺伝子変異のデータベース（Genomic Data Commons Data Portal；上）を解析し、TP53 遺伝子にて高頻度で報告されている上位 20 種類の変異を抽出した。

### 3. 今後の予定

2-1 項および 2-2 項により、本研究の目的である「変異単独の影響および複数変異間の相互作用を精緻に評価する」ための実験プラットフォームが整備された。今後は以下のアッセイを実施し、各ドライバー遺伝子のがん化、悪性化における役割を解析する予定である。これらの実験により、がんにおける変異の機能的意義を体系的に明らかにし、精密医療の基盤構築に貢献することを目指す：

- **増殖速度の測定**  
がん細胞の主要な特徴のひとつに、増殖速度がある。各ドライバー遺伝子が増殖速度に影響を及ぼすかを評価する。
- **薬剤耐性試験**  
臨床で使用されている抗がん剤や、治験・開発段階にある候補薬剤を用い、各変異が薬剤抵抗性に与える影響を評価する。
- **足場非依存性試験（軟寒天コロニー形成アッセイ）**  
血液系細胞を除く通常の体細胞は、生存と増殖に足場を必要とする。この「足場依存性」が失われることは、転移能の獲得に関与するとされる。軟寒天上で生育させる試験によって、各変異が足場非依存的な増殖を誘導するかを評価する。
- **分化抵抗性/指向性試験**  
がん細胞では、原発臓器本来の細胞の分化状態が部分的に失われていることが多い。本研究では、iPS 細胞の三胚葉分化能を活用し、ドライバー遺伝子の発現による分化抑制や特定系列への分化偏りの有無を解析する。

TP53 変異はがん患者の約半数で認められることから、変異別の機能プロファイルを一度整備すれば、複数のが

ん種にまたがって多数の患者に広く還元できるものとなるだろう。本研究で得られたデータセットが、個々の患者に適用する治療戦略の個別化 (precision medicine) に貢献できると期待される。

#### 【参考文献】

1. Cancer Genome Atlas Research Network, *Nat. Genet.*, 45, 1113-1120 (2013)
2. Gossen, M. & Bujard, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 5547-5551 (1992)

# 長鎖 DNA 合成スキームの高速自動化

「次世代合成生物基盤」プロジェクト  
赤瀬 太地

## 1. はじめに

近年、長鎖 DNA 合成の需要が急速に高まっている。本プロジェクトにおいても、がんドライバー遺伝子を人工的に発現誘導する iPS 細胞を作製したり、ウイルスゲノムを人工合成したりする際には、長鎖 DNA の合成が必須である。

長鎖 DNA の合成でも、一般的な遺伝子クローニング操作を活用する(図 1)。最初はゲノム DNA または cDNA を鋳型として PCR を実施するか、あるいは 1 本鎖 DNA を複数混ぜて PCA (Polymerase cycling assembly) を行うことで、目的とする比較的短い DNA フラグメントをまずは得る。次に、それらの DNA フラグメントを断片化したプラスミドと連結し、増幅させるために大腸菌を形質転換する。そして大腸菌から回収されたプラスミドは配列解析に供し、設計通りの塩基配列をもつ DNA 断片が完成しているかどうかを確認する。必要に応じてこの一連の操作を繰り返すことで、最終的に目的とする長鎖 DNA を得る。

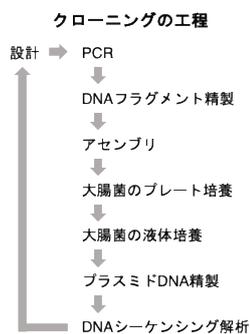


図 1. 一般的な遺伝子クローニングの工程。長鎖 DNA 合成においても同様の工程を活用する。本項目では、この工程の中でボトルネックになっている DNA フラグメント精製を高速自動化した。

本プロジェクトが参画している JST/GteX バイオものづくり事業において東京科学大学に発足したゲノム構築拠点では、長鎖 DNA 合成スキームのハイスループット (HP) 化が求められている。HP 化には改善すべきステップが複数存在するが、その中でも今回注目しているのが、PCR や PCA によって得られた DNA フラグメントを精製するステップである。

PCR や PCA が終わった溶液には、欲しい DNA フラグメント以外に、プライマーや鋳型 DNA が含まれているため、次の工程を考えるとそれらを除いておきたい。この精製は通常、PCR/PCA 後溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、目的長の DNA バンドを切出したのち、そのゲル片から DNA 精製キットによって目的 DNA フラグメントを溶出回収している。ここでの作業は全て 1 サンプルずつの手作業である

ため、スループットが低く、取量も実験者の手技に大きく依存している。

この課題に対する解決策として、本プロジェクトでは 2024 年度、DNA フラグメント精製工程を自動化するためにワークフロー全体を見直した。このために、東京科学大学すずかけ台キャンパス内で比較的自由に使える自動溶液ハンドリング装置 CyBio FeliX (Analytik Jena 社; 図 2) を活用することとした。本稿では、自動化による効果を手作業による従来法と比較し、その有効性について報告する。



図 2. DNA フラグメント精製ステップを自動効率化するために活用した CyBio FeliX (Analytik Jena 社) 96 サンプルを同時に取得分注できる移動式ヘッドが 1 つ搭載された装置。

## 2. ワークフローの構築

CyBio FeliX は、10~1000  $\mu$ L の液体を任意に分注でき、プレート間での液体の移動が可能なりキッドハンドリングロボットである。また、グリッパーパーツを用いることで、マイクロプレート自体の搬送も自動で制御できるため、複雑な実験操作を再現性よく実行できる点が大きな利点である。

本ワークフローの構築にあたっては、従来の手作業プロトコルを CyBio FeliX の動作単位に分解し、プログラムとして再構成した。プレートの配置、高さ、座標の調整なども最適化し、安定した動作を確認した。

構築したワークフローを用い、96 サンプル分実施した場合の動作確認を行った結果、全体の処理時間は 60 分程度であり、これは手動での処理時間を大きく短縮するものであった(図 3)。特に、作業者が直接手を動かす「実働時間」は、手動では 100 分を要していたのに対し、自動化では約 15 分と、約 6 分の 1 に削減された。これは作業負担と再現性の両面で大きな改善である。

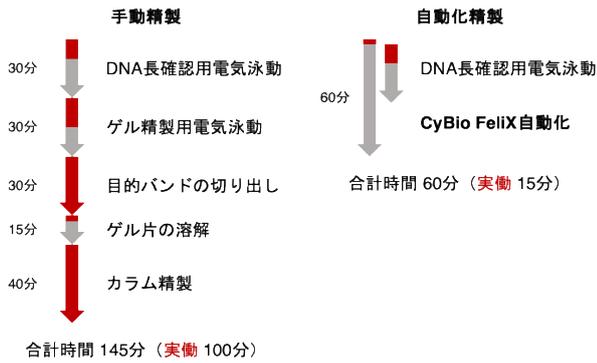


図3. 改良前後でのDNAフラグメント精製ワークフローの比較。改良により全体の時間が半減しただけでなく、実験者が関わるべき時間が1/6へと大幅に短縮された。

### 3. サンプルを使った実用性の確認

自動化ワークフローの実用性を検証するために、8種類のPCR後溶液に対してDNAフラグメント精製を行った。CyBio Felixによる自動ワークフローと、従来の手動ワークフローのそれぞれで同一の試料を精製し、結果を比較した。

回収されたDNAフラグメントの収量は、自動化ワークフローの方が8サンプル全てで高かった(図4)。手動ワークフローでは、ゲル片からの回収ステップでサンプルロスが起きていることが予想されているが、自動化の方ではゲル電気泳動を回避している分だけ収量が高くなったと考えられる。

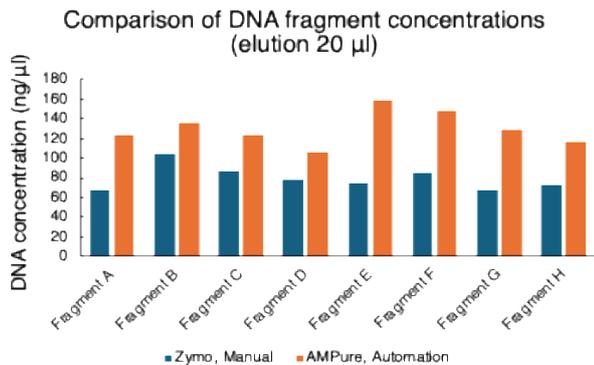


図4. 従来の手動プロトコール (Zymo) と、今回作成した自動化プロトコール (AMPure) によるDNAフラグメント精製後の収量の比較。自動化プロトコールの方が、8サンプル全てで収量が高かった。

次に、回収したDNAフラグメント溶液の精製度の評価として、Nanodropによる吸光度測定を実施した。260nmと280nmでの吸光度の比(タンパク質混入の指標)および260nmと230nmでの吸光度の比(塩類や有機溶媒の残留の指標)は、両ワークフローの間に大きな差は見られなかった(図5)。この結果から、今回初めて使用した磁気ビーズによるDNA精製には精製度合いで問題はないことが確認できた。

以上より、2024年度に再構築した自動化ワークフローが実用可能であることが確認できた。これはすでにGteXゲノム構築拠点にて活用を開始している。

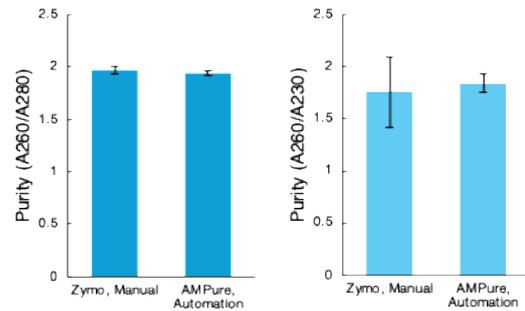


図5. 従来の手動プロトコール (Zymo) と、今回作成した自動化プロトコール (AMPure) によるDNAフラグメント精製後の性制度の比較。タンパク質の混入度合い (A260/A280; 左) と塩類や有機溶媒の残量 (A260/A230; 右) は、両ワークフローで同程度であった。

### 4. 今後の展望

本研究により、DNAフラグメント精製工程の自動化が実現し、大きな作業効率の改善が達成されたが、長鎖DNA合成の全工程をさらに自動化や効率化する必要があるため、そのためには解決すべき課題はまだ数多く残されている。

次に対処すべきことの一つは、PCR/PCAにおけるオフターゲット増幅への対策である。今回の自動化DNAフラグメント精製のワークフローでは、PCRやPCAで得られるDNAフラグメントは目的の1種類だけであることを前提としている。しかしPCRやPCAでは往々にして、期待しないDNAフラグメントが増幅されてくるため、今回のワークフローでは、目的とするDNAフラグメントと望まないDNAフラグメントが混在した溶液が得られることになる。一方、従来のマニュアルのワークフローでは、ゲル切出し精製を行うため、目的のバンドサイズを選別して回収できていた。25年度は、この非特異的な増幅が起こるケースを想定して、この後のワークフローを改変していく予定である。ここにも新しい工夫を導入しながら、全工程の自動効率化を進めていく。

# 業績

## 【原著論文】

(投稿掲載)

1. Masaya Egawa, Narumi Uno, Rina Komazaki, Yusaku Okano, Yuki Ishizu, Yusuke Ohkame, Hitomaru Miyamoto, Chihiro Yoshimatsu, Kyotaro Yamazaki, Teruhiko Suzuki, Kazuyoshi Hosomichi, Yasunori Aizawa, Yasuhiro Kazuki and Kazuma Tomizuka. Engineering a monosomy 21q human iPSC cell line using CRISPR/Cas9 targeted interstitial megabase deletion. *Genes to Cells*, 30(1):e13184 (2025) [IF: 1.3]
2. Hikaru Kurasawa, Yuta Matsuura, Riho Yamane, Tomoyuki Ohno, Yasunori Aizawa. Biallelic genome engineering to create isogenic induced pluripotent stem cells modelling Huntington's disease. *Genes & Genetic Systems DOI: 10.1266/ggs.25-00016* (2025) [IF: 1.5]

(印刷中)

3. Shinya Kaneko, Hiromi Fukushima, Misako Nakahama, Kenji Tsuge, Jun Ishii, Yasunori Aizawa, Mitsuhiro Itaya, Akihiko Kondo. Versatile Methodology for Efficient Large-sized DNA Delivery between Microorganisms without in vitro purification. *Journal of Molecular Biology* 437(17):169289. [IF: 4.7]

(投稿中)

4. Shinya Kaneko, Misako Nakahama, Yasunori Aizawa. Gap Repair Cloning-Based Assembly of DNA Fragments Using *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology* [IF: 4.1]

## 【総説】

1. 橋本陽太、赤瀬太地、相澤康則 「ヒト uORF 由来タンパク質の細胞内安定性を決定する要因の探究」 GSJ コミュニケーションズ 遺伝学のパラダイムシフトを目指して (V)、2025 年

## 【書籍】

該当なし

## 【口頭発表】

1. 相澤康則 [招待講演]  
ゲノム構築技術による細胞システムの理解と応用へ  
研究所内招待講演、2024 年 4 月 16 日、協和キリン東  
京リサーチパーク
2. 相澤康則 [招待講演]  
Precision human genome engineering for exploring  
noncoding functions and mutation synergy.

研究所内セミナー、2024 年 6 月 3 日、Axe Oncologic  
(カナダ・ケベック)

3. 相澤康則 [招待講演]  
ヒトゲノム構築の技術開発とその応用  
第 3 回生物機能化学国際シンポジウム、2024 年 6 月  
29 日、京都キャンパスプラザ
4. 相澤康則 [招待講演]  
高校 1 年生の時に芽生えたバイオへの三つ子の魂 ～  
ゲノム構築への道  
大学講演セミナー、2024 年 7 月 18 日、八王子学園八  
王子高校
5. 倉澤光、赤瀬太地、橋本陽太、大野知幸、山根里歩、  
山崎翔太、鈴木貴久、金子真也、相澤康則 [ポスター  
発表]  
Large-Scale Genome Downsizing in Human Induced  
Pluripotent Stem Cells.  
2024 International Mammalian Synthetic Biology  
Workshop、2024 年 8 月 6 日、Boston University (米  
国、ボストン)
6. 相澤康則 [招待講演]  
大規模ゲノム構築によるゲノム機能研究 (とその応用  
展開)  
第 122 回醗酵学談話会、2024 年 8 月 19 日、アサヒビ  
ール株式会社吹田工場
7. 金子真也、相澤康則 [一般講演]  
枯草菌を用いた Gap Repair Cloning 法  
令和 6 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2024 年 8 月  
23 日、長野市若里市民文化ホール
8. 山崎翔太、相澤康則 [一般講演]  
独立栄養条件下で高発現する水素酸化細菌遺伝子の機  
能解析  
日本遺伝学会第 96 回大会、2024 年 9 月 4 日、高知工  
科大学
9. 橋本陽太、赤瀬太地、相澤康則 [一般講演]  
ヒト uORF 由来タンパク質の細胞内安定性を決定する  
要因の探究  
日本遺伝学会第 96 回大会、2024 年 9 月 5 日、高知工  
科大学
10. 松本篤樹、伊志嶺桃佳、赤瀬太地、相澤康則 [一般  
講演]  
ヒト培養細胞における DNMT の必須性  
日本遺伝学会第 96 回大会、2024 年 9 月 5 日、高知工  
科大学
11. 山本歩夢、大野知幸、赤瀬太地、相澤康則 [一般講  
演]  
TP53 第 1 インtron 内レトロトランスポゾン Alu が転  
写発現を抑制する機序を解明する  
日本遺伝学会第 96 回大会、2024 年 9 月 5 日、高知工

- 科大学
12. 倉澤光、赤瀬太地、橋本陽太、松浦優太、山崎翔太、金子真也、大野智幸、相澤康則 [一般講演]  
広いゲノム領域の細胞生存必須性を評価する方法の開発  
日本遺伝学会第96回大会、2024年9月6日、高知工科大学
  13. 相澤康則 [一般講演]  
Understanding human genome architecture via genome minimization on X chromosome.  
X染色体研究会、2024年9月9日、北海道大学
  14. 相澤康則 [招待講演]  
ヒト iPS 細胞に対する大規模ゲノムエンジニアリング  
殿町・羽田再生医療拠点キックオフシンポジウム、  
2024年9月26日、Shimadzu Tokyo Innovation Plaza  
(川崎殿町)
  15. Hinata Hashimoto, Kengo Matsuzawa, Nobuaki Shiraki, Yasunori Aizawa [ポスター発表]  
Transcriptional dynamics of L1 antisense promoters during differentiation of human iPS cells into  $\beta$ -cells.  
Transposable elements、2024年10月16日、Cold Spring Harbor Laboratory、(米国ニューヨーク州)
  16. Shota Yamazaki, Yuriko Hori, Yasunori Aizawa [ポスター発表]  
Defining the minimal set of genes for autotrophy in *Cupriavidus necator* H16 and prospects for synthetic autotroph.  
Synthetic Biology for Health and Sustainability、2024年10月21日、Wellcome Genome Campus (英国ケンブリッジ)
  17. Hikaru Kurasawa, Taichi Akase, Hinata Hashimoto, Yuta Matsuura, Riho Yamane, Shota Yamazaki, Shinya Kaneko, Tomoyuki Ohno and Yasunori Aizawa [ポスター発表]  
Toward Minimization of 1% portion of the Human Genome.  
Synthetic Biology for Health and Sustainability、2024年10月21日、Wellcome Genome Campus (英国ケンブリッジ)
  18. Yasunori Aizawa [招待講演]  
Large-scale human genome engineering for basic science & therapy.  
Dark Genome Symposium 2024、2024年11月20日、New York University (米国ニューヨーク)
  19. 赤瀬太地、倉澤光、橋本陽太、松浦優太、山崎翔太、金子真也、大野知幸、相澤康則 [ポスター発表]  
ヒト X 染色体上にある細胞生存に必須なゲノム領域を探索する方法  
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
  20. 山崎翔太、相澤康則 [ポスター発表]  
水素酸化細菌の従属栄養・独立栄養スイッチングに必要な遺伝子セットの理解  
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
  21. 山本歩夢、大野知幸、赤瀬太地、相澤康則 [ポスター発表]  
イントロンに存在するレトロトランスポゾン Alu の転写抑制能を検証する  
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
  22. 金子真也、相澤康則 [ポスター発表]  
枯草菌での Gap Repair Cloning 法の開発  
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
  23. 橋本陽太、赤瀬太地、相澤康則 [ポスター発表]  
上流 ORF にコードされた Microprotein の細胞内安定性評価  
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月28日、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
  24. 松本篤樹、伊志嶺桃佳、赤瀬太地、相澤康則 [ポスター発表]  
ヒト培養細胞における DNMT の必須性  
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月29日、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
  25. 相澤康則 [招待講演]  
Large-scale human genome engineering for basic science and therapy.  
Japan-UK Synthetic Biology Conference、2025年2月4日、大阪国際コンベンションセンター
  26. 相澤康則 [招待講演]  
“技術覚醒”ヒト細胞ゲノム工学技術の最前線  
RINK フェスティバル 2025、2025年2月14日、TIAT SKY HALL (羽田空港)
  27. 相澤康則 [招待講演]  
大規模ゲノム構築技術によるゲノム機能探究とその産業展開  
福岡大学理学研究科 FD 講演会、2025年2月25日、福岡大学
- 【記者発表・取材】
- 1.取材対応者:相澤康則  
「ゲノム「読む」から「書く」という記事にコメント掲載  
公表年月日:2024年5月29日(毎日新聞朝刊)  
取材年月日:2024年1月19日

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 有望シーズ展開事業

### 「革新的インダストリアルマルチスケールセンサ」プロジェクト

◆ 統括	40
◆ マルチスケールセンサーによる非破壊診断技術の開発	43
◆ 赤外吸収特性を利用した物性評価モデルの構築	46
◆ 業績	49

# 「革新的インダストリアルマルチスケールセンサ」プロジェクト

プロジェクトリーダー 河野 行雄

## 【基本構想】

近年、製品に要求される品質の高まりや、数十年前に建設されたインフラの寿命の問題などにより、対象を破壊せずに検査を行う非破壊検査の重要性が増しており、その市場は年々拡大している。対象物を画像化する検査手法は、視覚的に分かりやすい形で詳細な情報を得ることが可能であるため、様々な場面での活用が期待されている。特に、光を用いた分光画像計測はその代表例の一つであり、非接触で対象の特性を取得することが可能である。一方、実際の検査対象は微細なものから大型のものまで多岐にわたり、これらをマルチスケールで可視化する必要があるが、統合的な分析は依然として困難である。革新的インダストリアルマルチスケールセンサプロジェクトでは、「新たな材料・構造体による光の自由度制御とマルチスケール光分析」というコンセプトのもと、新奇なセンサの構造や原理を探索し、非破壊画像検査の機能および適用範囲の拡張を図っている。この目的を達成するために、材料や構造体の光・電子物性の研究から出発し、光の機能を最大限に引き出す技術の開発を行っている。その成果として、様々なスケールの対象物に対して分光画像分析が可能なシステムの提供を目指している。本プロジェクトの特徴は、各レイヤーにおける専門家が結集し、分野横断的な研究を展開する点にある。最終的には、実際の多様な現場において活用可能な、より簡便な検査・分析手法を実現し、社会の安全と安心に貢献することを目標としている。

## 1. 2024年度の研究目的

検査対象を壊さずに画像化する非破壊画像検査の実現に向けて、当研究室では広帯域光センサ[1-9]の高性能化、マルチスケール計測化[10,11]を行っている(図1-3にそれぞれセンサアレイの作製例[4]、複数波長画像化の例[5]、センサの分析応用例[6]、微小領域計測用アンテナの例[11])。これらのセンシング技術をより高度化し、電波領域から光領域にまで至る広帯域、かつマルチスケールで分析可能な技術の創出を行う。2024年度では、マルチスケール計測用の光集光素子、センサの形状チューニング、分光画像分析のための特徴量抽出や新たな解析手法の開発を目的とした研究を実施した。

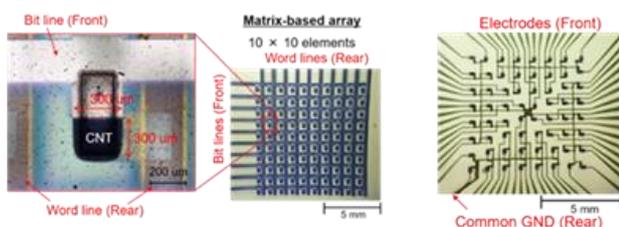


図1: 2次元センサアレイ[4]

## 2. 2024年度の研究成果

戦略的研究シーズ育成事業における成果を土台として、2024年度より新たに研究をスタートした。マルチス

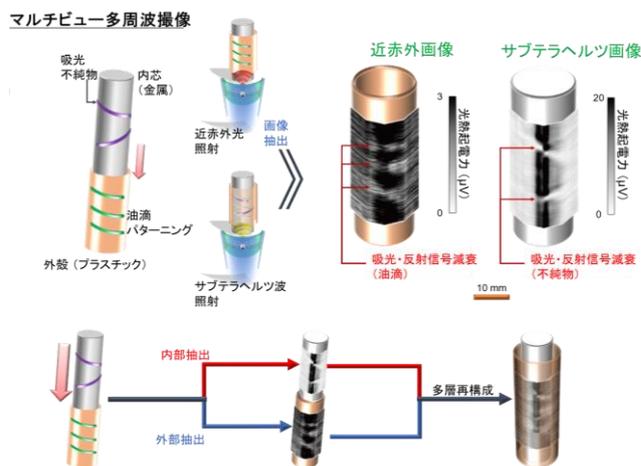


図2: マルチビュー画像化と複数波長帯画像融合による多層イメージング[5]

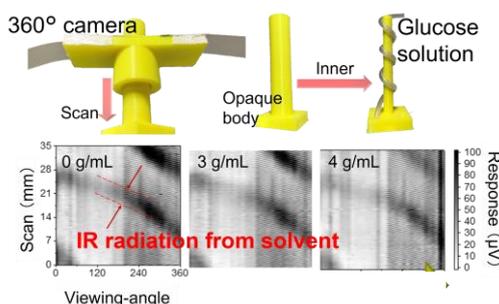


図3: 光センサアレイによる非採集水質検査[6]

ケール計測分析を実現するためには、複数分野に属する研究者の連携が重要となる。情報解析は大川研究員、分光分析は佐世研究員が中心になって実施し、有機的に連携しながら研究を進めた。以下、主な成果について説明する。

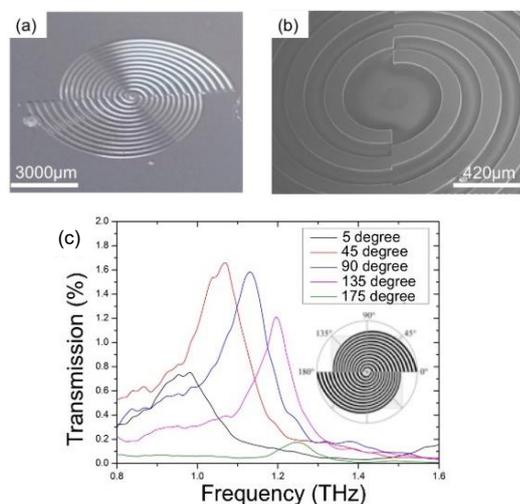


図 4: (a) 周波数可変の非円形プラズモニック構造の写真。(b) (a) の拡大画像。(c) 入射テラヘルツ波の偏光方向を変えた場合の (a) の透過スペクトル[11]。

### ① 光電界集中素子の開発

照射光を所望のセンシング領域へ集中させるための素子開発に着手した。電磁界シミュレーションにより、検出感度を向上させる素子構造の検討を行い、モデルに応じた共鳴周波数で大きな電界増強が生じることを確認した。また、電磁波が集中する箇所での素子形状が電磁界増強に大きく関係することを見出した。

この構造体と当研究室で開発している光センサを組み合わせることで、検出感度約 2.6 倍、検出速度約 15 倍の改善を達成した。検出感度・速度の改善は検査精度の向上につながる。今後、この素子を検査システムに組み込むことを検討している。また、この構造体は、凸凹のパターンを変えることで任意の周波数に対応可能であることから、今後、他帯域への展開も進める予定である。

### ② 分光画像分析・解析手法の開発

検査対象を構成する材料（無機物・有機物）に関して、特徴量を抽出するための分光画像測定を行った。様々な材料の解析にとって重要となる水の結合状態、タンパク質、糖、セルロースなどの情報を引き出すことができた。また、インフラ検査に向けて、電磁波の干渉を利用した手法の開発、光学画像情報の微分や積分による高解像度化の手法の提案を行った。これらの知見を元に試作機を制作し、実用化に向けた検討を行っている。

### ③ センサ材料のサイズチューニング

センサを構成する材料の自在なサイズチューニングを目指した研究を行った。材料や破断装置の各種パラメータを調整することで、材料サイズを細かくチューニングすることが可能となった。これは対象物に応じたマルチスケール計測に資する技術となり得る。

上記の通り、各研究項目とも順調に進んでおり、成果発表も積極的に行っているため、引き続き、それぞれの研究を進める。

来年度は本プロジェクトのラボが立ち上がり、研究員が 1 名増え研究資源が集約される。ここを核として各方面の研究を有機的に融合させることで、プロジェクトを加速する。

### 【参考文献】

1. D. Suzuki, S. Oda, Y. Kawano, *Nature Photonics* **10**, 809 (2016).
2. D. Suzuki, Y. Ochiai, Y. Nakagawa, Y. Kuwahara, T. Saito, and Y. Kawano, *ACS Applied Nano Materials* **1**, 2469 (2018).
3. D. Suzuki and Y. Kawano, *Carbon* **162**, 13 (2020).
4. D. Suzuki, K. Li, K. Ishibashi, Y. Kawano, *Advanced Functional Materials* **31**, 2008931 (2021).
5. K. Li, R. Yuasa, R. Utaki, M. Sun, Y. Tokumoto, D. Suzuki, and Y. Kawano, *Nature Communications* **12**, 3009 (2021).
6. K. Li, T. Araki, R. Utaki, Y. Tokumoto, M. Sun, S. Yasui, N. Kurihira, Y. Kasai, D. Suzuki, R. Marteiijn, J.D. Toonder, T. Sekitani, Y. Kawano, *Science Advances* **8**, eabm4349 (2022).
7. K. Li, Y. Matsuzaki, S. Takahara, D. Sakai, Y. Aoshima, N. Takahashi, M. Yamamoto, and Y. Kawano, *Advanced Materials Interfaces* **10**, 2300528 (2023).
8. Rei Kawabata, Kou Li, Teppei Araki, Mihoko Akiyama, Kaho Sugimachi, Nozomi Matsuoka, Norika Takahashi, Daiki Sakai, Yuto Matsuzaki, Ryo Koshimizu, Minami Yamamoto, Leo Takai, Ryoga Odawara, Takaaki Abe, Shintaro Izumi, Naoko Kurihira, Takafumi Uemura, Yukio Kawano, Tsuyoshi Sekitani, *Advanced Materials* **36**, 2309864 (2024).
9. K. Li, Y. Kinoshita D. Shikichi, M. Kubota, N. Takahashi, Q. Zhang, R. Koshimizu, R. Tadenuma, M. Yamamoto, L. Takai, Z. Zhou, I. Sato, and Y. Kawano, *Advanced Optical Materials* **12**, 2302847 (2024).

10. T. Iguchi, T. Sugaya, and Y. Kawano, *Appl. Phys. Lett.* **110**, 151105 (2017).
11. X. Deng, L. Li, M. Enomoto, and Y. Kawano, *Scientific Reports* **9**, 3498 (2019).

# マルチスケールセンサーによる 非破壊診断技術の開発

「革新的インダストリアルマルチスケールセンサ」プロジェクト  
大川 拓樹

## 1. はじめに

高度経済成長期に建設されたコンクリート構造物や社会インフラは、設計寿命の 50 年を超え、老朽化が社会的な課題となっている。これらの劣化診断や予防保全を目的とした非破壊検査技術の高度化は、社会インフラの安全維持に不可欠であり、特に広域構造物やトンネルなど非平面对象への適用が求められている。

本プロジェクトでは、紫外から GHz までという広帯域な周波数特性を利用する。特に GHz 帯域はコンクリートなどの高密度物質に対しても透過特性を持ち、構造物内部の診断に有効な周波数帯域とされる。一般的な電磁波検査では単一周波数を用いたコンクリートレーダーなどで誘電率の差を可視化することで鋼材の位置や状態を推定している。しかしながらこれらの情報の識別はオペレーターの熟練に依存するところが大きく、非平面形状や人間の立ち入りが難しい箇所における大面積測定は困難であるという課題があった。これに対して、我々はスペクトル測定により腐食の有無を識別するという手法を着想した。図 1 にコンクリートに埋設された鋼材サンプルとその反射スペクトルを示す。図 1 (下) は深さの異

なる鋼板位置で腐食の有無を変化させたスペクトルを比較しており、特定の周波数で違いが表れていることが示唆された。このことから本研究では本プロジェクトで開発するセンサーを用いたシステムの構築を目指す。

このセンサーをインフラ構造物の検査測定に高い適性を持つ。しかし一方で、GHz 帯で利用するためには微小な信号測定や高いコヒーレンスによって発生する電磁波干渉がスペクトル測定に与える歪みという課題がある。これらを克服するため、信号増幅回路と ADC (アナログ-デジタル変換器) を一体化した専用基板の設計・製作、さらに干渉影響を積極的に活用した新たな分光測定手法の開発を行った。本報告では、これらの開発と得られた成果を紹介するとともに、今後の応用展開の可能性についても考察する。

## 2. 実験と結果

### (1) 増幅及び ADC の一体化専用基板の設計

本プロジェクトで開発しているセンサー材料の吸光帯域は、多様な機序に起因しており、特に GHz 帯においてはこの材料が準導体的に振る舞うことで、伝導損失として電磁波を熱エネルギーに変換する現象が報告されている<sup>1</sup>。しかしながら、コンクリート構造物内での実用化を想定した場合、電磁波の減衰は著しく、たとえばコンクリート厚 10 cm では -10 dB 以下という大幅な減衰が確認されている<sup>2</sup>。こうした環境下では、本センサーの信号電圧が非常に小さく、特に構造物の欠陥や異常部位に由来する微小な信号差を正確に検出することが大きな課題であった。一方で、従来型の高性能 ADC (アナログ・デジタルコンバータ) を用いることで微弱な信号の高精度測定は技術的には可能であるものの、その手法では本センサーが本来有する大面積展開性 (スケーラビリティ) との適合性に乏しく、多素子展開や広域測定には向かないとの判断に至った。

そこで本研究では、センサーからの応答電圧を高 S/N 比で増幅し、かつ測定系としてのスケーラビリティを損なわない一体型基板の開発を進めた。増幅出力を後段の

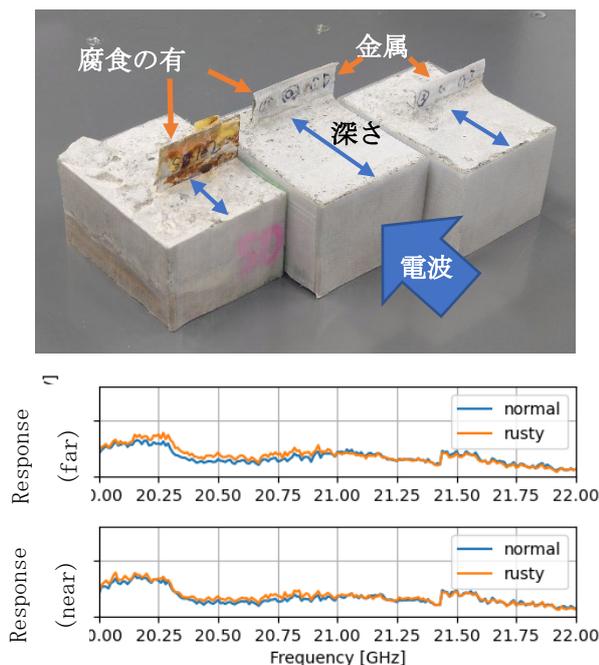


図 1 コンクリート埋設鋼材の概観 (上) と  
GHz 反射スペクトル (下)

回路に直接接続することで、測定素子の個別選択が可能となり、今後の多素子化・並列化の検証にも対応できる設計とした。

開発した一体型基板において、センサー部は基板上にセンサー材料を製膜し、交換可能なコネクタ接続とすることで、構造物への適用や消耗部材のメンテナンス性を向上させた。増幅器には、低ノイズかつ温度ドリフトの少ないアンプを採用し、信号電圧を後段回路で確実に検出できるレベルまで増幅した。また、測定系においては、素子ごとに短時間でデータ取得が可能であり、多素子を用いたマッピング測定では、高速なデータ取得に成功している。さらに、これらのハードウェア開発に併せて、PC上で制御・モニタリングを行う専用GUIアプリケーションの開発も行った。乾電池電源とUSB接続だけで駆動可能なポータブルな測定系を実現し、現場におけるリアルタイムデータ取得を可能としたことで、携帯性・操作性に優れた実用的な測定システムを構築することができた。

## (2) GHz帯スペクトルの干渉除去手法

コンクリート構造物の非破壊検査においては、内部劣化や異常を評価するために、主に反射測定法が用いられる。これは、コンクリート自体が高い電磁波吸収特性を有し、またその厚みが大きいことから、透過測定が現実的でないためである。しかし、反射測定では、測定対象物（サンプル）からの反射波のみを理想的に検出することが望ましいものの、実際の測定系ではビームスプリッター（BS）や集光レンズといった光学部品に加え、アンテナ自体、装置筐体の内部構造に起因する反射が複合的に干渉を引き起こし、スペクトルの歪みとして現れることが課題となる。

図2に、理想的な光路と、装置内部反射が発生した際の例を示す。左図のような理想的な測定系では、センサーに入射するのはサンプル反射波のみであるが、右図のように実際の系では、レンズ表面などで反射された電磁波がサンプル反射波に重畳し、測定結果に干渉として現れる。さらに、こうした装置内部反射は単一要素によるものではなく、複数の反射成分が干渉し合った結果が測定信号に現れており、そのため干渉成分は波長依存性や位相依存性を伴って複雑なスペクトル歪みを生じさせる。

この現象を理論的にとらえるために、本研究では装置内部反射波 $I_r$ 、サンプル反射波 $I_s$ 、そして観測される合成波 $I_m$ をそれぞれの振幅 $C_r$ 、 $C_s$ 、 $C_m$ で表現した電波干渉モデルを構築した（図3）。このモデルでは、観測波の振幅 $C_m$ は以下の式で表される：

$$C_m = \sqrt{C_r^2 + C_s^2 + 2C_r C_s \cos(kl - \theta_0)}$$

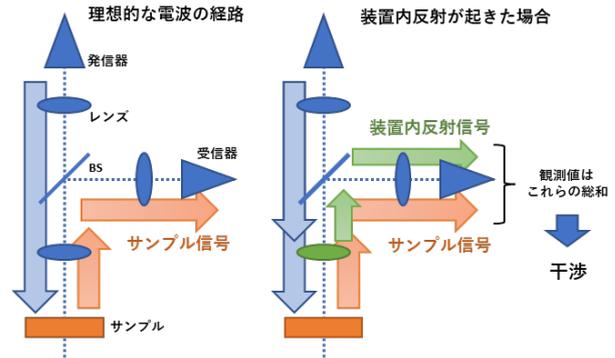


図2 反射光学系における干渉の発生

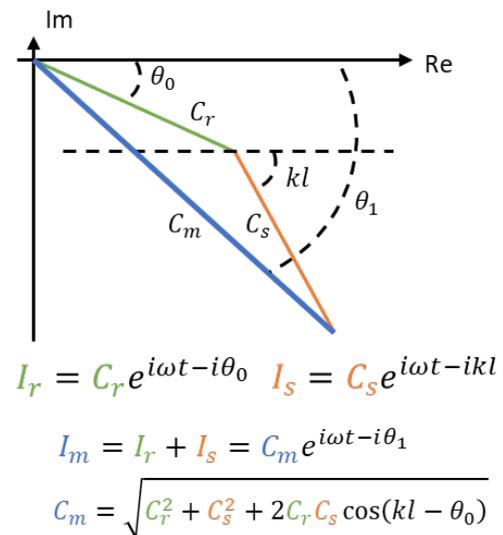


図3 干渉の数理モデル

ここで、 $k$ は波数、 $l$ はサンプルまでの距離、 $\theta_0$ は装置内部反射波の合成位相を表す。この式から分かる通り、観測される信号の振幅は波数 $k$ やサンプル距離 $l$ に依存して変動するため、たとえサンプルの反射特性 $C_s$ が一定であっても、干渉によりスペクトルに周期的なひずみが生じる。この干渉の影響は、装置とサンプルの距離を固定しても避けることができず、従来はこれを物理的なパルス変調やチョッパーを用いた高コストな抑制手法で対応してきた。

本研究では、この理論モデルに基づき、サンプルからの真の反射成分と装置由来の干渉成分を分離する新たな干渉除去手法を開発している<sup>3</sup>。この手法では、サンプルの位置（距離）を微小に変化させながら得られた一連のスペクトルデータを用いて、干渉項と本来の反射成分を数理的に分離する。複数距離でのデータ収集により、干渉項の周期的変動を捉え、サンプル固有の反射成分を抽出する解析アルゴリズムを適用した。

図4に示すように、本手法を適用することで、従来はスペクトル上に現れていた周期的な歪みが効果的に除去され、より正確な反射特性の解析が可能となった。さらに、本手法は既存のパルス変調方式と比較してシステムコストを大幅に低減でき、測定系の簡便化と現場適用性

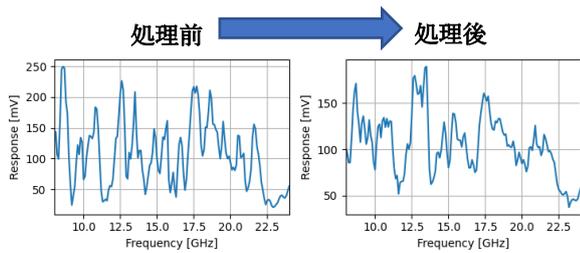


図4 GHz スペクトル測定における干渉歪除去

の向上にも貢献した。この成果は、GHz 帯の高感度非破壊検査における信号の高精度解析を実現する基盤技術として、今後の実構造物評価への展開が期待される。

### 3. 考察及び今後の展望

本プロジェクトでは、マルチスケールセンサーを基軸とした非破壊検査システムの開発に取り組んできた。特に、コンクリート構造物内部の腐食診断を可能とする GHz 帯スペクトル測定手法の確立を目指し、センサー、信号処理回路、測定系の最適化を図った。その結果、微小な信号電圧の安定測定を可能とする一体型基板の開発に成功し、従来困難とされた大面積・多素子化による測定も現実的なものとなった。さらに、リアルタイム測定を可能とする GUI アプリケーションの実装は、現場での実用化に向けた大きな前進といえる。

一方で、GHz 帯測定において不可避となる電磁波干渉の問題に対しては、数理モデルに基づく干渉成分除去手法を新たに開発した。装置由来の反射波成分を除去することによって、これまでオペレーターの経験に依存していたスペクトルの解釈が、より客観的かつ高精度に行える可能性が示された。

これらの成果を踏まえ、今後は現場環境を模した大型構造物での実証実験を進めるとともに、干渉除去アルゴリズムと測定システムの統合化を図る。また、腐食進行度の定量評価に資するデータ解析手法の高度化や、センサー素子のさらなる高感度化を目指した材料改良にも着手する予定である。

本技術が実用化されれば、これまで技術者の経験と勘に頼っていた社会インフラの健全性診断が、客観的なデータに基づく定量的評価に移行し、非破壊検査技術の新たなスタンダードとして社会実装されることが期待される。今後も、現場ニーズを的確に捉えた技術開発を推進し、社会インフラ維持管理分野への貢献を目指す。

#### 【参考文献】

1. Yan, M. et al., *J Mater Sci: Mater Electron*, 29, 20260-20270 (2018)
2. ITU-R, Recommendation P.2040-1, (2015)

# 赤外吸収特性を利用した物性評価モデルの構築

「革新的インダストリアルマルチスケールセンサ」プロジェクト

佐世 美帆

## 1. はじめに

### (1) 本研究の位置づけ

本研究室では、広帯域な受光特性を用いた評価系の構築を目指している。特に、多波長の吸収特性を統合的に利用する評価モデルの構築を推進している。本研究では、評価系の基礎検討として、多成分系の物性評価に着目した。

### (2) 物性評価の重要性と課題

産業界において、製品開発や品質管理を目的として多様な評価手法が導入されている。本プロジェクトでは、その応用先の一つとして、多成分系の物性評価に着目している。

現在、多成分系の物性評価には人による感覚的な判断や機械的破壊試験が用いられているが、それぞれに課題がある。前者は評価者の経験や感覚に依存するため、再現性や客観性に課題があり、後者はサンプルを破壊するため全数検査には適用できず、製造ラインでの連続的な監視には不向きである。

このような背景から、客観的かつ再現性があり、非破壊で評価可能な技術の開発が強く求められている。

### (3) 赤外吸収特性の利用

赤外分光法は、分子内の化学結合が固有の振動数で赤外光を吸収する現象を利用した分析手法である。化学結合は構造により特定の波数領域で赤外光を吸収するため、吸収スペクトルから分子構造や官能基を推定することができる。この利点から、赤外分光法は製薬分野における成分同定、石油化学分野での組成解析、精密工業における異物検査など、幅広い産業分野で応用されている。

検査分野では、一般的に近赤外 (NIR) 領域が試料透過性に優れることから、近年応用研究が活発化している。しかし、NIR は振動の重畳により吸収ピークが広がりやすく、その応用システムは多変量解析データを基盤とする場合が多い。一方、中赤外 (MIR) 領域は、透過性が NIR に劣るものの、物体表面から化学結合や官能基に直接対応する鋭い吸収が得られるため、物理状態や分子間相互作用の変化を捉えやすく、より明確な解釈が可能である。

### (4) 本研究のアプローチ

本研究では、多成分系のサンプルにおいて、中赤外の吸収特性から物性を把握することを検討した。多成分試料の吸収スペクトルでは様々な成分の吸収が重なって現れるため、スペクトルから分子構造や組成情報を一義的に決定することは困難である。しかし、主成分や物理状

態、分子間相互作用に起因する情報が含まれると考えられることから、多成分の吸収特性は物性評価に有用な情報を含んでいる可能性がある。

本研究で検討する評価デバイスでは、実験的に選定した複数波長の光源を組み合わせ、各波長における吸収の程度を定量化することで、多成分系物性の光学的評価を実現することを目指す。

## 2. 実験と結果

### (1) 赤外吸収特性と物性の計測

赤外吸収スペクトルの測定には、フーリエ変換赤外分光光度計と ATR プリズムを用いた。ATR 測定は、プリズムと試料の接触面で起こる光の吸収 (エバネッセント光) を利用する手法である。

物性の測定には、テクスチャーアナライザーを用い、2 バイトテクスチャー試験により数値化した。この試験は、圧縮と緩和を機械的に 2 回繰り返し、荷重の変化を時間軸方向に記録した試験曲線から、あらかじめ定義した条件に基づいて硬さや粘りなど複数の物性パラメータを算出する手法である。各試料 3~4 回測定した。

### (2) 物性評価 I

多成分試料の物性評価を目的として、まずはタンパク質や脂質、炭水化物などがそれぞれ含まれている試料を測定した。同サンプルのふわふわとした物性は、空隙のようなマクロ構造による効果が大いだが、一方で乾燥や状態変化による硬化など、マクロな構造を維持しつつも変化する状態が存在する。このような硬化現象は、水分の蒸発に加えて、澱粉の再結晶化が重要な役割を果たすことが知られている。このように、化学的な組成や結合の状態から定量できる物性がある可能性を踏まえ、数日室内で放置したサンプルについて、糖質と水の赤外吸収特性と硬さの相関を分析した。

赤外吸収スペクトルは ATR プリズムにスポンジ部分を潰すように押し付け密着させた状態で取得した。糖質の吸収ピークから  $960\text{ cm}^{-1}$  と  $1000\text{ cm}^{-1}$  (主に C-OH 伸縮)、水の吸収ピークから  $3275\text{ cm}^{-1}$  と  $3100\text{ cm}^{-1}$  (OH 伸縮) の吸光度を pick し、それぞれの吸光度比を各成分の吸収特性とした。物性は、スポンジ面の圧縮試験を行い、60 秒の圧縮範囲における最大試験力を「硬さ」と定義した。測定は Day 0 から Day 3 まで経日的に実施した。その間、サンプルの重量は表面からの水分蒸発に伴い徐々に減少した。

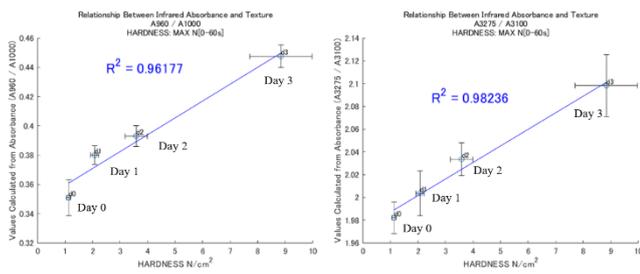


図 1. 糖質および水の吸光特性と硬さの関係

左図 Y: 糖質の吸光度比

右図 Y: 水の吸光度比

X: 圧縮試験で計測した応力、4 回計測 N / cm<sup>2</sup>

結果を図 1 に示す。糖質および水の赤外吸収特性が硬さと強く相関することが確認され、決定係数はいずれも  $R^2 \geq 0.95$  であった。この結果は、含水率の変化に伴って糖質および水の結合状態が変化し、さらには糖質の結晶化が進行することで、物性が変化する様子を観測したものと考えられる。この結果から、赤外吸収特性の変化を観測することで、分子レベルでの構造変化に起因する物性の評価が可能であることが示唆された。

### (3) 物性評価 II

物性評価の対象とする多成分系試料を拡張するため、引き続き、赤外吸収特性と物性の関係を解析した。ここで、サンプルに含まれる代表的な成分として、水・油・糖・小麦粉・タンパク質の赤外吸収スペクトルを図 2 に示す。各成分は特徴的な吸収バンドを有している。これらの特徴的なピークから、解析に用いる 10 の波数を選定した。

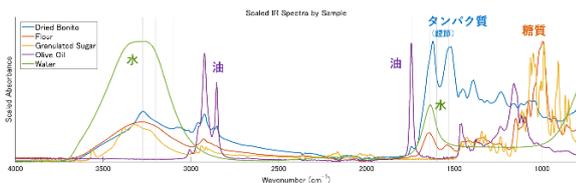


図 2. 代表的な多成分試料の中赤外吸収スペクトル

解析では主原料が類似したグループに分類し、グループごとに赤外吸収特性と物性の関係を解析した。選定した波数から最大 4 波数、最低 2 波数の吸光度を乗算あるいは積算により、機械的に最適な組み合わせによる回帰モデルを作成し、物性の決定係数が高いモデルの傾向を分析した。

分析の結果、硬さ、付着性、粘りにおいて物性推定に有効と考えられる評価モデルを作成することができた (決定係数  $R^2 \geq 0.9$ )。

作成した物性推定モデルの例として、硬さ推定モデルを示すことができた。また、水分含量の増加に伴い、マトリックス内での水分子間の相互作用や、水和状態による吸光特性の変化が物性に対して指数関数的に影響を与

える可能性を示した。

以上の結果から、中赤外領域の多成分系の特性吸収を利用することで、決定係数が高い物性推定モデルを構築可能であることが示された (図 3)。しかし、このアプローチの妥当性についてはより統計的な評価を行う必要がある。そこで、線形回帰の代表的な手法である 5 つ

(Linear, PLS, LASSO, Ridge, PCR) を検証した。この検証では、データセットの 80% を訓練データ、20% をテストデータとすることで過学習の影響を考慮した。

この評価から、中赤外光による物性推定は、サンプルの種類に応じて評価物性と回帰手法を適切に選ぶことで、線形モデルでも十分な精度が得られることが示唆された。一方で、一部のグループについては線形回帰では高い決定係数が得られず、非線形性を考慮する必要があることが示された。

## 3. 考察及び今後の展望

### (1) 考察と展望

本研究において、赤外吸収特性から高い決定係数 ( $R^2 \geq 0.9$ ) の物性推定モデルが構築できた理由として、以下の技術的要因が挙げられる。第一に、成分に帰属される特性吸収帯から 10 の解析波数を選定することにより情報量が最適化されたこと、第二に、物性推定モデルを構築する際に主成分が類似するグループに分類した上で検討を行ったことが有効であったと考えられる。

多成分系であっても、赤外吸収スペクトルには分子構造に関する情報はもちろん、成分や分子の状態が寄与する物性に関する情報が含まれている。本研究の成果は、従来の赤外分光法が主に定性分析に用いられてきた枠組みを超えて、潜在的な情報を効率的に抽出しモデル化することで、物性を定量的に評価できることを示している。

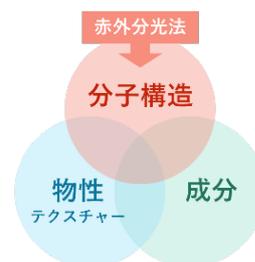


図 3. 赤外分光法で得られる情報の概念図

### (2) 今後の取り組み

今後は、分子レベルから集合体レベルまでの多階層的な物性情報の取得を可能にする計測・解析技術を構築する。これにより、従来の単一波長領域の分析では得られない新たな評価手法の獲得が期待される。

### 【参考文献】

1. T. Hasegawa, Quantitative Infrared Spectroscopy for Understanding of a Condensed Matter, Springer Japan, (2017)

2. D. Suzuki, S. Oda, and Y. Kawano, *Nature Photonics*, 10, 809 (2016)
3. 荒木峻 ら, 有機化合物のスペクトルによる同定法-第7版-, 東京化学同人, (2010)
4. 小林三智子, 神山かおる 編著, 食品物性とテクスチャー, 建帛社, (2022)
5. 尾崎幸洋, 分光法シリーズ第2巻 近赤外分光法, 講談社, (2015)
6. K. Kohyama, *Textural Characteristics of World Foods*, Wiley-Blackwell, (2020)
7. O. Anjos et al., *Food Chemistry*, 169, 218-223 (2015)
8. M. Szymanska-Chargot et al., *Carbohydrate Polymers*, 115, 98-103 (2015)
9. S. Ding et al., *Trends in Food Science & Technology*, 111, 670-679 (2021)
10. D. Wu et al., *Food Chemistry*, 145, 417-426 (2014)
11. R. Karoui et al., *Chemical Reviews*, 110, 6144-6168 (2010)
12. J. Workman Jr., *Spectroscopy Supplements*, 39(s8), 22-28 (2024)

# 業績

## 【原著論文】

### (投稿掲載)

01. Q. Zhang, H. Li, R. Koshimizu, N. Takahashi, Y. Kinoshita, A. Sano, J. Jin, H. Okawa, Y. Matsuzaki, D. Shikichi, Y. Kawano, K. Li, "Microwave Monitoring by Compact Carbon Nanotube Photo-Thermoelectric Sensors Beyond the Diffraction Limit Toward Ultrabroadband Non-Destructive Inspections", *Advanced Sensor Research*, Early View 2400159 (2025)
02. D. Shikichi, R. Ota, M. Kubota, Y. Kinoshita, N. Izumi, M. Kosaka, T. Nishi, D. Sakai, Y. Matsuzaki, L. Takai, M. Yamamoto, Y. Aoshima, R. Odawara, T. Q. Suyama, H. Okawa, Z. Zhou, T. Furukawa, S. Wada, S. Ikehata, I. Sato, Y. Kawano, K. Li, "Multi Computer Vision-Driven Testing Platform: Structural Reconstruction and Material Identification with Ultrabroadband Carbon Nanotube Imagers", *Advanced Materials Technologies*, Early View 2401724 (2025) [6.4]
03. Y. Matsuzaki, R. Tadenuma, Y. Aoshima, M. Yamamoto, L. Takai, Y. Kon, D. Sakai, N. Takahashi, R. Koshimizu, Q. Zhang, N. Hagiwara, M. Sun, D. Shikichi, R. Ota, S. Hirokawa, Y. Kawano, K. Li, "All-Solution-Processable Hybrid Photothermoelectric Sensors with Carbon Nanotube Absorbers and Bismuth Composite Electrodes for Nondestructive Testing", *Small Science*, Early View, 2400448 (2025) [11.2]
03. Leo Takai, Minami Yamamoto, Yuto Matsuzaki, Yukio Kawano, Kou Li  
p-/n-type inks-printed carbon nanotube photo-thermal pixels for mechanical high-yield integration as deformable millimeter-wave infrared imager sheets  
The 7th Event of the Young Researchers Society for Flexible and Stretchable Electronics (第7回 FSE 若手), 2024年05月, 大阪
04. 久保田 実樹, 木下 祐哉, 松崎 勇斗, 山本 みな美, 河野 行雄, 李 恒  
赤外・テラヘルツ帯域の多波長光照射による医薬品のインライン撮像検査  
第133回 日本画像学会年次大会, 2024年06月, 横浜
05. 河野 行雄  
カーボンナノ材料によるテラヘルツ・光撮像シートと全方位画像分析応用  
2024年度第2回 CPC 研究会, 2024年06月, 東京
06. Y. Matsuzaki, R. Tadenuma, Y. Aoshima, M. Yamamoto, L. Takai, Y. Kawano, K. Li  
Hybrid integration of high Seebeck coefficient materials with carbon nanotube film photo-thermoelectric broadband image sensors  
The 40th International and 20th European Thermoelectric Conference (ICT2024), 2024年07月, ポーランド
07. Miki Kubota, Yuya Kinoshita, Yuto Matsuzaki, Minami Yamamoto, Leo Takai, Yukio Kawano, Kou Li  
Ultrabroadband photo-thermoelectric imager for in-line multi-wavelength pharma inspection in a non-destructive manner  
The 40th International and 20th European Thermoelectric Conference (ICT2024), 2024年07月, ポーランド

## 【総説】

01. 敷地 大樹, 松崎 勇斗, 河野 行雄, 李 恒, "カーボンナノチューブ膜を用いたフレキシブル非破壊検査シートの開発と応用", *テラヘルツ波の発生、検出、制御技術と最新応用*
02. 久保田 実樹, 小田原 遼河, 高井 怜於, 河野 行雄, 李 恒, "カーボンナノチューブを用いた折り曲げ性・伸縮性撮像センサと検査応用", *検査技術 10月号(2024)*

## 【口頭発表】

01. 久保田 実樹, 木下 祐哉, 河野 行雄, 李 恒  
超広帯域・多波長光の撮像計測による医薬成分錠剤のインライン非破壊検査  
2024年度 日本写真学会年次大会, 2024年05月, 千葉
02. Ryoga Odawara, Minami Yamamoto, Yukio Kawano, Yoshihiro Watanabe, Kou Li  
Flexible carbon nanotube broadband cameras for non-destructive inspection with projection mapping  
The 7th Event of the Young Researchers Society for Flexible and Stretchable Electronics (第7回 FSE 若手), 2024年05月, 大阪
09. Ryoga Odawara, Minami Yamamoto, Norika Takahashi, Yukio Kawano, Kou Li  
Faster operation and integration of photo-thermoelectric sensor in carbon nanotube film camera, Faster operation and integration of photo-thermoelectric sensor in carbon nanotube film camera  
The 40th International and 20th European Thermoelectric Conference (ICT2024), 2024年07月, ポーランド

10. L. Takai, M. Yamamoto, D. Sakai, Y. Matsuzaki, Y. Kawano, K. Li  
All printable carbon nanotube film type photo-thermoelectric broadband 2D camera sheets  
The 40th International and 20th European Thermoelectric Conference(ICT2024), 2024 年 07 月, ポーランド
11. Qi Zhang, Honghao Li, Ryo Koshimizu, Norika Takahashi, Kou Li and Yukio Kawano, K. Li  
Microwave-based non-destructive monitoring by photo-thermoelectric sensors with carbon nanotube films beyond the diAraction limit  
The 40th International and 20th European Thermoelectric Conference (ICT2024), 2024 年 07 月, ポーランド
12. Ryoga Odawara, Minami Yamamoto, Yukio Kawano, Yoshihiro Watanabe, Kou Li  
Physical and chemical composition optimization of CNT imagers for augmented reality non-destructive inspections  
Nanocarbon photonics and optoelectronics (NPO2024), 2024 年 08 月, フィンランド
13. Miki Kubota, Yuya Kinoshita, Yuto Matsuzaki, Minami Yamamoto, Leo Takai, Yukio Kawano, Kou Li  
CNT film photo scanner for in-line pharma agent pills imaging in infrared-terahertz bands  
Nanocarbon photonics and optoelectronics (NPO2024), 2024 年 08 月, フィンランド
14. Masakazu Konishi, Hiroki Okawa, Shun Hashiyada, Yuto Matsuzaki, Qi Zhang, Kou Li, Yoshito Tanaka, and Yukio Kawano  
Designing Bull's eye structures for non-destructive inspection using GHz waves and carbon nanotube film  
Nanocarbon photonics and optoelectronics (NPO2024), 2024 年 08 月, フィンランド
15. L. Takai, Yuto Matsuzaki, Minami Yamamoto, Yukio Kawano, Kou Li, Kou Li, Yoshito Tanaka, and Yukio Kawano  
Two-dimensional high-yield printable integration of carbon nanotube photo-thermal pixels for realtime, large-area, and broadband non-destructive testing camera applications  
Nanocarbon photonics and optoelectronics (NPO2024), 2024 年 08 月, フィンランド
16. Yukio Kawano  
Multi-view terahertz and infrared imaging sheets for non-destructive inspection  
SPIE Optics + Photonics 2024, 2024 年 08 月, サンディエゴ
17. 佐世 美帆, 大川 拓樹, 小川 剛伸, 田中 充, 河野 行雄  
加工食品の赤外吸収特性を利用した食感の非破壊検査デバイスの開発を目指した基礎検討  
第 71 回 日本食品科学工学会, 2024 年 08 月, 名古屋
18. Yukito Kon, Minami Yamamoto, Yuto Matsuzaki, Leo Takai, Ryoga Odawara, Yukio Kawano, Kou Li  
Optical geometric pixel-alignment design for nanocarbon photo-thermoelectric camera sheets  
第 67 回 フラールン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム, 2024 年 09 月, 高知
19. Hayato Hamashima, Ryoga Odawara, Kouhei Murakami, Minami Yamamoto, Yukio Kawano, Kou Li  
Performance evaluations of carbon nanotube photo-thermoelectric imagers by controlling chemical solvents via high-yield post-cleaning approaches  
第 67 回 フラールン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム, 2024 年 09 月, 高知
20. 河野 行雄  
ナノカーボン光学撮像センサによる分光画像情報の高度利用創出  
M&BE 新分野開拓研究会 2024, 2024 年 09 月, オンライン
21. 佐世 美帆, 大川 拓樹, 小川 剛伸, 田中 充, 河野 行雄  
酸素の赤外吸収特性を利用した、野菜や果実のテクスチャー評価  
第 76 回 日本生物工学会, 2024 年 09 月, 東京
22. 村上 幸平, 小田原 遼河, 高井 怜於, 山本 みな美, 濱島 隼人, 河野 行雄, 李 恒  
オンサイト非破壊検査に向けた表示機能付きシート状カーボンナノチューブカメラ  
第 42 回レーザセンシングシンポジウム, 2024 年 09 月, 大阪
23. 小坂 充輝, 敷地 大樹, 久保田 実樹, 出水 のあ, 山本 みな美, 河野 行雄, 李 恒  
非破壊な多層構造復元に向けた光熱起電力型スキャナによる反射系赤外計測  
第 42 回レーザセンシングシンポジウム, 2024 年 09 月, 大阪
24. 松崎 勇斗, 蓼沼 怜士, 青嶋 祐斗, 山本 みな美, 高井 怜於, 河野 行雄, 李 恒, 小川 剛伸, 田中 充, 河野 行雄  
ハイブリッド光熱電ナノカーボン-ビスマス化合物型超高感度広帯域イメージャー  
第 21 回 日本熱電学会学術講演会, 2024 年 09 月, つくば市
25. 河野 行雄  
光が持つポテンシャルをいかに引き出すか：可視化技術の高度利用創出へ  
さきがけ「構造機能と計測分析」, 2024 年 10 月, 別府
26. 小西 優一, 西山 黎, 橋谷 田 俊, 河野 行雄  
キラルサブ波長構造体によるテラヘルツ円偏光近接場生成  
第 9 回フォトニクスワークショップ, 2024 年 11 月, 沖縄

27. Y. Matsuzaki, R. Tadenuma, Y. Aoshima, M. Yamamoto, L. Takai, Y. Kawano, K. Li  
All-solution-processable ultrasensitive terahertz-infrared detectors with printable nanocarbon-inorganic hybrid structures  
17th International Conference on Nanostructured Materials, 2024年11月, UAE アブダビ
28. D. Shikichi, R. Ota, R. Odawara, M. Kubota, Y. Kawano, K. Li  
Multi-wavelength computer vision for structure restoration with a carbon nanotubes imager  
17th International Conference on Nanostructured Materials, 2024年11月, UAE アブダビ
29. Q. Zhang, A. Sano, Y. Kawano, K. Li  
Micro-wave-based non-destructive monitoring by photo-thermoelectric sensors with carbon nanotube films beyond the diffraction limit  
17th International Conference on Nanostructured Materials, 2024年11月, UAE アブダビ
30. L. Takai, Y. Matsuzaki, M. Yamamoto, Y. Kawano, K. Li  
Two-dimensional high-yield printable integration of carbon nanotube pixels for real-time, large-area, and broadband non-destructive inspection camera applications  
17th International Conference on Nanostructured Materials, 2024年11月, UAE アブダビ
31. R. Odawara, M. Yamamoto, Y. Kawano, Y. Watanabe, K. Li  
Two-dimensional integration design of carbon nanotube sensor for realizing visualization of long wavelength information  
17th International Conference on Nanostructured Materials, 2024年11月, UAE アブダビ
32. Y. Matsuzaki, R. Tadenuma, Y. Aoshima, M. Yamamoto, L. Takai, Y. Kawano, K. Li  
Hybrid Structured Ultrasensitive Photo-Thermoelectric Ultrabroadband Image Sensors with Nanocarbon and Bismuth Composites  
The 8th International Conference on Electronic Materials and Technology for Green Environment, 2024年11月, 韓国
33. 黒崎 天翔, 根本 樹希, 佐野 明日美, 河野 行雄, 李 恒  
カーボンナノチューブ広帯域光学画素のワンタッチスプレー塗布型集積化に向けた前処理タイプ支持基板ロールの表面材料・形状検討  
第51回炭素材料学会年会, 2024年11月, 福岡
34. 山田 大翔, 山本 みな美, 松崎 勇斗, 高井 怜於, 昆 裕樹仁, 河野 行雄, 李 恒  
光熱起電力効果型カーボンナノチューブ膜カメラシートの高歩留まりな回路モジュール組み込み実装に向けた異種基板間での印刷工程  
第51回炭素材料学会年会, 2024年11月, 福岡
35. 西 智貴, 久保田 実樹, 出水 のあ, 敷地 大樹, 河野 行雄, 李 恒  
非破壊でオンサイトな二系統テラヘルツ・赤外モニタリングに向けたカーボンナノチューブ膜イメージャーによる基礎反射計測の検証  
第51回炭素材料学会年会, 2024年11月, 福岡
36. 高井 怜於, 松崎 勇斗, 昆 裕樹仁, 山本 みな美, 河野 行雄, 李 恒  
カーボンナノチューブ薄膜広帯域カメラシートの作製と非破壊検査応用  
第21回薄膜材料デバイス研究会, 2024年11月, 京都
37. 根本 樹希, 黒崎 天翔, 佐野 明日美, 河野 行雄, 李 恒  
スプレー塗布による作製と水洗浄による廃棄へ向けた広帯域光センサ薄膜の基板条件検討  
第21回薄膜材料デバイス研究会, 2024年11月, 京都
38. 金 峻宇, 佐野 明日美, 張 棋, 河野 行雄, 李 恒  
液中洗浄耐性を有する超広帯域ミリ波-可視光イメージセンサシートの設計および作製  
第21回薄膜材料デバイス研究会, 2024年11月, 京都
39. Yukio Kawano  
Sheet-Type Terahertz and Infrared Imagers for Multi-View Visualization and Analysis  
The 31st International Display Workshops, 2024年12月, 札幌
40. 佐世 美帆, 大川 拓樹, 小川 剛伸, 田中 充, 河野 行雄  
中赤外光による食品の栄養成分およびテクスチャーの推定  
日本食品化学工学会 関東支部大会, 2025年03月, 東京
- 【特許】  
・ 国際特許出願 1件

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 実用化実証事業

### 「人工細胞膜システム」グループ

- ◆ 統括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53
- ◆ プロトセルモデル膜の電気生理学的性質・・・・・・・・・・・・・・・・ 56
- ◆ センサ細胞アレイによる尿中匂い物質の気相検出法の開発・・・・・・・・ 60
- ◆ 「形」を用いた細胞匂いセンサ同時分析法の構築・・・・・・・・・・・・ 63
- ◆ 業績・・ 66

# 人工細胞膜システムグループ

グループリーダー 竹内 昌治

## 【基本構想】

膜タンパク質は細胞膜中に存在し、細胞の内外への物質輸送・排出、シグナル伝達・変換などにおいて重要な役割を果たしており、1兆ドル余り(2011年)の医薬品の世界市場において、薬剤の標的の半数以上がこれら膜タンパク質や膜表在性物質だと言われている。リガンド同定済みのGタンパク質共役型受容体(GPCR)に関するだけでも約600億ドル(2009年)に上り、リガンド未同定のGPCRをはじめ、イオンチャネルやトランスポーターなどの膜タンパク質の機能や特性を一つ一つ解明することが、基礎研究のみならず創薬・医療分野における重要な課題である。しかし細胞膜中に存在する膜タンパク質は単離が困難なため、機能解析は難しいとされてきた。

創造展開プロジェクト(2009-2012年度)では、細胞膜のモデルとなる脂質二重膜をマイクロチップ上に人工的に再構成した後、精製された膜タンパク質を導入することで、その膜タンパク質の特性を低ノイズで解析する戦略にもとづいて研究を行い、膜タンパク質を再構成するための2つの人工細胞膜システムを確立した。(1)電氣的計測技術に適する平面膜システムでは、ヒト由来イオンチャネルの並列同時シグナル計測に適する自動化・集積化チップ、小型化チップをそれぞれ研究・開発した。(2)光学的計測技術に適するリポソーム膜システムでは、細胞サイズリポソームの形成手法を確立し、トランスポーターの輸送現象やGPCRの基質結合を蛍光により観測することに成功している。

2013年度に実用化実証事業に移行後は、地域イノベーション戦略支援プログラムの支援も受けながら、創造展開プロジェクトで得られた研究成果を展開し、標的膜タンパク質の生体外での創薬解析支援システムを確立すべく研究開発を行ってきた。具体的には、効率的膜システム要素技術の開発として、人工細胞膜の集積化や薬剤スクリーニングに適したデバイスとするためのシステム全体の基盤研究開発を実施し、膜タンパク質の調製・導入法の開発として、イオンチャネルやGPCR、トランスポーターなどを人工細胞膜に効率的・体系的に導入できる手法の研究開発を実施している。最終的に、大学・研究機関などで使用できるシステムや製薬企業から薬剤候補化合物の評価を受託できる評価法の開発を目標とした。2021年度、このイオンチャネルの機能評価技術を基盤とするベンチャーの起業に至った。一方で、NEDO事業(2015-2019年度)および地域イノベーション・エコシステム形成プログラム(2018-2022年度)では、膜タンパク質の機能利用による人工細胞膜センサに関わる研究開発を行っている。膜タンパク質である嗅覚受容体に代表されるように、生体のもつセンサは優れた感度・特異性をもつことが知られており、膜タンパク質をセンサ素子として活用するための研究開発を実施している。JST-CREST事業(2020年度開始)、科研費研究(2021年度開始)において、細胞をセンサ素子として用いる研究開発も企業と共同で進めている。周辺技術も含め、小型・高性能な次世代センサの実用化技術の開発を目標としている。

## 1. 2024年度の研究目的

実用化実証事業12年目となる2024年度は、イオンチャネル機能評価システムについて、設立したKISTEC発ベンチャーの継続的な研究開発支援として、タンパク質作製技術の改良を目標とした。一方で、センサ開発に関しては、標的物質に応答する細胞をセンサ素子とするバイオハイブリッドセンサについて、東大・住友化学と共同でセンサアレイを開発し、複数の疾患マーカーに対する応答性評価を目標とした。

### (1) イオンチャネル機能評価システムの開発

従来、膜タンパク質の機能解析は、培養細胞を用いた電

気生理学的手法(パッチクランプ法)や蛍光イメージング法によって行なわれるのが一般的である。しかしながらこれらの手法では、培養中の汚染対策や個体差の均一化処理が煩雑であるほか、標的以外の雑多なタンパク質からの影響が避けられず、一つの標的タンパク質に限定して機能を探ることは難しかった。

我々の目指す人工細胞膜プラットフォームは、細胞膜のモデルとなる脂質二重膜を簡便に再現良く形成し、その膜に再構成する標的膜タンパク質の活性を保持したまま機能解析を可能とするシステムである。実用化実証事業においては、これらの人工細胞膜デバイスを膜タンパク質の機能解析や創薬スクリーニングといった場面におい

て実用的なプラットフォームとして拡張していくための要素技術、あるいは量産化に必要な技術の実現を目標として研究開発を行ってきた。

2024年度はわれわれの技術を元にした KISTEC 発ベンチャーである「株式会社 MAQsys」の研究開発支援を継続した。特にイオンチャネル機能評価システムの計測効率の向上に関して、イオンチャネル材料調製技術の改良を目標とした。

## (2) バイオハイブリッドセンサの開発

膜タンパク質は、匂いや味などの化学量センサとしての役割を生体内で担っており、その感度や特異性は人工的なセンサに比べ非常に高いことが知られている。こうした膜タンパク質の機能を活用することができれば、小型で高性能の化学量センサを実現できると考えられる。

イオンチャネル機能評価システムの開発成果により、マイクロチップ上での脂質二重膜を再現良く形成し、そこに再構成したイオンチャネルの機能を活用できるようになった。NEDO 事業（2015-2019 年度）では、昆虫嗅覚受容体を脂質二重膜に組み込んだ人工細胞膜センサのプラットフォーム技術を確立し、地域イノベーション・エコシステム形成プログラムでも、この人工細胞膜センサの要素技術の研究を行ってきた。その成果のデモンストラーションとして、ヒトの呼気中に混合したごく微量の疾患マーカーの検出を実証し、新聞・TV 等で取り上げられるなど注目された。2020 年度より、JST-CREST および科研費の支援を受け、生体機能と機械を融合したバイオハイブリッドセンサの学術基盤および概念実証を目的とする研究を進めている。

2024 年度は、複数種類の標的物質（疾患マーカー）に応答可能な細胞センサを実現するためのアレイ化技術と、その計測装置の開発を目標とした。

## 2. 2024 年度の研究成果

### (1) イオンチャネル機能評価システムの開発

JST 大学発新産業創出プログラム（START、2018-2021 年度）等の公的助成による支援と、東レエンジニアリング社の技術協力を得て、2021 年 8 月、KISTEC 発ベンチャーとして「株式会社 MAQsys」を設立した。同社は形質膜や細胞内小器官のイオンチャネルを標的とした薬剤候補化合物の評価を通して、新たな創薬市場の創出を目指している。2024 年度は、MAQsys 社が事業開始に向けて行う研究開発に関して、イオンチャネル材料調製技術の改良に関する研究支援を行い、計測精度および計測効率の更なる向上に取り組んだ。

イオンチャネル材料調製技術については、イオンチャネル材料の発現・調製技術および脂質二重膜への導入技術の改良を進めている。薬剤標的となるイオンチャネルごとに、複数の発現・調製方法および条件を検討した。また、イオンチャネルを担持するための脂質媒体についても、一般的なプロテオリポソームに加えて、異なる媒体への担持を検討し、脂質二重膜との融合効率の評価など

を行っている。これらの研究は、企業および大学・研究機関との連携により行っている。

計測チップに関しては、イオンチャネルの脂質二重膜への再構成を促進するため、前年度よりセパレータの孔形状を一般的な円形からさまざまな非円形状へと変更する検討を継続して行っている。各孔形状における定量評価を実施し、イオンチャネルが脂質二重膜に効率的に再構成される形状について明らかになりつつある。

成果展開として、協力研究員による萌芽研究を実施している。また国内外の研究機関との共同研究も行っている。2024 年度は、原始的細胞膜組成における膜の物理化学的性質を明らかにした米国 Iona 大学との共同研究成果が Langmuir 誌に掲載された。

### (2) バイオハイブリッドセンサの開発

生体機能と機械を融合したバイオハイブリッドセンサに関しては、科研費研究（2021-2025 年度）による学術基盤確立、JST-CREST 事業（情報担体；2020-2025 年度）による実用性実証をそれぞれ目的として、研究および開発を進めている。細胞上に発現させた受容体をセンサ素子とする細胞センサに関して、東京大学、住友化学と共同で実施している。KISTEC では、センサ細胞が標的物質に応答して発する微小シグナルをデバイスで検出するための計測基盤について研究を行い、概念実証のための計測システムを製作・開発することを目標としている。

2024 年度は、複数の標的物質に対する細胞センサの応答特性を評価するための、細胞センサのアレイ化技術の開発とその計測装置の試作を行った。

まずセンサ細胞のアレイ化技術について、異種センサ細胞を簡便・迅速にアレイ化する研究を前年度に引き続き行った。鉤爪を配列したデバイスにおいて、鉤爪内に細胞を含む溶液をピペットで滴下してゲル化することで、細胞アレイを作製できる。このデバイスおよび手法を用いて多種類のセンサ細胞からなるアレイを作製し、さまざまな標的物質に対する応答性を観測することに成功した。

一方で、規則性をもって配列することなく異なるセンサ細胞を判別する技術についても研究を行った。すなわち、特徴的な形状のハイドロゲル内にセンサ細胞を包埋することで、位置情報に頼ることなく、撮影画像から機械学習により自動で形状判別を行い、センサ細胞を特定することに成功した。本技術により乱雑な状態のセンサ細胞の応答性を評価できる。

こうした細胞センサを搭載し蛍光計測が可能な小型計測装置についても東大と共同で開発した（HardwareX 誌掲載）。さらにこの小型装置をベースとして高感度化した計測器についても試作を行っている。

### (3) 共同研究による成果

JST-CREST 事業（ゲノム合成：2018-2023 年度、東大臼髯教授代表、機能的人工染色体の設計と利用のための革新的研究）の成果発表を行った。同研究では、カエル卵

抽出液中で細胞核様構造が形成される機能を利用し、細胞核封入リボソームを再現性良く作製する技術を構築した。核様構造において機能的な核膜が形成されていること、核膜孔複合体構造が存在することを実験的に確認した（東大大杉研・理研と共同研究成果、*Small* 誌掲載）。また、人工細胞研究のためのリボソーム作製技術として、遠心機に取り付けてリボソームを作製するデバイスの研究を前年度から継続して実施した。

上記のそれぞれの研究成果は、業績一覧に示す通り、国際会議・国内学会での発表、学術論文、記者発表などとして積極的に公開している。また、コア技術・要素技術として重要な成果については特許出願も行っている。

# プロトセルモデル膜の電気生理学的性質

人工細胞膜システムグループ

大崎寿久、Caroline Scott、Riley Porteus、Sunghee Lee、竹内昌治

## 1. はじめに

生命が非生物的な前駆体から地球上に出現するに至った過程、すなわち生命の起源においては、自己と非自己を区別する隔壁となる構造（コンパートメント）の発達が重要であったと考えられている[1]。こうした原始細胞（プロトセル）がどのようなものであったかを探求する人工細胞研究では、閉じた小胞状の構造体（ベシクル）がプロトセルモデルとして広く用いられている[2]。このプロトセルモデルの隔壁（膜）を構成する分子としては、進化した細胞生命における膜構成成分にも類似しながら、前生物的地球の地殻にも存在可能なさまざまな分子が提案されている。中でも、リン脂質をはじめとした両親媒性分子が用いられることが多い。

一方、原始の細胞においても、成長や分裂に加え、膜を通じた栄養素の取り込みと老廃物の排出は不可欠な要素であったと考えられている。タンパク質が進化する以前の時代では、プロトセル内外への栄養素や老廃物などの必須分子の輸送は、膜を通じた受動的な拡散によってなされていたと提唱されている[3,4]。しかしながら、原始的な生命活動を可能にするには、熱力学的に不利な非平衡状態を形成する必要がある。すなわち、膜を介した必須分子の濃度勾配を維持できるよう、透過性の制御が膜には求められることになる[5]。このような膜透過性を調節することができるプロトセル膜の構成分子の候補として、長鎖アルキルカルボン酸が上げられている[6]。その中で、脂肪酸（FA）は狭い pH 範囲において二重膜様に自己集合し、ベシクルを形成することが知られている[7]。また、脂肪酸は比較的単純な構造をもち、リン脂質との類似性も高いことから、プロトセルモデルの膜構成分子の候補として研究が行われている。近年では、脂肪酸と混合することでベシクルの安定性を高める成分、例えばアルコールやアミンなどの研究についても進められている[8,9]。特に、モノグリセリド（MG、グリセロールのモノアシル脂肪酸エステル）の添加はカチオンに対する安定性を向上させ、ベシクル形成の可能性を高めることが分かってきており、脂肪酸とともにプロトセル膜成分の候補として研究が行われてきている[10,11]。

しかしながら、脂肪酸とモノグリセリドを混合して構成される二重膜に対して、その電気生理学的性質に関する理解は十分とはいえない。そこでわれわれは、脂肪酸（FA）とモノグリセリド（MG）の一種であるモノオレインを混

合して形成される二重膜の電気生理学的特性に及ぼすその組成の影響を明らかにするための研究を米国 Iona 大学と共同で行った。本稿では、この成果について誌上発表を行ったのでその内容を報告する[12]。

## 2. 実験方法

モノオレインと脂肪酸からなる二重膜の電気生理学的性質を評価するため、液滴接触法により形成した平面二重膜（Droplet Interface Bilayer: DIB）を用いた[13]。液滴接触法は簡便・再現良く二重膜を形成することが可能であり、イオンチャネルタンパク質や二重膜自身の電気生理学的評価で用いられている。

本研究では、脂肪酸（FA）の鎖長および含有比率がモノオレイン-脂肪酸混合二重膜の電気的特性に与える影響を明らかにすることを目的とした。FA の比率を段階的に増加させることで、膜のイオン透過性に与える影響を観測した。

### 2. 1 液滴接触法デバイスの作製

図 1 に液滴接触法デバイスの模式図を示す。デバイスはアクリル製のベース部品、微小孔をもつセパレータ、銀/塩化銀電極とコネクタからなる。ベース部品は、コンピュータ制御加工装置を用いて厚さ 4 mm のアクリル板を加工することで作製した。一対のウェルとウェル底面に電極を包埋するための貫通孔を設けている。ウェル間に、微小孔をもつセパレータ（厚さ 75  $\mu\text{m}$ ）を挿入して接着剤で固定している。孔径は、600  $\mu\text{m}$  または 400  $\mu\text{m}$  とした。電極表面は、銀/塩化銀ペーストを塗布している。ウェル側面部分は二重膜を顕微鏡観察するために研磨処理を施した。

### 2. 2 二重膜の電気生理学的評価方法

評価システムの概要を図 1b に示す。液滴接触法デバイスは、パッチクランプアンプに接続して電気生理学的計測を行った。計測時には電磁ノイズを低減するため、チップ全体をアルミホイル製のカップで覆い、ファラデーケージとして機能させた。アンプおよびファラデーケージは接地して使用した。二重膜形成を観察するため、デジタルマクロスコブを水平に設置している。形成された二重膜領域は、透過光を用いると観察・撮影できる。撮影画像から二重膜とその周縁部（annulus）との境界である Plateau-Gibbs 境界を明瞭化し、二重膜の面積を算出した。

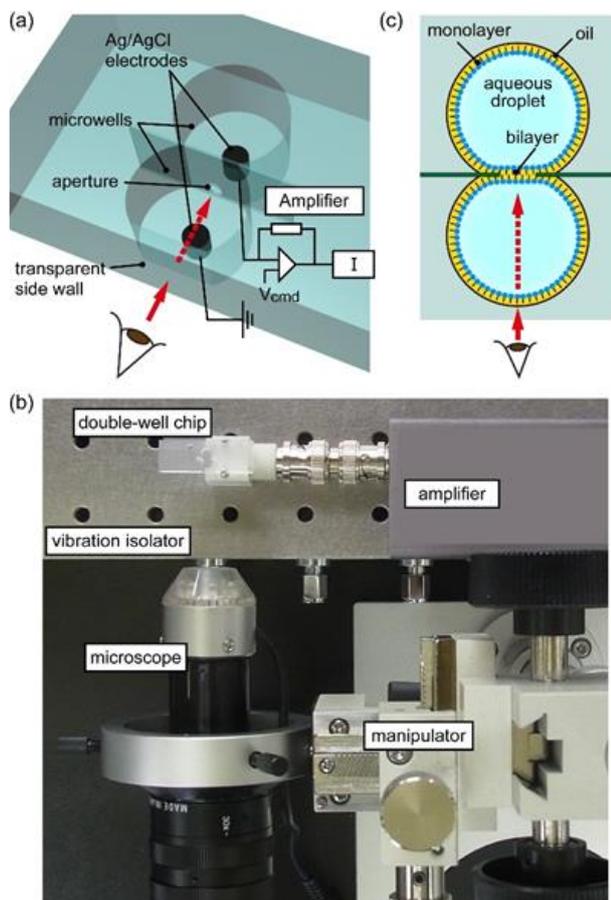


図1 (a) 液滴接触法デバイスの模式図。(b) 膜評価システムの概要。(c) 液滴接触法における二重膜形成の模式図。Reproduced from ref. [12].

平面型二重膜は、ヘキサデカン中に分散させたモノオレイン (MO) /脂肪酸 (FA) 混合液 (5 mg/mL) と 0.01 M KCl 水溶液 (pH8.5) を順次ウェルに滴下して形成した(図 1c)。この操作で油中水滴がウェル内に形成され、水-油界面において MO および FA 分子からなる単分子膜が自発的に形成される。セパレータの微小孔において単分子膜同士が接触して二重膜を形成する[13]。

膜静電容量は、矩形電圧刺激に対する電流応答から算出できる。詳細は文献 12 を参照されたい。二重膜の厚さ(膜厚)は、算出した膜静電容量と膜面積、膜の誘電率 (2.1 と仮定した) から求めることができる。一方、膜抵抗は、印加電圧に対するイオン電流値の関係から求めた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 モノオレイン-脂肪酸混合二重膜の形成

モノオレイン (MO) と脂肪酸 (FA) のさまざまな組成における二重膜形成を Plateau-Gibbs 境界の顕微鏡観察により確認した。MO は炭素鎖長が 18 であり、一般的なリン脂質と同程度であることから、モノグリセリドの代表として選定した。対となる FA として、炭素鎖長が 18、16、14 であるオレイン酸 (OA)、パルミトリン酸 (PA)、およびミリストリン酸 (MA) の 3 種を選んだ。MO と FA

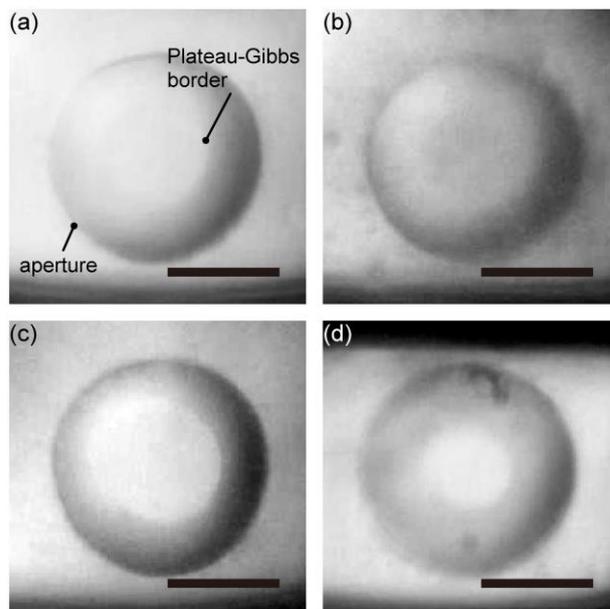


図2 MO-FA 混合二重膜の顕微鏡画像。(a) 100% MO、(b) 15-85 MO-OA、(c) 15-85 MO-PA、(d) 15-85 MO-MA。スケールバー: 300  $\mu\text{m}$ 。Reproduced from ref. [12].

のモル比は、100-0、50-50、30-70、15-85、0-100 を検討した。

MO および MO-FA 混合物から形成された代表的な二重膜の顕微鏡像を図 2 に示す。Plateau-Gibbs 境界が確認でき、MO および MO-FA 混合物がヘキサデカン溶媒中で二重膜を形成できることが示された。一方で、FA 比率の増加に伴い二重膜形成が困難になる傾向があった。特に、MA のみを用いた場合には、本研究の条件下では二重膜が形成できなかった。また、FA 比率の増加に伴い、形成された二重膜は不安定であった。このことから、脂肪酸 (FA) のみの二重膜形成、すなわち FA 単分子膜同士の接触による平面二重膜の構築は困難で、仮に形成された場合でも、二重膜は不安定な状態と考えられる。

#### 3.2 モノオレイン-脂肪酸混合二重膜の膜容量

MO と FA の混合比率を変化させた各条件において二重膜が形成されていることを検証するため、膜静電容量を計測し、そこから膜厚を算出した。図 3a, 3b に、MO と FA のモル比に対する膜容量および膜厚の変化を示す。膜容量は  $0.5 \sim 1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  の範囲にあり、これは先行研究で報告されているリン脂質二重膜やモノグリセリド膜における値と一致している。また、MO のみからなる二重膜の膜厚も、炭素鎖長 18 のリン脂質膜と整合する値を示した。これらの結果と Plateau-Gibbs 境界の観察結果も踏まえると、MO-FA 混合物は平面二重膜を形成し得る。

MO-OA 混合二重膜に関しては、モル比の変化による膜容量および膜厚に有意な変化は見られなかった。一方で、MO-MA 混合二重膜については、MA 比率の増加に伴って膜容量が大きくなり、すなわち膜厚が薄くなる傾向を示した。

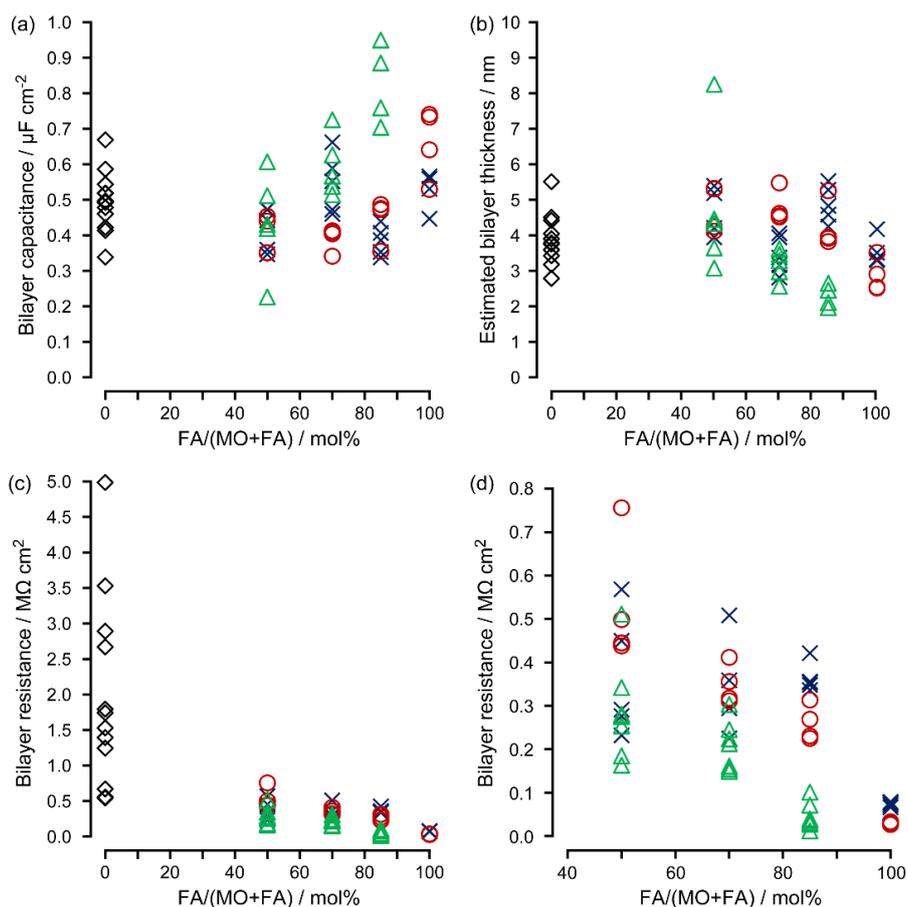


図 3 MO-FA 混合二重膜の電気生理学的性質。(a) 二重膜の膜静電容量。(b) 膜容量から算出した膜厚。(c, d) 膜抵抗とその拡大図。100% MO (◇); MO-OA (×); MO-PA (○); MO-MA (△)。N ≥ 4。Reproduced from ref. [12].

### 3. 3 モノオレイン-脂肪酸混合二重膜の膜抵抗

MO-FA 混合二重膜におけるイオン透過性を評価するため、膜抵抗を測定した (図 3c, 3d)。MO 二重膜の膜抵抗は約  $2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$  であり、先行研究と一致している。この値は、一般的なリン脂質二重膜と比較して 1 桁低く、MO 二重膜のイオン透過性が相対的に高いことを示している。さらに、FA 比率が増加するとともに膜抵抗は低下し、OA および PA 二重膜では  $0.1 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$  未満となった。MO-MA 二重膜ではさらに低い膜抵抗が観測された。MO-FA 二重膜がリン脂質二重膜と比べて高いイオン透過性を示すことが明らかとなった。

MO 二重膜がリン脂質二重膜と比較して 1 桁低い膜抵抗 (すなわち高い透過性) を示す理由は、炭化水素鎖長や膜厚によるものではなく、二重膜のパッキング状態の違いに起因すると考えられる。ホスファチジルコリンなどのリン脂質は、2 本の炭化水素鎖と親水性頭部のバランスにより円筒型構造をとり、曲率の小さい平面二重膜の形成に適する。一方 MO は、炭化水素鎖 9 位のシス型二重結合により立体障害を引き起こしやすい。また、くさび型 (逆円錐形) の分子構造であるため平面二重膜を形成しにくい。二重膜内で炭化水素鎖間の疎水相互作用の低下を引き起こす可能性があるこの構造的特性が、イオンや水分子の透過性を

高めていると考えられる。

上記の傾向は MO-FA 混合二重膜においても同様と考えられる。本研究で用いた FA は、炭化水素鎖長は異なるが全てシス型二重結合をもつ。MO-FA 二重膜内で欠陥が生じると考えられる。MO-OA 膜では、OA 比率の増加と共に膜抵抗が低下している。膜厚には大きな変化がないにもかかわらず透過性が上昇していることから、OA の分子構造が透過性に影響を及ぼしたと考えられる。仮説として、イオン透過に対する FA 分子のフリップ-フロップ運動の寄与が挙げられる。先行研究で、OA 分子のフリップ-フロップが数分程度の時間定数であることが報告されており、リン脂質よりも非常に速い。陽イオンと結合した OA 分子が膜を横断 (フリップ-フロップ) する過程でイオンが輸送される。さらに、MO-MA 膜では、MO-OA および MO-PA 膜に比べて透過性が一層高くなった。これは、MA の炭化水素鎖が短いことによる膜厚の減少による考えられる。

### 4. まとめ

本研究では、液滴接触法デバイスを用いてモノオレインと脂肪酸からなる二重膜の電気生理学的特性を明らかにした。モノオレイン二重膜のイオン透過性は、同程度の鎖長を有するリン脂質二重膜と比較して高く、分子構造による二重膜内の欠陥が主因と考えられる。混合二重膜において脂肪酸の比率を増加させると、膜厚に明確な変化なくイ

オン透過性が上昇した。この透過性上昇は、脂肪酸の迅速なフリップ-フロップ運動に起因する可能性がある。加えて、モノオレインと脂肪酸との炭化水素鎖長の不一致は、膜構造を不安定化させ、イオン透過性をさらに増加させる可能性が示された。

本研究結果は、プロトセルモデルにおいて膜組成の変化がイオン透過性を調節し得ることを示唆している。初期の原始細胞における膜透過現象は、タンパク質を介さない構造欠陥や一過性の膜孔形成といった物理化学的な機構に依存していたと考えられる。本研究の成果は、一本鎖の両親媒性分子のみで構成された原始的な膜において、フリップ-フロップが直接的または間接的にイオン輸送を担っていた可能性を示している。

### 【謝辞】

本研究内容の一部は、JSPS 科研費 (JP21H05013) および米国 NSF (NSF-CHE-2002900, 2304913) の支援により行われました。ここに感謝申し上げます。

### 【参考文献】

- [1] Monnard, P. A.; Deamer, D. W. Membrane self-assembly processes: Steps toward the first cellular life. *Anat. Rec.* 2002, 268, 196-207.
- [2] Deamer, D. W.; Dworkin, J. P. Chemistry and Physics of Primitive Membranes. In *Prebiotic Chemistry*, Walde, P., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005, pp 1-27.
- [3] Vlassov, A. How was membrane permeability produced in an RNA world? *Orig. Life Evol. Biosph.* 2005, 35, 135-149.
- [4] Deamer, D. W. The first living systems: a bioenergetic perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, 61, 239-261.
- [5] Piedrafita, G.; Monnard, P.-A.; Mavelli, F.; Ruiz-Mirazo, K. Permeability-driven selection in a semi-empirical protocell model: the roots of prebiotic systems evolution. *Sci. Rep.* 2017, 7, 3141.
- [6] Rushdi, A. I.; Simoneit, B. R. Lipid formation by aqueous Fischer-Tropsch-type synthesis over a temperature range of 100 to 400 C. *Orig. Life Evol. Biosph.* 2001, 31, 103-118.
- [7] Toparlak, O. D.; Mansy, S. S. Progress in synthesizing protocells. *Exp. Biol. Med.* 2019, 244, 304-313.
- [8] Jin, L.; Kamat, N. P.; Jena, S.; Szostak, J. W. Fatty acid/phospholipid blended membranes: a potential intermediate state in protocellular evolution. *Small* 2018, 14, 1704077.
- [9] Chen, I. A.; Salehi-Ashtiani, K.; Szostak, J. W. RNA catalysis in model protocell vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 13213-13219.
- [10] Monnard, P.-A.; Apel, C. L.; Kanavarioti, A.; Deamer, D. W. Influence of ionic inorganic solutes on self-assembly and polymerization processes related to early forms of life:

Implications for a prebiotic aqueous medium. *Astrobiology* 2002, 2, 139-152.

- [11] Maurer, S. E.; Deamer, D. W.; Boncella, J. M.; Monnard, P.-A. Chemical evolution of amphiphiles: glycerol monoacyl derivatives stabilize plausible prebiotic membranes. *Astrobiology* 2009, 9, 979-987.
- [12] Scott, C.; Porteus, R.; Takeuchi, S.; Osaki, T.; Lee, S. Electrophysiological characterization of monoolein-fatty acid bilayers. *Langmuir* 2025, 41, 2293-2299.
- [13] Kamiya, K.; Osaki, T.; Nakao, K.; Kawano, R.; Fujii, S.; Misawa, N.; Hayakawa, M.; Takeuchi, S. Electrophysiological measurement of ion channels on plasma/organelle membranes using an on-chip lipid bilayer system. *Sci. Rep.* 2018, 8, 17498.

# センサ細胞アレイによる尿中匂い物質の 気相検出法の開発

人工細胞膜システムグループ

三村久敏、大崎寿久、高森翔、竹内昌治

## 1. はじめに

### 1. 1 匂い物質を利用した疾患の検出

がんや糖尿病などの生活習慣病は、早期発見と予防が重要とされており、そのための新たなバイオマーカーの探索が進められている [1]。近年、尿や呼気に含まれる匂い物質（揮発性有機化合物：VOCs）は、これらの疾患に伴って組成や濃度が変化することが報告されており、非侵襲的に採取可能なバイオマーカーとして注目されている [2]。これらの匂い物質は、従来の血液検査や画像診断に比べて簡便かつ患者の負担が少ない点で優れており、早期診断やスクリーニング手法としての応用が期待され、匂い物質を用いた疾患検出技術に関する研究が活発に進められている。しかし、尿や呼気中に含まれる匂い物質は多種多様かつ微量であり、さらに検体には様々な夾雑成分が含まれているため、これらを高感度かつ高選択的に識別・検出することは容易ではない。この課題を解決するため、生物がもつ嗅覚システムを模倣したセンサ技術、特に嗅覚受容体を利用したバイオハイブリッドセンサの開発が注目されている [3]。

### 1. 2 昆虫嗅覚受容体による匂い物質の感知

生物は、嗅覚器官の感覚細胞に存在する嗅覚受容体を介して、空気中に存在する匂い物質を認識する。嗅覚受容体は、細胞膜上に存在する膜タンパク質であり、匂い分子の三次元構造を識別して結合することで、細胞内のシグナル伝達を開始する。この受容体とリガンド間の相互作用に基づく匂い識別は、匂い物質の化学構造を鋭敏に識別する能力を備えている。

昆虫における嗅覚受容体 (olfactory receptor: OR) は、共受容体 (olfactory receptor co-receptor: Orco) と複合体を形成し、リガンド依存性の陽イオンチャネルとして機能することが知られている [4]。この OR/Orco 複合体は、匂い分子が結合することで陽イオンチャネルが開き、ナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) やカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) などの陽イオンが細胞内に流入する。このイオン流入による脱分極が神経信号を生み出し、最終的に脳で「匂い」として認識される。蚊などの昆虫では 80 種類以上の OR が同定されてお

り、それぞれが異なる匂い物質に高い選択的で応答する [5]。このことから、昆虫の嗅覚系は、匂い分子の識別において高度な多様性と選択性を備えていることがわかる。

この嗅覚機構を人工的に再構成することで、匂い物質を分子レベルで選択的に検出できるセンサが実現可能となる。このようなセンサは、酸化半導体型などの人工センサと比較して高い感度と選択性を有し、微量かつ多成分の匂い物質の識別において有効であると考えられている。現在、昆虫由来の OR および Orco を人工的に発現させた培養細胞 (センサ細胞) を利用した匂いセンサの開発が進められている。

### 1. 3 センサ細胞を利用した匂い物質センサ

センサ細胞は、細胞内で嗅覚受容体および  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光タンパク質 (GCaMP) を発現しており、嗅覚受容体を介して匂い物質を認識すると、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する。それに応じて GCaMP が蛍光を発するため、匂い物質の存在を蛍光シグナルとして可視化することができる。我々はこれまでに、センサ細胞をハイドロゲルに封入し、簡便なピペッティング操作でアレイ化できるマイクロウェルデバイスを開発し、その有用性を報告してきた。このマイクロウェルデバイスを用いることで、多種類のセンサ細胞を空間的に配置し、異なる匂い物質に対する応答を同時に計測することが可能となる。これにより、疾患特異的な匂いプロファイルを識別するマルチセンサアレイとしての応用が期待される。

一方で、従来の手法では、匂い物質を含む液体検体をセンサ細胞に直接接触させていた。しかし、この方法では、検体中の夾雑成分がセンサ細胞の応答や蛍光測定を阻害する可能性がある。実際、我々の検討では、同じ濃度の匂い物質を添加した場合でも、バッファー中ではセンサ細胞が明瞭な応答を示したのに対し、人工尿中では応答が著しく低下することが確認されており、この影響は無視できない (図 1、後述)。

本研究では、この問題を解決するため、匂い物質を揮発性有機溶媒 (ヘキサン) で抽出・分離し、その後センサデバイス内の密閉された微小空間において揮発させる気相検出法を開発した。匂い物質を抽出し、揮発した標的分子

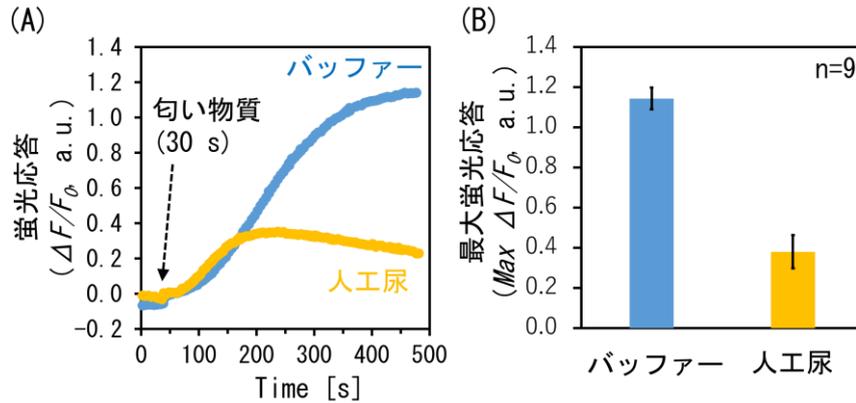


図1 センサ細胞アレイに対して、標的匂い物質 (アセトフェノン、100  $\mu\text{M}$ ) を含むバッファ溶液または人工尿を直接添加した際の正規化蛍光応答の比較。(A) 時間変化。(B) 最大値の比較。

を気相でセンサ細胞に曝露することにより、検体中の妨害成分を回避することが可能となる。このアプローチにより、センサ細胞が有する匂い物質への選択的応答性を最大限に活用することができ、より高精度な検出が実現すると考えられる。本手法は、匂い物質の組成が複雑かつ微量である尿などの生体検体に対して有効であり、センサ細胞の選択性と気相曝露の利点を活かした匂いセンシング技術として、疾患診断への応用が期待される。

## 2. 実験方法

### 2.1 デバイスの作製

本研究で用いたデバイスの設計は、CAM ソフトウェア (Alphacam) を用いて行った。デバイスの作製には NC 加工機を利用し、厚さ 4 mm のアクリル板を切削して行った。

### 2.2 センサ細胞の培養

センサ細胞には、昆虫嗅覚受容体 (OR)、共受容体 (Orco)、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質 (GCaMP) を発現させた昆虫培養細胞 (ExpiSf9) を用いた。センサ細胞の培養には ExpiSf CD 培地を使用し、三角フラスコを用いて、振とう培養 (27°C、125 rpm) で行った。

### 2.3 センサ細胞アレイの作製

センサ細胞アレイは、センサ細胞をハイドロゲルに封入し、ピペティングでデバイス上に分注することで作製した。まず、培養したセンサ細胞を遠心 (300 $\times$ g、5 分間) し、得られた沈殿を回収した。回収したセンサ細胞は、ゲル化前のハイドロゲル (TrueGel3D) に懸濁し、ピペティングによって 1.1  $\mu\text{L}$  ずつデバイス上に分注した。分注後のデバイスは、27°C で 25 分間静置することにより、ハイドロゲルを完全にゲル化させた。その後、アレイ化されたセンサ細胞を含むチャンパーに、保存溶液 (HBSS (ハンクス平衡塩溶液) / 20 mM PIPES, pH 6.2 / 0.1% BSA) を満たし、使用するまで 4°C で保存した。

### 2.4 センサ細胞アレイの蛍光応答の測定

センサ細胞アレイの蛍光応答の測定は、8 ビット CMOS カメラ、青色励起光 (485 nm)、緑色蛍光フィルタ (530 nm) を備えた蛍光イメージャーを用いて室温で行った。4°C で保存してあったセンサ細胞アレイは、27°C で 10 分間インキュベート後に測定に用いた。蛍光応答の測定は、タイムラプスイメージングによって行い、約 500 秒間に渡って記録した。標的匂い物質は DMSO に溶解後、目的の濃度となるようにバッファ溶液 (HBSS / 20 mM PIPES, pH 6.2) または人工尿で希釈し、センサ細胞アレイが配置されたチャンパーに添加した。

記録した蛍光応答画像の解析は、画像解析ソフトウェア (ImageJ) を用いて行った。センサ細胞アレイの各マイクロウェルに、円形の関心領域 (ROI) を設定し、各時点における平均蛍光輝度を定量した。数値化した蛍光輝度の変化は、センサ細胞の応答前の蛍光輝度 ( $F_0$ ) と応答後の蛍光輝度 ( $F$ ) から、正規化した蛍光輝度変化 ( $\Delta F/F_0$ ) を算出し、グラフを作成した。

### 2.5 標的匂い物質のヘキサン抽出

バッファ溶液または人工尿に添加した標的匂い物質の抽出は以下の手順で行った。標的匂い物質は DMSO に溶解したのち、所定の濃度に希釈した。まず、調製した検体試料 1 mL に対し、ヘキサン 0.1 mL を加え、ボルテックスで激しく混合した。続いて、遠心 (21,600 $\times$ g、5 分間) によって、ヘキサン層 (上層) と水層 (下層) に分離し、上層のヘキサン抽出液を回収した。抽出液は、使用するまで -80°C で保存した。

### 2.6 センサ細胞アレイによる気相検出

ヘキサン抽出液に含まれる標的匂い物質の検出は、センサ細胞アレイを用いて以下のように行った。まず、作製済みのセンサ細胞アレイのチャンパーから保存溶液の 90% を除去し、アレイと同サイズの小型容器の上に設置した

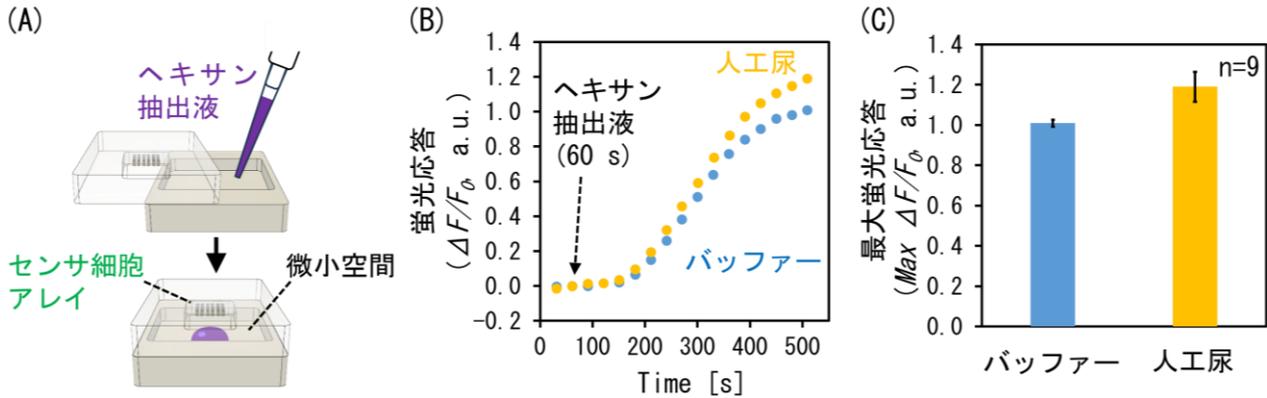


図2 開発した気相曝露法を用いた、標的匂い物質 (アセトフェノン、100  $\mu\text{M}$ ) を含むバッファー溶液または人工尿のヘキサンの抽出液に対するセンサ細胞アレイの蛍光応答。(A) ヘキサンの抽出液中の匂い物質をセンサ細胞アレイに気相曝露する手法の模式図。(B) 正規化蛍光応答の時間変化の比較。(C) 正規化蛍光応答の最大値の比較。

(図 2A)。このとき、センサ細胞がアレイ化された面を小型容器のサンプルチャンバーに向くように配置した。また、容器との間にわずかな隙間を設けて、サンプルチャンバー内へペッピング操作が可能な状態とした。次に、アレイと小型容器を蛍光イメージャー内に設置し、サンプルチャンバーにヘキサンの抽出液 3 $\mu\text{L}$  を滴下した。滴下後すぐにアレイと容器の位置を一致させ、チャンバーを密閉した。これにより、気化した標的匂い物質が微小空間内でセンサ細胞に曝露され、応答が誘導される。蛍光応答の測定と解析は、上述の方法に準じて行った。

### 3. 結果と考察

図 1 に、標的匂い物質であるアセトフェノンを終濃度 100  $\mu\text{M}$  となるように添加したバッファー溶液および人工尿に対するセンサ細胞アレイの蛍光応答の結果を示す。図 1A では、両検体における正規化蛍光応答の時間経過を示しており、グラフの曲線は 9 個のマイクロウェルの平均値を示している。バッファーに対しては、その添加から約 450 秒間にわたり、センサ細胞の蛍光応答が持続的に増加した。一方、人工尿では、添加後 150 秒程度まではバッファーと同様の応答増加が観察されたが、それ以降は応答が次第に低下した。図 1B には、図 1A における蛍光応答の最大値を示しており、棒グラフは 9 個のマイクロウェルの平均値および標準偏差を示す。これらの結果は、人工尿中に存在する夾雑成分がセンサ細胞の応答を阻害していることを示している。

図 2 には、人工尿中のアセトフェノンを揮発性有機溶媒であるヘキサンを用いて抽出し、得られた抽出液をデバイス内の微小空間で揮発させ、センサ細胞アレイに気相で曝露させた結果を示す。図 2A は、本研究で開発したセンサ細胞アレイに対する気相曝露法の概略図である。センサ細胞アレイは保存溶液を除去したのち、センサ細胞が配置された面を下向きにしてサンプルチャンバー上に設置し、ヘキサンの抽出液の添加後すぐに密封することで、微小空間を

形成し、揮発した標的匂い物質を曝露する構成とした。

図 2B は、アセトフェノンを含むバッファーおよび人工尿のヘキサンの抽出液に対するセンサ細胞の蛍光応答の時間経過を示している。両検体とも、添加後から約 450 秒間にわたり蛍光応答の増加が観察され、人工尿を直接添加した際に見られた蛍光応答の抑制は確認されなかった。図 2C には、図 2B の蛍光応答の最大値を示す。アセトフェノンを含むバッファーおよび人工尿のヘキサンの抽出液に対して、センサ細胞アレイはほぼ同等の応答を示しており、ヘキサンの抽出によって人工尿中の夾雑成分の影響を効果的に除去できることが示された。

本研究では、尿中の匂い物質をセンサ細胞アレイで検出するにあたり、検体に含まれる夾雑成分による応答阻害を回避する方法として、揮発性有機溶媒による標的匂い物質の抽出と、それに続く気相での検出を組み合わせた手法を開発した。その結果、人工尿中に添加した標的匂い物質を、バッファー中と同等に検出できることが確認された。今後は、本手法を実際のヒト尿検体に適用し、健常者と疾患罹患患者との間で匂い物質の検出パターンに差があるかを検討する予定である。本研究で開発した手法は、センサ細胞アレイを用いた疾患診断技術への応用に向けた有望な基盤技術になると期待される。

#### 【謝辞】

本研究は、JST・CREST・JPMJCR20C4 の支援を受けたものです。本研究で使用したセンサ細胞は、住友化学 (株) から供与されました。ここに記して感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

- [1] Bax C, et al, Cancers 2019, 11, 1244
- [2] Goertzen A, et al., Front Oncol 2024, 14, 1448760
- [3] Hirata Y, et al., Lab Chip 2021, 21, 2643-2657
- [4] Sato K, et al., Nature 2008, 452, 1002-1006
- [5] Carey AF, et al., Nature 2010, 464, 66-71

# 「形」を用いた細胞匂いセンサ同時分析法の構築

人工細胞膜システムグループ

高森翔、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治

## 1. はじめに

### 1. 1 細胞匂いセンサ

匂いの検出は、労働環境における安全管理、食品の品質保証、環境モニタリング、さらには医療診断や健康管理に至るまで、さまざまな分野で重要な役割を果たしている。従来の匂い検出手法には、訓練を受けた人間や動物による嗅覚検出 [1,2]、ガスセンサ [3]、およびガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS) [4] による化学物質の定量分析などがある。これらは高感度な検出が可能である一方で、大型装置を必要とするケースが多く、携帯性や現場での即時運用に制約がある。

こうした課題の克服に向け、近年ではバイオハイブリッド型匂いセンサ [5-9] が有望な代替手段として注目されている。特に、嗅覚受容体(OR)および共受容体(Orco)を発現させた細胞をセンサ素子として用い、カルシウム感受性蛍光インジケータ(例: GCaMP [9-11])と組み合わせることで、選択性と感度に優れ、かつポータブルな匂い検出系の構築が期待されている。実際、先行研究では、単一種のORを発現させたセンサ細胞を用いて、個別の匂い物質を検出するバイオセンサの有効性がすでに示されている [5,8,9,12,13]。

### 1. 2 匂いの「嗅ぎ分け」に向けた取り組み

匂い検出においては、単一の化学物質だけでなく、匂いを構成する多様な成分を識別する能力(=嗅ぎ分け)が求められる。これを細胞匂いセンサで実現するためには、異なるORを発現させた複数種類のセンサ細胞を同時に用い、それぞれの細胞の応答パターンを解析する必要がある。このためには、複数のセンサ細胞を同一の観察系内で扱い、それぞれの応答性を区別・解析する手法の構築が不可欠である。先行研究ではその一例として、異なるセンサ細胞を基板上に平面的にパターンニングし、位置情報に基づいて個々の応答を識別する方法が提案されている [14,15]。しかしながら、この細胞パターンニング手法は、取り扱う細胞の種類が増加するにつれて操作の複雑性が増し、自動化技術なしでは実験的な再現性や効率性の確保が難しいという課題がある。

### 1. 3 センサ細胞を用いた匂い検出の仕組み

匂いセンサ細胞では、細胞膜上に発現したORが匂い分子と結合すると、ORとOrcoが形成するカルシウムイオ

ンチャネルが開閉し、細胞外からカルシウムイオンが細胞内へ受動的に流入する。このカルシウム流入により、あらかじめ導入されているカルシウム感受性インジケータが蛍光を発する。この応答は個々の細胞ごとに独立して起こるため、理論的には単一細胞ごとに匂い物質を検出可能である。しかし実際には、細胞の状態や発現量のばらつきなどの影響により、一細胞レベルでの定量的な再現性には限界がある。そのため、複数細胞の応答を集団として平均化することで、より安定かつ再現性の高い検出を目指すアプローチが取られている。この平均化手法には、①基板上にパターンニングされた細胞集団によるもの、②多数の細胞を包埋したハイドロゲル粒子単位で応答を平均化する方法が存在する。

### 1. 4 異なるハイドロゲル粒子の識別方法

センサ細胞をハイドロゲル粒子に包埋する場合、異なる細胞種を含む粒子を確実に識別・区別する技術が必要となる。従来のアプローチとしては、粒子を基板上に整列・固定し、位置情報に基づいて識別する方法が報告されている [5]。一方、より柔軟な応用に向けて、ハイドロゲル粒子そのものに識別可能な情報をエンコードする技術、いわゆる「ハイドロゲル・エンコーディング技術」も数多く開発されている [16,17]。具体的には、粒子の形状、表面への微細な刻印パターン、あるいは種類ごとに異なる蛍光染色を施すなどの方法がある。これらはいずれもセンサ細胞包埋粒子の識別に利用可能であるが、実装の難易度や識別精度、使用環境への適応性など、それぞれに特有の利点と制約があるため、目的に応じた選択が求められる。

### 1. 5 粒子の「形」によるセンサ識別の新戦略

本研究では、異なる匂いセンサ細胞をそれぞれ異なる形状のハイドロゲル粒子に成形し、それらの形状情報を深層学習を用いて解析・識別することで、多種類のセンサ応答を同時にかつ自動的に判別する新たな方法を提案する。まず、異なるセンサ細胞をそれぞれ別個の形状を持つハイドロゲル粒子に包埋する。次に、それらの粒子画像をもとに畳み込みニューラルネットワーク(CNN)を訓練し、粒子の形状分類器を構築する。続いて、これらの異なる形状粒子を混合したサンプルに匂い物質を添加し、時間経過に伴う蛍光応答を撮像する。得られた時系列画像データを、前述の形状識別スキームにより解析し、各粒子の形状を特定する。さらに、それぞれの粒子に対する蛍光変化を自動的に

抽出・解析することで、複数の匂いセンサ細胞による同時応答の定量評価を可能とする。

## 2. 実験方法

### 2.1 センサ細胞調製とハイドロゲル粒子の形成

本研究では、ExpiSf9 細胞ベースの安定発現株を用い、それぞれ AgOR1、AaOR4、AaOR15 を含む 3 種類のセンサ細胞株を用意した。各株は Orco および GCaMP7 とともに共発現しており、匂い応答時にカルシウム流入に応じた蛍光増加が観察可能である。

細胞を遠心回収後、2%低融点アガロース(または 3%アルギン酸)と混合し、厚さ 0.5 mm のシリコンスペーサー間に展開して平面ゲルを形成した。ゲル化後、生検トレパンを用いて円形・三角形・四角形の 3 種類に打ち抜き、乾燥防止のため HBSS 中に保存した。

### 2.2 粒子形状識別スキームの構築と適用

粒子画像は GCaMP 蛍光チャンネルにて取得し、セグメンテーションを行った。粒子面積が 2,000~3,400 ピクセルの範囲内にある粒子を抽出し、ゼロパディングによって 128×128 ピクセルの画像に整形。形状ごとに約 2,600 枚ずつの学習データを用意し、2 層の畳み込み・プーリング、Flatten 層、全結合層、softmax 確率出力からなる CNN を 5 モデル学習させた。

分類時には各モデルの softmax 確率を平均化し、最高値が 0.5 を超えた場合は該当形状(円形(C)、三角形(T)、四角形(S))を、超えない場合は「分類不能(U)」とした。

### 2.3 匂い物質添加実験と蛍光応答解析

3 種類のセンサ細胞内包粒子を混合し、フェノール、6-methyl-5-hepten-2-one、アセトフェノン、DMSO(ネガコン)の 4 条件で蛍光タイムラプス撮像(1 fps, 5 分間)を実施。粒子ごとに形状分類を行ったのち、個々の粒子について蛍光強度を時系列で抽出し、 $\Delta F/F_0$  を計算。粒子追跡には重心距離に基づくアルゴリズムを用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 センサ細胞内包ハイドロゲル粒子の作製と粒子形状識別スキームの構築

図 1A, B にセンサ細胞を内包したハイドロゲル粒子と、それに用いた生検トレパンを示す。トレパンの形状に対応した三種類(円形、三角形、四角形)の粒子が安定して得られている。次に、取得した粒子の蛍光画像を用いて、形状識別用 CNN モデルの訓練およびバリデーションを行った(図 1C)。学習データの組合せを変えて 5 回独立に学習を行い、5 つの分類器を構築した。全ての訓練において損失関数と分類精度はそれぞれエポック 2~6 で急速に収束し(図 1D, F)、トレーニングセットでは 100%、バリデーションセットでも誤分類率 0.06%(1/1564)という高精度を達成した(図 1F)。これらの結果は過学習が起きていないことを

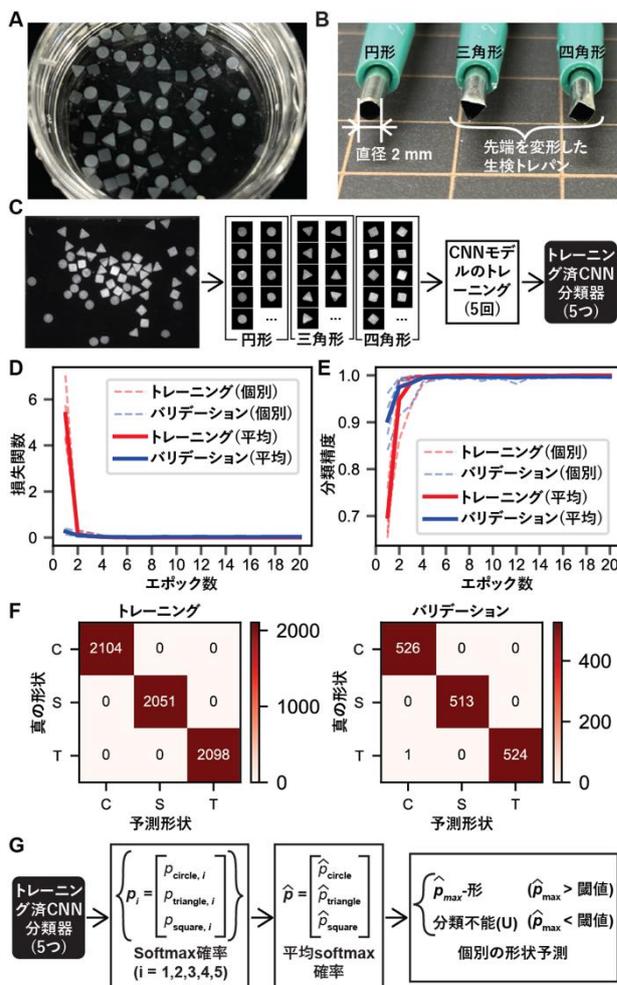


図 1. センサ細胞内包ハイドロゲル粒子の作製、および形状識別スキームの構築. (A)作製したセンサ細胞内包ハイドロゲル粒子. (B)先端を変形した生検トレパン. (C)CNN 形状分類器のトレーニング. (D)損失関数(カテゴリカル・クロスエントロピー). (E)分類精度. (F)トレーニングおよびバリデーションの混同行列. (G)構築した形状識別スキーム.

示唆する。最終的に、5 つの分類器の softmax 確率を平均し、閾値 0.5 で分類する形状識別スキームを確立した(図 1G)。

### 3.2 粒子形状による複数細胞センサの同時解析

構築した形状識別スキームを用いて、異なるセンサ細胞をそれぞれ封入した三形状のハイドロゲル粒子を混合し、各種匂い物質への応答を解析した。フェノール、6-methyl-5-hepten-2-one、アセトフェノンに加え、ネガティブコントロールの条件を加えた計 4 条件で実験を行った。代表例として、アセトフェノンに対する応答画像を図 2B に示す。95 個中 2 個の誤識別のみであり、4 実験を合わせた混同行列(図 2C)でも誤識別率は 1.6%(6/380)に留まり、高精度な識別が達成されている。図 2D はアセトフェノン条件下での各形状粒子における蛍光応答の経時変化を示しており、四角形粒子で強い応答が観察された。一方、円形および三角形粒子でも比較的弱い有意な応答が確認された。これは、それぞれが発現する OR(AgOR1、AaOR4)にもアセトフェノンに対する感受性がある可能性を示唆してい

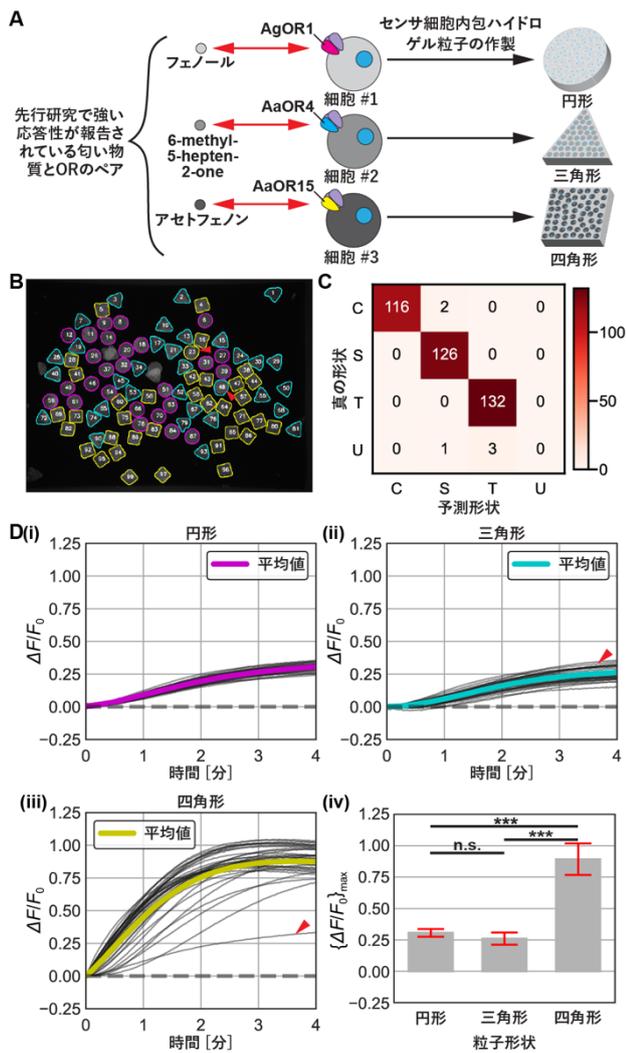


図 2. 異なる OR を発現した 3 種類の匂いセンサ細胞を内包したアガロース粒子を用いた匂い物質添加実験と、形状識別スキームによる応答性解析。(A) 実験に使用した 3 種類のセンサ細胞 (AgOR1, AaOR4, AaOR15) と、それぞれの細胞を内包したハイドロゲル粒子の形状(円形、三角形、四角形)。(B) アセトフェノン添加実験におけるハイドロゲル粒子の形状識別結果。(C) 4 種類の匂い物質(フェノール、6-methyl-5-hepten-2-one、アセトフェノン、ネガコン)添加実験における形状識別の混同行列。(D) 形状識別結果に基づく、アセトフェノン添加時の粒子ごとの蛍光応答 ( $\Delta F/F_0$ ) の解析

る。以上より、形状エンコードと CNN 識別を組み合わせることで、複数種類の匂いセンサ細胞による同時解析が高精度かつ自動的に実施可能であることが実証された。

### 【謝辞】

本研究で用いたセンサ細胞は住友化学株式会社にご提供いただきました。また、本研究は JSPS 科研費 JP21H05013 の助成を受けたものです。

### 【参考文献】

[1] Cleary, A. M., Konkel, K. E., Nomi, J. S., McCabe, D. P., Odor recognition without identification. *Mem. Cogn.* **2010**, 38(4), 452-460.  
 [2] Waggoner, P., Lazarowski, L., Hutchings, B., Angle, C., Porritt, F., Effects of learning an increasing number of

odors on olfactory learning, memory and generalization in detection dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2022**, 247, 105568.  
 [3] Kohl, D., Function and applications of gas sensors. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2001**, 34(19), R125.  
 [4] Högnadóttir, Á., Rouseff, R. L., Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, 998(1-2), 201-211.  
 [5] Hirata, Y., Morimoto, Y., Nam, E., Takeuchi, S., Portable biohybrid odorant sensors using cell-laden collagen micropillars. *Lab Chip* **2019**, 19(11), 1971-1976.  
 [6] Yamada, T., Sugiura, H., Mimura, H., Kamiya, K., Osaki, T., Takeuchi, S., Highly sensitive VOC detectors using insect olfactory receptors reconstituted into lipid bilayers. *Sci. Adv.* **2021**, 7(3), eabd2013.  
 [7] Misawa, N., Fujii, S., Kamiya, K., Osaki, T., Takaku, T., Takahashi, Y., Takeuchi, S., Construction of a biohybrid odorant sensor using biological olfactory receptors embedded into bilayer lipid membrane on a chip. *ACS Sens.* **2019**, 4(3), 711-716.  
 [8] Sato, K., Takeuchi, S., Chemical vapor detection using a reconstituted insect olfactory receptor complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53(44), 11798-11802.  
 [9] Mitsuno, H., Sakurai, T., Namiki, S., Mitsuhashi, H., Kanzaki, R., Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 65, 287-294.  
 [10] Deng, H., Nakamoto, T., Odor biosensors based on cell expressing olfactory receptor: Recent advances. *Anal. Sens.* **2024**, 4(5), e202400006.  
 [11] Oh, E. H., Lee, S. H., Lee, S. H., Ko, H. J., Park, T. H., Cell-based high-throughput odorant screening system through visualization on a microwell array. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 53, 18-25.  
 [12] Kida, H., Fukutani, Y., Mainland, J. D., de March, C. A., Vihani, A., Li, Y. R., Chi, Q., Toyama, A., Liu, L., Kameda, M., Yohda, M., Matsunami, H. Vapor detection and discrimination with a panel of odorant receptors., *Nat. Commun.* **2018**, 9(1), 4556.  
 [13] Terutsuki, D., Mitsuno, H., Sakurai, T., Okamoto, Y., Tixier-Mita, A., Toshiyoshi, H., et al., Increasing cell-device adherence using cultured insect cells for receptor-based biosensors. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, 5(3), 172366.  
 [14] Termtanasombat, M., Mitsuno, H., Misawa, N., Yamahira, S., Sakurai, T., Yamaguchi, S., et al., Cell-based odorant sensor array for odor discrimination based on insect odorant receptors. *J. Chem. Ecol.* **2016**, 42, 716-724.  
 [15] Yamahira, S., Mitsuno, H., Yamaoka, M., Nagamune, T., Okamoto, A., Kanzaki, R., Yamaguchi, S., Odorant-sensing cell micropatterns for odor discrimination. *Biosens. Bioelectron.: X* **2024**, 18, 100473.  
 [16] Ghosh, R., Arnheim, A., van Zee, M., Shang, L., Soemardy, C., Tang, R. C., et al., Lab on a particle technologies. *Anal. Chem.* **2024**, 96(20), 7817-7839.  
 [17] Cai, L., Bian, F., Chen, H., Guo, J., Wang, Y., Zhao, Y., Anisotropic microparticles from microfluidics. *Chem* **2021**, 7(1), 93-136.

# 業績

## 【原著論文】

1. Michio Kawai, Haruka Oda, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi  
Open-source and low-Cost Miniature Microscope for On-Site Fluorescence Detection  
HardwareX, Vol. 19, e00545 (2024)
2. Takuma Nakane, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Sho Takamori, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi  
Effective Dissolution of a Gaseous Odorant in Liquid Using Gas Flow  
Advanced Materials Technologies, Vol. 9, 2400494 (2024)
3. Caroline Scott, Riley Porteus, Shoji Takeuchi, Toshihisa Osaki, and Sunghee Lee  
Electrophysiological Characterization of Monoolein-Fatty Acid Bilayers  
Langmuir, Vol. 41, pp. 2293–2299 (2025)
4. Keisuke Sugahara, Shun Yasunaga, Minghao Nie, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi  
3D Wiring Microelectrodes in a PMMA Microfluidic Device by Vacuum Filling Method  
Advanced Materials Technologies, Vol. 10, 2401622 (2025)
5. Keisuke Ohta, Minghao Nie, Haruka Oda, and Shoji Takeuchi  
Skin-Covered Biohybrid Robotic Finger with Bilayered Permeable Subcutaneous Support for Internal Hydration Supplement  
Advanced Intelligent Systems, 2400871 (2025) online
6. Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Tomo Kondo, Miyuki Shintomi, Keishi Shintomi, Miho Ohsugi, and Shoji Takeuchi  
Nuclear Assembly in Giant Unilamellar Vesicles Encapsulating Xenopus Egg Extract  
Small, Vol. 21, 2412126 (2025)

## 【総説・概論】

1. 小田悠加、大崎寿久、竹内昌治  
マイクロ流体デバイス技術を利用したバイオハイブリッド匂いセンサ  
生体ガス計測の最新動向, シーエムシー出版, pp.134-143 (2024)

## 【口頭発表】

1. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Robotics: Harnessing Living Materials as Robotic Elements  
2024 Korea Biochip Society Spring Conference, 2024年5月, 韓国
2. Toshihisa Osaki, Kenji Nakao, Hisatoshi Mimura, Sho Takamori, and Shoji Takeuchi  
Artificial Cell Membrane System for Single-channel Characterization of Ion Channels  
ION CHANNEL MODULATION SYMPOSIUM (ICMS2024), 2024年5月, 東京
3. 高森翔、川上泰生、大崎寿久、三村久敏、三木則尚、竹内昌治  
複数細胞匂いセンサの実現のための異種形状ゲル自動識別技術の構築  
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第49回研究会 (CHEMINAS49), 2024年6月, 東京
4. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Materials and Devices for Highly Sensitive Sensing  
Joint Conference of GCIM 2024 & IUMRS-ICYRAM 2024 & MRS-K SPRING MEETING, 2024年6月, 韓国
5. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Robotics  
Yonsei University 機械工学部セミナー, 2024年6月, 韓国
6. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Robotics  
University of Illinois Urbana-Champaign MiV Seminar, 2024年6月, 米国
7. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Robotics: Integrating Living Materials for Enhanced Robotic Systems  
The 11th Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology (APCOT2024), 2024年6月, シンガポール
8. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Innovations: Building the Future of Sensing Devices  
International Conference on Smart Sensors (ICSS 2024),

- 2024年7月, 台湾
9. Shoji Takeuchi  
Emerging Technology for Biohybrid Robotics  
The 6th International Summer School for Medical Robotics (Chinese Government Scholarship International Summer School Programme 2024), 2024年7月, 中国
  10. 竹内昌治  
三次元組織形成技術の新展開  
第45回日本炎症・再生医学会, 2024年7月, 福岡
  11. 竹内昌治  
バイオハイブリッド研究の新展開  
佐渡カンファレンス, 2024年7月, 佐渡
  12. 大崎寿久, 中尾賢治, 三村久敏, 高森翔, 竹内昌治  
Artificial Cell Membrane System for Single-protein Characterization of Ion Channels  
第21回次世代を担う若手のためのフィジカル・フォーラム (PPF2024), 2024年8月, 葉山
  13. 加藤碧, 小田悠加, 大崎寿久, 三村久敏, 高森翔, 三木則尚, 竹内昌治  
Strip-type odorant sensor with an array of olfactory receptor-expressing cells  
日本味と匂学会第58回大会, 2024年9月, 岡山
  14. 大崎寿久  
細胞サイズものつくりと産学連携  
日本分析化学会第73年会 ものつくり技術交流会 2024 in 関東・東海, 2024年9月, 名古屋
  15. Sho Takamori, Taisei Kawakami, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi  
Shape Classification-based Fluorescence Analysis in Hydrogels Encapsulating Odorant Sensor Cells  
The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS2024), 2024年10月, カナダ
  16. Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, Haruka Oda, and Shoji Takeuchi  
A Micro-well Device Integrates Multiple Sensor Cells with Hydrogel for Odorant Detection  
The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS2024), 2024年10月, カナダ
  17. Haruka Oda, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi  
Reproducible and Repeatable Cellular Microarray  
Generation Using Multi-Capillary Stamping  
The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS2024), 2024年10月, カナダ
  18. Shoji Takeuchi  
The Frontier of Biohybrid Robotics in Biofabrication  
The International Conference on Biofabrication 2024 (ISBF2024), 2024年11月, 福岡
  19. 竹内昌治  
超高感度計測を実現するバイオハイブリッドセンサ  
第3回 EISESiV・iSyMs コンソーシアム合同シンポジウム, 2024年11月, 東京
  20. 竹内昌治  
Think Hybrid! ~異分野融合研究で拓くSFの世界~  
渋谷教育学園幕張中学校・高等学校進路講演会, 2024年11月, 千葉
  21. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Robotics  
2024 IEEE International Conference on Cyborg and Bionic Systems (IEEE CBS 2024), 2024年11月, 名古屋
  22. 田中葵, 大崎寿久, 三村久敏, 高森翔, 三木則尚, 竹内昌治  
細胞匂いセンサに向けたエレクトロスプレーを用いた高効率匂いガス溶解機構  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第50回研究会 (CHEMINAS 50), 2024年11月, 仙台
  23. 江澤伸司, 大崎寿久, 三村久敏, 高森翔, 三木則尚, 竹内昌治  
電氣的刺激に対する人工細胞膜の安定性  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第50回研究会 (CHEMINAS 50), 2024年11月, 仙台
  24. 高森翔, 三村久敏, 大崎寿久, 竹内昌治  
液滴形成ユニット内蔵 cDICE 型リポソーム形成デバイスの構築  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第50回研究会 (CHEMINAS 50), 2024年11月, 仙台
  25. 三村久敏, 大崎寿久, 高森翔, 小田悠加, 竹内昌治  
尿中の匂い物質検出のための細胞センサデバイスの開発  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第50回研究会 (CHEMINAS 50), 2024年11月, 仙台
  26. 大崎寿久, Caroline Scott, Riley Porteus, 竹内昌治, Sunghee Lee

液滴接触法デバイスを用いたモノグリセリド-脂肪酸二重膜の膜物性の評価  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 50 回研究会  
(CHEMINAS 50) , 2024 年 11 月, 仙台

27. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Robotics  
The 10th International Conference on BioSensors,  
BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS  
& Applications (Bio4Apps2024), 2024 年 12 月, 富山
28. 大崎寿久  
生物の細胞膜機能を次世代センサとして活用する分  
析技術  
令和 6 年度分析イノベーション交流会, 2024 年 12 月,  
東京
29. 竹内昌治  
バイオハイブリッドなモノづくり  
第 43 回整形外科バイオマテリアル研究会, 2025 年 1  
月, 松江
30. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Robotics  
Conference on Robots for Science - How Robots Will  
Facilitate Scientific Discovery, 2025 年 1 月, 香港
31. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Technology: Harnessing Biology for  
Engineering Innovation  
City University of Hong Kong, Seminar 2024/2025, 2025  
年 1 月, 香港
32. Shoji Takeuchi  
Emerging Technology for the Biohybrid Robotics  
The 38th International Conference on Micro Electro  
Mechanical Systems (IEEE MEMS 2025), 2025 年 1 月,  
台湾
33. 大崎寿久  
人工細胞膜を用いた創薬支援技術と次世代センサの  
開発  
BUTTOBE-NEXT 採択学生主催 第 2 回学内研究発表  
会, 2025 年 2 月, 東京

**【特許】**

国内特許出願 3 件  
海外特許出願 1 件

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 実用化実証事業

### 「次世代医療福祉ロボット」グループ

- ◆ 統括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・70
- ◆ 遠隔操作型ハプティックドリルシステムの開発と力触覚情報を活用した切削支援・・・・・・・・73
- ◆ 複数IMUを用いることによるpMDIの吸入動作測定精度の向上・・・・・・・・76
- ◆ 業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・80

# 「次世代医療福祉ロボット」グループ

グループリーダー 下野 誠通

## 【基本構想】

本研究グループでは、平成 28 年度～平成 31 年度に実施した有望シーズ展開事業で得られた研究開発成果を基に、実世界での力触覚の伝送・記録・再現を可能とするリアルハプティクスを援用した様々な医療デバイスの実用化研究を推進することを目的として令和 2 年度より開始し、令和 6 年度までの 5 年間実施した。特に、力触覚情報を活用することによって高い安全性や新しい診断機能を獲得した高付加価値な医療デバイス、遠隔触診を実現するネットワークシステム技術、革新的な手術支援ロボットなどの開発を行った。そして、産学公連携拠点としての殿町（川崎市川崎区）の研究室において、開発技術の社会実装へと繋げることを目指し、医療機器メーカーを中心とした産業界との密な連携によって学際的な医工融合研究を推進した。

## 1. 2024 年度の研究目的

2024 度は、実用化実証事業「次世代医療福祉ロボット」研究グループの研究活動五年目にあたり、これまでの研究開発活動の方針を変更することなく、リアルハプティクスおよびモーションコントロール技術を応用した革新的医療デバイスの実用化研究を主軸とした研究を推進することとした。特に実用化実証事業では、①貫通検知・自動停止機能を有するハプティック骨ドリルの開発、②腫瘍判別機能を有する脳神経外科ハプティック鑷子の開発、③操作エラー判別機能を有する吸入支援デバイスの開発の三つを重点テーマと定めている。産学公連携拠点としての殿町研究室を本拠地とし、医療機器メーカーを中心とした産業界とも密に連携した実用化研究を通じて、開発技術の事業化活動を推進する。

上記の重点テーマ①については、国際医療福祉大学医学部、慶應義塾大学医学部、日本メドトロニック株式会社、モーションリブ株式会社と連携し、貫通検知・自動停止機能を有するハプティック骨ドリルの実用化研究を推進している。2022 年度より支援を受けている日本医療研究開発機構 (AMED) の「医療機器等における先進的研究開発・開発体制強化事業」において、ハプティック骨ドリルの実用モデル機の開発研究を進め、非臨床試験による有用性実証を継続的に実施する。特に 2024 年度は、上記 AMED 事業の最終年度にあたり、市販ドリルへの技術実装や、ボンソー等への他の手術機器への横展開研究や、手術支援ロボット応用を見据えた桌上ロボットへのドリル搭載実験などを進める。

重点テーマ②では、東京歯科大学市川総合病院、慶應義塾大学医学部・脳神経外科、獨協医科大学等と連携し、脳腫瘍組織の自動判別機能を有するハプティック鑷子デバイスの開発研究を推進している。正常脳組織と種類の異なる脳腫瘍組織の剛性計測に関わる非臨床試験を実施し、ハ

プティック鑷子を通して得られた力触覚データから腫瘍領域さらには腫瘍種類の判別までが可能となることを実証することを目指す。さらに、2024 年度では、摘出したヒト腫瘍の硬さ計測といった臨床研究にも評価研究を進展させることとする。

重点テーマ③では、慶應義塾大学医学部・呼吸器内科、同大学病院薬剤部等と連携し、喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の治療高度化に向けた吸入センシングデバイスの改良研究と、服薬操作エラーの自動判別研究を推進している。臨床試験を継続実施することで、開発技術の有用性を確認すると共に、様々な操作エラーの自動判別が可能となるようにアルゴリズムの改良を進める。特に 2024 年度では、一連の吸入動作をフェーズ毎にクラスタリングするためのアルゴリズム研究にも取り組むことで、高度なエラー検出の実現を目指す。

## 2. 2024 年度の研究成果

### (1) ハプティック骨ドリルの開発研究

AMED「医療機器等における先進的研究開発・開発体制強化事業」の支援を得て、ハプティック骨ドリルの改良開発と貫通検知アルゴリズムのハンディドリルへの

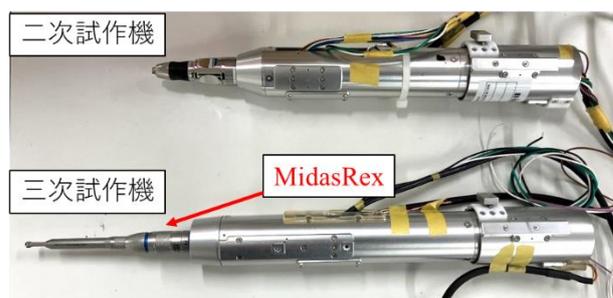


図 1 実用モデル試作機

応用研究を継続実施した。さらに、手術支援ロボットへの応用を目的とした多自由度遠隔操作型ドリルロボットの開発や、ボーンソー等の他の手術機器への技術展開研究を行った。

ハプティック骨ドリルの改良開発においては、力触覚情報を用いた脊椎の貫通検知と自動停止機能を有する安全安心なドリルの実用化に向け、市販ドリルへの技術の組み込みを目的とした第三次試作を行った（図1）。基礎実験の結果、ドリル刃の最大回転速度 75000rpm を達成し、現行市販ドリルにも本プロジェクトで開発した貫通検知・自動停止機能が実装可能であることを実証した。これらの試作機の基本性能評価に対しては、モーションリブ株式会社や日本メドトロニック株式会社と共同で模擬骨等を用いて実施し、脊髄脊椎手術に求められる十分な切削性能と、貫通検知・自動停止機能を併せ持っていることを検証した上で、国際医療福祉大学や慶應義塾大学非臨床試験に臨んだ。特に非臨床試験では、幼若骨や骨粗鬆症模擬骨等での性能の実証も行い、開発技術の有用性を確認することができた。また、研修医や医療関係者以外の脊椎外科医以外でも同等の性能が得られることが確認でき、開発技術が医療の均てん化にも貢献し得ることが示唆された。

さらに、今後の手術支援ロボット応用に向けた技術展開を想定して、ロボットプラットフォームに試作した骨ドリルを搭載し、模擬骨の掘削実験等を実施した（図2）。任意の姿勢において、貫通検知・自動停止機能が有効に作動することが確認でき、開発技術が多自由度ロボットにおいても活用可能であることが実証された。

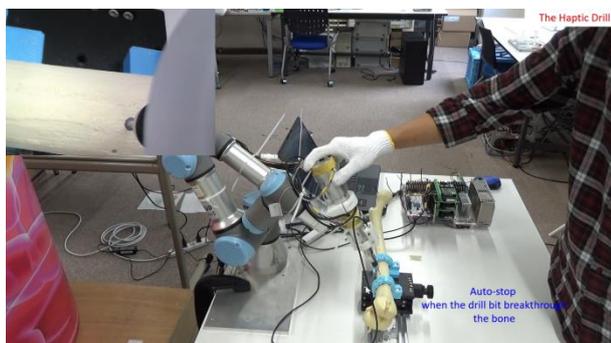


図2 多自由度ロボットでのドリル検証実験

## (2) ハプティック鑷子の開発研究

腫瘍判別機能を有する脳神経外科ハプティック鑷子の開発においては、これまでの非臨床試験を通して得られた知見を基に、プローブ型試作機を用いた摘出ヒト腫瘍検体の硬さ測定に臨んだ（図3）。独協医科大学での試験によって、ヒト腫瘍検体でも正常脳組織との剛性に違いが生じるデータが取得でき、臨床応用に向けたフィージビリティを確認することができた。今後は比較対象を精査した上で、エビデンスデータの蓄積を進め、実用化モデルの開発研究へと繋げていく予定である。



図3 プローブ型測定器での硬さ評価

## (3) 吸入支援デバイスの開発研究

本研究においては、吸入動作における吸入デバイスの姿勢角度を正確に推定するためのアルゴリズム改良研究と、吸入動作のクラスタリングによる自動化正誤判定アルゴリズムの開発研究とを主に実施した。

吸入デバイスの姿勢角度の推定精度の向上においては、特にヨー角に焦点を当て、pMDI型デバイスのレバー部分と本体にそれぞれ取り付けられた2つのIMUセンサー間の相対角度を用いて誤差を補正するアルゴリズムを開発した（図4）。



(a) デバイス (b) 振り動作 (c) 噴霧&吸入

図4 吸入動作測定デバイス(pMDI)

吸入動作の自動化正誤判定アルゴリズムの開発研究においては、IMUにより測定した吸入動作波形に対して、k-means法を用いて吸入手順毎に波形を自動で切り分けるクラスタリングアルゴリズムの開発を行った。波形の切り分けにより、蓋開け角度や吸気時のデバイスの傾け角度だけでなく、息吐き、息止め時間の識別が可能となるなど評価の高度化が期待される。エリプタに搭載したIMU（図5）により測定した波形を図6に示す。色付き箇所が蓋開け及び吸気時の角度の変位を示しており、その間の角度が変位しない箇所が息止め、息吐きの動作を示している。この波形に対しk-meansによりクラスタリングした結果を図7に示す。結果より動作手順毎に切り分けが可能であることが確認された。本アルゴリズムを用いて薬剤師による正誤判定との比較を行ったところ、蓋開け角度、吸入角度、息止め時間などに関するエラー判別に非常に有効であることが確認された。

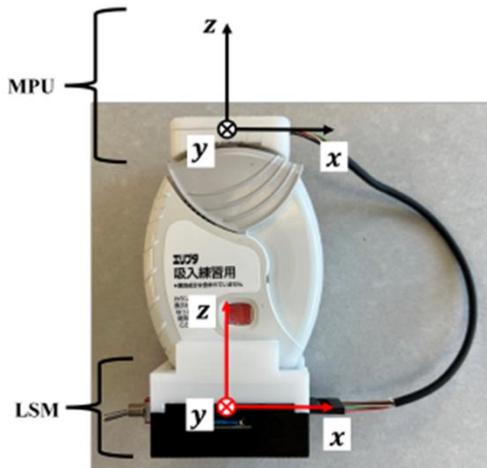


図5 吸入動作測定デバイス(エリプタ)

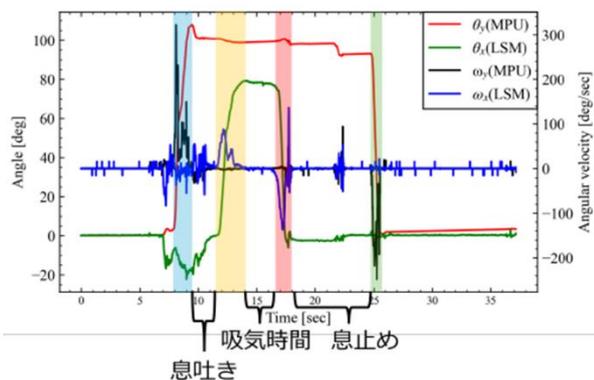


図6 正常動作の測定波形

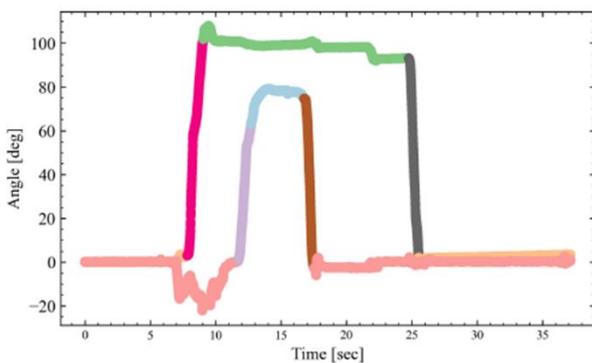


図7 クラスタリング結果

### 3. 今後の展望

本研究グループでは、これまでの研究シーズ育成事業および有望シーズ展開事業で得られた研究成果を発展させる形で、リアルハプティクスを援用した様々な医療デバイスの社会実装研究を実施してきた。これまでの実用化実証事業における研究成果から、骨ドリルに代表される治療機器への応用だけでなく、脳神経外科用鑷子デバイスのような診断機器、吸入支援デバイスの開発に代表

される動作評価への応用においても、リアルハプティクスを中心としたロボット制御技術が有用であることを示してきた。

医療機器メーカーを中心とした産業界との連携体制も構築でき、特に2022年度からは、日本医療研究開発機構(AMED)の「医療機器等における先進的研究開発・開発体制強化事業」において、分担研究機関として参画する骨ドリル開発の提案課題が採択され、産学公連携による実用化研究を推進してきた。

本プロジェクトは2024年度末を持って終了するが、今後も医療機器メーカーとの連携を通して、開発技術の社会実装に向けた実用化研究を継続的に進めていく予定である。

# 遠隔操作型ハプティックドリルシステムの開発と 力触覚情報を活用した切削支援

次世代医療福祉ロボットグループ  
松永 卓也

## 1. はじめに

脊椎手術における医療用ドリルを用いた骨の切削は高度なスキルが要求される。ドリル先端の刃は高速で回転し、接触した骨を切削する。骨周辺の組織が刃に触れた場合には損傷の危険性がある。特に脊椎の損傷は患者の運動機能や知覚機能に深刻な障害を与える可能性がある。したがって、従来の脊椎手術では術者がドリルの操作に熟達することで術中の事故を防ぐことが必要である。

高度なスキルを持つ術者の育成には時間を要するため、術者に対する工学的支援が研究されている。工学的支援の一つである貫通検知では、切削中の骨と周囲の空間、または骨以外の物体との境界にドリルの刃が到達したことを検知する。貫通検知と同時に刃を自動で停止させることで、骨周辺の組織の損傷を防ぐことができる。これまでに、ドリルが内蔵する回転モータの電流と速度から切削抵抗を推定し、サポートベクターマシンで貫通を検知する手法が提案されている[1]。また、刃の回転に加えて軸方向の直動自由度を有するドリルについて、力触覚情報を用いた貫通検知機能が開発されている[2]。

### (1) 遠隔操作型力触覚ドリルシステム

本研究では、視覚、力触覚情報を拡張することで貫通を回避し、切削作業の安全性を向上させる遠隔操作型力触覚ドリルシステムを開発する[3]。本研究で使用するドリルシステムは、エンドエフェクタの脊椎手術用ドリルによる骨切削を想定したリーダー・フォロワー式の遠隔操作型ロボットである[4]。作業空間側ロボットと操作者側ロボットが並進自由度の力触覚情報を双方向に伝達し、操作者に対して切削作業で発生する反力をフィードバックする。さらに、ロボット間で伝達される力触覚情報を貫通の回避に活用する。

#### (1)-1 作業空間側ロボット

本研究で使用するドリルシステムにおいて作業空間側に配置される4自由度ドリルロボットは、回転モータで駆動する刃をエンドエフェクタとして備えた並進3自由度を有するパラレルリンクロボットである(図1)。各アクチュエータが先端の並進自由度と対応し、デカルト座標系においてモータ空間での制御が可能である。また、

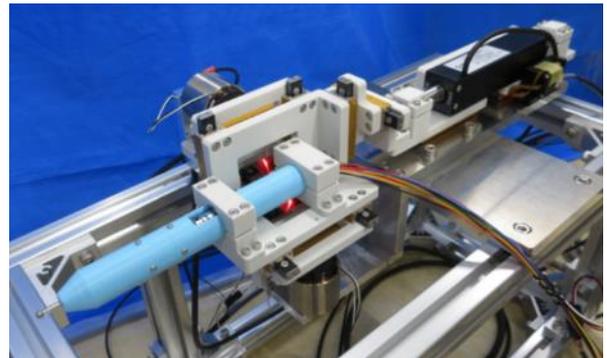


図1 4自由度ドリルロボット[5]

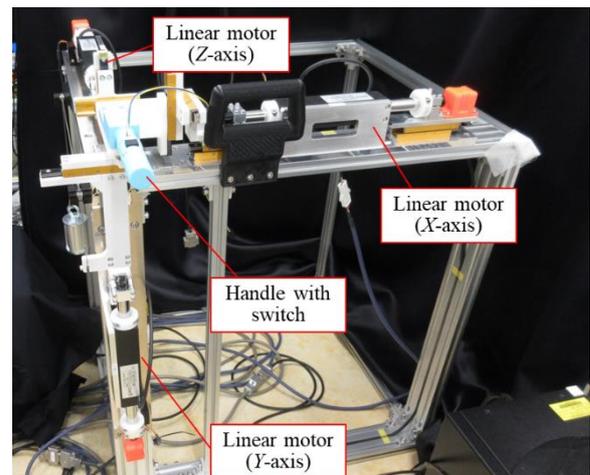


図2 ハプティックインターフェース

バックドライバビリティに優れたアクチュエータで駆動しており、力センサレスで力触覚情報が得られる。

#### (1)-2 操作者側ロボット

操作者側に配置されるハプティックインターフェースは、作業空間側のドリルロボットと同様に並進3自由度を有するパラレルリンクロボットである(図2)。エンドエフェクタとして取り付けられたハンドルのスイッチはドリルのON/OFFに用いられる。したがって、操作者はハプティックインターフェースを介して刃を回転させ、かつ3次元空間内で刃の位置を移動させることが可能である。

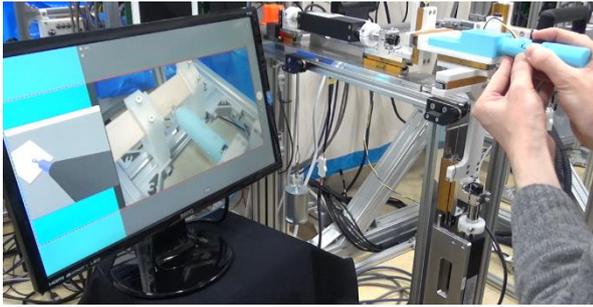


図 3 実験機器

## (2) 力触覚情報を用いた貫通回避

本研究でドリルシステムに実装する貫通回避機能は、最初に力触覚情報を用いて切削対象物を認識し、次に視覚・力触覚情報を拡張して対象物の貫通を妨げることで操作者を支援する。

### (2)-1 切削対象物の認識

4自由度ドリルロボットのエンドエフェクタが切削対象物の表面を切削する際、並進3自由度の動作で得られる反力推定値は接触判定に利用可能である。反力が発生した位置情報を接触点として記録して収集することで、対象物表面の位置および回転角度の情報が得られる。医療用画像機器が3次元画像を取得可能であることを考慮し、事前に対象物の3D形状データが得られるという前提を置くと、収集した接触点から得られた情報に基づいて仮想空間内の切削シミュレータに仮想の切削対象物を配置することができる。

### (2)-2 視覚・力触覚情報の拡張

ドリルロボットが得た力触覚情報に基づいて切削対象物の情報が得られた後、ドリルシステムは実物体の切削と同時に仮想空間で実施される切削シミュレーションに基づいて視覚、力触覚情報の拡張をおこなう。力触覚情報を伝達するバイラテラル制御はスケーリングによる力触覚の増幅と、仮想反力による力触覚の付加が可能である。仮想刃の位置に応じて力触覚の増幅率を増大させ、かつ仮想反力を発生させることで貫通を引き起こす切削を妨げることが可能である。さらに、切削シミュレーションを画像で可視化することで、操作者は力触覚伝達における切削領域やパラメータの変化を確認しながら作業を進めることが可能である。

## 2. 実験と結果

### (1) 方法

本研究で開発した貫通回避機能をドリルシステムに実装し、模擬骨を切削する実験をおこなった(図3)。視覚情報としてカメラで取得した作業空間の画像および切削シミュレーションをおこなう仮想空間の画像を並べてディスプレイに表示した。操作者はディスプレイで視覚情報を得ながらハプティックインターフェースを操作して模擬骨の切削を実施した。ドリルロボットには直径4mm

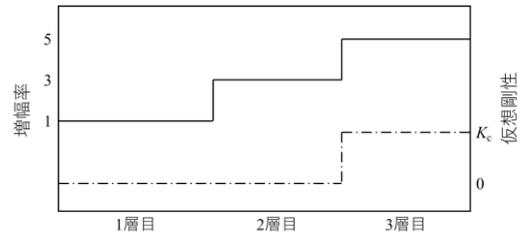


図 4 力触覚の増幅率と仮想剛性

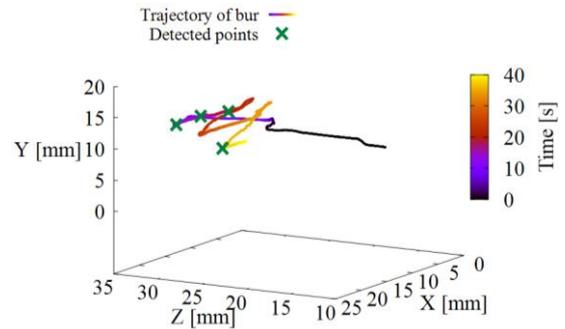


図 5 対象物の認識における先端位置

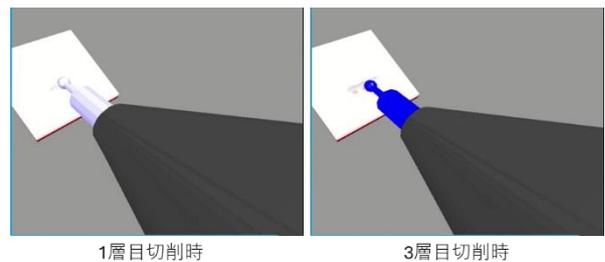


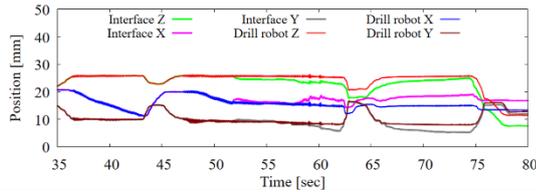
図 6 切削位置に応じた提示画像の変化

の球状の先端部を持つ医療用刃を取り付けた。模擬骨には厚さ3mmの板を使用し、ドリルの中心軸から30度傾けて配置した。模擬骨の3D形状データは3層で構成される直方体の仮想物体とした。1層目は切削作業において周辺組織を損傷する危険性が小さい領域、2層目は貫通までの距離が小さく切削に注意を要する領域として、仮想刃で除去可能なボクセルで表現した。3層目は貫通の危険性があり切削を避ける領域に設定し、単一の直方体で描写した。シミュレーション画像内では切削領域に応じて異なる色でドリル先端を描写した。さらに、力触覚伝達についても切削領域に応じて力触覚増幅率と仮想剛性を変化させた(図4)。

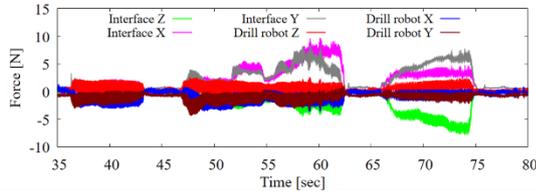
### (2) 結果

対象物の認識における先端位置の軌跡と収集した接触点の結果を図5に示す。実験では対象物表面の切削により4つの接触点を記録した。3つの接触点を選択して法線と重心を求めることで、切削シミュレーション内で使用する仮想物体の位置と回転角度を得た。

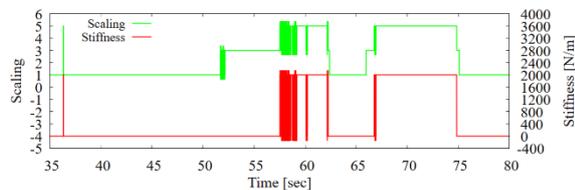
視覚、力触覚情報拡張下の切削における仮想空間画像を図6に示す。対象物認識で得られた情報に基づいて仮想空間の画像内に仮想物体が表示された。切削領域に応



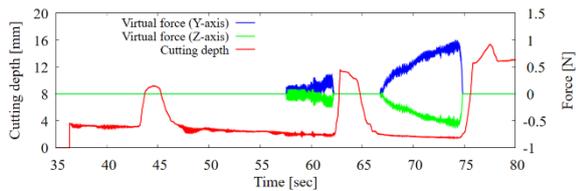
(a) 位置応答



(b) 力応答



(c) 増幅率と仮想剛性



(d) 切削深さと仮想反力

図 7 視覚、力触覚情報拡張子下における力触覚情報、力触覚伝達のパラメータ、切削深さ

じてドリル先端の描写が変化することで、制御器のパラメータの変化が可視化された。

視覚、力触覚情報拡張下の切削における力触覚情報、力触覚伝達のパラメータ、切削深さを図 7 に示す。約 50 秒経過時までは 1 層目を切削しており、ドリルロボットが得た力触覚情報はハプティックインターフェースで再現された。その後、仮想刃が 2 層目に達すると増幅率が増加し、力触覚情報が増幅されて操作者に伝達された。そして、約 57 秒経過時から刃が 3 層目に達すると増幅率がさらに増加し、かつ仮想反力が付加されて大きな反力が提示された。

### 3. 考察及び今後の展望

#### (1) 考察

切削深さは仮想ドリル刃の中心から仮想物体 2 層目と 3 層目の境界までの距離であり、実験における最小値は約 2mm となった。ドリル刃の半径が 2mm であることから、ドリル刃が仮想物体の 2 層目と 3 層目の境界近辺から大きく侵入しなかったことが確認できる。一方、刃が 3 層目に達して力触覚情報の増幅と付加がおこなわれた

際には大きな反力が発生しており、力触覚情報を拡張することで 3 層目における切削が抑制された。

実験結果において発生した増幅率のチャタリングは単一の閾値で切削領域を判定したことが原因として挙げられる。切削深さが減少する方向と増加する方向で異なる閾値を用いることでチャタリングを回避することが可能であると考えられる。

#### (2) 今後の展望

本研究では条件の単純化のために平らな表面を持つ物体を切削対象物としたが、手術で切削する骨は曲面を持つ。したがって、力触覚情報を用いた切削対象物の認識では、より複雑な形状を持つ物体に対応する必要がある。また、回転する刃をプローブとして対象物認識をおこなったが、刃が対象物を削ることで実際の物体と認識された物体の情報に差が生じる可能性がある。したがって、切削力の解析による精度向上について検討する必要がある。

#### 【参考文献】

1. T. Osa, C. F. Abawi, N. Sugita, H. Chikuda, S. Sugita, H. Ito, T. Moro, Y. Takatori, S. Tanaka, and M. Mitsuishi, *in Proc. 2014 IEEE Int. Conf. Robot. Autom.*, Hong Kong, China, 290–296(2014)
2. K. Yamanouchi, S. Takano, Y. Mima, T. Matsunaga, K. Ohnishi, M. Matsumoto, M. Nakamura, T. Shimono, and M. Yagi, *Sci. Rep.*, 13, 1–11(2023)
3. T. Matsunaga, S. Takano, T. Shimono, K. Ohnishi, M. Yagi, and M. Nakamura, *in Proc. 2025 IEEE Int. Conf. Mechatron.*, Wollongong, Australia, (2025)
4. T. Matsunaga, S. Takano, T. Shimono, K. Ohnishi, M. Yagi, and M. Nakamura, *in Proc. 18th IEEE Int. Workshop Adv. Motion Control*, Kawasaki, Japan, 217–222(2024)
5. KISTEC, “プロジェクト研究概要集 2024”, KISTEC, “[https://www.kistec.jp/kistec-manage/wp-content/uploads/propj\\_2024\\_all.pdf](https://www.kistec.jp/kistec-manage/wp-content/uploads/propj_2024_all.pdf)”

# 複数 IMU を用いることによる pMDI の

## 吸入動作測定精度の向上

次世代医療福祉ロボットグループ

高野 俊也

### 1. はじめに

気管支喘息及び慢性閉塞肺疾患 (COPD: chronic obstructive pulmonary disease) の治療には主に吸入器を用いた吸入薬治療が行われている。薬剤を効果的に吸入するには吸入器を正しい手順で使用することが重要であるが、約 70% の患者が正しく使用できていないという報告がある [1,2]。その理由として、患者が正しい使用方法を理解していないことや時間経過により正しい使用方法を忘れてしまうことが挙げられる。そのため、治療効果が低減し、治療の長期化や治療費の増加を招いている。

現状、有効的な対策としては医師や薬剤師による定期的な対面指導のみである。そのため、指導を行う医師や薬剤師の負担増大が問題となっている。また、患者が自宅で正しく使用できているかについては医師や薬剤師は情報を得ることが出来ず、適切な指導を行えないという問題がある。そのため、先行研究では吸入器の 1 種であるエリプタに慣性計測装置 (IMU: Inertial measurement unit) を搭載し、吸入手技をモニタリングする手法が提案されている [3,4]。

本研究では別の吸入器であるフルティフォーム (pMDI: 加圧噴霧式定量吸入器) に本手法を展開し、吸入動作が測定可能か検証を行う。

#### 1.1 IMU を搭載した吸入動作モニタリングデバイス

本研究ではフルティフォームに IMU を搭載した吸入動作モニタリングデバイスを用いて検証を行う。図 1 にフルティフォームに IMU を搭載した図を示す。IMU は 3D プリンタにより作成したアタッチメント内に搭載し、上部と下部にそれぞれ固定している。MPU、LSM は使用した IMU の型式 (MPU9250, LSM9DS1) である。各 IMU は 3 軸の加速度、角速度の測定が可能である。またこれらの測定値から角度情報も推定可能である。本手法では吸入動作の観測に角度情報を用いる。

表 1 にフルティフォームの使用手順を示す。手順 2 のデバイスを上下に振る動作及び、手順 5 の薬剤を吸入する動作を行った際のデバイスの姿勢を図 2 に示す。この時、図 2(a) の振り動作ではデバイスが上下に激しく振動する。また図 2(b) の吸入時はレバーを押し込むことで薬剤が噴霧され、使用者は噴霧された薬剤を吸入する。この時、薬剤噴霧のため上部のレバーが押し込まれ、吸入のためデバイス本体が傾く。この動作は各 IMU の X 軸方向に回転する

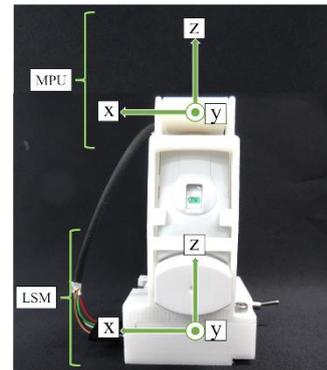
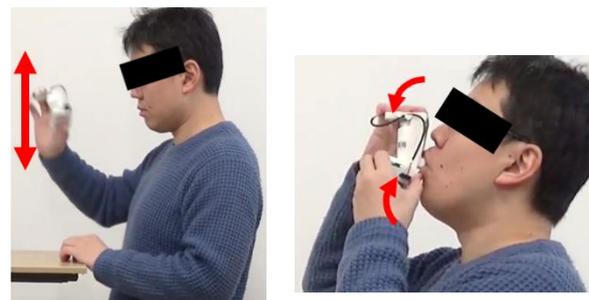


図 1 吸入動作モニタリングデバイス及びセンサ軸方向

表 1 フルティフォームの使用手順

1	フルティフォームのカウンタ残数を確認
2	上下に数回振り、薬剤を攪拌させる
3	ゆっくりと息を吐き切る
4	吸入口を咥える
5	息を吸いながらレバーを押し込み薬剤を吸入する
6	吸入口から口を離し、3秒以上息を止める
7	ゆっくりと息を吐く



(a)手順 2 蓋開け

(b)手順 5 吸入

図 2 各使用手順におけるデバイスの姿勢

ため、X 軸回転角度から各動作が観測可能である。特に噴霧のタイミングと吸入のタイミングが同時でない適切に肺に薬剤が吸入されないため、タイミングのズレの観測が重要である。このことから吸入時の噴霧のタイミングと吸入のタイミングを本デバイスにより観測を行う。

## 1. 2 角度推定アルゴリズム

一般的に IMU を用いた角度の推定には拡張型カルマンフィルタ (EKF : Extended Kalman Filter) が用いられる。しかしながら EKF は非定常特性を有する動作に対して追従性が悪化するという問題がある。ここでの非定常特性は振り動作の早い動きと吸入時の遅い動きが混在した一連の吸入動作のことを指す。そのため、本研究では適応型カルマンフィルタ (AKF: Adaptive Kalman Filter) を用いて非定常特性を有する動作への追従性の向上を行う [5,6]。以下に AKF を用いた角度推定の計算手法を示す。なお推定にはクォータニオンを用いて計算を行った。

まず、 $k$  番目のサンプルにおける IMU の姿勢角  $\mathbf{X}_k$  を (1) で定義する。

$$\mathbf{X}_k = [q_1 \ q_2 \ q_3 \ q_4]^T_k \quad (1)$$

これより、事前推定値  $\hat{\mathbf{X}}_k$ 、事前誤差共分散  $\hat{\mathbf{P}}_k$  は (2)-(5) で表される。

$$\hat{\mathbf{X}}_k = \mathbf{F}_k \mathbf{X}_{k-1} \quad (2)$$

$$\hat{\mathbf{P}}_k = \mathbf{F}_k \mathbf{P}_{k-1} \mathbf{F}_k^T + \mathbf{G}_k \mathbf{Q} \mathbf{G}_k^T \quad (3)$$

$$\mathbf{F}_k = \mathbf{I}^{4 \times 4} + \frac{1}{2} \Delta t \begin{bmatrix} 0 & \omega_z & -\omega_y & \omega_x \\ -\omega_z & 0 & \omega_x & \omega_y \\ \omega_y & -\omega_x & 0 & \omega_z \\ -\omega_x & -\omega_y & -\omega_z & 0 \end{bmatrix}_k \quad (4)$$

$$\mathbf{G}_k = \frac{1}{2} \Delta t \begin{bmatrix} q_4 & -q_3 & q_2 \\ q_3 & q_4 & -q_1 \\ -q_2 & q_1 & q_4 \\ -q_1 & -q_2 & -q_3 \end{bmatrix}_k \quad (5)$$

$\mathbf{Q}$ 、 $\omega$ 、 $\Delta t$ 、 $\mathbf{I}$  はそれぞれ、角速度センサのシステムノイズの共分散、角速度測定値、サンプリング時間、単位行列を表す。次に観測方程式及びカルマンゲインは (6)-(10) で表される。

$$\mathbf{Y}_k = \mathbf{Z}_k - h(\hat{\mathbf{X}}_k) \quad (6)$$

$$\mathbf{K}_k = \hat{\mathbf{P}}_k \mathbf{H}_k^T (\mathbf{H}_k \hat{\mathbf{P}}_k \mathbf{H}_k^T + \mathbf{R}_k)^{-1} \quad (7)$$

$$\mathbf{Z}_k = [a_x \ a_y \ a_z]^T \quad (8)$$

$$h(\hat{\mathbf{X}}_k) = g \begin{bmatrix} 2(q_1 q_3 - q_2 q_4) \\ 2(q_2 q_3 + q_1 q_4) \\ -q_1^2 - q_2^2 + q_3^2 + q_4^2 \end{bmatrix}_k \quad (9)$$

$$\mathbf{H}_k = \frac{\partial}{\partial \mathbf{X}_k} h \quad (10)$$

$a$ 、 $g$ 、 $\mathbf{R}_k$  はそれぞれ、加速度測定値、重力加速度、観測ノイズ共分散を表す。そして、事後推定値  $\mathbf{X}_k$ 、事後誤差共分散  $\mathbf{P}_k$  は (11)、(12) により計算される。

$$\mathbf{X}_k = \hat{\mathbf{X}}_k + \mathbf{K}_k \mathbf{Y}_k \quad (11)$$

$$\mathbf{P}_k = (\mathbf{I} - \mathbf{K}_k \mathbf{H}_k) \hat{\mathbf{P}}_k \quad (12)$$

得られた姿勢クォータニオン  $\mathbf{X}_k$  より回転行列  $\mathbf{A}_k$ 、姿勢角  $[\phi \ \theta \ \psi]^T_k$  を (13)(14) より計算することで、IMU の回転角度が得られる。

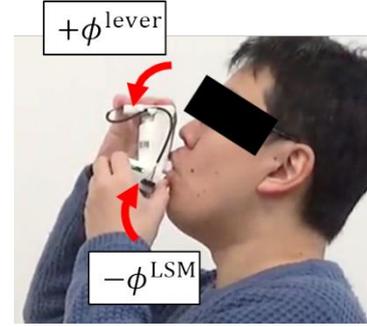


図3 吸入時回転方向

$$\mathbf{A}_k = \begin{bmatrix} q_1^2 - q_2^2 - q_3^2 + q_4^2 & 2(q_1 q_2 + q_3 q_4) & 2(q_1 q_3 - q_2 q_4) \\ 2(q_1 q_2 - q_3 q_4) & -q_1^2 + q_2^2 - q_3^2 + q_4^2 & 2(q_2 q_3 + q_1 q_4) \\ 2(q_1 q_3 + q_2 q_4) & 2(q_2 q_3 - q_1 q_4) & -q_1^2 - q_2^2 + q_3^2 + q_4^2 \end{bmatrix}_k \quad (13)$$

$$\begin{bmatrix} \phi \\ \theta \\ \psi \end{bmatrix}_k = \begin{bmatrix} \arctan\left(\frac{2(q_2 q_3 + q_1 q_4)}{-q_1^2 - q_2^2 + q_3^2 + q_4^2}\right) \\ \arcsin(2(q_2 q_4 - q_1 q_3)) \\ \arctan\left(\frac{2(q_1 q_2 + q_3 q_4)}{q_1^2 - q_2^2 - q_3^2 + q_4^2}\right) \end{bmatrix}_k \quad (14)$$

なお、レバーの回転角度は 2 つの IMU の相対角度で表されるため、(15) によりレバーの回転角度が得られる。

$$\mathbf{A}^{\text{lever}} = (\mathbf{A}^{\text{LSM}})^{-1} \mathbf{A}^{\text{MPU}} \quad (15)$$

## 1. 3 観測ノイズ $\mathbf{R}_k$ の更新

(7) において、 $\mathbf{R}_k$  を加速度センサのシステムノイズの共分散とすると、このシステムは EKF として動作する。AKF ではこの観測ノイズを実際の動作に応じて変動させることで追従性を向上させる。まず過去  $N$  サンプル分の  $\mathbf{Y}_k$  の平均値  $\bar{\mathbf{Y}}_k$  を (16) により計算する。

$$\bar{\mathbf{Y}}_k = \frac{1}{N} \sum_{j=k-N+1}^k \mathbf{Y}_j \quad (16)$$

$\bar{\mathbf{Y}}_k$  を用いて観測ノイズ  $\mathbf{R}_k$  を (17) により更新する。

$$\mathbf{R}_k = \frac{1}{N-1} \sum_{j=k-N+1}^k \left\{ (\mathbf{Y}_j - \bar{\mathbf{Y}}_k) (\mathbf{Y}_j - \bar{\mathbf{Y}}_k)^T - \frac{N-1}{N} \mathbf{H}_j \hat{\mathbf{P}}_j \mathbf{H}_j^T \right\} \quad (17)$$

更新した  $\mathbf{R}_k$  を (7) に適用することで、毎サンプルごとに観測ベクトルの重みが変化し、非定常特性を有する動作への追従性が向上する。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 実験方法

AKF による追従性の向上の検証のため、角速度のみで角度を計算した場合と、EKF を用いて計算した場合との比較を行った。測定する動作はフルティフォームの一連の吸入動作を対象とした。図 3 に示すように吸入動作及び噴霧動作 (レバー押し込み動作) はどちらも X 軸方向に回転動作が生じるため  $\phi^{\text{lever}}$ 、 $\phi^{\text{LSM}}$  の推移を観測した。

## 2. 2 実験結果

図4にフルティフォーム使用時の各角度推移を示す。緑線は角速度のみで角度を計算した結果、青線はEKFを用いて計算した結果、橙線はAKFを用いて計算した結果を示す。また、黄色部は吸入器の振り動作を行った箇所、緑部の範囲は薬剤吸入動作を行った箇所、灰色部の範囲はレバーの押し込みを行った箇所を示している。

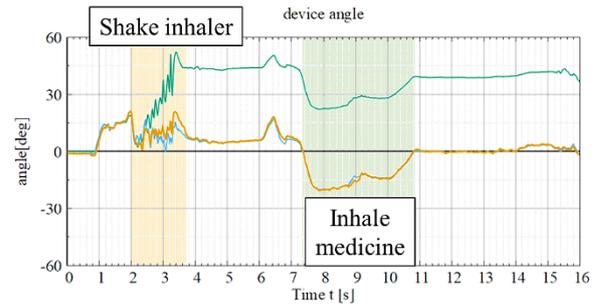
まず $\phi^{LSM}$ の推移において、振り動作後に緑線が大きく増加している。これは早い振り動作によって角速度の測定値に大きな誤差が生じたためである。対してEKF、AKFは振り動作後も角度が安定して推移している。これは角度の計算に加速度値も複合して計算しているため、角速度値の誤差を補正しているためである。一方で、振り動作中のEKFの $\phi^{lever}$ においては大きく振動が生じている。振り動作中は2つのIMUが一体で動くため、実際は相対角度であるレバー角度には変化が生じない。しかし振り動作により加速度値にも誤差が生じたため、EKFに誤差が生じたと考えられる。対して、AKFは振り動作中において角度の変動が著しく小さい結果となった。これはAKFが振り動作の早い動きに合わせて観測ノイズを適切に更新し、誤差の影響を抑制したためである。

またレバー押し込み時においてはEKFでスパイク上の波形が生じた(図4(b)赤枠拡大図参照)。患者はレバーが停止するまで押し込む動作を行うため、角度推移としては矩形波上の波形が生じる。しかし、レバー停止時には加速度値に大きな値が生じるため、EKFでスパイク上の波形が生じたと考えられる。対してAKFはレバーの押し込み時においてスパイク上の波形が生じず、矩形波状に推移した。よって結果より、AKFを適用することで吸入動作において角度推定値の追従性が向上されたことが実証された。また波形よりレバーの押し込みタイミング( $\phi^{lever}$ が矩形波上に推移し始める地点)と吸入のタイミング( $\phi^{LSM}$ が減少し始める地点)を比較することで、薬剤噴霧と吸入が同時に行われたかどうかを観測可能である。よって、本デバイスによりpMDI型の吸入器において吸入動作の観測が可能であることが確認された。

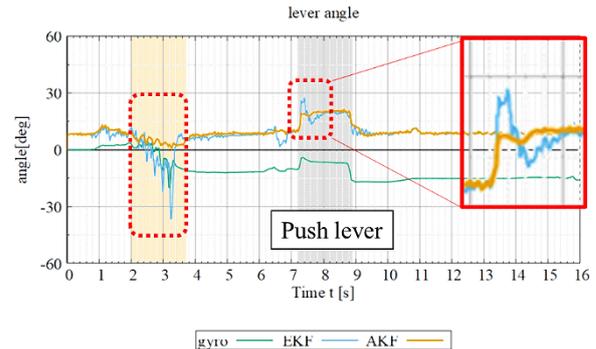
## 3. 考察及び今後の展望

本研究ではpMDI型の吸入器にIMUを搭載し吸入動作の観測が可能なモニタリングデバイスを提案した。pMDIの吸入動作では早い振り動作と遅い吸入動作が混在した非正常特性の動作を有するため、角度の推定にあたりAKFを適用し、角度推定値の追従性を向上させた。実際の測定結果において角速度値から計算した結果と、EKFを用いて計算した結果との比較を行ったところ、AKFが一番実際の動作に準じた推移を示した。また得られた結果からpMDIの各種動作が観測可能であることが確認された。

今後は臨床試験により実際の患者の吸入動作を測定し、誤った動作が検出可能か検証していく予定である。



(a) 吸入時角度( $\phi^{LSM}$ )



(b) レバー押し込み角度( $\phi^{lever}$ )

図4 実験結果

## 【参考文献】

1. V. G. Press, V. M. Arora, L. M. Shah, S. L. Lewis, K. Ivy, J. Charbeneau, S. Badlani, E. Naurekas, A. Mazurek, J. A. Krishnan, "Misuse of respiratory inhalers in hospitalized patients with asthma or COPD," *Journal of General Internal Medicine*, Vol. 26, pp. 635–642, 2011.
2. S. Schantz, N. Katjavuori, O. Antikainen, A. Juppo, "Evaluation of dry powder inhalers with a focus on ease of use and user preference in inhaler-naïve individuals," *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 509, Issues 1–2, pp. 50–58, Jul. 2016.
3. T.Ezaki, K.Masaki, M.Nishie, H.Nakada, J.Hakamata, S.Takano, K.Sunata, Y.Akiyama, M.Irie, S.Okuzumi, T.Tanosaki, H.Kabata, T.Shimono, S.Tsuda, T.Aomori, and K.Fukunaga, "Accelerometer-equipped external attachments to detect critical errors while using inhalation devices", *American Thoracic Society 2021 International Conference, ATS2021*, May. 2021.
4. S. Takano, T. Shimono, K. Masaki, K. Fukunaga, H. Kabata, M. Nishie, T. Ezaki, H. Nakada, J. Hakamata, and A. Hasegawa, "An Inhalation Device with Inertial Measurement Unit for Monitoring Inhaler Technique," *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, Vol. 27, No. 4, pp. 2204-2211, Aug. 2022.
5. K. Myers and B. Tapley, "Adaptive sequential estimation with unknown noise statistics," *IEEE Transactions on Automatic Control*, Vol. 21, No. 4, pp. 520-523, Aug. 1976.

6. A. Makni, H. Fourati and A. Y. Kibangou, "Adaptive Kalman filter for MEMS-IMU based attitude estimation under external acceleration and parsimonious use of gyroscopes," *2014 European Control Conference (ECC)*, Strasbourg, France, pp. 1379-1384, 2014.

# 業績

## 【原著論文】

(投稿掲載)

1. T. Ezaki, K. Kishima, S. Shibao, T. Matsunaga, Eriel Sandika Pareira, Y. Kitamura, Y. Nakayama, N. Tsuda, K. Takahara, T. Iwama, Oltea Sampetean, M. Toda, K. Ohnishi, T. Shimono and H. Sasaki, “Development of microsurgical forceps equipped with haptic technology for in situ differentiation of brain tumors during microsurgery”, *Scientific Reports* 14, Article number 21430 (2024), [IF2023=3.8]
  2. Y. Hatta, T. Shimono, S. Tanaka, H. Asai and Y. Fujimoto, “Mathematical Modeling, Finite Element Analysis, and Experimental Verification of Cross-Coupled 2-DOF Tubular SPMSM”, *IEEJ Journal of Industry Applications*, Vol. 14, No.3, [IF2023=1.0]
  3. N. Tojo and T. Shimono, “Prototyping Applications for Post-Stroke Rehabilitation with Kinesthetic Haptic Technology”, *IEEE Access*, Vol. 12, pp.186730-186739, (2024), [IF2023=3.4]
  4. K. Okumura, S. Takano, T. Shimono, T. Kageyama, J. Tanaka and T. Araki, “Accuracy Evaluation of Solid Material Transplantation Using Cell Transplantation Device and Comparison with Manual Operation”, The 11th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON2025), 2025年3月21日, Shimane, Japan
  5. A. Takimoto, S. Takano and T. Shimono, “Parallel Implementation of Disturbance Observers for Drilling Vibration Suppression”, The 11th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON2025), 2025年3月21日, Shimane, Japan
  6. T. Fujiwara and T. Shimono, “Remote Control System with Real Time Delay Estimation Using CDOB”, The 11th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON2025), 2025年3月23日, Shimane, Japan
  7. M. Fujii, T. Shimono, S. Takano, K. Masaki, H. Nakada, J. Hakamata, H. Kabata, J. Miyata, K. Fukunaga, “Assessment of Inhaler Operation by k-means Clustering”, The 11th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON2025), 2025年3月22日, Shimane, Japan
  8. M. Kase, N. Khuong, T. Shimono, “Fundamental Experiment for Control of 6-DOF Cylindrical Motor”, The 11th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON2025), 2025年3月21日, Shimane, Japan
1. T. Matsunaga, S. Takano, T. Shimono, K. Ohnishi, M. Yagi and M. Nakamura, “Teleoperated Orthopedic Drill System Presenting Haptic Information Extended by Bur Tip Position”, The 2025 IEEE International Conference on Mechatronics (ICM2025), 2025年2月28日 - 3月2日, The University of Wollongong, Wollongong, NSW, Australia
2. T. Matsunaga, S. Takano, T. Shimono, K. Ohnishi, T. Wakabayashi, S. Kobayashi and M. Nakamura, “Real Haptic Data Based Cutting Force Reproduction for Orthopedic Oscillating Saw Simulator”, The 11th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON2025), 2025年3月21日 - 23日, Shimane, Japan
  3. S. Takano, T. Shimono, K. Masaki, H. Nakada, J. Hakamata, H. Kabata, J. Miyata and K. Fukunaga, “Adaptive Kalman Filtering Based Angle Estimation for Monitoring Inhaler Technique”, The 11th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON2025), 2025年3月21日, Shimane, Japan

## 【口頭発表】

(国外)

9. K. Kodama, T. Shimono, H. Obara, T. Yokoyama,  
“High-Precision Force Control by Noise Reduction Using Multi-Level  
Inverters under High-Gain Current Control”  
The 11th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation,  
Motion Control, and Optimization (SAMCON2025),  
2025 年 3 月 22 日, Shimane, Japan

(国内)

1. 山田敦久, 下野誠通, 八木満, 中村雅也, 大西公平  
「整形外科手術支援ロボットの誘導に向けた脊髄画像  
検出器の開発」  
電気学会産業応用部門大会, 2024 年 8 月 29 日, 水戸

**【記者発表・取材・受賞】**  
(受賞)

1. 松永卓也  
The 10th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation,  
Motion Control, and Optimization (SAMCON2024),  
2023 年部門優秀論文発表賞 (国際ワークショップ) を  
受賞  
口頭発表 “Cutting State Estimation Based on Haptic  
Information Acquired by One DOF Teleoperated Oscillating  
Saw for Orthopedic Surgery”, 2024 年 3 月 2 日-4 日,  
京都府

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 実用化実証事業

### 「腸内環境デザイン」グループ

- ◆ 統括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・83
- ◆ 腸内環境制御に向けた基盤技術の構築と応用可能性の探究・・・・・・・・86
- ◆ 腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの開発・・・・・・・・89
- ◆ 業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・91

# 腸内環境デザイングループ

グループリーダー 福田 真嗣

## 【基本構想】

本グループは、腸内環境を適切に制御することで、腸内環境のバランスの悪化が起因となる疾患の予防や治療に向けた基盤技術の構築を目的としている。ヒトの腸管内にはおよそ 1,000 種類、38 兆個にも及ぶとされる腸内細菌が生息している。正常なバランスを保っている腸内細菌叢は外部から侵入する外来細菌の定着を防ぎ、宿主免疫系を活性化することで腸管内の恒常性を維持している。一方で、腸内細菌叢のバランスの乱れ（ディスバイオーシス）は大腸炎や大腸がんといった消化器関連疾患のみならず、遠隔臓器や全身における様々な疾患の発症に関連することが示唆されている。遺伝子解析技術の進歩により、腸管内に生息する細菌叢の構成や種類については多くの情報が得られているものの、生息する個々の腸内細菌が果たす役割、もしくはその培養法については研究途上である。また、腸内細菌叢由来の代謝物質も宿主の健康維持や疾患に深く関与していることが示唆されてきたが、それらがどのような腸内細菌から産生されているのかなど不明な点も多い。

腸内細菌叢をはじめとする腸内環境を適切に制御するには、消化管内に存在する個々の腸内細菌の特性を理解し、腸内細菌叢由来の代謝物質や菌体自身が宿主へどのような影響を与えるのかを知ることが重要となる。腸内細菌が主に生息する大腸は嫌気環境であり、腸内細菌叢を構成する細菌のほとんどは偏性嫌気性細菌に区分される。これらの腸内細菌を培養するために、グローブボックスなどの嫌気環境を構築する装置や、これらを用いた嫌気培養による腸内細菌の単離培養法が構築され、腸内細菌の単離に使用する培地もいくつか市販されている。しかしながら、現段階の技術では培養できない難培養性腸内細菌も報告されるなど、腸内細菌の培養技術については改善の余地が数多く残されている。本グループの鍵となる腸内環境制御基盤技術の構築を行うためには、難培養性腸内細菌を含む腸内細菌を安定的に単離・培養することで、標的とする腸内細菌の特性を理解し、自在に操るためのツール開発が必要となる。そこで、本研究では、標的となる腸内細菌を選択的に取得するためのツール開発、およびその有用性の検証に取り組んだ。これらの課題に取り組むことで、腸内環境を適切に制御するための基盤技術を確立し、将来的には腸内環境の乱れが素因となるような疾患の新たな予防法や治療法開発に貢献する。

## 1. 2024 年度の研究目的

2024 年度は以下の 3 つを重点項目として定めた。

### (1) 標的腸内細菌を単離するためのツール開発、有効性の評価

腸内細菌叢を構成する腸内細菌の中には、ビフィズス菌や乳酸桿菌などに代表される宿主の健康維持や免疫系の亢進に作用する有用菌が存在する（参考文献 1-3）。一方、消化器関連疾患、代謝疾患、アレルギー疾患などに関与する腸内細菌が存在することも報告されている（参考文献 2-4）。多種多様な腸内細菌により構成される腸内細菌叢から特定の腸内細菌を単離・培養するには、便試料懸濁液を培地プレートに播種し、コロニーを形成させ単離する方法が一般的である。選択培地や培地に特定の物質を添加することにより、ある程度の選択は可能であるが、標的細菌のみを単離する効率は低いことが課題となっている。そこで、標的腸内細菌を効率よく単離、検出するためのツール開発として疾患関連細菌由来タンパク質を標的とした抗体の開発、これまでに作製した腸内細菌標的抗体の機能評価を行なった。

### (2) 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト

世界規模でパンデミックを引き起こした新型コロナウイルスは現在も変異を重ねており、オミクロン株に匹敵するようなウイルスが出現する可能性もある。そのためワクチンや感染により獲得した免疫機能を維持・増強することがウイルスの脅威から私たちを守るために重要となる。新型コロナ感染症は、欧米では感染者数や死亡率が高く、アジアでは低いといった地域的な違いも指摘されており、その要因として遺伝子配列の違いや BCG ワクチン接種率（参考文献 5）、食生活をはじめとした生活習慣の違いなどが挙げられている。また、新型コロナ感染症の重症度や後遺症と腸内細菌叢との関連も示唆されている。そこで、本グループは神奈川県立保健福祉大学、神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター、株式会社メタジェン、株式会社明治による産官学連携による共同研究として「神奈川県産官学共同 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト」を進め、抗体市中モニタリングの結果と生活習慣や食習慣、健康状態に関するアンケート、腸内環境の網羅的解析、免疫系への影響の評価を統合的に解析・評価することで、生活習慣、特に食習慣がもたらすワクチン抗体価への影響について調べた。

### (3) 腸内環境制御による疾患予防法の検討

医療技術の進歩により平均寿命は延伸している一方で、加齢に伴い様々な疾患に対するリスクも増加し、複数の慢

性疾患を併存する人も増えている。こうした背景から、疾病に至る前段階である「未病」の状態を早期に発見し、対策を講じることで、疾病の発症を予防し、健康寿命を延ばすことの重要性が高まっている。近年の研究では、ディスバイオーシスがさまざまな疾患の発症や増悪に関与していることが示されており、腸内環境を適切に維持することが健康管理の一助となることが明らかになりつつある。実際に、近年患者数が増加している脳梗塞や認知症においても、腸内環境との関連が報告されている。腸は「第二の脳」とも呼ばれ、「脳腸相関」に関する研究も進んでおり、腸内環境の制御が脳機能の維持において重要な役割を果たすことが推察されている。しかし、脳梗塞や認知症、またそれらの前段階にあたる高血圧や肥満といった未病状態における腸内環境の改善による疾患予防効果については、十分に検討・報告されていない。そこで本グループでは、未病の改善を政策的に推進している神奈川県との連携のもと、腸内環境制御による未病段階での疾患予防効果を検証するための予備的な検討を行った。今年度は、高血圧モデル動物を用いた食品成分の継続摂取実験を通じて、腸内環境の変化と血圧抑制効果との関連を評価し、腸内環境改善による未病改善の可能性を検討した。

## 2. 2024 年度の研究成果

2024 年度は、以下に挙げる具体的な研究成果を得ることができた。実験方法、結果の詳細は各研究員からの報告書に記載しているため、本項では要点のみを示す。

(1) 標的腸内細菌を単離するためのツール開発、有効性の評価

これまでに作製してきた有用性の高い腸内細菌ならびに疾患に関連する腸内細菌に対する抗体についてそれぞれ機能評価を行なった。はじめに有用性の高い腸内細菌に対する抗体については、抗体を活用し、これまで検討してきた標的細菌を人為的に添加した腸内細菌叢液ではなく、本来の腸内細菌叢から標的細菌を分離・単離できるかを検討した。抗体結合磁気ビーズを用いて分取した分画より新たに 3 株の標的細菌の単離に成功し、いずれも再培養可能であることが示唆された。本成果は、腸内細菌叢から目的菌を選択的に回収可能な基盤技術の構築につながるものと考えられる。疾患に関連する腸内細菌に対する抗体については、疾患診断法の構築への応用が期待される複数の抗体の機能評価を実施した。精製した抗体に HRP 標識を施し、ELISA により標的タンパク質を定量的に検出する条件を確立した。さらに、便懸濁液に添加した標的タンパク質を、ELISA にて検出できた。これらの結果に加え、複数の抗体について、抗体可変領域の配列解析を行なった。これらの成果は新たな疾患の新規診断法開発の基盤情報として有用であることを示唆するものであった。

(2) 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト

本プロジェクトでは神奈川県が中心となり進めている大規模ゲノムコホートである「神奈川県みらい未病コホート研究」の研究基盤を活用し、新型コロナウイルス抗体市

中モニタリングを進めた。腸内環境の網羅的解析、免疫系への影響の評価を統合的に解析・評価することで、生活習慣、特に食習慣がもたらすワクチン抗体価への影響について調べた。本年度は 94 人分の腸内細菌叢の解析、81 名分の便中に含まれる SARS-CoV-2 S1 RBD タンパク質に対するヒト IgG 抗体およびヒト IgA 抗体量を ELISA にて定量した。さらに生活・食習慣、健康状態アンケート、血中抗体価ならびに免疫細胞解析データとの統合解析を進めた。腸内環境と血液中の抗-SARS-CoV-2 S タンパク質 IgG の相関解析を実施した結果、血中抗体価と便中抗体価の間に相関があった。また、血中・便中に抗体価の間に共通して相関がある腸内細菌や代謝物質はなかったものの、個々の抗体価と相関するものを見出した (図 1)

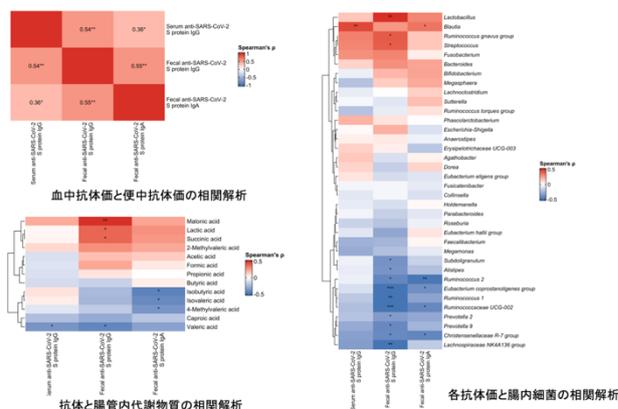


図 1 血中抗体価と腸内環境の関連性

(3) 腸内環境制御による疾患予防法の検討

ディスバイオーシスは多くの疾患の発症と関与しており、腸内環境の改善が疾患予防や未病状態への介入手段として注目されている。そこで、未病の一例として高血圧に着目し、腸内環境の制御によってその進行を抑制できるかを検討した。高血圧疾患モデル動物に対し、複数のプレバイオティクスとして知られる食品成分を自由飲水で継続摂取させ、経時的に収縮期血圧を測定した。その結果、いくつかの食品成分の摂取により、対照群 (水投与群) と比較して 5 週目以降に有意な血圧抑制効果が認められた。また、血圧上昇のタイミングについても、食品成分や代謝物質を摂取した群では対照群に比べて遅延が見られ、収縮期血圧の上昇を緩やかにする効果が示唆された。これらの結果は、食品由来成分の継続的摂取が腸内環境の維持・改善を通じて高血圧の進行を抑制し、未病段階での予防的介入として有効である可能性を示すものであった。

## 3. 研究体制

本グループでは、研究を円滑に進めるために様々な研究機関との共同研究を実施しており、共同研究先との綿密な連携はプロジェクトを推進する上で重要な項目となる。本グループではオンラインを活用し、多拠点の共同研究先とも定期的に進捗状況を報告する機会を設け、プロジェクトの成果や課題を共有し、共同研究の進め方を議論しながら進めた。

#### 4. 総括

本グループでは、腸内環境制御基盤技術の構築に向け、腸内細菌に関する新たな知見の取得および制御技術・ツールの開発を進めている。その一環として、腸内環境制御に資するツールのひとつである腸内細菌特異的抗体の作製に着手し、独自に確立した手法により複数の抗体を作製してきた。本年度は、有用性が示唆される腸内細菌を標的とした抗体を応用し、多種多様な腸内細菌から構成される腸内細菌叢から、標的細菌を効率的に単離することに成功した。得られた成果は、腸内細菌の機能解析および応用研究の基盤技術として有用であり、現在、学術論文として投稿を行っている。また、疾患に関連する細菌に対する抗体についても、機能解析およびアプリケーション開発を進めており、得られた研究成果に基づいて知的財産の出願を行った。

昨年度より、アフターコロナを見据えた取り組みとして、産官学連携による新型コロナウイルス抗体価に関する社会調査プロジェクトを開始した。本年度はその研究成果の一部として、新型コロナウイルスワクチン接種と食生活、腸内環境との間に密接な関連性があること明らかにした。これらの成果をもとに、研究成果をまとめた論文を投稿し、科学的根拠に基づく知見として発信を進めている。今後は、本研究で得られた知見を応用し、免疫機能を高めることを目的としたサプリメントや機能性食品の開発を進め、食を基盤としたアフターコロナ時代の感染症に強い身体づくりの実現を目指す。

腸内環境制御による疾患予防法の検討では、腸内環境制御による未病段階での疾患予防効果の検証を目的として、食品成分を継続的に摂取させた高血圧疾患モデル動物を用い、腸内環境の変化と収縮期血圧の推移を経時的に評価した。その結果、いくつかの食品成分において、腸内環境の維持・改善を通じた血圧上昇の抑制効果が確認され、腸内環境を標的とした栄養介入が高血圧をはじめとする未病状態の改善に有効である可能性が示唆された。一方で、血圧抑制作用の詳細な機序については依然として明らかでない点が多く、今後の検討課題として残された。今後はマルチオミクス解析で得られたデータを解析し、血圧調節に関与する腸内細菌および代謝物質の同定を進める。なお、本研究は、未病改善を重点政策として掲げる神奈川県との連携体制のもとで推進しており、得られた知見を基盤として、腸内環境制御を活用した未病対策の社会実装へ繋げる。

プロジェクト実施中に蓄積したデータやツールを活用することで、腸内環境制御を目指した有用菌を用いたサプリメントや機能性食品の開発、病原性細菌や疾患に対する予防・治療薬の開発など、医療やヘルスケア産業への応用も実施する。最終的には腸内環境を「意のままに」制御するための基盤技術を構築し、健康寿命の延伸を目指す。

#### 【参考文献】

1 Zheng, D., Liwinski, T., Elinav, E. Interaction between microbiota and Immunity in health and disease *Cell Res.*

Jun;30(6):492-506. (2020)

2 Sanders, ME., Merenstein, DJ., Gibson, GR., Rastall, RA. \*biology to the clinic *Nat Rev Gastroenterol.* Oct; 16(10):605-616, (2019).

3 Fan, Y., Pedersen, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol.* Jan;19(1):55-71, (2021).

4 Chen, Y., Zhou, J., Wang, L. Role and Mechanism of gut microbiota in human disease *Front cell Infect Microbiol.* Mar 17;11:625913 (2021).

5 Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C.. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 28;117(30):17720-17726 (2020).

# 腸内環境制御に向けた基盤技術の構築と応用可能性の探究

腸内環境デザイングループ

中藤学、大縄悟志、井上浄

## 1. はじめに

ヒトを含む哺乳類は、生後まもなく外部環境に曝露されることにより、微生物との共生関係を構築し始める。消化管内もその例外ではなく、体内にありながら外界と接する特性を持つ。ヒトの腸管には約 1000 種類、総数約 38 兆個の腸内細菌が存在し、その生息密度は極めて高く、地球上の環境の中でも最も高密度な微生物生息地の一つとされる（参考文献 1）。腸内細菌は相互作用を通じてバランスを保ちながら共存しており、この微生物集団は腸内細菌叢と呼ばれる。特に乳幼児期には食生活の変化に伴い腸内細菌叢の構成が大きく変動するが、成人以降は日々の食事や生活習慣に影響されつつも、比較的安定した状態が保たれるようになる（参考文献 2）。

### （1）腸内細菌叢が宿主に与える影響

宿主と共生関係を構築する腸内細菌叢は、宿主に対してさまざまな有益な効果をもたらすことが知られている。ヒトは呼吸や飲食を通じて常に外来抗原の侵入リスクにさらされているが、腸内細菌叢はこれらの外来抗原の腸管内への定着や体内への侵入を防ぐ役割を担っている。また、腸内細菌は食物由来の未消化成分を栄養源として発酵分解し、その過程で代謝物質を産生・分泌する。これらの代謝物質は、腸管上皮細胞のエネルギー源となるだけでなく、上皮細胞間の結合強化や腸管バリア機能の維持にも寄与することが示されている（参考文献 3）。一部の腸内細菌由来代謝物質は、宿主の免疫機能にも影響を及ぼす。例えば、腸内細菌叢を構成する主要な細菌群であるクロストリジウム目細菌群は、食物繊維を代謝して酪酸を産生する。この酪酸は、過剰な免疫応答を抑制する制御性 T 細胞

(Treg) の分化誘導を促進することが報告されている（参考文献 4,5）。また、ビフィズス菌が産生する酢酸は腸管バリア機能を強化し、腸管感染症の予防に寄与する。さらに、酢酸により誘導された免疫グロブリン A (IgA) は、病原性片利共生細菌に結合することで、大腸表面の粘液層への侵入を阻止することも明らかとなっている（参考文献 6,7）。

一方で、ストレスや生活習慣の乱れによって腸内細菌叢の構成バランスが崩れる状態（ディスバイオーシス）が生じ、この状態がさまざまな疾患の発症に関与することが明らかとなっている。実際に、ディスバイオーシスは大腸がんや炎症性腸疾患などの消化器疾患に加え、糖尿病、動脈硬化、自閉スペクトラム症、アレルギー疾患など多様な疾患と関連することが報告されている（参考文献 8）。さら

に、ディスバイオーシス時には腸内細菌叢由来の代謝物質の質や量にも変化が生じ、それ自体が病態形成に寄与する要因となる可能性がある。このような背景から、腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に維持することは、疾患の予防および健康の維持において極めて重要であると考えられる。

### （2）個々の腸内細菌を対象とした研究の重要性と課題

これまでの研究から、各個人の腸内細菌叢の構成およびその経時的変化については、多くの知見が得られている。また、項目 1.(1)で述べたように、腸内細菌叢由来の代謝物質は宿主の健康維持に重要な役割を果たしており、さまざまな疾患との関連も明らかになりつつある。したがって、個々の腸内細菌の特性や、それらが産生する代謝物質を理解することは、健康の維持および疾患の予防において重要である。メタボローム解析の進展により、疾患時などに变化する代謝物質の同定は進んでいるものの、それらの代謝物質が腸内細菌叢のどの菌種に由来するかについては、未解明な点が多い。個々の腸内細菌に関する研究報告が限られている主な要因としては、腸内細菌の培養法が十分に確立されていないことが挙げられる。腸内細菌の多くは偏性嫌気性菌であり、わずかな酸素の混入によっても生育が著しく阻害される。そのため、脱酸素剤を用いた簡易的な嫌気環境の構築や、嫌気グローブボックスを用いた培養法の開発が進められているが、それでもなお、単離・培養が困難な菌種が多数存在しているのが現状である。

### （3）腸内環境制御基盤技術の構築および利用法の検討

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御するための基盤技術の構築は、健康の維持や疾患予防における有効な手段として注目されている。このような基盤技術を確立するためには、以下の課題に体系的に取り組む必要がある。すなわち、課題 1:腸内細菌の安定培養法の確立と有用菌の単離、課題 2:個々の腸内細菌の特性解明と宿主への影響評価、課題 3:腸内環境制御基盤ツールの開発およびその評価である。これまでに、課題 1 および 2 に関しては、培養条件の最適化や疾患モデルを用いた機能解析を通じて多くの知見を蓄積してきた。また、課題 3 においても、様々な腸内細菌や腸内細菌由来タンパク質に対する抗体の作製を進めてきた。令和 6 年度は、この課題 3 について引き続き検討を進めながら、新たに課題 4 として、食品成分を用いた腸内環境の制御による疾患予防法の検討に着手した。本

研究から得られる成果は、腸内環境制御基盤技術に結びつく創薬、栄養補助食品、機能性食品の開発にも直結するのみならず基礎研究の発展にも大きな役割を果たすことが期待されている。

## 2. 実験と結果

本年度は腸内環境制御基盤ツールの評価ならびに食品成分を用いた腸内環境制御による疾患予防法の検討を行った。

### (1) 腸内細菌標的抗体の機能評価

本プロジェクトにおいてこれまで腸内細菌特異的抗体を作製し、標的細菌を人為的に添加した腸内細菌混合液から標的の腸内細菌を分離濃縮する方法を確立してきた。本年度は、標的細菌を含む腸内細菌叢より、抗体により標的細菌を分離濃縮できるかどうかを検討した(図1)。

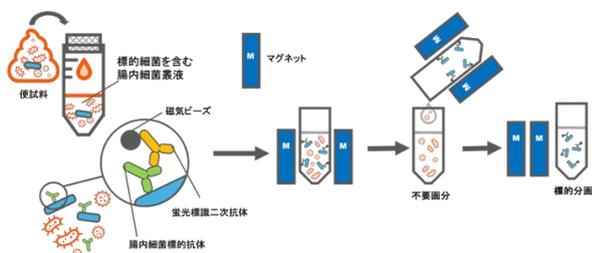


図1 抗体を用いた腸内細菌叢からの標的細菌分離手法

標的細菌を含む腸内細菌叢を調製し、抗体-磁気ビーズ(MojoSort)を用いて、標的細菌を分離し、再培養できるかどうかの検討を行った。MojoSortにより得られた標的細菌を含む分画を寒天プレートに播種し、コロニーを形成させた。標的細菌特異的プライマーおよび属特異的プライマーを用いたPCRにより、新たに標的細菌を3株単離することに成功した(図2A)。次に、単離されたそれぞれの株を液体培地にて培養を行った。その結果、それぞれの株は再培養可能であり、標的細菌と同様の形状ならびに増殖能を有していた(図2BおよびC)。

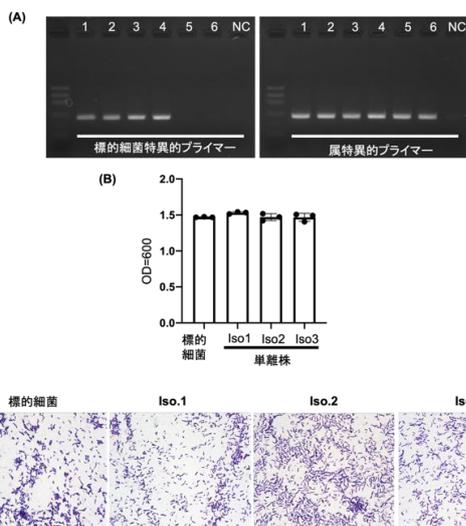


図2 腸内細菌標的抗体を用いた腸内細菌叢からの標的細菌の単離ならびに再培養の検討

(A) 標的細菌特異的プライマー、属特異的プライマーによるコロニーPCRの結果、1. Iso1、2. Iso2、3. Iso3、4. 標的細菌、5. 標的細菌同属細菌1、6. 標的細菌同属細菌2、7. Nuclease free waterをそれぞれ示す。(B) 新たに単離した標的細菌の再培養結果(C) 再培養後の標的細菌ならびに単離株のグラム染色画像

### (2) 腸内環境制御による疾患予防法の検討

背景の項にて記載したようにディスバイオーシスは疾患と深い関連性があり、腸内環境を改善することが疾患の治療につながる可能性がある。近年、健康から疾患に至る間の状態として「未病」という状態が着目されるようになってきている。そこで、腸内環境制御により腸内環境を整えることで未病を改善できるかどうかを検討した。本研究では脳梗塞や認知症の未病状態の一つとして考えられる高血圧に着目した。これまで蓄積した解析データや過去の論文報告より食品成分の継続的な摂取により、腸内環境を改善または維持することは、高血圧をはじめとする代謝性疾患を改善するための有効な手法の一つであることが示唆された。そこで、実際に食品成分摂取による腸内環境の改善により高血圧を改善できるかどうかの検討を行った。

高血圧疾患モデル動物(Spontaneously Hypertensive Rat:SHR)に様々なプレバイオティクスとして使用されている食品成分を自由飲水投与させ、経時的に収縮期血圧の測定、便、組織検体採取を行った(図3)。

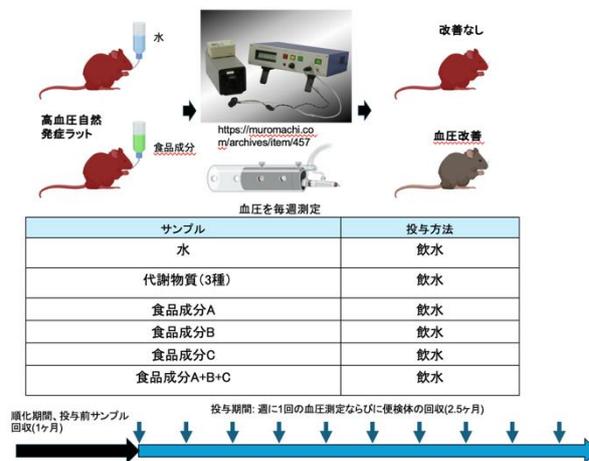


図3 食品成分摂取による血圧改善効果の実験概要

収縮期血圧を経時的に測定した結果、ネガティブコントロールである水を摂取した群と比較したところ、5週目で食品成分B投与群、そして6週目で食品成分C投与群において有意に高血圧抑制効果があった。9週目では有意差はないものの、食品成分B投与群、食品成分C投与群、食品成分A+B+C投与群は高血圧抑制の傾向がみられた(図4)。それぞれの群ごとの血圧上昇を検証したところ、水は2週目以降に収縮期血圧が有意に上昇し、他の群よりも早い上昇率であった。また、収縮期血圧が有意に上昇する時期は、代謝物質(3種)を投与した群では他の群に比べて遅く、食品成分C投与群以外の食品成分摂取群では

収縮期血圧の有意な上昇は水よりも遅く、血圧上昇抑制効果があることが示唆された。

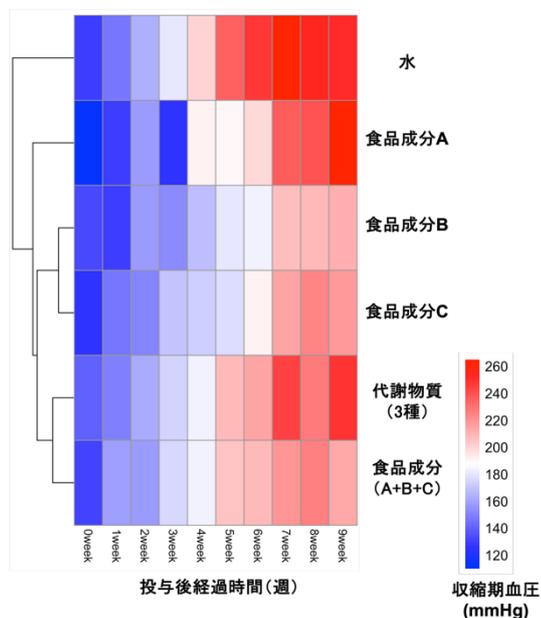


図4 食品成分摂取による高血圧症状改善の検討

水、代謝物質、食品成分を継続摂取した際の収縮期血圧の週ごとの変化を示したヒートマップ

### 3. 考察及び今後の展望

本年度は、これまでに作製した腸内細菌特異的抗体を活用し、腸内細菌叢中から標的細菌を高精度に分離・濃縮する手法の確立を試みた。従来は、腸内細菌混合液に人為的に添加した標的細菌の分離を成功させていたが、本年度はより実践的な条件下として、標的細菌を含む腸内細菌叢から直接分離できるかを検討した。調製した腸内細菌叢をMojoSortにて分画し、分取分画を寒天培地に播種した。得られたコロニーについて属特異的および種特異的プライマーを用いたPCR解析を行った結果、標的細菌と一致する新たな3株の単離に成功した。さらに、各株は液体培地での再培養が可能であり、形態や増殖能も標的株と一致していた。これらの成果は、腸内細菌叢に含まれる目的菌を抗体により選択的に分離・培養できる技術として、腸内細菌機能解析や応用研究に有用であることが示唆される。これらの成果に基づき、本技術の有用性を示す学術論文を現在投稿中である。

腸内環境制御による疾患予防法の検討として、食品成分の継続的摂取が腸内環境の改善あるいは維持を通じて収縮期血圧の低下に寄与していることが明らかとなった。一方で、血圧抑制効果の詳細な作用機序については、既報の知見も踏まえても依然として明確ではなく、今後の解析が必要である。そこで、本研究で得られた試料を用いてメタゲノム解析やメタボローム解析などのマルチオミクス手法を導入し、血圧抑制に關与する腸内細菌叢の変化および代謝物質の同定を行う。さらに、神奈川県および関連研究機関と連携し、得られた知見のヒトへの応用可能性についても検討を進める。

### 4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、慶應義塾先端生命科学研究所の楊佳約博士、筑波大学トランスポーター医学センターの尾花望博士をはじめ多くの方々のご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。本研究の一部は、JST 戦略的創造研究推進事業、一般財団法人糧食研究会、神奈川県庁の助成金の支援を受け実施しました。

#### 【参考文献】

- 1 Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **14**, e1002533 (2016).
- 2 Odamaki, T. *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* **25**:16:90, (2016).
- 3 Okada, T., *et al.* Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* **4**: 1654, (2013).
- 4 †Furusawa, Y., †Obata, Y., †\*Fukuda, S. († co-first and \*corresponding author), *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**: 446-450, (2013).
- 5 Atarashi, K., *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**: 232-236, (2013).
- 6 Fukuda, S., *et al.* Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543-547 (2011).
- 7 Takeuchi, T. *et al.* Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria. *Nature* **595**, 560-564 (2021).
- 8 Sekirov, I. *et al.* Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* **Jul**;90(3):859-904. (2010).

# 腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの開発

「腸内環境デザイン」グループ

大縄悟志、中藤学、井上浄

## 1. はじめに

ヒトの腸管内に生息する腸内細菌は食物由来の未消化物（食物繊維やオリゴ糖）を異化代謝することで短鎖脂肪酸を産生して増殖し、腸管上皮細胞の恒常性維持や粘膜免疫系の構築に寄与している。中には腸内環境改善効果を有する腸内細菌も存在しており、それらはプロバイオティクスと呼ばれ、腸内環境を整え、宿主に良い影響をもたらすことが知られている。その一方で、生活習慣の乱れやストレスなどにより腸内細菌叢が攪乱されると、腸内細菌叢より産生される代謝物質などが疾患の発症に関与することも知られている。したがって、疾患に関連する腸内細菌を標的とした創薬を効率よく開発する為には、標的となる腸内細菌を宿主の腸内細菌叢から効率よく検出するツールの開発が必要不可欠である。

### (1) 腸内環境を整える方法と課題

腸内細菌叢を含む腸内環境を整える方法としては、食物繊維やオリゴ糖の摂取のみならず、ヨーグルトや乳酸菌発酵飲料などの発酵食品の摂取が一般に浸透している。これらは日常的に取り入れられるという観点から予防的アプローチとして広く利用されている。しかしながら、これらを摂取している間は便から食品に含まれる有用菌が検出されるものの、摂取をやめてしまうと腸管から有用菌は検出されなくなる（参考文献1）。そのため、これらの食品の効果は一時的であることが示唆されている。その一方で、ヒトから分離した有用菌を人が摂取することで200日間経過しても摂取した有用菌が検出されるという報告もある（参考文献2）。このように有用菌が定着する、もしくはしない人がどのように決定されているかについては現在研究途上となっている。臨床においては、潰瘍性大腸炎やクローン病などの特定疾患に指定されている炎症性腸疾患治療において「便微生物叢移植療法」が一定の効果を示すことが報告されている（参考文献3、4）。しかしながら、これらの方法は同一個人由来の細菌叢ではなく他人の細菌叢のため、投与した腸内細菌群が患者の腸内に定着できないなどの課題も残る。そこで腸内環境を整える一つの手法として、外来性細菌ではなく宿主由来の腸内細菌を利用し、再度体内に戻すことにより、持続的な腸内環境改善が期待できるのではないかと考えた。このような腸内環境制御基盤技術の開発を行うには宿主由来の特定の腸内細菌を多種多様な腸内細菌が存在する腸内細菌叢の中から効率よく標的細菌のみを検出する為のツールの開発が重要となってくる。

### (2) 標的腸内細菌由来タンパク質特異的抗体の作製意義

抗体は免疫細胞の一つである形質細胞から産生される糖タンパク質で、抗原と呼ばれる免疫応答を引き起こす物質に特異的に結合する能力を持つ。細菌も抗原としての性質を有しており、実際に特定の細菌を認識する抗体も報告されている。例えば、有用菌の一つである *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) に対する抗体作製の報告がある。本抗体は *B. longum* を認識するものの、他の *Bifidobacterium* 属細菌にも広く交差性を示すため腸内細菌叢などの集団から標的となる *B. longum* のみを単離・濃縮するために利用することは困難であることが示唆される（参考文献5）。*B. longum* に対する抗体以外にも細菌に対する市販の抗体の多くが標的細菌以外の細菌に反応するという問題がある。そのため、腸内細菌叢を構成する多種多様な腸内細菌の中から標的となる細菌のみを検出するには、より特異性の高い抗体の使用が求められる。

### (3) 腸内環境制御基盤技術構築のための研究ツールの開発

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御する基盤技術の構築は、我々の健康維持や疾患予防、治療もしくは診断への有効な手段となる可能性がある。これまで本プロジェクトにおいて、独自の抗体作製方法を確立し、複数の腸内細菌に対して特異性の高い抗体の作製に成功している。また標的細菌のみを認識する抗体作製にも成功しており、疾病の新規診断法開発へと枠を広げる目的でこれまでに、疾病への関連が示唆される腸内細菌に発現するタンパク質の検出用抗体の取得、ならびにその遺伝子の簡易検出について評価を行い、引き続き抗体の機能評価と解析を行った。今年度は取得したクローンの最終化を行った抗体の機能評価を行い、有用性が高い抗体を産生するハイブリドーマについて、抗体可変領域解析および精製抗体の作製、標識を行った。

## 2. 実験と結果

### (1) 特定疾患診断法の確立に向けた抗体の機能評価 (1-1) 直接 ELISA 法によるタンパク X の検出

昨年度の研究より、特定疾患診断法に応用できる可能性のある2つのクローンについて腹水から抗体を精製した。ハイブリドーマ細胞をマウスに投与し、得られた腹水から抗体精製を行い、細菌由来タンパク質（以下、タンパク X と仮称）に対する抗タンパク X 抗体を2つ

取得した。抗体の一部は ELISA でのタンパク X の検出に向けて昨年度取得したタンパク X とともに HRP 標識キットによるラベル化を行った。次にこれらの標識抗体を用いてタンパク X を直接 ELISA 法にて検出できるか検討を行った (図 1A)。作成したすべての HRP 抗タンパク X 抗体を用いるとタンパク X を定量できた (図 1B)

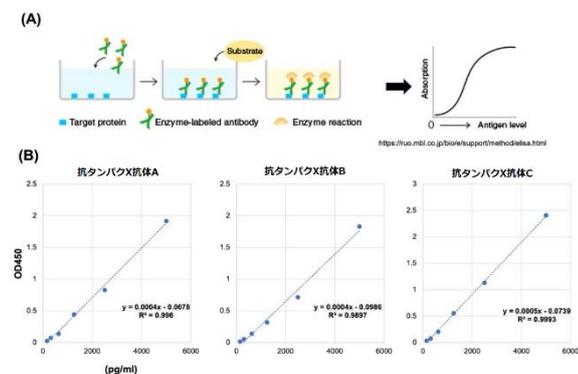


図 1 直接 ELISA 法によるタンパク X の検出

(A)直接 ELISA 法の概要

(B)HRP 標準抗タンパク X 抗体によるタンパク X の検出

### (1-2) 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による便懸濁液からのタンパク X の検出

作成した抗体を用いて特定疾患由来便懸濁液に添加したタンパク X を検出できるか検討した。便懸濁液にタンパク X を添加し、各種抗体で検出した結果、便に添加したタンパク X を検出することができた (図 2)。

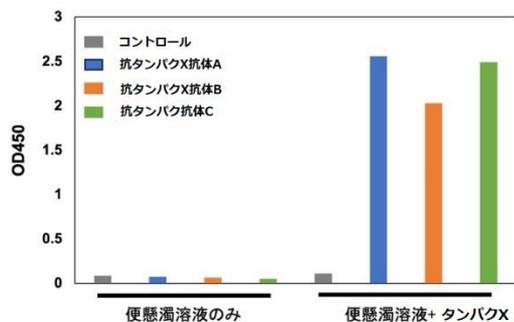


図 2 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA 法による便懸濁液からのタンパク X の検出結果

### (1-3) 抗タンパク X 抗体の抗体可変領域配列の解析

クローン A,B 由来の抗タンパク X 抗体が新規特定疾患検出法の開発に有用であることが明らかとなったため、将来的な応用に向け、抗体可変領域解析を行い、抗体分子の可変領域で抗原と直接接触する領域である相補性決定領域 (Complementarity Determining Region: CDR) の配列を決定した。その結果、クローン A については CDR 配列を決定することはできたが、クローン B については VL 可変領域の配列は解析できたものの VH 可変領域は配列解析できなかった。

### 3. 考察及び今後の展望

本年度、特定疾患関連細菌に発現するタンパク X に対する抗体と PCR を組み合わせたタンパク X 検出による新規特定疾患診断法の構築について知財申請を行った。今後は配列解析ができなかったハイブリドーマは必要に応じて再度抗体可変領域の配列解析を実施する。

### 4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、公益財団法人 実験動物中央研究所の高橋利一氏、小倉智幸氏、何裕遥氏、富山香代氏、野津量子氏にご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

### 【参考文献】

- Kim, S., Suda, W., Kim, S., Oshima, K., Fukuda, S., Ohno, H., Morita, H., Hattori, M., Robustness of Gut Microbiota of Healthy Adults in Response to Probiotic Intervention Revealed by High-Throughput Pyrosequencing. *DNA Res.* Jun;20(3):241-53, (2013).
- Maldonado-Gomez, M.X., Martinez, S., Bottacini, F., O'Callaghan, A., Ventura, M., van Sinderen, D., Hillmann, B., Vangay, P., Knights, D., Hutkins, R.W., Walter, J. Stable Engraftment of *Bifidobacterium Longum* AH1206 in the Human gut depends on individualized features of resident microbiome. *Cell Host Microbe.* Oct 12; 20(4):515-526, (2016).
- Ishikawa, D., Sasaki, T., Osada, T., Kuwahara-Arai, K., Haga, K., Shibuya, T., Hiramatsu, K., Watanabe, S. Changes in intestinal microbiota following combination therapy with fecal microbial transplantation and antibiotics for Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* Jan;23(1):116-125, (2017).
- Paramsothy, S., Kamm, M.A., Kaakoush, N.O., Walsh, A.J., van den Bogaerde, J., Samuel, D., Leong, R.W.L., Connor, S., Ng, W., Paramsothy, R., Xuan, W., Lin, E., Mitchell, H.M., Borody, T.J. Multidonor intensive fecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* Mar 25;389(10075):1218-1228 (2017).

## 業績

### 【原著論文】

1. Funahashia K, Lee CG, Sugitate K, Kagata N, Fukuda N, Song I, Ishii C, Hirayama A, Fukuda S. Development of a specialized method for simultaneous quantification of functional intestinal metabolites by GC/MS-based metabolomics. *Gut Microbes Rep*. 1: 1, 2024.
2. Yang J, Song I, Saito M, Hartanto T, Ichinohe T, Fukuda S. Partially hydrolyzed guar gum attenuates symptoms and modulates the gut microbiota in a model of SARS-CoV-2 infection. *Gut Microbiome (Camb)*. 2025 Jan 14;6:e1
3. Onishi M, Nakamura T, Kano C, Hirota T, Fukuda S, Morita H.  $\alpha$ -Cyclodextrin supplementation improves endurance exercise performance and reduces post-exercise fatigue in human males: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Biosci Microbiota Food Health*. 2025;44(1):80-89
4. Kobayashi M, Kobayashi N, Deguchi K, Omori S, Nagai M, Fukui R, Song I, Fukuda S, Miyake K, Ichinohe T. TNF- $\alpha$  exacerbates SARS-CoV-2 infection by stimulating CXCL1 production from macrophages. *PLoS Pathog*. 2024 Dec 9;20(12):e1012776
5. Ikeda H, Oshibuchi K, Yang J, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of *Bulleidia* sp. 10714-15 isolated from human colon cancer patients. *Microbiol Resour Announc*. 2024 Dec 12;13(12):e0093724
6. Ichimura R, Tanaka K, Nakato G, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of *Mediterraneibacter gnavus* strain R1, isolated from human feces. *Micorobiol Resour Announc*. 2024 Sep 30:e0086324
7. Mio K, Goto Y, Matusoka T, Komatsu M, Ishii C, Yang J, Kobayashi T, Aoe S, Fukuda S. Barley  $\beta$ -glucan consumption improves glucose tolerance by increasing intestinal succinate concentrations. *NPJ Sci Food*. 2024 Sep30;8(1):69
8. Grant ET, Parrish A, Boudaud M, Hunewald O, Hirayama A, Ollert M, Fukuda S, Desai MS. Dietary fibers boost gut microbiota-produced B vitamin pool and alter host immune landscape. *Microbiome*. 2024 Sep 23;12(1):179.
9. Steimle A, Neumann M, Grant ET, Willieme S, De Sciscio A, Parrish A, Ollert M, Miyauchi E, Soga T, Fukuda S, Ohno H, Desai MS. Gut microbial factors predict disease severity in a mouse model of multiple sclerosis. *Nat Microbiol*. 2024 Sep;9(9):2244-2261.
10. Kurokawa S, Nomura K, Sanada K, Miyaho K, Ishii C, Fukuda S, Iwamoto C, Naraoka M, Yoneda S, Imafuku M, Matsuzaki J, Saito Y, Mimura M, Kishimoto T. A comparative study on dietary diversity and gut microbial diversity in children with autism spectrum disorder, attention-deficit hyperactivity disorder, their neurotypical siblings, and non-related neurotypical volunteers: a cross-sectional study. *J Child Psychol Psychiatry*. 2024 Sep;65(9):1184-1195
11. Mizutani S, Tamaki A, Shiba S, Salim F, Yamada M, Takamaru H, Nakajima T, Yoshida N, Ikuta S, Yachida T, Shibata T, Soga T, Saito Y, Fukuda S, Ishikawa H, Yamada T, Yachida S. Dynamics of the gut microbiome in FAP patients undergoing intensive endoscopic reduction of polyp burden. *Gut*. 2024 Aug 1:gutjnl-2024-332381.
12. Salim F, Mizutani S, Shiba S, Takamaru H, Yamada M, Nakajima T, Yachida T, Soga T, Saito Y, Fukuda S, Yachida S, Yamada T. Fusobacterium species are distinctly associated with patients with Lynch syndrome colorectal cancer. *iScience*. 2024 Jun 4;27(7):110181.
13. Lin YH, Tahara-Hanaoka S, Obana N, Fukuda S, Shibuya A. An inhibitory immunoreceptor Allergin-1 regulates the intestinal dysbiosis and barrier function in mice. *Int Immunol*. 2024 Jun 8;36(7):365-371.
14. Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Nakai C, Wakaki-Nishiyama N, Okamoto C, Okuzaki D, Morita S, Kaji S, Furuta Y, Hemmi H, Kato T, Yamamoto A, Tosuji E, Saitoh SI,

Tanaka T, Hoshino K, Fukuda S, Miyake K, Kuroda E, Ishii KJ, Iwawaki T, Furukawa K, Kaisho T. A stress sensor, IRE1 $\alpha$ , is required for bacterial-exotoxin-induced interleukin-1 $\beta$  production in tissue-resident macrophages. Cell Rep. 2024 Apr 23;43(4):113981

#### 【総説】

1. 中藤学、尾花望、福田真嗣 総論:腸内フローラとは？  
*GO-VET*, 7(3), 4-13 (2024)

#### 【口頭発表】

1. 福田真嗣 腸内細菌をくすりに！最新”腸”科学が明らかにする個人差と腸内環境の関係性、日本薬学会第145年会市民公開講座、アクロス福岡(福岡)、2025年3月30日
2. 福田真嗣 Brown Gem Story ～メタジェンの挑戦～、第19回日本ゲノム微生物学会年会、かずさアカデミアホール(千葉)、2025年3月18日
3. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・創薬・ヘルスケアの現状、第21回日本消化管学会総会学会学術集会、京王プラザホテル(東京)、2025年2月21日
4. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアの現状と未来、第21回日本獣医内科学アカデミー学術集会、東京国際フォーラム(東京)、2025年2月16日
5. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアの現状と未来、第40回日本栄養治療学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川)、2025年2月15日
6. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来、第39回前立腺シンポジウム、コングレススクエア日本橋(東京)、2024年12月14日
7. 福田真嗣 腸内細菌と肥満解消～一層注目を集める短鎖脂肪酸の新しい可能性～、日本肥満症予防協会、オンライン、2024年12月5日
8. 福田真嗣 腸内細菌叢＝あなたの体質？最新”腸”科学が明らかにする個人差と腸内環境の関係性、第61回日本臨床生理学会総会、KABUTO ONE HALL & CONFERENCE(東京)、2024年11月15日

9. 福田真嗣 自己管理をサポートする新たな ME-BYO テクノロジー、国際シンポジウム ME-BYO サミット神奈川 2024、湯本富士屋ホテル(神奈川)、2024年11月8日
10. 福田真嗣 腸内細菌が決める！？あなたの体型と健康のひみつ、日本肥満症予防協会 市民講座、パシフィコ横浜(神奈川)、2024年10月21日
11. 福田真嗣 腸内環境の可視化と健康づくりへの活用、第26回ダノン健康栄養フォーラム、品川インターシティーホール(東京)、2024年9月28日
12. 福田真嗣 Cancer prevention and treatment by gut environmental design、第83回日本癌学会学術総会、福岡国際会議場(福岡)、2024年9月21日
13. 楊佳約、尾花望、中藤学、野村暢彦、福田真嗣 腸管粘膜局在細菌が大腸炎を緩和する 第38回日本バイオフィルム学会学術集会 大阪公立大学阿倍野キャンパス(大阪)、2024年7月27日
14. 市村涼葉、田中一己、清水映輔、小川葉子、坪田一男、福田真嗣 骨髄移植による免疫機能変化が腸内細菌叢移植後の腸内細菌叢定着にもたらす影響 第28回腸内細菌学会 タワーホール船堀(東京)、2024年6月25日
15. 根岸紘生、中藤学、門脇里恵、河野紘己、市川愛弓、牧野聖也、中村翔、成松宏人、福田真嗣 新型コロナウイルス(COVID-19)ワクチン抗原に対する免疫応答と特異的抗体価に影響を与える食習慣ならびに腸内環境の解析 第78回日本栄養・食糧学会大会、中村学園大学(福岡) 2024年5月25日
16. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来、日プレ・プロバイオティクスシンポジウム in 名古屋、ウイंक愛知(愛知)、2024年5月17日

#### 【ポスター発表】

1. 中藤学、根岸紘生、門脇里恵、河野紘己、市川愛弓、利光孝之、牧野聖也、狩野宏、中村翔、成松宏人、福田真嗣 新型コロナウイルスワクチン接種における免疫、食生活、腸内環境との関連性 ヘルスイノベーション・カンファレンス殿町 2025(川崎) 2025

年 2 月 22 日

2. Gaku Nakato, Hikaru Inoue, Satoshi Onawa, Nozomu Obana, Kazuki Tanaka, Hitoshi Agematsu, Isaiah Song, Joe Inoue, Shinji Fukuda Development of a strain-level microbial isolation method using monoclonal antibodies and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules. IUMS2024 (Florence, Italy) 2024 年 10 月 24 日
3. Nozomu Obana, Gaku Nakato, Shinji Fukuda Sortase-mediated capsular polysaccharide production facilitates intestinal competitive fitness in *Ruminococcus gnavus*. IUMS2024 (Florence, Italy) 2024年10月24日
4. Jiayue Yang, Nozomu Obana Gaku Nakato, Nobuhiko Nomura Shinji Fukuda Intestinal mucosa-associated bacterium *Adlercreutzia equolifaciens* attenuates colitis. IUMS2024 (Florence, Italy) 2024年10月23-25日
5. Jiayue Yang、Nozomu Obana、Gaku Nakato、Nobuhiko Nomura、Shinji Fukuda An intestinal mucosa-associated bacterium which attenuates colitis. 第97回日本細菌学会総会 札幌コンベンションセンター（北海道）2024年8月7日
6. Jiayue Yang、Nozomu Obana、Gaku Nakato、Nobuhiko Nomura、Shinji Fukuda Intestinal mucosal-associated bacterium *Adlercreutzia equolifaciens* attenuates colitis 第51回内藤コンファレンス シャトレーゼガトーキングダム札幌（北海道）2024年6月26日

【特許】

- (1)国内特許出願 1 件
- (2)国際特許出願 1 件

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 実用化実証事業

「次世代半導体用エコマテリアル」グループ

- ◆ 統括・・95
- ◆ 機械学習を用いた多元素置換  $\text{BiNi}_{1-x}\text{MxO}_3$  の負熱膨張特性の最適化・・・・・・・・98
- ◆ Tailoring Negative and Directional Thermal Expansion in  $\text{K}_2\text{NiF}_4$  Structured Materials・・・・102
- ◆ 業績・・108

# 次世代半導体用エコマテリアルグループ

グループリーダー 東 正樹

## 【基本構想】

全てのモノがインターネットにつながる IoT 社会の実現に向けて、電子デバイスの消費電力の低減や、環境負荷の小さい材料の開発が求められている。例えば 10 cm の鉄の棒は、温度が 1°C 上がるごとに 1.2mm の熱膨張を起こす。小型・高密度化が進む現在の LSI のゲート幅は 10nm 以下であり、熱膨張の制御なしには精度を保つことができない。本プロジェクトでは、こうした熱歪みを吸収する「負」熱膨張材料に加え、低消費電力不揮発性メモリ材料につながる強磁性強誘電体という、次世代半導体への応用展開を望める材料の研究を行っている。中でも負熱膨張材料については、企業との連携により安定な材料の供給ができる体制を整え、産業化への歩みを始めた。また、強磁性強誘電体についても、メモリデバイス化に必須なナノドット化の基礎技術を住友化学次世代環境デバイス協働研究拠点において開発した。

## 1. 2024 年度の研究目的

### ① 巨大負熱膨張材料の社会実装と新物質開発

令和 1 年度に特許申請、令和 2 年度に国際出願した、収率低下の原因となる酸化剤を用いずに巨大負熱膨張材料  $\text{BiNi}_{0.85}\text{Fe}_{0.15}\text{O}_3$  (BNFO) の合成を可能とする、共沈法による前駆体合成のスケールアップを果たし、日本材料技研に技術移転する。これにより、収率の向上、作業工程の簡略化に加え、焼結体を用いた一般的な熱膨張測定による品質管理が可能となり、KISTEC・東工大の手を離れて、日本材料技研だけで事業を展開できるようになる。また、動作温度範囲を拡張する組成探索を行う。この応用研究と平行して、 $\text{K}_2\text{NiF}_4$  型構造を持つ新しい負熱膨張材料の開発や、負熱膨張候補物質である  $\text{Bi}_{0.5}\text{Pb}_{0.5}\text{MO}_3$  (M: 3d 遷移金属) の電荷分布解明を進め、高インパクトファクタージャーナルへの論文掲載を目指す。

### ② 強磁性強誘電体の磁化反転検出

基板の上にスピコートで成膜した HSQ (水素シルセスキオキサン) に電子ビーム描画でマスクパターンを作製し、レーザーアブレーションでナノドットを作製する。その後 PFM と MFM で強誘電・磁気ドメインの観察と、分極反転に伴う磁化の反転を検証する。

## 2. 2024 年度の研究成果

### ① 巨大負熱膨張材料の社会実装と新物質開発

$\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  (BNFO) は  $x = 7.5, 10, 12, 15, 17$  の動作温度範囲の異なる 5 種類へとラインナップを広げた。また、一回の合成で 1kg へのスケールアップを果たした。一方でコスト削減に繋がる共沈酸化同時プロセスによる前駆体の合成法は、濾過や遠心分離による脱水法の工業化が難しい事が問題だったが、こちらでデカンテーション法の目処が立ちつつある。さらに、ペイズ最適化を用いた多元素置換によって、転移温度幅を 170 K にまで広げることが成功、日本材料技研に結果を開示して、2 組成の大量合成と商品化検討を開始した。詳しくは西久保研究

員 の 原 稿 を 参 照 さ れ たい。

BNFO の母物質である  $\text{BiNiO}_3$  は  $\text{Bi}^{3+}_{0.5}\text{Bi}^{5+}_{0.5}\text{Ni}^{2+}\text{O}_3$  の特徴的な電荷分布を持ち、4GPa に加圧すると  $\text{Bi}^{3+}\text{Ni}^{3+}\text{O}_3$  の高圧相に転移する。この際、 $\text{Ni}^{2+} \rightarrow \text{Ni}^{3+}$  の酸化に伴いペロブスカイト構造の骨格を作る Ni-O 結合が収縮するので、約 3% の体積収縮が起こる。Ni への Fe 置換でこの電荷移動転移を常圧下の昇温で起こるようにしたのが BNFO の負熱膨張である。今回は、250 K 以下の低温で圧縮すると、 $\text{Bi}^{3+}$  と  $\text{Bi}^{5+}$  の秩序配列が消失して電荷ガラス状態になる事を見いだした。この成果は Nature Communications に掲載され、プレスリリースも行った。

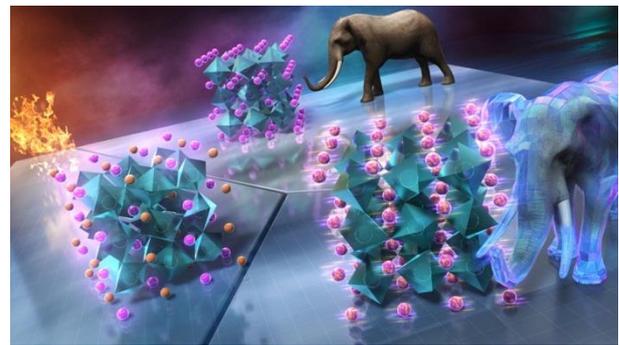


図 1:  $\text{BiNiO}_3$  の高圧・低温での  $\text{Bi}^{3+}/\text{Bi}^{5+}$  電荷ガラス転移と、高圧・高温での負熱膨張を伴う Bi-Ni 間電荷移動のイメージ

$\text{PbCrO}_3$  は、 $\text{BiNiO}_3$  に類似した  $\text{Pb}^{2+}_{0.5}\text{Pb}^{4+}_{0.5}\text{Cr}^{3+}\text{O}_3$  の電荷分布を持ち、2.5 GPa への加圧で 9.8% の体積収縮を伴って  $\text{Pb}^{2+}\text{Cr}^{4+}\text{O}_3$  の高圧相へと転移する。放射光 X 線回折その場観察で圧力-温度相図を作製したところ、常圧相・高圧相の相境界の傾きが  $\text{BiNiO}_3$  とは逆で、圧力下で昇温すると  $\text{Pb}^{2+}\text{Cr}^{4+}\text{O}_3$  から  $\text{Pb}^{2+}_{0.5}\text{Pb}^{4+}_{0.5}\text{Cr}^{3+}\text{O}_3$  への転移が起こることが判明した。これは、 $\text{Bi}^{3+}_{0.5}\text{Bi}^{5+}_{0.5}\text{Ni}^{2+}\text{O}_3$  では  $\text{Bi}^{3+}$  と  $\text{Bi}^{5+}$  が秩序配列しているために、金属伝導を示す  $\text{Bi}^{3+}\text{Ni}^{3+}\text{O}_3$  よりもエントロピーが小さいのに対し、

$\text{Pb}^{2+}_{0.5}\text{Pb}^{4+}_{0.5}\text{Cr}^{3+}\text{O}_3$  では  $\text{Pb}^{2+}$  と  $\text{Pb}^{4+}$  が長距離秩序を持たない電荷ガラス状態であるため、 $\text{Pb}^{2+}\text{Cr}^{4+}\text{O}_3$  よりも高エントロピーであるためだと考えられる。この結果に基づき、Pb を一部 Ca で置換することで高压相を安定化した  $\text{Pb}_{0.7}\text{Ca}_{0.3}\text{CrO}_3$  は、昇温で 11.9% もの巨大な熱膨張を示す事を確認した。この結果は Chemistry of Materials 誌に掲載された。

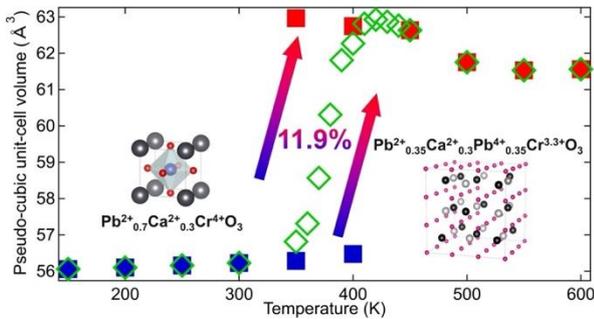


図 2 :  $\text{Pb}_{0.7}\text{Ca}_{0.3}\text{CrO}_3$  の巨大熱膨張

戦略シーズ、有望シーズで実現発見した、電子ドーピングした  $\text{PbVO}_3$  の極性—非極性転移（強誘電転移）による最高 9.3% もの体積収縮を伴う巨大負熱膨張を非鉛物質で実現するため、 $\text{BiCoO}_3$  の研究を進めている。この物質は  $\text{Bi}^{3+}$  の  $6s^2$  孤立電子対と、 $d^6$  電子配置を持つ  $\text{Co}^{3+}$  のヤーンテラー歪みのために  $cla=1.27$  と巨大な極性の正方晶歪みを持ち、圧力下では 13% の体積収縮を伴って立方晶相に転移する。昨年度 Bi を一部 La で置換する事で孤立電子対の効果を薄めた  $\text{Bi}_{0.8}\text{La}_{0.2}\text{CoO}_3$  では、高温立方晶相の分率が室温の 30% から 700K では 55% に増加し、2.6% の体積収縮が起こることを見だし、特許を申請した。今年度も組成探索を進め、 $\text{Bi}_{0.82}\text{Nd}_{0.18}\text{CoO}_3$  では高温立方晶相が 40% → 92% に変化、体積収縮率 6.1% を示し、非鉛物質としての記録を更新した。

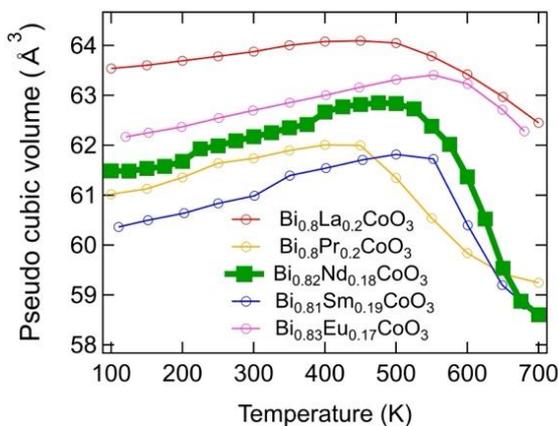


図 3 :  $\text{Bi}_{1-x}\text{Ln}_x\text{CuO}_3$  (Ln : 希土類元素) の負熱膨張

$\text{PbVO}_3$ 、 $\text{BiCoO}_3$  の合成には高压力が必要だが、常圧下での合成が可能で、大きな電気分極を持つ強誘電体として  $\text{BiFeO}_3$  がある。我々は強磁性強誘電体としての興味から Fe への Co, Mn, Al 置換を行ってきたが、1100 K の強誘電転移温度の大幅な低下は起こらず、負熱膨張材料と

見なすことはできなかった。しかしながら、昨年度開発した、スピン軌道相互作用の大きい  $\text{Ru}^{4+}$  を  $\text{Fe}^{3+}$  に、電荷の中性を保つために  $\text{Ca}^{2+}$  を同量  $\text{Bi}^{3+}$  に置換した  $\text{Bi}_{0.85}\text{Ca}_{0.15}\text{Fe}_{0.85}\text{Ru}_{0.15}\text{O}_3$  が室温で一部常誘電相になっていることに気づき、熱膨張測定を行ったところ、負熱膨張を示す事が確認された。同様に  $\text{Bi}_{1-x}\text{Ca}_x\text{Fe}_{1-x}\text{Ru}_x\text{O}_3$  や  $\text{Bi}_{1-x}\text{Ca}_x\text{Fe}_{1-x}\text{Zr}_x\text{O}_3$  も負熱膨張を示すため、併せて特許出願を行った。

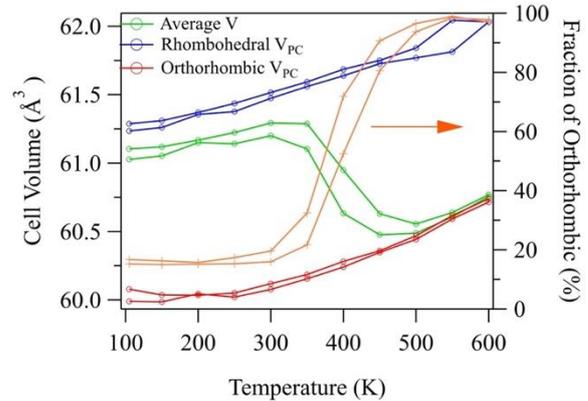


図 4 :  $\text{Bi}_{0.85}\text{Ca}_{0.15}\text{Fe}_{0.85}\text{Ru}_{0.15}\text{O}_3$  の負熱膨張

$\text{Bi}_0.5\text{Pb}_0.5\text{CoO}_3$  は、Bi, Pb の両方がそれぞれ  $3+$  と  $5+$ 、 $2+$  と  $4+$  に電荷不均化した  $\text{Bi}^{3+}_{0.25}\text{Bi}^{5+}_{0.25}\text{Pb}^{2+}_{0.5}\text{Pb}^{4+}_{0.5}\text{Co}^{2.5+}\text{O}_3$  という特徴的な電荷分布を持つ。100 K で金属絶縁体転移が起こることから、低温では  $2\text{Co}^{2.5+} \rightarrow \text{Co}^{2+} + \text{Co}^{3+}$  の電荷秩序が起きていると予測されたが、これまで結晶学的に捉えることができなかった。今年度、NMR 測定によって、この電荷秩序を確認した。論文を急いでいる。

## ② 強磁性強誘電体の磁化反転検出

前年度夏に UC Berkeley と Northeastern 大で行った、直径 190nm の  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  ナノドットのダイヤモンド NV イメージングの画像解析をさらに進めた。その結果、電気分極は湧き出し、または吸い込みのトポロジカルドメイン構造を形成しており、面直方向のポーリングを行ったにもかかわらず、面内の分極も反転する  $180^\circ$  スwitchングが起きていて、それに伴い面外磁化も反転していることが明らかとなった。この結果は現在論文投稿中である。

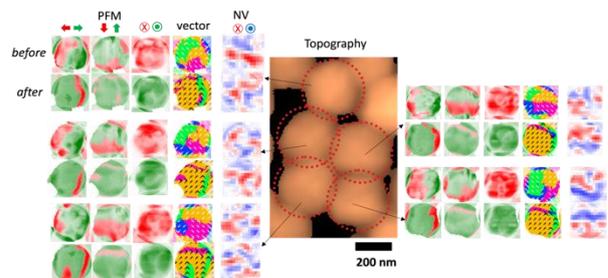


図 5 :  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  ナノドットの分極前後での圧電応答顕微鏡 (PFM) 像とダイヤモンド NV センター磁気像

上記の結果を受けて、リング状の電極を用いた面内電場印加で180°スイッチングを起こした場合には磁化反転が起こるのでは、と考え、実験を行った。

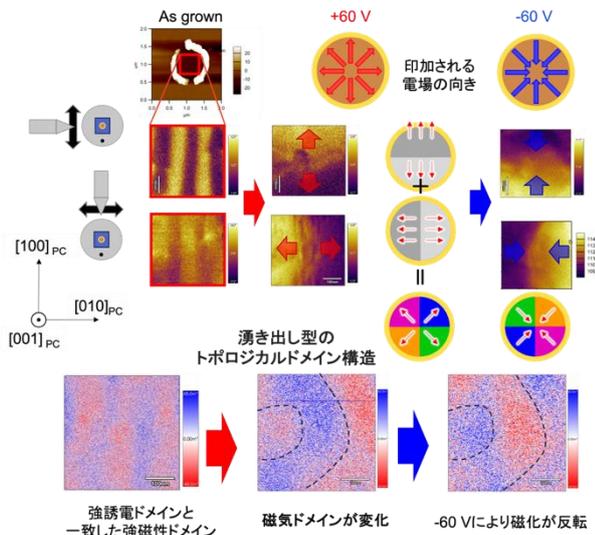


図6：リング電極を用いた面内電場印加磁化反転

BFCO/GdScO<sub>3</sub> (110)薄膜上に金をスパッタし、AFMのチップを中心から外側へ、円を描きながらスキャンすることで金を削り取り、リング状電極を作製した。As grownでは、GdScO<sub>3</sub>表面の単斜晶歪みに由来するストライプ状の強誘電ドメインがPFMによって確認された。円の中心にPFMのカンチレバーを置き、そこから外周のリング状電極に向かって+60Vの電場を印加したところ、狙い通り湧き出し型のトポロジカルドメイン構造に変化した。さらに電場を反転したところ、吸い込み型のトポロジカルドメイン構造への変化が観測され、分極の面内成分が反転したことが確認された。これに伴い、MFM像もAs grownのストライプ状から+60Vで円形に変化、さらに-60Vでコントラストの反転が観測され、面内電場印加による磁化反転の確認に成功した。この結果を受けて、リング状電極を利用した磁気メモリデバイスの特許を申請した。

ダイヤモンドNVイメージングに用いたナノドットは、陽極酸化アルミナ(AAO)のマスクを用いてパルスレーザー蒸着法で作製した物である。情報担体に用いるシングルドメイン化のためにはドット系を100nm以下にする必要があるが、厚さのあるAAOは詰まりやすく、ドット径を小さくすると高さが10nm程度と低くなり、分極反転状態を保てないという大きな問題があった。電子技術部で開発された、基板にスピコートした水素シラセスキオキサン(HSQ)に電子線描画を施すことでマスクを形成する手法を適用し、良好なBFCOドットを得られるようになった。直径200nmのドットではAAOマスクと同様のマルチドメイン構造を、100nmのドットでも高さ30nmを確保、シングルドメインであることを確認し、分極反転状態の保持にも成功した。

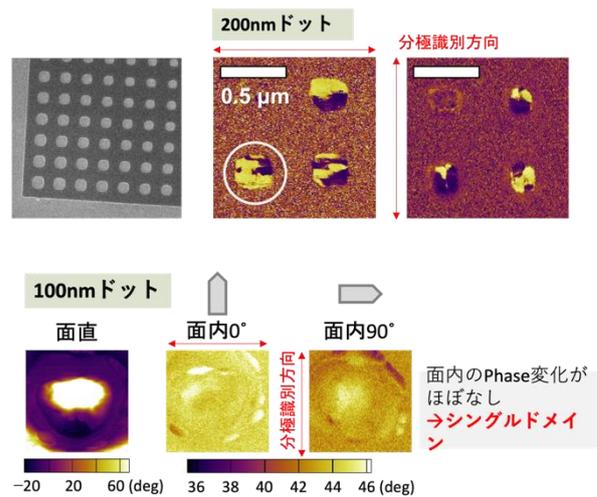


図7：Nb-STO基板上に作成したHSQマスク(左上)、200nm(右上)と100nm(下)のBiFe<sub>0.9</sub>Co<sub>0.1</sub>O<sub>3</sub>ナノドットのPFM像

メモリデバイスとしての応用を考えた場合、SrTiO<sub>3</sub>やGdScO<sub>3</sub>等の酸化物基板ではなく、Si上へのBFCOの成膜が必須である。市販されているSrRuO<sub>3</sub>/Pt/ZrO<sub>2</sub>/Si(001)基板上へのBFCOの成膜条件を確立し、強誘電性とコリニアスピン構造による弱強磁性の共存を確認、住友化学から特許出願を行った。

### 3. 今後の展望

BiへのCa置換とFeへの4価元素置換を併用することで、BiFeO<sub>3</sub>の強誘電転移温度を劇的に低下させ、負熱膨張物質化することに成功した。母物質のBiFeO<sub>3</sub>は常圧下で合成できるので、水熱合成などのマイルドな条件で元素置換を施すことで、普及グレードの負熱膨張材料になると期待できる。日本材料技研も興味を持っているため、早期に実現したい。

ナノドットへの面外方向の電場印加によって、180度の分極反転が起こることにヒントを得て、リング型電極を用いた面内方向の電場印加で、分極反転と磁化反転を起こすことに成功した。今後は磁気センサーによる磁化反転の検出を行い、メモリデバイスとしての動作検証を急ぎたい。

# 機械学習を用いた

## 多元素置換 $\text{BiNi}_{1-x}\text{M}_x\text{O}_3$ の負熱膨張特性の最適化

次世代半導体用エコマテリアル 東グループ  
西久保 匠

### 1. はじめに

航空宇宙分野など温度幅の広い環境下で用いられる材料や、半導体製造など小さな変位でも致命的となるような分野では、熱膨張による位置決めずれや、異種接合界面の剥離が大きな問題となる。そのため、熱膨張を制御する技術が求められており、多くの研究がなされている。この熱膨張抑制技術の一つとして、負熱膨張物質の利用がある。構造材料と混合することで熱膨張の抑制・制御ができる負熱膨張材料は様々な産業分野での応用が期待されている<sup>1</sup>。負熱膨張という物性は実は身近なものである。例えば、水の固相である氷が水面に浮くことは、液相よりも固相の密度が低く、固相から液相に相転移する際に負熱膨張を伴うことを表している。物質設計としてはここ数十年で活発に行われており、多くの負熱膨張材料が報告されている。既に応用されている負熱膨張物質としては、ガラスの熱膨張を補償している $\beta$ -ユークリプタイトなどが挙げられるが、その負の熱膨張係数の絶対値は樹脂や金属の熱膨張を補填するには小さすぎる<sup>2</sup>。これまで報告されてきた負熱膨張材料の期限は、強誘電体から常誘電体への転移、金属間電荷移動、磁気体積効果、軌道秩序転移、フレキシブルネットワークなど、多種多様である<sup>3-7</sup>。中でも近年注目されているのは、相転移による大きな体積変化を利用した材料であり、代表的なものに、巨大負熱膨張材料  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  がある。その母物質である  $\text{BiNiO}_3$  は 6 GPa の高圧力下で合成されるペロブスカイト型化合物で、常圧で  $\text{Bi}^{3+}_{0.5}\text{Bi}^{5+}_{0.5}\text{Ni}^{2+}\text{O}_3$  という特徴的な電荷分布を持ち、 $\text{Bi}^{3+}$  と  $\text{Bi}^{5+}$  が柱状に秩序した 2 つの Bi サイトが存在する三斜晶 ( $P-1$ ) をとる<sup>8</sup>。およそ 3 GPa 以上の圧力印加により  $\text{Bi}^{5+}$  と  $\text{Ni}^{2+}$  の間で電荷移動が起き、 $\text{Bi}^{3+}\text{Ni}^{3+}\text{O}_3$  の価数状態へと変化し、 $\text{Bi}^{3+}$  と  $\text{Bi}^{5+}$  の電荷秩序が融けることで Bi サイトが 1 つの斜方晶 ( $Pbnm$ ) への構造相転移を伴う。さらに、Ni が 2+ から 3+ となることで、ペロブスカイト構造の骨格をなす  $\text{NiO}_6$  八面体が収縮し、およそ 3% もの巨大な体積の収縮が起きる。Bi の一部を 3 価のランタノイド<sup>9</sup>、または Ni の一部を  $\text{Fe}^{3+}$  で置換すると<sup>10,11</sup>、 $\text{Bi}^{3+}\text{Ni}^{3+}\text{O}_3$  の価数状態が安定化されるため、昇温によって Bi-Ni 間電荷移動が生じるようになる。この体積収縮を伴う三斜晶から斜方晶への相転移が、温度によって相分率を変えながら、なだらかに起きるため、両相の分率の重みを付けた平均格子体積が連続的に収縮する負熱膨張が発現する。 $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  の負熱

膨張は  $x = 0.15$  で線熱膨張係数にして  $\alpha_L = -187$  ppm/K と前述の  $\beta$ -ユークリプタイトの  $\alpha_L = -3$  ppm/K と比較して非常に大きく、また  $x$  を変化させることで動作温度域を変化させることが可能であることから、様々な応用が期待される物質である。実際、この物質は日本材料技研(株)により試験販売が開始されている。しかし、転移温度幅が 30 K 程度と動作温度が狭い点や  $x > 0.25$  で  $\text{BiFeO}_3$  由来の菱面体晶相が出現し、低温側への動作温度制御ができないことが広い分野への応用への問題となっている<sup>11</sup>。そこで本研究では複数元素置換によってその解決を試みた。

複数の元素を置換することで 1 次元であった組成探索の空間は 2 次元以上に爆発的に広がるため、人力での探索は困難である。そのため、機械学習の手法であるベイズ最適化を用いて、組成の提案を行い、提案された組成を合成・評価を行うサイクルを繰り返した。

### 2. 実験手法

#### (1) 試料の合成と評価

$\text{Bi}_2\text{O}_3$ 、金属 Ni と置換元素種となる  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、金属 Ti、 $\text{V}_2\text{O}_5$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Nb}_2\text{O}_5$  を化学両論比で秤量し、濃硝酸に投入した。溶液を 373 K で十分に攪拌後、973 K で 12 時間加熱することで蒸発乾固させた。このようにして得られた前駆体に 20 wt% の  $\text{KClO}_4$  を酸化剤として混合した後に、Au カプセルに封入し高压セルに導入、キュービックアンビル型高压装置を用いて 6 GPa 1273 K で 30 分間高压高温処理をした。得られた試料は残存する KCl を除去するために水洗しよく粉碎した。その後、SPRing-8 の BL13XU での放射光 X 線回折 ( $E \sim 33$  または 35 keV) により 5 K/min の昇降温過程での回折パターンを 2 K ステップで得た。放射光 X 線回折パターンは TOPAS により連続的にリートベルト解析を行い、算出された相分率・格子定数から各温度での平均格子体積を求め、負熱膨張特性を評価した。

#### (2) ベイズ最適化

置換元素の d 電子数、電子親和力、電気陰性度、最外殻 s, p, d 電子数、原子半径を記述子として、動作温度幅が広がるように最適化を行なった。初期データセットとして

15 組成を合成・評価を行い、その動作温度幅を予測された組成の合成を行い、特性評価を行なった後、そのデータを追加して再度最適化を行うサイクルを 5 回繰り返した。なお、3 サイクル目からは動作温度幅のほか、動作温度の中心が 300 K に近づくようにしている。

### 3. 結果と考察

#### (1) 初期データセットとなる組成の合成

今回、置換元素として Al, Sc, Ti, V, Mn, Fe, Co, Cu, Nb の 9 元素を選択した。まず初めに 6 元素を 2% ずつ置換した  $\text{BiNi}_{0.88}\text{Al}_{0.02}\text{V}_{0.02}\text{Mn}_{0.02}\text{Fe}_{0.02}\text{Co}_{0.02}\text{Cu}_{0.02}\text{O}_3$  を合成し、評価したところ 130 K の温度幅を持つ負熱膨張を実現した (図 1)。この組成から V を Sc, Ti, Nb のそれぞれにリプレイスしたもの、1 元素ずつ抜いたもの、V とさらに 1 元素を抜いたものの 14 組成を合成・評価し、元の組成と合わせて 15 組成を初期データセットとした。初期データセットとなる組成の負熱膨張動作温度幅を図 2 に示す。

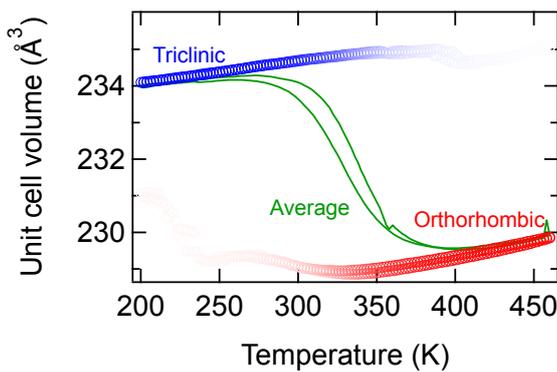


図 1 SXR D パターンのリートベルト解析から算出した  $\text{BiNi}_{0.88}\text{Al}_{0.02}\text{V}_{0.02}\text{Mn}_{0.02}\text{Fe}_{0.02}\text{Co}_{0.02}\text{Cu}_{0.02}\text{O}_3$  の負熱膨張挙動

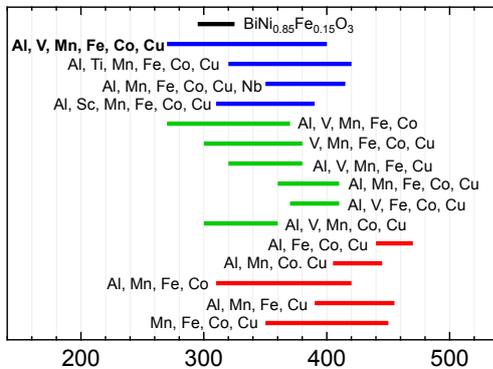


図 2 Temperat合成した初期データセットとなる組成のure (K) 負熱膨張温度幅。置換元素は全て 0.02 置換である。比較として  $\text{BiNi}_{0.9}\text{Fe}_{0.1}\text{O}_3$  のものを最上部に載せている。

#### (2) ベイズ最適化による動作温度の拡大

9 種の元素の組成を振るため、探索空間が膨大である一方で初期のデータセットは 15 種類と少ない。そのため、1 回目と 2 回目の最適化サイクルは置換量を 0.02 に固定して組成提案を行い、合成・評価を行なった。その結果を図 3 に示す。1 サイクル目 2 サイクル目ともに全ての組成において、負熱膨張を確認できた。1 サイクル目の  $\text{BiNi}_{0.94}\text{Ti}_{0.02}\text{Cu}_{0.02}\text{Nb}_{0.02}\text{O}_3$ 、及び 2 サイクル目の  $\text{BiNi}_{0.94}\text{Al}_{0.02}\text{Ti}_{0.02}\text{Co}_{0.02}\text{Cu}_{0.02}\text{Nb}_{0.02}\text{O}_3$ 、 $\text{BiNi}_{0.96}\text{Ti}_{0.02}\text{Co}_{0.02}\text{O}_3$ 、 $\text{BiNi}_{0.9}\text{Al}_{0.02}\text{Sc}_{0.02}\text{Fe}_{0.02}\text{Cu}_{0.02}\text{Nb}_{0.02}\text{O}_3$  は分解が想定される 470 K までに相転移が完了しなかった。 $\text{BiNi}_{0.96}\text{Ti}_{0.02}\text{Co}_{0.02}\text{O}_3$  については 470K までで滑らかに構造相転移が起っていたため、温度範囲を広げて測定を行っている。1 サイクル目に提案された組成の平均動作温度幅は 77.8K、最高の動作温度幅は 115K であり、2 サイクル目では平均動作温度幅は 92.5K、最高の動作温度幅は 120K であった。ここでは初期データセット最高動作温度幅である 130 K を超えることはできなかった。

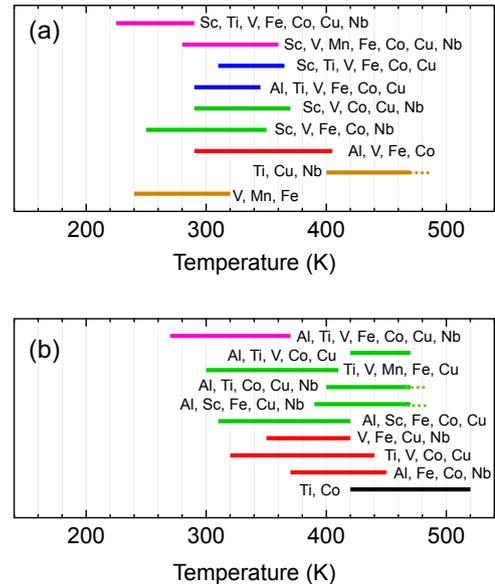


図 3 1 サイクル目 (a) と 2 サイクル目 (b) で合成したサンプルの負熱膨張動作温度域。置換元素は全て 0.02 置換である。破線は相転移を完了していないことを示す。

そこで 3 サイクル目以降では置換量を 0.02 のみならず 0.01-0.05 の間の値を取るよう組成を探索した (図 4)。また、相転移が完了しない組成を外すために動作温度の中心が 300 K に近づくようにしている。今回の提案では、測定温度範囲の 470K までにすべての組成で構造相転移が完了し、ベイズ最適化の条件追加による負熱膨張の動作温度幅の低温化を達成することに成功したことがわかる。3 サイクル目に提案された組成の平均動作温度幅は 110K、最高の動作温度幅は 150K となり、先行研究の 130K を超えることに初めて成功した。また、150K の動作温度幅を持

つ  $\text{BiNi}_{0.87}\text{Al}_{0.02}\text{Ti}_{0.02}\text{Mn}_{0.03}\text{Fe}_{0.03}\text{Co}_{0.01}\text{Cu}_{0.01}\text{Nb}_{0.01}\text{O}_3$  は応用上問題となる V を含まない組成であること、負熱膨張の開始温度を 250K であることから、今後の負熱膨張材料としての様々なニーズに応えることができると考える。4 サイクル目では V を含む組成は提案されず、平均の動作温度幅は 111.4K、最高の動作温度幅は 150K で、3 サイクル目の最高の動作温度幅を持つ組成と同じ結果になった。3 サイクル目に提案された組成については負熱膨張の開始温度が 250K と低温であったのに対し、今回の組成では比較的高温側で負熱膨張を示した。 $\text{BiNi}_{0.82}\text{Al}_{0.02}\text{Ti}_{0.02}\text{Mn}_{0.03}\text{Fe}_{0.03}\text{Co}_{0.02}\text{Cu}_{0.03}\text{Nb}_{0.03}\text{O}_3$ 、 $\text{BiNi}_{0.85}\text{Al}_{0.02}\text{Ti}_{0.01}\text{Mn}_{0.03}\text{Fe}_{0.03}\text{Co}_{0.01}\text{Cu}_{0.02}\text{Nb}_{0.03}\text{O}_3$  について、負熱膨張の開始温度及び、動作温度幅が同じ結果となった。この 2 組成の違いは Ti, Co, Cu それぞれ 1% が追加されているかの違いである。この 3 元素については負熱膨張の動作温度幅の拡大には寄与していないことが示唆された。これは、150K の動作温度幅を持つ  $\text{BiNi}_{0.9}\text{Al}_{0.02}\text{Sc}_{0.01}\text{Mn}_{0.03}\text{Fe}_{0.03}\text{Nb}_{0.01}\text{O}_3$  に、以上の 3 元素が含

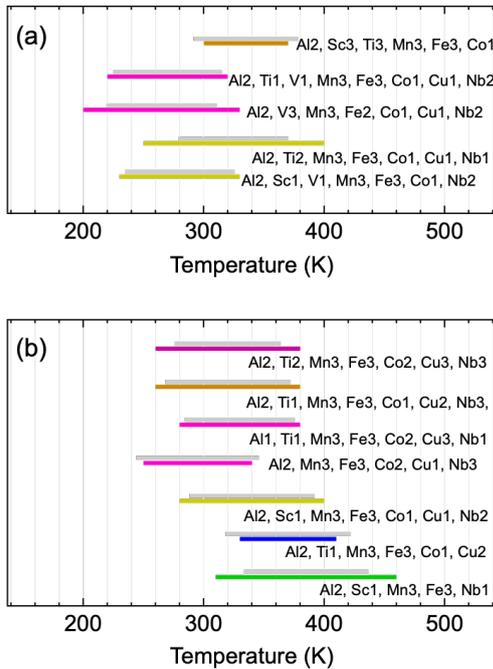


図 4 3 サイクル目 (a) と 4 サイクル目 (b) で合成したサンプルの負熱膨張動作温度域。置換元素の横の数字は置換量 (%) である。灰色に示すのは予測された温度幅を実測の温度幅の midpoint と合わせてプロットしたものである。

まれていないことから考えられる。

5 サイクル目は V を含む最適化と含まない最適化の 2 種類を行なった (図 5)。V を含む提案では、平均動作温度幅は 128.6K であり、平均の動作温度幅でも初期データセットの最大値 130 K に近い値まで動作温度幅を拡大することに成功した。また、最高の動作温度幅を持つ組成は動作温度幅が 170K を示し、130 K を大幅に超える組成が見つかった。また、170K を示した 2 組成

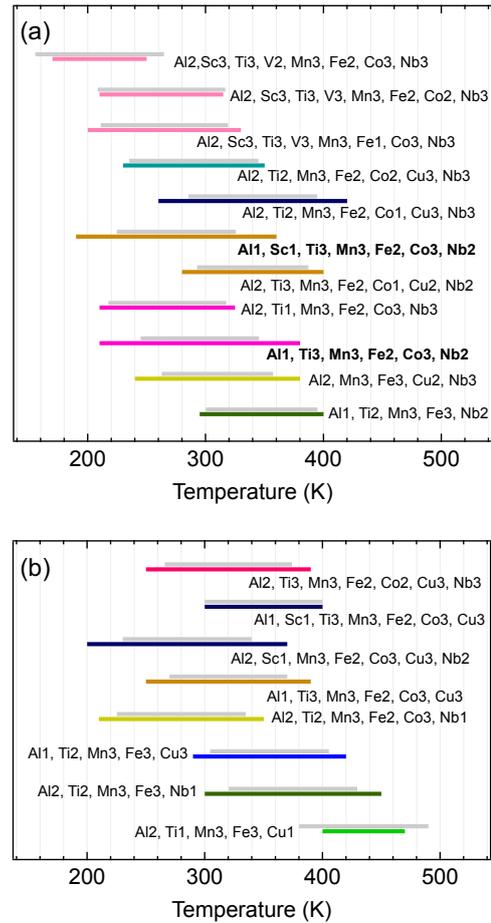


図 5 5 サイクル目で合成したサンプルの負熱膨張動作温度域。灰色に示すのは予測された温度幅を実測の温度幅の midpoint と合わせてプロットしたものである。置換元素の横の数字は置換量 (%) である。(a) は V を含んだ提案、(b) は V をのぞいた提案で示された組成である。

( $\text{BiNi}_{0.85}\text{Al}_{0.01}\text{Sc}_{0.01}\text{Ti}_{0.03}\text{Mn}_{0.03}\text{Fe}_{0.02}\text{Co}_{0.03}\text{Nb}_{0.02}\text{O}_3$ ,  $\text{BiNi}_{0.86}\text{Al}_{0.01}\text{Ti}_{0.03}\text{Mn}_{0.03}\text{Fe}_{0.02}\text{Co}_{0.03}\text{Nb}_{0.02}\text{O}_3$ ) の違いは Sc が含まれているかいないかであり、Sc が含まれている組成のほうがより低温側で負熱膨張が開始している。このことから、Sc は少量置換することで、動作温度幅を変えずに開始温度を低温側にシフトさせることができる。このことは、他の Sc が含まれている組成の開始温度が 200K 程度と低いことから考えられる。V を含まない提案では、 $\text{BiNi}_{0.9}\text{Al}_{0.02}\text{Ti}_{0.01}\text{Mn}_{0.03}\text{Fe}_{0.03}\text{Cu}_{0.01}\text{O}_3$  で構造相転移が完了しなかった。本サイクルでの平均動作温度幅は 138.6K であり、平均の動作温度幅でも先行研究の結果である 130K を超えることに成功した。置換する元素を限定し探索空間が狭くなるため、負熱膨張の動作温度幅は縮小すると考えられるが、予想に反して拡大する結果となった。これまでの組成提案サイクルで、これはサイクル数を重ねるごとに V が含まれる組成が提案される回数は減っていたことから、V 排除の動作温度幅への効果は限定的であったと考えら

れる。図6に最大温度幅となった組成の負熱膨張特性を示す。元の負熱膨張  $\text{BiNi}_{0.9}\text{Fe}_{0.1}\text{O}_3$  と比較して非常に広域で負熱膨張を示すことが見て取れる。

最後にサイクル数に対する平均の負熱膨張動作温度幅及び、最高の動作温度幅を図7に示す。サイクル数を重ねるごとに平均動作温度幅、最高動作温度幅ともに上昇する結果が得られた。1サイクル目では平均の動作温度幅が77.8 K、最高の動作温度幅が115 Kであったが、5サイクル目（元素を限定しない組成提案）では平均の動作温度幅が128.6 K、最高の動作温度幅が170 Kと、非常に幅広い動作温度幅を持つ組成を発見した。

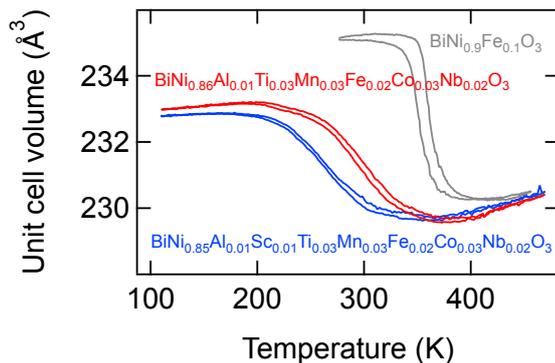


図6 最大動作温度幅を持つ2組成の負熱膨張特性。比較として  $\text{BiNi}_{0.9}\text{Fe}_{0.1}\text{O}_3$  のものも示している。

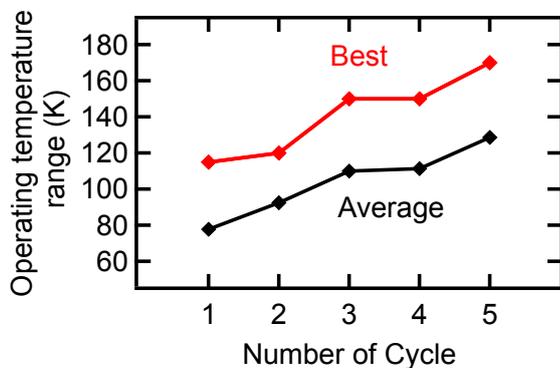


図7 サイクル数に対する平均動作温度幅および最高動作温度幅

### 3. 結論と今後の展望

本研究によって  $\text{BiNiO}_3$  系負熱膨張物質の問題であった狭い動作温度幅を解決することができた。機械学習を利用することで今まで見つけることのできなかつた最適な置換・組成を発見し、さまざまなニーズに対応できる材料を合成することができた。機械学習を用いることでそのニーズに合うような組成を設計することが可能であると示され、今後の特性のチューニングの指針となった。

### 【参考文献】

1. Takenaka, K. Negative Thermal Expansion Materials: Technological Key for Control of Thermal Expansion. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2012, 13 (1), 013001.
2. Schulz, H. Thermal Expansion of Beta Eucryptite. *J. Am. Ceram. Soc.* 1974, 57 (7), 313–318.
3. Azuma, M.; Chen, W.; Seki, H.; Czapski, M.; Olga, S.; Oka, K.; Mizumaki, M.; Watanuki, T.; Ishimatsu, N.; Kawamura, N. Colossal Negative Thermal Expansion in  $\text{BiNiO}_3$  Induced by Intermetallic Charge Transfer. *Nat. Commun.* 2011, 2, 347.
4. Takenaka, K.; Takagi, H. Giant Negative Thermal Expansion in Ge-Doped Anti-Perovskite Manganese Nitrides. *Appl. Phys. Lett.* 2005, 87 (26), 261902.
5. Long, Y. W.; Hayashi, N.; Saito, T.; Azuma, M.; Muranaka, S.; Shimakawa, Y. Temperature-Induced A–B Intersite Charge Transfer in an A-Site-Ordered  $\text{LaCu}_3\text{Fe}_4\text{O}_{12}$  Perovskite. *Nature* 2009, 458, 60.
6. Greve, B. K.; Martin, K. L.; Lee, P. L.; Chupas, P. J.; Chapman, K. W.; Wilkinson, A. P. Pronounced Negative Thermal Expansion from a Simple Structure: Cubic  $\text{ScF}_3$ . *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 15496–15498.
7. Takenaka, K.; Okamoto, Y.; Shinoda, T.; Katayama, N.; Sakai, Y. Colossal Negative Thermal Expansion in Reduced Layered Ruthenate. *Nat. Commun.* 2017, 8, 14102.
8. Ishiwata, S.; Azuma, M.; Takano, M.; Nishibori, E.; Takata, M.; Sakata, M.; Kato, K. High Pressure Synthesis, Crystal Structure and Physical Properties of a New Ni (II) Perovskite  $\text{BiNiO}_3$ . *J. Mater. Chem.* 2002, 12, 3733–3737.
9. Oka, K.; Mizumaki, M.; Sakaguchi, C.; Sinclair, A.; Ritter, C.; Attfield, J. P.; Azuma, M. Intermetallic Charge-Transfer Transition in  $\text{Bi}_{1-x}\text{La}_x\text{NiO}_3$  as the Origin of the Colossal Negative Thermal Expansion. *Phys. Rev. B* 2013, 88, 014112.
10. Nabetani, K.; Muramatsu, Y.; Oka, K.; Nakano, K.; Hojo, H.; Mizumaki, M.; Agui, A.; Higo, Y.; Hayashi, N.; Takano, M.; Azuma, M. Suppression of Temperature Hysteresis in Negative Thermal Expansion Compound  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  and Zero-Thermal Expansion Composite. *Appl. Phys. Lett.* 2015, 106, 061912.
11. Nishikubo, T.; Sakai, Y.; Oka, K.; Watanuki, T.; Machida, A.; Mizumaki, M.; Maebayashi, K.; Imai, T.; Ogata, T.; Yokoyama, K.; Okimoto, Y.; Koshihara, S.; Hojo, H.; Mizokawa, T.; Azuma, M. Enhanced Negative Thermal Expansion Induced by Simultaneous Charge Transfer and Polar–Nonpolar Transitions. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 19397–19403.

# Tailoring Negative and Directional Thermal Expansion in $K_2NiF_4$ Structured Materials

次世代半導体用エコマテリアル 東グループ  
Hena Das (ヘナダス)

## 1. Introduction

While most materials expand when heated, certain functional materials display the rare phenomenon of negative thermal expansion (NTE), contracting instead over specific temperature ranges. This unique behavior is vital for mitigating thermal stress in electronics and optics by enabling composite designs with tailored thermal responses [1]. Among various families, layered and quasi-2D systems like the Ruddlesden-Popper (RP) series have drawn special interest due to their structural and chemical flexibilities.  $Ca_2RuO_4$ , a notable  $K_2NiF_4$ -structured material, exemplifies this with its strong uniaxial NTE linked to a metal-to-insulator transition (MIT) near 357 K [2,3], driven by complex lattice distortions and phase transitions. In its insulating phase, it shows colossal positive and negative thermal expansions along the crystallographic **c** and **b** axes, respectively, in a sintered body achieving record volumetric NTE (6.7 %) around room temperature for lead-free RP perovskites [2]. To the best of our knowledge, this represents the strongest volumetric NTE around room temperature reported to date among both the Ruddlesden-Popper (RP) perovskite family [3-7] and lead-free materials. These effects stem from the interplay of structural anisotropy, microstructural voids, and the cooperative motion of  $RuO_6$  octahedra.

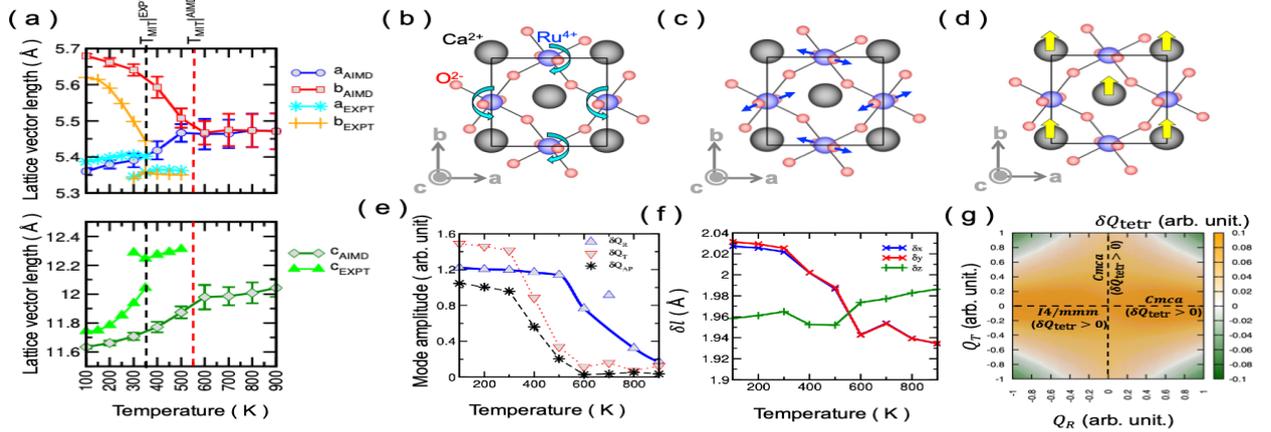
Despite extensive experimental insights, the microscopic origin of NTE in  $Ca_2RuO_4$  remains unclear, particularly the role of anharmonic lattice dynamics and octahedral distortions near the MIT. Conventional quasi-harmonic models fall short for such strongly anharmonic systems. To address this, we employ molecular dynamics (MD) [8-10] combined with an anharmonic model [11-13] and Grüneisen theory [14-15] to capture finite-

temperature lattice dynamics and mode evolution. By tracking temperature-dependent phonon properties and octahedral distortions, we reveal how cooperative lattice modes drive directional NTE and phase transitions. This approach highlights the crucial link between lattice anharmonicity and correlated electronic behavior, providing a pathway for tailoring negative and directional thermal expansion in  $K_2NiF_4$ -type oxides for advanced thermal management and tunable quantum phases.

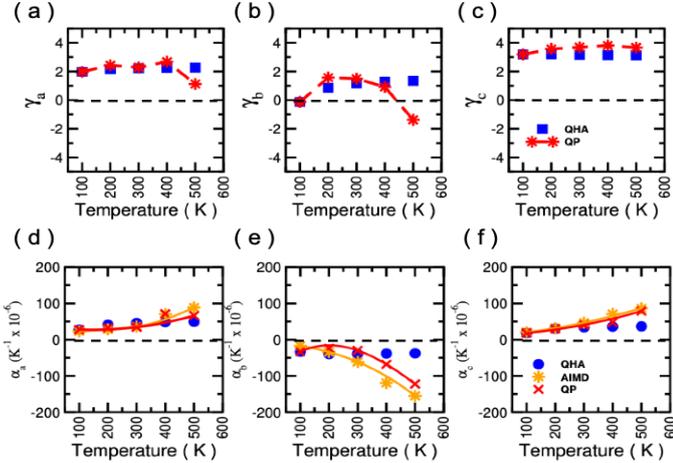
## 2. Results and Discussions

### 2.1 $Ca_2RuO_4$ : Uniaxial NTE studied using MD simulations

Although the ab-initio molecular dynamics (AIMD) simulations based on the GGA+U method and excluding Spin-Orbit Coupling (SOC) overestimate the phase transition temperature, they successfully reproduce several key features of the temperature-driven structural transition, nature of thermal expansion and electronic phase transitions in  $Ca_2RuO_4$ , as summarized in Fig. 1. Key observations are the following: the results show a first-order structural anomaly between 500 - 600 K, as shown in Fig. 1a. Notably, this transition is symmetry-preserving, meaning the space group symmetry remains unchanged to *Pbca* across the transition, consistent with experimental observations [2-3]. The system exhibits a discontinuous change in the lattice parameters, MIT and the coefficient of thermal expansion (CTE) capturing the uniaxial NTE along the crystallographic b-axis (i.e.  $\alpha_b < 0$ ) below the phase transition. Above the phase transition, thermal expansion in the ab-plane is negligible, while it is positive along the c-axis.



**Figure 2** (a) Temperature-dependent evolution of lattice parameters obtained from AIMD simulations and experiments (Ref. 3). The upper and lower panel illustrate the modulation of the in-plane (ab-plane) and out-of-plane (c-axis) lattice vector lengths, respectively, with increasing temperature. Experimentally and AIMD determined phase transition temperatures are denoted as  $T_{\text{MIT}}^{\text{EXPT}}$  and  $T_{\text{MIT}}^{\text{AIMD}}$ , respectively. (b) – (d) Distortion patterns of the normal modes that stabilize the Pbc<sub>a</sub> phase. RuO<sub>6</sub> octahedral rotation ( $Q_R$  around c-axis) and tilt ( $Q_T$  anti-phase rotation around ab-axis) distortions transform according to the irreducible representations (IRs)  $X_2^+$  and  $X_3^+$  of the  $I4/mmm$  phase, respectively. The anti-polar distortion of Ca<sup>2+</sup> ions along b-axis ( $Q_{\text{AP}}$  associated with  $M_2^+$ ) is indicated by yellow arrows. (e) Variation of the amplitude of the primary modes,  $Q_R$ ,  $Q_T$  and anti-polar movement of Ca<sup>2+</sup> ions, obtained from the AIMD run. (f) shows how the Ru – O bond lengths fluctuate with temperature along octahedral local x, y and z axes. (g) Variation of  $\delta Q_{\text{tetr}} = \frac{1}{\sqrt{6}}(2\delta z - \delta x - \delta y)$  (where  $\delta x$ ,  $\delta y$  and  $\delta z$  denote Ru-O bond-lengths along the x, y and z-directions, respectively) as a function of  $Q_R$  and  $Q_T$ .



**Figure 1** (a) – (c), calculated macroscopic Grüneisen parameters corresponding to the deformation which arises from the strain applied along the a-, b- and c- axes, using QHA and MD simulations. We used harmonic phonon calculations and the normal-mode-decomposition technique to characterize phonon quasiparticles and compute anharmonic free energy and the temperature-dependent macroscopic Grüneisen parameters. (d) – (f) subsequently, the calculated coefficient of thermal expansion (CTE) over  $0 \leq T \leq 500$  K, using three techniques.

At low temperature, RuO<sub>6</sub> octahedra exhibit cooperative tetragonal distortions ( $Q_{\text{tetr}}$ ), significant rotation ( $Q_R$ ) and tilting ( $Q_T$ ), as illustrated in Fig. 1b-c. Ca<sup>2+</sup> ions are positioned between the RuO<sub>6</sub> layers and exhibit anti-polar distortions ( $Q_{\text{AP}}$ , see Fig. 1d). Above 300 K, AIMD simulations reveal a significant reduction in tilt distortion (see Fig. 1e) in Ca<sub>2</sub>RuO<sub>4</sub>, indicating that thermal fluctuations begin to suppress the tilt modes and anti-polar Ca displacements along the **b**-axis. Interestingly, the octahedral rotations remain robust and nearly constant up to 500 K, highlighting their greater energetic favorability compared to tilt modes, though they too begin to relax at higher temperatures. A notable structural signature is the inversion of the tetragonal distortion ( $\delta Q_{\text{tetr}}$ ) near 550 K (Fig. 1f), reflecting a reordering of orbital energies driven by local bond reconfigurations. GGA+U calculations demonstrate that this sign change arises not from tilt or rotation alone but from their nonlinear coupling (see Fig. 1g), which governs both anti-polar Ca shifts and orbital rearrangement. This coupling mechanism is crucial for stabilizing the low temperature insulating phase and offers a route to tune the metal–insulator transition by

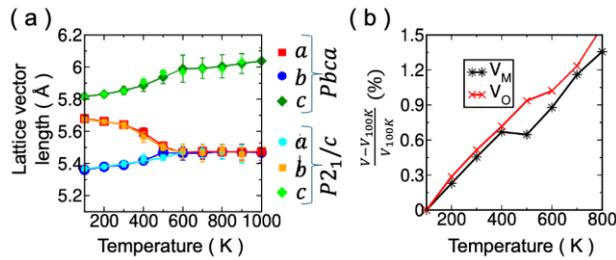
controlling  $Q_R$  and  $Q_T$  through strain, doping, or pressure.

## 2.2 Ca<sub>2</sub>RuO<sub>4</sub>: Temperature-dependent phonon renormalization and its effect on thermal expansion

By employing the normal-mode decomposition technique [13], we computed phonon quasi-particle (QP) frequencies and subsequently derived the temperature-dependent macroscopic Grüneisen parameters and CTEs, following equation given below,

$$\alpha_l = \frac{C_V}{V_0} \sum_k S_{kl} \gamma_k, \quad (l, k = 1, 2, 3) \quad (1)$$

Where,  $\gamma_k$  represents macroscopic Grüneisen parameters corresponding to the deformation which arises from the strain applied along the **a**-, **b**- and **c**- axes, i.e.  $\gamma_1 = \gamma_a$ ,  $\gamma_2 = \gamma_b$  and  $\gamma_3 = \gamma_c$ .  $V_0$  denotes the volume of the primitive cell,  $C_V$  denotes specific heat and  $S$  represents compliance tensor. Figure 2 shows a comparative analysis between the results obtained from Quasi harmonic approximation (QHA) and the normal-mode decomposition technique which considers the temperature evolution of phonon frequencies. Even though QHA also exhibit NTE along **b**-axis, due to the presence of strong negative off-diagonal components in the compliance tensor  $S$  (as shown in Table 1), as was observed in other RP oxides [16-17],



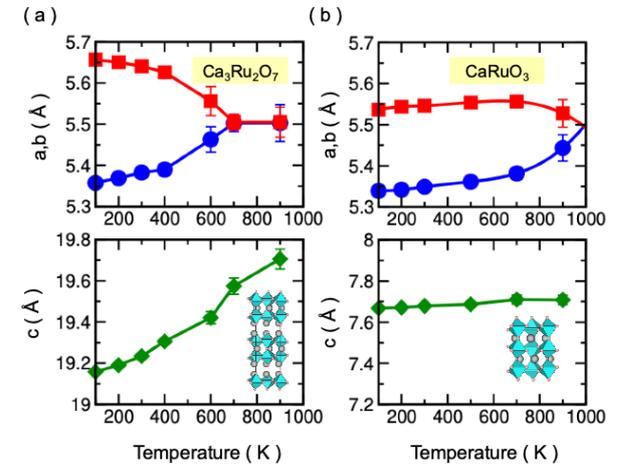
**Figure 3** (a) Temperature-dependent evolution of lattice parameters obtained from MD simulations for the orthorhombic (O) and the monoclinic (M) phase. (b) Temperature-dependent evolution of volume.

the inclusion of temperature dependence of phonon frequencies shows better agreement with MD results. A key outcome of this analysis is the strong temperature dependence of the Grüneisen parameter along the **b**-axis. While values remain positive at lower temperatures, a noticeable decrease sets in above 300 K,

eventually reaching strongly negative values as the system approaches the structural and electronic phase transition temperature. This behavior indicates a dominant contribution of anharmonic phonons along the **b**-axis. In contrast, the Grüneisen parameters along the **a**- and **c**-axes remain relatively

$S_{ii}$ ( $10^{-3}$ GPa $^{-1}$ )			$S_{ij}$ ( $10^{-3}$ GPa $^{-1}$ )		
$S_{11}$	$S_{22}$	$S_{33}$	$S_{12}$	$S_{13}$	$S_{23}$
16.9	14.5	7.1	-10.0	-2.9	-2.7

**Table 1** The components of the compliance tensor  $S$  contributing to thermal expansion were calculated for the orthorhombic  $Pbca$  phase, as listed here.



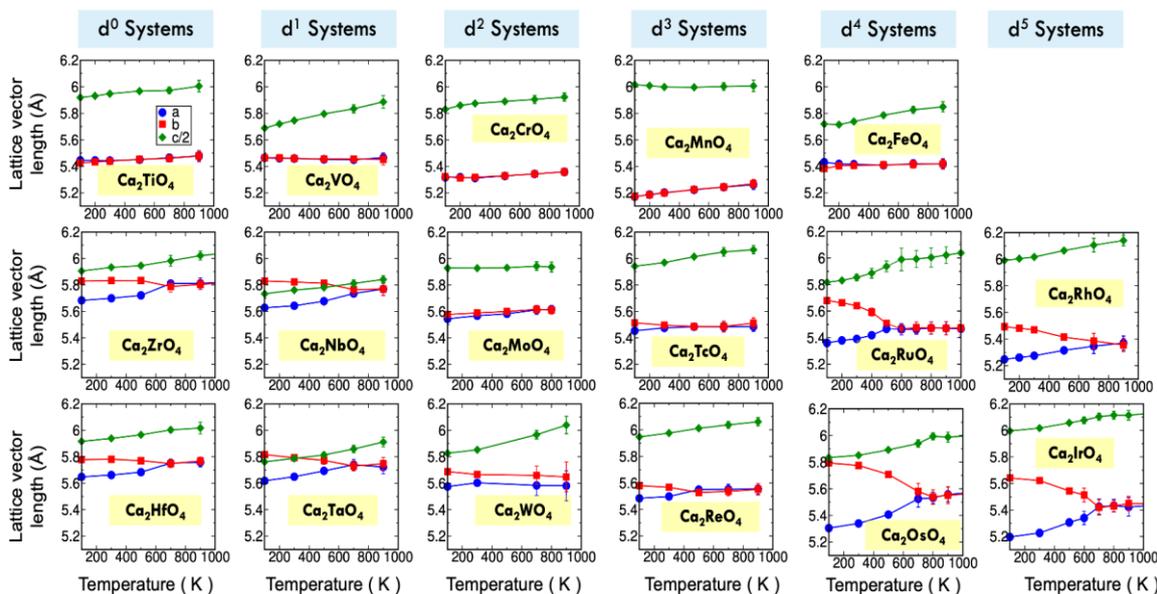
**Figure 4** Temperature-dependent evolution of lattice parameters obtained from MD simulations for the polar Ca<sub>3</sub>Ru<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (a) and non-polar CaRuO<sub>3</sub> (b) systems.

unchanged with respect to their QHA counterparts. We identified several Raman-active modes, having  $B_{1g}$ ,  $B_{2g}$  and  $B_{3g}$  symmetries, show strong negative contributions. Although octahedral tilt distortions contribute significantly to the observed NTE, the behavior cannot be strictly categorized under rigid unit modes (RUMs), as the octahedral units themselves undergo shape changes rather than remaining rigid. Additionally, anti-polar distortions play a crucial role in the thermal response, indicating that both octahedral distortions and anti-polar displacements must be considered together. This highlights the complex interplay between different structural distortions in driving NTE behavior.

## 2.3 Ca<sub>2</sub>RuO<sub>4</sub>: Monoclinic phase

A monoclinic phase of  $\text{Ca}_2\text{RuO}_4$  with  $\text{P2}_1/\text{c}$  space group symmetry was identified at room temperature using electron diffraction, X-ray absorption fine structure (XAFS), and

oxides increases with layer thickness, while thermal expansion anisotropy decreases, consistent with trends observed in similar RP systems [4-7]. The polar compound  $\text{Ca}_3\text{Ru}_2\text{O}_7$  exhibits pronounced anisotropic thermal expansion similar to  $\text{Ca}_2\text{RuO}_4$



**Figure 5** Temperature-dependent evolution of lattice parameters obtained from MD simulations for the  $\text{Ca}_2\text{MO}_4$  ( $M = \text{Transition metal}$ ) RP oxides.

synchrotron X-ray pair distribution function (PDF) techniques [3]. To understand its thermal behavior, molecular dynamics (MD) simulations were performed considering this monoclinic structure. The simulations yielded results that closely resemble those obtained for the orthorhombic phase, as illustrated in Fig. 3a. This similarity suggests that the weak monoclinic distortion does not significantly affect the proposed mechanism of uniaxial negative thermal expansion (NTE) in  $\text{Ca}_2\text{RuO}_4$ .

Although MD simulations indicated an overall positive volumetric thermal expansion (Fig. 3b), in contrast to the  $\sim 1\%$  crystallographic NTE observed experimentally [3], the discrepancy is minor. The simulated expansion is modest ( $\sim 1\%$ ) and appears sensitive to subtle anisotropic expansion along different crystallographic directions. Thus, fine-tuning the anisotropic thermal response may reconcile the observed and simulated behaviors.

## 2.4 $\text{Ca}_2\text{RuO}_4$ : Impact of layer thickness

As illustrated in Fig. 4, the phase transition temperature in RP

and is anticipated to undergo a MIT at elevated temperature. The end member  $\text{CaRuO}_3$  displays negligible thermal expansion along the  $c$ -axis and strong anisotropy in the  $ab$  plane. These observations suggest that the in-plane ( $ab$ ) lattice parameters are expected to critically influence the volumetric thermal expansion of  $\text{CaRuO}_3$  perovskite. Thus, precise control of in-plane lattice dimensions may offer a route to modulate the thermal expansion properties of these systems.

## 2.5 Predicted thermal expansion in $\text{Ca}_2\text{MO}_4$ ( $M = \text{Transition metal}$ ) RP oxides

We observed the structural stabilization of several RP oxides in the orthorhombic  $\text{Pbca}$  phase. While a subset of these materials has been experimentally examined [3-7] for their thermal expansion behavior, a significant number remain unexplored, representing an opportunity for further investigation.

As illustrated in Fig. 5, RP oxides incorporating 4d and 5d transition metals demonstrate promising anisotropic thermal expansion behavior, with several compounds exhibiting uniaxial

NTE. This behavior is similar to that observed in  $\text{Ca}_2\text{RuO}_4$ . Notably, late  $4d/5d$  RP oxides emerge as particularly compelling, they retain the characteristic anisotropy and NTE seen in  $\text{Ca}_2\text{RuO}_4$  but are predicted to undergo metal-insulator transitions (MIT) at higher temperatures. This shift in transition temperature could broaden the applicability of these materials in high-temperature or thermally demanding environments.

Among these,  $\text{Ca}_2\text{MoO}_4$  also stands out due to its negligible thermal expansion along all three crystallographic axes, suggesting a near-zero volumetric expansion over a broad temperature range. Such behavior is rare and valuable for applications requiring dimensional stability.

Overall, these observations underscore the potential of  $4d/5d$  RP oxides as a fertile ground for discovering new NTE materials and gaining insight into structure–property relationships. Further detailed studies, both experimental and theoretical, are essential to understand the thermal responses and to harness their properties for functional applications [18-24].

### 3. Conclusions

Our MD simulations reveal a symmetry-preserving, first-order structural transition in  $\text{Ca}_2\text{RuO}_4$ , marked by abrupt lattice distortions and a striking reversal in thermal expansion behavior, coinciding with the MIT. This transition is driven by temperature-induced lattice dynamics, where coordinated octahedral tilts, rotations, and A-site anti-polar displacements lead to distortions in the  $\text{RuO}_6$  octahedra, establishing a direct link between structural fluctuations and the electronic phase change. At low temperatures, uniaxial NTE arises from strong elastic anisotropy. In contrast, near the MIT, NTE originates from low-frequency (0–10 THz) Raman-active phonon modes with highly negative Grüneisen parameters. Importantly, although octahedral tilts play a central role, the distortions are not rigid-body in nature, excluding classification as rigid unit modes (RUMs); instead, they involve intrinsic shape deformations of the octahedra. Building on these insights from  $\text{Ca}_2\text{RuO}_4$ , we extended our investigation to other transition metal oxides and identified promising candidates that are likely to

exhibit uniaxial NTE and colossal volumetric thermal expansion.

### [References]

1. K. Takenaka, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **13**, 013001 (2012).
2. K. Takenaka, Y. Okamoto, T. Shinoda, N. Katayama and Y. Sakai, *Nat. Commun.* **8**, 14102 (2017).
3. L. Hu, Y. Zhu, Y.-W. Fang, M. Fukuda, T. Nishikubo, Z. Pan, Y. Sakai, S. Kawaguchi, H. Das, A. Machida, T. Watanuki, S. Mori, K. Takenaka and M. Azuma, *Chem. Mater.* **33**, 7665-7674 (2021).
4. M. S. Senn, A. Bombardi, C. A. Murray, C. Vecchini, A. Scherillo, X. Luo, and S. W. Cheong, *Phys. Rev. Lett.* **114**, 035701 (2015).
5. C. Ablitt, S. Craddock, M. S. Senn, A. A. Mostofi and N. C. Bristowe, *npj Comput. Mater.* **3**, 44 (2017).
6. N. Z. Koocher, A. B. Altman, R. A. Klein, C. D. Malliakas, S. D. Jacobsen, D. E. Freedman, J. M. Rondinelli, *Inorg. Chem.* **64**, 10761–10771 (2025).
7. C. Ablitt, A. A. Mostofi, N. C. Bristowe, and M. S. Senn, *Front. Chem.* **6**, 455 (2018).
8. H. C. Andersen, *J. Chem. Phys.* **72**, 2384 (1980).
9. M. Parrinello and A. Rahman, *Phys. Rev. Lett.* **45**, 1196 (1980).
10. M. Parrinello and A. Rahman, *J. Appl. Phys.* **52**, 7182 (1981).
11. A. McGaughey, *Annu. Rev. Heat Transf.* 49–87 (2013).
12. T. Sun, D.-Bo Zhang, R. M. Wentzcovitch, *Phys. Rev. B* **89**, 094109 (2014).
13. A. Carreras, A. Togo, I. Tanaka, *Computer Physics Communications* **221**, 221–234 (2017).
14. E. Grüneisen, *Ann. Phys. (Berlin, Ger.)* **344**, 257 (1912).
15. T. H. K. Barron and R. W. Munn, *Philos. Mag.* **15**, 85 (1967).
16. E. T. Ritz and N. A. Benedek, *Phys. Rev. Lett.* **121**, 255901 (2018).
17. C. Ablitt, H. McCay, S. Craddock, L. Cooper, E. Reynolds, A. A. Mostofi, N. C. Bristowe, C. A. Murray, and M. S. Senn, *Chem. Mater.* **32**, 605 (2020).
18. B. R. Mullaney, L. Goux-Capes, D. J. Price, G. Chastanet, J.-F. Létard and C. J. Kepert, *Nat. Commun.* **8**, 1053 (2017).
19. L. Zhang, J. Chen, L. Fan, O. Diéguez, J. Cao, Z. Pan, Y.

- Wang, J. Wang, M. Kim, S. Deng, J. Wang, H. Wang, J. Deng, R. Yu, J. F. Scott, X. Xing, *Science* **361**, 494 (2018).
20. X. G. Zheng, H. Kubozono, H. Yamada, K. Kato, Y. Ishiwata, C. N. Xu, *Nat. Nanotech.* **3**, 724–726 (2008).
21. H. Yamamoto, T. Imai, Y. Sakai, and M. Azuma, *Angew. Chem. Inter. Ed.* **57**, 8170-8173 (2018).
22. M. Azuma, W.-tin Chen, H. seki, M. Czapski, S. olga, K. oka, M. mizumaki, T. Ishimatsu, N. Kawamura, S. Ishiwata, M. G. Tucker, Y. Shimakawa and J. Paul Attfield, *Nat. Commun.* **2**, 347 (2011). Watanuki, N.
23. J. Liao, M. Wang, F. Lin, Z. Han, B. Fu, D. Tu, X. Chen, B. Qiu and H.-R. Wen, *Nat. Commun.* **13**, 2090 (2022).
24. B. Qiu, Y. Zhou, H. Liang, M. Zhang, K. Gu, T. Zeng, Z. Zhou, W. Wen, P. Miao, L. He, Y. Xiao, S. Burke, Z. Liu, Y. Shirley Meng, *Nature* **640**, 941-946 (2025).

# 業績

## 【原著論文】

(投稿掲載)

1. S. Kaneko, T. Tokumasu, M. Yasui, M. Kurouchi, D. Shiojiri, S. Yasuhara, S.K. Sahoo, M.M. Can, R.S. Yu, K. Sardar, M. Yoshimura, M. Azuma, A. Matsuda, and M. Yoshimoto, “Crystal orientation of epitaxial film deposited on silicon surface,” *Sci. Rep.* 14(1), 10891 (2024) [IF:3.8]
2. H. Zhong, Y. Song, F. Long, H. Lu, M. Ai, T. Li, Y. Yao, Y. Sakai, M. Ikeda, K. Takahashi, M. Azuma, F. Hu, X. Xing, and J. Chen, “Design of Excellent Mechanical Performances and Magnetic Refrigeration via In Situ Forming Dual-Phase Alloys,” *Adv. Mater.* 36(27), 2402046 (2024). [IF:27.4]
3. T. Ohmi, J.R. Neilson, W. Taniguchi, T. Fukui, T. Nagase, Y. Haruta, M.I. Saidaminov, T. Fukushima, M. Azuma, and T. Yamamoto, “FA<sub>4</sub>Pb<sub>2</sub>I<sub>7.5</sub>(SCN)<sub>0.5</sub>: n = 3 Member of Perovskite Homologous Series FA<sub>n+1</sub>Pb<sub>n-1</sub>I<sub>3n-1.5</sub>(SCN)<sub>0.5</sub> with Columnar Defects,” *ACS Materials Lett.* 6(5), 1913–1919 (2024). [IF:11.4]
4. K. Lee, H. Das, Y. Sakai, T. Nishikubo, K. Shigematsu, D. Ono, T. Koike, N. Kawamura, M. Mizumaki, N. Ishimatsu, and M. Azuma, “High-spin Co<sup>3+</sup> as a trigger of weak ferromagnetism in Co-substituted BiFeO<sub>3</sub>,” *Phys. Rev. B* 110(2), 024422 (2024). [IF:3.2]
5. T. Yamaguchi, M. Furo, Y. Sakai, T. Nishikubo, H. Hojo, M. Azuma, K. Oka, D. Mori, Y. Inaguma, M. Mizumaki, K. Yamamoto, J. Kuneš, T. Mizokawa, and A. Hariki, “Mechanism of intermetallic charge transfer and bond disproportionation in BiNiO<sub>3</sub> and PbNiO<sub>3</sub> revealed by hard x-ray photoemission spectroscopy,” *Phys. Rev. B* 109(20), 205131 (2024). [IF:3.2]
6. Z. Pan, Z. Liang, X. Wang, Y.-W. Fang, X. Ye, Z. Liu, T. Nishikubo, Y. Sakai, X. Shen, Q. Liu, S. Kawaguchi, F. Zhan, L. Fan, Y.-Y. Wang, C.-Y. Ma, X. Jiang, Z. Lin, R. Yu, X. Xing, M. Azuma, and Y. Long, “Mixed anion control of enhanced negative thermal expansion in the oxysulfide of PbTiO<sub>3</sub>,” *Mater. Horiz.*, (2024). [IF:12.2]
7. T. Koike, H. Das, K. Oka, Y. Kusano, F. Cubillas, F.B. Bojorquez, V.E. Alvarez-Montano, S. Ito, K. Shigematsu, H. Togano, I. Yamada, H. Ishibashi, Y. Kubota, S. Mori, N. Kimizuka, and M. Azuma, “Pressure-Induced YbFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Type to Spinel Structural Change of InGaMgO<sub>4</sub>,” *Solids* 5(3), 422–433 (2024). [IF:2.4]
8. M. Ai, Y. Song, F. Long, Y. Zhang, K. An, D. Yu, Y. Chen, Y. Sakai, M. Ikeda, K. Takahashi, M. Azuma, N. Shi, C. Zhou, and J. Chen, “Significantly Promoting the Thermal Conductivity and Machinability of Negative Thermal Expansion Alloy via In Situ Precipitation of Copper Networks,” *Adv. Sci.* 2404838 (2024). [IF:15.1]
9. K. Ozawa, Y. Nagase, M. Katsumata, K. Shigematsu, and M. Azuma, “Single or Vortex Ferroelectric and Ferromagnetic Domain Nanodot Array of Magnetoelectric BiFe<sub>0.9</sub>Co<sub>0.1</sub>O<sub>3</sub>,” *ACS Appl. Mater. Interfaces* 16(16), 20930–20936 (2024). [IF:8.3]
10. H. Yamamoto, T. Nishikubo, S. Kobayashi, K. Takahashi, M. Azuma, S. Kawaguchi, and T. Abukawa, “ZnVO<sub>3</sub>: an ilmenite-type vanadium oxide hosting robust V–V dimers,” *Dalton Trans.* 53(39), 16195–16201 (2024). [IF:3.5]
11. Zhao Pan, Sergey A Nikolaev, Jie Zhang, Maocai Pi, Mengqi Ye, Qiumin Liu, Xubin Ye, Xiao Wang, Takumi Nishikubo, Shogo Kawaguchi, Masaki Azuma, Youwen Long, “Z Extend the scope of negative thermal expansion in PbTiO<sub>3</sub>-based perovskites” *Appl. Phys. Lett.* 126(7), 071901 (2024). [IF:3.5]
12. Wei-tin Chen, Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Hena Das, Masayuki Fukuda, Zhao Pan, Naoki Ishimatsu, Masaichiro Mizumaki, Nomi Kawamura, Saori I Kawaguchi, Olga Smirnova, Mathew G Tucker, Tetsu Watanuki, Akihiko Machida, Shigehiro Takajo, Yoshiya Uwatoko, Yuichi Shimakawa, Mikio Takano, Masaki Azuma, J Paul Attfield, “Pressure-induced charge amorphisation in BiNiO<sub>3</sub>” *Nat. Commun.* 16(1) 2128 (2025) [IF:14.7]
13. Qiumin Liu, Takumi Nishikubo, Kazuki Takahashi, Seiho Higashi, Yusuke Shibata, Jun Miyake, Kano Hatayama, Yuki Sakai, Teppei Nagase, Koki Matsushima, Runze Yu, Takafumi Yamamoto, Masaki Azuma “Colossal Thermal Expansion in Ca-Substituted PbCrO<sub>3</sub>” *Chem. Mater.* (2025) [IF:7.2]

## 【総説】

1. T. Nishikubo, “Design and domain structure observation of phase-transition-type negative thermal expansion material”, *SPring-8 Research Frontiers* 2023, 66-67 (2024)
2. 西久保 匠, “放射光を駆使した負熱膨張物質の多角的評価・物質設計”, *SPring-8/SACLA 利用者情報* 29(4), 293-297 (2024)

## 【書籍】

該当なし

## 【口頭発表】

1. 中山 創, 吉川 浩太, Lee Koomok, 安井 学, 金子 智, 黒内 正仁, 重松 圭, 東 正樹  
電子線描画 HSQ をマスクに用いた  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  ナノドットの作製  
粉体粉末冶金協会 2024 年度春季大会 2024/5/22 東京工業大学すずかけ台キャンパス大会館
2. 高橋 一樹, 酒井 雄樹, 西久保 匠, 東 正樹  
 $\text{BiCoO}_3$  を母物質とした新規非鉛負熱膨張材料の実現  
粉体粉末冶金協会 2024 年度春季大会 2024/5/22 東京工業大学すずかけ台キャンパス大会館
3. 西久保 匠, 廣岡 孝聡, 酒井 雄樹, 東 正樹  
アモルファス前駆体を用いた負熱膨張物質  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  の合成及び粒径, 動作温度域の制御  
粉体粉末冶金協会 2024 年度春季大会 2024/5/22 東京工業大学すずかけ台キャンパス大会館
4. 重松 圭 小野大樹 東 正樹  
 $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  薄膜のギャップ型上部電極による 強誘電ドメイン変化と磁化反転  
第 41 回強誘電体会議 2024/6/13 京都産業会館 北室 (京都)
5. Kei Shigematsu, Masaki Azuma  
Domain Observation and Magnetic Reversal by Electric Field in Cobalt-substituted Bismuth Ferrite Thin Films and Nanodots  
The 16th Japan-China Symposium on Ferroelectric Materials and Their Applications (JCFMA-16) 2024/7/19 Matsue Tera Hall, Matsue, Shimane
6. Masaki Azuma  
Ferroelectric and Magnetic Domain Structure Control in Co substituted  $\text{BiFeO}_3$  Thin Films  
The 15th APCTP Workshop on Multiferroics 2024/8/24 Seoul National University
7. 西久保 匠  
構造相転移に起因する負熱膨張物質の設計とそのメカニズムの解明  
2024 年度 構造物性研究会, 結晶化学研究会 合同研究会 2024/9/4 九州大学伊都キャンパス
8. 西久保 匠  
放射光を駆使した負熱膨張物質の多角的評価, 物質設計  
SPRING-8 シンポジウム 2024 2024/9/6 九州大学医学部百年記念講堂
9. 小菅 大輝, 山添 睦果, 河口 彰吾, 細川 三郎, 東 正樹, 山本 隆文  
Sr-Fe 系ペロブスカイト酸化物におけるトポタクティック反応の時分割 XRD 測定  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/10 名古屋大学
10. 大見 拓也, 谷口 航, 長瀬 鉄平, 東 正樹, 山本 隆文  
欠陥秩序に基づく有機-無機ハイブリッドペロブスカイト化合物系列  $\text{FA}_{n+1}\text{Pb}_{n-1}\text{I}_{3n-1.5}(\text{SCN})_{0.5}$  の合成  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/11 名古屋大学
11. 松島 航暉, 大見 拓也, 東 正樹, 山本 隆文  
高圧合成法を用いた有機-無機ハイブリッドペロブスカイトの新規構造探索  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/12 名古屋大学
12. 谷口 航, 大見拓也, 東正樹, 山本隆文  
(110)p 面欠陥ペロブスカイト  $\text{FA}_4\text{Pb}_2\text{I}_{7.5}(\text{SCN})_{0.5}$  におけるアニオン置換効果  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/11 名古屋大学
13. 柴田 勇介, 西久保 匠, 清原 慎, 熊谷 悠, 東 正樹  
ベイズ最適化を用いた多元置換による  $\text{BiNiO}_3$  系負熱膨張材料の動作温度制御  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/12 名古屋大学
14. 劉 丘民, 西久保 匠, 東 正樹  
Ca 置換  $\text{PbCrO}_3$  の巨大熱膨張 日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/10 名古屋大学
15. 西久保 匠, 廣岡 孝聡, 酒井 雄樹, 東 正樹  
新規プロセスによる負熱膨張物質  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  のアモルファス前駆体の調整及び微細粒子の合成, 評価  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/12 名古屋大学
16. 高橋 一樹, 酒井 雄樹, 西久保 匠, 東 正樹  
 $\text{BiCoO}_3$  を母物質とした新規非鉛負熱膨張材料の実現  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/12 名古屋大学
17. 佐原 広樹, 大河内 寛保, 柝沢 晴希, 重松 圭, 西久保 匠, 酒井 雄樹, 東 正樹, 山本 隆文  
バナジウム酸水素化物の単結晶育成と物性評価  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/12 名古屋大学
18. 東 征甫, 西久保 匠, 東 正樹  
負熱膨張材料  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}_3$  における Mn の価数変化  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/12 名古屋大学
19. 小池 剛大, Hena Das, 岡 研吾, 草野 圭弘, 君塚 昇, Fernando Cubillas, Francisco Brown, 東 正樹  
圧力誘起による  $\text{YbFe}_2\text{O}_4$  型からスピネル構造への  $\text{InGaMgO}_4$  の構造変化  
日本セラミックス協会 第 37 回秋季シンポジウム 2024/9/12 名古屋大学
20. 長瀬 鉄平, 西久保 匠, 重松 圭, 東 正樹, 山本隆文  
[111]方向にカチオンが秩序した鉄系ペロブスカイト型酸化物の合成と物性評価  
日本物理学会 第 79 回年次大会 2024/9/16 北海道大学
21. 三宅 潤, 畑山華野, 西久保匠, 東 正樹  
A, B サイト同値置換による  $\text{BiFeO}_3$  の負熱膨張化

- 日本物理学会 第 79 回年次大会 2024/9/16 北海道大学
22. 畑山 華野, 小野 大樹, 西久保 匠, 壬生 攻, 尾上 智子, 東 正樹 Ca, Ru 同値置換による BiFeO<sub>3</sub> のキヤントコリニア弱強磁性化  
日本物理学会 第 79 回年次大会 2024/9/16 北海道大学
23. 李邱穆, Das Hena, 酒井雄樹, 西久保匠, 重松圭, 小野大樹, 小池剛大, 河村直己, 水牧仁一朗, 石松直樹, 東正樹  
高スピン Co<sup>3+</sup>置換による BiFeO<sub>3</sub> の弱強磁性秩序の発現  
日本物理学会 第 79 回年次大会 2024/9/16 北海道大学
24. 西久保 匠, 酒井 雄樹, 東 正樹  
新規アニオン欠損秩序型ペロブスカイト BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>2.8</sub> の特異な電荷秩序  
日本物理学会 第 79 回年次大会 2024/9/18 北海道大学
25. Jie Chen, Kei Shigematsu, Masaki Azuma  
Growth and Characterization of Epitaxial Co-Substituted Bismuth Ferrite Thin Film on Silicon Substrate  
第 85 回応用物理学会秋季学術講演会 2024/9/17 朱鷺メッセ (新潟)
26. 中山 創, 吉川 浩太, Lee Koomok, 角嶋 邦之, 星井 拓也, 金子 智, 安井 学, 黒内 正仁, 重松 圭, 東 正樹  
電子線描画 HSQ をマスクに用いた BiFe<sub>0.9</sub>Co<sub>0.1</sub>O<sub>3</sub> ナノドットの作製 (2)  
第 85 回応用物理学会秋季学術講演会 2024/9/17 朱鷺メッセ (新潟)
27. 東 正樹  
巨大負熱膨張物質の構造物性  
第 1 回構造物性研究会 2024/9/21 名古屋大学創発工学館 3 階オーディトリウムホール
28. Kei Shigematsu, Masaki Azuma  
Single or Vortex Ferroelectric and Ferromagnetic Domain Nanodot Array of Magnetoelectric BiFe<sub>0.9</sub>Co<sub>0.1</sub>O<sub>3</sub>  
The 4th International Symposium on Design & Engineering by Joint Inverse Innovation for Materials Architecture 2024/10/3 航空会館 7 階 Main Hall (新橋)
29. Takuya Ohmi, Wataru Taniguchi, Teppei Nagase, Masaki Azuma, Takafumi Yamamoto  
Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Perovskite Homologous Series FA<sub>n+1</sub>Pb<sub>n-1</sub>I<sub>3n-1.5</sub>(SCN)<sub>0.5</sub> with Defect-Ordering The Fourteenth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC14) 2024/10/8 東京科学大学すずかけ台キャンパス
30. Koki Matsushima, Takuya Ohmi, Masaki Azuma, Takafumi Yamamoto  
Exploration of Novel Organic-Inorganic Hybrid Perovskite Using High-Pressure Synthesis  
The Fourteenth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC14) 2024/10/8 東京科学大学すずかけ台キャンパス
31. Teppei Nagase, Takumi Nishikubo, Kei Shigematsu, Masaki Azuma, and Takafumi Yamamoto  
Synthesis, characterization, and physical property of iron-based perovskite oxide with cation ordering along [111] direction  
The Fourteenth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC14) 2024/10/8 東京科学大学すずかけ台キャンパス
32. 栢沢 晴希, 長瀬 鉄平, 西久保 匠, 重松 圭, 東 正樹, 山本 隆文  
Control of anion ordering in oxyhydrides under high pressure  
The Fourteenth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC14) 2024/10/8 東京科学大学すずかけ台キャンパス
33. Hajime Nakayama, Koomok Lee, Satoru Kaneko, Manabu Yasui, Masahito Kurouchi, Kei Shigematsu, and Masaki Azuma  
Fabrication of high-quality multiferroic BiFe<sub>0.9</sub>Co<sub>0.1</sub>O<sub>3</sub> nanodot array with electron-beam-lithographed HSQ mask  
The Fourteenth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC14) 2024/10/8 東京科学大学すずかけ台キャンパス
34. 三宅 潤, 畑山 華野, 西久保 匠, 東 正樹  
Negative thermal expansion in A, B-sites substituted BiFeO<sub>3</sub>.  
The Fourteenth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC14) 2024/10/8 東京科学大学すずかけ台キャンパス
35. 佐原 広樹, 大河内 寛保, 栢沢 晴希, 重松 圭, 西久保 匠, 酒井 雄樹, 東 正樹, 山本 隆文  
Single crystal growth and characterization of vanadate oxyhydrides  
The Fourteenth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC14) 2024/10/8 東京科学大学すずかけ台キャンパス
36. 小池 剛大, Hena Das, 岡 研吾, 草野 圭弘, 君塚 昇, Fernando Cubillas, Francisco Brown, 東 正樹  
YbFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 型からスピネル構造への InGaMgO<sub>4</sub> の圧力誘起構造変化  
第 65 回高圧討論会  
2024/11/13 いわて県民情報センターアイーナ (盛岡市)
37. 長瀬 鉄平, 西久保 匠, 重松 圭, 東 正樹, 山本隆文  
高圧下ポスト酸化反応によるカチオン秩序型ペロブスカイト酸化物の合成と特性評価  
第 65 回高圧討論会

- 2024/11/15 いわて県民情報センターアイーナ（盛岡市）
38. 西久保 匠, 東 正樹,  
特異な電荷秩序をもつアニオン欠損秩序型  
ペロブスカイト  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_{2.8}$   
第 65 回高圧討論会  
2024/11/15 いわて県民情報センターアイーナ（盛岡市）
39. 東 正樹  
高圧相機能性遷移金属酸化物の国際共同研究  
第 65 回高圧討論会  
2024/11/15 いわて県民情報センターアイーナ（盛岡市）
40. 西久保 匠  
相転移型負熱膨張材料の物質設計と多角的な評価  
粉体粉末冶金協会 2024 年度秋季大会  
2024/11/20 朱鷺メッセ（新潟市）
41. 高橋一樹、酒井雄樹、西久保匠、東正樹  
新規負熱膨張材料  $\text{Bi}_{1-x}\text{Ln}_x\text{CoO}_3$  ( $\text{Ln}$ :ランタノイド元素) の体積変化量の最大化  
粉体粉末冶金協会 2024 年度秋季大会  
2024/11/20 朱鷺メッセ（新潟市）
42. 東 征甫、西久保 匠、東 正樹  
負熱膨張材料  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}_3$  における Mn の価数変化  
粉体粉末冶金協会 2024 年度秋季大会  
2024/11/20 朱鷺メッセ（新潟市）
43. 劉 丘民、西久保 匠、東 正樹  
Ca 置換  $\text{PbCrO}_3$  の巨大熱膨張  
粉体粉末冶金協会 2024 年度秋季大会  
2024/11/20 朱鷺メッセ（新潟市）
44. 柴田 勇介、西久保 匠、清原 慎、熊谷 悠、東 正樹  
機械学習を用いた多元素置換による  $\text{BiNiO}_3$  系負熱膨張材料の動作温度制御  
粉体粉末冶金協会 2024 年度秋季大会  
2024/11/20 朱鷺メッセ（新潟市）
45. 松浦 伊吹、中山 創、Koomok Lee、重松 圭、東 正樹  
マルチフェロイック物質  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  への La 置換による特性改善  
第 63 回セラミックス基礎科学討論会  
2025/1/9 朱鷺メッセ（新潟市）
46. メモリデバイス化に向けた Co 置換  $\text{BiFeO}_3$  の電場印加磁化反転の解明と微細化  
重松 圭、東 正樹  
第 63 回セラミックス基礎科学討論会  
2025/1/9 朱鷺メッセ（新潟市）
47. 東正樹  
ビスマス・鉛の特性を活かした機能性酸化物の開発  
日本セラミックス協会 2025 年年会  
2025/3/6 静岡大学浜松キャンパス（浜松市）
48. 三宅 潤、畑山 華野、西久保 匠、東 正樹  
A, B サイト共置換による  $\text{BiFeO}_3$  の負熱膨張化  
日本セラミックス協会 2025 年年会  
2025/3/6 静岡大学浜松キャンパス（浜松市）
49. 畑山華野、小野大樹、西久保匠、壬生攻、尾上智子、重松圭、東正樹  
Ca, 4d・5d 遷移金属元素共置換による  $\text{BiFeO}_3$  の弱強磁性発現  
日本セラミックス協会 2025 年年会  
2025/3/7 静岡大学浜松キャンパス（浜松市）
50. 前田慶, Lee Koomok, 松浦伊吹, 中山創, 重松圭, 東正樹  
マルチフェロイック  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  薄膜を用いた面内電場印加デバイスの開発  
第 72 回応用物理学会春季学術講演会  
2025/3/15 東京理科大学 野田キャンパス（野田市）
51. 柴田 勇介、西久保 匠、東 正樹、清原 慎、熊谷 悠  
ベイズ最適化を用いた負熱膨張材料の多元素化  
日本化学会第 105 春季年会  
2025/3/29 関西大学 千里山キャンパス（吹田市）

#### 【記者発表, 取材】

1. KISTEC, 東京工業大学  
マルチフェロイック酸化物の単一分域ナノドット化に成功 一次世代低消費電力磁気メモリの構築へ前進—  
2024 年 5 月 23 日, 文部科学記者会、科学記者会、神奈川県政記者クラブ
2. 東京工業大学, KISTEC, CROSS, 愛媛大学, JASRI, 熊本大学, 京都大学, QST, 生産開発科学研究所, JST ニッケル酸ビスマスの圧力誘起電荷非晶質化を発見—熱膨張問題を解決する新たな負熱膨張材料の開発に期待—  
2025 年 3 月 5 日

#### 【特許】

国内出願特許 3 件

#### 【受賞等】

1. 西久保 匠, 13<sup>th</sup> SPRUC Young Scientist Award
2. 東 正樹, 日本セラミックス協会学術賞
3. 重松 圭, 東京科学大産学共創機構オープンイノベーション功労賞
4. 高橋 一樹, 粉体粉末冶金協会 2024 年度春季大会優秀講演発表賞
5. 大見 拓也, 日本セラミックス協会秋期シンポジウム優秀発表賞
6. 高橋 一樹, 日本セラミックス協会秋期シンポジウム優秀発表賞
7. 松島 航暉, 日本セラミックス協会秋期シンポジウム優秀発表賞

8. 高橋 一樹, 粉体粉末冶金協会 2024 年度秋季大会優秀講演発表賞
9. 三宅 潤, 粉体粉末冶金協会 2024 年度秋季大会優秀講演発表賞

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 実用化実証事業

### 「毛髪再生医療実証」グループ

- ◆ 統括・・114
- ◆ 毛包オルガノイドを用いた育毛・発毛素材の評価・・・・・・・・118
- ◆ 毛包上皮幹細胞の自己凝縮化培養・・・・・・・・・・・・・・・・120
- ◆ 業績・・122

# 「毛髪再生医療実証」グループ

グループリーダー 福田 淳二

## 【基本構想】

現在、毛髪の再生医療をめぐるには、主に三つの手法が提案されている。1.「毛乳頭細胞」の移植、2.「毛包原基」の移植、3.「生体外で再生した毛包」の移植である。我々は、それぞれのアプローチを Hair Regeneration の頭文字 HR を使って、HR01, HR02, HR03 と名付け、実用化を目指した研究開発を進めている（図）。

「HR01 毛乳頭細胞の移植」に至っては、間葉系細胞の機能を維持しながら細胞数を増加させる重層化培養技術を開発した。この技術で増殖させた間葉系細胞を移植することで細胞移植による毛髪再生の治療効果を向上できる可能性がある。連携企業や医療機関等と協力し、早期の実用化を目指す。

「HR02 毛包原基の移植」に至っては、上皮系細胞と間葉系細胞から毛包原基を簡便かつ大量に作製する技術を開発した。脱毛症患者の細胞を用いて、上皮系細胞と間葉系細胞の増殖培養から移植に至るまで一連の技術を開発し、高効率に毛髪再生する手法を確立する。

「HR03 再生毛包の移植」に至っては、生体外ではほぼ 100%の効率で毛髪を再生する技術をマウス細胞で確立し、再生毛包を移植すると皮下に生着し毛周期を繰り返すことを確認した。本手法を脱毛症患者の細胞に適用し、高効率で毛髪再生できる条件の探索を行う。また、生体外の毛髪再生技術を利用して構築した毛包オルガノイドを創薬モデルとして応用することで、脱毛症の治療薬開発にも貢献する。



図 我々が進める3つの毛髪再生アプローチ

## 1. 2024年度の研究目的

プロジェクト6年目となる2024年度は、以下の各項目を重点項目として研究を進めた。ただし、動物実験については、横浜国立大学動物実験専門委員会および動物実験中央研究所の承認を得て実施し、患者組織の利用については、横浜国立大学倫理委員会（人を対象とする医学系研究）の承認を得て実施した。

(HR01) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生

(HR02) 毛包原基の移植による毛髪再生

(HR03) 生体外再生毛包の移植による毛髪再生

(HR01)に関して、コア技術「毛乳頭細胞の重層化培養技術」の国内の特許査定が得られ、毛髪再生医療の事業化を目指す段階にある。ヒト臨床への展開を見据え、製薬企業への技術移転を進めた。(HR02)に関して、毛包原基の作製に必要な細胞源の培養技術として、毛包上皮幹細胞の自己凝集培養を開発し、特許出願を完了した。また、細胞の若返りやオートファジーの活性化により、毛髪再生能を向上させる技術を新たに開発した。(HR03)に関して、生体外で毛髪を再生する技術を開発し、ヒト細胞を用いて毛髪を再生する技術の確立に向けた最適化検討を行った。また、

本技術を薬剤スクリーニングモデルとして利用し、セロトニンの育毛・発毛効果について新たに見出した。

本報告書では、3つのアプローチの今年度の成果の概要を紹介する。また、(2)については、エン研究員が、(3)については、景山研究員が詳細を報告する。

## 2. 2024年度の研究成果

### (HR01) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生

細胞移植による毛髪再生治療は、2024年に資生堂が国内の医療機関での自由診療を開始した。資生堂の「毛髪再生治療」では、特定細胞加工物（増殖培養した毛球部毛根鞘細胞）を脱毛症患者の頭皮に注入する。注入された細胞加工物は、休止期毛包を活性化することで、発毛を促進する。一般に、細胞移植による再生治療においては、特定細胞加工物の品質が治療成果に大きく影響する。特に、毛髪再生治療に用いられる細胞源（毛球部毛根鞘細胞や毛乳頭細胞）は増殖培養中に毛髪再生能力を大きく失いやすく、優れた細胞培養技術の確立は、今後さらなる治療成果の向上に不可欠といえる。

このような背景から、我々は毛髪再生治療に用いられる細胞源（特に毛乳頭細胞）の増殖培養技術の開発を進め、これまでに電気刺激培養 [1]やゲルビーズ培養 [2, 3]など様々な培養技術を開発してきた。このような研究を進める中で、毛乳頭細胞を長期間（30日間）平面培養することで、毛髪再生能を従来技術（スフェロイド培養）よりも維持しながら、増殖培養する技術を開発した（特許第7380998号、PCT/JP2023/6551）。この培養法では、毛髪再生能に関連する遺伝子（ALP遺伝子）の発現量はスフェロイド培養と比較して2倍以上増加しており、細胞数は30日間で20倍まで増加した。我々はこの培養法を重層化培養と名付け、実用化に向けた検討を進めている。2024年度は、共同研究先となるロート製薬株式会社に対し、重層化培養の技術移転を行った。企業研究員が細胞培養手法を習得し、遺伝子解析や細胞増殖数の評価で重層化培養が再現できている。また、実用化に向けた最適化検討を進めている。早期の実用化を目指して研究開発を進めていきたい。

### (HR02) 毛包原基の移植による毛髪再生

“毛髪の総本数の増加”を可能とする毛髪再生医療として、毛包原基の移植技術の開発を進めている。毛包は、上皮と間葉の相互作用によって毛包原基が形成されるプロセスを経て発生する。近年、この発生過程で生じる毛包原基を生体外で人工的に再現し、これを移植することで毛髪を再生する技術が注目を集めている。我々は、生体外で毛包原基を大量作製する基盤技術を確立し（特許第6425319号、日本、中国、米国、欧州で成立） [4]、この毛包原基の移植による毛髪再生の実現を目指した研究開発を進めてきた [5-12]。2024年度は、細胞増殖技術に注力して検討を

進めた。

細胞増殖技術に関して、毛包原基の作製には間葉系の毛乳頭細胞と上皮系の毛包上皮幹細胞を用いることを想定している。我々は、これまでに毛乳頭細胞は重層化培養（特許第7380998号、PCT/JP2023/6551）、毛包上皮幹細胞は三次元培養（特許第7078925号）を開発してきた。しかし、毛包上皮幹細胞の三次元培養では、細胞数の増殖率が低いことが課題であった。この課題を解決するための新たな培養技術として、自己凝集化培養を開発した。この方法では、毛包上皮幹細胞を培養ディッシュ上で30日間培養するといったシンプルなものである（従来の平面培養は5日間で継代）。細胞は培養と共にディッシュ表面を覆うように増殖したのち、一部の細胞が剥離する形で自発的に凝集体の形成が始まる。凝集体は数十マイクロメートルサイズまで達すると、増殖が緩やかになるが、それと共に幹細胞マーカーの発現が増加するようになる。自己凝集化培養により増殖させた毛包上皮幹細胞の毛髪再生能力を評価するため、免疫不全マウスへの移植実験を行った。従来の平面培養した後の毛包上皮幹細胞をマウス間葉系細胞と混合し、懸濁液をマウス皮下に移植した場合は発毛が見られない一方で、自己凝集化培養した毛包上皮幹細胞を移植すると発毛が確認され、再生した毛の表面には、毛髪特有のキューティクル構造も観察された。本技術は2024年度に特許出願を完了した。

また、細胞の“老化”に着目した細胞培養技術の開発も進めている。毛包は胎児期に形成され、出生後も一定の周期で再生を繰り返す器官である。そのため、成人の細胞でも毛髪再生が可能と考えられている。しかし、胎児細胞と成人細胞を比較すると、毛髪再生能は圧倒的に胎児細胞の方が高い。もし、成人細胞を胎児の状態まで若返らせることができれば、毛髪再生能を劇的に向上できる可能性がある。そこで我々は、iPS細胞を作製するプロセスを参考に、遺伝子編集による毛乳頭細胞の若返りを試みた。方法の詳細は割愛するが、若返りさせた毛乳頭細胞では胎児マーカーが増加し、それに伴い、毛髪再生能を示すマーカーが向上する様子が確認された。また、この細胞を免疫不全マウスに移植すると毛髪再生能が有意に向上した。

オートファジーは細胞内のごみ回収といわれ、細胞で発生した活性酸素などの有害物質を排除する生体システムである。しかし、このオートファジーの機能は、加齢とともに低下する。これに伴い、様々な臓器や組織で疾患が生じることが明らかになっている。実際に、歳とともに進行する脱毛症とオートファジーには相関があることが報告されている。我々は、毛乳頭細胞にオートファジーの活性化剤（ラパマイシン）を添加する実験を行った。その結果、ラパマイシン処理した毛乳頭細胞は、毛髪再生能を示すマーカー遺伝子の発現が有意に向上し、移植後の毛髪再生本数は3倍程度向上した。以上より、遺伝子編集やオートファジーの活性化による細胞の若返りは細胞の毛髪再生能を向上させることが明らかとなった。今後は、細胞の若返りと細胞増殖技術を組み合わせることで、より毛髪再生に適した幹細胞を調製する手法を確立していきたい。また、

このようにして得られた細胞を用いて、毛包原基を作製することで、ヒト細胞で毛髪を効率よく再生する技術の確立を目指す。

### (HR03) 再生毛包の移植による毛髪再生

毛包原基は“毛の種”のようなものであり、皮膚という畑に移植することで毛包が再生するが、毛の再生方向（毛並み）まで制御することは難しく、ましてや移植した種から確実に毛包が再生するかは保証できない。生体外で毛包組織を再生できれば、畑に苗を移植するように、毛並みを揃えた毛髪をほぼ確実に再生することが可能となる。このようなコンセプトから、我々は生体外で毛包を再生する培養技術を開発した [13]。マウス毛包に存在する 2 種類の幹細胞（上皮系細胞と間葉系細胞）の自己組織化プロセスに着目し、培養初期に形成する凝集体の空間配置パターンを制御することで高効率（ほぼ 100%）に成熟した毛包を再生することが可能となる。再生した毛髪は 30 日間の培養で約 5 mm の長さまで達し、この毛包を移植すると移植部で生着し、毛周期を繰り返す様子が観察された。我々は、この組織を毛包オルガノイドと名付け、ヒト細胞で毛包オルガノイドを作製する研究開発を進めてきた [14]。

今年度は、臨床応用に向けた研究開発として、脱毛患者の細胞を用いて生体外で毛髪再生する培養技術の開発を進めた。詳細は割愛するが、毛包オルガノイドの作製に用いる細胞種や細胞外マトリクスの種類を最適化することで、再生する毛幹様構造の長さが伸長することを確認している。今後は、さらなる培養方法の最適化により、より成熟したヒト毛包を構築する。

また、この毛包オルガノイドを用いて、セロトニンの育毛・発毛促進効果を見出し、特許出願に至っている。その作用メカニズムの一部も明らかにし、片頭痛薬として臨床使用されているセロトニンレセプターのアゴニスト、スマトリプタンが育毛・発毛作用を有することも発見している。これらの知見が脱毛症治療のための新たな薬剤の開発につながることを期待している。

### 【参考文献】

[1] L. Yan, T. Kageyama, B. Zhang, S. Yamashita, P.J. Molino, G.G. Wallace, J. Fukuda, Electrical stimulation to human dermal papilla cells for hair regenerative medicine, *J Biosci Bioeng* 133(3) (2022) 281-290.

[2] T. Kageyama, L. Yan, A. Shimizu, S. Maruo, J. Fukuda, Preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine, *Biomaterials* 212 (2019) 55-63.

[3] M. Yamane, J. Seo, Y. Zhou, T. Asaba, S. Tu, A. Nanmo, T. Kageyama, J. Fukuda, Effects of the PI3K/Akt signaling pathway on the hair inductivity of human dermal papilla cells in

hair beads, *J Biosci Bioeng* 134(1) (2022) 55-61.

[4] T. Kageyama, C. Yoshimura, D. Myasnikova, K. Kataoka, T. Nittami, S. Maruo, J. Fukuda, Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation in vitro, enabling the large-scale production of HFGs for regenerative medicine, *Biomaterials* 154 (2018) 291-300.

[5] T. Kageyama, L. Yan, A. Shimizu, S. Maruo, J. Fukuda, Preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine, *Biomaterials* 212 (2019) 55-63.

[6] T. Kageyama, A. Nanmo, L. Yan, T. Nittami, J. Fukuda, Effects of platelet-rich plasma on in vitro hair follicle germ preparation for hair regenerative medicine, *J Biosci Bioeng* 130(6) (2020) 666-671.

[7] T. Kageyama, Y.S. Chun, J. Fukuda, Hair follicle germs containing vascular endothelial cells for hair regenerative medicine, *Sci Rep* 11(1) (2021) 624.

[8] R. Nakajima, Y. Tate, L. Yan, T. Kageyama, J. Fukuda, Impact of adipose-derived stem cells on engineering hair follicle germ-like tissue grafts for hair regenerative medicine, *J Biosci Bioeng* 131(6) (2021) 679-685.

[9] S. Hirano, T. Kageyama, M. Yamanouchi, L. Yan, K. Suzuki, K. Ebisawa, K. Kasai, J. Fukuda, Expansion Culture of Hair Follicle Stem Cells through Uniform Aggregation in Microwell Array Devices, *ACS Biomater Sci Eng* 9(3) (2023) 1510-1519.

[10] A. Nanmo, L. Yan, T. Asaba, L. Wan, T. Kageyama, J. Fukuda, Bioprinting of hair follicle germs for hair regenerative medicine, *Acta Biomater* 165 (2023) 50-59.

[11] E. Sugiyama, A. Nanmo, X. Nie, S.Y. Chang, M. Hashimoto, A. Suzuki, T. Kageyama, J. Fukuda, Large-Scale Preparation of Hair Follicle Germs Using a Microfluidic Device, *ACS Biomater Sci Eng* (2024).

[12] Y. Migita, T. Kageyama, N. Ito, N. Esaka, A. Nanmo, J. Seo, Y. Lei, S. Hamano, J. Fukuda, Preparation of hair follicle germs using centrifugal forces for hair regenerative medicine, *J Biosci Bioeng* (2025).

[13] T. Kageyama, A. Shimizu, R. Anakama, R. Nakajima, K. Suzuki, Y. Okubo, J. Fukuda, Reprogramming of three-dimensional microenvironments for in vitro hair follicle induction, *Sci Adv* 8(42) (2022) eadd4603.

[14] T. Kageyama, H. Miyata, J. Seo, A. Nanmo, J. Fukuda, In vitro hair follicle growth model for drug testing, *Sci Rep* 13(1) (2023) 4847.

# 毛包オルガノイドを用いた育毛・発毛素材の評価

「毛髪再生医療実証」グループ  
景山 達斗

## 1. はじめに

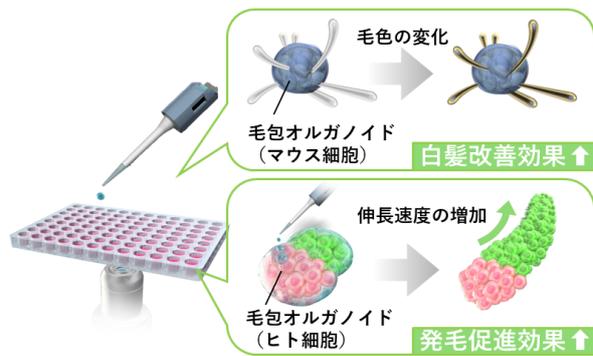
創薬開発の現場では、ハイスループットかつ正確に薬効を評価できる実験系が求められる。現在の育毛・発毛剤の評価では、「実験動物を用いた発毛試験」および「ヒト毛包の器官培養」が用いられている。前者は、マウスの背部皮膚を剃刀で脱毛し、そこに薬剤を毎日塗布することで、薬による毛の成長変化を観察する方法である。経皮吸収も含めて評価できるが、マウスとヒトの種差による有効性の違いがあるため、必ずしも正確な結果が得られる訳ではない。また、近年の化粧品業界の動物実験の規制により、本実験系の使用が禁止となっている企業も多い。後者は、ヒトの頭皮から毛包をくり抜き、採取した毛包に薬剤候補を振りかけて、毛の長さを測定する方法である。種差の影響がないため信頼性の高い評価が行えるが、ヒトから採取できる毛包の数に限りがあるため、大規模な薬剤スクリーニングは難しい。我々は、これらの課題を解決するために、細胞から毛包のクローン「毛包オルガノイド」を再生する技術を開発した [1, 2]。生体外で細胞を大量に増殖させれば、毛包オルガノイドは大量に作製でき、大規模な薬剤のスクリーニングが可能となる。毛包オルガノイドは、生体外で毛幹を伸長させるため、ヒト毛包の器官培養と同様に毛幹の長さを指標に育毛・発毛剤の有効性を評価できる。実際に、毛包オルガノイドに既存の発毛剤（ミノキシジル）を添加すると、ヒト毛包の器官培養と同様に、薬剤に反応して毛幹の伸長速度が増加する様子を確認している [2]。毛幹伸長を観察するのみで薬効を評価できる簡便性は、網羅的なスクリーニングを行う上で圧倒的メリットであり、この要素を兼ね備えた毛包オルガノイドは薄毛治療薬の開発を加速させる *in vitro* 培養モデルとして期待できる。

本稿では、この毛包オルガノイドを利用した育毛・発毛素材の評価の例をいくつか紹介する（図）。

## 2. 実験と結果

### (1) オキシトシン関連の育毛・発毛素材

オキシトシンは出産・授乳期に産生されるペプチドホルモンであり、家族やペットとのスキンシップによっても産生されるため愛情ホルモンとも呼ばれる。このように私たちに馴染みの深いホルモンであるが、生体に及ぼす作用の全貌は明らかになっておらず、オキシトシンと臓器のクロストークに関する研究は今もなお世界中で展開されている。本研究では、毛包オルガノイドを用いて、オキシトシンが毛包に与える作用を評価した。毛包オルガノイドにオキシトシンを添加すると、毛包オルガノイドから伸長する毛幹様構造の長さが増加したことから、オキシトシンが育毛・発毛作用を有している可能性が示された [3]。作用メカニズムとして、毛乳頭細胞の持つレセプターにオキシトシンが結合し、VEGF などの育毛因子を産生することを見出している。また、オキシトシン受容体のアゴニスト（WAY267464 や LIT001）やオキシトシン受容体を増加させる成分（ケイヒ酸）においても、育毛効果がみられたことから [4, 5]、オキシトシンシグナル経路の活性化は育毛・発毛促進に有効と考えられる。これらの薬剤の有効性は、「実験動物を用いた発毛試験」および「ヒト毛包の器官培養」においても検証しており、育毛・発毛促進効果を確認している。以上、毛包オルガノイド評価系を用いて、オキシトシンが毛の伸長を促進するという新たな知見を見出すことができた。



毛包オルガノイドで有効性が認められた素材

添加因子	効果	分類
ミノキシジル	発毛促進	市販の育毛・発毛成分
オキシトシン	発毛促進	オキシトシン関連
ケイヒ酸	発毛促進	オキシトシン関連
WAY267464	発毛促進	オキシトシン関連
LIT001	発毛促進	オキシトシン関連
脂肪酸混合物	発毛促進	脂肪酸関連
セロトニン	発毛促進	セロトニン関連
スマトリプタン	発毛促進	セロトニン関連
α-MSH	白髪改善	メラノソーム生成
RGMB	白髪改善	メラノソーム輸送

図 毛包オルガノイドを用いた薬剤評価

## (2) 脂肪酸関連の育毛・発毛素材

脂肪酸は、皮膚のバリア機能を維持し、乾燥や肌荒れを防ぐなど皮膚の恒常性維持において重要な生体物質である。本研究では、毛包オルガノイドを用いて、脂肪酸が毛包に与える作用を評価した。毛包オルガノイドの細胞に脂肪酸混合物を作用させると、毛包オルガノイドから伸長する毛幹様構造の長さが増加したことから、脂肪酸が育毛・発毛促進に関与している可能性が示された [6]。作用メカニズムとして、脂肪酸が HIF-1 $\alpha$  の発現を向上させることで、毛乳頭細胞の発毛関連マーカー (LEF1, VCAN, ALP) の発現が増加したと考えられる。我々の先行研究において、毛乳頭細胞の発毛機能向上に HIF-1 $\alpha$  が有効であることは報告していたが [7]、本研究では HIF-1 $\alpha$  を脂肪酸により制御できることが明らかとなった。

## (3) セロトニン関連の育毛・発毛素材

我々は「セロトニン」の育毛・発毛作用に関しても、毛包オルガノイドを用いて評価を行った。セロトニンは脳や腸で産生されるホルモンであり、幸福感と関係があることから、幸せホルモンともよばれる。このセロトニンを毛包オルガノイドに添加すると、毛幹様構造の長さが有意に増加し、ヒト毛包のオーガンカルチャーにおいても、セロトニン処理により毛幹の長さが有意に増加した [8]。これらの結果は、セロトニンに育毛・発毛作用があることを示唆している。セロトニン受容体をターゲットとした薬剤の一つに、片頭痛の治療薬として開発されたスマトリプタンがある。この薬剤を毛包オルガノイドに添加して発毛促進効果を検証した結果、スマトリプタンの添加により、オルガノイドの毛幹様構造の長さが有意に増加した。この結果は、セロトニン受容体をターゲットとした薬剤を、プロドラッグとして育毛・発毛剤分野に応用できる可能性を示唆している。セロトニンは血液脳関門を通過しないため、毛包には腸で産生されたセロトニンが血液を通じて受け渡される。すなわち、セロトニンは腸-毛包相関に関わる因子である可能性が高い。腸内環境の改善による脱毛症治療という新たなアプローチも今後期待できるかもしれない。

## (4) 白髪を改善する素材

マウスの細胞で作製した毛包オルガノイドは生体外で毛の色の変化まで忠実に再現できており、生体外でメラノソームが輸送する様子まで観察することが可能である。我々は、毛包オルガノイドにメラノソームの生成・輸送を促進する試薬を添加することで、毛の色を濃くする薬剤の評価モデルとして、毛包オルガノイドが利用できるか評価した。 $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) は、メラノソーム生成を促進する試薬として知られる。毛包オルガノイドに  $\alpha$ -MSH を作用させると、オルガノイドから形成する毛の色が濃くなる様子が観察された [1]。メラノソーム輸送を促進する試薬 Repulsive guidance molecule B (RGMB)

においても同様に、オルガノイドから形成する毛の色が濃くなった。これらの結果は、毛包オルガノイドが白髪を改善する素材の評価系として利用できる可能性を示唆している。我々の最近の研究では、毛包オルガノイドと遺伝子ノックダウン技術を用いて、白髪の原因遺伝子を探索することに成功している [9]。毛包オルガノイドで白髪の原因を解明できれば、その原因から白髪を改善する新たな素材を探索することも可能となるだろう。

## 3. まとめと今後の展望

本研究では、育毛・発毛素材の評価に毛包オルガノイドが利用できる可能性を明らかにした。今後、本評価系が毛髪科学分野の1つの評価系として利用されることに期待したい。一方、このモデルの課題として、生体外で毛周期まで観察できない点がある。休止期毛包の再活性化をターゲットとした脱毛症治療薬では、毛周期まで観察できることが好ましく、今後、毛包オルガノイド技術のさらなる深化が求められるだろう。

### 【参考文献】

- [1] T. Kageyama, A. Shimizu, R. Anakama, R. Nakajima, K. Suzuki, Y. Okubo, J. Fukuda, Reprogramming of three-dimensional microenvironments for in vitro hair follicle induction, *Sci Adv* 8(42) (2022) eadd4603.
- [2] T. Kageyama, H. Miyata, J. Seo, A. Nanmo, J. Fukuda, In vitro hair follicle growth model for drug testing, *Sci Rep* 13(1) (2023) 4847.
- [3] T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, J. Fukuda, Effects of oxytocin on the hair growth ability of dermal papilla cells, *Sci Rep* 13(1) (2023) 15587.
- [4] T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, J. Fukuda, Effects of oxytocin receptor agonists on hair growth promotion, *Sci Rep* 14(1) (2024) 23935.
- [5] T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, J. Fukuda, Cinnamic acid promotes elongation of hair peg-like sprouting in hair follicle organoids via oxytocin receptor activation, *Sci Rep* 14(1) (2024) 4709.
- [6] J. Seo, K. Matsumoto, A. Nanmo, S. Tu, D.W. Jeong, Y.S. Chun, L. Yan, T. Kageyama, J. Fukuda, The role of lipids in promoting hair growth through HIF-1 signaling pathway, *Sci Rep* 15(1) (2025) 4621.
- [7] J. Seo, L. Yan, T. Kageyama, A. Nanmo, Y.S. Chun, J. Fukuda, Hypoxia inducible factor-1alpha promotes trichogenic gene expression in human dermal papilla cells, *Sci Rep* 13(1) (2023) 1478.
- [8] T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, S. Hamano, J. Fukuda, Serotonin activates dermal papilla cells and promotes hair growth, *Sci Rep* 15(1) (2025) 24525.
- [9] S. Tu, T. Kageyama, J. Seo, Y. Zhou, J. Fukuda, Development of in vitro hair pigmentation model using hair follicle organoids, *J Biosci Bioeng* 139(2) (2025) 141-146.

# 毛包上皮幹細胞の自己凝縮化培養

「毛髪再生医療実証」グループ

YAN LEI

## 1. はじめに

毛髪は生命維持に直接関与しないが、外見や心理面に強く影響する重要な器官である。なかでも男性型脱毛症（AGA）は日本国内で1000万人以上が悩む疾患とされ、治療ニーズは非常に高い。現在は内服薬や自毛植毛などが主流であるが、効果の個人差や副作用、費用などの課題が残ることから、根本的な解決策として毛髪再生医療への関心が高まっている。

毛髪再生医療は、毛包由来の幹細胞を用いて毛包組織を再構築し、脱毛部位へ移植することで新たな毛髪を再生させる技術である。なかでも毛包上皮幹細胞（HFSC）は、毛幹そのものになる上皮細胞系列を生み出すための重要な細胞であり、その *in vitro* での幹細胞性維持と細胞数増加が再生医療の実現の鍵を握る。

しかし HFSC は、培養中に幹細胞マーカーの発現が低下し、発毛能も著しく減少することが知られている。この課題に対し、マトリゲルを用いた3次元培養[1]や、細胞表面コーティング法[2]、酸素透過性デバイスによる凝集培養などが報告されている[3]が、いずれもヒト細胞への応用には限界がある。ROCK 阻害剤を用いた短期的な維持法も提案されているが、長期的かつ臨床応用に適した培養法としては不十分である。

そこで本研究では、当研究室において毛乳頭細胞に適用することで機能向上が確認された「非継代・長期高密度培養法」を HFSC に応用し、幹細胞性を維持し、なおかつ増殖させることが可能かを検証した。実際に細胞は凝集しながら増殖したため「自己凝集化培養法」と名付け、その有効性を、*in vitro* および *in vivo* において解析した。

## 2. 実験と結果

### (1) 自己凝集化培養による HFSC の機能維持と増殖

まずは、HFSC に対して、継代を行わず 30 日間同一培養面で培養する「凝集培養法」の有効性を検証した。

初代培養では、播種後 5 日でコンフルエントに達したが、幹細胞マーカー CD200 の発現は採取直後と比べて低下した。1 回継代後に長期培養を行うと、培養 10 日目前後に細胞が自発的に凝集塊を形成し（図 1）、通常のコンフルエント時と比較して最大約 3 倍の細胞数を回収できた。

20 日目前後では、CD200 および ITGA6 の発現が上昇

し、K14 の発現は減少していた。免疫染色でも CD200 および K15 陽性細胞が増加しており、RNA・タンパク質レベルの両方で幹細胞性の回復が確認された。継代数 3 の条件でも同様の傾向が得られたが、マーカー発現はやや低下した。

以上の結果より、凝集培養は HFSC の幹細胞性を維持しつつ増殖させる簡便かつ有効な手法であり、特に培養 20 日前後が細胞回収の最適タイミングと考えられる。

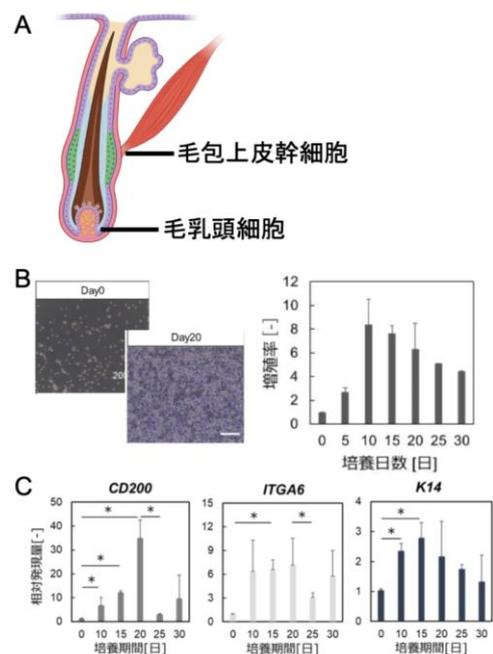


図 1. ヒト毛包上皮幹細胞の自己凝集化培養  
A 毛包の構造模式図。毛包上皮幹細胞はバルジ領域に、毛乳頭細胞は毛包基部に存在する。  
B 自己凝集化培養中における細胞形態の変化および増殖率。  
C 自己凝集化培養における幹細胞マーカー（CD200, ITGA6）および分化マーカー（K14）の遺伝子発現の経時的変化。

### (2) *in vitro* 毛包オルガノイドによる評価

次に、凝集培養後の HFSC とヒト毛乳頭細胞をマトリゲル中で共培養し、毛包オルガノイドを作製した。その結果、通常の平面培養由来の細胞と比べて、オルガノイドからの発芽構造形成が有意に早く、発芽率や伸長速度も向上していた。これは、凝集培養により HFSC の毛髪形成能力が改善されたことを示唆している。（図 2.A）

### (3) in vivo 移植試験

さらに、凝集培養後の HFSC とマウス胎児由来間葉系細胞を混合し、ヌードマウス背部皮下に移植した。従来の平面培養では毛髪再生が確認できなかったが、凝集培養由来の細胞では移植部位において発毛が観察された。これは、in vitro で示された幹細胞性の回復が in vivo でも有効に機能していることを示す (図 2. B)。

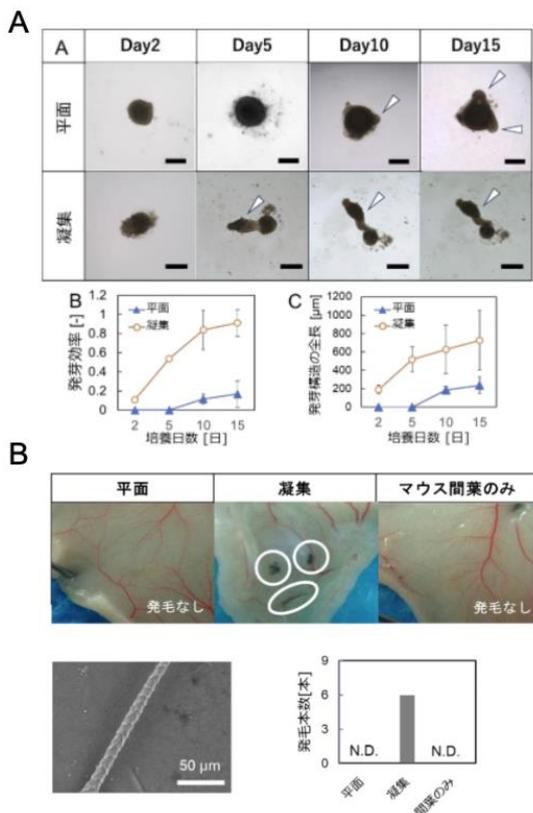


図 2. 自己凝集化培養による毛包形成と発毛能の評価  
**A:** ヒト毛包上皮幹細胞と毛乳頭細胞から作製したオルガノイドの成長比較。凝集培養群ではより早期に発芽構造が形成され、成長率・伸長率ともに高かった。  
**B:** ヌードマウスへの移植実験。凝集培養群のみで発毛が確認され、他条件では再生なし。

### 3. まとめと今後の展望

本研究では、脱毛症患者由来のヒト毛包上皮幹細胞を対象に、簡便な凝集培養法を用いて、幹細胞性を維持しつつ大量に増殖させる可能性を検討した。

その結果、継代を行わず 30 日間にわたって培養を続けることで、細胞が自発的に凝集し、CD200 や ITGA6 などの幹細胞マーカーの発現が上昇したことが明らかとなった。加えて、分化マーカーである K14 の発現は抑制され、幹細胞性の維持が示唆された。さらに、免疫染色によりタンパク質レベルでもマーカーの陽性率が向上していることが確認された。

in vitro においては、凝集培養群から作製した毛包オルガノイドにおいて、従来の平面培養群よりも高い効率で発芽構造の伸長が認められた。また、in vivo 試験では、

凝集培養によって得られた HFSC を移植した場合のみ、発毛が確認され、本手法の有効性が機能的にも裏付けられた。

今後は、凝集培養による幹細胞性維持の分子機構を解明することが求められる。特に、Wnt/ $\beta$ -カテニンや Notch、PI3K-AKT 経路など、HFSC の機能維持に関与するとされるシグナル伝達系への影響を明らかにする必要がある。また、本手法の臨床応用に向けて、GMP 対応の培養系の開発や、安全性・再現性を担保する標準化プロトコルの確立も重要である。将来的には、毛乳頭細胞やメラノサイトなど他の毛包構成細胞との組み合わせにより、より高機能な毛包再生系の構築が期待される。

### 【参考文献】

- [1] Carlos Andrés Chacón-Martínez et al. "Hair follicle stem cell cultures reveal self-organizing plasticity of stem cells and their progeny," EMBO J 36, 151-164, 2016.
- [2] P. Chen et al. "Nanoscale microenvironment engineering for expanding human hair follicle stem cell and revealing their plasticity," J Nanobiotechnol 19, 94, 2021.
- [3] S. Hirano et al. "Expansion Culture of Hair Follicle Stem Cells through Uniform Aggregation in Microwell Array Devices," ACS Biomater. Sci. Eng. 9, 3, 1510-1519, 2023.

# 業績

## 【原著論文】 (投稿掲載)

1. Tatsuto Kageyama, Jieun Seo, Yan Lei, and Junji Fukuda, Effects of oxytocin receptor agonists on hair growth promotion. *Scientific Reports*, 14, 23935, 2024 [IF: 3.8]
2. Shan Tu, Tatsuto Kageyama, Jieun Seo, Yinghui Zhou, and Junji Fukuda, Development of in vitro hair pigmentation model using hair follicle organoids, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 139, 2, 141-146 [IF:2.3]
3. Jieun Seo, Kotone Matsumoto, Ayaka Nanmo, Shan Tu, Do-Won Jeong, Yang-Sook Chun, Lei Yan, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, The role of lipids in promoting hair growth through HIF-1 signaling pathway., *Scientific Reports*, 15, 4621, 2025 [IF: 3.8]

## (投稿中)

4. Yuki Migita, Tatsuto Kageyama, Naoya Ito, Naoki Esaka, Ayaka Nanmo, Jieun Seo, Yan Lei, Sayuri Hamano, Junji Fukuda, Preparation of hair follicle germs using centrifugal forces for hair regenerative medicine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, [IF:2.3]
5. Tatsuto Kageyama, Riki Anakama, Shan Tu, Yuki Migita, Ayaka Nanmo, Lei Yan, Jieun Seo, Junji Fukuda, Hair follicle organoids using human iPSC-derived epithelial cells for hair regenerative medicine. *Scientific Reports* [IF: 3.8]
6. Tatsuto Kageyama, Lei Yan, Jieun Seo, Junji Fukuda, Serotonin activates dermal papilla cells and promotes hair growth. *Communications biology* [IF: 5.2]

## 【書籍】

1. 景山 達斗, 工学的手法を利用した毛髪再生技術の開発, *生物工学会誌*, 102(4) 158-162 (2024)
2. 景山 達斗, 再生医療や創薬のための毛包オルガノイドの構築, *バイオサイエンスとインダストリー*, 82(3), 344-345 (2024)
3. 景山 達斗, 福田 淳二, 発毛剤のスクリーニングのための毛包オルガノイド, *細胞*, 56(9), 678-682 (2024)

## 【口頭発表】

1. Lei Yan, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda  
Multilayer culture of dermal papilla cells promotes its growth while maintaining its hair inductive ability, World Congress of Hair Research 2024, 2024年4月6-9日、Dallas, USA
2. Jieun Seo, Lei Yan, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda  
The regulation of hair inducing genes by hypoxia-inducible factor-1a in dermal papilla cells, WCHR2024,

2024年4月6-9日、Dallas, USA

3. 景山達斗  
毛髪再生医療の実現に向けた組織工学技術  
第260回有機エレクトロニクス材料研究会、2024年4月11日、Web
4. Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda  
Application of hair follicle organoids in screening hair growth-promoting drugs, World Biomaterial Congress 2024, 2024年5月26-31日、Daegu, Korea
5. Junji Fukuda  
Hair regenerative medicine using tissue engineering approaches, World Biomaterial Congress 2024, 2024年5月26-31日、Daegu, Korea
6. Jieun Seo, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda  
毛髪再生機能向上のためのHIF-1aメカニズムの解明とその応用, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第49回研究会研究会、2024年6月1-2日、東京農工大学 小金井キャンパス
7. Junji Fukuda  
Tissue Engineering for Hair Regenerative Medicine, Asian Association of Hair Restoration Surgeons, 2024年6月6-9日、Hangzhou, China
8. Ayaka Nanmo, Atsushi Suzuki, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Rejuvenation Of Human Adult Dermal Papilla Cells By Partial Reprogramming For Hair Regenerative Medicine, TERMIS-WC 2024, 2024年6月25-28日、Seattle, USA
9. 福田淳二  
毛包由来細胞の三次元培養  
第10回細胞凝集研究会、2024年7月12日、とんどんどの森 アバンセホール
10. 江坂直希, Yan Lei, 景山達斗, 福田淳二  
毛髪再生医療のための移植体生着率評価について  
第10回細胞凝集研究会、2024年7月12日、とんどんどの森 アバンセホール
11. 景山達斗, 福田淳二,  
微細加工を用いた細胞培養技術、日本バイオフィルム学会、2024年7月26日、大阪公立大学
12. 福田淳二  
毛髪再生医療  
第13回細胞再生医療研究会学術集会、2024年9月7日、甲南大学ポートアイランドキャンパス
13. 南茂彩華, 鈴木敦, 景山達斗, 福田淳二  
パーシャルリプログラミングによるヒト毛乳頭細胞の若返り、第13回細胞再生医療研究会学術集会、2024年9月7日、甲南大学ポートアイランドキャンパス

14. Tu Shan、景山達斗、福田淳二  
白髪の治療のための in vitro 毛包モデル、第 13 回細胞再生医療研究会学術集会、2024 年 9 月 7 日、甲南大学ポートアイランドキャンパス
15. 景山達斗、福田淳二  
愛情ホルモン“オキシトシン”は毛包オルガノイドの毛幹伸長を促進する、第 76 回日本生物工学会研究会、2024 年 9 月 8-10 日、東京工業大学
16. 南茂彩華、鈴木敦、景山達斗、福田淳二  
毛髪再生医療のためのヒト毛乳頭細胞のパーシャルリプログラミング、第 76 回日本生物工学会研究会、2024 年 9 月 8-10 日、東京工業大学
17. 景山達斗、福田淳二  
毛髪再生医療の実現に向けた毛包の組織工学アプローチ、化学工学会第 55 回秋季大会、2024 年 9 月 11-13 日、北海道大学
18. Jieun Seo, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda  
Regulation of hair growth-related genes by HIF-1a, Biomolecular Horizons 2024, 2024 年 9 月 23 日、Melbourne Convention Center, Australia
19. 福田淳二、景山達斗、Yan Lei  
再生・細胞医療の産業化に向けた神奈川県立産業技術総合研究所の取組について、BioJapan/再生医療 JAPAN/healthTECH JAPAN、2024 年 10 月 9-11 日、横浜（神奈川）
20. Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda  
Hair follicle organoids for regenerative medicine and drug screening, Biofabrication2024, 2024 年 11 月 11 日、九州大学
21. Ayaka Nanmo, Atsushi Suzuki, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Partial reprogramming of human adult dermal papilla cells for hair regenerative medicine, Biofabrication2024, 2024 年 11 月 12 日、九州大学
22. Shan Tu, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, In Vitro Hair Follicle Models: A New Approach to Hair Graying Research, Biofabrication2024, 2024 年 11 月 11 日、九州大学
23. 江坂直希, Lei Yan, 景山達斗, 福田淳二  
毛髪再生医療のためのヒト毛乳頭細胞の生着率評価、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024、2024 年 10 月 28-29 日、仙台国際センター
24. 右田裕起、立花龍式、南茂彩華、景山達斗、福田淳二、In vitro における毛髪再構築モデル、化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 50 回研究会、2024 年 11 月 25-27 日、仙台国際センター
25. Shan Tu, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Gray Hair Model Using Hair Follicle Organoids, IEEE BNM2024, 2024 年 12 月 2-4 日、香港
26. Lei Yan, Seo Jieun, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Dense-Layered Culture of Dermal Papilla Cells, IEEE Bionanotechnology and BioMEMS, 2024 年 12 月 2 日、香港
27. 高梨悠、Lei Yan, 景山達斗, 佐藤文仁, 福田淳二  
毛髪再生医療のための毛包上皮幹細胞培養法、化学工学会第 90 年会、2025 年 3 月 12-14 日、東京理科大学葛飾キャンパス
28. 右田裕起、立花龍式、南茂彩華、景山達斗、福田淳二、毛髪再生毛を試験可能な in vitro 毛包形成モデルの構築、化学工学会第 90 年会、2025 年 3 月 12-14 日、東京理科大学葛飾キャンパス
29. 景山 達斗、福田 淳二  
毛包オルガノイドを用いたオキシトシンシグナルの発毛作用解析、第 24 回日本再生医療学会、2025 年 3 月 20-22 日、パシフィコ横浜

### 【記者発表・取材】

#### 1.取材対応者（福田淳二）

件名：加藤浩次のいまからサイエンス、毛髪の“再生医療”最前線！

放送日 2024 年 4 月 19 日、BS テレ東

#### 2.取材対応者（景山達斗）

件名：カズレーザーと学ぶ、『夢の薄毛治療！髪の毛クローン毛包オルガノイド』

放送日 2024 年 4 月 23 日、日本テレビ

#### 3.取材対応者（福田淳二）

件名：池上彰のニュースそうだったのか!!×林修の今知りたいでしょ！合体 3 時間 SP

放送日 2024 年 8 月 24 日、テレビ朝日

#### 4.取材対応者（景山達斗）

件名：髪の毛クローン「毛包オルガノイド」

公表日 2024 年 5 月 29 日、東京スポーツ新聞

### 【特許】

(1)国内特許出願 1 件

(2)国際特許出願 1 件

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## ライフサイエンス評価法開発研究

### 「次世代ライフサイエンス技術開発」プロジェクト

◆ 統括	125
◆ 次世代ライフサイエンス評価事業の取り組み	127
◆ 抗バイオフィルム性評価試験の拡張へ向けた検討	130
◆ 再生細胞等医療製品に関わる評価法の構築	133
◆ 業績	137

# 次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト

プロジェクトリーダー 石黒 斉

## 【基本構想】

本プロジェクトは、「感染症」、「未病」及び「再生・細胞医療」に関する評価サービスの提供による企業支援を推進していくとともに、新しい評価方法の提供に向けた研究開発を行っている。「感染症」に関しては、抗菌分野(JIS Z 2801)の ISO 17025 を取得している。これに基づいた高い品質の抗菌・抗ウイルス性能評価サービスにより、各種団体の認証マーク取得に必要な結果を提供しており、企業の研究開発を推進するような取り組みを行っている。更に、規格試験では対応できない抗菌・抗ウイルス材料や加工品について、それぞれに合わせた応用的な性能評価サービスを提案し、ニーズに合わせた性能評価サービスの提供を行っている。「未病」に関しては、食品成分の機能性を明らかとすることにより、各企業の製品の付加価値を高めるための機能性評価サービスを提供している。具体的には食品の成分分析や細胞に食品成分を作用させることによって起こる遺伝子発現の変動を明らかとすることで、食品成分の機能性評価を行っており、「ワンストップ型食品機能性評価サービス」として神奈川県未病ブランドの認定を受けている。「再生・細胞医療」に関しては、細胞の特性を理解し、品質を評価するサービスの提供に向けた取り組みを開始しており、2024年度は間葉系間質細胞(MSC)のロット間における細胞集団と分化指向性の違いについて、明らかとしつつある。これらの成果を展開することで、目的とする細胞を評価するための新しい品質特性マーカーの探索が進んでおり、各企業の製品開発の品質評価基盤を構築することを検討している。

## 1. 2024年度の研究目的

次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクトは様々な取り組みを進めている。今年度は特に、以下について報告する。

### 1-1. 新しい抗菌・抗ウイルス材料の機能解析

二次元ナノマテリアルであるホウ化水素ナノシート(HBシート)は、ホウ素と水素の組成比が1:1のシート状の物質であり、担持した水素を常温・常圧において電気エネルギーのみで放出できることが見出されている。同じく、二次元ナノマテリアルグラフェンは様々な分野で応用されており、その機能の一つとして、抗菌・抗ウイルス作用を有することが知られている。このことから、HBシートもグラフェンと同様に抗菌・抗ウイルス作用を発揮する可能性が考えられ、本研究では各種微生物に対するHBシートの機能について検討を行った。

### 1-2. 新たな評価方法の提供に向けた取り組み(抗微生物)

我々は抗バイオフィルム性能評価試験方法であるISO4768に基づいた評価サービスの提供を行っている。ISO4768のバイオフィルムの付着状況の確認方法はバイオフィルムの構成成分すべてをクリスタルバイオレットで染色する方法となっており、バイオフィルム中の生菌数を測定する方法ではない。一方で、バイオフィルム中の生菌への影響について、バイオフィルム中の生菌数の測定に

より評価したい、といったニーズがある。本研究では、そのようなニーズに応えるために形成されたバイオフィルム中の生菌数を測定する評価方法の確立に向けて、試験片から生菌を効率的に回収するための検討を行った。

### 1-3. 新たな評価方法の提供に向けた取り組み(再生・細胞医療)

間葉系間質細胞(MSC)はその不均一性により、ロット間によって、その特性が異なっていることが知られている。再生細胞医療の現場において、MSCは様々な機能を発揮する一方で、その特性の違いが問題となっている。そのため、個々のロットによる違いを明らかとすることにより、そこに含まれる細胞の特性を解析することで、品質管理や評価方法の確立につながると考える。本研究では、ロットの違うMSCに対して一細胞RNA解析を行い、発現パターンの比較を行うことで、各ロットが持つ特性について検討を行った。

## 2. 2024年度の研究成果

### 2-1. 新しい抗菌・抗ウイルス材料の機能解析

HBシートをガラス板に担持した試験片に対して、菌液やウイルス液を接種し、一定時間経過後、その生菌数やプラーク数を確認した。その結果、各種細菌やウイルスに対して、有効な抗菌・抗ウイルス性能が得られることが明らかとなった。ここでは、一例として SARS-CoV-

2を始めとしたウイルスに対する評価結果を図1に示す。グラフに示されるように各種ウイルスに対して、HBシートにウイルスが接触することで、有意なウイルスの不活化を認めた。特筆すべき点として、10分間の短い接触時間でウイルスの不活化を検出限界まで発揮出来ることが明らかとなった。今後は、製品への加工方法、安定性や安全性を含めた検討を続けていき、製品化へつながることを期待している。

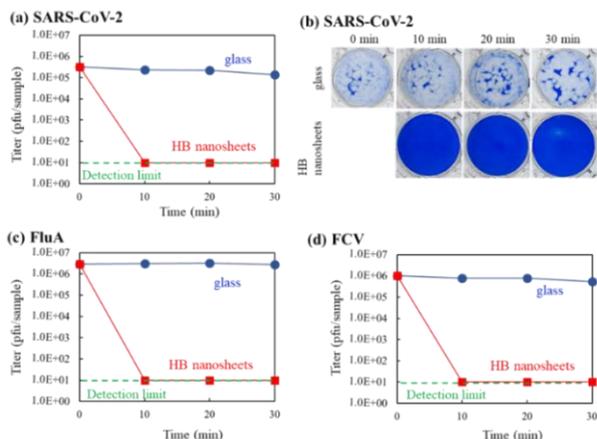


図1：HBシートによる抗ウイルス効果の例

## 2-2. 新たな評価方法の提供に向けた取り組み(抗微生物)

ISO4768は試験片をガラス板に接着させて、バイオフィームを形成する方法となっている。一方、形成されたバイオフィームから生菌を回収するためには、ガラス板から試験片を剥がして、生菌のみを回収する手法が必要である。本検討では、バイオフィーム内の生菌数を測定するために試験片を剥がす工程を簡便に行う方法として、磁石を応用した手法の開発と磁石がバイオフィーム形成に影響を及ぼすかについて、検討を行った。図2に示すように、磁石で試験片を固定用ガラス板に接着させることで、各作業中に試験片がはがれることはなく、また試験片のみを回収する際には簡便に固定用ガラス板から剥がすことができた。また、回収した試験片に付着したバイオフィームに関しては、超音波処理洗浄を行うことで、きれいにバイオフィームを剥がすことが可能であり、生菌数の確認も確実に行うことが出来ていた。



図2：磁石を用いた試験片の固定

## 2-3. 新たな評価方法の提供に向けた取り組み(再生・細胞医療)

骨髄由来のMSCの4ロットについて、シングルセルRNA解析を行い、これらのデータをプロットした結果、細胞周期関連遺伝子を高発現する群とそれ以外の二つの群に分類できることが明らかとなった(図3)。

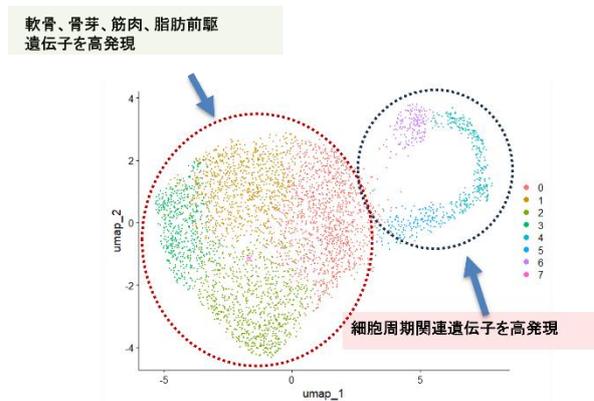


図3：シングルセル解析データの可視化

細胞周期関連遺伝子を高発現している集団を多く持つロットについて、その増殖能を確認したところ、細胞周期関連遺伝子の発現と細胞増殖能の相関性を認めることを確認しており、その他の分化指向性についても、それぞれの分化指向性に資する細胞集団を多く持つロットが実際に予想される分化指向性を示すことを明らかとした。

今後、更にシングルセル解析データ及びポテンシーアッセイのデータ等を蓄積していくことで、品質特性や有効性評価を確認する手法を確立し、企業支援に繋げていくことを目的に活動を続けていく予定である。

# 次世代ライフサイエンス評価事業の取り組み

次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト

永井 武、河野 掌、小林 慶一、石黒 斉

## 1.はじめに

次世代ライフサイエンス技術開発グループでは、ライフサイエンス分野における様々な性能評価サービスの提供や共同研究などを通じて、企業や大学等の研究開発の支援を行っている。具体的には、抗菌、抗ウイルス、抗カビ、抗バイオフィーム、防藻及び抗アレルギーなどの性能評価サービスを提供している。規格化されていない評価についても、既存の方法を応用するなどして、最適な評価法を提供できるように検討を重ねている。さらに、新しい性能評価試験方法の開発や国際標準化なども関係団体と協力しながら進めている。現在、新規の性能評価サービスとして再生細胞医療分野の性能評価サービスも開始する予定である。本稿では、抗菌・抗ウイルス分野での大学との共同研究の活動について報告する。

## 2.HB ナノシートの抗微生物効果についての研究

### 2-1 背景

ホウ化水素ナノシート (HB シート) は、筑波大学の近藤剛弘教授らが発明した二次元ナノマテリアルであり(1)、これまで、水素キャリアとしてのエネルギー貯蔵や触媒などへの応用が報告されている。HB シートは、ホウ素と水素の組成比が 1:1 のシート状の物質であり、担持した水素を常温・常圧において電気エネルギーのみで放出できることを見出している。二次元ナノマテリアルの代表格であるグラフェンは、バイオメディカル分野を含む様々な分野で応用されており、一部のグラフェン化合物は、抗菌・抗ウイルス作用を有することが知られている。そのため、HB シートにも同様の機能を有する可能性があると考えられた。

一方、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) によるパンデミックによって、抗菌・抗ウイルス機能を有する製品が世界的にも注目され、近年その需要が増々高くなっている。しかしながら、これらの製品は、治療を目的とするものではなく、あくまで感染の拡大を防止する目的であるため、安価で意匠性も高く安全な製品であることが求められる。HB ナノシートは安全性も高く透明な物質であり、比較的安価に合成できることから、抗菌・抗ウイルス製品への応用にも適していると考えられた。そこで、HB シートの新たな機能として抗微生物機能に関する研究を、KISTEC、東京科学大学、筑波大学および高知工科大学と共同で行った。その結果、HB シートは、SARS-CoV-2 を含む、様々なウイルスに対して高い抗ウイルス活性を有することが明らかになった。また、ウイルスばかりでなく、細菌やカビにも高い抗菌・抗カビ効果を有すること明らかになった (2)。

### 2-2 方法

HB シート (東京科学大学より提供) をアセトニトリルに溶解し、ガラス板 (2.5 cm × 2.5 cm) にコーティングしたものを HB シート加工品とした。また、コーティングしていないガラス板を無加工品とした。抗菌及び抗ウイルス試験の方法は、既存の JIS (3) 及び ISO (4) 規格を参考にして行った。具体的には、ウイルス及び細菌懸濁液を HB シート加工品または無加工品 (それぞれ n=3) に 50 [l を接種し、密着フィルムをかぶせ、25°C (抗ウイルス) または 35°C (抗菌) で所定時間作用させた。そして、SCDLP 培地 1 ml でウイルスまたは細菌を回収し、段階希釈を行った後、ブランク法 (抗ウイルス) または混釈平板培養法 (抗菌) によって感染価又は生菌数を測定し平均値を求めた。

試験に使用したウイルス及び細菌は、下記の通りである。

- SARS-CoV-2/Hu/Omicron/Kng/21-3301  
宿主細胞: VeroE6/TMPRSS2 (JCRB1892)
- A 型インフルエンザウイルス (A/Hong Kong/8/68 株  
ATCC VR-1679) 宿主細胞: MDCK 細胞 (ATCC CCL-34)
- ネコカリシウイルス (F-9 株、ATCC VR-782)  
宿主細胞: CRFK 細胞 (ATCC CCL-94)
- 黄色ブドウ球菌 (NBRC12732)
- 大腸菌 (NBRC3972)

細胞毒性試験は、上記の 3 種の宿主細胞に様々な濃度で HB シートを添加し 4 日間培養した後、細胞の生死を LDH アッセイによって測定した。

### 2-3 結果

#### 2-3-1 HB シートの抗ウイルス効果

HB シートの抗ウイルス効果を検証するため、HB シート加工ガラス板 (2 mg/sample) を用いて抗ウイルス試験を行った (図 1)。その結果、SARS-CoV-2、A 型インフルエンザウイルス (FluA) 及びネコカリシウイルス (FCV) に対して、HB シートは 10 分の作用で、ウイルスの感染価が検出限界以下 (4 桁以上の減少) となった。この結果より、HB シートは、ウイルスに対して非常に高い抗ウイルス効果を有することが明らかとなった。

次に、ガラス板にコーティングする HB シートの量を減らし、同様に抗ウイルス試験を行った (図 2)。その結果、SARS-CoV-2 では、HB シートの量が 450~500 µg/sample に減らしても、ウイルスの感染価が検出限界となり、それ以下の濃度では、徐々に効果が減弱した。また、インフルエンザウイルスでは 450 µg/sample の HB シートの量で、ウ

ウイルスの感染価は検出限界以下であったが、それ以下の濃度では、濃度依存的に効果が減弱した。一方、ネコカリシウイルスに対しては、450  $\mu\text{g}/\text{sample}$  でも、ウイルス感染価の減少は、ほとんど見られなかった。この結果より、HBシートは、エンベロープを持たないネコカリシウイルスより、SARS-CoV-2 やインフルエンザウイルスのようなエンベロープを有するウイルスに対して、より強い抗ウイルス効果を発揮することが考えられる。

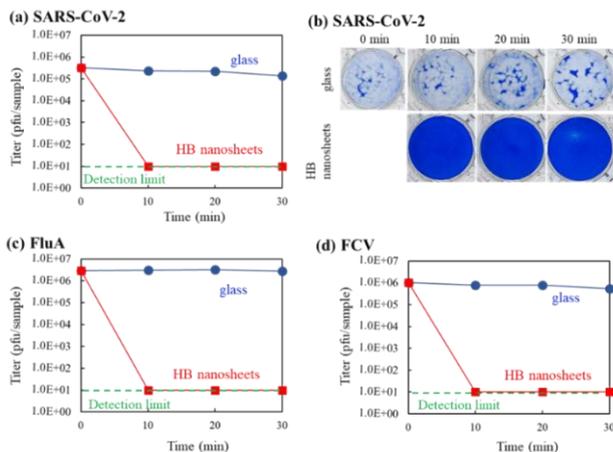


図1 HBシートの抗ウイルス効果

HBシート加工品 (2 mg/sample, 赤) 及び無加工品 (青) を用いて、10~30 分間作用させたときの各ウイルスの感染価を示す。(a)はSARS-CoV-2の感染価のグラフを示し、その時のプラークの様子を(b)に示す。(c)及び(d)は、それぞれインフルエンザウイルスおよびネコカリシウイルスの感染価を示す。

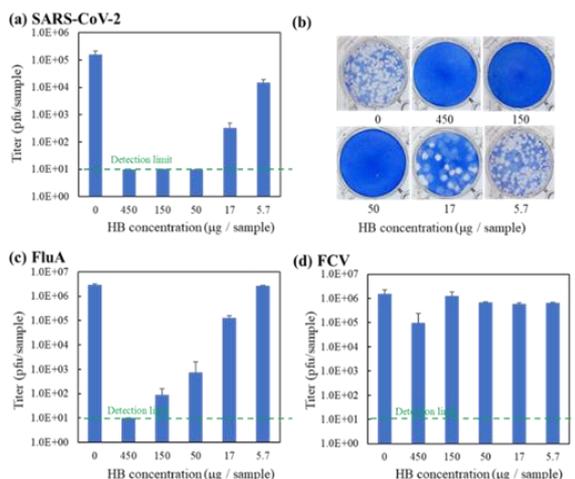


図2 HBシートの量と抗ウイルス効果

ガラス板に担持するHBシートの量を、450~5.7  $\mu\text{g}/\text{ガラス板}$  とし、10分間の作用時間で抗ウイルス試験を行った。(a)はSARS-CoV-2の感染価を示し、その時のプラークの様子を(b)に示す。(c)及び(d)は、それぞれインフルエンザウイルスおよびネコカリシウイルスの感染価を示す。

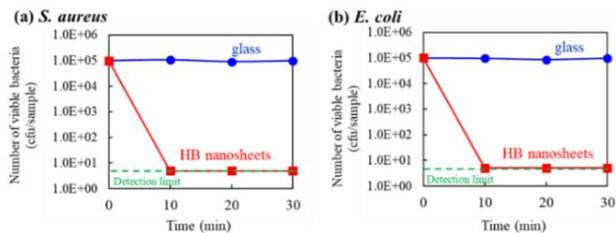


図3 HBシートの抗菌効果

HBシート加工品 (2 mg/sample, 赤) 及び無加工品 (青) を用いて、10~30 分間作用させたときの各菌の生菌数を示す。(a)は黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、(b)は大腸菌 (*E. coli*) の生菌数を示す。

### 2-3-2 HBシートの抗菌効果

2-3-1と同様の条件で、黄色ブドウ球菌と大腸菌に対する抗菌試験を行った(図3)。その結果、ウイルスと同様、10分間の作用という非常に短い時間で、両菌ともに検出限界以下となった(4桁以上減少)。

次に、最小発育阻止濃度(MIC)と最小殺菌濃度(MBC)を測定するため、以下の実験を行った。MH培地を用いてHBシートの1/2段階希釈系列を作成し、そこに菌液を添加後、35°Cで24時間の攪拌培養を行った。その結果、MICとMBCの濃度はともに1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった(図4)。

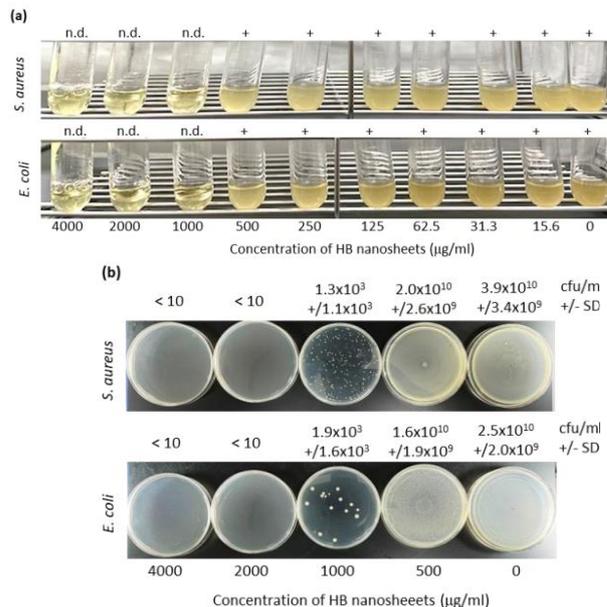


図4 HBシートのMIC及びMBCの測定

HBシートをMH培地に4000~15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で添加し、24時間培養した。(a)MICでは、培養後の菌の増殖を目視で判定した(n.d.:not determined、+:増殖あり)。 (b)MBCでは、培養後の菌液0.1 mlを寒天培地に塗布し、菌の増殖をコロニーの有無で判定した。

### 2-3-3 HB シートの細胞に対する毒性試験

HB シートが細胞に対してどの程度毒性を有するのか、細胞毒性試験を行った（図5）。対象とする細胞は、ウイルスで使用した宿主細胞を用いた。その結果、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  という比較的高い濃度でも約30%程度の細胞毒性であったことから、細胞への毒性は低いと考えられる。

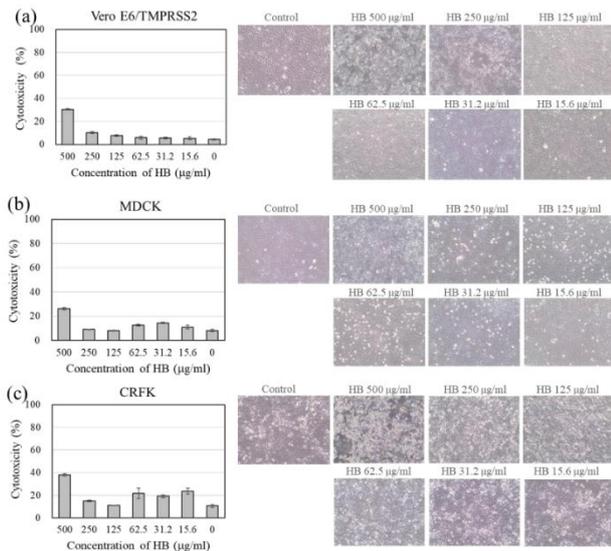


図5 HB シートの細胞への毒性

各濃度の HB シートを細胞（96 ウェルプレート）に添加し、4 日間培養した。その後、LDH アッセイにより細胞毒性を評価した。

### 3.今後の展望

本研究では、HB シートに広域かつ高い抗微生物活性が有することを見出した。しかしながら、今後、抗菌・抗ウイルス製品に使用していくためには、耐久性や安定性、さらには適切な加工方法を検討していく必要がある。また、HB シートの抗菌・抗ウイルス効果のメカニズムについても、まだ不明な点があるため、詳細に解析する必要がある。このような検討を重ねることで、最適な加工方法を提案し、製品化へつながる支援を進めていく予定である。

#### 【参考文献】

1. Hiroaki Nishino, Takeshi Fujita, Nguyen Thanh Cuong et al. Formation and Characterization of Hydrogen Boride Sheets Derived from MgB<sub>2</sub> by Cation Exchange. *J Am Chem Soc.* Oct 4;139(39):13761-13769 (2017)
2. Nagai T, Mauliana A, Kobayashi K, et al. Broad-spectrum antimicrobial effects of hydrogen boride nanosheets. *J Mater Chem B.* 2025 May 14;13(19):5723-5733 (2025)
3. JIS Z 2801 抗菌加工製品-抗菌性試験方法・抗菌効果
4. ISO 21702. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces (2019)

# 抗バイオフィーム性評価試験の拡張へ向けた検討

「次世代ライフサイエンス技術開発」プロジェクト  
小林慶一、河野掌、永井武、石黒斉

## 1. はじめに

バイオフィームとは、細菌などの微生物やそれらが分泌する多糖類やタンパク質などの細胞外高分子物質 (Extracellular Polymeric Substances : EPS) が集合して形成される膜状の構造体であり、台所、浴室・浴槽の内壁などでの「ぬめり」や歯の表面の歯垢 (プラーク) など、身近な生活環境中でも観察される。菌がバイオフィームを形成すると、薬剤に対する耐性が上がり、汚染・感染源として問題となることもあり、バイオフィーム対策は近年注目されている。

バイオフィームについては多くの機関や研究グループにより、目的に応じた様々な手法で解析・評価が行われているが、KISTEC では 2023 年 7 月に制定・発行された ISO 4768 (Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces)<sup>1)</sup> を基にした抗バイオフィーム活性測定試験の評価サービスを提供している。ISO 4768 は、バイオフィームの「付着しにくさ」の評価方法を規定した初の標準規格で、クリスタルバイオレット (Crystal Violet : CV) による染色を利用した手法である。CV は図 1 に示すようなトリフェニルメタン系化合物で、EPS だけに限らず、バイオフィーム中の菌や周囲からバイオフィーム中に取り込まれた有機・無機物が持つマイナスイオンにも結合し、染色する。そのため、三次元的な立体構造を持ち、その構成も複雑なバイオフィーム全体を捉え、その付着のしにくさを評価するには適した方法と言える。

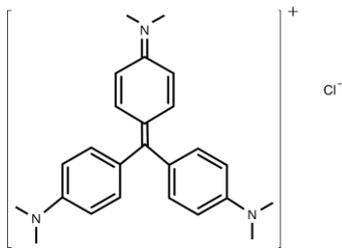


図 1 クリスタルバイオレット

一方、バイオフィーム中の生菌数にどれだけの影響を与えているかを評価したい、というニーズもある。しかし前述のとおり、CV は菌以外の EPS 等も染色し、また菌も生菌だけでなく死菌も染色するため、ISO 4768 に基づき得た CV 染色結果と生菌数を結びつけることは困難である。液剤の効果を評価するためにバイオフィーム内に存在する菌数の減少を評価する方法が米国試験材料協会の試験規格<sup>2)</sup>として存在しているが、当該規格ではバイオフィーム形成のために専用のリアクターを使用しており、初期環境整備がやや必要となる。

そこで本稿では、バイオフィーム中の生菌数評価を、ISO 4768 の手法をベースに形成させたバイオフィームで

簡便に行えないか検討した取り組みの一部を報告する。

## 2. 実験と結果

ISO 4768 による抗バイオフィーム性能評価試験の概要を図 2 に示す。ISO 4768 では、評価する試験片 (30×30 mm) を 40×40 mm サイズのガラス板に貼り付け、この固定用ガラス板ごと試験片を滅菌された容器に入れ、そこへ 1/5 濃度の TSB (Trypticase Soy Broth) で培養した *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (表皮ブドウ球菌) を菌濃度を調整して注ぎ、35°C、48 時間の静置培養でバイオフィームを形成させる。

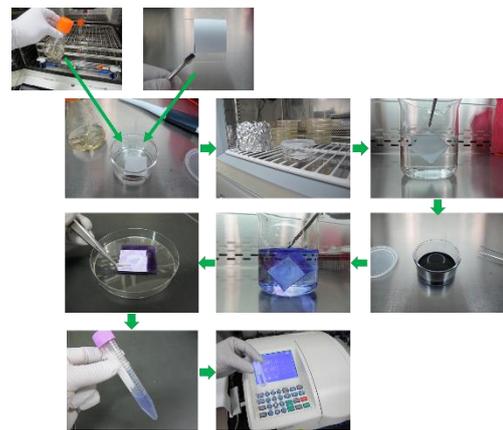


図 2 ISO 4768 による抗バイオフィーム性能評価試験概要

形成されたバイオフィームの定量までには試験片の洗浄のため純水や、染色のため CV 溶液に浸す工程があり、固定用のガラス板が丁度ピンセットでの摘み部分となり都合がよい。しかし、試験片上のバイオフィーム中の生菌数を計測するとなると、①固定用ガラスから試験片を剥がす、②試験片の表面には触れずに操作する、必要がある。①については試験片の固定が甘いと試験操作中で試験片が剥がれ落ちる恐れがあるが、逆に固定が強固過ぎると剥がすのが困難となる。また、ASTM 規格で規定されているバイオフィーム形成用リアクターのような装置が利用できれば別であるが、固定用ガラスが無いと②が困難であり、試験片の固定方法を工夫する必要がある。そこで、図 3 に示すように、固定用ガラス板と試験片の裏面それぞれに厚さ

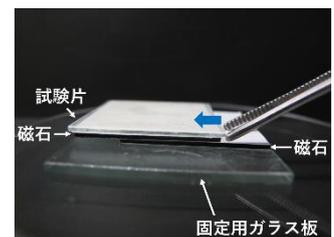


図 3 磁石を用いた試験片の固定

1 mm 程度の磁石シートを貼り付けて試験片を固定用ガラス板に固定し、固定用ガラス板から試験片を剥がす際は試験片の縁を押し、磁石をスライドさせる方法を考案した。磁石を用いることで、試験片を水で洗浄する際に試験片が固定用ガラス板から剥がれ落ちることなくしっかり固定できている一方で、固定用ガラス板から試験片を剥がす際には簡単かつ試験片表面には触れることなく剥がすことが可能であった。

以下、磁石を用いた試験片の固定方法がバイオフィーム中の生菌数測定に適用可能かについて検討した結果の一部を記載する。

### (1) 磁石によるバイオフィーム形成量および菌の増殖への影響確認

まず、磁石が存在することによるバイオフィーム形成量および培養液中の菌（浮遊菌）の増殖への影響の有無を確認した。ISO 4768 に基づき接着テープで試験片を固定したものと、磁石で試験片を固定したものを用意し、各試験片（n=3）上へのバイオフィーム形成量および培養液中の菌量を比較した。バイオフィームの形成は ISO 4768 に規定される手順に沿って行った。試験片として 30 × 30 mm サイズのガラス板を使用し、供試菌として *S. epidermidis* ATCC 3598 を使用した。バイオフィームの形成量は ISO 4768 に基づき、0.1% CV 溶液に試験片を浸し、試験片上のバイオフィームの染色により付着した CV 量を 590 nm の吸光度を測定することで評価した。図 4 に CV 染色後の試験片を示す。試験片裏面の磁石シートの写り込みにより、目視や写真では磁石により固定した試験片

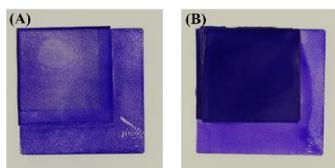


図 4 CV 染色後の試験片  
A: 接着テープで固定, B: 磁石で固定

(図 4(B))の方が濃く染色されているように見えるが、表 1 に示した吸光度測定結果のとおり、実際に試験片上に付着した CV 量は接着テープで固定した場合 ( $OD_{590} = 4.11$ ) と磁石で固定した場合 ( $OD_{590} = 3.97$ ) との間に差は無かった。

また、培養液中の菌の増殖への影響としては、バイオフィーム形成後の培養液を採取し、混積平板培養にて生菌数を測定することで評価した。その結果を表 1 に示す。表 1 のとおり、培養液中の生菌数は試験片を接着テープで固定した場合 ( $3.7 \times 10^8$  cfu/mL) と磁石で固定した場合 ( $3.4 \times 10^8$  cfu/mL) は同程度であった。

表 1 試験片固定方法による吸光度と菌量への影響確認

試験片固定方法	吸光度 $OD_{590}$ (-)	菌量 ( $\times 10^8$ cfu/ml)
接着テープ	4.11 ± 0.60	3.7 ± 1.1
磁石	3.97 ± 0.33	3.4 ± 0.3

### (2) 試験片上からのバイオフィーム回収方法の検討

次に、磁石で固定した試験片上からのバイオフィームの回収方法を検討した。バイオフィームの回収方法はいくつかあるが、今回は超音波を利用した方法が適用可能かを検証した。前述の 2 (1)と同様に試験片上へバイオフィームを形成させ、純水中で穏やかに洗浄した後に、図 3 に示したように試験片の縁を押し、スライドさせて固定用ガラス板から試験片を剥がし、新たな滅菌済み容器へ移した。そこへ生理食塩水 20 mL を加え、超音波洗浄器 (40 kHz) を利用して 5 分間超音波処理を行い、その後往復振盪 (90 rpm、2 分) でよく攪拌した。攪拌後、試験片を回収し、2 (1)と同様に 0.1% CV 溶液で染色し、吸光度により試験片上に残存するバイオフィームを定量した。図 5 に超音波処理をした試験片の CV 染色後の様子を示す。図 5 に示すとおり、超音波処理をした試験片は、超音波処理をしていない試験片と比べて殆ど染色されなかった。また、試験片上の CV 量を吸光度で定量した結果を表 2 に示す。吸光度測定の結果からも、超音波処理をした試験片上には殆ど CV が付着していないことが確認された。

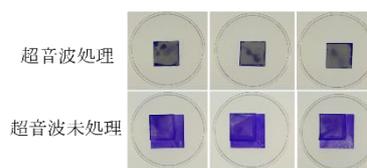


図 5 超音波処理後に CV 染色した試験片

表 2 超音波処理の有無による CV 染色度合の比較

超音波処理	吸光度 $OD_{590}$ (-)	比率 (%)
有り	0.15 ± 0.06	4.4
無し	3.48 ± 0.05	100

さらに、超音波処理後に往復振盪で攪拌したバイオフィーム回収液中の生菌数を混積平板培養で測定した結果、コロニーは正常に形成され、算出された回収液中の生菌数は  $2.6 \times 10^8$  cfu/mL であった。

### 3. 考察及び今後の展望

磁石が存在することによるバイオフィーム形成量および培養液中の菌の増殖への影響については、2 (1)の結果のとおり、ISO 4768 に沿って接着テープで試験片を固定した場合と、磁石で試験片を固定した場合との間に吸光度を指標としたバイオフィーム形成量、培養液中の生菌数のどちらにも有意な差は無く、今回の試験系においては影響が無いことが示唆された。また、磁石をスライドさせることで固定用ガラス板から剥がした試験片上のバイオフィームの回収方法については、2 (2)の結果のとおり超音波処理をしていない試験片に比べ、超音波処理をした試験片の吸光度は 95%以上減少していたため、本試験系では超音波処理が有効であることが示唆された。以上より、今回考案した磁石を用いた試験片の固定で、ISO 4768 の手法をバー

スに形成させたバイオフィーム中の簡便な生菌数評価に利用できる可能性が示唆された。

一方で、磁力の影響を受ける材質のサンプルや、供試菌が磁性細菌のような場合はバイオフィーム形成量および培養液中の菌の増殖への影響が懸念される。また、超音波処理についても周波数、強度や処理時間等の最適化や、菌種によってはバイオフィームの回収方法自体が超音波処理以外の方法が適している可能性もあり、今回考案した方法の適用範囲については更に検証が必要であると思われる。

今後も抗バイオフィーム性能評価試験に限らず、抗菌・抗ウイルス性能評価試験として請けられる範囲拡張のための試行や検証を進めていく予定である。

#### **【参考文献】**

1. ISO 4768, Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces (2023)
2. ASTM E2871, Standard Test Method for Determining Disinfectant Efficacy Against Biofilm Grown in the CDC Biofilm Reactor Using the Single Tube Method (2021)

# 再生細胞等医療製品に関わる評価法の構築

次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト

河野 掌、永井 武、石黒 斉

## 1. はじめに

再生医療等製品は、従来治療法が存在しなかった疾患に対して有効であり、損傷した組織の機能を回復・再構築する能力を有することから、近年その市場は急速に拡大している。具体的には、培養皮膚や培養軟骨などの製品が治験段階に進んでおり、近年では iPS 細胞を用いた脊髄損傷の患者に対する臨床研究結果も報告されている。一方で、こうした細胞製品においては、品質管理や製品特性に関する基準は十分に確立されておらず、治療法としての有用性への期待が先行し、臨床現場で科学的根拠が不十分なまま使用される例もある。

このような状況は、安全性や有効性の確保に課題を残しており、製品の一貫性や再現性を担保する評価系の整備が課題となっている。本グループでは、抗菌、抗ウイルス、抗カビ、抗バイオフィーム及び防藻などの性能評価サービスに加え、再生・細胞医療関連評価サービスの提供にも取り組んでいる。本稿では、その一例として様々な細胞への分化能を有し、優れた免疫調整能、増殖因子分泌能を持つヒト間葉系間質細胞 (MSC) を対象に、一細胞トランスクリプトーム解析 (一細胞 RNA 解析) を用いて、その特性評価をしたので報告する。

## 2. MSC の有する分化能の評価法の開発について

### 2-1 はじめに

再生医療とは組織や臓器の欠損あるいは機能不全に対して、幹細胞を用いてその機能を回復・再構築することを目的とした医療である。幹細胞は大きく多能性幹細胞と体性幹細胞に分類され、前者の代表例が人工多能性幹 (iPS) 細胞、後者の代表例が間葉系間質細胞 (MSC) である。iPS 細胞は、あらゆる細

胞に分化可能な多能性を持つ一方で、その作製には外来遺伝子の導入が必要であり、腫瘍化のリスクや倫理的・技術的な課題が指摘されており、臨床応用には依然として慎重な対応が求められる。一方、脂肪組織、靭帯、歯髄などの様々な組織に存在している MSC は自己複製能と限定的な分化能に加え、免疫調整作用や抗炎症作用、増殖因子の分泌能を備えている。これらの特性により、さまざまな疾患モデルにおいて組織修復や再生への寄与が報告されている。そのため、MSC はより安全かつ実用的な細胞医療製品の候補として、再生医療分野で注目を集めている。しかしながら、細胞製品全般に言える事ではあるが、細胞は不均一な集団であるため、ドナー由来や培養条件によって性質が大きく異なる。そのため、従来の単純な細胞表面分子の発現による方法ではなく、その品質や分化能を客観的かつ定量的に評価する手法の確立が重要な課題となっている。本研究では、MSC の持つ分化能 (主に脂肪分化能、骨芽分化能、心筋などの筋肉分化能、軟骨分化能) や細胞増殖能をより詳細に解析するために、一細胞トランスクリプトーム解析技術を用いた新たな評価法を実施した。その方法の有用性について報告する。

### 2-2 MSC の一細胞解析

LONZA 社より購入した 4 ロットの骨髄由来 MSC (BM-MSC) を、同社指定の専用培地を用いて培養をした。細胞は 5,000 cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種し、90% のコンフルエント状態に達した時点で継代を実施した。継代数が 5 に達した時点での細胞を用いて、10x Genomics 社の Chromium Single Cell Gene Expression Flex Kits を使用し、各ロットあたり約 4,000 細胞を目安にシングルセル RNA 解析を実施した。得られたデータは、Cell Ranger により一細胞毎の遺伝子発現マトリクスを生成し、R パッケージ Seurat を用いて次元削減 (UMAP) およ

び可視化を行った。その結果、細胞集団は大きく 2 つに分かれた。一方は細胞周期関連遺伝子を高発現する集団、もう一方は間葉系前駆細胞としての特徴を示す集団である。後者は主に 軟骨、骨芽、筋肉、脂肪前駆細胞に関連する遺伝子群の高発現を特徴とした。

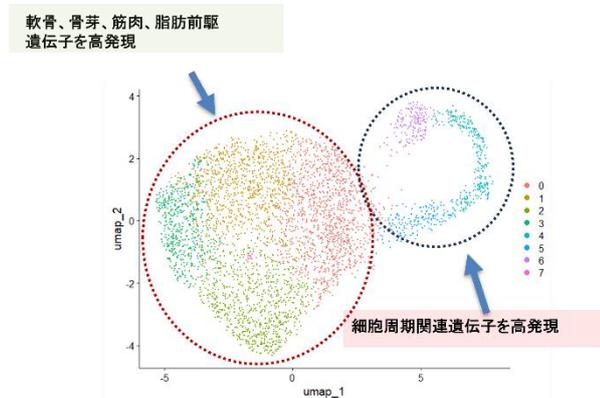
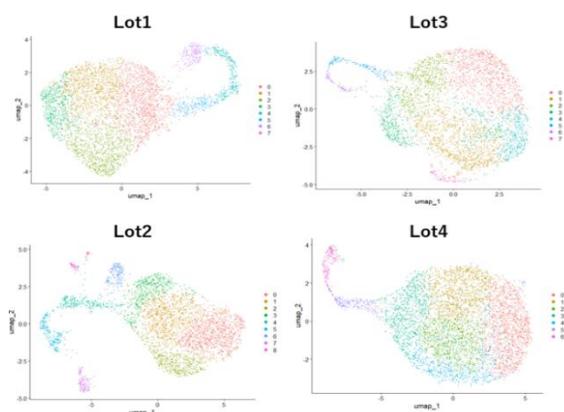


図1 一細胞 RNAseq data の UMAP による可視化結果

上記の解析を、4 つの BM-MS C ロットすべてに対して実施した結果が以下である。



Lot2 を除く Lot1, 3, 4 については、UMAP 上で類似した細胞群構成を示していた。一方 Lot2 は他のロットと異なる分布を示し、特徴的な挙動を示した。また、Lot3 および Lot4 においては、細胞周期関連遺伝子を高発現する細胞群に属する細胞の割合が、Lot1 や Lot2 と比較して少ない傾向が見られた。

4 ロットのデータに対して、R パッケージ Harmony を用いてバッチ効果の補正を行い、統合解析を実施した。その結果、各ロットの細胞はバッチ間のばらつきが抑えられた状態で統合され、図1で得られた結果と同様に、

細胞周期関連遺伝子高発現集団と間葉系前駆細胞集団に大別される形でクラスタリングされた。

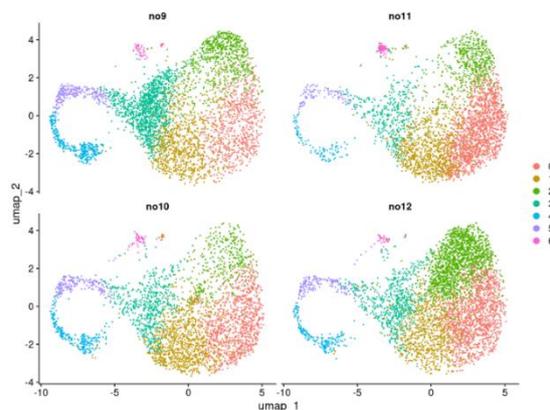


図2 4 ロットについてのバッチ効果補正後の UMAP

### 2-3 細胞増殖能の検討

細胞周期関連遺伝子を高発現する集団に属する細胞数の割合は、各ロットの細胞増殖能を反映している可能性があるかと仮定し、その検証のための実験を実施した。具体的には、各ロットについて 6 ウェルプレートに同量の細胞数を播種し、3 日後、5 日後、7 日後の各時点において細胞数を定量的に測定した。その結果を図3に示した。予想通り、Lot1 において最も高い細胞増殖能が認められた。

この結果は、シングルセル解析において Lot1 が細胞周期関連遺伝子を高発現する細胞群の割合が高かったことと一致しており、本指標が細胞増殖能の目安として機能する可能性を示唆している。

#### 細胞増殖能試験

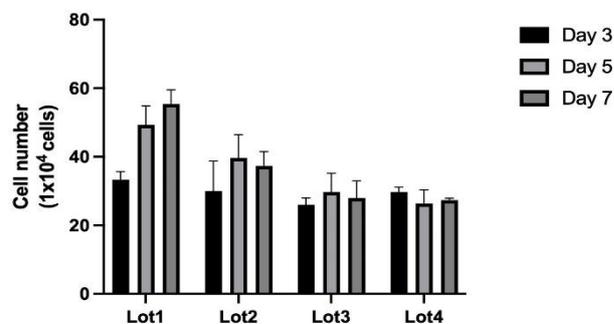


図3 4 ロットについての細胞増殖能試験結果

## 2-4 分化能の検討

Lot1 および Lot4 では、クラスター2 および 3 に属する細胞の割合が低く、一方で Lot2 および Lot3 では、クラスター 0 および 1 の割合が高い傾向が見られた。この観察結果をもとに、各クラスターの割合は分化能を反映している可能性があるとして仮定し、各ロットにおける脂肪、骨芽、軟骨への分化能を評価する実験を実施した。

### 2-4-1 脂肪分化能の評価

6 ウェルプレートに各ロット、等しい細胞数を播種し、100% のコンフルエント状態に達した時点で、脂肪分化誘導培地と脂肪分化メンテナンス培地を用いて培養に切り替えた。その後 18 日間培養し、脂肪細胞の蓄積を AdipoRed アッセイ試薬を用いて検出した。蛍光強度を測定し、相対蛍光強度として脂肪分化能を評価した。予期した通り、Lot1 および Lot4 は高い脂肪分化能を示し、Lot2 及び Lot3 においては脂肪滴の形成は確認されなかった。

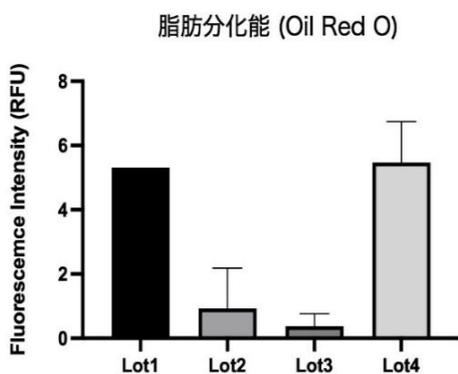


図4 4ロットについての脂肪分化能試験結果

### 2-4-2 軟骨分化能の評価

15ml チューブに各ロット、250,000 細胞を播種し遠心処理により細胞をペレット状にした。その後、TGF- $\beta$  を含む軟骨分化培地中で培養を行い、スフェロイドを形成させた。20 日間の培養後、Alcian Blue 染色キットを用いて軟骨細胞を染色し、色素を溶出させ 溶出液に対して波長 620nm で吸光度を測定し、軟骨分化の指標とした。Lot3 において高い分化能を有している事が示された。

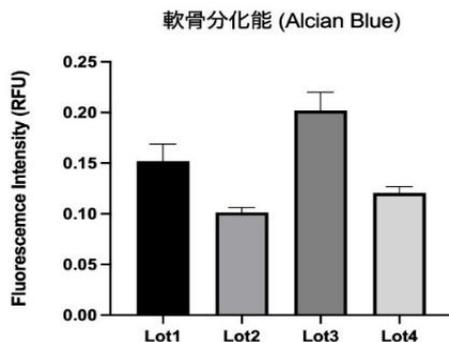


図5 4ロットについての軟骨分化能試験結果

### 2-4-3 骨芽分化能の評価

コラーゲンコート済みの 6 ウェルプレートに、各ロットから 30,000 細胞を播種した。24 時間後に骨芽分化用培地に交換し、28 日間にわたって分化誘導を行った。その後、OsteoImage Mineralization Assay を用いて骨芽細胞を蛍光染色し、励起波長 485nm/蛍光波長 520nm で測定を行い、相対蛍光強度として骨芽分化能を評価した。

Lot4 において高い骨芽分化能が観察できた。

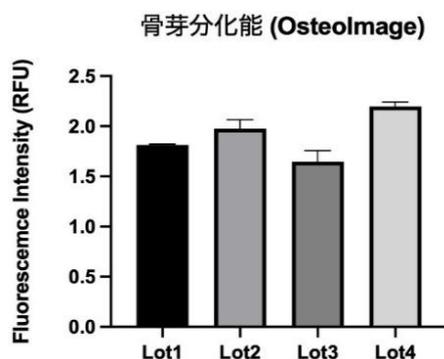


図6 4ロットについての骨芽分化能試験結果

上記の結果より、各クラスターにおける細胞の割合値と分化能の間に相関がある事が明らかとなった。各クラスターに特異的に発現している遺伝子群は、Clariom™ S マイクロアレイを用いてバルクレベルでロット間の発現パターンを確認・比較した所、シングルセル解析の結果と整合する発現傾向が確認された。

次に、BM-MSc における遺伝子発現制御の全体像を把握するため R パッケージ hdWGCNA (共発現遺伝子ネットワー

ク解析)を実施し、モジュール解析を行った。その結果、予想通り、細胞周期関連遺伝子高発現モジュール、脂肪・骨芽前駆関連遺伝子高発現モジュール、EMT(上皮間葉転換)関連遺伝子高発現モジュールとに分かれており、上記結果を支持していた。

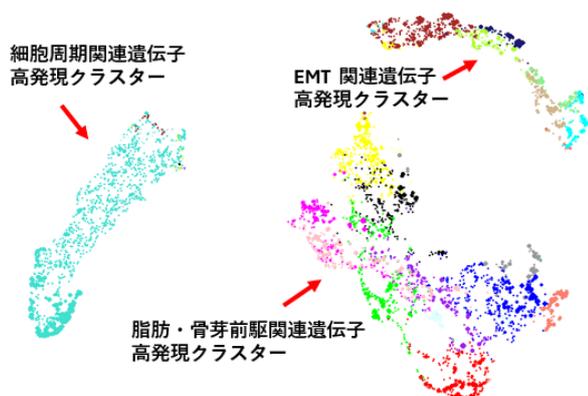


図7 共発現解析ネットワーク解析の結果

これらのモジュール構造は、シングルセル解析および分化能評価結果とも一致しており、BM-MSC の多様性の解釈を支持する知見となった。

## 2-5 老化細胞の検出

疑似時間解析を実施した結果、細胞状態の進行に伴う遺伝子発現の変化を疑似時間上で捉える事ができた。特に、既知の老化関連遺伝子については、疑似時間の後期において発現の上昇が確認された。これまでの実験結果と合わせて考察すると、細胞増殖能が低いロットでは、老化関連遺伝子の発現が高いと推定した。そこで、 $\beta$ -Gal 活性を GFP 蛍光染色により可視化し、各ロットにおける老化細胞の割合を評価した。

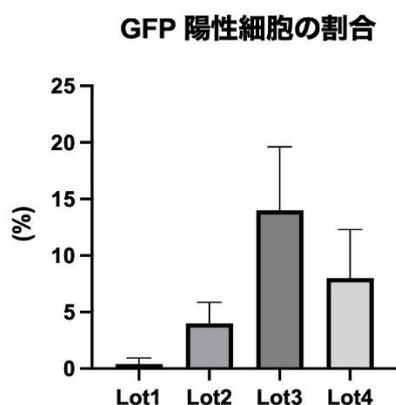


図8 4ロットにおける GFP 陽性細胞の割合

細胞増殖能が低いと評価された Lot3 および Lot4 においては、老化細胞の割合が高く、品質としては不適合なものであると判断される可能性がある。

## 3. まとめ及び今後の展開

本研究では、LONZA 社より提供された4ロットの BM-MSC に対して、一細胞 RNA 解析の結果と、実際の細胞増殖能、老化指標、分化能に関する包括的な評価を実施した。その結果、一細胞 RNA 解析結果を実施する事で細胞の品質特性を捉える事が可能な事を示した。又、詳細な解析を行う事で新しい有用な評価指標を得られる事を示した。現在展開している本評価サービスを安定的に提供できるように努めていく。

さらに、来年度からは厚生労働省 創薬クラスター事業がスタートとなる。KISTEC では、公設のオープンラボ機能を新設する。本評価法に限らず、様々な評価法(ポテンシーアッセイ)が実施可能な研究環境を整備し、実用化・産業化を支援する基盤として展開していく予定である。

### 【参考文献】

1. Miura T, Kouno T, Takano M, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals LRRRC75A-Expressing Cell Population Involved in VEGF Secretion of Multipotent Mesenchymal Stroma/Stem Cells Under Ischemia. *Stem Cells Transl Med* 15;12(6):379-390, 2023.
2. Gao Y, Chi Y, Chen Y, et al. Multi-omics analysis of human mesenchymal stem cells shows cell aging that alters immunomodulatory activity through the downregulation of PD-L1. *Nature communications* 14, Article number: 4373 (2023)

# 業績

## 【原著論文】

1. Kiribayashi R, Nakane R, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Antiviral and antibacterial activities of yttria-stabilized zirconia. *Materials Letters*. 367: 136658, 2024.
2. Nishitani T, Hirokawa T, Ishiguro H, Ito T. Mechanism of Antibacterial Property of Micro Scale Rough Surface Formed by Fine-Particle Bombarding. *Science and Technology of Advanced Materials*. 25: 2376522, 2024.
3. Abe K, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Antibacterial and antiviral activities of transparent PVA coating films prepared by mixing solutions containing leaked ions from rare earth iodates. *Journal of Coatings Technology and Research*. 22: 471-480, 2025.
4. Abe K, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Effects of UV illumination on organic dye decomposition activity and antibacterial and antiviral activities of rare earth iodates. *Journal of Materials Science*. 59: 17558-17572, 2024.
5. Matsushita Y, Inoue G, Ogawa N, Ishiguro H, Sunada K, Ishibashi K, Kojima H, Shimizu T, Shingubara S, Ito T. Antibacterial properties of resin nanostructures coated with SiO<sub>2</sub> thin films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 250:114560, 2025.

## 【口頭発表】

1. Ishiguro H. Proposal to change of existing standards and new test method. TC206/WG9. 2024年7月4日。(オンライン).
2. Ishiguro H. Determination of antiviral activity by photocatalytic materials. The 22<sup>nd</sup> Northeast Asia Standards Cooperation Forum. 2024年7月15日。韓国(ソウル).
3. Ishiguro H. Test for antiviral activity using animal virus. ISO TC206/WG9. 2024年9月26日。フランス(サンドニ).
4. Ishiguro H. Progress report for the standardization of antivirus activity by photocatalytic materials. Committee of Asian Standardization for Photocatalytic Materials and Products 2023. 2024年10月21日。台湾(台北)。(招待)
5. イットリア(YSZ)の抗菌・抗ウイルス活性. 桐林龍寿, 中根 陸, 砂田 香矢乃, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 永井 武, 石黒 斉, 中島 章. 日本防菌防黴学会 第51回年次大会. 2024年9月18日。(東京)
6. 石黒 斉, 永井 武, 小林 慶一, 河野 掌. 再生・細胞医療の産業化に向けた神奈川県立産業技術総合研究所の取組について. 2024年10月9-11日. BioJapan/再生医療 JAPAN/healthTECH JAPAN. (神奈川県)
7. 伊藤 昌可, 河野 掌, 佐藤 陽治, 三浦 巧, 高野 慈美, 河合 純. 間葉系幹細胞のクラスタリングと機能的な細

- 胞叢集団の特定. 2024年10月9-11日. BioJapan/再生医療 JAPAN/healthTECH JAPAN. (神奈川県)
8. 永井 武. 抗菌抗ウイルスの評価系と最新の標準化について. 光触媒ミュージアム会館 20周年記念 光触媒フォーラム「さらに、光触媒」. 2024年11月12日。(神奈川県)
9. 石黒 斉. 酸化チタンの安全性について. 光触媒工業会 管理責任者講習会. 2024年10月29日。(オンライン)
10. 宮崎 孝太郎, 小林 慶一, 永井 武, 石黒 斉, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章. 3d 金属を含む各種複合酸化物の作製とその抗ウイルス活性. 2024年度色材研究発表会. 2024年10月30日。(東京) 優秀ポスター賞
11. 小川 奈々子, 小林 慶一, 永井 武, 石黒 斉, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章. 遷移金属酸化物を担持した (Ce<sub>0.8</sub>, M<sub>0.2</sub>) O<sub>2-δ</sub> (M=Y, Gd, (Zr), Bi)の作製とその有機物分解活性および抗ウイルス活性. 2024年度色材研究発表会. 2024年10月30日。(東京)
12. 亀井 飛鳥. 未病から取り組むウェルネス向上. Cutting-edge Bio-seminar 9/ ワンヘルス&ウェルネスに向けた新たなアプローチ. 2024年11月20日。(オンライン) (主催: (一財)バイオインダストリー協会) JBA
13. 甘利 奈菜実, 亀井 飛鳥, 石黒 斉, 菅原 亨. TDP-43の変異で生じる神経細胞の遺伝子発現変動. 第47回日本分子生物学会年会. 2024年11月26-29日。(オンライン及び福岡)
14. 桐林 龍寿, 中根 陸, 宮崎 孝太郎, 砂田 香矢乃, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 永井 武, 石黒 斉, 中島 章. Sn系複合酸化物の抗菌・抗ウイルス活性およびそのメカニズム. 第63回セラミックス基礎科学討論会. 2025年1月9日。(新潟)
15. 桐林 龍寿, 中根 陸, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章, 砂田 香矢乃, 永井 武, 石黒 斉. 第一原理計算によるCu系酸化物の抗菌・抗ウイルス活性機構調査. 日本セラミックス協会 2025年年会. 3月5-7日。(静岡)
16. 小川 奈々子, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章, 小林 慶一, 永井 武, 石黒 斉. 遷移金属酸化物を担持した (Ce<sub>0.8</sub>, M<sub>0.2</sub>) O<sub>2-δ</sub> (M=Bi, Zr, Gd, Y)の暗所と可視光下における有機物分解活性および抗ウイルス活性. 日本セラミックス協会 2025年年会. 3月5-7日。(静岡)
17. 河野 掌, 永井 武, 小林 慶一, 河合 純, 石黒 斉. 一細胞トランスクリプトーム解析で評価する細胞の品質- MSCの品質評価-. 第24回日本再生医療学会総会. 2025年3月21日。(横浜)
18. 三浦 巧, 高野 慈美, 河野 掌, 草川 森士, 黒田 拓也, 平井 孝昌, 西村 仁孝, 山元 智史, 石黒 斉, 澤田 留美, 石井 明子, 佐藤 陽治, 安田 智. 細胞外小胞 (EV) 製剤製造用細胞基材の品質特性の探索に関する研究. 第

- 24 回日本再生医療学会総会. 2025 年 3 月 21 日.(横浜)
- 19.永井 武, 小林 慶一, 河野 掌, 石黒 斉. 第 24 回日本再生医療学会総会. 最新技術紹介コーナー. 第 24 回日本再生医療学会総会. 2025 年 3 月 20-22 日.(横浜)
- 20.永井 武. 抗菌・抗ウイルス効果と物質・材料 – 抗菌・抗ウイルス物質・材料とその評価法、および応用 (II) – 光触媒. KISTEC 抗菌セミナー. 2025 年 2 月 26 日. (オンライン)
- 21.河野 掌, 石黒 斉, 永井 武, 小林 慶一. 再生医療等加工製品に対する品質特性評価の提供に向けた取り組み. キングスカイフロンティアサイエンスフォーラム. 2025 年 3 月 14 日.(川崎)

**【特許】**

- (1)国内特許出願 2 件

# 研究報告2025目次【研究開発部】

## 戦略的研究シーズ育成事業

研究テーマ：光ファイバーベース高感度テラヘルツオシロスコープの実現

◆統括・業績・・ 140

研究テーマ：Beyond5G対応のナノセルロース製電子基材の創製

◆統括・業績・・ 145

研究テーマ：徐脈性不整脈の革新的細胞移植治療開発

◆統括・業績・・ 150

研究テーマ：未知を知るAI搭載型ハードウェアの開発

◆統括・業績・・ 155

研究テーマ：超高感度質量分析に向けたマイクロ流体技術の開発

◆統括・業績・・ 161

研究テーマ：内在性因子による造血幹細胞増幅法の開発

◆統括・業績・・ 166

# 光ファイバーベース

## 高感度テラヘルツオシロスコープの実現

研究代表者：横浜国立大学 片山 郁文

### 【基本構想】

テラヘルツ領域・ピコ秒領域は、エレクトロニクスが得意とする周波数領域と、光・フォトンクスが得意とする周波数領域・時間領域のちょうど中間に位置しており、研究や応用が難しい領域として知られてきた。近年では、超短パルスレーザー技術の発展により簡単にこの領域の電磁波や超高速ダイナミクスを発生検出できるようになり、様々な応用可能性が議論されるようになってきているが、その応用は進んでいない。そこで我々はこの領域の研究を妨げる要因の一つとして、リアルタイムにテラヘルツ・ピコ秒の波形を可視化する技術が不足していることがあると考え、リアルタイム波形計測技術を開発することを目指した。さらに、この可視化技術、すなわちテラヘルツオシロスコープ技術を高感度化し、光ファイバーベースの装置とすることで、テラヘルツ・ピコ秒波形の堅牢なリアルタイム検出装置を実現することを目指した。本稿では、これらの技術の概要を示し、その応用例として、半導体レーザーダイオードからのピコ秒パルス発生可視化と、共鳴トンネルダイオードからのテラヘルツ出力波形計測結果について報告する。

### 1. 研究目的

テラヘルツ領域・ピコ秒領域は、周波数  $10^{12}$  Hz、時間にして  $10^{-12}$  s の領域を指し、電場の変化があまりに早いことから、エレクトロニクスで扱うことが極めて難しい周波数領域であった。例えば、電圧波形をモニターするために良く用いられるオシロスコープは、半導体素子の処理速度の関係から 100 GHz を超えることが極めて難しく、テラヘルツ領域・ピコ秒領域の高感度な波形検出はほとんど実現されていない。また、計算機の処理速度も CPU コアあたり GHz を少し超えたところで頭打ちになっている他、無線通信などで用いられるキャリア周波数も現時点では GHz オーダーであり、次世代 5G/6G 通信においても 100 GHz を超えることが難しい状況にある。

一方で、テラヘルツ領域の研究のもう一つの方向性として、光技術を用いたアプローチがある。光領域では、その高いフォトンエネルギーを活用して、光によって励起された電流を計測したり、生成する熱を検出したりする。そのためにフォトダイオードやパイロセンサーなど様々な計測素子が存在しており、光強度を調べるために用いられている。また、これらの半導体素子を二次元に並列化することも可能であり、デジタルカメラをはじめとしてイメージング可能な二次元撮像素子が様々な実用化されている。しかしながら、テラヘルツ領域のフォトンエネルギーは、室温のエネルギーよりも小さいため、このような方式でテラヘルツ波を検出しようとする、熱雑音に埋もれてしまうという問題があった。このため、テラヘルツ検出では微小な電流を大きく増幅した

り、差分を高感度に検出したりする手法が必要になり、計測速度が犠牲となる場合が多かった。したがって、テラヘルツ領域で起こる強度の変化をリアルタイムに可視化することはこれまでには実現できていないと言える。

このような中で、我々は超短パルスレーザーを用いたコヒーレントなテラヘルツ波の発生検出手法に着目した。超短パルスレーザーを非線形結晶や光伝導アンテナなどの素子に照射すると、光励起によって超高速の分極や電流の変化が起こり、それによってテラヘルツ波が発生する。また、検出側では、テラヘルツ波と共に超短パルスレーザーが照射され、テラヘルツ電場によって誘起された屈折率変化や電流変化を検出することで、コヒーレントなテラヘルツ波の電場強度に関する情報を得ることができる。この測定手法を検出用のパルスレーザーを照射するタイミングを変えながら計測することで、テラヘルツ領域・ピコ秒領域のパルス波形を得ることができる。このような手法をテラヘルツ時間領域分光法 (THz-TDS) と呼び、物質の超高速ダイナミクスやテラヘルツ応答を調べるために良く用いられている。

しかしながら、この手法には重大な欠点が存在する。THz-TDS ではコヒーレントな電磁波を用いるために、熱励起などの影響は受けずその波形を検出することができるが、時間差を変えながら繰り返し測定するため、繰り返し同様の波形や現象が誘起される場合でなければ、精度よく波形を検出することができない。したがって例えば、時々刻々と揺らぐ現象について調べたい

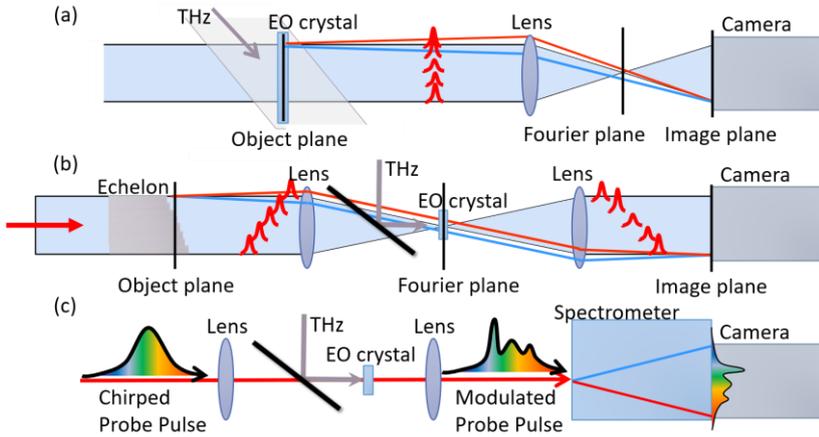


図1：リアルタイムにレーザー1パルス（シングルショット）でテラヘルツ波を検出する主な手法。(a) テラヘルツ波とプローブ光を斜めに交差させる手法。(b) 階段型の光学素子を用いて、検出用の光を分割し、電気光学結晶に集光する手法。(c) チャープパルスを用いて、時間情報を波長にマッピングする手法。

場合には、測定するたびに異なる強度が得られてしまうため、正確な測定を行うことができなくなる。このため、従来の THz-TDS は、繰り返し測定可能な平均的な現象のみが測定対象となってきた。一方で、テラヘルツ領域の波形や、ピコ秒の時間変化を示す現象は必ずしも繰り返し安定的に生じるものばかりではない。

我々は、この点に着目し、レーザーパルス1パルスでテラヘルツ波形や超高速波形を一挙に取得しようというシングルショット分光法を研究してきた[1]。図1にそのための計測手法として代表的なものの原理をまとめた[2]。本研究では、これまでに開発してきたこれらの技術を用いて、ピコ秒・テラヘルツ領域の光強度波形、電場波形をリアルタイム計測するシステムを開発し[3]、利得スイッチ半導体レーザーや[4]、テラヘルツ共鳴トンネルダイオードの出力波形計測に適用し[5]、パルス波形の計測に成功したので報告する。用いた手法は、前者については、チャープパルスを用いる分光手法(c)であり、後者については、階段型のミラーを用いてレーザーパルスを分割する手法(b)である。また、ファイバーレーザー技術と組み合わせることによって、堅牢なテラヘルツオシロ

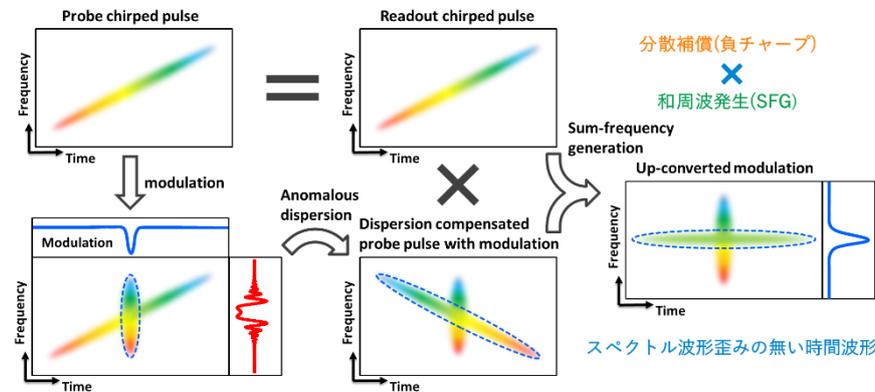


図2：分散補償チャープパルス分光法の原理。プローブのチャープパルス（左上）に変調を書き込むと、スペクトル領域では左下図の右赤線のようにになる。これを位相補償し中下図のようにした上で、中上図のチャープパルスと和周波を取ると、右図のような時間周波数スペクトルを得ることができる。これをスペクトル（横）方向で見ると干渉は生じず、右青線のように元の変調波形に対応した歪みのない波形を得ることができる。

スコープを実現できることを示した。

## 2. 研究成果

まず、本研究で主に追究したチャープパルスを用いて超高速波形を計測した手法及びその結果について述べる。超短パルスレーザーは極めて短いパルス幅を持つことからそのフーリエスペクトルは広帯域である。チャープパルスとは、この様々なスペクトル成分が別々の時間に到達することによってパルス幅が長くなった状態のことを指し、超短パルスレーザーを用いた実験において極めて重要な概念である。図2の左上に示したように、時間が経つにつれて中心周波数が変化していくパルスがチャープパルスである。

チャープパルスは、スペクトル位相の周波数依存性に周波数の二次に比例する成分が入ることによって表現できる。すなわち、光のスペクトル振幅  $A(\omega)$ 、周波数  $\omega$  とした時、光パルスの電場波形は、

$$E(t) = \int d\omega A(\omega) e^{-i\omega t + iat^2}$$

である。このとき位相項の  $iat^2$  がスペクトル成分ごとに到達時間が異なることを表している。この値の正負によって、光の周波数が時間的に上昇していくか、下降していくかを変えることができる。

これをテラヘルツ波や超高速応答のプローブとして用いた際には、時間的に変化する現象が光パルスの異なる波長によってプローブされるために、時間情報が波長にマッピングされることになる。そうすると、光パルスのスペクトルを見れば実効的に超高速領域の時間波形を見ていることにつながるため、単一の光パルスであってもそのスペクトル形状を測定することができれば、時間領域の情報を得ることができる。チャープパルスのパルス幅は制御することができるので、実際に観測できる時間幅もそれによって制御できる。

このような手法は非常に簡便であることから古くから研究され、テラヘルツ波や超高速現象の分光に数多く用いられてきた。しかしながらこの手法には、特に高い時間分解能が必要な時に、スペクトルで計測した波形が大きくゆがむという問題点があった。通常時間領域の分光法では、パルスの光がすべての光が位相の揃った状態で利用されるため（すなわちチャープがない、最も短いパルス幅の状態）、高い時間分解能を有すると考えられる。一方でチャープパルスを用いると、ある時間を計測するために利用できる光のスペク

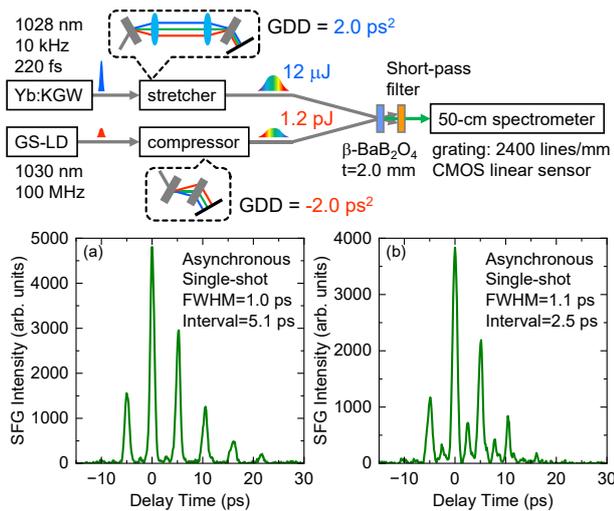


図3：利得スイッチレーザー（GS-LD）のパルス波形計測。上図に示したように、1  $\mu\text{m}$  のフェムト秒パルスレーザーを用いて位相補償をした上で、GS-LD の出力波形を計測した。(a) (b) 非同期で計測した出力パルス波形の一例。

トル幅が、パルス全体のスペクトル幅よりも狭くなるため、得られる情報としてはその狭くなったパルス幅の時間分解能しか得られないのではないかと、ということになる。このような考察から、チャープパルスを用いたシングルショット分光法の時間分解能  $\Delta t$  は、そのスペクトル幅で可能な最短パルス幅  $T_{TL}$ （チャープ 0 の状態）と用いるプローブの窓幅  $T_w$  を用いて、

$$\Delta t = \sqrt{T_{TL} T_w}$$

であると考えられてきた。すなわち、長い時間を見ようとして窓幅（チャープパルスのパルス幅  $T_w$ ）を大きくするとどんどん時間分解能  $\Delta t$  が悪くなる（長くなる）わけである。

我々をはじめいくつかのグループは、このような限界を打破するために、図2に示したような位相補償と和周波発生が利用できることを明らかにした[3]。上記の議論は、時間分解能を強度プロファイルの幅としてのみ取り扱っているが、実際には光パルスと超高速な変調それぞれをスペクトル領域もしくは時間領域で取扱い、その波形変化をシミュレーションすべきである。その結果、時間分解能の悪化は、超高速変調による信号とチャープパルスの干渉によって生じており、それによって、振動型の変調がかかってしまうことが分かった。これを補償するために図2に示したように、計測に使用したチャープパルスを一旦位相補償し、元のチャープパルスとの和周波を取ることで、図2右図のように、時間領域の情報を周波数領域に1対1で対応させることが可能となる。この手法を用いると、テラヘルツ波による変調波形や光パルスの超高速波形を、ゆがみなく周波数領域でシングルショット計測することが可能となる。

このような手法を用いて、利得スイッチレーザー(GS-LD)と言われるピコ秒パルスを発生させることのできる半導体レーザーを計測し、その出力波形を超高速領域で評価した[4]。図3はその実験系と評価結果を示す。図3上図に示したように、波形計測には Yb 系のパルスファ

イバーレーザーを使用し、回折格子対を用いてチャープパルスとすることで読み出し光として使用した。GS-LD の出力パルスは、読み出し光と逆で同量のチャープを付与し、非線形結晶  $\beta\text{-BaB}_2\text{O}_4$  において読み出し光との和周波数を取得した。和周波光は、ショートパスフィルダーで基本波をカットし、信号のみを分光器で波長分解してスペクトルを計測している。図2の右端に示したように、このような配置を用いると、スペクトル波形がそのまま時間軸に対応するような計測が実現できる。

図3(a)、3(b)はこのような計測で得られた典型的な出力パルス波形である。通常の超高速計測で二台のレーザーを用いる場合には、二つのレーザーを精密に同期する必要があるが、本研究で用いた波形計測手法はレーザー1パルスで計測が終了するシングルショット計測手法であることから、同期する必要なく計測を行うことが可能である。その結果、図に示したように、GS-LD からの出力は ps 程度のパルス幅を持つ光パルスが多数放出されている、パルス列であることが分かった。また、その出力は、パルスごとに大きく異なっていることが分かった。通常のパルス波形計測では、パルスごとに異なる波形が出力されている場合、その平均波形のみが計測されることが多いが、本手法では、個別の波形を計測できることから、より多くの情報を得ることが可能になる。

さらに、タイミングが合って発生した和周波光を多数回測定し、強度が最も高いタイミングを 0 ps として波形の時間軸を揃えた結果、これらの 5.1 ps のパルス列間隔が、再現性良く観測されることが分かった。この間隔は、用いた半導体レーザーのキャビティ長に対応することが分かっており、利得スイッチングによる光パルスが、1 ps を切るパルス幅を実際に有しており、キャビティ内で超短パルス発振が実現されていることを、時間領域ではじめて明らかにしたものである。

このように、チャープパルスを用いたシングルショット波形計測手法が GS-LD のような比較的強度の弱い光の計測にも活用できることは、本手法が、様々な光源の超短パルス波形計測へと応用できる技術として期待できることを示している。そこで、このような応用を実証しやすくするために、計測システムをファイバーベースとし、堅牢な光学系を実現することを目指した。チャープパルスを用いたシングルショット分光法は、図1に示した手法の中でも、光の内部自由度である波長に時間情報をマッピングするという意味で、特徴的である。このおかげで、計測時に必要なものはスペクトル測定のみであり、精密なイメージング光学系を構築する必要がない。したがって、ファイバーレーザー技術との組み合わせや顕微分光などが可能となる。

図4はそのために構築した、ファイバーベースの超高速波形計測モジュールのプロトタイプである。波形計測のためには読み出し光として超短パルスレーザーが必要であるが、それと、実際の被測定光をファイバーで入力し、それらの位相補償をした上で、和周波光を発生させ、スペクトル計測する構成としている。図に示してい

モジュール外観



モジュール内部

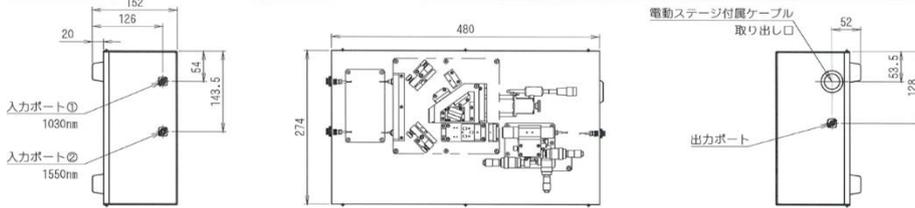


図4：ファイバーベースのリアルタイム波形計測モジュール。写真に示したように、図3の光学系を  $W480 \times D274 \times H152 \text{ mm}^3$  のフットプリントで実現することが可能である。

るように、比較的小さなフットプリントでモジュールを構成することが可能であり、将来的に、超短パルスレーザーおよび小型分光器と組み合わせることによって、高感度かつ広帯域の超高速計測が実現できる。今後は、和周波発生させる非線形光学結晶をより高効率な周期分極反転 LiNbO<sub>3</sub> 導波路等を用いて置き換え、光増幅器などとの組み合わせを可能にしていくことで、計測の高感度化を進め、より使いやすい波形計測システムを実現していくことが肝要である。

次に、同じく半導体デバイス

ではあるが、テラヘルツ波の出力が可能な共鳴トンネルダイオード(RTD)を計測した結果を図5に示す[5]。この研究では、現時点で最も高感度な計測が可能な図1(b)、階段状の光学素子を用いた手法で出力テラヘルツ波の計測を行った。図2とは異なり、反射型の階段状光学素子を用いることで、シングルショットの波形計測を可能にしている。また、計測においては、プローブ光を二つに分け、正負逆向きの位相オフセットをつけて、クロスニコル計測することによって、高感度かつ線形にテラヘルツ波形を計測できる手法を用いた。

図5に本手法を用いて計測した出力テラヘルツ波形の例を示している。この出力は、RTDに印加する電圧を意図的にON/OFFし、その瞬間にどのような波形が観測できるかを調べたものである。定常電圧を印加した場合の電場波形検出では、0.1 V/cm程度の振幅の正弦波の波形が観測できるが、デバイス電圧が動的に変化するタイミングでは、図5に示したような1 V/cmに達する電場強度を持ったテラヘルツ波が発生していることが分かった。図の上側がその電場波形に対応している。

このテラヘルツパルスの周波数の時間依存性を調べるために、得られた波形をウェーブレット変換し、各時間における周波数スペクトルを算出したのが下図のカラーマップである。このカラーマップにおいては、縦軸が周波数、横軸が時間であり、色が濃い部分でテラヘルツ波の振幅が存在することを示している。このRTDは0.24 THz程度で発振するデバイスであるが、このカラーマップからも分かるように、0.1 THzから0.6 THz程度の極めて広い範囲でテラヘルツ波の発振が観測できていることがわかる。さらに、得られたテラヘルツパルスの中心周波数は時間的に変化しており、タイミングによってその傾きが異なることや、一旦周波数が下降した後に反転し、上昇するパルスが得られていることがわかる。また、最下段の図からも分かるように、二つの成分が同時に発振する場合もあることが分かった。

これらの結果は、デバイスに印加する電圧を高速に変

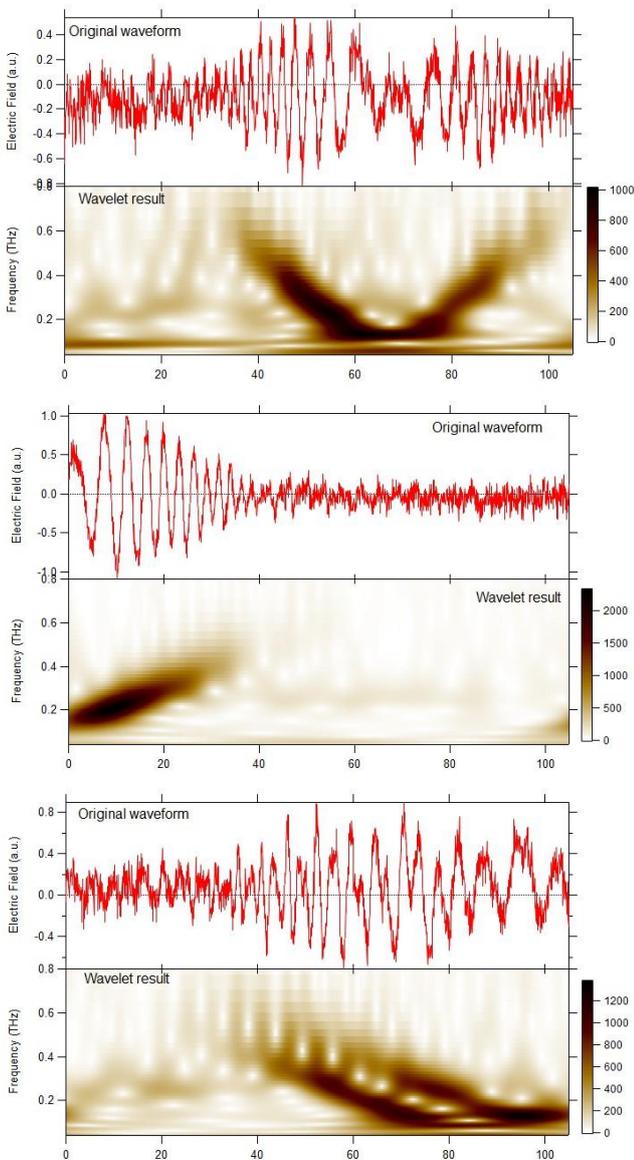


図5：三つの異なるタイミングで計測された出力テラヘルツ波形。周波数が時間的に変化するパルスが、デバイスをON/OFFした際に出力されていることが分かった。横軸は時間(ps)。

化させ、その状態が動的に変化する際に、テラヘルツ波の発振が大振幅で起こり得る条件があることを示している。通常 RTD の発振周波数は、デバイスの持つインダクタンスとキャパシタンスの積の平方根で表すことができるが、デバイス電圧が急激に変化する際には、その非線形性によってキャパシタンスが大きく変化し、発振周波数が動的に変化しているものと考えられる。このようなメカニズムは、GS-LD においても報告されているものであり、テラヘルツパルスを得るための新しい手法として期待できる。今後は、このような発振条件が実現される動作条件を明確にするために、より速い電圧変調を印加できるようにし、その結果現れる出力を調べていく必要がある。

このような結果は、デバイスの ON/OFF 時のみ現れるものであるために、リアルタイムの計測が可能で、テラヘルツオシロスコープ技術によってのみ明らかにできるものである。GS-LD や RTD におけるこれらの興味深い結果は、テラヘルツオシロスコープ技術がテラヘルツ波や光デバイスの計測だけではなく、超高速制御を行うために極めて有力なツールであり、必要不可欠なものであることを示している。

以上に述べたように、本研究では、チャープパルスを用いたリアルタイムテラヘルツオシロスコープ技術を開発し、ファイバーベースの技術と組み合わせることが可能であることを示してきた。また、開発した技術が GS-LD や RTD における、光出力、テラヘルツ出力の計測に使用可能であることを示してきた。これらの結果は、テラヘルツオシロスコープがデバイスの超高速応答を活用したデバイスを実現する上で重要な知見をもたらすことを示している。

### 【参考文献】

- [1] Y. Minami et al., "Single-Shot Measurement of a Terahertz Electric-Field Waveform Using a Reflective Echelon Mirror," *Appl. Phys. Lett.* **103**, 051103: pp. 1-4 (2013).
- [2] I. Katayama and R. Tamaki, "Singleshot and high-sensitivity detection of terahertz waveforms using phase-offset electro-optic sampling and an echelon mirror," *Proc. SPIE* **12406**, 1240603.
- [3] R. Tamaki et al., "Ultrafast pump-probe spectroscopy via chirped-pulse up-conversion with dispersion compensation," *Opt. Exp.* **31**, pp.40142-40150 (2023).
- [4] R. Tamaki et al., "Ultrashort gain-switched pulse trains from laser diodes characterized by single-shot up-conversion time microscope," *Appl. Phys. Exp.* **18**, 082002 (2025).
- [5] R. Tamaki et al., "Realtime visualization of transient terahertz waveforms emitted from a resonant tunnelling diode," submitted.

### 【研究成果】

<原著論文> (抜粋)

1. R. Tamaki et al., "Ultrafast pump-probe spectroscopy

via chirped-pulse up-conversion with dispersion compensation," *Opt. Exp.* **31**, pp.40142-40150 (2023).

2. R. Tamaki et al., "Ultrashort gain-switched pulse trains from laser diodes characterized by single-shot up-conversion time microscope," *Appl. Phys. Exp.* **18**, 082002 (2025).

### 【口頭発表】 (抜粋)

1. 玉置亮、小林真隆、中前秀一、金昌秀、伊藤隆、秋山英文、片山郁文、『シングルショット分光法を用いた利得スイッチレーザーの超高速パルス波形とジッター評価』、15a-K308-5、第 72 回応用物理学会春季学術講演会（東京理科大・野田キャンパス、2025 年 3 月 14 日－17 日）。
2. 分玉康太、高橋洗矢、玉置亮、有川敬、片山郁文、『シングルショット検出による連続波テラヘルツ光源の電場波形計測』、A06-22a-VI-04、レーザー学会学術講演会第 45 回年次大会（広島市、2025 年 1 月 21 日－23 日）
3. A. Maeshiro, R. Tamaki, J. Takeda, I. Katayama, "Performances of Chirped-Pulse Single-Shot Ultrafast Spectroscopy with Dispersion Compensation," Tu-29, International School and Symposium on Nanodevices and quantum Technologies (ISNTT 2024), (Atsugi, 2-6 December, 2024).
4. R. Tamaki, K. Takahashi, T. Arikawa and I. Katayama, "Single-shot terahertz waveform detection of resonant tunneling diode in time-domain," 49th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz), (Perth, Australia, 1-6 Sept. 2024).
5. R. Tamaki, M. Fukuoka, I. Morohashi, I. Katayama, "Ultrafast Detection of Pulse Profiles via Chirped-Pulse Up-Conversion," ALPS14-04, Optics and Photonics International Congress (Yokohama, Japan, 22-26 April 2024).

### 【特許等】

1 件

# Beyond 5G 対応のナノセルロース製電子基材の創製

研究代表者：東京大学 塩見 淳一郎

## 【基本構想】

近年、Beyond 5G 対応の高精度な通信センサーが搭載可能でフレキシブルな電子デバイスの需要が高まっており、それを構成する基材の高性能化が求められている。さらに、基材の環境親和性も要求されており、これらを満たす革新的な材料開発が必要となる。そこで本研究では、バイオマス由来の新素材であるセルロースナノファイバー (CNF) に注目する。CNF は、セルロース分子が一軸配向した結晶であり、高強度・高弾性率・低熱膨張率・絶縁性・環境分解性などの優れた材料特性を有しており、フレキシブル電子デバイスの基材としての応用が期待できる。しかし、応用に繋げるには、放熱のための高熱伝導化と、信号減衰抑制のための低誘電率化が必要である。その課題を克服するべく、多段階のボトムアッププロセスを通じて CNF 構造を精密制御し、格子振動 (フォノン) の状態やダイナミクスを変調するフォノンエンジニアリングにより、熱物性と誘電物性を制御し、高性能な CNF 製電子基材を開発する。

## 1. 研究目的

近年、情報インフラの整備が急速に進み、スマートセンサーやスマートロボットが普及してきている。2020 年には第五世代移動通信システム (5G) が商用化しており、その次世代規格である通称「Beyond 5G」は 2030 年頃の実用化を目標に開発が進められている。数十 GHz 以上の高周波数信号を用いる Beyond 5G は、超高速・超低遅延・超多数同時接続の通信を可能にするため、スマートセンサーやスマートロボット普及のための基盤技術である。総務省は「Beyond 5G 推進戦略」を掲げており、産学官が連携して次世代情報システムの構築に取り組んでいる<sup>1</sup>。神奈川県においても、デジタル技術を活用し、作業の効率化や自動化を試みる取り組みが増えてきている。医療問題や災害対策にもデジタル技術を取り入れ、遠隔操作や高精度な予測が可能となるよう、情報システム整備に注力している<sup>2,3</sup>。

そうした背景の中、Beyond 5G 対応の高精度な通信センサーが搭載可能でフレキシブルな電子デバイスの需要が高まっており、それを構成する基材の高性能化が求められている。一般に、基材が必要とする特性は、高速通信および信号減衰の抑制を可能とする低誘電特性 (低誘電率・低誘電正接)、チップからの熱を放熱する高熱伝導性、温度変化しても寸法を一定に保つ低熱膨張性である。また、これらの特性は、Beyond 5G 対応の基材ではより高い性能が要求されているが、既存材料のみではその達成が困難である。さらに、サステナブルな社会の構築に向けて、環境親和型の材料からの基材開発も要求されている。

そこで注目するのが、バイオマス由来の新素材であるセルロースナノファイバー (CNF) である (図 1)。セルロース分子が一軸配向した結晶である CNF は、高強度・高弾性率・低熱膨張率・絶縁性・環境分解性などの優れた材料

特性を有しており<sup>4</sup>、次世代フレキシブル電子デバイス基材としての応用が期待できる。しかし、応用に繋げるには、更なる高熱伝導化、低誘電化および低誘電正接化が必要である。Beyond 5G 対応の基材に要求される物性値は、線熱膨張係数 20 ppm、誘電率 2.0~2.4・誘電正接 0.0010~0.0015 (100 GHz 帯)、面内方向の熱伝導率 10 W/mK 以上とされており、これらの値を目標値に設定してその到達を目指す。

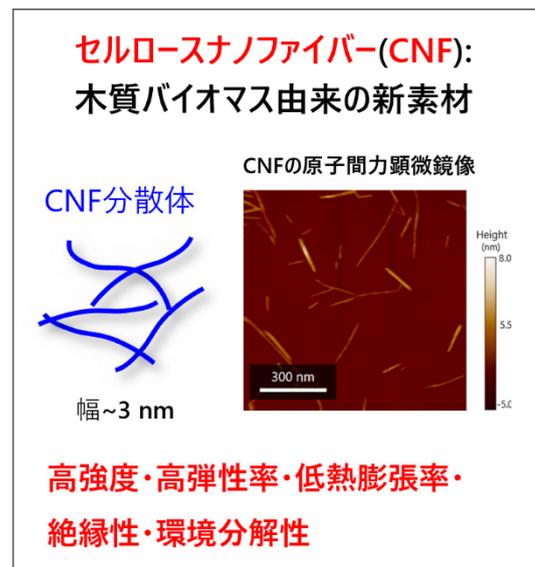


図 1. セルロースナノファイバー (CNF)

昨年度は CNF 単独のフィルム材料を対象として、多段階のボトムアッププロセスを通じてその構造を精密制御し、熱物性および電気物性の高性能化と CNF 構造との相関解析を実施して各物性の支配因子を精査した。伝熱特性

については、CNF フィルム中の熱輸送が湿度と CNF の配向度に支配されていることが明らかとなった。さらに熱伝導率を最大化するために、CNF を一軸に配向させたフィラメントでは、その調製条件を最適化することで熱伝導率が 10 W/mK を上回るフィラメントが安定的に製造された。つまり、CNF はデバイス基材に必要な高熱伝導性を達成できる材料であることが実証された。誘電特性については、CNF の表面化学構造および空隙率に支配されることが明らかとなり、CNF フィルムの誘電率および誘電正接を低下させることに成功した<sup>5</sup>。しかし、目標値への到達には更なる低誘電率化・低誘電正接化が必要であることが示された。そこで、本年度は低誘電性に特長のあるポリマー材料と CNF を複合化させることで、それぞれの特長を併せ持つ複合材料の開発を試みた。

## 2. 研究成果

### 2.1. 水系混合と乾燥で製造されたポリテトラフルオロエチレン (PTFE) ナノ粒子との複合フィルム

フッ素ポリマーの一つである PTFE は、その対称的な分子構造に由来して、ポリマー材料の中では最も低い誘電率・誘電正接を持つ。この PTFE はナノ粒子として水に懸濁した状態でも製造されているため、それを CNF 分散水と混合した分散水を乾燥させることで、CNF と PTFE が均一に分散した複合材の製造が期待される。

CNF と PTFE の乾燥後の重量比がそれぞれ 75 : 25, 50 : 50 および 25 : 75 となるように混合した分散水を樹脂製シャーレに注ぎ、恒温恒湿下で乾燥させてフィルム状の複合材を製造した。以下、これらの複合材は CNF75PTFE25 のように材料名の後にその重量比をつけて記載する。得られた複合材の外観から CNT と PTFE が一様に混ざっていることが示唆された。また、シャーレからはがしても自立可能な強度と手で曲げても破損しない柔軟性を備えていた。それぞれの材料の真密度 (CNF: 1.6 g/cm<sup>3</sup>, PTFE: 2.2 g/cm<sup>3</sup>)<sup>6,7</sup> と混合比をもとに算出した理論的な真密度と空隙を含んで測定されたみかけの密度との比から複合材の内部には空隙が存在し、その割合は PTFE の比率が増加するにつれて増加する傾向にあった (表 1)。

表 1. CNF/PTFE 複合材の密度と空隙率。

サンプル	理論密度 (g/cm <sup>3</sup> )	みかけの密度 (g/cm <sup>3</sup> )	空隙率 (vol%)
CNF75PTFE25	1.75	1.33	23.8
CNF50PTFE50	1.90	1.33	30.0
CNF25PTFE75	2.05	1.35	34.1

**誘電特性:** 空洞共振法を用いて室温・相対湿度 10 % 環境下における誘電率・誘電正接を測定した (周波数帯: 40GHz)。複合材の誘電率は PTFE の比率が増加するにつれて低下する傾向にあり、いずれの複合材でも Lichtenecker の対数複合式<sup>8</sup> から予測される値よりも低くなっていた (図 2 (a))。この対数複合式は、複合材が二成

分かなり、それらがランダムに分散していることを前提としている。しかし、この複合材の内部には体積分率で 20 % 超の空隙が存在しており、その誘電率・誘電正接は極めて低いことから、この空隙が予測を下回る低誘電率化に貢献したと考えられる。特に、CNF25PTFE75 の誘電率 (1.96) は PTFE 単独 (2.04) よりも低く、目標とする性能を上回る低誘電率値が達成された。複合材の誘電正接は CNF 単独よりも低い値となっており、PTFE 比率の増加に伴って減少する傾向にあることが明らかとなった (図 2 (b))。しかし、最も低い値を持つ CNF25PTFE75 でさえ、目標値の 200 倍以上の値 (0.022) であり更なる低下が必要である。

以上のことから、低誘電ポリマーである PTFE と複合化することで複合材の誘電特性を制御可能であることが明らかとなり、目標を超える低誘電率値への到達が達成された。

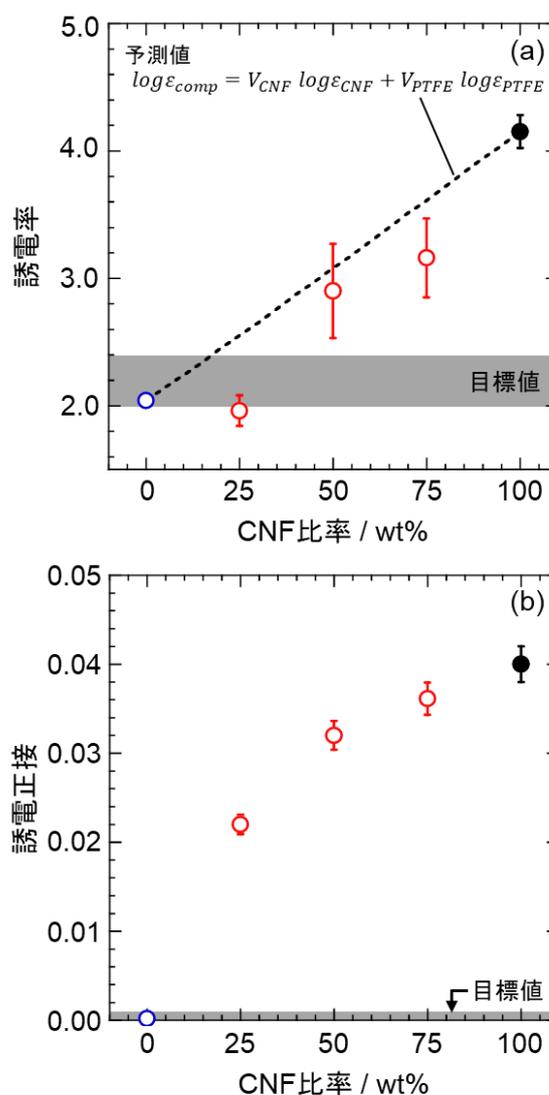


図 2. CNF/PTFE 複合材中の CNF 重量比と誘電特性との関係: (a) 誘電率, (b) 誘電正接。

**熱膨張特性:** 面内方向の熱膨張係数 (Coefficient of thermal expansion: CTE) は熱機械法によって計測した (測定範囲: 30–105°C、図 3 (a))。市販の PTFE シートの CTE は 130 ppm/K を上回っており、CNF 単独のフィルムでは 10 ppm/K 未満の値であった。我々が製造した複合材では、PTFE が高い CTE を持つにもかかわらず、いずれも CNF 単独のフィルムと同等もしくはそれ以下の CTE が計測された。さらに PTFE の比率が上昇するにつれて複合材の CTE は減少する傾向にあり (図 3 (b))、CNF25PTFE75 では負の値 (-6.1 ppm/K) となった。この傾向も空隙のない二成分を前提とした予測式<sup>9</sup>には当てはまらないが、空隙が内部に存在する多孔性の繊維強化樹脂材料では、空隙割合の増加に伴って CTE が減少することが報告されている<sup>10,11</sup>。これは温度変化中に強化繊維と樹脂との CTE の差によって生じた内部応力が空隙を圧縮させ、樹脂の熱膨張を打ち消すことに起因する (「ボイド効果」)。この CNF/PTFE 複合材もそれを構成する CNF と PTFE の CTE には、1 桁以上の大きな差があり内部には空隙が存在していることから、このボイド効果が発現して複合材全体の CTE を低下させたと推定している。

以上のことから、CNF/PTFE の複合材では構成材料の混合比に依存して、面内方向の CTE を CNF 単独並みの 10 ppm/K 未満から負の値まで制御可能であることが示された。PTFE と複合化することで CTE は低くなり、当初の目標としていた金属材料と同等の 20 ppm/K からの差は小さくなったが、半導体チップ (CTE: 2.5 ppm/K)<sup>12</sup> と同等の値に精密制御できる可能性が示された。

## 2.2. 熔融混練で製造されたポリエチレン (PE) との複合シート

成形加工性と強度に優れた PE は、絶縁材料としても広く用いられており、PTFE には及ばないまでも優れた低誘電特性を有している。その優れた成形加工性から CNF を含むセルロース材料との複合化研究が多数報告されているが、誘電特性に着目した論文は多くない。そこで PE と CNF の複合材の誘電特性の支配因子を同定し、低誘電特性と低熱膨張率を併せ持つ基材開発を試みた。

分散水の状態で製造される CNF は脱水・乾燥によって強く凝集するため、ポリマー材料内に均一に分散させるのは困難である。そこで、CNF の原料となるセルロース繊維を樹脂とともに熔融混練することで熔融樹脂内でのナノ微細化と複合化を同時に試みた<sup>13</sup>。

市販の PE ペレットとセルロース繊維を熔融混練と加熱プレスに供してシートの複合材を製造した。13wt%のセルロースを含む複合材中には、セルロースおよび PE への化学改質の有無によらずセルロースの凝集が目視で観察され、PE 内でのセルロースの微細化と均一分散は達成されなかった (図 4)。また、一部の化学改質セルロースを含む複合材では、全体が茶褐色に着色し、セルロースの酸化・熱分解が示唆された。

**誘電特性:** 化学改質が誘電特性に与える影響を検討するために、13wt%のセルロースを含む複合材の誘電率・誘電正

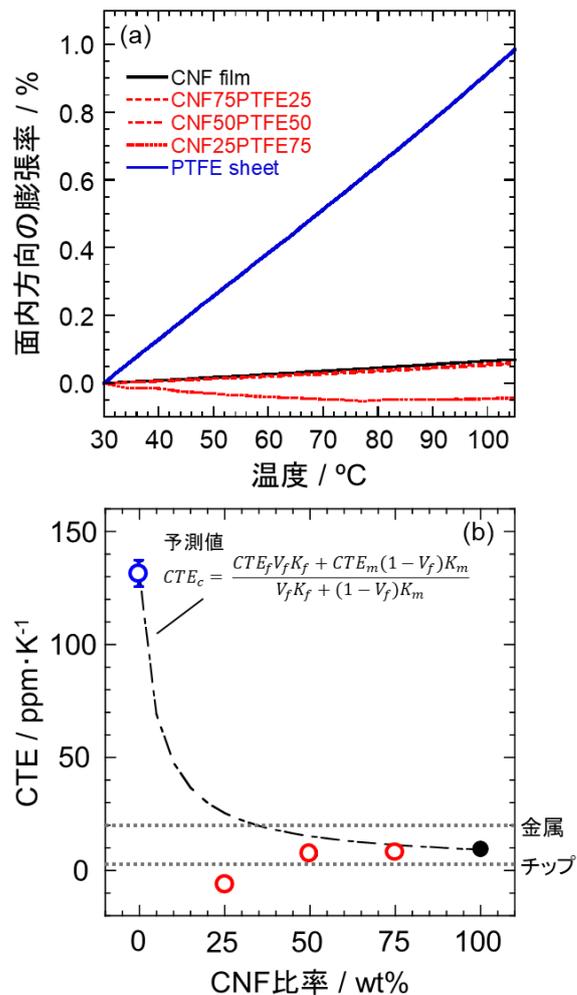


図 3. CNF/PTFE 複合材の熱膨張特性 (a) 面内方向の膨張率, (b) CNF 比率と CTE の関係

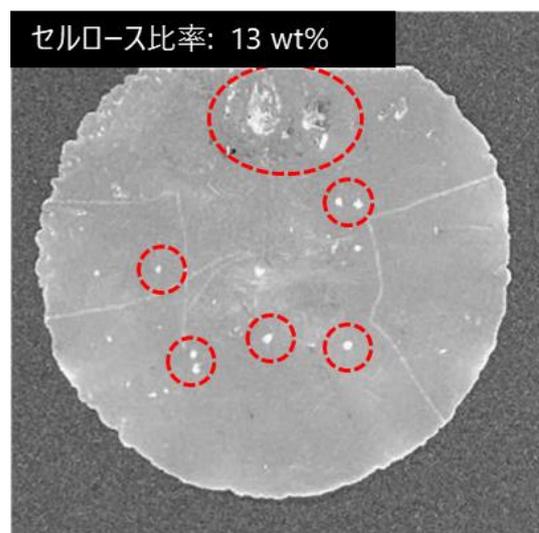


図 4. 未改質のセルロース繊維と PE の複合材. 赤破線: セルロースの凝集.

接を空洞共振法で計測した。誘電率は、化学改質の有無によらずおよそ 2.4 であり、化学改質は誘電率にほとんど影響しないことが明らかとなった。この値は PE 単独の値と同等であり、目標値が達成された。誘電正接は未改質セル

ロースとの複合材が最も低く(0.0013)、目標とする低い誘電正接値が達成された。また、化学改質により上昇することが明らかとなり、最大でおよそ0.007となった。この理由として、化学改質がセルロース繊維の微細化と分散性向上を促進することで、損失を引き起こすセルロース/PE界面が増加したためであると考えている。

次に、セルロース比率の影響を検討するために、化学改質されていないセルロース繊維を40 wt%含む複合材の誘電特性を計測した。誘電率はPE単独およびセルロース比率13 wt%の場合と同等であり、セルロース比率に影響されないことが明らかとなった。誘電正接はセルロースの増加に伴い上昇し、およそ0.007となった。

以上のことから、セルロース/PE複合材の誘電率は化学改質の有無やセルロース比率にはあまり影響されないことが明らかとなった。誘電正接は界面の親和性とセルロース比率に影響されるものの、目標値には到達しなかったが、汎用のデバイス基材並みの値は達成した。また、セルロース/PE複合材はBeyond 5G向けの高性能基材に要求される性能には達していないものの、既存の汎用デバイス基材に要求される誘電特性は満たしているといえる。

**熱膨張特性：**熱機械法によって30–70°Cにおける面内方向のCTEを計測した。13 wt%の未改質セルロースを含む複合材では、そのCTEは160 ppm/KとPE単独(167 ppm/K)からわずかな低下にとどまった。セルロース比率を固定した検討により、CTEは化学改質の影響を受けることが明らかとなったものの、最も低い値でも140 ppm/Kと目標値の7倍の高い値であった。40 wt%の未改質セルロースを含む複合材の計測では、セルロース比率の増加がCTEを低下させることが示されたが、128 ppm/Kと依然高い値であった。この複合材でセルロースに期待した熱膨張の抑制効果が表れなかったのは、セルロースの均一分散とネットワーク形成が達成されなかったためと考えられる。

### 3. まとめ

2カ年の本研究プロジェクトにおいて、昨年度はCNF単独材料の構造を制御することで、熱伝導率と誘電特性の支配因子を精査した。熱伝導性については、目標値として定めた10 W/mKが達成された。

本年度は、昨年度は実現されなかった誘電率・誘電正接の目標値を達成するために、低誘電ポリマー材料との複合化を行った。水系混合と乾燥により製造されたCNF/PTFE複合材は、自立可能な強度と曲げ可能な柔軟性を備えていた。この複合材は、それぞれの材料の特長である低誘電率と低熱膨張特性を併せ持っており、目標を上回る水準の低誘電率値が達成された。CTEはPTFEが高い値をもつにもかかわらずCNF単独フィルムよりも低下しており、目標値であった20 ppm/Kとの差は増加したものの、半導体チップのCTEと精密に適合可能であることが示された。目標を超える低誘電率値への到達と既存の二成分の複合則を覆すCTEの減少には、内部に20 vol%超存在する空隙の寄与が推定される。誘電正接は複合化によって低下するものの、依然として高い値にとどまった。

熔融混練で製造したセルロースとPEの複合材の誘電率は、化学改質の有無とセルロース比率に依存せずいずれもPE単独と同等であり目標値が達成された。誘電正接は化学改質およびセルロース比率に影響されることが明らかとなり、13wt%の未改質セルロースとの複合材では目標値が達成された。一方で、CTEはセルロース比率や化学改質の影響はうけるものの、最低でも120ppm/Kを超えており目標値には到達しなかった。これは、セルロース繊維がPE内で均一に分散しておらず、熱膨張の抑制に効果的なネットワークが形成されなかったためであると考えられる。

低誘電ポリマーとして用いたPTFEとPE自体の誘電率・誘電正接・CTEは同程度であるが、それらの複合材の計測値自体やセルロース比率に対する挙動は大きく異なっていた。この違いを生んだ原因の一つとして、複合材内部でのCNF分散性に注目すると、凝集のないCNFの均一分散はネットワークを形成することで低熱膨張特性の実現に対してポジティブに作用したが、界面分極を引き起こすCNF/ポリマー界面を増加させ、低誘電特性の実現に対してネガティブに作用したと考えている。

Beyond 5G対応の電子デバイス基材に要求される性能は高く、当初に設定した目標値のすべてを満たす材料の開発は実現できなかったが、目標値の一部を満たすCNF材料の開発は達成された。また、複合材の材料特性を支配する因子の推定にもつながった。このことから、環境親和型材料であるCNFがBeyond 5G対応の高性能次世代電子デバイス基材としての応用可能性を持つことが実証され、Beyond 5Gの実用化とサステナブルな社会構築の両方への貢献が期待される。

### Reference

1. 総務省 HP, R2.6/30, [https://www.soumu.go.jp/menu\\_news/s-news/01kiban09\\_02000364.html](https://www.soumu.go.jp/menu_news/s-news/01kiban09_02000364.html)
2. 独立行政法人情報処理推進機構 (IPA) HP, <https://local-iot-lab.ipa.go.jp/lab?k=kanagawa-pref-iot>
3. 神奈川県 HP, <https://www.pref.kanagawa.jp/docs/sr4/dx-project.html>
4. ナノセルロースジャパン HP, <https://www.nanocellulosejapan.com/about/>
5. W. Shennan, et al., Biomacromolecules, DOI: 10.1021/acs.biomac.5c00308, (2015).
6. T. Kondo, KONA Powder and Particle Journal 40, 109–123, (2023).
7. Y. Qi, et al., Materials 16 (4), 1688, (2023).
8. K. Lichtenecker, and K. Rother, Phys. Z., 32, 255-60 (1931).
9. P. Turner, J. Res. Natl. Bureau Stand. 37, 239, (1946).
10. T. Takei, and H. Hatta, Materials Science and Engineering, A, 131, 133-143 (1991).
11. T. Takei, et al., Materials Science and Engineering, A, 161, 213–220, (1993).
12. T. Li et al., IET Nanodielectrics, 6, 147-158, (2023).
13. Y. Igarashi, et al., Chem. Eng. Jour., 354, 563-568 (2018).

# 業績

## 【原著論文】

1. Kazuho Daicho, Shuji Fujisawa, Yoshinori Doi, Michio Suzuki, Junichiro Shiomi, and Tsuguyuki Saito, “Uniform elementary fibrils in diverse plant cell walls”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol 122, No 15, DOI: 10.1073/pnas.2426467122, 2025.
2. Guantong Wang, Lengwan Li, Lilian Medina, Sivasankaran Harish, Jing Liu, Bin Xu, Rulei Guo, Cheng Shao, Takashi Kodama, Lars A. Berglund, and Junichiro Shiomi, “Large Anisotropy of Thermal Conductivity in Oriented Cellulose-Clay Composite”, ACS Omega, DOI: 10.1021/acsomega.5c00316, 2025.
3. Shennan Wang, Kazuho Daicho, Yoshinori Doi, Marco Beaumont, Tsuguyuki Saito, and Junichiro Shiomi, “Dielectric Properties of Wood-Derived Cellulose Nanofiber Films in 10-40 GHz Band”, Biomacromolecules, DOI: 10.1021/acs.biomac.5c00308, 2025.

Printer Actuated Flow Focusing Spinning for Enhanced Thermal Conductivity in Cellulose Films, International Symposium on Wood Science and Technology 2025, 2025年3月18日, 仙台, 日本.

## 【口頭発表】

1. 彭佳欣, 大長一帆, 李禮林, 塩見淳一郎, 3Dプリンティングとフローフォーカシングを組み合わせた熱伝導率セルロースフィルム, 第61回日本伝熱シンポジウム, 2024年5月31日, 神戸, 日本.
2. Kazuho Daicho, Uniformity in Cross-Sectional Dimensions and Crystallinity of Diverse Plant Cellulose Microfibrils, Fujihara International Symposium on Nanocellulose, 9/30-10/4, 2024, 東京, 日本.
3. 大長一帆, セルロースナノファイバーの結晶性と表面構造, 第539回生存圏シンポジウム バイオナノマテリアルシンポジウム2024 - アカデミアからの発信 - (バイオナノマテリアル製造評価システム報告会) Bionanomaterials Symposium 2024, 2024年12月2日, 京都, 日本.
4. Kazuho Daicho, Shuji Fujisawa, Yoshinori Doi, Michio Suzuki, Junichiro Shiomi, and Tsuguyuki Saito, Uniformity in Morphology and Crystallinity of Diverse Plant Cellulose Microfibrils, International Symposium on Wood Science and Technology 2025, 2025年3月18日, 仙台, 日本.
5. Masato Kamogawa, Shennan Wang, Beomgyu Chio, Kazuho Daicho, and Junichiro Shiomi, Development of CNF/PTFE Composite Materials with Low Dielectric Constant and Low Thermal Expansion for beyond 5G Communication Substrate, International Symposium on Wood Science and Technology 2025, 2025年3月18日, 仙台, 日本.
6. Jia Xin Peng, Kazuho Daicho, and Junichiro Shiomi, 3D

# 徐脈性不整脈の革新的細胞移植治療開発

研究代表者：藤田医科大学東京 先端医療研究センター 遠山 周吾

## 【基本構想】

洞不全症候群や房室ブロック等の徐脈性不整脈では、心不全症状や脳虚血症状が生じるため、一般的に人工ペースメーカー植え込み術が行われる。本邦における件数は年間4万件以上(電池交換を除く)にのぼる。しかし、人工ペースメーカー植え込み術は根治治療法ではなく、定期的な電池交換やリードトラブル、感染、自律神経に対する不応答など、さまざまな課題が存在している(図1)。また、人工ペースメーカーの市場は大きく、国内のみで2000億円規模、世界では約70億米ドルと予測されている(世界の心臓ペースメーカー市場に関する調査レポート：予測2023-2035年、SDK.jp)。本邦では、人工ペースメーカーは100%海外からの輸入に依存しており、8000億円に上る医療機器の貿易赤字の多くを占めている。心臓ペースメーカーオルガノイド移植治療の開発は、人工ペースメーカー植え込み術がかかえる医学的な課題を解決するとともに、海外に依存し、貿易赤字の一因となっている人工ペースメーカーからの脱却につながることを期待される。そこで本事業では、ヒトiPS細胞から作製したバイオペースメーカー細胞移植により、従来の課題を解決することを目的として研究を行う。ペースメーカー細胞移植治療を実現するにあたり、①ペースメーカー細胞の大量作製、②腫瘍化の原因となる残存未分化幹細胞の除去、③徐脈性不整脈モデル大型動物の作製、④ヒト細胞を生着可能な大型動物の作製、⑤効率よい移植法の開発、⑥臨床グレード培養法の確立、⑦臨床応用のノウハウ・経験値、といった課題が存在するが(図2)、当研究室ではその課題の多くを克服する技術をこれまでに開発してきた(①関連、iScience 2021, STAR Protocols 2022a, Stem Cell Rep 2017、②関連、Cell Stem Cell 2013, Cell Metab 2016, iScience 2020, STAR Protocols 2022b、④関連、Nat Commun 2019、⑤関連、Nat Methods 2010, J Heart Lung Transplant 2019、⑥関連、Stem Cell Rep 2017)。また、我々は臨床応用が目前に迫った重症心不全患者に対するヒトiPS細胞由来心室筋細胞移植療法における臨床研究の実務責任者および品質管理責任者を務めており、⑦に関しても十分なノウハウと経験値が備わっている。ヒトiPS細胞からペースメーカー細胞を含むオルガノイドという組織塊を効率よく作製し、徐脈性不整脈患者の心臓に移植することで、人工ペースメーカー植え込み治療ではなし得なかった、徐脈性不整脈に対する真の根治治療法を開発することを目指す。

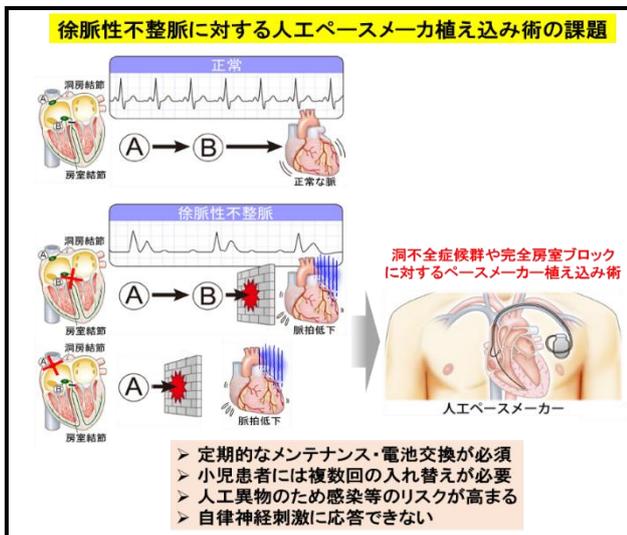


図1：徐脈性不整脈に対する人工ペースメーカー植え込み術の課題

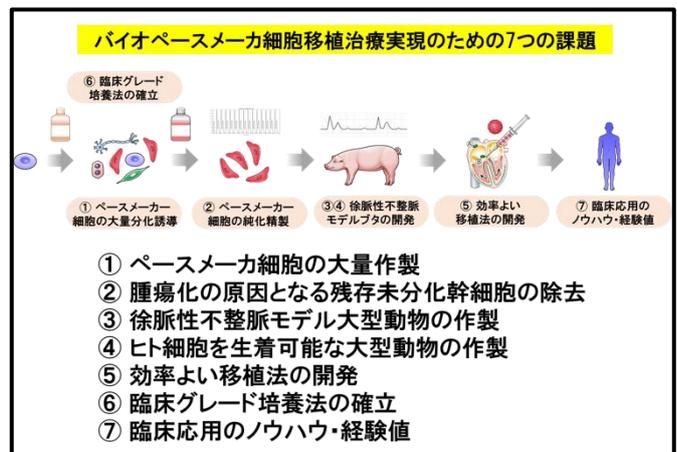


図2：ペースメーカーオルガノイド移植治療実現のための課題

## 1. 研究目的

本事業の目的は、移植後に拒絶反応が起こりにくいように遺伝子改変を行った低免疫原性ヒト iPS 細胞から心臓ペースメーカオルガノイドを作製し、それを心臓へ移植することで徐脈性不整脈の治療を可能にする新たな治療法を構築することである。上述(図2)にあるような課題を解決するために、具体的にはトリプトファン強化培養液によるヒト iPS 細胞の増殖促進法 (①関連, *iScience* 2021, *STAR Protocols* 2022a)、心筋細胞の大量作製法 (①関連, *Stem Cell Rep* 2017)、培養上清中 miRNA を用いた品質管理法 (②関連, *Stem Cell Rep* 2023, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、特殊培養液による超高純度 (99%以上) 心筋作製法 (③関連, *Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metab* 2016)、ペースメーカ細胞の純化精製法 (③関連, *unpublished* 特許出願, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、脂肪酸合成経路阻害による残存未分化幹細胞除去 (③関連, *iScience* 2020, *STAR Protocols* 2022b)、心筋組織球移植法の開発 (④関連, *Nat methods* 2010, *Cell Reports Methods* 2023, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、奇形腫イメージング法の開発 (④関連, *iScience* 2024, 特許出願, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、ヒト細胞を生着可能な中大動物への免疫抑制剤投与条件の同定 (⑤関連, *Circulation* 2024, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、臨床グレード培養液の開発 (⑥関連, *Stem Cell Rep* 2023) 等である。

戦略的研究シーズ育成事業における期間においては、①ペースメーカ細胞の分化誘導法の確立、②ペースメーカ細胞の純化精製法の確立、③オルガノイド作製法の確立、④移植細胞の品質評価システムの構築、⑤ *in vitro* PoC の取得、⑥ *in vivo* 造腫瘍試験および奇形腫のイメージング法の確立、⑦ ヒト細胞をサルに生着可能な免疫抑制剤投与条件の同定、に関する研究を行った。

## 2. 研究成果

### ① ペースメーカ細胞の分化誘導法の確立

心不全に対する細胞移植治療においては心室筋細胞が、徐脈性不整脈に対する細胞移植治療においてはペースメーカ細胞 (および心筋細胞) が必要である。ヒト iPS 細胞から心室筋細胞への分化誘導に関しては、発生の過程を模倣し、Wnt シグナルや BMP シグナルを調節することで可能となっている。そこで、本プロジェクトにおいて必要となるペースメーカ細胞への分化誘導についても、発生学的な観点から試みることとした結果、心筋細胞とペースメーカ細胞を効率よく分化誘導することに成功した。この条件で分化誘導した細胞集団に対してシングルセル RNA-seq を行ったところ、SHOX2 陽性のペースメーカ細胞が含まれていることを確認した。誘導効率をさらに向上させるため、30 以上の条件を検討し、最終的にペースメーカ細胞の分化効率を増加させることに成功した。ペースメーカ細胞の含有率が高いほど安定した品質のオルガノイドを作製することが可能であり、また移植細胞数を減らすことにも直結する (*unpublished*)。

さらに誘導ペースメーカ細胞の特性を評価するべく、拍動解析を行なった。ヒト iPS 細胞から作製したペースメーカ細胞と比較対象として心室筋細胞における拍動数を評価したところ、心室筋の拍動数は約 45 回/分であったのに対し、ペースメーカ細胞の拍動数は約 90 回/分であり、有意に高いことを確認した。また、未分化コロニー試験を用いることで残存未分化幹細胞の混入が 0.01%未満であることを確認した。現在は、移植細胞から分泌されているタンパクの定量を進めており、分化の安定性評価の指標となるタンパクの探索を行なっている。

### ② ペースメーカ細胞の純化精製法の確立

従来のペースメーカ細胞の選別方法として、ペースメーカ細胞特有の遺伝子座に蛍光タンパクを組み込み、セルソーターを用いて選別する手法が主であるが、移植治療を目的とした本事業に用いることは難しい。我々は、心筋細胞と非心筋細胞の代謝の違いを利用し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞のみを純化精製できることを報告した (*Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metab* 2016)。具体的には、グルコースとグルタミンを除き乳酸を添加した培地で培養す

ると、非心筋細胞は生存できず、心筋細胞のみを純化精製することができる。本研究では、代謝の違いを利用して、ヒト iPS 細胞由来の心室筋細胞は生存できず、ペースメーカー細胞（および心房筋細胞）が生存可能な培養条件を開発した。心室筋細胞およびペースメーカー細胞（および心房筋細胞）の代謝を詳細に検討し、その結果に基づいた特殊培地で培養したところ、心室筋細胞は生存できないが、ペースメーカー細胞（および心房筋細胞）は生存できることを明らかにした(*unpublished*, 特許申請中)。ヒト iPS 細胞からペースメーカー細胞へ分化誘導した後に、特殊培地に暴露させることで、ペースメーカー細胞（および心房筋細胞）のみを純化精製することが可能となった。

培養液を用いた細胞選別研究において、我々のグループは世界をリードしてきたが、本研究成果も世界初の研究成果であり、特許出願を行っている（特願 2024-110373）

### ③ オルガノイド作製法の確立

我々は、多孔質のマイクロウェル担体を用いて心筋細胞の懸濁液を下から吸引することで、短時間で大量の均質なオルガノイドを効率よく作製する手法を開発した

([図 3: Cell Reports Methods 2023, STAR Protocols 2025](#))

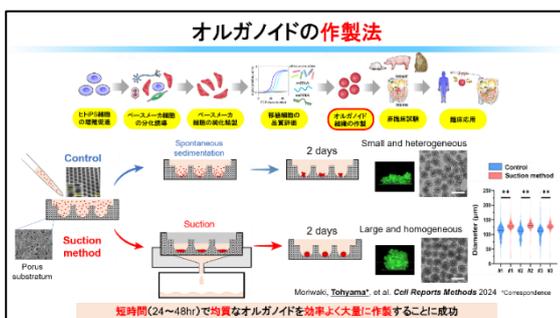


図 3：吸引法による均質なオルガノイド作製法

### ④ 移植細胞の品質評価システムの構築

移植細胞の品質を評価するにあたり、従来は flow cytometry や免疫染色、QPCR を用いていたが、貴重な細胞を多く消費することや途中の段階で順調に分化しているかの判断が困難であった。そこで、我々はシスメックス株式会社との共同研究により、培養上清中の miRNA を用いることで、中胚葉分化や心筋分化が順調に進んでいるかを簡便に評価する手法を構築した (*Stem Cell Reports*

2023)。

### ⑤ in vitro PoC の取得

我々は、心臓コラーゲンを用いてヒト iPS 細胞由来心室筋細胞から心室筋組織を作製することで、成熟した心室筋組織が作製できることを報告し (*Biomaterials* 2023)、その手法を活用することにより、拍動数が 25 回/分程度の in vitro 徐脈性不整脈モデルを構築することに成功した (unpublished)。in vitro 徐脈性不整脈モデルに、ペースメーカーオルガノイドを結合させたときに、徐脈を改善できるかどうかを検討した。まず、ヒト iPS 細胞から、心室筋細胞、心房筋細胞、ペースメーカー細胞を分化誘導し、それぞれのオルガノイドを作製した。オルガノイドの拍動数は、速い順にペースメーカーオルガノイド>心筋筋オルガノイド>心室筋オルガノイドであった。これらのオルガノイドを心室筋組織と結合させて、Motion Vector Imaging System (SONY)を用いて拍動解析を行った。その結果、心室筋オルガノイドを結合させた際の拍動数は 25 回/分程度と結合前と変わらなかったが、心房筋オルガノイドを結合させた際の拍動数は 45 回/分程度とやや速くなり、ペースメーカーオルガノイドを結合させた際の拍動数は 70 回/分程度と拍動数が正常化することがわかった。一方で、収縮力はどのオルガノイドを結合させても変化は見られなかった。in vitro 徐脈性不整脈モデルにペースメーカーオルガノイドを結合させることで徐脈を改善させることができ、in vivo において徐脈性不整脈を治療できる可能性が示唆された

### ⑥ in vivo 造腫瘍試験および奇形腫のイメージング法の確立

ヒト iPS 細胞から分化誘導したペースメーカー細胞からペースメーカーオルガノイドを作製し、免疫不全マウス (NOG マウス)の心臓に移植し、in vivo における生着を確認したところ、腫瘍は認めず、ペースメーカーオルガノイドの移植組織がしっかりと生着していることを確認した。移植心筋組織内には、ホストからの微小血管が豊富に入り込んでおり、生着に寄与していると考えられた。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の細胞移植治療において、移植細胞に未分化 iPS 細胞が残存していた場合に、移植部

位もしくは異所性に奇形腫が形成される可能性がある。そのため、移植後に奇形腫が形成された場合に、それを早期に発見できる非侵襲的なイメージング法の開発が求められている。そこで、まず奇形腫の代謝を明らかにするために、奇形腫を含む心臓組織切片に対してイメージング質量分析を行ったところ、奇形腫内にはフェニルアラニンやトリプトファンといった芳香族アミノ酸が豊富に蓄積していることが明らかとなった (図4)。アミノ酸の中で最も蓄積していたのがフェニルアラニンであったことから、 $[^{18}\text{F}]$ フルオロフェニルアラニンを合成し、奇形腫への集積を評価することとした。皮下に未分化iPS細胞を移植して奇形腫を形成させた免疫不全マウスに対して、 $[^{18}\text{F}]$ フルオロフェニルアラニンを投与したところ、奇形腫への集積を認め (図5)、 $[^{18}\text{F}]$ フルオロフェニルアラニンをを用いることで皮下や異所性 (骨格筋内) に形成された奇形腫を検出できることが示唆された (iScience 2024)。

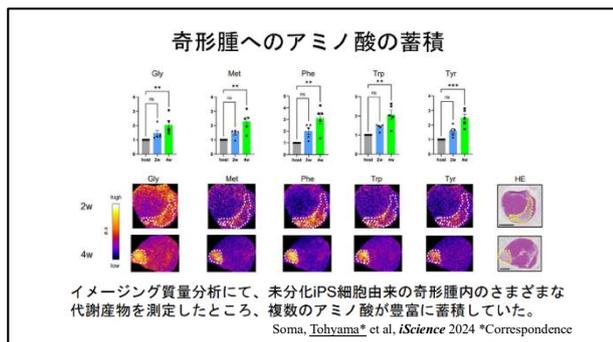


図4：イメージング質量分析による奇形腫に蓄積するアミノ酸の探索

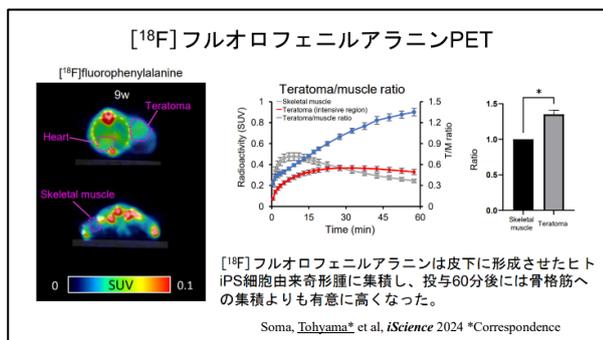


図5：奇形腫を可視化する技術の開発

## ⑦ 異種移植における免疫抑制剤プロトコルの確立

心筋梗塞モデルのカニクイザルの心臓にヒト iPS 細胞由来心筋スフェロイドを移植し、生着や心機能を評価する実験を行った (Circulation 2024)。本研究では、ヒト細胞をサルに生着させるために適切な免疫抑制剤を用いる必要があったが、これまでの検討を踏まえて、シクロスポリン、メチルプレドニゾロン、アバタセプト (CTLA4Ig) の3剤を用いることで、良好な生着が得られることを確認した (図6)。

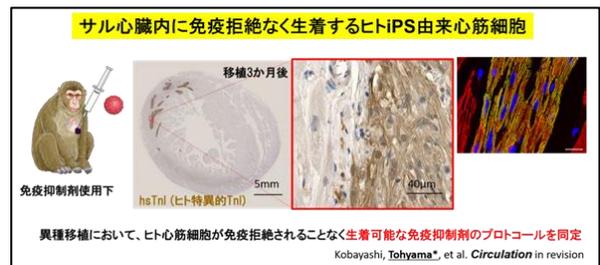


図6：異種移植における免疫抑制剤プロトコルの確立

# 業績

## 【原著論文】

1. Soma Y, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, Kubo A, Yamasaki T, Kabasawa N, Haga K, Tani H, **Morita-Umei Y**, Umei TC, Sekine O, Nakamura M, Moriwaki T, Tanosaki S, Someya S, Kawai Y, Ohno M, Kishino Y, Kanazawa H, Fujita J, Zhang MR, Suematsu M, Fukuda K, Ieda M.  
Metabolic changes of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and teratomas after transplantation  
*iScience* 27(11), 111234, 2024.
2. Masuda A, Kurashina Y, Tani H, Soma Y, Muramatsu J, Itai S, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, Onoe H\*.  
Maturation of Human iPSC-Derived Cardiac Microfiber with Electrical Stimulation Device.  
*Advanced healthcare materials* 2024,13(27), e2303477, 2024. [Front cover of the issue](#)
3. Kobayashi H, **Tohyama S\*(\*Co-first & Corresponding author)**, Ichimura H, Ohashi N, Chino S, Soma Y, Tani H, Tanaka Y, Yang X, Shiba N, Kadota S, Haga K, Moriwaki T, Morita-Umei Y, Umei TC, Sekine O, Kishino Y, Kanazawa H, Kawagishi H, Yamada M, Narita K, Naito T, Seto T, Kuwahara K, Shiba Y\*, Fukuda K.  
Regeneration of Nonhuman Primate Hearts With Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Spheroids.  
*Circulation* 150(8) 611-621, 2024.

## 【総説】

1. Ohno M, Tani H, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**.  
Development and application of 3D cardiac tissues derived from human pluripotent stem cells.  
*Drug metabolism and pharmacokinetics* 60 101049, 2025.
2. Soma Y, Tani H, Morita-Umei Y, Kishino Y, Fukuda K, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**.  
Pluripotent stem cell-based cardiac regenerative therapy for heart failure.  
*Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 187 90-100, 2024
3. 岸野 喜一, 市原 有起, **遠山 周吾**  
患者まで届いている再生医療 難治性重症心不全患者を対象とした同種 iPSC 細胞由来心筋スフェロイド移植  
再生医療 23(2) 78-83 2024 年 5 月

## 【口頭発表】

1. **遠山 周吾**  
循環器疾患に対するヒト iPSC 心筋組織球移植治療法の開発  
第 89 回 日本循環器学会学術集会  
2025 年 3 月 28 日～30 日
2. **遠山 周吾**  
ヒト iPSC 細胞を用いた心筋再生と疾患研究のための基盤技術開発  
第 34 回 日本循環薬理学会  
2024 年 12 月 20 日
3. **遠山 周吾**  
重症心不全に対するヒト iPSC 細胞を用いた心臓再生医療：基礎から臨床へ  
CVMW2024 国際心臓研究会 日本部会  
2024 年 12 月 8 日
4. **遠山 周吾**  
多能性幹細胞の代謝制御による心筋製造と再生医療への応用  
第 47 回 日本分子生物学会  
2024 年 11 月 30 日
5. **Shugo Tohyama**  
Human iPSC-Based Cardiac Regenerative Therapy: From Bench to Bedside  
KSSCR 2024 Annual Meeting 開催地：ソウル  
2024 年 8 月 30 日
6. **遠山 周吾**  
ヒト iPSC 細胞を用いた心臓再生医療：基礎から応用へ 次世代研究者が挑む再生医療の最前線  
2024 年 7 月 29 日

## 【特許】

- (1)国内特許出願 2 件
- (2)国際特許出願 0 件

# 未知を知る AI 搭載型ハードウェアの開発

研究代表者：横浜国立大学 島 圭介

## 【基本構想】

深層学習や ChatGPT などが牽引する人工知能 (AI) ブームはもはや第 4 次を迎え、日々めざましい進展を見せている。ただし、AI が万能ではないことは周知の事実であり、対象の問題に適切かつ十分な設備や費用を投入し、適切なモデルや多くの学習サンプルを用いて AI を正しく学習させなければ想定した成果が出せない。また、AI の高性能化に伴って、出力結果の信頼性・妥当性・説明性や AI と人の共存法が問題視されている。このような背景から AI 技術を身近な日常生活に十分に普及・定着させる新たな工夫が求められ、従来の AI が学習時に想定していない未知の対象を“知らない”と理解できないという根本的な問題や、通信環境や装置の制約によって人間支援ロボットなどのハードウェアへの AI モデルの搭載が難しいという課題などを解消する必要がある。本プロジェクトでは未知事象の推定と自律的な AI 構造の再構築機能を有する新しい確率型 AI チップを創生することで、これらの問題解決を目指している。

## 1. 研究目的

深層学習や ChatGPT が牽引している人工知能 (AI) ブームはもはや第 4 次を迎えたともいわれており、いまだに日々めざましい進展を見せている。ただし、このような現状においても AI が万能ではないことは周知の事実であり、対象の問題に適切かつ十分な設備や費用を投入し、適切なモデルや多くの学習サンプルを用いて AI を正しく学習させなければ想定した成果が出せない。また近年では、AI の高性能化に伴って AI が出力する結果の信頼性・妥当性・説明性や、AI 活用や AI と人の共存法が問題視され、AI 技術を身近な日常生活に十分に普及・定着させる新たな工夫が求められる。その実現のヒントには大きな 2 つの課題、従来の AI が①学習時に対象としていた問題しか取り扱うことができず、未知の対象を“知らない”と理解できないという点、さらに②数学的に表現された実空間の学習・識別モデルを人間支援ロボットなどのハードウェアに搭載することが困難である点を打破するアイデアが必要となる。

ロボットや工業用加工機、医療機器、検査装置などに AI 技術を導入する際には、通信環境や装置の制約から、比較的簡単な学習モデルや近似モデルを用いるしかなく、理論的に構築された識別能力を十分に適用できないという大きな矛盾がある。発展がめざましい高性能な AI 技術を人間社会に普及させるためには、確率的な振る舞いをする認識対象・データに対し、①学習していない未知の対象を“知らない”と AI 自身が高精度に認識できる革新的なアイデアと、ベイズ推論に基づいて AI の判断の根拠・信頼性・妥当性を議論／検討して、②AI そのものの構造を動的に変化できる基盤を整えること、さらにモデルに基づいて様々な対象に組み込んで適応・進化可能な③小型・高速な AI 搭載型ハードウェアの実現が必要不可欠である。

本研究では、AI を独自の確率モデルを用いて高性能化

することにより、未知の事象の推定と自律的な AI 構造の再構築機能を有する新しい確率型 AI チップを創生することによってベイズ推論を進化させ、これらの問題解決を目指す。

本稿では令和 6 年度の成果として、未知を知る AI の理論拡張、ならびに応用事例について検討した内容について報告する。

## 2. 研究成果

### 2.1. 近似 GMM 型未知推定ニューラルネットの FPGA 実装と健常者用義手制御への応用

昨年度までに、本研究では FPGA (Field Programmable Gate Array) に実装可能な近似 GMM 型未知推定ニューラルネットを提案し、前向き演算 (推論) 部分および誤差逆伝播演算 (学習) 部分の実装に成功していた。しかしながら、検証には検証用に周辺回路が整備された FPGA 評価ボードを使用しており、ボードの大きさや価格、演算リソースなどを考慮するとそれらを単純に筋電義手の開発へ適用することは非常に冗長であった。そこで、本研究ではより小型かつ安価な FPGA に実装された実用的な未知 AI チップの作成に取り組み、その応用例として未知 AI チップを搭載した健常者用筋電義手 (筋電位 (EMG) 信号によって制御可能な五指駆動型ロボットハンド) の開発を試みた。

まず、開発した筋電義手制御システムの概略図を図 1-1 に示す。本システムは EMG 信号の入力のための A/D コンバータの制御部、信号処理部、未知 AI のパラメータ保管部、未知 AI による推論部、インタフェース制御部からなる。信号処理部で処理された EMG 信号の特徴ベクトルを未知 AI に入力することで、実施された手指動作の分類を実現できる。さらに、インタフェース制御部において、動作分類の結果に基づきサーボモータの回転量を制御し、任意の動作の再現を可能にする。実装時の言語には SystemVerilog を採用し、FPGA チップ (AP68-06Z-A4、



図 1-1: 義手制御システムの概略図

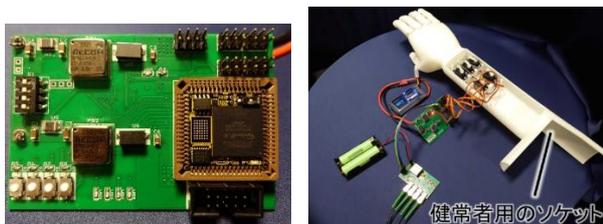


図 1-2: 作成した FPGA 周辺回路と健常者用筋電義

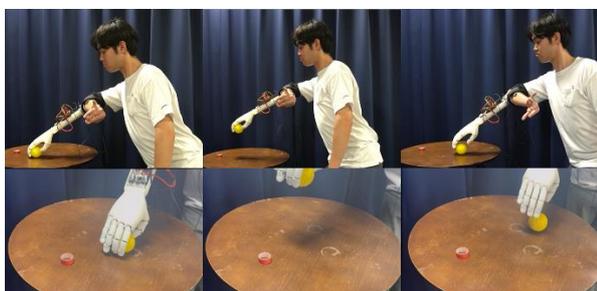


図 1-3: 健常者用筋電義手によるボールの  
把持タスクの実施例

HuMANDATA 製) を利用して作成した独自の FPGA ボードに実装した。また、公開データのロボットハンド(Flexy-hand, Gyrobot 製) を健常者に装着可能な筋電義手に加工したものを作成し、実応用のタスクとしてボールの把持を行った。作成した FPGA ボードと筋電義手を図 1-2 に示す。

次に、FPGA チップへの実装結果について述べる。本検証では Digital signal processing を使用せずに Adaptive logic module (ALM) のみを用いて実装を行い、提案システムの実装に必要な回路資源量を正確に把握した。分析結果から、ロボットハンド制御システムの実装に必要な ALM の数は 40、574 個であり、その中で学習部を含む未知 AI が占める ALM の数は 26、595 個であった。また、未知 AI を構成する ALM のうち、近似指数演算は 0.16% を、近似対数演算は 3.00% を占めていることが確認され、未知 AI 実装時のボトルネックにならないことが示された。さらに、近似した 2 つの関数に必要な ALM の数においては、1 つの近似指数関数演算器で 7 個、近似対数関数演算器で 133 個であった。近似を適用しない場合(FPGA Intellectual Property コア、Intel 社)の実装コストと比較すると、提案法の実装コストは指数関数と対数関数でそれぞれ従来法の 0.91%、13.2% に相当し、標準的な実装方法と比較して大幅な回路資源量の削減が可能になった。

最後に、作成した健常者用筋電義手について述べる。作

成した義手を用いてボールをピンチングによって把持する様子を図 1-3 に示す。図 1-3 (a)はボールを把持、図 1-3 (b)はボールの保持と移動、図 1-3 (c)はボールを特定の位置で離す動作を行った様子を表す。ボールの操作者の意思に従ったボールの把持と設置を実現できたことから、提案法を用いたシステムを搭載した筋電義手が実用可能であることが確認された。ただし、アクチュエータの大きさやバッテリー、FPGA 基板の大きさにより、義手本体に提案システムを格納することは困難であったため、基板の多層化や義手の再設計により、システムのさらなる小型化が必要である。

## 2.2. 未知 AI の産業分野への応用: 切削加工における加工面粗さ推定

近年の機械学習分野の急激な発展に伴って、産業分野では生産性向上や高品位化を目的として AI を活用した製造工程の自動化が積極的に進められている。一方、人の手を必要とする加工工程も依然として存在しており、切削加工はその一例である。任意の被削材に対して切削加工を行う際、より滑らかな加工面を実現するために加工条件を適切に設定することが求められる。ただし、加工条件設定に十分な経験が必要であり、加工条件の適応的調整には加工中の面粗さの自動的評価法が求められている [1]。一昨年度では未知 AI を加工面粗さ判別問題へ適用し、その有効性を示した。提案法では正常な加工面のデータを正規分布でモデル化し、時系列データに対する異常度を評価するために未知 AI の後段に Gated Recurrent Unit (GRU) [2] を導入した分類モデルを構築した (図 2-2)。未知 AI には前処理を行ったエンドミルの主軸加速度 (3 次元)、切削抵抗 (3 次元) のみを入力とし、提案法では煩雑な特徴抽出処理は必要なく、面粗さ推定に必要な時系列長を従来法より大幅に短くできるということを明らかにした。

昨年度も同課題に対する検討を継続し、判別に使用する特徴量の削減や、図 2-2 のモデルを切削機器内部に導入することを志向した近似分類モデルの構築などを検討した。

実験では様々な加工条件で切削加工された 200 種類のサンプルに対して面粗さ判別を行い、各種学習条件における分類精度を比較した。使用したデータは、100 mm の被削体の内、加工の最初と最後の 6 mm を除いた 94mm 分を抽出したものであり、真値である面粗さの計測値から分類対象区間となる 1 mm ごとの面粗さラベルを作成した。また、学習用データセットを構築する際には 200 条件の中から 120 条件をランダムに選択し、先頭の 12 mm の区間のみを学習に使用した。加えて、残りの 80 条件から作成したテストデータセット① (TS1)、学習対象条件の 12mm 以降から作成したテストデータセット② (TS2) に対する分類精度を評価した。

実験 I では、一昨年度に作成した図 2-2 のモデルに含まれる複雑な演算 (指数関数など) を独自の近似関数に置き換えた近似モデルの分類精度評価を実施した。FPGA などに代表されるハードウェアデバイスに実装する際には演算高速化が必要不可欠である一方、近似演算に起因する分類精度低下が懸念される。図 2-3 に各近似条件における分

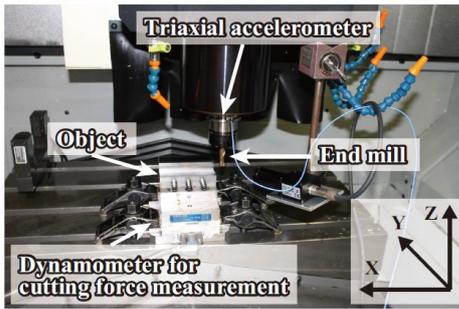


図 2-1：切削データの計測環境：3 軸加速度＋切削抵抗 [1]

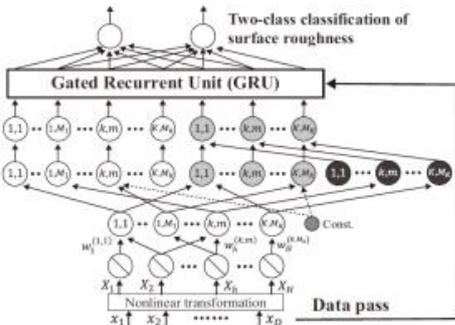


図 2-2：提案法のネットワーク構造（未知 AI+GRU [2]）

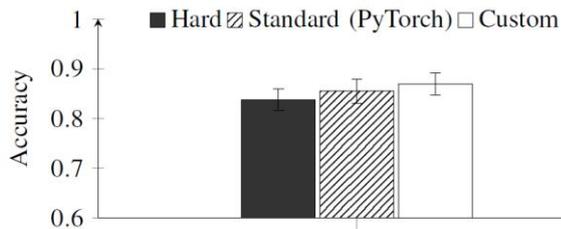


図 2-3：実験 I 近似条件による判別精度の変化

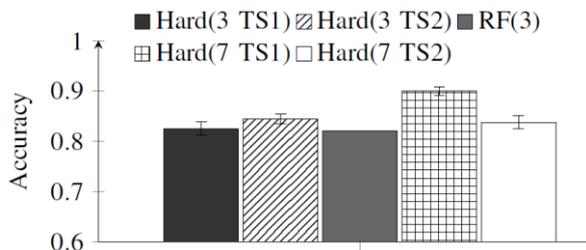


図 2-4：実験 II 入力特徴量を変更した際の分類精度変化

類精度を示す。図中の Standard は近似演算を導入しない条件を、Hard は単純に Hard-Sigmoid 関数を導入した場合を、Custom はビット幅などを調整した提案法を意味する。この結果から、近似関数を適切に設定することで演算コストを低減しつつ、同等かそれ以上の分類精度を実現できることが示された。

実験 II では、2 値分類を行う際の特徴量削減が可能か検討した。切削抵抗センサは高価かつ既存の機器への導入が困難であるという課題を有しており、入力特徴量を 3 軸加速度のみとした条件（入力：3 次元）と、加速度と切削抵抗の両方を入力する条件（入力：7 次元）の間で分類精度を比較する。提案法の近似手法には実験 I の Hard を採用し、従来法 [1] で提案された 3 軸加速度のみを使用するランダムフォレスト (RF 3) を比較対象として導入した。図

2-4 に各条件における分類精度を示す。結果から、入力特徴量を 3 軸加速度のみに限定した場合でも高い分類精度を発揮できることが示された。一方、学習対象に含まれない条件 (TS1) に対しては、切削抵抗のデータを使用した場合に分類精度が向上しており、使用環境に応じて適切な学習条件を設定する必要がある。

### 2.3. 未知から知識を得ながら動的に AI 構造を適応・再構築する方法論の開発

本節では未知を知る AI が運用され、未学習クラスのサンプルが十分に集まった後の処理について考える。パターン識別問題においては学習時に想定しない未学習クラスのサンプルは異常値として扱われ、未学習クラスを分類できる異常検知手法は数多く存在する。一方、それらの手法では異常を検知のみで異常値の特徴やデータ構造など未学習クラスに関する情報は一切得られないという問題が存在する。未知を知る AI のような異常検知を病症の診断支援や機器の故障検知に応用する場合、異常値に関する情報にも関心があり、未学習クラスの内部構造推定は実運用上、必要不可欠となる。本研究では未学習クラスの内部構造の解析だけ留まらず、異常値の情報を自動的に獲得し、進化する“未知を知る AI”を実現する。

昨年度までにディリクレ過程混合正規分布 (DPGMM) [2] を利用した未知クラスの内部構造推定、推定結果を未知 AI に反映するための分類対象とするクラスを追加/削除する方法論の確立、未知 AI のネットワークの重み係数を直接サンプリングする学習則の提案などを行ってきた。上記のように基礎理論の有効性を示してきた一方、DPGMM の学習時に使用する中華料理店過程 (CRP: Chinese Restaurant Process) に起因し、学習時間が非常に長くなってしまふ (数時間から長い場合には数日) という課題が存在する。また、CRP では未知クラス内部に存在するクラス数を事前に設定する必要がない代わりに、ざっくりとしたデータのまとまりを検出することに留まってしまふ。上記の課題を解消するために、本研究では CRP による大まかな構造の取得と、棒折り過程 (SBP: Stick Breaking Process) による各クラスの詳細な構造の取得を組み合わせた新たな学習則を提案する。SBP は存在するクラス数の上限を設定する必要があるものの、無限のクラス数を仮定できる CRP より早く学習が収束することが期待される。また、CRP で検出された複数の大まかなクラスに対して、それぞれに SBP を並列に適用することで、GPU の並列演算を利用した高速な学習が可能になる。CRP と SBP の配分を調整することで、より高速に、より詳細な未知クラスの内部構造推定を実現できる。

実験では、まず CRP の学習終了条件 (後段の SBP へ移行するタイミング) についての検証を実施した。検証に使用したデータは前腕から取得した 4 チャンルの筋電位 (EMG) 信号で、22 動作分の学習サンプルが含まれている (200 サンプル/動作)。本研究では CRP の終了条件を“尤度の変化量”と定義し、対数尤度の変化が 1%、5%、10% 以下で終了とする 3 つの終了条件を設けた。各条件での終了時間と学習によって獲得した確率モデルの尤もら

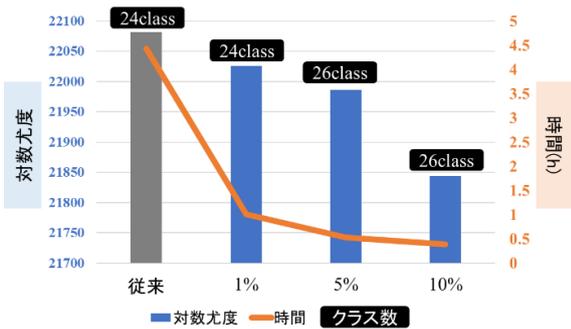


図 3-1: 終了条件を変更した際の対数尤度、学習時間の変化

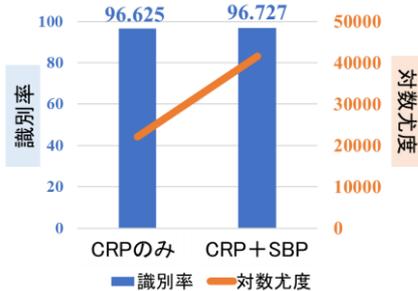


図 3-2: SBP の導入による尤度と識別精度の変化

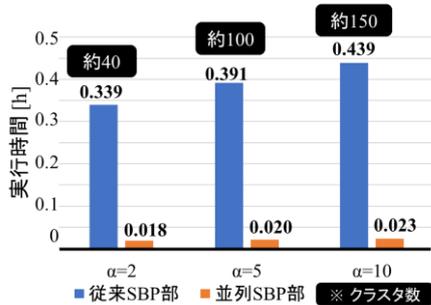


図 3-3: SBP の演算並列化による実行時間の変化

しさ (対数尤度) を図 3-1 に示す。この結果から、CRP の学習が終わりやすくなればなるほど、最終的に獲得した混合正規分布 (GMM) の尤度が低下してしまうことがわかる。また、学習時間もそれに伴って短縮され、10%とした場合には学習時間が 20 分 (従来の 1/15) 程度となっている。最終的に獲得したクラス数だけ見ても従来の条件と大差はなく、早期に打ち切られた CRP でもクラスタの大局的な検知に成功していることが示唆される。さらに、今回の学習条件では多くの動作 (学習サンプル) が含まれていたことで学習が延びたと推察され、扱う動作数が減少すれば学習時間の短縮はより顕著になると予想される。

次に、SBP の導入に関する検証結果について説明する。本検証では、前述の EMG データに対して CRP だけで学習した場合と、CRP の後に SBP を実施した場合の対数尤度や動作分類精度を比較した。その結果を図 3-2 に示す。得られた分類精度の結果を見ると、両条件でほとんど差はなく、どちらの条件でも動作分類に適用可能な GMM を獲得できていることがわかる。一方、対数尤度の差は歴然で、CRP と SBP を組み合わせた提案法のほうがより高い尤度に到達できている。GMM のコンポーネント数も大きく異

なり、22 動作分の EMG 信号を学習した際のそれぞれの GMM のコンポーネント数は、CRP のみの場合には 23 個、CRP+SBP の場合には 40 個となっている。以上により、CRP と SBP を組み合わせた提案法の有効性が示された。

最後に、後段の学習にあたる SBP の演算を並列化した場合の学習時間の変化についても調査した。図 3-3 に並列化した場合の SBP の学習時間の変化を示す。図中の  $\alpha$  は新規クラスの出来やすさを調整するハイパーパラメータで、 $\alpha$  が大きくなると検出されるクラス数が増える傾向になる。図中の結果を見ても、 $\alpha$  を 10 とした場合に最も多くのクラスが検知されている。実行時間について見ると、 $\alpha$  の大きさによらず、並列化によって SBP の学習時間を大幅に短縮できていることが確認できる。GPU による並列演算を導入したことで、20 分程度の従来の学習時間が、1.2 分程度まで短くなった。

以上の結果から、最も学習時間を短縮したい場合には SBP のみによる学習が推奨され、クラス数の上限を設定したくない場合には尤度変化による終了条件を設けた CRP による事前学習の実行が推奨されることが明らかになった。

#### 2.4. クラス分類の誤差とデータの生起確率の両方を考慮した未知 AI 学習則の提案

未知 AI は学習クラスに対応する正規分布と未知クラスの分布を仮定した余事象分布を内包した識別モデルであり、ベイズの定理に基づき、事後確率が最大となるクラスを選択することでオープンセット認識 (未知クラスを含む多クラス分類) が可能になる。しかしながら、未知 AI の学習では学習データに対する分類精度のみが考慮され、学習データの分布を学習によって適切に獲得できることが保証されない。その問題に起因し、学習時に分布パラメータが変化しにくいことや、他の特徴抽出を可能とする深層ニューラルネットと未知 AI を結合し、統合的学習を行うことができないという致命的な課題が存在する。この課題を解消するために、本研究では未知 AI の出力である事後確率に基づく学習に加え、学習データに対する尤度も考慮可能な学習方法を提案する。提案法では識別精度と学習データに対する GMM の尤度を組み合わせた同時確率を高める新たな学習則を適用し、学習データの分布を正確に獲得することで、分類精度の向上と、内包される確率分布のパラメータの誤差の低減を実現する。

提案する学習則では分類精度 (事後確率の誤差) を考慮したクロスエントロピー誤差に加え、Energy-based model (EBM) [3] で提案されたエネルギー関数をアレンジして導入する。EBM の重要なコンセプトは、“学習データと、ニューラルネットの内部からサンプリングしたデータの分布が一致するように学習する” ことであり、未知 AI の学習則にもこの概念を導入した。新しい学習則では、未知 AI に内包される GMM から都度ランダムにデータをサンプリングし、学習データの分布との差異を近似的に算出する。この差異を分布形状の誤差として定義し、最小化することで、未知 AI 内部の GMM からサンプリングされるデータの分布が学習データの分布に徐々に近づいていく。このエ

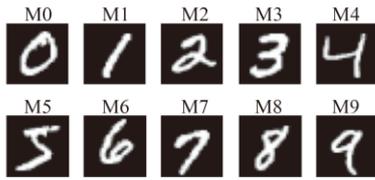


図 4-1: MNIST のデータ例

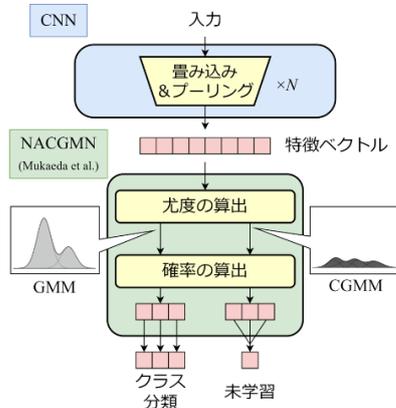
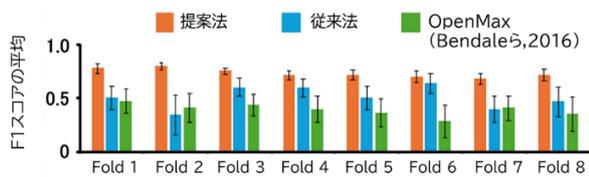
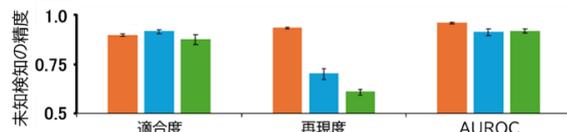


図 4-2: 利用した未知 AI のネットワーク構造



(a) 学習対象クラスをランダムに変更した交差検証における各ケースの分類精度



(b) 未知クラスに対する判別精度 (異常検知精度) の平均  
値図 4-3: MNIST データセットに対する分類性能

エネルギー関数に基づく学習則を導入することで、“学習データの分布形状と未知 AI 内部の GMM の一致”を担保できるようになり、従来の“学習時に分布パラメータが変化しにくい”ことに起因する課題を一度に解消することが可能になる。実験では、提案法の有効性を検証するために、画像分類のベンチマークデータ (MNIST) の分類に新たな学習則を導入した未知 AI を適用した。

本実験では他の深層ニューラルネットワークと未知 AI の統合モデルの性能を評価するために、高次元データである手書き数字画像データである MNIST データセットを使用した。図 4-1 に MNIST データの一例を示す。訓練データ 60,000 枚のうち、学習クラスとして 6 クラスを設定し、その 1% に相当する 600 枚を使用して少数データ環境での性能を評価した。テストデータには学習クラス 6 クラスと未知クラス 4 クラスを含む 10,000 枚を用い、学習クラスと未知クラスの組み合わせを学習対象動作の組み合わせを変更した交差検証を実施した。また、ネットワーク構造は図 4-2 のようになっており、畳み込みニューラルネット

(CNN) から抽出された中間層特徴量を未知 AI に入力することで画像データに対するオープンセット認識を実現した。比較手法には分類誤差のみから学習された未知 AI (従来法)、OpenMax [4] と CNN を組み合わせたオープンセット認識手法を用いた。

図 4-3 に学習対象クラスをランダムに変更した各ケースにおける分類精度を示す。この結果から、すべてのケースにおいて提案法が優れた分類精度を実現しており、学習サンプルに限られるケースでもエネルギー関数に基づく学習が有効であることが示された。また、図 4-4 には交差検証から得られた適合度、再現度、AUROC (Area Under the ROC Curve) の平均値を示す。どの指標も異常検知の性能を表し、値が高い程、検知精度が優れていることを示している。提案法は他の手法と比較し、特に再現度が優れていることがわかる。これは学習クラスに誤識別される未知データが大幅に減ったことを表しており、新学習則によって未知 AI の分類結果の信頼性を向上させることができた。

上記の結果から、従来は困難だった深層ニューラルネットワークと未知 AI 結合した分類モデルの構築が可能になり、未知 AI の適用範囲のさらなる拡大が期待される。

### 3. まとめと今後の展望

令和 6 年度では、主に未知 AI 搭載型の健常者用義手の実証や、未知 AI の学習理論の改善、未知 AI の応用事例創出に取り組んできた。未知 AI 搭載型の健常者用義手の実証においては、未知 AI の推論ネットワークと学習アルゴリズムの両方を FPGA に搭載できることを確認できた。また、未知 AI の学習理論を改善したことで、未知 AI に内包される確率モデルと学習サンプルの分布が一致するように学習できるようになった。新しい学習則の導入は分類精度や妥当性の向上を実現するだけでなく、従来は困難だった既存の深層学習ライブラリの併用も可能にした。

今後は汎用性の向上した新しい未知 AI を各種異常検知、オープンセット認識問題に適用し、さらなる応用事例の創出に努める。また、FPGA 上に構築する未知 AI の演算リソースと分類精度の間発生するトレードオフの最適化や新しく開発した学習則の FPGA 搭載を通して、最終的にエッジコンピューティングに特化した未知 AI 搭載型ハードウェアを実現する。

#### 【参考文献】

- [1] 横田知宏ら、“機械学習を用いたエンドミル加工のびびり振動判定”, 2022 年度砥粒加工学会学術講演会 (ABTEC2022), pp.345-346 (2022).
- [2] K.Cho *et al.*, “Learning Phrase Representations using RNN Encoder-Decoder for Statistical Machine Translation,” Proceedings of EMNLP 2014, pp.1724-1734(2014).
- [3] D.Görür *et al.*, “Choice of the Base Distribution,” J.Comput.Sci.Technol.25, pp.653-664 (2010).
- [4] W.Grathwohl *et al.*, “Your classifier is secretly an energy based model and you should treat it like one,” arXiv preprint arXiv:1912.03263 (2017).
- [5] A.Bendale *et al.*, “Towards open set deep networks,” Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition (2016).

# 業績

## 【原著論文】

1. 柏木 僚太, 迎田 隆幸, 島 圭介, FPGA 実装を指向した未学習クラス推定混合ガウス型識別モデルと複合動作の識別, 計測自動制御学会論文集, 60 巻 6 号 p. 397-406, 2024 年

## 【総説】

なし

## 【書籍】

なし

## 【口頭発表】

### 〔国際会議〕

1. Ryota Kashiwagi, Takayuki Mukaeda, Keisuke Shima: FPGA Implementation of An Approximated Gaussian Mixture Open-Set Recognition Model Application to Interface Control, 2024 IEEE Int. Conf. on Control, Decision and Information Technologies (CoDIT 2024, 査読有り), 2024 年 7 月, マルタ島 (イタリア)
2. Ryota Kashiwagi, Takayuki Mukaeda, Keisuke Shima: EMG Control of Prosthetic Hand on FPGA with Approximate Gaussian Mixture Open-Set Recognition, JSME The 8th Int. Conf. on Advanced Mechatronics (ICAM 2024, 査読有り), 2024 年 11 月, 福岡県北九州市
3. Adwait Rawat, Takayuki Mukaeda, Keisuke Shima: Application of OSR for hardware accelerated intelligent manufacturing machines, Int. Symposium on System Integration 2025 (SII 2025, 査読有り), 2025 年 1 月, ミュンヘン (ドイツ)

### 〔国内会議〕

4. 齋藤 凜, 柏木 僚太, 迎田 隆幸, 島 圭介: 関節インピーダンス制御を可能とするワイヤ駆動型指機構の設計, 第 25 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI 2024), 2024 年 12 月, 岩手県盛岡市
5. 北原 丈大, 柏木 僚太, 迎田 隆幸, 島 圭介: Energy-based model を導入した学習則による未知クラス推定確率ニューラルネットの最適化, 情報処理学会 第 87 回全国大会 (IPSJ 2025), 2025 年 3 月, 大阪府茨木市

## 【特許】

- (1)国内特許出願 0 件

# 超高感度質量分析に向けたマイクロ流体技術の開発

研究代表者：慶應義塾大学 嘉副 裕

## 【基本構想】

質量分析は、様々な分野における分析・検査に利用されており、近年では単一細胞プロテオミクスなどの超微量・超高感度分析への応用も期待されている。しかし、現状では分析対象である液体試料を質量分析計に導入・イオン化・検出する際に試料を噴霧するため、大部分が飛散してしまい、質量分析計への導入率が1%以下に留まり感度に限界があるという原理的な問題がある。当グループは、独自のマイクロ・ナノ流体工学の方法論と技術に基づき、2段階気液合流の流路構造を用いて液体試料を体積 fL の微小液滴に連続的に変換し方向制御して射出するマイクロ液滴シューターを創出し、質量分析計への試料導入率 100%と分析の2桁高感度化を達成した。しかし、従来の2次元微細加工ではデバイスの製造が難しく、更に、動作が不安定化であるため液滴生成・射出の持続時間が短く、実用化に至っていない。本研究では、超微量・超高感度質量分析の実現とその応用に向けて、3次元微細加工によるマイクロ・ナノ流体デバイス製造法を開発し、マイクロ液滴シューターにおける流体制御の問題を解消して安定な fL 液滴生成・射出を検証する。

## 1. 研究目的

質量分析 (MS) は、バイオ、製薬、環境、食品など様々な分野の分析・検査に利用される分析法であり、近年では、難病の病態解明のために細胞が産生するタンパクを1細胞レベルで網羅的に解析する単一細胞プロテオミクスへの応用も期待されている。本分析法では、液体試料をイオン化して質量分析計に導入する MS インタフェースが重要であり、図 1(a)に示すエレクトロスプレーイオン化法が広く用いられてきた。しかし、試料を噴霧するため、質量分析計への導入率が1%以下に留まり、感度に限界がある。そこで当グループでは、独自シーズとして、図 1(b)に示すように、数 1000 nm-数 10  $\mu\text{m}$  の2段階流路構造を用いた気液流体制御により液体試料を体積 fL の超微小液滴に変換

して軌道を制御して発射するマイクロ・ナノ流体デバイス (マイクロ液滴シューター) を開発した。これを MS インタフェースに用いることで、試料を逃さず全て質量分析計に導入し、290倍もの高感度化を達成した[1-3]。

しかし、マイクロ液滴シューターの動作が不安定化しやすく、液滴生成・射出の持続時間が数 10 分程度に留まり、実用化は依然として困難である。よって、この問題の解消が必要であるが、現状のリソグラフィ及びエッチングによる微細加工ではデバイス1つの製造に長時間 (2週間程度) を要し、不安定化の因子を特定する研究の妨げとなっている。また、流路が2次元形状に限定されるため、最適設計を追求する上で流路形状に制約がある。

そこで本研究では、マイクロ液滴シューターの実用化に

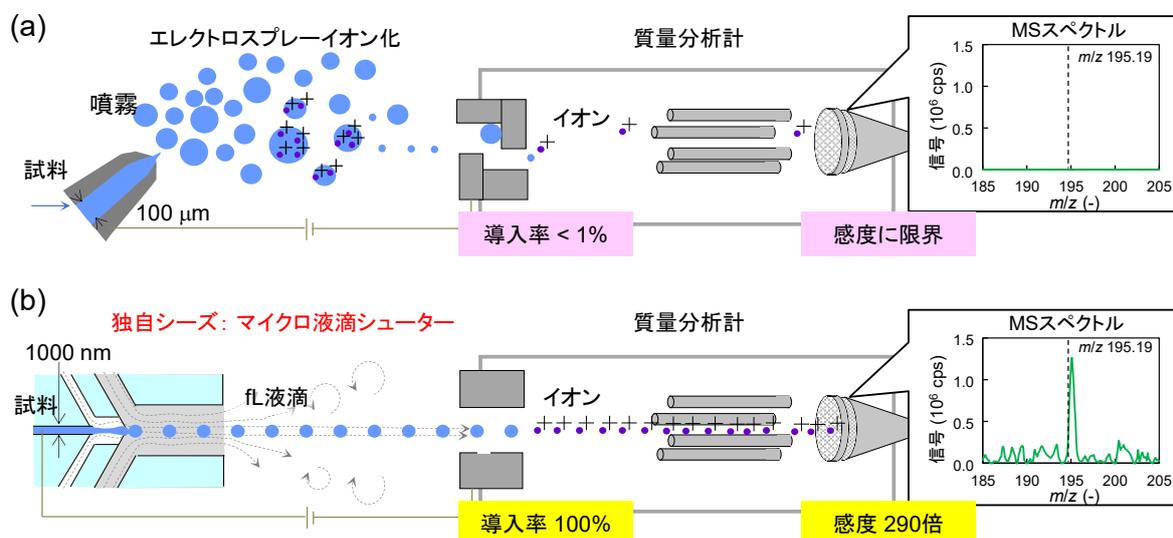


図 1. 質量分析 (MS) インタフェース : (a) エレクトロスプレーイオン化法、(b) マイクロ液滴シューター

向けて新たな基盤を構築することを目的とする。具体的には、デバイス製造法を2次元加工から3次元加工へと転換し、3次元流路形状によるマイクロ・ナノ流体工学の新たなプラットフォームを創出する。3次元造形の自由度が高い3Dプリンタおよび大量生産に適したナノインプリントによるデバイス製造プロセスを開発して、製造時間を数日にまで短縮し、歩留まりの問題を解決する。更に、3次元流路形状を利用したデバイスの最適設計により流体制御の問題を解決し、マイクロ液滴シューターの安定・長時間動作を達成する。具体的には、研究項目1) 3次元加工技術に基づくマイクロ・ナノ流体デバイス製造法の開発、研究項目2) 最適設計による $\mu\text{L}$ 液滴の安定生成・射出の検証と質量分析の実証に取り組む。

令和6年度は、研究項目1については3Dプリンタ及びナノインプリントそれぞれの加工プロセスを構築し、サイズが $1000\text{ nm}$ ～数 $10\text{ }\mu\text{m}$ で3次元形状の流路加工を達成することを目的とした。また、研究項目2についてはマイクロ液滴シューターの数値解析モデルを構築して、液滴生成・射出の安定化のための流路設計を検討することを目的とした。

## 2. 研究成果

### 2.1 研究項目1の成果

本研究で構築するマイクロ・ナノ流路加工プロセスを図2に示す。従来の2次元微細加工では、マイクロ液滴シューターの2段流路作製のためにリソグラフィとエッチングの繰り返しが必要であり、工程数と製造時間が増加する要因となっている。そこで、図2(b)に示すように、2光子重合3次元造形とナノインプリントを用いた加工プロセスを提案した。まず、3Dプリンタにより2段流路構造を造形する。ここで、2光子重合により超微細な3次元構造を造形できる一方、デバイス全体を造形するための時間が長く生産性が低いという欠点がある。また、流路の材料も耐薬品性が低い光硬化樹脂に限定される。そこで、3Dプリンタで造形した超微細構造を鋳型として、ナノインプリントにより樹脂製基板に構造を転写し流路を作製する。これにより、1工程で複雑な3次元形状を有する流路の作製が可能となり、デバイスの生産性向上につながる。以下、令和6年度の研究成果について述べる。

**(1) 3Dプリンタによる加工プロセスの構築:**2光子重合3Dプリンタ (Photonic Professional GT2、Nanoscribe 社) を用いて、微小流路の鋳型作製のための加工プロセスを構築した。サイズが $1000\text{ nm}$ ～数 $10\text{ }\mu\text{m}$ の流路パターンを造形することを踏まえて最適な光硬化樹脂を選定し、3Dプリンタによるサイズ・形状制御の条件を検討した。作製した矩形構造体の電子顕微鏡 (SEM) 写真、設計サイズと造形された構造体サイズとの関係を図3(a)に示す。これにより、最小で $3000\text{ nm}$ の構造体造形を実現した。また、造形した構造体を鋳型として用いるには、基板と構造体が強固に密着していることが要求される。そこで、構造体の密着性増強のために基板の表面修飾と構造体のコート処理を検討した。以上により、図3(b)に示すように、マイクロ液滴シ

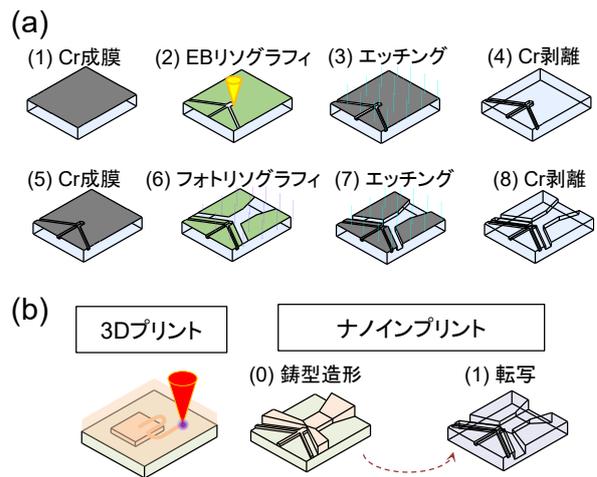


図2. 2段マイクロ流路の作製プロセス:(a) 従来の2次元微細加工、(b) 本研究の3次元微細加工

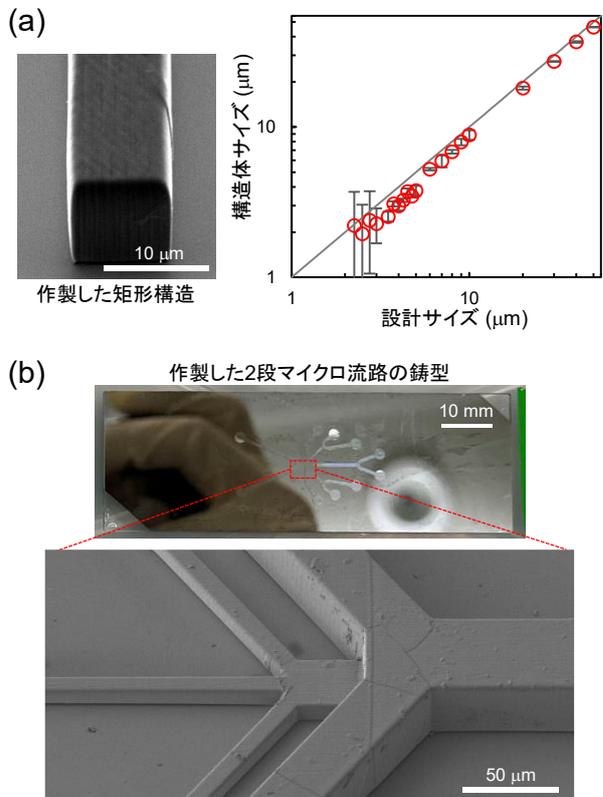


図3. 2光子重合3次元造形による微小流路の鋳型作製:(a) 矩形構造体の造形によるサイズ・形状制御の検討結果、(b) 作製した2段マイクロ流路の鋳型

ューターの2段マイクロ流路の鋳型作製を検証した。

**(2) ナノインプリントによる加工プロセスの構築:**UV/熱ナノインプリント装置 (X-300、SCIVAX 株式会社) を用いて、鋳型から微小流路を作製する加工プロセスを構築した。図4(a)に示すように、まず、微小流路の鋳型 (マスターモールド) を準備し、この流路構造を反転・転写したレプリカモールドを作製する。このとき、微細構造パターンの転写に優れるUVナノインプリントを用いる。更に、レプリカモールドから樹脂基板に流路構造を転写することで、所望の微小流路を作製する。このとき、材料の熱変形

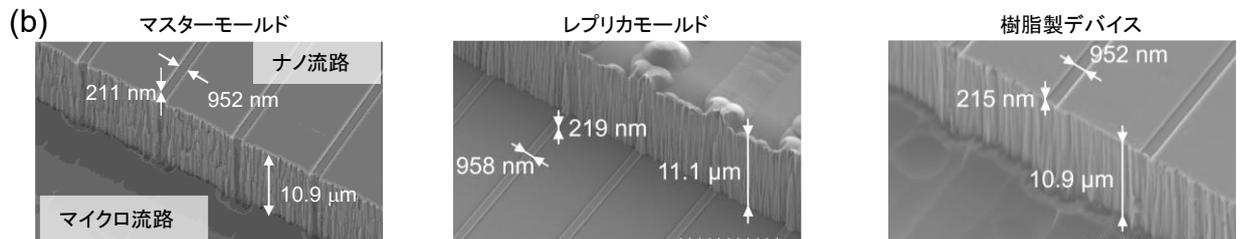
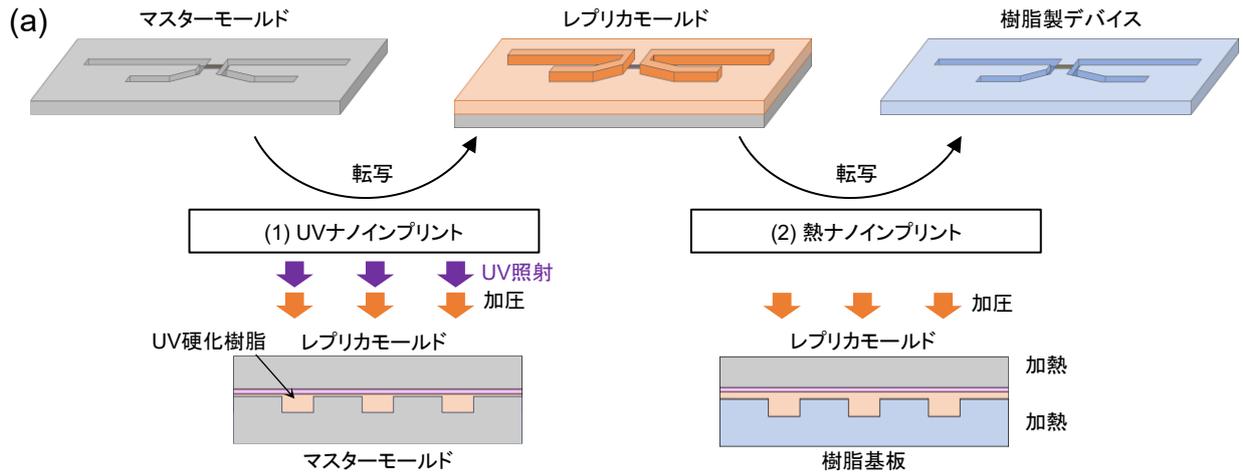


図4. ナノインプリントによる微小流路の作製: (a) UV ナノインプリント及び熱ナノインプリントによる樹脂製微小流路の加工プロセス、(b) ガラス製マイクロ・ナノ流路をマスターモールドとして用いたときの検証結果

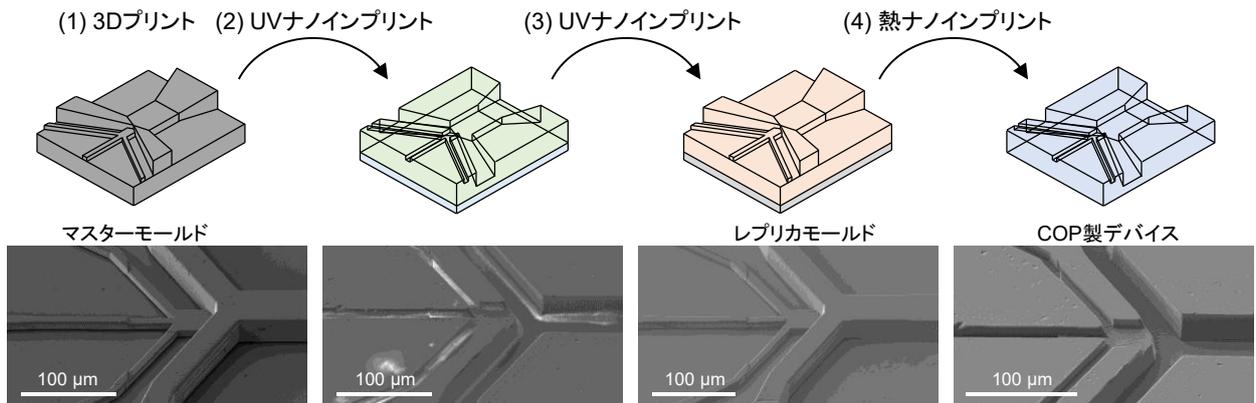


図5. 3Dプリントとナノインプリントを統合した加工プロセスによる2段マイクロ流路の作製結果

を利用した熱ナノインプリントを用いる。本研究では、微小流路の材料を耐熱性・耐薬品性に優れた環状オレフィンポリマー (COP) とし、COP 基板に流路構造を転写するためのプロセスを構築した。

UV ナノインプリントでは、離型処理したマスターモールドを UV 硬化樹脂に押し付けて加圧することで流路構造を転写し、その後に UV 光を照射して樹脂を硬化させる。このとき、最適な UV 硬化樹脂を選定し、離型処理および加圧条件を検討した。一方、熱ナノインプリントでは、離型処理したレプリカモールドを加熱条件下で COP 基板に押し付け加圧することで流路構造を転写する。このとき、COP 基板のガラス転移点を考慮してレプリカモールド及び基板それぞれの加熱温度を検討し、また、加圧条件も検討した。構築したプロセスに基づき、ガラス製マイクロ・ナノ流路を COP 基板に転写した結果を図 4(b)に示す。以上により、200 nm ナノ流路と 10 μm マイクロ流路の2段

構造を COP 基板に同時作製することに成功した。

**(3) 2段マイクロ流路作製の検証:** 構築した3Dプリント及びナノインプリントの加工プロセスを統合して、マイクロ液滴シューターの2段マイクロ流路作製を検証した。図5に示すように、2光子重合3次元造形によって流路を反転させた鋳型を作製した後、2回のUVナノインプリントによってレプリカモールドを作製した。このレプリカモールドを利用することで、COP基板上に2段マイクロ流路を作製することに成功した。鋳型の流路構造が正確に転写されていることが判る。レプリカモールドを繰り返し利用することで2段マイクロ流路を1日で製造することが可能であり、デバイス製造時間の短縮にも成功した。

## 2.2 研究項目2の成果

マイクロ液滴シューターの構造と原理、及び現行設計を図6に示す。液滴生成には気液界面のレイリー不安定性を利用しており、1000 nmスケールの液柱に $10^1$ – $10^2$  m/sの

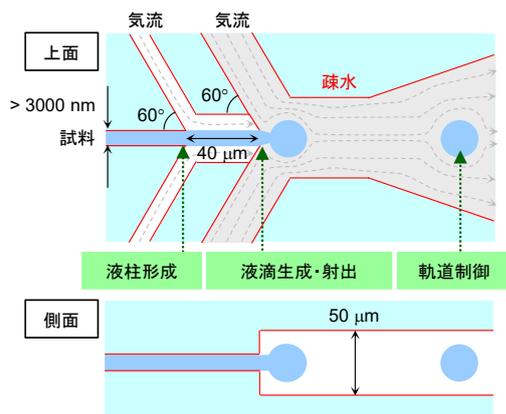


図 6. マイクロ液滴シューターの構造および原理と現行設計

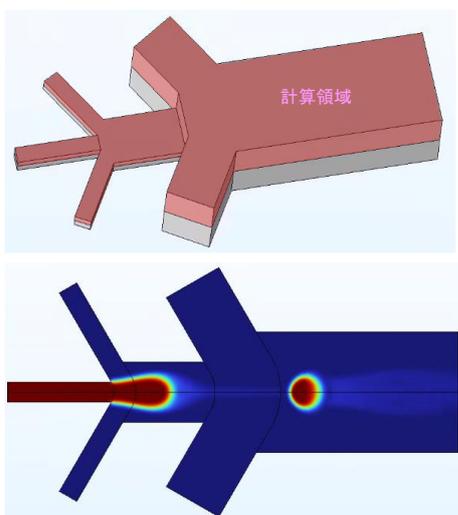


図 7. マイクロ液滴シューターにおける液滴生成・射出の数値計算結果

気流を合流させて界面を不安定化させることで液滴が生成される。この原理に基づき考案されたのが現行設計であり、1 段目の気流合流部で液柱を形成して、2 段目の気流合流部で界面を不安定化させ液滴を生成し、レイノルズ数が 200 程度の層流によって液滴の軌道を制御して外部に射出する。本研究項目では、まずマイクロ液滴シューターの数値計算モデルを構築して現行設計の妥当性を評価した後、得られた指針に基づき 3 次元流路形状を取込んだ新たな設計を検討する。次に、研究項目 1 で開発したデバイス製造法に基づき、実際に新設計のマイクロ液滴シューターを作製して、ロバスト性向上による fL 液滴の安定生成・射出を検証する。更に、開発したマイクロ液滴シューターを用いた MS 高感度化の実証にも取り組む。以下、令和 6 年度の研究成果について述べる。

**(1) 数値計算モデルの構築：**有限要素法による数値解析ソフトウェア COMSOL を用いて、マイクロ液滴シューターの数値計算モデルを構築した。非圧縮性流れにおけるナビエ・ストークスの式、連続の式を支配方程式として、フェーズフィールド法により 2 段マイクロ流路における液滴生成・射出を計算した。このとき、デバイス構造の対称性

を利用して計算負荷を低減し計算時間を短縮した。現行設計の計算結果を図 7 に示す。得られた液滴サイズは実験結果[1]と一致したことから、構築したモデルの妥当性を確認できた。

**(2) 現行設計の妥当性の検証：**構築した数値計算モデルを用いて、現行設計の妥当性を評価した。気液界面のレイリー不安定性を利用した液滴生成の原理に着目して、液柱形成に関する 1 段目の合流角（現行設計：60°）及び液柱長さ（現行設計：40 μm）、界面不安定化に関する 2 段目の合流角（現行設計：60°）をそれぞれ変化させて数値計算を行った。その結果、数値計算上の理想的な場であれば現行設計は概ね妥当であることが示された。

### 【まとめ】

以上のように、令和 6 年度は、2 光子重合 3 次元造形とナノインプリントによるマイクロ・ナノ流路の加工プロセスを開発して、1000 nm～数 10 μm サイズの 3 次元流路加工に成功し、更に従来の 2 次元加工と比較して製造時間の大幅な短縮も達成した。今後は、流路を加工した基板の接合プロセスを構築し、3 次元流路形状によるマイクロ・ナノ流体デバイスを実現する。また、有限要素法によるマイクロ液滴シューターの数値計算モデルを構築して、現行設計の妥当性を評価し、デバイスの設計指針を得た。今後は、3 次元流路形状を取込んだ新たな設計を検討して、開発したデバイス製造法により新設計のマイクロ液滴シューターを作製して、fL 液滴生成・射出の安定化を検証する。

### 【参考文献】

1. Kazoe, Y., Shimizu, Y., Morikawa, K., Terui, Y., Irie, T. and Kitamori, T., *Sens. Act. B*, 340, 129957, (2021).
2. Takagi, Y., Kazoe, Y. and Kitamori, T., *Microfluid Nanofluid*, 25, 74, (2021).
3. Takagi, Y., Kazoe, Y., Morikawa, K. and Kitamori, T., *Anal. Chem.*, 94, 10074-10081, (2022).

# 業績

## 【口頭発表】

1. 大庭将也、蔣鑫、嘉副裕、並行マイクロ流路における二相流操作を用いた脂質二重膜の安定形成、日本機械学会第15回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2024年11月26日、仙台、日本
2. 渡部勇暉、大穂亮介、蔣鑫、嘉副裕、ナノ流路内超微小液滴を用いた1分子の輸送および濃度定量、日本機械学会第15回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2024年11月26日、仙台、日本
3. 蔣鑫、嘉副裕、マイクロ液滴シューターを用いた気相中ピコリットル液滴生成の計算モデルの構築、日本機械学会第15回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2024年11月26日、仙台、日本
4. Shohei Sugita, Mizuho Koyama, Xin Jiang, Yutaka Kazoe, Development of a hydraulic actuator for integration of nanochannel open/close valves utilizing elastic glass deformation, The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2024), 2024年10月15日, Montreal, Canada
5. Yuki Watabe, Yuki Mita, Xin Jiang, Yutaka Kazoe, Development of a method for liquid injection into femtoliter droplet in a nanofluidic channel utilizing Laplace pressure, The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2024), 2024年10月15日, Montreal, Canada.
6. Masaya Ohba, Xin Jiang, Yutaka Kazoe, Stable formation of lipid bilayer in parallel microfluidic channels utilizing operation of aqueous/organic two-phase flow, The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2024), 2024年10月15日, Montreal, Canada.

# 内在性因子による造血幹細胞増幅法の開発

研究代表者：国立国際医療研究センター 田久保 圭誉

## 【基本構想】

多細胞生物を構成する各種の細胞は、それぞれが協調しながら臓器や個体が適切に作動するために固有の機能を発揮する。こうした細胞社会の作用の結果、それぞれの個体は恒常性を維持しながら生涯を過ごすことが可能になる。幹細胞は自己複製能と他分化能を有する細胞で、体内にある幹細胞（組織幹細胞）は日々組織の恒常性を維持するのみならず、細胞医療や臓器再生など、再生医学への応用が期待される細胞群である。体内の各臓器・組織には組織幹細胞が存在しているが、そのなかでも造血幹細胞は全ての血液・免疫細胞を産生する能力を持つ組織幹細胞である。哺乳類では骨の中・骨髄で自らを複製しながら、自身を維持し、必要なタイミングで必要な数の血液細胞を供給する。また、造血器腫瘍の根治療法である幹細胞移植に活用される細胞でもある。さらには、造血幹細胞レベルの単一遺伝子変異で生じる血液・免疫・代謝疾患において、造血幹細胞の遺伝子・細胞治療は重要なモダリティである。今後少子高齢化がさらに進む我が国においては、骨髄ドナーや臍帯血バンクに由来する造血幹細胞を含む移植細胞ソースは確保が困難になることが予想されている。治療における大きな障壁となり、医学的・社会的な問題が近い将来に生じる可能性が高い。

造血幹細胞を活用した医療技術の展開のためには、この限られた幹細胞リソースを活用する必要があるために、近年造血幹細胞を体外で増幅する技術の開発が進められている。しかし、その効果は限定的である。一方、体内に存在するはずの、内在性の造血幹細胞に自己複製を誘導している因子は未発見であった。そのため、体内同様の造血幹細胞の自己複製誘導は達成されていなかった。

私たちのグループは、長く未発見であった内在性の造血幹細胞増幅因子（endogenous hematopoietic stem cell expander; EHE）を同定した。偶然同定された同因子は既存のベストとされる造血幹細胞培養法よりも高い幹細胞増幅活性を有しており、独自かつ有望な幹細胞増幅手法を提供する。つまり、今回同定した因子を用いて幹細胞培養を追究・洗練して、治療技術シーズを整える必要性は高い。

そこで本研究では、私たちが同定した内在性造血幹細胞増幅因子の作動機構を解明しながら、幹細胞活性・性質を維持したまま造血幹細胞を増幅する培養技術を開発することを目的とし2つの研究項目「内在性造血幹細胞増幅因子の作動機構の解明」および「内在性造血幹細胞増幅因子による試験管内増幅条件の同定」についての研究開発を進めて、造血幹細胞医学に貢献する知見を得ることを目指した研究開発を進めている。

## 1. 研究目的

造血幹細胞は全ての血液・免疫細胞を産生する能力を持つ組織幹細胞である。ヒトを含む哺乳類の造血幹細胞は、骨髄に存在する特殊な微小環境（ニッチ）で自らを複製しながら、自身の数と機能を維持し、必要なタイミングで必要な数の血液細胞を供給することで造血システム全体を生涯にわたって維持する。造血幹細胞は、造血器腫瘍の根治療法である幹細胞移植に活用される細胞でもある。さらには、造血幹細胞レベルの単一遺伝子変異で生じる血液・免疫・代謝疾患において、造血幹細胞を用いた遺伝子・細胞治療は重要なモダリティである。一方、今後少子高齢化がさらに進んでいく我が国においては、骨髄ドナーや臍帯血バンクに由来する造血幹細胞を含む移植細胞ソースは確保が困難になることが予想されている。その結果、各種の造血幹細胞を活用した治療に

おける大きな障壁が出現して、医学的・社会的な問題が近い将来に生じる可能性が高い。

限られた幹細胞リソースを活用する必要があるために、近年造血幹細胞を体外で増幅する技術の開発が進められているが、その効果は限定的である。一方、体内に存在するはずの、内在性の造血幹細胞に自己複製を誘導している因子は未発見であった。そのため、体内同様の造血幹細胞の自己複製誘導は達成されていなかった。このたび私共のグループは、長く未発見であった内在性の造血幹細胞増幅因子を同定した。偶然同定された同因子は既存の培養法よりも高い幹細胞増幅活性を有しており、独自かつ有望な幹細胞増幅手法を提供する。つまり、今回同定した因子を用いて幹細胞培養を追究・洗練して、治療技術シーズを整える必要性は高い。そこで本研究では、私たちが同定した内在性造血幹細胞

増幅因子 (endogenous hematopoietic stem cell expander; EHE) の作動機構を解明しながら、幹細胞活性・性質を維持したまま造血幹細胞を増幅する培養技術を開発することを目的とし、それらに基づく加齢幹細胞の若齢化誘導や遺伝子編集法の開発につながる研究開発を進めることとした。

## 2. 研究成果

本研究の初年度では、2つの研究項目 (【研究項目①】内在性造血幹細胞増幅因子の作動機構の解明および【研究項目②】内在性造血幹細胞増幅因子による試験管内増幅条件の同定) を設定したうえで、それぞれを両輪として研究を展開することを通じて、EHE 機能解明に基づいた増幅法の技術開発を進めることとした。また、この研究過程では、本研究で着目する EHE が発見された経緯に関わる造血幹細胞エイジングについての研究を深めて、論文文化を進めた。

EHE の発見はそもそも偶然であった。加齢に伴いあらゆる細胞は機能が変化して、その結果個体の老化が進む。線維芽細胞を中心とした研究から、加齢に伴って細胞は増殖が停止して、炎症性のサイトカイン・ケモカインを産生することが知られるようになった。しかし、造血幹細胞の加齢変化については不明な点が多かった。幹細胞分野においては、山中因子に代表されるように転写因子が重要であることが知られているために、加齢による造血幹細胞の変化をもたらす転写因子スクリーニングを以前から実施していたが不調であった。その過程で、造血幹細胞の加齢変化を誘導する因子として、ミトコンドリアの酸化的リン酸化 OXPHOS の複合体 II のアセンブリーを促進する SDHAF1 を同定し、その作用はミトコンドリアに代謝学的頑健性を誘導であることを報告した (期間中に Watanuki et al., Cell Stem Cell 2024 として KISTEC のサポートを明示したうえで論文発表した)。この研究が示したのは、加齢造血幹細胞で発現が上昇する因子を若齢造血幹細胞に発現することで、造血幹細胞エイジングに寄与する因子を見出すことが可能である、というアイデアであった。そこで、さらに造血幹細胞エイジングを誘導する分子機構を同定するために、加齢で発現が上昇する様々な因子をスクリーニングした。その過程で、代謝関連因子の造血幹細胞エイジング誘導効果を検討することとなった。若齢マウス由来の造血幹細胞レトロウイルスベクターを用いて同因子を過剰発現して、1週間培養後にフローサイトメーターを用いて蛍光標識抗体を用いて表面マーカー上の造血幹細胞数等に変化が誘導されるか検証した。その際、体内に存在する同因子の基質の一つとされる分子を加えて、同因子の過剰発現の有無と、基質の有無の 2x2=計4条件の検討を行った。すると、当初の想定とは異なり、同因子の過剰発現では加齢形質は誘導されなかった。その一方、同因子の基質を加えたところ、培養後の細胞内の造血幹細胞の割合と、絶対数の双方が増加していることが示された。この基質分子の効果から、同因子の基質を EHE として本課題

の検討を進めることとなった。

EHE そのものについての初年度の研究推進内容と、実験検討・データ解析の過程で得られた研究成果を以下の通り示す。

EHE がどのように機能するかを理解のためには下流の分子機構の同定、すなわち作動機構の解明が必要である。そこで「作動機構の解明」のため、まず、EHE には関連分子や修飾体が存在することが知られている。そこで、造血幹細胞培養の際に EHE や関連分子を加えて、7日あるいは14日後に培養後の細胞クラスター内の造血幹細胞分画の頻度を、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー解析で評価した。すると、EHE 以外の類縁分子や修飾体では、7日間の培養では造血幹細胞の頻度を維持するものもあったが、14日間の培養では EHE 以外の分子では造血幹細胞を維持することができないことが判明した。すなわち、EHE および類縁分子群の中では EHE のみに培養した造血幹細胞を長期にわたって増幅する能力が存在することが確認された。

引き続き EHE の作動機構の解明を進めた。EHE および類縁分子群は、体内では分解酵素によって代謝されることが知られている。そこで EHE の作用機序を考えるために EHE 分解酵素ファミリーに着目した検討を行った。EHE 類縁分子群は、細胞に作用させた際にこの EHE 分解酵素ファミリーの発現を上昇することが知られている。そこで、造血幹細胞に培養中で EHE および EHE 類縁分子群をそれぞれ作用させて、7日後あるいは10日後に造血幹細胞分画をフローサイトメーターで単離・回収した。そして RNA 抽出ののちに cDNA を合成して、EHE 分解酵素ファミリーの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で検討した。その結果、培養7日目には EHE 分解酵素ファミリーの発現は低下したが、10日目には EHE 以外の類縁分子群を添加培養した造血幹細胞では EHE 分解酵素ファミリーの発現が上昇した。一方、EHE を添加した培養後10日目の造血幹細胞では EHE 分解酵素ファミリーの発現は上昇せずに培養7日目の発現レベルと同様に低下したままであった。以上から、EHE は自身の分解酵素のネガティブフィードバックによる発現上昇を防ぎ、造血幹細胞に対して生理活性を発揮していることが示唆された。これを検証するために引き続き、EHE 分解酵素ファミリーの発現が EHE による造血幹細胞の増幅に及ぼす効果を検討するために2つの実験を準備した。まず、EHE 分解酵素ファミリーを造血幹細胞にレトロウイルスを用いて過剰発現して EHE を添加培養した際の造血幹細胞への効果を検討した。培養7日後に蛍光標識抗体を用いてフローサイトメーターで解析し、造血幹細胞分画の割合を評価したところ、EHE の造血幹細胞増幅効果が EHE 分解酵素ファミリーの過剰発現で低下することが確認された。引き続き、EHE 分解酵素ファミリーの阻害による造血幹細胞分画の維持効果を確認した。造血幹細胞に EHE を添加して培養する際に、EHE 分解酵素ファミリーの阻害剤を添加して培養7日後に蛍光標識抗体を用いてフローサイトメーターで解析し、造血幹細胞分画

の割合を評価した。すると、EHE の造血幹細胞増幅効果が EHE 分解酵素ファミリーのうち、一部に対する阻害剤添加で亢進することが確認された。すなわち、EHE 分解酵素ファミリーは EHE の効果発揮に抑制的に機能し、一部は EHE 培養時においても造血幹細胞増幅効果に対してネガティブに機能していることが示唆された。

一方、申請時点では EHE を添加した培養後の細胞クラスターを移植すると、EHE 非添加条件に加えて添加前の造血幹細胞よりも移植生着能が高まることが示唆されていた。これは CD45.2+マウス骨髄から単離した造血幹細胞を CD45.1 陽性のコンペティター細胞とともに致死量放射線照射済の Ly5.1 マウスへと移植してその後の末梢血キメリズムをフローサイトメーターで解析することで得た。この予備データに加えてより厳密な造血幹細胞の増幅の証明のために、CD45.2+マウス骨髄から単離した造血幹細胞で EHE 培養を行い、細胞を希釈して致死量放射線照射済の Ly5.1 マウスへ CD45.1 陽性のコンペティター細胞とともに移植して、新鮮造血幹細胞の移植実験と比較した。この限界希釈法による移植解析の結果、EHE 培養後の造血幹細胞で機能的な造血幹細胞が増幅していることが確認された。

続けて、既存でベストの造血幹細胞の増幅培養を行うべく、合成ポリマーを添加した培養法と EHE 培養の効果の比較を実施した。EHE 培養あるいはポリマー添加培養でマウス骨髄由来造血幹細胞を 14 日間培養し、致死量放射線照射済の Ly5.1 レシピエントマウスへ CD45.1 陽性のコンペティター細胞とともに移植して、新鮮造血幹細胞の移植実験と比較した。そしてその後 1 か月ごとに移植後 4 か月までのレシピエント末梢血キメリズムをフローサイトメーターで解析した。その結果、EHE 培養はポリマー添加培養に比べて有意に高い末梢血再構築能を発揮することが確認された。これは B 細胞、顆粒球、T 細胞ごとのキメリズムについても同様であり、EHE 培養のポリマー培養に対する優位性が示唆された。末梢血に加えて骨髄のキメリズムも確認したところ、造血幹細胞や多能性前駆細胞といった骨髄の未分化血液細胞分画のキメリズムが、ポリマー添加培養に比して EHE 培養で高く保持されることが確認された。以上の末梢血および骨髄キメリズムに関しては、新鮮造血幹細胞を移植したレシピエントよりも優位に高いことが確認された。さらに、これらのレシピエント（1 次移植レシピエント）の骨髄を単離して、致死量放射線照射済の Ly5.1 レシピエントマウス（2 次移植レシピエント）へ移植した。そしてその後 1 か月ごとに移植後 4 か月までのレシピエント末梢血キメリズムをフローサイトメーターで解析した。その結果、EHE 培養した造血幹細胞を移植した群が新鮮造血幹細胞移植群およびポリマー添加培養した造血幹細胞を移植した群よりも高い末梢血キメリズムを呈することが確認されて、EHE は造血幹細胞の連続移植生着能を改善する、つまり造血幹細胞の寿命を延長することが示唆された。

こうしたポリマー添加培養に対する EHE 培養の優位性

を示唆するデータから、より厳密なポリマー添加培養との造血幹細胞増幅効果の比較のために、CD45.2+マウス骨髄から単離した造血幹細胞で EHE 培養あるいはポリマー添加培養を行い、細胞を希釈して致死量放射線照射済の Ly5.1 マウスへ CD45.1 陽性のコンペティター細胞とともに移植して、移植生着能を比較した。この限界希釈法による移植解析の結果、EHE 培養のほうがポリマー添加培養よりも機能的な造血幹細胞をより良好に増幅することが確認された。

EHE が造血幹細胞へ及ぼす効果がいかなるものであるかは不明な点が多い。幹細胞増幅の際に自己複製が誘導されている、ということが一番シンプルな解釈である。そこで造血幹細胞 1 個をウェルにソーティングして、EHE 培養を行って、同ウェルに含まれる細胞クラスターを 5 等分して、致死量放射線照射済の 5 匹の Ly5.1 レシピエントマウスへ CD45.1 陽性のコンペティター細胞とともに移植して、その後 1 か月ごとに移植後 4 か月までのレシピエント末梢血キメリズムをフローサイトメーターで解析し自己複製の直接的な評価を行った。その結果、4 か月まで生存した全てのマウスで末梢血への 1%以上の生着が確認され、骨髄キメリズムも 1%以上で確認された。すなわち、EHE の効果は造血幹細胞の自己複製誘導によることを直接的に証明することができた。

培養条件の最適化も実施した。EHE 培養時の培地交換の必要性や、培養プレートの形状、基本培地とその添加物についても評価して、最適な条件を決定した。さらに、入手可能な基本培地へと評価を拡張し、EHE 培養に必要な培養添加物を同定し、改良版の EHE 培地を作成することができた。

さらに、表面マーカーや移植生着能以外の造血幹細胞への効果を確認するために、造血幹細胞に特異的な転写因子 Evi1 ローカスに GFP 遺伝子をノックインした造血幹細胞レポーターマウス由来の造血幹細胞を用いた検討を行った。Evi1-GFP+造血幹細胞を単離して、EHE 添加あるいは EHE 非存在下で培養し、7 日後あるいは 14 日後に表面マーカー上の造血幹細胞分画における GFP 蛍光強度を測定した。その結果、7 日目および 14 日目の造血幹細胞における GFP 蛍光が EHE 添加培養によって高く保たれる（新鮮造血幹細胞同様に）ことが確認された。一方、EHE 非添加条件で培養すると、GFP 蛍光は経時的に低下していくことが見いだされた。

次に、EHE の作用機序の深掘りを行うこととした。まず、EHE には既報で受容体とされる遺伝子が知られている。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて既報の EHE 受容体遺伝子をノックアウトしたマウス骨髄由来造血幹細胞を準備して、それを 14 日間培養し、致死量放射線照射済の Ly5.1 レシピエントマウスへ CD45.1 陽性のコンペティター細胞とともに移植して、新鮮造血幹細胞の移植実験と比較した。そしてその後 1 か月ごとに移植後 4 か月までのレシピエント末梢血キメリズムをフローサイトメーターで解析した。その結果、既報の EHE 受容体遺伝子をノックアウトしても、対照群と同様にレシピエント

マウス末梢血を再構築することが確認された。これは B 細胞、顆粒球、T 細胞ごとのキメラズムについても同様であり、EHE 培養においては既報の EHE 受容体遺伝子は必要ではなく、他の EHE 受容体が造血幹細胞増幅を誘導していることが示唆された。

EHE が造血幹細胞に自己複製を誘導する際に活性化しているメカニズムを同定するための検討を進めた。EHE をマウスの骨髄から単離した造血幹細胞に作動させて培養し、生じる転写レベルの変化を解析するために RNA を抽出してライブラリ作成を行い、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq を実施してトランスクリプトーム解析を行った。データ解析の結果、造血幹細胞の未分化性を規定することが知られている各種の転写因子をはじめとする一連の遺伝子群の発現が高く保たれていることが示された。いかなるシグナルが特徴的に活性化しているか確認したところ代謝関連シグナルの亢進を示唆するデータも得られた。この際、一般的な単離したての新鮮造血幹細胞と異なる点として、分化関連遺伝子セットの発現上昇が強く抑制されて未分化性が高く維持されていることが示唆された。すなわち、新鮮造血幹細胞ではある程度分化関連遺伝子を弱く発現して、緊急の造血需要に応えるところ、EHE 培養では自己複製に特化していることが示唆された。EHE 培養が誘導するシグナルをトランスクリプトームデータを参考に探索し、細胞内フローサイトメトリー解析を行ったところ、特定のシグナルの活性化と、阻害剤によるシグナル活性化の抑制と EHE の増幅効果の消失が確認できた。当該シグナルにはアイソザイムが複数存在するために、トランスクリプトーム解析で絞り込みつつ、CRISPR/Cas9 でノックアウトを行って EHE の造血幹細胞の消失を確認したところ、シグナル経路で重要なアイソザイムを確定できた。

さらに、単離した造血幹細胞をポリマー添加培養、EHE 添加培養、EHE 非添加培養の 3 条件で培養して、single cell RNA-seq (scRNA-seq) を行って、ポリマー添加培養と EHE 培養の造血幹細胞への効果の違いを確認した。その結果、EHE 培養はポリマー添加培養に比べて遺伝子発現上の造血幹細胞を高く含むことが確認された。また、EHE 培養後には、一部の分化系統の細胞も出現しないことから、系列特有の分化抑制効果もあることが示唆された。ここまでは造血幹細胞への効果を中心に確認してきたが、造血幹細胞のみならず、多能性前駆細胞にも造血幹細胞様の signature を誘導する点で EHE は高品質な造血幹細胞と多能性前駆細胞の両方を増幅できるというユニークな効果を発揮すると判断している。加えて、pseudotime 解析からは、EHE 培養が造血幹細胞の分化を遅延する効果を有することも明らかにした。

また、幹細胞の未分化性維持にはエピジェネティックな状態の維持も不可欠であるために、ATAC-seq も実施したところ、Jun/Fos などの AP1 モチーフが濃縮されていた。興味深いことに EHE が過去の報告で結合するとされている典型的な受容体が駆動するシグナルの亢進は確認されなかった。これらの同定された結果を総合して、

EHE が直接・間接に造血幹細胞におよぼす影響は、典型的な EHE 受容体とは異なる非典型的なシグナルによるものと考えられた。同時に既報の造血幹細胞性を反映する様々な signature も活用して自己複製の実態を検討した。すると、一部の signature は亢進している一方、他の signature はむしろ解除されており、自己複製しながら未分化性を高く保つ一方で、柔軟に分化細胞産生が可能な状態も同時に保っていると考えられた。さらに、EHE の受容体は未同定であるために、アフィニティーナノビーズに EHE を結合して、これを利用して、造血幹細胞ライセートから EHE の受容体の同定を試みた。EHE 結合ビーズを用いて結合タンパクをプルダウンして、電気泳動で質量に応じて分離、バンドを切り出したうえでそれぞれを質量分析で解析した。その結果、EHE 受容体候補を複数同定し、一部については機能的意義の検証を進めた。

トランスクリプトーム解析の結果から、signature のみならず ATP 産生関連の代謝酵素群が EHE 処理された造血幹細胞において一括して発現亢進することが確認されて、EHE は細胞の代謝に影響を及ぼすことが示唆された。そこで、独自に開発した単一細胞代謝解析システム (Watanuki et al., eLife 2024) を活用した解析を実施した。このシステムは、細胞内の ATP 濃度に応じて蛍光が変化する FRET プローブ・GO-ATeam2 をノックインしたマウスモデルを活用する手法である。同マウス由来の骨髄細胞を単離して、様々な代謝物や代謝経路阻害剤や活性化剤を添加した後、フローサイトメーターで経時的に解析することで造血幹細胞の ATP 濃度の変化を追跡する。これら一連の解析を通じて特定の代謝物や代謝経路の造血幹細胞をはじめとする血液細胞における意義を検討する手法である。EHE 処理前後で比較すると、EHE 処理された造血幹細胞は代謝学的により強化されていることが示唆された。この代謝学的な効果は、既に同定した EHE で活性化される自己複製シグナルの阻害剤で消失することも確認された。なお、未分化性は損なわれるものの、生細胞そのものが消失するわけではない点はユニークな効果であった。

In vivo での EHE の効果も確認するために、マウスやゼブラフィッシュへの投与実験も実施して、EHE で造血幹細胞の自己複製が促進されることが確認できた。なお、ゼブラフィッシュへの EHE 添加の際に同定済の EHE 下流のシグナル阻害剤を添加することで、こうした効果は少なくとも一部消失した。つまり、EHE は種を越えて同一シグナルを介して造血幹細胞の自己複製を誘導する効果を有する分子であることが示唆された。

これらの検討の中心はマウス由来の造血幹細胞であったが、トランスレーショナルな視点から EHE の有用性をさらに確認するためにヒト造血幹細胞培養における EHE の効果の確認を実施した。まず、ヒト造血幹細胞を市販の各種培地に EHE を添加して培養した。そして、培養後のヒト造血幹細胞由来の細胞クラスターの中に含まれる造血幹細胞を、蛍光標識抗体を用いてフローサイトメー

ターで解析したところ EHE 添加で造血幹細胞数が増加することが確認された。ヒト造血幹細胞培養においてもポリマー添加培養の有用性が報告されている。そこでまず、ヒト造血幹細胞培養でよく用いられている培地と、ポリマー添加培養との比較を行ったところ、ポリマー添加培養は一般的なヒト造血幹細胞培地とは異なる効果を発揮することが示された。ポリマーの添加濃度も様々に変更しながら、ヒト造血幹細胞に対してロットを問わず良い効果を発揮する培地条件を探索したが、ロットごとに EHE の効果がばらつく結果となった。そこでポリマー濃度や追加の培養添加物のスクリーニング・評価検討を行ったところ、ヒト造血幹細胞を再現性高く維持・増殖できる基盤的な培地条件を同定できた。さらなる至適化を進める予定である。その過程では順次、機能的な造血幹細胞の増幅効果の確認を移植モデル等で進めて、既存法でベストとされる培養法と EHE との比較を実施中である。結果は第 2 年度に判明する予定である。

一方、EHE 培養をさらに改善しうる物質の同定は EHE 培養を改善するのみならず新規の知財にもつながる重要なアプローチである。そこで、AMED BINDS 事業の支援を受けることにして、KISTEC、国立国際医療研究センター、東京大学の 3 者間共同研究契約を締結のうえ、造血幹細胞培養を改善しうる物質のスクリーニングを開始した。

# 業績

## 【原著論文】

1. Watanuki S, Kobayashi H, Sugiura Y, Yamamoto M, Karigane D, Shiroshita K, Sorimachi Y, Morikawa T, Fujita S, Shide K, Haraguchi M, Tamaki S, Mikawa T, Kondoh H, Nakano H, Sumiyama K, Nagamatsu G, Goda N, Okamoto S, Nakamura-Ishizu A, Shimoda K, Suematsu M, Suda T, Takubo K., *Cell Stem Cell*, 31(8), 1145-1161(2024)

## 【口頭発表】

1. Keiyo Takubo  
Identification of an endogenous HSC expander  
The 24th IRCMS Symposium on Hematopoiesis and Leukemia、2025年2月、熊本
2. Keiyo Takubo  
Identification of an endogenous HSC expander  
The 2025 US/Japan/Australia Meeting Hematologic Malignancies、2025年3月、Hawaii