# 研究報告2024 目次【研究開発部】

## 有望シーズ展開事業

<b>実用化実証事業</b> 「貼るだけ人工膵臓」グループ・・・・・・・・・・・・・・	•••	•••	••	•	••	• • 47	7
「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」・・	••	•••	••	•	••	• • 33	}
「光スイッチ医療創出」プロジェクト・・・・・・・・・・	••	•••	•••	•	••	• • 20	)
「次世代合成生物基盤」プロジェクト・・・・・・・・・・	••	•••	••	•	••	• • 12	)
「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト・・・・・	••	•	••	••	• •	•••1	

「次世代半導体用エコマテリアル」グループ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	55
「腸内環境デザイン」グループ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	73
「次世代医療福祉ロボット」グループ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	87
「人工細胞膜システム」グループ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	102

## 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・・・・・・・・・・・・・・119
<b>戦略的研究シ</b> ー 研究テーマ:	<b>-ズ育成事業</b> : 高重力による3Dプリンタの超高機能化の研究・・・・・・・・・・・ 132
研究テーマ	: 未知を知るAI搭載型ハードウェアの開発・・・・・・・・・・・・ 137
研究テーマ	: 徐脈性不整脈の革新的細胞移植治療開発・・・・・・・・・・・・・・ 142
研究テーマ	: Beyond5G対応のナノセルロース製電子機材の創製・・・・・・・・・146
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・・・・・ 151
研究テーマ	: 非破壊画像検査用スマートシートの創出・・・・・・・・・・・・・・ 157

# 研究報告2024 目次 【研究開発部】

実用化実証事業

「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト

•	▶総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
•	▶毛髪オルガノイドを用いたオキシトシンの育毛効果の理解・・・・・・・・・・・・・・・・	5
•	■毛髪再生のための毛乳頭細胞培養法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	8
•	▶業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	10

## 「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト

プロジェクトリーダー 福田 淳二

#### 【基本構想】

現在、毛髪の再生医療をめぐっては、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において、独自 の特許技術を開発し、それを元に実用化を目指した研究開発を進めている(図1)。

「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。

「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。5年後の臨床試験開始を目標に研究開発を進める。

「再生毛包」の移植に至っては、生体外でほぼ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。10年後の臨床試験開始を目標に研究開発を進める。



図1 我々が進める3つの毛髪再生アプローチ

#### 1. 2023 年度の研究目的

プロジェクト5年目となる2023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。

- (1) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生
- (2) 毛包原基の移植による毛髪再生
- (3) 生体外再生毛包の移植による毛髪再生

(1)に関して、毛髪再生能の高い毛乳頭細胞を調製する 技術として重層化培養を開発した。また、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。(2)に関し て、毛包原基の移植に適したモデルマウスを作製した。ま た、毛包原基の新たな大量調製方法を開発した。(3)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、オキシトシンの育毛・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、(1)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. 2023 年度の研究成果

## (1) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生

毛乳頭細胞は、脱毛症患者の頭皮に移植することで、毛 髪の再生を促す能力を持ち、毛髪再生医療の細胞ソースと して世界的に注目されている。一方で、毛乳頭細胞の増殖 培養技術は確立されておらず、初代培養のみで遺伝子発現 プロファイルを劇的に変化させ、毛髪再生能を失うことが 課題となっていた。このような背景から、我々は毛乳頭細 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)。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。2023 年度は、重層化培養で毛髪再生能が維持され るメカニズムの解明を進めるとともに、共同研究先となる ロート製薬に対し、重層化培養の技術移転を行った。現時 点で、少なくとも、2名の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 できていることを確認している。早期の実用化を目指して 研究開発を進めていきたい。

#### (2) 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)[1]、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 [2-5]。2023 年度は、細胞増殖技術、毛包原基の作製 方法、移植評価系の最適化を進めた。

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)、毛包上皮幹細胞は三次元培養(特許第 7078925 号)[6]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、毛包原基の作製に必要な細胞数を調 製するまでに、長期間の培養日数を要することが課題であ った。2023 年度は、この課題を解決するために新たな培 養技術を開発した。詳細は省略するが、この方法では三次 元培養と比較して、10 倍以上の細胞数を得ることが可能 となる。世界的にも培養技術が確立されていない毛包上皮 幹細胞の新規培養法として提案できるよう、2024 年度に 最適化検討を進める計画である。

毛包原基の作製方法について、バイオプリンターやマイ クロ流体デバイスを用いた新たな手法についての論文を 発表した [7,8]。一般的なプリンターは、インクを用いて 紙に文字や絵を写している。それに対してバイオプリンタ ーでは、インクの代わりに細胞が使われており、細胞を好 きな形、好きな場所に立体的に印刷することができる。私 たちは、バイオプリンターで上皮系細胞と間葉系細胞を隣 り合うように印刷することで毛包原基様の構造を作製し た [7]。この方法では、千個の毛包原基を15分以内にプリ ントすることができるため、毛包原基の大量作製技術とな りうる。この毛包原基をマウスに移植すると、移植部から 毛周期を繰り返す毛髪が再生することも確認している。ま た、マイクロ流体デバイスを利用した方法も提案した。微 小な空間では液が混ざり合わず層流で流れるという特徴 を利用して、毛包原基を作製する方法である [8]。このア プローチも千個の毛包原基を15分で作製でき、バイオプ リンターと同様に自動的に大量調製が可能である。この方 法では、バイオプリンターのような高価な装置を必要とせ ず、より簡便な方法である。毛包原基の作製方法によって、 毛髪再生能に違いがあることも確認しており、臨床応用の 際にどの手法を用いるかは今後検討する必要がある。

これまでヒト患者から作製した毛包原基を移植する際 には、免疫不全マウスの皮膚に移植をしていた。免疫反応 は少ないとはいえ、マウスの皮膚環境にヒト細胞を移植す るため、実際の臨床を想定した実験系とは言い難い。そこ で我々は、免疫不全マウスの皮膚にヒト頭皮片を移植した 毛髪再生評価モデルマウスの作製を行った。NOG-hairless と SCID-hairless マウスの皮膚に約1mmの穴を形成し、 そこに脱毛症患者から採取した頭皮片(植毛グラフト採取 の際に毛根部が欠落したもの)を移植した。移植後1か月 程度でいずれのマウスでも皮膚が再生し、ヒト細胞核に対 する免疫染色の結果から、移植部でのヒト皮膚の形成が確 認された。興味深いことに、SCID-hairless マウスでは、移 植70日頃から毛髪の再生も見られており、頭皮片に含ま れていた幹細胞が毛髪を再生したと考えられる。NOGhairless マウスでは、毛髪が再生しなかった結果を踏まえ ると、SCID-hairless マウスに頭皮片を移植する系が、比較 的ヒト細胞を受け入れやすい系と考えられる。現在このモ デルマウスに毛包原基を移植する実験を計画している。よ り頭皮に近い環境での移植実験で効率よく毛髪を再生で きる条件を見出していきたい。

### (3) 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[9]。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5mm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[10]。

2023 年度は、臨床応用に向けた研究開発として、脱毛 症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、愛情ホルモン「オ キシトシン」の育毛効果を見出した [11]。オキシトシンが、 毛包オルガノイドの毛幹様構造を伸長させることを見出 し、その作用メカニズムの一部も明らかにした。さらに、 オキシトシンと類似した効果を持つ薬剤の探索も行って おり、オキシトシンレセプターのアゴニストやオキシトシ ンレセプターを増加させる効果を持つケイヒ酸が育毛作 用を有することも発見している [12]。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。

## 文献

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 154291-300. (2018)

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

[3] 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) 666-671. (2020)

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

[5] 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) 679-685. (2021)

[6] 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) 1510-1519. (2023)

[7] A. Nanmo, L. Yan, T. Asaba, L. Wan, T. Kageyama, J. Fukuda, Bioprinting of hair follicle germs for hair regenerative medicine, Acta Biomater 16550-59. (2023)

[8] 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).

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

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

[11] T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, J. Fukuda, Effects of oxytocin on the hair growth ability of dermal papilla cells, Sci Rep 13(1) 15587. (2023)

[12] 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) 4709. (2024)

## 毛包オルガノイドを用いたオキシトシンの育毛効果の理解

「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト 景山 達斗

### 1. はじめに

ヘアスタイルは人の印象を大きく左右する。そのため、 薄毛治療に対する需要は老若男女すべての世代において 大きい。現在、脱毛症患者の多くは育毛剤や発毛剤を利用 しており、早期に治療を開始すれば、脱毛の進行を抑制で きるようになってきた。しかし、生殖器への副作用やほと んど有効性を示さない患者もいるなど解決すべき課題も 多く、新薬開発への期待は大きい。我々は、育毛・発毛剤 開発のためのスクリーニング系として、毛包オルガノイド を開発し[1]、このオルガノイド評価系を用いて新薬の候 補を探索する中で、オキシトシンの育毛効果を見出した。 オキシトシンは出産期や授乳期の女性から産生されるホ ルモンとして知られ、家族やペットとのスキンシップによ っても、男女問わず、産生されるため"愛情ホルモン"と も呼ばれる。近年では、オキシトシンがストレスを緩和し 精神的な安らぎを与える効果が明らかとなり、ストレス関 連疾患に対する有効性も報告されてきた。ほかにも、心筋、 消化器、生殖器など様々な臓器・組織の機能を向上させる 効果もわかっているが、毛包とオキシトシンの関係につい ては、ほとんど理解が進んでいない。本稿では、はじめに 創薬モデルとしての毛包オルガノイドの有用性を紹介し たのち、我々が見出したオキシトシンの発毛メカニズムと 育毛・発毛剤への応用研究について紹介する。

#### 2. 実験と結果

#### 2.1. 創薬のための毛包オルガノイド

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 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(図1)。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。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]。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、薬剤に応答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。



図1 既存の育毛剤の評価モデルと毛包オルガノイド

#### 2.2. 毛包オルガノイドの作製技術

発生過程において、毛包は上皮系細胞と間葉系細胞の相 互作用により、毛包原基が形成するプロセスを経て生みだ される。筆者らは、上皮系細胞と間葉系細胞の共培養時に 低濃度の細胞外マトリクスを添加することで、毛包オルガ ノイドを作製することに成功した。すなわち、ヒト毛乳頭 細胞とヒト毛包由来の上皮系細胞を1:1の比率で混合し、 ごく低濃度(2%)のマトリゲルを添加した培地で4日間 浮遊培養することで毛包オルガノイドを作製した。この毛 包オルガノイドを、オキシトシン添加培地で6日間処理 し、毛幹様構造の長さを顕微鏡画像から定量した[3]。その 結果、オキシトシンの添加により、毛包オルガノイドから 伸長する毛幹様構造の長さは、添加なしのコントロールと 比べて有意に増加した(図2)。この結果は、オキシトシン に育毛促進効果があることを示唆している。



鏡写真(上)と毛幹長の定量結果(下)

続いて、オキシトシンの作用メカニズムを理解するため に、毛包の根元に存在する毛乳頭細胞に対して、オキシト シン受容体の免疫染色を行うとともに、オキシトシン添加 に伴い発現上昇する遺伝子群について、網羅的な遺伝子発 現解析を行った。その結果、毛乳頭細胞はオキシトシン受 容体を有しており、オキシトシンに応答した毛乳頭細胞が、 隣接する毛母細胞の増殖を促進する成長因子(VEGF等) を産生することで、発毛作用を発揮する可能性が示唆され た(図3)。





オキシトシンは、血中での安定性が低く、分解されやす いペプチドである。また、分子量が大きい(Mw:1007)た め経皮吸収性が低い。育毛・発毛剤への応用を考えると、 より分解性が低く、分子量の小さい代替物が好ましい。実 際に、毛包オルガノイドを用いた薬剤スクリーニングを行 った結果、オキシトシン受容体を増加させる作用のあるケ イヒ酸(シナモンの成分)で毛幹様構造の長さが増加する ことを確認した(図4)[4]。ケイヒ酸は、分子量が小さく (Mw:148)分解性も低いため、オキシトシンシグナル経 路を活性化する育毛・発毛剤への応用が期待される。



図4 ケイヒ酸の発毛促進効果

#### 3. まとめと今後の展望

本研究では、オキシトシンやケイヒ酸が毛包に作用し、 発毛を促す可能性を明らかにした。今後、脱毛症の動物モ デルやヒト毛包のオーガンカルチャーモデルによる詳細 な解析が必要であるが、本研究によりオキシトシンシグナ ルが脱毛症治療薬の新たなターゲットとなる可能性が示 された。

## 【参考文献】

 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) eadd4603. (2022)
 T. Kageyama, H. Miyata, J. Seo, A. Nanmo, J. Fukuda, In vitro hair follicle growth model for drug testing, Sci Rep 13(1) 4847. (2023)
 T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, J. Fukuda, Effects of

oxytocin on the hair growth ability of dermal papilla cells, Sci Rep 13(1) 15587. (2023) [4] 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) 4709. (2024)

## 毛髪再生のための毛乳頭細胞培養法の開発

「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト

YAN LEI

## 1. はじめに

毛乳頭細胞は、毛包の基部に局在する高度に特殊化さ れた間葉系細胞であり、毛包の形態形成と毛周期の制御 において重要な役割を果たしている。毛髪の再生医療を 実現するには、患者1名あたりに相当数の細胞が必要と なる。例えば、現在想定されている毛髪再生医療では、 まず患者から10本程度の毛包を採取し、顕微鏡下で毛乳 頭を分離する。この限られた数の毛乳頭から十分量の毛 乳頭細胞を得るために、生体外で増殖させる必要があ る。ただし問題は、この培養中に毛乳頭細胞の特性が失 われ、発毛誘導能が著しく低下することである[1]。この ような継代培養における毛乳頭細胞の機能低下の問題を 解決するため、さまざまなアプローチが報告されてい る。現段階で最も効果的なのはスフェロイド培養法であ り、生体内毛包における毛乳頭の形状に近いことから理 想的な手法とされている。

本研究は、毛乳頭細胞の毛髪再生能の向上に、従来考 えられていなかった高密度重層化培養法が有効であるこ とを発見したことが発端である。これにより、毛髪再生 に重要な幹細胞の大量調製が可能となった。

#### 2. 実験と結果

### 2.1. 毛乳頭細胞の重層化培養

私たちはヒト毛乳頭細胞で高密度重層化培養法の効果 を確認した。高密度重層培養とスフェロイド培養を1ヶ 月間にわたって観察した結果を図 1A に示した。高密度重 層培養では、ギムザ染色による観察において、毛乳頭細 胞がコンフルエントになった後、一部の細胞が重層化し て独特の模様が観察された。また、スフェロイド培養で は、毛乳頭細胞の凝集体が培養の経過とともに若干では あるが直径が大きくなる様子が示された。リアルタイム グローを用いた細胞増殖率の結果を図 1B 示した。一般 に、培養細胞、特に上皮系の細胞では、表面を覆いつく してコンフルエントになると、接触阻害と呼ばれる現象 が生じ細胞増殖は停止する。しかし、間葉系細胞である 毛乳頭細胞は、培養5日目にコンフルエントに達した 後、細胞の増殖は継続し次第に積層化した。培養5日目 には播種細胞数の約5倍に増加し、培養30日目には約 20 倍に増加した。一方、スフェロイド培養では培養30 日目で播種細胞数の約3倍程度の増殖に留まっていた。 さらに、リアルタイム PCR で細胞活性を評価したとこ

ろ、発毛に強く関連する ALP 遺伝子の発現は、培養初期 にはスフェロイド培養の方が高かったが、重層化が生じ る培養7日目以降から高密度重層培養の方が高くなっ た。それ以外の毛髪関連遺伝子の発現についても、高密 度重層培養の方が高いことが示された。



図1 購入凍結ヒト毛乳頭細胞を用いた重層化培養の in vitro 効果

(A) 重層化培養した毛乳頭細胞の共焦点画像、(B) 細胞増殖 率の比較、(C) ALP 相対発現量の比較

## 2.2. 重層化培養した毛乳頭細胞機能上昇の原理解 明について

重層化培養における機能向上メカニズムの解明につい ても検討を進めた。低酸素環境下での毛乳頭細胞の発毛 誘導能力の向上に関する研究は、近年注目されている [2]。本研究では、毛乳頭細胞が低酸素状態にどのように 反応するかを詳細に解析するため、図2に示すような酸 素分圧センサーを使用し、培地A(生物由来原料基準に 対応)と通常培地の酸素分圧の変化を30日間追跡した。 その結果、培地Aを使用した場合、細胞の増殖速度が速 く、酸素分圧は通常培地と比較して、末期には10%低下 するのに対し、培地Aでは40%まで低下したことが観察 された。

この酸素分圧の著しい低下は、HIF1 αという低酸素応 答因子の活性化を示す指標となる。実際、HIF1 αの遺伝 子発現は、培地 A では通常培地に比べて 11 倍に増加し

## 酸素分圧モニター装置



#### 図 2 重層化培養の細胞酸素分圧を測定する酸

素分圧モニター装置

た。更に、発毛関連のマーカーであるアルカリ性ホスフ ァターゼ(ALP)の発現は、80倍以上に増加しており、 この結果は毛乳頭細胞の発毛誘導能力が顕著に向上して いることを示している。

以上の結果から、低酸素環境が毛乳頭細胞の機能を高 め、毛髪再生医療の有効性を大幅に向上させる可能性が あることが確認された。



図2 酸素分圧モニター装置を用いて、重層化培養の細胞酸素分圧を測定(A)酸素分圧の経時変化、(B)細胞増殖率の 比較、(C)HIF1a相対発現量の比較(D)ALP相対発現量 の比較

## 3. 重層化培養の毛乳頭細胞を用いた事業化スケ ジュール

上述したように、私たちはこれまで新たに開発した毛 乳頭細胞の重層化培養技術により、毛乳頭細胞の増殖と 機能向上を示し、低酸素シグナル経路が機能上昇の原理 となっている可能性を示した。この重層化培養法によっ て、毛乳頭細胞はより活性化し、発毛促進の可能性が高 まることが確認された。

2023年には、この技術の商業化を目指して、企業へ、 技術移転を開始した。この契約により、研究成果が実際 の製品開発へとつながる重要な一歩となった。今後2~3 年間で臨床試験に着手し、その成果に基づき安全性と有 効性が確認され次第、日本国内での治療サービスの提供 を開始する計画 である。目標とするのは、4年以内にこれらの新しい毛 髪再生治療法を市場に導入し、脱毛症に悩む多くの患者 に新たな選択肢を提供することである。



#### 図4 重層化培養における事業化スケジュール

## 【参考文献】

- M. Ohyama, T. Kobayashi, T. Sasaki, A. Shimizu, M. Amagai, Restoration of the intrinsic properties of human dermal papilla in vitro, J. Cell Sci. 125 (2012) 4114–4125. https://doi.org/10.1242/jcs.105700.
- [2] Zheng, M. et al. Hypoxia improves hair inductivity of dermal papilla cells via nuclear NADPH oxidase 4mediated reactive oxygen species generation'. Br. J. Dermatol. 181, 523–534 (2019)



## 【原著論文】 (投稿掲載)

#### (投简拖戰)

- Binbin Zhang Molino, Tatsuto Kageyama, Lei Yan, Yumeng Wu, Izuru Kawamura, Shoji Maruo, Junji Fukuda, Gelatin acrylamide with improved UV crosslinking and mechanical properties for 3D biofabrication. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 136, 1, 51-57, 2023
- 2.Mio Aoki, Ryoto Yokota, Shoji Maruo, Tatsuto Kageyama, and Junji Fukuda, Cryopreservation of engineered hair follicle germs for hair regenerative medicine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 136, 3, 246-252, 2023
- 3. Tatsuto Kageyama, Jieun Seo, Yan Lei, and Junji Fukuda, Effects of oxytocin on the hair growth ability of dermal papilla cells. *Scientific Reports*, 13, 15587, 2023
- 4.Yinghui Zhou, Jieun Seo, Shan Tu, Ayaka Nanmo, Tatsuto Kageyama, and Junji Fukuda, Cell-Derived Exosomes for Hair Regeneration, Journal of Bioscience and Bioengineering, 137, 1, 1-8, 2024
- 5.Ellen Sugiyama, Ayaka Nanmo, Nie Xiaolei, Nina Chang, Michinao Hashimoto, Atsushi Suzuki, Tatsuto Kageyama, and Junji Fukuda, Large-scale preparation of hair follicle germs using a microfluidic device, ACS Biomaterial Science and Engineering, 10, 2, 998-1005, 2024
- 6.Tatsuto Kageyama, Jieun Seo, Yan Lei, and Junji Fukuda, Cinnamic acid promotes elongation of hair peg-like sprouting in hair follicle organoids via oxytocin receptor activation. *Scientific Reports*, 14, 4709, 2024

### (投稿中)

7.Shan Tu, Tatsuto Kageyama, Jieun Seo, Yinghui Zhou, and Junji Fukuda, Development of in vitro hair pigmentation model using hair follicle organoids, ACS Biomaterial Science and Engineering

### 【口頭発表】

- 南茂彩華、杉山衣蓮、景山達斗、福田淳二 毛髪再生医療のためのヘアマイクロゲルの大量調製 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第47回研究会 、2023 年 5 月 14 日、東北大学 川内キャンパス
- JIEUN SEO, TATSUTO KAGEYAMA, JUNJI FUKUDA The role of HIF-1a in dermal papilla cells SMBE23, 2022 年 7 月 23-27 日、Ferrara, Italy
- 景山達斗 工学的手法を利用した毛髪再生技術の開発 第101回日本生物工学会研究会、2023年9月3-5 日、名古屋大学東山キャンパス
- 景山達斗、福田淳二
   毛包オルガノイドの脱毛症治療薬スクリーニングへ

の応用、第101回日本生物工学会研究会、2023年9 月3-5日、名古屋大学東山キャンパス

- 5. 松元琴音、景山達斗、Seo Jieun、福田淳二 毛髪再生医療のためのヒト毛乳頭細胞の低酸素刺激 培養、第101回日本生物工学会研究会、2023年9月 3-5日、名古屋大学東山キャンパス
- 景山達斗、福田淳二
   毛髪再生医療のためのオルガノイド培養技術、化学
   工学会第 54 回秋季大会、2023 年 9 月 11-13 日、福
   岡大学 七隈キャンパス
- 肥高龍彦、景山達斗、福田淳二 Transplantation of hair follicles with long hair shafts generated in in vitro organoid culture、International Conference on Biofabrication 2023、2023 年 9 月 17-20 日、Saskatoon, Canada
- 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の育毛効果 の理解、第45回日本バイオマテリアル学会、2023 年11月7日、神戸国際会議場
- Tu Shan、景山達斗、福田淳二 Exploring Genes Associated With Hair Graying Using Hair Follicle Organoid, TERMIS-AP 2023, 香港
- 10. 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の育毛効果
   の理解、第45回日本バイオマテリアル学会、2023
   年11月7日、神戸国際会議場
- 南茂彩華、景山達斗、福田淳二
   毛髪再生医療のためのバイオプリンタを用いた移植 組織の大量調製,第61回人工臓器学会大会,ホテル イースト21東京
- Tu Shan、景山達斗、福田淳二
   毛包オルガノイドを用いた白髪 in vitro モデルの作
   製,第61回人工臓器学会大会,ホテルイースト21
   東京
- SEO JIEUN、景山達斗、福田淳二
   Hypoxia inducible factor-1a によるヒト毛乳頭細胞の
   発毛関連遺伝子の発現促進、2023 日本分子生物学会
   年会、神戸国際会議場
- 14. 景山達斗、福田淳二
  Tissue engineering of hair follicle germs using hydrogel shrinkage and microfluidic devices、IEEE-NANOMED 2023、2023 年 12 月 6 日、OIST
- 南茂彩華、景山達斗、福田淳二
   毛髪再生医療のための毛包原基のバイオプリンティング、2023 年 12 月 8 日、第 9 回細胞凝集研究会、 アバンセホール、佐賀
- 肥高龍彦、景山達斗、福田淳二 オルガノイド培養で作製した長い毛幹を有する毛包

の移植、2023 年 12 月 8 日、第 9 回細胞凝集研究 会、アバンセホール、佐賀

- 17. 宮田ひかる、景山達斗、笠井敬一郎、福田淳二 ヒト皮膚微小片を用いたマウス背部における毛包を 有するヒト皮膚の構築、2023年12月8日、第9回 細胞凝集研究会、アバンセホール、佐賀
- 景山達斗、福田淳二 Hair follicle organoid formation through self-assembly of epithelial and mesenchymal cell、RIKEN BDR Organoid Workshop、2024年2月6日、理研、神戸
- 19. 景山達斗、福田淳二 再生医療や創薬のための毛包オルガノイドの構築、 JBA 奨励賞受賞者特別講演企画セミナー、2024 年 3 月 13 日、Web
- 石川向陽、景山達斗、福田淳二
   毛髪再生に必要なヒト毛包上皮系細胞群の探索、化
   学工学会第89年会、2024年3月18日、大阪公立大学
- 21. 金文、景山達斗、高野智圭、三木敏生、福田淳二 ヒト羊膜上皮細胞を用いた毛包オルガノイドの作 製、化学工学会第89年会、2024年3月18日、大阪 公立大学
- (7) 廣田京飛、闫雷、景山達斗、福田淳二
   毛包構造を伴う in vitro 皮膚モデル、化学工学会第
   89 年会、2024 年 3 月 18 日、大阪公立大学
- 23. 中村光里、闫雷、景山達斗、福田淳二 重層化培養した毛乳頭細胞のエクソソーム解析、化 学工学会第89年会、2024年3月18日、大阪公立大 学
- 24. 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の育毛効果の評価、第23回日本再生医療学会、2024年3月23
   日、朱鷺メッセ、新潟
- 25. 宮田ひかる、景山達斗、笠井敬一郎、福田淳二 ヒト皮膚微小片を用いたマウス背部における毛包を 有するヒト皮膚の構築、第23回日本再生医療学 会、2024年3月23日、朱鷺メッセ、新潟

【記者発表・取材】

- 1.発表機関(KISTEC、横浜国立大学) 題名:「オキシトシン」に毛の成長促す働き 神奈川の 研究所など発表 公表 2023 年 12 月 29 日、NHK、取材 2023 年 12 月 27 日
- 2.取材対応者(景山達斗)
   件名:カズレーザーと学ぶ
   公表(予定)未定、媒体(日本テレビ)、取材年月日
   2024年3月21日

### 【特許】

(1)国内特許出願 1件(2)国際特許出願 0件

# 研究報告2024 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

◆総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	13
◆がんモデルiPS細胞ライブラリの構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	16
◆業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	19

# 「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、当グループが開発しているゲノムを大規模に構築する技術群を活用し、創薬分野 でのブレークスルー創出を支援するハードとソフトの研究開発基盤を作り上げる。具体的には、戦略シー ズ育成事業の成果である神経変性疾患モデル iPS 細胞群を活用して同疾患の発症メカニズムの詳細解明 と、同疾患の治療法開発に資する医学応用研究を進め、さらに感染症対策のためのウイルスゲノム構築ス キームの開発を模索しつつ、多くの人々の健康寿命を脅かしているガンに対する創薬研究技術基盤の構築 に注力している。「がんは、遺伝子変異の蓄積によって発症進行する」という本疾患研究分野における常 識への理解をより体系的に深めるために、同一ヒト細胞のゲノムに2種類のがん関連変異を人為的に導入 し、1種類の変異のみと比べたときに、変異の相乗効果が起こるかどうかを調べている。対象としている 変異は約 300 種類であり、これらのうちどの変異を2つずつ同時に存在させたときに、ガン化に特徴的な 細胞表現形が発生するかを網羅的に探索する。本研究で作り上げられていく「がん関連変異を網羅的にか つ体系的に人工導入した約1万種類の細胞コレクション」や、これら細胞を解析するために本年度導入し た自動細胞評価システムは、今後のがん研究分野において貴重なリソースとなる。以上、神経変性疾患や がんに関する創薬研究基盤を毆町で拠点化することで、国内外の研究機関や企業との連携を拡げ、人材と 資金を神奈川に呼び込むことを目指す。

#### 1. 2023 年度の研究目的

プロジェクト1年目となる 2023 年度では、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) ガン抑制遺伝子の両アリル欠損 iPS 細胞株ライブ ラリーの作成

摘出された癌組織のゲノムを解析すると、1つの遺伝 子の変異ではなく、複数遺伝子での変異が認められるこ とが多く、複数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年以上前から提唱され現在定着してい る。本研究ではこのモデルをより体系的に理解し、ガン 治療への貢献を目指して、「どのような遺伝子変異がより ガン化を促進するのか?」という問いに答えるための研 究を進めている。

本項目では、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ヒト遺伝子トップ30(右表)」に含まれる21種類のガン抑制遺伝子あるいはガン抑制遺伝子候補を対象にし、これら遺伝子を両アレルから欠損したiPS細胞株(癌モデルiPS細胞株)の作成を進めている。具体的には、日本人由来iPS細胞株(585A1株)に対して、これら21種類の遺伝子領域をそれぞれ両アリルで完全に欠損する。この結果、1つのガン抑制遺伝子が2コピーとも完全に欠損しているiPS細胞株が合計で21種類得られることになる。これら21種類の細胞株は全て、同一のiPS株から作られることから、欠損部位以外のゲノム領域は完全に同じであるため、21種類の欠損株と、元のiPS細胞株を比較しながら

ガン (NIH t	で高頻度変算 he Cancer G	異を受けている遺 enome Atlasのデ·	伝子トップ:	30 再解析)
遺伝子名 (ガンにて変異が多 い順にランキング)	原ガン or ガン抑制遺伝子	関連バスウェイ	変異が見られたガン# 器タイプの数 (合計33)	<sup>載</sup> 遺伝子領域全長 (kbp)
1. TP53	ガン抑制遺伝子	Genome integrity	27	19.1
2. PIK3CA	原ガン遺伝子	PI3K signaling	19	91.7
3. KRAS	原ガン遺伝子	MAPK signaling	17	45.7
4. PTEN	ガン抑制遺伝子	PI3K signaling	16	108,3
5. ARID1A	ガン抑制遺伝子	Chromatin SWI/ SNF complex	15	86.1
6. RB1	ガン抑制遺伝子	Cell cycle	14	178.1
7. CTNND1	ガン抑制遺伝子	Wnt/B-catenin signaling	12	57.7
-		Protein homeostasis/	11	215.5
8. FBXW7	両方の可能性あり	ubiquitination	11	215.5
9. NRAS	原ガン遺伝子	MAPK signaling	10	12.5
10. CDKN2A	ガン抑制遺伝子	Cell cycle	10	20.0
11. HRAS	原ガン遺伝子	MAPK signaling	9	3.3
12. NF1	ガン抑制遺伝子	MAPK signaling	9	282.7
13. IDH1	原ガン遺伝子	Metabolism	8	18.8
14. KMT2D	ガン抑制遺伝子	Chromatin histone modifiers	8	41.8
15. NFE2L2	原ガン遺伝子	Transcription factor	8	162.4
16. BAP1	ガン抑制遺伝子	Protein homeostasis/ubiquitinat ion	7	9
17. BRAF	原ガン遺伝子	MAPK signaling	7	194.3
18. ERBB2	原ガン遺伝子	RTK signaling	7	28.6
19. KDM6A	ガン抑制遺伝子	Histone modification	7	239.6
20. AKT1	原ガン遺伝子	PI3K signaling	6	26.4
21. ARID2	ガン抑制遺伝子	Chromatin SWI/ SNF complex	6	178.3
22. EP300	ガン抑制遺伝子	Chromatin histone modifiers	6	87.5
23. FAT1	ガン抑制満位子	Other signaling	6	136
24. NOTCH1	ガン抑制濃伝子	NOTCH signaling	6	51.6
25. PIK3R1	両方の可能性あり	PI3K signaling	6	86.1
26. SETD2	ガン抑制遺伝子	Histone modification	6	147.7
27. SMAD4	ガン抑制満位子	TGFB signaling	6	55.4
28. ATM	ガン抑制遺伝子	Genome integrity	5	146
29 ATRY	ポン記書場伝子	Chromatin SWI/	5	281.3
23. ATRA	AL PROPERTY.	An authors	5	541
30. CASP8	刀之抑制遺伝子	Apoptosis	5	54.1

様々な細胞機能評価実験を実施することで、各ガン抑制 遺伝子の単独欠損の影響を極めて正確に評価できるわけ である。なお、これらガン抑制遺伝子の中には、全長が 30万塩基対もの長い遺伝子も含まれており、定法ではそ の全長両アリル欠損は技術的に困難であるが、我々が戦 略的シーズ育成事業で iPS 細胞用に改良した UKiS 法を用 いれば問題なく欠損可能である。

## (2) 原ガン遺伝子変異体(ガン遺伝子)の過剰発現プ ラズミドライブラリーの作製

本項目では「ガンで高頻度変異を受けているヒト遺伝 子トップ 30」のうち、11 種類の原ガン遺伝子あるいは原 ガン遺伝子候補の変異体タンパク質を iPS 細胞内で発現 するためのベクターを作製する。NIH 主導 TCGA プロジェ クトのデータベースを独自に解析したところ、11 種類の 原ガン遺伝子のエキソン領域において、腫瘍臓器で2回 以上検出された変異が合計で290 箇所存在することが分 かっている。そこで本項目では、これら290 の全ての変 異を対象に、それらのうち<u>いずれか一つの変異を含む原</u> ガン遺伝子を iPS 細胞内で過剰発現できるベクター合計 290 種類の作成を進めている。

#### (3) ヒト細胞培養解析自動システムの構築

本項目では、様々な癌特有の変異をもつ iPS 細胞株の 表現型解析を自動高速に実施するためのシステムの構築 を推し進めている(下図)。同システムでは、以下の3つ の装置がプレート搬送ロボットアームと連動する:

 セルイメージャー:96 ウェルプレート内の細胞を高速 かつ自動で顕微鏡撮影する装置

② プレートウォッシャー:培地交換を自動で行う装置
 ③ 自動化対応細胞培養インキュベーター

なお有望シーズ展開事業の初年である 2024 年度の目標

は、同システムの搬入設置であった。

#### (4) ハンチントン病モデル iPS 細胞の応用性検証

戦略的シーズ育成事業で作成したハンチントンモデル iPS 細胞を活用し、同疾患の発病メカニズムの解明や薬 剤開発のための研究を推進することが本項目の目的であ る。同神経変性疾患の原因遺伝子変異が特定されて久し いが、その変異が単独で細胞機能にもたらす影響を正確 に調べる研究はこれまでなされていない。そこで我々は ゲノム構築技術によって原因遺伝子変異だけを健常人由 来 iPS 細胞のゲノムに導入した細胞株を作成した。この 細胞株は世界で初めて作成されたもので貴重な研究リソ ースであり、上述の「原因遺伝子変異が単独で細胞機能 にもたらす影響を正確に調べる」ためには理想的な細胞 株となっている。本研究項目では、このヒト iPS 細胞株 を解析し、同疾患の発症メカニズムに関する新たな知見 を得ることを目指しつつ、同疾患を専門とする外部研究 機関との共同研究を推進することで同疾患に対する治療 法の開発研究を進めることを目標としている。

#### (5) 長鎖 DNA 合成による感染症対策技術の開発

本項目では、戦略的シーズ育成事業で磨いてきたコロ ナウイルスゲノムの合成技術を発展させ、次なる感染症 パンデミックに備えることを目指している。具体的には、 ウイルスゲノム配列取得からウイルスゲノム合成までを 2週間で完結できるウイルスゲノム迅速構築系の確立を 目指している。このために、昨年度までに確立している コロナウイルスゲノムの合成プロトコールを見直し、時 間短縮が可能な実験ステップ候補の洗い出しを行う。ま た、KISTEC 次世代ライフサイエンスプロジェクトと協議 し、同グループが注目しているノロウイルス粒子を高力 価で産生するヒト細胞株の開発も目指している。



図1ヒト細胞自動培養システム。左:システムの全体構成。細胞が播種された96 穴プレートをインキュベータに搭載すると、毎日1回自動 でロボットアームがプレートを1枚ずつ取り出し、プレートウォッシャーに移動させると、そこでは古い培地が吸いとられ、新しい培地が加 えられる。その後、プレートはセルイメージャーに移動され、96 全てのウェル内にある細胞の顕微鏡画像がオートフォーカス機能にて撮影さ れる。その後、プレートはインキュベーターに戻されると、別の96 穴プレートに対して同じ工程で作業が自動的に繰り返される。右:殿町 LiSE に導入されたシステム作動中の写真。

#### 2. 2023 年度の研究成果

### (1) ガン抑制遺伝子の両アリル欠損 iPS 細胞株ライブ ラリーの作成

欠損対象としている 21 種類のがん抑制遺伝子のうち、 癌組織で最も変異が起きている上位 7 遺伝子に対する欠 損 iPS 細胞株の作成が完了した。

## (2) 原ガン遺伝子変異体(ガン遺伝子)の過剰発現プ ラズミドライブラリーの作製

これら項目の研究成果の詳細は、倉澤氏からの報告に 譲り、ここではその特筆すべき内容だけを述べる。

当初計画はしていなかったガン遺伝子発現系の開発を 本年度実施した。当初は、ガン遺伝子を常時発現するプ ロモーターで転写発現する計画であったが、実際に発現 させると内在遺伝子の発現量の1,000 倍以上の発現量と なってしまうことが判明した。これでは実際の癌細胞に おける変異の効果だけを調べることができないため、薬 剤誘導型プロモーターを採用すべく最適化を進め、後述 のように薬剤の濃度依存的に、遺伝子の発現量を iPS 細 胞内で調節することができるようになった。また、細胞 に導入された多くのプラズミド分子からのガン遺伝子発 現が導入直後から起きてしまうことも問題であることが 本年度初旬の結果で明らかになった。これを改善すべ く、プラズミド上のがん遺伝子は転写されず、ゲノムに 組み込まれた段階で初めて転写が起こるような仕組みを iPS 細胞のゲノム上に導入した。以上2点のガン遺伝子 発現系の改善によって、変異の相乗効果を正確に評価す

## (3) ヒト細胞培養解析自動システムの構築

るための基盤が完成したことになる。

図1に示すシステムー式が殿町LiSE4階に予定通り設置された。現在試運転中である。2025年度末には実際に ガンモデル細胞の表現型解析に活用を開始する予定である。

#### (4) ハンチントン病モデル iPS 細胞の応用性検証

戦略的シーズ育成事業で作成したハンチントン病 (HD)モデル細胞に関する論文が本年度公表された。本 事業では同疾患モデル細胞を作成するためのゲノム改変 基本技術をヒト大腸がん由来細胞 HCT116 を用いて確立し ている。この研究が、現在のヒト iPS 細胞をベースにし た HD モデル細胞開発の基礎となっている。

ヒト iPS 細胞をベースに作成済みの HD モデル細胞に対 する解析は本年度も継続して実施した。特にトランスク リプトームデータ解析を継続し、HD の原因とされている ハンチンチン遺伝子の CAG リピート伸長の影響を直接受 けている遺伝子の同定を進めた。その結果、現時点では 10 程度の遺伝子に絞り込むことができている。その中に は、これまで HD 発症とは無関係だとされていた遺伝子も 含まれていたことから、この再解析によって HD 発症の新 たな分子機構が提案できる可能性がでてきた。現在、こ の新知見を含め、本 HD モデル iPS 細胞開発の研究成果公 表に向けた準備を進めている。

#### (5) 長鎖 DNA 合成による感染症対策技術の開発

コロナウイルスゲノムの合成プロトコールのなかで、 時間短縮が可能な実験ステップ候補の洗い出しを進め た。枯草菌を用いることでウイルスゲノム断片を効率よ く連結できる方法を戦略的シーズ育成事業期間内に見出 しているが、枯草菌体内へのウイルスゲノム断片の導入 ステップが一つに律速になっていることから、本年度は この実験スキームの改良を進めた。またノロウイルス合 成系の開発においては、合成対象とするノロウイルス種 の選別を進めている。本項目は他と比較して遅れている 一方で、上述のガンプロジェクトは共同研究の拡大も含 めて大きな進展が見込まれ始めていることから、2025 年 度には事業全体の見直しをする予定である。

### (6)長鎖 DNA 合成技術による人工酵母ゲノム染色体 合成

戦略的シーズ育成事業期間中に培ってきた長鎖 DNA 合成技術を活用して、出芽酵母の16本の染色体の中で最も 長い第4染色体(全長145万塩基対長)の合成に従事し ていたが、その成果が本年度、一流誌に論文発表され た。真核生物に対するゲノム合成では世界初の研究であ り、この論文発表に伴い国内でも複数のメディアに紹介 された。本酵母ゲノム合成プロジェクトは、日米英中豪 星の6カ国の研究チームによる国際コンソーシアムによ って推進されており、我々は日本からの唯一の参画グル ープである。本研究も通して、本 KISTEC「次世代合成生 物基盤」プロジェクトは、神奈川県と世界との間の合成 生物学における橋渡しとなるべく今後とも国際プレゼン スを高めていくことを目指す。

## 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

がんは遺伝子変異に由来する複雑な疾患である。一般 に、健常な細胞ががん化する過程では、複数の遺伝子変 異を段階的に獲得している(「2 ヒット仮説<sup>1</sup>」、「多段階 発がん説<sup>2,3</sup>」)。その組み合わせの結果として異常な増殖 性や薬剤耐性、転移能などを獲得しており、この多様な 細胞表現型ががん治療を困難にさせている<sup>4</sup>。2020年に おける推定では、全世界で年間約 1930 万人が新たにがん と診断され、約 1000 万人ががんにより命を落としている <sup>5</sup>。また 2040年には年間 2840 万人ががんを発症すると予 測されており<sup>5</sup>、がんの分子機構の解明と、より効果的な 治療法の開発が急務となっている。

近年では配列解析技術の発展に伴い、多数の患者由来 がん組織に対するゲノム解析が精力的に進められてお り、The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクト<sup>6</sup>な どを通じて、がんに関連する遺伝子変異のカタログ化が 進展している。これらの研究により、①299 種の遺伝子 ががん化において主要な役割を果たすドライバー遺伝子 であると推定され<sup>7</sup>、また②特定の遺伝子ペアで変異が頻 発している<sup>8</sup>ことから、「変異の相乗効果」ががん化にお いて重要な要素であると認識されつつある。

一方で、がん化に関与する遺伝子や注目するべき組み 合わせが徐々に明らかになるものの、それらの変異が細 胞表現型に与える具体的な影響や、複数の変異を獲得し た場合の相乗効果に関する体系的理解はまだ十分とは言 えない。このギャップは、既存のがんゲノムデータベー スに対する解析だけでは限界があるためである。これに は以下のような問題に起因している:

#### ① ドライバー遺伝子の多様性

ドライバー遺伝子のアミノ酸変異の種類によっ て、がん化への寄与メカニズムが異なるため、各変 異に実験的な検証が必要である。多くのドライバー 遺伝子には複数の変異箇所が報告されており、それ らを網羅するには膨大な数の変異体を作成し、詳細 な表現型解析を行う必要がある。

#### 患者由来組織の複雑性

患者由来組織は、がんの進化過程で選択された変 異の集積体であり、ドライバー変異に加えて多数の パッセンジャー変異を含んでいる。これらの多様な 変異から主要なドライバー変異やがん化初期の変異 を特定し、その因果関係を明らかにすることは極め て困難である。そのため、実験を通じて各変異の機 能を解明することが不可欠である。

#### ③ 遺伝的背景の違い

患者ごとに異なる遺伝的背景や環境要因が存在す るため、個々の変異や複数の変異が細胞表現型に与 える純粋な影響を正確に評価することは困難であ る。したがって、同一の細胞株を基にしたがんモデ ル細胞ライブラリを作製し、これを用いて変異の影 響を精密に検証することが重要である。

以上のように、がんゲノムデータベースの情報解析だ けで解明できない課題を克服するためには、実験的なア プローチが不可欠であるといえる。我々は、これらの課 題を解決するために、健常者由来の人工多能性幹細胞

(iPS 細胞)。にゲノム改変を施し、体系的に任意の遺伝 子変異の影響を評価する実験系をデザインした。がん組 織で頻発する変異を持つ遺伝子を1つずつ、2つずつと 段階的に導入し、その結果生じる細胞表現型を観察する ことで、変異の相乗効果と細胞表現型との因果関係を解 明することを目指している。このようにして得られたが んモデル細胞は、同一の遺伝的背景を有するため、バッ クグラウンドノイズを排除した正確なデータを取得で き、変異が細胞表現型にもたらす純粋な効果をより精緻 に見積もることが可能になると期待される。以下に詳細 な実験デザインと、実装状況を報告していく。

#### 2. 実験と結果

#### 2-1. がん遺伝子ライブラリの構築

正常な細胞の成長と分裂は、増殖に関与する遺伝子 (原がん遺伝子)が厳密に制御されることで維持されて いる。しかし、原がん遺伝子に変異が生じると、それが がん遺伝子に変化し、恒常的な増殖シグナルを引き起こ すことでがん化が進行する。本プロジェクトでは、複数 のがん遺伝子を iPS 細胞に導入して人工的に発現させ、 がん化した状態をモデル化することを目指している。

我々は、先行研究で報告された 299 種類のがんドライ バー遺伝子の中から、特にがん組織で変異が頻発してい る11 種類の原がん遺伝子を選定した。TCGA がんゲノム データベースを参照し、変異箇所と頻度を解析して、計 290 種類の変異体ライブラリを構築することを目標とし た。表1には、現在の進捗状況として、健常者由来の iPS 細胞から11 種類の原がん遺伝子の cDNA をクローニ ングし、部位特異的変異導入法を用いて作製したがん遺 伝子の数を示している。目標の 290 種類のうち 114 個の 変異体が完成している。

遺伝子	作製した数/目標数
PIK3CA	31完了/83
KRAS	23完了/36
FBXW7	10完了/36
NRAS	13完了/21
HRAS	3完了/14
IDH1	4完了/6
NFE2L2	7完了/22
BRAF	10完了/24
ERBB2	5完了/14
AKT1	1完了/4
PIK3R1	7完了/30
-	計114/290

#### 表1. 原がん遺伝子変異体の作製状況

#### 2-2. Landing pad 細胞株のデザインと作製

2-1 項では、外来遺伝子として導入するがん遺伝子ラ イブラリの構築の進捗状況を報告した。これらのがん遺 伝子を iPS 細胞に導入し、安定的に発現させる工夫が必 要である。本項ではその目標を達成するための実験デザ インと実装状況を報告する。

外来遺伝子の安定した発現を実現するため、図1に示 す「Landing pad」を用いたスキームを考案した(Landing pad とは、外来遺伝子が導入される場所を指す)。まず、 任意の遺伝子座に2種類のLanding pad をノックインす る。これらの Landing pad は、強力なプロモーター配列と 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:1つは PhiC31 インテグラーゼ(橙色・黄 色)、もう1つはBxb1インテグラーゼ(緑色・黄緑色) により特異的に外来の環状 DNA を挿入することができ る。次に、図1に示すように、がん遺伝子1とPhiC31イ ンテグラーゼ認識配列を持つプラスミド、およびがん遺 伝子2とBxb1インテグラーゼ認識配列を持つプラスミ ドを用意し、それぞれのインテグラーゼを発現させるプ ラスミドと共導入することで、2 種類の Landing pad にが ん遺伝子を挿入し、がん遺伝子を安定的に発現させるこ とが可能となる。理論上、100種類のがん遺伝子を用意 すれば、最大で(100×99)÷2=4950 種類の組み合わせのが んモデル細胞を作製できると考えられる。

このスキームに従い、CRISPR/Cas9 技術を用いて日本 人健常者由来 iPS 細胞(585A1 株<sup>10</sup>)に2種類の Landing pad をノックインした。得られた細胞群からクローン化 を経て、期待される遺伝子型を有する細胞クローンを選 抜した。続いて、この細胞クローンを用いて、外来遺伝 子導入のテストを行った。具体的には青色蛍光タンパク 質(BFP)をコードするプラスミドを挿入し、発現を確 認した(図 2)。BFP コード配列を挿入する前の細胞

(BFP 非発現細胞)では青色の蛍光が観察できないのに 対し、インテグラーゼを用いて BFP コード配列を挿入し た細胞(BFP 発現細胞)では青色蛍光が観察された。こ のことから、図1に示したスキームの通り、任意の遺伝 子を発現させるプラットフォーム細胞を作製できたこと が分かった。



図 1. Landing pad 導入株のデザイン



図 2. Landing pad に BFP コード配列を挿入した細胞の写真

#### 2-3. 薬剤誘導型外来遺伝子発現系の設計

2-2 項では、Landing pad を導入した iPS 細胞株を作製 し、任意の外来遺伝子を挿入して発現させることが可能 であることを示した。本項では、Landing pad に挿入する プラスミドを改良し、薬剤添加によってがん遺伝子の発 現レベルを調節できるシステムを構築したことを報告す る。

この改良版では、実験者が任意のタイミングで、薬剤 濃度に応じてがん遺伝子を発現させることが可能とな り、がん遺伝子が細胞に与える影響をより精密に評価で きるようになると期待される。薬剤誘導系としては、広 く使用されている Tet-ON システム<sup>11</sup>(図3)を採用し た。Tet-ON システムは、人工的な転写因子を利用し、ド キシサイクリン (Dox) に応答して人工プロモーターか らの転写を活性化するシステムである。このシステムで は、Dox が存在しない場合、人工転写因子 (Dox 応答転 写因子)はプロモーターに結合しないが、Dox と結合す ることで構造が変化し、プロモーターに結合して転写を 促進する。

市販の Tet-ON プラスミドを購入し、本プロジェクト用 に改変した。発現誘導の検証として、2-2 項で用いたよう な BFP 発現プラスミドを構築した。このとき、Dox 応答 転写因子の結合配列(TetO)を4つ、5つ、6つとタンデ ムに並べた人工プロモーターを作成した。



図 3. Tet-ON システムの概要

このプラスミドを Landing pad にインテグラーゼを用 いて挿入し、Dox を 100 ng/mL または 1000 ng/mL の濃度 で培地に添加し、BFP 発現を誘導した。48 時間後に細胞 から RNA を抽出し、RT-qPCR で BFP の mRNA 発現量を 比較した (図 4)。TetO 配列が 6 つのプロモーター

(6xTetO-BFP)では、Dox 濃度 100 ng/mL および 1000 ng/mL の条件下で、それぞれ 4225 倍、10297 倍の発現誘 導が起きていた。TetO 配列が少ないプロモーター

(5xTetO-BFP および 4xTetO-BFP) では発現誘導の度合 いを減少させることができ、1795 倍~5311 倍程度であっ た。このことから、TetO 配列の数や Dox 濃度を調整する ことで、がん遺伝子の発現量を精密に制御できる実験系 が完成した。



**図 4. Dox 誘導実験の結果。**Dox 非存在下(0 ng/mL)における 6xTetO-BFP からの発現量を1としている。

## 3. 今後の展望

本研究期間において、がん iPS 細胞ライブラリの構築 に向け、原がん遺伝子変異体の作製(2-1項)と、これら を導入するための細胞株(2-2項)および薬剤誘導システ ム(2-3項)の開発に成功した。各項で示した通り、それ ぞれの開発は順調に進行し、基盤となる実験系の確立に 至った。今後は、作成したがん遺伝子を順次 Landing pad 株に導入し、異なるがん遺伝子の組み合わせが細胞表現 型に与える影響を調査する予定である。この研究により 得られる知見は、がん患者が持つ特定の遺伝子変異プロ ファイルに基づいて最適な治療法を選択するテーラーメ イド医療の発展に寄与すると期待される。また、本シス テムは創薬のツールとしても大きな可能性を秘めている と考えられる。がん遺伝子の組み合わせによって引き起 こされる異常な細胞挙動を再現することで、新たな標的 を探索したり、既存薬の有効性を評価することに繋がる と期待される。

## 【参考文献】

- Knudson, A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68, 820– 823 (1971).
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61, 759–767 (1990).
- Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. Nat. Med. 10, 789–799 (2004).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646–674 (2011).
- Sung, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J. Clin. 71, 209–249 (2021).
- Cancer Genome Atlas Research Network et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. Nat. Genet. 45, 1113–1120 (2013).
- Bailey, M. H. et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. Cell 173, 371– 385.e18 (2018).
- 8. Sinkala, M. Mutational landscape of cancer-driver genes across human cancers. Sci. Rep. 13, 12742 (2023).
- Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861–872 (2007).
- Okita, K. et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. Stem Cells 31, 458–466 (2013).
- Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 5547–5551 (1992).

# 業績

## 【原著論文】 (投稿掲載)

- Tomoyuki Ohno, Takeshi Nakane, Taichi Akase, <u>Hikaru</u> <u>Kurasawa, Yasunori Aizawa\*</u>, Development of an isogenic human cell trio that models polyglutamine disease. Genes & Genetic Systems, 98(4), 179-189, 2023
- Weimin Zhang, Luciana Lazar-Stefanita, Hitoyoshi Yamashita, Michael J. Shen, Leslie A. Mitchell, <u>Hikaru</u> <u>Kurasawa</u>, Evgenii Lobzaev, Viola Fanfani, Max A.B. Haase, Xiaoji Sun, Qingwen Jiang, Gregory W. Goldberg, David M. Ichikawa, Stephanie L. Lauer, Laura H. McCulloch, Nicole Easo, S. Jiaming Lin, Brendan R. Camellato, Yinan Zhu, Jitong Cai, Zhuwei Xu, Yu Zhao, Maya Sacasa, Lisa Scheifele, Karen Zeller, Marcus B. Noyes, Joel S. Bader, Samuel Deutsch, Giovanni Stracquadanio, <u>Yasunori Aizawa\*</u>, Junbiao Dai\*, Jef D. Boeke\* (\*共同責任著者) Manipulating the 3D organization of the largest synthetic yeast chromosome Molecular Cell, 83(23), 4424-4437, 2023

## 【総説】

 <u>相澤康則</u>,「高等生物のゲノム再構築を可能にする UKiS 法の開発」*Bioscience & Industry*, Vo. 81, No. 5, 418-9 (2023)

## 【書籍】

- 1. <u>相澤康則</u>、ThermoFisher 社の季刊誌(NEXT)66 号、 「DNA 70th Anniversary 特別インタビュー」、2023 年 6月
- 2. 遠藤智之、<u>相澤康則</u>、車兪澈「サイボーグ酵母で探る 「生命とは何か」」、日経サイエンス 2024 年 3 月号

## 【口頭発表】

- 発表者:<u>相澤康則</u> 題名:Sub-megabase and biallelic genome writing technology in human iPS cells.
   学会名:日本ゲノム編集学会第8回大会 発表年月:2023年6月7日 開催地:タワーホテル船堀
- 発表者:<u>相澤康則</u> 題名:Industrial potential of large-scale and precise genome engineering. 学会名:Link-J 主催シンポジウム 発表年月:2023年6月29日 開催地:日本橋ライフサイエンスビルディング
   発表者:倉澤光、<u>相澤康則</u>
- 題名:ゲノム改変技術によるハンチントン病モデル iPS 細胞の作製

学会名:第75回日本生物工学会 発表年月:2023年9月3日 開催地:名古屋大学

- 発表者:金子真也、<u>相澤康則</u> 題名:枯草菌を用いた長鎖 DNA 構築法 学会名:第75回日本生物工学会 発表年月:2023年9月4日 開催地:名古屋大学
- 発表者:金子真也、<u>相澤康則</u> 題名:長鎖 DNA 構築法
   学会名:第95回日本遺伝学会
   発表年月:2023年9月7日
   開催地:くまもと県民交流館パレア
- 6. 発表者:倉澤光、<u>相澤康則</u> 題名:マーカーレスかつアリル特異的なゲノム改変技 術の開発と、疾患モデル iPS 細胞の創出 学会名:第95回日本遺伝学会 発表年月:2023年9月7日 開催地:くまもと県民交流館パレア
- 7. 発表者: 倉澤光、大野知幸、相澤康則 題名: Human genome writing for understanding functionality of noncoding regions and disease-causing mutations 学会名:第50回国際核酸化学シンポジウム 発表年月: 2023年11月1日 開催地: 宮崎市民プラザ 8. 発表者:相澤康則 題名:ゲノム構築技術がもたらす近未来 学会名: KISTEC Innovation Hub 2023 発表年月: 2023 年 11 月 16 日 開催地:かながわサイエンスパーク 9.発表者:相澤康則 題名: Development of HLA-, KIR- or LILR-null iPSC lines 学会名: Keystone Symposia, Emerging Cellular Therapies 発表年月: 2024年1月 22-25日 開催地: Santa Fe Community Convention Center, USA 10.発表者:相澤康則 題名:"独創的技術=ゲノム構築"で新たに切り拓きつつ ある評価機能 学会名: RINK FESTIVAL 2024 with LINK-J 発表年月: 2024年2月16日
  - 開催地: Tokyo Midtown Yaesu
- 11.発表者:<u>相澤康則</u> 題名:ゲノム構造機能相関
   学会名:公開シンポジウム:Chemistry by Biology, Biology
  - y Line 2000 (1997) by Chemistry, 2024 ~ 生物有機化学の未来をすずかけ台 で考える 発表年月: 2024 年 2 月 20 日 開催地:東工大すずかけ台キャンパス

# 研究報告2024 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

◆総括・・		•••	•	•••	•	•	•••	•	•	•	•	•	•	21
◆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系	ž•	•	•••	•	•	•••	•	•	•	•	•	•	24
◆光スイッ	チ遺伝子医薬の開発・・・・・・・・・・・・・・・・	•••	•	•••	•	•	•••	•	•	•	•	•	•	28
◆業績・・			•		•	•		•	•	•	•	•	•	31

# 「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、ウィルス等は、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ィ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. 2023 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ィ 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2年目となる2023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. 2023 年度の研究成果

以下に、2023 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。NIR-CPTS に加えて、より複 雑な遺伝子の働きを光操作するための新たな技術開発も 実施している。

(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良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。特に、 遺伝子治療への応用の観点から、MagRedを導入した光 操作技術をアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに搭載 して、マウスでの検討を実施している。

(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できるこ 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。当該光スイッチタンパク質を応用 した最近の成果として、例えば、モノネガウイルスの光 操作に基づく新たなコンセプトのウイルスベクターが実 現している(参考文献 10)。本研究のスイッチタンパク 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、すでに研究をスタートさせている。

#### 3. まとめと今後の展望

上述のように、2023 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。2024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 組み合わせて、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, F. Kawano, T. Nakajima and M. Sato, "Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing" Nat. Biotechnol., 33, 755-760 (2015).

3. 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).

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).

 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).

6. 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).

7. Y. Nihongaki, Y. Furuhata, 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).

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).

9. 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).

10. 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).

## 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 降浩

#### 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



図 1. 生体組織の光透過性。生体組織による赤色光や近赤外 光の吸収は、青色光の場合の 20 分の 1 程度なので、赤色光 や近赤外光の方が青色光よりも生体組織透過性が高い.

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(図1)。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、へ 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(図1)。 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)。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



図 2. 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。



図 3. 天然の近赤外光スイッチタンパク質のリーク活性。天 然の近赤外光スイッチタンパク質は、暗所下でも結合してし まう。この「暗所下リーク活性(※)」が大変高いせいで、光 照射による活性化はたかだか1.8倍の増加にしかならない。

した(参考文献4)。

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(図1)。

#### 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



図 5. 近赤外光受容体(a)および結合パートナー(b)のアミノ 酸残基のアノテーション付け。アラニン置換により、各アミ ノ酸残基の役割を調べた。シアン色は暗所下の結合に影響を 与えると判明したアミノ酸残基であり、オレンジ色は近赤外 光照射下の結合に影響を与えると判明したアミノ酸残基で ある。



図 4. 天然の近赤外光スイッチタンパク質の暗所リーク活性 を低減させるために、我々がとったアプローチ。まず、光受 容体と結合パートナーのそれぞれに、変異導入やドメイン改 変を施す。その後、それぞれの項目で最適化した変異体を、 さまざまに組み合わせる。

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2)。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 (Cas9D10A/H840A; dCas9)とガイド RNAの複合体を、ゲ ノム遺伝子の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にのみ、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 ことができる(図2)。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 起した (図3)。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 1.8 倍しか遺伝子活性化を誘 起できない (図3)。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



図 6. 天然の結合パートナー は、5つのドメインから構成 される(図中1から5)。これ らドメインの順番を入れ替え たり、いくつかのドメインを 欠失させたりすることで、天 然には存在し得ないドメイン 変異体を作製できる。



## 図 7. 各アプローチを組み合わせて、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低減させることに成功した。

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 (図4)。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(図4)。この結果、暗所下の結合に影響を与えるアミ ノ酸残基(図5aのシアン色)と近赤外光照射下の結合に 影響を与えるアミノ酸残基(図5aのオレンジ色)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(図5b)。 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



図 9. LED アレイを用いてマウスの生体外から光照射。



図 8. 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。

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(図6)。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(図4)。我々は、さまざまな変異体の組 み合わせを作製し、その結果、暗所リーク活性を野生型の 10分の1に低減させることに成功した(図7)。また、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-Cas9based 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(図1)。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8)。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。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た (図9)。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(図10a)。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(図1 Ob)。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。

#### 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. Hausser, M. et al., Nature, 446, 617-619 (2007)
- **2.** Zhang, F. *et al.*, *Nature Protocols*, **5**, 439-456 (2010)
- 3. Kawano, F. et al., Nature Communications, 6, 6256 (2015)
- **4.** Kuwasaki, Y. *et al.*, *Nature Biotechnology*, **40**, 1672-1679 (2022)



図 10. (a) NIR-CPTS を導入したマウス肝臓における生物 発光レポーター遺伝子の光活性化。(b) NIR-CPTS を導入 したマウス肝臓におけるゲノム遺伝子(マウス *ASCL1* 遺 伝子)の光活性化。

# 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 小田部尭広

#### 1. はじめに

近年、ゲノム編集などの遺伝子治療技術の臨床応用が 盛んに行われている。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でも編集が行わ れてしまうことがあり、安全性の問題が課題となっている。 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導入したゲノム編集の光操作 技術を使用し、安全性と有効性を向上させた新しいコンセ プトの光スイッチ遺伝子医薬の創出を目指している。

我々の研究グループは、糸状菌の一種である赤パンカビ (Neurospora crassa)が持つ光受容体タンパク質に注目し、 これに様々なアミノ酸変異を導入して性質を改良したり、 新機能を追加したりすることで、光スイッチタンパク質で ある Magnet システムを開発した(参考文献1)。Magnet シ ステムは、青色の光を照射するとお互いに結合し、光照射 を止めると解離するタンパク質のペアである。Magnet シ ステムに任意のタンパク質 A とタンパク質 B の二分子を 連結することで、青色光の照射により A と B のタンパク 質間の結合と解離を制御できるようになる(図1)。この Magnet システムの特徴を利用することで、興味のある酵 素などあらゆるタンパク質の働きを光を介して自由自在



に制御できるようになった。

図 1: 我々の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システム」。このシステムは、青色光に応答して二量体を形成し、暗所に戻すと単量体に戻る特性を持っている。任意のタンパク質 A・B をこのシステムに連結することで、 青色光の照射オンとオフによって結合と解離を制御することができる。

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

一つ目の例として、CRISPR-Cas9 システムの光操作技術の 開発に取り組んでいる。これにより、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制御能を用いて、生体組織中の特定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できるようになった(参考文献 2)。さらに、遺伝子の発現のオン・オフを自由自在に繰り返し操作することも可能になった(参考文献 3)。 二つ目の例として、バクテリオファージ由来の DNA 組換

こう古の内として、ハウアリスワリーシェスの Bin A 融換 え酵素(Cre)の DNA 組換え反応を青色光の照射で誘導す る光活性化型 Cre(PA-Cre)の開発がある(参考文献 4,5, 6,7)。PA-Creの開発により、特定の生体組織や細胞を標的 にして、遺伝子の働きを制御することができるようになっ た。これにより、疾患に関わるさまざまな遺伝子の機能解 明に役立つことが期待されるとともに、現在、治療に必要 な遺伝子の発現を調整する遺伝子医薬としての応用も検 討している。

さらに、我々の Magnet システムは、ゲノム編集ツール以外のタンパク質へも展開している(参考文献 8)。

上述したように、Magnet システムは2分子間のタンパク 質の結合・乖離を青色光で制御する優れた光スイッチタン パク質である。しかし、Magnet システムは改善点が存在 する。それは、2分子間の反応を利用するため、細胞内へ 導入したツールの性能が細胞内での濃度に大きく影響を 受けやすい点である。具体的には、2分子が細胞内で出会 う確率が低いと反応効率も低下し、遺伝子治療薬として応 用する際に高い治療効果を得ることが難しくなることが 予想される。そこで、我々はこの課題を克服するために Magnet システムを改良し、新たな基盤技術の開発を行な った。



図 2:構造情報をもとにした Magnet システムの改良

#### 2. 実験方法

## (1) Magnet システムの改良

既存の Magnet システムでは、2 分子間の反応を利用する ため、細胞内での濃度に影響を受けやすいという課題があ る。そこで我々は、構造情報をもとにした「Concatenation」 アプローチを導入し、新たな Magnet システムを開発した (図 2)。この新システムにより、青色光照射時の反応効 率の改善が期待される。新たに開発した Magnet システム を既存の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) に導入 し、DNA 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)がレポーター遺伝子の上流に配置 され、通常はレポーター遺伝子の発現が起こらないような 評価系で実施した。この評価系において、青色光を照射し た際に改良型の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) が存在すると、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になる。青色光を照射しない場合(暗 所下にあるとき)には、レポーター遺伝子の発現は起こら ない。暗所下におけるレポーター遺伝子の発現を「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であるホタルルシフェラーゼ(Fluc)を 用いた。以下の手順で実験を進めた。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 ョン法を用いて各プラスミド DNA を細胞へ導入した。プ ラスミド DNA の導入後、24 時間の間プレートを暗所に置 いた。プラスミド DNA の細胞導入から 24 時間後、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組分 け、37℃の CO2 インキュベーター内で培養した。青色光 の照射は、LEDアレイを用いて行なった(図3)。



図 3:細胞への光照射に用いた青色 LED アレイ(波長:470 ± 20 nm, 光強度:1.0 W m<sup>-2</sup>)。

24 時間後、暗所に置いたプレートおよび青色光を照射し たプレート内の培地を Fluc の基質であるルシフェリンを 加えた培地に置換して、Fluc の生物発光を検出した。

#### 実験結果と考察

Magnet システムに「Concatenation」アプローチを導入したことで、暗所下でのリーク活性はほぼ変わらずに、青色光を照射した時の活性は既存の PA-Cre よりも大幅に向上した(図4)。これは、「Concatenation」により、細胞内での濃度の影響を克服できたからである。



図 4:改良した Magnet システムを導入した PA-Cre は、暗 所での活性(リーク活性)が PA-Cre とほとんど変わらず低 いままである。一方で、青色光を照射した時の活性はオリジ ナルの PA-Cre よりも大幅に向上した。

## 4. 今後の展開

本研究では、既存の Magnet システムに「Concatenation」 アプローチを導入することで、既存の Magnet システムを 超える新たな基盤技術の創出に成功した。この新たに開発 した Magnet システムを PA-Cre にも導入し、その有効性を 検証することができた。今後は、遺伝子治療のベクターと して多く利用されているアデノ随伴ウイルス (AAV) をベ クターとして、改良型 PA-Cre を搭載し、マウスを用いた 動物実験へと展開し、光スイッチ医療の創出へ向けた実証 を行っていく。それと同時に遺伝子医薬としての実用化を 見据え、近年報告されている AAV ベクターに搭載可能な CRISPR-Cas システムに本研究で新たに開発した Magnet システムを展開し、光スイッチ遺伝子医薬の開発を進めて いく。我々の開発した光スイッチ技術は、医療への応用だ けでなく、微生物による有用物質の生産にも展開している。 【参考文献】

- 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).
- Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima, and M. Sato, "Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing" *Nat. Biotechnol.*, 33, 755-760 (2015).
- Y. Nihongaki, Y. Furuhata, 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).

- 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).
- 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).
- K.Morikawa,K.Furuhashi,C.deSena-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).
- K.Yoshimi,Y.Yamauchi,T.Tanaka,T.Shimada,M.Satoan d T. Mashimo, "Photoactivatable Cre knock-in mice for spatiotemporal control of genetic engineering in vivo" *Lab. Invest.*, 101, 125-135 (2021).
- 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

mammals」

## 【原著論文】

- T. Okura, M. Tahara, N. Otsuki, M. Sato, K. Takeuchi and M. Takeda, "Generation of photocontrollable recombinant bovine parainfluenza virus type 3" *Microbiology and Immunology*, 67, 166-170 (2023).
- Y. Koganezawa, Y. Wakamoto, M. Sato and M. Umetani, "Detecting photoactivatable Cre-mediated gene deletion efficiency in *Escherichia coli*" *Bio-protocol*, 13, e4685 (2023).

## 【総説】

 1.佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」分析化学、 Vol.73 No.3 p87-93(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」 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム、2023 年5月10日、横浜 2.佐藤守俊 「ゲノムの光操作技術の創出」 第96回内分泌学会学術総会、2023年6月3日、名古 屋 3.佐藤守俊 Manipulating biological processes by light SPEED x Bottom-up biotech x ELSI joint workshop, 2023 年7月3日、東京 4.河田紗弥、小田部尭広、佐藤守俊 「光操作可能な医薬品としてのオプトバクテリアの開 発」 第11回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023年8月4 日、八王子 5.小田部尭広、中嶋隆浩、佐藤守俊 「遺伝子治療のための分割型 CRISPR-Cas12a の開発」 第11回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子 6.Jixuan He、河野風雲、佐藤守俊 [Enhancing the Performance of Photoswitch the "Magnet" for Optogenetic Control of Cellular Proteins 第11回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023年8月4 日、八王子 7.Dewen Cai、河野風雲、佐藤守俊

「Split-protein-based efficient and enhanced degradation (SPEED) approach for leakless chemogenetic gene editing in

第11回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023年8月4 日、八王子 8.大木悠翔、小田部尭広、佐藤守俊 「光刺激で標的 DNA 配列を自在に書き換えるゲノム編 集技術の開発」 第11回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023年8月4 日、八王子 9.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」 第11回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子 10.鈴木彩音、中嶋隆浩、佐藤守俊 「赤色光で制御可能な photoactivatable Cas9 (paCas9)の創 出日 第11回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子 11.佐藤守俊 「生命現象の光操作技術の創出」 第31回東北生活習慣病研究会、2023年8月8日、仙 台 12.佐藤守俊 「生命現象の光操作技術の創出」 コラボ Web セミナー第 11 弾 LSI メディエンス×セツ ロテック セミナー、2023年9月7日、オンライン 13.佐藤守俊 「ゲノムの光操作」 15<sup>th</sup> International conference on tetrapyrrole photoreceptors in photosynthetic organisms、2023年9月21日、静岡 14.中嶋隆浩、桑﨑勇人、山本翔太、小田部尭広、佐藤守 俊 「生体深部で生命現象を光操作するための赤色光スイッ チタンパク質| キングスカイフロントサイエンスフォーラム 2023、 2023年11月2日、川崎 15.小田部尭広、中嶋隆浩、佐藤守俊 「新たな遺伝子治療のための光操作技術の開発」 キングスカイフロントサイエンスフォーラム 2023、 2023年11月2日、川崎 16.佐藤守俊 「生命現象を光で操作する」 KISTEC Innovation Hub、2023年11月16日、川崎 17. 佐藤守俊 「Manipulating biological systems by light」 The 46th annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan、2023 年 12 月 1 日、オンライン 18. 佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」 光塾、2024年1月18日、東京 19.Nakajima Takahiro, Kuwasaki Yuto, Yamamoto Shota, Otabe Takahiro , Sato Moritoshi <sup>「</sup>A red light–responsive photoswitch for deep tissue optogenetics 第52回日本免疫学会学術集会、2024年1月18日、幕 張 20.佐藤守俊 「生命現象の光操作技術の創出」 第12回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2024 年2月29日、東京 21.佐藤守俊 「生命現象の光操作技術の創出」 第23回日本再生医療学会総会、2024年3月21日、新 潟

## 【特許】

(1)国内特許出願 1件(2)国際特許出願 1件

# 研究報告2024 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」プロジェクト

•	◆総括・・・・・・	••	•	•	•	•	• •	•••	•	•	•	•	•••	•	•	•	•	•	•	•	•	• •	•	•	•	•	•	•	•	•	34
•	◆分子集合体医薬の創業	ŧ۰	•	•	•	•	•	•••	•	•	•	•	•••	•	•	•	•	•	•	•	•	• •	•	•	•	•	•	•	•	•	37
•	◆分子集合体材料の創業	ŧ۰	•	•	•	•	• •	•••	•	•	•	•	•••	•	•	• •	•	•	•	•	•	•••	•	•	•	•	•	•	•	•	40
•	◆業績・・・・・・・		•	•	•	•	• •		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	43

## 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)3-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」への展開も目指す。

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. 2023 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 などのホモニ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 1eh)。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。



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℃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 自体がいまだ臨床応 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 Z を用い て、臨床応用を目指した研究開発として展開した。

加えて、Z-JigSAPの有効性の信頼性を高めるため、大 脳基底核まで広範な傷害を起こす中大脳動脈梗塞 (MCAO)モデルを確立した。また、歩行機能解析にお いける評価者のバイアスと労力削減を目的とした自動化 解析の確立にも着手した。

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、事業開発の準備も進める。「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」



#### (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 て結合させるアセンブロイド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。

そこで今年度は、中枢神経系のオルガノイド培養に適した JigSAP を開発することを目的とした。はじめに網膜の3 次元組織培養系をモデルに、ハイドロゲルの粘弾性が組織発生に与える影響を検討した。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。
研究開発と並行して、事業開発の準備も進める。「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ー 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、 それら企業ヘ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. 2023 年度の研究成果

#### (1) 分子集合体医薬の創生

詳細は常勤研究員・原の研究成果にて記載するが、齧歯類 脳梗塞モデルにおいて Z-JigSAP の治療効果を見出し、特 許出願に至った(特願 2023-192464)。また、大脳基底核ま で損傷領域が広く生じる中大脳動脈梗塞(MCAO)モデル マウス作製に成功し、歩行機能解析の精度向上と簡便化を 図ることを目的とした 2 次元画像からの 3 次元姿勢推定 に至るアルゴリズム確立に成功した。

以下はデータ未発表のため詳細は割愛するが、損傷脳再 生メカニズムの解明においては、従来、神経機能回復には 炎症シグナル抑制が重要だと考えられていたものの、急性 期の炎症シグナルがその後の運動機能回復に重要だと示 唆する研究成果を得た。さらに、静脈内および髄腔内投与 を可能にする改変型 JigSAP の開発においては、体内投与 に適した 2 種類のアニオン性の改変型 JigSAP、α-helix 構 造を示す JigSAP-α と β-sheet 構造を示す JigSAP-β の開発 に成功した。

今後は、Z-JigSAPの治療効果をMCAOモデルでも確認 し、有効性のデータを確固たるものにする。また、Z-JigSAP の投与最適濃度の決定、作用機序の解明を行う。作用機序 解明では、Z-JigSAP 投与群とコントロール JigSAP 投与群 での空間トランスクリプトーム解析や、JigSAP 単独投与 による安全性/毒性試験も進め、臨床応用展開に向けた研 究開発を進める。

#### (2) 分子集合体材料の創生

詳細は常勤準研究員・秋本の研究成果にて記載するが、低 融点アガロースを用いた胎仔網膜組織培養系において、ハ イドロゲルの粘弾性が組織発生に与える影響を検討し、生 体脳より弾性率が著しく低いアガロースゲルで培養した 網膜組織では立体構造を保つことができず、網膜傷害時に 発現増加するミュラーグリアマーカーの遺伝子発現量が 上昇することを見出した。一方で、同程度の弾性率を示す アガロースゲルでの培養では立体構造が維持され、ミュラ ーグリアマーカーの遺伝子発現量上昇は認められず、生体 脳と同程度の弾性率を示すゲル培養の重要性を見出した。

さらに、生体脳と同程度の弾性率を示す Culture (C)-JigSAP の開発に成功し、C-JigSAP の分解剤 Degradation (D)-JigSAP の開発に成功した(特願 2023-192489)。

今後は、今年度得られた材料設計指針を活かし、C-JigSAP を用いた多能性幹細胞由来の脳オルガノイド培養 系の確立を目指す。また、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。

# 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 を埋植することで、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。そこで今年度は臨床応用に適し た化学合成可能な生理活性ペプチドZを用いて、臨床応 用を目指した研究開発として展開した。

加えて、Z-JigSAPの有効性の信頼性を高めるため、 dMCAOモデルとは異なる脳梗塞モデルにおける治療効 果を検討するため、大脳基底核まで広範な傷害を起こす 中大脳動脈梗塞(MCAO)モデルを確立した。また、評 価者のバイアスと労力削減を目的とした歩行機能解析の 自動化にも着手した。

#### 2. 実験と結果

#### (1) Z-JigSAP の開発

血管新生能を持つ生理活性ペプチドZ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、Z-JigSAPはJigSAPを結合していない生理活性ペプチドZ 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Z-JigSAPを脳内に単回投与し、投与1週間後 に歩行機能を解析した。その解析の結果、Z単独投与で は歩行機能改善効果が認められなかったが、Z-JigSAP投 与群では改善効果が認められた(図1)。齧歯類脳梗塞モ デルにおいてZ-JigSAPの治療効果を見出したことで、特 許出願に至った(特願 2023-192464)。



図1:Z-JigSAP 投与による歩行機能回復. dMCAO モデル作製7日後に歩行機能テストを行い、足の 踏み外し割合を算出した。歩行機能テスト直後にZ-JigSAP を脳内に投与し、さらに7日後(脳梗塞14日後)に2回目 の歩行機能テストを行った。Y軸は歩行機能の回復度を示 したもので、「7日後の足の踏み外し割合/14日後の足の踏 み外し割合」として算出した。

#### (2) 中大脳動脈梗塞(MCAO) モデルの確立

これまで、損傷脳再生メカニズムの解明のために、中大 脳動脈遠位部梗塞(dMCAO)モデルマウスを用いてき た。再生メカニズム解明の手掛かりになる損傷中心部と ペナンブラ領域における遺伝子発現変動や経時変化の検 知に注力する手法である。しかしながら、損傷領域が大 脳皮質に限定しているため、行動異常が捉えにくいとい う問題点があった。また、Z-JigSAPの有効性を確固たる ものにするためには2種類以上のモデルで検討すること が望ましい。そこで、本研究では、大脳基底核まで損傷 領域が広く生じる中大脳動脈梗塞(MCAO)モデルマウ ス作製を試みた。具体的には、頸動脈から直径約200µm のファイバー(Doccol MCAO suture)を挿入して中大脳 動脈 (MCA)分岐域まで押し込み、血流を60分間止め る方法で重度脳梗塞 MCAOモデルマウスを作製した。こ れまでの dMCAOモデルマウスと今回新たに作製した MCAOモデルマウスの損傷領域を比較したところ、 MCAOモデルでは大脳基底核まで損傷部が拡大している ことを確認した(図2)。



図 2: MCAO モデルの確立 dMCAO (左) および MCAO (右) モデル作製 7 日後に脳 切片を作製し、ミクログリアマーカーIba1 で免疫染色して 損傷領域を可視化した。(左) dMCAO モデルでは大脳皮質 特異的に傷害された。(右) MCAO モデルでは大脳皮質に 加えて大脳基底核も傷害された。

#### (3) 歩行機能解析の自動化



歩行機能テストでは、図3に示す亀甲金網の上にマウス を置き、10分間自由歩行させ動画を撮影する。この動画 から、マウスの総歩数と足を踏み外した歩数を観測者が BORIS ソフトウェア上で記録し、足の踏み外し割合を算 出する。この解析の問題点は、観測者ごとに足の踏み外 し基準が異なるため、基準となる対象群の計測を実験ご とに行う必要があり多大な労力を要する点である。ま た、行動解析実験全般に当てはまるが、観測者が気づか ない変化を抽出できない点も問題点として挙げる。そこ で本研究では、足の踏み外しを物理量によって判別する 技術を開発し、歩行機能解析の精度向上と簡便化を図る ことを目的とした。

はじめに、実験環境を包括的に再現した仮想環境で複 数の合成データを作成し、そのデータをトレーニングデ ータとして使用した。具体的には、歩行機能テストの実 験環境を仮想環境で再現し、3次元空間内の物体が手前 の物体で隠れるオクルージョンが多くなるマウスの合成 データセットの作成と、2次元および3次元姿勢推定の 精度の比較を行った。2次元姿勢推定では YOLOv8-Pose を用いて複数の合成データセットを使用し、CG で作成 したテストデータと実際の実験の画像で精度の比較を行 った。3次元姿勢推定には複数視点からレンダリングし た合成データセットを用いて三角測量による推定値の評 価を行った。学習データを作成する際には、Unreal Engine 5.3 を使用して描画と基準データの生成を行った。 また、汎用性を高めるため、背景色やマウスの位置・回 転、亀甲金網の位置・回転、カメラの位置・回転などの 要素をランダムに設定できるようにした。マウスの重要 な基準点を図4に示した。





図4:機械学習のための合成データセット作成 (上)基準点の設定(下)Unreal Engine 5.3 でレンダリングさ れた教師データの例

作成した教師データを使用して姿勢推定モデルの学習 を行った。YOLOv8-Pose を使用し、事前学習された姿勢 推定モデルに対して、複数の教師データを使用したファ インチューニングを行った。図5に2次元姿勢推定のテ ストデータの結果を示すが、適合率が81.1%と算出さ れ、良好な結果を得た。次に3次元姿勢推定を行った。4 視点から撮影した CG 画像計36 枚からなるテストデータ に対し、上記データセットにより学習させたモデルを使 用し、Iskakov らの手法による三角測量を実行した (Karim Iskakov et al., Proc ICCV 7718-7727, 2019)。推定
 座標と正解座標の距離の平均 MPJPE を算出して精度を算
 出した結果、CGデータセットに対し平均誤差 7 mm 以内の推定値という良好な結果を得ることに成功した。



#### 図 5:姿勢推定解析

背景色やマウスの位置・回転、亀甲金網の位置・回転、 カメラの位置・回転などの要素を加えた適合率の測定







#### 図 6:3 次元姿勢推定 (上・中)4 視点から撮影した CG データを用いて 解析した(下)姿勢推定の精度評価(青線:正解座 標、赤線:推定座標)

# 3. 今後の展望

Z-JigSAP の治療効果を MCAO モデルで確認し、有効性 のデータを確固たるものにする。また、Z-JigSAP の投与 最適濃度の決定、作用機序の解明を行う。JigSAP 単独の 安全性および毒性試験も進め、臨床応用展開に向けた研 究開発を進める。

# 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 ドを組み合わせて結合させるアセンブロイド培養や移植 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。

そこで本研究では、中枢神経系のオルガノイド培養に適 した JigSAP を開発することを目的とした。はじめに網膜 の3次元組織培養系をモデルに、ハイドロゲルの粘弾性が 組織発生に与える影響を検討した。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。

#### 2. 実験と結果

#### (1) 網膜組織3次元培養に対するゲル弾性率の影響

マウスから摘出した脳 (Brain) と、オルガノイド培養で 一般的に用いられている天然 ECM コラーゲンゲル (Collagen gel) とマトリゲル (Matrigel) の機械強度を検 討するために、それぞれのサンプルの動的粘弾性測定を行 った(図1)。その解析の結果、コラーゲンゲルやマトリゲ ルに比べて、生体脳のせん断弾性率(G')の値が10倍以 上高く、より高い機械強度を示すことが明らかとなった。



そこで、中枢神経組織の3次元ゲル培養における弾性率 の差異の影響を検討するために、さまざまな弾性率を示す アガロースゲルを作製した。まず、ゲル化する低融点アガ ロース(SeaPlaque GTG Agarose)の濃度を検討し、約0.1% の濃度でゲル化することを確認した(図2)。



#### 図2:アガロースゲルの調整

低融点アガロース (SeaPlaque GTG Agarose)を用いてゲル 化濃度を検討した。0.13%以上の濃度でゲル化した。A: 2.0%, B: 1.0%, C: 0.50%, D: 0.25%, E: 0.13%, F: 0.063%, G: 0.031%

それぞれの濃度における動的粘弾性測定を行い、本研究 では生体脳組織よりも機械強度の高い2%と若干低い0.5%、 汎用ゲルと同程度の 0.1%のアガロースゲルの3 種類を用 いて検討することにした(図3)。



胎生 14 日目のマウスレンズと網膜を含む組織を単離し、 異なる弾性率を示すアガロースゲルに網膜組織を包埋し て17 日間メンブレン培養を行った(図4上)。培養後に凍 結切片を作成し、視細胞マーカーの Recoverin とレンズマ ーカーの CRYAB で免疫染色した。いずれの条件下でも生 体網膜と同様の網膜層構造を認めたが、0.1%アガロースで 培養した網膜組織は球状形態を保持しせず、潰れた形状を 示した(図4下)。



次に細胞分化に対する影響を検討するため、Q-PCR 解析にて視細胞(Recoverin)、ミュラーグリア(Glutamine synthetase)、未分化細胞(Nestin)、双極細胞(PKCa)、ア

マクリン/水平細胞 (Calbindin)のマーカー遺伝子発現を 検討した (図 5)。いずれの条件でも培養下でも個体発生と 同様に網膜分化は進行したが、出生 12 日目の生体網膜組 織 (P12)に比べ、2%ゲルでは視細胞マーカーの低下が認 められ、0.1%ゲルではミュラーグリアマーカーの上昇が認 められた。また、いずれの条件でも抑制性神経細胞マーカ ーの低下が認められた。



図 5:弾性率の遅いによる遺伝子発現の遅い 胎生 14 日目 (E14)、出生 2 日目 (P2)、および出生 12 日目 (P12)の網膜、2%, 0.5%, 0.1%アガロース 17 日間培養し た組織から RNA を抽出し、Q-PCR 解析を行った。P12 網 膜をコントロールとした。\* p<0.05 (P12 生体網膜との比較)

汎用ゲルと同程度の弾性率を示す 0.1%アガロースゲル で培養した培養組織は、球状形態を維持せず、網膜傷害時 に発現増加するミュラーグリアの遺伝子発現量が上昇し、 生体網膜よりも高い弾性率を示す 2%アガロースゲルで培 養した組織では、視細胞の遺伝子発現量が低下したことか ら、粘弾性特性が in vitro 網膜発生に影響を与えることが 明らかとなった。

### (2) D-JigSAPの開発

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。C-JigSAP の弾性



率は約1kPaで、生体脳の弾性率と同程度であった(図6)。

この C-JigSAP のゲル化に必要不可欠となる分子間結合 を同定するために、固体 NMR 解析で分子間結合ドメイン を明らかにし、その結合に重要なアミノ酸に変異を加え、 分子間結合を切断する 11 アミノ酸からなる Degradation (D)-JigSAP を開発した。C-JigSAP とは異なり、同条件で溶 解した D-JigSAP はゲル化せず(図7)、さらに興味深いこ とに、ゲル化した C-JigSAP に D-JigSAP を添加することで C-JigSAP ゲルが分解されることが明らかとなった。以上 の結果から、我々は生体脳と同程度の弾性率を示す C-JigSAP の開発に成功し、C-JigSAP の分解剤 D-JigSAP の開 発に成功した(図8)(特願 2023-192489)。



#### 3. **今後の展望**

今年度はハイドロゲルのキャラクタリゼーションを網 膜組織の立体培養系を中心に進めてきたが、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る。また、 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。



# 【原著論文】 (投稿掲載)

- 01. Qiming Liu, Tianyue Zhang, Yuka Ikemoto, Yudai Shinozaki, <u>Go Watanabe</u>, 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, <u>Go Watanabe</u>, Satoshi Minakata, Yoshimitsu Sagara, Youhei Takeda, "Water-Dispersible Donor–Acceptor–Donor π 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, <u>Go</u> <u>Watanabe</u>, 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, <u>Takahiro</u> <u>Muraoka</u>, "Semi-Enzymatic Acceleration of Oxidative Protein Folding by N-Methylated Heteroaromatic Thiols", *Chemical Science* (Vol.14), 7630-7636, 2023
- 05. <u>Go Watanabe</u>, 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. <u>味岡 逸樹</u>, <u>村岡 貴博</u>, "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, <u>Go Watanabe</u>, "Aquatic Functional Liquid Crystals: Design, Functionalization, and Molecular Simulation", *Advanced Science* (vol. 11), 2306529, 2023
- **03.** Noriyuki Uchida and <u>Takahiro Muraoka</u>, "Selfassembling 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, 馬渕 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 Phospholibid 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 Selfassembly 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

 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

- 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

 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

 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
- 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 亜急性期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
- 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, 馬渕 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 オ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, 馬渕 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, 馬渕 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 洸希, 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ポソームの開発 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2024 目次 【研究開発部】

実用化実証事業

「貼るだけ人工膵臓」グループ

◆総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	••••	 ••••	, <b></b> .	• 48
◆マイクロニードルの生体応用に向けた安全性の確認	忍••••	 • • • • •	· • • • •	• 51
◆業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	• • • • •	 • • • • •		• 53

# 「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

リーダー 松元 亮

#### 【基本構想】

糖尿病の治療においては、インスリン療法が重要な位置を占めているが、投与量調整の難し さ(長期的な血糖管理・低血糖の回避等)や煩雑さが問題となる。本プロジェクトは、高分子 ゲルを応用した自律型のインスリン供給機構とマイクロニードル等の低侵襲な経皮的薬剤送達 技術とを融合することで、より正確に、患者負担を抑え、かつ経済的なインスリン療法を実現 する「貼るだけで自律型の次世代人工膵臓」を開発する。これにより、糖尿病のインスリン療 法におけるアンメットメディカルニーズの克服を目指す。2023年3月、ニプロ社をPLとして AMED (医工連携イノベーション)事業に採択された。提案内容は、「マイクロニードル+リザー バー+アプリケーター」ヒト用システムの開発とPOC確認のための探索的臨床試験の実施。3 億円/3年間規模の予算のうち1/3をニプロ社が負担する内容である。ニプロ社の協力会社であ るエムダップ社が本 AMED 事業から新たに参画し、プロジェクトプロジェクト開始に伴い、 KISTEC 等を含めた5者による共同研究契約を締結して推進中である。



マイクロニードルには、コア技術のフェニルボロン酸含有グルコース応答性ゲルが充填され、スキン層を形成、皮内のグルコース量に応答して親水化することで、必要量のインスリンを自律的に放出・停止する

図1.「貼るだけ人工膵臓」の製品イメージ

## 1. 2023 年度の研究目的

#### ①製造歩留まり向上の検討

共同研究先であるニプロ株式会社と共同で、量産 開発へ向けた課題抽出と解決に取り組んでいる。現 時点で歩留まりを支配する課題は、モールドからの 離型時の変形や「針残り」である。これを解決する ための離型剤およびその洗浄プロセスの最適化を進 める。

# ②洗浄プロセスの高効率化のための検討

量産化へ向けた製造工程の課題として、洗浄プロ セスを高効率化する必要がある。超音波洗浄プロセ スの導入等を予定している。ニプロ社の協力会社に て取り組んだ実績があり、解決可能な範囲と考えら れる。

#### 2. 2023 年度の研究成果

現在、エムダップ社と東京医科歯科大学を中心 に試作開発に取り組んでいる。製造部分に関わる マイルストーンは「歩留まり向上へ向けた各プロ セスの最適化」である。具体的には、1. プレゲル 組成の最適化、2. 離型剤の最適化、3. 洗浄プロセ スの高効率化の3項目であり、前者2項目につい てはほぼ目処が立った。「3. 洗浄プロセスの高効率 化」については、現在、東京医科歯科大学で評価 を進めており、改善効果を示すデータが得られ始 めている。

「1. プレゲル組成の最適化」について;

エムダップ側での歩留まり改善のため、モノマー濃 度が比較的高い条件で検討を開始したが、それでは インスリン放出速度が小さくなることが課題とな った。低密度化を進める中で、モールドへの「針残 り」が顕著となったが、光重合時の UV 照射条件の 変更や、シリコン系オイルによる離型剤を使用する 事でこれを解決した。

図2に、離型剤及び引き剥がし条件の検討内容に ついてまとめた。プレゲル溶液が低硬度の状態で引 き剥がしを行うため、離型性の向上を目的にシリコ ーンオイルの塗布を検討した。PDMS モールドへ直 接塗布した場合(案 1)、針の先端にオイルが溜ま り、成形不良になることが問題となった。案2では、 先に金属オス型に塗布し、PDMS 型へ転写させてい る。均一かつ薄膜コーティングが可能で、針先端へ のオイル溜まりも回避されており、この方法を採用 した。



図 2. 離型剤及び引き剥がし条件の検討.

### 針裏部分での欠陥発生の原因究明と対応

製造時歩留まり向上が依然課題である。一部の サンプルでは良好なインスリン放出がみられたが、 リーケージ事象が頻発し、CT スキャンで確認する と、針の裏側部分に多数の欠陥(気泡状の空洞形 成)が生じていることが明らかになった。年度後 半では、その詳細メカニズムの解明と改善プロセ スを多岐に検討した。その結果、空洞・亀裂形成の 原因を突き止めた。これに対し、対応するプロセ スの検討を現在進めている。

# <u>マイクロニードルの穿刺性および皮膚炎症の</u> 評価

従来、皮膚への穿刺性や炎症評価は色素塗布によ る針穴の確認や組織学的評価が中心でああったが、 いずれも表皮を確実に穿破できているか確認するこ とは容易ではなかった。そのため、経皮水分蒸散量 (TEWL ; transepidermal water loss) のMexameter (Courage+Khazaka)を用いた皮膚色調評価の併用を 試みた。Mexameter は異なる波長の光を照射し、そ の反射光の比率を測定することで、ヘモグロビン量 を定量化できる。Oxazolone を用いた接触性皮膚炎 モデルを作成し、定量性を確認したところ、病変形 成に伴って赤みの増強が認められた(図4)。皮膚炎 によって上皮バリアが障害されるため、TEWL も並行 して上昇した。次に、マイクロニードルをマウスの 側腹部に1時間装着し、その前後の TEWL および赤 みを測定した(図5)。マイクロニードルの刺入効率 に応じて TEWL の増加が認められ、いずれも炎症性変 化(赤み)は認められなかった。今後、マイクロニ ードルの仕様が決定次第、皮膚刺入性および炎症性 変化の評価を進めていく。



図 4. Mexameter を用いた皮膚炎症の評価.



図 5. MN デバイスの皮膚穿刺性と炎症の評価.

# マイクロニードルの生体応用に向けた安全性の確認

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト伊藤 美智子

#### 1. はじめに

本プロジェクトではグルコース応答性の高分子ゲルを 用いてマイクロニードルを作成し、皮膚に留置すること で血糖応答性にインスリンを供給する「貼るだけ人工膵 臓」の開発に取り組んできた。本技術が確立されること によって、自律的なインスリン分泌による血糖コントロ ールが可能となるが、そのためには良好な皮膚刺入状態 の維持による十分な有効面積の確保が必須となる。これ までに開発されているマイクロニードルは皮膚に刺入

後、溶解・吸収されるタイプのものであったが、本プロ ジェクトで目指すマイクロニードルは皮膚留置型で長期 間にわたって効果を発揮するという挑戦的な取り組みで ある。そのためには、高分子ゲルそのものの機能向上や 構造的な強度の確保、生体において十分な血糖降下作用 を得るためのスケールアップに加え、適切な機能・副作 用の評価系が必要である。

#### 2. 刺入性・皮膚炎症評価の問題点

マイクロニードルの刺入性評価には穿刺後の皮膚をト リパンブルーなどの色素で染色する方法が広く用いられ ているが、マイクロニードルを押し付けたことによる皮 膚の陥凹と穿破を見分けることは困難である(図1A)。 一方、病理組織学的評価ではHE染色などによって穿刺 状態を確認することになるが(図1B)、皮膚は弾性に富 む組織であるため、マイクロニードルを除去した際に穿 刺によってできた皮膚の断裂が不明瞭になってしまう場



#### 図1. 皮膚の穿刺性評価

A. トリバンブルー染色による穿刺の評価。B. 皮膚のHE染色。C. サンブル採取に に伴う穿刺部の変化。D. 薄切方向によって穿刺部位の検出効率。実線、点線の 切れ方によって穿刺効率は異なって見える。 合がある(図1C)。また、固定標本をマイクロニードル の並びに合わせて薄切することは困難であり(図1D)、 マイクロニードルデバイスとしての正確な穿刺効率を算 出することは大きな困難を伴う。また、炎症を評価する 方法として、皮膚反応をスコアリングして評価するシス テム(表)や、皮膚組織への白血球浸潤を免疫染色で評 価する方法が考えられるが、検出感度や定量性に問題が ある。デバイスとしての機能を評価する場合、個々の穿 刺部位のみだけでなく、マイクロニードルの本数や長さ の違いがもたらす皮膚への影響を「面」として捉え、高 感度かつ定量的に評価する必要があると考えられる。

紅斑及び痂皮の形成       0         紅斑なし       0         非常に軽度の紅斑(かろうじて識別できる)       1         はっきりした紅斑       2         中等度ないし高度紅斑       3         高度紅斑からわずかな痂皮の形成(深部損傷まで)       4         【最高点4点】	
<ul> <li>浮腫の形成</li> <li>浮腫なし</li> <li>・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・</li></ul>	
【紅斑・痂皮及び浮腫の合計点数の最高点8点】	

表. 皮膚反応の評価付けシステム

#### 3. 実験と結果

昨年度までに、角質や上皮のバリア機能を反映する指 標として経皮水分蒸散量(TEWL: transepidermal water loss)計(Courage+Khazaka, Germany)を用いてマイクロ ニードル穿刺性の評価を試みてきた<sup>1,2</sup>)。TEWLは正常な 皮膚において10-20 g/m<sup>2</sup>h 程度が基礎値となるが、炎症 や物理的な障害に伴うバリア機能低下に伴って、水分蒸 散量が増加することを利用している。一方、皮膚に異な る波長の光を照射し、反射の程度によってヘモグロビン 量を定量化するMexameter(Courage+Khazaka, Germany) は皮膚の紅斑(赤み)インデックスを測定することがで きる<sup>3</sup>。この2つを組み合わせることでマイクロニード ルによる皮膚穿刺性と炎症性変化の定量化に取り組ん だ。

まず、皮膚炎のポジティブコントロールとしてオキサ ゾロン反復塗布によるアレルギー性皮膚炎モデルを作成 した。背部に5%オキサゾロンを塗布して感作し、5日後 から耳介に0.5%オキサゾロンを隔日で塗布した。耳介へ のオキサゾロン塗布前から経時的に耳介皮膚の紅斑イン デックスおよび TEWL を測定したところ、肉眼的な変化 の乏しい3日から軽度紅斑インデックスの上昇と (p = 0.06)、TEWL の優位な上昇が認められた(図2)。その 後、肉眼的所見と一致して紅斑インデックスの増加と TEWL のさらなる増加が確認できた(図2)。



次に、マイクロニードルの刺入性および炎症性変化を 評価するため、マウスの側腹部を剃毛し、マイクロニー ドルを1時間貼付した。その前後で Mexameter および TEWL 計を用いてそれぞれの変化量を評価したところ、 穿刺痕の数に応じて TEWL の増加が認められた(図3)。 一方、紅斑インデックスの増加は認められず、この観察 期間では穿刺あるいはマイクロニードルの接触による炎 症性変化はないと考えられた。



図3. MNデバイスの皮膚穿刺性と炎症の評価 穿刺痕の多い個体 (A) と少ない個体 (B)

#### 4. 考察および今後の展望

本年度の検討から皮膚の炎症が起きている際には角質 のバリアが障害されているため、紅斑インデックスとと もに TEWL の増加が高感度かつ定量的に評価できること が明らかになった。マイクロニードルの皮膚に対する影 響を考える上では、紅斑インデックスの増加を伴わず、 TEWL が十分に増加することが望ましいと考えられる。 現在、マイクロニードルの構造およびアプリケーターの 開発、固定方法などが検討段階にあるため、今回は試作 品を用いて1時間の留置で検討した。今後は針の長さに よる TEWL 変化量の比較、日から週でデバイスを留置し た際の炎症性変化、デバイスを除去した後の刺入痕の回 復過程などを評価していく予定である。

#### 【参考文献】

- Alexander H, Brown S, Danby S, Flohr C. Research techniques made simple: transepidermal water loss measurement as a research tool. J Invest Dermatol 138: 2295-2300, 2018.
- 2. 太田広毅. 皮膚バリア機能評価の現状と最新型 TewameterTMHex. COSMETIC STAGE vol. 12, 2020.
- 3.Matias AR, Ferreira M, Costa P, Neto P. Skin colour, sin redness and melanin biometric measurements: comparison study between Antera 3D, Mexameter and Colorimeter. Skin Res Technol 21: 346-362, 2015.



# 【原著論文】

- Wenqian Yang, Takuya Miyazaki, Yasuhiro Nakagawa, Eger Boonstra, Keita Masuda, Yuki Nakashima, Pengwen Chen, Lucas Mixich, Kevin Barthelmes, Akira Matsumoto, Peng Mi, Satoshi Uchida & Horacio Cabral (2023) Block catiomers with flanking hydrolyzable tyrosinate groups enhance in vivo mRNA delivery via π–π stacking-assisted micellar assembly, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 24, 1, DOI: <u>10.1080/14686996.2023.2170164</u> [IF 7.662]
- Michiko Itoh, Atsushi Tamura, Sayaka Kanai, Miyako Tanaka, Yohei Kanamori, Ibuki Shirakawa, Ayaka Ito, Yasuyoshi Oka, Isao Hidaka, Taro Takami, Yasushi Honda, Mitsuyo Maeda, Yasuyuki Saito, Yoji Murata, Takashi Matozaki, Atsushi Nakajima, Yosky Kataoka, Tomoo Ogi, Yoshihiro Ogawa, Takayoshi Suganami. (2023) Lysosomal cholesterol overload in macrophages promotes liver fibrosis in a mouse model of NASH. J. Exp. Med. 220(11), e20220681, DOI: 10.1084/jem.20220681 [IF 17.579]
- 3.Hatano M, Akiyama Y, Shimada S, Yagi K, Akahoshi K, Itoh M, Tanabe M, Ogawa Y, Tanaka S (2023) Loss of KDM6B epigenetically confers resistance to lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease-related HCC, *Hepatol. Commun.* 7: e0277, Doi: 10.1097/HC9. 00000000000277 [IF 5.703]
- 4.Barthelmes, K.; Sathitaphiwan, K.; Janwimaluang, N.; Ikehara, K.; <u>Matsumoto, A.</u>, Increased mechanical stability and permeability by filling the interconnected pores of porous microneedles, *Jpn. J. Appl. Phys.* 2024, *63*(2). [IF 1.5]

### 【総説】

- ボロン酸高分子ネットワークバイオ材料の設計と医療応用 (Design and medical application of boronic acid polymer network biomaterials) 松元 亮., ネットワークポ リマー論文集 (Network Polymer Papers) 2024, 45(1), 44-54.
- 2."Borono-lectin"-mediated Crosstalk and Its Application to Bioengineering, Matsumoto, A., *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* 2023, *143*(5), 435-441.
- 3.'ボロノレクチン'を応用した糖鎖シアル酸検出と腫瘍タ ーゲティング (Sugar chain sialic acid detection and tumor targeting using 'boronorectin'), 松元 亮. バイオマテリア ル (Journal of Japanese Society for Biomaterials) 2023, 42(1), 92-93.

### 【書籍】

1.菅波孝祥、田中都、伊藤美智子編、実験医学別冊「もっ とよくわかる!線維化と疾患」2023年9月20日発行  Wearable Artificial Pancreas Device Technology Matsumoto, A.
 Wearable Biosensing in Medicine and Healthcare 2024, 249-266 (Springer).

# 【口頭発表】

1.<u>Akira Matsumoto</u>, "Borono-lectin-inspired chemistry platform for bio-interactive DDS",

Seminar at Dept. of Chemical Eng. & Biotechnology, Taipei-TECH, March 13, 2024, Taipei, Taiwan

2.<u>Akira Matsumoto</u>, "Borono-lectin-inspired chemistry platform for bio-interactive DDS"

Seminar at Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, March 14, 2024, Taipei, Taiwan

3.<u>Akira Matsumoto</u>, "Borono-lectin-inspired chemistry platform for bio-interactive DDS"

Seminar at Graduate Institute of Biomedical Engineering, Chang Gung University, March 15, 2024, Taipei, Taiwan

4.<u>Akira Matsumoto</u>, "Borono-lectin-inspired chemistry platform for bio-interactive DDS"

The 10th Joint Symposium between IBB/TMDU and Chulalongkorn University on Biomedical Materials and Engineering, January 19, 2024, Bangkok, Thailand

5.<u>Akira Matsumoto</u>, "Borono-lectin'-inspired platform for biointeractive material designs"

3rd International Symposium on Design & Engineering by Joint Inverse Innovation for Materials Architecture (DEJI2MA-3), October 20, 2023, International Conference Center/WASEDA

6.<u>Akira Matsumoto</u>, "Borono-lectin"-inspired bioengineering for bio-interactive applications"

John S. Fossey Memorial Symposium, April 1, 2023, Birmingham University, UK

7.<u>Akira Matsumoto</u>, "Borono-lectin"-inspired bioengineering for bio-interactive applications"

Institute colloquium, February 22, 2023, Friedrich Schiller University Jena, Germany

8.Kevin Barthelmes, Kittipat Sathitaphiwan, Nuttawut Janwimaluang, Kiyoshi Ikehara, <u>Akira Matsumoto</u>, "Increased Mechanical Stability by Filling the Interconnected Pores of Porous Microneedles"

36th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2023), November 15, 2023, Keio Plaza Hotel, Sapporo

9. <u>松元 亮</u>, "Designer Lectins -設定自在な'ボロノレク チン'で愉しむ高分子バイオエンジニアリング-"

神戸大学大学院医学研究科医療創成工学専攻と生材研と の合同セミナー,2023年11月16日,神戸大学大学院医

学研究科医療創成工学専攻 10. 松元 亮, Kevin Barthelmes, 柳沼 慶一郎, "実用化 実証事業「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト" KISTEC Innovation Hub 2023, 2023 年 11 月 16 日, オン ライン 11. 松元 亮, "ボロノレクチンで展開する生体対話型バイ オエンジニアリング" 第 45 回日本バイオマテリアル学会大会 MEET THE DOCTORS: 画期的モダリティ・新時代医療機器, 2023 年 11 月7日,神戸国際会議場 12. 松元 亮, " ボロノレクチン'工学 ー「貼るだけ技術」 への展開ー" 文部科学省と国立大学附置研究所・センター 個別定例ラ ンチミーティング, 2023年10月20日, オンライン 13. 松元亮 ボロン酸の分子認識を駆使した DDS 39回日本 DDS 学会学術集会シンポジウム3『新素材で拓 くスマート DDS』 2023年7月27日 幕張メッセ国際会議場 14.松元亮 Designer Lectins -設定自在な"ボロノレクチン"で愉しむ 高分子バイオエンジニアリング-第25回高分子ゲル研究会講座 2023年9月7日 メニコンシアターAoi 15.柳沼 慶一郎、Kevin Barthelmes、片島 拓弥、松元 亮, "ボロン酸含有保護基を応用した新規開裂反応系の開拓と ハイドロゲルへの応用" 第45回日本バイオマテリアル学会大会, 2023年11月7 日,神戸国際会議場 16.<u>松元 亮</u>, Kevin Barthelmes, 柳沼 慶一郎, "ボロン酸 含有保護基を応用した環境応答的な開裂反応化学の開拓 と SDGs ゲルサイエンスへの展開" 第72回高分子討論会, 2023年9月28日, 香川大学 幸町 キャンパス 17.伊藤美智子 NASH 病態形成における脂肪毒性の理解と医学応用 第9回肝臓と糖尿病・代謝研究会 2023年5月13日 鹿児島城山ホテル 18.伊藤美智子 NASH におけるマクロファージの脂質代謝変容とリソソ ームストレス 第96回日本生化学会大会 2023年11月2日 福岡国際会議場 19.伊藤美智子 胞死を起点とする NASH の病態理解と医学応用—医工連 携を通して― 第44回日本肥満学会 2023年11月26日

仙台国際センター

# 【特許】

(1)国内特許出願 2件 1. 特願 2023-076968 出願日:2023/5/8 発明の名称:ジオキサザボロカン誘導体 発明者:松元亮、バーテルメス ケヴィン 出願人:KISTEC (50%)、国立大学法人東京医科歯科大 学 (50%) 2. 特願 2023-085727 出願日:2023/5/24 発明の名称:マイクロニードルの製造方法 発明者:松元亮、バーテルメス ケヴィン、松本裕子 出願人:KISTEC (80%)、国立大学法人東京医科歯科大 学 (20%) (2)国際特許出願 1件 3. PCT/JP2024/002308 出願日:2024/1/25 発明の名称:糖応答性ゲル 発明者:松元亮、伊藤美智子、松本裕子、金井紗綾香 出願人:KISTEC (85%)、国立大学法人東京医科歯科大

学(15%)

# 研究報告2024 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

◆総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	56
◆アモルファス前駆体を用いた異常高原子価ニッケル酸化物BiNi <sub>1-x</sub> Fe <sub>x</sub> O <sub>3</sub> の合成と評価・・・・・	59
$\bullet$ Determination of the charge state configuration of PdMnO <sub>3</sub> · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	63
◆業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	68

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℃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、強磁性強誘電体に関しても、メモリデバイス化 に必須なナノドッド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。

#### 2023 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 BiNi0.85Fe0.15O3 (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、K2NiF4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 Bi0.5Pb0.5MO3

(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

基板上にスピンコートで成膜した 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。 その後に 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. 2023 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

共沈酸化同時プロセスによる BNFO 前駆体の合成法の 日本材料技研への技術移転を開始した。この手法で調整 した前駆体は反応性が高いため、短時間の熱処理で BNFO に転換可能で、微粒子を得られることも見いだし た。

実用化が始まりつつある BNFO だが、動作温度幅が 50K 程度と狭く、動作温度範囲を広げてほしい、とのユ ーザーからの要求がある。



#### 図 1 : (上) BiNi<sub>0.88</sub>Al<sub>0.02</sub>V<sub>0.02</sub>Mn<sub>0.02</sub>Fe<sub>0.02</sub>Co<sub>0.02</sub>Cu<sub>0.02</sub>O<sub>3</sub>の負熱膨張

#### と、(下)多元素置換試料の負熱膨張動作温度範囲

我々は組成開発を進め、FeのサイトをAl, V, Mn, Fe, Co, Cuの6元素で置換する高エントロピー効果によって、転 移温度幅を270-400 Kの130 Kに広げる事に成功した。し かしながら、V<sup>5+</sup>が毒性である事からこの元素を除外した 組成の開発を日本材料技研から求められ、種々の組成を 検討した。その結果、BiNio.12Alo.02 Mno.02 Fe0.02 Coo.02 O3 でも 良好な結果が得られることがわかった。CRESTのテーマ として、東北大学金属材料研究所の熊谷教授と協力して ベイズ最適化での組成予測提案を受けながら進めてい る。粉末X線回折データからの格子定数導出に関して、 SPring-8 の新しいビームラインである BL13XU の高輝度 X線と高感度検出器を活用して、わずか 30 分で 200 K か ら 500 K の往復の回折データを取得できるようになっ た。また、解析も酒井研究員の開発したリートベルト解 析スクリプトを利用して自動化した。

有望シーズでその負熱膨張メカニズムの解明を行った Ca2RuO4は、材料組織を形成する針状の結晶粒の、長手 方向が収縮、円周方向が膨張する異方的な熱膨張のた め、昇温に伴って太鼓型に変形し、それによって結晶粒 間の空隙が減少することで全体として大きく体積が収縮 する。DASによる第一原理計算と MD シミュレーション で、この振る舞いを再現することに成功した。今後の物 質探索の指針を与えることができる。



図2:第一原理計算によるCa2RuO4の熱膨張予測



同様の材料組織効果による巨大負熱膨張の発現を期待して、同じく K<sub>2</sub>NiF<sub>4</sub>型構造を持つ化合物の実験的サーベイを行った。K<sub>2</sub>NiF<sub>4</sub>相はペロブスカイトに比べて低温安定相であるため、金属酢酸塩とアミノ酸の配位子交換でアモルファスの前駆体を得る「アミノ酸法」でハイスループットの合成を行った。中でも、これまでは 3000 気圧の高酸素圧下での合成の報告しかなかった LaSrCuO<sub>4</sub>の常圧での合成に成功し、Ca<sub>2</sub>RuO<sub>4</sub>同様の異方的な熱膨張を確認することができた。

戦略シーズ、有望シーズの研究で、電子ドープしたペ ロブスカイト PbVO3が、最高9.3%もの体積収縮を示す巨 大負熱膨張材料になる事を報告してきた。しかしなが ら、実用化のためには毒性元素である鉛を廃する必要が ある。そこで同様の結晶構造を持つ BiCoO3 に注目した。 この物質は Bi<sup>3+</sup>の 6s<sup>2</sup> 孤立電子対と、d<sup>6</sup> 電子配置を持つ Co<sup>3+</sup>のヤーンテラー歪みのために c/a=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。Bi を一部 La で置換する事で孤 立電子対の効果を薄めた Bi<sub>0.8</sub>La<sub>0.2</sub>CoO3では、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いだし、特許を申請した。そ の後、Bi<sub>0.8</sub>Pr<sub>2</sub>CoO3で立方晶相の分率変化を 45%から 85% に増大し、非鉛物質としては最大の 4.1%の体積収縮を実 現した。



図5:Bi<sub>0.8</sub>Pr<sub>0.2</sub>CoO<sub>3</sub>の負熱膨張

#### ②強磁性強誘電体の磁化反転検出

R4 年度に作製した、陽極酸化アルミナ(AAO)をマス クに用いた直径 190 nm の BFCO ナノドットの MFM 像を 見直し、強誘電ドメインと同じドメイン構造を仮定する ことで磁気像を再現できることを見いだした。この結果 は ACS Applied Materials and Interfaces に掲載され、 Supplementary Cover にも選出された。



図 6: AAO マスクを用いて作製した BFCO ナノドットの

#### MFM 像

GdScO<sub>3</sub> 基板上に下部電極として SrRuO<sub>3</sub> (SRO)を成膜し た上に HSQ をスピンコートし、電子ビーム描画で一辺 200nm の穴を作成した。HSQ をマスクとしてレーザーア ブレーションで BiFe0.9Co0.1O<sub>3</sub> (BFCO)を成膜し、フッ酸 溶液を用いて HSQ を除去した。その結果、BFCO ナノド ットが得られる事がわかったが、SRO、BFCO もかなり ダメージを受けていた。



# 図 7:HSQ マスクを用いて SRO/GSO 基板上に作成した試料 のリフトオフ後の SEM 写真

基板を Nb-STO に、エッチング溶液を加温した 3M~5M の NaOH 溶液に変更したところ、良好なリフトオフに成 功した。PFM と MFM による強誘電、磁気ドメイン観察 もできている。

また、SrRuO<sub>3</sub>/Pt/ZrO<sub>2</sub>/Si 基板上への BFCO 薄膜の作製に 成功、強誘電性、弱強磁性を持つ事も確認した。住友化 学、東京工業大学との共願で、特許申請をおこなった。



図 8 : HSQ マスクを用いて Nb-STO 上に作製した BFCO ナ ノドットの PFM 像(上)と MFM 像(下)

### 3. 今後の展望

 $K_2NiF_4$ 型化合物については、DAS 研究員が第一原理計 算で異方的負熱膨張の再現に取り組んでいる。Ca2RuO4 で実験結果を再現できたので、現在 Sr<sub>2</sub>VO4、Sr<sub>2</sub>CrO4、 Sr<sub>2</sub>CoO4の計算に取り組んでいる。これらの化合物は高 圧合成で得られるとの報告があるので、平行して実験も 行っている。また、B サイトを複合化した組成に関し て、ベイズ最適化で合成の可能性を予測しながら実験を 行っている。

HSQ マスクを用いた BFCO ナノドットの作製手法を確 立したので、100 nm のドットを作製し、シングルドメイ ンドットでの電場印加による磁化反転に挑戦する。ま た、ドットのサイズとドメイン構造の関連を明らかにす る。

# アモルファス前駆体を用いた

# 異常高原子価ニッケル酸化物 BiNi1-xFexO3の合成と評価

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のずれや、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」。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。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 B-ユークリ プタイトなどが挙げられる<sup>2</sup>。この数十年で多くの負熱膨 張材料が報告されており、特にペロブスカイト構造とその 関連構造(逆ペロブスカイト、ルドルスデン・ポッパー型 層状ペロブスカイト、ReO3型構造など)を持つ化合物にお いて多くの報告がある。これらは、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、多種多様な起源を有して いる 3-7。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る。代表的なものに、 巨大負熱膨張材料 BiNi1-xFexO3 がある。その母物質である BiNiO3 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 Bi<sup>3+</sup>0.5Bi<sup>5+</sup>0.5Ni<sup>2+</sup>O<sub>3</sub> という特徴的な電 荷分布を持ち、Bi3+と Bi5+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 8。およそ3 GPa 以上の圧 力印加により Bi5+と Ni2+の間で電荷移動が起き, Bi<sup>3+</sup>Ni<sup>3+</sup>O<sub>3</sub>の価数状態へと変化し、Bi<sup>3+</sup>と Bi<sup>5+</sup>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 NiO6八面体が収縮し、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 Fe<sup>3+</sup>で置換すると <sup>10,11</sup>、Bi<sup>3+</sup>Ni<sup>3+</sup>O<sub>3</sub>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。この物質の合成には数万気圧もの高圧を要する が、ダイヤモンドを生産しているメーカーへの製造委託に より高圧合成の問題であった合成スケールが研究室のも のと比較しておよそ 2000 倍のスケールアップに成功した 一方で、合成前駆体の作成プロセスには問題が残されてい る。

従来、BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub>の合成前駆体の作成には、酸化ニッ ケルが反応しづらいことから金属塩の硝酸溶液の蒸発乾 固による元素分散を必要とし、この際、公害の要因となる 窒素酸化物を多量に放出することから工業生産には難が ある。また、得られた合成前駆体はBi3価、Ni2価の化合 物であるため、高圧下での激しい酸化が必要となり、体積 にしておよそ1/3にもなる酸化剤の混合と合成後の洗浄が 不可欠であり、発生する多量の酸素により合成中のブロー アウトの危険を伴うものであった。本研究では元素分散の 手法として逆共沈法に着目し、これらの問題の解決を図っ た。

#### 2. 実験と結果

#### (1) 前駆体調整法の確立

前述の通り BiNi1<sub>x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub> の合成には高圧合成を要する。 まずは高圧合成に用いる前駆体調整法を確立した。逆共沈 法の酸性溶液としてビスマス・ニッケル・鉄の各硝酸塩を 化学両論比で希硝酸に溶解させたものを調整した。共沈の 際、ニッケルは水酸化ニッケル(II)として沈澱する(1)が、 BNFO の高圧相のニッケルイオンは 3 価であるため、酸化 剤を添加しない場合は前駆体の段階で Ni<sup>3+</sup>まで酸化する 必要がある。そこで、次亜塩素酸ナトリウムによる酸化を 共沈と同時に起こすことでオキシ酸化ニッケルとして沈 殿させた(2)。反応式は以下のとおりである。

 $Ni^{2+} + 2 OH^{-} \rightarrow Ni(OH)_2$  (1)

## $Ni^{2+}(OH)_2 + 1/2 \text{ NaCIO}$ $\rightarrow Ni^{3+}O(OH) + 1/2 \text{ NaCI} + 1/2 \text{ H}_20$ (2)

このようにして得られた沈殿を分離回収後、乾燥し反応 前駆体を得た。X線回折パターンから、得られた前駆体 は非晶質であることが明らかとなった(図1)。



#### (2) アモルファス前駆体の Bi, Ni の価数の決定

前駆体がアモルファスであるため X 線回折から結晶相 を特定し価数を見積もることができない。そこで SPring-8 の BL27SU での軟 X 線吸収分光実験により Bi と Ni の価 数を決定した。Bi K 端を見ると、532 eV 付近のエッジの 低エネルギー側(529 eV)にプレエッジピークが見られる (図 2(a))。これは BiNiO3 にも見られることから Bi<sup>5+</sup>(Bi<sup>3+</sup><u>L</u>2に)由来するものであると考えられる。また、Ni L 端では NiO とは異なるスペクトルが見られ、前駆体のス ペクトルが NiOOH のものと類似している<sup>12</sup>。以上のこと からアモルファス前駆体は Bi<sup>5+</sup>と Ni<sup>3+</sup>を含むため酸化剤 を添加せず BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub> を合成できると期待される。

## (3) 結晶相の生成過程の観察

次に、高温高圧処理によって、アモルファス前駆体から BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub> が生成するかを調べるために、SPring-8 の BL14B1 に設置されたキュービックアンビル型高圧装置 SMAP-IIを用いて、反応過程のその場観察を行った。比較 のために、硝酸塩の蒸発乾固による従来の前駆体の観察も 行った。

っこの測定では、通常の X 線回折と異なり、試料に白 色光を照射し、2 θ を固定した検出器でエネルギー分散で 回折光をとらえる。6 GPa の高圧下で昇温したところ、従 来前駆体からの反応では、Bi25FeO40 からはじまり、2 つ以 上の中間体を介し、950℃までに徐々に反応が進行して BiNi1-xFexO3 単相になっていくのに対し、今回のプロセス を用いて調整したアモルファス前駆体では、中間体をほと んど挟まずに徐々にペロブスカイト相が形成し、750℃で シャープなピークとなることが明らかとなった。このこと から、予想通り、アモルファス前駆体を用いることで、酸 化剤を要さず、低温・短時間で直接 BiNi1-xFexO3 が生成し たことがわかる。

#### (4) 負熱膨張性微粒子の合成

セラミックス材料は、複数の原料粉体を混合し高温で



図 2 アモルファス前駆体の軟 X 線吸収分光 スペクトル (a) O K 端, (b) Ni L 端

焼成する固相合成により得ることが一般的である。しかし ながら、固相反応法では原料粒子界面での元素拡散のため の熱エネルギーが必要な上、反応過程で生成する中間生成 物の存在のため、目的の相を得るまでに長時間の焼成と、 途中での解砕・混合が必要となる。その際に粒成長を引き 起こすが、今回得られた前駆体はアモルファスから直接目 的相が生成する。そこで、短時間の加熱により、微粒子が 得られることを期待し、加熱時間を変えた合成を試みた。 6 GPa の高圧下で 900℃まで 5 分間で昇温、温度をキープ する時間を30分,5分,0分と変えて合成を行った。その結 果、いずれの試料においても BiNi1-xFexO3 が生成した(図 4(a))。また走査電子顕微鏡での粒子の観察を行ったとこ ろ、30 分加熱では 15 μm 程度が大半であった粒径が 5 分 加熱では5µm、0分加熱では2µmまで縮小することがわ かった(図4(c-e))。各温度での放射光 X線回折パターン のリートベルト解析から負熱膨張を示すことが確認され た。30分の加熱により合成された BNFO の線熱膨張係数 は-158 ppm/K であるが、加熱時間を減らすことによって 相転移が緩慢になり、5分加熱の試料では-76.8 ppm/K、0 分加熱の試料では、-66.6 ppm/K となった。体積変化の幅 は変わらないため、微粒子化することで、より広い温度域 で負の熱膨張を示すようになったことがわかる。今まで機 械的な粉砕による微粒子化では試料が劣化し負熱膨張を 示さないこともあったが、本手法で得られた微粒子ではそ



# 図 3 アモルファス前駆体(左)と従来法前駆 体(右)の高圧下 X 線その場回折実験結果 〇は目的相, ▽は Bi25Fe040, ◊は NiO, #は Bi Kα線を示す

のような劣化が見られない。このような微粒子合成法はア モルファス前駆体からの直接結晶化させることを活かし た手法であると言える。

#### 3. 考察及び今後の展望

本研究ではダイヤモンド製造設備を用いた工業的な生産と、試験的な販売が始まっている BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub>の高圧合成の前駆体の調整法を検討した。硝酸塩の水溶液を水酸化ナトリウム・次亜塩素酸ナトリウム混合水溶液に滴下し、共沈と酸化を同時に行うことで、異常高原子価の Bi<sup>5+</sup>, Ni<sup>3+</sup>を含むアモルファス前駆体を得られることを見出した。さらに、このアモルファス前駆体を高圧下で加熱することで直接目的相が得られ、短時間の加熱により微粒子を作製することに成功した。

得られた負熱膨張微粒子の合成スケールアップが期待されるほか、この合成手法は他の異常高原子価イオンを含む酸化物の合成にも活かせると期待している。

### 【参考文献】

- 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.
- 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



図 4 6 GPa 900℃30 分,5 分,0 分の各加熱時間 で得られた BiNi<sub>0.85</sub>Fe<sub>0.15</sub>O<sub>3</sub> の(a) 放射光 X 線回 折パターン (λ=0.413854 Å),(b) リートベル ト解析により算出した平均格子体積温度変化, (c-e) 走査電子顕微鏡像

BiNiO<sub>3</sub> Induced by Intermetallic Charge Transfer. *Nat. Commun.* 2011, *2*, 347.

- Takenaka, K.; Takagi, H. Giant Negative Thermal Expansion in Ge-Doped Anti-Perovskite Manganese Nitrides. *Appl. Phys. Lett.* 2005, 87 (26), 261902.
- 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 LaCu<sub>3</sub>Fe4O<sub>12</sub> Perovskite. *Nature* 2009, *458*, 60.
- 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 ScF<sub>3</sub>. *J.Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 15496–15498.
- Takenaka, K.; Okamoto, Y.; Shinoda, T.; Katayama, N.; Sakai, Y. Colossal Negative Thermal Expansion in Reduced Layered Ruthenate. *Nat. Commun.* 2017, *8*, 14102.
- 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 BiNiO<sub>3</sub>. J. Mater. Chem. 2002, 12, 3733–3737.
- Oka, K.; Mizumaki, M.; Sakaguchi, C.; Sinclair, A.; Ritter, C.; Attfield, J. P.; Azuma, M. Intermetallic Charge-Transfer Transition in Bi<sub>1-x</sub>La<sub>x</sub>NiO<sub>3</sub> as the Origin of the Colossal Negative Thermal Expansion. *Phys. Rev. B* 2013, *88*, 014112.
- 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 BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub> and Zero-Thermal Expansion Composite. *Appl. Phys. Lett.* 2015, *106*, 061912.

- 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.
- Aa Samarai, M.; Hahn, A. W..; Abbas.; Askari, B.; Cui, Y.; Yamazoe, K.; Miyawaki, J; Harada, Y.; Roediger, O; DeBeer, S.; Elucidation of structure–activity correlations in a nickel manganese oxide oxygen evolution reaction catalyst by operando Ni L-edge X-ray absorption spectroscopy and 2p3d resonant inelastic X-ray scattering. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, *11*, 38595-38605.

# Determination of the charge state configuration of PbMnO<sub>3</sub>

# 1. Introduction

Properties of transition metal oxides are greatly influenced by the charge state and the ordering of the constituent multi-valent transition metal (M) ions. Change in the charge state induces changes in the overall properties of the system. Therefore, external manipulation of the charge state through carrier doping, is an effective means of controlling and designing the properties of these materials [1-4]. In complex oxides, like PbMO<sub>3</sub> and BiMO<sub>3</sub> perovskite oxides, which consist of multiple multivalent ions, this process of external manipulation and determination of charge state are rendered somewhat challenging and intriguing, on account of the multiple charge degrees of freedomexhibited by the main-group elements, Pb and Bi. The multiple charge degrees of freedom exhibit  $6s^2$  (Pb<sup>2+</sup>) and  $6s^0$  (Pb<sup>4+</sup>) electronic configurations. As the 6s level of Bi and Pb are close to the d-level of 3d transition metals and oxygen 2p level, subtle change in the crystal structure itself can lead to spontaneous exchange of charge between the cations leading to the generation of interesting properties in the material, such as metal-insulator transition, negative thermal expansion and colossal magnetoresistance [5-8]. Even though, both BiMO3 and PbMO3 series of materials exhibit systematic charge distribution change depending on the depth of the *d*-level of 3*d* transition metal M, this phenomenon is more profound in the later series [5], as shown in Table 1. Colossal negative thermal expansion (NTE) was observed in Pb<sup>2+</sup>V<sup>4+</sup>O<sub>3</sub> based systems, originating from the polar  $\rightarrow$  non-polar phase transitions [9]. Polar  $\rightarrow$  nonpolar phase transitions accompanied with NTE has also been observed in Pb<sup>4+</sup>Ni<sup>2+</sup>O<sub>3</sub> type systems [10]. R. Yu. et al., showed formation of a charge glassy phase in PbCrO<sub>3</sub>, where charge Pb<sup>2+</sup>/Pb<sup>4+</sup> disproportionation with 1:1 ratio occurs [11]. The pressure induced charge transfer transition is accompanied by metal-to-insulator transition and NTE. On the other hand, even though PbFeO<sub>3</sub> has a valence state configuration of Pb<sup>2+</sup>0.5Pb<sup>4+</sup>0.5Fe<sup>3+</sup>O<sub>3</sub>, charge transfer transitions and NTE have not been observed yet [12-13]. Interestingly,

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)

this system shows spin-orientation transition at high temperature rooted in the nontrivial charge pattern of the  $Pb^{2+}$  and  $Pb^{4+}$  ions [13]. Most interestingly,  $PbCoO_3$  shows multiple temperature and pressure induced phase transitions originating from the complex change in the charge and spin states of Co ions [14]. As

	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni
Bi	Bi <sup>3+</sup> V <sup>3+</sup> O <sub>3</sub>	Bi <sup>3+</sup> Cr <sup>3+</sup> O <sub>3</sub>	Bi <sup>3+</sup> Mn <sup>3+</sup> O <sub>3</sub>	Bi <sup>3+</sup> Fe <sup>3+</sup> O <sub>3</sub>	Bi <sup>3+</sup> Co <sup>3+</sup> O <sub>3</sub>	Bi <sup>3+</sup> 0.5Bi <sup>5+</sup> 0.5 Ni <sup>2+</sup> O <sub>3</sub>
Pb	Pb <sup>2+</sup> V <sup>4+</sup> O <sub>3</sub>	$\frac{Pb^{2+}_{0.5}Pb^{4+}_{0.5}}{Cr^{3+}O_3}$	?	Pb <sup>2+</sup> <sub>0.5</sub> Pb <sup>4+</sup> <sub>0.5</sub> Fe <sup>3+</sup> O <sub>3</sub>	$Pb^{2+}_{0.25}Pb^{4+}_{0.75}$ $Co^{2+}_{0.5}Co^{3+}_{0.5}O_3$	Pb <sup>4+</sup> Ni <sup>2+</sup> O <sub>3</sub>

Table 1 Experimentally observed charge states of maingroup and transition metal ions. The yellow and orange regions denote the presence of charge disproportionation in A-sublattice and both cation sublattices, respectively, in AMO<sub>3</sub> oxides.

to the charge-property relationship of compounds in the PbMO<sub>3</sub> series, least is known about PbMnO<sub>3</sub>, whose charge state is still shrouded in ambiguity.

The first case of synthesis of tetragonal perovskite phase of PbMnO<sub>3</sub> was reported in 2009 when the 6H hexagonal phase was treated at 15 GPa and 1273 K[15]. Here, both the perovskite 3C and hexagonal 6H phases, were found to be antiferromagnetic insulators. The value of Curie constant in the former phase, however, was 2.38 emu·K/mol which was significantly larger compared to the value expected for  $Mn^{4+}$  (S = 3/2) ions. The hexagonal 6H phase, on the other hand, had a Curie constant of value 1.87 emu·K/mol indicating the Pb<sup>2+</sup>Mn<sup>4+</sup>O<sub>3</sub> charge distribution. Interestingly, recent surface sensitive X-ray absorption spectroscopy (XAS) studies have reported а  $Pb^{2+}_{0.875}Pb^{4+}_{0.125}Mn^{3+}_{0.25}Mn^{4+}_{0.75}O_3$  charge

configuration [16], which is not in agreement with previous experimental observations. We, therefore, have examined the stability of charge state and structural phases of PbMnO<sub>3</sub> as functions of temperature and applied pressure by combining firstprinciples density functional theory (DFT) calculations, self-consistent phonon (SCP) theory and genetic algorithm, to develop higher insights into this direction. Our findings have been experimentally investigated by means of bulk sensitive hard X-ray photoemission spectroscopy (HAXPES), high-frequency electron spin resonance (ESR) measurement and local structural investigation employing atomic pair distribution function (PDF) analysis of synchrotron X-ray total scattering, by Azuma Group.

#### 2. Methods

To determine the ground state structure of PbMnO<sub>3</sub>, we investigated more than 100 candidate structures selected on the basis of the dynamical instability at the high temperature, high symmetry phase. First, we calculated phonon dispersion curve of the cubic  $Pm\bar{3}m$  phase of PbMnO<sub>3</sub> perovskite structure using harmonic approximation based on the first-principles density functional theory (DFT) + U [17] method as functions of electron-electron correlation factor (U) and occupancy level of the 3d orbital of Mn ions to determine structural distortions leading to symmetry and energy lowering. Second, based on the determined pool of initial structures, the phase stability was evaluated based on calculated enthalpy. Finally, for optimized structure, calculated each we а corresponding phonon dispersion curve to make a thorough assessment of their dynamic instability. Parallelly, we adopted a complementary approach, relying on a genetic algorithm combined with DFT+U calculations. In the set of initial structures supplied to the genetic algorithm, around 42 PbMnO<sub>3</sub> candidate structures which exhibit cooperative Jahn-Teller distortions and tilting of BO<sub>6</sub> octahedra, as reported in Ref[18] were considered to prepare seeds which are to be used for determination of ground state structure utilizing genetic algorithm. Since structural differences have a larger impact on the resulting free energy compared to the magnetic configurations, within the seed preparation step, all calculations are limited to ferromagnetic configurations.

# 3. Results and discussions

**3.1 Identification of candidate structures:** By investigating and analyzing the phonon dispersion of the cubic PbMnO<sub>3</sub> phase, *i.e.* with  $Pm\bar{3}m$  symmetry, as this is expected to be the high pressure and high temperature phase, as a function of the effective increase in the occupancy of the  $e_g$  level of the Mn ions, we identified more than 100 candidate structural

phases of PbMnO<sub>3</sub> and performed full structural optimization as a function of electron-electron correlation factor  $(U - J_H)$  at the Mn 3d states. The evaluated phase diagram as a function of  $U - J_H$  is shown in Figure 1. Our results indicate a strong correlation between the electronic and structural phases of PbMnO<sub>3</sub> and the effective Hubbard parameter at the Mn 3d orbitals that plays an important role to stabilize these phases. Along with the known phases, such as P4/mmm, Pnma and R3c, two new structures,  $P\overline{1}$ and Pmnm, having competing energies and exhibit cooperative Jahn-Teller (JT) distortions along with octahedral tilts were identified, which were not considered in the previous studies[15,16], having competing energies and exhibit cooperative Jahn-Teller (JT) distortions along with octahedral tilts. Based on the calculated enthalpy at 0 K and zero pressure P4/mmm phase was found to be unstable compared to the cubic structure. According to the DFT+U density



Figure 1 (a) The relative energy ( $\Delta E$ ) of the lowest energy phase with respect to *Pnma* structure as a function of effective Hubbard parameter ( $U - J_H$ ). (b) The calculated value of the net magnetization  $m_{Mn}$ and the volume of the FM state of the lowest energy structure as a function ( $U - J_H$ ) of the PbMnO<sub>3</sub> system.

of states (DOS), the charge state of Mn ( Pb ) ions in *Pbnm* and *R3c* phases are expected to be 4+(2+) and 2+(4+), respectively. Both structures are metallic and FM in nature within the level of GGA (PBEsol) [19], met-GGA (r<sup>2</sup>SCAN) [20] and hybrid HSE06 [21,22] exchange-correlation functional, which is not in

agreement with experimentally observed insulating phase [15,16]. In addition to  $P\overline{1}$  and *Pmnm*, various JT distorted patterns as observed in LaMnO<sub>3</sub> [23] and TbMnO<sub>3</sub> [24], have also been taken into consideration. The Pb<sup>4+</sup>/Pb<sup>2+</sup> columnar ordering within these JT distorted lattice frameworks tends to stabilize in the  $P2_1/m$  symmetry. However, the most stable  $P2_1/m$ structure is 49 meV/f.u. higher in energy than the  $P\overline{1}$ structure. The layered and the rock-salt Pb4+/Pb2+ ordered phases are also higher in energy than the  $P\overline{1}$ structure with values 100 and 24 meV/f.u., respectively. We cross-checked the energetics of the assumed structural phases of PbMnO3 by using hybrid exchangecorrelation functional (HSE06) and by considering common AFM orders, like G-type, A-type and C-type, along with the FM configuration. The lowest energy structure was pinned down to  $P\overline{1}$  phase, where Mn spins are ordered in FM pattern. This indicates that, PbMnO<sub>3</sub> does not form a trivial collinear AFM order and further investigation is required to achieve insights into this direction.

# 3.2 Electronic structure of DFT predicted ground-

state phase: The cooperative JT lattice distortion pattern of the  $P\overline{1}$  phase is complex in nature where each MnO<sub>6</sub> octahedron is composed of pairs of long, medium and short bonds. As a direct consequence, two types of Pb ions ordered in a columnar pattern were formed. The calculated DOS indicates that one half of the Pb ions (Pb1) have almost filled 6s orbitals and form 2+ valence state while the other half (Pb2) form ligand Computed orbital holes. crystal Hamiltonian population (COHP) (Figure 2) shows that in both spin channels, the bands above Fermi level (within 3 eV) are composed of strongly hybridized Pb2 - O sp\* antibonding states and the corresponding bonding states form at around 10 eV below the Fermi level. This indicates the formation of  $6s^2L^2$  configuration, where L denotes ligand hole. The ligand holes are therefore localized in the Pb2 - O bonds and form 4+ valence state. The calculated magnetic moment at the Mn site is  $m_{\rm Mn} \sim 4.02 \ \mu_B$  and the net magnetization of the FM state is  $M \sim 4.0 \ \mu_B/f.u$ . We also observe that while  $t_{2a}$ states of Mn ions are almost filled and completely vacant in the majority and the minority spin channels, respectively, the  $e_q$  states are half filled in the majority spin channel. These observations indicate the formation of 3+ valence states of Mn ions. At the level of GGA PBEsol and meta-GGA r<sup>2</sup>SCAN exchange correlation functional, the  $P\overline{1}$  phase was found to be half-metallic.

At the level of HSE06, this system is observed to be insulating in nature with a band gap of value 1.6 eV, which is in good agreement with previous experimental reports. Interestingly, using genetic algorithms we found the same ground state structure having  $P\overline{1}$ symmetry. Therefore, our theoretical investigation strongly indicates the formation of Mn<sup>3+</sup> charge state along with 1:1 Pb<sup>2+</sup>/Pb<sup>4+</sup> charge disproportionation.  $P\overline{1} \rightarrow Pnma$  phase transition is expected to be accompanied by the charge transfer and metal-toinsulator transitions (see Figure 2). In the proximity of the Fermi level, under the influence of the Pb – O bonds, the states assume an antibonding  $sp^*$  character, where the ligand holes are delocalized in the Pb - O covalent bond. This is in sharp contrast to BiNiO<sub>3</sub>, the states crossing the Fermi level have predominantly Ni - O pd\* antibonding character. Therefore, transition to the orthorhombic Pnma phase in PbMnO3, in contrast to the similar transition in BiNiO<sub>3</sub>[Ref], is not expected to change the character of ligand hole from Pb - O to Mn - O bonds and pressure induced weak negative thermal expansion is not expected.



Figure 2 Computed partial pCOHP for the Mn – O and Pb – O bonds of the ground state  $P\overline{1}$  (left panel), Pnma (middle panel) and  $Pm\overline{3}m$  (right panel) phases of PbMnO<sub>3</sub>. While – pCOHP(E) > 0 indicates a bonding character between a pair of atomic orbitals, –pCOHP(E) < 0 denotes antibonding interactions.

**3.3 Temperature Vs Pressure phase diagram:** To investigate the stability of the predicted structural phases as a function of temperature and applied pressure, we conducted self-consistent phonon (SCP) [25-27] calculations by incorporating lattice anharmonic effects. We studied  $P\overline{1} \rightarrow Pnma \rightarrow Pm\overline{3}m$  phase transitions. The results of SCP

calculations considering up to 4th order anharmonic terms, are summarized in Figure 3. Our results show temperature and pressure induced  $P\bar{1} \rightarrow Pnma \rightarrow$  $Pm\overline{3}m$  transitions, where the first transition is accompanied by charge transfer ( $Mn^{3+} \rightarrow Pb^{4+}$ ) and metal-to-insulator transitions. The  $P\overline{1}$  phase exhibits much smaller stability range compared to Pnma and  $Pm\bar{3}m$  at the level of GGA PBEsol exchangecorrelation functional. Note that we have conducted SCP calculations by fixing the cell parameters to the DFT evaluated values. To develop a comprehensive analysis of the thermodynamic stability of the perovskite PbMnO<sub>3</sub> structure, other energetically close phases that have been predicted by DFT calculations and change in lattice parameters need to be taken into consideration. Additionally, at the level of hybrid functional the stability of the  $P\overline{1}$  phase compared to Pnma and other phases significantly enhance. Therefore, the effect of e - e exchange-correlation needs to be carefully investigated.



Figure 3 Computed Temperature Vs Pressure phase diagram of PbMnO<sub>3</sub> using self-consistent phonon (SCP) methods.

#### 3. Conclusions

In summary, we have conducted detailed theoretical investigations to determine the ground state crystal structure and charge configuration of PbMnO<sub>3</sub>. The predicted ground state structure has  $P\overline{1}$  symmetry exhibiting cooperative Jahn-Teller (JT) distortions along with octahedral tilts, and forming Pb<sup>2+</sup>0.5Pb<sup>4+</sup>0.5Mn<sup>3+</sup>O<sub>4</sub> charge configuration. Interestingly, by combining genetic algorithms with DFT calculations we found the same ground state structure having  $P\overline{1}$  symmetry. Therefore, our theoretical investigation strongly indicates the formation of  $Mn^{3+}$  charge state along with 1:1 Pb<sup>2+</sup>/Pb<sup>4+</sup> charge disproportionation. However, the thermodynamic stability of the  $P\overline{1}$  phase was found to be much weaker compared to the *Pnma* and *Pm* $\overline{3}m$ . Therefore, further investigations are required to gain deeper insights in this direction.

#### [References]

- 1. M. Imada et al., Rev. Mod. Phys. 70, 1039 (1998).
- 2. B. Keimer et al., Nature 518, 179–186 (2015).
- M. B. Salamon and M. Jaime, Rev. Mod. Phys. 73, 583 (2001).
- E. Dagotto and T. Hotta, Physics reports, **344**, 1– 153 (2001).
- M. Azuma *et al.*, M. Dalton Trans. **47**, 1371–1377 (2018).
- M. Azuma *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **129**, 14433– 14436 (2007).
- 7. M. Azuma *et al.*, Science and Technology of Advanced Materials **16** (3), 034904 (2015).
- T. Nishikubo *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **141**, 19397– 19403 (2019).
- Z. Pan *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **139**, 14865–14868 (2017).
- 10. Y. Sakai *et al.*, Chem. Mater. **31**, 4748–4758 (2019).
- R. Yu *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **137**, 12719–12728 (2015).
- 12. X. Ye et al., Nat. Commun. 12, 1917 (2021).
- 13. Q. Liu et al., Chem. Mater. 36, 1899-1907 (2024).
- Y. Sakai *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **139**, 4574-4581 (2017).
- K. Oka *et al.*, Inorg. Chem. **48** (5), 2285-2288 (2009).
- 16. X. Li et al., Chem. Mater. 33, 92-101 (2021).
- 17. S. L. Dudarev et al., Phys. Rev. B 57, 1505 (1998).
- M. A. Carpenter and C. J. Howard. Acta Cryst, 65, 134–146 (2009).
- J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, Phys. Rev. Lett. 77, 3865 (1996).
- 20. J. W. Furness, A. D. Kaplan, J. Ning, J. P. Perdew, and J. Sun, J. Phys. Chem. Lett. **11**, 8208 (2020).
- 21. A. D. Becke, J. Chem. Phys. 98, 5648 (1993).
- 22. A. V. Krukau , O. A. Vydrov, A. F. Izmaylov, and G. E. Scuseria, J. Chem. Phys. **125**, 224106 (2006).
- 23. J. Rodríguez-Carvajal et al., Phys. Rev. B 57,

R3189(R) (1998).

- 24. T. Kimura et al., Nature (London) 426, 55 (2003).
- 25. D. J. Hooton, Philos. Mag., 3, 4954 (1958).
- 26. T. Tadano and S. Tsuneyuki, Phys. Rev. B, 92,

054301 (2015).

27. T. Tadano, Y. Gohda and S. Tsuneyuki, J. Phys.-Condens. Mat., **26**, 225402 (2014)



#### 【原著論文】

- 1.Jinya Suzuki, Hiroyasu Okochi, Naoki Matsui, Teppei Nagase, Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Takuya Ohmi, Zhao Pan, Takashi Saito, Hiroyuki Saitoh, Atsunori Ikezawa, Hajime Arai, Ryoji Kanno, Takafumi Yamamoto, Masaki Azuma, Selective Synthesis of Perovskite Oxyhydrides Using a High–Pressure Flux Method, Journal of the American Chemical Society, 145(30), 16398–16405 (2023)
- 2.Kengo Oka, Tomoyuki Ogawa, Hajime Yamamoto, Chika Sakaguchi, Ruwan Gallage, Naoya Kobayashi, Masaki Azuma, Compaction of α"-Fe<sub>16</sub>N<sub>2</sub> particles by high-pressure treatment at several gigapascals, Scripta Materialia, 229, 115390 (2023)
- 3.Blair W. Lebert, Benjamin Bacq-Labreuil, Mark P. M. Dean, Kari Ruotsalainen, Alessandro Nicolaou, Simo Huotari, Ikuya Yamada, Hajime Yamamoto, Masaki Azuma, Nicholas B. Brookes, Flora Yakhou, Hu Miao, David Santos-Cottin, Benjamin Lenz, Silke Biermann, Matteo d'Astuto, Paramagnon dispersion and damping in doped Na<sub>x</sub>Ca<sub>2</sub>. <sub>x</sub>CuO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Physical Review B, 108 (2), 024506 (2023)
- 4.Takuya Ohmi, Iain W. H. Oswald, James R. Neilson, Nikolaj Roth, Shunta Nishioka, Kazuhiko Maeda, Kotaro Fujii, Masatomo Yashima, Masaki Azuma, Takafumi Yamamoto, Thiocyanate-Stabilized Pseudo-cubic Perovskite CH(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PbI<sub>3</sub> from Coincident Columnar Defect Lattices, Journal of the American Chemical Society, 145 (36), 19759-19767 (2023)
- 5.Masayuki Fukuda, Takumi Nishikubo, Hongwu Yu, Yoichi Okimoto, Shin-ya Koshihara, Kazunari Yamaura, Masaki Azuma, A-Site Columnar-Ordered Perovskite CaZnV<sub>2</sub>O<sub>6</sub> as a Pauli-Paramagnetic Metal, Inorganic Chemistry, 62(21), 8372-8378 (2023)
- 6.Takafumi Yamamoto, Shogo Kawaguchi, Taiki Kosuge, Akira Sugai, Naoki Tsunoda, Yu Kumagai, Kosuke Beppu, Takuya Ohmi, Teppei Nagase, Kotaro Higashi, Kazuo Kato, Kiyofumi Nitta, Tomoya Uruga, Seiji Yamazoe, Fumiyasu Oba, Tsunehiro Tanaka, Masaki Azuma, Saburo Hosokawa, Emergence of dynamically-disordered phases during fast oxygen deintercalation reaction of layered perovskite, Advanced Science, 10 (19), 2301876 (2023),

- 7.Takuma Itoh, Kei Shigematsu, Takumi Nishikubo, Masaki Azuma, Out-of-plane polarization reversal and changes in in-plane ferroelectric and ferromagnetic domains of multiferroic BiFe<sub>0.9</sub>Co<sub>0.1</sub>O<sub>3</sub> thin films by water printing, Scientific Reports,13, 7236, (2023)
- 8.Kei Shigematsu, Marin Katsumata, Takuma Itoh, Keita Ozawa, Haruki Shimizu, Keisuke Shimizu, Masaki Azuma, Magnetic domain change induced by in-plane electric polarization switching in Bi(Fe, Co)O<sub>3</sub> thin film, Advanced Physics Research, 2(12), 2200099 (2023)
- 9.Hiroshi Nakajima, Akihiro Osako, Noriharu Yodoshi, Yoshiharu Yamada, Hirofumi Tsukasaki, Ken Harada, Yuki Sakai, Kei Shigematsu, Takumi Nishikubo, Masaki Azuma, Shigeo Mori, Magnetization controlled by crystallization in soft magnetic Fe-Si-BP-Cu alloys, Microscopy, 72(4), 274-278 (2023)
- 10.Haoting Zhao, Zhao Pan, Xi Shen, Jianfa Zhao, Dabiao Lu, Jie Zhang, Zhiwei Hu, Chang-Yang Kuo, Chien-Te Chen, Ting-Shan Chan, Christoph J. Sahle, Cheng Dong, Takumi Nishikubo, Takehiro Koike, Zun-Yi Deng, Jiawang Hong, Runze Yu, Pu Yu, Masaki Azuma, Changqing Jin, Youwen Long, Antiferroelectricity-Induced Negative Thermal Expansion in Double Perovskite Pb<sub>2</sub>CoMoO<sub>6</sub>, Small, 20(2), 2305219 (2023)
- 11.Qiumin Liu, Hena Das, Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Ko Mibu, Tomoko Onoue, Takateru Kawakami, Tetsu Watanuki, Akihiko Machida, Xubin Ye, Jianhong Dai, Zhao Pan, Lei Hu, Satoshi Nakano, Masayuki Fukuda, Shiori Kihara, Koomok Lee, Takehiro Koike, Youwen Long, Masaki Azuma, Pressure-induced amorphization of Pb<sup>2+</sup> and Pb<sup>4+</sup> in perovskite PbFeO<sub>3</sub>, Chemistry of Materials, 36(4), 1899-1907 (2023)
- 12.Feiyu Qin, Lei Hu, Yingcai Zhu, Yuki Sakai, Shogo Kawaguchi, Akihiko Machida, Tetsu Watanuki, Yue-Wen Fang, Jun Sun, Xiangdong Ding, Masaki Azuma, Integrating abnormal thermal expansion and ultralow thermal conductivity into (Cd,Ni)<sub>2</sub>Re<sub>2</sub>O<sub>7</sub> via synergy of local structure distortion and soft acoustic phonons, Acta Materialia, 264(1), 119544 (2024)
- 13.Botao Gao, Zhengyang Zhou, Shiqing Deng, Koomok Lee,

Masayuki Fukuda, Lei Hu, Masaki Azuma, Hui Liu, Jun Chen, Emergent Three-Dimensional Electric Dipole Sinewave in Bulk Perovskite Oxides

Nano Letters, 24(10), 3118-3124 (2024)

14.Takafumi Yamamoto, Yuya Otsubo, Teppei Nagase, Taiki Kosuge, Masaki Azuma, Synthesis and Structure of Vacancy-Ordered Perovskite Ba<sub>6</sub>Ta<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>X<sub>2</sub>O<sub>17</sub> (X = P, V): Significance of Structural Model Selection on Discovered Compounds Inorganic Chemistry, 63(10), 4482-4486 (2024)

**15.** Takuya Ohmi, James R. Neilson, Wataru Taniguchi, Tomoya Fukui, Teppei Nagase, Yuki Haruta, Makhsud I. Saidaminov, Takanori Fukushima, Masaki Azuma, Takafumi 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>3*n*-1.5</sub>(SCN)<sub>0.5</sub> with Columnar Defects ACS Materials Letters, 6(5), 1913-1919, (2024)

16.Keita Ozawa, Yasuhito Nagase, Marin Katsumata, 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> ACS Applied Materials and Interfaces, 16(16),20930-20936(2024)

#### 【総説】

 重松 圭,清水啓佑,北條 元,東 正樹 コバルト置換ビスマスフェライト薄膜における電場 印加磁化反転,日本物理学会誌,78(12),706 (2023)

#### 2.西久保 匠

圧力下体積収縮を活かした負熱膨張物質の設計 高圧力学会誌, 33(2), 125-132 (2023)

## 3.東 正樹

巨大負熱膨張材料 BiNi1-xFexO3 とゼロ熱膨張コンポ ジット,マテリアルステージ,23(12),44-47 (2024)

## 【口頭発表】

1.Masaki Azuma,

Giant negative thermal expansion materials, International Conference on PROCESSING & MANUFACTURING OF ADVANCED MATERIALS (THERMEC2023), 7 月 3 日, Vienna

2.Yuki Sakai, Masaki Azuma,

A-site and B-site charge ordering in perovskite-type PbCoO<sub>3</sub>,

Spin-Orbital-Lattice correlations induced phenomena in

emerging materials (SOLC23),7月3日, Rome

 Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Kengo Oka, Masaichiro Mizumaki, Tetsu Watanuki, Takashi Mizokawa and Masaki Azuma,

Systematic charge distribution changes in Bi, Pb-3d transition metal perovskite oxides, Spin-Orbital-Lattice correlations induced phenomena in

emerging materials (SOLC23), 7月4日, Rome

#### 4.Hena Das,

Competing magnetic phases and spin-reorientation transitions in ortho- and hexa- ferrites, Spin-Orbital-Lattice correlations induced phenomena in emerging materials (SOLC23), 7 月 4 日, Rome

5.Masaki Azuma, Kei Shigematsu, Hajime Hojo, Keisuke Shimizu, Takuma Itoh, Ko Mibu, Magnetization reversal by electric field in Co substituted BiFeO<sub>3</sub>, Spin-Orbital-Lattice correlations induced phenomena in

emerging materials (SOLC23), 7 月 4 日, Rome

6.Hena Das, Masaki Azuma,

Understanding the mechanisms responsible for the anisotropic thermal expansion in Ca2RuO4 ruthenates through quantum mechanical calculations, The 4th International Symposium on Negative Thermal Expansion and Related Materials (ISNTE-4), 7 月 6 日, Padua

7.Yuki Sakai, Shiori Kihara, Shogo Wakazaki, Takumi Nishikubo, Masayuki Fukuda, Hena Das, Masaichiro Mizumaki, Ko Mibu, Akihiko Machida, Tetsu Watanuki, Masaki Azuma, Systematic charge distribution change in perovskite-type Bi0.5Pb0.5MO3 (*M* = 3d transition metal), The 4th International Symposium on Negative Thermal Expansion and Related Materials (ISNTE-4), 7 月 7 日, Padua

8.Takumi Nishikubo, Takashi Imai, Yuki Sakai, Masaichiro Mizumaki, Shogo Kawaguchi, Norihiro Oshime, Ayumu Shimada, Kento Sugawara, Kenji Ohwada, Akihiko Machida, Tetsu Watanuki, Kosuke Kurushima, Shigeo Mori, Takashi Mizokawa and Masaki Azuma, Domain structure observation and design of phase transitiontype negative thermal expansion materials, The 4th International Symposium on Negative Thermal Expansion and Related Materials (ISNTE-4), 7 月 7 日, Padua

#### 9.Masaki Azuma

Magnetization reversal by electric field at room temperature in Co substituted bismuth ferrite thin film, International Conference on Materials Science, Engineering and Technology, 9 月 8 日, Singapore

- 10.Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Masaichiro Mizumaki, Shogo Kawaguchi, Norihiko Oshime, Kento Sugawara, Ayumi Shimada, Kenji Ohwada, Akihiko Machida, Tetsu Watanuki, Kosuke Kurushima, Shigeo Mori, Takashi Miokawa, Masaki Azuma Domain Structure Observation and Design of Phase Transition-type PbVO<sub>3</sub> Based Negative Thermal Expansion Materials International Conference on Powder and Powder Metallurgy, 2023, Kyoto (JSPMIC2023), 10 月 18 日, Kyoto
- 11.Qiumin Liu, Hena Das, Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Ko Mibu, Tomoko Onoue, Takateru Kawakami, Tetsu Watanuki, Akihiko Machida, Masaki Azuma Phase transition of PbFeO3 under high pressure International Conference on Powder and Powder Metallurgy, 2023, Kyoto (JSPMIC2023), 10 月 18 日

#### 12.Hena Das

Designing multiferroic magnetoelectric hexagonal oxide materials

The 14th APCTP Workshop on Multiferroics, 10 月 19 日, Tokyo

13.Masaki Azuma, Kei Shigematsu, Hajime Hojo, Keisuke Shimizu Takuma Itoh Magnetization reversal by electric field at room temperature in Co substituted bismuth ferrite thin film (invited) The 14th APCTP Workshop on Multiferroics, 10 月 19 日, Tokyo

14.Koomok Lee, Kei Shigematsu, Hena Das, Naomi Kawamura, Masaichiro Mizumaki, Naoki Ishimatsu, and Masaki Azuma Emergence of weak ferromagnetism in High Spin Co<sup>3+</sup> substituted BiFeO<sub>3</sub> Materials Research Society of Japan 2023/ the International Union of Materials Research Societies 2023 (MRM2023/IUMRS-ICA2023), 12 月 13 日,Kyoto

15.Masaki Azuma

Systematic Charge Distribution Changes in Bi, Pb - 3d Transition Metal Perovskite Oxides 3rd International Symposium on Solid State Chemistry: Applications & Sustainable Development, 11 月 28 日,Panama 16.Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Masaki Azuma Unusual Charge Distribution and Physical Properties Induced By Bi, Pb 6s Electrons 3rd International Symposium on Solid State Chemistry: Applications & Sustainable Development, 11 月 29 日,Panama

(国内)

- 1.重松圭,長瀬泰仁,伊藤拓真,東正樹, 陽極酸化アルミナマスクの孔径変化による Co 置換 BiFeO3の強誘電・強磁性ドメイン変化, 第40回強誘電体会議,5月24日,京都
- 2.高橋一樹, 酒井雄樹, 西久保匠, 東正樹, PbTiO3型巨大 c/a 相 BiCoO3の負熱膨張化の試み, 粉体粉末冶金協会 2023 年度春季大会, 6 月 7 日,東京
- 3.吉田駿之介,西久保匠,酒井雄樹,東正樹, BiNiO3系負熱膨張材料の動作温度範囲の制御, 粉体粉末冶金協会 2023 年度春季大会,6月7日,東京
- 4.劉丘民, 西久保匠, 酒井雄樹, Hena Das, 壬生攻, 尾 上智子, 川上隆輝, 町田晃彦, 綿貫徹, 東正樹, PbFeO3の圧力誘起相転移, 粉体粉末冶金協会 2023 年度春季大会, 6月7日,東京
- 5.栃沢 晴希, 西久保 匠, 酒井 雄樹, 重松 圭, 東 正 樹, 山本 隆文 圧力を利用した酸水素化物におけるアニオン配列の制 御, 日本セラミックス協会第36回秋季シンポジウム,9月6 日,京都

6.西久保 匠, 今井 孝, 酒井 雄樹, 水牧 仁一朗, 河口 彰吾, 押目 典宏, 島田 歩, 菅原 健人, 大和田 謙二, 町田 晃彦, 綿貫 徹, 久留島 康輔, 森 茂生, 溝川 貴 司, 東 正樹,
PbVO3の圧力下巨大体積変化を活かした負熱膨張設計 と分域構造の観察,
日本セラミックス協会第36回秋季シンポジウム,9月7 日,京都

7.高橋 一樹, 酒井 雄樹, 西久保 匠, 東 正樹,
PbTiO3型巨大正方晶歪みを持つ BiCoO3の負熱膨張物 質化
日本セラミックス協会第36回秋季シンポジウム,9月7
日,京都

 8.長瀬 鉄平,西久保 匠,酒井 雄樹,重松 圭,東 正樹,山本 隆文, カチオン秩序型ペロブスカイト酸化物 SrV<sub>0.3</sub>Fe<sub>0.7</sub>O<sub>3</sub>の 合成と物性評価, 日本セラミックス協会第 36 回秋季シンポジウム,9月8 日,京都

9.西久保匠, 今井孝, 酒井雄樹, 水牧仁一朗, 河口彰 吾, 押目典宏, 島田歩, 菅原健人, 大和田謙二, 町田晃 彦, 綿貫徹, 久留島康輔, 森茂生, 溝川貴司, 東正樹, PbVO3の圧力下巨大体積変化を活かした負熱膨張設計 と分域構造の観察, 物理学会, 9月16日,仙台

10.酒井 雄樹, 松野 夏奈, 西久保 匠, 東 正樹
 ペロブスカイト型酸化物 PbCr<sub>1-x</sub>Ti<sub>x</sub>O<sub>3</sub> の負熱膨張
 粉体粉末冶金協会 2023 年度秋季大会, 10 月 20 日,京
 都

11.三宅 潤,小池 剛大,西久保 匠,酒井 雄樹,東 正樹 非晶質前駆体を用いた K<sub>2</sub>NiF<sub>4</sub>型負熱膨張材料の合 成および探索 粉体粉末冶金協会 2023 年度秋季大会,10 月 20 日,京 都

- 12.小野 大樹, 西久保 匠, 酒井 雄樹, 重松 圭, 東 正樹 マルチフェロイック物質 BiFeO3の4d,5d 元素置換に よる弱強磁性化粉体粉末冶金協会2023年度秋季大 会,10月20日,京都
- 13. 西久保匠, 酒井雄樹, DAS Hena, 東正樹 ペロブスカイト PbMnO3の電荷秩序状態の解明 第64回高圧討論会, 11月1日,千葉
- 14.酒井雄樹, Sergey A. Nikolaev, 西久保匠, 中島宏, 森茂 生, 町田晃彦, 綿貫徹, 沖本洋一, 松田雅昌, 東正樹 ペロブスカイト型酸化物 PbCoO3の温度誘起相転移 第 64 回高圧討論会, 11 月 1 日,千葉
- 15.劉 丘民,西久保 匠・酒井 雄樹・Hena Das・壬生 攻・尾上 智子・川上 隆輝・町 田 晃彦・綿貫 徹・東 正樹
   PbFeO3の圧力誘起相転移 第 64 回高圧討論会,11 月 3 日,千葉

16.西久保 匠, 酒井 雄樹, 大和田謙二, 押目典宏, 久留島 康輔, 森 茂生, 東 正樹 PbVO3ベース負熱膨張物質の立方晶-正方晶相間ド メイン構造の観察 (Domain Structure Observation of PbVO3 based Negative Thermal Expansion Material) 日本 MRS 年次大会, 11 月 14 日,横浜

17.重松 圭, 勝俣 真綸, 伊藤 拓真, 小澤 慶太, 清水 陽樹, 清水 啓佑, 東 正樹
 Bi(Fe, Co)O<sub>3</sub>の面内電場印加によって生じる磁気ドメイン変化の観察 (Magnetic Domain Change Induced)

by In-Plane Electric Polarization Switching in Bi(Fe, Co)O<sub>3</sub> Thin Film) 日本 MRS 年次大会, 11 月 14 日,横浜

- 18.柴田 勇介,吉田 駿之介,西久保 匠,酒井 雄樹,東 正樹
  高エントロピー効果による B サイト置換 BiNiO3 の
  負熱膨張の拡大 (Broadening Negative Thermal
  Expansion in BiNiO3 Derivative by High-Entropy Effect)
  日本 MRS 年次大会, 11 月 14 日,横浜
- 19.東 正樹, 酒井 雄樹, 西久保 匠, 岡 研吾, 山本 孟 ビスマス, 鉛-3d 遷移金属ペロブスカイト酸化物の 系統的な電荷分布変化 (Systematic Charge Distribution Changes in Bi, Pb - 3d Transition Metal Perovskite Oxides) 日本 MRS 年次大会, 11 月 14 日,横浜
- 20.三宅 潤, 小池 剛大, 池田 政仁, 西久保 匠, 酒井 雄 樹, 東 正樹 非晶質前駆体を用いた K<sub>2</sub>NiF4型負熱膨張材料の探 索 第 62 回セラミックス基礎科学討論会,1月8日,東京
- 21.小池 剛大,西久保 匠,酒井 雄樹,東 正樹
   K<sub>2</sub>NiF4 型化合物 Sr<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>・Sr<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>の高圧合成と熱
   膨張評価
   第 62 回セラミックス基礎科学討論会,1月8日,東京
- 22.HENA DAS, Masaki Azuma Mechanism of anisotropic thermal expansion phenomena in Ca<sub>2</sub>RuO<sub>4</sub> 第 62 回セラミックス基礎科学討論会、1 月 8 日.東京
- 23.酒井雄樹, Sergey A. Nikolaev, 西久保匠, 中島宏, 森茂 生, 町田晃彦, 綿貫徹, 沖本洋一, 松田雅昌, 東正樹 ペロブスカイト型酸化物 PbCoO3 の温度誘起相転移 日本セラミックス協会 2024 年年会, 3 月 16 日,熊本
- 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 BiNinxFexO<sub>2.8</sub>の構造と特異な電荷秩序 日本セラミックス協会 2024 年年会,3月16日,熊本
- 25.Hena Das, Masaki Azuma Anisotropic thermal expansion phenomena in Ca2RuO4 type systems 日本セラミックス協会 2024 年年会, 3 月 16 日,熊本
- 26.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 BiFe0.9C00.1O3ナ
ノドットの作製 2024 年第 71 回応用物理学会春季学術講演会, 3 月 23 日,東京

【特許】 (1)国内特許出願 2件 (2)国際特許出願 1件

# 研究報告2024 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

٠	総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	4
٠	・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・・・・・・・・・・・・・・・・ 7	7
٠	・腸内細菌の単離・培養法の確立及び腸内細菌の特性の解明・・・・・・・・・・・・・・ 8	0
•	•業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	4

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、構築した嫌気培養方法を用いた腸内細菌の単離および安定培養方法の確立、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への貢献が期待できる。

#### 1. 2023 年度の研究目的

2023年度は以下の3つの項目を重点項目として定めた。

(1) ヒト由来腸内細菌の単離・培養技術の確立ならびに腸 内細菌の特性の解明

ヒトの腸内細菌叢において主要な割合を占める菌は、基 準株として単離され理化学研究所バイオリソース研究セ ンターをはじめとする国内外のバイオリソースセンター 寄託されているものも多い。一方で、腸内細菌叢の中でも その割合が低く、数が少ない菌の単離・培養は困難であり、 単離・培養するための培地の工夫や新たな培養法の開発が 必要不可欠である。多くの腸内細菌は偏性嫌気性細菌に分 類され、単離・培養中に少量の酸素が混入するだけで死滅 することもある。このような特徴を持つ腸内細菌を単離・ 培養するには、培養環境中の酸素を可能な限り除去するこ とが必要である。加えて、われわれの体内には食物に由来 する多くの栄養素や未消化物が存在しており、腸内細菌は それらを栄養源として増殖している。そこで本グループに おいて培ってきた腸内細菌培地や嫌気培養法を活用し、ヒ ト便試料から有用性の高い腸内細菌の単離・培養を試みた。 さらなる腸内細菌培養方法の検討のため、本年度は新たに

腸内細菌-腸管上皮細株共培養試験を行った。これらの実 験に加え、これまでに単離・安定培養を確立した腸内細菌 の特性を見出すために、単独腸内細菌定着マウスの解析や 腸内細菌定着競合試験を行った。

(2) 標的腸内細菌を単離するためのツール開発およびその 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、 病原性大腸菌などの消化器関連疾患や代謝疾患やアレル ギー疾患に関与する腸内細菌など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採用されることが多い。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を実施し、その有効性 を評価した。

(3) 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。

## 2. 2023 度の研究成果

2023 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) ヒト由来の腸内細菌の単離・培養

これまで蓄積してきた嫌気培養法のノウハウを用いて、 ヒト便試料からの腸内細菌の単離・培養を試みた。便試料 を血液寒天選択培地プレートに播種し、嫌気チャンバー内 にてコロニーを形成させた(図 1)。プレートに形成され たコロニー群からシングルコロニーを釣菌し、液体培地内 にて培養を継続した。増殖が認められたものから DNA を 抽出し、標的細菌プライマーによる PCR 選抜を行った。 選抜されたコロニーを再度培養し、標的細菌プライマーに よる PCR による最終確認を経たのち、シークエンス解析 することで、菌種の同定を行った。本年度はヒト便試料よ り疾患への関連が示唆される 1 種類のグラム陽性菌の単 離ならびにその安定培養法の確立に成功した。



図1 ヒト便試料からの疾患関連腸内細菌の単離法の概要

腸内細菌が存在する消化管内は、腸内細菌同士の相互関 係のみならず、腸内細菌—宿主細胞の相互関係も腸内細菌 の定着に必要となる。すなわち、宿主—微生物共生系を検 討することは腸内細菌の特徴や機能を評価する上で重要 である。そこで、本年度は新たな腸内細菌培養方法として 腸管上皮細胞培養株と腸内細菌の共培養系の構築を行っ た。その結果、腸内細菌と腸管上皮細胞培養株を共培養し たところ、一部の細菌は形状が培地のみでの単独培養時と 異なる形状に変化することが明らかとなった。

これまでに作製した腸内細菌特異的抗体の機能解析か ら腸内細菌特異的抗体に使用したヒト由来腸内細菌 A は 同基準株と表面構造が異なることが示唆されていた。 そこで本年度はヒト由来腸内細菌 A が宿主に与える影響 を評価した。それぞれの腸内細菌の単独腸内細菌定着マウ スの構築し、宿主への影響を解析したが、ヒト由来腸内細 菌 A と基準株の間に大きな違いは認められなかった。一 方、腸管への定着効率を検討するため、ヒト由来腸内細菌 A と基準株によるマウス腸内への競合定着試験を実施し たところ、ヒト由来腸内細菌 A はマウスの腸内において 基準株よりも優勢になることが明らかとなった。

(2) 標的腸内細菌単離に向けたツールの開発とその応用利用法の検証

多種多様の腸内細菌から構成される腸内細菌叢から標 的となる細菌を単離・培養するには、選択培地や特定の基 質を添加した培地による培養を経る必要がある。そこで、 より効率良く標的細菌のみを単離・濃縮する方法を検討す るツールとして抗体に着目した。抗体は抗体産生細胞が産 生する糖タンパク分子で、特定の分子を認識して結合する 働きを担う。実際に生体内に侵入した外来抗原を認識し、 排除する機構にも抗体は関与している。腸内細菌を認識す る抗体の作製は過去にも報告はあるが、その特異性は低く 分類学的に類似の腸内細菌も認識してしまうなどの課題 があった。このような課題を解決するために本グループ独 自の抗体作製法を用い、腸内細菌に対する抗体の作製を試 みた。本年度も引き続き疾患に関連するグラム陰性菌に発 現するタンパク質(タンパク質 X)に対する抗体の作製を 行った。タンパク質 X を発現する標的細菌、細菌破砕溶 液、および細菌培養上清を使用し、得られた抗体の機能を 検討した。その結果、作製した抗体は標的タンパク質を持 つ、幅広い疾患関連細菌を認識できるだけでなく、標的タ ンパク質を有さない同属の細菌には交差反応を示さなか った。次に作製した抗体の応用利用法の検討を実施するた めに、標的タンパク質 X を添加したヒト便懸濁液から作 製した抗体を活用し、標的タンパク質 X が検出できるか どうかの検討を行った。その結果、ELISA で便に添加した 標的タンパク質 X を検出することができた。また、作製 した抗体はウェスタンブロット法にも適用できることも 明らかとなった。

(3) 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。本年度は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。その結果、血中 のワクチン抗体価は、ワクチン接種後日数に依存して抗体 価は低下したが、接種直後でも抗体価が低い人や接種半年 後でも抗体価が維持されている人など個人ごとに大きく 異なることが明らかとなった。また新型コロナウイルスワ クチンと食、および腸内環境の関連性を調べたところ、ヨ ーグルトの習慣的な摂取が抗体価の上昇や維持、抗原特異 的 T 細胞の活性化と相関すること、ヨーグルトの習慣的な 摂取が腸内細菌叢や代謝物質を変化させることが明らか となった (図2)。



(A) ヨーグルト摂取がコロナワクチン投与に与える影響
 URL:<u>https://www.kistec.jp/aboutus/press/pr20231130-2/</u>

## (B) ヨーグルトの摂取頻度と腸内環境の相関解析結果

#### 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 の成果や課題の共有し、共同研究の進め方を議論しながら 進めた。

#### 4. 総括

本グループは腸内環境制御基盤技術の構築への礎とな る腸内細菌に関する新たな知見の取得、制御技術・ツール の開発を実施している。特に個々の腸内細菌の特性を理解 するため、一つでも多くの腸内細菌を単離・培養するため の手法の開発に注力し、その方法を活用することで腸内細 菌の単離・安定培養法の確立を進めている。本年度はヒト 便試料より新たに1種類の疾患への関連が示唆される腸 内細菌を単離、安定培養することに成功した。また腸管上 皮細胞株と腸内細菌の共培養系の構築し、宿主一微生物共 生系の解析のための有効なツールとなる可能性を見出せ た。これまでに見出してきた有用性の高い腸内細菌につい ては、引き続き腸内細菌単独定着マウスの構築や、腸内細 菌の投与実験により、腸内細菌の特性や宿主に及ぼす影響 を評価する。

腸内環境制御基盤術構築に向けたツールの一つとして、 腸内細菌特異的抗体の作製に着手し、独自に見出した作製 法を利用することで、本年度は疾患に関連するグラム陰性 菌に発現するタンパク質を標的とする抗体の応用利用法 の検討を行い、ELISA やウェッスタンブロット法にて標的 タンパク質を検出することができた。昨年度までに構築し た、PCR を用いた疾患関連タンパク質の簡易検出法と組み 合わせることで、新規特定疾患診断法の開発に繋げる。今 後も、これまでに蓄積した腸内細菌の基礎データの中から、 機能性食品開発への応用や創薬の標的として活用するこ とができる腸内細菌に対する抗体の作製を引き続き進め、 腸内環境制御基盤技術開発ツールとして活用する。

昨年度よりアフターコロナを見据え、産官学共同で新型 コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクトを開始した。 今年度の研究成果から新型コロナウイルスワクチン、食、 腸内環境は密接に関連していることが示唆された。今後解 析予定の200名のデータも加え、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更に検討を進 める。これらの研究成果を元に、免疫機能を高めるような サプリメントや食品開発などを行い、食を基盤としたアフ ターコロナ時代に求められる感染症に強い身体作りを実 現する。

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. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: form 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).

## 腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの開発

## 1. はじめに

ヒトの腸管内に生育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など)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る。プロバイオティクスを含む製品 や食品の摂取は、腸内環境を整え、宿主に良い影響をも たらす。その一方で、生活習慣の乱れやストレスなどに より腸内細菌叢が撹乱されると、腸内細菌叢より産生さ れる代謝物質が疾患の発症などに関与することも知られ ている。機能性食品やプロバイオティクス、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、ヨ ーグルトや発酵食品等の機能性食品の摂取が一般に浸透 しており、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、機能性食品を摂取している間は便中から機能性食品 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、機能性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 うに有用菌が腸内に定着する、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。臨床的面においては、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。

「腸内環境デザイン」グループ 大縄悟志、中藤学、井上浄

## (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B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の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 た。昨年度は疾病の新規診断法開発へと枠を広げ、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的検出に ついて評価を行い、今年度も引き続き抗体の機能評価と 解析を行う。

#### 2. 実験と結果

(1) 特定疾患関連細菌検出に向けたタンパク X 標的 抗体の機能評価

## (1-1) FACS による抗タンパク X 抗体と特定疾患関 連細菌の交差反応の検討

昨年度までに作製した特定疾患時に増加が認められ る細菌由来タンパク(以下、タンパクXと仮称する)に 対する抗体の最終クローンの評価を実施した。はじめに 口腔由来細菌基準株8種、単離株2種ならびに非口腔由 来細菌4種に対して抗体が交差反応を示すかフローサイ トメーターにより検討した。その結果2つのクローンに おいて2種の細菌に対する交差反応が認められたが、そ の他の細菌に対しては交差反応は認められなかった(図 1、表1)。



図1(上)、表1(下) FACS による抗タンパク X 抗体と特定疾 患関連細菌の交差反応の検討

## (1-2) ELISA による抗タンパク X 抗体と特定疾患関 連細菌由来タンパク質との交差反応の検討

次に特定疾患関連細菌の破砕分画、膜分画を用いた ELISAによる交差反応の検討を実施した。すべてのクロ ーンにおいて免疫抗原であるタンパクXに対する高い交 差反応があり、ネガティブコントロールタンパク質であ る複数種の非口腔由来細菌タンパク質混合液への交差性 はなかった一方で、FACSの結果とは異なり、口腔由来タ ンパクタンパク質に対する交差反応はクローン2を除く すべてのクローンで見られた。中でもクローン1、3、 4、5は特定疾患由来細菌由来タンパク質を含むすべての 口腔由来細菌に対して交差反応を示した。(表 2)

タンパク質							
クローン	A	В	c	D	E	F	G
1	0	×	0	0	0	0	△(0.825)
2	0	×	△(0.438)	△(0.484)	△(0.484)	0	×
3	0	×	0	0	0	0	△(0.974)
4	0	×	0	0	0	0	0
5	0	×	0	△(0.889)	0	0	0
6	0	×	×	×	×	×	×
7	0	×	0	△(0.425)	0	×	△(0.777)

表 2 ELISA による抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌由来 タンパク質との交差反応の検討

## (1-3) 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による特 定疾患関連細菌培養上清に含まれるタンパク X

#### の検出

タンパク X は細菌の表層に発現するだけでなく、細菌 外への分泌されている。そこで特定疾患関連細菌の培養 上清中に含まれるタンパク X が作製した抗体により検出 できるかどうかの検討を実施した。特異的疾患関連細菌 と特的疾患患者由来細菌を用いて検討したところ、培養 上清を直接添加した場合でもタンパク X を検出すること ができた。また、薬剤処理による濃縮を実施することで



## 図 2 特定疾患関連細菌培養上清中に含まれるタンパク X の検 出結果

次に口腔由来および非口腔由来特定疾患関連細菌に対 する交差反応の検討を行なった。その結果、クローン3 はすべての口腔由来特定疾患関連細菌由来の培養上清中 に含まれるクローンXを検出することができ、実用化へ 有用なクローンであることが見出された。また、クロー ン1と2についても全てではないものの、ほとんどの口 腔由来特定疾患関連細菌由来の培養上清中からクローン Xを検出することができた。一方で、クローン4 は交差 反応性が低かった(表 3)。

10.00	クローン						
ma (84	1	2	3	4			
1	0	0	0	×			
2	0	0	0	$\triangle$			
3	0	0	0	×			
4	0	0	0	×			
5	0	0	0	0			
6	×	×	0	0			
7	0	0	0	$\triangle$			
8	×	×	0	×			
9	0	0	0	×			
10	0	0	0	$\triangle$			
11	0	0	0	0			
12	×	×	0	×			
-13	- F -						
14		*	*	8			
15	×	×	*	~			
16	×.	×	<i>w</i>	×			
◎: OD=>2.0, ○: OD=1.0-2.0, △: OD=0.1-1.0, ×: OD<0.1 禄·非□防由来特定疾患関連細葉							



特定疾患関連細菌の単離方法については共同研究先大 学と連携し、4つの抗生物質を組み合わせた培地による 選択方法が有用であることを見出した。

## (1-4) 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による 便懸濁液に含まれるタンパク X の検出

得られた抗体を用いてヒト便懸濁液からタンパク X が 検出できるかどうか検討した。健常者と特定疾患患者由 来の便から便懸濁液を調製し、便懸濁液と便懸濁液にタ ンパク X を添加したサンプルを用いて ELISA による検出 を行った。その結果、タンパク X を添加した便懸濁液か らはタンパクXを検出することができた。一方で、未添 加の便懸濁液からは健常者ならびに特定疾患患者のどち



らからもタンパク X が検出されなかった(図 3)。

図 3 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による便懸濁液に含 まれるタンパク X の検出結果

## (1-5) 抗タンパク X 抗体によるウェスタンブロッドによるタンパク X の検出

ELISA による検出において特定疾患患者由来の便から タンパク X が検出できなかった要因の一つとして、タン パク X 自体が便中に含まれる何らかの因子によりマスク されており、抗体による検出ができなくなっている可能 性が示唆された。そこで、ウェスタンブロット法による 検出法の構築を行った。はじめに、タンパク X がどのく らいの濃度まで検出できるかの検討を行い、0.8 ng まで 検出できることを見出した。また、特定疾患関連細菌の 細菌破砕溶液を用いて同様の検討を行った。その結果、 タンパク X を持つ細菌破砕溶液では 0.1 μg まで検出可能 であった(図 4,A)。一方で、非口腔由来特定疾患関連細 菌である細菌破砕溶液からはシグナルが検出されなかっ た(図 4,B)。



図4 抗タンパクX抗体によるウェスタンブロッドによるタン パクXの検出(A)タンパクX組み換えタンパク質の検出限界の 検討(B)特定疾患関連細菌破砕溶液からのタンパクXの検出結 果

#### 3. 考察及び今後の展望

本年度の研究成果より特定疾患関連細菌に発現するタ ンパクXに対する抗体の構築並びにその機能解析が完了 した。そこで今後は抗体や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を実施する。具 体的には、ELISAやウェスタンブロットを用いた便懸濁 液からのタンパクXの検出法の開発およびPCRによる 口腔内特定疾患関連細菌と非口腔内特定疾患関連細菌の 判別法の開発を行い、研究成果の知財化を行う。また有 用性が高い抗体を産生する2つのハイブリドーマについ ては抗体可変領域配列解析および腹水化による抗体の取 得を行う。本年度に引き続き、特定疾患患者便検体から 抗体の機能評価に使用するための特定疾患関連細菌の単 離および安定培養法を確立する。

## 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。

本研究の一部は、JST 戦略的創造研究推進事業により 実施しました。

## 【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).

3. 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).

4. 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 feacal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. Lancet. Mar 25;389(10075):1218-1228 (2017).

## 1. はじめに

ヒトを含む哺乳類は、生後すぐに外部の環境に曝され ることにより微生物との共生関係が始まる。体内にありな がら外界とも繋がる消化管内も例外ではない。ヒトの腸管 にはおよそ1000 種類、38 兆個もの腸内細菌が生息してお り、地球上のあらゆる環境の中で最も生息密度が高い場所 である(参考文献1)。腸内細菌同士は共生したり、生存 競争をしながら一定のバランスを保っている。腸内細菌の 集団は腸内細菌叢と呼ばれ、食生活の変化が大きい乳幼児 期では変動も大きくなるが、成人になるにつれ日々の食事 や生活様式により多少の変動はあるものの、腸内細菌叢は 安定した状態となる(参考文献2)。

#### (1) 腸内細菌叢が宿主に与える影響

宿主と共存関係を構築している腸内細菌叢は宿主に有 益な効果をもたらしている。我々は呼吸や飲食を通じ、常 に外来抗原が体内へと侵入するリスクを抱えている。腸内 細菌叢は消化管内に侵入してきた外来抗原が体内に侵入 するのを防ぐのみならず、腸管内への定着を防ぐ役割を果 たしている。また、腸内細菌は食物由来の未消化物を栄養 源として発酵分解し、その際に代謝物質である低分子を菌 体外に放出する。腸内細菌叢由来代謝物質は腸管上皮細胞 のエネルギー源となるだけではなく、腸管上皮同士の結合 の強化にも寄与し腸管上皮細胞の恒常性維持にも重要な 役割を果たしている(参考文献3)。更に、一部の腸内細 菌由来代謝物質は宿主の免疫機能を活性化する。例えば、 腸内細菌叢を構成する主要な細菌群の一種であるクロス トリジウム目細菌群が食物繊維を代謝発酵し産生する酪 酸は、炎症やアレルギーの起因となる過剰な免疫応答を抑 制する細胞である制御性 T 細胞の分化誘導を促進すると いった重要な役割を果たしている(参考文献4、5)。ま た、ビフィズス菌により産生される酢酸が腸管バリア機能 を強固にし、腸管感染症を予防することや、酢酸により誘 導される免疫グロブリンA (IgA) が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防ぐこと も明らかとなっている(参考文献6、7)

一方、ストレスや生活習慣の乱れにより腸内細菌叢のバ ランスが崩れること(ディスバイオーシス)が疾病につな がることも知られている。実際に腸内細菌叢の乱れが大腸 がんや大腸炎などの消化器関連疾患のみならず、糖尿病、 動脈硬化、自閉症、アレルギー疾患など多岐にわたる疾患 の発症にも関連することが報告されている(参考文献8)。 また、ディスバイオーシス時の腸内細菌叢由来の代謝物質 も、これらの疾患を引き起こす要因となっている。ゆえに、 「腸内環境デザイン」グループ 中藤学、大縄悟志、井上浄

腸内細菌叢をはじめとする腸内環境を適切な状態に保つ ことは病気を防ぎ、健康維持に重要となる。

#### (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 経時変化については多く知見が得られている。また、前述 したように腸内細菌叢由来代謝物質は宿主の健康維持に 重要な要素となっているのみならず、様々な疾患とも深く 関わることが明らかになってきた。そのため個々の腸内細 菌の特性や腸内細菌由来代謝物質を理解することは健康 維持ならびに疾患を予防するために重要となる。メタボロ ーム解析などにより疾患時などおいて変化する代謝物質 は明らかとなっているが、それらの代謝物質が腸内細菌叢 を構成するどの腸内細菌由来によるものであるかについ ては、不明な点が多い。個々の腸内細菌における研究報告 数が少ない一番の要因は、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。腸内細菌の多くが偏性嫌 気性細菌に分類されており、わずかな酸素の混入により生 育が阻害されてしまう。脱酸素剤などを利用した簡易嫌気 環境の構築やグローブボックスなどの嫌気培養装置を利 用した腸内細菌の培養法の開発が進んでいるものの、依然 として単離・培養が困難な腸内細菌が数多く存在している。

## (3) 腸内環境制御基盤技術の構築に向けて

腸内細菌業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に有効な手段となる。 このような基盤技術を構築するためには、以下に示す課題 に取り組む必要がある。

- 1. 腸内細菌の安定培養方法の確立ならびにヒトや マウスからの有用性の高い腸内細菌の単離
- 腸内細菌の特性の解明ならびに宿主に与える影響の評価
- 3. 腸内細菌研究ツールの開発およびその評価

個々の腸内細菌がもつ特徴を明らかにすることや、それ らの安定培養方法のノウハウの蓄積は、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

本年度はヒト便試料からの腸内細菌の単離およびその 安定培養方法の確立、有用性の高い腸内細菌の特性の解明 ならびに新たな腸内細菌培養方法の検討を実施した。 (1)とト由来腸内細菌の単離および安定培養法の確立 これまでに蓄積してきた嫌気培養技術と腸内細菌選択培地 を組み合わせることで、腸内環境制御基盤技術への応用が期 待される腸内細菌の単離ならびにその安定培養方法を確立 した。

標的となる腸内細菌が多く含まれる便懸濁溶液を血液寒天 培地に播種し、嫌気環境下においてコロニーを形成させた。 24-48 時間後に形成されたコロニー群からシングルコロニ ーを釣菌し、液体 GAM 培地に植菌、PCR により標的細菌 であるかどうか検討した。選択された標的細菌コロニーを 再度、血液寒天培地、液体 GAM 培地にて嫌気環境下で培 養した。その中から増殖が認められたものは DNA を抽出 し、その配列を 16S rRNA 遺伝子増幅用ユニバーサルプラ イマーで遺伝子増幅した後にシークエンス解析を実施し、 菌種の同定を行った(図 1、A)。その結果、本年度は疾患 との関連性が示唆されている 1 種類、計 5 菌株のグラム陰 性菌の単離・培養に成功した(図 1、B)。



図 1 本年度ヒト便試料より単離した疾患との関連が示唆される 腸内細菌の単離方法(A)とグラム染色画像(B)

#### (2) 腸内細菌の特性の解明

本グループにおいて、これまでにヒト由来腸内細菌 A (以下細菌 A)に対する細菌特異的抗体を作製し、標的腸 内細菌を含む腸内細菌混合液から標的となる腸内細菌を 分離濃縮する手法の確立を実施してきた。昨年度までに、 細菌 A は同腸内細菌基準株(以下基準株)と異なる表層 構造を持つことを明らかにした。そこで本年度は、細菌 A の特性の解明ならびに宿主への影響についての解析を実 施した。

はじめに宿主へ与える影響を評価するために無菌マウ ス、単独腸内細菌定着マウスの構築を行なった。無菌マウ スに細菌 A 及び基準株を投与して定着させ 4 週間維持し た後、腸管組織、血液、盲腸内容物ならびに便を採取した。 便中の IgA を測定したところ、細菌 A と基準株を定着さ せた単独腸内細菌定着マウスにおいて有意な差はなかっ た。

次に宿主への影響の評価の一つとして、腸管への定着に ついて検討するために、細菌 A と基準株の競合試験を実 施した。競合試験では共投与したどちらの腸内細菌が定着 したかを判断する必要がある。これまでに構築した腸内細 菌特異的抗体を用い検討することも可能ではあったが、菌 数測定にて正確に定量するために細菌 A と基準株のゲノ ム情報を比較し、それぞれに特徴的な配列部分を見出すこ とで、それぞれの腸内細菌を検出可能な特異的プライマー を設計した。それぞれの細菌から DNA を抽出し、作成し たプライマーにて PCR を行なった。その結果、設計した プライマーはそれぞれ標的となる腸内細菌を判別するた めに使用できることが明らかとなった(図2)。

基準核検出プライマー				0.22	1.00	dian -	
A THE FW CAC CAT CAC CTA CCA GAG CO		基準接換出プライマー			ヒト由未満内線営A核出フライマー		
SAM RY ITTO GTO ACO ACO OTO TAG TO	1			1.000	-		
ヒト由未開内相関A(細菌A)検出プライマー	100				_		
上上由未開内相関A FW AAC GAG GCA GGC AAC ACT AA	32.09.65	10 MA	HO	35.10.05	1000	HO	
E F由朱編內編集A RV TOT AGT COG TCG TGT ATT GTC C	80-4-5A	No. 101-1	1120	02-49-5A	961014	1120	

図2 競合定着試験に向けた腸内細菌検出用プライマーの検討

次に、細菌 A と基準株を無菌マウスに共投与し、腸管 内での定着を比較した(図3、A)。作成した菌特異的プラ イマーを用いて定量 PCR を行ったところ、細菌 A はマウ スの腸内において基準株よりも優勢になることが明らか となった(図3、B)。



図3競合試験による腸内定着の評価

(A) 競合定着試験の概要(B) 腸内細菌 A と基準株の競合定着試験の結果。log10 競合指数(腸内細菌 A DNA 量÷基準株 DNA 量)
 を示す。\*p < 0.05 \*\*\*p < 0.001。</li>

### (3)新たな腸内細菌培養方法の検討

腸内細菌は宿主の消化管内の限られた生存領域を確保 しており、宿主由来の代謝物質の利用も消化管内への定着 に重要な役割を果たしていることが示唆され、宿主---微生 物共生系を検討することは腸内細菌の特性を理解する上 で重要となる。そこで本年度はこれまで培ってきた腸内細 菌培養技術と腸管上皮培養細胞を組み合わせることで、宿 主-微生物共生系の検討を実施した。細胞培養用のトラン ズウェル上に腸管上皮細胞培養株を播種し 3-4 週間ほど 細胞培養用培地にて培養を行い、極性を形成させた。次に 図 4A に示すように、トランズウェル下部には細胞培養用 培地、上部には細菌培養用培地ならびに腸内細菌を添加し、 嫌気環境下で48-72時間、37℃にて共培養を行った。共培 養後にトランズウェル内培地を回収し、グラム染色を行っ た。いくつかの腸内細菌について本培養方法を用いて共培 養したところ、共培養あり、なしにおいて腸内細菌の形状 に変化はなかったが、興味深いことに一部の細菌は腸管上 皮細胞培養株と共培養すると形状が変化することが明ら かとなった(図4B)。



## 図4 腸内細菌と腸管上皮細胞培養株の共培養の検討

(A) 共培養の概略図、Biorender を用いて作成(B) 共培養後の腸内細菌のグラム染色画像、腸内細菌 X および Y は共培養後に細菌の形状が変化した。

## 3. 考察及び今後の展望

本年度はこれまでに培ってきた嫌気培養法を用い、ヒト 便試料から疾患への関与が示唆される腸内細菌を単離し、 安定培養することができた。本年度分離された疾患関連細 菌は理化学研究所バイオリソース研究センターに寄託さ れている基準株と特性を比較したところ細菌の構造の一 部に違いがあることが示唆された。そこで今後は全ゲノム 解析を実施することで、本細菌の特性を明らかにする。今 後は、腸内細菌単独定着マウスを構築することで、代謝物 質の網羅的解析、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を検討す ることで疾患との関連性を評価する。

昨年度、腸内細菌 A が同種の腸内細菌を含む多くの腸 内細菌とは異なり本来細胞内に存在する酵素 X を表層に 発現し、それを細胞外へと放出することを見出した。本酵 素は細胞内において代謝物質の産生を触媒する酵素であ るが、本機能以外にも、細菌の接着にも関与する報告もあ った。そこで、本年度は細菌 A が宿主へ与える影響を評 価した。細菌 A もしくは基準株単独腸内細菌定着マウス 解析では宿主側で大きな変化は認められなかった。一方で、 無菌マウスを用いた細菌 A と基準株の競合試験では細菌 A が腸内への定着に優位性を持つことを明らかにした。本 年度の解析からは酵素 X の発現箇所の差異が腸内への定 着に直接寄与しているかどうかまでは明らかにできなか ったが、今後は酵素 X が関連するかどうか検討する。

新たな腸内細菌培養方法の検討では、腸内細菌培養技術 と腸管上皮培養細胞株を組み合わせることで、宿主一微生 物共生系の検討を実施し、いくつかの腸内細菌は共培養す ることで細菌の形状が変化することを見出した。本結果は 腸管上皮細胞培養株から供給される栄養素、腸内細菌自体 の増殖効率や環境が変化することにより生じていること が示唆された。腸管上皮細胞培養株と腸内細菌の共培養は 腸内細菌の単独培地培養と比較すると、より宿主一微生物 共生系に近い状態となっている可能性もあり、腸内細菌が 実際に腸管に定着している状況を捉えられる可能性もあ る。これらのことから本培養方法は今後、腸内細菌の特性 を知る上での重要な研究手法の一つになることが期待さ れる。

## 4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、腸内細菌の分離、新規培養技術 の構築では慶應義塾先端生命科学研究所の楊佳約博士、筑 波大学トランスボーダー医学研究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., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.Z., Abe, F., Osawa, R., Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 25:16:90, (2016).

3 Okada, T., Fukuda, S., Hase, K., Nishiumi, S., Izumi, Y., Yoshida, M., Hagiwara, T., Kawashima, R., Yamazaki, M., Oshio, T., Otsubo, T., Inagaki, O. K., Kakimoto, K., Higuchi, K., Kawamura, Y. I., Ohno, H., Dohi, T. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 4: 1654, (2013).

4<sup>†</sup>Furusawa, Y., <sup>†</sup>Obata, Y., <sup>†</sup>\*Fukuda, S. (<sup>†</sup>co-first and \*corresponding author), Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., <sup>†</sup>\* Hase, K., \* Ohno, H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450, (2013).

5 Atarashi, K., Tanoue, T., Suda, W., Oshima, K., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S.W., Fritz, J.V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., Honda, K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500: 232-236, (2013).

6 Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J., Topping, D., Suzuki, T., Taylor, T., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547 (2011).

7 Takeuchi, T. Miyaichi, E., Kaynaya, T., Kato, T., Nakanishi, Y., Watanabe, T., Kitami, T., Taida, T., Sasaki T., Negishi, H., Shimamoto, S., Matsuyama, A., Kimura, I., Williams, I., Ohara, O., Ohno, H. Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria. *Nature* 595, 560-564 (2021).

8 Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., Finlay, B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* Jul;90(3):859-904. (2010).

## 業績

## 【原著論文】

(投稿掲載)

- Lin YH, Tahara-Hanaoka S, Obana N, <u>Fukuda S</u>, Shibuya A. An inhibitory immunoreceptor Allergin-1 regulates the intestinal dysbiosis and barrier function in mice. *Int Immunol.* 2024 in press.
- Song I, Yang J, Saito M, Hartanto T, Nakayama Y, Ichinohe T, <u>Fukuda S\*</u>. Prebiotic inulin ameliorates SARS-CoV-2 infection in hamsters by modulating the gut microbiome. *npj Sci. Food.* 8: 18, 2024.
- Yamauchi Y, Masutomi H, Ishihara K, Hartanto T, Lee CG, <u>Fukuda S\*</u>. The differential effect of two cereal foods on gut environment: a randomized, controlled, double-blind, parallel-group study. *Front. Nutr.* 10: 1254712, 2024.
- Matsuzaki J, Kurokawa S, Iwamoto C, Miyaho K, Takamiya A, Ishii C, Hirayama A, Sanada K, <u>Fukuda S</u>, Mimura M, Kishimoto T, Saito Y. Intestinal metabolites predict treatment resistance of patients with depression and anxiety. *Gut Pathog.* 16: 8, 2024.
- Tsukimi T, Obana N, Shigemori S, Arakawa K, Miyauchi E, Yang J, Song I, Ashino Y, Wakayama M, Soga T, Tomita M, Ohno H, Mori H, <u>Fukuda S</u>\*. Genetic mutation in *Escherichia coli* genome during adaptation to the murine intestine is optimized for the host diet. *mSystems*, 20:9(2): e0112323, 2024.
- Tanaka A, Sanada K, Miyaho K, Tachibana T, Kurokawa S, Ishii C, Noda Y, Nakajima S, <u>Fukuda S</u>, Mimura M, Kishimoto T, Iwanami A. The relationship between sleep, gut microbiota, and metabolome in patients with depression and anxiety: A secondary analysis of the observational study. *PLoS One* 18: e0296047, 2023.
- Kawamata T, Wakimoto A, Nishikawa T, Ikezawa M, Hamada M, Inoue Y, Kulathunga K, Salim FN, Kanai M, Nishino T, Gentleman K, Liu C, Mathis BJ, Obana N, <u>Fukuda S</u>, Takahashi S, Taya Y, Sakai S, Hiramatsu Y. Natto consumption suppresses atherosclerotic plaque

progression in LDL receptor-deficient mice transplanted with iRFP-expressing hematopoietic cells. *Sci. Rep.* 13: 22469, 2023.

- Nishimoto Y, Salim F, Yamauchi Y, Mori Y, Murakami S, Suzuki A, <u>Fukuda S</u>, Yamada T. Kale improves bowel movements in constipated women and affects some intestinal microbes and metabolites: a pilot study. *Front. Nutr.* 10: 1247683, 2023.
- Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Okazaki Y, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, <u>Fukuda</u> <u>S</u>, Kiers ET, Toju H. Metagenomic analysis of ecological niche overlap and community collapse in microbiome dynamics. *Front. Microbiol.* 14: 1261137., 2023.
- Oshibuchi K, Yang J, Obana N, <u>Fukuda S</u>, Arakawa K. Complete genome sequence of *Solobacterium moorei* JCM 10645T isolated from a human stool sample. *Microbiol. Resour. Announc.* e0096523, 2023.
- Nishimoto Y, Salim F, Yama K, Kumagai K, Jo R, Harada M, Maruyama Y, Aita Y, Fujii N, Inokuchi T, Kawamata R, Sako M, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Mori Y, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, <u>Fukuda</u> <u>S</u>\*. Integrated analysis of the oral and intestinal microbiome and metabolome of elderly people with more than 26 original teeth: a pilot study. *Front. Microbiol.* 14: 1233460, 2023.
- Wang Y, Morishima T, Sezaki M, Sato R, <u>Nakato G</u>, <u>Fukuda S</u>, Kobiyama K, Ishii KJ, Li Y, Takizawa H. *Akkermansia muciniphila* induces slow extramedullary hematopoiesis via cooperative IL-1R/TLR signals. *EMBO Rep.* 2023 Oct 23:e57485. doi: 10.15252/embr.202357485. Epub ahead of print. PMID: 37870318.
- Zhu X, Sakamoto S, Ishii C, Smith MD, Ito K, Obayashi M, Unger L, Hasegawa Y, Kurokawa S, Kishimoto T, Li H, Hatano S, Wang TH, Yoshikai Y, Kano SI, <u>Fukuda S</u>, Sanada K, Calabresi PA, Kamiya A. Dectin-1 signaling

on colonic  $\gamma\delta$  T cells promotes psychosocial stress responses. *Nat Immunol.* 2023 Apr;24(4):625-636.

 Kawamoto S, Uemura K, Hori N, Takayasu L, Konishi Y, Katoh K, Matsumoto T, Suzuki M, Sakai Y, Matsudaira T, Adachi T, Ohtani N, Standley DM, Suda W, <u>Fukuda S</u>, Hara E.

Bacterial induction of B cell senescence promotes agerelated changes in the gut microbiota. *Nat Cell Biol.* 2023 Jun;25(6):865-876.

- Morita H, Kano C, Ishii C, Kagata N, Ishikawa T, Hirayama A, Uchiyama Y, Hara S, Nakamura T, <u>Fukuda</u> <u>S\*.</u> *Bacteroides uniformis* and its preferred substrate, αcyclodextrin, enhance endurance exercise performance in mice and human males. *Sci Adv.* 2023 Jan 25;9(4):eadd2120.
- Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Okazaki Y, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, <u>Fukuda</u> <u>S</u>, Kiers ET, Toju H. Facilitative interaction networks in experimental microbial community dynamics. *Front Microbiol.* 2023 Apr 11;14:1153952.
- Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Iwayama K, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, <u>Fukuda S</u>, Kiers ET, Toju H. Alternative stable states, nonlinear behavior, and predictability of microbiome dynamics. *Microbiome.* 2023 Mar 29;11(1):63.
- Nagai M, Moriyama M, Ishii C, Mori H, Watanabe H, Nakahara T, Yamada T, Ishikawa D, Ishikawa T, Hirayama A, Kimura I, Nagahara A, Naito T\*, <u>Fukuda</u> <u>S\*</u>, Ichinohe T\*. High body temperature increases gut microbiota-dependent host resistance to influenza A virus and SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.* 2023 Jun 30;14(1):3863.
- Kure A, Tsukimi T, Ishii C, <u>Aw W</u>, Obana N, <u>Nakato G</u>, Hirayama A, Kawano H, China T, Shimizu F, Nagata M, Isotani S, Muto S, Horie S, <u>Fukuda S\*</u>. Gut environment changes due to androgen deprivation therapy in patients with prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2023

Jun;26(2):323-330.

- <u>Tanaka K</u>, Tanigawa N, Song I, Komatsu T, Kuriki Y, Tanaka Y, Fukudo S, Urano Y, <u>Fukuda S\*</u>. A protease activity-based machine-learning approach as a complementary tool for conventional diagnosis of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Front Microbiol.* 2023 Jul 7;14:1179534.
- Nishimoto Y, Fujisawa K, Ukawa Y, Kudoh M, Funahashi K, Kishimoto Y, <u>Fukuda S\*</u>. Effect of urolithin A on the improvement of vascular endothelial function depends on the gut microbiota. *Front Nutr.* 2023 Jan 5;9:1077534.
- 22. Tanaka Y, Yamashita R, Kawashima J, Mori H, Kurokawa K, Fukuda S, Gotoh Y, Nakamura K, Hayashi T, Kasahara Y, Sato Y, <u>Fukuda S</u>. Further notice of omics profiles of fecal and oral microbiota change in irritable bowel syndrome patients with diarrhea and symptomexacerbation.

J Gastroenterol. 2023 Apr;58(4):427-428.

- 23. Yama K, Nishimoto Y, Kumagai K, Jo R, Harada M, Maruyama Y, Aita Y, Fujii N, Inokuchi T, Kawamata R, Sako M, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, <u>Fukuda S\*</u>. Dysbiosis of oral microbiome persists after dental treatment-induced remission of periodontal disease and dental caries. *mSystems*. 2023 Sep 12:e0068323
- Nishimoto Y, Kawai J, Mori K, Hartanto T, Komatsu K, Kudo T, <u>Fukuda S\*</u>. Dietary supplement of mushrooms promotes SCFA production and moderately associates with IgA production: A pilot clinical study. *Front Nutr.* 2023 Jan 9;9:1078060.

## 【口頭発表】

- 福田真嗣 腸内細菌を医薬品に:腸内環境層別化による新たな医療・創薬・ヘルスケア、日本薬学会第 144 回 年会、パシフィコ横浜(神奈川)、2024 年 3 月 29 日
- <u>福田真嗣</u> 食がもたらす腸内細菌叢の多重安定性と その機能、第71回日本生態学会大会、横浜国立大学 (神奈川)、2024年3月19日
- <u>Nakato G</u>, Inoue H, <u>Onawa S</u>, <u>Agematsu H</u>, Obana N, Furukawa R, <u>Inoue J</u> and <u>Fukuda S</u>. Development of

bacteria-specific antibody for isolation of target bacteria and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules. 日本農芸化学会 2024 年度東京大会、東 京農業大学 世田谷キャンパス(東京) 2024 年 3 月 26 日

- 祖田真嗣 マウス腸内適応時の大腸菌遺伝子変異と 食事との関連、第46回日本分子生物学会年会、オン ライン開催、2023年11月29日
- <u>福田真嗣</u> 腸内環境に基づく層別化医療・創薬・ヘル スケア産業の創出、第 10 回 JCR ベーシックリサーチ カンファレンス、富士ソフトアキバプラザ(東京)、2023 年 11 月 25 日
- <u>福田真嗣</u> 腸内環境層別化による新たな医療・ヘルス
   ケア、第 63 回日本臨床化学会年次学術集会、御茶ノ
   ホソラシティーカンファレンスセンター(東京)、2023 年
   10 月 28 日
- 福田真嗣 腸内環境層別化による新たな医療・ヘルス ケア、第 25 回日本神経消化器病学会、京王プラザホ テル(東京)、2023 年 9 月 29 日
- 楊佳約、尾花望、<u>中藤学</u>、野村暢彦、<u>福田真嗣</u>腸管 粘膜関連細菌が宿主健康に与える李教、日本遺伝学 会 第95回大会 くまもと県民交流館パレア(熊本)、 2023年9月7日
- 9. <u>福田真嗣</u> 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 64 回日本心身医学会総会ならび に学術講演会、パシフィコ横浜(神奈川)、2023 年 7 月1日
- Yang J, Obana N, <u>Nakato G</u>, Nomura N, Tomita M and <u>Fukuda S</u>. An intestinal mucosa-associated bacterium which modulates host health. Gordon Research Seminar on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 17-18th, 2023.
- <u>Shinji Fukuda</u> Bacteroides uniformis: A dominant bacterial species in the human gut enhances endurance excercize performance. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.
- 12. <u>Shinji Fukuda</u> Genetic mutation in Escherichia coli genome during adaptation to the murine intestine is

optimized for the host diet, Wolbachia Conference 2023, Orthodox Academy of Creta, Creta, Greece, June 11-16th, 2023.

 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、日本化学会第103春季年会、東京 理科大学野田キャンパス(千葉)、ハイブリット開催、 2023年3月25日

## 【ポスター発表】

- <u>市村涼葉、田中一己</u>、清水映輔、小川葉子、坪田一 男、<u>福田真嗣</u>便微生物叢移植および骨髄 移植併用 による腸内細菌叢定着への影響、第 46 回日本分子 生物学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫)、2023 年 12月8日
- <u>Nakato G</u>, Inoue H, <u>Onawa S</u>, Furukawa R, <u>Tanaka K</u>, <u>Inoue J</u> and <u>Fukuda S</u>. Development of bacteriaspecific antibody for isolation of target bacteria and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.
- Yang J, Obana N, <u>Nakato G</u>, Nomura N, Tomita M and <u>Fukuda S</u>. An intestinal mucosa-associated bacterium which modulates host health. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.

## 【特許】

(1)国内特許出願 1件(2)国際特許出願 なし

# 研究報告2024 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

◆総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	88
◆貫通検知機能を備えた遠隔操作型力接触ドリルシステム・・・・・・・・・・・・・・・・・	91
◆ Haptic Drill for Spinal Surgery:Detection of Penetration based on both Thrust and Cutting Forces • • • • • • • • •	94
◆リアルハプティクスを用いた貫通検知及び自動停止機能を有する外科手術用力接触パワーツールの開発・・・	97
◆業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	100

## 「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年度より開始している。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う。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、医療機器メーカーを中心とした産業界との密な連携 による共同研究を推進し、開発技術の社会実装へと繋げることを目指す。

## 1. 2023 年度の研究目的

2023 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四年目にあたり、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。特 に、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、産業界とも密 に連携した実用化研究を実施する。これにより、医療機器 メーカー等との協働による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・ 開発体制強靭化事業」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。

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。

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。

#### 2. 2023 年度の研究成果

(1) ハプティック骨ドリルの開発研究

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応用研究を実施した。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、先行研究における貫通 検知アルゴリズムとの比較検証を行った(図1)。先行研 究では回転モータのトルクの変動を用いて貫通の検知を 行っている。そこでこの従来アルゴリズムを試作機に適 用し、本プロジェクトで新たに開発した直動モータを用 いた貫通検知アルゴリズムとの比較検証を行った。その 結果、従来技術に比べて、開発アルゴリズムでは貫通検 知までの時間及び貫通後の侵入量を極めて小さくするこ とができることが確認できた。



図1 ハプティック骨ドリルによる検証実験

豚の脊椎を用いた非臨床試験において(図2)、従来ア ルゴリズムを用いたトルクの変動を用いた切削において は貫通を検知するまでの時間及び貫通後の侵入量が大き い結果となった。それに対して、開発アルゴリズムを実 装することで、術者の操作による切削動作においても高 速低侵襲な検知が可能であることが確認された。



図2 動物実験における貫通検知手法の比較検証

また、実用モデル機の開発研究においては、2022 年度 に開発した実用モデル試作機に対して更なる小型化を施 した二次試作機の開発(図3)、および性能評価を行った。 直動モータの仕様を精査し、ドリルの形状に合わせたモー タの製作を行うことで、ドリルの小径化と軽量化を実現し た。また回転モータの性能を向上させ、実際の手術用ドリ ルと同等の回転速度 60000rpm で動作可能なモータを搭載 した。これにより、実際の外科ドリルと同等の使用感で切 削が可能となった。性能評価においては、装置による貫通 検知と術者の貫通時の反応時間及び、貫通時の侵襲距離に ついて比較を行った。ブタの脊椎を用いて3名の術者で測 定を行ったところ、いずれも装置による貫通検知の方が反 応時間、貫通後の侵入距離が著しく少ないことが確認され た。また、術者による貫通検知では結果にバラつきが見ら れたが、装置による貫通検知では術者に依らずほぼ同程度 の値を示した。これにより、実用モデル二次試作機による 貫通検知は、術者に依らず安定して貫通を検知可能である ことが確認された。



図3 実用モデル第二試作機

さらに、力触覚情報に基づく貫通検知・自動停止機能の 手術支援ロボットへの応用を目的として、力触覚伝達機能 を備えた多自由度遠隔操作型ドリルロボットの試作機を 開発した。本研究では、位置制御で駆動する多自由度マニ ピュレータ先端に被操作側装置を搭載可能であり、かつ切 削作業において力触覚伝達が可能な多自由度遠隔操作型 ロボットを開発した。また、切削作業中に事故を引き起こ す可能性がある動作の検出機能を開発した。多自由度遠隔 操作型ドリルロボットによる切削作業において、貫通等に よる刃先端位置の急激な変化を検知して被操作側のドリ ルロボットを自動停止し、力触覚情報を利用した安全性の 向上が可能であることを確認した。

#### (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、ラットを用いた非臨床試験を継続実施 することでエビデンスデータの蓄積に努めた。特に、非 臨床試験の結果から、力触覚データを新たなバイオマー カーとして活用することで、正常脳と腫瘍脳の判別に留 まらず、膠芽腫と髄膜腫の異なる腫瘍の判別まで実現可 能であるというフィージビリティを検証することができ た。2023 年度においては、これらの新たな知見を纏め、 国際的な学術論文誌である Scientific Reports に論文投稿 を行った。

#### (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等 の姿勢角度を正確に推定するための適用型カルマンフィ ルタを応用したアルゴリズム開発と、動作の正誤判定の 自動化アルゴリズム開発とを実施した。

適用型カルマンフィルタでは、動作の速度に応じて加 速度と角速度の重み付けを変動させることで、高精度に 角度を推定することが可能となる。これにより、pMDI の吸入前に行われるデバイスを振る動作等による誤差の 抑制が可能となる。pMDIの下部とレバー内に IMU を搭 載した測定デバイスを用いて、吸入動作の測定を行っ た。カルマンフィルタによる角度推定ではデバイス振り 動作時に値が発散しているのに対し、適用型カルマンフ ィルタによる角度推定では、振る動作時の角度の振動が 抑制されており、安定した推移を示した。また、噴霧開 始時のレバー押込みによる急激な角度の変位も抑制され ていることが確認された。したがって、改良アルゴリズ ムを用いることで、速い動作における角度の変位を抑制 し、高精度な角度推定が可能であることを確認できた。



(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)

吸入動作に対する正誤判定アルゴリズムによる自動判 別研究では、IMUにより得られた吸入動作のデータを用 いて、動作の正誤判別を自動で行う判定アルゴリズムの 構築を行った。IMUにより得られるデータは各3軸方向 の加速度、角速度、角度を有し、IMUが2つの場合合計 18種類の変数を有する。これらの変数の中から、主成分 分析(principal component analysis: PCA)及び線形判別分析 (Linear Discriminant Analysis: LDA)を用いて、正常動作時 と誤り動作を含むデータとの間で異なる推移を示す変数 の抽出を行い、それらの変数に対し DP マッチングを行 うことで、高精度な正誤判定を実現した。

検証に用いた吸入器のエリプタでは、発生しやすい誤 り動作として、①カバー開け角度が不十分、②薬剤吸入 時の吸入角度が浅い、③吸入器を水平に傾けた状態でカ バーを開ける、の3つが挙げられる。これらの誤り動作 を含むデータに対し、正誤判別を行った。LDAのみによ る判別と、SVM (support-vector machine)による判別結果と 比較したところ、提案手法による判別精度は他の判別手 法と同等の精度を示すとともに、具体的な操作誤りを見 える化できる点で有用であることが確認できた。

## 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いる。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の 構築、充実化ができてきており、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・開発体制強靭化事業」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てい る。今後も外部資金を活用しながら、医療デバイス応用 技術の社会実装に向けた実用化研究を重点的に進めてい く予定である。

## 貫通検知機能を備えた遠隔操作型力触覚ドリルシステム

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ハンドヘルド型ドリルを 用いた骨の切削は、高度なスキルが要求される治療 行為である。医療用ドリルの先端部は高速で回転 し、接触した骨を切削する。先端部が骨周辺の組織 に触れた場合、切削対象ではない部位を損傷する可 能性がある。特に脊髄の損傷は患者の運動機能や知 覚機能に障害を生じる。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し、術中の事故を 可能な限り防ぐ必要がある。

高度なスキルは安全性の向上において重要である が、熟練医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先端部が到達 したことを検知する。貫通の際にドリルの回転を自 動で停止することで、骨周辺の組織の損傷を防ぐこ とができる。これまでにハンドヘルド型ドリルへの 実装を目的として、ドリルの回転モータの電流と回 転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、ドリルの回転に加えて軸方向の直動自由度を 有するハンドヘルド型ドリルについて、力触覚情報 に基づ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、貫通検知および自動停止機能を備えた遠 隔操作型力触覚ドリルシステムを開発する[3]。一般的に 遠隔操作型手術支援ロボットは大規模かつ高コストであ るが、ハンドヘルド型の器具や装置では実現困難な幅広 い機能で術者を支援可能であり、消化器外科分野では遠 隔操作ロボットの技術を応用した da Vinci<sup>TM</sup>が既に実用 化されている[4]。本研究で開発するシステムは、脊椎手 術用ドリルによる骨切削を想定した遠隔操作型ロボット である。ドリルシステムを構成する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、ドリルによる切削作業で発生する反力を術者 にフィードバックする (図 1)。そして、ロボット間で伝 達される力触覚情報に基づいて貫通の有無を判定し、貫 通時には作業空間側ロボットを自動的に停止する。

## (1)-1 作業空間側ロボット

本研究の構想において、切削対象の周囲に設置される 作業空間側ロボットは主に6自由度ロボットアームと4



図 1 遠隔操作型力触覚ドリルシステムの構成



図 2 遠隔操作型力触覚ドリルシステムを構成す る作業空間側ロボットのイメージ図

自由度ドリルロボットで構成され、アーム先端に搭載さ れた装置の移動と姿勢を変更する。4自由度ドリルロボ ットは回転モータで駆動するドリル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。本研究では、ドリルの遠隔操作における力 触覚伝達、および力触覚情報を利用した貫通検知手法の 実装のみに焦点を当て、作業空間側ロボットを4自由度 ドリルロボットのみで構成する(図3)。



図 3 作業空間側ロボット(4 自由度ドリルロボ ット)



図 4 操作者側ロボット(3 自由度ハプティック インターフェース)

## (1)-2 操作者側ロボット

4 自由度ドリルロボットが並進自由度で得る力触覚情報は、操作者側ロボットであるハプティックインターフェースが操作者に伝達する。本研究のハプティックイン ターフェースは、作業空間側ロボットと同様に並進3自由度のパラレルリンクロボットで構成される(図4)。エンドエフェクタのスイッチはドリルの回転速度の制御に用いられる。操作者はハプティックインターフェースを介して作業空間にあるドリルを回転させ、かつ先端部の位置を移動させることが可能である。

#### (2) 動作制御

貫通検知機能を備えた遠隔操作型力触覚ドリルシステ ムは、作業の状況に応じて制御器を決定する。貫通が検 知されていない正常時の作業では、遠隔操作のための制 御がパラレルリンクロボットとドリルに用いられる。貫 通検知後は遠隔操作が解除され、作業空間側ロボットと 操作者側ロボットに異なる制御器が適用される。したが って、ドリルシステムの制御器は力触覚情報を利用した 貫通検知によって切り替わる。

### (2)-1 正常時の制御

遠隔操作のための制御では、パラレルリンクロボット にバイラテラル制御、ドリルに速度制御が用いられる。 バイラテラル制御は2台のロボット間で位置・力情報を



図 5 貫通検知機能を実装した遠隔操作型ドリル システムによる桧板切削実験

双方向に伝達し、力触覚伝達を可能とする。ドリルシス テムの各パラレルリンクロボットは並進3自由度を有す るため、3次元直交座標系の各座標軸方向の力触覚情報 を伝達可能である。ドリルの速度制御では、ハプティッ クインターフェースのスイッチの状態により速度指令値 を決定する。したがって、遠隔操作下においてスイッチ により高速回転するドリルが対象物を切削し、パラレル リンクロボットが力触覚情報を伝達する。

#### (2)-2 貫通検知

ドリルシステムは遠隔操作下でデータ化した力触覚情 報を用いて切削対象物の貫通を検知する。パラレルリン クロボットは各並進自由度に対応する直動型モータで駆 動する。直動型モータの速度、力から3次元空間におけ るドリル先端部の速度、力が得られる。さらに、これら の情報を擬似微分して加速度、力微分値を得る。ドリル 先端部が切削対象物を貫通する際には速度が急激に増加 し、力が急激に減少するため、実際の加速度と力微分値 を閾値と比較することで貫通を検知する。

#### (2)-3 貫通検知後の制御

ドリルシステムは貫通検知の後、対象物周辺の損傷を 防ぐために作業空間側ロボットを自動停止させる。構成 要素であるパラレルリンクロボットには位置制御器が適 用され、ステップ入力で貫通検知位置から後退する。ド リルは正常時と同様に速度制御で駆動するが、スイッチ の状態に関わらず速度指令値がランプ関数で変化して減 速する。最終的にドリルの回転速度は0 rad/sec となり、 先端部の位置は貫通検知位置の後方で維持される。

### 2. 実験と結果

## (1) 方法

本研究で開発した遠隔操作型力触覚ドリルシステムを



(a) 位置応答および貫通検知信号



(b) 力応答



(c) 加速度応答および力微分値

## 図 6 貫通検知実験の結果

用いて切削作業をおこない、力触覚情報に基づく貫通検 知機能の実現可能性を確認した。実験では厚さ2mmの 桧板を模擬骨として使用し、ドリル中心軸から30度の傾 きで固定台に設置した(図5)。ドリルには直径4mmの 球形の先端部を有するダイヤモンドバー(医療用ドリル ビット)を取り付けた。作業空間の視覚情報はカメラで 取得し、ディスプレイで操作者に提示した。ドリル先端 部の加速度と力微分値を用いた貫通検知の可否を確認す るために、操作者はダイヤモンドバーが桧板を貫通する まで切削作業を継続した。

## (2) 結果

切削実験の結果を図6に示す。本実験では、約77秒経 過時に対象物の貫通が検知された。作業空間側ロボット の各軸の位置応答値は貫通が検知されるまで操作者側ロ ボットの位置応答値に追従し、各軸の力推定値には作用 反作用の法則が成立した。したがって、遠隔操作下では バイラテラル制御により力触覚情報が伝達された。貫通 検知時にはドリル先端の加速度が急激に増加し、力微分 値が急激に減少した。

## 3. 考察及び今後の展望 (1) 考察

遠隔操作型力触覚ドリルシステムの貫通検知機能は、 加速度と力微分値が同時に閾値を超えることで貫通を検 知する。図 6(c)では貫通検知時以外にも力微分値の急激 な減少が確認できる。しかしながら、加速度の急激な増 加が同時に発生せず、誤検知は起きなかった。先行研究 では直動型モータを内蔵したハンドヘルド型ドリルで得 られる1自由度の速度、力情報に基づいた貫通検知手法 が開発された[2]。これらの情報が3次元空間への拡張後 も有用であり、遠隔操作型ドリルでも利用可能であるこ とが本実験で確認された。

#### (2) 今後の展望

本研究では遠隔操作型力触覚ドリルシステムの作業空 間側ロボットを4自由度ドリルロボットのみで構成した が、実際の骨切削では図2のように6自由度ロボットア ームと組み合わせる必要がある。4自由度ドリルロボッ トのパラレルリンク機構は可動域が小さく、切削可能な 領域が限られる。また、回転自由度を持たないため姿勢 変更が不可能である。ドリルを任意の位置、姿勢に配置 することができる6自由度以上のロボットアームと組み 合わせることで、実際の骨切削に近い環境で実験が可能 となる。

## 【参考文献】

- 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)
- 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)
- 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)
- 4. G. S. Guthart and J. K. Salisbury, in Proc. 2000 IEEE Int. Conf. Robot. Autom., San Francisco, CA, USA, 618-621(2000)

## Haptic Drill for Spinal Surgery: Detection of Penetration based on both Thrust and Cutting Forces

Next-generation Medical and Welfare Robot Group Nguyen Duc Khuong

## 1. Introduction

It is necessary to develop a surgical drill with the ability to stop automatically to assist surgeons. Various studies have addressed issues related to drilling bones. Osa *et al.* developed a handheld bone-cutting-tool which detected the penetration based on estimating the cutting resistance from the response current and rotary speed [1], [2]. Qi *et al.* suggested an algorithm to find the singularity of the force signal for detecting the breakthrough based on the wavelet transform [3]. Dai *et al.* proposed a method to monitor bone cutting operations by using an acceleration sensor and a laser displacement sensor to measure the vibration amplitude of the bone being cut and its adjacent tissues [4]–[6].

However, guaranteeing successful penetration detection and auto-stop under varying drilling conditions is challenging. To deal with this problem, this study presents a detection of penetration method by capturing suddenly fluctuations in thrust and cutting forces.

First, the characteristics of thrust force and cutting force in intrusion, steady, and penetration stages of cutting bone are investigated. Then, from these characteristics, a detection method of penetration is developed based on a combination of thrust and cutting forces. Additionally, three difference cutting modes are developed and conducted in an experiment. Experimental results validate the performance of the method in all the developed cutting modes.

## 2. Cutting bone stages

Based on the drill bit radius, drilled hole depth, and bone thickness, cutting can be divided into intrusion, steady, and penetration stages as shown in Fig. 1. The intrusion stage occurs if the drilled hole is less than the radii of the drill bit. If the drilled hole is greater than the radii of the drill bit and less than the bone thickness, it is called the steady stage. Finally, the penetration stage happens if the drilled hole is greater than the bone thickness.

If a constant thrust force  $F_s$  is applied on the drill bit, the penetration rate  $v_s$  is very different from that in these stages. We assume that penetration rate in intrusion, steady, and penetration stages are  $v_{s1}$ ,  $v_{s2}$ , and  $v_{s3}$ , respectively. In reality,  $v_{s1}$  is smaller than  $v_{s2}$  and  $v_{s2}$ is smaller than  $v_{s3}$ . When penetration happens, the penetration rate  $v_{s3}$  suddenly increases from  $v_{s2}$ . As a result, the cutting force  $F_c$  suddenly increases. In contrast to the increase in cutting force, the thrust force suddenly decreases due to the rapidly decrease of environment stiffness as the drill breaks through the bone. The opposite fluctuation of these two forces is used as the basis for the penetrating detection method in this study.





In general, penetration can be detected based on the cutting force or thrust force, or both of them. This study aims to detect penetration by a combination of both these forces.

In the bone cutting process, the cutting force depends on various factors such as the stiffness of the bone, the rotary speed, the type and diameter of the drill bit, the difference in position between the drill bit and the bone





Fig. 3. Cutting force characteristic.

Fig. 2. Experimental platform.

(drilled hole), and the thrust force. If the bone, the rotary speed, the drill type, and the hole depth are identified, the cutting force  $(F_c)$  is only a function of the thrust force  $(F_s)$ .

In the intrusion and steady stages, it is obvious that the cutting force  $F_c$  is increased if the thrust force from the slave  $F_s$  increases. In contrast, if the thrust force decreases, the load on the rotary motor decreases and the cutting force decreases. However, in the penetration stage, the cutting force suddenly increases due to the increase in the penetration rate, while, thrust force suddenly decreases due to the decrease in environment stiffness. Therefore, the subtraction of these two forces is a good variable for penetration detection. In addition, cutting and thrust forces are only inversed if the penetration occurs. Thus, this method can prevent mistakes with varying thrust forces.

## 4. Results and discussion

The experimental platform is shown in Fig. 2. It consists of a Haptic drill and wooden bone models.

## 4.1. Cutting force characteristic in cutting bone process

For the cutting force, an experiment was conducted with the conditions as follows: a constant thrust force was generated to advance the drill bit into the bone model. The cutting force was estimated based on the response current of the rotary motor. The experimental result of the cutting force is shown in Fig. 3. It can be seen from the experimental result as follows:

- The cutting force increases when the drill bit gets deeper and deeper into the wood in the intrusion stage.
- The cutting force almost remains constant when the drill bit fully penetrates wood in the steady stage.



Fig. 4. Thrust force characteristic.

 If penetration happens, the load on the rotary motor suddenly increases due to the increase in penetration rate. Thus, the required current suddenly increases to satisfy the equation of motion. Consequently, the cutting force suddenly increases. Then, the load reduces to zero if the drill bit goes whole through the bone. At that time, the cutting force reduces to zero. It can be confirmed that cutting force can be used to detect penetration.

#### 4.2 Thrust force in cutting bone process

This section aims to investigate thrust force. Fig. 4 illustrates the thrust force characteristics when drilling bone model. It is difficult to conclude using this force because it depends on the applied force from the operator. However, the thrust force clearly decreases suddenly due to the environment stiffness rapidly decreasing when penetration occurs. This phenomenon can also be used as a sign to detect whether or not penetration has occurred.

# 4.3. Experimental validation performance of penetration detection method

Three drilling modes of continuous, partial, and automatic drilling were performed to test the effectiveness of the detection algorithm. In continuous mode, the operator advances the drill bit continuously until it penetrates the bone. In partial mode, the operator only drills a thin layer of the bone, then moves back. The process is repeated until the drill bit penetrates the bone. In automatic mode, the drill advances automatically without any action from operator.

Fig. 5 shows the cutting force  $(F_c)$  and threshold values (proportional to thrust force  $F_s$ ) in continuous



continuous drilling.



n Fig. 6. Thrust and cutting forces in partial drilling.

drilling mode. The detect point of penetration is the crossed point between  $F_c$  and threshold value. Fig. 6 and Fig. 7 present experimental results when drilling in partial and automatic modes. Good detections are obtained in all continuous mode, partial mode.

Additionally, experimental results of partial mode on Fig. 6 shows the detection ability even if the bone thickness is small lefts. The wood after drilling is shown in Fig. 8. The experimental results confirm the performance and the utility of the developed method.



Fig. 8. Wood after drilling.

#### 5. Conclusion and future works

This study introduced a method to detect penetration based on both thrust force from the operator and cutting force estimated from response current of rotary motor. Three difference modes of cutting were conducted in an experiment. Experimental results validated the performance of the method in continuing, partial, and automatic modes. Due to the inverse of thrust and cutting forces when penetration occurs, the method was able to detect penetration even if the bone was thin, avoiding wrong detection.

However, drilling was performed while the drill was placed horizontally. In future works, the penetration detection algorithm should to evaluate its detection performance when drilling in different postures.



Fig. 7. Thrust and cutting forces in automatic drilling.

#### Reference

- [1] T. Osa, C. F. Abawi, N. Sugita, H. Chikuda, S. Sugita, H. Ito, T. Moro, Y. Takatori, S. Tanaka, and M. Mitsuishi, "Autonomous penetration detection for bone cutting tool using demonstration-based learning," in 2014 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA), pp. 290–296. IEEE, 2014.
- [2] T. Osa, C. F. Abawi, N. Sugita, H. Chikuda, S. Sugita, T. Tanaka, H. Oshima, T. Moro, S. Tanaka, and M. Mitsuishi, "Hand-held bone cutting tool with autonomous penetration detection for spinal surgery," *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, vol. 20, no. 6, pp. 3018–3027, 2015.
- [3] L. Qi and M. Q.-H. Meng, "Real-time break-through detection of bone drilling based on wavelet transform for robot assisted orthopaedic surgery," in 2014 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (ROBIO 2014), pp. 601–606. IEEE, 2014.
- [4] Y. Dai, Y. Xue, and J. Zhang, "Vibration-based milling condition monitoring in robot-assisted spine surgery," *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, vol. 20, no. 6, pp. 3028–3039, 2015.
- [5] Y. Dai, Y. Xue, and J. Zhang, "Milling state identification based on vibration sense of a robotic surgical system," *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, vol. 63, no. 10, pp. 6184–6193, 2016.
- [6] Y. Dai, Y. Xue, and J. Zhang, "Bioinspired integration of auditory and haptic perception in bone milling surgery," *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, vol. 23, no. 2, pp. 614–623, 2018.

リアルハプティクスを用いた貫通検知及び自動停止機能を

有する外科手術用力触覚パワーツールの開発

## 1. はじめに

整形外科手術では通常、外科ドリルを用いて骨の切削 を行う。しかし骨の周囲には血管や神経網が通ってお り、術者はこれらの組織に触れないよう切削を行う必要 がある。また、骨の貫通は術者の手先の感覚のみで判断 を行う必要があるため、熟練した操作技術と経験が求め られる。特に神経の損傷は重大な合併症を引き起こすた め、術者への負担が大きい[1][2]。

そこで近年では骨の貫通を装置側が検知し、自動で停止することで組織の損傷を防ぐ外科ドリルの研究が進められている。主に回転モータのトルクの変動や、カセンサにより測定したドリルの押し込み力の変動から貫通を検知する手法が提案されている[3]-[6]。

## (1) 外科手術用力触覚パワーツール

本研究では主に骨の穿孔作業に用いられる外科用ドリ ルであるパワーツールをベースとし、同等のトルクを出 力可能な力触覚パワーツールを開発した。

図1に力触覚パワーツールの外観と模式図を示す。ド リルは直動モータと回転モータを有し、刃の回転動作と 直動動作を実現する。また回転モータはギア比1:3.13の タイミングベルトを介して刃を回転させる構造となって おり、パワーツールと同等のトルクを出力可能である。

貫通の検知には切削中の直動モータの力と位置の変位 を用いて観測を行う[7][8]。切削時には骨からの反力が直 動モータに加わるが、貫通時にはその反力が減少する。 加えて反力の減少に伴い、刃先の位置が急激に前進す る。すなわち、貫通時には直動モータの位置と力が大き く変位することから、この2つの変化を観測することで 骨の貫通を装置側で検知可能となる。貫通検知後には刃 先を引き込むように直動モータに制御を加える。これに より貫通時に刃先が侵入して周囲の組織を損傷すること を防ぐことが可能となり、安全性が向上する。

## (2)制御手法

本装置を用いた貫通検知の検証では別途用意した直動 モータ(マスタ側)と装置内の直動モータ(フォロワ側)間で バイラテラル制御を行う。図2に本制御システムの模式 図を示す。操作者はマスタ側の直動モータを用いて、フ ォロワ側の直動モータの先に取り付けた刃を操作し、骨 の切削を行う。これにより操作者は切削時の抵抗を感じ 「次世代医療福祉ロボット」グループ 高野 俊也







図2 力触覚パワーツール制御システム模式図 (a)バイラテラ ル制御による切削(貫通検知前)(b)位置制御による刃先の引込み (貫通検知後)

ながら切削を行うことが可能となる。貫通検知後は、2 つのモータ間のバイラテラル制御を停止し、即座にフォ ロワ側を位置制御に切り替え、刃先を引き込むように位 置指令を加える。これにより、貫通後の刃先の侵入を防 ぐことが出来るため、安全性の向上が可能となる。

#### 2. 実験と結果

#### (1)実験方法

自動停止機能により安全性が向上することを確認する







ため、豚の大腿骨を用いて検証を行った。図3に実験環 境とその模式図を示す。ドリルは施術台に設置した支柱 を用いて、豚の大腿骨の真上に垂直向きに固定した。術 者はマスタ側の直動モータを操作し、ドリルを前後させ て切削を行う。検証では装置が貫通を検知して自動で停 止をした場合と、自動停止機能を用いず、術者が貫通を 検知して手動で切削を止めた場合において、貫通してか ら停止するまでに要した時間と、刃先の侵入距離の比較 を行った。ドリルの刃は直径 2mm のキルシュナー鋼線を 使用した。また、自動停止機能は貫通を 2 回検知した場 合に実行するよう設定した。これは、骨の構造が外周に 硬い皮質骨と内部に脆い海綿骨の 2 層で構成されてお り、骨を貫くように切削を行った場合、硬い皮質骨を 2 回貫通することから、貫通動作が 2 回発生するためであ る。

なおこの動物実験は慶應義塾大学医学部の倫理委員会 の承認を得て行っており、倫理委員会の定める規則に従 って飼育された動物を使用している。(承認番号:18047)

#### (2)実験結果

大腿骨切削時の位置、力応答の結果を図4に示す。切 削中、マスタフォロワ間で位置が追従し、力応答値は作 用反作用の法則が成立していることから、切削中はバイ ラテラル制御により力触覚情報が術者に伝達された。図 4(a)より、約15秒経過時に位置が急激に増加し、反力が 急激に減少した。これは外周の皮質骨を貫通し、内部に 刃先が侵入したことを表している。そして約28秒経過時 に再度位置と反力に急激な変位が発生した。これは反対



図4 大腿骨切削実験結果 (a)位置、力応答 (b)自動停止地点拡 大図

側の皮質骨を貫通し、骨を完全に貫いたことを示してい る。このとき装置側で2回目の貫通を検知したため、フ オロワ側のモータが位置制御に切り替わり、刃先の引込 みを行った。図4(b)に貫通時の位置応答結果の拡大図を 示す。図より貫通後のフォロワ側の位置がわずかにしか 増加していないことが確認できる。すなわち装置側で貫 通を正常に検知し、位置制御による引込み動作により、 刃先の侵入を防いだことを示している。

図 4(b)の貫通時の位置応答の波形を用いて、貫通後に 刃先の引込みを開始するまでに要した時間(図 4(b)の①)と 引込みを開始するまでに進んだ距離(図 4(b)の②)の測定を 行った。この測定を、装置による自動停止を行った場合 と、自動停止を用いずに術者が貫通を検知して手動で切 削を止めた場合の結果に行い集計を行った。

図5に集計結果を示す。図5(a)が装置による自動停止 有りの結果を表し、図5(b)が自動停止機能を用いず、術 者が貫通を検知した際に切削を停止した場合の結果を表 す。グラフより、装置による自動停止を行った方が検知 時間及び、貫通後の刃先の侵入距離が少ないことが確認 された。すなわち、術者による貫通検知より、装置によ る貫通検知の方が高速、低侵襲な切削が可能であること が確認できた。また、表1より、術者による貫通検知で は、結果にバラつきが生じていたが、装置による自動停 止では、バラつきが少なく、すべてのトライで同等の結 果を示していることが確認できる。すなわち、装置によ る貫通検知・自動停止により、術者の技量に依らず同等



(b)

## 図5 貫通検知時間及び貫通後の刃先の侵入量結果 (a)装置に よる自動停止 (b)術者による貫通検知

#### 表1 貫通検知検証結果

		Average				
		Time required to Travel distance				
	Trials	detect penetration [s]	after penetration [mm]			
With automatic stop	43	$0.165\pm0.008$	$2.511 \pm 1.078$			
Without automatic stop	45	$0.455 \pm 0.123$	9.664±12.321			
Two-tailed paired t-test p*<0.00						

の施術を行うことが可能となることを示している。よっ て、外科手術用力触覚パワーツールを用いた貫通検知、 自動停止機能により、切削の安全性が向上することが実 証された。

## 3. 結論及び今後の展望

#### (1) 結論

本研究では主に骨の穿孔作業に用いられるパワーツール をベースとした、力触覚パワーツールを開発した。この ドリルに搭載されている直動モータを用いて切削時の力 と位置の変位を観測し、骨の貫通を検知することが可能 となる。また、貫通検知時に直動モータに刃先を引き込 む方向に制御を行うことで、貫通時に刃先が侵入して周 囲の組織を損傷することを防ぐことが可能となる。これ により安全な施術が実現可能となる。豚の大腿骨を用い た実験においては、術者による貫通検知より装置による 貫通検知及び自動停止の方が、高速低侵襲な切削が可能 であることを示した。また、結果にバラつきが少ないこ とから、術者に依らず同等の施術を行うことが可能とな る。

## (2) 今後の課題

今回行った実験では、ドリルを固定し術者が別の直動 モータを操作することで切削を行った。しかし、実際の 施術では術者がパワーツールを手で保持し切削を行って いる。しかし開発した力触覚パワーツールは回転モータ に加え直動モータを内蔵しているため、従来の機器より 大きさと重量が共に大きく、手で保持することが困難と なっている。そのため、モータの仕様を精査し小型化を 行っていく必要がある。

## 謝辞

本研究は AMED 課題番号 24he2202014h0103 の支援を受け実施された。

## 【参考文献】

- P. Guerin, A. Benchikh., E. Fegoun, I. Obeid, O. Gille, L. Lelong, S. Luc, A. Bourghli, J. C. Cursolle, V. Pointillart, and J. Vital, *Injury*, 43(4), 397-401(2012)
- 2.Y. R. Rampersaud, E. R. P. Moro, M. A. Neary, K. White, S. J. Lewis, E. M. Massicotte, and M. G. Fehlings, *Spine*, 31(13), 1503-1510(2006)
- 3.T. Osa, C. F. Abawi, N. Sugita, H. Chikuda, S. Sugita, T. Tanaka, H. Oshima, T. Moro, S. Tanaka, and M. Mitsuishi, *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, 20(6), 3018-3027(2015)
- 4.W. Lee, C. Shih, and S. Lee, *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, 9(1), 20-29(2004)
- 5.W. Lee, and C. Shih, Mechatronics, 16(2), 73-84(2006)
- 6.M. H. Aziz, M. A. Ayub, and R. Jaafar, *Procedia Engineering*, 41,352-359(2012)
- 7.S. Takano et al., 2023 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM), pp. 194-200 (2023)
- 8.K. Yamanouchi, S. Takano, Y. Mima, T. Matsunaga, K. Ohnishi, M. Matsumoto, M. Nakamura, T. Shimono, and M. Yagi, *Scientific Reports*, 13(1),(2023)



【原著論文】 (投稿掲載)

- N. D. Khuong and T. Shimono, "Modeling, Analysis, and Experimental Validation of Magnetic Geared Linear Motor", IEEJ Journal of Industry Applications, Vol. 12, No. 3, pp. 475-483, (2023) [IF2022=1.7]
- A. Hasegawa, T. Shimono, S. Takano, K. Masaki, H. Nakada, M. Nishie and J. Hakamata, "Inhaler Motion Evaluation Via Weighted DP Matching", IEEJ Journal of Industry Applications, Vol. 12, No. 5, pp. 885-893, (2023) [IF2022=1.7]

【口頭発表】 (国外)

- 1. T. Matsunaga, S. Takano, T. Shimono, K. Ohnishi, M. Yagi and M. Nakamura, "Handheld Haptic Drill Simulator Using Visual Servoing System for Axial Force Presentation", The IEEE 32nd International Symposium on Industrial Electronics (ISIE 2023), 2023 年 6 月 20 日, Helsinki-Espoo, Finland
- S. Takano, T. Shimono, T. Matsunaga, M. Yagi, K. Ohnishi, M. Nakamura, Y. Mima, K. Yamanouchi and G. Ikeda, "Development of Orthopedic Haptic Drill for Spinal Surgery with Penetration Detection Scheme based on Viscosity Estimation", 2023 IEEE / ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM2023), 2023 年 6 月 28 日, Seattle, USA
- K. Okumura, T. Shimono, S. Takano, T. Matsunaga, T. Kageyama, and J. Fukuda, "Experimental Evaluation of Solid Matter Injection Accuracy with Cell Transplantation Device for Hair Regenerative Medicine," Joint Conference of the 14th Edition of France-Japan, 12th Europe-Asia Congress on Mecatronics (Mecatronics2023) and the 9th Asia International Symposium on Mechatronics (AISM2023), 2023 年 9 月 10 日, Yokohama, Japan
- 4. A. Takimoto, S. Takano, T. Matsunaga, and T. Shimono, "A Consideration on Suppression of Chatter Vibration by Notch Filtering for Haptic Bone Drill," Joint Conference of the 14th Edition of France-Japan, 12th Europe-Asia Congress on Mecatronics (Mecatronics2023) and the 9th Asia International Symposium on Mechatronics (AISM2023), 2023 年 9 月 11 日, Yokohama, Japan

- T. Ezaki, K. Kisima, S. Shibao, T. Matsunaga, Pareira ES, Y. Kitamura, K. Takahara, T. Iwama, Sampetrean O, K. Ohnishi, T. Shimono and H. Sasaki, "Differentiation of glioblastoma and malignant meningioma from normal brain by tissue stiffness utilizing microsurgical forceps equipped with haptics technology", 28th Annual Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, 2023 年 11 月 17 日, Vancouver, Canada
- Nguyen Duc Khuong, "Development of High Thrust Tubular Magnetic Geared Linear Motor", 26th Power Electronics and Motion Control-Camp 2023, 2023 年 11 月 25 日, Tokyo, Japan
- T. Wakabayashi, S. Kobayashi, S. Takano, K. Yamanouchi, Y. Mima, M. Yagi, K. Harato, Y. Niki, T. Matsunaga, K. Ohnishi, M. Matsumoto, M. Nakamura and T. Shimono, "Effectiveness and safeness of the power toolwith a real haptic interface in orthopedic surgery", Orthopaedic Research Society 2024 Annual meeting (ORS 2024), 2024 年2月3-4日, California, USA
- T. Matsunaga, S. Takano, T. Shimono, K. Ohnishi, M. Yagi and M. Nakamura, "A Prevent of Motion Causing Accidents in Orthopedic Surgery by Teleoperated Haptic Drill", The IEEE 18th International Conference on Advanced Motion Control (AMC 2024), 2024 年 3 月 1 日, Kyoto, Japan
- T. Matsunaga, S. Takano, T. Shimono, K. Ohnishi, T. Wakabayashi, S. Kobayashi, M. Yagi and M. Nakamura, "Cutting State Estimation Based on Haptic Information Acquired by One DOF Teleoperated Oscillating Saw for Orthopedic Surgery", The IEEJ 10th International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON 2024), 2024 年 3 月 4 日, Kyoto, Japan

10. K. Kodama, H. Obara, T. Yokoyama, and T. Shimono, "Velocity Noise Reduction Using Multi-Level Inverters", The IEEJ 10th International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON 2024), 2024 年 3 月 4 日, Kyoto, Japan  Y. Kanai, T. Shimono, K. Sugawara, T. Suzuki, Y.
 Takenaka, and R. Sasaki, "Development of Measurement Method for Limb Tip Output during Muscle Relaxation", The IEEJ 10th International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON 2024), 2024 年 3 月 4 日, Kyoto, Japan

12. T. Fujiwara, D. Canton, and T. Shimono, "Delay Identification in Remote Control Systems with Time Delay", The IEEJ 10th International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization (SAMCON 2024), 2024 年 3 月 4 日, Kyoto, Japan

## (国内)

13. 松永卓也,下野誠通,大西公平 「力触覚伝達が可能なマスタ・スレーブ型パラレルリ ンクロボットと円弧リニアモータで構成した5自由度 刺入システム」 電気学会産業応用部門大会,2023年8月23日,名古 屋

## 14. 下野誠通

「殿町における医工×産学連携による次世代医療デバ イスの開発」 キングスカイフロントサイエンスフォーラム 2023,

2023年11月2日,川崎

【記者発表・取材・受賞】

## (受賞)

 高野俊也
 2023 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronic (AIM2023),
 Best Conference Paper Finalist を受賞
 口頭発表 "Development of Orthopedic Haptic Drill for Spinal Surgery with Penetration Detection Scheme based on Viscosity Estimation", 2023 年 6 月 27 日-7 月 1 日,

## (報道発表)

Seattle, USA

 下野 誠通, "かながわ未来人 ~遠隔で触覚伝える技 術開発~", 2023 年 9 月 18 日, 東京新聞

【展示会・出展】

 "ヘルスケア MaaS 2023 健康・移動をデータで結ぶ未 来", 2023 年 12 月 2-3 日, 湘南ヘルスイノベーション パーク

# 研究報告2024 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

•	▶総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	103
•	▶昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞のアレイ化技術の開発・・・・・・・・・・・・・・・	106
•	▶アフリカツメガエル卵抽出液を用いた人工細胞内核形成・・・・・・・・・・・・・・・・・	109
•	▶均一サイズ巨大ベシクル作製技術の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	113
•	▶業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	117

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)電気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. 2023 年度の研究目的

実用化実証事業 11 年目となる 2023 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、評価システムの計 測効率の向上を目標とした。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、疾患検知の概念実証を目標とした。

#### (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となる技術の実現を目標として 研究開発を行ってきた。 2023 年度は、2021 年度に設立した 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、 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 する技術開発を目標とした。

## (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レーション 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。

2023 年度は、標的物質に対する細胞センサの応答特性 を電気的・光学的計測方法で評価するとともに、東京大 学・住友化学と共同で細胞センサアレイを作製し、センサ アレイによる疾患検知の概念実証を目標とした。

## 2. 2023 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)等の公的研究費による支援と、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。2023年度は、MAQsys社が事業開始に向けて行う研 究開発に関して、イオンチャネル機能評価システムの計測 効率の向上に関する研究支援を行った。

計測効率向上に関して、昨年度に開始した脂質二重膜を 繰り返し形成するプロセスの自動化を目的としたデバイ スについての研究成果をまとめた。脂質二重膜は、計測チ ップの一対のウェルの境界において、油中液滴同士が接触 する界面に形成される。従来研究で、このウェル境界にお いて接触した液滴を分割・再接触させることで脂質二重膜 を再形成できることが分かっていた。そこで、計測チップ のウェル境界近傍に微小薄板を上から挿入するモジュー ルを設計・作製した。薄板の挿入により脂質二重膜を繰り 返し形成し、時間当たりのイオンチャネル評価データ取得 数を劇的に向上させることに成功した(Anal Chem 誌掲載、 当該号表紙に採用)。また、微小気泡をウェル境界近傍に 発生・誘導することで液滴を分割・再接触させ、脂質二重 膜を繰り返し形成する技術についてもその成果を公表し た(Droplet 誌掲載、当該号表紙に採用)。さらに、機械学 習によりイオンチャネルの応答をリアルタイムに解析す る技術を応用し、人工細胞膜を維持・再形成しながら計 測・解析を行える自動化システムについても報告を行った (Biosens Bioelectron 誌掲載)。

さらに、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、セパレータの孔形状に関する検討を開始した。 一般的に孔形状は円形が良いとされてきたが、さまざまな 孔で試行したところ、必ずしも円形が最適ではない可能性 を示唆する結果が得られたており、検討を行っている。

成果展開として、協力研究員による萌芽研究を実施し、 また国内外の研究機関との共同研究も行っている。

#### (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。

2023 年度は、細胞センサの応答特性を評価するととも に、センサアレイによる疾患検知の概念実証を行った。

光学的計測方法に関して、異なる種類のセンサ細胞を画 像判別し、個々の標的物質応答性を解析する研究を行った。 センサ細胞を特徴的な形状のハイドロゲルに包埋するこ とで、位置情報に頼らず形状情報により自動判別すること ができる。従来、異種センサ細胞を用いる場合にはあらか じめ規則性をもたせて配列する必要があったが、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た。

一方、センサアレイの研究についても東京大学・住友化 学と共同で進めた。ピペットを用いて簡便・迅速に細胞の アレイ化が可能な鉤爪を配列したデバイスを開発した。鉤 爪内にセンサ細胞を含む溶液をピペットで滴下すること で、細胞アレイを作製できる。また、この細胞センサを搭 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。このセンサ細胞と蛍光計測システムにより、 疾患マーカとされる標的物質を感度よく検出できること を示した。

#### (3) 共同研究による成果

JST-CREST 事業(ゲノム合成:2018-2023 年度、東大白 髭教授代表、機能的人工染色体の設計と利用のための革新 的研究)に参画した。同 CREST では東大大杉研と共同で、 人工細胞核を封入したリポソームを作製するための技術 開発を行った。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、細胞核封入リポ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。また、細胞核封入リポソームを培養細 胞と融合させるための異種リポソーム融合デバイスに関 して Sens Actuators B Chem 誌に発表した。

また、サイズや形状を制御したリポソーム作製技術についての成果が、Small Struct 誌に掲載された(当該号表紙・注目論文)。

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。

## 昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞の アレイ化技術の開発

## 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 昆虫の嗅覚受容体による匂い物質の感知 生物が匂いを感知するプロセスは、嗅覚器官の細胞によ って行われ、匂い物質が細胞膜に局在する嗅覚受容体タン パク質に結合することによって始まる。この匂い感知の分 子メカニズムは、脊椎動物と無脊椎動物で異なっている。 昆虫では、膜タンパク質である嗅覚受容体(Olfactory receptor, OR)と嗅覚受容体共受容体(Olfactory receptor co-receptor, Orco)が協働することにより、匂いの感知が行 われている [1,2], OR は匂い物質を識別する役割をもち、 蚊では約80種類が知られており、さまざまな匂い物質の 選択的受容において重要な役割を果たしている[3,4]。 Orco は細胞膜を横断してナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>) やカル シウムイオン(Ca<sup>2+</sup>)を透過するイオンチャネルとしての 役割をもち、OR との相互作用により、匂い物質に応答し て活性化されるリガンド依存性陽イオンチャネルとして 機能している。このような嗅覚受容体は、細胞膜を貫通し て細胞表面に露出している。細胞表面の嗅覚受容体に匂い 物質が結合すると、嗅覚受容体が活性化され、細胞外から 細胞内への陽イオンの流入が濃度勾配に従って起こる。こ の流入により、通常は維持されている細胞膜内外の陽イオ ンと陰イオンのバランスが崩れ、細胞膜の脱分極が引き起 こされる。この脱分極は、神経細胞を通じて信号として伝 達され、最終的に脳で匂いとして認識される。現在、この ような嗅覚受容体による応答メカニズムを利用して匂い 物質を検出するため、昆虫などの嗅覚受容体を発現させた 培養細胞が作製されている。このような細胞はセンサ細胞 と呼ばれ、次世代の匂いセンサへの応用を目指した研究が 進められている [5]。

## 1.2 センサ細胞による匂い物質の検出

匂い物質に対するセンサ細胞の応答は、一般的に蛍光を 利用した方法によって検出される。このため、センサ細胞 には OR と Orco の遺伝子に加え、カルシウムセンサタン パク質(GCaMP)の遺伝子が導入される[6]。GCaMP は、 緑色蛍光タンパク質(GFP)、Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質であるカ ルモジュリン、ミオシン軽鎖ペプチドフラグメントの3つ を遺伝子工学的に融合したタンパク質であり、Ca<sup>2+</sup>がカル モジュリン部分に結合することによって GFP の蛍光強度 が変化する。GCaMP を用いることにより、センサ細胞内 のCa<sup>2+</sup>濃度の変化を、蛍光強度の変化として測定すること が可能である[7]。これにより、センサ細胞に発現してい る嗅覚受容体に匂い物質が結合すると、活性化された嗅覚 受容体を通して細胞外のCa<sup>2+</sup>が細胞内に流入し、細胞質の Ca<sup>2+</sup>濃度の増加に従って、GCaMP の蛍光強度も増加する。 この蛍光応答を測定することにより、センサ細胞を用いて 溶液中の匂い物質を検出することが可能となる。

## 1.3 センサ細胞を利用した匂い物質センサ

生物の嗅覚受容体は、分子構造を三次元的に認識するこ とにより、特定の匂い物質に選択的に応答する。そのため、 嗅覚受容体を発現するセンサ細胞を用いた匂いセンサは、 従来の酸化物半導体センサなどの人工物と比較して、高い 選択性と感度を実現できる可能があると考えられている。 センサ細胞を利用した匂い物質センサの用途としては、匂 いによる病気の診断や早期発見など、将来的には健康医療 分野での応用が期待されている。 医療分野での最近の例と しては、匂いに対する線虫の化学走性を利用し、がんの早 期発見方法が実用化されている[8] がんに関連すると考 えられている匂い物質のデータベースが整備されつつあ **り**[9] 匂い物質に対する蚊の嗅覚受容体の反応選択性も 明らかになっており「3,41、がんに関連する匂い物質の検 出に昆虫の嗅覚受容体を利用する可能性も議論されてい る[5] 昆虫の嗅覚受容体を発現するセンサ細胞は、次世 代の匂いセンサの基盤要素として注目されており、センサ 細胞の蛍光応答を利用した匂い物質センサの開発が進め られている。

匂いは、複数の匂い物質の組み合わせによって形成され ている。そのような匂いを、高い選択性をもつ嗅覚受容体 を用いて識別するためには、それぞれ異なる嗅覚受容体を 発現する複数種類のセンサ細胞を組み合わせて使用する 必要がある。しかしながら、単一のチャンバ内に複数種類 の細胞をアレイ化する技術は、これまでのところ十分に開 発されていなかった。本研究では、複数の匂い物質を同時 に検出するため、単一のチャンバ内に複数種類のセンサ細



図1 開発したアレイ化デバイス。(A)デバイスの写真。(B)デバイスを用いてアレイ化したセンサ細胞の蛍光記録画像。

胞をアレイ化するデバイスを開発した。

## 2. 実験方法

## 2.1 アレイ化デバイスの作製

本研究で開発したアレイ化デバイスは、複数種類のセン サ細胞を単一のチャンバ内に配列することを目的として いる。デバイスの構造は、大きなチャンバ内に配置された 複数のマイクロウェルによって構成されている。デバイス の設計には CAM ソフトウェアを使用し、作製には NC 加 工機を用いた。材料には、厚さ 4mm のアクリル板を使用 した。

#### 2.2 センサ細胞のアレイ化

開発したデバイスを用いたセンサ細胞のアレイ化は、ハ イドロゲルと混合したセンサ細胞をピペッティングでマ イクロウェルに注入することによって行った。センサ細胞 には、ネッタイシマカ (Aedes aegypti) の嗅覚受容体 (AaOR15)と共受容体、カルシウムセンサタンパク質 (GCaMP)を発現する昆虫細胞(ExpiSf9)を使用した。セ ンサ細胞の培養には ExpiSf CD 培地を用い、平底の三角 フラスコを使用して27℃、125 rpm で振とう培養を行った。 培養したセンサ細胞は、5分間、300×gで遠心して回収し た。回収したセンサ細胞は、ハイドロゲル(TrueGel3D) と混合し、アレイ化デバイスのマイクロウェルに 1.0 ul ず つピペッティングによって分注した。ハイドロゲルは、 27℃で 25 分間静置することによってゲル化させた。アレ イ化デバイスのチャンバは、BSA を含むアッセイ溶液 (HBSS (ハンクス平衡塩溶液) / 20 mM HEPES, pH 7.2 / 0.1% BSA) で満たした。

## 2.3 蛍光応答の検出

センサ細胞の蛍光応答の測定には、CCD カメラ式ゲル 撮影装置を蛍光イメージャとして使用した。標的匂い物質 であるアセトフェノンは、 DMSO に溶解後、アッセイ溶 液(HBSS/20 mM HEPES)に希釈して使用した。センサ 細胞をアレイ化したデバイスを蛍光イメージャのイメー ジングボックス内に設置し、標的匂い物質を含むアッセイ 溶液をピペッティングによってアレイ化デバイスのチャ ンバに滴下した。蛍光画像の記録は、標的匂い物質を滴下 してから 210 秒間にわたって行われた。記録した蛍光応答 画像の解析には、画像解析ソフトウェア(ImageJ)を用い た。ソフトウェアの ROI 機能を利用して、マイクロウェ ルごとの蛍光輝度の変化を測定し、数値化した。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(Fo) と応答後の蛍光輝度(F)から、正規化した蛍光輝度変化 (*ΔF/Fo*)を算出し、標的匂い物質を含む溶液を添加した時 間を 0 秒とするグラフを作成した。

マイクロウェル内のハイドロゲルに封入されたセンサ 細胞の観察は、青色励起光 (470 nm) と緑色蛍光フィルタ (525 nm) を備えた蛍光顕微鏡を用いて行った。

## 3. 結果と考察

図1に、開発したアレイ化デバイスを示す。チャンバ内 には 81 個のマイクロウェルが配置されている (図 1A)。 マイクロウェルは円柱状構造をしており、チャンバ底面か らの微小突起によって形成されている。マイクロウェルは、 チャンバ内で均等に配置されている。チャンバの深さはマ イクロウェルよりも大きくなっており、アッセイ液でチャ ンバを満たすと、マイクロウェルはアッセイ液で完全に覆 われる。マイクロウェルの側壁には4つのスリットが設け られており(図 2B も参照) これによりチャンバ内のア ッセイ液はマイクロウェルの上部だけでなく、側面からも マイクロウェル内部にアクセスすることが可能である。こ のようなデバイスを用いることにより、ハイドロゲルに封 入されたセンサ細胞をピペッティングによって簡単にア レイ化することができる(図1B)。単一のチャンバ内に複 数種類のセンサ細胞をアレイ化することにより、複数種類 の標的匂い物質を同時に検出することが可能になると考 えられる。

図2に、作製したデバイスを用いてアレイ化したセンサ 細胞と、標的匂い物質に対する蛍光応答の結果を示す。こ こでは、2種類のマイクロウェル構造を用いて、標的匂い 物質に対するセンサ細胞の応答を調べた(図2A)。一方の 構造では、マイクロウェルを形成する側壁に4つのスリッ トがあり、もう一方の構造ではスリットがない。蛍光顕微 鏡画像から、どちらのマイクロウェル構造においても、ハ イドロゲルに封入されたセンサ細胞は流出することなく、


図2 アレイ化したセンサ細胞の蛍光応答。(A)マイクロウェルの蛍光顕微鏡画像。(B)蛍光応答の時間経過。(C)蛍光応答の最大 値の比較。

マイクロウェル内に保持されていることが確認された。粒 子状の構造体は、それぞれ1個のセンサ細胞に相当し、セ ンサ細胞で発現しているGCaMPに由来する緑色蛍光が観 察された。

図 2B は、2 種類のアレイ化デバイスを用いて測定した センサ細胞の正規化された蛍光応答の時間経過を示す。グ ラフの曲線は、それぞれ別々に測定した2種類のデバイス 中の 5 個のマイクロウェルの平均値と標準偏差を表して いる。標的匂い物質であるアセトフェノンを、終濃度100 μM となるようにアレイ化デバイスのチャンバに加えたと ころ、蛍光輝度の増加が確認された。これは、加えられた 標的匂い物質によってセンサ細胞の昆虫嗅覚受容体が活 性化され、その活性化された受容体のイオンチャネルを通 って Ca<sup>2+</sup>が細胞外から細胞質に透過し、細胞質の Ca<sup>2+</sup>濃度 が上昇したことに反応して GCaMP の蛍光輝度が増加した ためである。蛍光応答の時間変化からは、標的匂い物質を 加えてからセンサ細胞の応答が観察されるまでの時間は、 スリットがないマイクロウェルに比べて、スリットがある マイクロウェルで速かった。また、蛍光応答が最大となる のは、両方のマイクロウェルにおいて、標的匂い物質を添 加してから約200秒後であった。

図 2C は、2 種類のアレイ化デバイスを用いて測定した センサ細胞の正規化された蛍光応答の最大値の比較を示 す。スリットがあるマイクロウェルでは、スリットがない マイクロウェルに比べ、センサ細胞の応答が増加すること が確認された。このため、マイクロウェルの側壁に設けら れたスリットは、ハイドロゲルに封入されたセンサ細胞の 標的匂い物質に対する応答に効果的に機能していると考 えられた。すなわち、センサ細胞の応答性を向上させるた めには、センサ細胞を内封したハイドロゲルと標的化学物 質を含む溶液が接する表面積を増大させることが有効で あると考えられる。

本研究では、匂いを形成する複数の匂い物質を選択的に 検出することを目指し、次世代の匂いセンサ素子として期 待されるセンサ細胞を単一のチャンバ内にアレイ化する ためのデバイスを開発した。このデバイスを用いることに より、ハイドロゲルに封入されたセンサ細胞をピペッティ ングによって容易にアレイ化し、標的匂い物質の検出に利 用できる小型のセンサチップを簡便に作製できることが 確認された。また、デバイスの主要な構成要素であるマイ クロウェルの構造を検討することにより、マイクロウェル を形成する側壁に設けられたスリットが、標的匂い物質に 対するセンサ細胞の蛍光応答を向上させることを示した。 今後は、単一のチャンバに複数種類のセンサ細胞をアレイ 化したセンサチップを実際に作製し、複数の標的匂い物質 を選択的に検出する試みを進めていく予定である。本研究 で開発したアレイ化デバイスを活用することにより、複数 種類のセンサ細胞を用いた標的匂い物質の識別が可能と なり、匂いを利用した病気の診断など、さらなる研究の進 展が期待される。

### 【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] Sato K, et al., Nature 2008, 452, 1002-1006
- [2] Wicher D, et al., Nature 2008, 452, 1007-1011
- [3] Carey AF, et al., Nature 2010, 464, 66-71
- [ 4 ] Wang G, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 2010, 107, 4418-4423
- [5] Hirata Y, et al., Lab Chip 2021, 21, 2643-2657
- [6] Mitsuno H, et al., Biosens. Bioelectron 2015, 65, 287-294
- [7] Tian L, et al., Nat. Methods 2009, 6, 875-881
- [8] Hirotsu T, et al., PLOS ONE 2015, 10, e0118699
- [9] Janfaza S, et al., Database 2017, bax055

### アフリカツメガエル卵抽出液を用いた人工細胞内核形成

### 1. はじめに

### 1.1 人工細胞

近年、国内外で人工細胞研究が盛んに行われている。 本研究でいう人工細胞とは、脂質二分子膜によって細胞 のように外界から隔てられた区画、いわゆる脂質二分子 膜小胞(リポソーム)ことである。最近ではその定義が拡 張され、油相中に形成した水相液滴や両親媒性高分子膜 で囲われた小胞、ハイドロゲルなども人工細胞として用 いられる。これらの人工細胞に関する研究は、「ボトムア ップ」の合成生物学として、細胞(様)システムの構築を 行いつつ細胞システムの理解を深めるために、または既 存の細胞を凌駕する機能的で有用な細胞様システムの構 築するために取り組まれている。人工細胞に目的の機能 性を付与する際、人工細胞内への機能性区画の導入およ び、人工細胞内でのそれらの構築などが試みられる。例 えば、これまでにリポソーム内部に光合成反応[1]やミト コンドリアで行われる好気呼吸反応[2]、細胞核が行う遺 伝子発現反応の時空間的制御[3]などを再現し、それを利 用した機能性人工細胞の構築に関する報告がある。しか し、これらの先行研究では既存の細胞が持つ細胞小器官 の機能性の一部を模倣ないし再構築するにとどまり、そ れらの細胞小器官を人工細胞内に完全に構築したという 報告はない。今後、既存の細胞の構造や機能を完全に模 倣した人工細胞を構築するためには、人工細胞内に細胞 小器官を構築する技術を開発することが重要になると考 えている。

### 1.2 アフリカツメガエル卵抽出液

アフリカツメガエル卵抽出液はアフリカツメガエル (Xenopus laevis)の未受精卵を遠心分離し、脂質成分とミ トコンドリアなどを含む卵黄成分を取り除いたもので、 試験管内細胞核形成能[4]や試験管内双極性紡錘体形成能 などの珍しい特徴を持つ生体材料として知られる。この 卵抽出液調製の際にカルシウムイオンを添加したもの は、細胞周期が間期で停止し、DNA を添加するとその 周りに核膜が形成され、細胞核が形成されることが知ら れている。一方、カルシウムイオンを添加していない分 裂期卵抽出液では、添加 DNA を基点とした細胞核形 成、ならびに内部での DNA 複製が起こり、その後、細 胞膜が消失して双極性紡錘体の形成や娘 DNA の分配と いった、通常の体細胞内で細胞周期依存的に見られる動 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

的な細胞活動が見られることで知られている。先行研究 ではこれらの卵抽出液を油相中でマイクロ液滴化し、そ の内部での双極性紡錘体形成および細胞核形成が報告さ れている。しかし、これらをわれわれが人工細胞と呼ぶ リポソームの内部で形成したという報告はない。

### 1.3 界面通過法

一般にリポソーム形成手法には大きく分けて①水和法 と②界面通過法、③ダブルエマルション法の3つがあ る。このうち特定組成を持った水相溶液を内封したリポ ソームの作製には②界面通過通法が最も広く用いられ る。界面通過法では脂質を分散したオイルの中で標的溶 液のマイクロ液滴形成を行い、液滴界面に脂質分子を吸 着させてエマルション化する。さらに、このエマルショ ンを脂質分散オイルとリポソーム外液の界面に形成され た反対極性の脂質単分子膜で包み込むことで、標的マイ クロ液滴をリポソーム化する(図1)。一般的には、この 際、マイクロ液滴とリポソーム外液との間に密度差を作 り、遠心力などを用いて界面通過の促進が行われる。こ れまでに様々な研究において、この界面通過法を用いた 様々な生体分子のリポソーム内封が行われてきた。しか し、アフリカツメガエル卵抽出液に関しては未知のタイ プの卵抽出液内封の報告はあるが、その後の卵抽出液内 封リポソームの中で双極性紡錘体形成や間期細胞核形成 などに関する報告はない。

### 1. 4 卵抽出液内封リポソーム内細胞核形成

本研究では、アフリカツメガエル間期卵抽出液を用 い、リポソーム内での細胞核形成の実現に取り組む(図 2)。まず、界面通過法を用いた間期卵抽出液の効率的な リポソーム内封条件の検討を行い、効果的なリポソーム 内封プロトコル構築を行う。次に、作製した間期卵抽出 液内封リポソーム内にて細胞核形成反応を誘導し、核形 成反応後のリポソームの顕微鏡観察を行う。その際、形 成された核様構造の核内輸送能を評価する。さらに、リ ポソーム内に形成された核様構造について、免疫染色法 を用いた分子的特徴づけを行う。なお、本研究の詳細に ついてはプレプリントで報告している[6]。

### 2. 実験方法

### 2.1 卵抽出液内封リポソーム作製



図 1 界面通過法によるリポソーム作製.本研究の特徴として クロロホルム添加と待ち時間の導入を行っている.

アフリカツメガエル間期卵抽出液内封リポソームは下 記のように作製した。まず、氷上で間期卵抽出液(Ext)、 Energy mix(EM)、GFP-NLS、精子クロマチン(XSP)を 融解し、これらを Ext/EM/GFP-NLS/XSP = 50/1/1/1 の体積比で混合した後、ボルテックスおよびスピンダウ ンを行って氷上に静置した。1 mLの脂質分散オイル(2.5 mM POPC in mineral oil w/  $\Delta$ % chloroform)を1本の 2.0 mL チューブ(チューブ#1)に取り、氷上で冷却し た。続いて 1.5 mL チューブ(チューブ#2) 2 本を用意し、 150  $\mu$  L  $\mathcal{O}$  egg lysis buffer (250 mM sucrose, 10 mM HEPES pH 7.7, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT)、および 150 µL の脂質分散オイルを順番に重層 し、氷上で冷却した。その直後、チューブ#1 に 50 µL の卵抽出液ミックスを添加し、チューブ#2と合わせて氷 上で τ 分間油水界面の培養を行った(τ:待ち時間)。界 面培養後、チューブ#1を1分間ボルテックス(3,200 RPM) し、ボルテックスした卵抽出液ミックス入脂質分 散オイルを 500 μL ずつ直ちにチューブ#2の脂質分散 オイル上に氷上で重層した(2本)。次に、これらのチュ ーブ#2 を 4℃、9,000g で 30 分間遠心し、界面通過を行 った。遠心後のチューブ#2 を氷上に回収し、18G シリン ジ針を用いてチューブの底、リポソームペレット付近に 貫通穴を開け、蓋を開けたチューブトップに人差し指で 圧をかけることで、リポソームペレットをチューブから 押し出し、あらかじめ氷上で冷却しておいた1mL egg lysis buffer に分散・回収した。回収後のリポソームは直 ちにチューブをボルテックスすることによって撹拌し、 次の核形成反応誘導実験まで氷上で静置した。

### 2.2 リポソーム内細胞核形成

間期卵抽出液を内封したリポソーム内での細胞核形成 融合実験は下記のように行った。まず、卵抽出液内封リ ポソームを含む egg lysis buffer が入ったチューブを 22℃ にセットしたブロックインキュベータに静置し、90 分間 細胞核形成反応の誘導を行った。その後、200g で5 分間 遠心し、上澄みを捨て、総体積が 140 μL になるように 調整した。この際、DNA を蛍光染色するために最終濃 度5 μM の SYTO41 を添加してボルテックスを行っ た。蛍光染色後のリポソームは、BSA コートしたガラス



図 2 アフリカツメガエル間期卵抽出液内封リポソームを用い たリポソーム内細胞核形成.

とフレームシールで作製した顕微鏡観察用スライドサン プルに内封し、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。

### 2.3 リポソーム内核様構造の免疫染色

リボソーム内に形成された核様構造の分子構造を確認 するために、核膜孔複合体タンパク質抗体(mAb414-AF594)を用いた免疫染色を行った。まず、細胞核形成反 応を行ったリボソームを4°C、200gで5分間遠心し、上 澄みを捨てて体積を100  $\mu$ Lに調整した。次に、チュー ブを氷上に設置し、100  $\mu$ Lの固定液を添加した。氷上 で1時間静置した後、1 mLのクエンチ液を加え、4°C, 1,000gで5分間遠心した。上澄みを捨てて体積を100  $\mu$ Lに調整し、そこへ1  $\mu$ Lの0.5 mg mL<sup>-1</sup> mAb414-AF594 を添加して、氷上で一晩培養した。翌日、1 mL のクエンチ液を添加し、4°C、1,000gで5分間遠心した 後、上澄みを捨て、体積を100  $\mu$ Lにした。最終濃度5  $\mu$ MのSYTO41を加えてDNAの蛍光染色を行い、顕微 鏡観察用スライドサンプルに内封して、共焦点顕微鏡観 察を行った。

### 3. 結果と考察

### 3.1 卵抽出液内封リポソーム作製

クロロホルム添加量(Δ)と待ち時間(r)を変化させな がら界面通過法による卵抽出液内封リポソーム作製実験 を行った。その結果、形成されたリポソーム数とリポソ ームへの卵抽出液内封率について、クロロホルム添加に よる増加が見られた。一方、待ち時間については、形成 リポソーム数の増加に関してのみ有意な寄与が見られ た。各待ち時間条件ごとにも、クロロホルム添加量の増 加とともにリポソーム数(図3上)および卵抽出液内封率 (図3下)それぞれについて有意な増加が見られた。一 方、クロロホルム添加量の増加に対してこれらの変数の 有意な増加は認められなかった。これらはクロロホルム 添加が界面通過法を用いた卵抽出液内封リポソームの形 成に有効であること、待ち時間についてもリポソーム数 を増やすために有効であることを示唆している。

### 3.2 リポソーム内細胞核形成

界面通過法を用いて作製した間期卵抽出液内封リポソ ームを 22℃で 90 分間培養し、リポソーム内での細胞核



図 3 界面通過法による卵抽出液内封リポソーム作製. Δ:クロ ロホルム添加量、 r:待ち時間.

形成反応を誘導した。その結果、リポソーム中に核様構 造の形成を確認した。この際、形成された核様構造が核 としての特徴を持つかどうか確認するために、事前に核 移行シグナル(NLS)付 GFP(GFP-NLS)を卵抽出液に内封 した。その結果、リポソーム内に DNA と GFP-NLS が 同所局在する様子が見られた(図4上)。一方、NLS が付 いていない GFP では、リポソーム内での DNA 凝縮は見 られたが、GFP がリポソーム内部全体に分布する様子が 見られた(図4下)。これらは観察された核様構造が DNA と核内輸送能という細胞核の部分的特徴を持つことを示 唆している。

### 3.3 リポソーム内核様構造の免疫染色

リポソーム内形成が確認された核様構造について、細胞核としての特徴を追加で確認するために、核膜孔複合体タンパク質(NPC)抗体を用いた免疫染色実験を行った。その結果、固定したリポソーム内において、DNAとGFP-NLSの同所局在に加え、NPC抗体がそれらの区画の表面に集中して分布する様子が見られた(図4上)。これは、バルク条件の卵抽出液内で形成した細胞核の免疫染色結果と一致するものだった(図4下)。これらは観



**図 4 細胞核形成反応誘導後の卵抽出液内封リポソーム.** スケ ールバー:10 μm.



図 5 核様構造内封リポソーム、およびバルク卵抽出液中形成核 に対する、核膜孔複合体(NPC)抗体を用いた免疫染色. スケール バー:10 μm.

察された核様構造の表面に核膜孔複合体が分布している ことを意味しており、観察された核様構造が核内輸送の 機能に加えてその表面に核膜孔を持っていることを示唆 している。

### 【謝辞】

本研究で用いたアフリカツメガエル卵抽出液の調製 には新冨圭史博士(理研)にご協力いただきました。また、 GFP-NLS については原裕貴博士(山口大学)に譲渡いただ きました。本研究内容の一部は、戦略的創造研究推進事業 CREST「機能的人工染色体の設計と利用のための革新的 研究」(JPMJCR18S5)、科研費 (JP21H05013、 JP22K15080)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] Lee, K.Y., Park, S.J., Lee, K.A., Kim, S.H., Kim, H., Meroz, Y., Mahadevan, L., Jung, K.H., Ahn, T.K., Parker, K.K. and Shin, K., 2018. Photosynthetic artificial organelles sustain and control ATPdependent reactions in a protocellular system. *Nature biotechnology*, **36**(6), pp.530-535.
- [2] Westensee, I.N., Brodszkij, E., Qian, X., Marcelino, T.F., Lefkimmiatis, K. and Städler, B., 2021. Mitochondria encapsulation in hydrogel - based artificial cells as ATP producing subunits. *Small*, 17(24), p.2007959.
- [3] Aufinger, L. and Simmel, F.C., 2018. Artificial gelbased organelles for spatial organization of cell - free gene expression reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(52), pp.17245-17248.
- [4] Lohka, M.J. and Masui, Y., 1983. Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science*, 220(4598), pp.719-721.
- [5] Chiba, M., Miyazaki, M. and Ishiwata, S.I., 2014. Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by the inverted emulsion method. *Biophysical journal*, **107**(2), pp.346-354.
- [6] Takamori, S., Mimura, H., Osaki, T., Kondo, T., Shintomi, M., Shintomi, K., Ohsugi, M. and Takeuchi, S., 2024. Nuclear assembly in giant unilamellar

vesicles encapsulating *Xenopus* egg extract. *bioRxiv*, pp.2024-06.

### 均一サイズ巨大ベシクル作製技術の開発

1. はじめに

創薬の標的として重要な G タンパク質共役受容体 (GPCR) やトランスポータなどの膜タンパク質について は、細胞における物質授受や神経におけるシグナル伝達な どの生命現象に深く関与していることが知られており、光 学的観測技術の向上とともに培養細胞上での機能解析が 盛んに行われている。しかしながら、細胞上では単一の膜 タンパク質の機能を観測・評価することは困難であるため、 近年、人工細胞膜(脂質二重膜)が注目され、利用される ようになってきている。人工の脂質二重膜の中で、顕微鏡 観察に適した大きさである直径 10 マイクロメートル程度 の細胞サイズのベシクル(脂質二重膜小胞)も古くから用 いられているものの一つである。脂質二重膜が水相を内包 した形状のベシクルは、水中において脂質分子が自己組織 化により形成する構造の一つである[1]。その球状膜にお いて直径が数~数百マイクロメートルのものは巨大ベシ クルと呼ばれ、上述の通り、膜タンパク質研究や人工細胞 研究に多く利用されている[2]。

巨大ベシクルの形成には静置水和法やエレクトロフォ ーメーション法が一般的に用いられてきた[1]。どちらの 手法も試験管内やガラス基板上、電極上などで脂質を薄い 層にして乾燥させた後、水和させることでベシクルを自発 的に形成させるが、これらの手法では形状やサイズを揃え たり、制御したりすることはできなかった[1,3,4]。また、 浮遊しているベシクルでは経時的な観察を行う上で課題 があった。他方、脂質分子を分散させた油中水滴を水相の 上に積層し、遠心力などで水滴を油相から水相に移すこと によりベシクルを得る遠心沈降法(界面通過法)も多く利 用されるようになった[5]。また、サイズ制御の課題を解 決するため、マイクロ流体デバイスを用いたベシクル形成 方法も近年では盛んに研究が行われている。

そこでわれわれも、微細加工技術(MEMS)を利用する ことでこれらの問題を解決し、膜タンパク質研究や人工細 胞研究に資する、形状・サイズの整った巨大ベシクルを効 率よく形成できる手法の開発を目的として独自に研究を 行ってきた。その結果、脂質薄膜を基板上に微細パターニ ングできる方法を新たに見出し、この脂質薄膜の微細パタ ーンを水和させることにより、細胞サイズの巨大ベシクル をサイズ・形状を制御して形成・アレイ化することに成功 した。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[6]。

### 人工細胞膜システムグループ 大崎寿久、神谷厚輝、竹内昌治

### 2. 実験方法

本研究で開発した脂質薄膜の微細パターニングの手法 の概要を図 1a に示す。先行研究により、パターニングさ れた脂質薄膜を水和することでベシクルの形状やサイズ の均一性を改善できることが示唆されてきたが[3, 4]、再 現性の高いパターニング手法は報告されていなかった。本 研究では、絶縁性・導電性の複合基板構造とエレクトロス プレー法を組み合わせることで、脂質薄膜の微細パターニ ングを実現した。

### 2.1 複合材料基板の作製

図 1b に基板の作製プロセスを示す。ITO 薄膜を蒸着し たガラス上にパリレン高分子フィルムを CVD プロセスに より蒸着した。フィルム厚は 1 µm とした。このパリレ ンフィルムに、一般的なフォトリソグラフィープロセスを 用いて直径 5~30 µm の円形孔をパターニングした。こ れにより、円形孔底面は導電性の ITO 電極が露出し、そ れ以外は絶縁性のパリレンフィルムに覆われた絶縁性・導 電性の複合基板構造を得た。

### 2.2 脂質薄膜のパターニング

エレクトロスプレー法[7]による脂質塗布の模式図を図 1c に示す。内径 15 µm のガラスキャピラリを先端に接 続したシリンジには脂質溶液が満たされている。このシリ ンジに直流高電圧を印加することでキャピラリ先端から 脂質溶液が噴霧される。スプレーされた脂質は乾燥しなが ら複合材料基板の ITO 電極が露出した導電性表面、すな わち円形孔パターン底面にのみ堆積し、パリレンフィルム によりマスクされた絶縁性部分は回避される。脂質分子と して DOPC (0.5 mg/mL)を、スプレー条件として印加電 圧 0.5~2.0 kV、塗布時間 1 分を用いた。また蛍光顕微鏡 による観察を行うため、DOPC に対して 1wt%の蛍光脂質 (Rhod-DPPE)を混合した。

### 2.3 静置水和法によるベシクル形成

エレクトロスプレー法によりパターニングされた脂質 薄膜は真空デシケータ中で1時間以上乾燥し、保存した。 巨大ベシクルの形成は、静置水和法により行った。基板上 にシリコーンゴムにパンチで穴を開けたチャンバを貼り 付け、チャンバに水溶液を滴下することで水和を行った。 水和による巨大ベシクル形成の様子は、倒立型共焦点顕微 鏡により行った。



図1 エレクトロスプレー法による脂質分子の微細パターニング。(a)本方法による均一サイズ巨大ベシクル作製の概念図。(b)パリレ ンフィルムのパターニングプロセス。(c)複合材料基板上へのエレクトロスプレーの模式図。(d)基板上への脂質スプレー前後の明視野 顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真。(e)AFMによる脂質パターン画像。左画像の破線部の断面プロファイル(右上)。パターン上の脂質量分 布(右下)。AFM画像から見かけの体積を推定。実線はガウス分布。Reproduced from ref. [6].

### 3. 結果と考察

### 3. 1 巨大ベシクルの形成

まず、導電性・絶縁性複合材料基板上の脂質分子の微細 パターンの様子を示す(図1d)。明視野顕微鏡および蛍光 顕微鏡画像から、絶縁性のパリレン領域上ではなく、導電 性 ITO 電極上にのみ脂質分子が堆積していることを示し ている。エレクトロスプレーによりキャピラリ先端から噴 霧された脂質は、基板表面に堆積する前に乾燥していると 理論的に考えられる。液滴蒸発の原理に従うと、マイクロ メートル以下のサイズで噴霧された液滴(ミスト)は、1 ミリ秒以内に急速に蒸発する。蒸発までにミストが移動で きる距離は 500 µm 以下と推定され、本研究のキャピラリ 先端から基板までの距離 20 mm よりも十分に小さいため、 脂質粒子として基板に堆積していると考えられる。このこ とは、原子間力顕微鏡 (AFM) 画像からも支持されている (図 1e)。AFM による断面プロファイルが台形形状であ ることは、本パターニング法がコーヒーリングの形成を回 避し、均一な脂質薄膜パターンを作製できることを示して いる。

次に、脂質薄膜パターンの水和による巨大ベシクルの形 成を示す(図2)。脂質薄膜パターン上に水溶液を導入する と、脂質分子の自己組織化が始まり、基板上に均一サイズ のベシクルが形成された。得られたベシクルの形状は、エ レクトロスプレーにより堆積した脂質量に応じて、ドーム 状構造(図2a)から球状構造(図2b)へと変化した。図 2cに示すように、直径20.2±1.2 μm(変動係数(CV) 5.9%)の1000個を超える均一径の巨大ベシクルを得ることに成功した。均一な脂質薄膜パターンを形成できたことにより、ベシクルサイズの均一性が得られたと考えられる。 脂質薄膜の水和は、水溶液の導入後ただちに開始し、5分以内に完了した。

### 3.2 ベシクルアレイの評価

巨大ベシクルのサイズは、円形孔パターン上の脂質量を 調節することで制御できる。すなわち、円形孔パターンの 面積を変えることでベシクル直径を制御した。図 2d-h に 示すように、形成されたドーム型ベシクルの直径は、円形 孔とともに大きくなることが分かった。またそのときの CV は、円形孔パターン 5~20 μmの範囲で 8%未満であ り、均一径のベシクル形成を制御できた。

次に、巨大ベシクルを形成する脂質二重膜のラメラリティ(単層性)について確認した。蛍光脂質を含む脂質二重 膜の共焦点顕微鏡画像は、膜の層の数に従って離散的な輝 度を示すと考えられる。本研究で得られた巨大ベシクルの 蛍光輝度を確認したところ、単層と考えられるベシクルで は均一な輝度、小胞を含むベシクルではその2倍の輝度を 示したことから、単一層の脂質二重膜からなるベシクルが 形成できたと考えられる(図 2i)。

本方法の汎用性を確認するため、様々な組成の脂質を用 いた巨大ベシクル形成を行った。標準条件では、DOPC単 一脂質と DOPC/DOPS の 1:1 混合脂質を用いた(図 2)。 これらの脂質は動植物の細胞膜の主要な構成要素であり、 DOPC は双性イオンの極性基をもち、DOPS は 1 つの正 電荷と 2 つの負電荷を有する。また、9:1 の DOPC/DOPS



図2 脂質微細パターンから作製した巨大ベシクルの共焦点蛍光顕微鏡像。(a) ドーム型ベシクルと(b) 球状ベシクル。一連の共焦点二 次元スライス画像から再構築。(c) 均一サイズの巨大ベシクルアレイ。パリレンパターンは直径 22.7 µm。全体像は 4×5 の画像をつな ぎ合わせた。(d-g) パターンサイズを変えて得られたさまざまなサイズのベシクルアレイ。(h) 各パターンにおけるベシクルサイズ分布 を示すヒストグラム。平均直径は、4.2±0.3、9.7±0.7、20.4±0.8、34.4±2.6 µm(平均±標準偏差)。青色の矢印はパリレンパターン の直径。(i) 蛍光輝度の離散分布に基づいて評価したベシクルの脂質二重膜の単層性。単一ベシクル(青)と小胞を含むベシクル(赤) の投影輝度からヒストグラムを得た。Reproduced from ref. [6].

混合脂質や1:1:1 DOPC/DOPS/コレステロール混合脂質 でも均一巨大ベシクルを作製できた(図 3a,b)。さらに、 DOPC、DOPS、スフィンゴリン脂質(SM)、コレステロ ールの混合脂質によるパターニングと、巨大ベシクルアレ イの形成にも成功した(図 3 c-f)。これらの脂質はその混 合比率によってベシクル形成後にベシクル内で相分離が 起こり、ベシクル上に小ベシクルが出芽する。蛍光画像か ら、その相分離と出芽の様子を確認することができた。

### 4. まとめ

エレクトロスプレー法を用いて微細パターニングした 脂質分子の水和により巨大ベシクルの自発的形成を制御 する方法について提案を行い、形成した巨大ベシクルの評 価を通して本方法の妥当性を検証した。脂質分子の均一な 微細パターニングを行うため、導電性・絶縁性パターン化 基板とエレクトロスプレー法を併用した。脂質パターンの 正確性が巨大ベシクルの均一性に寄与することが分かっ た。個々のスポットから誘導されたベシクルは高い単分散 性を示し、変動係数 (CV) は 8%以下であった。本方法に より数平方ミリメートルに及ぶ領域に配列された多数の 単分散ベシクルが得られ、統計的、時間分解的な解析に適 した巨大ベシクルアレイを構築することができた。本成果 は、ベシクルのサイズと位置を正確に操作できるため、ベ シクルや膜タンパク質などに関する研究に利用できると 考えられる。例えば、アレイ化されたベシクルは、細胞組 織を模倣した二次元モデルとして利用できる可能性があ



図 3 種々の脂質組成から作られた巨大ベシクルアレイの共焦点 顕微鏡写真。(a) 9:1 DOPC/DOPS。平均径:13.7±0.9 μm。(b) 1:1:1 DOPC/DOPS/コレステロール。平均径:15.6±1.2 μm。 (c) 24:23:32:21 DOPC/DOPS/SM/コレステロール(1wt% DIC)。 (d) 14:14:52:20 DOPC/DOPS/SM/コレステロール(1wt% CF-DOPE)。(e, f) c および d の結果に対応する一連の共焦点画像か ら再構築された重畳画像。Reproduced from ref. [6].

り、また異なる膜湾曲上の膜タンパク質の分布と機能を研 究するためにのプラットフォームとしての活用も期待で きる。

### 【謝辞】

本研究内容の一部は、JSPS 科研費 (JP26600066, JP25706015, JP23710154)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】

- P. L. Luisi, P. Walde, Giant Vesicles, John Willy and Sons Inc., New York, 2000; N. Duzgunes, Methods in Enzymology Vol. 367 Liposomes Part A, Academic Press, California, 2003.
- [2] A. Karlsson, R. Karlsson, M. Karlsson, A-S. Cans, A. Strömberg, F. Ryttsén, O. Orwar, Networks of Nanotubes and Containers, Nature 2001, 409, 150-152; I. A. Chen, K. Salehi-Ashtiani, J. W. Szostak, RNA Catalysis in Model Protocell Vesicles, J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 13213-13219; G. Tresset, S. Takeuchi, Utilization of Cell-sized

Lipid Containers for Nanostructure and Macromolecule Handling in Microfabricated Devices, Anal. Chem. 2005, 77, 2795-2801.

- [3] K. Kuribayashi, G. Tresset, H. Fujita, S. Takeuchi, Electroformation of Giant Liposomes in Microfluidic Channels, Meas. Sci. Technol. 2006, 17, 3121-3126.
- [4] M. Le Berre, A. Yamada, L. Rech, Y. Chen, D. Baigl, Electroformation of Giant Phospholipid Vesicles on a Silicon Substrate: Advantages of Controllable Surface Properties, Langmuir 2008, 24, 2643-2649.
- [5] H. Saito, Y. Kato, M. Le Berre, A. Yamada, T. Inoue, K. Yoshikawa, D. Baigl, Time-Resolved Tracking of a Minimum Gene Expression System Reconstituted in Giant Liposomes, ChemBioChem 2009, 10, 1640- 1643; V. Noireaux, A. Libchaber, A Vesicle Bioreactor as a Step toward an Artificial Cell Assembly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 17669-17674; S. Ota, S. Yoshizawa, S. Takeuchi, Microfluidic Formation of Monodisperse, Cellsized, and Unilamellar Vesicles, Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 6533-6537.
- [6] T. Osaki, K. Kamiya, R. Kawano, K. Kuribayashi-Shigetomi, S. Takeuchi, Controlled Self-Assembly of Vesicles by Electrospray Deposition, Small Struct. 2024, 5, 2300543.
- [7] O. V. Salata, Tools of Nanotechnology: Electrospray, Curr. Nanosci. 2005, 1, 25-33.

# 業 績

### 【原著論文】

- Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Izumi Hashimoto, Yuya Morimoto, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi Real-time quantitative characterization of ion channel activities for automated control of a lipid bilayer system *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 237, 115490 (2023)
- Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi
   A microfluidic device for selective pairing and electrofusion of cell-sized liposomes *Sensors and Actuators: B. Chemical*, Vol. 393, 134226 (2023)
- Izumi Hashimoto, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sugiura, Hisatoshi Mimura, Sho Takamori, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi Reproducible reformation of a bilayer lipid membrane using microair bubbles *Droplet*, Vol. 2, e73 (2023)
- Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, Kenji Nakao, and Shoji Takeuchi Lipid Bilayer Reformation Using the Wiping Blade for Improved Ion Channel Analysis Analytical Chemistry, Vol. 95, 17354-17361 (2023)
- Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, and Shoji Takeuchi Controlled Self-Assembly of Vesicles by Electrospray Deposition Small Structures, Vol. 5, 2300543 (2024)

### 【口頭発表】

- 竹内昌治
   Think Hybrid. ~ 匂いセンサから培養肉まで ~
   味の素株式会社社内講演, 2023 年 4 月, 神奈川
- 2. 竹内昌治 細胞エンジニアリングによる三次元組織構造
   第 31 回日本医学会総会 2023 東京, 2023 年 4 月, 東京
- Shoji Takeuchi Microfluidics for biohybrid robotics MICROSYSTEM ANALYSIS THAILAND SYMPOSIUM 2023, 2023 年 5 月, Bangkok, Thailand

- Shoji Takeuchi
   3D printing of biohybrid systems
   2nd French-Japanese Workshop on Additive
   Manufacturing, 2023 年 5 月, Tokyo
- 竹内昌治 Think Hybrid ~ ロボットから培養肉まで~
   第1回「物質、デバイス、生命の融合」研究会,2023 年5月,北海道及びオンライン
- Shoji Takeuchi Biohybrid robotics based on microfluidic technology Swedish Microfluidics in Life Sciences (SMILS 2023), 2023 年 5 月, Stockholm, Sweden
- 竹内昌治
   Think Hybrid! 異分野融合で近づく SF の世界
   市民公開講座 第 136 回分子科学フォーラム, 2023 年
   6月、オンライン
- 竹内昌治
   MEMS 技術の展望とバイオものづくりへの展開
   マイクロマシンセンター オンライン講演会, 2023 年
   6月, オンライン
- 竹内昌治 バイオハイブリッドな研究のすすめ 日本学術振興会 R041 バイオ・分子・ナノテクノロジ ー融合委員会第3回研究会, 2023 年6月, オンライン
- 竹内昌治 バイオハイブリッドデバイス技術
   第 2 回生理研 - 北大遺制研ジョイントシンポジウム, 2023 年 9 月, 北海道及びオンライン
- 竹内昌治
   Think Hybrid. ~異分野融合研究のすすめ~
   第 49 回ケミカルバイオロジー研究所セミナー, 2023
   年 9 月,大阪
- 高森翔、三村久敏、大崎寿久、近藤興、新冨美雪、 新冨圭史、大杉美穂、竹内昌治 アフリカツメガエル卵抽出液内封リポソーム内部構 造解明へ向けた研究
   「細胞を創る」研究会 16.0, 2023 年 9 月,東京
- 13. 大崎寿久 人工細胞膜技術を用いた創薬支援と次世代センサの

研究開発 第 37 回機械系セミナー, 2023 年 9 月, 東京

 Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, Kenji Nakao, and Shoji Takeuchi
 SHAPE-CONTROLLED LIPID BILAYER FOR ENHANCED ION CHANNEL INCORPORATION The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2023), 2023 年 10 月, Katowice, Poland

 Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki and Shoji Takeuchi
 A CENTRIFUGAL DROPLET FORMATION UNIT FOR SINGLE-STEP GENERATION OF GIANT LIPOSOMES IN A CDICE DEVICE
 The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2023), 2023 年 10 月, Katowice, Poland

- 16. 大崎寿久、中根卓馬、三村久敏、高森翔、三木則尚、 竹内昌治
   匂いガスの流れを利用した細胞匂いセンサの応答性の向上
   化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会, 2023 年11月,熊本
- 三村久敏、大崎寿久、高森翔、小田悠加、竹内昌治 ハイドロゲルトラップ構造を用いたセンサ細胞アレ イの開発 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会, 2023年11月,熊本
- 18. 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
   細胞を複数配列するためのハイドロゲルストリップ 作製デバイス
   化学とマイクロ・ナノシステム学会第48回研究会, 2023年11月、熊本
- Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Tomo Kondo, Miyuki Shintomi, Keishi Shintomi, Miho Ohsugi and Shoji Takeuchi A challenge for nuclear assembly in synthetic cells using Xenopus egg extract 第 61 回日本生物物理学会年会, 2023 年 11 月, 愛知
- 20. 竹内昌治

バイオハイブリッドなものづくり キャノンメディカルシステムズ株式会社 ARL セミナ -2023「生体工学~細胞プロセシングの最先端」, 2024 年 1 月, 栃木

### 【特許】

国内特許出願 3件

# 研究報告2024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

◆総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	120
◆次世代ライフサイエンス評価事業の取り組み・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	123
◆抗バイオフィルム活性測定試験の受託に向けた取り組み・・・・・・・・・・・・・・・・・・	126
◆業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	128

## 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】

本プロジェクトは国際評価技術センターとして、「感染症」、「未病」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・維持しており、高い品質による抗菌・抗ウイルス性能 評価サービスの提供、各種団体の認証マーク取得に向けた性能評価サービスの提供等を通じて、企業の研 究開発を推進できるように取り組みを続けている。更に、本プロジェクトによる性能評価サービスの特徴 として、規格試験では対応できない抗菌・抗ウイルス材料について、応用的な性能評価方法を組み立てた 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 や細胞や生体に食品成分を作用、摂取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、 食品成分の機能性を評価するサービスであり、「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 の未病ブランドの認定を受けている。上記に加えて、新しい評価系技術の構築への取り組みとして、「再生・ 細胞医療」に関して、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 いる。2023 年度は間葉系幹細胞(MSC)のロット間における細胞集団と血管新生因子の発現量の違いを明ら かにしており、細胞品質特性マーカーによる MSC の品質管理の手法を確立している。また、iPS 細胞につ いての品質特性マーカーの探索を進めており、神経前駆細胞へ分化しやすい iPS 細胞株を予測できるマー カーを明らかにしている。現在は、これらの技術を更に展開することで、新しい品質特性マーカーの探索 や各企業の製品開発の品質特性を評価できるサポート体制を整えているところである。

### 1. 2023 年度の研究目的

2023 年度の取り組みとして、以下について重点的に取り組みを進めた。

### 1-1. 各種抗微生物材料・製品の性能評価サービスの提供

昨年度に引き続き、ISO 17025 の維持と技術の向上に向 けた取り組みを行うとともに、各種材料による抗微生物性 能評価サービスの提供を行う。特に、規格外の材料や製品 について、適切な試験方法を組み立てた性能評価方法を提 供していく。これにより、各企業の研究開発を推進してい く。また、2023年度に、抗かび性能評価試験や抗バイオフ ィルム性能評価試験を新しい性能評価サービスとして提 供すべく、性能評価サービス提供への整備を進めるととも に、更に安定した品質の高い評価サービスとするための検 討を進めた。特に、抗バイオフィルム試験は ISO 4768 と して、2023年に標準化されており、市場において注目さ れている性能評価試験方法である。一方で、作業が煩雑な 面もあり、安定した結果を出すための検討が今後も必要と 考えられる。今年度は静置培養時の条件による違いと試験 結果に及ぼす影響について明らかとすることを目的とし た検討を進めた。

### 1-2. 新たな評価サービスの提供に向けた取り組み

新たな評価サービスとして、①再生細胞医療に関わる細 胞特性の理解と品質評価サービス、②実ウイルスを用いた 光触媒の抗ウイルス性能評価試験方法の国際標準化の二 つのテーマついて、取り組みを進めた。

再生細胞医療の細胞特性の理解と品質評価サービスで は、シングルセル解析による間葉系幹細胞(MSC)の有効性 を評価する方法が研究や製品開発の重要な点になると考 え、経済産業省「令和4年度第二次補正予算「再生・細胞 医療・遺伝子治療の社会実装に向けた環境整備事業費補助 金」の「東日本における再生・遺伝子細胞治療の社会実装 基盤の構築(代表機関:学校法人藤田学園)」に参画した中 で、MSC の品質特性マーカー探索から品質評価方法確立 の基盤整備として、シングルセル解析装置の導入を行った。 また、シングルセル解析に用いる各種キットの比較を開始 し、品質評価サービスに使用する適切な手法について検討 を進めている。

実ウイルスを用いた光触媒の抗ウイルス性能評価試験 方法の国際標準化では、光触媒工業会が経済産業省「令和 4年度省エネルギー等に関する国際標準の獲得・普及促進 事業委託費(省エネルギー等国際標準開発(国際標準分野))」 の委託を受けて、2022年度より3年間の計画で、実ウイ ルスを用いた光触媒の抗ウイルス性能評価試験の国際標 準化(ISO化)に向けた活動を行ってきた。2023年度は、2022 年度に作成した評価試験方法案に基づいて、試験方法の妥 当性等についての検討を進めた。また、国際標準化に向け ては、北東アジア標準化フォーラム、ISO/TC206 WG9 や アジア光触媒標準化会議といった国際会議で実ウイルス を用いた性能評価方法の必要性や方法についての周知活 動も行った。

### 2. 2023 年度の研究成果

### 2-1. 各種抗微生物材料・製品の性能評価サービスの提供

新型コロナウイルスの感染拡大時から数年が経ち、抗 菌・抗ウイルス加工製品の研究開発も落ち着きを取り戻し つつある。一方で、今後も新たな菌やウイルスによる感染 症の拡大が起きる可能性もあることから、新型コロナウイ ルスの感染を教訓として、人々の新しい生活環境の整備が 重要である。このような背景のもと、抗菌・抗ウイルス加 工製品の重要性は更に高まると考えており、2023年度も 積極的な抗菌・抗ウイルス性能評価サービスの提供を行い、 多くの企業や研究機関の研究開発を推進することが出来 た。また、2023年度は防薬性能評価試験の需要が高くな っている傾向があり、抗菌・抗ウイルス性能評価試験だけ ではなく、様々な微生物を対象とした研究開発が進められ ていると考えられる。

抗かび性能評価試験サービスについては、光触媒加工品 を対象とした JIS R 1705 り及び抗かび繊維製品を対象とし て JIS L 1921<sup>2)</sup>の JIS について、試験整備を進めた。その 結果、8月に JIS R 1705、12月に JIS L 1921 の各抗かび性 能評価試験サービスを開始し、企業の研究開発支援につな げることが出来ている。その他、ISO 4768 3に基づいた抗 バイオフィルム性能評価試験サービスの提供も開始した。 ISO 4768 3)については、試験整備を進めていく段階より、 安定した評価結果を出すための条件検討を続けており、 2023 年度は静置培養時に使用する恒温器の使用頻度(ドア の開閉回数等の違い)とバイオフィルム形成能の変化につ いて検討を行った。その結果、使用頻度の高い恒温器で形 成されたバイオフィルム量は使用頻度の低い恒温器で形 成されたバイオフィルム量と比較して、形成量が少ないこ とが明らかとなった。また、使用頻度の低い恒温器で得ら れるバイオフィルム量が安定し、ばらつきも少ない傾向で あった。この原因は不明であるが、ドアの開閉による振動 や温度変化が影響している可能性があり、今後さらに検討 を行う予定である。

### 2-2. 新たな評価サービスの提供に向けた取り組み 2-2-1. 再生細胞医療の関わる細胞特性の理解と品質評価 サービス

MSC や iPS 細胞による再生細胞医療分野の研究開発、 臨床応用が盛んに進められている中で、有効性及び安全性 の評価方法が大きな課題となっている。特に、MSC に関 しては細胞の不均一性により、治療に対する有効性のばら つきが非常に大きいことが考えられる。そのため、MSC の 細胞集団の不均一性を知り、品質特性の指標となるマーカ ーを明らかにすることにより品質特性を理解することで、 どのような細胞集団を用いて有効性の高い製品開発につ ながると考えている。

我々は MSC の不均一性を分類するために、シングルセ ル解析を用いてクラスター分類を行った。また、虚血環境 で培養した MSC から血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の産 生能を確認し、細胞のクラスター分類と VEGF 産生を比 較することで、VEGF 産生に関与する細胞集団及び遺伝子 の同定を行った<sup>4)</sup>。本検討結果から、MSCの治療有効性の ばらつきの問題と考えられる不均一な細胞集団の中から 目的とする細胞集団を同定し、またその品質特性マーカー の探索、それに基づいた評価方法の手法が確立された。本 評価方法が普及することで、MSC を用いた再生細胞医療 に関する研究及び製品開発が促進されることが期待され る。そこで、経済産業省「令和4年度第二次補正予算「再 生・細胞医療・遺伝子治療の社会実装に向けた環境整備事 業費補助金」の「東日本における再生・遺伝子細胞治療の 社会実装基盤の構築(代表機関:学校法人藤田学園)」の一 環として、シングルセル解析装置や周辺機器の整備を進め た。また、MSC のロット間の増殖の違いと細胞の不均一 性の関係をシングルセル解析で検討するとともに、シング ルセル解析で使用するライブラリ作成キット間の違いを 検討し、評価方法提供に向けた各種データの取得を行って いる。また、iPS 細胞を対象とした品質評価方法の確立に 向けた取り組みも開始しており、今後それらの評価方法を 多くの企業や研究機関に提供していくことで、有効性の高 い安全な再生細胞医療等加工製品の開発につなげていく ことを考えている。



図1:シングルセル解析を行うための機器(10x genomics 社製)

### 2-2-2. 実ウイルスを用いた光触媒の抗ウイルス性能評価 試験方法の国際標準化

2022 年度より、光触媒工業会と共に実ウイルスを用いた光触媒材料の抗ウイルス性能評価試験方法の ISO 化について、活動を続けてきた。本検討では、バクテリオファージを用いた紫外光応答形光触媒の抗ウイルス性能評価試験方法である ISO 18061 <sup>5</sup>、可視光応答形光触媒を対象とした ISO 18071 <sup>6</sup>、プラスチック平板状の抗ウイルス加工製品を対象とした ISO 21702 <sup>7</sup>を組み合わせて、試験方

法を組み立てており、その妥当性についてインフルエンザ ウイルス、ネコカリシウイルス及びバクテリオファージ Qβを用いた試験検討を進めてきた。それらの結果をもと に、ISO 案を作成することが出来ている。2024 年度は ISO TC206 (fine ceramics)の光触媒に関する working group (WG9)に、作成した ISO 案と共に新規提案を行い、国際標 準化に向けて、引き続き取り組んでいく予定である。

【参考文献】

- 1. 日本規格協会. JIS R 1705:2016. ファインセラミック ス - 光照射下での光触媒抗かび加工製品の抗かび性 試験方法. 2016.
- 日本規格協会. JIS L 1921:2015. 繊維製品の抗かび性 試験方法及び抗かび効果. 2015.
- 3. ISO 4768:2023. Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces. 2023.
- Miura T, Kouno T, Takano M, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals LRRC75A-Expressing Cell Population Involved in VEGF Secretion of Multipotent Mesenchymal Stromal/Stem Cells Under Ischemia. *Stem Cells Transl Med* 15;12(6):379-390, 2023.
- ISO 18061:2014. Fine Ceramics (Advanced Ceramics, Advanced Technical Ceramics) - Determination of antiviral activity of semiconducting photocatalytic materials - Test method using bacteriophage Q-beta. 2014.
- ISO 18071:2016. Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) - Determination of antiviral activity of semiconducting photocatalytic materials under indoor lighting environment - Test method using bacteriophage Q-beta. 2016.
- 7. ISO 21702:2019. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces. 2019.

### 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、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を提供 することで、企業の技術支援を行っている。具体的には、 光触媒製品、平板状製品、繊維製品及び液体製品などにつ いて、抗菌、抗ウイルス、抗カビ、抗バイオフィルム及び 防藻などの性能評価サービスを提供している。また、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。さらに、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、再生細胞医療分野における性 能評価サービス提供に向けた活動及び動物ウイルスを用 いた光触媒抗ウイルス試験方法の国際標準化事業の活動 について報告する。

### 2. 再生細胞医療分野における性能評価方法の開発 について

### 2-1 はじめに

現在、再生細胞医療の分野では、ES 細胞、iPS 細胞及び 体性幹細胞を用いた臨床研究や治療が行われている。ES 細胞や iPS 細胞は、様々な細胞や組織に分化する能力があ る多能性幹細胞として知られている。これらの細胞は、一 部の疾患において、治験が行われており、今後様々な疾患 の治療に応用されることが期待されている。一方、体性幹 細胞は、血液、脂肪、軟骨、筋肉、血管などの組織の基に なっており、特定の組織にしか分化しないことが知られて いる。臨床の現場では体性幹細胞が、主に自由診療で用い られており、一部は保険適用になっている治療法もある。

体性幹細胞は、多能性幹細胞から数段階分化が進んだ 細胞であり、胎児期には体内に豊富に存在する。しか し、成長するにつれ、これらの体性幹細胞が分化し、体 を成熟させていくため、徐々に細胞の数が減少し、増殖 力も低下していく。そこで、体性幹細胞の一種である間 葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell、MSC)を単離及び培養 し、体外で増やした細胞を再び体内に戻すことにより、 本来持っていた再生能力を呼び起こし、様々な疾患の治 療へ応用する研究が進められている。体性幹細胞のうち MSC は脂肪、骨髄及び歯髄などから比較的容易に単離す ることが可能であり、MSC を用いた再生細胞治療の範囲 としては、心臓、腎臓、脳、関節、血管、免疫抑制、慢 性疼痛及び美容など非常に広範囲に及んでいる。

MSCを用いた再生細胞治療のメリットとしては、自家 細胞、他家細胞のいずれでも拒絶反応が起きにくいこと が知られている。また、iPS 細胞のように腫瘍化する恐れ

がなく、安全性が高い。一方、デメリットとしては、自 家細胞を用いる場合、細胞を採取してから培養を行うた め、時間と手間がかかり、コストが高くなってしまう点 が挙げられる。また、他家細胞を用いる場合、一度に大 量の細胞を培養しストックしておくことが可能なため、 投与までの時間を短縮できるが、同じ品質の細胞を維持 することが困難である。MSC を用いた再生細胞治療は、 多くは自由診療で広く臨床応用されているが、培養した MSC の治療効果に大きな差があることが知られており、 大きな課題となっている。その原因として、MSC がどの ようなメカニズムで対象疾患に対して効果を発揮してい るか不明確であることが挙げられており、MSC の品質特 性の解析が急務となっている。MSC を単離する際、培養 容器に付着した細胞を MSC としており、このように得ら れた MSC は不均一な細胞集団と考えられる。そこで、 我々は MSC のシングルセル解析を行い、各ロット中の細 胞集団のクラスター分類を行った。また、虚血環境培養 下における MSC からの VEGF 発現を確認し、各ロット の細胞集団クラスター分類との VEGF 発現の相関性を検 討した<sup>1)</sup>。その結果、あるクラスター及び遺伝子発現が VEGF の発現に重要であることを明らかとした。このよ うに、MSC の特性を解明することで、対象とする疾患に 適切な MSC を選択することが可能になると考えられる。

本プロジェクトでは、MSC における重要品質特性の評 価サービスを提供することで、有効性の高い再生細胞治 療の提供に貢献することを目的に、評価系の構築に取り 組んだ。

### 2-2 方法と結果

4 ロットの研究用の骨髄由来 MSC(BM-MSC)を LONZA 社から購入し、同社指定の専用培地を用いて培養を行っ た。5000~6000 cells/cm<sup>2</sup>の濃度で培養を始め、3 日もし くは4日後に培地交換を行った。1 週間で継代を行い、 継代回数4回でストックを作成し、継代回数5回目の細 胞をシングルセル解析に使用した。培養した BM-MSCの 顕微鏡下での写真及び細胞の濃度をそれぞれ図1と図2 に示す。これらは、継代回数5回目で培養後7日目のも のである。その結果、MSCのロットごとに増殖能が異な ることが明らかとなった。BM-MSC1 が最も増殖が速 く、BM-MSC2~4 はそれよりも遅い傾向にあった。ま た、BM-MSC1 は典型的な MSC の形状が見られ、コンフ ルエントになると繊維状に密集していた。一方で、BM-MSC3 及び4は、増殖が止まりコンフルエントになって も BM-MSC1 のような繊維状にはならず、隙間が空いて いる状態で、形状は樹状様のものが多く見られた。また、培養後の細胞濃度を計測した結果、BM-MSC1 が最も高いことが示された。



図1 各 BM-MSC の培養後7日の顕微鏡写真(40倍)





次に、シングルセル解析を行うため、以下の3種類の キットを用いてライブラリー調製を行った。

1. Chromium NextGEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (10X Genomics 社)

Single Cell Gene Expression Flex Kits (10X Genomics 社)
 Single Cell Library Preparation Kits (Scale Biosciences 社)

1のキットは、感度が高く、対象とする生物種が豊富で ある一方、新鮮な細胞で調製する必要があり、複数の細 胞サンプルを扱う場合は、それぞれのサンプリングのタ イミングを合わせる必要がある。一方、2及び3のキッ トは、細胞を固定してからライブラリー調整を行うた め、固定後は長期間の低温保管が可能である。そのた め、まとまった数の細胞サンプルが集まった段階でライ ブラリー調製を行えるため、非常に扱いやすいキットと 言える。しかし、1のキットに比べ、その後のシークエ ンス解析ではやや品質が劣ってしまうことと、解析可能 な生物種が限られてしまうことがデメリットである。現 在、上記のキットによるデータセットの違いを検討して おり、その結果から品質評価サービスに用いるのに最適 なライブラリー調製キットを選定する予定である。ま た、MSC の品質特性解析を通じて、再生細胞治療に向け た MSC の品質評価サービスを提供できるように、性能評 価方法の確立および基盤整備を行う予定である。

### 3 実ウイルスを用いた新規光触媒抗ウイルス試験方 法の国際標準化事業について

### 3-1 はじめに

現在、光触媒製品の抗ウイルス性能評価試験方法については、紫外光応答形光触媒ではISO18061<sup>2)</sup>、可視光応 答形光触媒ではISO18071<sup>3)</sup>が制定されており、供試ウイ ルスは比較的扱いやすいバクテリオファージQβを規定 している。一方、他の抗ウイルス性能評価試験方法であ る ISO 規格(平板上製品を対象とした ISO21702<sup>4)</sup>、繊維製 品を対象とした ISO18184<sup>5</sup>)では、インフルエンザウイル スとネコカリシウイルスが規定されている。また、新型 コロナウイルスの感染拡大の影響もあり、光触媒製品の 製品開発においても、バクテリオファージQβではな く、実ウイルスを用いた抗ウイルス性能評価試験の需要 が高まり、その標準化が求められてきた。そこで、光触 媒工業会の協力のもと、実ウイルスを用いた光触媒抗ウ イルス性能評価試験方法を新たな国際標準規格として作 成する取り組みを行った。

### 3-2 結果と展望

評価方法の作成にあたっては、光触媒製品の抗ウイル ス性能評価法(ISO18061 及び ISO18071)及び平板状製品の 抗ウイルス性能評価法(ISO21702)を組み合わせること で、新規評価方法案を作成した。表1にその概要を示 す。また、光触媒の性能評価方法で用いられる光源の標 準化が進められており、白色 LED に関しては既に ISO が 制定されている。紫外光 LED に関しても現在 ISO 化が進 められていることから、本評価方法の光源に加えてい る。

次に、この本案に基づいた試験が可能か検討するた め、光触媒工業会と協力し、紫外光応答形及び可視光応 答形の標準試験サンプルの作製と選定を行った。標準試 験サンプルの選定後、実ウイルスを用いた性能評価試験 を行い、本案によって抗ウイルス性能評価が可能である ことを明らかとした。更に、標準試験サンプルを用い て、細かい試験条件を検討するとともに他の試験機関を 含めた抗ウイルス性能評価試験を行うことで、本性能評 価試験方法の妥当性の検証を行った。以上の結果をもと に、紫外光応答形及び可視光応答形の各光触媒材料に対 してそれぞれ ISO 原案を作成し、ISO の作業部会に新規 提案として申請している。今後は、作業部会での議論に 対応しながら、ISO 化に向けて取り組みを続けていく予 定である。また、ISO として発行された段階で、速やか にこれらの性能評価サービスを提供して行く予定であ る。

試験サンプル	紫外光応答形	可視光応答形
サンプル形状	平板状光角	<b>迪媒加工品</b>
供試体	A型インフルエンザウイルス ネコカリシウイルス	
感染価測定方法	プラ-	- ク法
光源	BLB、BL、UV-LED	白色蛍光灯、白色LED

【参考文献】

- Miura T, Kouno T, Takano M, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals LRRC75A-Expressing Cell Population Involved in VEGF Secretion of Multipotent Mesenchymal Stromal/Stem Cells Under Ischemia. *Stem Cells Transl Med* 15;12(6):379-390 (2023)
- ISO 18061 Fine Ceramics (Advanced Ceramics, Advanced Technical Ceramics) — Determination of antiviral activity of semiconducting photocatalytic materials — Test method using bacteriophage Q-beta (2014)
- ISO 18071. Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) Determination of antiviral activity of semiconducting photocatalytic materials under indoor lighting environment Test method using bacteriophage Q-beta (2016)
- 4. ISO 21702. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces (2019)
- ISO 18184 Textiles Determination of antiviral activity of textile products (2019).

### 抗バイオフィルム活性測定試験の受託に向けた取り組み

「次世代ライフサイエンス技術開発」プロジェクト 小林慶一、永井武、石黒斉

### 1. はじめに

KISTEC では企業や研究機関等の研究開発支援の一環 として、製品や材料の抗菌・抗ウイルス性能評価サービス を提供している。当該性能評価試験は、JIS や ISO 等の標 準規格を基に実施しているが、性能評価試験の相談を受け る研究開発段階の製品や材料の形状や材質、また、標的と して希望される菌等の微生物やウイルスの種類は依頼ご とに様々である。これらの種々の要望に対し、適切な評価 方法を、時には標準規格を参考にその案件特有な方法を考 案・提案し、可能な限り対応している。

年々多様化していく抗菌・抗ウイルス性能評価試験の相 談に応えていくために、取扱い可能な JIS や ISO 等の標準 規格を増やし、抗菌・抗ウイルス性能評価試験として請け られる範囲の拡張に努めている。例として、抗かび性能評 価試験や 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ルム活 性測定試験の評価サービスの提供を昨年度より開始して いる。

バイオフィルムとは、菌などの微生物やそれらが産生す る物質などが集合して形成される膜状の構造体を指し、流 し台、浴室・浴槽の内壁、池や川に浸かった石などにみら れる「ぬめり」や歯の表面のプラーク(歯垢)など、身近な 様々な場所に存在する。菌がバイオフィルムを形成すると、 菌への薬剤の効きが低下することもあり、バイオフィルム 対策は注目されている分野の一つである。

本稿では、昨年度から受託を開始した抗バイオフィルム 活性測定試験の概要と、より安定した結果を出すために検 討した取り組みの一部を報告する。

### 2. 実験と結果

バイオフィルムの評価に関する試験規格としては、一定 の方法で形成されたバイオフィルムに対する薬剤の効果 を評価する ASTM E2871<sup>2)</sup>などが存在するが、昨年新たに 制定された ISO 4768 ではプラスチックや非多孔質材料表 面のバイオフィルム形成量を比較し、製品や材料に対する バイオフィルムの付着しにくさを評価する方法が規定さ れている。そのため、コントロール(対照)となる無加工試 験片に対してバイオフィルムが安定して形成される環境 で試験することが必須である。本検討では、無加工試験片 上で安定したバイオフィルム形成を得るために実際の試 験環境のうち、静置培養によりバイオフィルムを形成させ る際に利用する恒温器の違いとバイオフィルム形成能の 差異を確認した。

### (1) バイオフィルム形成量の測定1)

試験は ISO 4768 に定められた手順に従い実施した。先 ず、1/5 濃度の TSB(Trypticase Soy Broth)内で 35℃、24~48 時間振盪培養した *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984、 表皮ブドウ球菌)の培養液を、菌濃度が 1.0×10<sup>3</sup>~1.0×10<sup>4</sup> cell/mL になるように調製する。評価する試験片のサイズ は 30×30 mm を標準とし、40×40 mm サイズのガラス板 に固定する。ガラス板に固定した試験片を滅菌された容器 に入れ、サンプル表面から液面までの深さが少なくとも 5 mm 以上となるように菌濃度を調整した培養液を注ぎ、 35℃、48 時間静置培養する(図 1)。



図1試験片への接種手順の概要

静置培養後、試験片を固定したガラス板ごと水で穏や かに洗浄し、クリスタルバイオレット溶液に浸し染色す る。染色後、再び水で穏やかに洗浄し、試験片を水溶性 不織布で拭き取り、不織布を SDS(ドデシル硫酸ナトリウ ム)水溶液に溶解させて波長 590 nm での吸光度を測定す る(図 2)。



図2 バイオフィルム形成量の測定手順の概要

**ISO 4768** においてはこの計測した吸光度を用いて以下の 式(1)により算出される値が抗バイオフィルム活性値 *R* と 定義されている。

 $R = (1 - W_{\text{treated}} / W_{\text{untreated}}) \cdot \cdot \cdot \cdot \overrightarrow{\mathbb{T}}(1)$ 

- Wtreated:抗バイオフィルム加工された試験片から拭き取り調整した溶液の590 nmの吸光度の平均値
- Wuntreated:抗バイオフィルム加工されていない試験片から 拭き取り調整した溶液の 590 nm の吸光度の平 均値

本検討では抗バイオフィルム加工されていない無加工 試験片として 30×30 mm サイズのガラス板を使用した。 また、静置培養によりバイオフィルムを形成させる際に 利用する恒温器としては、使用頻度・高(1日1回以上本 体扉の開閉がある)、中(2日に1回程度本体扉の開閉があ る)、使用頻度・低(静置培養中に本体扉の開閉が無い)の 3 種類を利用し、それぞれの場合での吸光度を比較し た。

### (2) 結果と考察

各条件での吸光度測定結果を表1に示す。使用頻度が高い恒温器ほど吸光度が低下していく、すなわちバイオフィルムの形成量が減少していく傾向が確認された。また、今回はn数3での検証であったが、使用頻度が低い恒温器で形成されたバイオフィルムの方が、吸光度測定値のバラツキが小さい傾向が見られた。

表1	使用恒温器の違いに上る吸光度の比較
20.1	

使用頻度	低	中	高
吸光度 (590 nm)	$4.54\pm0.06$	$3.20\pm0.30$	$2.13 \pm 1.07$

また、図3に示したクリスタルバイオレット溶液で染色 した様子から、使用頻度が高い恒温器内で静置培養した試 験片ほど染まり具合が薄く、付着している菌やバイオフィ ルムは斑点状に不均一に付着している割合が増えてくる 傾向が観察された。原因は検証中であるが、使用頻度が高 く、恒温器の扉の開閉による振動がバイオフィルム形成に 影響を与える可能性が考えられる。いずれにしても安定し たバイオフィルム形成のためには使用頻度が低い恒温器 を使用すべきであることが示唆された。



図3 クリスタルバイオレット染色後の試験片

3. まとめと今後の予定

昨年度より新たな抗菌・抗ウイルス性能評価試験メニ ューとして、ISO 4768 を基にした抗バイオフィルム活性 測定試験の提供を開始した。本試験は吸光度によるバイオ フィルムの定量を原理としているが、比較的バラツキが大 きい実験であるため、より安定した結果を出すためには ISO 規格に記載された手順を忠実にトレースすることは 勿論であるが、実際の実験環境に合わせ細かな点での調整 や対応が必要で、今回記載した内容以外にも留意点が存在 した。より安定した結果を提供できるように、抗バイオフ ィルム活性測定試験を実施する際にはこれらの点を踏ま えて実施している。

抗バイオフィルム活性測定試験の受託件数は、少しずつ 増加傾向にある。一般社団法人抗菌製品技術協議会(SIAA) が抗バイオフィルム加工製品の認証制度を2024年7月に 開始したこともあり、今後もバイオフィルムへの注目度は 高くなると予想される。それに伴い抗バイオフィルム活性 測定試験に関しても、冒頭で記した従前の抗菌・抗ウイル ス性能評価試験の様に、様々なニーズが出てくることが予 想される。これらのニーズに応えていくために備えた検 討・検証も進めている。例えば、口腔ケア分野の研究開発 では歯垢がターゲットの一つとなることから、口腔内細菌 を用いたバイオフィルム形成方法や評価方法の検討にも 取り組んでいる。



図4 ガラス板上に Streptococcus mutans により形成 させたバイオフィルム

今後も、抗バイオフィルム試験に限らず、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、より安定した結果の提供ための検証に努めていく予 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)

### 【原著論文】

- 1.Ochiai T, <u>Nagai T</u>, Hamada K, Tobe T, Aoki D, <u>Sunada K</u>, <u>Ishiguro H.</u> Estimating the Anti-viral Performance of Photocatalytic Materials: The Correlation Between Air Purification Efficiency and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Inactivation. *Catalysts*. 14: 163, 2024.
- Nakane R, Kiribayashi R, <u>Sunada K</u>, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, <u>Nagai T</u>, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A. Degradation of 2-naphthol in water and antibacterial/antiviral activity by Zn<sub>2</sub>SnO<sub>4</sub>, ZnSn(OH)<sub>6</sub> and Y<sub>2</sub>Sn<sub>2</sub>O. *Ceramics International*. 50: 7 Part A, 10797-10805, 2024. 表紙掲載, 優秀論文賞
- 3.Hirai T, Kataoka K, Yuan Y, Yusa K, <u>Sato Y</u>, Uchida K, Kono K. Evaluation of next-generation sequencing performance for *in vitro* detection of viruses in biological products. *Biologicals*. 85: 101739, 2024.
- 4.<u>Kuroda T, Yasuda S</u>, Matsuyama S, <u>Miura T</u>, Sawada R, Matsuyama A, Yamamoto Y, Morioka MS, Kawaji H, Kasukawa T, Itoh M, Akutsu H, <u>Kawai J, Sato Y</u>. ROR2 predicts human-induced pluripotent stem cell differentiation into neural progenitor cells. *Scientific Reports*. 14: 690, 2024.
- 5.Iwakura S, Ito T, Sakai T, <u>Sunada K</u>, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, <u>Nagai T</u>, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A. Processing of cerium molybdates by solid phase process and their antiviral activity *Journal of the Japan Society of Colour Material*. 96: 96-103, 2023.
- 6.Abe K, <u>Sunada K</u>, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, <u>Nagai T</u>, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A. Preparation of rare earth iodates and their antibacterial and antiviral activities. *Ceramics International*. 49: 14681-14688, 2023.
- 7.Shinozaki F, <u>Kamei A</u>, Shimada K, Matsuura H, Shibata T, Ikeuchi M, Yasuda K, Oroguchi T, Kishimoto N, Takashimizu S, Nishizaki Y, <u>Abe k</u>. Ingestion of taxifolin-rich foods affects brain activity, mental fatigue, and the whole blood transcriptome in healthy young adults: a randomized, double-blind, placebo controlled, crossover study. *Food and Function*. 14: 3600-3612, 2023.
- 8.Kiribayashi R, <u>Sunada K</u>, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, <u>Nagai T</u>, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A. Decomposition of 2naphthol in and its antibacterial and antiviral activities by LaMnO<sub>3</sub> and LaCoO<sub>3</sub> in the dark. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 131: 117-125, 2023. 表紙採用
- 9.Miura T, Kouno T, Takano M, Kuroda T, Yayamoto Y, Kusakawa S, Morioka MS, Sugawara T, Hirai T, Yasuda S, Sawada R, Matsuyama S, Kawaji H, Kasukawa T, Itoh M, Matsuyama A, Shin JW, Umezawa A, <u>Kawai J, Sato Y</u>. Identification of biomarker of angiogenic potential of

mesenchymal stem cells using single cell transcriptome analysis. *Stem Cells Translational Medicine*. 12: 379-390, 2023.

- 10.Hirai T, Kono K, Kusakawa S, Yasuda S, Sawada R, Morishita A, Hata S, Wakita A, Kageyama T, Takahashi R, Watanabe S, Shiraishi N, <u>Sato Y</u>. Evaluation of the reproducibility and positive controls of cellular immortality test for the detection of immortalized cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy*. 21: 540-546, 2022.
- 11.Ogawa N, Sato K, <u>Sunada K</u>, <u>Ishiguro H</u>, Kojima H, Ito T. Polymeric Antibacterial Surface with Nano-pillar Array Mimicked of Cicada Wing. *Journal of Photopolymer Science* and Technology. 35: 213-217, 2022.
- 12.Okamoto T, Onaga C, Matsuoka I, Ozaki A, Matsuda C, Kasai T, Xiong Y, Harada Y, Sato T, Nakano Y, Mano Y, Miyazaki S, <u>Ishiguro H</u>, Sato K, Tamori S, Sasaki K, Ohno S, Akimoto K. High *SLC20A1* expression indicates poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Diagnosis and Prognosis*. 3: 439-448, 2023.
- 13.Sakai T, <u>Sunada K</u>, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, <u>Nagai T</u>, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A. Antiviral and antifungal activities of tin molybdenum solid solution oxide prepared using mechanochemical processing. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 131: 482-487, 2023.
- 14.Kobayashi N, <u>Sunada K</u>, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, <u>Nagai T</u>, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A. Decomposition of 2naphthol in water and antiviral activity of CoO<sub>x</sub> modified (Ce<sub>0.8</sub>, Bi<sub>0.2-y</sub>, La<sub>y</sub>) O<sub>2-8</sub> in the dark. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 131: 590-594, 2023.

### 【総説】

- 1.Ludwig TE, Andrews PW, Barbaric I, Benvenisty N, Bhattacharyya A, Crook JM, Daheron LM, Draper JS, Healy LE, Huch M, Inamdar MS, Jensen KB, Kurtz A, Lancaster MA, Liberali P, Lutolf MP, Mummery CL, Pera MF, <u>Sato Y</u>, Shimasaki N, Smith AG, Song J, Spits C, Stacey G, Wells CA, Zhao T, Mosher JT. ISSCR standards for the use of human stem cells in basic research. *Stem Cell Reports*. 18: 1744-1752, 2023.
- 2.<u>河合純</u>. 核酸医薬とゲノム・RNA データベース. Clinical Neuroscience. 41: 643-646, 2023.
- 3.落合 剛, 濱田 健吾, 小林 慶一, 石黒 斉. 抗菌・抗ウイルス効果から空気清浄機まで~光触媒評価総合サポート~. Colloid & Interface Communication. 48: 10-13, 2023.
- 4.<u>砂田 香矢乃,畑山 靖佳</u>,<u>永井 武</u>,<u>石黒 斉</u>.金属酸化 物の新型コロナウイルスに対する抗ウイルス活性.JETI.

71: 30-33, 2023.

5.<u>石黒 斉</u>. 光触媒による抗微生物効果. 防菌防黴学会誌. 51(7): 455-458, 2023.

### 【書籍】

 <u>Ishiguro H</u>, Yao Y, Kubota Y. TiO<sub>2</sub>-Ag antibacterial coatings for biomedical uses. *Handbook of Self-Cleaning Surfaces and Materials*, ed. Fujishima A, Irie H, Zhang X, Tryk DA. Wiley-VCH, 2023.

### 【口頭発表】

- 1.Ito T, Ogawa N, Sato K, Shimizu T, Shingubara S, Kojima H, <u>Ishiguro H</u>. Fabrication of polymeric film with nano-pillar array to mimick 3D nanostructures on cicada wing. The 39th International Conference of Photopolymer Science and Technology. 2022 年 6 月 29 日. オンライン.
- 2.伊藤 健,松本 叡佳,柳沢 雄志,小川 夏輝,三村 爽馬, 岩木 宏明,小嶋 寛明,石黒 斉,砂田 香矢乃,永尾 寿 浩,田中 重光.生物模倣技術を用いた新しい抗微生物 材料~ナノ・マイクロ構造と抗菌~.日本防菌防黴学会 第49回年次大会,2022年9月26日.東京.
- 3.小林 夏美,加藤 千尋,望月 泰英,磯部 敏宏,松下 祥子,中島章,<u>砂田 香矢乃</u>,<u>永井武</u>,石黒 斉. CoO<sub>x</sub>修飾した(Ce<sub>0.8</sub>, Bi<sub>0.2-x</sub>, La<sub>x</sub>) O<sub>2-δ</sub>の可視光下と暗所下における水中での 2-naphthol 分解活性および抗ウイルス活性.公益社団法人日本セラミックス協会 2023 年会. 2023 年 3月10日.神奈川.
- 4.境 辰矩,望月 泰英,磯部 敏宏,松下 祥子,中島 章, <u>砂田 香矢乃,永井 武,石黒 斉</u>. 各種モリブデン系複合 酸化物の作製とその抗菌・抗ウイルス・抗真菌活性.公 益社団法人日本セラミックス協会 2023 年会. 2023 年 3 月 10 日. 神奈川
- 5.猿渡 輝良, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 松下 祥子, 中島 章, <u>砂田 香矢乃</u>, <u>永井 武</u>, <u>石黒 斉</u>. モリブデン酸セリウム 薄膜の作製とその抗ウイルス活性. 公益社団法人日本セ ラミックス協会 2023 年会. 2023 年 3 月 10 日. 神奈川
- 6.川路 英哉,加藤 匠矢,伊藤 昌可,須田 亙,村川 泰裕, <u>河合 純</u>.標準ゲノム・RNA 塩基配列データベース D3G の更新.日本核酸医薬学会第8回年会.2023年7月12日. 名古屋.
- 7.<u>石黒 斉</u>. KISTEC における光触媒研究開発と支援サービス.環境浄化光触媒研究会. 2023 年 6 月 15 日.東京. (招待)
- 8.<u>石黒 斉</u>. Antivirus test using animal viruses. 第 21 回北東ア ジア標準協力フォーラム. 2023 年 7 月 25 日. 東京.
- 9.森下 美紀子, 久保田 曙, 倉本 幹也, 高木 洋二, <u>石</u> <u>黒 斉</u>, 岡山 誠史. JIS R 1712 光触媒防藻性試験におけ る発光測定法の適用. 防菌防黴学会 第 50 回年会. 2023 年 8 月 29 日. 大阪.
- 10.<u>Ishiguro H</u>. SARS-CoV-2 inactivation by the photocatalytic materials. International Congress on Pure and Applied

Chemistry Bali 2023. 2023 年 9 月 22 日. インドネシア. (招待)

- 11.<u>Ishiguro H</u>. Test for antiviral activity using animal virus. ISO TC206/WG9. 2023 年 10 月 5 日. 京都.
- 12.<u>Ishiguro H</u>. Test for antiviral activity using animal virus. Committee of Asian Standardization for Photocatalytic Materials and Products 2023. 2023 年 10 月 3 日. 京都. (招 待)
- 13.中根 陸,桐林 龍寿, 砂田 香矢乃,磯部 敏宏,望月 泰英,<u>永井 武</u>,石黒 斉,中島 章.スズ酸亜鉛、スズ酸 イットリウムの合成とその抗菌・抗ウイルス活性.公益 社団法人日本セラミックス協会.第 36 回秋季シンポジ ウム.9月7日.京都. 奨励賞
- 14.<u>亀井 飛鳥</u>. ~未病と食品機能性の評価システムの確立
   への挑戦. 2023 年度第2回機能性食品研究会.9月22日.
   東京.
- 15.<u>亀井 飛鳥.</u> 未病と食の機能性評価. キングスカイフロ ントサイエンスフォーラム. 2023 年 11 月 2 日. 神奈川.
- 16.小林 慶一. 新型コロナウイルスを含む各種抗菌・抗ウ イルス試験サービスの提供. キングスカイフロントサイ エンスフォーラム. 2023 年 11 月 2 日. 神奈川.
- 17. 阿部 和也, <u>砂田 香矢乃</u>, <u>永井</u><u>武</u>, <u>石黒</u><u>ろ</u>, 望月 泰 英, 磯部 敏宏, 中島 章. 希土類ヨウ素酸化合物の紫外 線照射下における抗ウイルス活性. 2023 年度色材研究 発表会. 2023 年 11 月 7 日. 大阪. 優秀ポスター賞.
- 18.<u>亀井 飛鳥</u>. 未病と食の機能性評価研究. 2023 年第 17 回 TKF オープンフォーラム. 2023 年 11 月 22 日. 東京.
- 19.Kiribayashi R, <u>Sunada K</u>, Mochizuki Y, Isobe T, <u>Nagai T</u>, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A. Antiviral and antibacterial activity of La<sub>2</sub>Sn<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Mg<sub>2</sub>SnO<sub>4</sub> and MgSn(OH)<sub>6</sub>. *MRM2023/IUMRS-ICA2023 Grand Meeting*. December 13, 2023, Kyoto, Japan.
- 20.阿部 和也, <u>砂田 香矢乃</u>, 望月 泰英, 磯部 敏宏, <u>永井</u> <u>武</u>, <u>石黒 斉</u>, 中島 章. 希土類ヨウ素酸化合物の抗菌・抗 ウイルス活性に及ぼす光照射の影響およびポリマーと の複合化. 第 62 回セラミックス基礎科学討論会、1E04 (2024)、1月7日. 東京.
- 21.落合 剛, <u>永井 武</u>, 濱田 健吾, 青木 大輔, <u>砂田 香矢</u> <u>乃</u>, <u>石黒 斉</u>. 新型コロナウイルスに対する光触媒材料 の抗ウイルス性能のスクリーニング試験法. 2024 年 3 月 14-16 日. 電気化学会第 91 回大会. 名古屋.
- 22.<u>砂田 香矢乃,永井 武,小林 慶一</u>,中野 竜一,中島 章,<u>石黒 斉</u>.可視光照射、暗所下でのモリブデン酸化 物材料の抗ウイルス活性.第28回シンポジウム「光触媒 反応の最近の展開」.2024年3月6日.東京
- 23.濱田 健吾, 落合 剛, 青木 大輔, <u>永井 武</u>, <u>砂田 香矢</u> <u>乃</u>, <u>石黒 斉</u>. RPA の光触媒性能評価への応用. 第 28 回 シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」. 2024 年 3 月 6日. 東京
- 24.桐林 龍寿,望月 泰英,磯部 敏宏,中島章,<u>砂田 香矢</u> <u>乃</u>,<u>永井</u>武,<u>石黒 斉</u>.希土類銅系複合酸化物の抗菌・抗 ウイルス活性.公益社団法人日本セラミックス協会 2024 年年会. 2024 年 3 月 14-16 日.熊本.

### 【特許】

国内特許出願 3件

# 研究報告2024 目次 【研究開発部】

戦略的研究シーズ育成事業

研	<b>究テー</b>	<b>マ</b> :	高重力による3Dプリンタの超高機能化の研究
	◆総括・	業績	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
研	<b>究テー</b>	<b>マ</b> :	<b>未知を知るAI搭載型ハードウェアの開発</b>
	◆総括・	業績	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
研	<b>究テー</b>	<b>マ</b> :	<b>徐脈性不整脈の革新的細胞移植治療開発</b>
	◆総括・	業績	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
研	<b>究テー</b>	<b>マ</b> :	Beyond5G対応のナノセルロース製電子機材の創製
	◆総括・	業績	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
研	<b>究テー</b>	<b>マ</b> :	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
	◆総括・	業績	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
研	<b>究テー</b>	<b>マ</b> :	<b>非破壊画像検査用スマートシートの創出</b>
	◆総括・	業績	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

# 高重力による 3D プリンタの超高機能化の研究

研究代表者:慶應義塾大学 小池 綾

### 【基本構想】

新しい生産技術として広く注目を集めている 3D プリンタは、複雑形状に対応しやすく、省資源性・省スペース性に優れることから、家庭用から先端産業用まであらゆる応用が進んでいる. この中でも、宇宙工学においては資源もスペースも限られた宇宙船内において部品の製造・修理を行ううえで適した生産技術として、微小重力場で利用可能な 3D プリンタの開発が進められている. しかしながら、微小重力場は材料の浮遊、材料供給の不安定化、内部欠陥の増加など、3D プリンティングを行う上で多様な技術課題の解決が求められる. これらの技術課題に対して、本研究は逆転の発想をもって、高重力場で 3D プリンティング を行うことで、材料の固定力増加、材料供給の安定化、造形物の高密度化といった、微小重力場の課題を 莫大なメリットに転換することを提案する. 遠心機と 3D 造形装置を融合することで、高重力場で 3D プリ ンティングを行える環境を整えた. とくに、本研究の対象とした材料押出 (Material Extrusion: MEX) では、 単位時間当たりの材料押出量の増加による造形効率向上、造形物の線幅縮小による造形分解能の向上とい った従来 3D プリンタの性能の限界を大きく超えた高機能性を有する 3D 造形となりえる. 実験を通じて、 高重力場が MEX にもたらす有用な効果を実証し、3D プリンティング技術の性能を飛躍的に向上させるこ とを目指す.

### 1. 研究目的

近年,3D プリンタとして広く知られる付加製造(AM: Additive Manufacturing)の発展は著しく,樹脂成形を行え る家庭用3Dプリンタから金属材料にまで対応可能な産業 用3Dプリンタまで,AMの応用の幅は拡大し続けている. しかしながら,AMにはいまだ,内部欠陥による造形物の 強度低下や,除去加工等に比べて加工精度が劣るなど,多 分野への導入する上で技術課題も多く残っている.

AMは7種類の方式があるが、その中でも樹脂の3D造形に適した図1のような材料押出(MEX: Material Extrusion)は、家庭用3Dプリンタにもよく利用される、最も簡便な造形方式といえる.ワイヤ状にした樹脂材料をノズルに挿入し、ノズルを加熱することで、造形点において所定量の造形材料を溶融・凝固させて堆積させる.このプロセスを層状に重ねて繰り返すことで、任意の形状を造形できる.MEXは、液体や粉末が造形プロセスにおいて利用されないことから、宇宙船内などの微小重力場において安全運用しやすい造形方式としても注目を集めており、2014年には、アメリカ航空宇宙局が国際宇宙ステーション内でMEXによる造形試験を行っている[1].資源もスペースも限られる宇宙船内における部品の製造・修理には、省資源性、省スペース性に優れる3Dプリンタが活躍するとも考えられている.

しかしながら、微小重力場におけるプロセス不安定化は、 あらゆる AM における課題となる[2]. たとえば MEX にお いては、図 2 に示すとおり、造形中の材料の浮遊、材料供 給の不安定化、内部欠陥の増加など、自然重力場(1G) に おける造形と比べると、造形物の機械特性や品質が大きく 低下する. 各国の宇宙計画において微小重力場, もしくは 月面などの低重力場における 3D 造形プロセスの不安定化 は,解決が強く求められる課題といえる.

一方で、本提案の先行研究においては、こうした微小重 力場・低重力場の課題を解決する提案ではなく、高重力場 においてそれらの課題を多大なメリットに転換する提案 を行っている[3]. つまり、3D造形プロセスに対して微小 重力場が不安定化をもたらすならば、逆に高重力場は安定 化をもたらすと予想でき、材料の十分な接合や材料供給の 安定化により、高精度、高強度な AM を実現できる. この ように高重力場こそが AM にとって極めて理想的な環境 とする概念に基づき、粉末床溶融結合法を高重力場で実行 して、たしかに造形物が高密度化、高強度化し、スパッタ が抑制され、通常では利用不可能な微細粉末による造形に 成功するなど、多大なメリットが得られることが実験的に 示された.

本研究では、他の造形方式においても同様に、高重力場 によって多大なメリットがもたらされると考え、もっとも 広く普及している造形方式である MEX を対象に、基礎的 な実験を行うことで、高重力場 MEX の有用性を示すこと を目的とする.





2. 原理

MEX を含め、AM は積層造形方式であるため、造形分 解能の向上する上で、1 層あたりの高さを低減する必要が ある.また、MEX に注目すると、図3に示すとおり、造 形物表面の凹凸や内部の空隙の大きさは、ノズル出口穴径 に大きく影響を受ける.ノズル出口穴径を小さくできれば、 造形分解能を容易に向上できるが、微細穴を流体が通過す る場合、材料を押し出す合力が、表面張力よりも大きくな る必要がある.こうした特徴をとらえる無次元量として、 重力と表面張力の比を示すエトベス数E<sub>0</sub> が用いられ、式 (1)のように定義される.

$$E_0 = \frac{\Delta \rho g L^2}{\sigma} \tag{1}$$

ただし、 $\Delta \rho$  [kg/m<sup>3</sup>] は密度差、g [m/s<sup>2</sup>] は重力加速度、L[m] は代表長さ、 $\sigma$  [N/m] は表面張力である. このとき、 出口穴径が代表長さにあたるため、出口穴径が小さくなる と表面張力が支配的となる. また、 $E_0$  を保ったまま代表 長さを小さくするためには、重力加速度を大きくすればよ いこともわかる. とくに、ノズル出口穴径が 1/n 倍の大き さとなった場合、重力加速度は n<sup>2</sup> 倍とすればよいことか ら、1/10 倍の造形分解能を目指すならば、100G を付与す ればよいことが理論的にも求まる.

高重力化は流体を微細穴に通す上で効果的な手段であ り,同様の原理は,綿菓子製造機などにも用いられている. 本研究は,こうした重力加速度がノズルからの材料押出プ ロセスに与える効果を評価する.

### 3. 高重量場におけるの造形分解能向上

宇宙開発などで低重力場実験を行う場合,自由落下塔を 利用する,パラボリックフライト試験を行う,実際に鋼臭 い宇宙ステーション等で実験するなど,実験に至るまで多 額の費用が求められるほか,安定的に長時間の実験を行う

ことが難しい.一方で、高重力場の実験は、遠心機程度の 単純で安価な機構でも長時間安定的に実行可能である.し たがって、MEX が高重力場で得られる効果を評価するた めには、遠心機と MEX ユニットを融合した機構の設計が 合理的である.本研究では、図2に示すように水平軸型遠 心機において回転機構に MEX を組み込む設計を行い,高 重力場 MEX 装置を試作した.遠心機には、回転軸の設定 によって, 鉛直軸型遠心機と水平軸型遠心機が存在するが, 鉛直軸型は設置面積が大きくなりやすく,インプロセスに 重力レベルを変更することが難しいほか,万一の事故時に 部品がオペレータ側に飛散してくる可能性がある.一方で, 本研究で採用した水平軸型は,回転数を変更することで重 カレベルをインプロセスに容易に変更でき,破損部品が正 面側に飛散してくることがないため,機能面,安全面とも に優れたデザインである.しかしながら,水平軸型のデメ リットとして、1 回転中に±1G の変動が生じてしまうこ とが避けられず、付与する重力レベルが低い際は、この変 動による影響も考慮しなければならないことが挙げられ る.

本研究における試作機は,最大回転数を 700 rpm とし, 最高で 100G までに造形実験をできるように設計している. これにより,従来 MEX 装置の造形分解能を 1/10 倍にする ことを目指している.

### 4. 実験結果

本研究は2ヵ年を計画しており,回転機構,MEX機構, ステージ駆動機構など,開発が完了し搭載可能となった機 構から順次,本体への組み込みを行う形で開発を進めてい る.1ヵ年終了時点では,すでにステージ駆動系以外の機 構はすべて開発が完了した.2ヵ年終了時点では,2軸駆 動ステージ上で7Gまでの薄壁造形に成功し,層間の接合 強度や硬さの向上など,高重力場における造形特性の変化 について評価を行った.



図 5 : 高重力場 MEX 装置の開発状況



図6:造形物の外観



200°C 220°C 1G 32G

図7:造形物表面の拡大写真



図9:造形物の1層あたりの高さ

図 5 に本研究で開発した高重力場 MEX の外観を示す. 本研究では、押出ノズルから材料が供給されるプロセスに 注目したため、まずは押出ノズルを動かさず、その場で材 料を押し出した.遠心加速度は 32G 場とし、1G 場におい て押し出された材料の様子と比較した.材料はポリ乳酸 (PLA)とし、ノズル温度は 200 °C,220 °Cの2 種類に設定 した.なお、ノズル出口穴径は 0.4 mm である.図6に10 秒間押し出された材料の様子、図7にその顕微鏡観察写真 を示す.1G 場と 32G 場の実験結果を比較すると、32G 場 の方がより多量の材料が押し出されながら、直径が非常に 小さい構造物が確認された.

図 8,9 にそれぞれ, 造形物の重量および1層あたりの平 均高さについてまとめる. 単位時間あたりに押し出される 材料の重量は, 1G 場と比較すると 32G 場において激増し ており,200 ℃では 8.38 倍,220 ℃では 6.33 倍になった. 1層あたりの高さについても,32G 場の結果は 1G 場の結 果と比べ,200 ℃では 0.21 倍,220 ℃では 0.17 倍になっ た.より高い重力場を付与することで,MEX の造形効率 と造形分解能を両立して劇的に高められる可能性を示し た.



図10:高重力場における薄壁造形の様子



図12: 固液混相流体解析による高重力場 MEX の材 料押出の解析結果.

次に、2軸ステージを実装し、5G 場までの高重力場で 0.4 mm ノズルによる3D 造形を行った様子を図10に示す. 回転中でも安定的に造形できることを示したが、回転時に ノズル先端に振動が生じ、壁面にうねりが生じた.図11 に示すとおり、側面からのビッカース硬度試験において、 5G 場において造形したサンプルの方が高い硬さを示した ことから、層間の接着強度は高まったといえるが、ノズル 駆動系の剛性設計が不十分であり、ノズルの振動を抑制で きれば、より高強度な造形物を作製できたと考えられる. 現状では、10G 場以上でノズルの振動がさらに大きくなり、 安定的な造形が困難となった.

図 12 には、MEX に対する高重力場の影響を理論的に評価するために、固液混相流体シミュレーションによる解析を行った結果を示す.10G場においてより多くの材料を押し出せていることがわかる.図13 に示したノズル出口付近での流体通過速度の分布からも、重力加速度を高めるほど単位時間あたりに押し出される材料の質量が大きくなることが明らかとなった.

### 5. まとめ

本研究は2ヵ年において,高重力場 MEX の開発に挑戦 し,高重力場において MEX のプロセス特性が大きく変化 することを実験的に示した.材料押出プロセスについては,



図11:薄壁側面上のビッカース硬度試験の結果



32G 場までの高重力場で,単位時間当たりの材料押出量が 大幅に増加することを明らかにした.一方で,立体造形物 を作製する場合は,回転中にノズル先端に振動が生じてし まい,5G 場程度の重力レベルでなければ安定的に造形で きなかった.5G 場までの成果でも,造形物の強度が向上 することは明らかとなった.今後,より高い重力場加速度 においてもノズル送りを安定的に行える3 軸駆動ステー ジの開発を行い,更なる高重力場における実験を行い,最 高100G 場の実験結果を取得することを目標とする.

### 【参考文献】

1. M. Schmidt et al., CIRP Annals, 66(2), 561 (2017).

2. T. Prater et al., The Int. J. of Adv. Manuf. Tech. **101**, 391 (2019).

- 3. R. Koike et al., CIRP Annals, 70(1), 191 (2021).
- 4. G. Sontti et al., CHEM. ENG. J. 330, 245 (2017).
- 5. S. Cai et al., ASC Omega 6(51), 35711 (2021).



### 【原著論文】

1.Xin Jiang, Ryo Koike, Polymers, 15(14), 3037 (2023)

2.Xin Jiang, Ryo Koike, Scientific Reports, 13, 14224 (2023)

3.Xin Jiang, Ryo Koike, Heliyon, 10(11), e32161 (2024)

### 【口頭発表】

 小池綾, Xin Jiang 流体解析に基づく重力変化が材料押出法に与える影響 の評価 日本機械学会生産システム部門研究発表講演会 2023、 九州工業大学 戸畑キャンパス、2023 年 3 月 6 日

### 2. 小池綾, Xin Jiang

高重力場における材料押出法の材料供給特性評価 2023年精密工学会春季大会学術講演会、東京理科大学 葛飾キャンパス、2023年3月16日

- 小池綾, Xin Jiang 高重力場材料押出プロセスにおける材料特性の影響の 評価
   2023 年精密工学会秋季大会学術講演会、福岡工業大学、2023 年9月13 日
- 4. Xin Jiang, 小池綾

Computational fluid dynamics simulation for evaluating influence of gravitational acceleration on material extrusion, 2023 年精密工学会秋季大会学術講演会、福岡工業大学、2023 年 9 月 13 日

5. Xin Jiang, Ryo Koike

Design and Evaluation of High-gravitational Fused Deposition Modeling System, 4D Materials Design and Additive Manufacturing 2023, Atlanta, USA, 7<sup>th</sup> September, 2023.

6. Xin Jiang, Ryo Koike

Evaluation for fused deposition modeling in high gravitational fields, The 25<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Abrasive Technology, Taichung, Taiwan, 11<sup>th</sup> December, 2023.

7. Xin Jiang

Effects of High Gravity Conditions on Additive Manufacture by Fused Deposition Modeling, 2<sup>nd</sup> International Conference and Expo on 3D Printing and Additive Manufacturing, 22<sup>nd</sup> March, 2024.

### 【特許】

(1)国内特許出願 1件 (2023年7月)(2)国際特許出願 0件

## 未知を知る確率的 AI チップの開発

研究代表者:横浜国立大学 島 圭介

### 【基本構想】

深層学習が牽引する第三次人工知能(AI) ブームが到来し、めざましい進展を見せている.しかし、必ずしも AI は万能ではなく、対象の問題に適切かつ十分な設備や費用を投入し、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 が出力する結果の信頼性・妥当性・説明性が問題視され、高性能な AI 技術が身近な日常生活に十分に普及・定着しているとは言い難い.この背景には、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が存在する.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.本稿では令和 5 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.

### 1. 研究目的

深層学習が牽引する第三次人工知能(AI)ブームが到来 し、めざましい進展を見せている.しかしながら、必ずし も AI は万能ではなく、対象の問題に適切かつ十分な設備 や費用を投入し、AI を正しく学習させなければ想定した 成果が出せない.これは、現行の AI のほとんどが単純な 演算素子を多段(深層)に組み合わせたモデルを基本とし ており、近年の IT 技術の高性能化に伴って容易に得られ る大量のデータを、強力かつ高価な GPU(画像処理装置) を用いて学習させることで高い認識精度を実現している ことに起因する.また近年では AI が出力する結果の信頼 性・妥当性・説明性が問題視され、科学技術振興機構(文部 科学省)戦略事業の令和2年度戦略目標に「信頼される AI」 が策定されるなど、AI システムの限界を克服する新技術 が求められている.

このような現状においては、ヒトの判断能力を超えるような高性能な AI 技術が身近な日常生活に十分に普及・定着しているとは言い難い. その背景には、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根本的な問題がある.また、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な現状も存在する.つまり、ロボットや 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(使用できる回路の制約や実時間内で 計算処理を終える必要があるなどの時間的制約)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.

発展がめざましい深層学習などの高性能な AI 技術を社 会に普及させるためには、人から発生する生体信号や人が 取り扱う対象などの確率的な振る舞いをする認識対象に 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新しい革新的なアイディアと, 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, AI 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 み込み可能な②小型・高速な AI チップの実現が必要不可 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.

本稿ではこれらの取り組みのうち, 令和5年度に実現した未知を知る AI に関する基礎理論の拡張,および応用事例について報告する.

#### 2. 研究成果

# 近似 GMM 型 "未知" 推定ニューラルネットの開発と五指駆動型筋電義手の制御への応用

昨年度までに本研究では FPGA 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) 部分の実装に成功していた.ただし,未知推定ニューラル ネットが内包する確率モデルのパラメータについては事 前に獲得しておく必要があり(例:別の PC を使用した事 前の学習を実施),オンボードでの学習を実現できていな かった.未知 AI を産業・医療・福祉分野で活用するため には,現場での学習(エッジコンピューティング)が必要 不可欠であり,本研究では FPGA 上で実施可能な誤差逆伝 搬法,および *k*-means 法による初期値設定法の実装に取り 組んだ.

未知 AI の学習では、各学習サンプルに One-hot ベクトル (所属クラスに1,その他のクラスに0を割り当てた離散的ベクトル)で表現される教師ラベルが与えられる.提案法では未知 AI 出力と教師ラベル間の推定誤差を、近似



図 2-1 (a) 比較手法との分類精度比較結果



図 2-1 (b) 筋電義手制御用インタフェースの実装例 対数関数を導入した近似交差エントロピーによって定義 することで, FPGA上での高速な誤差逆伝搬法の実行を可 能にした.また,未知 AI は確率モデル(正規分布や余事 象分布)を内包する特殊なネットワーク構造の影響で,ネ ットワークの重み係数をランダムに初期化することがで きない.従来では学習データの簡易構造を取得可能な *k*means 法による初期値設定法を適用していたが,*k*-means 法をそのまま FPGA上で実行することは困難である.そこ で,提案法ではクラスタの等分散性を仮定した制約付き*k*means 法を実装し,演算コストおよび使用リソースを低減 した初期値設定を実現した.さらに,提案法を利用した筋 電義手制御用のマンマシンインタフェースの制作にも取 り組んだ.

実験では筋電位 (EMG) 信号を利用した前腕動作識別を 実施し,五指駆動型ロボットハンドの制御に応用可能であ ることを確認した.図1-1(a)には被験者ごとの分類精度の 比較結果を示し,図1-1(b)には筋電義手制御用インタフェ ースの実装例を示す.提案システムで使用する FPGA にも 実装可能な簡易なオープンセット認識手法との分類精度 比較では,提案法は優れた分類精度を発揮し,現場でも使 用可能な高速な学習が実現できることが示された.

### 2.2. 時系列データに応用可能な"未知"推定 ニューラルネットとその応用

### 2.2.1. 適応的遷移確率を導入した隠れマルコフモデル を有する未知推定確率ニューラルネット

時系列データに対するパターン識別手法は数多く提案 されているが、それらは分類に用いる特徴量の性質によっ て、各時刻のデータに対して分類を行う静的な識別器と、 任意の区間におけるデータの時間変化を考慮可能な識別 器の2つに大別することができる.一般的に後者の時系列 型識別器の方が高い識別性能を有することが広く知られ ている一方、従来の未知を知る AI は時系列情報を考慮で きない静的な識別手法として設計されている.時系列デー タに対する識別精度向上を実現するためには、データの時



図 2-2 (a) GMM を有する A-HMM の例 間変化を考慮可能な未知を知る AI の改良モデルが必要と なる.そこで、本研究ではデータの時間変化を表現可能な 確率モデルの1つである確率隠れマルコフモデル (HMM) に着目し、適応的遷移確率を有した HMM に基づく未知推

定確率リカレントニューラルネットを提案する. 提案法では,従来のHMMの状態遷移構造を改良した適 応的遷移確率を有する HMM (図 2-2(a)) を開発した.適 応的遷移確率では HMM が有する状態遷移確率を時間関 数として定義することで,時間経過に伴う時系列データの 固有の変動に対し,遷移確率を適応的に変化させることが できるという特色を有する.状態遷移確率が固定されてい る従来の HMM より,提案する新しい A-HMM はより柔 軟な時系列変化をモデル化でき,分類精度の向上を可能に する. 未知クラスの分類を実現するために, 提案法では混 合正規分布(GMM)を有する A-HMM と混合余事象分布 (CGMM) を有する A-HMM のモデルパラメータを求め る必要がある. そこで, 提案した HMM の確率演算をニュ ーラルネット構造に展開したリカレント型の確率ニュー ラルネットを構築し,誤差逆伝播法を介した学習が可能に なることで高精度かつ高信頼な識別器を実現できる.

提案法の検証は、①未知クラスの分類を含まないネット ワーク構造において学習対象クラスにおいて分類精度向 上が可能か確認し、②未知クラスの分類を導入した未知 AIへの拡張が可能か確認する二段階で実施した.

検証①では、EMG 信号のオープンデータセット(IEE-EMG Dataset [1])を利用した際の検証結果について述べる. 提案法の検証では 8 種類の指動作,4 種類の手首動作,計 12 動作(M0-12)を分類対象動作とし、提供されている 全 EMG 信号から抽出した 10 チャネル分の EMG 信号を 利用し手指動作の分類を行った.また、学習時に一部のク ラス(M1,3,5,7,9,11)で学習サンプルを削減した場合(不 均衡データ問題)での有効性を検証した.図 2-2 (b)に不均 衡データを扱った場合の各動作の分類精度を示す.この結 果では、遷移確率が固定される従来の確率ニューラルネッ ト(RLLGMN)[3]と近年よく利用される LSTM [4],GRU [5]が比較対象となっており、提案法は従来法に比べ高い 分類精度を記録していることが確認できる.さらに、不均 衡データに対しても十分な耐性を有していることが確認 でき、提案法の有用性を示すことができた.

次に、検証②では CGMM を有する A-HMM を追加し、 未知クラスを考慮した分類を行った場合の提案法の分類 精度を検証した.検証に使用したデータは Motion Sense





### 2.2.2. 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てられている.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.様々な推 定手法が既に提案されている一方,判別に有効な周波数特 徴の選択が難しい点や加工装置の制御へ応用する場合に はより短い判定間隔を実現する必要がある点などが新た な課題として明らかになった.また、学習サンプルとして 作成した被削材へのラベル付けが煩雑で,必要な学習サン プルの種類をより少なく,被削材の長さをより短くするこ とも非常に重要な課題である.

本研究では未知 AI を加工面粗さ判別問題へ適用し,その 有効性について検討した.提案法では正常な加工面のデー



図2-2(f) 学習時に含まれる加工条件の影響(提案法) タを正規分布で,粗い加工面のデータを余事象分布でモデ ル化することを考える.また,今回の判別タスクでは時系 列データに対する異常度を評価できるようにするため,未 知 AI の後段に Gated Recurrent Unit (GRU) [5]を導入し, 未知 AI から得られる対数尤度と生データの時間変化から 面粗さを推定した(図 2-2(d)).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

できるという特徴を有する.

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,提案法と従来法 [6] の分類精度を比較した.学習・評価に使用できるデータは, 100 mm の被削体の内,加工の最初と最後の6 mm を除い た 94 mm 分を抽出したものであり,94 mm を 22 分割し た各区間(1 区間4 mm)に面粗さの2値ラベルが1 つ与 えられている.従来法では4 mm ごとに面粗さの分類を行 っている一方,提案法では1 mm ごとに分類を行うため, 区間内のラベルを複製し,アップサンプリングして学習お よび評価に用いた.また,学習用データセットを構築する 際には 200 種類存在する加工条件の中からランダムに選 択し,選択する個数を変更した3 つの条件(160 個,120 個,80 個)を設けた.学習用データセットに含まれる加 工条件が評価用データセットには含まれないものとした. また,先行研究では加工条件における全区間(22 区間) を学習に使用しているが,本研究では先頭の3 区間(6-18 mmの区間)のみを抽出し,学習に使用した.

まず,図 2-2 (e)に先頭の 3 区間のみを学習に利用した 場合の提案法,従来法,および全 22 区間を学習に使用し た場合の従来法のmicro-F1 スコア (Accuracy)を示す.提 案法の識別精度は工具情報までを追加した条件 C に匹敵 する識別精度を記録しており,従来法より短い区間,特徴 抽出処理なしに従来法と同等かそれ以上の判別性能を発 揮できることが示された.また,これらの結果では学習に 使用する区間数によって分類精度が変化しないことが推 察され,学習用の切削加工サンプルを作成する際に被削材 の長さを従来より大幅に短くできる可能性が示された.

次に、学習に使用する切削条件を減らした場合の提案法のmicro-F1 スコア、および AUC (Area Under the ROC)を図 2-2 (f) に示す. この結果から、学習に利用できる条件数が少なくなればなるほど判別性能が低下しており、学習用データセットに含まれる加工条件の多様性が判別精度向上に大きく寄与することが示唆される. ただし、学習に使用する切削条件を 80 種類まで絞った場合にも 0.9 程度の AUC を記録しており、少ない学習データからも高精度な面粗さ判定を実現可能であることが示された.

### 2.3. 無限混合正規分布を内包する未知ニューラル ネットの教師なし学習法の高速化

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.

昨年度はディリクレ過程混合正規分布 (DPGMM) [Gorur ら, 2010 年]を利用した未知クラスの内部構造推定,およ び推定結果を未知 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を行った.実験結果か らその有効性が示されたものの,実行時間の遅さが課題と なっており,本年度では学習アルゴリズムの高速化,およ びさらなる精度検証を実施した.

DPGMM の確率演算において冗長な部分として,パラメ ータをサンプリング(学習)した際に発生する評価値の算 出部分が挙げられる.この評価値算出部では,新しく得ら れたパラメータを使用し,学習データ全体に対する尤度計 算が行われる.この尤度計算には混合余事象分布(GMM) の複雑な逆行列演算が含まれており,1サンプルに対して 数万回行われる尤度計算を簡略化できれば,実行速度の高 速化に寄与できると考えた.提案法では IGMM 部分につ



図 2-3 (a) 提案法と従来法の実行速度の比較結果

いても未知 AI と同様に対数線形化[Tsuji ら, 2000 年]を適 用し, ネットワークの重み係数を直接サンプリングする形 に変更することで劇的な高速化を実現した.

実験では GMM から生成した人工データを利用し, 検証 を行った.学習データには 4 つの学習対象クラスが含ま れ, 各クラスに対して 100 点のデータが含まれているもの とした. CPU: Intel Core i7-8700 (3.20GHz), RAM: DDR4 2666MHz を搭載した汎用 PC において,従来の IGMM と 改良した IGMM を実行した際の実行速度を図 2-3 (a)に示 す.この結果から,提案法によって約 1.6 倍の高速化を実 現できたことが確認できる.また,IGMM における集中度 αのサンプリング部分のプログラムを最適化済みの別プ ログラムに差し替えたところ,さらなる高速化の兆しが確 認でき,現場で運用可能な速度まで達せられるよう今後も 継続的に検討を進めていく.

### 3. まとめと今後の展望

昨年度は,我々の研究グループで培ってきた学習時に想 定しない未知事象を考慮できる"未知を知る AI"を発展さ せた基礎理論の提案,および適用事例の創出に取り組み, ①ハードウェア実装された未知 AI によるマンマシンイン タフェース制御,②時系列データに応用可能な未知 AI の 拡張理論構築と加工面粗さ推定への応用,③未知 AI の教 師なし学習法の高速化を実現した.

今後はハードウェア制約も考慮した学習・最適化アルゴ リズムを確立することを目指し、医療・福祉・産業分野で の実用化を指向した実証実験にも取り組んでいく.

### 【参考文献】

- V. H. Cene *et al.*, "Open Database for Accurate Upper-Limb Intent Detection Using Electromyography and Reliable Extreme Learning Machines," Sensors, 19–8, 1864 (2019).
- [2] M. Mohammad *et al.*, "Mobile Sensor Data Anonymization," Proceedings of the International Conference on Internet of Things Design and Implementation, pp. 49–58 (2019).
- [3] T. Tsuji *et al.*, "A Recurrent Log-Linearized Gaussian Mixture Network," IEEE Trans. on neural networks, VOL. 14, NO. 2, pp. 304-316 (2003).
- [4] H. Abrishami *et al.*, "Supervised ECG Interval Segmentation Using LSTM Neural Network," BIOCOMP, pp. 71-77 (2018).
- [5] K. Cho *et al.*, "Learning Phrase Representations using RNN Encoder–Decoder for Statistical Machine Translation," Proceedings of EMNLP 2014, pp. 1724- (2014).
- [6] 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).



### 【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(採択済み)

### 【口頭発表】

- 川崎 弘貴,迎田 隆幸,島 圭介:周波数特徴を抽出 可能な畳込み層を有する深層確率ニューラルネットの 提案,第41回 日本ロボット学会学術講演会,R.5年 9月14日,仙台国際センター
- 迎田 隆幸,島 圭介,横田 知宏,奥田 誠:余事象分 布を内包するリカレント確率ニューラルネットによる エンドミル加工面の面粗さ推定,第31回インテリジ ェント・システム・シンポジウム,R.5年9月7日, 九州大学椎木講堂 ※優秀論文賞受賞
- 嘉山 敢太,迎田 隆幸,島 圭介:適応的遷移確率を 導入した混合正規分布内包型隠れマルコフモデルに基 づくリカレント確率ニューラルネット,第24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 R.5年12月16日,新潟コンベンションセンター
- 4. 堀松 壮吾,竹中 健祐,布野 大樹,迎田 隆幸,島 圭介:ロボットハンド制御を目的とした未学習クラス 推定型複合動作識別法,第29回ロボティクスシンポ ジア,R.6年3月6日,カヌチャリゾートカヌチャベ イホテル&ヴィラズ(沖縄県)
- 5. 迎田 隆幸, 嘉山 敢太, 島 圭介: 適応的遷移型 HMM を内包するリカレント確率ニューラルネットに よるオープンセット動作認識, 第29回ロボティクス シンポジア, R.6年3月6日, カヌチャリゾートカヌ チャベイホテル&ヴィラズ(沖縄県)
- 6. 南部 穣汰,迎田 隆幸,島 圭介:対数線形化された 無限混合正規分布に基づく未知クラス推定確率ニュー ラルネットの構造最適化,情報処理学会 第86回全国 大会, R.6年3月17日,神奈川大学横浜キャンパス
- Takayuki Mukaeda, Keisuke Shima: Open-set motion recognition and adaptive structural modification of classifiers based on clustering of unknown motions, 2023 IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics, R.5年10月4日, シェラトン ワイキキ (ハワイ州, アメリカ)
- Ryota Kashiwagi, Takayuki Mukaeda, Keisuke Shima: FPGA Implementation of An Approximated Gaussian Mixture Open-Set Recognition Model Application to

Interface Control, 2024 IEEE International Conference on Control, Decision and Information Technologies (3月に 投稿)

### 【特許】

(1)国内特許出願 1件

(2)国際特許出願 0件

### 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に対して、一般的に人工ペースメーカ植え込み術が行われており、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。しかしながら、人工ペースメーカ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等、さまざまな課題が存在してい る。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞からペースメーカオルガノイドを作製し、移植することにより、従来の全ての課 題を解決することを目的として研究を行う。

ペースメーカオルガノイド移植治療を実現するにあたり、①ペースメーカ細胞の大量作製、②細胞の品質評価法、 ③心筋細胞の純化精製法、④オルガノイド作製法、⑤ヒト細胞を生着可能なモデル動物の作製、⑥臨床グレード 培養法の確立、⑦臨床応用の経験値、といった課題が存在するが、我々は、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)、特殊培養液による超高純度心筋分離培養法(③関連, Cell Stem Cell 2013, Cell Metab 2016)、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)、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)、臨床グレード培養液の開発(⑥関連, Stem Cell Rep 2023)等、その課題の多く を克服する技術を開発してきた。また、ヒト iPS 細胞由来心室筋スフェロイド移植治療において臨床応用を主導した実 績があり、⑦に関しても十分な経験値が備わっている。

上述の技術を駆使することで、徐脈性不整脈に対するペースメーカオルガノイド移植治療を確立するための基盤技術を構築する。

### 1. 研究目的

洞不全症候群や房室ブロック等の徐脈性不整脈に対し て、一般的に人工ペースメーカ植え込み術が行われており、 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。しかしながら、人工ペースメーカ植え込み術は根 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等、さまざまな課題が存在 している(<u>図1</u>)。また、産業的側面においても、人工ペ ースメーカは100%海外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。

また、我々はヒト iPS 細胞を用いた再生医療におけるさ まざまな技術を確立してきた。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)、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)、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 2019)、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)、臨床グレード培養液の開発(⑥関連, Stem Cell Rep 2023)等である。また、ヒト iPS 細胞由来心室筋スフェロイド移植治療において臨床応用の実績があり、⑦に関しても十分な経験値が備わっている。

本研究では、ヒト iPS 細胞から作製したペースメーカオ ルガノイドを移植することにより、従来の全ての課題を解 決することを目的として研究を行う(**図**2)。

ヒト iPS 細胞は再生医療における有用な細胞源ペース メーカオルガノイド移植治療を実現するにあたり、① ペ ースメーカ細胞の大量作製、② 細胞の品質評価法、③ 心 筋細胞の純化精製法、④ オルガノイド作製法、⑤ ヒト細 胞を生着可能なモデル動物の作製、⑥ 臨床グレード培養 法の確立、⑦ 臨床応用の経験値、といった課題が存在す るが、上述の通り我々はそれらの課題を克服する技術を開 発してきた。そこで、上述の技術およびこれまでの経験値 を総動員し、本研究を遂行する。



### 2. 研究成果

#### 研究成果1:ペースメーカ細胞の製造と特性解析

我々は、これまでの検討により、ヒト iPS 細胞から高純 度の心室筋細胞と、ペースメーカ細胞(心房筋を含む)を 作り分けることに成功した(*unpublished*、**図3**)。また、ペ ースメーカ細胞においては、長期培養を行っても拍動数 90-100 回/分が維持されることを確認した。さらに、東京 大・野村先生との共同研究により single-cell RNA-seq 解析 を実施し、ペースメーカ細胞の存在を確認した。



### 研究成果2:ペースメーカ細胞の品質評価

従来の品質評価法は、製造している接着細胞を剥離・単 離し、flow cytometry や免疫染色、QPCR による評価が主 であったが、貴重な細胞を破壊する必要があること、全体 の評価ではなく一部の評価であること、分化の途中の段階 の品質が評価できないこと、等といった課題があった、

そこで我々は、心筋分化過程において培養液中に分泌さ れる miRNA を網羅的に解析し、培養上清中の miRNA を 検出することで、中胚葉分化効率、心筋分化効率、未分化 幹細胞の残存率等を定量化する方法を開発した (*Stem Cell Rep* 2023、図4)。



### 研究成果3:ペースメーカオルガノイドの作製

心臓オルガノイドの作製において、従来は細胞の懸濁液 をマイクロウェルプレートに播種することで、細胞が沈降 し、凝集塊を形成させることにより、作製していたが、細 胞死等によりロスする細胞が多く、オルガノイドの形成に 約 1 週間を要するといった課題があった (JACC Basic to *Cell Reports Methods* 2023)。
そこで、我々は、多孔質のプレートを用いて、プレート下 面から陰圧をかけることにより、効率よく細胞を凝集させ ることで、短期間で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 (*Cell Reports Methods* 2023、図5)。



#### 研究成果4: in vitro における有効性評価(in vitro PoC)

我々は、ヒト iPS 細胞から作製した心拍数 20-40 程度 の心室筋オルガノイド(*in vitro* 徐脈モデル)に、心拍数 100 程度のペースメーカオルガノイドを結合することで 心拍数が正常化することを確認した(*in vitro* PoC、図



#### 研究成果5:ヒト細胞をサルに生着させる条件

一方で、我々らは、ヒト細胞を生着する観点において、 ブタに比べてサルにおいて有利であり、信州大・柴先生と の共同研究により、ヒト細胞がサル心臓内に免疫拒絶なく 効率よく生着することに成功した(*Circulation* 2024、<u>図7</u>)

また、シングルセルの移植する場合に比べて、オルガノ イドを移植することにより、効率よく生着させることが可 能であることを示した。



以上の通り、本プロジェクトでは当初掲げていた目標を 順調に達成しており、Cell Press 発刊の学術誌や循環器領 域の最高峰の雑誌である Circulation 等にも成果を発表し ており、国内外に大きなインパクトを発信している。今後 は、本プロジェクトをさらに発展させ、産業応用の基盤を 構築していきたいと考えている。

# 業績

## 【原著論文】

 Kobayashi H<sup>#</sup>, <u>Tohyama S<sup>#\*</sup>(</u><sup>#\*</sup>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, <u>Morita-Umei Y</u>, Umei TC, Sekine S, Kishino Y, Kanazawa H, Kawagishi H, Yamada M, Narita K, Naito T, Seto T, Kuwahara K, Shiba Y\*, Fukuda K.

*Circulation* 150(8), 611-621(2024)

Regeneration of Nonhuman Primate Hearts With Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Spheroids.

 Moriwaki T, Tani H, Haga K, <u>Morita-Umei Y</u>, Soma Y, Umei T, Sekine O, Takatsuna K, Kishino Y, Kanazawa H, Fujita J, Fukuda K, <u>Tohyama S\*(\*Corresponding</u> <u>author)</u>, Ieda M,

*Cell Reports Methods*, 3(12), 100666(2023) Scalable production of homogeneous cardiac organoids derived from human pluripotent stem cells.

- Kurashina Y, Fukada K, Itai S, Akizuki S, Sato R, Masuda A, Tani H, Fujita J, Fukuda K, <u>Tohyama</u> <u>S\*(\*Corresponding author)</u>, Onoe H\*, *Advanced Science*, e2301831(2023) Hydrogel-sheathed hiPSC-derived heart microtissue enables anchor-free contractile force measurement
- Sekine O, Kanaami S, Masumoto K, Aihara Y, <u>Morita-Umei Y</u>, Tani H, Soma Y, Umei T, Haga K, Moriwaki T, Kawai Y, Ohno M, Kishino Y, Kanazawa H, Fukuda K, Ieda M, <u>Tohyama S\* (\*Corresponding& last author)</u>, *Stem Cell Reports*, 18(10)1, 1925-1939(2023)
  Seamless and Non-Destructive Monitoring of Extracellular MicroRNAs during Cardiac Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells.
- Tani H, Kobayashi E, Yagi S, Tanaka K, Kameda-Haga K, Shibata S, Moritoki N, Takatsuna K, Moriwaki T, Sekine O, Umei T, <u>Morita Y</u>, Soma Y, Kishino Y, Kanazawa H, Fujita J, Hattori S, Fukuda K, <u>Tohyama S\*</u> <u>(\*Corresponding & Last author)</u>, *Biomaterials*, 299, 122174(2023) Heart-derived collagen promotes maturation of engineered heart tissue.

### 【総説】

- 谷 英典, <u>遠山 周吾</u> 実験医学, 42(5), 728-735 (2024) 三次元新組織の開発とその応用
- 2. 谷 英典, **遠山 周吾**, 小林 英司

Organ Biology, 31(1), 12-16(2024)

成熟度の高いオルガノイドを試験管内でいかに作り 上げるか?ブタ臓器特異的細胞外基質の特性と心臓 由来コラーゲンの利用

 Yusuke Soma Y, Tani H,Morita-Umei Y, Kishino Y, Fukuda K, <u>Tohyama S\* (\*Corresponding author &</u> <u>last author)</u>, *J Mol Cell Cardiol*, 187, 90-100(2024)

Pluripotent stem cell-based cardiac regenerative therapy for heart failure.

- 梅井 智彦, 森田 唯加, <u>遠山 周吾</u> カレントテラピー, 42(1), 20-15(2024)
   培養液を利用したヒト iPS 細胞由来心筋細胞の大量 選別法と品質評価法の開発
- Kishino Y, <u>Tohyama S\*(\*Corresponding author)</u>, Morita Y, Soma Y, Tani H, Okada M, Kanazawa H, Fukuda K, *Journal of cardiac failure*, 29(4),503-513(2023) Cardiac Regenerative Therapy Using Human Pluripotent Stem Cells for Heart Failure: A State-of-the-Art Review.
   遠山周吾.

味の素グループ ASV レポート(2023) 再生医療用培地における味の素グループの優位性

# 【口頭発表】

1. <u>遠山 周吾</u>

重症心不全に対するヒト iPS 由来高純度心筋細胞移 植:基礎から臨床へ 第23回日本再生医療学会総会、2024年3月23日、 新潟 招待

#### 2. Shugo Tohyama

Metabolism-based production of cardiomyocytes from human PSCs for regenerative therapy Cardiovascular Bioengineering (NIH 主催) 2023、2023 年 5 月 29、京都 招待

#### 3. <u>遠山 周吾</u>

重症心不全に対する心筋再生治療法の開発 第9回日本心筋症研究会、2023年5月13日、大阪 招待

#### 4. <u>遠山 周吾</u>

重症心不全に対する心筋再生治療法の開発 第31回日本医学会総会 2023 東京、2023 年4月22 日、東京 招待

# 【特許】

(1)国内特許出願 0件(2)国際特許出願 0件

# 戦略的研究シーズ育成事業

# 「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、体内や環境モニタリング可能な、フレキ シブル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. 2023 年度の研究目的

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、さ らに、2030年頃には Beyond 5Gの実用化が検討されてい る。総務省が「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進めようとす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、情報システムの整備に力を入れている<sup>23</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、体内や環境モニタリング可能な、フレ キシブル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。このような次世代 フレキシブルデバイス基材に求められるスペックは従来 よりも高く、既存材料では実現が困難である。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)。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<sup>4</sup>、次世代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。



図1. セルロースナノファイバー (CNF)

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および低誘電正接化が 必要である。そこで 2023 年度の研究では、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、熱物 性及び電気物性の高性能化を試み、特に誘電特性および伝 熱特性と CNF 構造との相関解析を実施し、各物性の支配 因子を精査した(図2)。目標とする物性値は、関連企業の ヒアリングをもとに設定しており、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 以上とした。



図 2. CNF による電子デバイス基材の創製戦略

#### 2. 2023 年度の研究成果

(1) 誘電特性の制御:異なる表面化学構造と空隙率を有 する CNF フィルムの誘電率と誘電正接を、空洞共振法(周 波数帯:10/28/40 GHz) で室温 0~50%相対湿度下にて測 定した。CNF 表面にはカルボキシ基が導入されており、そ の対イオンを交換できる。対イオンとして Na・テトラア ルキルアンモニウム(TBA)・プロトン(H)を導入した CNF フィルムの誘電特性を解析したところ、表面官能基の極性 が低いほど誘電率が低くなる傾向があったが、大きな差は 見られなかった。一方、誘電正接は対イオン種に大きく依 存しており、TBA 型で最も低い値を示した(tanô:0.04 @40 GHz)。さらに、異なる湿度下で調湿したフィルムの誘電 特性を解析したところ、高湿度下において誘電率・誘電正 接ともに著しく増加した(図3)。



図 3. 表面化学構造が異なる CNF フィルムの誘電特性(上) 誘電率、(下)誘電正接

次に、空隙率が異なる CNF フィルムの誘電特性を解析し たところ、空隙率が高いほど誘電率および誘電正接が低下 した(図4)。Lichteneckerの対数複合式<sup>5</sup>を用いて固有誘 電率を算出すると、見かけの誘電率と逆の傾向が見られた。 空隙率が大きいほど比表面積が大きくなる(図5)。すな わち、誘電特性が界面分極によって支配される可能性があ ることを示している。以上より、低誘電率および低誘電正 接を達成するためには、分子極性の低減と空隙率の増加に より繊維間相互作用を減らすことが有効であると考えら れる。



図 4. 空隙率が異なる CNF フィルムの誘電特性(上) 誘電 率、(下) 誘電正接



(2)伝熱特性の制御:異なる湿度環境下で調製した CNF フィルムの面内・面外方向の熱伝導率を 3ω<sup>6</sup> 法により解析した。湿度増加に伴い、面内・面外方向ともに熱伝導率が増加し、面内方向において増加が顕著であった(図 6) この結果より、CNF フィルム中の熱輸送が CNF 間の水分子のチャネル効果と吸湿による膨張降下のバランスによって支配されていると考えられる(図 7)。次に、配向度が異なる CNF フィルムの熱伝導率を解析した。CNF の面内方向

の配向度が高まるにつれ、面内・面外方向ともに熱伝導率 が増加しており、CNFフィルムの熱輸送がCNFフィルム の配向度と密度によって支配されていると考えられる。



図 6. (a) CNF フィルムの熱伝導率の湿度依存性 (b) CNF フィルムの面直方向における熱伝導率の湿度依存性

さらに熱伝導率を最大化するために Flow-Focusing 法 により一軸配向した CNF フィラメントを調製し(図 9)、 その熱伝導率を T 型熱伝導率計測法で解析した。既存流 路の改良と化学処理の最適化により、CNF フィラメント の配向度と水素結合の程度を高めることに成功し、熱伝導 率が 10 W/mK を超えるフィラメントが安定的に作成でき ることを実証した(図 10)。



図 9. Flow-Focusing 法による CNF フィラメント調製



図 7. CNF フィルム内の熱輸送における湿度の影響 (a)面直 方向、(b)面内方向。CNF フィルムの熱輸送における水分子 のチャネル効果と膨張降下の比較 (c)面直方向、(d)面内方 向。



図 8. (a) 配向度が異なる CNF フィルムの熱伝導率 (b) 配向度が異なる CNF フィルムの面直方向における熱伝導



図 10. (a) 改良した Flow-Focusing 流路の模式図 (b) HCl 浸 漬による対イオン交換 (c) 既存流路 (○)、改良流路 (△) および HCl 浸漬 (◇) により調製したフィラメントの直径 と熱伝導率の関係 (d) 各調製法で得られたフィラメント の平均熱伝導率

### まとめ

以上のように、2023 年度は、CNF の構造を制御するこ とによって、CNF 材料の誘電特性および熱伝導率を制御 することに成功した。今後はさらなる低誘電率・低誘電正 接化に向けて、分子極性の低減と空隙率の増加により繊維 間相互作用を減らすことが有効であると考えられる。予備 実験において、CNF の水酸基を化学架橋により減らすこ とで、誘電率と誘電正接が減少することが確認された。ま た、ポリスチレンなどの低誘電率ポリマーとの複合化によ り、低誘電特性を実現できた。今後は CNF ポリマー複合 体を調製し、目標物性値を達成しうる材料の創製に取り組 む。また分子動力学シミュレーション等の計算的手法を活 用して、低誘電率化のための主要な影響因子を特定し、構 造最適化を図る。

#### Reference

- 総務省 HP, R2.6/30, https://www.soumu.go.jp/menu\_ne ws/s-news/01kiban09\_02000364.html
- 独立行政法人情報処理推進機構(IPA)HP、https://loc al-iot-lab.ipa.go.jp/lab?k=kanagawa-pref-iot
- 神奈川県 HP、<u>https://www.pref.kanagawa.jp/docs/sr4/dx</u> -project.html
- 4. ナノセルロースジャパン HP、https://www.nanocellulos ejapan.com/about/
- 5. Lichtenecker, K. and Rother, K., Phys. Z, 32, 255-60 (1931)
- Bauer, M. L., & Norris, P. M. (2014). Rev. of Sci. I nstrum., 85(6).

【口頭発表】

- 佐藤 俊大,大長 一帆,工藤 正樹,齋藤 継之,塩見 淳 一郎,高熱伝導性セルロースナノファイバーフィラ メントの開発,2023 年 9 月 23 日,第 84 回応用物理 学会 秋季学術講演会,熊本,日本
- Kazuho Daicho, Ayhan Yurtsever, Fabio Priante, Tsuguyuki Saito, Foster Adam, Takeshi Fukuma, Regularly-positioned surface charged groups of nanocellulose visualized by frequency-modulation atomic force microscopy (周波数変調原子間力顕微鏡 によるナノセルロース表面の可視化), The 5 th International Cellulose Conference, 2023 年 9 月 26 日, 広島, 日本
- 3. Kazuho Daicho, Shuji Fujisawa, Yoshinori Doi, Junichiro Shiomi, Tsuguyuki Saito, Dimension of elementary cellulose fibrils in plants (植物細胞壁中のミクロフィブリル断面の解析), 2024 年 3 月 19 日, ACS spring meeting 2024, New Orleans, USA.

# 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・フォトニクスが得 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いるが、その応用は進んでいな い。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、そのような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、堅牢なテラヘルツ・ピコ秒波形の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、テラヘルツデバイス、および半導体デバイスの電場検出実 験について報告する。

#### 1. 研究目的

テラヘルツ領域・ピコ秒領域は、周波数 10<sup>12</sup> Hz、時間 にして 10<sup>-12</sup> 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 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熱検出器など様々な 計測素子が存在しており、光強度を計測するために用い られている。また、これらの半導体素子を二次元に並列 化しイメージング可能な二次元撮像素子がデジタルカメ ラをはじめ様々に実用化されているのも良く知られてい 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と、信号が微弱 となってしまう問題があった。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、計測速度や感度が犠 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 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放 出される。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。このような手法を時間領域分光法と呼び、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。 時間領域分光法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必要 があるため、繰り返し同様の波形や現象を誘起する必要 がある。したがって、時々刻々と揺らぐ現象について調 べたい場合には、測定するたびに異なる強度が得られる ため、正確に測定することができない。このため、従来



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。

の時間領域分光法は、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長年研究してきた。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。本研究では、これまでの研究の蓄積のある階段型の ミラーを用いてレーザーパルスを分割する手法(b)と[1]、 チャープパルスを用いる分光手法(c)[2]について研究した のでそれらについて報告する。

#### 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 超高速波形を計測する手法について述べる。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。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*(*ω*)、周波数*ω*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<sup>2</sup>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強力であり簡 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、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、

#### $\Delta \boldsymbol{t} = \sqrt{\boldsymbol{T}_{\mathrm{TL}}\boldsymbol{T}_{\mathrm{w}}}$

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。







図3:分散補償チャープパルス分光法の実験配置図。プローブのチャープパルスは回折格子を用いた stretcher で用意し、それを読み出 し光としても用いた。ポンプ光によってプローブ光に変調を書き込み、回折格子型の compressor を用いて位相補償した後、読み出し光 との和周波数を非線形結晶によって発生させ、そのスペクトルを観測した。

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。

このような干渉波形であれば位相をうまく補償するこ とによって解消することが可能である。そのために、 我々は、チャープパルスに信号を書き込んだのちに、そ のチャープと反対向きのチャープを付与し、そのように して得られたパルスと読み出し用のチャープパルスとの 和周波数を取ることによって、超高速変調の波形歪みを 解消できると考えた。このようにすると、位相補償によ って、書き込んだ変調に関する信号の位相に、読み出し 用のチャープパルスとは逆の変調がかかるため、和周波 数を取った時にスペクトル領域で一定となる。

これを活用すれば、チャープパルスを用いた場合でも 波形ゆがみなくリアルタイムにテラヘルツ領域・ピコ秒 領域の超高速波形を可視化することができる。読み出し 過程で和周波発生という非線形過程を用いるため、測定 系は複雑にはなるが、カメラなどの二次元撮像素子を用 いる場合に比べれば光学系は簡便である。和周波発生過 程は非線形光学素子を最適化すれば高効率化可能であ り、また、ファイバーベースの光学系を構築することも 可能であることから、堅牢な光学系を構築できるものと 期待できる。 そこで、この技術を実証するために構築した光学系を 図3に示した。光ファイバーベースの光学系構築を前提 として、1µmの中心波長をもつ超短パルスレーザーを用 い、それにチャープを印加した後にプローブ光とした。 試料としては、1µmの波長域で透明な半導体である、 ZnTeを利用し、プローブ光と共にポンプ光を照射するこ とによって、二光子吸収過程などを通した、超高速の吸 収変調を誘起した。透過したプローブ光を、回折格子対 を用いてプローブ光とは逆のチャープをつけ、その後、 プローブ光の一部を分岐した読み出し光との和周波数を 非線型光学結晶である BBO で発生させ、発生した和周波 成分のスペクトルを分光器とラインセンサーで検出し た。時間軸はポンプ光の時間遅延を変化させて信号の変 化を見ることで校正した。

図 4(a)は、このようにして検出された和周波光のポン プ光あるなしによるスペクトル変化をプロットしたもの である。なお、位相補償を行わなかった場合のスペクト ルについても計測し表示している。図を見ると明らかな ように位相補償をしない場合には、ポンプ光によって誘 起される信号は大きく波打っており、干渉が生じている ことがわかる。一方で、位相補償を行うと、このような 干渉パターンは消去され、単一のパルスのみが現れるこ とがわかった。これはまさにポンプ光によって生じると 考えられる吸収変化と同様の波形である。

次に、この波形から、時間分解能を計測するために、 ポンプ光を照射するタイミングを変化させながら得られ る信号波形を計測した結果を図4(b)、4(c)に示す。滑らか なスペクトルを持つ固体レーザーとファイバーレーザー で得られた結果を比較のために示した。この実験から、 固体レーザーは比較的滑らかなスペクトルを持つことか



図4:分散補償チャープパルス分光法を用いた超高速変調波形計測結果。(a) ポンプ光ありなしによる透過率変化。灰色は位相補償を しなかった場合の信号であり、青はした場合の信号である。(b) ポンプ光の時間遅延を変化させた際の信号の変化。ファイバーレーザ ーを用いて計測した場合のものを示す。(c) 同様の時間遅延掃引結果を、固体レーザーを用いて計測した結果。



図5:時間窓幅と信号の時間幅のチャープ量依存性。チャー プ量を表す GDD=0 はプローブ光のパルス幅が最も短くなる場 合を示している。

ら、時間依存性もきれいに計測されているが、ファイバ ーレーザーは細かくスペクトル形状が変化することが知 られており、そのために信号強度が時間に依存して大き く変化する等の問題があることがわかる。このことか ら、シングルショットの波形計測には、スペクトルの滑 らかなレーザーが望ましいことが分かった。

また、窓幅と時間分解能の関係を明らかにするため に、窓幅を変えながら得られた測定窓幅と観測された信 号のパルスの幅を計測した結果を図5に示す。今回得ら れているパルス幅は、ほぼ元のプローブパルス幅とポン プ光のパルス幅の相関幅となっていることから、時間分 解能を表していると考えて良い。この結果を見ると、窓 幅を変化させても時間分解能は大きくは悪化しないこと がわかる。このようにチャープパルスを用いたシングル ショット分光法に位相補償を組み合わせることによっ て、高い時間分解能と窓幅可変性を両立できることが示 された。このことは、今回開発した手法がテラへルツ・ ピコ秒領域の超高速ダイナミクスを可視化する極めて有 望な手法であることを示唆している。

以上の実験は、単一のレーザーからポンプ光とプロー ブ光を準備して計測を行っていたが、この手法はシング ルショットの分光手法であることから、必ずしも用いる レーザーは単一でなくとも問題はない。通常異なる二台 のレーザーの相互相関波形を測定する場合には、二台の レーザーの周波数を固定する等複雑な制御手法が必要に なるが、シングルショットの実験系であれば、そのよう な取り組みは不要である。このことを実証するために、 我々は、1.0 µm のレーザーを読み出し用の光として、1.5 µm のパルスレーザーのパルス波形を評価する研究を試 みた。

この実験では 100 kHz のファイバーレーザーと 50 MHz の 1.5 µm パルスレーザーを用いた。これらのレーザーの 出力を図 3 における読み出し光、信号光と同様にチャー プ及び位相補償を行ったうえで、非線型光学結晶に入射 し、それらの和周波数発生させたうえで、そのスペクト ルからパルスの波形を取得する実験を行った。単一のパ ルスだと時間軸を校正するすべがないため、信号光はダ ブルパルスとし、パルス間隔を変えながら計測すること で横軸を校正した。

図6はその結果得られたスペクトル波形を示してい る。この結果、計測されているパルスのパルス幅は、1 psであり、2台のレーザーそれぞれのパルス幅から見積 もった相互相関幅に対応しており、波形歪みのない計測 ができていることを示している。この手法では、レーザ ーの同期は行っていないため、二台のレーザーのタイミ ングはランダムであるが、繰り返し周波数とパルス幅か ら見積もった信号発生確率とほぼ同じ確率で和周波信号 が計測されており、パルス計測が過不足なく行えている ことがわかる。

なお、この手法では二台のレーザーの波長が異なるた め、二つの光を同軸にすることが可能である。このため 和周波光も、それぞれの光の二倍高調波とは異なる波長 となり、スペクトルフィルターによって測定したい信号 光のみを取り出すことが可能である。したがって系の調 整が簡便になるほか、同軸配置を利用した高効率な和周 波数発生素子などの活用も検討できる。このように、被 測定光と信号光を異なる波長にすることは装置の堅牢化 や高効率化に極めて有効である。

次に、これらの実験系を用いて、シングルショット分 光系でなければ可視化することのできない現象を見るこ とを試みた。そのために、ピコ秒領域の超短パルスを電 気的に発生することが可能な、利得スイッチレーザーを 用い、その強度波形を計測した。利得スイッチレーザー は電気パルスを用いて半導体レーザーを駆動し、ピコ秒 のパルス幅を持つ光を放出するデバイスであるが、テラ ヘルツ・ピコ秒領域の詳細な波形はリアルタイムオシロ スコープがないため可視化することができていなかっ た。そこで、本研究で開発した、超高速波形計測系を活 用し、光パルスの波形を計測する実験を行った。

実際の実験は、図3に示した実験系を改良し、プロー ブ光を光変調する代わりに、利得スイッチレーザーを導 入する。その後は、位相補償とチャープパルスによる読 み出しを行うため、実験系としては同一である。図7 は、このような実験を行った結果得られたパルス波形の 一例を示したものであるが、図を見るとわかるように、 いつくかのパルス状の光が連続して放出されていること が見て取れる。これはレーザーキャビティの周波数に対 応するものと考えられるが、ゲインスイッチレーザーで



図6: ダブルパルスのパルス波形を開発した位相補償チャー プパルス分光法で計測した結果。タブルパルスの間隔は3ps とし、位相補償の有無によるスペクトル変化を示した。

はこのような光が発生するタイミングが異なるため、通 常の平均波形を計測する手法では、図7に示したように 包絡線のパルスが計測されるものと考えられる。このレ ーザーがこのような内部構造を持つということは、リア ルタイム計測によってはじめて明らかになったものであ り、リアルタイムテラへルツオシロスコープの重要性を 如実に示している。

なおこの時用いた光パルスのパルスエネルギーは、約 1 pJ であり、超短パルスレーザーに比べると非常に微弱 である。しかしながら、今回用いたアップコンバージョ ン分光法では、読み出し光の出力をかなり強くすること が可能であるために、測定が可能となっている。このこ とは、チャープパルス分光法が微弱な光パルスの分光に も適用可能であることを示している。例えば、テラヘル ツ波の計測にこのような技術を用いた場合、プローブ用 の光パルスは1 µJ 程度の強度を投入することが可能であ り、これとの比を考えると10<sup>-6</sup>程度の変化を調べること ができることに対応する。これはテラヘルツ電場計測に おける偏光回転量を考えると、1 mV/cm を切る領域であ り、チャープパルスを用いる方法がテラヘルツ波の計測 にも有効であることを示している。

最後に、シングルショット分光法として、チャープパ ルスではなく、反射型エシェロンと呼ばれる階段状の素 子を活用した結果について報告する。この手法では正確 な波形を得るためには、結像光学系を必要とするため、 ファイバー技術と組み合わせることは難しいが、チャー プパルスを利用する手法の際に問題となった波形歪みは 見られない。したがって、リアルタイムテラへルツ検出 の応用可能性を探索するためには適した手法であると言 える。そこで、本研究では、衝突イオン化透過時間

(IMPATT) ダイオード及び共鳴トンネルダイオード

(RTD)の出力テラヘルツ波形をリアルタイム検出する ことを試みた。

まずテラヘルツ波の検出感度を向上させるために、位 相オフセット差分検出法と呼ばれる高感度テラヘルツ検 出手法を採用した。この手法では、高感度にテラヘルツ 波を検出するために、クロスニコルに配置した二つの偏 光子を電気光学結晶の間に配置し、さらに四半波長板を 設置することにより、微小な偏光回転成分をコヒーレン トに検出できるようにする手法である。これによって、 反射型エシェロンを用いた手法でも、0.1 V/cm 程度の感



図7:利得スイッチレーザーからの出力の波形計測結果。多 数の超短パルスが連続して放出されている。点線はそのピー クを結んだ包絡線である。



図8:テラヘルツデバイスからの出力波形計測結果。上図の ような実験配置を用い、IMPATT及びRTDの出力波形を反射 型エシェロンを用いて計測した。

度を得ることに成功している。

図8はこのような実験の概略図とその結果を示したも のである。IMPATT、RTDいずれにおいても振動する電 場波形を計測することに成功した。また、点線で示した ように、テラヘルツ光源の出力と検出用のレーザーパル スは位相同期されていないため、特に IMPATT ダイオー ドの結果では、波形ごとに位相がずれていることがわか る。RTDの実験では周波数がより高周波であり、振幅も 小さいことからこの効果を確認することは難しいが、波 形検出が可能であることは、リアルタイム分光法の有効 性を明確に示していると言える。

#### 3. まとめ

以上の一連の実験から、リアルタイムにテラヘルツ波 形を検出する手法は、利得スイッチレーザーの光出力の 可視化や、テラヘルツデバイスの出力波形計測に極めて 有効であることが分かった。また、位相補償したチャー プパルス分光法は、微弱な光パルスであってもその超高 速波形を可視化できる有望な手法であり、かつ、テラヘ ルツ波形検出のための手法としても期待できることが明 らかとなった。今後は、これらのデバイス出力の可視化 によって、シングルショット分光法を用いることによっ て可能になる応用をさらに探索し、加えて簡便な装置を 構築することによって、テラヘルツ分光技術の応用範囲 を拡大する取り組みを進めていく。

#### 参考文献

- [1] R. Tamaki et al., Opt. Exp. 30, pp. 23622-23630 (2022).
- [2] M. Kobayashi et al., Jpn. J. Appl. Phys. 62 022001 (2023).
- [3] R. Tamaki et al., Opt. Exp. 31, pp. 40142-40150 (2023).

# 業績

### 【原著論文】

 R. Tamaki, M. Suzuki, S. Kusaba, J. Takeda, and I. Katayama, Ultrafast pump-probe spectroscopy via chirpedpulse up-conversion with dispersion compensation, *Opt. Exp.* 31(24), 40142-40150(2023)

## 【総説】

 1.片山郁文、玉置亮、浅井岳、瀧川雄一、レーザー加工 初期過程からのテラヘルツ放射、光アライアンス、
 2023 年 6 月号、33-38(2023)

## 【書籍】

なし

## 【口頭発表】

- 1.片山郁文、テラヘルツ・サブピコ秒の波形をゆがみな く計測、JST 新技術説明会、2023 年 6 月、オンライン
- 2.I. Katayama, K. Takahashi, T. Arikawa, R. Tamaki, J. Takeda, Singleshot Detection of Terahertz Waveforms Generated from an Impact Avalanche and Transit Time (IMPATT) Diode, 11th International Conference on Materials for Advanced Technology, June 2023, Singapore
- 3.R. Tamaki, J. Takeda, I. Katayama, Single-Shot Terahertz Waveform Detection by Chirped-Pulse Up-Conversion Spectroscopy with Dispersion Compensation, 48th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves, September 2023, Montreal, Canada
- 4.K. Takahashi, T. Arikawa, R. Tamaki, I. Katayama, Measuring terahertz electric-field waveforms of continuous wave terahertz sources using single-shot terahertz timedomain spectroscopy, 12th Asia-Pacific Laser Symposium, September 2023, Hakodate, Japan
- 5.K. Kumagai, R. Tamaki, G. Asai, Y. Takigawa, J. Takeda, I. Katayama, Terahertz radiation and resultant surface profile during femtosecond laser ablation process, 12th Asia-Pacific Laser Symposium, September 2023, Hakodate, Japan.
- 6.R. Tamaki, J. Takeda, and I. Katayama, High sensitivity single-shot terahertz waveform detection via chirped-pulse up-conversion spectroscopy with dispersion compensation, 第42回電子材料シンポジウム、2023年10月、奈良
- 7.R. Tamaki, K. Takahashi, T. Arikawa, I. Katayama, Singleshot terahertz waveform detection via reflective echelon mirror emitted from an IMPATT diode, 第 42 回電子材料シ ンポジウム、2023 年 10 月、奈良
- 8.I. Katayama and R. Tamaki(招待講演), Realtime Terahertz Waveform Detection Using Chirped Pulse Upconversion Spectroscopy, 5th Int. Workshop on Photonics

applied to Electromagnetic Measurement、2023 年 10 月、 札幌

9.玉置亮、眞榮城蒼、武田淳、片山郁文、分散補償チャ ープパルス和周波分光法における超短パルス幅依存 性、第71回応用物理学会春季学術講演会、2024年3 月、東京都市大学

# 【特許】

(1)国内特許出願 2件(2)国際特許出願 0件

# 非破壊画像検査用スマートシートの創出

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から、対象 を壊さずに検査する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。特に検査対象を二 次元に画像化する非破壊画像検査は、視覚的に分かりやすい形でより詳細な情報が得られることから注目 され、様々なシーンでの活用が期待されている。一方で、狭いスペースや危険な場所など人が立ち入るこ とが難しい環境でも運用できる柔軟な検査技術が求められている。本研究では、センサ材料の光学的・電 子的・機械的特長を活かした、形態可変撮像シート「スマートシート」を開発し、より簡便な検査を実現 し、社会の安全安心へ貢献することを目指す。

#### 1. 研究目的

近年、コンクリート構造物の寿命や産業製品に求めら れる品質の高度化などにより、非破壊検査市場が急速に拡 大している。特に検査対象を壊さずに画像化する非破壊画 像検査は、詳細な検査分析結果を提供できることから様々 な分野での活用が始まっている。一方で、狭所や難所など、 従来検査が難しかった状況でのモニタリングも必要とな ってきており、検査デバイスに求められる性能が高まって いる。

当研究室ではカーボンナノチューブ材料を用いた広 帯域光センサ[1-9]の開発を行っている(図1に2次元セン サアレイの作製例[4])。このセンサは、テラヘルツ・ミリ 波領域から赤外・可視光領域にまで至る広帯域において検 出感度を持ち、かつ材料の機械的強度と柔軟性により形状 を自在に変えられる(図2,3に画像化の例[5,6])。

本研究は、このセンサの非破壊検査への応用を目的と し、装置から運用までを包括的にフレキシブル化したス マートシートの創出を目指すものである。



図1:2次元センサアレイ[4]



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]





#### 2. 研究成果

以下に、具体的な研究成果について報告する。

(1) センサアレイ作製プロセスの開発

これまでに当研究室 で開発した濾過法やデ ィスペンサ式を用いた パターニングにより、セ ンサ作製を自動化して きた。これらの手法を用 いて、多数センサアレイ を作製し、画像化を達成 した。今回は以上に加え て、インフラ等の大型対 象物の検査も想定し、更な る大面積パターニングを





CNT膜型の 撮像画素アレイ

図 4 : スクリーン印刷により 作製されたセンサアレイ[7]



を用いた非破壊光画像化[7]

軟かつ自在なセンサアレイ設計が可能となった。

実際の画像化においては、検出信号を読み出し伝送す る回路も重要な要素技術である。アクティブ式による読み 出しセンサの切り替えや信号増幅を達成し、より鮮明な画 像化を達成した[8]。

また、小型の無線機とセンサを結合することで、光検 出信号の無線伝送を可能にした。これは今後の無人リモー ト検査につながる成果である。

(2) 電磁波・光解析技術の利用

カーボンナノチューブセンサのミリ波・テラヘルツ波 〜光領域の広範囲な電磁波検出の特性を用い、各波長帯で の物体の透過率の差異を利用することで、内部の物質識別 をしながら画像化する手法を開発した[9]。

また、光領域では考慮されてこなかった電磁波の干渉 がサブテラヘルツ・テラヘルツ領域では影響を与えること を考慮し、反射スペクトル測定における干渉除去手法や干 渉を積極的に利用した埋設物反射スペクトル測定並びに 画像化手法を開発した(特許出願済み)。

(3) 非破壊画像検査への応用

これまでに実施してきたセンサ性能向上や信号処理技術、解析技術を元に応用実証に取り組んだ。1つ目は、コ ンクリート内部の状態可視化に成功した。ここでは、分光 スペクトルの解析により、内部状態の推定を達成した。ま た、アレイ化されたカーボンナノチューブセンサとの組み 合わせにより、画像化測定の高速化を達成した。

2 つ目は、医薬品の識別であり、ベルトコンベア上で の検査を想定して、動きのある中での画像化を実現した。 以上から、静止画、動画双方の撮像が可能となった。

#### 3. 今後の展開

今後は、マルチスケールで対応可能な検査システムを 構築していく。扱う光や電波の状態を空間的に制御し、ア プリケーションに応じたシステム展開を実施する。そのた めに必要なセンサ、アンテナ、回路、分光画像解析の各技 術を開発し、用途に合わせて実装化する。

#### 【参考文献】

- D. Suzuki, S. Oda, Y. Kawano, *Nature Photonics* 10, 809 (2016).
- 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).
- D. Suzuki, K. Li, K. Ishibashi, Y. Kawano, Advanced Functional Materials 31, 2008931 (2021).
- K. Li, T. Araki, R. Utaki, Y. Tokumoto, M. Sun, S. Yasui, N. Kurihira, Y. Kasai, D. Suzuki, R. Marteijn, J.D. Toonder, T. Sekitani, Y. Kawano, *Science Advances* 8, eabm4349 (2022).
- K. Li, R. Yuasa, R. Utaki, M. Sun, Y. Tokumoto, D. Suzuki, and Y. Kawano, *Nature Communications* 12, 3009 (2021).
- K. Li, Y. Matsuzaki, S. Takahara, D. Sakai, Y. Aoshima, N. Takahashi, M. Yamamoto, and Y. Kawano, *Advanced Materials Interfaces* 10, 2300528 (2023).
- 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). *Selected for front cover*
- 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).



【論文】

- K. Li, Y. Mastuzaki, S. Takahara, D. Sakai, Y. Aoshima, N. Takahashi, M. Yamamoto, Y. Kawano, Advanced Materials Interfaces, 10, 35, 2300528 (2023)
- X. Deng, S. Oda, Y. Kawano, Optical Engineering, 62, 9, 097102 (2023)
- K. Li, Y. Kinoshita, D. Shikichi, M. Kubota, N. Takahashi, Q. Zhang, R. Koshimizu, R. Tadenuma, M. Yamamoto, L. Takai, Z. Zhou, I. Sato, Y. Kawano, Advanced Optical Materials 12, 14, 2302847 (2024)
- R. Kawabata, K. Li, T. Araki, M. Akiyama, K. Sugimachi, N. Matsuoka, N. Takahashi, D. Sakai, Y. Matsuzaki, R. Koshimizu, M. Yamamoto, L. Takai, R. Odawara, T. Abe, S. Izumi, N. Kurihira, T. Uemura, Y. Kawano, T. Sekitani, Advanced Materials, 36, 15, 2309864 (2024) Selected for front cover
- M. Nakatani, S. Fukamachi, P.S. Fernández, S. Honda, K. Kawahara, Y. Tsuji, Y. Sumiya, M. Kuroki, K. Li, Q. Liu, Y.C. Lin, A. Uchida, S. Oyama, H.G. Ji, K. Okada, K. Suenaga, Y. Kawano, K. Yoshizawa, A. Yasui, H. Ago, Nature Electronics, 7, 119 (2024)

#### 【総説】

 T. Araki, K. Li, D. Suzuki, T. Abe, R. Kawabata, T. Uemura, S. Izumi, S. Tsuruta, N. Terasaki, Y. Kawano, T. Sekitani, Advanced Materials 36, 2304048 (2024) *Selected for front cover*

#### 【口頭発表】

1. K. Li, N. Takahashi, Y. Togami, H. Li, M. Hamanaka, Y. Kawano

Compositional device design strategies of carbon nanotubes photo-thermoelectric imager sheets、第65回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポ ジウム、5/9/2023

2. 河野 行雄

シート状テラヘルツ・赤外撮像センサと非破壊マル チビュー画像検査応用,光設計研究グループ 第75 回研究会「インフラモニタリングのための光技術」, 5/10/2023

 太田 頼斗,中村 優花,李 恒,酒井 大揮,松崎 勇斗, 青嶋 祐斗,須山 孟,大川 拓樹,佐藤 いまり,河野 行雄
 多波長近赤外線コンピュータトモグラフィ像による
 多層立体・複合材料検査物の完全非破壊な構造復元 及び材料同定,第 39 回近赤外フォーラム年次大会, 15/11/2023,東京

#### 4. Y. Kawano

Flexible and Stretchable Terahertz/Infrared Imagers for Multi-View Visualization and Inspection, 33th International Symposium on Imaging, Sensing, and Optical Memory, 22/11/2023, Kagawa

D. Shikichi, R. Ota, K. Li, D. Sakai, Y. Matsuzaki, Y. Aoshima, T. Suyama, H. Okawa, S. Ikehata, I. Sato, Y. Kawano

Multi-wavelength computed tomography with carbon nanotubes broadband imagers, 23rd International Conference on the Science and Application of Nanotubes and Low-dimensional Materials, 6/2023, France

D. Shikichi, R. Ota, K. Li, D. Sakai, Y. Matsuzaki, Y. Aoshima, T. Suyama, H. Okawa, S. Ikehata, I. Sato, Y. Kawano

Carbon nanotubes photo-thermoelectric broadband imagers for multi-wavelength, and multi-layer computed tomography, 39th International Conference on Thermoelectrics, 7/2023, USA

 D. Shikichi, R. Ota, K. Li, D. Sakai, T. Suyama, H. Okawa, S. Ikehata, I. Sato, Y. Kawano Millimeter-wave–Infrared multi-wavelength computed tomography, 48th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 9/2023, Canada

#### 【特許】

 国内特許出願 1件 大川拓樹,河野行雄,田邉匡生,大橋隆宏 測定装置、測定方法及びプログラム, 特願 2024-031501

(2) 国際特許出願 0件