^{財國}中谷電子計測技術振興財団







Annual Report 2011

Nakatani Foundation of Electronic Measuring Technology Advancement

25 号

¹⁹⁷中谷電子計測技術振興財団

年

報

25 号

	目	次	
設立の趣意			 2
役員・評議員および事業	業の概要・・・・・		 3
平成 22 年度事業概要			 4
I 技術開発に対する助	カ成事業⋯⋯⋯		 4
Ⅱ 調査研究に対する助	カ成事業⋯⋯⋯		 5
Ⅲ 技術交流に関する支	€援事業・・・・・		 5
Ⅳ 電子計測技術に関す	る情報の収集及	び提供・・・・・・・	 5
V 中谷賞に対する表彰	彡事業⋯⋯⋯⋯		 5
平成 22 年度贈呈式			 7
平成 21 年度(第2回)	中谷賞研究成果	報告	 11
平成 20 年度(第 25 回))技術開発助成成	え果報告・・・・・・・	 21
平成 22 年度技術交流助	〕 成成果報告·····		 141
技術開発に対する助成	状況 · · · · · · · · ·		 148
調査研究に対する助成	状況⋯⋯⋯		 166
技術交流に対する助成	状況		 167

設立の趣意



中谷太郎初代理事長

わが国経済社会の高度化は、1970年代以降急速に進展しています。これは、わが国の唯 一の資源でもある恵まれた頭脳資源を、十分に活用することで達成されたものです。特に コンピュータを始めとするエレクトロニクス技術の発展が重要な役割を果たしてきました。

これらのエレクトロニクス技術の発展は、優れた電子計測技術の基盤の確立が無くして はありえません。今後わが国のエレクトロニクス技術の一層の発展を実現する上で、電子 計測技術基盤の一層の強化が大切であります。電子計測機器がエレクトロニクスのマザ ー・ツールであるといわれる所以でもあります。

政府におかれましても、その重要性を十分認識され、電子計測技術基盤の確立のためい ろいろな施策を展開されております。

このような客観的諸情勢から東亞医用電子株式会社(現シスメックス株式会社)の創立 者、故中谷太郎初代理事長は、電子計測技術の発展を推進し、産業基盤の確立に貢献する ことを強く念願され、昭和59年4月に財団法人「中谷電子計測技術振興財団」が設立され ました。

当財団は、技術開発・技術交流の推進、技術動向等の調査研究等を行うことにより、電子計測技術の基盤の確立に微力をつくす所存でございます。このような趣旨をご理解の上、 当財団にご指導、ご協力を賜りますようお願い申し上げます。

財団 中谷電子計測技術振興財団

設立年月日 昭和 59 年 4 月 24 日

役員

理	事 長			
菅	野	剛	史	浜松医科大学名誉教授
專	務理事			
家	次		恒	シスメックス株式会社代表取締役社長
理	事			
浅	野	茂	隆	早稲田大学理工学術院特任教授 東京大学名誉教授
輕	部	征	夫	東京工科大学学長 東京大学名誉教授
熊	谷	俊	·	医療法人社団神鋼会神鋼病院膠原病リウマチセンター長
中	谷		Æ	
和	歌	光	雄	
監	事			
秋	山	純	_ _	多摩大学名誉教授(公認会計士)
或	生		肇	國生肇弁護士事務所(弁護士)

評議員

Ш	越	裕	也	東大阪市立中央病院名誉院長
齋	藤	IE.	男	東京大学名誉教授
八	幡	義	人	川崎医科大学名誉教授
戸	川	達	男	早稲田大学人間総合研究センター客員研究員
渡	辺	清	明	NPO 法人東京臨床検査医学センター所長 慶應義塾大学名誉教授
佐	藤	俊	輔	藍野大学医療保健学部臨床工学科学科長・教授 大阪大学名誉教授
雪	本	賢		シスメックス株式会社取締役・専務執行役員
林		IE.	好	シスメックス株式会社取締役・専務執行役員

事業の概要

電子計測技術の発展を推進し、産業基盤の確立を図ることにより、わが国経済社会の発展および国民生活の 向上に資することを目的として、次の事業を行います。

- ■電子計測技術分野における技術開発に対する助成 電子計測技術分野における先導的技術開発活動を促進するため、これに助成します。
- ■電子計測技術分野における技術動向等の調査研究に対する助成

電子計測技術分野の実態および種々の問題についての調査研究に対して助成します。

■電子計測技術分野における技術交流に関する支援

電子計測技術分野における技術の交流を推進するため、内外の研究者等の交流に対して支援します。

- ■電子計測技術分野に関する情報の収集及び提供
- 電子計測技術に関する情報文献、資料等を収集整理し、その広汎な利用を図るための種々の活動を行います。 ■電子計測技術分野における技術開発に顕著な業績をあげた研究者の表彰

電子計測技術分野における技術開発の飛躍的な発展を期して、顕著な業績をあげた研究者の表彰を行います。

特定公益増進法人 当財団は平成23年2月に経済産業大臣より「特定公益増進法人」の認定を受けています。

平成22年度事業概要

我が国の経済は、リーマンショック以降やや回復基調にあるものの、依然厳しい状況にあり、先行き にも不透明感があります。また社会の構造的な問題として、少子化や高齢化、そして階層化の拡大など の課題も多く、閉そく感がただよっています。このような状況に対応していくためには、経済社会全体 の拡大と変革を同時に達成していくことが必要ですし、そのためにも、新たな先導的産業を創出する科 学技術の促進は、ますますその重要性が増してきております。中でも、各種産業の共通的基盤技術であ る電子計測技術の促進は大変重要であります。

このため、財団法人中谷電子計測技術振興財団は、創立以来、電子計測技術分野における先導的技術 開発、技術の交流等を促進するための助成事業、支援事業等を実施してきており、平成 22 年度におい ても次の諸事業を実施いたしました。

I. 技術開発に対する助成事業

電子計測技術は共通的基盤技術であって、先導的技術開発を促進することは極めて重要であります。 その電子計測技術に対する技術開発助成事業は、当財団の中核事業であり、本年度もこの事業に力点を 置いて実施しました。

1. 募 集

電子計測技術は極めて広汎な分野に亘りますが、健康で明るい人間社会を築くために重要な役割を果たすと考えられる技術開発分野として、理・工学と医学・生物学の境界領域にあり、学際的研究として 社会的ニーズが高まっております「生体に関する電子計測技術」を対象研究課題として、大学およびこれに準ずる研究機関に対して助成対象研究テーマの募集を行いました。また、前年度と同様、文書送付により募集案内を行ったほか、当財団のホームページに募集案内を掲載するなど、広範な方々へ募集内 容が周知されるよう努めました。

2. 審 査

財団法人中谷電子計測技術振興財団内に設置した審査委員会(鈴木良次委員長他7名で構成)の委員 により、各大学等から応募のあった44件(開発研究34件、奨励研究10件)の研究テーマに対して、 公正にして厳密なる審査を実施し、電子計測技術の先導的技術開発に寄与するものと考えられる11件 (開発研究7件、奨励研究4件)を選出いたしました。

3. 技術開発助成金の贈呈式

審査委員会において選出された研究テーマについて、次頁の11名の研究者に対して、平成23年2月 25日(金)世界貿易センタービル浜松町東京會舘において技術開発助成金(総額1,800万円)の贈呈式 を行うとともに、各研究者による研究計画内容の発表を実施いたしました。

Ⅱ. 調査研究に対する助成事業

生体に関する電子計測技術分野には様々な課題が存在しており、その調査研究を実施して得た成果を 広く社会で活用するための助成事業は重要な意義を有しております。下記の研究は平成20年度からの 継続調査研究であり、平成23年度の助成金を授与しました。

氏 名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
野口 眞三郎	大阪大学大学院医学系研究科 乳腺内分泌外科 教授	OSNA 法による乳癌センチネルリンパ節転移診断の臨床的意義に関する調査研究	平成 20~23 年度

Ⅲ. 技術交流に関する支援事業

近年におけるナノテクノロジーやバイオテクノロジーなどの発展に伴って、技術開発研究を行う場合 に関係する学術領域は益々複雑多様化しつつあり、内外における研究者の技術交流を推進する重要性が 増してきております。平成22年度は、技術交流に関して以下の事業について助成を行いました。

招聘

氏 名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
土井 健純	東京大学大学院	Niilo Saranummi Ph.D	第 50 回日本	東京大学	平成23年
	情報理工学系研究科	Oivind Lorentsen M.Sc	生体医工学		4月~5月
	教授	Robert M.Nerem Ph.D	会大会		

Ⅳ. 電子計測技術に関する情報の収集及び提供

生体に関する電子計測技術関連の情報について広汎な利用をはかるため、当財団の研究助成事業およ び技術交流事業による成果等、財団の事業活動を取りまとめて年報を作成し、広く関係機関に提供しま した。

V. 表彰事業

生体に関する電子計測技術分野における技術開発の飛躍的な発展を期し、顕著な業績をあげた研究者 の功績を讃えることを目的とした中谷賞は、公募のうえ推薦頂いた中から厳正に審査を行って、表彰候 補者を決定し、贈呈式にて第3回中谷賞を授与いたしました。

氏 名	所属機関・職名	研究題目	賞金(万円)
足立 善昭	金沢工業大学 先端電子技術応用研究所 准教授	生体磁場計測と空間フィルタ法による 非侵襲脊髄機能イメージングの開発	300

開発研究助成

単位:万円

氏(名	所 属 機 関・職	研究題目	助成金額
士田 *	+¥-→	豊橋技術科学大学大学院工学研究科	神経組織からの情報伝達分子の放出分布を	200
□□↑	叶丁	環境・生命工学系 講師	観測する近接光励起デバイスの開発	200
		十阪十学十学院博想到学研究到	極めて深い被写界深度を有する高機能照明	
香川景-	一郎	八败八子八子元 開報件子 明九件	内臓型3次元マルチスペクトル内視鏡の開	$2 \ 0 \ 0$
		· 捐報数理子导攻 · 衍性/框数按	発	
文十 点		慶應義塾大学理工学部	金ナノロッドの回転運動観察を利用した高	200
~~~~~~	戦宿	電子工学科教授	速・高感度ホモジニアスアッセイ法の開発	200
百场 5	之生	東京大学先端科学技術研究センター	培養神経回路に嗅覚受容体たんぱく質を遺	200
同情!	公和	生命・知能システム分野 講師	伝子発現させた匂いセンサー	200
	的上		変換濃縮ストリッピング法を利用した単一	200
女川1	省之	化学分析学分野 准教授	細胞の活性評価システムの構築	
内山	图印	名古屋大学大学院工学研究科	超高感度マイクロ磁気センサによる細胞活	
Р <b>Э</b> ТТІ	μIJ	電子情報システム専攻 准教授	動電流シグナルのリアルタイムマッピング	200
रन्द्र द	宏之	山形大学大学院理工学研究科	電気化学イメージング技術を応用した超高	200
		バイオ化学工学専攻教授	感度細胞呼吸機能診断装置の開発	

### 奨励研究助成

単位:万円

氏	名	所 属 機 関・職	研究題目	助成金額
吉川	元起	独立行政法人物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究 拠点 ICYS-MANA 研究員	超高感度自己検知膜型表面応力センサーに よる広帯域細胞ナノ振動解析手法の開発	100
小山	大介	東京工業大学 精密工学研究所 極微デバイス部門 助教	超音波 DDS 用センサ型マイクロカプセルの 開発とその血管内トレーサビリティ	100
曽和	義幸	法政大学生命科学部 生命機能学科 專任講師	細胞内高速三次元分子追跡顕微鏡の構築	100
石井	克典	大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 助教	近赤外分光イメージングによる動脈硬化プ ラークの血管内透視診断技術の開発	100

技術開発研究助成金総額 1,800万円

### 平成 22 年度贈呈式



ご挨拶をする菅野理事長



審査経過を報告する鈴木審査委員長



贈呈書の授与



研究の発表











上段左から、阿部、吉川、内山、香川、高橋、斎木、石井、曽和 下段左から、小山、鈴木、足立、菅野、家次、吉田、安川

### 記念懇親会



ご挨拶をする家次専務理事



ご祝辞をのべられるたに末永情報通信機器課課長補佐



乾杯の音頭をとられる川越評議員長

















## 平成21年度(第2回) 中谷賞研究成果報告

### コヒーレントラマン散乱顕微鏡による生体分子の無染色な高解像度・高速観測

大阪大学 大学院基礎工学研究科 機能創成専攻 生体工学領域 准教授 橋本 守



### 1. はじめに

光学顕微鏡は生きたままの細胞等を、比較的高 分解能で観測されることから、生物・医学分野で 広く用いられている。一般的に、葉緑体などを除 き組織・細胞はほとんど無色透明である。したが って、細胞内の生体分子を分別観測するために染 色を行わなければならない。2008 度のノーベル 化学賞は「GFP (Green Fluorescent Protein)の発 見とその応用」に対し贈られた。GFPは、今では 生物・医学研究に広く利用され、生きた細胞の特 定のたんぱく質を光らせることができるため、細 胞機能解明に大きな効果を発揮している。しかし ながら、GFP による観測も染色方法の一種であり、 発現した GFP によってタンパク自身の活性が低 下しないか常に検証する必要がある。また、遺伝 子導入過程が含まれるため、実際の人間へと適応 することや再生医療への適用も安全面に問題が ある。したがって、なんら前処理なく生体組織・ 細胞を、分子レベルで識別し観測することが可能 な手法の開発が望まれている。

分子は質点である原子が、化学結合というばね によって結び付けられたものであり、振動する。 ラマン散乱分光は、この全ての分子が持つ分子振 動を観測することで、分子種の同定や、分子の置 かれた環境、分子の構造変化に関する情報を得る 分光手法である。したがって、ラマン散乱分光を 顕微鏡下で行うラマン散乱顕微鏡は、無染色に分 子種のマッピングや分子の構造変化を観測する ことが可能な手法であり、これを生物・医学研究 に用いることができれば、画期的な手法となる。 しかしながら、自発ラマン散乱の強度は非常に弱 い。このため、自発ラマン散乱では観測時間が膨 大なものとなってしまい、とてもリアルタイムで 観測することはできなかった。

高強度なラマン信号を得られる分光手法とし て、 CARS (Coherent anti-Stokes Raman scattering)分光が挙げられる。CARS は、4 つ の光子が関与する非線形なラマン散乱現象であ り、1965年に P. D. Maker and R. W. Terhune によってはじめて報告された¹⁾。図1に CARS 過 程を示すが、角振動数  $\omega_1, \omega_2$  ( $\omega_1 > \omega_2$ )の2色の レーザー光を入射した際に、それらの周波数差が、 ラマン活性な分子振動の周波数と一致したとき、 角振動数  $2\omega_1 - \omega_2$ の光が放射される現象である。ま た、コヒーレントな放射であるため、指向性が高 くその光強度が自発ラマン散乱に比べ非常に大 きいことが知られている。

CARS 分光の顕微鏡への適用は、1982 年に Duncan らによって行われた²⁾。彼らは、位相整 合条件(コヒーレントな非線形光学現象を効率よ く起こす条件)を満たすために、入射レーザー光 を強く絞らずに観測領域全体に照射し、発生する CARS 光の検出を顕微鏡下で観測していた。この ため、非線形光学効果による空間分解能向上は達 成されていなかった。



図1 CARS のエネルギーダイアグラム

## CARS 顕微鏡の提案と観測ラマンシフト領域の拡大

Duncan らとは異なり、現在広く用いられて いる CARS 顕微鏡では、励起レーザー光を同軸に 重ね合わせて強く絞り込む光学配置を用いる。著 者^{3,4} と Zumbusch⁵⁾ らは独立に、この励起レ ーザー光を同軸に重ね合わせ強く絞り込む光学 配置を用いた顕微鏡を開発した。この手法では、 非線形光学効果による空間分解能、特に光軸方向 の分解能が高まり、また強く集光することで発光 領域が小さくなることから位相整合条件が緩和 される⁶⁾。また、Zumbuschらの観測結果は、3000 cm⁻¹ 付近の高波数ラマンシフト領域に限られて いた。3000 cm⁻¹ 付近の高波数ラマンシフト領域 の分子振動には CH、 OH、 NH 等の伸縮振動が 現れるが、それほど分子に対する定性能は高くな い。むしろ、分子振動は、指紋領域と呼ばれる 500 ~1800 cm⁻¹の領域でその分子構造を反映したス ペクトルを示す。そこで我々は、指紋領域での CARS イメージングを行った⁷⁾。しかしながら、 これらのシステムでは光源に再生増幅器を用い ていたため、レーザーの強度揺らぎが大きく、ま た繰り返し周波数が低いためイメージングには 適していなかった。

### 3. CARS 顕微鏡用レーザーの高精度制御

CARS スペクトルから物質を分別するためには、 少なくとも 2 波長のレーザー( $\omega_1$ および  $\omega_2$ 光) が必要となり、それらの周波数差すなわち波長差 も走査する必要がある。CARS は非線形な光学過 程であり、発生する CARS 分極 *P*_{CARS}は

 $P_{CARS} = \chi^{(3)} : E_{\omega}^{2} E_{\omega}^{*}$ (1)で与えられる。ここで、χ⁽³⁾は三次の非線形感受 率、 E_ω, E_ω は ω1 および ω2 光の電場、*は複素共 役を現す。したがって、CW 光を用いるよりも、 ピークパワーが著しく大きい超短パルスレーザ ーを用いると効率よく CARS 光を発生させるこ とが可能となり、また平均パワーは小さいため試 料に対する光ダメージを小さくすることができ る。しかしながら、パルス時間幅をいたずらに短 くすることはできない。典型的なフェムト秒レー ザーの時間幅は 100 fs 前後であるが、例えばチ タンサファイアフェムト秒レーザーのスペクト ル幅は不確定性原理(フーリエ変換限界とも呼ば れる) により 10 nm ほど広がっている。これを 波数で表すと約150 cm⁻¹となるが、一般的なラマ ンバンドは数 cm⁻¹ から十数 cm⁻¹ 程度であるた め、フェムト秒レーザーのスペクトル幅はラマン バンドの 10 倍以上広く、個々のラマンバンドを 分別することが難しくなる。 これらをまとめる と、CARS 顕微鏡の光源として必要とされる項目 として、

- 安定した光強度
- 高い繰り返し周波数(イメージを観測するために高い繰返し周波数が必要)

- ▶ 2波長のレーザー
- ▶ 波長可変レーザー
- 狭いスペクトル幅(一般的なラマンバンドは、 数 cm⁻¹から十数 cm⁻¹であるため、数 cm⁻¹程 度以下 (0.2 nm @ 800 nm) が要求される)
- ▶ 短いパルス時間幅(試料へのダメージを抑え るために、平均パワー下げながら、かつ非線 形現象である CARS 光強度を高めるために、 短いパルス時間幅が必要。ただし、不確定性 原理よりパルス幅とスペクトル幅を同時に は小さくできないため、数 ps のパルス幅が 最適となる。

が要求される。そこで、我々は2台のピコ秒チタ ンサファイアレーザーを同期動作させたシステ ムを開発した。

### 3.1 高精度同期システム

CARS は 2 色のレーザー光を同時に試料に照射 する必要があるため、2 台の別々のレーザーを用 いた場合、同期を取る必要がある。入射レーザー 光を時間幅  $\Gamma$ のガウス形、2 レーザー間の時間差 を  $\tau$  とし、 $\tau$ が揺らぐことによって雑音が生じる と仮定すると、観測される CARS 光の SN 比は

$$SNR = \frac{3\Gamma - 8\ln 2 \operatorname{E}[\tau^2]}{8\ln 2\sqrt{V[\tau^2]}}$$
(2)

で表される。ここで、 $E[\cdot]$ は期待値、 $V[\cdot]$ は分 散を表す。 $\tau$ の揺らぎが白色ガウス雑音であると 仮定すると、CARS 光の SN 比とパルス幅/ジッタ ー比との関係は、図2に示したような関係となる。 パルス幅を 5 ps と仮定すると、1 ps 程度のジッ ターがあるとき、すなわちジッター・パルス幅比 が 0.2 の時、SN 比は 30 程度となる。また、SN 比 1000 を得るためには、ジッター・パルス幅比 を 0.02 以下にする必要があり、パルス幅を 5ps の場合ジッターを 100fs 以下に抑えなければなら ないことが分かる 8。

そこで、バランス相互相関と2光子検出器を用 いたジッター観測手法を開発し高精度な同期レ ーザーシステムを実現した⁹。レーザーの同期シ



図 2 ジッター・パルス幅比と SN 比との関係

ステムは、一種の PLL (phase lock loop) 制御に より実現される。PLL はクロックの生成に良く用 いられ、マスター発振器からの信号と、スレーブ 発振器からの信号の時間差を検出し、このずれを 小さくするようにスレーブ発振器の発振周波数 を変更し、両者の同期を取るものである。

図3に同期システムの構成図を示す。モードロ ックレーザーのパルス間隔 *T*は、レーザーのキャ ビティ長 *L*で決まり、

$$T = 2L/c \tag{3}$$

で与えられる。ここで、c は光速である。したが って、レーザーのエンドミラー取り付けられた PZT (Piezo Transducer)によりレーザーのキャ ビティ長 L を変化させ、パルス間隔 (パルス周 期) を制御することができる。このレーザーを スレーブレーザーとし、他方のマスターレーザー との時間差が0になるように発振周期を制御する。 この際、両者の時間差 (ジッター)を高精度・高 感度に取得する必要がある。

高速なフォトダイオードを用い、2 レーザー間 の時間差を電気的に計測し、この信号をレーザー 共振器長にフィードバックすることで、約1-2 ピ コ秒程度までジッターを低減することが可能で ある。これに加え、図3中に示した、バランス相 互相関器によって、フェムト秒オーダーのジッタ ーを観測して、高精度な同期を実現した。バラン ス相互相関器は、ダイクロイックミラーと高反射 ミラー、2 光子検出器から構成された 2 台の相互 相関器から構成される。ダイクロイックミラーと 高反射ミラー間のギャップによって、2 ビーム間 には遅延が与えられるが、2 台の相互相関器では、 遅延の与え方が逆転している。このため、2 台の 相互相関器の差出力は両レーザーのジッターを 出力し、ピコ秒レーザーを用いてもフェムト秒オ ーダーの感度を持つ。

図4(a)にバランス相互相関器によって計測した、 2 レーザー間のジッター信号を示す。高速検出器 を用いた電気信号による同期(約10秒まで)で はジッターは約1psであったが、バランス相互相



図 3 高精度同期レーザーシステム

### 3.2 パルス幅制御システム

CARS スペクトルを得るためには、少なくとも 一方のレーザー光の波長を走査できなければな らない。しかしながら、我々が使用している ps チタンサファイアレーザーでは、波長走査を行う と、レーザーのパルス幅が変化してしまう。そこ で、レーザーの波長走査時にレーザー光のパルス 幅を常に最適化する必要がある。我々は、2光子 検出器を用いて、高速にパルス幅を検出しパルス 幅を常に最適化するシステムの構築を行った¹⁰。

#### 3.3 波長走査と同期・パルス幅制御

図5は、レーザー波長を変化させたときの同期 制御やパルス幅制御の様子を示したものである。 パルス幅情報を現す2光子検出器の出力(上、パ ルス幅に反比例)と、2レーザーの波数(波長) 関器を用いた場合(約10秒から)では、最短8fs(帯 域150Hz)までジッターを減少させることができ た。また、電子回路によるジッター検出の場合に 得られたイメージ(b)と、バランス相互相関器によ る場合の結果を(c)を示すが、レーザーを横方向に 走査するラスター走査による像のため、ジッター が多い場合には横方向に縞状の模様が現れてい るが、ジッターの低減によりそれらが取り除かれ ていることが分かる。



図42レーザー間のジッター

差(下)を示す。レーザー波長の 300ms で、波 長走査、同期制御・レーザーパルス幅の最適化が 終了し、高速に波長走査可能なレーザーシステム を構築することができた。



図5 波長走査時の2光子検出器の出力(上, パルスの時間幅に逆比例)と2レーザーの周波 数(波数)差(下)

### 4. 多焦点リアルタイム CARS 顕微鏡の開発

CARS 顕微鏡では、通常ガルバノミラーによっ てレーザービームを走査し、試料上各点から発生 する CARS 光を光電子増倍管で検出する単焦点 励起法が用いられる。また、より高速な CARS イ メージングを行うため、ポリゴンミラーを用いた 高速レーザービーム走査システムも開発されて いる。一般に、画像 1 点で得られる CARS 信号光 強度は以下の式で表される。

$$I_{CARS} = N \int_{0}^{\tau_{ex}} dt \left\{ \chi^{(3)} \right\}^{2} I_{1} I_{2}$$
 (4)

ここで、tex は露光時間、X⁽³⁾は 3 次の非線形感受 率、A は ω1 光の光強度、A は ω2 光の光強度、N は焦点数である。一般的なガルバノミラー等を用 いた単焦点励起法では、1 ビーム(単焦点)を走 査することでイメージングするため、高速なイメ ージングを実現するためには、必然的に露光時間 texを短くする必要がある。このため、十分な信号 を得るためには励起光強度を強くしなければな らない。しかし、超短パルスレーザーを用いた非 線形光学顕微鏡では、1 焦点あたりの励起光強度 には試料への光ダメージによる上限がある¹¹⁾。

1 焦点あたりの励起光強度を増加させず高速な イメージングを実現するために、我々は励起光の 空間的並列化(多焦点励起法)を行った。多焦点 励起法の場合、レーザービーム走査を並列化する ことによって1 焦点あたりの露光時間を焦点数に 比例して増やすことができる。これにより、1 焦 点あたりの励起光強度をダメージ閾値内に抑え 高速イメージングが可能となる。例えば、試料上 で 100 焦点形成した場合、露光時間も 100 倍に増 やすことができる。



図 6 マイクロレンズアレイを用いた CARS 顕微鏡システム

そこで我々は、マイクロレンズアレイを用いて レーザーの多焦点化を行った¹²⁾。図6にマイクロ レンズアレイを用いた CARS 顕微鏡システムの 全体図を示す。マイクロレンズアレイは、微小な 多数のレンズが一枚のガラス円盤上に配置され たもので、これに比較的大きな断面積の光ビーム を通すと、複数のスポットが形成される。各スポ ットから放射される CARS 光を、対向配置した対 物レンズで2次元カメラ上に結像する。マイクロ レンズアレイを高速に回転させることで、スポッ トが移動し一度に CARS イメージを取得するこ とが可能となる。

図7に3次元再構築した HeLa 細胞を示す。1 画像 0.2 秒の露光時間で観測し、トータル 85 枚 のイメージから再構成を行った(全イメージの取 得に約17秒)。観測は、2840 cm⁻¹ で行い主に脂 質の CH₂ 伸縮振動が画像化されている。脂質を 多く含む細胞内小器官が映像化されており、なん ら前処理なく短時間露光で可視化できた。



図 7 1 画像 0.2 秒で観測した 85 枚の CARS 画像(a) から 3 次元再構成した HeLa 細胞(b)観測は 2840 cm⁻¹の CH₂伸縮振動

## CARS 顕微鏡の多焦点化による細胞観測への影響

同じ CARS 信号を得る場合、多焦点化により1 焦点あたりの光強度を単焦点の場合より小さく することが可能となるが、総照射レーザー光強度 は逆に、多焦点の方が単焦点より大きくなる。そ こで、実験的に多焦点と単焦点励起の場合に生細 胞観測へどのような影響があるか調べた。

DAPI は、核染色色素であるが、生細胞では細 胞膜の透過性が悪くまた排出機構のために染色 されにくいが、死細胞では容易に核が染色される。 そこで、DAPI 色素の2光子蛍光イメージから光 ダメージを評価した。図8に細胞核の2光子蛍光 強度の時間変化を示す。入射レーザー光のパワー は、同一 CARS 信号を与える条件とした。なお、 単焦点励起と多焦点励起で同じ信号となるよう に、2 光子蛍光信号を1スポット当たりの光パワ ーの自乗と焦点数で除算したものを Stoxicity と定 義した。レーザー照射を行うことで、Stoxicity が強 くなっていることがわかる。特に、単焦点レーザ ー走査法で照射した場合に強い蛍光が得られ、レ ーザー照射 12 分以後に多焦点レーザー照射法に おける 2 光子蛍光強度と有意な差が見られた(P < 0.05)。レーザー照射を行うことで細胞膜状態の変 化または HeLa 細胞の DAPI 色素の排出機構が阻 害されたことを表わしており、単焦点レーザー走 査法の方が強いフォトダメージを与えているこ とが示された。



図 8 単焦点 (single) と多焦点 (multi)が生細胞へ与える光ダメージ。 縦軸は, DAPI の 2 光子蛍光から算出した生細胞の光ダメージ

### 6. 生細胞のリアルタイム CARS 観察

図7に示すように、高速に細胞の持つ脂質を可 視化できることが分かった。そこで、我々はレー ザーアブレーションにより遠隔的に生細胞を刺 激し、その反応の観測を行った。観測ラマンシフ トは、2840 cm⁻¹で、脂質のCH₂伸縮振動に合わ せた。図9は、細胞内の小器官にレーザー光を集 光して破壊した前後のイメージである。図を見て 分かるように、レーザー光照射によって、細胞内 の小器官が破壊され2つに分断されていることが 分かる。



図 9 レーザーアブレーションによる細胞内微小器官の破壊。(a) レーザー照射前, (b)レーザー照射後。観測は 2840 cm⁻¹ の CH₂ 伸縮振動

また、図 10 に、レーザーアブレーションによ る生細胞の細胞膜破壊とその修復の様子をリア ルタイムに観測した例を示す¹³⁾。これも、2840 cm⁻¹の CH₂伸縮振動の発光強度を表すが、レー ザー照射によって信号強度が上昇することが示 された。これは、細胞外にある Ca²⁺が細胞内に流 入することを防ぐための防御反応である resealing が起こった結果だと考えている。Ca²⁺ は細胞にとって有害であるので、細胞膜が破壊さ れると、その進入を阻止しなければならない。こ のため、破壊箇所に小胞が集まり、小胞同士が融 合することにより穴を塞ぐ反応が起きると考え られている¹⁴⁾。CH₂伸縮振動の CARS 信号の上 昇は、この小胞の集合による脂質濃度の上昇によ るものであると考えている。このような研究はこ れまで、細胞外に脂質と結合すると発色する蛍光 色素を用いて研究が行われていた。しかしながら、 この手法では、Ca²⁺と共に細胞内に流入した蛍光 色素によって可視化されるため、色素流入されて いない箇所での小胞の動態についてはなんら情 報を与えることができなかった。開発したリアル タイム CARS 顕微鏡でアブレーション前から脂 質(小胞)の観測を行えるようになった。



図 10 細胞膜のレーザーアブレーション前(a)後 (b)の HeLa 細胞 の CARS イメージ。観測は 2840 cm⁻¹の CH,伸縮振動を観測

7. 近接場効果を用いた高空間分解能 CARS 顕 微鏡

光学顕微鏡は、回折限界により波長程度の空間 分解能しか得られないとされてきたが、近年の近 接場光学により、より高分解能なイメージングが 可能であることが、示されるようになってきた。 そこで、まず金属ナノ微粒子による CARS の増強 効果があるかどうか検証を行い¹⁵⁾、CARS を近接 場光学に適用した近接場 CARS 顕微鏡の開発・ 観測を行った¹⁶⁾。図 11 に近接場 CARS 顕微鏡で の観測結果を示すが、15 nm という、使用レーザ 一光の波長に比べて 50 分の 1 以下という、非常 に高空間分解能なイメージを得ることができた。 また、この分解能は、線形な光学効果である自発 ラマンよりも高く、非線形光学効果によることが 示された。



図 11 近接場 CARS 顕微鏡による DNA ネットワークのイメージ(a)と矢印部での強度(b)。レーザー 光の周波数差(1337 cm⁻¹)は、アデニンの分子振動に合わせている。

### まとめ

我々は、同軸光学配置を用いた CARS 顕微鏡を 提案し、その観測波数領域の拡大、CARS 顕微鏡 の3次元光学特性の理論的導出、CARS 顕微鏡用 光源の開発、マイクロレンズアレイを用いた多焦 点 CARS 顕微鏡の開発、レーザーアブレーション による細胞膜破壊とその修復過程観測への応用、 近接場顕微鏡との組み合わせによる超解像イメ ージング等を行ってきた。CARS 顕微鏡では、脂 質分子の細胞内での動態等についての観測例が 多数報告されており^{17,18)}、また誘導ラマン散乱を 用いた新しい手法等も報告されている¹⁹⁾。レーザ ーアブレーションと組合せることで、細胞内部の 特定の箇所だけにアクセスしながらの無染色な 高速観測により、様々な観測への応用が期待でき るだろう。

細胞・組織観測への CARS 顕微鏡のアプリケ ーションとして報告されている研究は、現在のと ころ 2800-3000cm⁻¹の高波数領域に現れる CH 伸縮振動がほとんどである。これは、CH 伸縮振 動は強い CARS (ラマン散乱)信号が得られ、非 共鳴バックグラウンドと呼ばれる、分子振動とは 無関係な背景信号の影響を受けにくいためであ る。しかしながら、指紋領域と一般に呼ばれる 500 – 1800 cm⁻¹付近に表れる分子振動を用いると、よ り詳細に分子種を見分けることが可能となる。誘 導ラマン散乱顕微鏡など、高 SN 比で指紋領域を 観測可能な手法が開発されており、今後さまざま な分野へと応用されるものと確信している。

### 謝辞

本研究に対して、その初期段階から「中谷電子 計測技術財団第16回研究助成"コヒーレントア ンチストークスラマン散乱による生体組織の3 次元局所空間分子分光分析"」としてご支援いただ き、今回また中谷賞を授けられました。身に余る 光栄と共に感謝申し上げます。

### 参考文献

- P. D. Maker and R. W. Terhune, "Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength", *Phys. Rev.* 137, A801 (1965)
- M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, "Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope", *Opt. Lett.* 7, 350 (1982).
- 橋本 守, 荒木 勉,"コヒーレントアンチスト ークスラマン散乱顕微鏡の基礎特性", 第 59 回応用物理学会学術講演会 講演予稿集, no. 3, p. 876 (1998).
- M. Hashimoto and T. Araki, "Coherent anti-Stokes Raman scattering microscope", *Proc. of SPIE*, 3749, 496-497 (1999).
- A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, "Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering", *Phy. Rev. Lett.* 82, 4142 (1999).
- M. Hashimoto and T. Araki, "Three dimensional coherent and optical transfer functions of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy", J. Opt. Soc. Am. A, 18, 771 (2001).
- M. Hashimoto, T. Araki, and S. Kawata, "Molecular vibration imaging in the fingerprint region by CARS microscopy with collinear configuration", *Opt. Lett.*, 25, 1768 (2000).
- M. Hashimoto, T. Minamikawa, T. Araki, K. Fujita, and S. Kawata, "Multi-focus CARS microscopy using microlens array scanner for realtime molecular spectral imaging", *Proc. SPIE*, **7183**, 71830R (2009).
- T. Minamikawa, N. Tanimoto, M. Hashimoto, T. Araki, M. Kobayashi, K. Fujita, and S. Kawata, "Jitter reduction of two synchronized picosecond mode-locked

lasers using balanced cross-correlator with two-photon detectors", *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 191101 (2006)

- M. Hashimoto, T. Asada, T. Araki, Y. Inouye, and S. Kawata, "Automatic pulse duration control of picosecond laser using two photon absorption detector", *Jpn J. Appl. Phys.*, 44, 3958-3961, (2005).
- 11. K. König, T. W. Becker, P. Fischer, I. Riemann, and K.-J. Halbhuber, "Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes", *Opt. Lett.*, **24**, 113 (1999).
- T. Minamikawa, M. Hashimoto, K. Fujita, S. Kawata, and T. Araki, "Multi-focus excitation coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy and its applications for real-time imaging", *Opt. Express*, 17, 9526 (2009).
- T. Minamikawa, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto, "Real-time imaging of laser-induced membrane disruption of a living cell observed with multi-focus CARS microscopy", J. Biomed. Opt., 16, 021111 (2011).
- P. L. McNeil and T. Kirchhausen, "An emergency response team for membrane repair", *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 499 (2005).
- T. Ichimura, N. Hayazawa, M. Hashimoto, Y. Inouye, and S. Kawata, "Local enhancement of coherent anti-Stokes Raman scattering by isolated gold nanoparticles", *J. Raman Spectrosc.*, 34, 651 (2003).
- T. Ichimura, N. Hayazawa, M. Hashimoto, Y. Inouye, and S. Kawata, "Tip-enhanced coherent anti-Stokes Raman scattering for vibrational nano-imaging", *Phys. Rev. Lett.*, 92, 220801 (2004).

- 17. X. Nan, E. O. Potma, X. S. Xie, "Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy", *Biophys. J.*, **91**: 728 (2006).
- 18. X. Nan, J. X. Cheng, X. S. Xie, "Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti- Stokes Raman scattering microscopy", J. Lipid Res., 44, 2202 (2003).
- C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. G. Kang, X. S. Xie, "Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy", *Science*, **322**, 1857 (2008).

# 平成20年度(第25回) 技術開発助成成果報告

1.	DNA修復反応の1分子観察系の構築	
	(群馬大学 桂進司)	22
2.	細胞内活性評価のための酵素固定化ナノセンサ電極の開発	
	(熊本大学 冨永昌人)	35
3.	細胞への物質注入と電位測定のためのマイクロピペット電極の作製と応用	
	(九州大学 角田直人)	43
4.	マルチ時間スケールな自律神経調整機能から観た一人称視点映像効果の評価	
	(新潟大学 木竜徹)	51
5.	石英系ガラス平面光波回路を用いた生体計測用反射型屈折率センサの開発	
	(香川大学 丸浩一)	60
6.	分子インプリント高分子を用いた血糖値監視用グルコースセンサ	
	(芝浦工業大学 吉見靖男)	78
7.	流体シミュレーションとドップラーエコーからの肝循環圧測定法の開発	
	(兵庫医科大学 飯室勇二)	87
8.	ヘテロコア光ファイバによる脈拍や呼吸の無拘束・無意識生体計測	
	(創価大学 西山道子)	95
9.	誘電泳動を用いたマイクロロッド回転による腫瘍マーカー検出用小型デバイスの開発	
	(東北大学 伊野浩介)	102
10.	低温除細動における点電極通電刺激誘発興奮伝播現象の解析	
	(産業技術総合研究所 荒船龍彦)	110
11.	水晶振動子によるヒドロキシアパタイト粒子の環境応答型生体分子認識機構の解析	
	(山口大学 吉本則子)	120
12.	加速度センサを用いた騒音に頑健な骨伝導ー音声マイクロフォンの開発	
	(香川高等専門学校 中山仁史)	130
13.	蛍光蛋白標識による骨髄由来幹細胞の発癌および癌幹細胞ニッチ形成への関与の同定	
	(大阪大学 富丸慶人)	136

注1 顔写真は研究責任者です。

注2 本成果報告は平成20年度の助成金の贈呈に基づき、平成21年度に実施され、平成22年9月までに執筆された研究成果です。

DNA修復反応の1分子観察系の構築



研究責任者 群馬大学大学院工学研究科環境プロセス工学専攻 教授 桂 進司 共同研究者 群馬大学大学院工学研究科環境プロセス工学専攻 准教授 大重真彦

### 1. はじめに

従来の分子生物学的・生化学的解析では、1反 応中に数万分子以上の DNA やタンパク質分子を用 いて解析を行っている多分子解析が主流である。 この多分子解析による解析は、数万以上の分子の 平均的な挙動の結果を得ることになる。そのため、 多分子解析では1つの分子本来が持つ性質を解 析することは困難である。一方、1分子を対象と した微小操作・解析技術では、従来の多分子解析 では隠れてしまう分子個々の挙動やその分布の 解析や、DNA1分子毎の形態制御をおこなうこ とによりDNA分子の形態の影響の解析が可能 になると考えられる。このような特徴を持つ1分 子での操作・解析技術により得られた結果と従来 の分子生物学・生化学的解析法により得られた結 果とを組み合わせることにより、目的分子の本質 に迫った解析が行えると考える。

本研究では以上のような特徴を持つ1分子解 析技術をDNA修復反応に応用することを目指 して研究を進めてきた。DNA 修復反応の研究の歴 史は長く、DNA-タンパク質、タンパク質-タンパ ク質等の分子間相互作用について多くの結果が

示されている。特に DNA 修復遺伝子の変異・欠損 が 原 因 と な る 色 素 性 乾 皮 症 (Xeroderma Pigmentosum:以下 XP と略)は、遺伝学的研究 材料としての優位性を持ち、この利点を生かし、 生化学的・分子生物学的研究が盛んに行われてい る。その結果、XP 関連タンパク質群が相互作用 をしながら損傷 DNA の修復に関与するモデルが 提唱された(図1)。このモデルの提唱までには、 数万分子以上の DNA 及びタンパク質を用いた多 分子解析が行われた。そのため、この修復メカニ ズムに提示されている「損傷 DNA の発見方法(図 1-2)」、「ヘリケースによる2本鎖から1本鎖へ の解離される DNA の長さ (図1-③)」、「切り出 される損傷部位を含む DNA の長さ(図1-④) 等は、数万分子の平均的な挙動の結果が示されて いることになる。例えば、図1-④の切り出される DNAの長さは数十~数千 bp という幅で示されて いる。この数千 bp 以上幅は、反応がどのような 環境下(要求される修復スピードや損傷の数等) で行われるかにより変化するものだと推測して いる。



図1 XP関連遺伝子によるDNA修復モデル

DNA修復反応の1分子解析を行うために、① DNA修復系において重要な役割を果たしてい る1本鎖DNA結合タンパク質(Replication Protein A, RPA)の可視化技術の開発、②マッピン グを可能にするDNA分子の伸張固定技術の開 発、について財団助成期間中に研究を行ったので、 以下、報告する。

### 2. マッピングを可能にするDNA分子の伸張 固定技術の開発

### 2.1 DNA分子の物理的な性質と伸張固定技術

DNA分子は塩基対が連結されたポリマー構 造をとるために、水溶液中で折れ曲がることが可 能である。このようなポリマー構造を持つ場合に は、エントロピーを増大させるために末端同士が 近づき、外力が存在しない状態では長さが 16.5 μm にもおよぶλファージDNAであってもわず か1um 程度の輝点として観測されてしまう。こ のような蛍光像からは DNA-タンパク質間相互作 用の結果である基質 DNA の鎖長変化やタンパク 質の位置情報などを得ることは不可能である。し たがって、DNA-タンパク質間相互作用を蛍光顕 微鏡視野内で単分子観察するためには観察対象 となる DNA1 分子の形態制御が重要である。既往 の研究では DNA の片方の末端を観察用基板に固 定し溶液の流れを利用した DNA の伸張やガラス 基板に電極を設置し直流電界を利用した DNA の 伸張、あるいはポリスチレンビーズや磁気ビーズ を結合させて光ピンセットや磁気ピンセットに より DNA の1分子形態制御が行われている。し かし、これら既往の方法では、大容量の試料が必 要であったり、流路や微小電極の微細加工技術が 求められたりするために、DNA修復反応の産物 の解析には適用困難であった。そこで、財団の助

成を受けて、液滴移動法(Moving Droplet Method)と呼ぶ簡便なDNA伸張技術を開発し た。

### 2.2 液滴移動法の原理

DNA分子は非常に親水性が高いために、液相 (水溶液)と固相または気相の界面にDNA分子 が存在すると、水溶液との接触面積を最大にする ように振る舞うことが知られている。この状態で 固相、液相、気相の3相の界面が移動すると、親 水性が高いDNA分子は常に水溶液との接触面 積を最大にするように振る舞うために、気相部分 が伸張されることになる。この原理を用いた様々 な方法が報告されているが、従来の界面移動法 (1-6)では反応後の試料溶液が mL 単位で必要

であり、大量の試料が必要となること、スプレー

等を用いてガラス表面にスポットした溶液を吹 き飛ばたりすることにより界面移動させる方法 では試料が飛散し、使いきりとなってしまうこと、 伸張操作の際に加える力が一定ではなく DNA の 伸張にばらつきが生じる点等の問題があった。そ こで、著者らは、数~数 100µL の試料しか得ら れない生化学反応産物の解析に適用可能な液滴 移動法(Moving droplet method)の開発を行っ た(7)。この方法は図2で示すように、試料DN Aを含む液滴を斜めにおいたカバーガラスに沿 って落下させる方法である。液滴移動法は、数µL の試料でも十分であり、角度により液滴の移動速 度を調整することが可能であり、さらに、パラフ ィルムを下に敷くことにより貴重な試料の回収 も可能にした(図2)。



図2 液滴移動法によるDNA伸張操作の概念図

### 2.3 実験方法

伸張操作には 760 ng の2重らせん ADNA (Nippon Gene; 48,502 bp, 10-15 µm) を用い、D NA100 塩基対に1分子の色素の比率となるよう に YOYO-1 iodide (Excitation 491 nm/Emission 509 nm) (Invitorogen) で染色を行った。この蛍光 標識を行ったDNA試料には退色防止効果があ る 2-mercaptoethanol を最終濃度1 M となるよ うに加え、DNA合成反応を含む様々な生化学反 応で用いる KCI を最終濃度 20, 100, 200 および 500 mM となるように調製した TE バッファーで 希釈して、液滴移動法の試料とした。

### 2.4 実験結果

500mMKCI のバッファーを用いて試料を調製 した場合には YOYO-1 の蛍光発光阻害が生じて しまい、伸張したDNA分子像が観察できなかっ たので、残りの実験条件である 20, 100 および **200 mM**の KCI を含むバッファーで溶解させた DNA試料を用いて、液滴移動法によりDNA伸 張操作を行った結果を図3に示す。図3に示すよ うに、20mMから 200 mMの KCI 溶液を用いた場 合には液滴移動法による λ DNAの伸張に成功 し、20,100 および 200 mMの各 KCI 濃度で λ D NAはそれぞれ 12.5µm (12 分子の平均), 12.6µm (15 分子の平均) および 12.2 (11 分子の平均) µm の長さに伸張された。これらの結果を単位長さ当 たりのDNA長に換算すると、それぞれ 3880, 3850 and 3980 bases/µm という結果が得られ、 KCI に関しては、この塩濃度範囲では伸張効率は 大きく変化しないことが明らかになった。また、 KCI のこの塩濃度範囲は幅広い生化学反応に用い られているので、各種生化学反応産物のDNA分 子を1分子レベルで観察することに応用できる が示されている。



図3 各種塩濃度条件において液滴移動法により伸張された λ D N A 分子 矢印で示している凝集したり屈曲したりした D N A 分子像は解析から除外している。 スケールバーは 10μm

### 2.5 液滴移動法を用いたDNA合成反応産物の 解析

液滴移動法を用いて、プロセシビティ(一度に 合成するDNA長)の異なる2つのDNAポリメ ラーゼの合成反応を可視化したので、以下に報告 する。

熱処理(95°C, 10 min)によって1本鎖化した  $\lambda$ DNA に合成オリゴヌクレオチド(25 mer; 5'-CGT AAC CTG TCG GAT CAC CGG AAA G-3') をハイブリッド形成させることによって、DNA 合成反応の鋳型を準備した。そして、低プロセシ ビティのDNAポリメラーゼとしては DNA polymerase  $\beta(8)$ 、高プロセシビティのDNAポリ メラーゼとしては T7 DNA polymerase(9)を対象 として、以下のように反応を行った。 前述のDNA鋳型を用いて、50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 2mM DTT, 100 pM dNTPs, 30 pM Cy3-dCTP (GE Healthcare), 2 ng substrate  $\lambda$ DNA, 5 units DNA polymerase  $\beta$  (DNA polymerase  $\beta$ 合成反応) または 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM KCl, 6 mM MgCl2, 0.1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 100 pM dNTPs including 30 pM Cy3-dCTP, 2 ng substrate  $\lambda$ DNA, 5 units T7 DNA polymerase (T7 DNA polymerase 合成反 応)の反応溶液を 100  $\mu$ l 調製し、37 °C で 0, 5, 10, 30 分の反応を行った。その後、最終濃度 20mM になるように EDTA を加え、さらに蛍光色素 YOYO-1 (base pair:YOYO-1=100:1) and 退色防 止剤 2-mercaptoethanol (最終濃度 1 M)を加えた のちに、液滴移動法により試料DNAの伸張を行った。本実験では、2本鎖領域は YOYO-1 で可視化し、DNAポリメラーゼによる新生合成領域は
 Cy3-dCTPs で可視化している。

図4AおよびBはDNA合成反応前の鋳型DN Aを蛍光により可視化したものである。反応開始 後5分から30分にかけて、DNA合成反応が進 行に伴い、どちらのDNAポリメラーゼを用いた 場合でも2本鎖DNA領域が長くなっているこ とが観察されており、30分の時点で合成長は 4.3 および 11.5 µm に達している (DNA polymerase  $\beta$ , T7 DNA polymerase) ( $\boxtimes 4 \text{ C-H}$ )_o この合成長を伸長速度に換算すると、550および 1480 base/min となり、T7 DNA polymerase の伸 長速度は DNA polymerase  $\beta$  の伸長速度の2.7 倍であることが示された。本実験では反応系中の DNAポリメラーゼの活性は等しいにも関わら ず、伸長速度の違いが観測されたのは2種類のD NAポリメラーゼのプロセシビティの違いによ るものと考えられる。前述のように、DNA polymerase  $\beta$  のプロセシビティは低いために、D NAポリメラーゼのDNAへの結合、DNA合成、 DNAからのDNAポリメラーゼの遊離の一連 のサイクルを高頻度で繰り返すことになり、その 結果、DNA合成長の分布は狭いものとなると考 えられる。一方、T7 DNA polymerase のプロセシ ビティは高いために、DNAポリメラーゼがDN Aに結合してから遊離するまでの間に長いDN A鎖を合成することになる。その結果、反応後に は長く合成されたDNA鎖と短い未合成DNA との混合物が存在することになり、合成長の分布 は幅広いものとなると考えられる。以上のように、 本法によるDNA伸張を用いた1分子解析によ りDNAポリメラーゼのプロセシビティを解析 できる可能性が示された。

また、合成反応により取り込まれた Cy3-dCMPsの蛍光により、新生合成領域を可視 化した結果、YOYO-1により可視化された2本鎖 DNAと一致している(図41およびJ)。このこ とは、図4C-Hで観察された2本鎖DNA領域は DNAポリメラーゼにより新たに合成されてい ることを示している。



図 4 DNAポリメラーゼによる合成反応産物 の1分子蛍光像の時間経過

スケールバーは 5µm

### 2.6 液滴移動法を用いた $\lambda$ DNA-DNA polymerase $\beta$ 複合体の解析

DNA-タンパク質複合体の観察として、 $\lambda$ DNAとDNA polymerase  $\beta$ を用いてリアルタイ ム観察を目的とした実験系の確立を目指して、 $\lambda$ DNA-DNA polymerase  $\beta$  複合体を形成させ、さ らに、その複合体を液滴移動法により伸張し、蛍 光観察したので、以下に報告する。

### (1) DNA polymerase $\beta$ の蛍光標識

2本鎖部位染色観察と DNA polymerase 染色観 察を併せた実験系を確立するために、活性を保持 した状態でDNAポリメラーゼの蛍光標識を行 う必要がある。しかし、クロスリンカーを用いて 官能基に蛍光色素を結合させる方法では、活性中 心に存在する官能基も同様に修飾されてしまう ために、酵素活性が失われる可能性が高い。そこ で、活性を保持した状態で蛍光標識を行うために、 DNAポリメラーゼとDNAとの複合体を形成 した状態で、標識操作を行うことにより(図5)、 活性を保持した状態で蛍光標識をすることがで きた。その実験手順を以下に記す。



図5 蛍光標識DNAポリメラーゼ調製の概念図

磁 気 Avidinbeads (Dynabeads M-280 Streptavidin; INVITROGEN, 10mg/ml ) 50µl を TEN buffer(1×TE、0.1M NaCl)で2回洗浄後、 5'(biotin)-GACTCTTCCGAGCTCTAA-3'および 5'-ACACACACACACACACACATTAGAGCTCG GAAGACTC-3'をハイブリッド形成した ds-sshybridDNA; 2pmol/µl を含む 50µl TEN buffer に再懸濁した。その後、4℃で1時間反応 させたのちに、磁気分離器により上清を取り除い た。反応後のビーズを HEPES buffer(25mM HEPES(pH8.0)、40mM KCl、1mM DTT)で2回 洗浄したのちに、20µg/ml DNA polymerase  $\beta \epsilon$ 含む 50µl HEPES buffer に再懸濁した。そして、 4℃で1時間反応させたのちに、磁気分離器によ り上清を取り除いた(図5-1)。その後、50µl の Labeling Solution (100mMHEPES-buffer pH6.0, 0.5mM Sulfo-NHS, 0.5mM EDC, 10 $\mu$ M Oregon Green488)に再懸濁して、4°C 30 分で反 応を行った(図5-2)。反応後、磁気分離器に より上清を取り除いた後に、0.5×HEPES-1M KClを 100 $\mu$ l加えて再懸濁し、その後、4°Cで3 分の処理により標識ポリメラーゼをビーズから 遊離させた(図5-3)。計5回の遊離操作を行 い、あわせて 500 $\mu$ lの蛍光標識試料を 50mM Tris-HCl(pH7.5), 100mM KCl, 2mM EDTA, 0.1% Triton-X100 で平衡化した NAPTM-5 Columns sephadexTM G-25 DNA Grade を用い て、ゲルろ過によるバッファー交換を行った。こ のようにして、得られた試料は 20%になるように グリセロールを加え、使用時まで-80℃で保存さ れた。



図6 蛍光 DNA polymerase  $\beta$  の1分子蛍光観察像

以上のように蛍光標識した DNA polymerase  $\beta$ の活性を、梯子状DNAを鋳型として合成活性 を測定した結果、合成活性は保持されており、特 に 740ng の基質  $\lambda$  DNA に対して 30ng の DNA polymerase  $\beta$ を加えたときが最も合成効率が高 いことがわかった(データ省略)。また、DNA polymerase  $\beta$ のみを蛍光顕微鏡で確認した蛍光 像を図 6 に示すが、このように DNA polymerase  $\beta$ が Oregon Green488 で蛍光染色されている様 子が 1 分子レベルで観察されており、活性を保持 した状態でDNAポリメラーゼの蛍光標識に成 功したといえる。

### (2) λ DNA-DNA polymerase β 複合体の形成お よび観察

 $\lambda$  DNA-DNA polymerase  $\beta$  複合体の形成お よび観察を行うために、基質 $\lambda$  DNA をインター カレーター型色素(YOYO-1、SYTOX Orange)で 染色し、DNA Polymerase  $\beta$  を Oregon Green 488 で染色し、液滴移動法を用いて $\lambda$  DNA-DNA polymerase  $\beta$  複合体を伸張固定することにより、 2 重らせんDNAと DNA Polymerase  $\beta$  を同時 に観察する方法を開発した(図7)。

まず、鋳型DNAの調製法を以下に示す。 1×ExTaq buffer(TaKaRa lot.AA3501A), 2.5nmol dNTP mixture(TaKaRa lot.BF5601A), 2.5unit ExTaq (TaKaRa lot.KA2101DA),100pmol  $\lambda$ プライマー1(5'-GGGCGGCGACCTCGCGGG TTTTCGC-3'), 100pmol  $\lambda$  プライマー2 (5'-CGTAACCTGTCGGATCACCGGAAAG-3'), 1pmol  $\lambda$  DNA の反応溶液を作成し、94℃で5分間、 58℃で1分間のインキュベートを行う。その後、 72℃で20分間反応を行う(Taq polymerase は1分 間に1000base の合成を行うと言われているため、 20分間反応を行うとほぼ $\lambda$  DNA の半分が2本鎖領 域、もう半分が1本鎖領域になる)。以上の反応 後、4℃で急冷し、同じく4℃で保存した(図7)。



### 図7 2本鎖DNAとDNAポリメラーゼの2重染色

以上のように調製した 300ng ss-ds  $\lambda$ DNA お よび 30ng Oregon Green488 Polymerase  $\beta$  を 含む 100µl の 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1mM DTT, 100 pM dNTPs,、 0.5%glycerol, 1µM SYTOX Orange を調製し、 室温で 3 0 分反応させた後、液滴移動法により  $\lambda$  DNA-DNA polymerase  $\beta$  複合体を伸張させ、蛍 光観察を行ったので、その結果を図 8 に示す。図 8 -1 は B 励起光を当てたときの蛍光で Oregon Green488 が蛍光を発している。よって図 8 -1 で見える蛍光より DNA polymerase  $\beta$ の存在が 確認できる。図 8 - 2 は G 励起光を当てたときの 蛍光で SYTOX Orange が蛍光を発している。こ の時に見えるのは DNA の 2 本鎖の部分である。 図 8 - 2 で観察された 2 本鎖 DNA 部分の末端と 図 8 - 1 で観察された DNA polymerase  $\beta$ を示 す光点が一致しており、2 重らせんDNAの末端 に DNA polymerase  $\beta$ が結合していることが示 された。



1) Oregon Green488 (Ex496nm, Em520nm) DNA polymerase beta



### 2) SYTOX orange (Ex547nm, Em570nm) double strand DNA

図8 基質 DNA と 蛍光 DNA polymerase との 複合体観察結果

### 3.1 本鎖DNA結合タンパク質(Replication Protein A, RPA)の可視化技術の開発

### 3.1 蛍光タンパク質融合RPAの作成

RPA についての研究は多くなされており、結合 能を持つ部位も明らかとなっている。本研究では mouse RPA 70kDa subunit のうちDNA結合領域と して知られる190~431アミノ酸残基を切り出し、 黄色蛍光タンパク質(YFP)との融合タンパク質 となるよう設計した。熱変性により解離させ1本 鎖化させたλDNA と RPA-YFP を複合させ、2.2 にある液滴移動法により伸張固定したものを図 9 に示す。インターカレーター型色素 YOYO には見 られなかった蛍光のムラが生じたものの、1本鎖 部位を認識するに足る標識が可能であることが 判明した。



図9 ssDNA(48,500bases)と RPA-YFP との複合体観察結果

### 3.2 1本鎖・2本鎖共存 DNA における二重染色

λDNA を熱変性により1本鎖化し、プライマー とハイブリッド形成した後にポリメラーゼによ って全長の半分合成させたところで強制的に合 成を停止させることで1本鎖と2本鎖部位が局 在的に存在する基質を作成した。1本鎖部位を RPA-YFP で、2本鎖部位をインターカレーター型 蛍光色素で標識したものを液滴移動法によって
伸張固定させることで、1本鎖と2本鎖を別々に
認識する技術を開発した(図10)。その結果を
図11に示すが、1本鎖領域と2本鎖領域が独立
に、かつ、識別可能な形で染色することが可能な
ことを示している。



図10 2重染色の概略図



RPA-YFP B-2A(波長:490nm)

SYTOX Orange G-2A(波長:546nm)

図11 1分子上における1本鎖・2本鎖の同時染色結果

# 3.3 微細流路を適用した形態制御と塩による RPA 脱離の可視化

液滴移動法は伸張固定化に適した手法である が、基質と基板表面の相互作用により固定されて いるので、立体障害のために各種因子とDNAと の相互作用を阻害してしまう可能性が高い。そこ で、DNA損傷の修復等の反応をリアルタイムに 追うための手法として PDMS による微細流路を用 いた形態制御を開発した。図12に示すこのシス テムではDNA分子の片末端のみが基板と結合 するためDNAの大部分がフリーとなり、反応の 妨げとなる可能性を排除することができる。



図12 微細流路を用いた形態制御システムの概略図

基質の固定化のため、λDNA の片末端にチオー ル基(-SH)を修飾し、基板にはジメチルジクロ ロシランコートを施した。手順として、最初に1 本鎖 DNA の固定化を行い、続けて DNA 未結合部位 をBSAでブロッキング。その後RPAを複合化させ、 未複合のものは buffer を流すことで除去した。 さらに、NaC1 500mM を流すことで RPA を解離させ、 その後、RPA 溶液を流して再複合化を図った。な お、実験に用いたバッファー組成は 25mM HEPES pH8.0, 50mM EDTA, 50% glycerol, 0.1% Tween20, 0.5% メルカプトエタノールである。

この実験系を用いて、高塩濃度のバッファーを 供給し RPA を脱離させた後、再度複合体を形成さ せることが可能であることを示すことができた (図13)。本技術は、バッファー交換により任 意のタイミングで1本鎖部位の標識が可能であ り、かつ不用な際には非標識に変更できる優れた 技術であるといえる。



複合体再形成

流れによる複合体の脱離・複合化反応可視化 図13

### 4. まとめ

以上に示したように、財団の助成を受けて、修 復に関与するDNAポリメラーゼ、Replication Protein A (RPA) を1分子レベルで可視化し、D NA1分子と同時に観察するシステムを構築し た。また、RPA がDNA分子の1本鎖領域のみを 特異的に認識する性質を利用して、DNAの1本 鎖領域と2本鎖領域を同時に、かつ、識別しなが ら、観察する技術を開発し、RPA のダイナミクス もとらえることができた。また、液滴移動法によ り微量の試料のDNA形態制御が可能になった ので、可視化技術の進展とあわせて、DNA複製 の1分子解析のためのキーテクノロジーが確立 したと考えており、今後、さらに発展させていき たい。

#### 謝辞

本研究は財団法人中谷電子計測技術振興財団の 平成20年度(第25回)技術開発研究助成によ って行われました。ここに深く感謝の意を表しま す。

#### 参考文献

1. A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, D. Bensimon, Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. Science. 265 (1994) 2096-2098.

2. J.F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, V. Croquette, pH-dependent specific binding and combing of DNA. Biophys. J., 73 (1997) 2064-2070.

3. Z. Deng, C. Mao, DNA-Templated Fabrication of 1D Parallel and 2D Crossed Metallic Nanowire Arrays. Nano Lett., 3 (2003) 1545-1548.

4. H. Yokota, J. Sunwoo, M. Sarikaya, G. van den Engh, R. Aebersold, Spin-stretching of DNA and protein molecules for detection by fluorescence and atomic force microscopy. Anal. Chem., 71 (1999) 4418-4422.

5. J.H. Kim, W.X. Shi, R.G. Larson, Methods of stretching DNA molecules using flow fields. Langmuir, 23 (2007) 755-764.

6. J. Zhang, Y. Ma, S. Stachura, H. He, Assembly of highly aligned DNA strands onto Si chips. Langmuir, 21 (2005) 4180-4184.

 M. Oshige, K. Yamaguchi, S. Matsuura, H. Kurita,
 A. Mizuno, S. Katsura, A new DNA combing method for biochemical analysis, Anal. Biochem., 400 (2010) 145-147.

8. Werneburg,B.G., Ahn,J., Zhong,X., Hondal,R.J., Kraynov,V.S. and Tsai,M.D. DNA polymerase beta: pre-steady-state kinetic analysis and roles of arginine-283 in catalysis and fidelity. Biochemistry, 35 (1996) 7041-7050.

9. Patel,S.S., Wong,I., and Johnson,K.A. Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant. Biochemistry, 30 (1991) 511–525.

細胞内活性評価のための酵素固定化ナノセンサ電極の開発



研究責任者 熊本大学大学院自然科学研究科 複合新領域科学専攻

准教授 冨 永 昌 人

### 1. はじめに

現在、細胞内の単一分子イメージングに関する 研究が盛んになされており、それらの近年の成果 はすばらしいものがある。しかしながら、すべて の測定法には長所と欠陥が存在する。単一分子イ メージングの長所は、細胞にダメージを与えるこ となく、細胞内に存在する特定の分子の存在を3 次元的にイメージングできることである。欠点と しては、細胞内で活動している分子として例えば 酵素に限定すると、酵素反応をリアルタイムで測 定できないことや細胞内に蓄積される基質を検 出できないことが挙げられる。従って、単一分子 イメージング法を補足する手法が必要であり、リ アルタイム計測が可能な手法と組み合わせるこ とで、細胞内の活動の理解が飛躍的に高まると考 えられる。

細胞活性を反映した基質濃度を細胞内でリア ルタイムに計測することで、細胞内活動の理解が 深まると考えられる。さらに、酵素センサの研究 開発は20年以上の歴史があり、血糖値センサな ど一部実用化されたものもあり、基礎から応用ま で幅広く研究がなされている。しかしながら、こ れまでの酵素固定化電極センサでは、生きた細胞 のダメージを極力抑えた測定は極めて困難であ る。なぜならば、通常の酵素センサには酵素と電 極素子との間の電子伝達媒体となるメディエー タと呼ばれる有機金属錯体などが用いられるが、 多くの場合にはこれらのメディエータは生体毒 性がある(図1参照)。特に、細胞に直接侵襲す る場合には、これらの毒性物質の影響は極力排除



図 1 メディエータの溶出および電極サイ ズによる細胞ダメージの模式図

すべきである。さらに加えて、細胞にダメージを 与えないためには、ナノメートルサイズの電極の 開発が必要である、その直径サイズが小さいほど ダメージを抑制できると考えられる。その電極と して期待されるのがカーボンナノチューブであ
る。理想的には、直径数ナノメートルのカーボン ナノチューブに酵素を固定化し、メディエータを 介することなく酵素とナノチューブ間で直接電 子伝達が行われるような電極が望まれる(図2)。 このような電極を開発するための鍵は、ナノチュ ーブと酵素との直接的な電子伝達が可能な酵素 固定化法の開発である。



図2 酵素固定化ナノセンサ電極によ る細胞内活性測定の模式図

過去にはタンパク質は電気化学的に不活性で あることが教科書に記載された時代もあったが、 電子伝達タンパク質であるチトクロム c と電極基 板との直接的な電子移動反応が 1977 年に報告さ れてから 1~3)、種々の電子伝達タンパク質や酸化 還元酵素と電極との直接電子移動反応が検討さ れてきた 4~7)。しかしながら、直接電子移動反応 を達成できた酵素は生体内の酵素のごく一部に 過ぎない。酵素の活性中心の周りは厚いタンパク 質の壁に覆われているためである。電極と酵素活 性中心との距離が2nm 程度になると電子移動反 応は極めて困難になってくる 8.9%。電子移動反応速 度は反応距離が長くなるにつれて指数関数的に 遅くなるためである。カーボンナノチューブは、 直径が数ナノメートルで長さが数マイクロメー トルにもおよぶ「一次元的導電体」である 10~12)。 カーボンナノチューブを用いると、ナノチューブ が酵素の活性中心近傍まで接近可能となり、酵素 との直接的な電子移動反応が可能になると考え られる。

実際に、カーボンナノチューブを電極として用 いた研究報告が多々ある。しかしながら、それら のほとんどは市販品のカーボンナノチューブを 用いた研究である。市販品のカーボンナノチュー ブは、その合成触媒として用いられた重金属のナ ノ粒子を含む。金属触媒ナノ粒子による電極反応 への影響をなくすために、前処理としてこれらの カーボンナノチューブは酸処理と超音波処理が 施され、金属ナノ粒子が溶解除去される。一方で、 カーボンナノチューブもダメージを受けて、その 表面に欠陥が生じる。表面欠陥によって固定化さ れた酵素の電極反応は大きく変わる。我々は電極 上に直接カーボンナノチューブを合成すること でこれらの問題を解決した。すなわち、カーボン ナノチューブ修飾電極上の触媒金属ナノ粒子は、 ナノチューブに包括されており、ナノ粒子が直接 測定溶液に曝されることがないために電気化学 的には何ら影響を及ぼさないことがわかった。酸 処理などによる金属粒子の除去を行う必要もな く、合成された状態でのカーボンナノチューブを 電気化学測定に用いることができるため、ナノチ ューブの表面欠陥の制御が容易になった。加えて 重要なことは、カーボンナノチューブは、大気下 で容易にコンタミを受け、酵素の電極反応に多大 な影響を及ぼす。実際、合成直後のコンタミを受 けていないカーボンナノチューブ電極と、大気下 に暴露してコンタミを受けたそれとは、電極反応 特性が大きく変わることが示されている 13,14)。

本研究課題は、細胞内の活動状態評価のための 酵素固定化ナノセンサ電極の開発を目標とした。 ナノ電極にはカーボンナノチューブを用いるこ とを想定し、本開発においては、重要な鍵となる カーボンナノチューブと直接的な電子伝達反応 が可能な酵素固定化法について検討した。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 カーボンナノチューブ修飾金電極の作製

カーボンナノチューブ(CNT)を合成する方 法としてアルコールを炭素源として用いた化学 気層成長法を用いた。この方法は取扱いが簡便な エタノールを用い比較的低温で高純度なCNT を合成する方法として最も主流な方法である¹⁵⁾。

金属触媒源の酢酸コバルトおよび酢酸モリブ デンを金電極にディップコート法で担持し、図3 に示す合成装置を用いてCNTを合成した。金属 触媒修飾金電極を装置内の石英チューブ内に設 置後、水素ガス雰囲気下の加熱で金属触媒の有機 物を除去と還元を行った。その後、炭素源のエタ ノール蒸気を流入し、エタノールガスが熱分解さ れ、電極上にCNTが合成された(CNT/Au 電極)(図4参照)。合成されたCNTを電子顕微 鏡で観察すると、直径約1 nm の単層カーボンナ ノチューブ(SWCNT)が数本から数十本お互 いにバンドルした状態のCNTが電極上に合成 された様子が観測できた(図5参照)。また、ラ マン分光測定結果からは、欠陥の極めて少ない高 品質のSWCNTが合成されたことが解った。



図3 CNT 合成装置



図 4 SWCNT の合成前 (a) 後 (b) での金 ワイヤ電極の写真



図 5 金電極上に合成された SWCNTの走査型電子顕微鏡写真像

#### 2.2 酵素固定化 SWCNT/Au 電極の作製

本実験では、酵素としてラッカーゼ(Lac) を用いた。Lacは酸素を水まで4電子還元し、 還元中間体である活性酸素種を生成しない。 *Trametes* sp. 由来のLacを大和化成から購入し、 陰イオン交換クロマトグラフィにより精製して 用いた。SWCNT/Au電極を5 $\mu$ MのLac /リン酸溶液(pH 5)中に6時間浸漬して、両酵素 を吸着固定化した。酵素電極反応についてはサイ クリックボルタンメトリー(CV)測定で評価し た。SWCNT/Au電極上の全酵素修飾量につ いてはBCA Protein Assay Kitを用いて全タンパ ク質量を測定し、活性酵素修飾量については電子 メディエータ分子を用いて実際の酸素還元触媒 能を有する酵素量を定量した。

#### 2.3 細胞培養

細胞には MAGI /CCR5 細胞を用いた。DMEM 13.48 g、 イーグル MEM アミノ酸ビタミン培地 0.88 g、炭酸 水素ナトリウム 2.0 g、硫酸ストレプトマイシン 明治 0.1 g 、結晶ペニシリン G カリウム 0.01 g を Milli-Q 水 1.0 リットルに溶解し、メンブレン 孔径 0.22  $\mu$ m のボトルトップフィルターを用い て濾過滅菌した。さらにこの DMEM の容量に対し、 非動化・フィルター滅菌済みの血清 (FBS) が 10 % 濃度となるよう添加したものを細胞培養液 (DMEM with 10 % FBS) として使用した。これらの操作は すべてクリーンベンチ内で行った。24 well plate の1 well には 3×10⁴ cell/ml×0.5 ml 播種し、 インキュベーター内(37 ℃、5 % CO₂条件下)で5 日間培養した。

#### 2.4 電気化学測定

電気化学測定は三極式によるサイクリックボ ルタンメトリー (CV) 法で行った。最低 20 分以 上高純度アルゴンによるバブリングを行い、溶存 酸素を除去した。測定時にはセル内に高純度アル ゴンをフローし、アルゴン雰囲気下で測定した。 培養細胞が測定対象の場合には、アルゴンバブリ ングは行わなかった。

#### 3. 結果と考察

#### 3.1 SWCNT の電気化学的酸化処理

SWCNT 全体に酸化による構造欠陥を導入す るため、合成した SWCNT/Au 電極に電気化学的 処理を施した。図6にリン酸緩衝液 (pH 7)中で の SWCNT/Au および高配向パイロリティックグ ラファイト (HOPG) 電極におけるサイクリック ボルタモグラムを示す。SWCNT/Au 電極におい て 1 V 付近に酸化ピークが観察された。一方、



図 6 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) 中での SWCNT/Au(0.25 cm²)(a)および HOPG(0.34 cm²)(b) 電極におけるサイクリックボルタモグラム、電位掃 引速度は 20 mV/s

HOPG ではこのような酸化ピークは観察されな かった。この結果より1V付近に観察されたピー クは CNT 由来の酸化ピークであるとわかった。 カーボンナノチューブはキャップの部分に五員 環を有し、その部分は六員環より構造的に不安定 である。そのため、グラフェン構造を持つ側面の 部分よりも低電位側で酸化が起きると予想され、 1V付近に見られた酸化ピークはカーボンンナノ チューブのキャップ部分の酸化と考えられた。ま た、1.2 V付近から立ち上がる酸化電流値の増加 は HOPG 電極でも観測されたためグラフェンの 酸化と考えられた。本研究では、pH 7 のリン酸 緩衝液中で、掃引速度 20 mV/s で 0 V→1.5 V→0 V (vs. Ag/AgCl (飽和 KCl))において電位を掃 引し電気化学的酸化処理を行った。電位掃引のサ イクル数を変化させることで SWCNT の酸化の 程度を制御した。透過型電子顕微鏡(TEM)、ラ マン分光および XPS 測定により電気化学的処理 を施した CNT の表面状態を評価した。





電気化学的処理を施した SWCNT の TEM 像よ り SWCNT の側面に凸凹が見られダメージを受 けた様子が観察された。また、電位掃引を 0、5、 10 および 20 サイクル施した SWCNT のラマン分 光測定結果を図 7 に示す。ラマン分光法による測 定結果から、1592 cm⁻¹付近に G-band と呼ばれ るグラフェン構造由来のピークが観察され、また 1350 cm⁻¹付近に D-band と呼ばれる CNT の構造 欠陥やアモルファスカーボンに由来するブロー ドなピークが観察された。CNT の構造欠陥は空 礼、付加原子、stone-Wales 欠陥、5-7 員環対な どが考えられ、G-band と D-band の強度比 G/D 比から CNT の品質がある程度評価でき、G/D 比 が大きいほどグラフェン構造の質の高い CNT で あるといえる。そこで電位掃引のサイクル数に対 する G/D 比のプロットを図8に示した。0 サイク ルから5 サイクルにかけて急激に G-band が減少 し D-band が増大した。10 および20 サイクルに かけては、緩やかに G-band が減少し D-band が 増大した。





図9 電気化学的酸化処理前後での SWCNT の C(1s)の XPS 測定結果とピーク解析

電気化学的処理前後で XPS 測定を行い C(1s) 軌道のピーク分解を行うことにより SWCNT 表 面の官能基を評価した。図9に電気化学的処理を 施した SWCNT/Au 電極の XPS 測定結果を示す。 未処理の SWCNT と電気化学的酸化処理を 5、10 および 20 サイクル施した SWCNT において、 284.4 および 285.2 eV に sp² (Grahene) および sp³ (-CH₂-) 炭素原子由来のピークが観測され、 286.6, 288.0 および 289.2 eV に C-O, C=O および O-C=O のカーボン酸化物由来のピークがそれぞ れ観測された ¹⁶⁾。また、290.5 eV に π-π*



shake-up 由来のピークが観察された。C-C グル ープとカーボン酸化物の表面濃度を分析した結 果を図10に示した。サイクル数が多くなるに従 いC-C グループの割合が減少し、カーボン酸化物 の割合が増加する傾向が得られた。特に C-O 由来 のピークの増大が観測され、未処理の SWCNT に 比べ電気化学的酸化処理を 20 サイクル施した SWCNT には C-O が約 2.3 倍存在した。

以上のことから、電位掃引のサイクル数を変化 させることで SWCNT 表面の酸化の程度を制御 できることが解った。

#### 3.2 ラッカーゼと SWCNT 間の電子移動反応

Lac 修飾 SWCNT/Au 電極を用いて CV 測定を 行うと、0.6 Vから酸素の触媒還元電流が観測さ れた(図11参照)。特に、25%程度のカーボン酸 化物を有する電極において最も大きな酸素の触 媒還元電流が観測された。この酸素触媒電流値の 違いは酵素修飾量または吸着配向の違いによる ものであると考えられた。そこで酵素修飾量につ いて検討したところ、電極上の Lac の全酵素修飾 量は約 3.6×10⁻⁹ mol cm⁻²と電気化学的酸化処理 回数によらず同量であった。また活性酵素修飾量 も約 2.3×10-9 mol cm-2 と電気化学的酸化処理回 数に依存せず同量であった。以上のことから、触 媒還元電流の違いは酵素修飾量によるものでは なく、SWCNT 表面のカーボン酸化物が酵素の吸 着配向に影響を及ぼし、その結果として酸素触媒 電流値に違いが生じたものと考えられた。

以上のことから、CNT をナノ電極として用い る際には、CNT との直接的な電子移動反応を達 成可能な状態に配向固定化された酵素の存在が 重要であり、その適切な酵素配向を達成するため には、CNT 界面を酸化処理し、カルボキシル基 やカルボニル基といった官能基が2割程度存在す る界面が最適であることが明らかとなった。



図 1 1 Lac と SWCNT との直接電子移動反応に基づ く酸素の触媒還元電流の観測、サイクリックボルタ モグラムはリン酸溶液 (pH 5) 中、アルゴン雰囲気 下(波線)および酸素飽和雰囲気下(実線)で測定、 SWCNT に電気化学的酸化処理を施した(5 サイクル) 場合(a)と施さなかった場合(b)の Lac を修飾した SWCNT/Au 電極、電位掃引速度は 20 mV/s

#### 3.3 Lac/SWCNT/Au 電極を用いた細胞内酸素測定

金電極の先端部分(直径 0.8 mm)に SWCNT を合成した(SWCNT/Au 電極)。SWCNT/Au 電 極の SWCNT 部分のみを  $5\mu$  M の Lac 溶液(リ ン酸溶液、 p H 5)に 3 時間浸漬することで、 Lac/SWCNT/Au 電極を作製した。

Lac/SWCNT/Au 電極の先端を細胞に接触させ て、Lac が修飾された SWCNT を細胞内に挿入し た(図12参照)。SWCNT が細胞に触れること で、CNT は細胞内に容易に取り込まれること、 さらに細胞内の CNT はその核周辺に集積するこ とがすでに我々の他の研究結果から明らかにな っている。



図12 Lac/SWCNT/Au 電極の細胞へのアプローチ

測定結果を図13に示した。細胞に Lac/SWCNT/Au 電極先端が接触した場合とそう でない場合での測定である。いずれの場合も、Lac と SWCNT との直接的な電子移動反応に基づく 酸素の触媒還元電流が観測された。詳しく観察す ると、細胞と接触した電極の場合には、電気二重 層容量が若干減少したことが解った。これは SWCNT 表面に、細胞分子膜を形成している疎水 的な脂質分子もしくは細胞内のタンパク質の吸 着が起こったことを示すものであり、SWCNT が 細胞内に挿入されていることを示す間接的な証 拠である。また、細胞培地の溶液中には酸素が含 まれているため、細胞と接触していない電極にお いても Lac による触媒還元電流が観測された。電 極と接触した細胞はその後の培養において、コン トロール細胞と同様な増殖を示したことから、 SWCNT の侵襲によるダメージは小さいと考え られた。観測された触媒電流に違いが見られたこ とから、細胞内での計測に本手法が利用できるこ とが解った。



図13 Lac/SWCNT/Au 電極を用いた LacとSWCNTとの電子移動反応に基づ く細胞内の酸素還元電流(実践)お よび培地溶液中の酸素還元電流(波 線)、電位掃引速度は5 mV/s

#### 4. まとめ

金電極上に直接的にSWCNTを合成するこ とで、触媒重金属粒子の影響を受けないナノサイ ズ電極を作製できた。さらに、SWCNTと Lacとの直接的な電子移動反応を達成するた めのSWCNT界面のデザインを、SWCNT表 面の電気化学的酸化処理を施すことにより最適 化した。以上のように最適化した酵素固定化 SWCNT電極を用い、細胞ダメージを最小限に した酵素固定化ナノセンサ電極が開発できた。今 後、金電極サイズを小さくすることで、操作性に 優れたセンサ開発が可能と考えられる。

#### 謝辞

本研究は中谷電子計測技術振興財団の研究助 成によって行われました。ここに深く感謝の意を 表します。

#### 文献

- 1) P. Yeh, T. Kuwana, Chem. Lett. (1977) 1145.
- M. J. Eddowes, H. A. O. Hill, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1977) 771.
- K. Niki, T. Yagi, H. Inokuchi, K. Kimura, J. Am. Chem. Soc. 101 (1979) 3335.
- I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1982) 1032.
- S. C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, *Chem. Rev.* 104 (2004) 4867.
- 6) J. Wang, *Electroanalysis* **17** (2005) 7.
- 7) J. F. Rusling, Acc. Chem. Res. 31 (1998) 363
- R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* 811 (1985) 265.
- R. A. Marcus, Angew. Chem. Int. Ed. 32 (1993) 1111.
- 10) S. Iijima, *Nature* **354** (1991) 56.
- 11) A. K. Geim and K. S. Novoselov, *Nature Mater*.6 (2007) 183.
- 12) R. Saito, G. Dresselhaus, and M. S. Dressel-

haus, *Physical Properties of Carbon Nanotubes*, Imperial College Press, London, 1998.

- M. Tominaga, S. Kaneko, S. Nomura, S. Sakamoto, H. Yamaguchi, T. Nishimura, I. Taniguchi, *ECS Transactions* 16 (2009) 1.
- M. Tominaga, H. Yamaguchi, S. Sakamoto, I. Taniguchi, *Chem. Lett.*, **39** (2010) 976.
- S. Maruyama, R. Kojima, Y. Miyauchi, S. Chiashi and M. Kohno, *Chem. Phys. Lett.* 360 (2002) 229.
- H. Ago, T. Kugler, F. Cacialli, W. R. Salaneck,
  M. S. P. Shaffer, A. H. Windle, R. H. Friend, J. *Phys. Chem. B*, **103** (1999) 8116.

#### 学会発表実績

- M. Tominaga, H. Yamaguchi, S. Sakamoto, I. Taniguchi, "Electron Transfer Reactions of Cytochrome c at Carbon Nanotube Surface", Extended Abstracts for the International Symposium on Carbon Nanotube Nanoelectronics, pp.181-182 (2009).
- M. Tominaga, H. Yamaguchi, Y. Fukamichi, S. Sakamoto, I. Taniguchi, "Direct Electron Transfer Reactions of Enzymes at Carbon Nanotube Interfaces", Abstract Book for the International Symposium on Nanoelectrochemistry and Spectroelectrochemistry as the Satellite Meetings of the 60th of International Society of Electrochem Meeting, p.58 (2009).
- 深道 佑一,谷口 功,冨永昌人,"ラッカ ーゼの吸着状態および直接電子移動反応に 及ぼすカーボンナノチューブの界面",日本 分析化学会第 58 年会要旨集、p.76 (2009).
- M. Tominaga, "Biocatalytic Current Based on Direct Electron Transfer Reactin of Enzymes with Carbon Nanotubes", Abstracts for BIT's Inaugurate Symposium on Enzymes & Biocatalysis 2010 (SEB-2010), p.110 (2009).
- 5. M. Tominaga, Y. Fukamichi, H. Yamaguchi,

A. Iwaoka, and S. Sakamoto, "Direct Electron Transfer Reactions of Enzymes with Single-Walled Carbon Nanotubes", Abstracts for The 7th Asian Conference on Electrochemistry 2010 (ACEC 2010) in Kumamoto, p.146 (2010).

6.

M. Tominaga, Y. Fukamichi, H. Yamaguchi,
A. Iwaoka, and S. Sakamoto, "Electron Transfer Reaction of Laccase with Single-Walled Carbon Nanotubes Modified Gold Electrode", CD Abstracts for the 61st International Society of Electrochem Meeting (2010).

#### 細胞への物質注入と電位測定のためのマイクロピペット電極の作製と応用



研究責任者 九州大学大学院工学研究院エネルギー量子工学部門

准教授 角田直人

#### 1. はじめに

微細な先端を有するマイクロピペットは、単一 細胞内への物質注入(インジェクション法)と細 胞膜の電気測定(パッチクランプ法)の2つの目 的に使用される¹⁾。マイクロピペットは一般にガ ラス製で非導電体のため、パッチクランプ法の電 極として使用する場合は、中空部に電解質溶液を 充填する必要がある。この場合、インジェクショ ン機能が使えなくなり、両機能を同時に活用する ことはできない。マイクロピペットと同サイズの 金属微小管の作製は、現在の加工技術では難しい ため、本研究では、マイクロピペット外側表面に 金属コーティングした電極を作製し、中空部を確 保する。しかし、このような電極には、周囲の液 体との電気絶縁の課題が付随する。そもそも微細 な針形状に対して均一な絶縁膜を形成すること は技術的に難しく、加えて、仮に絶縁膜で全体を 覆うことができたとしても、最先端部の絶縁膜を 除去し、電位検出のための金属面を露出させる必 要がある。これらの作製技術を確立することが本 研究の第一の目的である。

電気絶縁膜としては水素含有アモルファスカ ーボン(a-C:H)を採用した。その理由は、プラ ズマ支援化学気相成長法(PECVD法)によって 針形状にも比較的均一にコーティングできるか らである²⁾。ただし、確実な絶縁のための厚膜化 と、先端膜除去に最適な膜質の探索が必要である ため、先ずこの課題に取り組んだ。先端部の a-C:H 膜除去については、従来の電気的膜破壊法^{3),4)}、 機械的膜破壊法⁵⁾⁻⁷⁾、および化学エッチング⁸⁾⁻¹¹⁾ の適用は不可能である。なぜなら、マイクロピペ ットは微細でガラス製のため、如何なる電気的破 壊や機械的切削でも破損が避けられない。化学エ ッチングでは、先端の微細なマスキングの困難性 により、最先端部の選択的エッチングは極めて難 しい。そこで著者は、マイクロピペット先端から のコロナ放電とそれを利用した先端膜の除去法 に着目し研究に取り組んできた。本報では、その 方法と結果について報告する。

# 2.水素含有アモルファスカーボンのコーティン グ

#### 2.1 マイクロピペットへの金属コーティング

ガラスマイクロピペットをパイレックスガラ ス管 (G-1, Narishige)からピペットプラー (PB-7, Narishige)を用いて作製した。ガラス管は事前に アセトンとアルコールにより超音波洗浄してお いた。マイクロピペット先鋭部先端の外径は 1 μm、 内径 0.5 μm、全体の長さ 50±2 mm とした。次に、 電極機能を付加させるため、専用のスパッタ装置 により、マイクロピペット外側表面にニッケルを 厚さ約 50 nm で堆積させた(図 1a)。ニッケルは ガラスとの密着性が比較的良く、次に堆積させる a-C:H 膜との相性も良好である。



図 1 (a) Ni コーティングしたガラスマイクロピペッ トの SEM 画像。軸方向斜め 45°から撮影。 (b) a-C:H コーティングした時の SEM 画像。

#### 2.2 PECVD 法による a-C:H 膜のコーティング

PECVD 法はサンプル形状の制限が他の方法、 例えば、スパッタリング、蒸着、アークイオンプ レーティングより少なく、マイクロピペット電極 に関しても均質な膜が形成できる²⁾。真空チャン バへソースガスとして CH₄を流量 10.0 sccm で送 り圧力 25 Pa とした。チャンバ内には、共に直径 が 90 mm のアノード円板電極とカソード円板電 極を 30 mm の間隔で平行に設置した。カソード円 板電極を RF (13.56 MHz) 電源と容量結合させ、 電極間にメタンプラズマを形成し、バイアス電圧 -40 V で維持した。

カソード円板電極からシース厚さに対応する 10 mm の位置に、12 本の Ni-マイクロピペットを 放射状に並べた。それらはすべて高電圧パルス発 生器 (PG-1K10, Pulse Electronic Engineering) と繋 がっており、100 Hz、Duty 10%で–900 V もしくは -450 V が印加された。堆積時間は 240 min もしく は 120 min とし、240 min の場合、a-C:H の膜厚は 約 1 µm となった (図 1b)。

#### 2.3 a-C:H 膜の評価

堆積した a-C:H 膜の特性は、炭素結合状態(sp² and sp³)と水素含有率に強く依存するが、これら はプラズマ強度やパルス電圧といった成膜条件 の変更である程度制御することができる。仮にパ ルス電圧を印加しない場合、すなわち低バイアス 電圧のプラズマ中にサンプルが置かれた状況で は、diamond-like よりむしろ polymer-like な膜とな る¹²⁾⁻¹⁴⁾。両者とも電気抵抗率は高いが、 polymer-like a-C:H は相対的に透明、柔軟、そして pinhole-free という特徴を有する¹⁵⁾。つまり、今回 のパルス電圧印加により、polymer-like 膜とパルス 時の sp³-rich 且つ less-hydrogen の a-C:H 膜が積層 した構造になっていると推測される。実際、パル ス印加で作製された膜はパルスなしの (polymer-like) 膜よりも不透明となった。恐らく、

硬度についてもパルス印加した膜の方が大きい と考えられる。尚、パルスではなく連続的に高電 圧を印加した場合、膜にはクラックや剥離が生じ た。これは膜成長時の内部ひずみが緩和されない ためと考えられる。加えて、温度上昇による膜の 変性が顕著となる。

a-C:H 膜の電気抵抗率は、薄膜抵抗測定法²⁾に よって測定した結果、 $3.1 \times 10^{12} \sim 1.1 \times 10^{14} \Omega m$  (*n* = 9)が得られた。電気絶縁体として十分機能する 膜が形成できたといえる。尚、PECVD における パルス電圧の違いと抵抗率の有意な関係はなか った。

# 3. コロナ放電による先端 a-C:H 膜の除去

## 3.1 方法

図 2 に示すように、a-C:H コーティングされた マイクロピペット電極を対向円板電極(直径 40 mm)から 8~13 mm 離れた位置に固定した。この ようなニードルと平板の位置関係はコロナ放電 において最も典型的な配置で、理論的および実験 的な研究も数多い¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。マイクロピペット躯幹側 末端の端子部(Ni 面が露出している)を過電流抑 制のための 1 MQ の抵抗を介して DC 高電圧電源 (model 248, Keithley) に接続した。電源出力は0.8 kV から 5.0 s 毎に+10 V ずつステップ状に 3.0 kV まで上昇させた。



# 図 2 マイクロピペット電極の先端 a-C:H 膜除去のための放電システム概略図。

放電電流は電流計 (model 617, Keithley) によっ て記録した (図 2 の記号 pA)。初期の実験では、 500 MHz デジタルオシロスコープを、放電時の電 流パルスを検出するために使用した。電流測定の ための抵抗値 (1 MΩ) は、オシロの入力最大値 (2 A、100 V) によって決めたが、これはオシロによ る電流検出値が 1 nA 以上であることを意味する。 作動電圧 90 V の Arrester によりサージ電圧から電 流計とオシロを保護した。

放電デバイスは暗室の中に置かれ、放電時の発 光をデジタル顕微鏡 (VH-5500, Keyence) により 撮影した。実験は大気中で行い、気温、気圧、お よび相対湿度はそれぞれ 17-26°C、 102-117 kPa、 および 42-58%の範囲であった。コロナ放電後の マイクロピペット電極を scanning electron microscope (SEM)により観察した。

#### 3.2 結果

図3は、電圧上昇に伴うマイクロピペット電極 からの放電電流の時間変化である。図中のプロッ トaとbは同一のマイクロピペット電極の結果で あるが、プロットbは2回目すなわちaの後に同 じ実験を行った時の結果である。縦軸の電流は対 数表記である。プロットaでは、300 s (1.4 kV)ま で電流はノイズレベル (~1 pA) 以下であった。 尚、電流スパイクの連なりが観察されるが、これ は電圧のステップ変化時の急激な上昇によるも のである。1.4~1.5 kVの領域では、不規則な電流 が観察され、徐々に nA レベルまで上昇した。デ ジタルオシロスコープの測定信号は1 nA 以下の 不規則な電流パルスの存在を示していた。これら の電流パルスは、onset streamers もしくは burst-pulse streamers と呼ばれる一連の電子なだれ に相当すると考えられる¹⁷⁾。1.5 kV では電流は1 ×10⁻⁷Aに跳ね上がり、続いて安定且つ線形的に1 µA に向かって上昇する。この安定状態は quasi-steady current で特徴づけられるグローコロ ナモード^{16), 17)}を示している。図4は1.8 kV時の マイクロピペット電極先端のグローコロナの発 光写真である。数 um サイズの微小なグローコロ ナが先端部を覆っていることが観察された。今回 の印加電圧の範囲(<3.0 kV)では、スパークは起 きなかった。

図3のプロットbのプロファイルはプロットa と大きく異なる。800 V でプロットbの電流はす でに1×10⁻¹¹ A を超えている。安定した電流上昇 が250 s の 1.3 kV 以降に観察され、最終的にはプ ロットaと同じ値になる。2つのプロファイルの 違いは a-C:H 膜が放電の抵抗として機能し、1回 目の放電実験(プロット a)の最後には先端膜が 消失した状態になっていたことを示唆している。 実際、プロットbの電流プロファイルは a-C:H コ ーティング前の Ni-マイクロピペットの結果と同 様である。さらに考察すれば、プロットaにおけ る 1.5 kV 付近の電流ジャンプと a-C:H 膜の破壊 は何らかの関係があることが示唆される。



図3(a) a-C:Hコーティングされたマイクロピペット電極の典型的な放電電流の時間変化。印加電圧は +10 V/5 s でステップ上昇させた。(b) 同一のマイ クロピペット電極の2回目の放電結果。



図 4 マイクロキャピラリ電極先端に発生したグロ ーコロナによる発光。白点線は電極位置。



図 5 異なる 4 本のマイクロピペット電極の電流変 化と放電停止位置:1840 V (a)、1850 V (b)、1920 V (c)、2260 V (d)。

次に、電流ジャンプが含まれる1500Vから2500 V の間の数点で 電圧印加を停止し、それぞれの a-C:H 膜の状態を SEM で観察した。図 5 は停止 電圧がそれぞれ 1840 V (a)、1850 V (b)、1920 V (c)、 および 2260 V (d)の4本のマイクロピペット電極 の電流履歴である。図6は図5に対応したそれら 4本の SEM 像である。図 6a では、a-C:H 膜は多 少の不規則なパルス放電を経験したと考えられ るが、大きな損傷は認められない。。一方、安定 状態(~1 µA)への移行直後に停止した図 6b から は、a-C:H 膜が先端から約8 µm 除去されたことが 分かる。そして、電圧上昇と共に除去領域は躯幹 部に向かって拡大していく(図 6c・6d)。この境 界の移動はデジタル顕微鏡でリアルタイムに観 察することができた。膜の境界面は非常に平滑で あり、目立った突出部や窪みは観察されなかった (図 6e)。最終的には、膜は先端から約 40 µm の 位置まで失われ、境界部も平坦化した(図 6d)。

電極間隔は、今回設定した範囲においては、開 始電圧に有意な差をもたらさなかった(図 7)。 ここで、開始電圧とは電流が初めて  $1.0 \times 10^{-7}$  A に到達した時点の電圧として定義した。図 7 はま た PECVD の成膜条件にも開始電圧は左右されな いことを示している。特に、開始電圧と膜厚さ(成 膜時間が 120 min と 240 min)の間に有意な相間が ないことが示された。a-C:H 膜の構造の違い(パ ルス電圧–900 V と–450 V) についても、開始電圧 には影響がなかった。また、大気条件も影響を及 ぼさないことを確認した。



図 6 電圧印加後のマイクロピペット電極先端の SEM 画像。(a) - (d):図5の放電停止位置と対応し ている。(e):(c)の拡大図。

#### 4. 考察

実験結果は、直流コロナ放電がマイクロピペッ ト電極先端の a-C:H 膜の除去に有用であることを 示した。現時点で膜除去のメカニズムを厳密に説 明することはできないが、実験結果や文献を手掛 かりに推察することはできる。先ず、SEM 像から、 µA レベルへの電流ジャンプの前、すなわち安定 したコロナモード(グローコロナ)へ移行するま では、膜は初期状態を保つことが分かる(図 6a・ 6b)。別の見方をすれば、burst-pulse streamers は膜 に明確な損傷を与えない(ただし、判別できない 小さなクラックやホールが発生しているかもし れないが)。最初の膜消失の形態は、帯電した膜 の先端部分が電界中へ blast-off するようなものか もしれない。それは強い burst-pulse streamer と同 時に生じるとも推測される。

図 6b よりもさらに小さな除去面積(理想的に は先端断面のみ)の実現を目指し、開始電圧付近 で放電を停止させることを試みた。しかし、結果 的には図 6b と同様の、すなわち先端から 6-10 µm 領域の膜除去面積しか得られなかった。初期の膜 制御におけるこのような限界(ある意味では安定 性)は、除去メカニズムに起因した本質的な現象 かもしれない。最も強い電界が形成されている先 端において、膜の一部が即時的且つ断片的に飛び 出すことが想像される。しかし、我々の試行は検 証の一部であり、除去面積をこれ以上小さくでき る可能性を否定するものではない。より精密な印 加電圧の制御などで実現できる可能性もあり、今 後の課題とする。



図 7 a-C:H 成膜条件の異なるマイクロピペット電 極の放電時の電極間隔と開始電圧の関係。

初期除去の後、除去面積は軸方向に拡大し、あ る距離で収束しているように見える(図 6c・6d)。 この事実には先端からの距離が明らかに関係し ており、以下の2つの直接的要因があると考えら れる。一つは電界強度の効果である。帯電した a-C:H 膜の微細な一部が絶え間なく電界中へ放出 しているとすれば、これは特に凸部で顕著と考え られ、境界面が平滑化する効果を説明する。平滑 化の進行および先端から離れることで電界効果 が弱まり、膜除去の進行はある時点で停止する。 もう一つは熱の効果である。a-C:H 膜は熱酸化に よって変性することが知られる¹⁹⁻²²。膜質にも因 るが、大気中で初期変性は 500 K 程度から観察さ れ、約 670 K では著しく変化することが報告され ている¹⁵⁾。C-H 振動スペクトルが 873 K までの 加熱でほとんど消失したという報告もある²⁰⁾。 Haasz et al.²¹⁾は、473 K の酸素暴露条件で, polymer-like a-C:D 膜(Dは重水素)からCとDがD₂O、 CO₂、および CO ガスの形態で放出されることを 報告している。Maruyama et al.の研究²²⁾では、 polymer-like a-C:D 膜が大気中で 500 K 以上で加熱 された場合、膜厚とCとDの面密度が減少するこ とが示され、さらにCとDの初期原子損失率がイ オンビーム分析により求められた。一般に、熱酸 化による a-C:H 膜の変性は収縮を伴い、結果とし て膜の皺、クラック、剥離などが観察される。た だし、これらの現象は有限サイズの平基板で観察 されたものである。一方、本研究では円筒形状の (円周方向に境界を有しない)膜である故に、仮

に変性が生じても、皺、クラック、剥離などが現 れ難いのかもしれない。加えて、エッジ部の膜厚 の減少は熱酸化の特徴と一致しているため、熱酸 化の効果を考察すべきである。

熱酸化に関しては、温度が鍵となる。温度上昇 の要因として考えられるのは、放電電流によるジ ュール熱とプラズマからの熱伝導である。そこで、 ジュール熱による上昇温度 ΔT を推定してみる。 長さ1um、厚さ50nm、直径の1um、抵抗率6.9× 10⁻⁴ Ωm (bulk の値)の円筒形のニッケル層を電流 が1 µA で流れた時、ニッケル層全体の発熱量は 4.4×10⁻⁹Wと計算される。熱平衡を仮定すれば、 発熱量は大気中への放熱量(AhΔT)と等しくなる。 ここで、A は表面積、h は熱伝達率である。A = 3.9  $\mu m^2$  (円筒の側面と上端面) と  $h = 5.0 W/(m^2 K) \delta$ 用いると、ΔT = 220 K が得られた。ここで注意す べきは、選択された物性値の関係上、温度は低く 見積もられた可能性があることである。例えば、 薄膜のニッケルの抵抗率は、今回の bulk の値より も高いはずである。いずれにしても、ジュール熱 によって先端温度が数百 K になる可能性が示さ れた。他方、プラズマ自体の温度を予測するのは 容易ではない。Stoffels et al.¹⁸⁾は、数種類のガス雰 囲気での金属針先端のグローコロナ(ただし、本 研究より相当大きい sub-mm サイズ)の発光スペ

クトルを分析し、回転温度は高くても数百K、電 子温度は 0.2-0.3 eV であることを提示した。さら に、プラズマの実温度が熱バランスの結果として 低い(触れられるほど)ことを示した。この報告 を踏まえると、我々の場合でも、プラズマ温度は 予想以上に低いのかもしれない。しかし、先端の 温度上昇にいくらかは寄与しているのは疑いの 余地はなく、温度上昇は複合的要因による結果と 考えるべきであろう。

コロナ放電プロセスは印加電圧の極性に依存 する。負コロナであれば、初期の放電は burst pulse ではなく Trichel pulse である^{16,17)}。本実験では(示 さなかったが)、正と負の放電で、電圧電流プロ ファイルや膜除去に関して差はみられなかった。 この事実は上述した膜除去のメカニズムと矛盾 してはいない。つまり、帯電膜の電界中への脱離、 そして熱酸化は負の放電でも同様に起きうる現 象である。

開始電圧は電極間隔、膜厚、そして湿度などの 外界条件に影響されるという予想に反し、本実験 の範囲においては、有意なデータが得られなかっ た。膜厚差は開始電圧に影響を与えるほどの大き さではなかったのかもしれないし、膜の初期除去 のメカニズムが様々なパラメータの差を打ち消 すぐらい閾値が安定しているのかもしれない。む しろ、測定データは開始電圧がマイクロピペット 電極間で差があることを示したが、これは各々の 形状や表面状態の差に起因すると考えられる。た だし、開始電圧の差は深刻な問題ではない。電極 間で電圧電流プロファイルは類似しており、μA への電流ジャンプは必ず起こるため、グローコロ ナへの移行のタイミングを実際上見逃すことは ない。マイクロピペット電極を簡便且つ確実に作 製する上で、この点は非常に有益である。尚、こ の方法はマイクロピペット電極に限らず他の針 型電極でも有用であることは明らかである。先端 径もしくは曲率が多少異なったとしても、開始電 圧が観察されグローコロナが発生すると期待で きる。

#### 5. まとめ

細胞内イオン濃度の変化や膜受容時の細胞の 電位変化を調べるためには、インジェクションと 電位計測を同時に行えるデバイスが求められて おり、本研究では、両機能を有するマイクロピペ ット電極の作製に取り組んだ。マイクロピペット 電極は、ガラスマイクロピペットにニッケル、続 いて電気絶縁膜としての a-C:H をコーティングす ることで作製される。しかし、作製過程において 最大の課題は、電気絶縁膜の先端部での局所的除 去である。これは、電極すなわち金属面を露出さ せる目的とインジェクション用の先端穴を確保 する目的である。本研究では、コロナ放電を利用 した a-C:H 膜除去法を提案し、その有効性を調査 した。大気中で、a-C:H 膜がコーティングされた マイクロピペット電極に直流電圧を印加し、その 電圧を徐々に上げていくと、安定したグローコロ ナモードに移行する。その際、1.5-2.0 kV におい て μΑ レベルへの電流ジャンプが観察され、同時 に膜が除去された。除去される領域は先端から 6-10 µm と毎回安定した数値が得られたが、実際 の測定で許容される電極露出面積であるかは、細 胞計測と併せて今後調べていく必要がある。

#### 謝辞

本研究を進めるにあたり電気通信大学の奥山 直樹先生と山田幸生先生にはご助言を頂きまし た。ここに感謝の意を表します。本研究を援助し て頂いた財団法人中谷電子計測技術振興財団に は心より感謝の意を表します。

#### 参考文献

- W. Walz, *Patch-Clamp Analysis*, 2nd ed., (Human Press, Totowa, NJ, 2007).
- N. Kakuta, M. Watanabe, Y. Yamada, N. Okuyama, and K. Mabuchi, Rev. Sci. Instrum. 76, 075109 (2005).
- E. Abelev, N. Sezin, and Y. Ein-Eli, Rev. Sci. Instrum. 76, 106105 (2005).
- 4) K. Luo, Z. Shi, J. Lai, and A. Majumdar, Appl.

Phys. Lett. 68, 325 (1996).

- D. W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz, Appl. Phys. Lett. 44, 651 (1984).
- T. Saiki and K. Matsuda, Appl. Phys. Lett. 74, 2773 (1999).
- I. U. Vakarelski and K. Higashitani, Langmuir 22, 2934 (2006).
- P. Pochay, K. D. Wise, L. F. Allard, and L. T. Rutledge, IEEE Trans. Biomed. Eng. 26, 199 (1979).
- Y. Zhang, Y. Zhang, J. Blaser, T. S. Sriram, A. Enver, and R. B. Marcus, Rev. Sci. Instrum. 69, 2081 (1998).
- 10) J. V. Macpherson and P. R. Unwin, Anal. Chem. 72, 276 (2000).
- Y. Cao and G. G. Jiang, Rev. Sci. Instrum. 73, 3012 (2002).
- H. Yasuda, *Plasma Polymerization*, (Academic Press, New York, 1985).
- N. Maître, S. Camelio, A. Barranco, Th. Girardeau and E. Breelle, J. Non-Crystalline Solids 351, 877 (2005).
- 14) R. Goswami, T. Jana, and S. Ray, J. Phys. D: Appl. Phys. **41**, 155413 (2008).
- H. O. Pierson, Handbook of Carbon, Graphite, Diamond, and Fullerenes (Noyes Publications, New Jersey, 1993).
- 16) J.-S. Chang, P. A. Lawless, and T. Yamamoto, IEEE Trans. Plasma Sci. 19, 1152 (1991).
- M. Khalifa and M. Abdel-Salam, *The corona discharge*, (in M. Adbel-Salam, H. Anis, A. El-Morshedy, and R. Radwan eds., *High-Voltage Engineering: Theory and Practice*, Chap. 5, Marcel Dekker, Inc, New York, 2000).
- E. Stoffels, A. J. Flikweert, W. W. Stoffels, and G. M. W. Kroesen, Plasma Sources Sci. Technol. 11, 383 (2002).
- Y. Bounouh, M. L. Thèye, A. Dehbi-Alaoui, A. Matthews, and J. P. Stoquert, Phys. Rev. B 51, 9597 (1995).
- M. H. Kim and J. Y. Lee, J. Mater. Sci. 26, 4787 (1991).

- A. A. Haasz, S. Chiu, J. E. Pierre, and Y. I. Gudimenko, J. Vac. Sci. Technol. A 14, 184 (1996).
- 22) K. Maruyama, W. Jacob, and J. Roth, J. Nuclear Mater. 264, 56 (1999).

### 発表論文

 A) Naoto Kakuta, Naoki Okuyama, and Yukio Yamada: Removal of a hydrogenated amorphous carbon film from the tip of a micropipette electrode using direct current corona discharge, Review of Scientific Instruments 81, 025103 (2010).

B) 角田直人,秋山輝和,奥山直樹,山田幸生: マイクロキャピラリ電極によるグローコロ ナ生成とその応用,応用物理学会学術講演会 予稿集,16p-ZH-7 (2010).

# マルチ時間スケールな自律神経調整機能から観た 一人称視点映像効果の評価



研究責任者	新潟ナ	大学自	然科学	全系		
	教	授	木	竜		徹
共同研究者	新潟ナ	大学自	然科学	系		
	准教	教授	岩	城		護
新潟大学医苗	<b></b> 歯学系					
	助	教	飯	島	淳	彦

#### 1. はじめに

急速な視聴覚関連技術の展開と汎用化に伴い、 携帯デバイスによる一人称視点映像や3D映像に 代表される様に高臨場感を求めた映像にふれる 機会が多くなった。しかも、その様な映像は映像 制作のプロでなくとも比較的簡単に撮影できる。 さらに、今や制作した映像を誰でもインターネッ トで幅広く提示できるパーソナル・メディアの時 代である。しかし、高臨場感映像がもたらす視聴 効果の生体への影響が懸念され、様々な方面から 生体影響が調べられている。この10年、映像に 関する問題は、手振れのひどい映像を視聴した際 に、めまいや吐き気などが引き起こされたとの報 道が散見され、産業技術総合研究所では「映像の 生体安全性評価法の標準化」の研究が進んだ^[1]。 海外でも関連研究が盛んになり、移動体での運動 酔い(Motion Sickness) との類似性を手がかりに 映像酔い (VIMS: Visually Induced Motion Sickness)の原因解明、映像酔い評価の定量化の研究 報告^[2]、さらに、映像酔い評価に使われた自律神 経系調整の観点から映像酔い防止策の報告があ った^[3]。

映像酔いの発現メカニズムに関しては運動酔

いに関連した論文が多く^[4,5]、運動酔い(乗り物酔 い)は passive 動作での注視や姿勢の不安定が原 因であり、注視の安定化と前庭系の感度を抑える 慣れの訓練が効果的とある^[6]。Cybersickness とも 称される VIMS では、視覚系と体性感覚系で実際 の情報(real)と過去の経験から予期される情報 (virtual)との不一致によって引き起こされるとい う説があるが十分ではない。VIMS 評価の定量化 では心理的評価が先行した。これは、シミュレー タ酔いや遊園地のジェットコースターでの乗り 物酔いアンケート評価[7]が一般に受け入れられて 研究が進んだ事による。最近、VIMS に対する懸 念の広まりから、生体信号を計測して VIMS を評 価しようとする研究が報告される様になった^[8, 9]。 これは自律神経系の振る舞いから VIMS を評価し ようとするアプローチである。自律神経系の評価 法は幾つかあるが、R-R 間隔(RRI)時系列の変 動(心拍変動:HRV)の周波数パワーから求める 研究が多い。HRVには、呼吸に同期した約0.3Hz を中心にした呼吸性成分(HF 成分)と血圧調整 に関わる Mayer 波関連の約 0.1Hz の成分(LF 成 分) が顕著に含まれる^[10]。ここで、HF 成分は副 交感神経系を、LF 成分は交感神経系と副交感神経

系の両方を反映し、LF/HF は交感神経系指標の代 表として多くの応用が報告されている。VIMS 評 価でも映像酔いの被験者群において LF/HF が増 加したとの報告がある^[11]。しかし、心拍変動は呼 吸による影響を非常に大きく受けるとの報告が あり^[12]、呼吸を考慮した自律神経系の評価が必要 である。

ここでは、実験環境におけるストレスを排除し、 呼吸周期変動を考慮した自律神経系の評価手法 を提案する。さらに、運動酔いで指摘があった注 視や姿勢の不安定との関係を報告する。

#### 2. 方法

#### 2.1 一人称視点映像

映像酔いを引き起こすとされる検証済みの映 像(自然を背景とした荒野をマウンテンバイクで 下る2分間のブレの強い一人称視点映像^[13])で呼 吸の影響を探った。さらに、最近の携帯デバイス

(iPod Nano 5G)を頭部に付けて、自転車走行時 のブレのある一人称視点映像を撮影し、その2分 間の映像を用いた。視聴環境は約25m²の個室で あり、プロジェクター投影時の椅子と70インチ スクリーンとの距離は1.7m、映像の解像度は720 ×480ピクセル、フレームレートは30フレーム/ 秒である。

#### 2.2 生体情報計測

映像視聴時の視聴覚以外を原因とする生理的 生体影響を抑えるため、座位でビデオ視聴した際 の生体信号を計測した。具体的には、胸部双極誘 導で心電図、肺呼吸トランデューサを介して呼吸 波形をバイオアンプ(100C シリーズ、BIOPAC Systems)にて計測し、BIOPAC (MP-150、BIOPAC Systems)のLAN 接続機能を経由することで、被 験者にストレスを与えない環境で生体信号をモ ニターしながら、サンプリング周波数 1000Hz で ノートブック PC (CF-W4, Panasonic) に計測デ ータを収集した。さらに、生理的・運動学的生体 影響を探るため、携帯デバイスによる映像を座位 や立位で視聴した際の心電図、呼吸波形、左腓腹 筋筋電図、左前頚骨筋筋電図、重心位置を計測し た。表面筋電図及び姿勢動揺(センサ貼付部位の 動揺)の同時計測にはワイヤレスセンサ(Trigno Wireless, Delsys)を使用し、重心位置の計測には フォースプレート (Wii Balance Board, Nintendo) を使用した。 計測データは、 BIOPACK の I/O モジ ュール (UIM100C, BIOPAC) を経由して PC に記 録した。なお、心理的評価にはシミュレータ酔い 評価で標準的なアンケート (SSQ: Simulator Sickness Ouestionnaire) ^[7]を用いた。

(1) 呼吸統制実験

映像負荷なしの状態で、5分間の安静後、3分間の0.25Hz(呼吸周期4秒)呼吸統制、3分間の 安静、3分間の0.125Hz(呼吸周期8秒)呼吸統制、 最後に1分間の安静からなる計15分間の呼吸統 制実験を行った。被験者は男性4名(23.7±1.0歳) である。

(2) 映像視聴実験

バイク搭乗体感映像(BE: biking experience)に よる生体影響は数分から数 10 分の時間が掛かる ため、2 分間の映像を繰返し5 回提示し、計 10 分 間の映像とした。座位にて、この 10 分間の映像 視聴中と視聴前後の5 分間の安静時で生体情報を 計測し、視聴前後の安静時で SSQ 調査を行った

(図 1)。なお、被験者は 17 名(22.7±2.5 歳)、 映像の内容に関する事前の告知はしなかった。





#### (3) 撮影者による映像視聴実験

撮影者(21歳)を被験者とし、座位と立位で自 ら撮影した携帯デバイス映像(MD: mobile device)を視聴してもらった。なお、被験者には運 動習慣はない。実験シーケンスは体感ビデオ視聴 実験と同様(図1)である。さらに、視聴実験経 験のない被験者1名と視聴実験の経験はあるが この映像を初めて見る被験者3名にも実験に参加 してもらい、合計5名の男性(23.7±1.0歳)で 生体影響を生理的・運動学的側面から計測・評価 した。

#### 2.3 映像酔いの評価

#### (1) 生理的応答

自律神経系指標を推定するため、不等間隔とな る RRI 時系列に 3 次スプライン補間を施して等間 隔時系列とした後、映像のフレームレートである 30Hz でリサンプリングした。その上で、等間隔 RRI 時系列に対し連続 Wavelet 変換でパワースペ クトル推定し、オーバーラップなしの区間長 30 サンプル(1秒)毎に HF 帯域(0.15~0.45Hz) と LF 帯域(0.05~0.15Hz)でのパワー成分(HF, LF)の時系列を求めた(図2)。一方、呼吸周期 が長くなり RRI 時系列の LF 帯域内に含まれた場 合に LF が増加するとの報告がある^[12]。そこで、 LF/HF に含まれる呼吸の影響を抑えるために、呼 吸波形のパワースペクトル RESP を求め、RESP が最大となるピーク周波数 fresp 周辺の帯域

(fresp±0.05Hz) をタスク毎に追跡した。この fresp 周辺の帯域で RRI 時系列の HF 帯域を修正し、修 正 HF 帯域での RRI 時系列のパワーの平均値から 修正 LF/HF を求めた。加えて、時間領域の評価値 として RRI の標準偏差 (SDNN: Standard Deviation of the NN Intervals) と隣接した RRI の差の二乗平 均平方根(RMSSD: Root Mean Square Successive Differences)を算出した。なお、これらの指標は タスク(120sec)毎(図1)に推定した。

(2) 心理的応答

数 10 分の映像視聴前後で、映像酔いの症状(吐 き気や不快感)と関連があると考えられる SSQ の Nausea スコア Ns から映像視聴前後の差分値

 $( \angle N : N_{s,post} - N_{s,pre} )$ を求め、 $\angle N \ge 25$ の被験者を"酔い群"、 $\angle N < 25$ の被験者を"非酔い群"として群分けした。

#### 3. 結果

#### 3.1 呼吸統制実験

呼吸統制に伴う呼吸波形のパワースペクトル RESP 及び RRI 時系列のパワースペクトルから求 めた時間周波数構造は類似していた。図2は被験 者1名の例である。 そこで、RESP と RRI 時系列 のパワースペクトルにおいて HF 帯域と LF 帯域 の成分及び LF/HF の時系列の類似の程度を相関 係数で調べたところ、HF 成分で(0.18±0.20)、 LF 成分で(0.79±0.12)、LF/HF で(0.74±0.12) であった。その結果、LF 成分、LF/HF に比べ、HF 成分はほとんど類似しなかった。

図 3 は各呼吸周期の 180 秒間及び安静時の 180 秒間(図 2:480~660 秒)における HF, LF, LF/HF, LF/HF_{resp}の全被験者から求めた平均±SD である。 その結果、LF と LF/HF は、安静に比べて呼吸周 期 4 秒で低く、呼吸周期 8 秒で高い値を示した。 一方で、HF と LF/HF_{resp} は呼吸周期が変化しても ほぼ一定の値を示した。



図3 各呼吸周期でのHF, LF, LF/HF, LF/HF_{resp}

#### 3.2 映像視聴実験

被験者 17 名を酔い群 8 名、非酔い群 9 名に分類し、映像視聴中の各タスクで LF/HF、修正 LF/HF, RMSSD 及び SDNN の平均値を求めた(図 4)。 酔い群と非酔い群においてタスク間で1 要因分散 分析を行い有意差が見られたので、多重比較

(Turkey 法)を行った。なお、有意水準 1%で有意差ありとした。その結果、LF/HF では酔い群、

非酔い群ともにタスク間の変化は見られなかっ た。一方、修正 LF/HF を用いた場合、酔い群の T1 と T4 で有為な増加が見られたが、非酔い群で は変化が見られなかった。RMSSD では酔い群と 非酔い群ともタスク間の変化は見られなかった。 一方、SDNN では酔い群の T1・T2 と T4 のタスク 間で有意な増加が見られたが、非酔い群のタスク 間の変化は見られなかった。





図4 酔い群と非酔い群でのタスク毎の映像酔いの評価値の推移

バイク搭乗体感映像と携帯デバイス映像の pan 方向の動きベクトル(動きベクトルの推定法は文 献^[13]を参照)それぞれを図 5、図 6 に示す。バイ ク搭乗体感映像では(0.3~2.0Hz)の周波数帯域 が顕著であったのに対し、携帯デバイス映像では (0.5~1.0Hz)の周波数帯域が顕著であった。



(a) 動きベクトル

(b) 動きベクトルの時間周波数構造



図5 バイク搭乗体験映像の pan 方向の動きベクトル

図6 携帯デバイス映像の pan 方向の動きベクトル

全被験者の∠Nのスコアを図7に示す。その結 果、バイク搭乗体感映像(BE)では、5名中2名 が酔い群に分類されたのに対し、携帯デバイス映 像(MD)では、座位と立位での視聴で5名中3 名が酔い群に分類された。また、被験者全体の平 均値では、バイク搭乗感映像よりも携帯デバイス 映像での∠Nのスコアが低く、座位での視聴より も立位での視聴での∠Nのスコアが低かった。





(b) 映像毎の平均値

図7 各映像の∠Nスコア

携帯デバイス映像で、酔い群と非酔い群の各 1 名の左右方向の重心位置(COP: Center Of Pressure)の時間変化と時間周波数構造をそれぞれ図 8、 図 9 に示す。その結果、酔いを起こした被験者で は、0.2Hz を中心とした成分が多く見られたのに 対し、酔いを起こさなかった被験者では0~0.1Hz の成分が多く見られた。



図9 左右方向の重心位置の時間周波数構造

被験者を酔い群の1名として、T4(図8(a))に おける重心位置と筋電図を図10に示す。その結 果、腓腹筋が活動した際に重心位置が左から右に 移動する傾向が見られた。一方で、前頚骨筋の活 動と重心位置との関係は見られなかった。



#### 4. 考察

安静時の副交感神経活動による変調は HRV の HF 成分に現れ、HF 成分の増加は副交感神経活動 の顕著化を意味した。しかし、運動によって呼吸 周期変動の帯域は変化する。呼吸統制実験による と、呼吸が HRV に大きく影響を与えていること がわかる。ここで、HRV の HF 成分が副交感神経 活動を反映するとされる。しかし、これは呼吸に よる影響が HF 帯域内に含まれる場合であり、呼 吸統制や運動を行った場合、呼吸の影響は HF 成 分ではなく他の帯域に現れる。

0.125Hz で呼吸統制を行った際に(3.1)、LF 帯 域内にゆっくりとした呼吸周期が含まれること により、LF/HF が増加した(図3)。運動後の回復 を HRV から評価するには周波数帯域を限定した HF 成分に比べ帯域を限定しない RRI の分散など が自律神経活動を反映しているとの報告がある ^[14]。そこで、呼吸波形のパワースペクトルから求 めたピーク周波数 fresp 帯域を追跡し、呼吸によ る影響を考慮した修正 LF/HF を提案した。その結 果、強制的な呼吸による影響としての LF/HF の増 加が修正 LF/HF で見られなくなった(図4)。な お、LF/HF と修正 LF/HF の差は、呼吸周期変動が HF 帯域内に含まれる 0.25Hz の呼吸統制下に比べ、 安静時や 0.125Hz の場合に大きかった。この様に 呼吸の周波数が LF 帯域内に含まれる場合は、呼 吸の影響を非常に大きく受けるため、呼吸を考慮 した評価を行わなければならない。

これを踏まえて、映像視聴実験では呼吸統制を 行わずに自然呼吸とし、修正 LF/HF を用いて映像 酔いの評価を行った。また、 LAN 接続ユニット を使用して実験ストレスの軽減を図った。その結 果、 LF/HF は映像酔いの有無に関係なく増加し たのに対し、修正 LF/HF は映像酔い群のみで有意 に増加した。SSQ の結果とも一致することから、 修正 LF/HF は映像酔いを評価する有効な手法で あると考える。

運動後の副交感神経亢進の効果が示唆されて いる^[14]ことから、呼吸周期変動に大きく影響する のは運動であろう。しかも、視聴前での事前運動 が映像酔い防止に効果があったとの報告がある^[3]。 ここで、事前運動の効果は運動時の交感神経亢進 後に呼吸を落ちつかせる副交感神経亢進への切 り替わりを促す効果ではないだろうか。また、注 視実験で注視しているほど頭を動かし注視と姿 勢が不安定だと酔いの症状が出るが^[6]慣れること

で酔いを回避できたとある^[15]。そこで、映像酔い における事前運動と慣れとの関係を解明するた め、立位で交感神経亢進とした上で映像酔いスコ アの高い被験者の頭部動揺を調べた。視聴実験に おける映像以外の環境ストレスをコントロール したが、映像酔い防止策に役立つポイントが見つ かる様な結果には至らなかった。しかし、身体動 揺は運動酔いの原因とも考えられており、被験者 の日常習慣及び映像酔いのある映像の特徴(映像 酔いが発生し易い映像はブレがあり、そのブレを バイク搭乗体感映像で動きベクトルの周波数で 調べると(0.3~2.5Hz)の周波数帯域であった^[13])。 また、運動酔いでの頭部動揺との関係^[6]から映像 酔いを評価するには、神経筋活動と姿勢動揺の同 時計測可能なワイヤレスセンサの適正な貼付位 置の更なる検討が必要である。それによって、適 正な酔い防止策の提案をすることが今後の課題 である。

#### 5. まとめ

呼吸による自律神経系への影響を評価するた めに異なる周波数での呼吸統制実験を行った。そ の結果、呼吸の変動周波数が低い場合において、 LF 帯域への呼吸の影響を確認した。また、自然 呼吸下において呼吸による影響を除去するため に、呼吸を考慮した手法を提案した。修正 LF/HF とRRIの時間領域の評価指標を用いて映像酔いの 評価を行った結果、映像酔いの被験者群に明らか な変化が見られた。また、映像酔いの防止策を映 像酔いの原因とされる身体動揺から調べたとこ ろ、関連はありそうであるがさらなる調査が必要 であった。今後、携帯デバイスによる一人称視点 映像を含む高臨場感映像が多くなってきている ことから、高臨場感映像の生体影響を視聴覚だけ でなく身体性の評価とあわせた研究が必要と考 える。

#### 謝辞

3D が一般化する環境が整い勢いがついた 2009 年から 10 年に本研究を進めることができ、幾つ かの新たな知見を得ることができました。ここで の成果はリアルとバーチャルな環境が及ぼす高 臨場感効果や影響を実際に計測・評価する新たな 手がかりを示したもので、本研究の実験システム 及び実験等は中谷電子計測技術振興財団第 25 回 研究助成の支援を頂戴して行ったものである。こ こに深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 氏家弘裕,鵜飼一彦,斉田真也,映像酔いに対する運動パタンと映像コンテンツの影響.日本バーチャルリアリティー学会論文誌,2004.9(4):
   p.377-386.
- 2)Section, S., The First International Symposium on Visually Induced Motion Sickness, Fatigue, and Photosensitive Epileptic Seizures (VIMS2007). Appl Ergon, 2010. 41(4): p. 491-521.
- 3)蘇日塔拉図,外山寛,小杉剛,木竜徹,林豊彦, 飯島淳彦,前田義信,山崎健,事前運動と映像注 視が映像酔いおよび心拍に与える影響.日本生 体医工学論文誌,2010.48(1): p. 95-105.
- 4)Bles, W., et al., Motion sickness: only one provocative conflict? Brain Res Bull, 1998. 47(5): p. 481-7.
- 5)Golding, J.F., Motion sickness susceptibility. Auton Neurosci, 2006. 129(1-2): p. 67-76.
- 6)Bouyer, L.J. and D.G. Watt, "Torso rotation" experiments; 2: Gaze stability during voluntary head movements improves with adaptation to motion sickness. J Vestib Res, 1996. 6(5): p. 377-85.
- 7)Kennedy RS, L.N., Berbaum KS, Lilienthal MG, Simulator Sickness Questionnaire: An Enhanced Method for Quantifying Simulator Sickness. The International Journal of Aviation Psychology, 1993.
  3(3): p. 203-220.
- 8)Kim, Y.Y., et al., The Application of Biosignal Feedback for Reducing Cybersickness from Exposure to a Virtual Environment. Presence, 2008. 17(1): p. 1-16.
- 9)Reavley, C.M., et al., Genetic influences on motion sickness susceptibility in adult women: a classical

twin study. Aviat Space Environ Med, 2006. 77(11): p. 1148-52.

- 10)早野順一郎,安間文彦,自律神経と心拍変動. 医学の歩み,2001.98(4): p. 285-290.
- 11)Himi N, Koga T, Nakamura E, Kobashi M, Yamane M and Tsujioka K, Differences in autonomic responses between subjects with and without nausea while watching an irregularly oscillating video, Autonomic Neuroscience.2004. 116(1-2): p. 46-53.
- 12)大須賀恵美子,映像酔い発症時の自律神経指 標変化について.生体・生理シンポジウム論文 集,2009: p. 315-316.
- 13)野村恵里,木竜徹,中村亨弥,飯島淳彦,板東 武彦,生体信号から推定した映像酔いとそのき っかけとなった映像の動きベクトルの特徴.電 子情報通信学会論文誌,2006. J89-D(3): p. 576-583.
- 14)Goldberger, J.J., et al., Assessment of parasympathetic reactivation after exercise. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 290(6): p. H2446-52.
- 15)Takahashi, M., K. Watanuki, and T. Ikeda, Sensation and action during active and passive movement. Acta Otolaryngol, 1999. 119(2): p. 121-5.

#### 発表論文

- 1)外山 寛,木竜 徹,岩城 護,飯島淳彦:" 自律神経系指標の時間推移からみた映像酔いの 評価",電子情報通信学会技術研究報告, MBE2009-93, pp.85-90(平 22-1) 2010.
- 2)飯島淳彦,小杉 剛,木竜 徹,長谷川功:"視覚 刺激に対する瞳孔径・瞳孔反応とストレス 評 価",生体・生理工学シンポジウム,第 25 回生 体・生理工学シンポジウム論文集,pp.101-102(平 22-9) 2010.
- 3)小杉 剛,飯島淳彦,木竜 徹:"高臨場感映像の ダイナミクスが心拍変動に与える影響の評価法 に関する検討",生体・生理工学シンポジウム, 第 25 回生体・生理工学シンポジウム論文集, pp.103-104(平22-9)2010.

#### 石英系ガラス平面光波回路を用いた生体計測用反射型屈折率センサの開発



研究責任者

香川大学工学部信頼性情報システム工学科 ※(旧)群馬大学大学院工学研究科 准教授 丸 浩 一 群馬大学大学院工学研究科 共同研究者

教授藤井雄作

#### 1. はじめに

屈折率センサは、分析化学、バイオ技術、環境 分析などの幅広い分野において重要な役割を果 たす。バイオ技術分野としては、医療診断、医薬 品開発、食品分析などの分野での応用が期待でき る。また、生体の血中や体液中に存在するグルコ ース等の物質濃度等を測定するためにも、屈折率 の高精度計測が有望である。これまで、様々な方 式の屈折率センサが提案され、実用化もされてい る。今後、臨床現場など現場での計測用途への幅 広い普及のためには、高精度化もさることながら、 センサの小型化、低価格化、測定の迅速・簡便化 が必須である。

このような屈折率計測として、光波を用いた方 式が有望である。これまで、屈折率センサとして、 表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance)を用いた方法^{1)~3)}、ファブリ・ペロー 干渉計を用いた方法⁴⁾、フォトニック結晶の共振 波長変化を用いた方法 5)、光ファイバを用いた方 法^{6)~8)}などが報告されている。ファブリ・ペロー 干渉計を用いたものは、干渉計内に充填した液体 を通過する光波の位相を測定する。干渉長を十分 長くすることにより、高分解能を得ることが出来 るが、位相情報は2πrad 周期で折り返されるため、

屈折率の絶対値を見積もることが困難であった。 光ファイバを用いたものは、SPR に基づくファイ バ型バイオセンサ、長周期グレーティングを用い たものなどが報告されており、光伝送路自身をセ ンシングに用い、光源・検出系を分離できる。し かしながら、これらのファイバ型センサは、大型 な光学系を持つ卓上のセンサに比べ測定感度が 落ちることが課題であった。SPR センサや、フォ トニック結晶の共振波長変化を用いたものは、非 常に少量の試料で測定可能である。しかし、これ らの方式の多くは、吸収波長や共振波長を測定す るものであり、反射光や透過光のスペクトル強度 分布を高精度に測定することが必須である。この ように、センサ本体の外部に光スペクトラムアナ ライザ等の大掛かりな測定系が必要であり、外部 測定系の精度に屈折率測定精度が大きく左右さ れる。この外部測定系の制限により、原理的には 高分解能が期待できる方式もあるものの、実際に 10⁶ オーダ程度の高屈折率分解能を実現すること は困難であった。また、光ファイバを用いた方式 以外では、主に光波の入力・出力に空間光学系を 用いており、小型にすることが困難であった。更 に、高分解能な特性を得ようとすると、屈折率測 定範囲が狭くなってしまう問題があった。

本研究では、高精度、広い屈折率測定範囲、大 掛かりな外部測定系が不要、リアルタイム計測可 能、という特徴を併せ持つ、石英系ガラス平面光 波回路⁹⁰を用いた on-chip 生体計測用屈折率セン サの実用化を目的とした技術開発を行う。第2章 では、屈折率精密計測のための新たな光学系コン セプトの一つ目として、反射型屈折率センサの検 討結果を述べる。第3章では、反射型屈折率セン サの原理検討として、位相測定原理実験の結果を 述べる。第4章では、新たな光学系コンセプトの 二つ目として、透過型屈折率センサの検討結果を 述べる。第5章では、測定対象液体を充填するための溝構造の最適化設計の検討結果を述べる。

#### 2. 反射型屈折率センサ

#### 2.1 原理

図1に、本研究で提案する反射型屈折率センサ の構成を示す。本構成では、屈折角変化による粗 測定と位相変化による精細測定の組み合わせに より、屈折率の絶対値を高精度に測定するもので ある。



図1 反射型屈折率センサのコンセプト

屈折率絶対値は、楔状のセルに液体試料を充填 し、試料を透過した光波の屈折角を測定すること により広い屈折率範囲において測定できる。しか し、この方法を単体で用いた場合、センサを小型 化しようとすると、高精度な特性の実現が難しい。 一方で、光波干渉計を用いて、試料を通過する光 波の位相変化(光路長変化)を測定することによ り、高分解能な屈折率測定が可能となる。しかし、 この方法では、広い屈折率測定範囲での屈折率絶 対値の判定が困難である。

提案する構成は、これらの利点を組み合わせる ことにより、小型かつ広い屈折率測定範囲におい て屈折率絶対値を高精度測定するものである。す なわち、楔状の試料充填セルを用いて、屈折角の 変化と、試料充填セル通過による位相変化を同時 にもたらす。

試料セル、レンズ及びハーフミラーからなる測 定パス、ならびに参照パスからなるマイケルソン 干渉計の構成とする。レーザからの光は、カプラ により分岐される。分岐された一方の光は、測定 パスを通過し、ハーフミラーで一部を反射後、再 び測定パスを通過する。もう一方の光は、シング ルモード導波路からなる参照パスを伝播後、ミラ ーで反射され、再び参照パスを通過する。測定パ スと参照パスを通過した光の干渉により、試料充 填セルでの光波の位相変化をフォトダイオード (PD)の受光強度変化として測定する。

屈折角の変化は、試料充填セル透過後にレンズ を用いて集光し、ハーフミラーを透過した光波の 集光位置を、電荷結合素子(CCD)または PD を並 ベたリニアイメージセンサにより測定し、屈折角 の変化に比例した位置変化として測定する。イメ ージセンサの各要素での受光強度と PD 受光強度 の測定結果を解析することで、楔形溝に充填した 液体の屈折率絶対値を高精度に測定することが 可能となる。

本構成では、イメージセンサと PD の受光強度 を直接パーソナルコンピュータ (PC) 等で解析処 理することにより、高精度な光スペクトラムアナ ライザなどを用いた大掛かりな測定装置を外部 に用いる必要が無く、簡便な系で測定が可能とな る。また、イメージセンサ及び PD における受光 強度情報を用いて瞬時に屈折率を測定できるた め、リアルタイムな計測が出来る。

#### 2.2 平面光波回路設計

図1で示したような光波干渉計には、これまで に空間光学系を利用した構成が広く用いられて いる。このような構成では、高性能の個別部品を 用いることにより高精度の干渉計を実現し易い が、各構成部品が高価となり、また、定盤上に組 み立てるため巨大となってしまう。また、光学系 の光路が長くなってしまうため、温度変化や振動 等の外乱に弱い問題がある。そこで、このような 計測装置に用いられる光学系としては、高精度な まま小型化することが望まれる。

高機能な光学系を小型化する方法として、Si 基 板やガラス基板上に石英系ガラス光導波路を形 成した、平面光波回路(PLC; Planar lightwave circuit)⁹⁾が期待できる。平面光波回路は、光通 信用途に既に広く用いられており、様々な機能を 持つ光エレメントを一括形成可能、光部品点数の 減少により信頼性が向上、平面的な構成を基礎と した他の光回路や部品と集積化が容易、などの利 点がある。そこで本研究では、二番目のコンセプ トとして、屈折率センサ本体の光学系として平面 光波回路を利用した on-chip で屈折率計測が可能 な光学系構成を提案する。

図2に平面光波回路を利用した反射型屈折率センサの例を示す。測定パスは、レンズとして動作 するスラブ導波路及びアレイ導波路回折格子

(AWG; Arrayed waveguide grating) により構成される。スラブ導波路の途中に、測定対象の液体を 充填するための楔形溝を形成する。楔形溝の容量 は非常に小さい(数百 nl 程度)ため、微量の液体 の屈折率測定が可能となる。



図2 平面光波回路を利用した反射型屈折率センサ

#### 2.3 位相計測方法

屈折率を高精度に測定するためには、測定パス と参照パスの位相差を高精度に測定する必要が ある。図3に、位相測定精度を向上した反射型屈 折率センサの構成を示す。本構成では、90度ハイ ブリッド回路を利用している。90度ハイブリッド 回路の2出力からの光パワーは、位相変化により 90度シフトして出力される。本構成では、これら の2出力からの光パワーを、二つのPDで受光す る。このため、図2のような PD をひとつのみ用 いた構成に比べ、より高精度に位相を測定するこ とができる。本構成による反射型屈折率センサの 設計パラメータ例を表1に示す。本方法によると、 二つの PD の光パワーから求められた位相の分解 能は1度以下とすることが可能であり、本設計パ ラメータでの屈折率分解能は1×10⁻⁶ と見積もら れる。また、屈折率測定範囲は1.0 から2.0 と見 積もることができる。



図3 90 度ハイブリッド回路を用いた構成

出力スラブ導波路焦点距離	50 mm
楔型溝の開き角度	30°
イメージセンサの素子間隔	15 μm
イメージセンサの素子数	1400

表1 反射型屈折率センサ設計パラメータ

もうひとつのアプローチとして、ヘテロダイン 光波干渉計の応用が有望である。図4にヘテロダ イン光波干渉計を利用した反射型屈折率センサ の構成を示す。ヘテロダイン方式の光源として、 2 周波レーザを用いる。直交する2つの異なる周 波数を持つ偏波は、偏波ビームスプリッタ (PBS; Polarization beam splitter)により測定パスと参照パ スに分岐される。ここで用いられる導波路型 PBS には、いくつかの方式が提案されている^{10)~12)}。 測定パスと参照パスを通過した光波は、PBS によ り再び合波され、これらの光波のビート信号を PD1 で検出する。PD2 で検出されたビート信号と の位相比較を行うことにより、測定パスの位相を 高精度に行うことができる。



図4 ヘテロダイン干渉計を用いた構成

#### 3. 反射型屈折率センサの位相測定原理実験

本章では、第2.3節で述べた反射型屈折率セン サの位相測定に使用される光学系の検討結果を 述べる。

反射型屈折率センサの位相測定のための原理 検討を行うため、バルク光学部品と微動ステージ を組み合わせた原理確認用測定系を試作し、原理 検証実験を行った。図5に、実験で用いた光学系 を示す。本光学系では、90度ハイブリッド回路を 用いる代わりに、直交する偏波間の位相を 90度 シフトさせることにより、90度位相シフトを実現 する。この光学系では、直交する2偏波を、それ ぞれ微動ステージを経由する測定アームと参照 アームに分岐・伝播させ、偏光子を通過させるこ とにより信号光と参照光を干渉させた後、PD で 干渉光の光強度を測定する。このとき、一方の偏 光子の手前に λ/4 波長板を挿入することで、一方 の参照光の位相を 90 度ずらし、90 度ハイブリッ ド回路と同様の効果を得る。光源としては、波長 632.8 nm の He-Ne レーザを用いた。本測定系によ り、微動ステージの変位を、周波数カウンタによ り測定した光強度のフリンジ数から求めた。





(b) 光学系の概観写真

図5 実験に用いた光学系

図6に、光学系を用いて測定した微動ステージ の変位の測定結果を示す。横軸は、微動ステージ に取り付けたバーニアスケールによる変位測定 値としている。光学系による測定結果とバーニア スケールによる測定結果はほぼ一致し、今回検討 した 90 度位相シフトを用いた光学系の効果を実 証できたと考える。光学系での測定値とスケール での測定値の差は平均値 0.12 mm、標準偏差 0.06 mm であり、主にバーニアスケール読み取り時の 誤差によるものと考えられる。

本実験では、光強度のフリンジ数を周波数カウ ンタによりカウントすることで変位量を求めた ため、変位の測定精度は波長オーダと見積もられ る。2 個の PD から出力される光強度信号は、90 度ずれているため、2 個の PD で得られた光強度 波形から位相を導出することが可能である。



図6 微動ステージ変位の測定結果

#### 4. 透過型屈折率センサ

第2章、第3章で提案した反射型の構成を用い た場合、反射面の平坦性が特性に大きく影響する ことが予測される。そこで、よりプロセス誤差に 強い構成として、透過型構成による屈折率センサ を検討した。

本章では、本研究において提案した透過型構成 による屈折率センサの構成及び原理を述べる。ま た、提案する屈折率センサの特性を検討するため の解析モデルの導出結果、ならびに、解析モデル を用いて実施した屈折率センサの特性シミュレ ーション結果を述べる。

#### 4.1 原理

図 7 に、提案する透過型屈折率センサを示す。 第2章で述べた反射型屈折率センサの場合と同様 に、測定対象の液体を充填するための楔形溝を伝 播する光の屈折角変化を利用し、ビームの集光位 置の変化を観測する。



図7 透過型屈折率センサ

従来のビームの集光位置の変化のみを観測す る方法の場合、高精度を得るには、屈折後の光路 長を大きくする必要があり、測定精度と寸法がト レードオフの関係にあった。

一方で、屈折後のビームでは、楔形溝に充填し た液体の屈折率が変わると、集光位置が変化する ことのみならず、屈折率の変化による位相変化も 生じている。提案する方法では、ビームシフトの 測定と同時に、この屈折率変化による位相変化も 検知することにより高精度化を実現する。この方 法として、図7に示す透過型屈折率センサでは、 屈折後のビームを単一のアレイ導波路からのブ ロードな出力光(以下、ブロード光と呼ぶ)と干 渉させる。この干渉により、楔形溝に充填した液 体の屈折率が変わると、出力側スラブ出力端での 電界分布が単にシフトするだけで無く、ブロード 光との位相差に応じた大きな変化が生じる。すな わち、屈折率変化による位相変化も検知できる状 態となる。これによって、単にビームの集光位置 を測定する方法に比べ、小型かつ鋭敏に屈折率を 測定できる。

測定精度向上のため、提案する構成では次の工夫 を取り入れた。

(1) 入力導波路を少なくとも2本用い、出力側ス ラブの出力端においてブロード光と干渉すると きに、集光位置でのブロード光を基準とした相対 的な位相が 90 度ずれるように入力側で位相調整 する。これらの入力導波路からの集光を観測する。 二つの入力導波路からの集光に対応するパワー を比較することにより、位相測定精度を向上する。 (2) 屈折率変化に対する屈折角変化が小さい場合、 位相変化を大きくして測定精度を向上しようと すると、集光したビームの位置はあまり変化せず に位相のみ大きく変化することになる。集光した ビームはブロード光と干渉させるため、ビームシ フト量が小さいと、同一出力導波路からの出力パ ワーの増減が繰り返される。すなわち、集光した ビームの絶対位置を測定することが難しくなる ため、屈折率絶対値の判定が困難となる。この困

難を回避するため、二つの入力導波路それぞれに ついて、集光位置でのブロード光を基準とした位 相が等しくなる入力導波路をもう一組設ける。こ のとき、屈折率変化により一方の入力導波路から のビームがある出力導波路に近づく場合、もう一 方の入力導波路からのビームは別の出力導波路 から遠ざかる位置となるように、入力導波路接続 位置を調整する。ブロード光を基準としたこれら の入力導波路からの光の位相は等しいため、二つ の出力導波路におけるパワーを比較することで、 集光ビームの絶対位置の概算値を測定すること ができる。

(1)は位相変化測定による屈折率相対値の高精 度測定、(2)は集光ビーム位置測定による屈折率絶 対値の概算値測定とみなすことができる。入力導 波路を4本接続し、これらの方法を同時に使用す ることで、屈折率絶対値を高精度に測定すること が可能となる。

#### 4.2 解析モデルの導出

提案する透過型屈折率センサの特性を検証す るため、解析モデルを導出した。図7において、 入力側スラブ及び出力側スラブの焦点距離をそ れぞれ $z_a$ 及び $z_b$ 、スラブ導波路接続部でのアレイ 導波路間隔をd、m 番入力導波路( $0 \le m \le 3$ )の 入力側スラブへの接続位置を $x_m$ 、n 番出力導波路 の出力側スラブへの接続位置を $y_n$ とする。スラブ 導波路の等価屈折率を $n_s$ 、波数を $k_s$ とする。入力 側スラブの入力端から距離 $z_{t1} \sim z_{t2}$ の位置に、測定 対象である液体(屈折率 $n_t$ )を充填するための溝 を配置する。溝の開き角は $\theta$ とする。

(1) 入力側スラブ

一般に、AWG に用いられる均一なスラブ導波 路では、スラブ導波路の出力端では、近軸光線近 似の下、入力端電界分布のフラウンホーファー回 折像が現れる¹³⁾。しかし、本屈折率センサに用い られる入力側スラブには、途中に測定対象となる 液体を充填した溝が形成されており、平面内で均 一な訳ではない。そこで、入力側スラブ内の光波 伝播に関しては、フレネル近似を用いた解析を行 う。

入力側スラブに接続した m 番入力導波路の入 カモード分布を $u_{in}(x-x_m)$ とおく。ここでxは入力

側スラブ導波路の入力端に沿う座標を表す。すべ ての入力導波路からの入力電界分布は、m 番入力 導波路からの光の複素電界振幅 Emを用いて

$$u_1(x) = \sum_{m=0}^{M-1} E_m u_{in} \left( x - x_m \right)$$
(1)

と表される。溝直前における電界分布は、u₁(x)の 2次元フレネル回折像として、

$$u_{2}(x) = \sqrt{\frac{jk_{s}}{2\pi z_{t1}}} e^{-jk_{s}z_{t1}} u_{1}(x) * g_{t1}(x)$$
(2)

と求められる。ここで $g_{\alpha}(x)$ を

$$g_{\alpha}(x) = e^{-jk_s \frac{x^2}{2z_{\alpha}}}$$
(3)

と定義している。光は、測定物体である液体を挿 入した溝を通過した後、位相シフトし、x に応じ て k_sΔθx だけ位相が傾斜する。ここで、

 $\Delta = (n_s - n_t)/n_s$ とおいた。溝を伝播した後の光の 電界分布は、

$$u_{3}(x) = \frac{jk_{s}}{2\pi} \sqrt{\frac{1-\Delta}{z_{t1}z_{t2t1}}} e^{-jk_{s}(z_{t1}+(1-\Delta)z_{t2t1})} e^{jk_{s}\Delta\theta x} u_{1}(x) * g_{t1}(x) * g_{w}(x)$$
(4)

と求められる。ここで、 $z_{t2t1} = z_{t2} - z_{t1}$ 、 $z_w = (n_s/n_t)z_{t2t1}$ =  $[1+\Delta/(1-\Delta)]z_{t2t1}$ 、及び、 $k_t = (n_t/n_s)k_s$ とおいた。

アレイ導波路手前での電界分布 u₄(x)は、u₃(x)のフ レネル回折像として次式で求めることができる。

$$u_{4}(x_{0}) = \sqrt{\frac{jk_{s}}{2\pi[z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} e^{-jk_{s}(z_{a} - \Delta z_{t2t1})} e^{jk_{s}\frac{z_{at2}[z_{t2} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}](\Delta \theta)^{2}}{2[z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} (5)$$

$$\cdot e^{-jk_{s}\frac{x_{0}^{2}}{2[z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} e^{jk_{s}\frac{[z_{t2} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]\Delta \theta x_{0}}{z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} \int_{-\infty}^{\infty} u_{1}(x_{1}) e^{-jk_{s}\frac{x_{1}^{2}}{2[z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} e^{jk_{s}\frac{(x_{0} + z_{at2}\Delta \theta)x_{1}}{z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} dx_{1}$$

ここで、 $z_{at2} = z_a - z_{t2}$ とおいた。実際には、アレイ 導波路の出力端は円弧上に配置されているため、 光がアレイ導波路に入力する際、位相は $k_x^2/(2z_a)$ 

だけ補償されることになる。このことを考慮する と、アレイ導波路の入り口での光の電界分布は、 次式のようになる。

$$u_{4}'(x) = \sqrt{\frac{jk_{s}}{2\pi[z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} e^{-jk_{s}(z_{a} - \Delta z_{t2t1})} e^{jk_{s}\frac{z_{at2}[z_{t2} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}](\Delta\theta)^{2}}{2[z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} (6)$$

$$\cdot e^{j\frac{k_{s}x^{2}}{2}\left(\frac{1}{z_{a}} - \frac{1}{z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}}\right)} e^{jk_{s}\frac{[z_{t2} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]\Delta\theta x}{z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} \int_{-\infty}^{\infty} u_{1}(x_{0}) e^{-jk_{s}\frac{x_{0}^{2}}{2[z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}]}} e^{jk_{s}\frac{(x + z_{at2}\Delta\theta)x_{0}}{z_{a} + \Delta/(1 - \Delta)z_{t2t1}}} dx_{0}$$

u₁(x)の分布が十分狭い範囲に局在しており、かつ u'₄(x)は次式のように近似できる。  $n_t$ の値が $n_s$ と比べて大きくは異ならない場合、

$$u_4'(x) \cong \frac{\hat{k}(\Delta)}{2\pi} e^{jk_s \frac{z_{t_2} \Delta \theta x}{z_a}} \int_{-\infty}^{\infty} u_1(x_0) e^{jk_s \frac{x_0(x+z_{at_2} \Delta \theta)}{z_a}} dx_0$$
(7)

ここで

$$\hat{k}(\Delta) = \left(1 - \Delta \frac{z_{t2t1}}{2z_a}\right) \sqrt{\frac{j2\pi k_s}{z_a}} e^{jk_s \frac{-2z_a(z_a - \Delta z_{t2t1}) + z_{at2}z_{t2}\Delta^2 \theta^2}{2z_a}}$$
(8)

とおいた。ここで、 $\hat{k}$ の位相項は溝とスラブ導波 路の屈折率が異なることによる位相シフト、(7) 式の積分の前の位相項は溝の楔形状によるイメ ージに生じる位相傾斜を表す。

(2) 出力側スラブ

出力側スラブの出力端における電界分布は、研 究代表者らの研究¹⁴におけるものと類似の方法 にて、以下のように導出できる。 i 番アレイ導波路に結合した光の振幅  $P_i$ は、  $u'_4(x)$ とスラブ導波路-アレイ導波路境界でのi番 アレイ導波路のモード分布  $u_a(x'-id)$ のオーバーラ ップ積分により求められる。アレイ導波路の像分 布 $f_a(x)$ はxについてモード分布 $u_{in}(x)$ に比べてゆっ くりとした変化である。したがって、 $f_a(x)$ はモー ド分布  $u_{in}(x)$ の範囲において一定値と近似できる。 この場合、 $P_i$ は

$$P_{i}(\Delta) = \hat{k}(\Delta) \sqrt{\frac{z_{a}}{j2\pi k_{s}}} e^{jk_{s}z_{a}} e^{j\frac{k_{s}idz_{t2}\Delta\theta}{z_{a}}} U_{in}(\frac{z}{z_{a}}(z_{at2}\Delta\theta + id)) \sum_{m=0}^{M-1} E_{m}f_{a}(x_{m} + z_{t2}\Delta\theta) e^{jk_{s}\frac{x_{m}z_{at2}\Delta\theta}{z_{a}}} e^{j\frac{k_{s}idx_{m}}{z_{a}}} (9)$$

と求められる。ここでアレイ導波路の像分布 $f_a(x)$ は、次式のように、 $u_a(x')$ の複素共役 $u_a^*(x')$ をフラ

ウンホーファー回折により入力端に投影した像 を表す:

$$f_{a}(x) = \sqrt{\frac{jk_{s}}{2\pi z_{a}}} e^{-jk_{s}z_{a}} \int_{-\infty}^{\infty} u_{a}^{*}(x') e^{j\frac{k_{s}xx'}{z_{a}}} dx' \,_{\circ} \tag{10}$$

i 番アレイ導波路に結合した光は、アレイ導波路 を伝播することにより  $2\Delta f / \Delta f_{FSR}$  (f:周波数、 $\Delta f_{FSR}$ : アレイ導波路の自由スペクトル域) だけ相対的な 位相シフトを受ける。その結果、アレイ導波路と 出力側スラブとの境界に形成される電界分布 *E_b(y', Δ)*は、

$$E_b(y',\Delta) = \sum_{i=-I}^{I} u_b(y'-id) P_i(\Delta) e^{j2\pi i \frac{f}{\Delta f_{FSR}}}$$
(11)

となる。ここで *u_b*(*y'-id*)は出力側スラブとの境界 における *i* 番アレイ導波路のモード分布を表す。

出力側スラブを伝播して出力端に集光した光

の電界分布  $E_{out}^{b}(y, \Delta)$ は、 $E_{b}(y', \Delta)$ のフーリエ変換 により与えられる。周期関数のコンボリューショ ンを考えると、 $E_{out}^{b}(y, \Delta)$ は

$$E_{out}^{b}(y,\Delta) = \hat{k}(\Delta) \sqrt{\frac{z_{a}}{j2\pi k_{s}}} e^{jk_{s}z_{a}} f_{b}(y) [g_{1}(y) \otimes g_{2}(y,\Delta) \otimes g_{3}(y,\Delta) \otimes g_{4}(y,\Delta)]$$
(12)

$$g_1(y) = \sum_{i=-I}^{I} e^{j2\pi i \frac{y}{\Delta y_b}}$$
(13-1)

$$g_{2}(y,\Delta) = \sum_{i=-\infty}^{\infty} e^{j2\pi i \frac{f}{\Delta f_{FSR}}} e^{j2\pi i \frac{z_{i_{2}} z_{b} \Delta \theta}{z_{a} \Delta y_{b}}} e^{j2\pi i \frac{y}{\Delta y_{b}}}$$
(13-2)

$$g_{3}(y,\Delta) = \sum_{i=-\infty}^{\infty} U_{in}(\frac{z}{z_{a}}(z_{at2}\Delta\theta + id))e^{j2\pi i \frac{y}{\Delta y_{b}}}$$
(13-3)

$$g_{4}(y,\Delta) = \sum_{i=-\infty}^{\infty} \sum_{m=0}^{M-1} E_{m} f_{a}(x_{m} + z_{t2}\Delta\theta) e^{jk_{s} \frac{x_{m} z_{a1} 2\Delta\theta}{z_{a}}} e^{j\frac{k_{s} idx_{m}}{z_{a}}} e^{j2\pi i \frac{y}{\Delta y_{b}}}$$
(13-4)

と表すことができる。ここで  $f_b(y)$ は  $u_b(y')$ のフラ あり、 ウンホーファー回折により出力端に現れる像で

$$f_{b}(y) = \sqrt{\frac{jk_{s}}{2\pi z_{b}}} e^{-jk_{s}z_{b}} \int_{-\infty}^{\infty} u_{b}(y') e^{j\frac{k_{s}yy'}{z_{b}}} dy'$$
(14)

を表す。また、 $\Delta y_b$ は波長 $\lambda$ を用いて $\Delta y_b = \lambda z_b/(n_s d)$ で定義する。  $g_1(y) \otimes g_2(y)$ は次式で定義する周

期 $\Delta y_b$ の周期関数  $g_1(y) \ge g_2(y)$ のコンボリューションを表す。

$$g_{1}(y) \otimes g_{2}(y) = \frac{1}{\Delta y_{b}} \int_{-\Delta y_{b}/2}^{\Delta y_{b}/2} g_{1}(\tau) g_{2}(y-\tau) d\tau$$
(15)

ここで、モード分布 u_{in}(y)が十分狭く、実質的にこの分布が(15)式の積分範囲-Δy_b/2<y< Δy_b/2 内に限

られているとみなせる場合、(12)式は次式のよう に変形できる。

$$E_{out}^{b}(y,\Delta) \cong \Delta y_{b} \left(1 - \frac{z_{t2t1}}{2z_{a}}\Delta\right) e^{jk_{s}\frac{2z_{a}z_{t2t1}\Delta + z_{at2}z_{t2}\Delta^{2}\theta^{2}}{2z_{a}}} f_{b}(y) \left[u_{in}\left(-\frac{z_{a}}{z_{b}}y\right) \otimes E_{o}(y,\Delta)\right]$$
(16)

$$E_{o}(y,\Delta) = \sum_{m} f_{a}(x_{m} + z_{t2}\Delta\theta) E_{m} e^{jk_{s}\frac{x_{m}z_{at2}\Delta\theta}{z_{a}}} D_{2I+1}\left(\frac{f}{\Delta f_{FSR}} + \left(\frac{z_{b}}{z_{a}}x_{m} + \frac{z_{t2}z_{b}\Delta\theta}{z_{a}} + y\right) / \Delta y_{b}\right)$$
(17)

ここで  $D_N(x)$ はディリクレ核¹⁵⁾を表す。測定対象 である液体を充填した溝及びアレイ導波路を伝 播し、出力側スラブの出力端に集光した光の電界 分布  $E^b_{out}(y, \Delta)$ は、本式により求めることができる。

一方、単一のアレイ導波路から出力し、出力側 スラブを伝播して出力端に現れるブロード光の 電界分布 E^eout(y)は、単一アレイ導波路の出力端で のモード分布 u_s(y-y_s)のフーリエ変換により

$$E_{out}^{s}(y) = \sqrt{\frac{jk_{s}}{2\pi z_{b}}} E_{s} e^{-jk_{s}z_{b}} e^{\frac{jk_{s}yy_{s}}{z_{b}}} \int_{-\infty}^{\infty} u_{s}(y') e^{\frac{jk_{s}yy'}{z_{b}}} dy'$$
(18)

と求められる。ここで Esは単一のアレイ導波路からの複素電界振幅を表す。したがって、出力端に

現れるトータルの電界分布は、 $E^{b}_{out}(y, \Delta) \ge E^{s}_{out}(y)$ の重ね合わせとして

$$E_{out}(y,\Delta) = E_{out}^{b}(y,\Delta) + E_{out}^{s}(y)$$
⁽¹⁹⁾

と求められる。

(3) 伝達関数

n番出力導波路に結合する光の振幅  $t(y_n, \Delta)$ は、 上述のように求めた  $E_{out}(y, \Delta)$ とn番出力導波路の モード分布  $u_{out}(y-y_n)$ とのオーバーラップ積分によ り求められる。モード分布  $u_{out}(y-y_n)$ が実質的に  $-\Delta y_b/2 < y < \Delta y_b/2$ 内に限られているとみなせ、さら に  $f_b(y)$ がモード分布  $u_{out}(y-y_n)$ の範囲において一定 値であると近似できる場合、 $t(y_n, \Delta)$ は次式で求め ることができる。

$$t(y_n, \Delta) \cong \Delta y_b^2 \left( 1 - \frac{z_{t_2t_1}}{2z_a} \Delta \right) e^{jk_s \frac{2z_a z_{t_2t_1} \Delta + z_{at_2} z_{t_2} \Delta^2 \theta^2}{2z_a}} f_b(y_n) \left[ u_{in} \left( -\frac{z_a}{z_b} y_n \right) \otimes u_{out}^*(-y_n) \otimes E_o(y_n, \Delta) \right]$$
(20)  
+  $\Delta y_b E_{out}^s(y_n) \otimes u_{out}^*(-y_n)$ 

(20)式の解析モデルを用いることで、AWGの出力 導波路から出力される光パワー・位相特性を求め ることが可能となる。

(4) 入力導波路4ポートからの光の位相条件

入出力導波路モード分布及びアレイ導波路モ

ード分布がいずれも基本モードであり、偶関数で あると仮定する。 (16)式から、m 番入力導波路か ら入射され、AWG を通過して出力側スラブの出 力端に集光した光  $E^{b}_{out}(y, \Delta)$ の位相 $\phi_{m}^{b}(\Delta)$ と集光位 置 $y'_{m}$ は、

$$\phi_m^b(\Delta) = \frac{\pi}{2} + k_s \frac{2z_a z_{t2t1} \Delta + z_{at2} z_{t2} \Delta^2 \theta^2 + 2x_m z_{at2} \Delta \theta}{2z_a} - k_s (z_a + z_b) + \arg(E_m)$$
(21)

$$y'_{m} = -\frac{f}{\Delta f_{FSR}} \Delta y_{b} - \left(\frac{z_{b}}{z_{a}} x_{m} + \frac{z_{i2} z_{b} \Delta \theta}{z_{a}}\right)$$
(22)

と求められる。

力端でのブロード光  $E_{out}^{\circ}(y)$ の位相 $\phi(y)$ は、

一方、単一アレイ導波路からの出力側スラブ出

$$\phi^{s}(y) = \frac{\pi}{4} - k_{s} z_{b} + \frac{k_{s} y y_{s}}{z_{b}} + \phi_{0}^{s}$$
⁽²³⁾

と表される。ここで $\phi$ ^sは単一アレイ導波路を伝播  $E^{b}_{out}(y, \Delta)$ と $E^{s}_{out}(y)$ の位相差はしたことによる位相シフトを表す。したがって、

$$\varphi_{m}^{b}(\Delta) - \varphi^{s}(y_{m}') = \arg(E_{m}) + k_{s} \frac{x_{m} z_{at2} \Delta \theta}{z_{a}} + k_{s} \frac{y_{s}}{z_{a}} x_{m}$$

$$+ \left(k_{s} \frac{z_{a} z_{t2t1} \Delta}{z_{a}} + k_{s} \frac{z_{at2} z_{t2} \Delta^{2} \theta^{2}}{2z_{a}} + k_{s} \frac{z_{t2} y_{s} \Delta \theta}{z_{a}}\right)$$

$$+ \left(\frac{\pi}{4} + \frac{2\pi y_{s}}{d} \frac{f}{\Delta f_{FSR}} - k_{s} z_{a} - \varphi_{0}^{s}\right)$$

$$\equiv \arg(E_{m}) + k_{s} \frac{x_{m} z_{at2} \Delta \theta}{z_{a}} + k_{s} \frac{y_{s}}{z_{a}} x_{m} + \varphi_{1}(\Delta) + \varphi_{2}$$
(24)

により求められる。ここで、右辺の第2項は、 $x_m$  無視できる。その場合、位相差は次式のように近を取りうる範囲が小さく、 $(z_{ar2}\Delta\theta)/z_a$ が小さい場合、 似される。

$$\phi_m^b(\Delta) - \phi^s(y_m') \cong \arg(E_m) + k_s \frac{y_s}{z_a} x_m + \phi_1(\Delta) + \phi_2$$
⁽²⁵⁾

したがって、1番入力導波路及び3番入力導波路 からのビームの振幅をブロード光と90度ずらす ためには、m番入力導波路からの光の位相 arg(*E*_m)

は、定数 $\widetilde{oldsymbol{\phi}}$ を用いて、次式となるようにする必要がある。

$$\arg(E_m) = \begin{cases} -k_s \frac{y_s}{z_a} x_m + \tilde{\phi} & (m = 0, 2) \\ -k_s \frac{y_s}{z_a} x_m + \tilde{\phi} + \frac{\pi}{2} & (m = 1, 3) \end{cases}$$
(26)

これらの条件を用いて、提案する透過型屈折率 センサの設計が可能となる。

#### 4.3 特性解析結果

表2に示す設計パラメータを用いた透過型屈折率

センサの特性を、第 4.2 節で導出した設計モデル を用いて計算した。

比屈折率差∆	2.5%		
入力導波路スポットサイズ	1.6 µm		
出力導波路スポットサイズ	1.63 µm		
入力導波路間隔	12 µm		
出力導波路間隔	6 µm		
入力スラブ導波路焦点距離	30 mm		
出力スラブ導波路焦点距離	60 mm		
楔型溝の開き角度	10 ^o		
溝伝播長	5 mm		

表2 透過型屈折率センサ設計パラメータ

図 8(a)に、出力側スラブの出力端に集光した光の 電界分布を示す。屈折率を 10⁻⁵ ずらしたものを比 較している。また、ブロード光を用いない場合(従 来の屈折角測定のみを行う場合に対応)の電界分 布を図 8(b)に示す。提案する透過型屈折率センサ では、ブロード光と干渉させることにより、10⁻⁵ というわずかな屈折率差によっても、電界分布に は明確な差が見られる。




図 9(a)に、提案する透過型屈折率センサにおいて、 集光の近傍における各出力導波路からの出力パ ワーを示す。これについても、屈折率を 10⁻⁵ ずら したものを比較している。本出力パワーが、PD におけるパワー検出値に相当する。ブロード光を 用いない場合の出力パワーも、図 9(b)に示す。提 案する透過型屈折率センサでは、高々10⁻⁵の屈折 率差によっても出力パワー分布に明確な違いが ある。これは、本構成を用いることにより、わず かな屈折率の違いを検出可能であることを表し ている。



図9 集光の近傍における各出力導波路からの出力パワー

図 10 に、屈折率が変化した場合の、集光位置付 近の4本の出力導波路からの出力パワー変化を 示す。ブロード光のみの場合の出力パワー値との 差をプロットしている。(-7)番出力導波路と1番 出力導波路からの出力光、ならびに(-3)番出力導 波路と5番出力導波路からの出力光は、第4.1節 で述べた(1)の条件である、90度位相がずれる関係 にある組み合わせである。また、(-7)番出力導波 路と(-3)番出力導波路からの出力光、ならびに1 番出力導波路と5番出力導波路からの出力光は、 第4.1節で述べた(2)の条件である、同位相となる 関係にある組み合わせである。



図 10 集光位置付近の4本の出力導波路からの出力パワー変化

図 11(a)に、(-7)番出力導波路と(-3)番出力導波路 からの出力光のパワー比、ならびに1番出力導波 路と5番出力導波路からの出力光のパワー比を示 す。図 10 で示した出力パワーが0 に近い部分の 計算結果は除外している。ブロード光のみの場合 の出力パワーを基準として、集光との位相関係に より出力パワーが増加した場合を「プラス側」、 出力パワーが減少した場合を「プラス側」とし てプロットを分離している。各プロットの纏まり のパワー比は、屈折率が増加するに従い順々に大 きくなる。したがって、図 11(a)のようにパワー比 を求め、かつ、「プラス側」あるいは「マイナス 側」のどちらであるかを判別することにより、少 なくとも屈折率がどのプロットの纏まりの範囲 であるかを知ることができる。図 11(b)に、(-7)番 出力導波路と1番出力導波路からの出力光のパワ ーから求めた位相、ならびに(-3)番出力導波路と5 番出力導波路からの出力光のパワーから求めた 位相を示す。出力パワー値に変動が見られる範囲 では、求められた位相は周期的に単調増加してい ることが分かる。図 10 で示した出力パワーが 0 に近い部分の計算結果を除外した場合、屈折率変 化 1 に対する位相増加率は 8.7×10⁵ deg~1.8×10⁶ deg であるため、1 度の位相変化が判別可能であ ると想定した場合、位相値からの相対的な屈折率 分解能は 0.5×10⁻⁶~1.1×10⁻⁶ である。

このように、図 11(a)により得られた屈折率範囲 と、図 11(b)より求めた位相差を組み合わせること により、屈折率絶対値を分解能 1×10⁻⁶のオーダで 求めることが可能となると考えられる。



(a) パワー比



(b) 位相 図 11 出力光のパワー比,及び出力光のパワーから求めた位相

## 5. 溝構造の最適化設計

本研究において提案する集積型屈折率センサ では、スラブ導波路に試料充填用の楔状溝を形成 する。このような構造をとった場合、溝では、基 板面の垂直方向への回折による損失が発生する。 光が光源から受光部まで伝播する間に大きく減 衰した場合、受光部ではノイズによる誤差が生じ やすくなる。そこで、溝における損失の低減が必 須である。本章では、溝による回折損失が小さい 溝構造の検討として、最適な溝配置間隔をシミュ レーションにより模索した結果を述べる。

# 5.1 分割溝構造

溝での回折損失を低減するため、本研究では、 溝を分割して最適な間隔で配置する方法を検討 した。本方法は、スポットサイズ変換等に利用さ れている¹⁶⁾。また、著者らは、通信用デバイスの 温度無依存化の用途として、樹脂充填溝構造を検 討してきた^{17)、18)}。本研究では、この方法を応用 し、提案する屈折率センサへの適用に適した溝構 造を検討した。

図 12 に、検討した溝構造を示す。コアとクラ ッドからなるスラブ導波路に垂直となるように 溝を同一周期で形成したものである。

2次元ビーム伝播法(BPM)を用いて、本構造 を伝播する基本モード光の損失を求めた。石英系 光導波路の利用を想定し、比屈折率差Δを1.5%、 2.5%の2種類として計算した。また、溝数は10 とした。



## 5.2 計算結果

溝周期に対する損失計算結果を図 13 に示す。1 個当たりの溝幅  $d \epsilon r$ ラメータとして求めた。各 溝幅について、損失が最小となる溝配置周期があ ることが分かる。例えば  $d = 20 \mu m$ の場合、溝配置 周期  $L = 20 \mu m$ (すなわち、溝を分割していない場 合)では溝部において 7.1dB の損失が発生してし まうが、溝周期  $L \epsilon$  32 $\mu m$ とすれば、損失を 0.7dB に低減できる。すなわち、使用する溝幅 dに応じ て溝周期  $L \epsilon$ 最適化することにより、損失を大幅 に低減できることが分かる。



図 13 溝構造における損失計算値。Δ = 1.5%、溝数 10。

図 13 から分かるように、最小損失となる溝配 置周期は、溝幅により少しずつ異なる。図 14 に、 溝幅に対する損失最小値と、最小損失となるとき の溝配置周期の関係を示す。溝幅を少しずつ増加 すると、損失最小値が上昇していくと同時に最適 な溝配置周期も増加していくことが分かる。



図14 溝幅に対する損失最小値と、そのときの溝配置周期の関係。△ = 1.5%、溝数10。

本屈折率センサでは、楔型溝とする必要がある が、楔形溝を縦列配置した場合、光伝播方向と垂 直な各領域で、溝幅が異なってしまうため、図 15(a)のように楔形溝をただ単純に縦列に並べた だけでは、各領域での損失が大きく変わってしま う。そこで実際の楔形溝配置では、図 15(b)に示す ように各領域で溝間隔が異なるように角度を変 化させながら配置し、さらに、図 15(c)のように、 楔形状を湾曲させ、位相劣化を防ぐことがより良 い構造であると考えられる。



コアとクラッドの比屈折率差∆を増加させると、 入出力ビームのスポットサイズを小さくでき、屈 折率分解能の向上に寄与する。しかし、∆を増加 するとたとえ溝間隔を最適にしたとしても、溝で の放射損失があがってしまう。この放射損失を低 減する方法としては、研究代表者が提案している セグメント型スポットサイズ変換器をスラブ導 波路途中に設け、溝周囲でのスポットサイズを拡 大する方法を用いることができる¹⁸⁾。

#### 6. まとめ

高精度、広い屈折率測定範囲、大掛かりな外部 測定系が不要、リアルタイム計測可能、という特 徴を併せ持つ、石英系ガラス平面光波回路を用い た on-chip 生体計測用屈折率センサの実用化を目 的とした技術開発を行った。まず、屈折率精密計 測のための新たな光学系コンセプトの一つ目と して、反射型屈折率センサの検討を行い、設計検 討の結果、屈折率分解能 1×10⁻⁶程度が得られる見 込みを得た。次に、反射型屈折率センサの原理検 討として、90度位相シフトを用いた光学系を用い た位相測定原理実験を行い、提案する反射型屈折 率センサにおける光学系の効果を検証した。次に、 透過型屈折率センサの検討を行い、解析モデルに よるシミュレーションの結果、本方式によっても 屈折率分解能1×10⁻⁶程度が得られる見込みを得た。 また、測定対象の液体を充填するための溝構造の 最適化設計を行い、光導波路の比屈折率差1.5%を 用いた場合における溝配置の最適間隔を見出し た。今後, 主に透過型屈折率センサを対象とした 実験検証を実施し、実用化に向けた試作検討を行 う予定である.

本研究で活用する技術は、光集積デバイスを用 いた光波による計測技術である。光集積デバイス は、主に光通信用途にて幅広い研究開発がなされ、 広く実用化されてきたが、計測用途としては発展 段階にある。本研究をきっかけとして、光波計測、 特に生体光計測のための光集積デバイス研究・開 発促進の足がかりとなることを期待している。

# 謝辞

本研究は財団法人中谷電子計測技術振興財団の 平成20年度(第25回)技術開発研究助成によ って行われました。ここに深く感謝の意を表しま す。

#### 参考文献

 J. Homola, "Optical fiber sensor based on surface plasmon resonance excitation," Sens. Actuators B, vol. 29, pp. 401-405, 1995.

2) K. Mitsui, Y. Handa, and K. Kajikawa, "Optical fiber affinity biosensor based on localized surface plasmon resonance," Appl. Phys. Lett., vol. 85, no. 18, pp. 4231-4233, 2004.

3) D. M. Wilson and L. E. Hansen, "Current-mode system-on-chip interface for SPR-based sensing systems," IEEE Sens. J. vol. 7, no. 11, pp. 1513-1523, Nov. 2007.

4) Z. L. Ran, Y. J. Rao, W. J. Liu, X. Liao, and K. S. Chiang, "Laser-micromachined Fabry-Perot optical fiber tip sensor for high-resolution temperature-independent measurement of refractive index," Opt. Express, vol. 16, no. 3, pp. 2252-2263, Feb. 2008.
5) S. Kita, K. Nozaki, and T. Baba, "Refractive index sensing utilizing a cw photonic crystal nanolaser and its array configuration," Opt. Express, vol. 16, no. 11, pp. 8174-8180, May 2008.

6) A. Iadicicco, A. Cusano, S. Campopiano, A. Cutolo, and M. Giordano, "Thinned fiber Bragg gratings as refractive index sensors," IEEE Sens. J., vol. 5, no. 6, pp. 1288-1295, Dec. 2005.

7) C. Caucheteur, D. Paladino, P. Pilla, A. Cutolo, S. Campopiano, M. Giordano, A. Cusano, and P. Mégret, "External refractive index sensitivity of weakly tilted fiber Bragg gratings with different coating thicknesses," IEEE Sens. J., vol. 8, no. 7, pp. 1330-1336, Jul. 2008.

8) N. Ni, C. C. Chan, L. Xia, and P. Shum, "Fiber cavity ring-down refractive index sensor," IEEE Photon. Technol. Lett., vol. 20, no. 16, Aug. 2008.

9) M. Kawachi, "Silica waveguides on silicon and their application to integrated-optic components," Optical and Quantum Electron., vol. 22, pp. 391-416, 1990.

10) Y. Hashizutne, R. Kasahara, T. Saida, Y. Inoue, and M. Okano, "Integrated polarisation beam splitter using waveguide birefringence dependence on waveguide core width," Electron. Lett., vol. 37, no. 25, pp. 1517-1518, Dec. 2001.

11) T. K. Liang and H. K. Tsang, "Integrated polarization beam splitter in high index contrast silicon-on-insulator waveguides," IEEE Photon. Technol. Lett., vol. 17, no. 2, pp. 393-395, Feb. 2005.

12) C. Y. Tai, S. H. Chang, and T. C. Chiu, "Design and analysis of an ultra-compact and ultra-wideband polarization beam splitter based on coupled plasmonic waveguide arrays," IEEE Photon. Technol. Lett., vol. 19, no. 19, pp. 1448-1550, Oct. 2007.

13) C. Dragone, "Efficient N x N star couplers using Fourier optics," IEEE J. Lightwave Technol., vol. 7, no. 3, pp. 479-489, Mar. 1989.

14) K. Maru, T. Mizumoto, and H. Uetsuka, "Modeling of multi-input arrayed waveguide grating and its application to design of flat-passband response using cascaded Mach-Zehnder interferometers," J. Lightwave Technol., Vol. 25, No. 2, pp. 544-555, Feb. 2007.

15) H. Dym and H.P. McKean, Fourier series and integrals. New York: Academic Press, Inc., 1972, ch. 1, pp. 31-32.

16) Z. Weissman and A. Hardy, "2-D mode tapering via tapered channel waveguide segmentation," Electron. Lett., vol. 28, no. 16, pp. 1514-1516, Jul. 1992.

17) K. Maru, K. Matsui, H. Ishikawa, Y. Abe, S. Kashimura, S. Himi, and H. Uetsuka, "Super-high- $\Delta$ athermal arrayed waveguide grating with resin-filled trenches in slab region," Electron. Lett., vol. 40, no. 6, pp. 374-375, Mar. 2004. 18) K. Maru, Y. Abe, M. Ito, H. Ishikawa, S. Himi, H. Uetsuka, and T. Mizumoto, "2.5%-∆ silica-based athermal arrayed waveguide grating employing spot-size converters based on segmented core," IEEE Photon. Technol. Lett., Vol. 17, No. 11, pp. 2325-2327, Nov. 2005.

## 発表論文

1) K. Maru, Y. Fujii, S. Zhang, and W. Hou, "Proposed design for high precision refractive index sensor using integrated planar lightwave circuit," Physics Procedia, Vol.2, No.1, pp. 39-44, July 2009.

2) K. Maru, K. Kobayashi, and Y. Fujii, "Multi-point differential laser Doppler velocimeter using arrayed waveguide gratings with small wavelength sensitivity," Opt. Express, Vol. 18, No. 1, pp. 301-308, Jan. 2010.

3) K. Maru, L. Y. Hu, R. S. Lu, Y. Fujii, and P. P. Yupapin, "Two-dimensional laser Doppler velocimeter using polarized beams and 90° phase shift for discrimination of velocity direction," Optik (in press) 分子インプリント高分子を用いた血糖値監視用グルコースセンサ



研究責任者 芝浦工業大学応用化学科 准教授 吉 見 靖 男 共同研究者 川崎医科大学生理学2教室 助 教 氷 見 直 之

# 1. はじめに

世界の糖尿病患者は 2003 年には 1.94 億人にも 達し、2025年には 3.33億人にも達する見込みであ る。我が国においても740万人(予備軍も含める と 1620 万人) に達し、莫大な医療費が負担され ている。糖尿病患者の血糖値を常時モニタリング し、適量のインシュリンを自動投与することで血 糖値を自動管理する人工膵臓の開発にかかる期 待は大きい。この開発の最大の課題は、採血を行 わずに血糖値をモニタリングする方法の確立で ある。最も有望とされてきたのが、グルコース酸 化酵素を電極表面に固定して作られたグルコー スセンサを皮下組織に埋め込む方法である。この 方法は長年の開発にもかかわらず、現在も実用に 至っていない。人体の皮下に埋め込むデバイスは 例外なく滅菌操作が不可欠である。グルコース酸 化酵素は、酵素の中では格別に安定性の高いもの だが、滅菌操作には耐えられない。したがって酵 素型グルコースセンサをヒトの皮下に埋め込む ことは、臨床上無理がある。この問題が、半世紀 近くにわたって未解決である

申請者は、酵素より耐久性に優れる合成高分子 を代わりに用いたグルコースセンサを開発すれ ば、この問題が解決すると考えた。基質特異性を

持った合成高分子には、分子インプリント高分子 がある。基質としたい分子(鋳型)を、それと可 逆的に結合するモノマー(機能性モノマー)と反 応させて複合体を形成し、これを架橋性モノマー と共重合させ、鋳型を除去すれば、鋳型と特異結 合する高分子が合成できる。このような合成法を 分子インプリント法と呼び、合成された高分子を 分子インプリント高分子(MIP)と呼ぶ。機能性 モノマーにビニルフェニルボロン酸を用いれば、 グルコースを鋳型とした MIP を合成できる。この MIP は、オートクレーブや γ 線による滅菌操作で は機能を失うことはない。したがって酵素に変わ る体内埋め込み型センサ用の分子認識素子とし て期待できる。しかし、この MIP は酵素のような 触媒活性を持たないため、センサ用素子として用 いるには、特異結合に応じた電気信号を発生でき る、新しい反応系を設計しなければならない。

申請者は、グルコースを鋳型とする MIP をグラ フトした電極は、グルコースの存在下で、フェリ シアン化ナトリウムの酸化電流を著しく変化さ せることを見いだした¹⁾。また、その電流変化の 大きさとグルコース濃度の間には、明らかな相関 があった。これは MIP がグルコースと特異反応す ることによって表面開孔率が変化し、フェリシア



図1 分子インプリント高分子の基本原理



図2:ゲート効果による鋳型物質のセンシング

しかし、体内留置型センサには、試薬の供給を 必要としないこと(リエージェントレス)や、生 体適合性を高めることが求められる。いずれも適 切な表面修飾が必要であるが、今までの方法¹⁾で は、機能を損なわせずに MIP 層の表面を修飾する ことは難しい。

本研究では、リビングラジカル重合による MIP のグラフトを試みた。リビングラジカル重合法に は、光イニファタ法や、原子移動法 (ATRP) な ど様々な種類があるが、今回は触媒の酸化還元反 応のサイクルを利用した、Activators ReGenerated by Electron Transfer-Atom Transfer Radical Polymerization(ARGET-ATRP)法を採用した。 Matyjaszewski らが開発した ARGET-ATRP 重合法 ²⁾では、銅錯体の触媒が高分子または開始剤末端 のハロゲン原子を引き抜いて、そこにラジカルを 形成する。このとき銅錯体触媒が酸化される。そ して末端のラジカルがモノマーを攻撃して、連鎖 的にモノマーが付加し、高分子が生長する。しか し酸化された触媒が、還元剤で還元されると、ハ ロゲン原子が高分子末端に戻る。ここで高分子の 生長が停止し、銅錯体にハロゲンを引き抜く能力 が戻る。このように還元剤と開始剤による銅錯体 の酸化還元サイクルに伴って、高分子の生長とそ の停止が繰り返される。換言すれば末端にハロゲ ン原子が残っている限り、停止した生長反応はい つでも再開できる。そのため2種類の異なるモノ マーのブロック共重合が可能である。この性質を 利用すれば、表面に生体適合性のある高分子鎖や、 リエージェントレスセンシング機能をもたらす 高分子鎖を修飾することは可能である。 また通常のラジカル重合は酸素によって阻害 されるが、この ARGET-ATRP は過剰の還元剤に よってこの阻害を妨げる。したがって、脱酸素処 理が不要で、大量生産の際にも製造コストを低く できる利点がある。

そこで、本研究では図3のようにシランカップ リング剤で末端にハロゲン原子を持つ官能基を ITO 電極表面に導入し、このハロゲン原子を開始 剤とした ARGET-ATRP 反応で ITO 表面に MIP を グラフトして固定する方法を開発し、そのグルコ ースセンサとしての性能を評価した。



図 3: ARFET-ATRP によるグラフト重合

# 2. 実験方法

#### 2.1 リガンドの合成

銅イオンに対するリガンドとして Tris[(2-pyridyl)methyl]amine (TPMA)を、Britovesk らの手法³⁾を参考 に合成した(図4)。



図4:リガンドの合成

2-アミノメチルピリジンとトリアセトキシ水素 化ホウ素ナトリウムをジクロロメタンに溶解さ せた溶液を撹拌しながら、2-ピリジンカルバルデ ヒドをパスツールピペットで滴下した。滴下後、 容器を密閉し、18h 撹拌して反応させた。その後、 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、15 min 撹 拌した。そして、溶液を分液ロートに移し、水相 (上相)と有機相(下相)を分離した。水相を酢酸エチ ルで洗浄して反応物を抽出した。また、有機相に も酢酸エチルを加えてよく振り混ぜた。酢酸エチ ルを含んだ両液を混合し、無水硫酸マグネシウム を薬サジ2杯程度加えて脱水した。その後、濾紙 で濾過し、エバポレーターで溶媒を留去した。そ の後、真空ポンプを用いて真空乾燥を行った。沸 点近くの温度まで温めた石油エーテルを数回に 分けながら、残留固化物を溶解させ、濾紙(No.1) を使用して濾過した。その後、エバポレーターで 溶媒を留去した。析出した固体をヘキサンに溶解 し、1晩放置して再結晶させた。再結晶後、容器 内の上澄み液を取り除き、真空ポンプを用いて真 空デシケーター内で乾燥させた。

# 2.2 鋳型/複合体の合成

鋳型としてのグルコース(Glc)と機能性モノ マーとしての4-ビニルフェニルボロン酸(VPBA) を脱水ピリジンに溶解させた。この溶液を温度 55℃、圧力55mmHgの条件下、共沸蒸留で生成 される水を除去しながら、エステル反応により結 合させた。共沸蒸留中、溶液の残量が1/6にな ったら脱水ピリジンを注ぎ足し、元の体積に戻し た。3h後、ピリジンを全て留去し、得られた固 体を一晩真空乾燥した。乾燥固体をジクロロメタ ンに溶解し、さらにこの溶液にヘキサンを静かに 加えた。アルミホイルで全体を覆い、冷蔵庫内で 48h以上放置し再結晶を行った。その後、デカン テーションにより溶媒を取り除き、一晩真空乾燥 することにより Glc/VPBA 複合体を合成した。

### 2.3 ITO 表面への開始剤の導入

ITO にアミノ基を導入するため、3-アミノプロ ピルトリメトキシシランのトルエン溶液に浸し、 80℃の水浴で4h加熱した。終了後、ITO 電極を 取り出し、メタノールで5min×3回と蒸留水で5 min×3回の超音波洗浄を行い、窒素で乾燥させた。 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジ イミドと2-ブロモイソ酪酸をDMFに溶解し、ア ミノ基を導入した ITO 電極を並べ、遮光・撹拌し ながら24h反応させた。その後、ITO 電極を取り 出し、メタノール中(5min×3回)および蒸留水 中(5min×3回)で超音波洗浄し、窒素ガスを吹 き付けて乾燥した。

# 2.4 グラフト重合

300 mL 三角フラスコに、Glc/VPBA 複合体を 0.8 mmol、架橋剤としてメチレンビスアクリルアミド (MBAA)を8 mmol、触媒として塩化銅(Ⅱ)0.06 mmol およびそれに対するリガンド 0.06 mmol を、 10 mL のジメチルホルムアミドに溶解させた。そ の後、開始剤を固定した ITO 電極を3枚並べ、中 央には撹拌子を置いた。そして、還元剤の2-エチ ルヘキサン酸スズ(II)0.2 mL(0.58 mmol)を DMF 3 mL に溶解させた溶液を加えた後、シリコーン栓 で三角フラスコを密閉し、70℃で24h熱重合を 行った。重合操作終了後、ITO 電極から触媒を除 去するために、ジクロロメタンを溶媒にソクッス レー抽出した。その後、鋳型を除去するために、 0.01 M HCl 水溶液に ITO 電極を 1 h 浸漬させ、電 極の導電面にシリコーン樹脂を塗布して絶縁し、 電極両端の有効領域を1cm×1cmに制限した。(こ の電極を Glucose Imprinted Polymer (GIP)固定電極 とした。) Glc/VPBA 複合体中に含まれる VPBA と等量の VPBA を仕込んで重合したものを Non Imprinted Polymer(NIP)として比較対象とした。修 飾した電極表面の元素組成を、X線光電子分光法 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) で分析し た。

# 2.5 サイクリックボルタメトリーによる MIP 固定 電極のグルコースセンシング能の評価

図4のようにポテンシオスタット(PS-08、東方 技研、東京)に作用極、対極、参照極を接続し、測 定溶液をアルゴンガスで5minバブリングした後、 スキャン速度200mV/s、走査電位-0.6~+1.2Vで作 用極に対して電位を走査し、電位-電流曲線(サ イクリックボルタモグラム)を記録した。作用極 には、各種 MIP-ITO、対極には未修飾ITO、参照 極には Ag/AgCl電極を使用した。さらに、支持電 解質に0.1M 硝酸カリウム、マーカー物質に5mM フェロシアン化カリウム、溶媒には蒸留水を用い た。フェロシアン化物イオンの酸化電流にゲスト 分子に5mMのGlcまたは比較対象のフルクトー スが与える影響を評価した。

# 結果および考察

# 3.1 XPS による MIP グラフト電極のキャラクタリ ゼーション

XPS により未修飾 ITO および GIP、NIP 固定電

極の表面を元素分析したところ、インジウム、ス ズ、炭素、酸素が検出された。GIP、NIPの固定電 極表面からはホウ素が検出された。触媒に含まれ る銅は検出されなかった。各表面のインジウム、 スズ、炭素、ホウ素の表面含有率(mol%)を表1 に示す。

グラフト重合処理によってインジウムの含有率 が減少していることから、ITO 表面を高分子で被 覆できたことは判明した。しかし、インジウムは 充分な強度を以て検出されていたので、グラフト 層の厚みは、XPS の検出限界深さ(10 nm)よりは小 さいことが解った。またグラフト処理によって、 ボロン酸基が有効に導入できたことも、この結果 で示された。

しかし意外なことに、グラフト処理後によって、 スズの含有率が著しく増大していた。このスズは ITO に由来するものではなく、還元剤のヘキサン 酸スズに由来するものだと考えられる。ソックス レー抽出時間を2倍に延長しても、スズは除去で きなかった。

主 1	٠	タ 重振の主 両 二 実 組 ぱ	<b>r</b> 0/ <b>1</b>
衣工	٠	育电極の衣囲ル糸租成	<b>1</b> 70

	In	Sn	C	В
未修飾-ITO	52.6	3.5	22.9	_
GIP	9.8	28.7	25.2	19.6
NIP	26.0	19.3	37.8	3.3

#### 3.2 電極へのグラフト重合のリビング性

グラフト重合反応時間ごとの、フェロシアン化 物イオンのピーク酸化電流密度を図5に示す。GIP 固定電極の場合は、重合反応時間の増大に伴って 酸化電流密度が減少していった。NIP 固定電極の 場合はその傾向が見られなかった。GIP の場合は、 リビング重合の反応時間が増大することによっ て、MIP の重合密度が増大し、フェロシアン化物 イオンの ITO 電極への拡散速度が低下し、電流が 小さくなったと考えられる。NIP の場合は、架橋 度の低さから酸素や還元剤が速く移動できるため、グラフト重合速度が速かったものと思われる。 しかし、NIP はボロン酸基がフリーであるため、 触媒となる銅錯体イオンとの相互作用が強く⁴⁾、 リビング重合能が失われたと考えられる。

MIPの場合はリビング重合できるということは、 反応時間でグラフト重合量を制御でき、さらには MIP層の表面に別の種類の高分子鎖を導入するこ とが可能になることを示している。



図 5:各重合反応時間におけるフェロシアン化物イオンの酸化電流密度(網目:NIP 電極、塗りつぶし:GIP 電極)

# 3.3 グルコースセンシング能の評価

グルコースまたはフルクトースよる各電極での 酸化還元電流の変化を図6に示す。未修飾 ITO に おいては、糖による電流変化は見られず、NIP 固 定電極ではフルクトースに対して電流値を増大 させた。フェニルボロン酸基のフルクトースに対 する結合定数は、グルコースに対するそれの 30 倍である⁵⁾。したがって、NIP がフルクトースと 結合することによって、その空隙の構造が変化し、 電流値が変化したと考えられる。

これに対し GIP 固定電極固定電極の場合は、フ

ルクトースの存在下で、NIP と同様の電流増大が 示された。しかしグルコースに対しては、より顕 著な電流値減少を見せた。この結果は、グルコー スを鋳型とすることにより、グルコースに特異的 な MIP 層内に結合サイトが形成され、そこに鋳型 が浸入することにより、開孔率が大きく変化しう ることを示している。換言すれば、ARGET-ATRP 法で作られた分子インプリント高分子により、グ ルコースの選択的なセンシングが可能である事 が解った。



図 6:各電極におけるフェロシアン化物酸化電流密度の糖による変化率(塗りつぶし:グルコース 5mM、白抜き:フルクトース 5mM)

# 3.4 MIP 層の安定性

空気中で保管した GIP 固定電極におけるフェロ シアン化物のサイクリックボルタグラムの変化 を図7に示す。グラフト重合から時間が経つにつ れて酸化電流および還元電流が上昇した。29日経 過後のサイクリックボルタグラムにおいては、未 修飾ITO電極におけるフェロシアン化物のサイク ボルタグラムとほぼ同じになった。この結果は、 グラフトした GIP の層が、大気中に保存の過程に おいて電極から脱落した可能性を示唆している。



図 7:GIP 固定電極におけるサイクリックボルタグラムの変化(実線:グラフト重合から3日間保管、点線: 5日間保管、破線:29日間保管)

GIP 固定電極を様々な環境下で保管し、フェロ シアン化カリウムのサイクリックボルタメトリ ーを行った。その結果のピーク酸化還元電流の経 時変化を図8に示す。大気中および二酸化炭素雰 囲気下では著しく電流が上昇し、アルゴン、酸素 雰囲気下では上昇が抑えられた。また水酸化ナト リウムとともに GIP を大気中で保管した場合は、 電流の上昇が抑えられた。この結果は、大気中の 二酸化炭素がGIPの脱落を促している可能性を示 唆するものである。

しかし本研究で作製された GIP は、シランカッ プリング剤を介した強固な共有結合で ITO 表面に 固定されているはずであり、二酸化炭素の作用だ けで脱落するとは考えにくい。実際、前報¹⁾で作 られた GIP 電極は少なくとも2年間は、大きな電 流値変化見せなかった。残留しているスズが何ら かの作用で脱落を促している可能性は高い。現在、 脱落のメカニズムを検討している段階である。



図 8:GIP 電極における酸化電流の経時変化(保管雰囲気:◆大気、▲二酸化炭素、■酸素、◇大気+水酸化 ナトリウム粒子、●アルゴン)

### 4. 結論

ARGET-ATRP 重合法によって、グルコースを鋳型とする分子インプリント高分子(MIP)を電極表面に固定することは可能である。この高分子の固定密度は、反応時間に依存することから、反応時間による MIP 固定量の制御や、ブロック共重合による MIP 層の表面修飾に期待が持てる。この

MIPを固定した電極はグルコースに対する高い選 択性を持つ。しかし、二酸化炭素の存在下で MIP 層が脱落する。体液中から二酸化炭素を除去でき ないため、この MIP 固定電極を当初目的としてい た体内留置型グルコースセンサに利用すること はできない。作製後の保存を短くすれば、検体検 査に使用することは可能かも知れない。

#### 謝辞

本研究を助成して下さいました中谷電子計測技 術振興財団に深謝します。また錯体の合成法に関 して、芝浦工業大学工学部応用化学科 北川 理 教 授から御指導をいただきました。X線光電子分光 法による MIP 固定電極の分析には、早稲田大学理 工学部応用化学科 松田雅人助手から御協力いた だきました。ここに感謝の意を表します。

# 参考文献

- Y. Yoshimi, A. Narimatsu, K. Nakayama, S. Sekine, K. Hattori, K. Sakai "Development of an 'enzyme-free' glucose sensor using the gate effect of a molecularly imprinted polymer", *J. Artificial Organs* 12, 264–270, 2009
- K. Matyjaszewski, H. Dong, W. Jakubowski, J. Pietrasik, A. Kusumo "Grafting from surfaces for "Everyone": ARGET ATRP in the presence of air", *Langmuir* 23, 4528–4531, 2007
- 3) G.J. P. Britovesk, J. England, A.J.P. White, "Non-heme iron(II) complex containing tripodal tetradentate nitrogen ligands and their application in alkane oxidation catalysis", *Inorg. Chem.*, 44, 8125-8134, 2005
- X. Zhang, K. Matyjaszewski, "Synthesis of functional polystyrenes by atom transfer radical polymerization using protected and unprotected carboxylic acid initiators", *Macromolecules* 32, 7349–7353, 1999
- G. Springsteen, B.A. Wang, "Detailed examination of boronic acid-diol complexation", *Tetrahedron*, 58, 5291–5300, 2002

# 業績:

吉見靖男, 脇坂映美: ARGET-ATRP 法で分子イン プリント高分子をグラフトして作製したグルコ ースセンサの安定性, 化学工学会第 42 回秋季大 会, 2010 年 9 月, 京都

脇坂映美,吉見靖男:「ARGET-ATRP」法による

分子インプリントポリマー型グルコースセンサ, 化学工学会第41回秋季大会,2009年9月,広島 脇坂映美,吉見靖男:「ARGET-ATRP法」で分子 インプリントポリマーをグラフトしたグルコー ス電極の開発,2009年電気化学秋季大会(第48 回化学センサ研究発表会),2009年9月,東京 (すべて口頭発表。原著論文は只今準備中)

# 流体シミュレーションとドップラーエコーからの肝循環圧測定法の開発



研究責任者	兵庫医科大学医学部外科学講座						
		准 教	(授	飯	室	勇	
共同研究者	兵庫医科	·大学	医学部外	<b></b> 朴科学	<b>之講</b> 区	Ĕ	
		主任	教授	藤	元	治	朗
兵庫医科大学医学部肝胆膵内科							
		教	授	飯	島	尋	子

## 1. はじめに

近年の画像診断技術の進歩により、生体内臓器 の詳細な形態学的解析のみならず、血流を反映し た機能・病熊解析や全身的な腫瘍存在診断などが 可能となっている。一方、生体内の血流動態自体 を解析して治療に役立てる事を目的に、動脈血流 流体解析を行い動脈瘤発生部位の予測などを試 みる研究が散見される 1), 2), 3), 4)。本研究者らの専 門領域である肝臓は、動脈と門脈による二重血流 支配をうけているが、門脈血流は動脈血流より血 流圧がはるかに低いため周囲環境の変化により 影響を受けやすい。また、門脈血は腸管から吸収 されるさまざまな物質を肝臓へ運搬するととも に、肝切除後の再生におけるその重要性などが指 摘されている。一方、慢性肝炎などに伴う肝線維 化が進行すると門脈圧が亢進し、胃食道静脈瘤な どの側腹血行路が発達して重篤な合併症をきた す。以上のことから、各種病態における門脈血流 動態の解析および把握は、肝疾患治療において重 要な課題である。

既存の門脈血流評価は、主にドップラー超音波 検査を中心に行われてきたが 5^{3, 6), 7}、流速や流量 の測定は可能であるものの、もうひとつの重要な 因子である門脈圧の評価は不可能であった。臨床

上重要な意味を持つ門脈圧の測定は、これまでカ テーテルなどを利用した観血的測定法によるも のであり、患者への侵襲が大きいものである。一 方、画像診断およびコンピューターの情報処理能 力の向上に伴い、生体内での血流シミュレーショ ンが可能となりつつあるが、肝臓、とくに門脈に 関する同様の検討はなされていない。本研究者ら は、これまでに、肝腫瘍切除症例において、術前 術後の門脈血流動態変化をシミュレーション解 析し、術後2週間での残存門脈枝血流変化率が術 後3ヶ月での灌流領域別再生率と相関する傾向に あることを見出している 8), 9), 10)。そこで、今回ド ップラーエコーから得られる各門脈枝における 血流情報を、CT データから得られる正確な門脈 形状による流体解析シミュレーションに加える ことにより、非観血的門脈内圧分布測定法の開発 が可能かを検討した。

#### 2. 研究方法

## 2.1 門脈血流動態シミュレーション

# 2.1.1 造影 MD-CT (DICOM データ) からの門脈 3D 画像および流体解析用メッシュモデルの作製

診断・治療を目的に施行される造影 MD-CT 画 像から得られる DICOM データをもとに、正確な 門脈 3D 画像を個々の症例で抽出する(3-D image processing and editing software を使用)。さらに、 抽出した門脈形状 (STL ファイル)をもとに流体 解析用メッシュモデルを作製する (Fluent 6.2, Fluent Inc.)。



図 1. 造影 MD-CT 画像



図 2. 門脈 3D 画像

# 2.1.2 流体解析ソフトによる門脈血流シミュレ ーション

作製された個々の門脈メッシュモデルを利用 して、流体解析ソフト (Fluent 6.2, Fluent Inc.) 上で、門脈血流動態をシミュレーションする。

# 2.2 ドップラー超音波検査による門脈血流情報 の入手

門脈血流シミュレーションを行う同一症例に おいて、体外ドップラー超音波検査を行い、各門 脈枝における血流の方向、流速、流量を仰臥位で 行う。具体的には、下記左図のように、測定目標 の門脈枝を同定し血流の方向、流速を同定した後、 同門脈枝の径(断面積)を正確に計測することに より、門脈枝内の血流量が測定可能である。



図4.血流の方向・流速の同定



図 3. 流体解析用メッシュモデル



図5.門脈径の測定による流量の算出

# 2.3 門脈血流設定変更による門脈内圧の推定

ドップラーUS から得られた門脈本幹血流量に 合わせて、シミュレーション上の門脈血流量を設 定することで、門脈内圧分布をシミュレーション した。一方、メッシュモデル各分枝の出口圧を 0 [Pa]に設定した場合と 20 [Pa]程度に設定した場 合の血流動態変化を検討した。

# 2.4 観血的門脈圧測定値との比較検討

肝切除術に先立ち、上腸間膜静脈分枝から門脈 本幹内にカテーテルを挿入し、門脈圧を直接測定 して得られた実測門脈圧と流体シミュレーショ ンから推測された門脈圧を比較検討した。

# 3. 結果

# 3.1 門脈血流動態シミュレーション

# 3.1.1 造影 MD-CT (DICOM データ) からの門脈 3D 画像および流体解析用メッシュモデルの作製

肝切除症例8例に対して、術前造影MD-CTを行い、DICOMデータより流体解析用門脈3Dメッシュモデルを作成した。







<u>症例 2</u>



症例3



<u>症例 4</u>



症例 5



<u>症例 6</u>



症例 7

3.2 ドップラー超音波検査による門脈血流情報 同一症例に対して、術前体外ドップラー超音波 検査を行い、門脈本幹、門脈右枝、門脈前区域・ 後区域枝、門脈臍部の血管径と血流情報から血流 量をそれぞれ計測し、その分布を検討した。(症 例1、2提示)

症例8



症例 1 門脈本幹血流測定(ドップラーUS)の実 際

#### 症例1 門脈血流量

門脈本幹:	Flow Volume 1.00 L/min (100 %)
右枝:	Flow Volume 0.53 L/min (53 %)
左枝:	Flow Volume 0.47 L/min (47 %)
前区域枝:	Flow Volume 0.28 L/min (28 %)
後区域枝:	Flow Volume 0.25 L/min (25 %)

#### 症例2 門脈血流量

Flow Volume 0.93 L/min (100 %)
Flow Volume 0.48 L/min (52 %)
Flow Volume 0.45 L/min (48 %)
Flow Volume 0.25 L/min (27 %)
Flow Volume 0.20 L/min (21 %)

3.3 門脈血流シミュレーション設定変更による 門脈内圧の検討

# 3.3.1 門脈血流量シミュレーション

門脈3Dメッシュモデルを用いた流体解析で、
 門脈本幹の血流量を 1200ml/min に固定して門脈
 枝の血流分布をシミュレーションした場合と、血
 流量を 800ml/min、600ml/min に減少させた場合

の血流分布を比較した(表1)。その結果、血流 量を1200ml/minから600ml/minまで減少させて も、各門脈枝の血流分布の変化は1%以下であっ た。このことから、生理的条件の範囲で門脈血流 を変動させても、各門脈枝における血流分布(%) は、流体シミュレーション上ほとんど変化しない と考えられた。

領域	1200 ml/min	800 m1/min	600 m1/min
1	2.74	2.66	2.56
2	12.93	12.56	12. 31
3	7.86	7.63	7.47
4	8.25	8.10	7.98
5	7.34	7.08	6.88
6	17.89	18.25	18.47
7	43.00	43.72	44.30

表1 門脈血流量の設定変動に伴う各領域における血流分布(%)の変化 (症例7)

一方、流体シミュレーション解析による血流分
布とドップラーエコーで得られた血流分布(3.2)
を比較すると、比較的良好に相関していた(下
図:症例1、2)。

以上の結果から、血流シミュレーション上、生 理的範囲内で門脈血流量を変化させても、比較的 正確な領域別血流分布が推定できることがわか った。



症例1 門脈血流シミュレーション [m/s] 1200 ml/min 設定



症例 2 門脈血流シミュレーション [m/s] 1200 ml/min 設定

# 3.3.2 門脈圧シミュレーション

次に、ドップラーエコーで得られた門脈本幹の 血流量(3.2)に合わせて、流体シミュレーショ ン上の門脈血流を設定し、門脈圧分布シミュレー ションを行った。設定条件として、3Dメッシュ モデルの各門脈の出口圧を0[Pa]に設定した。さ らに、出口圧を20[Pa]に設定した場合の門脈圧 分布についても検討した。その結果、出口圧を 0 [Pa]に設定した場合、症例 1 では、門脈本幹圧が 230[Pa]、症例 2 で 200[Pa]となった。出口圧を 20 [Pa]に設定した場合、症例 1、症例 2 のそれぞ れの門脈本幹圧は、250 [Pa]および 225[Pa]と増 加した。一方、出口圧を変化させても門脈血流分 布には、変化が見られなかった。



本幹 230 Pa (2.35 cmH₂0)

症例1 門脈内圧シミュレーション [Pa]: 血流量 1000ml/min, 出口圧 0 [Pa]



本幹 200 Pa (2.04 cmH₂0)

症例2 門脈内圧シミュレーション [Pa]: 血流量 930ml/min,出口圧 0 [Pa]

#### 3.4 観血的門脈圧測定値との比較

それぞれの症例において、全身麻酔下に開腹後、 肝切除術に先立ち観血的門脈圧測定を行った(研 究方法参照)。症例1、2での実測門脈本幹内圧は、

それぞれ 8.0 cmH₂O および 11.0 cmH₂O と流体 シミュレーションから推測された門脈圧より全 体にやや高い値が得られた。特に症例 2 のように、 ドップラーエコーから得られる門脈血流量が正 常平均門脈血流量(1200 ml/min)より減少して いる症例では、門脈圧のシミュレーション値と実 測値の差が大きい傾向にあった。一方、肝臓の線 維化が認められず、門脈血流量が1200 ml/min 程 度の正常肝においては、実測門脈本幹内圧は4.0 cmH₂O 程度であり、シミュレーションから推測 された門脈本幹内圧と比較的近似した値であった。

それぞれの症例で、出口圧の設定をさらに調節 する(増加させる)ことにより、実測値とシミュレ ーション値を近似させることは可能であるが、肝 臓の線維化に伴う出口圧の設定を肝臓の硬さな どからシミュレーションする必要がある。

以上の結果から、肝臓の実質が柔らかい正常肝 では、今回のシミュレーション方法により、実測 門脈本幹内圧に比較的近似した門脈圧を推測で きるのに対し、肝実質の線維化に伴う出口圧の上 昇が認められる症例では、肝臓の硬さなどの因子 をシミュレーションに考慮することで、出口圧の 調節を行う必要があることが示唆された。

# 4. まとめ

Multi-detector CT (MD-CT)から得られる DICOM データと、体外ドップラー超音波検査か ら得られる門脈血流情報をもとに、ヒトにおける 門脈血流シミュレーションを行った。血流分布に 関しては、比較的正確なシミュレーションが可能 である一方、門脈内圧のシミュレーションにおい ては、肝実質の線維化の程度による門脈出口圧の 設定調節が必要であり、今後、超音波検査などに より得られる肝実質の"硬さ"を加味したシミュ レーションにより、線維肝においてもより正確な 非観血的門脈圧の推定が可能になる可能性がある。

## 謝辞

本研究は、財団法人中谷電子計測技術振興財団、 平成 20 年度開発研究助成の支援により行われま した。ここに深く感謝の意を表します。

# 参考文献

- Sforza DM, Putman CM, Cebral JR. Hemodynamics of Cerebral Aneurysms. Annu Rev Fluid Mech. 2009;41:91-107.
- Jiang J, Strother C. Computational fluid dynamics simulations of intracranial aneurysms at varying heart rates: a "patient-specific" study. J Biomech Eng. 2009;131(9):091001.
- Castro M, Putman C, Radaelli A, Frangi A, Cebral J. Hemodynamics and rupture of terminal cerebral aneurysms. Acad Radiol. 2009;16(10):1201-7.
- Chien A, Castro MA, Tateshima S, Sayre J, Cebral J, Viñuela F. Quantitative hemodynamic analysis of brain aneurysms at different locations. AJNR Am J Neuroradiol. 2009;30(8):1507-12.
- Martínez-Noguera A, Montserrat E, Torrubia S, Villalba J. Doppler in hepatic cirrhosis and chronic hepatitis. Semin Ultrasound CT MR. 2002;23(1):19-36.
- Kruskal JB, Newman PA, Sammons LG, Kane RA. Optimizing Doppler and color flow US: application to hepatic sonography. Radiographics. 2004;24(3):657-75.
- Tochio H, Kudo M. Afferent and efferent vessels of premalignant and overt hepatocellular carcinoma: observation by color Doppler imaging.Intervirology. 2004;47(3-5):144-53.
- Iimuro, Y., Saito, S., Yamanaka, J., Hirano, T., Kuroda, N., Okada, T., Sugimoto, T., Asano, Y., Uyama, N., Uda, Y. and Fujimoto, J. Computational flow dynamics simulation of portal branches is useful for analyzing the mechanism of non-uniform regional liver regeneration after surgical resection. Hepatology, 2007; 46:4 suppl. 429A.
- Iimuro, Y., Saito, S., Yamanaka, J., Hirano, T., Kuroda, N., Okada, T., Sugimoto, T.,

Asano, Y., Uyama, N., Uda, Y. and Fujimoto, J. Non-uniform increases in blood flow and pressure in portal branches after liver surgery assessed by computational flow dynamics simulation well correlate with the regional liver regeneration. Hepatology International 2008; 2: A177.

 Iimuro, Y., Saito, S., Yamanaka, J., Hirano, T., Kuroda, N., Okada, T., Sugimoto, T., Asano, Y., Uyama, N., Uda, Y. and Fujimoto, J. Non-uniform regional liver regeneration after hepatic surgery well correlates with computationally simulated increases in blood flow and pressure in portal branches. Journal of Hepatology, 2008; 48(Suppl.2), S68. ヘテロコア光ファイバによる脈拍や呼吸の無拘束・無意識生体計測



研究責任者 創価大学工学部情報システム工学科

助教 西山道子

# 1. はじめに

人体の呼吸状態や脈拍、また手足の動きや腰や 関節の捩じりのための生体情報計測は、臨床分野 における評価にのみならず、バーチャルリアリテ ィ、スポーツバイオメカニクスや高齢者福祉とい った様々な分野で開発が期待されている。この生 体計測装置は、人体に対して拘束性が低く不快感 を与えないものが求められる。人体に直接センサ を取り付け、計測機器を携帯するウェアラブル型 計測は、被験者がその計測機器の近くに赴く必要 も無く、時間的・空間的制約が低減され無拘束計 測を実現する。日常生活を営む自宅などの環境側 にセンサを配置する環境配置型計測は、その環境 内で被験者は無意識に生体情報を集録され、健康 管理などに役立てられる。

従来のウェアラブル型計測として、導電性ファ イバによるコイルで作られた変位センサを衣服に 織り込むことによる、ウェアラブル呼吸計測とモ ーションキャプチャが提案されている¹⁾。また、 ファイバグレーティング (FG) 視覚センサという CCD カメラと FG 素子を使って入浴者の呼吸状態 と洗い場での転倒リアルタイムで計測する手法が 提案されている²⁾。呼吸によるわずかな身体の上 下動をリアルタイムで計測が可能であるが、浴室 内の湯気によるカメラレンズのくもりや石鹸の泡、 入浴剤による液体の非透明度の上昇といった画像 を捉えきれない場合がある。

これらの従来のセンシング手法に対し、軽量、 柔軟性、防爆性、耐電磁誘導性、耐腐食性といっ た利点を持つ光ファイバの利点を活かした、 LPFG (Long Period Fiber Grating)センサを用い たウェアラブル呼吸計測の研究が行われている³⁾。 しかし、LPFG センサは、歪み計測において温度 変動に対する補償用のセンサと計測装置を要し、 更に計測量は波長シフト量となり、波長ベースの 計測装置が必要となる。一方。プラスティック光 ファイバセンサによる光強度ベースの呼吸計測の 研究も行われているが⁴⁾、マルチモード光ファイ バで構成されるため、ファイバ伝送路上でセンサ 部以外の外乱の影響を受けやすい。

従来の光ファイバセンサに対して、本研究で用 いるヘテロコア光ファイバ^{5)~11)}は、コア径を適度 に調節されたヘテロコア部を設けることで、比較 的緩やかな曲げに対して感度があり、かつ温度変 動に依存しない。加えて、製造工程が簡便といっ た利点もある。また、シングルモードファイバで 構成されるため伝送路が安定しており、伝送路長 を自由に確保でき、センサ部以外の変形などの外 乱の影響を受けにくい。これらの利点を踏まえ、 今までの研究で、人間の大まかな動きをリアルタ イムで捉える、ウェアラブル光神経モーションキ ャプチャを試作し、ヘテロコアファイバ光神経網 の有用性を示してきた ⁵。

そこで本研究では、ヘテロコアファイバ光神経 センサを用いて、ウェアラブル型計測、環境配置 型計測として脈拍や呼吸、動作などの無拘束・無 意識生体情報モニタリングシステムを提案する。



図1 ヘテロコア光ファイバセンサの構造

# 2. 光ファイバ生体情報計測センサ

# 2.1 ヘテロコア光ファイバ

本研究で用いたヘテロコア光ファイバセンサの 構造を図1に示す。コア径9µmのSMファイバ伝 送路の途中に、コア径5µmのSMファイバ小切片 を挿入し融着することで作製される。このコア径 の小さいファイバの挿入部をヘテロコア部と呼ぶ。 伝送光はヘテロコア部において一部漏洩する。更 に曲げなどの変形が付与されるとその光の漏洩量 が増加し、曲げ変形を光損失の変化として捉える 事が出来る。曲げを加えない状態で、ヘテロコア 部を挿入したときに生じる損失は1dB以下となる。 今までの研究で、SMファイバで構成されるヘテ ロコア光ファイバセンサは、曲げ量に対して単調 な光損失変化を生じることが確認されている。 本研究では、曲げ量に対して単調な光損失変化を 生じ、かつ感度の比較的高いヘテロコア挿入長 2mm を採用した。

## 2.2 光ファイバ脈拍センサの構造

ヘテロコア部の曲率変化に鋭敏な光損失変化を 生じるこのセンサの特性を活かし、経年劣化の比 較的少ないシリコーンゴムシート厚さ0.5mmの2 枚のシートの間に光ファイバセンサを挟み、脈拍 による微弱な圧力変化が効率よくヘテロコア部の 曲げに変換されるようにシリコーン小切片を組み 込んでいる。図 2(a)に示すように、ヘテロコア部 を中心に 0.5~1.0cm 程度の間隔でファイバに小 切片を添えて固定した状態で、ヘテロコア部に急 激な曲率変化が生じるように 1.0mm 幅程度の小 切片を添えている。図 2(b)に示す通り、柔軟で経 年劣化の少ないシリコーン素材を用い、0.5mm 厚 シリコーンゴムシート(一辺 5.0cm の正方形)の中 心にヘテロコア部をおき、ヘテロコア部とその両 端にシリコーン小切片を添えて、シリコーンシー トを接着する。

更なるセンサ感度の向上を目指すと、脈拍によ る脈圧振動を伝える膜であるシリコーンゴムのシ ート厚を薄くすることが必要である。しかし、シ リコーンゴムは柔軟であるため、シート厚を薄く すると膜としての機能が低減し、ある程度厚みが なければ計測が困難であった。そこで、伸縮性が 見られず、経時変化が比較的少ない安定した素材 であるフッ素樹脂であれば、更に薄いシートを用 いることができ、より効率的に振動を伝えること ができると考えられる。シリコーンゴムシートで 作成したセンサ構造をフッ素樹脂シートに応用す ることで、シート厚が薄い場合でも脈拍計測が可 能であるか、検討を行った。



図2 ヘテロコア光ファイバ脈拍センサ; (a)脈拍計測構成、(b)脈拍センサの構造



図3 ヘテロコア光ファイバ感圧センサ; (a) 感圧センサ構成、 (b) 荷重に対する感圧センサ特性

## 2.3 呼吸を検知のための光ファイバ感圧センサ

図 3(a)にヘテロコア光ファイバ荷重センサの構 造を示す。荷重センサは、柔軟性のあり、また経 年劣化の少ないシリコーンゴム素材で構成した。 図 3(a)に示すように、上下からの荷重がヘテロコ ア部の曲率変化として生じさせやすいように、ヘ テロコア部にシリコーンゴムによる小切片をあて ている。更にヘテロコア部近傍の両側にシリコー ンゴムによる段差構造をもたせることで、荷重に よる曲率変化が顕著に生じるように構成されてい る。それらの構造をシリコーンゴムで挟み、上下 をプラスティック板で挟む構造をとっている。本 荷重センサの寸法は、20mm×20mm×4mm であ る。 図 3(b)に、本研究で使用した 8 個の荷重セン サのうち、代表的な4個と3.0kgの荷重に対する 光損失特性を5回繰り返し計測の平均値とその計 測誤差を示す。図3(b)より、どの荷重センサも荷





図 4 光ファイバ睡眠計測装置: (a)計測シス テム、(b)光ファイバ感圧センサを配置した寝 具の写真

重に対して光損失が単調増加する特性を有するこ とを確認した。図 3(b)の荷重光損失特性おいてセ ンサ No.2、 No.3、 No.5、 No.8 はそれぞれ、荷 重 3kg に対して、1.80、 0.91、 0.74、 0.55dB の光損失変化を示した。また、0.1kg 以下の比較 的軽い荷重に対しても光損失感度を有しているこ

## 2.4 睡眠時の呼吸における体動の無拘束計測

図 4(a)に、計測装置構成図と図 4(b)に実験で使 用した寝台であるソファベッド(180cm×100cm) の写真を示す。伝送波長は 1.3µm を採用し、 点の光損失をリアルタイムで計測可能な LED-PD 計測器を用いた。ヘテロコア荷重センサで発生し た光損失値を、サンプリング周波数 2Hz で A/D コ ンバータを介して PC で集録する。 図 4(b)に示す ように8個の荷重センサを、被験者の背中に相当 する箇所を中心にマジックテープでソファベッド に固定し、その上に被験者が荷重センサを意識し ないように、一枚薄い布を被せた。また、8個の センサは、図 4(a)に示すように被験者の睡眠時に 寝返りなどによる移動があった際でもセンサに荷 重がかかるように、縦5cm、横6cmと間隔をあけ て広がりを持たせるように設置した。睡眠時の被 験者の様子を確認するため、USB カメラを用いて 同時に動画記録を行った。本実験では、被験者7 名に対して睡眠状態にけるヘテロコア荷重センサ の光損失値の計測を行った。8名の被験者は全員 20代の男性で、実験前に頭の位置のみ指定し、睡 眠時の姿勢については特に制限を設けずに実験を 行った。

### 3. 実験

# 3.1 脈拍計測実験

脈拍信号の評価方法は、計測時間 30 秒間のうち、 脈拍の振動に伴って生じる光損失のピークから次 のピークまでを1周期として、連続した 20 周期分 のデータを抽出する。図5に示す1周期中の最小 とを確認した。従って、本荷重センサを用いて、 睡眠呼吸時の体動による僅かな圧力変化を検知で きると考えられる。また、身体からの荷重は、被 験者の体重は数+kgとなっても、荷重はベッドと の接触領域に渡って分散するため、荷重センサの 計測可能範囲は3kg程度で十分であると想定した。



値から最大値までの振幅を感度[dB]と定義する。 また、20周期分の感度の平均値をセンサ感度と定 義する。ここで、シリコーンゴムシートで作成し た脈拍センサの特性は予めへテロコア部に緩やか な曲率を与えている状態で固定した場合、感度 0.343[dB]となり、その波形からも脈拍を十分に捉 えていることが分かる。

図6に、フッ素樹脂素材で作製した脈拍センサ のリアルタイム光損失特性を示す。フッ素樹脂製 の脈拍センサは、3.2cm角の0.05mm厚フッ素樹 脂シートの中心に緩やかな曲率を与えたヘテロコ ア部を配置し、微弱な脈圧の変化をヘテロコア部 の曲率変化に効率良く変換するため、ヘテロコア 部とその両端に小切片を添える構造をとる。この 脈拍センサを手首に装着し、その手首を台座に乗 せることで、脈拍センサを手首に押しつけるよう に圧力を与えた場合と手首を台座に乗せず、圧力 を与えていない場合のセンサ感度の比較検討を行 った。図6に示すように、圧力を与えていない場 合のセンサ感度は0.015[dB]となり、加圧時のセ ンサ感度0.266[dB]に比べて微弱ではあるが、脈 拍を検知がすることができた。

#### 3.2 睡眠時呼吸モニタリング実験

図 7(a)、 (b)に、被験者 A、B の睡眠計測の 2 分30秒間抜粋したリアルタイム光損失波形を示 す。光損失値の基準となる OdB は、荷重を与えて いない状態としているため、身体が荷重センサの 上にのり、少しでも荷重がかかっていれば光損失 の値が発生することになる。呼吸による体の動き を捉えられていれば、その一定量の荷重がかかっ た状態で、更に損失変化が定期的に生じる。図7(a) から、このときの被験者 A の睡眠計測ではすべて の荷重センサにおいて規則的な光損失変化を確認 でき、呼吸による体の動きを示す波形が確認でき た。センサ No.7 においては約 0.11dB 程度の光損 失波形の振幅を示した。また、睡眠時の呼吸によ る細かい定期的な光損失変化は、比較的ある一定 の光損失値が生じている状態の上でみられている のが分かる。ここで、この一定量の光損失値は安 定しており、ヘテロコア光ファイバ荷重センサは 身体の荷重に対して安定して計測を行えることが 示された。また、その一定量の光損失値は、図3 に示す荷重光損失特性で示す光損失量の範囲内で



# 図7 睡眠時呼吸モニタリング実験結果;(a) 睡眠時呼吸のリアルタイム光損失特性、(b) 寝返り前後の光損失特性

あるため、荷重センサにかかる荷重は 3kg の範囲 内であることが分かる。一方、図 7(a)から、セン サ No.7 と No.1 は、光損失変化の波形の時間に対 する位相が逆になっているのが確認された。これ は、センサ No.1 と No.7 がベッドの上で離れた位 置に配置されており、身体が当たる個所が胸部と 腰部と異なり、センサの位置によって荷重のかか る方が異なったためと考えられる。しかし、波形 の周期はほぼ同じであり、睡眠時呼吸計測は行え ていることが分かる。

図 7(b)では、被験者 B の計測結果では、呼吸の 規則的な波形が見られた後に波形が乱れている。 これは、被験者が寝返りを打ったためであり、同 時に撮影した動画でも確認した。しかし、寝返り を打った後も、寝返り前に睡眠状態を捉えていた 荷重センサとは別の荷重センサが捉え始めている のが確認できる。従って、ある程度分布的に荷重 センサを配置したことで、寝返りによる身体の位 置の移動にも対応できていることが分かる。また、 寝返りの直後は、一定量の光損失値は生じている 状態でも規則的な波形の変化が見られず、十数秒 後から再度波形の変化が見られるようになった。 これは、一時的に無呼吸状態、又は低呼吸状態に なったためと考えられる。従って、無呼吸状態の 診断にも利用できる可能性が示唆された。

7名の被験者の内1名が睡眠途中で寝返りを打 ちセンサ設置位置から被験者の身体が離れてしま ったため、センサに荷重がかからなくなり、一時 的に呼吸計測が困難となったものの、7名の被験 者全員の睡眠時の呼吸を検知することに成功した。 これらの実験結果から、センサに被験者の体の荷 重がかかってさえいれば、ある程度の被験者の体 格差に関わらず、睡眠時の呼吸計測が可能である ことが分かった。また、睡眠時の無呼吸状態、又 は低呼吸状態を検知することが可能であることが 示唆された。

#### 4. まとめ

本研究では、安定した伝送路を有し、鋭敏な曲 げに対する感度を有するヘテロコア光ファイバセ ンサを生体情報計測に応用し、拍動による脈圧の 動きや睡眠時の呼吸による体動による荷重の変化 といった、僅かな変化を検知できる新しい生体情 報センサの提案を行った。従って、ヘテロコア光 ファイバを用いて、より無拘束な生体情報センシ ングシステムが構築できることが示唆された。

#### 謝辞

本研究は、中谷電子計測技術振興財団の研究開 発助成のもと行われたものである。記して、厚く 御礼申し上げます。

# 参考文献

1) R. Wijesiriwardana, "Inductive Fiber -

Meshed Strain and Displacement Transducers for Respiratory Measuring Systems and Motion Capturing Systems, " IEEE Sensors J. 6 (3) (2006) pp.571-579.

- 2) 西浦朋史他、電子情報通信学会論文誌 D、"カ ラー撮像素子内蔵型 FG 視覚センサによるバ スルーム監視システムの開発"、Vol.J89-D、 No.5、(2006) pp.1001-1010.
- T. Allsop, K. Carroll, G. Lloyd, D. J. Webb, "Application of long – period – grating sensors to respiratory plethysmography," J. Biomed. Opt., 12(6), (2007) 064003.
- 4) 三田地成幸、仲川南、"光ファイバを用いた簡 易操作型睡眠時無呼吸センサの開発、"2008 信学総大、no.C-3-81、p.262、March 2009。
- M. Nishiyama, H. Sasaki and K. Watanabe, "Performance characteristics of wearable embedded hetero-core fiber sensors for unconstrained motion analyses," Trans. SICE 43 (12) 1075-1081(2007).
- 6) H. Sasaki, Y. Kubota and K. Watanabe,
  "Sensitivity property of a hetero-core splice fiber optic displacement sensor," in Proc. SPIE, vol. 5579, 2004, pp. 136-143.
- 7) 宮本光夫、西山道子、渡辺一弘、"ヘテロコア 光神経を用いたシリコーン荷重センサの検 討、"第41回 SICE 北海道支部学術講演会論 文集、pp. 87-88、 2009 年 2 月.
- M. Sonobe, M. Nishiyama and K. Watanabe, "Unconstrained Pulse Monitoring for On-Site Usage Using a Hetero-core Fiber Optic Nerve," 2009 International Symposium on Smart Sensing and Actuator System, Proceedings of ISSS' 09, pp.48-51, 2009.
- M. Miyamoto, M. Nishiyama and K. Watanabe, "Hetero-core Fiber Optic Nerve Weight Sensors for Unconstrained

Respiration Monitoring during Sleep," 2009 International Symposium on Smart Sensing and Actuator System, Proceedings of ISSS' 09, pp52-55, 2009.

- 10) 園部雅子、西山道子、渡辺一弘、"フッ素 樹脂を用いたヘテロコア光ファイバ脈拍セン サによる無拘束ウェアラブル計測"、電子情 報通信学会 2009 ソサイエティ大会、2009 年 9 月、新潟、同大会通信講演論文集 2、 B-13-32: p.321.
- 西山道子、宮本光夫、渡辺一弘、"呼吸による 体動に着目したヘテロコア光ファイバ荷重センサによる無拘束睡眠モニタリング"、信学技 報、vol。109、no.428、OFT2009-92、pp. 49-52、2010年2月

# 誘電泳動を用いたマイクロロッド回転による腫瘍マーカー検出用小型デバイスの開発



研究責任者 東北大学大学院環境科学研究科 助教 伊 野 浩 介

# 1. はじめに

近年の分子生物学や分析技術の発展により、生 体試料中の微量物質を検出できる様々な手法が 開発されてきた。そして、医療分野における応用 として、血液中の微量物質の検出により病気の診 断が行えるようになっている。現在では、簡単で 高感度な検査用小型デバイスの開発が行われて いる。

そのような小型デバイスの開発には、新たなア クチュエーターやシステムを開発する必要があ る。そこで、本研究では、誘電泳動や電気回転と 言った物理化学現象を応用してマイクロガラス ロッドを回転させる事で、小型なデバイス内で溶 液を攪拌できるようなシステムの開発を行った。 また、マイクロロッドの表面状態の違いよる回転 速度の変化を観察し、その特性評価を行った。

#### 2. 誘電泳動と電気回転について

誘電泳動とは、分極した微粒子が電場中を動く 現象である。電場中では、微粒子は図1のように 分極している。溶液よりも微粒子の方が分極しや すい場合は図1Aのように分極し、逆の場合は図 1Bのようになる^{1,2)}。図1の上段のように均一な 電場中では、微粒子の両側に掛かる力が等しいた め、微粒子は動かない。一方、図1の下段のよう な不均一な電場中では、電気力線が密な部分と疎 な部分、電場強度が強い部分と弱い部分が現れる ため、それを駆動力として、微粒子が電場中を移 動する。これが誘電泳動と呼ばれる現象である。 微粒子が電場強度の強い部分に動く場合を正の 誘電泳動と呼び、電場強度が強い部分から弾かれ て弱い部分に微粒子が集まる場合を負の誘電泳 動を呼ぶ。本研究では、微粒子の捕捉に負の誘電 泳動を応用した。

図2で示したように、微粒子を回転電場に曝し た場合、誘電泳動と同様に、電場に曝された溶液 中の微粒子は、その界面の電気的不均一性から双 極子が誘起される^{1,2)}。双極子の形成と電場の回 転速度に時間差が生じるため、双極子と外部電場 の間で静電相互作用が生じ、回転力が粒子に作用 する。回転電場は常に一定速度で回転し続けるた め、回転力が常に粒子に作用し微粒子は回転を続 ける。この回転力は周波数に依存するため、印加 する周波数を制御する事で、微粒子の回転速度を 制御できる。この現象を利用する事で、細胞膜の キャパシタ、細胞質の導電率、誘電率の同定が可 能になっているが³⁻⁷⁾、本研究では、この回転力 を駆動力として用いた攪拌システムの開発を行った。



図 1 誘電泳動による微粒子の動き。(A) 微粒子の方が分極しやすい場合。(B) 溶液の分極しやすい場合。 上段は均一な電場中の微粒子の分極の様子。下段は不均一な電場中の微粒子の分極の様子。



図2 電気回転による微粒子の動き。(A)回転電場のスキーム。(B) 微粒子の分極の様子。

誘電泳動や電気回転を誘導するためには、電極 を緻密に配置する必要がある。特に電気回転の場 合、図2のように4本の電極を近接させて配置す る必要がある¹⁰⁾。したがって、単純に電極を配 置してだけでは、電気回転が誘導される場所が限 られてしまい、十分な攪拌が行えない場合が考え られる。そこで、本研究ではこの問題点を解決す るために、クシ型電極を組み込んだチップデバイ スを作製し、電気回転を誘導する場所を多数組み 込んだチップデバイスの開発を目指した。これま でに我々は、クシ型電極を用いた誘電泳動による 微粒子操作に成功しているが⁸⁾、本研究ではさら に電気回転のシステムをチップデバイスに組み 込む事で、攪拌用アクチュエーターとしての検討 を行った。



図3 測定スキーム。(A) クシ型電極を配置したガラス基板を重ね合わせ、デバイスを完成させる。 (B) ぞれぞれの電極にπ/2 だけ位相がずれるように交流電圧を印加する。

# 3.実験材料と実験方法

### 3.1 チップデバイスの作製

クシ型電極の作製には、酸化インジウムスズ (Indium Tin Oxide: ITO)を用いた⁸⁾。ITO が スパッタされているガラス基板上にポジ型フォ トレジスト(S-1818、Shipley)でクシ型電極の パターンを作製した。作製後、HNO₃/HCl 溶液で エッチングを行い、ITO のクシ型電極を作製した。 エッチング後、アセトンでレジストを剥離させた。 余分な電極を覆うため、ネガ型フォトレジスト (SU-8、MicroChem Corp.)で絶縁層を作製した。

デバイスを完成させるために、クシ型電極が配 置された 2 枚のガラス基板を、スペーサー(10 μm)を介して重ね合わせた(図 3A)。図 3B で示 すように各格子点には、回転電場が形成される。

#### 3.2 電場シミュレーション

チップデバイスの評価を行うため、電極によっ て形成される電場強度、電場ベクトルのシミュレ ーションを行った(COMSOL Multiphysics ver. 3.5, Comsol, Inc.)。

# 3.3 微粒子操作

チップデバイスの評価には、ポリスチレン微粒

子(直径 15  $\mu$ m、Polysciences, Inc.) とマイクロ ガラスロッド(長さ:10-30  $\mu$ m、直径:6  $\mu$ m) を用いた。これらの微粒子をチップデバイスに導 入し、ファンクションジェネレーター(Hioki E.E. Co.) でそれぞれの電極に位相が $\pi/2$ ずれた交流の 電圧を印加した(図 3B)。微粒子の動きは顕微鏡 (Olympus Co.) で観察した。

マイクロガラスロッドの誘電率を変化させる ために、マイクロガラスロッドの表面をタンパク 質で修飾した。まず始めに、マイクロガラスロッ ドのシラン化を行い、マイクロガラスロッドの表 面にエポキシ基を導入した⁹⁾。シラン化を行った 後、IgG、BSA溶液中にガラスロッドを浸漬させ、 マイクロガラスロッドをタンパク質で修飾した。

# 3.4 ELISA の足場としてのマイクロガラスロッ ドの検討

PSA に対する抗体で修飾したマイクロガラス ロッドを用いて、ELISA を行った。PSA 濃度が 0.6 ng/ml~100 ng/ml の溶液を作製し、抗体修飾 マイクロガラスロッドを添加した。2 次抗体、基 質として、HRP 標識抗体、TMB 溶液を用いて、 呈色後に 450 nm における反応溶液の吸光度を測 定した。



図4 チップデバイス内の電場強度、電場ベクトルのシミュレーション。(A)作成したモデル。a-dの電極に、 それぞれ5 sin (0+ $\sigma t$ )、5 sin (p+ $\sigma t$ )、5 sin ( $\pi/2+\sigma t$ )、5 sin ( $3\pi/2+\sigma t$ )の電圧を印加。各時間による電場 強度(B)と電場ベクトル(C)。(BI、CI: $\sigma t=0$ 、BII、CII: $\sigma t=\pi/3$ 、BIII、CIII: $\sigma t=\pi/2$ 、BIV、CIV: $\sigma t=2\pi/3$ )

## 4. 結果と考察

# 4.1 チップデバイスのデザイン

従来の電気回転チップデバイスは、電極を4本 設置し、1つの測定点しか得られなかった。した がって、1枚のチップ内に組み込める回転電場の 数は限られてしまい、攪拌力としての応用は限ら れてしまう。そこで本研究では、クシ型電極を3 次元的に配置したチップデバイスをデザインし た。このチップデバイスの各格子点には回転電場 を誘導できるため、1枚のチップデバイスに多数 の回転電場を誘導できると考えられる(図3)。

## 4.2 電場シミュレーション

まず始めに、デザインしたチップデバイスによ って形成される電場のシミュレーションを行い、 得られた電場強度、電場ベクトルから、十分に誘 電泳動、電気回転を行う事ができるかを検討した。 シミュレーションを行うために、図 4A のような モデルを作成した。それぞれのクシ型電極に位相 がπ/2 ずれた電圧を印加した場合、各時間におけ る電場強度は図 4B のようになる。負の誘電泳動 が誘導された場合、電場強度が強い部分から、弱 い部分に微粒子は集まるので、負の誘電泳動によ り微粒子は各格子点の中心に移動すると予測さ れる。また、断面のシミュレーションの様子から、 微粒子が電極からの斥力を受けるため、中心部分 に浮遊すると考えられる。

負の誘電泳動によって、微粒子が各格子点の中 心部分に捕捉される事が予測できたので、この部 分での電場ベクトルの様子をシミュレーション した。図 4C で示すように、各格子点の中心部分 では、デバイスの水平方向に回転電場が誘動され る事が確認できた。また各格子点の中心部分では、 鉛直方向での回転電場は誘導されないため、微粒 子やマイクロロッドは、デバイスの水平方向に回 転する。

# 4.3 チップデバイスの作製

このシミュレーションの結果を踏まえ、デザイ ンしたチップデバイスを作製した。チップデバイ スには、電極幅、電極間距離がそれぞれ 10 µm、 20 µm のクシ型電極を配置しており、クシの本数 は 50 本である。この縦と横の 50 本ずつの電極か ら形成される格子点には、回転電場が誘導できる ため、格子点の数である 2401 個の攪拌子をチッ プ内に組み込む事が可能である(図 5)。これまで、 このような多数の回転電場を組み込んだ報告は 行われておらず、本研究で開発したチップデバイ スは、電気回転用ツールとしての新規性が高いと 言える。



図5 作製したデバイス(A:全体図、B:拡大図)



図 6 誘電泳動と電気回転による微粒子の動き。(A) 直径 15 µm のポリスチレンビーズ。(B) 長さ 15 µm の マイクロガラスロッド。スケールバー: 20 µm。



図7 各周波数におけるマイクロガラスロッドの回転数(A:長さ18 µm、B:長さ15 µm、C:長さ13 µm)

#### 4.4 微粒子操作

続いて、微粒子をデバイス内に導入し、各電極 に電圧を印加した。電圧印加直後、微粒子は各格 子点に移動する様子が観察された(図 6A)。これ は、微粒子が負の誘電泳動によって斥力を受けた ためだと考えられ、シミュレーションの結果と一 致した。続いて、マイクロガラスロッドで同様に 実験を行ったところ、マイクロガラスロッドがシ ミュレーションの結果通り、回転する事が確認で きた(図 6B)。これらの結果は、本デバイスが攪 拌駆動力への応用に期待できることを示している。

攪拌駆動力としての応用を行うためには、回転 速度を制御する必要がある。そこで、印加する電 圧、周波数に対するマイクロガラスロッドの回転 の様子を観察し、回転速度との関係を考察した。 高い電圧を印加した場合、回転数が多くなり、こ の回転数は電圧の2乗に比例した(図7)。この結 果は理論と一致している。また、ロッドの長さが 長くなるにつれて、回転速度が劇的に減少してお り(図7)、これは溶液の抵抗によるものと考えられる。これらの結果が示すように、微粒子の形状、 印加電圧で回転速度を制御できるため、攪拌用ツ ールとして用いる事が可能であると考えられる。

さらに、本研究では、マイクロガラスロッド自体を検査素子とした検査ツールの検討を行った。 つまり、タンパク質の吸着による表面状態の変化 を、マイクロガラスロッドの回転数から検出する 事で、検査用ツールに応用できないかを検討した。 まず、マイクロロッドをタンパク質で修飾し、そ の回転数の変化を観察したところ、タンパク質で 修飾する事で回転数の減少が見られた(図 8)。タ ンパク質の電荷、疎水性度、また誘電率の変化が 回転数に影響を与えたと考えられる。このマイク ロガラスロッドを足場とした ELISA により腫瘍 マーカーである PSA の検出が可能であった(図 9)、本デバイスを組み合わせる事で、新規な分析 手法として提案する事が可能である。



図8 タンパク質修飾によるマイクロガラスロッドの回転数の変化。


# 5. まとめ

今回、微小デバイス内の攪拌を目的として、誘 電泳動と電気回転を誘導できるチップデバイス を開発した。このチップデバイスには、2401 個 の回転電場を有しており、迅速な攪拌が可能であ り、新たなアクチュエーターとしての応用が可能 である。また、マイクロガラスロッドを1つの検 査素子として用いた場合、2401 個の検出が行え るハイスループットなアッセイ法としても期待 できる。このように、本研究では、新規な回転電 場チップデバイスの開発に成功した。

# 謝辞

本研究は平成 20 年度(財)中谷電子計測技術 振興財団の奨励研究助成を受けて行われた。ここ に記して深謝いたします。

# 参考文献

- Herbert A Pohl. Dielectrophoresis. The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields. *Cambridge University Press*, 1978.
- 2. Thomas B Jones. Electromechanics of particles. *Cambridge University Press*, 1995.
- Wang XB, Huang Y, Gascoyne PR, Becker FF, Hölzel R, Pethig R. Changes in Friend

murine erythroleukaemia cell membranes during induced differentiation determined by electrorotation. *Biochim Biophys Acta.* 1193, 330-44, 1994.

- Huang Y, Wang XB, Becker FF, Gascoyne PR. Membrane changes associated with the temperature-sensitive P85gag-mos-dependent transformation of rat kidney cells as determined by dielectrophoresis and electrorotation. *Biochim Biophys Acta.* 1282, 76-84, 1996.
- Gascoyne P, Pethig R, Satayavivad J, Becker FF, Ruchirawat M. Dielectrophoretic detection of changes in erythrocyte membranes following malarial infection. *Biochim Biophys Acta*. 1323, 240-52, 1997.
- De Gasperis G, Wang XB, Yang J, Becker FF, Gascoyne PR. Automated electrorotation: dielectric characterization of living cells by real-time motion estimation. *Meas Sci Technol.* 9, 518-29, 1998.
- Yang J, Huang Y, Wang X, Wang XB, Becker FF, Gascoyne PR. Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion. *Biophys J.* 76,

3307-14, 1999.

- Suzuki M, Yasukawa T, Mase Y, Oyamatsu D, Shiku H, Matsue T. Dielectrophoretic micropatterning with microparticle monolayers covalently linked to glass surfaces. *Langmuir.* 20, 11005-11, 2004.
- Love JC, Ronan JL, Grotenbreg GM, van der Veen AG, Ploegh HL. A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. *Nat Biotechnol.* 24, 703-7, 2006.
- Reichle C, Schnelle T, Müller T, Leya T, Fuhr G. A new microsystem for automated electrorotation measurements using laser tweezers. *Biochim Biophys Acta*. 1459, 218-229, 2000.

# 発表論文

 Ino K, Ishida A, Inouea YK, Suzuki M, Koide M, Yasukawa T, Shiku H, Matsuea T. Electrorotation chip consisting of threedimensional interdigitated array electrodes, Sensors and Actuators B:Chemical, 153,468-473,2011

# 低温除細動における点電極通電刺激誘発興奮伝播現象の解析



研究責任者 東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学専攻 ※(旧)産業技術総合研究所 特任研究員 荒 船 龍 彦

# 1. はじめに

本研究は、光学マッピング技術を用いた計測 と解析により、未だ不明な点が多い"低温環境を 利用した除細動メカニズム"を明らかにするもの である。これにより、低エネルギーかつ確実な新 たな除細動手法の確立に資することを目指して いる。

心室頻拍・細動(VT/VF)は心臓突然死につな がる重篤な不整脈である。VF を停止させる最も 有効かつ唯一の手段は電気刺激を用いた除細動 治療であるが、現在一般に用いられている除細動 は体外式(AED)/体内式(ICD)共に刺激エネル ギーが高いことから患者への負担が大きく、また 通電刺激が却って複雑なVFを誘発してしまう催 細動の危険性も指摘されている。①刺激エネルギ ーを可能な限り低く抑え、②催細動を起こさない 安全・確実な通電刺激プロトコルを確立すること が急務である。

近年の研究によって、不整脈の成因が渦巻き型 の異常興奮(スパイラルリエントリ)であること、 また心筋組織への通電印加が電極近傍に脱分極 領域と過分極領域を心筋線維走向に依存した複 雑な形状で同時に引き起こす『仮想電極分極現象

(Virtual Electrode Polarization: VEP)』の存在が明

らかになった¹⁾。

VEP は心筋線維走向の電気伝導性の異方性率 が細胞内と細胞外で異なる bi-domain 特性により 生じる現象である。VEP は細胞間を伝播する興奮 伝播現象とは異なり、通電刺激による局所領域の 強制的な電位の上昇と下降である。VEP は通電刺 激印加中のみ形成され、通電を終了すると強制的 な分極現象も終了し、形成された脱分極または過 分極領域の外周から新たな興奮波が開始する。刺 激後の興奮様態は3種類に分類できる。

• Not Capture

電極直下の心筋組織が脱分極直後の不応期の タイミングで通電刺激印加された場合、VEPの脱 分極・過分極領域は形成されるが、通電終了後に 新たな興奮波が開始されないケース。

### • Make excitation (Make 興奮)

電極直下の心筋組織が十分再分極して興奮性 が回復している状態へ通電刺激が印加された場 合に、通電終了と共に VEP の脱分極領域の外周か ら新たに開始する興奮波。

### • Break excitation (Break 興奮)

電極直下の心筋組織が再分極相タイミングで 通電刺激印加された場合に、通電終了後まず VEP の過分極領域に周囲の興奮が流れ込んで脱分極 し、その後その元過分極領域の外周から新たに開 始する興奮波。

点通電刺激後の電極直下の興奮現象というの は必ず上記3種類に分類される。Make 興奮波は VEPの形状がすぐに融合拡大し、ほぼ楕円状の興 奮波が放射状に伝播するのに比べ、Break 興奮波 は VEP の脱分極領域を迂回するように伝播する ため旋回性の興奮波となる(図1)。



#### 図1. 仮想電極模式図および Make/Break 興奮

除細動を行う場合に必ず VEP が発生し、また VEP が除細動の成否に重要な役割を担うことが シミュレーション研究において指摘されている が²⁾³⁾、VEP は①その形成が微小時間かつ微小領 域に限られる事、②にもかかわらず VEP からの新 たな興奮伝播心臓全体の興奮状態をダイナミッ クに変化させるという理由から、高時間・空間分 解能を両立させた詳細な計測が非常に困難であ り十分な観察・検証がなされていなかった。通電 刺激がどのようにスパイラルリエントリを停止 させ、そして除細動を成功させるかを詳細に理解 するためには、VEP の十分な解析が必要不可欠で ある。そこで我々は光学マッピングシステムと透 明板埋込み型微小電極アレイを組み合わせた高 分解能の VEP 計測システムを開発し、点通電刺激 誘発の VEP および VEP から開始する新たな興奮 波の詳細な観察を可能とした⁴⁾。

一方近年、新しい低エネルギー除細動手法の提 案として、心臓の局所あるいは心臓全体を適度な 低温状態に維持した低温治療と通電刺激を組み 合わせた手法が報告されている⁵⁾⁶。提案された 全体冷却手法では、通常温度 37℃に対して、適度 冷却 33℃ (Modest Hypothermia) で除細動効率が 向上するが、30℃まで過度に冷却すると却って除 細動効率は低下すると報告されている。臨床でも 脳外科治療などにおける低体温治療の患者にお いて不整脈発生が抑制されることが経験的に知 られている。また基礎的研究として、低温環境が 心筋細胞のイオンチャネルや組織抵抗といった 個々の電気生理的特性を変化させることも知ら れている⁷⁾。だが、低温環境が具体的に除細動効 果を向上させるメカニズムや、33℃で特異的に除 細動効率が向上するという温度依存性の理由は、 全く不明である。

本研究では以下の解決策を以って低温除細動 メカニズムの解明を行う

・単相性刺激(monophasic shock)による VEP の
 計測と解析を行い、最も単純な系で、適度冷却環
 境で VEP からの興奮波が心臓興奮状態を捕捉す
 るメカニズムを明らかにする。

・二相性刺激(biphasic shock)による VEP の計測 と解析を行い、臨床で除細動に用いられている二 相性刺激による VEP が適度冷却環境によって受 ける影響について調べ、前項と合わせて全体冷却 心筋における除細動効果についてまとめる。

・局所冷却心筋における単相/二相性刺激による VEPの計測と解析を行い、冷却環境において除細 動効率が向上するメカニズムを総合的に解析し、 明らかにする。

本研究でターゲットとする低温除細動治療は、 ①数℃程度の温度低下のため心筋に与えるダメ ージがほとんど無く、②副作用が無い、③すぐに 元の状態へ回復できる、といった点で投薬治療に 対する優位性がある。しかし低温除細動治療に関 する研究は 2000 年代半ばから開始された新しい 研究分野であり、大型動物へ除細動器を埋め込ん だ in vivo 研究などで有用性が示されている^の一方 でそのメカニズムの解明に踏み込んだ研究はま だ無い。本研究が明らかにする低温除細動のメカ ニズムは、基礎的研究だけに留まらず、in vivo 研 究や臨床応用における新しい除細動手法の確立 に有用性を示すことが期待される。

なお、本報告書の内容の一部は既に学術論文と して掲載されている⁸⁾。

# 2. 方法

本研究で行った動物実験手順は産業技術総合 研究所および実験実施場所である名古屋大学動 物実験倫理委員会の規定と承認の下に実施した。

### 2.1 心臓標本

ウサギ摘出心からランゲンドルフ灌流心標本 を作成した。灌流液に膜電位感受性色素 di-4-ANEPPS、モーションアーチファクト除去の ための筋縮抑制剤 BDM を添加した。心臓標本の 内部は凍結探針にて心内膜を凍結破壊し、心表面 約 1mm 厚を残した二次元標本とした。

# 2.2 光学マッピングシステム

心臓興奮伝播現象の計測には、我々が開発した VEP 計測用光学マッピングシステムを用いた⁴⁾ (図 2)。主波長 520nm の青緑色高輝度 LED を環 状に配置したリングライトを励起光源とし、心臓 標本に光照射する。放射蛍光の主波長 600nm 付近 にカットオフ波長を持つロングパスフィルタを 介して、高速度デジタルビデオカメラ(Fastcam Max, Photron) により 1000fps、512×512pixel、10bit で観察領域約 30×30mm を撮影した。計測後 PC にて正規化処理、ノイズ除去を行い、活動電位信 号を取得した。



図2 光学マッピングシステム概要図

# 2.3 透明電極

全体冷却実験において、通電刺激を印加しなが ら光学マッピングを同時に行うため、透明アクリ ル板上に微小電極を多数配列した透明板埋込み 型微小電極アレイを製作した。径0.1mmの白金ワ イヤを電極とした。この透明電極を心臓標本の左 心室正面に設置し、心臓の反対側には白金対極板 を設置した。定常刺激(S1)用と早期刺激(S2) 用の2点の微小電極を左心室の心筋線維走向に沿 って4mm間隔で設置した(図3)。ペーシング波 面が心筋線維走向に沿って伝播することで、点刺 激印加時の電極周囲の空間的電位勾配を心筋線 維走向と一致させた。



図 3. 透明電極

# 2.4 局所冷却プローブ

局所冷却実験において、心臓の局所のみを一定 の温度で冷却するため、銅フレームと透明樹脂か ら構成する局所冷却プローブを製作した(図 4)。 冷却源にはペルチェ素子(S.T.S 社)を使用し、 ペルチェ素子の対面より生じる熱の廃熱には銅 パイプ製 CPU 用クーラーとファンを設置して急 速廃熱させた。冷却プローブ先端は円形の銅フレ ーム内を透明樹脂で満たし、設置した心表面の光 学マッピングを可能とした。さらに心臓と接する 箇所には微小の熱伝対を設置し、冷却プローブに よる温度変化を直接計測した。本プローブを心臓 標本に設置した状態からペルチェ素子に通電印 加を開始し、約1分で心臓表面温度が 34~37℃か ら 28~30℃に冷却が可能である。



図.4 局所冷却プローブ

#### 2.5 全体冷却実験

全体冷却環境の再現としては,通常温度(37℃), 適度冷却(33℃),過度冷却(30℃)の3つの 温度環境を設定した。心臓標本の温度が設定温度 になるよう,灌流液の温度を2台の恒温槽によっ て制御し,再現した。心臓の温度はサーモグラフ ィ(TVS-200, Nippon Avionics)および心内膜側に 配置したサーミスタで確認・管理した。

温度環境の変化に伴う基礎的心臓電気生理特 性の変化を調べるため、活動電位持続時間、活動 電位振幅勾配,興奮伝導速度、VEP形状等を各温 度において計測した。

### 2.5.1 全体冷却·単相刺激実験

S1 電極よりペーシング刺激となる定常刺激 S1 を 400ms 間隔で 10 発印加した後、早期刺激 S2 を -20V、パルス幅 10ms、単相性刺激で一発印加し て、点通電刺激誘発 VEP および VEP からの興奮 波誘発を計測した。S1-S2 間隔は、S1 波面の脱分 極直後から静止電位へ再分極するまでの活動電 位持続時間を網羅的にカバーするよう S1-S2 間隔 を 10~20ms 刻みで変化させて印加した。これを 前述の 37℃、33℃、30℃の 3 温度環境全てにおい て実施した。

全通電刺激プロトコルの刺激後興奮様態(Not Capture, Break 興奮, Make 興奮のいずれか)と、後述する各刺激における指標(Phase APD、%Repolarization)を関連付け、上記3刺激後結果の指標の帯域を求めた。

### 2.5.2 全体冷却·二相性刺激実験

単相刺激同様の電極配置、刺激プロトコルにて S1-S2 間隔を 10~20ms 刻みで変化させて刺激印 加した。ただし S2 刺激は前相 8ms、後相 2ms の 4:1 時間幅、±20V の二相性刺激とした。二相性 刺激により、通電刺激から形成される VEP は前相、 後相で脱分極領域、過分極領域をお互いに相殺す るよう分極するため、通電後の興奮様態は Not Capture もしくは Make 興奮のみとなるため、後述 の指標(Phase APD、%Repolarization)と上記 2 刺 激後結果を関連づけてその帯域を求めた。

### 2.6 局所冷却実験

心臓標本心尖部に設置したバイポーラ電極よ りペーシング刺激を印加し、心臓を左右から挟み こんだ電極板から直交刺激を印加して心臓標本 に VT を誘発する。

VT の持続時間が2分を超過した後

Control 群…さらに1分後に20V 除細動刺激印加

・局所冷却群…冷却を開始してさらに 1 分後に
 20V 除細動刺激印加

としてそれぞれ電極板から除細動刺激を印加す る。除細動刺激は20Vから開始し、VTが停止し なかった場合は10Vずつ刺激強度を上げて再び 除細動刺激を印加した。その間局所冷却は続行し た。

除細動刺激結果を光学マッピングシステムに よる計測結果より①Phase resetting (除細動刺激そ のもので旋回中心が消滅して VT が停止する)、② New phase arise and terminate reentry (除細動刺激に より生じた旋回中心とスパイラルリエントリの 旋回中心が相互作用して相殺し合い VT が停止す る)、③Multiple wave arise (除細動刺激によって 多数の旋回興奮が発生し多形性リエントリが生 じる)、④Unchanged (刺激前後で変化が見られな いもの)の4つに分類し、Control 群と局所冷却群 で比較した。

### 2.7 心筋興奮捕捉指標

温度環境の変化による VEP の解析のため、本研 究では新たに Phase APD、% Repolarization という 2 つの指標を提案する。

刺激間隔を変化させて網羅的に取得したデータ は、まず通電と共に脱分極を開始する Virtual cathode 領域から活動電位波形を導出し、Phase APD、% Repolarization と通電印加後の現象を関連 付けた。それぞれの指標については下記に詳細を 記す。

# 2.7.1 Percentage Repolarization

**S2**印加直前の**S1**による活動電位振幅を**Vm**とし、**S2**が印加された時の活動電位の高さを**V**_{shock}として

% Repolarization =  $(V_{\text{shock}}/Vm) \times 100 [\%]$ 

として算出した(図5)。



図 5. %Repolarization

### 2.7.2 Phase APD

S2 電極近傍でのS2 印加直前のS1 刺激による活 動電位の活動電位持続時間(Action Potential Duration: APD₉₀)、および最後のS1 刺激による波形 の立ち上がりからS2 刺激による刺激印加までの 時間(Real Coupling Interval: RCI)を元に

Phase APD =  $(RCI/APD_{90}) \times 100 [\%]$ 

として算出した(図6)。



図 6. Phase APD

なお APD₉₀ とは静止電位レベル時の信号の平均 値を静止電位値 Vm₀ とし、最大振幅を Vm_{max} とし て

 $Vm_{90} = (Vm_{max} - Vm_0) \times 0_{\circ} 1$ 

で得られる Vm₉₀を元に、脱分極時の Vm₉₀から再 分極時の Vm₉₀ までの時間を APD₉₀ と定めた。RCI も同様に、脱分極波形の Vm₉₀ タイミングから刺 激印加時間までの時間を RCI と定めた。以降、本 文では簡略化のため APD₉₀ を APD と記す。

# 3. 成果

# 3.1 全体冷却·単相刺激実験結果

同一標本において計測された3温度環境における Phase APD をまとめたものをグラフに示す(図7)。37℃から33℃に冷却することで Break 興奮となった帯域が縮小し、心筋捕捉のできない Not Capture および Make 興奮の帯域が拡大した。さらに 30℃まで冷却すると再び 37℃時と同程度まで Break 興奮の帯域が拡大し、Not Capture と Make 興奮の帯域が縮小した。



### 図 7. 単相性刺激実験・各温度における Phase APD

同様に、同一標本において計測され た%Repolarizationをまとめたグラフを示す(図8)。 Phase APD 同様に、37℃から33℃に冷却すること で Break 興奮の帯域が縮小し、Not Capture、Make 興奮の帯域は増加した。

しかし 30℃まで過度に冷却すると 37℃時とほ ぼ同程度に Break 興奮の帯域は増加し、その他 2 つの帯域は縮小した。



# 図 8. 単相性刺激実験・各温度におけ る%Repolarization

APD や CV、VEP パターンといった個々の心臓 電気生理特性は全て、心筋の温度を低下させるに 伴って一様に変化し、33℃にピークを持つような 変化を示さなかった。

 一方、通電刺激からの興奮現象を Phase APD お よび%Repolarization の指標を用いて分類すると、
 両方の指標で、33 ℃ において最も Break 興奮の
 発生帯域が小さくなることが示された。

Break 興奮発生のメカニズムは ①通電印加時の周囲の空間的な電位勾配≒先行 興奮の覚め具合、つまり空間的不応期の分布 ②通電刺激誘発 VEP の脱分極/過分極領域の形状 の相互作用・相互関係によって規定される。この ①は CV、APD、dV/dtMax、②は VEP 形状、 dV/dtMax が関与する。低温作用による APD 延長 は心筋細胞の K+イオンチャネルの抑制や Ca2+電 流の不活性化の遅延、CV 低下や dV/dtMax 低下に はNa+チャネルの抑制、CVL と CVT の変化率の 違いや VEP パターンの変化には心筋組織の gap junction や anisotropy ratio の変化が寄与している と考えられるが、温度低下に伴って一方向的に変 化する APD、CV、dV/dtMax、VEP 形状といった 各要素の温度依存性変化率は一定では無かった。 以上から33℃環境下でBreak 興奮発生帯域が最

も縮小する現象の原因は単一では無く、冷却によ る様々な電気生理学的要素の総合的な作用で規 定されている事が示唆された。

除細動を実現する電気生理的なメカニズムと して芦原らは、①通電刺激誘発 VEP がリエントリ を停止・消滅させ、②VEP から開始する新たな興 奮波がリエントリに発展しない、という2つの機 序が必要であると述べている²⁾。前述の通り、点 刺激による Break 興奮波は旋回性の興奮を生むた め、スパイラルリエントリへ発展する可能性を持 つ。33℃温度環境において Break 興奮波が発生し にくいという効果は、催細動抑制という上記除細 動メカニズムの後者の条件を補完するものであ る。また心臓標本において 33℃で Break 興奮が起 きにくいという本研究の結果は、大型動物を用い た検討において 33℃で除細動効率が向上すると いう先行研究の結果と矛盾しない。

### 3.2 全体冷却·二相性刺激実験結果

二相性刺激では単相性刺激と違い、Phase APD 指標では 33℃で Not Capture 帯域が最小となり、 通電刺激によって Capture する帯域が最大となっ た(図.9)。また、%Repolarization でも同様に 33℃ が通電刺激 Capture 帯域が最大となった(図.10)。









二相性刺激の場合、前相で形成した VEP の分極 パターンとほぼ同じ形状で極性が反転した分極 現象が後相で発生する。つまり通電印加直後には、 前相の脱分極領域は強制的に活動電位が抑圧さ れ、また前相の過分極領域は強制的に電位が上昇 している。そのため通電印加後は前相の脱分極領 域と後相の脱分極領域を合わせた刺激電極を中 心とした楕円状の領域が脱分極領域となって、両 領域外周より放射状に興奮波が心筋周囲へと伝 播していく。また単相刺激時に見られるような脱 分極領域を避けるように旋回する旋回興奮波は ほぼ生じない。本現象は二相性刺激で Capture し た興奮波による催不整脈性が非常に低いことを 示す。

本研究における二相性刺激実験結果で Capture した場合、全ての結果において放射状に興奮波が 伝播し旋回性興奮波は無かった。そのため33℃適 度冷却環境において最も Capture の帯域が大きく なったという結果は、即ち33℃温度環境における 通電刺激が最も除細動効率が高いことを意味し、 これもまた大型動物を用いた先行研究における 結果と矛盾しない。

#### 3.3 局所冷却実験結果

局所冷却実験における刺激電圧と VT 停止率を まとめたものを示す (図 11)。局所冷却によって、 局所冷却をしない Control 群に比べ、低い刺激電 圧で VT 停止を実現した。



図 11. 刺激電圧-VT 停止率グラフ

Control 群(図.12)、局所冷却群(図.13) それぞれの除細動刺激後の結果を前述の

- ① Phase resetting
- ② New phase arise and terminate reentry
- ③ Multiple wave arise
- ④ Unchanged
- に分類した結果を示す。

その結果、Control 群に比べ局所冷却群において ②が増加し、③④が低下した。局所冷却において は低エネルギー通電刺激による新たな旋回性興 奮の生成が、除細動の成功に重要な役割を担うこ とが示唆された。



図 12. 局所冷却除細動結果分類 Control 群



図 13. 局所冷却除細動結果分類 局所冷却群

### 4. まとめ

37℃、33℃、30℃の3温度環境における心筋通 電刺激印加時に発生する VEP および VEP からの 興奮伝播現象を計測・解析し、33℃の適度冷却環 境において、①単相刺激の場合は通電刺激から生 じる旋回性の興奮波 Break 興奮が抑制されること、 ②二相性刺激の場合は通電刺激由来興奮波が旋 回性興奮波を生じず、かつ最も心筋興奮を捕捉す ること、を明らかにした。以上の結果が適度冷却 除細動における除細動効率の向上に強く影響し ていることが示唆された。また局所冷却除細動に おいては、通電刺激から生じる旋回性興奮波と VT 興奮波の相互作用メカニズムにより、低い刺 激強度でも除細動が可能であることを示した。

本研究でターゲットとする低温除細動治療は、 ①数℃程度の温度低下のため心筋に与えるダメ ージがほとんど無く、②副作用が無い、③すぐに 元の状態へ回復できる、といった点で投薬治療に 対する優位性がある。しかし低温除細動治療に関 する研究は 2000 年代半ばから開始された新しい 研究分野であり、大型動物へ除細動器を埋め込ん だ in vivo 研究などで有用性が示されている一方 でそのメカニズムの解明に踏み込んだ研究はま だ無い。本研究が明らかにする低温除細動のメカ ニズムは、基礎的研究だけに留まらず、in vivo 研 究や臨床応用における新しい除細動手法の確立 に有用性を示すことが期待される。 謝辞

本研究は、財団法人中谷電子計測技術振興財団 平成 20 年度研究助成の支援のもとに行われた。 ご援助いただいたことに感謝いたします。

# 参考文献

- John P. Wikswo, Jr., Shien-Fong Lin, Rashida A. Abbas, "Virtual electrodes in cardiac tissue: a common mechanism for anodal and cathodal stimulation", Biophysical Journal 69(6):2195–2210, 1995
- Takashi Ashihara, Tsunetoyo Namba, Takanori Ikeda, Makoto Ito, Kazuo Nakagawa, Natalia Trayanova, "Mechanisms of myocardial capture and temporal excitable gap during spiral wave reentry in a bidomain model", Circulation 109(7):920-925, 2004
- Igor R. Efimov, Felipe Aguel, Yuanna Cheng, Brian Wollenzier, Natalia Trayanova. "Virtual electrode polarization in the far field: implications for external defibrillation", American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology. 279(3): 1055-1070, 2000.
- 4) 荒船龍彦,三嶋晶,佐久間一郎,稲田紘,柴田 仁太郎,中川晴道,山崎正俊,本荘晴朗,児玉 逸雄. "高空間時間分解能の心筋通電刺激誘発 Virtual Electrode 現象光学マッピングシステム ",生体医工学.41(4):314-320,2003.
- 5) Lucas Boersma, Zoltan Zetalaki, Josep Brugada, Maurits Allessie, "Polymorphic reentrant ventricular tachycardia in the isolated rabbit heart studied by high-density mapping", Circulation 105(25):3053-3061, 2002.
- Kimberly A. Boddicker, Yi Zhang, M. Bridget Zimmerman, Loyd R. Davis, Richard E. Kerber, "Hypothermia improves defibrillation success and resuscitation outcomes from ventricular fibrillation", Circulation 111(24):3195-3201, 2005.

- T Kiyosue, M Arita, H Muramatsu, A J Spidler, D Noble, "Ionic mechanisms of action potential prolongation at low temperature in guinea-pig ventricular myocytes", The Journal of Physiology. 468:85-106, 1993.
- 8) 荒船龍彦, 佐久間一郎, 柴田仁太郎, 芦原貴司, 中沢一雄, 本荘晴朗, 神谷香一郎, 児玉逸雄, "光学計測を用いた低温除細動における仮想電極誘発興奮伝播現象の解析", 生体医工学47(6):514-521, 2009.

# 発表論文

荒船龍彦, 佐久間一郎, 柴田仁太郎, 芦原貴司, 中沢一雄, 本荘晴朗, 神谷香一郎, 児玉逸雄, "光 学計測を用いた低温除細動における仮想電極誘 発興 奮 伝 播 現 象 の 解 析 ", 生 体 医 工 学 47(6):514-521, 2009.

# 学会発表

- ・ 荒船龍彦, 佐久間一郎, 柴田仁太郎, 芦原貴 司, 中沢一雄, 本荘晴朗, 神谷香一郎, 児玉逸 雄, "心臓局所冷却除細動における仮想電極分 極現象の解析", 第 48 回日本生体医工学会大 会
- ・ 荒船龍彦, 佐久間一郎, 柴田仁太郎, 芦原貴 司, 中沢一雄, 本荘晴朗, 神谷香一郎, 児玉逸 雄, "局所冷却除細動における virtual electrode 誘発興奮伝播現象の解析", 第26回日本心電 学会学術集会
- ・ 荒船龍彦, 佐久間一郎, 柴田仁太郎, 芦原貴 司, 中沢一雄, 本荘晴朗, 神谷香一郎, 児玉逸 雄, "光学計測を用いた低温除細動における仮 想電極誘発興奮伝播現象の解析", 生体医工学 シンポジウム 2009
- ・ 荒船龍彦, 佐久間一郎, 柴田仁太郎, 芦原貴 司, 中沢一雄, 本荘晴朗, 神谷香一郎, 児玉逸 雄, "局所冷却除細動における Phase Singularity の解析", 心電情報処理ワークショップ 2009

# 受賞

荒船龍彦

第48回日本生体医工学会大会 平成20年度 日本生体医工学会科学新聞賞・研 究奨励賞・坂本研究刊行助成賞・阿部賞 『光学マッピングを用いた冷却心筋における通

電刺激誘発仮想電極分極現象の解析』2009/4/24

# 水晶振動子によるヒドロキシアパタイト粒子の 環境応答型生体分子認識機構の解析



研究責任者 山口大学大学院医学系研究科
 助 教 吉 本 則 子
 共同研究者 山口大学大学院医学系研究科
 教 授 山 本 修 一

#### 1. はじめに

ヒドロキシアパタイト(HA)は、カルシウムとリ ン酸を含む水酸化物[Ca10(PO4)6OH2]である。人骨 とほぼ同じ成分であり安全性や生体親和性が高 い。このため頭蓋骨に損傷を受けた際の代替骨や 人工関節など、人工骨の材料として用いられる。 一方でバイオ分離材料としての需要もある。HA ではカルシウムイオンが2対の陽荷電部位(C-site) を形成し、3対のリン酸基中の6個の酸素原子か ら成る陰性荷電部位(P-site)を形成している。陰・ 陽の両電荷を有しているため、1956年にはTiselius らにより、陽イオン、陰イオンを兼ね備えたマル チモード型のクロマトグラフィーとして HA を充 填剤とした HA クロマトグラフィー(HAC)が開発 された。しかし、実際には HAC はイオン交換ク ロマトグラフィーとは異なる独特の保持特性を 示すことが分かった⁽¹⁾。まず、(1)アミノ酸などの 低分子物質は電荷があったとしても HAC にはほ とんど吸着されない。(2)ポリペプチドの場合、総 電荷数が十分であれば様々な分子量のものが吸 着できる。(3)ポリペプチドとHAの相互作用は尿 素の影響を受けないが、尿素存在下ではポリペプ チドがほとんど吸着されなくなる。これらの特徴 から HAC とタンパク質の間には静電気的な相互 作用に加えて(a)カルシウムイオンに対するメタ ルアフニティー、(b)タンパク質側鎖の極性基と陽 荷電部位との双極子間相互作用などが働いてい ることが想定された。これらの相互作用をもとに 酸性タンパク質は C-site に吸着し、塩基性タンパ ク質は P-site に吸着すると考えられたが、P-site に吸着されたアミノ酸側鎖は C-site からの荷電反 発が働く。さらに近年の分光学技術の発展により、 C-site に最初に静電的な相互作用で吸着したカル ボキシル基は通常のアニオン交換よりも強い配 位結合を C-site との間に形成しており、水を介し たタンパク質中のアミンとアパタイトの水酸化 物イオン間での水素結合も確認されており²⁾、そ の結合様式は複雑である。1956年に Tiselius が充 填剤として開発した当初の HA は多孔性の球状の 粒子ではなく、長方形棒状の形状であったため流 れ特性も悪く耐圧性もなく、耐久性も低かった³⁾。 このため、多様な保持特性を示す HA であったが、 イオン交換クロマトグラフィーに取って代わっ て使われることはなかった。しかし、多孔性で球 状の HA セラミックスの出現により耐久性に優れ 繰り返し使用の可能な HA カラムが製造され、

1990年代前半から現在にかけて、HAを用いた遺 伝子組み換えタンパク質の精製過程に使用され た報告例が大幅に増加している²⁾。また、培養液 からの抗体の精製過程に用いられた例も報告さ れている。培養液には緩衝塩や糖などの培養液成 分を多く含み、さらに DNA や細胞膜などの細胞 由来の成分が目的タンパク質以外の夾雑物質と して多く含まれるため、複数のステップを経て精 製され、クロマトグラフィーも proteinA、陽イオ ン交換、陰イオン交換などが組み合わされて使用 される。このため、その製造コストのうち8割以 上が精製コストを占める非常に高価なタンパク 質医薬品では、精製コストの低減化が急務の課題 でありマルチモード型の HA クロマトグラフィー は再び注目されている。しかし工業的に応用可能 であることを示すためには、前述の複雑なタンパ ク質との結合様式を明らかにし、そのタンパク質 吸着特性を予測可能なモデルを構築する必要が ある。このため本研究では、培養液成分に含まれ る夾雑イオンの影響を考慮し、各種イオンの存在 下における HA のタンパク質・ヌクレオチドなど の生体分子認識機構の解明を目的とし研究を行 った。これまでの研究においてクロマトグラフィ ーシステムを用いてイオン交換担体および HAC

# 3. 実験

# 3.1 使用タンパク質

酸性タンパク質としては bovine serum albumin (BSA, Mw=66000, pI=5.1~5.3)、β-lactoglobulin (β-LG, Mw=36000, pI=4.7~4.9)を、塩基性タンパク 質として lysozyme (Mw=14300, pI=11.0~11.4)を用 いた。 の生体分子に対する認識機構を数学的モデルを 用いたモデル化に成功しており^{4),5)}、マクロ的な 分子認識機構の解析にはクロマトグラフィーシ ステムを用いて行った。さらにミクロなレベルで の相互作用の解明のために、タンパク質との相互 作用をその質量変化と粘弾性の変化により直接 的に解析することのできる水晶振動子マイクロ バランス(Quartz Crystal Microbalance、QCM)法を 使用した。

# 2. 水晶振動子について 6)

水晶振動子は石英の結晶であり電圧をかける と規則正しく振動し、時計・パソコン・携帯電話 などに使われている。水晶振動子ーマイクロバラ ンス法に用いられる AT カット水晶振動子は、AT 面で結晶がカットされており両サイドに電極が 形成されている。この電極に電圧を加えると面内 方向にゆがみが生じ、電圧を解除するとずり振動 を生じる。このずり振動の固有周波数に加電圧を 同期することによって水晶振動子を共振させる ことができる。電極表面に物質が付着した場合、 その質量に応じて共振周波数 f が変動する。この 変動Δf を解析することによって極めて微量な質 量変化を計測することが可能になる。

### 3.2 使用移動相

共存イオンとしては、ナトリウムイオン、塩化 物イオン、リン酸イオン、カルシウムイオンを対 象とし、クロマトグラフィーおよび QCM の実験 で移動相には共通して次表の buffer を使用した。

Table 1 使用移動相

buffer A	10-400mM Sodium Phosphate +0.1mM CaCl ₂ (pH6.8)
buffer B	10-600mM Sodium Sulfate+10mM HEPES+3.0mM CaCl ₂ (pH6.8)
buffer C	0-1M NaCl+10mM Sodium Phosphate+0.1mM CaCl ₂

# 3.3 ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー を用いた実験

クロマトグラフィーシステム ÄKTAexplorer を 使用し、塩濃度直線勾配溶出実験を行った。HAC には主としてセラミック球状アパタイト粒子 CHT-Type1(BioRad)を用いた。( $d_c=0.46$ cm, Z=10cm, 粒子径 40  $\mu$  m)。

# 3.4 ヒドロキシアパタイト固定化電極 QCM を用 いたタンパク質吸着実験

水晶振動子は基準振動数が 5MHz の AT カット 水晶振動子を用いた。電極として金電極およびク ロムとチタンの合金(Cr5nm+Ti50nm)にヒドロキ シアパタイトをコーティングしたヒドロキシア パタイト電極(KSV Instruments 社および Q-sense 社 製)を使用した。ヒロドキシアパタイト電極は、 (株)UBE 科学分析センターに依頼して X 線光電子 分光分析(ESCA)により組成分析を行った(図 1)。 Ti が検出されているが、これはコーティングされ たアパタイトの厚みが薄いためであると考えら れる。また、各元素のピーク強度より表面原子濃 度を計算した結果、センサー表面での Ca/P 比は 3.2 と決定された。



図1 ヒドロキシパタイト電極の ESCA ワイドスペクトル

水晶振動子の大きさは、いずれも直径 14mm で ある。また、インピーダンスアナライザー内蔵の QCM-Z500(KSV Instruments 社製)を使用して水晶 振動子の共振周波数fを解析した。QCM の装置お よび水晶振動子のセルの概略図を図2に示す。セ ルは Flow 式であり、サンプルはシリンジから三 方コックを経てペルチェ素子で保温された流路 内に導入される。さらに三方コックを切り替える ことで恒温されたサンプルがセル内に導入され る。移動相として用いた buffer およびサンプルの 恒温を 15 分とし、その後計測を行った。洗浄は、 高濃度の塩を含む buffer を通液後、1MNaOH 溶液 を通液することによって行った。



図2 QCM 測定装置の概略図 (図中の a の部分はペルチェ素子により恒温される。)

### 4. 結果および考察

# 4.1 HAの酸性タンパク質分子認識機構におよぼ す共存イオンの影響

# 4.1.1 HAC を用いた HA と酸性タンパク質間相互 作用の解析

まず、酸性タンパク質を用いて各種共存イオン の存在下における HAC のタンパク質分子認識機 構を解析した結果を示す。HAC において、buffer A および buffer C を用いて中性条件(pH 6.8)におい て、酸性タンパク質β-LG を NaCl、あるいはリン 酸ナトリウムを低濃度に含む溶液条件で HA に吸 着させ、それらの濃度を増加させて HA から溶出 させた場合の溶出曲線の例を図 3(a)に示す。酸性 タンパク質であるβ-LG は中性条件では負電荷を 有していると考えられ、HA 中の陽荷電部位 C サ イトに吸着すると考えられる。高濃度の NaCl 共 存下においては溶出のピークは観察されず、 0.25M 程度のリン酸ナトリウム共存下で溶出され た。このことから、HA からβ-LG を脱着させるに はリン酸イオンが必要であり、これまでも報告と 一致して HA とβ-LG の結合は静電的な相互作用 ではなくタンパク質中のカルボキシル基と HAの

Ca²⁺イオンとの間のキレート結合であると考えら れる。また、溶液中の Ca²⁺イオンが HA の P サイ トに吸着することが報告されており⁷⁾、図 3(b)に は、HA と $\beta$ -LG の相互作用におよぼす Ca²⁺イオン の影響について検討した例を示す。Ca²⁺イオン濃 度を高濃度にした場合、リン酸ナトリウムが共存 すると沈澱が生じる。このため、Ca²⁺イオン濃度 を高濃度の場合は buffer B を用いた。 $Ca^{2+}$ イオン 濃度を 0.1mM あるいは 3mMで一定とし、低濃度 のリン酸ナトリウムあるいは硫酸ナトリウムの 条件で HAC にβ-LG を吸着させ、リン酸ナトリウ ムあるいは硫酸ナトリウムの濃度を増加させる ことによってβ-LGを脱着させた。この結果、Ca²⁺ イオン濃度が 3mMの場合の方が、脱着に高濃度 の硫酸ナトリウムを必要とし溶出体積が大きく なることが分かった。酸性タンパク質がCサイト に結合した場合、負電荷部位であるPサイトとの 間に電荷反発が生じることが報告されているが、 Ca²⁺イオンが高濃度に存在した場合、電荷反発が 抑制され、HA とB-LG との間の相互作用が強くな ったのではないかと考えられる。



図3 各種イオン共存下における HAC のβ-LG 保持特性

(a) 塩化物イオンおよびリン酸イオンが共存した場合の溶出挙動の違い

(上図のナトリウム・塩化物イオンの共存下では bufferC を用い、下図のナトリウム・リン酸イオンの共存下 では bufferA を用いた。)

(b) Ca²⁺イオン濃度の溶出体積に及ぼす影響

(図中の低濃度の Ca²⁺イオンが共存する場合は buffer A を用い、高濃度の Ca²⁺イオンが共存する場合は buffer B を用いた。)

また、酸性タンパク質である BSA においても  $Ca^{2+}$ イオンの濃度の影響を解析した結果、高濃度 の $Ca^{2+}$ イオンが共存した場合、 $\beta$ -LG と同様に溶 出体積が増加し HA との相互作用が強くなること が分かった。また、HA への吸着サイトの数をこ れまで報告してきたタンパク質相互作用を解析 するための数学的モデル⁵⁾を用いて解析を行った。 タンパク質が HA に吸着する際に HA 上に吸着し ているイオンとタンパク質の吸着部位の間に化 学量論的なイオン交換反応が起こると考える。こ のとき、タンパク質の溶出体積から求められる HAC における分配係数  $K_p$ は共存イオン濃度と次 式の関係がある。

 $K_{\rm P}={\rm A}\cdot I^{\rm B}$  (1)

Aは比例定数、Bはタンパク質中のHAへの吸着 部位の数である。また、タンパク質をHAから脱 着する際に起こった塩濃度変化を、変化する際に 要した溶液体積およびカラム体積で規格化した 値 *GH*[M]とタンパク質の分配係数の間には次式 が成立している。

$$\int_{I_0}^{I_R} dI / K\mathbf{p} = GH \quad (2)$$

(1)式を(2)式に代入すると GH と *I*_Rの関係は次式 となる。

$$GH = I_R^{B+1} / [A(B+1)]$$
 (3)

よって、GH[M]と脱着した際の塩濃度  $I_R[M]$ に対 して両対数プロット(GH-IR プロット)すると直線 関係が得られ、傾きから相互作用部位の数 B を決 定することができる。共存  $Ca^{2+}$ イオン濃度を変化 させた際の $\beta$ -LG の GH-IR プロットは図 4 のよう になった。



図4 Ca²⁺イオン濃度を変化させた際の $\beta$ -LG の GH-IR プロット

(図中の曲線の傾きからβ-LGのHAに対する吸着作用部位の数Bを求めると低濃度条件([Ca²⁺]=0.1mM)の場合 5.1, 高濃度条件([Ca²⁺]=3mM)の場合8.4となる。)

相互作用部位の数Bは共存Ca²⁺イオン濃度が高 い方が大きく、Pサイトとの電荷反発の抑制によ り増加したのではないかと考えられる。

# 4.1.2 QCM を用いた HA と酸性タンパク質間相互 作用の解析

HA と酸性タンパク質との相互作用におよぼす Ca²⁺イオンへの影響を、HA-QCM を用いて解析し た。図 5 には、低濃度([Ca²⁺]=0.1mM)あるいは高 濃度([Ca²⁺]=1mM)の Ca²⁺イオンの存在下おいて酸 性タンパク質 BSA の吸着による HA 電極の振動数 F の変化を解析した結果を示す。まず、移動相を 流し振動数が定常化したのち、2~10mg/mL の濃 度の異なる BSA 溶液を一定時間毎に供給を行っ た。この結果 Ca²⁺イオン濃度が低い方が振動数変 化は大きいが(図 5(a))、振動数の変化速度は Ca²⁺ イオン濃度が高い方が速い(図 5(b))、すなわち、 吸着速度が速くなることが分かった。これも、高 濃度の Ca²⁺イオンが共存することでタンパク質 の負電荷部位と P サイトとの電荷反発が抑制され ていることが示唆していると考えられる。また、 振動数変化の減少は BSA の負電荷部位に Ca²⁺イ オンが吸着し、HA への吸着量が減少したためで あると考えられる。また、HAC では一般的に Ca/P 比=1.6 程度であるのに対して、HA-QCM の場合は Ca/P=3.2 と高く電極上の P サイトの割合が少ない こと、タンパク質に対する比表面積が HA-QCM の方が小さいことなども吸着量の減少の原因と 考えられる。



図 5 HA-QCM 電極への BSA の吸着実験 (振動数 Fは移動相のみを供給して定常化した時の振動数の値を基準 とし振動数変化 $\Delta F$ を算出した。n は基準振動数以外はオーバートーン数である。移動相として (a) では bufferA を使用し、 (b) では bufferB を使用した。また、移動相のみをセルへ導入して平衡に達した時間を時間 0[s] とし、図中の矢印 (I) ~ (V) で、 [BSA]=2, 4, 6, 8, 10mg/mL の濃度に調整したサンプル溶液をセルに導入した。)

# 4.2 HA の塩基性ンパク質分子認識機構におよぼ す共存イオンの影響

# 4.2.1 HAC を用いた HA と塩基性タンパク質間相 互作用の解析

次に塩基性タンパク質であるlysozymeとHAの相 互作用に及ぼす共存イオンの影響について検討 した。図7には、bufferA~Cの低塩濃度の条件で lysozymeを吸着させ、塩濃度を増加させた脱着さ せたときの溶出曲線を示す。酸性タンパク質の場 合と異なり、高濃度のリン酸イオンが存在しなく てもナトリウム・塩化物イオンの共存下において lysozyme が溶出されているのが分かる(図 7 (a))。 これは、lysozyme が HA の負電荷部位である P サ イトに静電気的に結合していることを示してい ると考えられる。また、高濃度の  $Ca^{2+}$ イオンの共 存下では( $[Ca^{2+}]=2mM$ )、lysozyme に HA が吸着さ れずに移動相とともに溶出されることが分かっ た(図 7 (c))。これは、HA の P サイトに  $Ca^{2+}$ イオ ンが吸着したため、カラムに吸着できなかったの ではないかと考えられる。



図7 各種イオン共存下における HAC の lysozyme 保持特性

((a)では bufferC を使用し 0~1M に NaCl を変化させ、(b)では bufferA を使用し 10~400mM にリン酸ナトリ ウムを変化させ、(c)では bufferB を用い、[Ca²⁺]=2mM の条件で 10~60mM に硫酸ナトリウム濃度を変化させ て吸脱着させた。)

4.2.2 QCM を用いた HA と塩基性タンパク質間相 互作用の解析

図 8 に HA-QCM を用いて lysozyme の HA に対 する吸着に対する  $Ca^{2+}$ イオンの影響を解析した 結果を示す。HAC における実験結果と一致して、 低濃度 Ca²⁺イオンが共存している場合は吸着に よる振動数の減少がみられたが、高濃度 Ca²⁺イオ ンの共存下では、HA 電極への吸着はほとんど見 られず、振動数は一旦減少するがその後増加する 結果となった。



図 8 HA-QCM 電極への lysozyme の吸着実験 (移動相として (a) では bufferA を使用し、 (b) では bufferB を使 用した。また、移動相のみをセルへ導入して平衡に達した時間を時間 0[s]とし、図中の矢印 (l) ~ (V) では、 [lysozyme]=2, 4, 6, 8, 10mg/mL の濃度に調整したサンプル溶液をセルに導入している。)

# 4.3 HAのオリゴヌクレオチドの分子認識機構に およぼす共存イオンの影響

# 4.3.1 HAC を用いた HA とオリゴヌクレオチド間 相互作用の解析

図 9 には、 $Ca^{2+}$ イオンの存在下において一本鎖 あるいは二本鎖オリゴヌクレオチド(ss-DNA, ds-DNA)を吸脱着させた際の溶出曲線を示す。 ss-DNA は  $Ca^{2+}$ イオン濃度が低い場合、カラムに ほとんど吸着できず溶出されているのが分かる。 また、Ca²⁺イオン濃度が高濃度の条件では、 ss-DNA もカラムに保持され、さらに ss-DNA、 ds-DNA ともに溶出体積が増加していることが分 かる。ss-DNA はポリマー鎖が伸展した構造をと っているとされており、この為 Ca²⁺イオン濃度が 低い条件では HA の P サイトとの反発が大きく働 いているものと考えられる。また、高濃度の Ca²⁺ イオンが共存した場合、前述の酸性タンパク質と 同様に電荷反発が抑制されると考えられる。



図9 HACのオリゴヌクレオチド保持特性と Ca²⁺イオンの影響

((a)では bufferA を使用し[Ca²⁺]=0.1mM の条件で、(b)では bufferB を使用し、[Ca²⁺]=2mM の条件で DNA を吸 脱着させた。)

# 4.3.2 QCM を用いた HA とオリゴヌクレオチド間 相互作用の解析

図 10 には、低濃度 Ca²⁺イオン濃度が共存する条 件で HA 電極に対する ss-DNA(図 10(a))、 ds-DNA(図 10(b))の吸着を解析した結果を示す。 ss-DNA では吸着による振動数変化がほとんど見 られず、ds-DNA ではタンパク質における吸着と くらべてごくわずかにゆるやかに振動数が減少 する結果となった。これは DNA 分子の大きさの ためであると考えられ、HA 電極に対する吸着速 度がタンパク質と比較してはるかに遅いと考え られる。



図 9 HA-QCM 電極への DNA の吸着実験 (50mer のオリゴヌクレオチド 50A を一本鎖 DNA として、および 50A と50T を熱処理し二本鎖 DNA として使用した。図中の矢印の示す時間でサンプルの供給を行っている。)

### 4. まとめ

(1)酸性タンパク質はタンパク質中のカルボキシ ル基とHAのC-サイトとの間にキレート形成する 形でHAに吸着し、共存Ca²⁺イオン濃度が高い場 合は P-サイトとの電荷反発が抑制されることが 分かった。

(2)塩基性タンパク質はHAと静電気的相互作用を もとにHAに吸着し、共存Ca²⁺イオン濃度が高い 場合はHAに吸着できなくなることが分かった。 (3)オリゴヌクレオチドとHAの間の相互作用も酸 性タンパク質と同様に、共存Ca²⁺イオン濃度の影 響を受けHAのC-サイトとの間にキレートを形成 していることが分かった。また、タンパク質と比 較してHA電極に対する吸着速度がはるかに遅い ことが分かった。

# 謝辞

本研究は、財団法人中谷電子計測技術振興財団 の奨励研究助成の多大なる援助をうけて行いま した。ここに深い感謝の意を表し御礼申し上げま す。

# 参考文献

- (1)Marina J. Gorbunoff, 'The Interaction of Proteins with Hydroxyapatite 1.Role of Protein Charge and Structure', *Analytical Biochemistry*, **136**, pp.425-432 (1984)
- (2)Larry J. Cummings, *et al.*, 'Protein Chromatography on Hydroxyapatite columns', *Methods in Enzymology*, 463, pp.387-404 (2009)
- (3)Pete Gagnon, 'Monoclonal antibody purification with hydroxyapatite', *New Biotechnology*, 25, pp.287-293 (2009)
- (4)Shuichi Yamamoto, 'Electrostatic interaction chromatography process for protein separations: The impact of the engineering analysis of biorecognition mechanism on the process optimization', *Chem. Eng. Technol.*, **28**, pp.1387-1393

(2005)

- (5)Takashi Ishihara and Shuichi Yamamoto, 'Molecular recognition in hydroxyapatite chromatography and ion exchange chromatography of proteins', *Kagaku Kougaku Ronbunshu*, **27**, pp.186-190 (2001)
- (6)Hiroshi Muramatsu, 'Computation of equivalent circuit parameters of quartz crystals in contact with liquids and study of liquid properties', *Anal. Chem.*, 60, pp.2142–2146 (1988)
- (7)Pete Gagnon, *et al.*, 'Reverse calcium affinity purification of Fab with calcium derivatized hydroxyapatite', *J. Immunolog. Methods*, **342**, pp.115-118 (2009)

### 発表

- (1)Noriko Yoshimoto, Shintaro Higuma, Yukiko Nisizumi, Hirotaka Higuchi and Shuichi Yamamoto, 'Characterization of the retention properties of proteins and DNAs in hydroxyapatite chromatography', *Proceedings of APBiochec'09, J.B.B.* **108**, p.S71, (2009)
- (2)Megumi Seo, Mitsuyo Abe, Noriko Yoshimoto and Shuichi Yamamoto, 'Effect of P-site Block by Ca2+ on retention properties of Proteins and DNAs in Hydroxyapatite chromatography', *The 8th international symposium on membrane stress biotechnology*, P02, September (2010) Osaka

加速度センサを用いた騒音に頑健な骨伝導-音声マイクロフォンの開発



 研究責任者 香川高等専門学校 電気情報工学科

 助
 教
 中
 山
 仁
 史

 共同研究者 広島市立大学大学院
 システム工学専攻
 教
 授
 石
 光
 俊
 介

 (独) 産業技術総合研究所
 健康工学研究部門
 主任研究員
 中
 川
 誠
 司

# 1. はじめに

近年、音声認識を利用したアプリケーション が発達してきている。それに伴い、音声認識の 研究分野も音声ディクテーション処理から音声 ドキュメント処理へと広がりがみられる^[1]。しか し、音声認識技術の高精度化をおこなったとし ても、騒音の影響で信号の歪みが生じ、認識率 が低下することから騒音環境下で十分な認識性 能を得ることができない。このような理由から、 騒音に対して頑健な音声認識が求められる。

そこで著者らは、騒音環境下でも円滑な音声 認識・音声コミュニケーションを実現するため に、骨伝導一音声マイクロフォンの開発を行っ た。これは、骨伝導音として採取した信号から 周波数特性を改善し、明瞭度の高い信号を得る ことを目的とする。これまでの検討により、著 者らは体内伝導音をはじめとする骨伝導音を利 用した騒音に頑健な認識システムの構築を行っ た^[2]。骨伝導音は固体伝播音のため、騒音の影響 を直接受けずに信号を抽出ができる。このよう な性質を利用し、98dBSPL(-20dBSNR)の騒音環 境下でも 95% 以上の単語認識率を得ることを確 認した^[2]。しかしながら、骨伝導音は2kHz以上 の高周波成分を得ることができないため、音声 と比較して明瞭度の低い信号となる。よって、 高い認識率を得るためには骨伝導音用の認識シ ステムの構築を行うか、骨伝導音を明瞭化する 必要がある。そのため、適応フィルタ法^{[3] [4]}、 MTF や LPC^[5]などを用いた明瞭度改善に関する 研究が多く行われている。ところが、従来法で は目標となる音声やフィルタの設計が必要であ るため、実騒音環境下で用いることは難しい。 なぜなら、騒音環境下では音声が抽出できない からこそ骨伝導音を用いているからである。

このような研究背景から、これまで骨伝導音 は高周波成分には有効な成分が含まれていない という考えが一般的であった。その中で、著者 らは極めて微弱であるが、骨伝導音にも2kHz以 上の有益な信号成分が含まれていることを発見 した^{[6] [7]}。本研究ではこの成分を効果的に用いる ことで、骨伝導音のみで明瞭度の高い音質変換 手法を提案し、静寂環境下及び騒音環境下で採 取した信号に対する有効性を確認した。

Recorder	TEAC RD-200T			
Microphone	Ono Sokki MI-1431			
Microphone amplifier	Ono Sokki SR-2200			
Microphone position	30cm (mouth to mic.)			
Accelerator	Ono Sokki NP-2110			
Accelerator amplifier	Ono Sokki PS-602			
Accelerator position	Upper lip			

表1. 信号収録装置

### 2. 音声と骨伝導音

ここでは音声と骨伝導音の違いについて説明 する。まず、本研究で用いた信号収録装置を表1 に示す。これらの装置を用いて、静寂環境下に おいて 20歳男声が電子協・地名百選の単語" 旭"を発声し、音声及び骨伝導音を同時収録し た。図1はマイクロフォンで採取した音声、図2 は加速度ピックアップで採取した骨伝導音を示 す。各信号は上図に波形、下図にスペクトログ ラムを示している。図1の音声では採取すべき 帯域の信号を採取できていることが確認できる。 また同時に、母音の共振特徴であるフォルマン ト周波数や音素間の調音結合などが確認できる。 一方、図2の骨伝導音では2kHz以上の高周波成 分を得ることができないため、音声と比較して 不明瞭な信号となる。各信号を比較して分かる ように、骨伝導音は音声と比較して周波数特性

が低いという問題点が確認できる。しかしなが ら、98dBSPL環境下でも頑健な信号採取が可能 であることから、騒音環境下におけるインタフ ェースとして有効である^[2]。ここで示したように、 骨伝導音と音声では周波数特性が異なるため、 骨伝導音を用いた音声認識では十分な認識率を 得ることができない。よって、認識システムが 用いる音声用の音響モデルから骨伝導音用の音 響モデルへと再推定する必要がある。認識のみ を対象とするので有れば、音響モデルの再推定 のみで十分であるが、骨伝導音を音声として代 用するためには音声に近い明瞭度へと改善する 必要がある。このような手法が実現できれば、 音声が騒音に埋没する環境下でも頑健な信号抽 出が可能となり、雑音の影響を受けにくい音声 インタフェースが実現できる。



図1. 音声



図 2. 骨伝導音





図 4. スペクトルサブトラクション法

# 3. プリエンファシスと雑音抑圧による信号推 定

骨伝導音を必要とする騒音環境下では音声を 採取することができないため、骨伝導のみで明 瞭な信号を推定する必要がある。この中で、著 者らは骨伝導音内の2kHz以上の成分において極 めて微弱であるが有効な周波数成分が含まれて いることを発見し、この信号を効果的に用いる 手法を手案することにした。しかしながら、対 象となる周波数特性が極めて微弱であるため、 可能な限り該当周波数を強調する必要がある。

そこで、この高周波成分を強調するためにプ リエンファシスを用いることにした。プリエン ファシスは信号間の差分を計算することで、ハ イパスフィルタの特性を得ることが可能である。 フィルタを用いず差分のみを求めるため、極め て少ない計算コストで所望の信号を得ることが できる。また、フィルタの設計が不要であるな どの利点も有する。図3は骨伝導音に対して信 号間の差分を計算して求めた加速度差分信号を 示す。加速度差分信号は微弱な信号のため、振 幅レベルの補正が必要となる。ここで示す信号 は、加速度差分信号を求め、信号内の最大振幅 レベルを最大値として正規化したものである。 この信号から確認できるように、加速度差分信 るとみなせる。このことから、加速度差分信号 から雑音抑圧手法を用いることで所望の信号を 得ることにした。

### 4. 加速度差分信号における雑音抑圧

先に説明したように、加速度差分信号は定常 雑音に音声が埋没した信号とみなすことができ る。この信号から所望の信号を得るために、音 声信号処理分野で一般的に用いられている雑音 除去手法を用いることにした。本研究では音声 信号処理において広く用いられているスペクト ルサブトラクション法と音声のスペクトル包絡 情報を考慮したウィナー法を用いることにした。

# 4.1. スペクトルサブトラクションによる雑音 抑圧

スペクトルサブトラクション法は入力信号の スペクトルから雑音区間のスペクトルを減算す る雑音抑圧手法である。以下の式(1)及び(2)にス ペクトルサブトラクション法を示す。

 $x(i) = s(i) + n(i)\cdots(1)$  $S(\omega) = (|X(\omega)| - |W(\omega)|)e^{j \arg X(\omega)}\cdots(2)$ 



加速度差分信号 x(i) は式(1)で示されるように、 音声 s(i) 及び雑音 n(i) によって構成されている と仮定できる。よって、式(2)のように加速度差 分信号のスペクトル X(ω) から雑音区間のスペ クトルW(ω)を減算することで、雑音抑圧後の スペクトル $S(\omega)$ を得ることができる。その後、 S(ω)を逆フーリエ変換し、雑音抑圧後の波形信 号を得る。図4は反復回数7回、フレーム幅128 として処理したときに得られる信号を示す。反 復係数とはスペクトルサブトラクション法によ る処理の繰返し数である。ここで得られた信号 は高周波数成分の回復が得られたものの、ミュ ージカルノイズを含む結果となった。ミュージ カルノイズはより高精度なスペクトルサブトラ クション法を用いることで抑圧することが期待 できるが、一般的なスペクトルサブトラクショ ン法では難しいという結論に至った。

# 4.2. ウィナー法による雑音抑圧

スペクトルサブトラクション法では、雑音ス ペクトルを減算するだけで有益な高周波成分を 得ることができなかった。そこで、ウィナー法 を用いることにした。これは雑音混入音声から 線形予測係数で推定した音声スペクトルと自己 相関関数を用いて推定した雑音スペクトルを用 いた信号推定法である。以下の式(3) にウィナー 法を示す。

$$H_{Estimate}(\omega) = \frac{H_{Speech}(\omega)}{H_{Speech}(\omega) + H_{Noise}(\omega)} \cdots (3)$$

音声スペクトル *H*_{Speech}(ω) は自己相関関数を 計算し、レビンソン・ダービンアルゴリズム^[8] で線形予測係数を求め、音声のスペクトル包絡 を推定する。雑音スペクトル *H*_{Noise}(ω) は自己相 関関数から推定する。このとき、線形予測係数 及び自己相関関数は同じ次元数を用いた。

図 5 に線形予測係数及び自己相関関数の各係 数をともに 1、フレーム幅 764、反復回数 3 とし たときの結果を示す。このとき、線形予測係数 及び自己相関関数は 1 から 32、フレーム幅を 128 から 4,096、反復回数を 1 から 5 まで変化さ せてみたところ図 5 の条件においてもっともよ い結果を得ることができた。得られた信号では 骨伝導音で減衰していた 2kHz 以上の高周波成分 の回復がみられるとともに、スペクトルサブト ラクション法で混入されたミュージカルノイズ も含まれていないことが確認できる。

#### 5. 騒音環境下における有効性確認

これまでの検討において、静寂環境下で採取 した信号に対する有効性を確認した。ここでは、 騒音環境下で採取した骨伝導音に対する有効性 を評価することにした。騒音環境下のデータと して、先に収録した大島丸の信号データベース を用いることにした。そのため、信号収録環境 及び認識対象となる語彙は大島丸で収録した信 号データベースのものと同一の環境となる。

図6に騒音環境下における音声、図7に同環境 下における骨伝導音を示す。各信号は大島丸航 行時の機関室内において、男声20歳が電子協・ 地名百選の単語"上尾"を発声したものである。 図6から分かるように騒音環境下では音声が騒 音に埋没してしまうが、骨伝導音では頑健に信 号採取できていることが確認できる。騒音環境 下及び静寂環境下で採取した骨伝導音を比較し て、2kHz以上の高い周波数成分において同程度 の信号が得られることを確認した。よって、騒 音環境下におけるロンバート効果の影響はある ものの、採取する信号に対する騒音の影響はほ とんどないといえる。この信号に対して、加速 度差分を求めることで図 8 に示すような加速度 差分信号を得ることができる。図 8 から確認で きるように、加速度差分信号も静寂環境下と同 様の信号が得られることが確認できる。このこ とから、静寂環境下で用いたパラメータと同様 のセッティングでウィナー法による雑音抑圧を 試みることにした。なぜなら、雑音環境下では 音声の採取ができないため、目標となる信号が 得られないからである。

図 9 に加速度差分信号に対してウィナー法を 用いたときの結果を示す。図 9 は雑音抑圧の処 理回数 3 としたときの結果を示す。処理回数の 比較を行ったところ、回数を増やす毎に高周波 数における雑音抑圧が進み、3 回程度行ったとこ ろで所望の信号が得られることを確認した。こ の結果から、雑音環境下でも静寂環境下と同様 のパラメータ設定で同程度の性能を得ることを 確認した。



134

### 6. おわりに

本研究では加速度差分を用いた骨伝導音の明 瞭化に関する研究をおこなった。著者らは骨伝 導音において 2kHz 以上の高い周波数成分を発見 し、加速度差分と雑音抑圧による明瞭度改善手 法を提案した。スペクトルサブトラクション法 とウィナー法における検討を行い、ウィナー法 で有益な信号が得られることを確認した。提案 法における有効性を静寂下で確認するとともに、 騒音環境下における信号に対する有効性も確認 した。

今後はより明瞭度の高い信号を推定するため のアルゴリズムの検討を行うとともに、高磁 場・高騒音下でも信号採取可能な骨伝導光マイ クロフォンで採取した骨伝導光音に対する有効 性を確認する。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたりご支援をいただい た(財)中谷電子計測技術振興財団様に感謝の 意を示す。

### 文献

[1] 中川聖一、"音声ディクテーションから音
声ドキュメント処理へ"、2007年秋季研究発表
会講演論文集、日本音響学会、 pp. 1-4、2007年
9月。

[2] Shunsuke Ishimitsu, Masashi Nakayama and Toshikazu Yoshimi, "Construction of the Noise-Robust Body-Conducted Speech Recognition System", The Second International Conference on Innovative Computing, Informationand Control (ICICIC2007) CD-ROM, IEEE, 2007年9月。

[3] 石光俊介、中山仁史、村上泰樹、"舶用
運転機関運転支援のための骨導音認識システムの検討"、マリンエンジニアリング学会誌第39
巻4号、マリンエンジニアリング学会、 pp. 35-40 (pp. 263-268)、 2004年4月。

[4] 田宮俊樹、 島村徹也、 " 適応フィルタに

よる骨導音声の音質改善"、電子情報通信学会 技術報告SP2005-191、電子情報通信学会、 pp.41-46、2006年3月。

[5] Thang Tat Vu, Masashi Unoki, and Masato Akagi, "A study on restoration of boneconducted speech with the LPC based model", 電子情報通信学会技術報告SP2005-174、 電子情 報通信学会、pp. 67-72、 2006年3月。

[6]中山仁史、石光俊介、中川誠司、"加速 度差分を用いた骨伝導音明瞭化のための基礎検
討"、第22回信号処理シンポジウム、電子情報通信学会、pp. 622-627、2007年11月。

[7] 中山仁史、 石光俊介、 中川誠司、"加速 度差分を用いた骨伝導音認識の基礎検討"、
2008 年春季研究発表会講演論文集、 日本音響
学会、 pp. 815-818, 2008年3 月。

[8] J. Durbin, "The Fitting of Time-Series Models",
Review of the International Statistical
Institute, Vol. 28, No. 3, pp.233-244, 1960.
[9] 石光俊介、中山仁史、小田康平、"骨伝
導音認識を利用した発声機能障害者支援システムの基礎検討"、2007 年秋季研究発表会講演
論文集、日本音響学会、pp.715-716、2007年
9月。

# 蛍光蛋白標識による骨髄由来幹細胞の発癌および癌幹細胞ニッチ形成への関与の同定



研究責任者	大阪大学大学院浴	肖化	器外科				
		大	学院生	富	丸	慶	人
共同研究者	器外科						
		教	授	森		Æ	樹
大阪大学大学	院消化器外科	教	授	土	岐	祐-	一郎
大阪大学大学	院消化器外科	准	教 授	永	野	浩	昭
大阪大学大学	院消化器外科	講	師	堂	野	恵	$\equiv$
九州大学生体	防御医学研究所特	<b>}任</b>	隹教授	石	井	秀	始
九州大学生体	防御医学研究所	講	師	Ξ	森	功	$\pm$

#### 1. はじめに

消化器癌に対する治療には手術、放射線療法、 化学療法など様々なものがあるが、その治療成績 は十分なものではない。実際に、近年、社会の高 齢化に伴い、悪性腫瘍によって死亡する患者数が 増加している。消化器癌はそのような悪性腫瘍の 約7割を占めることから、消化器癌に対する治療 成績を向上させることは現在社会において非常 に重要であると考えられる。これまでは、発癌及 び転移などの癌の発育進展の活性をもつ細胞群 を、生きたままの状態で同定・分離することが不 可能であった。

このような開発研究上の課題に関して、近年の 抗体や表面マーカーの蛍光標識の技術の進歩に 伴い、このような細胞群の同定・分離が徐々に可 能になってきている。進歩した蛍光標識の技術を 駆使して、発癌および転移などの癌の発育進展の 機序を解明することは、癌に対する治療成績向上 のためには必要なことであり、現代社会において は非常に重要で意義のあることである。

本研究では、骨髄由来幹細胞が血行性に消化器 臓器に到達し、消化器癌のニッチの形成に関わる ことを検証することを目的とした。内外の研究に 於いて、近年、Houghton ら ¹)は、骨髄由来幹細 胞が発生した胃癌の一部分に認められたことを 報告しており、骨髄由来幹細胞が消化器癌の発生 に関与している可能性を指摘している。また、骨 髄由来の VEGFR1 陽性細胞が、癌の転移部位決 定因子として機能し、癌細胞を原発巣から誘導し、 転移増殖を促す転移前ニッチを確立するとの報 告もある ²)。このように、骨髄由来幹細胞が癌の 発生および転移形成において非常に重要な役割 を担っていることが予想されるため、本研究では、 動物モデルにおいて、蛍光標識技術を駆使して骨 髄由来幹細胞を標識可能にすることで、発癌およ び転移前ニッチとの相互作用について、調査・研 究を実施した。

#### 2. 本研究内容に関連する事項

#### 2.1 癌幹細胞について(図1)

癌細胞は、正常な体細胞と比較すると、(1)高い 増殖力、(2)細胞の不死化、(3)転移・浸潤能、と いう特徴を持っている。しかし、癌組織を構成し ている細胞のすべてが、これらの特徴を兼ね備え ているわけではなく、実際にこれらの特徴を併せ 持つものは、全体のごく一部である。これらの希 少の細胞群は、(1)自己複製能、(2)多分化能、と いう胚性幹細胞や体性幹細胞などの幹細胞と同 様の特徴を持っており、癌組織中で自己複製によ り自分と同じ細胞を維持しながら、分化によって 周辺の大多数の癌細胞を生み出すもとになって いると考えられている。これらの一部の癌細胞を 「癌幹細胞」という。癌幹細胞の概念は 1970 年 代より提唱されていたが、それを実験的に証明す ることが技術的に困難であった³⁾。しかし、本申 請で計画している細胞の蛍光標識やフローサイ トメトリーの技術の発展や新規の抗体の開発な どによって、様々な悪性腫瘍における癌幹細胞の 存在が明らかにされつつある^{4),5)}。本申請では、 緑色蛍光蛋白を利用して骨髄細胞を標識するこ とにより従来知られていなかった癌病態を明ら かにし臨床応用に向けて展開することを目指し た。



### 2.2 癌ニッチについて(図2)

幹細胞の周囲に存在する幹細胞が維持・増殖す る微小環境をニッチと呼ぶ。幹細胞はニッチにお いて細胞周期を静止した状態に保つことで、長期 にわたりその未分化性を維持していると考えら れている。近年、正常幹細胞と同様に、癌幹細胞 も、原発巣・転移巣のいずれにおいても癌ニッチ と呼ばれる微小環境を必要とすることが明らか になっている。



#### 2.3 骨髄由来幹細胞について

骨髄中に存在する幹細胞で、造血幹細胞および 間葉系幹細胞から成る。それぞれ、血球系および 間葉系に属する細胞への分化能をもつ。特に、間 葉系幹細胞は、骨や血管、肝細胞などを再生させ ることができるため、再生医療への応用が期待さ れている。近年、間葉系幹細胞の癌への関与につ いても注目されている。本研究では、この骨髄由 来幹細胞を蛍光物質で標識して追跡を目指した。

### 2.4 肝癌について

肝臓原発である原発性肝癌と、他臓器で発生し た癌が肝臓に転移した転移性肝癌の2つに分け られる。原発性肝癌はさらに組織型によって、肝 細胞癌、胆管細胞癌に分類され、その大部分は肝 細胞癌である。転移性肝癌は、消化器癌(胃癌・ 大腸癌・膵癌など)の門脈を介した血行性転移が 多い。原発性肝癌本研究で使用しているコリン欠 乏食の経口投与による発癌は原発性肝癌モデル であり、癌細胞株の脾臓または門脈への投与によ る発癌は転移性肝癌モデルである。本研究では、 標識された骨髄由来幹細胞との正確な位置関係 の情報を知ることにより、ニッチを分子論的に究 明することを目指した。

### 2.5 SP 細胞分画について

造血器および消化器を含む幹細胞の機能の1 つとして Hoechst 33342 色素の高い排泄機能が 知られる。この Hoechst 33342 色素は細胞透過性 が非常に高く、固定せずに生きた細胞に取り込ま れて DNA の A-T リッチ領域に優先的に結合する 性質を有し、紫外線で励起され 450/675(nm)とい う2つの波長の蛍光を発するという際だった特徴 を持つ。単一の色素でありなから紫外線励起時に 2種類の蛍光を発し通常の細胞周期解析で見ら れる G0/G1 分画よりも発色が弱い部分に Hoechst 陰性集団を観察できる。生細胞内に取り 込まれたHoechst 33342色素はP糖タンパク質お よび ABCG2 等の adenosine triphosphate(ATP) 結合カセット (ABC)トランスポーターにより細 胞外に汲み出される。その過程は verapamil や reserpine のような薬剤で阻害される。SP 細胞分 画が細胞周期の静止期(G0/G1期)に濃縮して存 在することには一定のコンセンサスがあるが完 全には対応していないという指摘もある。しかし 消化器癌での SP 細胞分画の研究はそれほど進ん でいないことから、我々はこの Hoechst 33342 非 染性の SP 細胞分画を手掛かりとして消化器癌幹 細胞の研究に着手した。

# 3. 方法および準備

# 3.1 肝臓の癌幹細胞およびニッチの免疫学的染 色検出

フローサイトメーター (FACS Aria セルソー

ター、BD) および蛍光顕微鏡 (オールインワン 蛍光顕微鏡、キーエンス)を用いた SP 細胞 分画を含む解析により、肝臓の癌幹細胞およびニ ッチを構成する分子として同定、免疫学的高感度 技術により染色検出。骨髄由来幹細胞の肝内にお ける存在部位、腫瘍との関係を調べ、また同細胞 の表面マーカーの解析や遺伝子解析などを実施。 検討材料としては、化学療法などの治療の有無の ものを使用し、治療後に残存する腫瘍を同定する ことでニッチを確認。ニッチ細胞の表面マーカー の解析や遺伝子解析を行い、また骨髄由来幹細胞 との関わりについて調査研究。

# 3.2 研究申請に関わる規則、倫理規定への対応

遺伝子組換え実験を含む本研究は、「遺伝子組 み換え生物等の使用等の規制による生物多様性 の確保に関する法律(「バイオセーフティに関す るカルタヘナ議定書」に基づくカルタヘナ法)」 の定める細則と、文部科学省・厚生労働省・経済 産業省の定める細則、ならびに施設内の組み換え DNA実験指針の基準に従って、定められた基準に 適合することを確認し、指針に従ってDNA組み換 え実験委員会等の倫理審査委員会の審査を経る 手続きを行った。動物実験に関する事項は、施設 内の「動物実験等の実施に関する基本指針」の基 準ならびに文部科学省・厚生労働省・経済産業省 の定める細則に従って、定められた基準に適合す ることを確認し、指針に従って動物実験委員会等 の倫理審査委員会の審査を経た。ヒトゲノム・遺 伝子解析研究に際しては、「ヒトゲノム遺伝子解 析研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労 働省・経済産業省の定める細則に従って、倫理審 査委員会の審査を経る手続きも実施した。

### 3.3 研究成果の社会への公開

本研究から得られた成果は、特許申請として知 財の是非を施設内で検討し、論文発表を行い、学 会発表を実施。また、地域社会とのパイプライン を持つ本学の特徴を生かして、地域医療に参加す る医師が主催するシンポジウムやその他の学 術・研究会活動、オープンラボ機能との連携を深 め、先端医科学の研究成果を直接・間接的に地域 社会の医学・医療に展開することを積極的に推進。

### 4. 実験結果

### 4.1 肝臓の癌幹細胞マーカーの同定(図3)⁶⁾

骨髄の造血幹細胞の研究と同様に、私達が消化 器癌細胞株および新鮮臨床材料を用いて解析す ると、CD13分子はでの肝臓癌 SP 細胞分画で有 為に濃縮しており、BrdUと pyronine Y 染色解析 に於ける弱染色から細胞周期の静止期(G0/G1 期)に濃縮していることが示された。臨床上用い られる抗癌剤の代表として CD13 陽性細胞の抗癌 剤抵抗性はアドリアシンと5-FUの双方で認めら れ、ABCG2の阻害で部分的に薬剤感受性の増加、 CD13 経路の阻害効果は顕著な細胞死を誘導した ことから、CD13 陽性細胞の抗癌剤抵抗性は部分 的にはABCトランスポーターに依存する経路と、 詳細は検討中であるが直接関係が明らかでない 経路の双方があることが示唆された。蛍光トレー サー試薬 DCF-DA を用いて細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species;ROS)の定量化を行うと、 治療抵抗性癌細胞の細胞内 ROS は有意に低く、 更にミトコンドリア呼吸活性(Mito-Sox蛍光量)有 意に低かった。肝細胞癌の TACE (transcatheter arterial chemoembolization therapy) 後の新鮮 材料を調べると低酸素領域特異的染色に一致し て抵抗性細胞が残存していた。



図3 肝細胞癌の癌幹細胞と癌ニッチ。癌幹細胞は CD13 陽性(赤)として、癌ニッチは CA9 陽性(緑)として検出された。上2つのパネルが抗癌剤治療前、下2つのパネルが治療後。矢印:癌幹細胞の存在を示す。 緑と赤の合わさった黄色は、低酸素領域に生存する癌幹細胞を示す。

# 4.2 癌ニッチの環境の検討

抗癌剤抵抗性の CD13 陽性細胞の特徴は、他の 固形癌としてごく最近報告された乳癌幹細胞の 性質と類似している。この報告ではヒト乳癌とマ ウス乳癌(MMTV-Wnt1;乳癌のモデルマウス) において、癌幹細胞(造腫瘍能を持つ集団)は、 非癌幹細胞(造腫瘍能を持たない集団)に比較し て ROS が明らかに低い状態であり、マウスとヒ ト癌組織で同様な傾向があることを示した。乳癌 では ROS スカベンジャー酵素(Gclm、Gss)の発現 量や多くの ROS 消去酵素の転写活性化に関わる Foxo1 遺伝子発現を測定すると上昇がみられた。 ROS スカベンジャー酵素の活性化は、肝癌細胞株 や新鮮臨床材料と同様であった。緑色蛍光色素 (GFP)でラベルした骨髄細胞で移植置換したマ ウスを用いて、癌ニッチの環境を分子論的に究明 している。

### 5. 考察

私達は肝臓癌幹細胞の CD13 を SP 解析から同 定したが、CD13 は ABC トランスポーターに直 接関わるという証拠は今のところ得られていな い。私達は治療抵抗性と再発に深く関わる機構を 解明するために、1つの例として SP 解析から出 発したが、そこで同定された CD13 分子は ROS 制御を通じて治療抵抗性と関連することが強く 示唆された。CD13分子はII型の膜貫通型受容体 のアミノペプダーゼ N 分子 (APN) であり、細 胞膜を始めとして、細胞内の小胞体・ゴルジに存 在する。APN 蛋白質には複数の機能が報告され ている:メタロ蛋白質分解能、コロナウイルス結 合能、亜鉛結合能、およびN末端アミノ酸の消化 能等である。経路解析では APN は還元型グルタ チオン(GSH)をROSスカベンジャー酵素(Gclm、 Gss)とともにグルタミル・サイクルを通じて細胞 内チオール環境の維持に関わると示唆される。デ ータ上も CD13 は細胞周期静止期強く相関する。 増殖期にある肝臓癌細胞は CD90 と恐らくは CD133 で検出できるようであるが、その関連機構 は現在解析中である。

癌幹細胞の性質を有する抗癌剤抵抗性細胞の 低い ROS 量の原因としては、低いミトコンドリ ア呼吸活性(Warburg 効果)と共に、ROS 代謝 経路の活性化による細胞内 ROS の消去系が亢進 していることが考えられる。癌幹細胞における低 ROS 状態は電離放射線等の DNA 損傷により生じ る ROS の細胞致死効果に対して防護的に働くと 予測される。実際に調べてみると、コメットアッ セイにより癌幹細胞では DNA 損傷量は有意に低 いことが判明し、私達が研究している肝癌の例と 先述の乳癌の報告で一致した結果となり、共通し た分子基盤として ROS 制御が示唆された。

#### 6. まとめ

癌幹細胞と癌ニッチ形成に関して、肝癌を例に とって、蛍光蛋白標識を含むフローサイトメータ ー(FACS Aria セルソーター、BD)および蛍光 顕微鏡(オールインワン蛍光顕微鏡、キーエ ンス)の最新技術を駆使することにより、骨髄の 造血幹細胞と類似の微小環境が固形腫瘍に於い ても重要な役割を果たしていることを明らかに した。本研究の一環として見いだした CD13 分子 は肝臓癌の癌幹細胞マーカーとしては世界初の 知見である。

### 謝辞

財団法人中谷電子計測技術振興財団から研究助 成を賜りましたことをこの場をお借りして深謝 いたします。

#### 参考文献

- 1) Houghton J, et al., Science. 2004.
- 2) Kaplan RN, et al., Nature. 2005.
- 3) Bonnet D, et al., Nat Med. 1997.
- 4) Al-Hajj M, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003.
- 5) Haraguchi N, et al., Stem Cells. 2006.
- 6) Haraguchi N, et al., J Clin Invest. In press.

# 平成22年度

# 技術交流助成成果報告



東京大学 大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻

教授 土肥 健純

- 会議等名 第50回日本生体医工学会大会 東京大学グローバル COE セミナー
- 開催地東京電機大学神田キャンパス東京大学本郷キャンパス
- 時 期 平成23年4月28日~5月1日

招聘1 (Robert M.Nerem)

### 1) 招聘の概要

4月27日 来日

- 4月28日 13:30-14:20 東京大学でのセミナー
- 4月29日 第50回日本生体医工学会大会参加
- 4月30日 特別講演、第50回日本生体医工学会大会参加
- 5月1日 第50回日本生体医工学会大会参加
- 5月2日 帰国

# 2) 被招聘者の紹介

Robert Nerem 教授は 35 年以上に亙り、心血管系のバイオメカニクスならびに細胞・組織工学を中心 に研究を行っている。初期にはアテローム性動脈硬化症における流体力学の役割に関する実験的研究を 行い、ウマの冠動脈内の流れを熱線流速計を用いて初めて実測するなどして注目を集めた。その後 1981 年、細胞培養研究室を立ち上げ、血管内皮細胞の流体せん断応力に対する応答に関する一連の先駆的な 研究を進めた。1990 年代に入り、組織工学の重要性と将来性にいち早く着目し、力学的刺激による血管 組織の再生で世界をリードしている。現在は、1998 年にNSF の出資により設立された Georgia Tech/Emory Center for the Engineering of Living Tissues (GTEC)のディレクターを勤めている。また、1995 年 より Parker H. Petit Institute for Bioengineering and Bioscience (IBB)のディレクターを務め、 生体工学を通じて工学と情報工学、ライフサイエンスの融合を図っている。

研究業績として、200件以上の学術論文を執筆しており、IUPESM(International Union for Physical

and Engineering Sciences in Medicine)の理事長、IFMBE(International Federation for Medical and Biological Engineering)の理事長など数多くの国際学会、国際組織の理事長等を歴任している。

#### 3) 会議または集会の概要

本大会は日本生体医工学会の年次学術集会であり、生体医工学領域に関連する国内外の大学、企業の 研究者、技術者が、医用工学・生体工学領域の研究の発展・知識の交流、社会的事業の振興などを目的 に、3日にわたり計 1130 名が一堂に介した。本年3月11日の大震災の影響により、当初開催予定で ある東京大学が使用できず、東京電機大学のご厚意により急遽会場が変更となり、また自粛ムードが広 がる中で参加者現象が懸念されていたが、例年以上の参加者数を記録した会であった。

近年の生体医工学の研究範囲はますます拡大しており、医療・保健に役立つ工学技術全般、工学技術 開発への医学生物学からの貢献、情報化社会、超高齢化社会など国民生活全般に生じる変化と様々な諸 問題の解決にまで及んでいる。従って一般演題では、治療機器開発におけるコンピュータ援用・症例報 告、人工臓器、診断機器開発、福祉工学、リハビリテーション工学、周産期、看護工学、画像・光・電 気・磁気・電波などの生体に及ぼす基礎研究、超音波の計測と応用、無侵襲・無拘束による計測と治療、 シミュレーションモデル解析、細胞工学・再生医療、医療用マイクロナノテクノロジー、バイオレオロ ジー・微小環境、バイオメカニクス・生体物性、医療情報システムなどのセッションで口頭発表、ポス ター発表および討論が行われた。

海外の当該分野の著名な研究者による招待講演として、リハビリテーションと福祉機器の開発に従事 する Prof. Øivind Lorentsen (Rehab-N or, Norway)、エンジニアリング、情報テクノロジーと生命 科学の統合を目指す Prof. Robert Nerem (Georgia Tech, USA) (当該研究者)、医用画像の可視化お よびコンピュータ画像の手術室への導入に関する研究の第一人者 Prof. Ron Kikinis(Harvard Medical School, USA)の3氏による講演が行われた。

また、シンポジウム、オーガナイズドセッション、パネルディスカッションはそれぞれ5セッション、25セッション、3セッションが企画されて、どの会場も盛況であった。また、本年3月に発生した東日本大震災での状況や経験などを踏まえて緊急に設けられた「大震災対応特別シンポジウム ME と災害対応」が開催された。

### 4) 会議の研究テーマとその討論内容

今年で 50 回を迎えた本大会では「新たな 50 年に向けての躍進」というテーマを設け、日本におけ る医工連携の発展を支え続けた日本生体医工学会の半世紀を振返るとともに、これから先の 50 年にお いても多くのヒトの命を救い、かつ人類の健康と福祉を守るために生体医工学領域が飛躍的発展を遂げ ることを約束する大会とした。年次学術学集会としての役割に加え、本大会が新たな出発点となるよう、 将来の方向性や課題などについて、広範で有意義な情報交換と活発な討論を行うことが本大会の大きな テーマとなった。また、緊急に企画した大震災対応特別シンポジウムでは、東北大学の先生からの現状 の把握や認識の報告があり、災害に対する ME 機器について議論が活発に行われた。

特に、Nerem 教授による特別講演では、これまで現在の細胞バイオメカニクス研究の基礎を築いた、 数々の研究成果と、これらの成果に基づき現在進めている、基礎研究から応用研究までの幅広い研究プ ロジェクトについてご紹介いただいた。さらに同氏の細胞・組織工学における長年の知見、特に基礎か ら応用研究に至るまでの幅広い研究内容について講演いただいた。

# 5) 招聘した成果

会議開催中は、自身の発表だけでなく、積極的に English Session に参加いただき、若手研究者と の議論に参加していただいた。参加研究者にとっては大変有意義な機会となった。さらに、東京大学で 主に機械・情報系の修士・博士学生に対しセミナー講演を行っていただき、講演後は学生から積極的な 質疑が行われた。国際的にも著名で、国際学会や国際組織の理事長を歴任している Nerem 氏の講演は 医用生体工学分野の世界的動向についても言及され、現在細胞工学、再生医療工学などを志す若手研究 者のみならず、他分野で研究を行う若手研究者や学生に対して、貴重な経験となった。



座長の林紘三郎先生



講演の様子


講演の様子

#### 招聘2 (Øivind Lorentsen)

#### 招聘の概要

5月1日(日)第50回日本生体医工学会大会での特別講演

#### 2) 被招聘者の紹介

Øivind Lorentsen 先生が所属する Rehab-Nor は、1997 年に設立した、リハビリテーションと福祉機器の研究開発センターである。同氏は現在ここで、リハビリテーションや介護プロセスにおける効率的手法の研究、介護サービスにおける組織基盤作り、介護・社会参加・自立支援のための機器開発、教育・トレーニングプログラムプロセスの研究を行っている。

同氏は 1973 年より一貫してリハビリテーション・福祉工学に関する開発・研究を進めてきており、 ノルウェーおよびヨーロッパでの重要な福祉工学に関するプロジェクトのリーダーを務めている。たと えば、ノルウェーリサーチカウンシルの責任者として、心理学者、社会科学者、工学者を含む福祉工学 に関する学際研究施設の立ち上げ、福祉・介護に関する北欧共同体の創始者の一人として、北欧 5 カ国 での研究・評価にかかる協力関係を築く、WHO、ECE、UNDO 等の国連組織での専門家としての知識提供を 行うといった数々の教育・研究・社会貢献の実績を有している。

#### 3) 会議または集会の概要

本大会は日本生体医工学会の年次学術集会であり、生体医工学領域に関連する国内外の大学、企業の 研究者、技術者が、医用工学・生体工学領域の研究の発展・知識の交流、社会的事業の振興などを目的 に、3日にわたり計 1130 名が一堂に介した。本年3月11日の大震災の影響により、当初開催予定で ある東京大学が使用できず、東京電機大学のご厚意により急遽会場が変更となり、また自粛ムードが広 がる中で参加者現象が懸念されていたが、例年以上の参加者数を記録した会であった。 近年の生体医工学の研究範囲はますます拡大しており、医療・保健に役立つ工学技術全般、工学技術 開発への医学生物学からの貢献、情報化社会、超高齢化社会など国民生活全般に生じる変化と様々な諸 問題の解決にまで及んでいる。従って一般演題では、治療機器開発におけるコンピュータ援用・症例報 告、人工臓器、診断機器開発、福祉工学、リハビリテーション工学、周産期、看護工学、画像・光・電 気・磁気・電波などの生体に及ぼす基礎研究、超音波の計測と応用、無侵襲・無拘束による計測と治療、 シミュレーションモデル解析、細胞工学・再生医療、医療用マイクロナノテクノロジー、バイオレオロ ジー・微小環境、バイオメカニクス・生体物性、医療情報システムなどのセッションで口頭発表、ポス ター発表および討論が行われた。

海外の当該分野の著名な研究者による招待講演として、リハビリテーションと福祉機器の開発に従事 する Prof. Øivind Lorentsen (Rehab-N or、 Norway)(当該研究者)、エンジニアリング、情報テク ノロジーと生命科学の統合を目指す Prof. Robert Nerem (Georgia Tech, USA)、医用画像の可視化およ びコンピュータ画像の手術室への導入に関する研究の第一人者 Prof. Ron Kikinis (Harvard Medical School, USA)の3氏による講演が行われた。

また、シンポジウム、オーガナイズドセッション、パネルディスカッションはそれぞれ5セッション、25セッション、3セッションが企画されて、どの会場も盛況であった。また、本年3月に発生した東日本大震災での状況や経験などを踏まえて緊急に設けられた「大震災対応特別シンポジウム ME と災害対応」が開催された。

#### 4) 会議の研究テーマとその討論内容

今年で 50 回を迎えた本大会では「新たな 50 年に向けての躍進」というテーマを設け、日本における 医工連携の発展を支え続けた日本生体医工学会の半世紀を振返るとともに、これから先の 50 年におい ても多くのヒトの命を救い、かつ人類の健康と福祉を守るために生体医工学領域が飛躍的発展を遂げる ことを約束する大会とした。年次学術学集会としての役割に加え、本大会が新たな出発点となるよう、 将来の方向性や課題などについて、広範で有意義な情報交換と活発な討論を行うことが本大会の大きな テーマとなった。また、緊急に企画した大震災対応特別シンポジウムでは、東北大学の先生からの現状 の把握や認識の報告があり、災害に対する ME 機器について議論が活発に行われた。

Lorentsen 先生ご本人は震災の影響のため、来日することが叶わなかったが、"Technology for Disabled and Elderly Persons. Potentials and Challenges"というタイトルで発表用資料をご用意 いただき、事務局による代読を行った。座長の富士温泉病院 矢野英雄先生より Lorentsen 先生の経歴 をご説明いただいたあと、福祉工学、あるいは高齢者や障害者のための支援工学について、これまで研 究開発に携わってこられたご経験を元に、様々なニーズを持つ人々を助ける機器開発の理念、北欧やE Uにおける関連プロジェクトの状況、評価方法のあり方、今後の課題や望まれる国際共同研究などにつ いて資料をもとに発表させていただいた。

#### 5) 招聘した成果

Lorentsen 先生は、1992 年に土肥、および他の北欧諸国の研究者らと協力して福祉工学に関する Japan-Nordic Workshop を開催するなど、この分野での国際共同に長くご尽力いただいてきた。今回の 招聘もその流れによるものである。 招聘講演は、事務局による代読であるにもかかわらず、多くの研究者が参加した。同先生の発表は高 齢者障がい者に対する支援工学について、WHOの国際生活機能分類に基づいた支援のあり方、支援工学 が社会に与える効果、実用化への課題について言及いただき、本分野の専門家のみならず、福祉工学を 目指す若手研究者に対しては貴重な講演であった。



座長の矢野英雄先生



講演の様子(代読)



学会会場 入り口

## 技術開発に対する助成状況 (金額単位:万円)

氏	:名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
中谷	_	大阪厚生年金病院眼科部長 大阪大学医学部非常勤講師	眼底の定量立体計測法の開発に関する研究	400
神津	忠彦	東京女子医科大学 消化器内科 助教授	臨床医学分野における電子計測技術に関する 基礎的研究	350
志賀	健	愛媛大学医学部 第二生理 教授	TV画像処理による血小板凝集反応の数値解 析	150
神野	耕太郎	東京医科歯科大学医学部 第二生理学講座 教授	オプトエレクトロニクスを活用した活動電位 の光学的超多部位同時測定装置の研究開発	200
西原	浩	大阪大学工学部 電子工学科 教授	光IC技術を用いたファイバ血流速度計測シ ステムの小型化に関する研究	200
梶谷	文彦	川崎医科大学 医用工学 教授	Walsh変換による64チャンネル高周波超音波 パルスドプラ血流速信号の実時間計測処理シ ステムの開発とその応用	300

第1回(昭和59年度)技術開発助成対象

### 第2回(昭和60年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
七里 元亮	大阪大学医学部 第一内科 助教授	Field Effective Transistor を用いたインス リン免疫センサーの開発	280
杉江 昇	名古屋大学工学部 電気工学第二学科 教授	音声合成方式発声代行システムのための電子 計測技術に関する研究	300
菊地 眞	防衛医科大学校 医用電子工学講座 教授	パラメトリックアレーを用いた超音波非線形 パラメータCTによる生体組織性状診断に関 する研究	$2\ 0\ 0$
船久保 熙康	東京大学工学部 精密機械工学科 教授	心臓用人工弁機能の電子計測技術システムの 開発	230
赤澤 堅造	大阪大学工学部 電気工学科 助手	データ圧縮による生体信号の長時間計測と痙 性の定量的評価への応用	200
三木 吉治	愛媛大学医学部 皮膚科 教授	高周波超音波診断装置の開発	$2\;5\;0$
中根 央	東京理科大学工学部 電気工学科 助手	運動時における連続血圧測定装置の開発研究	200
高橋 隆	東海大学医学部 教授	水晶体混濁度測定装置の研究開発	220
村田計一	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授	内耳よりの音放射に関する基礎的研究と臨床 検査法への応用	220

第3回(昭和61年度) 打	支術開発助成対象
---------------	----------

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
北畠 顕	大阪大学医学部 第一内科 講師	心臓・血管内血流速度ベクトル分布イメージ ング装置の開発	250

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
戸川 達男	東京医科歯科大学 医用器材研究所 教授	基礎体温自動計測システムの開発	250
奥山 雅則	大阪大学基礎工学部 電気工学科 助教授	サーモグラフィー用室温動作赤外線撮像素子 の開発	$2\;5\;0$
尾崎幸洋	東京慈恵会医科大学 共同利用研究部分析機器室 助手	レーザーラマン分光法に基づく白内障予知シ ステムの基礎的研究	$1\;5\;0$
武者 利光	東京工業大学 大学院総合理工学研究科 教授	磁性体微粒子によって散乱される光の偏波面 ゆらぎを利用した免疫反応の超高感度検出に 関する研究	200
古幡 博	東京慈恵会医科大学 医用エンジニアリング研究室 助教授	超音波位相追従法による血管追跡型超音波パ ルスドプラ血流計の開発	220
八木 直人	東北大学医学部 第一薬理 助手	生体内における筋活動のX線回折法による計 測技術の開発	230
矢崎 義雄	東京大学医学部 第三内科 講師	レーザー顕微蛍光分光測定法による単一細胞 内カルシウムイオン濃度測定法の開発	300
片山 芳文	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 自律生理学部門 教授	超高感度カメラと画像処理技術を用いた細胞 内カルシウムイオンの動態・解析システムの 開発	200

## 第4回(昭和62年度)技術開発助成対象

氏	:名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
堀	正二	大阪大学医学部 第一内科 助手	微小循環解析のための超音波の圧依存性音響 特性変化に基づく新しい非侵襲的圧計測	230
横地	高志	福井医科大学医学部 微生物学講座 助教授	レーザーフローサイトメトリーによる細菌の 分類・同定システムの開発とその臨床応用	180
岡本	卓爾	岡山大学工学部 情報工学科 教授	反射評価システムに関する開発	230
輕部	征夫	東京工業大学資源化学研究所 教授	半導体集積技術を利用した埋め込み型バイオ センサーの開発	230
大西	昇	名古屋大学工学部 電気工学第2学科 講師	盲人用図面認識支援システムの研究開発	$2\ 0\ 0$
新妻	博	東北大学脳疾患研究施設 脳神経外科 講師	SQUID 磁束計を用いた脳磁波計測システムの 臨床検査法への応用	$2\ 0\ 0$
巽	典之	大阪市立大学医学部 臨床検査医学教室 講師	網赤血球計数の標準化に関する研究	180
滝島	任	東北大学医学部 第一内科 教授	伝達関数法に基づく開心術中の心筋保護効果 監視装置の開発	$2\;5\;0$
吉村	武晃	神戸大学工学部 計測工学科 助教授	格子像投影方式定量立体計測法による眼底診 断装置の試作研究	250

第5回(昭和63年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
星宮望	東北大学工学部 通信工学科 教授	中枢神経損傷による運動筋麻痺患者の機能再 建のための計画・制御に関する研究	300
鈴木 直樹	東京慈恵会医科大学 医用エンジニアリング研究室 助手	冠動脈疾患の無侵襲的三次元的診断装置の開 発	$1\;5\;0$
河盛隆造	大阪大学医学部 第一内科 講師	長期生体内連続測定を可能とする植え込み型 ブドウ糖センサの開発	$2\;5\;0$
辻岡 克彦	川崎医科大学 医用工学 助教授	術中局所心機能評価のための超音波ドプラト ラッキング層別厚計の開発	250
鈴木 良次	東京大学工学部 計数工学科 教授	手の動作の計測・評価システムに関する研究 一三次元空間での手の運動の最適制御問題へ の応用—	300
鳥脇 純一郎	名古屋大学工学部 情報工学科 教授	CT画像に基づく人体組織の三次元計測技術の基礎的研究	200
山下安雄	東海大学医学部 ME学教室 助教授	超音波による生体組織の硬さの画像化に関す る研究開発	200
喜多村 直	九州工業大学情報工学部 教授	携帯用の人工心臓駆動装置のための血圧血流 量間接計測技術の開発	230

## 第6回(平成元年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
富川義朗	山形大学工学部 電気工学科 教授	がん温熱療法における非侵襲的患部温度計測 法の研究	150
中鉢 憲賢	東北大学工学部 電気工学科 教授	心臓疾患の音響的精密診断のための心音計測 技術・時系列分析法の開発に関する研究	240
上野 照剛	九州大学工学部 電気工学科 教授	脳磁図計測と脳機能局在性推定に関する研究	220
七里 元亮	熊本大学医学部 代謝内科学講座 教授	フーリェ変換赤外分析法を応用した血糖値の 非侵襲的計測法の開発	230
藤居 仁	九州工業大学情報工学部 電子情報工学教室 教授	レーザースペックル法による眼底血流画像化 装置の開発	$2\ 0\ 0$
立川 光	香川医科大学医学部 一般教育物理学 教務職員	連続画像の自動識別による動態機能解析	$2\ 0\ 0$
千原 國宏	大阪大学基礎工学部 制御工学科 助教授	超音波による瞬時三次元情報可視化装置の開 発	$2\;5\;0$
赤塚 孝雄	山形大学工学部 情報工学科 教授	放射光を用いた冠動脈診断のための高速画像 採取解析システム	220
渡邊 瞭	東京大学医学部 医用電子研究施設 助教授	振戦の機械的励振解析による運動制御情報の 計測評価のシステム	200
升島 努	広島大学医学部 総合薬学科 教授	レーザー光音響・蛍光法による多項目同時イ ムノアッセイシステムの開発	$2\ 0\ 0$

氏	:名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
今井	洋	九州工業大学情報工学部 電子情報工学科 助教授	スーパールミネッセントダイオードを用いた 多粒子流体速度測定システムの開発	230
久米	章司	山梨医科大学医学部 検査部 教授	血小板の細胞内カルシウムイオン、細胞内pH および凝集能の同時測定が可能な蛍光分光光 度計の開発	170
清水	孝一	北海道大学工学部 生体工学専攻 助手	光による生体内の構造および機能情報計測法 の開発	180
藤村	貞夫	東京大学工学部 計数工学科 教授	符号化開口CTを用いた生体組織内 RI分布の三次元計測	$2\ 0\ 0$
都甲	潔	九州大学工学部 電子工学科 助教授	脂質膜をトランスデューサとするマルチチャ ンネル味センサ	180
今坂	藤太郎	九州大学工学部 工業分析化学講座 助教授	半導体レーザー分光分析法による生理活性物 質の微量分析の研究	180
馬場	一憲	東京大学医学部 医用電子研究施設 講師	超音波像高速三次元表示システムの開発と新 しい胎児診断法への応用	$2\;5\;0$
早川	徹	大阪大学医学部 脳神経外科 教授	インテリジェントニューロサージカルマイク ロスコープの開発	220
吉原	治正	大阪大学医学部 生理学第一講座 助手	組織の酸素圧と酸化還元電位の二次元・時系 列マッピングシステムの開発	180
尾辻	省吾	鹿児島大学医学部 臨床検査医学講座 教授	電子スピン共鳴法による血管内皮細胞の膜流 動性およびフリーラジカルの測定と病態にお ける変動	200

第8回(平成3年度)技術開発助成対象

氏	:名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
岡田	正彦	新潟大学医学部 検査診断学教室 教授	動脈硬化症診断のための血管モデルの構築と 計測技術の研究開発	220
大坂	武男	東京工業大学大学院 総合理工学研究科 助教授	極微小電極ボルタンメトリーを用いる in vivo カテコールアミンセンサの開発	220
酒井	清孝	早稲田大学理工学部 応用化学科 教授	電気化学発光法を用いた生体内物質の連続計 測技術の開発	220
臼井	支朗	豊橋技術科学大学工学部 情報工学系 教授	瞳孔筋系の逆モデルに基づく無重力環境下の 自律神経活動推定に関する研究	$2\ 0\ 0$
石原	謙	国立大阪病院臨床研究部 医用工学研究室 室長	超解像超音波断層法の開発と不可視情報の可 視化	$2\;5\;0$
菅	弘之	岡山大学医学部 第二生理学教室 教授	心室容積計測用コンダクタンスカテーテルの 絶対容積キャリブレーション法の開発	200
信太	克規	佐賀大学理工学部 電気工学科 教授	脳内温度分析観測のための誘電率精密測定	$2\ 0\ 0$
宮保	進	福井医科大学医学部 第三内科 教授	マイクロ波を用いた非接触生体微小変位測定 装置の開発と臨床応用	$2\ 0\ 0$
荒木	勉	徳島大学工学部 機械工学科 助教授	時間分解顕微蛍光ファイバースコープの開発 とヒト歯牙診断への応用	180

氏	:名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
豊岡	了	埼玉大学工学部 応用物理学講座 教授	部分空間法による顕微分光画像解析	180
稻田	紘	国立循環器病センター研究所 研究機器管理室 室長	長時間血圧・心電図・身体活動度同時モニタ リング装置の開発	180
八幡	義人	川崎医科大学 内科学 教授	赤血球異常症診断プロトコールの研究開発	180

### 第9回(平成4年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
澤田嗣郎	東京大学工学部 工業化学科 教授	圧電性材料を用いたキャピラリー電気泳動 (CZE)の高感度検出法の開発とDNAシーケ ンサへの応用	200
江刺 正喜	東北大学工学部 機械電子工学科 教授	超小形集積化圧力センサの医用計測への応用	$2\ 0\ 0$
濱﨑 直孝	九州大学医学部 検査部 教授	赤血球内酵素の自動分析システムの開発	$2\ 0\ 0$
竹中繁織	九州工業大学情報工学部 生物化学システム工学科 助教授	遺伝子検出における電子計測技術の開発	200
森田 龍彌	大阪大学工学部 電気工学科 助教授	相関スペクトル解析法による局部微小網膜電 位の計測	200
出口光一郎	東京大学工学部 計数工学科 助教授	内視鏡画像による三次元形状計測	200
宮川 道夫	新潟大学工学部 情報工学科 教授	マイクロ波による体内温度の断層撮像技術に 関する研究	200
渡辺 清明	慶応義塾大学医学部 中央臨床検査部 講師	血栓形成における血管内皮細胞の制御機構の 解明 一ずり応力負荷装置を用いた流体 力学的アプローチー	200
谷口郁雄	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 情報医学研究部門 教授	光学的多点計測による大脳皮質聴覚領の神経 活動の画像化	180
南戸 秀仁	金沢工業大学工学部 電子工学科 教授	生体のX線回折用高感度二次元イメージセン サシステムの開発	150

### 第10回(平成5年度)技術開発助成対象

氏	:名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
尾崎	由基男	山梨医科大学医学部 臨床検査医学講座 助教授	散乱光による粒子計測法を用いた血小板凝 集能計測器の開発	$2\;5\;0$
金井	浩	東北大学工学部 電気工学科 助教授	超音波による動脈壁上の微小振動の計測に 基づく早期動脈硬化症の非侵襲的診断装置	220
松田	甚一	長岡技術科学大学工学部 教授	光音響分光法による高次生体機能の非侵襲 的観測・評価に関する研究	$2 \ 0 \ 0$
橋本	大定	東京警察病院 外科部長	超音波CTの開発と医用画像三次元再構成 による三次元計測	200

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
丸山 征郎	鹿児島大学医学部 臨床検査医学講座 教授	キャピラリー電気泳動法によるアポトーシ ス時の断片化したDNAの測定	$2\ 0\ 0$
赤澤堅造	神戸大学工学部 情報知能工学科 教授	骨格筋の粘性・弾性係数計測システムの開発 と収縮特性評価への応用	$2\ 0\ 0$
桐野 高明	東京大学医学部 脳神経外科 教授	脳神経外科手術における運動機能のモニタ リングの開発	$2\ 0\ 0$
黒田 輝	大阪市立大学工学部 電気工学科 助手	核磁気共鳴による体内温度分布の無侵襲画 像化法に関する研究	180
野口 義夫	佐賀大学理工学部 電気工学科 教授	スリット・スキャン・フローサイトメータに よるDNA診断法の開発	150
増山 理	大阪大学医学部附属病院 第一内科 医員	血管内超音波法を用いた生体内での動脈硬 化病変性状の定量的診断法の開発	150
辰巳 仁史	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 助手	光ピンセットを用いて細胞膜蛋白分子間の 相互作用力を計測する技術	150

## 第11回(平成6年度)技術開発助成対象

氏名	1	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
太田 茂	丧	川崎医療福祉大学医療技術部 医療情報学科 教授	心電図の無意識的計測を行うための入力機構 と信号処理システムの開発	220
高橋 幸郎	IR	埼玉大学地域共同研究センター 助教授	筋電制御式完全埋め込み型機能的電気刺激装置の開発	180
前田瑞夫	ŧ	九州大学工学部 応用物質化学科 助教授	DNAの電極への効率的固定化と化学センサ への応用	$2\ 0\ 0$
相沢義原	房	新潟大学医学部 第一内科学教室 講師	不整脈発生源からの微小電位記録法の開発と 応用に関する研究	180
三神 大世	<u>₩</u>	北海道大学医学部附属病院 循環器内科学講座 助手	三次元超音波法による心臓の動態評価と機能 計測	$2\ 0\ 0$
田中志信	11III	東京医科歯科大学 医用器材研究所 有機材料部門 助手	高生体適合性血管内留置型酸素分圧センサの 開発	$2\ 0\ 0$
河田 耶	浴	大阪大学工学部 応用物理学科 教授	レーザー・トラッピングされたプローブを用 いたニアフィールド光学顕微鏡による生体細 胞内のナノメトリック観察に関する研究	200
佐藤 正明	月	東北大学工学部 機械電子工学科 教授	血液および血管壁の自己蛍光分析による動脈 硬化診断装置の開発に関する基礎的研究	$2\ 0\ 0$
来 関	月	静岡大学工学部 電気電子工学科 助教授	電子線干渉計測と生物構造解析への応用	$2\ 0\ 0$
井須 尚絲	5	鳥取大学工学部 知能情報工学科 助教授	動揺病発症における半規管、耳石器、および 頚部体性感覚の関与に関する研究	180
上野照顾		東京大学医学部 医用電子研究施設 教授	磁気刺激による生体機能測定に関する研究	200

氏	:名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
辻	隆之	国立循環器病センター研究所 実験治療開発部 部長	植え込み型水晶体温センサによる移植臓器の 遠隔期拒絶反応の無侵襲検知に関する研究	250
井口	学	大阪大学工学部 材料開発工学科 助教授	動的画像解析法による生体細胞の同定と個数 の迅速測定に関する研究	200
須川	秀夫	京都大学大学院医学研究科 臨床生体統御医学講座 講師	電子計測技術を用いた血液中甲状腺悪性腫瘍 特異抗原定量系の開発	200
中村	収	大阪大学大学院工学研究科 物質・生命工学専攻 助教授	多光子過程による紫外高分解能走査型レーザ 一顕微鏡とその生物学への応用	$2\;5\;0$
松本	博志	東京大学大学院工学系研究科 精密機械工学専攻 教授	音響学的方法による冠動脈狭窄検出装置の開 発に関する研究	180
岡田	徳次	新潟大学工学部 情報工学科 教授	頸の傾斜、回転、および回旋角測定装置の研 究開発	200
野崎	修	近畿大学医学部 臨床病理学講座 講師	微小電極法による遊離細胞膜表面電位の測定	180
川上	憲司	東京慈恵会医科大学 放射線医学教室 教授	新しいガンマ線用検出器カドニウム亜鉛テロ ライドを応用した循環・呼吸計測用ポータブ ル装置の開発	180
小林	淳	三重大学工学部 分子素材工学科 助手	水晶振動子の電極表面に直接結合する遺伝子 組替え抗体の作製と免疫センサーへの応用	180

第12回(平成7年度)技術開発助成対象

## 第13回(平成8年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
春名 正光	大阪大学医学部 保健学科 教授	低コヒーレンス光干渉計測による生体表皮組 織の構造検出と計測系の小型化に関する研究	230
小澤 孝一郎	広島大学医学部 総合薬学科 講師	細菌解析フローサイトメーターの開発と実用 検査手法の確立	$2\ 0\ 0$
松田 信義	川崎医科大学 検査診断学 教授	コンピュータ支援による尿検査バリデーショ ンシステムの研究	$2\ 0\ 0$
井街 宏	東京大学医学部 医用電子研究施設 教授	体内埋め込みが可能な微小循環観察プローブ の開発	$2\ 0\ 0$
津田 孝雄	名古屋工業大学工学部 応用化学科 助教授	全血試料および毛細管内細胞交叉電気泳動法 を用いた血液型およびクロスマッチ判定	160
松尾 裕英	香川医科学 第二内科学 教授	超音波ドプラ法による局所脈波速度計測法の 新開発	180
民谷 栄一	北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 教授	医療用マイクロマシン型バイオセンサーシス テム	$2\ 0\ 0$
竹内俊文	広島市立大学情報科学部 情報機械システム工学科 教授	バイオミメティック有機素子を用いた血中コ レストロール計測用センサーの開発	$2\ 0\ 0$
田畑勝好	京都大学医療技術短期大学部 衛生技術学科 助教授	バイオリアクターを中核とするFIA法によ る糖尿病関連物質の高感度化学発光分析法の 開発に関する研究	200
入交 昭彦	高知医科大学 生理学講座 教授	全血の交流アドミッタンス計測による赤血球 凝集(連銭形成)計の試作	150

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
松十 吉阪	国立水産大学校	一重項酸素および一酸化窒素の特異的検出法	200
<b>郭</b> 尔 · 吾性	食品化学科 教授	としての高感度近赤外域発光分光装置の開発	200
	静岡大学工学部	共焦点型偏光顕微鏡の開発と生物細胞の偏光	200
川田 晋正	機械工学科 助教授	解析への応用	200
此口 改度	東京大学大学院医学系研究科	微量試料による組織酸素消費率の燐光測定法	200
朱田 以頃	生体物理医学専攻 講師	の開発	200
<b>甫田 雅</b>	大阪市立大学工学部	プロトン磁気共鳴画像化法を用いた生体内温	170
赤山 冲	電気工学科 助手	度分布の非侵襲画像計測の研究	170
北、木 な事由に	東北大学大学院工学研究科	ピペット吸引法を応用した生体組織微小領域	1 8 0
	機械電子工学専攻 助教授	弾性率計測システムの開発に関する研究	180
相净 住永	室蘭工業大学工学部	高感度フォトダイオードアレイを利用した実	180
11年 1王小	機械システム工学科 助教授	時間眼底計測法の開発	180
<b>塔山 実一</b>	北陸先端科学技術大学院大学	イニファーター重合法を利用したインテリジ	170
((供山)思)	材料科学研究科 助教授	ェントバイオセンサーの開発	170
<i>性</i> 皮卡 一正	北海道工業大学	光ファイバ形センサ方式による発ガン関連酵	170
在《小 正	応用電子工学科 教授	素センシングシステムの開発	170
松田 折山	京都大学医学部附属病院	Burst パルスを用いた超高速MR I 法の実	100
位日 日也	医療情報部 助教授	用化	100
松百一方已	岡山大学医学部	コンダクタンス法を用いた血管内径および血	1.0.0
	循環器内科 助手	管壁性状評価の試み	100

第14回(平成9年度)技術開発助成対象

## 第15回(平成10年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
南谷晴之	慶応義塾大学理工学部 物理情報工学科 教授	マイクロチャンネル微小血管モデルのマイク ロマシーニングと血球細胞の変形・凝集能の 画像解析システムに関する研究	200
石田英之	東海大学医学部 生理科学 講師	超高感度4倍速テレビカメラの開発と心筋細 胞内カルシウムイオン動態の高速三次元画像 解析	180
清水 章	大阪医科大学 病態検査学教室 教授	蛋白質構造異常症のソフトイオン化質量分析 による臨床検査技術の開発	180
片山 佳樹	九州大学大学院工学研究科 材料物性工学専攻 助教授	遺伝子結合性タンパク計測のためのバイオセ ンサの研究・開発	150
田中 拓男	大阪大学大学院基礎工学研究科 物理系専攻 助手	表面プラズモン共鳴と2光子励起蛍光を用い た高感度単一生体有機分子イメージング	160
楠岡 英雄	国立大阪病院 臨床研究部 部長	カルシウム依存性蛋白分解酵素活性とカルシ ウム濃度の細胞内同時測定システムの開発	180
今井 清博	大阪大学大学院医学系研究科 情報伝達医学専攻 助教授	携帯型酸素解離曲線自動解析装置の開発	140
野入 英世	東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科 助手	電気的細胞接着度解析法を用いた癌細胞浸潤 度に関する定量的検討	160
鈴木 政登	東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 講師	ラット用運動負荷時エネルギー代謝測定装置 の開発およびその適用―糖尿病性腎症に対す る運動処方に関する研究―	170

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
長倉俊明	鈴鹿医療科学技術大学 医用工学部医用電子工学科 助教授	糖尿病治療のための自律型微小インスリン注 入システムの研究	180

## 第16回(平成11年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
佐藤勝重	東京医科歯科大学医学部 生理学第二講座 助手	脱分極誘発色素を用いた laser photo- stimulation システムの開発と応用	210
石山 陽事	杏林大学保健学部 臨床生理学教室 教授	無拘束型心電図導出用パット電極センサの開 発	200
辻 千鶴子	東海大学医学部 生理科学2 講師	デァルコントラスト肺微小血管造影法の開発	180
枡田 晃司	愛媛大学医学部 医療情報部 助手	マイクロカプセルによる臓器の自動抽出と薬 物ターゲッテイングを兼ねた新しい超音波診 断・低侵襲治療システムの開発	200
熊谷 俊一	神戸大学医学部 臨床検査医学講座 教授	血球計数器による抹消血および採取幹細胞分 画での幹細胞簡便計測法の確立	170
田中 三郎	豊橋技術科学大学工学部 エコロジー工学系 助教授	乳癌にともなうリンパ節生検用トレース装置 の開発	180
大城 理	奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究調査センタ ー 助教授	超高速超音波立体イメージングに関する研究	160
萩原 正敏	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授	細胞内におけるリン酸化依存的蛋白質間相互 作用のイメージング	150
橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科 システム人間系専攻 講師	コヒーレントアンチストークスラマン散乱顕 微鏡による生体組織の三次元局所空間分子分 光分析	180
岩田 哲郎	徳島大学工学部 機械工学科 助教授	ワンチップ時間分解分光分析システムの開発 と生体計測への応用	150

# 第17回(平成12年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
石田 昭人	大阪大学産業科学研究所 機能分子科学研究部門 助手	微小空間内に局在する増強電場を用いる超高密 度・高感度蛍光分析	200
近江 政雄	金沢工業大学 人間情報システム研究所 教授	視線追従により手術者の意図を計測し内視鏡術 野を提示するシステムの開発	200
梶川 浩太郎	東京工業大学大学院総合理工 学研究科 物理情報システム 創造専攻 助教授	超小型表面プラズモン光ファイバ生化学センサ の作製	200
小池 卓二	東北大学大学院工学研究科 機械電子工学専攻 講師	マイクロマシン技術を応用した術中使用可能な 耳小骨可動性測定装置の開発	200

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
末廣純也	九州大学大学院システム情報 科学研究院 電気電子システ ム工学専攻 助教授	誘電泳動インピーダンス計測による細菌活性の リアルタイムモニタリング法の開発	200
庭野 道夫	東北大学電気通信研究所 物性機能デバイス研究部門 教授	多重内部反射赤外分光による生体分子計測シス テムの構築	$2\ 0\ 0$
日野田裕治	山口大学医学部 臨床検査医学講座 教授	癌の臨床検査を目指した質量分析機による遺伝 子多型解析法の開発	$2\ 0\ 0$
山越憲一	金沢大学工学部 人間・機械工学科 教授	携帯型循環動態連続計測システムの開発研究	$2\ 0\ 0$
山名一成	姫路工業大学工学部 応用化学科 助教授	アントラキノンーDNA修飾電極によるDNA センシング	$2\ 0\ 0$

## 第18回(平成13年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
中村 真人	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 生体システム分野 助教授	無侵襲血糖計測の新手法—ハイスピード・エリ プソメトリーによる生体偏光脈波の計測	250
安井 武史	大阪大学大学院基礎工学研究 科 システム人間系専攻 助手	THz時間領域分光法を用いた高機能皮膚診断 法の開発 一角質層の水分量と厚さの同時測定—	220
北島 勳	富山医科莱科大学医学部 臨床検査医学講座 教授	転写因子NF-κB活性化測定DNAチップ開 発によるエンドトキシンショック迅速診断	200
船津 高志	早稲田大学理工学部 物理学科 助教授	シャペロニンによるタンパク質折れたたみ機構 の1分子蛍光イメージング	$2\ 0\ 0$
六車 仁志	芝浦工業大学工学部 電子工学科 助教授	真空一貫プロセスで作製する銀を利用した表面 プラズモン共鳴バイオパー用チップ	200
高松 哲郎	京都府立医科大学 第2病理学教室 教授	多層観察型リアルタイム共焦点蛍光顕微鏡の開 発	180
鈴木 隆文	東京大学国際・産学共同研究センター 医用分野 助手	自律神経系信号による人工心臓制御システムの 開発	180
熊谷 正朗	東北大学大学院工学研究科 機械電子工学専攻 助手	回転磁界と差動磁界を用いた生体運動計測装置 の開発	100
山本 克之	北海道大学大学院工学研究科 システム情報工学専攻 教授	近赤外分光法を用いた筋組織酸素濃度の実時間 イメージングと筋代謝の定量評価	150
正宗 賢	東京電機大学理工学部 生命工学科 講師	三次元医用画像投影システムにおける精度評価 のための計測手法に関する研究	$1\;5\;0$
秀道広	広島大学医学部 皮膚科学講座 教授	表面プラズモン共鳴バイオセンサ(SPR)による 細胞機能測定技術の開発	150

## 第19回(平成14年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
伊藤 聡志	宇都宮大学工学部 情報工学科 助教授	回折理論を応用した磁気共鳴映像法の研究	220

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
山田憲嗣	広島市立大学情報科学部 情報機械システム工学科 助手	複眼光学系を利用した超小型・薄型三次元内視 鏡の開発と三次元表示系への展開	$2\;5\;0$
染谷 隆夫	東京大学先端科学技術研究センター 物質デバイス大部門 極小デバイス分野 助教授	カーボン・ナノチューブを用いたバイオセンサ による単一生体分子の検出	200
稲垣 正司	国立循環器病センター研究所 循環動態機能部 機能評価研究室 室長	拍動心臓での記録が可能な光学的心筋活動電位 マッピングシステムの開発	200
坂口 浩司	静岡大学電子工学研究所 画像電子システム部門 助教授	生体ナノスケール電気計測技術の開発と応用	200
石原 美弥	防衛医科大学校 医用電子工学講座 助手	関節軟骨の新しい非侵襲的粘弾性計測システム の開発	$2\ 0\ 0$
前川 真人	浜松医科大学医学部 臨床検査医学講座 教授	AP-PCR-SSCP法による遺伝子多型の 網羅的探索法の研究	$2\ 0\ 0$
灰田 宗孝	東海大学医学部 生体構造機能系生理科学 助教授	眼球情報の定量的解析に基づく脳・神経系疾患 の診断技術に関する研究	200
白木 賢太郎	北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 助手	アミロイド型疾患因子となるタンパク質線維へ の誘導とその定量システムの構築	150
井出 英人	青山学院大学理工学部 電気電子工学科 教授	運動関連脳電位による意図・情動伝達代行シス テム	150

# 第20回(平成15年度)技術開発助成対象

氏名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
和田英夫	三重大学医学部 臨床検査医学講座 助教授	網血小板判定による血小板減少症の鑑別	250
黒川 隆志	東京農工大学工学部 電気電子工学科 教授	周波数コム発生による光コヒーレンス・トモグ ラフィの研究	220
丸尾 昭二	横浜国立大学大学院工学研究 院 システムの創生部門 助教授	光駆動マイクロ流体制御素子の開発とバイオチ ップ応用	$2\ 0\ 0$
大西五三男	東京大学医学部 整形外科・脊椎外科 専任講 師	エコートラッキングによる超音波定量診断法の 骨癒合判定への応用に関する基礎的研究	$2\ 0\ 0$
吉田靖弘	岡山大学大学院医歯学総合研 究科 生体材料学分野 助教授	表面プラズモン共鳴のためのリン酸カルシウム および各種金属センサーの開発	$2\ 0\ 0$
橋本秀樹	大阪市立大学大学院理学研究 科 生体物性物理学 教授	多光子励起型3次元超高速分光計測システムの 開発	200
田村安孝	山形大学工学部 情報科学科 教授	高速超音波3次元動態計測用演算システム	200

氏:	名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
望月(	修	東京大学大学院医学系研究科 医用生体工学講座 助手	センサー機能を付加した人工弁の開発	180
木竜	徹	新潟大学大学院自然科学研究 科 情報理工学専攻教授	機能分散型健康増進支援システムのためのウエ アラブル生体情報計測・制御ユニットの開発	180
南	和幸	山口大学工学部 機械工学科 助教授	MEMS技術を用いた低侵襲組織診断のための MRS用マイクロプローブの開発	170

# 第21回(平成16年度)技術開発助成対象

0100000			
氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
小畠 英理	東京工業大学大学院生命理工 学研究科 生命情報専攻 助 教授	環境応答型高感度細胞バイオセンサの開発	200
谷下一夫	慶應義塾大学理工学部 システムデザイン工学科 教 授	生体組織への極低侵襲計測を目的とする極微小 一酸化窒素電極の開発	200
竹下 明裕	浜松医科大学医学部 臨床検査医学 助教授	糖鎖結合を利用したリガンドのラベルと非放射 性受容体定量法の確立	200
和田佳郎	奈良県立医科大学 生理学第一講座 講師	動体視力トレーニング法の確立を目指した頭部 ー眼球運動計測システムの開発	$2\ 0\ 0$
杉浦 清了	東京大学大学院新領域創成科 学研究科 環境学専攻 教授	心筋細胞内の細胞骨格の力学特性の評価法の開発	$2\ 0\ 0$
戸津健太郎	東北大学大学院工学研究科 ナノメカニクス専攻 助手	集積化3軸MIセンサを用いた低侵襲検査治療 ツール用3次元ナビゲーションシステムの開発	$2\ 0\ 0$
久冨 信之	国立循環器病センター研究所 放射線医学部医薬品機構 派遣研究員	O-15 標識化合物を使った脳酸素代謝・血流超迅 速 PET 検査法の確立	200
合田 典子	岡山大学医学部 保健学科 助教授	イオン感応性電界効果トランジスタ (ISFET) を用いた迅速・簡便な細胞活性測定システムの 開発	$1\;5\;0$
山家智之	東北大学加齢医学研究所 病態計測制御研究分野 教授	熱電子局所冷却装置と術中脳波マッピングを用 いた脳外科手術局所機能診断	150
奨励研究			

1	芝,	厉	þł	闭	ラ	Ľ

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
田邉 匡生	東北大学大学院工学研究科 知能デバイス材料学専攻 助手	半導体テラヘルツ電磁波光源を用いた生体内組 織観察システムの開発	$1\ 0\ 0$
野村英之	金沢大学大学院自然科学研究 科 電子情報科学専攻 助手	音声障害診断を目的とした声帯の力学的特性評 価システムの開発	100
福島修一郎	大阪大学大学院基礎工学研究 科 機能創成専攻生体工学領 域 助手	時間分解蛍光測定用カプセル化センサーチップ の開発	100

## 第22回(平成17年度)技術開発助成対象

開発研究

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
石原康利	長岡技術科学大学電気系 情報・通信システム工学講座 助教授	完全非侵襲がん治療を目的とした温度測定法に 関する研究	$2\ 0\ 0$
早崎 芳夫	徳島大学工学部 光応用工学科 助教授	2波長低コヒーレンス位相シフトデジタルホロ グラフィ	$2\ 0\ 0$
吉信 達夫	東北大学大学院工学研究科 電子工学専攻 教授	半導体センサによるマイクロ化学チップ内部の イメージングに関する研究	$2\ 0\ 0$
太田 善浩	東京農工大学大学院共生科学 技術研究部 生命機能科学部 門 助教授	単一ミトコンドリアの密度・体積変化の光計測	200
酒井 康弘	東邦大学理学部 物理学科 助教授	イオン付着飛行時間法を用いた万能型呼気分析 装置の開発	$2\ 0\ 0$
和田仁	東北大学大学院工学研究科 バイオロボティクス専攻 教授	新生児中耳疾患スクリーニングのための診断装 置の開発	$2\ 0\ 0$
下村 美文	東京工科大学バイオニクス学 部 軽部研究室 助手	生体内のダイオキシン類測定のための携帯用表 面プラズモン共鳴バイオセンサの開発	200
遠藤 恒介	川崎医科大学 生理学 助手	生体内使用のカテーテル型実時間連続計測スー パーオキサイドセンサの開発	100
三谷 博子	杏林大学保健学部 臨床生理学教室 講師	SSR 検出電極を内臓した指先センサによる SAS の型判定検出装置の開発	100
奨励研究	-		
氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額

氏 名	所 属 機 関・職 名	研 究 題 目	助成金額
宮田 昌悟	九州工業大学大学院 生命体工 学研究科 生体機能専攻 助手	MRI による陰性電荷イメージングを用いた再生 軟骨の非浸襲機能評価システム	100
長谷川 英之	東北大学大学院 工学研究科 電子工学専攻 講師	広帯域超音波 RF 信号を用いた動脈壁ひずみ・弾 性率分布の高精度計測	100
富崎 欣也	東京工業大学大学院 生命理工 学研究科 生物プロセス専攻 助手	金の異常反射特性を利用した分子間相互作用検出法に関する研究	100
細川 賀乃子	弘前大学医学部附属病院 リハビリテーション部 助手	嚥下圧測定のための、多チャンネルでの圧同時 測定センサーの開発	100

### 第23回(平成18年度)技術開発助成対象

氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
戸田 真志	公立はこだて未来大学システ ム情報科学部 情報アーキテ クチャ学科 助教授	耐ノイズ性を考慮した高精度な表面筋電位計測 システムの研究	198

氏名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
岩坂 正和	千葉大学工学部 メディカル システム工学科 助教授	磁気トルク負荷を用いた細胞活性の低侵襲診断 法の開発	$2\ 0\ 0$
小沢田 正	山形大学工学部 機械システ ム工学科 教授	圧電マイクロ3次元振動デバイスによる生体細胞の内部ストレス計測と損傷治療法	$2\ 0\ 0$
仁井見 英樹	富山大学附属病院 検査部 助手	real-time PCR 法を用いた迅速な敗血症起因菌 同定システムの構築に関する研究	$2\ 0\ 0$
椎名 毅	筑波大学大学院システム情報 工学研究科 コンピューター サイエンス専攻 教授	超音波による組織粘弾性3Dマイクロスコープ の開発	200
桑原 義彦	静岡大学工学部 電気電子工 学科 教授	マイクロ波イメージングによる初期乳癌検診法 の確立	170
金  郁喆	京都府立医科大学大学院医学 研究科 運動器機能再生外科 学 助教授	インピーダンス測定法を用いた新しい骨癒合判 定法の確立と携帯型測定器の開発	200

氏名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
関野 正樹	東京大学大学院新領域創成科 学研究科 先端エネルギーエ 学専攻 助手	MR I を用いた生体インピーダンスの非侵襲・ 高分解能画像計測	100
世良俊博	独立行政法人理化学研究所中 央研究所 生体力学シミュリ ーション特別研究ユニット 協力研究員	SPring-8 放射光を用いた小動物用4次元CT システムの開発	100
吉武 康栄	大分県立看護科学大学 人間科学講座 助手	レーザー変位計を用いた皮膚表面振動測定による力調節能力評価	100
平田 伊佐雄	広島大学大学院医歯薬学総合 研究科 生体材料学研究室 助手	医用材料の迅速評価に用いる表面因子アレイチ ップの作製とその測定システムの開発	100
田代 健太郎	東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 助手	磁性フラーレンとデンドリマーポルフィリンの 複合化による高機能MR I 造影剤の設計	100
工藤寛之	東京医科歯科大学生体材料工 学研究所 システム研究部門 助手	ウエアラブル化学センサを用いた非侵襲生体情 報モニタリングに関する研究	100

# 第24回(平成19年度)技術開発助成対象

1 12 111 =			
氏 名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
岡 浩太郎	慶應義塾大学理工学部 生命情報学科 教授	FRET 型蛍光タンパク質プローブに特化した新 規イメージング装置の開発	$2\ 0\ 0$
粟津 邦男	大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 教授	赤外分光による非侵襲的細胞解析装置の開発	$2\ 0\ 0$
上村 和紀	国立循環器病センター研究所 先進医工学センター循環動態 機能部血行動態研究室 室員	動脈圧波形と電気的コンダクタンスを用いた心 拍出量・左心房圧連続測定システム	179

氏名		所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
堀中 博	道	大阪府立大学大学院工学研究 科 電子・数物系専攻 電子物 理工学分野 教授	光アシスト超音波速度変化イメージング法によ る生体深部における薬剤分布モニター	178
鳥越 秀	峰	東京理科大学理学部第一部 応用化学科 准教授	糖尿病発症関連遺伝子の一塩基多型の電気化学 的検出方法の開発	$2\ 0\ 0$
守本 祐	司	防衛医科大学校 分子生体制御学講座 講師	金ナノ粒子を用いた非蛍光細胞標識による生体 分子動態測定	200
南哲	人	独立行政法人情報通信研究機 構・未来 ITC 研究センター 認知科学 専攻研究員	マルチモーダル脳計測手法を用いた脳情報デコ ーディング技術の開発	197

氏名	所 属 機 関・職 名	研究題目	助成金額
大森 努	防衛医科大学校 医用工学講座 助教	過渡回折格子法による組織診断測定とイメージ ング技術の開発	100
有光 小百合	大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学(整形外科学) 講座 大学院生	3次元バーチャルリアリティ装置による病的関 節の動態解析	100
永岡 隆	<ul><li>静岡県立静岡がんセンター</li><li>研究所</li><li>診断技術開発研究 研究員</li></ul>	がんの超早期診断に資するマルチスペクトラル カメラの開発	100
小野 宗範	京都大学大学院医学研究科 神経生物学 研究員	動物個体脳の単一神経細胞からの電気および光 学シグナルの同時計測	99

### 第25回(平成20年度)技術開発助成対象

氏	名	所 属 機 関・職	研究題目	助成金額
桂	進司	群馬大学大学院工学研究科 環境プロセス工学専攻 教授	DNA修復反応の1分子観察系の構築	$2\ 0\ 0$
冨永	昌人	熊本大学大学院自然科学研究科 複合新領域科学専攻 助教	細胞内活性評価のための酵素固定化ナノセン サ電極の開発	200
角田	直人	九州大学大学院工学研究院 エネルギー量子工学部門 准教授	細胞への物質注入と電位測定のためのマイク ロピペット電極の作製と応用	200
木竜	徹	新潟大学大学院自然科学研究科 人間支援科学専攻 教授	マルチ時間スケールな自律神経調整機能から 観た一人称視点映像効果の評価	$2\ 0\ 0$
丸	浩一	群馬大学大学院工学研究科 電気電子工学専攻 助教	石英系ガラス平面光波回路を用いた生体計測 用反射型屈折率センサの開発	$2\ 0\ 0$
吉見	靖男	芝浦工業大学工学部 応用化学科 准教授	分子インプリント高分子を用いた血糖値監視 用グルコースセンサ	100
飯室	勇二	兵庫医科大学 消化器外科・肝胆膵外科 准教授	流体シミュレーションとドップラーエコーか らの肝循環圧測定法の開発	100
西山	道子	創価大学工学部 情報システム工学科 助教	ヘテロコア光ファイバによる脈拍や呼吸の無 拘束・無意識生体計測	100

氏	名	所 属 機 関・職	研究題目	助成金額
伊野	浩介	東北大学大学院環境科学研究科 自然共生システム学講座 助教	誘電泳動を用いたマイクロロッド回転に よる腫瘍マーカー検出用小型デバイスの 開発	100
荒船	龍彦	独立行政法人産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門治療支 援技術グループ 特別研究員	低温除細動における点電極通電刺激誘発 興奮伝播現象の解析	100
吉本	則子	山口大学工学部 応用化学科 助教	水晶振動子によるヒドロキシアパタイト 粒子の環境応答型生体分子認識機構の解 析	100
中山	仁史	高松工業高等専門学校 電気情報工学科 助教	加速度センサを用いた騒音に頑健な骨伝 導-音声マイクロフォンの開発	100
富丸	慶人	大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座消化器外科学 大学院生	蛍光蛋白標識による骨髄由来幹細胞の発 癌および癌幹細胞ニッチ形成への関与の 同定	100

### 第26回(平成21年度)技術開発研究助成対象

Æ	<u>-</u> 名	所 属 機 関・職	研究題目	助成金額
上原	宏樹	群馬大学大学院工学研究科 応用化学・生物化学専攻 准教授	伸縮性を有するシリコーン・ナノポーラ ス膜の創製と生体デバイスへの応用	200
藤田	克昌	大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 准教授	細胞内タンパク機能の無標識イメージン グ	200
萩山	満	東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野 大学院生 (D2)	フェムト秒レーザーと原子間力顕微鏡の 応用による細胞間接着力測定法の開発	200
武田	淳	横浜国立大学大学院工学研究院 知的構造の創生部門 教授	反射型エシェロンを用いた生体光反応の 時間・周波数実時間マッピング装置の開 発	200
片山	建二	中央大学理工学部 応用化学科 准教授	マイクロチップ用動的光散乱法を用いた リポソームの反応速度解析法の開発	200
長谷川	寛雄	長崎大学大学院医歯薬総合研究 科 病態解析・診断部門 臨床検査医学 助教	フローサイトメトリーによる細胞死識別 マーカー計測系の確立	200
尾野	恭一	秋田大学大学院医学系研究科 細胞生理学講座 教授	新生児用ピエゾセンサー方式心拍呼吸モ ニターシステムの開発	200

氏	名	所 属 機 関・職	所 属 機 関・職 研究 題 目	
吉木	啓介	兵庫県立大学大学院工学研究科 機械系工学専攻 助教	3次元立体配向SHG顕微鏡を用いた応 力負荷に伴う繊維状タンパク質のマイク ロ力学試験	100
崔	森悦	新潟大学工学部 電気電子工学科 助教	光コムと正弦波位相変調法による光コヒ ーレンス・トモグラフィーの開発	100
田中	一生	京都大学大学院工学研究科 高分子化学専攻 助教	MRIによる定量性を持った機能イメージング剤の開発	100
西村	智	東京大学大学院医学系研究科 循環器内科学 システム疾患生 命科学による先端医療技術開発 拠点 特任助教	二光子生体分子イメージングを用いた生 活習慣病の病態解析	100

年 度	贈呈式年月日	助成件数	助成金総額
昭和 59 年度	昭和 60 年 2 月 28 日	6件	1,600万円
昭和 60 年度	昭和 61 年 2 月 25 日	9件	2,100万円
昭和 61 年度	昭和 62 年 2 月 27 日	9件	2,050万円
昭和 62 年度	昭和 63 年 2 月 26 日	9件	1,950万円
昭和 63 年度	平成元年2月10日	8件	1,880万円
平成元年度	平成2年2月23日	10件	2,110万円
平成2年度	平成3年2月22日	10件	2,010万円
平成3年度	平成4年2月28日	12件	2,430万円
平成4年度	平成5年2月26日	10件	1,930万円
平成5年度	平成6年2月25日	11件	2,100万円
平成6年度	平成7年3月24日	11件	2,160万円
平成7年度	平成8年2月23日	9件	1,820万円
平成8年度	平成9年2月28日	10件	1,920万円
平成9年度	平成 10 年 2 月 27 日	10件	1,670万円
平成 10 年度	平成 11 年 2 月 26 日	10件	1,700万円
平成 11 年度	平成 12 年 2 月 25 日	10件	1,780万円
平成 12 年度	平成 13 年 2 月 23 日	9件	1,800万円
平成 13 年度	平成 14 年 2 月 22 日	11件	1,980万円
平成 14 年度	平成 15 年 2 月 21 日	10件	1,970万円
平成 15 年度	平成 16 年 2 月 27 日	10件	2,000 万円
平成 16 年度	平成 17 年 2 月 25 日	12件	2,000 万円
平成 17 年度	平成 18 年 2 月 23 日	13件	2,000 万円
平成 18 年度	平成 19 年 2 月 23 日	13件	1,968万円
平成 19 年度	平成 20 年 2 月 29 日	11件	1,753万円
平成20年度	平成 21 年 2 月 27 日	13件	1,800万円
平成21年度	平成 22 年 2 月 26 日	11件	1,800万円
平成 22 年度	平成 23 年 2 月 25 日	11件	1,800万円

累計

278 件

52,081 万円

# 調査研究に対する助成状況

氏 名	所属機関・職名	研究題目	研究期間	
戸川 達男	東京医科歯科大学 医用器材 研究所 教授	無拘束生体電子計測に関する調査研 究	昭和 61~63 年度	

### 昭和61年度調査研究助成対象

#### 平成2年度調査研究助成対象

氏名	名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
赤澤	堅造	神戸大学 工学部情報知能工 学科 教授	生体電子計測技術における可視化・知 能化に関する調査研究	平成 2~4 年度

#### 平成14年度調査研究助成対象

氏 名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
松浦 成昭	大阪大学大学院 医学系研究 科保健学専攻機能診断科学 講座 教授	再生医療分野における電子計測技術 の利用に関する調査研究	平成 14~15 年度

### 平成20年度調査研究助成対象

氏 名	所属機関・職名	研究題目	研究期間
野口 眞三郎	大阪大学大学院医学系研究科 乳腺内分泌外科 教授	OSNA 法による乳癌センチネルリン パ節転移診断の臨床的意義に関する 調査研究	平成 20~22 年度

# 技術交流に対する助成状況

# 1. 派遣

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時期
巽	典之	大阪市立大学	国際血液学標準化委員会・ヨー	ベルギー	昭和 60 年
		医学部講師	ロッパ臨床検査学会 19 年次総	ルーベン	4月
			숲	フランス	
				ツールース	
堀	原一	筑波大学	第3回アジア太平洋心臓ペー	オーストラリア	10 月
		臨床医学系教授	シング・電気生理シンポジウム	メルボルン・シドニー	
黒川	一郎	札幌医科大学	国際血液標準化委員会	イギリス	10 月
		教授		ブライトン・ロンドン	
八幡	義人	川崎医科大学	日米学術交流セミナー	アメリカ	昭和 61 年
		教授		ミネアポリス	1月

## 昭和60年度技術交流(派遣)助成対象

#### 昭和61年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時期
柴田	昭	新潟大学医学部	第21回国際血液学会	オーストラリア	昭和 61 年
		教授		シドニー	5月
新谷	和夫	関東通信病院	第21回国際血液学会	オーストラリア	5月
		血液研究部長		シドニー	
屋形	稔	新潟大学医学部	1986 年度米国臨床化学会学術	アメリカ	7月
		教授	集会	シカゴ・サンフランシ	
				スコ	
江刺	正喜	東北大学工学部	第1回米日医生物工学シンポ	アメリカ	9月
		助教授	ジウム	ボルチモア	
信太	克規	電子技術総合研究	国際度量衡委員会電気諮問委	フランス	9月
		所標準計測部	員会他	パリ	
		主任研究官		イギリス	
				ロンドン	
瀬口	靖幸	大阪大学基礎工学	第8回 IEEE 医用生体工学国際	アメリカ	11月
		部 教授	会議	ヒューストン	
鈴木	良次	大阪大学基礎工学	中日双方向医用生体工学シン	中国	12 月
他8名	<b>7</b>	部 教授	ポジウム〔阪大7,川崎医大1,	上海	
			東京医歯大1〕		
田村	安孝	山形大学工学部	医用画像処理とパターン認識	アメリカ	昭和 62 年
		助手	及び音響映像法に関する国際	ニューポートビーチ	2月
			シンポジウム		

# 昭和62年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議	名	開催地	時 期
渡辺 清明	明 屢	慶應義塾大学	第11回国際血栓止血	1学会	ベルギー	昭和 62 年
	Ð	医学部講師			ブラッセル	7月

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時期
喜多	悦子	奈良県立医科大学	第11回国際血栓止血学会	ベルギー	7月
		助教授		ブラッセル	
三輪	史朗	(財)冲中記念成	第6回国際血液学アジア太平	インド	12 月
		人病研究所 所長	洋域会議	ボンベイ	

## 昭和63年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
杉江	昇	名古屋大学工学部	国際神経回路網会議	アメリカ	昭和 63 年
		教授		サンディエゴ	7 月
吉村	武晃	神戸大学工学部	国際 ME 学会	アメリカ	8月
		助教授		サン・アントニオ	
安藤	繁	東京大学工学部	システム人間およびサイバネ	中華人民共和国	8月
		助教授	ティックスに関する国際会議	北京・瀋陽	
浅野	茂隆	東京大学医科学研	造血と分化因子に関する国際	オーストラリア	8月
		究所 助教授	シンポジウム	メルボルン	
山口	延男	神戸大学医学部	第 22 回国際血液学会	イタリア	8月
		教授		ミラノ	
関根	松夫	東京工業大学大学	第 18 回ヨーロッパ・マイクロ	スウェーデン	9月
		院総合理工学研究	波国際会議	ストックホルム	
		科 助教授			
荒井	恒憲	防衛医科大学校	第4回医学における光学ファ	アメリカ	平成元年
		医学教育学助手	イバーの応用国際会議	ロスアンゼルス	1月

## 平成元年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
志賀	健	大阪大学医学部	弟7回国際バイオレオロジー	フランス	平成元年
		教授	学会総会	ナンシー	6月
川上	憲司	東京慈恵会医科大	第17回国際医学放射線学会	フランス	7月
		学 助教授		パリ	
幸道	秀樹	東京大学医科学研	国際実験血液学会総会	フランス	7月
		究所 講師		パリ	
菊池	眞	防衛医科大学校	第2回国際医用生体工学学会	オーストラリア	7月
		教授	(汎太平洋シンポジウム)	メルボルン	
只野	寿太郎	佐賀医科大学	弟2回国際健康と生命化学領	アメリカ	8月
		教授	域における質量分析学会	サンフランシスコ	
八幡	義人	川崎医科大学	赤血球膜および代謝に関する	東ドイツ	8月
		教授	国際シンポジウム	ベルリン	
岡田	正彦	新潟大学医学部	第11回 IEEE 医用生体工学国際	アメリカ	11 月
		助教授	会議	シアトル	
大西	昇	名古屋大学工学部	第11回 IEEE 医用生体工学国際	アメリカ	11月
		助教授	会議	シアトル	

	平成2年度技術交流	(派遣)	助成対象	
--	-----------	------	------	--

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
松本	元	電子技術総合研究	生物化学系における波動とパ	ソビエト	平成2年
		所 超分子部長	ターンに関する国際会議	モスクワ	5月
尾辻	省吾	鹿児島大学医学部	第 24 回世界スポーツ医学会議	オランダ	5月
		教授		アムステルダム	
作間	英一	計量研究所 量子	精密電気磁気測定国際会議	カナダ	6月
		計測研究室長		オタワ	
大城	巖	和歌山県立医科大	国際臨床化学総会	アメリカ	7月
		学中央検査部 主		サンフランシスコ	
		任技師			
桐生	昭吾	電子技術総合研究	応用超電導国際会議	アメリカ	9月
		所基礎計測部 研		アスペン	
		究員			
山本	徳則	川崎医科大学医用	超音波血流計測による動脈硬	イギリス	平成3年
		電子工学	化のメカニズムの解析に関す	ロンドン	2月
			る共同研究(インペリアル大		
			学)		

### 平成3年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
鈴木	宏治	三重大学医学部	第13回国際血栓止血学会	オランダ	平成3年
		教授		アムステルダム	6月
屋形	稔	新潟大学医学部	第16回世界病理・臨床病理学	カナダ	6月
		名誉教授	숲	バンクーバー	
犬塚	貴	新潟大学医学部	第13回国際神経化学会	オーストラリア	7月
		助手		シドニー	
樋口	哲也	電子技術総合研究	国際人工知能会議	オーストラリア	8月
		所情報アーキテクチャ部		シドニー	
		主任研究官			
増田	俊久	電子技術総合研究	第2回欧州宇宙用電源会議	イタリア	9月
		所エネルギー基礎		フィレンツェ	
		部 主任研究官			
石原	謙	国立大阪病院臨床	第6回世界超音波学会	デンマーク	9月
		研究部医用工学研		コペンハーゲン	
		究室室長			
北風	政史	大阪大学医学部	第64回米国心臓病理学会	アメリカ	11 月
		医員		アナハイム	
小澤	敬也	東京大学医科学研	第33回アメリカ血液学会総会	アメリカ	12 月
		究所 助教授		デンバー	
原田	裕一	東京工業大学大学	第3回北欧超伝導シンポジウ	デンマーク	平成4年
		院総合理工学研究	4	ナイボルグ	3月
		科			

氏名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
相沢 義房	新潟大学医学部	国際不整脈アブレーション会	アメリカ	平成4年
	講師	議	ノースカロライナ	5月
黒田 新一	電子技術総合研究	第6回コロイドおよび界面科	イタリア	6月
	所凝縮物性研究室	学における磁気共鳴に関する	フィレンツェ	
	長	国際シンポジウム		
八木 康之	電子技術総合研究	第 14 回プラズマ物理および制	ドイツ	9月
	所エネルギー基礎	御核融合に関する国際会議	ヴェルツブルグ	
	部 主任研究員			
小笠原 康夫	川崎医科大学	第14回 IEEE 医用生体工学国際	フランス	10 月
	講師	会議	パリ	
三戸 章裕	計量研究所熱物性	第15回レーザとその応用に関	アメリカ	12 月
	部 主任研究官	する国際会議	ビューストン	
中村 収	計量研究所力学部	共焦点顕微鏡と3次元画像処	オーストラリア	平成5年
	研究員	理に関する国際会議	シドニー	2月

平成4年度技術交流(派遣)助成対象

#### 平成5年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
河盛	隆造	大阪大学医学部	インシュリンに関する	カナダ	平成5年
		講師	Banting and Best シンポジウ	トロント	6月
			Д		
猪狩	淳	順天堂大学医学部	弟 18 回国際化学療法学会	スェーデン	7月
		教授		ストックホルム	
柴田	昭	新潟大学医学部長	第 27 回マレーシヤ・シンガポ	マレーシャ	8月
			ール医学総会	クアラルンプール	
佐藤	俊輔	大阪大学基礎工学	IMIA - IFMBE 生体信号の解釈	デンマーク	8月
		部 教授	に関する研究集会	アールボー	
濱崎	直孝	九州大学医学部	ゴードン研究国際会議	アメリカ	8月
		教授		ニューハンプシャー	
鈴木	淳	電子技術総合研究	第15回アモルファス半導体国	イギリス	9月
		所材料部 研究員	際会議	ケンブリッジ	
鈴木	康	昭和大学医学部	第17回世界解剖、臨床病理学	メキシコ	10 月
		助教授	会連合会議	アカプルコ	
木村	総	昭和大学医学部臨	第17回国際臨床病理学会総会	メキシコ	10 月
		床病理学 助手		アカプルコ	
清水	章	大阪医科大学医学	第15回国際臨床化学会議	オーストラリア	11 月
		部 教授		メルボルン	
岡部	紘明	熊本大学医学部	第15回国際臨床化学会議、第	オーストラリア	11 月
		教授	6 回アジア・太平洋臨床化学会	メルボルン	
			議		
佐々オ	、 匡秀	高知医科大学医学	第15回国際臨床化学会議	オーストラリア	11 月
		部 教授		メルボルン	
河野	均也	日本大学医学部	第15回国際臨床化学会議	オーストラリア	11 月
		教授		メルボルン	

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
大垣	英明	電子技術総合研究	1993 年原子核科学及び医用画	アメリカ	11 月
		所量子放射部	像に関する合同会議	サンフランシスコ	
		主任研究官			
中山	貫	計量研究所	アボガドロ定数およびシリコ	イタリア	平成6年
		主席研究官	ンによるモルの表示に関する	トリノ	3月
			国際研究集会		

# 平成6年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
関口	進	防衛医科大学校	第72回米国臨床病理学会春期	アメリカ	平成6年
		教授	大会	シアトル	4月
森	徹	京都大学医学部	第76回米国分泌学会議	アメリカ	6月
		教授		アナハイム	
伊藤	順司	電子技術総合研究	第7回国際真空マイクロエレ	フランス	7月
		所電子デバイス部	クトロニクス会議	グルノーブル	
		主任研究官			
加藤	吉彦	電子技術総合研究	電磁精密測定国際会議	アメリカ	7月
		所光技術部		ボルダー	
		主任研究官			
望月	精一	川崎医療短期大学	医用物理生体工学世界会議	ブラジル	8月
		講師		リオデジャネイロ	
菅原	基晃	東京女子医科大学	医用物理生体工学世界会議	ブラジル	8月
		教授		リオデジャネイロ	
佐野	雅之	佐賀医科大学輪血	接触因子異常症とその臨床に	アメリカ	9月
		部 講師	関する集会	ベセスダ	
櫻井	晃洋	信州大学医学部	第68回米国甲状腺学会議	アメリカ	9月
		助手		シカゴ	
津田	展宏	計量研究所量子部	第4回ジョイントナノテクノロジーシンポジ	イギリス	9月
		精密測定研究室長	ウム及び国際自動制御会議	ロンドン	
熊野	和雄	北里大学医学部	第15回国際腹膜透析学会	アメリカ	平成7年
		講師		ボルチモア	2月

## 平成7年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
星野	高伸	東京警察病院外科	第3回国際先端外科手術学会	ドイツ	平成7年
		副部長		ルクセンブルグ	6月
菅野	剛史	浜松医科大学医学	第11回 IFCC ヨーロッパ臨床化	フィンランド	7月
		部 教授	学会議	タンペレ	
橋本	琢磨	金沢大学医学部	第11回 IFCC ヨーロッパ臨床化	フィンランド	7月
		教授	学会議	タンペレ	
立花	博之	川崎医療短期大学	地中海医用物理生体工学会議	イスラエル	9月
		助手		エルサレム	
堀	原一	筑波大学名誉教授	第 10 回世界心臓ペーシング・	アルゼンチン	10 月
			電気生理会議	ブエノスアイレス	

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
大島	哲也	広島大学医学部	第16回国際高血圧学会学術集	イギリス	平成8年
		助教授	숲	グラスゴー	6月
村山	泰	電子技術総合研究	精密電磁気計測会議	ドイツ	6月
		所基礎計測部		ブラウンシュバイク	
		主任研究官			
西村	敏博	大分大学工学部	アメリカ電気電子工学学会パワ	イタリア	6月
		助手	ーエレクトロニクススへ゜シャリスト	バベノ	
杉浦	清了	東京大学医学部	ゴードンリサーチ会議	アメリカ	7月
		助手		ニューハンプシヤー	
井上	武海	電子技術総合研究	国際電波科学連合第25回総会	フランス	8月
		所光技術部		リール	
		主任研究官			
熊谷	俊一	神戸大学医学部	第60回アメリカリウマチ学会	アメリカ	10 月
		教授		オーランド	

平成8年度技術交流(派遣)助成対象

### 平成9年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
中澤	博江	東海大学医学部	第1回国際パーオキシナイト	スイス	平成9年
		教授	ライト会議	アスコナ	5月
上塚	芳郎	東京女子医科大学	第16回国際血栓止血学会議	イタリア	6月
		講師		フローレンス	
山田	俊幸	自治医科大学講師	第49回米国臨床化学会議	アメリカ	7月
				アトランタ	
豊田	英嗣	川崎医科大学	国際医用物理生体工学会議	フランス	9月
		大学院生		ニース	
秋山	修二	電子技術総合研究	第4回神経情報処理国際会議	ニユージーランド	11月
		所超分子部		ダニーデイン	
		主任研究官			

## 平成 10 年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
岡田	徳次	新潟大学工学部	ロボティクスと自動化に関す	ベルギー	平成 10 年
		教授	る電気電子学会国際会議	ルーベン	5月
橋本	大定	東京警察病院	(1)第6回世界内視鏡外科学会	(1) イタリア・ローマ	6月
		外科部長	(2)腹膜鏡下手術シンポジウム	(2) ドイツ・トリット	
				リンゲン	
松本	健志	川崎医療短期大学	第71回米国心臓学会学術集会	アメリカ	11 月
		助教授		ダラス	

平成 11 年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
石田	英之	東海大学医学部	第44回米国生物物理学会	アメリカ	平成 12 年
		講師		ニユーオリンズ	2月

## 平成 12 年度技術交流(派遣)助成対象

氏 名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
片岡 則之	川崎医療短期大学	実験生物学会 2000	アメリカ	平成 12 年
	臨床工学科 講師		サンディエゴ	4月
岩佐 章夫	電子技術総合研究	電磁気精密計測国際会議	オーストラリア	5月
	所基礎計測部		シドニー	
	主任研究官			
ハッサン M	東京医科歯科大学	国際医用物理生体工学会議シ	アメリカ	7月
Dモイヌディ	生体材料工学研究	カゴ 2000	シカゴ	
ン	所 大学院生			
谷口 慶治	福井大学	IEEE 信号処理部会主催 2000 年	カナダ	9月
	名誉教授	度画像処理に関する国際会議	バンクーバー	
清島 満	岐阜大学医学部臨	第73回米国心臓学会学術集会	アメリカ	11 月
	床検査医学 教授		ニューオリンズ	
入部 玄太郎	岡山大学大学院医	実験生物学会 2001	アメリカ	平成 13 年
	歯学総合研究科シ		オーランド	$3 \sim 4$ 月
	ステム循環整理学			
	助手			

### 平成 13 年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
井出	利英	明治大学大学院理	第4回窒化物半導体国際会議	アメリカ	平成 13 年
		工学研究科		デンバー	7 月
		大学院生			
清岡	崇彦	岡山大学大学院医	左心室 - 容積ループ (PV-	オランダ	平成 14 年
		歯学総合研究科シ	LOOPS) 国際シンポジウム	マーストリヒト	1月
		ステム循環生理学			
		大学院生			

#### 平成 14 年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
田中	三郎	豊橋技術科学大学	超伝導応用国際会議(ASC	アメリカ	平成 14 年
		助教授	2002)	ヒューストン	8月
柴田	政廣	東京大学大学院医	第22回欧州微小循環学会議	イギリス	8月
		学系研究科 講師		エクスター	

### 平成 15 年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議	名	開催地	時期
稲垣	正司	国立循環器病セン	World Congress	on Medical	オーストラリア・シド	平成 15 年
		ター研究所	Physics and	Biomedical	1	8月
		循環動態機能部機	Engineering			
		能評価研究室 室	2003年医学物理	理·生体医用		
		長	工学世界会議			

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時期
井内	洋介	岡山大学医学部	American Heart Association	アメリカ・ニューオ	平成 16 年
		保健学科放射線診療技	Scientific Sessions 2004	リンズ	11 月
		術学講座 助手	(米国心臓学会)		

#### 平成 16 年度技術交流 (派遣) 助成対象

## 平成 17 年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時期
森本	太郎	岡山大学医学部歯学部付	American Heart Association	アメリカ・ダラス	平成 17 年
		属病院 総合診療内科	(米国心臓学会)		11 月
		内科医師			

### 平成 18 年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会 議 名	開催地	時 期
前川	真人	浜松医科大学医学部臨床	American Association for	アメリカ・シカゴ	平成 18 年
		検査医学	Clinical Chemistry, Annual		7 月
		教授	Meeting		
			(米国臨床化学会)		
片岡	則之	川崎医療短期大学	5th World Congress of	ドイツ・ミュンヘン	平成 18 年
		講師	Biomechanics		7月
			(第5回生体力学世界会議)		

### 平成 20 年度技術交流(派遣)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
望月	精一	川崎医療福祉大学·医療	第13回国際バイオレオロジ	米国ペンシルベニア	平成 20 年
		技術学部・臨床工学科	ー学会・第6回国際臨床へモ	州ステートカレッジ	7月
		教授	レオロジー学会		

### 平成 21 年度技術交流(派遣)助成対象

氏 名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
有光百合子	Biomechanics	2009年アメリカ手の手術の	アメリカ合衆国サン	平成 21 年
	Laboratory	外科・ハンドラセラピー学会	フランシスコ州	9月
	Mayo Clinic			

### 2. 招聘

氏 名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
財団事務局		Reinhard Thom 教授 (西	血液電子計測研究会	東京	昭和 60
で招聘		独)			年11月

### 昭和 60 年度技術交流(招聘)助成対象

### 平成 12 年度技術交流(招聘)助成対象

氏	名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
神谷	暸	日本大学本部グロ	Sun I.Kim 教授 他 3	第39回日本エム・イー学	東京	平成 12
		ーバルビジネス研	名 (韓国)	会大会日韓合同セッション、他		年5月
		究科 教授				
望月	精一	川崎医療短期大学	Walter H.Chang 教授	第39回日本エム・イー学	東京、	5月
		臨床工学科	(台湾)	会大会日韓合同セッション、他	神戸、	
		助教授			他	
巽	典之	大阪市立大学医学	13名(内訳、インドネシ	臨床検査の標準化に関す	神戸	10 月
		部臨床検査医学教	ア2名、韓国5名、フィリ	る第2回アジア会議		
		室 教授	ッピン2名、シンガポール1			
			名、タイ3名)			

### 平成 13 年度技術交流(招聘)助成対象

氏	名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
戸川	達男	東京医科歯科大学	Piotr Foltynsky バイオサ	発汗計測ワークショップ、第9	東京	平成 13
		生体材料研究所教	イバネティクス医用生体工学	回日本発汗学会総会、他		年 7 ~
		授	研究所高等研究員(ポ			9月
			ーランド)			
齋藤	正男	東京電機大学工学	王明時 天津大学ME	第15回日本エム・イー学	東京	$11 \sim 12$
		部 教授	研究所所長 他1名	会秋季大会、TDU日中		月
			(中国)	ME学術交流懇談会、他		

### 平成 14 年度技術交流(招聘)助成対象

氏	名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
前川	真人	浜松医科大学医学	Steven Shoei-Lung Li	国際酵素学会浜松会議	浜松	平成 14
		部 教授	教授(台湾)			年10月
浅野	茂隆	東京大学医科学研	Suthat Fucharoen 教授	アジア血液連合第1回総	神戸	平成 15
		究所 教授	(タイ)他、シンガポール	会及びシンポジウム		年3月
			1名、中国5名、韓国4			
			名、台湾5名			

### 平成 16 年度技術交流(招聘)助成対象

氏 名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
山越憲一	金沢大学大学院自 然科学研究科 教 授	Niilo Saranummi 教授 (フィンラント゛)、Haldun Karagoz 博士(トルコ)	第43回日本エム・イー学 会	金沢	平成 16 年 5 月

### 平成 18 年度技術交流(招聘)助成対象

氏 名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
熊谷 俊一	神戸大学大学院医	Dr.Hardjoeno(Indones	第9回アジア臨床病理学	神戸国	平成 18
	学系研究科 生体	ia)他、Indonesia4名、	会	際展示	年10月
	情報医学講座 臨	Korea2 名、Mongolia5		場	
	床病態免疫学分野	名、Taiwan3 名			
	教授				

## 平成 20 年度技術交流(招聘)助成対象

氏 名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
浅野 茂隆	早稻田大学理工学	Willem Fibbe 欧州血	第5回アジア血液学連合	神戸ポ	平成 21
	術院先端システム	液連合会長(オランダ)他、	総会	ートピ	年2月
	医生物工学研究室	ドイツ1名、シンガポール1		アホテ	
	教授	名、タイ1名、韓国2名		ル会議	
				場	

## 平成 21 年度技術交流(招聘)助成対象

氏	名	所属機関・職名	被招聘者	会議名	開催地	時期
福井	康裕	東京電機大学理工学部	Rita Paradiso Ph.D	第48回日本	東京江戸川	平成 21
		電子情報工学科 教授	R&D	生体医工学	区 タワー	年4月
			Manager,Smartex	会	ホール船堀	
倉智	嘉久	大阪大学大学院医学系	Denis Noble PhD	第36回国際	国立京都国	平成 21
		研究科 分子・細胞薬		生理学会世	際会館	年7月~
		理学講座教授		界大会		8月

### 3. 会議等

氏 名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期	
吉本 千禎	北海道大学 名誉教授	極東医用生体工学会議国際準	東京	昭和 62 年	
		備委員会		8月	
	平成2年度技術交流(会議等)助成対象				
氏 名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期	
吉本 千禎	北海道大学 名誉教授	第1回極東医用生体工学会議	東京	平成2年	
				10 月	

### 昭和 62 年度技術交流(会議等)助成対象

#### 平成 13 年度技術交流 (会議等) 助成対象

氏	名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
原	宏	兵庫医科大学輸血部	第43回日本臨床血液学会総会	神戸	平成 13 年
		教授 細胞移植部長			11 月
内山	明彦	早稲田大学理工学部電子情報	第15回日本エム・イー学会秋	東京	12 月
		通信学科 教授	季大会		
上野	照剛	東京大学大学院医学系研究科	第6回MEフォーラム	東京	平成 14 年
		教授			1月
軽部	征夫	東京大学先端科学技術研究セ	バイオエレクトロニクス及び	東京	3月
		ンター 教授	バイオテクノロジーに関する		
			国際会議		

### 平成 14 年度技術交流 (会議等) 助成対象

氏	名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
土肥	健純	東京大学大学院情報理工学系	第5回医用画像工学及びコン	東京	平成 14 年
		研究科教授	ピュータ外科国際会議		9月
前川	真人	浜松医科大学医学部	国際酵素学会浜松会議	浜松	10 月
		教授			
野瀬	善明	九州大学大学院医学研究院	第16回日本エム・イー学会秋	神戸	11 月
		教授	季大会		

#### 平成 15 年度技術交流 (会議等) 助成対象

氏	名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
千原	國宏	奈良先端科学技術大学院大学	第6回日本ーポーランド医用	京都	平成 15 年
		情報科学研究科	生体工学シンポジウム		10 月
		教授			
梶谷	文彦	岡山大学大学院医歯学総合研	岡山国際シンポジウム:循環フ	岡山	平成 15 年
		究科システム循環生理学	ィジオーム		12 月
		教授			

### 平成 17 年度技術交流 (会議等) 助成対象

氏 名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
辻岡 克彦	川崎医科大学生理学教室	第6回アジア太平洋生体医工	筑波	平成 17 年
	教授	学会		4月

## 平成 18 年度技術交流 (会議等) 助成対象

氏 名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
前川 真人	浜松医科大学医学部臨床検查	第57回日本電気泳動学会	アクトシテ	平成 18 年
	医学 教授		イ浜松	10 月

### 平成 19 年度技術交流(会議等)助成対象

氏	名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
日野田	裕治	山口大学大学院医学系研究科	第58回日本電気泳動学会	山口県宇部	平成 19 年
		臨床検査医学分野教授		市	11 月

#### 平成 20 年度技術交流(会議等)助成対象

氏 名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
前川 真人	浜松医科大学医学部・臨床検	第48回日本臨床検査化学会年	静岡県浜松	平成 20 年
	查医学 教授	次学術集会	市	8月

# 財団法人中谷電子計測技術振興財団 御案内図



# 財団法人 中谷電子計測技術振興財団

- 〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 アートヴィレッジ大崎セントラルタワー 8F
- 電話 : 03-5719-5216 (代)
- Fax. : 03-5496-9217
- URL : http://www.nakatani-foundation.jp/
- E-mail: info@nakatani-foundation.jp
## [™] 中谷電子計測技術振興財団 年報

## 25 号

平成 23 年 8 月 10 日 発行

 発行所 ^{財団} 中谷電子計測技術振興財団
〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 アートヴィレッジ大崎セントラルタワー8階
TEL (03) 5719-5216 FAX (03) 5496-9217
URL:http://www.nakatani-foundation.jp/
E-mail: info@nakatani-foundation.jp
編^{*}, 浜 野 実
印刷 (有)盛光印刷