ISSN 0914-2487

公益財団法人
中谷医工計測技術振興財団

年　報　vol. 26

Annual Report　2012

Nakatani Foundation for Advancement of Measuring Technologies in Biomedical Engineering

26 号

公益財団法人
中谷医工計測技術振興財団

年　　報

26 号

目　　次

設立の趣意 …… 2
役員・評議員および事業の概要 …… 3
平成 23 年度事業概要 …… 4
Ⅰ 技術開発に対する助成事業 …… 4
Ⅱ 調査研究に対する助成事業 …… 6
Ⅲ 技術交流に関する支援事業 …… 6
Ⅳ 電子計測技術に関する情報の収集及び提供 …… 6
Ⅴ 中谷賞に対する表彰事業 …… 6
平成 23 年度贈呈式 …… 7
平成 22 年度（第 3 回）中谷賞研究成果報告 …… 11
平成 21 年度（第 26 回）技術開発助成成果報告 …… 22
平成 23 年度技術交流助成成果報告 …… 104
技術開発に対する助成状況 …… 107
調査研究に対する助成状況 …… 126
技術交流に対する助成状況 …… 127

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亜医用電子株式会社（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。

財団法人 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
専務理事
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　一　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
和　歌　光　雄　元シスメックス株式会社 取締役・常務執行役員
監　　事
秋　山　純　一　多摩大学名誉教授（公認会計士）
國　生　　肇　國生肇法律事務所（弁護士）

評議員

山　村　博　平　兵庫県立健康生活科学研究所長　神戸大学名誉教授
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　邊　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
神　保　泰　彦　東京大学大学院新領域創成科学研究科教授
雪　本　賢　一　シスメックス株式会社 取締役・専務執行役員
林　　正　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

本財団は、医工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ことによって、医工計測技術の広汎な発展を推進し、我が国経済社会の発展及び国民生活の向上に寄与することを目的として、次の事業を行います。

■医工計測技術分野における技術開発に対する助成
　医工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。
■医工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
　医工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。
■医工計測技術分野における技術交流に関する助成
　医工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助成します。
■医工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
　医工計測技術分野における技術の発展を推進するため、技術動向等に関する調査研究を助成します。
■医工計測技術に関する情報の収集及び提供
　医工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。

※当財団は、平成 24 年 4 月 1 日付けで、内閣府所管の公益財団法人に移行いたしました。

※名称も「中谷電子計測技術振興財団」から「中谷医工計測技術振興財団」に変更いたしました。

平成 23 年度事業概要

我が国の経済は、リーマンショック以降、回復の兆しがありましたが、昨年３月に未曾有の東日本大震災が発生し、先行きが非常に不透明になっております。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 23 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８名で構成）の委員により、各大学等から応募のあった 34 件（開発研究 24 件、奨励研究 10 件）の研究テーマに対して、公正にして厳正なる審査を実施し、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 24 年２月 24 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 1,798 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

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 23 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。

派遣

氏　名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
金　性勲	東北大学大学院工学研究科 電気通信工学専攻 博士課程後期３年	ＩＥＥＥ 国際磁気学会	カナダ・ バンクーバー	平成 24 年５月

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 25 号」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４件の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４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)
松元　亮	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 システム部門制御分野 准教授	トランジスタによる非破壊細胞診断法の開発と“デバイ長フリー”な信号変換機序の実証	３００

第28回（平成23年度）技術開発研究助成金贈呈者（敬称略・順不同）

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
小池　卓二	電気通信大学大学院情報理工学研究科 知能機械工学専攻　教授	非接触型中耳可動性測定装置の開発と実用化	２００
薮上　　信	東北学院大学工学部 電気情報工学科　教授	室温で動作する生体磁気計測用集積化薄膜磁界センサの開発	２００
本多　裕之	名古屋大学大学院工学研究科 化学・生物工学専攻　教授	磁気細胞パターニングによる１細胞機能画像解析システムの開発	１９８
長谷川英之	東北大学大学院医工学研究科 計測・診断医工学講座　准教授	心臓の高速超音波イメージング法の開発	２００
田中　栄一	北海道大学病院 消化器外科　助教	近赤外線イメージングを用いた切除後残肝機能診断システムの開発	２００
渡辺　哲陽	金沢大学理工研究域 機械工学系　准教授	把持力可視化による力覚提示可能な脳外科手術用マニピュレータの開発	２００
加藤　　大	独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 ナノバイオデバイス研究グループ 研究員	ナノカーボン電極を用いた高感度 LPS 検出法の開発	２００

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
西野　智昭	大阪府立大学 21 世紀科学研究機構 ナノ科学・材料研究センター 特別講師	分子探針による DNA 単分子検出技術の開発	１００
新岡　宏彦	大阪大学ナノサイエンスデザイン教育研究センター 特任助教	カソードルミネッセンス顕微鏡による細胞内蛋白質のマルチカラーナノイメージング	１００
須藤　　亮	慶應義塾大学理工学部 システムデザイン工学科　専任講師	微小培養環境の制御による毛細血管の再生と血管透過性による機能評価	１００
藤田　敏次	大阪大学微生物病研究所 感染症学免疫学融合プログラム推進室　助教	ゲノム結合分子の網羅的同定方法の開発	１００

技術開発研究助成金総額　　１，７９８万円

平成 23 年度贈呈式

ご挨拶をする家次専務理事

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

中谷賞受賞者挨拶

技術開発研究助成者代表挨拶

上段左から、西野、薮上、渡辺、本多、長谷川、藤田、須藤
下段左から、加藤、小池、松元、家次、鈴木、田中、新岡

記念懇親会

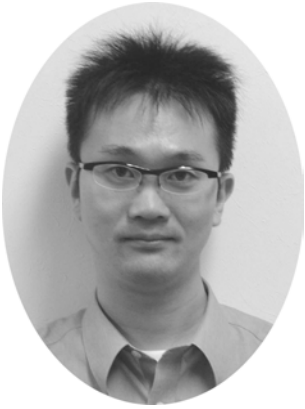
ご挨拶をする家次専務理事

ご祝辞をのべられる経済産業省情報通信機器課
末永課長補佐

乾杯の音頭をとられる川越評議員長

平成２２年度（第３回）
中　谷　賞　研　究　成　果　報　告

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



金沢工業大学　先端電子技術応用研究所
准教授　　足立　善昭

１．はじめに

日本には頚椎症性脊髄症や椎間板ヘルニアなどの脊椎・脊髄変性疾患が多く、高齢化社会を迎えて、その数は増加の一途にある。これらの変性疾患は、椎間板の膨隆や、靭帯の肥厚、骨の変形を生じ、そのため脊髄が局所的に圧迫された状態となる。また、靭帯骨化症や脊髄腫により、神経の圧迫を生じる患者も多く、これらの患者数を合わせると年間約 50 万人以上にのぼると言われている。圧迫された部位では、神経信号の伝導が阻害され、その結果、手足のしびれや麻痺、歩行障害、巧緻運動障害などの神経症状を示す。言い換えれば、手足のしびれや麻痺などの症状は、その真の原因が手足自体ではなく、手足から脳に至る途中の脊髄神経の圧迫による伝導障害である場合があり、その見極めが重要である。

これらの疾患は脊髄への圧迫を外科的な手術で取り除くことによって根治可能である。手術中の患者の負担をより軽減するためには、また、手術によって効果的な結果を得るためには、神経障害の部位を手術前に正確に把握し、手術の範囲を限定することが重要である。従来、このような障害部位の特定には、問診による神経学的所見や、X線画像、MRI などの形態的な画像診断情報に頼っていた。しかし、形態の異常が必ずしも病変位置であるとは限らない。つまり、形態的画像では圧迫がないように見えても伝搬障害が発生している場合や、その逆に形態的画像では圧迫があるように見えて、伝導障害のない場合もある。また、高齢者に特に多く見られる図 1(a)のような場合、形態的画像からは手術の必要な範囲を限定することができず、第３頚椎から第７頚椎までのすべての椎間に対して除圧をせざるを得ないことがある。より精度の高い診断のためには形態的な画像診断情報のみならず、神経生理学的な脊髄の機能検査を行うことが不可欠である。

図 1(b)は従来の脊髄機能検査の例として図 1(a)の患者の頚椎に硬膜外カテーテル電極を挿入し、電位計測を行ったものである。電気刺激に誘発された神経信号が脊髄を伝導する様子が観察できる。この結果から第３頚椎と第４頚椎の間に機能障害があることが術前にわかり、手術の範囲をあらかじめ限定することができる。しかし、この検査は脊柱管内への電極の挿入を必要とし、患者への侵襲性が高くならざるを得ない。とりわけ頚部への電極挿入は、特殊な手技を必要とする。

このため、電位計測による脊髄機能検査はその必要性は認識されながらも、施術できる機関が限定されており、広くは普及していないのが現状である。また、皮膚表面電極による電位計測は、非侵襲の計測ではあるが、生体内の導電率分布の影響により電位分布が歪む。これにより、脊椎という不導体に囲まれた脊髄の活動については診断に必要な空間分解能が確保できないという問題がある。

一方、体内の電気的な活動に伴って発生する微弱な磁場を、体外に配置した高感度磁場センサにより検出し、その磁場源のふるまいを観察する生体磁場計測という手法がある。体組織の透磁率は種別によらず真空とほぼ等しく一定である。したがって、体外で観測する磁場分布は体内の脂肪や骨などの影響を受けず、表面電極による電位計測では不可能だった高空間分解能な体内の電気現象の観測が可能となる。また、体内に電極を挿入することもなく計測可能である。

体表面で観測される磁場はきわめて微弱で、地磁気の 10 億分の 1 から 100 億分の 1 の大きさしかない。そのため、数 fT(=10^{-15}T)の磁場分解能を持つ超伝導量子干渉素子（SQUID）磁場センサでのみ検出可能である。これまでに体表面に数 10～100 箇所以上に配置した SQUID 磁場センサによる高感度磁場計測技術を基盤とした多チャンネルの脳磁計 [1),2)]や心磁計 [3)]が生体磁場計測の応用としてすでに実用化されている。生体磁場計測は陽電子放射断層撮影法(PET)や機能 MRI(fMRI)のように、人体に放射性同位元素をドープしたり、強磁場に曝露したりすることなく完全に非侵襲で神経活動の情報を得られる。また、PET や fMRI と異なり、神経活動の代謝ではなく神経の電気的な活動を直接検出できるので、ミリ秒オーダーの高い時間分解能での観測が可能である。

われわれは SQUID による生体磁場計測の非侵襲性、高時間分解能、高空間分解能という利点を活かし、脊髄電位計測に代わる非侵襲的な脊髄機能検査法を可能にする SQUID 脊髄磁場計測の研究開発を進めてきた。近年、実際の病院で患者を対象に適用しうる脊髄磁場計測システムと、計測した脊髄磁場から空間フィルタ法によって脊髄周囲の電流分布を可視化し、診断に必要な情報を提供する脊髄機能イメージングが可能になってきた。本稿では、これまでに開発した装置と得られた成果について述べる。

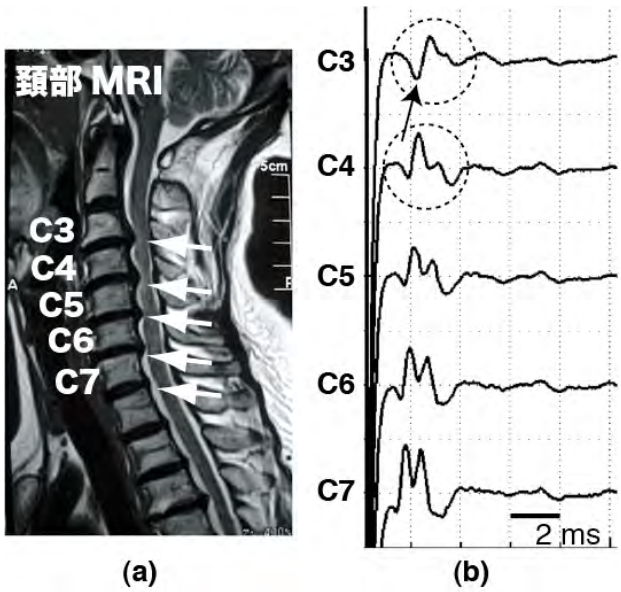


図 1(a)脊髄疾患患者の MRI の例;(b)(a)の脊髄電位検査の信号波形

２．神経細胞による信号伝搬

脊髄の神経信号の伝搬を担っているのは、神経細胞の軸索に沿って連鎖して発生する膜電位の変化である。この膜電位の変化は活動電位と呼ばれている。脊髄機能イメージングでは、この脊髄の神経細胞軸索を伝搬する活動電位に由来する微弱な磁場を、体表面にて SQUID で検出し、その磁場の分布から脊髄周囲の電流分布を再構成し可視化する。

活動電位が発生している部位では、細胞内外に発生したイオン流により図 2(a)に示すような局所的な電流分布が存在する [4)]。細胞内では、膜電位の変化によるイオンチャネルの開閉と、イオンの浸透圧による能動的な膜電流に起因する互い

に逆向きで対になった局所電流が形成される。一方、神経細胞の外では体積電流と呼ばれる電流が細胞内の局所電流を補償するように広い領域に分布する。脊髄の神経信号の伝搬に伴う磁場はこれらの細胞内電流と体積電流が磁場源となる。結果として、図 2(b)で模式的に示されるような四重極パターンの磁場分布が体表面で観測される。活動電位が軸索を伝搬するにつれて、この磁場分布も移動する。その移動速度は、軸索の直径や体温などにも依存するが、おおむね 30～120 m/s である[5]。

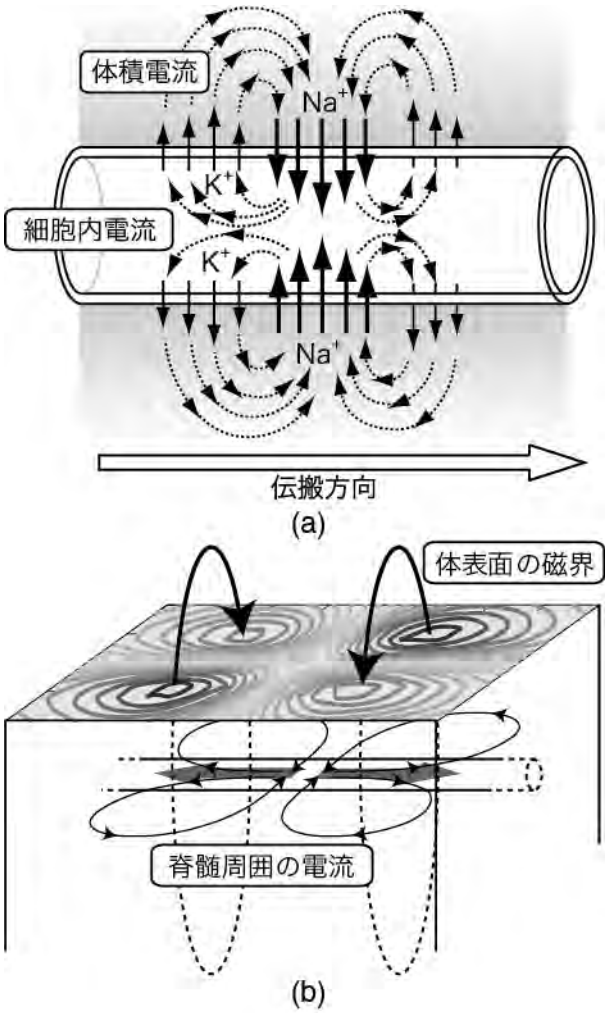


図 2(a) 神経信号伝搬に伴う電流分布の模式図;(b) (a)に伴う体表面の磁場分布の模式図

３．脊髄磁場計測システム

3.1　システム構成

図 3 に開発した脊髄磁場計測システム（以下、脊磁計）のシステム構成図を示す[6),7)]。われわれはこれまでに動物実験用脊磁計[8)]と 2 つの座位被験者用の脊磁計[9),10)]、2 つの仰臥位被験者用の脊磁計を試作開発してきたが、いずれの計測システムも基本的な構成は同様である。

脊磁計は大きく分けて、1) SQUID 磁束センサアレイによる磁場検出部、2) 液体ヘリウムを保持し、センサを超伝導状態に保つための低温容器、3) SQUID 駆動回路や増幅・フィルタ回路を含むアナログ電子回路、4) アナログ電子回路からの出力、すなわち検出した磁場信号をデジタルデータとして記録するデータ収録部、5) 被験者に外的刺激を与える刺激装置、6) システム全体を制御し、データの可視化、解析を司る解析・制御装置、7) 外部からの擾乱磁場を遮蔽する磁気シールドルームから構成されている。

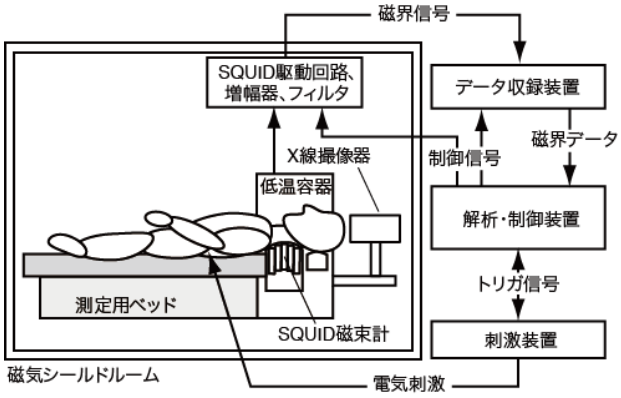


図 3 仰臥位被験者用脊磁計のシステムの構成

3.2　磁場検出部

計測した磁場分布から推定される磁場源の位置情報をより精度よく求めるには、観測領域にセンサを多数配置して、より多くの磁場信号を取得する必要がある。しかし、脊髄磁場計測では頚部背側のように、観測領域が狭い場合が多く、配置できるセンサ数に限りがある。そこで、磁場ベクトルの直交する 3 成分を同時に取り出すベクトル

SQUID 差分型磁束計を新たに開発し、限られた領域でできるだけ多くの独立した磁場情報が得られるようにした[11]。ベクトル SQUID 差分型磁束計では図 4 に示すように、同軸差分型ピックアップコイル 1 つと平面差分型ピックアップコイル 2 つがそれぞれ直交するような向きに配置されており、おのおのが個別の Ketchen タイプの低温 SQUID の入力コイルに結合されている[12),13)]。これにより、円筒軸方向(z 成分)と円筒軸に直交する方向(x、y 成分)の磁場信号を同時に検出し、擬似ベクトル的に磁場情報を得ることができる。差分型ピックアップコイルはグラスファイバー強化樹脂(GFRP)のボビンにニオブ細線を巻いて作られており、観測対象に近い方のコイル（図中では下のコイル）と遠い方のコイル（上のコイル）で逆向きに巻かれている。遠来の環境磁場雑音は両方のコイルを一様に通過するので、キャンセルされる。一方、センサ近傍の観測対象からの磁場は距離による減衰が大きいため、下のコイルには多くの磁場成分が通過するが上のコイルにはほとんど通過しない。結果として、遠来の雑音磁場が除去され、センサの近傍の磁場のみを大きく検出する仕組みである。上下のコイルの距離（ベースライン長）はセンサと観測対象の距離を考慮して設計する必要があるが、脊磁計では 68 mm とした。

このベクトル SQUID 差分型磁束計を 5×8 の準マトリックス状に 40 個配置し、センサアレイを構成している。センサの間隔は 20 mm で、センサアレイ正面から見たときの観測領域の大きさは 140 mm×90 mm である。被験者の頚部背側の形状に合うように、側面から見るとゆるやかな円弧状にセンサが配置されている。この円筒面の曲率半径は、東京医科歯科大学整形外科の外来患者の頚部形状を調査して決定した。

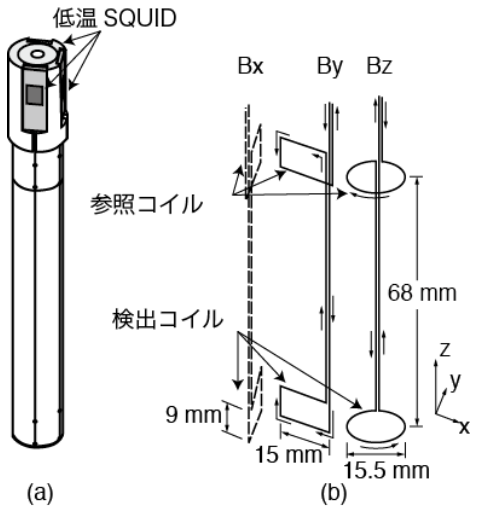


図 4(a)ベクトル SQUID 差分型磁束計の外観；(b)差分コイルの構造

3.3　センサ駆動回路

図 5 は脊磁計で使用している SQUID の典型的な磁場−電圧特性である。一般に SQUID の磁場−電圧特性は図に示されるように周期性を示し、非線形でかつダイナミックレンジも限られたものである。そのため、SQUID からの出力信号は、Flux Locked Loop(FLL)と呼ばれる回路により、線形化とダイナミックレンジ向上が図られている。FLL は SQUID ループを鎖交する磁束の変化量がつねにゼロになるように SQUID の信号を磁場的に帰還し、その帰還量を磁場変化量として出力する仕組みで、SQUID の駆動回路として広く利用されている。脊磁計の FLL は回路構成が比較的簡単で多チャンネル化が容易な Direct Offset Integration Technique(DOIT)方式の FLL[14)]をもとにしている。

従来の硬膜外カテーテル電極による電位計測から、脊髄磁場信号の周波数帯域は 300 Hz～2 kHz 程度であると予測されていた。一方、一般に脳磁場や心臓磁場などの生体磁場の計測に影響を与える大きな磁場的ノイズの要因は、1 Hz 以下の低周波領域のノイズや、商用電源からの 50 Hz もしくは 60 Hz のノイズである。つまり、脊髄磁場信号の信号周波数領域は、これらのノイズの帯域とは重複しない。したがって、FLL の出力段でこれらのノイズ領域、とくに低周波のノイズを可能な

限り遮断することにより、ダイナミックレンジや信号雑音比を向上させることができる。

そこで、脊磁計の FLL には線形化のための帰還系に加えて、低周波のみを選択的に帰還し、低周波の帯域を制限する積分回路を付加している。この FLL を二重積分器型と呼ぶ [10]。二重積分器型の FLL のブロック図と、脊磁計 FLL の周波数特性を図 6 に示す。

FLL を介した SQUID 磁束計の磁場感度は約 1～1.5 nT/V で、白色雑音領域における磁場分解能は平均で 3 fT/Hz$^{1/2}$ 以下となった。

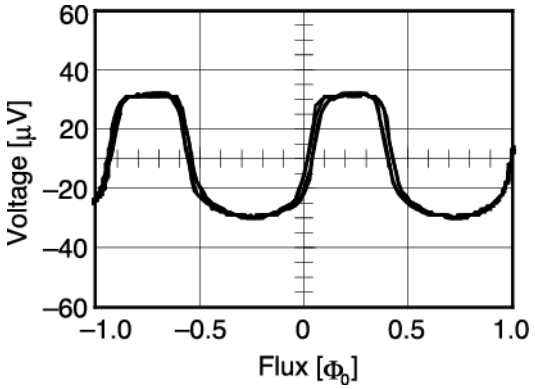


図 5 典型的な SQUID の磁場−電圧特性

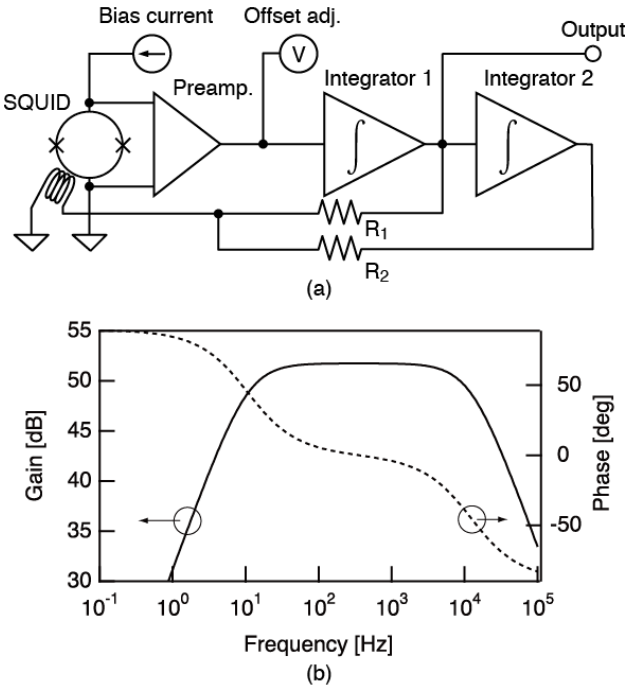


図 6(a)二重積分器型 FLL のブロック図；(b)脊磁計 FLL の周波数特性

3.4　低温容器

低温容器は、SQUID を液体ヘリウム中に保持し、超伝導状態に保つための容器である。真空断熱層を含む 2 重構造をもち、磁気計測を妨げないように GFRP で作成されている。従来の低温容器は液体ヘリウム貯蔵部の底面にセンサを配置する構造が一般的であった。この構造は、対象物に上からセンサを近づけるため、背側の脊髄の磁場を計測する際に、被験者がうつぶせで横になる必要がある。しかし、うつぶせの状態では被験者は胸部や腹部が圧迫された状態になるので、その姿勢を安定的に保持することがしばしば困難である。一方、被験者の姿勢を仰臥位とした場合は、計測中の姿勢を楽に保つことができるため、より安定性の高い計測が可能となる [6),7)]。被験者の疾患が重篤な場合には仰臥位での計測がとくに有効である。

仰臥位の被験者の背側にセンサを配置するため、センサ保持部が円筒状の本体の側面から水平方向に突き出たような特徴的な構造を持つ低温容器を新たに設計、開発した。図 7(a)にその内部構造と寸法を、図 7(b)に外観を示す。頚部の脊髄磁場を計測する場合、被験者は図 3 に示すように、頭部と頚部をはみ出させてベッドに仰臥位で横になり、頚部をセンサ保持部で支えるようにして計測する。

図 7(c)は低温容器の円筒部本体の内側から突起部分を見たときの写真である（図 7(a)の白い矢印の方向）。前述のセンサアレイが、センサ保持部の上面に沿って、鉛直上方向きに実装されている。センサ保持部上面が、センサアレイの形状に合わせた円筒面になっており、被験者はこの部分に頚部や腰部を密着させて磁場計測を行う。被験者と接する観測面の壁厚（室温−低温距離）は薄い方がセンサを磁場源に近づけられるので、より大きな磁場信号を得ることができて有利である。観測面を円筒面構造にすることで、強度を保たせながら、真空層を 3 mm に抑え、全体で 7 mm の壁厚を実現した。

低温容器の液体ヘリウムの容量は約 70 リットルで、1 度の充填で約 1 週間 SQUID の超伝導状態を保持できる。また、低温容器内部の熱勾配を抑制し、液面がセンサの位置より下方になっても、SQUID が動作するように設計されている。

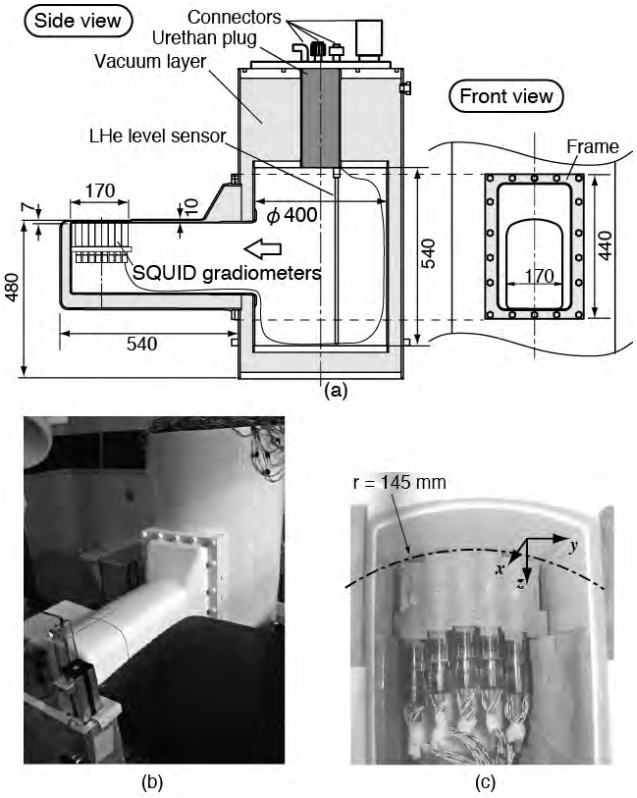


図 7(a)低温容器の内部構造；(b)低温容器の外観；(c)低温容器内突出部に実装されたセンサアレイ

3.5 X 線撮像

生体磁場計測で脳機能の検査を行う脳磁計では、磁場源解析で得られた神経の活動状態を、別途 MRI で得られる脳の形態的な画像情報に重畳して表示するのが一般的である。しかし、関節のない頭骨に囲まれた脳を対象とする場合と異なり、脊髄が対象の場合、磁場計測時と MRI 撮像時で同じ屈曲状態を再現するのは困難である。また、計測の信頼性と再現性を維持するためには、計測時の被験者の脊椎とセンサアレイの相対位置を正確に知ることが重要である。そこで、X 線撮像器を低温容器のガントリに搭載することで SQUID 計測システムと組み合わせ、計測しているその場での形態画像情報の取得を試みた。図 8(a)に脊磁計に X 線撮像器を組み合わせた状態を示す。図中右側の X 線照射器から X 線が照射され、低温容器を通過し、被験者の頚部を透過してその形態像を左側の X 線撮像パネルに投射する。図 8(b)に示すように、得られた X 線画像にはセンサアレイと被験者の頚椎が同時に写るので、それらの位置関係を明確に知ることができる。

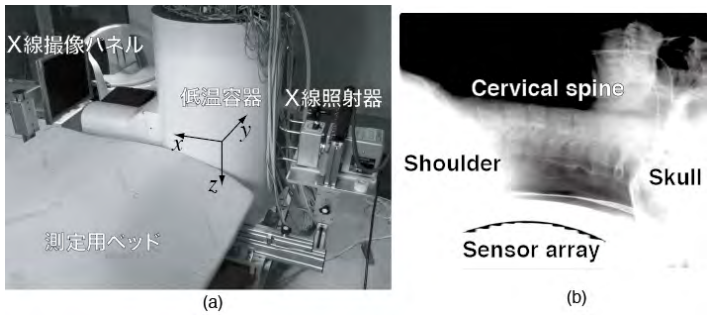


図 8(a)低温容器と X 線撮像機の配置；(b)X 線撮像の例

4．空間フィルタ法による電流分布再構成

計測した脊髄磁場の分布からその起源となる神経活動による電流分布を求めることを磁場源解析という。これは多くの場合不良設定問題となり、必ずしも解が一意に定まるとは限らない。脳磁計をはじめとする生体磁場の磁場源解析の手法として、近年空間フィルタ法と呼ばれる手法が注目されており、さまざまな空間フィルタが提案されている [15),16)]。本節では空間フィルタのうち Unit Gain Minimum Norm 空間フィルタ法（以下、UGMN 空間フィルタ法）による磁場源解析について簡単に述べる。

時刻 t における脊髄磁場信号を頚部近傍に配置した M 個のセンサで検出したとして、それぞれのセンサで得た磁場信号 $b_i(t)$を要素にもつ M 次元のベクトルを $\mathbf{b}(t)=[b_1(t), b_2(t), ..., b_M(t)]^T$ と定義する。一方、脊髄を含む関心領域中の点 $\mathbf{r}=[x, y, z]$に位置する電流密度ベクトルを $\mathbf{j}(\mathbf{r}, t)=[j_x(\mathbf{r}, t), j_y(\mathbf{r}, t), j_z(\mathbf{r}, t)]^T$ とする。ここで、位置 $\mathbf{r}$ の電流密度に対す

るセンサの感度を表す lead field 行列と呼ばれる行列 $\mathbf{L}(\mathbf{r})$を導入すると、$\mathbf{b}$ と $\mathbf{j}$ の関係は

$$\mathbf{b}(t) = \int \mathbf{L}(\mathbf{r})\mathbf{j}(\mathbf{r},t)d\mathbf{r} + \mathbf{n}(t) \qquad (1)$$

と表すことができる。$\mathbf{n}(t)$は各センサの出力に加わるノイズ $n_i(t)$を要素にもつベクトルである。$\mathbf{L}(\mathbf{r})$はここでは $M\times3$ の行列で、各要素は電流と磁場の関係を表す Biot-Savart の式により求めることができる。

ここでの目的は、測定した磁場データ $\mathbf{b}(t)$から電流分布 $\mathbf{j}(\mathbf{r},\ t)$を得ることである。空間フィルタ法では、測定データ $\mathbf{b}(t)$に対する位置 $\mathbf{r}$ の電流密度への重み行列 $\mathbf{W}(\mathbf{r})$を定義し、これを $\mathbf{b}(t)$に作用させて、再構成された電流密度 $\mathbf{j}_r(\mathbf{r},\ t)$を得る。すなわち

$$\mathbf{j}_r(\mathbf{r},t) = \mathbf{W}^T(\mathbf{r})\mathbf{b}(t) \qquad (2)$$

である。ＵＧＭＮ空間フィルタ法ではこの $\mathbf{W}(\mathbf{r})$を

$$\mathbf{W}(\mathbf{r}) = \mathbf{G}^{-1}\mathbf{L}(\mathbf{r})\left[\mathbf{L}^T(\mathbf{r})\mathbf{G}^{-1}\mathbf{L}(\mathbf{r})\right]^{-1} \qquad (3)$$

として、再構成電流を求める。ここで $\mathbf{G}$ はグラム行列と呼ばれ、センサ間の lead field の類似度を表すもので

$$\mathbf{G} = \int \mathbf{L}(\mathbf{r})\mathbf{L}^T(\mathbf{r})d\mathbf{r} \qquad (4)$$

と定義される。

UGMN 空間フィルタ法は、磁場源とセンサの距離が一定でない場合に適用しても、再構成される電流の密度が安定に推定できるという特長を持つ。脊髄磁場のように磁場源が湾曲した脊髄神経上にある場合にとくに適している。

５．脊髄磁場計測実験と結果

5.1　胸髄刺激の場合

この節では、東京医科歯科大学整形外科に開発した脊磁計システムを設置して、脊髄磁場計測を患者に適用し脊髄機能イメージングを行った例について述べる[17]。被験者は、関節リウマチを原因とする環軸亜脱臼による脊髄症を発症した 60 代前半の女性で、形態画像からは頚部脊髄の異常は認められなかった。術中モニタリングのために挿入した硬膜外カテーテル電極にて、胸髄に電気刺激を与え、頚部で脊髄磁場を検出した。電気刺激は強度 4 mA、持続時間 0.3 ms の矩形波電流パルスとした。信号雑音比の改善のため、頻度 17 Hz で 4000 回の繰り返し刺激を与え、加算平均処理を行った。各 SQUID からの信号は、500 Hz～5 kHz のアナログ帯域通過フィルタを介し、サンプリング周波数 40 kHz にてデジタルサンプリングされた。磁気遮蔽は東京医科歯科大学に既設のシールドルーム（住友金属製）を利用した。

上記の条件で得られた磁場データのうち、刺激後 3.0 ms～8.0 ms のデータに対して、UGMN 空間フィルタ法を適用し、脊髄周囲の電流分布再構成を行った。図 9(a)～(d)は刺激後、3.8、4.2、4.6、5.0 ms において、磁場源解析で得られた脊髄周囲の電流分布を、計測時に撮像した患者の X 線頚部矢状面画像に重ね合わせて表示したものである。白色枠内で、色の薄いところが電流密度の高い部分、色の濃い部分が電流密度の低い部分を表す。時間につれて電流密度の高い部分が頭部へ移動するのがわかる。また、図 9(e)は(a)～(d)中の A～G で示した位置における再構成電流の強度の時間変化をプロットしたものである。図 9(e)の矢印で示されたピークから、信号伝搬速度を見積もると約 53 m/s となる。この値は電気生理学的に知られている正常な神経信号の伝搬速度の範囲であり妥当と言える。信号伝搬速度は脊髄機能を診断する上で重要な情報である。磁場観測領域中では、顕著な伝搬速度の異常は見られなかったが、頭側に近い位置で再構成電流波形の歪みが確認され、患者の疾患部位とよく関連した結果となった。このように、磁場計測による脊髄機能イメージングにより、従来の侵襲的な脊髄電位計測と同等の情報を非侵襲的に得ることができた。

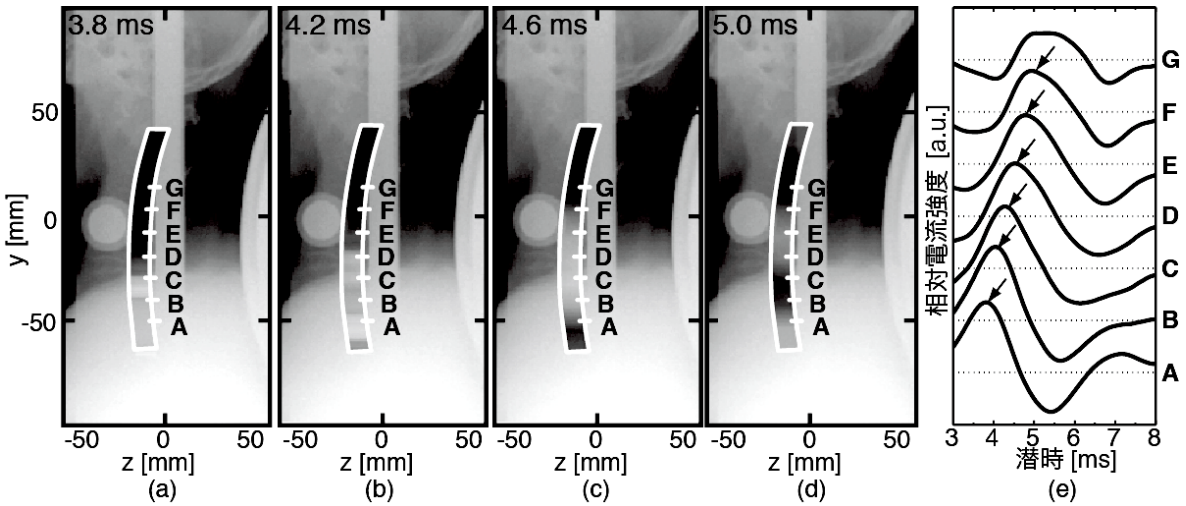


図 9(a)-(d)胸髄刺激脊髄磁場計測と空間フィルタによる脊髄機能イメージングの例;(e)A～G において再構成された電流波形

5.2　末梢神経刺激の場合

胸髄刺激は、神経信号が直線的に伝搬するため比較的磁場源の解析が容易である。しかし、電気刺激のために硬膜外カテーテル電極を使用する必要があり、術前の患者に対してしか適用することができない。経皮的な末梢神経刺激で脊髄磁場計測ができれば、より適用範囲が広がる。そこで、被験者の左手首の正中神経に表面電極により電気刺激を与え、頚部にて誘発する神経信号を磁場的に観測する実験を行った[6)]。被験者は頚部脊髄に疾患のない 20 代前半の男性である。電気刺激は強度 6 mA、持続時間 0.3 ms の矩形パルス電流で、繰り返し頻度は 8 Hz とした。体躯の正中線が観測領域の中央に位置するようにした。各 SQUID からの信号は、100 Hz～5 kHz のアナログ帯域通過フィルタを介し、サンプリング周波数 40 kHz にてデジタル的に記録した。前節の胸髄刺激の場合と同様にして、同一の刺激を 4000 回繰り返し、磁場データを加算平均処理して信号雑音比の改善を図った。加算平均処理後の磁場データにカットオフ周波数 1290 Hz のデジタル低域通過フィルタを適用した。

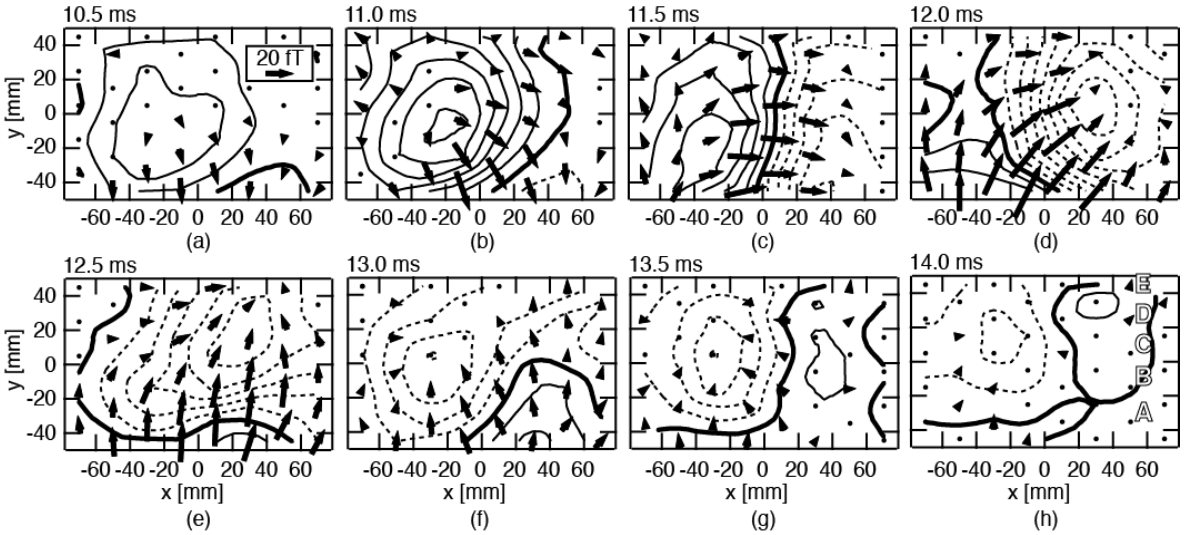


図 10 左手首正中神経刺激による脊髄磁場分布の時間変化

図 10 は刺激後 10.5 ms～14.0 ms の間に得られた磁場分布の時間的変化を、体表面に対して法線方向の成分は等磁場線図で、接線方向成分はアローマップで表したものである。被験者の頚部後方より見た図で、上下左右はそれぞれ被験者の頭側、尾側、左側、右側に対応している。等磁場線図の実線、点線はそれぞれ磁場のわき出し、吸い込みを表す。また等磁場曲線の間隔は 5 fT である。

腕の末梢神経からの信号が、頚椎間より脊柱管内に導入され脊髄に合流する場合、神経信号の経路は先に述べた胸髄刺激の場合と異なり、大きく湾曲しているばかりではなく、途中で複数の経路に分かれている。このことにより、頚部で観測される磁場分布は湾曲したそれぞれの経路を通る神経信号の磁場の合成となり、図 10(c)～(f)に見られるように磁場分布は複雑な変化を示す。このような場合、正確な電流源解析は困難であり、いまだ精度の高い結果は得られていない。このような末梢神経刺激の場合に適用できる磁場源解析手法には、解剖学的な神経経路の位置を先見情報として使うなどの工夫が必要で、今後の課題である。

しかし、図 10(a)～(c)、(f)～(h)を仔細に見ると、前者では左側からわき出した磁場が右側へ吸い込まれている。一方、後者では、右側からわき出した磁場が左側へ吸い込まれている。これは、図 1(b)に表されるような四重極様のパターンが左尾側から観測領域を通過し、上方の頭側へ移動していくのを反映しており、左手の末梢神経から脊髄を通って頭側へ伝搬する神経信号を磁場計測で観測できていることを示唆している。

図 11 は図 10(h)の A～E の位置で検出した法線方向の磁場信号波形を示す。矢印で示したピークから伝搬速度を見積もると約 74 m/s となった。磁場源解析によるより詳細な検査については今後の課題であるが、現状の磁場計測波形の変化の分析によっても脊髄機能の情報が非侵襲的な末梢神経刺激で得られることが示せた。

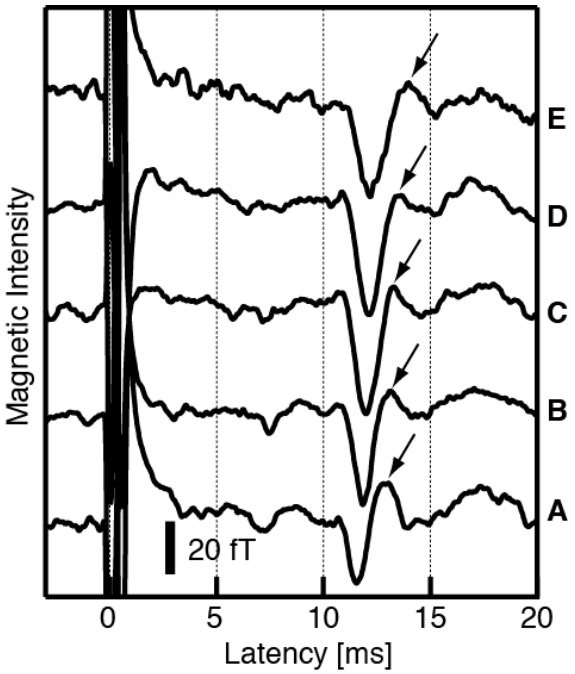


図 11 脊髄磁場信号波形の例

６．まとめ

脊髄磁場計測による脊髄機能イメージングは超伝導磁場センサを応用した脊磁計を用いて、これまで観測できなかった脊髄神経の活動を画像情報として提供するものである。最新の脊磁計の試作機では、脊髄疾患の患者から安定的に脊髄磁場データが取得できるようになった。得られた磁場データをもとにして、前節で述べた信号伝搬速度の分析や、磁場分布の時間変化の解析、および空間フィルタによる電流源再構成結果から、術前の脊髄の傷害部位の情報が非侵襲で得られる。従来の電位計測による侵襲的な脊髄機能診断と比較しても同等の結果が得られており、侵襲的な検査を非侵襲的な検査で代替することが技術的には可能になってきた。

今後は、引き続き、医療現場で計測システムを運用し、臨床データの蓄積と診断プロトコルの確立を図る。それと並行して、脊磁計システムのコストダウン [18]や精度評価法の確立 [19]にも取り組んでいる。脊髄機能イメージングが、一日でも早く医療機関で活用され、脊髄疾患で苦しむ方々の治療の一助となるよう研究開発を進めていく。

謝辞

本研究の遂行にあたって、脊磁計の試作機を病院で運用し、臨床応用研究を担当してくださった東京医科歯科大学の川端茂徳先生、空間フィルタ法による磁場データの電流源再構成を担当してくださった首都大学東京の関原謙介先生をはじめとする共同研究者の皆様一同に感謝の意を表します。また今回、中谷賞という栄えある賞を授与していただきました。本研究開発を高く評価してくださった方々に深く感謝いたします。

参考文献

1)M. Hämäläinen, R. Hari, R.J. Ilmoniemi, J. Knuutila, O.V. Lounasmaa, "Magnetoencephalography–theory, instrumentation, and application to noninvasive studies of the working human brain", Reviews of modern physics, vol. 65, pp. 413–498, 1993.

2)H. Kado, M. Higuchi, M. Shimogawara, Y. Haruta, Y. Adachi, J. Kawai, H. Ogata, G. Uehara, "Magnetoencephalogram system developed at KIT", IEEE Trans Appl Supercond, vol. 9, pp. 4057–4062, 1999.

3)A. Kandori, T. Miyashita, K. Ogata, Y. Seki, D. Suzuki, A. Tsukamoto, K. Saito, K. Yokosawa, K. Tsukada, "Magnetocardiography and impedance magnetocardiography", Proc. 10th Int. Supercond. Electr Conf., 2005.

4)J.P. Wikswo, "Biomagnetic sources and their models", in S.J. Williamson, M. Hoke, G. Stroink, M. Kotani(Ed.), Advances in Biomagnetism, Plenum, New York, pp. 1-18, 1989.

5)A.C. Guiton, J.E. Hall, "Textbook of medical physiology", 10th ed., Saunders, Philadelphia, pp. 532-533, 2000.

6)Y. Adachi, J. Kawai, M. Miyamoto, H. Ogata, M. Tomori, S. Kawabata, T. Sato, G. Uehara, "A SQUID system for measurement of spinal cord evoked field of supine subjects", IEEE Trans Appl Supercond, vol. 19, pp. 861-866, 2009.

7)Y. Adachi, M. Miyamoto, J. Kawai, G. Uehara, H. Ogata, S. Kawabata, K. Sekihara, H. Kado, "Improvement of SQUID magnetometer system for extending application of spinal cord evoked magnetic field measurement", IEEE Trans Appl Supercond, vol. 21, pp. 485-488, 2011.

8)Y. Adachi, G. Uehara, J. Kawai, S. Kawabata, H. Okubo, H. Komori, H. Kado, "A SQUID biomagnetometer system for measurement of spinal cord evoked magnetic fields", Supercond Sci Technol, vol. 14, 1075-1080, 2001.

9)Y. Adachi, J. Kawai, M. Miyamoto, S. Kawabata, H. Okubo, Y. Fukuoka, H. Komori, G. Uehara, "A 30-channel SQUID vector biomagnetometer system optimized for reclining subjects", IEEE Trans Appl Supercond, vol. 15, pp. 672-675, 2005.

10)Y. Adachi, J. Kawai, G. Uehara, M. Miyamoto, S. Tomizawa, S. Kawabata, "A 75-ch SQUID biomagnetometer system for human cervical spinal cord evoked field", IEEE Trans Appl Supercond, vol. 17, pp. 3867-3873, 2007.

11)Y. Adachi, J. Kawai, M. Miyamoto, G. Uehara, S. Kawabata, H. Okubo, Y. Fukuoka, H. Komori, "Three dimensionally configured SQUID vector gradiometer for biomagnetic measurement", Supercond Sci Technol, vol. 16, pp. 1442-1446, 2003.

12)J.M. Jaycox, M.B. Ketchen, "Planar coupling scheme for ultra low noise DC SQUID", IEEE Trans Magn, MAG-17, pp. 400-403, 1981.

13)M.B. Ketchen, J.M. Jaycox, "Ultra-low noise tunnel junction dc SQUID with a tightly coupled planar input coil", Appl Phys Lett, vol. 40, pp.736-738, 1982.

14)D. Drung, R. Cantor, M. Peters, H.J. Scheer, H. Koch, "Low-noise high-speed dc superconducting quantum interference device magetometer with simplified feedback electronic", Appl Phys Lett, vol. 57, pp. 406-408, 1990.

15)K. Sekihara, S.S. Nagarajan, Adaptive Spatial Filters for Electromagnetic Brain Imaging (Series in Biomedical Engineering), Springer, 2008.

16)T. Sato, Y. Adachi, M. Tomori, S. Ishii, S. Kawabata, K. Sekihara, "Functional Imaging of spinal cord electrical activity from its evoked magnetic field", IEEE Trans Biomed Eng, vol. 56, pp. 2452-2460, 2009.

17)佐藤朋也, 足立善昭, 友利正樹, 石井宣一, 川端茂徳, 関原謙介, "脊髄機能イメージングソフトウェア Sea-viewer の開発",臨床神経生理学, vol. 37, pp. 123-129, 2009.

18)Y. Adachi, D. Oyama, S. Kawabata, M. Sato, G. Uehara, "Realistic neural current model for developing a phantom for the evaluation of spinal cord biomagnetic measurement", IEEE Trans Magn, vol. 47, pp. 3837-3840, 2011.

19)Y. Adachi, D. Oyama, J. Kawai, H. Ogata, G. Uehara, "Integration of a cryocooler into a SQUID magnetospinography system for reduction of liquid helium consumption", Physics Procedia, in printing, 2012.

平成２１年度（第２６回）
技 術 開 発 助 成 成 果 報 告

１．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
（群馬大学大学院　上原宏樹）----------23

２．細胞内タンパク機能の無標識イメージング
（大阪大学大学院　藤田克昌）----------29

３．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
（近畿大学　萩山　満）----------35

４．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
（横浜国立大学大学院　武田　淳）----------42

５．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
（中央大学　片山建二）----------49

６．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
（長崎大学附属病院　長谷川寛雄）----------57

７．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
（秋田大学大学院　尾野恭一）----------65

８．　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
（兵庫県立大学大学院　吉木啓介）----------73

９．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
（新潟大学　崔　森悦）----------80

１０．ＭＲＩによる定量性を持った機能イメージング剤の開発
（京都大学大学院　田中一生）----------90

１１．二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
（東京大学　西村　智）----------96

注１　顔写真は研究責任者です。

注２　本成果報告は平成 21 年度の助成金の贈呈に基づき、平成 22 年度に実施され、平成 23 年 9 月までに執筆された研究成果です。

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

研究責任者　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　　上　原　宏　樹
共同研究者　群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻
教　授　　山　延　　健

１．はじめに

糖尿病は､現代における主要疾病の 1 つであり、2000 年には世界中で実に 1 億 7100 万人がこの病を患っているとのデータが公表されている。この値は 2030 年までに２倍以上になると世界保健機構（WHO）は警告している 。WHO によれば、現在、我々は破滅的規模の糖尿病蔓延の危機に潜在的に直面しており、その影響は、むしろ発展途上国で深刻である。

糖尿病患者の数（特に２型・糖尿病）は、世界中で急激に増加している。これは、主に老年層で顕著であり、運動不足や肥満につながる食習慣にその原因がある。今日では、早期に発見されて治療が行なわれれば、糖尿病は死に至る病ではない。糖尿病によって起こる合併症の治療技術や予防技術も進んで、患者の寿命も延びてきており、増え続ける糖尿病患者に多大な貢献をもたらしている。しかしながら、糖尿病自体の治療法は未だ見出されておらず、合併症を防ぐ最良の方法は血中のグルコース濃度（血糖値）を常にモニターし、その結果を踏まえてインシュリンを注射するしかない状況にある。また､21 世紀初頭に至るまで、注射なしで（すなわち無痛で）血糖値を検知する方法は未だ開発されてはいない。したがって、これに代わるモニター技術、すなわち、糖尿病患者が自分の指に針を刺して血液検査をしなくて済むようにする技術の開発研究がこの 30 年間続けられてきた。今日では、増え続ける糖尿病患者の数に応じて、このような技術開発の社会的要請は益々大きくなっている。

これに対して、長期間の使用が可能な「体内埋め込み型」のグルコースセンサーは、上記のような患者の負担を最小限化しうる電子計測技術でと言える。この方法は、患者の血糖値を絶え間なく監視できるようにすることで、糖尿病患者の生活の質（QOL）を向上させられると期待されている。さらに、この計測システムなら、低血糖症あるいは高血糖症になる前に患者本人にアラームなどで知らせることができるので、特に就寝中における容態急変の対処法として有効である。最終的には、血糖値の変化に対応してリアルタイムでインシュリンを投与する「フィードバック型の糖尿病管理システム」へ発展させられると期待される。したがって、平均で毎日 4 回の指先への針刺しによる採血が必要な従来の血糖値計測法と比較して、この体内埋め込み型センサーによる持続的な血糖値モニタリングは、糖尿病治療および一般患者の健康管理においても大きなブレーク・ス

ルーとなると予想される。

しかしながら、現在まで、長期間使用可能な体内埋め込み型のグルコースセンサーの商業化に成功した例はない。このため、ほとんどの糖尿病患者は今でも、インシュリン注射するタイミングを知るために 1 日の 2～6 回の血糖値測定が欠かせないが、この状況は 30 年前と何ら変わっていない。

最近、2～7 日間の使用が可能で FDA 認可の持続的グルコース・モニタリング装置（CGM）が幾つか市販されている。例えば、Medtronic 社の Guardian Real-TimerZ [1]、Abbott 社の FreeStyle Navigator [2]、Dexcom 社の Dexcom Seven [3]が挙げられる。しかしながら、これらはあくまで生体に対して「低侵襲性」でしかないので、長期間のモニタリングには適していない。感染症のリスクを考慮すると、長期間使用可能なセンサーとするには、生体に埋め込んでしまうしかない。また、これらはすべて指刺し採血を想定したシステムであり、実用化されたとしても依然として患者の QOL 向上にあたっては理想的であるとは言えない。

一方、我々とスイス連邦工科大ローザンヌ校（EPFL）の研究チームは、体内埋め込み型グルコースセンサーへの搭載を目指してブロック共重合体から細孔サイズの異なるナノポーラス膜を調製し、その力学強度や生体適合性を評価する国際共同研究を行っている[4]。具体的には、ポリエチレン／ポリスチレン・ジブロック共重合体を溶液キャストにて製膜し、エッチング条件を制御することで、細孔径が 5～40nm のナノポーラス膜を調製した。これらのグルコース透過性およびアルブミン透過性を評価したところ、すべての膜でグルコースを透過していたのに対し、細孔サイズが 10nm 以下の膜ではアルブミン透過を完全にシャットアウトしていた（図 1(a)）。これに対して、一般的なナノポーラス膜として知られているアルミナ膜ではアルブミンのリークが確認され（図 1(b)）、高分子ナノポーラス膜の優位性を実証することができた。また、このポリエチレン製ポーラス膜はアルミナ膜に比べて非常にフレキシブルであり、体内埋め込み型グルコースセンサーのような MEMS 加工が必須の計測システムに適していた。

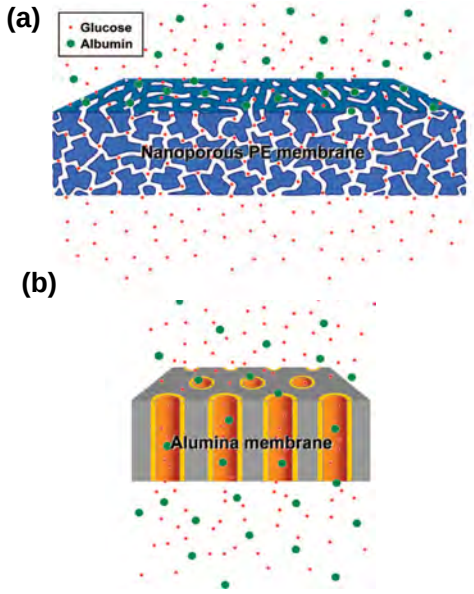


図 1 グルコース（・）およびアルブミン（●）透過の模式図．(a) ナノポーラス PE 膜，(b) 市販のナノポーラス・アルミナ膜．

しかしながら、このナノポーラス膜の基材であるポリエチレンは耐薬品性に優れ、長期間、生体内で作動可能であるものの、生体適合性に優れるとは言えない。一方、シリコーンは、耐薬品性に優れる上に人工臓器等の生体デバイスに実装されている実績がある。また、非常にフレキシブルであり、ポリエチレン・ナノポーラス膜同様に MEMS 加工に優れると考えられる。

そこで、本研究では、生体適合性に優れたシリコーン材料で多孔膜を創製し、その優れた伸縮性を利用して特定の生体分子のサイズ透過性を制御可能なシステムを開発することを目的とする。

具体的には、シリコーンに対して非相溶な溶媒を混合させた相分離エマルジョンを調製し、これを昇温することでシリコーン架橋と溶媒揮発を競争的に進行させ、膜厚方向に連通した細孔チャネルの形成を行なった。

２．実験

2.1　試料

本研究では、伸縮性に優れたシリコーンを基材とする必要がある。そこで、伸度を確保するために両末端にビニル基を有する鎖状のポリジメチルシロキサン(DMS)、また、収縮性を確保するために分岐状のまず、ポーラスシリコーン基材を調製するために、分岐末端にビニル基を有するポリ(ビニルメチルシロキサン - ジメチルシロキサン)共重合体(VDV)、さらに、架橋剤成分として、メチルハイドロジェンシロキサン(HMS)を組み合わせた。これに、細孔形成のための蒸留水および架橋反応触媒である白金錯体を用いた。

これら基材シリコーンおよび白金触媒には、Gelest 社製のものを用いた。用いたシリコーン原料の分子量ならびに粘度を表 1 に示した。

表 1. 用いたシリコーン原料の分子量特性

シリコーン	重量平均分子量	粘度（Pa・s）
DMS	117,000	60,000
VDV	28,000	800～1,200
HMS	1,900～2,000	25～35

2.2　多孔膜成形

一番粘度の低い HMS 0.135 g と蒸留水 0.135 g をまず室温で徒手により 15 分間撹拌して混合し、次に中程度の粘度を有する VDV 0.26 g を加え、さらに 15 分間撹拌した。 最後に一番粘度の高い DMS 0.61 を加えて 2 分撹拌し、全体をエマルジョン化したところに白金触媒を加えて 2 分間撹拌し、その後、離型用のポリイミドフィルム状にキャストし、これをホットプレス上のプレス板に乗せて所定の温度（50℃、80℃および 120℃）に加熱し、5 分間保持して熱架橋を進行させた。このうち、50℃および 80℃で架橋させた試料では、その後、水を揮発させるために温度を 120℃に上げて 2 分間保持して、室温に冷却して多孔膜を得た。なお、最終的な蒸留水の重量含有率は 12%である。

また、比較として、上記と同じ手順で蒸留水を加えずに 50℃、80℃、120℃で架橋させた無孔膜（50℃、80℃の熱架橋条件では、その後、120℃に昇温）も調製した。

2.3　TG-DTA 測定

Rigaku 製 TG8120 熱重量(TG-DTA)を用いて、架橋温度及び熱分解成分の同定を行った。基準物質にアルミナを用いて、酸素雰囲気下、昇温速度 5℃/min において室温～400℃の温度範囲で測定を行った。

試料としては、2-2 の手順で DMS 0.61 g 、VDV 0.26 g 、HMS 0.135 g および白金触媒を混合したもの（蒸留水なし）をそのまま用いた。

2.4　力学物性測定

2-2で得た多孔膜及び同条件で水を含まないで作製した無孔膜を長さ50mm、幅5mmに切り出し、ORIENTEC社製テンシロン万能試験機RTC-1325Aを用いて力学物性測定を行った。引張り条件は、室温にて、掴み間隔30mm、引張速度20mm/minで行った。

2.5　イメージング NMR

2-2で調整したシリコーン混合物を、キャストせずにφ12mmの試験管に直接詰め、オイルバス中で120℃で5分間加熱架橋させた塊状試料を用いた。これを室温にて、Bruker社製 AVANCEⅢ により、磁場勾配3000G/mの条件下でイメージング測定を行った。

３．結果と考察

3.1　TG-DTA 昇温曲線

まず、今回用いたシリコーンの架橋温度を調べるために、TG-DTA 測定を行った。シリコーン架橋反応は発熱反応であるので、DTA 曲線の変化から架橋温度を見積もることができる。また、TG 曲線からは、架橋物の耐熱温度を知ることができる。図 2 は、DMS、VDV、HMS を混合した試料

を昇温した際の熱量(DTA)と重量(TG)の変化を示したグラフである。DTA 曲線では 50~60℃の間で発熱ピークが観測された。このことより、DMS、VDV、HMS および白金触媒を混合して昇温することにより 50~60℃付近で架橋反応が起こることが確認された。

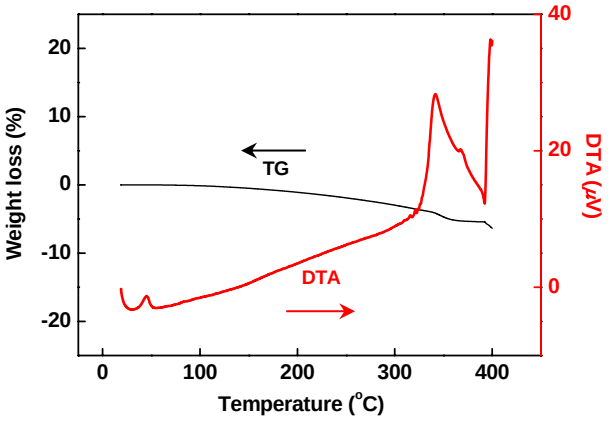


図２．DMS/VDV/HMS/白金触媒の混合物を昇温した際の TG-DTA 曲線．昇温速度は 5℃/min.

一方、TG の結果を見ると 300℃以上では重量減少が始まっているのが窺える。よって、形成された架橋構造は 300℃以降で熱分解することが確認された。

以上のことより、フィルムの架橋温度を 50℃、80℃、120℃に設定して今後の測定に使用するフィルムを作製した。

3.2　熱架橋後フィルムの力学物性

多孔化がシリコーン強度に与える影響を調べるために、異なる温度（50℃、80℃、120℃）で熱架橋させた多孔膜（蒸留水を混合）の引張り試験を行った（図 3）。比較として、同条件で蒸留水を混合せずに調製した無孔膜の力学物性評価も行った（図 4）。

まず、無孔膜の結果（図 4）を見ると、50℃、80℃架橋体では両者共に破断強度 0.07MPa、破断伸び 200～250%程度を示している。これに対して 120℃架橋体では、同程度の破断伸びを有しているものの、破断強度は 50℃および 80℃架橋体の約半分程度となっている。

次に多孔膜の結果（図 3）を見ると、50℃および 80℃で架橋させた多孔膜は、無孔膜（図 4）に比べて破断強度は若干減少しているが破断伸びは同程度であり、全体として大きな違いは認められない。これに対して、120℃で架橋体では多孔化により破断伸びがかなり減少していることが分かる。

以上より、120℃で架橋と多孔化を競争的に進行させた多孔膜は特異な構造を有していると考えられる。

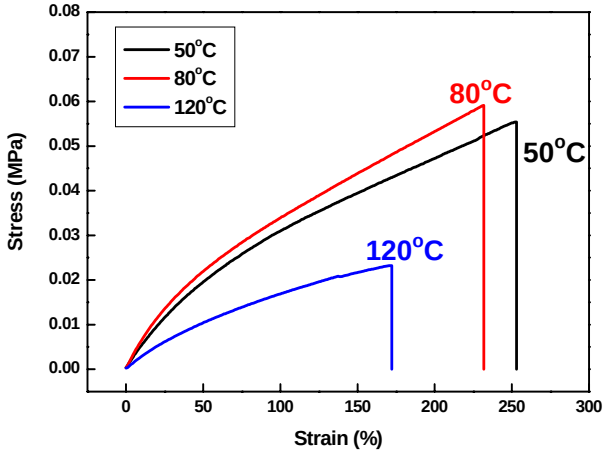


図３．含水シリコーン混合物を各温度で熱架橋後、水分揮発して得た多孔膜の引張り試験結果の比較.

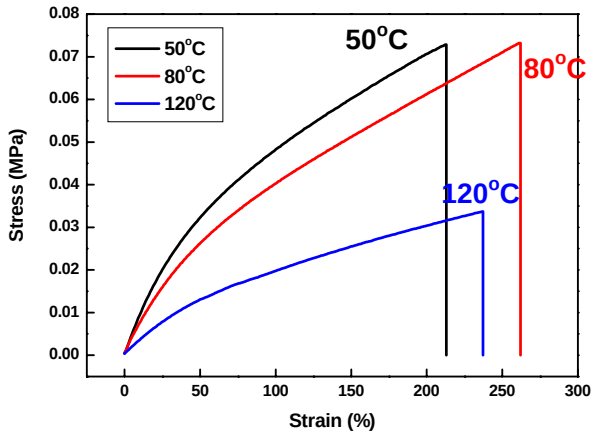


図４無水シリコーン混合物を各温度で熱架橋後、水分揮発して得た無孔膜の引張り試験結果の比較.

3.3　イメージング NMR

120℃で架橋させた多孔膜では破断伸びが無孔膜に比べて顕著に低くなる理由として、細孔の分布状態が関係していると考えられる。これを明らかにするためには、膜内部の多孔構造を観察する必要がある。そこで、膜内部の構造を電子顕微鏡観察するために、通常の無機材料で用いる研魔法あるいはヘキ開法では電子顕微鏡観察用の試料切片を調製しりょうとしたが、本研究で対象としたシリコーン等のエラストマー材料の場合、試料が極めて柔らかいため、電子顕微鏡観察可能な試料切片を調製することは難しかった。

そこで、イメージング NMR 測定によって多孔構造を観測することを試みた。NMR イメージングは一般には MRI と呼ばれ、生体などの内部の情報を画像にする方法であり、病理組織の同定など医療用途で広く用いられている。

ここで、原子核中の原子核スピンに静磁場を作用させることにより核スピンの持つ磁化は磁場をかけた向きに僅かに揃う。これにより全体として磁場をかけた向きに巨視的磁化が出来る。この核磁化を、特定の周波数のラジオ波を照射することにより、静磁場方向から傾けると、核磁化は静磁場方向を軸として歳差運動を行う。その運動の周波数はラーモア周波数といわれ、各原子核固有の周波数であり、かけた磁場の強さに比例する。そのパルスの照射をやめると徐々に元の状態に戻るが、このパルスをやめてから定常状態に戻る（緩和現象）でそれぞれの組織によって戻る早さが異なる。核磁気共鳴画像法では各組織の戻り方の違いをパルスシーケンスのパラメータを工夫することによって画像化する。この方法が MRI と呼ばれる測定法の原理である。

しかしこのままではどこがどのような核磁気信号を発しているのかという位置情報に欠ける。そこで静磁場とは別に、距離に比例した強度を持つ勾配磁場をかける。勾配磁場によって原子核の位相や周波数が変化する。実際に観測するのは個々の信号の合成されたものであるから、得られた信号を解析する際に二次元ないし三次元のフーリエ変換を行うことで個々の信号に分解し、画像を描き出すことができる。これが今回用いた磁場勾配 NMR イメージングの特徴である。

図 5 はφ12mm の試験管内で架橋させた、一つの試料を異なる xy 平面でスライスし z 軸方面から観察した画像である。これをみると、スライスする位置によって孔の大きさが違っていることが分かる。また、50℃および 80℃で架橋ささせた多孔膜についてもこの NMR イメージング測定を行ったとところ、架橋温度が下がるにつれて孔の大きさは小さくなっていた。このことより、120℃では孔径が大きいために破断伸びが小さくなったものと推測される。

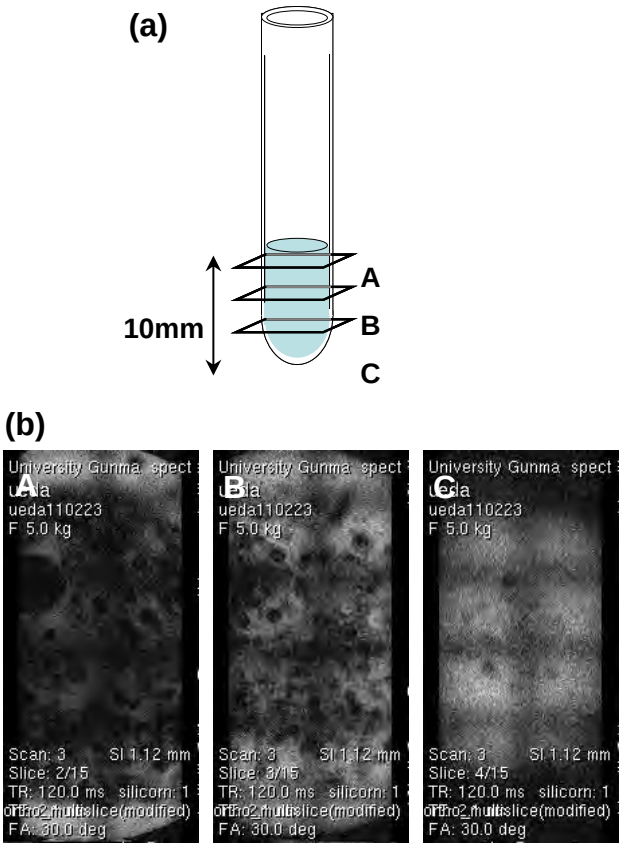


図５　120℃で調製した多孔シリコーンの NMR イメージング像．(a)イメージングにおける xy スライス面．(b) 各スライス面（A,B,C）におけるイメージング像．

４．まとめ

TG-DTA の結果より、DMS／VDV／HMS／Pt 触媒の混合系では、50℃以上で架橋反応が進行することが明らかになった。また、引張り試験結果より、120℃で架橋と多孔化を競争的に進行させた試料では特異な構造が成形されることが示唆された。そこで、NMR イメージングにより膜内部における細孔構造を解析したところ、孔径は高温で架橋させたものほど大きくなることがわかった。

今後、撹拌方法の変更及び反応条件の改善により孔のサイズをより微細化できるものと考えられる。将来的には、溶媒相にグルコースと特異的に反応する生体分子を分散させておけば、溶媒揮発に伴ってこれらの機能性分子はチャネル内壁に取り残されるので、チャネル形成と内壁修飾を同時に達成することができると期待される。

このナノポーラス修飾膜にグルコースを吸着させた際の膜電位差をセンシングし、これを駆動系に伝えて変形を印加する MEMS を開発する。これにより、細孔を一時的に拡張させてより大きな分子を透過させるシステムを構築することが可能である。このシステムを応用すれば、血糖値に応じてインシュリンを放出可能な理想的な生体デバイスが実現すると期待される。

体内埋め込み型グルコースセンサーは糖尿病患者の QOL を向上させられると期待されているだけでなく、低血糖症あるいは高血糖症になる前に患者本人にアラームなどで知らせることができるので、特に就寝中における容態急変の対処法として有効である。平均で毎日 4 回の指先への針刺しによる採血が必要な従来の血糖値計測法と比較して、この体内埋め込み型センサーによる持続的な血糖値モニタリングは、糖尿病治療および一般患者の健康管理においても大きなブレーク・スルーとなると予想される。

将来的には、血糖値の変化に対応してリアルタイムでインシュリンが投与可能な「フィードバック型の糖尿病管理システム」が求められているが、現状のアルミナ・ナノポーラス膜等では、体内に埋め込む際の生体適合性のハードルさえ越えられていない。本研究で開発されるシリコーン・ナノポーラス膜は伸縮性でかつ各種の人工臓器の基材に用いられていることからもわかるように生体適合性に優れていることから、グルコースのセンシングとともにインシュリン放出の機能を併せ持つ生体デバイスへと発展させられる可能性を秘めている。世界中で蔓延する糖尿病とこの疾患の治療のための莫大な保健医療費用が重大な関心事となっており、このようなフィードバック型の糖尿病管理システムの実用化は大きな社会的インパクトをもたらすと予想される。

謝辞

本研究は、財団法人中谷電子計測技術振興財団の第 26 回（平成 21 年度）開発研究助成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

1) http://www.medtronic.com/your-health/diabetes/device/insulin-pumps/guardian-real-time-system/index.htm.

2) http://www.freestylenavigator.com/ab_nav/url/content/en_US/10:10/general_content/General_Content_0000013.htm

3) http://www.dexcom.com/

4) H. Uehara, M. Kakiage, M. Sekiya, D. Sakuma, T. Yamanobe, N. Takano, A. Barraud, E. Meurville, P. Ryser, *ACS Nano*, 3, 924 (2009).

細胞内タンパク機能の無標識イメージング

研究責任者　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　　藤　田　克　昌

１．はじめに　光によるバイオイメージング

光は生体に優しいと言われる。その理由は、光と生体分子との相互作用の低さにある。細胞や生体組織を構成する分子は可視ー近赤外域の光をあまり吸収せず、光の照射による生体の損傷は少ない。このため、光は生体を生きたまま観察するのに適し、また空間を伝搬する光の特性を利用すれば、水中にある試料やその内部構造さえも容易に観察することができる。

光と生体の相互作用とが小さいということは、生体分子自体を光で捉えることが難しいことも意味している。そのため、従来の光学顕微鏡観察では、観察対象を様々な色素により染色し、その色素と光との相互作用により観察像をつくっていた。ここで用いる色素は、生体分子とは異なり、光をよく吸収し、またその結果として発光する場合もあり、観察像のコントラストを増強する。こういった色素プローブを利用することで、観察対象の生体分子を感度良く、またその細胞内での機能を高い空間分解能で観察することが可能となった[1]。最近では、色素プローブの光学特性をうまく利用して、光の回折限界を超えた空間分解能を有する顕微鏡の開発も進んでいる[2]。

色素プローブの利用により光によるバイオイメージングの用途が大きく広がったのは間違いないが、観察している対象が色素分子であって、本来の観察対象である「生体分子」でない点には注意しておく必要がある。観察像が情報を正しく示しているかは染色の技術に依るものであり、また蛍光性タンパク等を利用しても、その発光を完全にコントロールすることは難しい。また、色素プローブによる標識が観察対象の生体分子の特性を変化させることもあり、生きた試料の観察にはさらに注意が必要である。

そこで、本研究では、生体分子を色素プローブ無しで検出し、その情報を元に観察像を形成する光学顕微鏡の開発に取り組んだ。ラマン散乱を利用することにより、生体分子の振動を光により直接検出し、ラマン散乱光強度の空間分布により、試料の観察像を形成した。開発した顕微鏡を用いて、細胞内のタンパク質、脂質の分布を無標識で可視化することに成功し、また、ミトコンドリアに存在するタンパク質 cytochrome c を検出し、そのアポトーシスにおけるダイナミクスを観察することに成功した。

２．ラマン散乱による生体分子の分光計測

ラマン散乱とは、波長変化を伴う光散乱効果の一種である。生体分子に光を入射した際、その光のエネルギーの一部が分子を振動励起状態に励起する場合がある。このとき、光はエネルギーを失うことになり、そのエネルギーの分だけ波長を変化させる。どのような振動励起状態が存在するかは分子の構造に依存するため、ラマン散乱による光の波長の変化を測定すれば、どのような分子の振動が励起されたか、すなわち検出される光を散乱した分子の構造の情報を得ることができる[3]。例として、図１に、ヒト癌細胞より測定されたラマン散乱光のスペクトルを示す。このような分析方法はラマン散乱分光法と呼ばれ、構造化学、材料科学、表面分析等、非常に広い分野で利用されている。

ラマン散乱を利用した分析技術は非常に協力であるが、その散乱効率は非常に低く、長時間の測定を要求する。そのため、構成物質が時間的、または空間的に変化する試料は、ラマン散乱分光技術が苦手とする試料であった。生きた生体試料は、そのどちらにも当てはまるため、ラマン散乱を利用した生体試料のイメージング技術は、いくつかのパイオニア的な研究[4,5,6]を除き、一般的に利用されることはあまりなかった。

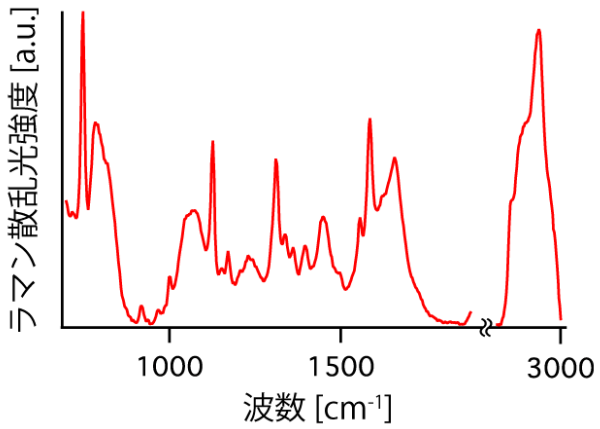


図１　ヒト癌細胞（HeLa 細胞）のラマン散乱スペクトル。細かなピークはそれを特徴付ける分子の振動をしてしている。ラマン散乱の励起には 532nm の連続発振レーザーを用いた。

３．スリット走査を利用した高速ラマン顕微鏡の開発

非常に微弱なラマン散乱光を用いて生きた細胞の観察を行うために、我々は、ラマン散乱イメージングを高速化できる顕微鏡光学系を設計し、実際に試作をおこなった。試料上の複数の点からのラマン散乱光を同時に分光計測できれば、試料上の１点１点をひとつずつ観察する従来の手法に比べ、大幅に撮像速度を改善できるため、2 次元 CCD カメラを利用し、散乱光の位置情報と分光情報を同時に取得することを考えた[7]。それを実現するため、試料のライン状のレーザー焦点により照明し、そのライン上の各点を分光器のスリット上に結像させる、スリット走査型光学系を採用し、ラマン散乱顕微鏡として構築した。

図２に開発したラマン散乱顕微鏡の光学系を示す。連続発振固体レーザー（Nd:YVO_4 レーザーの 2 倍波、波長 532nm）からのレーザー光をシリンドリカルレンズを用いてライン状に形成し、それを試料上に結像させることで、試料の照明とした。ライン状に照明された部位からのラマン散乱光は、対物レンズ、結像レンズ、またレーザー光を取り除くエッジフィルターを通して、分光器の入射スリット上に結像された。分光器内に入射したラマン散乱光は回折格子により波長毎に角度分散を受け、2 次元検出器の各画素上に集光し、測定された。2 次元検出器には冷却 CCD カメラを用いた。ライン状の照明光を一方光に走査（ガルバノメーターミラーを使用）しながらラマン散乱スペクトルを計測することにより、2 次元平面上でのラマン散乱スペクトルの分布を計測できる。また、生細胞の生理状態を保ったまま、顕微鏡観察を行うために、顕微鏡ステージ上に細胞培養用のインキュベータ（各種顕微鏡照明が利用できるよう設計した）を設置した。

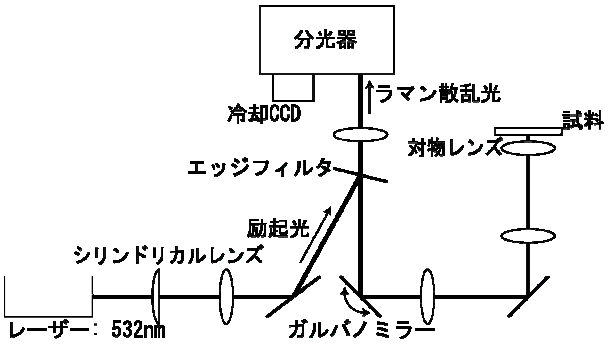


図２　試作したラマン散乱顕微鏡の光学系

４．生細胞のラマン散乱観察とタンパク機能イメージング

図３に、試作したラマン散乱顕微鏡によりヒト癌細胞（HeLa 細胞）の観察結果を示す。試料の各点から得られたラマン散乱スペクトルのうち、750、1686、および 2860 cm^{-1} に現れるラマン散乱ピークの強度の空間分布を、ぞれぞれ、図３a、b、c に示した。観察には NA1.2 の水浸対物レンズを用いた。750、1686、2860 cm^{-1} のラマン散乱ピークはそれぞれ、cytochrome c のピロール環の呼吸振動、タンパク質 β シートのペプチド結合の振動モード（Amide I）、CH_2 の伸縮振動に帰属することができ、図３a、b、および c は、それぞれ、cytochrome c、平均的なタンパク質濃度、および CH_2 を多く含む脂質分子の濃度により主なコントラストが形成されいてると考えられる。これらの観察像より、タンパク質の分布から細胞体の形状、cytochrome c の多く存在するミトコンドリアの分布、脂質分子が蓄積した脂質小胞の分布やその局在箇所を把握することができる。これらの結果から、試作したラマン散乱顕微鏡により、生体試料内の分子の振動を利用して画像コントラストを形成し、それらの分布を高い空間分解能で観察できることが示された。

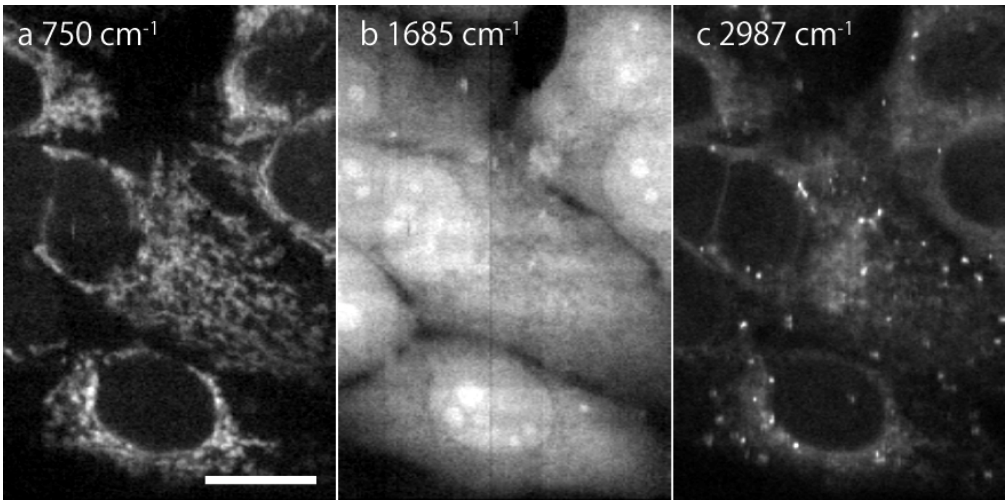


図３　生きた HeLa 細胞のラマン散乱観察像。スケールバー：10μm。

次に、HeLa 細胞に対しアポトーシスを誘導し、細胞体の破壊のトリガーとなる cytochrome c の挙動の観察を試みた [8]。まず、紫外線の照射により DNA を損傷させた HeLa 細胞を用意し、照射してから約 7 時間後にラマン散乱顕微鏡により観察した結果を図４に示す。図４a, b, および c は、750、1686、2850 cm^{-1} のラマン散乱ピークの強度分布を示しており、上記と同様、それぞれ、cytochrome c、タンパク質、脂質分子の分布により主にコントラストが形成されているものと考えられる。この結果と図３の結果を比べると、cytochrome c の分布に大きな違いがあることが分かる。図３においては、cytochrome c はミトコンドリアと似た分布を示しているのに対し、図４

においては、一部を除き、細胞質全体からラマン信号が得られている。この結果は、紫外光によりDNA へ損傷を受けた細胞がアポトーシスを起こす際、ミトコンドリアから cytochrome c が放出されたことを示していると考えられる。紫外線照射後の細胞は約 12 時間のうちにその 50%以上がアポトーシスにより死滅することを実験で確認しており、本結果がアポトーシスでの cytochrome c の空間分布の変化を観察している可能性が高い。この他、DNA の再構築に影響を与える Actinomycin D を用いてアポトーシスを誘導した際も同様の結果が得られている。図５a は、Actinomycin D を負荷させた HeLa 細胞をラマン散乱顕微鏡で観察した結果を示し、また図５b は同じ細胞のミトコンドリアを Mitotracker Red で染色して得た蛍光像を示している。この二つの観察像の比較より、アポトーシスの誘導により cytochrome c はミトコンドリアより外部に放出されている（右下の細胞）ことが確認できる。

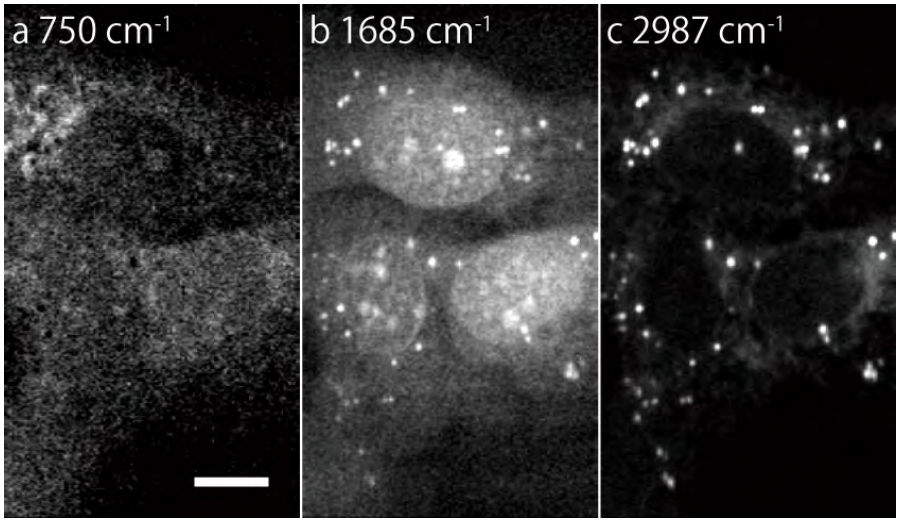


図４　紫外線照射によりアポトーシスを誘導した HeLa 細胞のラマン観察像。図３の結果と比べ、cytochrome c に帰属されるラマン散乱強度の分布が大きく異なる。スケールバー：10μm。

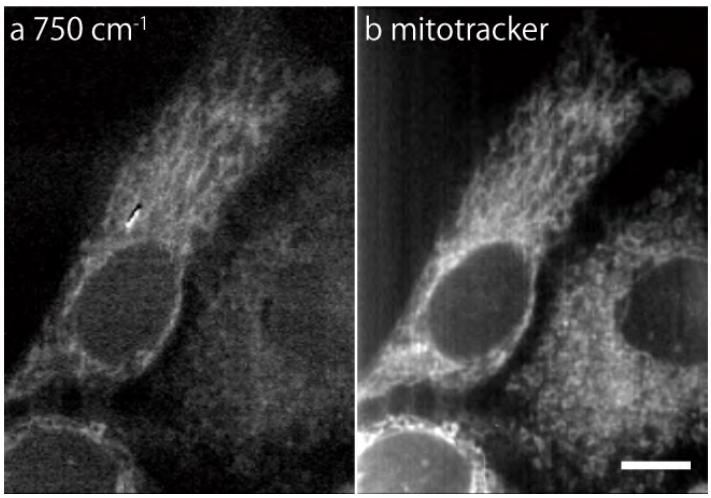


図５　アポトーシスを誘導した HeLa 細胞における、a) 750cm^{-1} のラマン散乱光の分布と b) ミトコンドリアの分布（蛍光像）との比較。スケールバー：10μm。

cytochrome c は酸化状態と還元状態でラマン散乱の散乱特性が大きく変化することが知られており、特に波長 532nm の光の照射の場合、酸化状態においてそのラマン散乱光の強度は大きく減少する。細胞内での cytochrome c の酸化還元状態の検出の可能性を探るため、HeLa 細胞が生きている状態、および固定して過酸化水素水を付加した状態でラマン観察を行った [8]。その結果を図６に示す。これらの図より、過酸化水素水の付加により cytochrome c からのラマン散乱光が著しく低下していることが分かる。過酸化水素水は強い酸化剤として作用するため、cytochrome c が酸化したことによりラマン散乱効率が低下した様子が観察されたと考えられる。この結果では、細胞内においても、cytochrome c の酸化還元状態によりラマン散乱光の強度が大きく影響を受けることが示唆されており、ラマン散乱分光を用いた細胞およびミトコンドリア代謝の分析する新しい生体計測法の可能が示されている。

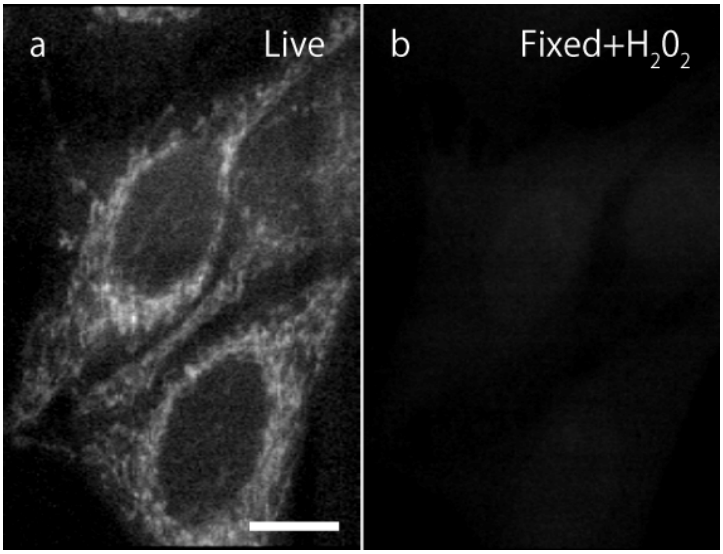


図６　a）生きた（未処理）状態、および b）パラホルムアルデヒドにより固定した後に過酸化水素水を付加した状態での HeLa 細胞のラマン観察像。スケールバー：10μm。

５．まとめ

本研究では、生細胞の観察に適したラマン散乱顕微鏡を試作した。生細胞観察における結像特性を把握したのち、アポトーシスにおける cytochrome c の空間分布の変化を観察することに成功した。これは、無標識でタンパク質シグナリングの様子を捉えた初めての例である。無標識での観察はより自然に近い状態での試料の様子の追跡を可能とするため、より詳細に生体情報を計測できる新しい手法を実現できる。また、光学的にタンパク質の酸化還元状態を把握しながら、その空間分布を観察できる可能性も示唆させた。これらの成果により、分子の振動を用いることにより、従来の手法では計測が不可能であった細胞内分子の情報の取得が可能であることが示された。

謝辞

本研究は財団法人中谷電子計測技術振興財団からの援助により行われました。ご援助に感謝いたします。

参考文献

1. B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Elisman, and R. Y. Tsien, “The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function,” Science, **312**, 217 (2006).

2. 藤田克昌, “回折限界をどう超えるか ~ 超解像蛍光イメージング ~ ,” 光学, **38**, 334-343 (2010).
3. 浜口宏夫、平井暁子編、ラマン分光法（学会出版センター 1988).
4. N. Uzunbajakava and C. Otto: “Combined Raman and continuouswave-excited two-photon fluorescence cell imaging,” Opt. Lett. **28**, pp.2073–2075 (2003).
5. H.-J. Manen, Y. M. Kraan, D. Roos, and C. Otto: “Intracellular chemical imaging of heme-containing exzymes involved in innate immunity using resonance Raman microscopy,” J. Phys. Chem. B **108**, pp.18762–18771 (2004).
6. Y.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, and H. Hamaguchi, “Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and spaceresolved Raman spectroscopy,” Biochemistry **44**, pp.10009-10019 (2005).
7. K. Hamada, K. Fujita, N. Smith, M. Kobayashi, Y. Inouye, and S. Kawata: "Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells," J. Biomed. Opt., **13**, 044027 (2008).
8. M. Okada, N. I. Smith, A. F. Palonpon, H. Endo, S. Kawata, M. Sodeoka, K. Fujita, "Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **109**, 28 (2012).

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

研究責任者　近畿大学医学部病理学講座
（旧）東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子
助　教　　萩　山　　満
共同研究者　近畿大学医学部病理学講座
教　授　　伊　藤　彰　彦
奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科
グリーンバイオナノ研究室
特任准教授　　細　川　陽一郎

１．はじめに

細胞間相互作用は多細胞生物の生命現象において本幹を成すものであり、その基本的な形態は細胞間接着である。細胞間接着はインテグリン、カドヘリン、あるいは免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する様々な接着分子によって媒介される[1)~3)]。接着分子を介した細胞間の接着は、例えば上皮細胞においては異物の侵入を防ぐ強固な生体防御装置を形成するし[4)]、白血球においては血管内皮細胞に接着し、血管外への遊走に関与する[5)]。また癌細胞が転移する際に、原発腫瘍からの離脱、脈管内への侵入・移動、遠隔組織血管への着床、脈管外への脱出と全ての課程に関与する[6)]。このように細胞間接着が織り成す生命現象については近年の生命科学の進歩に伴ってその重要性が詳細に明らかにされて来たにも関わらず、細胞間接着の物理的な側面にはほとんど答えて来なかった。その理由は、個々の細胞が非常に小さく(径 10 μm 程度)、構造は脆弱であるが細胞間の接着は相当に強固であるため、接着している細胞同士を乖離し、その強さを測定することが困難であったからである。

我々は、顕微鏡下でフェムト秒レーザーを集光したときに発生する衝撃力を利用することにより、1 細胞レベルの細胞間接着力の非接触計測技術を開発した[7)]。本技術は、細胞間の接着を乖離するために必要なフェムト秒レーザー誘起衝撃力の大きさを原子間力顕微鏡（AFM）技術の応用により定量化する方法を考案し、その成功により達成された。フェムト秒レーザー誘起衝撃力の特徴、AFM により衝撃力を定量評価する手法について述べ、細胞間の接着力を評価した例について示す。

２．フェムト秒レーザー誘起衝撃力

近赤外のフェムト秒レーザーパルスを顕微鏡下で水溶液に集光すると、多光子吸収により衝撃波とキャビテーションバブルが発生する[8)]。この多光子吸収の効率は、パルスが継続する時間内(例えば本研究では 150 フェムト秒)におけるパルスエネルギーの瞬間最大強度に従う。従って、フェムト秒レーザーでは、他のレーザー（ピコ秒レーザーやナノ秒レーザー)を使用するよりも遙かに少ないパルスエネルギーで多光子吸収が引き起こせる。さらに、多光子吸収による電子励起状態の生成と緩和を非常に短い時間で起こるため、定常状態でいう熱発生は極限にまで抑制される[9)]。多光子吸収に追随する衝撃波の伝搬とキャビテ

ーションバブルの生成消滅に伴い、集光点の周囲では応力波が発生する。図１に、この応力の力学作用を高速カメラ(Photoron FASTCAM-APX RS 250K) により観察した例を示す。ここでは、レーザー集光点の右側に直径 20 μm のポリマー微粒子があり、その動きは集光点周辺への応力波の伝搬挙動を反映している。レーザー照射直後（0 μs）にみられる集光点から広がる黒い円がキャビテーションバブルであり、その膨張と共にポリマー微粒子が集光点から外方向に押されていることが分かる。さらにこのキャビテーションバブルは 4 μs 程度の時間で崩壊し、それにより微粒子は引き戻される。この微粒子の大きさは細胞と同程度であり、この実験結果は、フェムト秒レーザーによる過渡的な応力波を１細胞への衝撃力として作用させられることを示している。ピコ秒やナノ秒レーザーでは、多光子吸収を引き起こすために、水にフェムト秒レーザーよりも大きなパルスエネルギーを持つ光を注入する必要があり、応力波の伝搬領域は大きくなる。つまり、フェムト秒レーザーを用いることによりはじめて、狙い定めた 1 細胞のみに衝撃力を付加することが可能となる[10]。我々はこれまでに衝撃力を利用することにより、基板から単一細胞を剥離したり、細胞を配列したりすることに成功している[11]。

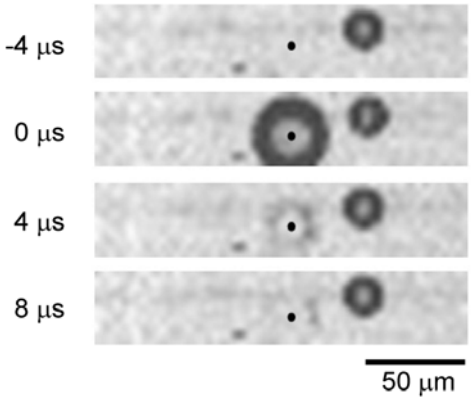


図１　フェムト秒レーザーを水中に集光したときに誘導される応力波の伝搬。
衝撃波の伝搬とキャビテーションバブルの生成消滅に伴い、集光点の周囲では応力波が発生し、レーザー集光点（黒丸）の右側に配置されたポリマー微粒子（φ=20μm）が大きく揺らされている。

３．原子間力顕微鏡（AFM）の応用による衝撃力の定量評価

我々はこの衝撃力の強度を定量評価することができれば、この衝撃力を単に基板から単一細胞を引き剥がすためだけではなく、細胞の接着力を細胞レベルで測定するためにも利用できると考えた。一般に溶液中の局所的な衝撃力の測定にはハイドロフォンが用いられるが[10]、フェムト秒レーザーによる数 10 μm の領域に局在した衝撃力は、ハイドロフォンの測定領域の最小限界を超えているため、その利用は不可能である。そこで、我々はこの衝撃力を測定するための新しい手法として、AFM 技術を応用した局所応力計測システムを考案した。図２A に実験システムの概念図を示す。AFM 探針は細胞培養液中に配置されており、その近傍に対物レンズを通ってフェムト秒レーザーが集光されるようになっている。レーザー照射により集光点で発生した応力波は、AFM 探針に衝撃力として作用し、それによって探針は揺らされる。この探針の揺れにより、四分割フォトダイオードへの検出用レーザーの位置が変化する。四分割フォトダイオードの上部と下部の電位差が直接オシロスコープに出力されており、AFM 探針のたわみを電圧差の時間変化として検出することができる。この電位差を校正することにより探針のたわみ量の時間変化を計測する。

図２B に代表例を示す。対物レンズ（10×、N.A. 0.125）を通して 170 nJ/pulse のフェムト秒レーザーを集光すると、AFM 探針は衝撃力により数 10 nm の範囲で大きくたわみ、つぎに振動を開始した。この振動は水の粘性抵抗により数 10 μs で減衰していく。

ここで AFM 探針に加えられる外力を *F(t)*とすると、探針の運動は、

$$m\frac{\partial^2 Y(t)}{\partial t^2}+c\frac{\partial Y(t)}{\partial t}+kY(t)=F(t) \qquad (1)$$

で表される質点の過渡減衰振動として近似する

ことができる。$Y(t)$ の特殊解はデュアメル積分、

$$Y(t)=\frac{\omega^2+\alpha^2}{\omega}\int_0^t \frac{F(\tau)}{k}e^{-\alpha(t-\tau)}\cdot\sin\{\omega\cdot(t-\tau)\}d\tau \quad (2)$$

で表せる。外力 $F(t)$ がデルタ関数である場合、衝撃力の時間積分である力積 F と $F(t)$ の関係は、

$$F(t)=F\cdot\delta(t)\Leftrightarrow\int F(t)dt=F \quad (3)$$

となる。2 式に 3 式を代入することで、衝撃力による過渡減衰振動を示す式

$$Y(t)=\frac{\omega^2+\alpha^2}{\omega}\frac{F}{k}e^{-\alpha\cdot t}\cdot\sin\{\omega\cdot t\} \quad (4)$$

が得られる。ここで、F、ω、α、k は、それぞれ衝撃力（力積)、角速度、減衰係数、探針のバネ定数である[12]。本実験で使用した探針のバネ定数は 44 N/m であり、ω、α、k を変数として 4 式により実験結果を最小二乗フィッティングすることで、最初の振幅以外の振動を、ほぼ再現することができた。ω は水中で計測した AFM 探針の共鳴周波数と一致しており、探針が衝撃力により基本振動で自律的に振動していると考えられる。初期振幅が 4 式で再現できない理由として、①外力が探針の振動周期（6 μs）と同程度の時間加わっておりデルタ関数として近似できない。②初期振動には探針の基本振動のみでなく、高次の振動が影響を与えている可能性が考えられる。これらの効果を無視した上記のフィッティングは、①と②の効果を含む初期振幅がその後の振動挙動により外挿できると仮定した近似解と考えることができる。このようにして、AFM 探針により、フェムト秒レーザー誘導衝撃力の大きさを定量評価することができた。

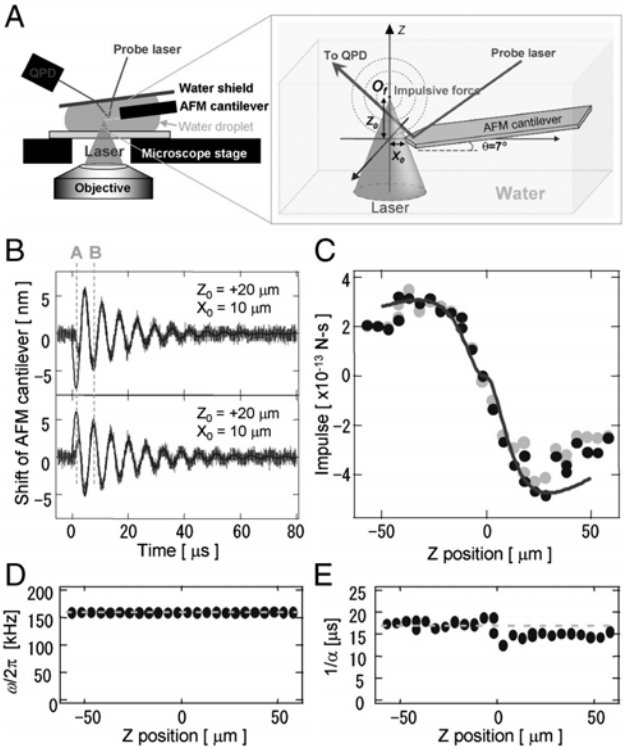


図２　AFM 技術を応用したフェムト秒レーザー誘起衝撃力の定量評価。
(A)AFM 技術を応用した局所応力計測システムの概念図。(B)フェムト秒レーザー誘起衝撃力によって引き起こされた AFM 探針の振動の代表的な例を示す。灰色の線は実測データであり、黒線は 4 式によるフィッティング結果である。(C~E)AFM 探針の振動から評価した衝撃力 F の Z 軸の位置による変化(C)、$\omega/2\pi$の振動数(D)、$1/\alpha$ の減衰時間(E)を示す。黒点は F、ω、α を変数とした場合のフィッティング結果であり、C の灰色の点と D と E の灰色の点線は定数とした場合のフィッティング結果である。

4. 細胞間接着力評価

4. 1　従来の方法との比較・検討

従来の方法としてよく用いられる細胞凝集アッセイは、外来性に接着分子を発現させた細胞を単一の細胞にして、浮遊させた状態でローターを用いて回転させ、接着分子を介する細胞間接着能をその回転させている間に凝集した細胞の割合で評価する方法である[13]。本研究では、フェムト秒レーザー誘導衝撃力によって、細胞凝集アッセイで形成した細胞凝集塊の細胞間接着を乖離する実験を行い、従来の方法である細胞凝集アッセイと比較・検討を行った。

先行研究おいて、我々は細胞凝集アッセイを用いて、cell adhesion molecule-1 (CADM1、別名：TSLC1、Necl-2)の接着能を評価した[14]。CADM1は免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する細胞間接着分子であり、傍膜貫通領域で選択的スプライシングを受け、4 つのアイソフォーム(a~d)を持つことが報告されている（本研究ではb~d に注目した)。内在性に CADM1 を発現していないマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 細胞にCADM1 スプライシング・アイソフォームの全長cDNA をそれぞれ遺伝子導入し、外来性に発現させた亜株を作製し実験を行った。

本研究では、細胞凝集アッセイに従って細胞を凝集させ、それをわずかに粘調のある 0.35%の寒天培地に包埋し、フェムト秒レーザーを 2 細胞から成る細胞凝集塊の接着面の端に集光させた。対物レンズ(10×､N.A.0.125)を通して 230 nJ/pulse のレーザーを集光すると、2 細胞から成る細胞凝集塊が乖離するものと乖離しないものが観察された。細胞凝集塊への直接的なレーザーのアブレーションは無視できるほど小さいと推測され、細胞の損傷は考えられない。そこで 1 時間で 30 組の細胞凝集塊に対してレーザーを照射し、乖離する頻度を算出した。

同じ CADM1 アイソフォームを発現している亜株同士を使ったホモフィリックな細胞凝集塊、または異なるアイソフォームを発現しているヘテロフィリックな細胞凝集塊に対して実験を行った。ヘテロフィリックの場合は 2 つの細胞のどちらか一方を蛍光色素でラベルし、蛍光イメージングによってヘテロフィリックであることを確認しながら行った。その結果、細胞の乖離する頻度はヘテロフィリックよりもホモフィリックのほうが高いことがわかった。同様の細胞を細胞凝集アッセイに供したところ、全ての組み合わせにおいてヘテロフィリックのほうがホモフィリックよりも凝集した細胞の割合が高く、その割合はレーザー照射によって細胞凝集塊が乖離した頻度と反比例であった。これらの結果から、フェムト秒レーザー誘導衝撃力は、CADM1 アイソフォームを介した細胞間接着力に依存すると考えられた。以上より、接着分子を介した細胞間接着力は細胞を乖離させるのに必要な最小の衝撃力から評価することができる。

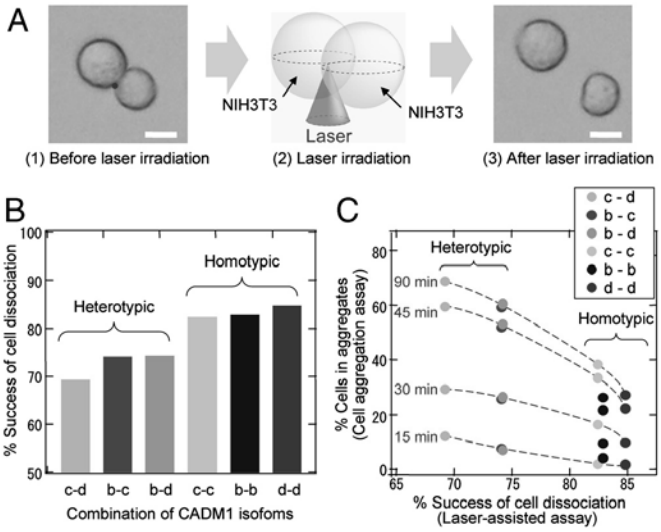


図３　細胞凝集アッセイで形成させた 2 細胞から成る細胞凝集塊のフェムト秒レーザー誘導衝撃力による乖離。
(A)NIH3T3 細胞の細胞凝集アッセイで形成させた 2 細胞から成る細胞凝集塊の透過顕微鏡写真(1)､それに対するフェムト秒レーザー照射の模式図 (2)、レーザー照射直後の細胞凝集塊の乖離した透過顕微鏡写真(3)。図中の白線の長さは 10μm。(B)フェムト秒レーザー照射による細胞塊が乖離した割合。2 細胞から成る細胞凝集塊のホモフィリックな組み合わせとヘテロフィリックな組み合わせを横軸に示す。(C)フェムト秒レーザー照射による細胞凝集塊が乖離した頻度(横軸)は細胞凝集アッセイの割合(縦軸)とは反比例した。

4.2　白血球と血管内皮細胞間の接着力評価

次に、生物学的環境下における細胞間接着力を乖離させるのに必要な衝撃力を評価した。血流を流れる白血球と血管壁との相互作用における物理的側面は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）単層と白血球細胞株 HL-60 細胞との共生培養系と Single cell force spectroscopy (SCFS) を組み合わせてこれまで研究されている[15)~17)]。

本研究では、同様の共生培養系をカバーガラス上に構築し、HUVEC 単層側が下になるようにシリコンのスペーサーをつけたガラスボトム培養ディッシュに置いた。対物レンズ（40×、N.A. 0.9）を通して、接着した HL-60 細胞の側方に 35 nJ/pulse のフェムト秒レーザーを集光したとき、HL-60 細胞が集光点（O_f）の反対側におよそ 1~3 μm 動いた。この動きは HUVEC 単層上を HL-60 細胞がローリングするのではなくスリップするのが観察された。2 回目、3 回目の照射でも HL-60 細胞は同様にスリップするのが観察された。

AFM によって O_f における衝撃力を見積もり、これを基にしてスリップを引き起こすのに必要な衝撃力は $2.6\sim2.8\times10^{-13}$ N-s であることがわかった。無作為に選択した HL-60 細胞にレーザー照射した場合も同様の評価が得られた。SCFS による実験と照らし合わせて [18]、本研究で評価した衝撃力は、HL-60 細胞から伸長し HUVEC 単層に実質的に接着している細胞構造物（tether）をおよそ 3 本分乖離させたことに相当すると考えられた。

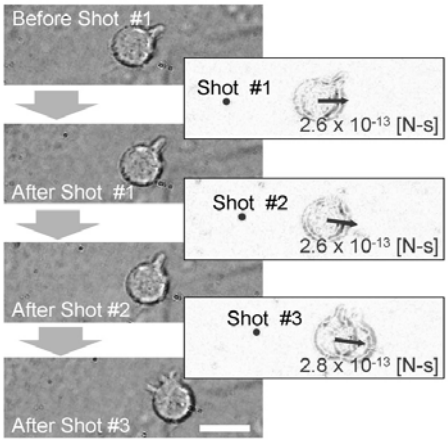


図４　フェムト秒レーザー誘導衝撃力による HUVEC 単層に接着した HL-60 細胞の乖離。
左側はフェムト秒レーザー照射前と直後の HUVEC 単層に接着した HL-60 細胞の連続した透過顕微鏡写真である。右側は左側の写真に対応する位相像であり、図中黒点はレーザー集光点であり、黒矢印は HL-60 細胞に負荷された衝撃力を示す。図中の数字は、力積で換算された力である。図中の白線の長さは 10 μm。

4.3　上皮細胞間の接着力評価

次に、接着細胞間に衝撃力を付加し、上皮細胞を乖離させる実験を行った。Madin-Darby canine kidney（MDCK）上皮細胞株を多孔性のフィルターをもつ培養インサートに播種し、3 日間培養して上皮様極性単層を構築させた。MDCK 細胞を培養したフィルターは上記の白血球 - 血管内皮細胞の実験と同様にガラスボトム培養ディッシュに置いた。図 3 に代表的な結果を示す。フィルターから 4 μm 離して、細胞がいない領域に対物レンズ(40×、N.A. 0.9)を通して 20 nJ/pulse のフェムト秒レーザーを集光したとき、興味深いことに、フェムト秒レーザー誘導衝撃力は、細胞の弾性を無視し、岩を割れ目から裂くように、細胞同士を乖離させ、結果として亀裂が観察された。この結果は、従来の方法では細胞同士の接着が強固で、評価が不可能であった細胞間接着に対しても、本手法が適用できる可能性を示すものである。

前述のとおり、O_f における衝撃力の大きさは AFM により見積もられており、これを基に細胞単層の前面に付加された衝撃力を、細胞間を押す方向と広げる方向の直交軸で算出した。図 5 右上に示すように衝撃力の大きさは細胞の輪郭に色のグラデーションをつけて表す。前者と後者の衝撃力の大きさと方向は図 5 右上中に示し、それぞれ 1.39×10^{-12} N-s と $(0.59 + 0.80)\times10^{-12}$ N-s と換算された。図 1 に示されるように細胞への衝撃力の付加時間は、μs 程度であると考えられる。つまり、図 5 の計算結果は μs の時間に μN 程度の力（$\mu s\times\mu N = 10^{-12}$ N-s）が付加されることにより、上皮細胞間の接着が乖離したことを意味している。AFM を用いた SCFS [18]などによる実験によって、細胞間接着力は、μN 程度であることが示されており [19]、本研究における結果は、それらと照らし合わせても妥当なものであった。

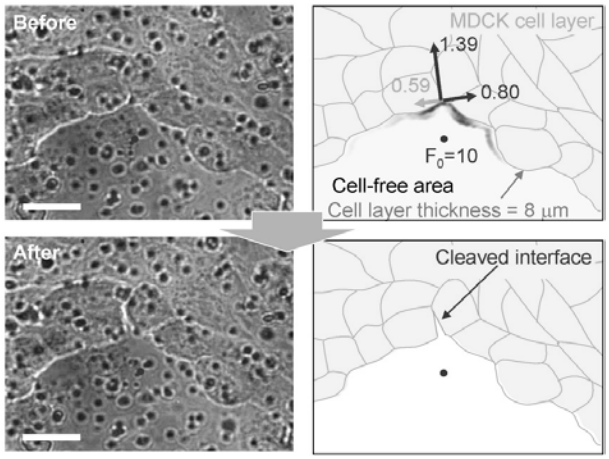


図５　フェムト秒レーザー誘導衝撃力による上皮細胞間接着の乖離。
左側はフェムト秒レーザーの入射方向から見た上皮細胞の透過顕微鏡写真である。写真に見える多数の黒点は、細胞培養したフィルターの通気孔である。右側は左側の写真に対応する模式図であり、灰色の領域に上皮細胞が存在し、白い領域には細胞培養液のみが存在する。上側と下側は、それぞれレーザー照射前と後の顕微写真と模式図である。図中黒点はレーザー集光点であり、レーザー照射後に集光点に近い上皮細胞間に亀裂が誘導された。右上図中の色のグラデーションの深みは負荷された衝撃力の大きさを示す。右上図中の数字は、力積で換算された力であり、単位は[×10^{-12} N-s]である。図中の白線の長さは10μm。

６．まとめと今後の展望

本研究によって、フェムト秒レーザー誘導衝撃力は、非接触で強い力を過渡的に細胞へ負荷し、細胞と細胞を乖離させるのに有益であり、SCFS[23), 24)] などによる実験と異なり、機械的に細胞を操作する必要がないため、より生物学的環境下における細胞間接着力を解析することが可能であると考えられる。また、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を AFM 技術の応用によって定量化することにより細胞間の接着力を評価する新しい方法を開発した。これまでに細胞間接着に関与する分子の分子レベルでの接着力について、SCFS により実測され、議論されている[23)]。本研究で示した細胞レベルの接着力と分子レベルの接着力の関係を明らかにするためには、細胞間の接着に関与している分子の数を定量評価する必要がある。そのためには、細胞表面に存在する接着分子のイメージングが不可欠であり、今後、本手法とイメージング技術を駆使することにより、細胞接着のミクロメカニズムとマクロメカニズムを統合的に理解し、解明していきたいと考えている。

謝辞

本研究の一部は、財団法人中谷電子計測技術振興財団の開発研究助成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

1) Sakisaka T, Ikeda W, Ogita H, Fujita N, Takai Y (2007) The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. Curr Opin Cell Biol 19:593-602.
2) Pugacheva EN, Roegiers F, Golemis EA (2006) Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling. Curr Opin Cell Biol 18:507-515.
3) Ito A, Jippo T, Wakayama T, Morii E, Koma Y, Onda H, Nojima H, Iseki S, Kitamura Y (2003) SgIGSF: A new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITF. Blood 101:2601-2608.
4) Strengert M, Knaus UG (2011) Analysis of epithelial barrier integrity in polarized lung epithelial cells. Methods Mol Biol 763:195-206.
5) Sperandio M, Pickard J, Unnikrishnan S, Acton ST, Ley K (2006) Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. Methods Enzymol 416:346-371.
6) Zetter BR (1993) Adhesion molecules in tumor metastasis. Semin Cancer Biol 4:219-229.

7) Hosokawa Y, Hagiyama M, Iino T, Murakami Y, Ito A (2011) Noncontact estimation of intercellular breaking force using a femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy. Proc Natl Acad Sci USA 108:1777-1782.
8) Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G (2005) Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. Appl Phys B-Lasers O 81:1015-1047.
9) Hosokawa Y, Yashiro M, Asahi T, Masuhara H (2001) Photothermal Conversion Dynamics in Femtosecond and Picosecond Discrete Laser Etching of Cu-phthalocyanine Amorphous Film Analyzed by Ultrafast UV-visible Absorption Spectroscopy. J Photochem Photobiol A 142:197-207.
10) Vogel A, Venugopalan V (2003) Mechanisms of pulsed laser ablation of tissue. Chem Rev 103:577-644.
11) Maezawa Y, Okano K, Matsubara M, Masuhara H, Hosokawa Y (2010) Morphological evaluation of cell differentiation after the isolation of single cells by a femtosecond laser-induced impulsive force. Biomed Microdevices 13:117-122.
12) Iino T, Hosokawa Y (2010) Direct measurement of femtosecond laser impulse in water by atomic force microscopy. Appl Phys Express 3:107002.
13) Miura M, Asou H, Kobayashi M, Uyemura K (1992) Functional expression of a full-length cDNA coding for rat neural cell adhesion molecule L1 mediates homophilic intercellular adhesion and migration of cerebellar neurons. J Biol Chem 267:10752-10758.
14) Koma Y, Furuno T, Hagiyama M, Hamaguchi K, Nakanishi M, Masuda M, Hirota S, Yokozaki H, Ito A (2008) CADM1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions. Gastroenterology 134:1544-1554.
15) Benoit M, Gabriel D, Gerisch G, Gaub HE (2000) Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. Nat Cell Biol 2:313-317.
16) Zhang X, Chen A, De Leon D, Li H, Noiri E, Moy VT, Goligorsky MS (2004) Atomic force microscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction. Am J Physiol-Heart C 286:H359-367.
17) Ovijit C, Sapun HP,Wilbur AL, Daniel AF (2009) Combined atomic force microscopy and side-view optical imaging for mechanical studies of cells. Nat Methods 6:383-387.
18) Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K, Evans E (1999) Energy landscapes of receptorligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. Nature 397:50-52.
19) Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T (1987) Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. Nature 330:769-771.

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

研究責任者　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　　武　田　　淳
共同研究者　横浜国立大学　学際研究プロジェクトセンター
特任教員（助　教）　片　山　郁　文

１．はじめに

極微量生体系試料の光反応初期過程や（微小な）機能性結晶の不可逆光誘起現象を捉えるためには、超短時間で時々刻々と変化する物質の構造や機能を実時間で可視化する新規分光技術の開発が望まれる。我々は、このような目的意識のもと、1 ショットベースで物質の過渡吸収変化を捉えることができる時間・周波数 2 次元（2D）実時間イメージング分光法を考案した[1,2]。この分光手法を用いることにより、例えば、光合成において重要な役割を担うカロテノイド薄膜の超高速内部転換 [3]や極微量の光捕集性π共役ナノスターデンドリマーの高効率エネルギー伝達[4]の時間・周波数特性が実時間でマッピング可能になる。本研究では、我々のアイディアをもとに、いくつかのシングルショット時間・周波数 2D 実時間イメージング分光法を開発した。とくに、階段状マイクロステップ構造をもつ反射型エシェロンを設計・製作し、これを時間遅延付与の光学素子として使用する新規の時間・周波数実時間マッピング分光装置を検討した。また、開発した新規マッピング分光技術を駆使していくつかの物性計測を行った。

２．シングルショット時間・周波数実時間イメージング分光法

図 1 に我々が考案したシングルショット実時間イメージング分光法の概略を記す。(a)はサンプル上でポンプ光とプローブ光を傾けてプローブ光に空間的な時間遅延（Δt）をつける方法（第 1 世代イメージング分光技術）、(b)は階段状構造を持つエシェロン光学素子により予めプローブ光に空間的な時間遅延（Δt）をつける方法（第 2 世代イメージング分光技術）を示している。(a)では、プローブ光として自己位相変調により発生した白色光を用いており、紫外ー赤外の広帯域で物質の過渡吸収変化を測定できるようになっている。一方(b)においては（現時点では広帯域化はできていないが）、サンプル上でプローブ光をほぼ点に集光できるというメリットがある。このため、均一でない試料や微小な固体試料への適用が可能となる。何れの場合も、サンプル通過後の（遅延時間のついた）プローブ光のイメージを 2 次元 CCD 検出器付分光器に取り込むことにより、物質の過渡応答の時間・周波数特性を 1 ショットベースで同時マッピングできる。

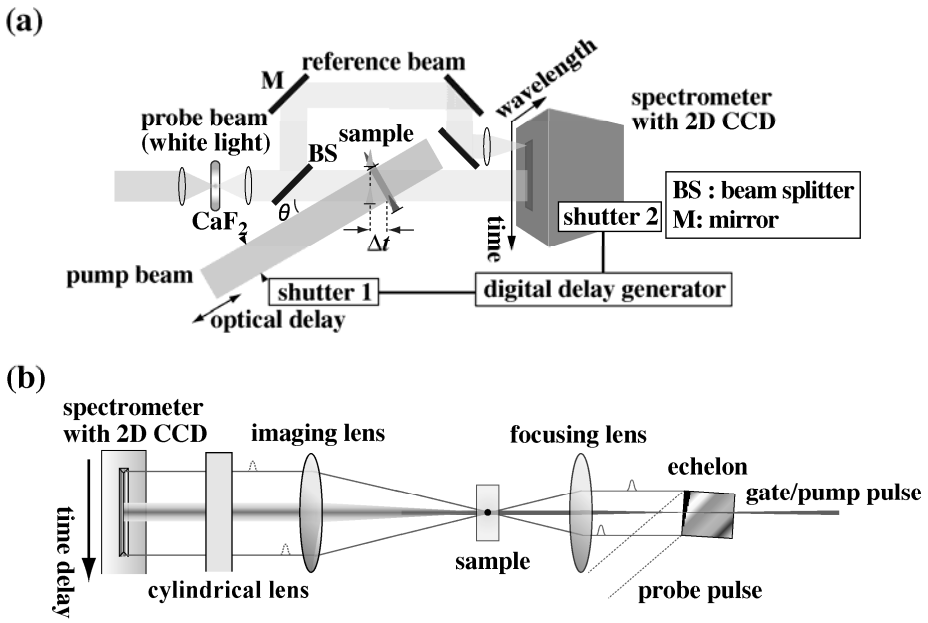


図１　シングルショット分光の概略図

３．第１世代イメージング分光技術による実験結果

まずは、図 1(a)の方法による研究成果について述べる。ポンプ光・プローブ白色光の交差角をθ〜20°、プローブ光のビーム径を〜7mm とすることにより、1 フレーム当たり〜5ps の時間範囲、〜260nm の波長範囲を一度にマッピングできる[1,2]。光学系は 1 ボックスに納める形でパッケージングを行った（図 2)。

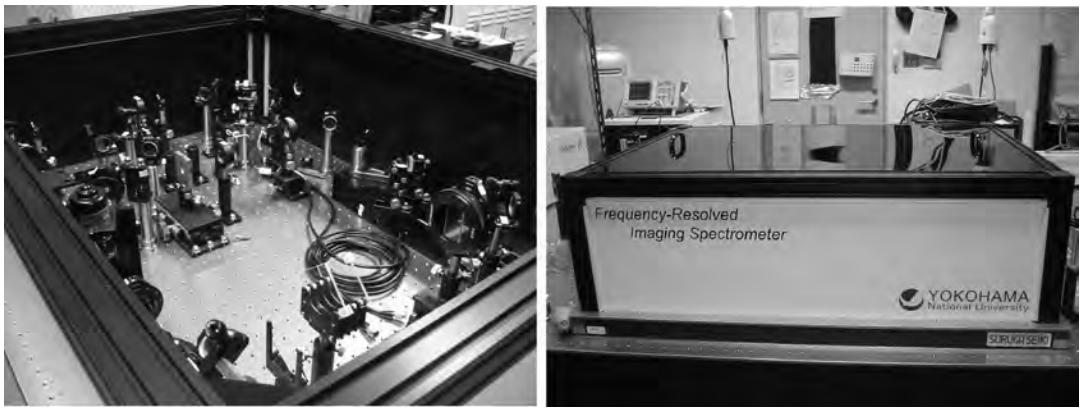


図 2　シングルショット時間・周波数実時間マッピング分光装置のパッケージング：（左）パッケージされた光学系の一部（右）外観

図 3 にこの手法によって測定したβカロテン薄膜の超高速内部転換の時間・周波数 2D イメージング画像（下段）及びポンプ光照射に伴って光劣化するβカロテン薄膜の写真（上段）を示す。イメージング計測の積算時間は 1 フレーム当たりわずか 20 ミリ秒（光パルス 20 ショット積算）であり、12 枚程度のフレームをつなぎ合わせて全時間・周波数領域の画像を作成している。ポンプ光を〜数百ショット照射するだけでカロテノイドのπ共役は切断され、瞬時に色抜けが生じる（上

段写真の丸点線の内部)。しかしながら、我々の開発した時間イメージング分光手法は1ショットベースであり、極めて短時間の積算で物質の過渡応答の時間・周波数 2D イメージをマッピングできるので、このような場合においても、$1^1A_g^-$状態への吸収のブリーチング（〜400nm)、$1^1B_u^+$状態からより高次の励起状態への過渡吸収（820〜900nm)、$1^1B_u^+$状態から$2^1A_g^-$状態への超高速内部転換後（〜0.2ps）に生じる $2^1A_g^-$状態からより高次の励起状態への過渡吸収（520〜620nm）が明確に観測される[3]。

次に、光捕集性デンドリマーについての結果を述べる。デンドリマーとは、光エネルギーを捕集するアンテナ分子とアンテナ分子から高効率でエネルギーを受け取るコア分子からなる高分子化合物であり、光合成を模した人工模擬物質あるいは次世代の光エネルギー変換物質として期待されている。本研究で用いたデンドリマーは図 4 に示すようにアンテナ分子としてペリフェリをコア分子としてフタロシアニンを用いたπ共役ナノスターデンドリマーであり、励起状態間の波動関数の重なりを介した高効率エネルギー移動が期待されている[5]。

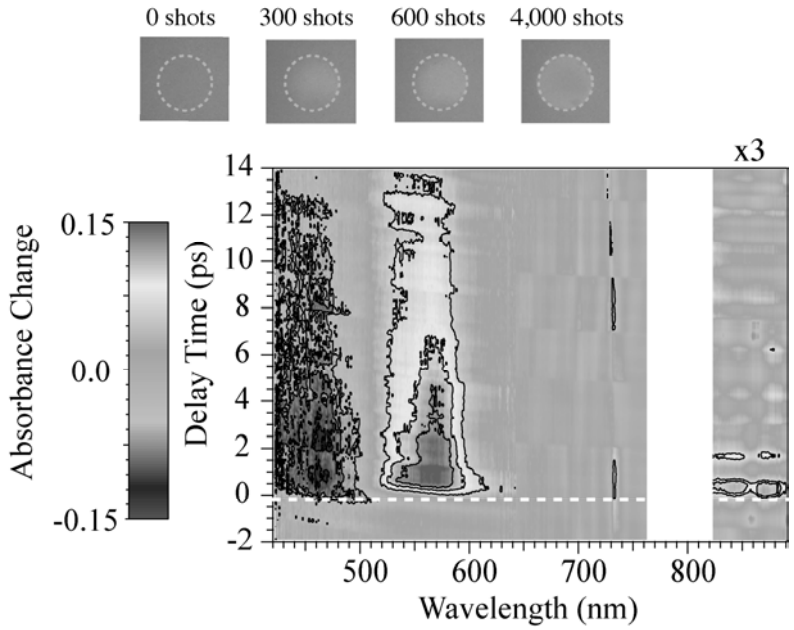


図 3　βカロテン薄膜の光劣化（上）と超高速過渡応答の時間・周波数 2D マッピング画像（下）

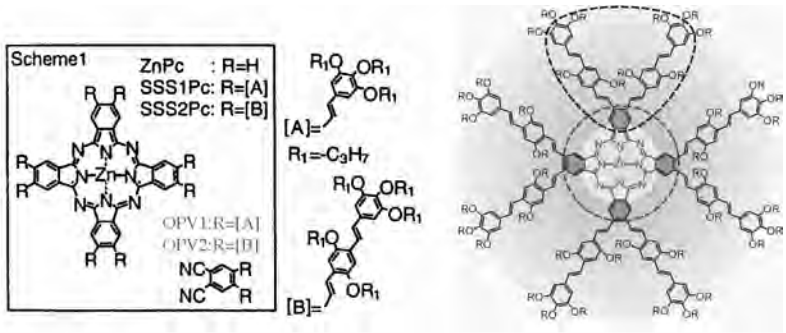


図 4　π共役ナノスターデンドリマーの分子構造

本研究では、アンテナ分子の長さと個数の異なる 4 種類のナノスターデンドリマー（SSS*n*Pc-*m*; *n*, *m*=1,2、*n* はアンテナ分子の長さ、*m* は芳香環あたりのアンテナ分子の個数）を用いて、アンテナ分子を選択励起した際のコア分子の（1）過渡吸収強度（実時間イメージング計測）、(2) 蛍光強度、(3) 蛍光寿命の 3 つの測定からエネルギー移動の効率を決定した。図 5 に、一例として、ナノスターデンドリマー（SSS2Pc-1）の過渡吸収変化の時間・周波数 2D イメージング画像を示す。また、4 種類のデンドリマーの各々のイメージング画像から切り出したコア分子の吸収変化量の時間発展を示す。

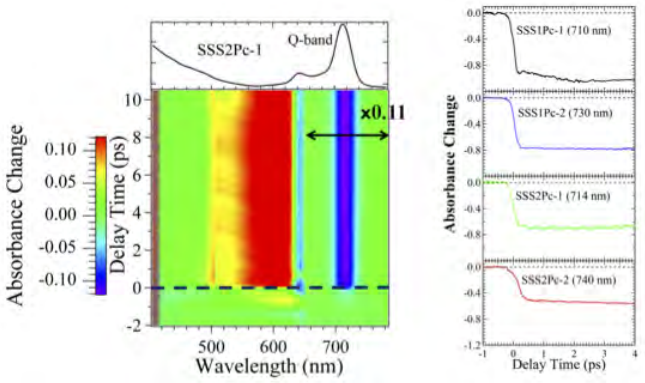


図 5　ナノスターデンドリマーの時間・周波数イメージング画像及びコア分子の吸収変化量の時間発展

コア分子の吸収変化量から、アンテナ分子の個数が増え長さが長くなるとアンテナからコアへのエネルギー移動の効率が減少することがわかる。これは、個数や長さが増加するとアンテナ分子同士の立体障害により分子の平面性（π 共役性）が損なわれ、アンテナ分子とコア分子の励起状態間の波動関数の重なりが減じることで理解できる。また、コア分子の蛍光強度と寿命からエネルギー伝達効率の絶対値を見積もると、SSS1Pc-1（0.63）＞SSS1Pc-2（0.49）≒ SSS2Pc-1（0.48）＞SSS2Pc-2（0.39）であることを見出した。一方、アンテナ分子の数を多くした方が光エネルギーを吸収しやすくなるので、エネルギー変換効率は SSS1Pc-1 ＜ SSS1Pc-2≒ SSS2Pc-1 ＜ SSS2Pc-2 となることを見出した[6]。

４．第 2 世代イメージング分光技術による実験結果

次に、エシェロン光学素子を用いたシングルショット分光の研究成果を示す。エシェロン光学素子は、石英ガラスを精密研磨して加工した透過型エシェロンと金属を切削研磨して作製した反射型エシェロンがあるが、ここでは後者について述べる。反射型エシェロン光学素子は Ni ブロック（10x10x10 mm^3）をダイアモンドバイトにより精密加工・研磨したもので、高さ 5μm 幅 20μm のステップが 500 段刻まれており、1 ステップあたり～37fs、全体で～17ps の時間を一度に計測することが可能である[7]。また、(日本の伝統的な精密金型技術を利用しているので)、反射型エシェロンのステップ構造は 1μm 以上であれば比較的自在に精密加工・研磨が可能であり、将来、様々な時間・周波数特性に合わせた設計ができる点がメリットの一つでもある。

まずは第 2 高調波発生を用いた自己相関法にこの反射型エシェロンを組み込み、再生増幅 Ti:Sapphire レーザー（λ=800nm, <100fs）からの光パルスの時間・周波数イメージング計測（FROG 計測；frequency-resolved optical gating [8]）を行った。第 2 高調波発生は、図 1(b)のサンプル位置に厚さ 1mm の非線形結晶（BBO）を置くことにより行った。図 6(a)は、再生増幅レーザーのコンプレッサーを操作し、正負のチャープに伴う FROG イメージの変化を 1 ショット計測したものである。図の上から負チャープ（NC)、近似的フーリエ限界パルス（TL)、正チャープ（PC）における実測した FROG イメージを示す。また、図 6(b)は、FROG ソフトウェア（Femtosoft）により再現されたイメージを示す。測定した FROG イメージは FROG ソフトウェアのアルゴリズムにより良く再現されており、ここから群遅延分散（2 次の分散）や 3 次の分散、光パルスのスペクトル形状や

位相シフトを簡単に求めることができる（例えば、図 6 における 2 次及び 3 次の分散は NC では -1.14×10^4 fs^2、3.82×10^5 fs^3、PC では 1.63×10^4 fs^2、3.39×10^5fs^3 である）[9]。

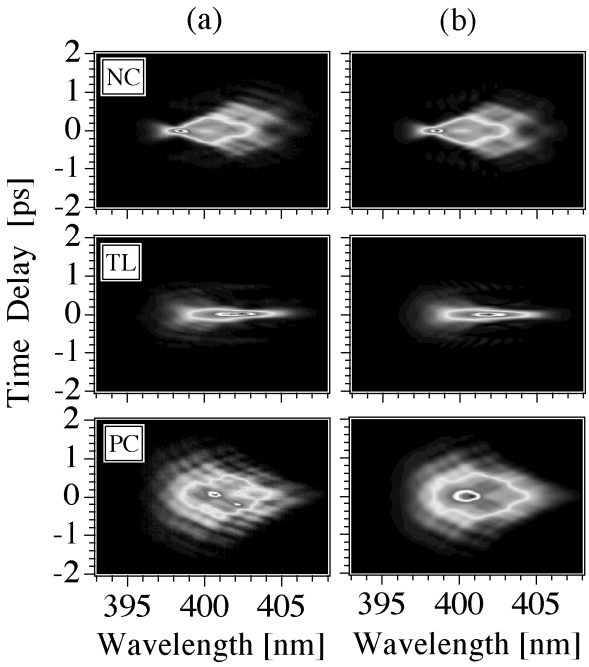


図 6　負チャープ（NC）、近似的フーリエ限界（TL）、正チャープ（PC）の各光パルスに対する（a）実測した FROG イメージと（b）再現した FROG イメージ

次に、反射型エシェロンを用いた実際のサンプルの計測結果を示す。ここでは、強誘電体（$LiNbO_3$）のフォノンポラリトン分散のイメージング計測について述べる。厚さ 0.5mm の X-cut の $LiNbO_3$ 結晶を用い、c 軸に 45° の偏光で強いポンプ光を入射し誘導ラマン過程により E モードフォノンを誘起した。またプローブ光は c 軸に平行（異常光線）および垂直（常光線）とし、カー配置にて光ヘテロダイン検出を行った。図 7 にプローブ光が異常光線（左）、常光線（右）の場合のフォノンポラリトンの時間・周波数実時間 2D イメージ画像（上段）とそのフーリエ変換（下段）を示す。時刻 0 付近における強い電子応答の後に、明確にフォノンポラリトンによる振動構造が観測される（丸点線内）。振動成分のフーリエ変換を行うと、その振動数はプローブの中心波長（〜795nm）を挟んで〜3THz と〜4THz であることがわかるが、プローブが異常光線か常光線かにより観測される振動数が中心波長に対して反転する。これは位相整合条件によるものであり、プローブ光が常光線の場合は、生成したフォノンポラリトン（〜4THz）とプローブ光の差周波が長波長側に、生成したフォノンポラリトン（〜3THz）とプローブ光の和周波が短波長側に観測されるためである。一方、プローブが異常光線の場合は、その逆が観測される[10]。

また、ここで重要なのは、ポンプ光のパルス幅（〜100fs）で決まる帯域のフォノンが誘導ラマン過程で誘起されているので、図 7 のマッピング画像は、ある波数範囲のフォノンポラリトン分散を一気にイメージングしているという点である。このため、例えば更に短い超短パルス光を用いたイメージング計測を行うことにより、より広範囲の波数領域、upper-branch のポラリトン分散などをシングルショットで決定できるものと期待される。

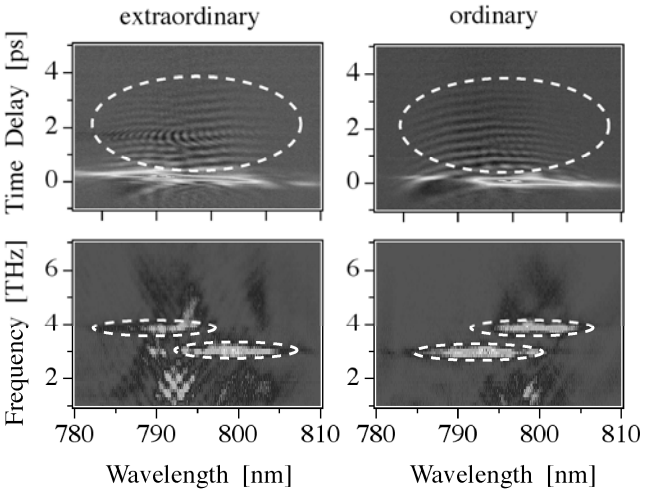


図 7　$LiNbO_3$ の E モードのフォノンポラリトン分散の実時間イメージングとそのフーリエ変換画像：（左）異常光線プローブ（右）常光線プローブ

５．まとめと展望

超高速過渡現象を１ショットベースで可視化する「時間・周波数２次元実時間イメージング分光法」を開発した。この分光技術を用いて、カロテノイド薄膜の超高速内部転換や極微量のπ共役ナノスターデンドリマーの超高速エネルギー伝達の可視化に成功した。また、エシェロン光学素子を用いたシングルショットイメージング分光法により、超短光パルス自身の FROG 計測や強誘電体のフォノンポラリトン分散の他、一次元物質の絶縁体-金属転移[11]の実時間イメージング計測に成功した。これらの手法が、今後、生体系サンプルをはじめとした様々な（不可逆）光誘起現象の解明や制御に活用されることを期待したい。

謝辞

本研究は中谷電子計測技術振興財団の援助により行われた。また研究の一部は、堺原弘行、河野太郎、古川直樹、牧嶋良哲、石田明大、山田愛各氏（以上横浜国大）、Keith A. Nelson 教授（MIT）のグループ、兼松泰男教授（大阪大学）のグループとの共同研究により行われました。ここに感謝申し上げます。

参考文献

1) N. Furukawa, C. E. Mair, V. D. Kleiman and J. Takeda, *Appl. Phys. Lett.,* **85**,4645 (2004).
2) Y. Makishima, N. Furukawa, A. Ishida and J.Takeda, *Jpn.J.Appl. Phys.,* **45**,5986 (2006).
3) J. Takeda, A. Ishida, Y. Makishima, and I. Katayama, *Sensors*,**10**,4253 (2010).
4) I. Akai *et al.*,*New J.Phys.*,**10**,125024 (2008).
5) M.Kimura *et al.*,*Chem. Matt.***14**,2711 (2002).
6) K. Satake, I. Akai, M. Kimura, I. Katayama and J. Takeda, *16th International Conference on Luminescence & Optical Spectroscopy of Condensed Matter* (Ann Arbor, USA; June 27- July 1, 2011) WP102 (2011).
7) H. Sakaibara, I. Katayama and J. Takeda, *Technical Digest of CLEO 2010*, JTh_E83 (2010).
8) R. Trebino, "*Frequency-resolved optical gating: the measurement of ultrafast laser pulses*," (Kluwer Academic Publisher, 2000).
9) I. Katayama, H. Sakaibara and J. Takeda, *Jpn. J. Appl. Phys.* **50**,102701 (2011).
10) I. Katayama, H. Sakaibara, Y. Kanematsu, H. Ichida and J. Takeda, *Technical Digest of CLEO* 2011, CFO5 (2011).
11) T. Kawano, I. Katayama, T. Shin, J. Wolfson, K. A. Nelson and J. Takeda, *Ultrafast Phenomena XVII* (Oxford University Press, New York, 2010), 311(2011).

発表論文

1) J. Takeda, A. Ishida, Y. Makishima, and I. Katayama, "Real-Time Time-Frequency Two-Dimensional Imaging of Ultrafast Transient Signals in Solid-State Organic Materials", *Sensors*, **10**, pp. 4253-4269 (2010).
2) H. Sakaibara, I. Katayama and J. Takeda, "Time-Frequency Real-Time Imaging of Ultrashort Laser Pulses with a Single Echelon Mirror", *Technical Digest of CLEO 2010*, JTh_E83: pp.1-2 (2010).
3) T. Kawano, I. Katayama, T. Shin, J. Wolfson, K. A. Nelson and J. Takeda, "Ultrafast Photoinduced Phase Conversion to a Metallic State in Quasi-One-dimensional Platinum Complexes under Extremely High-Density Excitation", *Ultrafast Phenomena XVII* (Oxford University Press, New York, 2010), pp. 311-313 (2011).
4) I. Katayama, H. Sakaibara, Y. Kanematsu, H. Ichida and J. Takeda, "Single-Shot

Time-Frequency Imaging of Phonon-Polariton Dispersion in Ferroelectric $LiNbO_3$", *Technical Digest of CLEO* 2011, CFO5: pp.1-2 (2011).

5) I. Katayama, H. Sakaibara and J. Takeda, "Real-Time Time–Frequency Imaging of Ultrashort Laser Pulses Using an Echelon Mirror", *Jpn. J. Appl. Phys.* **50**,102701 (2011).

6) H. Sakaibara, Y. Ikegaya, I. Katayama and J. Takeda, "Single-Shot Time-Frequency Imaging Spectroscopy Using an Echelon Mirror", *Opt. Lett.*, 37,pp.1118-1120(2012).

7) 武田　淳、片山郁文、『光パルス及び強誘電体フォノンポラリトンのシングルショット時間・周波数イメージング』、レーザー研究 40(8)、2012(印刷中).

主な招待講演

1) J. Takeda, A. Ishida, and I. Katayama（招待講演）,"Real-Time Time-Frequency Two-Dimensional Imaging of Ultrafast Excited-State Dynamics in Light-Harvesting Nano- and Biomaterials", *International Conference on Nanomaterials: Synthesis Characterization and Applications* (ICN2010), (India, April 27-29), 2010.

2) I. Katayama, H. Aoki, J. Takeda, H. Shimosato, M. Ashida, R. Kinjo, I. Kawayama, M. Tonouchi, M. Nagai and K. Tanaka（招待講演）,"Nonlinear THz Spectroscopy on the Dielectric Thin Films", The *Conference on Lasers and Electro-Optics* (CLEO/QELS2010), (San Jose, USA, May 16-21, 2010).

3) 武田　淳（招待講演）、『マイクロステップ構造を持つ光学素子を用いたイメージング分光技術の開発と応用』、横浜キーテクノロジー創生フォーラム 2010（横浜情報文化センター、横浜、11/2、2010).

4) 武田　淳（招待講演）、『シングルショット分光による超高速過渡現象の時間・周波数実時間イメージング』、レーザー学会第 31 回年次大会(電気通信大学、1/9-1/10、2011).

5) J. Takeda, H. Sakaibara and I. Katayama（招待講演）, "Real-Time Mapping of The Phonon-Polariton Dispersion in Ferroelectric $LiNbO_3$ Using Femtosecond Single-Shot Imaging Spectroscopy", *5th International Conference on Science and Technology for Advanced Ceramics*, 22pHsI02 (Yokohama, Japan, June 22-24, 2011).

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

研究責任者　中央大学理工学部応用化学科
准教授　　片　山　建　二

１．はじめに

Bangham らによって見出されたリポソームはリン脂質二重膜が袋状に閉じた小胞体であり[1]、生体膜モデル[2] や薬物送達システム（DDS）[3] などに利用されている。DDS はリポソームが内部に水相を内包することができることを応用したもので、リポソームが壊れることにより水相の薬理成分を放出する。よって、リポソームの膜崩壊過程を理解することは非常に重要である。

膜崩壊過程の一つにリポソームの界面活性剤による可溶化がある。これは、生体膜の精製や分析に利用されており、重要な研究対象である。[4] 生体膜・膜タンパクの可溶化に広く用いられる TritonX-100（以下 TX）によるリポソーム可溶化現象は、Dennis らにより初めて調べられた。[5]　可溶化反応の界面活性剤及び脂質濃度の依存性については様々な報告がなされ、[6,7,8] 現在リポソームから混合ミセルとなる 3stage モデルが最も受け入れられている[,9,10,11]。このモデルでは、リポソームからの可溶化の濃度依存性について、低濃度では、界面活性剤モノマーの二重膜へにとりこまれ(ステージ 1)、濃度がしていくと二重膜が界面活性剤で飽和し、混合ミセルが形成し始める(ステージ 2)、さらに濃度が増加すると混合ミセルに富むようになる(ステージ 3)と理解されている。また、分子論的には、リン脂質と界面活性剤の静電的相互作用・疎水性相互作用が重要であることが明らかにされている。[12]

しかし、可溶化反応の時間変化を追った報告[13] はあまりなされておらず、そのモデルが妥当かどうかは明らかになっていない。リポソーム可溶化反応のリアルタイム変化を考えたとき、リポソームから混合ミセルへとなるにつれて粒子径が小さくなっていくことが予想される。そこで、動的光散乱（DLS）測定により粒子径変化を明らかにできないかと考えた。DLS 測定を行うには、TX とリポソームを均一に混合して測定を行う必要がある。ガラスセルに 2 液を注入するのでは濃度分布ができてしまい、均一な混合は難しい。そこで我々は 2 液混合 Y 字型マイクロチップを用いることとした。Y 字型マイクロチップは 2 液の界面で液体が混合される。

また、DLS 測定をリアルタイムに行うには 2 つの問題を解消する必要がある。1)粒子数の絶対量が少ないことによる微弱な散乱光の検出、2)リアルタイム測定を行うための短時間測定である。そこで我々は回折格子ヘテロダイン動的光散乱測定装置により、[14] 2 点の問題をクリアした。また、

リポソーム可溶化反応のダイナミクス解明のため、顕微鏡で直接観察を検討した。

マイクロチップを用いた場合、溶液の流れが存在すると、観察対象が視野から外れてしまうため、個々のリポソームを追うことは困難であった。そこで、液体の流れを容易に止めることができるよう、マイクロチップを改良し部屋付きマイクロチップを考案した。この部屋付きマイクロチップとは、Y 字地点で 2 液を合流させ、そこから拡散により 2 液を混合させる。混合が終了する地点の流路に流路幅を広く設定した部屋を設けると、混合領域がまるで拡大されたように広がり、また流速が遅くなる。結果従来の直線マイクロチップよりも容易にフローアンドストップを行うことができる。流れを止めることにより、光学顕微鏡での個々のリポソーム可溶化反応の観察が容易になった。

本研究では、この新規 DLS 測定法によるリアルタイム粒子径変化の測定と新規マイクロチップを用いたリポソーム直接観察により、リポソーム可溶化反応のダイナミクスを解析した。さらに特定のリポソームと界面活性剤のくみあわせにおいては、通常穏やかに溶解していくリポソームが激しく運動しながら溶解する様子が観測された。その点について統計的解析を行い、反応機構を明らかにした。

２. DLS 測定及び顕微観察によるリポソーム可溶化反応の解析

2.1　実験方法

用いたマイクロチップは、ホウケイ酸ガラス製で、流路幅 230-240 μm、流路深さ 100 μm のものである。(図 1) Y 字混合型の 2 液混合流路を持ち、流路の途中に幅 1000 μm の部屋を作成した。この混合領域のみを呈色反応で色付けした場合の流路の様子を図 2 に示す。

DLS 測定測定では、当研究室で開発された回折格子ヘテロダイン動的光散乱法を用いて測定を行った。光源には、Nd:YVO4 レーザー（第三高調波・532 nm）強度 6 mW を用い、回折格子間隔 10 μm、検出角 32 度、測定時間 200 ms、積算回数 120 回（2 分）で測定した。

リポソームとしては、ジオレオリルホスファチジルコリン（DOPC)をリン脂質として用いた。測定前に、リポソームはシリンジフィルター（孔径 400 nm）にて処理を行った。界面活性剤としてはトリトン X-100(TX)を 0.5-5 mM の濃度で用いた。マイクロチップにリポソームと界面活性剤をシリンジポンプにて 1 μL/min で導入後、液体の流れを止めてから測定開始した。

顕微鏡観察による観察においては、オリンパス製顕微鏡（BX50)により、対物レンズ 50 倍を用いて観察した。マイクロチップにリポソームと界面活性剤をシリンジポンプにて 1 μL/min で導入後、液体の流れを止めてから観測開始した。

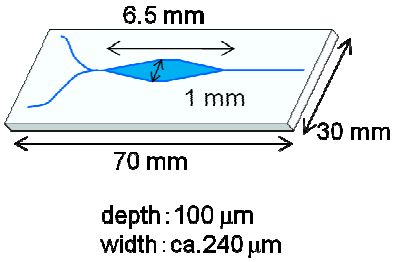


図１　使用したマイクロチップ

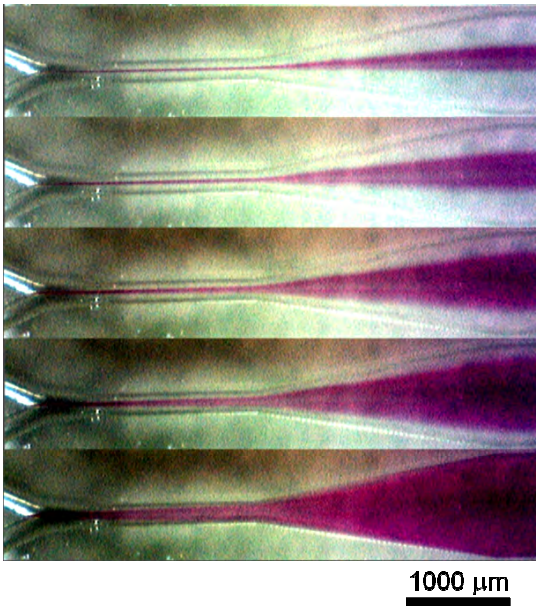


図 2　NaOH とフェノールフタレイン溶液が図中左側より混合して部屋に導入される様子。上から流速が 25, 10, 5, 3, 1μL/min のときの様子。

2.2　実験結果

TX とリポソーム溶液をマイクロチップに導入し、ポンプを止めてから 2 分ごとに粒子径を DLS 法により測定した。測定は 2 回行った。1 回目は 0 分、2 分、4 分、…、2 回目は 1 分、3 分、5 分、…に測定を行い、2 回のデータを組みあわせたデータをグラフに示す（図.3）。界面活性剤濃度を変えて測定を行ったとき、すべての測定においてリポソーム粒子径がいったん大きくなり、その後小さくなる現象が観測された。界面活性剤濃度を上げると、粒子径変化にかかる時間が短くなり、また粒子径が極大となる時間が早い時間に現れた。以上の結果から、反応速度は界面活性剤濃度に依存すると予想される。

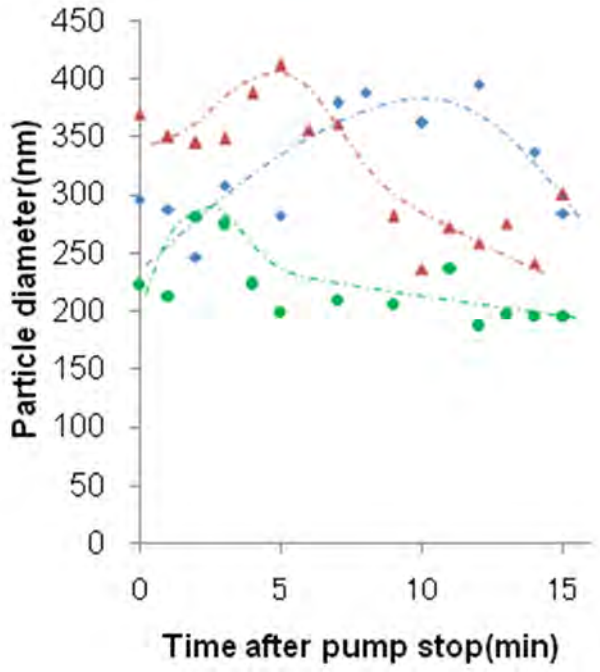


図 3　DLS 測定によって得られた TX による溶解反応におけるリポソームのサイズ変化。TX 濃度 0.5mM(◆), 2.5mM(▲), and5mM(●)

次に、同反応を顕微鏡により観察した。TX とリポソーム溶液をマイクロチップに導入し、ポンプを止めてから 1 時間リポソームの様子を観察した（図 4）。はじめ、リポソームはフィルター処理をしていないため凝集し、ひずんだ形状をしているものが多かった。界面活性剤を入れてしばらくすると、リポソームは徐々に球形に変化した。その後リポソームは数分の間球形を保ったのち、だんだんと小さくなり見えなくなった。また、小さくなったいくつかのリポソームは分裂を起こして見えなくなった。

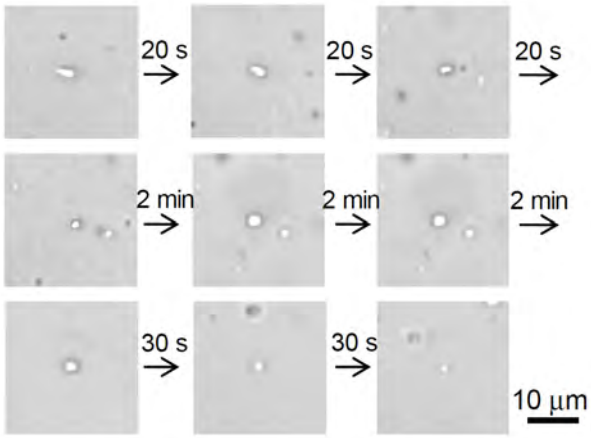


図 4　単一のリポソームの溶解過程を顕微観察した様子。

多重膜リポソームは、球形をしばらく保ったのち、一部分から内部リポソームが抜け出し別れる様子が確認された（図 5）。また、界面活性剤濃度を上げると、球形になり消えるまでの時間が短くなった。（図 6）この結果も、反応速度の界面活性剤濃度依存性を示唆する。また、異なる初期サイズのリポソームの可溶化を追ってみると、小さなリポソームは大きなリポソームよりも速やかに可溶化されたが、球形となってしばらくしてから小さくなるという可溶化の進行段階に違いは見られなかった。このことから、リポソームのサイズは反応速度に影響するが、辿る反応過程に変化はないといえる。

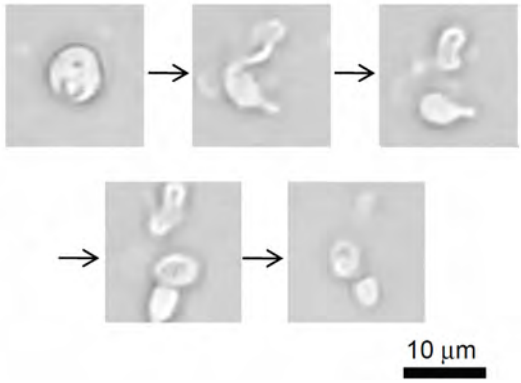


図 5　多重膜リポソームの溶解過程を顕微観察した様子。

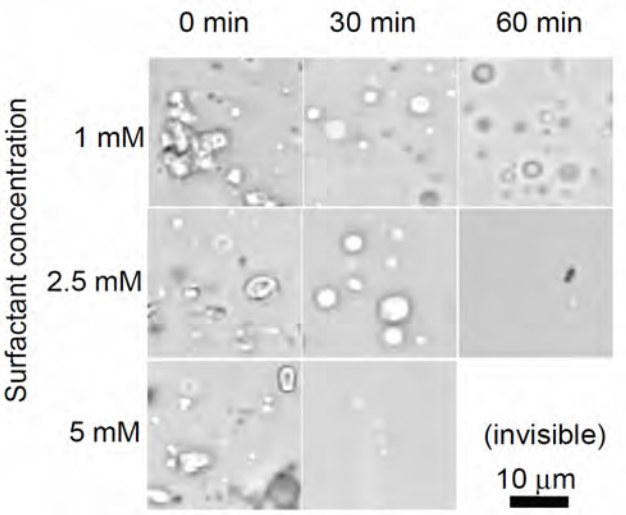


図 6　異なる TX 濃度による溶解過程の顕微観察像。

2.3　考察

DLS 結果と顕微鏡観察の結果から、リポソームの可溶化反応過程を以下の三段階スキームで示す（図 7）。まず、リポソーム二重膜内に界面活性剤分子が入り込み、界面活性剤分子の挿入によって界面活性剤分子が入り込むと膜内に空隙ができ、最密構造をとろうとするため球形になる。その後、リポソーム膜内にさらに界面活性剤分子が入り、徐々に界面活性剤濃度が高まっていく。界面活性剤分子が入るだけ粒子径も大きくなり、DLS 測定で粒子径の増大が観測されたものと考えられる。界面活性剤分子と脂質分子の割合には閾値があると考えられ、その閾値に達するまでは、リポソームは球形を保つ。この閾値の存在は、Somasundaran らからも報告されている。[8] 最終的に二重膜から混合ミセルが徐々に吐き出され、リポソームが小さくなる。

また、混合ミセル吐出が局所的に集中した場合、リポソームが不安定になり分裂が起こるものと考えられる。混合ミセルが吐き出された部分には空間ができるため、多重膜リポソームの場合は内部からリポソームが吐き出される。このステージは DLS 測定では粒子径の減少として確認された。

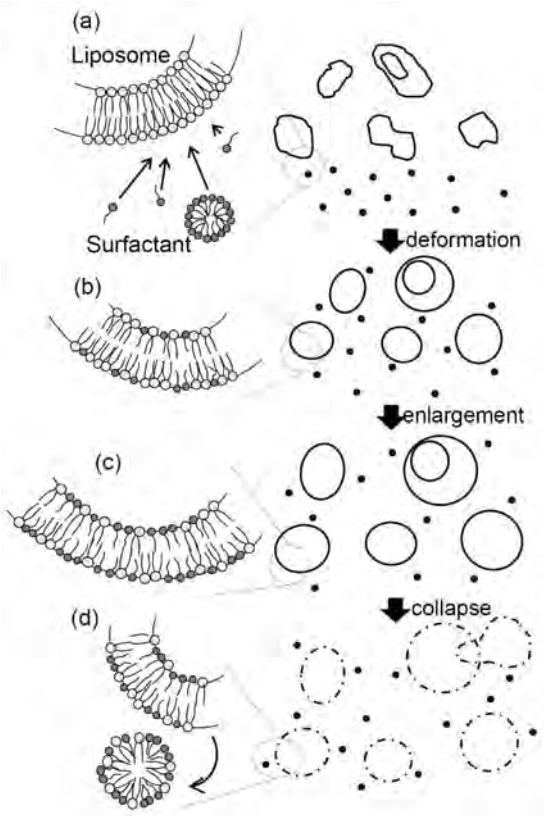


図 7　リポソーム溶解のモデル図。

３．特異なリポソーム可溶化反応のメカニズム

3.1 実験

リポソーム構成脂質としてはジミリストイルフォスファチジルコリン（相転移温度：23℃）を用い、界面活性剤としてはドデシル硫酸ナトリウムを用いた。リポソームは、DMPC 60 μmol をナスフラスコ内でクロロホルムに溶解し、40 ℃に設定したウォーターバスで加熱しながら、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを除去し、脂質フィルムを作成した。その後、6 時間以上アスピレーターによって減圧し、クロロホルムを除いた。

脂質フィルムを 40℃以上の純水 1 mL に溶解させ、ボルテクスミキサーで 5 分間撹拌した。この際、溶液温度が脂質の相転移温度以下にならないように 1 分ごとにナスフラスコを熱湯で加熱した。その後、熱湯につけたまま 30 分間超音波処理をして DMPC リポソームを得た。

リポソームの溶解条件を確認するために透過

率測定を行った。DMPC リポソーム溶液（1.2 mM）と SDS 溶液（1-10 mM）をプラスチックセル（光路長：10 mm）内にそれぞれ 0.5 mL 導入し、マグネチックスターラーで混合しながら、混合直後から透過率の時間変化を測定した。DMPC が溶解前は溶液が白濁しているため、透過率はほとんど 0 に近いが、リポソームが崩壊・溶解することで透明となり、透過率が上昇する。測定波長は 532 nm とした。

界面活性剤の臨界ミセル濃度（CMC）を調べるために電気伝導率測定を行った。DMPC リポソーム（DMPC 濃度：1.2mM）と SDS 溶液（1 -40 mM）を等量ずつマグネチックスターラーで 5 分間混合した後、溶液の電気伝導率を測定し、混合溶液中での SDS のモル電気伝導率を計算した。ここから、SDS の臨界ミセル濃度を求めた。

DMPC リポソーム溶液（1.2 mM）と SDS 溶液（6,8,10 mM）を顕微鏡下(対物レンズ倍率：50 倍) 2 液混合 Y 字型マイクロチップ（流路幅：230~240 μm・流路深さ 100 μm）に導入した。このマイクロチップは Y 字合流点で 2 液を接触させ、流路内で拡散により混合する。混合が終了する地点の流路に流路幅を広く設定した部屋を設けられている。これにより溶液が部屋内に入ると、急に溶液の流速が遅くなるため、従来の直線マイクロチップよりも容易に流れの制御を行うことができる。サイホンの原理より、廃液のビーカーは反応液である DMPC リポソーム溶液と SDS 溶液の高さを調節することで溶液の流れを制御して溶液を導入し、また、同原理により、流れを止めて、観察を開始した。流れをほぼ完全に止めることができるので、観察対象が視野から外れずに、個々のリポソームを観察することができる。光学顕微鏡(Olympus, BX50)で個々のリポソーム可溶化反応を部屋にて観察した。

溶液の流れを止めてから、顕微画像の動画（コマ数/ s）でパソコンに取り込み、個々のリポソームを解析することで、膜崩壊における挙動を観察・分類した。詳細は Discussion 中に述べるが、溶解分類では、Mild dissolution 型・Burst motion 型・Projection disruption 型に分類した。10 μm 以上移動するものについては、溶解中に移動したと判定し、リポソームから 2 個以上の突起物が観測された場合には、Projection disruption 型に分類した。ひとつの実験条件で、無作為に 100 個のリポソームを選択し、観察した。それぞれのリポソームの粒子径については、リポソームのキャプチャー画像から、断面積を求め、その値から計算した。

3.2　実験結果

3.2.1　透過率測定

まず、リポソームの溶解する SDS 濃度を確認するために、透過率の測定を行った。DMPC リポソーム（DMPC 濃度 1.2 mM）と SDS 溶液 1-10 mM を 0.5 mL ずつ混合し、図 8(a)に示す混合溶液の透過率の時間変化を調べた。5mM では、100 秒程で値が飽和していることから、この濃度ではリポソームは崩壊しないと考えられる。

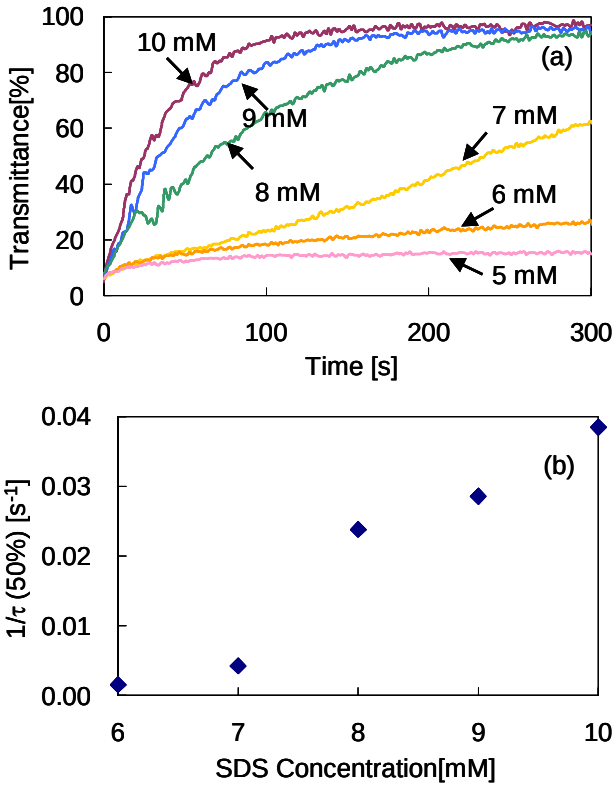


図 8　DMPC リポソームの SDS 溶液による溶解過程の透過率応答。(a) 様々な SDS 濃度における時間応答。(b) (a) から得られる反応速度定数。

7～8mM 付近で透過率の劇的な変化が確認された。透過率が 50 パーセントに達するまでの時間の逆数を SDS 濃度に対してプロットすると図 8(b)のようになり、反応性が 8mM 前後で大きく変わっている。さらに、リポソーム溶解において、SDS 濃度と SDS とリポソームの濃度比のいずれが重要であるのかを確認するために、DMPC 濃度を 2 倍にして、測定を行った。DMPC の濃度が 2 倍になっても、その可溶化に必要な SDS 溶液の濃度は 7-8 mM 付近であった。このことから、可溶化に必要なのは、DMPC と SDS の濃度比ではなくて、SDS 濃度がある閾値以上である必要があることが分かる。

3.2.2　電気伝導率測定

DMPC 溶液内での SDS の臨界ミセル濃度を確認するため、電気伝導度の SDS 濃度依存性を調べて。また、水溶液中の電気伝導度の SDS 濃度依存性についても同様に図 9 に示す。SDS 濃度が 8-9 mM において、SDS 溶液及び SDS/DMPC 混合溶液のモル伝導率の減少の勾配が変化しており、臨界ミセル濃度がこのあたりの濃度であることが分かる。また、SDS の臨界ミセル濃度の文献値が 8.2 mM であり、この結果と一致する。SDS のみ及び、SDS/DMPC 混合溶液の比較から、臨界ミセル濃度は DMPC の有無によって大きな変化がないことが分かる透過率変化測定において、臨界ミセル濃度付近において、反応性が劇的に変化していることを考慮すると、ミセルを形成した SDS があると、反応性が変化するものと考えられる。

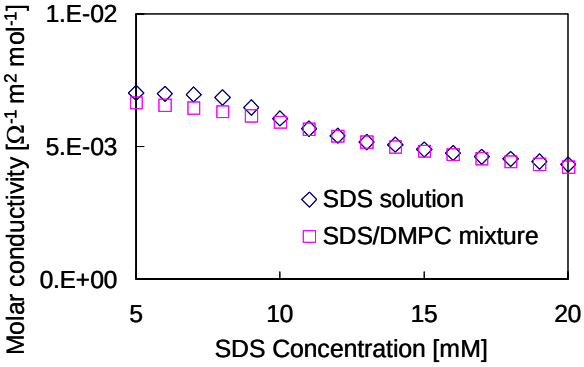


図 9　SDS 水溶液と SDS/DMPC 混合溶液のモル電気伝導度の SDS 濃度依存性。

3.2.3　顕微観察による可溶化パターンの統計的分類

DMPC リポソーム溶液（1.2 mM）と SDS 溶液（6,8,10 mM）をマイクロチップに導入し、個々のリポソームの可溶化反応を観察した。マイクロチップ流路内で DMPC リポソームと 10mM SDS 溶液を混合した際の典型的な顕微観察図を図 10 に示す。溶液の流れを止めてから時間の経過とともにリポソームの数が減少したことから、リポソームの可溶化の観察に成功した。

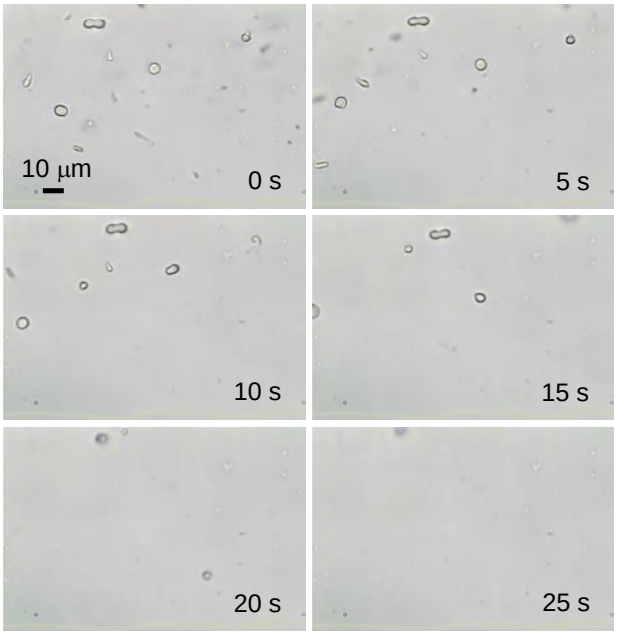


図 10　マイクロチップ内で観察したリポソームの SDS 水溶液による溶解過程。

各 SDS 濃度における可溶化反応の観察図において無作為に選択した 100 個のリポソームを解析することで、可溶化パターンは主に 3 種類あることを見出した。リポソームが可溶化の際、(1) 内部から複数の突起物を放出しながら、また、分裂するなど、激しく可溶化するものと、(2) ランダムに激しく移動しながら可溶化するものと、(3) 特に大きな運動せずにその場で穏やかに可溶化するものである。(1) の可溶化挙動を Projection disruption 型とした。(2) の可溶化挙動を Burst motion 型、(3) の可溶化挙動を Mild dissolution 型とした。これらの典型例を図 11 に示す。

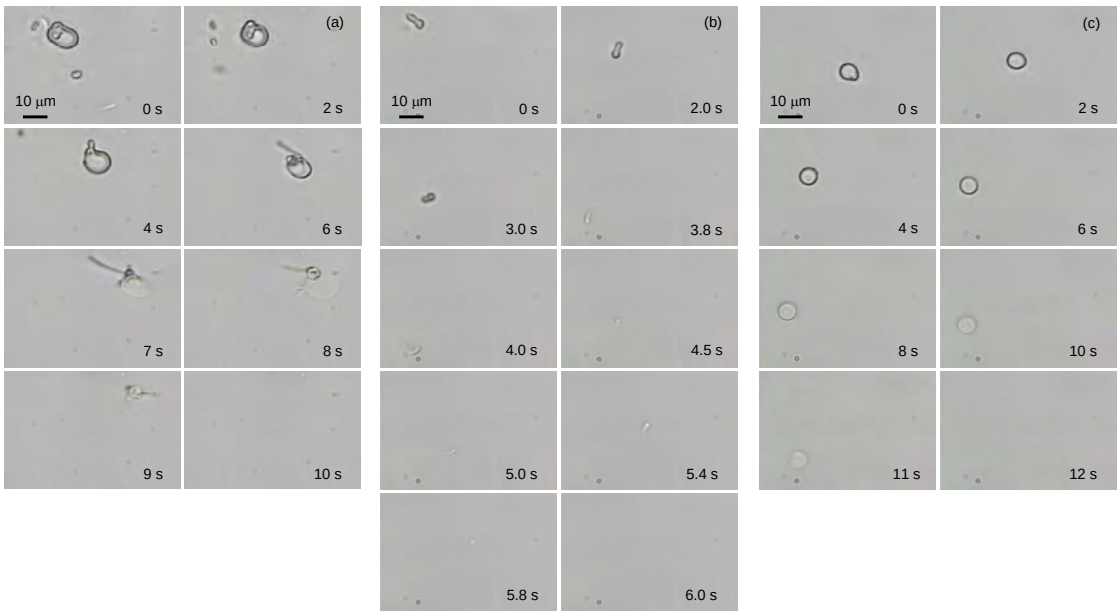


図 11　SDS 水溶液による DMPC リポソームの典型的な溶解パターン。(a) Projection disruption 型、(b) Burst motion 型、(c) Mild dissolution 型。

3 種類の可溶化パターンの割合は SDS 濃度によって変化した。これを図 12 に示す。SDS 濃度 6 mM からリポソームの膜崩壊が観測されるようになった。この濃度では、非運動型が最も多く見られた。SDS 濃度が 8mM 以上では、運動型が最も多く見られるようになった。また、SDS 濃度の増加に伴って分裂・崩壊型が増加した。

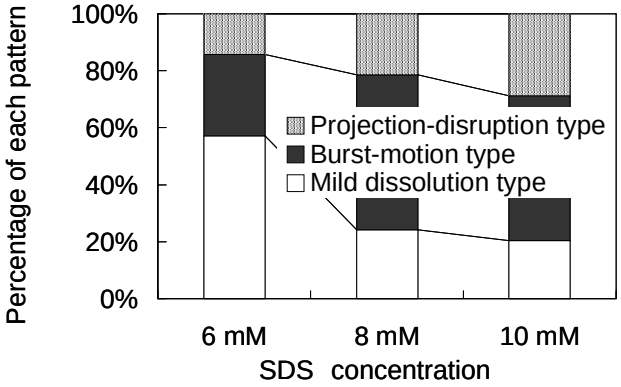


図 12　SDS 溶液による DMPC リポソームの溶解パターンの割合の濃度依存性。

SDS の臨界ミセル濃度が 8 mM 程度であることを考慮すると、6 mM の SDS を DMPC リポソームに加えた場合は、均一に SDS モノマーがリポソーム膜に入り込み、リン脂質と SDS の混合ミセルが徐々に放出されるため、非運動型が最も多く見られたものと考えられる。8 mM SDS を加えた場合は、ミセル状の SDS がリポソーム膜と作用して、膜の局所に大量の SDS 分子が入り、膜の一部を不安定化して、その部分から膜崩壊する。このために、膜の一部が崩壊したリポソームは表面張力が急激に不安定になり、移動型が増加したものと考えられる。10 mM SDS では、より多くの SDS ミセルがリポソーム膜と作用するため、部分的不安定化が複数箇所で起こり、分裂・崩壊型が増加したものと考えられる。

リポソームの可溶化パターン傾向はリポソームの粒径にも依存した。これを SDS 濃度別に図 13 に示す。図 13 のデータからすべての SDS 濃度において、リポソームの粒径の増大に伴い、可溶化傾向は分裂・崩壊型が増加し、非運動型は減少した。これは、分裂・崩壊型が局所的な膜の不安定化によって引き起こされることから説明できる。すなわち、粒径が増加すると、リポソーム 1 個に対して、SDS が相互作用可能なリポソーム膜の表面積が増加する。そのため膜の局所的な不安定化がおこる割合が増加する。逆に相互作用可能な表面積が減少すると膜全体の溶解が起こる割合が増加するものであると考えられる。

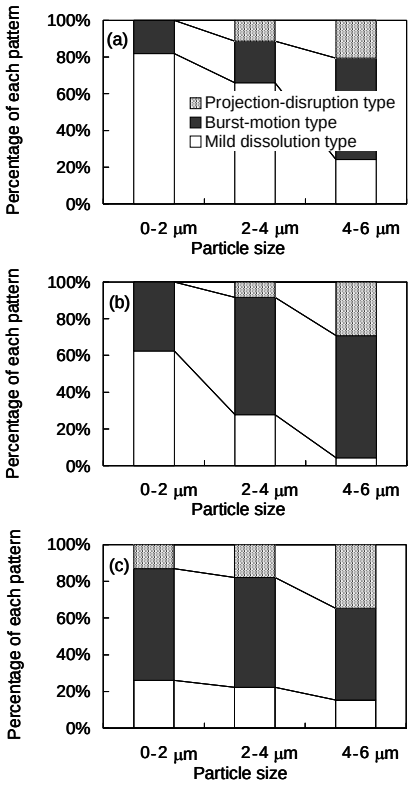


図 13　DMPC リポソームのサイズによる溶解パターンの変化。SDS 濃度(a)6mM, (b)8mM,(c)10 mM の場合。

４．まとめ

部屋付きマイクロチップを用いてリポソームの溶解過程を調べた。粒径の変化を測定するために、独自に開発してきた DLS 法を用い、その変化の過程を顕微観察結果と比較することで溶解過程のダイナミクスを明らかにした。DOPC リポソームにおいては、①最初にひずんだリポソームが球形に変化し、②しばらくその形状を保ったのち、③混合ミセルを放出して急激に溶解するという三段階の過程を経ることを見出した。

また、SDS 添加による DMPC リポソームの可溶化反応において特異な溶解過程を見出した。SDS の臨界ミセル濃度(SDS 濃度 8 mM)の前後でリポソームの可溶化の反応性の劇的な変化を確認した。その DMPC リポソーム可溶化反応の顕微観察により、可溶化反応を 3 種類の可溶化パターンに分類した。この可溶化パターンの傾向も SDS 濃度に伴って変化し、SDS 臨界ミセル濃度付近で可溶化パターンの傾向の変化を確認した。CMC 以下の SDS 条件では SDS モノマーがリポソーム膜に入り込み、リン脂質と SDS の混合ミセルが徐々に放出されるものと考えられる。CMC 付近では、SDS 条件では、ミセル状の SDS がリポソーム膜と作用して、膜の局所に大量の SDS 分子が入り、膜の一部分を不安定化するものと考えられる。さらに濃度の高い SDS 条件では、膜の部分的不安定化が複数箇所で起こるものと考えられる。大きなリポソームほど分裂・崩壊型の割合が増えた。このことはリポソーム 1 個に対して、SDS が相互作用可能なリポソーム膜の表面積が増加することで膜の局所的な不安定化がおこる割合が増加するものと考えられる。

謝辞

本研究は、中谷電子計測技術振興財団および、旭硝子財団からの研究助成により行われた。ここに深く感謝いたします。

参考文献

[1] Bangham, D., Horne, R. *J. Mol. Boil.* **1964**, *8*, 660–668.
[2] Singer, S. J., Nicolson, G. L. *Science* **1972**, *175*, 720–723.
[3] Sharma, A., Sharma, U. S. *Int. J. Pharm.* **1997**, *154*, 123–140.
[4] AndersenJ.P., M.Mairele, U.Kragh-Hansen, P.Champeil, V.J.Møller. (1983). Eur. J. Biochem., 234, 466-468.
[5] Lichtenberg, D., Robson, R. J., Dennis, E. D. *Biochin. Biophys. Acta.* **1983**, *737*, 285–304.
[6] Maria, I. V., Raquel, F. C., Anabela, C. F. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *351*, 156–165.
[7] Gustafsson, J., Oradd, G., Almgren, M. *Langmuir* **1997**, *13*, 6956–6963.
[8] Deo, N., Somasundaran, P., Itagaki, Y. *Ind. Eng. Chem. Res* **2005**, *44*, 1181–1186.
[9] Helenius, A., Simons, K. *Biochim. Biophys. Acta.* **1975**, *415*, 29–79.
[10] Lopez, O., Cocera, M., Coderch, L., Parra, J. L., Barsukov, L., Maza, A. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105 (49)*, 9879–9886.
[11] Deo, N., Somasundaran, P., Itagaki, Y. *Ind. Eng. Chem. Res* **2005**, *44*, 1181–1186.
[12] Su, Y. L., Li, J. R., Jiang, L. *Colloid and Surfaces A* **2005**, *257–258*, 25–30.
[13] Chern, C. S., Chiu, H. C., Yang, Y. S. *J. Colloid Interface Science* **2006**, *302*, 335–340.
[14] Nomura, H., Katayama, K. *Anal. Sci.* **2008**, *24*, 459–462

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

研究責任者　長崎大学附属病院臨床検査医学講座
講　師　　長谷川　寛　雄
共同研究者　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
院　生　　尾　坂　明　美
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
院　生　　佐々木　大　介
シスメックス株式会社・長崎大学大学院
医歯薬学総合研究科研究生　　鈴　木　裕　義

１．はじめに

アポトーシスに関する研究は、1972 年 Kerr らが細胞の死には壊死（ネクロシース）と異なる形態をした細胞死があることを発見し、それをアポトーシスと命名したことに始まる[1)]。その後、アポトーシス研究は急速に進展し、現在では生命維持のために重要な、統制された細胞死であると考えられている。また、放射線や化学療法剤、ウィルスなどの病理的要因に対する生体防御機構としての細胞死として、アポトーシスの重要性が明らかになっている[2)]。

従来、アポトーシス細胞を見分ける最良の方法は電子顕微鏡下での観察であると言われている。しかし、電子顕微鏡は簡便性および汎用性に欠け、また、正確な観察のためには高度な技術や装置が必要であり、一般的にはなかなか用いられない。実際的には、細胞染色色素を用いて生死細胞を染め分ける分染法によるアポトーシスの検出系が簡便であり、細胞死の一般的な判定法として用いられている。例えば Propidium iodide（PI）などの蛍光色素は一般的に生細胞の細胞膜を透過しない。しかし死細胞では、細胞膜構造の変化に伴い細胞膜を透過し、核酸にインターカレートすることにより赤色の蛍光を発するようになる。よってこれらの色素は死細胞の蛍光染色に使用されている。このように、働きの違う蛍光色素を用いることで、生細胞と死細胞を異なった色で染め分けることができ、これらの色素を同時に用いた生細胞および死細胞の同時二重染色をおこないフローサイトメトリーでの測定を行うことがアポトーシス研究において一般的となっている。

ミトコンドリアは細胞の生と死を司る重要な細胞内器官であり、ATP 産生の重要な器官であるだけでなく活性酸素種（ROS）の主な発生細胞内器官アポトーシス誘発を決定する重要な器官であり、がん治療の成否をにぎっているともいえる。ミトコンドリアに依存したアポトーシスの誘発に重要な段階として、種々のアポトーシス刺激によりミトコンドリア外膜の透過性（MOMP）が亢進し，それに引き続いてミトコンドリア膜内に保持されている Cytochrome C がミトコンドリア膜から細胞質に放出される。がん細胞ではこの段階に関与するいくつかの因子が制御されず、そのことががん細胞のミトコンドリアに依存したアポトーシスの誘発に耐性を示す原因となっている。MOMP は種々のアポトーシス促進因子（Bax, Bak 等）と抗アポトーシス因子（Bcl-2,Bcl-xL 等）の拮抗作用により決定される。多くのアポトーシ

ス研究では、ミトコンドリアの膜電位の低下をCMXRos (chloromethyl-X-rosamine)、TMRE (tetramethylrhodamine)、JC-1、DiOC6(3)、DilC1(5)あるいはrhodamine 123などを用いて測定している。

一方、Annexin-V とPI (PS-PI アッセイ) による同時二重染色をおこないフローサイトメトリーでの測定を行うことはアポトーシス研究において一般的となっている。アポトーシスを起こしている細胞では、ホスファチジルセリン(PS)が細胞膜の細胞質側から外層側に移動する。Annexin-V はこの PS に高い親和性を示す。アポトーシスの初期段階の細胞では露出した PS に結合した Annexin-V の蛍光が観察される。この際、細胞膜の構造自体は保たれているため PI には染色されない。アポトーシスの進行に伴い、細胞膜の構造が崩壊状態に至ると (後期アポトーシス)、アネキシンVとPIの両方の蛍光が観察される。

これらAnnexin-V染色、PI染色、ミトコンドリア外膜の透過性の測定 ($\Delta\psi_m$ status) 法は以前より確立されている手法であるものの３系同時測定系の解析評価はほとんどなされてこなかった[3,4]。そこで我々はこの研究においてPS-PIアッセイとミトコンドリア膜電位測定系を同時に測定可能な系を確立し、実際にどう機能するか詳細な検討をおこない、臨床応用可能な実務的な３パラメーター フローサイトメトリーアッセイ の確立を目指した。

２．材料と方法

2.1 細胞株

細胞株にはT-細胞リンパ性白血病株(KK1、ST1、LMY1、Jurkat および MOLT4)、骨髄性白血病細胞株 (K562 と THP1) と B-細胞系白血病細胞株 (RamosとSKW) を用いた[5-7]。アポトーシス誘導因子としてStaurosporine (STS)、Betulinic acid (BEA)、Anti-Fas及びTRAILを使用した。カスパーゼ阻害剤としてZ-VAD-fmk を使用した。

2.2 細胞処理とアポトーシス誘導

Jurkat細胞に対してはSTS (0.1μM)、anti-Fas (2.5ng/mL)、TRAIL (400ng/mL) および BEA (50μg/mL)を使用した。THP1、RamosとMOLT-4 細胞は 1μM STS、ST1 と KK1 細胞には 2μM STS と100ng/mL anti-Fas、LMY1細胞には0.5μMSTS と50ng/mL of anti-Fas、K562とSKW細胞は2μMSTSを使用した。

2.3 Annexin-V、PI、DilC1(5)による３パラメーターアッセイ

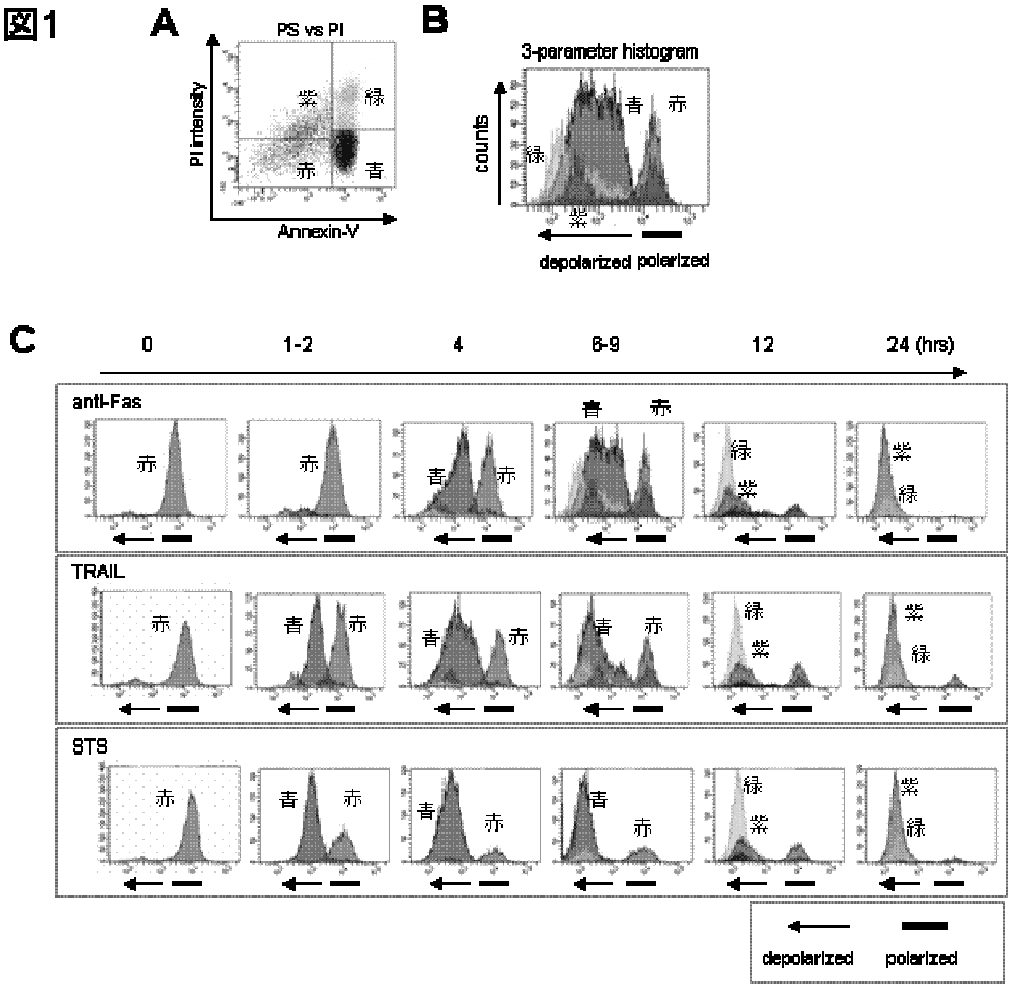
アポトーシス誘導刺激を加えた各細胞を回収前にDilC1(5)を最終濃度5nMにて20 分間培養する。細胞を回収後洗浄し、Annexin-VとPIによる染色を 20 分間行い、フローサイトメトリーにて測定を行った。カスパーゼ活性測定に際してはcaspase-3 アッセイキット (NucView 488; Biotium)、caspase-8 と -9 アッセイキット (FLICA apoptosis Detection kits; Immunochemistry Technologies LLC)を使用した。フローサイトメトリーによる測定は FACS Canto およびFACS Diva software (BD Bioscience)を使用した。

３．結果

3.1 3-パラメーター染色

レセプター依存性のアポトーシス誘導因子である anti-Fas に感受性である Jurkat 細胞をanti-Fasで6時間処理したのちAnnexin-V、PIおよびDilC1(5)による染色をおこない、フローサイトメトリーによる計測をおこなった。このような場合Annexin-V-PIアッセイでは通常 4グループ (生細胞群、初期アポトーシス群、後期アポトーシス群と死細胞群)に分けることができ、Annexin-V陽性細胞 (あるいはAnnexin-V陽性かつ PI 陰性細胞) をアポトーシス細胞とみなしている (図１A)。この結果を用いてAnnexin-V^-/PI^-分画 (生細胞)、Annexin-V^+/PI^-分画(初期アポトーシス)、Annexin-V^+/PI^+分画(後期アポトーシス)

とAnnexin-V⁻/PI⁺分画(死細胞)をそれぞれ赤、青、緑と紫で表示する。次に DilC1(5)染色の結果（Δψm）を反映させてX軸に展開した。この「3-パラメーターヒストグラム」の結果を図1Bに示す。Δψm 分極状態の細胞群とΔψm 脱分極群細胞を前述の4カラーを保ったまま観察することができる。分極エリア(polarized)には生細胞(赤) 細胞、脱分極エリア(depolarized)には初期アポトーシス（青)、後期アポトーシス（緑）と死細胞（紫）とクリアに分けられることが示された。



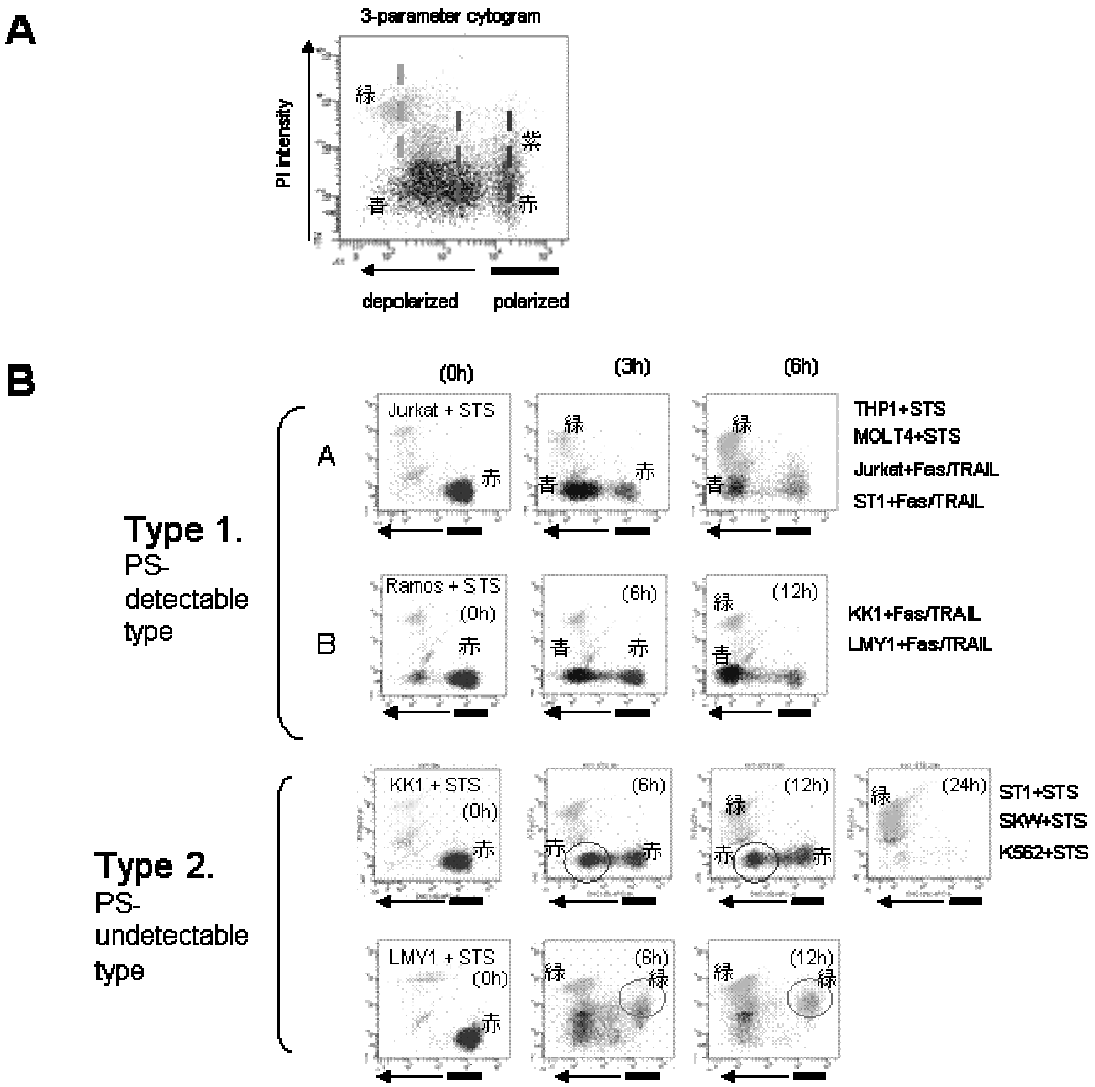
3.2 「3-パラメーターヒストグラム」によるアポトーシスの経時変化

Jurkat 細胞を様々なアポトーシス誘導因子で処理し、24時間後の細胞死状態がほぼ均一となるよう調整し、その過程を「3-パラメーターヒストグラム」によって観察した（図 1C)。初期アポトーシス(青)細胞群は脱分極エリアに約9時間後までに移動すること、後期アポトーシス(緑)が観察されるタイミングはほぼ同時であることが観察された。一方、脱分極が起こる早さはアポトーシス誘導因子の違いによって異なっており、STS、TRAIL、anti-Fas の順であった。さらに初期アポトーシス(青)細胞群の脱分極分画は同じ順で幅広となっていくことが分かった。これらのことから同一細胞が同じ経過時間で細胞死に到達していてもアポトーシス誘導因子の違いによってアポトーシスの状態が異なることが示唆された。このような「3-パラメーターヒストグラム」による観察では経時的な細胞死の違い、すなわちアポトーシスのプロセスの違いのスクリーニングに効果的と思われた。

3.3　「3-パラメーターサイトグラム」によるアポトーシスの経時変化

次に図 2A に「3-パラメーターサイトグラム」の例を示す。ここでは前述のように Annexin-V、PI および DilC1(5) による染色をおこない、4 グループをそれぞれ赤、青、緑と紫で表示した後、DilC1(5)染色の結果（Δψm）を横軸に、さらに PI の結果を縦軸に反映させたサイトグラムとして示している。この「3-パラメーターサイトグラム」を用いて分極エリアと脱分極エリアにおける細胞の構成を観察した。例えば STS 処理した Jurkat 細胞の場合、生細胞（赤）は分極エリアから約 6 時間後には消失するが、この時間までに脱分極エリアに出現してきた初期アポトーシス（青）と後期アポトーシス（緑）の細胞群をクリアに分離することができた。我々はまた、STS 処理細胞の変化の違いに基づいて細胞死パターンは 2 種に分類できることに着目した（図 2B)。タイプ 1 と 2 の主な違いは PS の発現（すなわち青細胞）の有無である。典型的なアポトーシスでは上述のタイプ-1A のような変化を示す。しかしタイプ-1B のような変化を示す細胞もあり、そこでは生細胞（赤）群はまず脱分極エリアに移動してから初期アポトーシス細胞（青）へと変化するような動きをする。タイプ-2 細胞では生細胞（赤）群は、赤色のまま脱分極エリアに移動し、驚くべきことに後期アポトーシス（緑）へと直接変化していった。

図2

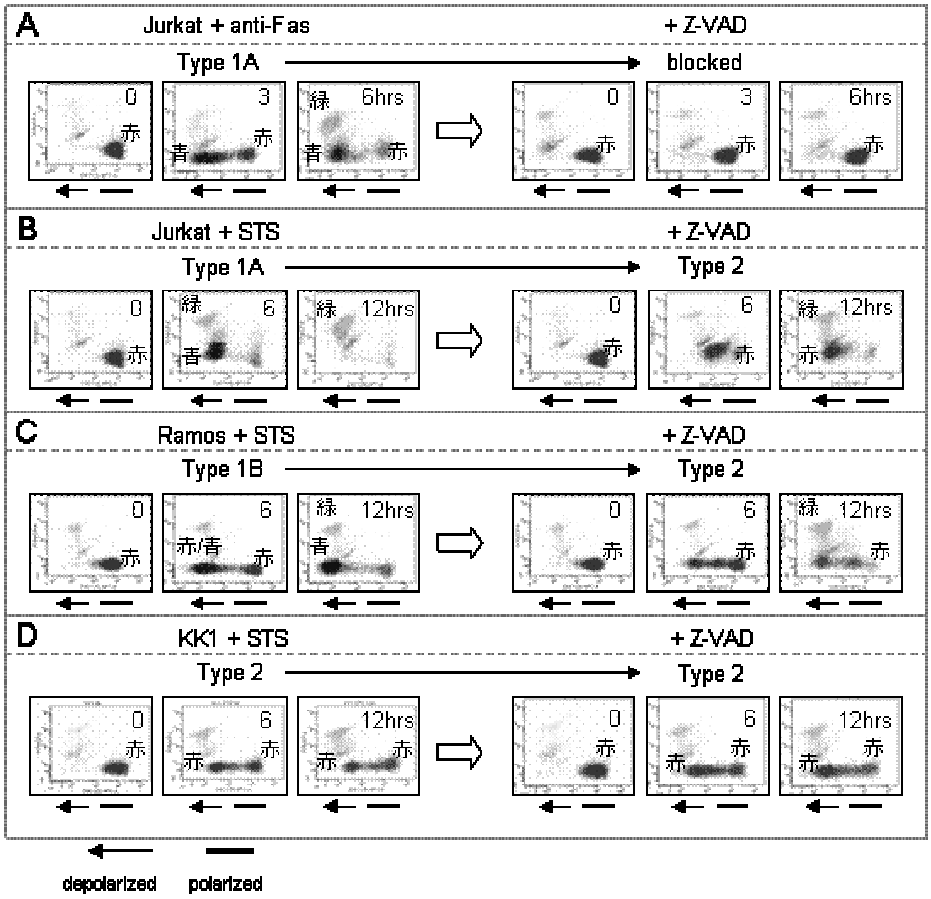


さらにこのような変化は細胞種に依存せずに観察された。例えば ST1、KK1 と LYM1 細胞は タイプ 1 だが STS 使用時はタイプ 2 となる。このように「3-パラメーターサイトグラム」ではミトコンドリア膜電位低下時に起こるアポトーシス変化の詳細を捉えるのに効果的であることがわかった。特に Annexin-V、PI による染色では生細胞(赤)と捉えられていた細胞の一部が（赤色のまま）脱分極エリア細胞となっていく様（図２丸部分上）は、これまでに報告されていない現象を捉えている。さらに生細胞(赤)の一部がミトコンドリア膜電位低下もないまま、後期アポトーシス(緑)細胞へと直接変化していく現象(図２丸部分下)もこれまでに捉えられていない現象といえる。

3.4　Z-VAD によるアポトーシス抑制試験

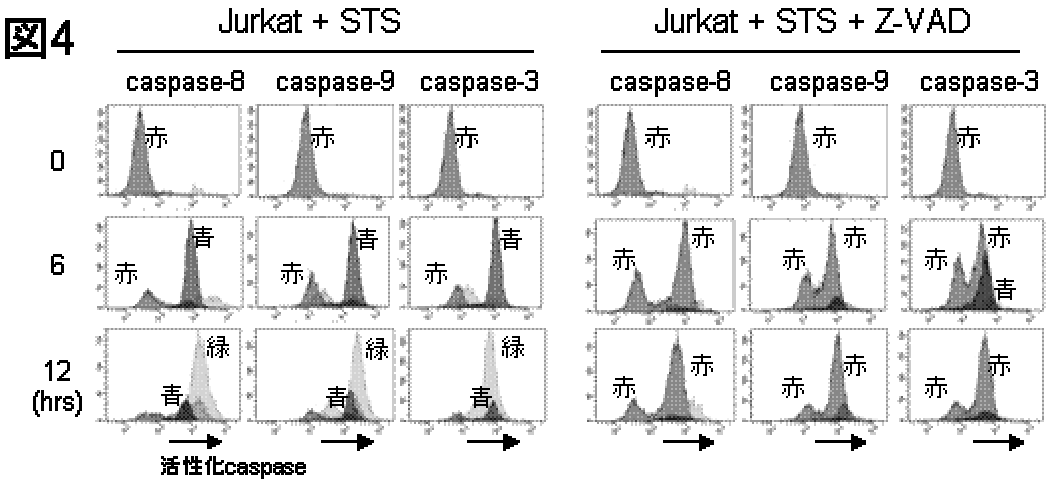
我々はさらにカスパーゼ阻害剤 Z-VAD によるアポトーシス阻害試験を Jurkat、Ramos、KK1、SKW と LMY1 細胞を用いておこない「3-パラメーターサイトグラム」を用いて観察した。anti-Fas と STS で処理した Jurkat 細胞はタイプ 1 のアポトーシス変化をする。しかし Z-VAD 添加によってこれらは異なるパターンをとった。アポトーシス変化は anti-Fas 処理細胞では阻害されたものの（図 3A）STS 処理細胞では阻害されずタイプ 2 アポトーシスパターンへと変化した（図 3B)。同様に Ramos はタイプ 1 からタイプ 2 へ（図 3C)、KK1 と SKW 細胞では変化なく（図 3D)、LYM1 細胞ではアポトーシスは阻害された。

図3



3.5　3-パラメーター 測定系のオプション：カスパーゼ活性アッセイ

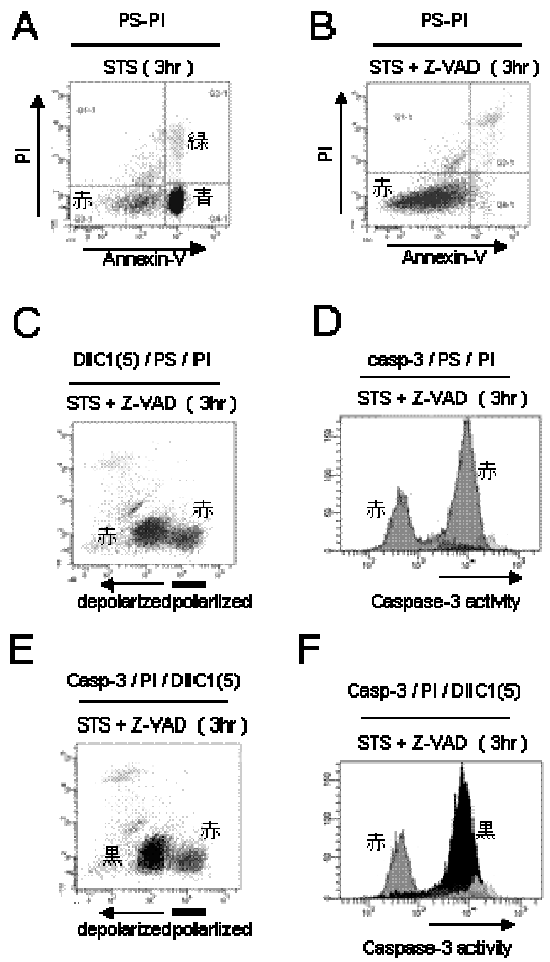
我々はさらにカスパーゼ活性測定系を 3-パラメーター測定系に組み入れる変法を試みた。DilC1(5) による$\Delta\psi_m$測定に変えてカスパーゼ-8、-9 及び -3 の活性を Annexin-V、PI アッセイと組み合わせた。STS 処理 Jurkat 細胞において６時間以内にいずれのカスパーゼ活性も捉える事が出来た（図 4 左)。カスパーゼ活性化細胞は初期アポトーシス(青)として現れその後、後期アポトーシス(緑)へ変化して行く様子も捉える事が出来た。一方 STS 処理細胞においては ZVAD によってカスパーゼ活性化が阻害されていない。そしてカスパーゼ活性化領域に生細胞（赤）群が認められた。このことは図 3B で認められた現象、すなわち生細胞が赤色のまま脱分極エリア細胞となっていく様と一致しているものと考えられた。



そこでこのような特殊な細胞群の特徴をさらに詳細に解析した。まず STS 処理 Jurkat 細胞は 3 時間でアポトーシスが起こり生細胞群（赤）の減少、初期アポトーシス群（青)、及び後期アポトーシス群（緑）が Annexin-VPI 染色によって捉えられた（図 5A)。この系に対しカスパーゼ阻害剤 Z-VAD を加えると Annexin-VPI 染色の結果を見る限りは、ほぼ全ての細胞は生細胞（赤）群領域に留まっており、カスパーゼ阻害によるアポトーシス減弱が起こっているように見える（図 5B)。しかし前述のごとく「3-パラメーターサイトグラム」を用いて観察した結果、Annexin-V、PI による染色では生細胞(赤)と捉えられていた細胞の一部は（赤色のまま）脱分極エリア細胞となっていく（図 5C)。この条件で DilC1(5)による$\Delta\psi_m$測定に変えてカスパーゼ-3 の活性をみるとやはり、Annexin-V、PI による染色では生細胞(赤)と捉えられていた細胞の一部は（赤色のまま）カスパーゼ-3 の活性細胞として観察される（図 5D)。そこで図 5C でみられる生細胞（赤)のまま脱分極エリアにある細胞群を黒に変色してみると（図 5E)、カスパーゼ-3 の活性化細胞として観察される細胞群はまさに脱分極エリアにある黒色細胞群と一致することが確認できた (図 5F)。すなわち STS 処理 Jurkat 細胞はカスパーゼ阻害剤 Z-VAD によって阻害されず、ミトコンドリア膜電位低下やカスパーゼ-3 の活性が起こっている。しかしこの現象は通常の Annexin-V、PI による染色では捉える事が出来ないため、カスパーゼ阻害剤 Z-VAD によって阻害されたと考えられてしまうであろう。一方、通常のミトコンドリア膜電位測定でアポトーシスを評価する場合は STS 処理 Jurkat 細胞はカ

スパーゼ阻害剤 Z-VAD によって阻害されないと判断されることになる。これまでこのような実験結果の解離は詳細に検討されてこなかった。我々の開発した「3-パラメーターサイトグラム」によってこのような「隠れたアポトーシス細胞」を明確に観察することが可能になったといえる。

図5



４．まとめ

この研究において我々は Annexin-V、PI によるアポトーシスアッセイとミトコンドリア膜電位測定系を同時に測定可能な系を確立し、アポトーシス評価においてどのように機能するか詳細な検討をおこなった。我々の開発した「3-パラメーターサイトグラム」には大きく 3 つの特徴があげられる。(1) STS に対する細胞死のプロセスパターンに基づいてそのパターンを 2 タイプに大別することができた。さらにカスパーゼ活性系などのオプションに対しても対応が可能であった。このような成果は、「3-パラメーターアッセイ」が新しい薬剤の作用機序を簡便にスクリーニングできるツールとなることを示唆している。(2) ミトコンドリア膜電位測定系を中心に「3-パラメーターアッセイ」を行うことで、これまでは捉えられていなかったアポトーシス細胞群を捉える事ができた。これはアポトーシス評価をどのような視点でおこなうべきかという問題の解答の一つではないかと考えられた。(3) Annexin-V、PI アッセイとミトコンドリア膜電位測定系はいずれも「古典的な」方法であるにも関わらず、これらを組み合わせることで得られた知見は新しい検査法に匹敵するものであった。さらに興味深いことは Annexin-V、PI アッセイの欠点（細胞膜レベルの変化しか捉えられない）とミトコンドリア膜電位測定系の欠点（初期、後期アポトーシスのどの状態の細胞が脱分極してくるか捉えられない）をお互いにカバーし合うように機能する点である。これらのことから我々は臨床応用可能な実務的な 3 パラメーターフローサイトメトリー法を確立できたと考えている。この成果は以下の論文として発表した。Relationships of diverse apoptotic death process patterns to mitochondrial membrane potential (Δφm)evaluated by three-parameter flow cytometric analysis. Cytotechnology. 2012 Jun 6.PMID:22669602

謝辞

今回の研究は財団法人中谷電子計測技術振興財団の多大な研究援助により可能となりましたことを、ここに深く感謝申し上げます。また、本測定系の構築について助言を頂いたシスメックス株式会社　辻智悠博士をはじめ、関係者の方々に深く感謝申し上げます。

参考文献

1.Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57.

2.Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000 Oct 12;407(6805):770-6.

3.Eray M, Matto M, Kaartinen M, Andersson L, Pelkonen J. Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. Cytometry. 2001 Feb 1;43(2):134-42.

4. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009 Jan;16(1):3-11.

5.Yamada Y, Sugawara K, Hata T, Tsuruta K, Moriuchi R, Maeda T, et al. Interleukin-15 (IL-15) can replace the IL-2 signal in IL-2-dependent adult T-cell leukemia (ATL) cell lines: expression of IL-15 receptor alpha on ATL cells. Blood. 1998 Jun 1;91(11):4265-72.

6.Maeda T, Yamada Y, Moriuchi R, Sugahara K, Tsuruda K, Joh T, et al. Fas gene mutation in the progression of adult T cell leukemia. J Exp Med. 1999 Apr 5;189(7):1063-71.

7.Hasegawa H, Yamada Y, Harasawa H, Tsuji T, Murata K, Sugahara K, et al. Sensitivity of adult T-cell leukaemia lymphoma cells to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Br J Haematol. 2005 Jan;128(2):253-65.

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

研究責任者　秋田大学大学院医学系研究科細胞生理学講座
教　授　　尾　野　恭　一
共同研究者　秋田大学大学院医学系研究科小児科学講座
教　授　　高　橋　　勉
秋田大学大学院医学系研究科細胞生理学講座
技術長　　佐　藤　紳　一

１．はじめに

現代において新生児集中治療室（NICU）に入院を要する新生児は粘着型心電図（ECG）電極を装着して心拍・呼吸活動の監視が行われている。しかしながら、早期産低出生体重児（未熟児）においては粘着型心電図（ECG）電極装着が困難であったり、またその粘着型 ECG 電極を未熟児の皮膚に貼り付けることが原因で皮膚がかぶれたり脱落するなどの皮膚の炎症障害を起こすことがしばしば問題となっている。特に超早産児では皮膚が未成熟で粘膜様であるため、接触性皮膚炎による永続する瘢痕を残してしまうこともある。この問題に対し皮膚保護シート[1)]や温水保温式マットレス型センサー[2)]などの皮膚障害対策および非侵襲的測定に関する報告がいくつかあったが抜本的かつ有効な解決手段としては広く実施されていない。この問題を解決するためには非侵襲的心拍･呼吸測定法の確立が不可欠である。我々は初め小動物の分野で世界初の非侵襲的測定を可能にするピエゾセンサーを使用したマウス用心拍・呼吸数測定装置（佐藤他：特許 US-7174854, JPN-4015115, EP-1481585）を開発した[3,4)]。ピエゾセンサーは非常に高感度なため生直後 1.2ｇのマウスの心拍･呼吸計測が可能であり、これを利用してマウスの心拍数および自律神経系の生後発達について論文をまとめた（佐藤、2008）[5)]。この小動物用心拍･呼吸モニター装置は既に製品化・販売され、その正確性、非侵襲性および安全性が確認されている。また最近我々はさらにそれを薄い板状にし新生児の身体下に敷いたタオルの下に設置して使用する小型かつ薄板状の新規なピエゾ素子方式心拍・呼吸センサー（国際特許出願中：PCT/JP2005/012068）を開発し、新生児における非接触かつ非侵襲的な心音・呼吸活動の記録を可能にした。このピエゾセンサーは振動伝達板を有し小型で身体の直近に位置することおよび通気孔を有することから信号感度、通気性（快適性）、取扱い性の点に優れており、保育器内の構造を一切変更することなしに新生児の心音および呼吸活動の非侵襲的記録を可能にするものである。本研究において、NICU における非侵襲的心拍･呼吸波形記録を可能にする小型の装置を開発することおよびピエゾセンサー信号の解析を行い新生児心疾患診断の可能性を検討した。

２．方法

2.1　ピエゾセンサーによる新生児心音記録

秋田大学医学部附属病院小児科 NICU に入院す

る新生児のうち両親からの同意が得られた新生児 13 名、および同病院産婦人科に入院し健康と思われる新生児 13 名を対象とし、新生児用ピエゾセンサーCHR-1（図 1：ユニークメディカル社、厚生労働省許可番号 13B1X10014）を用いて心拍・呼吸活動記録を行った。

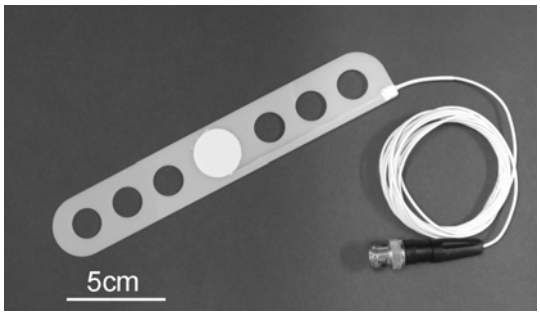


図 1：　新生児心拍･呼吸モニター用ピエゾセンサー

No.1 から No.8 までの NICU 新生児については、新生児用ピエゾセンサーの測定位置による検出信号強度および信号波形に及ぼす影響の検討を兼ねて、仰臥位で寝ている新生児の心臓直下を中心に上下左右に約 10cm づつずらした計 9 箇所においてピエゾセンサー記録を行った。ピエゾセンサーは無負荷時の厚み約 5mm のタオルの下に挿入し、それぞれの位置における記録時間は 1 分程度とした。記録された心音の 1 音、2 音および呼吸の振幅は 9 箇所の地点において顕著な差は認められず(図２)、新生児心臓直下からセンサー位置が多少ずれたとしても心拍･呼吸測定に及ぼす影響は少ないことがわかった。そこで、以後の記録は心臓直下近辺において行なった。

2.2　PC マイク入力インターフェースの開発

ピエゾセンサー信号をパーソナルコンピューター（PC）に入力するためには信号のＡＤ変換を行う AD コンバーターを用いるのが一般的であるが、低予算で開発が可能な PC のマイク入力を利用する方式とした。マイク入力方式の場合は、コンピューター内蔵オーディオ回路を利用するため AD コンバーターの設計は不要となり、シンプルかつコンパクトなインターフェースの製作が可能になった。試作はユニークメディカル社が担当し、アンプ回路のプリント基板設計製作およびコンピューター内蔵オーディオ回路出力を利用する信号記録ソフトウェアの開発を同時進行で行った。しかしながら、ユニークメディカル社の試作が完成したのは研究期間終了直前であったため、大部分のピエゾセンサー記録は以前から研究室で所持していた機材を用いて行った。（MiniDigi:AD コンバーター､Axon 社;　PowerLab 26T: AD コンバーター、AD instruments 社等）

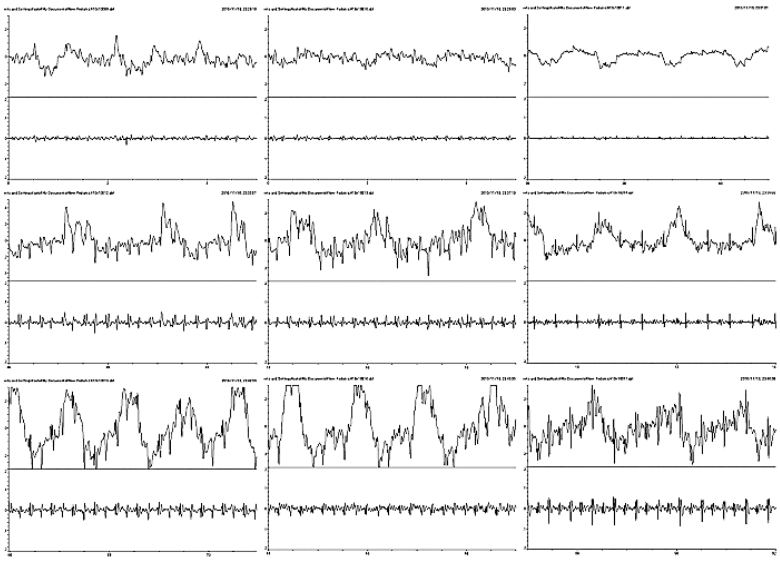


図 2:　9 地点における新生児心拍･呼吸波形記録。それぞれ上段はピエゾセンサー信号生波形（呼吸と心音の混合波形）、下段は同信号に 50Hz の高域通過フィルター処理した波形（心音）を示す。ピエゾセンサーの位置は９つの図の配置と対応しており、中央の図は新生児の背中の中央（心臓直下）にピエゾセンサーを置いて測定した信号を示している。

2.3　Mic 端子入力方式心音表示ソフトウェアの開発

ピエゾセンサーが検出する心音信号をコンピューター画面に表示する心音表示ソフトウェアはユニークメディカル社に試作を依頼した。コンピューター画面に表示する信号は、ピエゾセンサー生波形の他に１音、２音および心雑音が明瞭に観測できるように複数の周波数フィルター処理波形を表示する方式とした。内蔵するソフトウェアフィルターはフィルターの種類、次数およびカットオフ周波数などの設定が自由に行える設計を依頼した。

2.4　ピエゾセンサーによる心不全モデルラットの心音測定

本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は心疾患診断への応用を目指すものであるが、異常心音の発生メカニズムを検討するための心音解析は生理学実験（動物実験）による心音波形解析と並行して行なうことが重要であることから、大動脈弓横行部狭窄（TAC：Transverse Aortic Constriction）による圧負荷モデルラット（TAC ラット）を用い小動物用ピエゾセンサーを用いた心音測定および解析を行なった。

３．結果

3.1　心疾患を持つ新生児心音の解析

新生児用ピエゾセンサーCHR-1 を用いて心拍・呼吸記録を行なった NICU 新生児 13 名のうち患児４以降 10 名は表 1 に示すような心疾患を持つ患児であった。それぞれの患児において記録されたピエゾセンサー信号は、信号解析ソフト上で 15、30、70Hz 高域通過 RC フィルター（一次および３次）および 100、140Hz ベッセルフィルター（８次）処理し、生波形とともに並べて解析を行った。（図３）

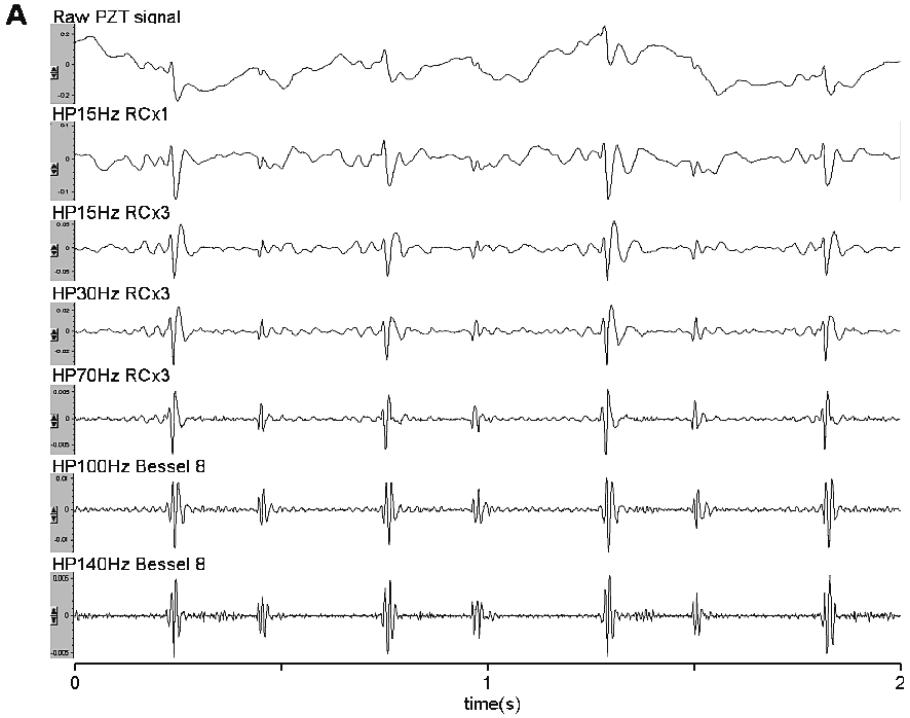
患児	疾患
1	腎のう胞
2	胎児水腫　RDS
3	早産児
4	TOF　LBW
5	CoA　VSD　DOWN　PGE1 注
6	TGA　small VSD
7	DORV　18trisomy
8	軽症 Ebstein 奇形
9	TAPVR
10	AVSD
11	DORV　右室単心室　18trisomy
12	VSD　18trisomy
13	AVSD　PH

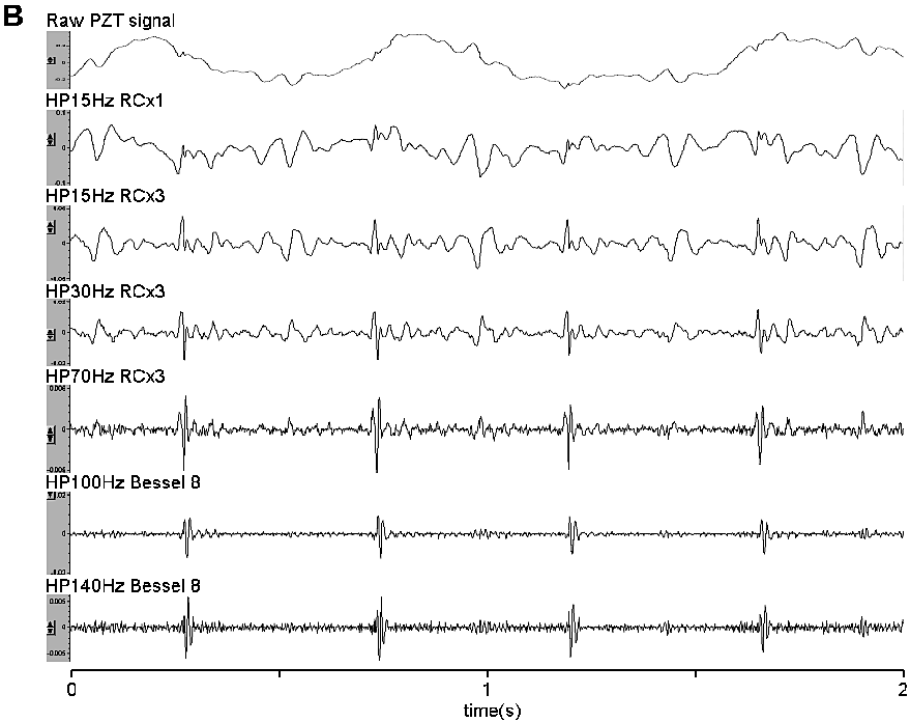
表１　患児疾患データ

RDS：　呼吸窮迫症候群
TOF：　ファロー四徴
LBW：　低体重
CoA：　大動脈狭窄
VSD：　心室中隔欠損
DOWN：　ダウン症
TGA：　修正大血管転位
DORV：　両大血管右室起始
18trisomy：　18 番目の染色体が 3 個ある染色体異常
TAPVR：　総肺静脈還流異常
AVSD：　房室中隔欠損（心内膜床欠損）
PH：　肺高血圧

心疾患の無い患児のデータ（A）においては明瞭に大きい 1 音、2 音とそれ以外の小さい信号強度の期間とのコントラストが大きいが、心疾患患児（B-D）のデータは生波形およびフィルター処理波形においてそれぞれ A とは異なる心疾患に対応した信号波形パターンが認められた。患児Ｂは

ＡＶＳＤ（房室中隔欠損症）およびPH（肺高血圧症）を有し、30Hz 以上の高域帯の心音信号において２音の亢進が顕著である。患児ＣはＶＳＤ（心室中隔欠損症）を有し、全収縮期雑音が生波形を含め全てのフィルター処理波形において観測された。患児ＤはＡＶＳＤ（房室中隔欠損症）を有し、心臓の収縮期・拡張期の全域にわたるノイズが 15Hz-RC フィルター以上の高域帯の心音信号において顕著に認められた。以上の結果から、ピエゾセンサーにより新生児心疾患に対応する心雑音の他、特徴的な低周波数帯域の心音情報が得られることが分かった。





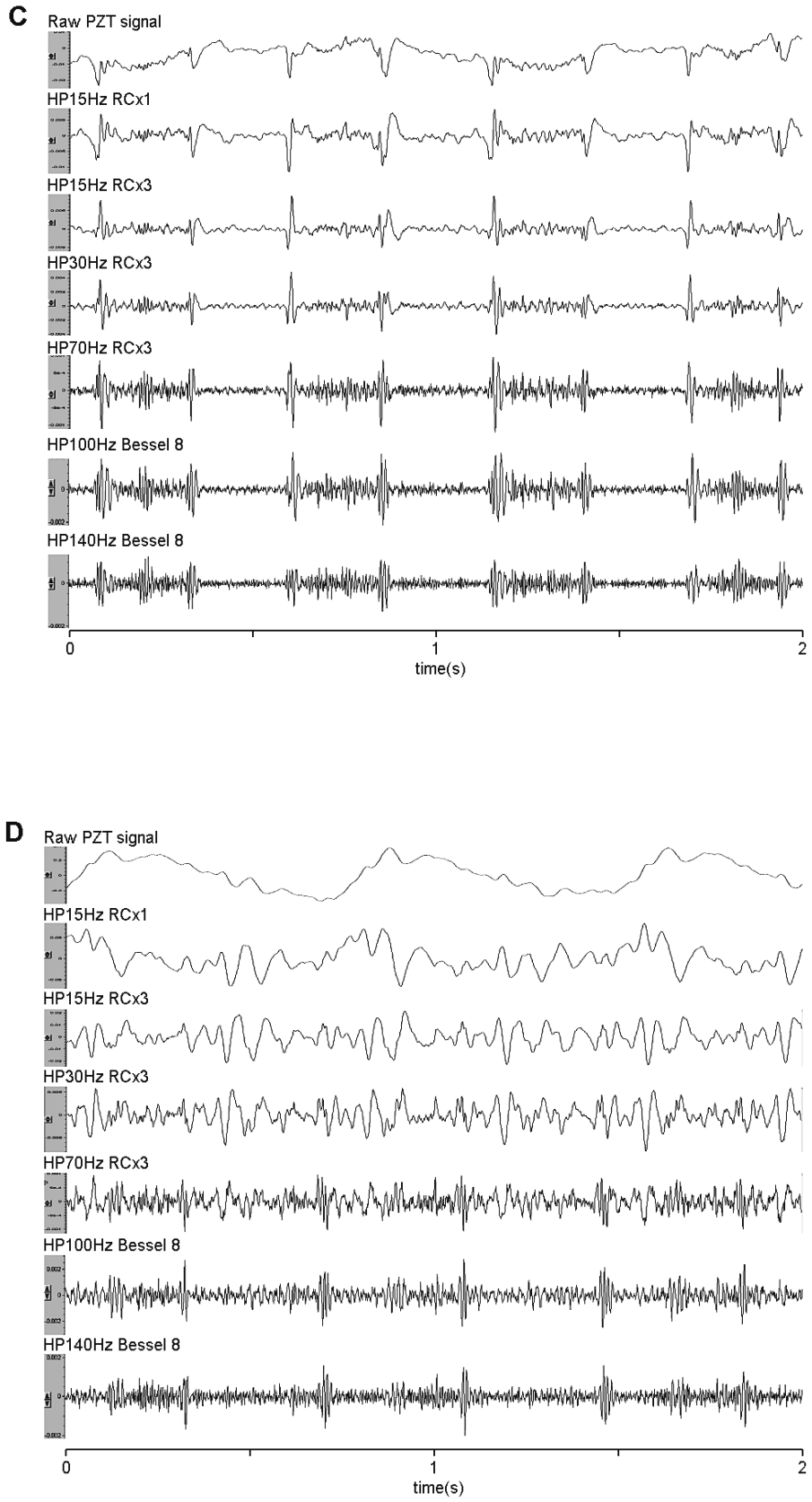


図３：　健康児および心疾患児のピエゾセンサー計測信号。最上段トレースは呼吸および心拍信号を含む生波形。２番目以降のトレースは表示のフィルター処理後波形を示す。

3.2　PC マイク入力インターフェース

ピエゾセンサーの出力信号は測定装置の入力インピーダンスに大きく影響を受けるため、適切な入力インピーダンスを持つバッファアンプを介在させることが望ましい。バッファアンプのための電源は USB コネクタから供給し、その USB コネクタとバッファアンプを一体化し、バッファアンプ出力をマイク端子に接続するミニジャックを具備する構成とした。本構成により極めてコンパクトな PC マイク入力インターフェースを実現することができた(図４)。

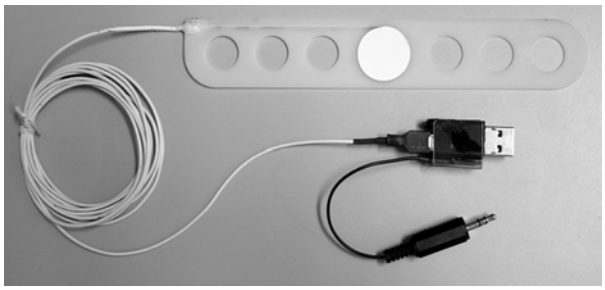


図４：　PC マイク入力インターフェース

3.3　Mic 端子入力方式心音表示ソフトウェア

ユニークメディカル社が開発した Mic 端子入力方式心音表示ソフトウェアのコンピューター表示画面デザインを図５に示す。４本のトレースは、最上段のピエゾセンサー信号生波形とそれに任意のフィルター処理を施した波形３本を並列に表示したものである。画面右下のコントロールパネルは、周波数フィルター条件、時間軸条件などを設定するためのもので、画面表示、非表示を選択することができる。

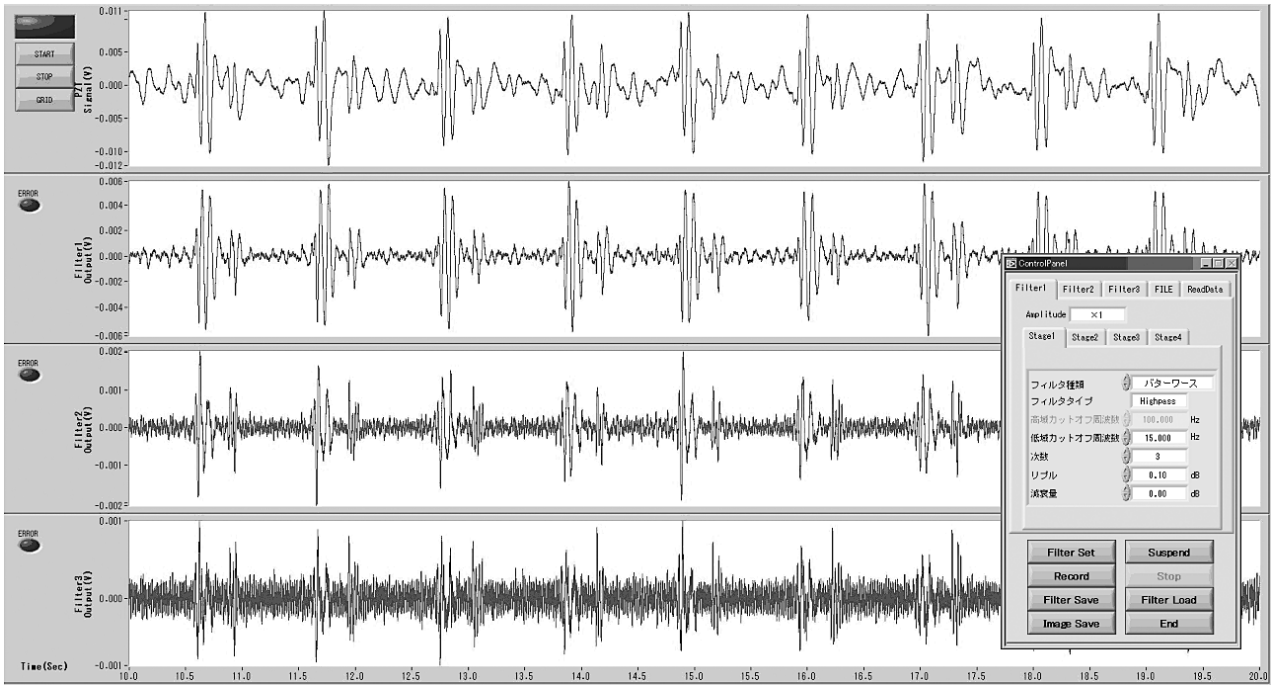


図５：　成人におけるピエゾセンサー記録心音信号（１０秒間)。

3.4　心不全モデルラット実験

心不全モデルのTACラットを作成しピエゾセンサー記録を行う動物実験の結果、上行大動脈内圧が高血圧（負荷）になることにより予想される２音振幅の増大が起こることが確認された(図６)。

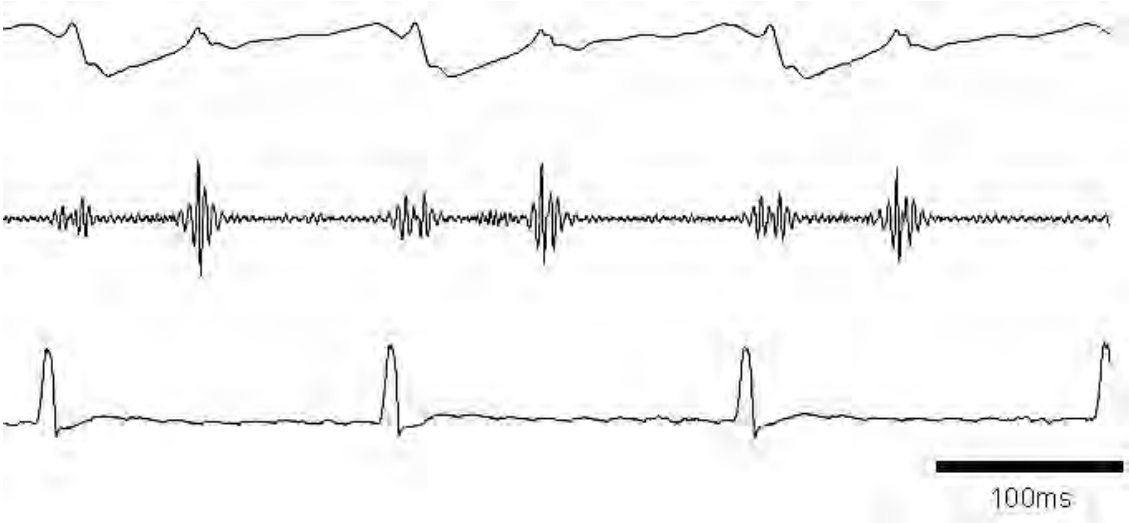


図６：　心不全モデルラットおけるピエゾセンサー記録信号。上から、ピエゾセンサー記録信号生波形、２００Ｈｚ高域通過フィルター処理波形、心電図。２番目のトレースにおいて２音が亢進している。

４．まとめ

以前から継続していたピエゾセンサーによるＮＩＣＵ新生児の非侵襲的心拍・呼吸モニタリングに関する論文を、本研究期間中に外国雑誌“Neonatology”に投稿し、掲載・出版された。本研究においては、コンピューターのマイク入力を利用する新規な構成の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試作が完成した。このシンプルなピエゾセンサー方式心拍・呼吸モニターはＮＩＣＵ新生児を対象とするばかりではなく、多方面への応用の可能性を持つものと考えられる。心雑音の解析による通常の心疾患診断の他に、我々は新規な着想に基づく低周波帯域の心音を利用した心疾患診断を提案しているが、本研究においてその可能性の一端を示す情報を得ることができた。本研究によって開発した本システムのハードおよびソフト試作品は一定レベルにあると考えられるが、さらに改良を続け実用性の高いものを創出することにより医療・医学の分野に貢献することが期待される。

謝辞

平成 21 年度開発研究助成にて本研究に助成いただきました、財団法人中谷電子計測技術振興財団に深く感謝申し上げます。

参考文献

1) Barak M, Hershkowitz S, Rod R, Dror S. The use of a synthetic skin covering as a protective layer in the daily care of low birth weight infants. ***Eur J Pediatr.*** **148**: 665–666, 1989.

2) Sarman I. Thermal responses and heart rates of low-birth-weight premature babies during daily care on a heated, water-filled mattress. ***Acta Paediatr.*** **81(1)**:15–20, 1992.

3) Sato S, Yamada Y. and Inagaki N. System for simultaneously monitoring heart and breathing rate in mice using a piezoelectric transducer. ***Med Biol Eng Comput.*** **44**: 353–362, 2006.

4) Shinichi Sato. CARDIAC BEAT DETECTOR-A Novel Analogue Circuitry for the First Heart Sound

Discrimination. ***BIOSIGNALS 2008 Proceedings.*** **2**:136-140, 2008.
5) Shinichi Sato. Quantitative evaluation of ontogenetic change in heart rate and its autonomic regulation in newborn mice with the use of a noninvasive piezoelectric sensor. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294**: H1708–H1715, 2008.

発表論文

Shinichi Sato, Wako Nakajima, Akira Ishida, Masanari Kawamura, Shinobu Miura, Kyoichi Ono, Nobuya Inagaki, Goro Takada and Tsutomu Takahashi. Assessment of a New Piezoelectric- Transducer Sensor for Noninvasive Cardiorespiratory Monitoring of Newborn Infants in the NICU. ***Neonatology.*** **98**:179–190, 2010.

学会発表

Shinichi Sato, Tomoo Ito, Hirokazu Arai, Masanari Kawamura, Wako Ishida-Nakajima, Akira Ishida, Nobuya Inagaki, Tsutomu Takahashi and Kyoichi Ono. A New Piezoelectric-Transducer Sensor for Noninvasive Cardiorespiratory Monitoring and Cardiac Diagnosis of Newborn Infants in the NICU. ***The 1st Global Congress for Consensus in Pediatrics & Child Health.*** 17-20 February 2011, Paris, France.

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

研究責任者　兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻
助　教　　吉　木　啓　介
共同研究者　兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻
教　授　　井　上　尚　三
兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻
准教授　　生　津　資　大

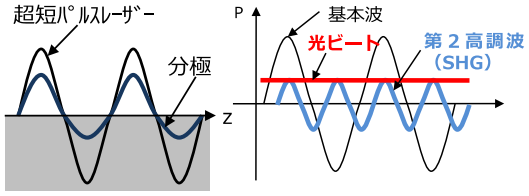
１．はじめに

生体は外部からの力学的刺激により自らを再構築することが知られており、その機序は実験により徐々に明らかとなっている [1)-4)]。一方、計算機を用いた細胞シミュレーターの発達により、これらのモデルを数値的に再現し、細胞の再現や仮想実験によるモデルの検証を行うことも将来的に可能となると考えられる。数値的な再現のためには定量的な実測値を初期値としなければならならず、計算結果も実現象との重ね合わせによって初めて意味を持つ。しかし、実験技術の限界により、未だ計測不可能なパラメーターがあり、応力もその中の一つである。本研究の目的は細胞外マトリクスの主要な構成要素の一つであるコラーゲン内部の応力を計測する技術の開発であり、第 2 高調波発生 (SHG: Second Harmonic Generation)顕微鏡 [5)-9)]によってこれを実現する。今後、応力の計測に対する本顕微鏡の有用性が実証されれば、応力と生体の関係を解明のための有力な手段となる。また、実験における培養細胞の品質管理や、再生組織の非破壊検査等の産業用との応用も考えられる。また、コラーゲン組織の異常によって起こる膠原病などの難病の治療法の発見の契機になる可能性もある。しかし、SHG と柔組織内の細胞外マトリクスにかかる応力の関係を定量的に研究した研究は未だない。そこで、本研究では応力計測の定量化を目指し、細胞外マトリクス、そして将来的には微小管、ミオシンなどにも同様の実験を行うことによって、細胞の力学刺激応答と再構築にかかわる新たなメカニズムの発見に繋がる可能性がある [2)]。

２．原理

2.1　第２高調波発生光の発生原理

超短パルスレーザーを非線形光学媒質に入射した時、高強度の光電場との相互作用により、Fig.1 に示すように、媒質内に非対称な分極が生じる。



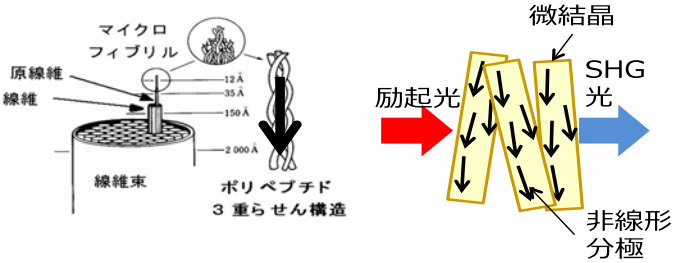
(a) 超短パルスレーザーによる非線形分極　(b) 非線形分極中の倍波，直流成分

Fig.1　超短パルスレーザー照射による SHG 光の発生

この分極を時間軸に対してフーリエ展開すると、入射光と同じ周波数を持つ光に加えて、その倍の周波数を持つ SHG 光、および、直流成分である光ビートが観測される。この現象を顕微鏡に応用し、SHG 光の発生強度をマッピング、画像化するのが SHG 顕微鏡である。

2.2　コラーゲンに発生する SHG に力学負荷及ぼす影響

生体分子のうち、コラーゲンも非線形光学特性を持っており、超短パルスレーザーの入射により SHG 光が発生する。コラーゲン繊維は線維状の細長い形状をした分子であり、励起光の光電場が分子の長軸に平行な方向に作用した時、最も強い SHG 光を発生する。そのため、SHG 光強度の励起光に対する偏光依存性を計測することによって分子の方向を計測することが出来る。また、生体中ではコラーゲン分子は構造化し、繊維構造をとっている。この時、SHG 光は干渉性をもつため、各々の非線形分極から発生した SHG 光は前方へは強め合い、後方へは弱め合う。これは各分極の方向が一様であり、かつ、周期構造を持つほど顕著となり同時に前方放射の SHG 光は強く発生する。逆に、ランダムに配向した分極からは SHG 光が打ち消し合い、SHG 光は弱くなる。このことから、SHG 光は結晶性が高いほど強くなる。コラーゲンにおいてもそれは同じことが言え、配向の揃ったコラーゲンと揃っていないコラーゲンでは SHG 光強度が異なる。このため、コラーゲン線維に応力が加わった時、線維内部の構造変化によって、SHG 光強度が変化する。この時のコラーゲン線維内部の構造は、Fig.2 に示すものと光学的には等価と考えられる。まず、コラーゲン線維は階層的な繊維構造をとるが、これを非線形光学結晶の微結晶の集合体とみなす。微結晶中のコラーゲン分子は一定の配向度をもって配向しており、そのため、結晶内に発生する非線形分極の方向も。それらに沿った方向となる。また、微結晶自体も完全に同一方向に配向しているわけではなく、線維全体の平均的な配向方向に対して、ある程度のズレをもって配向している。また、コラーゲンが階層的な構造を持っているのと同様、微結晶も階層的に集合して繊維束スケールの多結晶集合体を形成していると考えられる。



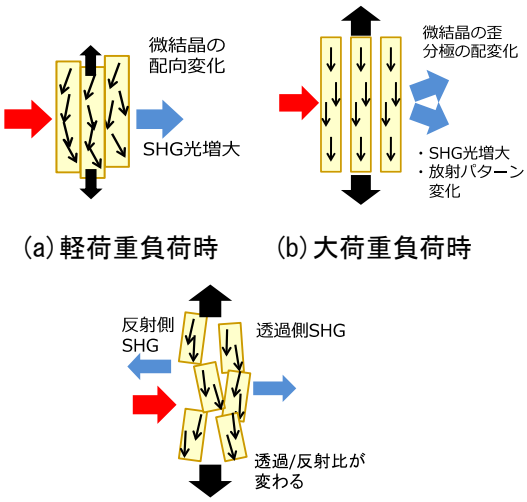
(a)コラーゲン線維の構造　(b)光学的な透過モデル
Fig.2　超短パルスレーザー照射による SHG 光の発生

次に、このような微結晶の多結晶体に超短パルスレーザーを入射した時の SHG 光放射を考える。入射条件は、SHG の発生効率が最大となるよう、偏光方向を結晶の平均の配向方向に一致させた。このとき、微結晶の配向がすべて入射偏光と同一方向に配列するほど SHG は増大する。これは入射偏光に対して最も効率的に励起される方向に微結晶方向が揃うことによる。

個々の結晶から放射される SHG 光は非線形分極の方向が揃うほど強度が上がる。これは、微結晶の場合と同様、励起方向に対する角度が平行に近づくことによる効果と、各分極からの SHG 光が互いに干渉し、強め合う効果を及ぼすためである。その結果、SHG 光の放射強度は透過側が反射側に比べて優位となる。また、微結晶の大きさが変化すると、干渉の効果が薄れ、より単一の分極に近い放射分布を示す。すなわち、透過側が減少、反射側が増加し、強度比は等分に近づいていく。

我々は応力下において、このような微結晶複合体の構造が変化し、SHG に影響を及ぼすと考えている。ここで、Fig.3 に示すとおり、平均的な配向方向を引っ張り軸として応力を加えた時の結晶構造の変化と SHG 光の変化を考えると、まず力が弱い時、Fig.3(a)のように微結晶同士の配向が応力負荷方向に揃い、結晶方向が偏光方向に一致

するため、SHG 光の強度は上昇する。さらに Fig.3(b)のように更に応力を加えると、結晶自体が変形し、それに伴い、結晶内部の非線形分極の方向も応力負荷方向に配向度を増す。これにより、SHG 光強度は更に上昇する。また、非線形分極間の距離が変化することによって、位相整合条件が変化し、SHG 光の発生効率、および伝搬方向が変化する。その他にもクリープ変形などの不可逆的な変形が起こる場合は結晶自体が破壊される場合があり、Fig.3(c)のように SHG 光の透過側、反射側の違いにとして観測される。



(a)軽荷重負荷時　(b)大荷重負荷時

(c)クリープ等，永久変形時

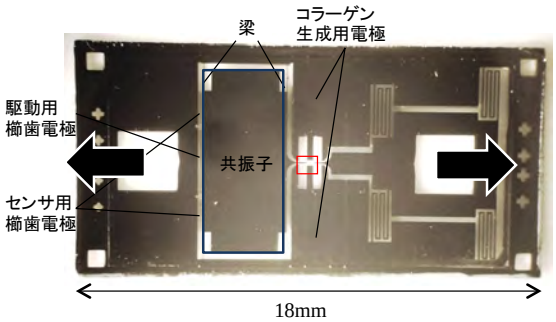
Fig.3　力学負荷によるコラーゲン微結晶の変化

実際にはこれらの変化は様々なスケールで複合的に起こると考えられる。また、無負荷の場合でも、コラーゲン線維の種類によって結晶サイズ、結晶内の分極の密度、配向はそれぞれ異なると考えられる。よって、コラーゲンの初期構造と、応力による影響を切り分けて計測する必要がある。そのため、SHG 光を透過光、反射光、偏光計測、放射角度計測など、より多角的に観察することで、これらの切り分けを行う必要がある。そこで、応力-SHG 光の関係を測定する実験系を構築した。また、コラーゲンの評価方法として従来から使用されている小角 X 線散乱による評価結果と比較し、SHG 顕微鏡による応力評価の可能性を検証した。

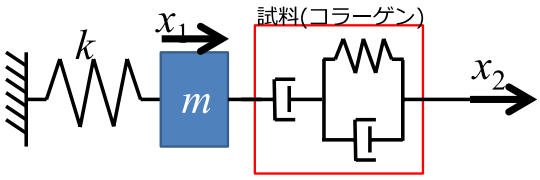
３．実験装置

3.1　顕微鏡上マイクロ引張試験装置

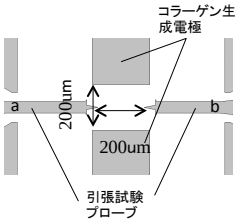
SHG 光と応力の依存性を調査するために、顕微鏡上で動作する微小コラーゲンの力学試験を行うマイクロデバイスの構築を行った。サブミリ以上のマクロなコラーゲン組織を用いた場合、荷重と断面積で求められる応力からは、その中に含まれる線維単体の応力を知ることはできない。そのため、試験片をμm以下の細さにすることで、線維単体の応力、荷重分布を計測することが出来る。また、線維をより細くすることによって、Fig.2(a)に示す線維、原線維などの更に細い線維に関して応力、と SHG 光の関係を調査することも目指している。これにより、仮説に示した微結晶がどのスケールの構造に当たるのかを調べることが出来るほか、応力による影響がどのスケールで起こるのかを明らかにすることが出来る。装置の外観と等価力学モデルを Fig.4 に示す。



(a)マイクロ引張試験機外観



(b)等価力学モデル



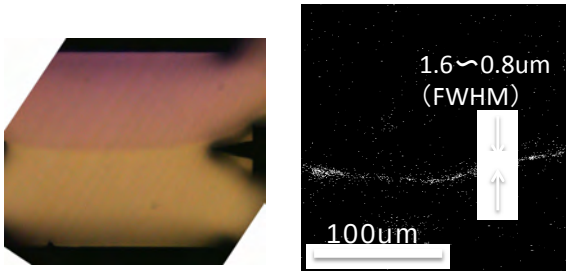
(c)試料把持部

Fig.4　顕微鏡上マイクロ引張試験機

本装置は、SOI ウェハから MEMS 製造プロセスを用いて作成されたデバイスであり、18×9mm のサイズである。２本の電極 a、b がバネによってフレームに接続されており、試料の両端を把持する。電極には重りが装着されている。電極の一方を引張ると、試料と共にもう一方の電極も引っ張られ、共に変位する。この時、両者の変位差 x_1-x_2 が試料の伸びとなり、電極 b の変位とそれをフレームにつないでいる板バネのバネ定数 k から荷重 kx_1 を求めることが出来る。この時、変位計測は画像計測により、10nm の精度が得られる。k の値は板バネの太さの 3 乗に依存するため、加工精度の影響が最も大きい。そのため、精度の確保のために、共振周波数の測定によるばね定数の測定法を考案した。まず、試験片の無い状態で、共振子に実装されている櫛歯電極にオフセットをかけた交流電圧（振幅 7V、オフセット 5V）を与え、周波数掃引によって共振周波数 1210Hz を得た。そこから求められるばね定数は k=116N/m となり、設計値 200N/m（有限要素法解析では 196。3N/m）よりも、機械的な手法による計測値 114.1N/m により高い一致を示した。これより、本手法による校正の有効性が示された。

3.2　電気化学法によるコラーゲン生成

引張試験片とする微小コラーゲン線維を生成する手法として我々が採用したのは、電気化学法[10] である。本法は、X.Cheng らによって開発された液中で簡便に配向を持ったコラーゲンを生成する方法である。まず、1 対の平行電極を用意し、その間にコラーゲン酸性溶液を満たす。次に、電極間に直流電圧をかける。すると、電気泳動によって電極間に pH の分布が出来る。コラーゲンは両親媒性物質のため、酸性、アルカリ性には溶解するものの、中性に対しては不溶で析出する。そのため、pH 分布の中性領域においてはコラーゲンが析出する。また、中性領域は電極方向に細長く分布しているため、析出するコラーゲンは細長くなる。また、析出の際、空間的な閉じ込め効果によって長手方向に配向する。これに架橋剤による処理を加えると、結晶性を伴う強固なコラーゲン繊維が出来る。ここで、コラーゲンの細さを制御するため、電極間と電圧を最適化した。電極間が狭くなればなるほど、また、電圧勾配が緩やかであればあるほど線維は細くなる。そこで、電極間は可能な限り狭く、また、電圧は可能な限り低く設定した結果、200μm の電極間隔に 3V を印加した時の変化を Fig.5 に示す。Fig.5(a)は pH 指示薬を混ぜたコラーゲン溶液に電圧を印加した例であり、明視野では観察することができなかった。そこで、SHG 顕微鏡で観察した結果、Fig.5(b)のように観察することが出来、その細さは 0.8μm〜1.6μm と、回折限界による光学顕微鏡の分解能の限界に迫るサイズであることがわかった。



(a)明視野像　　(b)SHG 顕微鏡像

Fig.5　電気化学法によって作成されたマイクロコラーゲン

3.3　小角 X 線散乱

コラーゲンを始め、高分子を計測する手法として小角 X 線散乱（SAXS: Small Angle X-ray Scattering）が使用されてきた。X 線ビームが試料に当たった時、試料内の微細構造によって散乱が生じる。その際の散乱角は構造体の大きさに依存し、その大きさはギニエの式などから推定することができる。ギニエの式に従う領域以外でも、一般に散乱が大きいほど構造は小さく、散乱が小さいほど構造は大きいと言える。SAXS は 10 度以下の小角で観察する手法であるため、数 nm 以上の構造を計測するのに適している。コラーゲンの構造は Fig.2 に示すとおり、単一分子の長さがおよそ 300nm であり、これらがより合わさり、66nm の

微細構造を形成し、それらが更により合わさることによって、さらに大きな構造を形成していき、最終的にサブμmオーダーに達する。このように、SAXS はコラーゲンを始めとした高分子のナノーサブμmの構造を解析する方法として普及しており、信頼性の高い評価技術である。ただし、散乱が微弱なため、特に今回のような小さい試料、薄い試料においては、散乱を起こす分子数が少ないため、強い信号が得られず、計測に時間がかかる。また、レンズで絞れないため、分解能に限界がある。このため、画像化が難しい。散乱強度分布はFig.6のように試料によって散乱されたX線ビームをイメージングプレートで受光し画像化することによって行う。直進したX線ビームは遮蔽板によって遮断されており、イメージングプレートにおいては散乱光が検出される、得られた散乱像は、等方的な構造を持つ場合は回転対称が得られ、異方性を持つ場合はそれぞれの方向の構造を反映した散乱分布を持つため、プロファイルも等方的ではなくなる。本研究で用いたコラーゲン線維も異方性を持ち、線維長手方向、線維断面方向のプロファイルを抽出することによって、それぞれの方向の構造単位の大きさを抽出した。計測はSpring-8のビームラインBL40B2を用いた。カメラ長は４m、波長は１Åである。本ビームラインの高輝度光源を用いることで、微小な試料の解析を行うことが出来る。

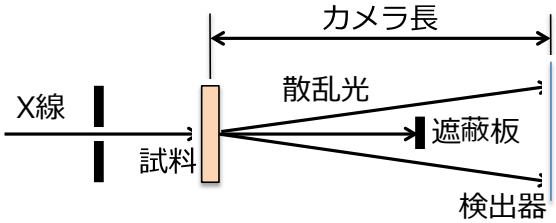
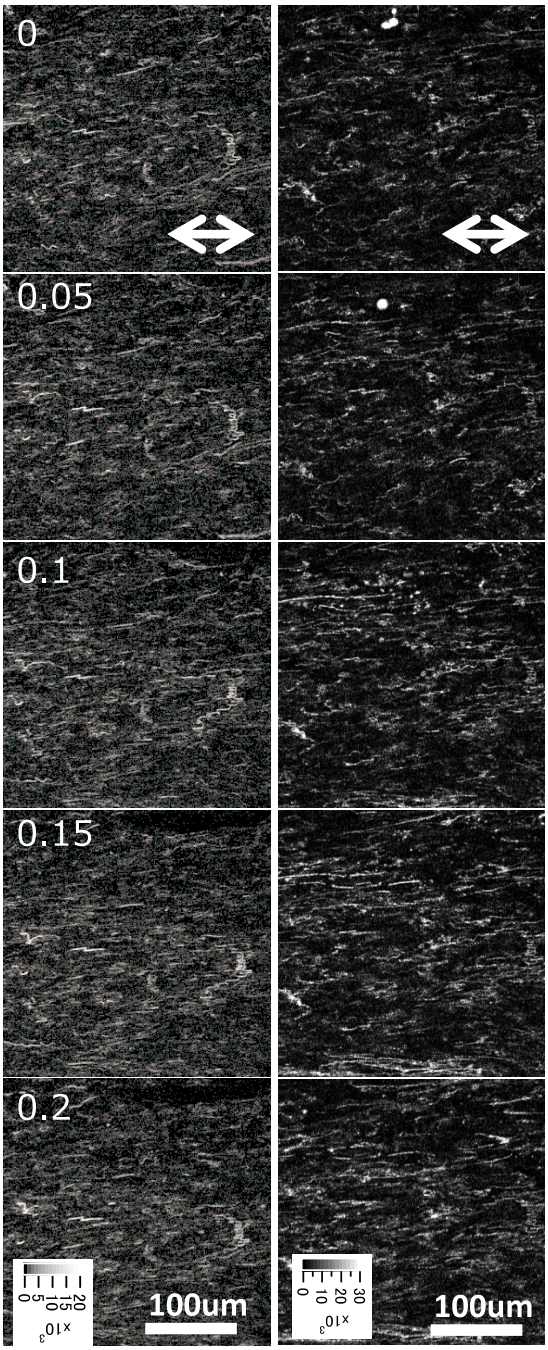


Fig.6　小角X線散乱光学系

４．実験結果

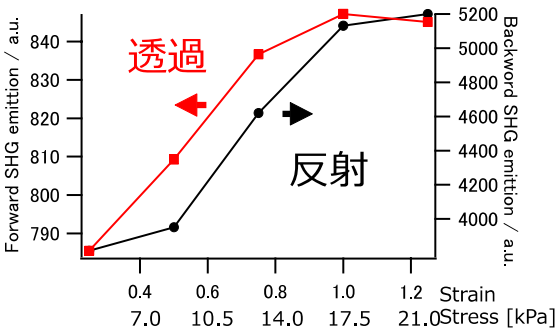
Fig.7.8 に電気化学法で作成したコラーゲンゲルの引張試験時のSHG顕微像とSHG光強度の変化を調べた結果を示す。透過側、反射側共に強度が増加しており、引張方向への配向度の増加が影響していると考えられる。また、透過反射強度比を比較すると、引っ張り試験の進行と共に反射側が相対的に増加していることがわかる。これは、クリープ変形による微結晶の分断によって、結晶サイズが小さくなったことに起因すると考えられる。また、変形が進み過ぎると、SHG の増加率が低くなる。このときのひずみ量はちょうど弾性領域と超弾性領域の境界領域にあたり、微結晶の配向が揃うことによる効果が飽和することに起因すると考えられる。更に変形が進むと、微結晶内部で分子の再配列が起こり、弾性領域程ではないにしろ、SHG 強度の上昇と、位相整合条件の変化による放射パターンの変化として現れると考えられる。Fig.9 に変形前後のコラーゲン線維の像の変化を示す。応力負荷前にはコイル状に観察された試料が、応力負荷によって伸ばされ、かつ、明るさは1.5倍に向上していることがわかる。本実験では、このような線維が多数より合わさったゲルを用いているため、この後超弾性域に入る前に試料は破断した。よって、超弾性域まで観察するためには、このような線維一本による引張試験を行う必要がある。

次に比較対象となる標準的な評価方法として、SAXS 像の引張変形による変化の観察を行った。Fig.10(a)に線維方向の散乱プロファイルを示す。変化がごく微小なため、Fig.10(b)に示すようにq値が0.028付近の強度を比較すると、引っ張り負荷の増加に伴い、強度が減少しており、線維方向の散乱角がより小角側へと移動したことが予想される。このことから、引っ張りによって引っ張り方向に線維の配向が揃い、線維方向の見かけの構造が粗大化しと考えられる。

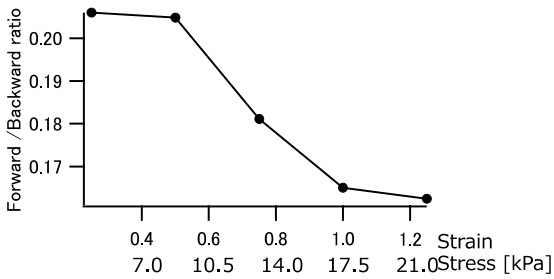


(a)透過 SHG 像　　(b)反射 SHG 像

Fig.7　引張試験下のコーラゲン SHG 顕微像

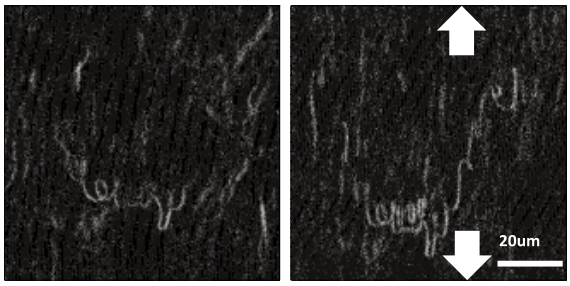


(a)透過、および反射 SHG 強度



(b)透過／反射 SHG 強度比

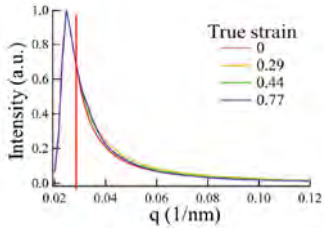
Fig.8　応力、ひずみによるのコーラゲン SHG 強度変化



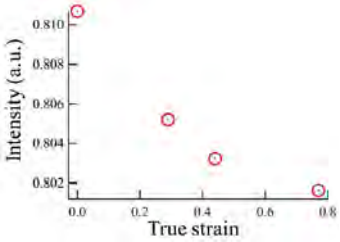
(a)ひずみ 0　　(b)ひずみ 0.15

Fig.9　応力負荷による線維形状の変化と SHG 強度の増加

次に架橋がコラーゲンに与える影響を SAXS を用いて計測した。架橋はゲニピンを用い、ゲニピン濃度を0ー3%へ変化させた時の SAXS 像の変化を観察した結果を Fig.11 に示す。その結果、Fig.11(a)に示す通り、線維方向の構造との相関は見られず、Fig.11(b)に示すように線維断面方向の構造は広角側へ変化し、微細化していることが分かった。これより、架橋の影響により、線維同士の間隔が狭くなったと考えられる。

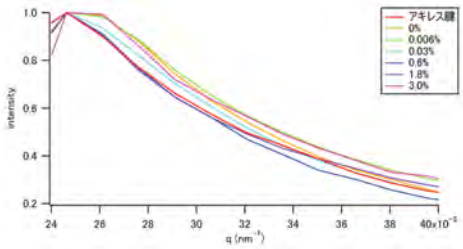


(a)線維方向散乱プロファイル

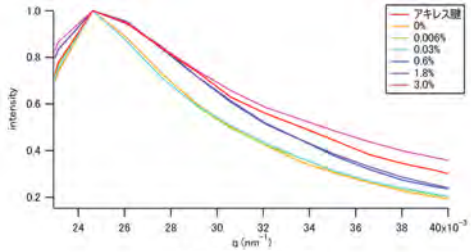


(b) q=0.028[nm^{-1}]における散乱強度

Fig.10　応力負荷による SAXS パターンの変化



(a)線維方向散乱プロファイル



(b)線維断面方向散乱プロファイル
Fig.11　架橋によるコラーゲンゲルの SAXS 計測

５．考察

SAXS 計測は観測する構造の大きさがギニエ領域に反映されるように、カメラ長、波長を最適化する必要がある。そのため、線維方向と線維断面方向で計測条件を変えることが本来必要だが、装置の占有時間の関係で現実的に不可能であった。それに対し、SHG 顕微鏡は、応力に対して SAXS と同じ計測領域でより高い感度を持つことが分かった。このことから、 SHG 顕微鏡は SAXS と比較し、応力をはるかに手軽に計測でることが分かった。しかも、空間分解能が高く、応力の方向も計測可能 [11)、12)]なことから、生体組織の応力分布の計測には SAXS より適している。ただし、架橋の影響を含めた計測が未だ不完全であり、SHG の位相整合条件や、偏光解析によって、これらの影響を除去出来ることで、SAXS を上回る応力解析技術となる可能性がある。

６．まとめ

本課題により、顕微鏡下で機械的な引張試験を行うマイクロデバイスが完成し、顕微観察結果と応力、ひずみの相関をとり、顕微下で非接触、非破壊の応力計測を行うための環境が整った。また、予備実験として、SHG 顕微鏡、および SAXS 下でのコラーゲン引張試験を行い、応力、ひずみとの相関を取得することに成功した。

謝辞

今回の研究は、中谷電子計測技術振興財団（現公益財団法人中谷医工計測技術振興財団）の助成により行われた。ここに深く謝意を表する。

参考文献

1) M. Kjaer, Physiol. Rev., 2004, **84**, 649-698.
2) P. Friedl, and E. B. Brocker, Cell. Mol. Life. Sci., 2000, **57**, 41-64.
3) M. Parsons, , E. Kessler, , G. J. Laurent, R. A. Brown, and J. E. Bishop, Exp. Cell. Res., 1999, **252**, 319-331.
4) R. L. Duncan and C. H. Turner, Calcif. Tissue Int., 1995, **57**, 344-358.
4) I. Freund, and M. Deutsch, 1986, Opt. Lett. **11**, 94-96.
5) G. B. Altshuler, N. R. Belashenkov, G. A. Martsinovski and A. A. Solounin, 1995, Proc. SPIE 1984, 6-10.
6) Y. Guo, P. P. Ho, A. Tirksliunas, F. Lui, and R. R. Alfano, 1996, Appl. Opt. **35**, 6810-6813.
7) E. Georgiou, T. Theodossiou, V. Hovhannisyan, G. Politopoulos, S. Rapti, and D. Yova, 2000, Opt. Commun. **176**, 253-260.
8) V. Hovanessian and A. Lalayan, 1997, Proc. Int. Cnof. Lasers **96**, 107-109.
9) P. C. Stoller, A. M. Rubenchik, K. M. Reiser and L. B. Da Silva, 2002, J. Biomed. Opt. **7**, 205-214.
10) X. Cheng, , U. A. Gurkan, C. J. Dehen, M. P. Tate, H. W. Hillhouse, G. J. Simpson, and O. Akkus, Biomaterials 2008, **29**, 3278-3288.
11) K. Yoshiki, K. Ryosuke, M. Hashimoto, T. Araki, and N. Hashimoto, 2007, Opt. Lett. **32**, 1680-1682.
12) K. Yoshiki, M. Hashimoto, and T. Araki, Jpn J., 2005, Appl. Phys., **44**, 1066-1068.

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

研究責任者　新潟大学工学部電気電子工学科
助　教　　崔　　森　悦

１．研究背景

近年、生体内の高精度且つ安定な 3 次元断層イメージング技術の研究が盛んに成されている。特に非侵襲な生体断層計測が可能な Optical coherence tomography (OCT)[1]は医療、生命工学など多くの分野で用いられている。従来の OCT 画像データ取得の形式は干渉計の参照ミラーの機械的走査による時間領域 OCT[2]または干渉スペクトルから深さ情報を得るフーリエ領域 OCT[3]に大別されている。時間領域 OCT では、機械的可動部が測定誤差と速度の低減の原因となり得る。またフーリエ領域 OCT では Full filed な計測には適用できず、フーリエ変換による位相共役像やバイアス成分に起因する SN 比の劣化などの問題がある。これらの状況に鑑み、我々は光コム干渉法[4]を提案し、機械的可動部とフーリエ変換演算のない干渉計測を実現した。しかし、この手法は、従来の時間領域 OCT と同様に干渉信号の強度分布情報から光の散乱や反射位置を可視化するため、深さ方向の分解能である干渉ピーク幅を十分微細化させる必要がある。高分解能化のために非線形光学効果を用いたスーパーコンティニウム光などの広帯域化光源[5]を用いて来たが、このような広帯域化技術は高価なレーザと非線形ファイバを要するためコストと実用性において課題が残る。

本研究は、以上の事情に鑑み光コム干渉法と正弦波位相変調法(SPM)[6]を用いて高精度な 3 次元 OCT の開発のための基礎的研究を目標とする。我々は、光コム干渉法による 3 次元形状計測技術と共に、新たに SPM による精密変位計測技術を導入し，干渉信号のゼロ位相点を検出することで光源の帯域幅によって制限される十数μm の深さ分解能の限界を超えたサブ nm 精度の計測を試みた。

先ず、コム干渉法の特徴である高次の干渉信号を用いることで、今までにない新しいタイプのフィゾー干渉計型低コヒーレンス干渉測定を実現した。この装置の利点は、共通光路を採用することにより従来のマイケルソン型干渉計に比べて格段に振動雑音を抑えることができる点である。次に、光コムの発生をピエゾ・アクチュエータによって操作されるファイブリー・ペロー(Fabry Perot: FP)共振器で実現した。この光源の利点は、簡便な構成で光コムが発生できる点と、最初から広帯域光源の導入が可能であるため、従来手法に比べて容易に広帯域光コムが得られる点である。また、FP 共振器に付加されたピエゾ・アクチュ

エータの駆動によって光コムの周波数間隔の掃引を実現した。この構成により干渉計側の機械的掃引を必要としない深さ方向のスキャンが可能となった。更に、低コヒーレンス干渉法に SPM による位相計測技術を組み合わせたことにより数 mm 以上の広いダイナミックレンジで nm の高精度な計測が可能になった事である。

本稿では、2 章に提案手法の主な技術に関する原理について述べる。次の 3 章に実験で用いた装置の構成について述べる。4 章では実験結果についてガラス膜の膜厚計測結果および平面ミラーの 3 次元平面形状計測結果について述べる。5 章に今後の展望について、当該研究から派生して今後発展が期待される空間周波数フィルタを用いた光コム計測と多波長逆伝搬法について述べる。最後に、6 章で本研究の総括を行う。

２．原理

本章では光コム計測法の基本原理と SPM による位相計測の原理について述べる。先ず、低コヒーレンス干渉法との違いについて説明し、光源のスペクトルが離散的多波長分布を持つ場合について議論する。

2.1　光コム干渉法の原理

低コヒーレンス干渉法では、光源の波長スペクトル分布 B(k)は、図１に点線で示したように波長が連続しており、スペクトル波長幅 W_λの連続スペクトル分布となっている。k は波数で、波長λと $k=2\pi/\lambda$の関係にある。図１の干渉計では、参照面であるミラーM からの反射光と測定対象からの反射光が干渉している。これらの２つの反射光の伝搬距離の差が光路差 L であり、干渉している光の波数をただ１つの k とすると、このとき光出器 PD で検出される干渉信号 $S_k(L)$は

$$S_k(L)=B(k)\cos(kL) \qquad (1)$$

と表現できる。白色干渉法で得られる干渉信号 $S(L)$は、すべての連続波長で生じている $S_k(L)$を k について連続的に足し合わせた信号となり、

$$S(L)=A(L)\cos\{\Phi(L)\} \qquad (2)$$

で表現する。すべての波数 k に対して $S_k(L)$の $\cos(kL)$が等しい値となるのは、光路差 L=0 の時だけである。よって、$A(L)$は $L=0$ の時に最大値をとり、かつ位相αは零となる。干渉信号 $S(L)$は、図１の点線で囲った部分に相当する。この特性から、参照面であるミラーM を平行移動させ、$L=0$ の位置を検出することによって測定対象面の位置を測定できる。この方法が低コヒーレンス干渉法の原理である。$A(L)$の波形は $B(k)$とフーリエ変換で関係づけられおり、$A(L)$の拡がりを半値幅 W_L で表現する。W_Lはスペクトル波長幅 W_λに逆比例する。図１に示すように、スペクトル分布 $B(k)$が中心波数 k_c を中心として左右に対称の分布であれば、$\Phi(L)=k_cL$ となる。

さて、次に従来の低コヒーレンス干渉法の光源が含んでいる連続波長成分から、図１の実線で示すように、一定の波数間隔Δk で波長を離散的に取り出した光源、すなわち光周波数コム光源を考える。この場合、離散的な M 個の波長は

$$k_m=k_0+m\Delta k \quad m=0,1,\ldots,M-1 \qquad (3)$$

と表現できる。(3)式を(1)式の k に代入すると、$S_k(L)$が離散的なとびとびの波数 k_m で生じているため、M 個の離散的な $S_k(L)$の $\cos(k_mL)$がすべて等しくなるのは、p を整数として$\Delta kL=2\pi p$ を満たす光路差 L の時となる。よって、これらの $S_k(L)$を足し合わせた干渉信号 $S(L)$は図１に示すように、$L=0$ の位置も含め、

$$L_p=p(2\pi/\Delta k) \qquad p=0,\pm1,\pm2,\ldots.. \qquad (4)$$

の光路差で $A(L)$がピーク値をとることになる。各ピークでの干渉信号の位相は$\Phi(L_p)=p(2\pi/\Delta k)k_0$

となる。この特性を用いれば、間隔Δk を走査しながら $A(L)$にピーク値が現れるΔk を検出することによって、(4)式から測定対象面の位置を表す光路差 L_p が得られる。ただし、用いているピークの p の値が既知であることが必要である。図１(b)の $S(L)$で、(II)の場合はΔk の値が(I)の場合より小さくなっている。Δk の変化に対する L_p の変化の大きさは、p の絶対値に比例する。また、$A(L)$のピーク値の大きさは、離散的に取り出された k_m を中心波数とする波長スペクトルの半値幅に依存して、p の絶対値が大きくなるにつれて減少して行く。

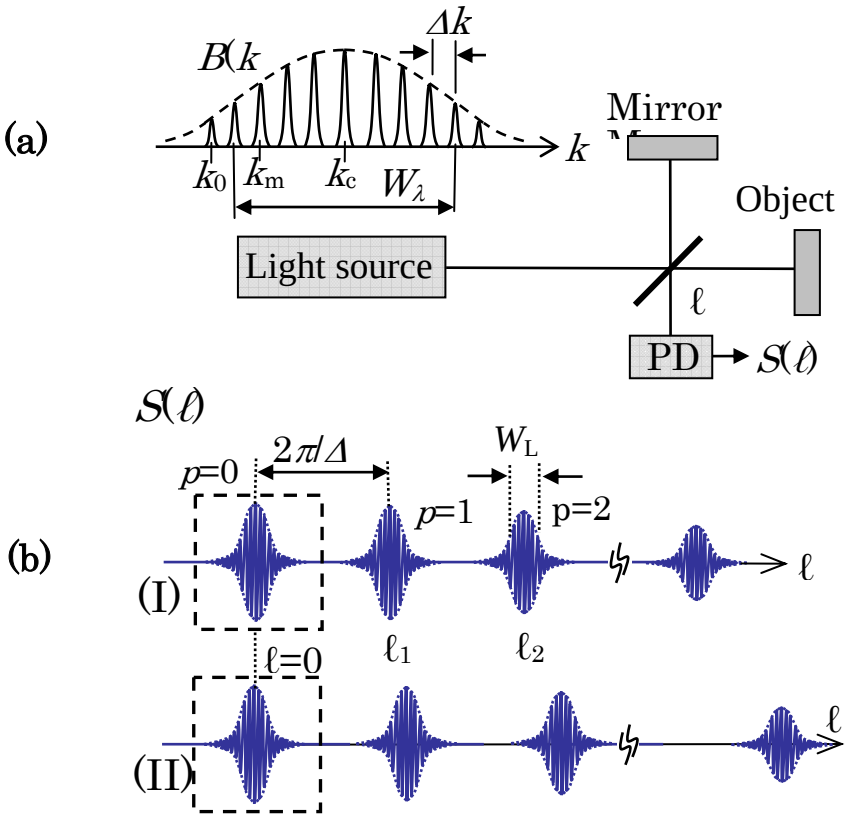


図１　光コム干渉法の原理、(a)スペクトルと干渉計、(b)干渉信号

2.2　SPM の原理

干渉位相を計測するために、参照アームの光路長を正弦波状に変調することで、位相が変調された干渉信号を得ることができる。SPM はこの位相変調信号をフーリエ変換によって解析することで雑音成分を除去する手法である。位相変調された干渉信号は（２）式から次のように表せる。

$$S(L,t) = A(L)\cos(2\pi k_c L + Z\cos(2\pi f_c t)) \qquad (5)$$

ここで、Z は位相変調の振幅、f_c は変調周波数である。位相$\alpha=2\pi k_c L$ は（５）式のフーリエ変換$F(f_c)=F[S(t)]$によって求められる。Z が既知であるならば、αは変調周波数成分 $F(f_c)$及び $F(2f_c)$を用いて次のように求まる。

$$\tan(\alpha) = \frac{|F(f_c)|/J_1(Z)}{|F(2f_c)|/J_2(Z)}\mathrm{sgn}(y),$$
$$\mathrm{sgn}(y) = \begin{cases} 1 & y \geq 0, \\ -1 & y < 0, \end{cases} \qquad (6)$$

ここで、$y=\{\mathrm{Re}[F(f_c)]J_1(Z)\}/\{\mathrm{Re}[F(2f_c)]J_2(Z)\}$であり

J_mは$|m|$次のベッセル関数である。Re[x]はxの実数を表す。理論的な数値解析により、位相が最も正確に求められるZの条件は、$J_1(Z)=J_2(Z)$の関係を満たすZ=2.6付近の時であり、位相の測定誤差は0.02rad以内であることが知られている[7]。SPMでは、変調周波数の逓倍成分のみを取り出すので、変調周波数より低い機械的振動などの雑音を取り除くことができる。従って、より安定で高精度な計測が可能となる。

３．装置の概要

図２に光コム干渉法を用いたフィゾー干渉計の概略を示す。Full-filed計測に対応するために、空間光学系で構成され、受光素子として２次元のCharge coupled device (CCD) イメージセンサが用いられた。また、CCDイメージセンサの代わりにPhotodetector(PD)を用いた１点計測にも対応可能である。

光コム光源はピエゾ・アクチュエータによって共振器長を走査できるFP共振器(FPE)によって構成された。共振器長は500μm以上掃引可能である。種光源としてはスーパールミネッセントダイオード(SLD)を用いた。光源の中心波長は840 nm、帯域幅は30nmであった。FP共振器による光コムのスペクトルを図３に示す。

フィゾー型共振器は、ビームスプリッタ(BS)とピエゾ素子(PZT)が取り付けられたガラス板(GP)の簡便な構成になっている。SPMによる位相計測のためにGPを正弦波状に振動する。変調周波数f_cは受光素子のフレームレートと同期が成されている。受光素子がPDの場合は、PDのサンプリング周波数を$8f_c$に設定した。また受光素子がCCDイメージセンサの場合はフレームレートを8fcに設定した。CCDイメージセンサはレンズ系によって測定物体面の波面を結像した。CCDからの垂直同期信号を基準として順序回路(SC)を用いて変調周波数f_cを生成し、ファンクションジェネレータ(FG)から正弦波状の駆動電圧をPZTに印加した。干渉信号と変調周波数の調整はSystem control（パソコン）で行われた。

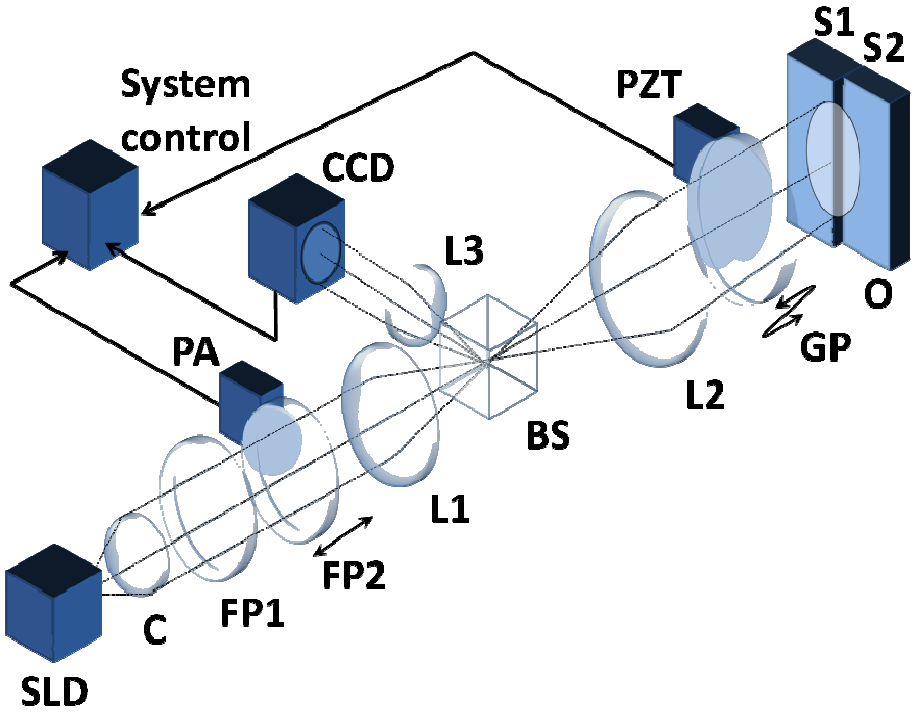


図２　フィゾー型干渉計を用いた光コム干渉計測装置

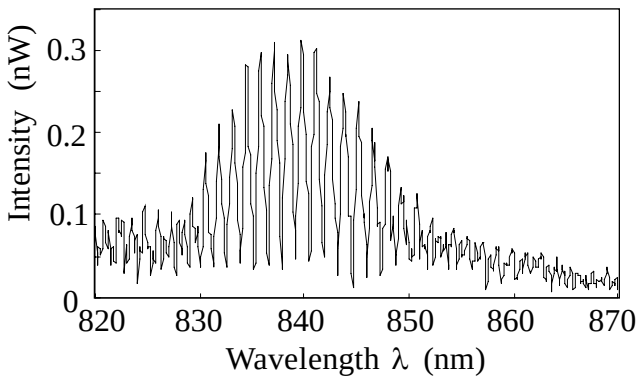


図３　FP 共振器による光コムスペクトル

４．実験結果

4.1　光コム干渉法の原理確認実験

先ず、図2(a)に示す構成を用いて、フィゾー型干渉計での低コヒーレンス干渉計測の原理確認実験を行なった。実験で観測した干渉次数は1次であった。FP共振器の共振器長をdとすると、$d=2\pi/\Delta k$であるので、(4) 式からきp次の干渉が観測される位置は$L_p=pd$であることが分かる。実験ではガラス板から共振器長とほぼ同程度離れた位置に測定物体を置いた。図４に測定物体を10μmずつ140 μmまで移動させながら光コム波数間隔掃引によって測定した干渉強度を示す。波数掃引はピエゾ・アクチュエータの駆動電圧を印加することにより行なった。図４の横軸は印加電圧である。

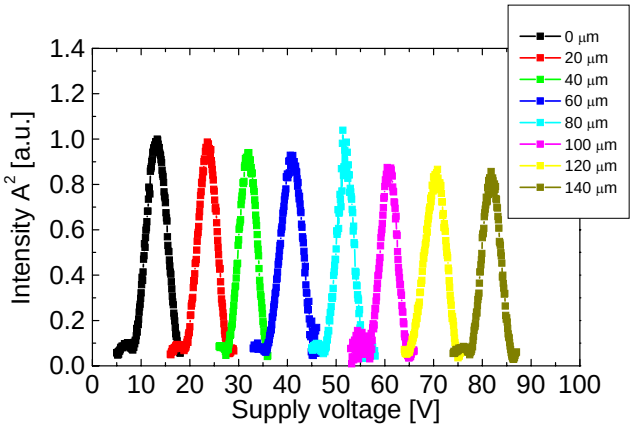


図4　測定物体の位置変動に対する1次の干渉強度ピークの推移

図４で示す様に、測定物体の位置に従って干渉ピークの推移が見られた。図５にピーク値を示す駆動電圧値と物体位置のプロットを示す。図５の結果から、１次の干渉において駆動電圧1 V当たり2.1 μmの深さ方向の掃引に相当することが分かった。プロットの線形誤差は1.58 μm以内であった。

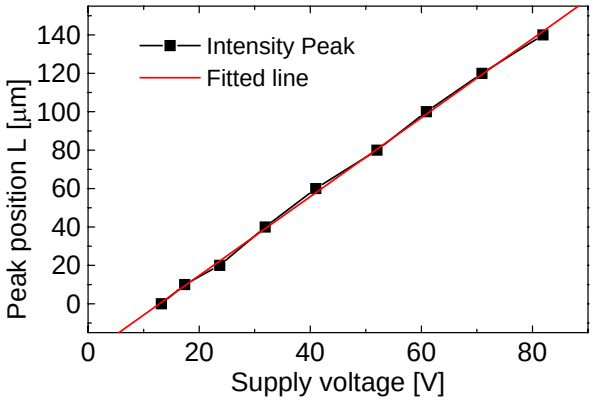


図5　FP共振器の駆動電圧に対するピーク位置の変動

次に、より制度の高い計測を行うために平面ミラーを測定物体として、その微小移動から反射位置の計測を行なった。図６に干渉ピーク値付近で測定物体を移動させた時の干渉強度分布及び位相分布を示す。位相分布はSPMによって求められた。位相変調周波数は125 Hzであった。分布の横軸は測定物体を動かしたPZTへの駆動電圧である。正確な反射位置は強度のピーク付近で位相が零になる位置となる。図６では、29.5 V付近が正確な反射位置を示している。この実験において、1 VのPZT駆動は約95 nmに相当し、干渉位相分布の9回の繰り返し測定による繰り返し誤差は0.2 radであった。長さに換算すると凡そ27nmであるため、提案方式による位相計測によって測定物体の反射位置を30nm以下の精度で求めることができることが示された。

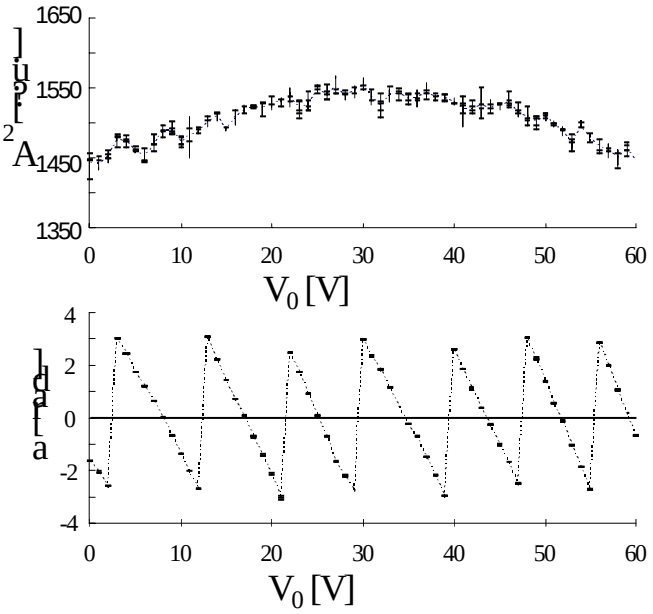


図6　干渉強度分布と位相分布

4.2　ガラス膜の膜厚計測

本研究で提案するシステムでの OCT の実現には表面の位置計測だけでなく、内部の断層の反射及び散乱位置が計測できる必要がある。そのため OCT 応用への基礎実験としてガラス膜の膜厚計測を行なった。測定物体には厚さ 0.08 から 0.12 mm までの分布を持つガラス膜を用いた。測定した物体の表面及び裏面の干渉強度分布を図 7 に示す。表面と裏面のピーク位置はそれぞれ L_{I1}= 8.6 μm と L_{I2}= 128.4 μm であった。測定された膜厚は 840nm での SiO_2 の屈折率が 1.45 であることを考慮すると 82.6μm と見積もられた。図 8 にそれぞれの物体面での干渉ピーク付近の強度分布及び位相分布を示す。表面では干渉強度のピーク位置 L_I 付近で干渉位相が零になる位置が正確な反射位置となる。裏面では、屈折率が高い媒質から空気層への反射であるため、反射による位相のずれが生じず、結果的に干渉位相はπだけずれる。従って裏面の正確な反射位置は位相がπとなる位置となる。以上の実験結果から光コムの波数間隔掃引による膜厚計測が可能であることが示された。

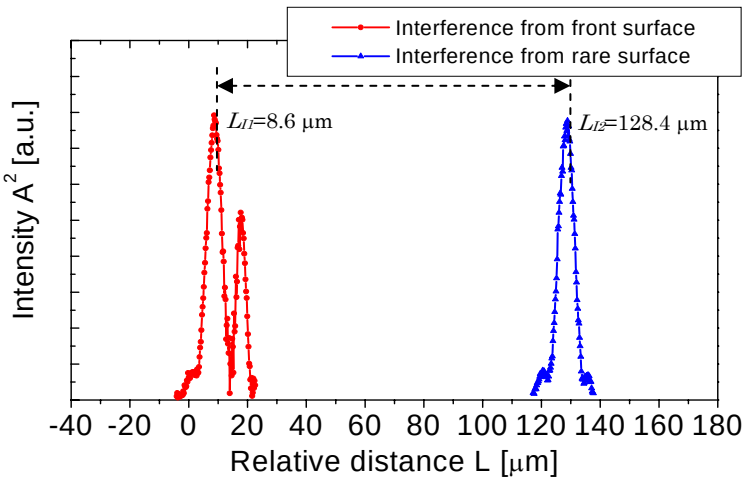


図 7　ガラス膜表面及び裏面の干渉強度分布

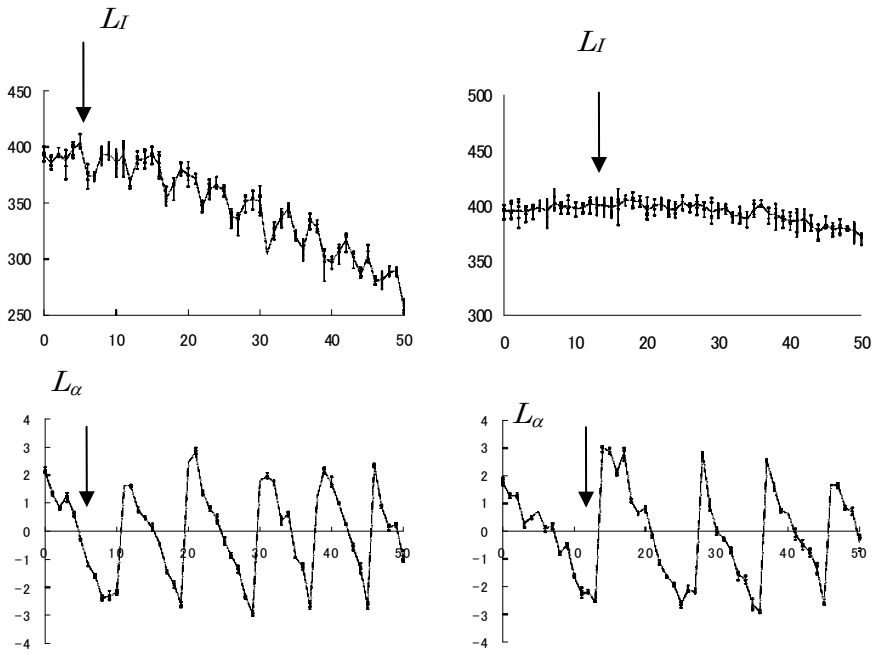


図８　ピーク値付近の強度分布と位相分布、(a)表面、(b)裏面

4.3　３次元 Full-filed 計測

次に、図２(b)に示す Full-filed 計測が可能な構成を用いて計測を行なった。CCD イメージセンサ（IMPERX 社製、ICL-B0620U）の垂直同期信号を変調周波数の８分周に同期させ、８枚の２次元干渉縞から２次元位相分布及び強度分布を得た。FPE の間隔を走査することによって深さ方向に２次元干渉縞を逐次的に生成することで３次元の形状情報を得ることが可能になった。図９に FPE のピエゾ・アクチュエータの駆動電圧に対する２次元干渉縞の変化を示す。図 10 に各駆動電圧に対応する干渉縞の強度の平均をプロットしたグラフを示す。図から 24V のときに最もコントラストが最大になったことが分かる。これは駆動電圧 24V に対応する FPE の間隔から光コムの波数間隔が決まり、(4)式から求まる光路差上に物体が位置することを示している。実際の応用においては駆動電圧に対する測定位置を特定する必要がある。今後の課題としては安定な FPE 間隔の掃引と、駆動電圧と測定位置の対応を正確に割り出す必要がある。干渉強度ピークの半値幅は約 15 μm と推定される。それは深さ方向の分解能は干渉強度のピーク幅に依存するためであるが、位相計測を導入することでより精度の高い計測が実現できる。実用段階の前提としてコヒーレンス長の範囲内で正確な２次元位相分布が得られなければならない。図 11 及び図 12 に 30「m の段差を持つゲージブロックの段差形状計測結果を示す。図 11 に示すように物体の凹面と凸面の位相分布を SPM によって求めることができた。また、図 12(a)は FPE 掃引によって得たコントラスト最大点を抽出して構成した３次元形状、(b)はコントラスト最大点に最も近い位相０点を抽出して構成した 3 次元形状である。SPM 導入によって位相 0 点を抽出したことで、測定誤差（平坦度の標準偏差）が 2.37 μm から 0.98 μm まで改善した。深さ方向の強度ピークの分解能が十数μm オーダであっても、サブμm から nm オーダの計測が可能であることが示された。

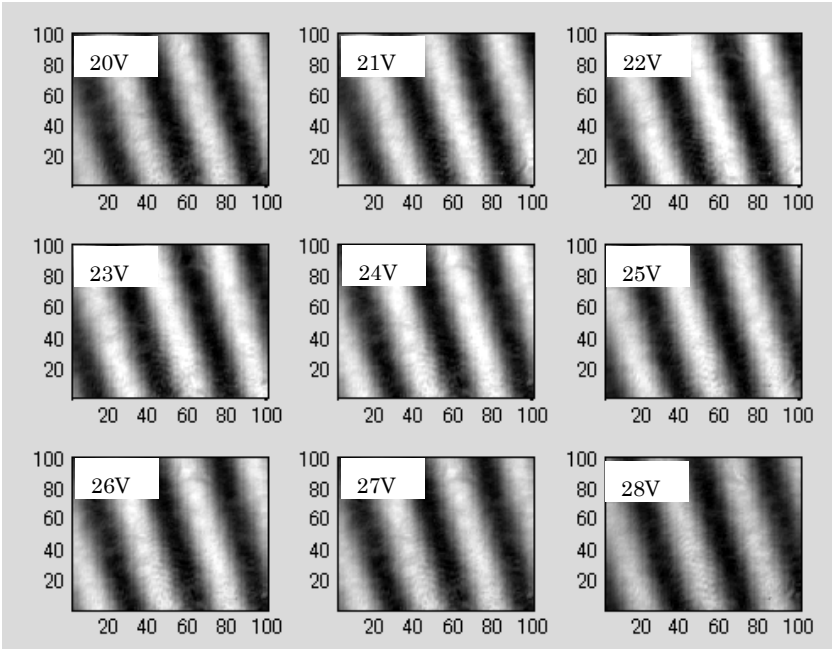


図９　FPE の間隔掃引による２次元干渉縞の変化

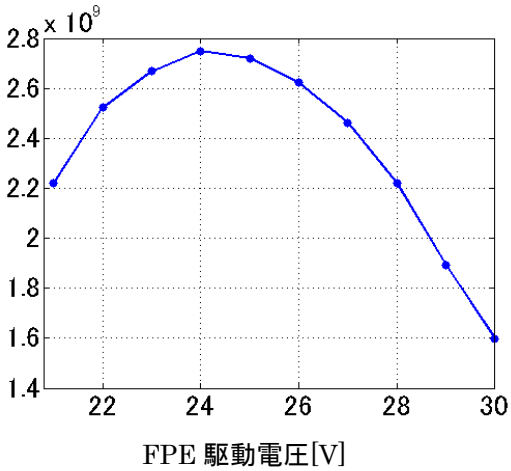


図 10　干渉強度の平均値のプロット

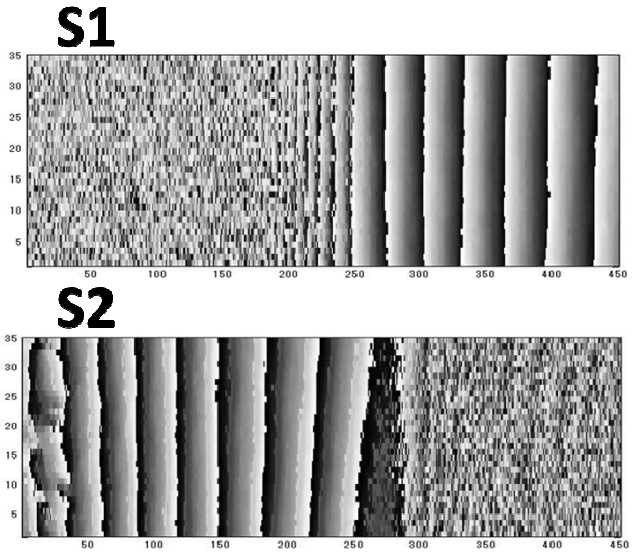


図 11　段差を持つゲージブロックの位相分布

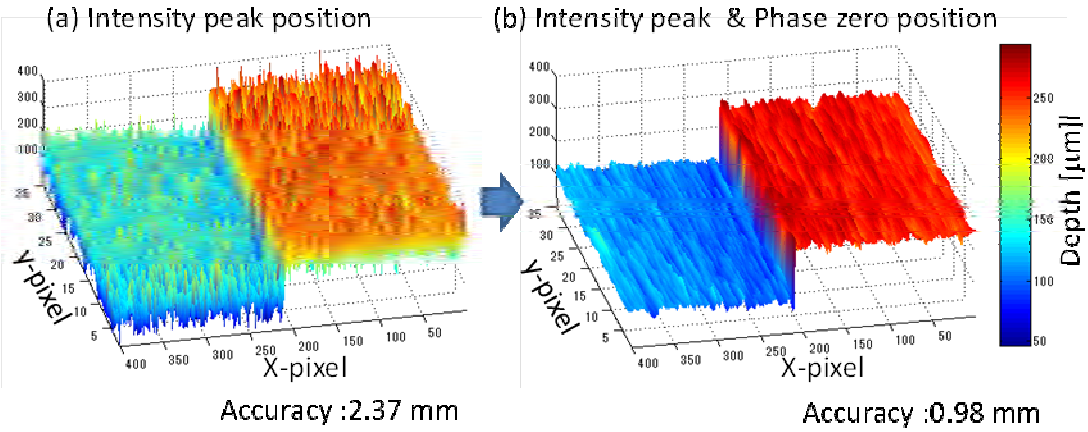


図 12.　ゲージブロックの 3 次元段差形状計測結果

５．今後の展望

本研究は、光コムの波数走査によって 3 次元表面形状が計測できる段階まで発展した。今後は、更に断層構造の 3 次元可視化と、mm オーダのマクロ計測及び nm オーダのミクロな計測の融合技術を確立する必要がある。現時点では波数間隔掃引によるマクロな視点での計測と SPM によるミクロな位相計測は分離しており、1 回のスキャンで同時に実現することが困難である。この点に鑑み、今後は測定速度を含む実用化へ向けた試みが必要である。また、生体などの散乱体における断層形状計測実験も行う必要がある。以上の様に今後の課題は、①マクロ的計測とミクロ的計測の効率化及び高速化、②生体計測実験の実施を挙げることができる。

本研究の派生研究として、光コムをフーリエ光学系と空間周波数フィルタにより生成し干渉計測へ応用する研究がスタートした [8]。これは、光コム計測を用いる時に課題となっている光源の広帯域化と波数間隔走査を容易に実現できる方法として提案された。本研究の光コム掃引が時間的な領域の掃引であるのに対し、この研究は空間周波数領域の掃引によって制御を行うため、より自由度が高い光源の掃引が可能となる。また光コムの対称的波数掃引による干渉位相の変化を計測する実験を行なっている。

もう一つの派生研究としては、多波長光源を利用した光場逆伝搬法の研究が進められている。本研究は Swept-source 的な OCT と同様な波数掃引を行う手法であるのに対し、この研究は周波数領域での Spectral な OCT に属する手法である。従来のフーリエ変換法の分解能限界、位相共役像、及びバイアス成分による精度の低下を解決できる方法として提案され、現在研究が進められている [9]。

６. まとめ

FP 共振器型光コム発生器とフィゾー型低コヒーレンス干渉計を構築し、測定物体の膜厚計測及び 3 次元表面形状計測を行なった。膜厚 82.6 μm のガラス膜を、繰り返し誤差約 30 nm 以内で計測できた。また、現時点において Full-filed 計測を実現し、測定物体の 3 次元表面形状計測が可能となった。今後の課題としては SPM による位相計測と FPE 間隔掃引による強度分布の計測を一体化し、より高速で効率の良いマクロな計測とミクロな計測の同時計測が可能なシステムを構築することである。また、生体のような散乱体に対する断層計測実験も計画している。更に、本研究のアイディアを起点として、空間周波数フィルタを用いたコム光源による干渉計測と多波長逆伝搬法を用いたスペクトラル干渉計測技術の派生研究が成されている。

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 21 年度技術開発研究助成によって行われました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

[1] J.G. Fujimoto, “Optical coherence tomography: Principle and Applications,” Rev. Laser Eng., Vol.13 No.10, pp. 635-642.

[2] D. Huang, E.A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, “Optical coherence tomography,” Science, Vol. 254, Issue 5035, pp. 1178-1181.

[3] G. Hausler and M. W. Lindner, ““Coherence Radar” and “Spectral Radar”—New Tools for dermatological diagnosis,” J. Biomed. Opt. vol. 3, No. 1, pp. 21-31.

[4] S. Choi, M. Yamamoto, D. Moteki, T. Shioda, Y. Tanaka, and T. Kurokawa, "Frequency-comb-based Interferometer for Profilometry and Tomography,” Opt. Lett., Vol.31, No.13, pp.1976 – 1978.

[5] S. Choi, N. Tamura, K. Kashiwagi, T. Shioda,

Y. Tanaka, and T. Kurokawa "Supercontinuum Comb Generation Using Optical Pulse Synthesizer and Highly Nonlinear Dispersion-Shifted Fiber," ,Jpn. J. Appl. Phys., Vol.48, pp.09LF01.
[6] O. sasaki and H. Okazaki, “Sinusoidal Phase Modulating Interferometry for Surface Profile Measurement,” Appl. Opt., Vol. 25, pp.3137-3140.
[7] O. Sasaki and H. Okazaki, “Analysis of Measurement Accuracy in Sinusoidal Phase Modulating Interferometry,” Appl. Opt. Vol. 25, pp. 3152-3158.
[8] S Choi, H Kato, O Sasaki, and T Suzuki, “Frequency comb generator using spatial frequency optical filter and its interferometric characteristics,” Proc. of OIE’11, Japan-Finland joint conference, Turuku, (2011).
interferometric characteristics
[9] K. Otsuki, S. Choi, O. Sasaki, T. Suzuki., "Profile measurement based on spectral interferometer with multi-wavelength back-propagation methods", Proc. of SPIE, Photonic Asia, Beijing, (2010).

本研究に関わる論文及び学会発表等

[1] S. Choi, J. Hukumoto, O. Sasaki and T. Suzuki, “Multi-frequency Sweeping Sinusoidal Phase Modulated Fizeau Interferometer for OCT,” Proc. of OECC2012, 5F1-2, (Pusan), 2012.
[2] S.Choi, H. Miyatsuka, O. Sasaki, T. Suzuki, "Profilometry using Fizeau interferometer based on optical comb interferometry and sinusoidal phase modulation method," Proc. of SPIE, Photonic Asia, Beijing, (2010).
[3] 宮塚英隆，崔森悦，佐々木修己，鈴木孝昌,“光コム干渉法と正弦波位相変調法を用いたフィゾー干渉計” 第 57 回応用物理学関係連合講演会、19a-J-12. (2010).
[4] 佐々木修巳，“白色干渉法から離散型多波長干渉法への発展--参照面の走査を必要としない白色干渉法（特集 白色干渉計測技術),” Optical alliance 21(3), pp.24-27, (2010).

MRI による定量性を持った機能イメージング剤の開発

研究責任者　京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻
重合化学分野
助　教　　田　中　一　生

１．はじめに

生体内の物質輸送や反応を計測することは基礎研究から疾病原因の解明、臨床診断など、生物学上様々に有用な情報を与えてくれる。特に、生体反応に応答して物性を変える分子はプローブとして標的の反応の分子レベルの情報を与えてくれる。また、新しい測定原理でシグナルの増減を示す物質は、今までとは切り口の異なる情報を与えてくれると期待される [1)~4)]。したがって、新規の概念に基づく分子プローブの開発は重要性が高い。

MRI は、非侵襲、リアルタイムに測定が可能で、測定深度が高いという特徴を有している [5)]。分子プローブを用いて、MRI のシグナルの制御系を構築することで、物質局在以上の生体情報の抽出が可能となると期待できる。^{19}F NMR は、天然では他の同位体が存在せず、測定感度は ^{1}H NMR の約 80%と、多核 NMR としては高感度という利点を持つ。また細胞等の生体内条件での測定に用いる場合、周辺にフッ素原子がほとんど存在しないことから、バックグラウンドノイズが低い。さらに、^{19}F MRI では造影剤上のフッ素原子核を直接測定するため、強度の数量化が容易である。これらの長所から、近年、フッ素原子を含有した化合物をイメージングプローブとして用いて撮像を行う ^{19}F MRI が注目を集めている。

一つの生体反応を異なる二つの測定手法で追跡することができれば、お互いのシグナル変化を比較することによって、情報の正確性を向上させることができる。逆に、片方の測定手法では検出が難しい場面においても、もう片方のシグナルを追跡することで検出を続けることもできる。ここで、蛍光法はシグナルの強度の定量化が容易である。特に、小動物レベルの実験を行うには最も強力な測定技法のひとつである。そこで本研究では、^{19}F NMR シグナルと蛍光発光を一つの酵素反応で同時に追跡することで、定量的検出が可能な機能性 MRI 造影剤の開発につながると考えた。

したがって、本研究では、^{19}F MRI を用いて、酵素反応を定量することが可能な分子プローブの合成を目指した。特に、蛍光法でもシグナル変化を同時に追跡することで、情報の正確性を上げる仕組みの開発に取り組んだ。以下、プローブの動作原理、本研究で行った操作と実験結果について述べる。

２．実験操作

2.1　水溶性高フッ素化デンドリマーの合成

一般に高フッ素化物は溶媒への溶解性が低い。一方、高感度の検出を行うには電子的に等価なフッ素原子を一分子中に集積しなくてはならない。このトレードオフ関係の解決のために、かご型シルセスキオキサン（POSS）というデンドリマー型分子に対し、にトリフルオロアセチル基を導入した高フッ素化化合物を合成した（図１）。このフッ素化 POSS は高い水溶性を示し、フッ素原子を多数分子内に有することから、既存の ^{19}F MRI 造影剤よりも 10 倍程度高い感度で検出が可能であった。さらに、pH 変化やプロテアーゼ添加において耐性を示し、血清中でも沈殿や凝集などが起こらなかったことから、生体からも安定してシグナルを発信することが可能であると考えられる。次に、ここで得られたフッ素化 POSS にスイッチ分子を導入することで、生体内の様々な変化の検出に対応したプローブを作成することを目指した。

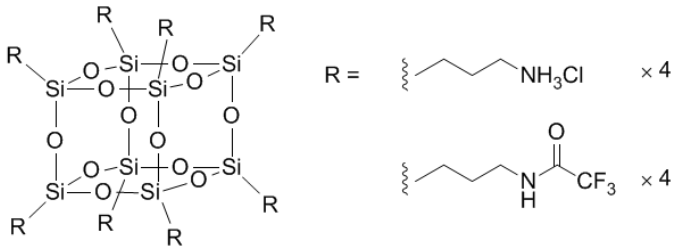


図１　フッ素化 POSS の構造式

2.2　プローブの作動原理と分子デザイン

がん細胞では特異性の低いリン酸加水分解酵素が過剰発現していることが報告されている。したがって、リン酸加水分解酵素活性を定量できれば、がん細胞の早期発見に役立つと考えられる[6]。よって、本研究ではりん酸加水分解酵素の活性の定量的な測定に応用可能な ^{19}F NMR/蛍光バイモーダルプローブの合成を目的とした[7]。NMR 測定において、固体状態では、溶液状態に比べ、化学シフトの異方性が平均化されず、また、局所磁場の不均化によって T2 緩和が加速され、感度が大幅に低下する。我々はこれまでの研究で、この現象を利用して、シリカナノ粒子表面にフッ素含有化合物を固定化し、擬似的な固体状態を作り出すことで、NMR シグナルの制御を行う手法を構築した（図２）。ナノ粒子表面に固定化されたフッ素含有化合物は、^{19}F NMR 測定において感度が低下し、シグナルが検出されない。生体内反応などの特定の刺激によってナノ粒子表面から水中に放出されることによって、分子運動が活発化し、シグナルが検出されるようになる。ここで、リンカーを構成する分子としてリン酸ケージされたフルオレセインを用いた。両端に存在する水酸基をリン酸エステルにより修飾するとスピロ構造を形成することで、フルオレセイン特有の緑色の蛍光発光は抑えられる。リン酸化水分解酵素の働きによりこれらのリン酸エステル基が除去されると、ラクトンの開裂に伴い、強い蛍光発光が観測される。したがって、リン酸加水分解酵素がリン酸部位を開裂させることで、高フッ素化 POSS とフルオレセインの放出が同時に起こることから、^{19}F NMR シグナルと蛍光発光の増加として酵素反応を検出することができると考えられる。

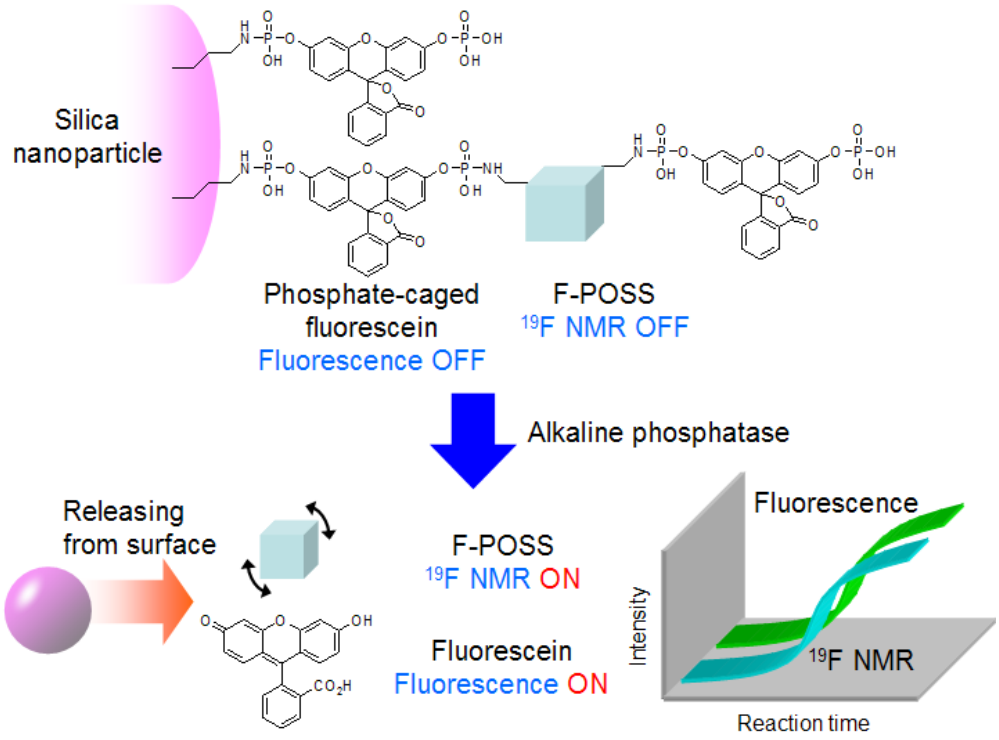
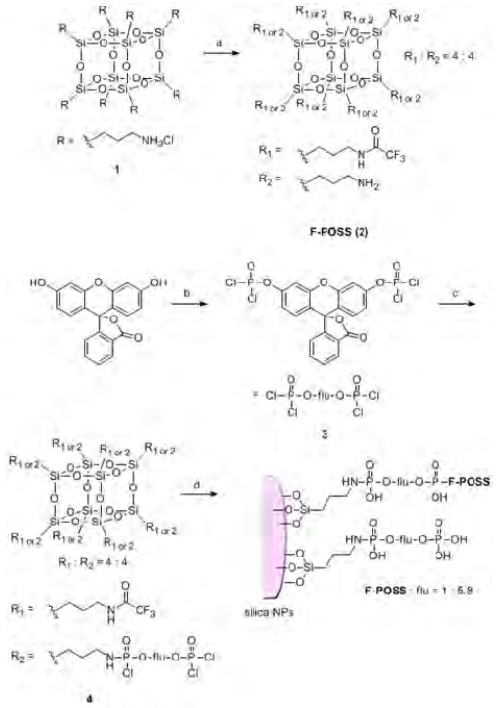


図２　プローブの動作機構

2.3　プローブ合成

プローブの合成はスキーム１のように行った。まず、ナスフラスコにメタノール 800 mL 及び濃塩酸 135 mL を入れて混合し、そこに 3-アミノプロピルトリエトキシシラン 100 mL を一気に添加した。その後、室温で 72 時間攪拌したところ、白色沈殿が生成した。この沈殿をろ過し、メタノールとジエチルエーテルで洗浄することにより、オクタアミノ POSS の塩酸塩を得た（18.8 g、収率 30%）。同定は、^{1}H・^{13}C・^{29}Si NMR で行い、特に ^{29}Si NMR で–66 ppm に一本線が得られることで T8 構造であることを確認した。もし、かごの形成が不完全でシラノールが残っている場合、–57 ppm 付近にピークが観測される。質量分析はジヒドロキシ安息香酸をマトリックスとして MALDI-TOF-MS により測定した。これ以外のマトリックスではあまり感度よくピークが観測されなかったことと、ケイ素の同位体のために観測されたピーク自体も分裂していた。これらのスペクトル測定の結果より不純物は確認されなかった。得られたオクタアンモニウム POSS に対し、4 当量のトリフルオロ酢酸エチルをメタノール中、トリエチルアミン存在下室温で 3 時間反応させた。^{1}H NMR により POSS の 2 位のプロトンのシフトからアミド結合生成量を算出し、反応が終結したことを確認した。溶媒を除去することで高フッ素化化合物とトリエチルアミン塩酸塩の混合物を得た。次に、3-アミノプロピルトリエトキシシランとテトラエトキシシランをエタノール中、アンモニア水を触媒として、ゾル—ゲル反応を行い、表面にアミノ基を有するシリカナノ粒子を作製した。フルオレセインに過剰量のオキシ塩化リンを加え、1 時間加熱還流した。反応液を真空乾燥した後、クロロホルムに溶解させ、トリエチルアミン存在下、上述のフッ素化 POSS と反応させた。この反応液をアミノ基が提示されたシリカナノ微粒子に作用させた。シリカナノ微粒子のクロロホルム分散液は室温中、1 時間撹拌した後、遠心沈降させた。クロロホルム、水、メタノールによる洗浄により目的のプローブを得た。



Reagents: (a) ethyl trifluoroacetate, triethylamine, methanol, 83%; (b) fluorescein, phosphorus oxytrichloride, triethylamine, chloroform, quant.; (c) F-POSS, chloroform; (d) amino-modified silica nanoparticles, chloroform.

スキーム１ ナノ微粒子型プローブの合成

2.4 キャラクタリゼーション

得られた高フッ素化 POSS 修飾シリカナノ粒子は水に高い分散性を示した。また、透過型電子顕微鏡の写真より、粒子間の癒着などはほとんど起こっていないことが示された（図３）。また、分散液を ^{19}F NMR で測定したところ、シグナルが観測されなかった。また、分散液からはほとんど蛍光発光は測定されなかった。5 M の水酸化ナトリウム水溶液でシリカナノ粒子ごと溶解させると、^{19}F NMR 測定において、－75 ppm 付近に鋭いピークが観測された。このことから、高フッ素化デンドリマーがナノ粒子上に導入された状態では、分子運動が抑制され、NMR シグナルが消失することが確認された。また、490 nm の光を照射すると 515 nm にピークトップを持つ蛍光発光が得られた。これらは、高フッ素化デンドリマーが溶液中に放出されることで、分子運動が回復し、^{19}F NMR シグナルとして観測できることと、フルオレセインの放出が起こったことを意味する。シリカナノ粒子ごと溶解させた溶液の ^{19}F NMR のシグナル強度から、フッ素原子の濃度を計算し、高フッ素化デンドリマーの導入量を測定したところ、81 nmol/mg と見積もられた。同様に、溶解液の紫外可視吸収スペクトルより、フルオレセインの導入量は 471 nmol/mg であることが分かった。

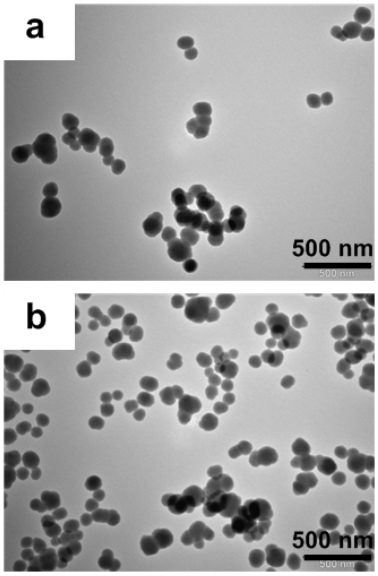


図３ (a) 修飾前 (b) 修飾後の透過型電子顕微鏡写真

３．結果と考察

3.1 酵素活性の定量

PBS 緩衝液中（pH = 7.4）で、リン酸加水分解酵素存在下、37 °C でプローブを反応させた。1 時間後に ^{19}F NMR を測定したところ、－75 ppm 付近に単一のピークが観測された（図４）。一方、酵素を加えなかった場合、NMR のシグナルが観測されなかった。蛍光強度についても同様に、酵素添加により発光強度が増大したが、酵素を含まない試料からは反応後でも発光はほとんど得ら

れなかった。この結果はプローブがリン酸加水分解酵素を検出可能であることを意味している。さらに、酵素濃度を変化させ、シグナルの増大速度を比較した（図５）。蛍光と ^{19}F NMR の両方で酵素濃度の上昇とともに、シグナル増大速度も増加した。横軸に酵素濃度、縦軸に増大速度をプロットすると直線関係が得られた（図６）。この直線を検量線として、濃度未知の試料の活性を測定することで、本研究で合成したプローブの有効性の検証を行った。

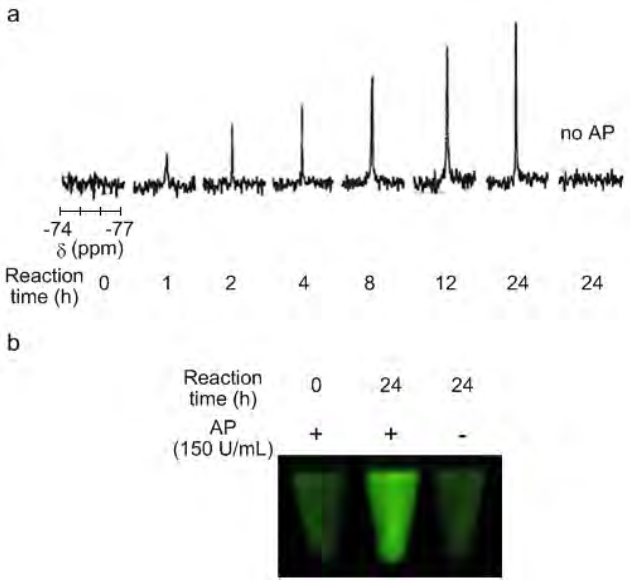


図４　(a) 時間経過による溶液の ^{19}F NMR シグナルの増大と (b) 蛍光発光の変化

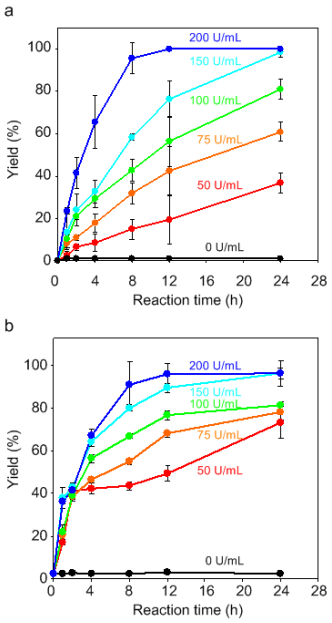


図５　(a) 溶液の ^{19}F NMR シグナル強度と (b) 蛍光発光強度の酵素量を増加させた時の時間変化のグラフ

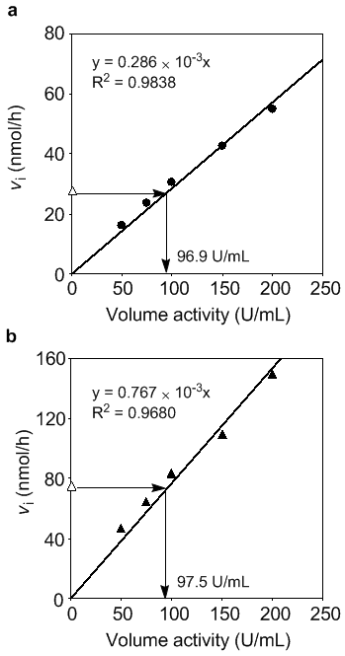


図６　図５の結果より得られた (a) ^{19}F NMR、(b) 蛍光発光における検量線に細胞破砕液からの測定値をフィッティングさせた結果

3.2　細胞内での酵素活性の定量

HeLa 細胞の破砕液中のリン酸加水分解酵素の定量を行った。まず、*p*-ニトロフェニルリン酸の加水分解より活性を求めると 95 ± 9 U/mL であった。次に、先ほどと同様にプローブを用い、反応を行った。そこから得られた値を図 5 にフィッティングすることで、^{19}F NMR からは 97 U/mL、蛍光強度の増加からは 98 U/mL という値が算出された。以上のことから、本研究で開発したプローブは一つの反応を ^{19}F NMR と蛍光で同時観測が可能であることのみならず、それぞれの方法で定量が可能であることが示された。

４．結論

今回、リン酸化水分解酵素を標的とし、シリカナノ微粒子を機能性分子により修飾したものを用いることで ^{19}F NMR/蛍光バイモーダルプローブの合成を行った。得られたプローブを用いるとそれぞれの検出手法でリン酸化水分解酵素の活性を定量することができた。ここで得られたプローブはがん細胞の早期発見への応用が期待できる。さらに、本研究戦略はリンカー部位を変えることで様々な生体反応や環境変化についても対応できると考えられることから、汎用的なプローブの開発につながると期待される。

謝辞

本研究の一部は、財団法人中谷電子計測技術振興財団の助成により行われた。

参考文献

(1) Tanabe, K., Harada, H., Narazaki, M., Tanaka, K., Inafuku, K., Komatsu, H., Ito, T., Yamada, H., Chujo, Y., Matsuda, T., Hiraoka, M., and Nishimoto, S. (2009) Monitoring biological one-electron reduction by ^{19}F-NMR: Hypoxia selective activation of ^{19}F-labeled indolequinone derivative. *J. Am. Chem. Soc. 131*, 15982–3.

(2). Tanaka, K., Kitamura, N., Takahashi, Y., and Chujo, Y. (2009) Reversible signal regulation system of ^{19}F NMR by redox reactions using a metal complex as a switching module. *Bioorg. Med. Chem. 17*, 3818–23.

(3) Tanaka, K., Inafuku, K., and Chujo, Y. (2008) Ratiometric multimodal chemosensors based on cubic silsesquioxanes for monitoring solvent polarity. *Bioorg. Med. Chem. 16*, 10029–33.

(4) Tanaka, K., Kitamura, N., Naka, K., and Chujo, Y. (2008) Multi-modal ^{19}F NMR probe using perfluorinated cubic silsesquioxane-coated silica nanoparticles for nonitoring enzymatic activity. *Chem. Commun.* 6176–8.

(5) Tanaka, K., Kitamura, N., Naka, K., Morita, M., Inubushi, T. Chujo, M., Nagao, M., and Chujo, Y. (2009) Improving Proton Relaxivity of Dendritic MRI Contrast Agents by Rigid Silsesquioxane Core. *Polym. J. 41*, 287–92.

(6) Tanaka, K., Kitamura, N., and Chujo, Y. (2010) Biodegradable main-chain phosphate-caged fluorescein polymers for the evaluation of enzymatic activity. *Macromolecules 43*, 6180–4.

(7) Tanaka, K., Kitamura, N., and Chujo, Y. (2011) Bimodal Quantitative Monitoring for Enzymatic Activity with Simultaneous Signal Increases in ^{19}F NMR and Fluorescence Using Silica Nanoparticle-Based Molecular Probes. *Bioconjugate Chem.* 2011,22,1484−1490.

(8) Heavy Metal-Free 19F NMR Probes for Quantitative Measurements of Glutathione Reductase Activity Using Silica Nanoparticles as a Signal Quencher Tanaka, K., Kitamura, N., Chujo, Y. (2012) Bioorg. Med. Chem. 20, 96-100.

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明

研究責任者　東京大学医学系研究科循環器内科
東京大学システム疾患生命科学による先端医療開発拠点
※(旧)東京大学大学院医学系研究科循環器内科
特任准教授　　西　村　　智

１．目的

心筋梗塞や脳卒中など動脈硬化性疾患の重大なリスク要因として、内臓肥満とインスリン抵抗性を基礎とするメタボリックシンドロームが注目されている。肥満に伴い蓄積した内臓脂肪は多様なアディポサイトカインを分泌する等、インスリン抵抗性や動脈硬化の発症に必須の役割を担っていると考えられる。しかし、脂肪組織の肥満における役割は必ずしも明らかではなく、脂肪組織が臓器としてどのように機能異常を起こすのか、その分子機構はよく分かっていない。

最近の研究により、心筋梗塞や脳卒中などの原因となるメタボリックシンドロームや動脈硬化、さらに悪性腫瘍は慢性炎症を本態とすることが明らかになってきた。例えば、メタボリックシンドロームでは、遺伝子素因に加えて、内臓肥満・加齢・喫煙などの外的誘因が加わって、全身・局所に持続的かつ低レベルの慢性炎症が持続し、様々な病態を形成している。つまり、三大疾病の元となる生活習慣病や悪性腫瘍の根底には慢性炎症が介在していると考えられる。感染症に代表される急性炎症に関しては病態の理解とともに、感染症に対する特効薬（抗生物質）が開発され、一定の治療成績を上げてきた。しかし、慢性炎症を基盤とする慢性疾患に関しては、慢性炎症の病態が不明であることから特効薬が存在せず、依然として多くの有病患者と高い死亡率を生ずる要因となっている。

我々は、独自に開発した「生体分子イメージング手法」を、脂肪組織に適応し、メタボリックシンドロームの病態にアプローチを行ってきた。我々の開発したイメージングは、従来の手法ではアプローチできなかった細胞間相互作用を生体内で直接可視化するものであり、多くの研究領域において今後重要な役割を果たすと考えられる。本稿では、我々の生体イメージングより明らかになった、肥満脂肪組織の再構築（リモデリング）と炎症性・血栓形成過程についての知見を紹介したい。

２．方法

本稿では我々は開発した「生体分子イメージング」手法について概説する。我々はまず、「脂肪組織をよりよくみるために」、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、生きたままの組織をそのまま染色する、「生組織イメージング手法」を開発した。手法としては、脂肪組織をマウスより取り出し、未固定のまま細かく切り出し、蛍光色素の入った培養液中でインキュベートし、生きたまま蛍光標識を行う。脂肪細胞は蛍光標識された脂肪酸で、血管内皮は蛍光標識レクチンで、核はヘキストで

染色し、肥満に伴う脂肪組織リモデリングの詳細を明らかにした。通常の固定した組織切片標本では、脂肪組織は白く抜けた脂質と、細胞質・核の集合体として漠然としか組織構築が捉えられなかったが、我々の手法では組織構築の詳細が可視化された。

新たに開発した「生体内分子イメージング手法」を概説する。高速レーザー共焦点顕微鏡を用いて、血流の方向と平行にごく狭い断面に焦点を合わせて画像取得し、血管内を変形しながら流れる赤血球・白血球・血小板に各々フォーカスを合わせて観察が可能となった。血管内の細胞動態を明らかにするためには高速な画像取得が必須だが、我々は主に多数のピンホールを有する円盤を高速回転させて画像を取得するニポウ式の共焦点ユニット（横河電機 CSU X1）及びレゾナンス型高速共焦点システム（Nikon A1R）を用いることにより、高速イメージングを行っている。なお、我々のシステムでは、空間解像度は回折限界（光を用いて観察する際に、理論上、最大で得られる解像度が決まっていること）に既に達している。また、我々は高速スキャニングレーザー共焦点を用いて、多色マルチカラー撮影にも成功している他、二光子による画像取得にも成功している。

検体の準備としては、麻酔下のマウスに蛍光色素を静脈全身投与し、観察部位を切開・露出する。観察部位を生理食塩水により湿潤した後、観察窓を設け、マウスを倒立顕微鏡上のチャンバーにおいて蛍光観察を行う。観察中はヒーティングプレートを用いて体温 37 度を保つ。本手法により臓器表面から 50 ミクロン程度であれば細胞構築・血流が明瞭に観察可能である。血流は、蛍光物質 FITC デキストランを尾静脈から全身投与することによりネガティブイメージで可視化される。分子量 150,000 のデキストランは血管外に漏出することはなく、血管内にとどまり血球成分を可視化する。我々の観察では直径 3 ミクロン程度の毛細血管網を変形しながら流れる血球成分が明瞭に可視化された。一方、白血球はアクリジンオレンジ及びローダミンを静脈投与し体内で核染色することで可視化される。さらに、細胞表面マーカーに応じた蛍光標識抗体を用いることにより、特定細胞集団を生体内でも標識することが可能である。さらに、血小板に特異的な蛍光標識抗 CD41 抗体を全身投与することにより単一血小板も生体内ではじめて可視化されている（後述）。血管内皮に対しては、血管内皮表面の糖鎖に特異的に結合する蛍光標識レクチンを用いることで、生体内で血管系を明瞭に描出することが可能である。本分子イメージング手法は脂肪組織だけでなく、骨格筋・肝臓・腎臓（糸球体を含む）など、さまざま実質臓器に応用可能であり、臓器血流・細胞動態を観察・定量することも可能になっている。

３．結果

3.1　肥満脂肪組織における生体分子イメージングの意義

動脈硬化・心血管疾患の原因として、末梢組織（骨格筋・脂肪組織）の機能異常が重要であると考えられるようになった。特に、脂肪組織は、長年、脂肪を蓄積するのみの「何もしない臓器」と考えられてきた。近年のライフスタイルの変化（食生活の欧米化）に伴う肥満・メタボリックシンドロームの蔓延により、脂肪組織は、様々な病気を引き起こす「活発な代謝臓器」として一躍、注目を浴びるようになった。内臓脂肪はアディポサイトカインを分泌することからも、肥満に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化の発症に必須の役割を担っていると考えられる。しかし、脂肪組織の肥満における役割は必ずしも明らかではなく、脂肪組織が臓器としてどのように機能異常を起こすのか、その分子機構は十分解明されているとは言えない。Weisberg らによる肥満脂肪組織に炎症性マクロファージが浸潤の報告(文献 1)を初めとして、肥満脂肪組織における慢性炎症の関わりについては複数のグループが報告しており、現在では肥満脂肪組織のリモデリングの背景に慢性炎症が存在することは明らかと考えられている

(文献 2)。しかし、従来の切片標本を用いた組織観察では、脂肪組織における血管や組織間質に存在する細胞群の三次元的構造の詳細は観察不能であり、生体内の細胞動態も不明であった。我々はメタボリックシンドロームの病態解明を目指し、新たに開発したイメージング手法を用いて、肥満に伴う脂肪組織の再構築（リモデリング）と機能異常を検討した。

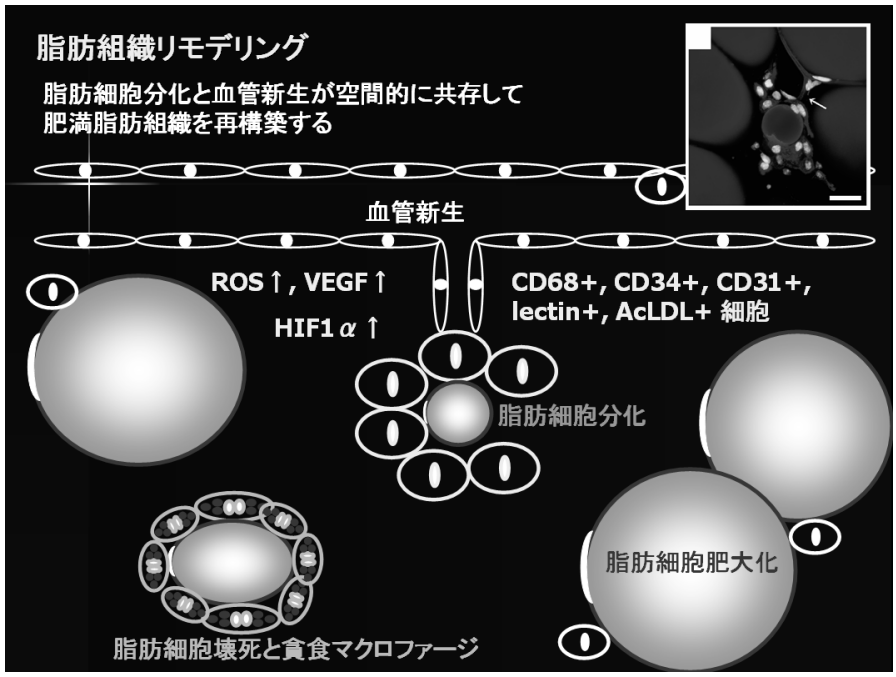


図１生体分子イメージングでみる肥満に伴う脂肪組織のリモデリング
生体分子イメージングでは従来の脂肪組織イメージングでは分からなかった組織の詳細な構築が明らかになっている。肥満脂肪組織では脂肪細胞の肥大のみならず血管新生、脂肪細胞分化、さらに脂肪細胞壊死とマクロファージ浸潤が生じている。

3.2　「生組織イメージング」でみる肥満脂肪組織リモデリング

我々はまず、「脂肪組織をよりよくみるために」、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、生きたままの組織をそのまま染色する、「生組織イメージング手法」を開発した。通常の固定した組織切片標本では、脂肪組織は白く抜けた脂質と、細胞質・核の集合体として漠然としか組織構築が捉えられなかったが、我々の手法では組織構築の詳細が可視化された(図１、文献 3)。

肥満動物モデルの脂肪組織では、多くの脂肪細胞は肥大していたが、加えて分化・増殖した小型脂肪細胞が新たに出現していた(文献 3)。さらに、小型脂肪細胞分化と共存して血管新生像（血管網より枝分かれした新生血管の断端）が観察され、その周囲には活性化マクロファージ浸潤が認められた。我々は、この細胞集団を「adipo/angiogenic cell clusters」と名付けた。

3.3　生体内の脂肪組織の可視化 生体分子イメージングの開発

従来、肥満に伴って脂肪組織内で慢性炎症が起きていることが示唆されていたが、その詳細な機序は不明であった。そこで、我々は本イメージング手法を生体に応用し「生きた動物の体内を手に取るように可視化すること」に成功し、肥満組織

において炎症性の細胞動態が生じていることを可視化手法により明確に示した（文献 4)。

動脈硬化のように血管が主な傷害の場になる病態だけでなく、腫瘍やメタボリックシンドロームにおいても、血流や血管機能といった生体内のダイナミックな変化、組織学的変化に先行する初期の炎症性変化を捉えることが可能な生体内分子イメージング技術は非常に有用である。従来の生体内観察では、透過光による観察が容易な腸間膜の微小循環を用いた研究が主に行われてきたが、近年の光学観察系・蛍光プローブの開発により、蛍光物質をトレーサーとして、透過光観察が不可能な厚みを有する実質臓器の血流観察も可能になった。時間・空間解像度も飛躍的に改善し、細胞内小器官レベルでの解析が可能となっている。

3.4　肥満脂肪組織と慢性炎症

我々は生体内分子イメージング手法を肥満内臓脂肪組織に応用することにより、脂肪組織内の微小血管で炎症性変化が起きていることを明らかにした。すなわち、肥満動物(ob/ob マウス、高脂肪食負荷肥満モデル動物)の白色脂肪組織内微小循環の観察で、細静脈において血管壁への白血球の rolling・adhesion が有意に増加していることをイメージングにより示した(文献 4)。肥満脂肪組織中では血流が間歇的に低下し、低酸素状態である事も確認された。また、白血球の血管壁への付着には活性化血小板の付着が伴っていた。すなわち、動脈硬化病変で知られているような炎症性の細胞動態が、肥満した脂肪組織の微小循環でも認められ、肥満脂肪組織そのものが炎症の場であることが示された。本イメージングでは単一血小板も生体内で捉えられており、血栓形成の詳細を可視化することも可能である。

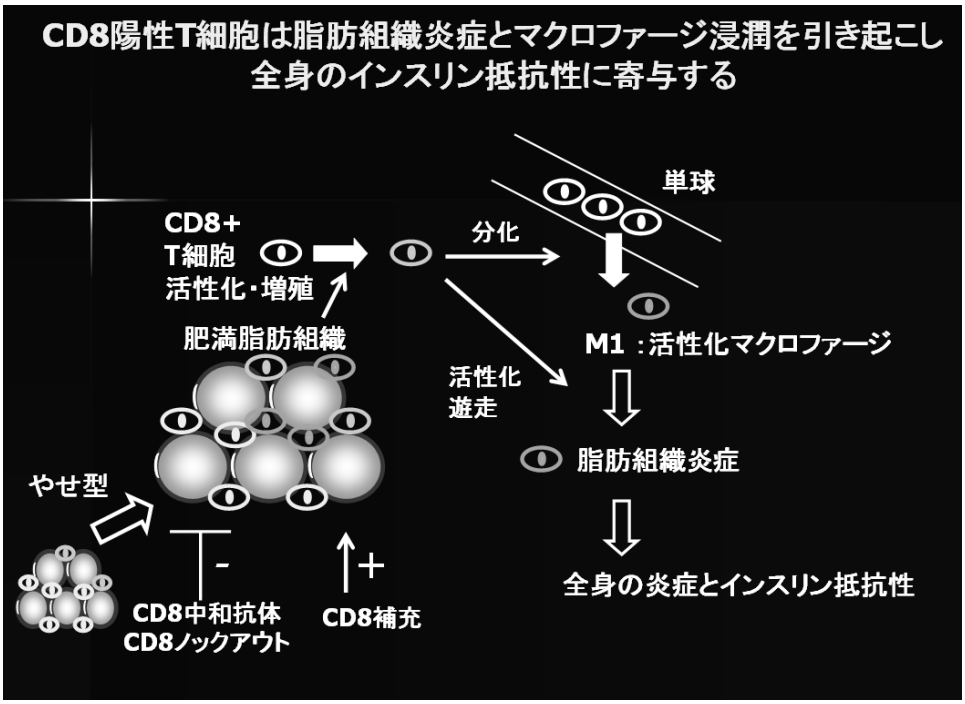


図 2 肥満脂肪組織に浸潤する CD8 陽性 T 細胞

肥満脂肪組織では活性化した CD8 陽性 T 細胞が多数浸潤しており、マクロファージの浸潤、ひいては、脂肪組織炎症と全身のインスリン抵抗性を引き起こしている。

3.5　CD8陽性T細胞の重要性　肥満病態の最も初期のトリガーは何か？

我々は、分子イメージング及び FACS を用いた解析から、脂肪組織の間質に多くのリンパ球が存在することも明らかにした。痩せ形マウスでも間質細胞の約 10%は T 細胞であり、肥満に伴ってその数は増加する。T 細胞サブセットの解析では、肥満に伴い、CD8 陽性 T 細胞の増加、CD4 陽性 T 細胞・制御性 T 細胞の減少が認められた(図２、文献 5)。さらに Winer らは T 細胞を標的とした免疫療法によりマウスの肥満が改善することを示している(文献 6)。また、脂肪組織にはマスト細胞･制御性 T 細胞といった特有の T 細胞が存在し、局所免疫や脂肪組織炎症をコントロールし、肥満に伴うインスリン抵抗性に寄与している事も明らかになった(文献 7,8)。このように脂肪組織局所においてはマクロファージや T 細胞をはじめとする多様な細胞が相互作用し、メタボリックシンドロームの病態を形成していると考えられる。我々はさらに、CD8 ノックアウトマウスおよび中和抗体を用いた検討、及び、複数の細胞種を用いた *in vitro* での共培養の実験を行い、肥満脂肪組織における CD8 陽性 T 細胞の役割を明らかにしている。すなわち、肥満脂肪組織では CD8 陽性 T 細胞がポリクローナルに活性化しており、この CD8 陽性 T 細胞は骨髄由来の単球からマクロファージへの分化、および、マクロファージの肥満脂肪組織への遊走･活性化を促進していた。つまり、肥満脂肪組織における炎症性マクロファージ浸潤の初期のトリガーが CD8 陽性 T 細胞の浸潤であることが示唆された。異常な肥満脂肪組織における局所免疫が、全身及び肥満脂肪組織の炎症、さらに糖尿病病態を引き起こしていることが示された。

3.6　血小板機能の生体イメージング

本邦の死因の上位を占める脳・心血管イベントの多くは血管の動脈硬化性変化を基盤としている。例えば、血栓性疾患（アテローム血栓症）では慢性炎症病態を基盤とした動脈硬化巣の形成と、それに引き続いて起こる、粥腫（アテローム）の破綻が病態形成に重要である。破綻部位においては、血小板は活性化され、血小板血栓が形成される他、凝固系も病態に関与する。しかし、動脈硬化巣の破綻は偶発的かつ高速に進行する病態であり、実験的にこれらを ex vivo, in vitro で再現することは不可能であった。実際に、これらの一連の過程には血小板のみならず、各種炎症性細胞、血管内皮細胞とその障害、局所の血流動態（血流とずり応力）が関わっている。このような多細胞からなる複雑病変とそのダイナミクスが病態の本質であり、これらを生体内で検討する手法が、病態理解の上で求められており、その検討を可能にしたのが我々の開発した「生体分子イメージング手法」である。

血小板を FITC-Dextran 及び anti-CD41、anti-GPIb 抗体により可視化したところ、定常状態においては、細動脈・静脈では血管壁近傍にそって血小板は運動していた。一方、流速の遅い毛細血管のレベルでは、血小板は血管内皮と相互作用して「stop and go」を繰り返しており、血流にのって rolling しながら流れているさまが可視化された。さらに、レーザー照射・傷害と組み合わせる事で血栓形成を誘発し、生体内での単一血小板を捉えながら、血栓形成のメカニズムの詳細が可視化された。

我々の血栓形成モデルでは、まずレーザー照射により活性酸素の産生が誘発されて血管内皮に血小板が付着する。その後、血小板はその数を増やし積み上がり、血管内腔を狭小化し、血液の流速は遅くなる。その後、赤血球、もしくは、白血球がプラギングを起こし、血管は閉塞する。本モデルが特徴的なのは、血栓形成の全過程が数十秒で終わり、時間的に経過がきわめて早い事である。本モデルではレーザー照射後に血栓形成に寄与した血小板数を数えることにより血栓形成能が定量可能であり、従来の頸動脈に対する塩化鉄傷害モデルにおける血栓による閉塞時間とも強い相関を示しており、生体内の血小板機能をきわめ

て鋭敏に示していると考えられる。それだけでなく、従来の止血時間の計測では分からなかった、血栓形成の素過程が可視化されており、遺伝子改変の効果がどの過程に影響を及ぼしているかを明らかにすることが出来る。

我々は本手法を用いて、Lnk というアダプター蛋白に注目して実験を進めた。Lnk は血球系幹細胞の維持に重要な蛋白であるが、巨核球・血小板にも発現している。興味深い事に、Lnk の欠損した遺伝子改変動物では、流血中の末梢血小板数が野生型の 5 倍になるにもかかわらず血栓性を示さず、むしろ止血時間が延長しており、Lnk の欠損が血小板機能に影響をもたらしていると考えた。骨髄移植を行い作成した Lnk キメラマウスを用い、生体イメージングにより血栓形成過程を観察したところ、Lnk キメラマウスではレーザー傷害により血小板は血管内皮に付着するものの、血栓は安定化・piling up せず血流に押し流され、血小板血栓の発達が阻害されていた。すなわち、Lnk が血栓の安定化に寄与している事が示された。分子生物学的機序としてはインテグリンのシグナリングにリン酸化した Lnk が C-Src、Fyn などと協同して関与していた(文献 9)。以上より Lnk が生体内血栓の形成・安定化に寄与していることが明確に示された。

近年、Lnk の遺伝子変異がヒトにおいて多血症・血小板無力症や骨髄増殖性疾患を引き起こすことが報告されている(文献 10,11)。多血症では血小板数は増加するものの、血小板機能は低下していることが多く、今回、Lnk ノックアウトマウスでみられた表現型にきわめて近いと言える。

今後は、さらに様々な血小板機能に異常を来す遺伝子改変動物における血栓形成過程・血小板動態を観察することにより、「生体内の血栓形成の各過程における遺伝子・物質の関与」を検討していきたい。

3.7　iPS 由来人工血小板の体内イメージング

近年の、多能性幹細胞（ES, iPS）の研究の進歩により、細胞療法を含む再生医学での広い範囲での臨床応用が期待されている。しかし、これらの基礎研究を臨床に繋げるためには、ヒトを対象とした研究に移行する前に、実際に試験管内で作成した細胞が、実際の個体（マウス及び大動物）の中でどのように機能しているか、どのように病変に働くかを明らかにすることは必須である。しかし、今までこれら iPS 由来の分化誘導細胞の体内での細胞動態を検討する手法は存在しなかった。共同研究者の東京大学医科学研究所幹細胞治療分野江藤准教授チームは C-Myc の発現をコントロールすることにより、飛躍的に効率的に、ヒト iPS 由来の人工血小板を作成する手法を確立した。我々は生体イメージングを用いて、こうして得られたヒト iPS 由来血小板の体内動態の可視化を行った。観察に用いて免疫不全マウス（NOG マウス）の体内で、iPS 由来血小板の細胞動態が捉えられ、iPS 由来血小板がマウス体内を循環しているだけでなく、レーザー傷害により誘発された血栓形成部位においてはホスト血小板と iPS 由来血小板が相互作用しながら血栓を形成するさまが観察された。つまり「人工血小板は体内を循環し、血栓も作る」事が証明されたわけである。本イメージング手法は iPS 分化誘導細胞を用いた細胞療法の臨床応用にむけて、安全性・有用性を評価する上できわめて有用性が高い手法と言える（文献 12、図 5)。

４．考察　次世代のイメージング

我々は主にニポウ式レーザー共焦点、一光子励起の組み合わせで画像取得を行ってきた。しかし、深部臓器・臓器内部の構造に関しては可視化できず、遺伝子機能も不明であった。生体の各種病態下での細胞連関・情報伝達異常をより明らかにするためには、形態と機能と組み合わせた深部の光イメージングが今後必要になると考えられる。例えば、遺伝子改変動物を用いた遺伝子機能の光による解析を、二光子フェムト秒レーザーと高速スキャニング共焦点システムで行うというもので

あり、今後の光学機器の開発・改良が望まれる。

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 21 年度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。

文献

(1) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel R L, & Ferrante A W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue (2003) J Clin Invest, 112(12). 1796-1808.

(2) Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders (2006) Nature, 444(7121), 860-867.

(3) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, & Sugiura S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels (2007) Diabetes, 56. 1517-1526.

(4) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, & Sugiura S. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue (2008) J Clin Invest, 118(2): 710-721.

(5) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, & Nagai R. $CD8^+$ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity (2009), Nature Medicine, 15:8, 914-920.

(6) Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy (2009), Nature Medicine, 15:8, 921-929.

(7) Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB, Hotamisligil GS, & Shi GP. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. (2009), Nature Medicine, 15:8, 940-945.

(8) Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, ,Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, & Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. (2009) Nature Medicine, 15:8, 930-939.

(9) Nishimura S, Takizawa H, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, & Eto K. Lnk/Sh2b3 regulates integrin alpha-IIb-beta3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo. (2010) J Clin Invest., 120(1): 179-190.

(10) Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD Jr, Merker JD, Zehnder JL, Nolan GP, Gotlib J. (2010) Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms.Blood 116(6):988-92.

(11) Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. (2010) LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis.(2010) N Engl J Med 363(12):1189-90.

(12) Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, & Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critifal for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. (2010) J Exp Med, 207(13):2817-2830

平成２３年度
技 術 交 流 助 成 成 果 報 告

電気通信研究所　助教　　金　　性勲

会議等名　　2012 年　IEEE 国際磁気学会

開 催 地　　カナダ　バンクーバー

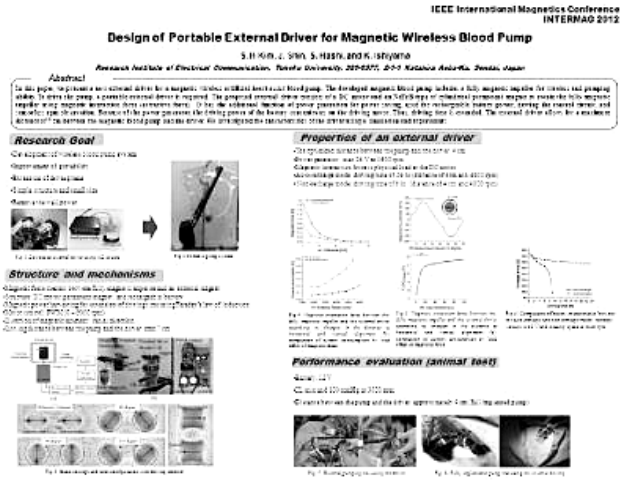
時　　期　　平成 24 年 5 月 7 日～5 月 11 日

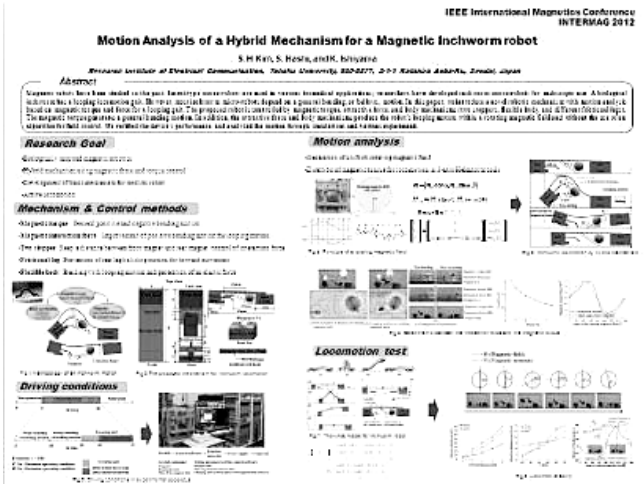
発表した研究題目

１．ワイアレス磁気ポンプ駆動のためのポータブル外部ドライバーとその磁気特性

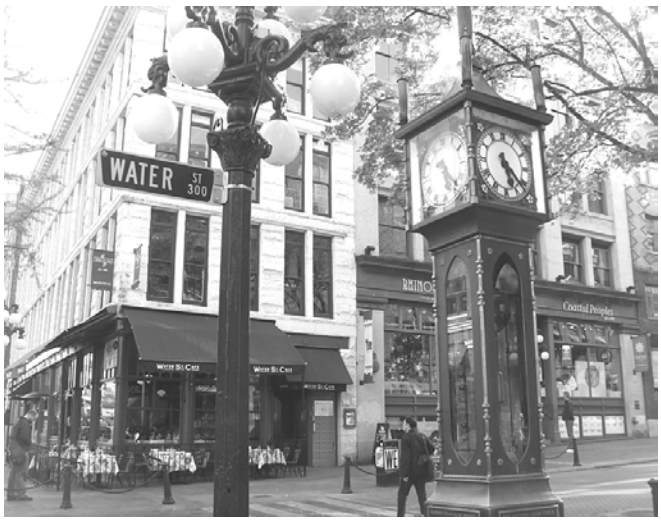
２．機能的移動のための湾曲動作型シャクトリムシマグネチックロボットのハイブリッドメカニズム

本人は公益財団法人、中谷医工計測技術振興財団の支援でカナダで開催された第 11 回国際磁気学会(IEEE International Magnetic conference)に参加し、本人の研究成果を対外的に知らせて検証を受けることができる機会を得てとても感謝の心を持つ。今回の学会では二つの研究テーマを発表する予定だった。また、Air Canada 航空の直航航空機を利用して旅程はあまり難しくなかったです. カナダ、バンクーバーの気温は仙台と似ているとか少し涼しかった。学生達と一緒にバンクーバー国際空港で電車に乗ってバンクーバー市内中心部の宿所に向けた。夕方 8 時が過ぎた遅い時間なのにバンクーバーは午後 4～5 時くらいに明るかったし平和な都市であった。7 日の朝、宿所から提供される食事をして、午前空いている時間を利用してバンクーバー市内の地域踏査をした後、学会場に移動した。バンクーバーで会った人々はアジア地域で見にくいフリーと余裕があった。バンクーバーは住みやすい所で世界でも有名な地域なので多くの旅人たちを見られた。バンクーバー





内では日本の寿司レストランがたくさんあって、易しく日本食べ物を接することができることがおもしろかった。何時間市内を踏査して午後には学会場に移動して久しぶりに会う海外の研究者たちとあいさつを交わしたし、参加登録を終えた。8 日の朝からフォスター発表と招請講演を始まりに本格的に進行された。参加した学術大会は国際磁気学会(IEEE International Magnetic conference)として磁性体分野の最大の学術大会中の一つで磁性体に対するすべての研究分野の最新結果が報告される学会である。8 日の午前フォスターセッションで医療用磁気マイクロロボットの能動型歩行のためのハイブリッドメカニズムを紹介したし、外部磁場を利用した制御方法に関する研究結果を発表した。4 時間くらい進行されるフォスターセッションで能動型ロボットの歩行のために生体模倣型ロボットメカニズムを紹介するようになったし、多くの研究者たちと討議をした。開発されたロボットは磁気トークと磁気力を利用してシャクトリムシの動きを模倣して体内消化器管内で動くことができる磁気無線ロボットである。今まで多様な磁気マイクロロボットが開発されて来たがロボット工学的メカニズムがなかった。しかし本研究結果はロボット工学的メカニズムを持っていて類似研究をする研究者たちには画期的な素材だった。また既存の診断のためのマイクロロボットは有線による制御、あるいは内臓の動きと重力によって移動することができるロボットであったが、本研究の革新的な内容は無線でバッテリーを使わないし、人体内部で自由に動くことができるロボット工学的メカニズムと外部磁場を利用した無線制御方法である。最近類似研究は増加しているし、特に日本、アメリカ、スイスなどで活発に研究が進行されています。スイスの研究者たちは磁気マイクロロボットを利用して眼球に挿入して薬物を伝達するマイクロロボットを開発したし、アメリカでは血管ナビゲーション、癌細胞抑制のための薬物伝達システムに適用した研究結果が報告されている。現在日本では外部磁場を利用したカプセル型内視鏡開発に成功をしたし、同じ基本原理を利用した多様な次世代医療機器開発に研究が活発に進行の中にある。



本研究で研究者たちの共通的な問題点は能動型歩行マイクロロボットの磁気トーク及び磁気力の計測だ。現在までマイクロロボットのトーク及び力の測定はとても難しい、あるいは不可能で数学的モデリングを通じて近似値で取り替えている。問題を解決するために多くの研究者たちと討議を実施して多様な方法論を導出して行った。最近スイス研究チームはマイクロロボットの物理的解釈のための特殊なステージを開発して磁気マイクロロボットの磁気トーク及び磁気力計測に成功した。しかし、開発されたステージの場合、特殊な形態のロボットにだけ適用になるのでマイクロロボットの物理的解釈のための計測システムに関する研究が中長期敵に必要だということを感じるようになった。実際アメリカ、スイスなど多数の研究チームと討議を通じて現在の研究の重大さ及び問題点を把握することができたし、研究のネットワークを形成することができるきっかけを作るようになった。

本人はマイクロロボット以外に磁気無線人工心臓補助ポンプ開発に関する内容を11日午後フォスターセッションで発表した。開発された磁気無線人工心臓補助ポンプの場合、世界最小で開発された無線人工心臓ポンプだ。特に開発された無線人工心臓補助ポンプで新しいトーク計測方法を提案して一般的

なセンサーを使わないでポンプの駆動力を計測することができる方法を紹介した。また携帯性を向上する外部駆動期を開発したし、自家発電を通じて充電用バッテリーを充電させる機能を内蔵していて多くの研究者たちから良い評価を受けた。開発された無線人工心臓補助ポンプの場合、マイクロロボットと等しく外部の回転子記章を利用するメカニズムである。

特に開発されたポンプの場合、機械的シャフトを持っていなくてローターの回転力測定が不可能だ。この問題を解決するためにペロデイ法則を使ってトークセンサーを使わないで磁気トークを測定することができる方法に関して討議をしたし、リアルタイムモニタリング及びポータブル外部駆動期の磁気的特性に関して多くの討論を実施した。開発されたポンプのローターは磁石として機械的シャフトとベアリングを使わない数力学的ベアリング方式でフローティングメス (floating mass)形態である。したがって一般的なトーク測定方法では開発されたポンプのトークを測定することができないのでペロデイ法則を採択してトーク測定をする方法である。外部の回転磁場を電圧信号に変換してポンプ内部に挿入されたピックアップ(pick up)コイルを利用してローターの回転運動を電気エネルギーで変換しても電気信号の位相差を利用して磁気トークを測定する。この方法は新しい測定方法として大勢の研究者たちに大きく寄与することができる方法論で実際多い研究者たちと討議を通じて提案した方法論に対して検証を受けた。この方法論は単純に磁気トークの測定だけではなく一般的なセンサーを使わないでリアルタイムでポンプの状態をモニタリングできる方法として複雑な計測システムを使わないで手軽くポンプの状態物理的変数を計測することができて学術大会で大きいイシューになった。また携帯性を考慮した外部駆動機開発に対する内容と発表を実施した。外部駆動機にはパワーホビースティング (power harvesting)の機能を内蔵していて、充電用バッテリーを自家で充電してバッテリーの駆動時間を増加させる。パワーホビースティングの原理はペロデイ法則を利用した磁気誘導方式だ。

学会活動をしながら学会場周りを見回した。バンクーバーの始めになったガスタウン(Gas town)に対してしばらく紹介をする。ガスタウンはバンクーバーの一番目らしいタウンだった。19世紀の雰囲気を感じるようにしてくれる所でもある。上の写真はガスタウンにある蒸気時計だ。蒸気時計はスチームエンジンで作動するガラスウィンドウが付けている時計だ。ウォトがとケムビが間に位置している。見た目は通常の時計と別段違うのがないが15分に一度ずつ蒸気をふいて音を出す不思議な時計だ。こちらはいつも観光客で混む名所中の名所である。

学会の参加を通じて普段には経験することができなかったことを一週間という短い期間だがたくさん見て聞いて感じることができた。特に有名な碩学たちの講演を聞きながら彼らの研究方法を間接的に分かることができたし、多様な分野の人々と会って話し合うことで考え方の転換にもなったりした。学術大会の参加は単純に研究内容の発表ではなく多様な友達と付き合うことができる場所で私の研究を発表しながら検証を受ける所でもある。大勢の研究者と討論を通じて本人の研究に思うことができなかった問題点を発見したりして、新しい霊感を得たりする。

技術開発に対する助成状況（金額単位：万円）

第１回（昭和５９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
中谷　　一	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	２００
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	２５０
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）技術開発助成対象

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	２５０
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	１５０
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	２００
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	２００
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	２５０
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	１５０
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	２５０
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―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	２００
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	２００
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	２５０
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	２００

第７回（平成２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
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	２００
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	２５０
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	２００
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	２５０
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	２００
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	２００
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
稲田　　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	２００
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	２００
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　　―ずり応力負荷装置を用いた流体力学的アプローチ―	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	２５０
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	２００
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	２００
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	２００
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	２００
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	所　属　機　関・職　名	研　　究　　題　　目	助成金額
太田　　茂	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	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	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	２００
相沢　義房	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	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	２００
田中　志信	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	２００
河田　　聡	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	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	２００
来　　関明	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	２００
井須　尚紀	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　照剛	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

第１２回（平成７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
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ー顕微鏡とその生物学への応用	２５０
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	２００
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	２００
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	２００
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	２００
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	２００
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

第１４回（平成９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
鈴木　喜隆	国立水産大学校 食品化学科　教授	一重項酸素および一酸化窒素の特異的検出法としての高感度近赤外域発光分光装置の開発	２００
川田　善正	静岡大学工学部 機械工学科　助教授	共焦点型偏光顕微鏡の開発と生物細胞の偏光解析への応用	２００
柴田　政廣	東京大学大学院医学系研究科 生体物理医学専攻　講師	微量試料による組織酸素消費率の燐光測定法の開発	２００
黒田　　輝	大阪市立大学工学部 電気工学科　助手	プロトン磁気共鳴画像化法を用いた生体内温度分布の非侵襲画像計測の研究	１７０
松本　健郎	東北大学大学院工学研究科 機械電子工学専攻　助教授	ピペット吸引法を応用した生体組織微小領域弾性率計測システムの開発に関する研究	１８０
相津　佳永	室蘭工業大学工学部 機械システム工学科　助教授	高感度フォトダイオードアレイを利用した実時間眼底計測法の開発	１８０
横山　憲二	北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科　助教授	イニファーター重合法を利用したインテリジェントバイオセンサーの開発	１７０
佐々木　一正	北海道工業大学 応用電子工学科　教授	光ファイバ形センサ方式による発ガン関連酵素センシングシステムの開発	１７０
松田　哲也	京都大学医学部附属病院 医療情報部　助教授	Ｂurst パルスを用いた超高速ＭＲＩ法の実用化	１００
松原　広己	岡山大学医学部 循環器内科　助手	コンダクタンス法を用いた血管内径および血管壁性状評価の試み	１００

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	２００
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	２００
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	２００
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－ＤＮＡ修飾電極によるＤＮＡセンシング	２００

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 ―角質層の水分量と厚さの同時測定―	２２０
北島　勲	富山医科薬科大学医学部　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	２００
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ﾊﾞｲｵｾﾝｻｰ用チップ	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	１５０
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	２５０
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	２００
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	２００
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	２００
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	２００
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	２００
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　修一	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

開発研究

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	２００
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	２００
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	２００
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	１５０
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

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	１００
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	２００
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	２００
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	２００
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	２００
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	２００
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
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

開発研究

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	２００
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	２００
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	２００
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

奨励研究

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　先端エネルギー工学専攻　助手	MRＩ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MRＩ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

開発研究

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	２００
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	２００
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	２００
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

奨励研究

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	静岡県立静岡がんセンター研究所　診断技術開発研究　研究員	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

開発研究

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	２００
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	２００
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	２００
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

奨励研究

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ー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

開発研究

氏　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

奨励研究

氏　名	所 属 機 関・職	研 究 題 目	助成金額
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

第２７回（平成２２年度）技術開発研究助成対象

開発研究

氏　名	所 属 機 関・職	研 究 題 目	助成金額
吉田　祥子	豊橋技術科学大学大学院工学研究科 環境・生命工学系　講師	神経組織からの情報伝達分子の放出分布を観測する近接光励起デバイスの開発	２００
香川景一郎	大阪大学大学院情報科学研究科 情報数理学専攻　特任准教授	極めて深い被写界深度を有する高機能照明内臓型３次元マルチスペクトル内視鏡の開発	２００
斎木　敏治	慶應義塾大学理工学部 電子工学科　教授	金ナノロッドの回転運動観察を利用した高速・高感度ホモジニアスアッセイ法の開発	２００
高橋　宏知	東京大学先端科学技術研究センター 生命・知能システム分野 講師	培養神経回路に嗅覚受容体たんぱく質を遺伝子発現させた匂いセンサー	２００
安川　智之	兵庫県立大学大学院物質理学研究科 化学分析学分野　准教授	変換濃縮ストリッピング法を利用した単一細胞の活性評価システムの構築	２００
内山　剛	名古屋大学大学院工学研究科 電子情報システム専攻 准教授	超高感度マイクロ磁気センサによる細胞活動電流シグナルのリアルタイムマッピング	２００
阿部　宏之	山形大学大学院理工学研究科 バイオ化学工学専攻　教授	電気化学イメージング技術を応用した超高感度細胞呼吸機能診断装置の開発	２００

奨励研究

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　専任講師	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

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
平成 23 年度	平成 24 年２月 24 日	11 件	1,798 万円
累計		289 件	53,879 万円

調査研究に対する助成状況

昭和６１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
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

平成２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
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 20～23 年度

技術交流に対する助成状況

１．派遣

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

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

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	慶應義塾大学 医学部講師	第 11 回国際血栓止血学会	ベルギー ブラッセル	昭和 62 年 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 助教授	第 11 回国際血栓止血学会	ベルギー ブラッセル	7 月
三輪　史朗	（財）沖中記念成人病研究所　所長	第 6 回国際血液学アジア太平洋域会議	インド ボンベイ	12 月

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 教授	国際神経回路網会議	アメリカ サンディエゴ	昭和 63 年 7 月
吉村　武晃	神戸大学工学部 助教授	国際 ME 学会	アメリカ サン・アントニオ	8 月
安藤　　繁	東京大学工学部 助教授	システム人間およびサイバネティックスに関する国際会議	中華人民共和国 北京・瀋陽	8 月
浅野　茂隆	東京大学医科学研究所　助教授	造血と分化因子に関する国際シンポジウム	オーストラリア メルボルン	8 月
山口　延男	神戸大学医学部 教授	第 22 回国際血液学会	イタリア ミラノ	8 月
関根　松夫	東京工業大学大学院総合理工学研究科　助教授	第 18 回ヨーロッパ・マイクロ波国際会議	スウェーデン ストックホルム	9 月
荒井　恒憲	防衛医科大学校 医学教育学助手	第 4 回医学における光学ファイバーの応用国際会議	アメリカ ロスアンゼルス	平成元年 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 教授	弟 7 回国際バイオレオロジー学会総会	フランス ナンシー	平成元年 6 月
川上　憲司	東京慈恵会医科大学　助教授	第 17 回国際医学放射線学会	フランス パリ	7 月
幸道　秀樹	東京大学医科学研究所　講師	国際実験血液学会総会	フランス パリ	7 月
菊池　　眞	防衛医科大学校 教授	第 2 回国際医用生体工学学会（汎太平洋シンポジウム）	オーストラリア メルボルン	7 月
只野　寿太郎	佐賀医科大学 教授	弟 2 回国際健康と生命化学領域における質量分析学会	アメリカ サンフランシスコ	8 月
八幡　義人	川崎医科大学 教授	赤血球膜および代謝に関する国際シンポジウム	東ドイツ ベルリン	8 月
岡田　正彦	新潟大学医学部 助教授	第 11 回 IEEE 医用生体工学国際会議	アメリカ シアトル	11 月
大西　　昇	名古屋大学工学部 助教授	第 11 回 IEEE 医用生体工学国際会議	アメリカ シアトル	11 月

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

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

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

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

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

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 教授	第 72 回米国臨床病理学会春期大会	アメリカ シアトル	平成 6 年 4 月
森　　徹	京都大学医学部 教授	第 76 回米国分泌学会議	アメリカ アナハイム	6 月
伊藤　順司	電子技術総合研究所電子デバイス部 主任研究官	第 7 回国際真空マイクロエレクトロニクス会議	フランス グルノーブル	7 月
加藤　吉彦	電子技術総合研究所光技術部 主任研究官	電磁精密測定国際会議	アメリカ ボルダー	7 月
望月　精一	川崎医療短期大学 講師	医用物理生体工学世界会議	ブラジル リオデジャネイロ	8 月
菅原　基晃	東京女子医科大学 教授	医用物理生体工学世界会議	ブラジル リオデジャネイロ	8 月
佐野　雅之	佐賀医科大学輸血部　講師	接触因子異常症とその臨床に関する集会	アメリカ ベセスダ	9 月
櫻井　晃洋	信州大学医学部 助手	第 68 回米国甲状腺学会議	アメリカ シカゴ	9 月
津田　展宏	計量研究所量子部 精密測定研究室長	第４回ｼﾞｮｲﾝﾄﾅﾉﾃｸﾉﾛｼﾞｰｼﾝﾎﾟｼﾞｳﾑ及び国際自動制御会議	イギリス ロンドン	9 月
熊野　和雄	北里大学医学部 講師	第 15 回国際腹膜透析学会	アメリカ ボルチモア	平成 7 年 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 副部長	第３回国際先端外科手術学会	ドイツ ルクセンブルグ	平成 7 年 6 月
菅野　剛史	浜松医科大学医学部　教授	第 11 回 IFCC ヨーロッパ臨床化学会議	フィンランド タンペレ	7 月
橋本　琢磨	金沢大学医学部 教授	第 11 回 IFCC ヨーロッパ臨床化学会議	フィンランド タンペレ	7 月
立花　博之	川崎医療短期大学 助手	地中海医用物理生体工学会議	イスラエル エルサレム	9 月
堀　　原一	筑波大学名誉教授	第 10 回世界心臓ペーシング・電気生理会議	アルゼンチン ブエノスアイレス	10 月

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

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 教授	第 1 回国際パーオキシナイトライト会議	スイス アスコナ	平成 9 年 5 月
上塚　芳郎	東京女子医科大学 講師	第 16 回国際血栓止血学会議	イタリア フローレンス	6 月
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 アトランタ	7 月
豊田　英嗣	川崎医科大学 大学院生	国際医用物理生体工学会議	フランス ニース	9 月
秋山　修二	電子技術総合研究所超分子部 主任研究官	第 4 回神経情報処理国際会議	ニユージーランド ダニーデイン	11 月

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

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 講師	第 44 回米国生物物理学会	アメリカ ニユーオリンズ	平成 12 年 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 臨床工学科　講師	実験生物学会 2000	アメリカ サンディエゴ	平成 12 年 4 月
岩佐　章夫	電子技術総合研究所基礎計測部 主任研究官	電磁気精密計測国際会議	オーストラリア シドニー	5 月
ハッサン　ＭＤモイヌディン	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所　大学院生	国際医用物理生体工学会議シカゴ 2000	アメリカ シカゴ	7 月
谷口　慶治	福井大学 名誉教授	IEEE 信号処理部会主催 2000 年度画像処理に関する国際会議	カナダ バンクーバー	9 月
清島　　満	岐阜大学医学部臨床検査医学　教授	第 73 回米国心臓学会学術集会	アメリカ ニューオリンズ	11 月
入部　玄太郎	岡山大学大学院医歯学総合研究科システム循環整理学 助手	実験生物学会 2001	アメリカ オーランド	平成 13 年 3～4 月

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

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 助教授	超伝導応用国際会議（ASC 2002）	アメリカ ヒューストン	平成 14 年 8 月
柴田　政廣	東京大学大学院医学系研究科　講師	第 22 回欧州微小循環学会議	イギリス エクスター	8 月

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	国立循環器病センター研究所 循環動態機能部機能評価研究室　室長	World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering ２００３年医学物理･生体医用工学世界会議	オーストラリア・シドニー	平成 15 年 8 月

平成 16 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
井内　洋介	岡山大学医学部 保健学科放射線診療技術学講座　助手	American Heart Association Scientific Sessions 2004 （米国心臓学会）	アメリカ・ニューオリンズ	平成 16 年 11 月

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属病院　総合診療内科 内科医師	American Heart Association （米国心臓学会）	アメリカ・ダラス	平成 17 年 11 月

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検査医学 教授	American Association for Clinical Chemistry, Annual Meeting （米国臨床化学会）	アメリカ・シカゴ	平成 18 年 7 月
片岡　則之	川崎医療短期大学 講師	5th World Congress of Biomechanics （第５回生体力学世界会議）	ドイツ・ミュンヘン	平成 18 年 7 月

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・医療技術学部・臨床工学科 教授	第 13 回国際バイオレオロジー学会･第 6 回国際臨床ヘモレオロジー学会	米国ペンシルベニア州ステートカレッジ	平成 20 年 7 月

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 Laboratory Mayo Clinic	2009 年アメリカ手の手術の外科･ハンドラセラピー学会	アメリカ合衆国サンフランシスコ州	平成 21 年 9 月

２．招聘

昭和 60 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
財団事務局で招聘		Reinhard Thom 教授（西独）	血液電子計測研究会	東京	昭和60年11月

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	日本大学本部グローバルビジネス研究科　教授	Sun I.Kim 教授　他３名（韓国）	第 39 回日本エム･イー学会大会日韓合同ｾｯｼｮﾝ、他	東京	平成12年5月
望月　精一	川崎医療短期大学臨床工学科 助教授	Walter H.Chang 教授（台湾）	第 39 回日本エム･イー学会大会日韓合同ｾｯｼｮﾝ、他	東京、神戸、他	５月
巽　　典之	大阪市立大学医学部臨床検査医学教室　教授	１３名（内訳、ｲﾝﾄﾞﾈｼｱ２名、韓国５名、ﾌｨﾘｯﾋﾟﾝ２名、ｼﾝｶﾞﾎﾟｰﾙ１名、ﾀｲ３名）	臨床検査の標準化に関する第２回アジア会議	神戸	10 月

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	東京医科歯科大学生体材料研究所教授	Piotr Foltynsky ﾊﾞｲｵｻｲﾊﾞﾈﾃｨｸｽ医用生体工学研究所高等研究員（ポーランド）	発汗計測ﾜｰｸｼｮｯﾌﾟ、第９回日本発汗学会総会、他	東京	平成13年7～9月
齋藤　正男	東京電機大学工学部　教授	王明時　天津大学ＭＥ研究所所長　他１名（中国）	第 15 回日本エム･イー学会秋季大会、ＴＤＵ日中ＭＥ学術交流懇談会、他	東京	11～12 月

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	浜松医科大学医学部　教授	Steven Shoei-Lung Li 教授（台湾）	国際酵素学会浜松会議	浜松	平成14年10月
浅野　茂隆	東京大学医科学研究所　教授	Suthat Fucharoen 教授（タイ）他、ｼﾝｶﾞﾎﾟｰﾙ１名、中国５名、韓国４名、台湾５名	アジア血液連合第１回総会及びシンポジウム	神戸	平成15年3月

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（ﾌｨﾝﾗﾝﾄﾞ）、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	神戸大学大学院医学系研究科　生体情報医学講座　臨床病態免疫学分野　教授	Dr.Hardjoeno(Indonesia)他、Indonesia4 名、Korea2 名、Mongolia5 名、Taiwan3 名	第 9 回アジア臨床病理学会	神戸国際展示場	平成 18 年 10 月

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	早稲田大学理工学術院先端システム医生物工学研究室教授	Willem Fibbe 欧州血液連合会長(ｵﾗﾝﾀﾞ)他、ﾄﾞｲﾂ 1 名、ｼﾝｶﾞﾎﾟｰﾙ 1 名、ﾀｲ 1 名、韓国 2 名	第 5 回アジア血液学連合総会	神戸ポートピアホテル会議場	平成 21 年 2 月

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電子情報工学科　教授	Rita Paradiso Ph.D R&D Manager,Smartex	第 48 回日本生体医工学会	東京江戸川区　タワーホール船堀	平成 21 年 4 月
倉智　嘉久	大阪大学大学院医学系研究科　分子・細胞薬理学講座　教授	Denis Noble PhD	第 36 回国際生理学会世界大会	国立京都国際会館	平成 21 年 7 月～8 月

平成 22 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
土肥　健純	東京大学大学院　情報理工学系研究科　教授	Niilo Saranummi Ph.D Oivind Lorentsen M.Sc Robert M.Nerem Ph.D	第 50 回日本生体医工学会大会	東京大学	平成 23 年 4 月～5 月

３．会議等

昭和 62 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	極東医用生体工学会議国際準備委員会	東京	昭和 62 年 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

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

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研究科　教授	第５回医用画像工学及びコンピュータ外科国際会議	東京	平成 14 年 9 月
前川　真人	浜松医科大学医学部 教授	国際酵素学会浜松会議	浜松	10 月
野瀬　善明	九州大学大学院医学研究院 教授	第 16 回日本エム・イー学会秋季大会	神戸	11 月

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情報科学研究科 教授	第 6 回日本－ポーランド医用生体工学シンポジウム	京都	平成 15 年 10 月
梶谷　文彦	岡山大学大学院医歯学総合研究科システム循環生理学 教授	岡山国際シンポジウム:循環フィジオーム	岡山	平成 15 年 12 月

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 教授	第 6 回アジア太平洋生体医工学会	筑波	平成 17 年 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査医学　教授	第 57 回日本電気泳動学会	アクトシティ浜松	平成 18 年 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臨床検査医学分野　教授	第 58 回日本電気泳動学会	山口県宇部市	平成 19 年 11 月

平成 20 年度技術交流（会議等）助成対象

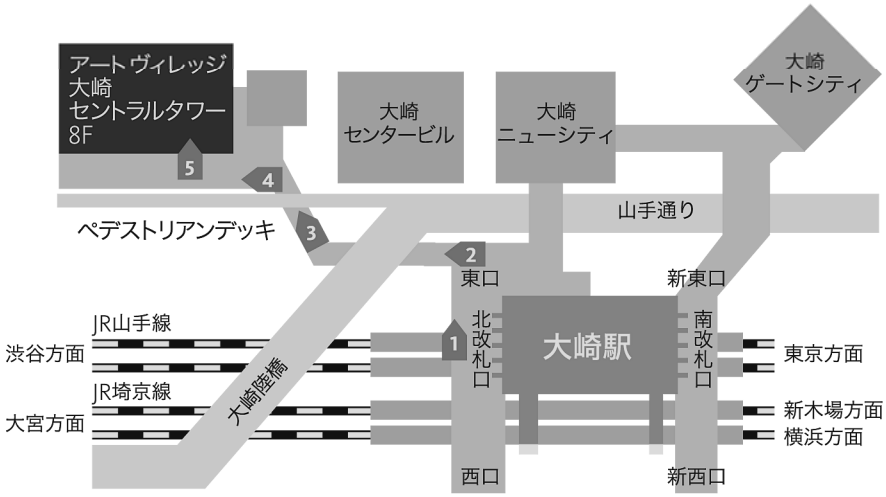
氏　名	所属機関・職名	会議名	開催地	時期
前川　真人	浜松医科大学医学部・臨床検査医学　教授	第 48 回日本臨床検査化学会年次学術集会	静岡県浜松市	平成 20 年 8 月

公益財団法人中谷医工計測技術振興財団　御案内図

大崎駅からのご案内

1.大崎駅北改札口を出て右に進みます。
2.突き当たりを左に(アートヴィレッジ案内板方面)
　エスカレータで1F歩道に、さらに直進します。
3.山手通りをくぐり、エスカレータで2Fへ進みます。
4.歩道橋を渡り、左方面へ５０メートルほど進みます。
5.右手のアートヴィレッジ大崎セントラルタワー入館口(2F)
　からお入りください。

アートヴィレッジ大崎セントラルタワー



公益財団法人　中谷医工計測技術振興財団

〒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

公益財団法人
中谷医工計測技術振興財団　年報

26 号

平成 24 年 8 月 10 日　発行

公益財団法人
発行所　中谷医工計測技術振興財団
〒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
編集・発行人　浜 野　　実

印刷 (有)盛光印刷