

神奈川工科大学

バイオメディカル研究センター

研究報告

第 6 号

2025 年度

研究推進機構

目次

- ・車両走行雑音下での心拍波形信号抽出に関する基礎検討

情報工学科 宮崎 剛

- ・生体情報を活用したヒューマン・セキュリティおよびマルチモーダル継続認証
システムの構築

情報工学科 納富 一宏

- ・運動とビタミンE 同族体摂取との併用で抗肥満効果を増強できるか

管理栄養学科 清瀬 千佳子

- ・吸光スペクトルを用いたブリ筋肉ミオグロビンの酸化状態の評価

応用化学生物学科 小澤 秀夫

- ・Fab1/Vac14 経路を標的とした新規抗真菌候補のスクリーニング

応用化学生物学科 飯田 泰広

車両走行雑音下での心拍波形信号抽出に関する基礎検討

情報工学科 宮崎 剛

1. 研究の目的

本研究は、車両走行中に運転者から取得した生体信号、特に心拍波形信号を、走行に伴う各種雑音の影響下においても安定的かつ非侵襲的に抽出することを目的とする。

近年の交通安全施策において、走行中の運転者状態をリアルタイムに把握することの重要性は増している。心拍は自律神経活動を反映する指標として広く用いられており、疲労・緊張・眠気等の生理的変化を定量的に評価できる。しかし、実際の走行環境下では路面振動やエンジン振動に起因する雑音が心拍信号と周波数帯域で重複するため、単純なフィルタリングによる分離は困難であり、高精度な信号抽出技術の確立が求められている。

こうした背景のもと、本研究では短時間フーリエ変換 (STFT) によって生成した対数スペクトログラムおよび位相スペクトログラムの双方を入力として活用した 2 チャネル構成の U-Net を用い、深層学習による車両走行雑音の除去と心拍波形の復元を試みる。従来研究では対数スペクトログラムのみを使用していたが、位相情報を加えることで信号復元の精度向上が期待される。

2. 研究の必要性及び従来の研究

交通事故の主要因の一つとして、運転者の疲労・不注意・健康状態の悪化が挙げられる。これらを予防するためには、走行中の運転者の生体状態を継続的かつ非侵襲的に計測する技術が不可欠である。心拍変動 (HRV) は自律神経活動の指標として確立されており、ウェアラブルセンサや接触型センサを用いた計測が試みられているが、車内環境における振動・雑音は安定した信号取得の大きな障害となっている。特に、路面の凹凸やエンジンの回転に伴う機械的振動は、センサで取得した信号に重畳し、心拍成分の精度の高い分離を阻害する。この問題を解決するための信号処理技術の高度化は、自動車の安全技術における重要な研究課題である。

筆者らは先行研究において、対数スペクトログラムを深層学習モデル U-Net に入力し、車両走行雑音を除去する手法を提案した^[1]。この手法では、走行状態と停車状態のデータを組み合わせた混合波形を学習データとして使用し、心拍波形の抽出に一定の成果を得た。

しかし、従来手法ではスペクトログラムの位相成分を利用せず、パワースペクトル成分のみに基づいて出力を生成していたため、逆短時間フーリエ変換 (ISTFT) による波形復元の際に位相の推定が別途必要となるという課題があった。

本研究で使用する U-Net はエンコーダ・デコーダ構造とスキップ接続を特徴とするネットワークであり、もともと医用画像分割に用いられていたが、その特性から音響信号処理にも広く応用されている。

3. 期待される効果

本研究によって期待される効果は以下のとおりである。

- ・ 位相情報の積極的活用によって、ISTFT による波形復元において別途の位相推定処理が不要となり、処理の簡略化と計算コストの低減が見込まれる
- ・ 対数・位相の2チャンネル入力により、車両走行雑音下での心拍波形抽出精度が向上し、SNR（信号対雑音比）等の定量的指標における改善が期待される
- ・ 本手法が実用化されれば、圧電センサ等の簡易センサを車内に設置するのみで、走行中の運転者の心拍を継続的にモニタリングすることが可能となり、疲労検知・健康管理システムへの応用が拓ける
- ・ 深層学習モデルの汎化能力が確認されれば、車種・路面状況・走行速度等の多様な条件への適応も期待でき、実環境での頑健な動作が見込まれる
- ・ 本基礎検討の成果は、今後のリアルタイム処理システムへの統合に向けた技術的根拠を提供し、自動車安全技術における生体信号処理分野の進展に貢献する

4. 研究の経過及び結果・評価

実験には、実際のガソリン車を走行させることで取得した振動・雑音データを使用した。心拍信号の代替として、サンプリング周期 10ms の生体ファントムを用い、拍動情報の取得には圧電ワイヤセンサを使用した。センサを貼り付けた生体ファントムを助手席に設置し、以下の3種類のデータを収録した（表 1）。

表 1 取得した波形データの種類

データ種別	ファントム状態	車両状態
ON 停車	作動 (ON)	エンジン停車・停車
ON 走行	作動 (ON)	エンジン稼働・走行
OFF 走行	停止 (OFF)	エンジン稼働・走行

「ON 停車」データと「OFF 走行」データを加算することで、心拍成分と走行雑音が混在した擬似的な混合波形を構成した。この混合波形に対して STFT を適用し、対数スペクトログラム (CH1) と位相スペクトログラム (CH2) の2チャンネルデータを生成して U-Net への入力とした。教師データとしては ON 停車データのスペクトログラムを使用し、走行雑音のみが除去された状態を学習目標とした。

ON 走行波形（心拍信号と走行雑音の混合）を学習済みの U-Net に入力したところ、走行雑音成分が除去され、ON 停車波形に近似した心拍波形を復元することが確認された。本手法の特筆すべき点は、位相スペクトログラムを CH2 として入力に含めることで、ISTFT 時の位相推定が不要となり、波形の時間的構造を直接復元できた点にある。

従来の対数スペクトログラムのみを入力とした手法と比較すると、復元波形の形状において拍動ピークの再現性が改善されており、位相情報が波形復元に有効に機能しているこ

とが示唆された。ただし、本実験は単一の走行条件（ガソリン車・特定路面）に限定されており、定量的評価指標（SNR・相関係数等）による体系的な性能比較は今後の課題である。

5. 今後の計画

本基礎検討の成果を踏まえ、以下の項目を中心に研究を発展させる予定である。

- ・ 定量的評価の実施：SNR, 相関係数等の客観的指標を用い、提案手法と従来手法との定量的な比較評価を行う。これにより、位相情報導入の効果を数値的に示す。
- ・ 多様な走行条件への対応：使用した走行データはガソリン車で特定路面に限定されていた。今後は高速道路や悪路、ハイブリッド車や電気自動車等の多様な条件下でデータを収集し、モデルの汎化性能を検証する。
- ・ 被験者データへの展開：生体ファントムによる模擬実験の段階から、実際の被験者を対象とした実験へ移行し、個人差や生理的変動を含む実データでの有効性を確認する。
- ・ リアルタイム処理への適用：現状は収録データのオフライン処理に留まっているが、将来的な車載システムへの実装を見据え、処理遅延の削減とモデルの軽量化に取り組む。特に、エッジデバイス上での推論が可能となる程度のモデル圧縮（量子化・プルーニング等）を検討する。

以上の取り組みを通じ、走行中の運転者心拍モニタリングシステムの実用化に向けた技術基盤を確立することを目標とする。

6. 研究成果の発表

- 1) 松尾 空, 鷹野 孝典, 田中 博, 宮崎 剛, 振幅・位相スペクトログラムを用いた車両走行雑音環境下での心拍波形信号抽出の基礎検討, 電子情報通信学会 2026 年総合大会 情報・システム講演論文集 2, p. 29, 2026.

参考文献

- [1] 松尾 空, 鷹野 孝典, 宮崎 剛, 田中 博, 深層学習を用いた車両走行雑音下における心拍波形信号の抽出に関する基本検討, 第 53 回画像電子学会年次大会予稿集, 4 ページ, 2025.

生体情報を活用したヒューマン・セキュリティおよびマルチモーダル継続認証システムの構築

研究者名：納富 一宏 （情報学部情報工学科）

1. 研究の目的

生体情報を活用した次世代セキュリティ研究の一環として、本研究は、入力頻度が極めて高い「エンターキー」を打鍵する際の手指の骨格座標から特徴量を抽出し、継続認証システムにおける有効性を評価することを目的としている。具体的には、複数人の2次元骨格情報を同時に検出可能な姿勢推定ライブラリ「OpenPose」を用いて取得した手指の形状データに、「手指のなす角度（行動的特徴量）」と「手指の長さ（身体的特徴量）」という2つの生体情報が含まれているかを検証する。本研究の最大の眼目は、これらの情報を欠損なく複合的に扱うことができる「打鍵手指特徴量」として抽出し、その評価手法の確立と、実際の認証精度（エラー率）の検証を行うことにある。

2. 研究の必要性及び従来の研究

現代の情報セキュリティにおいて一般的に利用されているIDとパスワードを用いた本人確認システムは、一度情報が漏洩してしまうとその有効性が完全に失われ、なりすましの被害を防ぐことができないという根本的な脆弱性を抱えている。この問題に対する抜本的な解決策として、ログイン時の1回限りの認証に依存するのではなく、ユーザーがシステム上で作業をしている間も継続的に本人確認を行う「継続認証」の必要性が急速に高まっている。継続認証を実用化するための最大の要件は、認証対象者の通常の作業を一切妨げず、ストレスを感じさせないことである。

一般に、バイオメトリクス（生体認証）は、主に以下の2つに大別される。

- ① 身体的特徴量：顔、虹彩、指紋など、生来の身体的構造に依存するもの。
- ② 行動的特徴量：キーボード操作、マウスの軌道、歩行の仕方（歩容）など、個人の癖や習慣に依存するもの。

キーボード操作に関連する継続認証の分野では、これまで数十年にわたり研究が行われてきた。例えば、Davidらによるキーストローク（打鍵タイミング）を用いた手法や、Rothらによる打鍵音とキーストロークを融合させる手法が提案されている。また、Josephらは打鍵時の手指の形状とキーストロークを融合させる研究を行い、継続的な認証における堅牢性の向上を示唆している。しかし、これらの先行研究の多くは、特定のキーワードやパスワードといった「静的テキスト」の入力を前提としており、ユーザーが自由にテキストを入力する実際の作業環境には必ずしも適していないという課題があった。加えて、打鍵のタイミング（キーストローク）や打鍵音を主軸とした認証システムでは、ユーザーの打鍵リズムが不安定になった場合や、周囲に雑音が多い環境下において、本人認証の成功率が著しく

低下してしまうという技術的な限界が存在していた。

3. 期待される効果

本研究のアプローチは、従来のキーストロークや打鍵音に、「手指形状（映像）」から得られる身体的・行動的な生体情報を新たに付加することである。映像情報を取り入れることで、打鍵間隔、音、映像というマルチモーダルな情報を並行して処理できるようになり、環境音のノイズが多い場面でも極めて堅牢な本人認証が可能になることが期待される。特に、本研究で定義する「打鍵手指特徴量」は、手指の長さ（身体的特徴量）と手指のなす角度（行動的特徴量）という、発生源の特性が異なる2つの生体パラメータを複合して用いる。これにより、仮にある日ユーザーの打鍵リズムや角度にばらつき（分散）が生じた場合でも、不変的な身体的特徴である手指の長さが安定していれば、互いの悪影響を相殺することができる。結果として、全体として精度の高い本人認証システムが実現できる。これは、「ユーザーに一切の物理的・心理的負担をかけずに、高度で自然なセキュリティ環境を構築する」というバイオメディカル研究センターの基本理念と完全に合致するものである。

4. 研究の経過及び結果・評価

本研究では、打鍵手指特徴量の有効性を検証するため、以下のプロセスに従い実験と評価を行った。項目ごとに簡潔に示す。

- **分析対象データ**：キーボード操作頻度（週1日～週7日）が異なる操作者の打鍵操作において、鉛直方向からの俯瞰打鍵映像および打鍵タイミングおよび打鍵音を分析対象データとした。
- **特徴量の抽出**：姿勢推定ライブラリ「OpenPose」を用いて映像から手指の2次元骨格座標（21箇所のキーポイント）を検出し、エンターキー打鍵の瞬間のフレームを特定した。さらに手首を原点として座標を正規化し、「打鍵手指特徴量」を抽出した。
- **評価手法**：本人の特徴量の重心からの「比較ユークリッド距離」を算出し、他人受け入れ率（FAR）と本人拒否率（FRR）が等しくなる「等価エラー率（EER）」を指標として認証精度を評価した。
- **実験結果（精度の向上）**：推定誤差などの外れ値を除外した結果、全20名の平均EERは5.6%となった。過去の「手指のなす角度」のみ（EER 21.4%）や「手指の長さ」のみ（EER 11.2%）と比較してエラー率が大幅に減少し、複合的な特徴量を用いる本手法の有効性が実証された。
- **考察（打鍵スタイルの影響）**：被験者ごとの精度差を分析した結果、他の被験者とは異なる「個性的な打鍵スタイル（手指の位置）」を持つユーザーほど、他人のデータと重なりにくいためFARの上昇が抑えられ、より高精度に本人と識別できることが判明した。

5. 今後の計画

本研究の今後の展開として、以下の計画を推進する。

1. **キーポイント分布のさらなる分析**：各キーポイントの分布傾向と EER の関係性（上述の個性的な打鍵スタイルの影響など）について、より詳細な統計的分析を進める。
2. **別アルゴリズムによる検証**：今回確立した「打鍵手指特徴量」のデータを活用し、ユークリッド距離以外の機械学習ベースの判定手法や分類アルゴリズムでの検証を行う。
3. **マルチモーダル生体認証システムの構築**：最終的な目標として、既存の研究で培った「キーストローク（打鍵タイミング）」「打鍵音」の特徴量と、本研究で有効性が証明された「手指の骨格座標（映像）」の3つを統合（マルチモーダル化）し、あらゆる環境ノイズに耐えうる、極めて強固で実用的な次世代継続認証システムの構築を目指す。

6. 研究成果の発表

直近3年間における本研究の成果は、「継続認証におけるキーボード操作時手指形状から得られる行動的特徴量の検討」として、バイオメディカル・ファジィ・システム学会誌に原著論文として2025年に採択・掲載された。また関連する先行研究の成果は、同学会の第36回年次大会（2023年12月）における「エンターキー打鍵時の手指の角度を用いた本人認証の検討」や、2024年電子情報通信学会総合大会（2024年3月）における「エンターキー打鍵時の手指の骨格座標を用いた本人確認方法の検討」などで発表されている。

査読付き論文（直近3年間）

- [1] 齊藤 仁*, 納富一宏: “継続認証におけるキーボード操作時手指形状から得られる行動的特徴量の検討”, バイオメディカル・ファジィ・システム学会誌, Vol. 26, No. 2, pp. 43-51, (2025. 02).
- [2] 齊藤 仁*, 納富一宏: “特定単語の打鍵タイミングと打鍵音を用いた継続的な本人認証手法の検討”, バイオメディカル・ファジィ・システム学会誌, Vol. 25, No. 2, pp. 73-82, (2024. 02) [採録決定 2024. 1. 16]. **[最優秀論文賞]**.

(*: 当時、I 専攻博士前期課程に在学。納富研究室所属)

学会発表（直近4年間）

- [1] 齊藤 仁*, 納富一宏: “動的テキストに対応した手指の形状、キーストローク、打鍵音から得られる特徴量を用いた継続的なマルチモーダル認証の検討”, バイオメディカル・ファジィ・システム学会 第37回年次大会講演論文集, pp. 42-45, (4 pages), (2024. 12).
- [2] 齊藤 仁*, 納富一宏: “キーストローク、打鍵音、手指の形状を使用した継続的なマルチモーダル認証の検討”, 電子情報通信学会 2024年度 HCG シンポジウム B-5-3, (6

pages), (2024. 12).

- [3] 齊藤 仁*, 納富一宏:“手指の骨格座標による本人確認に用いる特徴量と判定手法の検討”, 情報処理学会 第 23 回情報科学技術フォーラム(FIT2024)講演論文集 第 4 分冊, L-011, pp. 173-174, (2024. 09).
- [4] 齊藤 仁*, 納富一宏:“キーボード打鍵時の手指形状を用いたキーストロークダイナミクスにおける特徴量抽出の検討”, 電子情報通信学会 技術研究報告, ヒューマン情報処理研究会(HIP), IMQ2024-5, HIP2024-36(2024-07) pp. 13-18, (2024. 07).
- [5] 齊藤 仁*, 納富一宏:“エンターキー打鍵時の手指の骨格座標を用いた本人確認方法の検討”, 2024 年電子情報通信学会総合大会, A-7-17 (1page), (2024. 03).
- [6] 齊藤 仁*, 納富一宏:“エンターキー打鍵時の手指の角度を用いた本人認証の検討”, バイオメディカル・ファジィ・システム学会 第 36 回年次大会講演論文集, pp. 54-57, (4 pages), (2023. 12).
- [7] 齊藤 仁*, 納富一宏:“打鍵情報を用いたマルチモーダル認証実現の実現 ～ 手指形状から得られる特徴量を用いた本人認証の検討 ～”, 電子情報通信学会 2023 年度 HCG シンポジウム C-6-3, (4 pages), (2023. 12).
- [8] 齊藤 仁*, 納富一宏:“キーストロークと手指形状の特徴量を用いた継続的なマルチモーダル本人認証の検討”, 情報処理学会 第 22 回情報科学技術フォーラム(FIT2023)講演論文集 第 4 分冊, L-010, pp. 157-158, (2023. 09). **[FIT 奨励賞]**
- [9] 齊藤 仁*, 納富一宏:“エンターキーとスペースキーの打鍵音を用いた継続的な個人認証の検討”, 情報処理学会 第 85 回全国大会講演論文集 第 3 分冊, 1ZD-05, pp. 489-490, (2023. 03).
- [10] 齊藤 仁*, 納富一宏:“特定単語の打鍵タイミングと打鍵音を用いた継続的な本人認証手法の検討”, バイオメディカル・ファジィ・システム学会 第 35 回年次大会講演論文集, B-1, (4 pages), (2022. 12). **[学生奨励賞]**
- [11] 齊藤 仁*, 納富一宏:“文章中に現れる特定の単語の打鍵情報による継続的な本人認証”, 情報処理学会 第 21 回情報科学技術フォーラム(FIT2022)講演論文集 第 4 分冊, L-006, pp. 157-158, (2022. 09). **[FIT 奨励賞]**

(*:当時、I 科から I 専攻博士前期課程に在学。納富研究室所属)

以上

「運動とビタミン E 同族体摂取との併用で抗肥満効果を増強できるか」

管理栄養学科 清瀬千佳子

【背景】

我々の体内には大きく分けて2つの脂肪細胞が存在する。1つは白色脂肪細胞で、内臓周囲や皮下にあり、1つの細胞の中に大きな脂肪滴をかかえている。これはいざという時のために摂取した糖質などを貯蔵エネルギーとして蓄えているからである。しかし近年、過剰な脂肪の蓄積が様々な生理活性物質を産生している事が明らかとなった。脂肪で産生される生理活性物質はアディポサイトカインと呼ばれるが、そのほとんどが我々の身体にとって負の働きとなるもので、生活習慣病の惹起に大いに関わっていることが明らかになっている。一方、褐色脂肪細胞とは脂肪細胞でありながら、脂肪滴は小さく多胞化されており、ミトコンドリアが多数存在する事で、茶褐色に見える事から褐色脂肪細胞と呼ばれるようになった。褐色脂肪細胞にあるミトコンドリアには脱共役タンパク質である UCP1 が存在し、この UCP1 は ATP を介さずに熱産生することができるタンパク質である。元々この2つの脂肪細胞は幹細胞が異なっており、まったく異なる起源から派生している。しかし、近年、白色脂肪細胞へと分化する際、ある条件が揃う事で、白色脂肪細胞でありながら、褐色脂肪様組織に分化できる事（ベージュ化）が明らかとなった。その条件とは、寒冷や運動などの物理的な負荷と言われていたが、我々は食品成分を摂取することで白色脂肪細胞のベージュ化へと誘導できないか、それによって抗肥満効果へと導けないかと考えた。そこで着目したのがビタミン E である。ビタミン E は脂溶性ビタミンの一種で、栄養素として大事な働きを持っているが、新たな機能を見出せるのではないかと考え検討を始めた。その結果、 α -ならびに δ -トコフェロールが白色脂肪細胞をベージュ化出来る事を明らかにした(Tanaka-Yachi, R., Kiyose, C.et.al., *J. Oleo Sci.*, 66, 171-179 (2017), Tanaka-Yachi, R., Kiyose, C. et.al., *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 506, 53-59 (2018))。そこで、これらの結果を踏まえて、骨格筋で産生されるマイオカインに注目した。

マイオカインである、irisin は骨格筋から分泌される生理活性物質の1つで、ホルモンのような働きをする事が明らかになっている。irisin は膜タンパク質である FNDC5 の細胞外ドメインの部分であり、切断されることで血中に分泌される。運動によって分泌が促進される事が明らかとなっており、これが血中を介して白色脂肪組織や褐色脂肪組織に働いて、UCP1 の発現を増強することが推察されている(図 1)。我々は先に述べたように、ビタミン E の一種である δ -トコフェロールを摂取すると白色脂肪細胞をベージュ化する事を明らか

にしている事からその理由について検討する際に、 δ -トコフェロールが骨格筋に働いて、

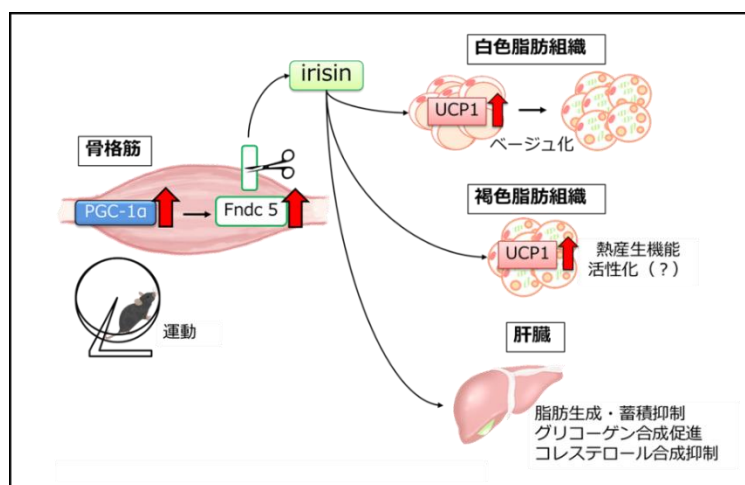


図 1. Irisin による臓器間ネットワーク (推論)

ロールを摂取し、さらに自由運動ができる群 (CED 群) の 4 群に分け、8 週間飼育した。飼育終了後、イソフルラン麻酔下にて解剖を行い、血液ならびに各組織は分析まで -80°C で保存した。

【実験結果】

骨格筋中のイリシンの遺伝子発現量を見た所、運動のみの群でも δ -トコフェロール摂取のみでもその遺伝子発現量を有意に上昇させる事が明らかとなり、さらに運動と δ -トコフェロール摂取との相乗効果も見られた (現在、特許申請中)。これらの結果より、 δ -トコフェロールは骨格筋にも作用し、irisin の遺伝子発現を上昇させる事で、脂肪組織のベージュ化を誘導する可能性を示唆した。つまり、 δ -トコフェロールは脂肪組織と骨格筋との間の臓器間ネットワークを成り立たせる可能性が考えられた。現在は、irisin のタンパク質発現量および血中イリシン濃度への影響についても検討をおこなっている。

【今後の予定】

irisin は 2012 年に発見された比較的新しい生理活性物質で、まだ明らかになっていない作用が存在する可能性が考えられる。ビタミン E の摂取が irisin の遺伝子発現や活性を上昇させる事が論証されれば新たな発見として非常に注目されると考えられる。さらに、最近では、irisin がアルツハイマー型認知症の予防にも関わっているという報告も出始めており、益々目が離せない物質となっている。我々は δ -トコフェロールの摂取で、骨格筋中イリシン産生を増強することで、白色脂肪細胞のベージュ化だけでなく、アルツハイマー型認知症の予防を間接的に行える可能性を見出したいと考えている。

irisin の産生を増大させる事で、白色脂肪のベージュ化を誘導する可能性があるのではないかと考えた。そこで、irisin に着目して実験を行った。

【実験方法】C57BL/6J マウスを対照群(C 群)、自由運動群(CE 群)、運動を行わずに δ -フェロールを摂取する群(CD 群)と δ -トコフェ

吸光スペクトルを用いたブリ筋肉ミオグロビンの酸化状態の評価

研究者名：小澤 秀夫（神奈川工科大学 工学部）

1. 研究の目的

赤身魚肉の品質は外観的な色調に大きく依存しており、その変化は消費者の評価や商品価値に直接影響を及ぼす重要な因子である。特に、貯蔵や流通の過程において生じる褐変は品質低下の主要な要因の一つであり、その本質は筋肉中に含まれる色素タンパク質であるミオグロビンの酸化反応にある。ミオグロビンは、酸素結合状態や酸化状態によって呈色が変わることが知られており、デオキシ型、オキシ型、およびメト型の間で相互変換が起こる。このうち、メトミオグロビンは褐色を呈するため、その割合（メト化率）は褐変の進行程度を表す直接的な指標となる。従来、メト化率の測定には、特定波長における吸光度を用いた簡便な方法が採用されてきた。本研究では、これらとは異なるアプローチとして、可視領域の吸光スペクトル全体を利用した解析手法を検討した。本手法により、ブリ筋肉中のミオグロビンの酸化状態をより精度よく評価することを目的とした。

2. 研究の必要性及び従来の研究

魚肉の鮮度評価には、K 値、pH、ドリップ量、色調など複数の指標が用いられているが、色調は消費者が直接判断する視覚的要素であり、特に重要である。赤身魚の色は主にミオグロビンによって決定され、その化学状態の変化は鮮度低下を反映する指標となる。従来、メト化率は特定波長における吸光度から算出する方法が広く用いられてきた。これに対し、本研究では吸光スペクトル全体を利用することで、より多くの波長情報を反映した評価を行い、ミオグロビン各状態の割合を推定する手法を検討した。

3. 期待される効果

吸光スペクトル全体を利用することにより、従来の 2～4 波長を用いる方法と比較して情報量が増加し、測定精度の向上が期待される。また、複数波長の情報を同時に扱うことで、特定波長に起因するノイズや測定誤差の影響を低減できる。さらに、本手法では測定スペクトルと再構成スペクトルとの一致度を評価することにより、推定結果の妥当性を客観的に判断可能である。この点は従来法にはない特徴であり、結果の信頼性向上に寄与すると考えられる。加えて、本手法は一般的な分光光度計で実施可能であり、特別な装置を必要としないことから、食品分野における実用的な分析法としての応用が期待される。さらに、代表スペクトルを適切に取得することで、他の魚種や畜肉への展開も可能と考えられる。

4. 研究の経過及び結果・評価

本研究では、まずブリ血合筋よりミオグロビンを抽出し、その抽出液に対して酸化剤および還元剤の処理を行うことにより、メト型、デオキシ型およびオキシ型の各状態を調製した。これらの試料について、可視領域における吸光スペクトル（500～650 nm）を測定し、それぞれの状態を代表するスペクトルとして用いた。次に、未知試料のスペクトルについて、これら3種類の代表スペクトルの線形結合として表されると仮定し、各状態の寄与を最小二乗法により推定した。最適化計算には表計算ソフトのソルバー機能を用い、測定スペクトルとの差の二乗和が最小となる条件を求めた。その結果、未処理抽出液のスペクトルは、メト型、デオキシ型およびオキシ型のスペクトルを組み合わせることで良好に再現されることが確認された。特に 500～650 nm の範囲では一致度が高く、本解析手法の妥当性が示された。一方で、より短波長側では、試薬由来と考えられる吸収の影響により差異が見られる場合があった。また、異なる条件で取得した代表スペクトルを用いて解析を行った場合でも、推定されたメト化率はおおむね一致した。差異の要因としては、ミオグロビン抽出効率の差や試料調製条件の違いが影響している可能性が考えられる。従来法との比較においては、本手法との間に一定の相関関係が認められたものの、条件によっては過大または過小評価が生じる傾向も見られた。この結果は、従来法が限られた波長情報に基づいていることや生物種が異なることを反映していると考えられる。本研究で得られた結果から、適切な条件設定のもとでは、本手法によるメト化率の推定誤差は数%程度に収まることが示された。以上より、本手法はミオグロビンの酸化状態評価において有効かつ実用的な手法であると評価された。

5. 今後の計画

今後は、本手法のさらなる精度向上および適用範囲の拡大を目的として、以下の検討を進める予定である。まず、代表スペクトルの取得条件をより厳密に決定し、試料間のばらつきを低減する方法について検討する。ミオグロビンの吸収特性は生物種によって異なることが知られており、既存の計算式を他の魚種へ適用する際には誤差が生じうることが知られているため、ブリ以外の魚種や畜肉への適用性を評価し、本手法の汎用性を検証する。さらに、測定および解析の効率化を図るため、解析を自動化するプログラムの開発も検討する予定である。加えて、K 値や pH などの他の品質指標との比較を行い、本手法の位置付けを明確化することで、食品品質評価体系への組み込みを目指す。

6. 研究成果の発表

本研究内容は、農水省委託プロジェクト研究（JPJ012041）として実施し、既に学術論文(小澤 2025)として公表している。本報告書では、これら既発表成果を基に、研究の目的、方法、および得られた知見を整理し、その意義および応用可能性についてまとめた。

吸光スペクトルを用いたブリ・ミオグロビンのメト化率の推定 日本水産学会誌
/Vol. 92/No. 1/pp. 30-39/2026 小澤秀夫

Fab1/Vac14 経路を標的とした新規抗真菌候補のスクリーニング

応用化学生物学科 飯田泰広

1. 研究の目的

本研究の目的は、真菌特有の生育手法である「先端成長 (tip growth)」に関連する分子機構を標的とした新しい作用機作を有する抗真菌活性物質を探索することにある。

真菌の増殖において、細胞先端部では細胞壁の分解と合成が行われている。その際、その分解酵素や合成酵素は小胞輸送により真菌の先端部へ運ばれている (エキソサイトーシス)。また、エンドサイトーシスも重要であり、小胞の先端部への輸送または先端部からの回収により真菌の生育が行われている。

脂質キナーゼ Fab1 とその活性化因子 Vac14 からなる複合体は、ホスファチジルイノシトール-3,5-二リン酸 (PI(3,5)P₂) の産生を介し、小胞輸送およびエンドソームの恒常性維持に中心的な役割を果たしている。PIKfyve はヒトが有している Fab1 のオルソログであるが、この PIKfyve 阻害剤が Fab1 に作用しなかったこと、Fab1 欠損体は生育が著しく悪く、生育に重要な因子である知見を得ている。本研究では、この Fab1 およびその活性化因子 Vac14 に着目し、出芽酵母をモデルとして Fab1/Vac14 が先端成長における機能や抗真菌薬としての可能性を検証し、創薬標的として有用であることを見出している¹⁾。

本研究では、Fab1/Vac14 経路阻害を機序とする新規抗真菌物質の取得を目的として、Fab1/Vac14 の作用点であるエンドサイトーシス経路阻害作用および BGL2 先端局在化率上昇作用を有する生薬抽出物のスクリーニングを行うことを目的とした。

2. 研究の必要性及び従来の研究

深在性真菌症は、免疫不全患者において極めて予後不良な疾患であり、侵襲性アスペルギルス症 (年間死亡数約 180 万人) や侵襲性カンジダ症 (同約 199 万人) など、その高い致死率 (罹患した際の死亡率は世界的に 50%、国内では 30%ほどである) は世界的な脅威となっている。しかし、臨床で使用可能な抗真菌薬は以下の 4 クラスに限定されており、全てに耐性菌が確認されていることに加え、副作用などの課題を抱えている。

- 1) アゾール系: エルゴステロールの合成を阻害する薬剤である。Cyp51A 遺伝子変異等による耐性菌の出現が確認されている。
- 2) キャンディン系: β -1,3-グルカン合成阻害を行う。副作用は比較的少ないが、 β -1,3-グルカン合成酵素の遺伝子変異による耐性化が報告されている。
- 3) ポリエン系 (アムホテリシン B 等): 細胞膜中のエルゴステロールに作用し、細胞膜障害作用 (イオノフォアとして機能) を有する。ヒト細胞のコレステロールへの親和性に起因する腎毒性等の重篤な副作用が治療上の制約となっている。

- 4) ピリミジン系（フルシトシン（5-FC）等）：シトシンパーミターゼにより細胞内へ取り込まれ、シトシンデアミナーゼにより抗がん剤としても使用されている 5-FU として核酸合成を阻害する。シトシンパーミターゼおよびシトシンデアミナーゼをヒトが有していないことを選択毒性の原理としているが、単独使用では耐性が生じやすく、骨髄抑制等のリスクを伴う。

本研究室では、これまでに真菌先端部の細胞壁が合成と分解が同時に行われることにより真菌が成長していることに着目し、グルカン合成酵素である β -1,3-グルカン合成阻害に緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合させ、先端への小胞輸送および先端部への局在を可視化するシステムを構築してきている。また、その先端輸送の阻害を指標とした新規作用機作を有する化合物スクリーニングを行ってきている。しかし、先端への輸送であるエキソサイトーシスの評価であることに対して、本研究ではエンドサイトーシスの阻害を指標としている。

3. 期待される効果

Fab1/Vac14 経路の制御を指標とした抗真菌剤スクリーニングにより、以下の効果が期待できる。

- 1) 新規作用機作による耐性菌への対応:

従来の抗真菌剤とは作用機作が異なるため、既存薬に耐性を持つ株に対しても抗真菌効果が期待できる。

- 2) 副作用の低い抗真菌剤の開発:

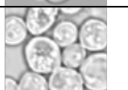
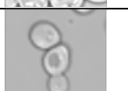
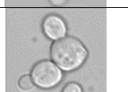
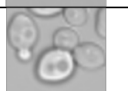
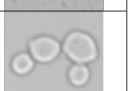
ヒトの Fab1 ホモログである PIKfyve と真菌の Fab1 には顕著な感受性差が存在する。PIKfyve 阻害剤として知られる YM-201636 は、300 μ M という高濃度においても真菌 (*S. cerevisiae*, *C. albicans*) に対して空胞表現型を一切誘発しない。このことは、副作用が極めて低い抗真菌剤としてのリード化合物を得られることが期待できる。

4. 研究の経過及び結果・評価

4-1. *S. cerevisiae* を供試菌とした生薬抽出物の抗真菌フェノティピックスクリーニング

供試菌として、*S. cerevisiae* INVSc1 株を用い、190 種類の生薬抽出物（50%エタノール抽出）を対象に、DMSO に溶解後 YPD 培地で調製した。96 ウェルプレートの各ウェルに、INVSc1 およびこれらの生薬抽出物を添加し、13～16 時間の培養を行った後、600 nm の吸光度を測定することで細胞増殖率を評価することで一次スクリーニングを行った。25%以上の生育阻害を示した生薬抽出物処理酵母に対して、顕微鏡態観察を行い、Fab1 または Vac14 の阻害の空胞化に類似する表現型を呈した生薬 12 種類を得た。このフェノティピックスクリーニングにより陽性と判定した生薬抽出物（25%以上の増殖抑制を行い、かつ、空胞化を示させたもの）を Table 1 に示す（No.は当該スクリーニングにおける生薬抽出物の管理番号である）²⁾。

Table 1 Select list of Chinese herbal medicines

No.	Chinese herbal medicine	Phenotype	No.	Chinese herbal medicine	Phenotype
5	<i>Agrimonia pilosa</i>		82	<i>Gardenia jasminoides</i>	
51	<i>Coptis japonica</i>		84	<i>Gentiana macrophylla</i> Pall	
64	<i>Dictamnus dasycarpus</i>		100	<i>Leonurus heterophyllus</i>	
66	<i>Dioscorea tokoro</i> Makino		148	<i>Polyporus umbellatus</i>	
72	<i>Ephedra sinica</i>		166	<i>Saxifraga stolonifera</i>	
80	<i>Forsythia suspensa</i>		177	<i>Swertia japonica</i>	

4-2. 空胞化を生じさせた生薬抽出物のエンドサイトーシス経路に及ぼす影響評価

真菌への生育抑制を行い、かつ空胞化を生じさせる生薬抽出物を選定する一次スクリーニングにより得られた 12 種類の生薬抽出物がエンドサイトーシス経路に及ぼす影響を評価するため、共焦点顕微鏡を用いて FITC-dextran エンドサイトーシス/エキソサイトーシス評価を実施した。その結果、ヒカイ (*D. tokoro* Makino) 抽出物が FITC-dextran のエンドサイトーシスを増加させることが示された (Fig.1) ²⁾。

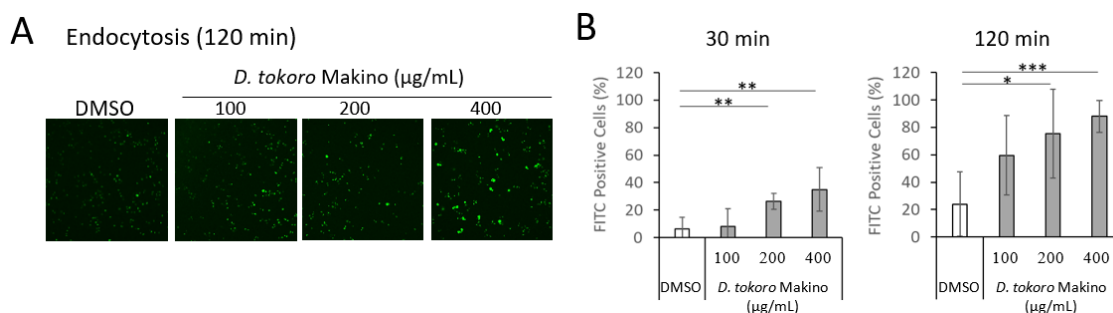


Fig. 1 FITC-dextran endocytosis assay in cells induced by *D. tokoro* Makino extract

(A) Fluorescence images of cells in the FITC-dextran endocytosis assay. Wild-type INVSc1 or Δ Vac14 cells were incubated in YPD medium containing FITC-dextran for 120 min with DMSO or *D. tokoro* Makino extract and washed twice with PBS. The fluorescence of FITC incorporated in the cells was subsequently observed. (B) Quantitative analysis of the FITC-dextran endocytosis assay (n = 5). Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

一方、FITC-dextran エキソサイトーシス評価を実施した結果、DMSO 処理群では 2 時間後に FITC 陽性細胞率がベースラインレベルまで減少したのに対し、ヒカイ抽出物処理群では FITC 陽性細胞率が高値を維持した (Fig.2) ²⁾。これらの現象は、ヒカイ以外の 11 種類の抽出物では確認されなかった。

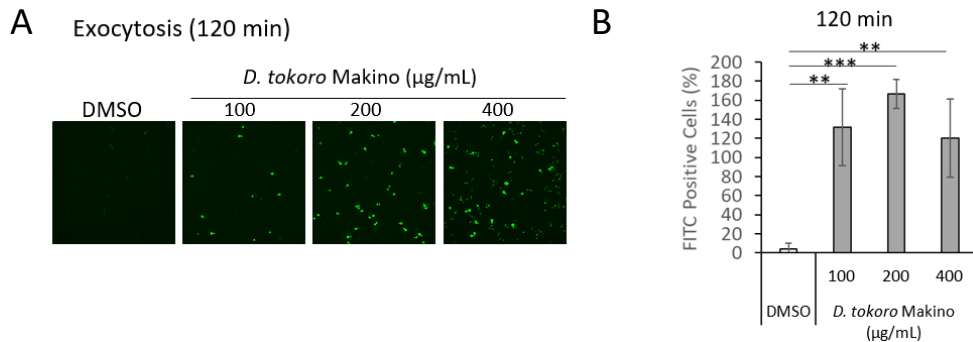


Fig. 2 FITC-dextran exocytosis assay in cells induced by *D. tokoro* Makino extract.

(A) Wild-type INVSc1 was incubated for 120 min, washed twice with PBS, and then incubated in YPD medium containing DMSO or *D. tokoro* Makino extract for 120 min (n = 5). (B) Quantitative analysis of the FITC-dextran exocytosis assay (n = 5). Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. ** P < 0.01, *** P < 0.001.

4-3. ヒカイ抽出物の *S. cerevisiae* の先端成長に与える影響評価

ヒカイ抽出物が、小胞輸送におけるエンドサイトーシスを抑制している可能性が示唆されたため、当研究室で保有している BGL2-EmGFP を発現する INVSc1 株を用いてヒカイ抽出物の先端成長に与える影響を評価することとした。その結果、BGL2-EmGFP の先端局在率が容量依存的に増加した。これらの結果から、ヒカイ抽出物がエンドリソソームからの小胞のエキソサイトーシスを抑制することで、エンドサイトーシス経路を阻害することが示唆された (Fig.3) ²⁾。

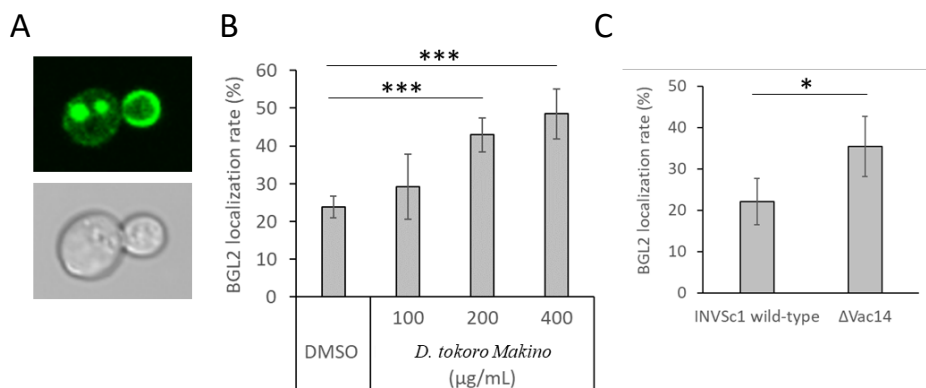


Fig. 3 Increase in the rate of BGL2 localization at the tip induced by *D. tokoro* Makino extract.

(A) DIC and EmGFP fluorescence images of cells incubated with *D. tokoro* Makino extract. The cells transformed with pYES2-BGL2-EmGFP were cultured for 2 h in medium containing 2% galactose and *D. tokoro* Makino extract. (B) Tip growth assay using cells prepared as described in (A) (n = 5). (C) Tip growth assay using Δ Vac14 cells (n = 5). Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. * P < 0.05, *** P < 0.001.

4-4. ヒカイ抽出物の *S. cerevisiae* に対する空胞化評価および Fab1 抑制評価

ヒカイ抽出物が Fab1/Vac14 阻害に及ぼす影響を評価するため、Fab1/Vac14 阻害の特徴である液胞の肥大化（空胞化）を CMAC-Ala-Pro 染色で評価した結果、ヒカイ抽出物処理後の *S. cerevisiae* において染色強度の増加が確認されたが、そのパターンは顆粒状の形態を示し、 Δ Vac14 の表現型とは異なっていた (Fig.4)²⁾。そのため、ヒカイ抽出物の作用機作が Fab1 活性阻害ではない可能性が示唆されたため、抗 PI(3,5)P₂ 抗体を用いてヒカイ抽出物処理 INVSc1 株の細胞内の PI(3,5)P₂ レベル評価を行うこととした。これは、Fab1 により生じた PI(3,5)P₂ を評価することにより Fab1 活性を評価する方法である。その結果、PI(3,5)P₂ は減少しておらず、ヒカイ抽出物の抗真菌作用は、Fab1/Vac14 阻害によらない可能性が示唆された (Fig.5)²⁾。

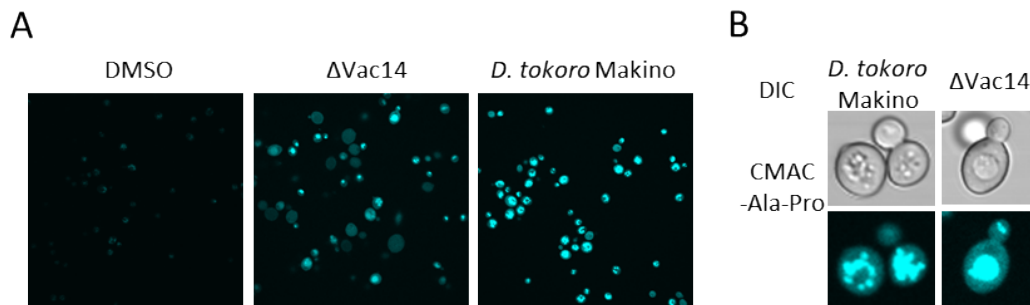


Fig. 4 Effect of *D. tokoro* Makino extract on the vacuole phenotype in cells.

(A) CMAC-Ala-Pro staining of the cells. Wild-type INVSc1 and Δ Vac14 cells were treated with DMSO or *D. tokoro* Makino extract for 4 h, followed by CMAC-Ala-Pro staining. (B) DIC and CMAC-Ala-Pro staining images of the cells.

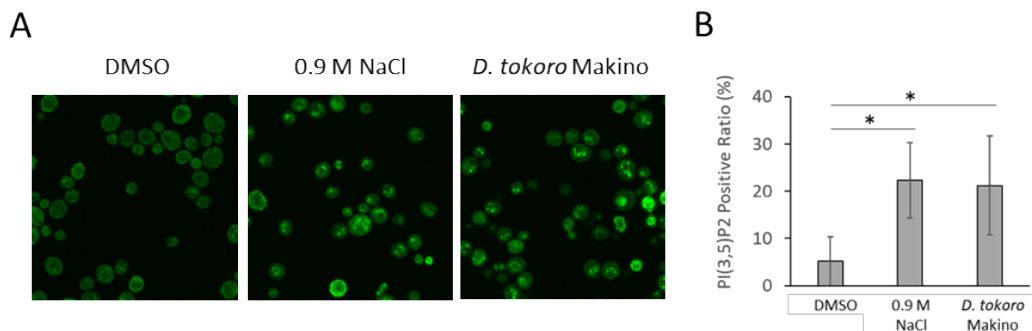


Fig. 5 Effect of *D. tokoro* Makino extract on PI(3,5)P₂ levels in cells.

(A) Anti-PI(3,5)P₂ antibody staining of the cells. Wild-type INVSc1 cells were treated with DMSO or *D. tokoro* Makino extract for 16 h, followed by immunostaining with an anti-PI(3,5)P₂ antibody. (B) Quantitative analysis of the anti-PI(3,5)P₂ antibody staining of the cells (n = 5). Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation.

*P < 0.05.

4-5. ヒカイ抽出物の *S. cerevisiae* に対する増殖抑制効果

ヒカイ抽出物が Fab1 活性抑制を作用機作としていないことが示唆されたが、実際の抗真菌活性を評価するため、その増殖抑制効果を調べることにした。その結果、ヒカイ抽出物は液胞異常を伴う濃度依存的な細胞増殖の抑制を確認することができた (200 $\mu\text{g/mL}$ 以上で 90%以上抑制) (Fig.6) ²⁾。

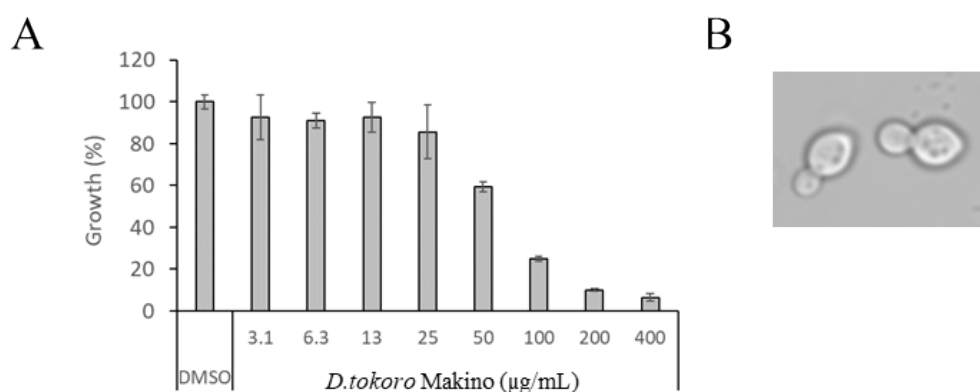


Fig. 6 Growth inhibition of *D. tokoro* Makino extract.

(A) Cell proliferation assay using wild-type INVSc1 incubated with DMSO or *D. tokoro* Makino extract. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). (B) DIC images of wild-type INVSc1 incubated with *D. tokoro* Makino extract.

5. 今後の計画

本研究で用いているヒカイ抽出物は混合物であり、当該抽出物に含まれている抗真菌活性物質を分離・精製し、再度 *S. cerevisiae* の Fab1 阻害能等、表現型も含めて評価したい。また、単離後、得られた物質の構造解析を進めて行きたい。また、現状 *S. cerevisiae* を供試菌としているが、*Candida albicans* や *Aspergillus fumigatu* などの病原性真菌を対象に、MIC 評価および有効性検証を実施したい。

6. 研究成果の発表

- 1) 竹下 亘、令和 7 年度 博士学位論文「Fab1/Vac14 の先端成長における機能の解析およびその抗真菌薬開発への応用」
- 2) S. Takeshita, H. Inoue, Y. Iida, "Dioscorea tokoro Makino extract suppresses the growth of *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 by disrupting the endolysosomal pathway.", *J Microbiol. Methods*, **239**, 107321 (2025)
- 3) S. Takeshita, Y. Iida, "Exploring the potential of FAB1/VAC14 as a target for antifungal agents based on tip growth regulation", *BioMolecular Horizons* 2024,

- 4) 竹下 亘、飯田泰広, “先端成長制御を指向した新規抗真菌薬標的としての Fab1/Vac14 の可能性”, 日本防菌防黴学会第 51 回年次大会 要旨 p. 188 (2024)
- 5) 竹下 亘、飯田泰広, “出芽酵母の BGL2 先端局在に対する Fab1/Vac14 阻害の影響評価”, 日本農芸化学会 2024 年度大会

7. 参考文献

- 1) S. Takeshita, Y. Iida, Impact of Fab1/Vac14 inhibition on β -1,3-glucanase localization at the tip in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (BBRC), **739**, 150928 (2024)
- 2) S. Takeshita, H. Inoue, Y. Iida, "Dioscorea tokoro Makino extract suppresses the growth of *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 by disrupting the endolysosomal pathway.", *J Microbiol. Methods*, **239**, 107321 (2025)