

神奈川工科大学

次世代センシングシステム研究所研究報告

第9巻

2016

The Memoirs

of

Experiment and Research Center,

Kanagawa Institute of Technology

(1030 Shimoogino, Atsugi-shi, Kanagawa, Japan)

Vol.9 (2016)

目次

1. 次世代 HEMS 基盤技術の研究	
H 科 一色正男 教授 (代表)、E 科 武尾英哉 教授、H 科 黄啓新 教授、 H 科 三栖貴行 准教授、I 科 田中博 教授、松本一教 教授	1
2. 高感度分光法を利用した人体に有害な物質の検出法の開発	
応用化学科 川嶋良章	6
3. コレステロールの非侵襲的センシング及びストレスマーカーの多検体迅速分析法の開発	
工学部応用化学科 齋藤 貴	10
4. アロステリック酵素を用いたエフェクターのフローインジェクション計測	
応用化学科 佐藤生男	15
5. 次世代 HEMS 基盤技術の研究― 医用画像診断支援システムの高度化に関する研究 ―	
電気電子情報工学科 武尾 英哉	20

次世代 HEMS 基盤技術の研究

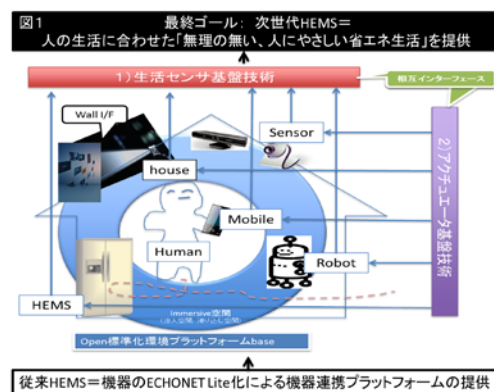
H 科 一色正男 教授（代表）、E 科 武尾英哉 教授、H 科 黄啓新 教授、
H 科 三栖貴行 准教授、I 科 田中博 教授、松本一教 教授。

1. 研究の目的

本研究の目的は、次世代 HEMS で必要になるであろう HEMS 基盤技術に着目し、学内関係研究者で連携研究することで幅広い分野での基盤技術確立が図ることである。

1) 人の行動を把握する技術（センサ技術）＝あらゆる機器がセンサになり、画像センサも含めセンサとそのデータ処理ができるようにする基盤技術確立する。

2) 人へ戻す技術（アクチュエータ技術）＝あらゆる機器が環境へ影響を与え、人へより良い環境を作るアクチュエータできるようにする基盤技術確立する。



2. 研究の必要性及び従来の研究

インフラとしての HEMS 環境研究は従来から実施してきて成果が出てきている。ところが、生活内での利用シーンを想定した HEMS 利用研究はまだ始まったばかりであり、特に、生活者が意識しないで「無理のない省エネ生活を実現できるような、次世代 HEMS」はこれからの発展が期待されている。

3. 期待される効果

神奈川工科大学では、HEMS 認証支援センタを設け、すでに、社会的貢献として、HEMS 機器の開発支援と中小企業支援を実施してきた。この点では、世界第一の地位がある。また、機器連携テストができる IOT スペースの検討も開始している。大学として、次世代 HEMS の研究を開始し、さらなる未来における先進研究拠点であり続ける研究が期待されている。

特に、今回の研究成果が、神奈川工科大学と連携強化してくれている中小企業の開発環

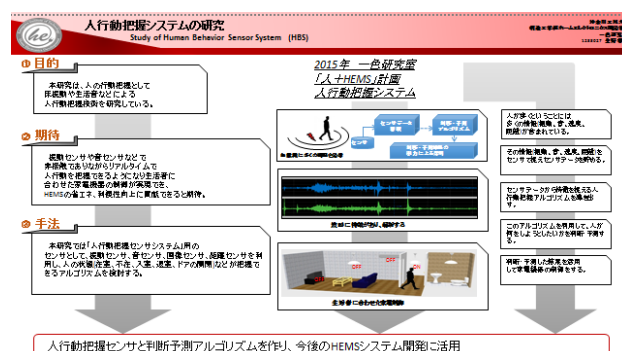
境となり、新しい地域サービスの基盤となるように提供することで、地域発展への貢献が期待される。

4. 研究の経過及び結果

学内保有技術の集約による、新しい取り組みによる、当該事業領域での研究を加速し、世界的にも最先端な研究成果を確保すること。を目指し、3年計画で以下の研究を計画した。本年度は、初年度であり、設計と基礎試作を実施した。

本年度は、要素技術の設計試作を行う。特に、下記2項目について、検討を実施する。

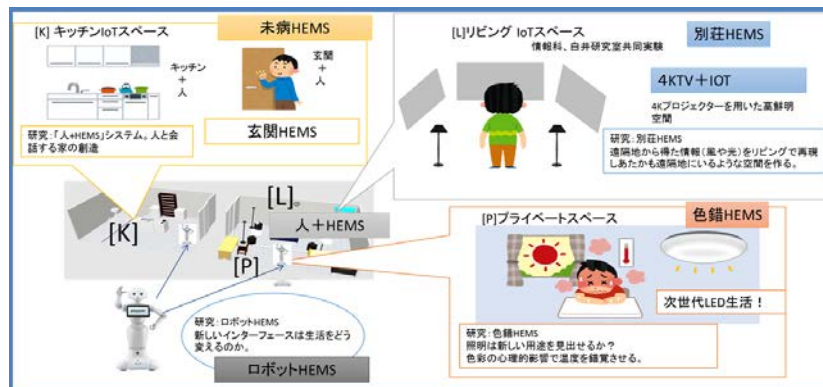
- 1) センサ利用基盤技術として、生活者の身近な機器、センサ機器あらゆる機器からの情報をセンサとして利用するセンサ基盤技術を限定して試作。特に、人検知として、画像検知、振動センサ検知、IOT スペースに設置した機器情報収集による HEMS センサ技術を検討した。人行動把握として、非接触センサを利用した検出可能性を評価した。また、電流波形からの機器操作と行動予測技術を検討した。[8][9][11][20][26]



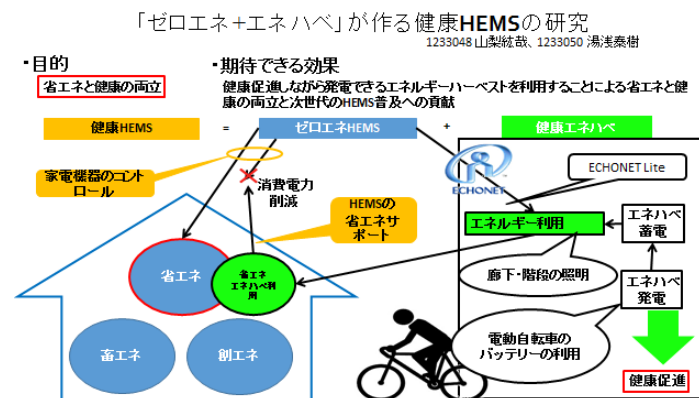
- 2) アクチュエータ利用基盤技術として、生活者の周りにあるあらゆるものを人への働きかけをするアクチュエータとして利用できる技術基盤を限定して試作。図4では、本年度着目する生活シーン（キッチン）を想定した図で代表解説しているが、関係する機器からの情報を生活センサ基盤技術として、入手方法入手情報を検討し、DD 収集エンジンにて収集の仕組みと利用基盤としてのログ D a t a データベースを設計試作することへつながることを目指して、基盤の可能性を、リビングルームとキッチンの扉（玄関も含む）で検討した。また、HEMS 家電機器からの情報、ワイヤレス技術での宅内測位への利用技術、宅内カメラの画像処理によるセンタデータ抽出技術などの、生活シーンでの人行動把握への情報利用の可能性を研究するべく、

- a) 基盤として、国際規格 ECHONET Lite 対応機器を IOT 家電機器として複数連携させる環境を構築し、IOT スペースとして整備。インターネット連携機器を併設して、同時に動作制御できる環境を IOT スペースとして整備した。IOT の、ロボットと HEMS 連携や、産業用への ECHOENT Lite の対応展開の可能性を検討し、発展へ貢献した。

[1][3][4][7][12][14][17][19][25]



- b) それら IOT 機器をインターネット連携環境制御を利用した、サービスの可能性を検討。ゼロエネ・エネハベ HEMS、健康 HEMS、ブラインド制御 HEMS、きずなドア。AR マーカ利用、HMD での表示、AR 利用技術での表示サービス等を検討した。
[2][5][6][10][13][15][16][18][21][22][23][24]



5. 今後の計画

基盤技術の可能性検討まで実施したが、本テーマでの継続はなく、初年度のみで完結したので、今後の発展は別研究へゆだねることになった。

6. 研究成果の発表

【学会誌等印刷発表論文】

- [1] 村上隆史, 杉村博, 一色正男, “HEMS における通信インタフェースの業務用機器への拡張”, IPSJ CDS 研究会トランザクション(14), Vol.CDS14, No.8, p7, Oct.2015(査読あり)
- [2] 宇佐美真, 三浦喬平, 杉村博, 一色正男, “人の動作に対してグラフィクスを高速かつシームレスに追従させる 3 次元 AR マーカの開発”, IPSJ CDS 研究会トランザクション(14), Vol.CDS14, No.4, p8, Sep.2015(査読あり)
- [3] 金子将之, 有馬一貴, 村上隆史, 杉村博, 一色正男, “家電製品遠隔制御を用いた複合起床支援システムの開発”, 第 14 回情報科学技術フォーラム, 第 4 分冊, RO-021, pp.

153-156, 2015. (査読あり)

【国際学会等発表論文】

[4] Takashi Murakami, Hiroshi Sugimura, Masao Isshiki, “Application of ECHONET Lite which is Open Standard Into Energy Management System”, 2016 IEEE International Conference on Consumer Electronics (ICCE), pp493-496, Jan. 2016, (査読あり)

[5] Okamoto, K. Ishikawa, M. Misu, T, and Isshiki, M. “Construction of Environment for the Evaluation of the Subjectivity of Brightness Suitable for Indoor Activities”, 2016 IEEE International Conference on Consumer Electronics (ICCE), pp285-288, Jan. 2016, (査読あり)

[6] Makoto Usami, Masao Isshiki, Hiroshi Sugimura, Kyouhei Miura, “3D Augmented Reality Marker Expands Workable Fields of Virtual Reality Action Games”, 2015 IEEE 4th Global Conference on Consumer Electronics (GCCE), pp323-327, Oct. 2015, (査読あり)

[7] Masayuki Kaneko, Kazuki Arima, Makoto Usami, Hiroshi Sugimura, Masao Isshiki and Keishin Koh, “Development of Information Living Integrated by Home Appliances and Web Services”, 2015 IEEE 4th Global Conference on Consumer Electronics (GCCE), pp328-329, Oct. 2015, (査読あり)

[8] Masao ISSHIKI, Yuji SASAGAWA, “Smart Houses -HEMS Initiatives-, -Certification of Smart Meter Communication-”, New Breese, vol.27 April 2015, p.8-11 (査読あり)

【学会等口頭発表論文】

[9] 生野雷人, 数野翔太, 岡本健司, 内海 和貴, 関家一雄, 一色正男, “HEMS のための人
行動把握センサシステムの研究”, 情報処理学会第 78 全国大会, 口頭発表, pp, Mar, 2016

[10] 小田原健雄, 岡本健司, 藤田裕之, 三栖貴行, 一色正男, “暖寒色を利用した省エネ空調
制御システムの構築”, 情報処理学会第 78 全国大会, 口頭発表, pp, Mar, 2016

[11] 桑田 陽介, 李 俊男, 杉村 博, 一色 正男, “センサデータマイニングによる消費電力
予測”, 研究報告コンシューマ・デバイス&システム(CDS), 2016-CDS-15(23), pp. 1-4 (2016)

[12] 宮澤 重明, 桑田 陽介, 杉村 博, 一色 正男, “ロボットを介したゆるい親子間コミュニ
ケーションツールの開発”, 研究報告コンシューマ・デバイス&システム
(CDS), 2016-CDS-15(20), pp. 1-4 (2016)

[13] 山梨 紘哉, 湯浅 泰樹, 小田原 健雄, 岡本 健司, 関家 一雄, 杉村 博, 三栖 貴行,
一色 正男 “「ゼロエネ+エネハベ」がつくる健康 HEMS の研究”, 研究報告コンシューマ・デバ
イス&システム(CDS), 2016-CDS-15(16), pp. 1-4 (2016)

[14] 数野翔太, 緒方ケント大和, 嶋大輝, 奥村万規子, 一色正男, “IoT 技術を用いた「洗濯物
取り込みロボット」の研究”, 研究報告コンシューマ・デバイス&システム
(CDS), 2016-CDS-15(19), pp. 1-4 (2016), ★学生奨励賞,

[15] 石川誠弥, 茂木奈菜, 小田原健雄, 岡本健司, 三栖貴行, 一色正男, 今吉秀幸, “側窓採光
による室内の明るさ感推定システムの構築”, 研究報告コンシューマ・デバイス&システム
(CDS), 2016-CDS-15(24), pp. 1-4 (2016)

- [16] 岡本健司, 石川誠弥, 杉村 博, 三栖貴行, 一色正男, 今吉秀幸(ニチベイ) “光環境最適化システムの動作アルゴリズムのための室内作業時最適明るさ感の検討”第 30 回光源物性とその応用研究会 LS-15-04, pp.17-22, Dec.2015.(査読あり)
- [17] 村上隆史, 杉村博, 一色正男, “HEMS における通信インタフェースの業務用機器への拡張”,情報処理学会 CDS 研究会講演会,CDS14-5, p6, Oct. 2015
- [18] 宇佐美真, 杉村博, 三浦喬平, 一色正男, “新 3 次元マーカの活用により動作環境範囲を拡大させたバーチャルリアリティアクションゲーム方式の提案”,情報処理学会 CDS 研究会講演会,CDS14-4, p6, Oct. 2015
- [19] 有馬 一貴, 金子 将之, 宇佐美 真, 杉村 博, 一色 正男 “CONCON:節電を継続するための HEMS 支援ツール”,FIT2015 情報科学技術フォーラム,O-015, pp. 453-454, 2015
- [20] 坂本優大・安藤夏生・岡本健司・宇佐美真・三栖貴行・一色正男, “デジタルカメラ画像を用いた照度測定の検討”,FIT2015 情報科学技術フォーラム,I-012, p4, Sep. 2015,
- [21] 岡本健司・杉村 博・三栖貴行・一色正男,今吉秀幸(ニチベイ), “電動ブラインドと一般照明を用いた照度最適化システムの検討”,FIT2015 情報科学技術フォーラム,K-006, p4, Sep. 2015, ★FIT 奨励賞
- [22] 岡本健司, 坂本優大, 杉村博, 三栖貴行, 一色正男, 今吉秀幸 “Android 端末と電動ブラインドを用いた照度最適化システムの検討”平成 27 年度照明学会全国大会 0315, Aug.2015
★優秀ポスター発表者賞
- [23] 武内 浩平, 鈴木 洸斗, 金子 将之, 関家 一雄, 杉村 博, 益子 寛, 一色 正男 “汎用赤外線リモコンの ECHONET Lite 化と家電ゲームの開発”,第 13 回コンシューマ・デバイス & システム研究会 Vol.2015-CDS-13, No. 2, pp. 1-4, May 2015.
- [24] 宮澤 重明, 石川 誠弥, 葉山 拓哉, 岡本 健司, 関家 一雄, 杉村 博, 奥山 武彦, 一色 正男 “新世代 HEMS サービスの開発 ～スマートメータのデータ活用～”,第 13 回コンシューマ・デバイス & システム研究会,Vol.2015-CDS-13, No. 3, pp. 1-4, May 2015,
- [25] 内海 和貴, 岡本 健司, 村上 隆史, 宇佐美 真, 杉村 博, 一色 正男 “クラウド型 HEMS サービス基盤の研究”, 第 13 回コンシューマ・デバイス & システム研究会 Vol.2015-CDS-13, No. 1, pp 1-447, May 2015.
- [26] 茂木 奈菜, 桑田 陽介, 有馬 一貴, 杉村 博, 関家 一雄, 梅田 哲士, 一色 正男, “電流波形解析による家電機器分離技術の HEMS 実用化支援”,第 13 回コンシューマ・デバイス & システム研究会,Vol.2015-CDS-13, No. 4, pp. 1-4, May 2015. ★学生奨励賞,

以上

高感度分光法を利用した人体に有害な物質の検出法の開発

応用化学科 川嶋良章

1. 研究の目的

- ①フーリエ変換マイクロ波(FTMW)分光法を用いてアルコールやチオール、環状オキシドやスルフィドさらには生体関連分子に焦点をあて、回転異性体を個別に検出するとともに、前処理をせずにそれらの回転異性体を分離し、微量検出の可能性を試す。
- ②開発してきた高感度・高分解能な特徴を有するFTMW分光計を用いて、炭素原子が3~5個を含むアルコール、エーテル、メルカプタンやチオエーテル化合物など人体に有害な分子の検出を行う。また、エチレンオキシド、エチレンスルフィドと大気中に含まれる窒素分子や炭酸ガス、COなどとの分子錯体を検出し、酸素原子と硫黄原子での分子構造の相違や反応機構についての検討を行う。

2. 研究の必要性及び従来の研究

高感度・高分解能な特徴を有するFTMW計を製作改良しながら、回転異性体を個別に検出するとともに、前処理をせずに分子を分離し、微量検出の可能性を探る必要がある。製作したFTMW分光計を用いてファンデルワールス分子やペプチド結合を持つ生体関連分子などこれまでに40種類を超える分子種の回転スペクトルを測定し、分子構造や分子内運動に関する知見を得てきた。

3. 期待される効果

FTMW分光法は、分子種、同位体種、さらには回転異性体を個別に識別できる精密な分光法である。高分解能な分光法なので前処理をせずに同時分析が可能である。地球温暖化で注目浴びている炭酸ガスを含む分子錯体の回転スペクトルを測定・帰属し、分子構造や分子運動を詳細に研究することは、炭酸ガスが地球大気に及ぼす影響を知るうえで重要な役割を果たす。

4. 研究の経過及び結果

4.1 *trans*-2-ヘキセナールのFTMWスペクトル

芝生の匂いの原因物質の一つである*cis*-3-ヘキセナールを取り上げた。市販されている*cis*-3-ヘキセナールを50℃に加熱、FTMW分光計を用いて回転スペクトルを測定し、強い吸収線を得た。スペクトルから求めた回転定数の値は、*trans*-2-ヘキセナール(*t*-2-hexenal)の計算値に近い。*cis*-3-ヘキセナールは容易に*trans*-2-ヘキセナールに異性化することが知られている。今回、市販の*trans*-2-ヘキセナールを用いFTMW分光計により4種の回転異性体の回転スペクトルを観測・帰属した。

【結果】量子化学計算から期待される a 型遷移 $J=5\leftarrow 4$ の周波数領域8.0~8.3GHzを掃引し、強い吸収線を観測した。さらに9.7GHz近辺に $J=6\leftarrow 5$ を、6.45GHzに $J=4\leftarrow 3$ を見出し、帰属した。これらのデータから得た実効回転定数 $B+C$ の値は1614MHz (set1と名付ける)である。他の回転異性体に期待される周波数領域を掃引し、2組の a 型遷移を測定・帰属した。実効回転定数はそれぞれ、2019MHz (set2)、1800MHz (set3)である。Set1

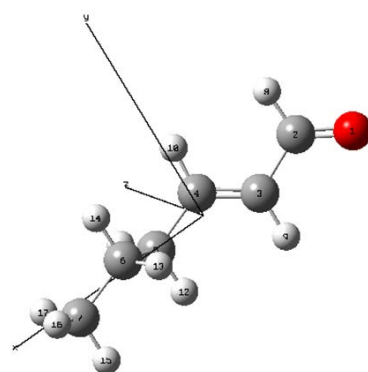


Fig.1 Molecular structure of the skew-t form of t2-hexenal

の *b* 型、*c* 型遷移は観測できなかったが、set2、set3 は *b* 型 *R* 枝遷移を 6 本測定・帰属した。さらに、set3 の近くに *a* 型遷移を新たに帰属し、set4 とした。回転スペクトルの解析には、非対称コマ回転スペクトルに対する Watson の *S*-reduced Hamiltonian を用いた。set1 では $J = 3 \leftarrow 2 \sim 11 \leftarrow 10$ 、 $K \leq 10$ の *a* 型 *R* 遷移 113 本を用いて最小二乗法により回転定数と 5 個の遠心力歪定数 D_J 、 D_{JK} 、 d_1 、 H_{JK} と H_{KJ} を決定した。同様に、set2、set3 および set4 に対しても解析を行った。スペクトルの強い回転異性体 (set1 と set2) の ^{13}C 種の測定・帰属を行った。Table 1. Rotational constants, dipole moment, and energy difference from the most stable isomer of *t*-2-hexenal, calculated by ab initio MO methods, MP2/6-311++(d,p), B3LYP/6-311++(d,p), and cam-B3LYP/6-311++(d,p).

Rotational conformer	<i>skew-trans</i> (<i>s-t</i>) = (<i>s'-t</i>)	<i>skew-gauche</i> (<i>s-g</i>) = (<i>s'-g'</i>)	<i>skew-gauche'</i> (<i>s-g'</i>) = (<i>s'-g</i>)	<i>cis-trans</i> (<i>c-t</i>)	<i>cis-gauche</i> (<i>c-g</i>) = (<i>c-g'</i>)
<i>A</i> / MHz	14010.0	8293.1	6804.8	9313.4	5596.4
<i>B</i> / MHz	809.2	949.8	1035.6	936.6	1181.1
<i>C</i> / MHz	804.7	898.0	959.3	864.5	1039.5
μ_a / D	4.23	4.32	4.12	3.83	3.75
μ_b / D	0.78	0.02	1.26	2.09	2.19
μ_c / D	1.06	0.77	0.89	0.00	0.55
MP2 / cm^{-1}	84.9	229.7	0.0	274.1	451.7
B3LYP / cm^{-1}	0.0	300.0	136.3	152.2	537.5
cam-B3LYP / cm^{-1}	0.0	276.3	104.6	80.9	439.5

Table 2. Observed molecular constants of four rotational isomers of the *t*-2-hexenal

	Set 1 (<i>s-t</i>)	Set 2 (<i>s-g'</i>)	Set 3 (<i>c-t</i>)	Set 4 (<i>s-g</i>)
<i>A</i> / MHz	13805 (45)	6628.17061 (64)	9173.15264 (68)	8145.730 (77)
<i>B</i> / MHz	808.671848 (72)	1049.653776 (64)	936.696450 (69)	952.836616 (89)
<i>C</i> / MHz	805.383571 (72)	968.620638 (62)	863.705276 (66)	901.205201 (88)
<i>D_J</i> / kHz	0.090242 (85)	0.38229 (11)	0.07045 (11)	0.29350 (14)
<i>D_{JK}</i> / kHz	-11.66076 (59)	-4.97629 (69)	-2.7625 (16)	-10.46295 (94)
<i>V₃</i> / cm^{-1}	1009.2 (30)	1023 (33)	1026.7 (16)	954.8 (32)
λ_a / -	(0.920237)	(0.047356)	(-0.99991)	(0.36890)
λ_b / -	(0.391298)	(-0.976306)	(0.00136)	(-0.85508)
<i>N_(a-type)</i> / -	113	118	101	64
<i>N_(b-type)</i> / -	0	6	6	0
σ / kHz	1.3	1.6	1.9	1.8

4.2 2-メチル-1-ブタノールの FTMW スペクトル

2-メチル-1-ブタノール(2-Me-1-BuOH と略す)の回転スペクトルを FTMW 分光計で研究し、1 種類の回転異性体 *TGt* 型を帰属したが、多数の未帰属線が残っているので今後検討をする課題が残っていた。今回 *TTt* 型の帰属に成功した。量子化学計算で 2 番目に最安定の *TTt* 型で 15~21GHz に *b* 型 *R* 枝遷移のシリーズ 3 本を見出し、最終的に *a* 型、*b* 型、*c* 型遷移を測定・帰属した。測定された周波数を用いて回転定数を最小二乗法で決定した (表 3)。回転異性体の回転定数を示した。

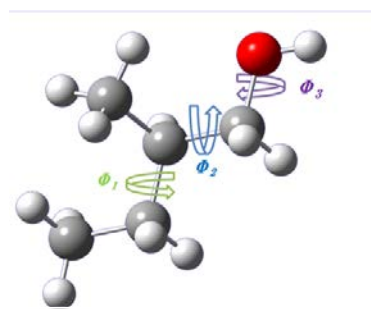


Fig. 1 Molecular structure of 2-Me-1-BuOH

Table 3 Obtained and calculated molecular parameters and number of transitions of the 2-Me-1-BuOH

Parameter	Obtained	Calculated
<i>A</i> / MHz	6863.6274 (20)	6910.5
<i>B</i> / MHz	1895.6380 (5)	1900.2

C /MHz	1627.1407 (4)	1630.7
N_a /- or μ_a /D	1	0.02
N_b /- or μ_b /D	14	1.27
N_c /- or μ_c /D	11	1.01

5. 今後の計画

次の研究課題について成果をまとめて公表することに専念する。

① C_4 、 C_5 、 C_6 の直鎖アルコール分子のまとめとシクロペンタノールの回転スペクトルの解析

1-ブタノール、1-ペンタノールに続き、今年度から測定を開始した 1-ヘキサノールで 2 個の回転異性体 ($TTTGt$ と $TTTTt$) を測定・帰属した。残りの回転異性体を検出し論文にまとめる。

現在、共同研究している CalTech の広帯域 FTMW 分光計と本学の狭帯域 FTMW 分光計で測定されているシクロペンタノールの回転スペクトルの解析を引き続き行う。

② 草の匂い的一种である cis -3-ヘキサナールおよび $trans$ -2-ヘキサナールへの異性化反応

シス-3-ヘキサナールを加熱ノズルに封入して FTMW 分光計で加熱温度 80°C で測定したところ、4 種類の測定・帰属された回転スペクトルはすべて $trans$ -2-ヘキサナールのものであることが分かった。 cis -3-ヘキサナールは $trans$ -2-ヘキサナールへの異性化反応が起こりやすいことが知られている。この異性化反応を抑えることにより cis -3-ヘキサナールの回転スペクトルを検出することを試みる。例えば、加熱温度をできるだけ下げて測定を行い、 cis -3-ヘキサナールを検出するとともにこの異性化反応について追跡を行う。また、残り 1 種類の $trans$ -2-ヘキサナールを検出することを試みる。

③ 錯体分子

弱い分子間結合をしている CO_2 -DMS (ジメチルスルヒド) 錯体は、2 種の回転異性体を帰属しているが、測定されているスペクトルの 2/3 が未帰属である。量子化学計算を行い他に安定構造がないか検討する。 N_2 分子と DMS やエチレンスルヒド (ES) 錯体を FTMW 分光計で測定・帰属を行い、分子錯体の複雑な分子運動についての知見を得ると同時に、 CO_2 -DMS への帰属に役立てる。これまで帰属の進まなかった N_2 -DME 錯体でこれまでに帰属した a 型遷移のほかにも未帰属線が多数残っており、これらは c 型遷移と予想される。この c 型遷移を帰属し、分子構造や低周波数振動が回転に及ぼす影響を検討する。

6. 研究成果の発表

論文発表

- 1) Yoshiyuki Kawashima, Yoshio Tatamitani, Takayuki Mase, and Eizi Hirota, “Dimethyl Sulfide-Dimethyl Ether and Ethylene Oxide-Ethylene Sulfide Complexes Investigated by Fourier Transform Microwave Spectroscopy and Ab Initio Calculation”, *J. Phys. Chem. A* 2015, 119, 10602-10612

口頭発表

- 1) Yoshiyuki Kawashima, Yoshio Tatamitani, Takayuki Mase, and Eizi Hirota, “DIMETHYL SULFIDE-DIMETHYL ETHER AND ETHYLENE OXIDE-ETHYLENE SULFIDE COMPLEXES INVESTIGATED BY FOURIER TRANSFORM MICROWAVE SPECTROSCOPY AND AB INITIO CALCULATION”, 70th International Symposium on

Molecular Spectroscopy (Champaign (Illinois) USA)

2) Yoshiyuki Kawashima, Sakae Iwano, and Eizi Hirota, “Dynamical Molecular Structure of the CO₂-DMS Complex Investigated by Fourier Transform Microwave Spectroscopy”, 23rd International Symposium on High Resolution Molecular Spectroscopy, Dijon (France).

3) 川嶋良章・豊谷仁男・廣田榮治 “FTMW 分光による DMS-DME 錯体の研究(2) “、第 9 回分子科学討論会 L1 九州大学

4) 横山良輔・川嶋良章・廣田榮治 “トランス-2-ヘキセナールのフーリエ変換マイクロ波スペクトル” 第 9 回分子科学討論会 4P0008 東京工業大学

コレステロールの非侵襲的センシング及びストレスマーカーの多検体迅速分析法の開発

工学部応用化学科 齋藤 貴

1. 研究の目的

- (1) 目的：近年、少子高齢化が急速に進み、人々の健康意識の高まりも大きくなっており、これに伴いより自己管理がますます重要になることは明らかである。そのため、医療施設での利用はもちろんのこと自己管理も可能となる健康管理診断や疾病検査に対応できるセンシング技術の要求が高まっている。その際、迅速に簡易に且つ被験者に負荷をかけない検査法の開発が急務となる。そこで、成人病や社会病とも言われる生体物質マーカーの検査を目的に、非侵襲的な診断検査に基づくセンシング法とそのシステムの考案と具現化を目指すことを狙いとして研究を展開する。
- (2) 研究期間内(平成27年度)に明らかにする事項：ストレスマーカーとして唾液中の α -アミラーゼを指標としたストレスの判定法について、その分析法と応用分析を行うことを目的として検討を行う。

2. 研究の必要性及び従来の研究

ヒトストレスの非侵襲的センシング

ヒトストレスの身体状況は、近年、社会病とも言われ、健康意識の高まりにより人々が知っておく重要なキーワードである。しかしながら、現状では従来より問診法などが医師のもとで行われ、定量的な扱いはされておらず、また医師の技量にも影響を受ける診察法となっている。当然ながら被験者の自主管理的な個人による客観的な測定も不可能である。すなわち、現在の医療機関に出向いての医療分析では、簡易な自己管理の進展に限界を生じることになる。そのため、生体試料としてヒトの唾液中の試験紙に基づく簡易な比色計測法などを確立することは、医師によるより客観的な診断結果が得られ、継続的に測定することで統計的に被験者の身体状況がモニタリングでき、ストレス管理の指標としての利用も可能となる新たな展開が期待できると考えられる。

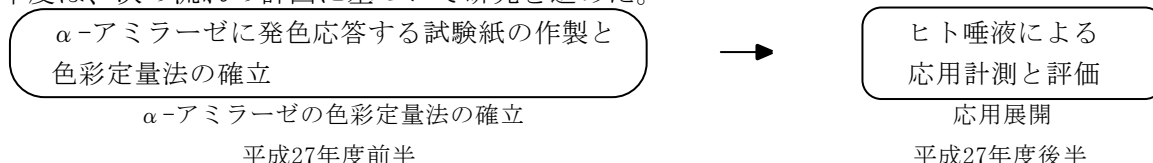
3. 期待される効果

研究の特色・独創的な点と予想される結果と意義

唾液中の α -アミラーゼの簡易なセンシング法に関して、生活習慣病、社会病でもあるストレスの定量的で客観性のある診断として利用することが期待できる。また将来的には、医師による利用ばかりでなく、その場で個人によるモニタリングも可能となる手法に発展させたいと考えている。

4. 研究の経過及び結果

今年度は、次の流れの計画に基づいて研究を進めた。



(1) 測定原理

ストレス評価において、ストレスマーカーである唾液中の α -アミラーゼを指標として用いる。この物質はストレスによりストレス負荷がかかることで活性が変動する。ストレスが快ストレスの場合は酵素活性が減少し、不快ストレスの場合は酵素活性が増大する。そのため、この酵素を用いてストレス測定が可能である。

本研究で使用する反応式を図1に、測定の流れを図2に示した。酵素である α -アミラーゼに対する基質として、2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosyl maltoside (Gal-G2-CNP)を用いた。この物質は α -アミラーゼの酵素触媒作用により加水分解され、 β -D-galactopyranosylmaltose (Gal-G2)と黄色分解生成物である2-Chloro-4-nitrophenol (CNP)が生成される。人が不快ストレスを受けると唾液中の α -アミラーゼの分泌比率が増大し、見かけ上の酵素能力も増大する。そのた

め、Gal-G2-CNPの分解速度が上昇し、生成されるCNPの濃度が増大する。つまり、生成されたCNPの濃度が高ければ(CNPによる発色が大きければ)、唾液中の α -アミラーゼの分泌比率が高いことがわかる。以上のメカニズムにより、唾液中の α -アミラーゼを定量的に測定し、ストレス評価を行った。なお、測定には色彩色差計CM-3600d(MINOLTA社)を用いて色度(a^*b^*)($a^*b^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$)を算出した。平常時のストレスの経日的な測定から、ストレス評価が可能となる。

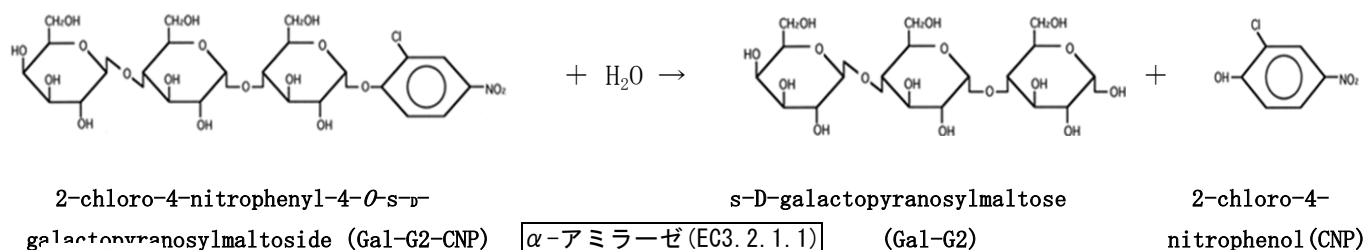


図1 α -アミラーゼの測定原理

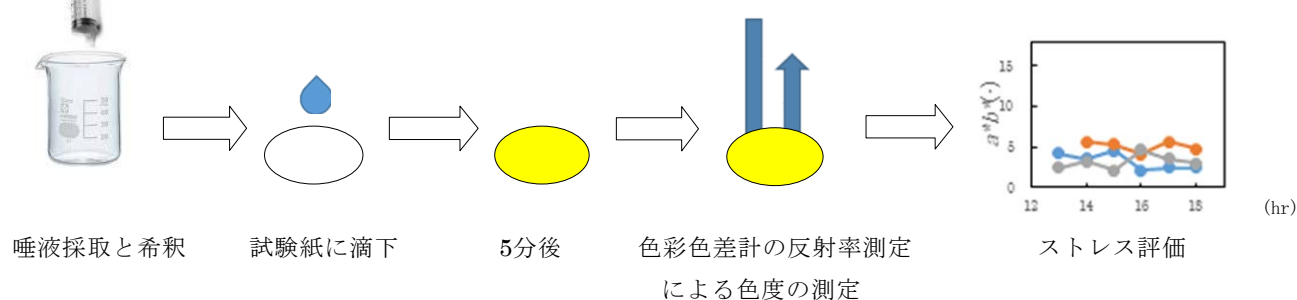


図2 測定方法

(2) α -アミラーゼ色彩計測用試験紙の作製

ストレス評価用の試験紙を作製した。分析用濾紙No. 26-WA (ADVANTEC)を直径10 mmの円状に切り取る。その濾紙に含まれる水分の除去のため、80℃で1時間以上乾燥させた。その後、試薬R1 620 μL と試薬R2 180 μL の混合液40 μL を濾紙に滴下し、乾燥させてストレス評価試験紙を作製した。

- ・試薬R1:緩衝溶液ベース溶液、試薬R2:2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosyl maltoside (Gal-G2-CNP) 溶液 (Mizuho Medy 社)

(3) ヒト由来 α -アミラーゼの濃度に対する経過時間と色度変化の関係(0~3000 U/L)

0~3000 U/Lの濃度の α -アミラーゼによる色度変化を調査した。発色10分間のストレス評価試験紙について、 α -アミラーゼの濃度に対する経過時間と色度変化の関係(0~3000 U/L)を図3に、発色5分時の濃度と色度の関係(0~3000 U/L)を図4に示した。

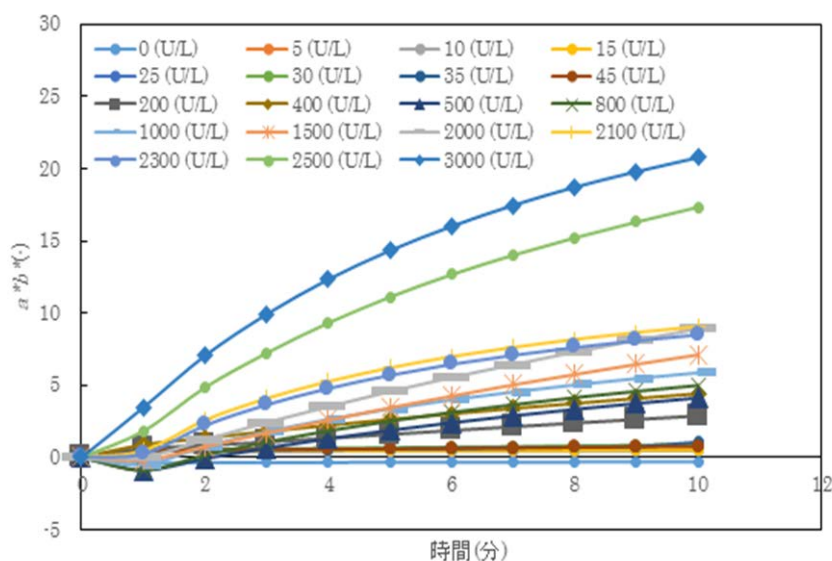


図3 ヒト由来 α -アミラーゼの濃度に対する経過時間と色度変化の関係

その結果、図3より、 α -アミラーゼの濃度に対する試験紙上の色度変化の度合いを確認することができた。さらに図4では、濃度に対する色度に多少ばらつきが生じているものの、 α -アミラーゼ濃度と色度(a^*b^*)とはほぼ直線的な関係にあり、定量的に唾液中の α -アミラーゼが測定できることが分かった。以上のことから、生成されるCNPを測定することで、唾液中の α -アミラーゼの定量的な評価が可能であることが明らかとなった。

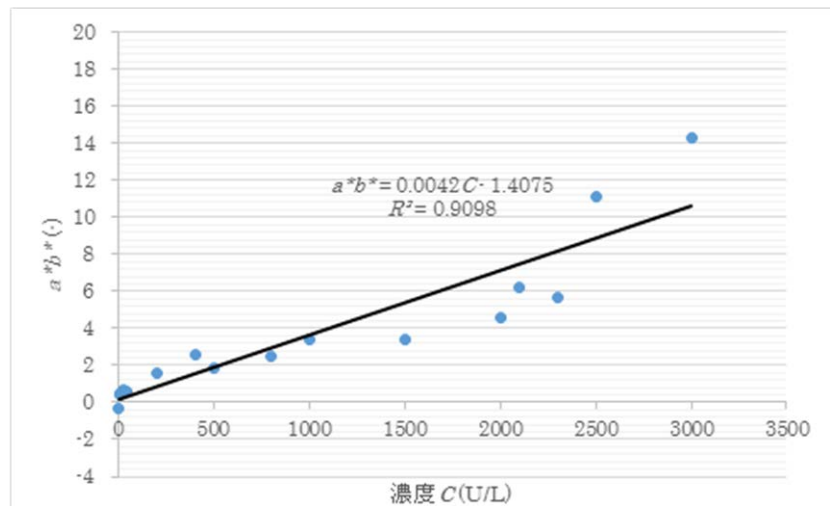


図4 発色5分時の濃度と色度の関係(0~3000 U/L)

(4) 平常時のストレス度の定量

ストレス評価試験紙に唾液を滴下し、発色5分時の試験紙の色度を測定することで、 α -アミラーゼの濃度と色度の関係から唾液中のストレス度を定量することができる。しかし、ストレス度を測定するにはストレス負荷時のストレス度と平常時のストレス度の差を考慮する必要がある。そのため、まず平常時のストレス度を測定した。平常時のストレス度を調査する実験を被験者1人につき3日間室温で行った。また、飲食から1時間以上時間を空け、口をゆすいだ後、唾液をコットンで1分間採取した。

測定日数に対する採取時間と色度変化の関係を図5に示した。その結果、同時間帯においても測定日によって色度に変動することが確認された。また、経時変化では2日目の13時の色度を除けば、時間が経過しても色度の変動があまり大きくないことがわかった。6時間の測定結果において1日目は2.2倍、2日目は1.4倍、3日目は2.2倍の差が見られた。2日目の13時の色度が高かった原因は昼食からの経過時間が十分でなく、食事による影響が生じたものと考えられる。

以上のことから平常時において、2日目の13時のストレス度を除外して評価するとストレス度があまり大きく変動していないことが判明した。また、ストレス度の変動の度合いも測定日によって異なることが確認された。

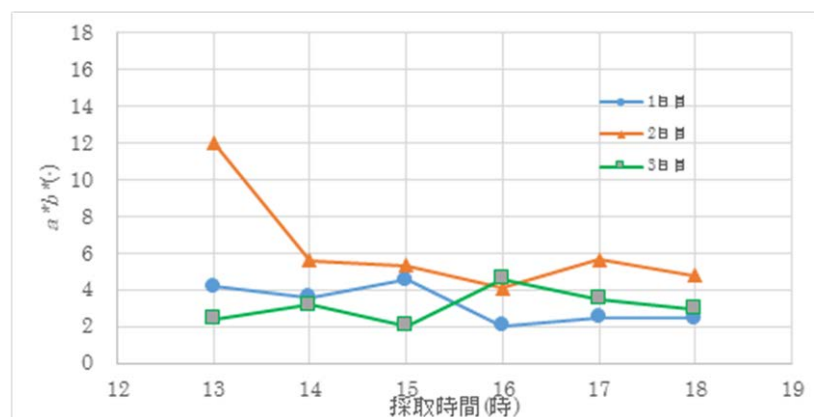


図5 測定日数に対する採取時間と色度変化の関係

(5) ストレス負荷実験

(A) 被験者A(22歳女子大学生)

ストレス負荷によるストレス度の変動を調査した。被験者Aのストレス負荷には箸で米粒をつまんで移動させる方法を行った。採取時間帯と色度変化の関係を図6に示した。

その結果、ストレス負荷時におけるストレス度の上昇は確認できず、ス

ストレス負荷時のストレス度はストレス負荷前より低くなった。これはストレス負荷前の行動が被験者Aのストレス度の上昇に寄与し、米粒の移動作業が単純であったため、自分のペースで行っていくことでストレスとして認識されなかったことが考えられる。

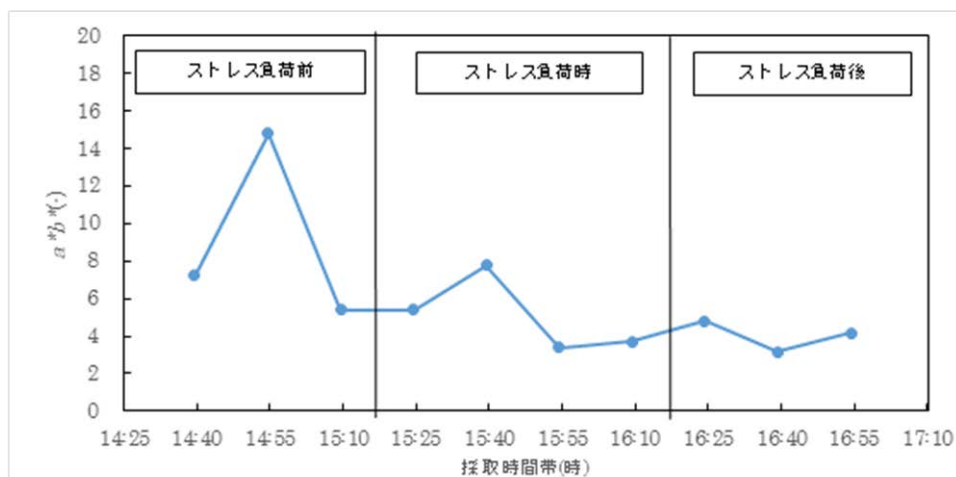


図6 被験者Aに対する採取時間と色度変化の関係

(B) 被験者B(22歳女子大学生)

被験者Bのストレス負荷には被験者Aと同様の箸で米粒をつまんで移動させる方法を行い、さらに別のストレス負荷としてトランプタワーの作製を行った。色度変化の経時的挙動を図7に示した。

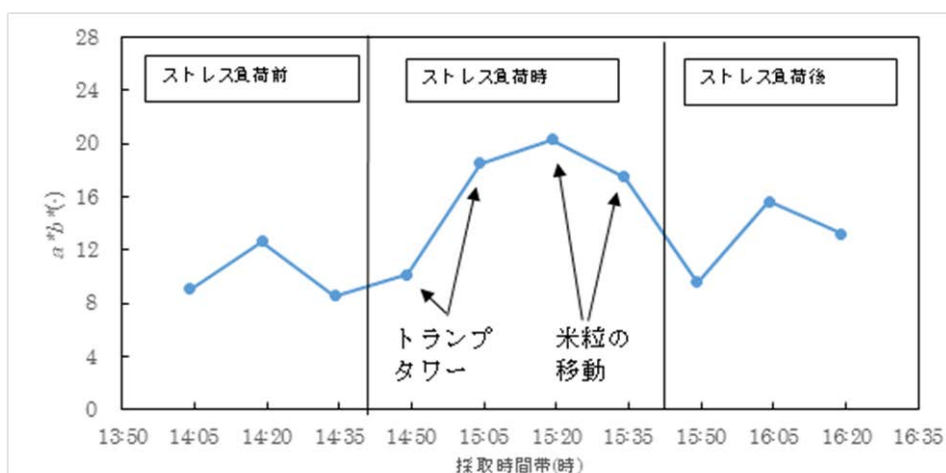


図7 被験者Bに対する採取時間と色度変化の関係

ストレス負荷時におけるストレス度の上昇が確認できた。これはトランプタワーや米粒の移動が被験者Bにとって集中力を要する行為であり、トランプタワーが崩れたり、米粒がうまく掴めなかったりすることでストレス度が上昇したと考えられる。

5. 今後の計画

今回、当初の目的であったストレスマーカーによる多検体迅速分析法を確立することができた。そこで今後は第2の目的である健康食品中の生理活性物質である(+)-カテキン類の高選択的センシング法について開発を行い、応用分析を行う方針である。

6. 研究成果の発表

研究成果の主な公表に関しては次の通りである。本研究に関する論文は現在準備中である。

- 1) 学術論文：斎藤貴、日本材料科学会、53巻、No. 1、p. 1-5、2016年(平成27年度)
- 2) 口頭発表論文：13件(平成27年度)
- 3) 特許：特願2015-150237「高分子化合物膜で被覆された基材、その用途及び製造方法」

(2015年7月30日)

特願2015-150267「温度応答性ポリロタキサンゲル及び薬物保持体」(2015年7月30日)

アロステリック酵素を用いたエフェクターのフローインジェクション計測

応用化学科 佐藤 生 男

1. 研究成果の要約

炭素繊維をディスク状に加工し、次いで化学修飾して酵素固定化用の担体に用いた。昨年度、クロロ金酸液を炭素繊維に含浸させ、これを還元する際に、水素ガスの代わりに過酸化水素水を作用させて金属状の金に変換し、酵素の固定化を試みると定量的に酵素が固定化できるものの、酵素活性の発現については予期した程の成果を得られなかった。一方また、塩化パラジウム液をこのディスク状の炭素繊維に一度、願浸させた後、パラジウム(II)イオンをパラホルムアルデヒドで還元し、次いで金属パラジウムと金酸とをイオン交換し、金属状態の金に換える方法において、酵素タンパク質を振盪・固定化するには予め、炭素繊維表面の気泡を徹底的に除去することが不可欠と思われた。酵素触媒として、代表的なアロステリック酵素の一つであるグリコーゲンホスホリラーゼ *b* を用い、フローインジェクション計測システムを用いて、エフェクター(アデノシンーリン酸、以後AMPと略称)の微量計測を試行することとした。この酵素固定化繊維をプラスチック製のミニリアクタに充填し(内径：約 7.0 mm, 充填高さ：約 15 mm)、本リアクタを識別素子とし、分光測光法に基づいたフローインジェクション計測システムに構成した。本法を用いることで、少なくとも 5 μM (最低検出限界) 以上の正リン酸(酵素反応の一生成物)を定量できることを再度確認し、次いで 0.5mM 以上の AMP を分光測光法的にモニターすることができた。

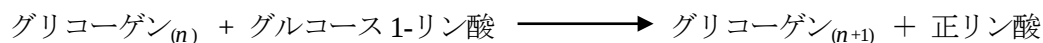
2. 研究概要

2.1 計測原理

一般の糖代謝系においてアロステリック酵素はその存在が認められ、しかもその代謝系において、特異的な制御作用を発揮する。一方、酵素タンパク質分子にあって、その活性部位とは空間的に異なる部位(エフェクター部位)へ、エフェクターとして作用する分子が結合することで、本酵素の触媒活性が調節され、ひいては代謝系の制御がなされることは公知の事実である。代表的なアロステリック酵素として、グリコーゲンホスホリラーゼ *b* もよく知られ、本酵素のエフェクターである AMP は、この酵素のエフェクター結合部位に配位、結合することで、触媒活性が制御されている。他方、エレクトロニクスの基礎分野では、電子デバイスのトランジスタが、グリッド電圧の調節を介して増幅作用が行われることも既知である。これらの関係に注目し、電子デバイスの特性を生物素子に導入した計測法の開発を企図した。

この実践に際しては、エフェクターとしての AMP 分子に着目し、酵素触媒にグリコーゲンホスホリラーゼ *b* を用い、次のグルコース鎖の伸長反応で生成される正リン酸を分光測光法的にモニタリングすることで活性の計測が果たされるとした。

グリコーゲンホスホリラーゼ *b*



上記の反応で生成される正リン酸をさらに、リンモリブデン酸塩の誘導体にし、マラカイトグリーンと反応させることで発色、生成されるイオン会合体をモニタリングすることにより、ひいてはこの反応を分光測光法的に定量することで、間接的にエフェクターのフロー式定量がなされるものとした。血液中の AMP 濃度の計測は、手術後の患者の回復度の指標として、医療計測上、意義を有するものである。

2. 2 グリコーゲンホスホリラーゼ *b* の固定化

代表的なアロステリック酵素としてグリコーゲンホスホリラーゼ *b* (略称 GP*b*, EC 2. 4. 1. 1, 11. 8 U/mg 固体物, ウサギ筋肉起源, Sigma-Aldrich 社製) を用いた。

- (a) 炭素繊維の酸処理工程： まず、ポンチで円盤（ディスク）状（内径 約 7.0 mm, 高さ 5.0 mm）に打ち抜いた炭素繊維（日本カーボン(株)製 No.シ 01007-044）15 個をアセトン中で超音波洗浄（15 分間）し、脱脂、乾燥した。次いで、10 mM 硝酸液中に浸漬し（30 分間, 75℃）、吸引ろ過後、洗浄、分離して、110℃で乾燥した。
- (b) 金酸液の含浸： 10 mL の純水中にテトラクロロ金(III)酸四水和物（0.33 g）を溶解し（80 mM 液）、50 mL 容の三角フラスコに移し、上記の硝酸処理後、乾燥済の炭素繊維を保冷庫内（4℃）で、一晚（約 18 時間）ゆっくりと往復振盪（60 rpm, 振れ幅 25 mm）した。この金酸液に浸漬、振盪済のディスク状の炭素繊維をろ過・吸引、洗浄し、保冷庫内で乾燥した。なお、往復振盪する前に、予め、真空ポンプを用いて、炭素繊維表面にある気泡の除去操作の必要性が示された。
- (c) パラジウムと金酸とのイオン交換法による金属状の金への還元： 過酸化水素水による金への還元を行うと、定量的に酵素タンパク質を固定化できたが、パラジウムイオンの金との置換による金属状の金が炭素繊維の表面で被覆されることを試みた（所謂化学メッキ法である）。300 mL 容の三角フラスコに飽和塩化パラジウム溶液（100 mL）を先ず加え、次いで硝酸処理済みの炭素繊維を入れ、恒温槽（60℃）中で 2 時間保温し、室温に冷めてから 30 分間減圧状態に置いた。次いで、恒温室（4℃）で約 18 時間以上、振盪（60 rpm; 振れ幅 25 mm）させた。

昨年度と同様、パラホルムアルデヒド 0.180 g を三角フラスコに秤取し、総量として純水 200 mL を少しずつ攪拌しながら加えて、恒温槽中（60℃）で約 2 時間、溶解させた。このパラホルムアルデヒド溶液 200 mL をディスク状の炭素繊維が浸漬したパラジウム溶液中に、さらに恒温槽中（60℃）で 5 分間毎に 10 mL ずつ添加し、4 時間を経て反応させた。室温に戻した後、減圧吸引ろ過を行い、100 mL の純水で洗浄した。吸引ろ過操作で水滴が出なくなるまで乾燥させ、恒温室（4℃）で風乾させた。

テトラクロロ金(III)酸四水和物 (0.0693 g) を 50 mL 容の三角フラスコで秤量し、塩化ニッケル液 21 mL (Ni^{2+} として、5000 ppm に調製)を加え、溶解した。この液にディスク状の炭素繊維を添加し、30 分間減圧下に置き、恒温室 (4°C) で約 1 日間振盪させ、金属パラジウムを金酸(III)イオンとイオン交換し、金属状の金に置換させることとした。その後、パラジウム液の処理と同様の操作でろ過と乾燥を行った。

- (d) アミノエタンチオール化： 金属状の金で置換、被覆したディスク状の炭素繊維を 20 mM 2-アミノエタンチオール液 (0.05M リン酸ナトリウム緩衝液中, pH 8.0, 100 mL) に入れ、予め室温で液中の気泡を減圧下で除去し、再び 4°C の保冷庫内で往復振盪 (18 時間以上, 60 rpm, 振れ幅 25 mm) した。その後、吸引・ろ過して洗浄 (0.05M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 8.0) し、4°C の保冷庫内で乾燥させた。
- (e) グルタルアルデヒド活性化： 0.25% グルタルアルデヒド溶液 (100 mL) で架橋法 (0.1M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0, 60 min) を用いて作用 (グルタルアルデヒド活性化) させた後、0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) , 次いで純水で洗浄し、秤量値が変化しなくなるまで室温で乾燥させた。
- (f) 酵素とのカップリング： この乾燥済みのディスク状の炭素繊維に対し、10%の重さに相当する GPb を最終濃度が 0.1M になるように調整したリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 10 mL 中に溶解し、9.0 mL を固定化に適用した。50 時間、4°C の保冷庫内で振盪後、0.1 M リン酸ナトリウム、緩衝液 0.5 M 塩化ナトリウム、純水の順で各 1L ずつ洗浄し、酵素固定化物を得た (固定化収率: ほぼ 100%)。このようにして本酵素を定量的に固定化することができた。なお、シッフの塩基の残存を考慮し、一旦、水素化ホウ素ナトリウム液で還元処理後、酵素固定化炭素繊維 (3 個のディスク) をポリアセタール製のリアクタに詰め、さらにアクリル製の恒温ホルダーに取り付け、計測システムに組み込んだ。

2. 3 酵素触媒反応のモニタリング

マラカイトグリーンを用いた正リン酸の分光測光法の測定条件の改善を既に行った。酵素触媒反応に適した中性付近の pH で、安定した計測条件を検討し、最適計測条件として、キャリアの組成が 50 μM グリセリン酸と 15 mM メルカプトエタノールからなる緩衝液 (pH 6.2) の適用が最適であったことを再確認した。一方、発色試薬としては 0.11 M モリブデン酸液 - 0.22 mM マラカイトグリーン液を用いた。

3. 結果

先ず、このシステムを用いて正リン酸を微少濃度 (5 μM) で測定できることを再度確認した。固定化された酵素の活性の発現に対しは、グリコーゲンとグルコース 1-リン酸からなる基質液を注入しても、

酵素リアクタからの排出液と発色液とを混合しても、この混合液の発色が認め難かった。つまり、イオン会合体の生成に起因する応答が認められなかったことになる。イオンの置換法ではわずかにしか触媒活性の発現が観察されなかった。酵素タンパク質自体の固定化は可能であったが、活性を発現する状態には未だ至っていないと思われる。

4. 今後の展望

炭素繊維を担体とする新たなグリコーゲンホスホリラーゼ *b* の分光測光法によるエフェクターのフローインジェクション分析法を提唱し、定量的な固定化が可能であった。十分な酵素活性のある炭素繊維を取得するためには、ガス状の水素が不要でしかも酵素タンパク質の固定化率の向上が必定で、次年度にはパラジウムで予め被覆した炭素繊維を金酸液に含浸（振盪・攪拌）し、金属状の金に置換した標品を酵素固定化用の担体に適用する予定である。この際、気泡を炭素繊維表面から予め、徹底的に除去しておく必要が有ると考えた。そこで、今年度はアスピレーターの使用に代えて、真空ポンプの適用を考慮した。果たせるかな、金属酵素の一種、アルカリホスファターゼを利用した結果では、固定化率が 30% から 35% に僅かであるが、改善することが示された。次年度は炭素繊維の化学修飾の一環として、ケルセチンの試行を考慮している。ケルセチンは、縮合環の構造をしており、炭素繊維と一部、親和性があり、しかも五つのヒドロキシル基を合わせ持ち、親水的雰囲気下ではカチオン類に親和性を有すると期待される。

研究発表リスト

印刷物発表

- (1) Ikuo SATOH and Yasushi KANZAKI : “Use of carbon fibers as supporting materials for flow-injection analyses of bio-related substances ”, *Book of Abstracts of Flow Analysis XIII*, 5-10 July, p. 72, Prague, Czech Republic, (2015).
- (1) Ikuo SATOH, and Yasushi KANZAKI : “Immobilization of Biocatalysts onto Carbon Fibers Modified Chemically and Their Application to Flow Sensors”, *Proceedings of the 59th Chemical Sensors Symposium*, 31, Supplement B, pp.55- 57, 2015.
- (3) Ikuo SATOH, Yohsuke KAWAKAMI and Yasushi KANZAKI : “Flow-injection Determination Using Enzymes Immobilized onto Carbon Fibers Chemically Modified”, *Proceedings of the 60th Chemical Sensors Symposium*, 32, Supplement A, pp.54 - 56, 2016.

口頭発表

- (1) Ikuo SATOH and Yasushi KANZAKI : “Use of carbon fibers as supporting materials for flow-injection analyses of bio-related substances ”, *Flow Analysis XIII, OP-24, Session 7*, 5-10 July, Prague, Czech Republic, (2015).
- (2) 佐藤生男, 神崎愷 : 「酵素の修飾済炭素繊維への固定化とフロー計測への適用」, 公益社団法人電気化学会, 化学センサ研究会 第 59 回講演会, No.17, 深谷, 9 月 11 日 2015 年.
- (3) 佐藤生男, 川上洋輔, 神崎愷 : 「化学修飾済の炭素繊維上に固定化した酵素を用いるフロー計測」, 公益社団法人電気化学会, 化学センサ研究会, 第 60 回講演会, No.17, 吹田, 3 月 29 日, 2015 年.
- (4) Ikuo SATOH, Yohsuke KAWAKAMI, and Yasushi KANZAKI : “Use of carbon fibers for immobilisation of alkaline phosphatase for flow-injection microdetermination of zinc(II) ions based on the electrolytically regenerated apoenzyme reactivation”, Biosensors 2016 Conference, P.S.142, Gothenburg, Sweden, May 25-27, 2016.

次世代 HEMS 基盤技術の研究

— 医用画像診断支援システムの高度化に関する研究 —

電気電子情報工学科 武尾 英哉

1. 研究の目的

CT, MRI, デジタル X 線, 超音波診断機などに代表される医療診断機器の高性能化に伴い, 一回の撮影で得られる医用画像の毎数は大幅に増大した. 例えば, CT 装置では画像あたり 0.1~0.5mm のスライス精度まで向上し, 胸部診断の場合, 約 500~1000 枚に及ぶ画像データが収録される. しかしながら, こういった装置の高性能化とは逆に, 病変の見落としが心配される. 理由は, 情報として埋もれている小さな信号 (病変を表す情報) を大量の画像情報の中から見落としなく発見 (診断) することが難しくなっているからである. そこで, これら医師の画像診断を支援する コンピュータ支援画像診断 (CAD: Computer Aided Diagnosis) の研究がされている. CAD とは, 医用画像をコンピュータを用いて解析し, 病変の疑いのある候補を抽出し表示することで, 医師の診断をサポートする機能であり, 第二の意見 (セカンドオピニオン) とも呼ばれている.

ところで, 人体における様々な病気を対象として考えている CAD において, 現在研究が着手されている領域はまだごく一部にすぎない. 一方, 最近の CT 装置の進化に伴い, 比較的低被爆線量で人体の全身 (頭~足のつま先まで) を容易に撮影できるようになった. また, CT 検診車なども登場し, 検診で CT が使われるようになってきている. このことから, 健常者も含めて 全身 CT を撮影し, 全身のあらゆる病変を対象とした夢の CAD システムが実現できれば, より早期に病気を見つけることが可能と思われる. そこで本研究では, 人工知能による認識技術の高度化を進め, 全身 CAD の実現に向けた基礎研究の強化を図る.

2. 研究の必要性及び従来の研究

これまで国内外の研究機関では, X 線画像や CT 画像を用いて, 乳がん, 肺がん, 胃がん, 肝臓がんなど一部の部位を対象とした CAD が開発されてきたが, これらは人体の疾病 (病変) の一部にすぎない. そこで, 将来的には全身のあらゆる病変を対象とした CAD システムを開発するために, 本研究では, 以下の部位とモダリティを対象とした CAD の適応領域の拡大を目指す.

- (A) CT 画像による胸部疾患の診断支援技術の確立と更なる高精度化
- (B) 他部位への診断支援技術の適用拡大の可能性検討
- (C) CAD システム開発の効率化および FDA・薬事認可のための客観的評価仕組みの確立

本年度は, 上記のうち, (A) および (C) の CAD システム開発の効率化に関して, 基礎技術の確立と高精度化を目標に研究を進めた. 本研究の進め方の特徴は, これまで乳がんを中心に 20 年間以上研究を進めて築いてきた CAD の基盤技術を, 広く他部位やマルチモダリティに展開するとともに, 臨床の現場と連携を図りながら実用化 (役に立つシステムの運用の実現) を目指していく点にある.

3. 期待される効果

本研究は, 医療分野のある単一のモダリティにとどまらず, X 線撮影, CT, MRI, さらには細胞画像 (明視野もしくは顕微鏡画像) にまで至っている. また, 検診~診断, さらには治療や新薬研究に至るまでの分野にわたっている. このように, CAD の応用領域の拡大化を図っており, 医学・臨床 (医療・治療) の発

展に大きく寄与している。

なお、本研究を進める上で、市場サイドの声を反映するために、より一層、臨床サイド（医療機関）との連携を強めた。本学に加え、栃木県立がんセンター（黒木放射線科医）、国際医療福祉大学病院（縄野放射線科医）、（独）国立がん研究センター中央病院（永井臨床放射線技師）と共同研究および共同開発を進めた。

4. 研究の経過及び結果

本研究の特徴は、これまで乳がんを中心に15年間以上研究を進めて築いてきたCAD技術を、広く他部位や他モダリティに展開するとともに、臨床の現場と連携と図りながら実用化（役に立つシステムの開発）を目指していく点にある。研究課題（A）は栃木県立がんセンター、（C）日本医用画像工学会CADグループ（医師と工学者の集まり）と連携を図り、臨床データの収集および臨床評価を進めてきた。そして、その研究成果はCARS2015国際会議で発表^{[1], [2]}するとともに、日本医用画像工学会(JAMIT)論文誌(MIT誌)にも掲載された^{[3], [5]}。基本的に研究課題（A）は本年度では完了とし、現在、研究課題（B）と（C）に取り組んでおり、その研究成果は平成28年度中に海外を中心とする学会で発表する予定である（現在、CARS2016国際会議およびMIT誌へ投稿中）。

（1）胸部CT画像を用いた胸膜中皮腫の領域抽出処理の高度化^[1]

胸膜中皮腫は胸膜にがん細胞が認められる病態であり、胸壁や肺の表面にも腫瘍が浸潤・転移する。中皮腫は胸膜浸透による胸水貯留や、それに伴う呼吸困難を引き起こす要因となる。また縦隔胸膜より心膜に浸潤し腫瘍を形成すると拡張不全による心不全を引き起こすなど、早期の治療が必要となる。従来の単純X線画像による診断では、初期の中皮腫の発見は、中皮腫自体の初期症状の乏しさもあり困難であった。そこで本研究では、胸部CT画像を用いて胸膜中皮腫の領域を抽出し、個別に体積を計測する手法を開発した。定量化を行うことで病状の進行度や治療の経過を数値的に判断することが可能となる。

本手法では1スライスごとに胸膜中皮腫の領域抽出を平面的に行い、個別に面積を求める。この処理をCT画像のスライス毎に行い、抽出された面積を加算することで胸膜中皮腫領域の体積を計算する。本処理は、①肋骨情報を用いた肺輪郭検出、②肺空気層抽出、③心臓領域の除外、④胸膜中皮腫領域の抽出で構成され、最終的には、候補として抽出された各中皮腫の体積計測が出力される。

図1には、本手法を用いて抽出を行った結果画像を示す。また表1には、抽出結果一覧を示す。なお、グループAがテストデータ、グループBが未知データの症例となっている。未知データであるB01の抽出結果から、本手法で胸膜中皮腫領域の抽出が可能であることがわかる。また、B02の健常者の抽出結果から、不要部位の過抽出は0であったことがわかる。

複数個存在する胸膜中皮腫の個別計測手法の提案として、CT画像から体積計測を行う手法を開発した。本処理を胸膜中皮腫の症例を含む未知データの画像に適用した結果から、本手法による胸膜中皮腫領域の個別計測が可能であることが確認できた。

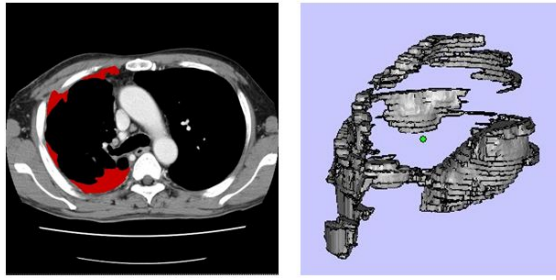


図 1. 胸膜中皮腫候補の抽出結果画像

表 1. 胸膜中皮腫候補の体積計測結果

No	Mesothelioma detection [point]	Misdetecation [point]	Mesothelioma regions [cm ³]
A01	9	1	Average 9.66 Max 43.13 Min 0.48
A02	0	0	0
B01	5	3	Average 6.37 Max 18.05 Min 0.47
B02	0	0	0

(2) 胸部 CT 画像を用いた骨格左右比較による肋骨原発性骨腫瘍の体積計測^{[2]–[4]}

肋骨原発性骨腫瘍の所見には溶骨性と骨硬化性がある。溶骨性は骨を破壊しながら成長し、肝臓等の臓器よりも低い CT 値を持った腫瘍である。一方、骨硬化性は骨表面より突出した腫瘍であり、骨領域と似た CT 値を持つため、腫瘍と骨格の境界を識別しにくく、領域の分割が難しいので体積計測などの定量化は困難である。本論文では、腫瘍の溶骨性、骨硬化性の判別と検出を行い、骨格左右比較による体積計測を行う。骨硬化性の場合は骨格の体積左右比較による体積計測、溶骨性の場合には SVM を用いた識別器によって、従来使用されている領域拡張法より高精度な腫瘍領域抽出を行う手法を提案する。健常例を用いて肋骨の左右対称性について考察し、溶骨性腫瘍 4 症例、骨硬化性腫瘍 1 症例を用い、腫瘍の判別と検出及び体積計測を行った。健常肋骨の体積差は、それぞれ左右対称に位置する肋骨に対して 10%未満の差に抑えられ、有症例との明確な体積差を得ることができた。また、対称に位置する肋骨同士で差分をとることで、ほとんど誤差なく骨腫瘍の体積を計測でき、腫瘍の検出を行えることを確認した。

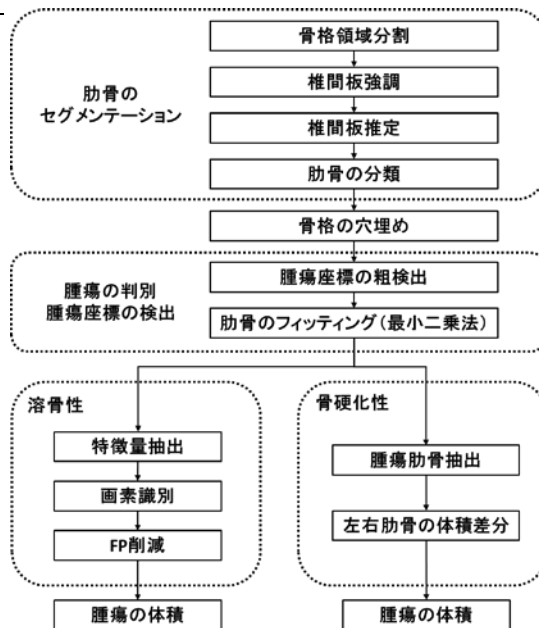


図 3. 腫瘍付着肋骨の抽出例

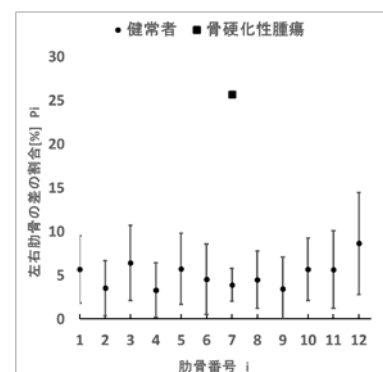


図 2. 本処理の流れ

図 4. 体積差分比の比較

(3) CAD 開発における人工症例画像の有効性の検討^{[5]-[7]}

現在様々な部位においてコンピュータ画像支援診断の研究・開発が行われているが、研究・開発を行う上での問題の1つとして症例画像の入手が困難であるという点があげられる。そこで現在、病変の存在しない画像に症例陰影（がん腫瘍など）の埋め込みを行い、人工的に症例画像を作成する取り組みが行われている。しかし、現状は医師による視覚評価により違和感のない画像が作成できているかどうかといった評価が行われているにすぎず、実際にCADへ適用した場合の有効性は十分に確認されていない。

そこで本研究では、機械学習を用いた肝腫瘍の検出 CAD を開発し、人工症例画像を用いてその有効性の有無や実症例画像と混ぜ合わせた場合の CAD の検出性能への影響の確認などの検討を行った。

一個抜き交差検証法（Leave-one-out cross-validation）を用いて評価を行い、一定割合ごとに実症例と人工症例画像を入れ替えて評価を行った結果、人工症例画像の割合が 50%程度までは全て実症例で開発した CAD と比較して検出性能はほぼ同等で、一定の割合で用いる場合には人工症例画像は有効であるという可能性が示唆された。

また、人工肝腫瘍作成のコンテスト大会^[7]にも参加した。医師約 15 人による視覚評価から、我々が提出した 10 例の人工腫瘍の本物らしさは平均 54 点（100%本物の腫瘍と評価されると 100 点、逆に偽物の腫瘍と評価されると 0 点）であった。一方、本物 10 例の本物らしさは平均 55 点であった。このことから、人工症例画像を作成する実力についても十分にあることが確認もできた。

5. 今後の計画

本研究成果で得た CAD 技術を発展させて、今後も多部位展開（最終的には全身 CAD の開発を夢見ている）、すなわち研究課題（B）を進め、CAD システムの普及に貢献したい。 また、本技術を HEMS やホームヘルスケア分野にも応用していきたい。

6. 研究成果の発表

- [1] Extraction of pleural mesothelioma regions using chest CT images, Computer Assisted Radiology and Surgery 29rd International Congress and Exhibition, CARS2015, pp.S177-S179, 2015 June, Barcelona, K. Abe, H. Takeo, Y. Dounomae, Y. Kuroki, Y. Nagai
- [2] Left-right skeletal comparison method using chest CT images for measuring the volume of rib primary bone tumors, Computer Assisted Radiology and Surgery 29rd International Congress and Exhibition, CARS2015, pp.S288-S290, 2015 June, Barcelona, R. Kobayashi, H. Takeo, Y. Nagai
- [3] 胸部 CT 画像を用いた骨格左右比較による肋骨原発性骨腫瘍の検出と体積計測, Medical Imaging Technology, Vol. 34, No. 2, pp. 116-122, 2016, 小林涼, 武尾英哉, 永井優一
- [4] 胸部 CT 画像を用いた骨格左右比較による肋骨原発性骨腫瘍の体積計測, 第 34 回日本医用画像工学会大会 (JAMIT2015), PP-16, July. 2015, 小林涼, 武尾英哉, 永井優一
- [5] CAD 開発における人工症例画像の有用性の検討, Medical Imaging Technology, Vol. 34, No. 1, pp. 38-42, 2016, 安倍和弥, 武尾英哉, 畠山拓也, 黒木嘉典, 永井優一
- [6] 腹部 CAD 開発における人工症例画像の有用性の検討, 第 34 回日本医用画像工学会大会 (JAMIT2015), OP1-5, July. 2015, 安倍和弥, 畠山拓也, 武尾英哉, 黒木嘉典, 永井優一
- [7] JAMIT-CAD コンテスト（3 次元腹部 CT 像への肝腫瘍の埋め込み）, 第 34 回日本医用画像工学

会大会 (JAMIT2015), July. 2015, 村石卓也, 能村巧, 福田剛, 武尾英哉

疾病検査に関する迅速なセンシング技術の開発

-ストレスマーカー検出酵素と糖尿病診断用酵素の探索とセンシングシステムへの応用-

応用バイオ科学科 准教授 山村 晃

1. 研究目的

現代人は、多くのストレスや糖尿病などの疾病のリスクを抱えている。これらの症状が軽度のうちに診断できれば、治療が開始できれば治療費などが軽減できる。本研究では、様々なストレスマーカーや糖尿病のマーカーなどを酵素法によって簡便に計測できるシステムを構築することを目的とする。

また、前年度までに研究を重ねてきたプトレッシンオキシダーゼやヒスタミンオキシダーゼについても酵素化学特性の改善を行い産業界や消費者に提供する。

2. 研究の必要性

様々なバイオマーカーを簡便に入手できる尿や唾液などを試料としてモニタリングすることで、ストレスや疾病のリスクを監視して、疾病の早期発見に貢献できる。

3. 研究の経過および結果

(1) ストレスマーカーであるヒドロコルチゾンを経化する酵素のスクリーニング

コルチゾール(cortisol)は副腎皮質ホルモンである糖質コルチコイドの一種であり、ストレスによっても発散され、分泌される量によっては、血圧や血糖レベルを高め、免疫機能の低下や不妊をもたらす。また、このホルモンは、過剰なストレスにより多量に分泌された場合、脳の海馬を萎縮させることが近年 PTSD 患者の脳の MRI など为例として観察されている。海馬は記憶形態に深く関わり、これらの患者の生化学的後遺症の一つとされている。

コルチゾール酸化還元酵素のスクリーニングを行った結果、5株にオキシダーゼおよびデヒドロゲナーゼ活性を見出した。しかしながら、コントロールが高くなってしまったので、コントロールを低く抑える必要がある。

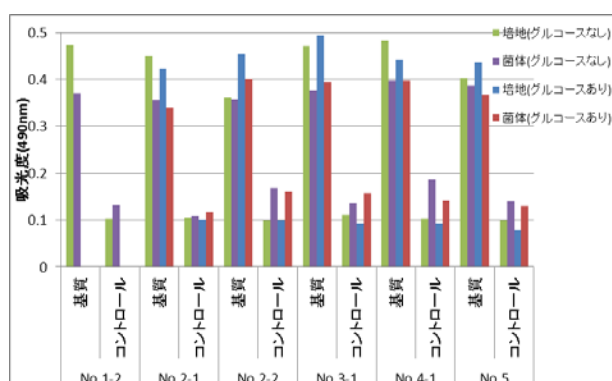


図1 コルチゾールオキシダーゼの探索

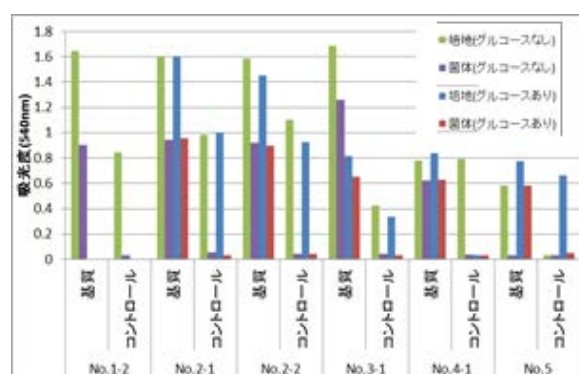


図2 コルチゾールデヒドロゲナーゼの探索

(2) 糖尿病診断用酵素のスクリーニング

① 1,5-アンヒドログリシトール(1,5-AG) 酸化還元酵素のスクリーニング

1,5-AGは、食物中にあるブドウ糖によく似た構造の糖である。高血糖の時には、血液中のブド

ウ糖である血糖が尿糖として排泄されるが、その時血液中の 1,5-AG も同時に尿の中に排泄される。そのため、高血糖状態では血液中の 1,5-AG が減少する。この 1,5-AG に反応するが、グルコースとは反応しない酵素をスクリーニングした。

その結果、グルコースとは反応せず 1,5-AG とのみ反応するオキシダーゼを産生する No.8 と No.17、No.18、デヒドロゲナーゼを産生する No.13 を探索することができた。

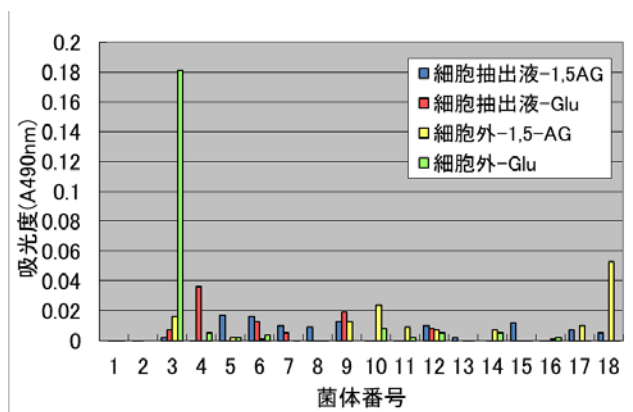


図 3 1,5-AG オキシダーゼの探索

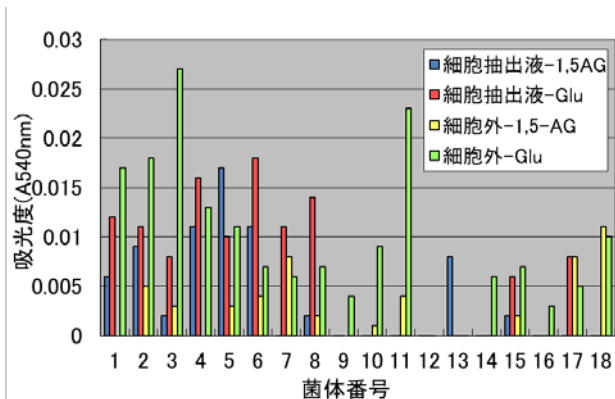


図 4 1,5-AG デヒドロゲナーゼの探索

②フルクトシルバリン酸化還元酵素のスクリーニング

ヘモグロビン A(HbA)は成人血液中の主成分を占め、HbA_{1a1},A_{1a2},A_{1b},A_{1c}に分けられる。これらは同じ一次構造を持つがβ鎖のN末端バリンのアミノ基が糖あるいはその誘導体でブロックされている。そのうち HbA_{1c}はグルコースが結合したもので、健常者では総ヘモグロビンの 6%以下を占めるが、糖尿病患者では 2～3 倍に増加する。さらに赤血球寿命中に分解されることはなく、1～2 ヶ月前の血糖値を反映するものとして糖尿病診断における重要な指標となっている。HbA_{1c}をプロテアーゼで切断して遊離させ、生成したフルクトシル-L-バリンを特異的に酸化還元する酵素によって検出する分析手法を確立する。

フルクトシル-L-バリンと反応するオキシダーゼを探索したが、活性が低く実用化には不向きであることが分かった。一方、フルクトシル-L-バリンと反応し、しかも、L-バリンとは反応しないデヒドロゲナーゼを 3 株見出すことができた。今後、培養方法の最適化と酵素化学的特性の評価を行っていきたい。

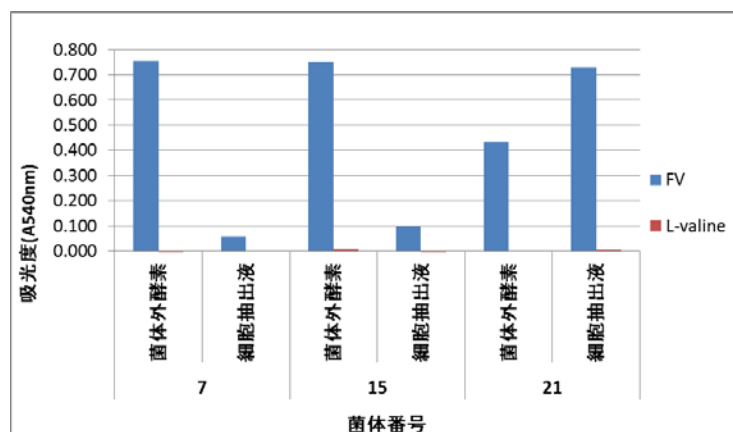


図 5 フルクトシル-L-バリンデヒドロゲナーゼの探索

③フルクトシルリジン酸化還元酵素のスクリーニング

グリコアルブミン(GA)とは、血液中のアルブミンのうち、ブドウ糖と結合して変化したアルブミンのことをいう。アルブミンの中でグリコアルブミンが占める割合をパーセントで表した数値がグリコアルブミンの値となる。グリコアルブミンは HbA_{1c} と同様に高血糖状態が続いていると高くなり、そして、高血糖が改善したからといってもすぐには下がらない。そのため、採血時点から遡って血糖コントロールを推測することができる。グリコアルブミンをプロテアーゼで切断して遊離させ、生成したフルクトシル-L-リジンを特異的に酸化還元する酵素によって検出する分析手法を確立する。

フルクトシル-L-リジンオキシダーゼ活性は低く、L-リジンと反応するものが多いため、測定には不向きであると考えた。一方、No.5 の菌体に L-リジンよりもフルクトシル-L-リジンとの反応性が高いデヒドロゲナーゼを見出すことができた。今後、培養方法の最適化と酵素化学的特性の評価を行っていきたい。

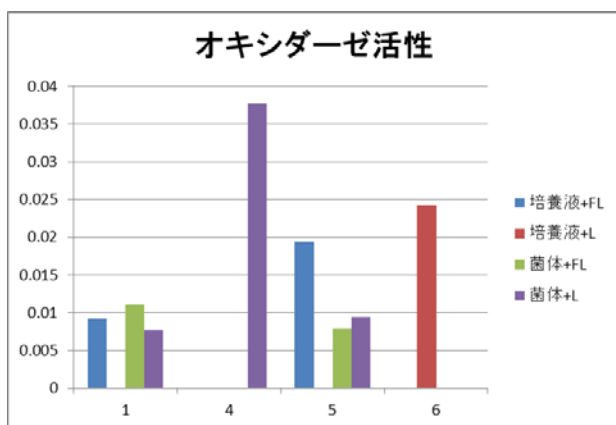


図 6 フルクトシル-L-リジンオキシダーゼの探索

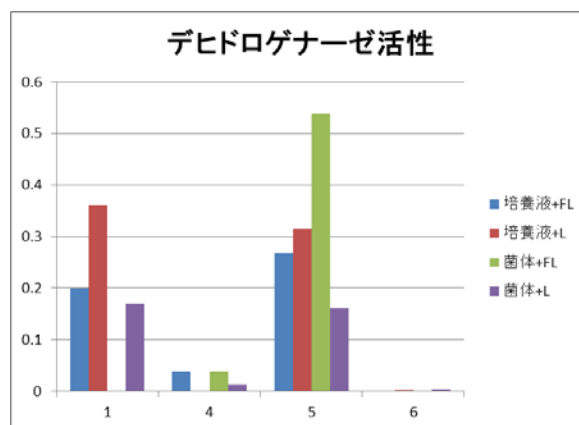


図 7 フルクトシル-L-リジンデヒドロゲナーゼの探索

(3) 酵素化学的特性の改善・解明

①プトレッシンオキシダーゼの酵素化学的特性の改善

プトレッシンは L-オルニチンがオルニチンデカルボキシラーゼによって脱炭酸されて生合成されるポリアミンの前駆体である。プトレッシンオキシダーゼ(PUO)遺伝子をクローニングし大量発現系を構築できているが、安定性と基質特異性が低いため分析用酵素には応用できていない。本研究では、アミノ酸置換を行い、熱安定性を向上 (F373C) するとともに基質特異性を改善(Q327N)できた。

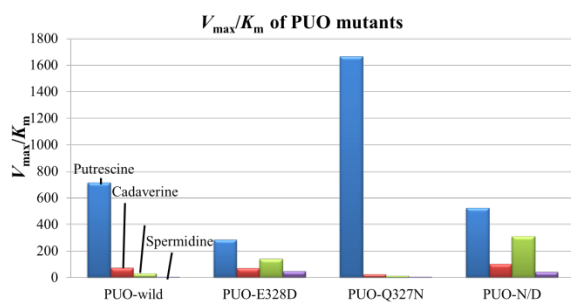


図 6 PUO アミノ酸置換体の基質特異性

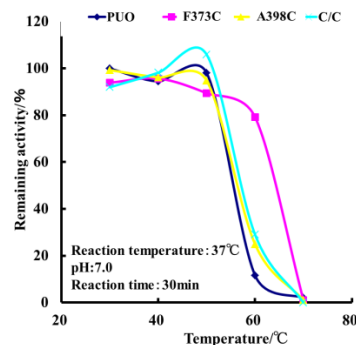


図 7 PUO アミノ酸置換体の熱安定性

②ヒスタミンオキシダーゼの酵素化学的特性の解明

ヒスタミンは主に魚に含まれるヒスチジンが脱炭酸することによって生じるアミン類である。ヒスタミンオキシダーゼ(HOD)はヒスタミンを酸化する酵素である。前年度までの研究成果から *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007 由来 HOD(HOD007)の遺伝子前部分と *Arthrobacter globiformis* IFO121137 由来 HOD(HODglobi)の遺伝子後部分を持つ HOD (HOD007mae)を作製したところヒスタミンには反応せず、チラミンに反応する事が分かった。これらの知見をもとに基質特異性を決めている部分を、HOD のアミノ酸置換体の合成およびキメラ作製によって検討した。その結果、酵素遺伝子を4分割した前から2番目の部分にヒスタミンとチラミンの結合に影響を与える部位をアミノ酸置換があることが分かった。今後さらなる特定を行い、ヒスタミン測定に適した酵素の作製に生かしたい。

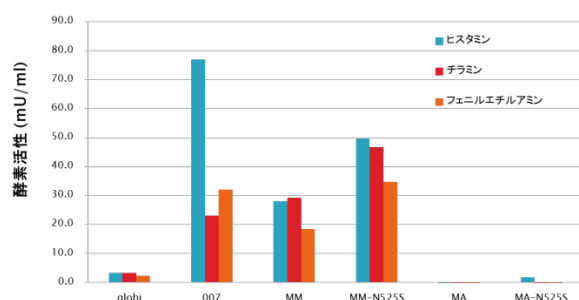


図8 HOD キメラの基質特異性

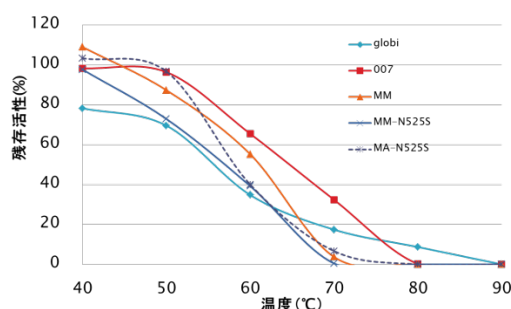


図9 HOD キメラの熱安定性

4. 今後の計画

本年度発見した酵素の精製と特性評価を行うと共に、より優れた酵素のスクリーニングを継続して行う。また、酵素遺伝子のクリーニングを行い発現ベクターに組み込み大量生産を行う。

5. 研究成果の発表

- 1) ヒスタミンオキシダーゼキメラタンパク質の酵素化学的特性、山村晃、末廣美羽、金井彩香、松本邦男、2015.9、第9回バイオ関連化学シンポジウム（熊本）
- 2) プトレッシンオキシダーゼのアミノ酸置換による基質特異性と熱安定性の改変、山村晃、川上勇希、丹治樹、2016.3、電気化学会第83回大会（大阪）

6. 産業への利用

フジデノロ株式会社と共同研究を行う（予備研究 2015 年、共同研究 2016 年）