

# Drug-Loaded Antioxidant Nanoparticles for Oral Tumor Therapy

Zoe CHAU\*<sup>1</sup>, Yutaka IKEDA<sup>2</sup>, Yukio NAGASAKI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Master's School of Medical Science, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba

<sup>2</sup>Department of Material's Science, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba

## 1. Abstract

Inflammation is associated with poor prognosis of numerous diseases, including cancer <sup>(1)</sup>. Interleukin-6 (IL-6), a pro-inflammatory cytokine in blood, is a critical target for treating cancer growth and associated phenomena like muscle-loss and other cancer-related deteriorations – particularly given its positive correlation with worsened prognoses <sup>(2)</sup>. IL-6 also decreases the efficacy of doxorubicin (DOX), a common anti-cancer drug <sup>(3)</sup>. Thus, IL-6 is an important target for treating cancer growth. We have previously shown oral administration of siSMAPo<sup>TN</sup>, an antioxidant-based nanoparticle, can significantly reduce blood plasma IL-6 through the intestinal scavenging of reactive oxygen species (ROS) <sup>(4)</sup>. The administration of siSMAPo<sup>TN</sup> to tumor-bearing mice mitigated the cachectic state by suppressing IL-6 elevation; however, it did not inhibit solid tumor growth. In this work, we aimed to suppress IL-6 elevation and inhibit the growth of solid tumors by loading DOX into the nanoparticles to form DOX@siSMAPo<sup>TN</sup>, synergistically increasing DOX efficacy with the nanoparticle. Both siSMAPo<sup>TN</sup> and DOX@siSMAPo<sup>TN</sup> were characterized for properties like size and drug release profile at differing pH, in addition to their toxicity in various cancer cell lines. In this work, we successfully synthesized nanoparticles of satisfactory sizes and found they had a toxic effect on cancer cells.

## 2. Introduction

Inflammation is related to up to 20% of cancer-related deaths <sup>(1)</sup>. Specifically, Lippitz et al. found that elevated levels of the IL-6 marker are significantly associated with worse prognosis in 86% of patients in 23 different cancer types <sup>(2)</sup>, while Chen et al. found that the efficacy of DOX was decreased in leukemia mice with IL-6, compared to the IL-6 knockout condition <sup>(3)</sup>. Our prior work showed that selectively reducing intestinal ROS through orally administered siSMAPo<sup>TN</sup> significantly lowered blood plasma IL-6 <sup>(4)</sup>. However, this approach did not significantly inhibit solid tumor growth. Thus, we tested the efficacy of DOX@siSMAPo<sup>TN</sup>, an anti-cancer drug-loaded antioxidant nanoparticle, in inhibiting solid tumor growth through the reduction of intestinal ROS, decreased blood plasma IL-6, and increased efficacy of DOX in cell models (Fig. 1).

## 3. Experimental

### 3.1 DOX@siSMAPo<sup>TN</sup> synthesis and characterization

PEG, TEMPO, and trialkoxysilyl moieties were chemically bound with commercially available poly(styrene-co-maleic anhydride) to prepare siPSMA(T)-g-PEG (Fig. 2). The DMF solution of siPSMA(T)-g-PEG were dialyzed against water, leading to the self-assembly of nanoparticles (diameter: tens of nanometers), forming siSMAPo<sup>TN</sup>. DOX was loaded into the nanoparticle during dialysis. The nanoparticles were characterized using dynamic light scattering, ultraviolet spectroscopy, and at varying pH conditions to evaluate the nanoparticles' diameter, encapsulated DOX, and

drug release patterns at different physiological pH's, respectively.

### 3.2 MTT toxicity testing of DOX@siSMAPo<sup>TN</sup>

The cytotoxicity of DOX@siSMAPo<sup>TN</sup> was tested within C26 colon, MCF-7 ER+/HER2-breast, and MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell lines at concentrations ranging from 100 pmol/L to 10 μmol/L. An MTT assay kit was used to evaluate cell viability.

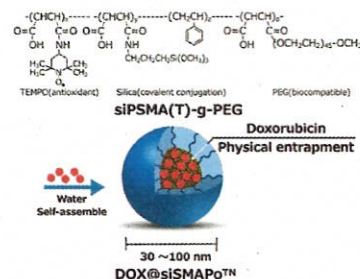


Fig 2: Synthesis scheme of DOX@siSMAPo<sup>TN</sup>

## 4. Results and Discussion

Here, we successfully synthesized siSMAPo<sup>TN</sup> and DOX@siSMAPo<sup>TN</sup>, polymer-based antioxidant nanoparticles. Both conditions' sizes remained at or below 100 nm, ensuring maximal accumulation in intestinal mucosa to increase ROS scavenging <sup>(5)</sup>, while achieving a satisfactory DOX loading efficiency of 91.3% in the 2% drug-loaded condition. To note, increased DOX loading incrementally increased particle diameter from 1-5% DOX conditions, but the nanoparticle became unstable at higher concentrations, causing aggregation. DOX@siSMAPo<sup>TN</sup> demonstrated faster drug release in acidic conditions, in addition to cell toxicity in C-26, MCF-7, and TNBC cells. We hypothesize siSMAPo<sup>TN</sup> will have a synergistic effect in mice cancer models, with reduced tumor growth in mice administered with i.v. DOX/oral siSMAPo<sup>TN</sup>, in comparison to i.v. DOX only mice. DOX@siSMAPo<sup>TN</sup> is expected to be a novel approach for addressing the clinical need for reducing inflammation-associated cancer growth, which presently has no targeted solution. Further, the relation of IL-6 with multiple cancer types provides the exciting possibility for the nanoparticle's application to multiple cancer types, helping to address the challenge of cancer heterogeneity in therapeutic approaches. By suppressing cancer metastasis and exacerbation of the disease, treatment options would increase, and long-term survival rates would improve. This would provide patients and their families with a sense of mental security and elevate their attitude toward treatment.

## 5. References

- (1) M Murata, Inflammation and Cancer, *Environmental Health and Preventative Medicine*, Vol. 23, No. 50 (2018).
- (2) B Lippitz, R Harris, Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis, *Oncoimmunology*, Vol. 5 (2016).
- (3) EH Bent, LR Millán-Barea, I Zhuang, et al. Microenvironmental IL-6 inhibits anti-cancer immune responses generated by cytotoxic chemotherapy. *Nat Commun*, Vol. 12, pp. 6218 (2021).
- (4) Y Ikeda, N Saigo, Y Nagasaki, Direct evidence for the involvement of intestinal reactive oxygen species in the progress of depression via the gut-brain axis, *Biomaterials*, Vol. 295, pp. 122053 (2023).
- (5) LB Vong, T Tomita, T Yoshitomi et al, *Gastroenterology*, Vol. 143, pp. 1027-36 (2012).

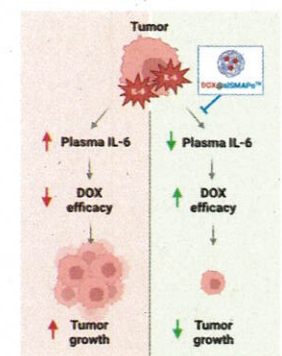


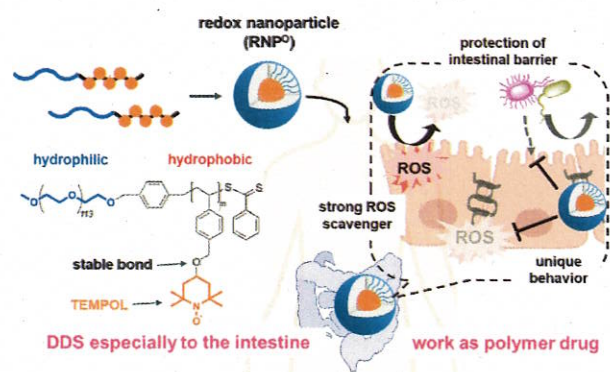
Fig 1: Utilizing DOX@siSMAPo<sup>TN</sup> to reduce tumor growth via targeted decrease of blood plasma IL-6



## 抗酸化ナノ粒子薬を用いた腸管保護における作用機序の解明

佐々木峻<sup>\*1</sup>, 文淞湖<sup>\*2</sup>, 丸島愛樹<sup>\*3</sup>, 長崎幸夫<sup>\*1</sup>\*<sup>1</sup> 筑波大学数理物質系、\*<sup>2</sup> 筑波大学生命環境系、\*<sup>3</sup> 筑波大学附属病院脳神経外科, つくば市天王台 1-1-1

【緒言】腸は免疫調節や代謝恒常性の維持に関与し、全身の健康を支える重要な臓器として注目されている。特に、活性酸素種 (ROS) の過剰産生による炎症や酸化ストレスなどの腸管機能の障害は、さまざまな全身性疾患に関与する。クローン病や潰瘍性大腸炎 (UC) などの炎症性腸疾患 (IBD) は腸管機能を著しく損ない、世界中の患者に深刻な生活の質の低下をもたらしている。従来の治療には低分子薬 (LMW) が用いられてきたが、投与後すぐに全身へ非特異的に拡散するため、腸管内での薬物濃度を維持できず、副作用も大きな課題となっている。近年では薬物送達システム (DDS) が進展を遂げているが、リポソームなどの物理的な薬物カプセル化法では経口投与中の安定性が課題であり、薬物漏出による治療効果の低下は避けられない。そこで我々の研究室では安定したニトロキンドラジカルを含む自己組織化高分子薬 (RNP<sup>o</sup>) を設計し、その有効性を報告してきた。従来の DDS が薬物を物理的に包み込むのに対し、ナノ粒子型の RNP<sup>o</sup> では低分子抗酸化薬が化学的に高分子側鎖に結合しているため血中へ漏出しにくい。先行研究において、RNP<sup>o</sup> は腸粘膜に特異的に蓄積し、炎症部位で治療効果を最大化する局所的な薬物送達を実現した。その結果、RNP<sup>o</sup> を自由飲水で投与したマウスでは、腸管内特異的な抗酸化作用を通じて UC に対する治療効果が確認された<sup>(1)</sup>。一方で、その詳細な作用メカニズムはまだ十分に解明されておらず、さらなる研究が必要である。RNP<sup>o</sup> は高分子の構造を維持したまま薬物として機能するため、標的臓器への送達後にも独自の作用機構を発揮すると考えられる。そこで本研究では腸への DDS に加え、腸管上皮内での作用機構のさらなる詳細な解明を目的とした (Fig. 1)。さらに、本研究を通じて腸疾患に対するより標的性の高い効率的な治療法の開発に寄与することを目指す。

Fig. 1 Therapeutic strategy of RNP<sup>o</sup> in the intestine.

【実験方法】ポリエチレングリコール (PEG) に連鎖移動剤を修飾したマクロ開始剤の存在下で、クロロメチルスチレンをモノマーとして可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合によりブロック共重合体を得た。その後、繰り返し側鎖にエーテル結合を介して 4-ヒドロキシ TEMPO (TEMPOL) を導入した。この両親媒性ポリマーを DMF に溶解させた後、水に対して透析することでナノ粒子 (RNP<sup>o</sup>) を調製した。続いて、トランスウェルインサート上で Caco-2 細胞を培養することで腸上皮様の単層膜構造を確立した。腸管バリア機能に対する薬物の保護効果を評価するため、蛍光物質の透過試験を行った。TEMPOL および RNP<sup>o</sup> を投与し 1 時間前処理をした後、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を添加し、酸化ストレスを促進することでバリア機能の破壊を誘導した。培地を交換した後、FITC 標識デキストラン (分子量: 2MDa) をトランスウェルインサートの頂端側に添加し、2 時間後に基底側で測定した蛍光強度から透過量を定量した。さらに、タイトジャンクションの完全性を評価するためにタイトジャンクション関連タンパク質 (ZO-1) の一次抗体および蛍光標識二次抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果および考察】電子スピン共鳴 (ESR) の測定により、得られた高分子に TEMPO ユニット由来のピークを確認した。また動的散光乱 (DLS) による粒径測定によりナノ粒子の粒子サイズが約 30 nm であることを確認し、RNP<sup>o</sup> の調製に成功したと結論づけた。FITC 標識デキストランの透過試験では、RNP<sup>o</sup> は DSS 刺激によって引き起こされる FITC 標識デキストラン透過量の増加を効果的に抑制した (Fig. 2)。これにより

RNP<sup>o</sup> は腸管バリア機能を効果的に維持することが示された。また免疫染色の結果、RNP<sup>o</sup> を投与した群では ZO-1 による緻密な細胞間接着が確認された。よって RNP<sup>o</sup> のもつ抗酸化効果は腸管上皮様構造の維持に関連することが示唆された。当日の発表では、細胞内における RNP<sup>o</sup> の独自の動態、および炎症抑制効果の機序についても報告する。

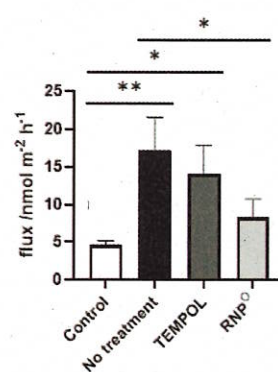


Fig. 2 Flux of FITC-dextran (MW: 2MDa) measured across caco-2 monolayers on transwell inserts.

【参考文献】(1) L, B, Vong, et al. Development of an oral nanotherapeutics using redox nanoparticles for treatment of colitis-associated colon cancer, *Biomaterials*, Vol. 55, pp. 54-63 (2015)

Investigation of the mechanisms of intestinal protection by redox nanoparticles

Takashi Sasaki, Moon Song Hoo, Aiki Marushima, Yukio Nagasaki

Dept. of Mater. Sci., Fac. of Pure and Appl Sci., Univ. of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8573, Japan.

E-Mail: moon.songho.ft@u.tsukuba.ac.jp, aiki.marushima@md.tsukuba.ac.jp, happyhusband@nagalabo.jp

つくば医工連携フォーラム 2025 講演予稿集 (2025.1.24, 国立研究開発法人産業技術総合研究所)



# 血液浄化を目指した尿素化学吸着ポリマーの設計と評価

## Design of Phenylglyoxaldehyde-based Polymers for the Chemical Adsorption of Urea in Blood

○菅原圭吾<sup>1,2</sup>, 佐々木信<sup>1,2</sup>, 荏原充宏<sup>1,2</sup>

Keigo SUGAHARA<sup>1,2</sup>, Makoto SASAKI<sup>1,2</sup>, Mitsuhiro EBARA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター, つくば市並木 1-1,

<sup>2</sup> 筑波大学大学院 理工情報生命学術院 数理工学科学研究群, つくば市天王台 1-1-1

<sup>1</sup> Research Center for Macromolecules and Biomaterials (RCMB), National Institute for Materials Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tsukuba, <sup>2</sup> Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba

### 1. 緒言

慢性腎臓病 (CKD) とは、様々な原因により腎臓の機能が低下していく進行性の疾患であり<sup>(1)</sup>、心血管疾患のリスクを高める。CKD が進行していくと末期腎不全 (ESKD) に陥り、現在の ESKD 患者の治療方法は腎臓移植、腹膜透析、血液透析である。この中でもっともよく選ばれているのが血液透析であり、全透析患者の 97 % に上る<sup>(2)</sup>。しかし血液透析は「拡散、ろ過」を駆動力としているために、1 回当たり 200 L と大量の水が必要とされ、十分な量の水が確保できない災害時や途上国での実施が困難である。また通常、透析センターや病院で週に 3~6 回、2~8 時間の透析を受けなければならない<sup>(3)</sup>ため、患者の QOL 低下も問題となっている。そこで当研究室では、「拡散、ろ過」の代わりに「吸着、吸水」の原理を用いて血液中の老廃物を除去するウェアラブル血液浄化装置の開発を行ってきたが、1 日に生産されるモル量が最も多い尿素的除去が依然として課題として残っている<sup>(2)</sup>。本研究の目的は尿素を化学吸着できるポリマーを合成し、エレクトロスピニング (ES) 法を用いて吸着能の高い尿素吸着ナノファイバーを開発することである (Fig. 1)。

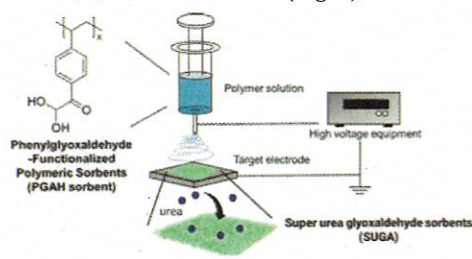


Fig. 1 Diagram of fabrication of nanofibers with high urea adsorption capacity.

### 2. 実験方法

合成の出発物質である Polystyrene (PS) を用いて ES 法におけるナノファイバー作製時の条件検討を行い、得られたファイバーの構造を電子顕微鏡 (SEM) で観察し、ファイバーの直径を測定した。また尿素と共有結合可能な Phenylglyoxaldehyde-functionalized sorbents (PGA sorbent) の合成を行い、得られた生成物をフーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) と固体核磁気共鳴 (NMR) によって評価した。PGA sorbent は、PS を Friedel-Crafts 反応によりアセチル化した後、Kornblum 酸化を行うことで合成した。さらに得られた生成物を尿素溶液に入れ、37°C で 1~24 時間静置し、尿素吸着試験を行った。一定時間経過した後、遠心分離をかけて上澄みを回収し、urea assay kit を用いて呈色した後、520 nm の吸光度を測定した。

### 3. 結果及び考察

SEM 画像の解析により、繊維径が 3.6  $\mu\text{m}$  程度の直径を持つ polystyrene のファイバーの作製が確認された (Fig. 2)。また FTIR スペクトルと固体 NMR の解析により、PS のアセチル化が成功していることを確認した。また FTIR スペクトルから最終生成物である PGA sorbent が持つアルデヒド基のピークが見られなかったが、固体 NMR からは PGA sorbent に由来するピークを確認できた。ここからアセチル化された PS の酸化反応が進行したと考えられる。この最終生成物を用いて尿素吸着試験を行ったところ、24 時間で濃度が 144 mg/dL 程低下することが確認できた (Fig. 3)。またこの尿素吸着量を単位質量あたりで計算し、他の吸着剤と比較した (Fig. 4)。他の吸着剤よりも吸着量が低いことが確認されたが、これは酸化反応が一部のポリマーのみ進んだ結果だと考えられる。酸化反応が不十分であった理由としては酸化反応時間、またはアセチル基の修飾率が低いことが予想されるため、今後改善を図る予定である。

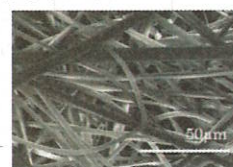


Fig. 2 SEM image of PS fibers.

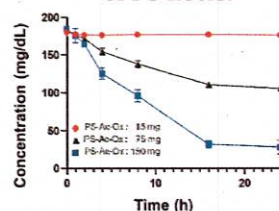


Fig. 3 Change in urea adsorption concentration with different amounts of PGA sorbent.

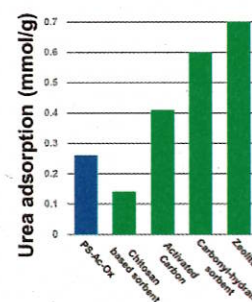


Fig. 4 Urea adsorption capacity of various adsorbents.

### 4. 参考文献

- (1) Kalantar-Zadeh, Kamyar Jafar TH, Nitsch D *et al.*, *Chronic kidney disease*, *Lancet*, Vol. 398, No. 10302, pp. 786–802 (2021).
- (2) K. Namekawa, *et al.*, *Fabrication of zeolite-polymer composite nanofibers for removal of uremic toxins from kidney failure patients*, *Biomaterials Science.*, Vol. 2, No. 5, pp. 593-804 (2014).
- (3) van Gelder MK, *et al.*, *Urea removal strategies for dialysate regeneration in a wearable artificial kidney*, *Biomaterials Science*, Vol. 1, No. 2, pp. 10–15 (2020).

# Extracellular Vesicles from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Modulate Tumor Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer

Patricia Rika ARIANI<sup>\*1,\*2</sup>, Vuong Cat KHANH<sup>\*2</sup>, Osamu OHNEDA<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan, <sup>\*2</sup> Laboratory of Regenerative Medicine and Stem Cell Biology, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

## 1. Introduction

Triple negative breast cancer (TNBC) is an aggressive form of breast cancer that accounts for 10-15% of all breast cancer cases and is associated with higher malignancy and chances of relapses<sup>1</sup>. Common breast cancer types could be diagnosed with the presence of three markers: ER, PR, and HER2. TNBC, however, lacks the presence of these three important markers for breast cancer, causing difficulties in diagnosis as well as specific-targeting with commercially available drugs<sup>1,2</sup>. Due to this problem, TNBC is considered as more difficult to treat compared to other types of breast cancer. Recently, cancer treatment research has been shifting perspectives to not only targeting the cancer cells themselves, but also the tumor microenvironment (TME)<sup>3</sup>. TME is the environment in the patient's body that are altered by the cancer cells to support their growth and metastasis. One of the most important components of TME is macrophage. Under the influence of cancer cells, monocyte differentiate into tumor-associated macrophages (TAMs) which could favor towards malignancy and protect cancer cells from the body's immune system. TAMs are associated with lower phagocytotic capabilities, increased M2 macrophage levels, release of tumor-associated factors or cytokines, as well as higher migration towards cancer cells. Since targeting the TNBC cells specifically is very difficult, targeting the TME components of TNBC might be a potential target for a more effective treatment approach.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells that have the capabilities to differentiate into several other cell types. MSCs have been studied as a potential therapeutic approach against several diseases such as cardiovascular disease, neurological disease, ischemic wounds, as well as cancer. MSCs could be derived from many sources including adipose tissue, bone marrow, liver, umbilical cord, or placenta. Wharton's jelly (WJ) is a gelatinous connective tissues that could be found in the umbilical cord. MSCs derived from WJ (WJ-MSCs) and its surrounding tissues have been shown to have promising inhibitory effects against certain types of cancer, including breast cancer<sup>4</sup>. MSCs have been known to secrete a large quantity of extracellular vesicles (EVs) and they carry important factors that are beneficial for cell growth, differentiation, as well as other important cellular functions. One of hallmarks of EVs is that they carry microRNAs (miRNAs), non-coding RNAs that regulate gene expression mainly by direct binding to messenger RNAs (mRNAs).

## 2. Proposed Method

Our aim is to first investigate inhibitory effect of WJ-MSC EVs against TNBC. We isolated EVs from WJ-MSC by ultracentrifugation and characterize them based on EVs marker and electron microscopy. Afterwards, we optimized the appropriate dose by labeling the EVs with membrane dye and measured the minimum dose that could exhibit more than 80% EV intake by the TNBC cells. For cancer-related assays, we use CCK8 viability assay and colony formation assay to measure proliferation, mammosphere assay to measure tumor-formation, and gene expression qRT-PCR to measure both metastatic and stemness markers.

Secondly, we aim to observe the effect of WJ-MSC EVs in the TME in the aspect of cancer cells interaction with other cancer cells as well as the monocytes and macrophages differentiated

from monocytes. Therefore, to simulate the interaction between cancer cells and its TME components through cellular communication mediated by EVs, we isolated cancer EVs and compare the WJ-MSC EVs treated cancer EVs (WJ-TNBC EVs) with the untreated cancer EVs (TNBC EVs). We use these EVs in comparison with no EV treatment as the control. We first observe the characteristics of monocytes under the influence of cancer EVs. Then, to obtain TAMs, we pre-differentiated THP-1 monocyte with Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and treat them with cancer EVs until the macrophages matures. Then, we isolated the macrophages and analyze for phagocytotic, M2 markers, and migration towards cancer cells. Furthermore, we also isolated the conditioned medium (CM) from the macrophage culture after cancer EV treatment and add into TNBC cells to explore the different effect of macrophage-secreted cytokines or factors under the influence of those cancer EVs.

## 3. Results

Our research found that EVs derived from WJ-MSCs (WJ-MSC EVs) impaired TNBC cells in several aspects including proliferation, tumor-formation, metastasis, as well as cancer stemness *in vitro*. When treated with TNBC EVs, THP-1 monocytes showed increased characteristics associated with TAMs, including elevated levels of monocyte adhesion to endothelial cells, increased monocyte and macrophage migration towards cancer cells, lower macrophage phagocytosis capabilities, and increased macrophage M2 markers gene expression as well as surface protein. Interestingly, treatment of the cancer cells with WJ-MSC EVs caused them to produce "transformed" cancer cell EVs or WJ-TNBC EVs that could suppress the increased malignant characteristics shown in cancer cell EVs treatment in monocyte and macrophage as the components of TME. Lastly, we also found that TNBC treated with CM derived from TAMs under the influence of these cancer EVs showed similar pattern as their respective cancer EVs, where TNBC EV CM showed increased malignancy and WJ-TNBC CM showed reduced malignancy. Our results suggest that TME alteration was largely affected by cancer cell EVs and treatment with WJ-MSC EVs not only significantly reduced the malignancy of the cancer cells themselves, but also negatively affected TME components to favor towards recovery.

## 4. References

1. Zagami, P. & Carey, L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *npj Breast Cancer* vol. 8, 2022.
2. Paramanatham, A. *et al.* Doxorubicin-resistant tnbc cells exhibit rapid growth with cancer stem cell-like properties and emt phenotype, which can be transferred to parental cells through autocrine signaling. *Int J Mol Sci* 22, (2021).
3. Petitprez, F. *et al.* Quantitative Analyses of the Tumor Microenvironment Composition and Orientation in the Era of Precision Medicine. *Frontiers in Oncology* vol. 8, 2018.
4. Chang, Y. H. *et al.* Extracellular vesicles derived from Wharton's Jelly mesenchymal stem cells inhibit the tumor environment via the miR-125b/HIF1 $\alpha$  signaling pathway. *Sci Rep* 12, 2022.



## Role of Adult Pancreatic Very Small Embryonic-like Stem Cells in Early Mouse Development via Intraplacental Transplantation

Zeynab Javanfekr Shahri\*<sup>1</sup>, Atsushi Noda\*<sup>1</sup>, Ching-wei Liao\*<sup>1</sup>, Michito Hamada\*<sup>1</sup>, Satoru Takahashi\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

### Introduction

Diabetes mellitus, a global health concern affecting over 537 million adults worldwide, necessitates novel therapeutic approaches beyond conventional insulin therapy<sup>(1)</sup>. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) have emerged as a promising source for regenerative medicine, particularly in pancreatic disorders<sup>(2)</sup>. This study investigates the potential of adult pancreatic VSELs to differentiate into insulin-producing cells and contribute to early pancreatic development through intraplacental transplantation.

### Methodology

VSELs were isolated from adult GFP expressing (GRR) mice pancreas using a protocol adapted from Bhartiya et al.<sup>(3)</sup>, with modifications to enrich VSELs in donor population. Flow cytometry analysis confirmed the VSEL phenotype (Sca-1+/Lin-/CD45-). Intraplacental transplantation was performed at E9.5 following the method described by Jeon et al.<sup>(4)</sup>. Recipient embryos included *Pdx1* knockout (KO) and wild-type mice. Post-natal tracking of transplanted cells was performed using flow cytometry, digital droplet PCR (ddPCR), immunohistochemistry and ELISA to assess their differentiation and contribution to pancreatic development.

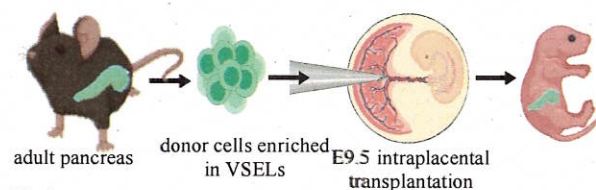


Fig.1

Schematic representation of the intraplacental transplantation experiments

### Results

Our results demonstrate that transplanted VSELs differentiated into insulin-expressing cells in *Pdx1* KO recipients, extending their survival to 8 days post-birth compared to the typical 1-2 day lifespan of untreated *Pdx1* KO mice<sup>(5)</sup>. ddPCR assay revealed that transplanted cells primarily homed to the pancreas in wild-type recipients and to the pancreatic bud in *Pdx1* KO recipients.

In wild-type recipients, GFP+ cells were observed in various pancreatic cell types, including  $\beta$ -cells (insulin+),  $\alpha$ -cells (glucagon+), and exocrine cells, suggesting multilineage differentiation potential. Remarkably, ELISA confirmed the presence of insulin in *Pdx1* KO recipients blood serum, prompting the possibility of VSEL differentiation into insulin-positive cells, partially rescuing the phenotype.

### Discussion

Our study provides compelling evidence for the potential of adult pancreatic VSELs in regenerative medicine. The ability of these cells to differentiate into insulin-producing cells and contribute to early pancreatic development offers a new avenue for diabetes treatment. Unlike induced pluripotent stem cells (iPSCs) or embryonic stem cells, VSELs present fewer ethical concerns and may offer a more cost-effective approach to cell-based therapies<sup>(2)</sup>. The extended survival of *Pdx1* KO mice following VSEL transplantation suggests that these cells can partially compensate

for the lack of *Pdx1*, a critical transcription factor in pancreatic development<sup>(5)</sup>. This finding not only demonstrates the plasticity of VSELs but also highlights their potential in treating congenital pancreatic disorders.

Furthermore, our research underscores the importance of understanding the microenvironment's role in stem cell differentiation. The unique conditions within the early development embryo may influence VSEL behavior and enhance their ability to differentiate into specific cell types. The observed homing of VSELs to the pancreatic region in both wild-type and *Pdx1* KO recipients suggests the presence of tissue-specific signals guiding their migration and differentiation.

The multilineage differentiation potential of VSELs observed in our study aligns with recent findings in the field of pancreatic regeneration. Bhartiya et al. reported the presence of VSELs in adult mouse pancreas and their potential role in regenerating endocrine pancreas<sup>(6)</sup>. Our *in vivo* results extend these findings, demonstrating the capacity of VSELs to respond to developmental cues and contribute to pancreatic organogenesis. We observed VSEL differentiation into multiple pancreatic cell types, including insulin-producing  $\beta$ -cells, glucagon-producing  $\alpha$ -cells, and exocrine cells, highlighting their plasticity and potential for pancreatic tissue regeneration.

### Future Directions and Implications

While our results are promising, several questions remain to be addressed in future studies. Long-term follow-up of VSEL-transplanted animals is necessary to assess the stability and functionality of the differentiated cells. Additionally, investigating the molecular mechanisms underlying VSEL homing and differentiation could provide insights for optimizing transplantation protocols and enhancing therapeutic efficacy.

The potential applications of this research extend beyond diabetes. Understanding VSEL biology and their response to developmental cues could lead to breakthroughs in regenerative medicine across various fields, including neurodegenerative disorders and cardiovascular diseases.

In conclusion, our study establishes adult pancreatic VSELs as a promising source for pancreatic regeneration and offers a novel approach to studying early pancreatic development. These findings may contribute significantly to developing new treatments for diabetes and other pancreatic disorders, potentially revolutionizing the field of regenerative medicine.

### References

- (1) International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium (2021).
  - (2) Bhartiya, D. et al. *Stem Cell Rev. Rep.* 15, 729-743 (2019).
  - (3) Bhartiya, D. et al. *Hum. Reprod. Update* 23, 41-76 (2017).
  - (4) Jeon, H. et al. *Sci Rep* 11, 4374 (2021).
  - (5) Subhan Ali Mohammad et al. *Stem Cell Rev. Rep.* 15, 664-681 (2019).
  - (6) Bhartiya, D. et al. *Stem Cell Res Ther.* 2;5(5):106 (2014)
- Animations were taken from BioRender.com



# 形状記憶ナノトポグラフィ—材料を用いた細胞集団移動動態の解明

## Unraveling of collective cell migration dynamics using Shape Memory Nanotopographic Materials

國吉優輔<sup>1,2</sup>, 宇都甲一郎<sup>1</sup>, 荻原充宏<sup>1,2</sup>  
Yusuke KUNIYOSHI<sup>1,2</sup>, Koichiro UTO<sup>1</sup>, Mitsuhiro EBARA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>国立研究開発法人物質・材料研究機構(NIMS) 高分子・バイオ材料研究センター, つくば市並木 1-1、

<sup>2</sup>筑波大学 理工情報生命学術院 数理工学科学研究群, つくば市天王台 1-1-1、

<sup>1</sup>Research Center for Macromolecules and Biomaterials, National Institute for Materials Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tsukuba, <sup>2</sup>Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba,

**1. 緒言** 多くの細胞はその機能において方向性をもった移動を行うことが知られている。特に、集団的な細胞の移動は、創傷治癒、癌浸潤、胚発生といった生物学的に重要なプロセスに関与している。細胞移動現象においては、化学シグナル<sup>(1)</sup>、電場<sup>(2)</sup>、機械的刺激などによる様々な方向性制御のメカニズムが知られている。なかでも足場基材のナノトポグラフィは細胞移動の方向性を制御する重要な機械的因子として注目されている<sup>(3)</sup>。しかしながら、基材のナノトポグラフィが細胞に認識され、方向性をもった細胞移動を誘起する機構については、依然として理解が進んでいない。形状記憶足場基材は、培養中に基材のナノトポグラフィを変化させることのできる材料として提案された<sup>(4)</sup>。本研究では、形状記憶材料にナノスケールの溝構造をもつナノトポグラフィを固定し、基材のトポグラフィ変化に対する細胞移動の形態学および速度論的応答を観察することで、方向性を伴う集団的細胞移動の動態解明に挑んだ。

**2. 実験** 形状記憶ポリマー(SMP)基材は Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) をベースとして末端に導入したビニル基を重合することで作製した<sup>(4)</sup>。作製した SMP 基材を融点以上に加熱しアモルファス状態としてから、ナノトポグラフィ鑄型を基材表面に押し込み、結晶化させることで基材にナノトポグラフィを固定した。また基材の細胞接着性を向上させるため、フィブロネクチンを物理吸着させた。細胞が接着した SMP 基材を 42°C で 15 分処理することでナノトポグラフィ変化(フラット化)を誘起させた。Wound healing assay による細胞移動を定量的に評価するため、タイムラプス撮影にて基材上のコンフルエントな領域から無細胞領域への移動を追跡した。また撮影された画像について ImageJ を用いた細胞移動に伴う被覆面積の経時変化を追跡し、基材上の細胞移動速度を定量的に評価した。

**3. 結果・考察** Wound healing assay により細胞の被覆面積を追跡した結果、ナノトポグラフィ上の細胞はフラットな基

材上の細胞と比較して、異方的な移動が誘導されることが確認された。実際に、ナノトポグラフィに直交する方向での移動速度がフラット上での移動と比較して有意に低下していることが認められた。これはナノトポグラフィが移動中の細胞に対してコンタクトガイダンスを誘導していることに起因すると考えられる。さらにフラット化後の SMP 基材上で同様な解析を行った結果、追跡した 15 時間において、細胞はフラットな基材上を移動しているにも関わらず、ナノトポグラフィ上と類似した移動挙動を示した(Fig. 2)。この結果は、接着時に規定された細胞極性の配向が、その後も方向性の情報として保持されることを示唆している。以上の結果から、SMP 基材はトポグラフィによるコンタクトガイダンス消失後の細胞動態を観察するための新たなツールとして有用であり、細胞の根源的な機能に関する新たな発見をもたらす可能性が期待される。

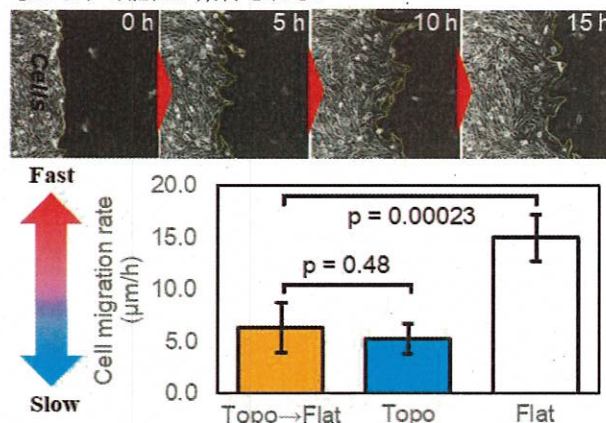


Fig. 2 Quantification of cell migration by wound healing assay on each topography

#### 4. 参考文献

- (1) K. Aoki, Y. Kondo, N. Honda, et al. Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration, *Developmental Cell*, Vol.43, pp. 305–317(2017)
- (2) M. S. Kim, M. H. Lee, B. J. Kwon, et al. Control of neonatal human dermal fibroblast migration on poly(lactic-co-glycolic acid)-coated surfaces by electrotaxis, *Tissue Eng Regen Med*, Vol.11, pp. 862–868(2017)
- (3) L. Ge, L. I. Yang, Reinier Bron, Janette K. Burgess, et al. Topography-Mediated Fibroblast Cell Migration Is Influenced by Direction, Wavelength, and Amplitude, *ACS Appl. Bio Mater*, Vol.3, pp. 2104–2116(2020)
- (4) M. Ebara, K. Uto, N. Idota, et al. Shape-Memory Surface with Dynamically Tunable Nanogeometry Activated by Body Heat, *Adv. Mater*, Vol.24, pp. 273–278(2012)

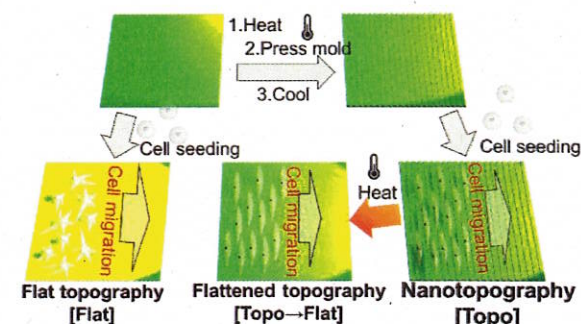


Fig. 1 Cell migration on shape memory polymer substrate. Cell migration was quantified on three states of topography: on nanotopography, on flat, and after nanotopography flattening.



# マクロファージの表現型制御を目指した形状記憶ファイバー基材の作製

## Fabrication of Shape-memory Fibers Scaffolds for Modulating Macrophage Phenotypes

川田楠旺<sup>1,2</sup>, 佐々木信<sup>1,2</sup>, 稲葉亮太<sup>1,2</sup>, 國吉優輔<sup>1,2</sup>, 宇都甲一郎<sup>1</sup>, 荏原充宏<sup>1,2</sup>  
 Nao KAWATA<sup>1,2</sup>, Makoto SASAKI<sup>1,2</sup>, Ryota INABA<sup>1,2</sup>, Yusuke KUNIYOSHI<sup>1,2</sup>  
 Koichiro UTO<sup>1</sup>, Mitsuhiro EBARA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター つくば市並木 1-1

<sup>2</sup> 筑波大学 理工情報生命学術院 数理物質科学研究群 つくば市天王台 1 丁目 1-1

<sup>1</sup> Research Center for Macromolecules and Biomaterials, National Institute for Materials Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tsukuba, <sup>2</sup> Graduate School of Science and technology, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba

### 1. 緒言

マクロファージは炎症性の M1 型と、組織修復性の M2 型という 2 つの表現型をとることが知られており、これらのバランスは人体の恒常性維持において重要な役割を果たしている。免疫力の低下により M1 型が優勢な状態が続くと、慢性創傷のような非感染性疾患の原因となるため、M1/M2 型の動的な制御が求められている。先行研究において、ナノ構造を有するファイバー基材がマクロファージの形態的な極性を制御し、その表現型に影響を及ぼすことが報告されている。具体的には、マクロファージはランダムファイバー基材上では M1 型、配向ファイバー基材上では M2 型への分極が促進される傾向が示されている<sup>(1),(2)</sup>。そこで本研究では、生体適合性のポリ(ε-カプロラクトン)(PCL)を用いた形状記憶ファイバーを作製し、マクロファージの表現型を動的に制御することを目的とした(Fig. 1)。さらに、従来の物理架橋によ

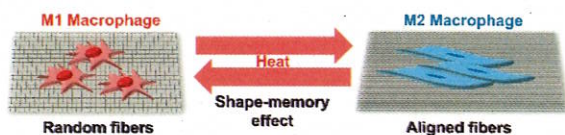


Fig. 1 Dynamic control of macrophage phenotypes using shape-memory substrates.

る形状記憶ファイバー<sup>(3)</sup>では形状回復後にファイバー構造も変化するという課題があったため、本研究では、ベンゾフェノン(BP)を開始剤とした化学架橋法により、形状や構造安定性を向上させたファイバーの作製を試みた。

### 2. 実験方法

電界紡糸法で作製した BP 含有 PCL ファイバー(PCL-BP ファイバー)に紫外線(UV, 365 nm)を照射し、化学架橋 PCL ファイバー(cPCL)を作製し、走査電子顕微鏡(SEM)を用いてファイバー構造を観察した。また、架橋構造の形成を確認するために、PCL ファイバーと UV 照射前後のファイバー(PCL-BP と cPCL ファイバー)に対して、PCL の良溶媒への浸漬試験やゲル分率の測定<sup>(4)</sup>を行った。さらに、示差走査熱量測定(DSC)を用い、熱的特性の変化を定量的に評価した。形状記憶特性については、マクロ、及びミクロスケールで変形後の形状回復挙動の観察による定性的評価を行った。作製した化学架橋ファイバー上にマクロファージ(RAW-Blue cells)を播種し、その形態の変化を光学顕微鏡により観察した。

### 3. 結果及び考察

SEM を用いた構造観察により、PCL-BP ファイバーの形成が確認された。良溶媒であるアセトン中で PCL、化学架橋前の PCL-BP ファイバーは溶解したが、化学架橋後の cPCL ファイバーは溶解せずに膨潤した。また、ゲル分率測定、DSC を用いた熱的特性の測定結果からも、化学架橋の導入に伴う物性の変化が示唆された。変形後の SEM 画像において、ミクロスケールでのファイバー構造の変化が確認された。一方、形状回復後の SEM 画像においては、ファイバー構造が維持されていることが確認された。これにより、物理架橋のファイバーに比べ、形状記憶特性が向上していることが示唆され

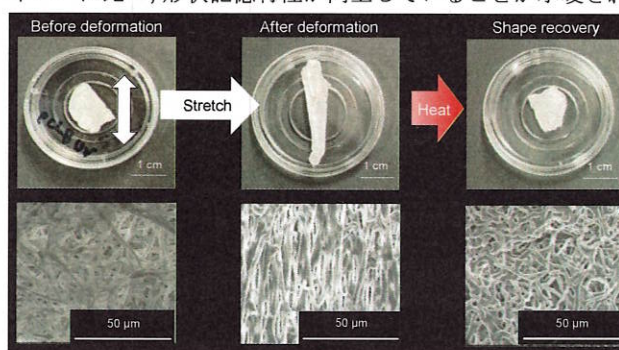


Fig. 2 Digital (top) and SEM (below) images of cPCL fibers w/ UV before deformation (left), after deformation (middle), and after shape recovery (right).

た(Fig. 2)。ファイバー上に播種したマクロファージの形態は、ファイバーの構造によって変化していることが確認された。

### 4. 参考文献

- (1) Xie J, Wu X, Zheng S, et al. Aligned electrospun poly(l-lactide) nanofibers facilitate wound healing by inhibiting macrophage M1 polarization via the JAK-STAT and NF-κB pathways, *J Nanobiotechnol.* Vol. 20, No. 342. (2022).
- (2) McWhorter F, Davis C, Liu W. Physical and mechanical regulation of macrophage phenotype and function, *Cell Mol Life Sci.* Vol. 72, No. 7, pp. 1303-16 (2015).
- (3) Niiyama E, Ebara M, Kikuchi A, et al. Shape-Memory Nanofiber Meshes with Programmable Cell Orientation, *Fibers.* Vol. 7, No. 3, pp. 20 (2019).
- (4) Halligan, E, Geever L.M., Keane G, et al. Synthesis and Characterization of Hydrogels Based on Poly (N-Vinylcaprolactam) with Diethylene Glycol Diacrylate, *Gels.* Vol. 9, No. 6, pp. 439 (2023).



# Functional analysis of extracellular vesicle derived from mesenchymal stem cell against viral infection

Neni Anggraeni, Vuong Cat Khanh, Osamu Ohneda

Graduate School of Comprehensive Human Science, Laboratory of Regenerative Medicine and Stem Cell Biology, University of Tsukuba, 1-1-1, Tsukuba, 305-8575, Japan

## 1. Introduction

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has been controlled; however, the incidence of persistent long-term post-COVID-19 syndrome increases the risk for human healthcare. Several studies have shown that SARS-CoV-2 is co-infected with influenza virus (IAV) and is associated with disease severity and mortality. After recovery from COVID-19, SARS-CoV-2 viral proteins are still detected in the sera of these subjects over the long term, raising concerns about the co-effects of SARS-CoV-2 and IAV proteins if these subjects are infected by IAV<sup>(1,2)</sup>. Therefore, it is necessary to investigate the co-impact of SARS-CoV-2 and IAV on the lung function and develop effective therapeutic strategies for the treatment of influenza patients with post-COVID-19 syndrome.

Extracellular vesicles derived from Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-EV) over promising therapeutic effect as they possess immunomodulatory and anti-inflammatory abilities. WJ-EV is secreted by mesenchymal stem cells containing biological signals, including proteins, mRNAs, and miRNAs, which can be incorporated into target cells and modulate the genotypic and phenotypic characteristics of recipient cells. Numerous studies have reported the role of WJ-EV in improving severe lung injury induced by bacteria or viruses<sup>(3)</sup>. However, the effects of WJ-EV treatment on SARS-CoV-2 and IAV co-infection have not been elucidated. In the present study, we examined the effects of co-induction of SARS-CoV-2 and H1N1 viral proteins on lung epithelial-endothelial cell crosstalk and the ability of WJ-EV to rescue these alterations.

## 2. Result

The results showed that the co-induction of SARS-CoV-2 and H1N1 viral proteins resulted in robust upregulation of inflammatory cytokines in lung epithelial cells compared to those single inductions. Consequently, SARS-CoV-2 and H1N1 viral protein-co-induced lung epithelial cells showed the altered effects on the epithelial-endothelial crosstalk, which induced the apoptosis and impaired the angiogenic abilities of lung endothelial cells, and the induced recruitment of immune cells. In addition, lung epithelial cells co-induced by both SARS-CoV-2 and H1N1 viral protein showed paracrine effects on the recruitment of immune cells, including monocytes, macrophages and neutrophils. Of note, extracellular vesicles derived from Wharton Jelly's mesenchymal stem cells (WJ-EV) transferred miR-146a to recipient lung EpiC, which impaired TRAF6 and IRAK1, resulting in the downregulation of NF- $\kappa$ B pathway and secretion of inflammatory cytokines, rescuing the epithelial-endothelial crosstalk, and reducing the elevation of immune cell recruitment.

## 3. Conclusion

Taken together, our findings suggested that WJ-EV derived from healthy donors provides an encouraging insight on developing an inventive approach to regulate inflammatory cytokines induced by co-infection of both SARS-CoV2 and H1N1 influenza viruses. In addition, targeting miR-146a to impair NF- $\kappa$ B pathway is a promising strategy to enhance the anti-inflammatory abilities of WJ-EV.

## 4. Figures

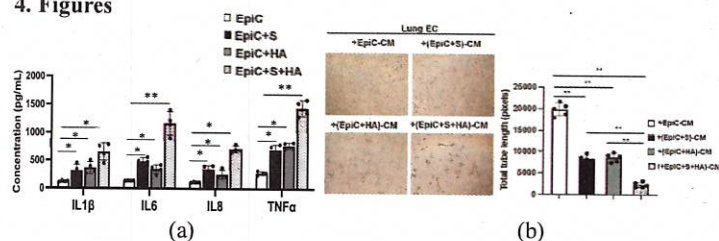


Figure 1. Co-induction of SARS-CoV-2 S-protein and H1N1 HA protein robustly elevates cytokine secretion in lung EpiC (a) and has the worst effect in the EC function (b) compared to single induction of SARS-CoV-2 S-protein or H1N1 HA protein.

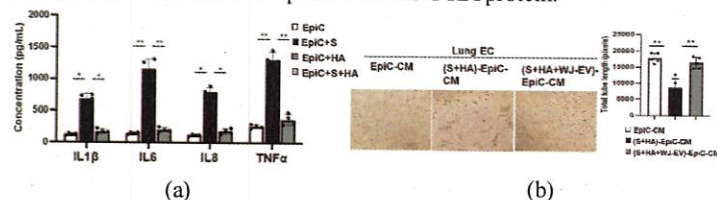


Figure 2. EV derived from MSC abolished the elevation of cytokine secretion in lung EpiC (a) and improved EC dysregulation (b) caused by SARS-CoV-2 S-protein and H1N1 HA protein.

## 5. References

- Luo, G. & Gao, S. J. Global health concerns stirred by emerging viral infections. *J. Med. Virol.* **92**, 399–400 (2020).
- Maltezou, H. C. *et al.* COVID-19 and Respiratory Virus Co-Infections: A Systematic Review of the Literature. *Viruses* **15**, 865 (2023).
- Khanh, V. C. *et al.* Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Reduce SARS-CoV2-Induced Inflammatory Cytokines Under High Glucose and Uremic Toxin Conditions. *Stem Cells Dev.* **30**, 758–772 (2021).

## 6. Proposed method

Lung EpiC were co-induced using the SARS-CoV-2 S-protein and the H1N1 HA protein for 24 hours, followed by treatment with EV derived from MSC for an additional 24 hours. After the treatment, cytokine secretion was analyzed using an ELISA kit, while the levels of the p65 protein were examined using western blot. The conditioned medium (CM) was then collected for future experiments.

A tube formation assay was conducted to assess EC function after treatment with the CM from the co-induced lung EpiC. The expression levels of angiogenesis-related genes were analyzed using quantitative PCR. To investigate the mechanism by which EV regulates inflammatory cytokines in lung EpiC, miRNA sequencing analysis was performed, followed by predictive analysis using various database tools. Finally, to confirm these predictions, inhibitory and mimic assays were carried out.



## 細胞膜酸化により細胞機能を制御する細胞培養基材の開発

Development of porphyrin/polycation-immobilized cell culture dishes for regulation of cell function via oxidation of the cell membrane

吉富徹<sup>1</sup>, Van Thi Hong Doan<sup>1</sup>, 川添直輝<sup>1</sup>, 陳国平<sup>1</sup>Toru Yoshitomi<sup>1</sup>, Van Thi Hong Doan<sup>1</sup>, Naoki Kawazoe<sup>1</sup>, and Guoping Chen<sup>1</sup><sup>1</sup> 国立研究開発法人物質・材料研究機構, つくば市並木 1-1<sup>1</sup> Research Center for Macromolecules and Biomaterials, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki

細胞膜は、細胞の最外層にあるため、ストレスや刺激の影響を一番に受ける。膜タンパク質がシグナル伝達に大いに寄与していることはよく知られているが、近年では細胞膜の中の脂質酸化などもシグナル伝達に関与している可能性が報告され、細胞膜が受けるストレス刺激(細胞膜ストレス刺激)への応答に関して科学的に理解することが求められている。これまでに、脂質酸化に関しては、細胞レベルで数多く研究が行われており、脂質酸化の影響を調べる研究手法として、酸化剤、例えば過酸化水素やアゾ系ラジカル開始剤などが多く用いられてきた。しかし、これらの遊離した低分子酸化剤を細胞培養液中に添加しても、細胞内を自由に拡散するため、細胞膜内だけでなく、細胞質内や核内にも拡散し、細胞全体に酸化的ストレス刺激を引き起こすため、選択的に細胞膜のみを酸化することはできない。よって、これまでは細胞膜ストレス刺激を正確に解析することは、技術的に不可能であった。

そこで、我々は、酸化的細胞膜ストレス刺激を解明するために、ポルフィリンが表面に固定化したガラス基板を装着した細胞培養皿を新規に開発した(図1)。<sup>1</sup> 写真中央のガラス基板表面には、一級アミノ基を持つポリマー(PA)が固定化されており、一部の一级アミノ基にヘマトポルフィリン(HpD)が結合している。この細胞培養皿のガラス基板(PA-HpD)に向かって光を照射すると、ガラス表面からのみ一重項酸素( $^1O_2$ )が発生する。この $^1O_2$ 量は、光のエネルギー密度(照射強度、及び照射時間)によって制御することができる。この細胞培養皿のガラス基板上に未成熟樹状細胞株を添加すると、未修飾のガラス基板には接着しない樹状細胞が、表面にあるポリマーの正電荷のため、PA-HpD表面上によく接着するようになる。細胞が接着しているガラスに向けて弱い光を照射すると、細胞質内、及び核内では合戦酸素種(ROS)を発生させず(細胞は全くダメージを受けない)、細胞膜の構成成分である脂質をわずかに酸

化し、脂質ラジカルが発生することを確認した。このように、開発したポルフィリン・ポリカチオン固定化細胞培養皿は、細胞膜だけを選択的に酸化し、細胞膜に刺激を与えることができる。さらに、興味深いことに、光を照射することで、未成熟樹状細胞の丸い細胞の形状から樹状突起を形成していることを見出した。通常、未成熟樹状細胞が成熟化すると、樹状突起を形成する。そこで、この細胞の機能をさらに調べると、抗原提示量を増大させ、免疫抑制(免疫寛容)に寄与するインターロイキン(IL)-10を過剰に分泌するようになることもわかってきた。このことから、光照射によって未成熟樹状細胞の細胞膜に酸化的刺激を与えると、免疫寛容性の抗原提示細胞に変化することが明らかとなった。この免疫寛容性の抗原提示細胞は、体内で活性化した免疫システムを抗原特異的に抑制できる可能性があり、将来的には自己免疫疾患や臓器移植の際の免疫拒絶を回避する細胞治療への応用が期待できる。

## 引用文献

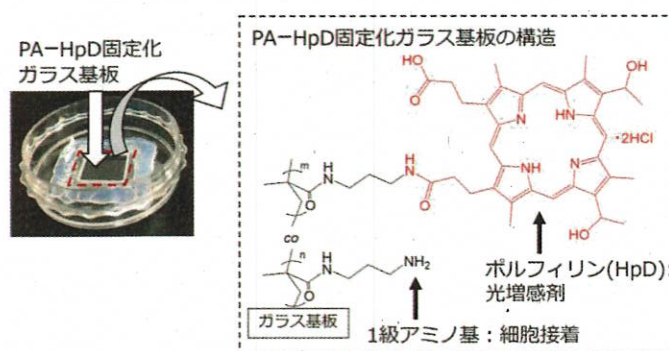
<sup>1</sup> Doan et al, Free Radic Biol Med. 2023, 207:239.

図1 細胞膜近傍を選択的に酸化する細胞培養皿。この一重項酸素( $^1O_2$ )発生ガラス基板には、ポルフィリンが結合したポリアミンが固定化されている。このガラス上に細胞を接着させ、635nm程度の赤色光を照射することにより、ガラス表面に結合したポルフィリンから $^1O_2$ が発生する。



## 医療画像診断における SAM2 の有用性の検討

### Evaluation of SAM2 Effectiveness in Medical Image Diagnosis

岡崎亮太郎<sup>\*1,2</sup>, 池田篤史<sup>\*1</sup>, 金原稷<sup>\*2</sup>, 野里博和<sup>\*2</sup>, 西山博之<sup>\*1</sup>  
 Ryotaro OKAZAKI<sup>\*1,2</sup>, Atsushi IKEDA<sup>\*1</sup>, Kim WONJIK<sup>\*2</sup>,  
 Hirokazu NOSATO<sup>\*2</sup>, Hiroyuki NISHIYAMA<sup>\*1</sup>

※<sup>1</sup> 筑波大学, つくば市天王台 1 丁目 1-1、

※<sup>2</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市並木 1-2-1

<sup>\*1</sup>University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba

<sup>\*2</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba

#### 1. 背景

一般的に性能の良い人工知能を開発するためには大量の学習データが必要不可欠である。医療画像診断に適用する場合においては、学習のための大量の検査画像の収集とラベル作成は容易ではない。特に内視鏡画像においては、撮影角度や照明条件の変化により画像の特徴が大きく変動することから、より多くの学習データが必要となる。そこで本研究では、2024年7月にMetaが公開した画像から対象領域を抽出するセグメンテーション用の基盤モデルである SAM2 (Segment Anything Model 2) <sup>(1)</sup> を医用画像に適用し、少量の学習データにより病変領域が正しく抽出できるかどうかの可能性を検討した。SAM2 は静止画像と動画の両方で高精度なセグメンテーションを実現する基盤モデルであり、特に医療画像への応用可能性が注目されている。

#### 2. 方法

実験では、Ambu® aScope™ 4 Cysto (400×400 ピクセル) を用いて経尿道的膀胱腫瘍切除術中に記録された映像を使用した。2種類の動画像(合計約142秒間・1729フレーム)から、腫瘍の視認性が高い19フレームを抽出して学習データとした。フレームの選択は、各腫瘍が最初に明確に視認できる部分を中心に行った。過去の学習結果を効果的に活用するため、各画像の解析結果を最大100フレームまで保持し、その後指数関数的に重みを減衰させる手法を実装した。評価方法として、AIによる予測領域が泌尿器科医によるアノテーション領域と50%以上の重なりを示した場合を正確な診断と定義した。この基準は、臨床的に意味のある腫瘍検出の最低限の要件として設定された。

#### 3. 結果

SAM2 によるセグメンテーションの時系列での重なり率の推移と、代表的なフレームにおける AI 予測結果と正解ラベルの比較を Figure 1 に示す。実験の結果、病変を正しく認識する割合である感度が 81.7%、病変がない場所を正しく認識する特異度が 96.4%、予測した箇所が実際に病変である割合を示す適合率が 93.8% を達成した。これは、従来報告されている 8159 枚の膀胱鏡画像を事前学習した AI の検出結果(感度 93.6%、特異度 89.7%、適合率 64.8%) <sup>(2)</sup> と比較して、特異度、適合率において優れた性能を示している。また、感度と適合率の両方を考慮した診断精度の総合的な評価指標である F1 スコアにおいても、従来手法の 76.3 に対し 87.3 という結果を達成した。

#### 4. 考察

従来手法と比較して性能差が生じた主な要因として、SAM2 が 10 億枚を超える大規模な一般画像データセットで事前学習されていることによる高い汎用性、実装した重み減衰システムによる時間的文脈を考慮した安定した検出、そして動画像に特化した設計による連続フレーム間の情報の効果的な活用が挙げられる。

一方で、腫瘍の近接や急なカメラの動き、ピントのずれによる検出精度の低下、また腫瘍に連続する一部正常組織の誤認識といった課題も明らかとなった。ただし、適切なアノテーションマスクを提供することで、検出漏れは現状では発生していないことも確認された。

本研究により、まだ2つの動画像でしか試すことができていないものの、SAM2 を用いることで人工知能を構築するための学習画像枚数を大幅に減らすことができる可能性を示すことができた。今後は、より多様な症例での検証や、リアルタイム診断支援システムとしての実用化に向けた検討が必要である。

#### 5. 参考文献

- (1) N Ravi, V Gabeur, Y Hu, R Hu, C Ryali, T Ma, H Khedr, R Rädle, C Rolland, L Gustafson, E Mintun, J Pan, K V Alwala, N Carion, C Wu, R Girshick, P Dollár, C Feichtenhofer. SAM 2: Segment Anything in Images and Videos, \*arXiv preprint\*, pp. 1-42 (2024).
- (2) A Ikeda. Cystoscopic Diagnosis of Bladder Cancer Using Artificial Intelligence, \*Japanese Society for Laser Surgery and Medicine\*, Vol. 42, No. 4, pp. 419-426 (2022).

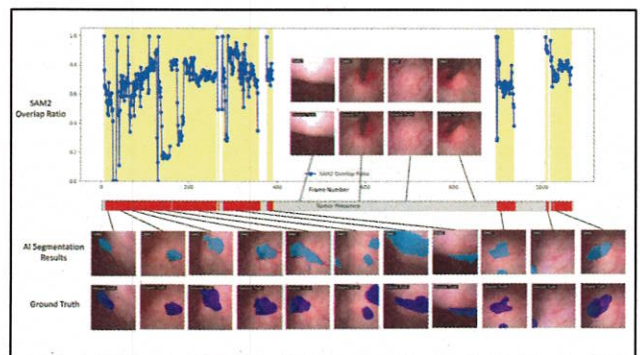


Figure 1: Time Series of SAM2 Segmentation Overlap Ratio



## 超音波を用いた発達障害モデルマウスの脳機能ネットワーク解析

Functional brain network analysis in a mouse model of developmental disorders using ultrasound

疋島啓吾<sup>\*1,2</sup>, 水間広<sup>\*3,4,5</sup>, 釣木澤朋和<sup>\*1</sup>, 笠原和美<sup>\*1</sup>, 林隆介<sup>\*1</sup>, 宮坂尚幸<sup>\*6</sup>, 尾上浩隆<sup>\*7</sup>,  
 葭仲潔<sup>\*1</sup>, 新田尚隆<sup>\*1</sup>

Keigo HIKISHIMA<sup>\*1,2</sup>, Hiroshi MIZUMA<sup>\*3,4,5</sup>, Tomokazu TSURUGIZAWA<sup>\*1</sup>,

Kazumi KASAHARA<sup>\*1</sup>, Ryusuke HAYASHI<sup>\*1</sup>, Naoyuki MIYASAKA<sup>\*6</sup>, Hiroataka ONOE<sup>\*7</sup>,

Kiyoshi YOSHINAKA<sup>\*1</sup>, Naotaka NITTA<sup>\*1</sup>

※<sup>1</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市並木 1-2-1、※<sup>2</sup> 沖縄科学技術大学院大学, 恩納村谷茶 1919-1、※<sup>3</sup> 大阪公立大学大学院医学研究科 病因診断科学分野, 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3、※<sup>4</sup> 量子科学技術研究開発機構 脳機能イメージング研究センター, 千葉市稲毛区穴川 4-9-1、※<sup>5</sup> 理化学研究所 生命機能科学研究センター, 神戸市中央区港島南町 6-7-3、※<sup>6</sup> 東京科学大学大学院医歯学総合研究科 生殖機能協働学分野, 東京都文京区湯島 1-5-45、※<sup>7</sup> 神戸学院大学薬学部 神経精神薬理研究室, 神戸市中央区港島 1-1-3

<sup>\*1</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki,

<sup>\*2</sup> Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST), 1919-1 Tancha, Onna-son, Okinawa,

<sup>\*3</sup> Department of Neuroetiology and Diagnostic Science, Osaka Metropolitan University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka, <sup>\*4</sup> Advanced Neuroimaging Center, National Institutes for Quantum and

Radiological Science and Technology (QST), 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba, <sup>\*5</sup> RIKEN Center for Biosystems

Dynamics Research, 6-7-3 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, <sup>\*6</sup> Comprehensive Reproductive Medicine,

Institute of Science Tokyo, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, <sup>\*7</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Neuropsychopharmacology, Kobe Gakuin University, 1-1-3 Minatojima, Chuo-ku, Kobe

### 1. 背景

安静時における自発脳活動のイメージングデータを解析することで大域的な脳機能ネットワークを表現できる。アルツハイマー病、うつ病、自閉スペクトラム症などで、それぞれ特徴的な脳機能ネットワークが報告されている。一方、超音波イメージングでは、平面波送信を用いた超高速計測とそのコンパウンド走査、受信後の合成により、高い時間分解能と感度を兼ね備えた脳微小血管計測が可能となり、近年、神経-血管カップリングを利用した脳活動イメージング手法として急速に研究が拡大している。本研究では、超音波脳活動イメージングに基づくネットワーク解析により、自閉症様行動を示す発達障がいモデルマウスの脳機能ネットワーク異常を調べ、MRIを用いた脳活動イメージングに基づく解析結果と比較することで妥当性の検証を行った。

### 2. 方法

胎生期 (E12.5) の母胎マウスに人工の二本鎖 RNA である polyI:C を腹腔内投与し、その産仔のうち、性成熟後、3 チャンバー試験により自閉症様社会性行動を確認した個体を発達障がいモデルとして用いた。超音波開発用プラットフォーム (Vantage 256) に中心周波数 18MHz のリニア型プローブ (L22-14vX) を接続し、健常と発達障がいモデル群から、覚醒安静状態における脳血流量画像を 0.1 秒の時間分解能で計測した。脳血流の時系列画像を脳アトラス空間へ座標変換し、非神経活動成分を時空間的に除去するため k-means クラスタリングフィルタおよびバンドパスフィルタを適用した。最後に、独立成分分析を用いて複数の安静時脳機能ネットワークを同定<sup>(1)</sup>し、健常と発達障がいモデル群で比較した。

### 3. 結果

超音波と MRI の両方のイメージングデータを用いた解析結果において、内側前頭前野、一次運動野、一次体性感覚野、

海馬背外側、外側手綱核を含む複数の安静時脳機能ネットワークが特定された。さらに、Bregma から +1.5mm に位置する内側前頭前野ネットワークのクラスターサイズは発達障がいモデル群で大きく、その画像統計解析により、過活性を示すボクセルが内側前頭前野 (medial prefrontal cortex) 内の前辺縁皮質 (prelimbic cortex) に分布していることが明らかになった (Fig.1)。

### 4. 考察

前辺縁皮質は社会性行動に関わる中心領域として知られている。本研究により観測された前辺縁皮質の安静時過活性が、発達障がいモデルの自閉症様社会行動と関わる可能性が示唆される。超音波は、スクリーニングに適した安全で携帯可能かつ安価な計測モダリティであり、乳児の脳画像検査にも使用されている。本研究の知見は、発達障がいに関連する脳機能検査への将来的な応用の可能性を示している。

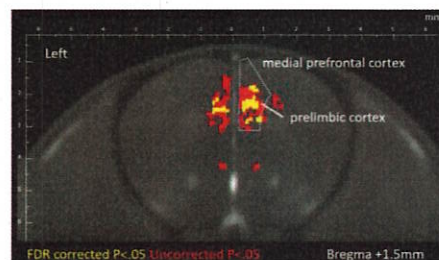


Fig. 1 Excessive activity in the medial prefrontal cortex in a mouse model of developmental disorders.

### 5. 参考文献

(1) K Hikishima, T Tsurugizawa, K Kasahara, et al. Brain-wide mapping of resting-state networks in mice using high-frame rate functional ultrasound. *NeuroImage* Vol. 279, pp. 120297 (2023).



## SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の擬似ルシフェラーゼ活性

西原諒<sup>1,2</sup>, Hisham M. Dokainish<sup>3,4</sup>, 木原良樹<sup>1,5</sup>, 杉田有治<sup>4</sup>, 栗田僚二<sup>1,5</sup>

※<sup>1</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研),つくば市東 1-1-1、※<sup>2</sup> 国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)さがけ,川口市本町 4-1-8、※<sup>3</sup> 北海道大学,札幌市北区北 12 条西 6 丁目、※<sup>4</sup> 国立研究開発法人理化学研究所,和光市広沢 2-1、※<sup>5</sup> 筑波大学,つくば市天王台 1-1-1

## 1. はじめに

ホタルなど発光生物が発する生物発光は、発光基質ルシフェリンの“酸化反応”を発光酵素ルシフェラーゼが補助する酵素反応によって自発的に光を産生する。蛍光とは異なり励起光源を必要とせず、原理的に自家蛍光によるバックグラウンドや光毒性のない分析が可能である。そのため、生物発光は、癌細胞検出から洗浄度検査等、その応用先は医療ライフサイエンスから食品衛生まで多岐に渡る<sup>1-4</sup>。しかし、従来生物発光法は、遺伝子工学技術でタンパク質等の目的分子に予めルシフェラーゼ標識する必要がある実験の煩雑さが、分析化学技術として持つ課題であった。

## 2. 本文

本研究では、発光酵素として知られていないタンパク質が、特異な化学構造を持つルシフェリンを発光させる、という驚くべき発光酵素的機能(擬似ルシフェラーゼ活性と命名)を世界に先駆けて報告してきた<sup>5-9</sup>。測定対象とするタンパク質自身の擬似ルシフェラーゼ活性を新規に発見及び利用することで、発光生物由来ルシフェラーゼを使用しない、迅速かつ簡便なタンパク質発光分析手法を開発する事に成功した。具体的には、標的としたタンパク質に適合する、特異な化学構造のルシフェリンを設計開発または選定する方法で、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のスパイクタンパク質(ウイルス粒子上のタンパク質抗原)<sup>8</sup>やヒト血清アルブミン(HSA)<sup>5-7,9</sup>に擬似ルシフェラーゼ活性を発見した。面白いことに、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質はウミホタル由来のルシフェリンの発光を特異的に触媒することが分かった(Fig. 1)。この現象を利用すると、ウミホタルルシフェリンを未処理のヒト唾液と混合するだけで、標的とする唾液中スパイクタンパク質濃度を ELISA(抗体を使用した免疫学的測定法)と同等の精度で定量することに成功した。SARS-CoV-2の感染診断技術には PCR(ウイルスに特徴的な遺伝子を増幅して検出)法や抗原検査法(タンパク質抗原を検出)があるが、本技術は約 1 分で定量分析できるなど、従来技術以上に迅速で簡便な発光測定を実現した。HSA は、ウミホタルルシフェリンの化学構造を改変した、ルシフェリン誘導体の発光を特異的に触媒することが可能で、当該ルシフェリンを未処理のヒト血清と混合するだけで、スパイクタンパク質の測定系と同様に、ELISA と同等の精度で HSA を 1 分で定量分析することに成功した。従来の HSA 簡易検出法(BCG 法)ではグロブリンとの交差反応性が問題となっていたが、本技術はグロブリンをはじめとする他のタンパク質とは全く反応しない特異性の高い検出法として有用であることを示した。

以上、「発光生物由来の酵素でしか、生物発光反応を触媒できない」という常識から脱却し、ウイルスのタンパク質やヒト由来タンパク質にもこれまで見出されてこなかった発光機能(擬似ルシフェラーゼ活性)があることを発見、これら擬似ルシフェラーゼ活性は、標的タンパク質のラベル化や発光生物由来のルシフェラーゼを必要としない、新たな発光分

析技術として利用可能であることを提案する。

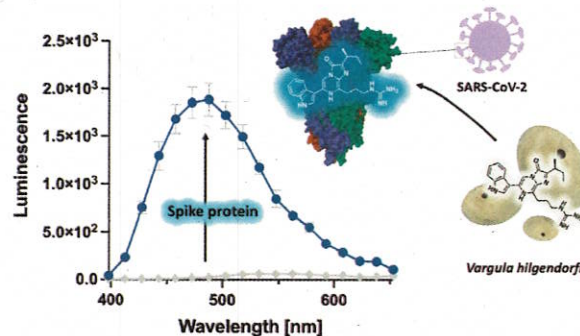


Fig.1 The spike protein, which decorates the SARS-CoV-2 virus, catalyzes the oxidative luminescence reaction of *Cypridina* luciferin, a substrate for *Cypridina* luciferase.

## 3. 参考文献

- [1] R. Nishihara, R. Paulmurugan, T. Nakajima, E. Yamamoto, A. Natarajan, R. Afjei, Y. Hiruta, N. Iwasawa, S. Nishiyama, D. Citterio, M. Sato, S.B. Kim\* and K. Suzuki\*, Highly bright and stable NIR-BRET with blue-shifted coelenterazine derivatives for deep-tissue imaging of molecular events *in vivo*, *Theranostics*, 9, 2646-2661 (2019).
- [2] Y. Ikeda, M. Tanaka, R. Nishihara\*, Y. Hiruta, D. Citterio, K. Suzuki and K. Niwa\*, Quantitative evaluation of luminescence intensity from enzymatic luminescence reaction of coelenterazine and analogues, *J. Photochem. Photobiol. A Chem*, 394, 112459, (2020).
- [3] R. Nishihara\*, Y. Kihara, K. Niwa, M. Mimura, S. Tomita\* and R. Kurita, Quantum yield enhancement of firefly bioluminescence with biomolecular condensates, *Chemical Communications*, 58, 13317-13320 (2022).
- [4] 近江谷克裕, 西原諒, SUPER サイエンス 生物発光が人類の未来を変える、シーアンドアール研究所, 240 ページ, ISBN 4863544421 (2024)
- [5] R. Nishihara\*, T. Tomita, K. Niwa and R. Kurita\*, Coelenterazine analogue with human serum albumin-specific bioluminescence, *Bioconjugate Chem*, 31, 2679-2684 (2020).
- [6] R. Nishihara\*, T. Tomita, K. Niwa and R. Kurita, Design of coelenterazine analogue to reveal bioluminescent reaction of human serum albumin, *IntechOpen*, 13 pages (2021).
- [7] R. Nishihara\* and R. Kurita\*, Mix-and-read bioluminescent copper detection platform using a caged coelenterazine analogue, *Analyst*, 146, 6139-6144 (2021).
- [8] R. Nishihara\*, H. Dokainish, Y. Kihara, H. Ashiba, Y. Sugita and R. Kurita, Pseudo-Luciferase Activity of the SARS-CoV-2 Spike Protein for *Cypridina* Luciferin, *ACS Central Science*, 10, 283-290 (2024).
- [9] R. Kurita\* and R. Nishihara\*, Dry chemistry utilizing artificial luciferin for human serum albumin quantification, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2024), *in press*.



# 新規バイオチップによる進行がん迅速診断法

## Rapid diagnostic technology for progressive cancer by a novel biochip

梶本和昭\*<sup>1</sup>Kazuaki KAJIMOTO\*<sup>1</sup>\*<sup>1</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研),高松市林町 2217-14\*<sup>1</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2217-14 Hayashi-cho, Takamatsu,

### 1. 研究の背景

がんの予後の予測や抗がん剤による治療効果の判定、転移や再発の早期発見に利用できる CTC は、採血のみで低侵襲な検査を可能とするリキッドバイオプシーの標的として注目されている。がん患者の血液 10ml (白血球 数千万個に相当) 中に数個~数十個程度しか存在しない CTC を検出するため、米国食品医薬品局 (FDA) によって唯一認可された CTC 検査法 (CellSearch System; Veridex 社) では上皮細胞接着分子 (EpCAM) に対する抗体を用いて CTC を濃縮する手法が用いられている。しかし、腫瘍の悪性化に伴って EpCAM 発現が低下した CTC を検出できないことから、適用可能ながん種は限定的であり (大腸がん、乳がん、および前立腺がんの 3 種類)、見落としのない新たな CTC 検出法が強く求められている。

我々は、これまでの研究でスライドガラス大のプラスチック平板上に 1,000 万個以上の細胞を単層に敷き詰めて安定に付着させる高密度細胞単層配列技術 (High-Density Cell Spreading in a Monolayer; HD-CeSM 法) を開発した<sup>(1)</sup>。本技術の特色は、細胞を単層に保持した状態で任意の抗体で染色できる点にあり、平板上での免疫多重染色と、広視野蛍光顕微鏡を用いた全面観察によって、細胞集団中の標的細胞を 1 細胞レベルで検出できる (Fig.1A)。また医療機関との連携により、膵臓がん患者の血液から採取した細胞画分を HD-CeSM 法で単層配列させ、上皮細胞マーカー (EpCAM および Cytokeratin) と白血球マーカー (CD45) に対する抗体を用いた多重染色により、CellSearch System では検出できない EpCAM 陰性/Cytokeratin 陽性の CTC を検出することに成功した (Fig.1B)。

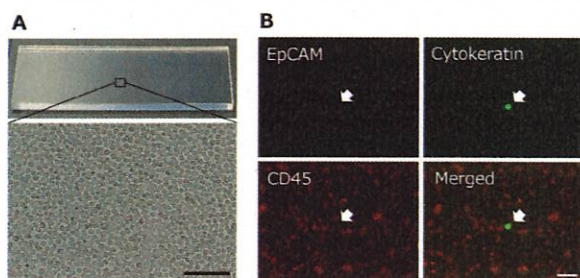


Fig.1 CTC detection using a novel biochip

A. large number of white blood cells was attached on a PMMA substrate in a monolayer. B. EpCAM<sup>+</sup>, Cytokeratin<sup>+</sup> CTC was successfully detected on the biochip. Bars are 100 $\mu$ m.

### 2. 実用化に向けた自動細胞標本作製技術の確立

これまででは、PMMA 製の平板上基板を使用し、への細胞配列や免疫染色等は全て手動操作で行っており、良質な標本作製には熟練者が操作を行う必要があった。臨床検査の現場で信頼性、再現性の高い検査結果を安定に取得するためには、

操作者の習熟度に依存しない標本作製法が不可欠である。そこで、検体となる細胞懸濁液や抗体染色液、洗浄液等の順次注入のみで標本作製が可能なチップデバイスの設計、試作検討を行った。

標本作製用チップは、2 枚の PMMA 平板を 0.5mm のスペーサーを挟んで貼り合わせた構造とし、上板の片端に設けた注入口から各種溶液を注入する。下板の上面には、独自に開発した新規細胞付着用ポリマーを予めコーティングしておくことでチップ内での細胞単層配列を可能とした (Fig.2A)。さらに、手のひらサイズ (76x53mm) チップ底面全体に均一かつ高密度に細胞を単層配列させ、抗体染色液や洗浄液を注入操作のみでむらなく交換するための周辺パーツを設計、試作検討し、良質な細胞標本を人の手に依らず自動的に作製するためのデバイスを構築した (Fig.2B)。本デバイスを用いた検証において、大量の白血球細胞中に混入した肺がん細胞を 1 細胞レベルで検出できることが明らかとなった (Fig.2C)。

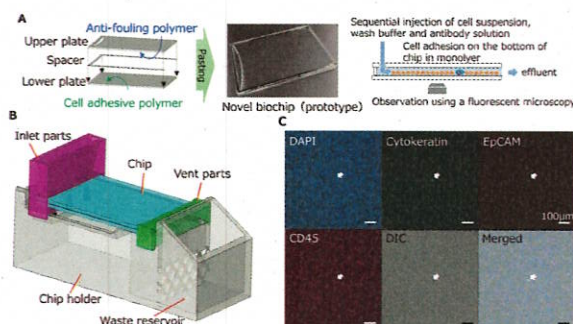


Fig.2 A unique device for preparation of cellular specimen using a novel biochip

A. Schematic illustration of the novel biochip for cellular specimen preparation. B. 3D model of chip device. C. Detection of cancer cells spiked in T lymphocytes. Bars indicate 100 $\mu$ m.

### 3. まとめ

これまで、熟練者が手動操作で 1 検体ずつ作製していた細胞標本を人の手に依らず溶液の順次注入のみで自動的に作製可能なチップデバイスの開発に成功した。現在、民間企業および医療機関との連携により製品化に向けた取り組みを遂行中である。

### 4. 参考文献

(1) 梶本和昭、橋本宗明、片岡正俊. “単離細胞標本、単離細胞標本の製造方法、及び目的細胞の検出方法” 特許第 7153365 号 (登録日: 2022 年 10 月 5 日)



## ポアデバイスによる赤血球変形能評価

## Evaluation of the Red Blood Cell Deformability by Using Pore Devices

横田一道<sup>\*1</sup>, 橋本宗明<sup>\*1</sup>, 中司敦子<sup>\*2</sup>, 和田淳<sup>\*2</sup>Kazumichi YOKOTA<sup>\*1</sup>, Muneaki HASHIMOTO<sup>\*1</sup>, Atsuko NAKATSUKA<sup>\*2</sup>, Jun WADA<sup>\*2</sup>\*<sup>1</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), 高松市林町 2217-14、\*<sup>2</sup> 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, 岡山市北区鹿田町 2-5-1\*<sup>1</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2217-14 Hayashi-cho, Takamatsu,\*<sup>2</sup> Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama

## 1. はじめに

## 1.1 ポアデバイスとは

微細加工技術によって作製した微細孔(ポア)を有するポアデバイスでは、ポアを介した電解質イオンの流れをイオン電流として計測する(Fig 1 a)。ポアデバイスを用いて微小粒子を含む電解質溶液を計測すると、1粒子がポアを通過する際にイオンの流れが阻害されることでパルス状のイオン電流阻害波形が得られる(Fig 1 b)。パルス波形を評価することで、通過する1粒子のサイズ、形状、表面電荷等の物性をリアルタイムに計測することが可能になる。

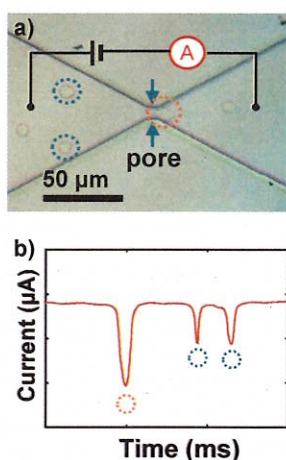


Fig. 1 a) Microscope image and schematic of the measurement for single-cells (broken-line circles) by using pore devices. b) The passages of single-cells via a pore are recorded as a series of corresponding pulse-like waveforms.

## 1.2 ポアデバイスを用いた

## 1 細胞検出・識別

マイクロポアデバイスによる1粒子分解能計測

を細胞等の生体試料に適用することで、標識や増幅等の前処理を必要としない、簡便かつ迅速な1細胞分解能検出・識別技術の実現が可能になる。これまで我々は、がん細胞と白血球の非標識識別<sup>(1)</sup>や、ビール酵母のコンタミ酵母検出<sup>(2)</sup>について報告してきた。

## 2. ポアデバイスを用いた赤血球とマラリア感染赤血球識別

赤血球(Red Blood Cell, RBC)は非常に柔軟性に富み、それ自身の直径(約7 μm)より細い毛細血管(2-5 μm)を、変形と形状の修復を繰り返しながら通過することで、全身に酸素に運ぶ。一方で、マラリア原虫に感染した赤血球(infected RBC, iRBC)では、赤血球の変形能が低下することが知られている。RBCとiRBCでは、サイズは変わらずに変形能の異なることに注目し、通過する細胞の変形能の違いが、ポアデバイスによって得られる波形に及ぼす影響を評価した。

## 3. 実験

ポアデバイスはSiO<sub>2</sub>/Si ウェハ上にフォトリソグラフィ法により形成した鋳型を用い、polydimethyl siloxane (PDMS)に転写したものをスライドガラスに接着・封止することによって作製した。形成されたポアの幅は5 μm、長さは10 μmで

つくば医工連携フォーラム 2025 講演予稿集 (2025.1.24, 国立研究開発法人産業技術総合研究所)

ある(Fig 2 a)。RBCおよびiRBCを含むリン酸緩衝生理食塩水(5×10<sup>6</sup>/mL、感染率29.1%)にアクリジンオレンジを加え、その10 μL懸濁液をポアデバイス中に導入した。倒立蛍光顕微鏡下で観察しながら、1.0Vの印可電圧を加えイオン電流計測を行った。

## 4. 結果と考察

蛍光顕微鏡動画では、アクリジンオレンジによる核染色により、iRBCは輝点として、核を持たないRBCは暗点としてされた観測された(Fig 2 a)。Fig. 2 b)にイオン電流計測によって得られたRBCおよびiRBCの典型的なパルス波形を示す。RBCの波形がピーク位置に対して左右対称(L/R~1)であるのに対し、iRBCでは左右非対称(L/R>1)の波形が観測された。これは、柔軟性に富むRBCでは、ポア通過による変形が速やかに修復されたのに対して、変形能が低下したiRBCでは変形が十分に修復されず、ポア通過前後(それぞれLおよびRに相当)の形状が異なったためであると考えられる。以上の結果から、我々は赤血球変形能が波形非対称性として評価可能であることを見出した<sup>(3)</sup>。

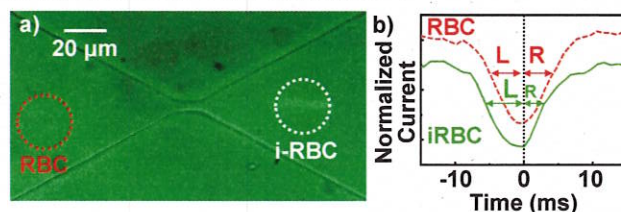


Fig. 2 a) Fluorescence microscope image of the passage of RBC and iRBC through a pore and b) typical waveform of RBC and iRBC acquired by the pore device.

## 5. 今後の展望

現在、本手法を応用した、糖尿病合併症リスク評価デバイスへの開発を、岡山大学病院との共同研究のもと実施している。

## 6. 参考文献

- (1) Kazumichi Yokota, Muneaki Hashimoto, Kazuaki Kajimoto, et al. Effect of Electrolyte Concentration on Cell Sensing by Measuring Ionic Current Waveform through Micropores, *Biosensors*, Vol. 11, No. 3, p. 78(11 pages) (2021).
- (2) Kazumichi Yokota, Asae Takeo, Hiroko Abe, et al. Application of Micropore Device for Accurate, Easy, and Rapid Discrimination of *Saccharomyces pastorianus* from *Dekkera* spp., *Biosensors*, Vol. 11, No. 8, p. 272(10 pages) (2021).
- (3) 横田一道、橋本宗明、梶本和昭、浮遊細胞の変形能評価方法(特願 2023-099478, PCT/JP2024/021668) .



# カンジダ細胞壁マンナン特異的結合タンパク質の開発

## Development of *Candida* cell wall $\alpha$ -mannan specific binding proteins

高坂拓<sup>\*1,3</sup>, 山中大輔<sup>\*2</sup>, 鈴木健斗<sup>\*2</sup>, 安達禎之<sup>\*2</sup>, 橋本幸一<sup>\*3,4</sup>  
Taku KOSAKA<sup>\*1,3</sup>, Daisuke YAMANAKA<sup>\*2</sup>, Kento SUZUKI<sup>\*2</sup>, Yoshiyuki ADACHI<sup>\*2</sup>, Koichi HASHIMOTO<sup>\*3,4</sup>

※<sup>1</sup> 筑波大学大学院 人間総合科学学術院, 茨城県つくば市天王台 1-1-1、※<sup>2</sup> 東京薬科大学, 東京都八王子市堀之内 1432-1、※<sup>3</sup> 筑波大学医学医療系 橋渡し・臨床研究学、※<sup>4</sup> 筑波大学つくば臨床医学研究開発機構 茨城県つくば市天王台 1-1-1

<sup>\*1</sup> Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki  
<sup>\*2</sup> Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo <sup>\*3</sup> Department of Clinical and Translational Research Methodology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, <sup>\*4</sup> Tsukuba Clinical Research and Development Organization, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki

### 1. 研究背景

#### 1.1 侵襲性カンジダ症

侵襲性カンジダ症は免疫不全者において、致死率の高い感染症の一つであり、ここ数年で発症率が増加している。確定診断のため、病巣から *Candida* 属菌の分離・同定を行うが、感度が低く、一般的に病原体の特定には日数を要する。そのため、 $\beta$ -1,3-D-グルカンやマンナンなどの真菌多糖類を測定する血清学的検査が補助診断法として用いられている。これらの補助診断法は特定の環境では診断精度が向上したが、感度や特異度の面でまだ限界がある<sup>(1)</sup>。

また近年、病院や介護施設等で多剤耐性 (MDR) 酵母の *Candida auris* の蔓延による侵襲性カンジダ症の発症が海外で問題となっているが、*C. auris* 表面のマンナン構造は  $\beta$ -1,2 結合を豊富に含むなど、特殊なマンナン構造を持つことが報告されており<sup>(2)</sup>、*Candida* マンナンの構造特異的な検出が重要視されつつある。

#### 1.2 *Candida* 細胞壁マンナン

*Candida* 細胞壁はキチン、 $\beta$ -1,6-グルカン、 $\beta$ -1,3-グルカン、マンナンといった多糖構造から構成されている (Fig1.A)。中でも、*C. albicans* の細胞壁マンノプロテインは、 $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3、 $\alpha$ -1,6、 $\beta$ -1,2 結合のマンノピラノース残基とリン酸化結合のマンノピラノース残基を持つ *N* および *O* 結合のマンナンから構成されている (Fig1.B)<sup>(3)</sup>。これらのマンノプロテインは強力な免疫抗原であり、Dectin-2などを介して、カンジダ症における宿主の自然免疫応答を調整する。

### 2. 研究の目的

本研究では、侵襲性カンジダ症の補助診断法における欠点や、*C. auris* など特殊なマンナン構造を持つ菌種の報告から、*Candida* 細胞壁の主要な多糖の一つである  $\alpha$ -マンナンに焦点を当てた。そして、 $\alpha$ -マンナンを構造特異的に検出するためのタンパク質プローブの開発を本研究の目的とした。

### 3. 方法

*Candida* マンナン構造の中でも、本研究では側鎖構造の中で分量が多い  $\alpha$ -1,2-マンナンにターゲットを絞った。 $\alpha$ -1,2-マンナンの検出にあたって、 $\alpha$ -1,2-mannosidase である、*Enterococcus faecalis* 由来 EfGH92-man1 (EC 3.2.1.113) に注目した。このタンパク質の触媒ドメインに位置する、Glu494 および Asp637 をそれぞれ Gln、Ala に置換した改変体をコードする DNA 配列をプラスミドに挿入し、大腸菌に形質転換してタンパク質を発現させた。

つくば医工連携フォーラム 2025 講演予稿集 (2025.1.24, 国立研究開発法人産業技術総合研究所)

各種改変体プローブにはルシフェラーゼ断片を融合発現させ、プローブと *C. albicans* 由来マンナンとの反応性はルシフェラーゼの発光レベルを指標に評価した。また、リガンド構造特異性や non-*albicans Candida* 菌種との結合性についてについても評価した。さらに、プローブと *Candida* 菌体との結合性については、蛍光標識したプローブを用いて菌体表面の蛍光を顕微鏡下で観測することにより評価した。

### 4. 結果、考察

EfGH92-man1 改変体の一部は、 $\alpha$ -mannosidase の合成基質である 4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-Mannopyranoside に対する分解活性を完全に消失し、さらに *C. albicans* の培養上清から得られる水溶性マンナン画分 (CAWS) との結合活性を示した。一方で、市販の Yeast 由来マンナンや  $\beta$ -グルカン、キチンなどの多糖類とは結合性を示さなかったことから、CAWS に対し特異的に結合していることが証明された。当該プローブは *C. albicans* 並びに各種 *Candida* 菌体とも反応性を示し、特に *C. parapsilosis* に対する強い反応を認めた。蛍光標識プローブを用いた検討では、*C. parapsilosis* の表層に直接結合する様子が観測され、この結合は予め  $\alpha$ -1,2-mannosidase で処理することにより消失した。このことから、本プローブは *Candida* 由来の  $\alpha$ -1,2-マンナンに対して特異的に結合することが示唆された。

### 5. 参考文献

- (1) Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs B, et al. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 27, pp. 490-526 (2014).
- (2) Yan L, Xia K, Miliakos A, et al. Unique Cell Surface Mannan of Yeast Pathogen *Candida auris* with Selective Binding to IgG, *ACS infectious diseases*, Vol. 6, pp. 1018-1031 (2020).
- (3) Shibata N, Kobayashi H, et al. Immunochimistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on Mannan, *Proceedings of the Japan Academy Series B* 88, 2022, pp. 250-265 (2012).

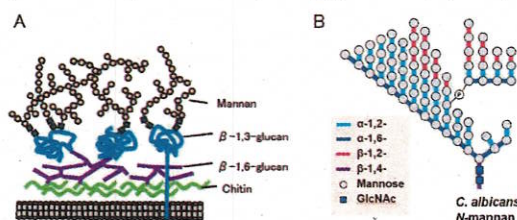


Fig1. Structure of glycans in the cell wall(A) and mannan(B) of *Candida albicans*.



## Monitoring Spatial-Temporal Changes of Dissolved Oxygen Levels in Biological Systems

Gabriel Tai Huynh<sup>\*1,\*2</sup>, Salma S. Tunny<sup>\*1</sup>, Helmut Thissen<sup>\*2</sup>, Jessica E. Frith<sup>\*3,\*4,\*5</sup>, Laurence Meagher<sup>\*3,\*5</sup>, Simon R. Corrie<sup>\*1,\*5</sup>

<sup>\*1</sup>Department of Chemical and Biological Engineering, Monash University, Australia <sup>\*2</sup>Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) Manufacturing, Australia, <sup>\*3</sup>Department of Materials Science and Engineering, Monash University, Australia, <sup>\*4</sup>Australian Regenerative Medicine Institute, Monash University, Australia, <sup>\*5</sup>ARC Training Centre for Cell and Tissue Engineering Technologies, Monash University, Australia,

### 1. Introduction

Oxygen is a key biomolecule which is critical for many important biological functions. While there has been many methods and techniques developed for detecting and monitoring oxygen levels in biological systems – such as electrochemical probes (i.e. Clarke Electrode), many of these equipment do not possess the ability to detect oxygen levels spatially. For this work, we propose the use of nanoparticle-based biosensors (nanosensors), where they can overcome this limitation. Due to their size, nanosensors can be easily incorporated into biological systems, where they can be used to spatially detect and resolve changes of the targeted analyte over time. For this work, we will present the development of an oxygen-responsive nanosensor to monitor and detect changes of oxygen levels in biological

### 2. Experimental Methods

Organosilica nanoparticles were synthesized as described by Robinson et al. and Huynh et al. Here, hydrolyzed 3-mercaptopropyl trimethoxysilane (MPS) was used as the basis of our nanosensors, where a MPS core was labelled with Cyanine3-maleimide (Cy3). Subsequently, a porous organosilica shell was synthesized and labelled with an oxygen-responsive dye: palladium (II) meso-tetra-(4-carboxyl) porphine (PdTCPP). Lastly, these nanosensors were coated with poly(ethylene glycol) (PEG) to improve the colloidal stability and biocompatibility of the material. The sensors were then characterized by fluorescence measurements, where both the sensitivity and dynamics of the sensors were determined. Additionally, the nanosensors were used to monitor real-time oxygen levels within *Escherichia coli* (E. coli) and bone-marrow derived mesenchymal stem/stromal cells (BM-MSCs).

### 3. Experimental Results

The developed oxygen sensors showed good oxygen sensitivity and dynamic properties (Figure 1), where it could detect both hypoxic and normoxic oxygen levels within minutes. Moreover, the use of these sensors was able to detect heterogenous populations present in both bacterial and mammalian cell cultures (Figure 2)

### 4. Conclusion and Future works

The developed nanosensors showed good sensitivity, and biocompatibility, while showing good dynamics towards oxygen levels. Moreover, heterogenous oxygen populations present within biological systems highlight the importance of spatial and temporal monitoring of analytes in real time. Future work with these sensors involved monitoring real time hypoxia development in different cell lines.

### 5. References

Robinson, Huynh, Corrie et al. Modified organosilica core-shell nanoparticles for stable pH sensing in biological solutions, *ACS Sensors*, vol 3, No. 5, 967-975 (2018)  
Huynh, Tunny, Corrie et al. Organosilica Nanosensors for Monitoring Spatiotemporal Changes in Oxygen Levels in Bacterial Cultures, *ACS Sensors*, Vol 9, No. 6, 2383-2391 (2024)

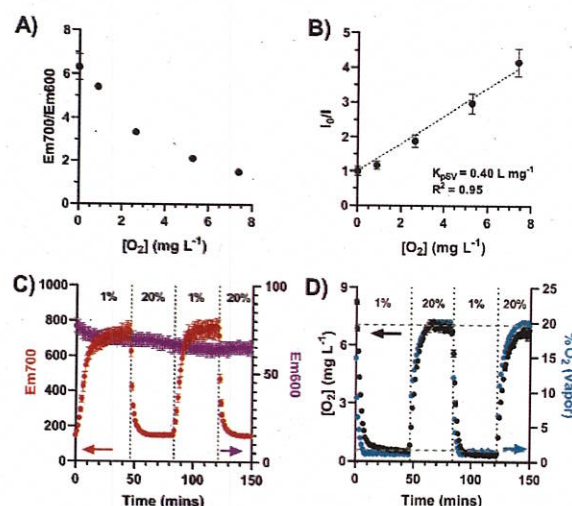


Figure 1: Oxygen sensitivity and dynamic testing of the organosilica nanosensors. A) The change of nanosensor signal as a function of dissolved oxygen levels at steady state. B) Steady state sensitivity/calibration plot of the oxygen nanosensors. C) Dynamic changes of fluorescence signals of the individual fluorophores present within the nanosensor as a function of time at different oxygen levels (1% and 20% v/v). D) The dynamic trace of the fitted oxygen levels by the nanosensors (black) versus the changing oxygen levels in the vapor phase (blue)

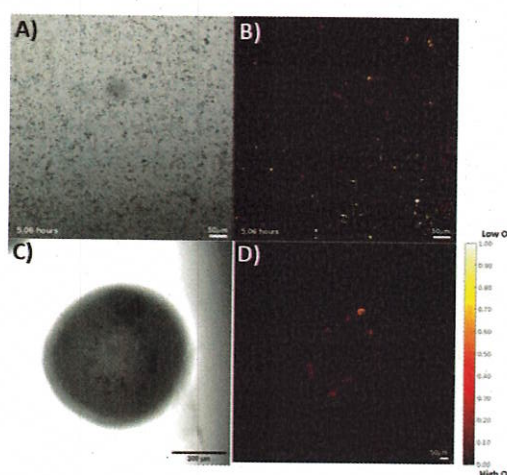


Figure 2: Spatial oxygen levels present in A,B) e. coli cultures, and C,D) BM-MSCs spheroid cultures. Oxygen levels are shown as relative oxygen levels from low to high levels.



# 脳損傷後の運動介入と薬理的介入の併用による機能回復の促進

## Combination therapy of rehabilitation and pharmacological approach after brain injury.

後藤太一<sup>\*1,2,3</sup>, 九里信夫<sup>\*1</sup>

Taichi Goto<sup>\*1,2,3</sup>, Nobuo Kunori<sup>\*1</sup>

※<sup>1</sup> 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 人間情報インタラクション研究部門、つくば市梅園 1-1-1  
 ※<sup>2</sup> 筑波大学大学院 人間総合科学学術院、つくば市天王台 1-1-1、※<sup>3</sup> 日本学術振興会 特別研究員(DC2)、  
 東京都千代田区麹町 5-3-1

<sup>\*1</sup> *Human Informatics and Interaction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Umezono, Tsukuba.* <sup>\*2</sup> *Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba.* <sup>\*3</sup> *Research Fellow (DC2), Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), 5-3-1 Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo.*

### 1. はじめに

脳を始めとした中枢神経系の損傷は、運動機能障害を引き起こし、受傷後、長期にわたり運動リハビリテーション（リハビリ）が必要となる。しかし、運動機能障害は、リハビリを経ても回復が困難な場合が多く、より効果的に運動機能を回復させるリハビリ戦略が求められている。

脳内のミエリンの構造変化（ミエリン化）は、運動機能の向上に重要な役割を果たすことが指摘されている。さらに、薬理的介入により、ミエリン化を促進できることが報告されている。

そこで本研究では、脳損傷を作製した脳性麻痺モデルラット（CP ラット）を用い、リハビリによる運動介入と、ミエリン化を促すための薬理的介入を併用することの有用性を検証した<sup>(1)</sup>。

### 2. 方法

CP ラットは、出生後 7 日目（P7）に右側の総頸動脈を結紮離断し、その後、低酸素環境（酸素濃度 8%）へ 90 分間暴露させることで作製した。

離乳後、ロータロッド装置を用いたリハビリと、ミエリン化促進薬であるクレマスチンの腹腔内投与を P22 から P42 まで行った。

実験終了後、摘出した脳試料を用い、脳内におけるミエリン密度とミエリンを形成するグリア細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞数を免疫組織学的手法により解析した。

### 3. 結果

ロータロッド装置を用いた運動課題成績において、クレマスチン投与とリハビリの併用は、CP ラットの運動機能を有意に回復させた。併用による運動機能の回復は、生理食塩水（偽薬として）の投与とリハビリを併用した群、および、クレマスチン投与のみを行った群と比較して有意であった。生理食塩水投与とリハビリを併用した群では、リハビリ中の運動負荷と課題成績の間に相関を認めなかったが、クレマスチン投与とリハビリを併用した群では、正の相関が認められた。これより、リハビリとクレマスチン投与の併用が、リハビリ効果を高め、運動機能の向上を促したことが示唆された。

組織学的な解析では、クレマスチン投与とリハビリを併用した群において、右大脳半球（頸動脈の結紮離断と同側半球）の一次体性感覚皮質におけるミエリンの光学密度比が増加していた。加えて、オリゴデンドロサイト数の増加も観察さ

れた。これより、リハビリと薬理的介入の併用が、運動機能の向上だけでなく、脳内のミエリン化を促進させたことが明らかとなった。

以上の結果より、脳損傷後のリハビリとミエリン化促進薬の併用はリハビリ効果を高め、その背景には、ミエリン化が関係している可能性がある。

### 4. まとめ

リハビリに加えて、ミエリン化促進のための薬理的介入を行うことは、脳損傷後の運動機能回復を促進するための新たな介入戦略の 1 つになり得ると考えられる（Fig）。

また、脳内のミエリン化は、リハビリ効果を判定する器質的な評価指標になる可能性がある。定量的に評価可能な医療機器開発により、「リハビリ効果の見える化」へと発展できる可能性を有すると考えられる。

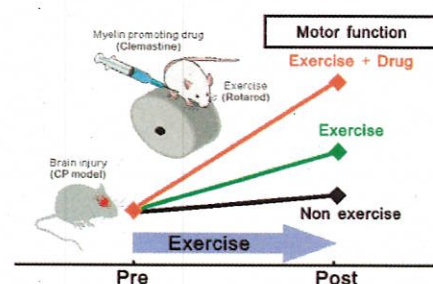


Fig. Combination of exercise and myelin promoting drug improved motor recovery after brain injury.

### 5. 参考文献

(1) Taichi Goto, Tomokazu Tsurugizawa, Yuji Komaki, Ichiro Takashima, Sunao Iwaki, Nobuo Kunori. Clemastine Enhances exercise-induced motor improvement in hypoxic ischemic rats. *Brain Res.*, vol. 1846, 2025.



## 生体に適用する洗浄液としてのプラズマバブル水の殺菌効果検証

Investigation of disinfection effect of plasma bubbled-up water as application to living organism

大澤泰樹<sup>1</sup>, 劉子鈺<sup>1</sup>, 八井田朱音<sup>1</sup>, 松村有里子<sup>2</sup>, 岩澤篤郎<sup>2</sup>, 金高弘恭<sup>3</sup>, 沖野晃俊<sup>1</sup>  
Taiki OSAWA<sup>1</sup>, Ziyu LIU<sup>1</sup>, Akane YAIDA<sup>1</sup>, Yuriko MATSUMURA<sup>2</sup>, Atsuo IWASAWA<sup>2</sup>,  
Hiroyasu KANETAKA<sup>3</sup> and Akitoshi OKINO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京科学大学未来産業技術研究所, 横浜市緑区長津田町 4259, <sup>2</sup>東京医療保健大学大学院医療保健学研究科, 東京都品川区東五反田 4-1-17, <sup>3</sup>東北大学大学院歯科研究科, 宮城県仙台市青葉区星陵町 4 番 1 号

<sup>1</sup>FIRST, Institute of Science Tokyo, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama, <sup>2</sup>Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University, 4-1-17 Higashigotanda, Shinagawa-ku, Tokyo, <sup>3</sup>Graduate School of Dentistry, Tohoku University, 4-1 Seiryō, Aoba-ku, Sendai

### 1. はじめに

日常的に行う感染予防として、石鹸やハンドソープによる手洗い、消毒用アルコールを用いた手指の消毒、うがい薬や洗眼薬による洗浄が挙げられる。しかし、いずれの手法を用いても、頻度や用法が適切でないと細胞に損傷を与えてしまう<sup>(1,2)</sup>。また、薬剤を使用すると毒性が残留する場合があります。そのため、安全で迅速に生体に適用できる殺菌方法が求められている。

近年、新しい殺菌手法として大気圧低温プラズマが注目されている。大気圧低温プラズマは、室温程度の低温でありながら反応性の高い活性種を多く生成でき<sup>(3)</sup>、残留毒性が少ないといった特徴があるため、生体にも安全に適用できる技術として期待されている。我々がこれまで行った研究から、液体にプラズマを照射することで、酸化力の高い活性酸素種を多く生成できることがわかっている<sup>(3)</sup>。また、多孔質ガラスフィルタを介して細かい泡としてプラズマを液中に導入することで、活性酸素種を溶存させた殺菌効果を持つ水を作製できることがわかっている。我々はこれをプラズマバブル水 (Plasma bubbled-up water: PBW) と呼んでいる。

本研究では、皮膚の常在菌や口腔内の細菌に対してこの PBW が持つ殺菌効果を検証した。

### 2. 実験手法

#### 2.1 PBW の作製方法

プラズマは、我々が開発したマルチガスプラズマジェットに流量 3 L/min のガスを導入し、9 kV、16 kHz の交流電圧を印加することで生成した。その生成したプラズマを、長さ 110 mm の多孔質ガラスフィルタを介して精製水にバブリングすることで PBW を作製した。プラズマ生成部から液中に導入されるまでに約 17 ms を要するため、HO $\cdot$ のような寿命が短く反応性の高い活性種を液中に直接導入することはできない。しかし、O $_3$  や H $_2$ O $_2$  といった比較的安定な活性酸素種同士が反応することで、二次的に HO $\cdot$  を生成でき、殺菌に寄与すると考えている<sup>(3,4)</sup>。

#### 2.2 PBW を用いた殺菌手法

酸素および二酸化炭素のプラズマバブリングで作製した PBW を用いた殺菌実験方法を Fig. 1 に示す。細菌には眼感染症の原因菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aureus*)、口腔内に存在する腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、ミュータンス菌 (*Streptococcus mutans*) を用いた。菌懸濁液 10  $\mu$ L に対して、作製後一定時間静置した PBW を 990  $\mu$ L 混合させ、5 秒間ボルテックスで攪拌した。段階希釈系列を作成して寒天培地に滴下後、37°C のインキュベータで 24 時間培養し、コロニー

カウント法で生存菌数を算出した。

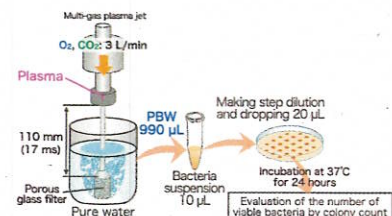


Fig. 1 Disinfection method using PBW

### 3. 実験結果

静置時間ごとの酸素の PBW が各細菌に与える殺菌効果を Fig. 2 に示す。今回実験で用いたすべての細菌に対して、作製直後の酸素 PBW は生存菌数が 2 桁以上減少した。特に、ミュータンス菌に対しては生存菌数を約 4 桁減少させる効果が得られた。また、PBW を 30 分静置すると、減少する生存菌数が 1 桁未満まで殺菌効果が減衰することも実験的に明らかになった。これは、溶存している寿命の短い活性種が失活したためと考えられる。

時間経過によって殺菌効果が減衰したことから、細胞への毒性も減衰することが推測できる。そのため、高い殺菌効果を持ちつつ時間経過によって毒性が少なくなる PBW は生体への適用が期待できると考えられる。

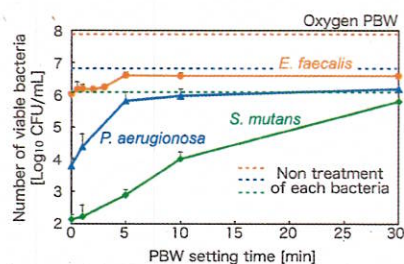


Fig. 2 Disinfection effect of oxygen PBW against both bacteria

### 4. 参考文献

- (1) S. Seino, Y. Takada and S. Saika, *Yakugaku Zasshi*, Vol. 141, No. 1, pp. 35-39 (2021).
- (2) S. Hayakumo, S. Arakawa, M. Takahashi, et al., *STAM*, Vol. 15, No. 5, pp. 055003-055009 (2014).
- (3) T. Takamatsu, K. Uehara, Y. Sasaki, et al., *RSC Advances*, Vol. 4, pp. 39901-39905 (2014).
- (4) G. Merenvi, J. Lind, S. Naumov, et al., *Ind. J. Clin. Biochem.*, Vol. 30, No. 1, pp. 11-26 (2014).



## Investigating the Effect of Adenosine A1 Receptor Positive Allosteric Modulators in Sleep Regulation

Muhammad Fairuziko NURRAJAB<sup>\*1</sup>, Tsuyoshi SAITOH<sup>\*1</sup>, Kaspar VOGT<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>International Institute for Integrative Sleep Medicine (WPI-IIMS), 1-1-1 Tennodai, Tsukuba

### 1. Introduction

Adenosine is an endogenous somnogen that plays a crucial role in sleep regulation<sup>(1)</sup>. Local injections of adenosine into the basal forebrain and laterodorsal tegmental (LDT) area significantly reduce wakefulness and increase sleep duration<sup>(2)</sup>. These effects are likely mediated by the A1 and A2A receptors<sup>(3)</sup>. Even though adenosine effectively promotes sleep, direct systemic administration of adenosine or its agonists can lead to bradycardia and hypotension<sup>(4-5)</sup>. Positive allosteric modulation (PAM) is a safer alternative, possibly enhancing receptor activity without these side effects<sup>(6)</sup>.

The administration of A2A receptor PAMs has been shown to dose-dependently enhance slow-wave sleep (SWS) in mice<sup>(7)</sup>. In contrast, the A1 receptor PAM in the central nervous system (CNS) is mainly used for pain-related research<sup>(8-9)</sup>. Therefore, the effect of A1 receptor PAM on sleep regulation has yet to be explored. This study investigates the effects of two positive allosteric modulators of the A1 receptor, MIPS521 and T62, in sleep regulation.

### 2. Methods

We used C57BL/6J mice (3-6 months old) for this experiment. After surgically implanting electrodes for an electroencephalogram (EEG), electromyogram (EMG), and, in some mice, a cannula for intracerebroventricular (ICV) injections into the mice, we gave 7 days for recovery. Sleep was recorded for 24 hours under each condition, with 12 hours of light and 12 hours of dark phases. The injection was administered 15 minutes before the light phase. Subsequently, we analyzed the sleep recordings semi-manually, utilizing custom MATLAB functions.

### 3. Results

#### 3.1 Effect of MIPS521 in Sleep Regulation

Intraperitoneal (IP) injection of MIPS521 before the light phase produced a significant 154% increase in REM sleep (Control, 1.238 ± 0.026 hours; MIPS521 50 mg/kg, 1.903 ± 0.046 hours; N = 6 Mice C57BL/6J Fig 1A), with no substantial changes in total NREM sleep or delta energy over 24 hours (Fig. 1A, Fig. 1B, Fig. 1C). Injection of the A1R antagonist DPCPX shortly before MIPS521 blocked its effects. MIPS521 also increased the number of REM sleep episodes without altering their average duration, indicating it shifts sleep states from NREM to REM rather than stabilizing REM sleep (Fig. 1D, Fig. 1E). Heart rate after MIPS521 injection remained within the normal resting range (Fig. 1F) without significant deviation to control.

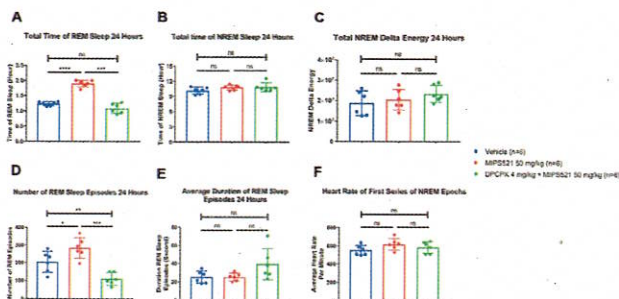


Fig. 1. Effect of MIPS521 on sleep after IP injection. (A) Total time of REM sleep in 24 hours. (B) Total time of NREM sleep in 24 hours. (C) Total NREM delta energy in 24 hours. (D) Number of REM sleep episodes in 24 hours. (E) The average duration of REM sleep episodes in 24 hours. (F) Average heart rate of the first series of NREM epochs. The significance of differences in response was determined using a one-way ANOVA repeated measure, Tukey multiple comparison) (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )

#### 3.2 Effect of T62 in Sleep Regulation

T62 did not show significant REM or NREM sleep changes under the IP injection (Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 2C). However, T62 produced the same pattern as MIPS521 after (ICV) injection, suggesting that this drug might not penetrate the BBB or being metabolized before reaching the brain (Fig. 3A, Fig. 3B, Fig. 3C).

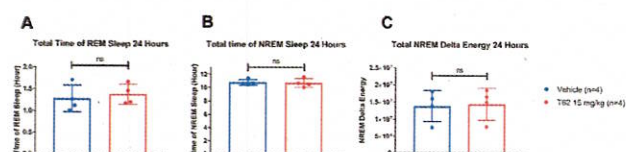


Fig. 2. Effect of T62 on sleep regulation under IP injection. (A) Total time of REM sleep in 24 hours. (B) Total time of NREM sleep in 24 hours. (C) Total NREM delta energy in 24 hours. The significance of differences in response was determined using a two-tailed paired t-test.

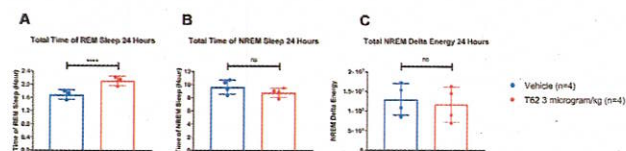


Fig. 3. Effect of T62 on sleep regulation under ICV injection. (A) Total time of REM sleep in 24 hours. (B) Total time of NREM sleep in 24 hours. (C) Total NREM delta energy in 24 hours. The significance of differences in response was determined using a two-tailed paired t-test (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

### 4. Conclusions

This study investigates the effects of two A1 receptor PAMs, MIPS521 and T62, on sleep regulation in mice. The results show that MIPS521 significantly increased REM sleep without affecting NREM sleep or heart rate. At the same time, T62 had no significant effects under intraperitoneal injection, possibly due to its inability to cross the blood-brain barrier, but showed similar results to MIPS521 under intracerebroventricular injection. Further tests on drug brain penetration and memory consolidation behavior will be conducted to confirm these results, as REM sleep plays a crucial role in memory consolidation.

### References

- Bjorness, T. E., Greene, R. W., et al. Adenosine and Sleep, *Current Neuropharmacology*, Vol. 7, No. 3, pp. 238-245 (2009).
- Strecker, R. E., Moraíry, S., Thakkar, M. M., et al. Adenosinergic Modulation of Basal Forebrain and Preoptic/Anterior Hypothalamic Neuronal Activity in the Control of Behavioral State, *Neuroscience*, Vol. 115, No. 2, pp. 183-204 (2000).
- Lazarus, M., Oishi, Y., Bjorness, T. E., et al. Gating and the Need for Sleep: Dissociable Effects of Adenosine A1 and A2A Receptors, *Frontiers in Neuroscience*, Vol. 13, pp. 740 (2019).
- Shryock, J. C., Belardinelli, L., et al. Adenosine and Adenosine Receptors in the Cardiovascular System: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology, *The American Journal of Cardiology*, Vol. 79, No. 12, pp. 2-10 (1997).
- Schindler, C. W., Karcz-Kubicha, M., Thorndike, E. B., et al. Role of Central and Peripheral Adenosine Receptors in the Cardiovascular Responses to Intraperitoneal Injections of Adenosine A1 and A2A Subtype Receptor Agonists, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 144, No. 5, pp. 642-650 (2005).
- Romagnoli, R., Baraldi, P. G., Moorman, A. R., et al. Current Status of A1 Adenosine Receptor Allosteric Enhancers, *Future Medicinal Chemistry*, Vol. 7, No. 10, pp. 1247-1259 (2015).
- Korkutata, M., Saitoh, T., Cherasse, Y., et al. Enhancing Endogenous Adenosine A2A Receptor Signaling Induces Slow-Wave Sleep Without Affecting Body Temperature and Cardiovascular Function, *Neuropharmacology*, Vol. 144, pp. 122-132 (2018).
- Li, X., Bantel, C., Conklin, D., et al. Repeated Dosing with Oral Allosteric Modulator of Adenosine A1 Receptor Produces Tolerance in Rats with Neuropathic Pain, *Anesthesiology*, Vol. 100, No. 4, pp. 956-961 (2004).
- Draper-Joyce, C. J., Bhola, R., Wang, J., et al. Positive Allosteric Mechanisms of Adenosine A1 Receptor-Mediated Analgesia, *Nature*, Vol. 597, No. 7877, pp. 571-576 (2021).



## Microenvironmental viscosity affects chemoresistance of colon cancer cells

Zeng Tianjiao<sup>\*1,2</sup>, Lu Chengyu<sup>\*1,2</sup>, Wang Man<sup>\*1,2</sup>, Chen Huajian<sup>\*1</sup>, Yoshitomi Toru<sup>\*1</sup>, Kawazoe Naoki<sup>\*1</sup>, Yang yingnan<sup>\*3</sup>, Chen Guoping<sup>\*1,2</sup>

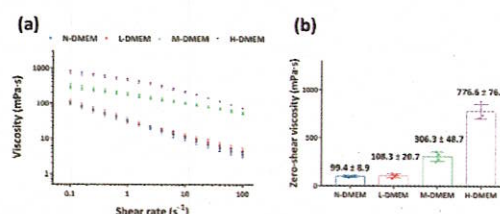
<sup>\*1</sup>Research center for macromolecules and biomaterials, National institute for materials science, 1-1 Namiki, Tsukuba, <sup>\*2</sup>Graduate school of science and technology, University of Tsukuba, Tsukuba, <sup>\*3</sup>Graduate school of life and environmental science, University of Tsukuba

Colon possesses a unique physiological environment among human organs, where there is a highly viscous body fluid layer called mucus layer above colonic epithelial cells. Dysfunction of the mucus layer not only contributes to the occurrence of colorectal cancer (CRC) but also plays an important role in the development of chemoresistance in CRC. Although viscosity is an essential property of the mucus layer, it remains exclusive how viscosity affects drug resistance in colon cancer cells. In this study, the influence of viscosity on their chemoresistance was elucidated by culturing colon cancer cells in media of different viscosities supplemented with doxorubicin (DOX).

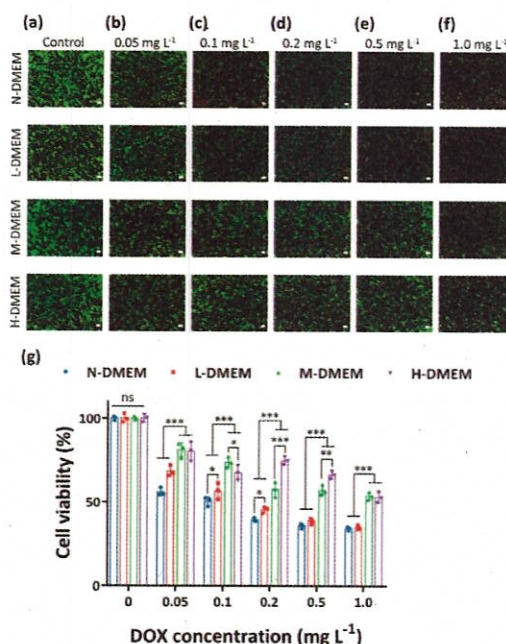
The culture medium was prepared with viscosity ranging from 99.4 mPa·s to 776.6 mPa·s by adding polyethylene glycol (PEG) of different molecular weights. The viscosity of cell culture medium was measured by a MCR 302 rheometer. Colorectal cancer cell line SW480 were used to do the in vitro experiment. The anticancer effect of doxorubicin (DOX) to SW480 cells was investigated by Live/Dead staining and WST-1 assay. The mRNA expression levels of ABCB1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1), ABCC1 (ATP-binding cassette sub-family C member 1), ABCC2 (ATP-binding cassette sub-family C member 2), ABCG2 (ATP-binding cassette super-family G member 2), MUC1 (mucin-1), MUC2 (mucin-2), and CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) in the SW480 cells were analysed after cell culturing by real-time PCR. The cell migration ability was analysed by a scratch assay. The cell proliferation ability was analysed by using WST-1 assay.

Cell viability was dependent in both microenvironmental viscosity and DOX concentration. Cell viability decreased with the increase of DOX concentration. When DOX concentration was the same, the cell viability in the high viscosity medium was higher than that in the low viscosity medium. Expression of chemoresistance-related genes such as ABCC2 and ABCG2 increased when cells were cultured in the high viscosity medium. Furthermore, cell migration increased while proliferation decreased when cells were cultured in the high viscosity medium. The colon cancer cells cultured in the high viscosity medium exhibited high expression of p21 mRNA. The results suggested that viscosity could affect the chemoresistance of colon cancer

cells to DOX by regulating the expression of chemoresistance-related and proliferation-related genes.



**Fig. 1** Viscosity of cell culture media supplemented with different molecular weight of PEG. (a) Apparent viscosity of cell culture media under steady shear rate from 0.1 s<sup>-1</sup> to 100 s<sup>-1</sup> at 37 °C. (b) Zero-shear viscosity of cell culture media under a shear rate equal to 0.1 s<sup>-1</sup>. Data are expressed as the means ± S.D. (n = 4).



**Fig. 2** Live/Dead staining of colon cancer cells after 48 h culture in N-DMEM, L-DMEM, M-DMEM and H-DMEM without (a) or with different concentration of DOX (b-f). Scale bar: 200  $\mu$ m. Green fluorescence: live cells; red fluorescence: dead cells. Live cell percentage evaluated from Live/Dead staining of colon cancer cells after 48 h culture by flow cytometry (g). The data were normalized to the cell viability in the respective culture medium without DOX. Data are the means ± S.D. (n = 3). Significant differences: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001. ns = no significant difference.



# 皮膚に直接照射するためのシャワーヘッド型プラズマ装置の基礎特性

## Basic characteristic of shower head plasma jet using on skin

劉子鈺<sup>1</sup>, 大澤泰樹<sup>1</sup>, 八井田朱音<sup>1</sup>, 松村有里子<sup>2</sup>, 岩澤篤郎<sup>2</sup>, 沖野晃俊<sup>1</sup>  
Ziyu Liu<sup>1</sup>, Taiki Osawa<sup>1</sup>, Akane Yaida<sup>1</sup>, Yuriiko Matsumura<sup>2</sup>, Atsuo Iwasawa<sup>2</sup>, Akitoshi Okino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京科学大学, 横浜市緑区長津田町 4259, <sup>2</sup> 東京医療保健大学, 東京都品川区東五反田 4-1-17

<sup>1</sup> Institute of Science Tokyo, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama,

<sup>2</sup> Tokyo Healthcare University, 4-1-17 Higashigotanda, Shinagawa-ku, Tokyo

### 1. 皮膚応用に向けた大気圧プラズマ装置の開発

現在, 広く用いられている殺菌方法として, 高圧蒸気滅菌, 紫外線, 化学薬品殺菌が挙げられる。しかし, これらの殺菌手法は細胞に損傷を与えることがあるため, 生体への適用は容易ではない。大気圧低温プラズマは大気圧下で生成可能であり, 樹脂や金属などの材料を親水化できることや, 化学薬品を使わないドライプロセスで殺菌できるなどの特徴がある<sup>2)</sup>。また, 生体に熱損傷や放電損傷を与えずに直接照射できるため, 創傷治癒, 止血, 消毒等の医療分野への応用研究が進められている<sup>3)</sup>。

大気圧プラズマは, ガス種を変えてプラズマを生成することで様々な活性種が生成されることがわかっている<sup>4)</sup>。生成された活性種が, 皮膚疾患を引き起こす黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌に作用することで殺菌できる。また, 活性種は材料表面の親水化にも寄与するため, 皮膚表面の親水化も生じる。皮膚表面が親水化されることで, 美容液などの浸透を促す効果も期待できる。我々は, 皮膚に直接照射することを目的として, 図1に示す直径40mm程度の範囲を一度に処理できるシャワーヘッド型プラズマ装置を開発した。本研究では, この装置を用いて生成したプラズマが皮膚常在菌に与える殺菌効果を検証した。また, 材料表面の親水化実験を行った。

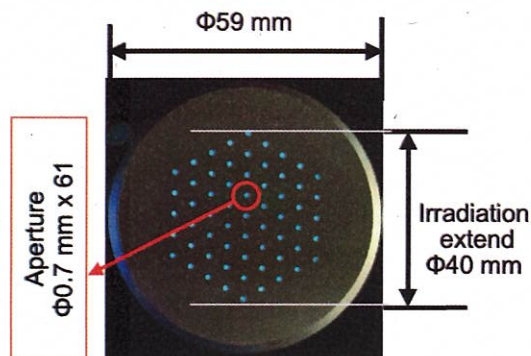


Fig. 1 Shower head type plasma jet

### 2. 実験方法

シャワーヘッド型プラズマにプラズマ生成ガスを 10 L/min 流し, 9 kV, 16 kHz の交流電圧を印加することでプラズマを生成した。プラズマ生成ガスは窒素, 酸素, 二酸化炭素とした。

殺菌実験では, 黄色ブドウ球菌, 表皮ブドウ球菌, アクネ菌それぞれを精製水に混合して  $10^{8-9}$  CFU/mL の濃度に調製し, 菌懸濁液を作製した。この菌懸濁液をプレパラートに 10  $\mu$ L 滴下し, 乾燥させて処理サンプルを作製した。このサンプルに対して, ガス種の異なるプラズマを 1 mm の距離で 60, 180, 300 秒間照射した。照射後, 10 mL の 0.5%ポリソルベ

ート 80 溶液が入った遠沈管に試料を入れ, 1 分間攪拌することでプレパラートに付着した細菌を回収した。回収した菌を段階希釈して寒天培地に滴下し, 37°C のインキュベータで 24 時間培養した後, コロニーカウント法で生存菌数を評価した。

親水化実験では, オートクレーブで滅菌したプレパラートを乾燥させて処理サンプルを作製した。各種ガスのプラズマを 1 mm の距離から 60, 180, 300 秒間照射した後, 水の接触角を測定することで親水化効果を評価した。

### 3. 結果および考察

黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果を図 2(a) に示す。窒素, 酸素, 二酸化炭素のプラズマを 300 秒間照射した場合, 未処理と比べて生存菌数が約 1 桁減少した。表皮ブドウ球菌に対する殺菌効果を図 2(b) に示す。酸素および二酸化炭素のプラズマを 300 秒間照射した場合は生存菌数が約 1 桁減少したが, 窒素プラズマでは, 生存菌数の減少は 1 桁未満であった。発表では, アクネ菌に対する殺菌効果も報告する。

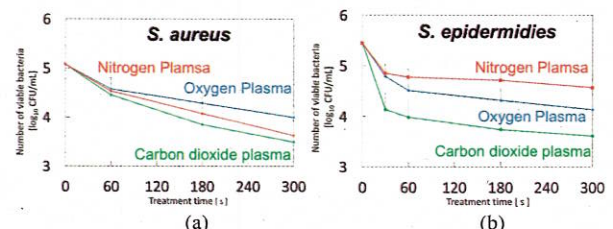


Fig. 2 Disinfection effect against *S. aureus* and *S. epidermidies*

親水化実験では, いずれのプラズマを照射した場合でも, 親水化効果が得られた。未処理の接触角は  $34.0^\circ$  であったが, 窒素プラズマと二酸化炭素プラズマを 60 秒間処理したときは  $5.2^\circ$ , 酸素プラズマ処理では  $20.0^\circ$  まで減少した。

殺菌実験と親水化実験の結果から, シャワーヘッド型プラズマで生成した二酸化炭素プラズマを照射することで, 殺菌効果と親水化効果を同時に得られることが示された。今後は皮膚に対してプラズマ処理を行い, 処理効果を検証する計画である。

### 4. 参考文献

- 1) 五十部誠一郎, 非加熱殺菌法を中心とした新規殺菌技術, 日本食品微生物学会雑誌, 27, 115 (2010).
- 2) 水野彰, 酸素ラジカルによる殺菌, 応用物理, 72, 457 (2003).
- 3) 小野亮, 放電で病気やけがを治すプラズマ医療の研究動向, 電気学会誌, 133, 290 (2013).
- 4) 岩井貴弘, プラズマ分光分析の基礎とその医学応用, 分光研究, 69, 112 (2020).



# 骨吸収阻害薬としてのミダゾラムのドラッグ・リポジショニングの可能性

## Potential for drug repositioning of midazolam as an inhibitor of bone resorption

針ヶ谷紘子<sup>\*1</sup>, 千葉-大熊理沙子<sup>\*2</sup>, 唐木田丈夫<sup>\*2</sup>, 山本竜司<sup>\*2</sup>, 藤井-阿部佳子<sup>\*1</sup>,  
河原 博<sup>\*1</sup>, 山越康雄<sup>\*2</sup>

Hiroko HRIGAYA<sup>\*1</sup>, Risako CHIBA-OHKUMA<sup>\*2</sup>, Takeo KARAKIDA<sup>\*2</sup>, Ryuji YAMAMOTO<sup>\*2</sup>,

Keiko Fujii-Abe<sup>\*1</sup>, Hiroshi KAWAHARA<sup>\*1</sup>, Yasuo YAMAKOSHI

<sup>\*1</sup> 鶴見大学歯学部麻酔学講座、<sup>\*2</sup> 鶴見大学歯学部分子生化学講座

<sup>\*1</sup>Department of Dental Anesthesiology, School of Dental Medicine, Tsurumi University 2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku,

<sup>\*2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Dental Medicine, Tsurumi University, 2-1-3  
Tsurumi, Tsurumi-ku,

### 1. はじめに

ドラッグ・リポジショニングは既存の薬剤に新たな効果を探査し、その実用化の可能性を広げる方法である。ミダゾラム (MDZ) は、合成イミダゾベンゾジアゼピン誘導体であり、催眠、鎮静、麻酔、抗不安、筋弛緩、抗けいれんなどの薬理効果を示す。一方、これら既存の薬効とは別に、MDZ はこれまでにブタ由来歯髓細胞株の象牙芽細胞への分化を促進することや、骨形成タンパク質-2 と組み合わせることで、不死化マウス骨芽細胞株の骨芽細胞への分化を促進し、石灰化を誘導することが報告されている。これらの知見は、MDZ を骨形成促進薬としてリポジショニングする可能性を示唆している。しかし、MDZ が骨吸収に与える影響については不明である。本研究では、MDZ が炎症性骨吸収に対する治療薬としての可能性を検証することを目的とした。

### 2. 材料・方法

#### 2.1 細胞実験

##### 2.1.1 破骨細胞分化の調整

破骨細胞分化の指標として TRAP (酒石酸耐性酸性ホスファターゼ) の活性および染色を用いて評価を行った。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞を用い、培地にミダゾラム (MDZ) と破骨細胞分化因子 (RANKL) を添加して、MDZ の濃度依存的効果を調べた。

##### 2.1.2 骨吸収活性の測定

破骨細胞による骨吸収活性を評価するため、骨吸収窩形成アッセイを実施した。RAW264 細胞をリン酸カルシウムでコーティングしたプレートに播種し、RANKL を含む培地で培養し、形成された骨吸収窩面積を測定し、MDZ の骨吸収能に及ぼす影響を調査した。

##### 2.1.3 遺伝子発現解析

破骨細胞分化関連遺伝子である活性化 T 細胞核因子 1 (*Nfatc1*)、*Trap*、およびカテプシン K (*Ctsk*) の発現量を定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) にて解析した。

#### 2.2 動物実験

炎症性骨吸収モデルとして、9 週齢の雄性 ICR マウスを 3 群に分け：(1) PBS 単独群 (コントロール)、(2) リポ多糖 (LPS) 群、(3) LPS+MDZ 群、2 日ごとにイソフルランによる吸入麻酔を施し、PBS (2mL/kg)、LPS (5mg/kg)、または LPS と MDZ (2mg/kg) を頭部に投与した。7 日後に頭蓋骨を摘出した後、マイクロ CT 分析を行い骨吸収の程度を評価した。また、摘出した頭蓋骨に対して TRAP 染色を施し、実体顕微鏡で観察しながら破骨細胞の分布および活性を確認した。

### 2.3 抑制メカニズムの解明

#### 2.3.1 活性酸素種 (ROS) の測定

ROS 産生の評価を行った。培養中に MDZ を添加し、ROS 産生に及ぼす濃度依存的影響を解析した。

#### 2.3.2 p-38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK)

p38 MAPK 経路に対する MDZ の影響を評価するため、ウェスタンブロット解析を行った。RAW264 細胞を培養後、p38 およびリン酸化 p38 (p-p38) の発現を測定し、p38 に対する p-p38 の比率 (p-p38/p38) を算出した。

### 3. 結果

#### 3.1 破骨細胞分化と骨吸収抑制

MDZ の添加は、濃度依存的に TRAP 活性を顕著に低下させることが確認された。TRAP 染色を用いた評価では、MDZ が破骨細胞の分化および融合を効果的に抑制することが示された。さらに、破骨細胞分化マーカー遺伝子 (*Nfatc1*, *Trap*, *Ctsk*) の mRNA 発現レベルも、MDZ の濃度に応じて段階的に減少することが明らかとなった。骨吸収窩形成アッセイの結果では、MDZ を添加することで吸収窩面積が有意に減少した。

#### 3.2 LPS 誘発頭蓋骨モデルマウスにおける抑制効果

LPS を用いたマウス頭蓋骨骨吸収モデルにおいて、MDZ が骨吸収を抑制する効果が観察された。TRAP 染色の解析では、LPS 単独群で破骨細胞の集積が縫合部で顕著に見られたが、LPS と MDZ を併用した群では、破骨細胞の数も減少していた。

#### 3.3 ROS および p38 MAPK シグナル伝達の抑制

破骨細胞分化に関連する酸化ストレスおよびシグナル伝達の評価では、MDZ が RAW264 細胞の ROS 産生を濃度依存的に抑制する効果が確認された。この作用に加え、LPS 処理された RAW264 細胞を用いたウェスタンブロット解析の結果、p38 MAPK 経路の活性を示す p-p38/p38 比が MDZ の存在下で濃度依存的に低下する傾向が認められた。

### 4. 考察

本研究では、MDZ が破骨細胞の分化および骨吸収活性を効果的に抑制することが示された。特に、MDZ は ROS の産生を抑制し、TNF 受容体関連因子 (TRAF6)-p38 MAPK 経路を負に制御することで破骨細胞分化を抑えるメカニズムが関与していることが明らかとなった。この結果は、*in vivo* での MDZ の効果を支持し、MDZ が炎症性疾患に対する治療薬としての潜在的な応用価値を持つことを示している。



# 放射線治療における治療計画装置およびモンテカルロ法による線量分布の比較

## Comparison of dose distributions in cancer radiotherapy calculated by a treatment planning device in a hospital and those by Monte-Carlo method

森下雄一郎<sup>\*1</sup>, 古山良延<sup>\*2</sup>, 安江憲治<sup>\*3</sup>, 清水森人<sup>\*1</sup>, 布施拓<sup>\*3</sup>,  
阿部慎司<sup>\*3</sup>, 生駒英明<sup>\*2</sup>, 奥村敏之<sup>\*2</sup>

Yuichiro MORISHITA<sup>\*1</sup>, Yoshinobu FURUYAMA<sup>\*2</sup>, Kenji YASUE<sup>\*3</sup>, Morihito SHIMIZU<sup>\*2</sup>,  
Hiraku FUSE<sup>\*3</sup>, Shinji ABE<sup>\*3</sup>, Hideaki IKOMA<sup>\*2</sup>, Toshiyuki OKUMURA<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市梅園 1-1-1

<sup>\*2</sup> 茨城県立中央病院, 笠間市鯉淵 65281

<sup>\*3</sup> 茨城県立医療大学, 稲敷郡阿見町大字阿見 4669-2

<sup>\*1</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Umezono, Tsukuba

<sup>\*2</sup> Uibaraki Prefectural Central Hospital, 6528 Koibuchi Kasama

<sup>\*3</sup> Ibaraki Prefectural University of Health Sciences, 4669-2 Ami, Inashiki-gun

### 1. はじめに

放射線によるがん治療ではがん細胞を死滅させるのに必要十分な放射線を照射するために、放射線量の正確な計測や人体内の放射線による線量分布の正確な計算が要求される。人体内の線量分布については、実際の患者の精密な CT 画像を用いて、人体内における放射線の輸送を計算することで得られている。この放射線の輸送については放射線により発生する電子・光子一つ一つについてすべての挙動を計算するモンテカルロ(MC)法による計算が最も正確とされているが、この計算は膨大な時間がかかるため、病院では一部を単純化した計算が行われている。

本研究では MC 計算による線量分布を機械学習し、即座に MC レベルの計算結果を得ることを目的としている。そのためには、機械学習、MC 法および病院の治療計画による線量分布をそれぞれ計算して、少なくとも病院の治療計画よりも同等かもしくは優れた結果を示す必要がある。機械学習と MC 法による線量分布の違いはこれまでの結果で±5%以内で再現できることが分かっている。

本発表では、MC 法と病院の治療計画装置の出力の関係がどのようになっているかについて調べた結果を報告する。

### 2. 方法と結果

病院で使用している治療計画装置(今回は RayStation)は、病院毎に設置されている加速器(Linac)に最適化されている。このため MC 法(今回は EGSnrc)との比較を行うためには MC コード上に病院の加速器と同等のものを構築し、そこで発生する放射線をまず計算し、その後、その放射線を人体に照射した時の線量分布を計算しなければならない。このため、まずは問題を簡単にするため、一様な水の中の線量分布を計算し、相互に比較した。

図 1(左)は 15 MV で加速された電子により発生する X 線をおよそ 10 cm 角のビームに整形し、30 cm 角の水に入射し、水中の線量分布を RayStation と EGSnrc で計算し、線量の違いを 100%線量比で表したものである。ビームのエッジでは違いが顕著に見えるが、ビームの中心付近ではよく合っていることが分かる。図 1(右)は、左図のボクセルごとの線量比をヒストグラムにしたもので、RayStation と EGSnrc の違いは±1%程度であった。

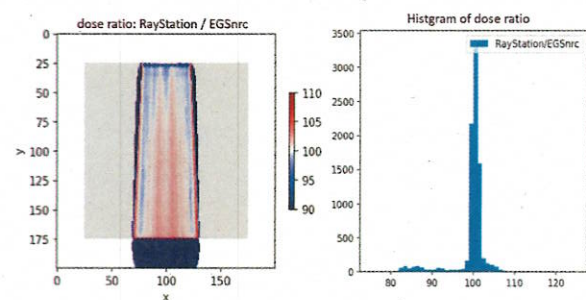


Fig. 1 (left) Ratio between dose by RayStation and that by EGSnrc, and (right) histogram of the dose ratio in each voxel in water

次に実際の患者の CT 画像を RayStation および MC コード上に乗せて、水の計算の時と同じ条件で人体内の線量分布を計算・比較した。結果については当日のポスターで示すが、放射線が人体に入射する部分、骨のある部分及びその周辺、および、肺の部分で顕著な違いが見られた。それ以外の部分は水での比較と同じように良く合っていた。よく合わない部分の違いは±5%程度の違いであり、これは機械学習で計算される線量分布と EGSnrc の結果との違いと同じ程度であり、病院の治療計画装置と同じ程度までは機械学習でも計算できることが分かった。

本研究はヒ 2022-0509(産総研)、e358(茨城県立医療大学)、1199(茨城県立中央病院)それぞれの倫理審査の許可のもと行われています。



## 最適化による擬似的な心電図波形の生成

### How to generate pseudo-ECG waveforms using optimization

城 真範<sup>\*1</sup>, 関口 祐<sup>\*1</sup>, 香川 璃奈<sup>\*1</sup>, 佐藤 洋<sup>\*1</sup>

Masanori SHIRO<sup>\*1</sup>, Yu SEKIGUCHI<sup>\*1</sup>, Rina KAGAWA<sup>\*1</sup>, Hiroshi SATO<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市梅園 1-1-1

<sup>\*1</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Umezono, Tsukuba

#### 1. はじめに

擬似的な生体データは、個人情報漏洩リスク回避、自由な利用、高度な数理モデル構築への基礎、人間のデジタルツインへの基礎などに資する。本発表ではその一つとして心電図の一波形について、実際のデータを数理モデルで再表現する方法を提案する。

健全なヒトの心電図波形を数理モデルとして表現する研究は電気工学者ファンデルポールに始まり、およそ1世紀の歴史があるが、その基本的な方法は McSharry によって大きく進展した。それはガウシアンを重ね合わせて波形を表現するというもので、現在ではガウシアン放射基底関数による表現に相当する。

McSharry の方法は優れていたが、ほとんどが非対称波形である心電図の5波(P波、Q波、R波、S波、T波)に対して、それぞれ対称分布であるガウシアンを使うため、一つの波を表現するためにも最低2つのガウシアン、合計で30変数が必要であった。本報告ではその点を改善し、あわせて異常波形でも効率よく12誘導心電図の波形を数理モデルに変換するための方法を提案・実装する。

#### 2. 提案方法

##### 2.1 データ

公開されている心電図データとして、The PTB Diagnostic ECG Database8) から Reason\_for\_admission が "Healthy control" とラベルされた80個の波形を利用した。

##### 2.2 アルゴリズム

次の順に従って元データの加工と数理モデル化を行う。まず、時系列の数値分布の中央値が0になるように基線を設定する。次に一周期の波形を、基線を基準として正の値を取る部分と負の値を取る部分に分割する(これをここでは分割波と呼ぶ)。それぞれの分割波について絶対値と時間軸方向に自由度を加えた対数正規分布状関数を仮定し、残差平方和を最小とする最小二乗法によりパラメータを決定する。求解アルゴリズムには Nelder-Mead 法を用いる。分割波の数理モデルは各分割領域内だけで有効であるが、その他の分割領域とシームレスにつなぐため、分割領域外ではモデルに  $\exp(-t/T)$  を掛けることで値を急速に0に近づけるようにする。時定数  $T$  は分割領域の両端点で1であり、そこから外側に向かって領域の半分の位置で0.01となるようにする。このように得られた対数正規分布状関数の線形和で心電図の一周期の波形をモデル化する。最後に結果に若干のガウシアンノイズを加えてリアリティを与える。

#### 3. 結果の一例

Fig. 1 に提案手法によって実データを数理モデルによって再表現した一例を示す。青線は実データで赤線は構成した数理モデルである。順に I 誘導、II 誘導、V1 誘導、V2 誘導、V3 誘導、V4 誘導、V5 誘導、V6 誘導である。四肢誘導の残りは市販の心電図計と同様に計算によって求めることができる

ため記載しない。実装には C++言語と Nlopt ライブラリを使い Linux 上にて計算した。通常の PC を利用し、概ね1秒以内で数理モデルの構成が完了する。

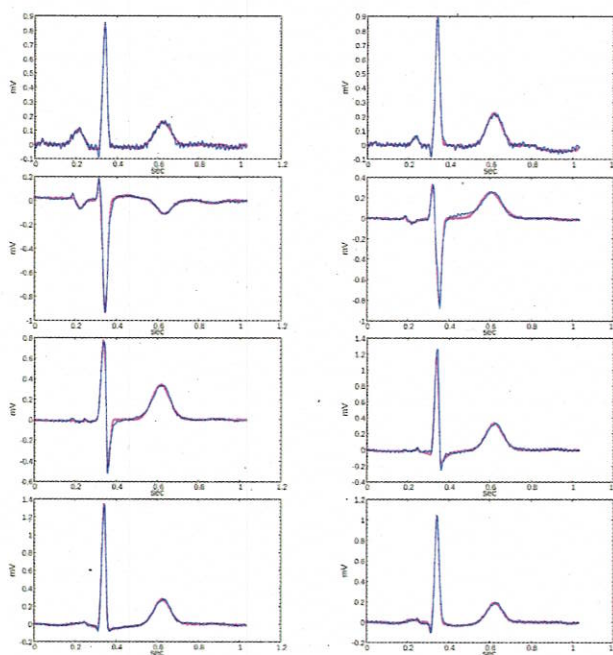


Fig. 1: An example of the results of optimizing the electrocardiogram waveform using our proposed method

#### 4. 結論

ヒト心電図の1周期の波形を数理モデルで表現するために対数正規分布状の関数を用いることで自明に波形の非対称性を取り込み変数の数を半分に削減した。また中央値によって波形を分割して独立に最適化することによって最適化を高効率で行えるようにした。疾患のある波形でも分割数が増えるだけなので、計算量は高々線形に増大するのみで、本提案方法は疾患を有する心電図においても容易に拡張可能である。

実際の心電図波形を作成するためには一波形をどうつなげるか、すなわち R-R 間隔をどう作成するかという課題が残っている。今後はそちらも検討する。

#### 5. COI および倫理的配慮・予算

本報告について開示すべき COI はない。本研究はインターネット上で公開されている匿名化データのみを用いたもので倫理審査が必要な研究に該当しない。本研究の一部は産総研次世代治療・診断技術研究ラボ、および科研費 JP19K19347、JP21K12068、JST 未来社会創造事業 (JP19211284)、JST さきがけ (JPMJPR2313) の支援を受けている。



# 大腸内視鏡自動挿入に向けた ダブルバルーン電動内視鏡および挿入機器の開発

## Development of a Double-Balloon Motorized Colonoscope and Insertion Device Towards Automated Colonoscopy Insertion

伊藤優作<sup>\*1</sup>, 安江立輝<sup>\*1</sup>, 高松利寛<sup>\*2</sup>, 竹村裕<sup>\*1</sup>

Yusaku ITO<sup>\*1</sup>, Tatsuki YASUE<sup>\*1</sup>, Toshihiro TAKAMATSU<sup>\*2</sup>, Hiroshi TAKEMURA<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 東京理科大学, 千葉県野田市山崎 2641、

<sup>\*2</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), 茨城県つくば市並木 1-2-1

<sup>\*1</sup> Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda,

<sup>\*2</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba

### 1. 序論

大腸がんは早期に発見することで根治を見込めるがんである。したがって、定期的で大腸検査を受診し、がんを早期に発見できるようにすることが重要である。しかし、全体の検査数を増やすために医者数を増やそうとしても、それには限界があるため、大規模スクリーニング検査の実施は定着していない。このような理由により、大腸内視鏡挿入の簡易化および自動化が望まれている。

### 2. ダブルバルーン電動内視鏡の開発

本研究では、小腸検査に使用されるほど挿入性や操作性が優れているダブルバルーン内視鏡に着目した。

我々が製作したダブルバルーン式内視鏡を図1に示す。これは、二重管構造になっており、外筒と内筒から構成される。外筒および内筒の先端部はワイヤーを用いてそれぞれ独立して湾曲させることができる。また、内筒は、外筒の軸方向に移動でき、内筒のみを押し進めることが可能になっている。さらに、外筒および内筒の先端にはそれぞれ空気膨らむバルーンが搭載されている。これらによって各バルーンを交互に膨張させることで、片方の管を大腸内に固定しつつ、もう片方の管を奥へ進ませることができるようになっている。

我々が開発したダブルバルーン電動内視鏡を用いることで、挿入初心者用ではあるが大腸ファントムへの挿入が可能であることを確認している<sup>(1)</sup>。

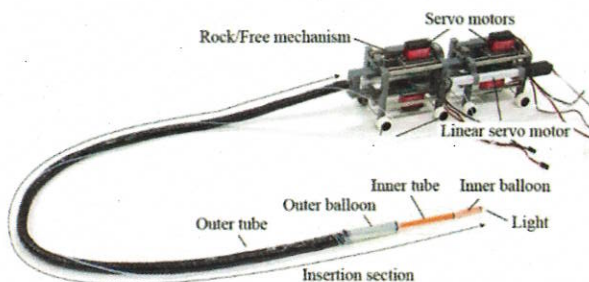


Fig. 1 Motor-driven colonoscope with double-balloon

### 3. 管腔方向検出 AI の開発

我々の研究チームでは、管腔方向の検出を自動で行う AI の開発も実施している。従来の大腸内視鏡を大腸ファントムに挿入したときの映像から画像を 300 枚選択し、アノテーション後、機械学習を行った。その結果、大腸モデルに挿入した際の動画における全フレーム中、97%のフレームでバウンディングボックスを確認することができた。よって、おおよそ常に管腔方向を検出することができているといえる。

### 4. 挿入用機器の開発

ダブルバルーン内視鏡の自動化のためには、人の代わりに内視鏡を大腸内に押し込む機器が必要になる。そこで、挿入を行うための機器の開発も行っている。挿入用機器は内視鏡の保持や位置姿勢移動を行うロボットアームや、内視鏡を送り出すために製作したローラー式の送り出し装置などからなる。さらに、実際の内視鏡医が、内視鏡から手先に伝わる力を頼りにして内視鏡挿入を行っていることを鑑みて、力覚センサーも装置に搭載している。開発した装置の全体像を図2に示す。

この装置を用いた挿入では直腸部から先へ進ませることはできなかった。しかし、力覚センサーを搭載したことにより内視鏡の挿入状況や腸壁に加わる力を把握できることについては確認できた。

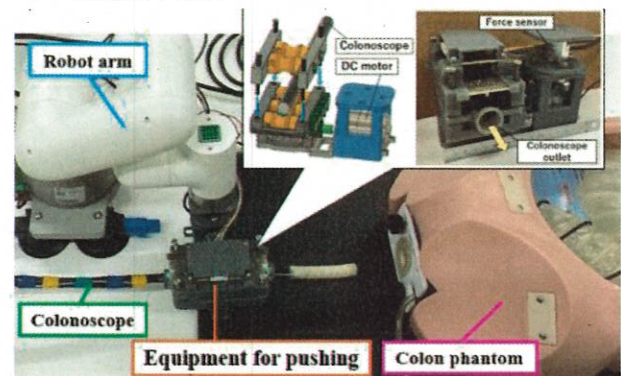


Fig. 2 Entire view of the insertion device

### 5. 結論

本研究の最終目的は、大腸内視鏡挿入の自動化およびスクリーニング検査としての利用である。それに向け、内視鏡の開発や、管腔方向検出 AI、挿入用機器の開発を行った。内視鏡本体や、AI については要求通りの機器の開発が完了し、また、挿入用機器についても安全に、かつ痛みのない自動挿入を実現するための下地はできあがった。

今後はこれらを組み合わせることで、最終目的である大腸内視鏡挿入の自動化を目指す。

### 6. 参考文献

(1) T Takamatsu, Y Endo, R Fukushima, et al. Robotic endoscope with double-balloon and double-bend tube for colonoscopy, *Scientific Reports*, Vol. 13, pp. 1-9 (2023).



# LEX (Leg exercise Apparatus) を用いた食道癌術後 VTE 予防の取り組み Intervention to Prevent Postoperative Venous Thromboembolism (VTE) in Esophageal Cancer Using the Leg Exercise Apparatus (LEX)

姫松花子<sup>\*1,2</sup>, 清水如代<sup>\*3</sup>, 大和田洋平<sup>\*4</sup>, 羽田康司<sup>\*3</sup>  
Hanako HIMEMATSU<sup>\*1,2</sup>, Yukiyo SHIMIZU<sup>\*3</sup>, Yohei OWADA<sup>\*4</sup>, Yasushi HADA<sup>\*3</sup>

※<sup>1</sup> 筑波大学附属病院リハビリテーション部, つくば市天久保 2-1-1、※<sup>2</sup> 筑波大学大学院人間総合科学学術院, つくば市天王台 1-1-1、※<sup>3</sup> 筑波大学医学医療系 リハビリテーション医学, つくば市天王台 1-1-1、※<sup>4</sup> 筑波大学医学医療系 消化器外科, つくば市天王台 1-1-1

<sup>\*1</sup> Department of Rehabilitation, University of Tsukuba Hospital, 2-1-1 Amakubo, Tsukuba, <sup>\*2</sup> Doctoral Program in Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, <sup>\*3</sup> Department of Rehabilitation Medicine, Institute of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, <sup>\*4</sup> Department of Gastrointestinal and Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Institute of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba

## 1. はじめに

床上下肢自動運動器 LEX (Leg Exercise Apparatus) (Fig.1) は静脈血栓塞栓症 (VTE) 予防を目的に, 床上で効果的下肢自動運動ができるよう開発された医療機器である。足関節の底背屈運動に加え, 膝・股関節の屈曲・伸展運動も含めた 3 関節の複合運動が可能である<sup>(1)</sup>。LEX 使用時の大腿静脈血流量は開始 1 分後にベースラインの 2.6 倍まで上昇して 10 分間維持され<sup>(1)</sup>, かつ従来 VTE 予防目的に使用されてきた間欠的空気圧迫法 (IPC) よりも増加するため, VTE 予防効果に優れる。これまでに人工関節置換術・脊椎疾患手術の術後患者に対する使用の安全性, 新規 VTE 発症予防効果が確認されている<sup>(2,3)</sup>。

切除可能食道癌に対する標準治療である食道切除術は消化器外科手術の中でも侵襲が大きく, 他の癌腫に比して術後 30 日以内の VTE 発症率が高い<sup>(4)</sup>。当院では 2022 年のつくば式食道癌周術期多職種連携プロジェクト(つながるプロジェクト) 発足後, 従来の ICU での早期離床に加え, LEX による床上下肢自動運動を導入した。当院の取り組みを紹介し, 安全性について検討する。

## 2. 対象と方法

対象: 2022 年 11 月～2024 年 5 月に当院で食道癌に対して食道切除術を施行した患者。

方法: 消化器外科の指示により LEX を使用した群 (LEX 使用群) と非使用群の 2 群に分類。使用群は, 消化器外科の指示により術後 1 日目より LEX を 1 日 3 回, 計 15 分間実施した。両群ともに IPC は終日着用し, 使用群は LEX 時のみ中断した。

評価項目: 年齢, 性別, 術翌日離床状況, 術前 VTE 既往, 術後新規 VTE 発症, リハビリテーション介入時の有害事象の有無。

統計処理: Mann-Whitney の U 検定,  $\chi^2$  検定にて群間比較を実施した。(SPSS ver16.0.2.0,  $\alpha=0.05$ )



Fig. 1 Leg Exercise Apparatus (LEX)

## 3. 結果

解析対象は 45 名。LEX 使用群/非使用群は 20 名/ 25 名。年齢は 70.6±9.6/ 68.7±8.5 歳, 性別は男性 80%/ 92%。術翌日離床状況は床上 5/6 名, 端座位 5/2 名, 立位 2/6 名, 歩行 8/11 名。術前 VTE 既往は 1/2 名, 術後新規 VTE 発症は 0/2 名。LEX 時の有害事象は嘔吐・下腹部痛各 1 名であったが, 開始 1 時間後まで継続する症状はなかった。

## 4. 考察

LEX 中・後の重篤な有害事象はなく, 術翌日の離床が十分に行えない患者も使用可能であった。先行研究では, LEX 使用時の下肢静脈血流量は IPC 使用時よりも増加することが示されており, 食道癌術後患者に対する ICU での LEX 使用は安全かつ簡便に VTE 予防が行える可能性がある。

## 5. 参考文献

- (1) Shimizu Y, Kamada H, Sakane M, et al. A novel apparatus for active leg exercise improves venous flow in the lower extremity. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, Vol. 56, No. 12, pp.1592-1597 (2016)
- (2) Tanaka K, Shimizu Y, Kamada H, et al. Feasibility and Safety of a Novel Leg Exercise Apparatus for Venous Thromboembolism Prophylaxis after Total Joint Arthroplasty of the Lower Extremities-A Pilot Study. *Tomography*, Vol.7, No.4, pp.734-746 (2021)
- (3) Kobayashi K, Shimizu Y, Haginoya A, Hada Y, Yamazaki M. Safety of Venous Thromboembolism Prophylaxis Protocol Using a Novel Leg Exercise Apparatus in Bedridden Patients due to Spinal Diseases. *Cureus*. Vol.13, No.10, e19136 (2021)
- (4) Theochari NA, Theochari CA, Kokkinidis DG, et al. Venous thromboembolism after esophagectomy for cancer: a systematic review of the literature to evaluate incidence, risk factors, and prophylaxis. *Surg Today*. Vol.52, No.2, pp.171-181 (2022)



# 車いすユーザーに立つ選択肢を提案したい 医工学融合チームによる起立支援モビリティ Qolo の開発 Development of the Standing Mobility Device Qolo by a Medical-engineering Team

清水如代<sup>\*1</sup>, 門根秀樹<sup>\*2</sup>, 江口洋丞<sup>\*3</sup>, 佐々木海<sup>\*3</sup>, 羽田康司<sup>\*1</sup>, 鈴木健嗣<sup>\*4</sup>  
Yukiyo Shimizu<sup>\*1</sup>, Hideki Kadone<sup>\*2</sup>, Yosuke Eguchi<sup>\*3</sup>, Kai Sasaki<sup>\*3</sup>, Yasushi Hada<sup>\*1</sup>, Kenji Suzuki<sup>\*4</sup>

<sup>\*1</sup>筑波大学医学医療系リハビリテーション医学, <sup>\*2</sup>筑波大学医学医療系サイバニクス医学, <sup>\*3</sup>Qolo 株式会社,  
<sup>\*4</sup>筑波大学システム情報系, つくば市天王台 1-1-1

<sup>\*1</sup>Department of Rehabilitation Medicine, Institute of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba,  
<sup>\*2</sup>Department of Cybernetics Medicine, Institute of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, <sup>\*3</sup>Qolo  
Inc., 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, <sup>\*4</sup>Institute of Systems and information Engineering, University of Tsukuba, 1-1-1  
Tennodai, Tsukuba

## 1. はじめに

車いすは、下肢機能障害者にとって、日常生活の移動手段として不可欠である。一方で、“座位を継続しなくてはならない”という制約がある。筑波大学人工知能研究室では、歩行困難な体幹下肢機能障害者に対して、起立動作と着座動作の双方を補助することで、今までの車いすでは実現できなかった立位姿勢での移動を可能にするパーソナルモビリティ Qolo を開発した。プロジェクトは 2012 年に開始し、プロトタイプが 2013 年に完成した。機器開発エンジニア、病院に常駐するエンジニアである医工学研究者、医師、エンドユーザからなる multidisciplinary team で取り組み、現在は 2021 年 4 月にスタートした Qolo 株式会社（茨城県つくば市）で商品化に向けて開発を継続している。本発表では、機器開発から改良、適応拡大に向けての取り組みを紹介する。

## 2. 機器紹介

Qolo は体幹前傾によりばねが膝関節伸展を補助、起立動作を補助する機器である<sup>(1)</sup>。



Fig. 1. Qolo-1(2013)

## 3. 臨床研究および機器改良<sup>(2)</sup>

Qolo 第一世代 (Qolo-1, 2013 年) : 神経学的損傷高位は腰椎レベルを想定されていた。本機器を対象とする患者は、更に高位の胸髄損傷者と考え、胸髄損傷者を含めて検証した。2015 年から、脊髄損傷者 4 名 (神経学的損傷高位 T10~L3、ASIA Impairment Scale (AIS) A~C) を対象とし、起立および着座動作を安全にできるか検証した。MMT 股関節伸展が 1 以上、膝関節伸展が 3 以上の症例では、起立・着座動作とも可能であったが、MMT が 1 の症例では、着座可能であったが起立不可であった。

Qolo 第二世代 (Qolo-2.0, 2018 年) : ばね力を 2 倍に強化、上肢支持のためのハンドルを追加

脊髄損傷者 13 名 (神経学的損傷高位 C5-L3, AIS:A-C) の起立着座動作検証を行った。完全損傷では、T6 以下の全例で起立着座動作が可能であり、T4 の一例では硬性コルセットを使用し、起立着座動作が可能であった。

Qolo 第三世代 (Qolo-3, 2019 年) : 座面を追加、座位での移動が可能となった。

起立動作の意義について車椅子エンドユーザからリスニングしたところ、高所からものを取る、洗車する、買い物するなど具体的な用途が提示された。同時に、ばね力を調整することで起立訓練器として使いたいというニーズを聴取した。

## 4. エンジニアメンバーによる起業 (Qolo 株式会社)

さらに開発を進めていくため、2021 年からは Qolo 株式会社で、モビリティタイプ (Fig.2) とリハビリテーションタイプ (Fig.3) の二軸で開発を継続している。

リハビリテーションモデルでは、ばね力を容易に調節可能であり、さまざまな疾患や重症度に対応できるようになった。モビリティタイプは、座面や上肢支持部の追加により、頸髄損傷や脳性麻痺など上肢麻痺者を含め適応拡大できる可能性がある。機器改良や適応の判断については、ユーザー、医療従事者、エンジニアと多職種からなるチームにより、慎重かつ柔軟に取り組む必要があると考える。



Fig. 2. Qolo for Mobility



Fig.3. Qolo for Rehabilitation

## 4. 参考文献

- (1) Eguchi Y et al : Standing mobility device with passive lower limb exoskeleton for upright locomotion. IEEE/ASME Trans Mechatron 23:1608-1618, 2018
- (2) 清水如代ら : 車椅子ユーザーに立つて移動する選択肢を一起立型車椅子「Qolo」の開発—整・災外 65 : 1407-1412, 2022



## 遠隔医療に必要とされる技術開発への取り組み

～Doctor to Patient with Nurseによる対面と同等の医療を目指す～

An approach to the technology development needed for telemedicine

～Challenge to the new telemedicine equivalent to the on-site therapy based on  
“Doctor to Patient with Nurse”～

久保田 泰広<sup>\*1\*2</sup>, 西山 修司<sup>\*1\*2</sup>, 福田 隆史<sup>\*1</sup>, 市塚 勇正<sup>\*1</sup>, 熊田 泰之<sup>\*2</sup>,  
宮崎 剛<sup>\*2</sup>, 平井 勝之<sup>\*2</sup>, 石田 和裕<sup>\*2</sup>, 丸山 修<sup>\*1</sup>

Yasuhiro Kubota<sup>\*1\*2</sup>, Shuji Nishiyama<sup>\*1\*2</sup>, Takashi Fukuda<sup>\*1</sup>, Hayamasa Ichitsuka<sup>\*1</sup>, Yasuyuki  
Kumada<sup>\*2</sup>, Takeshi Miyazaki<sup>\*2</sup>, Katsuyuki Hirai<sup>\*2</sup>, Kazuhiro Ishida<sup>\*2</sup>, Osamu Maruyama<sup>\*1</sup>

\*1国立研究開発法人産業技術総合研究所 東邦ホールディングス - 産総研ユニバーサルメディカルアクセ  
ス社会実装技術連携研究ラボ、つくば市並木 1-2-1、

\*2東邦ホールディングス株式会社, 東京都中央区八重洲 2-2-1 東京ミッドタウン八重洲  
八重洲セントラルタワー9階

<sup>\*1</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki

<sup>\*2</sup>TOHO HOLDINGS CO., LTD, 9th Floor, Yaesu Central Tower, Tokyo Midtown Yaesu, 2-2-1 Yaesu, Chuo-  
ku, Tokyo

### 1. 背景・課題

少子高齢化・人口減少に伴い、2024年医師の働き方改革や医療従事者の働き手不足の問題を解決するために、医療の効率化を図り、医療資源集約を行う事が必要とされている。本研究では、その一つの解決策として、遠隔医療システムの確立を目指している。遠隔医療については、医療の質や患者の利便性の向上、また離島やへき地などにおける医療の地域差の是正等、地域医療の充実の観点から重要であると厚生労働省が位置付けをしている<sup>1)</sup>。

本研究では、遠隔医療の中でも普及率があまり高くないオンライン診療に注目している。しかし、オンライン診療は、実施例は少ないものの、すでに現実に使用されているものであり、特に独居の高齢者の増加に伴う重要な診療技術と位置付けられている<sup>2)</sup>。

我々が取り組むオンライン診療における問題の一つとして、患者が上記のような高齢者の場合、PC関連のインフラを準備、使用することが難しいことが挙げられる。そのためには、患者側に看護師のような医療従事者が介在し、PC等の使用をサポートすることが理想的である。つまり、Doctor to Patient with Nurse (D to P with N)による体制が望ましいと考えている。その、D to P with Nによる効率的なオンライン診療を実施するために必要な条件を検証する必要がある。

### 2. 目的

医療へのアクセスが困難な高齢者等が、対面と同等の医療を受けるため、D to P with Nによるオンライン診療において、何が必須の条件となるのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 実験方法

医師、看護師、患者からの視点を想定した様々な環境下において、診察時間3分のオンライン診療デモンストレーションを行い、通信安定性、画像の状態および通信接続に要する時間を計測した。本デモンストレーションは、通信デバイスとしてノートPCを使用し、また通信アプリケーションとしてKAITOS (東邦薬品㈱ 東京) およびMicrosoft Teams (日本マイクロソフト㈱ 東京) を使用した。バイタル計測に関しては、市販のポータブルタイプの医療機器で体温 (電子体温計C231 TERUMO㈱ 東京、および非接触体温計BT-54X ㈱TANITA 東京)、酸素飽和度 (302Aパルスオキシメータ WinicCorp. 台湾、およびCheckmeProX 三栄メディスン㈱ 京都)、血圧 (手首式ES-T3200ZZおよびテルモ電子血圧計H56エレマーノ2 TERUMO㈱ 東京) について、計測に要した時間を調べた。

### 4. 実験結果

オンライン診療デモンストレーションを実施した場所や使用した通信デバイスにより通信の安定性が共に大きく異なっており、通信安定性が低下すると、画像は不鮮明となり、また音声途切れる状態を確認した。またオンライン診療時の通信接続までに要する時間の平均は約60秒であった。

バイタルデータを得るのに要した時間は、医療機器の測定原理により差があるが、体温: 1~30 秒、酸素飽和度: 11~24 秒、心電図: 32 秒、血圧: 38 秒~54 秒 (脱衣時間を含める場合は、上記に 20~41%の追加) であり、最も長い4項目の総和は 140 秒もの時間を要することがわかった。

### 5. 考察

遠隔医療システムを効率的に行うためには、通信環境の整備が必須であり、また、バイタル測定の検査には、検査数が増加することによって、総診察時間に大きく影響することが考えられた。このことから、オンライン診療中の通信デバイスの不具合に対しては、看護師による迅速な復旧対応が必要であると感じた。

システムに慣れていないケース等は、オンライン診療実施の総時間が対面診療の2倍以上かかっている事や診察そのものが実施出来ない事が課題として挙げられる<sup>3)</sup>。従って、対面と同等のオンライン診療を行うには、事前に必要な検査実施後に看護師が傍にいる事が望ましいと考えられた。現段階では、バイタル検査は事前検査を要するが、今後のデバイス開発により、診察中のリアルタイム検査も可能になると期待できる。

### 6. 結論

対面と同等なオンライン診療を確立するには、通信環境の安定供給が必須である。そのためには、患者をサポートしながら実施するD to P with Nによる遠隔医療が有効である。今後、遠隔医療に必要とされる技術開発への取り組みとし、新たな検査デバイスの開発により、リアルタイムでの検査も可能になると期待できる。

### 参考文献

- [1] 『厚生労働白書-社会保障を支える人材の確保-』令和4年度版
- [2] N.v.d.Berg et al, Telemedicine and telecare for order patients-A systematic review, Maturitas 7394-114, 2012
- [3] 原田 昌範, 西村 謙祐, へき地医療の推進に向けたオンライン診療体制の構築についての研究, 70P



# 生体にプラズマを直接照射するための高精度温度制御プラズマ開発

## Development of high-precision temperature-controlled plasma for direct irradiation on living organisms

杉浦 諒<sup>\*1</sup>, 大澤 泰樹<sup>\*1</sup>, 八井田 朱音<sup>\*1</sup>, 柳川 由紀<sup>\*2, \*3</sup>, 沖野 晃俊<sup>\*1</sup>  
 Ryo SUGIURA<sup>\*1</sup>, Taiki OSAWA<sup>\*1</sup>, Akane YAIDA<sup>\*1</sup>, Yuki YANAGAWA<sup>\*2, \*3</sup>, Akitoshi OKINO<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>東京科学大学, 横浜市緑区長津田町 4259,

<sup>\*2</sup>千葉大学, 松戸市松戸 648, <sup>\*3</sup>理化学研究所, 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

<sup>\*1</sup>Institute of Science Tokyo, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama,

<sup>\*2</sup>Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo, <sup>\*3</sup>RIKEN, 1-7-22 Hirosuecho, Tsurumi-ku, Yokohama

### 1. はじめに

大気圧低温プラズマは残留毒性が少なく、処理対象に放電損傷を与えない特徴を持つ。しかし、低温と言ってもプラズマのガス温度は 40~100°C 程度であるため、熱に弱い生体等に照射するには、より低い温度が望ましい場合がある。一般的には照射距離を大きくしたり、放電電力を下げて使用するが、各種の処理効果に寄与する活性種の量も減少してしまう。我々の研究室では、放電電力等に依存せずにプラズマのガス温度を制御できるマルチガス温度制御プラズマジェットを開発してきた<sup>(1)</sup>。これは様々なガスで 3~108°C までの温度のプラズマ生成が可能である。この装置では、プラズマジェット管体内部に温度制御流体 (TCF) を流し、管体との熱交換を通じてプラズマのガス温度を制御していた。

しかし、この温度制御プラズマジェットには温度制御性能に関して 2 つの問題があった。1 つ目はプラズマ生成用ガス温度の応答性の遅さである。これは、熱容量がプラズマ生成用ガスの約 3000 倍大きい TCF の温度を調整することにより、ガス温度を制御していたためであり、1°C の加熱に 34 秒、冷却に 59 秒を要していた。2 つ目の問題はプラズマガス温度の安定性についてである。プラズマを長時間生成するとガス温度が上昇するため、生成直後の温度を測定して実験しても、条件を変えた数分後の処理では設定温度と数°C の差異が生じることもあった。そこで本研究では、プラズマガス温度の応答性と安定性を向上させた新しい温度制御プラズマジェットを開発した。

### 2. フィードバック機能付き大気圧温度制御プラズマジェットの開発

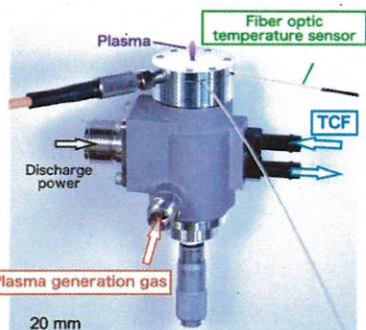


Fig. 1 Temperature-controllable plasma jet

開発した新しい温度制御プラズマジェットの外観を図 1 に示す。このジェットでは、プラズマジェット管体内に流れる熱容量の大きい TCF の温度を -30°C で固定して管体の冷却用として用い、ヒーターで加熱する温度を変えることでプラズマ生成部のガス温度を制御する。また、プラズマ照

射口のキャップ内に挿入された光ファイバー温度計が、プラズマガス温度を逐次的に測定してヒーターへフィードバック制御を行うことでリアルタイムな温度制御を可能にしている。この制御方法により、プラズマガス温度が迅速かつ正確に設定温度に制御され、生体へ熱損傷を与えない安全なプラズマ照射が可能となると期待できる。

### 3. 実験方法

新しい温度制御プラズマジェットのプラズマ生成用ガス温度の応答性と安定性を調べるため、プラズマ生成用ガスとして乾燥空気を流量 10 L/min で流し、ガス温度の制御実験を行った。ガス温度の測定はプラズマ照射口のキャップ内に挿入された光ファイバー温度計により行った。その際、初期温度はヒーターにより加熱を行っていない -17.4°C として、そこから 20°C, -10°C, 10°C, 0°C の順に設定値とした。

### 4. 実験結果と考察

実験結果を Fig 2 に示す。ガス温度を約 -20°C から 20°C, 10°C から 10°C に加熱させた際の立ち上がり時間はそれぞれ 155 秒と 81.5 秒であった。また、ガス温度を -10°C から -30°C, 0°C から -10°C へ冷却させた際の立ち下がり時間は 28 秒および 10.5 秒であった。これらの結果から、新しい温度制御プラズマジェットでは 1°C の加熱に 3.8 秒、冷却に 1.8 秒と、従来システムと比較して加熱時間は約 1/7, 冷却時間は約 1/45 に短縮されたことがわかった。ガスヒーターの出力を増加させたり、TCF の流量を制御したりすることで、さらなる温度応答性の向上が期待できると考えられる。

発表では、プラズマ生成用ガス温度の安定性についても報告する。

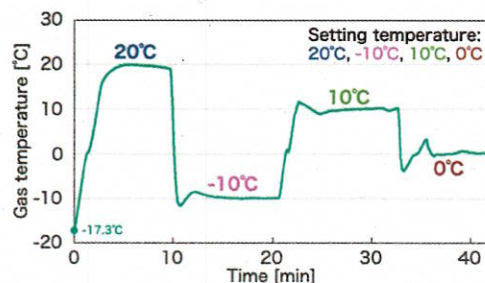


Fig. 2 Time variation of gas temperature

### 5. 参考文献

(1) Yuma Suenaga, Toshihiro Takamatsu, Toshiki Aizawa, et al. Plasma Gas Temperature Control Performance of Metal 3D-Printed Multi-Gas Temperature-Controllable Plasma Jet, Applied Sciences, MDPI, 11, 24, pp.11686-11694 (2021).



# リアルタイムでの透過分析と対象識別を可能とする 近赤外マルチスペクトラル内視鏡デバイスの開発

## Development of a near-infrared multispectral endoscopic device enabling real-time transparency analysis and target identification

林聖也\*<sup>1</sup>, 高松利尋\*<sup>2</sup>, 新垣慎太郎\*<sup>3\*4</sup>, 岡本成亮\*<sup>3</sup>, 竹村裕\*<sup>1</sup>

Seiya HAYASHI\*<sup>1</sup>, Toshihiro TAKAMATSU\*<sup>2</sup>, Shintaro ARAKAKI\*<sup>3\*4</sup>, Nariaki OKAMOTO\*<sup>3</sup>, Hiroshi TAKEMURA\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> 東京理科大学, 野田市山崎 2461, \*<sup>2</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市並木 1-2-1, \*<sup>3</sup> 琉球大学医学部, 西原町上原 207, \*<sup>4</sup> 国立がんセンター東病院, 柏市柏の葉 6-5-1

\*<sup>1</sup> Tokyo University of Science, 2461 Yamazaki, Noda, \*<sup>2</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba, \*<sup>3</sup> University of the Ryukyus, Faculty of Medicine, 207 Uehara, Nishihara, \*<sup>4</sup> National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa

### 1. はじめに

現在の腹腔鏡は観察対象が表面のみに限られてしまい深部にある腫瘍を検出できない。また、手術画像から機械学習を用いて組織を同定する研究が進められているが、RGB3色の色情報のみでは可視光下で色味の似た組織同士や神経などの区別が難しい。

これら①深部観察, ②同色物体識別, の課題解決に対して, 高い生体透過性を持ちながらも分子振動解析が可能な「近赤外分光画像法(NIR-MSI)」に着目した<sup>(1)</sup>。しかし既存の装置では空間および波長分解能が高く撮像時間が長くかかってしまうため<sup>(1)</sup>, 手術中での適用が難しい。そこで本研究では, 術中の使用を想定した, 赤外マルチスペクトラル内視鏡デバイスを新たに開発し, その性能の検証を行った。

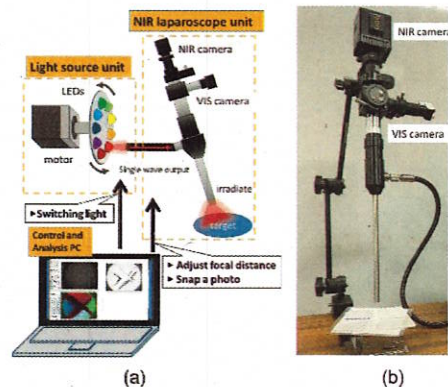


Fig.1 (a)Diagram of NIR-MSI endoscopic system (b)overview

### 2. 近赤外マルチスペクトラル内視鏡の開発

開発した NIR-MSI 内視鏡デバイスは、近赤外 LED を回転させ切り替え可能な近赤外光源部と、近赤外光が導光可能な硬性鏡部で構成されている (図 1)。照射波長の変更や焦点レンズ調整を同期的に制御することで、硬性鏡部のカメラに結像をし、近赤外画像を撮影する。同時に可視光画像も取得できる。

### 3. 性能の検証

#### 3.1 透過分析

3mm 目盛りのチェッカーボードの上にささみ肉に厚さ 4~5mm のささみ肉を置いたときの内視鏡視野を図 2 に示す。可視光画像 (上) では肉表面の様子しか見えないが、近赤外画像 (下) は、ささみ肉を透過して下の模様がはっきりと見えることが確認できる。また、この透過画像は約 30fps で取得表示が可能である。

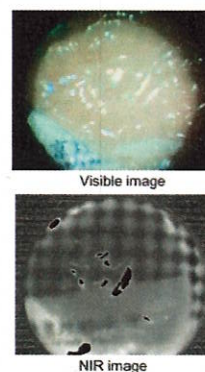


Fig.2 Transparency analysis

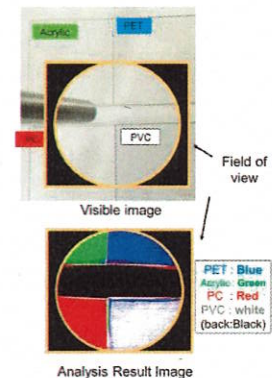


Fig.3 Object identification

#### 3.2 同色物体識別

可視光下では区別の難しい同色物体として、4 種の透明樹脂 (図 3 上) を用意した。中央に黄色で示している内視鏡視野に対して、9 波長の近赤外光を照射した画像から近赤外スペクトルの分析を行った (図 3 下)。視野内の 4 種類樹脂の位置する場所を、4 色 (背景含め計 5 色) でそれぞれの領域を分割できていることが確認できた。画像の取得から結果の表示まで約 2 秒以内で完了でき、その精度は約 95%であった。

### 5. まとめ

本研究では、NIR-MSI 硬性内視鏡デバイスを開発し、リアルタイムでの透過分析と、高精度かつ高速での同色物体識別を実現し、術中の深部腫瘍の検知や同色組織の区別などへの可能性が示唆された。今後は、ヒト検体を対象に検証を行う。

#### 参考文献

(1) R. Fukushima et al., Detection of Exposed Nerves in Two Individuals In Vivo and Unexposed Nerves Ex Vivo with Near-Infrared Hyperspectral Laparoscope, 2024 IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII), pp.19-24.