



研究成果報告書

(2023年度採択 研究開発助成)

設 立 の 趣 旨

設 立 の 趣 旨

科学技術の振興は、一国の産業発展の原動力となるとともに、国民福祉を増進させる上で極めて重要な役割を担うことは、改めて申すまでもありません。

戦後の荒廃した日本経済が、短時日のうちに復興し、めざましい躍進を遂げたのも、我が国における科学技術の著しい進歩とその成果の積極的な活用によるものであるといえます。こうして我が国は今日、世界の経済大国にまで発展いたしました。昨今において我が国をめぐる経済環境は極めて厳しく、資源・エネルギーの制約、国際競争の激化、高齢化社会の到来、社会資本の不十分など解決を図るべき諸問題が山積しております。こうした問題や、将来我が国が直面するであろう問題を克服し、長期にわたって調和ある発展を実現していく上で、新しい科学技術の研究開発を推し進め、高付加価値産業、知識集約産業の振興、社会開発の強化を図ることが何よりも肝要であります。このためには優れた研究開発課題の発掘と推進、創造性に富んだ研究、人材の育成、科学技術に対する一般の理解の強化などが是非必要であります。

我が国科学技術が直面する、以上のような状況にかんがみ、株式会社島津製作所の拠出資金により財団法人島津科学技術振興財団を設立し、科学技術に関し、研究開発の助成及び振興を図り、もって我が国産業の発展と福祉の増進に寄与しようとするものであります。

(設立 昭和55年6月10日)

事 業

1. 科学技術に関する研究開発の助成
2. 科学技術の普及啓発
3. 科学技術に関する研究において著しい成果をあげた功労者の表彰
4. その他この法人の目的を達成するために必要な事業

研究成果報告 （2023年度採択 研究開発助成） 23件

研究題目	研究者	ページ
腎機能診断を目指した キラルアミノ酸の多次元LC一斉計測法開発	九州大学 薬学研究院 助教 石井 千晴	1
粘弾性流体の複雑挙動解明に向けた 時系列応力分布計測法の開発	慶應義塾大学 大学院理工学研究科 特任助教 市川 賀康	6
超高圧下熱量・圧力同時測定装置の開発	阿南工業高等専門学校 創造技術工学科 准教授 上田 康平	15
DNA損傷の超高解像度解析による 重粒子線治療の新論理体系構築	群馬大学 重粒子線医学推進機構 教授 尾池 貴洋	20
脳へ埋込可能なプラズモン型化学センサによる 神経ペプチド計測	産業技術総合研究所 エレクトロニクス・製造領域 研究員 大下 雅昭	25
1細胞質量分析イメージングによる疾患組織の可視化	大阪大学 大学院理学研究科 准教授 大塚 洋一	30
α 線のリアルタイム検出を目指した α 線-光検出器の開発	千葉大学 大学院薬学研究院 助教 甘中 健登	36
顕微界面振動分光法による、 界面分子・電子環境の高精細解像	東京科学大学 生命理工学院 准教授 関 貴一	41
タンパク質構造安定性の超並列測定技術と その予測モデル開発	東京大学 生産技術研究所 講師 坪山 幸太郎	47
生成系人工知能による 高速AFMデータの高解像度化技術の開発	京都大学 大学院理学研究科 准教授 寺川 剛	53
液体クロマトグラフィー用細繊維状ポリイミド固定相の開発	豊橋技術科学大学 大学院工学研究科 助教 中神 光喜	59
階層的な細胞内分子ダイナミクスの時空間分解計測法の開発	京都大学 大学院理学研究科 助教 中曽根 祐介	65
高カルシウムアルミニウム含有物形成温度圧力推定のための メリライトの結晶構造解析	金沢大学 理工研究域 助教 濱田 麻希	71

研究題目	研究者	ページ
セミアクティブ制御を用いた圧電素子による 自己給電構造物損傷検出法の開発	東北大学 工学研究科 助教 原 勇心	76
タンパク質の複合体と 相互作用を高精度に計測する計算技術の開発	筑波大学 計算科学研究センター 准教授 原田 隆平	82
イベント駆動型画像センサーによる 超高速光電子画像計測法の開発	九州大学 大学院理学研究院 准教授 堀尾 琢哉	87
腎臓病理診断AIの開発	大阪大学 大学院医学系研究科 特任助教 松本 あゆみ	92
エクソソームを用いた オートファジーモニタリング方法の開発	大阪大学 大学院医学系研究科 特任助教 南 聡	97
含窒素グラフェンナノリボンの構造解析	千葉大学 大学院工学研究院 准教授 山田 泰弘	102
2探針プローブによる電気化学界面の化学種識別と 局所物理量の同時計測	理化学研究所 開拓研究本部 専任研究員 横田 泰之	109
先進情報解析を用いた物質動態のX線ブリッキング計測	茨城大学 学術研究院 講師 倉持 昌弘	115
拡散モデル正則化を駆使した高精度レンズレスイメージング	大阪大学 大学院基礎工学研究科 准教授 中村 友哉	122
マルチモーダルAIを活用した骨掘削ドリルの開発研究	大阪大学 大学院医学系研究科 講師 藤森 孝人	127

腎機能診断を目指したキラルアミノ酸の多次元 LC 一斉計測法開発

九州大学薬学研究院 助教 石井 千晴

1. 研究背景

慢性腎臓病は世界有病率 9%を超え、患者 QOL の向上のみならず予防や早期診断が肝要な加齢性疾患である。しかし、現行の腎機能マーカー（クレアチニン、シスタチン C 等）は早期診断に課題を有し、人々の健康寿命延伸および迅速な治療介入のため鋭敏な診断指標の開発が切望されている。近年、光学識別分離分析技術の進歩により、D-セリン（D-Ser）など数種の D-アミノ酸含量がヒトを含む哺乳類の血中で腎機能低下に伴い増加することが示された^[1-3]。従って様々なアミノ酸のキラル識別分析による新規診断指標探索が期待されているが、D-アミノ酸の内在性含量は極めて微量であり、多様な共存成分によって定量妨害を受けやすく、正確な計測が困難な場合が多い。このような背景から、高い検出感度と選択性を兼ね備えたキラルアミノ酸の網羅的計測法の開発と利用が切望されていた。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、『クロマトグラフィーを駆使したキラルアミノ酸の高選択的計測法を開発し、様々なタンパク質構成アミノ酸の D/L 解析を通して慢性腎臓病における高感度な新規診断指標を探索すること』である。著者らはこれまでに複数の分離モードを組み合わせることで劇的な選択性向上を実現する多次元クロマトグラフィー技術（Fig. 1、二次元 LC-MS/MS 法）を独自に構築してきた^[4-6]。代表的なキラルアミノ酸を対象としてヒト血液や尿などの臨床検体に適用した結果、従来は共存成分の共溶出により正確な

定量が困難であった微量 D-アミノ酸について高感度精密定量を達成し、健常人と比較して腎機能低下にともない D 体含量が増加することを見出した。これらの結果から、著者らの独自技術である多次元クロマトグラフィー技術を駆使することで臨床検体における様々な内在性 D-アミノ酸の探索を推進し、より鋭敏な診断指標候補の発見に繋がると考えた。本研究ではこの二次元 LC-MS/MS 法の基盤技術を進化させ、様々なタンパク質構成アミノ酸を対象とする高選択的かつ網羅的キラル識別分析法を開発し、腎臓病患者血中におけるスクリーニングを行った。

3. 研究の方法

本研究では、逆相分離（一次元目）と光学分割（二次元目）およびタンデム型質量分析装置による検出を組み合わせた二次元 LC-MS/MS 一斉計測法を開発した（Fig. 1）。

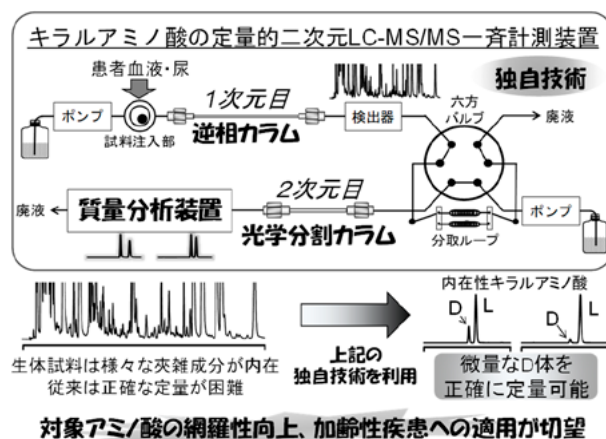


Fig. 1 二次元 LC-MS/MS 法の概略

近年「多次元分析法」は世界で急速に注目されているが、最終次元までターゲット化合物の定量性を維持した分析法は他の研究チームでは実現

できていない。これに対し、著者らはこれまで「定量的多次元クロマトグラフ」を実用化するために様々な基盤技術を構築してきた(特許 4980740 号、6296382 号、US-9266826 等)。これらの技術を駆使することで、一次元目では目的アミノ酸の画分のみを定量性を確保して高精度で自動分取し、妨害成分を大幅に排除する。一次元目で対象アミノ酸分取画分に混入した成分については、二次元目でのクロマトグラフィー分離に加えて検出部にタンデム型質量分析装置による質量フィルター(SRM モード)を用いることで対象化合物と識別し、キラルアミノ酸の高選択的な精密一斉定量を実現する。

4. 研究成果

4.1. 哺乳類血中キラルアミノ酸の正確な計測を可能とする二次元 LC-MS/MS 法の開発

分析対象としてアラニン (Ala)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、ロイシン (Leu)、リジン (Lys)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe)、プロリン (Pro)、Ser およびバリン (Val) の計 10 種を選択した。これらのアミノ酸は 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いてプレカラム誘導体化し、NBD-アミノ酸の全自動二次元 LC-MS/MS 法を構築するため、各次元の分離・検出条件を精査した。その結果一次元目では、微粒子充填型マイクロ ODS カラム Singularity RP18 (1.0 x 500 mm) を固定相とし、0.05 % トリフルオロ酢酸を含む 10–30 % アセトニトリル水溶液 (30 μ L/min) を移動相として、約 270 分ですべての分析対象アミノ酸の相互分離および他の夾雑成分からの粗精製が可能であった。六方バルブの切替えにより分取した各アミノ酸画分を自動で二次元目へ導入した結果、オリジナル Pirkle 型セミマイクロ光学分割カラム Singularity CSP-001S (1.5 x 150 mm) を固定相とし、ギ酸を

含むアセトニトリルとメタノールの混液 (50/50 または 75/25, 200 μ L/min) を移動相として、30 分以内に各アミノ酸の良好な光学分割が可能であった ($R_s \geq 1.38$)。三連四重極型質量分析装置 (Triple Quad 5500, Positive ion mode) による検出条件を検討した結果、すべての NBD-アミノ酸が十分な感度で検出され、一度のインジェクション操作でキラルアミノ酸の高選択的一斉分析が可能とする二次元 LC-MS/MS 法を構築可能であった。本分析法を用いて標品アミノ酸およびヒト血中キラルアミノ酸の分析を行った結果、定量性、再現性および真度について良好な値が得られた。

ヒト血中キラルアミノ酸の分析結果を Fig. 2 に示す。

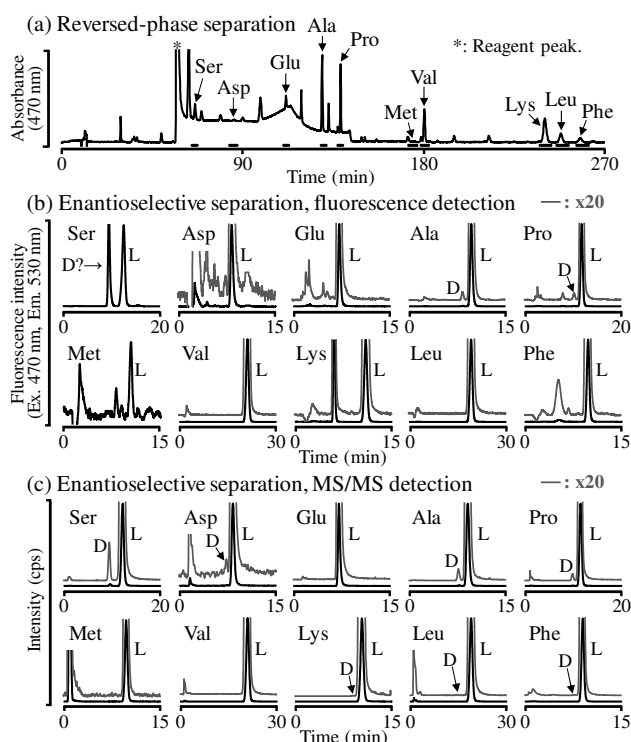


Fig. 2 二次元 LC-MS/MS 法を用いる健康人血中キラルアミノ酸の逆相分離 (a) および光学分割 (b: 蛍光検出, c: 質量分析)

一次元目において対象アミノ酸を夾雑成分から逆相分離し (Fig. 2a)、各アミノ酸画分を二次元

目へ導入して光学分割を行った。従来の二次元 LC 法と同様に蛍光検出器を用いて分析を行った場合、キラルアミノ酸の近傍に溶出する夾雑成分が認められ、アミノ酸の正確な一斉分析は困難であった (Fig. 2b)。

これに対して二次元 LC-MS/MS 法を用いて分析を行った結果、夾雑成分による定量妨害を殆ど受けずに内在性キラルアミノ酸の精密な一斉分析が可能であった (Fig. 2c)。

Ala、Pro および Ser については健常人の血中で明瞭な D 体のピークが認められ %D 値 ($D/(D+L) \times 100$) は 0.5、0.3、1.7 %であった。また、Asp、Leu、Lys および Phe についても D 体の溶出時間に定量下限以下のピークが確認された。以上のように本二次元 LC-MS/MS システムは生体試料中におけるキラルアミノ酸の全自動精密定量に適用可能であり、幅広いアミノ酸の含量制御機構や疾患との関連解析を推進可能であると考えられる。

4.2. 健常人における血中 D-アミノ酸の含量変動

血中キラルアミノ酸濃度を用いる慢性腎臓病患者の腎機能評価に先立ち、分析対象アミノ酸 10 種について健常人における含量変動を解析した。検体としては、20 代の健常男性 5 名を対象として異なる 4 日間、一晩絶食後に血液（臨床現場で一般的に採血が行われる朝食前の血液）を採取した。得られた血漿について除タンパク操作および NBD-F による誘導体化を行い、二次元 LC-MS/MS 法を用いて分析した。

すべての試料に比較的多量の D 体が認められた Ala、Pro および Ser について、D 体と L 体の血漿中濃度および %D 値を Fig. 3 に示す。

D 体の血漿中濃度は Ala が 0.54–2.90 nmol/mL、Pro が 0.26–1.25 nmol/mL、Ser が 1.51–2.58 nmol/mL であり、L 体の濃度は Ala が 200.82–

467.44 nmol/mL、Pro が 121.60–346.52 nmol/mL、Ser が 62.20–150.62 nmol/mL であった。また、Ala、Pro および Ser の %D 値はそれぞれ 0.1–0.9 %、0.1–0.8 % および 1.2–2.9 % であった。

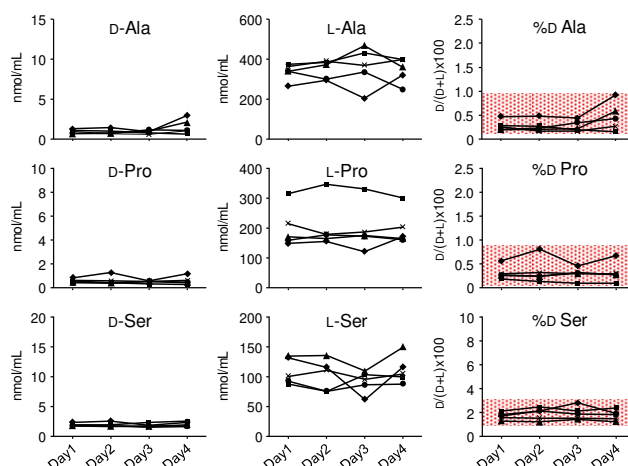


Fig. 3 健常人における血中キラルアミノ酸含量の日間変動

その他の対象アミノ酸についても同様の解析を行った結果、すべての D-アミノ酸含量が一定の低濃度範囲内に制御されており、D 体、L 体の絶対量および %D 値ともに顕著な日間変動は認められなかった。従って、健常人の血漿に内在するこれらのアミノ酸鏡像異性体含量は、同時時間帯においてそれぞれ一定の範囲内に制御されていると考えられる。

4.3. キラルアミノ酸分析を利用する腎機能評価

血中キラルアミノ酸分析により腎機能評価が可能か検討するため、開発した二次元 LC-MS/MS 法を用いて慢性腎臓病患者の血漿試料を測定した。患者検体としては、腎障害の程度が異なる 3 群（軽度、中等度、重度）から 5 名ずつ計 15 検体を選択した。その結果、腎機能の低下に伴う血中含量の増加がすでに報告されている D-Ser、D-Ala および D-Pro について今回の検討でも矛盾しない結果が得られ、二次元 LC-MS/MS 法が腎臓病患者の血中キラルアミノ酸分析に適用可能である

ことが示された。加えて本研究では Glu、Leu および Phe についても患者群と健常人群で %D 値の有意な差があることが初めて示された。特に Glu は健常人のすべての検体において D 体のピークが定量下限以下であったのに対して、殆どの患者検体では定量可能であり、Fig. 4 に示すように中等度の腎障害患者群において健常人群との有意な含量差が確認された ($P<0.05$)。また、Phe についてはすべての患者検体において D 体の明瞭なピークが検出され、軽度腎障害の患者群でも健常人群とのあいだに有意な %D 値の増加が認められた ($P<0.05$)。

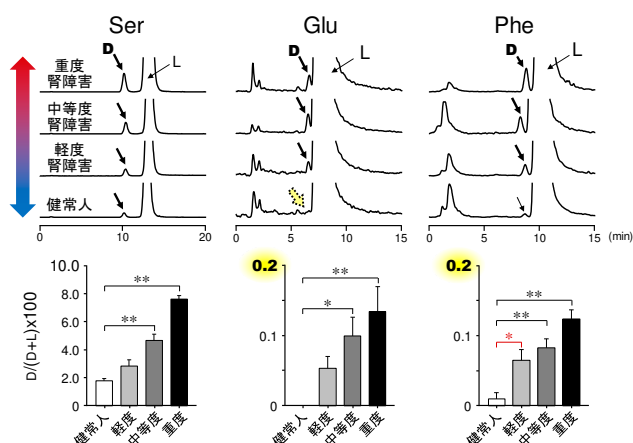


Fig. 4 腎機能低下に伴う超微量な血中 D-アミノ酸の含量変化

5. 結論

本研究で開発した二次元 LC-MS/MS 法は極めて高い選択性を有しており、夾雑成分の存在する血中において従来は選択性不足により解析困難であった微量 D-アミノ酸についても精密定量を達成した。これらの D-アミノ酸は腎機能診断における鋭敏な指標として利用価値が高いと考えられ、今後は検体数を増加させたさらなる検討および臨床応用が期待される。

6. 参考文献

- [1] T. Kimura, A. Hesaka, Y. Isaka; D-Amino acids and kidney diseases, *Clin. Exp. Nephrol.*, **24**, (2020) 404–410.
- [2] Y. Nagata, R. Masui, T. Akino; The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma, *Experientia*, **48**, (1992) 986–988.
- [3] T. Kimura, K. Hamase, Y. Miyoshi, R. Yamamoto, K. Yasuda, M. Mita, H. Rakugi, T. Hayashi, Y. Isaka; Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease, *Sci. Rep.*, **6**, (2016) 26137.
- [4] C. Ishii, T. Akita, M. Mita, T. Ide, K. Hamase; Development of an online two-dimensional high-performance liquid chromatographic system in combination with tandem mass spectrometric detection for enantiomeric analysis of free amino acids in human physiological fluid, *J. Chromatogr. A*, **1570**, (2018) 91–98.
- [5] C. Ishii, N. Takizawa, T. Akita, M. Mita, T. Ide, R. Konno, K. Hamase; Offline two-dimensional LC-MS/MS determination of tryptophan enantiomers in mammalian urine and alteration of their amounts in D-amino acid oxidase deficient mice, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **219**, (2022) 114919.
- [6] C. Ishii, T. Akita, M. Mita, R. Konno, K. Hamase; Chiral amino acid analysis in the plasma of B6DAO^{-/-} mice lacking D-amino acid oxidase activity, *Chromatography*, **44**, (2023) 39–43.

7. 本研究にかかわる成果発表等

- C. Ishii, T. Akita, T. Kimura, S. Sakai, M. Mita, T. Ide, Y. Isaka, K. Hamase; Evaluation of individual variation of D-amino acids in human plasma by a two-dimensional LC-MS/MS system and application to the early diagnosis of chronic kidney

- disease, *Anal. Chem.*, **96**, (2024) 4876–4883.
- ・ C. Ishii, K. Hamase; Development of two-dimensional LC-MS/MS methods for highly-selective analysis of chiral amino acids and the evaluation of their intrinsic amounts in mammals and stereoinversion in proteins, *Chromatography*, **45**, (2024) 11–21.
 - ・ C. Ishii, T. Akita, Y. Nakagawa, M. Mita, K. Hamase; Development of Pirkle-type chiral stationary phases for the enantioselective and comprehensive HPLC analysis of all proteinogenic amino acids, *Chromatography*, **47**, (2026) 113–117.
 - ・ 山部真弓, 石井千晴, 清水有紀子, 三田真史, 秋田健行, 岡村匡史, 浜瀬健司, ロイシン連鎖異性体を対象とする二次元キラル HPLC 法の開発と D-アミノ酸酸化酵素欠損に伴う哺乳類血漿・尿中における含量変化解析, 第 31 回クロマトグラフィーシンポジウム, 那覇, 2024 年 6 月 5 日.
 - ・ C. Ishii, M. Yamabe, Y. Shimizu, T. Akita, M. Mita, T. Okamura, K. Hamase, Development of a two-dimensional chiral HPLC system for the simultaneous analysis of leucine chain isomers and their alteration in the plasma and urine of D-amino acid oxidase deficient rats, The 6th International Conference of D-Amino Acid Research, Kanazawa, Japan, August 21st, 2024.
 - ・ 石井千晴, 山部真弓, 清水有紀子, 秋田健行, 三田真史, 岡村匡史, 浜瀬健司, 二次元キラル HPLC 法を用いるロイシン連鎖異性体の一斉識別定量と D-アミノ酸酸化酵素欠損によるラット血漿および尿中含量の変化, 第 36 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 静岡, 2024 年 8 月 29 日.
 - ・ 井上裕貴, 道清祐輝, 石井千晴, 根岸栄一, 井本啓史, 三田真史, 池田昌隆, 井手友美, 秋田健行, 浜瀬健司, NBD-トリプトファンの高感度蛍光分析を可能とする光リアクター搭載高分離能三次元 HPLC 法開発, 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025 年 3 月 28 日.
 - ・ 中村拓人, 石井千晴, 永田優凜, 小田京香, 三田真史, 秋田健行, 浜瀬健司, アキラル-キラルタンデムカラムを用いるイソロイシン立体異性体の一斉分離法開発, 第 32 回クロマトグラフィーシンポジウム, 長崎, 2025 年 5 月 14 日.
 - ・ 石井千晴, 秋田健行, 三田真史, 池田昌隆, 木村友則, 浜瀬健司, 内在性キラルアミノ酸の多次元 LC 分析法開発と鋭敏な腎機能検査マーカーの探索, 第 68 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2025 年 6 月 22 日.
 - ・ 中村拓人, 石井千晴, 永田優凜, 三田真史, 秋田健行, 浜瀬健司, アキラル-キラルタンデムカラムを用いるイソロイシン立体異性体の一斉分離法開発と二次元 LC によるマウス・ラット尿中含量の解析, 第 22 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム, 北九州, 2025 年 8 月 22 日.
 - ・ 石井千晴, 二次元 LC-MS/MS を用いる内在性微量 D-アミノ酸の分析法開発および疾患における早期診断マーカーのスクリーニング, 第 22 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム, 北九州, 2025 年 8 月 22 日.
 - ・ 石井千晴, 生体・食品に存在するキラルアミノ酸の高選択的分析法開発, 日本分析化学会第 74 年会, 札幌, 2025 年 9 月 25 日.

8. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成金によるご支援のもと遂行したものであり、財団のご関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

粘弾性流体の複雑挙動解明に向けた時系列応力分布計測法の開発

慶應義塾大学大学院理工学研究科 特任助教 市川 賀康 *

1. はじめに

石油増進回収のために使用される高分子溶液や血液に代表される粘弾性流体は、粘性力が支配的な微小スケールの流れ場においても、定常状態から複雑な不安定挙動を示す非定常状態へと遷移する。この遷移は、流体に働く応力に起因することが示唆されているが、その詳細は明らかにされていない。

流体に働く応力は、一般的に流体に働くせん断速度と粘度によって決定されるものであるが、粘弾性流体は非ニュートン性を有しているため局所的に粘度が変化することもあり、ニュートン流体における応力算出の式を適用できず、溶液に応じた構成方程式を適切に選択・使用する必要がある。このとき、構成方程式に含まれるせん断速度や粘度を高精度に取得する必要がある。特に、非定常状態における応力取得のため、粘度分布と速度分布を同時に取得できれば、構成方程式と合わせて時系列的な応力分布が取得可能と考えた。そのため、当初は粘弾性流体における応力の時系列計測の実現を目的とし、速度と粘度の同時計測手法の開発に取り組むことを予定していた。

粘度の計測にあたり、粘度に応じて蛍光輝度が変化する蛍光分子ローターを使用した手法の確立に取り組んだが、粘弾性流体における粘度には伸張粘度とせん断粘度の2種類が存在し、それらを別々に計測することが重要であることが研究を進める中で次第にわかってきた。そのため、時系列計測を行うための前段階として、まずは流動中におけるせん断粘度および伸張粘度の計測手法の確立に取り組んだ。

また、蛍光分子ローターを使用した粘度計測手法の確立と同時並行的に、粘弾性流体における流動現象の理解を深めるために、マイクロ流路中の微細構造周りにおける粘弾性流体の流動の可視化に取り組むことにした。

2. 粘度分布計測手法の検討

2.1. 使用した蛍光分子ローター

本研究では、Fig. 1 に示す 9-(2,2 ジシアノビニル)ジュロリジン (DCVJ) と呼ばれる蛍光分子ローターを使用した。DCVJ はビニル基が粘度に応じて回転し、その回転のしやすさで蛍光輝度が変化するという特徴を有している。せん断速度に対する感度は無く^[1]、粘度のみに反応するため、粘度計測に適しているといえる。本研究では、この分子の濃度を 0.1 mM に設定した水溶液を実験に用いた。そして、予めせん断および伸張粘度が既知の溶液を用いて蛍光輝度と粘度の関係を取得した。

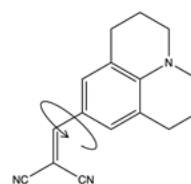


Fig. 1 DCVJ の構造式。矢印のように、ビニル基が回転する。

2.2. 実験装置

本研究では、倒立顕微鏡によるマイクロ流路の下方観察により、蛍光輝度の取得を行った。マイクロ流路を用いることで、その低いレイノルズ数により慣性の影響を無視でき、粘弾性流体におけ

* (助成採択時) 東京理科大学 工学部機械工学科

る粘性と弾性の影響のみを評価できる。マイクロ流路にはポリジメチルシロキサン(PDMS)製のものを使用し、実験に応じて流路形状を使い分けた。流路にはDCVJを混合した試料をシリンジポンプにより送液し、顕微鏡から照射される励起光によって励起された蛍光を科学計測用CMOS(sCMOS)カメラにより取得した。

2.3. セン断粘度 η_s の計測

まず、せん断速度とDCVJの蛍光輝度の関係を取得するため、グリセリン水溶液にDCVJを混合し、長方形断面の矩形マイクロ流路に送液しながら蛍光輝度を取得した。このとき、グリセリン水溶液の濃度を変化させながら計測を行っており、粘度に応じた蛍光輝度を取得している。なお、各濃度のグリセリン水溶液のせん断粘度はレオメータにより取得している。

Fig. 2 に、取得した蛍光輝度 I とせん断粘度 η_s の関係を示す。このとき、せん断粘度 η_s の上昇に伴い、蛍光輝度 I が上昇していることがわかる。ここで、輝度 I とせん断粘度 η_s の関係を $I = a \eta_s^n$ (a, n は定数) でフィッティングした^[1]。これを、粘度が変化する場におけるせん断粘度計測の検量線として使用した。

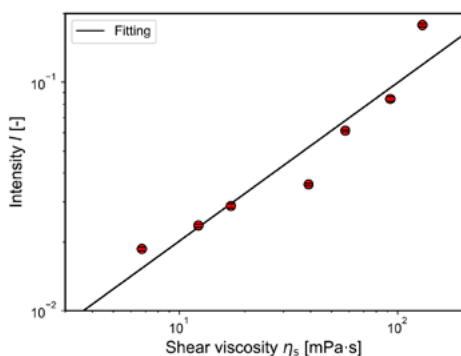


Fig. 2 蛍光輝度 I とせん断粘度 η_s の関係。

次に、マイクロ流路中においてせん断粘度計測を行うために、せん断速度の増加に応じてせん断粘度が低下する shear-thinning 性を有するカルボ

キシメチルセルロース(CMC)水溶液の濃度 1.5 wt% のものを用いた。そして、流路幅 $W = 400 \mu\text{m}$ 、流路の中央に直径 $D = 200 \mu\text{m}$ の円形ピラーを配置したマイクロ流路において、DCVJ を混合した CMC 水溶液をシリンジポンプで流量を変化させながら送液し、蛍光輝度の取得に取り組んだ。一例として、送液流量を $30 \mu\text{L/h}$ としたときの蛍光輝度の分布を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より、ピラーと流路壁面で囲まれる領域において蛍光輝度がわずかに減少していることが確認できる。これは、流路中央に円形ピラーが存在することにより、この領域において流速の増加に伴ってせん断速度が増大し、せん断粘度が低下するためである。

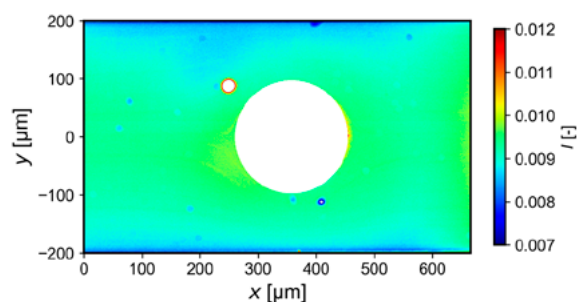


Fig. 3 DCVJ を混合した CMC 水溶液を流量 $30 \mu\text{L/h}$ で送液した際に得られた蛍光輝度の分布。中心の円形の空白部分は円形ピラーの位置に相当する。また、左から右へと水溶液は流れている。

このとき、流量を変化させながらピラーと流路壁面間の領域における輝度の平均値と、Fig. 2 に示したフィッティング関数を用いて、せん断粘度 η_s の値を算出した。その結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 より、流量増大に伴ってせん断速度が増加し、せん断粘度が低下すること、そして、ある流量を超えるとせん断粘度の数値がほぼ一定の値を示すようになった。本研究で使用したマイクロ流路は PDMS 製のものであり、粘度の大きなニュートン流体の蛍光溶液を大流量で送液すると、圧力の影響で流路が高さ方向に変形して蛍光

輝度が増大することが予めわかっている。CMC 水溶液を用いた場合、流量の増大によるせん断速度の上昇に伴ってせん断粘度は低下する、即ち、蛍光輝度は低下するが、前述したように、同時に流路の変形に伴う輝度の上昇の影響を受けて、流量が増加しても輝度に変化しなかったと考えられる。そのため、本研究のように圧力で変化する可能性のある流路を使用した場合、低流量の条件においては DCVJ を用いた shear-thinning 型を有する溶液のせん断粘度イメージングは可能と考えられる。

課題としては、まず、大流量の条件下で実験を行う場合は、変形量が小さな材質の流路、例えばガラス製のマイクロ流路などを使用することが好ましい。また、CMC 水溶液は DCVJ と相性が悪く、溶解が不十分もしくはコロイドのような物質が析出することが確認されていた。そのため、DCVJ を良好に溶解可能な shear-thinning 性の溶液の使用を検討する必要がある。

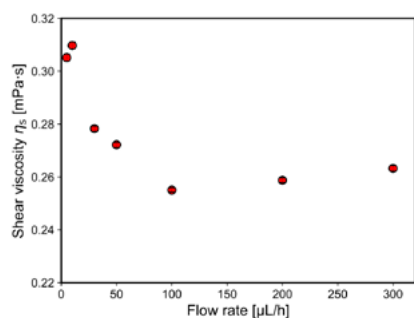


Fig. 4 送液流量を変化させながら取得した、円形ビラー-流路壁面間におけるせん断粘度 η_s の変化。

2.4. 伸張粘度 η_E の計測

次に、伸張粘度 η_E の計測手法の確立に取り組んだ。伸張粘度は溶液が伸張している際の挙動から算出されるため、CaBER^[2]や DoS^[3]などの手法を用いて、液体が伸張する際における液糸の径の変化量から定量化されることが一般的である。しか

し、マイクロ流路中においては撮影方向に対して溶液の厚みが一定であるため、径が変化する手法を校正に用いることができない。そのため、本研究では extensional viscometer-rheometer-on-a-chip (EVROC)^[4]と呼ばれる、マイクロ流路を使用した伸張粘度の定量化手法に着目した。この手法は、Fig. 5 に示すような拡大・縮小部を有する流路を用い、流路全体の圧力損失、拡大・縮小部における圧力損失、そして、縮小部を通過する際における流速分布に基づいたひずみをそれぞれ取得することで、伸張粘度が得られるというものである。

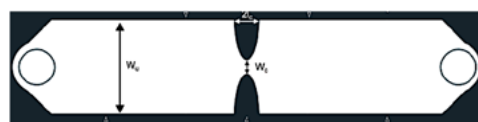


Fig. 5 EVROC に用いたマイクロ流路の概形。

本研究では、強い弾性を有するポリエチレンオキサイド(PEO)の 0.5 wt% 水溶液に DCVJ を混合したものを用いて実験を行った。PEO 水溶液はせん断速度の変化に対して粘度の変化が非常に小さいという特徴を有している。蛍光輝度の取得は Fig. 5 に示す流路の縮小部において行った。

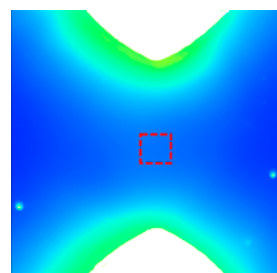


Fig. 6 縮小部における蛍光輝度の画像。赤枠の領域における平均値を伸張粘度 η_E に対応する輝度とした。

流量を変化させながら取得した、伸張粘度 η_E と蛍光輝度 I の関係を Fig. 7 に示す。Fig. 7 には校正実験実施時における送液流量の値も同時に示している。Dinic らは、溶液に働くひずみの増大

に伴って伸張粘度が増大することを報告しており[3], 本研究においても, 流量の増大に伴って伸びが增加し, 伸張粘度も増加することを期待していた。しかし, 流量が 1500 $\mu\text{L/h}$ 以上の条件で伸張粘度の値が低下した。これは, 大流量の条件下において, EVROC における η_E 決定のための圧力損失の計測に原因があると考えられるが, 更なる検証が現段階では必要である。

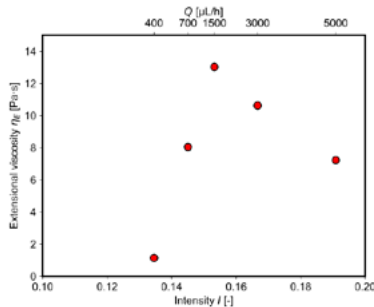


Fig. 7 セン断粘度 η_E と蛍光輝度および送液流量の関係。

一方, 低流量の条件では伸張粘度の上昇に伴って蛍光輝度が上昇することが確認できた。EVROC では, 2.3 節同様に PDMS 流路を使用して校正を試みたことから, 流路の高さ方向に対する変形に起因した輝度の増大の影響も考えられるものの, Fig. 2 に示したせん断粘度の場合とは異なり, 伸張粘度の増大に伴って蛍光輝度は増大すると考えられる。そして, 適切な関数を選択して検量線を作成すれば, 伸張粘度が変化する場においてそのイメージングが可能になるといえる。

3. 微細構造周りにおける粘弾性流体の挙動

微細構造周りにおける粘弾性流体の挙動の可視化に取り組んだ。ここでは, 2.3 節で使用した 1 つの円形ピラーを有するマイクロ流路を用いた場合における流れの 3 次元流速計測と, 複数の円形ピラーが敷設されたマイクロ流路において実施した, 蛍光粒子の流跡線を用いた可視化について説明する。

3.1. 円形ピラー周りにおける低速域の 3 次元流動

高分子であるポリアクリルアミド(HPAM)の水溶液は非常に強い粘弾性を有する。HPAM 水溶液を, ピラーを有する流路に送液すると, ピラーの上流側に低速領域を形成することが知られている[5]。これは, 高分子溶液がピラーと壁面間のような急縮小部において, 弾性応力が溶液に蓄えられ, それに伴ってせん断が働くようになるためである。この低速域は, その周りの高速域とのせん断と, 蓄えられた応力の緩和に伴い, 3 次元的な挙動を示すが, 流動構造に関しては不明点が多い。このような背景から, 詳細に低速域の挙動を解明することを目的として, 本研究では非点収差 PTV (APTV)[6]と呼ばれる手法を用いて 3 次元流速分布の計測に取り組んだ。

3.1.1. 非点収差 PTV(APTV)

APTV は, カメラのイメージングセンサの前方にシリンダリカルレンズを設置することにより, 焦点面から外れた位置にあるトレーサ粒子の像のボケを異方的に歪ませ, 粒子像の重心位置の変位および像形状の変化を時系列的にトラッキングすることで 3 次元 3 成分流速を取得可能な方法である。実際に, 円形ピラー周りで取得された粒子像の様子を Fig. 8 に示す。

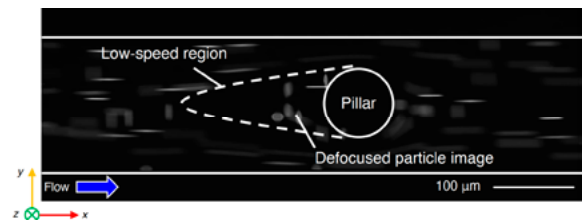


Fig. 8 シリンダリカルレンズを設置して得られた, ピラー周りにおける歪んだ粒子像の様子の一例

このとき, 歪んだ粒子像を速度計測に使用していることから, 高速領域ではカメラの露光時間の

都合で像が必要以上に伸びてしまう．そのため、低速域にのみ着目し、画像処理によってこの領域のみの粒子像を抽出するようにして速度場の取得に取り組んだ．

3.1.2. 3次元可視化の結果

Fig. 9(a)に、流路幅 $W = 200 \mu\text{m}$ 、ピラー径 $D = 100 \mu\text{m}$ の流路を用い、HPAM 水溶液を流量 $100 \mu\text{L/h}$ で送液した場合において、低速域内部の平均速度分布を流線にしたものを示す．Figure 9(a)より、ピラー上流側で速度分布は得られているものの、流線だけでは低速域内部が複雑な流動をしていることが分かるのみであり、具体的な流れの構造を把握するにはいたらなかった．そこで、 z 方向の速度 w 成分のみに着目し、速度成分の等値面を可視化した．Fig. 9(b)に、 $w = \pm 10 \mu\text{m/s}$ の等値面の様子を示す．等値面の表示では、赤い領域が z 方向上向き、青い領域が z 方向下向きの流れを示している．このとき、青と赤の領域が上流側から下流側にかけて交互に現れていることを確認した．実際にこの実験条件において取得した粒子画像を時系列的に見てみると、粒子像が縦伸びから横伸びへと交互に変化する様子が確認できしており、低速域の内部において、回転流もしくは z 方向に対する振動流のようなものが存在することが示唆された．

更に、流量およびピラーの径 D を変化させながら w 成分を抽出した．そして、ピラー-壁面間におけるせん断速度 γ_{pillar} と w 成分の最大値の大きさの関係を取得した．その結果を Fig. 10 に示す．Fig. 10 では $|w|$ の最大値をバルク流速 U_∞ で無次元化しており、 γ_{pillar} の増加にともなって $|w|/U_\infty$ が低下することが確認できた．ピラーの上流側に形成される低速域は、流量の増大に伴い xy 平面においてはその領域が拡大し、流路スパン方向に振動することがわかっている．一方、 z 方向に対し

ては xy 平面同様に領域が増大した結果、3次元的な形状から2次元的な形状へと変化し、それに伴い低速域内部の3次元的な流動が鈍化したのでは無いかと考えられるが、考察の域を出ていない．

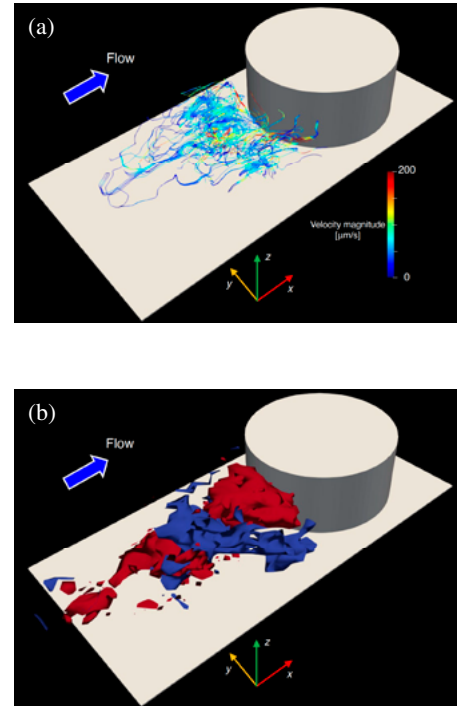


Fig. 9 ピラー上流に形成された低速域内部の流動の様子．(a) 流線で平均流速を示したもの、(b) $w = \pm 10 \mu\text{m/s}$ の等値面を示したもの．($W = 200 \mu\text{m}$, $D = 100 \mu\text{m}$, 流量 $100 \mu\text{L/h}$)

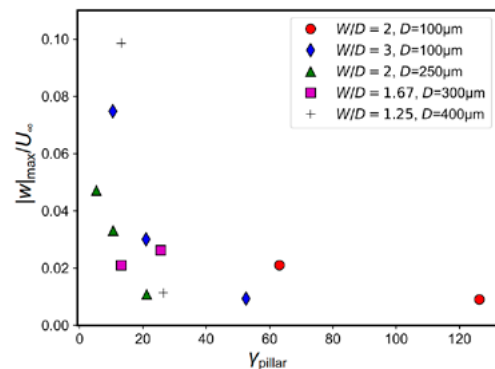


Fig. 10 低速域内部における w 成分の最大値とピラー-流路壁面間におけるせん断速度 γ_{pillar} の関係．

3.2. マイクロピラーアレイ周りにおける流動の計測

次に、微細な円形ピラーを複数並べた場合における流動の計測を行った。円形ピラーアレイが敷設されたマイクロ流路に粘弾性溶液を送液すると、弾性の影響で流れが不安定化することが知られている^[7]。この不安定な流動は、流路スパン方向に対して振動するような挙動を示すが、不安定流動への遷移を引き起こす原因は明らかにされていない。本研究でも、HPAM 水溶液の準希薄溶液にトレーサ粒子を混合して流れの可視化を行ってきた。そして、Fig. 11 に示すように、スパン方向に輝度が歪む挙動が確認された。この輝度の変化に着目し、流れの時系列的な進行方向を割り出す方法を検討した。

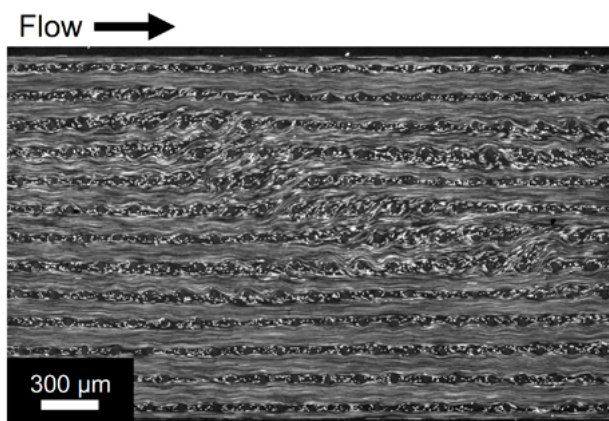


Fig. 11 準希薄な HPAM 水溶液を円形ピラーが大量に敷設されたマイクロ流路に送液した際に得られた流れの挙動。

3.3. 構造テンソルの導入

不安定な挙動の解析を目的として、輝度 I の変化を時系列的にトラッキングするために、本研究では Eq. (1) で定義される構造テンソル $\mathbf{J}$ を導入した。

$$\mathbf{J} = \begin{bmatrix} \langle I_x^2 \rangle & \langle I_x I_y \rangle \\ \langle I_x I_y \rangle & \langle I_y^2 \rangle \end{bmatrix} \quad \text{Eq. (1)}$$

構造テンソル $\mathbf{J}$ は、輝度情報から局所的な方向

を解析するものであり、流跡線から局所的な流れの角度を推定できる。これを用いて、Fig. 11 から角度を推定した結果を Fig. 12 に示す。Fig. 11 において輝度の歪みが確認された領域が Fig. 12 では赤くなっており、図の上方向へ移動する挙動が反映されている。

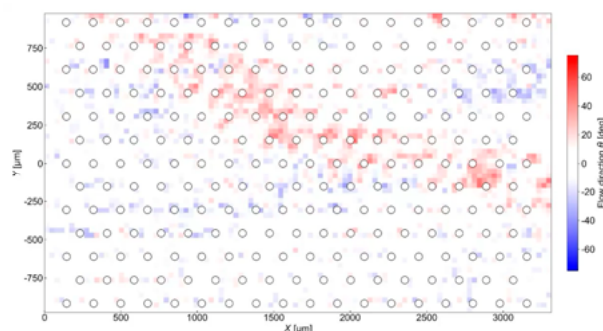


Fig. 12 Fig. 11 の可視化結果に対して構造テンソル $\mathbf{J}$ を適用し、流れ方向に対する振動挙動の角度を算出した結果。

最後に、流跡線の時系列的な可視化結果に対して構造テンソル $\mathbf{J}$ を適用して流れの角度を算出し、観察領域の上流、中流、下流において角度の時間発展の様子をそれぞれ算出した。その結果を Fig. 13 に示す。

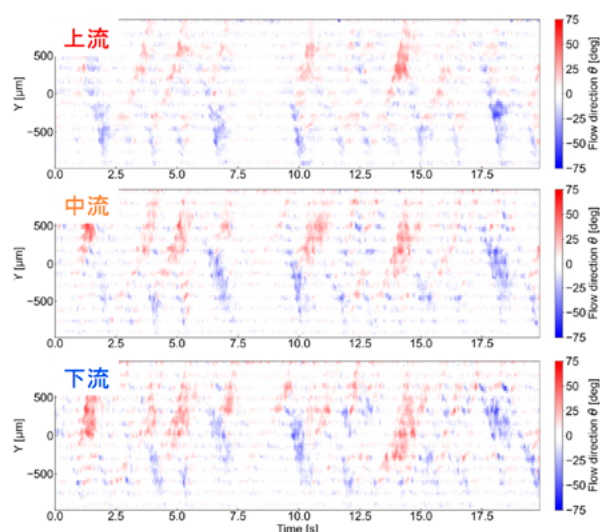


Fig. 13 上流・中流・下流において、流跡線の変化の様子に対して構造テンソル $\mathbf{J}$ を適用して取得した、流れの角度の時間発展の様子。

Fig. 13 より、流路スパン方向に対して特徴的な斜め方向の流動構造が間欠的に生じていること、そして、流路中の流れ方向に対する離れた位置においても角度の分布が非常に類似していることから、振動挙動そのものの同期、もしくは、非定常流動の中にコヒーレントな構造が存在していることが示唆される。

4. おわりに

本研究では、粘弾性流体の流動中における応力算出に向け、特に重要である粘度分布の計測手法の確立と、可視化計測に基づく3次元的速度分布の取得や、構造テンソルに基づいた角度算出手法の検討に取り組んできた。

まず、せん断粘度および伸張粘度の計測に関しては、この2つの粘度を計測する手法について、実施可能なことと課題について検討をすることができた。

可視化計測に関しては、粘弾性流体が障害物の周りで3次元的に非常に複雑な流動を示すことを明らかにできた。一方、流跡線の解析に基づく複数の障害物周りの流れにおいては、複雑な流動を示すものの、普遍的な流れの構造が存在することが示唆された。

当初の目的としていた時系列的な応力計測の達成には未だ至っていないが、研究を進める過程で、粘弾性流体の計測手法と、それに基づいた可視化において、現象面について非常に多くの知見を得ることができた。

5. 参考文献

[1] Haidekker, M. A., Akers, W., Lichlyter, D., Brady, T. P., and Thodorakis, E. A.; Sensing of flow and shear stress using fluorescent molecular rotors, *Sensor Letters*, **3**-1 (2005), 42–48.

[2] Miller, E., Clase, C., and Rothstein, J. P.; The effect of step-stretch parameters on capillary breakup extensional rheology (CaBER) measurements, *Rheological Acta*, **48**-6 (2009), 625–639.

[3] Dinic, J., Zhang, Y., Jimenes, L. N., and Sharma, V.; Extensional relaxation times of dilute, aqueous polymer solutions, *ACS Macro Letters*, **4**-7 (2015), 804–808.

[4] Ober, T. J., Haward, S. J., Pipe, C. J., Soulages, J., and McKinley, G. H.; Microfluidic extensional rheometry using a hyperbolic contraction geometry, *Rheological Acta*, **52**-6 (2013), 529–546.

[5] Ichikawa, Y. and Motosuke, M.; Viscoelastic flow behavior and formation of dead zone around triangle-shaped pillar array in microchannel, *Microfluidics and Nanofluidics*, **26**-44 (2022), 1–12.

[6] Ichikawa, Y., Yamamoto, K., and Masahiro, M.; Three-dimensional flow velocity and wall shear stress distribution measurement on a micropillar-arrayed surface using astigmatism PTV to understand the influence of microstructures on the flow field, *Microfluidics and Nanofluidics*, **22**-73 (2018), 1–9.

[7] Walkama, D. M., Waisbord, N., and Guasto, J. S.; Disorder suppresses chaos in viscoelastic flows, *Physical Review Letters*, 124-16 (2020), 164501.

6. 本研究にかかわる成果発表等

- Yoshiyasu Ichikawa and Masahiro Motosuke; Velocity-based analysis of mainstream direction effects on low-speed region formation and

- oscillation in dilute polymer solution around triangular pillars in microchannel, *Journal of Applied Physics*, **137** (2025), 144702.
- ・ 市川賀康; マイクロ流路内における微細構造周りの高分子流動の 3D 可視化, *日本機械学会熱工学部門ニュースレター*, No. 107, 2025 年 12 月号.
 - ・ Yoshiyasu Ichikawa and Masahiro Motosuke; Visualization of three-dimensional velocity field around a micropillar in dilute polymer-solution flow by astigmatism PTV, *The 78th Annual Meeting of the American Physical Society Division of Fluid Dynamics (APSDFD2025)*, Houston, TX, USA, November 2025.
 - ・ Syusuke Takizawa, Yoshiyasu Ichikawa, and Masahiro Motosuke; Periodic flow oscillation of semi-dilute polymer solution in microchannel with pillar arrays, *The 78th Annual Meeting of the American Physical Society Division of Fluid Dynamics (APSDFD2025)*, Houston, TX, USA, November 2025.
 - ・ Yoshiyasu Ichikawa, Junying Yang, Syusuke Takizawa, and Masahiro Motosuke; Can fluorescent molecular rotor detect the viscosity changes in non-Newtonian flows around microstructures in microchannels?, *2nd European Fluid Dynamics Conference (EFDC2)*, Dublin, Ireland, August 2025.
 - ・ Yoshiyasu Ichikawa; Complex flow behavior of viscoelastic fluids in microchannel, *2nd International Workshop for Interfacial Thermofluidics*, Tokyo, Japan, August 2025.
 - ・ Syusuke Takizawa, Yoshiyasu Ichikawa, and Masahiro Motosuke; Velocity-based analysis of oscillatory flow instability around pillar arrays in a polymer solution using μ PIV, *16th International Symposium on Particle Image Velocimetry (ISPIV2025)*, Tokyo, Japan, June 2025.
 - ・ Yoshiyasu Ichikawa, Junying Yang, and Masahiro Motosuke; Viscosity imaging by fluorescent molecular rotor for polymer-solution flow around microstructures, *The 77th Annual Meeting of the American Physical Society Division of Fluid Dynamics (APSDFD2024)*, Salt Lake City, UT, USA, November 2024.
 - ・ Yoshiyasu Ichikawa; Optical flow diagnostics and their practical use on small-scale complex flow behavior, *King's College London Engineering Seminar Series*, London, UK, August 2024.
 - ・ Yoshiyasu Ichikawa; Optical flow measurement on small-scale complex flow behavior, *International Workshop for Interfacial Thermofluidics*, Tokyo, Japan, April 2024.
 - ・ 市川賀康, 楊俊英, 滝沢脩介, 元祐昌廣; 蛍光分子ローターは果たして粘弾性流体の粘度変化を捉えられるのか?, *第 21 回学際領域における分子イメージングフォーラム*, 東京, 2025 年 12 月.
 - ・ 滝沢脩介, 市川賀康, 元祐昌廣; マイクロ流路内の構造物が高分子溶液の流動と圧力損失に与える影響, *第 27 回複雑流体研究会*, 愛知, 2024 年 11 月.
 - ・ 市川賀康, 元祐昌廣; 高分子溶液がマイクロピラー周りに形成する低速域の 3 次元流動, *日本流体力学会年会 2024*, 宮城, 2024 年 9 月.
 - ・ 滝沢脩介, 市川賀康, 元祐昌廣; 高分子溶液がマイクロ流路内に形成する低速域の流動と圧

力損失の評価，第 52 回可視化情報シンポジウム，沖縄，2024 年 7 月．

究開発助成の助成金により実施されたものである．ここに謝意を表する．

7. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の 2023 年度研

超高圧下熱量・圧力同時測定装置の開発

阿南工業高等専門学校 創造技術工学科 准教授 上田 康平

1. はじめに

高圧力は温度と並ぶ重要な熱力学変数であり、物質に対して圧力を印加することで結晶構造、分子間相互作用、相平衡などを大きく変化させることができる。そのため高圧下での熱分析は、相転移現象の理解や新規材料探索において重要な研究手段となっている。特に有機結晶、水素結合性液体、水和物、ガラスなどの研究では、高圧下での熱的挙動を把握することが不可欠である。

100 気圧程度までの圧力領域では、気体を圧力媒体とした高圧 DSC が市販されており、常圧測定とほぼ同等の品質の熱量データを取得できる。しかし、それ以上の圧力領域では液体や固体の圧力媒体を利用する必要がある、自作装置を用いた測定が為されてきたが、測定は著しく困難となる^[1]。圧力媒体を介した熱拡散や圧力制御に伴う温度変動が発生するため、感度やベースライン安定性が低下し、熱量の定量が容易ではない。また、相転移が発生した温度での実際の圧力を正確に決定することも困難である。

著者らはこれまで、ピストンシリンダ型クランプセルを利用した高圧熱分析装置の開発を進めてきた。この方式では、室温で加圧した後にセルを機械的に固定するため、測定中に圧力を動的制御する必要がなく、比較的安定した熱分析信号が得られる。一方で、試料や圧力媒体の熱収縮によって測定中の圧力が変化するため、熱異常発生時の圧力を決定できないという問題があった。また、相転移に伴う体積変化やアニール中に進行する状態変化については熱分析だけでは十分な情報が得られない。

そこで本研究では、試料内部に圧力センサーを組み込み、熱分析信号と圧力変化を同時に測定できる高圧熱分析装置を開発した。本手法では熱量と圧力を同時に測定することで、従来の高圧熱分析では困難であった相転移圧力の決定や体積変化の追跡を可能とすることを目指した。また、モデル試料を用いて装置性能を評価するとともに、高圧領域での課題についても検討した。

2. 熱量・圧力同時測定装置の開発

装置は二段式 GM 冷凍機を用いた低温測定システムであり、圧力セル全体を真空断熱空間内に設置した。二重の輻射シールドを設けることで外部からの熱流入を抑制し、広い温度範囲において安定した温度制御を可能とした。室温から 10 K までの温度範囲で安定した温度制御が可能である。

圧力セルにはピストンシリンダ型クランプセルを採用した。試料はテフロンセル内部に封入され、室温で所定圧力まで加圧した後に機械的に固定される。この構造により、測定中に外部ポンプを接続する必要がなく、圧力制御に伴うノイズや温度変動を避けることができる。Fig.1 に開発した装置のクランプセル及び内部の概略を示す。

試料温度測定には E 熱電対を用いた。熱電対は 3 対を直列につなぐことで感度を高めた。熱電対接点を試料内部に配置することで、試料の温度変化を直接測定した。また、圧力測定にはマンガン線を用いた抵抗式圧力ゲージを採用した。マンガン線は低温まで圧力係数の温度依存性が無視できるほど小さく、低温での圧力測定に広く用いられている材料である。本研究では四端子法に

よってマンガン線抵抗を測定し、あらかじめ取得した常圧での温度依存性と、室温での圧力係数を用いて圧力を求めた。

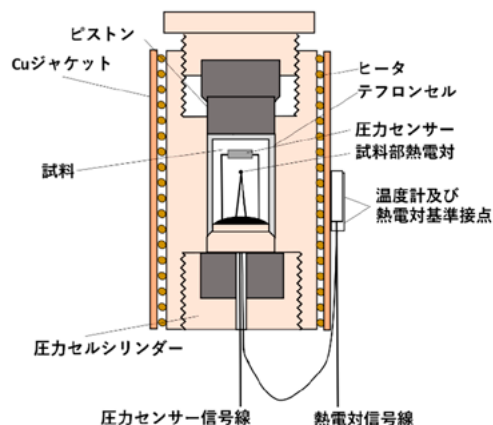


Fig. 1 熱量・圧力同時測定装置の概略図。クランプセルおよび試料空間の模式図を示す。

圧力センサーを試料内部に直接配置したことにより、試料が実際に受けている圧力をリアルタイムで測定できるようになった。この点が従来法との最大の違いである。従来のクランプセル型熱分析では、室温での印加圧力しか分からず、低温で相転移が発生した際の圧力は推定するしかなかった。本手法では熱異常が観測された温度における圧力を同時に取得できる。

さらに圧力変化は試料の体積変化を反映するため、熱分析では検出が困難な現象の観測も期待できる。例えばアニール中に進行する結晶成長や相分離は、熱流としては極めて小さいが、高密度の相への相転移では、圧力減少が生じ、低密度相への相転移では、圧力上昇が生じるなど、密度変化を伴う相転移を圧力変化として観測できる可能性がある。

3. モデル試料による性能評価

開発した装置の性能を評価するため、アルコール水溶液をモデル試料として測定を行った。アル

コール水溶液は、融解、結晶化、構造相転移、相分離など、異なる密度の相への変化が期待される。また、本試料は常圧において複数の熱異常を示し、高圧下での熱分析装置の評価試料として適している。本研究では熱量と圧力の同時測定が可能であることを検証することを主目的とした。

3.1. 3 kbar 印加試料の熱量・圧力同時測定

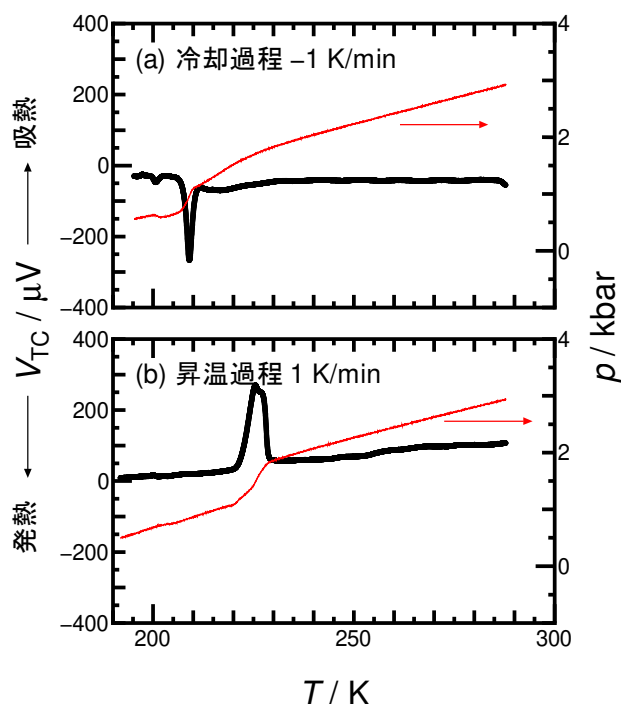


Fig. 2 3 kbar 印加試料の測定結果。(a) 冷却過程、(b) 昇温過程。左軸は熱電対起電力、右軸は試料空間内の圧力を示す。

Fig.2 に室温で 3 kbar まで圧力印加した試料の測定結果を示す。試料を室温から 1 K/min で冷却測定 (Fig. 2(a)) を行い、その後 1 K/min で昇温測定 (Fig 2(b)) を行った。

冷却過程では 218 K をピークとするブロードな発熱、209 K と 201 K のシャープな発熱と複数の発熱過程が観測された。従来の熱分析ではこれらの発熱反応のみが観測対象となるが、本研究では圧力変化も同時に測定しているため、それぞれの

熱異常に対して試料内部でどのような体積変化が起こっているかを追跡できる。実際に発熱ピークが観測された温度領域では圧力にも明瞭な変化が観測され、熱異常と圧力変化との対応関係を確認することができた。

熱異常が見られない領域でも、徐々に圧力が減少しているが、これは、試料そのものの熱収縮による効果である。一般に高压セルの材料である金属に比べ、有機物は熱膨張率が大きいので温度を下げると自然と内部の圧力が低下する。高压測定用の圧媒体として用いられるダフニオイル 7373 で室温から 4 K まで、約 1.5 kbar の圧力減少があることが報告されている^[2]。

特筆すべきは、218 K のブロードピークである。従来法ではこのようなブロードな現象に関して、温度制御の揺らぎに由来するのか試料由来であるかを判断するのは難しかった。しかし、本測定では、明確な圧力減少も同時に観測されており、温度制御の揺らぎではなく、試料に由来する現象であることが確認できた。圧力セルのような巨大な熱浴を正確に温度制御することは難しく、同時測定の利点が発揮された形である。

また、209 K と 201 K の熱異常はどちらもシャープだが、圧力変化の方向が異なる。209 K は圧力が減少しており、高密度相への転移、201 K は圧力が増加しており、低密度相への転移であることが示唆される。

昇温過程では吸熱ピークが観測された。圧力変化も同時に測定することで、その温度における圧力を決定することができた。クランプセル型測定では室温で加圧した圧力と低温での圧力は大きく異なるため、この情報は極めて重要である。

また、昇温終了後の圧力センサーは、測定開始時と同じ値を示した。このことは、用いた圧力センサーが熱操作によって不可逆な変形をしてい

ないことを示している。

従来のクランプセル型高压熱分析では、熱異常の存在は分かっても、その際にどのような体積変化が生じているかを知ることは困難であった。本研究で開発した装置では圧力情報を同時取得することで、熱分析だけでは得られない情報を取得できることが示された。つまり、吸熱発熱信号だけからそれぞれの起源を判断することは容易ではないが、圧力変化を同時に観察することで現象の識別に有用な情報が得られることが示された。

3.2. アニール過程の圧力変化

高压熱分析法の特徴を検証するため、試料を一定温度で長時間保持するアニール実験を行った。Fig. 3 にその結果を示す。アニール開始直後から圧力は連続的に変化し、その変化は数時間にわたって続いた。特に初期には比較的大きな圧力減少が観測され、その後緩やかな変化へと移行した。圧力減少は、高密度相の生成を示唆している。

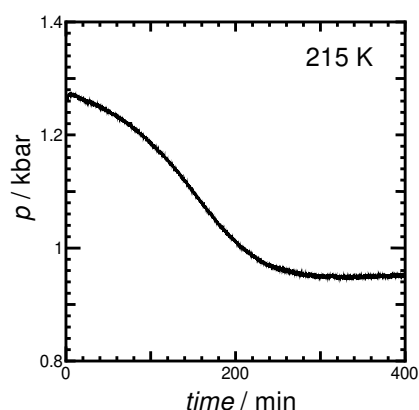


Fig. 3 アルコール水溶液試料の 215 K におけるアニール中の圧力変化。

この結果は、試料内部で長時間にわたる状態変化が進行していることを示している。一般的な DSC では一定温度で進行する現象の観測は容易ではない。例えば、等温下で進む、結晶成長や相分離のような現象は発熱量が小さい場合が多く、ベースラインとの区別が困難になる。実際本研究

でも、アニール中の吸熱・発熱は有意には観測されなかった。一方で本研究では圧力変化を利用することにより、等温条件下で進行する現象を追跡することができた。

さらに興味深い点として、圧力変化は数百分程度の長時間にわたって継続していた。このことは試料内部で進行する構造変化が想像以上に長い時間スケールを持つことを示している。熱量のみを測定する従来法では、このような情報を得ることは難しい。本研究で開発した熱量・圧力同時測定法は、アニール現象や緩和現象の研究において有力な手法となることが期待される。

申請時には、圧力変化を利用することでアニール中の状態変化を観測できる可能性を提案していた。本研究の結果は、その着想が実際に有効であることを示したものと考えられる。

3.3 相転移温度の圧力依存性の検討

室温で 5 kbar、7 kbar まで圧力印加した試料の測定を行った。3 kbar 測定と同様に、冷却および昇温過程において熱異常と圧力変化を同時に観測することができた。圧力が高くなることで昇温時の吸熱ピーク温度は、240 K、249 K と上昇した。

相転移温度の圧力依存性とクラウジウス・クラペイロンの式からは、転移エンタルピーや体積変化が逆算できる。従来法では、正確な圧力が分からないことから、クラウジウス・クラペイロンの式の適用に限界があったが、本研究では、熱異常が発生した温度だけでなく、そのときの圧力も正確に決定することができることから、クラウジウス・クラペイロンの式を用いた解析に有効であると考えられる。

4. 水試料への適用と高圧領域での課題

さらに装置の適用範囲を検証するため、水を対象に本手法による熱量・圧力同時測定を行った。常圧で得られる通常の氷は 1h 相と呼ばれ、高圧下

では密度の異なる様々な氷相が形成することが知られている^[3]。そのため、水は高圧測定系の評価に適した試料である。また結晶化や相転移に伴う体積変化が大きく、圧力センサーの評価にも有効であると考えた。

測定の結果、熱異常および圧力変化の観測そのものは可能であった。しかし測定終了後に常温へ戻した際、圧力ゲージ出力が同じ温度の測定開始の値に戻らない現象が観測された。興味深いことに、同様の現象は約 7 kbar 領域で測定を行ったアルコール水溶液の測定でも観測されている。

一方で、圧力センサーそのものは、室温で 20 kbar 程度までの圧力履歴に対して、異常を示さず、この問題は、試料の状態変化が圧力センサーへ不可逆的影響を与えたものと理解される。

氷結晶の成長に伴って局所的な応力が発生する。また結晶が圧力センサー表面に固着する可能性も考えられる。こうした影響によってマンガニン線に異方的応力が加わり、塑性変形あるいは不可逆なひずみが生じた結果として常圧時の抵抗値が変化した可能性がある。

本研究では原因の完全な解明には至らなかったものの、圧力センサーの異常が重要な課題であることを明らかにした。また、測定前後の抵抗値を比較することで圧力センサーの健全性を評価できることも確認された。

この結果は、今後さらに本測定の適用範囲を拡大するためには圧力センサー構造の改良が必要であることを示している。

5. 結論

本研究では、高圧下において熱量と圧力を同時測定できる熱分析装置を開発した。試料内部にマンガニン圧力ゲージを配置することで、熱異常と圧力変化を同時に取得することに成功した。

モデル試料による評価では、相転移に伴う熱異

常と圧力変化を同時観測できることを確認した。
またアニール中のような等温過程についても圧力変化を利用して追跡できることを示した。

さらに水試料への適用により、圧力ゲージに不可逆変化が生じる可能性があることを明らかにした。この結果は装置改良に向けた重要な知見である。

以上の結果から、本研究で開発した熱量・圧力同時測定法は、高圧下における相転移や構造変化の研究に有効な手法であり、今後の高圧熱分析技術の発展に寄与するものと期待される。特に、熱量と圧力を同時に取得できることは、従来法では得られなかった情報を与える点で重要である。

6. 参考文献

- [1] Atsushi Nagoe, Shinji Iwaki, Masaharu Oguni, and Ken-ichi Tôzaki; Pressure Dependence of the Liquid-Liquid Phase Transition of Nanopore Water Doped Slightly with Hydroxylamine, and a Phase Behavior

Predicted for Pure Water, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 83, (2014), 094601.

- [2] Keizo Murata, Harukazu Yoshino, Hari Om Yadav, Yoshiaki Honda, Naoki Shirakawa; Pt resistor thermometry and pressure calibration in a clamped pressure cell with the medium, Daphne 7373, *Rev. Sci. Instrum.*, 68, (1997), 2490-2493.
- [3] Aleks Reinhardt, Mandy Bethkenhagen, Federica Coppari, Marius Millot, Sebastien Hamel & Bingqing Cheng; Thermodynamics of high-pressure ice phases explored with atomistic simulations, *Nature Comm*, 13, (2022), 4707.

7. 謝辞

本研究は公益財団法人島津科学技術振興財団の研究開発助成によって実施されたものである。研究遂行にあたりご支援を賜った同財団に深く感謝申し上げます。

DNA 損傷の超高解像度解析による重粒子線治療の新論理体系構築

群馬大学重粒子線医学推進機構 教授 尾池 貴洋 *

1. はじめに

放射線治療は手術、薬物療法と並ぶがん治療の三本柱のひとつである。重粒子線（炭素イオン線）治療は炭素イオンを光速の 70%まで加速し照射する、先端的放射線治療である。本邦では 2016 年に保険収載され、適用が拡大中である。

本邦における炭素イオン線治療の計画は、HSG がん細胞株に由来する生物学的効果比(RBE)値を用いた臨床線量単位"Gy(RBE)"により規格化されている。しかし、実際の腫瘍は多彩な RBE を示すため、固定 RBE 値を用いる現行の線量処方方法は低 RBE 腫瘍に対する線量不足のリスクとなる。一方で、臨床腫瘍の RBE を分子生物学的あるいは画像学的に推定することは現実的にはハードルが高い。以上から、新たな視座に立った高精度殺細胞効果予測のための論理体系確立が喫緊の課題である。

臨床においては線量分布を症例固有の腫瘍形状にフィットさせるために多様な電離密度(linear energy transfer : LET)の炭素イオン線を混成させたビームが使用される。そのために、等しい臨床線量の照射を受けた症例間でも LET プロファイルは異なる。症例間の LET プロファイルの差異が抗腫瘍効果に影響する可能性はこれまでも指摘されてきたが、いまだ十分に検証されていない。

我々は 2013 年より炭素イオン線の強い殺細胞効果の機序を解明するための研究に取り組んできた。サブマイクロメートルの解像度をもつ超解像蛍光顕微鏡 DeltaVision OMX を用いて、炭素イオン線の強い殺細胞効果は大きく複雑な DNA 二

重鎖切断の集合体 (DSB クラスター)の誘導と、それに起因する高効率な分裂期破局の誘導によることを報告した^[1-3]。この知見から、様々な LET の炭素イオンビームにおける DSB クラスターの誘導確率および超解像体積と医学物理シミュレーションで計算される炭素イオンビームの LET プロファイルとを関連解析することで、臨床使用される混成 LET ビームの抗腫瘍効果を予測する新たな論理体系を作れるのではないかと着想した。

以上から、本研究は、炭素イオン線治療の抗腫瘍効果の高精度予測を目指し、LET と DSB クラスターから殺細胞効果を推定するモデルの確立を目的とした。

2. 方法

臨床使用される混成 LET 炭素イオンビームの主成分である 13~100 keV/ μm の単一 LET 炭素イオンビームを A549 細胞に照射し 30 分後に DSB 指標 γH2AX foci の蛍光免疫染色をおこなった。超解像蛍光顕微鏡 DeltaVision OMX を用いて γH2AX foci シグナルを取得し、画像解析ソフト Imaris を用いてシグナルを三次元再構成した。LET と γH2AX foci 体積の関係をガウス関数で近似した。GEANT4 を用いたモンテカルロ計算をおこない臨床使用される混成 LET 炭素イオンビームの LET プロファイルを算出した。上記条件における殺細胞効果をコロニー形成法で測定した。以上のデータを用いて臨床使用される混成 LET 炭素イオンビームにおける LET・ γH2AX foci 体積・殺細胞効果の関係性を検討した。

* (助成採択時) 群馬大学重粒子線医学推進機構 講師

3. 結果

各 LET 照射後に得られた γ H2AX foci 像を Fig.1 に示す。

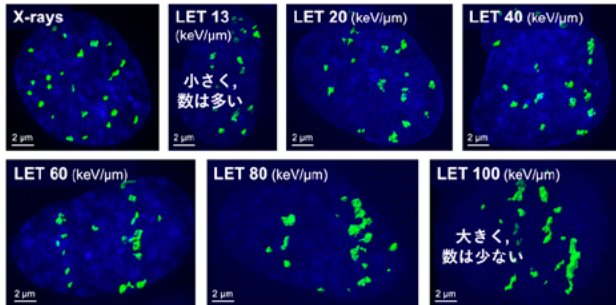


Fig. 1 炭素イオン線照射細胞における γ H2AX foci の超解像顕微鏡像

約 3000 個の foci 体積を取得し、1 細胞核に誘導された最大の foci の体積を v とし、その確率密度分布図をガウス関数に近似した。このガウス関数のパラメータである μ と σ をそれぞれ LET の一次関数として記述した。結果、1 細胞核に体積 v_{th} 以上の foci が誘導される確率 p を物理線量と LET の関数として記述し得た (Fig. 2)。

$$p = D \int_{v_{th}}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{(v - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) dv$$

v : γ H2AX foci 体積 (μm^3)
 p : γ H2AX foci 誘導確率
 D : 物理線量 (Gy)
 v_{th} : v の閾値
 μ (v の平均値) : $0.0158\text{LET} + 0.126$
 σ (v の標準偏差) : $0.00724\text{LET} + 0.0312$

Fig. 2 任意体積の foci の誘導確率を示す関数

群馬大学で使用する全ての幅 (3~12 cm) の拡大ブラッグピークの中心部における線量平均 LET をモンテカルロ計算で求め、同値を上記関数に代入し p を算出したところ、 p と殺細胞効果は $v_{th} = 0.7$ において高度 (全 LET にわたり差 3%未

満) に一致することを見出した (Fig. 3)。

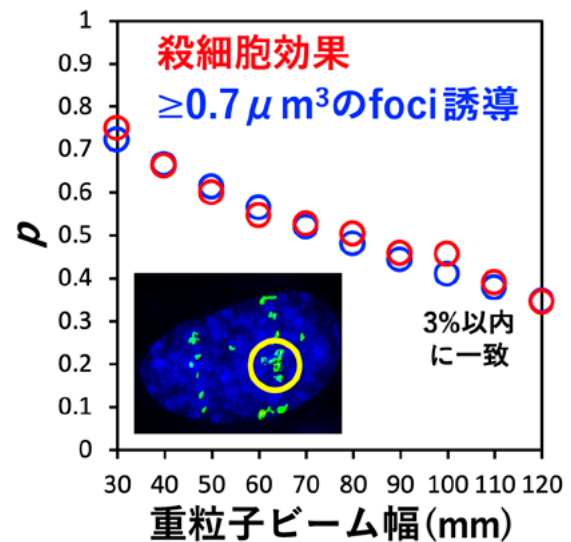


Fig. 3 臨床ビーム条件での炭素イオン線の殺細胞効果と、 $v_{th} = 0.7$ における p の高度な一致。黄色丸は体積がおおよそ $0.7\mu\text{m}^3$ の foci を示す。

4. 考察

本知見は、体積 $0.7\mu\text{m}^3$ の DSB クラスタは致死性であることを示唆する。すなわち、腫瘍中の任意点における抗腫瘍効果は同体積の DSB クラスタ誘導確率から推測可能であり、それは本研究で得られた関数により治療パラメータである物理線量ならびに LET から求めることが可能である。本研究成果を臨床導出するために、現在我々は治療計画アルゴリズムに導関数を実装し、治療計画画像上に p をカラーマップとして表示することを目指して研究を進めている。

5. 参考文献

- [1] Amornwichet N, Oike T, Shibata A, Ogiwara H, Tsuchiya N, Yamauchi M, Saitoh Y, Sekine R, Isono M, Yoshida Y, Ohno T, Kohno T, Nakano T. Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe. PLoS One. 2014 Dec 22;9(12):e115121.
- [2] Oike T, Niimi A, Okonogi N, Murata K,

Matsumura A, Noda SE, Kobayashi D, Iwanaga M, Tsuchida K, Kanai T, Ohno T, Shibata A, Nakano T. Visualization of complex DNA double-strand breaks in a tumor treated with carbon ion radiotherapy. Sci Rep. 2016 Mar 1;6:22275.

- [3] Kobayashi D, Oike T, Shibata A, Niimi A, Kubota Y, Sakai M, Amornwhichet N, Yoshimoto Y, Hagiwara Y, Kimura Y, Hirota Y, Sato H, Isono M, Yoshida Y, Kohno T, Ohno T, Nakano T. Mitotic catastrophe is a putative mechanism underlying the weak correlation between sensitivity to carbon ions and cisplatin. Sci Rep. 2017 Jan 16;7:40588. doi: 10.1038/srep40588.

6. その他成果発表等

- ・ Fuma Tsuji, Makoto Sakai, Takahiro Oike. Development and validation of an algorithm for predicting the antitumor effects of heavy ion beam therapy. The 5th International Conference on Radiological Physics and Technology 横浜市 2026 年 4 月 16 日.
- ・ Takahiro Oike. Writing the future of radiation oncology: How physician-scientists can transform practice and expand access. Indonesian Radiation Oncology Society 2025 Annual Meeting インドネシア共和国ジャカルタ 2025 年 12 月 14 日.
- ・ 坂本宗一郎, 尾池貴洋, 小林大二郎, 宮坂勇平, 酒井真理, 岡本雅彦, 柴慎太郎, 富澤建斗, 吉田英恵, 田代睦, 大野達也. 膵癌の重粒子線治療における線エネルギー付与分布と治療成績の関係について. 日本放射線腫瘍学会第 38 回学術大会 東京都千代田区 2025 年 11 月 20 日.
- ・ 弓崎晃, 久保亘輝, 尾池貴洋, 大西真弘, 川村英将, 田代睦, 大野達也. 前立腺癌に対する超寡分割重粒子線治療計画の実現可能性とロバストネスに関する研究. 日本放射線腫瘍学会第 38 回学術大会 東京都千代田区 2025 年 11 月 20 日.
- ・ 森康晶, 岡本雅彦, 宮坂勇平, 清原浩樹, 坂本宗一郎, 渋谷圭, 尾池貴洋, 入江大介, 大野達也. 大腸癌術後骨盤内再発に対する重粒子線治療成績の遡及的解析. 日本放射線腫瘍学会第 38 回学術大会 東京都千代田区 2025 年 11 月 20 日.
- ・ 尾池貴洋, 神戸峻輔, Narisa Dewi Maulany Darwis, 柴田淳史, 大野達也. 多層オミクス情報の付随するがん細胞放射線感受性データベースの構築と初期解析. 日本放射線腫瘍学会第 38 回学術大会 東京都千代田区 2025 年 11 月 20 日.
- ・ 富澤建斗, 尾池貴洋, 坂本宗一郎, 宮坂勇平, 平田秀成, 吉本由哉, 安藤謙, 大野達也. 子宮頸癌における MYC 増幅の放射線治療抵抗性バイオマーカーとしての意義. 日本放射線腫瘍学会第 38 回学術大会 東京都千代田区 2025 年 11 月 20 日.
- ・ 宮坂勇平, 岡本雅彦, 清原浩樹, 坂本宗一郎, 森康晶, 渋谷圭, 尾池貴洋, 大野達也. 切除困難な脂肪肉腫に対する重粒子線治療. 日本放射線腫瘍学会第 38 回学術大会 東京都千代田区 2025 年 11 月 20 日.
- ・ 劉恩恵, 尾池貴洋, 酒井真理, 田代睦, 大野達也. がん種特異的な細胞データを用いた炭素イオン線治療の腫瘍制御確率の推定. 日本放射線腫瘍学会第 38 回学術大会 東京都千代田区 2025 年 11 月 20 日.
- ・ Takahiro Oike, Kento Tomizawa, Soichiro Sakamoto, Yuhei Miyasaka, Hidenari Hirata,

- Yuya Yoshimoto, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino, Ken Ando, Atsushi Shibata, Tatsuya Ohno. A nested case-control study to analyze candidate predictive biomarker of radioresistance in cervical cancer. American Society for Radiation Oncology 2025 Annual Meeting 米国サンフランシスコ 2025 年 9 月 28 日.
- ・ Takahiro Oike. Establishing the clinical and biological basis for LET modulation in carbon ion radiotherapy. Radiation Research Society 71st Annual International Meeting プエルトリコ 2025 年 9 月 21 日.
 - ・ 尾池貴洋. 放射線生物学の基礎と発展. 第26回放射線腫瘍学夏季セミナー 富山県富山市 2025 年 8 月 2 日.
 - ・ Soichiro Sakamoto, Takahiro Oike, Daijiro Kobayashi, Yuhei Miyasaka, Makoto Sakai, Masahiko Okamoto, Shintaro Shiba, Kento Tomizawa, Hanae Yoshida, Mutsumi Tashiro, Tatsuya Ohno. Analysis of LET profiles and treatment outcomes of pancreatic cancer treated with carbon ion radiotherapy. 63rd Annual PTCOG Conference アルゼンチン・ブエノスアイレス 2025 年 6 月 2 日.
 - ・ Takahiro Oike. From bench to bedside: Fostering collaboration between the radiation oncology disciplines. 63rd Annual PTCOG Conference アルゼンチン・ブエノスアイレス 2025 年 6 月 2 日.
 - ・ 富澤建斗, 尾池貴洋, 坂本宗一郎, 宮坂勇平, 平田秀成, 吉本由哉, 安藤謙, 大野達也. 子宮頸癌の放射線抵抗性を予測するバイオマーカー候補としての MYC 遺伝子の増幅. 第62回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会・第53回放射線による制癌シンポジウム 東京都千代田区 2025 年 5 月 30 日.
 - ・ 尾池貴洋. がんと放射線、双方の高精度化を目指して. 第 62 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会・第 53 回放射線による制癌シンポジウム 東京都千代田区 2025 年 5 月 30 日.
 - ・ 堀込瑛介, 尾池貴洋, 安達彰子, 大野達也. 選択的 FGFR 阻害薬 LY2874455 による放射線増感. 日本量子医科学会第 4 回学術集会 千葉県千葉市 2024 年 12 月 6 日.
 - ・ 尾池貴洋. 絶対に書く！はじめての科学論文. 日本放射線腫瘍学会第37回学術大会 神奈川県横浜市 2024 年 11 月 21 日.
 - ・ Takahiro Oike, Sangeeta Kakoti, Makoto Sakai, Akihiko Matsumura, Tatsuya Ohno, Atsushi Shibata. Prediction of the cell killing effect of clinically-used mixed-LET carbon ions by clustered DSBs volumes using super-resolution microscopy. American Society for Radiation Oncology 2024 Annual Meeting 米国ワシントン D.C. 2024 年 9 月 29 日.
 - ・ Hikaru Okumura, Ryota Hayashi, Daiki Unami, Mayu Isono, Motohiro Yamauchi, Kensuke Otsuka, Takahiro Oike, Yuki Uchihara, Atsushi Shibata. MeCP2 deficiency leads to the γ H2AX nano foci expansion after ionizing radiation. The Eighth JCA-AACR Special Joint Conference 京都市 2024 年 6 月 28 日.
 - ・ 尾池貴洋, 吉本由哉, 大日方英, 吉川和宏, 大野達也. 子宮頸癌における血漿 Creatine Riboside 検出の概念実証研究. 第 65 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 鹿児島県鹿児島市 2024 年 7 月
 - ・ 熊澤琢也, 安藤謙, 尾池貴洋, 入江大介, 吉松幸彦, 野田真永, 村田和俊, 神沼拓也, 大野達

也。婦人科腫瘍原発オリゴリンパ節再発に対する救済治療としての重粒子線治療の有効性と安全性。第 65 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 鹿児島県鹿児島市 2024 年 7 月 14 日。

- ・ 尾池貴洋, 堀込瑛介, 佐藤浩央, 安達彰子, 大野達也。多層オミクス情報を付随するがん細胞株放射線感受性データベースの構築。第 61 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会 群馬県前橋市 2024 年 5 月 18 日。
- ・ 堀込瑛介, 尾池貴洋, 吉本由哉, 安藤謙, 大野達也。リバース TR による放射線増感標的の探索。第 61 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会 群馬県前橋市 2024 年 5 月 18 日。
- ・ Ruan Hanguang, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 安藤謙, 大野達也。Analysis of tumor mutational burden and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in patients with cervical cancer treated with definitive radiotherapy. 第 61 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会 群馬県前橋市 2024 年 5 月 18 日。
- ・ 関口慶仁, 吉本由哉, 尾池貴洋, 安藤謙, 大野達也。早期子宮頸癌の放射線治療抵抗性因子探

索を目的としたクリニカルシーケンスと基礎的検討。第 61 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会 群馬県前橋市 2024 年 5 月 18 日。

- ・ 今村文香, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 吉本由哉, 安藤謙, 大野達也。子宮頸癌・根治的放射線治療症例の治療前後ペア腫瘍組織検体における抗腫瘍免疫応答の比較検討。第 61 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会 群馬県前橋市 2024 年 5 月 18 日。
- ・ 岩永素太郎, 河村英将, 久保亘輝, 水上達治, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 大野達也, 中野隆史。去勢抵抗性, X 線抵抗性前立腺癌細胞における多層オミクス解析。第 61 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会 群馬県前橋市 2024 年 5 月 18 日。

7. 謝辞

本研究に助成を賜りました島津科学技術振興財団に深く御礼を申し上げます。今後とも、一人でも多くの患者様に最良の重粒子線治療をお届けすべく、研究に邁進する所存です。

脳へ埋込可能なプラズモン型化学センサによる神経ペプチド計測

産業技術総合研究所エレクトロニクス・製造領域 研究員 大下 雅昭 *

1. はじめに

社会的相互作用（例：闘争、繁殖）に関する脳機能の解明には、複数の実験動物の参加が必須であり、それらの動物の活動を制限しない脳神経活動のワイヤレス計測（Fig. 1(a)(b)）が不可欠である。特に複数の動物が参加する実験では、ワイヤを使用した場合互いに絡み合い、行動を阻害するため、ワイヤレス化は必須である^[1]。複数の動物が参加する実験では雌雄行動や攻撃行動などの社会活動とそれに関連した神経活動の同定が行われている。しかし、社会性に深く関連するオキシトシンなどの神経ペプチドをワイヤレスで計測する手法が確立されていないため、リアルタイムな社会的相互作用と神経ペプチドの動態を結びつける脳機能の解明には至っていない。

神経ペプチドを計測する方法として一般に微小透析法が知られているが、脳脊髄液を回収するための管を脳内に固定する必要があり、ワイヤレス化できない。また、Magnetic resonance spectrometry や陽電子放出断層撮影(Positron Emission Tomography, PET)でも神経ペプチドの計測は報告されているが、計測対象の位置を固定する必要があり、自由行動下における神経活動の計測には適さない。したがって、脳内物質濃度をワイヤレス計測する場合、計測装置を実験動物に搭載する必要があるため、適用可能な計測技術は電氣的にインピーダンスを計測し、目的とした化学物質の濃度に換算する電気化学測定法のみになる。しかし、電気化学測定法によって 5 ~ 15 pg/ml 程度の低濃度で生理活性をもつ神経ペプチドを生体内で計測できた例は存在しない。一方、

表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance, SPR)を利用したセンシング^[2]はセンサ表面近傍に検出領域を限定できるため、検出限界が 3 pg/ml の高感度計測が可能である。しかし、既存の技術では装置内部に嵩張るプリズムと外部に光検出器が必要であり脳内へのセンサの埋込が困難であった。

そこで金回折格子と半導体接合を用いてこれらの機能を神経プローブとして一体化する構造が考えられる（Fig. 1(c)）。具体的には、金表面に対象となる神経ペプチドを選択的に捕捉する膜を形成することで、対象の濃度変化を特異的に検出する。想定するセンサの断面構造を Fig. 1(e)に示す。

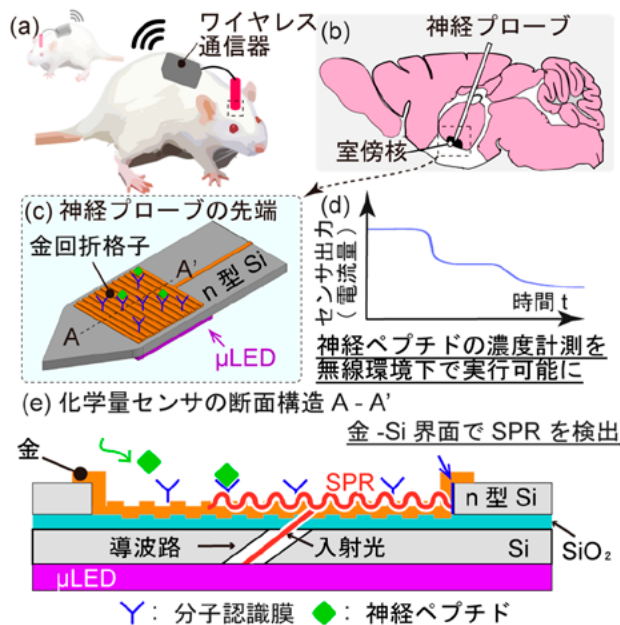


Fig. 1 本研究で提案する神経ペプチド計測システムの概念図

Fig. 1(e)の導波路はSPRの発生する入射角に傾いており、 μ LEDからの励起光が金表面を伝搬す

*（助成採択時） 電気通信大学大学院情報理工学研究科 助教

るモードの SPR と結合する。SPR は金と n 型 Si との界面部分まで伝搬し、その SPR の強度は界面部の半導体接合で電流値として計測できる。SPR は金表面の屈折率変化で発生する入射角を変えるため、対象の濃度が上昇すると屈折率に変化が生じ、出力電流値が低下する (Fig. 1(d))。この電流値の低下を計測することで、センサ表面の物質濃度を計測できる。

本研究では、神経プローブ先端への搭載が可能な SPR センサの実現に向け、その想定構造に基づく計測原理を検証した。提案構造は、導波路から伝搬型 SPR へ入射光を結合させる複合構造であり、これを一体で試作して評価することは容易ではない。そこで本研究では、まず SPR の励起と検出を担う金回折格子部に対象を限定し、原理検証を行った^[3]。

2. 金回折格子を用いた伝搬型 SPR 検出機構

金回折格子部は励起した伝搬型 SPR を金と Si との界面で電流検出する機能を持つ。この部分の原理検証のために、ガラス基板上に形成した金回折格子と、その近傍に配置された n 型シリコン片から構成されるデバイス (Fig. 2(a)) を試作した。デバイスが動作する詳細な原理について述べる。まず TM (transverse magnetic) 偏光の励起光を、ガラス側から入射角 θ で入射する。ガラス側から導入された励起光は回折格子により回折されるため、その回折格子表面に平行な波数成分は次式で表される：

$$k_0 \sqrt{\epsilon_{\text{air}}} \sin \theta + \frac{2m\pi}{\Lambda} \quad \text{Eq.(1)}$$

ここで、 θ は入射角、 k_0 は真空中における光の波数、 Λ は金回折格子の周期、 m は回折次数、 ϵ_{air} は空気の比誘電率を表す。一方、金回折格子上に比誘電率 ϵ_m を有する媒質が存在する場合の表面プラズモンの波数 k は、次式で与えられる：

$$k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_{\text{Au}} \epsilon_m}{\epsilon_{\text{Au}} + \epsilon_m}} \quad \text{Eq.(2)}$$

ここで、 ω は入射光の角周波数、 c は真空中の光速、 ϵ_{Au} は金の比誘電率を表す。

回折格子表面に平行な波数成分 Eq.(1) と表面プラズモンの波数 Eq.(2) が一致するとき、伝搬型表面プラズモンが励起され、励起光は金と試料との界面で吸収される。このとき、シリコン片は SPR 結合位置近傍に配置されているため、励起された表面プラズモンは伝搬し、Fig. 2(b) に示すようにシリコン側壁へ到達する。シリコン側壁には Au/n 型シリコン接合が形成されており、ショットキー障壁 (高さ Φ_B) が形成されている。この界面のバンド構造を Fig. 2(c) に示す。伝搬表面プラズモンは減衰過程において、シリコン側壁に形成された金薄膜中の電子を励起する。エネルギーを得た電子の一部はショットキー障壁を越えてシリコンへ注入され、表面プラズモン強度に依存した光電流 I_{ph} として検出される。

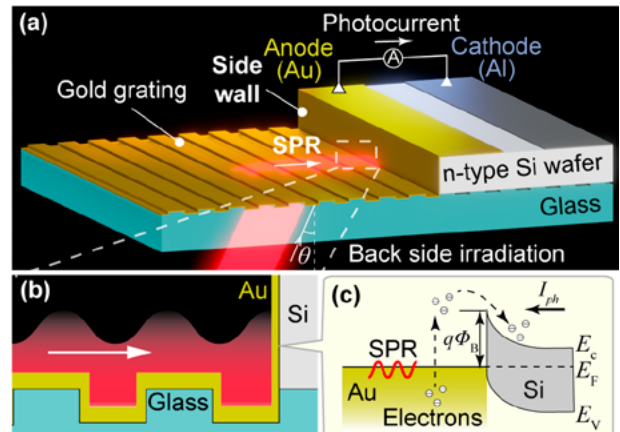


Fig. 2 伝搬型表面プラズモン検出機構の原理検証用デバイス

さらに、金回折格子に存在する試料の比誘電率の変化は、表面プラズモンの結合条件、すなわち共鳴入射角 θ を変化させる。このため、励起光の入射角を一定に保った状態で光電流をモニタすることで、誘電率変化に応じた光電流の変化が得

られる。したがって、本デバイスでは光電流の変化を観測することにより、試料の誘電率変化を電気信号として読み出すことが可能となる。

3. デバイスの製作と基礎特性計測

本研究の伝搬型 SPR 検出原理を実験的に確認するため、デバイスの試作を行った。まずガラスウエハ上にフォトリソグラフィを行い、フッ酸蒸気によりガラスをエッチングすることで一次元回折格子を形成した。回折格子はピッチ $3.20\ \mu\text{m}$ の周期構造で、原子間力顕微鏡による評価の結果、溝の深さは約 $60\ \text{nm}$ であった。続いて、 n 型シリコン片をガラス基板上に固定し、回折格子表面およびシリコン側壁を覆うように金薄膜を斜め蒸着により成膜した。この工程により、回折格子部と側壁部が電氣的に連続した金薄膜で構成されるとともに、シリコン側壁においては Au/n 型 Si のショットキー接合が形成される構造とした。まず、デバイスの基本的な電氣的特性を確認するため、金薄膜とシリコン電極間の電流-電圧特性を測定した。その結果、整流特性が確認され、ショットキー接合が形成されていることが確認された。

次に試作したデバイス上で SPR が発生しうるか検証するために Fig. 3(a) に示す反射率測定系を構築した。Fig. 3(a) に示す通りデバイスを回転ステージ上に設置し、金回折格子に対して励起光を照射した。デバイス上の回折格子溝はステージの回転軸と平行に配置した。光源には波長可変光源（スーパーコンティニューム光源 SC-450, Fianium 社製）を用いた。回転ステージにより入射角を 5° から 30° の範囲で反射光強度を取得した。表面プラズモンの分散特性を調べるため、 $1100\ \text{nm}$ から $1300\ \text{nm}$ まで $50\ \text{nm}$ 間隔で複数の波長を用いて測定を行った。得られた各角度の反射率を Fig. 3(c)-(g) の青線で示す。すべての波長

において、Fig. 3(c)-(g) に示すようにディップが確認された。Fig. 3(b) には、Fig. 3(c)-(g) から抽出した各波長におけるディップ角（青点）と、Eq.(1) および Eq.(2) に基づいて計算した理論的な表面プラズモン励起角（実線）を示す。

Fig. 3(b) より、回折次数 $m = +2$ に対応するディップ角は、波長の増加に伴い減少する傾向を示し、理論曲線と整合する結果が得られた。また、 $m = -4$ に対応するディップについては、波長の増加に伴いディップ角が増加する傾向が観測された。一方で、理論計算では $m = -3$ に対応する表面プラズモン励起が約 5° から 15° の範囲で存在すると予測されるにもかかわらず、実験結果 (Fig. 3(c)~(g)) には対応するディップは観測されなかった。

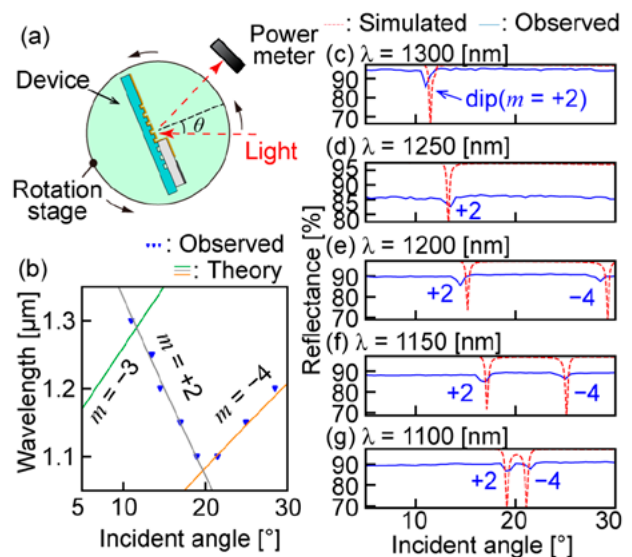


Fig. 3 試作したデバイス上での各角度における反射率測定

このディップが消失した要因を検討するため、AFM から得られた回折格子寸法を用いて厳密結合波解析 (rigorous coupled wave analysis, RCWA) ソフトウェア (DiffractionMOD, RSoft 社) による数値計算を行った。回折格子の実寸よりフィルファクタは 0.28 とした。計算結果を Fig. 3(c)~(g) に

赤破線で示す。RCWA 計算においては、回折次数 $m = +2$ および -4 に対応するディップが確認された一方、 $m = -3$ に対応する表面プラズモン結合は抑制される結果となった。以上より、作製したデバイスにおいて SPR が励起されていることが確認された。

4. 光電流測定および溶液中評価

本デバイスは、ガラス基板側から入射した励起光により励起された伝搬型表面プラズモンを、シリコン片側壁に形成されたショットキー障壁において光電流として検出する構成を有する。この動作は、Fig. 4(a)に示す光電流測定により検証した。励起光は金回折格子と反対側であるガラス基板背面から入射させた。光電流は入射角 5° から 30° までは 0.2° 刻みで測定した。

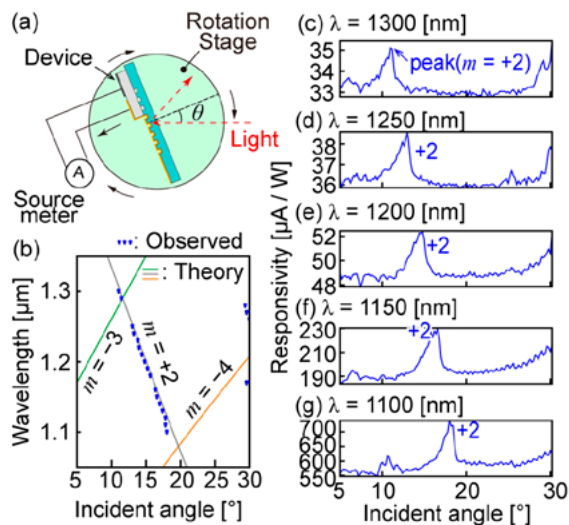


Fig. 4 光電流による表面プラズモン検出

測定結果を Fig. 4(c)～(g)に示す。

すべての波長において明瞭なピークが観測され、そのピーク位置は波長に応じて系統的に変化した。Eq.(1)および Eq.(2)に基づく計算から、これらのピークは回折次数 $m = +2$ に対応することが確認された(Fig. 4(b))。一方で、理論的には存在が予測される回折次数 $m = -3$ および $m = -4$

に対応するピークは、Fig. 4(c)～(g)の実験結果には観測されなかった。 $m = -3$ に対応するピークの消失は、反射特性評価で議論した回折格子のフィルファクタに起因すると考えられる。一方、 $m = -4$ に対応するピークの消失は、表面プラズモンの伝搬方向が回折次数に依存することに起因することが示唆された。

ただし、本研究の主眼は提案構造における表面プラズモン電流検出の実証であり、回折次数 $m = +2$ において理論と一致する結果が得られていることから、本デバイスにより背面照射構造において励起された伝搬型表面プラズモンを、シリコン側壁において電流として検出可能であることが示された。

5. 参考文献

- [1] S. M. Won, L. Cai, P. Gutruf, and J. A. Rogers, Wireless and battery-free technologies for neuroengineering, Nat. Biomed. Eng, Vol. 7 - 4, (2023) 405–423.
- [2] M. L. Yola, N. Atar, and A. Erdem, Oxytocin imprinted polymer based surface plasmon resonance sensor and its application to milk sample, Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 221, (2015), 842–848.
- [3] M. Oshita, S. Suzuki, K. Masamoto, T. Kan; Detection of backside coupled propagating surface plasmon resonance on the sidewall of a wafer, AIP Advances, Vol 13 - 11, (2023), 115325.

6. その他成果発表等

- M. Oshita, S. Suzuki, K. Masamoto, T. Kan, Noise Characteristics of Backside Coupled Propagating Surface Plasmon Resonance with Wafer Side Detection, The 11th Asia-Pacific

Conference of Transducers and Micro-Nano
Technology (APCOT2024), Singapore, 2024 年
6 月 23 日.

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りま
した公益財団法人 島津科学技術振興財団に深
くお礼申し上げます。

1 細胞質量分析イメージングによる疾患組織の可視化

大阪大学大学院理学研究科 准教授 大塚 洋一

1. 質量分析イメージングによる組織の可視化

我々の体の基本単位である細胞では、細胞内小器官や高密度の分子集合体が存在し、生命活動に必要な代謝反応が高効率に進行する。細胞がネットワーク化した組織に含まれる、多彩な化学情報の一斉分析技術は、生命科学分野の基礎理解と医用応用の両面で重要である。脂質は、エネルギーの蓄積や生理活性脂質など、生命活動において重要な役割を果たすが、分子種に特異的な染色が困難である。病理学的な染色法や振動分光法を用いる観察では組織中の脂質の種類と分布を十分に捉えることが出来ない課題があり、新たな計測技術への挑戦が求められている。

質量分析イメージング (mass spectrometry imaging, MSI) は、生体組織や細胞に含まれる分子群の分布を可視化することを可能にする (Fig. 1)。MSI では、生体組織の微小領域に含まれる成分を抽出し、イオン化する。イオン化された分子の質量分析を行うことでマススペクトルを取得する。マススペクトルには、複数のイオンの m/z と、それらの信号強度の情報が含まれる。イオン化を行う領域を、試料表面に対して二次元方向に走査しながら同様の計測を繰り返すことで、位置情報が紐付けられた多数のマススペクトルが得られる。特定の成分に由来するイオンの信号強度を、試料の座標情報と結びつけることで、成分分布をイオン像として可視化することができる。

MSI は、質量情報に基づいて分子を特定すると共に、それらの分布情報を取得することができるため、生体組織を構成する細胞ネットワークの変容を理解するための有力な手法として注目され

ている。

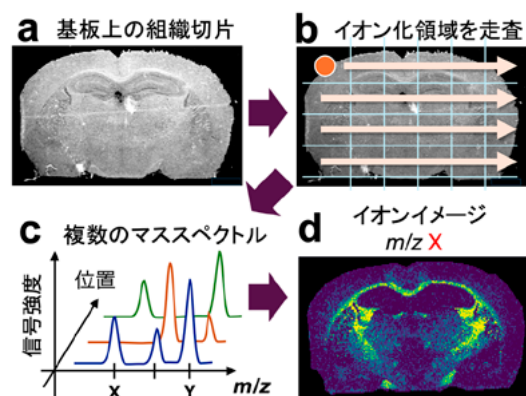


Fig. 1 質量分析イメージング (MSI) の概要図。

2. 抽出—イオン化法「t-SPESI」の開発

著者はこれまでに、独自技術であるタッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (tapping-mode scanning probe electrospray ionization, t-SPESI) の開発と、疾患組織や細胞の MSI への応用に取り組んできた^[1-6]。

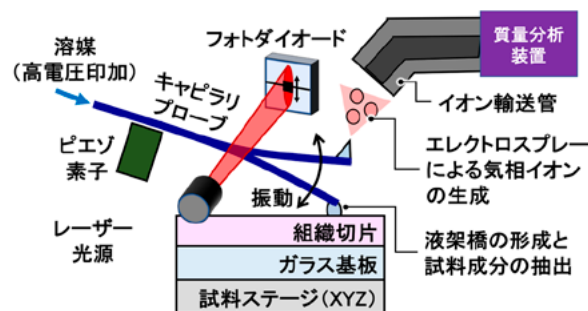


Fig. 2 タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (t-SPESI) の模式図。

t-SPESI は、先端開口径がマイクロメートルスケールのキャピラリープローブを用いて、試料表面の微小領域に微量の溶媒を供給し、局所的な抽出と試料成分のイオン化を高速に行う技術である

(Fig. 2)。

キャピラリープローブを上下方向に振動させながら、プローブ内に一定の流量で溶媒を流す。試料表面にプローブ先端を断続的に接触させると、両者の間に溶媒の架橋（液架橋）が形成され、溶媒に試料成分が抽出される。その後、試料からプローブ先端が離れる過程で、エレクトロスプレーが生じる。

試料成分が溶解した溶液に高電圧を印加することで、直径がマイクロメートルスケールの帯電した液滴を生成する。大気圧環境において、帯電液滴の溶媒が蒸発するにつれて、液滴のサイズが微細化し、最終的に液滴中に溶解した分子に電荷が与えられ、気相イオンが生じる。

t-SPESI では、試料の微小領域に含まれる成分の抽出とイオン化を繰り返しながら、試料表面をプローブ先端が走査することにより、MSI を実施することができる。

MSI の条件として、10 nL/min の送液速度で、プローブの振動周波数が 600 Hz の条件では、1 回の抽出・イオン化において、約 280 fL の溶媒が消費されると見積もられる。このような極微量の溶媒を用いて、微小領域の成分抽出とイオン化を行うことは、他の方法では困難であり、t-SPESI の特徴の一つである。

3. 1細胞質量分析イメージングシステムの開発

本研究では、生体組織に含まれる細胞の成分分布を可視化する、1細胞 MSI 計測システムの開発と疾患組織への応用を目的とした。

1細胞 MSI に適した計測系を構築するために、小型の倒立型顕微鏡が組み込まれた t-SPESI-MSI システムを開発した (Fig. 3)。本システムでは、試料ステージを上下から挟むように、t-SPESI ユニットと倒立型顕微鏡が配置される。

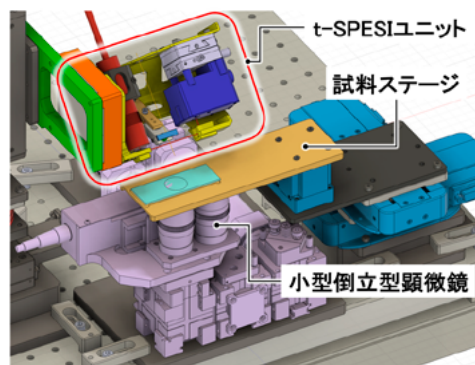


Fig. 3 新型 t-SPESI-MSI システムの模式図。

t-SPESI ユニットには、レーザー光源、ピエゾアクチュエータ、フォトダイオード、ミラーなどが搭載される。ピエゾアクチュエータに固定されたプローブの側方からレーザー光を照射し、プローブの影の位置の変化をフォトダイオードで検出する。プローブの変位情報をロックインアンプに入力し、振動振幅をリアルタイムに計測する。

さらに、振動振幅が設定値を満たすように、ユニット全体の高さをピエゾステージで自動的に制御する。このフィードバック制御によって、試料表面の高さのわずかな変化があっても、振動振幅が一定の範囲内に維持され、抽出・イオン化条件をできるだけ一定に保ちながらプローブ走査を行うことができるようになった。

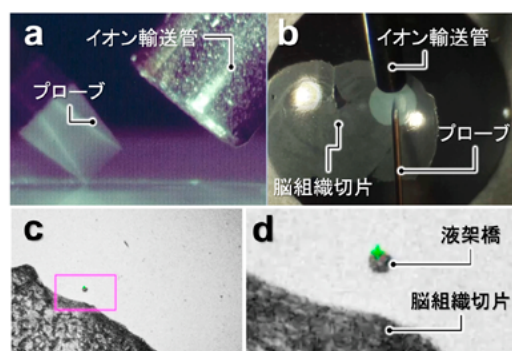


Fig. 4 (a)プローブの側方からの観察の様子。(b)プローブの上方からの観察の様子。(c)試料の裏面からの観察の様子。(d)液架橋と生体組織の拡大図。

新システムでは、プローブの側方と上方からのカメラによる観察に加えて、試料の裏面から、ガラス上の試料とプローブ先端に形成される液架橋を直接観察できるようになった (Fig. 4)。従来の計測システムでは困難であった、生体組織の位置を高精度に特定した上で、抽出領域を確認しながら MSI を実施することが可能になった。

4. 疾患組織の 1 細胞質量分析イメージング

新たに開発した計測システムを用いて、疾患モデルマウスの網膜組織や心臓組織の 1 細胞 MSI を実施した。これらの詳細は、論文執筆中^[7,8]のため概要を述べる。

第 1 に、網膜組織は、複数の細胞層が秩序だてて配置された高度な層構造を持つ神経組織であり、各層の細胞が視機能を担う。視細胞外節や網膜色素上皮における脂質代謝の恒常性の破綻は、網膜変性や視機能障害と密接に関係する。網膜のそれぞれの層は数十～数百マイクロメートル程度と薄く、層ごとの成分分布を直接的に捉えるには、高精細 MSI が必要となる。

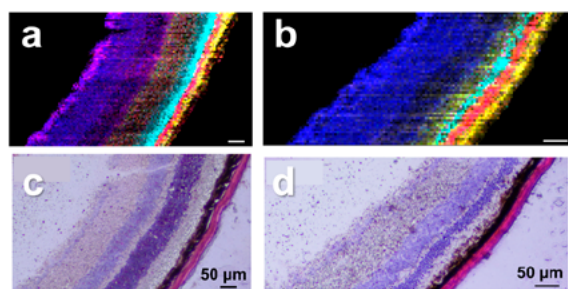


Fig. 5 (a)野生型マウスおよび (b)疾患モデルマウスの網膜組織のイオン像。5 種類のリン脂質のイオン像を重ね合わせた結果を示す。(c)野生型マウスおよび(d)疾患モデルマウスの H/E 染色組織像。

本研究では、脂質代謝酵素の一種である LPLAT8 を欠損した KO マウスと WT マウスを用いて、網膜を構成する細胞層の脂質分布を比較

した。Fig.5 (a,b)にイオン像の比較を示す。イオン像はピクセルサイズ 5 μm で取得した。ここでは 5 種類のリン脂質のイオン像を重ね合わせた結果を示す。また、MSI を実施した後に、同一の組織切片をヘマトキシリン・エオジン (H/E) 染色を施し、光学顕微鏡による観察を行った (Fig. 5(c,d))。

染色組織像において、網膜の層構造が明瞭に確認され、t-SPESI による MSI を実施した後も組織の極端な欠損が生じないことが確認された。イオン像においては、脂質の種類によって層ごとの信号強度が変化することが見いだされた。

複数のリン脂質のイオン像を比較した結果、KO マウスの各々の層の脂質分布が、WT マウスとは異なることを見いだした。LPLAT8 の欠損に伴う、層構造に特異的な脂質代謝異常を可視化できたことで、視機能障害の分子機序を理解するための新たな情報が得られた。

第 2 に、拡張型心筋症は、左室収縮機能の低下と左室内腔の拡張を特徴とする難治性心筋疾患である。その診断は主として除外診断に基づいて行われているが、背景にある分子病態は不均一であると考えられている。したがって、拡張型心筋症の病態をより詳細に理解し、個別化医療の開発へつなげるためには、心臓組織の空間分子情報を取得することが重要である。

ミトコンドリア心筋症モデルマウスの心臓組織の MSI をピクセルサイズ 10 μm で取得した (Fig. 6)。線維化領域に分布する脂質 (スフィンゴミエリン) や、心臓組織の全体に広く分布する脂質 (ジアシルグリセロール) に加えて、局在するアシルカルニチンを明瞭に可視化することに成功した。

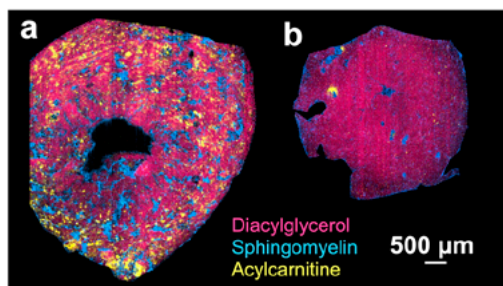


Fig. 6 (a)拡張型心筋症モデルマウスおよび(b)野生型マウスのイオン像の比較。ジアシルグリセロール、スフィンゴミエリン、アシルカルニチンのイオン像を重ね合わせた結果を示す。

心臓の収縮のためのエネルギーはアデノシン三リン酸（ATP）であり、心筋細胞では、ミトコンドリアにおける脂肪酸 β 酸化によって ATP が産生される。このプロセスにおける中間代謝物としてアシルカルニチンが利用される。

本結果は、心筋症における細胞の代謝異常の空間的特徴を、t-SPESI による 1 細胞 MSI により詳細に捉えることで、病態解明や治療法の開発のための多次元化学分布情報が獲得できる可能性を提示した。

5. まとめと展望

本研究では、1 細胞質量分析イメージングシステムの開発と、疾患組織における脂質分布情報の可視化に取り組んだ。装置構成の改良により、高精細なイオン像を取得できるようになった。本研究で得られた成果は、国内外の学会発表と論文投稿を行った。今後は、ヒトやマウスの疾患組織における病態関連分子の探索や、疾患機構の解明への応用展開を目指す。

6. 参考文献

[1] Yoichi Otsuka, Sayuri Shide, Junpei Naito, Masafumi Kyogaku, Hiroyuki Hashimoto, Ryuichi Arakawa; Scanning probe electrospray ionization for ambient mass spectrometry,

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 26, (2012), 2725-2732.

- [2] Yoichi Otsuka, Junpei Naito, Shuya Satoh, Masafumi Kyogaku, Hiroyuki Hashimoto, Ryuichi Arakawa; Imaging mass spectrometry of a mouse brain by tapping-mode scanning probe electrospray ionization, *Analyst*, 139, (2014), 2336-2341.
- [3] Yoichi Otsuka, Shuya Satoh, Junpei Naito, Masafumi Kyogaku, Hiroyuki Hashimoto; Visualization of cancer-related chemical components in mouse pancreas tissue by tapping-mode scanning probe electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 50, (2015), 1157-1162.
- [4] Yoichi Otsuka, Bui Kamihoriuchi, Aya Takeuchi, Futoshi Iwata, Sara Tortorella, Takuya Matsumoto; High-spatial-resolution multimodal imaging by tapping-mode scanning probe electrospray ionization with feedback control, *Analytical Chemistry*, 93, (2021), 2263-2272.
- [5] Yoichi Otsuka, Kazuya Kabayama, Ayane Miura, Masatomo Takahashi, Kosuke Hata, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Koichi Fukase, Michisato Toyoda; Single-Cell Mass Spectrometry Imaging of Lipids in HeLa Cells via Tapping-Mode Scanning Probe Electrospray Ionization, *Communications Chemistry*, 8, (2025), 147.
- [6] Yoichi Otsuka; Advances in tapping-mode scanning probe electrospray ionization (t-SPESI): Instrumental development for high-spatial-resolution ambient mass spectrometry imaging, *International Journal of Mass*

Spectrometry, 521, (2026), 117569.

[7] M. Sun, Y. Otsuka, H. Shindou, K. Nagata and M. Toyoda, in preparation.

[8] Y. Otsuka, T. Yasuda, H. Kioka, S. Shimma, T. Ohtani and Y. Sakata, in preparation.

7. その他成果発表等

- ・ (招待講演) 大塚洋一, High-Spatial-Resolution Mass Spectrometry Imaging of Phospholipids in Biosynthesis-Impaired Mouse Tissues via Tapping-Mode Scanning Probe Electrospray Ionization, 2nd Annual Conference on Mass Spectrometry Imaging and Integrated Topics (IMSIS 2024), Münster university, 2024/9/12.
- ・ (招待講演) 大塚洋一, 迅速抽出ーイオン化法「t-SPEI」の開発と生体組織・細胞の質量分析イメージングへの展開, 第 18 回メタボロームシンポジウム, 鶴岡メタボロームキャンパス, 2024/10/23.
- ・ (招待講演) 大塚洋一, 直接抽出ーイオン化法「t-SPEI」の開発と疾患組織の脂質イメージングへの展開, 第 97 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜ノース, 2024/11/8.
- ・ (招待講演) 大塚洋一, 技術融合による大気圧サンプリングイオン化法の開発と質量分析イメージングへの応用, 第 86 回イオン反応研究会, 大阪公立大学 杉本キャンパス, 2024/11/12.
- ・ (招待講演) 大塚洋一, Development of tapping-mode scanning probe electrospray ionization for mass spectrometry imaging of tissues and cells, Japanese-German Research Symposium, Advancement and Application of Methods for Proteoform-Centric Proteomics, Kyoto International Community House,

2024/11/17.

- ・ (受賞) 孫夢沢, 第 56 回応用物理学会講演奨励賞, 第 71 回応用物理学会春季学術講演会, Mass Spectrometry Imaging of Mouse Retina by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization (t-SPEI), 2024/9/17. 関連発表者: 孫夢沢、大塚洋一、長田克之、岡田茉樹、進藤英雄、豊田岐聡.
- ・ Yoichi Otsuka, Maki Okada, Tomomi Hashidate-Yoshida, Katsuyuki Nagata, Makoto Yamada, Motohito Goto, Mengze Sun, Hideo Shindou, Michisato Toyoda, High-Spatial-Resolution Mass Spectrometry Imaging of Phospholipids in Biosynthesis-Impaired Mouse Testis via Tapping-Mode Scanning Probe Electrospray Ionization, 72nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, ポスター発表, Anaheim Convention Center, USA, 2024/6/4.
- ・ Mengze Sun, Yoichi Otsuka, Katsuyuki Nagata, Hideo Shindou, Akiyoshi Hirayama, Michisato Toyoda, Mass Spectrometry Imaging of LPLAT8 Knockout Mouse Retina by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, 第 72 回質量分析総合討論会, ポスター発表, つくば国際会議場, 2024/6/11.
- ・ 大塚洋一、新聞秀一、木岡秀隆、大谷朋仁、坂田泰史, タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法によるヒト拡張型心筋症組織の質量分析イメージング, 第 72 回質量分析総合討論会, 口頭発表, つくば国際会議場, 2024/6/12.
- ・ Yoichi Otsuka, Kazuya Kabayama, Ayane Miura, Masatomo Takahashi, Kosuke Hata, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Koichi Fukase,

Michisato Toyoda, Mass Spectrometry Imaging of a Single HeLa Cell by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, International Mass Spectrometry Conference 2024, 口頭発表, MELBOURNE CONVENTION AND EXHIBITION CENTRE, AUSTRALIA, 2024/8/20.

- ・ Mengze Sun, Yoichi Otsuka, Katsuyuki Nagata, Hideo Shindou, Akiyoshi Hirayama, Michisato Toyoda, Mass Spectrometry Imaging of LPLAT8 Knockout Mouse Retina by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, International Mass Spectrometry Conference 2024, 口頭発表, MELBOURNE CONVENTION AND EXHIBITION CENTRE, AUSTRALIA, 2024/8/22.

- ・ 大塚洋一、新聞秀一、木岡秀隆、大谷朋仁、坂田泰史, タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法を用いたヒト心臓

疾患組織の質量分析イメージング, 第 85 回応用物理学会秋期学術講演会, 口頭発表, 朱鷺メッセ, 2024/9/18.

- ・ Mengze Sun, Yoichi Otsuka, Maki Okada, Katsuyuki Nagata, Hideo Shindou, Michisato Toyoda, High-Spatial-Resolution Mass Spectrometry Imaging of Mouse Retina by Improved Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, 第 85 回応用物理学会秋期学術講演会, 口頭発表, 朱鷺メッセ, 2024/9/18.

8. 謝辞

本研究は、公益財団法人島津科学技術振興財団の助成金による支援を受けて実施された。ここに深く感謝申し上げます。あわせて、試料提供、装置開発、測定、解析にご協力いただいた共同研究者、研究室メンバー、関係各位に感謝申し上げます。

α 線のリアルタイム検出を目指した α 線-光検出器の開発

千葉大学大学院薬学研究院 助教 甘中 健登

1. はじめに

近年、核医学分野において高 LET (linear energy transfer: 線エネルギー付与) 放射線である α 線を放出する核種で標識した薬剤 (α 線放出核種標識薬剤) を用いて治療を行う“標的 α 線治療”が注目されている^[1]。特に、 α 線放出核種であるアクチニウム-225 (^{225}Ac) で標識された前立腺が標的薬剤 (^{225}Ac -PSMA) による治療は、 β -線放出核種標識薬剤による治療が奏功しなかった事例に対しても強力な治療効果が実証されており^[2]、それを契機に α 線放出核種標識薬剤の開発研究が盛んに行われている。

一般的に放射性薬剤は飛程の長い γ 線や X 線を放射線検出器で検出するが、 α 線は極端に飛程が短いと直接検出することは困難であり、実際は崩壊系列内で放出される α 線以外の飛程の長い放射線を代替的に検出する手法や、 α 線を光変換して検出するシンチレーション法、感光作用を利用したオートラジオグラフィ法が用いられている^[3, 4]。これらの検出法では、放射性崩壊が定常状態になるまでの待機時間や、シンチレータやイメージングプレートを α 線源にコンタクトさせる煩雑な作業が必要となるため、迅速性と利便性に課題がある。そのため、 α 線を簡便にリアルタイムで検出できれば、 α 線放出核種標識薬剤の製造や分析の過程で非常に有用なツールになり得ると考えられる。これに対し我々は、有機合成化学実験で汎用される蛍光指示薬であるマンガン活性化ケイ酸亜鉛 ($\text{Mn-doped Zn}_2\text{SiO}_4$: F_{254}) を含有した薄層クロマトグラフィー (TLC; thin-layer chromatography) プレートに付した α 線放

出核種標識薬剤を、高感度カメラにより検出できることを発見し、 α 線を簡便に光として捉えられることを見出した (Fig. 1)^[5, 6]。特筆すべきことは、本成果は汎用されるプラスチックシンチレータ (PS) を用いた場合よりも光強度が高く、検出効率に優れていることである。そこで本研究では、 F_{254} を軸とした α 線の光検出技術を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 等の分離-分析機器に接続可能なフローセル型の α 線-光検出器開発に展開することを最終目標に、 α 線の簡便かつリアルタイム検出の達成に向けた基礎的検討を行った。

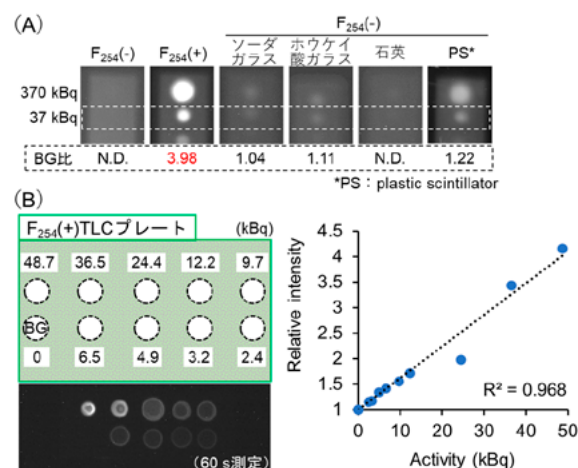


Fig. 1 α 線の発光検出画像。(A) F_{254} の有無や種々のガラス板、PSの設置により発光強度が異なる。(B) $\text{F}_{254}(+)$ TLCプレートに塗布した α 線の発光強度比の線形性評価。

2. 実験方法

F_{254} 含有 TLC プレートや F_{254} 粉末は Merck 社から購入した。ZnS(Ag)シンチレータや ZnS(Ag)粉末は Elijen 社から購入した。検出器として、高感度カメラ (CS-67) は Bitran 社製、光電子増倍管 (PMT、H16146-110) は浜松ホトニクス社製

のものをを用いた。高感度カメラには $f/0.95$ の Universe 社製のレンズを接続し、筐体温度 0°C 、シャッター速度 $0.2\text{ ms}\sim 300\text{ s}$ の条件で撮像した。PMT は、電圧 700 V 、光電面とサンプル間距離 $2\sim 10\text{ mm}$ 、測定時間 10 s の条件で測定した。 α 線放出核種であるアスタチン-211 (^{211}At) は福島県立医科大学からの郵送により入手し、標識化合物を合成してから使用した。その他、試薬等は和光純薬株式会社や東京化成株式会社、ナカライテスク株式会社、根本特殊化学株式会社から手配し、精製せずにそのまま用いた。

3. 結果・考察

3.1. 光電子増倍管 (PMT) による検出条件検討

これまで高感度カメラの長時間露光により発光検出していた検出器部分をリアルタイム検出に向けて光電子増倍管 (PMT) に変更して評価した。 $F_{254}(+)\text{TLC}$ プレートでは $F_{254}(-)\text{TLC}$ プレートと比較して、高い検出強度を示した (Fig. 2A, B)。プラスチックシンチレータを置いた際に検出強度が大幅に増大した。一方で、種々のガラスを置いた際の検出強度に大きな変化は見られなかった。これらの結果は高感度カメラを使用した場合と異なる部分もあるが、高感度カメラが長時間露光により積算しながら光検出する一方で、PMT では短時間で検出するという検出法の違いや、 F_{254} やプラスチックシンチレータ、ガラス等光変換材料の光特性の違いが関係していると考えられた。 $T_{254}(+)\text{TLC}$ プレートでは、放射能と検出強度の相関がある程度低い放射活性でも見られ、定量的な結果が得られた (Fig. 2C)。しかしながら、 F_{254} の含有割合 (シリカゲルと混合させる際の割合) を変化させた場合、 $70\sim 80\%$ までは F_{254} の増量とともに検出強度の増大が見られた一方で、 100% ではその強度が低下したことから、光の自己吸収や自己遮蔽が示唆され、 α 線を光変換するフロー

セルの設計の際に重要となる知見が得られた (Fig. 2D)。以上の結果より、PMT を用いることで α 線のリアルタイムでの定量検出の実現が示唆された。

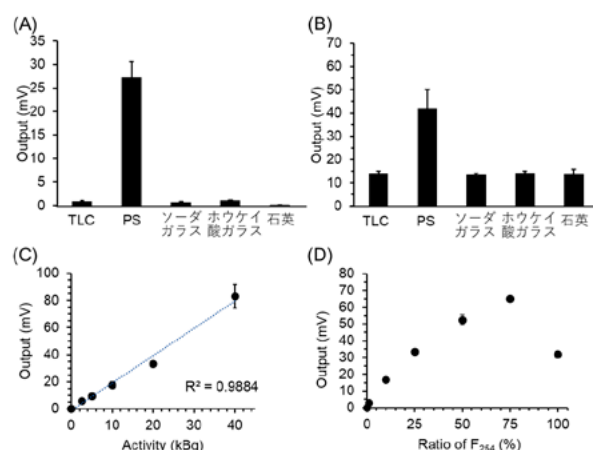


Fig. 2 $F_{254}(-)\text{TLC}$ プレート (A) および $F_{254}(+)\text{TLC}$ プレート (B) に ^{211}At (10 kBq) を塗布した際の PMT による検出。(C) $F_{254}(+)\text{TLC}$ プレートに ^{211}At ($0\sim 40\text{ kBq}$) を塗布した際の PMT 検出の線形性評価。(D) F_{254} 含有量が PMT 検出に及ぼす影響評価。

3.2. F_{254} と既報の α 線光変換材料 (ZnS (Ag)) との性能比較

α 線の光変換材料としての性能比較に、 F_{254} と α 線検出で使用されている ZnS(Ag) シートを用いて比較を行った。 $F_{254}(\pm)\text{TLC}$ プレートに各放射活性の ^{211}At 溶液をスポットし、 α 線用プラスチックシンチレータや ZnS(Ag) シートをプレート上に設置し、 60 s 間高感度カメラによる撮像を行った。その結果、これまでの検討通り $F_{254}(+)\text{TLC}$ プレートでは $S/N: 3.26$ となり、 $F_{254}(-)\text{TLC} + \alpha$ 線用プラスチックシンチレータを設置した場合の $S/N: 1.97$ よりも高く、 F_{254} が α 線用プラスチックシンチレータよりも有用であることが確認された。一方で、ZnS(Ag) シートを設置した場合、 $S/N: 8.59$ となり、本検討の中では、最も検出効率が高いことが示された (Fig.

3C)。

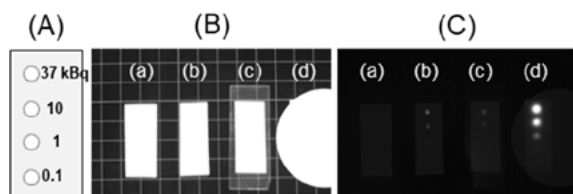


Fig. 3 ^{211}At 由来の α 線検出 (A) 放射活性イラスト (B) 明視野画像 (C) 発光画像 (シャッター速度 60 s))。プレートはそれぞれ (a) $\text{F}_{254}(-)$ TLC プレート、(b) $\text{F}_{254}(+)$ TLC プレート、(c) $\text{F}_{254}(-)$ TLC プレート + α 線用プラスチックシンチレータ (d) $\text{F}_{254}(-)$ TLC プレート + $\text{ZnS}(\text{Ag})$ シート。

一方で、 F_{254} と $\text{ZnS}(\text{Ag})$ の酸に対する安定性について PMT を検出器として評価した結果、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 添加水溶液に 1 週間付した後の F_{254} 原末と $\text{ZnS}(\text{Ag})$ 原末では、水に 1 週間付した場合と比較して、 F_{254} では検出強度に大きな差は見られなかったものの、 $\text{ZnS}(\text{Ag})$ では検出強度が著しく低下した (Fig. 4)。データシート上では、いずれの物質も酸には耐性が低いとの記載があるが、 F_{254} では 0.1%TFA 程度の溶媒条件では大きな変化は見られず、本検出技術を基盤とした装置開発に向けた応用性の高さを有すると判断し、 F_{254} を利用した開発研究を進めることとした。

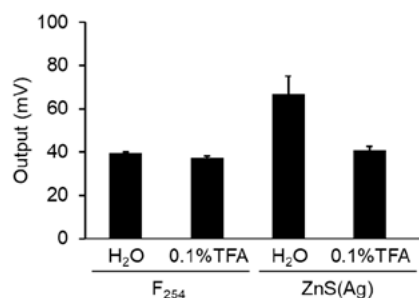


Fig. 4 F_{254} と $\text{ZnS}(\text{Ag})$ を用いた α 線検出における 0.1%TFA 添加溶媒の影響評価

3.3. クロマトグラフ装置用のフローセル型 α 線リアルタイム検出器の試作と有用性評価

これまでの検討結果を踏まえ、 α 線を光変換可能なフローセルの試作と、実際に ^{211}At 標識薬剤を流したリアルタイム検出を実施した。本検討では、フローセルの設計に際し、 F_{254} 原末だけをチューブに充填させた場合では、 α 線の光検出効率の低下と、細かい粒子による溶媒溶出時の高い圧力がかかることが懸念されたため、ガラスに F_{254} を混練させたものをチューブに充填させることとした。 F_{254} 原末を混練したガラス棒をガラス細工により作製し (Fig. 5A)、シリコンチューブにそのまま詰めたものと (Fig. 5B 上)、乳鉢でビーズ状に加工した後に詰めたものを作製した (Fig. 5B 下)。 F_{254} 混練ガラスを含むチューブを PMT の光電面に設置し、 ^{211}At 標識薬剤を流した (Fig. 5C)。

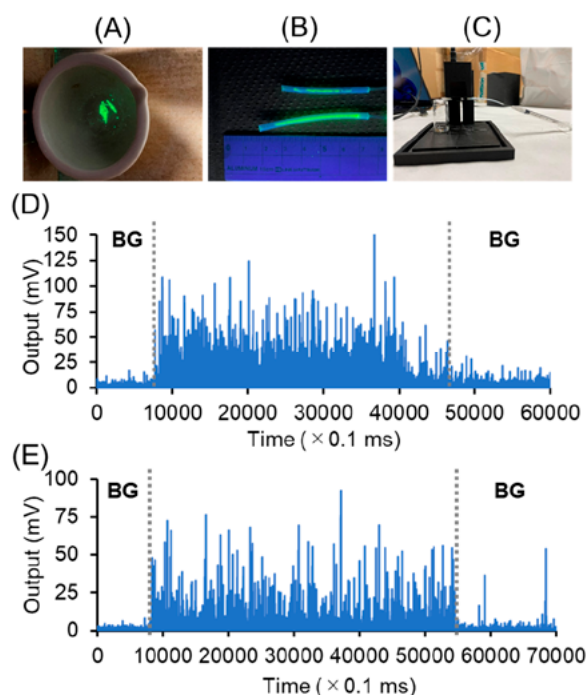


Fig. 5 F_{254} 混練ガラスを用いたフローセル型リアルタイム α 線検出器の試作方法 (A、B、C) と ^{211}At 標識薬剤を実際に流した際の検出結果 (D (棒状ガラス充填ループ)、E (ビーズ状ガラス充填ループ))。BG : Back ground。

その結果、棒状およびビーズ状に加工した F₂₅₄ 混練ガラスを詰めて作製したいずれのフローセル型チューブの場合においても、²¹¹At 標識薬剤が流れている間の検出値がその前後の検出値と比較して高値を示したことから、 α 線をフローかつリアルタイムで検出することに成功した (Fig. 5D, E)。なお、注入した ²¹¹At 標識薬剤の放射活性は 95% 以上回収できていたことから、使用した薬剤に関しては F₂₅₄ やガラスへの吸着は大きくないことが確認された。

4. 結論

本研究では、飛程の短い α 線を有機合成化学分野で汎用される TLC プレートに含まれる蛍光指示薬 (F₂₅₄) を利用し、簡便かつ効率的な光検出技術を開発し、分析機器への応用を試みた。特に、 α 線放出核種標識薬剤のフローかつリアルタイム検出に成功した成果は、これまで時間や作業を必要とした検出技術とは一線を画するものであり、今後の α 線放出核種標識薬剤の開発研究や臨床応用を加速化する分析技術開発に寄与するものと考えられる。今後は、本研究で得られた基礎的成果を基に社会実装を目指し、さらに定量性や利便性を向上させた分析機器として利用できるよう評価していく予定である。

5. 参考文献

- [1] Bodei L., *et al.*, Radiotheranostics in oncology: current challenges and emerging opportunities, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **19**, (2022), 534-550.
- [2] Kratochwil C., *et al.*, ²²⁵Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer, *J. Nucl. Med.*, **57**, (2016), 1941-1944.

- [3] Kelly J.M., *et al.*, A suitable time point for quantifying the radiochemical purity of ²²⁵Ac-labeled radiopharmaceuticals, *EJNMMI Radiopharm. Chem.*, **6**, (2021), 38.
- [4] Segawa M., *et al.*, Analytical method for the determination of ²¹¹At using an α -scintillation camera system and thin-layer chromatography, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **326**, (2020), 773-778.
- [5] 特願 2023-078147「放射性物質の検出装置」
上原知也、鈴木博元、甘中健登、岩井亮.
- [6] 特願 2023-068169「放射性物質の検出装置」
上原知也、鈴木博元、甘中健登、岩井亮.

6. 本研究にかかわる成果発表等

- ・ PCT/JP2024/015621「放射性物質の検出装置」
上原知也、鈴木博元、甘中健登、岩井亮.
- ・ 甘中健登、鈴木博元、高橋和弘、上原知也、短飛程放射線の簡便かつ高効率な光検出技術の開発に向けた基礎的評価、第 6 回日本核医学会分科会放射性薬品科学研究会／第 22 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、千葉、2023 年 9 月.
- ・ 甘中健登、鈴木博元、高橋和弘、上原知也、簡便かつ高効率な α 線放出核種標識薬剤の分析法の開発、第 63 回日本核医学会総会、大阪、2023 年 11 月.
- ・ 甘中健登、鈴木博元、高橋和弘、上原知也、短飛程放射線の簡便な光検出を目指した基礎的評価、第 71 回応用物理学会春季学術講演会、東京、2024 年 3 月.
- ・ 甘中健登、鈴木博元、高橋和弘、上原知也、短飛程放射線である α 線・ β^+ 線の簡便な光イメージング法の開発、第 18 回日本分子イメージング学会学術集会、東京、2024 年 5 月.
- ・ Kento Kannaka, Hiroyuki Suzuki, Kazuhiro

Takahashi, Tomoya Uehara, TLC plates containing fluorescent indicators are useful for analysis of alpha-particles and beta⁺-rays, 7th Asia-Pacific Symposium on Radiochemistry 2025 (APSORC2025), 松江, 2025 年 9 月.

・ 甘中健登, 石原悠悟, 軍司昌秀, 松本恵子, 鈴木博元, 高橋和弘, 上原知也, α 線のリアルタイム光検出器の開発を目的とした基礎的検討, 日本薬学会第 146 年会, 大阪, 2026 年 3 月.

7. 謝辞

本研究は、公益財団法人島津科学技術振興財団の研究開発助成の支援の下で実施されました。この場を借りて心より御礼申し上げます。また本研究の実施にあたり、PMT による検出に関してご相談させていただきました島津製作所 松本恵子氏、石原悠悟氏、軍司昌秀氏に感謝申し上げます。

顕微界面振動分光法による、界面分子・電子環境の高精細解像

東京科学大学生命理工学院 准教授 関 貴一 *

1. はじめに

新奇的な電子・機械・光学特性を持ち合わせた材料を開発する上で、材料界面における分子の配向や位置などの三次元構造や界面における電荷密度などの局所状態を理解することは重要である。例えば、電極界面反応の効率は、界面の不均一性に大きく影響を受けることが知られている。グラフェン電極上でラマン分光測定を行うと、局所的な電荷密度のゆらぎが確認される (Fig. 1)。このような不均一性は、触媒・電子デバイス特性に大きく影響することが知られ、従来、触媒活性や電子デバイス特性を損なうため避けられてきた。

しかし近年では、このような局所不純物や歪などの空間的な不均一性は、触媒活性や電子デバイス特性に特異な性質をもたらすことから、注目を集めるようになってきている。例えば、空間的に単独に埋め込まれた金属原子の単一金属触媒 (single-atom catalyst) などの Å-ナノレベルの空間的な不均一性は、触媒活性を著しく高めることが知られ^[1]、ナノマイクロレベルの電荷や親水疎水の空間パターンは特定の細胞を吸着させるために都合が良いことや、歪構造はバイオセンサーにおいては高感度な生体分子の検出を実現する上で重要であることが報告されている^[2,3]。

また生体系では、脂質膜のドメイン構造 (Fig. 1) や液液相分離により形成されるミクロスコピックな核酸とタンパク質の凝縮相など、分子論的な形成機構などがわかっていない現象が多々挙げられ、生命科学的観点から局所分子環境の理解が求められている。

このように、材料・生体界面におけるミクロス

コピックな局所電子・分子環境：(1) 空間的な電荷分布、(2) 分子組成、そして(3) 界面機能性分子の配向構造や局所水和構造など、界面近傍の分子・イオン環境を含めて詳細に解明することは、新たな機能性材料の設計指針の確立や、複雑な生体機能の解明につながると期待されている。

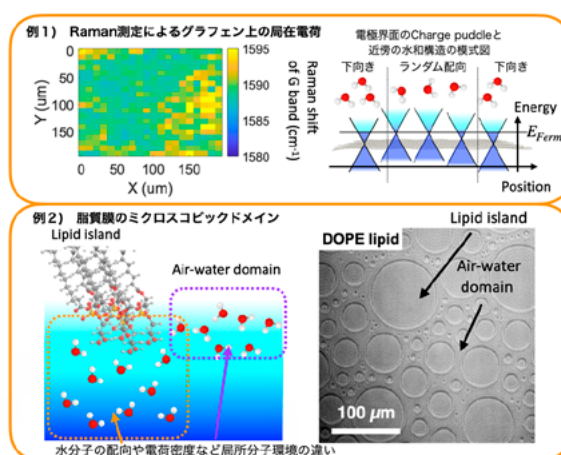


Fig. 1 局所電子・分子環境の存在する2つの例

これまで材料表面・界面における局所分子構造や電荷状態の観察は、赤外・ラマン顕微鏡や物理プローブを用いる原子間力顕微鏡 (AFM) や走査型トンネル顕微鏡 (STM) などが用いられてきた。前者を用いることで空間的に化学組成を把握することが可能であり、後者を用いることでトポグラフィ像など界面の形状を得ることができる。しかし、前者の分光顕微法では原理的にバルクに存在する分子と界面に局在する分子の区別ができず、後者のプローブ顕微鏡では気液界面などのソフト分子界面や固固界面などの埋没界面の分子構造や電荷情報を取得できないという問題があり、既存の表面・界面分析法では、分子選択性と水

* (助成採択時) 弘前大学大学院理工学研究科 助教

平方向・深さ方向への空間分解能など界面の分子現象を“見る”上で必要な要件をすべて満たすことは容易ではなかった。

そこで、本研究で私が着目した技術は、界面特異的な非線形振動分光法の1つである和周波発生振動分光法 (Sum-Frequency Generation, SFG) である。SFG 分光法は、非侵襲かつ分子選択性、さらに光学的選択律に基づく界面選択性から、界面の分子イベントを界面の化学部位の“赤外吸収”スペクトルを通して“見る”強力なツールであり、近年我々が提案してきた、界面電荷量の定量法^[4]、界面分子の三次元配向・界面深さ方向の Å スケールでの分子位置推定^[5]、界面イオン種の水和構造解析⁶を利用することで、上述の不均一材料・生体界面の理解が可能になると考えられる。

本研究期間では、これらの界面解析手法を顕微分光法として拡張し、不均一材料・生体界面の局所分子環境の取得を可能とする計測プラットフォームの土台構築に取り組んだ。

2. 研究内容・成果

上述の SFG 分光法を行うためには、分子振動情報を高精度かつ詳細に取得する位相検出法であるヘテロダイン検出顕微 SFG 分光システムを構築する必要がある。まず本研究期間初期では、その土台構築として、2024 年 7 月に自身の研究室

に導入した新規高繰り返しフェムト秒パルス光源を用いて、まず広視野のヘテロダイン検出顕微 SFG 分光システムの構築に取り組んだ。

SFG 分光法では、界面の振動子を振動励起するための中赤外光パルス (3 μm -7 μm 程度の領域) と、その振動子を仮想励起状態へアップコンバージョンするための近赤外光パルス (今回用いた光源においては、1030 nm) を用いる必要がある。さらに、それらのビームをサンプル測定位置で、時間的、空間的にオーバーラップさせる必要がある。それぞれの光路を、ビーム径 (1030 nm: 4-5 mm, 3 μm : 3-4 mm) などを調整しつつ構築した。まず SFG 分光測定 of 波長分解能を決めるアップコンバージョン光の狭帯域化に取り組んだ。初期のプリリミナルな検討により、反射型回折格子・シリンドリカルレンズ・スリット・ミラーを用いた自作の 4 f パルスシェーパーを構築した場合の狭帯域化では、高輝度光源による回折格子の熱収縮などによりビームポインティングが安定しないことが判明していたため、この方法は断念した。そこで熱膨張や素子のダメージを軽減させるため、透過型回折格子 (Light Smith, Coherent) を用いて同様に 4f パルスシェーパーを構築し、狭帯域化を行ったところビームポイントも安定しており、狭帯域化が可能となった。

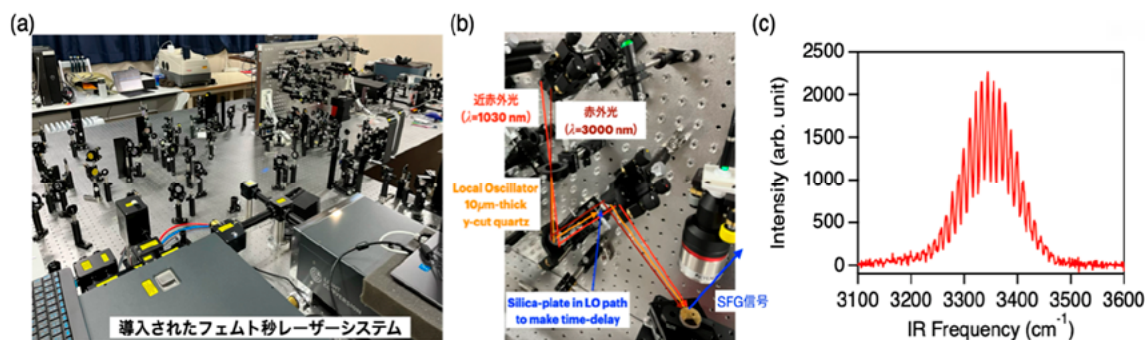


Fig. 2 (a, b) SFG 分光システムの様子と (c) 金表面より取得したヘテロダイン検出 SFG 信号

アップコンバージョンのビーム幅は $\sim 12\text{ cm}^{-1}$ 程度であり、サンプル位置で $1\text{--}2\text{ }\mu\text{J}$ 程度の強度となった。適宜 ZnSe レンズなどを用いてコリメーションを行うことで、中赤外光に関しては、サンプル位置で、 $1\text{ }\mu\text{J}$ 程度のパルス強度となった。このシステムを用いて、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 厚の y カット水晶から発生させた参照 SFG 信号と、テストサンプルとしての金表面や z カット水晶からの SFG 信号を干渉させ、ヘテロダイン SFG 信号を検出することができた (Fig. 2)。

次に、このシステムを用いたテスト測定として 2-propanol/water の空気水界面からの SFG 信号の位相検出に取り組んだ。しかしながら、 $\text{Im}\chi^{(2)}$ スペクトル内に観測されると予想した 2-propanol に由来する C-H 伸縮モードのピークは、はっきりと検出されず、位相の correction を 60 度ほど行くとピーク様の信号がようやく観測された (Fig. 3)。

これはエアコンなどの外乱により、参照サンプルの SFG 信号取得時と 2-propanol/water 表面からの SFG 信号取得時において、サンプル高さ(もしくはビーム集光位置)が参照サンプル表面の高さと比べて、数 $10\text{ }\mu\text{m}$ ほどずれてしまっていることに由来すると考えられた。

この原因としては、SFG 分光測定部位が空調やコンプレッサー類の振動などの外部環境に対してオープンな状態となっており、測定対象である液面の高さが安定でなかったためだと考えた。そこで、光路の安定性やサンプル表面の平面性を担保するために、SFG 分光装置全体を外部環境から遮断するためのエンクロージャーを行った (Fig. 4a)。そして、z-cut 水晶からの SFG 信号の位相安定性を評価したところ、1 時間あたり、わずか $1\text{--}2$ 度の位相ドリフトのみが発生することがわかった (Fig. 4b)。

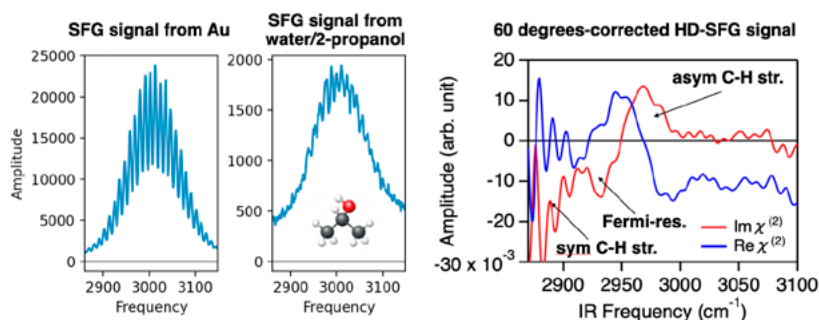


Fig. 3 金表面と 2-propanol/water の空気水界面より取得したヘテロダイン検出 SFG 信号の結果。

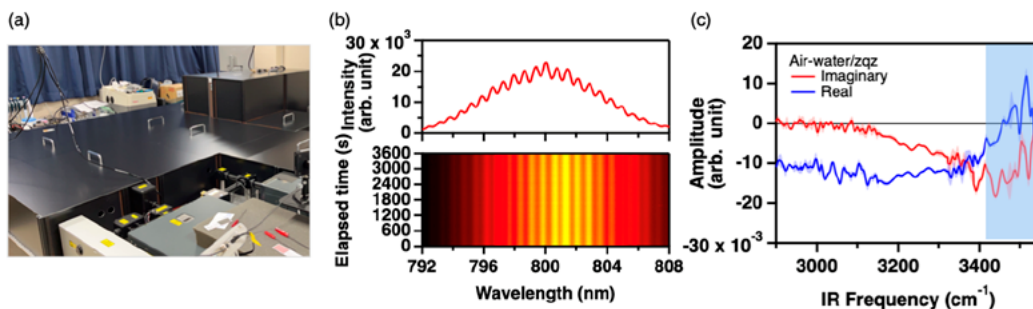


Fig. 4 (a) SFG 分光システムへのエンクロージャーの導入と、(b) z-cut 水晶からの SFG 信号の位相安定性の評価、そして(c)空気水界面の O-H 伸縮モード領域のヘテロダイン検出 SFG 信号測定。

エンクロージャーの効果だけでなく、おそらく新規光源の安定性に由来して、従来のノンコリニアタイプの SFG 分光システム (Ti サファイヤ光源を用いるもの) の位相安定性 (10-20 度/h) の 5 - 10 倍ほど優れていることが判明した。このシステムを用いて、微弱な信号ではあるが、SFG 分光における、いわばゴールドスタンダードである空気水界面の O-H 伸縮モード領域のスペクトル測定した (Fig. 4c)。注目する $\text{Im}\chi^{(2)}$ スペクトル内の 3000 cm^{-1} 付近は、resonant なモードが存在しないためゼロ amplitude を示し、 $3100 - 3400\text{ cm}^{-1}$ にかけて、負の O-H 伸縮モード信号を見ることができる。このスペクトル形状は、先行研究を十分に再現しており (3400 cm^{-1} 以上の振動数領域は、光路内の水蒸気による中赤外光の吸収の効果が

出てしまっているため noisy である)^[7]、この SFG 分光システムにはゴースト信号の発生や高次の光学効果などの寄与はなく、信頼性の高いシステムであると結論づけられる。と考えられた。

そして、この土台となる SFG 分光システムにブランチを作製する形で、顕微 SFG 分光システムの構築に取り掛かった (Fig. 5)。顕微 SFG 分光システムにおいては、波長領域の大きく異なる光をサンプル上で集光する必要がある。そのため、通常のガラスを用いる対物レンズなどの屈折光学素子を用いることはできず、反射型の対物システムを用いる必要があり、本研究期間では、まず操作の容易さを鑑みて、Beck Optronic 社の銀コート低倍率反射型対物 (x15) を用いて、従来法の強度検出型顕微 SFG 測定の検証を行うこととした。

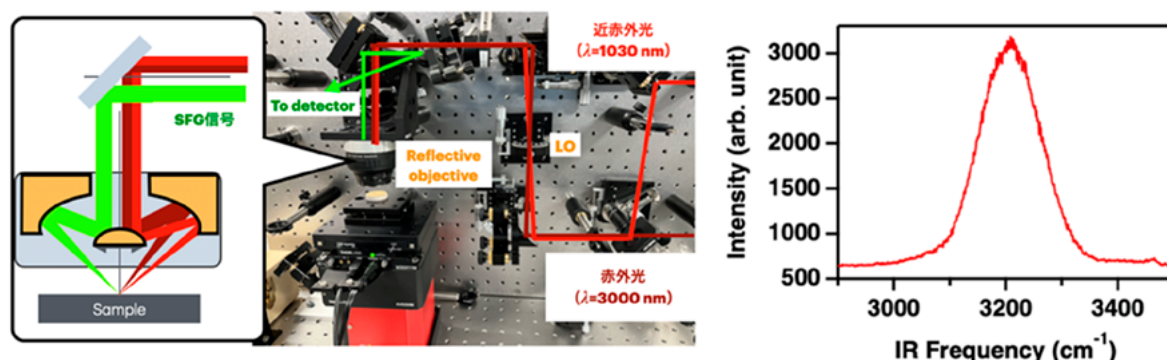


Fig. 5 顕微 SFG 分光システム測定部の概観と、金表面からのホモダイン検出 SFG 信号測定。

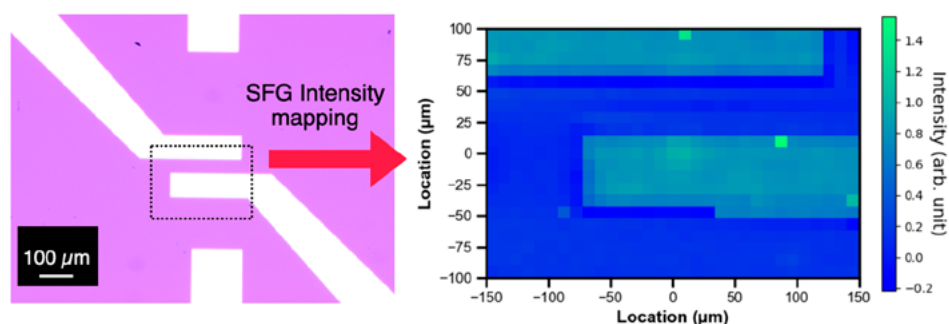


Fig. 6 顕微 SFG 分光システムによるシリコンウェハ上のパターン金属電極のホモダイン検出スキャンと積算非共鳴信号に基づく再構築画像。

上述のマクロスコピック SFG 分光システムにブランチを作製する形で、顕微 SFG 分光システムの光学素子の配置を完了した。近赤外光と中赤外光のビームサイズを 1 - 2 mm とし、直径 12 mm の凸面鏡の半面に反射させ、金表面から従来法であるホモダイン検出 SFG 信号測定を行う状態まで装置を構築できた。そしてテスト測定として、シリコンウェハ上にパターンニングした FET 基板を強度検出型 SFG システムでスキャンした結果を Fig. 6 に示す。

スキャンした波数領域は、Fig. 5 と同じ $3000 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ であり、各点 $10 \text{ }\mu\text{m}$ のステップサイズで、露光時間は 30 s である。この波数領域において、金、シリコンウェハ (270 nm-thick SiO_2 on *p*-doped Si) は明確な振動モードを持たないため、非共鳴バックグラウンドの違いによるコントラストが見えている。空間分解能・時間分解能ともに課題は残されているが、顕微 SFG 分光システムの構築により、界面振動情報の空間マッピングが可能

能となった。

そして、研究室の移転後に、これまでの実験設備の問題点を踏まえて、10 m ほどあった光路長を 8m 程度に短縮し、強度検出 SFG 顕微鏡を位相検出タイプへとアップグレードした。それを用いて、パターン電極基板を再度スキャンした。参照信号により、サンプル表面からの信号が増強されているため、各点 1 秒程度の露光時間で、Fig. 6 と同様の SN 比の信号を得ることができた (Fig. 7)。

3. 結論

本研究期間内では、界面分子環境測定のための測定システムとして、位相検出型顕微 SFG 分光システムの土台構築に取り組んだ。高輝度の新規光源を用いた SFG 分光システムの構築を通して、適切な光学素子を選定し、まずマクロスコピック SFG 測定システムの構築を完了した。そのシステムを用いて、空気水界面や脂質膜界面の先行研究データを十分に再現し、素子類の選定や測定システムのデザインに問題がないことを確認した。

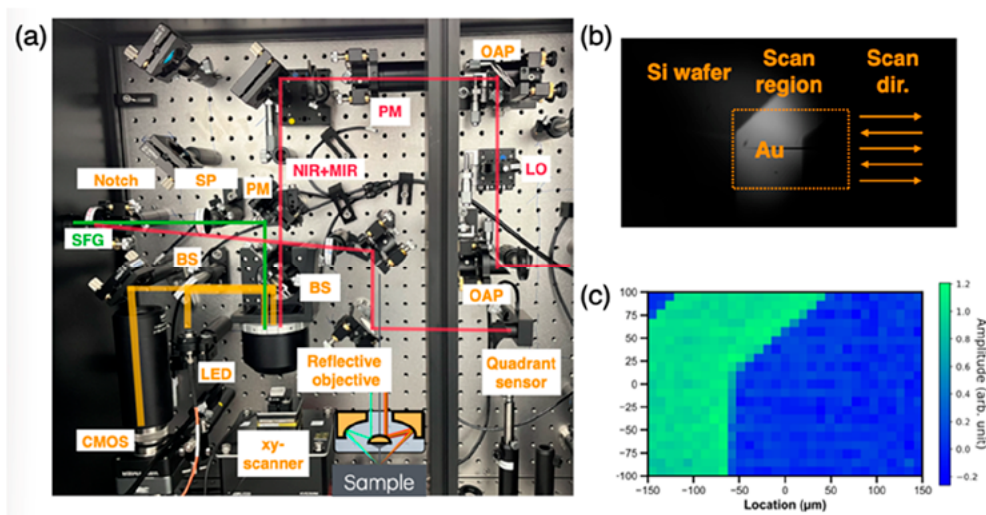


Fig. 7 再設計を施した顕微 SFG 分光システム測定部の概観と、パターン金電極表面からの位相検出 SFG 信号測定による画像再構成。

その後、マクロスコピック SFG 分光システムにブランチを作製する形で、SFG 顕微鏡の作製に取り掛かった。強度検出型 SFG 顕微鏡の構築から始め、途中研究室の移動をはさみ、位相検出 SFG 顕微鏡の構築を行った。現状は、測定条件や高速測定へ向けた条件出しを行っており、それが完了し次第、当初の開発目標である、表面電荷計測や分子構造解析のアドオンを実装していく予定である。装置構築を進める傍ら、水和構造から界面イオン種の特定を行う方法論の展開を進めていた(下記、成果参照)。その手法に関しても、SFG 顕微鏡に実装していく所存である。

4. 参考文献

- [1] Kyriakou, G. et al. Isolated metal atom geometries as a strategy for selective heterogeneous hydrogenations. *Science* 335, 1209–1212 (2012).
- [2] Hwang, M. T. et al. Ultrasensitive detection of nucleic acids using deformed graphene channel field effect biosensors. *Nat. Commun.* 11, 1543 (2020).
- [3] Du, F. et al. Controlled adsorption of multiple bioactive proteins enables targeted mast cell nanotherapy. *Nat. Nanotechnol.* 19, 698–704 (2024).
- [4] Seki, T. et al. Real-time study of on-water chemistry: Surfactant monolayer-assisted growth of a crystalline quasi-2D polymer. *Chem* 1–13 (2021).
- [5] Yu, C.-C., Seki, T., Wang, Y., Bonn, M. & Nagata, Y. Polarization-dependent sum-

frequency generation spectroscopy for Ångstrom-scale depth profiling of molecules at interfaces. *Phys. Rev. Lett.* 128, 226001 (2022).

- [6] Seki, T. et al. Ions speciation at the water-air interface. *J. Am. Chem. Soc.* 145, 10622–10630 (2023).
- [7] Nihonyanagi, S. et al. Accurate determination of complex $\chi(2)$ spectrum of the air/water interface. *J. Chem. Phys.* 143, 124707 (2015).

5. その他成果発表等

- ・ Seki, T.; Yu, C.-C.; Yu, X.; Chiang, K.-Y.; Sun, S.; Bonn, M.; Nagata, Y. Spontaneous Appearance of Triiodide Covering the Topmost Layer of the Iodide Solution Interface Without Photo-Oxidation. *Environ. Sci. Technol.* 58, 3830–3837 (2024).
- ・ Takakazu Seki, Chun-Chieh Yu, Kuo-Yang Chiang, Mischa Bonn, and Yuki Nagata, SFG 分光法を用いた、空気—ヨウ化ナトリウム水溶液界面の界面活性イオン種の解析, 第 18 回分子科学討論会, 京都大学, 2024 年 9 月 21 日.
- ・ 関貴一, 花王科学奨励賞、花王芸術・科学財団, 2024 年 3 月.

6. 謝辞

研究室立ち上げ時から、島津科学技術振興財団様の助成を頂け大変助かりました。また細々とした研究室整備などに財源を利用でき助かりました。ここに感謝申し上げます。

タンパク質構造安定性の超並列測定技術とその予測モデル開発

東京大学 生産技術研究所 講師 坪山 幸太郎

1. はじめに

タンパク質は、生体にとって必須の分子であり、多様かつ、精緻な生体機能を担っている。生体内の天然タンパク質が担っている機能の例として、太陽エネルギーを化学エネルギーに変換すること（ルビスコなど）、小さな分子や光を超高感度に検出すること（嗅覚受容体やロドプシン）、pH 勾配を化学エネルギーへと変換すること（ATP 合成酵素）、化学エネルギーを仕事へ高効率に変換すること（アクチンおよびミオシン）などが挙げられる。過去数百年の技術の進歩にもかかわらず、人間が作った機械は、ナノスケールのタンパク質機能の精密さや効率の良さに太刀打ちできていない。ナノマシンとして多彩で高性能な機能を発揮できる構造安定性が高いタンパク質を自在に設計できるようになれば、医学・工学分野におけるさまざまな技術的課題を解決する可能性を秘めている。

2. 「新奇」人工タンパク質とは？

驚くべきことに、30-40 億年に渡る進化の過程で生命は、タンパク質の可能性を余すことなく使いこなしているとは言い難い。200 アミノ酸からなる典型的な長さを持つタンパク質について、あり得る配列数は 20^{200} （それぞれの位置について、20 種類のアミノ酸があり得るため）であるが、現存する生物が利用しているタンパク質の数はわずか 10^{12} 個程度である^[1]。また、自然界に存在するタンパク質は進化により形成されるため、全配列空間に一様に広がっているわけではなく、それぞれのファミリーがある程度かたまって分布し

ている。つまり、アミノ酸配列空間のごくわずかな領域を進化は探索したに過ぎず、これまでの進化の過程で試されていない可能性の高い、残りの広大なアミノ酸配列空間が、新奇人工タンパク質設計の舞台となる。したがって、進化の過程はその探索の助けにはなるが、絶対的な指標とは言えない。進化の過程から得られる情報に加えて、タンパク質構造の生物物理学における原理を理解することで、ゼロから設計された「新奇タンパク質」を人工的に設計することができるはずである。

3. 「新奇」人工タンパク質の合理設計のためのタンパク質の基本法則解明

これまでも実際に、様々な人工タンパク質が設計されてきている（新型コロナウイルスの感染を強力に阻害できる人工タンパク質^[2]、全く異なる基質を利用する発光タンパク質^[3]、超小型の蛍光タンパク質^[4]など）。しかし、その設計は現時点では「運と職人技」に依存していることが、医学・工学分野における人工タンパク質のより積極的な応用の妨げになっている。例えば、Yeh らが設計した発光タンパク質の中で、実験における成功率は 0.03% 程度^[3]、Cao らが設計した標的と強力に相互作用する人工タンパク質の成功率は 0.01% 程度^[2]、という状況であり、合理的に機能性タンパク質を設計できているとは言い難い。

そもそも、タンパク質は 20 種類の多彩な性質を示すアミノ酸からなる多量体であり、アミノ酸の主鎖・側鎖同士の相互作用が複雑な構造を形作ることで、特有の機能を示すことが可能となる。人工タンパク質設計が運任せとなっている理由

は、タンパク質のアミノ酸配列-構造-機能という「タンパク質の基本原則 (Anfinsen のドグマ)」を正確に理解できていないためである。Anfinsen のドグマは約半世紀前に提案されたものの、タンパク質のアミノ酸配列空間があまりにも広大であるため、その全容は未だに明らかではない。

その全容の解明の鍵を握っているのは、大規模データと深層学習の組み合わせであると考えられる。例えば、Google の子会社である DeepMind 社が開発した AlphaFold^[5] は、約半世紀の課題となっていたタンパク質構造の正確な予測を可能にした。この AlphaFold は、タンパク質の構造データベースである Protein Data Bank (PDB) と深層学習を組み合わせることにより構築されてきた。したがって、タンパク質構造に加えて、タンパク質の性質や機能を規定する基本原則の全容解明に、大規模データと深層学習が役立つことが期待される。以降は、その一端として、タンパク質の構造安定性を正確に理解し、更に予測するための著者らの試みを紹介する。

4. 基本原則の解明の一環としてのタンパク質の構造安定性の大規模測定

ほぼすべてのタンパク質は、構造がほどけた状態 (Unfolded) やきちんと折りたたまれた状態 (Folded) を含む複数の状態を行き来しているが、原則として、折りたたまれた状態でのみ機能的である。したがって、折りたたまれた構造をもつ分子の割合を示す「タンパク質の構造安定性」は、機能的なタンパク質分子の割合を示すため、タンパク質の最も重要な特徴量の一つである (Fig.1A)。実際に、タンパク質の構造安定性が低下すると、構造がほどけたタンパク質同士が凝集したり、細胞内で機能的なタンパク質が不足したりすることにより、神経変性疾患やがんなど様々な疾患を引き起こしうる^[6]。

このような重要性にもかかわらず、タンパク質構造安定性を規定する法則の全容は明らかでない。その理由は、構造安定性の測定に多大な手間と費用がかかり、構造安定性データの規模と網羅性が不足しているためである。AlphaFold をはじめ、機械学習・深層学習がタンパク質科学において驚異的な性能を発揮しはじめているにもかかわらず、データが十分に存在しないために、構造安定性を予測するモデルの正確性は頭打ちになっていた^[7]。

4.1. 構造安定性の大規模測定法; cDNA display proteolysis 法に至った経緯

近年、そういった問題点に対応するために、構造安定性に関するデータを大規模かつ網羅的に取得する実験系の開発が進められている。例えば、Yeast display 法と次世代シーケンスを組み合わせることで、タンパク質の構造安定性を大規模に測定することが可能となり、安定構造を持つ人工タンパク質の設計に際して、注意すべき特徴量などが特定された^[8]。

しかし、この方法では、酵母への形質転換とセルソーターによる酵母細胞の選別が必須となるため、形質転換効率が律速となり、解析可能なアミノ酸配列の数に限りがあった。この問題を解決するために、試験管内で完結する cDNA display 法^[9]を用いるという着想に著者らは至った。

4.2. cDNA display proteolysis 法の概要

まず、タンパク質のアミノ酸配列がコードされた合成 DNA 配列を用意 (Fig.1B-1) し、cDNA display 法により各タンパク質と cDNA からなる複合体を合成する (Fig.1B-2)。本手法においては、cDNA が常にタンパク質の C 末端側に付加されるため、PA タグを N 末端側に付加した。タンパク質-cDNA 複合体を様々な濃度のプロテアーゼと混合する (Fig.1B-3) と、ほどけた状態のタン

パク質分子のみが切断される。プロテアーゼ処理後でも、全長を保持しているタンパク質と対応する cDNA を抗 PA タグ抗体により回収 (Fig.1B-4)、その cDNA を次世代 DNA シーケンサーにより解析する。これにより、プロテアーゼにより切断されていない各タンパク質の割合が明らかとなり、各タンパク質のプロテアーゼ抵抗性 (Fig.1A の K50 [最大切断速度の 50%を達成するために必要なプロテアーゼ濃度]) を大規模に定量することができる。

ただし、このプロテアーゼ抵抗性は構造安定性 (折りたたみの自由エネルギー ΔG [kcal/mol]) を直ちに表すわけではない。そこで、実測の抵抗性 (K50)に加え、それぞれのタンパク質が完全にほどけた/折りたたまれたと仮定した際のプロテアーゼ抵抗性 (Fig.1A の $K_{50,U}$ / $K_{50,F}$) の推定値を用いることで、構造をもつタンパク質分子の

比率を算出でき (Fig.1A、式 1)、この比率から折りたたみにおける構造安定性を導出できる (Fig.1A、式 2)。

したがって、プロテアーゼ抵抗性 (K50) は実測値であるが、タンパク質の構造安定性 (ΔG) はあくまでも推定値であることに注意が必要である。しかし、塩基性アミノ酸を標的とするトリプシンと芳香族アミノ酸を標的とするキモトリプシンによる実験のそれぞれから算出される構造安定性が cDNA display proteolysis 法で推定されたタンパク質構造安定性 (ΔG)によく一致している。また、先行文献において、個別に精製されたタンパク質を用いて測定された構造安定性と、本手法による構造安定性の間でも高い一致性が確認されるため、本手法により導出された構造安定性 (ΔG) の信頼性は高い。

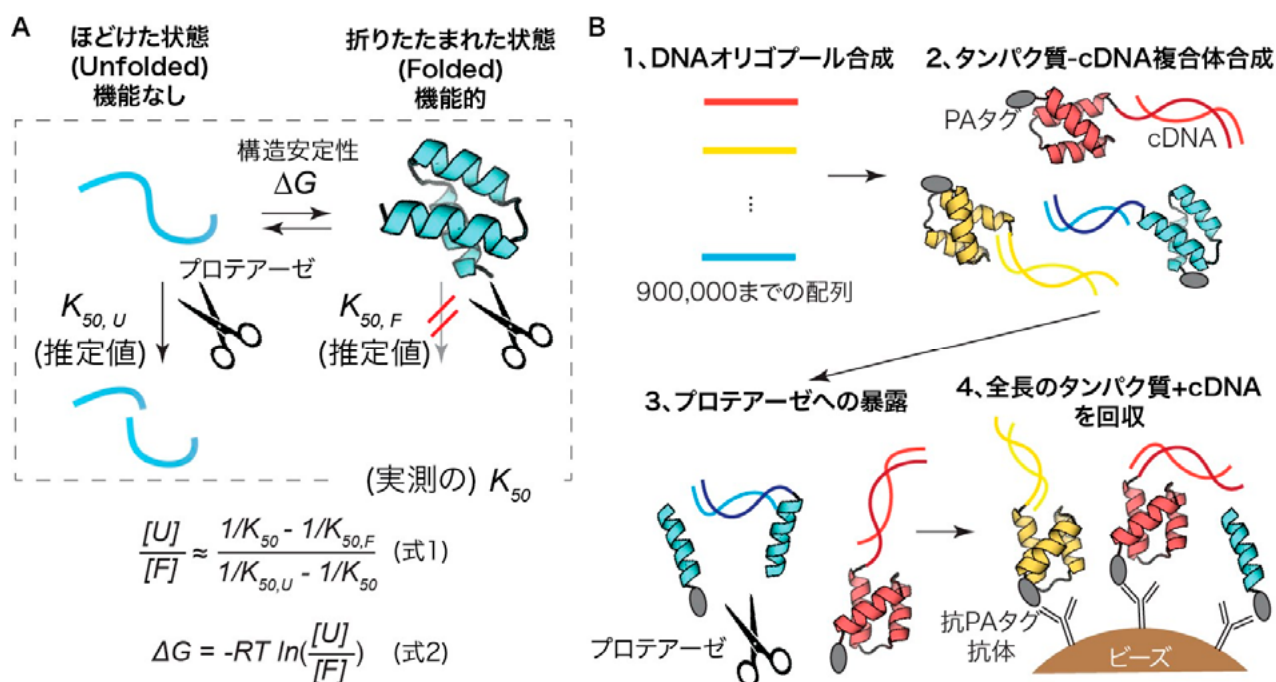


Fig. 1 cDNA display proteolysis 法の概要

4.3. cDNA display proteolysis 法の利点と欠点

本手法の利点は、(A) 一度の実験で、少なくとも 90 万種類程度までのアミノ酸配列について、(B) 相対的な構造安定性の比などではなく、絶対的な構造安定性 (ΔG) を、(C) 同一バッファー・温度条件で定量可能な点である。

一方で、本手法の限界としては、(a) 長いリンカーなどが存在せず、折りたたまれた状態ではプロテアーゼにより容易に切断されないこと、(b) 凝集などが生じることなく、プロテアーゼ切断処理中に、折りたたまれた状態とほどけた状態との平衡状態が維持されること、(c) 完全にほどけた/折りたたまれた状態でのプロテアーゼ抵抗性 (K50,U/K50,F) の推定が正確であること、(d) ジスルフィド結合などを含まず、プロテアーゼ切断により N 末端と C 末端が分離すること、といった複数の条件が満たされる必要があることが挙げられる。加えて、(e) オリゴプールによる DNA 合成と次世代 DNA シーケンスによる全長の DNA 配列の確認を行うため、80 アミノ酸を超えるアミノ酸配列の構造安定性測定が(現時点では) 困難なことも大きな制約である。

以上のような限界はあるものの、本論文以前に出版されたほぼすべての構造安定性データを統合したデータベース^[10]の大きさは約 3 万種であったが、本研究を通じて、約 77 万種のアミノ酸配列の構造安定性データを取得・公開しており、構造安定性のデータ規模は 25 倍以上へと飛躍的に増加した。データの規模もさることながら、上記のデータベースとは異なり、測定バッファーや温度、手法などが同一であることも、本データベースの有用性を高めている。

4.4. cDNA display proteolysis 法による網羅的な 1 アミノ酸置換による解析

本研究では、約 500 種の小型タンパク質ドメインにおいて、それぞれの位置のアミノ酸を別の 19

種類のアミノ酸へと置換した場合の構造安定性を測定した。これにより、それぞれのタンパク質において、どの部位が構造安定性にとって重要なかなどを可視化することが可能となった (Fig.2A)。

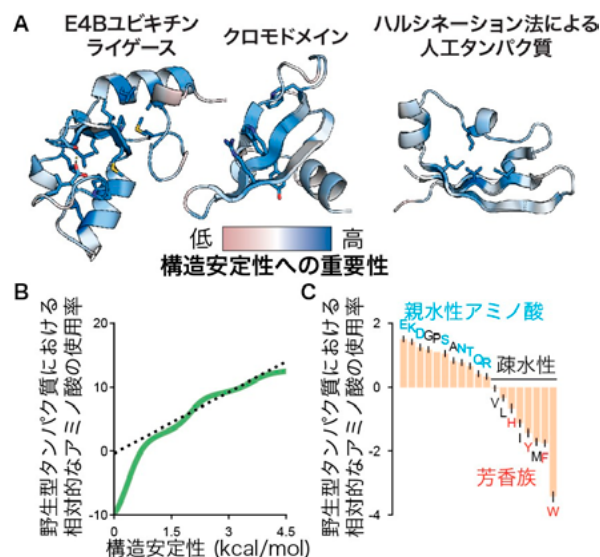


Fig. 2 網羅的なアミノ酸置換による構造安定性解析

さらに本データを用いて、生物由来の天然タンパク質における各アミノ酸の使われやすさと、各アミノ酸がもたらす構造安定性との関係性を解析した。予想通り、構造を安定化させるアミノ酸ほど、よく使われる傾向があった (Fig.2B)。加えて、そのような構造安定性による影響を排除した際のアミノ酸の使用頻度を定量したところ、親水性アミノ酸はより使用されやすい一方で、疎水性アミノ酸、特に芳香族アミノ酸は使われにくい傾向にあった (Fig.2C)。これは、芳香族アミノ酸の合成コストが高いこと、また、疎水性アミノ酸は可溶性を損なうことなどに起因すると考えられる。

4.5. cDNA display proteolysis 法によるデータの有用性

本研究において取得された、タンパク質構造安定されるメカニズムの解明に加え、アミノ酸配列からタンパク質の構造安定性を正確に予測する

機械学習モデルの構築にも役立つと期待される。本データベースを利用して、タンパク質の構造安定性を正確に予測することができれば、タンパク質の発現量や細胞内の存在量などの正確な予測や、酵素活性を向上させるアミノ酸の特定、さらには、がんなどの疾患の原因の特定などがより容易になることが期待される。さらに本データベースは、人工的に設計したタンパク質のデータも含まれるため、自然界にはない配列の構造安定性の予測にも寄与できるものである。そのような有用な予測モデルの開発を通じて、工学や臨床医学におけるタンパク質の応用を下支えする可能性を本研究は秘めている。

5. おわりに

タンパク質科学は、現在大きな過渡期にある。仮説を基に数個のタンパク質の性質や機能を検証する研究から、大規模データの取得・解析から始まるデータ駆動型の研究へと移行しつつある。このような新たなタンパク質科学には、大規模データ取得とその解析技術の双方が必要となる。情報科学の進歩に伴い、データ解析技術は飛躍的に向上しているものの、一方で、大規模データの取得が困難な領域においては、データの生成が全体の律速段階となってしまう。新奇人工タンパク質を効率的に設計するための構造安定性予測のためのデータも今の段階では十分にあるとは言えない。従って、次世代のタンパク質科学を切り開くためには、本稿で紹介したようなタンパク質の大規模データの取得を可能とする実験手法が今後ますます重要になると期待される。大規模データ取得により、天然タンパク質の性質や機能だけでなく、全く既存のタンパク質とは異なる配列をもつ新奇人工タンパク質についてもより正確に構造、性質や機能を予測できるモデルの構築につながり、そのようなモデルを用いること

でより必要性の高いデータを取得することが可能になる、というようなポジティブフィードバックを達成することが期待される。本研究がそのようなポジティブフィードバックの第一歩となれば、幸甚である。

6. 参考文献

- [1] Huang PS, Boyken SE, Baker D. The coming of age of de novo protein design. *Nature*. 2016 Sep 15;537(7620) 320-7.
- [2] Cao, L et al. De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors *Science* 370, 6515 426-431 (2020)
- [3] Yeh, AHW et al. De novo design of luciferases using deep learning *Nature* 614, 773-780 (2023)
- [4] Dou J, Vorobieva AA, Sheffler W, Doyle LA, Park H, Bick MJ, Mao B, Foight GW, Lee MY, Gagnon LA, Carter L, Sankaran B, Ovchinnikov S, Marcos E, Huang PS, Vaughan JC, Stoddard BL, Baker D. De novo design of a fluorescence-activating β -barrel. *Nature*. 2018 Sep;561(7724) 485-491.
- [5] J, Jumper et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold *Nature* 596, 583-589 (2021)
- [6] Stein, A., Fowler, D. M., Hartmann-Petersen, R. & Lindorff-Larsen, K. Biophysical and mechanistic models for disease-causing protein variants. *Trends Biochem. Sci.* 44, 575-588 (2019)
- [7] Broom, A., Trainor, K., Jacobi, Z. & Meiering, E. M. Computational modeling of protein stability: quantitative analysis reveals solutions to pervasive problems. *Structure* 28, 717-726.e3 (2020) .

- [8] Rocklin, G. J. et al. Global analysis of protein folding using massively parallel design, synthesis, and testing. *Science* 357, 168–175 (2017) .
- [9] Yamaguchi, J. et al. cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions. *Nucleic Acids Res.* 37, e108 (2009) .
- [10] Nikam, R., Kulandaisamy, A., Harini, K., Sharma, D. & Gromiha, M. M. ProThermDB: thermodynamic database for proteins and mutants revisited after 15 years. *Nucleic Acids Res.* 49, D420D424 (2021) .

7. その他成果発表等

- ・ Nishimura, T. & Tsuboyama, K. et al,

Engineering of lipid-binding probes via high-throughput protein-lipid interaction screening, *Nature Cell Biology* (accepted)

- ・ Yao, P. & Nishimura, T., Tsuboyama, K. Quantitative Kinetic Analysis of Protein–Phosphoinositide Binding by Optimized Liposome-Based Bio-Layer Interferometry, *Biochemistry* (submitted)

8. 謝辞

島津科学技術振興財団の助成金により本研究を遂行することができました。当研究室メンバーなくして、本研究を進めることは不可能でした。この場をお借りして、御礼申し上げます。

生成系人工知能による高速 AFM データの高解像度化技術の開発

京都大学大学院理学研究科 准教授 寺川 剛 *

1. はじめに

高速原子間力顕微鏡 (AFM) イメージングは、生体分子の動態をナノメートルスケールかつリアルタイムで観察可能な強力な手法であり、近年、タンパク質の構造変化や分子機械の動作原理の解明において重要な役割を果たしている。一方で、高速 AFM は測定速度と空間分解能の間にトレードオフが存在し、取得される画像はしばしばノイズや分解能の制約を含む。そのため、観察された構造から分子の詳細な立体構造や状態遷移を定量的に解釈することは依然として困難である。

このような課題に対し、近年発展が著しい生成系人工知能 (AI) を活用し、低分解能データから高分解能構造情報を再構成する試みが注目されている。本研究では、実験データと分子シミュレーションを統合することで、AFM 画像から分子構造を推定する枠組みを構築し、その基盤技術の確立を目指した。具体的には、溶液中 AFM 観察によって得られたコンデンシン分子の構造像に対し、粗視化分子動力学シミュレーションにより生成した構造アンサンブルを対応付けることで、画像情報から分子構造を再構成する手法を開発・適用した。さらに、機械学習に基づく粗視化ポテンシャルの構築にも取り組み、単量体の構造情報のみから多量体形成を再現可能なデータ駆動型モデルの開発を行った。これらの研究は、生成系 AI による構造推定の基盤となる「データ生成」と「構造空間の学習」の両面を補完するものである。

本報告では、まず AFM データと分子シミュレーションの統合による構造推定手法の実証として、コンデンシンの ATP 加水分解サイクルに伴

う構造変化機構の解明について述べる。続いて、機械学習を用いた粗視化モデル開発の成果を報告し、最後に本研究の意義と今後の展望について述べる。

2. 高速 AFM と分子シミュレーションの統合によるコンデンシン構造変化機構の解明

2.1. 研究背景と目的

コンデンシンは、染色体の凝縮や分配に必須な分子モーターであり、ATP 加水分解に伴う構造変化を通じて DNA ループ形成を駆動することが知られている^[1]。しかし、その分子機構、特に ATP 結合・加水分解の各段階においてどのような構造状態を取り、それらがどのように相互に遷移するのかについては、依然として不明な点が多い。このような構造ダイナミクスを直接観察する手法として高速 AFM は有力であるが、取得される画像は空間分解能やノイズの制約を受けるため、観察像から分子の詳細な三次元構造を一意に決定することは困難である。本研究では、この課題を克服するために、高速 AFM データと分子シミュレーションを統合することで、観察像から分子構造を推定する枠組みを構築することを目的とした。具体的には、溶液中 AFM によって取得したコンデンシンの画像に対し、粗視化分子動力学シミュレーションにより生成した構造アンサンブルを対応付けることで、各画像に対応する分子構造を推定し、ATP 加水分解サイクルに共役した構造変化機構の解明を目指した^[2]。

* (助成採択時) 京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 助教

2.2. 高速 AFM と分子シミュレーションの統合手法

本研究では、高速 AFM で取得された低分解能画像から分子構造を推定するために、分子シミュレーションと統合した解析手法を構築した。まず、出芽酵母由来のコンデンシン複合体について、ATP、ATP アナログ (AMP-PNP、ATPcS)、および ADP 存在下で溶液中 AFM 観察を行い、異なるヌクレオチド状態における構造像を取得した。次に、これらの AFM 画像に対応する分子構造を推定するため、Smc2/4 二量体に対する粗視化分子動力学シミュレーションを実施し、ヘッドの会合・解離およびヒンジの開閉状態を組み合わせた条件で構造アンサンブルを生成するとともに、AFM 画像へのフィッティングにより一致度 (coverage score) に基づいて最適構造を選択した。このようにして、実験で得られた AFM 画像とシミュレーションにより生成された構造アンサンブルを対応付けることで、「画像から構造を推定する」枠組みを実現した。本手法は、低分解能観察データに対して構造空間を探索し最適構造を同定する点で、生成系人工知能に類似したアプローチと位置づけられ、高速 AFM データの高解像度化に向けた基盤技術となる。

2.3. ヌクレオチド依存的構造変化の観察結果

高速 AFM 観察の結果、コンデンシン複合体はヌクレオチド状態に応じて顕著に異なる構造をとることが明らかとなった。まず、ヌクレオチド非存在下 (Apo 状態) では、ヒンジが閉じ、コイルドコイルアームが折れ曲がったコンパクトな構造 (One-form) がほぼ全ての分子で観察され、この構造は既報のクライオ電子顕微鏡構造とよく一致した。一方、ATP アナログである AMP-PNP や ATPcS 存在下では、アームが大きく開いた O-form が頻繁に観察され、ATP 結合に伴うヒ

ンジ開放が示唆された。また、B-form や I-form も一部で観察され、ATP 結合状態では複数の構造状態が共存することが明らかとなった。さらに、ADP 存在下ではヘッドが解離した V-form が多く観察されるとともに、ヘッド間距離が著しく拡大した新規構造 (Hat-form) が同定された。Hat-form は ATP 加水分解後の状態に特有であり、従来の研究では明確に捉えられていなかった構造である。以上の結果から、コンデンシンはヌクレオチドの結合および加水分解に応じて複数の構造状態を取り、それらの分布が大きく変化することが明らかとなった。これらの観察結果は、構造ダイナミクスが ATP 加水分解サイクルと強く結びついていることを示す直接的な証拠である。

2.4. 構造フィッティングと統計解析による機構解明

本研究では、高速 AFM 像から得られた分子形態を定量的に解釈するため、粗視化分子動力学シミュレーションによりヘッドの会合・解離およびヒンジの開閉状態を組み合わせた構造アンサンブルを生成し、AFM 画像へのフィッティングと統計解析により、アーム領域の一致度 (coverage score) に基づいて最適構造を同定した。

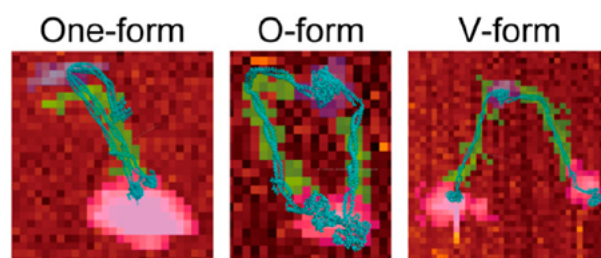


Fig. 1 コンデンシン分子構造の AFM 像へのフィッティングの代表例。粗視化分子動力学シミュレーションコンデンシン分子のコンフォメーションをシアンで示している。

その結果、ヌクレオチド存在下の AFM 像を再現するにはヒンジが開いた構造が不可欠であり、

ATP 存在下ではヘッド会合とヒンジ開放が協調的に誘起される一方、ADP 存在下ではヘッド解離状態が優勢となり、V-form および Hat-form が多くの画像を説明した。以上の結果は、ATP 結合に伴うヘッド会合とヒンジ開放の共役、および ATP 加水分解後のヘッド解離と構造再編成という一連の構造変化機構を示すものである。本研究は、AFM 観察像と分子シミュレーションを統合することで、コンデンシンの ATP 駆動型構造ダイナミクスを分子レベルで定量的に解明したものである。

2.5. コンデンシンの ATP 駆動構造変化モデル

以上の観察および統計解析の結果に基づき、コンデンシンの ATP 加水分解サイクルに共役した構造変化モデルを提案する。まず、ヌクレオチド非存在下では、ヒンジが閉じたコンパクトな One-form が安定状態として存在する。ATP が結合すると、ヘッドの会合が誘起されると同時にヒンジが開いた状態へと遷移し、O-form あるいは I-form が形成される。この状態ではアームが柔軟に開閉し、DNA の取り込みに適した構造をとると考えられる。その後、ATP の加水分解に伴いヘッドは解離し、V-form へと遷移する。さらに一部の分子では、ヘッド間距離が大きく拡大した Hat-form が形成され、この状態では Brn1 の一部が解離している可能性が示唆される。これらの結果は、ATP 結合によるヒンジ開放とヘッド会合、加水分解後のヘッド解離という一連の構造変化が段階的に進行することを示している。本モデルは、コンデンシンが ATP 駆動的に構造状態を切り替えることで DNA ループ形成を実現するという枠組みを支持するものであり、特にヒンジ開閉とヘッド状態の共役が DNA 取り込みおよび放出の制御に重要な役割を果たすと考えられる。

2.6. 本研究の意義

本研究は、高速 AFM 観察と分子シミュレーションを統合することで、分子構造ダイナミクスを定量的に解釈する新たな枠組みを提示した点に意義がある。特に、低分解能かつノイズを含む AFM 像に対し、構造アンサンブルとの対応付けによって分子構造を推定する手法は、高速 AFM データの高解像度化に向けた基盤技術となる。また、本研究により、コンデンシンの ATP 加水分解サイクルに共役した構造変化機構が明らかとなり、染色体構造制御の分子機構理解に新たな知見を与えた。さらに、本手法は他の動的タンパク質複合体にも適用可能であり、広範な生体分子の機能解明に寄与することが期待される。加えて、本研究のアプローチは生成系人工知能による構造推定と本質的に共通する枠組みを有しており、今後の AI 技術との融合により、より高精度な構造再構成手法へと発展する可能性を持つ。

3. 機械学習粗視化モデルによるタンパク質構造アンサンブルの再現と多量体形成の予測

3.1. 研究背景と目的

天然変性領域 (IDR) を含むタンパク質は多様な構造アンサンブルを取りながら機能を発現し、転写制御や液-液相分離 (LLPS) に重要な役割を果たす。これらの機構理解には構造分布とその遷移を記述できる分子動力学 (MD) シミュレーションが有効であるが、全原子 MD は計算コストの制約から大規模系や長時間ダイナミクスの解析に限界がある。本研究では、この課題を解決するため単量体の全原子 MD から得られた構造分布を教師データとして機械学習により粗視化力場を構築し、単量体情報のみから多量体形成に伴う構造変化の再現を検証するとともに、構造多様性と会合過程を統一的に記述する枠組みの確立を目指した。

3.2. 機械学習粗視化モデルの構築

本研究では、タンパク質の構造アンサンブルを再現する粗視化力場の構築に拡散モデルに基づく機械学習手法(Two-for-one; TFO)を用いた^[3]。TFO モデルは全原子分子動力学シミュレーションから得られた構造分布を教師データとし、その確率分布の勾配(スコア)を学習して力場を導出する。本研究では GCN4 ロイシンジッパー単量体の全原子 MD から得られた構造アンサンブルを1 残基 1 ビーズに粗視化して学習に用い、各残基を1 粒子として分子内相互作用をデータ駆動的に記述することで、参照構造に依存する Gō モデルと異なり特定構造を過度に安定化せず構造アンサンブル全体を再現できるモデルを構築した。さらに、多量体形成の再現に向けて分子内相互作用に TFO 力場、分子間相互作用に Gō ポテンシャルと排除体積ポテンシャルを組み合わせたハイブリッドモデルを用い、単量体情報に基づく力場によるタンパク質会合過程の再現を試みた。

3.3. 単量体構造アンサンブルの再現

構築した TFO 力場の妥当性を検証するため、GCN4 ロイシンジッパー単量体の粗視化分子動力学シミュレーションを行い全原子 MD で得られた構造アンサンブルと比較した結果、ヘリックスとコイルが混在する分布を概ね再現し単量体の構造多様性を表現できた。PCA および tICA 解析でも粗視化 MD の分布は全原子 MD とよく一致した。一方、AICG2+力場ではヘリックス構造が過度に安定化され部分的な構造ゆらぎを十分に再現できなかったが、TFO 力場は参照構造に依存せず構造アンサンブル全体を反映することでヘリックス-コイル間の多様性を適切に記述できた。以上の結果は機械学習に基づく粗視化力場が単量体の複雑な構造分布を再現できることを示している。

3.4. 多量体形成の予測

次に、単量体の構造アンサンブルのみを学習した TFO 力場を用いて GCN4 ロイシンジッパーの二量体形成を再現できるかを検証した。分子内相互作用には TFO 力場、分子間相互作用には Gō ポテンシャルと排除体積ポテンシャルを用いたハイブリッドモデルにより粗視化分子動力学シミュレーションを行った結果、初期状態で離れて配置した2本の単量体は自発的に接近・会合しコイルドコイル様の二量体構造を形成した。この過程では会合に伴いヘリックス構造が安定化し、単量体で部分的にほどけていた構造が秩序化されることが示され、「coupled folding and binding」を再現できた。さらに PCA および Q スコア解析からも二量体の構造分布は全原子 MD に近づくことが確認され、単量体情報のみから学習した力場が多量体形成を予測し構造遷移の物理的傾向を捉えていることが示唆された。

3.5. 学習データ依存性の検証

次に、構築した TFO 力場の学習データ依存性を検証した。単量体 MD から高ヘリックスフレームを除外して再学習した結果、70%以上除外では単量体分布と二量体でのヘリックス安定化は維持された一方、60%以上除外では単量体分布は再現されたものの二量体でのヘリックス安定化は失われた。これらは、二量体形成の再現に一定量のヘリックス情報が必要であり、TFO の表現能力がデータの量と質に依存することを示す。

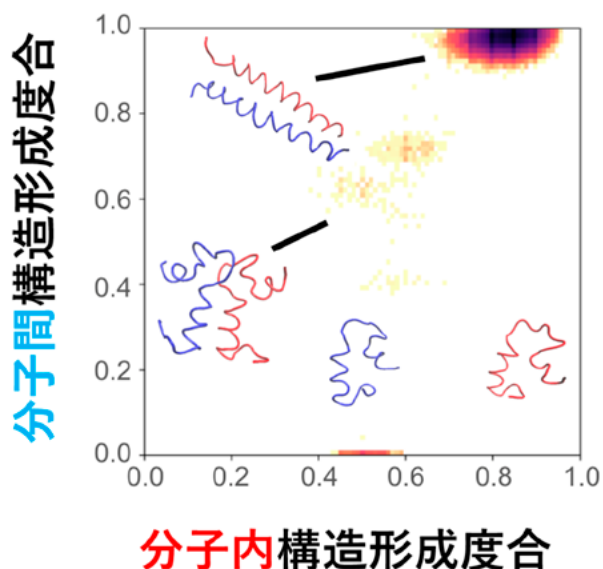


Fig. 2 分子内および分子間の構造形成度合いに基づく状態分類。横軸は分子内構造形成度合い、縦軸は分子間構造形成度合いを示す。ヒートマップは各状態の出現頻度(または確率密度)を表している。

3.6. 本研究の意義

本研究は、機械学習により構造アンサンブルから粗視化力場を構築し、単量体の情報のみから多量体形成を予測できることを示した点に意義がある。従来の粗視化モデルは参照構造に依存し構造多様性の表現に限界があったが、本手法は構造分布を学習することで IDR に特徴的な構造ゆらぎを含むアンサンブルを再現でき、学習データに含まれない多量体形成を再現したことからモデルが物理的傾向を捉えていることを示唆し、今後の汎用的な分子モデリング手法の発展につながると期待される。

4. 結論

本研究では、「生成系人工知能による高速 AFM データの高解像度化技術の開発」という目的のもと、実験と計算を統合した新たな分子構造解析手法の構築と、その応用を行った。まず、高速 AFM

観察と粗視化分子動力学シミュレーションを組み合わせることで、低分解能 AFM 像から分子構造を推定する枠組みを確立し、コンデンシンの ATP 加水分解サイクルに共役した構造変化機構を明らかにした。この結果、ヘッド会合とヒンジ開放の共役、および加水分解後のヘッド解離という一連の構造ダイナミクスが定量的に示された。さらに、機械学習に基づく粗視化モデルの開発により、単量体の構造アンサンブルのみから多量体形成を予測できることを示し、データ駆動型アプローチの有効性を実証した。これらの成果は、実験データとシミュレーションを融合することで情報の解像度を高める新しい方法論を提示するとともに、生成系人工知能と分子シミュレーションの統合による次世代の構造解析技術の基盤を築くものである。

5. 参考文献

- [1] Rutkauskas M, Kim E; In vitro dynamics of DNA loop extrusion by structural maintenance of chromosomes complexes, *Current Opinion in Genetics & Development*, 90, (2025), 102284.
- [2] Hiroki Koide, Noriyuki Koder, Shoji Takada, Tsuyoshi Terakawa; Solution AFM Imaging and Coarse-grained Molecular Modeling of Yeast Condensin Structural Variation Coupled to the ATP Hydrolysis Cycle, *Journal of Molecular Biology*, 437 -17, (2025), 169185.
- [3] Arts M., Garcia Satorras V., Huang C. W., Zügner D., Federici M., Clementi C., Noé F., Pinsler R., van den Berg R.; Two for One: Diffusion Models and Force Fields for Coarse-Grained Molecular Dynamics, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 19 - 18, (2023), 6151–6159.

6. 本研究にかかわる成果発表等

- ・ Hiroki Koide, Noriyuki Koderu, Shoji Takada, Tsuyoshi Terakawa; Solution AFM Imaging and Coarse-grained Molecular Modeling of Yeast Condensin Structural Variation Coupled to the ATP Hydrolysis Cycle, Journal of Molecular Biology, 437 -17, (2025), 169185.

7. 謝辞

京都大学理論生物物理学研究室のメンバーの皆様には、本研究を通じて多くの議論とご支援を賜り、心より感謝申し上げます。また、貴重なご議論をいただいた Christian Haering 教授、ならびにタンパク質精製を行っていただいた寺川 まゆ博士に深く感謝いたします。本研究は、公益財団法人島津科学技術振興財団研究開発助成の支援を受けて実施されました。

液体クロマトグラフィー用細繊維状ポリイミド固定相の開発

豊橋技術科学大学大学院工学研究科 助教 中神 光喜

1. はじめに

液体クロマトグラフィー (LC) は、試料中に存在する混合物を個々の成分に分離するとともに、後続の検出器にて、それぞれの同定・定量が可能な分離分析技術の一つであり、その分離性能の高さや分析対象となり得る試料範囲が極めて広範であることから、種々の分野において一般的に使用されている。LC 分離は、カラム内に充填された分離媒体である固定相と化合物との間に働く各種相互作用を利用しており、測定対象物質である個々の化合物が有する種々の物理化学的パラメーターの大小が化合物ごとに異なることから分離が達成されている。従って、混合物である試料から各成分に単離・精製するためには、測定試料に応じた適切な分離条件を選択する必要がある、特に、分離性能に強く影響を及ぼす固定相の選択は極めて重要である。

LC 用の分離固定相は、多くの場合、多孔性のシリカゲル表面に、アルキル基などの固定相配位子をシランカップリングにより化学結合した微粒子が採用されている。代表的な固定相としては、多孔性のシリカゲル粒子表面に固定相配位子としてオクタデシル基を化学結合させたオクタデシルシリカ (ODS) 固定相があげられる。ODS 固定相は、その固定相配位子の化学構造から推察されるように、保持メカニズムに疎水性相互作用が強く寄与している無極性固定相である。広範な化合物種の分離に適合することから、LC 用の標準的な固定相であり、未知試料分析の際には、分離固定相の第一候補とされることが多い。しかし、ODS 固定相は無極性化合物の分離には広く適合

する一方で、分析対象となり得る化合物範囲の拡大に伴い、多くの極性化合物の分離が求められている。このような背景から、種々の官能基を有する固定相配位子を導入し、保持メカニズムに寄与する相互作用の種類を拡張することにより、ODS 固定相とは異なる分離選択性を有する新規固定相が開発されてきた。

近年、LC 用の分離固定相として、シリカゲルベースとは異なる分離媒体の開発が一層推進されており、その一例として、ポリマーベース固定相があげられる。具体的には、ポリスチレンをベースに各種官能基を導入したタイプや、分子インプリントポリマーや、モノリス構造を導入した固定相など、合成高分子材料などの各種担体を LC 用の分離媒体として導入した新規固定相が開発されてきた。しかし、依然として、試料中に存在する化合物どうしの化学構造が酷似している場合、それぞれの保持に寄与する相互作用の種類ならびに大きさの差が極めて小さいため、分離が困難なケースが存在する。

本研究は、上述の課題に対する一つのアプローチとして、ポリイミド細繊維を新規分離媒体として導入した LC 用分離カラムの開発を行った。ポリイミド繊維は、複数の芳香環がイミド結合を介して結合した、極めて剛直な化学構造を有する細繊維状合成高分子材料であり、優れた耐熱性や耐溶媒性を有するスーパーエンジニアリングプラスチックの一つである。この細繊維状のポリイミドを LC 用の固定相として導入し、各種芳香族化合物の保持を系統的に調査するとともに、その保持挙動ならびに保持メカニズムの物理化学的

考察を行った。従来の固定相は、そのほとんどが微粒子状の形状を有しているが、本研究では、細繊維状のポリイミドを新規固定相として採用し、その細繊維束をカラムに平行に充填している。従来型固定相として採用されている多孔性微粒子型、モノリス型、コア-シェル型のいずれとも異なる特殊なカラム内部構造を有する新規分離媒体として、この細繊維状ポリイミド固定相の応用可能性について検討した。

2. ポリイミド細繊維充填カラム

細繊維状のポリイミドとして、P84を採用した。その化学構造を Fig. 1 に示す^[1]。このポリイミド細繊維の束を内径 4.6 mm、長さ 250 mm のステンレス管に平行に充填することにより、ポリイミド細繊維充填カラムを作製した。

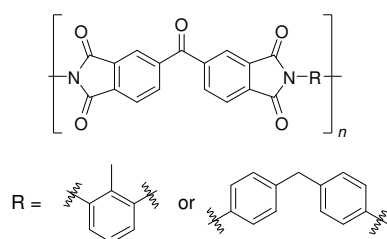


Fig. 1 細繊維状ポリイミドの化学構造。

細繊維の充填方法については、これまでに当研究グループにおいて、内径 0.3~0.5 mm 程度のキャピラリーに細繊維を充填したデバイスを作製しており^[2]、その際に使用してきた手法を、より内径の大きい LC 用のステンレス管に応用した。具体的な手順は、(1) ポリフッ化ビニリデン製の釣り糸をステンレス管に挿入して、挿入側とは反対の管端から 100 mm 程度引き出す。引き出した釣り糸の端部を管内に再度挿入し、ステンレス管の管端にループを形成する。(2) 166 本から構成される Zylon 繊維（東洋紡）1 束を約 700 mm の長さに切り出した後、ステンレス管の管端に形成

したループに通す。この際、切り出した Zylon 繊維の midpoint がループ内に入るように配置するとともに Zylon 繊維の両端を揃える。その後、釣り糸の端をステンレス管の反対側から引き出すことにより、当初ループを形成した管端とは反対側の管端に Zylon 繊維のループを形成する。(3) 次に、1 束約 480 本のフィラメントから構成されるポリイミド細繊維を長さ 700 mm に 55 束分切り出す。これを繊維方向を揃えて束ねた後、Zylon 繊維のループに通す。その後、Zylon 繊維をステンレス管の反対側から慎重に引き抜くことにより、ポリイミド細繊維をステンレス管の管軸方向と平行に充填する。上記の充填方法では、ポリイミド細繊維は二つ折りのように充填されるため、カラム 1 本あたりの細繊維充填本数は、準備した細繊維本数の 2 倍である、約 52,800 本のポリイミド細繊維を充填することが可能である。上記の充填工程の後、ステンレス管の管端からはみ出した余剰のポリイミド細繊維を切断し、LC 装置に接続するためのカラムナットをステンレス管の両端に取り付けることにより、ポリイミド細繊維充填カラムを作製した。

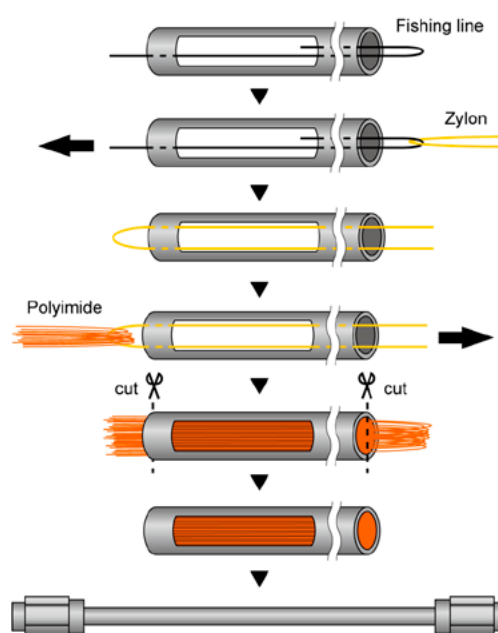


Fig. 2 ポリイミド細繊維の充填方法。

3. 結果と考察

本研究で使用した LC システムについては、汎用の装置構成を採用している。また、本研究において作製したポリイミド細繊維充填カラムも、市販の LC カラムと同一のカラムナットを使用していることから、その導入には、専用設計した特殊デバイス等は不要であり、市販の分離カラムと同様に接続することが可能である。

本研究では、比較用の固定相として、モノメリック型の ODS 固定相(Develosil ODS-UG; 4.6 mm i.d., 150 mm length; 野村化学)と、その固定相の化学構造中に芳香環を有するフェニルブチルシリカ(PBS)固定相(YMC-Triart Phenyl; 4.6 mm i.d., 150 mm length; YMC)を使用した。

3.1. 保持メカニズムの評価

細繊維状ポリイミド固定相の基本的な保持傾向を調査するため、同一骨格にそれぞれの長さのアルキル基を有する試料の保持を測定し、その保持係数 k を評価した。保持傾向の評価に際し、1-オクタノール/水分配係数($\log P$)を導入した。 $\log P$ が大きいほど、その化合物の疎水性が大きいことを示し、ODS 固定相をはじめとする汎用無極性固定相においては、 $\log P$ が大きい化合物に対して強い保持を示すことが知られている^[3]。

各固定相において、メタノール水混合移動相条件下における、炭素数 1~5 の直鎖のアルキル基を有するアルキルベンゼンならびに安息香酸アルキルエステルの $\ln k$ - $\log P$ プロットを Fig. 3 に示す。双方の試料群において、ODS ならびに PBS 固定相では、 $\ln k$ と $\log P$ の間に良好な直線関係が確認された。しかし、ポリイミド細繊維固定相においては、比較的長いアルキル基を有する化合物においては、 $\log P$ が大きい化合物を強く保持する傾向が確認できるものの、短いアルキル基を有する化合物、特にトルエンおよび安息香酸メチ

ルの保持は、疎水性相互作用から予想される保持よりも大きかった。従って、ポリイミド細繊維固定相の保持メカニズムには、分散力に起因する疎水性相互作用とは異なる相互作用が寄与していることが推察される。

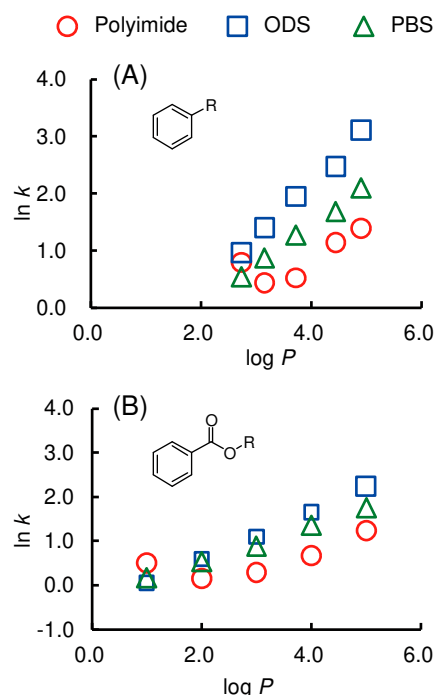


Fig. 3 各種芳香族化合物に対する保持挙動。(A)アルキルベンゼン、(B)安息香酸アルキル。

また、上述の化合物のパラ位に水酸基が結合した、4-アルキルフェノールならびに *p*-ヒドロキシ安息香酸アルキルを導入し、同様の測定を行った。それらの $\ln k$ - $\log P$ プロットを Fig. 4 に示す。その化学構造中に水酸基を有する化合物種については、水酸基を有していない化合物と比較して、いずれの固定相においてもその保持は小さかった。しかし、ポリイミド細繊維固定相における保持挙動は、従来の無極性固定相と異なっている点、また、メチル基を有する化合物に対して強い保持を示す点については、水酸基を持たない化合物とよく似た傾向を示した。

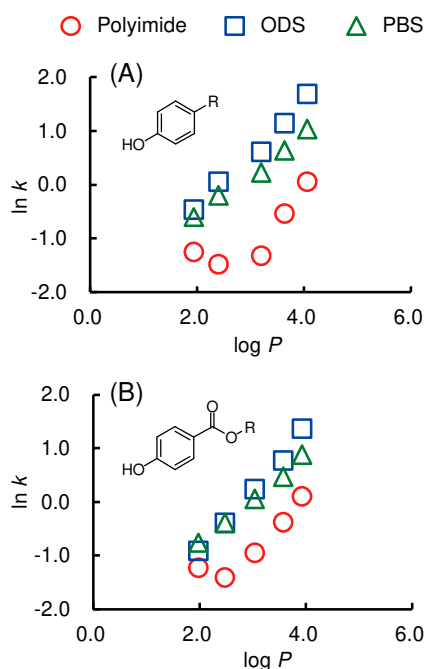


Fig. 4 極性官能基を有する化合物に対する保持挙動。
(A) 4-アルキルフェノール、(B) *p*-ヒドロキシ安息香酸アルキル。

水酸基の有無に対する選択性を評価するため、水酸基を有しない化合物の保持係数を、水酸基を有する化合物の保持係数で除し、各化合物について分離係数を算出した。Table 1 に水酸基の有無に対する分離係数をそれぞれ示す。ポリイミド固定相は、安息香酸アルキル類及びアルキルベンゼン類のほぼすべての化合物ペアにおいて、ODSおよびPBS固定相よりも高い分離係数を示した。この結果から、細繊維状ポリイミド固定相が、水酸基の有無に対して高い選択性を有していると判断することができる。また、ODSやPBS固定相では、アルキル基の長さによって、その分離係数がほとんど変化しないものの、細繊維状ポリイミド固定相では、炭素数が短いほど高い分離係数を示したことから、その保持メカニズムには、アルキル鎖の分散力に起因する疎水性相互作用よりも、水酸基に起因する極性相互作用あるいは双極子モーメントなどが強く影響を及ぼしていることが推察される。

Table 1 水酸基の有無に対する分離係数。

アルキル基の炭素数		分離係数		
ポリイミド		ODS	PBS	
1	5.65	2.60	2.52	
2	4.78	2.60	2.52	
3	3.44	2.34	2.29	
4	2.82	2.40	2.41	
5	3.09	2.37	2.40	

アルキル基の炭素数		分離係数		
ポリイミド		ODS	PBS	
1	7.73	4.20	3.14	
2	6.83	3.82	2.91	
3	6.72	3.82	2.88	
4	5.33	3.80	2.86	
5	3.79	4.14	2.89	

3.2. ポリイミド細繊維の示す特異的温度依存性

一般的に、測定時のカラム温度と固定相が各化合物に対して示す保持の関係は、下記の van't Hoff の式に従うことが知られている^[4]。

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \varphi \quad \text{Eq. (1)}$$

ここで、 $\ln k$ は保持係数の自然対数、 ΔH° および ΔS° は、化合物が移動相から固定相に保持される際のエンタルピー変化およびエントロピー変化、 R は気体定数、 T は測定時のカラムの絶対温度、 φ は相比を示している。この式より、カラム温度の上昇に対して試料の保持が減少することがわかり、測定時に温度変化を伴う分離、特にガスクロマトグラフィーにおける温度プログラム分離などにおいては、この式が示す関係性を考慮したうえで、その温度条件を決定している。本研究で固定相として応用したポリイミド細繊維は、高い耐熱性を有していることから、LC 測定時のカラム温度を変更した際の保持挙動の変化を評

価した。

Fig. 5 に、トルエンの保持を用いて作成した van't Hoff プロットを示す。ODS 固定相や PBS 固定相では、カラム温度の上昇に伴いその保持の減少が確認できる一方で、細繊維状ポリイミドでは特異的な温度依存性が確認できた。この傾向は、ポリイミド細繊維をガスクロマトグラフィー用の固定相として応用した報告^[4]や、PMDA-ODA タイプのポリイミド微粒子を LC 用固定相として応用した報告^[5]では確認されておらず、限定的な条件下において発生するものであると考えられる。一方で、そのメカニズムの詳細については明らかになっておらず、今後も継続して原因探求を行う必要がある。

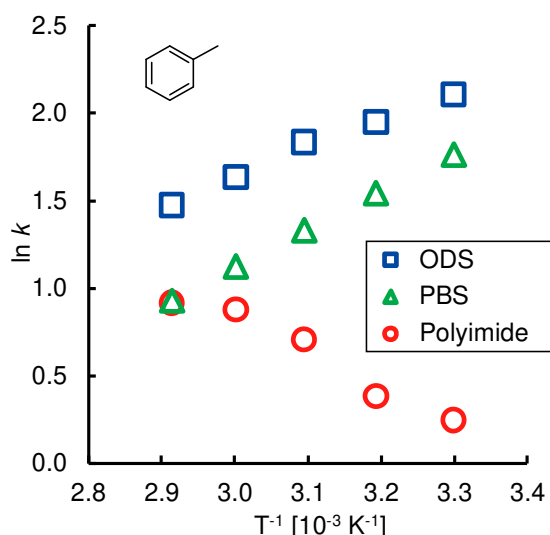


Fig. 5 トルエンに対する van't Hoff プロット。

4. 結言

本研究では、これまでに採用されてきた分離媒体とは異なる物理的構造を有する細繊維状の合成高分子材料として、ポリイミド細繊維を新規 LC 用固定相として導入し、その保持メカニズムの解析を行った。細繊維状のポリイミドにおける保持メカニズムには、疎水性相互作用が関与しているものの、メチル基を有する化合物の保持が、エチル基を有する化合物の保持よりも大きかつ

たことから、その寄与は限定的であることが推察される。また、極性官能基の有無に対する認識能は、従来固定相よりも優れていることが確認された。さらに、細繊維状ポリイミドでは、特異的な温度依存性についても確認され、この特性については、細繊維状のポリイミドが高温条件における LC 分離への応用可能性を有していることが予想される。一方で、細繊維状ポリイミドが示す温度依存性の原因については、さらなる系統的な調査が必要である。本研究の発展的応用として、繊維の表面改質や、細繊維間の綿密な流路設計を実施することにより、従来のシリカゲル系固定相とは異なる分離性能を持つ、LC 用新規固定相の開発につながると考えられる。また、ポリイミド細繊維をはじめとする、優れた耐熱性などの物理化学的特性を有する合成繊維材料の導入により、超高温 LC 分離技術への展開が期待される。

5. 参考文献

- [1] K. Nakagami; Polymer-Based Materials for Sample Preparation and Chromatographic Separation, *Chromatography*, **47**, (2026), 11-19.
- [2] K. Nakagami, A. Yamaguchi, R. Kono, I. Ueta, Y. Saito; Fibrous Polyimide Stationary Phase for the Separation of Aromatic Compounds in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Chromatography*, **45**, (2024), 47-53.
- [3] K. Nakagami, M. Hamada, T. Aya, I. Ueta, Y. Saito; Retention Behavior of Aromatic Compounds on a Poly(butylene terephthalate) Stationary Phase: Effect of Mobile Phase Composition, *Chromatography*, **46**, (2025), 63-69.
- [4] K. Nakagami, O. Sumiya, T. Tazawa, T. Monobe, M. Watanabe, I. Ueta, Y. Saito;

Polyimide Filaments as a Novel Stationary Phase in Packed-Capillary Gas Chromatography, *Chromatography*, **39**, (2018), 91-96.

- [5] O. Sumiya, T. Tazawa, K. Nakagami, Y. Shirai, K. Moriuchi, I. Ueta, Y. Saito; Spherical Polyimide Particles as a Novel Stationary Phase in Liquid Chromatography, *Chromatography*, **39**, (2018), 105-111.

6. その他成果発表等

- ・ 中神光喜, 山口綾友, 河野凌雅, 植田郁生, 齊戸美弘, 細繊維状ポリイミド固定相における芳香族化合物の保持挙動, 第 31 回クロマトグラフィーシンポジウム, 那覇, 2024 年 6 月 6 日.
- ・ 中神光喜, 植田郁生, 齊戸美弘, ポリイミド繊維を充填した試料前処理針を用いたギ酸の抽出・誘導体化同時処理, 日本分析化学会第 73 年会, 名古屋, 2024 年 9 月 11 日.
- ・ 中神光喜, 合成高分子材料の試料前処理ならび

にクロマトグラフィー分離への応用に関する研究, 第 36 回クロマトグラフィー科学会議, 京都, 2025 年 9 月 16 日.

- ・ 中神光喜, 山口綾友, 中村颯汰, 植田郁生, 齊戸美弘, ポリイミドフィラメント固定相の芳香族化合物に対する分子形状選択性, 第 36 回クロマトグラフィー科学会議, 京都, 2025 年 9 月 17 日.
- ・ K. Nakagami, A. Yamaguchi, S. Nakamura, I. Ueta, Y. Saito, "Retention Behavior for Aromatic Compounds with Polyimide Fine Filaments as a Stationary Phase in Reversed-Phase Liquid Chromatography," 20th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2025), Kyoto University, September 18.

7. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成により行われました。この場を借りて御礼申し上げます。

階層的な細胞内分子ダイナミクスの時空間分解計測法の開発

京都大学 大学院理学研究科 助教 中曽根 祐介

1. はじめに

生命現象は、生体分子の構造変化や分子間相互作用が時間的・空間的に連鎖することで成り立っている。タンパク質や核酸などの生体高分子は、単に静的な構造体として存在しているのではなく、熱揺らぎの中で絶えず構造を変化させ、周囲の分子や細胞内環境と相互作用している。例えば、タンパク質の局所的な側鎖配向変化、ドメインの開閉運動、分子間会合・解離、さらに液-液相分離や線維状集合体形成のような高次の集合反応は、互いに異なる時空間スケールで進行する。これらの反応は独立に起こるのではなく、局所的な構造変化が高次構造変化を誘起し、それが分子間相互作用や集合状態の変化へとつながる場合が多い。

したがって、生命現象を分子論的に理解するためには、原子・分子レベルの反応だけでなく、細胞内の微小環境において分子がどのように動き、どのように相互作用し、どのように集合状態を変えるのかを階層的に捉える必要がある。特に近年、細胞内では膜をもたない分子集合体や凝縮体が重要な役割を担うことが明らかになりつつあり、生体分子の構造変化と運動性変化を細胞内で直接計測する技術の重要性が高まっている。

一方で、従来の計測法にはそれぞれ限界がある。バルク溶液を対象とした分光法は、高い時間分解能と感度を有し、生体分子の反応過程を詳細に追跡できる。しかし、測定対象は試料全体の平均情報であり、細胞内や微小領域に存在する局所的な分子環境の違いを区別することは難しい。これに対して、蛍光顕微鏡法は細胞内の空間情報を得るうえで優れているが、分子の並進拡散や回転運動

といった運動性を高速かつ定量的に測定することは容易ではない。特に、反応の進行に伴って分子の拡散係数や回転運動がどのように変化するかを、細胞内の特定領域で時間分解的に追跡する手法は限られている。

そこで本研究では、生体分子の階層的なダイナミクスを時空間分解能をもって計測するため、独自の顕微分光法の開発に取り組んだ。具体的には、分子の並進拡散や反応に伴う拡散係数変化を検出できる過渡回折格子法 (Transient Grating, TG 法) と、分子の回転運動や局所的な揺らぎを検出できる高速蛍光偏光解消法 (High-speed Fluorescence Depolarization, HS-FDP 法) を顕微鏡システムへ導入した。これにより、細胞内や微小領域における生体分子の構造変化、分子間反応、運動性変化を相補的に解析できる計測基盤の構築を目指した。

2. 方法

2.1. 過渡回折格子法 (TG 法)

過渡回折格子法では、二本の励起パルス光を試料上で交差させ、光の干渉によって周期的な励起パターンを形成する。干渉縞の明部では分子が選択的に励起され、励起分子からの熱放出、吸収スペクトル変化、部分モル体積変化などにより、試料中に周期的な屈折率変調が生じる。この屈折率変調は一時的な回折格子として働くため、別途導入したプローブ光を回折させる。得られた回折光の時間変化を解析することで、分子反応に伴う熱、体積変化、拡散過程を高感度に検出できる (Fig. 1)。

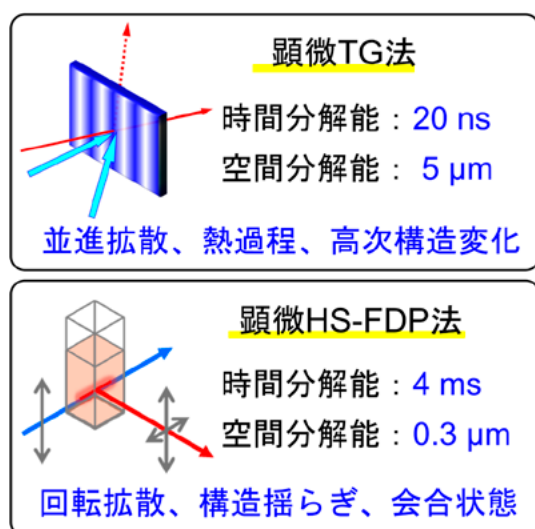


Fig. 1 顕微 TG 法と顕微 HS-FDP 法の原理図と得られる情報。両手法を組み合わせることで、細胞のような微小空間における分子運動性を相補的に計測できる。

TG 信号は、熱拡散や分子拡散によって時間とともに減衰する。この減衰過程は、形成された空間変調が時間とともに消失する過程を反映している。そのため、TG 信号の時間変化から分子の拡散係数を短時間で決定することができる。また、光反応に伴ってタンパク質の高次構造変化や分子間会合・解離が起こる場合には、反応前後で分子の大きさや形状が変化し、それに伴って拡散係数も変化する。TG 法では、この拡散係数変化を時間分解で追跡できるため、分子反応の進行を「分子の動き」の変化として直接捉えることができる (Fig. 1)。

従来の TG 法は、主にバルク溶液中での測定に最適化されており、高い時間分解能と感度を有する一方で、空間分解能は限定的であった。そのため、細胞内やマイクロ流路内のような微小空間で局所的な反応を測定することは困難であった。本研究では、顕微鏡光学系と TG 法を組み合わせ、測定スポットを微小化することで、空間分解能を

高めた顕微 TG 法の開発を進めた。特に、励起光とプローブ光の集光条件を制御することで、十分な信号強度を確保しながら、試料への光損傷を抑える光学設計を行った。

2.2. 高速蛍光偏光解消法 (HS-FDP 法)

蛍光偏光解消法では、直線偏光で蛍光色素を励起し、発生した蛍光の平行偏光成分と垂直偏光成分を検出する。励起直後の蛍光は偏光性をもつが、蛍光寿命の間に分子が回転運動を行うと、観測される蛍光偏光は時間とともに解消する。この偏光解消過程を解析することで、蛍光色素が結合した部位の局所運動や、分子全体の回転運動を評価できる (Fig. 1)。

この手法は、分子の構造揺らぎや会合状態を調べるうえで有効である。例えば、タンパク質が単量体として自由に運動している場合には比較的速い偏光解消が観測される。一方、分子が会合体や凝集体を形成すると、回転運動が遅くなり、偏光解消の速度や振幅が変化する。したがって、蛍光偏光解消法は、分子の構造変化だけでなく、集合反応や相分離に伴う運動性変化を検出するための有力な手法である (Fig. 1)。

本研究では、ストリークカメラを用いて蛍光偏光の平行成分と垂直成分を同時に検出する高速蛍光偏光解消システムを構築した。従来の逐次測定では、測定中の蛍光強度変化や光退色が解析に影響する場合があるが、本システムでは二つの偏光成分を同時に取得できるため、これらの影響を抑えた解析が可能である。また、ストリークカメラを用いることで、短時間で時間分解蛍光データを取得でき、試料の状態変化を追跡しやすい。

さらに、この HS-FDP 法を顕微鏡に組み込むことで、細胞内や微小領域における分子の回転運動を測定することを目指した。これにより、蛍光イメージングで得られる空間情報に加えて、分子運

動性に関する時間分解情報を同時に取得できると考えられる。

3. 結果

3.1. 顕微 TG 法の開発

本研究では、まず顕微鏡下で TG 信号を取得するための自作光学系を構築した (Fig. 2). 顕微 TG 法では、励起光によって形成される干渉縞とプローブ光の検出領域を正確に重ねる必要がある。また、測定スポットを小さくすると空間分解能は高くなるが、得られる信号量は減少しやすくなる。さらに、励起光を強く集光しすぎると、試料の光損傷や局所的な加熱が問題となる。したがって、顕微 TG 法の実現には、空間分解能、信号感度、試料への負荷のバランスを取る光学設計が重要であった。

この課題を解決するため、本研究では集光性の高いレンズを光学系に導入し、顕微鏡下での検出領域を微小化した。特に、プローブ光を小さく絞り込むことで、局所的な屈折率変化に由来する回折光を選択的に検出できるようにした。一方で、励起光については過度に集光せず、比較的広い領域に照射する設計とすることで、試料への光損傷や局所的な加熱を抑えた。すなわち、プローブ光の検出領域を微小化して空間分解能を高めつつ、励起光の照射密度を抑えることで、信号感度と試料への低侵襲性の両立を図った。構築した顕微 TG 光学系を用いて信号取得を行ったところ、熱信号を明瞭に観測することができた。さらに、測定条件を最適化することで、従来条件と比較して信号感度の向上が確認された。これは、プローブ光の検出領域を適切に制限したことで背景信号が抑えられ、局所的な屈折率変化に由来する回折光を効率よく検出できたためと考えられる。

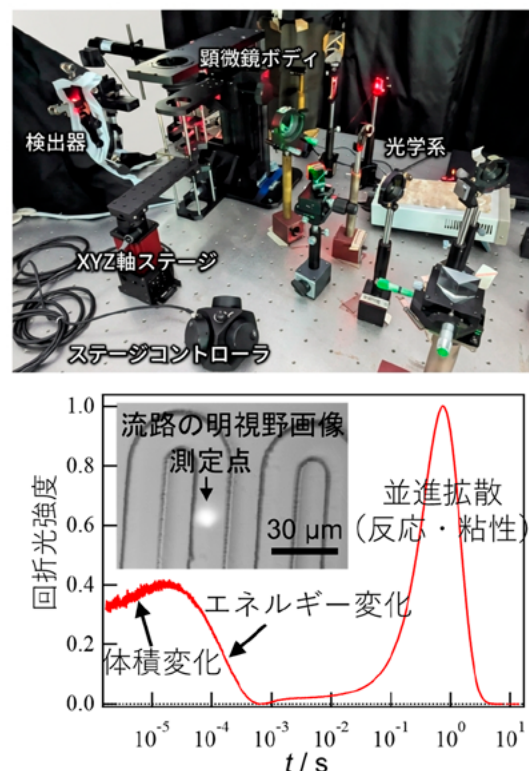


Fig. 2 空間分解測定の実証として、蛇行型のマイクロ顕微 TG 法の開発と空間分解測定。上図は、顕微鏡下で TG 信号を取得するために構築した自作光学系を示す。下図は、マイクロ流路を用いた空間分解測定の例であり、微小領域における局所的な信号取得が可能であることを示している。

空間分解測定の実証として、蛇行型のマイクロ流路を作製し、内部に光応答性タンパク質溶液を封入して測定を行った (Fig. 2). マイクロ流路は、顕微鏡下で測定位置を制御しながら、流路内外の信号変化を評価するために有用である。実験では、ステージの座標を制御しながら TG 信号を測定し、測定位置に応じた信号強度の変化をモニターした。その結果、流路内の試料溶液から明瞭な TG 信号を検出することに成功した。

得られた TG 信号には、光励起に伴う体積変化、熱放出に由来する熱過程、さらに分子の並進拡散に伴う拡散過程など、複数の寄与が含まれていた。これらの成分は異なる時間領域に現れるため、信号の時間変化を解析することで、光応答性タンパ

ク質の反応に伴う物性変化と分子運動を評価できる。この結果は、顕微 TG 法により、微小流路内に閉じ込めた生体分子の局所的な反応信号を取得できることを示している。

3.2. 顕微 HS-FDP 法の開発

次に、分子の回転運動や局所的な揺らぎを細胞内および微小領域で検出するため、顕微 HS-FDP 法の測定系構築を進めた (Fig. 3)。

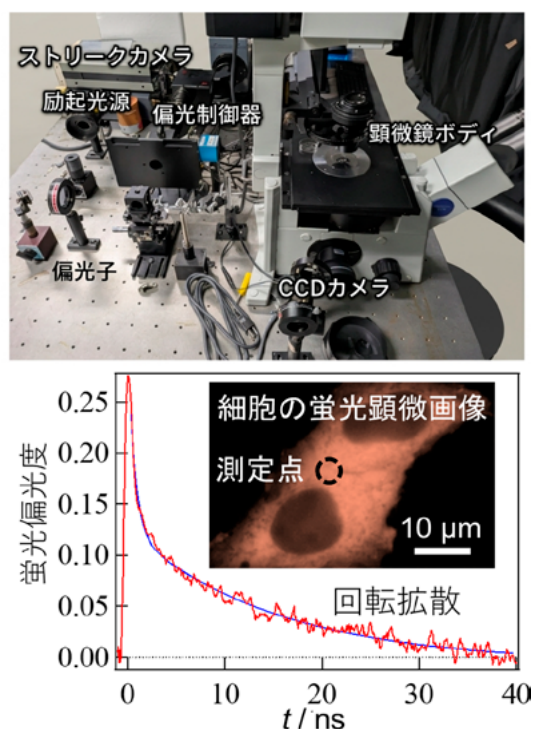


Fig. 3 顕微 HS-FDP 法の開発と細胞内測定. 上図は、蛍光偏光解消信号を顕微鏡下で取得するために構築した光学系を示す。下図は、細胞内蛍光タンパク質を対象とした測定例であり、細胞内の特定領域から時間分解蛍光偏光解消信号を取得できることを示している。

本研究では、顕微鏡下の試料から発生した蛍光を効率よく集光し、ストリークカメラへ導入するための光学系を構築した。顕微鏡から取り出した蛍光をできるだけ損失なく検出系へ導くため、リレーレンズ系および結像条件を最適化し、微小領域からの弱い蛍光信号を時間分解測定に利用で

きる構成とした。

また、蛍光偏光解消信号の取得と同時に、明視野画像を観察できる光路を導入した。これにより、細胞の形状や測定位置を確認しながら、特定領域からの蛍光信号を選択的に取得できるようになった。測定位置の情報と時間分解蛍光信号を対応づけられるため、細胞内および微小領域における局所的な分子運動性を解析するための基盤が整った。

一方、HS-FDP 法による分子運動性解析を安定に行うためには、蛍光異方性が高く、かつ十分な蛍光寿命をもつ色素を用いる必要がある。そこで本研究では、蛍光偏光解消測定に適した色素を選定し、タンパク質へのラベル方法を検討した。測定対象として、環境変化に応じて集合反応を起こす天然変性タンパク質 Pbp1 を用い、HS-FDP 測定に適した標識試料の調製条件を確立した。

標識 Pbp1 を用いた測定では、集合反応の進行に伴って蛍光異方性の時間変化が変化することを確認した。この変化は、集合状態への移行により、分子全体の回転運動や局所的な揺らぎが変化したことを反映していると考えられる。さらに、集合から線維化へ至る過程では、分子運動性の低下を示す信号変化が観測された。以上の結果から、HS-FDP 法により、天然変性タンパク質の集合や線維化に伴う運動性変化を時間分解で検出できることが示された。

さらに、構築した顕微 HS-FDP システムを用いて、細胞内に発現した蛍光タンパク質を対象とした測定を行った。明視野画像により細胞の位置を確認しながら、顕微鏡下で細胞内の特定領域を選択し、その領域から蛍光偏光解消信号を取得することに成功した (Fig. 3)。これにより、精製タンパク質を対象とした運動性解析で確立した測定原理を、細胞内および微小領域の局所測定へ展開

するための基盤が整った。

3.3. 顕微 TG 法と顕微 HS-FDP 法の統合

顕微 TG 法と顕微 HS-FDP 法は、それぞれ異なる分子運動を検出する相補的な手法である。顕微 TG 法は、分子の並進拡散や反応に伴う拡散係数変化を捉えることに適している。一方、顕微 HS-FDP 法は、分子の回転運動や局所的な構造揺らぎを検出することに適している。したがって、これら二つの手法を同一の顕微鏡基盤上で利用できれば、生体分子の運動性を多角的に解析できる。

そこで本研究では、顕微 TG 法と顕微 HS-FDP 法の要素技術の開発を進めるとともに、両者を切り替えて使用できる統合型顕微鏡システムの構築に取り組んだ。具体的には、蛍光顕微鏡システムを基盤として、TG 信号を取り出すためのレンズおよびミラー系を対物レンズ切り替え用のターレット部に導入した。これにより、ターレットを切り替えることで、TG 測定と HS-FDP 測定を同一システム上で選択できる構成とした。

この統合により、同一試料に対して、並進運動と回転運動の両方を相補的に調べるための基盤が整った。例えば、分子集合体の形成過程では、分子全体の拡散は遅くなる一方で、局所的な揺らぎは残る場合がある。また、液滴状の凝縮体では、分子が集合しているにもかかわらず、内部では一定の流動性を保つ場合がある。このような複雑な状態を理解するには、並進拡散だけ、あるいは回転運動だけを見るのでは不十分であり、両者を組み合わせた解析が重要である。

4. まとめと今後の展望

本研究では、細胞内および微小領域における生体分子の階層的ダイナミクスを解析するため、顕微 TG 法および顕微 HS-FDP 法の開発を進めた。顕微 TG 法では、微小流路内に導入した光応答性

タンパク質から TG 信号を検出し、体積変化、熱過程、拡散過程を含む局所的な反応信号を取得した。顕微 HS-FDP 法では、蛍光色素の選定とタンパク質ラベル法を確立し、分子運動性の変化を蛍光偏光解消信号として検出した。さらに、細胞内蛍光タンパク質を対象として、顕微鏡下の特定領域から偏光解消信号を取得することに成功した。

また、本研究期間内には、顕微化に向けた技術開発と並行して、その基盤となる TG 法および蛍光偏光解消法を用いた生体分子ダイナミクス研究を進めた。光応答性タンパク質、光応答性 DNA、蛍光タンパク質、光制御型タンパク質放出系などを対象として、構造変化、分子間相互作用、並進拡散、回転運動に関する解析を行い、その成果を論文として発表した^[1-6]。これらの成果は、TG 法および蛍光偏光解消法が多様な生体分子系の運動性解析に有効であることを示しており、顕微 TG 法および顕微 HS-FDP 法を細胞内・微小領域測定へ展開するための基盤となる。

以上の成果により、分子の並進拡散、回転運動、局所的な揺らぎを微小領域で相補的に解析するための基盤が整った。今後は、光応答性タンパク質、天然変性タンパク質、液-液相分離系、細胞内分子集合体などへ応用し、細胞内の局所環境における分子反応や集合過程を時間分解的に解析する。これにより、細胞内で進行する生命現象を分子運動の観点から理解するための新しい顕微分光法として展開していく。

5. 参考文献

- [1] DSouza RS, Nakasone Y, Iwabe N, Tomii K, Suzuki J, Sakamaki K; c-FLIP: A pseudoprotease with emerging metal-binding activity, FEBS Journal, (2026), in press, doi: 10.1111/febs.70593.
- [2] Kinoshita Y, Nakasone Y, Terazima M, Hosoi

- H; Different dimerization affinity and orientation of fluorescent proteins eGFP and eYFP, *Physical Chemistry Chemical Physics*, (2026), in press, doi: 10.1039/d6cp01098a.
- [3] Tokashiki T, Ohata T, Tokonami S, Oda T, Terazima M, Nakasone Y; Kinetic Insights into Photoinduced Monomer-Dimer Conversion and Activation of Orange Carotenoid Protein, *Journal of Physical Chemistry B*, 130, (2026), 2331–2342.
- [4] Yoshimura M, Sasayama R, Kajiwarra T, Mori C, Nakasone Y, Inose T; Remote Silyl Groups Enhance Hydrolytic Stability and Photocleavage Efficiency in Carbamates for Protein Release, *Angewandte Chemie International Edition*, 64, (2025), e202502376.
- [5] Takekawa G, Nakasone Y, Kamiya Y, Asanuma H, Terazima M; Reaction and interaction dynamics of azobenzene-tethered DNA with T7 RNA polymerase, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 27, (2025), 3302–3312.
- [6] Nakasone Y, Murakami H, Tokonami S, Oda T, Terazima M; Time-resolved study on signaling pathway of photoactivated adenylate cyclase and its nonlinear optical response, *Journal of Biological Chemistry*, 299, (2023), 105285.

6. その他成果発表等

- 西野 晶翔, 西谷 公佑, 永井 萌土, 寺嶋 正秀, 中曽根 祐介, 微小空間内の反応解析に向けた顕微過渡回折格子法の開発, 第 19 回分子科学討論会, 広島, 2025 年 9 月 12 日 .

7. 謝辞

本研究は、公益財団法人島津科学技術振興財団の研究開発助成を受けて実施されました。貴重なご支援を賜りました同財団に深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、マイクロ流路を作製いただいた豊橋技術科学大学の永井萌土教授に感謝申し上げます。あわせて、実験系の構築、試料調製、測定および議論にご協力いただいた研究室の学生の皆様に感謝いたします。

高カルシウムアルミニウム含有物形成温度圧力推定のための メリライトの結晶構造解析

金沢大学理工研究域 助教 濱田 麻希

1. はじめに

メリライトは主に火成岩に産する鉱物であるが、隕石中で見られる高カルシウムアルミニウム含有物(CAI)中にも産出することが知られている。CAIは難揮発性物質であるCaやAlを多く含む鉱物で構成されており、その中にメリライトも含まれている。CAIの大きさは0.1 mm～数 cm 程度であり、太陽系形成最初期で形成されたことが示唆されている。CAI中に共生している鉱物を調べることで惑星形成時の温度や圧力に関する情報を得ることができるが、現在推測されている温度や圧力は熱力学的に求められたものであり、実際のCAIが形成するガス凝縮過程での温度や圧力が一致するかは不明である^[1]。そのため実際のCAI形成時の温度圧力を解明することは、太陽系形成最初期での物質の挙動を知るために非常に重要である。

CAI中に含まれているメリライトは温度圧力に応じて特徴的な構造変化を示し、特に常圧では変調構造を示すことが知られている^[2,3]。CAI中で見られるのはオケルマナイト($\text{Ak}:\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$)—ゲーレンナイト($\text{Geh}:\text{Ca}_2\text{Al}_2\text{SiO}_7$)固溶体のメリライトである。このメリライトと同じ組成の構造変化を明らかにすることで、CAIの形成時の温度圧力条件を制約することができると考える。

したがって本研究ではCAI中のメリライトに多く含まれるゲーレンナイト成分に着目し、CAI形成時の温度圧力条件を決定するための、結晶構造を用いた温度圧力計を提案するための基礎となる、ゲーレンナイト-鉄ゲーレンナイト固溶体系における化学組成と結晶構造変化の関係性を明らかに

することを目的とする。

2. 研究手法

2.1. 合成方法

ゲーレンナイト(Geh)-鉄ゲーレンナイト(FeGeh)系固溶体メリライトは、酸化物試薬を混合し合成した。使用した試薬は、非晶質 SiO_2 、 Al_2O_3 、 Fe_2O_3 、 CaCO_3 である。 $\text{Geh}_x\text{FeGeh}_{1-x}$ ($x=100, 87.5, 75, 50$)となるように試薬を混合し、出発物質を作成した。出発物質を約1 g秤量し、白金るつぽに封入した。 $\text{Gehlenite-Fe gehlenite}$ の相図^[4]をもとに、各組成の出発物質が融解する温度(1570-1650°C)で3時間加熱、その後10°C/minで1200°Cまで徐冷、1200°Cで10時間保持し、合成を行った。

2.2. 化学組成分析

合成したメリライトの化学組成を確認するために、山口大学機器分析実験施設に設置されているJEOL JXA-8230を用いて分析を行った。加速電圧、試料電流、ビーム径はそれぞれ15 kV、20 nA、1-5 μm である。LiF、PETおよびTAP分光結晶を用いて、元素同定およびバックグラウンド測定を実施した。Si、Al、FeおよびCaの測定に用いた標準試料はそれぞれalbite, hematite, K-feldspar, およびwollastoniteである。データ補正にはZAF法を用いた。

2.3. 単結晶結晶構造解析

合成メリライトの結晶構造を決定するために、単結晶を用いたX線回折測定を実施した。測定は山口大学機器分析実験施設に設置されているHypix-6000HE回折計搭載のRigaku XtaLAB Synergy-R/DWを用いた。合成で得られた単結晶をガラス棒の先端に接着し、測定を行った。強度

データは室温で、MoK α 線 ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) を用いて測定した。回折データの処理と経験的吸収補正には CrysAlisPro^[5]を使用した。構造精密化は、SHELXL-2019/3^[6]を用いて行った。

3. 結果と考察

3.1. 合成

合成で得られた結晶は樹枝状であり (Fig.1), 複数相に分かれているように見られたため、熔融後の降温を $10^\circ\text{C}/\text{min}$ から $1.5^\circ\text{C}/\text{hr}$ に変更したが改善が見られなかった。そのため、目的組成に最も近い結晶片を化学分析で探し、X線回折測定に用いた。



Fig. 1 樹枝状の合成メリライト

3.2. 合成メリライトの化学組成

合成メリライトの化学組成を Table 1 に示す。

Table 1 合成メリライトの化学組成

試料名	Geh ₁₀₀	Geh _{87.5} FGeh _{12.5}	Geh ₇₅ FGeh ₂₅	Geh ₅₀ FGeh ₅₀
SiO ₂	22.27	21.62	21.60	21.05
Al ₂ O ₃	36.54	31.77	27.73	23.07
Fe ₂ O ₃	0.01	6.69	12.27	17.18
CaO	40.99	39.42	38.66	37.92
Total	99.81	99.50	100.26	99.22
O = 7				
Si	1.018	1.015	1.025	1.031
Al	1.969	1.757	1.551	1.332
Fe ³⁺	0.000	0.236	0.438	0.633
Ca	2.008	1.982	1.966	1.990

得られた結晶の化学組成はおおむね目的組成

と合致していた。上でも述べた通りこれらの組成の結晶片をX線回折測定に用いた。

3.3. FeGeh 成分の増加に伴う構造全体および各配位多面体の変化

構造精密化は、 $R1 = 1.75\text{--}8.98\%$, $wR2 = 4.86\text{--}19.31\%$ に収束した。結晶構造の精密化で得られたそれぞれの合成メリライトの結晶構造図および格子定数をそれぞれ Fig.2, Fig.3 に示す。

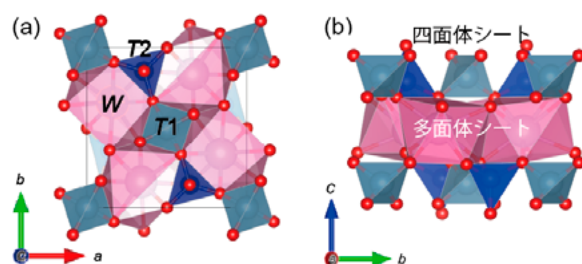


Fig. 2 合成メリライトの結晶構造図

(a)c軸から見た構造, (b)a軸から見た構造

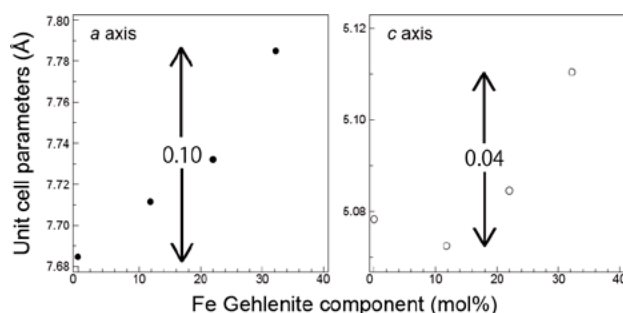


Fig. 3 合成ゲーレンナイトの格子定数変化

メリライトは正方晶系で、構造式は $W_2T1T2_2O_7$ であり、結晶学的に独立した2つの4配位席 ($T1$ および $T2$ 席) と8配位多面体である W 席が層状に重なるような結晶構造をしている。今回作成したゲーレンナイトでは、 W 席に Ca, $T1$ 席と $T2$ 席に Fe^{3+}Al , Si が入る。

FeGeh 成分の増加に伴い、格子定数が増加している。 a 軸、 c 軸ともに増加しているが、 a 軸方向への構造変化がより大きい。また、この格子定数変化が結晶構造中のどの配位多面体の影響を受けているか検討するため、配位多面体を構成する

原子間距離、配位席の格子体積および T 席のひずみの変化を Fig.4, Fig.5, Fig.6 に示す。

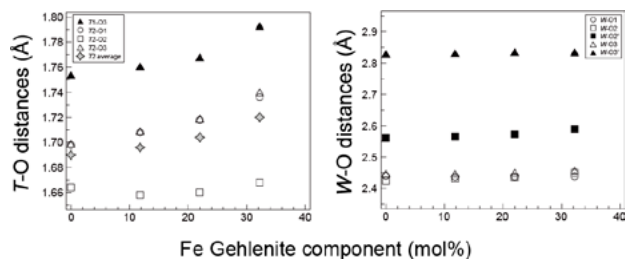


Fig. 4 FeGeh 成分と T -O および W -O 原子間距離の関係

T -O 原子間距離、 W -O 原子間距離はどちらも FeGeh 成分の増加とともに増加しているが、 W 席よりも T 席のほうが増加量が多い。特に $T1$ 席は $T1$ -O3 (+0.039 Å), $T2$ 席は $T2$ -O3 (+0.041 Å), $T2$ -O1 (+0.038 Å) が顕著に増加している。一方 W -O 原子間距離の変化量は少なく、最も変化している W -O1 原子間距離も 0.026 Å 程度しか増加していない。

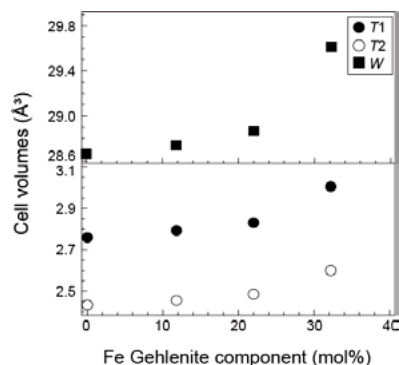


Fig. 5 FeGeh 成分と格子体積の関係

それぞれの配位席の格子体積は、FeGeh 成分の増加とともにすべての配位席の体積が増加している。 $T1$ 席と $T2$ 席の増加幅はそれぞれ 0.25 Å³, 0.17 Å³ である。 W 席は T 席の 4 倍以上変化しており、体積が 0.95 Å³ も増加している。

配位多面体の体積増加は、それぞれの配位席を占有している陽イオンの影響により起こっていると考えられる。鉄が T 席に配位すると、そのイ

オン半径^[7] (0.49 Å) により T -O 原子間距離が Si (0.26 Å) や Al (0.39 Å) よりも増加する。 W 席には Ca のみ配位するため、基本的には格子体積は変化しないはずだが、上下に存在する T 席の変化に伴う影響により W -O 原子間距離が増加し、比較的等方的に体積増加すると考えられる。

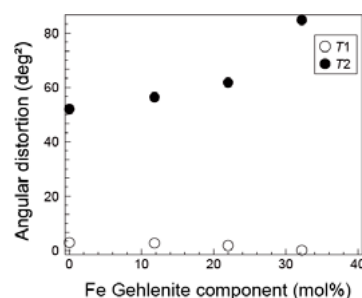


Fig. 6 FeGeh 成分と角度ひずみの関係

TO_4 四面体で陽イオン置換が起こる際に、どの程度四配位席がひずむかを示したのが Fig.6 である。 $T1O_4$ 四面体を構成する酸素は O3 のみで、結合も $T1$ -O3 のみの等方的な配位席であるため、ひずみ量はかなり小さい。 $T2O_4$ 四面体の頂点にいる酸素は O1, O2 および O3 の 3 種あるため、 $T2$ -O 原子間距離の非等方的な変化をする。そのため FeGeh 成分の増加に伴いひずみもかなり大きくなっている。

3.4. 各配位多面体シートの変化

ここでは Fig.2(b)に示したそれぞれの配位多面体シートの変化について検討するため T 席の結合角 O- T -O 角度および T -O- T 角度を Fig.7 に示す。

$T1O_4$ 四面体を構成する酸素は O3 のみであるが、結合角は O3- $T1$ -O3 および O3- $T1$ -O3' の 2 種類存在する。FeGeh 成分を全く含まない Geh₁₀₀ のこの 2 つの角度は 111.7° および 108.37° で、その差は 3.33° であるが、FeGeh 成分が増加すると O3- $T1$ -O3 が減少、O3- $T1$ -O3'が増加し、その差は 1.00° まで減少する。O3- $T1$ -O3 が c 軸方向

の配位多面体の高さを制御するため、 $T1$ 席は FeGeh 成分の増加とともに c 軸方向の高さが低くなる。一方で $O3-T1-O3'$ 角度は増加しているため、 ab 面方向に $T1O_4$ 四面体が拡大する。

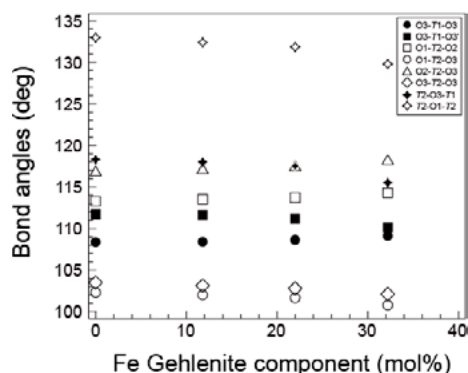


Fig. 7 O-T-O および T-O-T 結合角の変化

$T2O_4$ 四面体の結合角は $O1-T2-O3$, $O1-T2-O2$, $O2-T2-O3$ および $O3-T2-O3$ の 4 種類が存在する。FeGeh 成分の増加に伴い、 $O1-T2-O2$ および $O2-T2-O3$ は増加することで $T2O_4$ 四面体 c 軸方向に拡大する。 ab 方向への変化に関連するのは角度ではなく結合距離である。 $T2-O1$ および $T2-O3$ はどちらも伸長しているため ab 方向にも拡大している。

従って $T1O_4$ 四面体と $T2O_4$ 四面体の変化を合わせると、FeGeh 成分の増加に伴って a 軸と c 軸はどちらも伸長するが、 ab 方向の増加に寄与する結合長および結合角の影響が大きいため、 a 軸の伸長が c 軸よりも大きいと考えられる。

W 席で構成される多面体シートは、結合長の変化も少なく、 T 席の変化に伴うわずかな変化をするのみであるため、結晶構造変化への寄与はほとんどないと考えられる。

4. まとめと展望

CAI 形成温度圧力制約のための、メリライト結晶構造を用いた温度圧力計を作成するために、CAI 中のメリライトに多く含まれているゲーレナ

イト成分に着目し、その陽イオン置換に伴う結晶構造変化を調査した。ゲーレナイトに鉄を含むゲーレナイト成分を固溶させると、主に $T1O_4$, $T2O_4$ 四面体の結合長や結合角度が変化することで、結晶構造全体が大きくなるが、 a 軸方向への変化が c 軸よりも大きいため、 a 軸のほうがより顕著に伸長すると考えられる。ここで得られた知見をもとに、今後、Ak-FeAk, Ak-Geh で起こる陽イオン置換 ($T1: Al \leftrightarrow Mg$) に伴う常温常圧～低温高压状態での詳しい構造変化について明らかにしていきたい。

5. 参考文献

- [1] 坂本尚義; 原始太陽系の解剖学 宇宙物質の分析解析による太陽系の起源と進化の解明, 応用物理, **91**-3, (2022), 134-143.
- [2] Hemingway et al.; A study of phase transitions in the heat capacity and thermal expansion of åkermanite, $Ca_2MgSi_2O_7$, and revised values for the thermodynamic properties of åkermanite. Canadian Mineralogist, **24**, (1986), 425-434.
- [3] Seifert et al.; A commensurate-incommensurate phase transition in iron-bearing Åkermanites. Physics and Chemistry of Minerals, **14**, (1987), 26-35.
- [4] Huckenholz and Ott; Synthesis, stability, and aluminum-iron substitution in gehlenite-ferrigehlenite solid solutions. Neues Jahrbuch für Mineralogie Monatshefte, **12**, (1978), 521-536.
- [5] Agilent; CrysAlis PRO. Agilent Technologies Ltd., Yarnton, Oxfordshire, England, (2014).
- [6] Sheldrick; Crystal structure refinement with SHELX, Acta Crystallographica, **C71**, (2015) 3-8.

- [7] Shannon; Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. Acta Crystallographica, **A32**, (1976), 751-767.

6. その他成果発表等

- ・ 濱田麻希, 永島真理子, ゲーレンナイトー鉄ゲーレンナイト系合成メリライトの4配位席における鉄の分布と結晶構造変化, 日本鉱物科学会

2024 年度年会, 名古屋大学, 2024 年 9 月 14 日.

7. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成金により実施しました。この場をお借りして心より御礼申し上げます。また化学組成分析およびX線回折測定の際にサポートしていただいた、山口大学の永島真理子博士, 山口大学機器分析実験施設の森福洋二氏に感謝いたします。

セミアクティブ制御を用いた圧電素子による 自己給電構造物損傷検出法の開発

東北大学工学研究科 助教 原 勇心

1. はじめに

構造物の安全性を評価するためには、加振入力と振動応答に基づいて構造物の数値モデルを取得し、健全時モデルとのずれを残差として評価する構造ヘルスマモニタリングが有効である。しかし、従来の方法ではアクチュエータ、振動センサ、外部電源を別々に必要とし、配線、保守、電源交換が実装上の障壁となった。

本研究では、圧電素子が機械エネルギーと電気エネルギーを相互変換できる点に着目し、単一の圧電素子を用いて、加振、応答計測、自己給電を統合する自己給電型構造物損傷検出法の構築を目指した。観測可能な単一の圧電電圧から、構造応答成分と入力成分を分離し、同定モデルおよび残差生成器を構築するための信号処理法を検討した。

2. 研究計画と成果

申請時には、発電回路を接続した際に構造物モデルと発電回路モデルが混在する問題に対し、構造物ダイナミクスの2次遅れ性と発電回路ダイナミクスの1次遅れ性の差を利用して、両者を分離する方針を示していた。本報告では、当初の方針をそのまま成果として主張するのではなく、研究の進展により得られた解決策「電圧微分値を用いた入力・出力分離」と「ロバストカルマンフィルタに基づく変形成分・電荷成分分離」として整理する。本助成金の援助の元、達成した成果は下記の通りである。

- 1) 単一の圧電素子に発電、励振、観測の3つの役割を担わせる概念を提唱した

- 2) 単一の圧電素子の発生電圧から、ヘルスマモニタリング対象の構造物の励振力と振動応答を分離する信号処理手法を提案した
- 3) 約 50 kg の構造物の損傷を質量 2% 削減によって模擬し実験から損傷時刻を検出した
- 4) 研究成果を国際論文にまとめる執筆作業を行っている

3. 研究成果の概要

本研究では、圧電素子を備えた構造物を対象に、構造物自身が発生する電気信号のみを用いたセルフパワード・セルフセンシング異常検知技術の構築を目的とした。センサや電源の設置が制限される環境では、圧電素子から生成される電圧信号を用いた異常検知が有効な手段となる。一方で、圧電電圧は構造変形だけでなく、圧電素子内部の電荷挙動も含む混合信号である。そのため、電圧から変形成分と電荷成分を分離して推定することが本研究の中心課題であった。

本研究では、電圧速度表現、ロバストシステム同定、ゼロ領域を考慮したロバストカルマンフィルタを組み合わせ、圧電変形成分と電荷成分を分離し、データ駆動型残差生成器へ接続する手法を構築した。

3.1. セルフパワード構造加振装置

圧電素子は電荷を流入させると変形する性質を持ち、精密ステージの位置決めなどで広く産業利用されている。パンタグラフなどの変形拡大機構を使うと大型構造物の制御に十分な変形を生成できる。また、圧電素子は変形に応じて電圧が発生するため、圧電素子にバッテリーを接続すると

発電ができ、これは振動発電と呼ばれる。振動発電で充電されたバッテリーの一部のエネルギーでコントローラを駆動させ圧電素子への流入電荷を操作できれば、構造物を外部電源なしで制御できる。これを Fig.1 の通り、自己給電駆動と呼ぶ。コントローラと発電のエネルギー収支が課題である。

一般的な圧電制御では、コントローラとアンプを常時駆動させるため、エネルギー消費が膨大で、エネルギー収支が成立せず、自己給電駆動は困難だった。一方で、申請者の目的は異常検知のために構造物を揺らすことであり、精密な位置決めではない。そこで、回路接続を間欠的に切り替えて、電荷の符号だけを制御する方法^[1]を採用した。間欠的動作なので、エネルギー収支問題が解決される。間欠的な回路切替の周期に応じて、周期的な構造振動を励起できる。また、ランダムに切り替えれば、異常検知に広く利用される広帯域な周波数成分を持つ構造振動が励起^[2]できる。

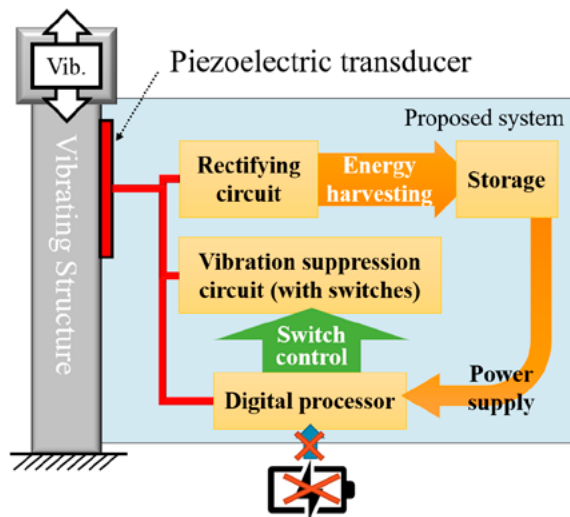


Fig. 1 自己給電型駆動装置の概念図

3.2. 圧電電圧に含まれる変形成分と電荷成分

本研究の基本的な着想は、観測量である圧電電圧を、圧電変形に由来する成分と圧電電荷に由来する成分の和として捉える点にある。圧電素子は

電気機械連成素子であり、その特性は以下の2つの圧電基礎方程式で記述される。

$$f_p = k_p u_p - b_p Q_p,$$

$$V_p = -b_p u_p + C_p^{-1} Q_p \quad \text{Eq.(1)}$$

ただし、 f_p , u_p , Q_p , V_p はそれぞれ、圧電素子が構造物から受ける力、素子の変形、外部回路から素子への流入電荷、素子の発生電圧を示している。 k_p , b_p , C_p はそれぞれ、圧電素子の剛性、圧電係数、静電容量を示している。圧電素子の取り付けられた構造物の運動方程式は以下の通り

$$M\ddot{x} + D\dot{x} + Kx = B_p Q_p + d \quad \text{Eq.(2)}$$

ただし、 M , D , K は、質量、減衰、剛性行列であり、 B_p は圧電素子の取付位置も考慮した圧電係数行列を示す。 x と d はそれぞれ、変位ベクトルと外乱ベクトルを示す。圧電素子は構造物の振動と同調して変形するため以下の関係式が成立する。

$$u_p = L_p x \quad \text{Eq.(3)}$$

ただし、 L_p はアクチュエータ位置行列である。以上より、構造物は圧電素子に流入する電荷に比例する力で加振され、その振動は圧電素子の変形として現れる。また、圧電電圧は変形と電荷の和で記述される。構造物の入力は力、出力は振動である。したがって、単一の圧電電圧 V_p を u_p と Q_p に分離できれば、構造物の入力と出力情報を同時に取得できる。

3.3. 劣決定問題としての圧電セルフセンシング

圧電電圧の信号問題は本質的に劣決定である。Fig.2 に示す通り、観測できる量は圧電電圧という1つの信号であるが、その中には変形成分と電荷成分という2つの未知量が含まれる。電荷と変形の挙動は時間的に変化し、振動状態や電気的条件にも依存するため、単純な静的関係式や直接的な

逆解析では安定な分離は困難であった。

本研究はカルマンフィルタが備えるノイズ除去の機能を活用し、1つの圧電電圧信号に混在する2つの成分を、信号表現と状態推定により分離するアイデアを提唱する。

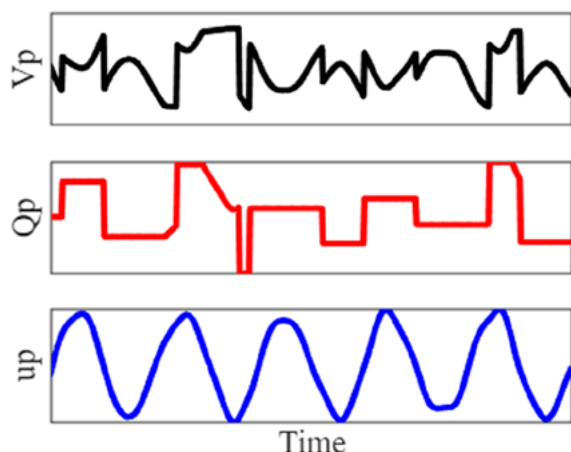


Fig. 2 上から電圧、電荷、変形の波形概念図。電圧は電荷と変形の和で書けるが、分離が難しい。

3.4. 電圧速度表現による問題の変換

圧電電圧ではなく、その時間変化である電圧速度に着目した。Fig.3の通り、電圧速度に変換すると、構造変形に由来する成分は比較的連続的な振動応答として現れ、電荷挙動に由来する成分は局所的・突発的なスパイク状成分として現れる。

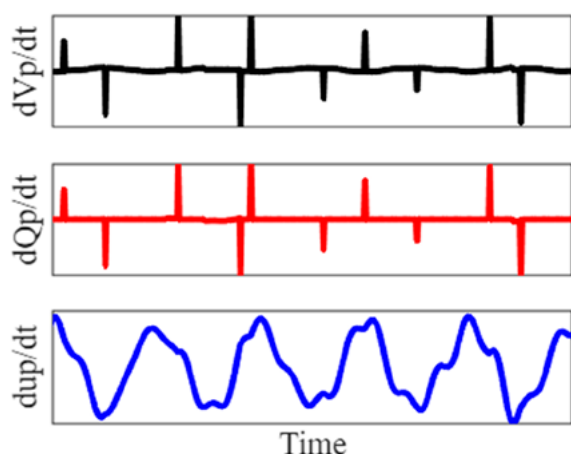


Fig. 3 電圧速度、電荷速度、変形速度の波形概念図。電荷速度を外れ値とみなすと、計測信号から外れ値を除去するデジタル信号処理によって、電圧速度から変形速度が推定できる。

この見方により、元の劣決定問題は「電圧速度信号から、モデルで説明可能な構造変形成分と、モデルから外れる電荷成分を分離する問題」へ変換される。重要な点は、外れ値を不要ノイズとして捨てず、圧電電荷の挙動を反映する有用な情報として再解釈した点にある。

3.5. ロバストカルマンフィルタによる変形速度と電荷速度の分離

この分離を実現するため、本研究ではロバストカルマンフィルタを用いた。カルマンフィルタは、動的モデルによる予測と観測信号を組み合わせることで状態を推定する手法である。一般的なカルマンフィルタはノイズがガウス分布に従うと仮定しており、外れ値のような特徴的なノイズを取り除くのは不得意であった。本研究で扱う電圧速度信号には、構造変形成分に加えて、電荷挙動に起因するスパイク成分(外れ値)が含まれる。そこで、モデルで説明できる連続成分を予測出力として抽出し、モデル予測から大きく外れる成分を電荷速度として扱った。

3.6. カルマンフィルタモデルの同定

ロバストカルマンフィルタを構成するためには、電圧速度データから構造応答を表す状態空間モデルを同定する必要がある。そこで、電圧速度データに対して外れ値に強い確率的部分空間同定法^[3]を適用した。通常の部分空間同定法では、電荷由来のスパイク成分が構造モデルの推定を乱す可能性がある。これに対して、ロバスト部分空間同定法はスパイク成分の影響を抑えながら、構造変形に対応する基準モデルを抽出する。これにより、電圧速度のみから、後段のロバストカルマンフィルタに必要な状態空間モデルを取得した。

3.7. ゼロ領域を考慮した予測

本研究では、カルマンフィルタの観測更新に、

観測の有効性判定を導入した。Fig.4 の通り、電圧速度には、変形速度や電荷速度とは別にゼロ近傍に留まる領域がある。この領域は、圧電素子の電荷がバッテリーへ供給されることで生じ、構造物の振動とは関係しない。そのため、ゼロ領域では観測信号を用いず、予測信号のみで推定するカルマンフィルタを提案した。

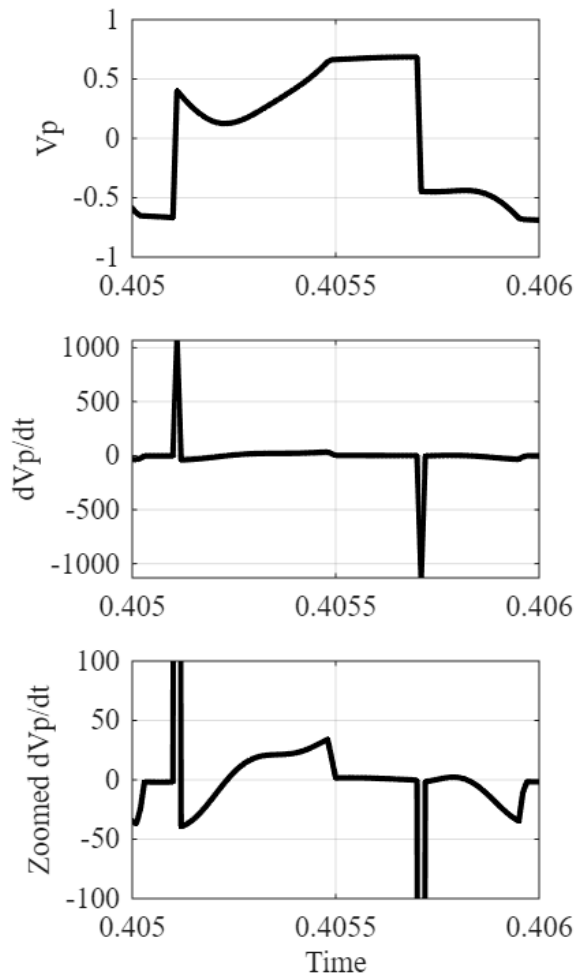


Fig. 4 ゼロ領域を含んだ圧電電圧波形。図中央に顕著。この領域は信号推定の精度を低下させるため、推定に反映しない。

具体的には、観測が有効な情報を含むかを逐次判断し、有効でない場合には観測更新を行わず、モデル予測のみで状態を推定した。ある離散時刻 i における観測の有効確率を γ_i とし、有効率が低い場合は、観測更新を停止する。この処理により、電圧速度がゼロ近傍となる情報欠落区間でも、推

定が破綻しないようにした。

3.8. データ駆動型残差生成器による異常検知

最後に、推定された圧電変形速度を出力、推定された電荷速度を入力に相当する量として用い、データ駆動型の残差生成器^[4]を構成した。正常な構造物では、入力に相当する電荷速度と出力に相当する変形速度の間には、同定された動的モデルに従う一定の関係が存在する。一方、構造物に損傷や異常が発生すると、この入力出力関係が変化し、正常モデルでは説明できないずれが生じる。

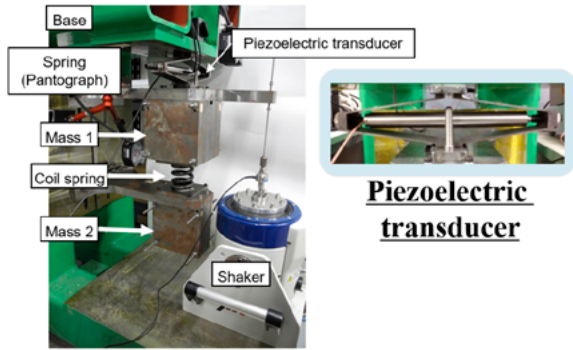
本研究では、このずれを残差として抽出し、異常検知指標として用いた。これにより、単なる電圧振幅の変化ではなく、圧電電荷と構造変形の関係性の破綻を検出できる。すなわち、本手法は圧電電圧そのものの大小ではなく、推定された電荷速度と変形速度の間に正常時の動的関係が保たれているかを評価する。

4. 研究の成果

4.1. 実験装置

Fig.5 に示す圧電素子の接続された実験装置を用いて、提案するセルフパワード・セルフセンシング異常検知手法を評価した。上から固定端、圧電素子の組み込まれたパンタグラフ型ばね、上部パーツ、コイル型ばね、下部パーツで構成されており、二自由度振動構造物としてモデリングできる。加振器は外乱源に相当し、加振器により励起された振動は異常検知に使用されない。圧電素子が励起した振動が異常検知に使用される。総質量は約 50 kg であり、上部に総質量の 2% に当たる 1.0 kg のおもりが設置されている。このおもりを試験開始から 55 秒経過した後に取り外すことで、疑似的な損傷を模擬する。構造物にはレーザー変位計が取り付けられ、圧電素子には変形と電荷を計測するセンサが接続されている。速度は後退差分で事後的に計算した。また、圧電素子には自己

給電型駆動装置を取り付けた。なお、本実験では安定動作のために補助電源を併用した。



Experimental apparatus

Fig. 5 圧電素子を備えた実験装置の写真。圧電素子には補助電源を備えた自己給電型駆動装置が接続されている。

4.2. 実験結果

まず、提案する方法で1つの電圧速度を2つの推定信号に分離できているかを確認する。Fig.5の中段と下段に示す通り、提案手法は計測結果と同等な推定結果を示している。従って、提案手法を用いて、単一の電圧信号から2つの信号、電荷速度と変形速度を推定できることを確認した。

つぎに、付加マス除去前の電荷速度を正常構造物の入力、変形速度を出力として残差生成器を作成した。全時系列データを残差生成器に代入し、残差振幅の変化履歴を出力した。同じ処理を、提案手法で推定された入出力データと、センサで計測された入出力データの2条件で実施した。Fig.6に結果を示す。0～20秒の残差増加はバッテリー充電未完了による過渡応答であり、20秒以降は一定値に収束した。提案手法では53.66秒、従来のセンサデータでは55.32秒で顕著な残差変化が生じた。この変化はおもり除去による疑似損傷に対応する。検出時間差は1.66秒であり、電圧計測のみで異常検知が達成できることを確認した。

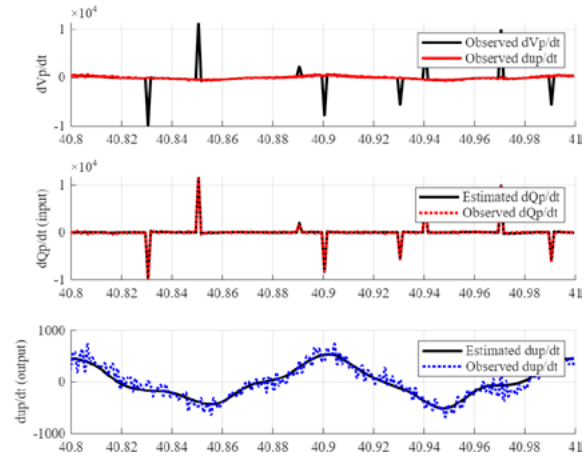


Fig. 6 上は、計測電圧と計測速度。中央の破線は電荷センサ計測結果の後退差分、実線は推定された電荷速度。下部の破線は変位センサの後退差分、実線は推定された変形速度。

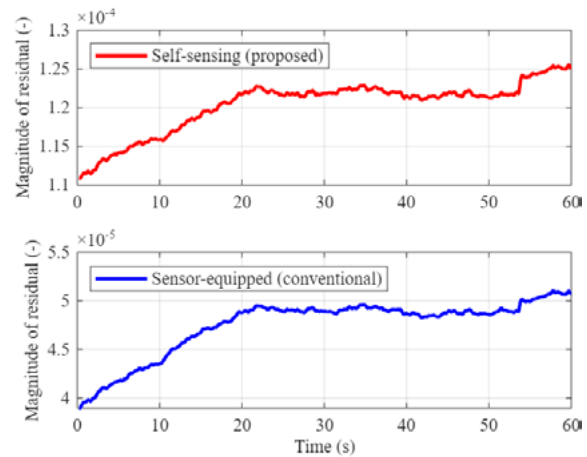


Fig. 7 上は、提案手法で推定された入出力データを用いた残差の時間変化、下は従来通りセンサ計測された入出力データを用いた残差の時間変化。55秒周辺の変化が一致している。

5. 結言

本研究では、単一の圧電素子が発生する電圧信号のみを用いて、加振、応答推定、異常検知を統合するセルフパワード・セルフセンシング異常検知手法を構築した。圧電電圧に含まれる変形成分と電荷成分の分離は、観測量が1つで未知量が2つ存在する劣決定問題であり、従来の直接的な信号処理では困難であった。これに対し、本研究では電圧速度に着目し、構造成形に対応する連続成

分と電荷挙動に対応するスパイク状成分をロバスト状態推定により分離した。実験では、約 50 kg の構造物に対して質量 2% の変化を模擬損傷として与え、推定された電荷速度と変形速度を用いた残差生成器により損傷時刻を検出できることを確認した。以上より、外部電源や追加センサに依存しない構造物異常検知の基盤技術を確立した。

6. 参考文献

- [1] Hara Y., Yamamoto, Y., and Makihara K.; Self-Sensing State Estimation of Switch-Controlled Energy Harvesters, **31** – 20, (2020), pp.2326–2341.
- [2] Hara, Y., Otsuka, K., and Makihara, K.; Low-Energy-Consumption Structural Identification with Switching Piezoelectric Semi-Active Input, *Mechanical Systems and Signal*

Processing, **187**, (2023), p. 109914.

- [3] O’Connell, B., and Rogers T.; A Robust Probabilistic Approach to Stochastic Subspace Identification, *Journal of Sound and Vibration*, **581**, (2024), p. 118381.
- [4] Hara, Y., Tang, T., Li X., Saito H., and Makihara, K.; Sensor-Less Piezoelectric-Based Structural Health Monitoring of Space Structures, *Journal of Evolving Space Activities*, **3**, (2026), p. 237.

7. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成金により実施された。

タンパク質の複合体と相互作用を高精度に計測する計算技術の開発

筑波大学計算科学研究センター 准教授 原田 隆平

1. はじめに

タンパク質や核酸などの生体分子は、分子間相互作用により複合体を形成し、機能を発現する。ゆえに、機能を解明するためには複合体にはたらく分子間相互作用を解析することは重要である。生体機能は分子間相互作用により制御されており、その喪失が疾患のトリガーとなる。よって、疾患原因となる合理的な分子間相互作用の喪失を特定することが重要となる。しかしながら、複合体構造を高精度にモデリングするためには、生体分子が示す個々の揺らぎをあらわに考慮し、複合体形成プロセスを抽出しなければならない。計算技術として分子動力学計算(MD)は揺らぎをあらわに考慮できるが、計算技術の限界から複合体形成にいたる時間スケールまでダイナミクス(構造変化)を追跡できない。実際問題として、現状のMDが到達できる時間スケールはマイクロ秒($\mu\text{s}=10^{-6}$ 秒)程度であり、複合体形成が観測されるミリ秒($\text{ms}=10^{-3}$ 秒)以上の時間スケールに遠く及ばない。そこで、独自に開発した長時間ダイナミクス抽出法(PaCS-MD: Parallel Cascade Selection MD)^[1-3]を適用することにより複合体形成プロセスを抽出し、この困難を打開する。具体的には、PaCS-MDにより複合体形成プロセスを促進かつ抽出し、揺らぎをあらわに考慮した複合体の構造予測を実現する。さらに、予測された複合体構造の分子面にはたらく分子間相互作用ネットワークを蓄積しながらデータベースを構築することで、アミノ酸変異に起因する機能失活の原因となる相互作用ネットワークを特定できる異常検知システムを構築する。

2. 計算方法

2.1. PaCS-MD の概要

PaCS-MD は、構造変化における始状態と終状態の構造が既知である場合、状態間をつなぐ遷移パスウェイ(構造変化)を抽出できるレアイベントサンプリング法である(Fig.1)。典型的なPaCS-MDの適用例として、タンパク質に関する大規模構造変化の抽出が挙げられる。例えば、始状態としてOpen構造、終状態としてClosed構造が実験構造として既知である条件のもと、PaCS-MDを適用してOpen構造からClosed構造に向かう遷移パスウェイを抽出する場合を考える。効率的に遷移パスウェイを探索するには、Closed構造へ向かう遷移確率が高いMDスナップショットを同定し、短時間MDを繰り返せば良い。具体的には、遷移確率の高い重要なMDスナップショットを同定するための物理的な指標を設定する。指標の設定は任意であり、様々な物理量が考えられる。典型的な指標として、遷移先である終状態の構造から測定した平均自乗距離、root-mean-square deviation(RMSD)が考えられ、遷移先であるClosed構造から測定したRMSDが指標となる。各サイクルにおいて、短時間MDが生成するMDスナップショットに対してRMSDを計算し、値が小さい順に並べ替え、上位にランクするN個のMDスナップショットから短時間MDをリスタートする。これらの手順をサイクルとして繰り返すことにより、Closed構造に類似したMDスナップショットから短時間MDがリスタートされるため、サイクルが進むにつれて終状態に向かって遷移していく。

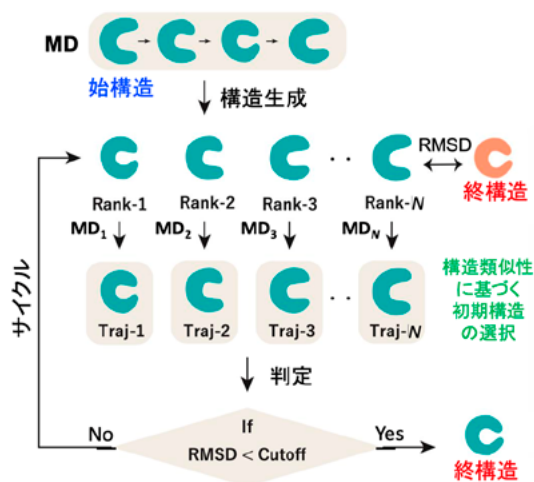


Fig. 1 PaCS-MD のフローチャート

2.2. 計算結果および性能評価

疾患原因に関係する典型例として、リボ核酸 (RNA) 結合タンパク質 (RBP: RNA Binding Protein) と RNA の複合体に着目した。生体内において RBP と RNA は互いに揺らぎながら複合体を形成し、合理的な分子間相互作用を介して機能を制御している。近年、Alpha Fold2 (AF2)^[4]に代表される人工知能 (AI) に基づく複合体予測も実績を上げつつあるが、構造予測は揺らぎの小さい生体分子のドメイン領域のみに限定される。このように、AI が発展した現在においても生体分子の

構造予測は難しく、揺らぎをあらわに考慮しなければならない RBP-RNA などの複合体構造予測はとくに難しい。事実、複合体形成では大規模な揺らぎを利用して RBP のループで連結された 2 つのドメインが RNA を掴むように結合して複合体を形成することから、構造予測の難易度は高い。そこで本研究では、PaCS-MD を適用することにより複合体形成に重要な役割を果たすループ領域の長時間ダイナミクスを抽出した。PaCS-MD の適用にあたり、長時間ダイナミクス (複合体形成プロセス) の前 (RNA 結合前) と後 (RNA 結合後) の構造を指定する必要がある。本手法では、RNA 結合前の構造を機械学習 (AF2) に基づきアミノ酸配列から予測した。RNA 結合後の構造は、タンパク質と核酸が結合した実験 (部分) 構造を利用した。これらの条件のもと、PaCS-MD により各部分構造が実験構造へ構造遷移する可能性が高い初期構造を選択しながら短時間 MD を繰り返し、合理的な分子間相互作用をもつ複合体の全体構造へモデリングした。以上により、PaCS-MD の拡張に基づく Protein-RNA フレキシブルドッキング手法を開発した (Fig.2)。

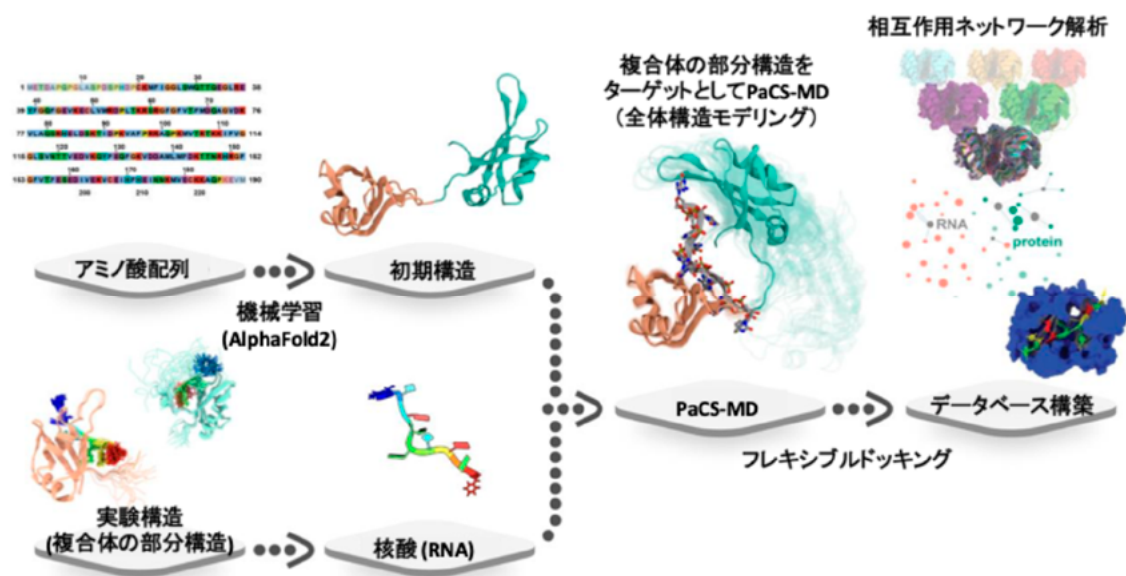


Fig. 2 PaCS-MD による複合体構造予測のフローチャート

本手法の性能評価として、Protein-RNA の複合体が部分構造として実験的に決定されている「MUSASHI1-Protein (MSI1)」^[5-6]に適用することで、複合体の全体構造を予測した。計算結果として、PaCS-MD により複合体形成プロセスの抽出に成功し、MSI1 が有する 2 つのドメインで RNA を囲んだ合理的な分子間相互作用をもつ全体構造を予測することができた。定量的な安定性評価として、既存の汎用的予測プログラム (Phyre2)^[7]により得られた全体構造と比較したところ、揺らぎをあらわに考慮しない既存手法 (Phyre2) と比較し、PaCS-MD は相対的に安定な結合自由エネルギーを示す複合体構造を予測することが分かった (Fig.3)。^[8]以上の性能評価から、本手法はタンパク質と RNA の実験構造から複合体構造を高精度に予測できることが分かった。

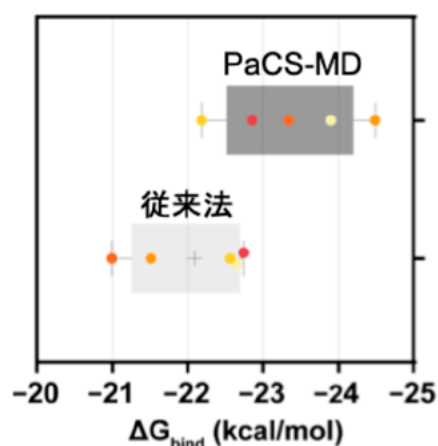


Fig. 3 MUSASHI1-Protein と RNA に関する結合自由エネルギー計算
PaCS-MD と 従来法 (Phyre2) の比較

2.3. 今後の展望

今後の展望として、多様な実験手法が明らかにするタンパク質構造を活用し、本計算スキームに基づき、複合体の分子間相互作用解析を展開していく。例えば、近年におけるエレクトロニクスの

発展に伴い、電子顕微鏡による生体超分子の構造決定が急速に進んでいることに注目する。電子顕微鏡の利点は、複数のタンパク質が会合した複合体などの生体超分子構造の電子密度を計測できる点にある。生体超分子は、従来の実験技術で構造決定が難しいケースも多かったが、電子顕微鏡の普及により生体分子単体だけでなく、分子同士が互いに会合して形成される巨大で複雑な生体超分子についても構造決定できるようになってきた。将来的には、電子密度を手がかりに PaCS-MD に基づき生体超分子の精密モデリングを実現し、タンパク質間相互作用を計測することで、分子集合体としての機能解明が期待できる。将来的には、電子顕微鏡が提供する電子密度を手がかりに生体超分子の精密モデリングを実現し、分子間相互作用をあらわに計測し、生体機能を解明する計算技術へ発展させたい。そのための戦略として、重要度が高い (実験から計測される電子密度と相関が高い) 候補構造から MD をリスタートするサイクルを繰り返す「データ駆動型 PaCS-MD」へ拡張する。具体的には、実験データと整合する合理的な候補構造から MD を繰り返す「データ駆動型」の構造探索に基づき、精密構造をモデリングする。モデリング後は、生体超分子を構成するタンパク質の分子面について残基間コンタクト=相互作用マップを計算し、生体超分子が正常 (健康) に機能する場合の分子間相互作用として蓄積する。データベースの利用価値として、疾患によるアミノ酸変異で異常が生じた相互作用解析に活用できる。最終的に、健康及び疾患の相互作用マップを比較して差分を調べることで、どの残基間において相互作用が異常であるかを特定できるようになるため、疾患原因の究明に貢献できる (Fig.4)。

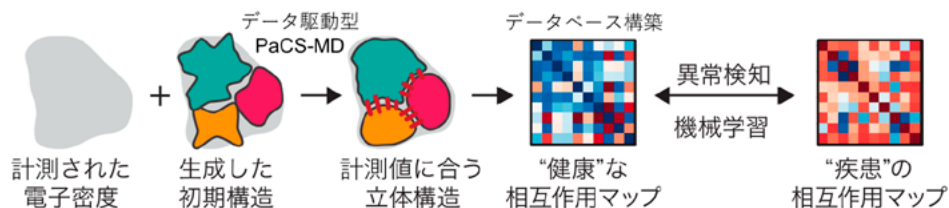


Fig. 4 疾患を引き起こす相互作用の異常検知システム構築

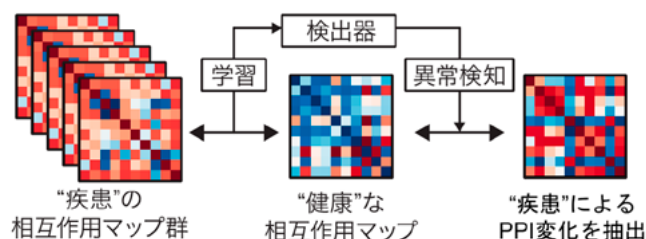


Fig. 5 異常な分子間相互作用を検知するアルゴリズム

具体的な異常検知システムの構築にむけて、データ駆動型 PaCS-MD に基づきモデリングした高解像度構造を解析し、生体超分子の分子面にはたらくタンパク質間相互作用 (PPI) を計測する。定量的には、PPI 形成に重要な分子間コンタクトを残基間距離として計算し、それらを成分とする 2 次元行列 (相互作用マップ=PPI 画像) として蓄積する。相互作用マップの利用価値として、疾患により分子面の PPI が変化した場合、健康な PPI 画像と比較して差分を調べれば、どの PPI 変化が疾患原因であるかを特定できる (Fig.5)。最終的に、蓄積された PPI 画像をもとに機械学習を進め、異常検知器を構築することで、どの PPI 異常が疾患原因になっているのかを特定できる。

3. まとめ

本研究では、PaCS-MD を適用したタンパク質の機能解析に重要な複合体予測と分子間相互作用の測定に関する方法論を開発した。本研究で開発した方法論は、従来 MD と比較して低い計算コストで複合体予測と結合自由エネルギー計算を

実現できる。このため、生体機能と密接に関連しているタンパク質相互作用を抽出できると同時に、複合体形成に重要な構造変化と共役する自由エネルギーや相互作用を定量的に評価できる。今後の展開として、本手法を医薬品の様々な標的タンパク質に適用し、機能解析に貢献していきたい。

4. 参考文献

- [1] R. Harada and A. Kitao, "Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD) to Generate Conformational Transition Pathway" J. Chem. Phys., **139**-3, (2013), 035103.
- [2] R. Harada, Y. Takano, T. Baba, and Y. Shigeta, "Simple, yet Powerful Methodologies for Conformational Sampling of Proteins", Phys. Chem. Chem. Phys., **17**-9, (2015), 6155-6173.
- [3] R. Harada, "Simple, yet Efficient Conformational Sampling Methods for Reproducing/Predicting Biologically Rare Events of Proteins", Bull. Chem. Soc. Jpn., **91**-9, (2018), 1436-1450.

- [4] J. Jumper et al. “Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold”, *Nature*, **596**, (2021), 583–589.
- [5] R. Iwaoka et al. “Structural Insight into the Recognition of r(UAG) by Musashi-1 RBD2, and Construction of a Model of Musashi-1 RBD1-2 Bound to the Minimum Target RNA”, *Molecules*, **22**, (2017), 1207.
- [6] T. Oyama et al. “Structure of Musashi1 in a Complex with Target RNA: the Role of Aromatic Stacking Interactions”, *Nucleic Acids Res.*, **40**-7, (2012), 3218–3231.
- [7] L. A. Kelley et al. “The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis”, *Nat. Protoc.*, **10**, (2015), 845–858.
- [8] N. Darai et al. “A Structural Refinement Technique for Protein-RNA Complexes Based on a Combination of AI-based Modeling and Flexible Docking: A Study of Musashi-1 Protein”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **96**-7, (2023), 677–685.

5. その他成果発表等

- ・ 原田隆平, “生体機能を紐解く分子シミュレー

ション手法の開発と応用”, 自然科学研究機構 計算科学研究センター スーパーコンピュータ ワークショップ 2023, 分子科学研究所, 2024 年 1 月 15 日.

- ・ 原田隆平, “中分子創薬を革新する分子シミュレーション手法の開発”, 第 453 回 CBI 学会講演会, オンライン, 2024 年 2 月 26 日.
- ・ 原田隆平, “生体機能を紐解く新しい分子シミュレーション手法の開発”, 筑波ミニワークショップ 「計算・分光・情報・合成が拓く分子設計の最前線」, 筑波大学, 2024 年 2 月 26 日.
- ・ Ryuhei Harada, “Simple yet Powerful Rare-Event Sampling Methods (PaCS-MD/OFLOOD) for Elucidating Membrane Permeation Processes of Drugs”, *Pacificchem 2025 (Invited Talk)* 2025 年 12 月 18 日.
- ・ 原田隆平, 「UBE 学術振興財団 学術奨励賞」, 公益財団法人 UBE 学術振興財団, 2024 年 6 月 19 日.

6. 謝辞

本研究は、島津科学技術振興財団の助成金によって実施されたものであり、心より感謝申し上げます。

イベント駆動型画像センサーによる超高速光電子画像計測法の開発

九州大学大学院理学研究院 准教授 堀尾 琢哉

1. はじめに

光電子画像計測法とは、物質にレーザー光を照射し、その際放出される光電子の速度・角度分布を可視化することで、物性・反応性の根源である物質内電子の振る舞いに迫る手法である。言うまでもなく、光電子の散乱画像を如何にして精度良く撮像できるかが、同手法の成否に関わる。撮像には、後述する二次元位置敏感型検出器により1個の光電子を約 10^6 個まで増幅した後、その電子集団を蛍光体に照射し、そこからの発光をカメラにより記録する。つまり、光電子の数と飛来位置を如何に正確に記録できるかが鍵となる。撮像用カメラとして、数メガピクセルのCCDもしくはCMOSセンサーを搭載した理科学用カメラを使用するのが一般的であるが、それらの画像読み出し速度(fps: frames per second)は数十からせいぜい数百fpsである。この場合、1フレームの画像に輝点(つまり光電子)が多数存在すると互いに重なり合い、複数個の輝点を1個の輝点として誤認してしまう。そのため、1フレームの画像に輝点がまばらになるよう、レーザー光の出力や繰返し周波数を抑えるなどして、光電子発生レートを強制的に下げざるを得ない。これは計測時間の大幅な増加を生む。光電子画像計測法のみならず、現代科学の多くの分野において高繰返しかつ高出力レーザーの導入が進んでおり、肝心の画像計測の方がこの流れに追従できていない。例えば、繰返し周波数1MHzの高出力レーザーで光電子画像計測を行う場合を考える。レーザーパルスは $1\mu\text{s}$ に1発出射され、一般的な実験条件では、レーザーパルス1発あたり、1個から10個程度の光

電子が発生する。これは、リアルタイムで光電子の計数と位置を記録するために、1Mfpsという超高速で画像読み出しを行う必要性を意味する。高速度カメラにより実現可能であるが、仮に1Mピクセル、16bit階調の画像を、同速度で読み出すと毎秒あたりの容量は2テラバイトにもなり情報爆発をきたす。

そこで着目したのがイベント駆動型画像センサー^[1]である。同センサーは、近年自動運転を始めとする分野で開発が進み、人間の眼細胞を模倣した画素子である。輝度の時間変化があった画素 (x, y, t) (=“動くもの”だけの位置情報)のみを最大1Mfpsで読み出せるため、従来型の画像センサーに比べ高速かつ圧倒的にデータ容量が少ない(従来型カメラは、輝度に変化していない画素、すなわち画像計測法では無駄な情報も出力する)。光電子画像計測法は、広義に荷電粒子画像計測法の一つであり、イベント駆動型画像センサーを同分野に応用した初めての例は、筆者の知る限り、沖野友哉博士らである。彼らは繰返し1kHzのチタンサファイア(Ti:Sa)レーザーでエタノール分子をクーロン爆発させ、その際発生する解離イオン種の運動量画像をイベント駆動型画像センサーで可視化した例を報告している^[2]。イオン種は質量選別が可能であるため背景信号に邪魔されることはないが、光電子の場合は真空装置の残留ガスや電極からの二次電子放出に悩まされるため、イオン画像の取得に比べ実験難易度が格段に上がる。イベント駆動型センサーを用いて光電子画像を撮像できれば、当該分野の動向を変革させるのは明白であり、さらにレーザーの

繰返し周波数を 100 倍の 100 kHz (将来的には 1 MHz=1,000 kHz を目指す) にすれば、極めて高効率の光電子画像計測法を実現できると確信し、本研究を着想した。以下にその実験手法と得られた成果について述べる。

2. 実験手法

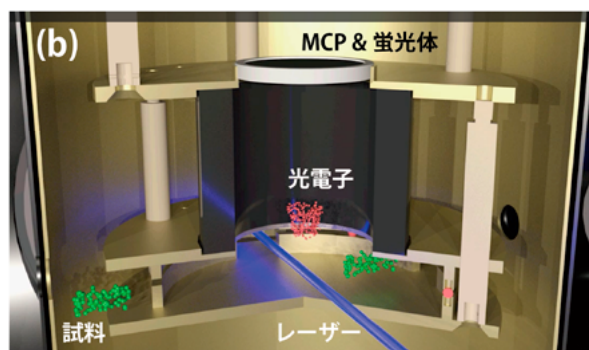
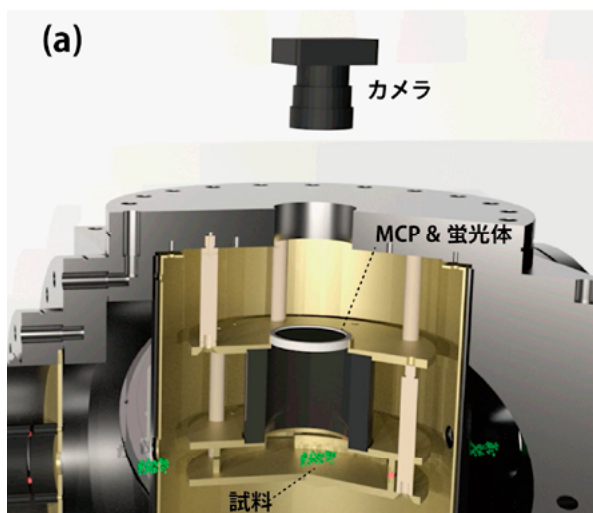


Fig. 1 光電子画像計測法の概略図。

(a)全体図 および (b)拡大図。

Fig. 1 に光電子画像計測法の概念図を示す。目的試料を真空中に導入し、そこにレーザー光を照射することで光電効果を誘起する。光電効果により試料から放出された光電子は立体角 4π 方向に散乱するが、それら全てを静電場 (約 10 V/cm) により捕集し、二次元位置敏感型検出器 (マイクロチャンネルプレート (MCP) と蛍光体) に誘導する。蛍光体からの発光を撮像することで三次元空間に広がった光電子放出分布の二次元射影像

を取得し、その画像に逆アーベル変換と呼ばれる数学的処理 (一種のコンピュータトモグラフィ: CT) を施すことで元の光電子放出分布を得ることが出来る。この二次元射影像を撮像するため、新たにイベント駆動型画像センサーを搭載したカメラ (CenturyArks 社製 SilkyEvCam HD, 1280×720 ピクセル、以下イベント駆動型カメラと呼ぶ) を導入し、その性能評価を行った。

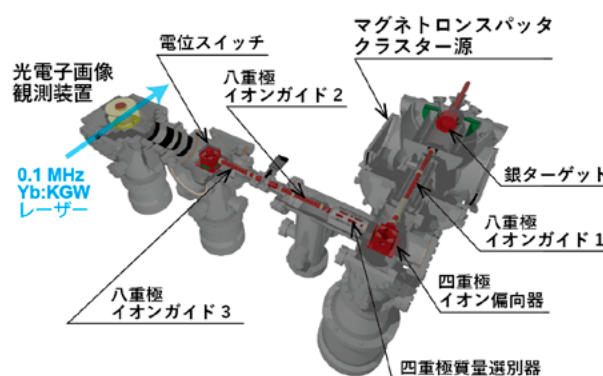


Fig. 2 本研究で用いた実験装置の概略図。

本実験は Fig. 2 に示す既存の装置を用いて行った。二次元射影像観測用の試験試料には銀原子の負イオン Ag^- を用いた。同負イオンの電子束縛エネルギー (= 銀原子の電子親和力) は $1.302 \text{ eV}^{[3]}$ であり、近赤外光や可視光でも容易に電子脱離を起こせる利点がある。前述の背景信号による障害は受けず、性能試験に最適な系である。真空チャンバーに設置した直径 50.8 mm, 厚さ 5 mm の銀ターゲットを高速のアルゴンイオンによりスパッタすることで、銀原子が放出される。スパッタ時に生ずるプラズマにより、負電荷が銀原子に付与され、イオンガイドと四重極質量選別器により Ag^- のみを後段の光電子画像観測装置まで導いた。光源には、繰返し周波数 100 kHz の Yb:KGW 再生増幅器を用いた。その基本波 1030 nm の光子エネルギー 1.20 eV は、銀原子負イオン Ag^- の電子脱離を誘起するには不十分なため、基本波の出力と光パラメトリック増幅器の組み合わせによ

り、波長 310 から 2,600 nm の連続波長可変レーザー光を発生させた。四重極質量選別器通過後の銀原子負イオン Ag^- は連続イオンビームとして得られる。光パラメトリック増幅器から出射される繰り返し周波数 100 kHz のフェムト秒パルスと同期させるためポテンシャルスイッチを使い、その後、 Ag^- から放出された光電子散乱分布の二次元射影像をイベント駆動型カメラで撮像した。

3. 結果と考察

Fig. 3(a)に銀原子負イオン Ag^- から放出された光電子の二次元射影像を示す。光電子脱離に用いたレーザーの波長は 400 nm (光子エネルギー 3.10 eV) であり、エネルギー保存則から 1.80 eV ($= 3.10 - 1.302$ eV) の運動エネルギーを持った光電子が発生する。画像の中心に銀原子負イオン Ag^- が位置し (もちろん視認はできない)、そこから放出された光電子の放出分布を MCP に対して射影した像である。撮像は 1 分以内の積算で完結する。Fig. 3(a)において、白の四角の破線で囲った領域の拡大図を右上図に示す。良く見ると、周辺ピクセルと比べて著しくカウント数の多い点 (以降、ホットピクセルと呼ぶ) が一つだけ確認できる (拡大図中の白い輝点)。イベント駆動型カメラの設定など、撮影条件やその他の実験条件を検討したものの、残念ながらこのホットピクセルの原因を特定することは出来なかった (ホットピクセルの位置が毎回同じであれば、容易に除去可能であるが、ホットピクセルの位置がランダムに変わるので非常に厄介な問題である)。そこで、これらホットピクセルの影響を低減するため、Fig. 3(a)の画像に 3×3 の画像フィルターを施すこととした。得られた結果が Fig. 3(b)である。ホットピクセルの影響が低減化されているのが見て取れる。しかし、画像フィルターを施した場合に起こる問題が画像分解能の低下である。それを精査

するため、Fig. 3(a)および 3(b)の両画像に対して逆アーベル変換を行い、元の三次元分布を復元し、そこから光電子の運動エネルギー分布 (光電子スペクトル) を抽出した (逆アーベル変換には Verlet らが開発した Polar Onion Peeling 法^[4]を用いた)。

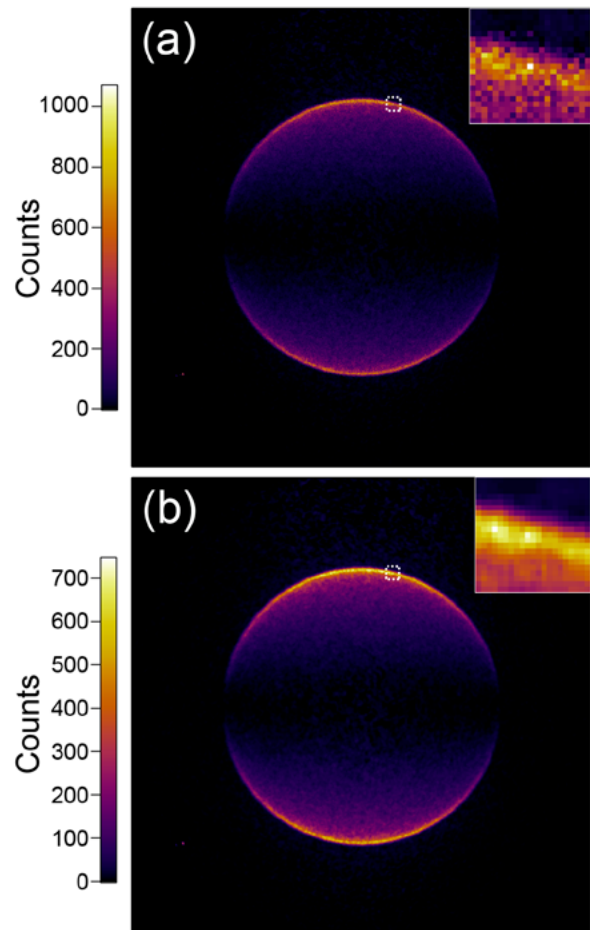


Fig. 3 レーザー波長 400 nm にて得られた銀原子負イオン Ag^- から放出された光電子の二次元射影像。

その結果を、Fig. 4(a)および 4(b)にそれぞれ示す。画像フィルター無しの場合のエネルギー分解能が 4.3%、 3×3 の画像フィルター有りではエネルギー分解能が 4.7%であった。分解能が大きく損なわれない上、ベースラインのノイズが低減されていることから、 3×3 画像フィルターの画像処理が本実験では有効であると総合的に判断した。以上の通り、イベント駆動型画像センサーと繰り返し

周波数 100 kHz のレーザーを組み合わせることで、超高速光電子画像計測法を実現した。

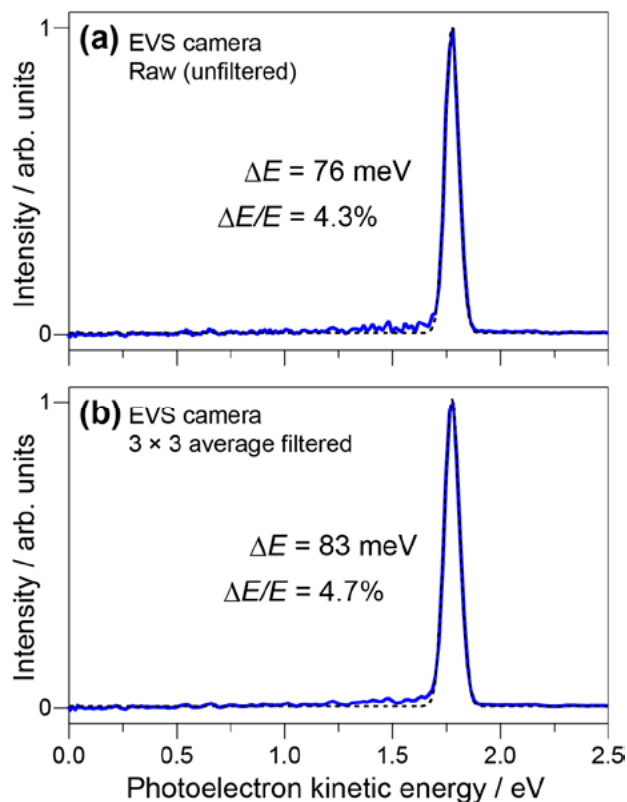


Fig. 4 Fig. 3(a)および 3(b)から得られた Ag^- の光電子スペクトル。

イベント駆動カメラの性能評価後、Fig. 2 に示す装置を使い銀三量体負イオン Ag_3^- を気相合成し、その光電子画像観測を行った。以下では、その結果について詳述する。 Ag_3^- の基底電子状態は直線型構造を有し、その最高被占軌道（以下、HOMO）、および HOMO の次に軌道エネルギーが低い $\text{HOMO}-1$ は、それぞれ σ_u および σ_g 軌道である。 σ_u 軌道は、中央の銀原子上に節（波動関数の値がゼロになる位置）を持ち、原子 p 軌道に似た電子分布を、一方、 σ_g 軌道は角度方向に節の無い、原子 s 軌道に共通する特徴を有する。レーザー波長を変えながら、これら二つの対称的な被占軌道から電子を叩き出し、その際発生する光電子の散乱分布の二次元射影像をイベント駆動型カメラで撮影した。得られた結果を Fig. 5 に示す。

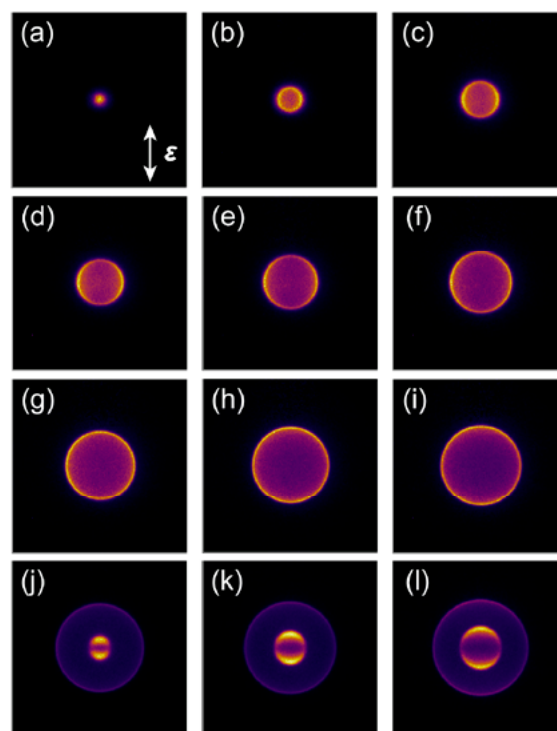


Fig. 5 銀三量体負イオン Ag_3^- から放出された光電子の二次元射影像。光電子脱離に用いたレーザーの光子エネルギーは以下の通り。
(a) 2.43, (b) 2.53, (c) 2.64, (d) 2.76, (e) 2.89, (f) 3.02, (g) 3.18, (h) 3.35, (i) 3.45, (j) 3.65, (k) 3.77, (l) 3.88 eV

Fig. 5(a)を見ると、画像中心に光電子信号が集中している。これは HOMO からの電子脱離しきい値(2.43 eV^[3])とレーザーの光子エネルギーが等しいため、運動エネルギーがほぼゼロの光電子が発生していることを意味する。光子エネルギーを増加させると、それに伴い信号の分布が拡大していく様子が明らかである。光電子が獲得する運動エネルギーが増えるためである。レーザー電場の偏光軸（図(a)中に示した両矢印）に対する角度分布を見ると、運動エネルギーの増加に伴い、偏光軸と垂直な方向に異方性を示すことが分かる（例えば図(e)）。古典的には電子はレーザー電場と平行な方向に揺動されると想像できるので、この直感と矛盾する。これが量子力学的効果であり、HOMO が原子 p 軌道に似た性格を帯びているた

めである。原子 p 軌道から光電子の波が放出される場合、光学選択則より s 波と d 波の二つの波が放出される。その波の出方は光電子の運動エネルギーに依存し、エネルギーが低い場合は、s 波が支配的であるのに対し、エネルギーが高くなると、d 波の寄与が増加する。それら二つの波がレーザー偏光軸と平行な方向で破壊的干渉を、垂直な方向で建設的干渉を起こした結果、前述の結果となる。さらに光電子の運動エネルギーを増加すると、画像中央に新たな信号が出現する。これが HOMO-1 から放出された光電子であり、レーザー偏光軸に沿って著しい異方性を示す。これは前述の通り、HOMO-1 が原子 s 軌道と似た性格を有するため、低エネルギーでは p 波が支配的に放出されたことを意味している。

4. 結論

本研究では、次世代の超高速光電子画像計測法の開発に成功し、それが占有軌道の固有エネルギーだけでなく、それらの軌道形状（厳密には軌道角運動量）までをも調べる強力な実験手法であることを示した。本成果は、2025 年に米国物理学協会の専門学術誌 The Journal of Chemical Physics に掲載された^[5]。その他、研究計画書で記載したように、蛍光体上の輝点に対して重心演算処理を行うことで画像分解能を向上させる研究も推進した。本成果も今後公表する予定である。

5. 参考文献

- [1] ソニーセミコンダクタソリューションズグループ株式会社 ウェブサイト. 技術紹介ページ: 技術_産業用イメージセンサー_“イベントベースビジョンセンサー (EVS) 技術”.
<https://www.sony-semicon.com/ja/technology/industry/evs.html>
- [2] 沖野友哉, 緑川克美, 第 16 回分子科学討論会 2022 横浜 1A22.
- [3] J. Ho, K. M. Ervin, and W. C. Lineberger; Photoelectron spectroscopy of metal cluster anions: Cu_n^- , Ag_n^- , and Au_n^- , J. Chem. Phys., **93**, (1990), 6987.
- [4] G. M. Roberts, J. L. Nixon, J. Lecointre, E. Wrede, and J. R. R. Verlet; Toward real-time charged-particle image reconstruction using polar onion-peeling, Rev. Sci. Instrum., **80**, (2009), 053104.
- [5] Y. Suzuki, T. Nishizato, K. Matsumoto, Y. Ushiki, Y. Aoki, A. Terasaki, and T. Horio; Photoelectron imaging spectroscopy of Ag_3^- in the S_0 and S_1 states, J. Chem. Phys., **162**, (2025), 184304.

6. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成金により行われました。この場を借りて、深く御礼を申し上げます。

腎臓病理診断 AI の開発

大阪大学大学院医学系研究科 特任助教 松本 あゆみ *

1. はじめに

腎生検病理診断は疾患の診断や治療方針決定、予後の評価に不可欠である。腎疾患の診療では、血液検査、尿検査、画像検査、臨床経過を総合的に判断する必要があるが、腎生検組織から得られる病理所見は、疾患活動性や慢性化の程度を直接反映する重要な情報である。特に、糸球体病変は、治療介入の必要性や腎予後の推定に関わるため、正確かつ再現性の高い評価が求められる。

一方で、腎病理診断には高度な専門性が必要である。また、同一標本を評価した場合でも、観察者間で所見の判定に差が生じることがある^[1]。さらに、腎生検病理画像は施設ごとに標本作製法、染色条件、スライドスキャナ、画像形式が異なり、画像データ自体も極めて大容量である。そのため、人工知能（artificial intelligence：AI）を用いた病理診断支援には大きな期待が寄せられているものの、実臨床で多施設に展開するためには、施設間差異に堅牢なモデルを構築する必要がある^[2]。

加えて、腎病理 AI では、希少病変の検出が特に重要な課題となる。糸球体病変のなかでも、半月体形、分節性硬化や全節性硬化は、疾患活動性や重症度、慢性化の程度を反映し、治療方針に影響し得る重要な病変である。しかし、これらの病変は全糸球体所見の中で出現頻度が低く、AI 学習に必要な十分量の教師データを確保しにくい。一般に、深層学習モデルは多数の正例を用いて特徴を学習するため、出現頻度の低い病変では、見逃しが生じやすい（クラス不均衡）。このため、単純に教師あり学習を行うだけでは、臨床的に重要な希少病変を安定して検出することは難しい。

AI 開発においても一つ重要な問題が、ドメインシフトである。これは、学習に用いたデータ分布と、実装後に入力されるデータ分布が異なることにより、AI の性能が低下する現象である^[3]。病理画像では、同じ染色が施された標本であっても、染色濃度、色調、明るさ、スキャナ固有の画像特性が施設ごとに異なるため、単一施設のデータで学習した AI を他施設に適用すると性能低下が生じる可能性が高い。腎病理 AI を社会実装するためには、単に一施設内で高精度なモデルを作成するだけでは不十分であり、多施設でも安定して機能する方法論の確立が不可欠である。そこで本研究では、腎生検 Periodic acid Schiff (PAS) 染色画像を対象に、施設間差異を補正しつつ、希少な腎病理所見を自動検出する AI の開発を行った。

2. 研究方法と結果

2.1. 多施設腎生検 PAS 染色画像データセットの構築

国内 22 施設で施行された腎生検症例の PAS 染色組織をデジタルデータ化した whole slide image (WSI) を用いた。対象は 2014 年 1 月から 2018 年 12 月までに腎生検を受けた 16 歳以上の患者であり、解析には開発コホート 2498 WSI、テストコホート 2178 WSI、合計 4676 WSI を用いた。各施設で通常診療として作製された PAS 染色標本を、Aperio ScanScope、Hamamatsu NanoZoomer、VS120 virtual slide microscope のいずれかのスキャナでデジタル化し、SVS、NDPI、VSI の 3 種類の画像形式を含むデータセットを構築した。

*（助成採択時） 大阪大学医学部附属病院 腎臓内科 医員

2.2. 糸球体病変アノテーションと希少病変の設定

複数の腎臓専門医により、PAS 染色画像上の糸球体領域に対してアノテーションを付与した。分類対象は、全節性硬化および半月体、分節性硬化を除く糸球体、全節性硬化、半月体、分節性硬化の4カテゴリとした (Fig.1)。

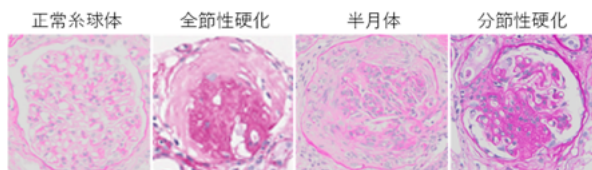


Fig. 1 分類対象とした糸球体病変

全節性硬化は全アノテーションの約 16%を占めた一方、半月体および分節性硬化はそれぞれ約 2~3%にとどまった。半月体や分節性硬化はデータ数が少なく、AI にとって検出が難しい希少病変であることが確認された。

2.3. 施設間・スキャナ間ドメインシフトの可視化と定量評価

まず、PAS 染色糸球体画像の特徴量解析を行った。ImageNet で事前学習された ResNet50 を用いて糸球体画像から特徴量を抽出し、t-SNE により分布を可視化した。

その結果、画像特徴は施設およびスキャナ形式により明確にクラスター化し、スキャナ由来の画像特性が AI 性能に影響し得る主要因であることが示された (Fig.2)。

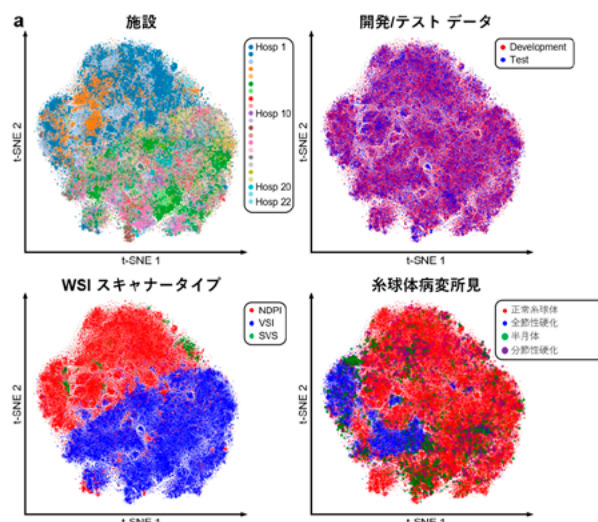


Fig. 2 多施設腎生検 PAS 画像における施設間・スキャナ間差異

2.4. YOLOv8 によるベースライン病変検出モデルの構築

次に、糸球体病変検出モデルとして YOLOv8 を採用した。NDPI、VSI、SVS を代表する 3 施設を選び、各施設のデータを用いて教師あり学習による Baseline YOLO を作成した。性能評価においては、同一施設の未使用画像、同一スキャナ形式だが別施設の画像、異なるスキャナ形式の画像という 3 種類のテスト条件を設定し、施設差およびスキャナ差に対する頑健性を検証した。

その結果、一般的な糸球体検出では比較的高い性能が得られたが、希少病変である半月体および分節性硬化では検出性能が低く、さらに他施設画像、特に異なるスキャナ形式の画像に適用した場合に性能低下を認めた。例えば、VSI 形式施設で学習したモデルを NDPI 形式画像に適用した場合、半月体検出の AP50 は 0.64 から 0.19 へ低下し、希少病変検出がドメインシフトの影響を強く受けることが示された。これは、腎病理 AI の実用化において、施設間差異の補正が必須であることを示す重要な結果であった。

2.5. 半教師あり学習による未ラベル画像の活用

第一の対策として、半教師あり学習を導入した^[4]。単一施設の専門医アノテーション付き画像で作成した Baseline YOLO を用いて、他施設の未ラベル画像に疑似ラベルを付与し、一定以上の信頼度を示す画像パッチを元の教師データに加えて再学習した。疑似ラベル採用の信頼度閾値として 50%、70%、90% を比較した。90% 閾値では採用される疑似ラベルが少なく、改善効果は限定的であった一方、50% 閾値ではより多様な疑似ラベルを取り込むことができ、特に希少病変の検出性能改善に有用であった。このため 50% 閾値で疑似ラベルを用いる Semi-Supervised YOLO を最適モデルとして選択した。

Semi-Supervised YOLO は、同一施設内評価において希少病変の検出性能を改善した。これは、専門医による追加アノテーションを大幅に増やさなくても、未ラベル画像を活用することで AI 性能を高められることを示している。ただし、半教師あり学習単独では、スキャナ形式が異なる施設への一般化には限界が残った。すなわち、未ラベルデータの活用には有効であるが、画像スタイル自体が大きく異なる場合には、ドメインシフト補正を併用する必要があると考えられた。

2.6. Residual CycleGAN による施設間画像差の補正

第二の対策として、Residual CycleGAN に基づくドメイン適応を導入した^[5]。これにより、染色調やスキャナ由来の画像スタイル差を補正しながら、糸球体係蹄、硬化、半月体など診断上重要な形態情報を保持することを目指した。

代表施設ごとに、他 21 施設の画像スタイルへ変換する Residual CycleGAN を構築し、変換画像を用いて GAN-Augmented YOLO を作成した。さらに、このモデルを用いて他施設画像に疑似ラ

ベルを付与し、50%以上の信頼度を示すデータを追加して再学習する GAN-Semi-Supervised YOLO を構築した (Fig.3)。Residual CycleGAN による変換後画像では、施設間の特徴量分布差が縮小し、平均 FID は 55.9 から 20.2 へ低下し、施設およびスキャナ由来の画像分布差が定量的に緩和されたことが示された。

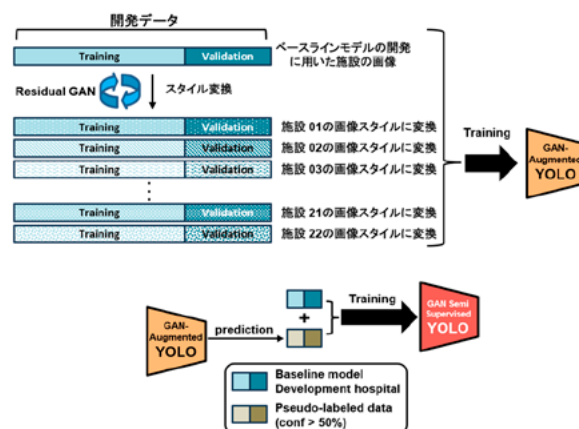


Fig. 3 Residual CycleGAN を用いたドメイン適応と AI 学習戦略

2.7. AI モデルの性能比較と希少病変検出の改善

最終的に、Baseline YOLO、Semi-Supervised YOLO、GAN-Augmented YOLO、GAN-Semi-Supervised YOLO の 4 種類を比較した。一般的な糸球体検出ではいずれのモデルも高性能であったが、半月体および分節性硬化といった希少病変では学習戦略による差が明確であった。同一施設内評価では Semi-Supervised YOLO が有効であり、希少病変検出に 15.2~17.7% の改善を示した。一方、NDPI と VSI のようにスキャナ形式が異なる条件では、GAN-Semi-Supervised YOLO が最も安定して性能を改善し、半月体検出では最大 63.4% の改善を示した (Fig.4)。これにより、半教師あり学習と Residual CycleGAN によるドメイン適応を組み合わせることで、専門医アノテーション不足と施設間差異という二つの課題を同時に緩和できることが示された。

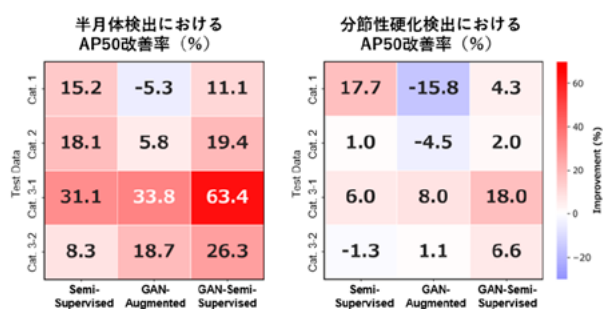


Fig. 4 学習戦略による病変検出性能の改善

2.8. Grad-CAM による AI 判断根拠の可視化

さらに、モデルの判断根拠を検討するため、Gradient-weighted Class Activation Mapping (Grad-CAM) を用いた可視化を行った。Baseline YOLO では萎縮尿細管を全節性硬化と誤認する例や、分節性硬化部位への注意が不十分な例がみられたが、GAN-Semi-Supervised YOLO では実際の糸球体領域、硬化部位、非典型的半月体により適切に注意が向く傾向が確認された。この結果は、性能改善が単なる数値上の改善にとどまらず、病理構造の識別に関わる特徴学習の改善を伴っている可能性が示された。

3. 考察

本研究により、腎病理画像 AI の社会実装における主要課題である、専門医アノテーション不足と施設間ドメインシフトに対して、半教師あり学習と Residual CycleGAN を組み合わせた方法が有効であることが示された。特に、半月体および分節性硬化のような希少病変は、臨床的には重要である一方、アノテーション数が少なく、AI 学習において不利である。本研究では、疑似ラベルを用いて未ラベル画像を活用することで、このデータ不足を部分的に補える可能性を示した。

一方、半教師あり学習単独では、異なるスキャナ形式への一般化には限界があった。この結果は、病理 AI においては学習データ数を増やすだけでなく、画像取得条件の違いそのものを補正する必

要があることを示している。Residual CycleGAN によるドメイン適応は、施設間の画像特徴量差を縮小し、NDPI と VSI のような異なるスキャナ形式間で希少病変検出性能を改善した。これは、当初計画で掲げた「施設間差異を標準化した腎生検病理画像を用いることで AI 性能を向上させる」という目的に合致する成果である。

本研究成果は、腎生検診断の均てん化に資する可能性がある。腎病理専門医に限られる医療環境において、AI が糸球体や主要病変を自動検出し、定量的な情報を示唆できれば、診断補助、教育支援、病理カンファレンスの効率化に寄与し得る。今後は、より多様な施設・染色法・病変を含む外部検証を進め、臨床情報との統合や予後予測への応用を検討する必要がある。

4. 結論

本研究では、腎生検画像を対象に、腎病理診断 AI の実用化に向けた基盤技術を開発した。多施設・多スキャナ環境では明確なドメインシフトが存在し、特に半月体や分節性硬化などの希少病変検出で AI 性能が低下することを明らかにした。

これに対し、半教師あり学習により未ラベル画像を活用し、さらに Residual CycleGAN によるドメイン適応を組み合わせることで、専門医アノテーション不足と施設間画像差の双方を補正し、希少病変検出性能を改善できることを示した。

本成果は、腎病理 AI の社会実装に向けた有用な方法論であり、今後は多様な染色法、病変、施設への展開を通じて、病理画像診断 AI 全般への応用が期待される。

5. 参考文献

- [1] Tizhoosh, H. R. et al. Searching images for consensus: can AI remove observer variability in pathology? Am. J. Pathol. 191(2021), 1702–

1708.

- [2] Satturwar, S. & Parwani, A. V. Artificial intelligence-enabled prostate cancer diagnosis and prognosis: current state and future implications. *Adv. Anat. Pathol.* 31 (2024), 136–144.
- [3] Stacke, K., Eilertsen, G., Unger, J. & Lundstrom, C. Measuring domain shift for deep learning in histopathology. *IEEE J. Biomed. Health Inf.* 25 (2021), 325–336.
- [4] Cheplygina, V., de Bruijne, M. & Pluim, J. P. W. Not-so-supervised: a survey of semi-supervised, multi-instance, and transfer learning in medical image analysis. *Med. Image Anal.* 54 (2019), 280–296.
- [5] Ade Bel, T., Bokhorst, J. M., van der Laak, J. & Litjens, G. Residual cyclegan for robust domain transformation of histopathological tissue slides. *Med. Image Anal.* 70 (2021), 102004.

6. その他成果発表等

6.1. 論文発表

- ・ Matsui I, Matsumoto A, Imai A, et al, Domain-adaptive semi-supervised learning for efficient rare pathological lesion detection with minimal annotation. *NPJ Digit Med.* 23-8(1), (2025), 778.

6.2. 学会発表

- ・ 松本あゆみ, 松井功, 今井淳裕ら, 異なる医療機関における病理画像差異を校正する手法の確立, 第 67 回 日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2024 年 6 月 28 日～30 日.
- ・ 松井 功, 腎生検画像における稀少糸球体病変検出のための半教師あり学習と Residual GAN を用いたデータ拡張の統合的アプローチ, 第 7 回 日本メディカル AI 学会学術集会, 東京, 2025 年 6 月 27 日～28 日. 優秀一般演題賞

7. 謝辞

本研究は、公益財団法人 島津科学技術振興財団の助成金を受けて実施され、成果の報告に至りました。心より感謝申し上げます。

エクソソームを用いたオートファジーモニタリング方法の開発

大阪大学大学院医学系研究科 特任助教（常勤） 南 聡

1. はじめに

オートファジー-リソソーム系は、細胞内恒常性を維持する中核的な分解機構であり、タンパク質や脂質の品質管理を通じて細胞機能を支えている。この系は単なる分解経路にとどまらず、細胞の代謝適応、ストレス応答、さらには細胞運命決定にも関与する統合的な制御システムとして機能している。近年、この系の破綻が加齢や肥満、糖尿病、慢性腎臓病など多様な疾患の発症・進展に関与することが明らかとなり、その機能評価および制御は基礎研究から臨床応用に至るまで極めて重要な課題となっている。

しかしながら、オートファジー活性やリソソーム機能を生体内で非侵襲的かつ動的に評価する手法は未だ確立されていない。従来の評価は主として組織学的解析や細胞内分子マーカーに依存しており、時間的な変化を追跡することが困難である。また、オートファジーは形成、輸送、融合、分解といった多段階の過程から構成される複雑なシステムであるため、単一の指標ではその機能状態を正確に反映することが難しい。このような背景から、細胞外からオートファジー・リソソーム機能を読み出す新たな概念の構築が求められている。

本研究は当初、「エクソソームを用いたオートファジーモニタリング方法の開発」を目的として開始された。細胞外小胞（extracellular vesicles）は細胞間情報伝達の担い手として注目されており、その内容物が細胞内状態を反映する可能性が示唆されていることから、非侵襲的評価系として有望であると考えられていた。

一方、解析を進める過程で、脂質負荷条件下にお

ける細胞外への物質放出が、従来想定していたエクソソーム経路のみでは説明できず、リソソームが細胞膜と融合して内容物を直接放出する「リソソーマルエクソサイトーシス」^[1-2]が重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに、この分泌機構がオートファジー・リソソーム系のマスターレギュレーターである TFEB^[3]により制御されることを見出した。

以上を踏まえ、本研究ではエクソソームを含む細胞外分泌機構という当初の枠組みを維持しつつ、その本質的分子基盤としてリソソーマルエクソサイトーシスに着目することで、細胞内分解系の機能状態を細胞外から読み出す新たなオートファジーモニタリング法の確立を目的とした。

2. 方法

本研究では、リソソーマルエクソサイトーシスの分子機構および細胞外へ放出される分子の特性を多面的に解析するため、培養細胞およびマウスモデルを用いた統合的アプローチを採用した。

培養細胞として近位尿細管上皮細胞を用い、代謝ストレスモデルとしてパルミチン酸による脂質負荷条件を設定した。このモデルは、細胞内に脂質が蓄積し、リソソーム機能障害およびオートファジー異常を誘導することが知られており、病態再現性の高い系である。

TFEB 活性は、そのリン酸化状態および核内移行を指標として評価した^[4]。具体的には、核分画ウエスタンブロッティングおよび免疫蛍光染色を用いて、TFEB の細胞内局在変化を定量的に解析した。また、TFEB 標的遺伝子の発現解析により、そ

の転写活性の変化を検証した。

リソソーム機能については、LAMP1 などのリソソームマーカーの局在および数の変化を評価し、リソソームの量的および空間的再編成を解析した。さらに、リソソーマルエクソサイトーシスの評価として、リソソーム膜タンパクの細胞膜局在への移行、および細胞外への内容物放出量を指標とした。

細胞内構造変化については電子顕微鏡を用いて詳細に観察し、特にリソソーム内に形成される multilamellar bodies の出現頻度および蓄積量を定量化した。

さらに、細胞外に放出される脂質分子を網羅的に同定するため、質量分析を用いたリピドミクス解析を実施し、リソソーム由来脂質の分子種および特徴を明らかにした。

in vivo 解析として脂質負荷条件を再現したマウスモデルを用い、組織学的解析、免疫染色および電子顕微鏡解析を通じて、TFEB 活性とリソソーム機能異常の関連を検討した。

3. 結果

脂質負荷条件下において、TFEB の脱リン酸化および核内移行が時間依存的に誘導され、TFEB 標的遺伝子群の発現上昇が確認された。これに伴い、リソソーム数の増加および細胞周辺部への再配置が観察され、リソソーム動態が大きく再編成されることが示唆された(Fig. 1)。

このようなリソソーム動態の変化に対応して、リソソーム膜タンパクの細胞膜への局在が増加し、リソソームと細胞膜の融合が促進されることで、リソソーマルエクソサイトーシスが顕著に亢進した。この過程は TFEB 活性に依存しており、TFEB 機能を抑制するとエクソサイトーシス活性は著明に低下した。

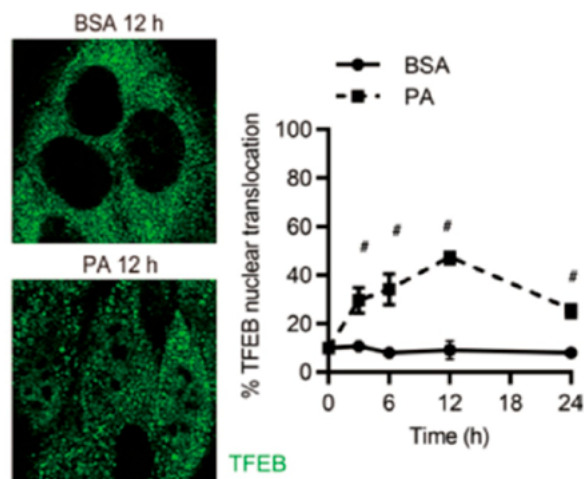


Fig. 1 培養尿細管細胞にバルミチン酸を負荷すると TFEB が核内移行する

一方で、脂質負荷によりリソソーム内にはリン脂質が過剰に蓄積し、電子顕微鏡解析により特徴的な multilamellar bodies の形成が確認された。これらの構造は脂質の層状蓄積を反映するものであり、リソソーム機能障害の指標と考えられる。興味深いことに、TFEB 活性化に伴いこれらの構造は減少し、同時に細胞外へのリン脂質放出量が増加したことから、リソソーム内に蓄積した脂質がリソソーマルエクソサイトーシスを介して排出されることが明らかとなった(Fig. 2)。

リピドミクス解析の結果、細胞外に放出される脂質は特定のリン脂質群に富み、その分子プロファイルはリソソーム特異的脂質である bis(monoacylglycero)phosphate (BMP)^[5] に特徴的な分布と一致した。このことから、BMP がリソソーマルエクソサイトーシスの主要な放出成分である可能性が強く示唆された。

さらにマウスモデルにおいても同様の傾向が認められ、TFEB 活性低下に伴うリソソーム内脂質蓄積の増加および細胞障害の増悪が確認された。これらの結果は、TFEB 依存的なリソソーマルエクソサイトーシスが生体内においても重

要な役割を担うことを示している。

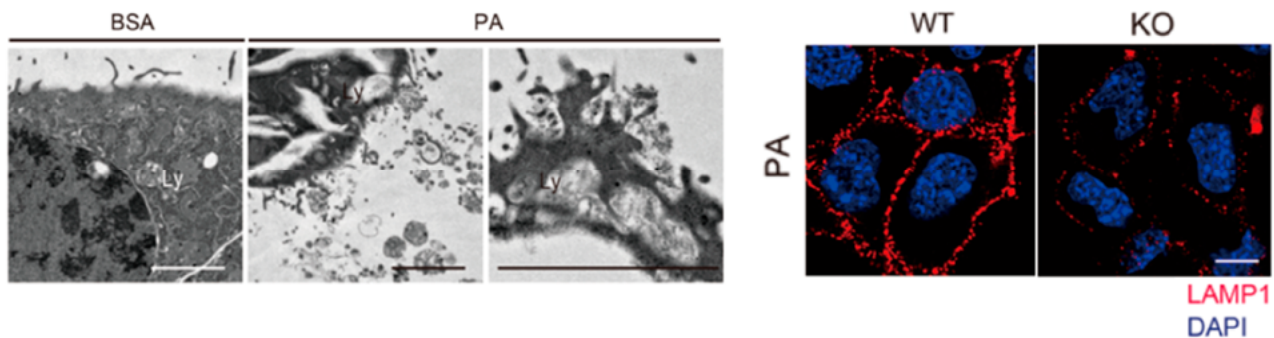


Fig. 2 (左) 培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷した電子顕微鏡画像

パルミチン酸を負荷した尿細管細胞ではリソソーム内容物を細胞外に放出するリソソーマルエクソサイトーシスが盛んにおこなわれている。

(右) 野生型尿細管細胞 (WT) と TFEB ノックアウト尿細管細胞 (KO) の細胞膜上の LAMP1 (リソソームマーカー) 染色。

細胞膜上の LAMP1 の存在はリソソーマルエクソサイトーシスを示す。

WT ではパルミチン酸負荷後リソソーマルエクソサイトーシスが盛んに生じているが、KO ではリソソーマルエクソサイトーシスがほとんど起こっていない。

4. 考察

本研究は、細胞外小胞を介したオートファジーモニタリングという当初の研究枠組みに対し、その分子基盤としてリソソーマルエクソサイトーシスが中心的役割を担うことを明らかにした点に新規性がある。特に、エクソソームを含む細胞外分泌機構の解析を進める過程で、リソソーム由来分泌という経路が主要な寄与因子として浮かび上がったことは、細胞外小胞研究の概念そのものを再考させる重要な知見である。

従来、リソソームは細胞内分解の最終段階を担う比較的静的なオルガネラとして理解されてきた。しかし本研究の結果は、リソソームが分解にとどまらず、細胞外への物質排出を通じて細胞内環境を調整する能動的な制御系として機能することを示している。すなわち、リソソームは「分解」と「排出」を統合した動的オルガネラとして位置づけ直す必要がある。

特に注目すべき点は、脂質負荷条件下において

リソソーム内に蓄積したリン脂質が multilamellar bodies として構造化され、TFEB 依存的に細胞外へ排出されるという一連の過程である。この現象は、リソソーム機能が飽和あるいは破綻に近づいた際に作動する代償的排出機構と解釈できる。すなわち、細胞は過剰に蓄積した脂質を単に分解するだけでなく、分解しきれない場合には細胞外へ排出することで恒常性を維持しようとする可能性が示唆される。

さらに、これらの排出脂質の主要構成成分として BMP が同定されたことは、リソソーム特異的脂質代謝と細胞外分泌を結びつける重要な発見である。BMP はエンドリソソーム系に特異的に存在し、脂質分解酵素の活性化や膜ダイナミクスの制御に関与することが知られている。本研究の結果は、BMP が単なる構造脂質ではなく、リソソーム機能状態を反映する“シグナル分子”として機能する可能性を示唆するものである。

また、TFEB が本過程を制御する中心的因子と

して機能する点も重要である。TFEBはオートファジーおよびリソソーム生合成を統合的に制御する転写因子であり、その活性化は細胞の分解能力を増強する。本研究では、TFEB 活性化によりリソソーマルエクソサイトーシスが亢進し、結果として細胞内に蓄積した脂質が効率的に排出されることが示された。このことは、リソソーマルエクソサイトーシスが単なる分泌現象ではなく、オートファジー-リソソーム系全体の機能状態を反映する統合的アウトプットであることを意味する。

この観点から、本研究で同定された BMP を中心とするリソソーム由来脂質は、従来の細胞内指標に依存しない非侵襲的バイオマーカーとして極めて有望である。特に、体液中の脂質プロファイルとして測定可能である点は、臨床応用に向けた大きな利点となる。すなわち、本研究はオートファジー機能を「細胞外から読み出す」という新たな概念を提示するものであり、これまで困難であった生体内オートファジー活性の評価に新たな道を開くものである。

一方で、本研究にはいくつかの課題も残されている。まず、細胞外に検出される BMP がどの程度リソソーム由来であるか、また他の分泌経路や細胞種からの寄与をどのように区別するかが重要な検討課題である。さらに、リソソーマルエクソサイトーシスとエクソソーム分泌との相互関係、あるいはそれぞれが担う生理的役割の分担についても、今後詳細な解析が必要である。

以上より、本研究はリソソームを中心とした細胞内分解系と細胞外分泌機構を統合的に捉える新たな枠組みを提示し、オートファジー研究およびリソソーム研究に新たな視点を提供するものであるとともに、非侵襲的診断法および創薬標的探索に向けた重要な基盤を構築するものである。

5. 結論

本研究により、細胞外小胞を介したオートファジーモニタリングの分子基盤として、リソソーマルエクソサイトーシスが重要な役割を担うことが明らかとなった。特に、TFEB により制御されるリソソーム由来分泌経路を介して、リソソーム内に蓄積した脂質が細胞外へ排出されることが示され、この過程は細胞内のオートファジー・リソソーム機能状態を反映する動的指標となり得ることが示唆された。さらに、細胞外に放出される脂質の主要成分として BMP が同定され、これらリソソーム由来分子は非侵襲的にオートファジー機能を評価する新規バイオマーカーとなる可能性がある。以上より、本研究は、細胞外分泌機構を基盤とした新たなオートファジーモニタリング法の概念を提示し、その実用化に向けた重要な基盤を提供するものである。

6. 参考文献

- [1] Ballabio A, Bonifacino JS; Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 21, (2020), 101-118.
- [2] Reddy A, Caler EV, Andrews NW; Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes, *Cell*. 106, (2001), 157-169.
- [3] Medina DL, Paola SD, Peluso L, et al; Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB, *Nat Cell Biol.* 17, (2015), 288-299.
- [4] Settembre C, Di Malta C, Polito VA, et al; TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis, *Science*. 332, (2011), 1429-1433.
- [5] Gallala HD and Sandhoff K; Biological

function of the cellular lipid BMP—BMP as a key activator for lysosomal lipid degradation, *Neurochem Res.* 36, (2011), 1594-1600.

7. その他成果発表等

- ・ Minami S. “Lipid metabolism dysfunction–induced lysosomal fragility disrupts autophagy and promotes acute kidney injury progression” World Congress of Nephrology, Yokohama, Japan, Mar. 29th, 2026.
- ・ Minami S. “Lipid metabolism dysfunction–induced lysosomal fragility disrupts autophagy and promotes acute kidney injury progression”

International Symposium on Protein and Organelle Lifetime Regulation, Nara, Japan, Nov. 1st, 2025.

- ・ Minami S. “Autophagy in Life-omics: Cellular Purification Opens the Door to Overcoming Kidney Disease ” The 1st International Symposium on Life-omics Research, Suita, Japan, Jan. 17th, 2025.

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 島津科学技術振興財団に深くお礼申し上げます。

含窒素グラフェンナノリボンの構造解析

千葉大学大学院工学研究院 准教授 山田 泰弘

1. はじめに

含窒素グラフェンナノリボン (GNR) (Fig. 1) は、含窒素官能基を含む GNR で、長さや、幅、エッジの種類、官能基の種類や導入位置を制御することで種々の性質を制御し、触媒や電極、吸着剤、センサー等で注目されている炭素材料である。この含窒素 GNR の特性を向上させるためには、構造制御や正確な構造解析技術が必須である。しかし、顕微鏡による原子レベルでの観察以外では含窒素 GNR の窒素の置換位置の特定は困難である。赤外 (IR) や Raman 分光分析は、一般的な分析法であるが、IR では官能基の種類の特定以外については不明確で、Raman では黒鉛と欠陥由来の G および D band 等以外については曖昧で、官能基の導入位置や密度について議論されておらず、最近発表された千葉大学山田らの研究を除いて詳細な構造解析が行われていない^[1]。山田らはピリジニック窒素^[2]や第三級窒素^[3]、ピローリック窒素^[4]、隣接したピローリック窒素、隣接した第一級アミン^[5]が制御された炭素材料を合成し、その構造解析を IR や Raman、X 線光電子分光 (XPS) 分析と計算で行ってきたが、エッジ構造が十分に制御されておらず、明確な議論が困難であった。

また山田らにより、含窒素官能基に関するピークが IR と Raman スペクトルにおいて 1500-1550 cm^{-1} 付近に現れることがわかっていった^[6]。また、種々の芳香族化合物を使用して、ジグザグエッジやアームチエアエッジを含む炭素材料や GNR の IR^[7] や Raman スペクトル^[8] における種々のアサインメントを報告してきたが、含窒素官能基の影響について明確にできていなかった。

そこで本研究では、1) エッジ構造が明確な含窒素 GNR を使い、IR や Raman 分光分析と計算を組合せて、含窒素官能基の種類や導入位置、密度が、特にエッジの C-H 面外変角振動や C=C 伸縮振動のピーク位置に与える影響について明らかにすることにより、炭素材料における IR と Raman 分光分析による構造解析の体系化を目指した。本研究が完成することにより、原子レベルの直接観察を行うことなく、IR と Raman 分光分析により一般的な数多くの炭素材料の構造を詳細に解析可能となることが期待できる。本報告書では IR 分光分析による成果を報告する。

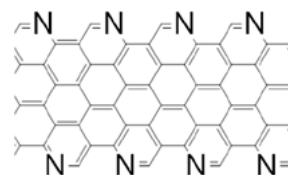


Fig. 1 ピリジニック窒素を含む含窒素 GNR の構造例

2. 実験・計算

2.1. 実験

1-アミノアントラセン (AA) やベンゾ[g]キノリン (BQ) など計 7 種類の基準化合物を、精製せずそのまま使用した。これらを希釈剤の KBr で 100 倍 (1 wt.%) に希釈し、日本分光株式会社製の FT/IR-4200 (検出器: MCT_M) を用いた拡散反射赤外フーリエ変換 (DRIFT) 分光法により分析を行った。これらの実測の IR や Raman スペクトルは下記のスペクトル計算で確認し、計算の妥当性を示した。本報告書では省略する。

2.2. 計算

本研究では、Gaussian 16 を用いた B3LYP/6-

31g(d)レベルの計算により、炭素材料の構造最適化および赤外 (IR) スペクトルのシミュレーションを行った。精度向上のため計算条件を厳密化し、標準化合物の実験値との比較を通じてスケールリングファクターを決定した。

解析対象として、ジグザグ型およびアームチェア型エッジを持つグラフェンナノリボン (GNR) に、9 種類の窒素 (N) 官能基を導入したモデルを構築した (Fig. 2)。またピリジニック窒素の導入位置と個数の異なる GNR の計算も行った。これらにより、GNR 内の窒素種と導入位置・量の影響を評価した。また、第四級窒素を含む系には電荷補償のため臭化物や塩化物イオンを追加した。

さらに、窒素の導入位置や個数が IR スペクトルに与える影響を詳細に調査するため、複数のピリジン型窒素を持つモデルを網羅的に解析し、それぞれの窒素種 (アミン、ピリジン、第三級・第四級窒素等) を各部位 (エッジ、バレー、基底面) に応じて分類・定義した。

伸縮振動のピークシフトと力定数の関係は、二原子分子間の調和振動子モデル (Eq.(1))^[9]に従うことが知られている。また、力定数と核間距離の関係は Badger の法則^[10]として知られており、力定数の増加は結合長の短縮を意味する。これらの式を用い、多様な窒素官能基やエッジ構造を持つ窒素ドーピング・グラフェンナノリボン (N-doped GNR) の精密な解析を行った。

$$\nu = \sqrt{k/\mu}/2\pi c \quad \text{Eq.(1)}$$

ここで、 ν は二原子分子振動のピーク波数を、 μ は換算質量を表す。本手法は、単なる定性的な議論を超えて、理論的根拠に基づいた炭素材料解析を可能にする重要なアプローチと言える。

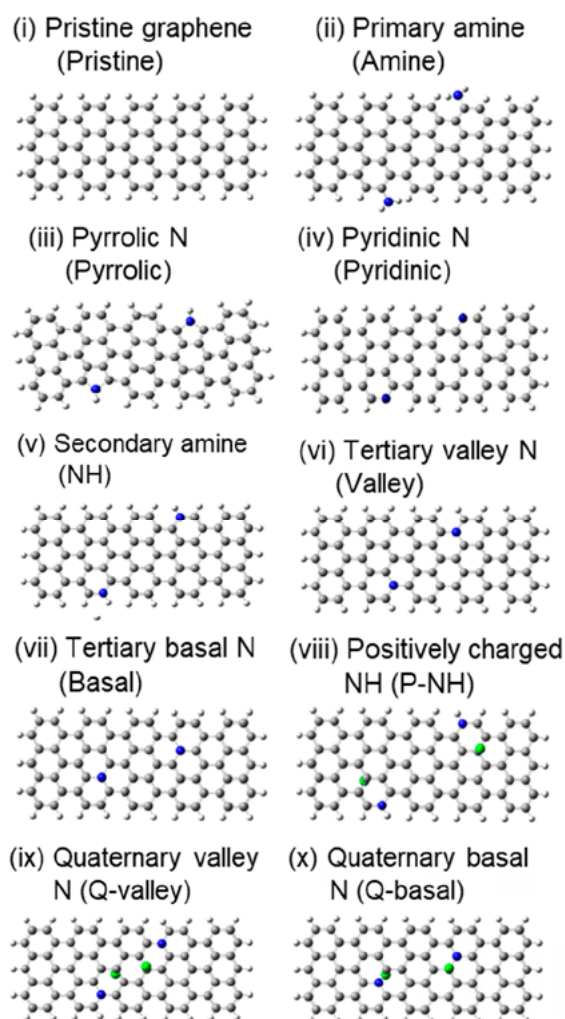


Fig. 2 計算に使用した種々のアームチェア型グラフェンナノリボンの構造

3. 結果

Fig. 3a に示すアームチェア型 GNR (Arm-GNR) の C-H 結合長と C-H 伸縮振動由来のピーク位置の関係は、相関係数 0.94 という極めて高い直線性を示した。本報告書に示していない Zig-GNR の C-H ピーク位置は異なるため、 sp^2 C-H 伸縮振動のピークシフトを利用することで、エッジ形状を識別することができる。

同様に、Fig. 3b に示す N-H 結合長とピーク波数の関係においても、決定係数 R^2 が 0.91 に達する強い線形相関が確認され、官能基の種類の違いによる N-H の結合距離とピーク位置が明確と

なった。この N-H の種類とピーク位置についてはすでに芳香族化合物では数多く報告されているが、本研究では、エッジ構造の影響についても明確にすることができた。ただ、本研究の計算では吸着水等の影響を考慮していないため、実際の実験では真空加熱などの注意が必要となる。

さらに、Fig. 3c に示すように、C-H 結合長とピーク位置に強い連動性があることから、C-H 伸縮振動のピーク位置は隣接するピリジン型窒素 (N) の数に鋭敏に依存することも分かった。例えば、ジグザグエッジにおける C-H 伸縮振動ピーク (本来は 3026 cm^{-1}) は、ピリジン型 N が離れた位置にある場合は $3026\text{--}3030\text{ cm}^{-1}$ へのわずかなシフトにとどまった。しかし、隣接するピリジン型 N が 1 つ存在すると $3048\text{--}3054\text{ cm}^{-1}$ へ、2 つ存在すると $3071\text{--}3075\text{ cm}^{-1}$ へと、高波数側へ大きくシフトした。このシフトの傾向は、よく知られた調和振動子近似式によって物理的に説明できるだけでなく、2 つのピリジン型 N に挟まれた C-H の水素原子上の電子数が、他のエッジ環境と比較して劇的に減少するという化学的な電子状態の変化にも起因していることがわかった。

アームチェア型 (arm-GNR) はジグザグ型に比べて共役が不十分であり、結合長は短く、波数は高めに現れた (Fig. 4a)。強い電子吸引力を持つピリジン型 N は C=C や C-N の結合が短くなり、最高波数を示した。逆に電子供与性のピロール型やアミン類 (NH_2 , NH) は結合を伸長し低波数化させる。特に第一級アミン (NH_2) は電子注入が 1 点の炭素に集中し、第二級の NH よりも結合が長くなったことが原因と考えられる。一方、ジグザグ型 (zig-GNR) は電子が局在するエッジ状態を持つため、N 基の影響が長距離に伝播し、波数の変化幅が広がったと考えられる。

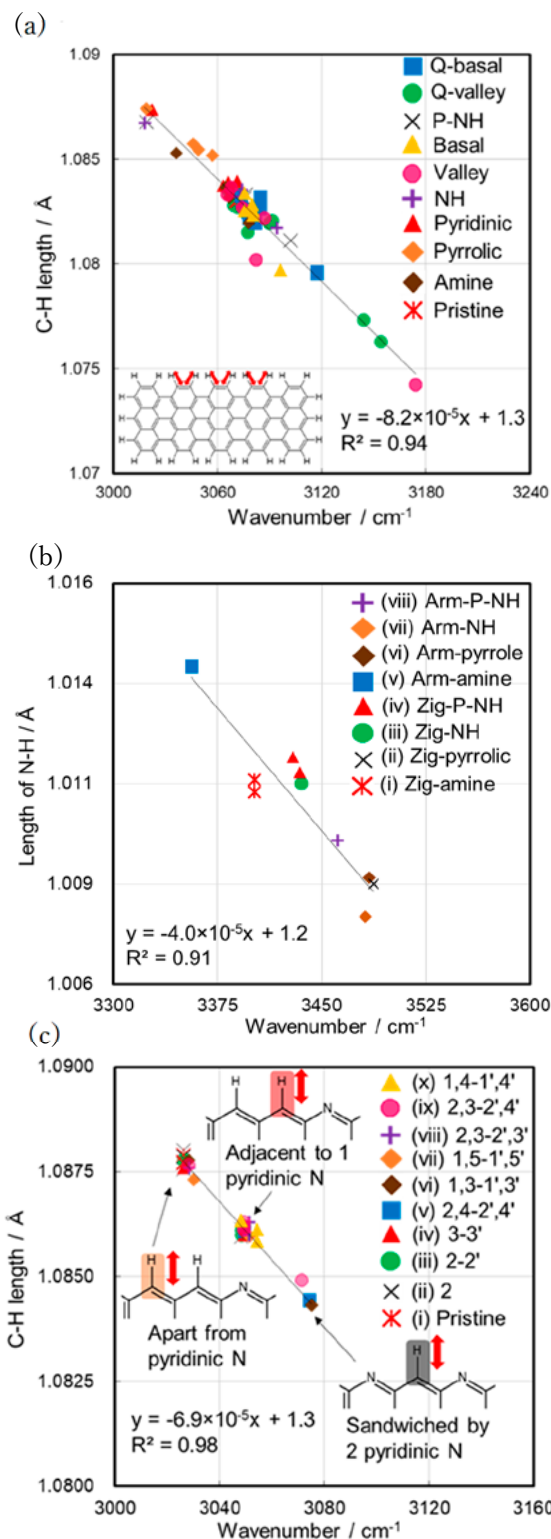


Fig. 3 種々のグラフェンナノリボンの計算した IR スペクトルにおける C-H または N-H の結合距離とピーク位置の関係. (a) Arm-GNR. (b) Arm-GNR and Zig-GNR. (c) Zig-GNR.

Fig. 4b に Arm-GNR の DUO の C=C 伸縮振動に由来するピークをプロットし、官能基による影響を可視化した図を示す。Raman 分光分析で黒鉛の 6 員環の C=C の伸縮振動に由来する G band やそれよりも少し低い G' band に相当する位置にピークが現れているが、このピーク位置も官能基の種類が大きく影響していることが分かった。Zig-GNR ではピークの位置が異なるため、エッジの種類によってもピーク位置が異なるため、エッジの構造も明確にできれば、含窒素官能基により影響を受けた G band (または G' band) の位置を推定できる可能性がある。

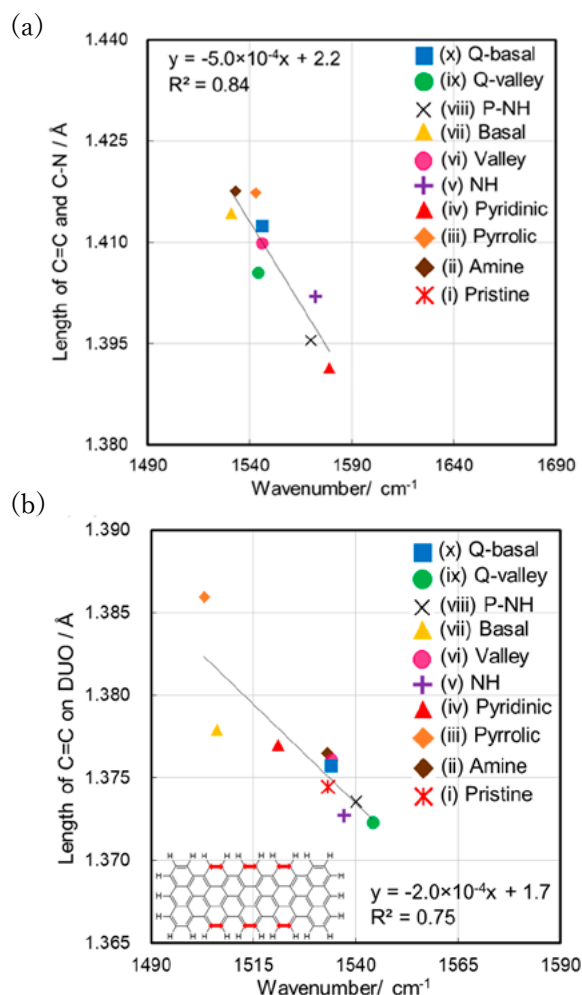


Fig. 4 種々のグラフェンナノリボンの計算した IR スペクトルにおける C=C または C-N 結合距離とピーク位置の関係

Fig. 5 に Arm-GNR の計算より得た IR スペクトルを示す。一番下が窒素を含まない Arm-GNR の IR スペクトルで、下から 2 番目以上が種々の官能基が導入された Arm-GNR の IR スペクトルを示している。また、IR においても Raman 分光分析で用いられる G band と D band (欠陥由来のバンド) の強度比に対応する I_D/I_G 比も示した。さらに一番右側に示しているのが C-H の結合距離となる。官能基の種類によって I_D/I_G 比や C-H の結合距離にも影響を与えていることがわかる。特にベール面 (エッジ以外の部分) に含窒素官能基が導入されることにより (第三級窒素等)、 I_D/I_G が高くなることも分かった。この結果は、一般的に炭素材料の構造解析には、Raman 分光分析が利用されているが、IR 分光分析も強力なツールと成りえることを示している。

Fig. 6 に本研究で得られた結果をまとめた含窒素炭素材料の IR スペクトルにおけるアサインメント例を示す。本研究では GNR を用いた構造解析であるが、この研究成果は種々の炭素材料にも応用できると考えている。本研究によって得られた重要な知見は、Raman スペクトルの G band で知られる領域に相当する IR スペクトルの G-band like ピーク位置 ($1500-1600\text{ cm}^{-1}$) が含窒素官能基の種類のみならず、エッジの違いによっても異なることを明確に示した。また、ベンゼン環に 1 つの C-H が存在する SOLO や 2 つの C-H が存在する DUO などに由来する C-H の面外変角振動 ($800-900\text{ cm}^{-1}$) や、伸縮振動 ($3000-3150\text{ cm}^{-1}$) も窒素の影響によってピーク位置が大きくシフトすることが明確になった。さらに、N-H の伸縮振動 ($3300-3500\text{ cm}^{-1}$) も官能基の結合状態の違いやエッジの違いによりシフトすることもわかり、今後の含窒素炭素材料の構造解析の基盤として長年利用される可能性が高い重要な成果を数多く得ることに成功した。

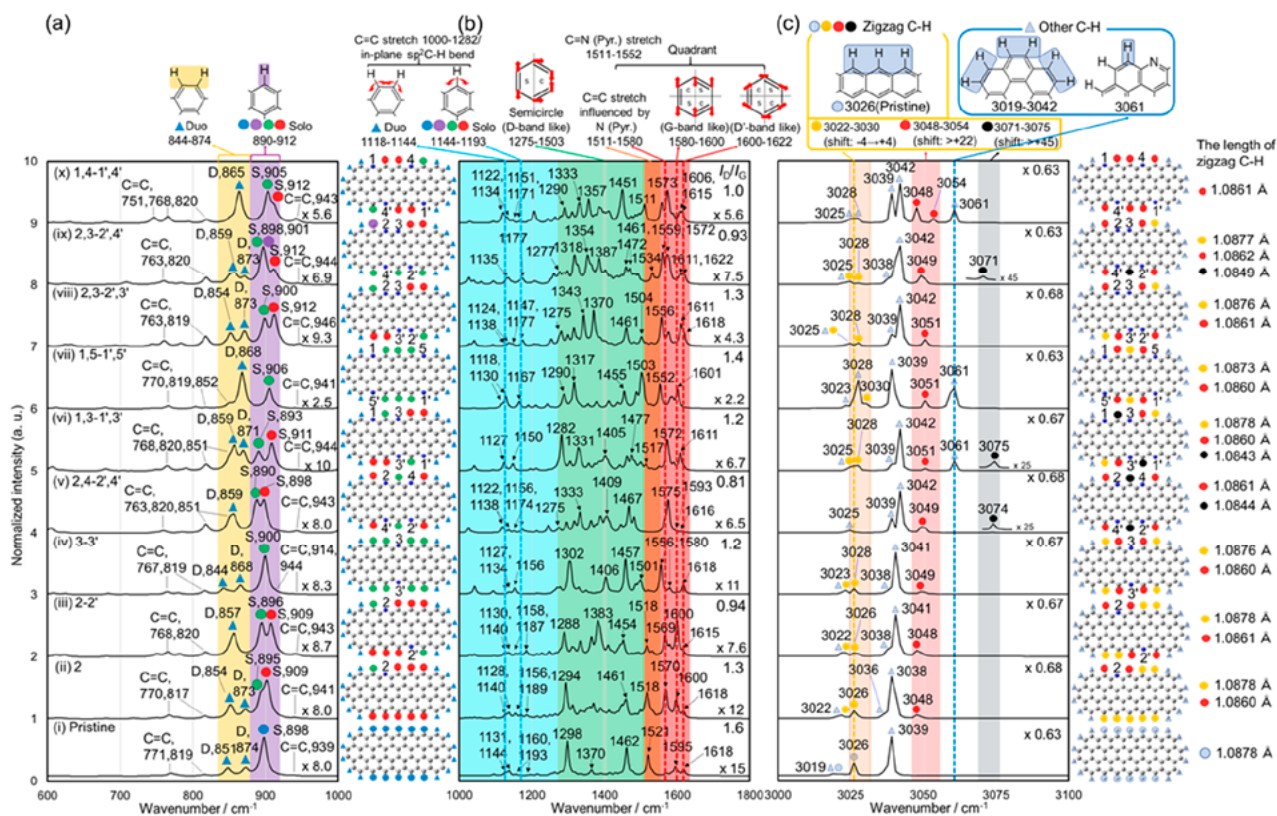


Fig. 5 Arm-GNR の IR の計算スペクトル結果の例

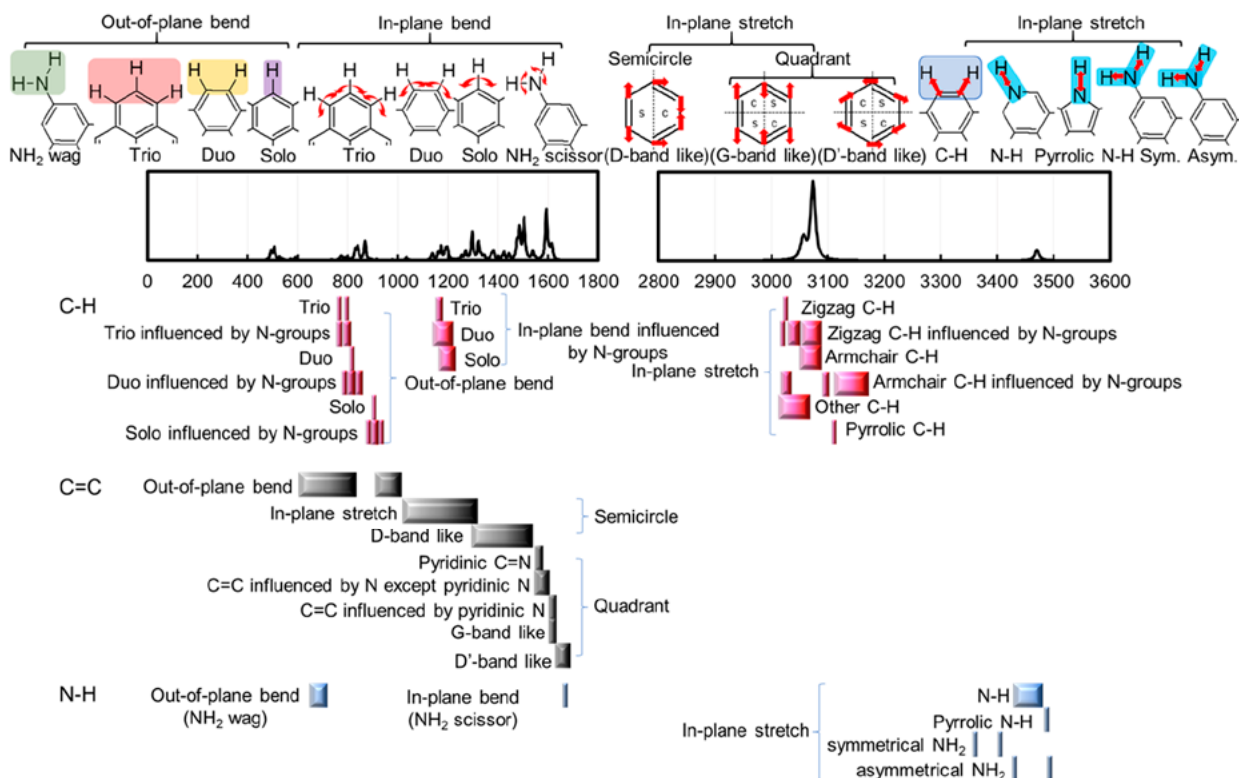


Fig. 6 含窒素炭素材料の IR スペクトルのアサインメント例

4. 結論

本研究では、含窒素官能基を有する芳香族化合物を実験や計算により IR や Raman 分光分析で分析し、その計算の妥当性を示した。その後、ジグザグエッジやアームチェアエッジを有する含窒素グラフェンナノリボン(N-GNR)の IR や Raman スペクトルを計算することで、構造（エッジ状態や官能基の種類）を識別する手法を示した。Raman スペクトルについては文量の都合上掲載していない。

エッジの種類は、C-H 面外変角振動 (SOLO/DUO) のピーク位置、ジグザグ ($1419\text{--}1494\text{ cm}^{-1}$) およびアームチェア ($1506\text{--}1544\text{ cm}^{-1}$) エッジの C=C 伸縮振動のピーク位置等の関係から識別できることを示した。また、含窒素官能基の種類は、一般的に知られている N-H ピークの位置に加え、ID/IG 比、本報告書では触れていないが、 $\text{sp}^2\text{C-H}$ 変角振動のピークの分裂、 $\text{sp}^2\text{C-H}$ 伸縮振動のピーク位置等でも特定できることがわかった。

特にこれまで $1400\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ の領域のピークは、議論が難しかったが、本研究成果によって、この領域のピークシフトの原因がエッジの種類と官能基の種類に関係していることが明確化できた。これは今後の含窒素炭素材料のみならず、他のヘテロ元素を含む炭素材料の構造解析の指針にもなる重要な知見と言える。

さらに、ピリジン型窒素の数と導入位置は、 1298 cm^{-1} 以下のピーク位置 (N 数の増加や隣接度で低波数シフト)、C-H 振動の分裂状態やシフトから推定可能であることがわかった。

本報告書では、主に IR の計算スペクトルを用いて N-GNR の構造を推定する手法を提案し、含窒素炭素材料における IR 分光法の基礎を構築し

た。Raman 分光分析の結果と合わせて今後はさらなる詳細な解析を行い、論文等で発表を行う。

5. 参考文献

- [1] Y. Yamada, M. Morimoto, T. Senda, K. Kondo, S. Sato, S. Kubo, T. Sogabe; Unveiling origins of defect peaks in carbon materials by analyzing oxygen and non-hexagonal rings in isotropic pitch-based carbon fiber using Raman, infrared, X-ray photoelectron spectroscopy, and density functional theory calculations, *J. Mater. Sci.* 61(2026), 23750–23797.
- [2] Y. Yamada, H. Tanaka, Y. Tanaka, S. Kubo, T. Taguchi, S. Sato; Toward strategical bottom-up synthesis of carbon materials with exceptionally high pyridinic-nitrogen content: development of screening techniques, *Carbon* 198 (2022), 411-434.
- [3] Y. Yamada, H. Sato, S. Gohda, T. Taguchi, S. Sato; Toward strategical bottom-up synthesis of carbon materials with exceptionally high basal-nitrogen content: development of screening techniques, *Carbon* 203 (2023), 498-522.
- [4] A. Sato, K. Gotoh, S. Sato, Y. Yamada; Toward strategical bottom-up synthesis of carbon materials with exceptionally high pyrrolic-nitrogen content: development of screening techniques, *Carbon* 222 (2024), 118904.
- [5] K. Kondo, A. Uchizono, L. Pu, I. Takahashi, R. Suzuki, S. Nakamura, K. Kan, K. Gotoh, T. Soejima, S. Sato, T. Ohba, Y. Yamada, Viciatzites: carbon materials with adjacent

- nitrogen functionalities for advanced CO₂ capture, Carbon 254 (2026), 121405.
- [6] Y. Yamada, Structural control and structural analyses of defects in carbon materials, Carbon Rep. 3 (2024), 101-112.
- [7] T. Sasaki, Y. Yamada, S. Sato, Quantitative analysis of zigzag and armchair edges on carbon materials with and without pentagons using infrared spectroscopy, Anal. Chem. 90 (2018), 10724-10731.
- [8] J. Kim, N. Lee, Y.H. Min, S. Noh, N.-K. Kim, S. Jung, M. Joo, Y. Yamada, Distinguishing zigzag and armchair edges on graphene nanoribbons by X-ray photoelectron and Raman spectroscopies, ACS Omega 3 (2018), 17789-17796.
- [9] N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley, Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3rd ed., Academic Press, Boston, (1990), 7-354.
- [10] R. M. Badger, A relation between internuclear distances and bond force constants, J. Chem. Phys. 2 (1934), 128-131.

6. その他成果発表等

- ・ 蒲荔芝, 山田泰弘, 阿部功幹, 佐藤智司, ジグザグやアームチェアエッジを有する含窒素グラフェンナノリボンの赤外分光分析とラマン分光分析による構造解析, 日本化学会, 東京理科大学 野田キャンパス, 2023 年 3 月 24 日
- ・ L. Pu, Y. Yamada, K. Abe, S. Sato, Structural analysis of nitrogen-doped graphene nanoribbons with zigzag and armchair edges by infrared and Raman spectroscopy, The Chemical Society of Japan, Tokyo University of Science, March 24, 2023.
- ・ L. Pu, U. Yamamoto, S. Sato, Y. Yamada, Synthesis of structure-controlled carbon materials with pyridinic nitrogen, The 40th Joint Symposium (The 90th The Association of Organic Micro-Analysts, The 122nd The Society of Instrument and Control Engineers 力学量計測部会), 22-23 June, 2023. Online

7. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成金により実施されました。心より御礼申し上げます。

2 探針プローブによる電気化学界面の化学種識別と局所物理量の同時計測

理化学研究所 開拓研究所 専任研究員 横田 泰之 *

1. はじめに

SDGs や脱炭素に向けた具体的な取組みが活発化の中で、蓄電池や水素燃料といった電気化学分野の重要性が益々高まっている。脱炭素に伴うエネルギー関連市場の規模は 2030 年には数兆円に上ると予測され、学界・産業界共に出口志向の研究開発が活発化している。一方で、人口減少が続く中、日本が国際競争力を維持しながら高い数値目標を実現するためには絨毯爆撃型の材料開発では難しく、電気化学反応が起こる界面の原子・分子レベルの知見に基づいてデザインされた高性能デバイスへの転換が喫緊となっている。

電気化学で重要な電解液と電極の界面について、原子・分子スケールでその詳細を明らかにしたいという電気化学者の長年の要望に応えるため、これまで様々なその場計測法が開発されてきた。中でも、1980 年代の後半に開発された電気化学走査トンネル顕微鏡(EC-STM)の登場によって、電極自体の構造やその変化、吸着種の状態解析、電子移動反応の追跡といった従来法では難しかった界面の詳細が明らかとなってきた^[1]。

EC-STM によって電極界面の構造解析が著しく進展した一方で、このような探針技術にナノスケールで化学種識別能を付与したいという要望が近年特に高まっている。1 例として、EC-STM を用いて酸素発生反応前後のグラファイト電極を観察した結果を Fig. 1(a)に示す^[1]。右の図の点線と矢印で示したように、平坦なグラファイト電極のステップ部分が削れていることが分かる。一方で、平らなテラス部分は原子レベルで変化しないことを容易に示すことができる。従って、グラ

ファイト電極を用いて酸素発生反応を行うと、電流が余計な反応に消費されて効率が低だけでなく、長期間の耐久性も期待できないことを直接示すことが可能である。しかしながら、EC-STM の測定だけでは、なぜ削れる部分と削れない部分があるのかを説明することは難しく、Fig. 1(b)に示すような化学的な情報を探針直下で取得できる手法の開発が望まれている。

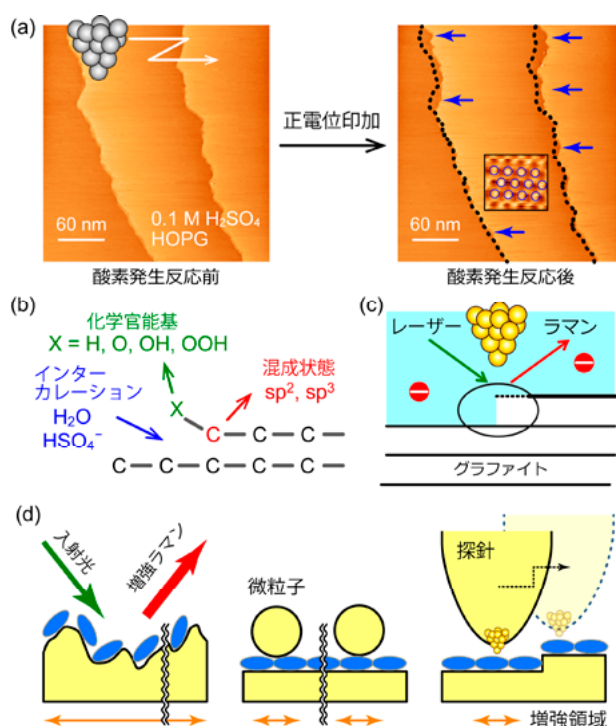


Fig. 1 固液界面の研究の重要性: (a) 0.1 M H_2SO_4 水溶液中で酸素発生反応を行った前後のグラファイト電極の EC-STM 像。矢印はエッチングされたステップ部分を示す。(b) ステップエッジの化学的な情報。(c) EC-TERS 測定の概念図。(d) SERS と TERS の比較。左から凸凹電極を用いた SERS、平坦電極と微粒子を用いた SERS、平坦電極と探針を用いた TERS の模式図。

そこで近年注目されているのが、Au や Ag といった貴金属探針にレーザー光を照射していわゆるプラズモン(自由電子の集団振動)を励起し、その強い電場増強効果を利用して振動分光測定を行う探針増強ラマン分光(TERS)と呼ばれる手法である(Fig. 1(c))^[1]。この技術は 2000 年頃に主に光学分野の研究者によって開発されたもので、Fig. 1(d)に TERS 測定のベースとなる表面増強ラマン分光(SERS)と比較した図を示す。

本研究者は、80 年代に開発された電気化学走査トンネル顕微鏡(EC-STM)に化学種識別能を付与するため、上記の EC-TERS 及びその周辺技術の開発を行ってきた^[2-8]。しかしながら、EC-TERS で用いる探針は手作業で作製する必要があり、歩留まりが悪いという課題を抱えていた(Fig. 2(a))。そこで本研究者は、ガラスピペット作製技術とメッキ技術に着目し、長年の課題を解決する革新的な探針作製法を開発した(Fig. 2(b))^[9,10]。本研究では、この革新的 EC-TERS 探針を更に発展させ、温度や pH といった局所物理量の同時計測が可能な 2 探針プローブの開発を行う^[11]。これにより、局所的な同時計測の基盤技術を構築する^[12,13]。

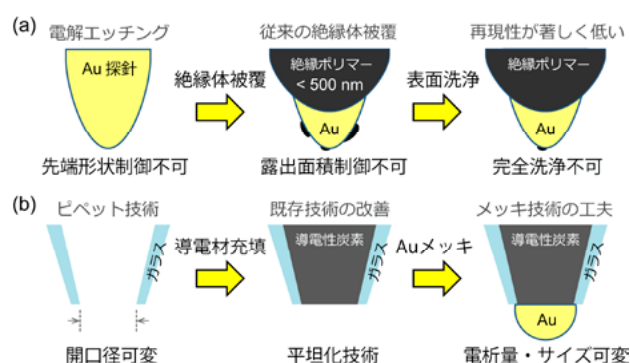


Fig. 2 探針作製方法の比較: (a) 30 年来的 EC-STM 及び EC-TERS の探針作製方法。 (b) ガラスピペットとメッキ技術を用いた新手法。

2. 実験方法

2.1. 探針作製

はじめに、本研究課題の基となる θ 型ガラス管

の写真を Fig. 3(a)に示す。太さが 1 mm のため金属線などで電気信号を外部に取り出せることが分かる。この θ 型ガラス管に対して、 CO_2 レーザーの局所加熱を利用したプラー(P2000, SUTTER)で先端を細くしたガラスピペットを作製した。次に、 θ 型の片方にボタンガスを封入して加熱することで導電性炭素材料の充填を行った。作製した炭素充填 θ 型ガラスピペットの写真を Fig. 3(b)に示す。これにより、 θ 型の片方に電気伝導性を持たせることができるため、2 探針プローブの作製が可能となる。本研究ではこれを作用電極、Au 線を対極および擬似参照電極、 AuCl_4^- 溶解液(0.5 mM、Wako)を 0.1 M H_2SO_4 で 10 倍希釈した溶液を電解液として、電気化学セル中でピペット先端への Au 電析を行った。

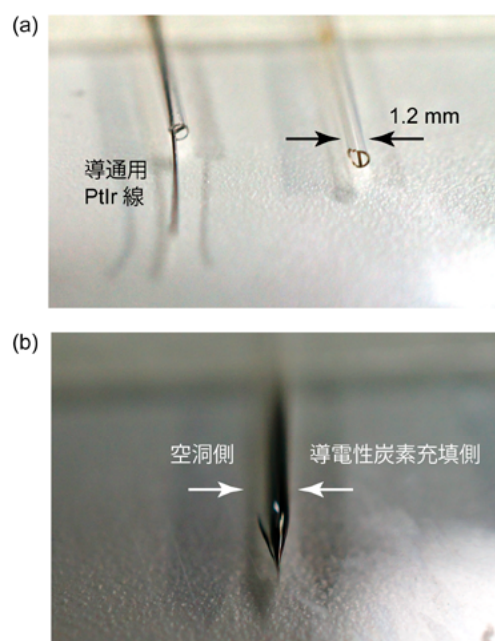


Fig. 3 ガラスピペットの詳細: (a) 2 探針プローブの基になる θ 型ガラス管の写真。 (b) θ 型ピペットの片方に導電性炭素を充填した時の写真。

2.2. 試料作製

清浄化した Au(111)単結晶電極を 0.1 mM 1,1',4,1''-terphenyl-4-thiol (Ph_3SH , Aldrich)のアセトン溶液に 12 時間以上浸漬して安定な自己組

織化単分子膜を作製した。これを試料として、EC-TERS 測定を行った。

2.3. 電気化学探針増強ラマン分光(EC-TERS)

NanoScope V (Bruker)で制御した MS-10 STM (Bruker)を用いて EC-STM 測定を行い、TERS 測定では探針先端に対物レンズ(50×, Nikon)を通して波長 633 nm のレーザー光を照射し、CCD カメラを備えた分光器(Princeton Instruments)によりスペクトル取得を試みた(Fig. 4)。

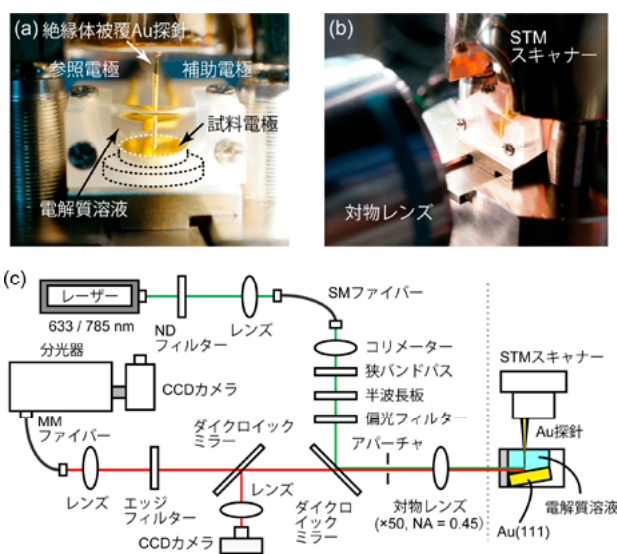


Fig. 4 EC-TERS 測定の詳細：(a) EC-TERS のセットアップを正面から眺めた写真。(b) STM スキャナーと対物レンズの位置関係を示した写真。(c) 共焦点光学系と EC-STM を組み合わせた EC-TERS システムの模式図。

3. 実験と考察

3.1. θ 型ガラスピペットへの Au 電析

Au 電析のためのセットアップを行い、電解液中で θ 型ガラスピペットの観察を行った光学顕微鏡像を Fig. 5 に示す。上半分が空洞側、下半分が導電性炭素充填側であることが分かる。下半分の導電性炭素に PtIr 線から通電し、 -0.4 V vs Au 線の電圧を印加した。これまでの研究から、下記の還元反応が起こり、ガラス探針の先端に Au が電析されることが分かっている^[9]。

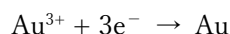


Fig. 5(b)に示した電析後の光学顕微鏡像には数 μm 程度の微小球が観察され、上記の Au 電析が進行したことが分かる。このように作製した探針はガラスによって先端以外が絶縁されているため、EC-STM や EC-TERS 測定では電解液由来のリーク電流が無視できるという特徴を有している。また、空洞側は同様のプロセスでもう一つの金属電極にしたり、溶液やガス種の通り道としての利活用が期待できる。

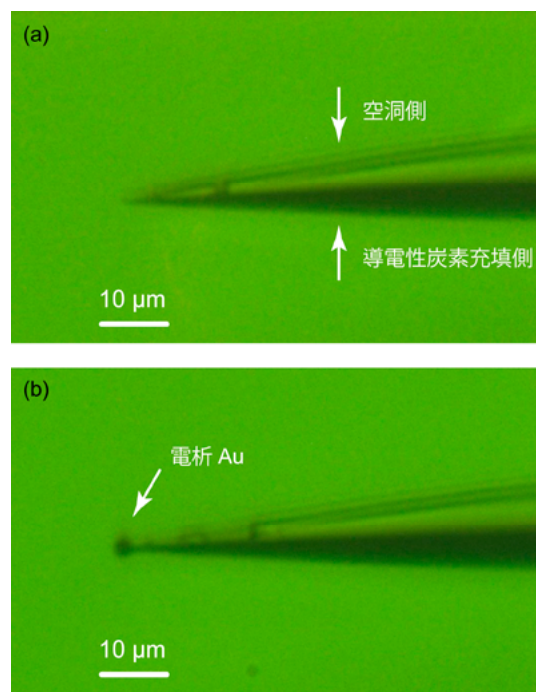


Fig. 5 θ 型ガラスピペットへの Au 電析：(a) Au 電析を行う前の θ 型ピペットの光学顕微鏡像。(b) Au 電析を行った後の θ 型ピペットの光学顕微鏡像。

3.2. EC-TERS による探針評価

上記の θ 型ガラスピペットを用いた探針及び Ph_3SH 吸着 Au(111)電極によって、EC-TERS 測定を行った。しかしながら、セットアップ中に電析 Au が剥離するといった問題が多発したため EC-TERS 信号を取得することはできなかった。本研究者は、 θ 型ガラスピペットをベースとした

2 探針プローブを作製するためには Au 電析の最適条件を見出すことが最優先であると考え、当初の計画にはなかった以下の検討を行った。

3.3. 探針作製条件の検討

上記の問題を解決するため、Fig. 2(b)に示した探針作製方法の見直しを行い、機械的安定性やプラズモン共鳴が十分に期待できる Au 電析サイズの探索を行った。具体的には、Au のメッキにおけるモデルを仮定して(1 点で核形成して半球状に成長するモデル)、適切な電析条件の検討を行った (Fig. 6)。

1点で核形成して半球状に成長するモデル

$$\int_0^t I dt = Q = \frac{nF}{2} \times \frac{4}{3} \pi r^3 \frac{\rho_{Au}}{M_{Au}}$$

$$2\pi n F D C r = \frac{nF}{2} \times \frac{\rho_{Au}}{M_{Au}} \times 4\pi r^2 \frac{dr}{dt}$$

$$\int_0^t 2\pi n F D C dt = \int_0^r \frac{nF}{2} \times \frac{\rho_{Au}}{M_{Au}} \times 4\pi r dr$$

$$2\pi n F D C t = \frac{\pi n F \rho_{Au}}{M_{Au}} r^2 = \frac{\pi n F \rho_{Au}}{M_{Au}} \frac{I^2}{(2\pi n F D C)^2}$$

$$I = \sqrt{\frac{(2\pi n F D C)^3 M_{Au}}{\pi n F \rho_{Au}}} t \propto \sqrt{t}$$

$n: 3 \text{ (Au}^{3+} \xrightarrow{2e^-} \text{Au)}$
 $C: 0.5 \text{ mmol/L}$
 $M_{Au}: 197 \text{ g/mol}$
 $\rho_{Au}: 19.3 \text{ g/cm}^3$

Fig. 6 Au 電析条件の検討: 電析条件を見直すためのモデル構築。

その結果、適切なサイズの探針を歩留まり良く作製することが可能となり (Fig. 7)、ラマン散乱光の取得確率を著しく向上することに成功した。本研究課題によって、 θ 型ガラスピペットを用いた 2 探針プローブの作製が可能であることが分かり、電解液と電極の界面を多角的に同時計測するための基盤技術の構築に成功した。

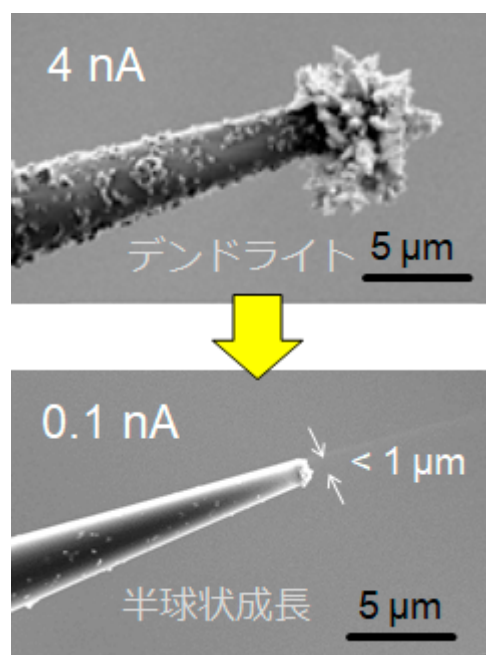


Fig. 7 Au 電析の最適化: (a) EC-STM 測定の条件に合わせて電析した探針の電子顕微鏡像。(b) θ 型ピペット用に最適化した条件で電析した探針の電子顕微鏡像。

4. まとめ

本研究で開発した技術によって 2 探針プローブの作製が可能になったため、EC-STM や EC-TERS の更なる多機能化によって、固体と液体の界面で機能発現する様々な電気化学デバイスの分子スケール評価が実現すると考えられる。電気化学デバイスの開発では、電極界面の構造と反応性の関係、不純物や添加物の役割の微視的な理解と制御、レアイベントの検出といったこれまで不可能であった知見を得る必要があり、本研究課題で開発した技術は脱炭素社会の実現に向けた応用開発に欠かせない界面分析技術への発展が期待できる。

5. 参考文献

- [1] Y. Yokota, M. Hong, N. Hayazawa, Y. Kim; Electrochemical Tip-Enhanced Raman Spectroscopy for Microscopic Studies of Electrochemical Interfaces, Surf. Sci. Rep., **77**-

- 4, (2022), 100576.
- [2] Y. Yokota, N. Hayazawa, B. Yang, E. Kazuma, F. C. I. Catalan, Y. Kim; Systematic Assessment of Benzenethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) as a Standard Sample for Electrochemical Tip-Enhanced Raman Spectroscopy, *J. Phys. Chem. C*, **123**-5, (2019), 2953.
- [3] Y. Yokota, M. Hong, N. Hayazawa, B. Yang, E. Kazuma, Y. Kim; Self-Consistent Tip Conditioning for Tip-Enhanced Raman Spectroscopy in an Ambient Environment, *J. Phys. Chem. C*, **124**-42, (2020), 23243.
- [4] M. Hong, Y. Yokota, N. Hayazawa, E. Kazuma, Y. Kim; Homogeneous Dispersion of Aromatic Thiolates in the Binary Self-Assembled Monolayer on Au(111) via Displacement Revealed by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy, *J. Phys. Chem. C*, **124**-24, (2020), 13141.
- [5] Y. Kobayashi, Y. Yokota, R. A. Wong, M. Hong, J. Takeya, S. Osawa, F. Ishiwari, Y. Shoji, T. Harimoto, K. Sugimoto, Y. Ishigaki, T. Suzuki, T. Fukushima, Y. Kim; Single-Molecule Observation of Redox Reactions Enabled by Rigid and Isolated Tripodal Molecules, *J. Phys. Chem. C*, **127**-1, (2023), 746.
- [6] 横田泰之, 早澤紀彦, 楊波, 数間恵弥子, F. C. I. Catalan, 金有洙; 電極界面の局所化学分析に向けた電気化学探針増強ラマン分光の開発, 表面と真空, **63**-6, (2020), 277.
- [7] 横田泰之; 探針増強ラマン分光の発展: 溶液・電気化学環境測定への展開, 化学と工業, **73**-2, (2020), 118.
- [8] 横田泰之; 電気化学界面の研究における探針増強ラマン分光法の活用, 電気化学, **93**-2, (2025), 126.
- [9] Y. Kobayashi, Y. Yokota, Y. Takahashi, J. Takeya, Y. Kim; Electrodeposited Gold Probe for Electrochemical Scanning Tunneling Microscopy, *J. Phys. Chem. C*, **127**-28, (2023), 13929.
- [10] 横田泰之; 電気化学探針増強ラマン分光の現状と展望, 分光研究, **73**-5, (2024), 138.
- [11] Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Zhang, N. Ebejer, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, A. J. Pollard, D. Roy, C. A. Clifford, H. Shiku, T. Matsue, D. Klennerman, Y. E. Korchev; Multifunctional Nanoprobes for Nanoscale Chemical Imaging and Localized Chemical Delivery at Surfaces and Interfaces, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**-41, (2011), 9638.
- [12] Y. Yokota, R. A. Wong, M. Hong, N. Hayazawa, Y. Kim; Monatomic Iodine Dielectric Layer for Multimodal Optical Spectroscopy of Dye Molecules on Metal Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, **143**-37, (2021), 15205.
- [13] Y. Kobayashi, Y. Yokota, Y. Shoji, S. Sajisha, C. J. Martin, J. Takeya, T. Fukushima, Y. Kim; Fluorescence Detection of Tetraphenylporphyrin Isolated on the Au(111) Electrode Enabled by Tripodal Molecules, *J. Phys. Chem. C*, **128**-36, (2024), 15082.

6. その他成果発表等

- ・ 横田泰之, 電気化学界面の微視的理解に向けたプローブ顕微鏡技術の開発, 日本顕微鏡学会第80回学術講演会, 幕張メッセ, 2024年6月3日.
- ・ Y. Yokota, How to Experimentally Obtain Microscopic Information on Electrochemical

- Interfaces?, International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) Mongolia 2024, Holiday Inn Ulaanbaatar, Mongolia, 28 August 2024.
- ・ 小林柚子, 横田泰之, 高橋康史, 竹谷純一, 金有洙, ガラス絶縁電析 Au 探針による電気化学走査トンネル顕微鏡計測と探針増強ラマン分光への応用, 第 85 回応用物理学会秋季学術講演会, 朱鷺メッセ, 2024 年 9 月 17 日.
 - ・ 小林柚子, 横田泰之, 高橋康史, 竹谷純一, 金有洙, ガラス絶縁電析 Au 探針の探針増強ラマン分光への応用, 第 18 回分子科学討論会 2024, 京都大学吉田キャンパス, 2024 年 9 月 21 日.
 - ・ Y. Yokota, Nanoscale Exploration of Electrochemical Interfaces: In Situ and Ex Situ Approaches, The 12th Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology (AsiaNANO 2024), IIT Madras, India, 24 September 2024.
 - ・ Y. Kobayashi, Y. Yokota, Y. Takahashi, J. Takeya, Y. Kim, Electrochemical Scanning Tunneling Microscope Measurements of Self-assembled Monolayers using a Glass Insulated Au Deposited Carbon Electrode Probe, International Symposium on Surface Science (ISSS-10), Kitakyushu International Conference Center, 22 October 2024.
 - ・ 横田泰之, 電気化学 STM とレーザー分光を組み合わせた電気化学 TERS の開発, 第 2 回プローブ顕微鏡セミナー, 金沢大学角間キャンパス, 2024 年 12 月 20 日.
 - ・ 横田泰之, 電気化学デバイスの分子スケール制御に向けた近接場基盤技術の創成, 第 72 回応用物理学会春季学術講演会, 東京理科大学野田キャンパス, 2025 年 3 月 16 日.
 - ・ 横田泰之, Development of Electrochemical Tip-Enhanced Raman Spectroscopy toward Molecular-Scale Understanding and Control of Electrochemical Interfaces, 2025 年日本表面真空学会学術講演会, つくば国際会議場, 2025 年 10 月 20 日.
 - ・ 横田泰之, 電気化学探針増強ラマン分光の現状と周辺技術の開発, 日本分光学会赤外ラマン研究部会シンポジウム, 京都大学宇治キャンパス, 2025 年 11 月 28 日.
 - ・ 横田泰之, 固液界面研究のフロンティア開拓: 持続可能社会に向けた技術開発と学理追求, 東京大学物性研究所短期研究会, 東京大学柏キャンパス, 2026 年 2 月 17 日.

7. 謝辞

本研究の一部は島津科学技術振興財団の助成金により行われました。萌芽段階の研究に対しましてご支援を頂きましたこと、心より御礼申し上げます。

先進情報解析を用いた物質動態の X 線ブリッキング計測

茨城大学学術研究院 講師 倉持 昌弘 *

1. はじめに

柔軟な構造変化や物質間相互作用によって発現する動的物性は、環境や刺激への応答を通じて多様な機能を生み出す。その理解には、物質の動態を捉える量子計測技術が有効である。本研究者が開発した X 線ブリッキング法は、ピコメートル精度で回転拡散や構造変化を検出できる新しいオペランド動態計測技術であり、生体高分子に加え、ハロゲン化銀、ソフトクリスタル、ポリマーなどにも適用を広げてきた。さらに、これまで放射光で行ってきた計測を実験室 X 線装置でも実用化し、大きな波及効果を示してきた。

近年では、このコンセプトをさらに拡張し、小角散乱領域や透過領域の測定にも応用できる可能性を見出している。一方、小角散乱や透過領域では、従来の回折現象に比べて SN 比が著しく低下するため、現行の自己相関関数に依存した解析では、真の情報がノイズに埋もれ、十分な解析性を発揮できないという課題も生じてきた。また、得られる情報も主として緩和時間に限定されているが、実際の回折・散乱・透過像データには、時間変化に伴う多様な運動情報が潜在している。本研究では、機械学習などの先進的解析法を導入し、ノイズに対して頑強かつ従来取得できなかった多次元運動情報の抽出法を開発することで、機能発現と結びついた新たな動態物性の計測基盤を確立する。

2. X 線動態計測法

2.1. X 線回折・小角散乱領域の動態計測

本研究者は 2018 年、単色 X 線を用いた時分

割 X 線回折動画において回折スポットが明滅する現象を発見し、この明滅挙動が結晶粒子の運動と関連することを報告した^[1]。本手法は、Diffracted X-ray Blinking (DXB) 法と命名した。放射光施設だけでなく実験室 X 線光源においても、原子スケールの動態計測が可能となった。これまでに、生体高分子に加えて、無機材料、有機材料、ポリマー、ゴム、ソフトクリスタルなど、多様な物質系へと応用を広げてきた^[2-6]。

さらに最近では、この概念を回折像に限定せず、X 線散乱像における散乱強度の揺らぎにも、物質固有の運動成分が反映され则认为、その検証を進めてきた。実際に、タイヤゴムを対象として自由電子レーザーを用いた高速時分割測定を行ったところ、カーボン微粒子とポリブタジエン高分子の相互作用に由来する動的挙動を捉えることに成功し、散乱強度の揺らぎにも運動情報が含まれることを実証した。この知見を基盤として、小角散乱領域における時分割動態計測法である Small-Angle X-ray Blinking (SAXB) 法を考案し、ナノメートルスケールの構造動態を評価可能な新たな計測法へと展開してきた^[7]。

これらの成果は、X 線透過像における透過強度の揺らぎにも、試料内部の運動成分が含まれる可能性を示唆している。X 線回折は主に原子スケール、SAXB 領域はナノスケールの構造動態を反映するのに対し、X 線透過像ではナノメートルからマイクロメートルスケールにわたるより大きな階層の動態を捉えられると考えられる (Fig. 1)。

そこで本研究では、透過 X 線強度の揺らぎを利用した新たな動態計測法として、透過 X 線明滅法

* (助成採択時) 茨城大学理工学研究科 助教

(Transmitted X-ray Blinking) を考案した^[8]。

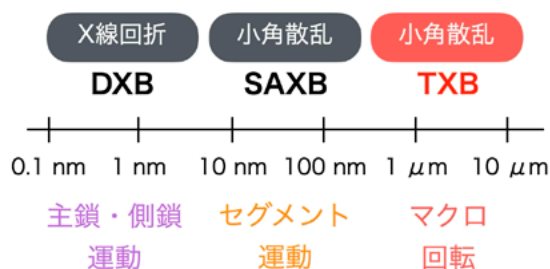


Fig. 1 X線動態計測法の概要.

2.2. Transmitted X-ray Blinking (TXB)

TXB 測定には、独自開発した実験室 X 線管球を用いた。この X 線管球は、Cu ターゲットと LaB₆ カソードを備えており、30 kV、100 μ A の条件で動作させた。Cu ターゲットに電子線を照射することで X 線を発生させ、試料全体を十分に照射できるように、試料位置では約 10 mm 径の X 線ビームとなるよう設計した。試料と検出器の距離は 3 mm とし、試料のごく近くで X 線透過像を取得した。試料を透過した X 線は、CsI シンチレータによって可視光に変換し、その光強度の時間変化を高速カメラで記録した (Fig. 2)。撮影には Photron FASTCAM Nova S20 を使い、露光時間 900 ns、約 110 万フレーム/秒の条件で、5,000 枚の時系列透過像を取得した。撮影領域は 128 $\times$ 16 pixel に切り出し、時間分解能を高めた。このときの実視野は 2.56 mm $\times$ 0.32 mm であった。CsI シンチレータの主な発光減衰成分の半減期は約 0.90 μ s であり、本測定の時間分解能はこの応答速度を十分に捉えられる条件であった。わずかな残光成分が次のフレームに影響する可能性はあるが、自己相関解析の前に平均値を差し引くことで、その影響を低減した。また、PEEK と PEI は同じシンチレータ、同じ光学系、同じ撮影条件で測定しているため、CsI 由来の影響は比較解析では実質的に相殺されると考えられる。測定は暗室内で行い、

装置全体をアルミ材で覆うことで、透過像以外の外光が入らないようにした。

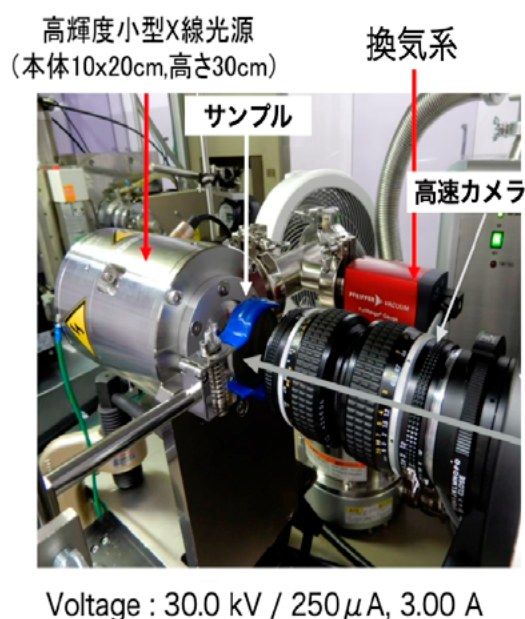


Fig. 2 X線動態計測法の概要.

2.3. 高分子試料

測定試料には、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) およびポリエーテルイミド (PEI) (Mitsubishi Chemical Advanced Materials Inc.) を用いた。各試料は 10 mm $\times$ 10 mm $\times$ 1 mm の板状に加工し、TXB 解析に供した。使用した PEEK (PK450) は無充填の半結晶性ポリマーであり、PEI (Semitron ESd410C) は炭素充填の非晶性エンジニアリングプラスチックである。各試料について、同一条件下で 5,000 枚の時系列透過画像を取得した。撮影領域は高速撮影に適した ROI に制限し、マイクロ秒以下の時間分解能で透過強度の揺らぎを計測した。測定は暗室下で行い、装置を遮光することで外光の影響を排除した。

2.4. 1 画素自己相関解析 (single-pixel

Autocorrelation Function: sp-ACF)

PEEK および PEI の DXB、SAXB、TXB 動画から、ImageJ を用いて各ピクセルの強度ゆらぎを抽

出した。得られた強度ゆらぎに対して自己相関関数 (Autocorrelation Function: ACF) を計算した。

$$ACF = \frac{\langle I(t) + I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle} \quad \text{Eq.(1)}$$

ここで、 $I(t)$ は X 線透過強度、 $\langle \rangle$ は時間平均を表す。

ACF トレースは、単一指数関数 $ACF(\tau) = A * \exp(-\Gamma\tau) + y$ でフィッティングされた。ここで、 A は振幅、 y は収束値、 Γ は減衰定数である。パラメータ A と y は、計算された ACF データから決定される。パラメータ Γ は、Levenberg-Marquardt アルゴリズムを使用した非線形最小二乗法によって、実際の ACF 曲線に適合するように最適化された。

2.5. PCA-LDA 解析

自己相関関数 (ACF) プロファイルから動的特徴を抽出するため、主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) および線形判別分析 (Linear Discriminant Analysis: LDA) を行った。PEEK および PEI から得られた全 ACF 曲線に対して PCA を適用し、全分散の 83% を説明する 20 個の主成分を抽出した。得られた 20 個の主成分を特徴量として LDA に入力し、PEEK と PEI の分類を行った。機械学習解析では、全 ACF データの半分を訓練データ、残り半분을テストデータとして用いた。透過画像中の位置情報が分類に影響することを避けるため、メルセンヌツイスター乱数を用いてピクセル順序をランダム化した。訓練データから得られた PCA-LDA モデルをテストデータに適用し、分類性能を評価した。

3. 結果

3.1. TXB による PEEK・PEI の動態評価

TXB データから得られた ACF 減衰定数分布を比較したところ、PEEK は PEI よりも有意に広い

分布を示した (Fig. 3)。両者の分布には重なりが存在するが、分布形状には明確な違いがあった。この傾向は DXB、SAXB 結果とも一致し、回折・散乱ベースの測定で報告された明滅現象が X 線透過像の強度ゆらぎにも含まれていることが示唆された。

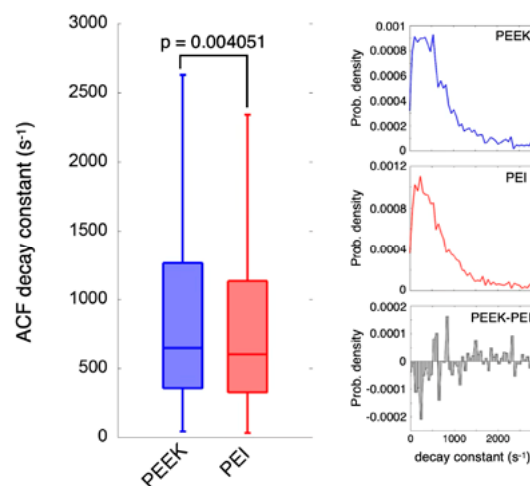


Fig. 3 PEEK および PEI における ACF 減衰定数の比較. (左) ACF 減衰定数の箱ひげ図. (右) PEEK および PEI の ACF 減衰定数の確率密度分布、その差分結果.

3.2. PEEK・PEI の 2 次元動態マップ

通常の X 線透過測定では、試料を透過した X 線強度を 2 次元画像としてマッピングすることで、試料内部の構造や吸収コントラストを可視化する。しかし、本研究で用いた PEEK と PEI は、測定条件下における実効吸収差が小さく、積分透過画像のみでは両者を明瞭に識別することは困難であった。

一方、TXB 測定では、透過強度の時間的なゆらぎを解析することで、静的な吸収画像には現れにくい動的情報を抽出できる。実際、各ピクセルの強度ゆらぎから算出した ACF 減衰定数は、PEEK と PEI の間で統計的に有意な差を示した (Fig. 3)。このことから、透過強度の時間ゆらぎには、材料

固有の動的挙動が含まれていると考えられた。そこで、ACF 減衰定数を各ピクセル位置に対応させて 2 次元マッピングし、動的情報に基づく空間的な材料識別が可能かを検討した。もし PEEK と PEI の動的挙動の違いが各領域で明瞭に反映されていれば、減衰定数マップ上で両者の間に明確なコントラストが現れると期待される。しかし、実際に得られた減衰定数マップでは、PEEK と PEI を視覚的に識別できるほどの明瞭なコントラストは得られなかった (Fig. 4)。

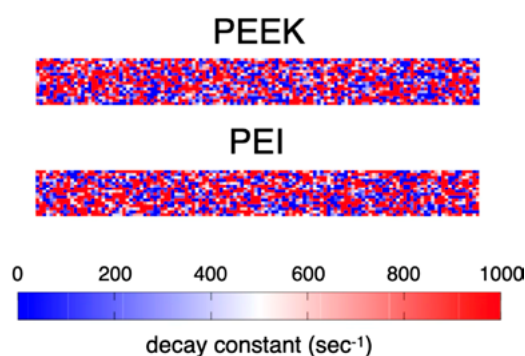


Fig. 4 PEEK および PEI における ACF 減衰定数の 2 次元マップ。

この原因として、Fig. 3 に示すように、PEEK と PEI の ACF 減衰定数分布には大きな重なりが存在することが挙げられる。PEEK は PEI に比べて広い減衰定数分布を示し、両者の動的挙動には統計的な差が認められるものの、個々のピクセル単位では共通する減衰定数範囲が多く含まれていた。そのため、単一の減衰定数のみを指標とした 2 次元マッピングでは、材料間の違いを十分に可視化することはできなかった。

3.3. PCA-LDA 解析による 2 次元マッピング

ACF 解析により、PEEK と PEI の間には統計的に有意な動的差異が認められたが、従来の X 線透過像と同様に、各ピクセルの ACF 減衰定数を 2 次元的にマッピングするだけでは、両材料を明瞭に識別することはできなかった。この結果は、PEEK

と PEI の動的差異が単一の減衰定数だけでは十分に表現できず、ACF プロファイル全体に含まれる多次元的な特徴を利用する必要があることを示している。

そこで、ACF プロファイルから材料固有の動的特徴を抽出するため、主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA)^[9] と線形判別分析 (Linear Discriminant Analysis: LDA)^[10] を組み合わせた機械学習解析を行った。spACF 解析から得られたすべての ACF 曲線に対して PCA を適用したところ、全分散の 83% を説明する 20 個の主成分 (PC) が得られた。PC1 は主に ACF 全体の減衰傾向を反映していた一方、PC2 以降の高次成分には、振動的または周期的な動的成分が含まれていた (Fig. 5)。

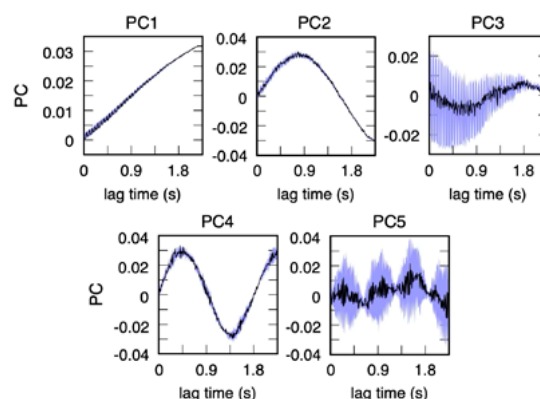


Fig. 5 PEEK および PEI の ACF データに対する主成分分析の結果。

次に、得られた 20 個の主成分を特徴量として LDA に入力し、PEEK と PEI の分類を行った。解析では、ランダムに選択した全ピクセルの半分を訓練データ、残り半分の半分をテストデータとして用いた。その結果、LDA 分類器は訓練データで 90.9%、テストデータで 90.1% の分類精度を示し、PEEK と PEI を動的特徴に基づいて高精度に識別できることが明らかとなった (Fig. 6)。

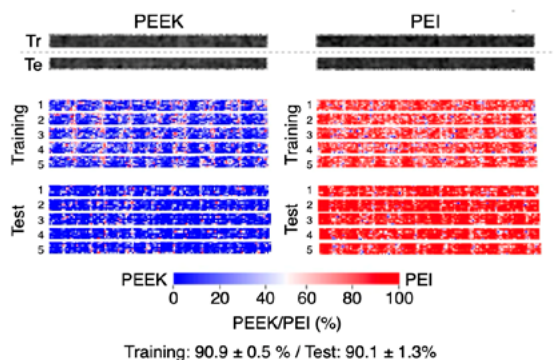


Fig. 6 主成分を用いた LDA ベースの PEEK と PEI の分類による空間マップ. (上) サンプル透過像をトレーニングセットとテストセットに分割. (下) 分類確率マップ. 青色は PEEK、赤色は PEI を示す. 5 回の独立した測定・解析を行った.

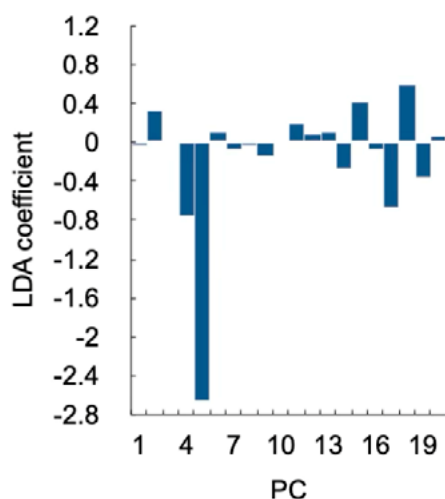


Fig. 7 各主成分に対する LDA 係数. PCA-LDA 解析において、各主成分が PEEK と PEI の分類にどの程度寄与したかを示す. PC5 成分が最も大きな LDA 係数を示し、両材料の判別に最も重要な主成分であることが明らかとなった.

さらに、LDA 軸に対する各主成分の寄与を解析したところ、PC5 および PC4 が分類に大きく寄与していることが分かった (Fig. 7)。この結果は、PEEK と PEI の識別に重要な情報が、ACF 全体の単純な減衰挙動ではなく、高次主成分に含まれる周期的または複雑な動的モードに存在すること

を示している。

以上の結果から、TXB データに機械学習解析を組み合わせることで、静的透過像や単一の ACF 減衰定数マッピングでは捉えきれない、材料固有の微細な動的差異を抽出できることが示された。これは、構造や吸収コントラストが類似した材料に対しても、TXB が動的情報に基づく新たな識別手法として有効であることを示している。

3.4. PCA-LDA 特徴量の周波数解析

前述の PCA-LDA 解析により、PC5 が PEEK と PEI の判別に重要な主成分であることが示された。そこで、PC5 がどのような動的特徴を反映しているのかを調べるため、PC5 に含まれる周波数成分を解析した。まず PEEK および PEI の ACF データを PC5 軸に投影したところ、PEEK は PEI よりも大きく異なる PC5 スコアを示した。このことから、PC5 で表される動的特徴は、PEEK により強く現れていると考えられた (Fig. 8 左)。

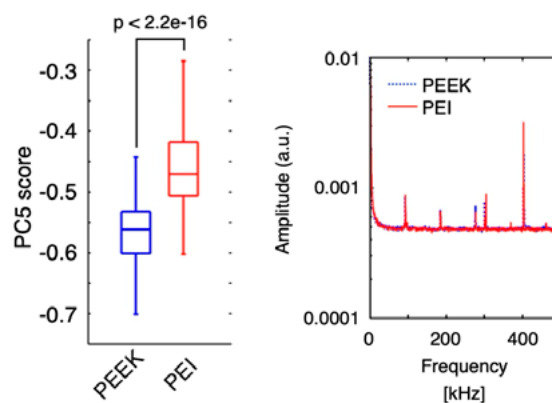


Fig. 8 PC5 の周波数特性と PEEK・PEI における高周波成分の比較. (左) PEEK および PEI の PC5 スコアの箱ひげ図. (右) PC5 に対する FFT 解析により得られた振幅スペクトル. PEEK および PEI の ACF データに対する FFT 解析結果. PC5 で顕著であった 300 kHz および 400 kHz 付近の周波数帯域に着目したところ、PEEK と PEI でピーク位置に違いが認められた。

次に、PC5 に対して高速フーリエ変換 (FFT) 解析を行った。その結果、PC5 には主に 300 kHz 付近および 400 kHz 付近の高周波成分が含まれていることが分かった。さらに、ピクセルごとの ACF データに対して FFT 解析を行い、これらの周波数帯域に注目したところ、PEEK では約 301 kHz および 403 kHz 付近に、PEI では約 304 kHz および 405 kHz 付近にピークが観察された (Fig.8 右)

このように、PEEK と PEI では ACF プロファイルに含まれる周波数成分がわずかに異なっていた。したがって、PC5 は単なる減衰速度の違いではなく、材料ごとに異なる高周波の動的モードを反映していると考えられる。この周波数成分の違いが、PCA-LDA 解析による PEEK と PEI の高精度な識別に寄与したと考えられる。

4. 参考文献

- [1] H. Sekiguchi, M. Kuramochi, K. Ikezaki, Y. Okamura, K. Yoshimura, K. Matsubara, J. W. Chang, N. Ohta, T. Kubo, K. Mio, Y. Suzuki, L. M. G. Chavas, Y. C. Sasaki; Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions, *Scientific Reports*, 8, (2018), 17090.
- [2] M. Kuramochi, H. Omata, M. Ishihara, S. Ø. Hanslin, M. Mizumaki, N. Kawamura, H. Osawa, M. Suzuki, K. Mio, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki; Tilting and rotational motions of silver halide crystal with diffracted X-ray blinking, *Scientific Reports*, 11, (2021), 4097.
- [3] T. Taniguchi, K. Ishizaki, D. Takagi, K. Nishimura, H. Shigemune, M. Kuramochi, Y. C. Sasaki, H. Koshima, T. Asahi; Superelasticity of a photo-actuating chiral salicylideneamine crystal, *Communications Chemistry*, 5, (2022), 4.
- [4] K. Ishizaki, D. Takagi, T. Asahi, M. Kuramochi, T. Taniguchi; Unraveling the Structural and Property Differences between Highly Similar Chiral and Racemic Crystals Composed of Analogous Molecules, *Crystal Growth & Design*, 23 - 7, (2023), 5330–5337.
- [5] M. Kuramochi, H. J. Kirkwood, J. C. P. Koliyadu, R. Letrun, R. Wijn, C. Kim, T. Masui, K. Mio, T. Arai, H. Sekiguchi, H. Kishimoto, A. P. Mancuso, T. Sato, Y. C. Sasaki; Direct observation of 890 nano-second dynamics of carbon black and polybutadiene in rubber materials using diffracted X-ray blinking, *Applied Physics Letters*, 123, (2023), 101601.
- [6] T. Arai, R. Inamasu, H. Yamaguchi, D. Sasaki, A. Sato-Tomita, H. Sekiguchi, K. Mio, S. Tsuda, M. Kuramochi, Y. C. Sasaki; Laboratory Diffracted X-ray Blinking to Monitor Picometer Motions of Protein Molecules and Application to Crystalline Materials, *Structural Dynamics*, 8, (2021), 044302.
- [7] T. Arai, K. Mio, H. Onoda, L.M. Chavas, Y. Umena, Y.C. Sasaki; The Blinking of Small-Angle X-ray Scattering Reveals the Degradation Process of Protein Crystals at Microsecond Timescale, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 - 23, (2023), 16640.
- [8] M. Kuramochi, K. Hoshisashi, S. Shimomura, D. Sasaki, T. Arai, K. Mio, H. Sekiguchi, K. Uesugi, Y. Suzuki, S. Akaho, Y. C. Sasaki; Sub-microsecond molecular motion analysis of polymer resins via transmitted X-ray blinking, *Optics Express*, 33 - 24, (2025), 51657–51657.
- [9] I. T. Jolliffe; *Principal Component Analysis*,

Springer Series in Statistics, 2nd ed., (2004).

- [10] J. Cohen, P. Cohen, S. G. West, L. S. Aiken;
Applied Multiple Regression/Correlation
Analysis for the Behavioral Sciences,
Routledge, 3rd ed., (2013)

5. その他成果発表等

- ・ 佐々木 裕次, 倉持 昌弘, ナノ秒 X 線動画でミ
クロ分子動態計測に成功 — 超小型 X 線光源

を用いた高速レントゲン動画の幕開け —, 共
同プレス発表, 東京大学・茨城大学・科学技術
振興機構 (JST), 2025 年 11 月 27 日.

6. 謝辞

本研究は、公益財団法人 島津科学技術振興財
団の研究助成を受けて実施された。ここに深く感
謝申し上げる。

拡散モデル正則化を駆使した高精度レンズレスイメージング

大阪大学大学院基礎工学研究科 准教授 中村 友哉 *

1. はじめに

レンズレスイメージングは、従来のレンズを符号化開口や位相マスクのような薄型光学素子に置き換え、入射光をセンサ上に多重化して取得する撮像方式である。計測後の画像再構成処理を組み合わせることで、レンズレス光学系でありながらイメージングを実現する。概念図を Fig.1 に、実現例を Fig.2 に示す。従来型の結像光学系を必要としないため、この手法はカメラの薄型化、軽量化、および広視野化に有望であり、ウェアラブルデバイス、IoT センサ、医療用内視鏡など、小型化や低コスト化が求められる応用において特に期待されている。しかし、得られるセンサ画像は、シーン情報が空間的に絡み合った符号化計測画像であり、シーン再構成は極めて悪条件な逆問題となる。

この問題に対する再構成手法は、大きく三つに分類できる。第一に、ウィナーフィルタや交互方向乗数法(ADMM)アルゴリズム^[1]のような物理モデルに基づく手法は、強い計測整合性を達成するが、知覚品質の面では限定的な再構成結果となる。第二に、U-Net や FlatNet^[2] のような教師あり学習手法は、深層学習の変換自由度を利用することで高速かつ高品質な再構成を可能にするが、物理整合性を明示的に保証するものではない。また、これらの手法は順モデルとは異なるレンズ付きカメラで撮影した画像を教師データとして用いることが多く、光学系パラメータに起因するバイアスが再構成に影響し得る。近年は、第三のアプローチとして、拡散モデルの援用が注目されている。拡散モデルはノイズから段階的に画像を生成する生成モデルの一種であり、自然画像の分布を表現する強

力な事前情報として、さまざまなコンピュータショナルイメージングの逆問題に応用されている^[3]。

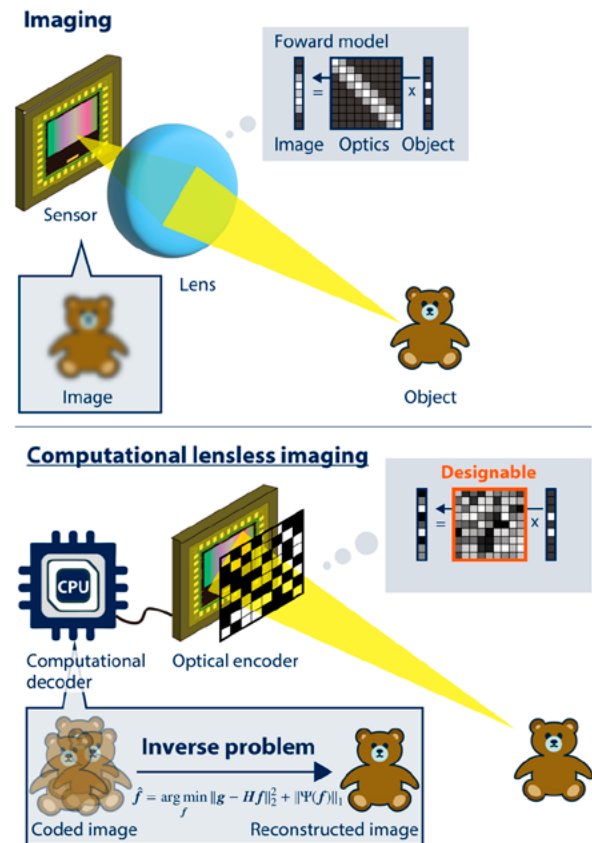


Fig. 1 レンズレスイメージングの概念図

特にレンズレスイメージングにおいては、値域-零空間分解を活用する DDNM+^[4]アルゴリズムが、高い知覚的リアリズムと物理的忠実性の両方を達成できることを示している。しかし、これらの拡散モデルに基づく手法は反復的なサンプリングを必要とするため、リアルタイム推論は実用的ではない。したがって、既存の手法には、計測整合性、知覚品質、推論速度の間に根本的なトレードオフが存在する。

* (助成採択時) 大阪大学産業科学研究所 准教授

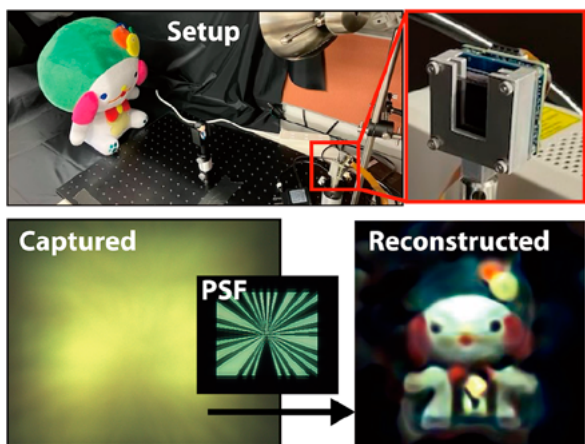


Fig. 2 レンズレスイメージングの実験例

本稿では、値域-零空間分解に基づく DDNM+ の構造化された推論を単一パスのフィードフォワードネットワークへ蒸留する Null-Space Diffusion Distillation (NSDD) を用いたレンズレス再構成アルゴリズム^[5]について、本助成を受けて我々が設計した原理と実験結果を紹介する。

2. 提案手法

レンズレスイメージングシステムにおける画像再構成問題は、次の線形計測物理モデルの逆問題として定式化される。

$$\mathbf{y} = \mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{n} \quad \text{Eq.(1)}$$

ここで、 $\mathbf{x}$ は未知のシーンを表現するベクトル、 $\mathbf{y}$ は観測された計測画像ベクトル、 $\mathbf{A}$ は光学系の作用を表現する行列、 $\mathbf{n}$ はノイズベクトルである。DDNM+ は、各反復的な拡散サンプリングステップにおける再構成を、計測と整合する値域空間成分と、計測のみからは決定できない零空間成分に分離する。前者は観測に従うよう制約され、後者は拡散モデルによって補完される。これにより、高い知覚的品質と物理的忠実性の両方が達成されるが、およそ 1,000 回程度の反復を必要とするため、高速性が求められる応用に対する実用は困難である。

NSDD は、DDNM+ による再構成を教師信号と

して事前計算し、その再構成挙動を単一パスのフィードフォワードネットワークへ蒸留する。具体的には、まず各学習用計測画像に対して DDNM+ を実行し、復元画像を教師データとして保存する。次に、DDNM+ で使用した拡散モデルと同一の U-Net の重みで生徒ネットワークを初期化し、教師の復元画像との平均二乗誤差を損失関数として最適化する。生徒モデルは、観測された計測画像 $\mathbf{y}$ と擬似逆再構成 $\mathbf{A}^\dagger \mathbf{y}$ の両方を入力とし、最終的な再構成画像 $\hat{\mathbf{x}}_s$ を次のように出力する。

$$\hat{\mathbf{x}}_s = \mathbf{A}^\dagger \mathbf{y} + \hat{\mathbf{r}}(\mathbf{y}, \mathbf{A}^\dagger \mathbf{y}) \quad \text{Eq.(2)}$$

ここで、 $\mathbf{A}^\dagger \mathbf{y}$ はウィナーデコンボリューションによって得られる値域空間成分であり、 $\hat{\mathbf{r}}$ はネットワークによって予測される零空間残差補正である。生徒ネットワークが予測するのは画像そのものではなく、 $\mathbf{A}^\dagger \mathbf{y}$ からの残差のみである。 $\mathbf{A}^\dagger \mathbf{y}$ は計測に整合する成分を既に含んでいるため、ネットワークは計測からは決まらない零空間の情報のみを学習すればよい。このように、蒸留において値域-零空間分解の構造を保持することで、NSDD は反復的サンプリングなしに、物理整合性と知覚品質の両方を維持した高速再構成を達成する。

NSDD の学習は二段階で行われる。第一段階では、21,000 枚のレンズレス計測画像それぞれに対して DDNM+ を実行し、教師復元画像を生成する。この処理には単一 GPU で約 52 時間を要する。第二段階では、生成された教師データを用いて生徒ネットワークを約 25 時間で学習する。これらの計算コストは一度きりであり、学習完了後は 1 枚あたり約 0.034 秒での高速推論が可能となる。

3. 実験結果

実験には二つのレンズレスイメージングデータセットを用いた。Lensless-FFHQ は、振幅マスク型レンズレスカメラにより 21,000 枚の顔画像を撮

影したデータセットであり、PhlatCam は異なる位相マスク型レンズレス光学系により取得された多様なシーンのデータセットである。評価指標には、構造的類似度 (SSIM)、知覚品質 (LPIPS)、無参照知覚品質 (CLIP-IQA)、および計測整合性誤差 ($\|y - Ax\|$) を用いた。従来手法、教師あり手法、および拡散モデルに基づく従来の再構成手法の比較を行った。結果、NSDD は、DDNM 教師に近い知覚品質と計測整合性を達成しつつ、推論時間を約 600 倍短縮した。例えば Lensless-FFHQ データセットにおいて、NSDD の SSIM は 0.4984、LPIPS は 0.3807 であり、DDNM+ の SSIM 0.4830、LPIPS 0.3717 と比較して同等の水準を維持している。一方、教師あり手法である FlatNet は SSIM 0.5042 と高いものの計測整合性が大幅に劣り、物理モデルに基づくウィナーフィルタは計測整合性に優れるが SSIM が 0.5432 にとどまり知覚品質は低い。その他網羅的な定量評価結果やその実験条件の詳細は文献^[5]を参照されたい。

さらに、蒸留における値域-零空間分解の有効性を検証するため、全画像を直接蒸留する直截的な手法との比較実験を行った。Lensless-FFHQ において、全画像蒸留の SSIM は 0.4719、LPIPS は 0.4071 であったのに対し、NSDD は SSIM 0.4984、LPIPS 0.3807 と、知覚品質・構造類似度のいずれにおいても優れた結果を示した。この結果は、値域空間成分を解析的に固定し、ネットワークの学習を零空間の補完に集中させることが、蒸留の効率と精度の両方を向上させることを示している。

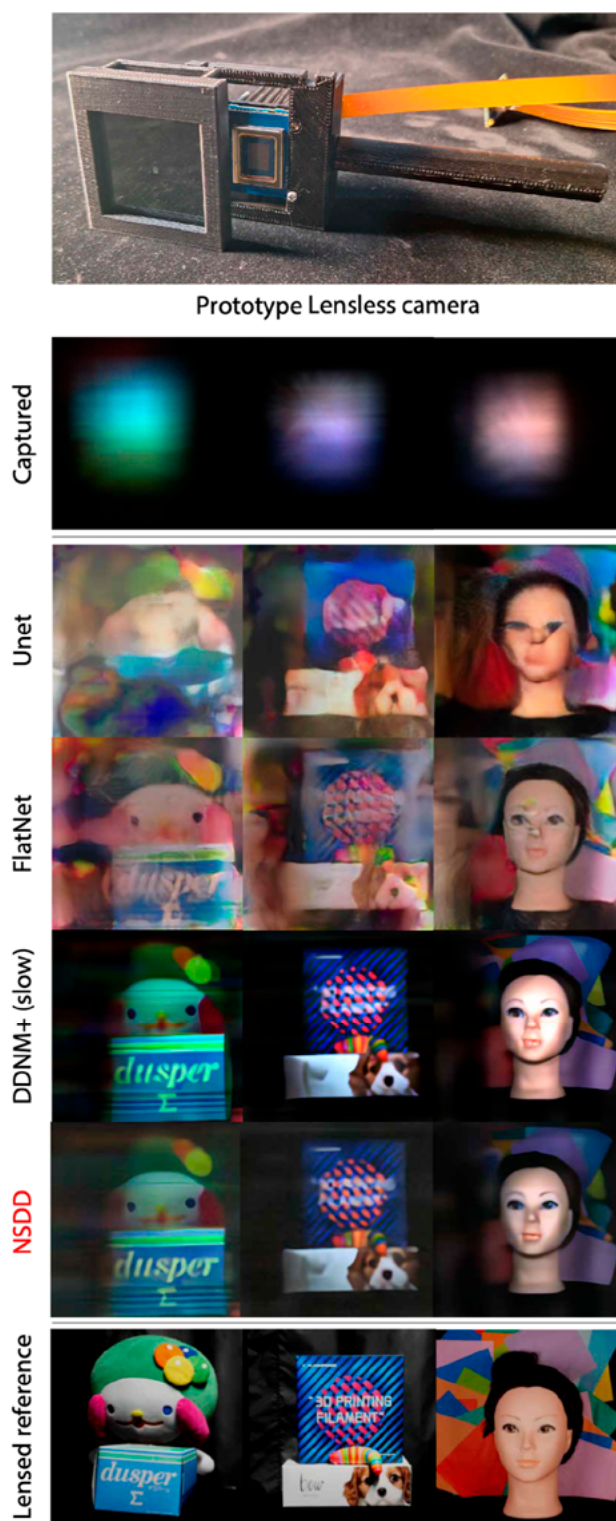


Fig. 3 OOD 条件下でのレンズレス撮像結果

実シーンへの汎化性能を評価するため、Fig.3 に示すように、レンズレスカメラを試作し、それを用いて実環境の物体のレンズレス計測を行った。再構成用のモデルは、モニタ表示された顔画像のみ

で学習した。この学習条件に対して、撮像実験系は一般拡散物体を用いたため、学習と撮像条件に乖離が発生している (OOD: Out-Of-Distribution)。教師あり手法はこの OOD 条件下の実験において再構成に失敗した一方、DDNM+および NSDD はいずれも、実在する顔に似た物体および非顔物体に対して高品質な再構成を生成した。この結果は、実用化において重要な意味を持つ。レンズレスカメラを任意のシーンで使用するためには、学習時に想定していない被写体に対しても安定して高速に動作することが不可欠であり、NSDD がその要件を満たすことが示された。これらの結果は、値域-零空間分解が実用的なレンズレスイメージングに対するロバストな枠組みを提供し、そのロバスト性が提案する蒸留を通じても保持されることを示唆している。

4. まとめと今後の課題

本稿では、拡散モデルを用いたレンズレスイメージングの再構成手法に関する研究成果^[5]について述べた。レンズレス画像再構成には計測整合性、知覚品質、推論速度の間に根本的なトレードオフが存在し、従来手法はこれらを同時に満たすことが困難であった。我々の提案した NSDD 法は、DDNM+法の値域-零空間分解に基づく構造化された推論過程を単一パスのネットワークへ蒸留することで、物理整合性と知覚品質を維持しながら約 600 倍の高速化を実現した。さらに、学習時に想定していない実物体に対しても高速かつ安定した復元を示し、実用的なレンズレスイメージングへの適用可能性を確認した。

一方で、本手法にはいくつかの課題が残る。第一に、提案手法の性能は計測物理モデルおよび擬似逆変換 $\mathbf{A}^\dagger$ の精度に依存しており、現状ではシフト不変な点像分布関数(PSF: Point Spread Function)を仮定している。実際のレンズレスカメラでは、視

野周辺部で PSF が空間的に変化するため、空間変化 PSF への対応は実用化に向けた重要な課題である。第二に、本研究では二次元シーンの復元のみを扱ったが、三次元シーンへの拡張や、マルチスペクトルイメージングへの拡張も有望な方向である。第三に、蒸留の教師モデルである DDNM+自体の性能向上、例えばより高精度な計測物理モデルの導入やノイズモデルの改良も、NSDD の復元品質をさらに改善し得る。拡散モデルに基づくレンズレスイメージングは、薄型・軽量な次世代撮像システムの実応用に向けた有望な研究方向であると考ええる。

5. 参考文献

- [1] N. Antipa, G. Kuo, R. Heckel, B. Mildenhall, E. Bostan, R. Ng, and L. Waller; DiffuserCam: lensless single-exposure 3D imaging, *Optica*, **5** - 1, (2018), pp. 1–9.
- [2] S. S. Khan, V. Sundar, V. Boominathan, A. Veeraraghavan, and K. Mitra; FlatNet: Towards Photorealistic Scene Reconstruction From Lensless Measurements, *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, **44** - 4, (2022), pp. 1934–1948.
- [3] H. Kawachi, J. Neto, Y. Yagi, H. Nagahara, and T. Nakamura, “Single-Image Depth from Defocus with Coded Aperture and Diffusion Posterior Sampling,” *IEEE Transactions on Computational Imaging*, **12**, (2026), pp. 1034–1045.
- [4] Y. Wang, J. Yu, and J. Zhang; Zero-Shot Image Restoration Using Denoising Diffusion Null-Space Model, *The International Conference on Learning Representations (ICLR)*, (2023).
- [5] J. Neto, H. Kawachi, Y. Yagi, and T. Nakamura; Null-Space Diffusion Distillation Unlocks

Speed, Fidelity and Realism in Lensless
Imaging, IEEE International Conference on
Computational Photography (ICCP), (2026).

6. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成を受けて
実施された。

マルチモーダル AI を活用した骨掘削ドリルの開発研究

大阪大学大学院医学系研究科 講師 藤森 孝人

1. はじめに

骨掘削は骨折固定、関節置換術、脊椎手術など、多くの整形外科手術において不可欠な基本手技である。しかし、皮質骨を貫通した後のドリルの過剰進入は、神経・血管・軟部組織への医原性損傷をもたらす重大なリスクをはらんでいる^[1,2,3]。とりわけ脊柱管や関節面に近接した領域では、わずかな行き過ぎでも致命的な合併症を引き起こしかねない。

熟練した外科医は触覚フィードバックを通じて皮質骨貫通を予測し、適切なタイミングで穿孔を停止することができる。しかし、この技能の習得には豊富な臨床経験が必要であり、経験の浅い術者において医原性損傷のリスクが増大する。

従来より皮質骨貫通を検出する手法として、推力やトルク、音響放射などの急激な低下を閾値で捉える方法が広く用いられてきた^[4-8]。また近年では深層学習を応用した分類モデルも開発されている。しかしこれらはいずれも貫通後にはじめて情報が得られる事後的（リアクティブ）な検出に留まっており、貫通前の自動減速や能動的制御には十分対応できない。さらに閾値ベースのアプローチは骨質・骨密度・解剖学的形状の個体差に影響を受けやすく、安定した性能の確保が難しい。

これらの課題を解決するため、本研究では長短期記憶（Long Short-Term Memory; LSTM）ニューラルネットワークを用いて、推力とトルクの時系列信号のみから皮質骨に対するドリル先端の相対位置を連続的に回帰推定するディープラーニングモデルを開発した。センサデータを予測的な位置情報へと変換する本フレームワーク

は、貫通前の制御された減速や自動停止を可能にし、安全・知能的な整形外科手術システムの実現に向けた「Physical AI」の概念を実践するものである。^[9-13]

2. 研究方法

2.1. 試料の準備

実験には市販の豚肋骨を用いた。肋骨骨幹を短軸方向に 2 cm ごとに切断後、縦割りにして海綿骨を除去し、厚さ 2 mm 以上の皮質骨片（平均 3.0 ± 1.2 mm）を 268 個選別した（Fig. 1）。各試料は穿孔角度の垂直性確保と振動抑制を目的とした専用治具に固定した。

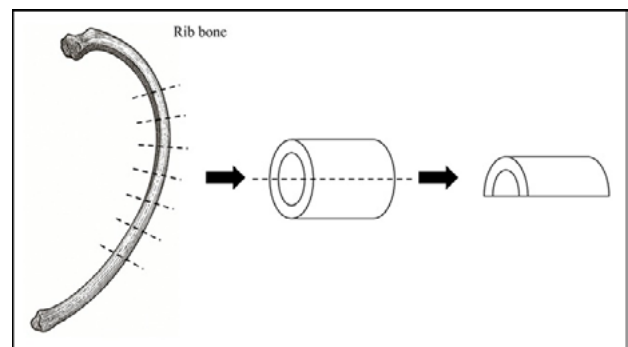


Fig. 1 ブタの皮質骨標本の調製。ブタの肋骨軸部を 2cm 間隔（短軸方向）で切断し、縦方向に分割した。海綿骨を除去し、厚さ 2mm 以上（平均 3.0 ± 1.2 mm）の皮質骨片を得た。

2.2. 実験装置と条件

穿孔実験にはコンピュータ制御マシニングセンタ（AJV-18; ヤマザキマザック社）に高速スピンドル（HES810; ナカニシ社）を装着し、直径 3.0 mm ツイストドリルを使用した。推力はドリル下部に設置した 6 軸力センサ（9327C; Kistler 社）で Z 軸方向成分として計測し、トルクはドリルユ

ニットのモータ負荷電圧信号から導出した。穿孔条件はスピンドル回転数 2,000 rpm・送り速度 0.5 mm/s で統一した。

皮質骨貫通の確認は高速度カメラ (HAS-EF; DITECT 社、100 フレーム/秒) でミラーを介して遠位皮質面を観察することにより行い、映像をグラントゥールスとして用いた。全信号はデータロガー (NR-600; キーエンス社) で 10,000 Hz にてサンプリングし、共通トリガで同期した。

2.3. データ処理とドリル先端位置アノテーション

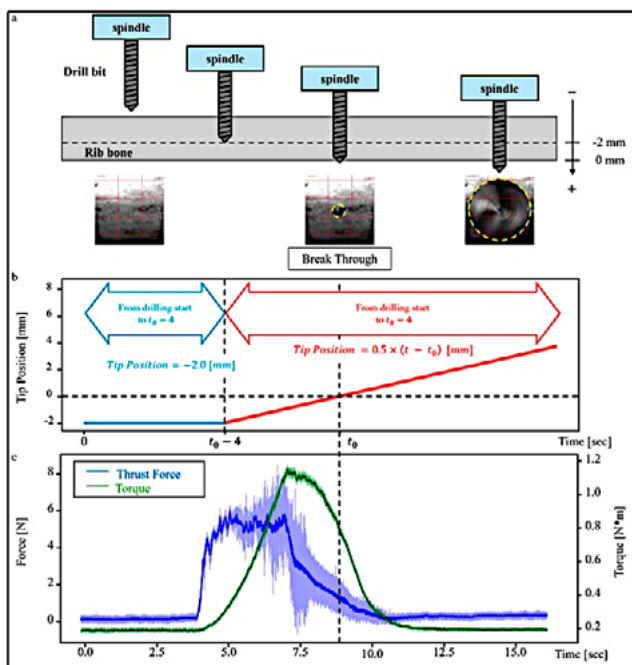


Fig. 2 (a) ブタの肋骨におけるドリルの進み方の模式図。進み方向（下方）をZ軸の正方向と定義する。対向する皮質を高速度カメラで撮影した画像：貫通前（先端が見えない）、貫通時（先端が初めて見える）、完全貫通（ドリルの全径が見える）。

(b) 深層学習用のグラントゥールスラベリング。穿孔中の代表的な生データおよびフィルタ処理済み時系列信号：推力（青）およびトルク（緑）

収録した推力・トルク信号にカットオフ周波数

50 Hz の 4 次バターワースローパスフィルタを適用して高周波ノイズを除去した後、試験ごとに平均値と標準偏差を用いて標準化した。高速カメラとの時間分解能整合と計算負荷軽減のため、100 Hz にダウンサンプリングした。

高速カメラ映像においてドリル先端が遠位皮質面を初めて超えた時刻を t_0 （貫通時刻）と定義した。ドリル先端位置アノテーションは t_0 を基準に区分的に設定し、 t_0 の 4 秒前（貫通 2 mm 前）以前は -2.0 mm で固定し、それ以降は送り速度 $\times (t - t_0)$ で線形増加する値とした ($t_0 = 0$ mm)。モデルの評価は臨床的に重要な周貫通帯 (± 2 mm) に限定した (Fig.2)。

2.4. AI モデルの構築

64 ユニットの単層 LSTM と全結合出力層からなるネットワークを用い、回帰モデル（先端位置の連続推定）と二値分類モデル（貫通判定）の 2 種類を構築した。入力条件は「推力のみ」「トルクのみ」「推力+トルク（複合）」の 3 条件とし、アブレーション比較を行った。データセット 268 試験を試料ごとに訓練 60%・検証 20%・テスト 20% に分割した。回帰モデルは平均二乗誤差 (MSE) 損失で訓練し評価指標に平均絶対誤差 (MAE) を用いた。分類モデルは二値交差エントロピー損失で訓練し Accuracy・Precision・Recall・F1 スコア・AUC で評価した。学習率 0.01 の Adam オプティマイザで 300 エポック学習し、実装には PyTorch (v2.3.1) を使用した。

3. 結果

3.1. 穿孔パラメータ

推力およびトルク信号は穿孔進行に伴って漸増し、貫通直前に最大値を示した後、貫通後に急激に低下する特徴的なパターンを 268 試験すべてで一貫して観察した。主要穿孔パラメータの記述統計は、穿孔時間の中央値は 5.80 秒（四分位範囲

4.95～6.96 秒)、最大推力の中央値は 7.29 N (同 5.96～8.36 N)、最大トルクの中央値は 1.32 N・m (同 1.09～1.61 N・m) であった。

3.2. AI モデルの性能

各入力条件のモデル性能を Table1 に示す。回帰タスクでは、推力+トルク複合モデルが最も低い MAE 0.41 mm を達成し、推力単独 (0.42 mm) およびトルク単独 (0.47 mm) を上回った。二値分類タスクでは、複合モデルが精度 0.94・AUC 0.99 を達成し、単変数モデル (AUC 0.98) よりも高い判別能を示した。複合回帰モデルの学習曲線は訓練・検証損失ともに単調に収束し (約 100 エポック)、過学習の兆候は認められなかった。代表的なテストケースでは、予測されたドリル先端位置の軌跡が実測値に高精度で追従した。

Table 1 各入力のモデル性能

モデル	推力 + トルク	推力のみ	トルクのみ
MAE (mm)	0.41	0.42	0.47
Accuracy	0.94	0.92	0.93
Precision	0.94	—	—
Recall	0.95	—	—
F1	0.94	—	—
AUC	0.99	0.98	0.98

4. 考察

本研究は、LSTM ネットワークが推力・トルクの時間的ダイナミクスからドリル先端位置の連続推定を高精度に学習できることを実証した。MAE 0.41 mm という精度は、スクリュー把持力に関する先行研究が臨床的に重要と示す「穿孔深度誤差が固定力に大きく影響する範囲」を下回っており、予測的制御への応用可能性を示唆する。

従来の研究は骨種分類や貫通後の事後検出を主眼としており、連続的なドリル先端位置の推定は本研究が初めて体系的に示したものである。Torun ら^[12]はモータ電流と推力による閾値ベース分類で高い分類精度を示し、Seibold ら^[13]は音響信号を用いた深層学習で貫通検出の実現可能性を示した。これらの知見を踏まえ本研究では、同様の高性能分類を単純な LSTM で確認しつつ、さらに連続位置回帰という新たな枠組みを導入した。

LSTM の予測能力を支えるのは、皮質骨が薄くなるにつれ推力・トルクが緩やかに低下するという物理的なダイナミクスである。リカレント接続によりモデルはこの微妙な時間発展を瞬時値ではなく短期的依存として捉え、振動や局所的な骨密度変動による過渡的な変動と区別する。これは熟練術者が抵抗の微細な変化から皮質の残存厚を直感的に把握する過程を、データ駆動的に定量化したものと解釈できる。

本研究はまた、センサから取得した物理的相互作用データから AI が制御方策を学習する「Physical AI」の概念を整形外科手術の文脈で例示するものである。本フレームワークは骨掘削のみならず、切断・ミリングなど他の外科的操作への展開も期待され、振動・音響センサなどとのマルチモーダル融合によりさらなる汎用性向上が見込まれる。

限界として、本実験が in vitro・均質試料・一定送り速度という統制環境下で実施されており、骨粗鬆症骨を含む臨床的に多様な骨質への汎化は今後の検証課題である。また、術中展開に向けたリアルタイム推論の遅延評価、および Transformer などより高度なアーキテクチャの探索が今後必要である。

5. 結論

推力とトルクのみを入力する LSTM モデルにより、周貫通帯において MAE 0.41 mm という亜ミリメートル精度でドリル先端位置を連続推定できることを実証した。本フレームワークはセンサデータを予測的な位置情報へと変換し、リアルタイム AI 支援・自律型骨掘削システムの基盤を提供するものである。機械が物理世界との相互作用から直接学習してより安全な動作を実現する Physical AI の実用化に向けた重要な一歩である。

6. 参考文献

- [1] Antoniadis, G. et al. Iatrogenic Nerve Injuries. Dtsch. Ärztebl. Int. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0273> (2014) doi:10.3238/arztebl.2014.0273.
- [2] Arnold, M. C. A., Zhao, S., Doyle, R. J., Jeffers, J. R. T. & Boughton, O. R. Power-Tool Use in Orthopaedic Surgery: Iatrogenic Injury, Its Detection, and Technological Advances: A Systematic Review. JB JS Open Access 6, e21.00013 (2021).
- [3] Nigam, A., Kellam, J. F., Ambrose, C. G. & Tai, B. L. A Data-Driven Methodology to Comprehensively Assess Bone Drilling Using Radar Plots. JBJS Open Access 9, (2024).
- [4] Lee, W.-Y. & Shih, C.-L. Control and breakthrough detection of a three-axis robotic bone drilling system. Mechatronics 16, 73–84 (2006).
- [5] Wen-Yo Lee & Ching-Long Shih. Force control and breakthrough detection of a bone drilling system. in 2003 IEEE International Conference on Robotics and Automation (Cat. No.03CH37422) 1787–1792 (IEEE, Taipei, Taiwan,2003). doi:10.1109/ROBOT.2003.1241853.
- [6] Aziz, M. H., Ayub, M. A. & Jaafar, R. Real-time Algorithm for Detection of Breakthrough Bone Drilling. Procedia Eng. 41, 352–359 (2012).
- [7] Murai, Y. et al. Reuse of a Reversed “Bone Pad” to Perforate Incompletely Penetrated Burr Holes Created by Automatic-Releasing Cranial Perforators. Oper. Neurosurg. 13, 324–328 (2017).
- [8] Assumpcao De Monaco, B. et al. Safety Analysis of a New Portable Electrical Drill With a Smart Autostop Mechanism for Bedside Cranial Procedures. Oper. Neurosurg. <https://doi.org/10.1227/ons.0000000000000804> 804(2023) doi:10.1227/ons.0000000000000804.
- [9] Lisacek-Kiosoglous, A. B. et al. Artificial intelligence in orthopaedic surgery. Bone Jt. Res. 12, 447–454 (2023).
- [10] Kita, K. et al. Automated entry of paper-based patient-reported outcomes: Applying deep learning to the Japanese orthopaedic association back pain evaluation questionnaire. Comput. Biol. Med. 172, 108197 (2024).
- [11] Fujimori, T. et al. Development of artificial intelligence for automated measurement of cervical lordosis on lateral radiographs. Sci. Rep. 12, 15732 (2022).
- [12] Torun, Y. & Öztürk, A. A New Breakthrough Detection Method for Bone Drilling in Robotic Orthopedic Surgery with Closed-Loop Control Approach. Ann. Biomed. Eng. 48, 1218–1229 (2020).
- [13] Seibold, M. et al. Real-time acoustic sensing

and artificial intelligence for error prevention in orthopedic surgery. Sci. Rep. 11, 3993 (2021).

7. その他成果発表等

- ・ 時系列深層学習モデルを活用した力覚フィードバック型自律手術ロボットの開発(原著論文)
- ・ 今井 大達(大阪大学 大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科)), 藤森 孝人, 岸本 紘樹, 喜多 洸介, 鈴木 裕紀, 細澤 幸輝, 蟹江 祐哉, 古家 雅之, 汪 涵, 佐竹 うらら, 万 偉偉, 榎本 俊之, 岡田 誠司 日本医用画像工学会大会予稿集 44 回 Page134-135(2025.08)
- ・ 時系列深層学習モデルを活用した力覚フィードバック型自律手術ロボットの開発(会議録)
- ・ 今井 大達(大阪大学 大学院整形), 藤森 孝人, 蟹江 祐哉, 古家 雅之, 喜多 洸介, 鈴木 裕紀, 汪 涵, 佐竹 うらら, 万 偉偉, 榎本 俊之, 岡田 誠司 日本整形外科学会雑誌 (0021-5325)99 巻 8 号 Page S1979(2025.09)
- ・ 脊椎領域における AI 脊椎分野における AI の

活用(会議録)

- ・ 藤森 孝人(大阪大学 大学院整形), 喜多 洸介, 鈴木 祐紀, 蟹江 祐哉, 古家 雅之, 中嶋 望, 細澤 幸輝, 岸本 紘樹, 新屋敷 佳, 北原 貴之, 生田 雅人, 文 勝徹, 古市 拓也, 今井 大達, 岡田 誠司 Journal of Spine Research(1884-7137)16 巻 3 号 Page106(2025.02)
- ・ 力覚情報を活用した時系列深層学習モデルによるドリルの貫通予測(会議録)
- ・ 今井 大達(大阪大学 大学院医学系研究科器官制御外科学整形外科), 藤森 孝人, 蟹江 祐哉, 古家 雅之, 汪 涵, 喜多 洸介, 鈴木 祐紀, 佐竹 うらら, 榎本 俊之, 岡田 誠司
- ・ 日本肘関節学会雑誌(1349-7324)32 巻 1 号 Page S127(2025)

8. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団 (Shimadzu Science Foundation) の助成金によるものである。

発行者 公益財団法人 島津科学技術振興財団

〒604-8445 京都市中京区西ノ京徳大寺町1番地

電話 (075) 823-3240 FAX (075) 823-3241

<https://www.shimadzu.co.jp/ssf/>

E-mail : info@ssf1980.org

発行日 2026年8月20日

印刷所 株式会社島津総合サービス

公益財団法人

島津科学技術振興財団

〒604-8445 京都市中京区西ノ京徳大寺町1番地

Tel 075-823-3240 Fax 075-823-3241

<https://www.shimadzu.co.jp/ssf/>

E-mail info@ssf1980.org

