

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

**平成 25 年度～平成 27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」  
研究成果報告書概要**

1 学校法人名 東北工業大学                      2 大学名 東北工業大学

3 研究組織名 東北工業大学

4 プロジェクト所在地 仙台市太白区八木山香澄町35-1

5 研究プロジェクト名 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

6 研究観点 大学の特色を活かした研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
小林 正樹	大学院工学研究科	教授

8 プロジェクト参加研究者数 6 名

9 該当審査区分 理工・情報      生物・医歯      人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
小林 正樹	工学研究科・教授	光による生体内活性分子種非侵襲イメージング技術の開発	酸化ストレス画像計測技術の開発
葛西 重信	工学研究科・教授	細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発	細胞レベルでの計測による酸化ストレス評価
多田 美香	共通教育センター・准教授	酸化ストレスマーカー、活性種の定量・定性分析	酸化ストレスの生化学的解析
Ankush Prasad	PD 研究員	活性酸素の定量検出と分析	各研究課題の研究支援
(共同研究機関等) 末永 智一	東北大学・教授	細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発	細胞レベルでの計測による酸化ストレス評価
庭野吉己	東北大学・教授	医学要素を含む生物学的な実験系の構築	酸化ストレスモデル実験系(動物・細胞)の確立

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

(変更の時期:平成 26 年 7 月 15 日)

新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
Palacky 大学研究員	PD 研究員	Ankush Prasad	各研究課題の研究支援

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

## 11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

### (1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

#### 目的と意義

近年、工学をより広く人類の幸福に資するための生体医工学の発展が社会から強く望まれている。東北工業大学はその要請に応えた経営戦略として、生体医工学を大学の重要な教育・研究ターゲットの一つと考えている。本学においては、活性酸素やフリーラジカルなどの生体活性種の分析と、その医学への応用に関する分野での優れた研究実績がある。本研究プロジェクトの目的は、その分野の研究者を学科組織の枠を越えて組織化し、本学における生体医工学研究の拠点とすることにより、飛躍的な研究成果の向上を図り、もってわが国の科学技術の進展および福祉に寄与することである。

本研究プロジェクトは、炎症、アレルギー、老化や三大生活習慣病、アルツハイマー病などの各種疾患に関わる酸化ストレスの非侵襲画像計測技術の確立を目的とする。これは医療・福祉応用機器としての実用化への道を開くものであり、社会的要請としてのその今日的な意義は大きい。また本学の特徴ある研究資源を共同プロジェクトとして融合することで、生体活性分子種の直接計測に基づく酸化ストレス診断のための新しい *in vivo* 非侵襲画像計測システムの開発を目指すものであり、その新規性において学術的な意義も大きい。

#### 計画の概要

生体酸化ストレスの画像計測には、微量かつ短寿命な生体活性分子種の定量計測が求められる。本プロジェクトでは、光による計測技術を主軸とした生体内画像化技術を研究開発する。その手法として、活性酸素種と生体構成物質との反応に基づく光子レベルでの自発発光(バイオフィトン)検出による酸化ストレスの画像化法、および活性酸素種や酸化ストレスマーカーに特異的に結合する化学発光、蛍光プローブを用いた生体内酸化ストレス画像計測法を開発する。生体内部を光により画像計測する手法として、本学が開発した超音波を援用した光断層画像計測技術をベースとし、これにより酸化ストレス非侵襲画像計測技術の確立をめざす(小林)。計測データと酸化ストレスとの相関を評価するためには、細胞あるいは組織レベルでの生体活性種または代謝物の分析が必要である。そのために電子スピン共鳴(ESR)、質量分析などの定性・定量分析方法の開発(多田)と、走査型顕微電気化学顕微鏡(SECM)による細胞レベルでの酸素消費・活性酸素計測、代謝物分析法およびデバイスの開発(葛西)を行う。具体的な研究課題は以下の通りである。

#### 1. 光による生体内活性分子種非侵襲イメージング技術の開発(小林)

マクロな生体レベルを対象とした酸化ストレス光画像計測技術の研究として、バイオフィトン画像計測・分光計測による酸化ストレス画像化法の検討、および化学発光・蛍光プローブによる生体内部酸化ストレス非侵襲画像計測のための、超音波を援用したイメージング技術(超音波タグ光断層イメージング法)の開発を行い、小動物用画像計測装置の開発を目指す。

#### 2. 細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発(葛西)

活性酸素種やフリーラジカル、酸化ストレスマーカー分子を細胞・組織レベルで分析・同定する技術として、細胞・組織レベルにおける活性酸素種および酸素消費・呼吸活性をリアルタイムモニタリングする技術、およびそのバイオチップデバイスを開発する。

#### 3. 酸化ストレスマーカー、活性種の定量・定性分析(多田)

光画像計測で捉えられる酸化ストレスマーカー関連物質(活性種・発光種)を定性・定量的に分析し、励起分子種の生成メカニズムを解明する。定性・定量分析した励起分子種と酸化ストレス画像データとの相関解析を行う。

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

## (2) 研究組織

本学では、活性酸素やフリーラジカル等の生体活性分子種の計測技術、生成メカニズムの解析に関する研究が複数の研究者により個々に進められてきた。独自の技術を保有する研究者を、新たに設置した生体医工学研究センターに組織横断的に結集し、それぞれの技術シーズの相互活用・統合を図った。マクロな生体を対象とした in vivo 生体内光画像計測技術の開発(小林: バイオフォトニクスイメージング研究室)と並行して、得られたデータと酸化ストレス状態との相関を酸化ストレスマーカーの分析・探索を通じ、細胞・組織レベルで電気化学法(葛西: バイオセンサデバイス研究室)および電子スピン共鳴(ESR)、飛行時間型質量分析(TOFMS)法(多田: 生体レドックス反応研究室)により分析する技術の開発を行った。電子工学と生化学分野の間での綿密な情報交換と技術共有を図り、医学応用を指向した新しい画像診断技術の創出を目指す体制とした。臨床医学応用については学外共同研究者と医工連携体制をとった。

研究代表者は各研究室の研究進捗状況を随時チェックするとともに、各研究室で実施した自己点検評価に基づいて研究ターゲットの見直し等、目標へ向けて全体を統括した。研究支援体制として極微弱発光計測、ESR 分析に精通し、活性酸素分析を専門とするポスドク研究員(A. Prasad)を配置した。本研究に参加した大学院生はバイオフォトニクスイメージング研究室延べ2名、バイオセンサデバイス研究室延べ4名であり、各研究室共に RA として採用した。生体医工学センターにはミーティングスペースを設け、随時研究発表、意見交換を行いながら、各研究室の連携を図る体制を整えた。

## (3) 研究施設・設備等

**研究施設**

本プロジェクト専用の研究施設として生体医工学研究センター(東北工業大学八木山キャンパス 5 号館 522 室総面積 120 m<sup>2</sup>)を既存建物内に改装して設置した。3つの研究課題(研究室)に対応した光計測暗室、バイオセンサ開発室、機器分析室、および共通スペースからなる。共通スペースは、共用実験、ミーティング・セミナースペースとして使用し、PD 研究員を含む4名の研究者と各研究室に所属する大学院生5~6名、および卒業研究のための学生4~5名程度が常時使用している。その他学外共同研究機関の研究者6名が必要に応じて研究設備を使用した。

**主な研究設備**

整備年度	研究設備名	主な用途	利用時間
25	冷却 CCD カメラ	極微弱発光画像・分光計測	80 時間/月
25	飛行時間型質量分析装置 (TOFMS) 装置	酸化ストレスマーカー分析	80 時間/月
26	小型スパッタ装置(走査型電気化学顕微鏡)	バイオチップデバイスの開発	60 時間/月
26	蛍光顕微鏡	細胞の観察	15 時間/月
既設	生体極微弱発光画像計測装置	極微弱発光画像計測	80 時間/月
既設	生体極微弱発光光子計数装置	極微弱発光計測	80 時間/月
既設	チタンサファイヤレーザー装置	蛍光計測	30 時間/月
既設	X-band ESR 装置	フリーラジカル計測	20 時間/月

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

(4) 研究成果の概要 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び\*を付すこと。

### 1. 光による生体内活性分子種非侵襲イメージング技術の開発

#### (1) バイオフィトンによる酸化ストレス画像計測法の検討

- ① バイオフィトン発光と酸化ストレスの相関を検討するため、酸化ストレスモデル動物として関節リウマチモデルマウスによる検討を行い、画像計測に成功するとともに(論文\*12)、酸化ストレスとの相関を明らかにした(論文\*6)。
- ② 酸化ストレスイメージング用バイオフィトン発光画像計測システムを構築し、検出感度に関する評価検討を行った(論文\*10)。その上で発光メカニズムの解析や分光的特徴抽出による酸化ストレス評価法を検討するための、ヒト体表を計測対象とした同時多波長バイオフィトン分光分析装置を開発し、分光性能を評価・確認した。各種生体色素分子の発光スペクトルとの発光パターン比較・解析による、酸化ストレス特徴抽出法について検討し、有効性を確認した(論文\*1)。

#### (2) 超音波タグ光断層イメージングによる酸化ストレス画像計測法の検討

- ① 蛍光プローブによる散乱媒質内可視化法として、超音波一蛍光変調法に基づく生体内画像計測法について検討し、微量蛍光物質の検出能を評価した。さらに化学発光プローブによる可視化法として、超音波による化学発光増強を利用した蛍光色素検出法を開発し、生体に安全な超音波パワーレベルにおいて断層画像計測が可能であることを、生体模擬試料を用いて実証した(論文\*9)。
- ② 化学発光増強効果のメカニズム、ならびに活性酸素種や蛍光色素の定量計測の可能性について検討するとともに、活性酸素検出のためのルミノール化学発光系を利用した断層画像計測法について検討を行った(論文\*4)。小動物を対象とした酸化ストレスイメージングへ適用するための超音波焦点走査機構など、実用装置化技術の見通しを得、装置を試作した。

### 2. 細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発

#### (1) 電気化学計測法による酸化ストレス画像計測技術の開発

- ① 免疫細胞の活性酸素種産生に伴う急激な酸素消費をアンペロメトリーにより画像計測するための、3次元培養細胞チップを開発した。THP-1細胞を用いて走査型電気化学顕微鏡(SECM)による2次元画像計測法の検討を行い、呼吸バーストの画像検出に成功した(論文\*3)。
- ② 活性酸素種を計測するための酵素( $O_2$ -HRP)修飾電極を開発し(論文\*5)、細胞レベルにおける活性酸素種および酸素消費・呼吸活性をリアルタイムモニタリングする2ch型バイオチップデバイスを開発した。これを用いTHP-1細胞刺激時の呼吸バーストに伴う酸素消費と過酸化水素産生の同時計測に成功した(論文\*2)。

#### (2) 低周波電気化学インピーダンス法による酸化ストレス評価技術の開発

低周波電気化学インピーダンス法による細胞増殖挙動解析について検討し、酸化ストレス評価法としての有効性を示した(学会\*29,33,38, 論文投稿準備中)。

### 3. 酸化ストレスマーカー、活性種の定量・定性分析

#### (1) バイオフィトンによる酸化ストレス画像化法の支援研究

- ① 励起カルボニル由来の微弱発光機構の発光分子種を酸化ストレスマーカー候補とし、組成解析をTOFMSで試みた。DSA/TOFによる酸化リノール酸の組成解析を行った結果、組成式  $C_{36}H_{64}O_4$  の64成分からリノール酸2量体の3成分を絞り込んだ(学会\*30)。
- ② In vitroの実験系で黒色メラニン485 nm前後の光を吸収して625 nm近傍の蛍光を放つことから生体構成成分(リノール酸など)の励起カルボニル形成には暗反応で起こ

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

る脂質過酸化とメラニンとの連鎖反応による発光機構の存在が推察された。

- ③ 黒化モデル反応(メイラード反応)で生成する活性種を検討した。サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社の試供サンプル(焙煎コーヒー豆)をメイラード反応生成物のモデルとした。焙煎コーヒー豆の安定なフリーラジカル計測や微弱発光計測, および熱水抽出液の TOFMS 分析の結果から, フリーラジカル信号強度や微弱発光強度にはカフェインの含有率の関与は認められなかった。プロジェクト終了後, 今回のデータをもとに, 飲料開発に繋がるようなフリーラジカル実験系を立ち上げる。

(2) 活性酸素, フリーラジカル, その反応物(酸化物), 代謝産物の定性・定量計測法の検討

- ① 生物色素である黒色メラニンの形成機構において, アルブチンやコウジ酸のメラニンの生成を抑制しつつ・OH 生成も低減させる抗酸化能作用を見出した。(論文\*11, 学会\*25, \*26, \*27)
- ② 皮膚や脳などに滞留するメラニン合成経路と医薬品との副次的なラジカル反応が起因する新たな酸化ストレスマーカー候補のスクリーニングの一端として, キレーション療法などに関連する医薬品 Deferoxamine(デフェロキサミン)の反応中間体であるデフェロキサミンラジカル生成機構を示した。デフェロキサミン自体が電子移動のメディエーター(レドックス指示薬)となりうる可能性を示した。(論文\*8)
- ③ 過去の臨床データを再検討し, 自己免疫疾患である花粉アレルギー患者において, 血漿サイトカイン・ケモカイン分析と顆粒球から生成した酸素ラジカル( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ )との統計学解析から, 炎症マーカー(TNF $\alpha$ , IL-6)と  $O_2^{\cdot-}$ との間に相関関係が認められた。これは, 炎症性の自己免疫疾患である関節リウマチと顆粒球の  $O_2^{\cdot-}$ 生成との関連性を想定させる。
- ④ プロアントシアニジンなどの天然色素の光増感反応に注目し, UVA に近い可視光による抗菌性について検討した(論文\*7)。皮膚内在黄色ブドウ球菌に対する感染症予防, 光過敏症などの疾病予防につながることを期待される。

<優れた成果が上がった点>

### 1. 光による生体内活性分子種非侵襲イメージング技術の開発

(1) バイオフィトンによる酸化ストレス画像計測法の検討

- ① 酸化ストレスに関連した炎症性疾患として知られている関節リウマチに関して, 小動物を利用しバイオフィトンにより病態をモニターするモデル系を開発し, その画像計測に初めて成功した。関節リウマチなど酸化ストレスモデル動物を用いた薬効評価法への応用が可能であることを示した。また, 関節リウマチ誘導マウスの血中代謝産物の分析をオランダ・ライデン大学と共同で行い, 炎症性シグナルメディエーターとしてのオキシリピンと酸化ストレスの関係について明らかにした。
- ② 酸化ストレス評価のための, 同時多波長バイオフィトン分光分析装置を開発した。バイオフィトン発光には活性酸素による生体構成物質の酸化過程が関与するが, そのメカニズムとして脂質過酸化過程での励起種の生成が想定されている。不飽和脂肪酸自動酸化過程と共役した生体色素由来自然発光の分光分析と, ヒト体表からのバイオフィトン分光分析に世界で初めて成功した。発光スペクトルのパターン分析により, 酸化ストレスに由来する発光機構や発光分子種の推定に有効であることを示した。

(2) 超音波タグ光断層イメージングによる酸化ストレス画像計測法の検討

- ① 化学発光プローブを用いた光散乱媒質内画像計測法について検討を行った。生体への適用可能なレベルの超音波照射による化学発光の増強が検出可能であること, さらにそれを利用した断層イメージングが可能であることを見出した。画像計測への応用を検討するモデル系として, 過シュウ酸エステル化学発光系に着目し, 化学発光増強率

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

と照射パワーとの関係や、媒質光散乱係数と空間分解能の関係など、基本特性を明らかにした。生体模擬試料による実証実験を行い、従来にない新しい原理に基づく生体光断層画像計測法として提案した。

- ② 生体計測への適用可能性を示すため、生体組織を用いた検討を行い、深さ 25mm において約 3mm の横分解能での断層イメージングに成功した。発光増強メカニズムの検討を行い、発光増強度が活性酸素や蛍光色素濃度に比例することなど、定量イメージング法として適用が可能であることを示した。さらにルミノール化学発光系についても適用可能であり、酸化ストレス画像計測法として有効であることを示した。

## 2. 細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発

### (1) 電気化学計測法による酸化ストレス画像計測技術の開発

- ① 骨髄性白血病患者の細胞株である THP-1 細胞は、phorbol myristate acetate (PMA) 刺激により、急激な酸素消費と過酸化水素産生を起こす現象(呼吸バースト)とともにマクロファージに分化する。この呼吸バースト現象をアンペロメトリーにより経時的にとらえることに成功した。また、細胞の急激な酸素消費を画像化するため、シリコンの異方性エッチングを用いてピラミッド型のウェルを作製し、3次元コラーゲン培養法と組み合わせた細胞チップを開発した。これによりマイクロ電極と同様に呼吸バースト現象をとらえることに成功した。
- ② 活性酸素を検出するための Os-HRP 修飾電極バイオセンサを開発し、Photosystem II (PSII)の過酸化水素産生の経時的变化をアンペロメトリーでとらえた。THP-1 細胞は呼吸バーストと同時に活性酸素種を産生するため、酸素及び過酸化水素計測が可能な 2ch 型バイオセンサの開発を行い、酸素消費と過酸化水素産生が同時に計測できる 2チャンネル型電気化学バイオチップデバイスをフォトリソグラフィ法により開発した。

### (2) 低周波電気化学インピーダンス法による THP-1 細胞の分化過程に伴う酸化ストレス評価技術の開発

低周波電気化学インピーダンス法による細胞増殖挙動及び分化挙動解析について検討し、細胞の増殖状態と分化状態を指標とした、酸化ストレス評価法を提案した。

## 3. 酸化ストレスマーカー、活性種の定量・定性分析

### (1) バイオフィトンによる酸化ストレス画像化法の支援研究

- ① 可視光を照射したメラニンの蛍光計測データから推定した励起カルボニルとメラニンとの連鎖反応による発光機構を検証するために、不飽和脂肪酸自動酸化過程と共役したメラニンの発光計測および分光分析を行った。生きている環境(常温・常圧)において、発光スペクトルの波長特性から励起カルボニルからのエネルギー遷移による励起メラニンの生成が示唆され、推定発光機構が実証された。このような生体構成成分において、異なる分子間でのエネルギー授受を示した分光データは、ヒト体表で検出されたバイオフィトンの分光データからバイオフィトンの生成部位(組織)を知る上で重要である。

### (2) 活性酸素、フリーラジカル、その反応物(酸化物)、代謝産物の定性・定量計測法の検討

- ① メラニン初期反応で生成する $\cdot\text{OH}$ を指標とした抗酸化能評価の方法論を開発した。この方法論を応用してアルブチンやコウジ酸のメラニンの生成を抑制しつつ $\cdot\text{OH}$ 生成も低減させる抗酸化能作用を見出した。研究論文は Highly accessed articles として認定された。
- ② キレーション療法などに関連する医薬品 Deferoxamine のフリーラジカル生成に関する論文が日本分析化学会の英文誌 Analytical Sciences Special Issue: Cutting-Edge Analytical Chemistry Research by Women Scientists に掲載された。

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

- ③ 東北大学歯学部(庭野チーム)と(株)ハーバー研究所との連携研究により、ワイン製造工程で排出される圧搾ブドウ残渣から抽出した水溶成分に光照射し殺菌作用を検討し、水抽出液中に含まれる機能性成分にカテキン類が含まれていることを TOFMS で定性的に検証した。
- ④ バイオセンサデバイス研究室(葛西)と連携してクロロフィルの光化学系 II における過酸化水素をターゲットにしたアンペロメトリー評価法と ESR スピントラップ法によるスーパーオキシドの定性・定量分析を行った。

#### <課題となった点>

### 1. 光による生体内活性分子種非侵襲イメージング技術の開発

- ① 冷却 CCD カメラ装置の整備の遅れから、バイオフィトン分光分析技術の研究が予定より遅れた。しかしながら、ヒト体表皮膚のバイオフィトン発光同時多波長計測による発光スペクトル解析について論文発表することができた。生体関連物質の参照分光データの収集やそのデータベース化を現在行っており、今後さらに酸化ストレスの分光的情報抽出法の研究を継続して行う。
- ② 超音波タグ光断層イメージング法に関しては、当初計画した蛍光法の検討を最初に行ったが、励起背景光雑音による検出能の制約が判明したため、背景光の影響のない化学発光系にターゲットを絞った。化学発光系では超音波による増強効果を利用することで、生体画像計測への応用が可能であることを見出し、目標とした生体内部の画像計測に成功した。超音波焦点走査機構を含む小動物サイズの光断層画像計測装置プロトタイプ機を試作するに至ったが、その評価実験は今後も継続する必要がある。

### 2. 細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発

- ①  $O_2$ -HRP 修飾電極による THP-1 細胞の過酸化水素産生の評価については、食時の呼吸バーストなどの条件を変えた検討が必要である。今後、食時の過酸化水素産生挙動について刺激剤のみの場合と比較検討し、本手法の実用性を示す予定である。
- ③ 2ch 型バイオセンサを用いた細胞の呼吸バーストに伴う酸素消費と過酸化水素産生の同時計測については、変換効率の検討が必要である。その上で細胞シート(組織)による画像化について有効性を今後示す予定である。また共同研究機関(末永チーム)において開発したバイオ LSI を用いて呼吸バーストにおけるイメージング技術を現在検討している。

### 3. 酸化ストレスマーカー、活性種の定量・定性分析

- ① TOFMS の設置にともなう施設整備の準備期間を含めると TOFMS の動作確認までに 5ヶ月間を要し、H25 年度に計画していた TOFMS の装置特性チェックやターゲット分子の分析条件検討が遅れた。
- ② バイオフィトンと励起カルボニルに由来する発光種の相関解析は未完である。プロジェクト終了後もエライザ法などの生化学的手法を加えて研究を続ける。

以上全体を総括すると、プロジェクトが目標とした酸化ストレス画像計測技術の開発に関しては、マクロな生体体表近傍でのバイオフィトン画像計測が有効であることを、極微弱光分光技術の開発とともに示すことができた。また生体内部の活性酸素計測のための従来になかった新しい光断層画像計測技術の提案およびその実証実験に成功し、小動物程度のサイズを対象とした光断層画像計測装置を試作することができた。一方、細胞レベルにおいては、酸化ストレス分析のための、電気化学的手法に基づく新たな活性酸素高感度検出技術、画像化技術の開発に成功した。同時に物質レベルにおいても、最新の TOFMS 技術により各種酸化ストレスマーカーの定量分析評価法を見出し、画像計測チームをサポートするとともに、酸化ストレスや抗酸化メカニズムの研究に貢献した。これらの成果は、合計 12 報の学術論文と

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

して国際的評価の高い学術雑誌に原著論文として掲載された。本学における特色のある研究分野において研究チームによる研究基盤を形成するという観点において、また新しい計測・分析技術を研究成果として対外的に発信し社会へその成果を還元するという観点において、本プロジェクトはおおむねその目標を達成できたと総括する。今後の課題は、これらの研究成果を酸化ストレス計測装置として実用化する技術の開発と、そのための評価試験をさらに継続して行うことである。平成 28 年度以降も外部資金の導入を図りつつ、本制度で整備した施設・設備を、学内にとどまらずより広く、この分野における共同研究拠点として有効に活用する計画を進めている。

#### <自己評価の実施結果と対応状況>

研究課題ごとに毎年度末に自己点検評価を行い、それに基づいて戦略プロジェクト運営会議において研究の進捗状況に関する相互評価を行った(別紙1:自己点検評価票)。各研究課題における研究費の使用状況や研究の方向性については随時協議し、研究実績と予想される成果物を勘案しながら予算の再配分を行うなど、柔軟に対応する体制をとった。費用対効果の評価については、各研究者の学術論文としての発表を成果物とし、発表誌の国際的評価(インパクトファクター)を考慮した分析を行った。その結果に基づき H28 年度は、光断層画像計測装置の試作のため、バイオフィotonicsイメージング研究室(小林)に研究費 33%増となる傾斜配分を行った。

#### <外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

第三者による外部評価委員会を設置し、研究課題ごとにその専門分野の研究者に委員を委嘱した。外部評価委員は埼玉医科大学保健医療学部戸井田昌宏教授、東北大学大学院工学研究科西澤松彦教授、北海道大学大学院情報科学研究科平田拓教授の3名であり、3年間の研究期間が終了する3ヶ月前に、本プロジェクト構想調書、計画調書、3年間の研究成果報告概要、各年度の自己点検評価票、および既発表学術論文に基づいた外部(書面)評価を委嘱した。3委員から提出された外部評価結果は、おおむね研究成果を高評価したものであったが、課題として指摘された事項に関しては、それを改善することで論文発表に繋がるとともに、最終報告にその結果を反映させた。(別紙2:外部評価票)

#### <研究期間終了後の展望>

それぞれの研究課題ごとに競争的資金の申請を行い、平成 28 年度以降も継続して本プロジェクトで得られた研究成果に基づいて研究を行う。今後を生体酸化ストレス画像計測装置としての実用化を目指した第2フェーズの研究として位置づけ、本プロジェクトで整備した生体医工学研究センター研究施設および設備は其中で有効に活用する。国内外の研究機関からの共同研究の提案もあり、より広く酸化ストレス生体画像計測にかかわる共同研究体制を構築しつつ、本学研究施設のこの分野における拠点化をめざすつもりである。

#### <研究成果の副次的効果>

酸化ストレス画像計測装置としての試作プロトタイプ機の評価と高解像化技術の検討を行った上で、「生体光断層画像計測装置」として特許申請を予定している。

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- |                       |                  |                    |
|-----------------------|------------------|--------------------|
| (1) <u>酸化ストレス</u>     | (2) <u>生体光計測</u> | (3) <u>呼吸バースト</u>  |
| (4) <u>バイオチップデバイス</u> | (5) <u>画像計測</u>  | (6) <u>電子スピン共鳴</u> |
| (7) <u>フリーラジカル</u>    | (8) <u>活性酸素</u>  |                    |



法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

## 13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

## &lt;雑誌論文&gt; (別紙3論文別刷集参照)

- \*1. “Polychromatic spectral pattern analysis of ultra-weak photon emissions from a human body”  
M. Kobayashi, T. Iwasa, M. Tada, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **159**, 186–190 (2016) (査読有)
- \*2. “Simultaneous real-time monitoring of oxygen consumption and hydrogen peroxide production in cells using our newly developed chip-type biosensor device”  
A. Prasad, H. Kikuchi, K. Inoue, M. Suzuki, Y. Sugiura, T. Sugai, A. Tomonori, M. Tada, M. Kobayashi, T. Matsue, S. Kasai, *Frontiers in Physiology* **7**, 109, 1–10 (2016) (査読有)
- \*3. “Scanning electrochemical microscopy imaging during respiratory burst in human cell”  
H. Kikuchi, A. Prasad, R. Matsuoka, S. Aoyagi, T. Matsue, S. Kasai, *Frontiers in Physiology* **7**, 25, 1–6 (2016) (査読有)
- \*4. “Ultrasound-enhanced chemiluminescence tomography in biological tissue”  
M Kobayashi, N. Kikuchi, A. Sato, *Ultrasonics Sonochemistry*. **31**, 1–6 (2016) (査読有)
- \*5. “Detection of hydrogen peroxide in Photosystem II (PSII) using catalytic amperometric biosensor”  
A. Prasad, A. Kumar, M. Suzuki, H. Kikuchi, T. Sugai, M. Kobayashi, P. Pospíšil, M. Tada, S. Kasai, *Frontiers in Plant Science* **6**, 862,1–10 (2015) (査読有)
- \*6. “Collagen induced arthritis in DBA/1J mice Associates with oxylipin changes in plasma”  
M. He, E. Van Wijk, R. Berger, M. Wang, K. Strassburg, J. C. Schoeman, R. Vreeken, H. A. Van Wietmarschen, A. Harms, M. Kobayashi, T. Hankemeier, J. V. van der Greef, *Mediators of Inflammation*, 543541,1–11 (2015) (査読有)
- \*7. “Bactericidal action of photo-irradiated aqueous extract from residue of crushed grape for wine preparation”  
M. Tsukada, H. Sheng, M. Tada, T. Mokudai, S. Oizumi, T. Kamachi, Y. Niwano, *Biocontrol Science* (in press) (査読有)
- \*8. “Generation Mechanism of Deferoxamine Radical by Tyrosine–Tyrosinase Reaction”  
M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, *Analytical Sciences* **31**, 911–916 (2015) (査読有)
- \*9. “Optical tomography of fluorophores in dense scattering media based on ultrasound-enhanced chemiluminescence”  
M. Kobayashi, N. Kikuchi, A. Sato, *Appl. Phys. Lett.* **106**, 021103,1–6 (2015) (査読有)
- \*10. “Highly sensitive imaging for ultra-weak photon emission from living organisms”  
M. Kobayashi, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **139**, 34–38 (2014) (査読有)
- \*11. “Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA”  
M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, *BMC Biochem* **15**(1), 23 (2014) (査読有)
- \*12. “Imaging of ultra-weak photon emission in a rheumatoid arthritis mouse model”  
E. van Wijk, M. Kobayashi, R. van Wijk, J. van der Greef, *PLoS ONE* **8** (12) e84579, 1–6 (2013) (査読有)

## &lt;図書&gt;

なし

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

<学会発表>

1. 電気化学会第 83 回大会, 杉浦大和, 橋由佳, 井上久美, 伊野浩介, 末永智一, 葛西重信, “バイオ LSI を用いた光合成における酸素産生リアルタイムイメージング”, 大阪大学・吹田キャンパス(2016.03)
2. 電気化学会第 83 回大会, 高橋明美, 松岡涼, 菅井智也, 菊地紘幸, 青柳重夫, 相川達男, 近藤剛史, 湯浅真, 葛西重信, “鉄ポルフィリン修飾電極を用いた THP-1 細胞由来のスーパーオキシド検出”, 大阪大学・吹田キャンパス(2016.03)
3. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 多田美香, 河野雅弘, 庭野吉己, “Tyrosinase 反応で生成する・OH に対する機能性成分の低減効果”, 札幌市・札幌コンベンションセンター(2016.03)
4. 第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小川和訓, 小林正樹, “ルミノール化学発光の超音波増強効果を用いた散乱媒質内イメージング”, 東京都・東京工業大学(2016.03)
5. 第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 岩佐琥偉, 佐藤佑哉, 及川大揮, 小林正樹, “ヒト皮膚由来バイオフォンの同時多波長スペクトルパターン分析”, 東京都・東京工業大学(2016.03)
6. 平成 28 年電気学会全国大会, 杉浦大和, 橋由佳, 井上久美, 伊野浩介, 末永智一, 葛西重信, “バイオ LSI を用いた植物組織の酸素産生リアルタイムイメージング”, 東北大学・川内北キャンパス(2016.03)
7. 平成 28 年東北地区若手研究者研究発表会, 小川和訓, 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正樹, “超音波による化学発光増強を用いた生体ルミノールイメージング法の検討”, 郡山市・日本大学(2016.03)
8. 平成 28 年東北地区若手研究者研究発表会, 及川大揮, 佐藤佑哉, 岩佐琥偉, 小林正樹, “同時多波長分光による植物由来バイオフォンのスペクトル分析”, 郡山市・日本大学(2016.03)
9. 平成 28 年東北地区若手研究者研究発表会, 岩佐琥偉, 佐藤佑哉, 及川大揮, 小林正樹, “ヒト指先から放出されるバイオフォンの発光スペクトル特性”, 郡山市・日本大学(2016.03)
10. 第 61 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 杉浦大和, 菊地紘幸, 鈴木誠, 菅井智也, 本望知浩, 高橋明美, 井上久美, 末永智一, 葛西重信, “電気化学デバイスを用いた THP-1 細胞の薬剤濃度変化及び温度変化に伴う酸素消費と過酸化水素産生のリアルタイムモニタリング”, 姫路市・イーグレ姫路(2015.11)
11. 第 61 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 本望知浩, 菊地紘幸, 菅井智也, 杉浦大和, 高橋明美, 葛西重信, “電気化学的手法を用いた温度変化に伴う THP-1 細胞の貪食能による酸素消費挙動評価”, 姫路市・イーグレ姫路(2015.11)
12. 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 菊地直斗, 佐藤彰洋, 青木孝輔, 小林正樹, “超音波による化学発光増強を用いた生体イメージング”, 名古屋市・名古屋国際会議場(2015.09)
13. 平成 27 年度電気関係学会東北支部連合大会, 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正樹, “超音波による化学発光増強効果を利用した光散乱媒質内化学発光プローブイメージング”, 滝沢市・岩手県立大(2015.08)
14. 227th Meeting of ECS- Chicago, S Kasai, M Suzuki, H Kikuchi, A Prasad, K Inoue, M Tada, M Kobayashi, T Matsue, “Simultaneous measurements of oxygen consumption and hydrogen peroxide generation during respiratory burst in THP-1 using an electrochemical method”, Chicago, USA (2015.05)
15. 平成 27 年東北地区若手研究者研究発表会, 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

- 樹, "化学発光増強を利用した超音波タグ生体光イメージング", 郡山市・日大 (2015.02)
16. 平成 27 年東北地区若手研究者研究発表会, 佐藤佑哉, 石田知明, 佐藤瞳, 遠藤祐太, 小林正樹, "バイオフロン分光分析のための高感度ポリクロメータの開発", 郡山市・日大 (2015.02)
17. 平成 27 年東北地区若手研究者研究発表会, 佐々木康宏, 富樫玖苑, 小林正樹, "Si-PMT を用いた小動物用遺伝子発現 in vivo 計測システムの開発", 郡山市・日大 (2015.02)
18. 応用物理学会東北支部第 69 回学術講演会, 菊地直斗, 佐藤彰洋, 小林正樹, "光散乱媒質内化学発光イメージングの検討", 仙台市・東北大 (2014.12)
19. 第 60 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 菅井智也, 鈴木誠, 菊地紘幸, 松岡涼, 青柳重夫, 井上久美, 湯浅真, 末永智一, 葛西重信, "電気化学的手法を用いた THP-1 細胞の薬剤濃度変化及び温度変化に伴う酸素消費挙動評価", 京都市・京都工芸繊維大 (2014.11)
20. 第 60 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 本望知浩, 菊地紘幸, 鈴木誠, 菅井智也, 鈴木礼紀, 葛西重信, "マイクロ電極を用いた免疫細胞の貪食に伴う呼吸バースト評価", 京都市・京都工芸繊維大(2014.11)
21. 電気化学秋季大会, 鈴木礼紀, 石井隆介, 多田美香, 丸尾容子, 加藤善大, 小林正樹, 葛西重信, "低周波電気化学インピーダンス法を用いた免疫細胞の薬剤刺激による挙動評価", 札幌・北海道大(2014.11)
22. 電気化学秋季大会, 鈴木誠, 多田美香, 小林正樹, 井上久美, 末永智一, 葛西重信, "チップ型電気化学バイオセンサを用いた THP-1 細胞の貪食による呼吸バースト評価", 札幌・北海道大(2014.11)
23. 電気化学秋季大会, 菊地紘幸, 松岡涼, 菅井智也, 本望知浩, 青柳重夫, 多田美香, 小林正樹, 末永智一, 葛西重信, "走査型電気化学顕微鏡を用いた THP-1 細胞の刺激剤による呼吸バースト及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生の変換効率評価", 札幌・北海道大(2014.11)
24. 平成 26 年度電気関係学会東北支部連合大会, 富樫玖苑, 小林正樹, "遺伝子発現 in vivo リアルタイム計測のための Si PMT フォトンカウンティングシステムの検討", 米沢市・山形大(2014.08)
- \* 25. The 3rd International conference on cellular environmental stressors in biology and medicine: Focus on Redox reactions, M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, "Arbutin alleviates oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA: tested by electron paramagnetic resonance (EPR)-spin trapping method", Ferrara, Italy (2014.06)
- \* 26. The 3rd International conference on cellular environmental stressors in biology and medicine: Focus on Redox reactions, M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, "Tyrosinase inhibitors alleviate oxidative stress induced by melanin synthesis: tested by an EPR-spin trapping method", Ferrara, Italy (2014.06)
- \* 27. Biological and Materials Science Oriented Applications (2nd AWEST 2014), M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, "Tyrosinase inhibitors alleviate oxidative stress induced by melanin synthesis: tested by an ESR-spin trapping method" (invited talk), Awaji Island, Hyogo (2014.06)
28. 225th Meeting of ECS-Orlando, S. Kasai, H. Kikuchi, M. Suzuki, M. Nakano, K. Y. Inoue, T. Honmo, M. Tada, S. Aoyagi, M. Kobayashi, T. Matsue, "Respiratory Burst Evaluation of THP-1 Cell Chip Using a Scanning Electrochemical Microscopy", FL, USA (2014.05)
- \* 29. 225th Meeting of ECS-Orlando, S.Kasai, Y.Suzuki, R.Ishii, M.Tada, Z.Kato, Y.Maruo, M.

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

- Kobayashi, “Proliferation Monitoring of Immunocytes Using Low Frequency Impedance Measurement”, Orlando, USA (2014.05)
- \* 30. Society for Free Radical Research International 17th Biennial Meeting (SFRR 2014), M. Tada, M. Kobayashi, S. Kasai, M. Kohno, Y. Niwano, “Scavenging and quenching effects of melanin on ROS and other reactive species”, Kyoto International Conference Center (2014.03)
31. 電気化学会第 81 回大会, 鈴木誠, 菊地紘幸, 菅井智也, 本望知浩, 多田美香, 小林正樹, 井上久美, 末永智一, 葛西重信, “チップ型電気化学バイオセンサを用いた THP-1 細胞の呼吸バースト及び過酸化水素産生の同時計測評価”, 関西大 (2014.03)
32. 電気化学会第 81 回大会, 菊地紘幸, 鈴木誠, 佐藤大輔, 本望知浩, 多田美香, 小林正樹, 井上久美, 末永智一, 葛西重信, “走査型電気化学顕微鏡を用いた THP-1 細胞の呼吸バーストイメージング”, 吹田市・関西大 (2014.03)
- \* 33. 電気化学会第 81 回大会, 鈴木礼紀, 石井隆介, 多田美香, 丸尾容子, 加藤善大, 小林正樹, 葛西重信, “低周波電気化学インピーダンス法を用いた免疫細胞の増殖曲線評価”, 吹田市・関西大 (2014.03)
34. 平成 26 年東北地区若手研究者研究発表会, 菊地直斗, 高橋巧, 小松健太, 高橋良, 小林正樹, “超音波を援用した生体内活性種光イメージング法の検討”, 仙台・東北工大 (2014.02)
35. 平成 26 年東北地区若手研究者研究発表会, 富樫玖苑, 菅野晃一, 残間隆太, 小林正樹, “脳内遺伝子発現計測のための APD フォトンカウンティングシステムの開発”, 仙台・東北工大(2014.02)
36. 第 59 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 鈴木誠, 井上久美, 菊地紘幸, 中野将識, 本望知浩, 多田美香, 小林正樹, 末永智一, 葛西重信, “電気化学的手法を用いた浮遊性免疫細胞の呼吸活性および過酸化水素産生の評価”, 石垣市 (2013.11)
37. 第 59 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 菊地紘幸, 井上久美, 鈴木誠, 中野将識, 本望知浩, 多田美香, 小林正樹, 末永智一, 葛西重信, “走査型電気化学顕微鏡を用いた THP-1 細胞の呼吸バーストの定量的評価”, 石垣市 (2013.11)
- \* 38. 第 59 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 鈴木礼紀, 石井隆介, 多田美香, 小林正樹, 葛西重信, “低周波電気化学インピーダンス計測法を用いた細胞の挙動評価”, 石垣市 (2013.11)
39. 電子スピンスイエンズ学会年会, 多田美香, 伊藤智博, 尾形健明, “レドックス指示薬としての TEMPOL に関する研究”, さいたま市・大宮ソニックシティ(2013.10)
40. 第 52 回電子スピンスイエンズ学会年会-故横山秀克先生メモリアルシンポジウム-(招待講演), 多田美香, “In vivo ESR の発展とその医学応用”, さいたま市・大宮ソニックシティ(2013.10)
41. 第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 多田美香, 庭野吉己, 小林正樹, 葛西重信, 伊藤智博, 尾形健明, 河野雅弘, “メラニン形成機構で生成するフリーラジカルの研究”, 東京都・昭和大学旗の台キャンパス(2013.08)
42. 第 17 回 ESR フォーラム研究会, 多田美香, 庭野吉己, 小林正樹, 葛西重信, 伊藤智博, 尾形健明, 河野雅弘, “チロシン・チロシナーゼ反応阻害と・OH 生成との関係”, 福岡市・九州大学医学部百年講堂(2013.07)
43. Conference on Ultra-weak Photon Emission From Living Systems, M. Kobayashi, “Biophoton imaging technology and its application” (invited talk), Olomouc, Czech Republic (2013.06)

法人番号	041003
プロジェクト番号	S1312001

<研究成果の公開状況>(上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

<既に実施しているもの>

研究成果は大学ホームページでトピックスとして随時公開し、社会への発信に心掛けた。

URL は次の通り。http://www.eis.tohtech.ac.jp/study/labs/kobayashi/strategic/

<これから実施する予定のもの>

研究成果報告書を出版した後に開催する予定。

14 その他の研究成果等

1. PerkinElmer 社と連携研究を開始した(多田)。DSA/TOF データを共同研究成果として発表した(\*学会 30)。
2. (株)JEOL RESONANCE より化粧品の ESR アプリケーションデータとして、化粧料のアルブチンの研究論文(\*論文 11)のデータ提供を依頼された。
3. 株式会社ハーバー研究所との研究成果が Biocontrol Science Vol.21, No.2(2016)に掲載予定である(\*論文 7)。本プロジェクト終了後も連携体制を継続する。

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項>

「若手研究者の育成, 研究成果の評価体制を十分に考慮されたい」

<「選定時」に付された留意事項への対応>

**若手研究者の育成**

- ・若手研究者である多田美香准教授の研究環境を充実させるため、本プロジェクト研究設備予算は総額の 51%, これを含む 3 年間の研究費は 43%を配算し重点的研究基盤整備を行った。最新機能を有する PerkinElmer 社製飛行時間型質量分析装置を日本で最初に導入しその活用により論文 2 報, 酸化ストレスマーカー関連論文 4 報, 招待講演 1 件の研究成果を挙げた。これらの研究成果や社会活動が評価され、日本酸化ストレス学会評議員, および一般社団法人電子スピサイエンス学会代議員に選任された。
- ・生体医工学センター内にはミーティングスペースを確保し、活発なディスカッションができる研究環境を整備し、若手研究者育成に配慮した。
- ・大学は本研究プロジェクトのエフォート確保に留意し、とくに若手研究者の学内業務量を低減するなど十分な配慮を行った。

**研究成果の評価体制**

- ・研究課題ごとに毎年度末に自己点検評価を行い、それに基づいて研究プロジェクト連絡会議において研究の進捗状況に関する相互評価を行った。各研究課題における研究費の使用状況や研究の方向性については随時協議し、研究実績と予想される成果物を勘案しながら予算の再配分を行うなど、柔軟に対応する体制をとった。研究実績に関しては研究論文としての成果に重点を置いて評価し分析した。
- ・第三者による外部評価委員会を設置し、研究課題ごとにその専門分野の研究者に委員を委嘱した。3年間の研究期間が終了する3ヶ月前に、年度ごとの自己点検評価票に基づいた外部(書面)評価を行い、最終年度の研究取り纏めに向けて客観的評価が得られる体制を整えた。

<「中間評価時」に付された留意事項>

研究期間が3年間のため該当なし

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

該当なし

法人番号	41003
プロジェクト番号	S1312001

## 16 施設・装置・設備・研究費の支出状況(実績概要)

(千円)

年度・区分	支出額	内 訳						備 考
		法 人 負 担	私 学 助 成	共同研 究機関 負担	受託 研究等	寄付金	その他( )	
平成二 五年度	施 設	0						
	装 置	0						
	設 備	31,052	10,525				20,527	冷却CCDカメラ 飛行時間型質量分析装置
	研究費	9,326	5,197	4,129				
平二六 年度	施 設	0						
	装 置	0						
	設 備	18,036	6,652				11,384	小型スパッタ装置 蛍光顕微鏡
	研究費	8,016	4,131	3,885				
平成二 七年度	施 設	0						
	装 置	0						
	設 備	0						
	研究費	8,030	4,145	3,885				
平成 年度	施 設	0						
	装 置	0						
	設 備	0						
	研究費	0						
平成 年度	施 設	0						
	装 置	0						
	設 備	0						
	研究費	0						
総 額	施 設	0	0	0	0	0	0	0
	装 置	0	0	0	0	0	0	0
	設 備	49,088	17,177	0	0	0	0	31,911
	研究費	25,372	13,473	11,899	0	0	0	0
総 計	74,460	30,650	11,899	0	0	0	31,911	

## 17 施設・装置・設備の整備状況 (私学助成を受けたものはすべて記載してください。)

《施設》(私学助成を受けていないものも含め、使用している施設をすべて記載してください。) (千円)

施設の名 称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体

※ 私学助成による補助事業として行った新增築により、整備前と比較して増加した面積

\_\_\_\_\_ m<sup>2</sup>

《装置・設備》(私学助成を受けていないものは、主なもののみを記載してください。)

(千円)

装置・設備の名称	整備年度	型 番	台 数	稼働時間数	事業経費	補助金額	補助主体
(研究装置)				h			
				h			
				h			
(研究設備)							
冷却CCDカメラ	25	850S42-40B	1	1,500	h 11,102	7,261	文部科学省
飛行時間型質量分析装置	25	KJP-TOF	1	1,700	h 19,950	13,266	文部科学省
小型スパッタ装置	26	HV-405	1	600	h 12,960	8,000	文部科学省
蛍光顕微鏡	26	DM14000B	1	180	h 5,076	3,384	文部科学省
				h			
(情報処理関係設備)							
				h			
				h			
				h			

## 18 研究費の支出状況

(千円)

年 度	平成 25 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	2,279	実験用資材	988
光 熱 水 費			
通 信 運 搬 費	7	配送料	7
印 刷 製 本 費			
旅 費 交 通 費	377	学会参加	217
報 酬 ・ 委 託 料	715	実験機器関連作業	477
( 修 繕 費 )	1,941	機器修理	1,941
( 諸 会 費 )	40	学会参加費	
( 出 版 物 費 )	5	出版物	5
計	5,364		
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 ( 兼 務 職 員 )	367	学生アルバイト雇用	367
教育研究経費支出			
計	367		
設 備 関 係 支 出 (1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	3,595	実験用機器	1,332
図 書			
計	3,595		
研 究 ス タ ッ プ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント			
ポスト・ドクター			
研究支援推進経費			
計	0		

法人番号	41003
------	-------

(千円)

年 度	平成 26 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	2,995	実験用資材	733
光 熱 水 費			
通 信 運 搬 費			
印 刷 製 本 費	41	論文印刷製本	41
旅 費 交 通 費	473	学会参加	421
報 酬 ・ 委 託 料	812	実験機器保守契約	233
( 修 繕 費 )	340	実験用機器修理	340
( 諸 会 費 )	89	学会参加費	89
( 出 版 物 費 )	49	出版物	49
計	4,799		
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 ( 兼 務 職 員 )	64	学生アルバイト雇用	64
教育研究経費支出			
計	64		
設 備 関 係 支 出 (1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	3,153	実験用機器	1,674
図 書			
計	3,153		
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント			
ポスト・ドクター	4,261	研究員	4,261
研究支援推進経費			
計	4,261		学外1人

(千円)

年 度	平成 27 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	2,871		2,083
光 熱 水 費			
通 信 運 搬 費	3	配送料	3
印 刷 製 本 費	79	論文印刷製本	79
旅 費 交 通 費	513	学会参加	464
報 酬 ・ 委 託 料	730	実験機器関連作業	298
( 修 繕 費 )	601	実験用機器修理	601
( 諸 会 費 )	89	学会参加費	89
( 出 版 物 費 )	1	出版物	1
計	4,887		
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 ( 兼 務 職 員 )			
教育研究経費支出			
計	0		
設 備 関 係 支 出 (1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	3,143	実験用機器	1,631
図 書			
計	3,143		
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント			
ポスト・ドクター	6,000	研究員	6,000
研究支援推進経費			
計	6,000		学外1人



自己点検評価票(平成 25～27 年度)

平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 25 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学

研究観点 大学の特色を活かした研究

研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） バイオフォトンイメージング研究室（小林 正樹）

研究課題 蛍光・発光検出による生体内活性分子種非侵襲イメージング技術の開発

(1) 当該年度研究計画の概要

マクロな生体レベルにおける、光による酸化ストレス画像計測技術の研究を行う。そのための手法として、①活性酸素種が関与した自発的な生体極微弱発光であるバイオフォトンの画像計測による酸化ストレス分析法と、②生体内部での酸化ストレス状態を蛍光または化学発光プローブを用い、超音波との相互作用を利用して断層画像計測する、超音波タグ光断層画像計測技術の開発を行う。平成 25 年度は、以下の項目に関して検討を行う。

- ① 超高感度冷却型 CCD によるバイオフォトン画像計測装置を用いて酸化ストレスとの相関を検討する。小動物を対象とした酸化ストレスモデルを作製し、画像評価の可能性を探る。
- ② 蛍光プローブによる光散乱媒質内蛍光画像計測法の高感度化技術について検討する。超音波バースト波による音響光学変調法や光子レベルでの検出法、また超音波による蛍光分子密度変化を利用した変調信号増強法の検討と、同時にシステム化に必要な超音波源、励起光源の最適化設計を行い、蛍光色素を用い生体計測への適用の可能性を探る。

(2) 研究組織・体制

小林研究室の学生を研究補助として、小林が研究を実施する。

(3) 整備した研究施設・設備等

研究施設：生体医工学研究センター光計測室暗室の整備

研究設備：冷却 CCD 装置 (11,102,175 円)

(バイオフォトン計測による酸化ストレス評価に用いる)

(4) 研究成果の概要（論文等の成果には下線）

- ① バイオフォトンによる酸化ストレスイメージング法の研究として、酸化ストレスモデル動物による検討を行った。
- ② 超音波タグイメージングによる発光・蛍光プローブの散乱媒質内可視化法の研究として、生体組織において光透過性に優れた近赤外波長での蛍光を示し、臨床現場で用いられているインドシアニングリーンを蛍光プローブとした生体内画像計測法について検討した。超音波による蛍光変調検出法に基づいた検討を行い、励起光源の変調や、変調蛍光の光子計数法によるゲート検出法を試み、また同時に励起エネルギー移行による化学的励起条件下での超音波変調の可能性を探索した。

<優れた成果があがった点>

- ① 酸化ストレスに関連した炎症性疾患として知られている関節リウマチに関して、小動物を利用してバイオフィトンにより病態をモニターするモデル系を開発した。これにより、関節リウマチモデルによる薬効評価非侵襲計測法への応用が可能であることを示した。本研究はオランダライデン大学との共同研究で研究成果は“Imaging of ultra-weak photon emission in a rheumatoid arthritis mouse model.”として PLoS ONE 誌に掲載された。
- ② 蛍光プローブ音響光学変調の高感度化に関する研究と同時に、化学発光プローブを用いた光散乱媒質内画像計測法について検討を行った。その結果、これまでに開発した音響光学計測技術を生かしたまま、超音波による化学発光増強効果を利用して化学発光プローブのイメージングを行うことが可能であることを見出した。変調法に比べて高感度での検出が可能であることから、蛍光色素を用いて化学発光プローブ化することで目標としたインドシアニンググリーンの散乱媒質内のイメージングが可能であるとの見通しを得た。

<問題点>

- ① 酸化ストレス評価のためには、バイオフィトンイメージング法の高感度化と同時に、発光分子種の分析・同定を行う必要があり、そのための高感度同時多波長分光分析装置の開発を本研究テーマ遂行上の重要な研究項目としていたが、その高感度検出装置として予定していた冷却 CCD 装置の納期が発注の遅れにより年度末にずれ込んだため、イメージング法と同時に行うべき、分光分析系の開発に遅れが生じた。
- ② 光散乱媒質内発光・蛍光プローブ画像計測法について、超音波による蛍光の音響光学変調法高感度化技術として、光子計数法によるゲート式変調成分検出法の検討を行った。また、蛍光微粒子系と蛍光分子系での超音波による蛍光強度変調メカニズムの差異に関して解析を行った。その結果、目的とする蛍光分子系の場合、音響光学変調光を検出するには、その成分が励起背景光に対して極端に小さいことがわかった。

<次年度への展望>

- ① バイオフィトンイメージングと同時にバイオフィトンレベルの発光に適用可能な分光分析装置の開発を進める。
- ② 超音波による化学発光増強効果に注目し、化学発光プローブによる生体内イメージング法の開発を進める。

<研究成果の副次的効果>

化学発光増強イメージングは有望であることから、外部発表時期との兼ね合いとなるが、可能であれば権利化を目指したい。

(5) 研究発表の状況（研究論文等公表状況。印刷中も含む。）

<雑誌論文>

1. \* “Imaging of ultra-weak photon emission in a rheumatoid arthritis mouse model.” E. van Wijk, M. Kobayashi, R. van Wijk, J. van der Greef, PLoS ONE (査読有) **8**, 12, e84579 pp. 1-6 (2013)

<図書>

なし

<学会発表>

1. \*平成 26 年東北地区若手研究者研究発表会, 菊地直斗, 高橋巧, 小松健太, 高橋良, 小林正樹, ”超音波を援用した生体内活性種光イメージング法の検討”, 仙台, 2014 年 2 月
2. 平成 26 年東北地区若手研究者研究発表会, 富樫玖苑, 菅野晃一, 残間隆太, 小林正樹, ”脳内遺伝子発現計測のための APD フォトンカウンティングシステムの開発”, 仙台, 2014 年 2 月
3. Conference on Ultra-weak Photon Emission From Living Systems, M. Kobayashi, “Biophoton imaging technology and its application (invited talk)” Olomouc, Czech Republic , 2013 年 6 月

(6) その他の研究成果等特記事項

なし

平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 25 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学

研究観点 大学の特色を活かした研究

研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） バイオセンサデバイス研究室（葛西 重信）

研究課題 細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発

(1) 当該年度研究計画の概要

細胞レベルでの呼吸活性、酸化ストレスマーカーを非侵襲検出するため、マイクロ電極によるアンペロメトリー計測を行い、呼吸バースト現象をとらえた。酸化ストレス評価を行うため、酸素と過酸化水素を同時に計測可能な 2 チャンネル型バイオチップデバイスの開発を行った。

(2) 研究組織・体制

- 1) マイクロ電極を用いた呼吸バーストのアンペロメトリー計測と計測用細胞チップの開発及び 2 c h 型バイオセンサーの開発（葛西）
- 2) 細胞機能評価のインピーダンス計測法の開発（葛西）
- 3) 酸素及び過酸化水素計測可能な多チャンネルバイオセンサーの開発（末永）

(3) 整備した研究施設・設備等

(4) 研究成果の概要（論文等の成果には下線）

生体酸化ストレス状態を、ミクロな細胞レベルにおいて電気化学計測法により画像計測する技術の研究開発を行う。本テーマでは免疫細胞を計測対象とする。まず、活性酸素種産生に伴う急激な酸素消費について、画像化法の検討を行う。さらに細胞の酸化ストレス状態を非侵襲画像計測するため、活性酸素種を計測するための酵素修飾電極の開発を行う。また、細胞レベルにおける活性酸素種および酸素消費・呼吸活性をリアルタイムモニタリングするための、バイオチップデバイスを開発する。

<優れた成果があがった点>

骨髄性白血病患者の細胞株である THP-1 細胞を対象物として以下の知見を得た。

- ① THP-1 細胞は、**phorbol myristate acetate (PMA)** 刺激により、急激な酸素消費を起す現象（呼吸バースト）についてマイクロ電極を使用してアンペロメトリーにより経時的にとらえることができた（学会発表 2), 3), 5), 6)）。
- ② 細胞の急激な酸素の消費を画像化するためにシリコンの異方性エッチングを用いてピラミッド型のウェルを作製し、**3 次元コラーゲン培養法**と組み合わせた細胞チップを開発した。この細胞チップを用いても先の述べたアンペロメトリーを計測し同様の呼吸バースト現象をとらえることに成功した（学会発表 3), 6), 9)）。
- ③ THP-1 細胞は、**phorbol myristate acetate (PMA)** 刺激により、呼吸バースト現象をとらえたがこの細胞は、**PMA** 刺激により分化し、マクロファージになることが知られているため、呼吸バーストがおきることと分化の変化を低周波電気化学イン

ピーダンス法によりとらえることを検討するため、まず、無刺激で細胞増殖する過程について低周波電気化学インピーダンス法が可能か検討し、細胞数に応じたインピーダンスの依存についてとらえることができた(学会発表 1, 4, 7, 10)。

④ 呼吸バーストは急激な酸素消費とともに活性酸素種産生も同時に行うことが知られているため酸素消費と過酸化水素産生が同時に計測できる 2 チャンネル型の電気化学バイオセンサについてフトリソグラフィ法により開発した(学会発表 8)。

⑤ 酸素及び過酸化水素計測可能な多チャンネルバイオセンサーの開発(論文 1)

<問題点>

- ① 呼吸バースト現象による経時的な解析は世界的にもほとんど行われていないが、急激な酸素消費のうちのどのくらいが活性酸素になるのかがこの計測のみではわからない。
- ② 開口が 200  $\mu$ m 四方の 3 次元チップについて作成した細胞チップを使用して、呼吸活性、呼吸バーストの違いについてとらえる必要がある。
- ③ 細胞の呼吸バーストと分化の関係がわかっていない。
- ④ 2ch 型バイオセンサーの開発により、酸素、過酸化水素を同時にとらえられることについては検討したが細胞への応用について未検討である。

<次年度への展望>

- ① OS-HRP 修飾電極を用いた、THP-1 細胞の過酸化水素産生の評価を行う。
- ② 走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用いての THP-1 の通常呼吸活性と呼吸バースト現象時の違いを画像化する。
- ③ 低周波電気化学インピーダンス法による増殖曲線の検討を行う。
- ④ 開発した 2ch 型バイオセンサーを用いた THP-1 細胞の呼吸バーストに伴う酸素消費と過酸化水素産生の同時評価を行う。

<研究成果の副次的効果>

(5) 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)上記(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

<雑誌論文>

論文名、著者名、掲載誌名、査読の有無、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)について記入してください(左記の各項目が網羅されていれば、項目の順序を入れ替えても可)。また、現在から発表年次順に遡り、通し番号を付してください。

1. 中野将識、井上(安田)久美、久保礼有志、國方亮太、須田篤史、松平昌昭、伊野浩介、珠玖 仁、末永智一. 第二世代バイオ LSI システムを利用した生体分子のイメージングのための酸素・過酸化水素の同時検出法の開発.
2. Masanori Nakano, Kumi Y. Inoue, Reyushi Kubo, Ryota Kunikata, Atsushi Suda, Masahki Matsudaira, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue., Development of a Simultaneous Detection Method of Hydrogen Peroxide and Oxygen Using 2nd Generation Bio-LSI System Toward Bio-imaging. Chemical Sensors 29 Suppl. B (2013) 67-69.

<図書>

--

<学会発表>

(学会発表 2013.3～2014.3)

1. 石井隆介, 鈴木礼紀, 葛西重信, コラーゲンゲル法を用いた免疫細胞のインピーダンスモニタリング, 日本化学会第 93 春季年会, (立命館大), 2013.3
2. 鈴木誠, 菊地紘幸, 石井隆介, 鈴木礼紀, 桐生春樹, 葛西重信, マイクロ電極を用いた単一細胞の呼吸バースト評価, 電気化学会第 80 回大会, (東北大), 2013.3
3. 菊地紘幸, 鈴木誠, 石井隆介, 鈴木礼紀, 桐生春樹, 阿部泰, 岩松新之輔, 小林誠也, 矢作徹, 葛西重信, マイクロ電極を用いた細胞チップの呼吸バースト評価, 第 80 回電気化学大会 (東北大), 2013.3
4. 鈴木礼紀, 石井隆介, 菊地紘幸, 鈴木誠, 矢作徹, 阿部泰, 岩松新之助, 小林誠也, 葛西重信, 免疫細胞のインピーダンス計測用チップの作製と基本的特性, 第 80 回電気化学大会 (東北大), 2013.3
5. 鈴木誠, 井上久美, 菊地紘幸, 中野将識, 本望知浩, 多田美香, 小林正樹, 末永智一, 葛西重信, 電気化学的手法を用いた浮遊性免疫細胞の呼吸活性および過酸化水素産生の評価, 第 59 回ポーログラフイーおよび電気分析化学討論会ポスター発表, (石垣市), 2013.11
6. 菊地紘幸, 井上久美, 鈴木誠, 中野将識, 本望知浩, 多田美香, 小林正樹, 末永智一, 葛西重信, 走査型電気化学顕微鏡を用いた THP-1 細胞の呼吸バーストの定量的評価, 第 59 回ポーログラフイーおよび電気分析化学討論会 (石垣市), 2013.11
7. 鈴木礼紀, 石井隆介, 多田美香, 小林正樹, 葛西重信, 低周波電気化学インピーダンス計測法を用いた細胞の挙動評価, 第 59 回ポーログラフイーおよび電気分析化学討論会(石垣市), 2013.11
8. 鈴木誠, 菊地紘幸, 菅井智也, 本望知浩, 多田美香, 小林正樹, 井上久美, 末永智一, 葛西重信, チップ型電気化学バイオセンサを用いた THP-1 細胞の呼吸バースト及び過酸化水素産生の同時計測評価, 電気化学会第 81 回大会, (関西大), 2014.3
9. 菊地紘幸, 鈴木誠, 佐藤大輔, 本望知浩, 多田美香, 小林正樹, 井上久美, 末永智一, 葛西重信, 走査型電気化学顕微鏡を用いた THP-1 細胞の呼吸バーストイメージング, 電気化学会第 81 回大会 (関西大), 2014.3
10. 鈴木礼紀, 石井隆介, 多田美香, 丸尾容子, 加藤善大, 小林正樹, 葛西重信, 低周波電気化学インピーダンス法を用いた免疫細胞の増殖曲線評価, 第 81 回電気化学大会 (関西大), 2014.3

(6) その他の研究成果等特記事項

--

平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 25 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学

研究観点 大学の特色を活かした研究

研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） 生体レドックス反応研究室（多田 美香）

研究課題 酸化ストレスマーカー，活性種の定量・定性分析

(1) 当該年度研究計画の概要

a.極微弱自発発光計測による酸化ストレス画像化法の検討を，冷却型 CCD による画像計測装置を用いて行う。(小林，多田)  
d.分光，蛍光，発光検出を組み合わせた酸化ストレス評価技術を確認するために，生体由来の活性酸素やフリーラジカル，またはその反応物（酸化物），代謝産物を定性・定量的に計測する。(多田，庭野)

(2) 研究組織・体制

本研究プロジェクトでは，生体活性分子種の検出と分析のための独自の技術を保有する学内の研究者を，新たに設置する生体医工学研究センターに結集し，それぞれの技術シーズを相互に活用・統合することで，病態としての生体酸化ストレス状態を分析する技術の開発研究を行う。本プロジェクトでの分担者（多田）の研究課題は，酸化ストレスマーカー，活性種の定量・定性分析である。

(3) 整備した研究施設・設備等

研究プロジェクトで使用する生体医工学研究センター（5 号館 2F）は既存の施設を改装した。H25 年度末までに，共通実験室として，細胞培養室，Time-of-Flight mass spectrometry (TOFMS) 分析室，electron spin resonance (ESR)・紫外可視分光光度計の測定スペースを整備した。

(4) 研究成果の概要（論文等の成果には下線）

研究プロジェクトの計画や目的・意義と関連づけて，年度当初の目標をどれだけ達成したか記述するとともに，新たに得られた知見などについても具体的に記述してください。

H25 年度計画 (a) の関連事項

極微弱自発発光計測による酸化ストレス画像の生化学的解析に関連する基礎研究の一端として，生体構成成分であるリノール酸の自動酸化にともなう生成物の定量・定性分析を試みた。Dr. Yong-Ming Xie (PerkinElmer Sr. Manager, APAC Mass Spectroscopy Business) の協力の下，上海ラボで測定を実施した。分析は，未反応のリノール酸，37°Cで 1hr，または 1day 加温して自動酸化させたリノール酸を AxION® Direct Sample Analysis™ TOFMS system (DSA/TOF)で行った。DSA は，夾雑物を含むサンプルを分離することなく直接分析ができるため，劣化しやすいサンプルや未反応サンプル，反応直後のサンプルの質量分析に有効である。また，ESI 法でイオン化しにくい非極性成分（疎水性成分）の分析にも DSA は適している。本研究では，リノール酸のような組織や細胞膜の構成成分で，かつ酸素に触れると直ちに連鎖反応を開始するような不飽和脂肪酸の反応前後の成分の差異を見出す計測法（方法論）が



必要である。ポジティブモードで得られたリノール酸の[M+H]<sup>+</sup>マススペクトルから、リノール酸の加温時間に依存して m/z 560.49 のピーク強度が顕著に変化した。そこで、m/z 560.49 の組成解析を行った結果、組成式 C<sub>36</sub>H<sub>64</sub>O<sub>4</sub> の 64 成分が推定され、それらの構造式からリノール酸の 2 量体の 3 成分を絞り込んだ。このような結果は、励起カルボニル由来の微弱発光機構において発光分子種を酸化ストレスマーカー候補としたターゲット分子の組成解析に役立つことが期待できる。ただし、DSA での実験系では定量性に限界があるため、H26 年度はリノール酸分析を DSA/TOF と UHPLC/TOF の両システムで行い、発光種由来の反応中間体の TOF 分析を試みる。

#### H25 年度計画 (d) の関連事項

光検出による酸化ストレス評価マーカー分子を検討するために、光線皮膚障害および光線過敏症の原因となる光感受性物質（ポルフィリン骨格、メラニン、フラボノイド、等）による光励起反応機構の検討、黒化モデル反応系としてメラニン合成酵素のチロシナーゼ反応と活性分子種の定性・定量分析を行った。

プレートリーダーでの予備実験より、黒色メラニンは 485 nm 前後の光を吸収して 625 nm 近傍の蛍光を放つことが推察された。従来の研究より 485 nm 近傍の発光現象には励起カルボニル由来の発光が知られている。生体構成成分由来の励起カルボニル形成機構の上流にはリノール酸などの脂質過酸化反応が推定される。このような知見は、暗反応で起こるメラニンと脂質との連鎖反応による微弱発光機構の可能性を示唆させる。

<優れた成果があがった点>  
なし

#### <問題点>

TOFMS の設置にともなう施設整備の準備期間を含めると TOFMS の動作確認までに 5 ヶ月間を要し、採択通知が 2013 年 6 月末に遅れたことも重なり、H25 年度に計画していた TOFMS の装置特性チェックやターゲット分子の分析条件検討が不十分である。また、メラニン形成過程で生成するヒドロキシルラジカル (・OH) を酸化ストレスマーカーとして捉えたデータを査読付き論文に投稿したがアクセプトに至っていない。

#### <次年度への展望>

H25 年度のデータと投稿先を見直し、査読付き論文に再投稿をする。ストレスマーカー因子として、光感受性物質に加えて・OH 生成抑制試薬および臨床ではキレート療法で用いられているデフェロキサミンの活性種（励起種やフリーラジカル）の生成過程を検討する。

#### <研究成果の副次的効果>

(研究成果の活用状況又は今後の活用計画（実用化・企業化の見通しや、特許の申請があればその申請状況・取得状況等）について、記述してください。)

なし

(5) 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)上記(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

<雑誌論文>

なし

<図書>

なし

<学会発表>

- 1) \*第17回ESRフォーラム研究会, 多田美香, 庭野吉己, 小林正樹, 葛西重信, 伊藤智博, 尾形健明, 河野雅弘, チロシン・チロシナーゼ反応阻害と・OH生成との関係(福岡市・九州大学医学部百年講堂) 2013.07.
- 2) \*第26回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 多田美香, 庭野吉己, 小林正樹, 葛西重信, 伊藤智博, 尾形健明, 河野雅弘, メラニン形成機構で生成するフリーラジカルの研究(東京都・昭和大学旗の台キャンパス) 2013.08.
- 3) 電子スピンサイエンス学会年会, 多田美香, 伊藤智博, 尾形健明, レドックス指示薬としてのTEMPOLに関する研究(さいたま市・大宮ソニックシティ) 2013.10
- 4) 第52回電子スピンサイエンス学会年会, 多田美香, In vivo ESRの発展とその医学応用-故横山秀克先生メモリアルシンポジウム-(さいたま市・大宮ソニックシティ) 2013.10
- 5) \*Society for Free Radical Research International 17th Biennial Meeting (SFRR 2014), M. Tada, M. Kobayashi, S. Kasai, M. Kohno, Y. Niwano, Scavenging and quenching effects of melanin on ROS and other reactive species (Kyoto International Conference Center) 2014.03.

(6) その他の研究成果等特記事項

企業との連携実績

2014.01.09 Dr. Yong-Ming Xie (PerkinElmer Sr. Manager, APAC Mass Spectroscopy Business)の表敬訪問および研究依頼

\* 2014.02.20-21 Dr.Yong-Ming Xie (PerkinElmer Sr. Manager, APAC Mass Spectroscopy Business)と上海ラボで実験(2014.03.SFRR 2014 M. Tada, et al.,口頭発表の追加データ取得, 謝辞で連携実績を公開)

平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 26 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学

研究観点 大学の特色を活かした研究

研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） バイオフォトンイメージング研究室（小林 正樹）

研究課題 蛍光・発光検出による生体内活性分子種非侵襲イメージング技術の開発

(1) 当該年度研究計画の概要

マクロな生体レベルにおける、光による酸化ストレス画像計測技術の研究を行う。そのための手法として、①活性酸素種が関与した自発的な生体極微弱発光であるバイオフィオンの画像計測による酸化ストレス分析法と、②生体内部での酸化ストレス状態を蛍光または化学発光プローブを用い、超音波との相互作用を利用して断層画像計測する、超音波タグ光断層画像計測技術の開発を行う。平成 26 年度は、以下の項目に関して研究を行う。

- ① バイオフォトンイメージングによる酸化ストレス評価のための、同時多波長バイオフィトン分光分析装置を開発し、各種生体関連試料のスペクトル解析を行う。
- ② 化学発光プローブを対象とした化学発光の超音波増強イメージングの検討を、様々な化学発光系を用いて行い、生体模擬試料を用いた実験により散乱媒質内での画像計測の可能性について検証するとともに、生体組織を用いた評価を行う。

(2) 研究組織・体制

小林研究室の学生を研究補助として、小林と Ankush Prasad（ポスドク研究員：7 月～）が研究を実施する。

(3) 整備した研究施設・設備等

なし

(4) 研究成果の概要（論文等の成果には下線）

- ① バイオフィオンの発光メカニズム解析を通じて酸化ストレス評価法としての有効性を評価する必要があるため、従来にない光子レベルの極微弱光を対象としたバイオフィトン用同時多波長分光分析装置の開発を行い、生体内での生化学反応の条件で生成する極微弱発光の分光分析システムの開発を行った。
- ② 超音波タグイメージングによる発光プローブの散乱媒質内可視化法の研究として、インドシアニングリーン<sup>TM</sup>の化学発光を利用した化学発光プローブを開発した。生体と同様な光散乱媒質内でその化学発光の超音波増強イメージングが可能となる化学発光系を探索し、生体に安全な超音波パワーレベルにおいて画像計測に十分な化学発光増強が見込める化学発光系を見出した。生体模擬試料による画像計測を通じ、その有効性を示した。

<優れた成果があがった点>

- ① バイオフォトンイメージングによる酸化ストレス評価のための、同時多波長バイ

オプトン分光分析装置の開発を行った。バイオフィトン発光は生体構成物質の酸化過程での化成酸素が関与した発光であるが、そのメカニズムとして脂質過酸化過程での発光が想定されている。脂質過酸化過程では、励起カルボニルおよびそのエネルギー移行による蛍光性物質の励起による発光が知られているため、生体温度での不飽和脂肪酸自動酸化過程での発光スペクトル分析を行い、同時に共存する蛍光色素へのエネルギー移行とスペクトル遷移について分光計測実験を行った。極微弱多波長発光分光分析システムを構築し、生体由来試料のスペクトル分析に成功した。

- ② 化学発光プローブを用いたに光散乱媒質内画像計測法についての検討するモデル系として、発光量子収率の高い過シュウ酸エステル化学発光系に着目し、超音波による化学発光増強イメージングの検討を行った。発光増強率と照射パワーの関係や、光散乱媒質散乱係数と分解能の関係や生体模擬試料による画像計測とその評価を通じて、新しい生体光画像計測法として発表した。“Optical tomography of fluorophores in dense scattering media based on ultrasound-enhanced chemiluminescence.”として *Appl. Phys. Lett.*誌に掲載された。

<問題点>

- ① バイオフィトン発光にかかわる多様な生体分子の分光分析データが必要となるが、現状の感度では *in vitro* での生体分子化学発光の分光分析は可能であるものの、実際の生体試料を *in vivo* 計測するための感度は十分でない。そのため、さらなる高感度化を目指し分光分析部(ポリクロメータ)の改良を行う必要がある。
- ② 過シュウ酸エステル化学発光系は、生体への適合性が悪いため、ルミノール化学発光など、一般に生体計測で用いられている化学発光系をベースとした超音波感受性化学発光プローブの開発が求められる。

<次年度への展望>

- ① バイオフィトン分光分析に最適化した高スループット分光光学系の開発を目指し、バイオフィトンイメージングとの併用による酸化ストレス評価法を検討する。
- ② 超音波による化学発光増強効果を利用した、ルミノール化学発光プローブによる計測法の開発と、実用レベルでの感度を目標とした生体内酸化ストレス画像化装置の開発を目指す。

<研究成果の副次的効果>

論文発表を優先したため権利化は見送った。化学発光プローブの開発と組み合わせで権利化を目指したい。

(5) 研究発表の状況 (研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

<雑誌論文>

1. \*“Optical tomography of fluorophores in dense scattering media based on ultrasound-enhanced chemiluminescence.” M. Kobayashi, N. Kikuchi, A. Sato, *Appl. Phys. Lett.* (査読有) **106** 021103 (2015)
2. \*“Highly sensitive imaging for ultra-weak photon emission from living organisms.” M. Kobayashi, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* (査読有) **139**, pp. 34-38 (2014)
3. “超高感度 CCD によるバイオフィトンイメージング”, 小林正樹, *Electrochemistry* (査読無) **82**, 4, pp. 294-298 (2014)

<図書>

なし

<学会発表>

1. \*平成 27 年東北地区若手研究者研究発表会, 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正樹, ” 化学発光増強を利用した超音波タグ生体光イメージング”, 郡山市, 2015 年 2 月
2. \*平成 27 年東北地区若手研究者研究発表会, 佐藤佑哉, 石田知明, 佐藤瞳, 遠藤祐太, 小林正樹, ” バイオフォトン分光分析のための高感度ポリクロメータの開発”, 郡山市, 2015 年 2 月
3. 平成 27 年東北地区若手研究者研究発表会, 佐々木康宏, 富樫玖苑, 小林正樹, ”Si-PMT を用いた小動物用遺伝子発現 in vivo 計測システムの開発”, 郡山市, 2015 年 2 月
4. \*応用物理学会東北支部第 69 回学術講演会, 菊地直斗, 佐藤彰洋, 小林正樹, ”光散乱媒質内化学発光イメージングの検討”, 仙台市, 2014 年 12 月
5. 平成 26 年度電気関係学会東北支部連合大会, 富樫玖苑, 小林正樹, ”遺伝子発現 in vivo リアルタイム計測のための Si PMT フォトンカウンティングシステムの検討” 米沢市, 2014 年 8 月

(6) その他の研究成果等特記事項

なし

平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 26 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学  
研究観点 大学の特色を活かした研究  
研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） バイオセンサデバイス研究室（葛西 重信）

研究課題 細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発

(1) 当該年度研究計画の概要

前年度開発した 2ch 型バイオセンサーを用いて、細胞の呼吸活性、呼吸バースト検出能を評価する。また、昨年度作製した細胞チップを用いて走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いての THP-1 の通常呼吸活性と呼吸バースト現象時の違いを画像化した。また、低周波電気化学インピーダンス法による増殖曲線の検討を行った。

(2) 研究組織・体制

- 1) 細胞チップを用いた走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いての THP-1 の通常呼吸活性と呼吸バースト現象時の違いを画像化及び低周波電気化学インピーダンス法を用いた増殖曲線評価 (葛西)
- 2) 多チャンネル型バイオセンサーの設計と開発 (末永)

(3) 整備した研究施設・設備等

小型スパッタ装置 (12,000 千円)

(4) 研究成果の概要 (論文等の成果には下線)

THP-1 細胞を用いて活性酸素種産生に伴う急激な酸素消費について、昨年作製した細胞チップを用いて SECM の 2 次元画像化することに成功した。さらに細胞の酸化ストレス状態を計測するため、OS-HRP 修飾電極を用いた、THP-1 細胞の過酸化水素産生についてアンペロメトリー評価を行った。また低周波電気化学インピーダンス法による増殖挙動は増殖曲線との相関が得られた。

さらに開発した 2ch 型バイオセンサーを用いた THP-1 細胞の呼吸バーストに伴う酸素消費と過酸化水素産生の同時にとらえることに成功した。

<優れた成果があがった点>

- ① OS-HRP 修飾電極を用いた、THP-1 細胞の過酸化水素産生の評価をとらえた (学会発表 4), 6)。
- ② 走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いての THP-1 の通常呼吸活性と呼吸バースト現象時の違いを画像化する (学会発表 1), 7)。
- ③ 低周波電気化学インピーダンス法による増殖曲線の検討を行う (学会発表 2), 5)。
- ④ 開発した 2ch 型バイオセンサーを用いた THP-1 細胞の呼吸バーストに伴う酸素消費と過酸化水素産生の同時評価を行う (学会発表 3), 6)。

<問題点>

- ① OS-HRP 修飾電極を用いた、THP-1 細胞の過酸化水素産生の評価について、測定温度、PMA 濃度、食食時での呼吸バーストなどの条件を変えたときの検討がなされていない

い。再現性の確認。

- ② 開発した 2ch 型バイオセンサーを用いた THP-1 細胞の呼吸バーストに伴う酸素消費と過酸化水素産生の同時評価について測定温度、PMA 濃度、食食時での呼吸バーストなどの条件を変えたときの検討がなされていない。再現性の確認

<次年度への展望>

以下の 2 点の内容について論文にまとめる。

- ① 走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いての THP-1 の通常呼吸活性と呼吸バースト現象時の違いを画像化したことに関する論文。
- ② 開発した 2ch 型バイオセンサーを用いた THP-1 細胞の呼吸バーストに伴う酸素消費と過酸化水素産生の同時評価について測定温度、PMA 濃度、食食時での呼吸バーストなどの条件を変えたときの検討を加え、論文にまとめる。

<研究成果の副次的効果>

(研究成果の活用状況又は今後の活用計画 (実用化・企業化の見通しや、特許の申請があればその申請状況・取得状況等) について、記述してください。)

(5) 研究発表の状況 (研究論文等公表状況。印刷中も含む。) 上記 (4) に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

<雑誌論文>

\*1. Kumi Y. Inoue, Masahki Matsudaira, Masanori Nakano, Kosuke Ino, Chika Sakamoto, Yusuke Kanno, Reyushi Kubo, Ryota Kunikata, Atsushi Kira, Atsushi Suda, Ryota Tsurumi, Toshihito Shioya, Shinya Yoshida, Masanori Muroyama, Tomohiro Ishikawa, Hitoshi Shiku, Shiro Satoh, Masayoshi Esashi, Tomokazu Matsue. Advanced LSI-based amperometric sensor array with light-shielding structure for effective removal of photocurrent and mode selectable function for individual operation of 400 electrodes. Lab Chip, 15 (2015) 848-856. DOI: 10.1039/c4lc01099j.

\*2. 橋由佳、井上(安田)久美、高良幸輔、國方亮太、須田篤史、伊野浩介、珠玖 仁、末永智一. 細胞呼吸活性の電気化学的検出に向けたバイオ LSI の開発. Yuka Hashi, Kumi Y. Inoue, Kosuke Takara, Ryota Kunikata, Atsushi Suda, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue. Development of Bio-LSI for the electrochemical detection of cell respiration activity. Chemical Sensors 31 Suppl. A (2015) 118-120.

<図書>

<学会発表>

(学会発表 2014.4~2015.3)

- \* 1 . S. Kasai, H. Kikuchi, M. Suzuki, M. Nakano, K. Y. Inoue, T. Honmo, M. Tada, S. Aoyagi, M. Kobayashi, T. Matsue, Respiratory Burst Evaluation of THP-1 Cell Chip Using a Scanning Electrochemical Microscopy, 225th Meeting of ECS- Orlando, FL, 2014.5
- \* 2 . S.Kasai, Y.Suzuki, R.Ishii, M.Tada, Z.Kato, Y.Maruo, M.Kobayashi, Proliferation Monitoring of Immunocytes Using Low Frequency Impedance Measurement, 225th Meeting of ECS- Orlando, FL, 2014.5

- \* 3. 鈴木誠, 多田美香, 小林正樹, 井上久美, 末永智一, 葛西重信, チップ型電気化学バイオセンサを用いた THP-1 細胞の貪食による呼吸バースト評価, 2014 年電気化学会秋季大会, (北海道大), 2014.9
- \* 4. 菊地紘幸, 松岡涼, 菅井智也, 本望知浩, 青柳重夫, 多田美香, 小林正樹, 多田美香, 末永智一, 葛西重信, 走査型電気化学顕微鏡を用いた THP-1 細胞の刺激剤による呼吸バースト及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生の変換効率評価, 2014 年電気化学秋季大会 (北海道大), 2014.9
- \* 5. 鈴木礼紀, 石井隆介, 多田美香, 丸尾容子, 加藤善大, 小林正樹, 葛西重信, 低周波電気化学インピーダンス法を用いた免疫細胞の薬剤刺激による挙動評価, 電気化学秋季大会 (北海道大), 2014.11
- \* 6. 菅井智也, 鈴木誠, 菊地紘幸, 松岡涼, 青柳重夫, 井上久美, 湯浅真, 末永智一, 葛西重信, Os-HRP 修飾電極を用いた免疫細胞の過酸化水素産生評価, 第 60 回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会 (京都工芸繊維大), 2014.11
- \* 7. 本望知浩, 菊地紘幸, 鈴木誠, 菅井智也, 鈴木礼紀, 葛西重信, マイクロ電極を用いた免疫細胞の貪食に伴う呼吸バースト評価, 第 60 回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会(京都工芸繊維大), 2014.11

(6) その他の研究成果等特記事項



平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 26 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学

研究観点 大学の特色を活かした研究

研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） 生体レドックス反応研究室（多田 美香）

研究課題 酸化ストレスマーカー，活性種の定量・定性分析

(1) 当該年度研究計画の概要

c. 酸化ストレスメカニズムを解析するため，蛍光プローブや化学発光プローブによる細胞レベルでの活性酸素や酸化ストレスマーカーを観察し，in vivo 計測へのデータを提供する。(多田，庭野)

(2) 研究組織・体制

本研究プロジェクトでは，生体活性分子種の検出と分析のための独自の技術を保有する学内の研究者を，新たに設置する生体医工学研究センターに結集し，それぞれの技術シーズを相互に活用・統合することで，病態としての生体酸化ストレス状態を分析する技術の開発研究を行う。本プロジェクトでの分担者（多田）の研究課題は，酸化ストレスマーカー，活性種の定量・定性分析である。

(3) 整備した研究施設・設備等

研究プロジェクトで使用する生体医工学研究センター（5号館 2F）に蛍光顕微鏡での観察スペースを整備した。

(4) 研究成果の概要（論文等の成果には下線）

研究プロジェクトの計画や目的・意義と関連づけて，年度当初の目標をどれだけ達成したか記述するとともに，新たに得られた知見などについても具体的に記述してください。

H26 年度計画 (c) の関連事項

ポリフェノール成分として抗酸化力を有するプロアントシアニジンなどの天然色素を光増感物質として着目し，その新規機能性を調べるために共同研究者の庭野チームにて先行実験を行った。その結果，プロアントシアニジンやフラボノイド類と活性酸素である過酸化水素が共存した条件下，UVA に近い波長の可視光（400 nm）を照射すると，抗菌性が上昇することがわかった。このような成果は，食品等に含まれるポリフェノール成分摂取前後，または化粧品に含まれる抗酸化成分を塗布した皮膚の微弱発光の発光特性（蛍光波長）の変動を調べることで，皮膚に存在する黄色ブドウ球菌などの除菌度合と微弱発光強度との相関解析によって感染症などの予防医学に役立つ要素が含まれている。

生物色素である黒色メラニンの形成機構において，美白作用をもつアルブチンやコウジ酸によって，メラニンの生成を抑制しつつ・OH 生成も低減させる抗酸化能作用を見出した。さらに，・OH 生成抑制試薬として用いられているデフェロキサミンのニトロキシラジカル生成がチロシナーゼ反応過程で認められた。デフェロキサミンの副作用には過敏症があり，累計 598 例中発疹等の皮膚障害 3 件（0.5%）である

([http://www.kegg.jp/medicus-bin/japic\\_med?japic\\_code=00053483](http://www.kegg.jp/medicus-bin/japic_med?japic_code=00053483) :2015年3月 第8版改訂 文献請求先ノバルティスファーマ株式会社)。一方、チロシナーゼは酸素添加反応を触媒する酵素でありヒドロキシレーションの実験モデルに有用である。このような成果を皮膚や脳などに滞留するメラニン合成経路と医薬品との関連性を調べる方法論として応用し、副次的なラジカル反応(連鎖反応)が起因する新たな酸化ストレスマーカー候補のスクリーニングに展開したい。

<優れた成果があがった点>

メラニン初期反応で生成するヒドロキシルラジカルを指標とした抗酸化能評価の方法論に関する研究論文(M. Tada, et al. BMC Biochemistry, 15(1),23 2014.10)が出版されて3ヶ月間で Highly accessed articles (Total accesses to this article since publication: 954 from 09 Oct 2014 to 12 Jan 2015) になった。

<問題点>

H25年度計画の継続研究でリノール酸(C18H32O2)を DSA/TOF と UHPLC/TOF の両システムで行った結果、発光種由来の励起カルボニルに由来する生成物を同定することはできなかった。リノール酸が酸化されたリノレン酸(C18H30O2)を推定させるマススペクトルが検出された。そこで、リノレン酸/リノール酸のピーク比と 37°C 加温によるリノール酸自動酸化時間との相関関係を調べたが、酸化ストレス度合の評価基準としての有用性は認められなかった。また、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸の異性体の配合率を TOFMS では解析できない。このような問題が生じたため、年度当初の目標達成度は6割である。そこで、H27年度は実験計画を見直し、TOFMS の分析ターゲットをポリフェノールなどの天然物にシフトする。

<次年度への展望>

#### デフェロキサミンに関する論文投稿

臨床で汎用されている医薬品の反応中間体(フリーラジカル・励起種)に注目しヒトを対象とした計測技術開発を支援するための基礎データを公開する。

#### H26年度実績をベースにした企業との共同研究

非侵襲画像計測技術へ還元できるような生体由来の蛍光・発光種をストレスマーカーとして、生体に安全な食品や化粧品などに含まれるポリフェノール成分に注目する。

<研究成果の副次的効果>

(研究成果の活用状況又は今後の活用計画(実用化・企業化の見通しや、特許の申請があればその申請状況・取得状況等)について、記述してください。)

リノール酸(C18H32O2)の TOFMS 分析によるリノレン酸/リノール酸のピーク比解析データの特許性について株式会社パーキンエルマージャパンの古石博士(工学)と協同で競争メーカーの先行技術(特許, 等)をリサーチした。特許申請は H27 年度に再検討の予定。

(5) 研究発表の状況（研究論文等公表状況。印刷中も含む。）上記（4）に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

<雑誌論文>

- 1) \*Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA, M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, BMC Biochem 15(1), 23 2014. 査読有
- 2) \*Bactericidal Activity and Mechanism of Photoirradiated Polyphenols against Gram-Positive and -Negative Bacteria, K. Nakamura, K. Ishiyama, H. Sheng, H. Ikai, T. Kanno, Y. Niwano, J Agric Food Chem. Epub 2015 Feb 16. 査読有

<図書>

--

<学会発表>

- 1) \*Biological and Materials Science Oriented Applications (2nd AWEST 2014), M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, Tyrosinase inhibitors alleviate oxidative stress induced by melanin synthesis: tested by an ESR-spin trapping method (Awaji Island, Hyogo) 2014.06.
- 2) \*The 3rd International conference on cellular environmental stressors in biology and medicine: Focus on Redox reactions, M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, Arbutin alleviates oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA: tested by electron paramagnetic resonance (EPR)-spin trapping method (Ferrara, Italy) 2014.06.
- 3) \*The 3rd International conference on cellular environmental stressors in biology and medicine: Focus on Redox reactions, M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, Tyrosinase inhibitors alleviate oxidative stress induced by melanin synthesis: tested by an EPR-spin trapping method (Ferrara, Italy) 2014.06.

(6) その他の研究成果等特記事項

--

平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 27 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学

研究観点 大学の特色を活かした研究

研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） バイオフォトンクス・イメージング研究室（小林 正樹）

研究課題 蛍光・発光検出による生体内活性分子種非侵襲イメージング技術の開発

(1) 当該年度研究計画の概要

マクロな生体レベルにおける、光による酸化ストレス画像計測技術の研究を行う。そのための手法として、①活性酸素種が関与した自発的な生体極微弱発光であるバイオフィオンの画像計測による酸化ストレス分析法と、②生体内部での酸化ストレス状態を蛍光または化学発光プローブを用い、超音波との相互作用を利用して断層画像計測する、超音波タグ光断層画像計測技術の開発を行う。平成 27 年度は、以下の項目に関して研究を行う。

- ① バイオフォトン分光分析に最適化した高スループット分光光学系を開発し、各種生体試料の分光データとの比較による酸化ストレス画像評価法を検討する。
- ② 超音波によるルミノール化学発光の増強効果を利用した、酸化ストレス検出超音波感応プローブの開発と、生体内酸化ストレス画像化のための高感度システム化研究を行う。

(2) 研究組織・体制

小林研究室の学生を研究補助として、小林と Ankush Prasad（ポスドク研究員）が研究を実施する。

(3) 整備した研究施設・設備等

なし

(4) 研究成果の概要（論文等の成果には下線）

研究プロジェクトの計画や目的・意義と関連づけて、年度当初の目標をどれだけ達成したか記述するとともに、新たに得られた知見などについても具体的に記述してください。

- ① バイオフォトンを利用した酸化ストレス分析のための、発光種や発光機構の特徴化による酸化ストレス評価法の確立を目標とし、これまで計測が困難であった自発バイオフィオン発光の分光分析が可能な同時多波長分光分析装置の開発を行った。これを用いヒト体表を対象とした計測を系統的に行うことで発光パターンによる特徴抽出法の検討を行った。
- ② 超音波タグイメージングによる発光プローブの散乱媒質内可視化法の研究として、化学発光増強のメカニズムの検討を行い、活性酸素種や蛍光性色素の定量化の可能性を検討した。またルミノール化学発光系を利用した断層画像計測法について検討を行い、同時に高感度化を目的とした超音波の電子走査化による効果的増強イメージング法の開発を行った。今後、生体模擬試料による画像計測を通じ、

その有効性を示す予定である。

<優れた成果があがった点>

- ① 昨年度開発した分光分析装置の更なる高感度化を図り、自発バイオフィトン発光の分光分析が可能な超高感度同時多波長分光分析装置を開発した。これにより、脂質過酸化過程における励起分子種からの励起エネルギー移行による発光機構や発光種の推定が可能となった。とくに、ヒト体表のバイオフィトン発光のスペクトルパターンから、その最終励起種の候補として生体色素が有力であることを見出した。その成果は光化学光生物学専門誌に原著論文として掲載された (M. Kobayashi, T. Iwasa, M. Tada: Polychromatic spectral pattern analysis of ultra-weak photon emissions from a human body. J. Photochem. Photobiol. B: 159, 186-190 (2016))。また H25 年度に行った関節リウマチモデルマウスのバイオフィトン画像モニタリングの実験に関連して、誘導マウスの血中代謝産物の分析をオランダライデン大学と共同で行い、炎症性シグナルメディエーターとしてのオキシリピンと酸化ストレスの関係について明らかにした。その成果は炎症メディエーター専門誌に原著論文として掲載された (M. He, et.al, Collagen induced arthritis in DBA/1J mice Associates with oxylipin changes in plasma. Mediators of Inflammation Vol. 2015, 543541, 1-11 (2015))。
- ② 光散乱媒質内化学発光プローブ画像計測法について、実際の生体組織試料を用いた実験により深さ 25mm において約 3mm の横分解能での断層イメージングに成功した。また発光増強メカニズムについての検討を行い、発光増強度が活性酸素や蛍光色素濃度に比例することなど、定量イメージング法としての可能性を示した。その成果はソノケミストリー専門誌に原著論文として掲載された (M. Kobayashi, N. Kikuchi, A. Sato: Ultrasound-enhanced chemiluminescence tomography in biological tissue. Ultrasonics Sonochemistry Vol. 31, 1-6 (2016))。ルミノール化学発光系についても発光増強が認められ、活性酸素検出に有効であることを示した。

<問題点>

- ① バイオフィトン分光データの酸化ストレス指標化のための参照データの収集が不十分である。
- ② 超音波電子走査システムに必要なフェイズドアレイ超音波トランスデューサの入手に時間を要したため、プロトタイプ機の試作が完了した段階であり今後評価実験を行いながら、制御・データ処理ソフトウェアの改良を継続する必要がある。

<研究期間終了後の展望>

- ① バイオフィトン分光分析と各種試料のスペクトルパターンのデータベース化を図りそれによる酸化ストレス評価法を確立する。
- ② 超音波による化学発光増強効果を利用した生体内酸化ストレスイメージングに関しては、本テーマでの科研費を申請中であり、来年度以降試作システムの評価研究を継続し、電子走査化による高感度化とともに高空間分解能化を図る予定である。

<研究成果の副次的効果>

電子走査による高分解イメージング法について権利化を目指す。超音波感応プローブの開発を担当する他大学との共同研究が今年度からスタートした。

(5) 研究発表の状況 (研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

<雑誌論文>

(全て査読あり)

1. M. Kobayashi, T. Iwasa, M. Tada:  
Polychromatic spectral pattern analysis of ultra-weak photon emissions from a human body.  
J. Photochem. Photobiol. B: Biology Vol. 159, 186-190 (2016)  
doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.03.037
2. Y. Yamaguchi, K. Okada, T. Mizuno, T. Ota, H. Yamada, M. Doi, M. Kobayashi, H. Tei, Y. Shigeyoshi, H. Okamura:  
Real-time recording of circadian Per1 and Per2 expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving rats.  
J Biol Rhythms Vol. 31, No. 1, 108-111 (2016)  
doi: 10.1177/0748730415621412
3. M. Kobayashi, N. Kikuchi, A. Sato:  
Ultrasound-enhanced chemiluminescence tomography in biological tissue.  
Ultrasonics Sonochemistry Vol. 31, 1-6 (2016)  
doi:10.1016/j.ultsonch.2015.11.027
4. M. He, E. Van Wijk, R. Berger, M. Wang, K. Strassburg, J. C. Schoeman, R. Vreeken, H. A. Van Wietmarschen, A. Harms, M. Kobayashi, T. Hankemeier, J. V. van der Greef:  
Collagen induced arthritis in DBA/1J mice associates with oxylipin changes in plasma.  
Mediators of Inflammation Vol. 2015, Article ID 543541, 1-11 (2015)  
doi:10.1155/2015/543541

<図書>

<学会発表>

1. 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小川和訓, 小林正樹  
ルミノール化学発光の超音波増強効果を用いた散乱媒質内イメージング  
第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 講演番号 21p-S422-4, 講演予稿集 03-528  
(東京都・東京工業大学, Mar. 21, 2016)
2. 岩佐琥偉, 佐藤佑哉, 及川大揮, 小林正樹  
ヒト皮膚由来バイオフィオトンの同時多波長スペクトルパターン分析  
第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 講演番号 21p-S422-5, 講演予稿集 03-52  
(東京都・東京工業大学, Mar. 21, 2016)
3. 小川和訓, 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正樹  
超音波による化学発光増強を用いた生体ルミノールイメージング法の検討  
平成 28 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-14-C7, 講演資料 pp. 77-  
78 (郡山市・日本大学, Mar 1, 2016)
4. 及川大揮, 佐藤佑哉, 岩佐琥偉, 小林正樹  
同時多波長分光による植物由来バイオフィオトンのスペクトル分析  
平成 28 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-14-C8, 講演資料 pp. 79-  
80 (郡山市・日本大学, Mar 1, 2016)
5. 岩佐琥偉, 佐藤佑哉, 及川大揮, 小林正樹  
ヒト指先から放出されるバイオフィオトンの発光スペクトル特性  
平成 28 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-14-C9, 講演資料 pp. 81-

82 (郡山市・日本大学, Mar 1, 2016)

6. 菊地直斗, 佐藤彰洋, 青木孝輔, 小林正樹  
超音波による化学発光増強を用いた生体イメージング  
第76回応用物理学会秋季学術講演会, 講演番号 14p-2N-5, 講演予稿集 03-267 (名古屋市・名古屋国際会議場, Sep. 14, 2015)
7. 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正樹  
超音波による化学発光増強効果を利用した光散乱媒質内化学発光プローブイメージング  
平成27年度電気関係学会東北支部連合大会, 講演番号 1C11, (岩手県滝沢市・岩手県立大学, Aug. 27, 2015)

(6) その他の研究成果等特記事項

--

平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 27 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学  
研究観点 大学の特色を活かした研究  
研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） バイオセンサデバイス研究室（葛西 重信）

研究課題 細胞活性モニタリング用バイオチップデバイスの開発

(1) 当該年度研究計画の概要

開発したバイオチップデバイスにより、酸化ストレス計測性能の評価を行う。同時に細胞診断スクリーニング装置としての応用の可能性について検討する。(葛西, 末永)

(2) 研究組織・体制

研究組織  
Ankush Prasad (ポスドク)、葛西研究室大学院生 3 人、東北大学大学院環境科学研究科末永研究室 2 名 (教授 末永智一、講師井上久美)。  
1) 細胞の酸素消費と過酸化水素産生計測可能な 2 c h 型バイオセンサーの開発及び SECM による呼吸バースト評価 (葛西)  
2) バイオ LSI による酸素消費及び過酸化水素の同時検出評価及び細胞の呼吸活性評価 (末永、井上)

(3) 整備した研究施設・設備等

主な研究装置 (葛西研究室内) : 環境制御走査型電気化学顕微鏡  
及び走査型電気化学顕微鏡 使用者 Ankush Prasad 大学院生 3 名 約 60 時間/月

(4) 研究成果の概要 (論文等の成果には下線)

<優れた成果があがった点>  
開発した Os-HRP 修飾電極のバイオセンサーを用いて Photosystem II (PSII) の過酸化水素産生の経時的変化をアンペロメトリーでとらえた(学会発表 1、論文 1)。  
2ch 型バイオセンサーを用いて THP-1 細胞の呼吸バーストに伴う酸素消費と過酸化水素産生の同時計測をとらえた (論文 2)。  
SECM を用いた呼吸バーストイメージングをとらえた(論文 3)。  
マイクロ電極を用いて測定温度、PMA 濃度、食食時での呼吸バーストなどの条件を変えたときの検討を行った (学会発表 2～4)。  
FePo カーボン修飾電極を用いた THP-1 細胞の活性酸素のリアルタイムモニタリング (学会発表 5)  
以下の論文について投稿及び投稿準備中である。  
1. A. Prasad, A. Kumar, A. Takahashi, R. Fujii, R. Matsuoka, H. Kikuchi, S. Aoyagi, T. Aikawa, T. Kondo, M. Yuasa, P. Pospíšil, S. Kasai, Real-time monitoring of superoxide anion radical generation in response to wounding: in-vivo electrochemical study, submitted.



2. A. Prasad, T.Sugai, T. Honmo, R. Matsuoka, S. Aoyagi, M.Yuasa, Mika Tada, Masaki Kobayashi, Shigenobu Kasai, Real-time monitoring Respiratory Burst by THP-1 using electrochemical and chemiluminescence method, in prepalation.
3. A. Prasad, Y. Suzuki, R. Ishii, M. Tada, Y. Maruo, M. Kobayashi, S. Kasai. Proliferation monitoring of immunocytes using low frequency impedance measurement, in prepalation.
4. S. Kasai,A.Prasad, Y.Sugiura, K.Ino, Y.K.Inoue, T. Matsue, Real-time imaging of oxygen production in photosynthetic using a Bio-LSI, in prepalation.
5. S. Kasai, A. Prasad, A. Takahashi, R. Matsuoka, T.Sugai, H. Kikuchi, S. Aoyagi, M. Yuasa. Real-time monitoring of superoxide anion radical generation in THP-1 cells using iron-porphyrin modified carbon electrode, in prepalation.

<問題点>

今年度までに共同研究で開発したバイオ LSI を用いて呼吸バーストにおける酸素消費のイメージング技術を検討予定である。

<次年度への展望>

これまでの研究成果を発展させるために研究費申請を予定している。

<研究成果の副次的効果>

(5) 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)上記(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

<雑誌論文>

\* 1. Ankush Prasad, Aditya Kumar, Makoto Suzuki, Hiroyuki Kikuchi, Tomoya Sugai, Masaki Kobayashi, Pavel Pospíšil, Mika Tada, Shigenobu Kasai Detection of hydrogen peroxide in Photosystem II (PSII) using catalytic amperometric biosensor, Technical Advances in Plant Science 6, 862, 1-10 (2015).

\* 2. A. Prasad, H. Kikuchi, K. Inoue, M. Suzuki, Y. Sugiura, T. Sugai, A. Tomonori, M. Tada, M. Kobayashi, T. Matsue, S. Kasai, Simultaneous Real-Time Monitoring of Oxygen Consumption and Hydrogen Peroxide Production in Cells Using Our Newly Developed Chip-Type Biosensor Device, Frontiers in Physiology 7, 109, 1-10 (2016).

\* 3. Hiroyuki Kikuchi, Ankush Prasad, Ryo Matsuoka<sup>3</sup>, Shigeo Aoyagi<sup>3</sup>, Tomokazu Matsue<sup>4</sup> and Shigenobu Kasai, Scanning Electrochemical Microscopy Imaging during Respiratory Burst in Human Cell, Frontiers in Physiology 7, 25, 1-6 (2016).

<図書>

葛西重信, 「2016年の化学:最新のトピックス」呼吸バースト現象を非侵襲に画像化する-細胞が産生する過酸化水素を電気化学チップで計測, 化学同人 Vol.71, No.3, 68-69 (2016).

<学会発表>

(学会発表 2015.4～2016.3)

- \*1. Shigenobu Kasai, Makoto Suzuki, Hiroyuki Kikuchi, Ankush Prasad, Kumi Inoue, Mika Tada, Masaki Kobayashi, Tomokazu Matsue, Simultaneous measurements of oxygen consumption and hydrogen peroxide generation during respiratory burst in THP-1 using an electrochemical method, 227th Meeting of ECS- Cicago, Illinois, 2015.5
- \*2. 杉浦大和, 菊地紘幸, 鈴木誠, 菅井智也, 本望知浩, 高橋明美, 井上久美, 末永智一, 葛西重信, 電気化学デバイスを用いた THP-1 細胞の薬剤濃度変化及び温度変化に伴う酸素消費と過酸化水素産生のリアルタイムモニタリング, 第 61 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会(兵庫県イーグレ姫路), 2015.11
- \*3. 菅井智也, 菊地紘幸, 杉浦大和, 本望知浩, 高橋明美, 松岡涼, 青柳重夫, 湯浅真, 葛西重信, 電気化学的手法を用いた THP-1 細胞の薬剤濃度変化及び温度変化に伴う酸素消費挙動評価, 第 61 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会(兵庫県イーグレ姫路), 2015.11
- \*4. 本望知浩, 菊地紘幸, 菅井智也, 杉浦大和, 高橋明美, 葛西重信, 電気化学的手法を用いた温度変化に伴う THP-1 細胞の食能による酸素消費挙動評価, 第 61 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会(兵庫県イーグレ姫路), 2015.11
- \*5. 杉浦大和, 橋由佳, 井上久美, 伊野浩介, 末永智一, 葛西重信, バイオ LSI を用いた植物組織の酸素産生リアルタイムイメージング, 平成 28 年電気学会全国大会, 東北大学 (川内北キャンパス) ,2016.3
- \*6. 杉浦大和, 橋由佳, 井上久美, 伊野浩介, 末永智一, 葛西重信, バイオ LSI を用いた光合成における酸素産生リアルタイムイメージング, 電気化学会第 83 回大会, 大阪大学 (吹田キャンパス) ,2016.3
- \*7. 高橋明美, 松岡涼, 菅井智也, 菊地紘幸, 青柳重夫, 相川達男, 近藤剛史, 湯浅真, 葛西重信, 鉄ポルフィリン修飾電極を用いた THP-1 細胞由来のスーパーオキシド検出, 電気化学会第 83 回大会, 大阪大学 (吹田キャンパス) ,2016.3
- \*8. S. Kasai, A. Prasad, A. Takahashi, R. Matsuoka, T.Honmo, T.Sugai, H. Kikuchi, S. Aoyagi, T. Aikawa, T. Kondo, M. Yuasa., Mika Tada, Masaki Kobayashi, Real-time monitoring of superoxide anion radical generation in THP-1 cells using iron-porphyrin modified carbon electrode. 227th Meeting of ECS-Hilton Bayfront and the San Diego Convention Center, 2016.6.1 発表予定 (査読審査結果、発表受理) .
- \*9. A. Prasad, A. Takahashi, R. Fujii, R. Matsuoka, H. Kikuchi, S. Aoyagi, T. Aikawa, T. Kondo, M. Yuasa, M. Tada, M. Kobayashi, P. Pospíšil, and S. Kasai, Real-Time Monitoring of Superoxide Anion Radical and Hydrogen Peroxide Generation in Higher Plants in Response to Wounding: In-Vivo Electrochemical Study, 227th Meeting of ECS-Hilton Bayfront and the San Diego Convention Center, 2016.6.1 発表予定 (査読審査結果、発表受理) .

(6) その他の研究成果等特記事項

--

平成 25 年度～27 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

平成 27 年度 自己点検評価票

学校法人／大学名 東北工業大学  
研究観点 大学の特色を活かした研究  
研究プロジェクト名／研究テーマ 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究

研究室名（研究者名） 生体レドックス反応研究室（多田 美香）

研究課題 酸化ストレスマーカー，活性種の定量・定性分析

(1) 当該年度研究計画の概要

c. フリーラジカル，酸化ストレスマーカーを分析することにより，a.で試作した小動物用酸化ストレス計測装置の評価を行う。また，臨床応用に向けた評価基準を明らかにする(多田，庭野)

(2) 研究組織・体制

**生体レドックス反応研究室；多田（1名）**

研究チーム間の連携状況：

2015.04.02

「JENESYS2.0 事業」の一環として ASEAN11 カ国の大学生が生体医工学センターを見学。各研究室の紹介（情報公開）

2015.04.30～10.15

バイオセンサデバイス研究室と活性酸素生化学研究室

Ankush らの論文"Detection of hydrogen peroxide in Photosystem II (PSII) using catalytic amperometric biosensor" のデータディスカッション，論文作成，レビュアーのコメント対応を行った。

2015.12～2016.03

バイオフィotonics・イメージング研究室

情報交換・微弱発光計測装置の共同利用，メールでのデータディスカッション

共同研究機関との連携状況：

東北大学歯学部生体適合性計測工学寄附講座 庭野教授と株式会社ハーバー研究所（HABA）との連携研究

2015.05.31 論文打合せ（多田，庭野（外部），他 1 名，場所：生体医工学センター）

2015.07.20 論文データ解析（多田，庭野（外部），他 1 名，場所：生体医工学センター）

2015.09.25-27 連携研究成果報告・醸造所視察（多田欠席，開催地：余市町，会議資料あり）

2015.10.10 研究打合せ（多田，庭野（外部），他 1 名）

2015.11.22 研究打合せ（多田，庭野（外部），他 1 名）

2015.12.06 研究打合せ（多田，庭野（外部），他 1 名）

2015.12.16 研究報告（多田，庭野（外部），他 2 名）

2016.04.02 研究打合せ予定（多田，庭野（外部），他 1 名）

その他（企業）との連携状況：	
2016.02～	サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社 （予備実験 場所：生体医工学センター（2/10））
2016.03	サントリーウェルネス株式会社（研究相談，大阪市（3/5））

（3）整備した研究施設・設備等

研究施設の面積：生体レドックス反応研究室 約 24m <sup>2</sup>	
紫外可視分光光度計の測定スペース約 8 m <sup>2</sup>	
研究設備の名称：紫外可視分光光度計 使用者数：4 名（主に多田）	
利用日数：2015.10.13（Ankush，大学院生，学生），2015.04～2016.03（多田）	
研究設備の名称：Time-of-Flight mass spectrometry（TOFMS）	
使用者数：3 名	
利用日数：	
2015.04	ポリフェノール分析
2015.05.31	デモ（庭野教授（外部），社会人ドクター（外部））
2015.06.	HABA 依頼サンプルの試験分析（予備実験）
2015.07.20	論文データ 解析（庭野教授（外部），社会人ドクター（外部））
2015.12	コーヒー代謝物分析の予備検討
2016.02	依頼分析（サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社）
2016.03	リノール酸分析
修理・メンテナンス日数：	
2015.04.15-16	UHPLC チェック（PerkinElmer 担当者，多田）
2015.06.01-04	UHPLC チェック（PerkinElmer 担当者，多田）
2015.07.13-14	UHPLC/TOF チェック（PerkinElmer 担当者，多田）
2015.07.23-24	UHPLC/TOF チェック（PerkinElmer 担当者，多田）
2015.08-12	UHPLC/TOF 安定性チェック（多田）
2016.03.11-25	一斉停電前後の装置点検・修理（PerkinElmer 担当者，多田）
研究設備の名称：エライザ分析スペース	
利用日数：2016.02.10 96well プレート洗浄機器の設置	

（4）研究成果の概要（論文等の成果には下線）

<p>研究プロジェクトの計画や目的・意義と関連づけて、年度当初の目標をどれだけ達成したか記述するとともに、新たに得られた知見などについても具体的に記述してください。</p> <p><b>H27 年度計画（c）の関連事項</b></p> <p>☆ <u>H26 年度までの実績から実験計画を見直し，チロシナーゼのヒドロキシレーションを実験モデルとすることで，メラニン合成経路における医薬品の安定性を評価</u></p>
--

する方法論として、デフェロキサミン由来のニトロキシラジカル生成に関する論文を発表した(論文1)。デフェロキサミンの反応中間体(フリーラジカル)の存在は、デフェロキサミン自体が電子移動のメディエーターとして働く可能性を示しており、レドックス指示薬としての活用も期待できる。

#### 外部評価委員からのコメント対応

- ☆ ‘複数のメンバーで研究チームを構成しているので、メンバーが直接関わることができるサブテーマが設定されていればよかった’を考慮して、チーム間を横断した当該年度計画である‘臨床応用に向けた評価基準を明らかにする’ことを目的とし、過去の臨床データの再解析を行った。サイトカイン・ケモカインなどの炎症マーカーと ESR 法で検出したスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) やヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) などの酸化ストレスマーカーとの網羅的解析 (Genomic Approaches and Oxygen Radical Measurement at Biomarker Candidates of Off-season Predictor of Pollinoses: A Pilot study, E. Ichiishi, M. Tada, Y. Ohta, M. Sami, T. Kanda, M. Ikeda, M. Kohno, Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 13, 41-50, 2015, 査読有) に基づき、自己免疫疾患であるスギ花粉アレルギー患者において、炎症マーカー ( $TNF\alpha$ , IL-6) と  $O_2^{\cdot-}$  との間に相関関係があった。これは、バイオフィotonクス・イメージング研究室の炎症性自己免疫疾患の関節リウマチモデルマウスのバイオフィotonの画像データにおいて、 $O_2^{\cdot-}$  生成の関与を示唆させるものである。
- ☆ 先に述べたサイトカイン・ケモカイン測定値は、ABC\*法による過酸化水素 - ペルオキシダーゼ反応を応用したルミノール化学発光ベースのエライザキットでヒト血漿および血清を分析したものである。過去の論文研究では、ESR 法の他にルミノール化学発光でもヒト顆粒球から生成する活性種(活性酸素, 活性窒素, 他)を測定している。ルミノールの化学発光は、ルミノールが励起状態になるための活性種であれば非特異的に発光現象を生じる。そのため、ラジカル構造をもつ活性酸素の定性・定量分析が可能な ESR データとルミノール化学発光の相関解析を行った。その結果、PMA 刺激後の顆粒球ではルミノール感受性の高い活性種または複数の活性酸素の共存が示唆された。この相関解析データは、バイオセンサデバイスの研究に関連しており、酸化ストレスの自発発光(バイオフィoton)と酸化ストレス励起種の相関解析につなげるために、免疫染色やエライザ分析スペースを整備した。
- \*ABC 法: ESR での検出ができない分子構造, すなわち、フリーラジカル構造ではない過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 検出に注目した蛍光プローブや免疫染色法が汎用されている。代表的な生理学的手法には、組織学的に重要な抗原や、その他の目的分子の局在性を確認するための免疫ペルオキシダーゼ法が知られている。免疫ペルオキシダーゼ法は、一次抗体, ビオチン標識二次抗体, およびあらかじめ調製したアビジン- ビオチン標識酵素複合体 (Avidin: Biotinylated Enzyme Complex) を用いるため、ABC 法とよばれている。
- ☆ 外部評価委員から高評だったメラニン初期反応で生成するヒドロキシラジカルを指標とする抗酸化能評価法を応用し、①食品として摂取②化粧品として皮膚に塗布、のような二つの有用性に考慮した機能性成分について検討した成果を日本農芸化学会 2016 年度大会で発表した(2016 年 3 月 28 日)(学会発表\*)。発表内容について、2016 年度大会の顧問(北翔大学・北翔大学短期大学部 学長 西村弘行先生)、化粧品関係者(株式会社ハーバー研究所: HABA) および連携研究者の庭野教授と今後の方向性についてメール会議を行った。研究テーマと H28 年度計画は 5 月中旬に相談予定。

### **バイオセンサデバイス研究室（統括；葛西教授）との連携研究**

クロロフィルの光化学系IIにおける過酸化水素をターゲットにしたアンペロメトリー評価法と ESR スピントラップ法によるスーパーオキシドの定性・定量分析データの論文投稿，査読者からのコメント対応を行った（論文3）。この研究成果は，予防医学に通じる生薬や機能性食材の酸化ストレス状態の非侵襲画像計測技術の基盤形成に必要である。

### **バイオフィotonics・イメージング研究室（統括；小林教授）との連携研究**

H25 年度計画 (a) を継続し，極微弱自発発光計測による酸化ストレス画像の生化学的解析の一端として TOFMS による生体構成成分であるリノール酸反応物の定性分析を試みている。Society for Free Radical Research International 17th Biennial Meeting (SFRRRI 2014, M. Tada, M. Kobayashi, S. Kasai, M. Kohno, Y. Niwano, Scavenging and quenching effects of melanin on ROS and other reactive species.) で口頭発表した酸化リノール酸とメラニン色素との相互作用を示唆する発光計測データに関する論文が受理された（論文4）。

外部評価委員からの指摘事項に対応するべく，酸化ストレス励起種と化学発光増強画像との関連性の端緒を示せるよう，小林教授らの論文につながるリノール酸由来の励起種（励起カルボニルなど）や反応中間体の生成メカニズムの端緒を示すためのデータを蓄積している。一部の成果は，査読付国際学会 Proceeding（に投稿した（審査中））。

### **H26 年度実績をベースにした企業との共同研究**

2015 年 5 月末より，東北大学歯学部（庭野チーム）と HABA との連携研究をスタートした。先行論文 [K. Nakamura, et al., Bactericidal Activity and Mechanism of Photoirradiated Polyphenols against Gram-Positive and -Negative Bacteria, J Agric Food Chem. 2015 Sep 9;63(35):7707-13.] を応用し，ワイン製造工程で排出される圧搾ブドウ残渣から抽出した水溶成分に照射し，殺菌作用を検討した。生体レドックス反応研究室では，水抽出液中に含まれる機能性成分にフラボノイド類（カテキン類）が含まれていることを TOFMS で定性的に分析した。一部の成果は査読付き論文 Biocontrol Science Vol.21, No.2 (2016) に掲載予定（論文2）。

### **その他（企業からの依頼分析）**

社会貢献の一端として，サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社研究部から，飲料開発のための試供サンプル分析の依頼をうけた。上席研究員の中原博士（農学）とともにコーヒー熱水抽出方法の条件検討を実施した（2016 年 2 月 10 日）。後日，TOF でコーヒー成分のカフェインに着目した定性・定量分析を試みた。カフェインレス・ノーマルのカフェイン含有量の割合は依頼者に報告済みである。加えて，カフェインレス・ノーマルのコーヒー豆成分の酸化状態を ESR および微弱発光計測法での評価を試みた。コーヒー豆由来の安定フリーラジカルや自家発光強度に対するカフェインの影響は認められなかった。このような評価系は，カフェインを除去するためのスイスウォーター製法によるコーヒー豆の成分変化，および焙煎によるポリフェノールのメイラード反応物（黒色色素）の非破壊的なスクリーニング法として提案したい。

### **<優れた成果があがった点>**

☆キレーション療法などに関連する医薬品 Deferoxamine のフリーラジカル生成に関する論文が日本分析化学会の英文誌 Analytical Sciences Special Issue: Cutting-Edge Analytical Chemistry Research by Women Scientists に掲載された。

☆外部評価委員のコメントをうけて，メンバーが直接かかわることができるサブテー

マを設定し、チーム間の連携研究の成果を論文で発表することができた。  
☆株式会社ハーバー研究所との研究成果が Biocontrol Science Vol.21, No.2 (2016) に掲載予定である。本プロジェクト終了後も連携体制を継続する。

<問題点>

外部評価委員にご指摘いただいた問題点について、TOFMS 以外の他の分析手法によって標的分子の同定するための追加実験を試みることはできなかった。

<次年度への展望>

外部評価委員のコメントのとおり、プロジェクトの任期が終了後も学内外の研究チームとの連携研究を継続する。継続テーマは4月以降に絞り込む。

<研究成果の副次的効果>

(研究成果の活用状況又は今後の活用計画(実用化・企業化の見通しや、特許の申請があればその申請状況・取得状況等)について、記述してください。)

☆メラニンの研究成果を発展させるために H28 年度科研費(基盤 C)を申請した(代表者:多田)。

☆学内の若手研究者と次のステップに向けて本プロジェクトの成果が基盤となる研究テーマを検討した。情報交換会:2015/12/1, 12/7, 12/15, 12/17(計4回)

☆脳機能研究チーム(学内1名,学外1名)と共同で一般財団法人全日本コーヒー協会 H28 年度助成金を申請した(代表者:多田)。

☆サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社 研究部飲料開発のための試供サンプル分析のご依頼をうけた。上席研究員の中原博士(農学)とともに条件検討を実施した(2016年2月10日)。商品化に向けた研究相談はプロジェクト終了後に計画している。

☆サントリーウェルネス株式会社 健康科学研究所 研究主幹 小野博士(理学)と研究成果の活用について議論した(2016年3月5日)。2016年8月30-31日に開催される第69回日本酸化ストレス学会学術集会までに活用計画を提案する予定。

(5) 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)上記(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

<雑誌論文>

1) \* Generation Mechanism of Deferoxamine Radical by Tyrosine-Tyrosinase Reaction, M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, Analytical Sciences, 31, 911-916, 2015, 査読有

2) \* Bactericidal action of photo-irradiated aqueous extract from residue of crushed grape for wine preparation, M. Tsukada, H. Sheng, M. Tada, T. Mokudai, S. Oizumi, T. Kamachi, Y. Niwano, Biocontrol Science, in press, 査読有

3) \* Simultaneous Real-Time Monitoring of Oxygen Consumption and Hydrogen Peroxide Production in Cells Using Our Newly Developed Chip-Type Biosensor Device, A. Prasad, H. Kikuchi, K. Inoue, M. Suzuki, Y. Sugiura, T. Sugai, A. Tomonori, M. Tada, M. Kobayashi, T. Matsue, S. Kasai, Frontiers in Physiology 7, 109, 1-10, 2016, 査読有

4) \* Polychromatic spectral pattern analysis of ultra-weak photon emissions from a

human body, M. Kobayashi, T. Iwasa, M. Tada, accepted. 査読有

< 図書 >

< 学会発表 >

日本農芸化学会 2016 年度大会, 多田美香, 河野雅弘, 庭野吉己, “Tyrosinase 反応で生成する・OH に対する機能性成分の低減効果” (札幌市, 2016.03.28)

(6) その他の研究成果等特記事項

社会活動

研究成果や社会貢献が認められ, 下記の学会役員に就任した。

代議員 一般社団法人電子スピンスイェンス学会 2016.01～

[http://sfrj.umin.jp/officers\\_list.htm](http://sfrj.umin.jp/officers_list.htm)

評議員 日本酸化ストレス学会 2015.06～

<http://www.sest.gr.jp/page2-3.html>



外 部 評 価 票

「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」外部評価票

プロジェクト番号 S1312001  
学校法人／大学名 東北工業大学  
研究観点 大学の特色を活かした研究  
研究プロジェクト名 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究  
研究期間 平成25年6月～28年3月

評価観点 生体光画像計測

1. 研究プロジェクトの意義について

生体内での酸化ストレスが各種疾患や老化に深く関わっているものの、酸化ストレスを *in vivo* 非侵襲的に計測する技術がないため、その解析はほとんど行われていないのが現状である。これに対し本研究プロジェクトは、酸化ストレスの画像計測技術と活性種の同定解析技術の開発により、新たな酸化ストレス評価法の創出と医療・福祉機器への応用を目指した、意欲的なものである。少子高齢化社会における要請である「健康寿命の延伸」への新たな道標を示し得る可能性がある。

2. 研究内容について

<評価できる点>

関節リウマチモデルマウスのバイオフィトン画像計測と炎症性シグナルメディエーター解析により、酸化ストレスとオキシピリンの関係を示したことは、酸化ストレス計測による疾患解析や予兆診断の可能性をうかがわせる成果として評価できる。

超音波による化学発光増強効果を見出し、これを利用したルミノール化学発光プローブの生体内イメージングの可能性を示した点は、生体内の酸化ストレスを非侵襲で計測する道を拓く画期的成果として評価できる。

OHラジカルを指標とした抗酸化能評価の方法論の構築は、酸化ストレスの解析を大きく前進させられる点で評価できる。また酸素と過酸化酸素の同時計測 2ch 型バイオセンサの開発は、細胞を対象とした酸化ストレスの計測技術への展開が期待できる点で評価できる。

<問題点>

バイオフィトン画像および化学発光増強画像と酸化ストレス励起種の相関解析には至っていないのが残念である。画像計測技術の難易度が高いため時間的制約があるものの、その端緒を示して欲しかった。

酸化ストレスの自発発光（バイオフィトン）画像と酸化ストレス励起種の相関解析とデータベース化は、本手法が疾病予兆診断へつなげるためには避けて通れない道であることから、継続的な研究の推進が計られるべきである。

3. 研究成果の発表、社会への発信について

研究成果として、論文発表は論文誌に7報、letter誌に1報、学会発表は国内が25件、海外が7件であり、研究成果相応の発信ができていているといえる。

4. その他

本研究プロジェクトにより、酸化ストレスの画像計測技術と活性種の同定解析技術の開発が緒に就いたところであり、新たな酸化ストレス評価法の創出と医療・福祉機器への応用へ、継続的な研究が必要である。

評価日 平成27年11月20日

外部評価委員

所属機関名・職名：埼玉医科大学 保健医療学部 医用生体工学科・教授

氏名： 戸井田 昌宏



「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」外部評価票

プロジェクト番号 S1312001  
学校法人／大学名 東北工業大学  
研究観点 大学の特色を活かした研究  
研究プロジェクト名 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究  
研究期間 平成25年6月～28年3月

評価観点 バイオセンサー

1. 研究プロジェクトの意義について

生体酸化ストレスを非侵襲で画像計測・定量計測する技術は、関連疾患の診断を革新する可能性があり、その装置化を目標に掲げる本プロジェクトの意義は大きい。参画する3研究室は、以前から生体活性種の分析に優れた業績を有しており、研究計画には説得力がある。

2. 研究内容について

<評価できる点>

生体酸化ストレス画像計測装置の開発を目標に掲げ、その実現に向けた3研究室の役割と必要性が明解であり、さらに各研究室がハイレベルな成果をあげている。研究室間での協力体制が効果的に機能していることも、共著論文 (Frontiers in Plant Science 2015) からうかがえる。

「バイオセンサデバイス研究室」では、SECMを改良し過酸化水素の極局所における定量計測と、その空間分布表示を可能とした。これは細胞・組織レベルの酸化ストレス応答を電気化学的に定量計測できる独特・唯一の技術として高く評価できる。さらに、呼吸活性の同時マッピング (2chセンシング) や、3次元培養系に対応したシステム構築も進んでおり、本技術の可能性は更に拡充し続けている。

<問題点>

重大な問題は生じておらず、順調である。

今後、可能であれば、イメージング研究室とセンサデバイス研究室の計測対象 (現状では関節リュウマチと免疫細胞の呼吸バースト) を共通化することで、さらにプロジェクトが強化できる。

3. 研究成果の発表、社会への発信について

学会発表の件数が非常に多く、積極的に発信する姿勢が評価できる。学術論文に関しても、現在投稿中・印刷中が多数あり、掲載予定雑誌はいわゆる一流誌である。ホームページでの広報も上手く出来ている。

4. その他

評価日 平成27年11月28日

外部評価委員

所属機関名・職名： 東北大学・教授

氏名：

西澤 松彦





「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」外部評価票

プロジェクト番号 S1312001  
学校法人／大学名 東北工業大学  
研究観点 大学の特色を活かした研究  
研究プロジェクト名 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究  
研究期間 平成 25 年 6 月～28 年 3 月

評価観点 生体レドックス反応, 酸化ストレスマーカー計測

1. 研究プロジェクトの意義について

酸化ストレスの非侵襲的画像化を目指す研究プロジェクトであり、将来的に医療分野への応用も期待される研究対象である。生体は光波に対して高吸収かつ高散乱体であるため、生体由来の微弱的な光の計測は非常に挑戦的な課題である。この分野で実績のある研究代表者が主導し、生体酸化ストレス計測に関連する研究者がチームを構成した研究プロジェクトであり、当該分野の基礎研究及び技術開発に資する計画である。東北工業大学の特色ある研究テーマに焦点をあてた計画は、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業として意義が認められる。

2. 研究内容について

<評価できる点>

TOFMS 装置を導入し、ESR 分光に加えて生体レドックス関連分子の分析能力を向上させたことは、今後の研究活動に大いに役立つ。H26 年度には、メラニン初期反応で生成するヒドロキシラジカルを指標とする抗酸化能評価法に関して成果を上げている (BMC Biochemistry, 2014)。

<問題点>

(1) 代謝生成物の分析がバイオフィトンによる酸化ストレス画像計測に直接貢献するには至っていない。今後、直接的な共同研究が進むことを望む。複数のメンバーで研究チームを構成しているので、メンバーが直接関わることができるサブテーマが設定されていれば良かったかもしれない。  
(2) TOFMS を用いてリノレン酸の質量スペクトルを検出しているが、異性体の分析ができずに同定がストップした点は残念である。その後、分析のターゲットをポリフェノールなどに変更した点は次善の策として理解できる。他の分析手法を用いて標的分子の同定ができれば、研究としては一段前進できたと思われる。

3. 研究成果の発表, 社会への発信について

生体レドックス反応研究室から、第一著者として、H25 年度は国内の学会と研究会 4 件、国際会議 1 件、H26 年度は国際会議 3 件の発表を行っている。H27 年度は 9 月までであるが発表は記載されていない。論文は BMC Biochemistry (2014) と Analytical Sciences (2015) に発表している (他に 1 編が受理済み)。TOFMS 装置や研究を立ち上げるまでの時間と人員、研究環境を考慮すると、実質的には 1.5 年程度の研究期間と考えられるため、発表論文が 2 編というのは平均的なレベルである。

化粧品メーカー (ハーバー研究所) との共同研究においてフラボノイド類の TOFMS 分析を担当しており、社会貢献の一つとして評価する。ただ、東北大学・庭野教授が共同研究の主導的な役割を果たしており、多田氏は補助的な役割に留まっているように見受けられる。今後の貢献を期待したい。

4. その他

若手研究者育成に考慮するよう採択時に指摘されており、予算が重点的に配分されていた。高額な TOFMS 装置を導入するなど、若手研究者 (多田氏) の研究サポートが行われた点は評価したい。研究期間は H28 年 3 月で終了するが、引続き成果をまとめて論文発表することを望む。

評価日 平成 27 年 11 月 18 日

外部評価委員

所属機関名・職名: 北海道大学・教授

氏名: 平田 拓

