



ISSN 2434-5873

# 研究報告 2020

(KISTEC Annual Research Report, 2020)

(地独) 神奈川県立産業技術総合研究所

Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology



# 研究報告2020 目次

## 【機械・材料技術部】

◆ X線透視画像を用いた立体視の実用化について	1
◆ ラマン分光による混合試料の個別粒度分布解析	3
◆ 人工オパール陶磁器への応用	6
◆ 特性インピーダンスおよび伝搬定数を用いた垂直入射吸音率の理論予測	9
◆ 金属3Dプリンターにより造形したTi-6Al-4V合金の疲労強度	11
◆ フッ素ドーパ酸化スズ膜の加熱による透過率変化	13
◆ X線による半田実装部の品質確認について	14
◆ レーザー照射による炭素系膜の表面改質	16
◆ 振動試験機を用いたねじの緩み評価試験	18
◆ 超微細多結晶CBNホイールの研削特性	20
◆ 流体潤滑領域における炭素系硬質薄膜(DLC)の摩擦特性評価	22
◆ ZnO微粒子を添加した圧電性高分子膜の開発	24

## 【電子技術部】

◆ 耐電圧試験における不確かさの検討	27
◆ KISTECにおける放射エミッション測定の不確かさの評価	29
◆ 電子線描画装置を用いた加速電圧50kVでの逆テーパー形状レジストパターンの形成	34
◆ 光給電RoFレシーバを用いたノイズ環境下におけるEMI測定	36
◆ ミリ波帯送信器の開発と測定技術の検討	39
◆ ナノインプリント用金型を目的としたNi-Wめっき面の改善	42

## 【情報・生産技術部】

◆ ネットワーク連携ロボット開発環境の構築	45
◆ IoTデバイス間の時刻同期に関する研究	47
◆ 表面処理を施した部材の疲労強度解析	49
◆ 木材乾燥用散水システム構築に向けた基礎的実験	51
◆ レーザ照射によるLMD肉盛層の特性改善	53
◆ ボールエンドミルによる加工面品位の検討	55

## 【化学技術部】

◆ プラスチック材料の引張試験及びその破面	59
◆ 六価クロム分析用水道水標準物質の長期安定性評価	61
◆ 消毒用アルコールジェル中のエタノール定量分析の検討	63
◆ 油脂類の酸化危険性の評価手法の検討	65
◆ 非線形粘弾性解析手法の検討	67
◆ ポリメタクリル酸メチルの劣化に関する総合的解析(1)	70

## 【川崎技術支援部】

◆実証型光触媒フィルタ評価方法の開発	73
--------------------	----

【抄録】	75
------	----

## 【研究開発部】

### 有望シーズ展開事業

#### 「力を感じる医療・福祉介護次世代ロボット」プロジェクト

◆総括	81
◆アキシナル積層モータの特性解析	86
◆力触覚技術による治療行為支援が可能な医療用デバイスの開発	89
◆脳性麻痺児のための3軸座位保持支援装置の開発	94
◆業績	96

#### 「革新的高信頼性セラミックス創製」プロジェクト

◆総括	101
◆常温緻密化プロセスによるEu賦活CaAlSiN <sub>3</sub> 粒子分散MgOバルク体の開発	104
◆メソスケール破壊特性評価法の確立	107
◆光コヒーレンストモグラフィ観察による一軸加圧下の粉体層中の空隙形態変化過程の4次元定量解析	110
◆業績	113

#### 「腸内細菌叢」プロジェクト

##### 解析ツール開発グループ

◆総括	117
◆肥満者、または、耐糖能異常者に特有の腸内細菌と代謝物の探索	120
◆業績	123

##### 腸内環境制御グループ

◆総括	125
◆腸内環境制御基盤技術の開発に向けた難培養性腸内細菌の培養法確立および生体に与える影響の評価	128
◆腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの作成	131
◆業績	134

#### 「次世代機能性酸化物材料」プロジェクト

◆総括	137
◆放射光を用いた負熱膨張メカニズムの解明	140
◆業績	144

「貼るだけ人工臓腑」プロジェクト	
◆総括	147
◆Totally synthetic, mechanical strong microneedle patch	150
◆生体内におけるマイクロニードルからのインスリン放出動態の解析	154
◆ポリマーコーティングによるマイクロニードルの力学的強度の増大および機能評価	157
◆業績	159

## 実用化実証事業

### 「人工細胞膜システム」グループ

◆総括	161
◆イオンチャネル機能評価システムを用いた細胞内イオンチャネルのイオン電流計測	163
◆確率論的バイオセンサの検出迅速化に関する研究	166
◆難溶性の匂い物質検出に向けたガス導入機構開発	169
◆イオンチャネルの解析のための信号処理技術開発	173
◆業績	177

### 「高効率燃料電池開発」グループ

◆総括	181
◆カーボンフリーPt系ナノ粒子連結触媒の開発	185
◆酸高密度型細孔フィリング薄膜および高温低湿度対応膜電極接合体の開発	190
◆業績	194

## 国際評価技術サービス提供事業

### 「抗菌・抗ウイルス研究」グループ

◆総括	197
◆KISTEC機器の共用化とISO 17025改正に伴う試験室運営	200
◆防藻性能評価試験方法のJIS化に向けた取り組み	203
◆可視光下でのモリブデン酸化物の抗ウイルス活性に関する研究	206
◆業績	209

### 「食品機能性評価」グループ

◆総括	211
◆食品機能性評価に特化したモデル動物の開発	214
◆食品機能性評価研究－脳機能評価と血液トランスクリプトーム解析	218
◆摂取物の違いとマイクロRNAの変動	223
◆業績	226

## 戦略的研究シーズ育成事業

研究テーマ：毛包原基の大量調製法を用いた毛髪再生医療	
◆総括・業績	227
研究テーマ：ナノカーボン光源分析装置開発	
◆総括・業績	232
研究テーマ：3Dナノ界面を有する異種接合技術の開発	
◆総括・業績	237
研究テーマ：新産業創出に向けた無標識AIセンサー	
◆総括・業績	243
研究テーマ：脳梗塞治療のためのスキャフォールド材料	
◆総括・業績	250
研究テーマ：セキュア量子基盤技術の研究	
◆総括・業績	255

## 政策課題受託研究

「グローバルヘルスリサーチコーディネーティングセンター（GHRCC）」プロジェクト	261
---	-----

# X線透視画像を用いた立体視の実用化について

伊東 秀高（機械・材料技術部 解析評価グループ）

## 1. はじめに

当所では電子基板や電子部品、機械部品等を主な対象とし、X線透視画像により内部の構造や欠陥を調査する技術支援を従来より行っている<sup>1)2)</sup>。詳細に観察対象の内部の状況を3次的に把握する必要がある場合には、おもにX線CTスキャン装置が利用されるが、コスト面や時間のかかる試験となるので、昨年度より両眼の立体視機能を活用し、左右両目に適切な透視画像を入力することにより観察サンプル内部を3次的に把握する方法を検討している<sup>3)</sup>。これまでの検討では、適切な透視画像を左右両眼に入力できれば、大部分の被験者が立体的な認識が得られることを確認している。しかし、左右両眼に入力する透視画像を作成するのに煩雑な作業や時間を必要とし、技術支援の現場ですぐに利用できる状況にない。そこで、技術支援の現場で直ちに両眼立体視による透視観察画像を迅速に作成するための環境の整備をおこなったので紹介する。

## 2. 両眼用透視画像の撮影方法と問題点

両眼立体視用透視画像は図1のような位置関係で撮影し、右眼用・左眼用画像をスマートフォン等の画面に並べて表示し図2に示したVRゴーグルを使用して観察する。VRゴーグルには眼間調整および両目それぞれに視度調整があり被験者自身に調整する必要がある。

両眼用の透視画像を最も簡単に撮影するには、X線透視装置SMX-2000（島津製作所製）の傾動機能を用いる方法となる。この方法は、図3のように観察サンプル、X線源、

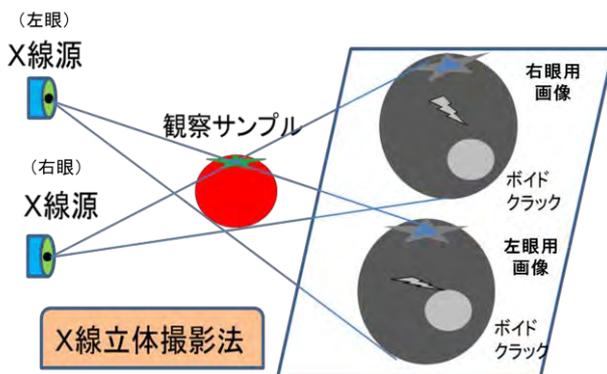


図1 X線立体撮影法の原理



図2 VRゴーグルの例

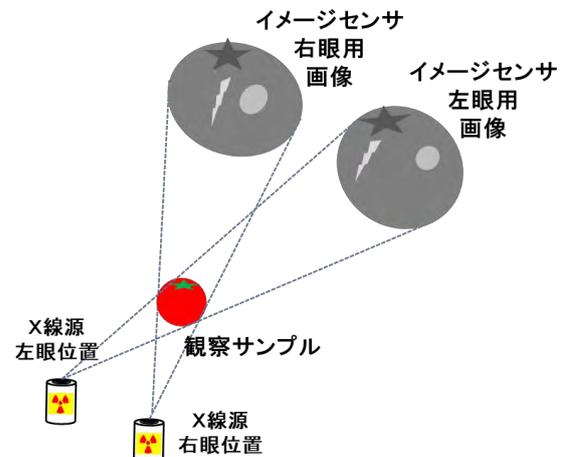


図3 傾動機能を用いた両眼立体視用撮影方法

イメージセンサを配置し左右両眼用にそれぞれ別々に撮影する必要があります。この方法は最も簡便で手軽な方法であるが、傾動角度には限界があるので観察サンプルを360°回転する撮影には対応できない。また、X線源から照射されるX線の強度は図4に示すように周辺ほど弱くなる傾向があるので観察角度を大きく変化させる場合には、画像の濃淡が観察角度により変化してしまうが、観察角度が小さくても十分な場合には有用である。

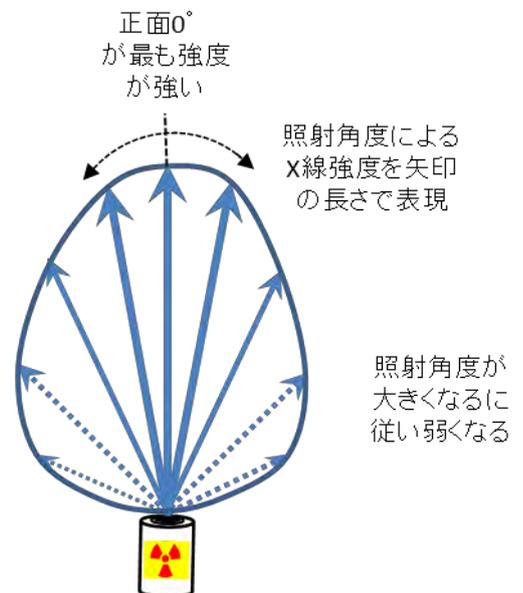


図4 照射角度によるX線強度変化

次に装置の機能を利用し立体視用画像を撮影する方法として考えられる方法は、回転トラッキングの機能を用いる方法である。この機能を用いると、図5に示すように、装置内部下部に設置固定されたX線源があり、その焦点をOとする、その斜め上に観察サンプルの中心をS、さらに、この2点を結んだ延長先にイメージセンサがあり、センサ

面の法線ベクトルは  $\vec{SO}$  方向となる。回転トラッキング機能を利用すると、X線源の焦点  $O$  を頂点とし、 $O$  をとおる鉛直線を中心に観察サンプル  $S$  とイメージセンサ  $I$  は逆円錐状に回転する。さらにこの運動を観察サンプルの中心に相対的に理解すると図 6 のように観察サンプルの中心を  $S_R$  とし、その斜め下方に置かれたX線源よりX線を照射し、斜め上方に置かれたイメージセンサ上に透過像が投影される。観察サンプルの中心  $S_R$  をとおる鉛直線を回転軸としてイメージセンサは頂点を  $S_R$  とした逆円錐状に回転する。また、この回転に対応してX線源は頂点を  $S_R$  とした円錐状に回転する。

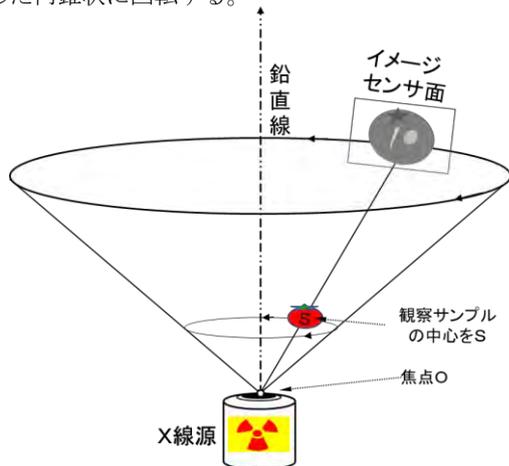


図 5 回転トラッキング機能時の観察サンプルとイメージセンサの動き：X線源の焦点  $O$  を中心とした絶対的な動き

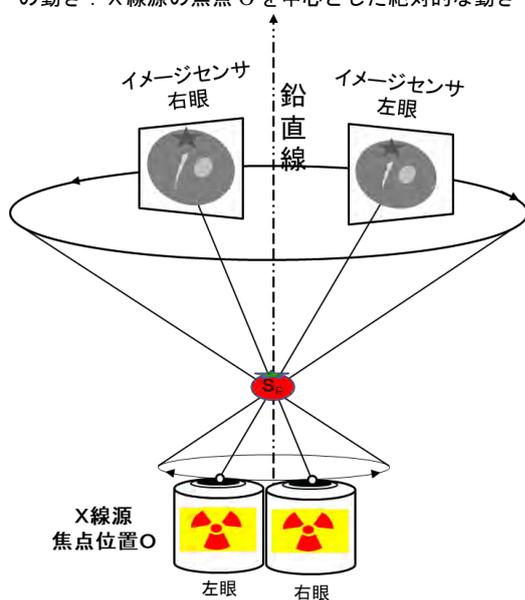


図 5 回転トラッキング機能時の観察サンプルとイメージセンサの動き：観察サンプルを中心とした相対的な動き

この方法は鉛直線に対して  $45\sim 60^\circ$  程度の角度のついた観察となるが  $360^\circ$  全周を観察でき、観察サンプルのアスペクト比が大きく板状の電子基板における特定箇所の BGA 接合部やスルーホール等を中心に多方向から観察でき、自動的に回転角度を逐次的に変化させながら透視画像を順番に蓄積するティーチングプログラムを組むことが

できる。このように蓄積した透視画像から両眼用画像を配列しなおし GIF アニメーションとして簡易的な動画としても作成が可能であり、技術支援現場で利用できる。

### 3. 装置内部に観察サンプルを把持し回転させる方法の検討について

前章までの方法では観察サンプルを回転軸により回転させながら回転軸に垂直の方向から観察することは不可能であったが装置内部にマイコンで制御されるサーボモータを設置することによりこれが可能となる。図 7 に装置の構成を示す。

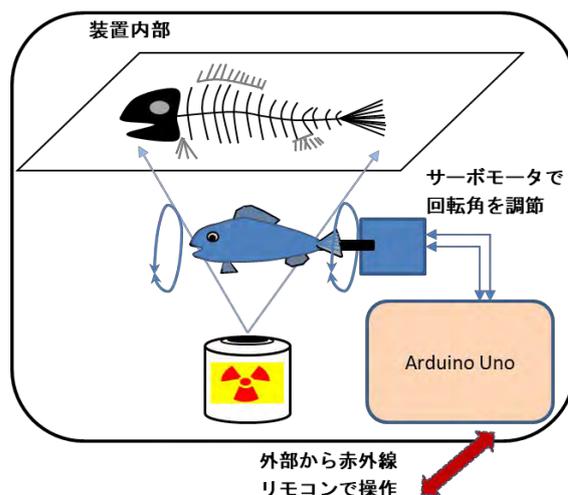


図 7 装置内にマイコン制御のサーボモータを設置

装置内に外部から制御可能なサーボモータを用意し外部から赤外線リモコンを用いて回転角を制御する。X線源とイメージセンサの位置姿勢は固定しその間に置かれた観察サンプルそのものを回す仕組みであるため、一定の角度で回転軸を回しながら、逐次的に透視画像を蓄積することが可能となる。

### 4. まとめ及び今後の展開

X線透視装置の機能を用いて両眼立体視用画像を撮影する方法について、傾動機能を用いる方法と回転トラッキング機能を用いる 2つの方法について検討し、観察角度を逐次的に変化させながら蓄積した透視画像から両眼立体視用の GIF アニメーションを生成する手順を整理した。これらの成果を簡易的な立体視の方法として技術支援に活用する予定である。

#### 【参考文献】

1. 増田, 伊東, 曾我; BGA の接続不良解析事例, 神奈川県産業技術センター研究報告 15, 68 (2009).
2. 伊東, 増田; BGA 接合部の品質確認, 神奈川県産業技術センター研究報告 16, 53 (2010).
3. 伊東, 増田; 両眼立体視機能を用いた X線透視観察の試み, KISTEC 研究報告 2019, 1 (2019).

# ラマン分光による混合試料の個別粒度分布解析

奥田 徹也（機械・材料技術部 ナノ材料グループ）

## 1. はじめに

当所では、マイクロメートルサイズ以上の粒度分布計測を目的として、2年前に画像解析式粒度分布計を導入した。一般的なフロータイプではなく、精密XYZステージを備えた光学顕微鏡下で観察するタイプである。装置本体は、ラマン顕微鏡（堀場製作所製 XploRA Plus、レーザー波長532nm）で、粒度解析ソフトウェアが付属している。このタイプの装置は、フロータイプに比べて粒子カウント数では劣るものの、時間をかけて詳細に観察ができ、当所のような多様な未知試料の評価が求められる状況に対応できる。また、粒度解析を行った粒子に対して、自動的にラマンスペクトルが取得できるので、複数の成分粒子をもつ混合試料に対して、スペクトルで分別する個別粒度解析が可能となる。そこで装置導入時より、このラマン分別法の用途展開を模索してきたところである。

しかし、装置側の問題ではなく、ラマン分光特有の蛍光の問題や凝集など試料側の問題で、多くの実サンプルそのままでは、本手法は適用できないことが分かった。そこで昨年度の報告<sup>1)</sup>では、計測の妨害となる成分を有機溶媒で洗浄・溶解除去した後の残留粒子に対して粒度解析を行うという、対象を限定する方針で実サンプルを評価した。本報告でも引き続き、同様の方針で解析した事例などを紹介し、本手法の利点と問題点を浮き彫りにしたい。

なお当所の装置は、観察試料作製用に真空分散器を備えている。真空チャンバー上部の薄いフィルムの上に試料粉末を載せて、フィルムを破って試料を拡散させつつ、真下に置いた基板に落下させる。汎用性が高く、破壊的な力を与えずに分散性の良好な観察試料を得ることができる。

## 2. 実験及び結果

### 2.1 入浴剤

昨年度の報告とは異なる市販の入浴剤を評価した。アセトンで何度も洗浄した後、沈殿した不溶な固形物を乾燥させて、真空分散器でスライドガラス上に展開し、10倍の対物レンズで観察した。10×8ミリの領域を2視野撮像して粒度解析した後、30 $\mu$ m以上の粒子一つ一つに対し、全自動でラマン測定を行った。なお、これ以下の小粒子までを対象とする場合は、対物レンズを高倍にする必要があり、視野の広さ（あるいは、粒子カウント数）と所要時間がトレードオフになるため、目的に応じてバランスの良い観察条件を採用することになる。図1にラマンスペクトルを示す。(a)重曹、(b)フマル酸、(c)ガラス基板である。ほとんどの粒子はこの3種のうちのいずれかで、蛍光の弱い明瞭なスペクトルが得られた。(c)基板のスペクトルが出る

原因は、レーザー光のずれや透過などが考えられる。この3種のスペクトルをモデルデータとして、CLS（最小二乗法）解析を行い、各粒子を最もスコアの高いモデルに帰属した。その結果、円形度0.6以上の粒子587個中、重曹粒子222個、フマル酸粒子276個を得た。円形度の低い粒子を除くのは、凝集粒子の可能性が高いためである。

図2に成分で色分けした光学顕微鏡（光顕）像、図3にECD（円相当径）の分布ヒストグラムを示す。図2に見られる四角い区切りは元々の視野であり、精密ステージによるモンタージュ機能を使った画像合成で視野を広げている。重曹は約90 $\mu$ mに平均値のピークがあり、粒度が比較的揃っている。一方、フマル酸は大粒子も多いが、50 $\mu$ m以下の小さい粒子が多く、測定を打ち切った30 $\mu$ m未満までピークが広がっている（よって平均値には意味はない）。この入浴剤は蛍光が弱かったため、全自動で帰属まで完了し、かなり短時間で結果を得ることができた。

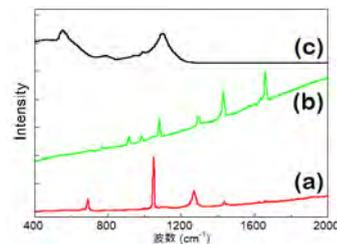


図1. ラマンスペクトル

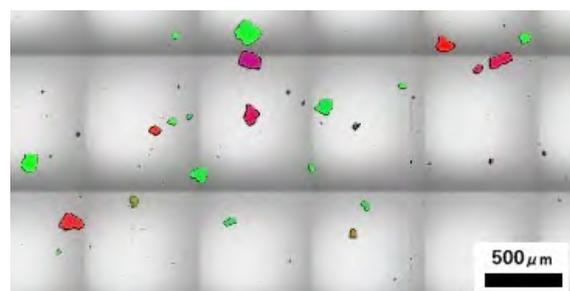


図2. 分別して色分けした光顕像  
赤：重曹，緑：フマル酸

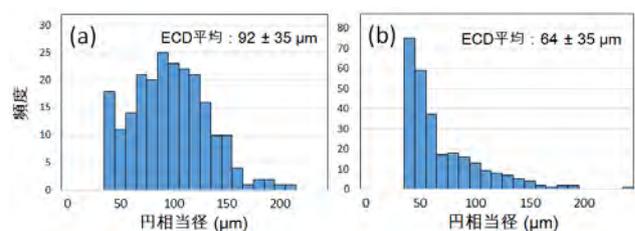


図3. 個別粒度分布ヒストグラム (a) 重曹, (b) フマル酸

## 2. 2 土中の粒子

試料は、当所に隣接した国道脇の田んぼ近くの地面表層から採取した。アセトンで何度も洗浄するとともに、浮遊する泥質の細粒を除いた。乾燥後、真空分散器でスライドガラス上に展開し、10倍の対物レンズで10 x 8ミリの領域を3視野撮像して粒度解析した後、20 $\mu$ m以上の粒子一つ一つに対し、自動でラマン測定を行った。スペクトルが必ずしも明瞭でなかったため、帰属を手動で行った結果、円形度0.6以上の粒子1064個の中に、石英131個、長石372

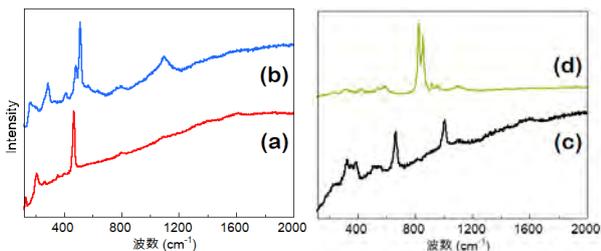


図4. 土中粒子のラマンスペクトルの例

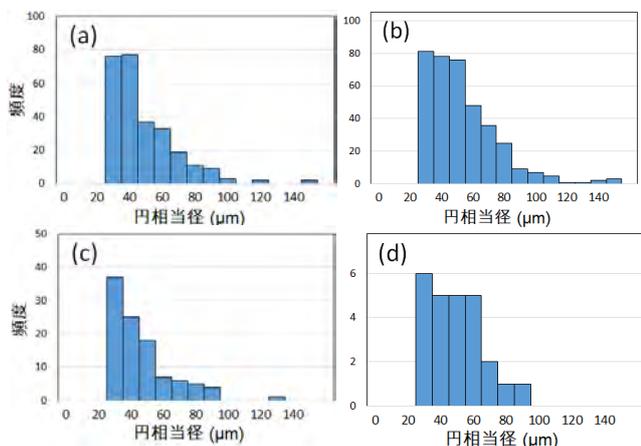


図5. 個別粒度分布ヒストグラム

(a) 石英, (b) 長石, (c) 輝石, (d) かんらん石

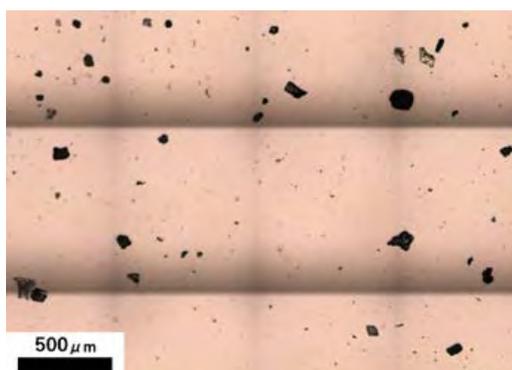


図6. 光顕像

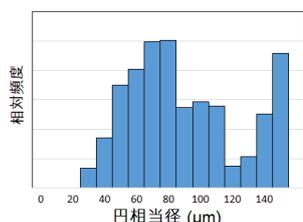


図7. 長石の体積分布ヒストグラム

個、輝石72個、かんらん石17個が検出された。主成分は長石で、石英とかんらん石が共存していることから、様々な起源の土が混ざっていると推測される。残りは、炭素を含む別の物質または蛍光が強く解析不能な粒子であった。

図4にラマンスペクトルの例を示す。(a)石英、(b)長石、(c)輝石、(d)かんらん石である。図5にECDの分布ヒストグラムを示す。長石以外はカウント数が不足していたため、さらに3視野撮像して追加したが、石英はまだ不十分に見える。いずれの鉱物も未測定で20 $\mu$ m未満にピークが伸びており、小粒子が多数存在している(図6)。長石について体積分布に換算した結果を、図7に示す。120 $\mu$ m以上の粗大粒子を除いた場合のD<sub>50</sub>は69 $\mu$ mであり、小粒子が総体積中に占める割合はそれほど大きくない。

## 2. 3 海辺の砂

粗大な粒子の例として、京都府宮津市の海岸で採取した砂の粒度を評価した。この砂浜は付近の花崗岩質の山の風化物質からなり、それらが海で洗われ、泥質の細粒や植物などが除かれた後に、打ち寄せられて形成されたと考えられる。よってラマン測定の手間となる不純物があまり付着していないので、バイアスの要因となる洗浄は行わず、採取したままで測定に供した。手動で試料をスライドガラス上に展開して7枚分を撮像したところ、サイズが40 $\mu$ m以上で円形度が0.6以上の粒子を3406個得た。粒子一つ一つに対してラマン分析を行って、手動で帰属した結果、石英1305個、長石1280個、輝石28個が検出された。石英と長石はほぼ同数で、大多数を占める。上記3鉱物で同定できなかった793個のうち、大部分は強い蛍光で解析不能の粒子であったが、ピークが不明瞭で同定できない粒子も存在した。その一例は、顕微鏡下で金色に輝く粒子(図8(a))や黒く見える粒子(図8(b))である。風化した黒雲母などの可能性が考えられるが、詳細は不明である。

なお、すべてが一粒子一鉱物とは限らず、例えば図8(b)の赤く囲った部分では、小さな石英が大きな黒色粒子に固く結合している。レーザースポット径は数十 $\mu$ m以下であるため、仮にレーザーが石英部分だけに当たった場合、大サイズの石英粒子として分別されることが本手法の問題点の一つである。石英と長石の合体粒子などでも同様の問題が生じるが、本手法においてこの種の誤差は避けられないものとして扱うしかない。

図9に代表的な光顕像、図10に40~400 $\mu$ mの(a)石英および(b)長石の粒度分布を示す(区間幅は10 $\mu$ m)。いずれも大粒子と破片のような小粒子との二極化が見られ、そ

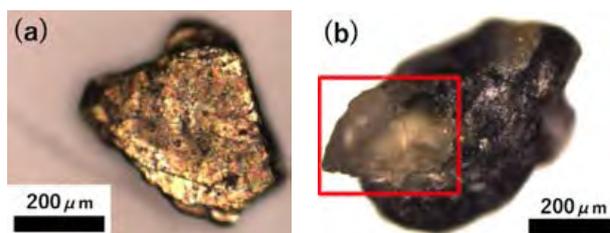


図8. 同定できない粒子の例

の間の中間サイズの粒子は乏しい。この結果から、我々が通常、「海辺の砂浜の砂」として認識する粒子としては、 $100\mu\text{m}$  以上の砂粒を対象とすれば十分であることが分かる。図 11 が、最終的に得られた (a) 石英および (b) 長石の ECD の分布ヒストグラムである (区間幅は  $50\mu\text{m}$ )。両者とも平均値は約 0.3 ミリ、標準偏差は約 0.1 ミリであるが、いずれも正規分布からずれており、分布の尖度はそれぞれ 1.4 と 1.2 である。

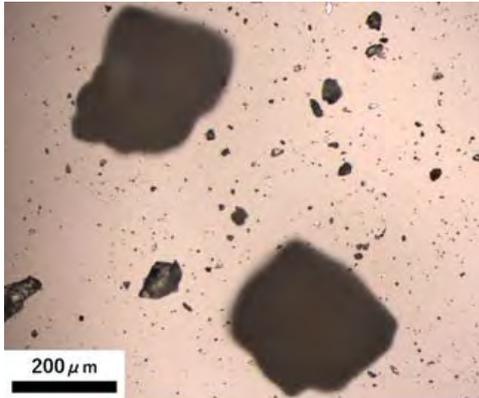


図 9. 光顕像 (大粒子はともに長石)

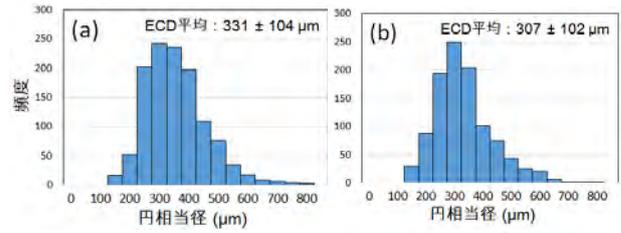


図 11. 個別粒度分布ヒストグラム (a) 石英, (b) 長石

### 3. まとめ

ラマンスペクトルを分別基準として、混合粒子試料の個別粒度解析を試みた。複雑な混合系に対しては、洗浄・溶解除去により対象を限定することで、実サンプルに対しても適用可能なことが分かった。特に蛍光が弱い場合は、全自動で短時間に結果を得ることができた。また、土中粒子の例のように、粒度分布の精度としては不十分でも、短時間に各成分粒子の個数比率を知ることが可能なので、この方面の応用も期待される。

#### 【参考文献】

- 1) 奥田徹也, KISTEC 研究報告, 2, 4 (2019)

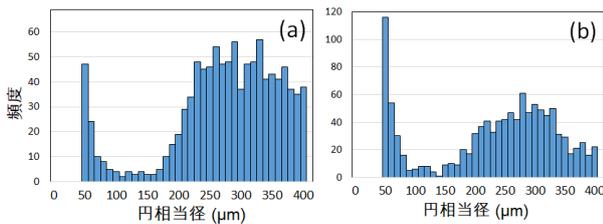


図 10. 小粒子側を拡大した個別粒度分布ヒストグラム (a) 石英, (b) 長石

# 人工オパール陶磁器への応用

小野 洋介（機械・材料技術部 ナノ材料グループ）

吉田 潤一郎（女子美術大学）

## 1. はじめに

数百ナノメートルオーダーの周期からなる構造は、一定の条件下で可視光を強め合うように反射し、色を呈する。構造色と呼ばれており、クジャクの羽や宝石のオパール等、自然界にもみられる。特にオパールの構造色は、球状の微粒子を化学的に合成し最密充填することで比較的容易に模倣できることから、光学分野を中心に人工オパールの研究が進められている。

人工オパールは、食品用シリカゲル乾燥剤としても知られる、環境にやさしい酸化ケイ素で作ることができる。また、構造色特有の、見る角度（光の角度）によって色が変わるユニークな発色により、国宝「曜変天目茶碗」のような虹色のデザインを可能とする新しい色材になりうる。技術と美術の両面でメリットがあると考え、美工連携となる女子美術大学との共同研究を実施した。なお、ここで紹介する内容は J. Asian Ceram. Soc.誌にて発表した研究成果<sup>1)</sup>を含む。

## 2. 実験方法

80 wt%のエタノール水溶液 25 g に、オルトケイ酸テトラエチル(TEOS;  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ) 5~10 g と 1 mol/L のアンモニア水 5~10 mL を添加し、粒子を析出させた(図 1(a))。分散体の溶媒を蒸発させて得た粉末を大気中 900°C 1 時間の条件で焼成し、焼成前後の粒径及び色の変化を調査した。粒径は SEM (JEOL JSM-IT200)による粒子観察像をもとに計測し、色は紫外-可視分光光度計 (SHIMADZU UV-3100PC) により反射率スペクトルのピーク波長を測定し評価した。

得られた各分散体を市販の陶器（東急ハンズ カタログ No.2401026303928）の内側に筆で塗布した後に大気中 900-960°で 1 時間焼成し、試作品を作製した(図 1(b))。

## 3. 結果

TEOS とアンモニアの配合量を 5.5 g、5.5 mL から 8.0 g、8.0 mL まで 0.5 刻みで変えて、6 種の人工オパールを合成した。粒径の異なる 6 種の人工オパールは、図 2 に示す試作品のように、紫、緑、赤等の異なる色を発現した。これ

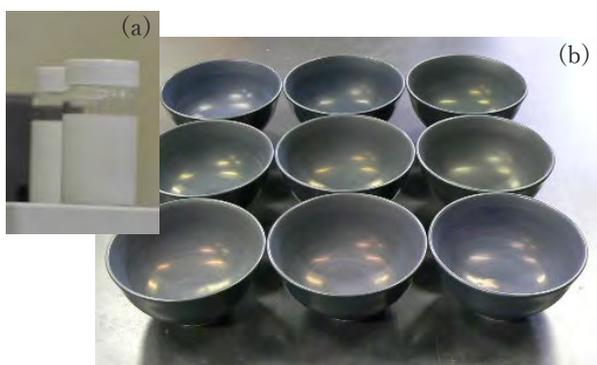


図 1. (a) 合成した人工オパールの粒子分散体と (b) 陶器試作品の外観写真

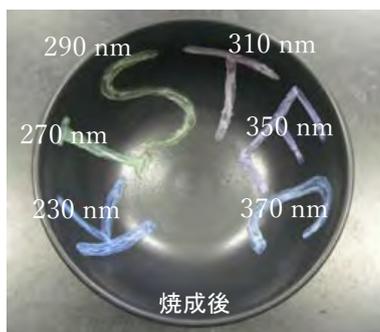


図 2. 粒径の異なる 6 種の人工オパールを使用した試作品

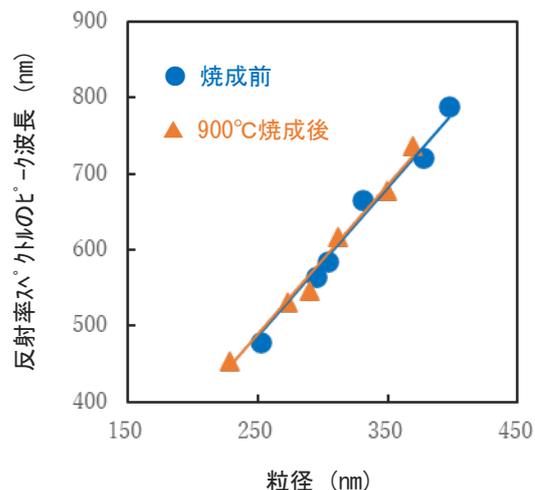


図 3. 焼成前後の人工オパールの反射率スペクトルのピーク波長と粒径の関係

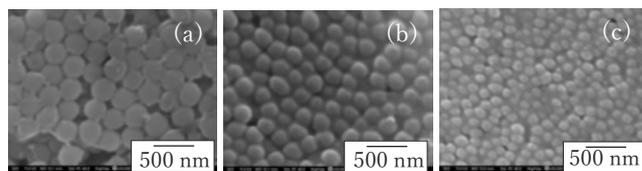


図 4. 試作品の SEM 像；TEOS 7 g に対してアンモニア水を (a) 7 mL、(b) 6 mL、(c) 5 mL 添加して得た分散体をそれぞれ使用

らの反射率スペクトルのピーク波長を測定したところ、人工オパール粒子の直径と正比例の関係にあることが分かった(図3)。人工オパールを900°Cで焼成すると粒子が収縮し色が変化するが、焼成後の試料も同じ直線上にプロットされることが分かった。理論的には、周期構造が強く反射する光の波長は、周期間距離(粒径)と屈折率の関数で表される。すなわち、図3に示した結果から、900°C焼成に伴う人工オパールの屈折率変化は小さく、色は粒径に強く依存することが示唆された。

陶磁器への応用にあたり、粒子の規則的配列と陶磁器基材への接合の両立に技術的な課題があったが、海島構造の形成方法を発見し、両立のバランスを改善することができた。図4は、TEOS原料7gに対してアンモニア水の添加量を7mL、6mL、5mLと変えて得られた試作品のSEM像である。アンモニア水の量を少なくするにつれ、析出する粒子が小さく粒子の隙間が埋まっている様子が確認された。反応促進剤であるアンモニアの量を減らした結果、粒子が十分に成長せずにTEOS未反応成分が粒子の隙間を埋めるガラス相を形成したと考えられる。このような海島

構造の形成により、人工オパールの接合強度が向上すると同時に、表面が平滑になり艶が増す効果が確認できた。

人工オパールの構造色に類似する従来技術として、薄膜の干渉色が挙げられる。数百ナノメートルの薄膜をコーティングすると干渉色は発現しうる。しかし、基材の僅かな凹凸やコーティング厚さのバラツキの影響により膜厚を一定にするのが困難であり、意図せず虹色になりやすい(図5(a))。一方、人工オパールの構造色の場合には、基材の上に積み重なる粒子の周期間距離によって色が決まるため、基材凹凸やコーティング厚さの影響を受けることなく均質に色を発現する(同図(b))。このメリットにより、図6に示すような、同心円状の虹色のデザインを施すことも可能となる。基材凹凸やコーティング厚さの影響を受けずに、陶器内側のカーブによる光の角度の違いのみに依存して色が異なるため、同心円状の虹色が現れたと考えられる。1種類の人工オパールで異なる色を発現しており、例えば赤色の領域を別の角度から見ると橙色や緑色に見える。

人工オパールの特徴を活かし、女子美術大学の研究協力の下、制作した作品を図7に示す。6種類の人工オパール

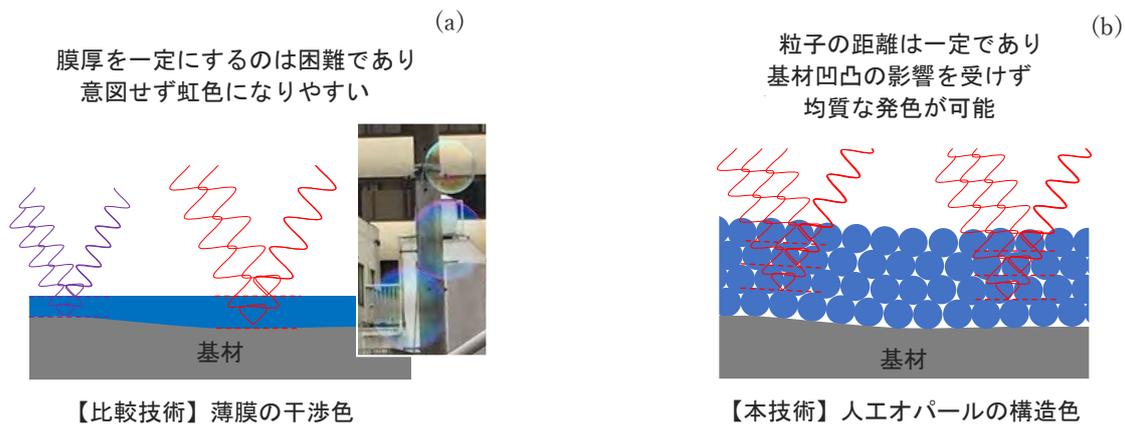


図5. (a)従来からよく知られる薄膜の干渉色と(b)新しく陶磁器に応用しようとする人工オパールの構造色を比較するイメージ図



図6. 同心円状の虹色をデザインした陶器試作品の外観写真  
内側のカーブによって光の角度が異なり緑～赤が見える

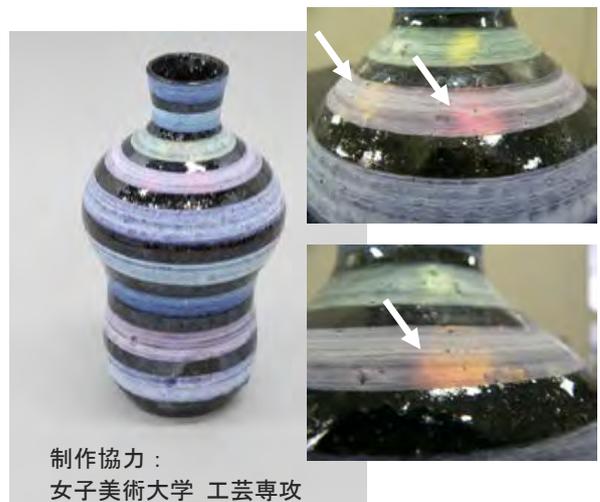


図7. 色の異なる6種の人工オパールを用いて制作した作品  
矢印で指し示したように光の角度によって黄緑、橙、赤等に色が変わる

## 【機械・材料技術部】

を使用した作品であり、それぞれ異なる色を呈した。図中に矢印で示したように、正反射光による輝度の高い発色が可能であること、角度によって黄緑、橙、赤等に色が変化する発色が可能であることが確認できた。

### 4. 今後の展開

環境にやさしいレアメタルフリー顔料として、また、新しいデザインを可能とする高機能顔料としての利用を期待する。KISTEC 単独で特許出願しており、陶磁器に限らず様々な分野での実用化に向け企業への技術移転に取り組んでいる。随時、特許ライセンスや技術に関する相談を受け付けている。

#### 【参考文献】

1. Y.Ono, *J. Asian Ceram. Soc.*, in press (2020).

【外部発表】 口頭発表 3 件, 論文等発表 1 件

# 特性インピーダンスおよび伝搬定数を用いた 垂直入射吸音率の理論予測

機械・材料技術部 機械計測グループ 小島 真路

## 1 はじめに

家電や産業機械をはじめ様々な機器に対して、音や振動に係わる要求が従来に増して高まっている。騒音対策に多く使用される吸音材の選定や開発の際には、実測定による評価だけでなく、吸音率を計算によって求めることが、開発時間の短縮やコスト削減に有効である。

本研究では、2 マイクロホン法による音響管計測で得られる音響パラメータ（特性インピーダンスおよび伝搬定数）を用いて、次の3つの場合の垂直入射吸音率の理論予測プログラムを作成した。①吸音材の厚さを変更した場合、②二種類の吸音材を積層した場合、③吸音材の背後に空気層がある場合。計算結果は、実測定結果と比較し妥当性を検証した。

## 2 垂直入射吸音率の理論予測

### 2.1 特性インピーダンスおよび伝搬定数の計測

音響管の構成を図1に示す。音響管の一端に取り付けられたスピーカによって管内に平面波を励起し、2本のマイクロホン間の伝達関数から垂直入射吸音率を算出する。また、吸音材の表裏面の音響インピーダンス $Z_a$ 、 $Z_b$ も測定により求まる。 $d$ と $L$ はそれぞれ吸音材と背後空気層の厚さである。特性インピーダンス $Z_c$ と伝搬定数 $\gamma$ は、吸音材の背後空気層を変えて測定した二つの音響インピーダンスから次式で求まる。ここで、背後空気層の厚さを $L'$ としたときの表裏面の音響インピーダンスを $Z'_a$ 、 $Z'_b$ とする。

$$Z_c = \pm \sqrt{\frac{Z_a Z'_a (Z_b - Z'_b) - Z_b Z'_b (Z_a - Z'_a)}{(Z_b - Z'_b) - (Z_a - Z'_a)}} \quad (1)$$

$$\gamma = \frac{1}{2d} \ln \left( \frac{Z_a + Z_c}{Z_a - Z_c} \frac{Z_b - Z_c}{Z_b + Z_c} \right) \quad (2)$$

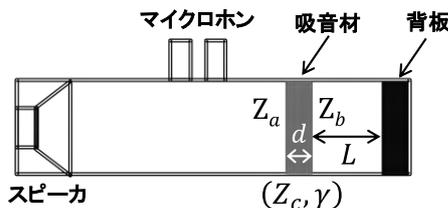


図1 音響管の構成

### 2.2 垂直入射吸音率の算出

#### (a) 吸音材の厚さを変更した場合

剛壁面に密着した厚さ $d$ の吸音材の音響インピーダンス $Z_a^*$ は、次式で表される<sup>1)</sup>。

$$Z_a^* = Z_c \coth \gamma d \quad (3)$$

ここで、特性インピーダンス $Z_c$ と伝搬定数 $\gamma$ は、実験で得られる値であり、吸音材の厚さ $d$ を指定すれば音響インピーダンス $Z_a^*$ が求まる。反射係数 $r$ および垂直入射吸音率 $\alpha$ は次式で算出される。

$$r = \frac{Z_a^* - \rho_0 c_0}{Z_a^* + \rho_0 c_0}, \quad \alpha = 1 - |r|^2 \quad (4)$$

ただし、 $\rho_0$ は空気の密度、 $c_0$ は音速である。

#### (b) 二種類の吸音材を積層した場合

図2において、スピーカ側および背板側の吸音材の特性インピーダンス、伝搬定数、厚さについて、それぞれ添え字1、2で表すと、音圧 $p$ と粒子速度 $u$ との関係は次式で表すことができる<sup>1)</sup>。

$$\begin{pmatrix} p_a \\ u_a \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cosh \gamma_1 d_1 & Z_{c1} \sinh \gamma_1 d_1 \\ \frac{1}{Z_{c1}} \sinh \gamma_1 d_1 & \cosh \gamma_1 d_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} p_b \\ u_b \end{pmatrix} \quad (5)$$

$$\begin{pmatrix} p_b \\ u_b \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} p_c \\ u_c \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cosh \gamma_2 d_2 & Z_{c2} \sinh \gamma_2 d_2 \\ \frac{1}{Z_{c2}} \sinh \gamma_2 d_2 & \cosh \gamma_2 d_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} p_d \\ u_d \end{pmatrix} \quad (6)$$

ここで、

$$\begin{pmatrix} p_a \\ u_a \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_1 & B_1 \\ C_1 & D_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_2 & B_2 \\ C_2 & D_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} p_d \\ u_d \end{pmatrix} \quad (7)$$

とすれば、音響インピーダンス $Z_a^*$ は、式(7)の $u_d$ を0として、次式で表される。

$$Z_a^* = \frac{p_a}{u_a} = \frac{A_1 A_2 + B_1 C_2}{C_1 A_2 + D_1 C_2} \quad (8)$$

これを式(4)に代入して、反射係数 $r$ および垂直入射吸音率

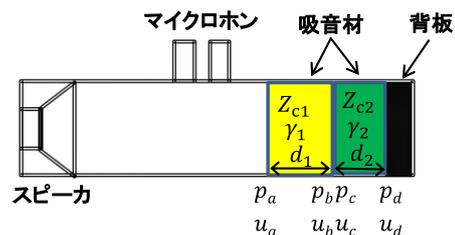


図2 吸音材を積層した場合の音響管の構成

$\alpha$ が算出される。

(c) 吸音材の背後に空気層がある場合

前項(b)の特性インピーダンス $Z_{c2}$ と伝搬定数 $\gamma_2$ に空気の値を代入することで、反射係数 $r$ および垂直入射吸音率 $\alpha$ が算出される。

3 実験結果と考察

本研究では、グラスウール、ウレタン、シンサレートの3種類の吸音材を対象とした。一例として、グラスウール(厚さ 40mm)の垂直入射吸音率の計算値と実測値の比較を図3(a)に示す。計算値は、厚さ 20 mmのグラスウールから得られた音響パラメータを用いて計算された値である。全周波数にわたり、実測値とよく一致している。ウレタンを対象とした場合も良好な結果が得られた。しかしながら、厚さ 10mmのシンサレートの実測値から厚さ 20mmの垂直入射吸音率を計算した結果は、図3(a)に示すように、3kHz以下の周波数領域で実測値とのずれが見られた。そこで、音響パラメータを求める際の背後空気層の厚さの組み合わせ( $L, L'$ )を3通りとして結果を比較したところ、グラスウールとウレタンに比べ、シンサレートでは、得られた特性インピーダンスの大きさにばらつきが生じていることが明らかとなった。特性インピーダンスの標準偏差を表1に示す。したがって、垂直入射吸音率の理論予測の誤差は、音響パラメータが正しく得られていないことが要因の一つであるといえる。

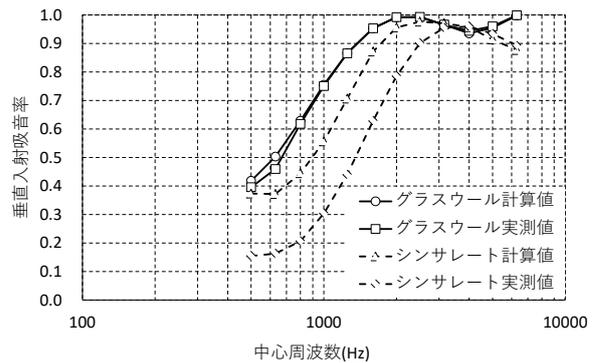
グラスウール(厚さ 20 mm)とウレタン(厚さ 25mm)を積層した場合の結果を図3(b)に示す。少しずれがあるものの、全周波数にわたり、良好な結果が得られた。

グラスウール(厚さ 20mm)の背後に空気層(厚さ 30mm)がある場合の結果を図3(c)に示す。吸音材の背後に空気層がある場合も、グラスウールとウレタンについては、良好な結果が得られた。

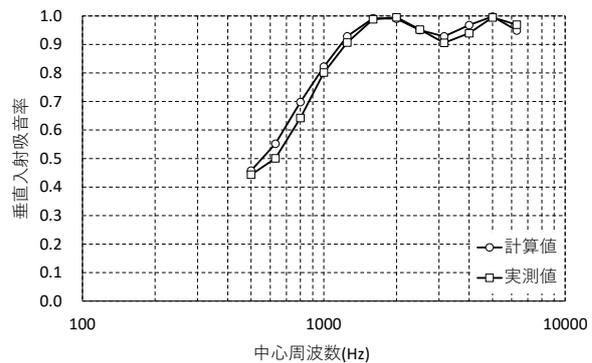
4 まとめ

本研究では、計測で得られる音響パラメータを用いて、垂直入射吸音率を理論予測するプログラムを作成した。吸音材の厚さを変更した場合、二種類の吸音材を積層した場合、吸音材の背後に空気層がある場合について検証した結果、シンサレートでは、計算値と実測値に誤差が見られたものの、グラスウールとウレタンについては、良好な結果が得られた。この理論予測を用いることで、実測することなく、吸音材の厚さと吸音率の関係を把握することが可能となることから、吸音材の特性評価に有効である。

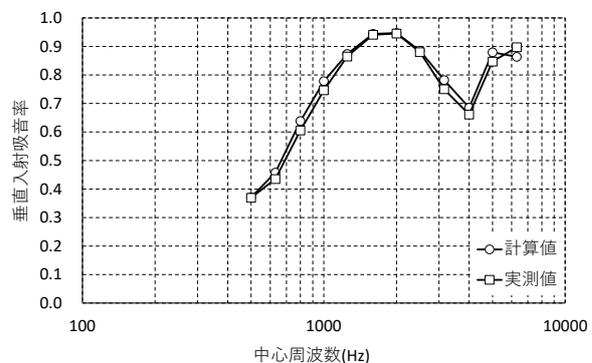
シンサレートで良好な結果が得られなかった要因は、特性インピーダンスが正しく計測できなかったためである。これは、吸音材の種類によって生じる避けることが難しい現象であり、正確な音響パラメータを得るための研究が多く



(a) 吸音材の厚さを変更した場合



(b) 二種類の吸音材を積層した場合



(c) 吸音材の背後に空気層がある場合

図3 垂直入射吸音率の計算値と実測値の比較

表1 特性インピーダンスの標準偏差

中心周波数(Hz)	500	630	800	1000	1250	1600	2000	2500	3150	4000	5000	6300
グラスウール	0.51	0.31	0.16	0.03	0.05	0.04	0.03	0.02	0.04	0.01	0.07	0.29
ウレタン	0.02	0.03	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.09	0.05	0.19
シンサレート	0.93	0.51	0.25	0.27	0.32	0.33	0.41	0.41	0.49	0.49	0.22	1.03

行われている<sup>2), 3)</sup>。当所においても、正しい音響パラメータを得るための手法について、今後検討していく予定である。

【参考文献】

1. 加藤大輔, 日本音響学会誌, **68**, 463-468(2012).
2. M.E.Delany and E.N.Bazley, *Apl.Acoust.*, **3**, 105-116(1970).
3. 加藤大輔, 日本音響学会誌, **63**, 635-645(2007).

# 金属 3Dプリンターにより造形した Ti-6Al-4V 合金の疲労強度

殿塚 易行、大谷 行雄(機械・材料技術部 材料評価グループ)

安田 剛敏 (富山大学)

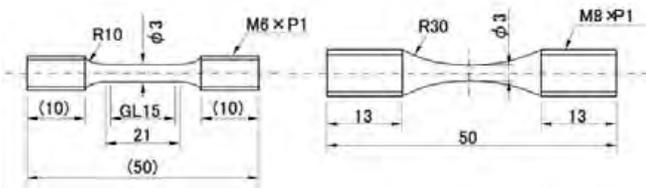
山内 隆嗣(ヤマウチマテックス・エンジニアリング株式会社)

## 1. はじめに

金属 3Dプリンターによる積層造形は、複雑な形状の部品を直接製作出来るなどのメリットがあるため、患者に合わせて形状が異なるような整形外科用インプラントの造形に適している。このインプラントには体内で長期間の使用に耐えるよう高い疲労信頼性が求められるが、金属 3Dプリンターによる造形では内部欠陥が発生する可能性が高く、疲労強度の低下が懸念される。今回 Ti-6Al-4V 合金について疲労強度特性を調査したので結果を報告する。

## 2. 実験方法

供試材は Ti-6Al-4V 合金で、長さ方向に電子ビーム積層造形後、機械加工仕上げで製作した。引張試験及び疲労試験は、図 1 のような試験片形状で、引張試験を 4 ロット 144 本、疲労試験を 2 ロット 28 本実施した。疲労試験条件は室温大気中、引張片振り (応力比  $R=0.1$ )、試験周波数 10Hz、 $10^7$  回打ち切りで、製造ロット違いの「3rd」と「5th」の 2 種類について実施した。試験片および試験方法は、経済産業省「三次元積層造形技術を用いた椎体間固定デバイスの開発ガイドライン 2018」を参考にした。試験機はインストロン製 8802 型疲労試験機および、島津製作所製 ACT5KN100 型疲労試験機を使用した。またすべての疲労破面を走査電子顕微鏡(SEM)で観察し、一部の疲労起点に対しエネルギー分散型 X 線分光分析(SEM-EDX)で成分分析を実施した。



(a)引張試験片(JIS Z2241) (b)疲労試験片  
図 1 試験片形状

表 1 引張試験結果および硬さ

0.2% 耐力 (MPa)	引張強さ (MPa)	破断伸び (%)	絞り (%)	硬さ HV
864	973	12.2	17	329

## 3. 結果および考察

引張試験の結果およびマイクロビッカース硬さの測定結果を表 1 に、疲労試験の結果を図 2 に示す。図 2 から、いずれの種類(ロット)も疲労限度は明瞭に現れず、 $10^6$  回を超えても疲労強度は低下傾向であり、ばらつきも大きかった。2 種類で大きな差異はみられなかった。

ばらつきを統計的に見るために、日本材料学会「S-N 線回帰法 (Ver.2.0.3)」による片対数連続低下直線モデル

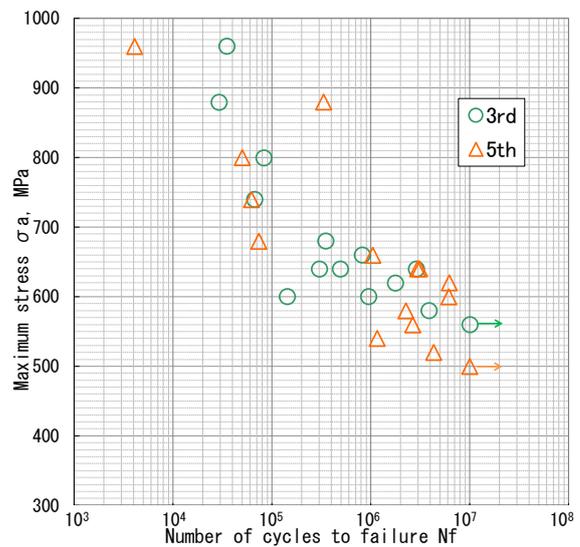


図 2 S-N 線図

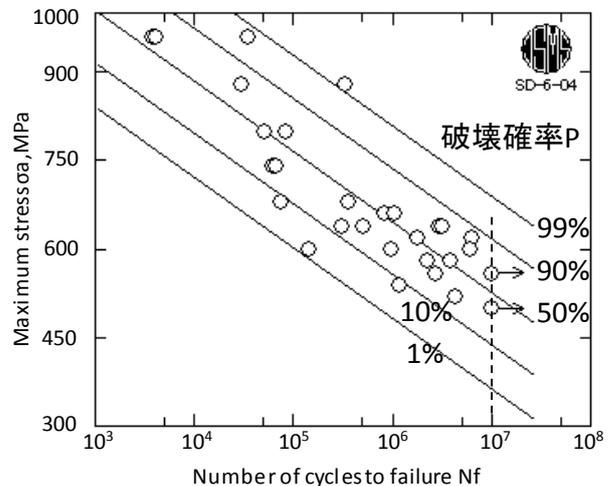


図 3 P-S-N 線図

ルを用いて P-S-N 線図を求めた (図 3)。10<sup>7</sup> 回における破壊確率 50%の最大応力は 530MPa 程度であるが、ばらつきが大きいため破壊確率を 1%にするには最大応力を 370MPa 程度まで下げる必要がある。

SEM を用いて破面を観察した結果、疲労起点は内部欠陥が多く、特に破断繰り返し数が 10<sup>6</sup> 回を超える高サイクル域では、ほとんどが内部欠陥であった。疲労起点となった内部欠陥の多くは図 4 のように引け巣のような複雑な形状で、深さは浅く底面は平坦であった。一部の欠陥は円形で、そのうちの 1 本を詳細に観察した結果、図 5 のように片面は浅く底面は平坦であったのに対し、反対面はすり鉢状でやや深く、底面はやはり平坦であった。

疲労起点となった欠陥の代表寸法 $\sqrt{area}$  の頻度分布を図 6 に示す。このばらつきを正規分布で近似すると、中央値、標準偏差はそれぞれ 119 $\mu$ m、46 $\mu$ m になる。以下に示す内部に欠陥のある材料の疲労限度の予測式<sup>(1)</sup>を用いると、欠陥寸法 $\sqrt{area}$ の中央値での応力振幅 $\sigma_w$ は 256MPa で、これを最大応力 $\sigma_a$ に換算すると 569MPa となり、

$$\sigma_w = \frac{1.56(HV+120)}{(\sqrt{area})^{1/6}} \left[ \frac{(1-R)}{2} \right]^\alpha \quad (1)$$

ここに、 $\sigma_w$  : 疲労限, MPa

HV : ビッカース硬さ

$\sqrt{area}$  : 欠陥寸法,  $\mu$ m

R : 応力比(=  $\sigma_{min}/\sigma_{max}$ =0.1)

$\alpha$  : =0.226 + HV × 10<sup>-4</sup>

図 3 の 10<sup>7</sup> 回における破壊確率 50%の最大応力(530MPa)に近い値となった。ばらつきについて見ると、図 6 より欠陥全体の 99%をカバーする $\sqrt{area}$ は 225  $\mu$ m でこれは $\sigma_a$ =513MPa に相当する。一方、図 3 の 10<sup>7</sup> 回、破壊確率 1%(信頼度 99%)に相当する $\sigma_a$ は 370MPa で $\sqrt{area}$ をもとにした応力よりかなり小さい。このことは、本試験結果のばらつきの要因が欠陥の寸法だけではなく、位置(表面開口、表面付近、内部等)や 3 次元形状など他にもあることを示唆している。

疲労起点となった内部欠陥付近の成分分析を SEM-EDX を用いて Ti, Al, V について実施した結果、いずれの欠陥も図 7 のように周囲と同一成分であった。このことから欠陥は介在物等の異物ではなく造形時の溶け残りと思われる。

#### 4. まとめ

電子ビーム積層造形されたチタン合金 Ti-6Al-4V の疲労強度特性を調べた結果、10<sup>6</sup> 回を超える領域でも明確な疲労限を示さず疲労破壊が発生し、ばらつきも大きかった。疲労起点の多くは積層造形時に形成された内部欠陥と思われ、その大きさや分布が疲労特性に影響している。疲労強度向上には、この内部欠陥の小形化、分散化、および圧縮残留応力の付与などが有効と考えられる。

#### 【参考文献】

- (1) 村上敬宣: 金属疲労 微小欠陥と介在物の影響, 養賢堂 (1993), 103.

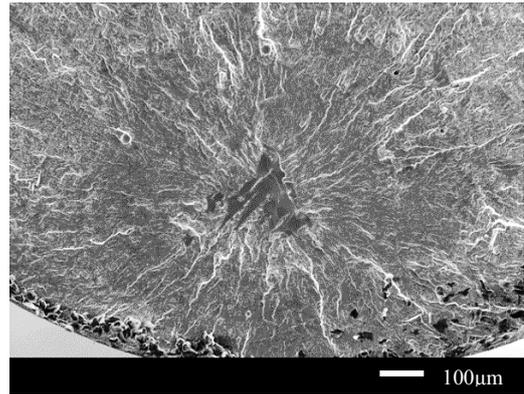


図 4 内部欠陥 (複雑な形状)

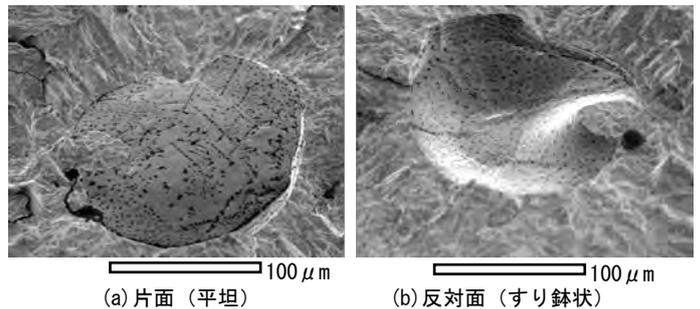


図 5 内部欠陥 (円形, 斜め 30° 方向から見た同一部位の両破面)

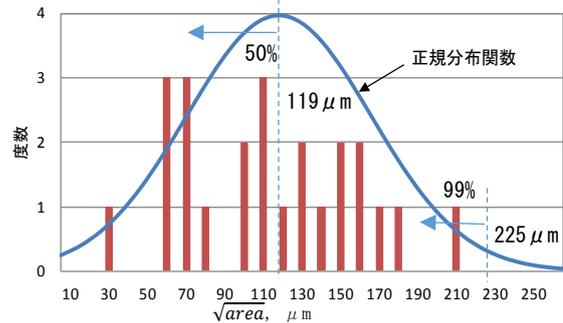


図 6 欠陥の代表寸法  $\sqrt{area}$  の頻度分布

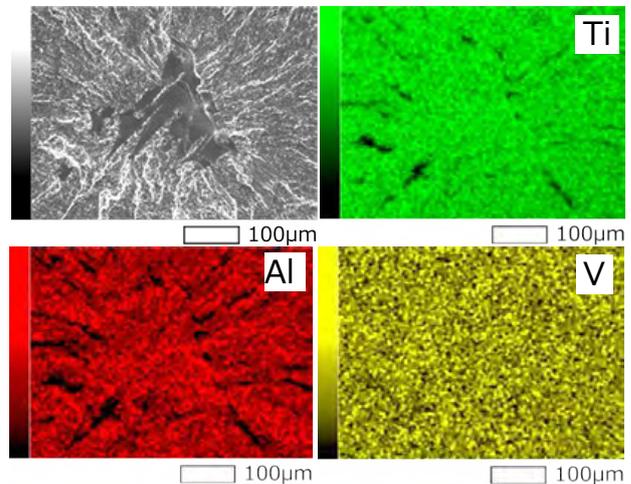


図 7 欠陥付近の Ti, Al, V 成分分布

# フッ素ドープ酸化スズ膜の加熱による透過率変化

藤井 寿（機械・材料技術部 ナノ材料グループ）

## 1. はじめに

熱処理工程における温度管理では、熱電対や放射温度計が使用されることが多い。しかし、熱処理装置の中には熱電対や放射温度計の設置が難しいケースも多い。そのような状況では熱電対の代わりとして、温度を不可逆的に記録する示温材料を用いた温度測定が行われている。我々はこれまでの研究で、アンチモンドープ酸化スズ (ATO) 膜の透過率変化が示温材料に利用できることを見出し、ATO膜を用いた新たな温度測定方法を開発してきた<sup>2)3)</sup>。

示温材料は一般的に最高到達温度を調べるために用いられるが、熱処理工程では様々な温度プロファイルによる熱処理が行われており、最高到達温度以外の情報を得たいというニーズも高い。そのようなニーズに応えるため、我々は加熱により異なる物性変化を示す複数の材料を組み合わせることで、最高到達温度以外の情報を引き出すことを目指している。ここでは ATO 膜と同じ酸化スズベースの材料であるフッ素ドープ酸化スズ (FTO) 膜について、加熱による透過率変化を調べた結果について報告する。

## 2. 実験及び結果

実験には市販の高耐熱性 FTO 膜を用いた。試料の加熱は電気炉 VTDS-2R (いすゞ製作所製) を使い、300°C、400°C、500°C の 3 水準の温度でそれぞれ 1 時間加熱した。電気炉から試料を取り出した後、室温に戻した状態で試料の透過率の測定を行った。透過率測定には紫外可視分光光度計 UV-3100PC (島津製作所製) を使い、直線透過法で 250～2500 nm の波長範囲で測定した。また、加熱による膜の組成変化は X 線光電子分光 (XPS) 装置 JPS-9000 (日本電子製) を用いて調べた。

図 1 に加熱による FTO 膜の透過率スペクトル変化を示す。300°C および 400°C では、加熱により短波長領域 (600～1400 nm) で透過率が増加する一方で、長波長領域 (1400～2500 nm) では透過率が減少している。一方、500°C 加熱後の試料の透過率スペクトルでは、長波長領域においても 400°C 加熱後試料に比べ透過率が増加している。

図 2 は、加熱前 FTO 膜および 400°C、500°C 加熱後 FTO 膜の、フッ素 (F) の 1s 電子ピーク付近の XPS スペクトルである。図 2 を見ると 500°C ではフッ素のピークが大きく減少していることが分かる。

## 3. 考察

図 1 のような透過率変化の波長依存性 (短波長領域で増加、長波長領域で減少) は ATO 膜と同様の傾向<sup>2)</sup>を示し

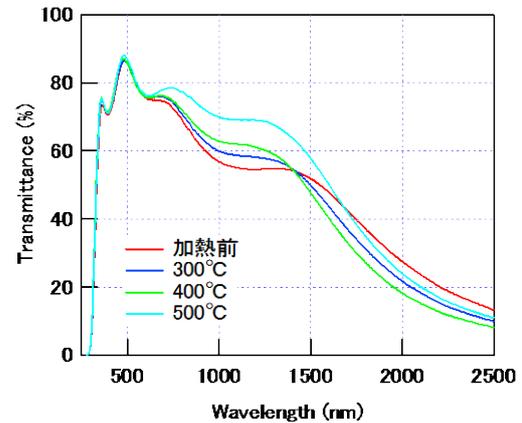


図 1 加熱による FTO 膜の透過率スペクトル変化

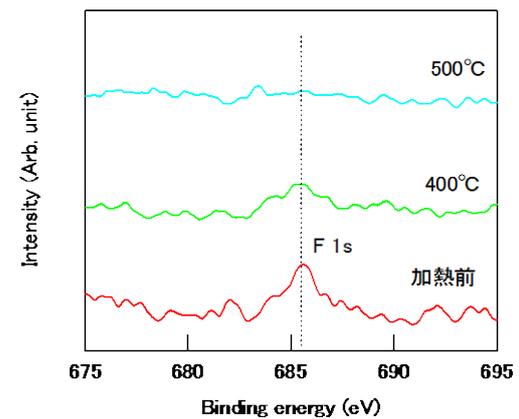


図 2 フッ素 (F) 1s 電子の XPS スペクトル

ており、酸化スズベースの膜に共通の性質と考えられる。一方で 500°C 加熱後試料の長波長領域における透過率増加は、ATO 膜では見られなかった変化である。この原因は図 2 における 500°C 加熱後試料での F 1s ピークの減少と関係していると考えられる。つまり、加熱によるフッ素原子の脱離により伝導電子の減少が起こり、それによって伝導電子による近赤外領域での反射率が減少 (結果として透過率が増加) したためであると解釈できる。

## 【参考文献】

1. 稲葉見敬, 材料試験, **8**, 53 (1959).
2. 藤井寿, 金属, **87**, 397 (2017).
3. WO2017/086280.

# X線による半田実装部の品質確認について

増田 信次（機械・材料技術部 解析評価グループ）

清水 貴司（機械・材料技術部 材料物性グループ）

## 1. はじめに

近年、様々な電気製品に用いられる電子基板は小型・高密度化し、また実装される電子部品も様々な高性能なものが開発され、その接続方法も多種多様化している。従来においてもその半田実装部の品質確認にはX線が使用されることがあったが、明確な検査基準や規格も無いため、どのような解析手法が適しているのか、また得られた情報のどの部分をどのように判断してよいか相応の知識が無い限り解析が困難であるのが現状である。

そこでX線による半田実装部の品質確認について、経験が浅い方でも、的確な識別・判断ができるようにすることを目的に代表的な故障状態とそれに対応する様々な解析データを収集し、X線による半田実装部の故障解析や品質確認に役立つデータベースを作成した。

## 2. X線による故障解析データベースの作成と効果

データベースは閲覧者が自分の知りたい情報まで簡単に辿り着くことができるように電子ファイルで作成することとした。データベースのホーム画面を図1に示す。故障状態（一般的な不具合名称）を縦軸に、またそれに対する解析手法等の項目を横軸にした一覧表にすることにより全体が容易に把握できる構成となっている。

横軸の項目は下記のとおりである。

- ・特徴（故障要因や発生タイミング等）
- ・X線透過像
- ・CT断層画像
- ・CT3次元立体像
- ・断面観察像（機械研磨による）
- ・その他、解析手法に対するコメント等

	特徴	透過像	CT断層	CT3立体	断面観察	横軸に関するコメント
半田不足	加熱不足によりハンダが溶融していない状態	○	○	△	×	ペースト内部のハンダ粒子が観察できることが多い。完全に溶融し接合しているため断面観察には不向き。
高加熱	加熱すぎた状態	○	○	○	○	リフロー温度が高すぎる。もしくはピーク温度時間が長すぎるためハンダが全周パッドに均一に濡れられず部分で乾燥できる。断面観察時に表面の金属状態を見る必要がある場合もある。
アライメント不良	部品が位置ずれを起こして実装されたもの	○	△	○	○	全体の形状が重要な判断材料となるため透過像もしくはCT立体像が適している。CT3スキャンも有効である。断面観察による形状確認が必要である。
ハンダ不足	ハンダが溶融しているが、表面の酸化層や有機物によりお互いに溶け合っていない状態	△	△	○	○	全体の形状が重要な判断材料となるためCT立体像が適している。透過像では分かりにくい。断面を観るためにはハンダの断面形状を詳細に調査する必要がある。
ボイド	主にペースト内の水分が原因で、ハンダ流動時に空気が混入する状態	△	○	○	○	数十～数百μmオーダーのものにはペースト中の水分が揮発されたまま凝固して残る。そのまま置かれたものであっても、クラック発生の大気な原因となる。
クラック	ハンダが固まる時、もしくは経年による応力でハンダ内部に亀裂が発生した状態	×	○	△	△	CT断面画像で判断できることが多い。但し、微細なクラックまで観察の必要がある場合は高倍率でスキャンする必要がある。断面観察は位置決めが困難な場合がある。
析出	ハンダと全周パッド表面の金属成分が反応して析出物が発生し、酸化層が形成された状態	×	×	×	○	界面の析出物は10μm以下の範囲であることが多く、透過像での観察が困難である。また、全周硬化化合物の形状を調べる必要がある場合もある。
異物混入	10μmの比較的大きい異物下部にチップ抵抗等の異物が入り込んだ状態や電子基板そのものに異物が混入した状態	△	△	○	△	マウンタによる部品実装時にマウンタからこぼれ落ちたチップ抵抗が下部に侵入している。異物は異物として抽出することによる発生原因もある。マウンタレジン、ワイヤカッターの残渣も発生し得る。異物が混入したリ外力が加わらない限り発生しない。異物は異物として抽出することによる発生原因もある。マウンタレジン、ワイヤカッターの残渣も発生し得る。
ショート（内層不良）	様々な要因で発生するが、銅箔層の薄い層が剥離する可能性がある	△	○	△	△	透過像での観察が困難な場合がある。異物が混入したリ外力が加わらない限り発生しない。異物は異物として抽出することによる発生原因もある。マウンタレジン、ワイヤカッターの残渣も発生し得る。
ショート（内層不良）	内層がラウンがずれることによって銅箔層が剥離する可能性がある	×	○	△	△	CT断面画像で判断できることが多い。透過像では判別が難しく、断面観察は位置決めが非常に難しい。

解析手法として ○：適している △：場合によっては適している ×：適さない

図1. X線による故障解析データベースのホーム画面

それぞれの解析手法の欄には○△×の記号が記されているが、これは各故障状態に対する様々な解析手法の有効性を表したものである。（解析手法として○：適している △：場合によっては適している ×：適さない） また、この一覧表に記載されている情報から更に詳しい情報を知ることができるように表中には多くのリンクを貼り、各故障状態に対する詳細な解析データや解析手法についてのコメントが閲覧できる。例えば電子基板のショート（内層不良）が疑われる場合、この一覧表からCTによる断層撮影が解析手法として最も適しているのが分かる（図1矢印部）。そしてCT断層に対応する○印をクリックするとCT断層画像による解析事例とコメントが表示（図2）され、図中点線部で内層のショートが判別でき非常に良好な解析手法であることが確認できる。一方、透過像に対応する×印をクリックすると、解析が困難と思われるX線透過像とコメントが表示（図3）され、解析手法としては適していないということが確認できる。

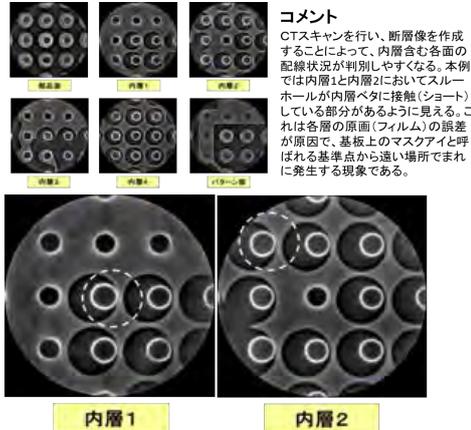


図2. CT断層に対応する○部をクリックした場合

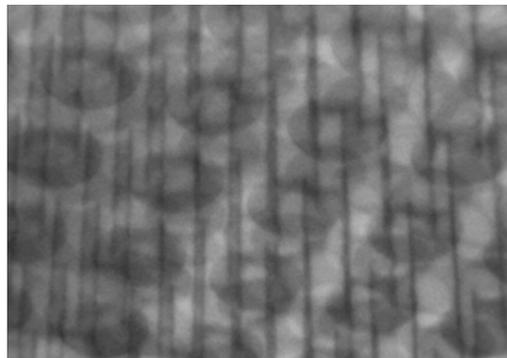


図3. 透過像に対応する×部をクリックした場合

現在、当所では本データベースを利用した技術支援を実施している。従来は解析手法の違いによる問題の識別・判断について口頭で説明していたが、その違いを十分に伝えることが困難であった。現在は本データベースに掲載されている故障状態に類似した案件であれば、解析手法の違いによる解析結果の違いが非常に分かりやすくスムーズに伝えられることから業務の効率化が図れる。また、利用するお客様からもわかりやすく納得のいくサービスが受けられると好評を頂いている。

### 3. 今後の展開

現段階ではデータベースのオンライン公開は行っていないが、将来的には実装関係の問題が生じたときに使用できるX線による故障解析の教本になる可能性もある。X線による故障解析の現状を広め、普及させるという意味でも大きな社会的効果が見込まれるので何らかの形で公開することを考えている。

今後、利用価値の高いデータベースにするためには更に多くの故障状態に対する解析事例が必要であり、大きな課題である。もともと故障とは偶然の産物であり、それを意図的に作製することは困難である。例えばBGAアライメント不良の解析事例が欲しいと思っても頻繁に発生する現象ではないので自作をして解析を行う必要がある。今回は生基板の上に前もって周囲にチップ部品を接着し、意図的にICがずれて実装されるようにした試料を作製した(図4)。しかし、どの程度ずらせば適当なアライメント不良が起きるのか情報が無いため、少しずつ変位量を変えながら試行錯誤した。このように作製した試料についてX線透過像(図5)やCT断層像、CT立体像(図6)、BGAスコープ画像(図7)による解析ができる状態になる。以上のようにたった一つの項目を増やすだけで膨大な時間・労力がかかるので、適当な故障状態を自作することは効率が悪い。このような事情から今後は自作を行わず、遭遇した故障事例を積み重ねることで更に充実したデータベースを作成していく予定である。また、故障パターンは無限に存在するため、今後も長い年月をかけて継続して作成し続ける必要がある。

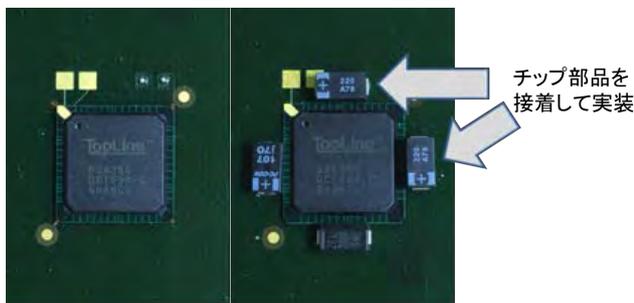
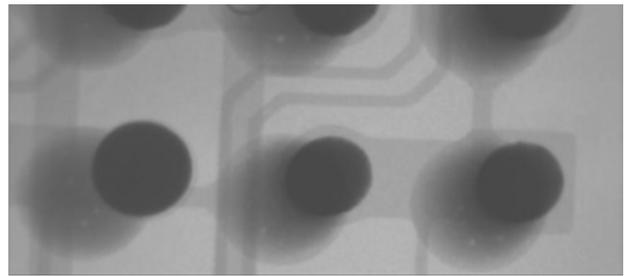


図4. 自作した試料 (アライメント不良)



垂直方向からのX線透過像

コメント  
X線透過撮影で確認が可能であるが、垂直方向からの透過だけでは良否の判断が難しい。

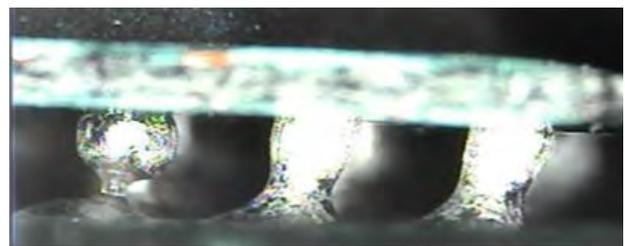
図5. アライメント不良の透過像



CT立体像

図6. アライメント不良のCT立体像

コメント  
CTスキャンを行い立体像を作成すると接続状況が詳しく分かり、良否の判断に役立つ。



BGAスコープ画像

コメント  
一般的にアライメント不良は部品の周辺部で顕著に現れるので、BGAスコープも有効である。

図7. アライメント不良のBGAスコープ画像

### 【参考文献】

1. 伊東秀高, 増田信次, BGA 接合部の品質確認, 神奈川県産業技術センター研究報告 (2010).

# レーザー照射による炭素系膜の表面改質

本泉 佑 (機械・材料技術部 解析評価グループ)

金子 智 (電子技術部 電子材料グループ)

## 1. はじめに

近年、IoT (Internet of Things : モノのインターネット) 市場の拡大にともない、身に着ける IoT 機器であるウェアラブルデバイスが様々な形態で実用化されている。ウェアラブルデバイスの性質上、軽量でフレキシブルな端末が求められており、容易に変形する素材への回路形成材料として、炭素同素体の一つであるグラフェンに着目した。しかしながら、グラフェンは真空雰囲気下での製造や金属基板を用いた製法に頼らざるを得ず、応用するにはコスト面で課題がある。そこで、上記課題の解決のため、導電経路が自在に大気プロセスで形成できるようなグラフェン生成に関する基礎研究が必要であると考えた。

これまでに我々は、鉛筆で塗りつぶした印画紙へのフェムト秒レーザー照射により鉛筆内に含まれるワックス等の不純物を除去することで欠陥の少ない純粋なグラファイトに近いものへと変化させることに成功しており<sup>1)2)</sup>、加えてグラフェン粒が点在していると推定した。しかし、基材である紙は表面粗さが数  $\mu\text{m}$  であり、一様な膜の成長は困難であった。そこで、本研究では基材をシリコンウエハーとし、表面に炭素系膜をコーティングすることで、粗さのない基材に均等に鉛筆で塗りつぶした状況に見立て、フェムト秒レーザーにより実用に適した改質が可能かを確認することにした。

## 2. 実験及び結果

フェムト秒レーザー装置 (Cyber Laser IFRIT) を用いて、アモルファスカarbonにレーザー照射を行った。アモルファスカarbonはPVDコーティングにより20 nmの膜厚でシリコンウエハー上に成膜したものである。

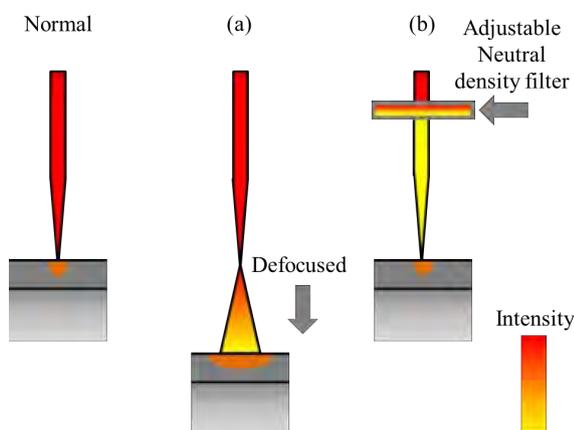
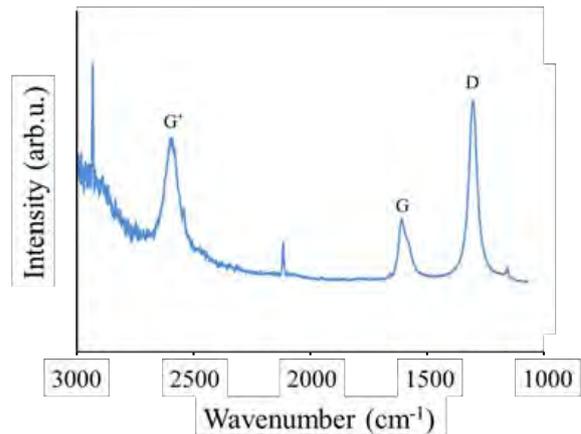
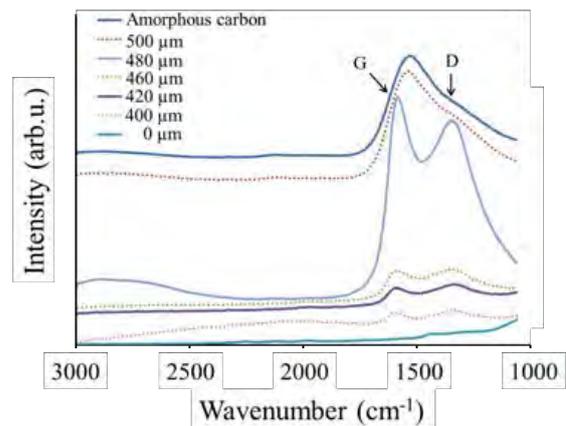


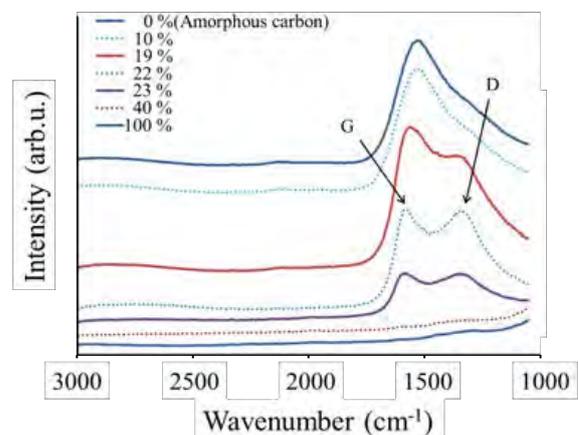
図1 レーザー照射強度の制御方法概略図



(a) グラフェンのラマンスペクトル

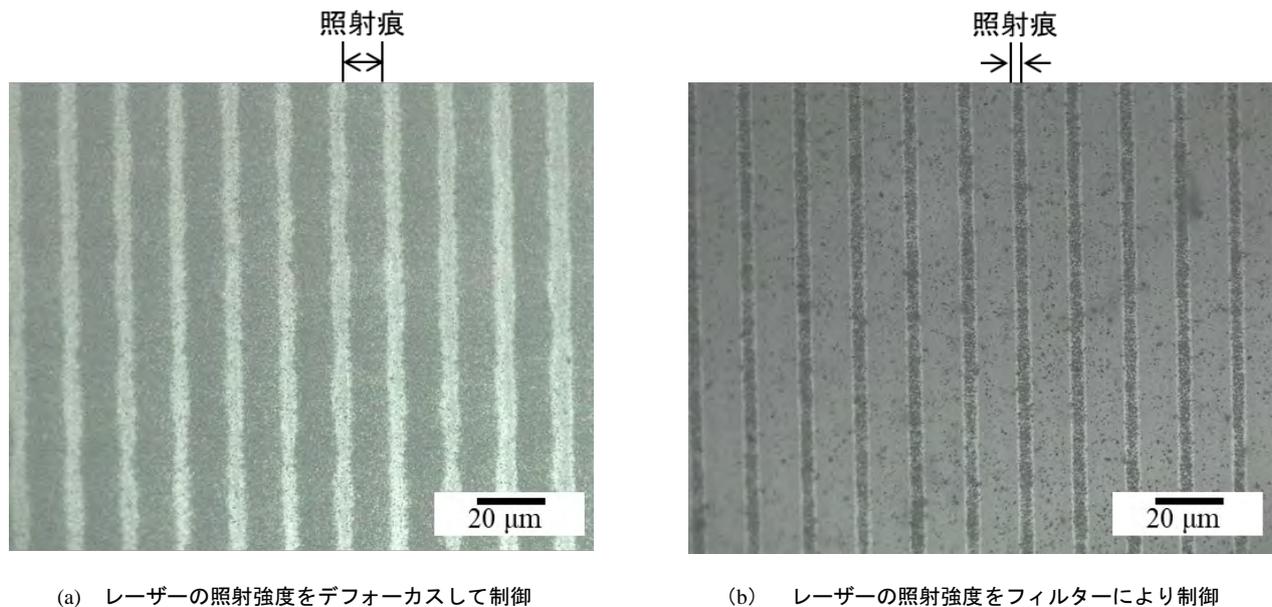


(b) レーザーの照射強度をデフォーカスして制御



(c) レーザーの照射強度をフィルターにより制御

図2 レーザー照射後のラマンスペクトル



(a) レーザーの照射強度をデフォーカスして制御

(b) レーザーの照射強度をフィルターにより制御

図3 レーザー照射痕の光学顕微鏡写真(暗色部が照射痕)

最小出力である 1 mW にしてもレーザーによるサンプルダメージが顕著であったため、通常の照射であるレーザー出力 1 mW、走査速度 1000  $\mu\text{m/s}$  に加え、(a)焦点距離を 0  $\mu\text{m}$  から 500  $\mu\text{m}$  までデフォーカスさせる方法、(b)透過率が可変可能なフィルターを用いて 0 % から 100 % まで透過率を変化させる方法により照射強度を変化させた(図1)。

レーザー照射後、ラマン分光分析を行うことにより効果の有無を判断した。図2にグラフェンおよびレーザー照射後試料のラマンスペクトルを示す。グラフェンのラマンスペクトルは、 $\text{SP}^2$ 結合に由来した G ピーク、構造のゆがみや欠陥に由来した D ピークの他、約 2700  $\text{cm}^{-1}$  付近に G' ピーク (2D ピーク) を示している。なお、一般にグラフェンの層数が少ないほど、G ピークに対する G' ピークの強度比が高くなるとされている。各照射強度制御方法における各々のラマンスペクトルはグラフェンの存在を示唆する G' ピークが生じておらず、グラフェン生成には至っていないものと思われる。しかしながら、いずれの制御方法においても、特定の照射条件下で元のブロードピークから G ピークと D ピークへの分離がみられた。この D ピークは  $\text{SP}^3$  結合や構造のゆがみや欠陥に起因するものであると考えられ、レーザー照射によってアモルファスな構造から結晶化が進行し、性質も変化していると推定される。

図3に照射後の外観写真を示す。焦点位置からデフォーカスさせる方法による照射条件では焦点距離 400  $\mu\text{m}$  以上で 10  $\mu\text{m}$  以上の幅の広い照射痕となり、フィルターを用いて光量を制御する方法での照射条件では 3  $\mu\text{m}$  以下の幅の狭い照射痕となっていた。いずれの制御方法でも改質現象が確認されていることから、広い領域に均一な効果を与えることを目的とする場合は、デフォーカスさせることにより制御し、逆にパターンを形成させるような微細な加工が要求される場合はフィルターを用いて制御をするといった、用途に応じた制御方法の使い分けが可能であることがわかった。

### 3. まとめ及び今後の展開

アモルファスカーボンにフェムト秒レーザー装置によるレーザー照射を行ったところ、特定の照射条件でラマンスペクトルが元のブロードピークから G ピークと D ピークへと分離するという特異な変化がみられた。G' ピークが生じておらず、当初目的としたグラフェン生成には至らなかったが、結晶化が進行していると推察される。

また、この現象はレーザーの照射強度を焦点位置からデフォーカスさせる方法、フィルターを用いて光量制御する方法のいずれの手法でも確認されており、用途に応じた加工方法の使い分けが可能であることがわかった。しかしながら、照射痕は均一ではなく照射ムラを生じていた。改善策としてビームシェイパーの導入により、ビームを平均的にすることを検討しており、さらに次のステップとして異方性の無い膜を広い領域に形成させることに挑戦したい。

改質後の被膜はグラフェンではないものの、元のアモルファスカーボンから性質が変化していると思われ、電気回路への応用が期待できる可能性がある。そこで、今後はレーザー照射試料の特性を評価し本技術の実用化について検証することにする。

#### 【参考文献】

1. Y. Motoizumi, S. Kaneko, *et al.*, 電気学会フレキシブルセラミックスコーティング研究会, EFM-17-031 (2017).
2. S. Kaneko, Y. Motoizumi, *et al.*, *Nanoscience and Nanotechnology letters*, 8, 611 (2016).

# 振動試験機を用いたねじの緩み評価試験

百瀬 晶（機械・材料技術部 機械計測グループ）

## 1. はじめに

ねじは部品の締結に用いられる機械要素として様々な工業製品で使われているが、メンテナンスの容易さの反面、緩みが生じるという問題を抱えている。ねじの緩み・脱落は時に重大な事故を招くことから、緩み防止の機能を高めた様々な製品が開発されており、その効果を実証するためにねじの緩み試験が行われている。

現在広く普及しているねじの緩み試験には、軸直角振動式と衝撃加振式があり、前者はドイツ工業規格 DIN65151 に準拠したユンカー振動試験、後者は米国航空規格 NAS3350<sup>1)</sup> に準拠した NAS 振動試験と呼ばれている。どちらも民間企業や試験機関<sup>2)</sup> 等で実施されているが、当所では対応できていなかった。

そこで本研究では、既設の振動試験機を活用して、NAS 式によるねじの緩み試験が可能か検証することを目的とした。NAS 規格に基づいて製作した治具を振動試験機に設置し、ねじの締結条件を変えて加振実験を行った。ここではその結果を報告する。

## 2. 実験方法

NAS 振動試験の概要を説明する。この試験は、図 1 のように加振台に取付けられた試験治具にボルトナット締結体を設置して、全体を上下方向に振動させる試験である。締結体は、治具の長穴内で自由に上下動できるようになっているが、加振台を規定の条件で動かすと、長穴の上下両端に衝突する。これを規定の回数繰り返して、ねじの緩みを評価するのが NAS 振動試験である。

本研究で評価対象としたねじは、呼び径 M8 である。市販の鋼製ねじで強度区分 10.9 のものを使用した。試験治具については、材質や硬度、長穴部の寸法、摺動部分の表面粗さなどが規格 NAS3354 で規定されている。寸法はねじの呼び径ごとに決められているが、インチねじで示されているため、M8 に数値が最も近い 5/16 インチ用の仕様を

参考にして試験治具を設計・製作した。加振機は IMV (株) 製の振動試験機 i250/SA5M を使用した。試験治具および試験装置の外観を図 2 に示す。締結体の緩み、脱落によって、これが飛び出すと危険であるため、台の周囲にポリカーボネート製のプレートを設置している。

次に、締結条件については、締付けトルクを変えたり、緩み防止機能<sup>3)</sup>の有無など、様々な条件で実験を行った。締付けトルクは、標準締付けトルク 1.8T、2.4T 系列の参考値<sup>4)</sup>をもとに 28Nm を最大設定値とし、その 1/2 の数値を最小設定値として、その間でいくつか水準を設けた。トルクはデジタルトルクレンチを用いて設定した。また、緩み防止機能としては、標準の六角ナットを重ねたダブルナット (DN と記す)、テーパの付いた 2 つのナットのうち一方が偏心していて、組んだ際の楔効果により緩み防止機能を高めた市販の偏心テーパ二重ナット (HLN と記す) の 2 種類について効果を確認した。

加振条件は規格 NASM1312-7 に従った。単位系をインチからメートルにし、表 1 に示す条件で実施した。

またこの規格では、締結体が治具内を自由に動けるよう、摺動部には潤滑油を塗布することが要求されている。ここでは、SAE0W-20 を使用した。

表 1. 加振条件

振動数	30Hz
振幅	11.43mmp-p
衝撃ストローク	19mm
振動回数	30,000 回 (約 17 分)

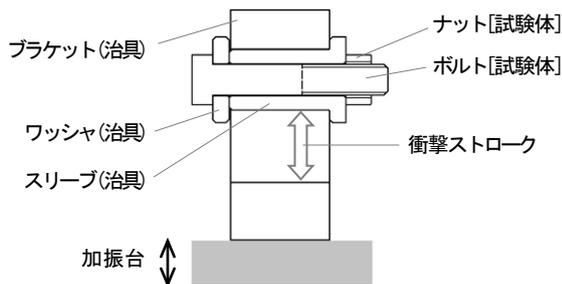


図 1. ねじの緩み評価試験の構成

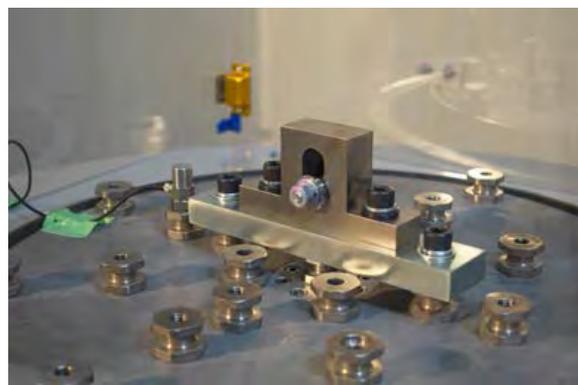


図 2. 試験治具および試験装置の外観

### 3. 結果および考察

M8 ねじ締結体を対象に、締結条件を変えて緩み試験を実施した。緩みの有無については、ボルト、ナットやワッシャに合わせるようにして引いた線（合いマーク）が3万回終了後にずれていないかで判断した。また、参考値として戻しトルクも測定しているが、数値の記載は省略する。

まず、締付けトルクを変えた時の結果を表2に示す。締付けトルクを26Nmまで低下しても緩みは見られなかった。さらに数値を下げると、緩みが発生して締結体は分離・脱落した。試験 No.1-4 と No.1-1、2-2 の結果が示すように、トルク値が小さいほど短時間で脱落している。

次に、緩み防止機能の有無を通じて、その効果を確認した。結果を表3に示す。締付けトルクを23Nmとした試験 No.4-3 では47秒で脱落したが、これをダブルナットにする（試験 No.4-4）ことで緩まなくなった。ダブルナットの緩み防止効果を確認することができた。

表2. 締付けトルクを変えた時の緩み試験結果

試験 No.	締付けトルク(Nm)	試験回数または時間	結果
1-3	28	30,000	緩み無
3-4	26	30,000	緩み無
1-4	25	4min50sec	脱落
1-1, 2-2	22	39sec, 49sec	脱落

表3. 緩み防止効果の確認

試験 No.	締付けトルク(Nm)	防止機能	試験回数または時間	結果
4-3	23	無	47sec	脱落
4-4	23	DN	30,000	緩み無
5-4	14	DN	55sec	脱落
5-5	14	HLN	30,000	脱落無,緩み有

さらに、緩み止め機能が優れているとされる市販の緩み止めナット（HLN）を取り上げて、その効果を確認した。締付けトルクは14Nmと大幅に小さい値に設定した。試験 No.5-4 と No.5-5 の結果から、DN に比べて HLN の方が優れた緩み防止効果を示すことが確認できた。No.5-5 の結果について補足しておく、3万回終了後の合いマークにはずれが見られたものの、ナットは脱落しなかった。

### 4. まとめと今後の展開

呼び径が M8 のねじ締結体を対象に、締結条件を変えながら、振動試験機を用いてねじの緩み評価試験を行った。その結果、

- (1)締付けトルクの大小に応じて緩みの有無が確認できた。
- (2)緩み防止機能を有する市販品を用いて、その効果を確認することができた。

以上により、この方法による NAS 振動試験の実施可能性について検証することができた。

今後の展開として、本研究成果の展開および課題への取り組みについて述べる。本研究成果に関しては、お客様の実サンプルを対象に評価試験を実施したいと考えている。評価をご希望のねじサンプルがありましたら、ぜひ機械計測グループまでご連絡いただきたい。また、課題としては、呼び径違いへの対応や試験治具の寿命の見極め、緩みの開始時期の調査、等々があげられる。これについては今後のニーズを踏まえつつ検討を進めていきたい。

#### 【参考文献】

1. NATIONAL AEROSPACE STANDARD, NAS3350, NAS3354, NASM1312-7.
2. 滋賀県工業技術総合センター, 研究報告, 10 (2009).
3. 田村修, ねじの知識, 養賢堂
4. 東日トルクハンドブック, Vol.8, 35.

# 超微細多結晶 CBN ホイールの研削特性

横内 正洋 (機械・材料技術部 材料物性グループ)

横田 知宏 (情報・生産技術部 試作加工グループ)

市田 良夫 (CBN&D ナノ加工研究所)

## 1. はじめに

近年開発された超微細多結晶 cBN 砥粒は結晶粒径が約  $0.3\sim 0.4\mu\text{m}$  と細かいため一般的な単結晶 cBN 砥粒よりも破壊強度が高く、耐摩耗性に優れた特性を有している<sup>1)~3)</sup>。このため、多結晶 cBN ホイールは一般の鉄鋼材料をはじめ、高硬度鋼や耐熱合金等の難削材の研削加工にも有効である。また、多結晶 cBN の結晶粒径が細かいため、同じ粒度の単結晶 cBN よりも切れ刃として作用する刃先領域が小さく、切れ刃の数も多い。このことは、同じ粒度の cBN 砥粒でも、実質的には粒度が細くなることを意味しており、工作物の面品位を高める仕上げ加工に有効であると考えられる。一般的に鏡面研削に用いられる cBN 粒度は #325 以上の細かい砥粒が用いられているが、微粒の砥石は目詰まりを起しやすく、また、ドレッシング等の影響が研削現象に大きく影響するため、工作物の面粗さを維持しにくい。一方で、cBN 粒度が粗いと工作物の表面粗さが大きくなる傾向がある。粗粒の cBN ホイールによって工作物の表面粗さの向上を図ることができれば、目詰まりによるドレッシング回数を減らすことができるため、安定した研削加工を長時間維持することができる。

そこで本研究では、比較的粒度が大きい #140 の超微細多結晶 cBN ホイールを用いて高硬度材の鏡面研削加工を実施し、同じ粒度の一般的な単結晶 cBN ホイールとの比較を行い、その研削特性を評価することを目的とした。

## 2. 実験方法

表 1 に実験に用いた砥石の諸元とドレッシング条件を示す。使用した cBN ホイールは #140 の超微細多結晶 cBN 砥粒(cBN-UX)と単結晶 cBN 砥粒(cBN-M)を用いたメタルボンドホイールである。図 1 に今回使用した砥石表面の cBN 砥粒の SEM 観察像を示す。図中(a)の cBN-UX 砥粒では 1 つの粒内に  $0.3\sim 0.4\mu\text{m}$  の結晶粒に起因した微細な凹凸が見られる。一方で(b)cBN-M ではこうした凹凸は観察されない。鏡面加工を実現するためには、微細な切れ刃が作用する cBN-UX 砥粒が有効であると考えられる。実験は横軸平面研削盤による平面研削加工でプランジカットを行い上向き削りでの評価を行った。ドレッシングは WA スティックで行った後にインプリドレッサで最終ドレッシングを行った。

表 2 に研削条件を示す。被削材には SKH51 を HRC65 に調質したものを、工作物速度と切り込み深さを変化

表 1. 砥石の諸元とドレッシング条件

Grinding method	Plunge surface grinding, up cut
Grinding wheel	CBN140N100M Dimensions : $\phi 200\times t10\text{mm}$
cBN grain	Ultrafine polycrystalline cBN-UX Monocrystalline cBN-M
Dressing condition	WA stick (WA#220G) Impregnated dresser(#100)2 $\mu\text{m}\times 2$

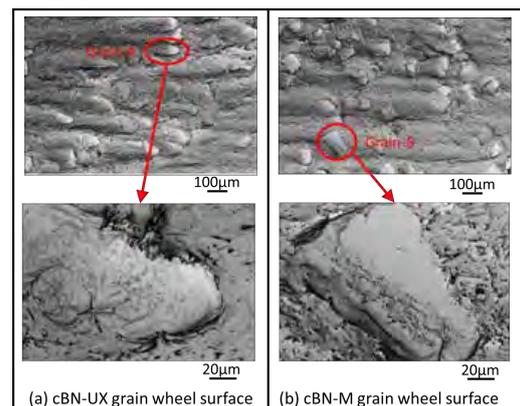
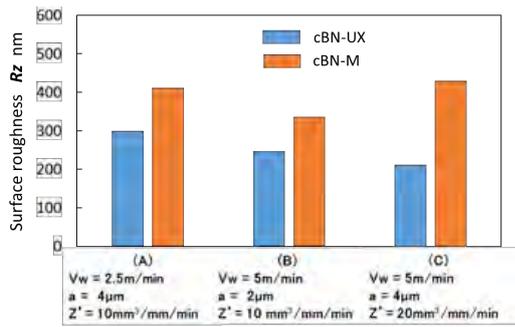
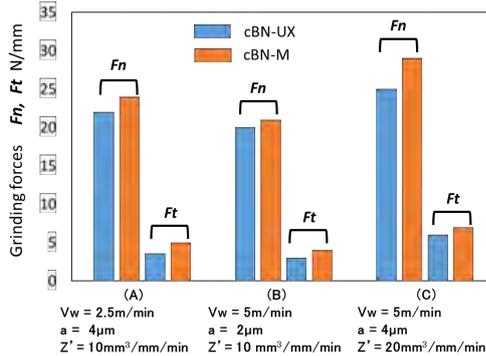
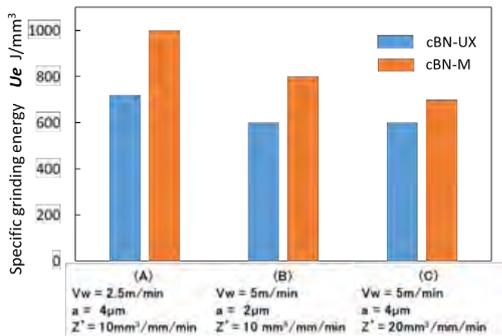
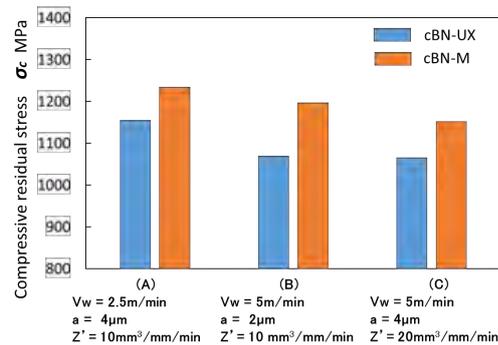


図 1. cBN ホイールの SEM 観察像

表 2. 研削条件

Grinding condition	(A)	(B)	(C)
Work speed $V_w$ (m/min)	2.5	5	5
Wheel depth of cut $a$ ( $\mu\text{m}$ )	4	2	4
Stock removal rate $Z'$ ( $\text{mm}^3/\text{mm}/\text{min}$ )	10	10	20
Peripheral wheel speed $V_s$ (m/min)	2000		
Grinding with (mm)	5		
Work piece	SKH51 HRC65 100 $\times$ 5 $\times$ 30mm		
Grinding fluid	Soluble 5% dilution		

させた(A)、(B)、(C)の3つの条件で行った。評価項目として単位砥石幅当たりの法線研削抵抗  $F_n(\text{N}/\text{mm})$  と接線研削抵抗  $F_t(\text{N}/\text{mm})$  をキスラーの切削動力計で測定した。また、工作物表面粗さ  $R_z(\text{nm})$  と X 線による工作物表面の残留応力  $\sigma_c(\text{MPa})$  をそれぞれ測定した。

図 2. 表面粗さ  $R_z$  への影響図 3. 研削抵抗  $F_n$ ,  $F_t$  への影響図 4. 比研削エネルギー  $U_e$  への影響図 5. 残留応力  $\sigma_c$  への影響

### 3. 実験結果

図 2 に表 2 で設定した研削条件で cBN-UX と cBN-M ホイールを使用し、平面研削加工した工作物表面粗さを示す。今回設定した 3 つの条件全てにおいて、cBN-UX ホイールで研削加工した工作物表面粗さは cBN-M ホイールで研削加工した時よりも小さく、かつ  $R_z=300$  nm 以下の表面粗

さを得ることが出来た。特に今回設定した研削条件の中で最も研削能率の高い (C) 条件 (研削除去率  $Z'=20$  mm<sup>3</sup>/mm/min) で研削した工作物表面粗さは 210 nm を示し、最も表面粗さが良い結果となった。このことは、cBN-UX ホイールが高効率な加工条件においても高精度な研削加工が実現可能であることを示唆している。

図 3 に各研削条件での単位砥石幅当たりの法線研削抵抗  $F_n$  と接線研削抵抗  $F_t$  を示す。研削抵抗においても cBN-M ホイールに比べ、cBN-UX ホイールのほうが低い値を示した。

図 4 に各研削条件での比研削エネルギーを示す。比研削エネルギーについても cBN-UX ホイールは cBN-M ホイールに比べ比研削エネルギーが小さく、より少ないエネルギーで研削加工が可能となっていることが分かる。

図 5 に工作物表面の残留応力測定結果を示す。X 線による残留応力の測定については、工作物長手方向について測定を行った。工作物表面の残留応力についても cBN-UX ホイールは cBN-M ホイールに比べ残留応力が約 100 MPa 程度低い値を示した。これは、図 3 の結果から cBN-M ホイールに比べ cBN-UX ホイールは研削抵抗が低い状態で研削加工が行われたため、工作物に過度な抵抗がかからなかったためであると考えられる。

以上のことから、cBN-UX ホイールは cBN-M ホイールに比べ研削抵抗および比研削エネルギーが小さい状態での研削加工が可能であり、その結果として工作物表面の残留応力が低く、表面粗さも小さいことから、高硬度鋼の鏡面研削加工に有効であることが明らかになった。この理由の 1 つとして、図 1 に示した砥石表面の cBN 砥粒の形状の違いが挙げられる。すなわち、cBN-UX で見られた微細な多結晶粒子に起因する凹凸が微細な切れ刃となり、研削抵抗の低減や工作物表面の残留応力の低減に有効に働き、結果として工作物表面粗さの向上につながったものと考えられる。

### 4. おわりに

本研究では、比較的粒度が大きい #140 の超微細多結晶 cBN ホイールと一般的な単結晶 cBN ホイールを用いて平面研削加工におけるプランジカットでの高硬度材の鏡面研削加工を実施した。明らかになったことを以下に示す。

- (1) 超微細多結晶 cBN ホイールを用いることにより、 $R_z = 300$  nm 以下の良好な鏡面研削が実現できた。特に研削除去率  $Z' = 20$  mm<sup>3</sup>/mm/min で研削した工作物表面粗さは 210 nm を示した。
- (2) 超微細多結晶 cBN ホイールは単結晶 cBN ホイールよりも研削抵抗が低く、比研削エネルギーや工作物残留応力についても低い値を示した。

#### 【参考文献】

- 1) 市田良夫ほか: 日本機械学会論文集(C 編), 62, 3 (1996) 1169-1175.
- 2) Y. Ichida: JSME J.AMDSM, 2, 3 (2008) 385-395.
- 3) Y. Ichida: JSME J.AMDSM, 4, 5 (2010) 1005-1014.

# 流体潤滑領域における炭素系硬質薄膜(DLC)の摩擦特性評価

吉田 健太郎 (機械・材料技術部 材料物性グループ)

## 1. はじめに

潤滑下における DLC 膜のしゅう動においては、膜の種類や使用する潤滑剤によって摩擦特性が異なることが知られており、これには摩擦面に生成する化学反応膜が関与している<sup>1,2)</sup>。この現象は主に対象となる二物体間に潤滑剤が十分に供給されない境界潤滑や混合潤滑下での議論であるが、潤滑剤の供給が十分な弾性流体潤滑や流体潤滑領域では、このような議論はされてこなかった。本研究では弾性流体潤滑領域から流体潤滑領域に相当するしゅう動速度範囲において DLC 膜の摩擦係数としゅう動速度の関係曲線(ストライベック曲線)<sup>3)</sup>を作成することによって、摩擦特性を評価したのでその結果を報告する。

## 2. 実験方法

基材には、SUJ2 軸受鋼(焼入れ、HRC 60)のリング (Φ 35 mm × t 9.5 mm) およびブロック (16.5 mm × 6.18 mm × 9.52 mm) を使用した。全てのリングとブロックにラッピング研磨を施し、二乗平均平方根粗さ(Rq)で、9.6 nm の鏡面に仕上げた。その後、ブロックの一面 (16.5 mm × 6.18 mm) に、DLC 膜を成膜した。各 DLC 膜の性状を表 1 に、表面観察画像を図 1 に示す。

SUJ2 (基材まま)、a-C:H-1.0、ta-C-1.0、ta-C-0.1 の 4 種類のブロックおよび SUJ2 リングの組合せで、ブロックオンリング式摩擦試験を行った。試験装置の外観を図 2 に、図 2 の黄枠内試験部を拡大した模式図を図 3 に示す。試験は潤滑剤中 80 °C の環境下にて行い、回転運動を行うリングに対し、上部に固定したブロックに 32 N の荷重をかけ、速度を 1 mm/s から 9158 mm/s まで 13 step で上昇させ、各速度で 30 s 保持する試験を実施した。ブロックおよびリングは、摩擦試験の前に 2-プロパノールに浸漬して 5 分間超音波洗浄を行った後、送風乾燥した。

潤滑剤としては、合成油のポリ-α-オレフィン(PAO)、PAO にグリセリンモノオレートを 1 wt% 添加した油 (PAO+GMO)、脂肪酸エステル の 3 種類を用いた。材料 4 種類、潤滑剤 3 種類で総計 12 水準の摩擦試験を実施した。

## 3. 実験結果と考察

各 DLC 膜について、弾性流体潤滑領域から流体潤滑領域にかけての摩擦係数としゅう動速度の関係を図 4 に示す。摩擦係数は各 step で 0.1 s 毎に取得したデータの平均

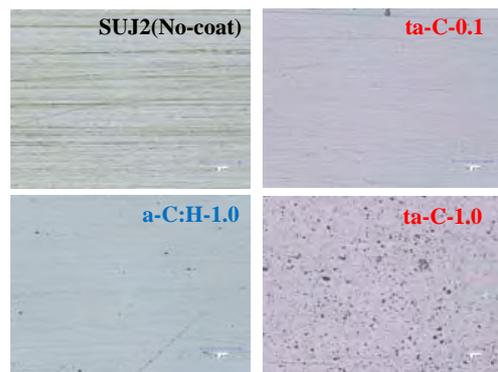


図 1. 各 DLC 膜の表面観察画像



図 2. ブロックオンリング摩擦試験装置外観

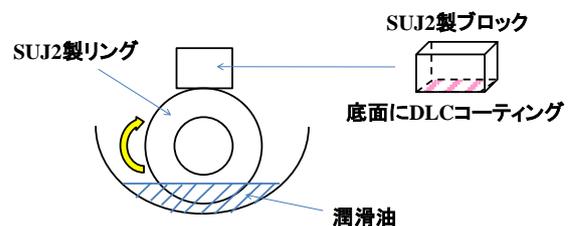


図 3. 摩擦試験部模式図

表 1. 各 DLC 膜の性状

	SUJ2(No-coat)	a-C:H-1.0	ta-C-0.1	ta-C-1.0
成膜法	-	プラズマ化学蒸着 (PCVD)	物理蒸着 (PVD)	物理蒸着 (PVD)
DLC膜厚, μm	-	1.0	0.1	1.0
二乗平均平方根粗さ Rq, nm	9.6	11.7	11.4	28.9

値である。青色は PAO、茶色は PAO+GMO、緑色はエステルの変化である。いずれの試験においても速度が 1000-2000 mm/s 付近で最小値をとり、速度の増加に伴い摩擦係数も上昇する傾向を示した。

いずれのグラフにおいても、エステルを潤滑剤とした場合に相対的に低い摩擦係数が得られた。また ta-C-0.1 は 3 種類の潤滑剤すべてに対して摩擦係数 0.01 以下の超潤滑状態を示した。一方、a-C:H-1.0 は潤滑剤によって摩擦係数が異なる結果となった。一般論として、流体潤滑領域においては二物体間が油膜で隔てられた状態となるため、摩擦係数は流体の粘性抵抗のみに依存すると言われて<sup>4)</sup>いる。この場合、Rq 値がほぼ同じである a-C:H-1.0 と ta-C-0.1 においては、同様の曲線になると想定されたが、実際は異なる結果となった。このことは流体潤滑領域における摩擦係数が膜種に依存することを示しており非常に興味深い結果である。また ta-C-0.1 と ta-C-1.0 において、膜種が同じであるにも関わらず、ta-C-1.0 は摩擦係数値が高い傾向でかつ変化も大きい。この要因はドロップレット（表面凹凸）の影響による表面粗さの違いが考えられる。

次に、同じ実験結果を用いて潤滑剤の性能を比較するため、潤滑剤毎に摩擦係数の測定結果を比較したものを図 5 に示す。紫色は SUJ2、緑色は a-C:H-1.0、茶色は ta-C-1.0、青色は ta-C-0.1 の変化である。エステルや PAO を用いた

場合の a-C:H-1.0 の摩擦係数が低い傾向であった。エステルはほぼ全ての材料および速度において超潤滑を示した。PAO+GMO は相対的に摩擦係数が大きく、PAO のみの結果と比較して、何らかの要因で GMO が影響した可能性が考えられる。

#### 4. まとめ

各種 DLC 膜および潤滑剤を用いてストライベック曲線を作成することにより、弾性流体潤滑領域および流体潤滑領域における摩擦特性を評価した結果、以下の知見を得た。

- ・膜種によって摩擦係数が異なった。
- ・エステルは膜種によらず摩擦係数 0.01 以下の超潤滑を維持した。また ta-C-0.1 は潤滑剤によらずほぼ同様の变化を示した。この機構考察については今後実施する予定である。

#### 【参考文献】

- 1) M. Kalin & R. Simic ; Appl. Surf. Sci., 271(2013)317.
- 2) 吉田ら, トライボロジスト, 58, 10(2013)773.
- 3) 桜井俊男; “新版潤滑の物理化学”, P25(1978).
- 4) 桜井俊男; “新版潤滑の物理化学”, P28(1978).

#### 【外部発表】 口頭発表 1 件予定

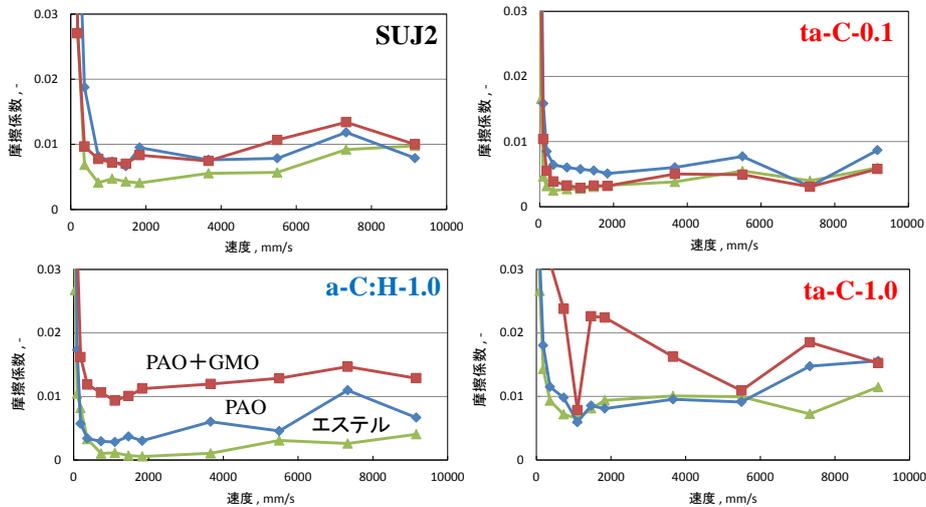


図 4. 各 DLC 膜における摩擦係数と速度の関係

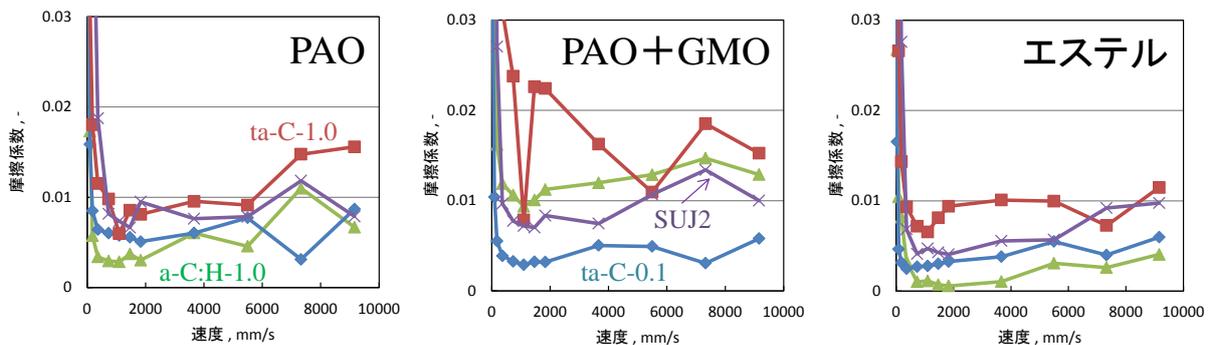


図 5. 潤滑剤ごとの摩擦係数と速度の関係

# ZnO 微粒子を添加した圧電性高分子膜の開発

良知 健(機械・材料技術部 ナノ材料グループ)

## 1. はじめに

圧電材料は機械/電気エネルギーを相互に変換できる特徴を持ち、センサやアクチュエータとして古くから利用されている材料である<sup>1)2)</sup>。また近年では環境からエネルギーを取り出すエナジーハーベスティングの観点からも注目されている。

現在一般的に使用されている圧電材料は、チタン酸ジルコン酸鉛(PZT)<sup>3)4)</sup>に代表される無機材料を用いた圧電セラミックスである。しかし、圧電セラミックスは柔軟性に乏しいため曲面部への適用が難しく適用箇所が制限されるという問題がある。さらに PZT は鉛を含むため、環境への影響という観点からも課題がある。これに対し、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)などの圧電性高分子は圧電特性や耐熱性の点ではセラミックス系には及ばないものの、柔軟性が高いという特長を持つ。そのため柔軟性と圧電性の両立を目的として、セラミックスと高分子を組み合わせた様々な複合圧電材料が検討されている<sup>5)6)</sup>。しかし、高分子膜中に分散させるセラミックスの量が増えてくると柔軟性が低下するため、圧電性能の向上が困難になるという課題がある。

そこで、本研究ではこの柔軟性の低下を抑制するため、圧電性高分子であるフッ化ビニリデンとトリフルオロエチレンの共重合体(P(VDF-TrFE))に分散するセラミック粒子を酸化亜鉛(ZnO)微粒子とした。微粒子とすることでセラミックスの量が増えても柔軟性が確保できるとともに、ZnOは有害な元素を含まないことから環境負荷も低減できる。

## 2. 実験方法

ZnO 微粒子の作製は、ガスデポジション装置(真空冶金、PJ930-KK)を用い、ガス中蒸発法により行った。ガス中

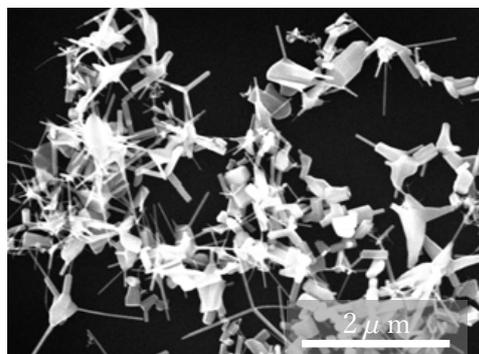


図1 ZnO 微粒子のSEM像

蒸発法は、原料となる材料をガス中で蒸発させ、微粒子を得る方法である。原料の亜鉛粉末の蒸発はアーク加熱により行い、負極はカーボン電極とした。なお、アーク放電の印加電圧、電流はそれぞれ 20 V、50 A とした。雰囲気ガスには 20% O<sub>2</sub> - He ガスを用い、作製時の圧力は 1.1×10<sup>5</sup> Pa、ガス流量は 3 l/min とした。生成した微粒子は水冷されたチャンバー内の内壁に付着するため、作製終了後にチャンバー内壁から掻き取って回収した。

P(VDF-TrFE) (Sigma-Aldrich Solvne200/P200) をメチルエチルケトン (MEK) に溶解した後、そこにガス中蒸発法により作製した ZnO 微粒子を添加し、スターラーを用いて分散させた。なお、ZnO の添加量は 0, 1.5 wt% とした。Au 電極を形成したポリイミドフィルム (12.5 μm) に上記分散液を滴下し、室温で乾燥させた後、強誘電性を示す β 型結晶を得るため 130-150 °C で 1 時間加熱した。最後に膜の表面に Au 電極を形成し測定試料とした。作製した膜に直流電場を印加し分極処理を行った。圧電性の発現は、ファンクションジェネレータで交流電圧を印加し、膜の振動に伴う音の発生により確認した。

ZnO 微粒子と膜表面の形状は走査電子顕微鏡 (SEM) (日本電子 JSM-IT200LA) により評価した。膜の比誘電率はインピーダンスアナライザ (日置電機 IM3570) を用いて測定した。P(VDF-TrFE)の結晶相は顕微レーザーラマン分光装置 (堀場製作所 XploRA Plus) を用いて評価した。

## 3. 結果および考察

ガス中蒸発法により作製した ZnO 微粒子の SEM 像を図 1 に示す。ZnO 微粒子は短径が 10~500 nm 程度、長径が 50 nm~1 μm 程度の異方性を持った粒子であることがわかる。

まず ZnO を添加せずに P(VDF-TrFE)膜を作製し、加熱

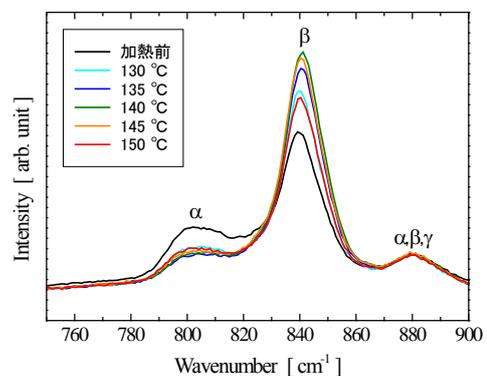


図2 P(VDF-TrFE)膜の加熱前と130-150 °Cで1時間加熱後のラマン分光スペクトル

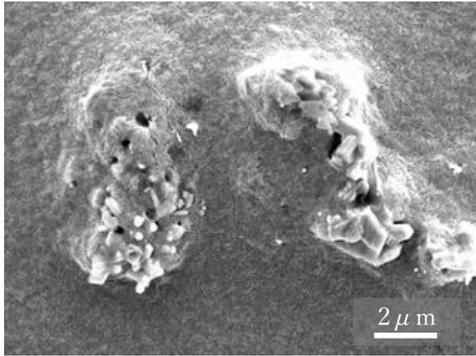


図3 ZnO 5wt% 試料表面のSEM像

温度条件、分極条件を確認した。P(VDF-TrFE)膜を130-150°Cで1時間加熱した試料のラマン分光スペクトルを図2に示す。140°Cで $\beta$ 型結晶の割合が最も大きくなっていることがわかる。以後加熱温度は140°Cとした。分極条件については、膜に印加する直流電場を段階的に上げていき、その都度ファンクションジェネレータで交流電圧を印加して音の発生の有無（圧電性の有無）を確認した。その結果、22 MV/mの電場を印加した時点で圧電性の発現が確認できた。

次にZnOの添加量が1 wt%、5 wt%の試料について同様の評価をしたところ、電極間に短絡が見られ、圧電性の発現が確認できなかった。この原因を明らかにするため、試料の表面をSEMで観察したところ、膜の所々に図3に見られるようなZnOの凝集体があることがわかった。この凝集体付近では膜に空隙が見られていることから、ZnOの凝集箇所ピンホールが生じ、そのため膜の表面と裏面の電極間で短絡が生じたものと考えられる。圧電性評価のためにはZnOの凝集を防ぐ必要があり、ZnOの分散方法に課題があることがわかった。

最後に、作製した試料の1 kHzにおける比誘電率の測定結果を表1に示す。上述したようにZnOを添加した試料では電極間の短絡が見られており、これによりリーク電流が増大したために大きく見積もられている可能性はあるが、添加量の増加につれて比誘電率が大きくなっているこ

表1 1 kHzにおけるZnO添加P(VDF-TrFE)膜の比誘電率

ZnO量 (wt%)	比誘電率
0	7.5
1	27
5	150

とが分かる。このことから、ZnOの添加によってP(VDF-TrFE)膜の誘電特性が向上し、圧電特性が向上することが期待できる。

#### 4. まとめ

P(VDF-TrFE)膜にZnO微粒子を添加することにより高い圧電性と柔軟性を両立した膜の開発を試みた。P(VDF-TrFE)膜に分極処理を施すことで圧電性の発現を確認したが、ZnO微粒子を添加して作製した膜では微粒子の凝集により膜に空隙が見られ、これにより電極間が短絡したために圧電性の発現を確認することができなかった。一方で、ZnO微粒子を添加した膜では添加量の増加に伴い比誘電率が大きくなることから、圧電特性の向上が期待できる結果となった。

#### 【参考文献】

1. C. D. Richards, M. J. Anderson, D. F. Richards, J. Micromechanics and Microengineering, **14**, 717 (2004).
2. H. Luo and S Hanagud, J. Aerospace engineering, **23**, 23 (1999).
3. G. Shirane and K. Suzuki, J. Phys. Soc. Japan, **7**, 333 (1952).
4. B. Jaffe, R. S. Roth and S. Marzullo, J. Research of Natural Bureau of Standards, **55**, 239 (1955).
5. T. Furukawa, K. Fujino and E. Fukada, Jap. J. App. Phys., **15**, 2119 (1976).
6. R. E. Newnham et al., Proc. IEEE Ultrasonic Symp., 501 (1984).



# 耐電圧試験における不確かさの検討

井上 崇（電子技術部 電子システムグループ）

## 1. はじめに

試験所の技術的適格性を評価する試験所認定制度において、認定の基準となる国際規格 ISO/IEC 17025（試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項）が、2017年に改正された（邦訳版の JIS Q 17025 は 2018 年改正）。

改正後の規格では、旧規格において、測定不確かさの評価が求められていなかった試験についても、検討を実施する事が必須となっている（ISO/IEC 17025:2017 7.6.1 項および 7.6.3 項）<sup>1)</sup>。

現在、日本における試験所認定制度の 1 つとして、JIS 法に基づく試験事業者登録制度（JNLA：Japan National Laboratory Accreditation system の略）が、独立行政法人 製品評価技術基盤機構において運営されている。

当部でも平成 18 年より、この試験事業者登録制度（JNLA）による登録を受け、耐電圧試験を実施している。

耐電圧試験は、結果が数値で表せないため、旧規格による基準では、測定不確かさの評価が求められていない試験の一つとされていた。しかし、先にも述べた通り、改正後の ISO/IEC 17025:2017（JIS Q 17025：2018）基準に対応させるためには、不確かさの検討が必要となっている。

そこで、今回、この耐電圧試験の不確かさについて、検討を行った結果を報告する。

## 2. 不確かさについて<sup>1) 2)</sup>

不確かさは、いわゆる誤差（真の値からの差）と異なり、真の値が、ある範囲の間に存在していることを表し、測定結果の疑わしさを数値で表しているともいえる。

通常、不確かさの評価を実施するには、以下のような流れで行われる。

- ① 不確かさに影響を及ぼす要因を特定
- ② 各要因のばらつきを算出
- ③ 各要因のばらつきを合成し、全体のばらつきを算出

不確かさの評価についての詳細は、ISO の「測定における不確かさの表現のガイド（Guide to the expression of uncertainty in measurement :GUM）」等を参照してもらうのが良いが、不確かさの要因として考えられる主な項目として、以下のような要因がある。

- ・ 温湿度等の試験環境に関係する要因
- ・ 試験を実施する作業者に関係する要因
- ・ 測定機器に関係する要因
- ・ 試験品（サンプル）に関係する要因

また、各要因のばらつきを算出する際には、以下のような手法を利用する。

- ・ A タイプ評価  
実験により、ばらつきを算出する。
- ・ B タイプ評価  
実験以外の方法により、ばらつきを推定する。

## 3. 耐電圧試験について

当部において、JIS 法に基づく試験事業者登録制度（JNLA）による登録を受け、実施している耐電圧試験は、以下の 2 種類となっている。

- ・ JIS C 6950-1  
情報技術機器—安全性—第 1 部：一般要求事項
- ・ JIS T 0601-1  
医用電気機器—第 1 部：基礎安全及び基本性能に関する一般要求事項

各 JIS に規定されている試験方法に多少の違いはあるが、基本的には、測定対象の規定された箇所へ、耐電圧試験機（図 1）により、規定の電圧（AC1000V 等）を 1 分間印加し、絶縁破壊等が起こらないことを確認するといった試験内容となっている。



図 1. 耐電圧試験機

## 4. 実験及び結果

今回、耐電圧試験の不確かさ要因として、以下のような項目を検討した。

- ・ 測定環境（試験実施時の周囲温度・湿度）
- ・ 作業員（測定実施者・繰り返し測定）
- ・ 測定機器（校正・安定性・表示分解能）
- ・ 試験品（保管温度・動作温度等）

これらの要因に対し、先のばらつきを算出する手法のう

ち、実験により評価を行う A タイプ評価を用いて、作業者と試験品に関係する要因のばらつきを算出することとし、実験以外の方法により評価を行う B タイプ評価により、測定機器に関係する要因のばらつきを算出することとした。なお、測定環境については、 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$   $60\% \pm 15\%$  に管理されている場所での測定としているため、ほとんど影響は無いと考えられる。

さて、A タイプ評価により、作業者と試験品に関係する要因のばらつきを算出するため、図 2 に示すような小型の JIS T 0601-1 対応絶縁トランス (5 台) を準備し、以下のような実験を行った。

(実験 1)

2 名の作業者による JIS T 0601-1 に基づいた、耐電圧試験の実施 (日を変えて 2 回実施)。

(実験 2)

保管条件として、JIS T 0601-1 に基づく湿度前処理 ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C} \cdot 93 \pm 3\% \cdot 48$  時間) 前後における耐電圧試験の実施。



図 2. 試験用サンプル (絶縁トランス)

試験実施時には、作業者の試験順番をランダムとし、測定条件も以下の通り、固定した内容で行った。

(測定条件)

- 試験電圧 : AC1000V
- 周波数 : 60Hz
- 試験時間 : 1 分間印加
- 試験箇所 : 電源入力部と筐体間

その結果、実験 1 では、全ての試験において、出力電圧 (試験電圧) は安定し、試験開始から終了時までの間に電圧変動は見られなかった。

なお、耐電圧試験機が電圧と同時に表示 (測定) する漏れ電流 (カットオフ電流) 値に、わずかな変動がみられたが、その変動率は 1% 以下であった。

同様に、実験 2 においても、漏れ電流値に最大 5% 程度の増加がみられたものの出力電圧に変動は見られず、作業者による影響と保管条件による影響は、ほとんど見られなかった。

これらの結果より、先の 2 つの要因による測定不確かさへの寄与率は低いことが確かめられた。

ちなみに、漏れ電流値の変化は、絶縁性能の変化を示していると考えられる。しかし、試験規格 (JIS) 上では、試験電圧の規定のみで漏れ電流値に制限を設けていないため、漏れ電流値による評価は行っていない。

続いて、B タイプ評価により、測定機器に関係する要因のばらつきを以下の様に算出した。

- ・校正の不確かさ  
一般的には、機器の校正証明書に記載された不確かさを適用するが、今回は、当所における機器の管理範囲において矩形分布すると仮定し、算出した。
- ・安定性の不確かさ  
仕様上、機器の AC Accuracy は、1% of Reading +30V となっているため、矩形分布すると仮定し、算出した。
- ・表示分解能の不確かさ  
仕様上、機器の表示分解能は 10V となっているが、表示単位が kV のため、AC Accuracy 等の値を考慮して、試験時の読取値を 100V としている。今回は、読取値 100V の 1/2 となる 50V として、矩形分布すると仮定し、算出した。

以上のようにして算出した各要因のばらつきを合成し、試験電圧 AC1000V で耐電圧試験を実施した場合の拡張不確かさを計算すると次のようになる。

$$\text{AC1000V} \pm 84\text{V} \quad (k=2)$$

結果として、試験手順が正しく実施されている限り、試験機に関連する要因以外の不確かさは、あまり影響が無いことも確かめられた。

5. まとめ

今回、国際規格である ISO/IEC 17025 の改訂に伴い、算出例の少ない耐電圧試験について、不確かさの検討を行った。その結果、試験の実施手順が正しく実施されている限り、ほぼ試験機に関連する要因のみとなることが確かめられた。

ただし、試験品 (サンプル) による要因が全くない訳ではなく、試験中に出力電圧が不安定となる場合などには、繰り返し測定を実施する必要があるかもしれない。

【参考文献】

1. 藤間, 大高 編著, ISO/IEC 17025:2017 (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項) 要求事項の解説, 日本規格協会 (2018).
2. 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 認定センター, JNLA 不確かさの見積もりに関するガイド (電気分野), JNG320S0301-02, 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (2018).

# KISTEC における放射エミッション測定の不確かさの評価

白井 亮、鶴田 誠（電子技術部 電磁環境グループ）

## 1. はじめに

KISTEC では、1995 年より電波暗室・電磁波シールド室において EMC（電磁両立性: electromagnetic compatibility）試験業務を開始し、これまで、多くの企業の方にご利用いただいている。

EMC 試験には大きく分けて 2 種類のものがあり、一つは、電子機器から発生する不要な電磁ノイズが規格で決められた限度値以下に収まっているかを評価する EMI（Electromagnetic Interference：電磁妨害）測定。もう一つは、規格で決められた電磁ノイズを電子機器へ与えて耐性能力を評価するイミュニティ（耐性: immunity）試験であり、これらの EMC 試験は電子機器の開発において不可欠なものとなっている。

EMC 試験の試験規格は技術の変化に伴い試験方法や測定周波数範囲などが改定されてきたが、近年ではさらに測定の不確かさが求められるようになってきた。

日本国内では EMI 測定の自主規制を進めている（一財）VCCI 協会（以下 VCCI：Voluntary Control Council for Interference by Information Technology Equipment）において、2019 年 4 月から不確かさの算出を求めようになり、賛助会員である KISTEC でも対応が必須となった。

2019 年度の研究報告では EMI 測定うち比較的算出が容易な電源ポート伝導エミッション測定の不確かさについて報告したが、2020 年度は、KISTEC において利用率が非常に高い、30MHz～1GHz における放射エミッション測定の不確かさについて記載する。なお、報告内容の性質上、2019 年度の研究報告と共通する箇所があり、記載内容が重複している部分があるが、ご容赦願いたい。

## 2. 放射エミッション測定の測定系

放射エミッション測定は、供試機器の筐体から発生する放射ノイズの測定を目的としており、KISTEC においては図 1 の 3m 法電波暗室にて実施している。



図 1 3m 法電波暗室における放射エミッション測定

放射エミッション測定の測定系を図 2 に示す。供試機器からの放射ノイズはアンテナで受信され、整合用の減衰器を介してプリアンプへ入力される。プリアンプにより増幅された信号は電波暗室と測定室の間にあるフィルタ盤を介して受信機へ入力される。測定には計測ソフトを使用する。

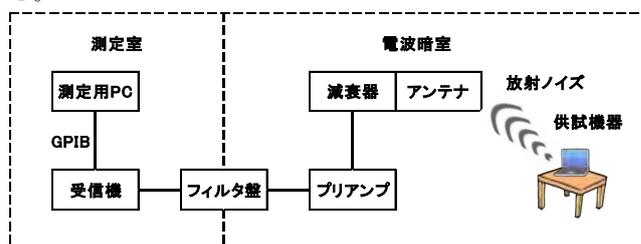


図 2 放射エミッション測定の測定系

受信機：ROHDE&SCHWARZ ESU26

プリアンプ：SONOMA 310

バイコニカルアンテナ：Schwarzbeck BBA9106+パラボラ VHA9103B

ログペリオディックアンテナ：Schwarzbeck VULP9118A

減衰器：HUBER+SUHNER 6dB

計測ソフト：テクノサイエンスジャパン TEPTO

## 3. 不確かさの要因

放射エミッション測定のバイコニカルアンテナ（30MHz-200MHz）水平／垂直のバジェットシートを表 1、2 に、ログペリオディックアンテナ（200MHz-1000MHz）水平／垂直のバジェットシートを表 3、4 に示す。入力量  $X_i$  の測定量  $V$  は次のとおりとなる。

$$V = V_{r+ac} + G_P + F_a + \delta V_{SW} + \delta G_P + \delta V_{pa} + \delta V_{pr+} + \delta V_{nf} + \delta M_{aa} + \delta M_{ar} + \delta F_{af} + \delta F_{ah} + \delta F_{adir} + \delta F_{aph} + \delta F_{acp} + \delta F_{abal} + \delta AN + \delta d + \delta AN_T + \delta h + \delta E_{amb}$$

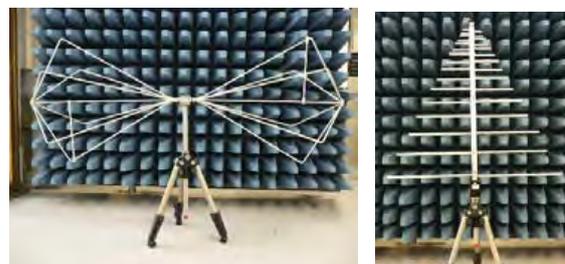


図 3 バイコニカルアンテナ（左）とログペリオディックアンテナ（右）

不確かさの要因である入力量の推定値  $x_i$  について検討した内容を以下に記載する。なお a)、f)を除き、入力量と

確率分布関数については、VCCI 規定と CISPR16-4-2(CISPR: 国際無線障害特別委員会)を引用している。

a) 測定用受信機の読み:  $V_r$  は、測定系の不安定さや計測ソフトの数値の丸め込みに関する入力量である。一般的な算出方法である平均値の実験標準偏差を求めたが、使用している計測ソフトの丸め込み(小数点 2 位以下を四捨五入)による影響の方が大きいので  $V_r$  は $\pm 0.05\text{dB}$  と推定した。確率分布関数は一様(除数 $\sqrt{3}$ )となる。

b) アンテナ-受信機 減衰量:  $a_c$  は、アンテナ-受信機間を接続する同軸ケーブルで生じる高周波損失に関する入力量である。損失はネットワークアナライザにより測定しているため、ネットワークアナライザの校正データからレベル測定に関する不確かさを引用して  $a_c$  を求めた。校正データからの引用であるため、確率分布関数は正規分布(除数 2)となる。

c) アンプの利得:  $G_p$  はアンテナで受信した信号を増幅するプリアンプの利得に関する入力量である。利得はネットワークアナライザにより測定しているため、ネットワークアナライザの校正データからレベル測定に関する不確かさを引用して  $G_p$  を求めた。校正データからの引用であるため、確率分布関数は正規分布(除数 2)となる。

d) アンテナ係数:  $F_a$  は、受信電圧を電界強度に変換するためのアンテナ係数に関する入力量であり、校正データから引用した。校正データからの引用であるため、確率分布関数は正規分布(除数 2)となる。

e) 正弦波電圧:  $\delta V_{sw}$  は、受信機の正弦波電圧測定に対する精度の入力量であり、校正データから引用した。校正データからの引用であるため、確率分布関数は正規分布(除数 2)となる。

f) アンプの不安定さ:  $\delta G_p$  は、アンプの電源投入から安定するまでのエージングの影響に関する入力量である。電源投入後 0 分、30 分、60 分、90 分、120 分でそれぞれ 10 回ずつ利得を測定して、平均値の実験標準偏差を求めたところ、大きな変動は確認できなかったため、30 分後の平均値の実験標準偏差の最悪値を引用した。平均値の実験標準偏差からの引用であるため確率分布関数は正規分布(除数 1)となる。

g) パルス振幅応答:  $\delta V_{pa}$  は、受信機のパルス振幅測定に対する精度の入力量である。校正データから引用することもできるが、校正時に使用するパルスは、実際の供試機器から発生する妨害波とは大きく異なるため、引用せず、代わりに CISPR16-4-2 が定める基準値を引用した。確率分布関数は一様(除数 $\sqrt{3}$ )となる。

h) パルス繰り返し率応答:  $\delta V_{pr}$  は、受信機の繰り返しパルスに対する精度の入力量である。g)と同様の理由から CISPR16-4-2 が定める基準値を引用した。確率分布関数は一様(除数 $\sqrt{3}$ )となる。

i) ノイズフロアの影響:  $\delta V_{nf}$  は、受信機のノイズフロアが測定値に与える影響に関する入力量である。使用している受信機は CISPR 規格に適合したもので、ノイズフロアは VCCI 規格の限度値に対して 30dB 程度の余裕があるため、影響は無視できると考えた。

j) アンテナ-アンプ間の不整合:  $\delta M_{aa}$  は、アンテナとアンプの接続箇所の反射の影響に関する入力量である。アンテナ(減衰器含む)とアンプ(入力)の反射係数を実測し、合成して算出した。確率分布関数は U 字(除数 $\sqrt{2}$ )となる。

k) アンプ-測定用受信機間の不整合:  $\delta M_{ar}$  は、アンプ・フィルタ盤、測定用受信機の接続箇所の反射の影響に関する入力量である。アンプ(出力)の反射係数は実測値。フィルタ盤の反射係数は一般的な値(1.2)。測定用受信機の反射係数は校正データから引用し、これらを合成して算出した。確率分布関数は U 字(除数 $\sqrt{2}$ )となる。

l) アンテナファクタ周波数補間:  $\delta F_{ar}$  は、校正データから得られるアンテナファクタを周波数補間によって計算する際に生じる誤差に関する入力量であり、校正データから算出した。確率分布関数は一様(除数 $\sqrt{3}$ )となる。

m) アンテナファクタ高さ変動:  $\delta F_{ah}$  は、アンテナの設置高さによるアンテナファクタの変動に関する入力量であり、CISPR16-4-2 が定める基準値を引用した。確率分布関数は三角(除数 $\sqrt{6}$ )となる。

n) 指向性の相違:  $\delta F_{adir}$  は、各周波数におけるアンテナの指向性と最大受信レベルが得られるアンテナの高さに関する入力量であり、CISPR16-4-2 が定める基準値を引用した。確率分布関数は一様(除数 $\sqrt{3}$ )となる。

o) 位相中心差:  $\delta F_{aph}$  は、アンテナの基準点から共振する周波数のアンテナエレメントまでの距離の違いによる影響に関する入力量である。バイコンカルアンテナは、基準点とエレメントの位置が同じなので入力量は 0。ログペリオディックアンテナは高周波側の短いエレメントと低周波側の長いエレメントの中央付近に基準点があり、基準点から各エレメントまでの距離から入力量を算出した。確率分布関数は一様(除数 $\sqrt{3}$ )となる。

p) 交差偏波:  $\delta F_{acp}$  は、アンテナの水平偏波と垂直偏波の識別度に関する入力量である。6 面電波暗室内での測定結果の最悪値から算出した。確率分布関数は一様(除数 $\sqrt{3}$ )となる。

q) 平衡度:  $\delta F_{abal}$  は、アンテナを上下逆にセットして測定したときの影響に関する入力量である。KISTEC ではアンテナの上下を決めて測定を実施しているので 0 とした。

r) サイトの不完全さ:  $\delta A_{ni}$  は、電波安室内の不要な反射による影響に関する入力量である。サイトアッテネーション測定の最悪値から算出した。確率分布関数は三角(除数 $\sqrt{6}$ )となる。

s) 離隔距離:  $\delta d$  は、測定距離による影響に関する入力量である。距離を正確に測定できれば無視できるが、CISPR16-4-2 に準じて $\pm 0.1\text{m}$ として算出した値を引用した。確率分布関数は一様(除数 $\sqrt{3}$ )となる。

t) 試験テーブル材質の影響:  $\delta A_{NT}$  は、発泡スチロール、FRP、木材などのテーブル材質の反射の影響に関する入力量である。CISPR16-1-4 では 200MHz 以上の周波数帯域で評価することが記載されている。当研究所では、発泡スチロールのテーブルを使用しており、影響は小さいと考えるが、評価用のアンテナを所有していないため、CISPR16-4-

2が定める基準値を引用した。

u) 試験テーブルの高さ： $\delta Ah$  は、試験テーブルの高さの誤差の影響に関する入力量である。当研究所で使用している発泡スチロールのテーブルは、テーブルそのものは規格で決められた高さ 0.8m だが、材質が柔らかいため重量の重い EUT を設置した場合、僅かな誤差が考えられるため、CISPR16-4-2 に準じて  $\pm 0.01m$  として算出した値を引用した。確率分布関数は正規分布（除数 2）となる。

v) OATS 上の外来雑音の影響： $\delta E_{amb}$  はオープンサイト（OATS）で測定する場合の外来雑音の影響に関する入力量である。KISTEC では、電波暗室内で測定を行っているため影響は無視できると考えた。

#### 4. 拡張不確かさの算出

標準不確かさ  $c_i u(x_i)$  は、感度係数  $c_i$  を 1 とし、 $x_i$  の不確かさを除数で除して算出する。次に合成標準不確かさ  $u_c(y)$  を次式により算出する。

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_i c_i^2 u^2(x_i)}$$

この合成標準不確かさに、次式のとおり包含係数  $k=2$  を乗ずることにより拡張不確かさ  $U_{lab}$  を算出する。

$$U_{lab} = 2u_c(y)$$

#### 5. 結果および考察

KISTEC における放射エミッション測定の不確かさを算出した結果、拡張不確かさ  $U_{lab}$  はバイコンカルアンテナ水平 3.3dB、垂直 3.9dB、ログペリオディックアンテナ水平 3.6dB、垂直 5.0dB（ $U_{lab}$  は包含係数  $k=2$  として求めた拡張不確かさで、約 95%の信頼の水準を持つと推定される区間を定める。）となった。CISPR で提示されている基準値  $U_{CISPR}$  は 6.3dB であり、いずれも基準値内に収まっている。ログペリオディックアンテナ垂直で若干大きな値

となっているが、これは  $n$  指向性の相違の影響が大きいためである。高周波帯域のログペリオディックアンテナではアンテナパターンが一様でない部分の影響が比較的大きく、アンテナが高い位置にあるときは供試機器との角度が大きくなり、アンテナパターンの正面から離れたところで供試機器からの放射ノイズを受信するため不確かさの入力量が大きくなっている。CISPR では入力量を小さくする方法として、供試機器の方向へアンテナに傾斜角を付けて測定する方法が提案されている。また、測定距離が長い 10m 法電波暗室では 3m 法電波暗室に比べて供試機器との角度が小さいため入力量は小さくなる。

今のところ VCCI では不確かさの算出を要求していないが、測定結果への適用までは要求していない。しかし、CISPR では、不確かさが基準値より大きい場合は測定値に不確かさを加えて評価する必要があり、VCCI でも、将来的には適用する可能性もあることから、不確かさの算出は、重要な課題と言える。今回、KISTEC における放射エミッション測定の不確かさは CISPR の基準値内に収まっていたが、今後は、CISPR 基準値を引用した入力量の再検討や、測定系の改善などを行い KISTEC における不確かさをより小さくしたいと考える。

#### 【参考文献】

- 1.VCCI32-1-3:2016 測定装置の不確かさ、(一財) VCCI 協会、(2016)
- 2.CISPR16-4-2 Edition2.1 Specification for radio disturbance and immunity measuring apparatus and methods - Part 4-2: Uncertainties, statistics and limit modelling - Measurement instrumentation uncertainty, CISPR, (2014)
- 3.今井秀孝ほか、測定における不確かさの表現ガイド [GUM]ハンドブック、日本規格協会、(2018)
- 4.白井亮、鶴田誠、KISTEC における電源ポート伝導エミッション測定の不確かさの評価、KISTEC 研究報告、(2019)

表1 放射エミッション測定, バイコニカルアンテナ (30MHz-200MHz) 水平のバジェットシート

入力量	$X_i$	$x_i$ の不確かさ		標準不確かさ
		dB	確率分布関数	
a)測定用受信機の読み	$V_r$	± 0.05	一様	0.03
b)アンテナ-受信機 減衰量	$a_c$	± 0.28	K=2	0.14
c)アンプの利得	$G_p$	± 0.28	K=2	0.14
d)アンテナ係数	$F_a$	± 0.62	K=2	0.31
・受信機補正值:				
e)正弦波電圧	$\delta V_{sw}$	± 0.25	K=2	0.13
f)アンプの不安定さ	$\delta G_p$	± 0.002	K=1	0.002
g)パルス振幅応答	$\delta V_{pa}$	± 1.5	一様	0.87
h)パルス繰り返し率応答	$\delta V_{pr}$	± 1.5	一様	0.87
i)ノイズフロアの影響	$\delta V_{nf}$	± 0		
j)不整合:アンテナ-アンプ	$\delta M_{aa}$	0.43 -0.45	U字	0.31
k)不整合:アンプ-測定用受信機	$\delta M_{ar}$	0.17 -0.17	U字	0.12
・バイコニカルアンテナ補正				
l)アンテナファクタ周波数補間	$\delta F_{af}$	± 0.2	一様	0.12
m)アンテナファクタ高さ変動	$\delta F_{ah}$	± 1	一様	0.58
n)指向性の相違	$\delta F_{adir}$	± 0		
o)位相中心位置	$\delta F_{aph}$	± 0		
p)交差偏波	$\delta F_{asp}$	0.79 -0.87	一様	0.48
q)平衡度	$\delta F_{abal}$	± 0		
・サイト補正				
r)サイトの不完全さ	$\delta A_N$	2.25 -0.87	三角	0.64
s)離隔距離	$\delta d$	± 0.3	一様	0.17
t)試験テーブル材質の影響	$\delta A_{NT}$	± 0		
u)試験テーブルの高さ	$\delta h$	± 0.1	K=2	0.05
v)OATS上の外來雑音の影響	$\delta E_{amb}$	± 0		

合成標準不確かさ 1.7dB

拡張不確かさ 3.3dB (Ucisp=6.3)

表2 放射エミッション測定, バイコニカルアンテナ (30MHz-200MHz) 垂直のバジェットシート

入力量	$X_i$	$x_i$ の不確かさ		標準不確かさ
		dB	確率分布関数	
a)測定用受信機の読み	$V_r$	± 0.05	一様	0.03
b)アンテナ-受信機 減衰量	$a_c$	± 0.28	K=2	0.14
c)アンプの利得	$G_p$	± 0.28	K=2	0.14
d)アンテナ係数	$F_a$	± 0.62	K=2	0.31
・受信機補正值:				
e)正弦波電圧	$\delta V_{sw}$	± 0.25	K=2	0.13
f)アンプの不安定さ	$\delta G_p$	± 0.002	K=1	0.002
g)パルス振幅応答	$\delta V_{pa}$	± 1.5	一様	0.87
h)パルス繰り返し率応答	$\delta V_{pr}$	± 1.5	一様	0.87
i)ノイズフロアの影響	$\delta V_{nf}$	± 0		
j)不整合:アンテナ-アンプ	$\delta M_{aa}$	0.43 -0.45	U字	0.31
k)不整合:アンプ-測定用受信機	$\delta M_{ar}$	0.17 -0.17	U字	0.12
・バイコニカルアンテナ補正				
l)アンテナファクタ周波数補間	$\delta F_{af}$	± 0.2	一様	0.12
m)アンテナファクタ高さ変動	$\delta F_{ah}$	±		
n)指向性の相違 距離3m,<130MHz	$\delta F_{adir}$	± 0.5	一様	0.29
距離3m,>130MHz	$\delta F_{adir}$	± 1	一様	0.58
o)位相中心位置	$\delta F_{aph}$	± 0		
p)交差偏波	$\delta F_{asp}$	0.79 -0.87	一様	0.48
q)平衡度	$\delta F_{abal}$	± 0	一様	0.00
・サイト補正				
r)サイトの不完全さ	$\delta A_N$	3.39 -2.26	三角	1.15
s)離隔距離	$\delta d$	± 0.3	一様	0.17
t)試験テーブル材質の影響	$\delta A_{NT}$	± 0		
u)試験テーブルの高さ	$\delta h$	± 0.1	K=2	0.05
v)OATS上の外來雑音の影響	$\delta E_{amb}$	± 0		

合成標準不確かさ 2.0dB

拡張不確かさ 3.9dB (Ucisp=6.3)

表3 放射エミッション測定, ログペリオディックアンテナ (200MHz-1000MHz) 水平のバジェットシート

入力量	$X_i$	$x_i$ の不確かさ		標準不確かさ $c_{u(x)}$ dB
		dB	確率分布関数	
a)測定用受信機の読み	$V_r$	± 0.05	一様	0.03
b)アンテナ-受信機 減衰量	$a_c$	± 0.28	K=2	0.14
c)アンプの利得	$G_p$	± 0.28	K=2	0.14
d)アンテナ係数	$F_a$	± 0.62	K=2	0.31
・受信機補正值:				
e)正弦波電圧	$\delta V_{sw}$	± 0.25	K=2	0.13
f)アンプの不安定さ	$\delta G_p$	± 0.002	K=1	0.002
g)パルス振幅応答	$\delta V_{pa}$	± 1.5	一様	0.87
h)パルス繰り返し率応答	$\delta V_{pr}$	± 1.5	一様	0.87
i)ノイズフロアの影響	$\delta V_{nf}$	± 0		
j)不整合:アンテナ-アンプ	$\delta M_{aa}$	0.29 -0.31	U字	0.21
k)不整合:アンプ-測定用受信機	$\delta M_{ar}$	0.25 -0.26	U字	0.18
・ログペリアンテナ補正				
l)アンテナファクタ周波数補間	$\delta F_{af}$	± 0.18	一様	0.10
m)アンテナファクタ高さ変動	$\delta F_{ah}$	± 0.3	一様	0.17
n)指向性の相違	$\delta F_{adir}$	± 1	一様	0.58
o)位相中心位置	$\delta F_{aph}$	0.91 -0.92	一様	0.53
p)交差偏波	$\delta F_{acp}$	1.08 -1.24	一様	0.67
q)平衡度	$\delta F_{abal}$	± 0		
・サイト補正				
r)サイトの不完全さ	$\delta A_N$	1.81 -0.78	三角	0.53
s)離隔距離	$\delta d$	± 0.3	一様	0.17
t)試験テーブル材質の影響	$\delta A_{NT}$	± 0.5	一様	0.29
u)試験テーブルの高さ	$\delta h$	± 0.1	K=2	0.05
v)OATS上の外来雑音の影響	$\delta E_{amb}$	± 0		

合成標準不確かさ 1.8dB

拡張不確かさ 3.6dB (Ucisp=6.3)

表4 放射エミッション測定, ログペリオディックアンテナ (200MHz-1000MHz) 垂直のバジェットシート

入力量	$X_i$	$x_i$ の不確かさ		標準不確かさ $c_{u(x)}$ dB
		dB	確率分布関数	
a)測定用受信機の読み	$V_r$	± 0.05	一様	0.03
b)アンテナ-受信機 減衰量	$a_c$	± 0.28	K=2	0.14
c)アンプの利得	$G_p$	± 0.28	K=2	0.14
d)アンテナ係数	$F_a$	± 0.62	K=2	0.31
・受信機補正值:				
e)正弦波電圧	$\delta V_{sw}$	± 0.25	K=2	0.13
f)アンプの不安定さ	$\delta G_p$	± 0.002	K=1	0.002
g)パルス振幅応答	$\delta V_{pa}$	± 1.5	一様	0.87
h)パルス繰り返し率応答	$\delta V_{pr}$	± 1.5	一様	0.87
i)ノイズフロアの影響	$\delta V_{nf}$	± 0		
j)不整合:アンテナ-アンプ	$\delta M_{aa}$	0.29 -0.31	U字	0.21
k)不整合:アンプ-測定用受信機	$\delta M_{ar}$	0.25 -0.26	U字	0.18
・ログペリアンテナ補正				
l)アンテナファクタ周波数補間	$\delta F_{af}$	± 0.18	一様	0.10
m)アンテナファクタ高さ変動	$\delta F_{ah}$	± 0.1	一様	0.06
n)指向性の相違	$\delta F_{adir}$	± 3.2	一様	1.85
o)位相中心位置	$\delta F_{aph}$	0.91 -0.92	一様	0.53
p)交差偏波	$\delta F_{acp}$	1.08 -1.24	一様	0.67
q)平衡度	$\delta F_{abal}$	± 0		
・サイト補正				
r)サイトの不完全さ	$\delta A_N$	1.67 -1.23	三角	0.59
s)離隔距離	$\delta d$	± 0.3	一様	0.17
t)試験テーブル材質の影響	$\delta A_{NT}$	± 0.5	一様	0.29
u)試験テーブルの高さ	$\delta h$	± 0.1	K=2	0.05
v)OATS上の外来雑音の影響	$\delta E_{amb}$	± 0		

合成標準不確かさ 2.5dB

拡張不確かさ 5.0dB (Ucisp=6.3)

# 電子線描画装置を用いた加速電圧 50kV での 逆テーパ形状レジストパターンの形成

黒内 正仁、安井 学、金子 智(電子技術部 電子材料グループ)

## 1. はじめに

電子線リソグラフィはフォトリソグラフィの微細限界以下のサイズのパターン形成が可能である。研究開発用途の直接描画によるパターン形成の他、高精細フォトマスクの作製やナノインプリントの原盤作製に利用され、応用面において重要な微細加工技術である。また、リフトオフは化合物半導体の高周波トランジスタなどの極微細パターンを有するデバイスの研究や試作の場面で利用されているパターン形成方法であり、リフトオフ加工を容易にするために 2 層レジスト構造からなるオーバーハング構造を有するレジストパターンが用いられる。同様に逆テーパ形状のレジストパターンもリフトオフ加工に有益であり、高密度パターンの形成に有利であると考えられる。電子線描画では、逆テーパ形状レジストは高ドーズで短い現像時間の条件で形成され<sup>2)</sup>、電子線の前方散乱の到達距離  $\sigma_f$  が長い 10~20kV 程度の低い加速電圧条件<sup>3)</sup>が有利と考えられる。一方で、50kV の加速電圧で逆テーパ形状レジストができれば、高精細パターン形成や装置の安定した運用の面で利点がある。そこで、高加速電圧(50kV)条件下での逆テーパ形状レジストの形成を試みたので、その結果を報告する。

## 2. 実験

3 インチシリコン基板上にポジ型の電子線レジスト(日本ゼオン社製、ZEP-520A)を約 500nm の厚さで塗布した試料に電子線描画装置(ELIONIX 社製、ELS-S50)でハーフピッチ 300nm のラインアンドスペースパターンを形成した。電子線描画は 50kV の加速電圧で行い、ドーズ量は 120~320 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  とした。高ドーズによる感光領域の広がりを補償するために描画に用いたパターンの描画領域幅に対するバイアスを図 1 に示すように設定して、バイアス量を 0~60nm とした。電子線描画後、現像液 ZED-N50(日本ゼオン社)に 30 秒浸漬した後、2-プロパノールに 10 秒リンスをして、N2 ブローを行うことで短い現像処理をした。SEM のトップビュー観察を行い、開口部幅を測定して 1:1 パターンとなる描画条件を調べた。得られた 1:1 パターンの描画条件を使用してパターン長さを 1mm とした断面観察用試料を作製した。断面観察用試料を劈開して、Pt コートによるチャージアップ防止の処置をして、SEM 装置(日本電子社製、JSM-7800F Prime)で断面観察を行った。断面 SEM 観察時の加速電圧は 5kV とした。

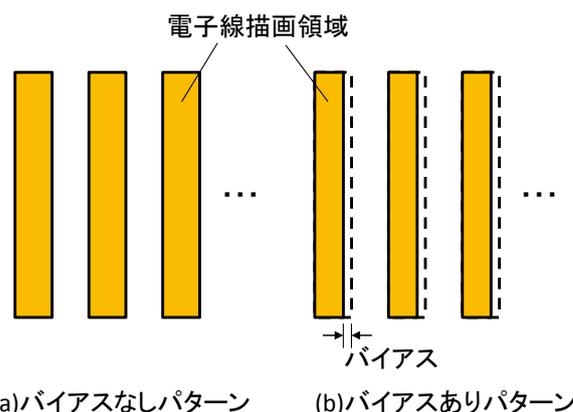


図 1 高ドーズ描画による描画領域を補償するバイアスをいれたラインの描画パターン

表 1 線幅 300nm のラインアンドスペースパターンのバイアス量と 1:1 パターンが得られるドーズ量の関係

バイアス量 (nm)	ドーズ量 ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )
0	150
20	200
40	250
60	300

また、作製した逆テーパレジストを用いて、Pt のラインパターンをリフトオフ法でパターン形成を行った。Pt 膜は電子線ビーム蒸着法で成膜を行い、Pt の密着性を上げるために Ni 層を Pt 層の下地に用いて成膜した。作製したパターンは SEM 観察を行った。

## 3. 結果と考察

SEM のトップビュー観察を行い、開口部幅を測定して 1:1 パターンとなる描画条件を調べたところ、それぞれのバイアス値において 1:1 パターンが形成されるドーズ量の条件は表 1 に示す結果となった。

図 2 に 1:1 パターンの形成条件で作製したレジストパターンの断面 SEM 像を示す。(a)バイアス値 0nm、低ドーズのときにパターン形状は垂直形状となる一方で、(d)バイアス値 40nm、高ドーズで作製したパターンは逆テーパ形状が形成されていることがわかる。また、その中間条件に

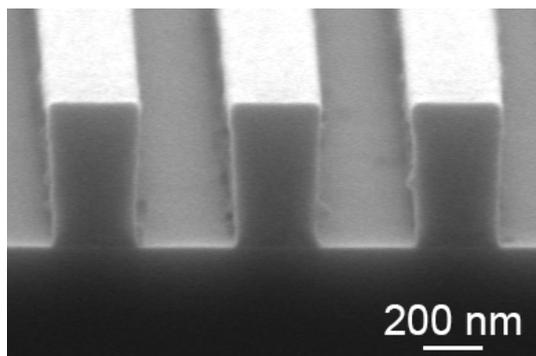
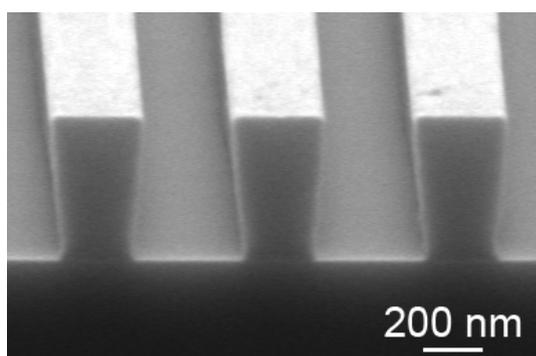
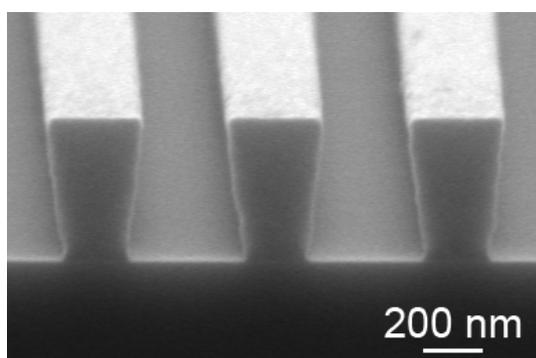
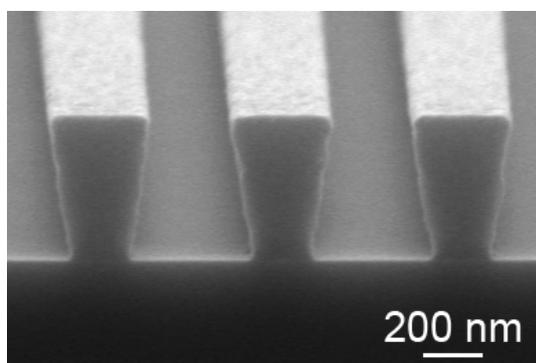
(a) 150 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , バイアス 0nm(b) 200 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , バイアス 20nm(c) 250 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , バイアス 40nm(d) 300 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , バイアス 60nm

図2 電子線レジストパターンの断面 SEM 像

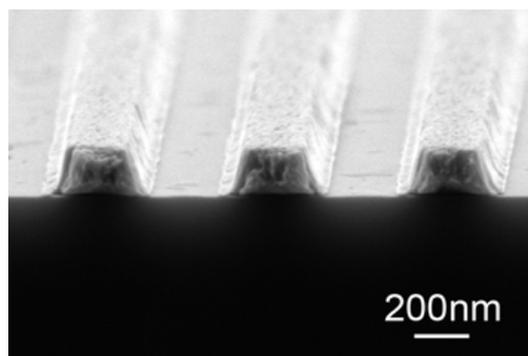


図3 逆テーパ状レジストパターンを利用してリフトオフ加工によって作成した Pt ラインパターン

については徐々に逆テーパの傾斜角が変化していることが確認できた。つまり、レジストの逆テーパ形状は描画領域幅のバイアス量とドーズ量によって制御可能であることが分かる。

図3に逆テーパレジストパターンを用いたリフトオフ法によって Pt/Ni ラインパターンを形成した結果を示す。線幅 300nm のラインアンドスペースパターンが形成されていることが確認できる。

上記の結果から、リフトオフ加工に有益な逆テーパ形状を有するハーフピッチ 300nm のレジストパターンの形成が 50kV の加速電圧についても形成可能であり、逆テーパ形状が描画条件で制御可能であることが確認できた。

#### 4. まとめ

加速電圧 50kV での電子線描画でリフトオフ加工に適した逆テーパ形状をもつレジストパターンの形成条件を調べた。線幅 300nm のラインアンドスペースパターンを高ドーズで描画して、短い現像処理を行った結果、逆テーパ形状を有する電子線レジストパターンが形成されたことを断面 SEM で確認した。また、作製したレジストパターンを用いてリフトオフ加工を行い、線幅 300nm での Pt のラインアンドスペースパターンが形成できることを確認した。

#### 【参考文献】

1. 応用物理学会編, “超微細加工技術”, オーム社, P.77 (1997).
2. <http://nanolithography.gatech.edu/proximity.pdf>
3. T. Takigawa, H. Wada, Y. Ogawa, R. Yoshikawa, I. Mori, and T. Abe., J. Vac. Sci. Technol. B **9**, 2981 (1991).

【外部発表】 口頭発表 1 件

# 光給電 RoF レシーバを用いたノイズ環境下における EMI 測定

菅間 秀晃、土屋 明久（電子技術部 電磁環境グループ）

柳澤 幸樹、諏訪部 豊（株式会社多摩川電子）

橋本 修、須賀 良介（青山学院大学）

## 1. はじめに

自動車産業では、自動車の電動化（EV、HEV など）、コネクティッドカーや自動運転技術、ワイヤレス充電など、電気・電子化が急速に進んでおり、安全性を確保する上で高精度な EMC 計測が今後重要になる。しかし、モーターやインバータから高電圧（数千 V）・大電流（数千 A）のスイッチングノイズが発生している劣悪な電磁環境下で、高精度に EMC 計測を行うためには、従来の金属製同軸ケーブルでは外来ノイズの混入を防ぐことが困難である。光給電 RoF（Radio on Fiber；光ファイバ無線）レシーバは、光ファイバの高絶縁性を活かした高精度な EMC 計測を実現する有効な技術である<sup>1)2)3)</sup>。

本研究は、モーターやインバータなどから高出力の電磁放射がある環境下において高精度に EMI 測定を行うために、開発した光給電 RoF レシーバの有効性について検討を行った。

## 2. 光給電 RoF レシーバと同軸ケーブル

光給電 RoF システムは、図 1 に示すように電気信号を光信号に変換して光ファイバで伝送するだけでなく、センサヘッド内の電子回路への給電も光ファイバで行うため、長時間の測定も可能である。開発した光給電 RoF レシーバ（センサヘッド+制御コントローラ）を図 2 に示す。

光給電 RoF レシーバの伝送特性は、周波数 10kHz~6GHz において伝送ケーブルとしては約 8dB（一定）の減衰量となっている<sup>1)</sup>。このため、30MHz 以下の低周波領域において、同軸ケーブルに比べ減衰量が大きいので、不利な面もあるが、光ファイバの軽量かつ優れた屈曲性及び高い絶縁性といった利点を活かせる分野での活用が期待できる。

一般的な電子計測において図 3 に示すように EUT、測定治具、及び測定器は電気的安全性やノイズ対策などの理由により、その金属筐体をアースに接続して使用される。これらを金属製の同軸ケーブルで接続すると、同軸ケーブルの外部導体、アース線（または浮遊容量）、グラウンド・プレーンにより大きなグラウンドループを形成してしまう。または、アース線を接続していない場合でも、浮遊容量などによりグラウンド・プレーンと交流的に結合して、グラウンドループを形成していることもあり、予期せぬノイズ問題に至る場合がある。同軸ケーブルの外部導体は、周波数 10MHz 以上では、概ね高い磁界シールド効果を有しているが、周波数 1MHz 以下においては、同軸ケーブルの磁界

シールド効果が著しく低下する<sup>1)</sup>。外部に大きなノイズ源がある場合は、誘導されたグラウンドループ電流が同軸ケーブル外部導体の内側に侵入してくるため、測定したい EUT からのノイズ以外に外来ノイズも観測されてしまう。

スイッチング回路を内蔵した電子機器、EV や HEV などに搭載させる車載用電子機器の EMI 測定において、グラウンドループに起因する問題点を検証し、光伝送システムが有効と考えられる試験方法について検討を行った。

## 3. 実験方法

### 3.1 雑音端子電圧測定（9kHz~30MHz）

スイッチング電源回路を内蔵した電子機器等は、伝導 EMI 測定として図 4 に示す雑音端子電圧測定を実施している。疑似電源回路網（LISN）と受信のスペクトラムアナライザ（SA）が同軸ケーブルで接続されるため、同軸ケーブルの両端が LISN と SA のアース線を通してグラ

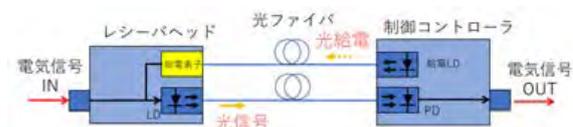


図 1 光給電 RoF レシーバの原理



図 2 開発した光給電 RoF レシーバ

ンド・プレーンに接続されることでグラウンドループを形成する。VCCI 規格など一般的な雑音端子電圧測定の周波数範囲は 150kHz から 30MHz であるが、LED 照明器具などを対象とした CISPR15 など一部の規格は 9kHz~150kHz の範囲も規制されている。一般的な計測用同軸ケーブルのシールド性能は周波数 1MHz 以下において著しく低下するため、外来ノイズある環境下では、グラウンドループを通して外来ノイズが混入して測定結果に影響してしまうことがある。そのため、図 5 に示すように同軸ケーブルの一部を高絶縁性の光ファイバに置き換えることで、グラウンドループを切断して外来ノイズの影響を除去できる。

そこで図 4、図 5 に示すように、同軸ケーブルの一部にパルス・ジェネレータからパルス信号（電圧 10V、繰り返し周波数 5kHz、デューティ比 50%）を印可することで、従来の同軸ケーブルの測定系に対する光給電 RoF レシーバの有効性を確認した。

### 3. 2 金属筐体内の二次元磁界強度分布測定

外来ノイズを印加された環境下での測定事例として、金

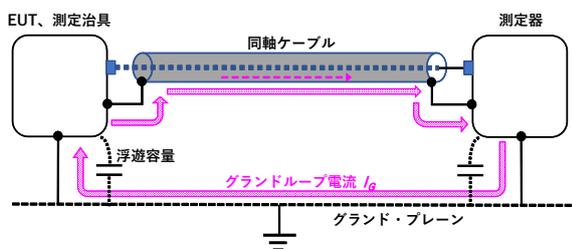
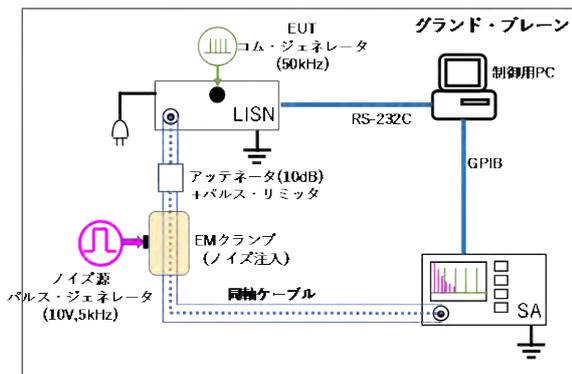
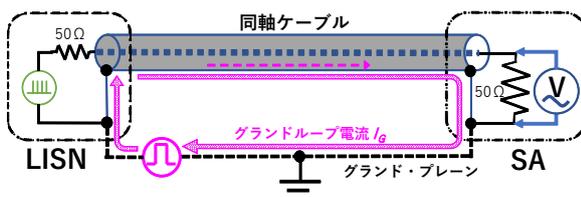


図 3 測定系におけるグラウンドループ



(a) 同軸ケーブルによる測定系

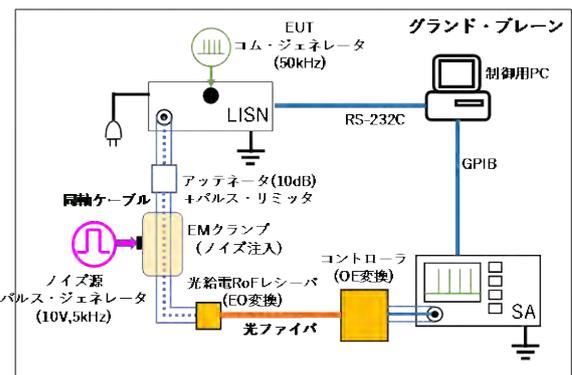


(b) 等価回路モデル

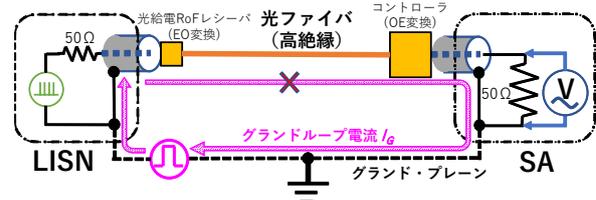
図 4 従来の雑音端子電圧測定

属筐体内に配置されたスイッチング電源回路基板 (AC-DC コンバータ；入力 AC100V、出力 DC12V) を EUT とし、外部から電源ラインノイズを与えた状況での二次元走査による磁界分布測定を行った。その測定系を図 2 に示す。EUT は、グラウンド・プレーンに接地された金属筐体の中心に配置し、回路基板のグラウンドは金属筐体へ接続した。外来ノイズを模擬するため、EUT の電源ケーブルにインパルスノイズ試験装置 (ノイズ研究所 INS-AX2-450H) より広帯域ノイズ「電圧 250V、パルス幅 1 $\mu$ s、繰り返し周期 60Hz」を誘導性 (磁界) 結合クランプ (CA-806) より印加した。EUT の二次元磁界分布は、EUT 直上を XY ステージに固定された微小磁界プローブによって測定した。この磁界プローブに接続される信号線を同軸ケーブルと光給電 RoF レシーバの場合とで比較した。測定周波数範囲は、EUT からのスイッチングノイズを想定し、100kHz から 4MHz とした。

### 4. 結果及び考察



(a) 光給電 RoF レシーバによる測定系



(b) 等価回路モデル

図 5 光給電 RoF レシーバによる雑音端子電圧測定

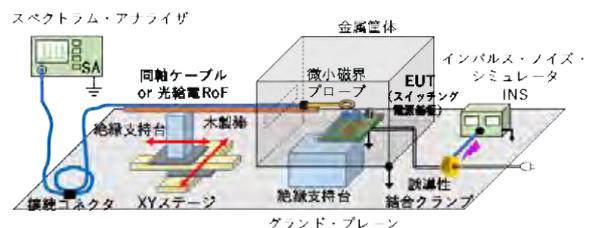


図 6 二次元磁界強度分布測定

#### 4. 1 雑音端子電圧測定 (9kHz~30MHz)

図7に周波数9kHz~1MHzにおいて、同軸ケーブル及び光給電 RoF レシーバを用いて測定した結果を示す。周波数9kHz~150kHzの範囲はスペクトラム・アナライザの分解能帯域幅 RBW は200Hzと規定されているため、ノイズレベルが150kHz以上の測定 (RBW 120kHz) に比べて約10dB低下している。同軸ケーブルによる測定では、EUT (コムジェネレータ)の高調波成分が50kHz間隔で観測される他に、パルス・ジェネレータの高調波成分が10kHz間隔で観測されている。これに対して光給電 RoF レシーバによる測定では、EUTの高調波成分のみが観測できている。このことから、光ファイバの高絶縁性により、グラドループを形成しない光給電 RoF レシーバの有効性が確認できた<sup>2)</sup>。EUTのスイッチ電圧が高い場合は、150kHz以上でもグラドループが問題となり、電源線にノイズフィルタを挿入しても十分な効果が得られない場合も考えられるので、光給電 RoF レシーバは雑音端子電圧測定の測定精度向上に寄与する。

#### 4. 2 金属筐体内の二次元磁界強度分布測定

図8、図9にEUT (スイッチング電源回路基板)に電源ラインノイズを印可した場合の周波数130kHzにおける二次元走査による測定した磁界強度分布を示す。この分布は分布内の最大値を基準として規格化している。EUTに電源ラインノイズを印加しない場合、同軸ケーブルと光給電 RoF システムともに概ね電磁界分布が一致し、スイッチング電源回路基板から放射されるノイズ分布を測定可能である。一方、EUTの電源部分にノイズを印加した場合、同軸ケーブルは接続コネクタの外部導体をグラウンド・プレーンに接触させることでグラドループを形成すると、このループを介して電源ラインノイズが重畳され、EUTからの放射以外に外来ノイズによる影響がみられ、二次元電磁界分布に乱れが生じている。また、外導体がグラウンドに接触しない場合においても、1MHz以上に外導体とグラウンド間に容量結合によってノイズが重畳されることがわかった。一方、光給電 RoF レシーバは電源ラインノイズが印加された場合においてもケーブルは光ファイバのため、接触によるグラドループは形成されることはなく、電源ラインノイズを印加しない場合と同様の結果となった<sup>3)</sup>。

#### 5. まとめ

ノイズ環境下において光給電 RoF レシーバと同軸ケーブルの比較検討を行った。開発した光給電 RoF レシーバは光ファイバの高絶縁性により外来ノイズの影響を除去して高精度なEMC計測を実現できることを確認した。

今後、5Gによる自動運転技術、ワイヤレス充電などの研究開発において、高レベルのノイズ環境下でのEMC計測等へ活用が期待できる。

#### 【参考文献】

- 菅間, 土屋, 柳澤, 諏訪部, 橋本, 須賀; “次世代 EMC 試験に適用可能な光伝送システムの開発”, KISTEC 研究報告 2019, 29(2019).
- 土屋, 菅間, 柳澤, 橋本, 須賀; “光給電 RoF による低周波ノイズ測定”, 信学技報, MW2018-113, pp.115-120 (2018).
- 土屋, 菅間, 柳澤, 橋本, 須賀; “光応用計測技術のノイズ計測への活用”, 電子情報通信学会総合大会 通信講演論文集 2, BI-7-4, p.SS-81 (2020).

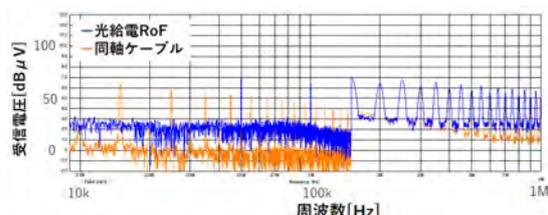


図7 グラドループの影響

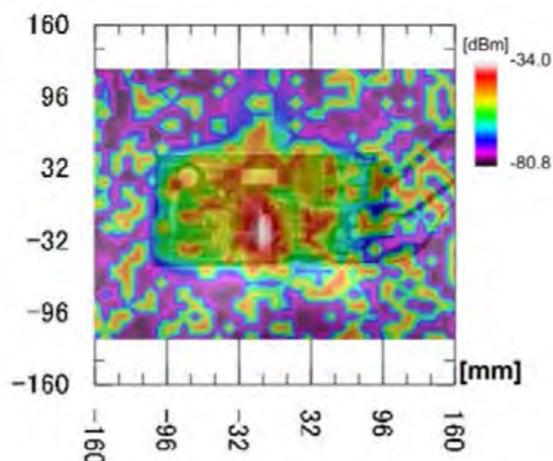


図8 同軸ケーブルによる磁界強度分布測定

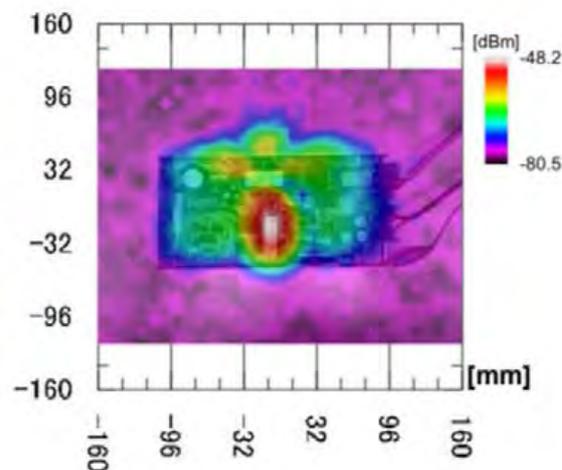


図9 光給電 RoF レシーバによる磁界強度分布測定

# ミリ波帯送信器の開発と測定技術の検討

鶴田 誠、臼井 亮（電子技術部 電磁環境グループ）

## 1. はじめに

近年、ミリ波帯の電磁波を活用した研究開発が活発化してきている。ミリ波は、波長が1mmから10mmの電磁波であり、30GHzから300GHzである。波長が短くて、周波数帯域幅が広いという特徴を活かして、車載レーダー・非接触のバイタルセンサー・高速データ伝送・非破壊のイメージングなど幅広い分野の応用が期待されている。

ところで、EMC (Electro-Magnetic Compatibility: 電磁両立性)/EMI(Electro Magnetic Interference: 電磁波妨害)規制は、1960年代からテレビ・自動車の普及に伴って始まった。近年では、2010年代からミリ波帯の製品の研究開発が加速し、EMC/EMIのミリ波帯の評価が広く求められるようになってきた。

また、ミリ波帯の一般的な計測環境を整備した場合には、現時点でも、少なくとも数千万円程度の予算規模が必要となる。しかしながら、ミリ波帯の需要増加に伴って廉価な部品も入手可能な情勢となってきている。そこで、本報告では、所内の既存の測定系を拡張して廉価なミリ波帯の周波数変換器(送信側)を検討した結果を報告する。

## 2. 廉価なミリ波帯の測定系の構築

一般的に、ミリ波帯の特性評価として、次の3点の制限を加えることにより、大幅なコストダウンを図ることが可能となる。

- ① COTS(Commercial Off-The-Shelf: 商用オフザシェルフ)の活用
- ② 帯域幅の条件の緩和
- ③ デジタル信号処理の活用

COTS製品は、流通性が高いことから廉価なミリ波帯の部品を調達できる。次に、アンテナ等の基本的な指標であるビームパターン・利得・偏波などの測定においては、CW(Continuous Wave: 連続波/無変調波)を利用すれば測定できる。OFDM(Orthogonal Frequency-Division Multiplexing: 直交周波数分割多重方式)信号のサブキャリア数を限定することにより、狭帯域であっても基本的な伝送評価も可能となる。加えて、デジタル信号処理を適用することにより、ミリ波帯のRF(Radio Frequency:無線周波数)領域の性能向上を図ることができる。更に、ソフトウェア無線機の技術を適用することにより、デジタル通信・レーダーシステムなどの評価も可能となる。最後に、自由空間法による材料定数測定等に適用できる。

### 2. 1 ミリ波帯の測定系の構成方法

図1に示すミリ波帯の測定系は、所内の既存設備（送信側の信号発生器及び受信側のスペアナ）を活用する構成で

ある。図1の構成では、信号発生器及びスペアナ間に送受信のミキサ及びアンテナを追加することで、ミリ波帯の基本的な測定系が構成できる。この図1の構成により、ビームパターン及び利得等のミリ波帯の測定が可能となる。

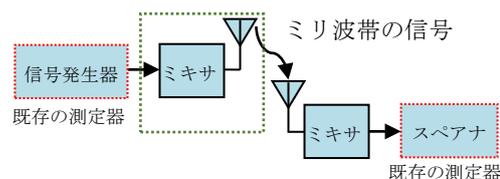


図1 測定系の構成例1 (測定器を使用する場合)

ところで、RF部品が廉価であるが故に、ダイナミックレンジなどの高周波特性とコスト間でのトレードオフが発生する。そのために、中級から高級なミリ波帯の測定系の高周波特性に近づけるために、デジタル信号処理技術を活用し、高周波特性を改善する。

加えて、無線システム並びにレーダーシステム等の評価、材料定数測定等のためのSパラメータの評価なども可能になる。これを廉価に解決する方法は、図2のソフトウェア無線技術を適用した測定系の構成例2になる。

図3にCOTS製品を活用したミリ波帯の測定系の構築の考え方をまとめた。

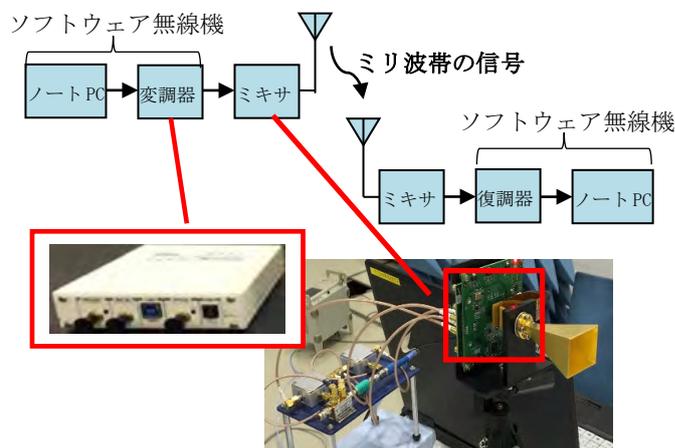


図2 測定系の構成例2 (測定器を使用しない場合)

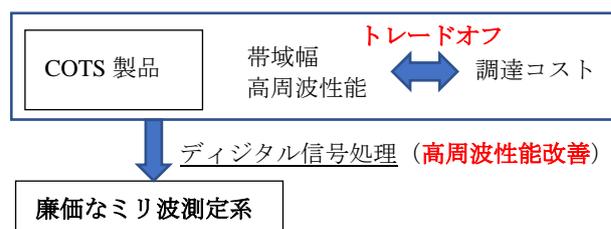


図3 COTS製品を活用した高性能ミリ波帯測定系の構築

## 2. 2 測定系の構成

本報告における測定系の構成例1及び構成例2の具体的な機材配置を図4に示す。なお、材料定数測定時には、図4の中央部に測定対象の試料を設置する。ビームパターン・利得などの測定などの無線の評価時には、試料は設置しない。構成例1及び構成例2による測定結果の比較は、3.2節に示す。

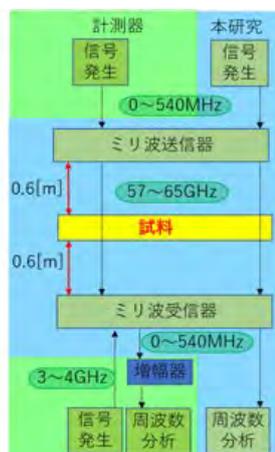


図4 ミリ波帯の構成例1及び構成例2の測定系

## 3. 測定結果

本報告では、ダイナミックレンジ及び透過損失量の測定結果について報告する。

### 3.1 ダイナミックレンジの評価

図4の測定系で57.24GHzのCW信号の送受信した場合の測定結果を図5に示す。図5は、CW信号をアルミニウム板で非遮蔽(0秒から12秒まで)とCW信号をアルミニウム板で遮蔽(12秒から20秒)した結果である。非遮蔽のスペクトラムのピークを注視すると僅かであるがドップラが生じていることも合わせて確認することができる。

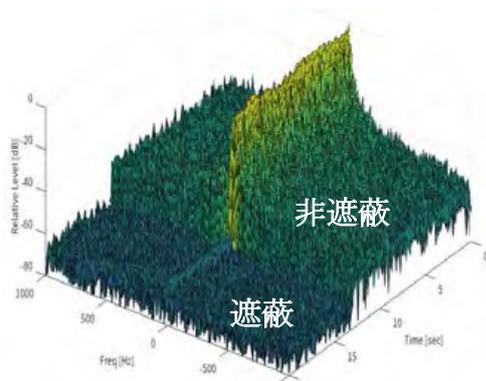


図5 60GHzのCW波形のウォータフォール

図5の測定結果を時間軸方向に平均化した周波数スペクトラムを図6に示す。この周波数スペクトラム(中心周波数57.24GHz)のアルミニウム板で遮蔽/非遮蔽の差が、約62dBとなった。この結果から材料の透過損失の測定に活用できるダイナミックレンジを有することが確認された。

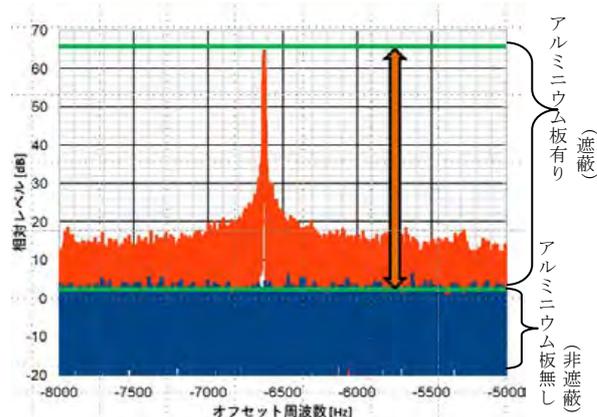


図6 57.24GHzのCW波形の周波数スペクトラム

### 3.2 狭帯域な材料定数測定(透過損失量)

図7にテフロン及びベークライトの透過損失量を測定した結果とシミュレーション結果を示す(ベークライトの黒色の黒色実線はシミュレーション結果、実測の破線は測定系の構成例1で測定した結果、実測の実線は測定系の構成例2で測定した結果)。この結果から測定器とソフトウェア無線機による測定結果には、大きな差異は確認されなかった。ベークライトの実測とシミュレーションは、よい一致を示した。

この結果から、廉価なソフトウェア無線機によるミリ波の測定系(図2の測定系の構成例2)は、十分な測定が可能であることの見込みが得られた。

ところで、450MHz幅において透過損失量の変動が2から3dB程度ある。この変動要因を確認するために周波数幅を広げて、ベークライト(10mm)について広帯域な測定結果を図8に示す。

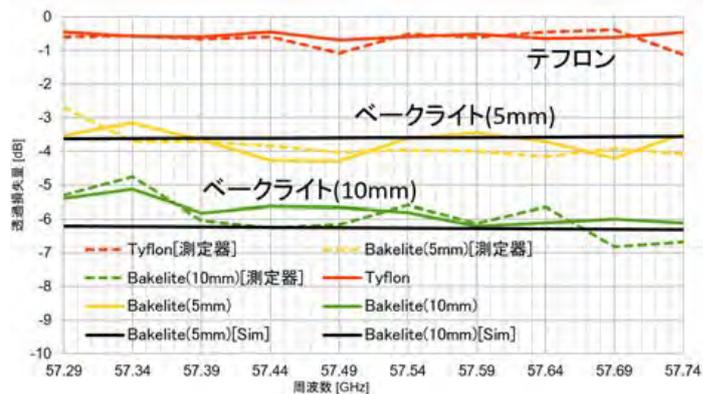


図7 透過損失量の測定例(狭帯域)

### 3.3 広帯域な材料定数測定(透過損失量)

図8の実測結果は、周波数方向に対して周期的に変動をしている。この変動は、図4の測定系内で信号が反射していることが原因であると考えられる。これは廉価なRF部品で構成しているが為に、透過損失量に対して周波数方向に変動が生じている。この反射波を抑圧する信号処理を施した結果とシミュレーション結果は、よい一致をしている。この結果から、信号処理を適用することにより、透過損失

量の測定に適用できる。

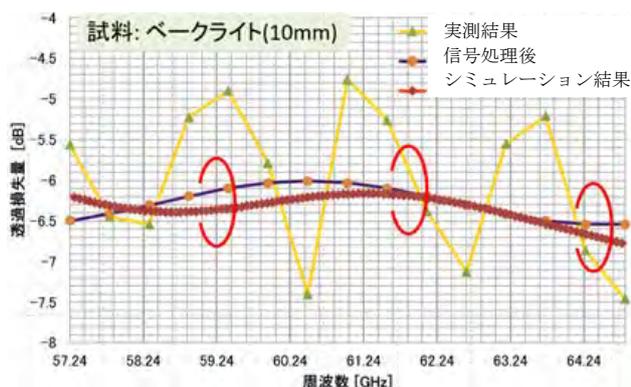


図 8 透過損失量の測定例(広帯域)

#### 4. 考察及び今後の展開

廉価なミリ波帯の測定系を用いた測定技術に関する基礎的な実験・シミュレーション結果から、キャリブレーション技術を活用することにより、期待される測定精度を確保できる見込みが得られた。

廉価なソフトウェア無線機による測定が、既存の測定器との差異が少ない点についても、合わせて確認された。

また、ソフトウェア無線機をベースとした測定系であり、無線機の開発等への活用が期待される。

【外部発表】 口頭発表 1 件

# ナノインプリント用金型を目的とした Ni-W めっき面の改善

安井 学、黒内 正仁、金子 智（電子技術部 電子材料グループ）

## 1. はじめに

撥水性を示す樹脂表面に 200nm 周期以下のナノ構造体を形成することにより、樹脂表面の濡れ性を上げて視認性を確保すること<sup>1)</sup>や、純アルミニウム表面に形成した数百 nm の微細な穴を利用した小型波長フィルター<sup>2)</sup>、ガラス表面に形成したナノ構造体による反射光の映りこみの抑制<sup>3)</sup>などで、ナノ構造体が広く使われている。

ナノ構造体の形成技術として、インプリントが注目されている。樹脂を対象としたインプリントでは、樹脂のガラス転移温度より高い温度において、5MPa 程度で加圧する。そして、加熱温度が 200℃未満であれば、市販の Ni 電鍍金型を利用できる。しかし、純アルミニウムやガラスを対象としたインプリントでは 100MPa 以上の高圧や 600℃前後の高温に耐えられる金型が求められる。

筆者らはガラス成形金型の離型層に使用されている Ni-W-Mo に組成が近い Ni-W めっき膜に着目し、純アルミニウム<sup>4)</sup>やジュラルミン<sup>5)</sup>、硼珪酸ガラス<sup>6)</sup>などを対象としたインプリント金型に Ni-W めっき膜を用いた Ni-W 電鍍金型が有効であることを示してきた。そして、転写パターンのサイズをマイクロサイズからナノサイズに小さくすることを目指している。

Ni-W 電鍍金型の作製方法として、原版となる Ni 電鍍金型上に析出させた Ni-W めっき膜を剥がして、Ni-W 電鍍金型とすることを考えている。ただし、内部応力の大きい Ni-W めっき膜は剥離が生じやすい欠点があり<sup>7)</sup>、Ni 電鍍金型に対する Ni-W 膜の密着力を高めて、Ni-W 膜の剥離を防止する必要がある。

そこで、本報告は、プラズマ照射により Ni 電鍍金型の表面を親水性に改質して、Ni-W 膜の剥がれを解消することを目的として、プラズマ照射時間に対する接触角の変化が Ni-W めっき膜の表面状態の指標となるか検討した。

## 2. 実験

プラズマ照射装置に SEDE-GE (Meiwafosis (株) 製) を用いた。放電方式はグロー放電である。ナノパターンを有する Ni 電鍍金型をチャンパーに入れた。2Pa まで真空引きを行った後、大気を導入してチャンパー内の圧力を調整した。チャンパー内の圧力と電流値は 8Pa と 3.5~4mA であった。プラズマ照射時間は、15、30、45、60、120、180、240、300 秒の 8 水準とした。プラズマの照射状態を図 1 に示す。

プラズマ照射直後に、接触角計である DropMaster 300 (協和界面科学 (株) 製) で Ni 電鍍金型上に滴下した純水 (約 1  $\mu$ L) の接触角を測定した。接触角測定を 5 回行

い、その平均値を用いた。

Ni-W めっき液は、スルファミン酸ニッケルを 0.2Mol/L、タングステン酸ナトリウムを 0.2Mol/L、クエン酸アンモニウムを 0.4Mol/L を超純水に溶解して作製した<sup>7)</sup>。60℃に加熱した Ni-W めっき液に Ni 電鍍金型を浸漬して、1200 A/m<sup>2</sup> の電流で Ni 電鍍金型に Ni-W めっき膜を析出させた。電析時間は 80 分であった。図 2 に Ni-W めっきの実験装置を示す。

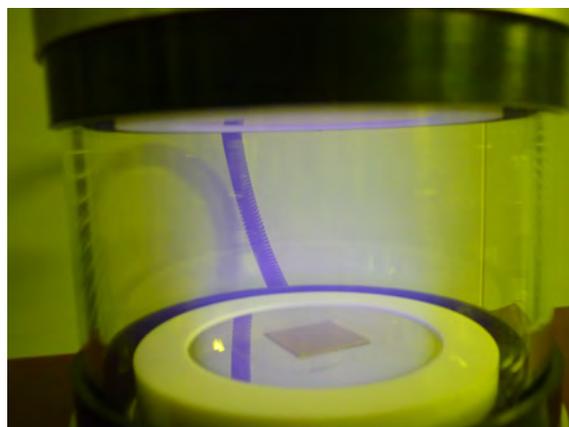


図 1 Ni 電鍍金型に対するプラズマの照射状態

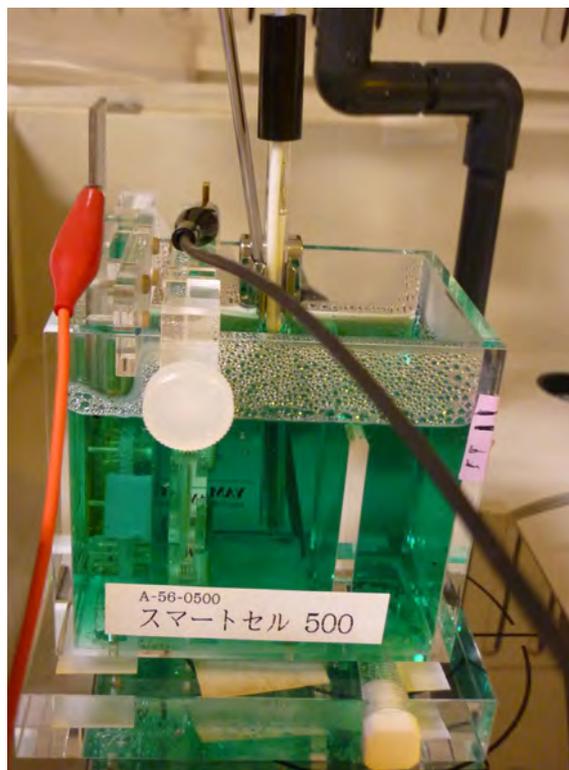


図 2 Ni-W めっきの実験装置

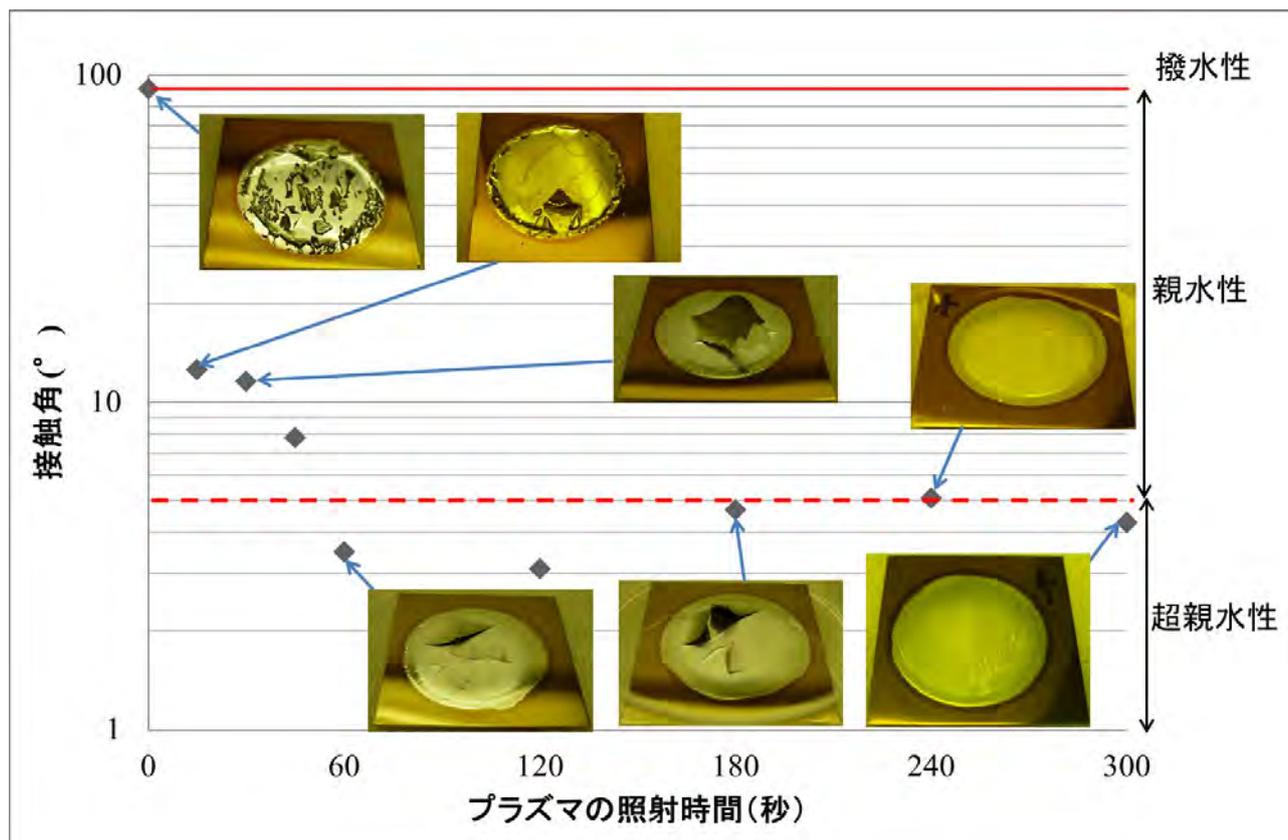


図3 プラズマ照射時間に対する接触角と Ni-W めっき膜の表面状態  
(Copyright (2020) The Japan Society of Applied Physics<sup>8)</sup>)

### 3. 結果と考察

図3にプラズマ照射時間に対する接触角と Ni-W めっき膜の表面状態を示す<sup>8)</sup>。プラズマ照射時間の増加に伴って、接触角は減少傾向を示した。具体的には、接触角が撥水性の目安となる90°近傍より大きい100°では、Ni-W めっき膜全面で剥離が生じた。また、接触角が15°付近まで小さくなった場合では、Ni-W めっき膜の周辺部で剥離が生じた。そして、接触角が超親水性の目安となる5°<sup>10)</sup>より小さい4°近傍を示し始めたあたりで、Ni-W めっき膜の周辺部の剥離が無くなり、中央部で大きな剥離が生じるようになった。

その後、接触角が5°近傍で推移する間に、親水性がさらに強まり、Ni電鍍金型に対するNi-W めっき膜の密着力が

更に増加したことにより、Ni-W めっき膜の剥離は解消したと考えられる。

このように一連の接触角の変化に応じてNi-W めっき膜の表面状態が変化することから、接触角がNi-W めっき膜の表面状態の指標となることを確認できた。

なお、親水性の進展に伴う密着力増加の要因の検証は今後の課題である。

### 4. まとめ

プラズマ照射時間に対するNi電鍍金型上の純水の接触角の変化がNi-W めっき膜の表面状態の指標となることを確認できた。

#### 【参考文献】

1. 栗原 一真, 特開2010-253903, 成形構造体, 平成22年11月11日
2. S. Yokogawa, Nano Letter, **12**, 4349 (2012).
3. 栗原 一真, 光学, **40**, 24 (2011).
4. M. Yasui, Isplasma2018, 05P58 (2018).
5. M. Yasui, Int. J. of Automation Technology, **9**, 674 (2015).

6. M. Yasui, JJAP **52** 11NJ05 (2013).

7. 安井 学, 電気学会論文誌 C, **139**, 644 (2019).

8. M. Yasui, Isplasma2020, 10P3-33 (2020).

9. 中島 章, 表面技術, **60**, 2 (2009).

10. 入江 寛, 化学と教育, **59**, 100 (2011).

【外部発表】ポスター発表 1件



# ネットワーク連携ロボット開発環境の構築

阿部 顕一（情報・生産技術部 試作加工グループ）

## 1. はじめに

近年のサービスロボットの普及をはじめとして、今後、多くのロボットが登場し利用されると考えられる。さらにIoT技術の活用により、ロボットも含め、多くの物がネットワークへの接続が必須となりつつある。ネットワークに接続することで、情報の収集や情報の共有連携、ロボットへのタスク割当てに利用することで、ロボットの高効率の活用が期待される。

ロボットの活用分野は多岐にわたるが、産業用ロボットをはじめとした専用ハードウェアを主体としたものに対し、汎用的な機器のみでソフトウェアや総合的なサービスを活用するロボットが増えている。それらの開発の主体はハードウェアよりもソフトウェアに比重が高く、IoTやAIを利用して、どのようなサービスを提供できるかが重要になってきている。

神奈川県立産業技術総合研究所では、これまでに、移動ロボットプラットフォームの設計支援や、移動ロボットに

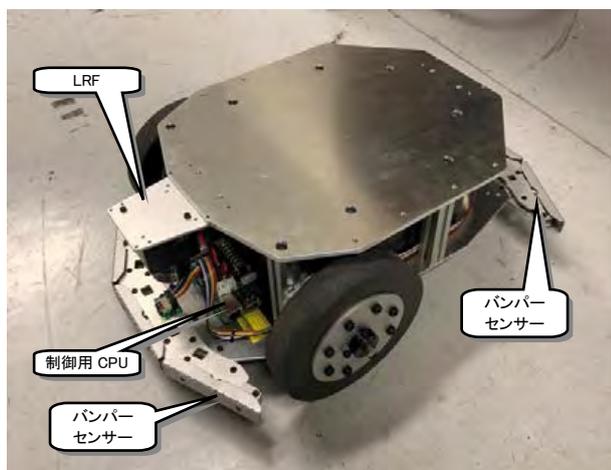


図1. 移動ロボット



図2. Bluetooth接続による手動操作

よる遠隔操縦実験のための画像処理研究などを行ってきた。その際、ハードウェアのみの設計であったり、もしくは既存の制御システムを利用するものであったりした。そこで、今後のロボット開発やIoTを用いたネットワーク連携技術の研究のための開発環境を整備することを目的に、開発プラットフォームとしての移動ロボットを構築することとした。

## 2. 実験用移動ロボットの構築

移動ロボットはVSTON社製メガローバー Ver2.0を利用した。移動ロボットは3点接地の二輪駆動型で、各種のセンサーを接合できる。可搬重量 40 kg、最高速度 1.4 m/s、稼働時間 約 30 時間である。今回、衝突を感知するためのバンパーセンサー、周囲の地形を感知するためのレーザーレンジファインダー（以下、LRFと記す）を接合した。図1に外観を示す。

ロボット本体に加え、ネットワーク環境として、Wi-Fiルーターを用いて構築した。ワンフロア以上の活動領域に対応できるようにメッシュ接続の機能を有している。

## 3. ソフトウェア環境の構築

移動ロボットには、制御用CPU（ESP-WROOM-32）が搭載されており、モータ制御や通信制御を行っている。制御用CPUを操作するために、Windows PCにArduino IDEを構築し、通信方法の設定や情報を送受信するためのサーバー機能の設定を行えるようにした。動作確認として、Bluetooth接続したコントロールパッドでの手動操作と、Wi-FiとWebでの手動制御を行なえるようにした。図2に操作状況を示す。

次に、移動ロボットに、より複雑な機能を付加できるようにするために、Open Source SoftwareであるROS (Robot Operating System)を構築した。ROSはロボット用ソフトウェアの開発に有用なツールやライブラリが提供されており、多くのロボット開発者に利用されている。移動ロボットにはRaspberry Pi 3Bが搭載されておりROSを導入することは可能だが、より開発が容易と思われるノート型PCにUbuntu 16.04 (LinuxをベースとしたOpen Source Software OS)を導入し、ROS Kineticを構築した。移動ロボット上にROSを構築したノート型PCを積載し、図3に示すように移動ロボットの制御用CPUとUSBケーブルで接続して、制御・入出力ができるようにした。

今回ROSに導入したモジュールは、以下のとおりである。

- ・シリアル通信の接続

移動ロボットの制御用CPUとROS(ノート型PC)との接続。

・LRFの接続

LRFをROSから制御するためのドライバおよび取得情報の可視化モジュール。

・SLAM (マッピング) の確認

LRFから取得した情報を基にした、地図(地形)データの作成モジュール。図4は、移動ロボットを室内で移動させ、リアルタイムで地図データを作成している。

図5に構築したハードウェアおよびモジュールの構成図を示す。(破線部は今後増設する。)

4. まとめ

ネットワーク連携実験・研究が可能な移動ロボットを構

築した。ロボットシステムを制御するためのソフトウェアを組み込んだ。

現状、Web等から基本モジュールを流用している段階であり、独自の開発は今後の課題となる。近々には、遠隔監視用のカメラの搭載と、SLAMも基にした自動走行を予定しており、標準的なモジュールの組み合わせだけで、自動巡回ロボットを実現したい。

今後、種々のサービスロボットやIoTの、実験や開発のプラットフォームとして利用したい。ロボット制御やIoTを始めとしてネットワーク全般に関する知見が得て、当該分野における企業支援に活用していく。

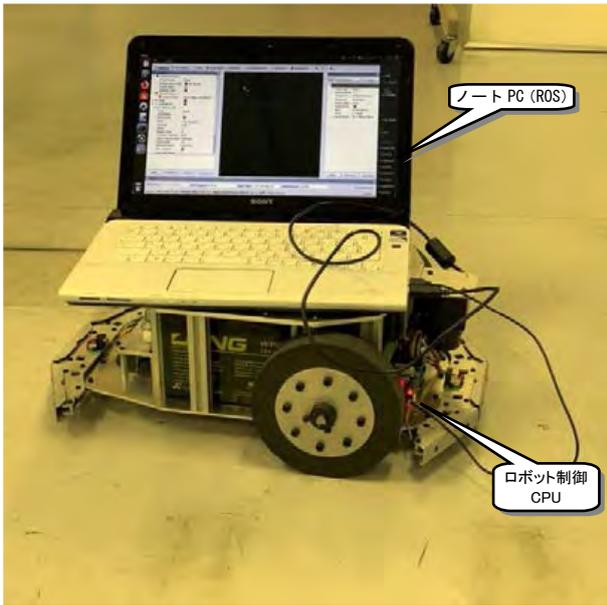


図3. ノート PC (ROS) との接続



図4. SLAM 動作表示

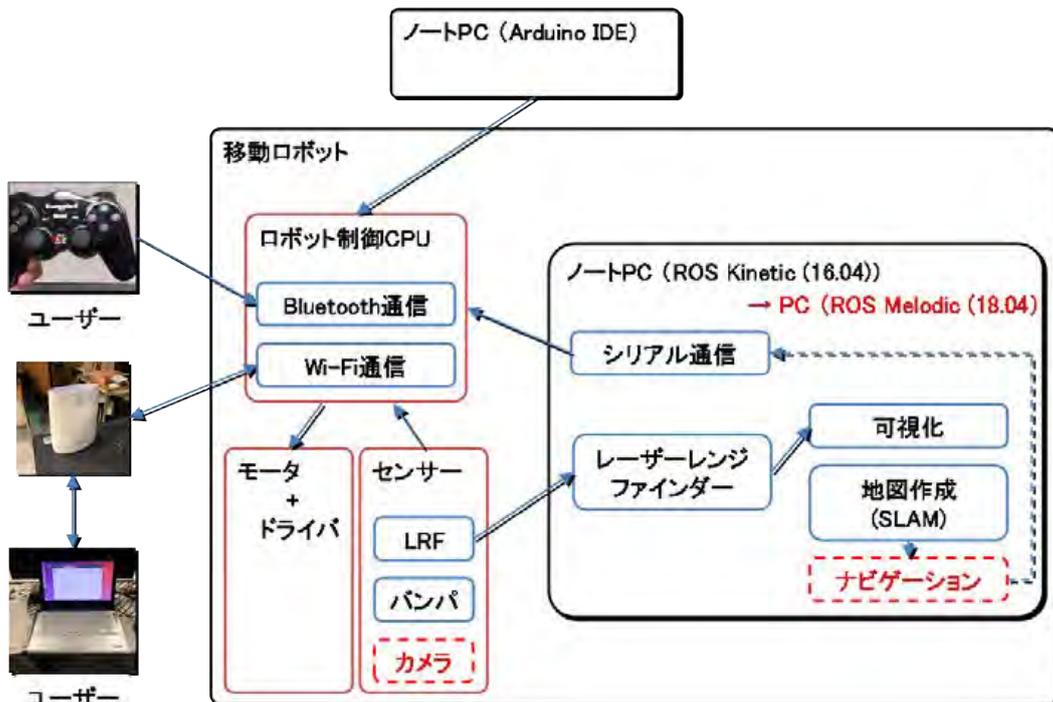


図5. 移動ロボット構成

# IoT デバイス間の時刻同期に関する研究

奥田 誠(情報・生産技術部 システム技術グループ)

## 1. はじめに

近年、IoT や Industrie 4.0 を背景に、センサなどのデバイスは増加傾向にあり、振動や音、電力などのセンサデータを解析することで、装置の故障診断や異常検出などの付加価値が期待されている。IoT デバイスに接続されたセンサから得られる時系列データに対して、正確な解析を行うためには、それぞれのデータの時間軸を一致させることが重要である。時間軸を一致させるには、異なる IoT デバイスで時刻同期を行えばよく、各 IoT デバイスに時刻同期を行う方法はすでにいくつか存在している。

一つは、IoT デバイスそれぞれに、GPS アンテナを接続して、GPS 時刻を取得・設定する方法である。これは、実際に工場内に設置することを考えた場合に現実的ではない手法である。GPS の電波を受信するために、窓際に設置する必要があるが、装置が窓近くに設置されているとは限らず、また大量の IoT デバイスを用いる場合には GPS アンテナも同数用意する必要がある。

もう一つは、NTP<sup>1)</sup> (Network Time Protocol)を用いる手法である。これは、LAN でネットワーク接続されているデバイスに対して、LAN 経由での時刻同期を可能とし、設置は簡単であるが、同期精度が数 ms ~ 数百 ms であるため、高時間分解能のデータが必要となる振動や音の解析には不十分である可能性がある。また、正確な時刻を設定したい場合には、インターネットに接続する必要がある。

本研究では、工場への設置を想定し、GPS アンテナを1個のみ用いたシステム構成で、NTP よりも高精度な時刻同期技術の PTP<sup>2)</sup> (Precision Time Protocol, IEEE 1588)で、複数のデバイスに対して時刻同期を行うシステムを試作し、その時刻同期の精度を実測した結果について報告する。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 実験構成

図1に示すシステム構成で実験を行った。同期する時刻の基になるマスタークロック(他のデバイスへ配信する時刻)には、Raspberry Pi 3B (master) (以下、マスターという)のシステムクロックを用いる。マスタークロックには、GPS (Global Positioning System) HAT(Hardware Attached on Top)を介して接続した GPS アンテナから取得した正確な時刻を設定する。時刻同期されるデバイス(以下、スレーブという)の実装種別により、2台のデバイスを用いた。TS とは、日付と時刻を表すデータであり、あるデータに対して追加することで時刻情報の付与を可能とし、一般的には実装方法の種類によりハードウェア TS とソフトウェア TS に区

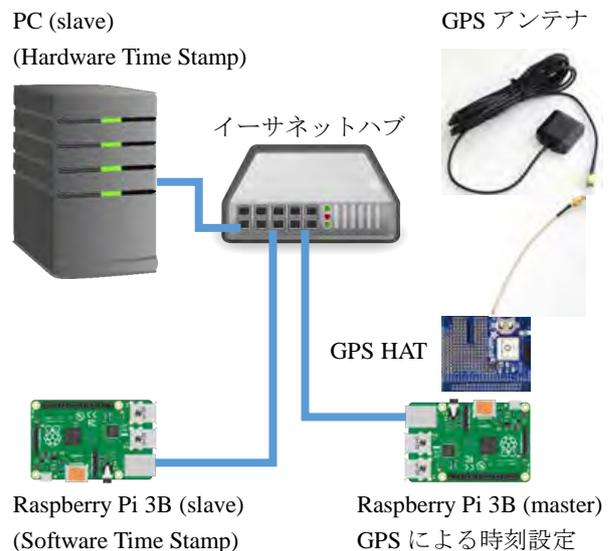


図1 実験システム構成図

分される。ハードウェア TS の PC (slave)およびソフトウェア TS の Raspberry Pi 3B (slave)を、スレーブとして用いる。マスターとスレーブは、イーサネットハブを介して、LAN ケーブルでスター接続している。また、時刻精度向上のため、GPS HAT 上の GPS 受信機から出力される 1PPS (Pulse Per Second)信号を用いている。1PPS 信号とは、正確に1s 間隔で、約 100ms のパルス幅で、出力される信号のことである。時刻同期には、PTP を用いる。これらの機能を実装するのに使用したソフトウェアパッケージ一覧を表1に示す。

### 2. 2 実験方法および結果

時刻同期の精度は、基準となるデバイスの時刻から、あるデバイスの時刻に対する時刻差(Offset)を取得して、その最小値と最大値の差(range)を評価した。表2に示した a), b), c) それぞれのデバイス間に対して、縦軸を時刻差、横軸を時間(24h 分)としたグラフを図2に示す。表2 a)のデバ

表1 使用したソフトウェアパッケージ一覧

技術略称	用途	パッケージ名
GPS	正確な時刻を取得、マスタークロックへの時刻設定	gpsd <sup>4)</sup> , gpsd-client <sup>5)</sup> , python-gps, ntpd
1PPS	時刻精度向上	pps-tools <sup>6)</sup>
PTP	各デバイスへの時刻同期	Linuxptp <sup>7)8)</sup> (ptp4l <sup>9)</sup> , phc2sys <sup>10)</sup>

イス間では、NTP のステータス情報である loopstats<sup>11)</sup>ファイルの内容から、約 16s 間隔で 24h 分の時刻差を取得した。表 2 b), c) のデバイス間では、Unix 系 OS のログファイルである syslog ファイルから、約 1s 間隔で 24h 分の時刻差を取得した。図 2 a) については、単純に GPS 時刻とマスタークロック間の時刻差となり、約  $12\mu\text{s}$  である。他の IoT デバイスも同様に、GPS 時刻との時刻差が約  $12\mu\text{s}$  と想定されるため、各 IoT デバイスにそれぞれ GPS アンテナを接続する IoT システムにおける時刻同期精度は、これらを加算した値の約  $24\mu\text{s}$  であると考えられる。図 2 b) は、マスターとソフトウェア TS のスレーブ間の時刻同期精度を表しており、約  $325\mu\text{s}$  である。図 2 c) は、マスターとハードウェア TS のスレーブ間の時刻同期精度を表しており、約  $100\mu\text{s}$  である。したがって、ソフトウェア TS とハードウェア TS の違いにより、時刻同期精度が約 3 倍異なる。数

ms ~ 数百 ms の時刻同期精度の NTP と比較すると、PTP ではソフトウェア TS で約 3 倍、ハードウェア TS では約 10 倍の精度が得られることが分かった。

### 3. 考察および今後の展望

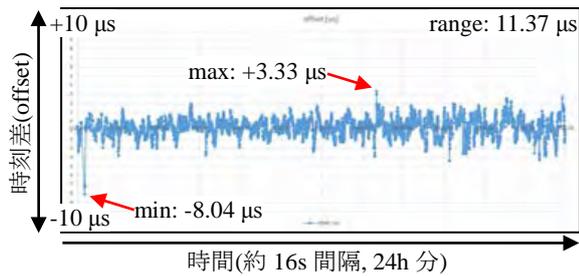
ソフトウェア TS およびハードウェア TS で同期精度が異なる要因について考察した。ソフトウェア TS では、大半のデータは  $\pm 50\mu\text{s}$  以内にあるが、一部のデータにおいて、時刻差の絶対値が大きくなっているため、CPU が他の処理を優先している場合があるためと推測できる。一方、ハードウェア TS では、他の処理に負荷を取られるようなことがないため、24h 分の全データにおいてほとんどバラつきがなく、 $\pm 50\mu\text{s}$  以内に収まっている。

IoT デバイス間に必要な時刻同期精度は、データ活用の目的や対象装置の環境によって異なる。例えば、人の不快度指数を求めるための湿度・温度などのデータでは、1 分間隔程度での取得で十分であり、時刻同期も NTP で十分である。しかし、高速に動作する工作機械などに対して設備の故障診断や異常検出、加工品の良否診断を目的とした場合、振動や音、電力などのデータを高時間分解能で取得する必要があることが想定される。この場合、異なる IoT デバイスでデータの時間軸を合わせるために、高精度での時刻同期が必要となる。

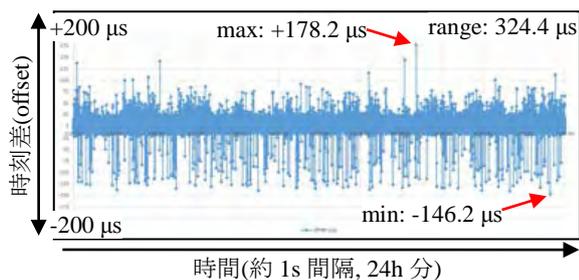
今後、IoT デバイス間の時刻同期の精度の違いにより、設備の故障診断や加工品の良否診断にどの程度影響を与えるか調査するため、工作機械に対して振動や音、電力などのデータを取得する IoT システムを開発し、実データの解析を試行する予定である。

表 2 時刻差測定条件

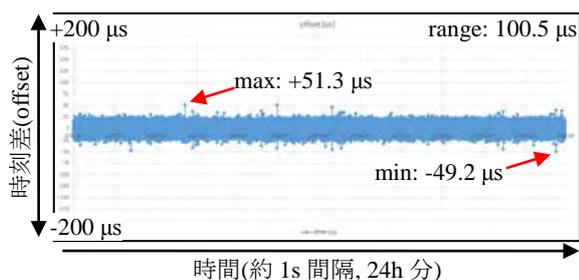
	基準デバイス	時刻差測定デバイス
a)	GPS アンテナ	Raspberry Pi 3B (master)
b)	Raspberry Pi 3B (master)	Raspberry Pi 3B (slave) (Software Time Stamp)
c)	Raspberry Pi 3B (master)	PC (slave) (Hardware Time Stamp)



a) GPS アンテナと Raspberry Pi 3B (master)



b) Raspberry Pi 3B (master) と Raspberry Pi 3B (slave)



c) Raspberry Pi 3B (master) と PC (slave)

図 2 時刻同期精度の実験結果

#### 【参考文献】

- 1) NTP web site, <http://www.ntp.org/>
- 2) IEEE-1588 Standard Ver.2 Tutorial Agilent Technologies
- 3) Timestamp wiki, <https://en.wikipedia.org/wiki/Timestamp>
- 4) gpsd web site, <https://gpsd.gitlab.io/gpsd/index.html>
- 5) GPSSD Client HOWTO web site, <https://gpsd.gitlab.io/gpsd/client-howto.html>
- 6) Ubuntu 18.04 LTS pps-tools web site, <http://manpages.ubuntu.com/manpages/bionic/man8/pps-tools.8.html>
- 7) linuxptp web site, <http://linuxptp.sourceforge.net/>
- 8) raspberrypi-ptp web site, <https://github.com/twteamware/raspberrypi-ptp>
- 9) ptp4l を使用した PTP の設定 web site, [https://access.redhat.com/documentation/ja-jp/red\\_hat\\_enterprise\\_linux/7/html/system\\_administrators\\_guide/ch-configuring\\_ptp\\_using\\_ptp4l](https://access.redhat.com/documentation/ja-jp/red_hat_enterprise_linux/7/html/system_administrators_guide/ch-configuring_ptp_using_ptp4l)
- 10) クロックの同期 (phc2sys) web site, [https://access.redhat.com/documentation/ja-jp/red\\_hat\\_enterprise\\_linux/7/html/system\\_administrators\\_guide/sec-synchronizing\\_the\\_clocks](https://access.redhat.com/documentation/ja-jp/red_hat_enterprise_linux/7/html/system_administrators_guide/sec-synchronizing_the_clocks)
- 11) NTP documentation web site, <http://doc.ntp.org/current-stable/monopt.html>

# 表面処理を施した部材の疲労強度解析

齊藤 光弘 (情報・生産技術部 デザイン・設計グループ)

## 1. はじめに

本研究では、有限要素法シミュレーションソフト ANSYS Mechanical Pro の疲労ツール及びプリポスト機能である“表面コーティング”を使用し、ソリッドモデルの表面に薄膜層を設定した場合の応力寿命への影響を評価した。

## 2. 有限要素法シミュレーションソフトについて

当所では、3次元 CAD (Autodesk Inventor) と ANSYS Mechanical Pro を利用して、3次元モデリング及び静的構造解析の技術支援を実施している。ANSYS Mechanical Pro は疲労解析や非線形解析 (大変形) に対応しており、また 2018 年より実装された“表面コーティング”では、シェル要素の厚さや材料及び物性値を指定することで、ソリッドモデルの表面にシェル要素を簡単に作成することが可能となっている。

## 3. 評価の方法

当所の疲労試験機 (図 1) で実施した 4 点曲げ疲労試験を例に取り上げ、同一条件で疲労解析を行い、双方の結果

を比較した。試験の条件は以下の通りである。

- ・材質 A2017-T351
- ・表面処理 (3 種類)
  - 処理なし
  - 炭化ケイ素 (SiC, 厚み 45  $\mu\text{m}$ )
  - タングステン (W, 厚み 53  $\mu\text{m}$ )
- ・試験片の寸法 6×20×68mm
- ・荷重点 (圧子) 間距離 20mm
- ・支点間距離 60mm
- ・支点ピン径  $\phi 10$
- ・荷重の大きさ 1.7kN

疲労試験結果を図 2 に示す。応力振幅は、繰り返し数 (設計寿命) 1E+05~1E+07 を通し、処理なしの場合と比較して、SiC では約 14%、W では約 31%向上している。なおこの試験では、形状、荷重条件、拘束条件がすべて奥行き方向に対称となっているので、ANSYS Mechanical



図 1 疲労試験機 (インストロン製 8802 型)

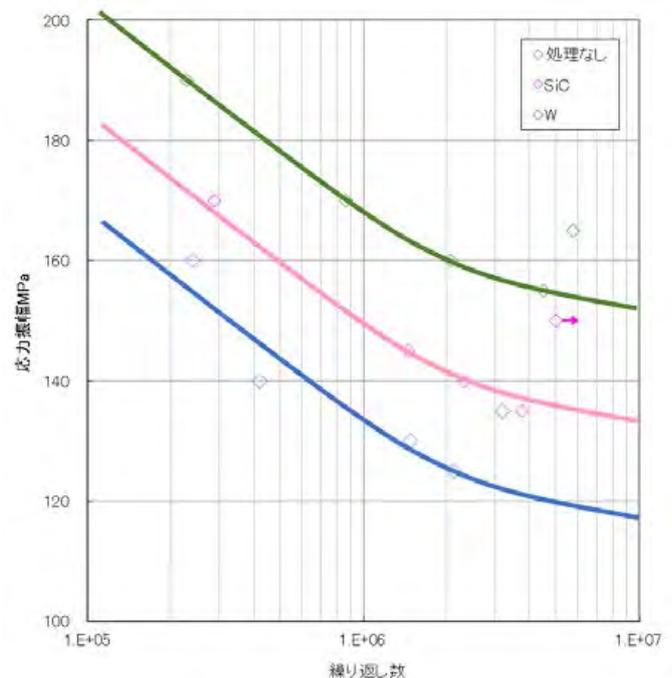


図 2 疲労試験結果 (疲労強度特性)

Pro での疲労解析は、図 3 のように奥行き方向をカットした 1/2 モデル（幅 10mm）を作成し、その断面を“摩擦なし支持（対称条件）”として行った（この場合、加える荷重の大きさ（荷重点 2 つの合計）は半分の 850N となる）。このモデルの、収束計算を行う前のデフォルトの要素数は 33590 であり、要素サイズは 0.5mm と設定した。なお左右方向も条件は対称だが、試験片中央部分の応力等の結果を正確に評価するため、1/2 モデルを用いた。疲労解析では支点ピンは剛体とし、試験片と支点ピン及び荷重を加える圧子の接触条件は共に“摩擦なし接触”とし、圧子については、上下方向以外には動かないよう、左右方向の拘束を付加した。解析結果の評価は、試験片と支点ピン及び圧子の接触部分の影響を考慮し、試験片下面の、支点ピンとの接触部分を除いた中央部について行った。

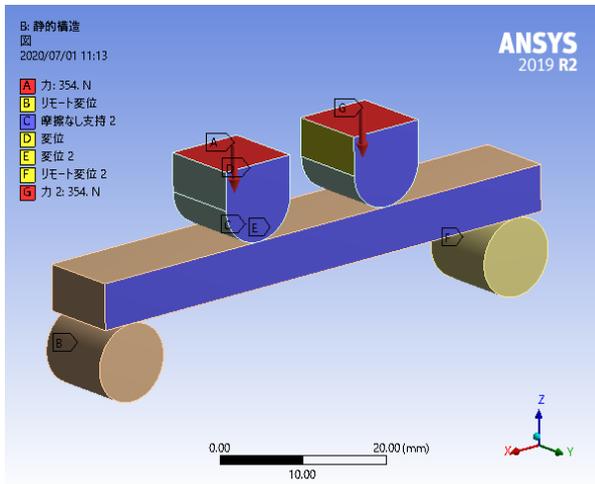


図 3 構造解析条件

#### 4 結果および考察

ANSYS Mechanical Pro では、疲労解析結果として疲労感度（荷重履歴－サイクル線図）が得られる。この結果を図 2 と比較するため、疲労強度特性（繰返し数－応力振幅線図）に変換したのが図 4 である。この図より、応力振幅は処理なしの場合と比較して、SiC では約 28%、W では約 32% 向上しているが、疲労試験の結果と比較すると、処理なしと W では約 30%、SiC では約 45% 上回っている。疲労試験結果との差の原因としては、試験片と支点ピン及び圧子の接触条件、A2017-T351 の物性値として使用した S-N 曲線（交番応力－繰返し数）や、疲労強度係数等の疲労解析のパラメーターが適切でない事などが考えられる。

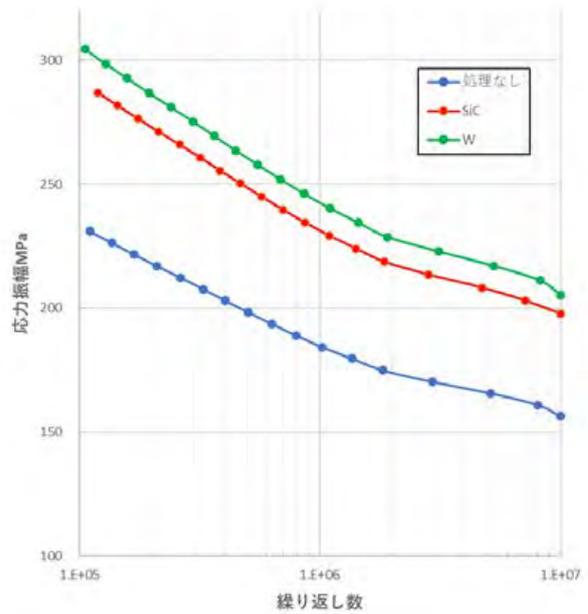


図 4 疲労解析結果（疲労強度特性）

#### 5 おわりに

表面処理を施したソリッドモデルの疲労解析を行い、表面処理の有無や処理の違いによる効果を確認することが出来た。ただし、疲労試験結果との差については、疲労解析のパラメーターの検証及び見直しを行うと共に、他の材料で実施した疲労試験についても同様の検証を行い、精度を高めていく必要がある。今後は疲労試験とも連携し、依頼試験や受託研究など、企業支援への対応を可能とする。

#### 【参考文献】

1. 線延飛, 都井裕, 日本シミュレーション学会論文誌, Vol.9, No.3, pp.39-45, (2017).
2. 加賀谷忠治, 加藤政則, 江上登, 「材料」第 31 巻 第 343 号, pp.364-369, (1982).
3. 殿塚易行, 斉藤光弘, “4 点曲げ疲労試験方法における試験片形状の影響”, 神奈川県産業技術センター研究報告, No.19/2013
4. 殿塚易行, “4 点曲げによる「簡易的な疲労強度評価法」”, 神奈川県産業技術センター研究報告, No.15/2009

# 木材乾燥用散水システム構築に向けた基礎的実験

中島 岳彦(情報・生産技術部 試作加工グループ)  
長尾 達明(情報・生産技術部 システム技術グループ)

## 1. はじめに

木材に積極的に熱を加えない天然乾燥では、外気にさらされる表面ほど乾燥が進み収縮するが、中心部ではほとんど水分が動かず収縮はしない。このアンバランスな状態が続くと、収縮した表面が引張り応力に耐えられず割れる。この木材表面の引張りひずみが測定できれば、割れの予測につながると考えた。

割れを軽減するには、表面に散水して含水率を上昇させ、過乾燥による割れを緩和する方法がある。昨年度の研究<sup>1)</sup>では塗装の影響により、乾燥速度が落ちることが観察された。散水システムとして遠隔操作が可能な Raspberry Pi を利用し、今後 IoT 技術を応用することの余地も残した。まずはどのようなシステム構築が可能なのか模索した。

## 2. 実験

乾燥過程で木材表面は収縮するが、試験材の年輪の配列により収縮の仕方が異なる。そこで暴露試験を行う前に、小試験体にて乾燥促進試験を行い、ひずみ方などを事前に検証することとした。

### 2. 1. 木口面での収縮

屋外曝露で使用する試験材（スギ未乾燥材、長さ 3m）から、端部の未使用部分（50cm）を使用した。木口面観察用として年輪の配置が異なる 2 種類（G1、G3）切り出し、木口断面 105mm×105mm、長さ 20mm に仕上げた。試験は恒温槽にて乾燥（105℃ 6h）を行い、乾燥過程で木材がどのような収縮をするか観察した。

### 2. 2. 屋外曝露試験

試験体は長さ 3m のスギ未乾燥材 2 本から、両端 50cm を除いた中央部を使用し、1 本につき 2 個の試験体を得た。切り出した試験体のサイズは木口断面が 105mm×105mm、長さ 1m のものを 4 本用意した。乾燥過程で割れる場合、木口付近で割れることが多いことから、木口端部から 10mm の距離にひずみゲージを貼り付けた。ゲージ長は 5mm で比較的長いものを使用し、年輪に対して接続方向のひずみ量を測定した。

試験体は建物の北西向きの壁面に設置した（図 1）。屋根はなく雨が降れば濡れるような場所である。日照は午後のみで、西側には多少の生け垣がある程度で日没の 1 時間ほど前までは日照がある。試験場所としては日照時間が長い南向きの場所が適していると思われたが、電源や水道の確保、ネットワークケーブルの届く範囲など、試験に要す

る条件を満たすため、このような場所で行うこととした。ここでは散水システムによる散水の影響を観察するとともに、気温や天候がひずみに与える影響を測定した。2 本の試験体は木材用塗料を塗布し、塗料による乾燥抑制やひずみ防止に影響があるか調べた。



図 1 屋外設置状況

## 3. 散水システム

屋外に積み重ねられた木材を過度の乾燥から保護するためには、水を撒くのが一般的であり、タイミングは人間が判断している。人間は天気や気温、降雨の状況、材料の色、割れの具合など様々な因子を総合的に判断している。これは経験に裏付けられたもので、数値化できていないのが現状である。本研究では乾燥に影響する多くの因子の中から、木材表面のひずみに着目し、測定することとした。

Raspberry Pi では WEB カメラによる監視と、センサーによる温湿度測定ができるよう構築した（図 2）。データは所内ネットワークを使って PC 端末からアクセスできることを目指した。

散水は水道水を蛇口から直接シャワーホースへつなぎ、Raspberry Pi で電磁弁を制御して行えるようにした。ひず



図 2 システム全体

み量は別に用意したデータロガーで記録した。ひずみ量が乾燥や割れ防止に役立つことが確認できれば、Raspberry Pi 上で処理できるよう改良していきたい。

開発した監視画面を図3に示す。監視画面はWEBページとして表示され、所内のPC端末から散水するON/OFFスイッチを付けた。現状では手動による散水のみである。



図3 管理用のWEB画面

#### 4. 実験結果

##### 4. 1. 木口面での収縮

図4に乾燥による収縮の違いを示した。G1は中心から同心円状に年輪があるため、年輪の外側の方でひずみが大きくなり、割れに至っている。G3では同心円になっていないことから、収縮がスムーズに進行し割れが発生していない。

##### 4. 2. ひずみの推移（屋外曝露試験）

10月～12月にかけて、屋外で放置したときのひずみ量と気温の関係を図5に示す。測定を開始した数日間は、塗料の影響によりひずみ量が少なく、乾燥が抑制されていると考えられた。その後は塗布なしとほぼ同じように推移し、塗料の影響が見られなくなった。今回使用した塗装条件では十分な効果を得ることができなかった。

ひずみは収縮（－）と膨張（＋）を繰り返している。10

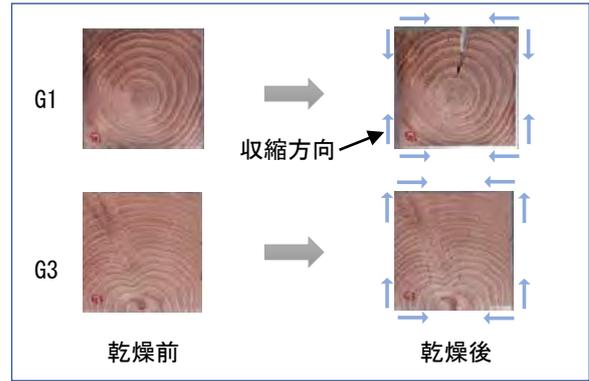


図4 年輪による収縮の違い

月29日～30日を拡大してみると、気温による影響が見られ、気温の上昇とともに収縮し、降雨によって膨張する傾向が見られた。図中の青色の帯はその時間に雨が降っていたことを示す。降雨後は木材が濡れて膨潤しているため、ひずみがプラスに転じていることがわかる。水分の影響が出やすい木口付近の状況であるため、全体の乾燥を測定するのであれば、ひずみゲージの測定個所を増やしていく必要があると思われた。

#### 5. まとめ

散水システムに必要な機器類と監視用WEB画面は製作できた。乾燥状態はひずみ量を使って限定的ではあるが測定できることも確認できた。今年度の研究では基礎的な結果しか得られておらず、割れ抑制に対する散水実験や実際の含水率測定などを行うことはできなかった。システム構築には気温や湿度、ひずみ量や含水率、さらには散水による影響など様々なデータを収集していく予定である。

#### 【参考文献】

1. 中島岳彦, 長尾達明; KISTEC 研究報告2019, 44, (2019).

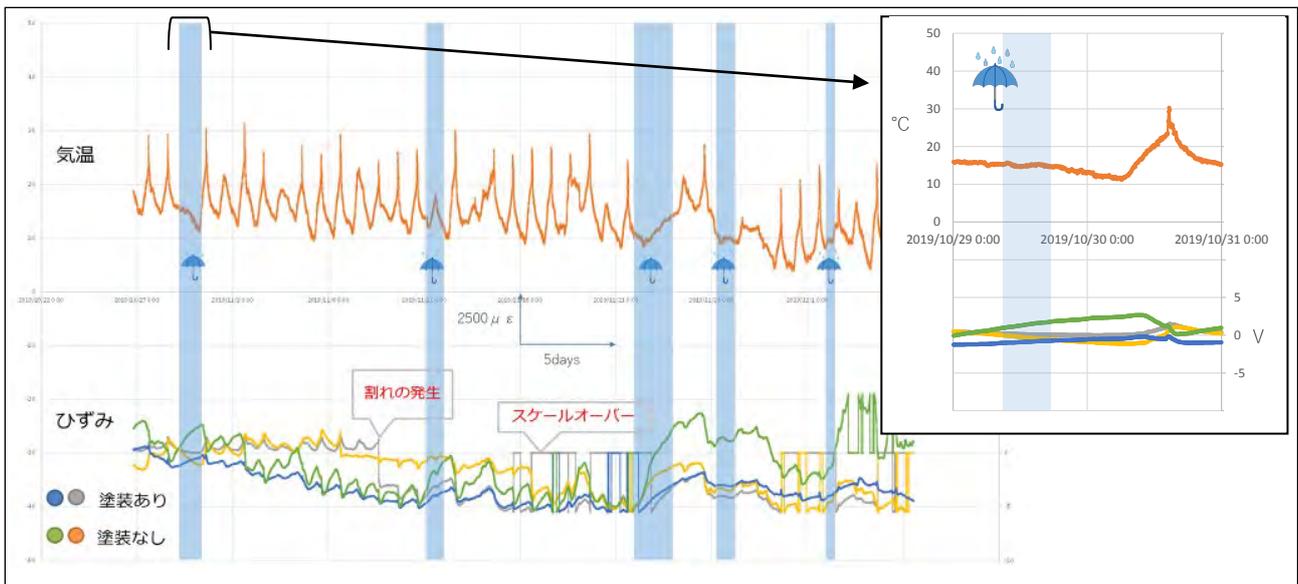


図5 ひずみの推移 (2019. 10. 26～12. 6)

# レーザー照射による LMD 肉盛層の特性改善

福山 遼 (情報・生産技術部 試作加工グループ)

中村 紀夫 (情報・生産技術部 システム技術グループ)

薩田 寿隆 (情報・生産技術部長)

## 1. はじめに

モノづくりのデジタル化に伴い、設計データ (3D-CAD) を直接入力して部品を得る積層造形技術 (3D プリンティング) が注目されている。金属材料を用いた金属 3D プリンティングにおいては、その市場規模は 2030 年には約 2 兆円と予測されており、現在では医療、航空・宇宙、発電分野で先行実装されている<sup>1)</sup>。

金属 3D プリンティングの中でも、レーザー粉体肉盛溶接 (Laser Metal Deposition : LMD) はレーザー照射してできた溶融池に金属粉末を送り、肉盛溶接を行う技術である。LMD は母材希釈が少なく、低入熱量であり、肉盛厚さを正確に制御できることから、局所的な肉盛層の形成が容易となる。現在では、タービン翼や金型などの高付加価値の金属部材の補修として期待されており、金属ブロックからの削り出しによる作製に比べて製造コストの削減が見込める。

金型を対象と考えると、補修を行うに際して高速度工具鋼を用いることが想定されるが、LMD で肉盛溶接を行った高速度工具鋼の肉盛層は、場所により硬さに変動が生じる。この硬さ変動を抑えつつ溶接ままよりも硬化させるために別工程で炉内熱処理を行う必要もあり、製造コストの増加や製作期間が長くなる要因になる。

そこで本研究では、LMD 装置のみで肉盛溶接と熱処理を行う加工法を新たに考案した。本手法を用いて、LMD で肉盛した高速度工具鋼の硬さ変動の軽減と、より硬さの大きい高機能的な溶接部の形成を行った。

## 2. 実験及び結果

本研究で用いた LMD 装置 (TRUMPF 製 : TruDisk3006) の概略を述べる。発振器から発したレーザー光 (ディスク発振の YAG) は光ファイバーで伝送され、ロボットアーム先端に設けた出射光学系により集光され、対象物表面を溶融する。粉末は供給装置からアルゴンガスにより搬出され、出射光学系先端のノズル内に設けた出射口から溶融部に供給される。レーザー照射と同期してロボットアームは移動し、目的とする形状の肉盛層を形成する。

表 1 に LMD の積層条件を示す。粉末は粒径 53-150  $\mu\text{m}$  の高速度工具鋼 SKH51 を使用した。表 2 に粉末の化学組成を示す。基材は一般構造用圧延鋼材 SS400 を用いた。これらの条件で 1 層 5 パス (ラップ幅 2mm) の肉盛層を形成した。

続いて、硬さ変動を軽減させるために LMD 装置を用いた肉盛層のレーザーによる熱処理 (以下、レーザー熱処理) を

試みた。LMD による肉盛加工を行った後に、粉末を供給せずレーザー (ビーム径  $\phi 4\text{ mm}$ 、走査速度 5 mm/s) のみを各パスの肉盛面の真上から再照射した。レーザー熱処理の回数は 5 パスで 1 回と定義し、これを 1、2、4、6 回行った。

評価方法は光学顕微鏡による金属組織観察とマイクロビッカース硬さ試験機による硬さ試験 (試験力 100 gf) を用いた。試験片はワイヤ放電加工で断面切断後に樹脂に埋め込み研磨し、ピレラ試薬によるエッチング処理を行ったものを使用した。

表 1. LMD の積層条件

レーザー出力 (kW)	2
ビーム径 $\phi$ (mm)	4.0
キャリアガス流 ( $\ell/\text{min}$ )	2.1
シールドガス流 ( $\ell/\text{min}$ )	23.0
粉末供給量 (g/min)	15.5
レーザー走査速度 (mm/s)	6

表 2. SKH51 粉末の化学組成 (mass%)

C	Si	Mn	P	S	Cr	Mo	V	W	Fe
0.88	0.22	0.35	0.02	0.01	4.12	4.97	1.77	6.50	Bal.

図 1 にレーザー熱処理を行う前の肉盛断面の光学顕微鏡像と硬さ分布を示す。各パスにエッチングによる組織の濃淡の違いが見られ、この金属組織の違いがそのまま硬さの変動に繋がっているのが分かる。3 パス以降の硬さの変動は少なく、最高で 833 HV の硬さを得たが、1 パスから 2 パスは硬さが低く最低で 685 HV であった。また、1 パスから 5 パスまでの平均硬さは 785 HV、硬さの標準偏差は 40.3 であった。

硬さの変動を低減し、更なる硬さの増加を狙うために肉盛層へのレーザー熱処理を行った。図 2 にレーザー熱処理回数に伴う肉盛断面の平均硬さと硬さの標準偏差の推移を示す。また、代表例としてレーザー熱処理を 2 回行ったときの肉盛断面の硬さ分布と光学顕微鏡像を図 3 に示す。レーザー熱処理を 2 回以上行うことで、レーザー熱処理前の肉盛層に比べエッチングによる組織の濃淡は少なくなった。レーザー熱処理を 2、4、6 回行ったときの平均硬さは 851 HV、硬

さの標準偏差は 25.7 となり、レーザ熱処理前に比べ硬さが 66 HV 増加し、硬さの標準偏差は 14.6 低減された。

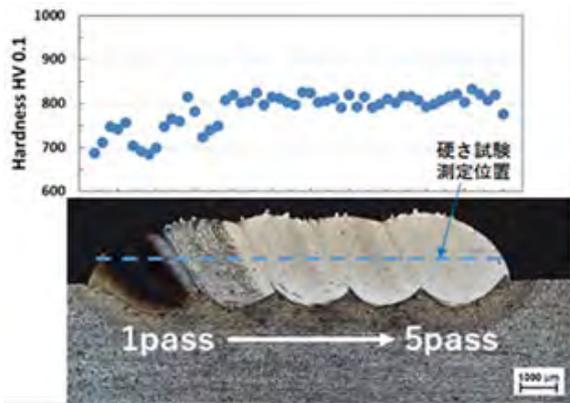


図 1. レーザ熱処理前の肉盛断面の硬さ分布と光学顕微鏡像

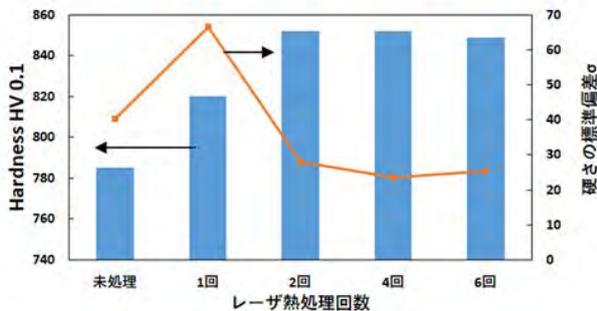


図 2. レーザ熱処理回数に伴う肉盛断面の平均硬さと硬さの標準偏差  $\sigma$  の推移

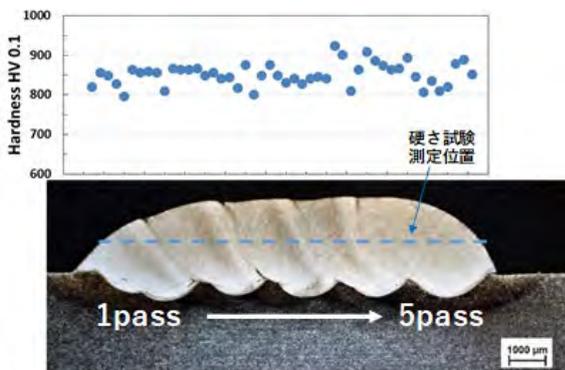


図 3. レーザ熱処理 2 回の肉盛断面の硬さ分布と光学顕微鏡像

### 3. 考察

図 1 に見られる肉盛ままの組織の濃淡の違いと硬さの変動について図 4 を用いて考察する。1 パスは試験片温度が室温でのレーザ照射であったため、マルテンサイト変態開始点 ( $M_s$  点) 以下に冷却された後に、後続パスの昇温による焼戻し状態で炭化物が析出し、濃くエッチングされたと考えられる。2 パスもほぼ同様な現象が生じていると考えられる。また、1、2 パスの各硬さ分布を見ると、各パス中央部の硬さが高くなっている。硬さが増加した所は後続パスからの距離が遠く到達温度が低いため二次硬化が起き、硬さが低下した所は後続パスからの距離が近く到達

温度が高いため軟化したと考えられる。また、3 パス以降の硬さが 800 HV 程度で維持されているのは、1、2 パスの形成により試験片温度が上昇し、更に後続パスの入熱により  $M_s$  点以上に保持され、オーステナイト組織のまま最終 5 パスの加工が終了し、5 パスの加工終了後の冷却時に 3 から 5 パスが一齐にマルテンサイト変態したと考えられる。このように 3 から 5 パスは同程度の熱履歴を経たため同じようなエッチングの濃さと硬さを得たと考えられる。

一方、レーザ熱処理を 2 回以上行ったときは、レーザ照射の回数増加に伴い試験片温度が  $M_s$  点以上に昇温保持されていたため、一部を除きほとんどの領域がオーステナイト組織に維持され、レーザ照射終了後の冷却時に全てのパスが一齐にマルテンサイト変態したと考えられる。しかし、図 3 の硬さ分布を注視すると、硬さが低下している箇所があり、これは図 1 の肉盛ままの時とほぼ同じ箇所の硬さが低下しているのが分かる。硬さが下がる程の温度履歴を受けた場合、オーステナイト域まで達しない焼戻し処理はそのまま低い硬さを維持する。また、本研究の熱処理は肉盛層全体を均一かつ高精細に温度制御されているのではなく、レーザの中心 (約 1300 °C) が照射されている肉盛面と、レーザ中心に比べ温度が低いレーザ端が照射されている肉盛面に分かれる。従って、レーザ照射とその熱伝導によってオーステナイト域まで昇温されなかったため硬さの低下を招いたと考えられる。この対策として、LMD による肉盛時と同じ照射位置である各パスの真上からレーザ照射せずに、硬さの低下を招く箇所はレーザの中心が照射されるように走査し、オーステナイト域まで昇温させる必要があると推察される。

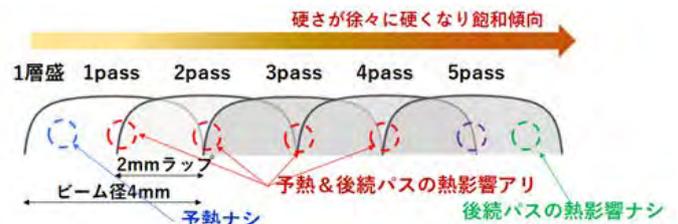


図 4. LMD による各パスの温度履歴の違い (肉盛断面)

### 4. 今後の展開

レーザ熱処理を行うことで 1 パスから 5 パス全ての領域でエッチングによる組織の濃淡が均一化され、硬さの変動が低減された。更に、熱処理による硬さの上昇効果も得られた。今後は、レーザの照射条件であるスポット径、走査速度、出力、レーザ照射位置などを調整することで、肉盛層の内部組織を均質化させつつ任意の硬さに調整できる熱処理手法の開発を目指す。

#### 【参考文献】

- 1) 井関隆之：金属積層造形プロセス概要，第 3 回 NEDO 『TSC Foresight』セミナー発表資料 (2019)。

【外部発表】 口頭発表 1 件， 特許出願 1 件

# ボールエンドミルによる加工面品位の検討

横田 知宏(情報・生産技術部 試作加工グループ)

## 1. はじめに

5軸加工の特長の一つに、3軸加工と比べ加工品質を向上させることができる点が挙げられる。ボールエンドミルによる平面加工を行う場合、3軸制御マシニングセンタではボールエンドミルの中心付近の切れ刃を使って加工することになる。中心付近では切れ刃の周速がゼロに近いため、材料を押しつぶすような加工となり良好な面品位を得られない。一方5軸制御マシニングセンタでは、工具を傾斜させることによってボールエンドミルの外径に近い部分の切れ刃で加工することができる。このことにより高い周速を持った切れ刃で材料を切削することができ、良好な面品位を得ることができる。

5軸制御マシニングセンタでは、テーブル傾斜軸（A軸またはB軸）とテーブル回転軸（C軸）の組み合わせにより、工具をあらゆる角度に傾斜させることが可能である。本研究では、ボールエンドミルの傾斜角を変えて平面加工を行い、工具傾斜角が加工面品位に及ぼす影響を検討した。

## 2. 実験方法

被削材 A5052 に対し、直径 6 mm (R3 mm) 2 枚刃のボールエンドミルにより平面加工を行った。切削条件は、主軸回転速度  $13,262 \text{ min}^{-1}$ 、送り速度  $1,326 \text{ mm/min}$ 、切込み (ap) 0.3 mm 及び 0.05 mm、ピッチ (p) 0.35 mm 及び 0.15 mm の一方向走査線加工とした。工具の傾斜角と送り方向の模式図を図 1 に示す。リード角（工具送り方向への傾斜角）を  $-60^\circ$  から  $+60^\circ$  まで 11 段階に、チルト角（工具送り方向に直角な方向への傾斜角）を  $0^\circ$  から  $+60^\circ$  まで 5 段階に

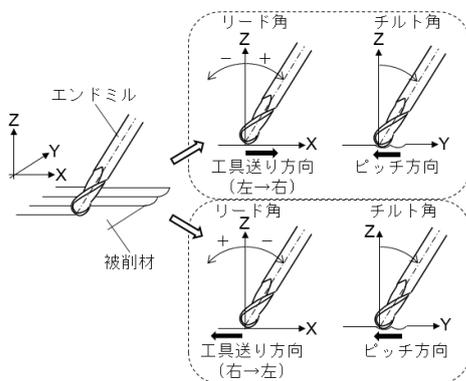


図1 工具傾斜角及び工具送り方向の模式図

表1 傾斜角の設定値

設定角度 (°)	
リード角	-60, -35, -20, -10, -5, 0, +5, +10, +20, +35, +60
チルト角	0, +15, +30, +45, +60

変化させ、工具送り方向を左→右、右→左の2通りとして、それぞれの組み合わせを実施した。具体的な傾斜角の設定値を表1に示す。

## 3. 実験結果

切込み 0.3 mm、ピッチ 0.35 mm、リード角  $0^\circ$  で加工した面の写真を図2に、ピッチとリード角は同じで切込みを 0.05 mm として加工した面の写真を図3に示す。切込み 0.3 mm の場合、チルト角  $0^\circ$  では工具の送り方向によらず白濁した加工面となった。またチルト角  $15^\circ$ 、左→右送りの場合には、不規則な傷が生じた。その他はほぼ傷が発生せず光沢のある加工面であった。一方切込み 0.05 mm では、チルト角  $15^\circ$ 、左→右送りの場合でも光沢のある加工面となった。他の条件の加工面は切込み 0.3 mm の場合と大きな差はなかった。

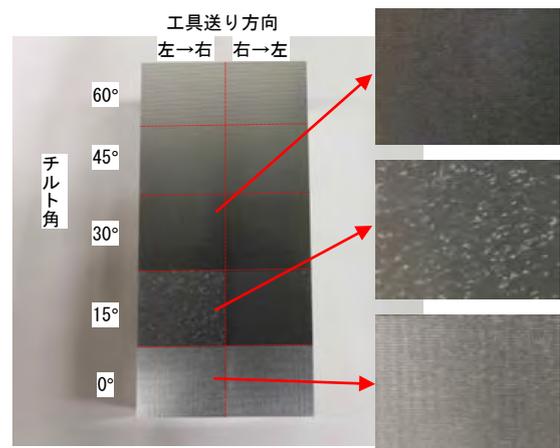


図2 加工面 (ap0.3mm, p0.35mm, リード角  $0^\circ$ )

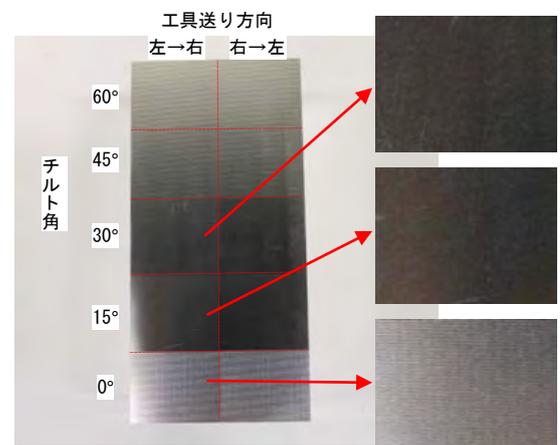


図3 加工面 (ap0.05mm, p0.35mm, リード角  $0^\circ$ )

図4に、切込み0.3mm、ピッチ0.35mm、チルト角15°で加工した面の写真を示す。リード角-5°と-10°の場合に工具送り方向によらず不規則な傷が発生した。特に-10°の場合は著しく荒れた加工面となった。写真の掲載は省略するが、チルト角30°以上の条件では、いずれのリード角の場合でも傷はほとんど発生せず光沢のある加工面となった。

図2に示した切込み0.3mm、ピッチ0.35mm、リード角0°の加工面のピッチ方向に測定した面粗さRzを図5に、切込みとリード角は同じでピッチを0.15mmとした加工面のRzを図6に示す。いずれのピッチ条件でもチルト角0°でRzが最も小さく、次いでチルト角30°となった。それ以外の条件では、ピッチ0.35mmの場合いずれもほぼ同等、ピッチ0.15mmの場合チルト角15°が最も大きくなった。いずれの条件も工具送り方向の差はほとんどなかった。

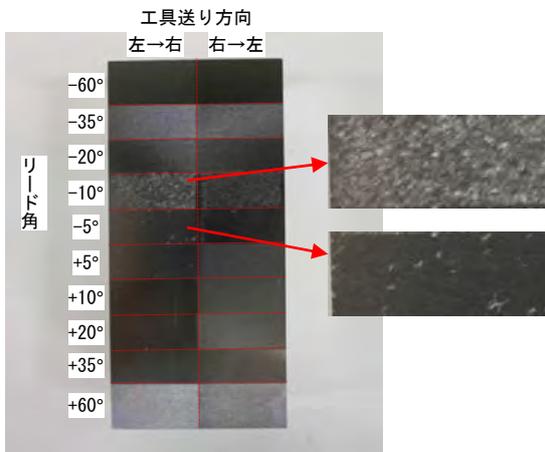


図4 加工面 (ap0.3mm, p0.35mm, チルト角 15°)

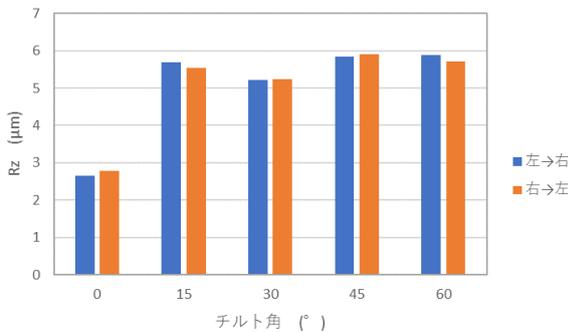


図5 加工面粗さ (ap0.3mm, p0.35mm, リード角 0°)

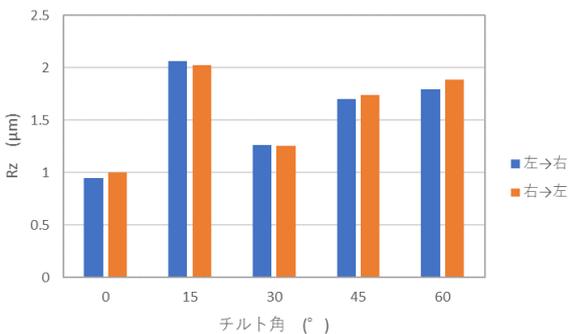


図6 加工面粗さ (ap0.3mm, p0.15mm, リード角 0°)

#### 4. 考察

##### 4.1 加工面への傷の発生

加工面に傷が発生する条件について考察する。ボールエンドミルで被削材を切削する際の工具傾斜角と切込みの関係を図7に示す。切込み0.3mmの場合、傾斜角15°では工具中心が被削材に切り込んだ状態で切削するが、30°以上では工具中心が被削材に接触せずに切削することがわかる。一方切込み0.05mmの場合、傾斜角15°でも工具中心は被削材に接触しなくなる。今回加工面に傷が発生したのは、切込み0.3mm、チルト角15°でリード角0°、-5°、-10°の場合であった(図2、図4)。これらはいずれも工具中心が被削材に切り込んだ状態で切削する条件である。また、リード角0°、チルト角15°でも切込みを0.05mmにした条件では傷は発生しなかった(図3)。以上から、工具を傾斜させて加工する際に工具中心が被削材に切り込んだ状態のとき、加工面に傷が発生すると考えられる。このことから、良好な加工面品位を得るためには、工具傾斜角と切込みの関係を考慮し、工具中心が切削に関与しないようにする必要があることがわかった。

工具のボール半径を  $R$ 、切込みを  $ap$ 、工具傾斜角を  $\theta$  とすると、工具中心がちょうど被削材に接触するときの  $ap$  と  $\theta$  の関係は次式で表される。

$$\theta = \cos^{-1}(1 - ap / R) \quad \text{①}$$

この関係式で導かれる曲線を図8に示す。図にはボール半径  $R$  が 1, 3, 5 mm の場合を示した。それぞれの曲線が加工面への傷発生有無の境界線である。つまり、曲線より上の領域で工具傾斜角を設定すれば、傷の発生なく良好な加工面を得ることができる。この図は、ツールパス作成時に工具傾斜角を決定するための目安として活用できる。

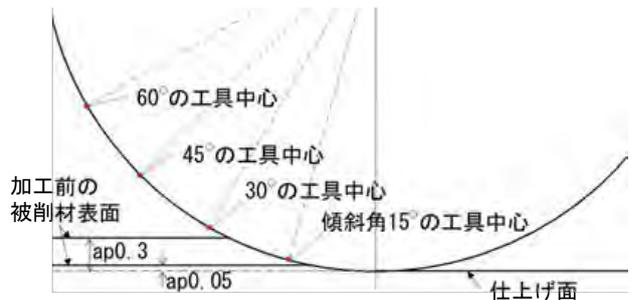


図7 工具傾斜角と切込み、工具中心位置の関係

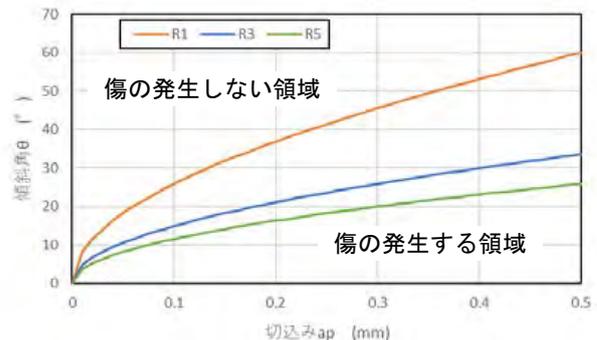


図8 加工面への傷発生有無の境界線

#### 4. 2 加工面の光沢と加工面粗さの関係

加工面の光沢と加工面粗さの関係について考察する。

リード角  $0^\circ$  としてチルト角のみ変化させたとき、チルト角  $0^\circ$  では白濁した加工面となったが、チルト角  $30^\circ$  以上では光沢のある加工面となった (図 2)。チルト角  $15^\circ$  では 4.1 の通り加工面に傷が発生したためここでの考察から除外する。チルト角  $0^\circ$  及び  $30^\circ$  の加工面のマイクロSCOPE 観察像を図 9 に示す。チルト角  $0^\circ$  の場合は工具中心が通過した部分の材料が押しつぶされたような跡となっており、工具中心通過部とそうで異なる加工面の状態となっている。一方チルト角  $30^\circ$  の場合は規則的な凹凸模様が広がっている。この違いが光の反射に影響し、白濁した加工面と

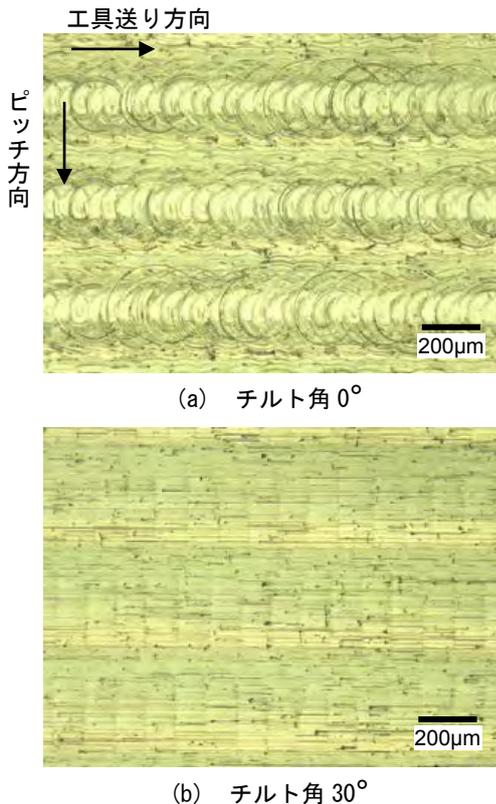


図 9 加工面の観察像 (ap0.3mm, p0.35mm, リード角  $0^\circ$ )

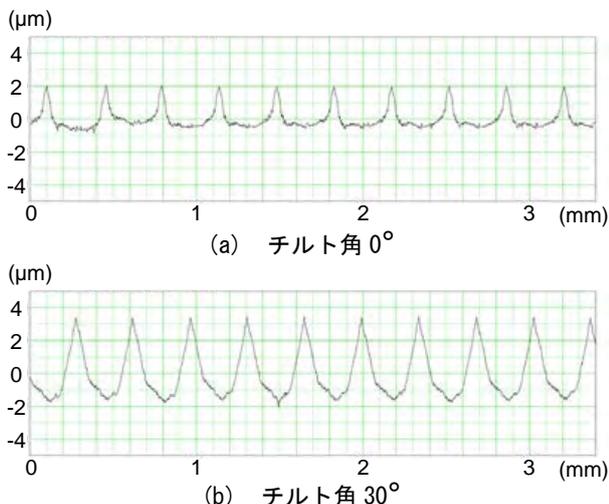


図 10 加工面の粗さ曲線 (ap0.3mm, p0.35mm, リード角  $0^\circ$ )

なったか光沢のある加工面となったかの差である。加工面の見た目の品位を評価する場合、一般的には光沢のある面のほうが良好と判断されると考えられる。その意味では、チルト角  $30^\circ$  以上の加工面が良好と考えることができる。

一方加工面粗さはピッチ  $0.35\text{ mm}$ 、 $0.15\text{ mm}$  ともチルト角  $0^\circ$  の場合が最も小さい値となった (図 5、図 6)。ピッチ  $0.35\text{ mm}$  の理論面粗さは  $5\text{ }\mu\text{m}$ 、ピッチ  $0.15\text{ mm}$  の理論面粗さは  $1\text{ }\mu\text{m}$  である。すなわちチルト角  $0^\circ$  の面粗さは、ピッチ  $0.35\text{ mm}$  で理論粗さを大きく下回っており、ピッチ  $0.15\text{ mm}$  でもほぼ理論粗さに近い値となっていることである。図 10 に、ピッチ  $0.35\text{ mm}$  でチルト角  $0^\circ$  及び  $30^\circ$  の加工面の粗さ曲線を示す。チルト角  $0^\circ$  では谷の中央付近がほぼ平坦になっているが、チルト角  $30^\circ$  では谷の中央付近が最も凹んだ形状となっている。これは、チルト角  $0^\circ$  の場合に工具中心付近でボールエンドミルの R 形状通りの切削ができていなかったことを示している。すなわち、工具中心付近の削り残しがあったためにピッチ間の段差が小さくなり、面粗さが小さくなったと考えられる。

チルト角  $15^\circ$  以上の面粗さについては、ピッチ  $0.15\text{ mm}$  の条件で差が顕著になっている。チルト角  $15^\circ$  で面粗さが大きいのは 3.1 で考察した加工面の傷発生の影響である。一方チルト角  $30^\circ$  以上では、チルト角が小さいほど面粗さが小さい傾向が認められる。この理由に関しては考察が十分にできていないため今後の課題であるが、傷が発生しない傾斜角、すなわち工具中心が切削に関与しない傾斜角の範囲では、傾斜角が小さいほど面粗さは小さくなるのではないかと考えられる。

1 章で述べた通り、3 軸制御マシニングセンタによるボールエンドミルの平面加工 (リード角、チルト角とも  $0^\circ$ ) では良好な面品位を得られないことは既知であったが、面粗さの点では、リード角、チルト角とも  $0^\circ$  のほうが、工具を傾斜させるより小さくなることが明らかになった。加工面粗さを重視するか、見た目の面品位を重視するかで加工方法を変える必要があることがわかった。

#### 5. まとめ

本研究では、5 軸加工の特長である工具傾斜と加工面品位の関係を検証した。その結果、以下の結論を得た。

- 1) 工具を傾斜させて加工する際、工具中心が被削材に切り込んだ状態のとき加工面に傷が発生した。良好な加工面品位を得るためには、工具傾斜角と切込みの関係を検討する必要があることがわかった。
- 2) 工具を傾斜させない加工では白濁した加工面となったが、工具を傾斜させた場合光沢のある加工面となった。一方加工面粗さは工具を傾斜させないほうが小さくなることが明らかになった。加工面粗さを重視するか、見た目の面品位を重視するかで加工方法を変える必要があることがわかった。

今後は、工具寿命の観点から工具傾斜角の最適値を検証し、総合的に良好な切削特性を得られる加工条件を明確化させたい。



# プラスチック材料の引張試験及びその破面

荒木 真由美(化学技術部 環境安全グループ)

栃木 勲(川崎技術支援部 材料解析グループ)

羽田 孔明(化学技術部 材料化学グループ)

中島 岳彦(情報・生産技術部 試作加工グループ)

田中 聡美(化学技術部 環境安全グループ)

## 1. はじめに

プラスチック材料は、軽量性・成型性をはじめとする優位性から、金属材料からの代替が進んでいるが、破損トラブルも絶えない。破断面の形状観察から破損に至る経緯を推察する破面解析が、トラブル対策手段として期待されている。一方で、プラスチック材料の破面解析は、金属材料にくらべて歴史が浅い上、メーカーのノウハウとして蓄積されていることが多く、公開されている情報が少ない。本研究では、汎用エンジニアリングプラスチック材料の一つであるポリカーボネートについて、引張応力による破壊現象を再現することを目的として、引張試験により得られた破断面の特徴を観察し、破壊様式と破断面形状との対応関係について検討した。

## 2. 実験

市販のポリカーボネート(PCET1600, タキロンポリマー株)の押出成形板から、JIS K7139に記載されている多目的試験片タイプA2について厚さを5mmに変更したダンベル試験片を切削加工により作製した。引張試験は、5565型5KN容量万能材料試験機(インストロン・ジャパン株)を用い、引張速度1mm/min、10mm/min及び100mm/min、試験数各n=10で実施した。得た破断面について、実体顕微鏡(Discovery V2.0 SteREO, カールツァイス株)による観察を行った。

## 3. 結果及び考察

図1に引張試験により得られた応力-ひずみ曲線、表1に応力-ひずみ曲線から得られた降伏点および破断点におけるひずみと応力の平均値と標準偏差を示す。ポリカーボ

ネートは延性材料のため、降伏現象を経た後、破断に至る。表1に示すように、引張速度が大きくなるほど、降伏ひずみ、ならびに降伏応力は大きくなった。引張速度の増大は、材料の変形に対する抵抗を大きくするため、降伏ひずみならびに降伏応力が速度の増大により上昇したと考えられる。破断ひずみ及び破断応力については、速度との相関が認められなかった。樹脂の破断は、表面の細かいキズや、内部の空隙(ボイド)の存在が影響する。今回、市販品を切削加工したものを引張試験片として用いたため、試験片の個体差や表面の加工キズが破断の特性値に大きく影響し、速度依存性がみられなかったものと推察される。

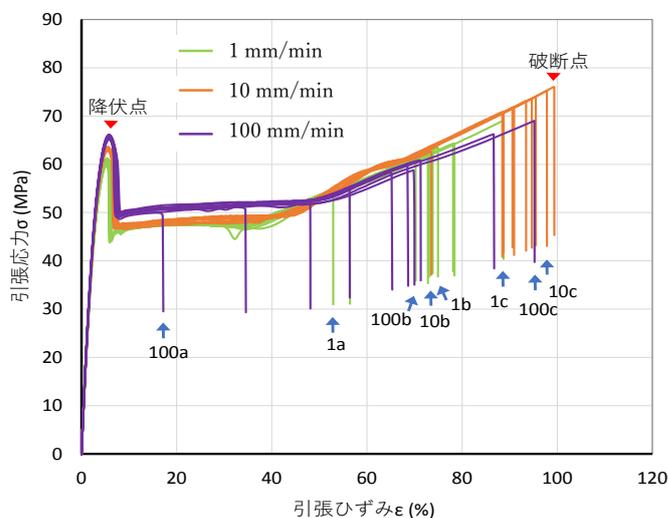
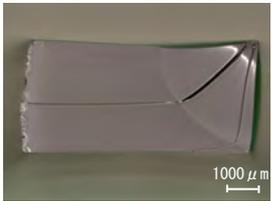
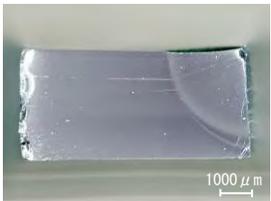
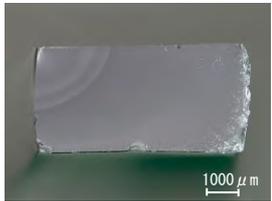
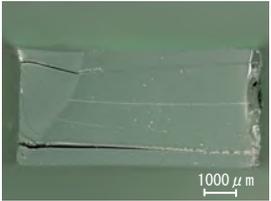
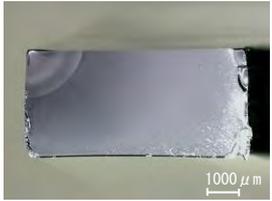


図1. 応力-ひずみ曲線

表1. 降伏点および破断点におけるひずみと応力

	引張速度					
	1 mm/min		10 mm/min		100 mm/min	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
降伏ひずみ [%]	5.3	0.1	5.5	0.1	5.8	0.1
降伏応力 [MPa]	60.5	0.8	63.2	0.3	65.7	0.3
破断ひずみ [%]	71.9	9.9	89.8	8.1	61.2	22.1
破断応力 [MPa]	61.6	4.3	71.2	4.2	57.9	6.2

表 2. 引張試験破断面

破断ひずみ 引張速度	0 ~ 60 %	60 ~ 80 %	80 ~ 100 %
1 mm/min	1a (52.9, 53.4) 	1b (74.9, 63.1) 	1c (88.7, 69.1) 
10 mm/min		10b (73.4, 62.6) 	10c (97.8, 75.2) 
100 mm/min	100a (17.1, 49.4) 	100b (68.4, 59.9) 	100c (95.2, 69.0) 

※ 試料 No. (破断ひずみ, 破断応力)

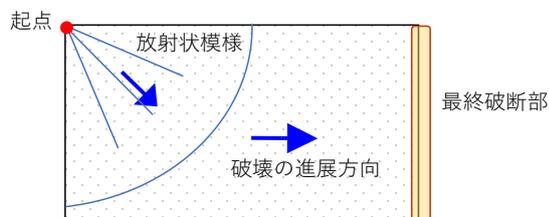


図 2. 破面の模式図

引張試験により得られた破断面について、破断ひずみや引張速度の大小によって分類したものを表 2 に示す。いずれの破断面とも、図 2 の模式図のように、端部を起点とし、段差模様（ラチェットマーク）が放射状に広がっていることが確認できた。なお、段差模様は、亀裂進展が速く、亀裂が連続的につながった模様と定義される。一般的に、角や表面のキズ、微小な欠陥に応力が集中し、その場所を起点として亀裂が生じる。端部から広がる円弧部分は、塑性変形を伴って亀裂進展が進んだ特徴を表し、円弧の中心が破壊の起点を示していると考えられる。円弧を呈しながら亀裂が急速に進展した後は、一方向の引張応力により、脆性的に最終破断に至ったと推測される。

破断ひずみが小さい破断面については、塑性変形や段差模様が顕著に現れ、放射状模様の半径が大きい傾向が見られた。キズや欠陥が大きいものほど、起点から段差模様が大きく入り、放射状模様が広がり、残りの部分が応力に耐えられず容易に破断した可能性がある。この事象のメカニズムについては、切り欠きを入れた試験片について、引張試験による破断面観察を行うなど、さらなる検討が必要と考えられる。

#### 4. まとめ及び今後の展開

ポリカーボネート板のダンベル型試験片を用いた引張試験により、樹脂板が引張応力を受けた場合を想定した破断面を観察し、破壊様式と破断ひずみとの相関を示すことができた。

これらの情報は、今後、依頼される破断面の解析に有効な基礎データとすることができる。今後、試料の種類や破壊応力の様式を変えて、付加される応力と破面の関係を整理し、樹脂の破面解析の基礎データの蓄積を進める。

#### 【参考文献】

1. 藤木榮, 萩原利哉「プラスチック材料の破壊・破断面の見方」日刊工業新聞社 (2015).

# 六価クロム分析用水道水標準物質の長期安定性評価

乾 哲朗、城田 はまな、坂尾 昇治(化学技術部 化学評価グループ)

## 1. はじめに

水道法では、水道水の安全確保と生活利用上の観点から、51 項目の水質基準が定められていて、水道水事業者等に水質検査を義務づけている。2020 年 4 月に水道法が一部改正され、六価クロム (Cr(VI)) 化合物の水質基準が  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  から  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  に強化された。そのため、水道水中の極低濃度の Cr(VI) を正確に分析することが求められる。

水道水中の Cr(VI) はジフェニルカルバジド吸光光度法やイオンクロマトグラフ-ポストカラム吸光光度法で分析する。Cr(VI) の分析結果の妥当性を確認するためには Cr(VI) の濃度が値付けされた水道水標準物質が必要となる。しかし、溶液中の Cr(VI) の安定性に関する知見が少ないことから、Cr(VI) の濃度が値付けされた水道水標準物質が開発されていないのが現状である。そこで、本研究では Cr(VI) 分析用の水道水標準物質を開発することを目的とした。

これまでに、著者らは水道水に Cr(VI) 標準溶液を添加して酸性化せずに弱アルカリ性の状態で水道水標準物質を調製し、ジフェニルカルバジド吸光光度法で Cr(VI) の濃度を値付けする方法を開発した<sup>1)</sup>。標準物質は長期にわたり安定であることが要求されるので、標準物質を調製したときは、その標準物質の長期安定性を確かめなければならない。本報告では、調製した Cr(VI) 分析用水道水標準物質の長期安定性を評価したので、その結果を報告する。

## 2. 実験

### 2. 1 装置

Cr(VI) の分析には U-1800 形レシオビーム分光光度計 (日立製作所製) を用いた。全 Cr の分析には SpectrAA-220Z 原子吸光光度計 (Varian 製) に GTA110 グラファイトチューブアトマイザー (Varian 製) を組み合わせ合わせたものを用いた。pH の測定には F-72 pH メーター (堀場製作所製) を用いた。脱イオン水の製造には Aquarius RFD342HA 蒸留水製造装置 (Advantec 製) を用いた。

### 2. 2 試薬と試料

$100 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(VI) 標準溶液は容量分析用の二クロム酸カリウム (関東化学製、純度 99.98 % 以上) を脱イオン水で溶解して調製した。 $10 \text{ g L}^{-1}$  ジフェニルカルバジド溶液は試薬特級の 1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド (関東化学製) をアセトンで溶解し、酢酸を数滴加えて調製した。その他の試薬はすべて特級のものを使用した。



図 1 水道水標準物質

水道水は神奈川県海老名市で採取し、孔径  $1 \mu\text{m}$  のセルロースろ紙でろ過したものを原料とした。

### 2. 3 水道水標準物質の調製

2 L ガラス製メスフラスコに  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(VI) 標準溶液を 1 mL 添加し、原料で希釈して酸性化せずに弱アルカリ性 (pH 7.6) の状態で水道水標準物質を調製した。この水道水標準物質 (2 L) を硝酸洗浄した 10 本のフッ素樹脂 (PFA) ボトルに 200 mL ずつ充填し (図 1)、冷蔵庫で保管した。

### 2. 4 Cr(VI) の定量

Cr(VI) は JIS K 0102 工場排水試験方法<sup>2)</sup>に準拠してジフェニルカルバジド吸光光度法で定量した。 $50 \text{ mL}$  ガラス製メスフラスコに水道水標準物質を 25 mL 分取し、 $1.8 \text{ mol L}^{-1}$  硫酸 2.5 mL と  $10 \text{ g L}^{-1}$  ジフェニルカルバジド溶液 1 mL を添加して発色させ、脱イオン水で定容希釈した。この発色液を 100 mm 石英セルに移して、分光光度計を用いて波長 540 nm における吸光度を測定した。Cr(VI) の濃度はあらかじめ標準溶液で作成しておいた検量線から求めた。

## 3. 結果と考察

水道水標準物質の長期安定性を評価するために、10 本の PFA ボトルから 5 本を取り出し、標準物質の調製日から 0、1、3、6、12 か月後に各ボトルを開封して、Cr(VI) 濃度、全 Cr 濃度、pH をそれぞれ測定した。12 か月にわたる安定性試験の結果を表 1 に示す。水道水標準物質の Cr(VI) 濃度は  $50 \sim 51 \mu\text{g L}^{-1}$  であり、全 Cr 濃度 ( $50 \sim 51 \mu\text{g L}^{-1}$ ) と良く一致したことから、水道水標準物質中の Cr(VI) は Cr(III) に還元されていないことが分かった。

表 1 水道水標準物質の安定性試験の結果

保管時間 (月)	Cr(VI) 濃度 (μg/L)	全 Cr 濃度 (μg/L)	pH
0	50	51	7.6
1	51	50	7.6
3	50	51	7.6
6	50	51	7.6
12	51	50	7.6

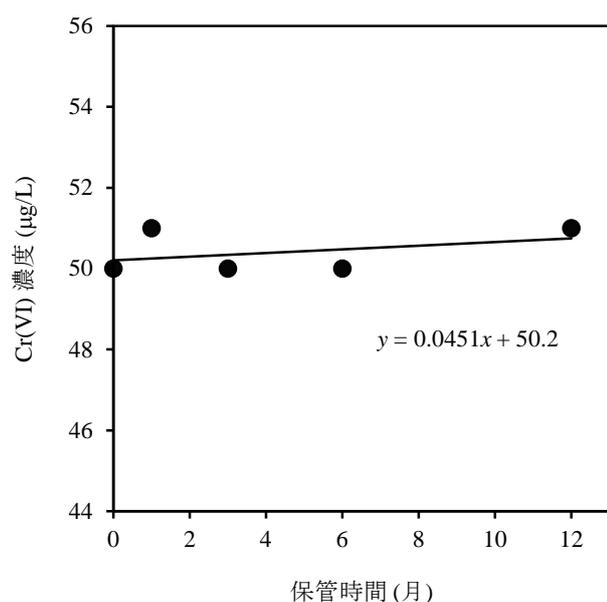


図 2 Cr(VI) 濃度と保管時間の回帰直線

また、水道水標準物質の pH は 7.6 と一定であったことから、水道水標準物質中の Cr(VI) は  $\text{CrO}_4^{2-}$  の状態で存在していると考えられる。更に、水道水標準物質は調製後 12 か月が経過しても、藻や沈殿物が発生することはなかった。

水道水標準物質の安定性は JIS Q 0035 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則<sup>3)</sup>に従い、Cr(VI) 濃度の経時変化を直線 ( $y = b_1x + b_0$ ) と仮定して評価した。 $|b_1| < t_{0.95, n-2} \times s(b_1)$  であれば、こう配はゼロと有意に異なる(すなわち、不安定性はない)と判断できる。こ

こで、 $b_1$  はこう配、 $b_0$  は切片、 $t_{0.95, n-2}$  は 95 % 信頼水準における自由度  $n - 2$  から求めた学生 t 係数、 $s(b_1)$  はこう配にかかわる不確かさである。表 1 の保管時間を  $x$  軸、Cr(VI) 濃度を  $y$  軸にプロットして得られた回帰直線を図 2 に示す。回帰分析の結果、 $b_1$  は 0.0451 で  $s(b_1)$  は 0.0736 であった。この場合、学生 t 係数は 3.18 に等しい。結果として、こう配はゼロと有意に異ならず、12 か月の間、水道水標準物質に不安定性は見られなかった。このことから、本法で調製した Cr(VI) 分析用の水道水標準物質は長期間安定であると判断した。

#### 4. まとめ

Cr(VI) 分析用水道水標準物質の長期安定性を評価するために、調製した水道水標準物質を冷蔵庫で 12 か月間保管して Cr(VI) 濃度の経時変化を調べた。Cr(VI) 濃度と保管時間の回帰直線のこう配はゼロと有意に異ならず、水道水標準物質は 12 か月間安定であることが分かった。以上のことから、本法で調製した Cr(VI) 分析用の水道水標準物質は水道水中の Cr(VI) の分析結果の妥当性確認に使用できると考えられる。

#### 【参考文献】

1. T. Inui, H. Shirota, S. Sakao, *Anal. Sci.*, **35**, 1375 (2019).
2. JIS K 0102, 工場排水試験方法 (2016).
3. JIS Q 0035, 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則 (2008).

【外部発表】論文等発表 1 件

# 消毒用アルコールジェル中のエタノール定量分析の検討

岩本 卓治(化学技術部 環境安全グループ)

## 1. はじめに

新型コロナウイルス感染症の発生に伴い、医薬品および医薬部外品の手指消毒用エタノールの需要が高まる一方で、国内製造販売業者の供給が追いつかず、消毒液不足が続いている。こうした逼迫した需給状態を少しでも改善するため、手指消毒用エタノール以外の高濃度エタノール製品を用いた手指消毒について、令和2年3月23日付けで厚生労働省医政局経済課、医薬・生活衛生局医薬品審査管理課、医薬・生活衛生監視指導・麻薬対策課連名で事務連絡として「新型コロナウイルス感染症の発生に伴う高濃度エタノール製品の使用について」が周知され、その後、4月10日、4月22日<sup>1)</sup>と2度の改定が行われた。この取扱いとは臨時的・特例的な対応であり、高濃度エタノール製品を手指消毒用エタノールの代替品として用いることに差し支えないとするものであるが、今後の流行状況の変化等によっては、この取扱いは変更・廃止されるものとなっている<sup>1)</sup>。

高濃度エタノール製品の要件は、エタノール濃度が原則70 vol%～83 vol%の範囲内であること(70 vol%以上のエタノールが入手困難な場合には、手指消毒用として60 vol%台のエタノールを使用しても差し支えないこと)と、含有成分にメタノールが含まれないこととしている<sup>1)</sup>。

ジェルタイプの高濃度エタノール製品は粘性があり、微量ではあるがグリセリン、カルボキシビニルポリマー等の保湿剤、増粘剤が成分として含まれていることが多く、精製水が10 vol%のオーダーで存在する。このような成分を含む試料をガスクロマトグラフ(GC)で分析した場合、分析条件によっては酸化されず、装置を汚す原因となる可能性やカラム劣化の一因となる可能性が考えられた。そこで本研究ではこれらの装置への負担の可能性を極力減らすため、ヘッドスペースGC(HS-GC)を用いて、アルコールジェル中のエタノールを定量する検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 分析カラムの検討

高濃度エタノール製品を分析するにあたって分離カラムの検討を行った。高濃度エタノール製品にはメタノールが含まれていないこととする要件があることと、消毒用エタノールには2-プロパノール(IPA)を添加した規格もあるため、これら3成分を分離できるカラムの検討を行った。具体的には3成分の標準試薬を使って極性カラムのDB-WAXETRと中極性カラムのDB-624で検討した。HS-GCの測定条件を表1に示す。

表1 HS-GC測定条件

装置	Hewlett Packard(現 Agilent) HS部: HP-7694型、GC部: HP-5890II型	
HS加熱条件	60℃、20 min	
移動相ガス	He	
分離 カラム	①	J&W DB-624 長さ60m 内径0.32mm 膜厚1.8μm
	②	J&W DB-WAXETR 長さ60m 内径0.32mm 膜厚0.5μm
カラム温度	40℃(5min) → (10℃/min) → 120℃	
検出器	水素炎イオン化検出器(FID)	

### 2.2 エタノール定量分析の検討

ジェルタイプの高濃度エタノール製品(指定医薬部外品)を精製水で希釈し、標準添加法で定量することを試みた。

高濃度エタノール製品を1g以上の重量で正確に秤量し、内標準物質として水と混和するtert-ブタノール(TBA)を添加した。これに精製水を加え、ゆっくりと攪拌することでジェルを溶かし、分析試料とした。ジェルは透明で水に溶けたかどうかはわかりづらいため、注意が必要であった。

ヘッドスペース用のバイアル瓶に分析試料を5mL、既知濃度に調整したエタノール水溶液を2mL、500℃で2時間焼成した塩化ナトリウムを3.0g添加して密閉した。この分析試料を表1に示す測定条件(カラム①を使用)で測定し、製品中に含まれるエタノール重量濃度を求めた。標準添加法による検量線は3点検量とした。

手指消毒用エタノールのエタノール濃度は体積濃度で表示されるため、HS-GCで得られたエタノール重量濃度から(1)式を使って、体積濃度に換算した。

$$\text{エタノール体積濃度(vol\%)} = \text{エタノール重量濃度(wt\%)} \times \frac{\text{製品の密度(g/cm}^3\text{)}}{\text{エタノール密度(g/cm}^3\text{)}} \quad \dots(1)$$

ここで、製品の密度は15.0℃における密度を、エタノール密度も15.0℃における密度を表している。製品の密度は恒温器(エスベック製LU-113)を用いて、高濃度エタノール製品を15.0℃に温調し、密度比重計(京都電子工業製DA-110)で実測した。15℃におけるエタノール密度は文献値(0.79351 g/cm<sup>3</sup>)<sup>2)</sup>を用いた。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 分析カラムの検討

図1にDB-624を分離カラムに用いた時のクロマトグラムを、図2にDB-WAXETRを用いた時の結果を示す。DB-WAXETRの場合、IPAとエタノールのピークが近接し、分離が悪いのに対し、DB-624の場合はメタノール、エタノール、IPAともにピークが分離されていた。また、内標準物質として考えたTBAとも分離が良いことを確認した(図1)。よって、これ以後の測定はDB-624を使用し、エタノールの定量分析を検討した。

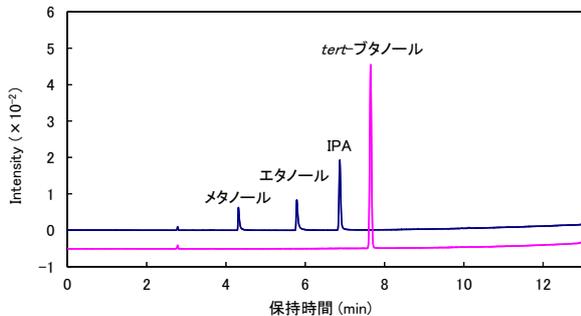


図1 DB-624を用いた時のクロマトグラム

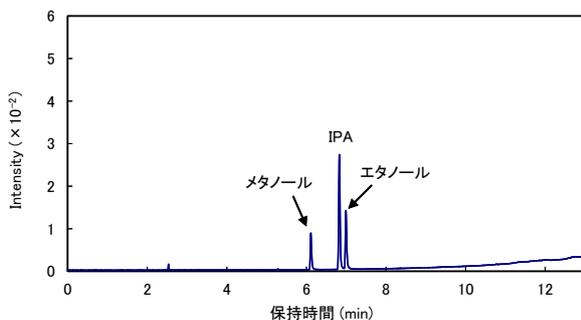


図2 DB-WAXETRを用いた時のクロマトグラム

### 3. 2 塩析効果の検討

表2に塩析あり(NaCl 3.0 g)と塩析なしの場合のエタノールと内標準物質のTBAの検出感度の比較を示す。エタノール、TBAともに塩析の効果を確認でき、塩析なしと比較してピーク面積値は1.4倍となった。この時のエタノールとTBAのピーク面積比は塩析ありとなしで同じ0.83であったため、それぞれの成分に同様の塩析効果があったといえる。これらのことから検出感度を上げるために塩析は効果的であるということが確認できた。

表2 塩析の有無による各成分の検出感度の比較

	ピーク面積値		比率 <sup>※1</sup>
	塩析あり	塩析なし	
エタノール	33290	24299	1.4
TBA	39869	29105	1.4
ピーク面積比 <sup>※2</sup>	0.83	0.83	-

※1) 塩析ありのピーク面積値/塩析なしのピーク面積値

※2) エタノールのピーク面積値/TBAのピーク面積値

### 3. 3 HS-GCによるアルコールジェル中のエタノール分析

図3に標準添加法により得られた検量線を示す。決定係数( $R^2$ )は0.9999で、検量線は良好な直線関係にあった。この検量線を外挿し、X軸との交点から分析試料中のエタノールとTBAの濃度比を求め、既知のTBA濃度を乗じることで試料中のエタノールの重量濃度70.5 wt%が得られた。一方、密度比重計を用いた15°Cにおける高濃度エタノール製品の密度は0.8725 g/cm<sup>3</sup>であった。これらの実験結果から(1)式を用いてジェルタイプの高濃度エタノール製品におけるエタノールの体積濃度は77.5 vol%と算出された。今回、分析の検討に用いたアルコールジェル製品は指定医薬部外品でアルコール濃度は76.9 vol%~81.4 vol%であることから、標準添加法を用いたHS-GC法で、アルコールジェル中のエタノールを定量することができた。

今回分析に用いたアルコールジェルにはメタノール及びIPAは含まれていなかったが、DB-624を用いることでピーク分離ができ、標準添加法を用いることでそれぞれの成分について定量ができると考えられる。

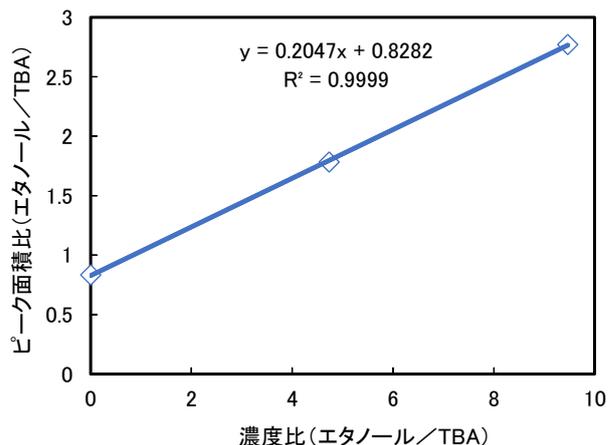


図3 検量線(標準添加法)

### 4 まとめ

アルコールジェル中のエタノールの定量分析をHS-GCを用いて試みた。その結果、カラムにはDB-624を用いることで、メタノール、エタノール、IPAを分離できることがわかった。また、NaClを用いた塩析はピーク面積値を1.4倍大きくする効果があった。TBAを内部標準に用いた標準添加法は直線性の良好な検量線が得られ、アルコールジェル中のエタノールの定量ができることがわかった。

#### 【参考文献】

- 厚生労働省、新型コロナウイルス感染症の発生に伴う高濃度エタノール製品の使用について(改訂(その2))(令和2年4月22日), <https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000611836.pdf> (参照日:2020年6月)
- 日本工業規格(JIS) JIS B 7548:2009. 酒精度浮ひよう附属書A(規定) 国際アルコール表(2009)

# 油脂類の酸化危険性の評価手法の検討

内田 剛史（化学技術部 新エネルギーグループ）

竹内 茉莉子（化学技術部 環境評価グループ）

## 1. はじめに

油脂類は製造業においては潤滑油、熱媒体などに利用されている。これら油脂類は有機物であるため、使用時には空気中の酸素によってしだいに酸化していく。この酸化反応では過酸化物を生成する場合があり、環境条件によっては生成した過酸化物が蓄積していく危険性がある。そして、この過酸化物が熱などによって分解することで発火や爆発が発生する。特に保守が行き届かない状況で、ほこりにまみれた油が発火する事故が生じており、エスカレーター、車両、金属加工機、真空ポンプなど様々な場所で発生している。

これらの危険性を把握するためには油脂類の酸化しやすさや、酸化の進行度合いによる発火危険性を評価することが必要である。これまでの研究から、発火危険性と油脂の酸化により生成する過酸化物量との相関性から評価が可能であることが明らかとなった<sup>1)</sup>。

本研究では油脂類の酸化の進行に伴う危険性挙動の変化について発火温度測定と過酸化物価による相関性からの危険性評価手法についての検討を行う。不飽和度の異なる油脂類や飽和油脂類の酸化危険性について評価し、本評価手法の妥当性について検討した。

## 2. 実験

### 2. 1 試料

今回の測定では油脂類として不飽和油脂の脂肪酸エステルであるオレイン酸メチル、リノール酸メチルおよびリノレン酸メチルを使用した。一般的な植物油はオレイン酸、リノール酸、リノレン酸など種々の不飽和脂肪酸を含む混合物であり組成にばらつきがあるため、試薬を用いて測定を行った。これらは不飽和結合を1から3個有している。

また、飽和油脂として似た構造を持つステアリン酸メチルを用いて飽和、不飽和結合による酸化危険性への影響を検討した。さらに、エステル以外にも熱媒体等で利用されるパラフィンを用いて酸化危険性評価を行った。

### 2. 2 油脂類の評価方法

初めにこれら油脂類の酸化した試料を作成するため、60℃から120℃の恒温槽内で数日間静置し、一定期間ごとに取り出し、これらを実験用試料とした。

油脂類の酸化による危険性の指標としての発火温度測定は高圧示差熱天秤(HP-TG/DTA)により測定した。ガラスウールに含浸させた試料をアルミニウム製の試料容器に入れたのち、装置に設置し酸素1MPaに加圧した。これを昇温速度20℃/minで加熱した時の発熱と重量変化より発

火温度を測定した。

また、空気中の酸素が不飽和油脂に吸収されて生成する過酸化物量を示す過酸化物価を測定し、発火温度の関係を検討した。

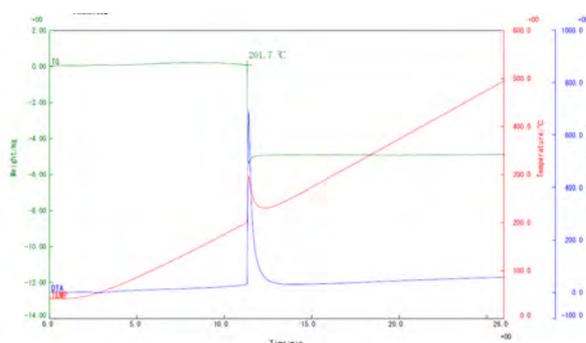


図1 ステアリン酸メチルの発火温度測定結果  
発火温度：202℃

## 3. 考察

### 3. 1 油脂類の発火温度測定

発火温度測定の一例としてステアリン酸メチルの発火温度測定の結果を図1に示す。HP-TG/DTAでの昇温過程において試料が発火、燃焼する際には、熱重量曲線(TG：緑)の急激な減少と同時に示差熱曲線(DTA：青)、温度曲線(赤)が急激に立ち上がる現象が生じる。このように各曲線に急激な変化が生じた時を発火とし、この時の開始温度を発火温度と定義している。

HP-TG/DTAによる測定では、綿やポリスチレンなどの一般的な有機物の発火温度は250℃から300℃となる物質が多く、発火事故の多いポリプロピレンなどは200℃付近で発火する。不飽和油脂は発火温度が200℃以下にまで低下する<sup>2)</sup>。そのため、アロマオイルなどの不飽和油脂を含む油脂類の発火事故が多く発生している。

### 3. 2 油脂類の劣化による発火危険性

ステアリン酸メチルを60℃から120℃の範囲において、空气中で保持した日数と過酸化物の変化を図2に示す。これまでの結果より、不飽和油脂のリノール酸メチルやオレイン酸メチルは60℃で過酸化物の生成が容易に確認されたが<sup>3)</sup>、飽和油脂のステアリン酸メチルは過酸化物が検出されず、ほとんど酸化しない。100℃程度まで加熱すると過酸化物価の上昇が顕著となることから、不飽和油脂に比べて酸化しにくいことが示された。

このステアリン酸メチルの発火温度と過酸化物価の相

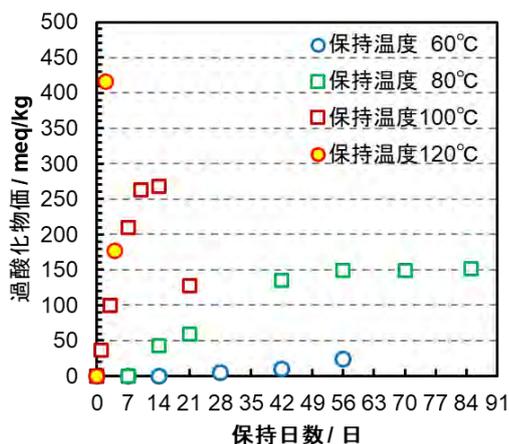


図2 ステアリン酸メチルの酸化劣化による過酸化物価の経時変化

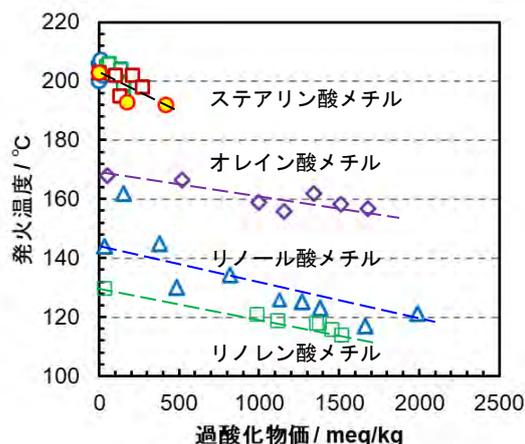


図4 油脂類の酸化劣化による過酸化物価と発火温度の関係

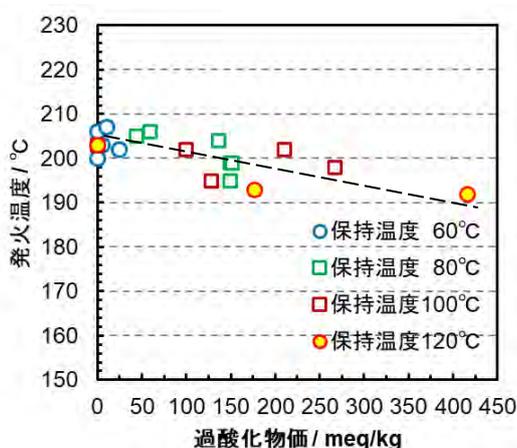


図3 ステアリン酸メチルの酸化劣化による過酸化物価と発火温度の相関性

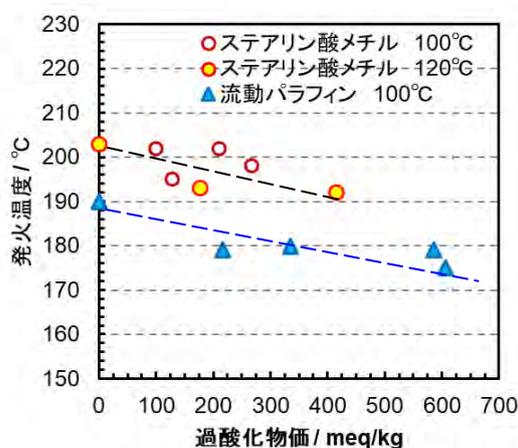


図5 流動パラフィンの酸化劣化による過酸化物価と発火温度の変化

関性について図3に示す。発火温度は過酸化物価の増大によって低下し、最大で10℃程度の低下がみられた。また発火温度は過酸化物との相関性が高く、保持温度の影響を受けないことが明らかとなった。

この結果から、油脂類の発火危険性は酸化によって生成する過酸化物量に依存すること、使用温度が高いほど生成速度が速くなることが示された。油脂類を使用する環境温度が高い場合や、真空ポンプなどのように運転中に油脂の温度が高くなる場合には劣化しやすく、さらに油脂の温度が発火温度に近い状況であることから発火危険性が増大する。このような環境下での利用においては定期的な保守および点検が重要である。

また、不飽和油脂についても図4のようにまとめると、不飽和度の大きい油脂ほど過酸化物価の増加とともに発火温度が低くなることが明らかとなった。また、図3から図5のデータは過酸化物価が増大しているときの発火温度と分解により減少しているときの発火温度も表記しているが、生成時または分解時にかかわらず、過酸化物価と発火温度には高い相関がみられた。そのため、保守時に油脂類の劣化度について過酸化物価による評価することで発火危険性も予測することが可能である。

さらに、脂肪酸エステル以外に飽和炭化水素のパラフィ

ンについても評価したところ、ステアリン酸メチルと同様に100℃の環境温度で過酸化物価の増加とともに発火温度の低下が見られ、170℃まで低下した。

以上のことから、油脂類の種類によらず酸化劣化による過酸化物濃度の上昇により発火温度が低下することが明らかとなった。酸化劣化した油脂の発火危険性評価として過酸化物価を測定することで発火危険性が予測できることが明らかとなった。

#### 4. まとめ

油脂類は酸化の進行により過酸化物が増加することで発火温度は低下する。特に高温での使用は発火危険性が高まることから、油脂や使用する機器の保守の実施により発火事故を予防する必要がある。

#### 【参考文献】

1. 内田剛史, 竹内茉莉子, 第50回安全工学研究発表会予稿集, 71-72 (2017)
2. M. Wakakura, K. Komamiya, *Polymeric Materials Encyclopedia*, 5, p.3187-3190 (1996)
3. 内田剛史, 竹内茉莉子, *KISTEC 研究報告 2019*, 50-51 (2019)

# 非線形粘弾性解析手法の検討

武田 理香、津留崎 恭一(化学技術部材料化学グループ)

## 1. はじめに

我々はこれまで、ゴム等の柔らかい材料を用い、線形粘弾性 LVE 指標 ( $G'$ 、 $G''$ 、 $\tan\delta$ ) では表すことができない非線形粘弾性 NLVE 特性を評価してきた<sup>1-4)</sup>。NLVE は、動的粘弾性測定から得られる歪 $\gamma$ ・歪速度 $\dot{\gamma}$ ・応力 $\sigma$ を3次元プロットしたリサージュ曲線 3D-Lis のゆがみによって視覚的に捉えることができる(図1)。我々の考案した新たな NLVE 指標は、3D-Lis を多角形とみなし、等時間間隔で測定した $\gamma \cdot \dot{\gamma} \cdot \sigma$ を規格化し、隣り合う3点のなす外角 $\theta$ の総和 $\Theta$ によって数値化する(図1)。多角形が平面であれば $\Theta$ は $2\pi$ となるが、ゆがむと $2\pi$ 以上になる幾何学定理を用いることで NLVE を定量的に評価できる。

粘弾性測定において、LVE の微小変形では正弦波歪 $\gamma$ の入力に対し応答 $\sigma$ も正弦波となる。但し、柔らかい試料で微小歪測定を行うと、応答 $\sigma$ が小さくなってしまい、SN比が悪くなる。これまでの解析方法では、 $\sigma$ のフーリエ変換を行い、高次の項を切り捨てることでノイズを除去してきた。例えばゴムの場合、3D-Lis の形状から最大歪 $\gamma_0=1\%$ では LVE であると判断し、3次項以上は除去してしまう。 $\gamma_0=10\%$ 程度になると NLVE が発現し始めるので5次項まではデータに取り込む、など不確定な解析を行っていた。このため、ノイズと高次の項との区別がつかないことや、どこまでのデータを除去してよいのかを明確に判断できないことが問題であった。

本研究では、ノイズを抑え、且つ測定データの解析を簡素化した NLVE 指標の改良を試みる。

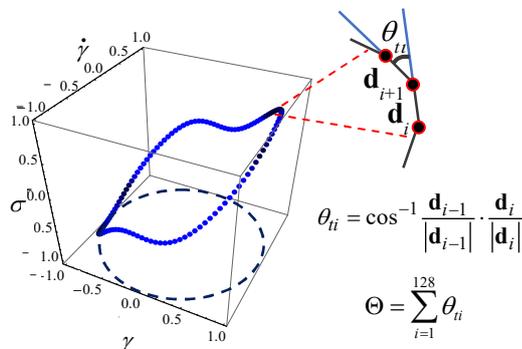


図1 3D-Lis から NLVE 指標 $\Theta$ の導出方法

## 2. 解析方法

これまでの、3D-Lis を離散的な多角形の外角として解析していた。新たな解析方法として、3D-Lis を曲率円とみなし、その中心角 $\alpha$ から NLVE 変化を捉える方法を示す。なお、本研究では、粘弾性測定で得られる $\gamma \cdot \dot{\gamma} \cdot \sigma$ を最大値で規格化した値で解析する。

$\alpha$ を導出する方法として、まず、等時間間隔の2点間を局所部分の円弧とみなし、曲率 $\kappa$ を求める。 $\kappa$ は曲率半径 $R$ の逆数で表される。時刻 $t=0$ で点 $O$ にあるとし、時刻 $t$ での位置ベクトルを $\mathbf{r}$ 、弧長を $s$ とする(図2)。 $\mathbf{r}$ において、接線方向の単位ベクトルを $\mathbf{e}_1$ とする( $\mathbf{e}_1 \cdot \mathbf{e}_1 = 1$ )。 $\mathbf{e}_1$ は $s$ で微分することで得られる。

$$\mathbf{e}_1 = \frac{d\mathbf{r}}{ds} \quad (1)$$

$\mathbf{e}_1$ をさらに $s$ で微分した $\mathbf{e}_1' = d\mathbf{e}_1/ds$ は、 $\mathbf{e}_1$ と直角方向にある。

$$\frac{d}{ds}(\mathbf{e}_1 \cdot \mathbf{e}_1) = 2 \frac{d\mathbf{e}_1}{ds} \cdot \mathbf{e}_1 = 2 \mathbf{e}_1' \cdot \mathbf{e}_1 = 0 \quad (2)$$

$\mathbf{e}_1'$ 方向の単位ベクトルを主法線ベクトル $\mathbf{e}_2$ とし、 $\mathbf{e}_1'$ の大きさを $\kappa$ で表す。

$$\mathbf{e}_1' = \kappa \mathbf{e}_2 \equiv \kappa \quad (3)$$

(1)と(3)より、 $\kappa$ は位置ベクトルの二階微分で与えられる。 $\mathbf{e}_1$ と $\mathbf{e}_2$ に対する直角方向の単位ベクトル $\mathbf{e}_3$ とする。この様に設定した $\mathbf{e}_1$ 、 $\mathbf{e}_2$ 、 $\mathbf{e}_3$ をフレネの標識と呼び、公式から $\kappa$ を求めることができる。 $\tau$ は振率と呼ばれ、曲線が平面上にあるときは0となる。

$$\begin{pmatrix} \mathbf{e}_1' \\ \mathbf{e}_2' \\ \mathbf{e}_3' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & \kappa & 0 \\ -\kappa & 0 & \tau \\ 0 & -\tau & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{e}_1 \\ \mathbf{e}_2 \\ \mathbf{e}_3 \end{pmatrix} \quad (4)$$

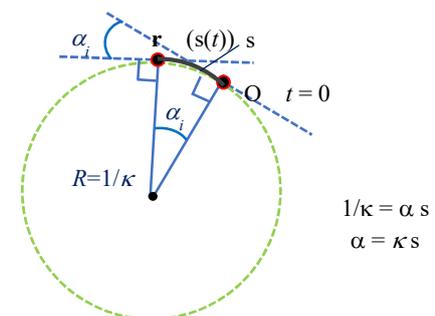


図2  $\kappa$ と $\alpha$ の定義

規格化した 3D-Lis のパラメータ ( $\gamma \cdot \dot{\gamma} \cdot \sigma$ ) は以下のよう  
に表示できる。

$$\mathbf{r}(t) = (\sin \omega t \quad \cos \omega t \quad \sigma(t)) \quad (5)$$

(1)、(4)、(5)より、 $\kappa = |d^2\mathbf{r}/ds^2|$  が得られる。

曲率ベクトル  $\mathbf{\kappa}$  の時間変化の公式は次のようになる。

$$\mathbf{\kappa} = \dot{\mathbf{e}}_i / \dot{s} = \left( -\dot{\omega} \sin \omega t - \frac{\omega \ddot{\omega}}{\omega^2 + \dot{\omega}^2} \cos \omega t \quad -\dot{\omega} \cos \omega t + \frac{\omega \ddot{\omega}}{\omega^2 + \dot{\omega}^2} \sin \omega t \quad \ddot{\sigma} - \frac{\dot{\sigma}^2}{\omega^2 + \dot{\omega}^2} \right) / (\dot{\omega} + \dot{\sigma}) \quad (6)$$

曲率  $\kappa$  は  $\mathbf{\kappa}$  の絶対値で与えられる。

$$\kappa = |\mathbf{\kappa}| = \sqrt{\omega^2 + \frac{\dot{\omega}^2}{\omega^2 + \dot{\omega}^2} \frac{\omega}{(\omega^2 + \dot{\omega}^2)}} = \sqrt{\omega^2 + \left(\frac{d\dot{\omega}}{ds}\right)^2 \frac{\omega}{\dot{s}^2}} \quad (7)$$

(7)は LVE、NLVE に関わらず成り立つ公式である。

また、LVE であれば  $\sigma$  も正弦波となることから、 $\sigma$  は位相  
差  $\delta$  によって求めることができる。

$$\sigma(t) = \sin(\omega t + \delta) \quad (8)$$

(8)を(7)に代入することで線形理論値  $\kappa_{LVE}$  を得る。

$$\kappa_{LVE} = \frac{4}{(3 + \cos(2\omega t + 2\delta))^{3/2}} \quad (9)$$

さらに、弱い NLVE の場合 (wNLVE)、 $\sigma$  は位相が加わ  
った正弦波と弱い非線形波の重ね合わせで得られると考  
える。線形波を  $\sigma_L$  とし、非線形波を  $\sigma_{NL}$  とする。

$$\sigma = \sigma_L + \varepsilon \sigma_{NL} \quad (10)$$

(10)を(7)に代入し、 $\varepsilon$  の 1 次の項まで摂動展開することで摂  
動理論値  $\kappa_{wNLVE}$  を得る。

$$\kappa_{wNLVE} = \kappa_{LVE} + \frac{-1}{(3 + \cos[2(\omega t + \delta)])^{5/2}} \times \left( \dot{\sigma}_{NL} \frac{(17\cos[\omega t + \delta] - \cos[3(\omega t + \delta)])}{\omega} + \ddot{\sigma}_{NL} \frac{(5\sin[\omega t + \delta] + \sin[3(\omega t + \delta)])}{\omega^2} \right) \quad (11)$$

ここで  $\kappa$  と、これまで指標として扱ってきた  $\Theta$  との関係  
を示す。測定時間間隔を 0 に近づけた連続極限の下では、  
3D-Lis の局所部は円の一部分とみなすことができる。この円  
に含まれる 2 点の中心角を  $d\alpha$ 、弧の長さを  $ds$ 、接線が交  
わる外角  $d\theta$  とする。円の半径を  $R$  とすれば、 $ds = R d\alpha$   
の関係が得られる。曲率  $k=1/R$  であるので、 $d\alpha = \kappa ds$  が  
得られる。連続極限では  $d\alpha = d\theta$  が成り立つので、3D-Lis  
に沿って  $d\theta$  を積分した  $\Theta$  は  $\int \kappa ds$  を 3D-Lis に沿って 1 周線  
積分すればよい。最終的に次の公式が得られる。

$$\Theta = \oint_{3D-Lis} \kappa ds = \oint_{3D-Lis} \sqrt{\omega^2 + \frac{\dot{\omega}^2}{\omega^2 + \dot{\omega}^2} \frac{\omega}{(\omega^2 + \dot{\omega}^2)^{3/2}}} dt \quad (12)$$

以上のことから、実験値  $\alpha$ 、線形理論値  $\alpha$ 、摂動理論値  $\alpha$   
を求めると次のようになる。

$$(7)より、 \quad \text{実験値} \alpha = \kappa ds \quad (13)$$

$$(9)より、 \quad \text{線形理論値} \alpha = \kappa_{LVE} ds \quad (14)$$

$$(11)より、 \quad \text{摂動理論値} \alpha = \kappa_{wNLVE} ds \quad (15)$$

(13)、(14)、(15)により  $\gamma_0$  を変化させたときの NLVE の  
移り変わりを比較評価できる。

### 3. 実験

試料にカーボンブラックを含まないスチレンブタジエ  
ンゴム (厚さ 2 mm) を使い、3D-Lis データ取得には、振  
じり振動型の動的粘弾性測定装置 (TA Instruments 社製  
ARES-G2) を使用する。測定条件として、振動数は 1 Hz、  
最大歪  $\gamma_0$  は 1 %、10 %、30 % で走査する。温度は室温と  
し、各  $\gamma_0$  において、 $\gamma$  が 1 周する間に  $\sigma$  を等時間間隔で  
128 点測定する。

### 4. 結果

#### 4.1 $\alpha$ と $\theta$ の比較

図 3 に LVE の範囲である  $\gamma_0 = 1\%$  の場合の  $\alpha$  と  $\theta$  の 128  
測定点の値を示す。 $\alpha$  は、 $\theta$  に比べてノイズが少なく連続  
的な波形となっていることが分かる。この結果、 $\alpha$  の総和  
 $\Theta_\alpha$  は 6.3 となるが、 $\theta$  の総和  $\Theta$  は 11.8 と非常に大きい値と  
なってしまった。LVE の場合、総和は  $2\pi$  となることから、  
 $\alpha$  は  $\theta$  と比較してノイズを抑えることができる有効な解析  
であるといえる。

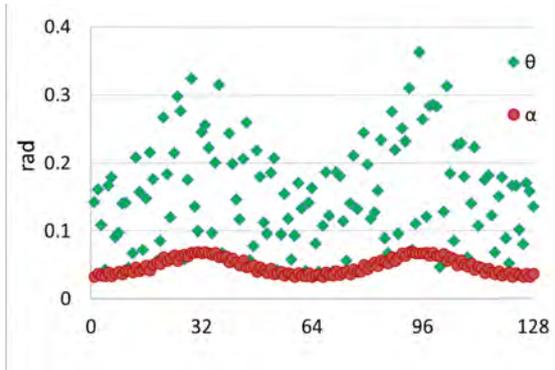


図 3  $\alpha$  と  $\theta$  の 128 点測定値 ( $\gamma_0 = 1\%$ )

#### 4.2 $\alpha$ の実験値と理論値との比較

ここでは、実験値 $\alpha$ と(14)、(15)から求めた $\alpha$ を比較する(図4~図6)。まず $\gamma_0=1\%$ では、実験値と線形理論値が一致している(図4)。なお、図3よりもノイズが大きく見えるのは、縦軸の最大スケールを0.4から0.1に小さくしたためである。次に $\gamma_0=10\%$ では、実験値と線形理論値でピークの山部分にずれが生じる(図5の▲と●)が、摂動項を含めた理論値と実験値では良く合う結果となる(図5の■と●)。最後に $\gamma_0=30\%$ になると実験値と線形理論値ではピークの山・谷部に大きな違いが見られる(図6)。摂動理論値との比較では、ピーク高さの合う部分も見られるが、摂動理論値では谷にあたる部分に実験値ではダブルピークが見られ、形状が大きく異なる。

このように、理論値と実験値を比較することで、LVEから弱いNLVE、摂動項では表しきれない強いNLVEへの変化を明確に示すことができる。

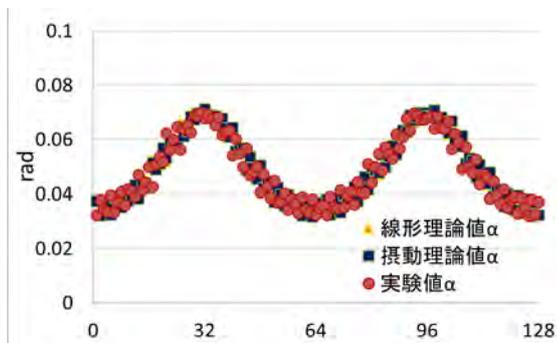


図4 線形理論値 $\alpha$ 、摂動理論値 $\alpha$ と実験値 $\alpha$ の比較( $\gamma_0=1\%$ )

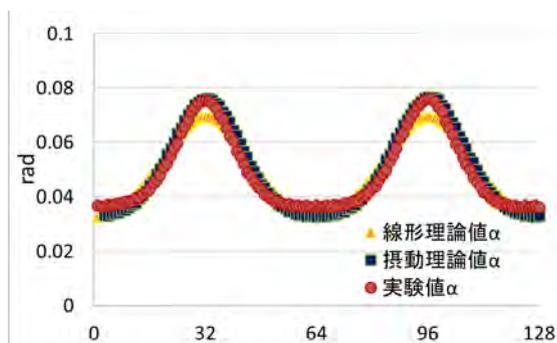


図5 線形理論値 $\alpha$ 、摂動理論値 $\alpha$ と実験値 $\alpha$ の比較( $\gamma_0=10\%$ )

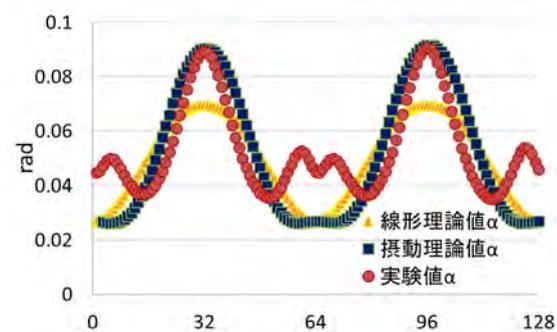


図6 線形理論値 $\alpha$ 、摂動理論値 $\alpha$ と実験値 $\alpha$ の比較( $\gamma_0=30\%$ )

#### 5. まとめ

3D-Lisを円弧とみなして曲率 $\kappa$ を求め、曲率円の中心角 $\alpha$ を新たなNLVE指標とした。また、 $\kappa$ の時間変化を規格化応力から解析的に厳密計算する方法を導き出した。これにより、 $\sigma$ 応答のデータをフーリエ変換で加工する複雑な解析が不要となった。さらに大きな成果として、LVE、摂動項程度で示すことのできる弱いNLVE、摂動項では表しきれない強いNLVEの3段階に分類する手法を考案し、指標値の大小関係を明確に区分することができた。

#### 【参考文献】

- 1.武田、西村、津留崎、*神奈川県産業技術センター研究報告*、No.21, 1(2015) .
- 2.武田、本多、津留崎、*神奈川県産業技術センター研究報告*、No.22, 18(2016) .
- 3.武田、本多、津留崎、*神奈川県産業技術センター研究報告*、No.23, 9(2017) .
- 4.武田、柴田、津留崎、*KISTEC研究報告*、2019.

# ポリメタクリル酸メチルの劣化に関する総合的解析(1)

村上 小枝子 (化学技術部 バイオ技術グループ)

田中 聡美、加藤 千尋 (化学技術部 環境安全グループ)

津留崎 恭一、武田 理香、羽田 孔明 (化学技術部 材料化学グループ)

熊谷 賢一、松尾 涼子 (化学技術部 環境評価グループ)

高橋 亮 (化学技術部 新エネルギーグループ)

長沼 康弘 (機械・材料技術部 解析評価グループ)

## 1. はじめに

プラスチックは、軽量性、易加工性、低コストといった金属材料に対する優位性から、ますますその適用範囲が拡大している。一方で光・熱・水などの環境因子による劣化はさけられず、劣化現象に係る相談は当所においても数多く寄せられている。

プラスチックの劣化解析にあたり、用いられる評価・診断法は多岐に渡るが、その中から相談内容に応じて適切な手法を選択し、劣化現象を的確かつ迅速に把握することが求められている。

当所では、ニーズに応じた適切な劣化解析法選定のための指針を得ることを目的として、プラスチックの劣化について、種々の評価法を組み合わせる総合的に解析検討を行っている。

前報<sup>1)</sup>では透明性、耐衝撃性、耐熱性に優れ、エンジニアリングプラスチックとして広範囲な分野で使用されるポリカーボネート (PC) について、促進耐候性試験を行い、力学特性、光学特性、ならびに、化学構造を分析評価し、それらの相関について調べた。本報では、PC と同じく樹脂ガラスとして用いられるが、脆性材料であるポリメタクリル酸メチル (PMMA) (PC は延性材料) について、同様の検討を行ったので報告する。

## 2. 実験

### 2.1 試料

PMMA は、三菱ケミカル (株) から提供された、アクリレン・フィルム HBS006 (厚さ 50  $\mu\text{m}$ ) をそのまま用いた。

### 2.2 促進耐候性試験

試験には、低温サイクルキセノン・サンシャインロングライフウェザーメーター WEL-75XS-LHP-BEC (スガ試験機 (株)) を使用した。試験条件は、JIS K 7350-2-1995 に準拠し、放射照度  $60 \pm 3 \text{ W/m}^2$  (波長 300~400nm)、ブラックパネル温度  $63^\circ\text{C}$ 、1 サイクル 60 分間の照射時間中に 12 分間の水噴射を行った。暴露時間は、100、200、400、800 時間とした。

## 2.3 促進耐候性試験を行った試料の評価

熱特性は、示差熱重量測定装置 TGA/SDTA851 (メトラ・トレド (株) 製) により熱分解過程を評価した。化学構造については、フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-4100 (日本分光 (株) 製) により表面数  $\mu\text{m}$  の情報が得られる ATR 法を用いて赤外吸収スペクトルを測定することで評価した。また、走査型 X 光電子分光分析装置 (XPS) PHI5000 VersaProbe II (アルバック・ファイ (株) 製) により炭素の 1s 軌道の結合エネルギーを測定し、表面数 nm の化学構造についても評価した。力学特性については、JIS K 6251 引張 2 号形ダンベル試験片を作成し、5565 型材料試験機 (インストロンリミテッド製) により引張試験を行った。光学特性は、紫外可視分光光度計 UV-3100PC ((株) 島津製作所製) により可視域の吸収スペクトルを測定した。

## 3. 結果と考察

図 1 に空気雰囲気での TGA 測定プロファイルを、表 1 に 2% 重量減少温度を示す。暴露時間に伴い、重量減少温度の低下がわずかに認められた。PMMA の光劣化は、1) エステル側鎖の開裂に伴うラジカルの生成に続く主鎖の切断、ならびに、2) 主鎖の直接切断が主たる過程であると報告されている<sup>2)</sup>。2% 重量減少温度の低下は、主鎖の切断により分子量がわずかに低下あるいは低分子成分が生成したことに起因すると考えられる。

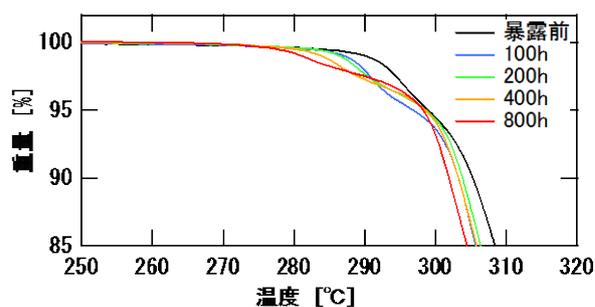


図 1. 各暴露時間での TGA 曲線

暴露時間	重量減少温度
0h (暴露前)	293 °C
100 h	290 °C
200 h	289 °C
400 h	287 °C
800 h	287 °C

表 1. TGA 曲線から求めた各暴露時間における 2%重量減少温度

図 2 に赤外吸収スペクトルの変化を示す。測定波数領域でスペクトルに顕著な変化は見られなかったものの、図 2 (a) ならびに図 3 に示すとおり、1720  $\text{cm}^{-1}$  付近のカルボニルバンドが低波数側に広がる現象が観測された。全体としてスペクトルに顕著な変化が見られなかったのは、PMMA の劣化が主に主鎖の切断によるもので、単位構造に変化がないためと考えられる。また、カルボニルバンドの低波数側への広がり、一般的にエステルより 10  $\text{cm}^{-1}$  強、低波数側に赤外吸収ピークを有するケトンあるいはアルデヒドが暴露により生成した可能性、あるいは、劣化により、エステル基の化学環境が変化した可能性が考えられる。

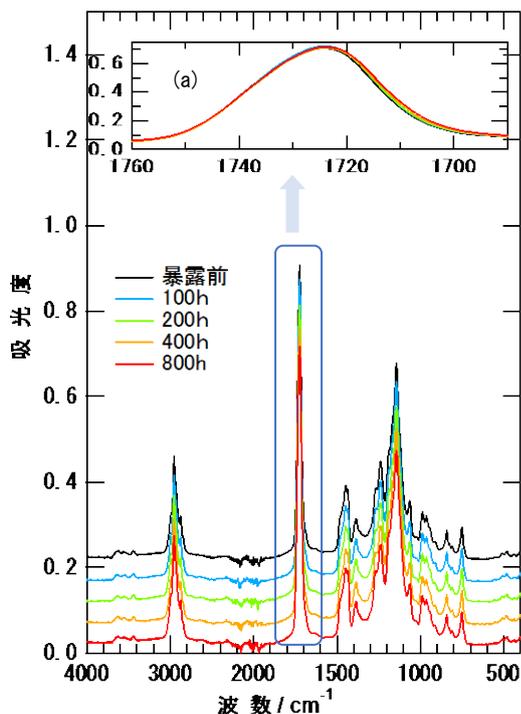


図 2. 暴露時間に伴う赤外スペクトルの変化

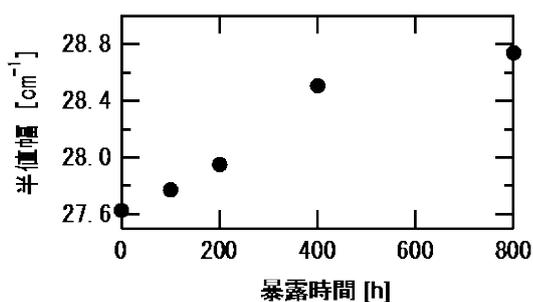


図 3. 暴露時間に伴う赤外スペクトルのカルボニルバンドの半値全幅の変化

図 4 に XPS C1s スペクトルの変化を示す。XPS C1s スペクトルにおいては、暴露 200 時間で C=O ( $\sim 288 \text{ eV}$ ) バンドの生成、COO ( $\sim 289 \text{ eV}$ ) ならびに C-O ( $\sim 287 \text{ eV}$ ) バンドの上昇が観測された。C=O バンドの生成は、赤外分光分析によりケトンあるいはアルデヒドが生成した可能性が示唆される結果と矛盾しないものであった。

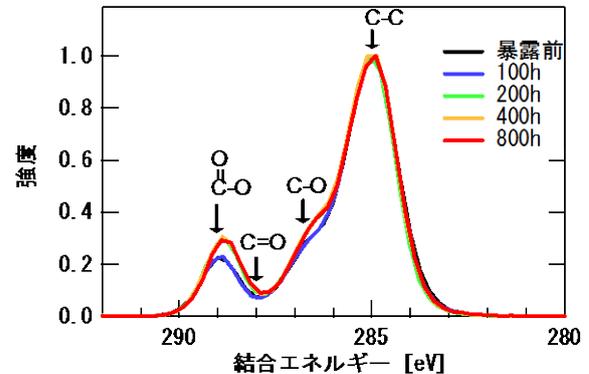


図 4. 暴露時間に伴う XPS C1s スペクトルの変化

次に、上述のような劣化による化学構造の変化が材料の機械特性ならびに光学特性にどう影響するか検討した。

図 5 に引張試験による破断伸びの変化を示す。破断伸びは暴露時間 100 時間で大きく減少したのに対し、引張強さに変化はなかった。破断伸びの急激な減少は、劣化による側鎖の開裂や主鎖の切断により構造が不安定になっている状況下で引張応力をかけると、応力を緩和することができず、構造内部でマイクロボイドが発生し、繊維状高分子鎖の束（フィブリル）と空けきから構成されるクレイズに成長して、脆性破壊したものと推察される。一方、引張強さに変化がみられなかったのは、フィブリルの強度が暴露によりほぼ変化していないことに対応すると考えられる。フィブリルの強度は数平均分子量に依存することが知られている<sup>4)</sup>。これより、劣化による主鎖の切断反応が分子鎖末端からのものが大半で、大きく分子量は変化していない可能性が示唆された。この可能性については、暴露による分解生成物について質量分析をするなどさらなる検討が必要である。

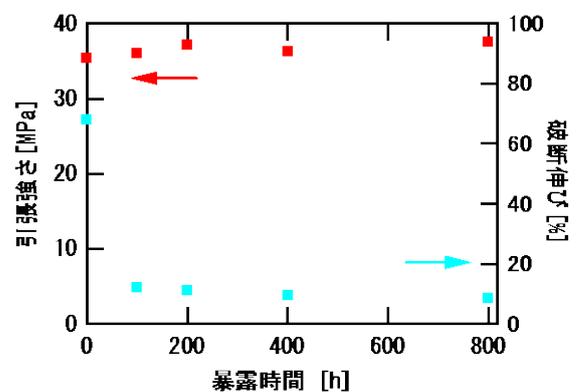


図 5. 暴露時間に伴う引張強度ならびに破断伸びの変化

図6に可視吸収スペクトルの変化を示す。暴露により可視域の吸光度に変化は見られなかった。前報<sup>1)</sup>で対象としたPCでは暴露により光フリース転位と呼ばれる転位反応が起こり、黄変物質が生成することが報告されているが<sup>2)</sup>、PMMAの劣化は主鎖の切断が主たるもので、黄変物質が生成されないことに起因する。

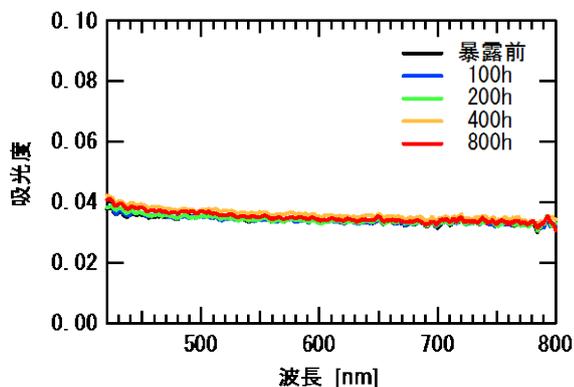


図6. 暴露時間に伴う可視吸収スペクトルの変化

#### 4. まとめと今後の展開

プラスチックの劣化の総合的な解析を目的として、PMMAを対象として、促進耐候性試験を行い、各種分析、評価を行った。表2に今回検討した5つの評価法により

評価項目	劣化として観測された事象	劣化を確認できた暴露時間
熱重量測定	重量減少温度の低下	100 h
赤外分光測定	ケトンあるいはアルデヒドの生成	100 h
X線光電子分光測定		200 h
引張試験	破断伸び	100 h
	引張強度	—
紫外可視分光測定	変化なし	—

表2. 各評価法で観測された劣化現象

観測された劣化現象と劣化を観測できた暴露時間をまとめたものを示す。

今後は、水噴霧を行わない促進耐候性試験を行い、光劣化に対する水の影響について、今回の結果と比較するとともに、前報<sup>1)</sup>のPCと化学構造の違いによる劣化現象の差異や特徴について検討を進める予定である。

本研究結果については、データベース化などにより、技術支援への活用を図っていきたいと考えている。

#### 【参考文献】

1. 村上他, KISTEC Annual Research Report, 60 (2019).
2. T. Mitsuoka et al., *J. Appl. Polym. Sci.*, **47**, 1027 (1993).
3. A. Rivaton, *Polym. Degrad. Stab.*, **49**, 163 (1995).
4. 石川優, 高分子, **47**, 326 (1998).

# 実証型光触媒フィルタ評価方法の開発

落合 剛 (川崎技術支援部 材料解析グループ)

## 1. はじめに

光触媒フィルタの性能評価法として、図1に示す JIS 試験が用いられている。しかし、近年の空気汚染問題の多様化に伴い、より実環境に近い条件で試験したいというニーズが高まっている。そこでまず、JIS 試験で対象となっていないが、実環境で問題視されている臭気成分(溶剤など)の分解試験を実施した。つぎに、様々なサイズや使用条件に対応できる実証型光触媒フィルタ試験機(図2)を試作し、評価した。

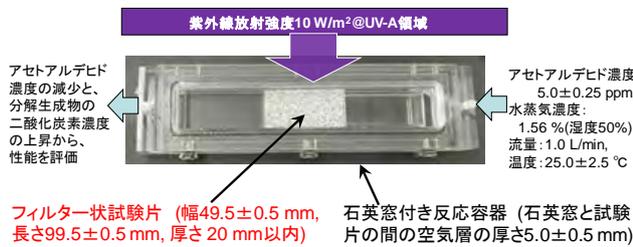


図1. JIS 試験の例 (R1701-2、アセトアルデヒド除去試験)



図2 実証型光触媒フィルタ試験機と、設定可能な試験条件

## 2. 実験及び結果

光触媒フィルタ材料として、盛和环境エンジニアリング株式会社製光触媒担持セラミックフィルタを所定のサイズに切り出して用いた。まず、実環境で問題視されている臭気成分の分解試験については、図1の JIS 試験用反応器を用い、各臭気成分の分解性能を評価した。いずれも、紫外線強度 1.0 mW/cm<sup>2</sup>、各臭気成分濃度 5.0 ppm、流量 1.0 L/min とし、光音響マルチガスモニターで反応器出口での各臭気成分濃度と分解生成物の二酸化炭素濃度を測定した。次に、図2の実証型光触媒フィルタ試験機を、90 L および 1000 L の反応器に設置して、それぞれ 50 ppm のアセトアルデヒドガスの分解試験を実施した。いずれも、紫外線強度 4.0 mW/cm<sup>2</sup>、風量 5.4 m<sup>3</sup>/min、フィルタ有効面積 150 × 240 mm とした。

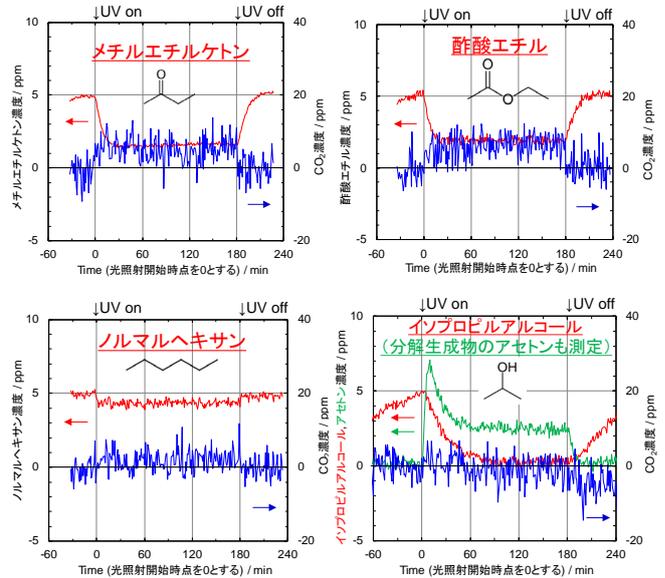


図3. 各臭気成分の分解試験結果

実環境で問題視されている臭気成分の分解試験結果を図3に示した。臭気成分によって、分解挙動が大きく違うことがわかる。この理由として、光触媒表面への吸着特性の違いが考えられる。光触媒反応による有機物分解は、ほとんど表面での反応である。まず光触媒表面への吸着が起き、その後、正孔や活性酸素種による酸化反応が続く。したがって、比較的吸着しやすいメチルエチルケトンなどは除去率が高いが、吸着しにくいノルマルヘキサンの除去率は低いと考えられる。また、イソプロピルアルコールのように、除去率が高くて、最終分解生成物である二酸化炭素まで分解が進まない化合物もあった。これも、分解生成物の光触媒表面への吸着特性の影響が考えられた。

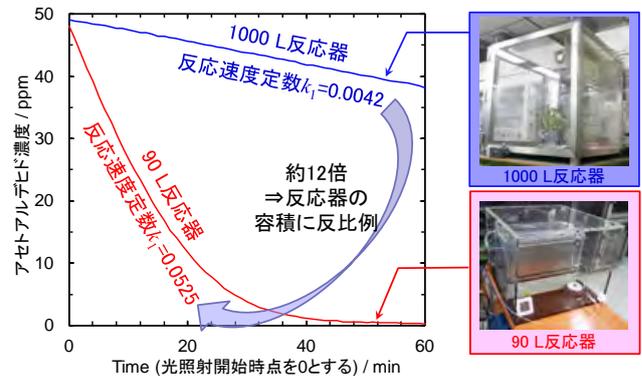


図4. 実証型フィルタ試験機でのアセトアルデヒド分解試験結果

実証型光触媒フィルタ試験機によるアセトアルデヒドの分解試験結果を図4に示した。それぞれの濃度変化を解析し、擬一次反応速度定数を算出すると、90 L 反応器の方が、1000 L の方よりも12倍はやく分解している様子が観測された。これは反応器の容積比に反比例しており、リーズナブルな結果といえる。

### 3. 考察及び今後の展開

JIS 試験で対象となっている各種臭気成分（アセトアルデヒドなど5種類）は、比較的分解しやすく、反応生成物の確認も容易なものが多い（あるいは、トルエンなど、反応生成物の確認まで求めている JIS 試験項目もある）。一方、JIS 試験で対象となっていないが実環境で問題視されている臭気成分の中には、比較的分解しにくいものも多い。本研究では、それぞれの臭気成分について、その分解挙動を詳細に分析する必要があることが示唆された。つぎに、実証型光触媒フィルタ試験機でのアセトアルデヒド分解性能試験では、試験条件の変化に対応して臭気成分の分解挙動が変化することが確認できた。つまり、様々なフィルタサイズや使用条件に応じた性能を評価することができ、実際の空気清浄機等の設計方針を立てるうえで参考になるデータが得られる設計といえる。

本研究は、多種多様な光触媒フィルタ材料や臭気成分の評価に適用でき、新しい評価法として有効であるといえ

る。今後は、図5に示すように、本研究の成果を、材料から製品までの光触媒評価法のひとつとして提案し、普及させていくことが重要である。あわせて、今後も社会のニーズをふまえ、とくに環境浄化・医療分野に資する研究を重点的に継続していく必要があると考えている！

### 4. 謝辞

本研究に使用した光触媒フィルタ性能試験装置の設計・製作については、電磁機械工業株式会社の小田貞二部長に御協力いただきました。また、使用した光触媒セラミックフィルタの作製および試験において、盛和环境エンジニアリング株式会社の栗屋野伸樹社長ならびに内田悦嗣統括部長の御協力を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

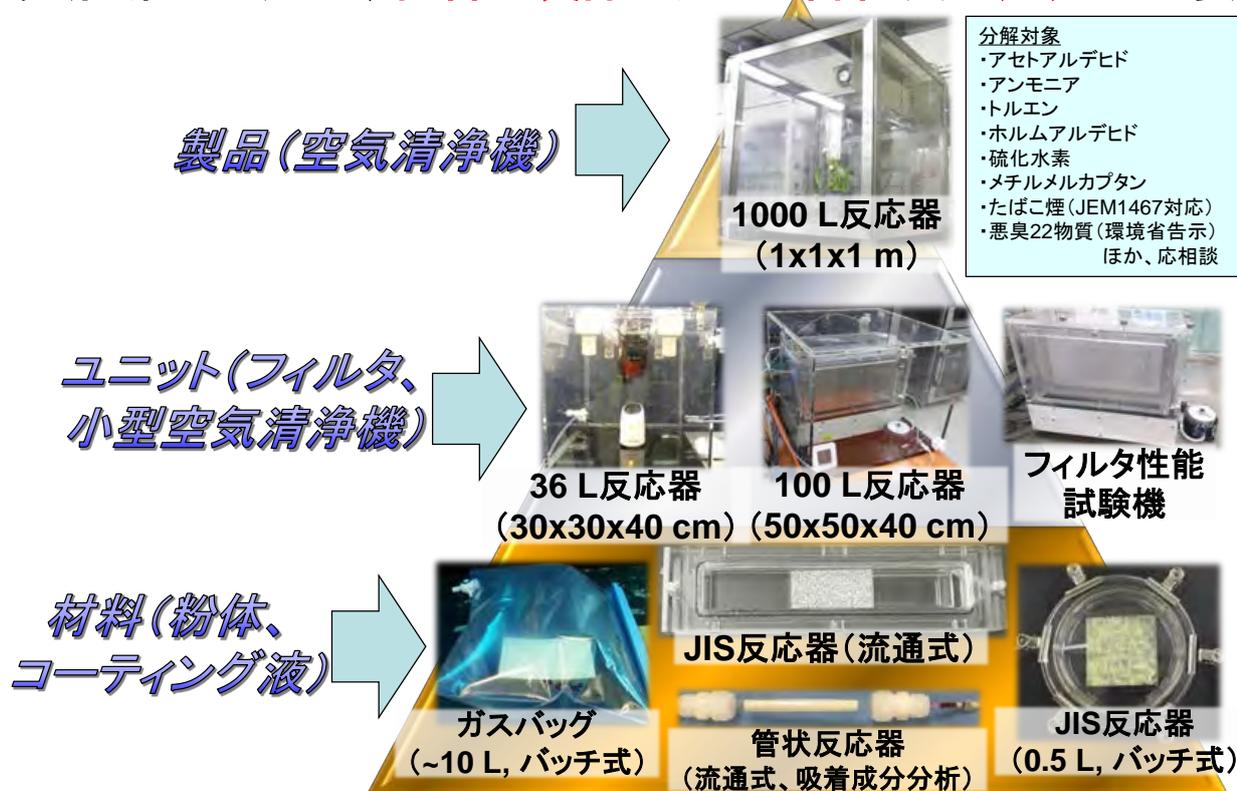
#### 【参考文献】

1. 落合 剛、石黒 斉、砂田香矢乃、永井 武、青木大輔、阿久津 康久 最先端の研究現場から～(地独)神奈川県立産業技術総合研究所(KISTEC)における材料から製品までの光触媒評価総合サポート～. 電気化学 2019, 87, 356-357.

#### 【外部発表】

学会等発表2件, 論文等発表1件

## 光触媒の応用は、材料や製品に適した評価法の選定が重要



**JIS, ISO等をふまえ、最適な評価方法をご提案します！**

図5. 材料から製品までの光触媒評価法の提案イメージ

◆Formation of Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces on Plastics by a Facile Method Using a Silica Opal

機械・材料技術部ナノ材料グループ 小野洋介

掲載誌：Chemistry Letters, Vol.48, pp.541-543 (2019)

低コストかつ簡単な方法で親水・疎水表面を形成することに成功した。直径 250-290 nm の酸化ケイ素粒子を合成し最密充填して人工オパールを作製した。190°Cに加熱したプラスチックに人工オパールを接触させ、放冷後に部分的に人工オパールを剥がした。その結果、人工オパールの最密充填構造がプラスチック表面に転写され、直径 200-230 nm の半球状の孔（穴）が規則的に配列する構造が形成されることが分かった。また、孔の形成により、プラスチック表面に疎水性が付与されることが分かった。人工オパールを担持させることにより親水表面を、剥がすことにより疎水表面を形成することができ、柔らかく曲げられる親水/疎水材料を得ることができた。

◆触媒のいらぬグラフェン作成～炭酸ガス、紙と鉛筆～

電子技術部電子材料グループ 金子 智

掲載誌：ニューダイヤモンド第 35 巻,3 号 pp 25-27 (2019)

グラフェン作成には金属触媒が必要である。そのため素子化のためには金属触媒から剥がして、絶縁基板に張り合わせる工程が必須である。本報告では、触媒を不要とするグラフェンの作成方法として、炭酸ガス中での成膜とレーザー照射による新手法を紹介している。

◆Constriction of a lattice constant in an epitaxial magnesium oxide film deposited on a silicon substrate

電子技術部電子材料グループ 金子 智

安井 学

黒内正仁

東北大学流体研究所 徳増 崇

中丸佳美

国分智恵美

根田香代子

イスタンブール大学 CAN Musa

サバンチ大学 SHAWUTI Shalima

ジャパン・アドバンスト・ケミカルズ安原重雄

遠藤民生

相模原表面技術研究所 須藤理枝子

東京工業大学 松田晃史

吉本 護

掲載誌：Japanese Journal of Applied Physics Vol. 58 pp SAAD06-1-4 (2019)

機能的酸化物である酸化マグネシウム(MgO)の作成にスパッター法パルスレーザー蒸着法を用いた。基板にシリコンを用いた場合、単結晶 MgO はシリコン基板に対して 45 度回転して成長することが知られている。しかし、成長した MgO の構造を主に X 線回折で観察すると、45 度の回転をしない、cubic on cubic 成長していることが分かった。本研究ではシミュレーションによりシリコン基板上の MgO の安定性について報告している。

◆Fracture Toughness of CF-Plug Joints of Ti and Epoxy Matrix CFRP

電子技術部電子材料グループ 西 義武

金子 智

東海大学 内田ヘルムート貴大

東京都市大学 FAUDREE C. Michael

掲載誌：Key Engineering Materials Vol. 821 pp 131-134 (2019)

高品質な炭素繊維は、金属とエポキシポリマーの間では大きな摩擦力を示す。良好な接合のため、熔融金属を毛細管現象により繊維に含浸させる手法を提案した。金属とエポキシに接着剤を用いた場合や自己融着と比べ、本手法では破壊靱性が大きく向上することが分かった。

◆A New Process of Thermoplastic Polypropylene Reinforced by Interlayered Activated Carbon Fiber Treated by Electron Beam Irradiation under Nitrogen Gas Atmosphere with Oxygen Prior to Assembly and Hot-Press

東海大学 北川翔大

木村英樹

内田ヘルムート貴大

利根川昭

電子技術部電子材料グループ 西 義武

金子 智

東京都市大学 FAUDREE Michael

エコール・サントラル・リヨン SALVIA Michael

掲載誌：Materials Transactions Vol. 60 pp 587-592 (2019)

炭素繊維強化ポリマーは軽量化のために電気自動車や太陽電池車など多様な場所で使われている。本報告では、炭素繊維に電子線を照射して活性化を行うことで、炭素繊維強化ポリマーの許容曲げ応力において約 2 倍の強化が可能になった。

◆Properties of sol gel synthesized ZnO nanoparticles

マドラス大学 MANIKANDAN B.  
JOHN Rita  
さがみはら表面技術研究所 遠藤 民生  
電子技術部電子材料グループ 金子 智  
Central Electrochemical Research Institute  
MURALI K.R.

掲載誌：Journal of Materials Science:Materials in Electronics Vol. 29 pp 9474-9485 (2018)

レアメタルである酸化チタン(TiO)の代替材料として安価な酸化亜鉛が注目されている。本報告では、酢酸亜鉛(Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>)を原料としてゾルゲル法により酸化亜鉛のナノ粒子を作製した。その評価として、X線回折(XRD)、ラマン測定、フーリエ赤外分光などを用いている。XRDによる評価では TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の大きさを 22nm と見積もった。

◆Wear-resistive and electrically conductive nitrogen-containing DLC film consisting of ultra-thin multilayers prepared by using filtered arc deposition

豊橋技術科学大学 針谷 亨  
為國公貴  
飯島佑史  
出貝 敏  
谷本 壮  
須田善行  
滝川浩史  
鷹合滋樹  
安井治之  
金子 智  
岡山県工業技術センター 國次真輔  
岐阜工業高等専門学校 羽瀨仁恵  
伊藤光学工業 神谷雅男  
オンワード技研 瀧 真  
オーエスジーコーティングサービス 権田英修

掲載誌：Japanese Journal of Applied Physics Vol. 58 pp SEED05-1-5 (2019)

窒素を含有するダイヤモンドライクカーボン(DLC)の多層膜をフィルターアーク法により炭化タングステン基板(WC)上に作製した。X線反射率測定(XRR)により、膜厚は約500nm、多層膜の各層が10nmであることを見積もり、更に密度が通常のDLCよりも低いことが分かった。また、摩耗性については多層膜が単層膜よりも高いことを確認している。

◆巻線応力が環状試料の直流磁気特性に及ぼす影響

電子技術部電子デバイスグループ 馬場康壽

掲載誌：日本磁気学会論文特集号-Transaction of the Magnetics Society of Japan Special Issues-Vol.3 No.1 pp：24-27(2019)

正磁歪現象を示す FeCoV 合金の環状試料において、試料を環状樹脂容器に入れてコイル巻をした場合と試料に直接コイル巻をした場合の直流磁化特性を測定した。両者を比較した結果、直接コイル巻をした場合は、試料を締め付ける巻線応力の影響で B-H 特性は磁化容易に変化する逆磁歪現象が現れた。B-H 曲線を測定する最大磁界強度を変化させた場合、保磁力、残留磁束密度及び角形比の磁気特性値の誤差率は、最大磁界強度が 20A/m から 100A/m の間の弱い磁界強度の時に非常に大きくなった。しかし、磁気分極が等しい時はヒステリシス損失に巻線応力の影響は見られなかった。

◆ガラス熱インプリント用 Ni-W ナノ金型

電子技術部電子材料グループ 安井 学  
黒内正仁  
金子 智  
近畿大学工学部 伊藤寛明  
名古屋大学工学研究科 荒井政大

掲載誌：電気学会論文誌 C(電子・情報・システム部門誌), Vol.139 pp.644-647 (2019)

機械的特性、耐熱性、耐食性に優れ、ガラス熱インプリントの金型材料に有望な Ni-W めっき膜に対してパルス電源を利用した。パルス電流の周波数を 0.5kHz から 5kHz に上げることにより、Ni-W 膜の亀裂を抑制できた。そして、Ni-W めっき膜の厚さを 15 $\mu$ m から 20 $\mu$ m に増加できた。ただし、Ni-W 膜の W 含有量は約 20at% で一定であり、Ni-W めっき膜中の W 含有率はパルス電流の周波数の影響は受けなかった。原版に樹脂鑄型を用いた場合では、めっき中に Ni-W 膜が剥がれてしまった。一方、原版を Ni 鑄型に変更した場合、Ni-W めっき膜の厚さを 78 $\mu$ m まで増やすことができた。しかしながら、Ni-W めっき膜上のモスアイ構造の頂点にピンホールが発生していた。ピンホールの発生原因として、Ni 鑄型上の凹部にメッキ時に発生した水素が残留したことが考えられる。Ni 鑄型上の凹部に水素が残留しない工夫が必要である。

## ◆ Preparation of a Reference Material for the Determination of Hexavalent Chromium in Tap Water

化学技術部化学評価グループ 乾 哲朗  
城田はまな  
坂尾昇治

掲載誌 : Analytical Sciences, Vol.35, pp.1375-1379 (2019)

六価クロム (Cr(VI)) 分析用水道水標準物質を開発した。水道水標準物質は水道水に Cr(VI) 標準溶液を添加し、酸性化せずに弱アルカリ性 (pH 7.6) の状態で調製した。水道水標準物質は 10 本のフッ素樹脂 (PFA) ボトルに 200 mL ずつ充填し、5°C の冷蔵庫で保管した。水道水標準物質の Cr(VI) 濃度は 100 mm 石英セルを用いてジフェニルカルバジド吸光光度法で求めた。水道水標準物質の均質性は Cochran 検定で等分散を確認してから分散分析で評価した。ボトル間で Cr(VI) 濃度に有意差はなく、水道水標準物質は十分に均質であった。水道水標準物質の安定性は Cr(VI) 濃度を 6 か月間モニタリングして回帰分析で評価した。Cr(VI) 濃度と保管時間の回帰直線のこう配はゼロと有意に異ならず、水道水標準物質は 6 か月間安定であった。水道水標準物質の Cr(VI) 濃度 ( $50 - 51 \mu\text{g L}^{-1}$ ) と原子吸光分析法で求めた全 Cr 濃度 ( $50 - 51 \mu\text{g L}^{-1}$ ) は良く一致した。

◆ MOCVD growth of  $\beta$ -FeSi<sub>2</sub> film on modified Si surface by silver and enhancement of luminescence

化学技術部新エネルギーグループ 秋山賢輔  
野島咲子  
高橋 亮  
企画部経営戦略課 松本佳久  
東京工業大学物質理工学院  
舟窪 浩

掲載誌 : Journal of Crystal Growth, Vol.506, pp. 131-134 (2019)

銀(Ag)層の導入によりシリコン (Si) 基板の表面改質を行い、有機金属気相成長(MOCVD)法で  $\beta$ -FeSi<sub>2</sub> 薄膜を合成した。 $\beta$ -FeSi<sub>2</sub> 薄膜の結晶内部、及び Si とのヘテロ界面の非輻射再結合中心密度が低減され、フォトルミネッセンス (PL) 発光が増大化した。この Ag 層導入による表面改質 Si 基板の結晶構造、及びその表面に成長する  $\beta$ -FeSi<sub>2</sub> の成長機構と非輻射再結合中心密度低減との関連を明らかにした。

◆ Preparation of CaMgSi and Ca<sub>7</sub>Mg<sub>7.25</sub>Si<sub>14</sub> single phase films and their thermoelectric properties

東京工業大学 物質理工学院材料系  
上原睦雄  
片桐敦夫  
黒川満央  
小川将太  
清水荘雄  
松島正明  
木村好里  
舟窪 浩  
上智大学 理工学部 内田 寛  
化学技術部新エネルギーグループ 秋山賢輔

掲載誌 : MRS Advances, Vol.4, No.25-26, pp. 1503-1508 (2019)

環境低負荷で地球上に豊富に存在するカルシウム(Ca) 元素を導入した Ca-Mg-Si 系の材料に着目した。この系では母材料として p 型のゼーベック起電力を示す相の報告があるが、系統的な熱電特性に関する実験報告例がほとんどないため、様々な組成比を持つ CaMgSi、及び Ca<sub>7</sub>Mg<sub>7.25</sub>Si<sub>14</sub> 基膜をスパッタリング法により系統的に作製しその電気的特性について評価した結果を報告する。

◆ Epitaxial growth of Mg<sub>2</sub>Si films on (111) Si substrates covered with epitaxial SiC layers

東京工業大学 物質理工学院材料系  
片桐敦夫  
小川将太  
清水荘雄  
松島正明  
舟窪 浩  
上智大学 理工学部 内田 寛  
化学技術部新エネルギーグループ 秋山賢輔

掲載誌 : Japanese Journal of Applied Physics, Vol.59, pp. SF1001-1-4 (2020)

Si(111)基板上に炭化シリコン (SiC) 層を導入することでスパッタ法にて Mg<sub>2</sub>Si 膜のエピタキシャル成長を実現した。作製膜は X 線回折法による  $\theta$ -2 $\theta$  法、極点法、インプレーン法にて解析し、膜作製時の成長圧力を変えることで Mg と Si 組成を変化させたいずれの薄膜においても、(110)配向のエピタキシャル膜が形成されることが明らかとなった。これらのエピタキシャル薄膜は面内に回転した 3 回対称なドメインで構成されることが、明らかとなった。

◆ Kinetics of Interfacial Microstructural Variation across Insulator-Thermoelectric Semiconductor interface and its Effects on Thermoelectric Properties of Magnesium Silicide Thin Films

東京工業大学物質理工学院材料

P.S.Sankara Rama Krishnan

小川将太

片桐敦夫

松島正明

舟窪 浩

Institute of Physics NAS of Ukraine

Anna N. Morozovska

Eugene A. Eliseev

上智大学理工学部 内田 寛

化学技術部新エネルギーグループ 秋山賢輔

掲載誌 : Materialia, Vol.7, pp. 100375- 100378 (2019)

熱電材料として期待される  $Mg_2Si$  をサファイア( $Al_2O_3$ )、及びマグネシア ( $MgO$ ) 単結晶上にエピタキシャル成長させた薄膜を透過電子顕微鏡 (TEM) および分析電子顕微鏡 (STEM-EDS) を用いてヘテロ接合界面の微細構造解析を行った。その結果、 $Al_2O_3$  (001) 面上の (110) 配向  $Mg_2Si$  エピタキシャル薄膜では接合界面に酸化薄膜 ( $MgO$ ) 層が観察されないものの、 $MgO(111)$ 面上の(110) 配向  $Mg_2Si$  エピタキシャル薄膜では結晶成長中に形成したと思われる  $SiO_2$ 、および  $MgO$  層の形成が観察された。

◆ Analysis of Adsorption and Decomposition of Odour and Tar Components in Tobacco Smoke on Non-woven Fabric-supported Photocatalysts

Tsuyoshi Ochiai

Daisuke Aoki

Hidenori Saito

Yasuhisa Akutsu

Morio Nagata

掲載誌 : Catalysis, Vol.10, No.3, pp.304(2020)

The release of substantial amounts of toxicologically significant, irritant, and malodorous compounds during the complete combustion of tobacco can generate an unpleasant environment, especially indoors. Herein, we developed non-woven fabric-supported UV- and visible-light-responsive photocatalysts capable of adsorbing and decomposing the odour and tar components of tobacco smoke under irradiation with UV or visible light. The processes of odour component adsorption and subsequent decomposition under irradiation were evaluated in terms of colour changes in the catalytic system and by gas chromatography-mass spectrometry. By considering three

different photocatalysts, namely  $TiO_2$ , Fe(III)-grafted  $TiO_2$ , and Cu(II)-grafted  $WO_3$ , we assessed the magnitude of odour and tar component adsorption on the fabric fibres, as well as the decomposition of these species after specific visible light or UV irradiation periods. Considering the expansion of our technology for practical applications, the best results among the three tested materials were obtained for non-woven fabric-supported Fe/ $TiO_2$ . We believe that our technology can be implemented in the design of interior decoration materials for creating a comfortable environment.

◆ Facile Functionalization of Cotton fabrics with Hierarchical Flower-like  $Ag_2Ti_3O_7$  layer for Enhanced Photocatalytic Activities under Visible Light Irradiation

Mouheb Sboui

Mohamed Faouzi Nsib

Tsuyoshi Ochiai

掲載誌 : Cellulose Chemistry and Technology, Vol.54, No.3-4, pp.395-403(2020)

This paper reports on a facile method for the immobilization of flower-like  $Ag_2Ti_3O_7$  architectures on cotton fabric by a mild alkali hydrothermal process at 130 °C, followed by ion exchange in an aqueous solution at room temperature. Evidence of the generation of silver titanate ( $Ag_2Ti_3O_7$ ) was obtained by Raman and XPS, and the morphology of the appended structure was analyzed by FE-SEM. The photocatalytic activity of the titanate material under sunlight stimulant was evaluated with the photodegradation of four models of organic molecules, including Rhodamine B (RhB), phenol (Ph), aniline (AN) and benzoic acid (BA). The  $Ag^+$  doped sodium titanate exhibited remarkable photocatalytic activity in the degradation of organic molecules under both sunlight and visible light irradiations.

◆ Water Purification in Dark Conditions Using Photocatalytic Light-Leakage Type Plastic Optical Fiber

Haruki Nagakawa

Takuya Sato

Goki Takahashi

Tsuyoshi Ochiai

Rei Furukawa

Morio Nagata

掲載誌 : Chemistry Letters, Vol.49, No.2, pp.199-202(2020)

In this study, we fabricated a device that can be used for water purification in dark areas by combining a light-leakage type

plastic optical fiber with a photocatalyst. The light-leakage type fiber was prepared by adding a scattering agent to the fiber core, and the titanium dioxide photocatalyst was composited by a two-layer coating method. Photocatalytic decomposition of methylene blue was performed by introducing light into the fiber without direct light irradiation.

◆ Elucidation of the Electron Energy Structure of  $\text{TiO}_2(\text{B})$  and Anatase Photocatalysts by Analysis of Electron Trap Density

Haruki Nagakawa  
Tsuyoshi Ochiai  
He Ma  
Changhua Wang  
Xintong Zhang  
Yang Shen  
Mai Takashima  
Bunsho Ohtani  
Morio Nagata

掲載誌 : RSC Advances Vol.10, No.31, pp.18496-18501(2020)

A clear understanding of the electron energy structure of  $\text{TiO}_2(\text{B})$ /anatase is needed to study the related catalytic reactions and design new composite photocatalysts. In this study, the electron energy structures of  $\text{TiO}_2(\text{B})$  and anatase were estimated by analyzing the energy-resolved distribution of electron traps measured by reversed double-beam photoacoustic spectroscopy. In the mixture of  $\text{TiO}_2(\text{B})$  and anatase, interfacial charge-transfer excitation from anatase to electron traps of  $\text{TiO}_2(\text{B})$  was suggested. By analyzing this for  $\text{TiO}_2(\text{B})$ , the electron level with a relatively high density of states was found to be located  $\sim 0.07$  eV deeper than that for anatase. Furthermore, a similar electron energy structure was suggested for a composite photocatalyst having a mixed phase of  $\text{TiO}_2(\text{B})$  and anatase.



# 「力を感じる医療・福祉介護次世代ロボット」 プロジェクト

プロジェクトリーダー 下野 誠通

## 【基本構想】

超高齢社会を迎える21世紀の我が国において、経済産業の持続的発展と安全安心で質の高い生活の実現に寄与する新しい科学技術の開発に対して大きな期待が寄せられている。特に、ロボット技術は従来の生産加工分野への応用のみならず、人間支援分野にも広く展開されることが強く望まれている。しかしながら、産業ロボット技術が高速精密で頑強な動作を可能としてきたのに対して、人間支援に応用するためには優しく柔らかな接触動作を可能とするロボット技術を新たに開発する必要がある。これはつまり、ロボットが精密に接触力を制御する機能を獲得する必要があることを意味する。このような機能は力触覚技術（リアルハプティクス技術）を援用することで初めてロボットに付与することができる。

本プロジェクトでは、医療分野、リハビリテーション分野および介護分野などにおける人間動作の直接的支援を目指した、次世代ロボットを開発することを目的としている。具体的には、リアルハプティクス技術を基盤とすることで、(A) 力触覚の伝送や記録機能を有する最先端医療デバイス、(B) 力触覚に基づいて身体機能の定量化を可能とするリハビリテーション支援ロボット、(C) 生活空間での動作補助や介護支援を提供する生活支援ロボット、(D) 高度で安全安心な手術を可能とする手術支援ロボットの四つのテーマ課題を推進している。様々な医療・リハビリ・介護ロボットの試作開発を、産学公連携を通じて遂行することで、リアルハプティクス技術の医療福祉分野における社会実装を目指す。

## 1. 研究目的

本プロジェクトは図1に概要を示すように、平成27年度研究シーズ育成事業で得られた人間支援ロボットへの応用を指向したアクチュエータ技術と、実際の力触覚の伝送・記録・再現を可能とするリアルハプティクス技術の両者を基盤として、医療・福祉・介護のための新しいロボット開発を行うことを主テーマとしている。平成28年度から31年度までの4年間で、以下を重点項目として取り組むこととした。

### (1) 人間支援ロボット用アクチュエーション技術の開発研究

平成27年度研究シーズ育成事業において実施した機能性ハプティックアクチュエータに関する開発研究で得られた知見を基にして、人間支援ロボットに実装可能なアクチュエーション技術の開発研究を継続して実施する。特に、高い力触覚伝達特性とバックドライバビリティを有するアクチュエーション技術を開発し、医療デバイス等への実装を目指す。

### (2) ハプティック医療デバイスの開発研究

従来の鉗子、ピンセット、局所麻酔器具等の医療デバイスに高い力触覚伝達特性を有するアクチュエータを埋め込み、力触覚増幅機能を付与することで、直接的に臨床応用が可能な力触覚機能付き医療デバイスを開発する。はじめに内視鏡下手術用の鉗子を主な対象として機能性ハプティックアクチュエータを埋め込み、試作機の開発を達成する。さらに、脳神経外科や整形外科などへと原理を応用



図1 プロジェクト概要

し、各医療分野における有用性を実証する。プロジェクト期間内に、小動物実験などの非臨床実験を順次行い、実用化へと繋げる成果を得る。

### (3) リハビリロボット・生活支援ロボットの開発研究

リアルハプティクス技術を応用することで、力強さと柔らかさを兼ね備えた身体的な支援を可能とするリハビリテーション支援ロボット、介護支援ロボットなどを開発する。看護師、介護士、理学療法士、作業療法士といった専門家と協働し、現場のニーズに即したロボットの設計開発を進める。

### (4) 手術支援ロボットの開発研究

鋭敏な力触覚を伝達可能な新しい手術支援ロボットを開発する。消化器外科や口腔外科などの領域で、試作ロボットの有用性を実証する。

## 2. 平成28～31年度の研究成果

平成28年度から31年度までの4年間の研究活動において、主として以下の研究成果を得ることができた。

### (1) 人間支援ロボット用アクチュエーション技術の開発研究

平成27年度研究シーズ育成事業で培ったハプティクス用アクチュエータの知見を基に、種々の特殊モータの開発研究を推進した。手術支援ロボットプラットフォームへの応用を目指し、大型の円弧リニアモータの試作開発を行い(図2)、発生推力に関する理論方程式を確立した。有限要素解析結果および試作モータの性能試験から有用性を確認した。また、研究シーズ育成事業で原理実証を行った積層リニアモータの原理を回転モータへと応用し、ラジアル積層モータ(図3)とアキシアル積層形モータ(図4)を試作し、ロボットへの応用可能性を実証した。その他にも、高出力化のための磁気ギアを内蔵したリニアモータや、円筒二自由度モータにおける直動方向と軸回転方向の運動を計測するための二出力同時検出用レゾルバなどの試作に成功した。

### (2) ハプティック医療デバイスの開発研究

リアルハプティクス機能を実装した様々な医療デバイスの試作開発を行った。まずマスタ・スレーブ体型ハプティック鉗子デバイスを試作し、鋭敏な力触覚の伝達および知覚増幅を実現すると共に、動作データおよび把持環境データの記録が可能であることを示した(図5)。本デバイスの原理を応用し、脳神経外科手術用の鑷子デバイス(図6)や多自由度ハプティック鉗子デバイスを開発し、動物実験結果から力触覚情報を活用することで癌化領域のマッピングや脈動検知による誤動作防止といった付加価値を与えることが可能であるとの見通しを得た。



図2 大型円弧リニアモータ



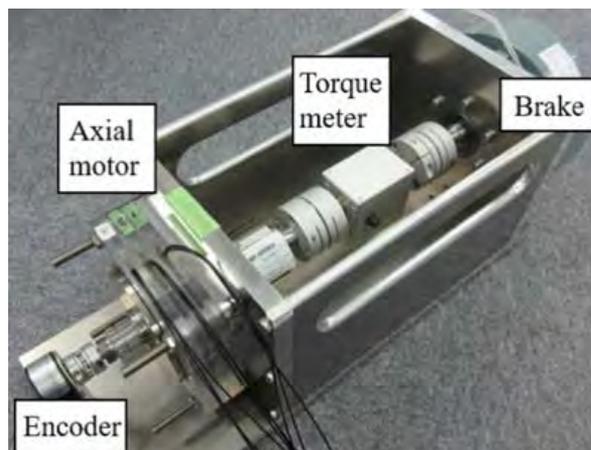
(a) 一層モデル (b) 二層モデル (c) 三層モデル  
図3 ラジアル積層モータ



(a) コイル層



(b) 磁石層

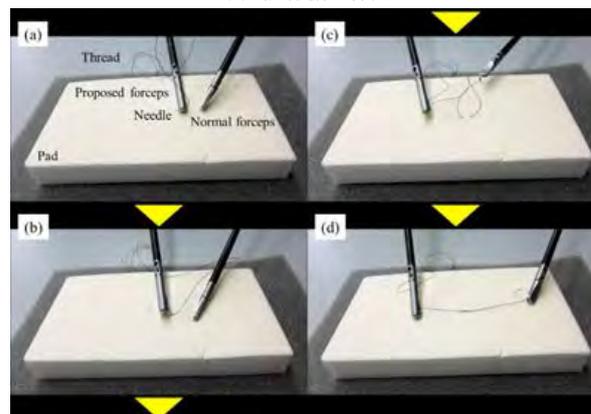


(c) モータ試験機

図4 アキシアル積層モータ



(a) 試作機全体図



(b) ハプティック鉗子による結紮動作の様子

図5 ハプティック鉗子デバイス試作機

このように、開発したリアルハプティクスの医療応用技術について、様々な医療領域への応用性を確認することができた。整形外科への応用を目指したハプティックドリル



図6 ハプティック鉗子デバイス試作機



図7 多自由度ハプティック鉗子デバイス

の開発研究についてはAMED ACT-MSに申請課題が採択され、遠隔触診デバイスの開発研究については総務省SCOPEに申請課題が採択されるなど、様々な競争的研究経費を獲得したと共に、実用化研究へと着実に進展してきている。また、ハプティック医療デバイスの開発研究においては、特にJSTリサーチコンプレックス事業の補助を得たことで、開発技術の様々な医学分野への横展開を加速することができた。

### (3) リハビリロボット・生活支援ロボットの開発研究

高齢者等に対する身体的な動作支援を実現するために、リハビリテーション支援ロボットや生活支援ロボットの開発研究を行った。看護学の専門家らとの共同研究では、車いす、ベッド、トイレなどの中での移乗動作を支援するためのロボットマニピュレータの開発研究を行った(図8)。日本人高齢女性の体格を模して作られた人体ダミーを用いた実験を行い、開発したロボットが移乗支援を実際に達成可能であることを確認した。また、下肢トレーニングを実現するリハビリテーション支援ロボットの開発研究では、下肢筋力の評価法を開発し、試作したロボットで検証実験を行った。下肢筋機能を支援するアシストロボットの開発研究(図9)では、発生トルクの伝達特性を表す数理的な基本式を導出すると共に、実験結果からアシスト効果を示した。さらに、座位姿勢の保持を支援する椅子型ロボット等を開発し、理学療法士や作業療法士といった専門家との共同研究を推進した。座位保持支援のための運動制御アルゴリズムを開発し、実証実験まで達成した。

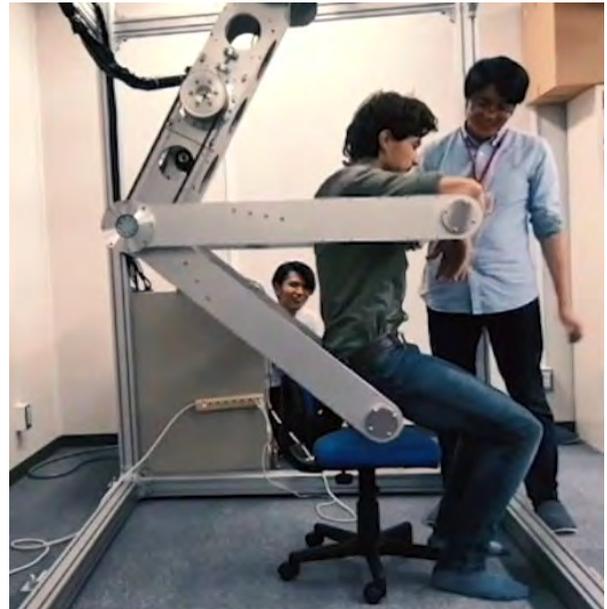


図8 移乗支援ロボット



図9 下肢筋機能支援ロボット

### (4) 手術支援ロボットの開発研究

鮮明な力触覚の伝達機能を有する新しい手術支援ロボットの開発研究を推進した。口腔外科分野においては、再建手術やインプラント手術に対する支援を目的として、図10に示す6自由度手術支援ロボットの試作を行った。リアルタイムでの鋭敏な力触覚フィードバックが可能であ



図 10 口腔外科手術支援ロボット



図 11 手術支援ロボットプラットフォーム

ること、口腔外科手術に必要な基本自由度を獲得できていることなどを基礎実験により確認した。画像データとの統合による手術ナビゲーションの実現といった発展的研究にも着手することができた。また、大型円弧リニアモータ駆動による多自由度手術支援ロボットプラットフォームの開発にも成功した(図 11)。双腕による物体把持・操り動作を遠隔操作で達成するなど、基本的な有用性を実証することができた。

#### (5) 開発技術の普及活動

試作開発したハプティック医療デバイスや人間支援ロボットについては、積極的に神奈川県内の自治体が企画する展示イベントや、学協会のシンポジウムでの動態展示に参加することで、地域社会への成果普及にも努めた。例えば、平成 28 年 5 月には第 51 回日本理学療法学会大会に参加し、リハビリテーション支援ロボットや人間支援ロボットの展示を行った。また、平成 31 年 3 月には健康未来 EXPO で、同年 12 月には日本内視鏡外科学会総会において、ハプティック鉗子デバイスなど医療機器の動態展示を行った。

また、招待講演についても積極的に実施し、第六回かながわ未来フォーラム(図 13)や、静岡県産業振興財団ファルマバレーセンター技術セミナーなど、様々な講演会で講演した。リハビリ・生活支援ロボットについては、地域での産学連携を加速させるためにマッチングセミナーを企画し(図 14)、企業との共同研究にも繋がった。さらに、本プロジェクトが主催する形で、「未来医療ロボット技術シンポジウム」を開催した。2018 年 3 月に第一回を

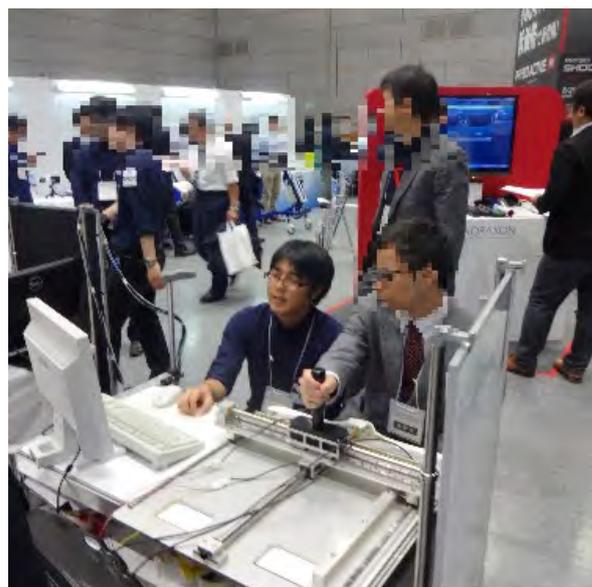


図 12 日本理学療法学会大会での動態展示  
(2016 年 5 月 27 日～29 日)



図 13 第六回かながわ未来フォーラム  
(2016 年 11 月 22 日)



図 14 リハビリ・介護ロボットコンソーシアム  
マッチングセミナー  
(2018 年 12 月 12 日)

開催してから、2019 年 3 月に第二回を、2019 年 11 月には第三回を開催し、地域への成果還元を達成できた。



図15 第一回未来医療ロボット技術シンポジウム  
(2018年3月2日)

### 3. 今後の展望

平成28年度から平成31年度までの4年間の研究期間において、有望シーズ展開事業として計画していた研究目標を概ね達成することができた。令和元年7月より、川崎市殿町に慶應義塾大学ハプティクス研究センター、同大学医学部との共同研究ラボを設置しており、今後は同地区での特にハプティック医療デバイスの開発研究における産学公連携を中心とした実用化研究を加速させる。また、各試作機についても、動物実験等の非臨床実験を実施し、実用性の検証をさらに進めていく予定である。「力を感じる医療・福祉ロボット技術」の社会実装を実現することで、県民・国民のQoL向上、国際的競争力を有する先進技術による市場拡大と持続的成長といった様々な社会的・経済的効果が期待される。

## アキシシャル積層モータの特性解析

浅井 洋

### 1. はじめに

近年、高速かつ高精度な制御が可能なアクチュエータとしてダイレクトドライブモータの研究開発が進められている[1], [2]。鉄心等のコアによる磁気吸引力やコギングトルク、ギア等の減速機によるバックラッシュや装置の振動が発生せず優れた制御性能を得られるためである。一方でダイレクトドライブ構造ではコアによる磁路が形成されない、減速機による出力増幅がされない等の理由から出力密度が小さくなりがちであり、所望のトルクを得るための装置の肥大化が問題となっている。

このようなダイレクトドライブモータの出力密度向上案として、磁石とコイルを複数に分割し層を積み重ねる積層構造が提案されている[1]。この文献では積層された磁石層による相乗効果が発生し、積層数に対して層数倍以上の推力が得られたことが報告されている。同構造を回転型モータに実装した例がラジアル積層モータであり[2]、同様に積層の効果も確認されたが層や分割数によって部品の寸法が異なるため設計の点において難を抱えている。そこで本研究では回転型モータにおける新たな積層構造を検討し、電磁界解析からその有用性を確認した[3]。

### 2. アキシシャル積層モータの構造・原理

先行研究となるラジアル積層モータでは、磁石層とコイル層を径方向に積層させた構造となっているが、それに対し本研究では磁石層およびコイル層を軸方向に積層させるアキシシャル積層構造を提案する。図1にアキシシャル方向へ積層した回転型モータのCAD図を示す。環状に磁石を16個配置した磁石層とコイルを24個配置したコイル層の繰り返しによって構成され、層間のエアギャップは1.0mmとなっている。隣り合う磁石同士で磁極の向きが異なっており、紙面左下に向かって赤がN極、青がS極を指している。また隣り合うコイル同士でU, V, Wの3相を構成しており、磁石層とあわせて3層2極が周方向に8組繰り返す構造となっている。以上の構造により層同士の相乗効果を生じさせ、かつ層数の変更が容易となった積層型回転モータを実現している。なお両層における構造パラメータを表1に纏める。

### 3. 電磁界解析

#### 3. 1 コイル外径による特性変動

本モータでは径方向に流れる電流と軸方向の磁束密度により生成される円の接線方向へのローレンツ力が駆動源となるため、周方向に電流が流れるコイルの底辺部は駆動力に寄与しない。そのため図2のようにコイル外径が磁石外径より大きい場合、底辺部が磁石層から外れ、駆動力を生み出す二等辺部と磁石層の重なる領域が増加しトルクが増加する。そこで本節ではコイルの外径に対するトルク特性の変動を電磁界解析によって確認する。

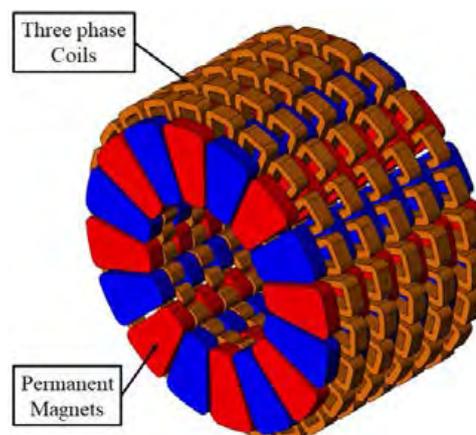


図1. アキシシャル積層モータ構造図

表1. 両層の寸法

	Magnet Layer	Coil Layer
Outside diameter [mm]	100	110
Inside diameter [mm]	47.8	47.8
Axial length [mm]	5.00	5.00
Gap angle between one's neighbor [deg]	2.00	2.00
Angle of one part [deg]	20.5	13.0
Material	N40SH	Copper



図2. 駆動力の生成原理

コイル外径を100mm(=磁石外径)から114mmまで2mm毎に増加させた際のトルク解析結果を図3に示す。図3の結果から、コイル外径100mmでは0.596Nmのトルクが外径110mmでは0.652Nmまで増加していることが分かる。一方で緩やかに増加していたトルクは以後変化が見られず、外径114mm時のトルク値は外径110mm時とほぼ同一の値となっている。これはコイルの二等辺部と軸方向磁束の重なる領域が頭打ちになったためであり、トルク特性の飽和点とも言える。

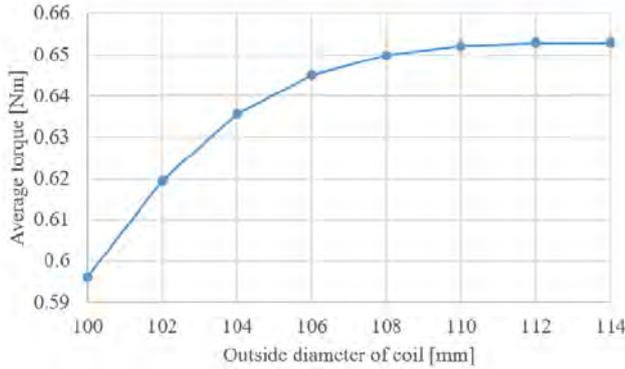


図 3. コイル外径増加に伴うトルク特性変動[5]

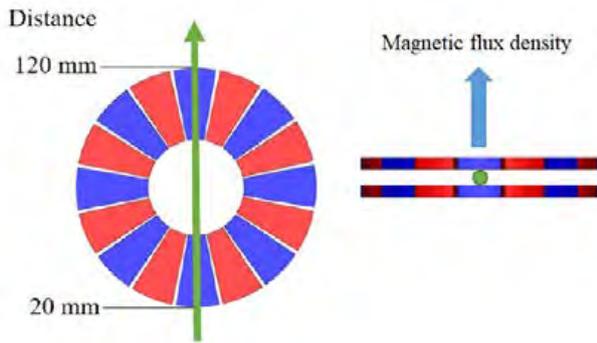
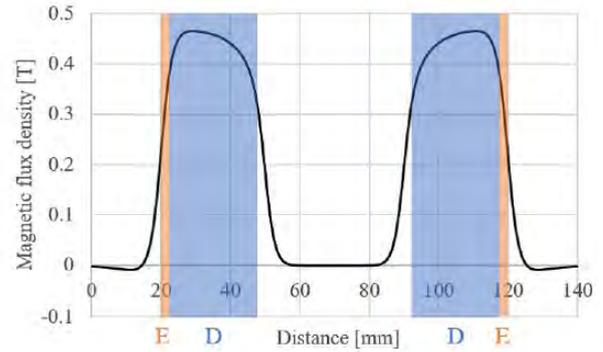


図 4. 磁束密度解析における位置定義[5]

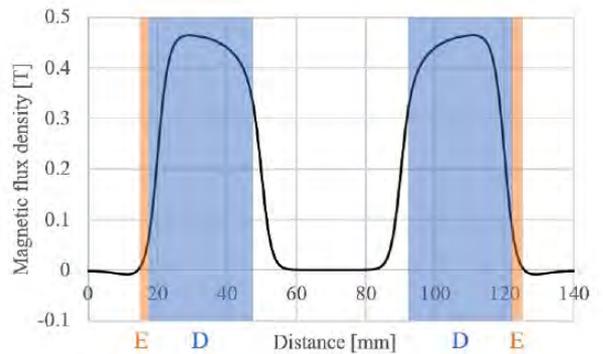
この現象を磁束密度次元で確認するため図 4 で示す位置定義のもと電磁界解析を行った。解析では磁石層間の中点において円の直径に沿った軸上(緑矢印)での軸方向磁束密度(青矢印)を求める。この解析結果に外径 100mm コイルおよび 110mm コイルによる二等辺部(青・領域 D)と底辺部(橙・領域 E)を図示したものがそれぞれ図 5(a)および(b)となる。青領域とグラフの正の部分の重なる面積がコイル層における鎖交磁束量を表しており、この面積の大小がトルクの大小と一致する。この結果からコイルの外径が 110mm に増加することで Distance 軸 20mm および 120mm 付近のグラフ正領域も青領域と重なり、トルクが増大することが分かる。一方で同様に、これより大きい青領域でもグラフ正領域と重なる面積は非常に少なく、トルクが増大が見込めないことが容易に判断できる。これがコイル外径 110mm 以後での特性飽和を示している。以上の結果から試作機ではコイル外径を 110mm として設計した。なお内径は底辺部と二等辺部のような領域が不明瞭であるため磁石と同一の値としている。

### 3. 2 磁束密度解析

本節では図 6 のように複数層積層した際の相乗効果を磁束密度次元で確認する。表 2 に示す条件のもと電磁界解析を行った結果を図 7 に示す。この結果からコイル 1 層目(Axial Distance 軸 18mm 付近)における 1 層モデル(濃い青)と 2 層モデル(薄い橙)を比較すると、磁束密度が若干向上していることが確認できる。これは 2 層モデルで追加された左から 3 番目の磁石層によって発生した相乗効果であ



(a) 磁束鎖交領域(コイル外径 100mm)



(b) 磁束鎖交領域(コイル外径 110mm)

図 5. コイル外径増加に伴う磁束鎖交領域変動[5]

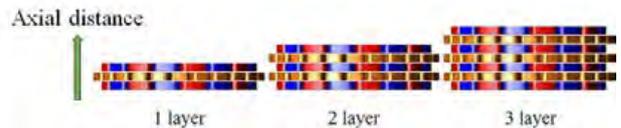


図 6. 積層定義図[5]

表 2. シミュレーション条件

	運動条件		コイル条件
ステップ数	16	振幅[A]	1.41
1 ステップ時間[s]	4.44*10 <sup>-4</sup>	周波数[Hz]	50
1 ステップ角度[deg]	1.00	巻数	63

る。この時、3 番磁石層を中心軸としてコイル 1 層目と対称となるのはコイル 4 層目(Axial Distance 軸 55mm 付近)であるため、コイル 4 層目の領域における 2 層モデルでの値がコイル 1 層目における磁束密度の増加量である。同様の法則から、2 層モデルから 3 層モデル(灰)となった際のコイル 1 層目における磁束密度の増加量は 3 層モデルにおける最外部(Axial Distance 軸 80mm 付近)での値に等しく、どちらもほぼ 0 であることが確認できる。以上からアキシヤル積層構造による相乗効果、および相乗効果の原理を磁束密度次元での考察から明らかにした。

### 3. 3 トルク解析

本節では積層構造による相乗効果をトルク次元で確認する。積層定義およびシミュレーション条件は前節と同様

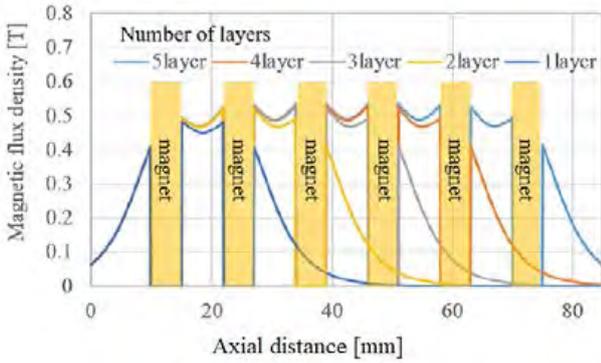


図7. 積層数変化による磁束密度変動[5]

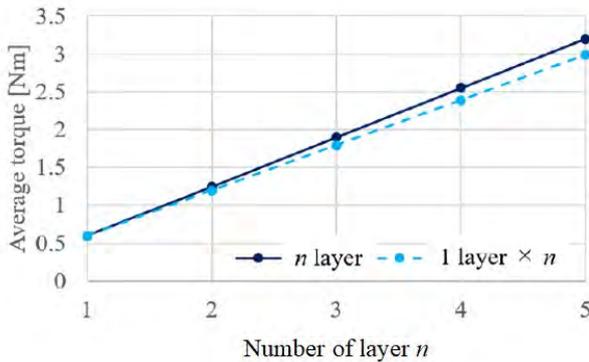


図8. 積層数変化によるトルク変動[5]

に図6および表2に示された通りである。図8に示すトルク解析結果から、N層モデルによるトルク(実線)では1層モデルによるトルク定数をN倍した値(点線)より大きくなっており、トルク次元でも相乗効果が発生していることが確認できる。

### 3. 4 同一軸長下に対する最適層数

これまでの解析では複数層による相乗効果の確認を目的とした解析を行った。この節では軸長があらかじめ決められた条件下における分割数の変化に伴うトルク定数の変動について解析を行う。この解析はコイル層および磁石層の軸長設計時の指針となるデータを得ることが目的である。図9に示す通り、あらかじめ軸長Lが決められた場合の分割数によるトルク特性の変動を確認する。図10の解析結果から軸長Lが50mmの場合は4層モデルでトルクが最大となるが、80mmでは6層モデルでトルクが最大となり、軸長によって最適な分割数が異なることが確認できる。これは軸長Lが50mmの4層モデルでの寸法をもとに設計した場合、積層数の増加によって軸長が80mmを超えた際に最適なパフォーマンスは発揮できないことを示している。

### 4. 結論および今後の展望

本研究では磁石やコイルを軸方向に積層して出力密度を増加させる構造を提案し、電磁界解析の結果から本構造の実現可能性を確認した。本研究の今後の展望として

1. 実機を試作し、複数層モデルでの特性を比較

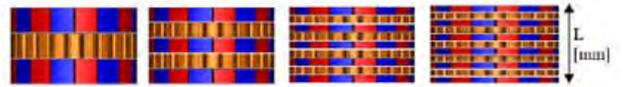


図9. 既定軸長下における分割[5]

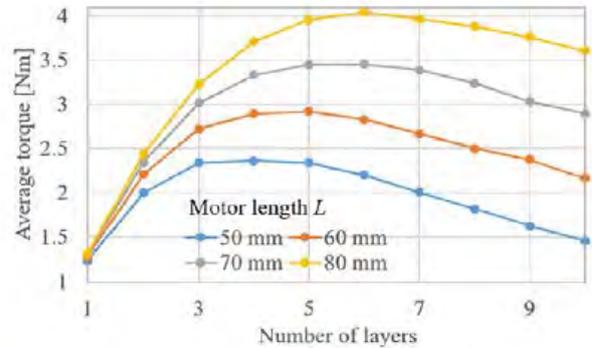


図10. 既定軸長下における分割数変化に対するトルク変動[5]

2. 磁石およびコイル層の軸方向厚さ変化時の特性変動解析
3. 磁束密度およびトルク特性理論式の導出などが挙げられる。

### 【参考文献】

1. X. Wang, C. Hu, M. Zhao, L. Wu, and S. Zhou, "Design of multi-layer PCB coreless axial permanent magnet synchronous motor," *2019 22<sup>nd</sup> International Conference on Electrical Machines and Systems, ICEMS2019*, 2019.
2. S. Neethu, S. P. Nikam, A. K. Wankhede, S. Pal, and B. G. Fernandes, "High-Speed Coreless Axial-Flux Permanent-Magnet Motor with Printed Circuit Board Winding," *IEEE Transactions on Industry Applications*, Vol. 55, No. 2, pp. 1954-1962, 2019.
3. S. Takano, S. Tanaka, S. Yamaguchi, T. Shimono, and T. Mizoguchi, "Analysis of the Effect on Applying Halbach Array to LPMM with Three Phase Multi-layered Structure," *2016 International Symposium on Industrial Electronics, ISIE2016*, 2016.
4. K. Sakuma, S. Takano, T. Shimono, and T. Mizoguchi, "Design and analysis of multi-layered coreless permanent magnet synchronous motor," *The 4<sup>th</sup> International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control and Optimization, SAMCON2018*, 2018.
5. C. Soneda, H. Asai, Y. Hatta, T. Shimono, and K. Ohnishi, "Design and Analysis of Core-less Multi-layered Axial Motor," *2019 IEEE 28<sup>th</sup> International Symposium on Industrial Electronics, ISIE2019*, 2019.

# 力触覚技術による治療行為支援が可能な 医療用デバイスの開発

溝口 貴弘、松永 卓也

## 1. はじめに

外科手術における医師と患者の負担軽減や人間の手では不可能であった新しい治療方法の実現のために、医工連携によるロボット技術の医療分野への応用が進められている [1][2]。遠隔操作ロボットの構成方法の一つであるマスタ・スレーブシステムは多くの手術支援ロボットに採用されており、腹腔鏡等の視覚系の技術と統合した手術支援システムである da Vinci® (Intuitive Surgical, Inc.) は、日本国内を含めて多くの病院で使用されている [3][4]。しかしながら、現在普及している手術支援ロボットは力触覚を操作者に伝達する機能が無く、臓器や血管等に接触した感覚が得られない。また、手術支援ロボットは規模が大きく、導入、維持に費用がかかる。さらに、従来の手術器具とは操作方法が異なり、ロボットを使用して治療をおこなうためのトレーニングを要する [5]。これらの問題が今後のロボット手術の普及において障害となる。本研究では、マスタ・スレーブ一体型医療用デバイスの開発と力触覚技術の応用によってロボット手術の課題に取り組む。

### 1. 1 マスタ・スレーブ一体型デバイス

本研究では、従来の手術器具と同様の使用方法でありながら操作者に対する動作支援が可能なマスタ・スレーブ一体型の医療用デバイスを開発する。従来のマスタ・スレーブシステムでは操作者側のマスタロボット（マスタ）と作業空間側のスレーブロボット（スレーブ）を機械的に分離して遠隔操作を可能とする。マスタ・スレーブ一体型医療用デバイスは一つの手術機器にマスタとスレーブを組み込むことで、手術支援ロボットと比較して導入における障害が少ない医療器具の形態をとりながらロボット技術による支援が可能となる。

### 1. 2 力触覚技術

マスタ・スレーブシステムにおける力触覚伝達は、より安全で繊細なロボット手術の実現に貢献する重要な技術の一つである。加速度制御に基づくバイラテラル制御は、位置情報と力情報をマスタ、スレーブ間で双方向に送信することで力触覚を伝達する [6]。バイラテラル制御の制御目標は式(1)、式(2)となる。

$$X_m - X_s = 0 \quad (1)$$

$$F_m + F_s = 0 \quad (2)$$

式(1)でマスタの位置  $X_m$  とスレーブの位置  $X_s$  を一致させ、

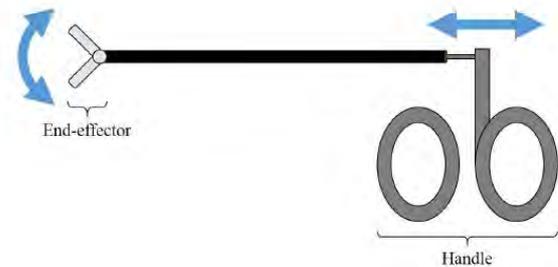


図1. 従来の腹腔鏡手術用鉗子の構造の概略図

かつ、式(2)でマスタに加わる外力  $F_m$  とスレーブに加わる外力  $F_s$  に作用反作用の法則を成り立たせる。これらの制御目標を同時に達成することで、環境のかたさが操作者に伝達される。また、位置情報と力情報を加工することで力触覚の増幅伝達が可能である。位置の増幅率を  $\alpha$ 、力の増幅率を  $\beta$  と定義すると、式(1)、式(2)の制御目標は式(3)、式(4)となる。

$$X_m - \alpha X_s = 0 \quad (3)$$

$$F_m + \beta F_s = 0 \quad (4)$$

これらの制御目標を達成することで、 $\alpha$  倍されたスレーブの位置と  $\beta$  倍されたスレーブに加わる外力がマスタに伝達される。さらに、力触覚をデータとして扱うことで可視化や操作者の動作の記録、再現、解析が可能となる。

バイラテラル制御では各モータの位置および力を高精度に制御することが求められるため、外乱オブザーバ [7] を用いたロバストな加速度制御をおこなう。また、装置のコストや機構の複雑化などの難点を考慮し、反力オブザーバを用いて力センサレスで力情報を推定する [8]。

## 2. 実験と結果

消化器外科等で使用される腹腔鏡手術用鉗子と脳神経外科手術等で使用される鑷子にマスタ・スレーブ一体型構造を適用した医療用デバイスの開発と、力触覚技術を実装した装置の評価について述べる。

### 2. 1 腹腔鏡手術用鉗子

腹腔鏡外科手術では、トロッカーを介して治療をおこなうために先端のグリップと医師の手元のハンドルが細長いシースで接続され、内部のロッド等で動力伝達をおこなう図1の構造の鉗子が用いられる [9]。マスタ・スレーブ

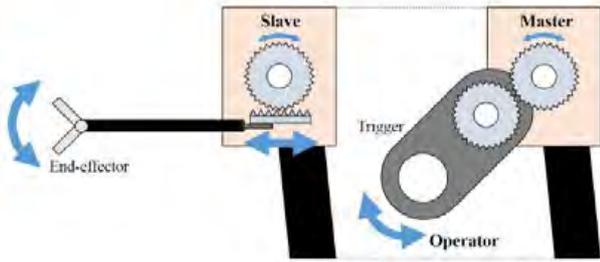


図 2. マスタ・スレーブ一体型鉗子の構造の概略図

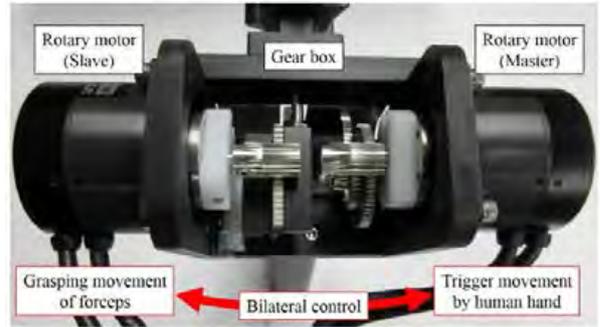
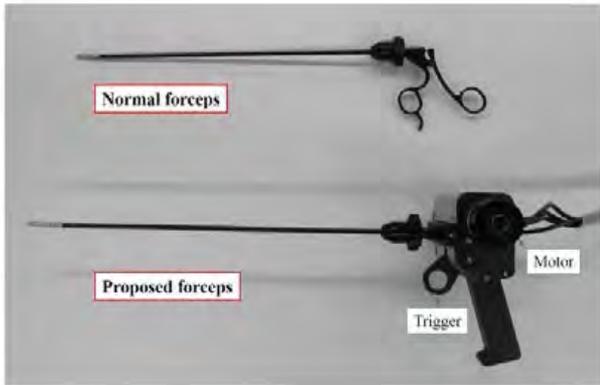
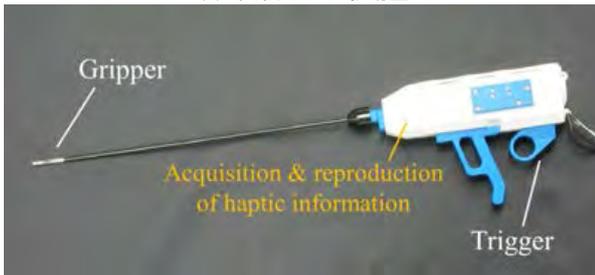


図 4. 実際の機構の様子



(a) 回転モータ駆動型



(b) 直動モータ駆動型

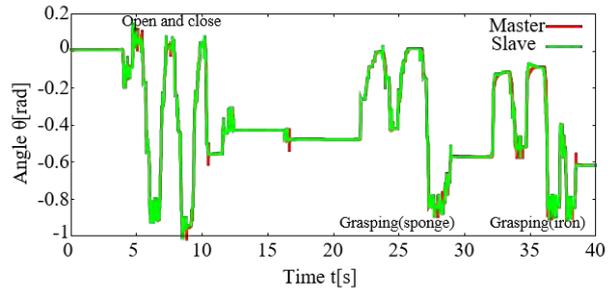
図 3. 開発した鉗子の全体像

一体型鉗子は腹腔鏡手術用鉗子の把持自由度に力触覚機能を実装した医療用デバイスであり、ハンドルを介してグリッパで把持した物体のかたさを伝達する。

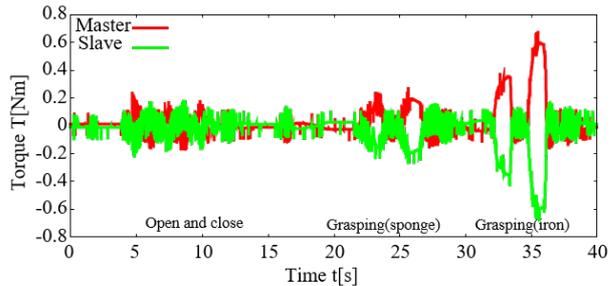
### 2. 1. 1. 装置の機構

マスタ・スレーブ一体型鉗子の構造の概要を図 2 に示す。物体を把持するエンドエフェクタはスレーブ側のモータに接続されており、モータの運動に応じて開閉をおこなう。操作者が動かすトリガー型のハンドルはマスタ側のモータに接続されており、モータの運動に応じてハンドルが動作する。各モータは角度情報を得るためのエンコーダを備えており、力触覚技術を実装してグリッパとハンドルを電氣的に接続することで、従来の鉗子のように把持自由度を操作することが可能となる。

本研究で開発したマスタ・スレーブ一体型鉗子の全体像を図 3 に示す。装置に駆動部を備えるため従来の腹腔鏡手術用鉗子と比較して大型であるが、片手で扱うことが可能な大きさである。また、エンドエフェクタは取り換えが可能である。図 3(a) の回転モータ駆動型鉗子の内部構造を図 4 に示す。マスタ側およびスレーブ側のモータは装置の



(a) 角度応答



(b) トルク応答

図 5. マスタ・スレーブ一体型鉗子による実験の結果

両側面に配置され、装置内部でギア機構によって動力伝達をおこなう。外部の制御装置に各モータを接続してバイラテラル制御をおこなうことで、力触覚伝達下でグリッパの操作が可能である。一方、図 3(b) の直動モータ駆動型はダイレクトドライブである。

### 2. 1. 2. 実験

図 3(a) の回転モータ駆動型鉗子を使用して開閉動作および物体の把持動作をおこなった。実験は先端を閉じた状態から開始し、以下の 3 種類の動作をおこなった。

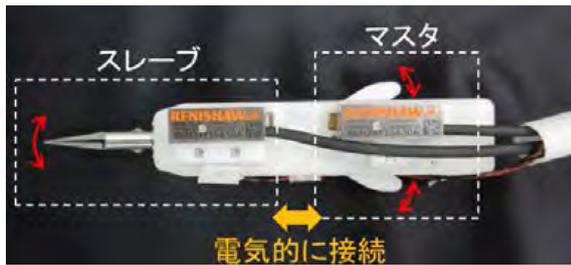
- (1) 開閉動作を 2 回ほど実施
- (2) 剛性の低い物体としてスポンジを 2 回ほど把持
- (3) 剛性の高い鉄を 2 回ほど把持

力触覚の増幅伝達を実装し、角度の増幅率  $\alpha$  を 5 倍、トルクの増幅率  $\beta$  を 10 倍に設定した。

実験の結果を図 5 に示す。図 5(a) の角度応答において、マスタの角度とスレーブの角度が一致しており、ハンドルの操作に連動してグリッパが開閉したことが確認できる。すなわち、式(3)の制御目標が達成された。図 5(b) のトルク応答では作用・反作用の法則が成立しており、式(4) の



(a) 全体像



(b) 構成

図 6. マスタ・スレーブ一体型鑷子 (ストレート)

制御目標が達成されたことが確認できる。

実験における最初の開閉動作は5秒から10秒にあたり、角度応答値が大きく変化しているが、物体を把持していないため発生したトルクは小さい。2番目の動作であるスポンジの把持は20秒から30秒にあたり、最初の開閉動作と比較して大きなトルクの発生を確認できる。最後の把持動作は30秒から40秒にあたり、3種類の動作の中で最大のトルクの発生を確認できる。また、鉄の把持ではスポンジの把持と比較してグリップが閉じておらず、把持対象物の剛性の変化が認識可能である。

## 2. 2 脳神経外科手術用鑷子

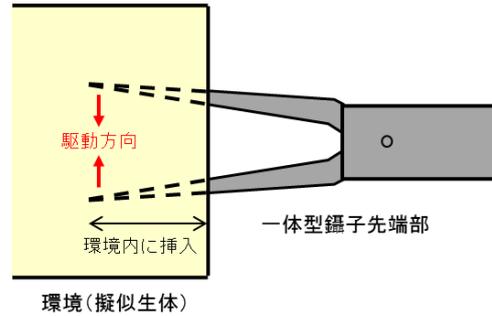
狭い術野で神経や血管を傷付けずに繊細な治療をおこなうことが要求される脳神経外科手術は術者の負担が大きく、精密な動作が可能なロボットによる治療行為支援の効果が期待できる。本研究では、脳神経外科手術で用いられる鑷子にマスタ・スレーブ一体型構造を適用し、力触覚機能を実装する [10][11]。

### 2. 2. 1 装置の機構

図6に示すマスタ・スレーブ一体型鑷子は、上述の腹腔鏡手術用鉗子と同様に、鑷子の把持自由度に力触覚機能を実装した医療用デバイスである。装置にはマスタとスレーブに対応する2台の直動型モータ（ボイスコイルモータ）が組み込まれており、エンコーダを用いて各モータの位置情報を取得する。マスタ側モータの運動は装置両側面のレバー、スレーブ側モータの運動はエンドエフェクタのグリップに運動変換機構を介して伝達される。装置内のマスタ・スレーブシステムにバイラテラル制御を実装することで、レバー押し込み時に物体の反力を感じながらグリップ



図 7. マスタ・スレーブ一体型鑷子 (バヨネット)



環境(擬似生体)

図 8. 一体型鑷子による接触動作

を閉じることが可能となる。また、把持力を緩めるとばねによって先端が開く従来の鑷子の構造を模擬するために、マスタ側モータにはばねが取り付けられており、レバーに加える力を緩めるとばねの力でグリップが開く構造である。

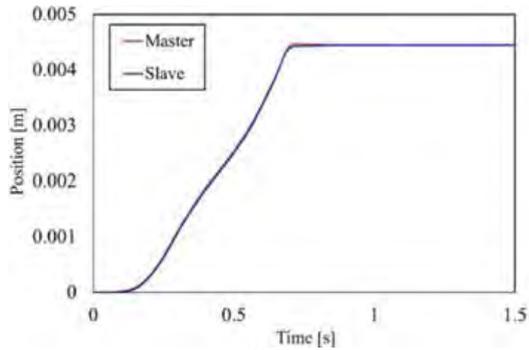
図7に示す医療用デバイスはマスタ・スレーブ一体型鑷子の改良機であり、バヨネット型のエンドエフェクタを有する。先端が屈曲したバヨネット型鑷子は操作者の手や鑷子の後端部が視野を遮らない形状であり、マスタ・スレーブ一体型鑷子を用いた作業においても同様の効果が得られる。また、マスタのレバーを前方に配置することで、使用時に力を加える位置が従来の鑷子に近い構造となっている。

### 2. 2. 2. 実験

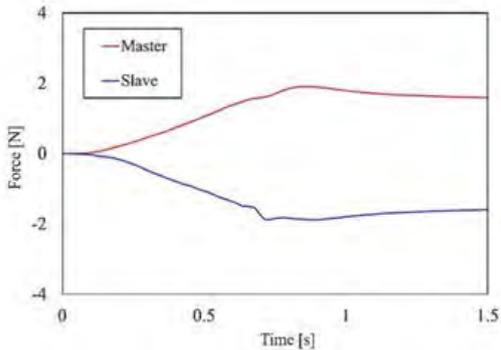
図7のマスタ・スレーブ一体型鑷子にバイラテラル制御を実装し、物体に対する把持動作と剛性の比較をおこなった。把持対象として正常な脳組織を模擬した絹豆腐と癌化した脳組織を模擬した木綿豆腐を使用した。物体に対する接触方法を図8に示す。初期姿勢として鑷子の先端を開いた状態で物体内に挿入した。測定時はマスタを介してスレーブを操作し、力触覚伝達下で徐々に鑷子の先端を閉じて把持動作をおこなった。

図9に絹豆腐、図10に木綿豆腐を把持した際の位置応答および力応答を示す。いずれの結果においてもマスタの位置とスレーブの位置が一致しており、また、マスタで推定した反力とスレーブで推定した反力の間に作用・反作用の法則が確認できる。したがって、マスタ・スレーブ間において、環境に接触した際の力触覚が伝達された。

図9および図10の結果における位置と力の応答値の関

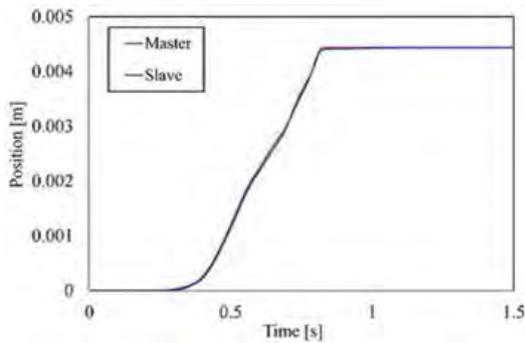


(a) 位置応答

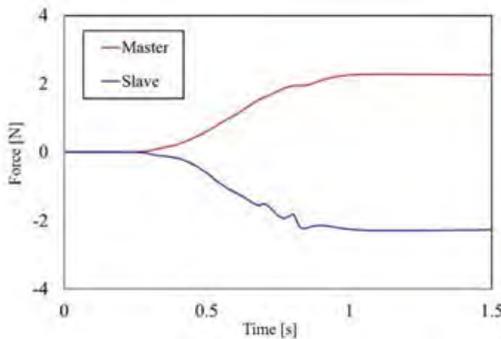


(b) 力応答

図 9. 絹豆腐に対する接触動作



(a) 位置応答



(b) 力応答

図 10. 木綿豆腐に対する接触動作

係を図 11 に示す。グラフの傾きは把持対象の物体の剛性値を示す。図 11 の結果より、木綿豆腐に対する把持動作では、絹豆腐より大きな剛性が推定されたことが確認できる。

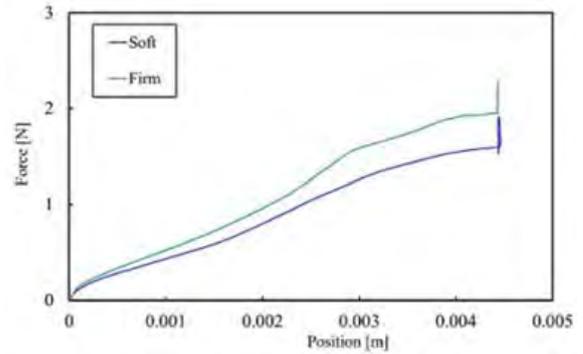


図 11. 一体型鑷子を用いた把持動作における位置と力の関係

### 3. 考察及び今後の展望

#### 3. 1 考察

本研究で開発したマスタ・スレーブ一体型構造の医療用デバイスを用いた実験において、マスタ・スレーブ間における位置の追従と作用反作用の法則の成立が確認でき、バイラテラル制御の二つの制御目標が達成された。すなわち、一つの器具に組み込まれたマスタとスレーブの間で力触覚が伝達された。そして、力触覚の増幅伝達や記録された情報に基づく剛性比較等の解析が可能であることが確認できた。したがって、従来の手術器具と同様の操作方法であり、かつ力触覚による動作支援が可能な医療用デバイスであることが確認できた。

#### 3. 2 今後の展望

本研究ではマスタ・スレーブ一体型の医療用デバイスとして腹腔鏡手術用鉗子と脳神経外科手術用鑷子を開発した。今後の課題として装置の小型軽量化に取り組む必要がある。マスタ・スレーブ一体型装置は内部に駆動部を組み込むため、従来の器具と比較して質量が増加する。長時間の手術では術者の負担となるため、小型、高推力のモータの使用や形状変更による軽量化が必要である。一方、マスタ・スレーブ一体型医療用デバイスの機能の面では、これまでに力触覚の増幅伝達や記録が可能であることを確認できた。脳神経外科手術用鑷子を用いた実験では、記録した力触覚情報を解析することで対象物の剛性が判別できており、今後は実用化に向けた臨床やオンラインでの剛性推定による動作支援等が課題となる。

#### 【参考文献】

1. R. H. Taylor and D. Stoianovici, *IEEE Transactions on Robotics and Automation*, **19**, 5, 765-781 (2003).
2. B. Hannaford, J. Rosen, D. W. Friedman, H. King, P. Roan, L. Cheng, D. Glozman, J. Ma, S. N. Kosari, and L. White, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **60**, 4, 954-959 (2013).
3. G. S. Guthart and J. K. Salisbury Jr., *Proceedings of IEEE International Conference on Robotics and Automation*, 618-621 (2000).
4. 家入里志, 橋爪誠, *日本コンピュータ外科学会誌*, **15**, 4, 319-322 (2014).

5. 富川盛雅, 植村宗則, 橋爪誠, *日本コンピュータ外科学会誌*, **20**, 3, pp. 151-153 (2018).
6. W. Iida and K. Ohnishi, *Proceedings of the 8th IEEE International Workshop on Advanced Motion Control*, 217-222 (2004).
7. K. Ohnishi, M. Shibata, and T. Murakami, *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, **1**, 1, 56-67 (1996).
8. T. Murakami, F. Yu, and K. Ohnishi, *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, **40**, 2, 259-265 (1993).
9. M. Yokoyama, T. Mizoguchi, T. Matsunaga, and T. Shimono, *Proceedings of the 2017 IEEE International Conference on Intelligent Mechatronics*, 743-748 (2017).
10. M. Aoki, T. Shimono, T. Matsunaga, T. Mizoguchi, S. Shibao, H. Sasaki, and Kouhei Ohnishi, *Proceedings of IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics*, 207-212 (2018).
11. M. Aoki, T. Shimono, T. Matsunaga, T. Mizoguchi, S. Shibao, H. Sasaki, M. Nishimoto, E. Ishihara, and K. Ohnishi, *Proceedings of IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization*, 1-6 (2019).

# 脳性麻痺患者のための 3 軸座位保持支援装置の開発

富樫 信之

## 1. はじめに

新生児 1000 人の内、2 から 3 人の割合で脳性麻痺を発症するという調査結果が報告されている[1]。このような脳性麻痺を発症した患者の生活支援を行うため、今日ではロボット技術による介護やリハビリ支援について研究開発が盛んになっている[2][3]。

脳性麻痺を発症した患者が抱える問題の一つとして、日座位姿勢の保持がある。脳性麻痺を発症した患者は日常生活における動作の僅かな刺激を受けた際に緊張して、座位姿勢をそらす。そのため、日常生活を送るためには抱きかかえるようにして座位姿勢を保持しなければならず、介護者の負担が増加する。その問題を解決するため、座位姿勢を保持する車椅子が開発されている。また、自立支援を目的とした、座位保持車椅子型ロボットの研究についても報告されている[4][5]。

しかしながら、これらの器具はいずれも座位姿勢が固定されたものであり、患者が姿勢を自由に反らすことは困難である。自由に座位姿勢を変えることが出来なくなってしまうため、ストレスを抱え込んでしまう等の問題が生じる。そこで、本研究では背もたれに加わった力に応じて座位姿勢を変えることが可能な椅子型の装置を開発した。この装置はリクライニング、腰のひねり及び首周りにモータが搭載されており、モータにより駆動する装置となっている。本稿では開発した装置及びリクライニングと腰のひねりにおける制御手法について述べる。

## 2. 3 軸座位保持支援装置と運動制御

### 2. 1 3 軸座位保持支援装置

図 1 に開発した 3 軸座位保持支援装置を示す。この装置はリクライニング、腰のひねり、首周りの 3 箇所がモータによって駆動する。それぞれの可動範囲はリクライニングが 45°、腰のひねりが±30°、首周りが 45°となっている。また、各駆動部には減速機が実装されており、これにより大きなトルクが出力可能となっている。さらにリクライニングにおいては減速比の増加を抑え、良好なバックドライブバビリティを獲得するため、2 個のモータによるツインドライブ方式を採用している。装置に取り付けられている背もたれや座面、首周りのクッションやシートは車椅子型の座位保持器具から移植したものであり、対象となる被験者の体格に合わせて作成されたものとなっている。座面には、股の開き具合を固定するクッションが取り付けられており、背もたれには体の軸を固定するベルトが備え付けられている。表 1 に開発した 3 軸座位保持支援装置の機械的パラメータを示す。



図 1. 3 軸座位保持支援装置

表 1 3 軸座位保持支援装置のパラメータ

Length of the reclining part	1.14 × 10 <sup>3</sup> mm
Weight of the reclining part	17.0 kg
Length of the backrest	540 mm
Seat size	400 mm × 400 mm
Weight of the chair	67.0 kg
Gear ratio of the right side in reclining	96.0
Gear ratio of the left side in reclining	96.0
Gear ratio of the twist of hip	35.8
Gear ratio of the neck	5.00

### 2. 2 リクライニングの運動制御

本装置では力に応じて姿勢の保持と姿勢の変化を切り替えるために、可変コンプライアンス制御を実装する[6]。また、ロバストな加速度制御を実現するために外乱オブザーバを、人が装置に加えた力をトルクとして推定するために反トルク推定オブザーバを実装する[7][8]。図 2 にリクライニングに実装したブロック線図を示す。図中の DOB は外乱オブザーバを、RTOB は反トルク推定オブザーバを

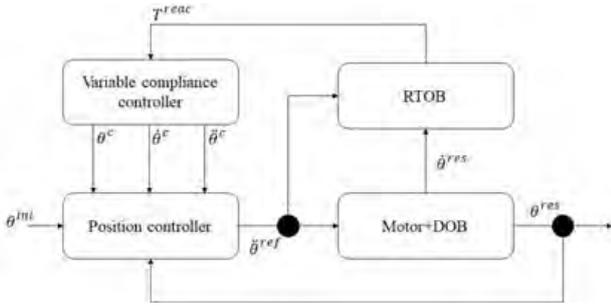


図 2. リクライニングにおける運動制御のブロック線図

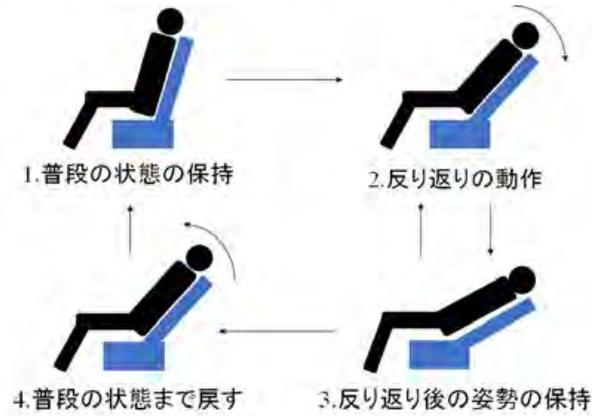


図 3. 座位の状態

示す。 $T^{react}$ はRTOBによって推定された人が装置に加えたトルクを示す。 $\theta^{mi}$ は普段の姿勢を表し、装置に印加された力に応じて生成された角度、角速度、角加速度の変化量を普段の姿勢の角度に加えて演算することによって、姿勢の変化と姿勢の保持を切り替える。

図3に座位の状態図を示す。座位の状態は、1.普段の状態の保持、2.反り返りの動作、3.反り返り後の姿勢の保持、4.普段の状態まで戻す動作の4つに状態分けされる。この4つの状態に応じた生成すべき角度、角速度、角加速度の変化量および状態遷移の条件について述べる。

### 2. 2. 1 普段の状態の保持

普段の状態の保持における可変コンプライアンス制御器によって生成される角度、角速度、角加速度の変化量は(1)式となる。

$$\theta^c = \dot{\theta}^c = \ddot{\theta}^c = 0 \dots (1)$$

(1)式に示すように変化量を0とすることによって、姿勢の保持が可能となる。

普段の姿勢の保持から反り返りの動作への遷移条件は、椅子に印加された力によって決定する。反り返りの動作においては、小さく反る場合と大きく反る場合の2種類があるため、力に応じて反り返り動作における変化量の目標値を設定する。また、過敏な動作を防止するため、待機時間を設ける。この状態における遷移条件は次の通りである。



図 4. 反り返りの動作における力の関係

- a.  $T^{low} < T^{react}$  のとき、 $t_1$ 秒待機する。 $t_1$ 秒後、 $T^{low} < T^{react}$ を満たしている場合、 $T^{react}$ に応じてbまたはcの条件のどちらかを実行する。満たしていない場合は普段の姿勢の保持を継続する。
- b.  $T^{low} < T^{react} < T^{high}$  のとき、変化の目標値  $\theta_{low}$ を設定して、反り返りの動作に移る。
- c.  $T^{react} > T^{high}$  のとき、変化の目標値  $\theta_{high}$ を設定して、反り返りの動作に移る。

$T^{low}$  および  $T^{high}$ はそれぞれ、トルクの閾値を示し、 $\theta_{low}$  および  $\theta_{high}$ はそれぞれ小さく反る場合の変化量の目標値と大きく反る場合の変化量の目標値を示す。 $t_1$ はこの状態における設定した待機時間を示す。

### 2. 2. 2 反り返りの動作

反り返りの動作においては、図4に示すように急な加減速を防止するために、動作開始時は椅子から人に加わる抵抗力を減少させ徐々に加速し、目標角度付近に接近した場合は抵抗力を増加して減速する必要がある。この力関係を満たすよう設計した、反り返り時における可変コンプライアンス制御が(2)式から(5)式である。

$$\ddot{\theta}^c = \frac{(K_f T^{react} - T^{comp})}{M} \dots (2)$$

$$T^{comp} = \left( K_{c1} \left( \theta^c - \frac{\theta^{cmd}}{2} \right)^2 + D_{c1} \dot{\theta}^c + T_{min} \right) \dots (3)$$

$$\theta^c = \frac{1}{s} \dot{\theta}^c \dots (4)$$

$$\dot{\theta}^c = \frac{1}{s} \ddot{\theta}^c \dots (5)$$

(2)式から(5)式中の  $s$  はラプラス演算子を示す。 $K_f$ 、 $K_{c1}$ 、 $D_{c1}$ 、 $M$  はコンプライアンス制御に用いる力ゲインおよび仮想的な弾性、粘性、慣性を表し、それぞれ定数値として用いる。また、 $T_{min}$ は動作中の抵抗力の極小値を示す。 $\theta_{cmd}$ には  $\theta_{low}$  または  $\theta_{high}$  が代入される。(2)式中に示すように、 $T^{react}$ に釣り合うような椅子からの抵抗力  $T^{comp}$  が(3)式によって生成され、(4)式および(5)式に示すようにその積分によって角度および角速度の変化量が生成される。 $\theta_c$  が  $0 < \theta_c < \theta_{cmd} / 2$  の範囲にある場合には抵抗力が減少し、 $\theta_{cmd} / 2 < \theta_c < \theta_{cmd}$  の範囲にある場合には抵抗力が増加する。これにより、図4の力関係を満たすように動作することが可能となる。 $\theta_c \geq \theta_{cmd}$ を満たした場合、反り返り後の姿勢の保持に移行する。

### 2. 2. 3 反り返り後の姿勢の保持

反り返り後の姿勢の保持における可変コンプライアンス制御器によって生成される角度、角速度、角加速度の変化量は(6)式および(7)式となる。

$$\theta^c = \theta^{cmd} \dots (6)$$

$$\dot{\theta}^c = \ddot{\theta}^c = 0 \dots (7)$$

生成される角度を  $\theta_{cmd}$  に固定し、角速度および角加速度を 0 とする。これにより、変化後の姿勢を保持することが可能となる。

また、反り返り後の姿勢の保持から次の動作に移移する場合、遷移する状態が 2 通りあり、元の姿勢に戻る場合があるいはより大きく姿勢を反る場合のどちらかである。遷移条件は次の通りである。

- a.  $T^{reac} < T^{low}$  または  $T^{reac} > T^{high}$  のとき、 $t_2$  秒待機する。 $t_2$  秒後、その条件を満たしている場合、 $T^{reac}$  に応じて以下 b または c の条件を実行する。満たしていない場合は反り返り後の姿勢の保持を継続する。
- b.  $T^{reac} < T^{low}$  のとき、普段の状態まで戻す動作に移る。
- c.  $T^{reac} > T^{high}$  かつ姿勢の保持の変化量が  $\theta_{low}$  の場合、変化の目標値  $\theta_{high}$  を設定して、反り返りの動作に移る。

$t_2$  はこの状態における設定した待機時間を示す。

### 2. 2. 4 普段の状態に戻す動作

普段の姿勢に戻す場合は、急激な変化を防止するために設定した時間によって戻るよう制御する必要がある。その条件を満たすよう設計した、可変コンプライアンス制御によって生成される椅子からの抵抗力は(8)式となる。

$$T^{comp} = K_{c2} \left( \theta^c - \theta^{cmd} \left( 1 - \frac{t}{t_{const}} \right) \right) + D_{c2} \left( \dot{\theta}^c + \frac{\theta^{cmd}}{t_{const}} \right) \dots (8)$$

$K_{c2}$ 、 $D_{c2}$  はコンプライアンス制御に用いる仮想的な弾性、粘性、および慣性を表し、それぞれ定数値として用いる。また、 $t$  および  $t_{const}$  は普段の状態に戻す動作に移移してから経過した時間及び元の姿勢に戻すまでに要する時間を示す。(8)式によって生成された椅子からの抵抗力  $T^{comp}$  を(2)式、(4)式および(5)式に代入することによって、変化すべき角度、角速度、角加速度を得る。これにより、 $t_{const}$  で設定した時間通りに普段の状態に戻ることが可能となる。 $\theta^{cmd}$  が 0 と一致した場合、普段の状態の保持に移る。

### 2. 3 腰のひねりの制御

腰ひねりの動作については、リクライニングと連動して変化しようコンプライアンス制御を設計する。(9)式が腰ひねりの軸におけるコンプライアンス制御となる。

$$T_{hip}^{comp} = K_f T_{hip} - K(\theta_{hip}^c - \alpha \theta_{reclining}^c) - D(\dot{\theta}_{hip}^c - \alpha \dot{\theta}_{reclining}^c) \dots (9)$$

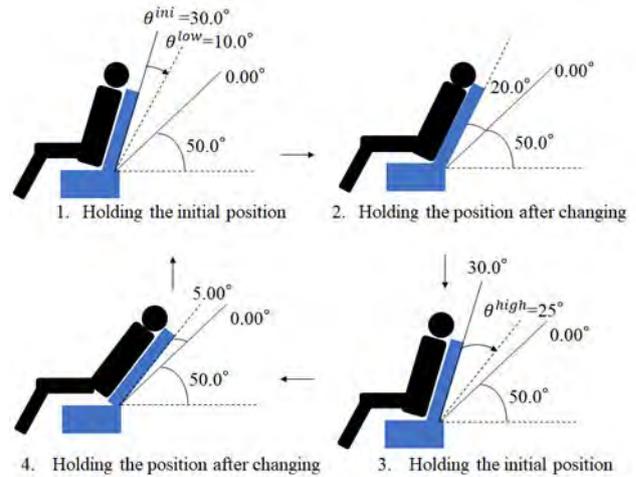


図 5. 実験における座位状態 [9]

(9)式の  $\alpha$  はリクライニングの変化量の倍率を示す。(9)式によって生成された腰ひねりの軸のトルクを(2)式、(4)式および(5)式に代入することによって、変化すべき角度、角速度、角加速度を得る。(9)式に示すように、リクライニングの変化量を用いることで、腰ひねりのコンプライアンス制御の基準角度がリクライニングの変化量となるため、リクライニングに連動して動作する。また、 $\alpha$  の倍率および仮想的な弾性および粘性を設定することで腰ひねりの軸の変化量を変更することが可能となり、腰ひねりのトルクに応じて微調整が可能となる。

## 2. 4 実験

### 2. 4. 1 実験設定

セラピストの方に試乗いただき、図 5 に示すように座位状態が変化するよう装置の背もたれに力を加えた。普段の姿勢から始まり、小さい姿勢変化となるよう小さく力を加えた。その後、加えている力を緩めて普段の姿勢に戻った後、大きな姿勢変化が発生するよう大きな力を印加した。

### 2. 4. 2 実験結果

図 6 から図 9 に実験結果を示す。図 6 および図 7 はリクライニングの角度応答及びトルク応答を示し、図 8 および図 9 は腰ひねりの軸の角度応答及びトルク応答を示す。図 6 および図 7 より、装置に力が加わり、反トルクが赤線で示された閾値  $T_{low}$  を超えた際に、動作しているということが分かる。このとき、7.00s 付近において緑線で示された閾値  $T_{high}$  を超えなかったため、小さい反り返り動作が行われていることが分かる。10.0s 付近では、一度  $T_{high}$  を瞬間的に超えているが、継続的には超えておらず  $T_{low}$  を下回っているため、しばらくしてから元の姿勢に戻っていることが分かる。また、20.0s 以降も同様に、 $T_{high}$  を超えた際に大きな反り返り動作を行っていることが分かる。また、50.0s 付近で  $T_{low}$  を下回ってしばらくしてから、元の姿勢に戻っていることも分かる。

腰ひねりの軸についても同様に図 8 および図 9 より、リ

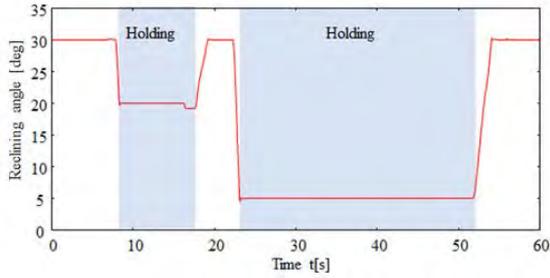


図 6. リクライニングの角度応答 [9]

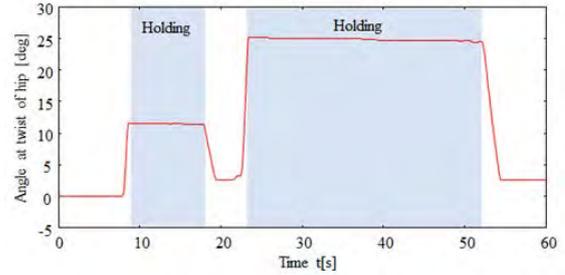


図 8. 腰ひねりの角度応答 [9]

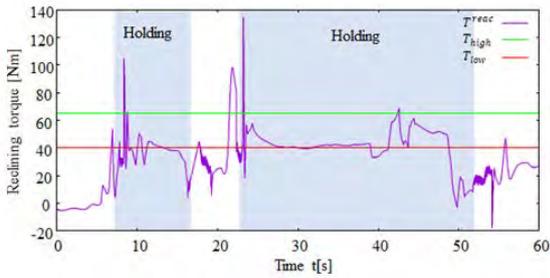


図 7. リクライニングのトルク応答 [9]

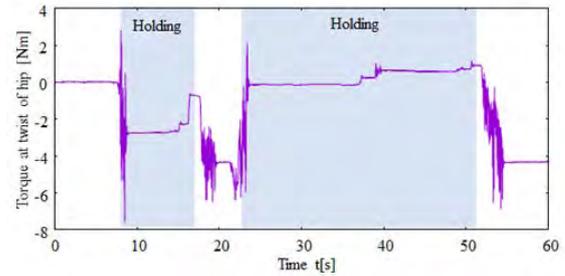


図 9. 腰ひねりのトルク応答 [9]

クライニングと連動して同じ時刻において同じ変化量で動作していることが分かる。特に小さい反り返り動作では、姿勢保持中にトルクが発生しているため 10.0deg からずれて姿勢を保持していることが分かる。以上より、姿勢保持が可能であることが確認できた。

#### 4. 考察及び今後の展望

##### 4. 1 考察

今回の実験では、力に応じて姿勢の保持と姿勢の変化を切り替えるという機能的な部分について有効に動作しているという知見が得られた。しかし、反り返り動作時において姿勢の保持に移行する前に十分に減速せず、急な減速になってしまっていることも確認された。姿勢の保持と姿勢の変化の間に、制御の連続性がないため、姿勢の保持と姿勢の変化を連続して行うコンプライアンス制御の提案が今後必要となる。

##### 4. 2 今後の展望

今後の展望としては、リクライニングの運動制御の改善の他、首周りの制御の設計が挙げられる。また、共同研究先である心身障害児総合医療療育センターの協力の下、臨床試験を実施することを予定している。

#### 【参考文献】

1. C. Morris, "Definition and classification of cerebral palsy: a historical perspective," *Development Medicine and Child Neurology*, Vol. 109, No. 49 pp. 3–7, 2007.
2. L. Maisa, F. Frascarelli, P. Morasso, G. Di. Rosa, M. Petrarca, E. Castelli, and P. Cappa, "Reduced short term adaptation to robot generated dynamic environment in children affected by Cerebral Palsy," *Journal of Neuroengineering and*

*Rehabilitation*, No. 1, Vol. 8, article No. 28, 2011.

3. C. Bayon, R. Raya, S. L. Lara, O. Ramirez, I. Serrano J, and E. Rocon, "Robotic Therapies for Children with Cerebral Palsy: A Systematic Review," *Translational Biomedicine*, No. 1:44, Vol. 7, pp. 1–10, 2016.
4. C. W. Dennis, S. Stansfield, and H. M. Larin, "Feasibility of a mobile robot with alternative control system for a child with cerebral palsy," *Proceedings of the FICCDAT RESNA Conference*, pp. 1–4, Toronto, Canada, 2011.
5. C. Y. Zheng and T. T. Yang, "Development of portable hand cycle for children with cerebral palsy — The Malaysian scenario: Wheelchair propulsion motion," *Proceedings of 2017 IEEE Region 10 Humanitarian Technology Conference*, pp. 873–877, 2017.
6. N. Motoi, T. Shimono, R. Kubo and A. Kawamura, "Task Realization by a Force-Based Variable Compliance Controller for Flexible Motion Control Systems," *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, Vol. 61, No. 2, pp. 1009-1021, February 2014.
7. T. Murakami, F. Yu, and K. Ohnishi, "Torque Sensorless Control in Multi degree-of-freedom Manipulator," *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, Vol. 40, No. 2, pp. 259–265, 1993.
8. K. Ohnishi, M. Shibata, and T. Murakami, "Motion Control for Advanced Mechatronics," *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, Vol. 1, No. 1. pp. 56–67, 1996.
9. N. Togashi, T. Shimono, T. Nozaki, T. Shibata, Y. Aoyama, and Y. Kitahashi, "Development and motion control of three-axis seating posture holding assist chair for cerebral palsy patient," *LIFE 2019*, OS 10-1, Kanagawa, Japan, September, 2019.

## 業 績

### 【原著論文】

1. 中村 堯子, 下野誠通  
負荷側オブザーバのノミナル剛性設計に基づく柔軟マニピュレータの位置制御  
電気学会産業応用部門誌, **139**, **8**, 681-688 (2019).
2. 桑原 央明, 溝口 貴弘, 下野誠通, 大西公平  
発電機点検の合理化に向けた力センサレス打振検査デバイスの開発  
精密工学会誌, **86**, **1**, 120-125 (2020).
3. 松永 卓也, 大西公平, 和田 則仁, 北川 雄光  
力触覚伝達機能を備えた細径軟性把持鉗子ロボットの開発  
電気学会論文誌D (産業応用部門誌), **139**, **2**, 966-972 (2019).
4. Y. Hatta and T. Shimono  
Analysis and Experimental Verification of Cross-coupled 2-DOF SPM Motor with Halbach Array  
IEEJ Journal of Industry Applications, **9**, **2**, 177-190 (2020).

### 【総説】

1. 大西公平, 下野誠通  
力触覚伝送を実現するリアルハプティクス機能材料, **2019** 年 7 月号, 3-11.
2. 溝口 貴弘, 永島 晃  
「AbcCore」で実現するリアルハプティクス機能材料, **2019** 年 7 月号, 12-21.
3. 下野誠通, 大西公平, 溝口 貴弘, 松永卓也, 浅井洋  
リアルハプティクス技術を用いた外科支援手術ロボット  
腎臓内科・泌尿器科, **2019** 年 11 月号, 471- 476.
4. 野崎 貴裕, クローズアップ! 農業最新技術  
軟弱な果実を取り扱えるロボットハンドを開発し、カンキツ類の選果作業の自動化を目指す  
農耕と園芸, **2019** 年 冬号, 62-65.

### 【招待講演】

1. 下野誠通  
力触覚のデジタル化を実現する医療デバイス  
JST ものづくり技術 新技術説明会, **2019** 年 5 月, 東京

2. 永島 晃  
人の繊細さ・優しさを遠隔化・自動化するリアルハプティクス技術  
Smart Sensing 2019 Innovation Summit, **2019** 年 6 月, 東京
3. Tomoyuki Shimono  
Real Haptics and Its Medical Applications  
The 5th Vietnam International Conference and Exhibition on Control and Automation, VCCA2019, **2019** 年 9 月, ベトナム・ハノイ
4. 下野誠通  
リアルハプティクスが拓く未来医療  
新川崎・創造のもり 新川崎(K2)タウンキャンパス オープンセミナー リアルハプティクス技術が拓くイノベーション, **2019** 年 11 月, 川崎
5. 大西公平, 下野誠通, 松永卓也, 浅井洋, 溝口 貴弘  
リアルハプティクスによる手術支援ロボットの革新  
日本内視鏡外科学会総会, **2019** 年 12 月, 横浜

6. Kouhei Ohnishi  
Haptics-Led Innovation for Coming Society  
2019 IEEE International Electron Devices Meeting, IEDM2019, **2019** 年 12 月, アメリカ・カルフォルニア
7. 下野誠通  
感触を伝える力触覚ロボット  
藤沢ロボット産業研究会, **2020** 年 1 月, 藤沢

### 【口頭発表】

1. T. Shimono, S. Takano, and H. Asai  
Development of DC Linear Permanent Magnet Machine based on Multi-Layered Core-less Structure  
The 10th International Conference on Power Electronics, ICPE2019, **2019** 年 5 月, 韓国
2. T. Matsunaga, H. Asai, T. Shimono, and K. Ohnishi  
Multi DoF Robotic Platform using Large Circular Linear Motors for Haptic Surgical Robots  
The 28th IEEE International Symposium on Industrial Electronics, ISIE2019, **2019** 年 6 月, カナダ
3. C. Soneda, H. Asai, Y. Hatta, T. Shimono, and K. Ohnishi  
Design and Analysis of Core-less Multi-layered Axial Motor  
The 28th IEEE International Symposium on Industrial

- Electronics, ISIE2019, 2019年6月, カナダ
4. 八田禎之, 下野誠通  
埋込磁石型クロスカップル二自由度モータにおけるセンサレス制御のための位置推定法  
マグネティクス/リニアドライブ合同研究会, 2019年6月, 長野
  5. N. Tojo, T. Tashiro, M. Yokoyama, T. Shimono, R. Oboe, T. Mizoguchi, and K. Ohnishi  
Communication Delay Compensation for Precise Force Matching in Teleoperation,  
The 17th IEEE International Conference on Industrial Informatics, INDIN2019, 2019年7月, フィンランド
  6. 下野誠通  
リアルハプティクスを応用した次世代医療システム  
第3医工融合連携マッチング例会, 2019年8月, 大阪
  7. 鳥海宗太郎, 堀越幹生, 下野誠通, 松永卓也, 景山達斗, 福田淳二  
毛髪再生医療のための植毛動作支援に向けた環境インピーダンス推定による層変化検  
産業応用部門大会, 2019年8月, 長崎
  8. 矢島正大朗, 下野誠通, 富樫信之, 大西公平, 太田喜久子, 平尾美佳, 真志田祐理子, 加藤星羅  
双腕型介護支援ロボットの開発に向けた起き上がり介助の動作解析  
産業応用部門大会, 2019年8月, 長崎
  8. 富樫信之, 下野誠通, 野崎貴裕, 芝田利生, 青山祐樹, 北橋由貴  
脳性麻痺患者のための3軸座位保持支援装置の開発と運動制御  
LIFE2019, 2019年9月, 横浜
  9. T. Matsunaga, T. Shimono, H. Asai, and K. Ohnishi  
Force Sensorless Haptic Probe Driven by Large Circular Linear Motor for Haptic Rendering  
The 45th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, IECON2019, 2019年10月, ポルトガル
  10. A. Zignoli, F. Biral, K. Yokoyama, T. Shimono  
Including a musculoskeletal model in the control loop of an assistive robot for the design of optimal target forces  
The 45th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, IECON2019, 2019年10月, ポルトガル
  11. T. Sugimoto, T. Nozaki, and T. Murakami  
Extended T-Type Boost Inverter Using Switched Capacitors  
The 45th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, IECON2019, 2019年10月, ポルトガル
  12. Y. Yamada, T. Nozaki and T. Murakami  
Observer Structure Considering Reluctance Torque of IPMSM for Noise Resistance  
The 45th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, IECON2019, 2019年10月, ポルトガル
  13. K. Sugihara, T. Nozaki, and T. Murakami  
Continuously Variable Transmission by High-speed Path Switching of Linear Electro-hydrostatic Actuator  
The 45th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, IECON2019, 2019年10月, ポルトガル
  14. Y. Saito, S. Shimmyo, T. Nozaki and K. Ohnishi  
A Controller Design Method of Bilateral Teleoperation for Velocity Control Driver  
The 45th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, IECON2019, 2019年10月, ポルトガル
  15. S. Shimmyo, Y. Saito, T. Nozaki, and K. Ohnishi  
Bandwidth Expansion of Bilateral Teleoperation Based on Synergy of Observer Gain and Velocity Feedback Gain  
The 45th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, IECON2019, 2019年10月, ポルトガル
  17. T. Iijima, T. Matsunaga, T. Shimono, K. Ohnishi,  
Development of a Multi DOF Haptic Robot for Dentistry and Oral Surgery  
2020 IEEE/SICE International Symposium on System Integration, SII2020, 2020年1月, アメリカ
  18. T. Sugimoto, T. Nozaki, and T. Murakami  
Extended T-Type Boost Inverter for Capacitance Reduction  
The 21st International Conference on Industrial Technology, ICIT2020, 2020年2月, アルゼンチン
  19. Y. Yamada, T. Nozaki and T. Murakami  
Independent Drive of Multiple AC Motors Using Amplitude Modulation  
The 21st International Conference on Industrial Technology, ICIT2020, 2020年2月, アルゼンチン
  20. M. Fukui, G. Kokubun and T. Nozaki

Visualization of Important Human Motion Feature Using Convolutional Neural Network

The 21st International Conference on Industrial Technology, ICIT2020, 2020年2月, アルゼンチン

21. T. Matsunaga, T. Shimono, T. Mizoguchi, K. Ohnishi, T. Yukinari and M. Ui

Verification of Relation Between Ultrasound Image and Haptic Data Obtained by Tele-echography System Implementing Bilateral Control

The 6th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization, 2020年3月, 東京

22. N. Togashi, T. Shimono, T. Nozaki, K. Ohnishi, T. Shibata, Y. Aoyama and Y. Kitahashi

Motion Control Based on Sigmoid Function in Three-axis Seating Posture Assist Chair for Person with Cerebral Palsy

The 6th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization, 2020年3月, 東京

23. T. Iijima, T. Matsunaga, T. Shimono, K. Ohnishi, S. Usuda and H. Kawana

Work Space Control of Parallel Manipulator by Levenberg Marquardt Method

The 6th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization, 2020年3月, 東京

24. C. Soneda, H. Asai, T. Shimono and K. Ohnishi

Mathematical Modeling and Experimental Validation of Core-less Multi-layered Axial Motor

The 6th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization, 2020年3月, 東京

25. T. Okano, T. Nozaki and T. Murakami

Development of Neural Network-based Explicit Force Control for Step Command

The 6th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization, 2020年3月, 東京

3. CEATEC2019, 幕張メッセ, 2019年10月15日～18日

4. 第3回未来医療ロボット技術シンポジウム, KSP 西棟3階, 2019年11月7日

5. 第32回日本内視鏡外科学会総会, パシフィコ横浜, 2019年12月5日～7日

6. ロボット産業研究会, 湘南産業振興財団 ロボテラス, 2020年1月22日

#### 【特許】

国内特許出願 2件

国外特許出願 1件

#### 【展示会】

1. 健康未来 EXPO2019, ポートメッセなごや, 2019年4月1日～7日

2. Smart Sensing2019, 東京ビッグサイト, 2019年6月5日～7日

# 「革新的高信頼性セラミックス創製」プロジェクト

プロジェクトリーダー 多々見 純一

## 【基本構想】

本プロジェクトは、平成 25 年 4 月より実施した戦略的研究シーズ育成事業の成果をさらに展開し、革新的な機能と信頼性を有するセラミックス材料を創製し、これを低炭素社会の実現に大きく貢献する分野を中心に応用展開することを目的としたものである。具体的には、

○高効率高出力 LED 照明の社会実装を推進するための透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体の開発、および、これを含めた各種セラミックスの機械的信頼性の向上するための

○材料のメソスケール破壊特性評価法と

○光コヒーレンストモグラフィーによるセラミックス内部構造形成過程のリアルタイム 3 次元観察法の確立と広範な実部材への適用に関する研究

を進める。本研究で得られる成果は、エネルギー供給に伴う温室効果ガスの発生抑制とともに、分散型エネルギーシステムの推進に大きく貢献すると期待される。

## 1. 2019 年度の研究目的

電池、フィルター、断熱材、風力発電、医療など非常に広範な分野を支えるセラミックス材料が開発されているが、これらを実用化するためには、機能と機械的信頼性の両方が重要である。本プロジェクトは、革新的で高い機械的信頼性を有するセラミックスを創製することを目的として、プロジェクト 3 年目となる 2019 年度は、以下の各項目を重点項目として研究開発を進めた。

### (1) 透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体の開発

照明の LED 化は、神奈川県地球温暖化対策計画（2016 年 10 月改訂）にあるように低炭素社会実現のために有効な手段であることは言うまでもない。また、2016 年 5 月に閣議決定された地球温暖化対策計画においても、LED 等の高効率照明を 2030 年までにストックで 100% 普及することを目指すこととなっている。現在、白熱電球や蛍光灯の代替として LED 照明が普及しつつあるが、高出力 LED 照明は普及が十分に進んでいるとはいえない。現在の最も典型的な LED 照明では、UV、紫色あるいは青色 LED を励起光源として、これに樹脂に分散させたサイアロン蛍光体からの赤や緑、黄色の発光を併せて白色を実現している。LED 照明においては、励起光源から発生した熱や光に起因した樹脂の劣化により光束減少が生じて寿命となる。特に、高天井用照明や屋外インフラ用照明、スタジアムなどの投光器、大型プロジェクターなどの高出力 LED 照明の発熱量は大きく樹脂の劣化は顕著であり、蛍光体関連部材の耐久性の欠如が高出力 LED 照明の社会実装のボトルネックとなっていた。これを解決するためには、耐熱性の高いセラミックスを利用することが極めて有効である。

2019 年度は、透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体開発のための冷間静水圧加圧装置を導入した成形条件の最適化、粉体プロセスの高度化について引き続き検

討を進め、黄色に発光するセラミックスバルク体の透光性向上について検討した。さらに、高熱伝導率マトリックスとしての AlN セラミックスの透光性向上、および、低融点ガラスをマトリックスとした蛍光体粒子分散ガラスの開発、常温緻密化プロセスによる蛍光体粒子分散 MgO セラミックスの開発も進めた。

### (2) メソスケール破壊特性評価法の確立と高信頼性材料設計の研究

環境エネルギー分野や安心・安全な社会を支える重要な各種構造用セラミックスや機能性セラミックスの研究開発が進められている。これらの材料は社会実装が近づくにつれて、機械的信頼性の向上や耐久性の確保への要求が高まっているが、現時点で、高信頼性化のための材料設計やその基礎となる破壊現象の理解は十分なされていない。セラミックスの破壊の素過程はこれを構成する要素の破壊である。従って、セラミックスの機械的信頼性や耐久性は、結晶粒子や粒界といった構成要素と同程度のサブ

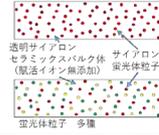
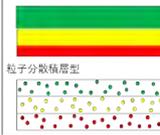
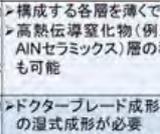
	全蛍光体型	粒子分散型	積層型
	各色 単一相サイアロン 	蛍光体粒子 1種 透明サイアロンセラミックスバルク体 (駆逐イオン無添加) サイアロン 蛍光体粒子  蛍光体粒子 多量	全蛍光体積層型  粒子分散積層型 
特長	<ul style="list-style-type: none"> <li>単一相で作製可能</li> <li>工程数が少なく簡便</li> <li>α-SiAlON、β-SiAlON、CaAlSiN<sub>2</sub>で実績あり</li> <li>蛍光体濃度が高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>蛍光体濃度調整による励起光 (青色・UV光) の透過率・反射率を制御可能</li> <li>多種類のサイアロン蛍光体粒子の分散も可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>構成する各層を薄くできる</li> <li>高熱伝導窒化物 (例えば AlNセラミックス) 層の導入も可能</li> </ul>
プロセス	<ul style="list-style-type: none"> <li>励起光 (青色・UV光) 透過型では、励起光透過のため薄くする必要あり</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>サイアロン蛍光体粒子の均一分散</li> <li>ミクロスケールも含めた焼結挙動の制御</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ドクターブレード成形などの湿式成形が必要</li> <li>同時焼成のための焼結収縮挙動の制御</li> </ul>
性能上	<ul style="list-style-type: none"> <li>α-SiAlON、β-SiAlON、CaAlSiN<sub>2</sub>以外での検討</li> <li>さらなる透光性の向上</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>蛍光体粒子の分散形態設計による励起光透過率と発光特性の制御</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>左記全蛍光体型と粒子分散型と同じ</li> <li>光源を含めた色度調整のための各層の厚み制御</li> </ul>

図 1 本研究で研究を進める透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体の概念図

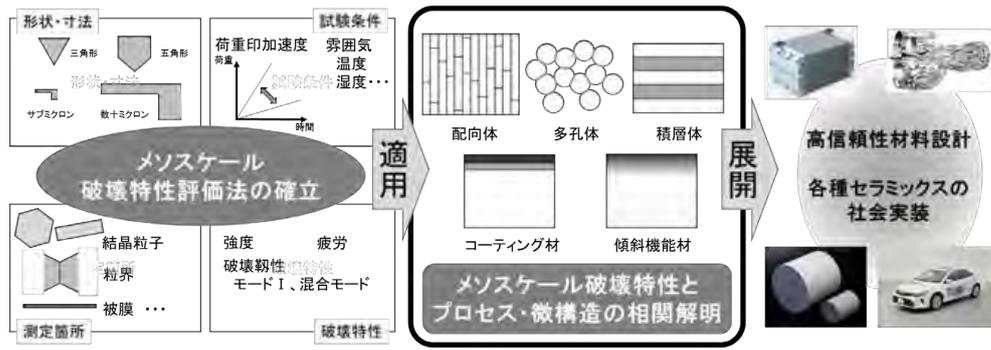


図2 メソスケール破壊特性評価法の確立と高信頼性材料設計の研究の概念図

μm から数十 μm スケールの領域、すなわち、メソスケールでの破壊特性に支配される。しかし、その実測データはなく高信頼性材料の設計と創製の足かせとなっていた。これまでに研究を進めてきたマイクロカンチレバー法によるメソスケール破壊特性評価法の確立を目指した研究を行う。

平成30年度は、単結晶 Si および各種 SiC を試料として用いてマイクロカンチレバー試験片を加工し、この破壊試験を行い、マイクロカンチレバー試験片の寸法や材料の結晶性とメソスケール力学特性の相関を明らかにすることを目的とした。また、多孔質 SiC に関しては、メソスケール破壊特性とバルク体の強度の相関についても検討した。

(3) 光コヒーレンストモグラフィーによるセラミックスの構造形成過程のリアルタイム3次元観察

セラミックスの各種機能はその構造に強く依存することから、優れた特性と高い信頼性を有するセラミックスを開発するためには、内部構造の理解と制御に関する知見を得なければならない。セラミックスの内部構造は、原料粉体からスラリー、成形体、焼結体に至るまでプロセス中に大きく変化することが知られており、その内部構造の形成

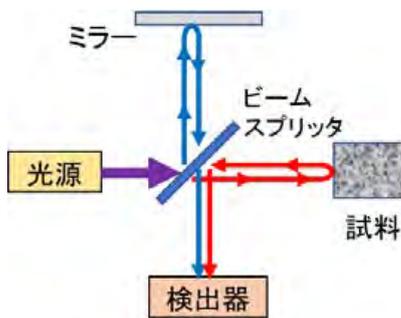


図3 光コヒーレンストモグラフィーの概略図

表1 光コヒーレンスと他の観察手法の比較

手法	3D	非破壊	深さ	速度	分解能	価格
光学顕微鏡	×	×	×	ビデオレート○	数μm○	○
共焦点顕微鏡	○	○	×	数min△	数μm○	○
X線CT	○	○	○	数十min~10h×	数μm○	×
超音波CT	○	○	○	ビデオレート○	約100μm×	○
FIB-SEM	○	×	×	破壊観察×	<1μm○	×
OCT	○	○	○	ビデオレート○	数μm○	○

過程を観察することが重要である。これまでに、光学顕微鏡、X線CTなどの手法でこれらの内部構造観察が行われてきたが、製造プロセス中に3次的に刻々と変化する構造を観察できる手法がなく、内部構造の形成過程に関する知見は十分ではなかった。光コヒーレンストモグラフィー(OCT)は、光の干渉を利用して内部構造の観察が可能な手法であり、他の内部構造観察手法と比較して、3次元、非破壊、高速、安価、高分解能と高い優位性を有している。

平成30年度は、OCTによるセラミックススラリー、成形体、焼結体の内部構造観察手法の確立を目指して、乾式成形過程、脱脂過程、焼結過程、スラリーへのせん断場印加時の内部構造のその場観察を進めた。

2. 2019年度の研究成果

以下に挙げるのは、2019年度の具体的な研究成果である。

(1) 透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体の開発

透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体の開発  
サイアロンセラミックスバルク体の透明化は、超高压静水圧加圧成形による成形体の均質性向上を中心に研究を進めた。その結果、150℃に温度を上げた静水圧加圧により、ガス圧焼結のみの焼成で95%以上の高い密度の焼結体が得られた。得られたEu賦活Ca-α-サイアロンセラミックスをレーザー励起で発光させたところ、強い白色発光が確認された。また、ビーズミルによる原料粉体の微細化についても検討した。原料のうち、Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>粉体のみをビーズミル処理することにより、優れた蛍光特性を示しながら、従来よりも低温での緻密化できることを明らかにできた。さらに、各種希土類添加物を変化させた実験も行い、HoからLuにかけての原子番号の大きな希土類元素の酸化物を添加することが、サイアロンセラミックスの透明化に非常に有効であることも見いだすことができた。特に、Ho、Er、Tm、Ybを添加した透明体はレーザー光源等への展開も期待され、引き続き検討を進めていく。

高い熱伝導率を有するAlNについても透光性の向上に関する検討を行い、分極率の大きな希土類元素としてDyやGdの酸化物を焼結助剤として用いることで透光性が向上することやMnを共添加することで、紫外線だけでなく、熱や機械的刺激によっても発光する透明バルク体

を得ることに成功した。低温での焼結を目指して、窒化物蛍光体粒子分散 h-BN/ガラス複合材料を作製し、分散した蛍光体が劣化しないこと、および、h-BN の配向により熱伝導率が向上することを確認した。また、MgO をマトリックスとして、高い静水圧印加と水の添加による化学反応を利用した常温緻密化プロセスにより蛍光体粒子の固定化を行った。得られた窒化物蛍光体粒子分散 MgO は原料と変わらない発光特性と高い熱伝導率を示すことが明らかとなった。特に、従来にない材料である後者の窒化物蛍光体粒子分散 MgO セラミックスは企業からの引き合いも多く、2社に対して有償にてサンプル提供を行った。

## (2) メソスケール破壊特性評価法の確立と高信頼性材料設計の研究

単結晶 SiC の機械的特性を評価したところ、単結晶 Si と同様に塑性変形が生じること、引張応力下でも転位に起因していると考えられる結晶格子の不整合を生じること、および、小さな試験片では理論強度と同程度の曲げ強度が得られることを明らかにした。また、この考え方を単結晶ダイヤモンドにも適用し、100GPa 程度の高い曲げ強度の実測に成功するとともに、塑性変形も生じている可能性を示した。

本手法でのメソスケール破壊特性の測定環境を拡張するために、水中での破壊試験も実施した。その結果、使用する圧子の径を小さくすることで水中においても正確に荷重と変位を測定できること、および、マイクロカンチレバー試験片を用いて測定したシリカガラスの水中でのメソスケールの強度は空気中よりも 30% 増加することを発見した。

## (3) 光コヒーレンストモグラフィーによるセラミックスの構造形成過程のリアルタイム 3次元観察

スラリーのせん断場印加に伴う構造の変化、成形体中の空隙の変化、焼結体中の OCT 信号の減衰曲線についての検討、脱脂過程における成形体内部構造と重量変化、および、生成ガス分析の同時評価を行い、OCT の適用範囲を拡大した。また、アルミナセラミックスの OCT 信号の減衰曲線から密度分布を可視化することにも成功した。特に、平成 30 年度に導入した 3次元構造解析ソフトウェアを利用した OCT 像の定性的・定量的評価は、セラミックスのスラリー、成形体、焼結体の内部構造に関する知見を得る上で重要であることが確認された。さらに、新たに導入した中心波長 1.7 $\mu\text{m}$  の OCT を用いて、アルミナセラミックスの内部構造を観察したところ、中心波長 1.3 $\mu\text{m}$  の OCT と比較して、深部まで不均質構造を観察可能であることを明らかにした。また、微構造観察を行ってきた YSZ 成形体の荷重印可下での MSC についても検討し、一軸応力によらず密度に関する MSC を作成できることを明らかにした。

## 常温緻密化プロセスによる

# Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子分散 MgO バルク体の開発

高橋 拓実、高橋 絵美、多々見 純一、李 穎、横内 正洋

### 1. はじめに

本プロジェクトでは、高出力半導体照明向けの高熱伝導率蛍光部材として、高い透明性を有する Eu 賦活の Ca- $\alpha$  SiAlON など、セラミックスを基とする新規蛍光部材の開発を様々なアプローチで進めてきた。マトリックスとしてセラミックスを採用する場合、励起光の深達や蛍光の効率的な取り出しなどに直接的に係るマトリックス部の透明化は解決すべき課題である。従来、セラミックスの透明化は、光学的不均質領域の生成を抑制しなければならず、このために高温焼結が不可欠とされてきた。我々もこれまで、SiAlON 系セラミックスの透明化のために粉体プロセスに立脚した成形体中の粒子集合構造制御と、高温での熱間等方圧 (Hot Isostatic Press: HIP) 焼結などでサブミクロン級の微細な粒子径の粒子からなる緻密な微構造を実現してきた。他方、高温焼結は蛍光体粒子を変質、劣化させる原因となるため、材料設計を制約し、一部の蛍光体 (Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> など) への応用が困難だった。

近年、米国の Randall らによって、酸化物系の機能性材料をメインターゲットに Cold sintering 法で作製した緻密なセラミックスが様々報告されている。その基本的なメカニズムは 1000°C 以下の加温と最大 500 MPa の一軸加圧で促進された液相を介した物質移動による緻密化である。液相へ溶解する物質という制限があるものの、1000°C を超える高温焼成なしに相対密度 95% 以上を達成するなど、有望な低温焼結技術である。他方、加圧が一軸方向であるため、異方的な加圧に起因する不均質領域の生成が本質的な課題としてある。また、1000°C 以下の加温や、ペースト調製のために大量の液相を必要とする点も、蛍光体粒子の変質や劣化の観点で課題である。

そこで本研究では、成形体内の粒子充填構造の均質性向上により不均質領域の生成を抑制しつつ、常温で化学反応を促進するために、少量の液相添加と最大 1 GPa の冷間静水圧プレス (Cold Isostatic Pressing: CIP) からなる常温緻密化プロセスにより、各種サイアロン蛍光体を分散固定させた MgO セラミックスを実現することを目的とした。MgO は、①高出力半導体照明として利用することを想定した材料特性 (可視光域で透明で、かつ本質的に 10 W/m $\cdot$ K 以上の高熱伝導性) と、②常温緻密化プロセスへの適用性 (液相に対する溶解性) の観点から選定した。本稿では、①マトリックスとなる MgO の緻密化を達成するための基礎的検討として行った、粒子径が異なる MgO 粉体の混合

割合が成形体、常温緻密化体の相対密度に及ぼす影響と②赤色蛍光体である Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子の固定化に関する成果について報告する。

### 2. 実験と結果

#### 2. 1 常温緻密化による MgO バルク体の作製

原料粉体として、平均粒子径が異なる 2 種類の MgO (A 粉: 11  $\mu$ m、B 粉: 50 nm) を用いた。粗大な A 粉と微細な B 粉は、重量比で 0:10~10:0 の所定の比率になるよう秤量した後、自転公転ミキサーで乾式混合した。その後、一軸プレス法 (50 MPa、30 秒) で予備成形を行い、さらに 1 GPa (比較として 200 MPa) で 1 分保持の条件で CIP 成形を行って成形体を得た。さらに、反応前後の体積増加率を踏まえ、粉体全量に対して 10 wt% の蒸留水を成形体中含浸させた後、1 GPa で 60 分保持の条件で常温緻密化のための CIP 処理を行った。

作製した試料の相対密度は、寸法変化と重量測定により算出した。この時、基準となる理論密度は、含浸させた蒸留水が全て反応に寄与したものと仮定して計算した。

#### 2. 2 Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子分散 MgO バルク体の作製

原料粉体として、平均粒子径が 50 nm の MgO 粉体と市販の Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粉体を用いた。これらを乳鉢で 3 分乾式混合した後、一軸プレス法で 50 MPa、30 秒の条件で予備成形し、200 MPa で 1 分の条件で CIP 処理を行った。さらに、粉体全量に対して 10 wt% の蒸留水を成形体中含浸させた後、1 GPa で 60 分保持の条件で常温緻密化のための CIP 処理を行った。

作製した試料の相対密度は、寸法変化と重量測定により算出した。この時、基準となる理論密度は、含浸させた蒸留水が全て反応に寄与したものと仮定して計算した。蛍光スペクトルは量子効率測定システム (QE-2000、大塚電子 (株) 製) で測定 (反射モード) した。

### 3. 結果と考察

#### 3. 1 常温緻密化による MgO バルク体の作製

図 1 は、原料粉体の混合割合と相対密度の関係である。図 1 (A) は、一般的な CIP 成形圧力である 200 MPa との比較である。まず、粗大な A 粉の重量割合が 70 wt% の時、最も密度が高くなる傾向が一軸プレス法による予備成形の段階でみられ、本傾向を踏襲するように CIP 成形後の密

度が変化した。これは、粗大な A 粉の粒子の間隙を微細な B 粉が埋めるように密に充填した結果と考えられる。また、CIP 圧力については、200 MPa よりも 1 GPa の方が、相対密度を大きく向上させることがわかった。これは、高圧を印加することにより粒子の再配列が促進され、より密に粒子が詰まったためと考えられる。以上の結果より、相対密度の観点から最適と考えられる原料粉体の混合割合は、粗大な A 粉と微細な B 粉の重量比が 7:3 で、さらに常温緻密化前の CIP 条件は 1 GPa がより好ましいことがわかった。本知見を踏まえ、さらに水含侵後に 1 GPa で 60 分保持した結果を図 1 (B) に示す。水含侵後の CIP 処理でさらに相対密度が向上し、高温焼結を経ることなく、90%以上の緻密化を達成した。図 2 は、作製した MgO バルク体 (粗大な A 粉が 70wt%) の外観写真である。本写真は、水含侵後に 1 GPa で 60 分保持の条件で CIP 処理した試料を手研磨で 0.5mm まで薄片化 (鏡面研磨なし) し、背面から白色光を照射している状態である。図 2 より、背面の黒線が視認できる程度の透光性を有していることがわかる。しかしながら、本条件では緻密化が不十分で、内部に散乱源となる不均質領域が多数存在していることがわかった。また、図 1 (B) に示すように、同程度の相対密度を達成した粗大な A 粉が 100 wt% の試料では、透光性はなかった。本結果は、水含侵前の CIP 処理後の成形体中の粒子集合構造が重要な制御因子であることを示唆しており、より精緻な制御でさらなる高密度化が期待できる。

### 3. 2 Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子分散 MgO バルク体の作製

図 3 は、Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子を 1、5、10 wt% の各濃度で添加し、分散固定化した MgO バルク体の外観である。図中に相対密度も示した。図 2 に示したような、粗大な MgO 粒子と微細な MgO 粒子を組み合わせたものと比べて相対密度は 80% と低いものの、添加した Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子が全体的に分散し、MgO マトリックスと一体化して固定されている様子がわかる。また、添加濃度が高くなるにつれて Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> に起因する赤色が明瞭になっていることがわかる。

図 4 は、Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子分散 MgO バルク体の蛍光スペクトルである。励起光は 460nm の青色光とした。図 4 より、添加濃度が高くなるにつれて蛍光強度が高くなっていることがわかる。他方、5 wt% と 10 wt% で蛍光強度の差が小さい。これは、緻密化が十分でないために、内部での散乱の影響が大きく、①励起光の内部への深達度が低下し、さらに②表面より深部に存在する Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子由来の蛍光が系外に出てこなかったことに起因すると思われる。

### 4. 今後の展望

本稿では、開発している高出力半導体照明向けの高熱伝導率蛍光部材の一例として、常温緻密化プロセスによる Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子分散 MgO バルク体の開発の基盤的成果について報告した。本研究に関連する最先端の成果は、

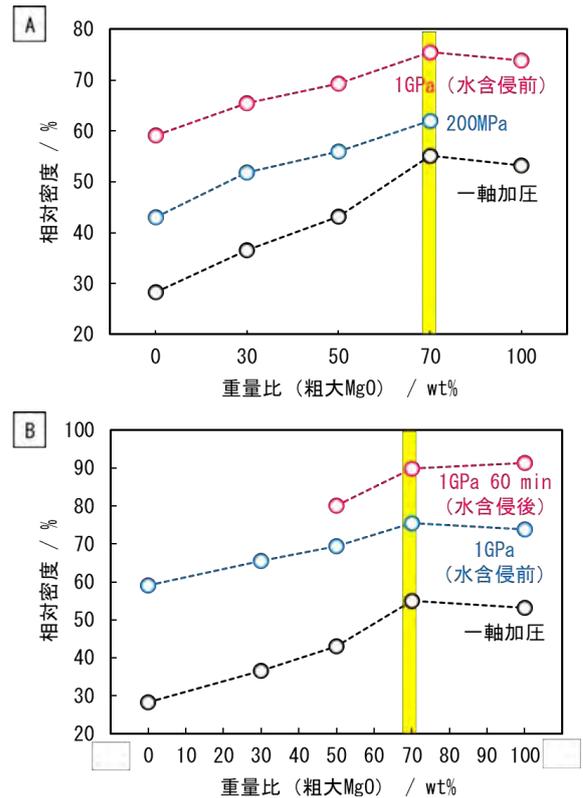


図 1 原料粉体の混合割合と相対密度の関係



図 2 MgO バルク体の外観 (粗大 MgO 70wt%)



図 3 Eu 賦活 CaAlSiN<sub>3</sub> 粒子分散 MgO バルク体の外観

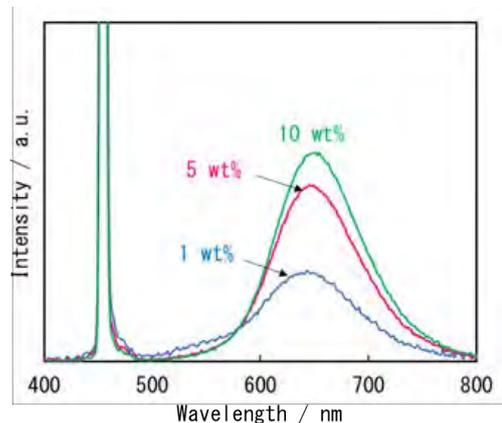


図 4 蛍光スペクトル (励起光 : 460nm)

## 【研究開発部】革新的高信頼性セラミックス創製

学術論文誌に投稿する都合により控えたが、本稿で示したいくつかの解決すべき問題はすでに踏破（例えば、相対密度は95%を達成している）しており、材料メーカーや部材メーカーから具体的な問い合わせがあるなど、社会実装化に大きく近づいている状況である。他方、常温緻密化プロセスのメカニズム解明にも着手しており、技術的な課題はいくつかあるものの、化学反応場と応力場の重畳により実

現されるユニークな焼結機構の一端が、徐々に見え始めてきている。今後も引き続き、精力的に研究を進めたい。

### 【参考文献】

1. M. Ohtsu, *Optoelectronics*, **10**, 147 (1995).

# メソスケール破壊特性評価法の確立

高橋 拓実、矢矧 東穂、飯島 志行、多々見 純一

## 1. はじめに

環境エネルギー分野や安心・安全な社会を支える重要な各種構造用セラミックスや機能性セラミックスの研究開発が進められている。これらの材料は社会実装が近づくにつれて、機械的信頼性の向上や耐久性の確保への要求が高まっている。しかし、現時点で、高信頼性化のための材料設計やその基礎となる破壊現象の理解は十分なされていない。

セラミックスの破壊の素過程はこれを構成する要素の破壊である。従って、セラミックスの機械的信頼性や耐久性は、結晶粒子や粒界といった構成要素と同程度のサブ $\mu\text{m}$ から数十 $\mu\text{m}$ スケールの領域、すなわち、メソスケールでの破壊特性に支配される。これまでに、有限要素法によるき裂進展シミュレーションや理論解析などが行われ、材料の強度や破壊靱性を予測する試みがなされている。この計算を妥当に行うためには、メソスケールの強度や破壊靱性を用いなければならないが、使用可能な信頼できるデータは限られていた。また、量子力学計算等による結晶粒子や粒界の破壊現象の理解の試みも行われているが、計算結果の妥当性を検証するためには実験値と比較しなければならない。単結晶やバイクリスタルを擬似的な結晶粒子や粒界と見なして実験的に破壊特性を評価することが検討されている。しかし、バルクな単結晶やバイクリスタルで実験できる物質系はわずかであり、セラミックスの計算科学を支援するには多様な材料系での破壊特性に関する情報が必要であった。これらの課題はメソスケールの破壊特性の実測で解決できると考えられる。しかし、これまでそのような研究はなく、セラミックスの破壊現象の理解と高信頼性材料設計は不十分なままであった。

これを受けて我々のグループでは、集束イオンビーム加工装置を利用して断面が縦横数 $\mu\text{m}$ 、長さが約 $10\mu\text{m}$ のマイクロカンチレバー試験片を加工し、これをナノインデントで破壊試験することで、微小領域の強度や破壊靱性を測定できる革新的手法を提案した。これまでに、バルクな単結晶やバイクリスタルを作製することができない $\text{Si}_3\text{N}_4$ セラミックス中の単一粒子(=単結晶)および粒界の破壊靱性の実測に世界で初めて成功し、定性的な議論に留まっていた $\text{Si}_3\text{N}_4$ セラミックス中の粒界破壊靱性の希土類添加物依存性も実験的に解明するなど研究を進めている。この新規な方法は現時点で一部の材料での検討であるが、従来得ることのできなかった領域の強度と破壊靱性を実際の部材を用いて実測できる点で極めて有用である。この手法を拡張し、多様な構造の部材に対して、他の破壊特性も含めてメソスケールで評価可能になれば、破壊現象の理解に

基づく高信頼性設計による各種セラミックスの社会実装に大きく貢献することができる。

そこで本プロジェクトでは、セラミックスの破壊を支配するメソスケール破壊特性の評価法確立と微構造因子との相関解明、および、これを活用した高信頼性材料の設計と創製を行うことを目的として研究を進めている。令和元年度は、シリカガラスの水中での機械的特性評価、および、典型的な機能性セラミックスである単結晶 $\text{BaTiO}_3$ を対象としてマイクロカンチレバー試験片を用いたメソスケール破壊特性を行った。

## 2. 実験と結果

### 2.1 シリカガラスの水中でのメソスケール破壊特性評価

シリカガラスは水中と空气中で異なった機械的特性を示すことが知られている。例えば水中でバルクなシリカガラスは応力腐食割れを生じる。一方シリカガラスに水蒸気処理を行うと応力緩和と強度向上が起こることも報告されている。このような現象は室温ではわずかにしか表れないかもしれないが、数ミクロン程度のマイクロカンチレバー試験片を用いた曲げ試験では、機械的特性に顕著な影響が表れると期待される。本研究では、マイクロカンチレバー試験を水中に適用する妥当性を評価したのちマイクロカンチレバー法で測定されるシリカガラスの機械的特性に及ぼす水の影響を明らかにすることを目的とした。

#### 2.1.1 実験方法

水中でマイクロカンチレバー試験片にダイヤモンド圧子で荷重を印加する際には、測定される荷重は圧子支持部の周囲に沿って働く水の表面張力の影響を受けると考えられる。そこでまず、圧子支持部の太さが異なるダイヤモンド圧子を用いて市販のシリカガラス表面に水中および空气中で圧子圧入試験を行い、測定される荷重の妥当性を評価した。次に、 $5\times 5\times 1\text{ mm}$ 市販のシリカガラスの表面に集束イオンビーム加工装置を用いて、断面が約 $2.5\times 1.5\mu\text{m}$ の五角形で長さが約 $12\mu\text{m}$ のマイクロカンチレバー試験片を作製した(図1)。これを直径 $20\text{ mm}$ 、厚さ $3\text{ mm}$ の容器に固定し、その中を水で満たしたものを水中、水を入れていないものを空气中、及び、水に浸漬したのち空气中で試験したものを水 $\rightarrow$ 空气中として、マイクロカンチレバー試験片支持部からの距離が $10\mu\text{m}$ の位置を荷重点とする破壊試験を行い、機械的特性を評価した。

2. 1. 2 実験結果と考察

水中と空気中でガラス平板に圧子圧入試験を行った結果を比較すると、支持部が細い圧子を使用した場合に、水中での表面張力に起因した力は無視できるほどに小さくなることが確認された。図2にマイクロカンチレバー試験片の応力ひずみ曲線を、表1に機械的特性を示す。応力印加直後の応力とひずみは比例関係にあり線形弾性変形をしていることが確認された。この領域の応力ひずみ曲線の傾きから算出したヤング率は測定環境によらず約 71 GPa となり、ブリュアン散乱測定法で報告されているヤング率である 71.5 GPa とよく一致した。これより本研究で行ったマイクロカンチレバー試験片を用いた曲げ試験は妥当であることがわかった。応力をさらに印加すると、ひずみが約 6.5%までは測定環境によらず応力ひずみ曲線はほぼ一致した。しかし、空気中、水→空気中で測定した場合には、それぞれ約 4.4 GPa、4.3 GPa の曲げ応力で破壊したのに対して、水中で測定した曲げ応力は約 5.7 GPa となり、マイクロカンチレバー試験で測定される曲げ強度は水中で高い値となった。このような水中での高強度化は、引っ

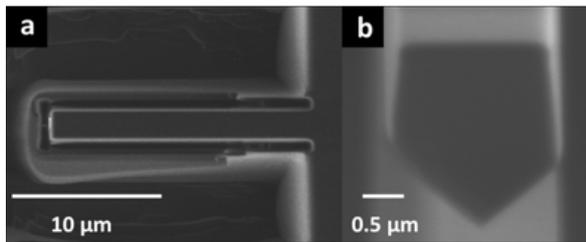


図1 (a) 上方から、および(b)前方から観察したシリカガラスのマイクロカンチレバー試験片

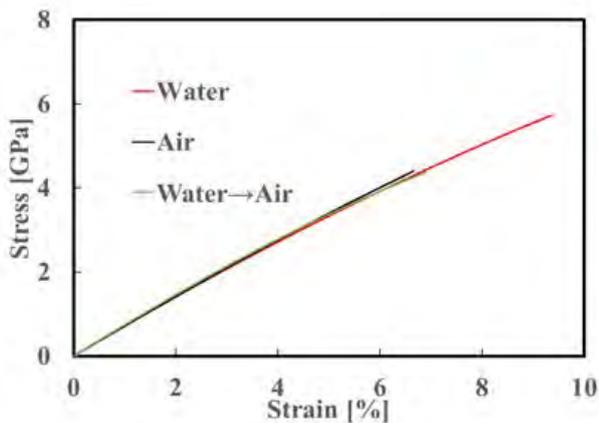


図2 水中および空気中で測定したシリカガラスのマイクロカンチレバー試験片の応力ひずみ曲線

表1 マイクロカンチレバー試験へを用いて作製したシリカガラスの機械的特性

測定環境	水中	空気中	水浸漬後→空気中
ヤング率 / GPa	70.9	71.2	74.1
曲げ強度 / GPa	5.72	4.40	4.34

張り応力印加下で、水分子がシリカガラスに拡散した結果、格子緩和や体積膨張が生じたことに起因すると考えられる。

2. 2 単結晶 BaTiO<sub>3</sub> のメソスケール破壊特性評価

優れた電気特性を持つセラミックス部品やデバイスが広く普及しており、機器の小型化に伴いその寸法は年々小さくなっている。誘電特性を持つ BaTiO<sub>3</sub> を使用した電子セラミックス部品の一つである積層セラミックスコンデンサ(MLCC)の層の厚さは 1 μm 以下である。このような機能性セラミックスからなる微小な部品における機械的信頼性の向上は構造用セラミックスと同様非常に重要であり、その機械的特性の測定の測定が求められる。そこで、本章では単結晶 BaTiO<sub>3</sub> にマイクロカンチレバー試験片を作製し、そのメソスケール破壊特性を評価した。

2. 2. 1 実験方法

試料には、5×2×0.5 mm の単結晶 BaTiO<sub>3</sub> 基板 (株式会社ネオトロン製) を用いた。ただし、5×2 mm の面が BaTiO<sub>3</sub> の(0 0 1)面、2×0.5 mm の面が(1 1 0)面である。FIB-SEM を使用して、単結晶 BaTiO<sub>3</sub> 表面に試験片の長手方向の結晶方向が<1 1 0>と<1 0 0>となるように 2 種類のマイクロカンチレバー試験片を作製した (以下、それぞれ<1 1 0>試験片および<1 0 0>試験片)。試験片寸法は、長手方向が<1 0 0>の試験片では 1.8×2.9×11.3 μm、<1 1 0>の試験片では 1.8×2.9×11.1 μm とした。破壊試験における荷重印加点は、試験片端から 9.5 μm の位置とし、応力印加速度が同一になるように、30 nm s<sup>-1</sup> の速度でキューブコーナー圧子を圧入した。機械的特性の算出には片持ち梁の場合の梁理論を仮定した。

2. 2. 2 実験結果と考察

図3に単結晶 BaTiO<sub>3</sub> のマイクロカンチレバー試験片の破壊試験から得られた荷重変位曲線を示す。低荷重側では荷重と変位は線形関係であったが、高応力側では特徴的な非線形関係が現れた。線形的な応力とひずみの関係を示した低応力領域のヤング率は、正方晶の BaTiO<sub>3</sub> の弾性コンプライアンス定数から算出した単結晶 BaTiO<sub>3</sub> の<1 0 0>方向のおよび<1 1 0>方向のヤング率(それぞれ 125 GPa および 157 GPa) とよく一致した。応力印加開始時には応力とひずみは線形関係であったが、0.2 GPa 付近ではほぼ応力一定のままひずみのみ増加する完全弾塑性変形を示した。<1 0 0>試験片、<1 1 0>試験片ともに約 0.15%変形した後応力とひずみは再び非線形的に増加したが、時折離散的にひずみが増加する様子も確認された。応力ひずみ曲線の非線形関係の要因を考察するために、それぞれの方位の試験片について破壊前に荷重を除荷する未破壊試験を行った。この時、それぞれの方位に対して最大応力の異なる 3 本のマイクロカンチレバー試験片を用意した (最大応力は 0.15 – 0.25 GPa、0.40 – 0.60 GPa および 4.5 – 5.5 GPa、それぞれ未破壊試験片 (低応力)、未破壊試験片 (中応力) および未破壊試験片 (高応力) と表記)。その結果、完全弾塑性変

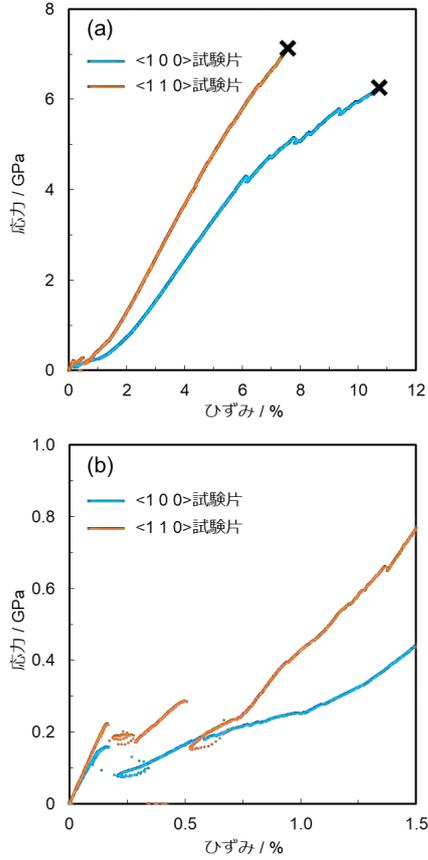


図3 単結晶 BaTiO<sub>3</sub>のマイクロカンチレバー試験片の応力ひずみ線図

形までで応力を除荷した未破壊試験片（中応力）と（低応力）については除荷後に永久ひずみが確認されなかった（図4および図5）。一方、離散的なひずみの増加が現れるまで応力を印加した未破壊試験片（高応力）には永久ひずみが確認された。

さらに各種分析法を駆使して、破壊過程を解析することで、このような特異な破壊挙動のメカニズムを明らかにすることができると考えられる。

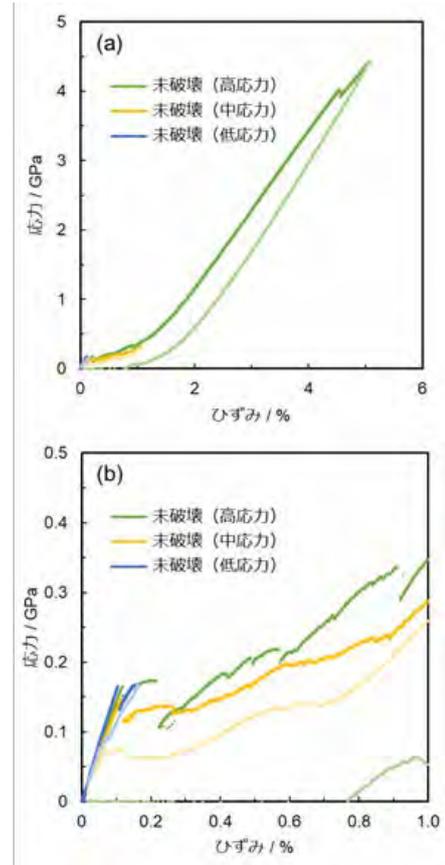


図4 単結晶 BaTiO<sub>3</sub>の<100>試験片の未破壊試験時の応力ひずみ線図 (b)は(a)の拡大図

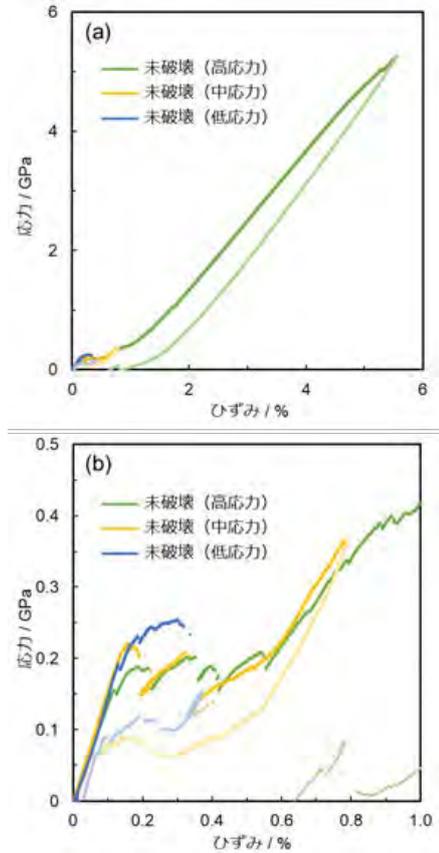


図5 単結晶 BaTiO<sub>3</sub>の<110>試験片の未破壊試験時の応力ひずみ線図 (b)は(a)の拡大図

## 光コヒーレンストモグラフィ観察による

# 一軸加圧下の粉体層中の空隙形態変化過程の4次元定量解析

高橋 拓実、多々見 純一

### 1. はじめに

顆粒を型に充填し、一軸方向の圧力を加えて圧粉する一軸プレス法は、その簡便さからセラミックスのみならず、身近な医薬品や機能性食品などの錠剤成形にも広く用いられている汎用的な粉体成形法の一つである。成形体の特性は粒子の充填構造と密接に関係するため、成形中の粒子の充填過程を明らかにすることは製品開発、品質管理の高度化のための重要な知見である。他方、一軸プレス法では異方的な応力場の作用や粉体層中の応力分布に起因して粒子充填が不均質になることが報告されているものの、その過程で内部構造がどのように変化するかは直接的に明らかにされていない。我々はこれまで、先駆的に開発を進めてきた波長掃引型光コヒーレンストモグラフィ（Swept Source Optical Coherence Tomography: SS-OCT）を基軸とする非破壊観察技術の成果の一つとして、一軸加圧下の粉体層中の空隙を3次元的に可視化できることを報告してきた。本報告では、これを発展させた一軸加圧下の粉体層中の空隙形態変化過程の4次元定量解析について述べる。

### 2. 実験方法

#### 2.1 観察試料

原料粉体は市販の  $\text{Al}_2\text{O}_3$  顆粒（平均粒径  $50\mu\text{m}$ 、DS-25、大明化学工業（株）製）を用いた。図1は、浸液透光法で透過観察した  $\text{Al}_2\text{O}_3$  顆粒である（図1）。顆粒径は約  $10\text{-}50\mu\text{m}$ 、中央部の窪みは約  $5\text{-}40\mu\text{m}$  である。顆粒を構成する一次粒子径は  $1\mu\text{m}$  未満（カタログでは  $0.1\mu\text{m}$ ）である。

#### 2.2 OCT 観察

市販の  $\text{Al}_2\text{O}_3$  顆粒を観察治具であるアクリル樹脂製の透明成形型（ $\phi 7.77\text{mm}$ ）内に充填し、これを材料試験機中に設置した。圧縮試験は、 $0.1\text{mm}/\text{min}$  で最大  $250\text{N}$  の条件で圧縮試験を実施した。

試験中の粉体層の観察は、SS-OCT 装置（IVS-2000-WR、santec（株）製）のプローブを型の側面に設置し、A-scan は型の径方向、B-scan は加圧方向に対応させた。観察時の OCT 像の空間分解能は  $3.7\mu\text{m}/\text{pixel}$  とした。3次元撮像は変位  $0.2\text{mm}$  ごとにマニュアルで行った。1回あたりの撮像に要する時間は約4秒（計算上は3.6秒）だった。

#### 2.3 画像処理・解析

SS-OCT は物質透過性の高い近赤外レーザーを光源とし、プローブに戻ってきた光の内、光源と同じ位相と波長をも

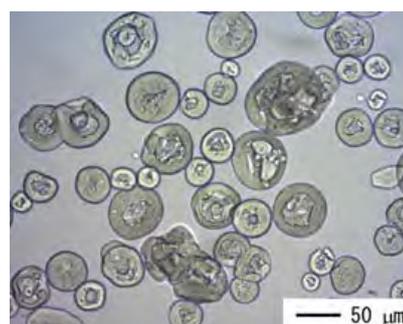


図1 浸液透光法で観察した  $\text{Al}_2\text{O}_3$  顆粒の透過像

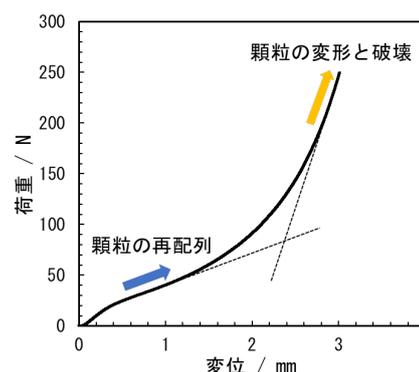


図2 3次元観察中の荷重-変位曲線

つ信号光（反射直進光）のみを干渉で検出する。他方、信号光同士でも干渉を起こすため、OCT 像には構造を直接反映していない粒状パターン（スペックルパターン）が全体に現れる。構造観察の観点で、スペックルパターンはノイズでしかないため、これを除去するために Image J を使った画像処理を行った。

OCT 像の3次元構築、ならびに定量評価は、市販の3次元画像解析ソフトウェア（Exfact VR、日本ビジュアルサイエンス（株）製）にて行った。

### 3. 結果と考察

図2は、3次元観察中の荷重-変位曲線である。顆粒からなる粉体層の圧縮試験で見られる顆粒の再配列に対応する変化と、続く顆粒の変形と破壊に対応する変化が確認された。粉体成形のためには本来、さらに高い荷重を印加する必要があるが、今回は観察のためにアクリル樹脂製の透明成形型を用いている都合上、型そのものの変形や破壊が

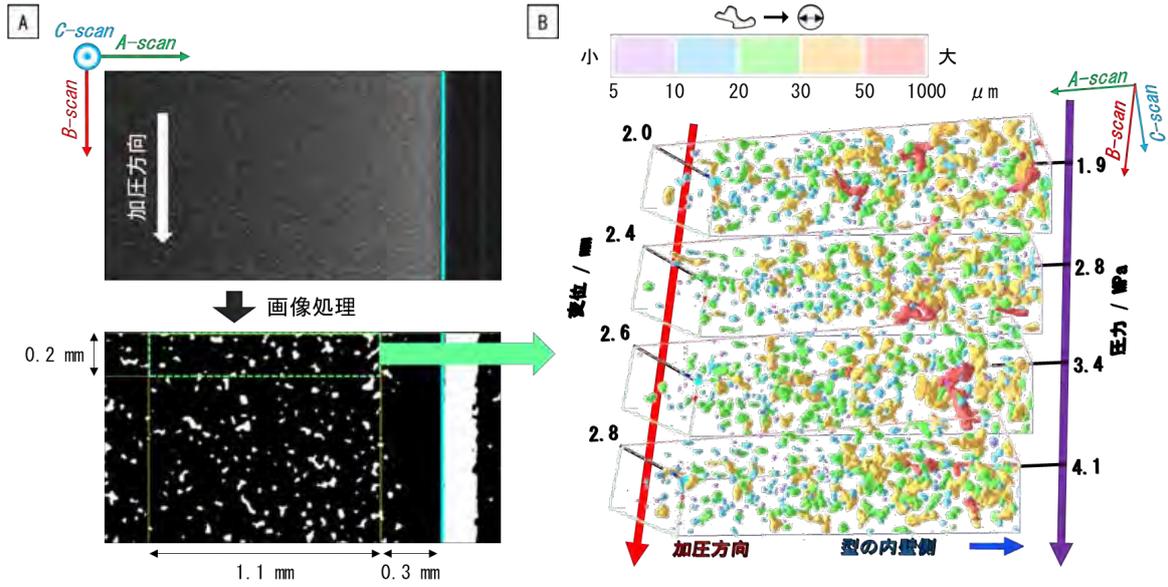


図3 (A) OCT 原画像から画像処理で空隙部を抽出した二値化像と (B) 同一空間内の空隙形態の変化過程の3次元可視化

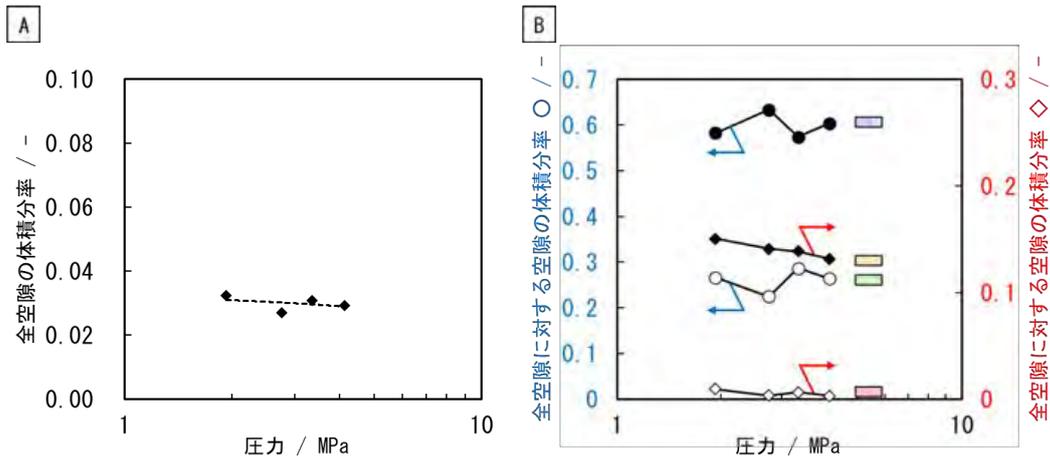


図4 一軸加圧下における同一空間内の (A) 全空隙の体積分率の変化と (B) 全空隙に対する空隙の体積分率の変化

懸念されたため、図2の範囲とした。

図3は、(A) OCT 原画像から画像処理で空隙部を抽出した二値化像と、これを元に構築した (B) 同一空間内の空隙形態の変化過程を3次的に可視化した結果である。空隙部の抽出は、OCT 原画像で信号強度がバックグラウンドと同等の暗領域が対応すると考え、散乱による A-scan 方向の信号強度の減衰に起因するコントラストの分布を平坦化し、その上でスペックルパターンを除去するために Median フィルター等を適用して二値化処理を行った。型の内壁と粉体層の界面から 0.3mm 深さの範囲については、壁効果の影響で特異的な挙動を示すことが想定されたため、本解析ではそれ以降の深さ (図中、1.1mm の範囲で示した) を対象とした。さらに、同一空間に限定して解析を行うため、図中、緑色破線の領域について3次元可視化を行い、各変位における空隙形態を比較した。図3(B)において、各空隙の色は同図の上部に示す球近似径の範囲に対応する。本解析より、OCT 観察で抽出できている空隙の大きさはその殆どが 10μm よりも大きいことがわかる。図1に示したように、本実験で用いた顆粒の大きさは約

10-50μm、中央部の窪みは約 5-40μm である。さらに、顆粒を構成する一次粒子径は 1μm 未満 (カタログでは 0.1μm) である。また、本観察においては、空間分解能を 3.7μm/pixel に設定した。以上を鑑みて、抽出された空隙は、①顆粒間の空隙、または②顆粒の窪みに対応する顆粒内空隙に対応するものと考えられる。次に、空隙の分布に着目してみると、黄色や赤色で示された粗大な空隙は、おおむね型の内壁側に多く存在し、より細かい空隙は全体にわたって散在している様子がわかる。さらに、加圧による粒子充填は、空隙の形や大きさといったドラスティックな形態変化を伴って進行することが定性的に理解できる。本結果を元に、さらに空隙変化の定量解析を試みた。

図4は、一軸加圧下における同一空間内の空隙率の変化である。(A) が全空隙の体積分率、(B) は全空隙に対する各大きさ (分類は図3(B)に対応) の空隙の体積分率の変化である。まず図4(A)より、圧力の増加に伴い、全空隙の体積分率が徐々に減少したことから、粒子充填に対応する粉体層中の内部構造変化を捉えられたと考えられる。他方、本解析で算出された全空隙の体積分率が全体

の体積に対して1%にも満たないことについては、顆粒間、あるいは顆粒内の空隙よりも、OCT 観察の空間分解能よりも小さな一次粒子間の空隙が支配的であるためと考えられる。しかしながら、成形体の強度や焼結性の観点で、直接的に悪影響を及ぼす因子は顆粒間や顆粒内の空隙に起因する粗大な空隙であることから、OCT 観察は一軸プレス法による成形プロセス条件の最適化に力強く貢献できるものと考えられる。

#### 4. 今後の展望

本実験により、OCT 観察が一軸加圧下における粉体層

中の粗大空隙の形態変化過程の直接的な理解に有効であることが示された。本成果の詳細は、論文誌「粉体および粉末冶金」に掲載予定である。今後は本知見をもとに、同様の粒子集合構造体（スラリーなど）へ横断的に展開し、OCT 観察の新たな応用展開の拡大を狙う。

#### 5. 謝辞

本研究は、科学技術振興機構研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム A-step 産業ニーズ対応タイプ AS282I001e の支援を受けて行われた。記して謝意を示す。

## 業 績

## 【原著論文】

1. T. Takahashi, J. Tatami, H. Nakano, S. Tanaka  
Anisotropic sintering shrinkage and microstructural evolution of c-axis-oriented Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ceramics  
Journal of the ceramics society of Japan, 127(6), 435-442 (2019)
2. F. Sakamoto, T. Takahashi, J. Tatami, M. Iijima  
Prediction of strength based on defect analysis in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ceramics via non-destructive and three-dimensional observation using optical coherence tomography  
Journal of the Ceramic Society of Japan, 127(7), 462-468 (2019)
3. 虎瀬なつみ、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
窒化物蛍光体粒子分散 h-BN/ガラス複合体の作製  
Journal of the Society of Powder Technology, Japan, 57(3), 137-143 (2020)
4. 高橋拓実、多々見純一  
光コヒーレンストモグラフィーによる Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 焼結体の内部構造観察  
セラミックス (CERAMICS JAPAN)、55(2), 103-107 (2020)
5. H. Yamaguchi, J. Tatami, T. Yahagi, H. Nakano, M. Iijima, T. Kondo  
Dislocation-controlled microscopic mechanical phenomena in single crystal silicon under bending stress at room temperature  
Journal of Materials Science, 55(17), 7359-7372 (2020)

## 【口頭発表】

1. 高橋拓実  
セラミックス製造プロセス中の構造変化過程のオペランド観察  
センシング技術応用研究会第 207 回研究例会、2019 年 4 月
2. 多々見純一、井本由美、矢矧東穂、高橋拓実、飯島志行  
Mechanical properties of SiC measured using microcantilever beam specimens  
Engineering Ceramics 2019, 2019 年 5 月
3. 多々見純一、矢矧東穂、高橋拓実、飯島志行  
Mesoscale characterization of mechanical properties of ceramics using microcantilever beam specimens  
CICC11, 2019 年 5 月
4. 多々見純一、坂本文香、高橋拓実、飯島志行  
Real-time and 3-dimensional observation of sintering behavior of alumina green body by optical coherence tomography  
ECerS2019, 2019 年 6 月
5. 高橋拓実、多々見純一、坂本文香、伊東秀高、田口勇、

飯島志行

Observation of Internal Structure of Ceramics and Slurry by Optical Coherence Tomography  
ECerS2019、2019 年 6 月

6. 多々見純一、坂本文香、高橋拓実、飯島志行  
In-situ observation of internal structure of ceramic slurry, green body and sintered body by optical coherence tomography  
GFMAT-2019、2019 年 7 月
7. 多々見純一、梶井健司、飯島志行、高橋拓実、矢矧東穂  
YSZ 成形体の粒子集合構造と焼結収縮挙動の相関  
粉体工学会第 55 回夏期シンポジウム、2019 年 8 月
8. 高橋拓実、多々見純一  
光コヒーレンストモグラフィーを用いた乾式成形過程における粒子集合構造変化のその場観察  
粉体工学会第 55 回夏季シンポジウム、2019 年 8 月
9. 鷹羽絃希、多々見純一、高橋拓実、飯島志行  
光コヒーレンストモグラフィーによるせん断場下における Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> スラリーの内部構造観察  
粉体工学会第 55 回夏季シンポジウム、2019 年 8 月
10. 虎瀬なつみ、多々見純一、飯島志行、高橋拓実、広崎尚登  
窒化物蛍光体粒子分散ガラスの作製  
粉体工学会第 55 回夏季シンポジウム、2019 年 8 月
11. 相原伊吹、多々見純一、高橋拓実、飯島志行  
3 次元動的その場観察による多層グラフェン被覆ガラスファイバーの磁場配向挙動評価  
粉体工学会第 55 回夏季シンポジウム、2019 年 8 月
12. 加藤真由、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
TG-OCT 複合システムによるセラミックス成形体の脱脂過程のオペランド観測  
2019 年度エンジニアリングセラミックス若手セミナー、2019 年 8 月
13. 多々見純一、山口拓志、中野裕美、飯島志行、矢矧東穂、高橋拓実  
単結晶シリコンの微粒子スケールでの強度と変形  
粉体工学会第 54 回技術討論会、2019 年 9 月
14. 多々見純一、坂本文香、高橋拓実、飯島志行  
In-situ Observation of the Internal Structure of an Alumina Green Body during Sintering by Optical Coherence Tomography  
MS&T19、2019 年 10 月
15. 高橋絵美、高橋拓実、多々見純一  
蛍光体粒子分散 MgO バルクセラミックスの常温緻密化  
粉体工学会 2019 年度秋季研究発表会、2019 年 10 月
16. 高橋拓実、高橋絵美、多々見純一  
応力場と化学反応場を重畳させた室温緻密化プロセス

- による蛍光体粒子分散高熱伝導 MgO セラミックスの作製  
粉体粉末冶金協会 2019 年度秋季大会、2019 年 10 月
17. 多々見純一、高橋拓実  
セラミックスラリーおよび成形体の外場印加による内部構造変化の OCT その場観察  
粉体粉末冶金協会 2019 年度秋季大会、2019 年 10 月
18. 相原伊吹、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
Evaluation of rotation behavior of multilayer graphene coated glass fibers in magnetic field via in situ three-dimensional dynamic observation  
PACRIM13、2019 年 10 月
19. 鷹羽紘希、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
Observation of Internal Structure of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Slurry under Shear by Optical Coherence Tomography  
PACRIM13、2019 年 10 月
20. 秋元勇人、多々見純一、飯島志行、高橋拓実、奥田徹也  
Influence of rare earth oxide as a sintering aid on translucency of aluminum nitride ceramics  
PACRIM13、2019 年 10 月
21. 山口拓志、多々見純一、飯島志行  
Mechanical properties of single crystal BaTiO<sub>3</sub> measured using microcantilever beam specimens  
PACRIM13、2019 年 10 月
22. 虎瀬なつみ、多々見純一、飯島志行、高橋拓実、広崎尚登、Preparation of nitride phosphor particle dispersed glass、PACRIM13、10月29日
23. 加藤真由、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
In-situ observation of dewaxing process of ceramic powder compacts by optical coherence tomography  
PACRIM13、2019 年 10 月
24. 多々見純一、坂本文香、高橋拓実、飯島志行  
Real-time and 3-dimensional observation of sintering behavior of alumina by optical coherence tomography、PACRIM13、2019 年 10 月
25. 李穎、高橋拓実、横内正洋、多々見純一  
Preparation of Transparent and Fluorescent Ca- $\alpha$ -SiAlON:Eu<sup>2+</sup> Bulk Ceramics  
PACRIM13、2019 年 10 月
26. 高橋拓実、多々見純一、坂本文香、伊東秀高、田口勇、飯島志行  
Internal structure observation of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ceramics using optical coherence tomography  
PACRIM13、2019 年 10 月
27. 多々見純一、井本有美、山口拓志、中野裕美、矢矧東穂、高橋拓実、飯島志行  
Mechanical properties of single crystal, bicrystal and amorphous SiC measured using microcantilever beam specimens  
PACRIM13、2019 年 10 月
28. 高橋拓実、多々見純一、飯島志行、杉本奈菜子、佐渡万里子、相原伊吹  
多層グラフェン被覆粒子の低磁場配向  
第 14 回日本磁気科学会年会、2019 年 11 月
29. 多々見純一、坂本文香、加藤真由、高橋拓実、飯島志行  
In-situ observation of internal structure of ceramics during dewaxing and sintering by optical coherence tomography  
ISSPAC、2019 年 11 月
30. 多々見純一、井本由美、矢矧東穂、高橋拓実、飯島志行  
Mechanical properties of silicon carbide in mesoscale measured by bending using microcantilever beam specimens  
MRM2019、2019 年 12 月
31. 高橋拓実、多々見純一、坂本文香、伊東秀高、田口勇、飯島志行  
Observation of internal structure of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ceramics by optical coherence tomography  
MRM2019、2019 年 12 月
32. 秋元勇人、多々見純一、飯島志行、高橋拓実、奥田徹也  
Influence of rare earth oxide as a sintering aid on translucency of aluminum nitride (AlN) ceramics  
MRM2019、2019 年 12 月
33. 相原伊吹、多々見純一、高橋拓実、飯島志行  
Evaluation of rotation behavior of multilayer graphene coated glass fibers in magnetic field via in situ three-dimensional dynamic observation  
MRM2019、2019 年 12 月
34. 加藤真由、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
In-situ observation of dewaxing process of ceramic powder compacts by optical coherence tomography  
MRM2019、2019 年 12 月
35. 山口拓志、多々見純一、飯島志行  
Mechanical properties of single crystal BaTiO<sub>3</sub> measured using microcantilever beam specimen  
MRM2019、2019 年 12 月
36. 鷹羽紘希、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
Observation of Internal Structure of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Slurry under Shear by Optical Coherence Tomography  
MRM2019、2019 年 12 月
37. 相原伊吹、多々見純一、高橋拓実、飯島志行  
異なる機械的処理条件で作製した多層グラフェン被覆複合粒子の磁化率異方性  
第 14 回セラミックフェスタ in 神奈川、2019 年 12 月
38. 秋元勇人、多々見純一、飯島志行、高橋拓実、横内正洋、奥田徹也  
窒化アルミニウムセラミックス(AIN)の透光性に及ぼす希土類添加物の影響  
第 14 回セラミックフェスタ in 神奈川、2019 年 12 月
39. 鷹羽紘希、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> スラリーの OCT オペランド観察～せん断場下におけるスラリーの内部構造と粘度の相関～  
第 14 回セラミックフェスタ in 神奈川、2019 年 12 月

40. 山口拓志、多々見純一、飯島志行  
 マイクロカンチレバー試験片を用いて測定した単結晶 BaTiO<sub>3</sub> の機械的特性  
 第 14 回セラミックフェスタ in 神奈川、2019 年 12 月
41. 多々見純一、高橋絵美、高橋拓実  
 窒化物蛍光体粒子分散 MgO セラミックスの常温緻密化  
 2019 年度第一回バルクセラミックスの信頼性に関するワークショップ、2019 年 12 月
42. 高橋拓実、多々見純一  
 光コヒーレンストモグラフィーによる外場印加状態の粒子集合構造変化過程の 3 次元観察  
 第 58 回セラミックス基礎科学討論会、2020 年 1 月
43. 多々見純一、高橋絵美、高橋拓実  
 Room temperature densification of nitride phosphor particle dispersed MgO ceramics  
 ICACC2020、2020 年 1 月
44. 多々見純一、鷹羽紘希、飯島志行、高橋拓実  
 Direct observation of alumina slurry under applying shear field by optical coherence tomography  
 ICACC2020、2020 年 1 月
45. 多々見純一、高橋絵美、虎瀬なつみ、高橋拓実、飯島志行  
 蛍光体粒子分散高熱伝導プレートの開発  
 第 379 回蛍光体同学会、2020 年 2 月
46. 李穎、多々見純一、高橋拓実、横内正洋  
 Lower temperature densification of Ca- $\alpha$  SiAlON:Eu<sup>2+</sup> ceramics using bead milled raw materials  
 日本セラミックス協会 2020 年年会、2020 年 3 月
47. 高橋絵美、高橋拓実、多々見純一  
 MgO の常温緻密化による窒化物蛍光体粒子分散高熱伝導セラミックスの作製  
 日本セラミックス協会 2020 年年会、2020 年 3 月
48. 宇田充伸、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
 マイクロカンチレバー試験片を用いて測定されるシリカガラスの水中高強度化  
 日本セラミックス協会 2020 年年会、2020 年 3 月
49. 田島充稀、多々見純一、飯島志行、高橋拓実  
 光コヒーレンストモグラフィー観察による Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> セラミックスの密度分布の可視化  
 日本セラミックス協会 2020 年年会、2020 年 3 月
50. 網中康平、多々見純一、飯島志行、高橋拓実、横内正洋  
 低温焼結による透明 Lu- $\alpha$ -SiAlON の作製  
 日本セラミックス協会 2020 年年会、2020 年 3 月
51. 高橋拓実  
 セラミックスの高機能化のための粒子集合構造制御と新規評価法  
 日本セラミックス協会 2020 年年会、2020 年 3 月
52. 多々見純一、井本有美、山口拓志、中野裕美、矢矧東穂、飯島志行、高橋拓実  
 4H-SiC 単結晶の室温におけるメソスケールでの曲げ

強度と変形挙動

日本セラミックス協会 2020 年年会、2020 年 3 月

【特許】

- (1) 国内特許出願 2 件  
 (2) 国外特許出願 1 件



# 「腸内細菌叢」プロジェクト

プロジェクトリーダー兼解析ツール開発グループリーダー 大野 博司

## 【基本構想】

我が国において糖尿病患者は増加の一途をたどり、罹患者数は約 950 万人を数えるに到っている。糖尿病は高齢者における主要な疾患であり、糖尿病に肥満・高脂血症・高血圧が合併するメタボリックシンドロームは動脈硬化を促進し、心筋梗塞・脳卒中のリスク増大を介して日本人の健康寿命を短縮する最大の原因となっており、大きな社会的・経済的問題となっている。最近腸内細菌と肥満、2 型糖尿病といった生活習慣病との関連が動物やヒトで報告され、このことが肥満や 2 型糖尿病の誘因の 1 つとなっているのではないかと考えられる。従って摂取する栄養素やエネルギー状態によって変化する腸内細菌叢を捉えることができれば、肥満や 2 型糖尿病発症といった生活習慣病の予測や治療に役立つと考えられる。本研究では、摂取する栄養素やエネルギー状態の把握とメタゲノム解析による腸内細菌の菌種や機能といった包括的な解析に加え、遺伝的背景を加味し、そのデータを横断的に解析することにより、食習慣、腸内細菌叢、生活習慣病発症の相互関係を明らかにすることを目的とする。方法は、これまでの欧米人の論文をもとに東京大学付属病院の検診受診者で 20 歳から 75 歳までの男女含む肥満者 100 名、耐糖能異常者 100 名、肥満も耐糖能異常もない者 計 100 名の合計 300 名を対象とした。解析項目は、(1) 簡易型自記式食事歴法質問票 (BDHQ) を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定、(2) 腹部エコーを含む臨床データ (3) 血中アディポカインの測定、(4) 腸内細菌叢の 16S・メタゲノム解析、(5) 血中・糞便中のメタボローム解析、(6) 単核球を用いたトランスクリプトーム解析、(7) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析、(8) 統合データベースの作成と解析ツールの開発を行う。このことにより、どのような腸内細菌叢が生活習慣病発症に重要な役割をしているかが明らかとなり、さらに新規バイオマーカーなどの開発や予防薬、個別化医療といった新しい予防法やリスク診断の実現を目指す。

## 1. 2019 年度の研究目的

解析ツール開発グループでは、食事・栄養摂取状況、身体活動量・エネルギー消費量などの生活習慣データ、炎症性サイトカインを含めた臨床データ、腸内細菌叢の 16S 解析・メタゲノム解析、水溶性や脂溶性のメタボローム解析、CAGE 手法を用いた RNAseq 解析を行うとともに、これらのデータを統合的・包括的に解析するためのデータベース化を図り、新しい解析ツールをモジュールした解析ソフトウェアの開発を行っている。さらに、この統合データベースと解析ソフトウェアを用いて、食習慣・身体活動量、腸内細菌叢、生活習慣病発症の相互関係を明らかにし、腸内細菌叢を介した未病改善やリスク診断の開発を行うことを目的としている。2019 年度は、下記の項目を重点的に取り組み、前年度に引き続き統合データベースを作成するための元となるデータの取得と、統合データベースとデータベースを参照するインターフェースの作成を行った。

- (1) 統合データベースの作成と解析ツールの開発
- (2) 簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定
- (3) 血中・糞便中のメタボローム解析
- (4) 各種データの相関解析
- (5) 腸内細菌叢のメタゲノム解析
- (6) 全ゲノムシーケンスの解析

## 2. 2019 年度の研究成果

(1) 統合データベースの作成と解析ツールの開発  
臨床情報、腸内細菌叢、代謝物の情報のデータベースを作成し、被験者ごとに目的の情報を表示できるインターフェースを作成した。さらに、データ間の関連性を簡単に調べるため臨床情報と各データの相関解析を行うツールも実装した。

(2) 簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定  
昨年度収集した 245 名分の BDHQ による食事調査について、栄養素について 90 項目、食事の項目として 70 項目について一日当たりの摂取量を解析した。また活動量については 600 時間以上計測できた 170 名について歩数と活動強度についてデータの抽出が完了した。

(3) 血中・糞便中のメタボローム解析

血液、及び、糞便から水溶性と脂溶性代謝物の抽出を行い、水溶性代謝物はガスクロマトグラフィー質量分析を用いて分析を行い、306 検体から糞便中から 124 種類、血清中から 102 種類の代謝物を同定した。また、脂溶性代謝物は液体クロマトグラフィー質量分析を用いて分析を行い、3 糞便中から 1927 種類、血清中から 625 種類の物質を同定した。

(4) 各種データの相関解析

代謝物データは相互の相関係数に応じてクラスタリングを行い代謝物クラスター (Co-abundance group; CAG) を作成した。次に、被験者の耐糖能異常や肥満の表現型とこれらの代謝物クラスターとの相関について解析した。本研究では、健常者、肥満者、耐糖能異常者からそれぞれ血清生化学検査、および血中のインスリン、アディポカインを測定している。これらの情報をもとに、糖尿病の指標として空腹時血糖 (FBG)、HbA1c、HOMA-IR、肥満の指標として BMI などを臨床データとして組み込み、相関解析を行った。その結果、糞便中の水溶性代謝物に関していくつかの代謝物クラスターと臨床データと有意な相関 (Spearman 偏相関)、もしくは Wilcoxon rank-sum test による有意な増減を認めた。同様に、糞便中の脂質代謝物についても解析を行い、有意に関連する代謝物クラスターを同定した。

次に、腸内細菌叢データと代謝物クラスターの結果との相関解析を行い、耐糖能異常と関連のある代謝物と細菌の同定を試みた。その結果、水溶性代謝物に関しては単糖や糖代謝物のクラスター (CAG 05, 06) がインスリン抵抗性 (HOMA-IR)、脂肪肝 (NAFLD)、メタボリック症候群 (MetS) やその他のパラメーターと強い正の関連を示していたため、まずこれらの代謝物と腸内細菌との相関解析を行った。その結果、インスリン抵抗性を示す被験者 (HOMA-IR  $\geq 2.5$ ) の検体ではインスリン感受性 (HOMA-IR < 1.6) の被験者の検体と比較して単糖 (水色) およびその他の糖代謝物 (青、紫) が増加していることが示された。また、これらの代謝物は *Dorea* 属、*Coprococcus* 属などの腸内細菌と正の相関を示す一方、*Bacteroides* 属、*Alistipes* 属などの細菌と負の相関を示した。

特に *Dorea* 属と *Coprococcus* 属は Lachnospiraceae 科に属する細菌種であり、過去の報告でも肥満や糖尿病との関連が示唆されている[1]。また、単糖や糖代謝物の増加は、腸内環境において多糖の分解が亢進している可能性を示唆している。過去の報告ではマウスにおいて多糖の分解亢進による宿主への過剰なエネルギー供給が肥満に関与する可能性が指摘されているが[2]、ヒトにおいては未だ実証されておらず、今回の結果はその仮説を証明する重要な知見となる可能性がある。

同様の手法を用いて脂質代謝物クラスターと腸内細菌との関連も検討したところ、顕著な所見としてリゾホスファチジルコリン (LPC) がインスリン抵抗性の高い被験者の検体で増加していたこと、またこれらの代謝物は *Alistipes* 属や *Parabacteroides* 属と負の相関を示すことがわかった。腸管内での LPC の増加と腸内細菌によって生成されるその代謝物は動脈硬化性疾患との関連が示唆されており[3]、今回の結果は糖尿病患者において動脈硬化性疾患が増加する一つの機序を示唆している可能性がある。

(5) 腸内細菌叢のメタゲノム解析

上記で認めた代謝産物を産生する腸内細菌叢を明らかにするため、メタゲノム解析に必要な DNA 量が採取でき

た 271 検体の糞便から DNA を再抽出し、ショットガンシーケンシング法によるメタゲノム解析を行った。その結果、7G のシーケンシングリードが得られ、そこから約 6M の遺伝子を同定した (図 2)。本研究のデータは過去に報告されていた日本人のメタゲノム解析から得られた遺伝子数 (約 4.8M) [4] よりも多く、本研究から新規遺伝子を含むより多数の日本人の腸内細菌の遺伝子カタログを得ることができた。

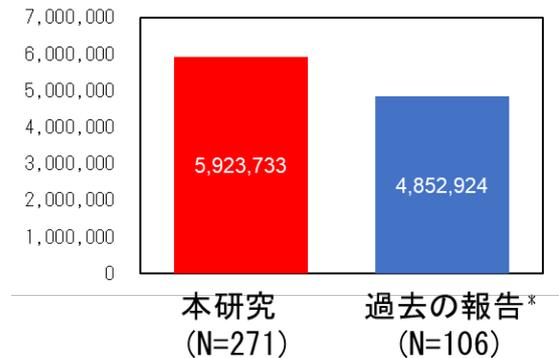


図 2 メタゲノム解析から推定された糞便中の腸内細菌の遺伝子数

(6) 全ゲノムシーケンスの解析

313 名分の DNA 抽出が終了し、疾患感受性遺伝子を同定するために約 150 人の全ゲノムシーケンス解析が終了した。

3. 今後の研究計画

1. 統合データベースについては、引き続きデータベースの充実化と解析ツールの実装等を進める。
2. BDHQ で得られた栄養素や食事の項目について、腸内細菌叢や代謝産物との関連性について検討するとともに、活動量のデータについて解析を行う。
3. 既に解析が終了している血清代謝物解析と前述の糞便代謝物解析の統合解析を行い、糞便代謝物が実際に宿主の代謝や肥満・高血糖などの表現型に影響を与えているかを検討する。
4. 2019 年度はメタゲノム解析のシーケンシングが終了したところであり、詳細な解析を 2020 年度行う。メタゲノム解析により、表現型と関連する種レベルのより細かい細菌種を同定が可能になるとともに、腸内細菌の機能的な側面の解析も可能になることが期待できる。また、上記で表現型および代謝物との関連性が示された細菌種についていくつか選択し、高脂肪食誘発性糖尿病モデルマウスに投与することで、細菌と肥満・高血糖・インスリン
5. ヒトゲノムの全ゲノムシーケンス解析について順次行っていく。
6. 解析したデータについては順次統合データベースに集約し充実をはかるとともに、共分散構造分析や全ゲノムシーケンスなどを用いた層別化・個別化に向けた解析システムを構築していく。

【参考文献】

1. K. H. Allin, V. Tremaroli, R. Caesar, B. A. H. Jensen, M. T. F. Damgaard, M. I. Bahl, T. R. Licht, T. H. Hansen, T. Nielsen, T. M. Dantoft, A. Linneberg, T. Jørgensen, H. Vestergaard, K. Kristiansen, P. W. Franks, T. Hansen, F. Bäckhed and O. Pedersen, *Diabetologia*, **61**, 810-820, (2018)
2. P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis and J. I. Gordon, *Nature*, **444**, 1027-1031, (2006)
3. Z. Wang, E. Klipfell, B. J. Bennett, R. Koeth, B. S. Levison, B. Dugar, A. E. Feldstein, E. B. Britt, X. Fu, Y. M. Chung, Y. Wu, P. Schauer, J. D. Smith, H. Allayee, W. H. Tang, J. A. DiDonato, A. J. Lusis and S. L. Hazen, *Nature*, **472**, 57-63, (2011)
4. S. Nishijima, W. Suda, K. Oshima, S. W. Kim, Y. Hirose, H. Morita and M. Hattori, *DNA Res*, **23**, 125-33, (2016)

# 肥満者、または、耐糖能異常者に特有の 腸内細菌と代謝物の探索

中西 裕美子

## 1. はじめに

近年、肥満や2型糖尿病（T2D）といった生活習慣病と腸内細菌との関連が動物やヒトで報告されている。肥満のヒトでは Firmicutes 門の細菌と Bacteroidetes 門の細菌の比（Firmicutes/Bacteroidetes[F/B]比）が高く、細菌種の多様性は低いことなどが報告されている。さらに肥満や T2D の患者の腸内細菌を無菌マウスに移植すると同様の病態を生じることから、異常な菌の組成そのものが病態の原因の1つであることが証明されている。従って、肥満や T2D に伴う異常な腸内細菌叢を改善することで病態の治療や予防に役立つことが期待されている。本研究では、肥満や T2D の発症に関連する腸内細菌やその代謝物を探索し、また、それらの機能解析を行うことで、肥満や T2D の発症や悪化に関与する腸内細菌のメカニズムを解明する。

### 1. 1 肥満や T2D と腸内細菌との関わり

近年、世界中で増加の一途をたどっている肥満や糖尿病が腸内細菌と密接な関わりがあると多数報告されている。まず、2006年に Gordon らのグループが肥満の患者や肥満モデルマウスにおいて、Firmicutes 門が増加し、Bacteroidetes 門が減少することを報告した[1, 2]。その後、肥満のヒトや肥満モデルマウスにおいて、Verrucomicrobia 門の *Akkermansia muciniphila* の割合が減少していることが明らかとなり、同菌をマウスに経口投与したところ、インスリン抵抗性や脂肪の蓄積といったメタボリックシンドロームの病態を改善できたことが報告された[3]。一方、T2D の発症には遺伝的要因と環境要因が関与すると考えられているが、これまでの研究から遺伝学的要因の寄与は小さく、環境要因の影響の方が大きいことが示唆されている[4]。そのため、環境要因の1つとして近年、腸内細菌の重要性が注目されており、実際に、中国やヨーロッパにおいて T2D 患者の大規模コホート研究が行われた[5, 6]。中国人の T2D 患者の腸内細菌叢のメタゲノム解析（細菌のゲノム情報すべてを読み、どのような遺伝子を持つかを解析する手法）結果から、T2D 群に特徴的な腸内細菌の遺伝子群を用いて T2D 発症リスクを判別することが可能であることが報告されている[5]。また、ヨーロッパでも同様のコホートが行われたが、2つコホート研究を比較するとヨーロッパ系コホートと中国人コホートでは T2D を識別するメタゲノムマーカーが異なっていたことから、メタゲノムによる T2D 予測法は、研究の対象集団の年齢や居住場

所に応じて作成する必要があると提唱されている。

### 1. 2 日本における肥満や T2D を対象とした腸内細菌研究

前述のように、海外ではヒトを対象とした肥満や T2D の対規模なコホート研究が行われているが、日本人における肥満や T2D の腸内細菌叢の研究例は少ない。肥満に関しては2015年に発表された健康者23名と肥満者33名の糞便中の腸内細菌叢を T-RFLP（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism）法で比較した結果では、Bacteroidetes 門の細菌が肥満者で有意に低かったことを報告している[7]。また、T2D に関しては健康者50名と2型糖尿病患者50名の糞便中の腸内細菌を RT(Real time)-PCR 法で比較した結果、T2D 患者で *C. coccoides* group、*Atopobium* cluster、*Prevotella* 属が有意に減少し、*Lactobacillus* 属が有意に増加していた。また、*C. coccoides* group、*Atopobium* cluster は T2D 患者の血中でも検出された。T2D 患者では糞便中の酢酸、プロピオン酸が有意に減少していたことも報告している[8]。これらの研究では、症例数が少ないこと、また、腸内細菌叢を解析する手法として、T-RFLP 法や RT-PCR 法を用いているが、これらの方法では腸内細菌叢の一部分を解析することしかできないことが問題であり、症例数を増やし網羅的な解析法による腸内細菌叢解析を行い、日本人における肥満や糖尿病の発症に関わる腸内細菌を探索することが重要である。

### 1. 3 腸内細菌叢の性差について

腸内細菌叢には性差があり[9]、腸内細菌叢の違いが性別特有の免疫システムに関与することが報告されている[10]。また、日本人の男性では心筋梗塞の発症率が高く、心筋梗塞は糖尿病や高脂血症、高血圧などの結果として起こるため、男性に多い疾患は生活習慣と深い関係があることがわかる。そこで、肥満や T2D と腸内細菌叢との関係を調べる上で、性別による差異も調べ、性別特有の腸内細菌や代謝物が肥満や T2D の発症に関与するか解析を行う。

## 2. 1 実験方法

### 2. 1. 1 ヒト試験の概要

本研究では、東京大学附属病院予防医学センターと共同で、健康診断の受診者うち、空腹時血糖が 110 mg/dL もしくはヘモグロビン A1c が 6.0%以上の受診者を耐糖能異常

（Impaired glucose tolerance :IGT）群、また、BMI が 25 以上で正常血糖の受診者を肥満群とし、これらの受診者に加え、同数の非肥満で非 IGT の受診者を健常者群として本研究にリクルートし、通常の検診項目に加えて便や血液を採取した。リクルートした人数はそれぞれ約 100 名である。

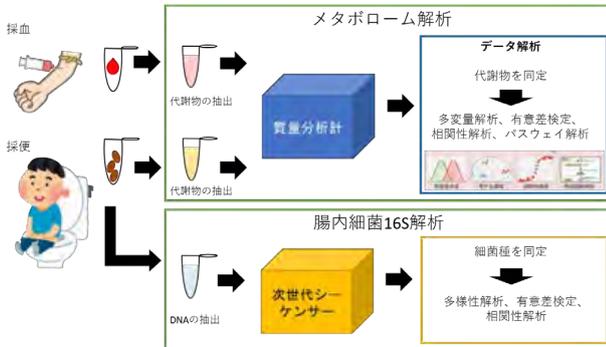


図 1. 分析の概要

### 2. 1. 2 腸内細菌叢解析

採取した糞便から DNA 抽出し、16S rRNA 遺伝子の V1-2 領域を PCR で増幅した後、Miseq (Illumina) によりシーケンスを行った (図 1)。得られた遺伝子配列から 97% 以上の類似性をもつ配列を Operational taxonomic unit (OTU) と設定した。OTU の系統分類は、理化学研究所内で保有している腸内細菌のゲノム DNA 情報をリファレンスとして種レベルまで分類した。

### 2. 1. 2 メタボローム解析

腸内細菌叢解析に用いた糞便検体から水溶性代謝物と短鎖脂肪酸を抽出し、それぞれの抽出サンプルを GCMS-TQ8030 (島津製作所) を用いて、測定を行った (図 1)。水溶性代謝物の抽出と誘導体化は、糞便に水 : MeOH : クロロホルムを 5 : 5 : 2 の比率で加え、上層の水溶性画分を凍結乾燥した後に、Methoxyamine を加えオキシム化後に N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide を加えてトリメチルシリル化を行った。また、短鎖脂肪酸の抽出と誘導体化は、水 : HCl : ジエチルエーテルを 2 : 1 : 4 の比率で加え、上層の脂溶性画分を採取し、N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide を加え誘導化を行った。それぞれの誘導体化したサンプルは BPX-5 カラムを用いて、GCMS-TQ8030 の MRM モードで測定を行った。

## 2. 2 結果

### 2. 2. 1 腸内細菌叢解析の結果

昨年度報告したように、腸内細菌叢の全体的な変化の指標である  $\beta$  多様性と  $\alpha$  多様性は健常者、肥満者、IGT で有意差は見られなかった。細菌の系統的な種類ごとに比較を行ったところ、肥満群では Bacteroidetes 門の細菌が有意に減少していた。これは過去の研究の結果とも一致していた。また、肥満群では Actinobacteria 門の細菌も有意に増加していた。細菌の分類を属レベルで比較を行ったところ、Collinsella 属が肥満群と IGT 群で有意に増加し、

Bacteroides 属が肥満群で有意に増加していることが分かった。また、性別の違いについても比較を行ったところ、 $\alpha$  多様性は女性がやや低い傾向にあるものの、男女で有意な差は見られなかった。腸内細菌の構成を比較したところ、Prevotella 属、Coprococcus 属が男性で多く、Veillonella 属、Faecalibacterium 属、Streptococcus 属は女性で多い特徴が見られた。さらに、健常者、肥満者、IGT について性別ごとに違いを調べたところ、女性では Collinsella 属が肥満群と IGT 群で有意に増加していたが男性で有意な差が見られなかった。また、Bacteroides 属についても、男性では肥満群で有意に増加しているが、女性ではその違いは見られなかった。以上のことから、性別ごとに肥満や IGT に特有な腸内細菌が異なることが考えられた。

### 2. 2. 2 メタボローム解析の結果

昨年度報告したように、血漿と糞便のメタボローム解析を行ったところ、血漿中代謝物は IGT 群が他の 3 群と比較し全体的に代謝物が異なる結果であった。一方で糞便中代謝物については 3 群で全体的な傾向に違いは見られなかった。多群検定を行い 3 群間で有意に異なる代謝物を調べた結果、血漿中代謝物では 64 化合物に有意差 ( $P$  値が 0.05 以下) が見られた。血漿中ではアミノ酸や単糖が IGT 群で多く、短鎖脂肪酸が健常者で多いことが分かった。糞便中代謝物では 34 化合物に有意差が見られた。糞便中代謝物では肥満群でアミノ酸や単糖が多い傾向にあり、血漿中と糞便中では異なる傾向にある事が分かった。

性別の違いについても比較を行ったところ、プロピオン酸やアミノ酸の一部が男女で有意に異なる事が分かった。さらに、健常者、肥満者、IGT について性別ごとに違いを調べたところ、多くの代謝物は男女の違いに関係なく、3 群で有意に異なる代謝物が一致していた。しかし、IGT の女性では男性と比較し、糞便中の糖類がより増加していることが分かった。

### 2. 2. 3 LC-MS を使用したメタボローム解析の構築

これまでガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) を使用したメタボローム解析を行ってきたが、一部の代謝物は GC/MS での分析系では測定することが難しい。そこで、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) を使用し計測する代謝物を増やし解析するため、新たな LC-MS の分析系を構築した。

LCMS-8040 (島津製作所) を用いて、カラムは Discovery HS F5 (Sigma) を使用し移動相 A 液 (0.1% ギ酸)、B 液 (0.1% ギ酸/アセトニトリル) をグラジエント溶出し代謝物の分離を行い、MRM モードで測定を行う系を構築した。このシステムを使用し、アミノ酸系代謝物を 14 物質、ビタミン 6 物質、また、腸内細菌由来の代謝物であり動脈硬化を誘発する Trimethylamine oxide とその代謝物である Trimethylamine を新たに計測することが可能となった。

以上より、現在までに GC/MS のシステムで 310 物質、LC-MS のシステムで 22 物質を計測することが可能となっ

た。

### 3. 考察及び今後の展望

糞便中の腸内細菌叢と代謝物解析の結果から、性別ごとに肥満や IGT に特有な腸内細菌が存在する一方で、代謝物では量的な違いは見られたものの、多くの代謝物は男女の違いに関係なく、3 群で有意に異なる代謝物が一致していた。すなわち、健常者、肥満者、IGT に着目した場合、男女間で腸内細菌叢は異なるが代謝物は近いプロファイルを示すことから、男女間で異なる細菌種が近い代謝を行っている可能性が考えられた。本研究では、糞便中のメタゲノム解析も行っているため、異なる細菌種でも近い代謝酵素の遺伝子を持つかどうかをメタゲノム解析の結果から調べる事ができる。今後はメタゲノムデータを用いて男女間の比較を行い、代謝物データとの関連性を調べ、健常者、肥満者、IGT に特有の細菌種とその代謝遺伝子について明らかにする。

メタボローム解析については、今年度は LC-MS を使用した新たな分析計を構築した。今後も LC-MS を活用して、計測できる代謝物を増やしていく予定である。

#### 【参考文献】

1. R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, J. I. Gordon, Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023 (2006).
2. P. J. Turnbaugh et al., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031 (2006).
3. H. Plovier et al., A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature medicine* 23, 107-113 (2017).
4. C. Fuchsberger et al., The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature* 536, 41 (2016).
5. J. Qin et al., A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55-60 (2012).
6. H. K. Pedersen et al., Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 535, 376-381 (2016).
7. C. Kasai et al., Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol* 15, 100 (2015).
8. J. Sato et al., Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 37, 2343-2350 (2014).
9. Bolnick, D.I., et al., Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nature Communications*, 2014. 5(1): p. 4500.
10. Franssen, F., et al., The Impact of Gut Microbiota on Gender-Specific Differences in Immunity. *Frontiers in Immunology*, 2017. 8(754).

## 業 績

## 【原著論文】

- Miyauchi E, Kim S-W, Suda W, Kawasumi M, Onawa S, Taguchi-Atarashi N, Morita M, Taylor TD, Hattori M, **Ohno H**. Gut microbes act in concert to exacerbate inflammation in spinal cords. *Nature in press* (IF: 40.070)
  - Shimokawa C, Kato T, Takeuchi T, Ohshima N, Furuki T, Ohtsu Y, Suzue K, Imai T, Obi S, Ochiai A, Izumi T, Sakurai M, Arakawa H, **Ohno H**, Hisaeda H. CD8+ regulatory T cells are critical in prevention of autoimmune-mediated diabetes. *Nat Commun.* 2020;11(1):1922. (IF: 11.878)
  - Satoh-Takayama N, Kato T, Motomura Y, Kageyam T, Taguchi-Atarashi N, Kinoshita-Daitoku K, Duroda E, Di Santo JP, Mimuro H, Moro K, **Ohno H**. Bacteria-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Stomach Provide Immune Protection through Induction of IgA. *Immunity* 2020;52(4):635-649. (IF: 21.522)
  - Wakabayashi T, Yamaguchi K, Matsui K, Sano T, **Kubota T**, Hashimoto T, Mano A, Yamada K, Matsuo Y, Kubota N, Kadowaki T, Iwatsubo T. Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019;14:15. (IF: 8.274)
  - Hara S, Sasaki T, Satoh-Takayama N, Kanaya T, Kato T, Takikawa Y, Takahashi M, Tachibana N, Kim KS, Surh CD, Ohno H. Dietary Antigens Induce Germinal Center Responses in Peyer's Patches and Antigen-Specific IgA Production. *Front Immunol.* 2019;10:2432. (IF: 5.511)
  - Sasaki T, Moro K, **Kubota T**, Kubota N, Kato T, **Ohno H**, Nakae S, Saito H, Koyasu S. Innate Lymphoid Cells in the Induction of Obesity. *Cell Rep.* 2019;28:202-217. (IF: 7.815)
- 病 ヒトマイクロバイオーム Vol.2 2020
- 中西裕美子、大野博司** 老化と腸内細菌 実験医学増刊 Vol.37 No. 2 2019
  - 中西裕美子、大野博司** 腸内細菌叢が宿主の生理機能へ及ぼす影響 感染症 Vol.49 No.4 2019
  - 中西裕美子、大野博司** 腸内細菌と健康長寿 老年医学 Vol.57 No.8 2019
  - 窪田哲也、窪田直人、門脇孝**：TLR4 は飽和脂肪酸に対する受容体ではないが、マクロファージの代謝をリプログラミングすることによって脂質誘導性の炎症を惹起させる *Cardio-Renal Diabetes* Vol.7 40-44, 2019, 01
  - 窪田哲也、窪田直人、門脇孝**：肥満に伴う高インスリン血症によるマクロファージの Irs2 低下は IL-4 誘導性の M2a-subtype マクロファージの活性化を障害する *DIABETES UPDATE* 8(2) 2-3, 2019.4
- 【招待講演】
- 大野博司** 出生コホートによる小児アトピー性皮膚炎と腸内細菌叢解析 第 119 回日本皮膚科学会総会 2020.6, 京都 (Web 講演)
  - Hiroshi Ohno**, Chikako Shimokawa, Eiji Miyauchi, Hajime Hisaeda Gut microbiota and host diseases, especially autoimmune diseases. The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity 2020.1, Chiba, Japan
  - Hiroshi Ohno**, Chikako Shimokawa, Eiji Miyauchi, Hajime Hisaeda Gut microbiota and autoimmune diseases. 第 48 回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
  - 大野博司** 腸内細菌と 2 型糖尿病 第 44 回日本比較内分泌学会及びシンポジウム 2019.11, さいたま市
  - 大野博司、柴田亮平、中西裕美子、加藤完、池田和貴、須田互、Weng Sheng Kong、山出史也、中野泰至、服部正平、菅野雅元、有田誠、下条直樹** 腸内細菌叢と小児アトピー性皮膚炎：出生コホートによる解析 第 56 回日本小児アレルギー学会 2019.11, 千葉
  - Hiroshi Ohno** Gut microbiota and autoimmune diseases. Block Symposium : Mucosal Immunology and Microbiota KAI International Meeting 2019 2019.10, Seoul, 大韓民国
  - 大野博司** 腸内細菌叢研究と疾患、特に腸疾患に関して 第 74 回日本大腸肛門病学会学術集会 2019.10, 東京
  - 大野博司** 知っていますか？腸内環境と免疫系・生体防御や病気との関わり 千葉県獣医師会市民公開講座 2019.10, 千葉
  - 大野博司** 宿主-腸内細菌叢相互作用 第 37 回日本ヒト細胞学会学術集会 2019.10, 東京
- 【総説】
- Ohno H**. The impact of metabolites derived from the gut microbiota on immune regulation and diseases. *Int. Immun.* in press (IF: 4.168)
  - 對田 尚、**大野博司** 炎症性腸疾患と抗体医薬 臨床免疫・アレルギー科 Vol.74 No.1 2020s
  - 宮内栄治、**大野博司** 多発性硬化症における腸内細菌と免疫系の役割 *メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 2020
  - 竹内直志、**中西裕美子** 腸内細菌叢と肥満・2 型糖尿

## 【研究開発部】腸内細菌叢（解析ツール開発）

10. **Hiroshi Ohno** Gut microbiota and autoimmune diseases. 17th International Congress of Immunology 2019.10, 北京、中華人民共和国
11. **大野博司** 宿主-腸内細菌叢相互作用:腸内細菌叢の解析手法と医療・産業への応用の可能性 情報機構セミナー 2019.9, 東京
12. **大野博司** 腸内細菌叢と疾患の発症・病態との関わり 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2019.8, 神戸
13. **大野博司** 腸内細菌叢と自己免疫疾患:多発性硬化症と1型糖尿病 動物共生科学の創生による、ヒト健康社会の実現に関する国際シンポジウム 2019.7, 相模原
14. **Hiroshi Ohno** Impact of small intestinal bacteria on the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology International Conference, 2019.6, 済州、大韓民国
15. **Hiroshi Ohno** Impact of small intestinal bacteria on the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. 3th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health IPC2019, 2019.6, Prague, Czech Republic
16. **大野博司** 宿主-腸内細菌叢相互作用:腸内細菌叢の解析手法と医療・産業への応用の可能性 情報機構セミナー、2019.9, 東京
17. **窪田哲也** 肥満に伴う M2a-subtype マクロファージ活性化障害の分子機構 第62回日本糖尿病学会 2019.5, 仙台
18. **窪田哲也** The novel mechanisms of adiponectin secretion DESIRE Conference 2019, 2019.2.28, 東京

### 【受賞講演】

1. **窪田哲也** 病態発症における臓器内・臓器間のインスリン作用失調メカニズムの解明-IRS-1/IRS-2を中心とした解析- 第22回日本臨床分子医学会 学会賞 2019, 4, 名古屋

### 【口頭発表】

1. Takashi Taida, Eiji Miyauchi, Yumiko Nakanishi, **Hiroshi Ohno** Cigarette smoking facilitates intestinal colonization of oral bacteria in patients with inflammatory bowel disease. 第48回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
2. Naoko Satoh-Takayama, **Hiroshi Ohno** Identification of stomach ILC2-inducibile commensal bacteria belonging to S24-7 family of order Bacteroidales. 第48回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
3. 竹内直志、宮内栄治、島本周、松山彰取、**大野博司** 腸内細菌代謝物酢酸は IgA の反応性を変化させ細菌叢を制御する 第56回日本消化器免疫学会総会 2019.8, 京都
4. **窪田哲也**、窪田直人、林高則、相原允一、山内敏正、門脇孝: 血管内皮細胞の IRS-2 は動脈硬化抑制に働く、第62回日本糖尿病学会年次学術集会、2019.5、仙台

5. **窪田哲也**、窪田直人、井上真理子、林高則、相原允一、山内敏正、門脇孝: マクロファージ Irs2 を介した慢性炎症とインスリン抵抗性発症メカニズム、第92回日本内分泌学会学術総会、2019.5 仙台

### 【ポスター発表】

1. Takashi Ito, **Yumiko Nakanishi**, Tamotsu Kato, Toshi Jinnohara, Fumiya Yamaide, Naoki Shimojo, **Hiroshi Ohno** Exploring asthma onset factors in the intestinal environment with a human children birth cohort. 第48回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
2. Tadashi Takeuchi, Keishi Kameyama, Eiji Miyauchi, Yumiko Nakanishi, Takashi Kanaya, **Hiroshi Ohno** Lipid-reactive bacteria exacerbates metabolic disorders via impairment of the gut integrity. 第48回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
3. Eiji Miyauchi, Tomoyo Taniguchi, Alex Olia, Eiji Nagayasu, Katuru Osbert, Kazutomo Suzue, Takashi Imai, Chikako Shimokawa, Risa Onishi, E.I. Odongo-Aginya, Nirianne Palacpac, Haruhiko Maruyama, Eisaku Kimura, Toshihiro Mita, Toshihiro Horii, Hajime Hisaeda, **Hiroshi Ohno**. Altered gut microbiota composition in patients with Plasmodium falciparum malaria. 第42回日本分子生物学会年会 2019.12, 福岡
4. **中西裕美子**、竹内直志、水野由子、山道信毅、須田互、服部正平、窪田直人、**窪田哲也**、**大野博司** 2型糖尿病や肥満の発症に関わる腸内細菌と代謝物の探索 第62回日本糖尿病学会 2019.5, 仙台

### 【特許】

- (1) 国内特許出願 0件
- (2) 国外特許出願 0件

# 「腸内細菌叢」プロジェクト

腸内環境制御グループリーダー 福田 真嗣

## 【基本構想】

本プロジェクトは、様々な疾患との関連が示唆されている腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御することにより、腸内環境のバランスの悪化が起因となる疾患の予防や治療につながる腸内環境制御システムの基盤構築を目的とする。

ヒトの腸管内にはおよそ1,000種類、40兆個にも及ぶとされる腸内細菌が生息する。正常なバランスを保っている腸内細菌叢は外部から侵入する外来細菌の定着を防ぎ、宿主免疫系を活性化する。一方で、腸内細菌叢のバランスの乱れは大腸炎や大腸がんといった腸管関連疾患のみならず代謝疾患、自己免疫性疾患などの発症にも関連することが報告されている。遺伝子解析技術の進歩により、腸管内に生息する細菌叢の構成、種類に関しては多くの情報が得られているが、生息する個々の腸内細菌が果たす役割もしくはその培養方法に関しては研究途上である。また、腸内細菌叢由来の代謝物質が宿主の健康維持や疾患に深く関与していることが示されてきたが、それらがどのような腸内細菌により産生されているかは不明な点が多い。

腸内細菌叢をはじめとした、腸内環境を適切に制御するためには個々の腸内細菌の特性を理解し、腸内細菌叢由来の代謝物質や菌体自身が宿主へ与える影響を知ることが重要となる。腸内細菌が主に生息する大腸は嫌気性環境であり、腸内細菌叢を構成する細菌のほとんどは偏性嫌気性細菌に区分されている。簡易的な嫌気環境下やグローブボックスなどの嫌気培養装置を使用した腸内細菌の単離培養法が構築され、腸内細菌の単離培養に使用する培地もいくつか市販されている。しかしながら、現段階の技術では培養できない難培養性腸内細菌も報告されるなど、腸内細菌の培養技術については改善の余地が数多く残されている。本プロジェクトの鍵となる腸内環境制御システムの構築を行うためには難培養性腸内細菌を含む腸内細菌を安定的に単離・培養する方法を構築し、標的とする腸内細菌の特性を理解し、自在に操るためのツールの開発が必要となる。そこで本研究では以下の研究課題に取り組む（1）難培養性腸内細菌の新規培養方法の確立（2）難培養性腸内細菌単独定着マウスを用いた表現型解析（3）標的となる腸内細菌を選択的に取得するためのツールの開発、の3つを実施する。これらの研究を遂行することで、腸内環境制御を行うためのツール、有用菌を利用したサプリメント、機能性食品の開発、病原性細菌に対する予防の検討、治療薬の開発など多方面へ応用可能とすることで、健康維持や疾患予防および新規治療方法開発に貢献できると考えている。

## 1. 平成31年/令和元年度の研究目的

プロジェクト三年目となる平成31年/令和元年度は以下の各項目を重点項目として定めた。

### (1) 腸内細菌基準株の安定的培養技術の確立

腸内細菌叢を構成する個々の腸内細菌を得るには二つの方法がある。一つ目は、腸内細菌叢が含まれているヒトやマウスの便試料懸濁液を直接培地プレート上に播種し、コロニーを形成させ、単離する方法である。二つ目は微生物バンクに登録されている腸内細菌基準株を入手し、培養する方法がある。日本国内において腸内細菌を含む微生物基準株は理化学研究所バイオリソースセンター（以下理研BRCとする）内の微生物材料開発室に保管、登録されている（URL：<http://jcm.brc.riken.jp/ja/>）。

プロジェクト当初より蓄積してきたヒトおよびマウスの腸内細菌叢の解析データから重要性が高いと考えられる細菌の中から、入手可能な腸内細菌基準株を理研BRCより購入した。入手した腸内細菌基準株は、今後の研究に向

け嫌気チャンバー内にて安定的かつ容易に培養する方法を模索した。

### (2) ヒト由来腸内細菌の単離、培養技術の確立

ヒトやマウスの腸内細菌叢において主要な割合を占める菌は基準株として単離されているものが多い。一方で、腸内細菌叢の中における割合が低く、数が少ない菌の単離、培養は困難であり、単離・培養するための培地の工夫や既存の方法とは異なった新たな培養法の開発が必要不可欠である。多くの腸内細菌は偏性嫌気性細菌に分類され、単離、培養中に少量の酸素が混入するだけで死滅することもある。このような特徴を持つ腸内細菌を失うことなく単離、培養するには、培養環境中の酸素を可能な限り除去することが必要となる。

また、我々の体内には食物に由来する多くの栄養素や未消化物が存在しており腸内細菌はそれらを栄養源として増殖している。そのため細菌の増殖に必要な栄養等を添加した新たな培地を作製することも重要となる。これらのこ

## 【研究開発部】腸内細菌叢（腸内環境制御）

とを踏まえ、昨年度に引き続き慶應義塾大学先端生命科学研究所や森下仁丹株式会社と協力し、新たな培地作製や昨年度構築した新規培養装置を使用した難培養性腸内細菌の培養方法の改良を試みた。

また新規培地を用いて、健康人の便試料からの腸内細菌の単離、培養を試みた。

### (3) 腸内細菌が生体に及ぼす影響の評価

単離、培養方法が確立した腸内細菌が生体に与える影響を評価するためには、(1)腸内細菌単独定着マウスを構築し、代謝物の網羅的解析や腸管上皮細胞、免疫細胞の組成や数を検討する。(2)安定培養した腸内細菌の投与による免疫系の変化や、薬剤マウス誘導腸炎モデルにおける炎症応答への感受性を評価する。本プロジェクトの拠点である川崎生命科学・環境センター(LiSE)には実験動物の維持、繁殖、実験を実施するための研究設備が備わっていない。そこで隣接する公益財団法人 実験動物中央研究所（以下CIEAとする）と連携し腸内細菌単独定着マウスの解析や腸内細菌投与実験を実施した。これまでに安定培養方法を確立した腸内細菌の数もプロジェクトの進捗とともに増加しており、腸内細菌単独定着マウスを構築するためのスペースを確保が課題となっていた。そこで、一つでも多くの腸内細菌の機能を明らかにするため、大型実験動物施設を有する筑波大学との共同研究を締結し、同施設において単独腸内細菌定着マウスに関連する研究を進めた。

### (4) 標的腸内細菌を単離するためのツールの開発

腸内細菌叢を構成する腸内細菌の中には、ビフィズス菌や乳酸菌などを代表とする宿主の健康維持や免疫系の亢進にはたらく有用菌が存在する一方、病原性大腸菌などの腸管関連疾患や代謝疾患・自己免疫疾患に関与する腸内細菌などのいわゆる病原性細菌が存在している。多種多様な腸内細菌により構成される腸内細菌叢から特定の腸内細菌を単離するには先に述べたように便試料懸濁液を直接培地プレート上に播種し、コロニーを形成させ、単離する方法である。選択培地や培地に特定の物質を添加することによりある程度の選択をすることは可能であるものの、標的となる細菌のみを単離する効率は高くない。そこで本年度は標的腸内細菌を効率よく単離するためのツールの開発に着手した。

## 2. 平成31年/令和元年度の研究成果

平成31年/令和元年度は以下に挙げる具体的な研究成果を得ることができた。実験方法、結果の詳細は各研究員報告書に記載しており本項では要点のみを示す。

### (1) 腸内細菌基準株の安定的培養方法の確立

独自に作成した腸内細菌株のリストを元に、本年度は理研BRCから入手可能な腸内細菌基準株16種類を入手した。はじめに嫌気性菌の一般的な培養に広く用いられているGAMブイヨンを用いて寒天培地、液体培地を作成し、腸内細菌基準株の培養を実施した。表1は本プロジェクトにお

いて検討した腸内細菌基準株の現段階における培養状況をまとめたものである。大半の腸内細菌基準株はGAM培地を用いて安定培養することができた。その一方で、一部の腸内細菌基準株はGAM培地のみでは培養できなかったが、GAM培地に特定の基質を追加することで安定培養することができた。

しかしながら、6種類の腸内細菌基準株に関してはこれまで検討してきた培養方法では培養することができないことが明らかとなっており、これらに関しては、引き続き組成の異なる培地を用いて安定的な培養方法の確立を目指していく。

	基準株入手数	培養成功数	培養検討中
グラム陽性菌	47	45	2
グラム陰性菌	16	12	4

表1 本年度終了時の腸内細菌基準株の培養状況

### (2) ヒト由来腸内細菌の単離、培養技術の確立

これまで構築してきた嫌気培養方法を用いて、ヒト便試料からの腸内細菌を単離、培養を試みた。便試料に含まれる食物由来未消化物をフィルターにより除去し、残った腸内細菌懸濁液を様々な非選択培地/選択培地に播種、嫌気チャンパー内にてコロニーを形成させた。プレート上に形成されたコロニー群から単コロニーを分取し、液体培地内にて培養を継続した。増幅が確認されたものはDNAを抽出し、その配列をシーケンス解析することで、菌種の同定を行った。本年度は本手法により2種類グラム陰性菌(2名分、各個人から1株ずつ)をヒト便試料より単離した(表2)。

	グラム陽性菌	グラム陰性菌
本年度	-	2種(4菌株)
累計	2種(6菌株)	4種(6菌株)

表2 本年度終了時の腸内細菌単離株の状況

多くの腸内細菌の培養が難しい理由として考えられる一つの要因は、腸内細菌同士の共生関係がお互いもしくは片方の生存に必須となる場合が想定される。腸内細菌叢を構成する個々の腸内細菌同士は生存競争を繰り広げる一方で、互いに助け合い共生する細菌も存在していると考えられている。すなわち、ある腸内細菌が産生する代謝産物が他の腸内細菌の増殖に重要である可能性がある。このような状況を擬似的に再現するために、二槽式透析培養器を用いた腸内細菌の培養を試みた。本培養装置は細菌を通さずに特定の成分のみを通す特殊な膜を中央部に配置しており、腸内細菌叢を含む培地で産生された代謝産物などの成分が膜を通して反対側に供給される仕組みとなっている。始めに本培養装置の有用性を検証するために、左側に培地と難培養性腸内細菌基準株を添加し、右側に腸内細菌叢を含む培地を加え、嫌気チャンパー内にて培養を試みた。その結果、本透析培養器を用いることで難培養性腸内細菌基準株を培養することができた。本年度はこれまで確立し

てきた二槽式透析培養器の小型化や使用する腸内細菌叢を含む培地の至適条件の検証を行った。

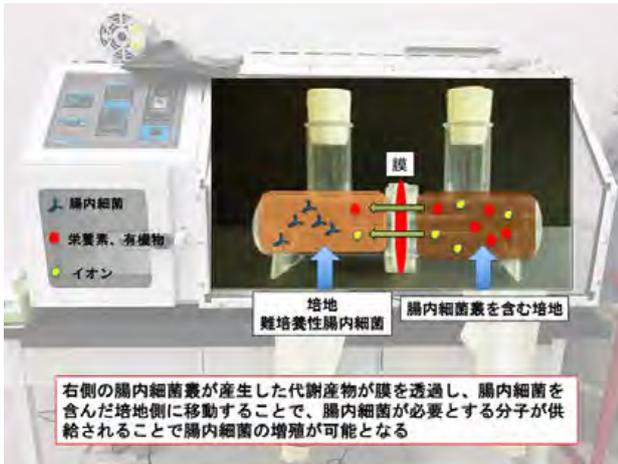


図2 二槽式透析培養器を用いた腸内細菌の培養

(3) 腸内細菌が生体に及ぼす影響の評価

これまでグラム陰性常在腸内細菌の一つを投与するとマウスの生存には影響しないものの、脾臓が肥大し、炎症に関する免疫応答が強く惹起されることを見出している。本年度は炎症の応答を惹起する成分を特定するために細菌分画を投与した。その結果、グラム陰性常在腸内細菌膜分画を投与すると投与後12時間で脾臓の重量の増加、免疫細胞の増加が認められた。一方で、骨髄の細胞を検討したところ造血幹細胞や骨髄系前駆細胞の減少が見られた。これらの結果から、グラム陰性常在腸内細菌の膜成分が炎症の引き金となり、造血幹細胞および多能性前駆細胞が脾臓に移行し、免疫細胞を増やしていることが示唆された。

さらにグラム陰性常在腸内細菌の定着が粘膜免疫系に及ぼす影響を評価するため無菌マウスおよび単独グラム陰性常在腸内細菌定着マウスにおける脾臓での免疫細胞の検討を行った。その結果、脾臓の重量や免疫細胞数に大きな変化は生じておらず、菌の定着のみでは脾臓における炎症を惹起しないことを明らかにした。

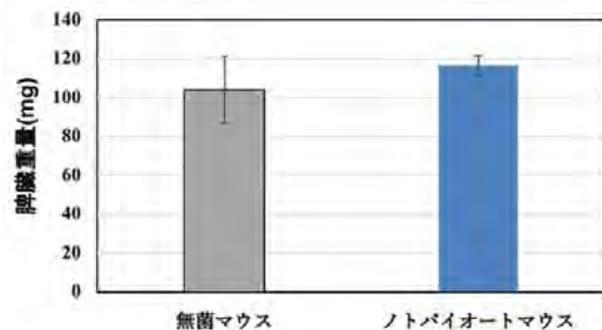


図3 同週齢の無菌マウスとグラム陰性常在腸内細菌定着マウス（ノトバイオームマウス）の脾臓重量の検討

(4) 標的腸内細菌単離に向けたツールの開発

多種多様の腸内細菌から構成される腸内細菌叢から標的となる細菌を単離するには選択培地や特定の基質した

培地による培養など経る必要がある。そこでより効率よく標的細菌のみを単離・濃縮する方法の検討を行った。そこで抗体に着目した。抗体は免疫細胞が賛成する糖タンパク分子で特定の分子を認識して結合する働きを担う。実際に生体内に侵入した外来抗原を認識し、排除する機構にも抗体は関与している。一方で、腸内細菌を認識する抗体の作製は過去にも報告はあるが、近い種族の腸内細菌も認識してしまうという課題がある。そこで本プロジェクトでは標的抗原に対する特異性の高い抗体の作製が可能な手法を用いて、特定の腸内細菌を標的とする抗体の作製を試みた。グラム陽性腸内細菌の一つを標的とする抗体作製を行い、同種族の腸内細菌に対して様々な反応様式をとる抗体産生細胞が得られた。その中の一つは、標的となるグラム陽性細菌特異的な結合がありながら、同種族の腸内細菌には結合を示さなかった。また、標的細菌を含む複数の腸内細菌基準株を混合した擬似腸内細菌叢から本抗体を用いることで効率よく標的細菌を単離・濃縮する系の構築に成功した。

3. 研究協力体制に関して

本プロジェクトでは研究を円滑に進めていくために様々な研究機関との共同研究を実施している。そのため、共同研究先との綿密な連携はプロジェクトを推進していく上で重要な項目となる。CIEAは隣接しているため、研究ディスカッションも容易に行うことが可能である。一方で、慶應義塾大学の両研究施設、筑波大学は距離も離れており、互いの研究施設での打ち合わせをする機会が少なくなっ



てしまう。そのため常時オンラインで互いの研究室を繋ぐことにより円滑にコミュニケーションを取れる環境を整備し活用している。また、森下仁丹株式会社および熊本大学とは定期的に進捗状況を報告する機会を設け、プロジェクトの成果や課題の共有を行い、共同研究の進め方を議論している。

図4 本プロジェクトの研究協力体制

4. 総括

プロジェクト3年目となる本年度は、研究計画に沿った研究項目に取り掛かり、概ね予定通り研究を進めることができた。来年度以降も引き続き研究目標以上の成果を生み出せるように尽力する。

# 腸内環境制御基盤技術の開発に向けた難培養性腸内細菌の 培養法確立および生体に与える影響の評価

中藤 学、大縄 悟志

## 1. はじめに

ヒトを含む哺乳類は、生後すぐに外部の環境に曝されることにより微生物との共生関係が始まる。体内にありながら外界とも繋がる消化管内も例外ではない。ヒトの腸管にはおよそ1000種類、40兆個もの腸内細菌が生息しており、地球上のあらゆる環境の中で最も生息密度が高い場所の一つとなっている。腸内細菌同士は互いに生存競争を繰り返したり、互いに支えあったりしながら一定のバランスを保つことで腸内細菌叢を形成している。食生活の変化が大きい乳幼児期では腸内細菌叢の変動も大きくなるが、成人になると日々の食事や生活様式により多少の変動はあるものの腸内細菌叢は安定した状態となる（参考文献1）。

### 1. 1 腸内細菌叢が宿主に与える影響

宿主と共存関係を構築している腸内細菌叢は宿主に有益な効果をもたらしている。我々は呼吸や飲食などにより、常に外来抗原が体内へと侵入するリスクを抱えている。腸内細菌叢は消化管内に侵入してくるこれらの外来性抗原の定着を防ぐ役割を果たしている。また、腸内細菌は食物由来の未消化物を栄養源として発酵分解し、その際に代謝物質として低分子を菌体外に放出する。腸内細菌叢由来代謝物質は腸管上皮細胞のエネルギー源となるだけでなく物理的バリアの構築に寄与し腸管上皮細胞の恒常性維持にも重要な役割を果たしている（参考文献2）。更に、一部の腸内細菌由来代謝物質は宿主の免疫機能を活性化させる。例えば、腸内細菌叢を構成する主要な細菌群の一種であるクロストリジウム目細菌群が食物繊維を代謝発酵し産生する酪酸は、炎症やアレルギーの起因となる過剰な免疫応答を抑制するT細胞である制御性T細胞の分化誘導を促進するといった重要な役割を果たしている（参考文献3、4）。

その一方で、ストレスや生活習慣の乱れにより腸内細菌叢のバランスが崩れることが疾患につながることも知られている。実際に腸内細菌叢の乱れが大腸がんや大腸炎などの腸管関連疾患のみならず、糖尿病、動脈硬化、自閉症、アレルギー疾患など多岐にわたる疾患の発症にも関連することが報告されている（参考文献5）。また、バランスの乱れた腸内細菌叢由来の代謝物質も、これらの疾患を引き起こす要因となっている（参考文献6）。ゆえに、腸内細菌叢をはじめとする腸内環境を正常に保つことは健康維持にとって重要となる。

## 1. 2 個々の腸内細菌を対象とした研究の重要性と課題

これまでの研究から個人個人の腸内細菌叢の構成、種類および経時的変化は明らかとなってきた。また、項目1.1で述べてきたように腸内細菌叢由来の代謝物質は宿主の健康維持に重要な要素となってくるのみならず、疾患とも深く関わることが明らかとなってきた。そのため個々の腸内細菌の特性や代謝物質を理解することが重要である。しかしながら、それらの代謝物質が腸内細菌叢を構成するものの腸内細菌由来するものであるかについては、不明な点が多い。また、これらに関する研究報告数が少ない一番の理由は、腸内細菌の培養方法が十分に確立されていないことが挙げられる。腸内細菌はその多くが偏性嫌気性細菌に分類されており、少量の酸素の混入により生育が阻害されてしまう。脱酸素剤などを利用した簡易的嫌気環境の構築やグローブボックスなどの嫌気培養装置を利用した腸内細菌の培養も進んでいるものの、依然として単離、培養ができない腸内細菌も数多く残されているのが現状である。

## 1. 3 腸内環境制御基盤技術の構築に向けて

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御する基盤技術の構築は、我々の健康維持や疾患予防に有効な手段となる。このような基盤技術を構築するためには、以下に示す3つの課題に取り組む必要がある。

1. 腸内細菌の安定的な大量培養方法の確立
2. 難培養性腸内細菌の新規培養技術の開発
3. 腸内細菌単独定着マウスを作製や腸内細菌の投与が生体に与える影響の評価する

個々の腸内細菌に関する基礎データの蓄積は、腸内環境制御基盤技術に必要となる創薬、栄養補助食品、機能性食品の開発にも直結することが期待される。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 腸内細菌基準株の安定的培養方法の確立

個々の腸内細菌の特性を理解するために微生物バンクの一つである理化学研究所バイオリソースセンターより腸内細菌基準株16種類を入手した。これらの腸内細菌基準株に加え、これまで安定培養法が確立できていない6種類の腸内細菌基準株を加えた合計22種類の基準株の安定培養方法の確立を試みた。

はじめに嫌気性菌の培養に一般的に用いられているGAM

ブイヨン（日水製薬株式会社）を用いて、寒天培地および液体培地を作製し、嫌気チャンパー内にて腸内細菌基準株の培養を試みた。本年度入手した腸内細菌基準株のうち12種類に関しては安定培養方法を確立できた。残りの4種類に関してはGAM培地単独では培養できなかった。そこで、理化学研究所バイオリソースセンター（BRC）の情報をもとに特定の基質をGAM培地に添加したものを使用して、培養を試みた。その結果、残りの4種類についても安定培養法を確立することに成功した。安定的な培養方法を確立したすべての腸内細菌基準株は、細菌類を染色する方法の一つであるグラム染色を実施することで単一の細菌であることを確認した。単一菌であることが確認できた腸内細菌基準株については、今後の実験の際に他の菌が混入した際にも対処できるように予備の凍結ストックを作製した。

	検討数	培養成功数
グラム陽性菌	16種	16種 (GAM12種, 改良型GAM4種)

表1 本年度に実施した腸内細菌基準株の培養状況

## 2.2 ヒト由来腸内細菌の単離、培養

これまでに確立してきた嫌気培養方法を用いて、ヒト便試料からの腸内細菌の単離、培養を試みた。本年度はビタミンやミネラル成分が多く含まれるYCFA培地に更に数種類の栄養素添加した改良型YCFA培地(mYCFA)を用いてヒト便試料より腸内細菌の単離、培養を試みた。はじめに便試料から未消化物などを含む夾雑物をフィルターにて除去したのちに、mYCFA液体培地で一晚培養した。次に培養液をmYCFA寒天培地に播種し、培養プレート上から単コロニーを分取、培養した後にコロニーPCRにより目的となるコロニーを選択した。その後、シークエンス解析により菌株の同定を実施し、今後の研究のためグリセロールストックの作成を行った。本年度は、2種類のグラム陰性菌を合計4株単離、培養することに成功した(図1)。

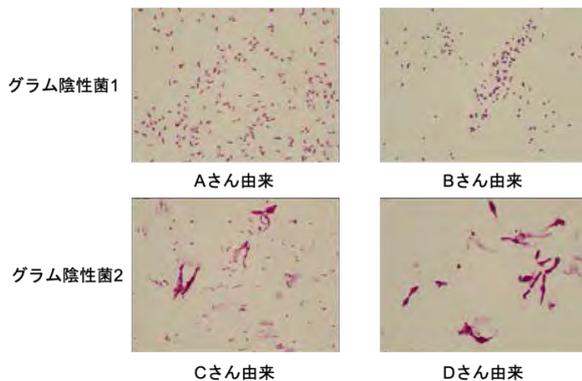


図1 健康人便試料より単離した腸内細菌のグラム染色

## 2.3 ヒト由来腸内細菌単離に向けた新規培養技術の確立

腸内細菌同士は生存競争をすることにより宿主の消化管内の限られた生存領域を確保しているが、一方で、互い

に共生関係を持つ腸内細菌も存在している可能性が示唆されている。このような腸内細菌は互いの利益になるような代謝物質を産生、利用することで増殖していることが推察される。そこで微生物共生系を検討するために、二槽式透析培養器を用いた培養方法を構築した。本年度は装置の小型化および栄養素供給側の使用培地の至適条件の検討を実施した。はじめに装置の小型化に関する検討を行なった。現在使用しているガラス製二槽式透析培養器は片側に12-15 mlの培地が必要となる。栄養素供給側の使用培地する培地の量も多くなってしまふ。近年、プラスチック製の類似した構造を有する培養器(Uniwells, 図2)が購入可能となった。本プラスチック製共培養器は最大容量が1.0-1.5 mlと少なく、使用する培地を減らすことが可能である。そこでUniwellsを用いて難培養性腸内細菌基準株の培養を試みた。培養後24時間以降、菌の増殖が開始される様子が確認された。しかしながら96時間培養後にグラム染色により便懸濁液を用いて増幅された菌を確認したところ標的細菌以外にも複数の菌が増殖していることが確認された(図2)。複数回実験を繰り返し実施したが目的の菌のみの培養することは出来なかった。これらの結果から、装置を小型化するには現状使用しているガラス製培養機器自体を小型化する必要であると考えられる。

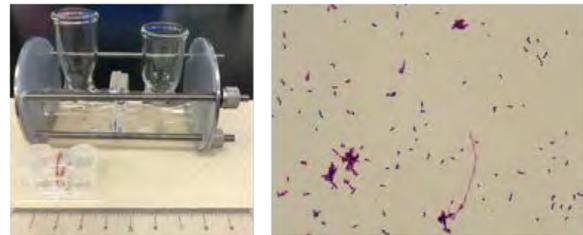


図2 小型透析培養器の検証、左図はガラス器具との大きさの違い、右図は小型装置で培養した後のグラム染色画像

次に、栄養供給側に使用する培地の検証を行なった、様々な物質を含む培地を用意し、難培養性腸内細菌基準株の培養を行なった。その結果、いくつかの培地で難培養性腸内細菌基準株を培養することが出来た。興味深いことに、培養した同じ腸内細菌基準株の形態が使用した培地により異なることを見出した(図3)。これは供給培地側から入り込む栄養素が異なり、腸内細菌自体の増殖効率や環境ストレスが変化することにより生じていることが示唆される。

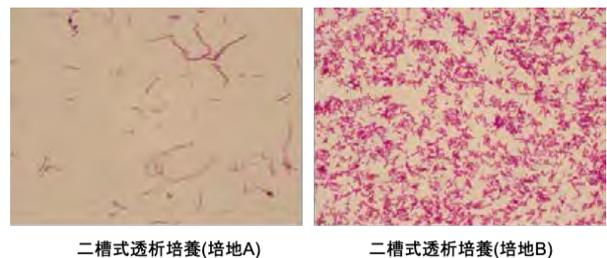


図3 二槽式透析培養器を用いた難培養性腸内細菌基準株の培養検討、培地Aの形態がBRCに掲載されているグラム染色像に近い。

## 2. 4 腸内細菌が生体に与える影響の評価

本プロジェクトはこれまでに 40 種類を超える腸内細菌基準株の安定培養方法を確立してきた。それらを用いることにより、昨年度にグラム陰性常在腸内細菌の一つが脾臓において強い炎症応答を引き起こし、各種免疫細胞の増加を引き起こすことを明らかにしてきた。本年度はさらに詳細な機構を解明するために炎症を引き起こすグラム陰性常在細菌側の因子および様々な組織に対する影響を検証した。その結果、細菌の膜成分を投与すると、細菌を投与した際と同様の炎症が引き起こされることを新たに見出した。また新たに、骨髄において造血幹細胞や骨髄系前駆細胞の減少が見られた。これらの細胞サブセットの減少は脾臓やリンパ節などの全身に細胞が移行したことによるものであると推測される。これらの結果からグラム陰性常在腸内細菌の膜成分が炎症の引き金となり、造血幹細胞および多能性前駆細胞が脾臓に移行し、免疫細胞を増やしていることが示唆された。

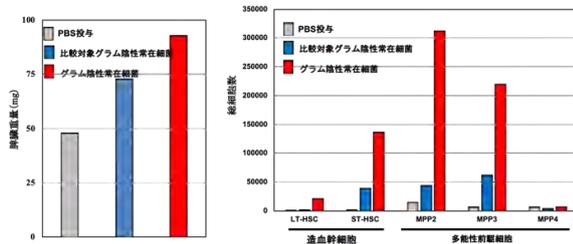


図 4 細菌膜成分投与後 12 時間における脾臓の重さ（左図）および骨髄における各細胞数（右図）

グラム陰性常在腸内細菌の定着が生体に与える影響を評価するため無菌マウスおよび単独グラム陰性常在腸内細菌定着マウスにおける脾臓での免疫細胞の検討を行なった。その結果、脾臓の重量や免疫細胞数に大きな変化は生じておらず、菌の定着のみでは脾臓における炎症を惹起しないことが明らかとなった。以上のことから、グラム陰性常在腸内細菌は恒常性が保たれた状態では生体内に侵入できないため炎症を惹起できないことを示唆するものであった。今後炎症時における本グラム常在腸内細菌が及ぼす影響を明らかにするには実験腸炎モデルによる検証が必要である。

## 3. 考察及び今後の展望

本年度は 16 種類の腸内細菌基準株の安定的培養法の確立に成功した。一方で、安定培養法の確立出来ていない腸内細菌基準株に関しては引き続き二槽式透析培養器を用いた培養による培養を検討していく。常在グラム陰性腸内細菌の免疫感作により引き起こされる強い炎症応答に関しても引き続き詳細なメカニズムの解明を進めていく。共同研究先とも連携しつつ、一つでも多くの腸内細菌単独定着マウスを構築し、代謝物の網羅的解析、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を検討する。

## 4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、腸内細菌の分離、新規培養技術の構築では慶應義塾先端生命科学研究所の谷川直紀博士、楊佳約博士、筑波大学トランスボーダー医学センターの尾

花望博士、森下仁丹株式会社の河野麻美子博士を始め多くの方々のご協力を賜りました。腸内細菌が生体に与える影響の評価では熊本大学 滝澤仁教授、林慶和博士のご協力を賜りました。また動物実験に関しては公益財団法人 実験動物中央研究所の高橋利一氏、小倉智幸氏、何裕遥氏、野津量子氏から腸内細菌単独定着マウス構築のためのご指導、ご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

## 【参考文献】

- 1 Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.Z., Abe, F., Osawa, R., Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 25:16:90, 2016.
- 2 Okada, T., Fukuda, S., Hase, K., Nishiumi, S., Izumi, Y., Yoshida, M., Hagiwara, T., Kawashima, R., Yamazaki, M., Oshio, T., Otsubo, T., Inagaki, O. K., Kakimoto, K., Higuchi, K., Kawamura, Y. I., Ohno, H., Dohi, T. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 4: 1654, 2013.
- 3 †Furusawa, Y., †Obata, Y., \*Fukuda, S. († co-first and \*corresponding author), Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., \*Hase, K., \*Ohno, H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450, 2013.
- 4 Atarashi, K., Tanoue, T., Suda, W., Oshima, K., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S.W., Fritz, J.V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., Honda, K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500: 232-236, 2013.
- 5 Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., Finlay, B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):859-904.
- 6 Schulz, M.D., Atay, C., Heringer, J., Romrig, F.K., Schwitalla, S., Aydin, B., Ziegler, P.K., Varga, J., Reindl, W., Pommerenke, C., Salinas-Riester, G., Böck, A., Alpert, C., Blaut, M., Polson, S.C., Brandl, L., Kirchner, T., Greten, F.R., Polson, S.W., Arkan, M.C. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature.* 514(7523):508-12, 2014

# 腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの作成

大縄 悟志、中藤 学、井上 浄

## 1. はじめに

ヒトの腸管内に共生する腸内細菌は食物由来の未消化物を発酵分解することで代謝物質を産生し、腸管上皮細胞の恒常性維持や粘膜免疫系の構築に寄与している。中には腸内環境改善効果を有する菌も存在しており、それらを含む製品や食品はプロバイオティクスと呼ばれ、腸内環境を整え、宿主に良い影響をもたらす。その一方で、生活習慣の乱れなどのストレスにより腸内細菌叢が攪乱されると、腸内細菌叢より産生される代謝物質が疾患の発症に関与することも知られている。機能性食品やプロバイオティクスの開発や、疾患に関連する腸内細菌を標的とした創薬を効率よく進めるには、標的となる腸内細菌を宿主の腸内細菌叢から効率よく分離するツールの開発が必要不可欠である。

### 1. 1 腸内環境を整える方法と課題

腸内細菌叢を含む腸内環境を整える方法として、ヨーグルトや発酵食品等の機能性食品の摂取が一般に浸透しており、これは日常的に実施可能という観点から予防的アプローチとして広く利用されている。しかしながら、機能性食品を摂取している間は便中から機能性食品に含まれる有用菌が検出されるものの、摂取していない期間は体内から有用菌は検出されなくなるため（参考文献 1）、機能性食品の効果は一時的であることが示唆されている。一方で、人から分離した有用菌を人に摂取することで 200 日間経過しても摂取した有用菌が検出されるという報告もある（参考文献 2）。また、臨床的見知からは、潰瘍性大腸炎などの特定疾患に指定されている炎症性腸疾患治療において「便細菌叢移植療法」が一定の効果を示すことが報告されている（参考文献 3、4）。しかしながら、これらの方法は同一個人由来の細菌叢ではなく他人の細菌叢のため、投与した腸内細菌群が患者の腸内に定着できないなどの問題も残る。そこで我々は腸内環境を調整する一つの手法として、外来性細菌ではなく宿主由来の腸内細菌を利用し、再度体内に戻すことにより、持続的な腸内環境改善が期待できると考えた。このような腸内環境制御基盤技術の開発を行うには宿主由来の特定の腸内細菌を多種多様な腸内細菌が存在する腸内細菌叢の中から効率よく標的細菌のみを単離するツールの開発が重要となってくる。

### 1. 2 標的細菌特異的抗体の作製意義

抗体は免疫細胞の一つである B 細胞から産生される糖タンパク質で、抗原と呼ばれる免疫応答を引き起こす物質に特異的に結合する能力を持っている。抗原の中には細菌も含まれており、特定の細菌を認識することのできる抗体

も報告されている。例えば、有用菌の一つである *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) に対する抗体作製の報告がある。本抗体は *B. longum* を認識するものの、他の *Bifidobacterium* 属細菌にも広く交差性を示すため腸内細菌叢などの集団から標的となる *B. longum* を特異的に単離・濃縮するために利用することは困難であることが示唆される（参考文献 5）。*B. longum* に対する抗体以外にも市販の細菌に対する抗体も多くのもが標的細菌以外の細菌に反応するという問題がある。そのため、腸内細菌叢を構成する多種多様な腸内細菌の中から標的となる細菌のみを単離するにはより特異性の高い抗体の使用が求められる。

### 1. 3 腸内環境制御基盤技術の構築のための研究ツール作成

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御する基盤技術の構築は、我々の健康維持や疾患予防に有効な手段となる。プロバイオティクスのような基盤技術を構築するため以下に示す 2 つの課題に取り組んだ

1. 特異性の高い腸内細菌特異的抗体の取得
2. 作製した腸内細菌特異的抗体を用いた標的細菌の分離・濃縮法の検討

## 2. 実験と結果

### 2. 1 標的腸内細菌特異的抗体の作製

本研究室で安定培養方法を確立した菌の中から、腸内細菌 A（以後、菌 A）を選択し、菌 A に対する抗体の作製を試みた。はじめに従来の抗体の作製方法と本研究室で確立した免疫不全マウスを使用した新規抗体作製方法（以降、新規法と記載する）を比較し、抗原感作後における血清中の抗体価の確認を ELISA 法により検討した。最終抗原感作が終了した時点で、血清を採取し、抗体価を検討したところ従来法に比べ、新規法では有意な抗体価の上昇が確認された（図 1）。

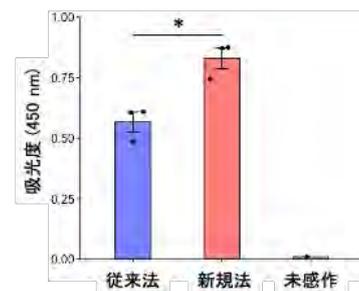


図 1 最終抗原感作後の血清中の菌 A に対する抗体価の比

較、青は従来法、赤は新規法、グレーは未感作をそれぞれ示す。

\* p<0.05

## 2. 2 菌 A に対する特異的な抗体の選抜

抗体価の上昇が確認されたマウスの脾臓を用いて、抗体産生細胞（ハイブリドーマ）の構築を行なった。得られた 48 クローンハイブリドーマの中から菌 A に対する反応性が高いものを選択し、以後の解析に用いた。はじめに、菌 A に対する特異性を検証するために、菌 A および菌 A と同属の腸内細菌に対する抗体の反応性の検証を行なった。フローサイトメータを用いて、各菌と抗体との反応を検討したところ菌 A 以外の同属の菌に対して反応性を示さなかった（図 2）。次に作製した抗体と腸内細菌叢を構成する代表的なグラム陰性菌、グラム陽性菌との反応性の検証を行なった。2 種類のグラム陰性菌、3 種類のグラム陽性菌に対する抗体の反応性を検証したところ全ての菌に対して結合は見られなかった（図 3）。これらの結果から、新規法を用いた抗体作製方法は標的細菌に対して高い特異性を有する抗体を作製するための有効な手法であることが明らかとなった。

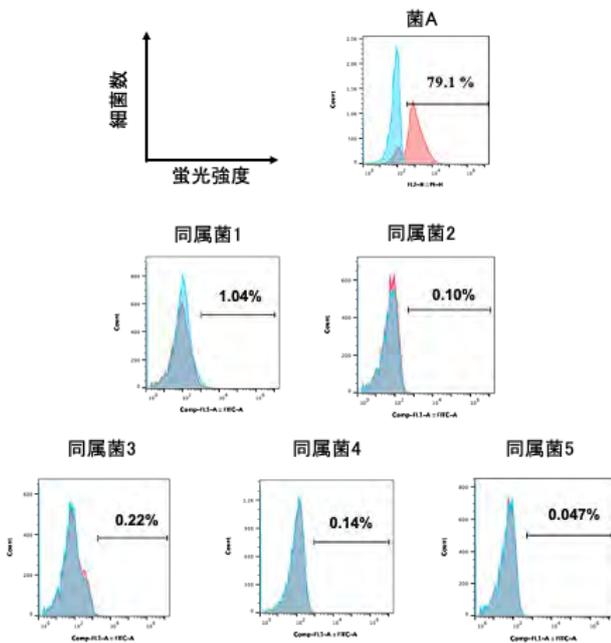


図 2 フローサイトメータによる抗体と菌 A および同属菌への結合の検証。赤色は菌 A に対する抗体、青はアイソタイプコントロール抗体をそれぞれ示している。

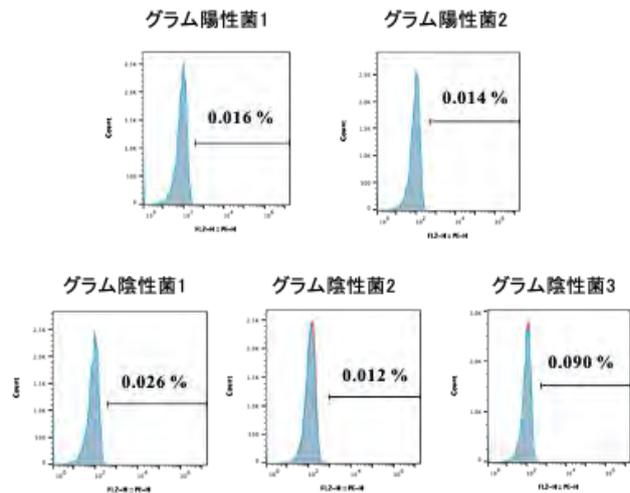


図 3 フローサイトメータによる抗体と代表的な腸内細菌への結合の検証。赤色は菌 A に対する抗体、青はアイソタイプコントロール抗体をそれぞれ示している。

## 2. 3 抗体を使用したアプリケーションの検討

標的となる腸内細菌を特異的に認識する抗体が得られたため、次に腸内環境制御基盤技術へと応用するためのツールとしての有用性を検証した。まず、作製した抗体を用いて以下の点についての評価を行った。

1. 抗体が結合した標的細菌が再培養できるか
2. 複数の腸内細菌が存在する中から標的細菌のみを単離・濃縮することが可能か

一般的に抗体を用いた標的の分取方法としてはフローサイトメトリーを使用した分離方法が使用されている。しかしながら、酸素濃度に過敏な腸内細菌を扱うためには可能な限り嫌気環境下において作業をする必要が生じる。そこで、本プロジェクトでは抗体、磁気ナノ粒子、カラムを使用して標的を分離することが可能な、Magnetic-activated cell sorting (MACS) を使用することとした。MACS 機材は嫌気チャンパーに入れ込むことが可能であり、嫌気環境下で作業をすることが可能である。

項目 1 の検討のため標的細菌に特異的な抗体および MACS に必要な各種試薬を反応させたサンプルをカラムに通したのちに、標的分画を寒天培地上に撒種し、コロニーが形成されるかどうかの検討を行なった。未処理の状態と MACS 工程を経たサンプルの双方においてコロニー形成が確認された。このことから MACS 試薬は標的細菌の生育を阻害しないことが明らかとなった（図 4）。

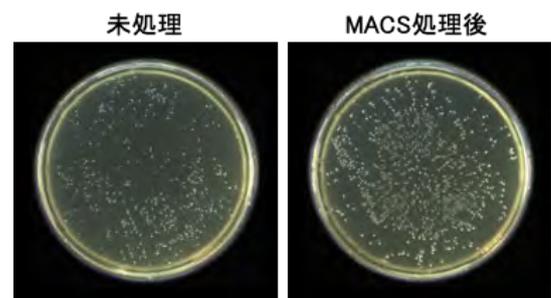


図 4 未処理と MACS 処理した後の菌 A を寒天培地に播種したのち 24 時間後のコロニー形成の様子

最後に菌 A および 5 種類の腸内細菌 B から F までを混合した、擬似腸内細菌叢から作製した抗体を用いた MACS により菌 A の単離・濃縮を検討した。作製した抗体を擬似腸内細菌叢に反応させたのち、MACS による分離・濃縮を検証した。MACS 前後の試料をそれぞれフローサイトメータにて解析したところ、標的細菌を含まない分画であるフロースルー分画では菌 A が含まれず、標的分画の方にのみ菌 A のシグナルが観察された。より詳細な解析を実施するため MACS 後のフロースルー分画と標的分画からそれぞれ DNA を抽出し、菌 A を検出するプライマーおよび腸内細菌 B を検出するプライマーを利用した定量 PCR を実施した。その結果、フローサイトメータの結果と同様の結果を得ることができた。これらの結果から本プロジェクトで作製した抗体を用いることで効率よく標的細菌を分離・濃縮するツールとして利用できる可能性を示せた（図 5）。

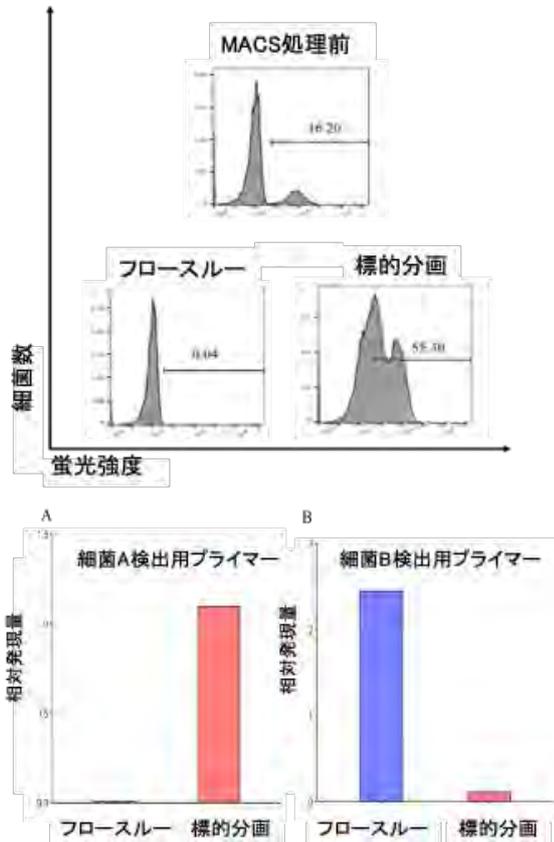


図 5 MACS 前後におけるそれぞれの試料の FACS の結果（上段）、菌 A 検出用プライマーおよび菌 B 検出用プライマーを用いた q-PCR（下段）

### 3. 考察及び今後の展望

本年度は腸内環境制御基盤技術の構築に向けたツールの作成として腸内細菌特異的抗体の作製に着手し、新規法を利用することで標的細菌のみを認識する抗体の作製に成功した。それらの抗体を利用して、擬似腸内細菌叢からの標的細菌の分離・濃縮法を構築することができた。来年度以降の課題としては、多種多様な腸内細菌で構成される腸内細菌叢からの標的細菌の単離・濃縮法の検証が必要とな

る。また、これまでに蓄積した腸内細菌の基礎データの中から機能性食品への応用や創薬の標的になりうる腸内細菌に対する抗体の作製を進めていく予定である。

### 4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、慶應義塾大学の井上ひかる氏、公益財団法人 実験動物中央研究所の高橋利一氏、小倉智幸氏、何裕遥氏、野津量子氏にご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

### 【参考文献】

- 1 Kim, S., Suda, W., Kim, S., Oshima, K., Fukuda, S., Ohno, H., Morita, H., Hattori, M., Robustness of Gut Microbiota of Healthy Adults in Response to Probiotic Intervention Revealed by High-Throughput Pyrosequencing. *DNA Res.* Jun;20(3):241-53, 2013
- 2 Maldonado-Gomez, M.X., Martinez, S., Bottacini, F., O'Callaghan, A., Ventura, M., van Sinderen, D., Hillmann, B., Vangay, P., Knights, D., Hutkins, R.W., Walter, J. Stable Engraftment of Bifidobacterium Longum AH1206 in the Human gut depends on individualized features of resident microbiome. *Cell Host Microbe.* Oct 12; 20(4):515-526, 2016.
- 3 Ishikawa, D., Sasaki, T., Osada, T., Kuwahara-Arai, K., Haga, K., Shibuya, T., Hiramatsu, K., Watanabe, S. Changes in intestinal microbiota following combination therapy with fecal microbial transplantation and antibiotics for Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* Jan;23(1):116-125, 2017.
- 4 Paramsothy, S., Kamm, M.A., Kaakoush, N.O., Walsh, A.J., van den Bogaerde, J., Samuel, D., Leong, R.W.L., Connor, S., Ng, W., Paramsothy, R., Xuan, W., Lin, E., Mitchell, H.M., Borody, T.J. Multidonor intensive fecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* Mar 25;389(10075):1218-1228
- 5 Amrouche, T., Boutin, Y., Moroni, O., Kheadr, E., Fliss, I. Production and characterization of anti-bifidobacteria monoclonal antibodies and their application in the development of an immune-culture detection method. *J Microbiol Methods* Apr;65(1):159-70, 2006

## 業績

### 【原著論文】

1. Nanto-Hara F, Kanemitsu Y, \*Fukuda S, Kikuchi K, Asaji K, Saigusa D, Iwasaki T, Ho HJ, Mishima E, Suzuki T, Suzuki C, Tsukimi T, Matsuhashi T, Oikawa Y, Akiyama Y, Kure S, Owada Y, Tomioka Y, Soga T, Ito S, \*Abe T.  
The guanylate cyclase C agonist linacotide ameliorates the gut-cardio-renal axis in an adenine-induced mouse model of chronic kidney disease.  
Nephrol. Dial. Transplant. 2020 Feb 1;35(2):250-264.  
doi: 10.1093/ndt/gfz126.
2. Erawijantari PP, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Nakajima T, Sakamoto T, Saito Y, Fukuda S, Yachida S, Yamada T.  
Influence of gastrectomy for gastric cancer treatment on faecal microbiome and metabolome profiles.  
Gut 2020 Jan 16. pii: gutjnl-2019-319188.doi: 10.1136/gutjnl-2019-319188. [Epub ahead of print]
3. Kitamoto S, Alteri CJ, Rodrigues M, Nagao-Kitamoto H, Sugihara K, Himpls SD, Bazzi M, Miyoshi M, Nishioka T, Hayashi A, Morhardt TL, Kuffa P, Grasberger H, El-Zaatari M, Bishu S, Ishii C, Hirayama A, Eaton KA, Dogan B, Simpson KW, Inohara N, Mobley HLT, Kao JY, Fukuda S, Barnich N, Kamada N.  
Dietary L-serine confers a competitive fitness advantage to Enterobacteriaceae in the inflamed gut.  
Nat. Microbiol. 5: 116-125, 2020.
4. Yang J, Tsukimi T, Yoshikawa M, Suzuki K, Takeda T, Tomita M, \*Fukuda S.  
Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) 16S rRNA genotyping of microbial samples from possessions contributes to owner identification.  
mSystems 4: e00594-19, 2019.
5. Jo R, Nishimoto Y, Umezawa K, Yama K, Aita Y, Ichiba Y, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, \*Fukuda S.  
Comparison of oral microbiome profiles in stimulated and unstimulated saliva, tongue, and mouth-rinsed water.  
Sci. Rep. 9: 16124, 2019. (IF=4.122)
6. Tanaka K, Watabe T, Kato K, Tsukimi T, Sato MP, Odamaki T, Tomita M, \*Fukuda S.  
Draft genome sequences of Enterococcus faecalis strains isolated from healthy Japanese individuals.  
Microbiol. Resour. Announc. 8: e00832-19, 2019.
7. Aw W, \*Fukuda S.  
Protective effects of bifidobacteria against enteropathogens.  
Microb Biotechnol. 2019 Jul 8.
8. Yachida S, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Nakajima T, Sakamoto T, Watanabe H, Masuda K, Nishimoto Y, Kubo M, Hosoda F, Rokutan H, Matsumoto M, Takamaru H, Yamada M, Matsuda T, Iwasaki M, Yamaji T, Yachida T, Soga T, Kurokawa K, Toyoda A, Ogura Y, Hayashi T, Hatakeyama M, Nakagama H, Saito Y, Fukuda S, Shibata T, Yamada T.  
Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer.  
Nat Med. 2019Jun;25(6):968-976.
9. Kikuchi K, Saigusa D, Kanemitsu Y, Matsumoto Y, Thanai P, Suzuki N, Mise K, Yamaguchi H, Nakamura T, Asaji K, Mukawa C, Tsukamoto H, Sato T, Oikawa Y, Iwasaki T, Oe Y, Tsukimi T, Fukuda NN, Ho HJ, Nanto-Hara F, Ogura J, Saito R, Nagao S, Ohsaki Y, Shimada S, Suzuki T, Toyohara T, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Akiyama Y, Ichijo M, Matsuhashi T, Matsuo A, Ogata Y, Yang CC, Suzuki C, Breeggemann MC, Heymann J, Shimizu M, Ogawa S, Takahashi N, Suzuki T, Owada Y, Kure S, Mano N, Soga T, Wada T, Kopp JB, Fukuda S, Hozawa A, Yamamoto M, Ito S, Wada J, Tomioka Y, Abe T.  
Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease.  
Nat Commun. 2019 Apr 23;10(1):1835.

### 【口頭発表】

#### （招待講演）

1. 福田真嗣  
腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来  
第35回日本臨床栄養代謝学会学術集会, 京都府, 2020年2月27日
2. 福田真嗣  
もう一つの臓器腸内細菌叢の機能に迫る 微生物の個・集団・共生が支える持続可能な社会  
茨城県つくば市, 2020年2月10日
3. 田中一己, Aw Wanping, 鈴木健大, 尾花望, 楊佳約, 木村彰宏, 富田勝, 福田真嗣.  
米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は腸内細菌叢由来トリプトファン代謝物質がもたらす  
第42回日本分子生物学会年会, 福岡県博多市, 2019年12月6日
4. 福田真嗣

腸内環境を標的とした新たな疾患予防・治療基盤技術の創出

第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 愛媛県松山市, 2019 年 12 月 6 日

5. 中藤学  
私たちが腸内細菌:腸内環境を整えて、健康寿命を延ばそう  
健康に働くための腸内細菌セミナー 神奈川県川崎市, 2019 年 10 月 28 日
6. 福田真嗣  
微生物叢に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来  
第 3 回大型医療研究推進フォーラム 歯科医師会館(東京)、2019 年 5 月 25 日
7. 福田真嗣  
第 3 の液性因子:腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす機能  
第 92 回日本内分泌学会学術集会 仙台国際センター(宮城)、2019 年 5 月 10 日

(口頭発表)

1. Haruno Takahashi, Kazuki Tanaka, Nao Takeuchi, Nozomu Obana, Masaru Tomita, Shinji Fukuda  
Investigating the relationships between gut microbiota and obesity onset in androgen receptor knockout mice  
Miami Winter Symposium 2020 Molecular Mechanisms Linking the Microbiome and Human Health, Miami, Florida, 2020 年 1 月 27 日
2. Hikaru Inoue, Gaku Nakato, Masaru Tomita, Joe Inoue, Shinji Fukuda  
Development of target bacterial isolation method using anti-bacterial species specific monoclonal antibody  
Miami Winter Symposium 2020 Molecular Mechanisms Linking the Microbiome and Human Health, Miami, Florida, 2020 年 1 月 27 日
3. Kazuki Tanaka, Wanping Aw, Kenta Suzuki, Nozomu Obana, Jiayue Yang, Akihiro Kimura, Masaru Tomita, Shinji Fukuda  
Gut microbiota-derived tryptophan metabolites from rice bran dietary intervention ameliorate colonic inflammation  
Miami Winter Symposium 2020 Molecular Mechanisms Linking the Microbiome and Human Health, Miami, Florida, 2020 年 1 月 27 日
4. Nao Takeuchi, Kazuki Tanaka, Wanping Aw, Nozomu Obana, Masaru Tomita, Shinji Fukuda  
Understanding the anti-obesity molecular mechanisms of rare sugar, D-psicose, intake via gut microbiota modulation  
Miami Winter Symposium 2020 Molecular

Mechanisms Linking the Microbiome and Human Health, Miami, Florida, 2020 年 1 月 27 日

5. 田中一己, Aw Wanping, 鈴木健大, 尾花望, 楊佳約, 木村彰宏, 富田勝, 福田真嗣  
米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は腸内細菌叢由来トリプトファン代謝物質がもたらす  
日本農芸化学会 2019 年度関東支部例会, 東京都世田谷区, 2019 年 12 月 7 日
6. 竹内奈穂, 田中一己, Aw Wanping, 尾花望, 富田勝, 福田真嗣  
希少糖摂取がもたらす腸内細菌叢を介した抗肥満効果の分子機構の解明  
第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡県博多市, 2019 年 12 月 6 日
7. 高橋春乃, 田中一己, 竹内奈穂, 尾花望, 富田勝, 福田真嗣  
アンドロゲン受容体欠損マウスにおける腸内細菌叢を介した肥満発症機構の解明  
第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡県博多市, 2019 年 12 月 6 日
8. 井上ひかる, 中藤学, 富田勝, 井上浄, 福田真嗣.  
腸内細菌標的抗体を用いた標的腸内細菌分離技術の開発  
第 42 回日本分子生物学会, 2019 年 12 月 4 日
9. 田中一己, Aw Wanping, 鈴木健大, 尾花望, 楊佳約, 富田勝, 福田真嗣  
米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は腸内細菌由来トリプトファン代謝物質がもたらす  
第 23 回腸内細菌学会, 東京都江戸川区, 2019 年 6 月 18 日 最優秀発表賞 受賞

#### 【共同研究成果】

(口頭発表)

1. Hayashi Y, Sezaki M, Sheoran S, Morishima T, Nakato G, Fukuda S, Takizawa H.  
Microbial signal instructs early hematopoiesis upon intestinal tissue damage  
48th Annual Scientific Meeting of International Society of Experimental Hematology, Brisbane, Australia, 2019 年 8 月 24 日
2. Takizawa H, Hayashi Y, Sezaki M, Sheoran S, Morishima T, Nakato G, Biswas S, Fukuda S.  
Early hematopoiesis translates microbial signals to intestinal tissue repair  
24th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam, Netherlands, 2019 年 6 月 16 日

#### 【特許】

- (1) 国内特許出願 1 件
- (2) 国外特許出願 0 件



# 「次世代機能性酸化物材料」プロジェクト

プロジェクトリーダー 東 正樹

## 【基本構想】

全てのモノがインターネットにつながる IoT 社会の実現に向けて、電子デバイスの消費電力の低減や、環境負荷の小さい材料の開発が求められている。例えば 10 cm の鉄の棒は、温度が 1°C 上がるごとに 1.2mm の熱膨張を起こす。小型・高密度化が進む現在の LSI の配線は 10nm オーダーであり、熱膨張の制御なしには精度を保つことができない。本プロジェクトでは、こうした熱歪みを吸収する「負」熱膨張材料のほか、低消費電力不揮発性メモリ材料につながる強磁性強誘電体や、風や振動から電気エネルギーを生む圧電発電のための非鉛圧電体などの、革新的な環境調和機能性材料に関する技術的シーズをさらに発展させていく。中でも負熱膨張材料については、企業との連携により安定な材料の供給ができる体制を整え、産業化への歩みを始めている。

## 1. 2019 年度の研究目的

プロジェクト 1 年目となる 2019 年度は、以下の各項目を重点項目として研究を行った。

### (1) 巨大負熱膨張材料高収率合成手法の開発

$\text{BiNi}_{0.85}\text{Fe}_{0.15}\text{O}_3$  は、室温近傍で既存材料の 5 倍の -187ppm/K の巨大な負熱膨張を示す。日本材料技研によって試験的な工業生産が始まったが、現状では前駆体の調整を研究室で行っているため、大量生産が出来ない。これは、原料を硝酸に融解して蒸発乾固するプロセスでの硝煙の発生が問題となり、外注先が見つからないためである。そこで、硝酸以外の溶媒を用いたプロセスを開発する。また、工業生産において収率低下の原因となる、酸化剤としての  $\text{KClO}_4$  の添加を不要にする前駆体の開発も行う。現状では、硝酸塩を蒸発乾固、空气中で熱処理した、 $\text{Ni}^{2+}$  を含む前駆体に  $\text{KClO}_4$  を 20vol% 加えたものを日本材料技研に提供し、高圧高温処理を施している。残った  $\text{KCl}$  は水洗で取り除くので、この際にもロスが生じる。共沈法で前駆体を調整、 $\text{NaClO}$  を用いて予め  $\text{Ni}^{3+}$  に酸化する事が可能である事を発見、実験室では  $\text{KClO}_4$  を混合しなくても高圧高温処理で巨大負熱膨張物質を得る事が出来る事を確認している。この手法を工業生産に展開し、低コスト化を推し進める。また、さらに次世代の負熱膨張物質開発のための基礎研究も推進し、高インパクトジャーナルへの論文掲載を行う。

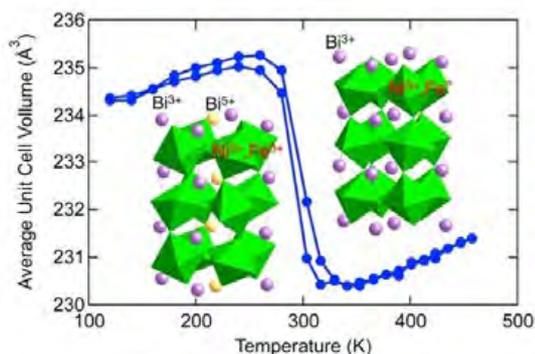


図 1 :  $\text{BiNi}_{0.85}\text{Fe}_{0.15}\text{O}_3$  の巨大負熱膨張

### (2) 強磁性強誘電体の単一強誘電ドメイン化

HDD 等の磁気メモリは温度安定性に優れるが、書き込みの際にコイルに電流を流して磁場を発生する必要があるため、消費電力が大きい、という問題がある。強磁性と強誘電性が共存するマルチフェロイック材料において、電気分極の反転に伴って磁化も反転するならば、超低消費電力磁気メモリへの応用が期待できる。我々は戦略シーズの成果として、 $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  薄膜においては、ジャロシンスキー・守谷相互作用のために、電気分極に直交した自発磁化が存在することを明らかにし、さらに、圧電応答顕微鏡 (PFM) と磁気力顕微鏡 (MFM) を用いて、室温での電場印加による磁化反転の観測に成功した。この現象を用いたメモリデバイスの実現に向け、単一強誘電ドメイン化を行う。これにより、電極を用いた分極反転が可能となり、デバイス動作の実証に大きく前進する。具体的には、陽極酸化ポーラスアルミナをマスクとしたナノドット成膜と、PFM を用いて加工したストライプ状のドメインに、ナノギャップ電極を用いて面内方向に電場を印加する、2 通りの方法でアプローチする。

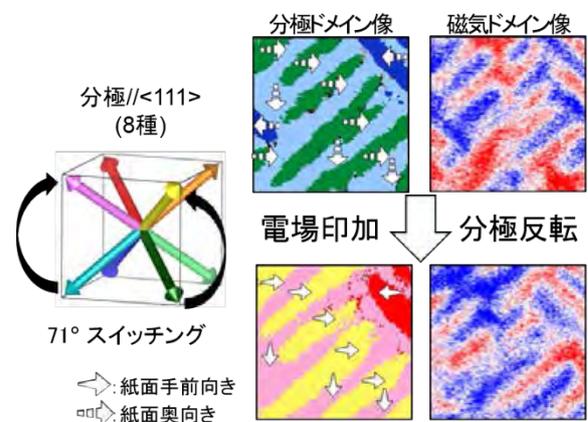


図 2 :  $\text{GdScO}_3$  基板上の  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  薄膜の強誘電・強磁性ドメイン構造の観察。分極ドメイン像の色は、左の 8 つの  $\langle 111 \rangle$  方向の分極に相当する。紙面奥から手前への分極反転 (71° スイッチング) の前後で、磁気ドメインのコントラストが反転している。

(3) 非鉛圧電体の研究

代表的な鉛系の圧電体である  $\text{PbZr}_{1-x}\text{Ti}_x\text{O}_3$  (PZT) は、 $\text{PbTiO}_3$  リッチの正方晶相と、 $\text{PbZrO}_3$  リッチの菱面体晶相の間の組成相境界 (MPB) 近傍で良好な圧電特性を示す。これは、結晶構造が単斜相に歪んでおり、電気分極の方向が 001 方向と 111 方向の間で変化 (回転) 出来るためだと説明されている。戦略シーズの研究で、PZT の MPB 組成で報告されているのと同じ単斜晶の結晶構造を持つ  $\text{BiFe}_{1-x}\text{Co}_x\text{O}_3$  薄膜において、圧電応答の増大が見いだした。しかしながら構造歪みが大きすぎるために電気機械結合が弱く、圧電定数は PZT の 1/6 程度に留まった。同じく戦略シーズで開発した  $\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{VO}_3$  と  $\text{K}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{VO}_3$  は、PZT と同程度の 1.085, 1.054 の  $c/a$  比を持つ。これらを端成分として、菱面体晶の  $\text{BiFeO}_3$ 、 $\text{BiAlO}_3$  等との固溶体を作ることで、分極回転メカニズムによる非鉛巨大圧電体を実現する。高压合成法による物質探索と結晶構造の温度変化、圧電特性の評価を行う。

2. 2019 年度の研究成果

以下に挙げるのは、2019 年度の具体的な研究成果である。

(1) 巨大負熱膨張材料高収率合成手法の開発

まずは研究室にて調製した前駆体を供給することで、良好な負熱膨張特性を示す材料の 300g スケールでの合成に成功している。毒性や比熱、熱伝導率といった基礎物性データも整い、試験的な外販を開始した。また、前駆体調整の外注にあたって硝煙の発生が問題となったため、検討を進め、硝酸の代わりにエチレングリコールや酢酸、クエン酸を用いるプロセスを開発することに成功、特許を出願した。一方で、酸化剤を不要とする共沈法は、遠心分離の工程が必要のため、スケールアップすると組成ずれが起きてしまうことがわかったため、特許を申請して基礎研究を進めている。幸い追加予算で大型の遠心分離器を導入することができ、外注のための工程確立に向けて、さらに研究を重ねる予定である。共沈法による前駆体調整の改善のため、民間企業と共同研究を始めるべく、調整中である。

基礎研究でもいくつかの大きな成果を得た。 $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  が、 $0.60 \leq x \leq 0.80$  では極性—非極性転移によって負熱膨張を示す事を発見した。 $\text{BiCoO}_3\text{-BaTiO}_3$  系においては、鉛を含まない極性—非極性転移型負熱膨張材料を実現した。さらに  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  ( $0.25 \leq x \leq 0.50$ ) では、サイト間電荷移動と極性—非極性転移が共存することで負熱膨張が増強されることを発見した。また、 $\text{PbCoO}_3$  を加圧すると、スピン状態転移とサイト間電荷移動により、不連続な体積収縮を示す事を見いだした。これらの成果は Chemistry of Materials (IF: 10.159)、Journal of the American Chemical Society (IF: 14.695) に掲載され、内 3 つの成果が Supplementary Cover を飾った。



図 3:  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  (左)、 $\text{BiCoO}_3\text{-BaTiO}_3$  (中)、 $\text{PbCoO}_3$  (右) 論文の Supplementary Cover

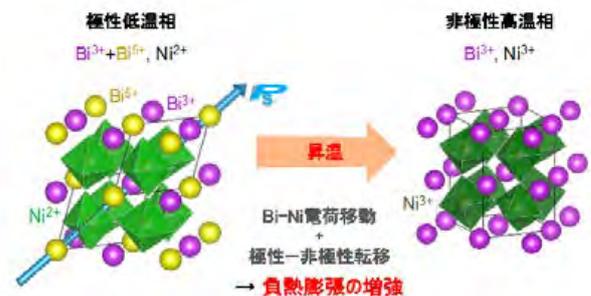


図 4:  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  の負熱膨張メカニズム。0.20  $\leq x \leq 0.50$  では、サイト間電荷移動と極性—非極性転移が同時に起こることにより、負の熱膨張が増強される。

(2) 強磁性強誘電体の単一強誘電ドメイン化

二段階の陽極酸化によって、約 60 nm の孔径をもつ陽極酸化ポーラスアルミナを得た。これを Nb:STO 基板上に転写して、マスクとして用い、パルスレーザー堆積法で  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  を成膜した。その結果、規則的に配列したナノドット構造を得ることに成功した。現状では膜厚が 3nm 程度と薄いため、圧電性を確認することは出来ていない。今後は成膜時間を最適化することで、圧電応答顕微鏡を用いた強誘電ドメインの観察を目指す。

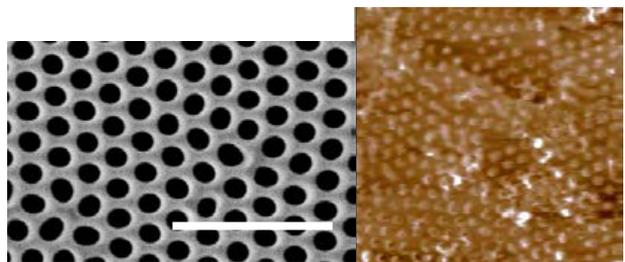


図 5: 陽極酸化アルミナマスク (左) と、それを用いて成膜した  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  ナノドット

また、 $\text{GdScO}_3(110)$  基板上に成膜した厚さ 100 nm の  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  薄膜の上に、NANOBIIC でのフォトリソグラフィとリフトオフ工程を経て、電極間ギャップ幅 1.4  $\mu\text{m}$  の Pt 上部電極を作製する事に成功した。これを用い、面内方向にストライプドメイン構造を安定化、面内の電場印加で 100 回もの分極反転を可能とした。

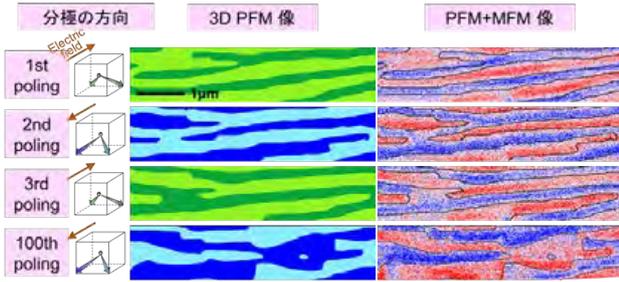


図 6：圧電応答顕微鏡 (3D PFM) と磁気力顕微鏡 (MFM) で観察した、 $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  薄膜への面内の電場印加御の強誘電ドメインと強磁性ドメイン構造

同じく記録媒体として、スピン流生成のために重要な材料である、強磁性体薄膜の特許申請を行った。有望シーズの研究で、350 K 以上の高いネール温度( $T_N$ )を持つこと、大きな磁気抵抗効果を示すことからスピントロニクスへの応用が期待されている  $\text{CeCu}_3\text{Mn}_4\text{O}_{12}$  を  $\text{YAO}(110)_0$  基板上に PLD 法で成膜することで、室温をはるかに超える 420K の磁気転移温度と、式量あたり  $9\mu\text{B}$  の大きな飽和磁化を持つ薄膜を得た。さらに、バッファー層として  $\text{YCaAlO}_4$  を用いる事で面内に圧縮応力を付与し、形状磁気異方性によって磁化困難軸になっていた面外方向の磁化が増大し、垂直磁気異方性が実現したことが確認された。この件を特許申請、さらに ACS Applied Electronic Materials に論文が掲載され、当該号の表紙を飾った。

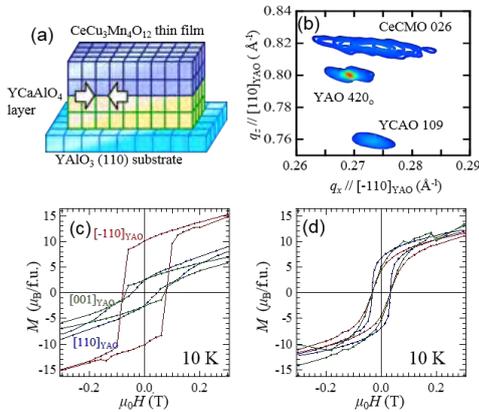


図 7： $\text{YCaAlO}_4$  バッファー層の上に成長した  $\text{CeCu}_3\text{Mn}_4\text{O}_{12}$  の磁気異方性



図 8： $\text{CeCu}_3\text{Mn}_4\text{O}_{12}$  論文が掲載された巻の表紙

(3) 非鉛圧電体の研究

高圧合成法を用いて、正方晶の  $\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{VO}_3$  と、菱面体晶の既知物質である  $\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{TiO}_3$  の固溶体を合成し、相図を作成した。 $(1-x)\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{VO}_3 - x\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{TiO}_3$  として、 $x=0.9$  近傍に多相相境界 (MPB) がある事を確認した。また、放射光 X 線回折データのリートベルト解析によって、ここでは結晶構造が MPB 組成の PZT と同じ単斜晶相であり、組成と温度によって、分極の方向が回転することを見いだした。この単斜晶相において、圧電応答が増加したことから、特許の申請を行った。

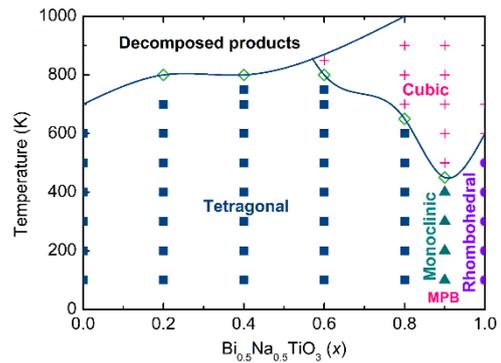


図 9： $(1-x)\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{VO}_3 - x\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{TiO}_3$  の相図

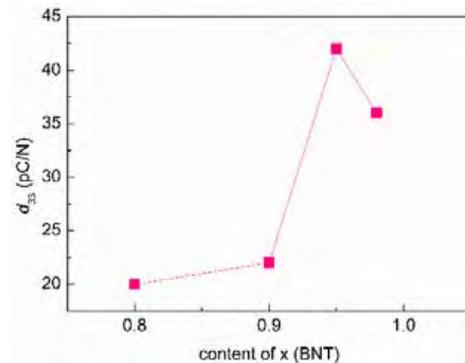


図 10： $(1-x)\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{VO}_3 - x\text{Na}_{1/2}\text{Bi}_{1/2}\text{TiO}_3$  の圧電定数

## 放射光を用いた負熱膨張メカニズムの解明

酒井 雄樹

## 1. はじめに

ほとんどの物質は温度が上昇すると、熱膨張によって長さや体積が増大する。光通信や半導体製造などの精密な位置決めが要求される局面では、このわずかな熱膨張が問題になる。そこで、昇温に伴って収縮する“負の熱膨張”を持つ物質により、構造材の熱膨張を補償(キャンセル)することが試みられている<sup>1-3)</sup>。

これまでに、反強磁性転移<sup>4)</sup>、電荷移動<sup>5-7)</sup>、極性-非極性転移<sup>8, 9)</sup>などの相転移が負熱膨張の起源となることがわかってきた。ニッケル酸ビスマスは  $\text{Bi}^{3+}_{0.5}\text{Bi}^{5+}_{0.5}\text{Ni}^{2+}\text{O}_3$  という特徴的な電荷分布を持つペロブスカイト型酸化物である。 $\text{Bi}^{3+}$ と  $\text{Bi}^{5+}$ が柱状に秩序した、二つの Bi サイトが存在する三斜晶構造を持つ。圧力下では Bi と Ni の間で電荷移動が起き、 $\text{Bi}^{3+}\text{Ni}^{3+}\text{O}_3$  の価数状態へと変化する。この際、 $\text{Bi}^{3+}$ と  $\text{Bi}^{5+}$ の電荷秩序が融けることで、Bi サイトが1つの斜方晶構造への構造相転移を伴う。さらに、Ni の価数が2価から3価へ増大することで、ペロブスカイト構造の骨格を担っている  $\text{NiO}_6$  八面体が縮むため、約2.2%もの巨大な体積の収縮が起きる。Bi ビスマスの一部を3価の希土類元素<sup>9)</sup>、またはニッケルの一部を3価の鉄で置換すると<sup>6)</sup>、 $\text{Bi}^{3+}\text{Ni}^{3+}\text{O}_3$  の価数状態が安定化されるため、昇温によって Bi と Ni 間でサイト間電荷移動が生じるようになる。この体積収縮を伴う三斜晶から斜方晶への相転移が、温度によって相分率を変えながら、緩やかに起きるため、両相の分率の重みを付けた平均体積が連続的に収縮する、負熱膨張が発現する。

一方、代表的な強誘電体である  $\text{PbTiO}_3$  (チタン酸鉛) では、極性の構造を持つ強誘電相から非極性の常誘電相への転移に伴い、電気分極による構造歪みが解消することで、約1%体積が収縮することが知られている。我々のグループは、 $\text{PbTiO}_3$  型の結晶構造を持ち、 $d^1$  電子配置を取る  $\text{V}^{4+}$  イオンのヤーンテラー効果のため、 $c/a = 1.21$  と巨大な正方晶歪みを持つ  $\text{PbVO}_3$  の  $\text{Pb}^{2+}$  サイトを  $\text{Bi}^{3+}$  で一部置換した  $\text{Pb}_{1-x}\text{Bi}_x\text{VO}_3$  において、最大8%もの体積収縮を伴った負熱膨張を示す事を見いだした<sup>9)</sup>。

今回、我々はニッケル酸ビスマスとニッケル酸鉛の固溶体  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  を作成し、 $0.05 \leq x \leq 0.25$  と  $0.60 \leq x \leq 0.80$  の二つの組成領域で、それぞれ負熱膨張が発現することを発見した<sup>10,11)</sup>。また、 $0.05 \leq x \leq 0.15$  で電荷移動による負熱膨張が発現する、ニッケル酸ビスマスと鉄酸ビスマスの固溶体  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  の鉄置換の量をさらに増やした試料を作成し、 $0.20 \leq x \leq 0.50$  の高鉄置換領域でも負熱膨張が発現することを発見した<sup>12)</sup>。

本研究ではさらに、第一原理計算、第二高調波発生、大

型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL02B2 での放射光 X 線回折実験、BL22XU での放射光 X 線全散乱データ PDF 解析、そして BL09XU と BL47XU での硬 X 線光電子分光実験を組み合わせて、結晶構造と電子状態変化を詳細に解析し、それぞれの固溶体における負熱膨張メカニズムの解明を行った。

## 2. 実験と結果

2.1  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  での組成によって変化する負熱膨張メカニズム

$\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  多結晶は、クエン酸錯体重合法で用意された前駆体に重量比20%の  $\text{KClO}_4$  を混ぜ込み、8万気圧・1200 °C の高温高压条件下で30分熱処理することで作成した。

図1に放射光 X 線回折パターンの温度依存性を、図2に回折パターンのリートベルト解析により求めた相分率で重み付けした平均格子体積の温度依存性を示す。 $x = 0.10$  の試料では、希土類置換体や鉄置換体同様、昇温によって負熱膨張を伴う、三斜晶から斜方性への構造転移が起こっている様子が分かる。一方、 $x = 0.25$  では、昇温により、斜方晶(斜方晶 I 相)から体積の小さい斜方晶(斜方晶 II 相)へ、対称性の変化がない相転移が起こった。 $0.30 \leq x \leq 0.50$  の組成で一度負熱膨張は生じなくなるが、 $x = 0.60$  では、先ほどの斜方晶 I-II 転移とは異なる斜方晶-斜方晶相転移(斜方晶 III-I 転移)に起因する負熱膨張が観測された。放射光 X 線回折実験の結果、図3に示す組成-温度相図が得られ、三つの異なる斜方晶構造が存在していることが明らかになった。

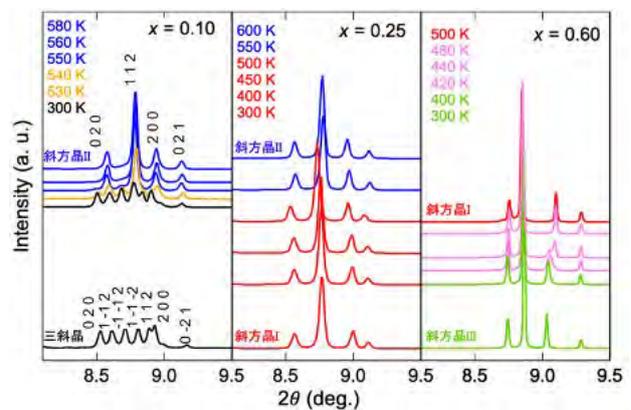


図1.  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  の放射光 X 線回折パターン。参考文献 11) より、American Chemical Society の許諾を得て転載。

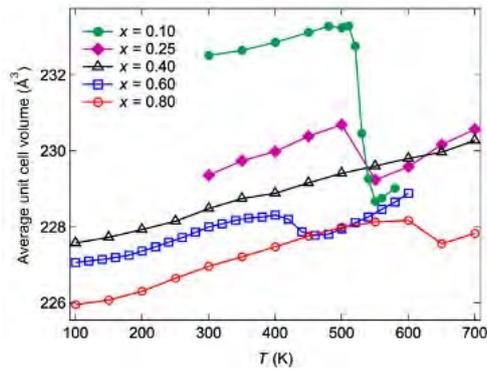


図 2.  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  の格子体積の温度依存性。参考文献 11) より、American Chemical Society の許諾を得て転載。

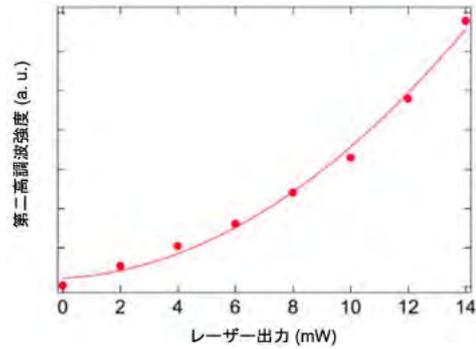


図 5.  $\text{Bi}_{0.2}\text{Pb}_{0.8}\text{NiO}_3$  の第二高調波強度のレーザーパワー依存性。レーザー強度の 2 乗に比例する第二高調波強度は、極性構造を有していることを示している。参考文献 11) より、American Chemical Society の許諾を得て転載。

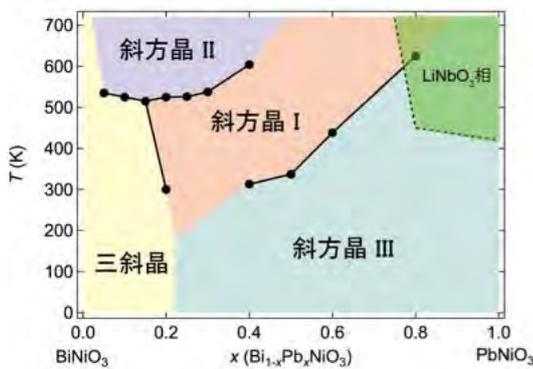


図 3.  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  の組成-温度相図。三つの異なる斜方晶相が存在している。参考文献 11) より、American Chemical Society の許諾を得て転載。

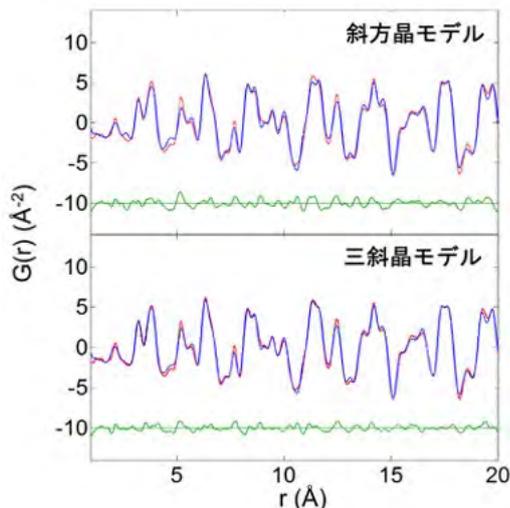


図 4.  $\text{Bi}_{0.75}\text{Pb}_{0.25}\text{NiO}_3$  の PDF 解析結果。二つの Bi サイトを持つ三斜晶モデルにより、15 Å 以下の領域でのフィッティングが向上する結果は、局所的には Bi が 3 価と 5 価に電荷秩序していることを示している。参考文献 10) より、American Chemical Society の許諾を得て転載。

硬 X 線光電子分光と X 線吸収分光、放射光 X 線全散乱データの PDF 解析から、斜方晶 I 相は  $\text{Bi}^{3+}$  と  $\text{Bi}^{5+}$  が短距離秩序した  $(\text{Bi}^{3+}_{0.5}\text{Bi}^{5+}_{0.5})_{1-x}\text{Pb}^{4+}_x\text{Ni}^{2+}\text{O}_3$  の電荷分布を持っていることが明らかになった (図 4)。また、リートベルト解析で精密化したそれぞれの金属イオンと酸素との結合距離と配位数から価数を見積もる、ボンドバレンスサム計算により、高温斜方晶相の価数状態を計算したところ、斜方晶相 II は Bi の電荷不均化が解けた、 $\text{Bi}^{3+}_{1-x}\text{Pb}^{4+}_x\text{Ni}^{(3-x)}\text{O}_3$  の価数状態であることが示された。これらの結果から、斜方晶 I-II 転移で発現する負熱膨張は、希土類置換体や鉄置換体同様の、Bi と Ni 間のサイト間電荷移動に起因するものということが明らかになった。また、リートベルト解析による結晶構造解析と第二高調波発生の測定結果から、斜方晶 III 相は非極性構造である斜方晶 I・II 相とは異なり、極性構造であることが明らかになった (図 5)。硬 X 線光電子分光から求めた斜方晶 III 相の電荷分布は、斜方晶 I 相と同様の  $(\text{Bi}^{3+}_{0.5}\text{Bi}^{5+}_{0.5})_{1-x}\text{Pb}^{4+}_x\text{Ni}^{2+}\text{O}_3$  であり、斜方晶 III 相から斜方晶 I 相への転移では電荷移動が起きていないことを示している。このことから、斜方晶 III-I 転移での負熱膨張は電荷移動ではなく、 $\text{PbTiO}_3$  や  $\text{PbVO}_3$  ベースの負熱膨張材料と同様な、極性-非極性転移であることが明らかになった (図 6)。

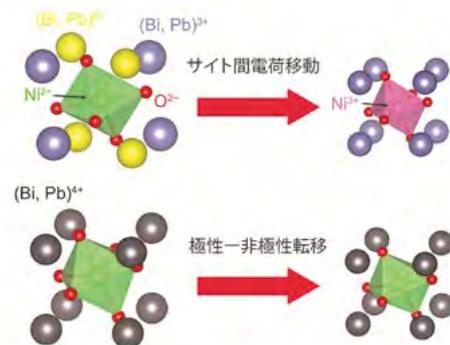


図 6.  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  の負熱膨張メカニズム。0.05  $\leq$  x  $\leq$  0.25 ではサイト間電荷移動により(上図)、0.60  $\leq$  x  $\leq$  0.80 では極性-非極性転移により(下図)、負の熱膨張が発現する。

## 2. 2 BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub> での異なるメカニズムの同時発現による負熱膨張の増強

我々の研究グループはすでに、ニッケル酸ビスマスと鉄酸ビスマスの固溶体が、サイト間電荷移動によって巨大な負熱膨張を示す事を発見し、2015年に報告した<sup>6)</sup>。本研究では、この固溶体について、鉄置換の量を増やした場合の結晶構造と電子状態の変化、熱膨張特性をさらに詳細に解析した。

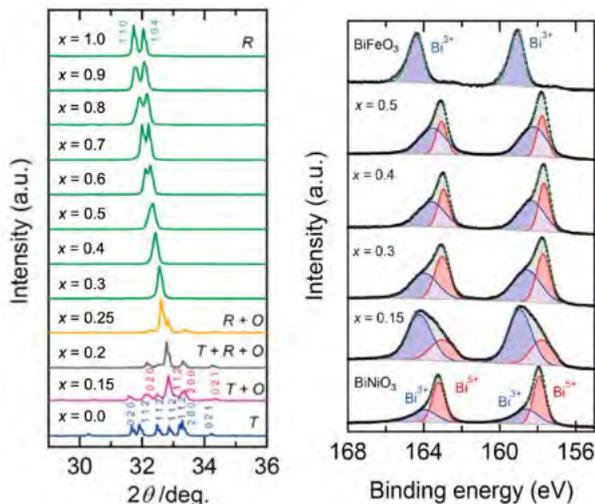


図7. BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub>の放射光X線回折パターン（左図）と硬X線光電子分光スペクトル（右図）。T、O、Rはそれぞれ三斜晶、斜方晶、菱面体晶相を示している。硬X線光電子分光スペクトルが二つのピークに分離できることは、三斜晶相と菱面体晶相では、Biが3価と5価に電荷不均化していることを示している。参考文献12)より、American Chemical Societyの許諾を得て転載。

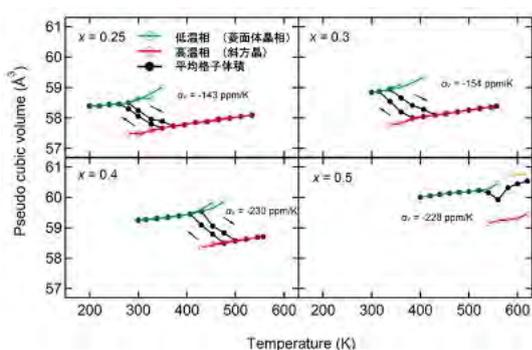


図8. BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub>の格子体積（擬立方晶表記）の温度依存性。参考文献12)より、American Chemical Societyの許諾を得て転載。

BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub>多結晶は、Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>と硝酸鉄、金属Niを硝酸に溶かしたものを蒸発乾固し、得られた粉末を空气中750°Cで熱分解することで用意された前駆体に、重量比20%のKClO<sub>4</sub>を混ぜ込み、4–6万気圧・850–1200°Cの高温高圧条件下で30分熱処理することで作成した。

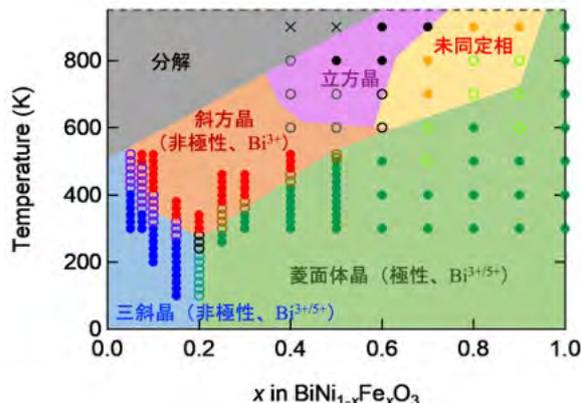


図9. BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub>の組成-温度相図。参考文献12)より、American Chemical Societyの許諾を得て転載。

図7に放射光X線回折パターンと硬X線光電子分光スペクトルを、図8に格子体積の温度依存性を示す。x = 0での、Bi<sup>3+</sup>とBi<sup>5+</sup>が柱状に秩序した、2つのBiサイトを持つ三斜晶構造が、x = 0.15ではBiが1サイトの斜方晶構造へと変化し、x > 0.3では最終的にBiFeO<sub>3</sub>と同様の極性構造の菱面体晶相へと転移する。そして、昇温すると、x < 0.25までは、希土類置換体と同様な三斜晶から斜方晶への負熱膨張を伴う相転移が観測され、x > 0.25では菱面体晶から斜方晶への相転移を伴う相転移が観測された。硬X線光電子分光とPDF解析の結果から、菱面体晶相はBi<sup>3+</sup><sub>0.5(1+x)</sub>Bi<sup>5+</sup><sub>0.5(1-x)</sub>Ni<sup>2+</sup><sub>1-x</sub>Fe<sup>3+</sup><sub>x</sub>O<sub>3</sub>の電荷分布を取り、局所的にはBi<sup>3+</sup>とBi<sup>5+</sup>が電荷秩序した構造であることが明らかになった(図9)。

この解析の結果、0.05 ≤ x ≤ 0.15での負熱膨張は、ビスマスとニッケル間の電荷移動のみによって引き起こされている一方、0.20 ≤ x ≤ 0.50では、PbTiO<sub>3</sub>と同様の、極性から非極性の結晶構造転移が電荷移動と同時に起こっており、そのために負熱膨張が増強されていることが明らかになった(図10)。

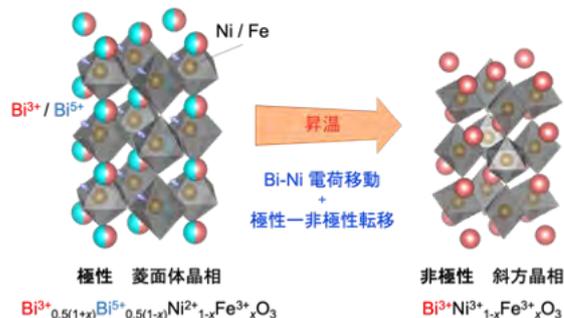


図10. BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub>の負熱膨張メカニズム。0.20 ≤ x ≤ 0.50では、サイト間電荷移動と極性-非極性転移が同時に起こる。

BiNi<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3</sub>の鉄置換では、低温で2価が安定なニッケルを、3価が安定な鉄で置換するため、鉄置換量が増えることに伴って、電荷移動に寄与する低温相のNi<sup>2+</sup>の量は減少する。このため、低温相から高温相へ変化する場合の体積

収縮の割合は、 $x = 0.05$  で 2.8%であるのに対し、 $x = 0.15$  では 2.5%と減少する。この減少ペースでいくと、 $x = 1.0$  で負熱膨張による体積収縮が消失することが予測される。しかし実際には、 $0.20 \leq x \leq 0.50$  では極性-非極性転移が電荷移動と同時に起こるため、負熱膨張が増強され、鉄置換量が増えても体積収縮は 2%と一定であった (図 11)。鉄置換量を変化させても体積収縮の割合が変化しないことは、負熱膨張材料の特性が安定することを意味する。

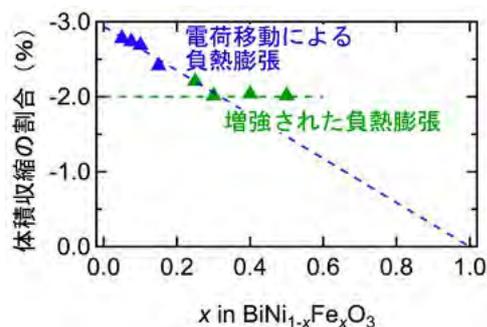


図 11. 負熱膨張による体積収縮の割合。0.05  $\leq x \leq 0.15$  では、電荷移動による負熱膨張が起こるが、鉄置換に伴って体積収縮の割合が減少する。一方、0.20  $\leq x \leq 0.50$  では極性-非極性転移が同時に起こるため、負熱膨張が増強され、体積収縮の割合が一定になっている。参考文献 12)より、American Chemical Society の許諾を得て転載。

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では、放射光を用いた回折および分光実験により、 $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  と  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  の負熱膨張の起源を解明した。 $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  の研究では、一つの材料系で、組成に応じてサイト間電荷移動と、極性-非極性転移という、2つの異なるメカニズムで、負熱膨張を示すことを発見した。また、 $x = 1.0$  に対応するニッケル酸鉛は、これまで電気分極を持たない非極性の化合物だと考えられていたが、今回の研究で、極性の結晶構造をしていることが明らかになった。これは、4価を持つ鉛イオンによる酸素との強いクーロン力によるものと考えられ、 $\text{Pb}^{2+}$  の孤立電子対効果や遷移金属のヤーン・テラー効果に頼らない極性構造の安定化機構は、今後の負熱膨張材料や強誘電体の設計指針構築につながると期待される。また、 $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$  の研究では、単一の材料で、電荷移動と極性-非極性構造転移という異なるメカニズムでの負熱膨張が同時に実現し、それによって負熱膨張が増強することが確かめられた。複数のメカニズムを組み合わせることの有用性が示されたことで、今後の負熱膨張材料の設計指針構築につながると期待される。

#### 【参考文献】

1. K. Takenaka, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **13**, 013001 (2012).
2. J. Chen, L. Hu, J. Deng, X. Xing, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 3522-3567 (2015).
3. J. P. Attfield, *Front. Chem.*, **6**, 371 (2018).

4. K. Takenaka and H. Takagi, *Appl. Phys. Lett.*, **87**, 261902 (2005).
5. K. Oka, K. Nabetani, C. Sakaguchi, H. Seki, M. Czapski, Y. Shimakawa, and M. Azuma, *Appl. Phys. Lett.*, **103**, 061909 (2013).
6. K. Nabetani, Y. Muramatsu, K. Oka, K. Nakano, H. Hojo, M. Mizumaki, A. Agui, Y. Higo, N. Hayashi, M. Takano and M. Azuma, *Appl. Phys. Lett.*, **106**, 061912 (2015).
7. Y. W. Long, N. Hayashi, T. Saito, M. Azuma, S. Muranaka, Y. Shimakawa, *Nature*, **458**, 60-63 (2009).
8. J. Chen, K. Nittala, J. S. Forrester, J. L. Jones, J. X. Deng, R. B. Yu and X. R. Xing, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11114 (2011)
9. H. Yamamoto, T. Imai, Y. Sakai and M. Azuma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 8170-8173 (2018).
10. K. Nakano, K. Oka, T. Watanuki, M. Mizumaki, A. Machida, A. Agui, H. Kim, J. Komiyama, T. Mizokawa, T. Nishikubo, Y. Hattori, S. Ueda, Y. Sakai, and M. Azuma, *Chem. Mater.*, **28**, 6062 (2016).
11. Y. Sakai, T. Nishikubo, T. Ogata, H. Ishizaki, T. Imai, M. Mizumaki, T. Mizokawa, A. Machida, T. Watanuki, K. Yokoyama, Y. Okimoto, S. Koshihara, H. Das and M. Azuma, *Chem. Mater.*, **31**, 4748-4758 (2019).
12. T. Nishikubo, Y. Sakai, K. Oka, T. Watanuki, A. Machida, M. Mizumaki, K. Maebayashi, T. Imai, T. Ogata, K. Yokoyama, Y. Okimoto, S. Koshihara, H. Hojo, T. Mizokawa and M. Azuma, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 19397-19403 (2019).

## 業績

### 【原著論文】

1. Y. Sakai, T. Nishikubo, T. Ogata, H. Ishizaki, T. Imai, M. Mizumaki, T. Mizokawa, A. Machida, T. Watanuki, K. Yokoyama, Y. Okimoto, S. Koshihara, H. Das, M. Azuma  
Polar-Nonpolar Phase Transition Accompanied by Negative Thermal Expansion in Perovskite-Type  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$   
*Chem. Mater.*, **31**, 13 4748-4758 (2019).
2. Z. Pan, X. Jiang, T. Nishikubo, Y. Sakai, H. Ishizaki, K. Oka, Z. Lin, M. Azuma  
Pronounced Negative Thermal Expansion in Lead-Free  $\text{BiCoO}_3$ -Based Ferroelectrics Triggered by the Stabilized Perovskite Structure  
*Chem. Mater.*, **31**, 16, 6187-6192 (2019).
3. K. Shigematsu, K. Shimizu, K. Yamamoto, T. Nishikubo, Y. Sakai, S. A. Nikolaev, H. Das, M. Azuma  
Strain Manipulation of Magnetic Anisotropy in Room-Temperature Ferrimagnetic Quadruple Perovskite  $\text{CeCu}_3\text{Mn}_4\text{O}_{12}$   
*ACS Appl. Electron. Mater.*, **1**, 12, 2514-2521 (2019).
4. H. Ishizaki, H. Yamamoto, T. Nishikubo, Y. Sakai, S. Kawaguchi, K. Yokoyama, Y. Okimoto, S. Koshihara, T. Yamamoto, M. Azuma  
Robust Giant Tetragonal Distortion Coupled with High-Spin  $\text{Co}^{3+}$  in Electron-Doped  $\text{BiCoO}_3$   
*Inorg. Chem.*, **58**, 23, 16059-16064 (2019).
5. T. Nishikubo, Y. Sakai, K. Oka, T. Watanuki, A. Machida, M. Mizumaki, K. Maebayashi, T. Imai, T. Ogata, K. Yokoyama, Y. Okimoto, S. Koshihara, H. Hojo, T. Mizokawa, M. Azuma  
Enhanced Negative Thermal Expansion Induced by Simultaneous Charge Transfer and Polar-Nonpolar Transitions  
*J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 49, 19397-19403 (2019).
6. Z. Liu, Y. Sakai, J. Yang, W. Li, Y. Liu, X. Ye, S. Qin, J. Chen, S. Agrestini, K. Chen, S. Liao, S. Haw, F. Baudalet, H. Ishii, T. Nishikubo, H. Ishizaki, T. Yamamoto, Z. Pan, M. Fukuda, K. Ohashi, K. Matsuno, A. Machida, T. Watanuki, S. I. Kawaguchi, A. M. Arevalo-Lopez, C. Jin, Z. Hu, J. Paul Attfield, M. Azuma, Y. Long  
Sequential Spin State Transition and Intermetallic Charge Transfer in  $\text{PbCoO}_3$   
*J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 12, 5731-5741 (2020).
7. Z. Pan, T. Nishikubo, Y. Sakai, T. Yamamoto, S. Kawaguchi,

M. Azuma

Observation of Stabilized Monoclinic Phase as a “Bridge” at the Morphotropic Phase Boundary between Tetragonal Perovskite  $\text{PbVO}_3$  and Rhombohedral  $\text{BiFeO}_3$   
*Chem. Mater.*, **32**, 8, 3615-3620 (2020).

8. 若崎翔吾, 西久保匠, 酒井雄樹, Hena Das, 東正樹  
 $\text{Bi}_{0.5}\text{Pb}_{0.5}\text{MnO}_3$ における電荷秩序と孤立電子対効果  
粉体および粉末冶金, **67**, 2, 92-96 (2020).
9. 小澤慶太, 勝俣真綿, 重松圭, 東正樹  
陽極酸化アルミナマスクを用いた  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  ナノドットの作製・評価  
粉体および粉末冶金, **67**, 2, 100-102 (2020).

### 【総説】

1. 東正樹  
負の熱膨張を示すセラミックス  
セラミックデータブック 2019/20(工業と製品), **47**, 101, 110-113 (2019).
2. 東正樹  
巨大負熱膨張材料を用いた熱膨張制御  
配管技術, **62**, 3, 6-10 (2020).

### 【口頭発表】

1. M. Azuma  
Enhanced Piezoelectric Response due to Polarization Rotation in Cobalt-Substituted  $\text{BiFeO}_3$   
The 11th International Conference on High-Performance Ceramics (CICC-11), 2019年5月, 中国
2. K. Shigematsu, K. Shimizu, K. Yamamoto, M. Azuma  
Epitaxial growth and strain manipulation of functions in quadruple perovskite oxides  
The 2019 Collaborative Conference on Materials Research (2019CCMR), 2019年6月, 韓国
3. Y. Sakai, T. Nishikubo, M. Mizumaki, T. Mizokawa, A. Machida, T. Watanuki, Y. Okimoto, S. Koshihara, M. Azuma  
Negative thermal expansion in  $\text{Bi}_{1-x}\text{Pb}_x\text{NiO}_3$  ( $0.6 \leq x \leq 0.8$ ) induced by polar-nonpolar transition  
The 11th international Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-11), 2019年7月, 日本
4. T. Nishikubo, Y. Sakai, A. Machida, T. Watanuki, H. Hojo, T. Mizokawa, M. Azuma  
Negative thermal expansion in ferroelectric-palaelectric

- transition driven by intermetallic charge transfer in  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$   
The 11th international Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-11), 2019年7月, 日本
5. T. Ogata, M. Azuma, Masaki, H. Yamamoto, K. Oka, Y. Sakai  
Negative thermal expansion in electron doped  $\text{PbVO}_{3-x}\text{F}_x$   
The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13), 2019年10月, 日本
6. Y. Sakai, M. Azuma  
Colossal negative thermal expansion in Bi- and Pb-3d transition metal perovskites  
The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13), 2019年10月, 日本
7. T. Nishikubo, Y. Sakai, K. Oka, A. Machida, T. Watanuki, M. Mizumaki, H. Hojo, T. Mizokawa, M. Azuma  
Negative thermal expansion in ferroelectric-palaelectric transition driven by intermetallic charge transfer in  $\text{BiNi}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_3$   
The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13), 2019年10月, 日本
8. Z. Pan, M. Azuma  
Negative Thermal Expansion in  $\text{BiCoO}_3$ -Based Lead-Free Ferroelectrics  
The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13), 2019年10月, 日本
9. M. Azuma, K. Shimizu, R. Kawabe, H. Yamamoto, K. Shigematsu, H. Hojo, K. Mibu  
Magnetization reversal by electric field in Co substituted bismuth ferrite thin film  
14th Asia-Pacific Physics Conference, 2019年11月, マレーシア
10. M. Azuma, H. Yamamoto, Y. Sakai, T. Nishikubo  
Giant Negative Thermal Expansion Induced by Polar-Nonpolar Transitions  
3rd International Symposium on Negative Thermal Expansion and Related Materials (ISNTE-3), 2019年12月, イギリス
11. 若崎翔吾, 西久保匠, 今井孝, 東正樹, 酒井雄樹  
 $\text{Bi}_{0.5}\text{Pb}_{0.5}\text{MnO}_3$ における電荷秩序と孤立電子対効果  
粉体粉末冶金協会 2019年度春季大会, 2019年6月, 横浜
12. 小澤慶太, 勝俣真綸, 重松圭, 東正樹  
陽極酸化アルミナマスクを用いた  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  ナノドットの作製・評価  
粉体粉末冶金協会 2019年度春季大会, 2019年6月, 横浜
13. 東正樹  
ビスマス、鉛ペロブスカイトの系統的な電荷分布変化と巨大負熱膨張  
第4回固体化学フォーラム研究会, 2019年6月, 岡崎
14. 若崎翔吾, Hena Das, 山本樹, 酒井雄樹, 西久保匠, 東正樹, 町田晃彦, 綿貫徹  
 $\text{PbMnO}_3$ の電荷分布再検討  
日本物理学会 2019 秋季大会, 2019年9月, 岐阜
15. 勝俣真綸, 清水陽樹, 清水啓佑, 重松圭, 東正樹  
 $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  薄膜のストライプ型強誘電・強磁性ドメインの面内電場印加による構造変化  
第80回応用物理学会秋季学術講演会, 2019年9月, 札幌
16. 小澤慶太, 勝俣真綸, 重松圭, 東正樹  
陽極酸化アルミナマスクを用いた  $\text{BiFe}_{0.9}\text{Co}_{0.1}\text{O}_3$  ナノドットの作製・評価  
第80回応用物理学会秋季学術講演会, 2019年9月, 札幌
17. 福田真幸, 東正樹  
A サイト columnar 秩序型ペロブスカイトの高圧合成と誘電特性  
第60回高圧討論会, 2019年10月, 札幌
18. 東正樹  
革新的負熱膨張材料を用いた熱膨張抑制  
KISTEC Innovation Hub 2019, 2019年10月, 海老名
19. 福田真幸, 西久保匠, 東正樹, 酒井雄樹  
非鉛強誘電体  $\text{CaMnTi}_2\text{O}_6$  の  $\text{V}^{4+}$  置換による自発分極増大  
日本セラミックス協会 2020 年年会, 2020年3月, 東京

## 【特許】

- (1) 国内特許出願 5 件  
(2) 国外特許出願 0 件



# 「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

プロジェクトリーダー 松元 亮

## 【基本構想】

糖尿病は、インスリンの絶対的あるいは相対的な作用不足に起因するため、これに対する最も有効かつ安全な治療法はインスリン療法である。これは、血糖値のモニタリングや個人の生活習慣等に基づいて、即効性から遅効性のインスリン製剤を組み合わせ投与し、血糖値をできる限り正常域にコントロールするものである。一方、インスリン療法は患者の生活の質を著しく損なううえ、意識障害等の重篤な症状に繋がる低血糖の危険性がある。心筋梗塞等の心血管合併症を予防するためには、より精密な血糖コントロールが有効であるが、頻回の低血糖症状はむしろ予後を悪化させる可能性も指摘されている。この急性かつ重篤なリスク（低血糖発作）を避ける結果、実臨床上、十分な血糖コントロールが得られていない。最近では、マイクロコンピューター制御による装着型のインスリンポンプが欧米を中心に普及しつつあるが、あらかじめ設定されたアルゴリズムに従ってインスリンを投与するか基礎分泌相当を供給するに留まり、オーダーメイド医療とはほど遠いものである。従って、より正確かつ連続的にインスリン供給制御が可能な代替技術が強く要請されている。我々は、糖との結合能で知られるボロン酸をキーコンポーネントとし、これを導入した水溶性アクリルアミドゲル構造を最適化することで、生体由来材料やエレクトロニクスを一切用いない上記目的のインスリン供給機構を実証してきた。本プロジェクトでは、究極的な低侵襲性を志向したマイクロニードル融合型（「貼るだけ人工膵臓」）デバイスの開発を進めている。生活習慣病を中心とする非感染性疾患（non-communicable disease: NCD）は世界の医療費の43%を占め、2020年には60%に増加するとともに、全死亡の73%に関与すると予測されている。世界に類を見ない速度で高齢化が進行する本邦では、糖尿病等の生活習慣病が国民医療費の約15%、死亡数割合では約30%を占める。「貼るだけ人工膵臓」の技術は、糖尿病治療におけるアンメットメディカルニーズ（長期的な血糖管理、低血糖の回避、患者負担の軽減）を解決し、「健康寿命」と「平均寿命」の差“ゼロ”の実現を図る革新的な医療技術として期待される。

## 1. 2019年度の研究目的

プロジェクト1年目となる2019年度は、以下の各項目を重点項目として実施した。

### (1) 小・中・大動物実験用デバイスの開発の開発

順次スケールアップする動物モデルでの評価結果、数理モデル化の結果に基づき、外力からの保護とインスリン供給に最適ナゾーバー構造と挿入補助デバイス（アプリケーション）等周辺技術をパートナー企業と連携して開発する方針として実施した。患者の体重差や異なる病態に対応するためのプロダクト・ラインアップの整備を目指した。また、大量・均一製造プロセスの開発も重要課題の一つであり、滅菌プロセスについては、エチレンオキシド法を第一の候補として検討した。

### (2) 放出動態の数理モデル構築

本項目では、外部の専門企業との共同研究により、インスリン放出動態を数理モデル化し、デバイスの形状やサイズなど、大動物（ブタ）およびヒト用デバイスの定量的な設計指針を得ることを目的とした。なお、本項目は、PMDA相談時および米国FDA関係者との面談時にその重要性を指摘されており、認可申請プロセスにおいて重要な位置付けである。

### (3) 医学的機能評価

様々なサイズの動物モデルを用いてデバイスの医学的

機能評価を行い、デバイスの段階的なスケールアップと様々な病態適応性の判断を得ることを目的とした。正常および1型糖尿病（ストレプトゾトシン誘導性）モデル動物（マウス、ラット、ブタ）の皮下または表皮にデバイスを留置（貼付）し、血糖値やインスリン値等の血液パラメーター、インスリン標的臓器におけるインスリンシグナル遺伝子発現変化、グルコース負荷試験による急激な血糖上昇に対するデバイスの即応性やインスリン放出挙動、in vivo 共焦点顕微鏡を用いた皮内環境での薬物動態等、多角的に評価することとした。

## 2. 2019年度の研究成果

以下に挙げるのは、2019年度の代表的な研究成果である。

### インスリン放出挙動が温度に依存しないマイクロニードルの開発

マイクロニードルの温度応答性を抑制するために、ゲル組成の最適化を行った。具体的には、「主鎖」、「ボロン酸ユニット」、ネットワーク全体の親水性の向上とともにボロン酸ユニットとの分子内架橋度を調節する目的で導入した「水酸基含有ユニット」からなる3元共重合体ゲルを様々な組成で調整し、それらの相図を評価することで最適組成を探索した。従来型（温度依存型）のマイクロニードル

## 【研究開発部】貼るだけ人工膵臓

ドルと同様に多孔性の構造を有し、温度依存性が顕著に抑制されたゲル組成を見出した (図 1)。

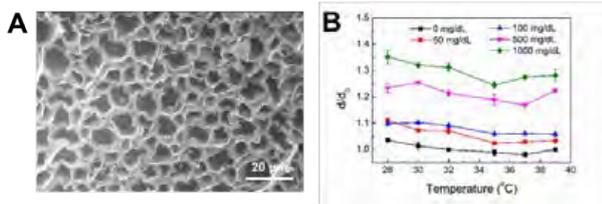


図 1. (A) ゲル断面の SEM 画像、(B) ゲルの相図。

### 生分解性ポリマー被覆によりマイクロニードルの力学的強度を向上させる手法の開発

マイクロニードルの皮膚刺入時の力学的強度を一時的に向上させることを目的とし、これを生分解性ポリマーの被覆により達成する手法を検討した。具体的には、可視化のための蛍光物質ローダミン B を含むポリビニルアルコール (PVA、分子量: 89-98 kDa) 溶液をマイクロニードルに添加し、蛍光顕微鏡により観察した (図 2)。マイクロニードルへの PVA 溶液の添加回数に応じて被覆の厚みと力学強度が線形に増大した。ニードル形状保存性の観点も考慮して最適な添加回数を決定した。また、当該 PVA 被覆は生理食塩水中で 30 分程度で溶解することで下地のゲル本来の特性が迅速に回復することを確認した。本手法の開発により、ゲル単独ではマイクロニードルとしての力学的強度が乏しい場合にも、簡便な操作でこれを解決する手法を確立した。

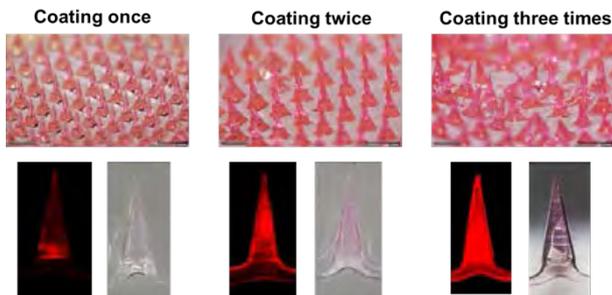


図 2. マイクロニードルへの PVA 溶液添加後の共焦点顕微鏡像。

### 皮内環境下でのインスリン動態の評価

生体組織は光透過性が低いいため、通常は固定後に薄切をほどこして組織学的な解析を行うが、処理に伴う変化や 3 次元情報が失われてしまうといった点が問題になる。組織透明化技術は組織内部まで構造を維持したまま観察が可能であるが、処理に時間がかかり、薬剤動態を捉えるような実験には適さない。組織の表面であれば共焦点あるいは多光子顕微鏡を用いて組織内部を観察可能な場合があるため、様々な蛍光プローブを利用し、皮膚におけるインスリン放出を捉える方法を検証した。マイクロニードル側からの観察はそれ自体の厚みや色調によって観察の障壁と

なるため、本年度は皮下脂肪側からのアプローチを検討した。その結果、*ex vivo*・*in vivo* いずれの条件においても生体の皮膚組織内部を共焦点顕微鏡によって観察可能であることを明らかにした。

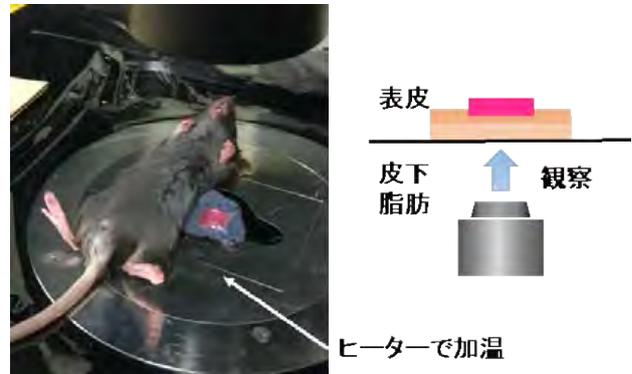


図 3. In vivo 共焦点顕微鏡観察の様子。

### 糖尿病モデルブタでの機能評価

内因性インスリンがほぼ枯渇した重症 1 型糖尿病モデル 3 頭に対して、インスリン含有デバイスが皮下留置したところ、2 頭で明らかな効果を確認したものの、血糖コントロールは不安定であり、7 日後までには効果が消失した。中程度 (およそ 400 mg/dL) の高血糖を呈した 3 頭に対してインスリン含有デバイスを装着したところ、皮下留置では顕著に血糖値が低下し、効果が 7 日後まで持続したのに対し、皮膚貼付では弱い効果にとどまった。これらの結果は、持続血糖モニタリング装置 (FreeStyle リブレ) でも確認され、デバイスは、食事や日内リズムに関係なく、安定した血糖コントロールをもたらした。一方、ほぼ正常血糖を呈したブタ 2 頭に対してインスリン含有デバイスを装着したところ、初期の一過性低血糖を除いて、血糖値は概ね正常範囲内に維持され、デバイスからの血糖依存性インスリン放出が確認できた。さらに装着 7 日後に、生体適合性を確認したところ、病理組織像では、皮下留置群において明らかなマイクロニードルの刺入が確認でき、末梢血白血球数はデバイス装着の前後でほぼ同程度であった。これに対して、皮膚貼付群では、血糖改善効果が認められなかった。血清インスリン量は、これらの結果に合致する結果が得られた。以上の結果より、プロジェクト開始時からの最大懸案であったヒト体重規



図 4. ブタ実験の様子。

模でのパワー（放出量）確保や安全性については一定の目処が立った一方、皮膚刺入性については課題が浮き彫りとなった。

### 3. 総括

2019年度計画では、「小・中・大動物実験用デバイスの開発」、「放出動態の数理モデル構築」、「ex vivo および in vivo 評価系の開発」、「医学的機能評価」を予定し、概ね予定通り進捗した。特に、共焦点顕微鏡を利用した評価系は、高い学術性に加え、今後実施するデバイスのブラッシュアップ作業において中心的な評価プラットフォームとして利用できる水準で達成した。次年度（2020年度）より着手予定としていたブタモデルでの実験を半年前倒して年度10月より着手する方針に変更した。本項目は、文科省・地域エコプロジェクトの中で「プロジェクトの加速化」に寄与するものと認められ、追加予算が処置されて実施したものである。これに伴い、いくつかの変更点および追加の検討課題が生じたが、連携企業らの協力を得て遂行することができた。3回のブタ実験を通じ、本技術の「現在地」と課題について明確に認識することができた。すなわち、プロジェクト開始時からの最大懸案であった「スケール=パワー」や安全性については一定の目処が立った一方、皮膚刺入性については困難が浮き彫りとなった。目下の技術課題は、当該刺入性の改善とともに、デバイスの小型化、リザーバーやアプリケーター等周辺デザインの具体化と考えている。これらの要素項目については、連携企業と協力して2020年度の中心課題として取り組む予定である。

# Totally synthetic, mechanical strong microneedle patch

Siyuan Chen

## 1. Introduction

Phenylboronic acid, a synthetic material that will not be denatured nor trigger the immune system, is an attractive candidate to realize glucose-responsive insulin delivery system.<sup>1-3</sup> Although our previous studies have reported a microneedle (MN) patch with silk fibroin/boronate semi-interpenetrating network hydrogel that possible to provide a week-long on-demand insulin release, its glucose-sensitive release profile was highly dependent on the temperature.<sup>4</sup> In order to eliminate the safety concerns for clinical application, we further improve the gel formulation and mechanical property. The study mainly focusses on the following two parts:

### 1.1. Fabrication of totally synthetic MNs with temperature independent release profile

For a remaining challenge, the previous reported hydrogel was highly dependent on the temperature,<sup>1-6</sup> posing a potential safety concern. In this study, a new totally synthetic glucose-responsive microneedle patch was developed. The MNs could provide on-demand glucose-responsive release in a temperature-independent manner within clinically a relevant range.

### 1.2. MNs surface coating to enhance the mechanical strength

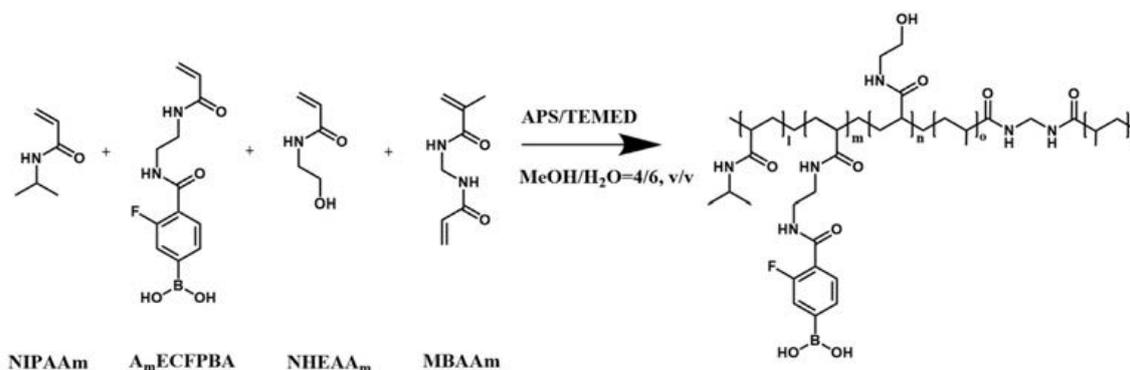
The mechanical strength of totally synthetic MNs is not high enough. To ensure efficient skin penetration, surface coating with dissolvable polymer was applied to enhance the mechanical property. The surface coated polymer could be dissolved after skin insertion and therefore will not hamper the insulin release.

## 2. Results and discussion

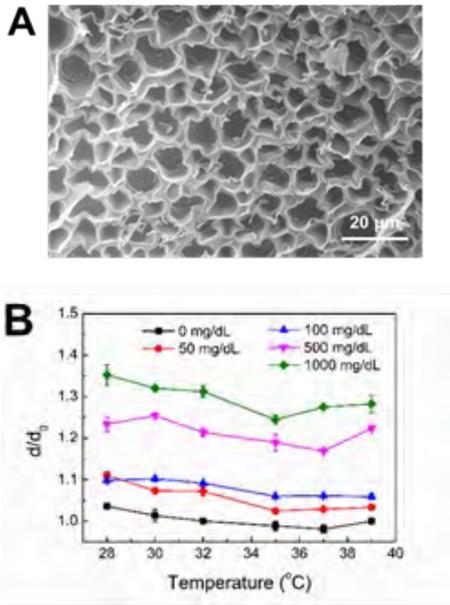
### 2.1. Fabrication of totally synthetic MNs with temperature independent release profile

A number of factors including exercise, illness, environment temperature, could easily cause variation of the skin temperature. In order to achieve glucose-responsive insulin release independent of temperature change, the fraction of thermo-sensitive *N*-Isopropylacrylamide (NIPAA<sub>m</sub>) was decreased and the fraction of boronate component (A<sub>m</sub>ECFPBA) was increased compared with previous formulation.<sup>4-6</sup> To maintain the hydrophilic/hydrophobic balance of the network, *N*-hydroxyethylacrylamide (NHEAA<sub>m</sub>) bearing hydroxyl group that can crosslink with boronic acid was introduced the hydrogel formulation as a third monomer to further control the hydrophobic/hydrophilic balance of the hydrogel and avoid unwanted loosen of polymer network (Figure 1).

The hydrogel with optimized formulation displayed microporous and interconnected structure, which aids in smooth diffusion of insulin (Figure 2A). Figure 2B shows phase diagrams of the hydrogel for various temperatures and glucose concentrations. In the presence of glucose, the binding of PBA with glucose leads to an increased fraction of boronate and hence promotes hydration of the gel. More importantly, these gels are only marginally sensitive to the temperature for the range of investigation (28-39°C). Note that in these gels the molar contents of AmECFPBA is significantly higher (10.7 %) than that used in the previous system (7.5 %)<sup>2-5</sup> and, correspondingly, the contents of thermos-sensitive main-chain components (NIPAA<sub>m</sub>) is much lower (60.7 mol%) as compared to the our previous formulation<sup>2-5</sup> (91.5 mol% of



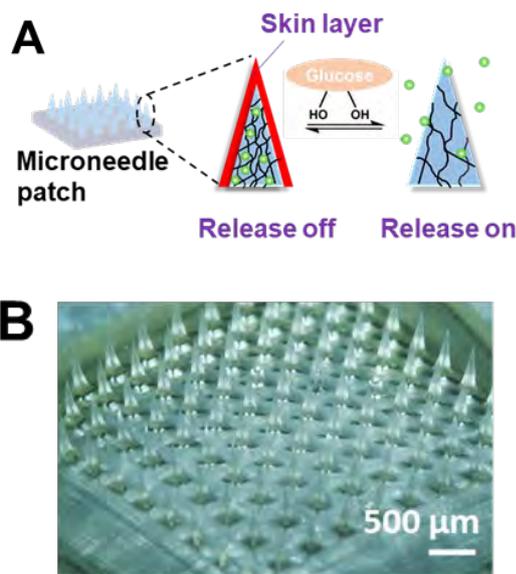
**Figure 1.** Chemical structure of hydrogel with monomers kept at optimized molar fraction (1:m:n:o=60.7:10.7:23.8:4.8) to decrease the impact of temperature to the glucose-responsive functionality of the hydrogels.



**Figure 2.** (A) Cross-sectional SEM image and (B) glucose-dependent volume change of the boronate-containing hydrogel.

NIPMAAm). These factors, along with the hydrophobicity-modulating effect by the use of NHEAAm, collectively aided in making the gel practically insensitive to the temperature.

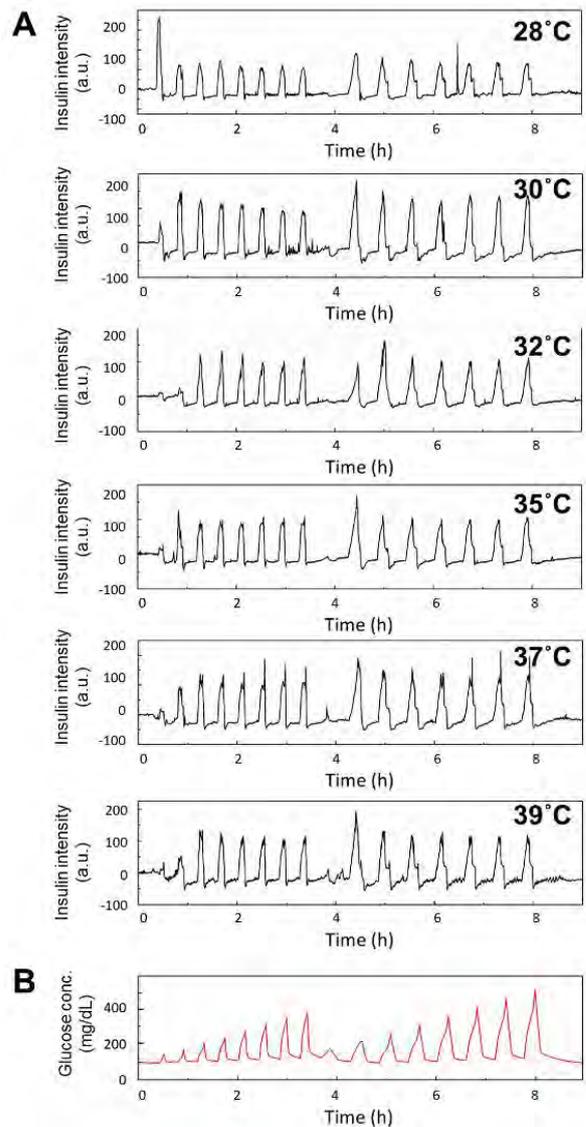
In order to achieve painless and convenient transdermal delivery of insulin, the temperature-independent, glucose-responsive hydrogel was fabricated into MN format. The tip region of the MN patch was fabricated with the glucose-responsive hydrogel, thus allowing sensing the glucose level change in the interstitial fluid after skin insertion (Figure



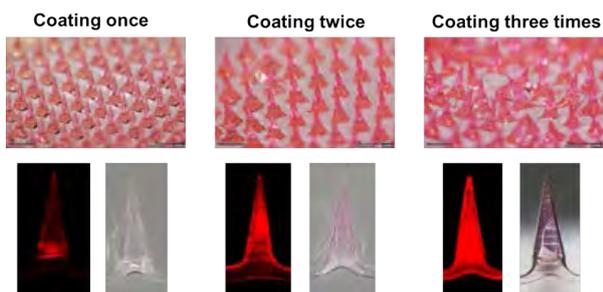
**Figure 3.** (A) Schematic of glucose-responsive insulin release from the MN patch. (B) Morphology of totally synthetic MNs.

3A). The height of the MN patch was set to be 700 μm, which is an ideal length to ensure efficient stratum corneum disruption but without touching nerve fibers and blood vessels (Figure 3B). The base layer part was formed by biocompatible PVA instead of hydrogel to avoid deformation during the manufacturing process. To improve the aqueous stability of PVA, it was heat treated at 130 °C for 1h for crystallization. No detachment between the needle region formed by glucose-responsive hydrogel and the base layer fabricated by crystallized PVA was observed, indicating the two-layer MN patch was successfully manufactured.

Figure 4 shows the *in vitro* insulin release profile of thus-obtained two-layer MN patch, with an insulin reservoir attached at the back of the MNs patch to ensure sufficient amount of insulin loading. Rapid response of the two-layer MNs to the programmed glucose pattern was observed at the



**Figure 4.** (A) *In vitro* FITC-labeled insulin release from MNs at various temperatures, pH 7.4. (B) Temporal pattern of the fluctuation in glucose concentration.



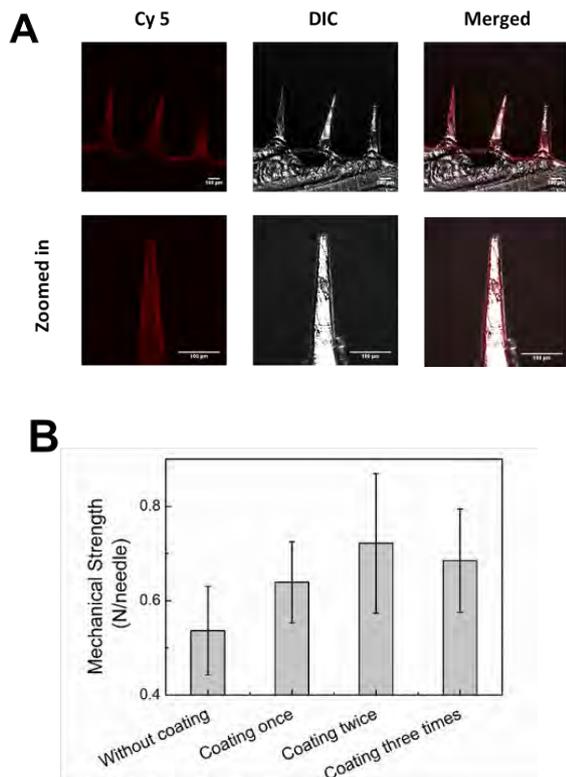
**Figure 5.** Morphology of MNs coated with Rhodamine B blended PVA for different times.

mean skin temperature (32°C) and other clinically relevant temperature conditions (28-39 °C), similar to the release profile of hydrogel. These results suggest the temperature independent, glucose-responsive functionality of the hydrogel 2 was well reproduced after incorporating into MN patch.

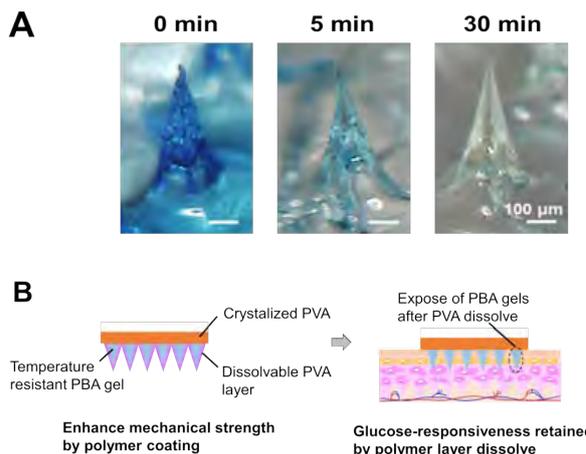
### 2.2. MNs surface coating to enhance the mechanical strength

One drawback of the totally synthetic MNs is relatively low mechanical strength. In order to overcome this disadvantage, the needle region was coated with dissolvable polymer layer. The polymer will dissolve after skin insertion and thus not affect the glucose-responsiveness.

MNs were coated with 5 wt% PVA (Mw 89-98 kDa)



**Figure 6.** (A) Confocal microscopy images showing the distribution of Cy5-PVA in MNs. (B) Mechanical strength of MNs with or without PVA coating.

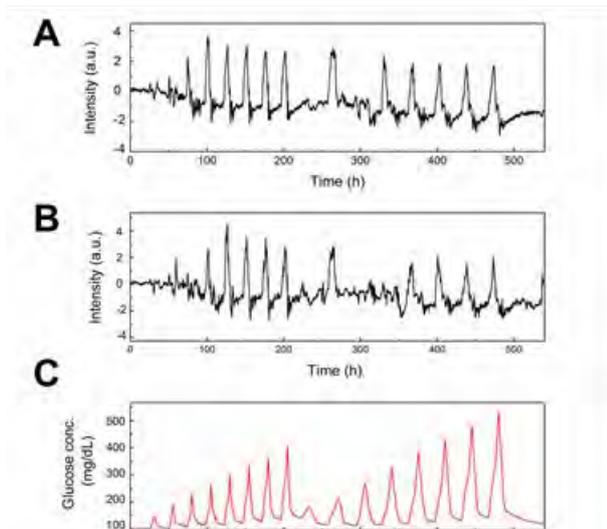


**Figure 7.** (A) Morphology of Cy5-PVA coated MNs immersed in PBS for various time. (B) Mechanical strength of MNs with or without PVA coating.

solution by dip-coating method. Coating was performed 1, 2 and 3 times. Rhodamine B were added in the polymer solution to indicate the location of PVA. As shown in Figure 5, Rhodamine B not only present on the MNs surface but also diffused into the inner core of needles, possibly due to the pore opening after gel hydration. Fluorescence intensity increase with coating time, indicating increased coating thickness with coating time. However, increase coating time to three may increase the possibility of deformation.

In order to further characterize the polymer distribution, MNs were coated with cy5 conjugated PVA for twice. As seen in the confocal microscopy images (Figure 6A), the accumulation of red fluorescence derived from Cy5 indicates the successful surface polymer coating. In the meanwhile, red fluorescence was also observed in the core of MNs. This is possibly because during the dip process, the hydrogel in the MNs needles hydrated with the polymer solution, and thus part of the polymer diffused into the gel network. Polymer coating increased the mechanical property of the MNs. The mechanical strength of PVA coated twice MNs was 34.5% higher than the one without coating (Figure 6B).

The coated polymer is dissolvable. As seen in Figure 7A, after immersing in PBS for 5 min, the colour of cy5-PVA coated MNs faded compared to the one without hydration. After 30 min, majority of the coated PVA was removed from the MNs surface, indicating coating MNs with dissolvable polymer will not affect the functionality of the MNs after skin application (Figure 7B). As shown in Figure 8, almost no difference was noted in the release profiles of the PVA coated and uncoated MNs, possible due to the rapid dissolution of the coated PVA layer. This result shows the polymer coating did not hamper the glucose-responsiveness of the MNs.



**Figure 8.** Time-course changes in the fluorescence intensity of FITC-labelled insulin released from MNs (A) without and (B) with PVA coating. (C) Temporal patterns of the fluctuation in glucose concentration.

### 3. Conclusion and future plan

Compared to all reported  $\text{GO}_x$  loaded nanoparticles containing glucose-responsive MN patches that could only provide hours-long duration and associated with safety concerns caused by immunotoxicity and denaturation risks of  $\text{GO}_x$  and toxic byproduct hydrogen peroxide, this diffusion-driven, skin layer controlled release mode offers

several advantages; no production of harmful byproducts upon reaction with glucose, sustainable and suitable for large-scale production, and no cold chain requirement. This totally synthetic MNs patch showed potential to achieve persistent glycemic control and is promising to improve the quality of life for diabetic patients.

Future research will be conducted to prepare new types of MNs. E.g. use photopolymerization to synthesize glucose-responsive hydrogels in tips, and prepare porous non-glucose responsive hydrogel to serve as base layer and reservoir. This strategy is aim to increase the fluid transportation speed and to facilitate skin penetration. Detailed in vitro and in vivo characterization will be carried out for further evaluation.

### 【References】

1. A. Matsumoto et al., *Chem. Commun.*, 2010, 46, 2203-2205.
2. A. Matsumoto et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51(9), 2124-2128.
3. A. Matsumoto et al., *Sci. Adv.*, 2017, 3(11), eaaq0723.
4. S. Chen, A. Matsumoto et al., *Adv. Funct. Mater.*, 2019, 29(7), 1807369.
5. S. Chen, A. Matsumoto et al., *ACS Biomater. Sci. & Eng.*, accepted.
6. A. Matsumoto and S. Chen, Japanese patent, No. 2018-053817, patent pending.

# 生体内におけるマイクロニードルからの インスリン放出動態の解析

伊藤 美智子

## 1. はじめに

様々な薬剤投与経路の中で、経皮投与は表皮から真皮へと薬剤が浸透・拡散し、皮下組織の毛細血管から吸収される。経口投与や静脈内投与と比較して、経皮投与では血中濃度が緩やかに上昇し、血中濃度が長く持続する特徴があり、経口投与ができない患者にも容易に用いることができる。一方で、角質層というバリアが存在するため、経皮投与可能な薬剤の性質や分子量には制限がある。マイクロニードル技術は数 100  $\mu\text{m}$  の針が角質層を通過して表皮へと到達するため、タンパクや難経皮吸収薬剤を投与することが可能であり、今後臨床応用への展開が期待される分野である [1]。

### 1. 1 マイクロニードルの種類と特徴

マイクロニードルの針の構造には複数のタイプがあり、中空の微細な針から薬剤を注入する方法や、中実な針で皮膚を穿刺し、針の表面あるいは穿刺後の皮膚に塗布した薬剤を浸透させる方法がある [2]。また、生分解性の中実針に薬剤を担持させ、皮膚に留置することで針の溶解とともに皮膚内に薬剤を拡散させる様式も開発されている [2]。これまでに我々の研究グループではインスリンを含有するグルコース応答性ゲルを中空糸に充填し、血糖値に応じてインスリンを放出する皮下埋め込み型デバイスを確立した [2]。現在、この技術をさらに応用し、マイクロニードル自体にグルコース応答性をもたせ、自律的にインスリンを放出する「貼るだけ人工膵臓」の開発を目指している。すなわち、通常短時間で除去するマイクロニードルを長期間（日から週）にわたって皮膚に留置し、さらに針自体が周辺環境への応答性を有するという、従来のマイクロニードルとは全く異なるコンセプトに基づいている。本技術が確立することで、食事摂取に応じて複数回の自己注射が必要であった糖尿病の管理が大幅に簡便化し、さらに生理的な血糖コントロールに近づくことが期待される。そのためには皮膚環境において適切なグルコース応答性とインスリン放出能を担保することが必要不可欠である。

### 1. 2 マイクロニードルの機能評価系

マイクロニードルの性能は多くの要因によって決定される。マイクロニードル自体の材質による刺入性や強度、形状、有効面積、耐久性などに加え、薬剤側の要因として、分子量や溶解性、修飾、濃度などが関わる。また、生体側

の要因として皮膚構造（角質層の厚さ、皮膚の硬さ、毛孔・汗腺の存在など）、バリア障害の有無、血流、体温などもマイクロニードルの性能を発揮する上で重要な要素となる。従来、マイクロニードルの機能評価はニードル自体の物性や構造に基づく検証と、*in vitro* における薬剤放出の検出によってなされることが多く、生体における効果は個体全体としての変化（結果）が検討されてきた。例えば、ワクチン投与に対する抗体獲得や、薬剤投与後の血中薬剤濃度測定や病態に対する治療効果などが挙げられる [4, 5]。刺入性や皮膚内の拡散について皮膚片を用いた検討もなされているが [6]、正常な血流のない状態では生体内における皮膚環境を反映しているとは言い難く、皮膚局所でマイクロニードル自体が受ける影響や薬剤の放出動態は十分に検討されてこなかった。「貼るだけ人工膵臓」は長期間にわたって皮膚に留置され、皮膚環境に応答して機能を発揮するという性質上、生体側の要因がその性能に多大な影響を与える。皮膚におけるインスリンの放出動態を明らかにすることが、安定で有効なデバイスの開発・改良に重要であると考えられる。

## 2. 実験と結果

生体組織は光透過性が低いため、通常は固定後に薄切をほどこして組織学的な解析を行うが、処理に伴う変化や3次元情報が失われてしまうといった点が問題になる。組織透明化技術は組織内部まで構造を維持したまま観察が可能であるが、処理に時間がかかり、薬剤動態を捉えるような実験には適していない。組織の表面であれば共焦点あるいは多光子顕微鏡を用いて組織内部を観察可能な場合があるため、様々な蛍光プローブを利用し、皮膚におけるインスリン放出を捉える方法を検証した。マイクロニードル側からの観察はそれ自体の厚みや色調によって観察の障壁となるため、今回は皮下脂肪側からのアプローチを検討した。

### 2. 1 *ex vivo* 評価系

一晩絶食下においた野生型マウスの背部にマイクロニードルを装着し、グルコース投与後 60 分まで経時的に皮膚をサンプリングし、*ex vivo* における共焦点顕微鏡（Olympus, FLUOVIEW FV10i）観察を試みた。①マイクロニードルを装着した状態で皮膚を切り出し、皮下脂肪側から水平面を観察するとともに、②マイクロニードルを除去

して皮膚を1mm厚の短冊状に切り、断面がカバーガラスに接するように配置することで垂直面の観察を行った(図1)。Cy5 標識ポリエチレングリコール (PEG: polyethylene glycol) を静脈内投与して血管を可視化し、脂肪細胞はBODIPY を皮下投与することで染色した。また、マイクロニードルを Rhodamine、インスリンを FITC にて標識した。

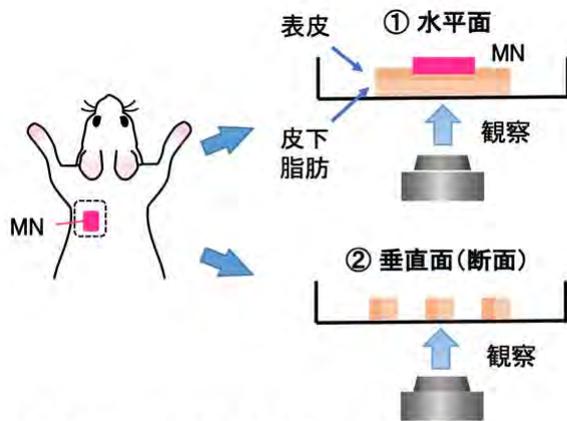


図1. *ex vivo* 評価系概要  
MN: マイクロニードル

①の皮下脂肪側から観察する方法では、皮下脂肪層を走行する血管、およびその周囲の脂肪細胞が観察された(図2A)。さらに焦点を皮膚表面にずらしていくことで、表皮層の血管やマイクロニードルの横断面が確認できたが(図2B)、針の刺入度合いやカバーガラスからの距離によって、観察可能な面積や蛍光強度に大きな開きがあり、定量的な比較はやや困難であった。

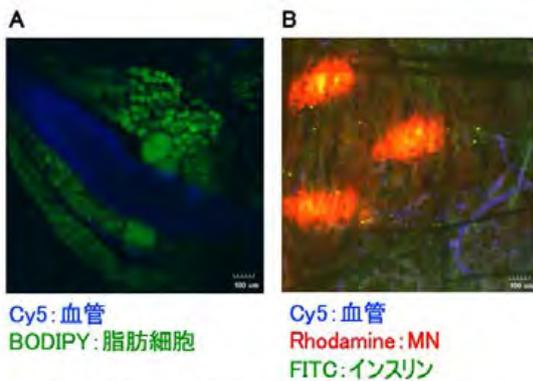


図2. 共焦点顕微鏡による皮膚構造の観察 (*ex vivo*, 水平面)

②の皮膚垂直面(断面)の観察では、血管を染める Cy5-PEG の蛍光強度の違いによって表皮・真皮と皮下脂肪を区別することが可能だった。また、マイクロニードル自体を観察することはできないものの、グルコース投与後に表皮・真皮層において FITC 蛍光強度の増強が認められた(図3)。また、皮膚表面からの深度に応じた蛍光強度の変化を定量的に捉えることも可能であった。

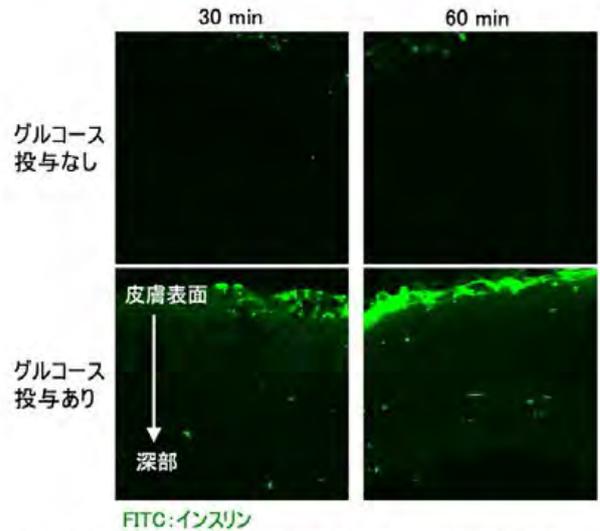


図3. グルコース投与後のインスリン拡散 (*ex vivo*, 垂直面)

## 2. 2 *in vivo* 評価系

*ex vivo* 評価系では解析のタイムポイントごとに別個体を用いて解析することになるため、1つのデバイスから放出されるインスリン動態を捉えることはできない。そこで、マウス背部にデバイスを装着し、血管が豊富な部分を避けるように皮膚に切開を入れ、デバイス付きの皮膚弁をカバーガラスに展開して麻酔下に皮下脂肪側から経時的な観察を試みた(図4)。共焦点顕微鏡(Nikon, 共焦点レーザー顕微鏡システム C2+)、試料台に Thermo Plate (TOKAI HIT) を設置し、観察期間中マウスを被覆することで体温維持を図った。

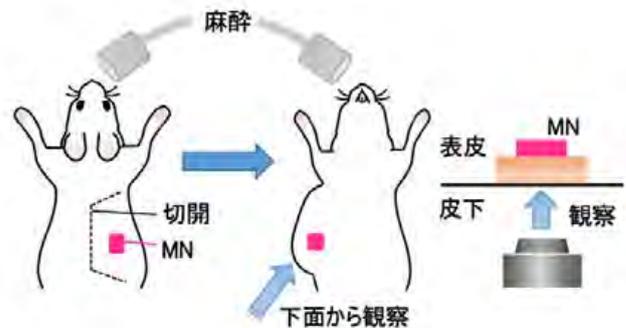


図4. *in vivo* 評価系概要

透過光にて皮下脂肪層の脂肪細胞や血管を確認し、さらに皮膚表面に視野を移すことで Rhodamine 標識のマイクロニードルが確認された。Rhodamine にてマイクロニードルが確認できる視野を確保し、グルコース投与後に FITC-インスリンの経時的な変化を検討した(図5)。グルコース投与後60分の範囲ではマイクロニードル断面を指標にした視野には大きな変化はなく、同一個体内での FITC 強度比較は可能であると考えられた。一方で、マイクロニードルの刺入具合によって観察可能な視野の広さや皮膚深度に差があるため、刺入性の向上と安定した装着方法の開発が必要であると考えられた。

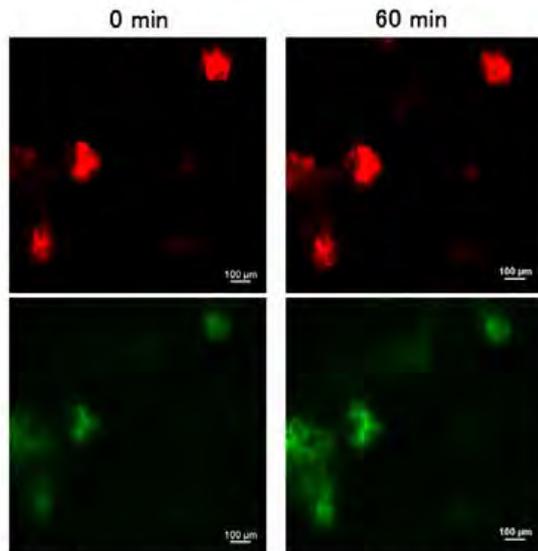


図5.グルコース投与後のインスリン拡散 (*in vivo*)

### 3. 考察及び今後の展望

本年度の検討により、*ex vivo*・*in vivo* いずれの条件においても生体の皮膚組織内部を共焦点顕微鏡によって観察可能であることが明らかとなった。固定や薄切などの手順はさまずリアルタイムに観察できることから、生体内におけるマイクロニードルからのインスリン放出動態を理解する重要な情報が得られる。*ex vivo* 評価系では皮膚表面に装着したマイクロニードルからの水平・垂直方向のインスリン拡散動態を把握できる可能性があるが、異なる個体同士の比較になってしまう点や、皮膚片を細切する際の手技的なバラツキが撮像に影響する可能性がある。一方で、*in vivo* 評価系では生きているマウスの皮膚における変化を同一視野で経時的に評価することができる。しかしながら、皮膚弁としてカバーガラス上に展開するため、通常の皮膚とは温度や血流量が異なる可能性が否定できな

い。また、深部を観察するためにレーザー強度を上げる必要があり、蛍光同士の漏れ込みについて注意深く観察条件を設定する必要がある。

現在、マイクロニードル素材や形状の改良を続けていることから、*ex vivo*・*in vivo* 評価系を用いて刺入性やインスリン放出能の検証を行っていく。また、皮膚弁局所の温度や血流量測定を導入し、さらにそれらの条件を変えることで、皮膚環境がインスリン放出動態に与える影響を明らかにする。

### 【参考文献】

1. R. J. Pettis, A. J. Harvey. Microneedle delivery: clinical studies and emerging medical applications. *Ther. Deliv.* **3**: 357-371, 2012.
2. M. Kirkby, A. R. J. Hutton, R. F. Donnelly. Microneedle mediated transdermal delivery of protein, peptide and antibody based therapeutics: current status and future considerations. *Pharm. Res.*, **37**: 117 (2020).
3. A. Matsumoto, H. Kuwata, S. Kimura, et al. Hollow fiber-combined glucose-responsive gel technology as an *in vivo* electronics-free insulin delivery system. *Commun. Biol.* **3**: 313 (2020).
4. M. Leone, J. Monkare, J. A. Bouwstra, et al. Dissolving microneedle patched for dermal vaccination. *Pharm. Res.* **34**: 2223-2240 (2017).
5. J. Wang, J. Yu, Y. Zhang, et al. Charge-switchable polymeric complex for glucose-responsive insulin delivery in mice and pigs. *Sci. Adv.* **5**: eaaw4357, 2019.
6. A. D. Permana, M. T. C. McCrudden, R. F. Donnelly. Enhanced intradermal delivery of nanosuspensions of antifilaria drugs using dissolving microneedles: a proof of concept study. *Pharmaceutics* **11**: 346 (2019).

# ポリマーコーティングによるマイクロニードルの 力学的強度の増大および機能評価

宮崎 拓也

## 1. 緒言

マイクロニードル(MN)は非侵襲的かつ持続的に薬剤を投与することのできる医療機器として注目されている<sup>[1]</sup>。しかしながら、ニードル部の力学的強度が低いことが課題として挙げられ、皮膚への貼付によりニードル部が変形することにより MN と生体との接触面積が減少し、薬剤の投与が困難となる。そこで、MN の生体応用に向けてはニードル部の力学的強度の向上により内包した薬剤を皮下に確実に投与することが必要である。

そこで、本研究では MN のニードル部にポリマーを添加することにより力学的強度を増大し皮膚刺入性を向上することを目指した。ポリビニルアルコール(PVA)が優れた力学特性を有することに注目し、MN の表面に PVA コーティングを行うことにより MN の力学的強度の増大を目指した。また、MN 表面への PVA の導入により MN から薬剤放出が阻害される可能性があるため、生理条件下における MN 表面からの PVA の脱離および MN の機能評価を行った。

## 2. 実験結果

### 2. 1 MN 表面への PVA コーティング

MN は既報<sup>[2]</sup>に従って調製した。具体的には、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)およびフェニルボロン酸モノマー(AmECPBA)、N-ヒドロキシエチルアクリルアミド(NHEAAm)、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBAAm)を水/メタノール混合溶媒に溶解し、開始剤および触媒を添加し、鋳型中での重合反応により MN を調製した(Figure 1)。また、調製した MN を PVA 溶液(分子量: 89-98 kDa、100 mg/mL)に添加することによりニードル部を PVA コーティングした。ここで、PVA のヒドロキシル基にエステル結合を介して蛍光色素 Cy5 を導入することにより Cy5 標識 PVA を合成し、PVA 溶液に添加することにより PVA 層の蛍光による可視化を目指した(Figure 2)。蛍光顕微鏡による観察から、MN 表面での Cy5 由来の蛍光シグナルが確認されたことから、MN 表面への Cy5 標識 PVA の導入が示唆された(Figure 3a-c)。また、MN への PVA コーティング回数を1回から3回に増やすと MN 表面の PVA 層の厚みが 10  $\mu\text{m}$  から 25  $\mu\text{m}$  に増大したことから、PVA コーティングの回数により PVA 層の厚みを制御できることを確認した(Figure 3d)。



Figure 1. MNの合成スキーム。

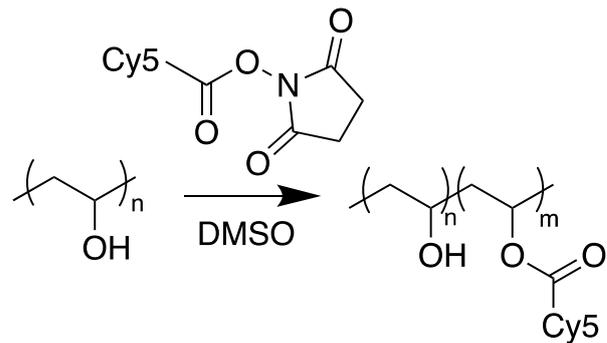


Figure 2. Cy5 標識 PVA の合成スキーム。

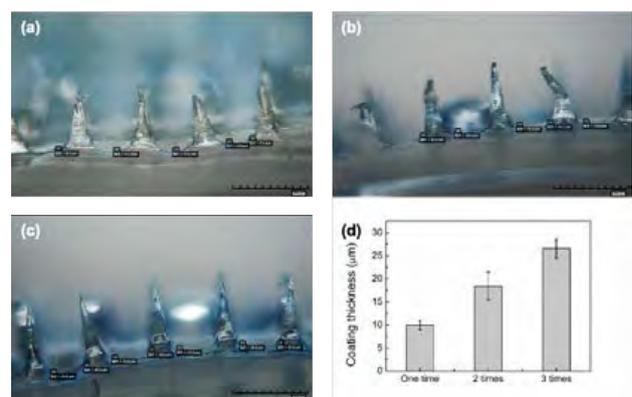


Figure 3. Cy5 標識 PVA を添加した MN の蛍光顕微鏡像. (a) PVA を 1 回添加した MN. (b) PVA を 2 回添加した MN. (c) PVA を 3 回添加した MN. (d) MN 表面の PVA の厚さ.

### 2. 2 PVA コーティングによる力学的強度の増大

マイクロニードル表面への PVA の導入が確認できたことから、マイクロニードルの力学的強度の評価を行った。具体的には、マイクロニードルのニードル部にせん断応

力を印加し、降伏応力を測定することにより力学的強度の指標とした。PVA 層が形成されたマイクロニードルの降伏応力がコーティングを行っていないマイクロニードルよりも高いことから、PVA 層形成によるマイクロニードルの力学的強度の向上が示唆された(Figure 4)。また、PVA コーティングの回数を 2 回以上にしても力学的強度の改善がみられなかったことから、最適な溶液の添加回数は 2 回であることが示唆された(Figure 4)。よって、今後の評価においては MN への PVA コーティングの回数は 2 回とした。

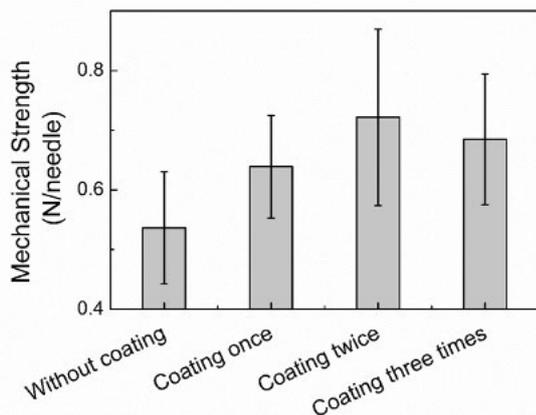


Figure 4. PVA コーティング後の MN の力学的強度。

### 2. 3 PVA コーティングの生分解性および MN の機能評価

MN 表面での PVA 層の形成および PVA 層の導入による力学的強度の向上が確認できた一方で、MN 表面での PVA 層の形成による薬剤放出量の減少が懸念されることから、PVA 層の分解性および PVA 層分解後の薬剤放出量の評価を行った。具体的には、アガロースを PBS に添加することによりアガロースゲル(アガロース濃度: 1%)を調製し、Cy5 標識 PVA コーティング後の MN を添加することにより、MN 表面の Cy5 の観察およびアガロース中の Cy5 の蛍光強度の測定を行った。また、アガロースをグルコース溶液(100 mg/dL)に添加することによりグルコース含有アガロースゲル(アガロース濃度: 1%)を調製し、MN からの FITC 標識インスリンの放出量をアガロース中の FITC の蛍光強度を測定することにより評価した。PBS 添加 35 分後に MN 表面から Cy5 由来の蛍光が消失し、その Cy5 由来の蛍光がアガロースゲル中において検出されてことから、生理塩条件下での MN 表面からの PVA の速やかな脱離が示唆された(Figure 5a-c)。さらに、アガロースゲルへのグルコース溶液の添加によりゲル中の FITC 由来の蛍光強度が増加していることから、PVA 層の消失による MN のグルコース応答性の回復およびインスリン放出が示唆された(Figure 5d)。

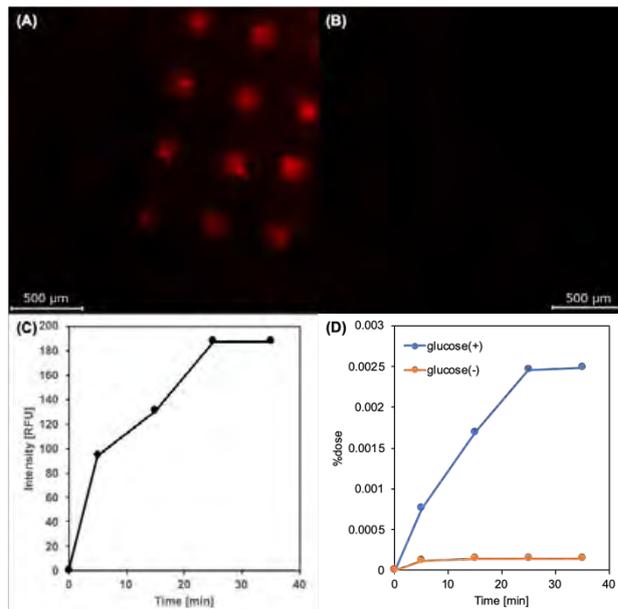


Figure 5. (a) PBS 添加前. (b) PBS 添加 35 分後の Cy5 標識 PVA 層を有するマイクロニードルの共焦点顕微鏡像. (c) PBS 添加後のマイクロニードルからの Cy5 標識 PVA の放出. (d) インスリン溶液 (mg/dL) 添加後の PVA 層分解後のマイクロニードルからの FITC 標識インスリンの放出。

### 3. 結言及び今後の展望

MN を PVA 溶液に添加することにより溶液の添加回数に依存した MN 表面への PVA の導入に成功した。また、PVA の導入によりニードル部の力学的強度を増大し、PVA 溶液の最適な添加回数を 2 回に決定した。さらに、生理塩条件下において PVA は速やかに分解し、分解後にはグルコース濃度依存的にインスリンを放出したことから、PVA コーティングは MN の機能に影響を与えないことを確認した。本研究の MN の力学特性を向上する手法は MN の構造および特性に依存しないことから、様々な MN の皮膚刺入性を向上することのできる一般的な手法になる可能性が高いと考えられる<sup>[3]</sup>。

MN に求められる機能として、①優れた力学的強度、②優れた吸水性、③週レベルでの持続性、が挙げられ、本研究では力学特性の改善に成功したことから、今後は優れた吸水性を有する持続型 MN の開発を進める。具体的には、吸水性の高い新規ポリマーを MN に添加することにより皮膚刺入後の速やかな吸水を目指す。また、MN に持続的に薬剤を供給することのできるレザーバーの設計を行う。

#### 【参考文献】

1. Y-C. Kim, J-H. Park, M. R. Prausnitz. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 1547-1568 (2012).
2. S. Chen, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto. *Adv. Funct. Mater.*, **29**, 1807369 (2019).
3. S. Chen, T. Miyazaki, M. Itoh, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto. *ACS Appl. Polym. Mater.* (2020) in press.

## 業 績

## 【原著論文】

1. S. Chen, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto. Smart microneedle fabricated with silk fibroin combined semi-interpenetrating network hydrogel for glucose-responsive insulin delivery. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5**: 5781-5789 (2019).
  2. S. Chen, T. Miyazaki, M. Itoh, Y. Morooka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto, Temperature-stable Boronate Gel based Microneedle Technology for Self-Regulated Insulin Delivery, *ACS Applied Polymer Materials*, **in press**
  3. T. Miyazaki, S. Uchida, S. Nagatoishi, K. Koji, T. Hong, S. Fukushima, K. Ishihara, K. Kataoka, H. Cabral. Polymeric nanocarriers with controlled chain flexibility boost mRNA delivery in vivo through enhanced structural fastening. *Adv. Healthc. Mater.* **in press**
  4. M. Asakawa, M. Itoh, T. Suganami, T. Sakai, S. Kanai, I. Shirakawa, X. Yuan, T. Hatayama, S. Shimada, Y. Akiyama, K. Fujiu, Y. Inagaki, I. Manabe, S. Yamaoka, T. Yamada, S. Tanaka, Y. Ogawa. Upregulation of cancer-associated gene expression in Activated fibroblasts in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Sci. Rep.* **9**: 19601, (2019).
  5. M. Kawakubo, M. Tanaka, K. Ochi, A. Watanabe, M. Saka-Tanaka, Y. Kanamori, N. Yoshioka, S. Yamashita, M. Goto, M. Itoh, I. Shirakawa, S. Kanai, H. Suzuki, M. Sawada, A. Ito, M. Ishigami, M. Fujishiro, H. Arima, Y. Ogawa, T. Suganami. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition prevents nonalcoholic steatohepatitis-associated liver fibrosis and tumor development in mice independently of its anti-diabetic effects. *Sci. Rep.* **10**: 983, (2020).
1. 陳思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中都, 越智梢, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元亮  
Enzyme-Free and Nanoparticle Free Polymeric Microneedle-Array Patch Serves as An On-Skin Pancreas for Sustained On-Demand Insulin Delivery  
第 68 回高分子学会年次大会, 2019 年 5 月, 大阪
  2. 陳思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中都, 越智梢, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元亮  
Two layer microneedles fabricated with Semi-Interpenetrating Network Hydrogels for smart transdermal insulin delivery  
第 68 回高分子討論会, 2019 年 9 月, 福井
  3. 陳思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中都, 越智梢, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元亮  
Enzyme free Microneedle Array Patch Composed of Boronate-Containing Hybrid Hydrogel for On-Demand Transdermal Insulin Delivery, 32nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2019 年 10 月, 広島
  4. 陳 思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 宮崎拓也, 伊藤美智子, 田中 都, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元 亮  
Protein-free insulin delivery microneedle patch integrated with temperature independent, glucose-responsive hydrogel,  
第 31 回高分子ゲル研究討論会, 2020 年 1 月, 東京
  5. 宮崎拓也, 内田智士, 片岡一則, Horacio Cabral  
最適化したアミノ酸側鎖を有するポリエーテル骨格生分解性ポリカチオンを用いた mRNA 内包高分子ミセルの安定化  
第 25 回次世代医工学研究会, 2019 年 7 月, 京都
  6. 宮崎拓也, 内田智士, 片岡一則, Horacio Cabral  
mRNA の生体応用に向けた柔軟な生分解性ポリカチオンの開発  
遺伝子・デリバリー研究会第 19 回夏季セミナー, 2019 年 9 月, 京都
  7. 宮崎拓也, 内田智士, 長門石暁, 津本浩平, 福島重人, 片岡一則, Horacio Cabral  
メッセンジャーRNA の生体応用に向けた柔軟性ポリカチオンを用いたポリイオンコンプレックス型ミセルの構築  
第 68 回高分子討論会, 2019 年 9 月, 福井
  8. 宮崎拓也, 鈴木研資, 永松健, 片岡一則, Horacio Cabral.  
妊娠期の化学療法に向けたナノ医薬の開発

## 【書籍】

1. T. Miyazaki, N. Nakagawa, H. Cabral. Strategies for Ligand-Installed Nanocarriers in Handbook of Nanotechnology Applications. Elsevier, 2020.

## 【口頭発表】

## 【研究開発部】貼るだけ人工臓器

第 26 回次世代医工学研究会, 2019 年 12 月, 香川

9. T. Miyazaki, S. Uchida, H. Cabral.

Development of polymeric micelles for mRNA delivery through stable complexation with flexible block ionomer.

1st French-Japanese Symposium on Polymer Science, 2020.1, Montpellier, France

### 【特許】

(1) 国内特許出願 2 件

### 【受賞】

1. 第 68 回高分子学会年次大会 (2019 年度) 広報委員会  
パブリシティ賞

陳 思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中 都, 越智 梢, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元 亮

2. 32nd International Microprocesses and Nanotechnology  
Conference (2019) Most Impressive Presentation

陳 思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中 都, 越智 梢, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元 亮

3. 第 31 回高分子ゲル研究討論会 (2020 年度) Soft Matter  
Presentation Prize

陳 思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 宮崎拓也, 伊藤美智子, 田中 都, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元 亮

# 「人工細胞膜システム」グループ

グループリーダー 竹内 昌治

## 【基本構想】

膜タンパク質は細胞膜中に存在し、細胞の内外への物質輸送・排出、シグナル伝達・変換などにおいて重要な役割を果たしており、1兆ドル余り(2011年)の医薬品の世界市場において、薬剤の標的の半数以上がこれら膜タンパク質や膜表在性物質だと言われている。リガンド同定済みのGタンパク質共役型受容体(GPCR)に関するだけでも約600億ドル(2009年)に上り、リガンド未同定のGPCRをはじめ、イオンチャネルやトランスポーターなどの膜タンパク質の機能や特性を一つ一つ解明することが、基礎研究のみならず創薬・医療分野における重要な課題である。しかし細胞膜中に存在する膜タンパク質は単離が困難なため、機能解析は難しいとされてきた。

創造展開プロジェクト(2009-2012年度)では、細胞膜のモデルとなる脂質二重膜を人工的に再構成した後、精製された膜タンパク質を導入することで、その膜タンパク質の特性を低ノイズで解析する戦略にもとづいて研究を行い、膜タンパク質を再構成するための2つの人工脂質二重膜システムを確立した。(1)電氣的計測技術に適する平面膜システムでは、ヒト由来イオンチャネルの並列同時シグナル計測に適する自動化・集積化チップ、小型化チップをそれぞれ研究・開発した。(2)光学的計測技術に適するリポソーム膜システムでは、細胞サイズリポソームの形成手法を確立し、トランスポーターの輸送現象やGPCRの基質結合を蛍光により観測することに成功している。

2013年度にスタートした実用化実証事業および地域イノベーション戦略支援プログラムでは、創造展開プロジェクトで得られた研究成果を展開し、標的膜タンパク質の生体外での創薬解析支援システムを確立すべく研究開発を行っている。具体的には、効率的膜システム要素技術の開発として、人工脂質二重膜の集積化や薬剤スクリーニングに適したデバイスとするためのシステム全体の基盤研究開発を実施し、膜タンパク質の調製・導入法の開発として、イオンチャネルやGPCR、トランスポーターなどを人工脂質二重膜に効率的・体系的に導入できる手法の研究開発を実施している。最終的に、大学・研究機関や製薬企業、受託試験機関などで使用できる評価法およびシステムの開発も目標としている。2015年度から参画しているNEDO事業および2018年度に開始した地域イノベーション・エコシステム形成プログラムでは、膜タンパク質の機能利用による人工細胞膜センサに関わる研究開発を行っている。膜タンパク質である嗅覚受容体に代表されるように、生体のもつセンサは優れた感度・特異性をもつことが知られており、膜タンパク質をセンサ素子として活用するための研究開発を実施している。周辺技術も含め、小型・高性能センサの実用化技術の開発を目標としている。

## 1. 2019年度の研究目的

実用化実証事業7年目となる2019年度は、イオンチャネル機能評価システムの開発では、事業化に向けた研究開発を推進することを目的とした。一方で、膜タンパク質を利用したセンサ開発に関しては、開発を続けてきた匂いセンサ要素技術を統合し、プラットフォーム基盤技術として確立することを目指した。

### (1) イオンチャネル機能評価システムの開発

従来、膜タンパク質の機能解析は、培養細胞を用いた電気生理学的手法(パッチクランプ法)や蛍光イメージング法によって行なわれるのが一般的である。しかしながらこれらの手法では、培養中の汚染対策や個体差の均一化処理が煩雑であるほか、標的以外の雑多なタンパク質からの影響が避けられず、一つの標的タンパク質に限定して機能を探ることは難しかった。

我々の目指す人工細胞膜プラットフォームは、細胞膜の

モデルとなる脂質二重膜を簡便に再現良く形成し、その膜に再構成する標的膜タンパク質の活性を保持したまま機能解析を可能とするシステムである。実用化実証事業においては、これらの人工脂質二重膜デバイスを膜タンパク質の機能解析や創薬スクリーニングといった場面において実用的なプラットフォームとして拡張していくための要素技術、あるいは量産化に必要な技術の開発を目標として研究開発を行っている。

2019年度は、創薬スクリーニングプラットフォームの事業化に向けた研究開発を推進するため、スクリーニングシステムの各部品について量産化技術の詳細な検討を行うことを目標とした。また、開発システムの実用性を評価するため、イオンチャネルに対する化合物の活性評価を確認する一連の実証試験を行うことを目標とした。

### (2) 膜タンパク質を利用したセンサ開発

膜タンパク質は、匂いや味などの化学量センサとしての

役割を生体内で担っており、その感度や特異性は人工的なセンサに比べ非常に高いことが知られている。こうした膜タンパク質の機能を活用することができれば、小型で高性能のバイオセンサを実現できると考えられる。

これまでの研究成果を通じてマイクロチップ上での脂質二重膜の形成が再現良くできるようになり、膜タンパク質機能の解析技術が発展したことで、膜タンパク質機能を利用する研究が可能となりつつある。2019年度が最終年度となった NEDO 事業では、昆虫の嗅覚受容体を利用したヒトの汗の匂いを検知するセンサの開発に取り組んできた。また、2018年度からは人工細胞膜センサの要素技術開発を進めるため、地域イノベーション・エコシステム形成プログラムに参画している。

2019年度は、標的物質を高感度・高確度で検出するための基盤技術および標的物質濃度を実時間検出するための要素技術開発を目的とした。

## 2. 2019年度の研究成果

### (1) イオンチャネル機能評価システムの開発

前年度、ベンチャーキャピタルであるウエルインベストメント社と共同で JST 大学発新産業創出プログラム (START) の採択を受けた。同プログラムでは、マイクロチップ上に細胞膜を簡便・再現良く形成するコア技術を利用し、細胞内イオンチャネルに対する薬剤候補物質の評価技術確立することを目標とする。細胞内イオンチャネルを標的とした創薬向けの高品質なスクリーニングサービスの実現によってベンチャーを設立し、新たな創薬市場の創出を目指している。

イオンチャネル計測チップの量産化技術に関しては、東レエンジニアリング社と共同開発を進めている。脂質二重膜を担持する部品 (セパレータ部品) について、基礎性能評価を終了した。また、チップのベース部品に関しても量産化を目的とした大量試作を行った。電極材料についても設計・外注試作を行った。これら部品を組み立て、量産型の試作チップを完成させた。精製したイオンチャネルを用いて試作チップの性能評価を実施しているところである。

計測システムに関しても、計測の全自動化を目標として、装置試作を行った。イオンチャネルは、チップ上の脂質二重膜に再構成することで機能評価を行うが、脂質二重膜は液滴を滴下することで形成できる。計測チップに対して液滴分注操作を行うロボットにより、脂質二重膜を再現良く形成することを目標として条件検討を行っている。また、計測チップから計測装置に接続するためのマウンタユニットの開発も行った。

事業化においては、イオンチャネル計測システムの実用性について実証実験を行い、課題を把握する必要がある。2019年度は、新たな標的イオンチャネルの選定と作製から始め、標的イオンチャネルの既知化合物を用いた基礎評価、未知化合物を用いた活性評価の、一連の実証試験を実施した。

成果展開として、外部研究期間との共同研究については2019年度も継続して実施している。また、アウトリーチ

活動として、大学院生向けの講義のほか、小中学生を対象とした理科実験室を開催し、細胞膜に関する実験や最先端研究の紹介を行った。

### (2) 膜タンパク質を利用したセンサ開発

昆虫の嗅覚受容体を用いた匂いセンサの開発については、これまでの研究成果を受け、センサプラットフォームとしての基盤技術の確立に注力した。特に、標的物質の濃度変化を高感度・高確度・実時間検出するための研究開発を実施した。

まず、標的匂い物質の濃度変化を観測するためのデバイス開発を行った。匂い物質は、気中から嗅覚受容体が浸漬するバッファ溶液中に溶解しなければ検出されない。溶液中への溶解を迅速に効率良く行うため、嗅覚受容体が浸漬する液滴に接するように標的ガスを導入できるマイクロ流路を配置した。このマイクロ流路に匂い物質を混合したガスを導入すると、静置条件に比べて溶解速度が格段に向上した。また、匂い物質を含まない標準ガスを導入することで、液滴中の匂い物質を除去できることも明らかとなった。

次に、匂い物質の検出確度を向上させるため、上記デバイスの並列化を行った。脂質二重膜を形成するウェル 16個と、各ウェルにガス導入を行うマイクロ流路を対称となるようにデバイスを設計・作製した。16ウェル並列化により、1 ppm の標的匂い物質に対する 10分以内の検出確率が 90%超となり、劇的に向上させることができた。

また実時間検出を実現するため、センサの信号を匂い物質の濃度に変換する信号処理方法の開発を行った。センサ信号を連続的に匂い濃度に変換するには、信号を統計物理的なモデルに回帰させて、そのパラメータを推定していくアルゴリズムが必要となる。そこで、拡張カルマンフィルタのアルゴリズムに、ロジット分布を仮定したイオンチャネルの応答モデルを組み込むことで、実時間で定量的な匂い物質濃度の検出方法を実現した。

### (3) 共同研究による成果

受託研究に関して、東京大学浦野泰照教授と行っている革新的先端研究開発支援事業 (CREST) では疾患特異的代謝活性の探索を、開発したデバイスを用いて腹部大動脈瘤の臨床検体を対象として行った。また、2018年度より東京大学白髭克彦教授の CREST 研究である機能的人工染色体の設計と利用のための革新的研究に参画している。人工細胞核を封入したリポソームを作製するため、東京大学大杉研究室と共同で細胞核を形成する予備実験を開始した。

上記のそれぞれの研究成果は、業績一覧に示す通り、国際会議・国内学会での発表、学術論文、記者発表などとして積極的に公開している。

# イオンチャネル機能評価システムを用いた 細胞内イオンチャネルのイオン電流計測

三村 久敏、杉浦 広峻、山田 哲也、大崎 寿久、竹内 昌治

## 1. はじめに

### 1. 1 創薬ターゲットとしてのイオンチャネル

イオンチャネルは全ての細胞の細胞膜と細胞小器官の膜に存在する膜タンパク質である。脂質二重膜を貫通することにより、特定の無機イオンだけを通すことが可能なイオン選択性のある小孔を形成する。生体内においては、膜で隔てられたコンパートメント間のイオンの流出入を制御し、細胞間や細胞内において電気的なシグナルを伝える役割を果たしている。すなわち、イオンチャネルは、膜電位（膜の片側とその反対側に存在する陽イオンと陰イオンの濃度差により生じる電位）の確立と調節を行う。これには、神経細胞や筋肉で電気的指令として利用される膜電位の変化（活動電位）や、感覚細胞で物理化学的刺激によって電気的シグナルとして生じる膜電位の変化（受容器電位）などが含まれる。イオンチャネルは生体機能の維持に基本的な役割を果たしているだけでなく、神経疾患、心血管疾患、代謝異常疾患、免疫疾患、癌といった様々な疾病の創薬ターゲットとしても重要であると考えられている[1]。タンパク質をコードするヒト遺伝子の数は 21,000 前後と推定されているが、そのうちイオンチャネルは少なくとも 400 種以上が存在し、膜タンパク質の中では GPCR (G protein-coupled receptor; 約 800 個) に次いで 2 番目に大きな創薬ターゲットとなっている[2]。創薬に関連したヒト遺伝子の調査結果によると、重要な創薬ターゲットであるヒト遺伝子ファミリーの 19% がイオンチャネルであり、12% が GPCR である[3]。しかし、これらのヒト遺伝子ファミリーをターゲットとした薬剤のうち、イオンチャネルをターゲットとしたものは 18% にとどまり、GPCR をターゲットとしたものは 33% に達する。このことは、イオンチャネルは様々な疾病に関わる重要な創薬ターゲットとして認識されているものの、その薬剤探索は期待通りには進んでおらず、今なお困難な研究対象であることを示している。

### 1. 2 イオンチャネル機能評価システム

イオンチャネルの研究が困難である理由の一つとして、その標準的活性測定法であるパッチクランプ法の実験難易度が高い点が挙げられる。この方法は、細胞膜に押し当

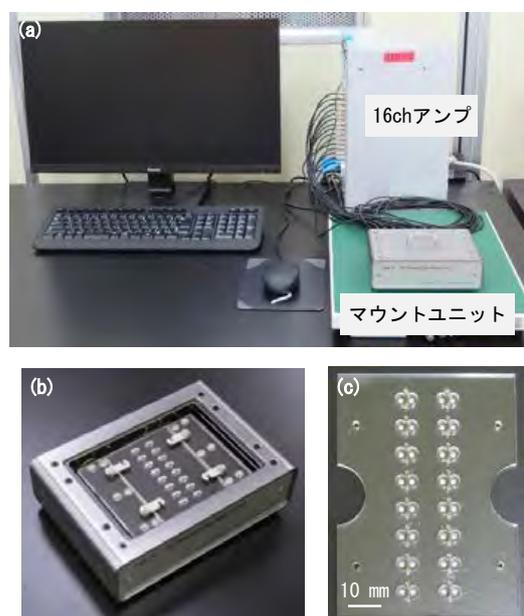


図 1 (a) イオンチャネル機能評価システムの概観。人工細胞膜チップのマウントユニット、増幅器（アンプ）、データ記録用 PC から構成される。(b) 人工細胞膜チップをセットしたマウントユニット。(c) 人工細胞膜チップ。16 のダブルウェルがあり、複数のイオン電流の同時計測が可能である。

てた微小ガラス管を高抵抗で密着させ、開口先端部の微小膜領域に含まれるイオンチャネルをイオンが透過することで生じる電流を計測する手法である。高度な技術と経験を要し、通常の生化学実験を行う研究室が導入するにはハードルの高い方法である。また、スループットも低い。

これまでに当研究室では、人工平面リン脂質二重膜を利用したイオンチャネル機能評価システムを開発してきた(図 1) [4-5]。複数のイオン電流の同時計測が可能な人工細胞膜チップとその計測システムを用いることにより、イオンチャネルのイオン電流計測と薬剤スリーニングを効率的に行うことを目指している。人工細胞膜チップのフォーマットは、通常の生化学実験で用いられるサイズとポリ

ュームに対応し、サンプルを加えるウェルには上方からアクセスできる。パッチクランプ法に比べて実験操作は簡便であり、通常の生化学実験を行う研究室でも容易に導入可能であるほか、ウェルへの薬剤の添加など、汎用性も高い。さらに、構造がシンプルであるので、ロボットインジェクションシステムを適用した全自動化も期待できる。

### 1. 3 液滴接触法

イオンチャネルを組み込むために必要となる人工平面リン脂質二重膜は、当研究室で考案された液滴接触法[6]を利用し、人工細胞膜チップ上に形成可能である。液滴接触法では、リン脂質二重膜は2つの液滴の界面に形成される。リン脂質を分散した有機溶媒中に水滴を滴下し、油中水滴(液滴)を形成させると、両親媒性であるリン脂質は、リン酸を含む親水性部分を水滴に向け、脂肪酸を含む疎水性部分を有機溶媒に向ける。これにより、有機溶媒と水滴の界面には、リン脂質が向きを揃えて並んだ単分子膜が形成される。このような液滴を2個形成し、適切な距離で接触させることにより、液滴表面にある単分子膜の脂肪酸同士の間相互作用を通して、液滴間の界面にリン脂質二重膜が形成される。液滴接触法を利用した人工細胞膜チップを用いることにより、貼り合わせ法やペインティング法といった従来法に比べ、人工平面リン脂質二重膜を容易に再現性よく形成できる。

### 1. 4 細胞内イオンチャネル

前述のパッチクランプ法は、細胞膜に局在するイオンチャネルのイオン電流計測を得意とするが、微小ガラス管を細胞内にある細胞小器官へ到達させるには高度な技術を要するため、これらの膜に局在する細胞内イオンチャネルのイオン電流計測は容易ではない。そのため、細胞内イオンチャネルもまた重要な創薬ターゲットであるものの、イオン電流の計測を指標として薬剤スクリーニングを行うことは難しかった。細胞内イオンチャネルの薬剤探索は、細胞膜に局在するイオンチャネルほどは進んでおらず、今後その需要は大きく拡大するものと考えられる。そこで本研究では、当研究室で開発されたイオンチャネル機能評価システムについて細胞内イオンチャネルへの適用を検討した。

### 1. 5 ヒト TRPML1 チャンネル

今回、イオン電流の計測対象とする細胞内イオンチャネルには、ヒトの TRPML1 (transient receptor potential mucolipin 1) を選んだ。これは、ヒトでは27個のイオンチャネルを含む TRP チャンネルファミリーに属する。これらのイオンチャネルは、いずれも陽イオンチャネルであり、痛みや温度の感受、Ca<sup>2+</sup>を介した細胞応答、カルシウムやマグネシウムの恒常性維持といった役割を担い、様々な刺激や生理学的リガンドによって活性化される。TRPML1 は分子量約 65,000 の単量体が4量体を形成し、Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>を含む多様な陽イオンを透過できる[7]。主に細胞内のリソソームと後期エンドソームに局在し、これらのオルガ

ネラの正常な機能に必須である。TRP チャンネルファミリーは様々な疾患に関連しており、ヒトの TRPML1 の遺伝子の変異もまた、重篤な疾患のムコ多糖症 IV 型を引き起こす[8]。これは、指定難病のライソゾーム病の一種であり、精神運動発達遅滞、視覚障害を伴う。TRPML1 はまた、同じくライソゾーム病であるニーマン・ピック病 C 型のほか[9]、アルツハイマー病への関与も示唆されている[10]。

本研究ではまず、ヒトの TRPML1 の発現を培養細胞で行い、単離・精製を行った。次に、精製した TRPML1 を人工細胞膜チップ上に形成した平面リン脂質二重膜に導入し、そのイオン電流を計測した。その際、TRPML1 のリン脂質二重膜への導入と、本システムによる薬剤スクリーニングへの適用を確認するため、TRPML1 の特異的活性化剤である ML-SA1 (Mucolipin synthetic agonist 1) を添加し、その効果を確認した。

## 2. 実験方法

### 2. 1 ヒト TRPML1 チャンネルの調製

ヒトの TRPML1 の発現には、ヒト浮遊性培養細胞 (FreeStyle 293-F) を用いた。哺乳類発現ベクターには pcDNA3.1 を用い、化学合成したヒトの TRPML1 の遺伝子を組み込んだ。アフィニティー精製に利用するため、TRPML1 の N 末端に FLAG タグを付加するための配列を加えた。培養細胞は、完成した発現ベクターを用いて一過性トランスフェクションを行い、一定時間培養して TRPML1 を発現させた。細胞は回収後、超音波処理または窒素ガス細胞破砕器を用いて粉砕し、低速遠心で未粉砕細胞や細胞核を含む沈殿を除き、細胞膜や細胞小器官の膜を含む膜画分を上清に回収した。膜画分には界面活性剤を加え、TRPML1 を含む膜タンパク質を可溶化し、超遠心後の上清に回収した。可溶化画分からの TRPML1 の精製は、Anti-FLAG M2 アフィニティーゲルを用いて行った。可溶化画分にアフィニティーゲルを加えてインキュベートし、カラムにパックして回収した。バッファーで洗浄後、FLAG ペプチドを含むバッファーで TRPML1 を溶出した。TRPML1 は、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いてさらに精製し、イオン電流計測のサンプルとした。

### 2. 2 ヒト TRPML1 チャンネルのイオン電流計測

ヒトの TRPML1 のイオン電流は、人工細胞膜チップとその電気計測システムを用いて計測した。まず、人工細胞膜チップをマウンターにセットし、リン脂質 (20 mg/ml) を分散したオイル (*n*-Decane) を8の字型ウェルの両方に滴下した。次に、精製した TRPML1 を希釈して加えた水溶液を両方のウェルに滴下した。これにより、2つの液滴間の界面にリン脂質二重膜の形成が可能となる。リン脂質二重膜に TRPML1 分子が導入されると、イオンチャネル電流の計測が開始される。計測を開始してから一定時間後に、TRPML1 の特異的活性化剤である ML-SA1 を両ウェルの液滴の水溶液中に加えた。

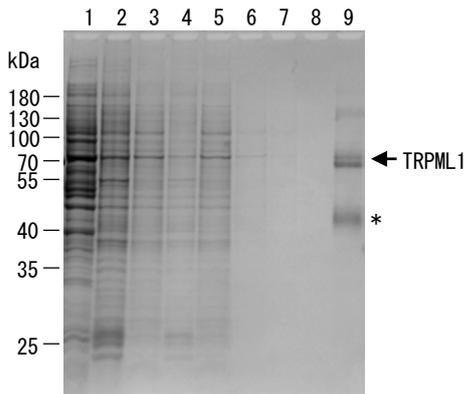


図2 精製したヒトのTRPML1のSDS-PAGE解析。電気泳動後、CBB (Coomassie Brilliant Blue) でタンパク質を染色した。1 細胞全体, 2 膜画分, 3-4 膜画分を界面活性剤で可溶化した上清 (3) と沈殿 (4), 5-9 FLAG タグ精製のフロースルー (5), 洗浄 (6-8), 溶出画分 (9)。アスタリスク (\*) は、TRPML1の分解産物を示す。

### 3. 結果と考察

本研究で調製したTRPML1をSDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) で分析した結果を図2に示す。精製操作の各ステップのサンプルに含まれるタンパク質を分子量によって分画し、色素で染色することによって検出している。バンドパターンから、TRPML1のタンパク質を培養細胞から高純度に精製できたことがわかる。ゲル中にはTRPML1のバンドが複数本見える。動物細胞で発現されたタンパク質は不均一な糖鎖修飾を受けることが多く、TRPML1もまた糖鎖修飾を受け、分子量が僅かに異なるイオンチャネルが合成されたことを示している。50 kDa付近に見えるバンドは、TRPML1の分解産物である。TRPML1は、細胞内の消化器官であるリソソームに局在するため、精製の過程で一部が分解されたものが含まれることが知られている[11]。

精製したTRPML1のイオン電流を、人工細胞膜チップとその電気計測システムを用いて計測した結果を図3に示す。TRPML1の特異的活性化剤であるML-SA1を加えることにより、計測されたイオン電流が変化していることがわかる。ML-SA1の添加前は、電気信号はclosedの位置を多く占め、イオン電流の流れる頻度は低くなっている。このとき、TRPML1のイオン透過孔は閉じている確率が高いと考えられる。ML-SA1の添加後は、電気信号はopenの位置を多く占めるようになり、イオン電流の流れる頻度は高くなっている。このとき、TRPML1はML-SA1によって活性化され、イオン透過孔は開いている確率が高くなったと考えられる。以上の結果から、観察されたイオン電流はヒトのTRPML1に由来するものであり、創薬スクリーニングで重要となる薬剤添加の効果も確認可能であると考えられる。

本研究では、当研究室で開発されたイオンチャネル機能評価システムを用い、ヒトのTRPML1をモデルタンパク質として、細胞内イオンチャネルのイオン電流計測を行っ

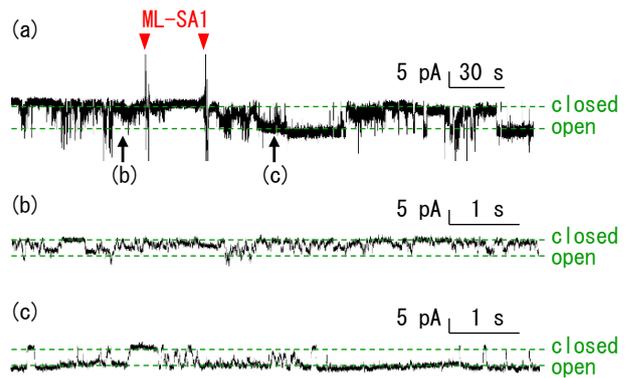


図3 (a) イオンチャネル機能評価システムを用いて計測したヒトのTRPML1のイオン電流。TRPML1の特異的活性化剤であるML-SA1を計測の途中で加えている。(b, c) (a)の(b)と(c)部分の拡大図。ML-SA1の添加前(b)に比べ、添加後(c)では、イオンチャネルが開いていることを示す電気信号(open)が、閉じていることを示す電気信号(closed)に比べて増えていることがわかる。

た。ヒト浮遊培養細胞で発現し、単離・精製したTRPML1は、人工細胞膜チップ上に形成された平面リン脂質二重膜に導入され、特異的活性化剤ML-SA1によって活性化されるイオン電流が観察された。今後は、ヒトのTRPML1のより詳細な解析を進めるとともに、解析対象とする細胞内イオンチャネルの探索及び拡充を図ることにより、イオンチャネル機能評価システムの実用化並びにこれを用いた事業化に向けて検討を進めていく。

#### 【謝辞】

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 大学発新産業創出プログラム (JPMJST1811) による支援、日本学術振興会 科研費基盤研究B (17H02758) の助成を受けて行われました。ここに記して感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

- [1] Wulff H, et al., *Nat Rev Drug Discov* 2019, 18, 339-357.
- [2] Hutchings C J, et al., *mAbs* 2019, 11, 265-296.
- [3] Santos R, et al., *Nat Rev Drug Discov* 2017, 16, 19-34.
- [4] Kawano R, et al., *Sci Rep* 2013, 3, 1995.
- [5] Kamiya K, et al., *Sci Rep* 2018, 8, 17498.
- [6] Funakoshi K, et al., *Anal Chem* 2006, 78, 8169-8174.
- [7] Waller-Evans H, et al., *Biochem Soc Trans* 2015, 43, 442-446.
- [8] Bargal R, et al., *Nature genetics* 2000, 26, 118-123.
- [9] Shen D, et al., *Nat Commun* 2012, 3, 731.
- [10] Zhang L, et al., *Cell Physiol Biochem* 2017, 43, 2446-2456.
- [11] Schmiede P, et al., *Nature* 2017, 550, 366-370.

# 確率論的バイオセンサの検出迅速化に関する研究

大崎 寿久、伊藤 嘉玖、神谷 厚輝、山田 哲也、三木 則尚、竹内 昌治

## 1. はじめに

### 1. 1 細胞膜を用いたバイオセンサ

細胞膜は、脂質二重膜と膜タンパク質から構成されており、その厚さはわずか5 nmほどである。脂質二重膜は細胞内外を隔てる役割を果たしている。一方、膜タンパク質は細胞内外への物質輸送や情報の伝達に関与しており、細胞の生理学的機能に対する寄与は大きい。そのため、膜タンパク質の機能評価は創薬においても不可欠になっている。そうした中で、膜タンパク質の機能を細胞外で評価するための方法として、マイクロチップ上で脂質二重膜を形成し、細胞膜を人工的に再現する人工膜法の研究開発が行われてきた。

膜タンパク質の中で、リガンド結合型のイオンチャネルはリガンド（基質分子）の結合によりイオンチャネルを通過するイオン電流の調節を行っている。近年、このリガンド結合型イオンチャネルを極小のセンサとして利用する研究が注目されている。リガンド1分子の結合を検出する感度、リガンド分子に対する高い特異性、リガンドの結合を毎秒1千万個のイオン電流に変換する高い変換・増幅効率といった優れた特長により、次世代のバイオセンサ素子への応用を期待されている[1,2]。

### 1. 2 液滴接触法

細胞外で脂質二重膜を形成する方法は、ガラスキャピラリー先端に刷毛塗り法によって形成する方法、マイクロ流路中で形成する方法など、従来、多数報告がある[1,3]。

液滴接触法は、2つの油中水滴の界面に脂質二重膜を形成する手法である。脂質を分散した油中に、水滴を滴下するとその表面に脂質分子の単分子膜が自発的に形成する。この水滴を2つ接触させることで、接触界面が脂質二重膜となる[4]。液滴滴下操作のみの単純な手順で、液滴サイズと距離を規定することで迅速に再現良く脂質二重膜を形成できる。本方法は他の方法に比べてマイクロチップの構造も比較的単純であり、またポンプなどの周辺機器も不要であることから小型化や携帯化、使い捨てが重要なセンサ用途に適すると考えられる。

### 1. 3 確率論的バイオセンサの課題

上述の通り、人工細胞膜を用いたセンサは、物質に対する特異的な相互作用を利用するため、標的特異性に優れる。また、電気的な計測と組み合わせることで、標的物質1分子の結合を検出することも可能である。分子レベルの大き

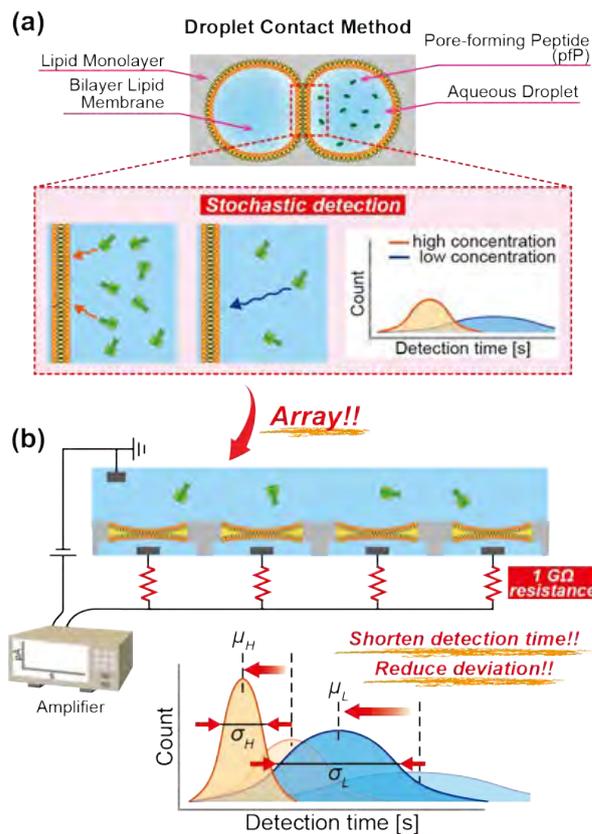


図1 並列化センサによる確率論的センサの検出時間の迅速化。(a) 人工細胞膜センサにおいて、低濃度の標的物質の検出には時間を要するという課題がある。(b) 並列化により、検出時間やそのバラツキを抑えられると考えられる。

さのセンサが有する高い特異性と感度は、健康診断や環境計測など、その場で迅速・簡便・正確に計測結果を示すことが必要な分野での応用が期待される。

しかしながら、人工細胞膜を利用したセンサにおいては、検出時間が一定しないという課題がある。これは標的物質の検出において、1分子の確率論的な現象に依存しているためである。検出過程はデジタルに0または1として捉えられる一方で、1度の検出過程からは定量的な濃度を導くことはできない[5-7]。そこで本研究では、人工細胞膜センサの課題である迅速検出の課題について、並列化に関する研究を行った。

2. 実験方法

2. 1 並列化のための脂質二重膜モジュール

人工細胞膜の並列化において、本研究では脂質二重膜に対して直列に 1 GΩ の抵抗器を接続した。人工細胞膜センサでは、膜に対して定電圧を印加し、電流変化を観測することで標的物質の検出を行う。例えばイオンチャンネルやナノポアの場合、標的物質との相互作用によりイオン電流に変化が生じる。一方で、脂質二重膜が破壊されると、ピコアンペアレベルの観測電流に比べて大電流が発生するため、計測器（増幅器）の計測可能な電流上限値を超え、観測ができなくなってしまう。並列化を行う場合も、膜破壊が並列化した膜の 1 つで生じると観測ができなくなるため、膜 1 つに対して 1 つの計測器を配置する必要があった。抵抗器を挿入することにより、脂質二重膜が破壊された場合でも電流を抑制できる。並列した場合でも、膜破壊により計測不能とならず、1 つの計測器で観測することができる。そこで、本研究では脂質二重膜ウェルと 1 GΩ の直列抵抗器を合わせてモジュール化し、これを並列化したセンサシステムを構築した。

本研究で使用した並列化デバイスを図 2 に示す。デバイスは、16 個のマイクロ孔を有する回転プレートと 16 ウェルの固定プレートとからなる。固定ウェルの底面には銀/塩化銀電極が挿入されており、回転プレートにはグランド電極を設置した。固定ウェル側の電極には、直列して 1 GΩ の抵抗器を配置している。ここでは、脂質二重膜モジュールを 4 つ並列化した場合と、個別に計測器に接続した場合とで比較実験を行った。

2. 2 ポア形成ペプチドの検出

脂質二重膜は下記の手順で形成した。まず、固定プレートのウェルそれぞれに 1 M KCl バッファ溶液を滴下し、その上に脂質溶液を滴下した。次に、回転プレートを固定プ

レート上に静置し、バッファ溶液を添加した。固定プレートと回転プレートのマイクロ孔が一致するように、回転プレートを回転することで脂質二重膜が形成される。膜破壊が起こった場合、回転プレートを回転することで膜の再形成を行うことができる。

本研究では、ポア形成ペプチド (pFP) を標的物質として、並列化による検出時間の迅速化について検証した。ここでは、pFP が形成するポアは 1 GΩ の抵抗値を示す。脂質二重膜にポアが一つ形成されると、100 mV に対して 100 pA の電流が観測される。

図 2b は、直列抵抗器の有無による電流変化の例を示している。抵抗器がない場合、膜の破壊によりモジュールの抵抗値はほぼゼロと見なされる。並列化デバイスにおいて、計測器 1 つで観測する場合、電流値は各モジュールの和として表れるため、脂質二重膜のいずれか一つが破壊されると電流のオーバーフローが生じる。一方で、抵抗器が挿入されている場合、電流のオーバーフローを防ぎ、観測を継続することが可能となる。

3. 結果と考察

図 3a に 4ch 並列化デバイスにおける電流の観測結果を示す。100 mV の印加電圧に対して、100 pA のステップ電流 (ii) と、50 pA のステップ電流 (iii および iv) が観測された。iii および iv は、1 GΩ のポア形成と 1 GΩ の直列抵抗の和 (2 GΩ) による電流上昇値と一致していることから、pFP の検出を示している。一方で、ii については、膜破壊が 4ch のいずれかで生じたためと考えられる。

並列化による検出時間の迅速化について、図 3b に示す。検出時間は、脂質二重膜形成後に最初の pFP 検出までに要した時間とした。図は、30 秒までに検出できた結果についてヒストグラムとしてまとめたものである。4ch 並列化デバイスと、1ch デバイスの検出時間の平均値と標準偏差

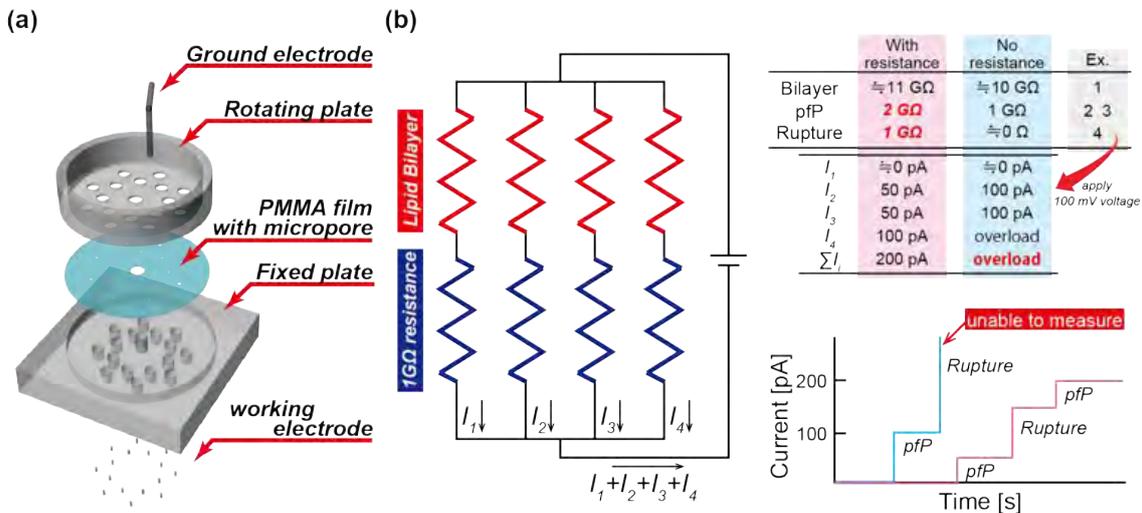


図 2 (a) 並列化デバイスの分解図。(b) 脂質二重膜と直列抵抗器のモジュールを 4 つ並列化した場合の回路図。計測器では、4 つのモジュールの和として電流を観測する。右図は、pFP の検出や膜破壊が 4 つのモジュールで起こった場合の、電流値の変化。直流抵抗器が挿入されている場合（ピンク）と挿入されていない場合（青）。

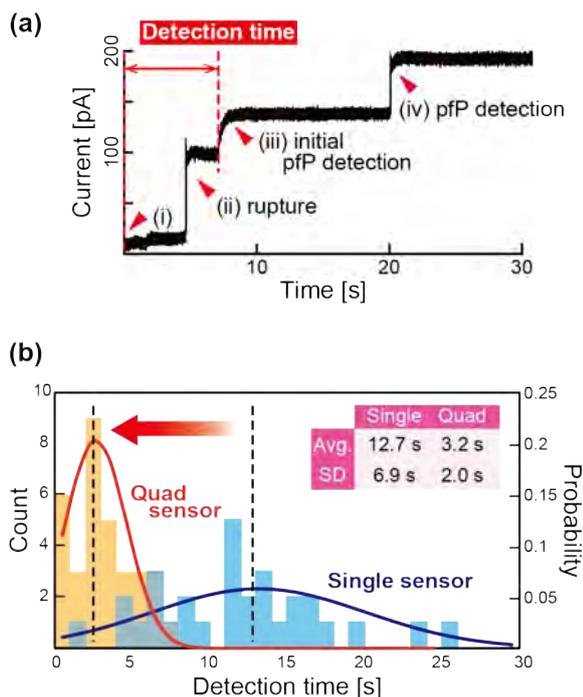


図3 (a) 4ch 並列デバイスによる pfP 検出結果の代表例。赤矢尻 (ii~iv それぞれ) において、4つの脂質二重膜のいずれか一つで変化が生じたことを示している。(b) pfP 検出時間に関するヒストグラム。1ch デバイス (青) に比べ、4ch 並列化デバイス (オレンジ) で検出時間の短縮化が実現できた。

の結果を示す。並列化により検出時間は短縮化され、また分散についても抑制されることが分かる。並列化が pfP の検出確率を高め、限られた時間内での検出に対して有効であることが示された。

本研究では、脂質二重膜に直列抵抗器を挿入するモジュール化によって並列化デバイスを作製し、並列化による確率論的センサの迅速化に関する研究を行った。このモジュール化により、計測器のリソースを増やすことなく、迅速化を達成できることが明らかとなった。検出時間の短縮は、センサの定量性獲得にも寄与すると考えている。

#### 【謝辞】

本研究内容の一部は、文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラム、日本学術振興会科研費基盤研究 B 17H02758 の助成、および国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 次世代人工知能・ロボット中核技術開発委託事業により行われました。ここに感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

- [1] T. Osaki and S. Takeuchi, "Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 216–231, 2017.
- [2] N. Misawa, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Membrane Protein-based Biosensors," *J. R. Soc. Interface*, vol. 15,

20170952, 2018.

- [3] L. K. Bright, C. A. Baker, M. T. Agasid, L. Ma, and C. A. Aspinwall, "Decreased aperture surface energy enhances electrical, mechanical, and temporal stability of suspended lipid membranes," *ACS Appl. Mater. Interface*, vol. 5, pp. 11918–11926, 2013.
- [4] K. Funakoshi, H. Suzuki, and S. Takeuchi, "Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 8169–8174, 2006.
- [5] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, and A. Meller, "Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient", *Nat. Nanotechnol.*, vol. 5, pp. 160–165, 2010.
- [6] J. Ivica, P. T. F. Williamson, and M. R. R. de Planque, "Salt Gradient Modulation of MicroRNA Translocation through a Biological Nanopore", *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 17, pp. 8822–8829, 2017.
- [7] K. J. Freedman, L. M. Otto, A. P. Ivanov, A. Barik, S-H. Oh, and J. B. Edel, "Nanopore sensing at ultra-low concentrations using single-molecule dielectrophoretic trapping", *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 10217, 2016.
- [8] F. Tomoike, T. Tonooka, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Repetitive formation of optically-observable planar lipid bilayers by rotating chambers on a microaperture", *Lab Chip*, vol. 16, pp. 2423–2426, 2016.

# 難溶性の匂い物質検出に向けたガス導入機構開発

山田 哲也、杉浦 広峻、三村 久敏、大崎 寿久、竹内 昌治

## 1. はじめに

自然界に目を向けてみると生物はフェロモンといった匂いを嗅覚受容体により識別し一種の情報として検出し処理している[1]。その匂いを検出するメカニズムは哺乳類と昆虫では異なる[2]。哺乳類においては匂い分子が嗅覚受容体と結合することで G タンパク質が活性化され、アデニル酸シクラーゼを動かし ATP を環状 AMP へと反応させる。作られた環状 AMP がイオンチャンネルに作用し、細胞質へのイオン流入が起こり、脱分極化による電気シグナルが脳に送られる。

上記の通り、哺乳類の匂い検知メカニズムは複数の反応過程が含まれており極めて複雑である。一方で、昆虫などの無脊椎動物の嗅覚受容機構は哺乳類の検知メカニズムと比べ反応プロセスが少なく、匂い分子が嗅覚受容体と結合するとそれに伴いイオンチャンネルが開く仕組みになっているとされる。上記の通り、嗅覚受容体は特定の匂いに応答しイオン電流を流すゲートの役割を果たしており、工学的な観点からは嗅覚受容体は高い感度と選択性の両方を兼ね備えた優れたセンサ素子といえる。これまで開発されてきた酸化物半導体型を利用した匂いセンサと比べ、嗅覚受容体を利用するセンサは高い感度と選択性が期待されており、従来の匂いセンサでは難しかった匂い診断や爆発物・麻薬検知、食品の品質管理、環境評価などの幅広い分野への応用が期待できる[1], [3]。

我々は人工細胞膜を容易に形成できる液滴接触法を基盤技術とし、NEDO 次世代人工知能・ロボット中核技術開発のプロジェクトの一つとして、人検知に向けた嗅覚受容体を用いた匂いセンサの開発を進めてきた(図 1)。液滴接触法の特徴は簡便かつ再現性高くにハイスループットで人工細胞膜を形成させることである[4]。汗の匂い成分の一つであるオクテノールに特異的かつ高感度に応答する嗅覚受容体を脂質二重膜に再構成させることで人工細胞膜センサを開発してきた[5]。ここで利用した嗅覚受容体は蚊 (*Aedes albopictus*) [6]の嗅細胞で発現し、人の汗に応答することが知られている。この嗅覚受容体を合成するための方法は二つあり、その一つは細胞内に嗅覚受容体を発現させる方法と細胞を使わない無細胞発現系で合成する方法である[7]。

人工細胞膜を利用した匂いセンサ開発における課題は、多段階の匂い濃度変化を検出すること、そして、センサとしての感度と応答性を向上させることであった。これらの課題の根底には難溶性の匂い物質をいかに効率的に液滴へ導入するかという問題があった。これは液滴接触法によ

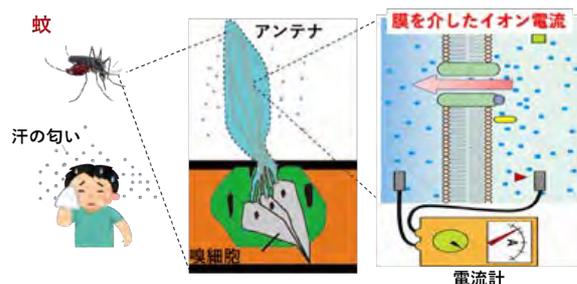


図 1. 蚊の嗅覚受容体を利用した人工細胞膜匂いセンサ。蚊は汗の匂い成分であるオクテノールを検知できる。蚊の嗅覚受容体を人工膜に再構成させてセンサとして利用する。

り人工細胞膜を形成させた場合には、嗅覚受容体は2つの溶液に挟まれた状態になり、水に対して難溶性の匂い物質は嗅覚受容体に到達するのが難しくなる。さらには、人工細胞膜を構成するためにデカンなどの油に使用し、匂い物質はその油に溶解してしまい、嗅覚受容体に到達するのが難しくなる。

上記の難溶性の匂い物質を嗅覚受容体に到達させるためのアプローチの一つとして、液滴をアガロースゲルで作った。これにより、一方の液滴に油を入れることなく人工細胞膜の形成を可能にし、残留農薬を検出することができるようになった[8]。また、多段階の匂いの濃度変化を検出するための機構として溶液に溶けた基質を吸水性ポリマーの駆動力により洗い流し溶液交換ができる機構を開発した。これまでに外部ポンプを利用した溶液交換機構はすでに存在したが[9], [10]、これらの機構では外部電力が必要であり可搬性が低いことが問題点であった。我々は吸水性ポリマーの駆動力に着目し、液滴を駆動させることにより小型で外部電力を必要としない溶液交換機構を実現させた[11]。

上記のようにアガロースゲルや吸水性ポリマーを利用した匂い検出機構を検討したが、多段階の匂い物質濃度を高感度で検出することは難しかった。そこで着手したのが匂いを能動的に取り込み、液滴に送り込むためのガス導入機構である[11](図 2)。このガス導入機構では、疎水化したマイクロスリットを配置することで、液滴を滴下したときにマイクロスリットが液滴を撥水する。これにより、マイクロスリット内にガスが通る流路が形成され、液滴近傍に匂い物質を送り届けることが可能になる。この機構により比較的短い時間で匂い物質を嗅覚受容体に送り届ける

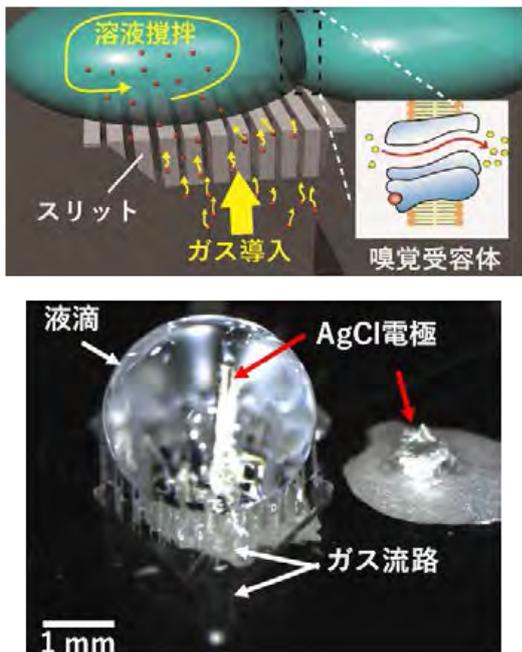


図 2. 難水溶性のガスを導入するための機構を搭載した液滴接触法模式図 (上)。疎水化したマイクロスリットに液滴を滴下した時の写真 (下)。

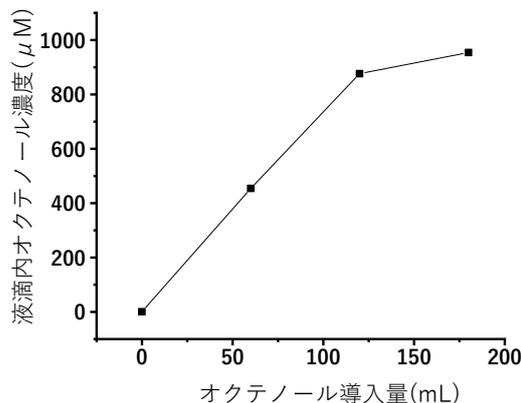
ことができる。また、気液界面ではせん断力が発生し、液滴内が攪拌され、より効率的に匂い物質を嗅覚受容体に送り届けることができる。さらには、気液平衡を利用することで液滴に溶け込んだ匂い物質を取り出すことができ、多段階の匂い濃度検出を実現できる。ここではガス導入機構と我々の基盤技術である液滴接触法を組み合わせた匂いセンサ開発について記述する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 ガス導入機構を搭載した人工細胞膜センサの作製方法

我々が提案するガス導入機構の模式図を図 2 に示す。この機構にはガスを吸引するためのインレットとガスを排出するためのアウトレットが搭載されている。インレットとアウトレットはマイクロ流路で繋がれており、その途中に液滴を載せられる疎水化したマイクロスリットが配置されている。液滴部位では従来の並列化したダブルウェルを使い人工細胞膜を形成できる構造となっている[12], [13]。マイクロスリットとマイクロ流路は厚さ 1 mm のアクリル板に切削し、液滴を入れるダブルウェルは 3 mm のアクリル板に切削した。これら 2 つのアクリル板を熱圧着機により接合し、デバイスを組み立てた。マクロスリットに疎水化剤 (SFCOAT) を塗布することで、液滴を撥水するようにした (図 3)。ダブルウェルの下部に銀線を差し込み、液滴が触れる電極表面に Ag/AgCl ペーストを塗布した。また、2 つの液滴が接触する界面に直径 100  $\mu\text{m}$  の

A) オクテノール導入



B) オクテノール脱離

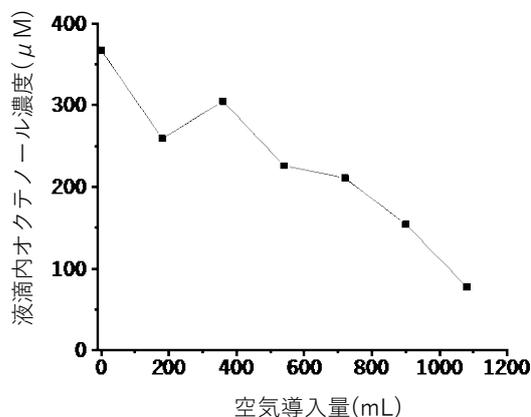


図 3. ガス導入機構によるオクテノールの液滴への導入及び脱離。A) オクテノールガスの導入量と液滴内オクテノール濃度の関係。B) 空気導入量と液滴内オクテノール濃度の関係。

孔を 11 個設けたセパレーターを設置し、人工細胞膜が安定的に形成できるようにした。

### 2. 2 液滴接触法による人工細胞膜の形成

液滴接触法は、簡便に平面リン脂質二重膜を作製する方法であり、その原理はリン脂質を分散した有機溶媒液中に液滴を滴下し、その表面に脂質の単分子層が形成されることを利用している。このような方法で形成した単分子膜を接触させることで脂質二重膜を形成することができる。このように通常の液滴接触法では、脂質を含んだ有機溶媒の中に 2 つの液滴を入れる。今回のガス導入機構では有機溶媒をスリットがあるウェルに滴下すると有機溶媒がスリット内に侵入する。そのため、スリットがないウェルのみ脂質が分散した有機溶媒を滴下した (DOPC:DOPE = 3:1 の混合脂質 20 mg/ml, 溶媒はデカン)。液滴には塩化カリウムを溶解させたリン酸緩衝溶液を使用し、2 つの液滴が接触すると脂質二重膜が自己組織化されて形成される。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ガス導入機構を利用したオクテノールの導入とその特性評価

オクテノールガスが導入できるかを検証するために、5 ppm のオクテノールガスをマイクロ流路に導入し、このとき液滴内に取り込まれたオクテノール濃度をガスクロマトグラフィー（島津製作所 GC-2010 Plus, 検出器は水素炎イオン化検出器）により分析した。液滴には塩化カリウムを溶解させたリン酸緩衝溶液を利用し、脂質溶液は DOPC:DOPE=3:1 の混合脂質 20 mg/ml をデカンに溶解させた。オクテノールはガス発生装置（パーミュエーター, DP-1B-2）を利用し、一定濃度のオクテノールガスを発生させ、デバイス内に導入した。

オクテノールガス 100 ppm をデバイス内に導入した場合に、液滴内に導入されるオクテノール濃度をプロットした結果を図 3 に示す。図 3A よりオクテノール導入量に応じて液滴内オクテノール濃度が上昇することがわかる。さらにオクテノール導入後に、オクテノールを含まない空気を導入した場合の結果を図 3B に示す。空気導入量に対して、液滴内オクテノール濃度は減少し、液滴内のオクテノールの脱離が起こったことがわかる。すなわち、この図 3 よりガス導入機構により、液滴内に難溶性のオクテノールを導入し、更には空気を入れることで液滴内からオクテノールを取り除くことができることがわかった。このように匂い物質を導入し、脱離できる特性は多段階の匂い濃度を識別し、繰り返し計測を行うために必要不可欠な要素である。

#### 3.2 ガス導入機構を搭載した並列デバイスによるオクテノールの高感度・高確率検出

人工細胞膜センサの特徴はセンサ素子となる膜タンパク質を数分子で導入し、一分子レベルの応答挙動を観察できることである。そのため、高い感度と選択性を実現できる。一分子レベルの応答は基質の低濃度領域では、離散化し、膜タンパク質と基質の結合は確率的な挙動になる[14], [15]。そのため、短時間でかつ再現性高く匂い物質を検出するためには、人工細胞膜の並列化が最も有効かつ確実な方法となる[12], [13]。

今回開発したガス導入機構はマイクロ流路でガスを導入するので、これまで我々が開発した 16 ch 並列装置に搭載できる（図 4）。オクテノールを検出するための受容体は無細胞合成により作り出し、人工細胞膜に再構成させた。その後、人工細胞膜に電圧を 60 mV 印加し、電気計測を開始した。はじめに窒素ガスを導入した場合には、大きな電流値の変化は見られなかった。一方で、オクテノールガスを導入した場合には、嗅覚受容体由来と考えられステップ状の矩形が見られた。この矩形シグナルは嗅覚受容体のイオンチャンネルが開閉するときに流れるイオン電流由来であると考えられる[16]。オクテノール導入により矩形波シグナルが観測されたあと、窒素ガスを流すことでそのシグナルは消失した。この結果は、窒素ガスにより液滴内

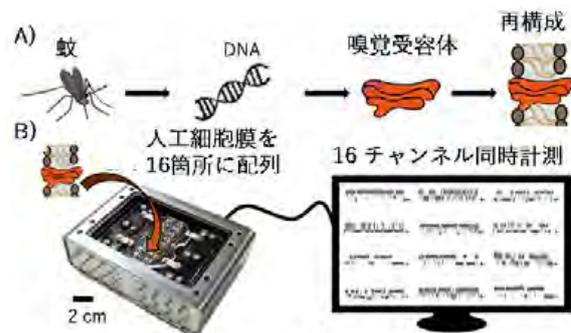


図 4 蚊の嗅覚受容体を人工細胞膜に再構成させオクテノールを検出。A) 無細胞合成により蚊の嗅覚受容体を人工細胞膜に再構成させる模式図。B) 16 箇所人工細胞膜を並列化し、オクテノール由来のシグナルを検出する模式図。

のオクテノールが脱離し、嗅覚受容体とオクテノールの結合が減少したためであると推察される。

オクテノールは、ヒトの汗の成分として含まれているため、災害時における行方不明者の探索への応用が期待できる。また、がん等の疾患と関連して呼気から検出されることが分かってきており、バイオマーカーとして計測を行うことで健康状態の把握に利用できる可能性も示唆されている[17], [18]。

### 4. 今後の展望

本研究では、疎水化したマイクロスリットにより難溶性の匂い物質を液滴に導入する機構を開発し、人工細胞膜匂いセンサに搭載した。このガス導入機構によりこれまで難しかった連続計測や低濃度の匂い物質の検知が可能になった。

嗅覚受容体を利用した人工細胞膜匂いセンサの特徴は、小型化が可能であり、高い感度と選択性を実現できることである。そのため、可搬性を持つ高性能な匂いセンサを開発しロボットなどに搭載することも可能になるだろう。今後の展望としては、複数の嗅覚受容体をセンサ素子として並列化し、あらゆる匂いを検出することである。今回開発したガス導入機構は複数の嗅覚受容体をセンサ素子として並列化するための要素技術になるだろう。例えば人間は約 400 種類の嗅覚受容体が存在し、複雑な匂いを数種類の嗅覚受容体を利用し認識する[19]。このように複数の嗅覚受容体を並列化することで、呼気や体臭に含まれる数千種類もの代謝物を一度に分析することができ、ガンなどの診断に応用できるだろう。そのためには、まず嗅覚受容体ライブラリを構築するとともに、人工知能を活用した匂いとシグナルを結びつけるような研究が必要になると考えられる。

【謝辞】

本研究の一部は（国研）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託事業 次世代人工知能・ロボット中核技術開発委託事業、および、文部科学省 地域イノベーション・エコシステム形成プログラムにより支援された。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] 渋谷達明、外池光雄, においの受容. フレグランスジャーナル社, 2002.
- [2] 三澤宣雄、竹内昌治, “AROMA RESEARCH: Journal of aroma science technology and safety,” vol. 18, pp. 110–115, 2017.
- [3] T. Hirotsu *et al.*, “A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–15, 2015.
- [4] K. Funakoshi, H. Suzuki, and S. Takeuchi, “Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 8169–8174, 2006.
- [5] N. Misawa *et al.*, “Construction of a Biohybrid Odorant Sensor Using Biological Olfactory Receptors Embedded into Bilayer Lipid Membrane on a Chip,” *ACS Sensors*, vol. 4, no. 3, pp. 711–716, 2019.
- [6] J. D. Bohbot, N. F. Durand, B. T. Vinyard, and J. C. Dickens, “Functional development of the octenol response in *Aedes aegypti*,” *Front. Physiol.*, vol. 4, no. March, pp. 1–8, 2013.
- [7] Y. Lu, “Cell-free synthetic biology: Engineering in an open world,” *Synth. Syst. Biotechnol.*, vol. 2, no. 1, pp. 23–27, 2017.
- [8] S. Fujii *et al.*, “Pesticide vapor sensing using an aptamer, nanopore, and agarose gel on a chip,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 14, pp. 2421–2425, 2017.
- [9] Y. Tsuji, R. Kawano, T. Osaki, K. Kamiya, N. Miki, and S. Takeuchi, “Droplet-based lipid bilayer system integrated with microfluidic channels for solution exchange,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 8, p. 1476, 2013.
- [10] R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, and S. Takeuchi, “A Polymer-Based Nanopore-Integrated Microfluidic Device for Generating Stable Bilayer Lipid Membranes,” *Small*, vol. 6, no. 19, pp. 2100–2104, 2010.
- [11] T. Yamada, K. Kamiya, T. Osaki, and S. Takeuchi, “A pumpless solution exchange system for nanopore sensors,” *Biomicrofluidics*, vol. 13, no. 6, p. 064104, 2019.
- [12] R. Kawano *et al.*, “Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels,” *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 1995, 2013.
- [13] K. Kamiya *et al.*, “Electrophysiological measurement of ion channels on plasma/organelle membranes using an on-chip lipid bilayer system,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 17498, 2018.
- [14] R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, M. Takinoue, S. Yoshizawa, and S. Takeuchi, “Rapid Detection of a Cocaine-Binding Aptamer Using Biological Nanopores on a Chip,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 22, pp. 8474–8477, 2011.
- [15] T. Osaki and S. Takeuchi, “Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 216–231, 2017.
- [16] P. L. Jones, G. M. Pask, D. C. Rinker, and L. J. Zwiebel, “Functional agonism of insect odorant receptor ion channels,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 21, pp. 8821–8825, 2011.
- [17] R. Xue *et al.*, “Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 22, no. 8, pp. 1181–1186, 2008.
- [18] H. Haick, Y. Y. Broza, P. Mochalski, V. Ruzsanyi, and A. Amann, “Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 5, pp. 1423–1449, 2014.
- [19] N. Horio, K. Murata, K. Yoshikawa, Y. Yoshihara, and K. Touhara, “Contribution of individual olfactory receptors to odor-induced attractive or aversive behavior in mice,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2019.

# イオンチャネルの解析のための信号処理技術開発

人工細胞膜システムグループ

杉浦広峻、大崎寿久、山田哲也、三村久敏、竹内昌治

## 1. はじめに

近年、環境中の揮発性有機化合物を、イオンチャネルのリガンド依存性を用いて計測する研究が進められている。膜受容体の機能を示すイオンチャネルは、微量の化学種を検出する素子として機能し、生体内の反応を律する重要な要素として機能している。我々の研究グループでは、人工的に再現した細胞膜に、精製したイオンチャネルを導入し、パッチクランプ法と同様の計測をデバイス上で再現することで、イオンチャネルの機能評価や、イオンチャネルの機能を活用するセンサデバイスとしての研究開発を進めてきた。この人工細胞膜を用いたセンサデバイスは、従来のパッチクランプ法によるイオンチャネルの解析では難しかった、システムの操作性、定量性、選択性、計測感度を総合的に達成可能であるという大きな可能性を秘めている技術である[1]。とりわけ、極微量の標的化学物质に対する応答を観測できるという計測感度については、他のセンサデバイスには追従できない大きな特徴であり、次世代の匂いセンサデバイスとして大きな注目を集めている[2][3]。人工細胞膜デバイスの基盤技術には、リガンド依存性イオンチャネルの精製など生化学的研究要素もさることながら、実用的な膜デバイスを開発し、現場環境で計測する技術や、イオンチャネルの信号のみを精度良く抽出する技術、イオンチャネルの信号をもとに、化学種を定量する技術などが重要である。

## 2. 実験方法、結果

### 2. 1 イオンチャネル計測プラットフォームの概要

Fig. 1 にイオンチャネルの特性計測システムの概要を示す。計測系は、膜タンパクの足場となるアクリルウェルチップと、一定の電圧を印加した、微弱な電流信号を計測する回路によって構成されている。アクリルウェルに、脂質を溶かした有機溶媒と KCl などを含む緩衝溶液を滴下すると、ウェルの隔壁の微小孔に脂質の平面膜が形成される。ここに、精製したタンパクを再構成することで、細胞膜上の環境を人為的に再現できる。イオンチャネルの検出標的となる化合物は緩衝溶液を介して脂質膜上の膜タンパクに到達し、匂いの分子が検出される。電流検出回路は、IV 変換アンプ、ローパスフィルタなどで構成される。出力電圧はイオンチャネルを流れるイオン電流であり、イオンチ

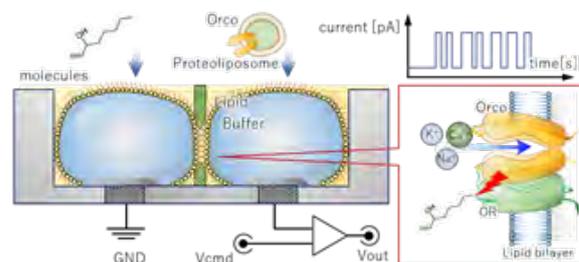


Fig. 1 イオンチャネル解析プラットフォームの概要図。液滴接触法で形成した脂質二重膜に、イオンチャネルを導入し、検出対象の化学種の作用を電氣的に評価する。

ャネルの開閉に対応した矩形波の信号が観測される。

### 2. 1 ウェーブレット変換を用いた、イオンチャネルの時間軸スペクトル解析

イオンチャネルを IV 変換アンプで計測した信号は、計測回路に起因するノイズに加えて、様々の不要な外乱を含んでいる。これらの外乱は、イオンチャネルの信号と同程度以上の S/N 比をもっていることが多いため、単純なローパスフィルタだけでは、イオンチャネルに相当する信号を選択的に抽出することは難しい。とりわけ、イオンチャネルを利用するために、冷凍状態から常温に戻した直後は、イオンチャネルの応答は鋭敏な信号をえることができるが、時間が経つにつれて、イオンチャネルの応答が鈍化してくることが、従来研究の傾向として要られていた。適応的なフィルタアルゴリズムを利用して、これらの外乱を排除するためには、ある時刻におけるイオンチャネルの応答を正確に計測信号から抽出することが必要である。そこで、連続時間ウェーブレット変換で、基底関数をメキシカンハットウェーブレット（ガウシアン<sup>2</sup>階微分）とし、変換後の係数の実部が正であるものを抽出することで、矩形波の時系列的なスカログラム（周波数スペクトル図）を得た。これにより、周波数ドメインでイオンチャネルに該当する信号の特性周波数を評価した。Fig. 2 に今回用いたイオンチャネルである Olfactory-receptor-coreceptor は、蚊の嗅覚受容体に由来するものであるが、特性周波数は初期状態で 1 Hz から 10 Hz であることがわかった。また、計測を進めて時間が経つにつれて、応答の特性スペクトルは、1 Hz

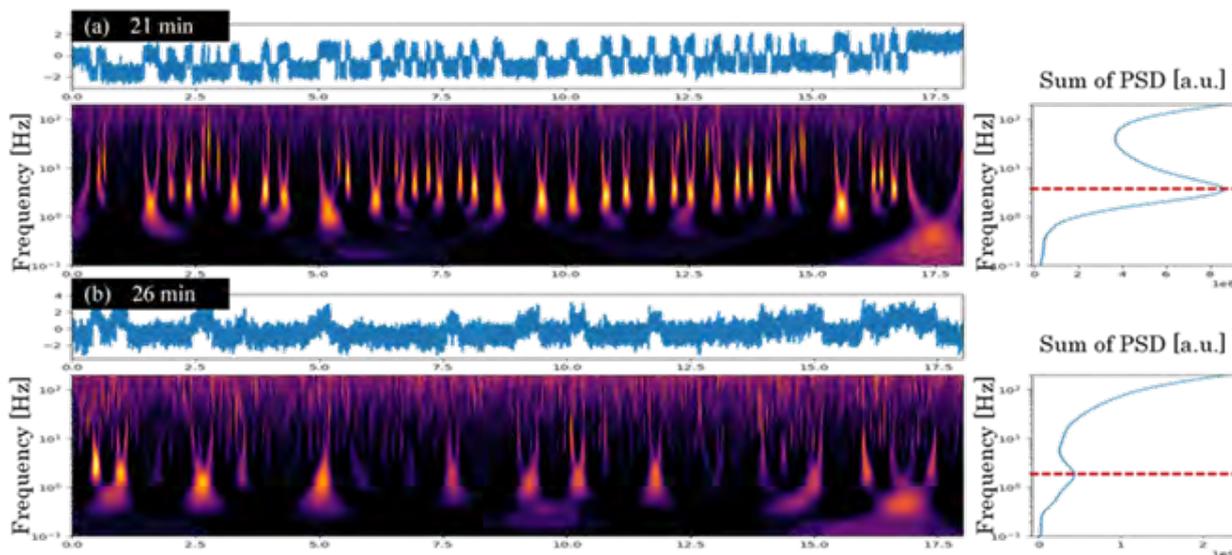


Fig. 2 イオンチャネルの出力をウェーブレット変換したもの. 検出初期状態において、1~10Hz に特異的なイオンチャネルのスペクトルを確認することができる。時間が経つにつれて、波形が鈍化しても、特性スペクトルは安定して検出できる。

以下のドメインに遷移することが確認された。Wavelet 変換による周波数ドメインの信号検出は、時系列信号ではノイズに埋もれている信号や、信号の形状が鈍化しているものにたいしても適応可能であることから、イオンチャネルをセンサ素子として利用するさいに、ロバストな検出を期待する事ができる。また、イオンチャネルのノミナルの特性を評価することができるほか、スペクトルの異なる外乱信号が入った際に、その影響を明示的に可視化する事ができる。センサの研究を進める過程では、外乱となる電磁ノイズ、電源ノイズや、イオンチャネルや、実験に用いる溶媒が発生させる偽信号の影響などを評価、確認することができた。

## 2. 2 拡張カルマンフィルタによる、イオンチャネルと化学種濃度定量化

イオンチャネルの応答に基づくリガンドの作用濃度依存性の定量化を行うため、以下のモデルベース逐次推定アルゴリズムを構築する。これは、従来のイオンチャネルの信号を事後解析する手法ではない、実時間逐次推定が可能な方法である。逐次推定アルゴリズムとして、カルマンフィルタに基づく手法の構築を目指す。まず、システムのモデル化の指針を Fig. 2 に示す。モデル化すべき要素は2箇所あり、1つ目は検出対象である化学種が緩衝液に溶存平衡を維持しているモデルである。これはウィナー過程に基づくランダムウォークモデルを利用して表現する。すなわち、濃度 $x_c$ と変動量成分を含む状態変数 $x = [x_c \quad \dot{x}_c]^T$ に関して、

$$x_{k+1} = Ax_k + w_i \quad (1)$$

なる状態方程式を構成する。もう一つは、イオンチャネルが化学種を検知して出力を変化させるモデルであり、観測

方程式に相当するものである。イオンチャネルは、化学種の結合状態に応じて開閉の2値選択的な値を出力するためには、例えば、

$$y^* = \beta_0 + \beta_1 x_c \quad (2)$$

$$y = \begin{cases} 1 & \text{for } y^* > 0 \\ 0 & \text{Otherwise} \end{cases} \quad (3)$$

なる条件を満たすモデルを適応できれば良い。ここで、イオンチャネルの応答を化学ポテンシャルと反応速度の観点から考える。Fig. 3 に示すように、イオンチャネルの開閉状態は、ともにギブスエネルギーの鞍点であり、そのポテンシャルの差分、ならびにポテンシャル障壁から速度定数が決定されると考えられる[4]。ボルツマンの法則によると、平衡時の化学エネルギーは

$$\frac{P_{open}}{P_{close}} = \exp\left\{-\frac{\Delta G}{k_B T}\right\} \quad (4)$$

となる。ここで、 $\Delta G$ はイオンチャネルのギブスエネルギー、 $k_B$ はボルツマン定数、 $T$ は温度である。従来研究から、化学種の対数濃度が $\Delta G$ に作用する影響が線形であると仮定すると、イオンチャネルの開確率 $P_{open}$ は

$$P_{open} = \frac{\exp\{\beta_0 + \beta_1 x_c\}}{1 + \exp\{\beta_0 + \beta_1 x_c\}} \quad (5)$$

として与えられる。これは、Eq. (2)、(3)を満たすロジック分布の累積分布関数となるから、Eq. 5 をあらためて $h(x)$ と置くことで、観測方程式

$$y = h(x) + v_i \quad (6)$$

が得られる。ここで、 $w_i, v_i$ はそれぞれプロセスノイズと観測ノイズであり、正規分布を仮定する。Eq. 6 は非線形

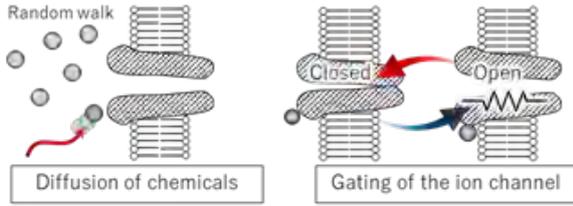


Fig. 3 実時間逐次濃度推定のために使用した物理モデル.

方程式であるから、動点周りで線形化を行うと

$$C = \begin{bmatrix} \frac{\beta_1 \exp\{\beta_0 + \beta_1 x_c\}}{(1 + \exp\{\beta_0 + \beta_1 x_c\})^2} & 0 \end{bmatrix}_{x=x_k} \quad (7)$$

なる観測行列が得られる。以上の Eq. 1, 6, 7 より、拡張カルマンフィルタは以下のように構築される [5]。

• Estimation Step

$$x_{k+1|k} = Ax_{k|k} \quad (8)$$

$$P_{k+1|k} = AP_{k|k}A^T + Q \quad (9)$$

• Innovation Step

$$K_k = P_{k|k-1}C^T(CP_{k|k-1}C^T + R)^{-1} \quad (10)$$

$$x_{k|k} = x_{k|k-1} - K_k(y_k - h(x_k)) \quad (11)$$

$$P_{k|k} = (I - K_kC)P_{k|k-1} \quad (12)$$

ここで Q、R はノイズの共分散行列である。初期値には事前にサンプリングした値を用いて、 $x_{0|0} = 0$ 、 $P_{0|0} = AA^T + Q$  とした。係数  $\beta_0, \beta_1$  はイオンチャネルの特性を表現するパラメータであり、イオンチャネルの種類に応じて実験的に求める必要がある。そこで、既知の化学種濃度におけるイオンチャネルの応答を利用して、最尤推定値を利用することを考える。Eq. 5 をもとに得られる対数尤度関数  $\mathcal{L}$  は、

$$\mathcal{L}(\beta_0, \beta_1) \sim \sum_{i=0}^n y_i \log h(x_i) + (1 - y_i) \log\{1 - h(x_i)\} \quad (13)$$

である。最尤推定値をあたえるとき、 $\partial \mathcal{L} / \partial \beta_i = 0$  であることから、ニュートン法を利用すると、

$$\begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \end{bmatrix}_{k+1} = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \end{bmatrix}_k + \begin{bmatrix} \Sigma l(x_i) & \Sigma x_i l(x_i) \\ \Sigma x_i l(x_i) & \Sigma x_i^2 l(x_i) \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \Sigma y_i - h(x_i) \\ \Sigma x_i (y_i - h(x_i)) \end{bmatrix} \quad (14)$$

として、 $\beta_i$  を計算することができる。以上のアルゴリズムを、実環境で実証した。Fig. 4 に実験系の構成を示す。サンプルとなるガスは、パーミエータという飽和ガスを供給する手法によって、デバイスの底面から連続的に供給された。また、リファレンスとして窒素ガスも供給できるようにした。まず、既知の濃度情報とイオンチャネルの応答から、モデルの係数  $\beta_0, \beta_1$  を同定する。収束の絶対許容差を

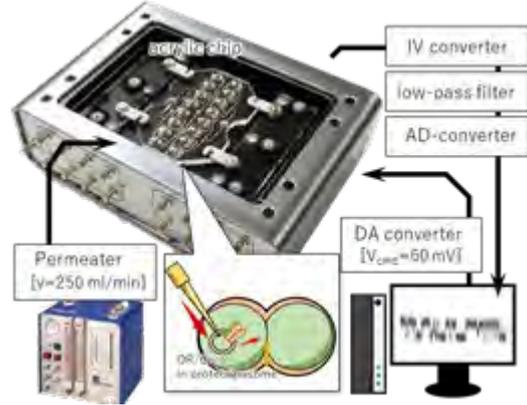


Fig. 4 実験に用いたオクテノール計測システム.

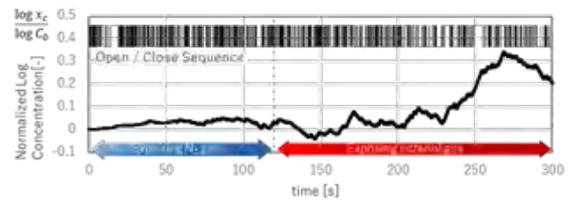


Fig. 5 イオンチャネルを用いたオクテノール濃度推定結果.

$10^{-5}$  として Eq. 14 を解くと、係数  $\beta_0, \beta_1$  は  $-0.6236, 1.1135$  と推定された。推定されたパラメータをもとに OR/Orco の開確率とガス濃度の関係を同定し、この係数をもとに拡張カルマンフィルタを構築し、ガスの濃度を計測した結果を Fig. 5 に示す。この実験では時間軸の 120 s の点において、デバイスに供給するガスを  $N_2$  からオクテノールに切り替えた。ガスの変化をイオンチャネルが感知し開確率が変化したことを利用して、オクテノール分子の検出ができていくことがわかる。今回の実験では、オクテノールのガス検出にはおよそ 2 分程度を要することも示された。本手法は、時系列データからタンパクの特性を同定し、状態空間で信号をフィルタリングするため、ノイズレベルや共分散行列などの直感的に設定しやすい値で、実時間計測センサとしての機能を容易に実現できる。そのため、より実用的かつ汎用的な匂いセンサの情報処理設計の指針として、今後幅広い応用が期待できる。

2. 3 高精度信号処理を実現可能な、新規人工細胞膜形成手法の実現

イオンチャネルの信号を適切に処理する方法に加えて、従来の膜タンパク解析プラットフォームのハードウェアの改善も重要になってくる。従来の脂質二重膜形成方法である液滴接触法は、脂質二重膜を作製する、微細加工によって形成されたセパレータの口径をある程度の大きさ (100 mm 程度) で作製する必要があった。しかしながら、膜タンパクの応答をパッチクランプと同程度の時間スケール (100ms オーダ) で解析するためには、脂質二重膜の

大きさは、むしろ小さくすることが望まれる。これは、電流—電圧変換を行うトランスインピーダンス・アンプのノイズゲインの周波数特性が、脂質二重膜の静電容量に依存しているからである。

液滴接触法は、膜を保持する領域の脂質分散溶媒である *n*-decane などの制御性を担保していないため、膜の大きさは実験条件による安定化が難しい。すなわち、膜の大きさを小さくしようと、セパレータの穴系を絞ると、脂質二重膜の中間層の溶媒が邪魔をして、真に二重膜をえることができない。この問題を解決するため、新たな膜の形成方法を提案、実証した。これは、従来脂質を含む有機溶媒をアクリルウェルに直接滴下していたものを、脂質膜形成部位に新たに設計した、微細なスリットに脂質分散液を与え、メニスカスの釣り合いをうまくバランスすることで脂質二重膜を得る方法である。膜を形成するためのセパレータは、強度、化学的安定性、表面特性を調整しながら、微細加工美術によって、硼珪酸ガラス基盤を加工することによって実現した。実際に作製したセパレータデバイスと、膜の様子を Fig. 6 に示す。この膜は、前述の通りメニスカスによって保持され、また膜の内部の有機溶媒を、外部に強制的に排出することができる。そのため、従来手法より小型の膜を作成できる可能性を秘めている。この技術によって小型の膜を形成し、膜受容体機能を示すイオンチャネルを解析できれば、安定した信号処理を実現することを見込むことができ、今後の発展が期待される。

### 3. 今後の展望

本研究は、イオンチャネルを用いた標的化合物検出デバイスに適用可能な実時間信号処理技術を開発した。本研究が更に進むと、たとえば高精度生物の機能に匹敵する嗅覚機能をロボットに付与することができる。本研究は、計測のデバイス技術と信号処理を相補的にさらに改良することで、さらなる進展を期待する事ができる。

また、本技術は、創薬スクリーニングなどの応用において、イオンチャネルの化合物に対する応答を評価する場合においては、無数の標的化合物の種類や条件、リガンドの作用部位などの評価を実時間で効率よく実現することを可能にする。すでに我々は、この目標を達成すべく、イオンチャネル解析プラットフォームのための、96ch同時計測システムを立ち上げた。今後、本研究の技術はマルチウェル解析プラットフォームの基盤技術としても利用が見込まれる。

#### 【謝辞】

本研究の一部は、(国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託事業である次世代人工知能・ロ

ボット中核技術開発委託事業、および文部科学省の地域イノベーション・エコシステム形成プログラム、JSPS 科研費 研究活動スタート支援 (JP19K23505) により支援されました。ここに感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

- [1] K. Funakoshi, H. Suzuki, and S. Takeuchi, "Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 78, pp. 8169–8174, 2006.
- [2] N. Misawa, S. Fujii, K. Kamiya, T. Osaki, T. Takaku, Y. Takahashi, and S. Takeuchi, "Construction of a Biohybrid Odorant Sensor Using Biological Olfactory Receptors Embedded into Bilayer Lipid Membrane on a Chip," *ACS Sensors*, vol. 4, pp. 711–716, 2019.
- [3] R. Kawano, Y. Tsuji, K. Kamiya, T. Kodama, T. Osaki, N. Miki, and S. Takeuchi, "A Portable Lipid Bilayer System for Environmental Sensing with a Transmembrane Protein," *PLOS ONE*, vol. 9, e102427, 2014.
- [4] J. Zheng and M. C. Trudeau, "Handbook of Ion Channels," *CRC Press*, 2015.
- [5] R. Schneider and C. Georgakis, "How To NOT Make the Extended Kalman Filter Fail," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, pp. 3354–3362, 2013.

## 業 績

## 【原著論文】

1. Masahide Gotanda, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi  
Automatic Generation System of Cell-Sized Liposomes  
Sensors & Actuators: B Chemical, Vol.292, pp.57-63 (2019).
  2. Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi  
Formation of Vesicles-in-a-Vesicle with Asymmetric Lipid Components Using a Pulsed-Jet Flow Method  
RSC Advances, Vol.9, pp.30071-30075 (2019).
  3. Tetsuya Yamada, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi  
A Pumpless Solution Exchange System for Nanopore Sensors  
Biomicrofluidics, Vol.13, 064104 (2019).
  4. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Taro Toyota  
Hydrodynamic Accumulation of Small Molecules and Ions into Cell-Sized Liposomes against a Concentration Gradient  
Communications Chemistry, Vol.3, 32 (2020).
  5. Saori Nonaka, Emil Salim, Koki Kamiya, Aki Hori, Firzan Nainu, Takumi Nishiuchi, Shoji Takeuchi, Noriyuki Kodera, Takayuki Kuraishi  
Molecular and Functional Analysis of Pore-Forming Toxin Monalysin from Entomopathogenic Bacterium *Pseudomonas entomophila*  
Frontiers in Immunology, Vol.11, 520 (2020).
- Takeuchi  
Artificial Cell Membrane System for Odorant Sensor: Development of Solution Exchange Driven by Superabsorbent Polymer for Repeatable Detection  
18th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ISOEN 2019)  
2019年5月、福岡
4. 竹内昌治  
バイオハイブリッドデバイスのすすめ  
応用電子物性分科会 研究例会  
2019年6月、東京
  5. Shoji Takeuchi  
Emerging Technologies for Biohybrid Machines  
SELECTBIO - Lab-on-a-Chip & Microfluidics Europe 2019  
2019年6月、オランダ
  6. Yoshihisa Ito, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Tetsuya Yamada, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi  
Quad Lipid Bilayer Module with 1-GΩ Series Resistors  
Transducers 2019 – EUROSENSORS XXXIII  
2019年6月、ドイツ
  7. Toshihisa Osaki  
Artificial Cell Membrane Platforms for Drug Discovery and Super Sensors  
Leibniz Institute of Polymer Research Dresden  
2019年6月、ドイツ
  8. 竹内昌治  
細胞や生体分子を使った"やわらかい"モノづくり  
「バイオハイブリッド」研究が変える医療と食の未来  
第8回 First Penguin Salon  
2019年7月、東京
  9. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Taro Toyota  
Microfluidic Trapping and Observation of Size-Sorted Liposomes Prepared by Water-in-Oil Emulsion Transfer Method  
ACS Fall 2019 National Meeting & Expo  
2019年8月、アメリカ
  10. 竹内昌治  
"バイオハイブリッド"が拓く工学と医学の融合研究
1. 竹内昌治  
バイオハイブリッドが拓く新たな機械工学  
機械工学の将来展望ーイノベーション創出にむけた次の一手ー  
2019年4月、東京
2. Takami Maekawa, Koki Kamiya, Tooru Takahashi, Kentaro Kaji, Yukio Tezuka, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Takashi Kondoh  
TMC6 : A Novel Salt Taste Receptor in Mice  
AChemS XLI  
2019年4月、アメリカ
  3. Tetsuya Yamada, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Shoji

## 【口頭発表】

## 【研究開発部】人工細胞膜システム

- 令和元年度東京大学医学部医学科 基礎臨床社会医学  
統合講義  
2019年8月、東京
11. 竹内昌治  
バイオハイブリッドロボティクス  
第37回日本ロボット学会学術講演会  
2019年9月、東京
12. 杉浦広峻  
におい計測のための脂質二重膜デバイス技術について  
日本機械学会 情報・知能・精密機器部門 未来技術ワー  
ークショップ  
2019年9月、秋田
13. 杉山博紀、大崎寿久、竹内昌治、豊田太郎  
フィードバック制御環境下での細胞サイズのリポソ  
ムの自動観測  
日本分析化学会第68年会  
2019年9月、千葉
14. Shoji Takeuchi  
Emerging Technologies for Biohybrid Devices  
45th International Conference on Micro & Nano  
Engineering  
2019年9月、ギリシャ
15. 瀬尾明彦、赤木大輔、保科克行、栗木優五、小松徹、  
神谷真子、大崎寿久、浦野泰照  
腹部大動脈瘤（AAA）開腹手術への応用を目的とした  
蛍光ペプチターゼプローベライブラリーを用いた正常  
血管の客観的評価方法  
第60回日本脈管学会総会  
2019年10月、東京
16. 山田哲也、杉浦広峻、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治  
蚊の嗅覚受容体を利用した匂いセンサの開発  
「細胞を創る」研究会 12.0  
2019年10月、松山
17. 神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治  
リン脂質非対称膜小胞封入リポソームによる小胞の膜  
融合観察  
「細胞を創る」研究会 12.0  
2019年10月、松山
18. 竹内昌治  
バイオハイブリッドが拓く異分野融合イノベーション  
東レ研究本部研修会  
2019年10月、三島
19. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and  
Taro Toyota  
Automated Observation of Cell-Sized Liposome with  
Feedback Control of Outer Environment  
The 23rd International Conference on Miniaturized  
Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2019)  
2019年10月、スイス
20. Tetsuya Yamada, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji  
Takeuchi  
Volatile Odorant Detection by Olfactory Receptors Formed  
in a Lipid Bilayer Membrane  
The 23rd International Conference on Miniaturized  
Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2019)  
2019年10月、スイス
21. Toshihisa Osaki  
Artificial Cell Membrane Platforms for Functional  
Analyses and Drug Screenings of Ion Channels  
Ion Channel Modulation Symposium (ICMS) 2019 Boston  
2019年10月、アメリカ
22. Shoji Takeuchi  
Biohybrid Micro/Nano Devices  
The Japan-US Science Forum in Boston 2019  
2019年11月、アメリカ
23. 竹内昌治  
バイオハイブリッドデバイスの新展開  
JACI 公益社団法人新化学技術推進協会 電子情報技  
術部会 マイクロナノシステムと材料・加工分科会  
講演会  
2019年11月、東京
24. Hatsuhi Kato, Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji  
Takeuchi, and Taro Toyota  
Observation of Self-Propelled Giant Multilamellar Vesicles  
Driven by Surfactant Addition in a Microfluidic Device  
The Okinawa Colloids 2019 (An International Conference  
on Colloid & Surface Science)  
2019年11月、那覇
25. 竹内昌治  
Microfluidics for Biohybrid Devices  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会  
CHEMINAS 二十周年記念シンポジウム  
2019年11月、浜松
26. 杉浦広峻、山田哲也、大崎寿久、三村久敏、竹内昌治  
Point-of-care 応用のための膜タンパクを用いた微小に  
おいセンサ  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会  
2019年11月、浜松

27. 山田哲也、杉浦広峻、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治  
匂いセンサ開発に向けたガス導入システムの構築  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会  
2019年11月、浜松
28. 橋本和泉、杉浦広峻、大崎寿久、山田哲也、三村久敏、  
三木則尚、竹内昌治  
微小バブルによる脂質二重膜の再形成  
第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム  
2019年11月、浜松
29. 三村久敏、杉浦広峻、山田哲也、神谷厚輝、三浦重徳、  
大崎寿久、竹内昌治  
人工細胞膜システムによる細胞内イオンチャネルのスクリーニング  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会  
2019年11月、浜松
30. Hirotaka Sugiura, Tetsuya Yamada, Atsufumi Ozoe, Yuki Kodama, Yasuhiko Takahashi, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi  
Quantitative Signal Analysis of a Ligand-Gated Ion Channel on a Lipid Bilayer Using Continuous-Time Wavelet Transformation  
30th 2019 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems)  
2019年12月、名古屋
31. 三村久敏、杉浦広峻、山田哲也、神谷厚輝、三浦重徳、  
大崎寿久、竹内昌治  
平面脂質二重膜を利用した細胞内イオンチャネルのスクリーニングシステム  
第42回日本分子生物学会年会  
2019年12月、福岡
32. Shoji Takeuchi  
Lipid Bilayer on a Chip for Highly Parallel Ion Channel Screening  
SMMIL-E Workshop on BioMENS and Cancer Research in Lille  
2019年12月、フランス
33. 杉浦広峻、山田哲也、大崎寿久、三村久敏、竹内昌治  
2値選択モデルを内包する拡張カルマンフィルタを用いたイオンチャネルの実時間状態推定  
第20回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会  
2019年12月、高松
34. Shoji Takeuchi
35. Tetsuya Yamada, Hirotaka Sugiura, Hisatoshi Mimura, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki and Shoji Takeuchi  
Odorant Sensor Using Olfactory Receptor Reconstituted in a Lipid Bilayer Membrane with Gas Flow System  
The 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2020)  
2020年1月、カナダ
36. Izumi Hashimoto, Hirotaka Sugiura, Toshihisa Osaki, Tetsuya Yamada, Hisatoshi Mimura, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi  
Bubble-Assisted in situ Re-Formation of Artificial Bilayer  
The 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2020)  
2020年1月、カナダ
37. 竹内昌治  
バイオハイブリッドが拓く新産業創出に向けて  
MEMS SENSING & NETWORK SYSTEM 展 2020  
2020年1月、東京
38. 大崎寿久  
細胞膜作製技術を利用した創薬・センサ開発  
九州工業大学 生命体工学セミナー  
2020年1月、北九州
39. 竹内昌治  
バイオハイブリッド技術が拓く次世代医療デバイス  
札幌医科大学先端医学研究セミナー  
2020年2月、札幌
40. Hisatoshi Mimura, Hirotaka Sugiura, Tetsuya Yamada, Koki Kamiya, Shigenori Miura, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi  
A Planar Lipid Bilayer Array for Drug Screening of Intracellular Ion Channels  
64th Annual Meeting of the Biophysical Society  
2020年2月、アメリカ
- 【記者発表、取材】
1. 大崎寿久,  
「東大など、原始細胞のモデルが特性の分子を内部に溜め込む新現象を発見」  
日本経済新聞 (Web), 2020年3月9日

## 【研究開発部】人工細胞膜システム

### 【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 2件

# 「高効率燃料電池開発」グループ

グループリーダー 山口 猛央

## 【基本構想】

本プロジェクトは、平成 23 年より開始した戦略的研究シーズ育成事業、有望シーズ展開事業の成果をさらに展開し、低白金、高耐久で、広温・広湿・広電流密度で運転できる固体高分子形燃料電池（PEFC）の実用化へ向けた取り組みである。

現在の科学技術では、化学物質から仕事（電気）への変換効率は低い。火力発電所における変換効率は平均 40 %程度であり、自動車の移動仕事はガソリンエンジンで 20 %程度、ハイブリッド車でも 35 %程度である。熱力学的な最高効率は、水が水蒸気になる潜熱を仕事として活かせるすると、効率は 25 °C で 95 %以上にもなる。現実世界で目指すべきは、60-70 %の変換効率であろう。PEFC は、低温、小型であり、必要な場所で、必要なときに、必要な量の発電が効率的に行えるデバイスである。日本では世界に先駆け、定置用のエネファームは既に 25 万台が設置され、燃料電池自動車の販売も開始された。しかしながら、普及技術とするためには、さらなる技術革新が必要となっている。

燃料電池自動車の白金使用量を 10 分の 1 程度にまで低減できれば、燃料電池に用いる白金量は、ガソリン自動車の排ガス触媒に使用する貴金属量と大差なくなる。水管理が重要と言われる PEFC において、幅広い湿度および低温から 100 °C までの幅広い温度での効率的な運転が可能となれば、システムが簡便となり、信頼性向上、低コスト化だけでなく、総合効率も向上する。また、現状の耐久性を大幅に向上できれば、自家用車だけでなく、商用車にも展開できる。材料としては、白金担持カーボンの 10 倍の活性を有する触媒材料、広い湿度および温度範囲で高いプロトン伝導性を発現する電解質材料の開発が重要となる。さらに、新しい材料を開発しても、燃料電池としての性能および高い耐久性に結びつかなければ意味は無く、物質からデバイスまでを繋げた設計が重要となる。

これらを実現するためには、現状の燃料電池材料とは異なる発想が必要であり、低白金、高性能、高耐久を有する次世代型の燃料電池デバイスをイメージし、そこから発想した触媒材料および電解質膜の設計・開発が必要である。本グループでは、これまでの研究成果を発展させ、新しい触媒・触媒層と電解質膜の開発を行い、組み合わせることにより、高耐久で、広い湿度・温度領域で作動し、低白金量で高効率発電が可能な次世代型の燃料電池の設計・開発を行っている（図 1）。さらに、企業と連携し、これらの材料の実用化に向けた取り組みを積極的に進めている。

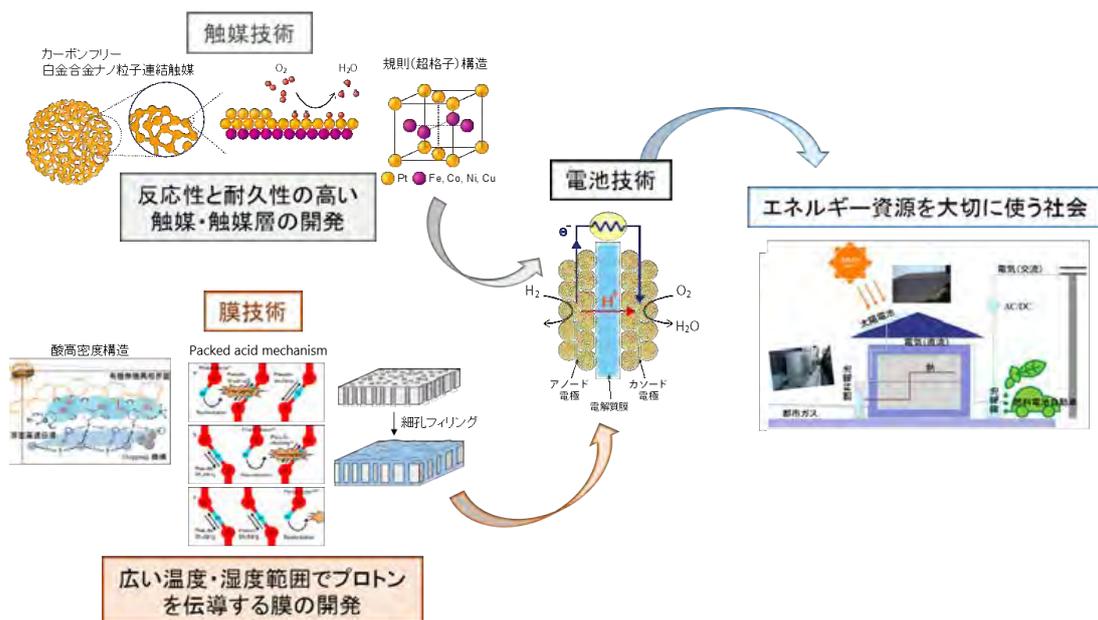


図 1. 触媒・電解質膜材料及びシステムの燃料電池設計・開発

1. 2019 年度の研究目的

実用化実証事業 3 年目である 2019 年度は、以下を重点項目として、研究開発および実用化に向けた取り組みを実施した。

(1) カーボンフリー白金系ナノ粒子連結触媒の開発

本グループは、カーボン担体上に白金ナノ粒子を担持させた従来の触媒 (Pt/C, 図 2a) とは異なるカーボンフリー Pt 系ナノ粒子連結触媒の実用化に向けた取り組みを進めている。図 2 に示すように、Pt 系ナノ粒子連結触媒は、Pt 系ナノ粒子が連結したナノサイズのネットワークで構成されるため、高い表面積を有し、且つ、金属ネットワークが導電性を持つため、カーボン担体を必要としない。従来の Pt/C と比べて、Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒は、約 9 倍高い酸素還元反応 (Oxygen reduction reaction: ORR) 活性を示し、大幅な低白金化が可能である。さらに、カーボンフリー触媒は、燃料電池の起動停止運転の際に生じるカーボン腐食による劣化を回避できるため、高耐久性を実現する。一方で、燃料電池触媒は、起動停止耐久性に加えて、負荷応答耐久性も改善しなければならない。燃料電池発電時の負荷応答サイクルによって触媒金属の溶出が生じ、触媒活性の低下を引き起こすため、燃料電池の長期安定性には触媒金属の溶出を抑制することが必要不可欠である。

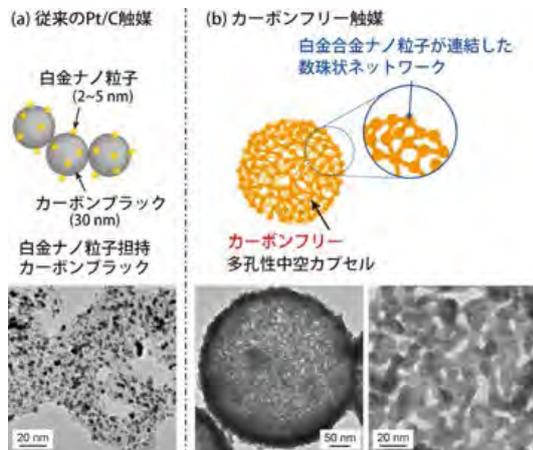


図 2. (a) 従来の Pt/C 触媒、(b) Pt-Fe 合金ナノ粒子が連結した中空カプセル状のカーボンフリー触媒の模式図と TEM 像

本グループはこれまでに、カーボン担持白金合金ナノ粒子 (連結無し) において、合金内の原子が規則的に配列した原子配列規則 (face centered tetragonal: fct, 図 3a) 構造を有する触媒開発を行い、不規則配列 (face centered cubic: fcc, 図 3b) 構造の触媒よりも、合金金属の溶出を抑制し、高い負荷応答耐久性を示すことを実証している。

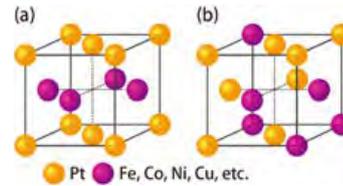


図 3. (a) 規則配列 fct 構造、(b) 不規則配列 fcc 構造を持つ白金合金触媒の格子構造

そこで、本グループは、カーボンフリー Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒における原子配列規則度 (fct の割合) を向上させる簡易な合成法 (シリカコート法、後述の研究報告参照) を新たに提案・実証した。従来の合成法では、高温・高圧での超臨界処理を用い、低規則度 (40-50 %) の Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒が得られていたが、シリカコートと熱処理を組み合わせたシリカコート法では、高温熱処理のみでナノ粒子連結ネットワークと高規則度 (70-80 %) を実現できる。

2019 年度は、規則度が負荷応答耐久性に与える影響を整理するために、規則度の異なる Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒を合成し、負荷応答耐久性試験、および試験後の構造解析を行った。また、さらなる高性能化を図るために、原子配列規則度の制御に加えて、合金金属種や組成比 (純 Pt、または Pt<sub>1</sub>-M<sub>x</sub>, M = Fe, Co) の異なる白金系ナノ粒子連結触媒の開発を進めた。

さらに、本グループの独自技術である金属ナノ粒子連結触媒の実用化を推進するために、異なるエネルギーデバイス (固体アルカリ燃料電池や固体分子形水電解) への展開にも取り組んでいる。

(2) 酸高密度型細孔フィリング薄膜及び高温低湿度対応 MEA の開発

本グループは、高いスルホン酸基容量 (Ion exchange capacity: IEC) を持つパーフルオロスルホン酸 (PFSA) ポリマーを超高分子量ポリエチレン多孔質基材に充填した酸高密度型細孔フィリング薄膜 (図 4) の開発に取り組んでいる。従来の高 IEC のキャスト膜では、水に対して極度に膨潤するため、単独で燃料電池に使用することは困難である。一方、細孔フィリング膜は、機械的強度の高い基材によって充填ポリマーの膨潤を抑えるため、高い膨潤抑制能を有する。さらに、本研究では、従来の膜 (膜厚 25 μm) よりも薄い約 7 μm の細孔フィリング薄膜を開発し、水の少ない高温低湿度環境においても優れたプロトン伝導性を示すことを実証した。

本グループは、高 IEC 細孔フィリング薄膜における高温低湿度環境下での高速プロトン伝導の要因を調査するために、日産アークと共同で、膜内部のマイクロ構造の観察を進めている。さらに、高 IEC 細孔フィリング薄膜は膜電極接合体 (MEA, 図 5) での評価にも取り組んでいる。これまでの成果において、低い IEC の市販ナフィオン膜 (Nafion 211, 膜厚 25 μm) では実現できなかった高温低湿度環境下での高い燃料電池性能の発現に成功している。さらに、実

用化を見据えて、燃料電池運転環境下での高 IEC 細孔フィリング薄膜の耐久性評価および劣化メカニズムの解明に取り組んでいる。

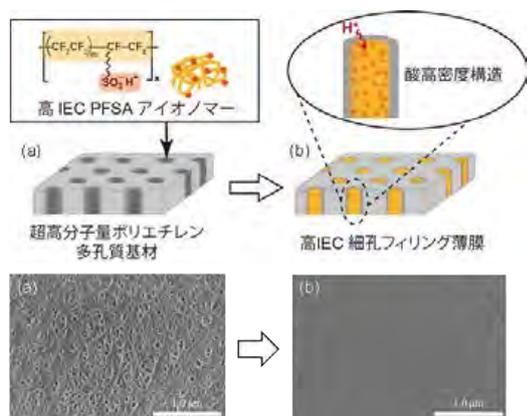


図 4. (a) 超高分子量ポリエチレン多孔質基材に高 IEC の PFSA ポリマーを充填した (b) 細孔フィリング薄膜の模式図と膜表面の SEM 像

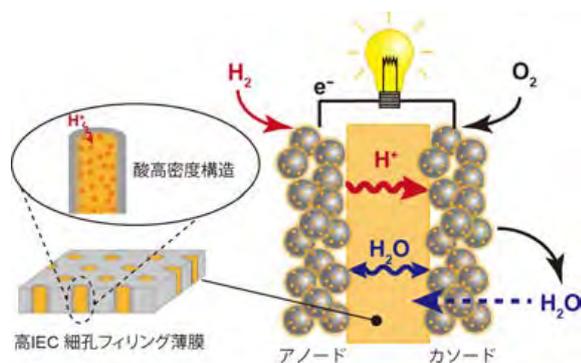


図 5. 酸高密度型細孔フィリング薄膜を用いた MEA の模式図

## 2. 2019 年度の研究成果

以下に挙げるのは、2019 年度の研究成果の概要であり、詳細は各研究員の報告書に記載する。

### (1) カーボンフリー白金系ナノ粒子連結触媒の開発

シリカコート法を用いて、原子配列規則度の異なる Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒を開発し、原子配列規則度と負荷応答耐久性の関係性を調査した。その結果、原子配列規則度が高くなるに伴い、ORR 表面比活性の保持率が高い傾向を確認した。さらに、STEM-EDX ラインマッピングの結果から、高い規則度は Fe の溶出を抑制し、負荷応答耐久性を向上させることが示された。この高い原子配列規則度を有するカーボンフリー Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒は、従来の触媒では困難であった高い触媒活性と高い起動停止・負荷応答耐久性の全てを実現している。

さらに、本研究ではシリカコート法を用いることで、これまでの超臨界法で合成が困難であった純 Pt ナノ粒子連結触媒や組成比の異なる Pt<sub>3</sub>-Fe<sub>1</sub>, Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>3</sub> ナノ粒子連結触

媒の開発に成功した。特に、純 Pt ナノ粒子連結触媒の ORR 表面比活性は、Pt/C に比べ約 4 倍高いことが分かり、カーボンフリーのナノ粒子連結構造が ORR 活性向上に大きく寄与する明確な証拠が得られた。さらに金属組成比の異なる Pt-Fe ナノ粒子連結触媒において、触媒構造 (Pt-Pt 結合距離) と ORR 表面比活性に相関が確認された。カーボンフリーナノ粒子連結構造による活性向上に加えて、適切な量の Fe と合金化することで、Pt-Fe ナノ粒子連結触媒の ORR 表面比活性は Pt/C よりも 10 倍高くなることが示された。

また、2019 年度の重要な成果として、シリカコート法を用いて、Pt-Co ナノ粒子連結触媒の開発にも成功した。MEA に用いる電解質材料の耐久性を考えた場合、フェントン反応により OH ラジカルを生成する Fe イオンは MEA 内に存在しないことが望まれる。Pt-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒は高規則度によって Fe イオンの溶出を抑制できるが、Fe フリーの Pt-Co ナノ粒子連結触媒は、この問題を根本的に回避できる。さらに、Pt-Fe での結果と同様に、熱処理温度を変えることで規則度向上を達成でき、高い負荷応答耐久性を実現し得る。現在、Pt-Co ナノ粒子連結触媒の外部企業での評価も進めている。

上記の PEFC 用触媒に留まらず、金属ナノ粒子連結触媒は、水電解のための Ir 系ナノ粒子連結触媒の開発や、固体アルカリ燃料電池への Pt-Fe ナノ粒子連結触媒の応用にも展開しており、他のエネルギーデバイスにおいても金属ナノ粒子連結触媒の有用性を実証している。

### (2) 酸高密度型細孔フィリング薄膜及び高温低湿度対応 MEA の開発

日産アークとの共同研究において、クライオプラズマ集束イオンビーム (Cyro-PFIB) を用いて、冷却下で高 IEC 細孔フィリング薄膜の薄い切片を作製し、膜内部のマイクロ構造を TEM-EDX 測定から観察した。EDX マッピングから F, S 元素の分布が観察され、細孔内に充填された PFSA ポリマーが確認された。さらに、細孔内 PFSA ポリマー中にスルホン酸基が集合した構造が観察され、充填ポリマーはチャンネル構造を形成することが示唆された。

さらに、本グループは、高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA において、従来の膜では実現できなかった高温低湿度での高い発電性能と、高い開回路電圧 (OCV) 保持耐久性 (膜の化学的耐久性) を実証してきた。2019 年度では OCV 保持試験後の膜構造を詳細に解析することで、高 IEC 細孔フィリング薄膜は従来のナフィオン膜とは異なるメカニズムで劣化することが示唆された。このように、従来の膜よりも優れた性能を示す高 IEC 細孔フィリング薄膜は、次世代の PEFC 用膜材料として有望であり、実用化に向けて外部企業での評価も推進している。

上記で得られた研究成果は、国内・国外での学会発表や学術論文により、世の中へ広く発信した。(詳細は業績の項を参照) さらに、本事業で開発した Pt 系ナノ粒子連結

## 【研究開発部】高効率燃料電池開発

触媒や高 IEC 細孔フィリング薄膜は、次世代 PEFC への導入に向けて、外部企業での評価を進めている。

本プロジェクトが目標とする高効率燃料電池が実現すれば、大型発電所を凌ぐ効率で低コストな家庭用発電・移動用発電を普及することが可能で、現在の変換効率の低いエネルギー技術に替わる革新的技術となり得る。今後も、本事業で得られた材料や技術の実用化に向けた取り組みを積極的に推進していく。

# カーボンフリーPt系ナノ粒子連結触媒の開発

黒木 秀記、井村 悠、Liao Qiancheng、田巻 孝敬、有田 正司、山口 猛央

## 1. はじめに

固体高分子形燃料電池 (PEFC) は環境負荷が低く、高効率な発電システムであるため、定置用燃料電池や燃料電池自動車として普及が開始された。しかしながら、PEFCを普及技術として確立するためには、さらなる低コスト化、高耐久化、高出力化が必要不可欠である。

本グループは、図 1 に示す白金鉄 (Pt-Fe) ナノ粒子が連結したネットワークから成る、多孔性中空カプセル状 Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒の開発に取り組んでいる。<sup>1-3</sup> 本触媒は、従来の燃料電池触媒である白金ナノ粒子担持カーボンブラック (Pt/C) に比べて、酸素還元反応 (Oxygen Reduction Reaction: ORR) における表面比活性が約 9 倍高い値を示すため、低白金による低コスト化が実現できる。加えて、金属ネットワークは導電性を有するため、カーボン担体を必要とせず、カーボンフリーである。燃料電池の起動停止時にはカーボン腐食が起こり、発電性能を大幅に低下させる要因となることが知られている。<sup>4</sup> カーボンフリー触媒は、カーボン腐食の問題を回避できるため、高耐久性を実現する。さらに、カーボン担体は電極触媒層内の体積を大きく占めているため、カーボンフリーとすることで、燃料ガスの物質移動に対して有利な薄い触媒層を形成できる。このように、カーボンフリー白金系ナノ粒子連結触媒は、高い触媒活性、カーボンフリーによる高耐久化、極薄触媒層による高出力化を実現し得る有望な燃料電池材料であり、本グループは、本触媒の実用化に向けた取り組みを推進している。

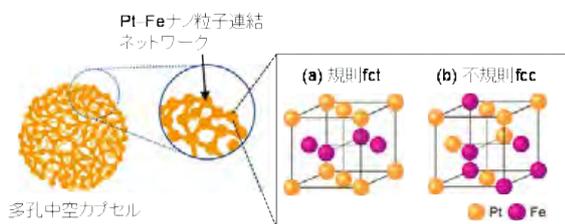


図 1. Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒と格子構造の模式図: (a) Pt, Fe 層が規則的に配列した規則配列構造、(b) Pt, Fe がランダムに配置している不規則配列構造

PEFC 触媒の実用的な運転では、起動停止サイクルによるカーボン腐食の劣化に加えて、負荷応答サイクルにおける触媒金属の溶出も問題となる。触媒金属の溶出は表面構

造の変化を引き起こし、活性低下につながる。つまり、高い活性を持つ触媒を長期的安定に使用するためには、触媒金属の溶出を抑える必要がある。

本グループは、有望シーズ展開プロジェクトにおいて、原子配列規則 (face centered tetragonal: fct) 構造を持つ白金合金ナノ粒子担持カーボンの開発を行い、不規則配列 (face centered cubic: fcc) 構造の触媒よりも高い ORR 活性と優れた負荷応答耐久性を示すことに成功している。<sup>5-9</sup>

そこで、本研究では、高い規則度を有するカーボンフリー Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒を開発した。ここでは、図 2a に示す高温・高圧の超臨界処理を用いる従来の合成法を改良し、新たな合成法 (以下、シリカコート法、図 2b) を提案・実証した。シリカコート法では、まず Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子をテンプレートシリカ粒子上に生成させる。その後、ナノ粒子の脱離・凝集を抑制するために、表面をシリカ層で被覆させる。そして、大気圧下で熱処理を行う。この熱処理は、規則度を向上させると同時に、ナノ粒子が連結したネットワーク構造を形成する。最後に表面と内部のシリカをアルカリ処理で除去し中空カプセル構造を得る。このシリカコート法は、超臨界 (高温・高圧) 処理を用いず、熱処理のみを使用するため、より簡易であり、量産化に適した合成プロセスを構築できる。

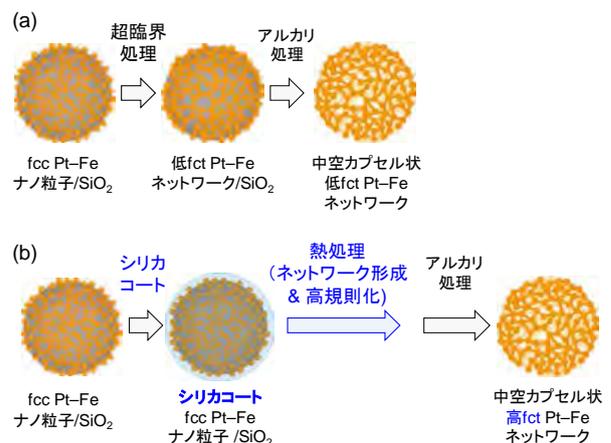


図 2. Pt 系ナノ粒子連結触媒の合成法。 (a) 高温高圧下の超臨界処理を用いる従来の合成法、(b) 熱処理のみで高規則度とネットワーク構造を形成するシリカコート法

従来の超臨界法では、Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒の規則度は 40-50%程度であった。一方で、シリカコート法を用

いることで、70–80%の高規則度を達成した。さらに、高規則度の Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒は、高い負荷応答耐久性を示すことを実証した。そこで、2019 年度は、規則度の異なる Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒を用いて、規則度が ORR 活性および負荷応答耐久性に与える影響を詳細に議論した。また、金属組成比の異なる Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>x</sub> ナノ粒子連結触媒を新たに開発し、金属組成比が ORR 活性に与える影響を調査した。

さらに、シリカコート法は、ネットワーク形成の際に、表面をシリカ層で覆うため、ナノ粒子の脱離・凝集が抑制され Pt-Fe 以外の金属種に対してもナノサイズのネットワーク構造を形成し得る汎用性の高い合成法である。そこで、本研究では新たに Fe フリーの Pt 系ナノ粒子連結触媒の開発に取り組んだ。PEFC における膜電極接合体 (MEA) の耐久性を考えた場合、Fe イオンの溶出抑制は重要な技術である。その理由として、Fe イオンはフェントン反応の触媒となり、OH ラジカルを発生させるため、電解質材料 (電解質膜や触媒層アイオノマー) の分解を促進することが懸念される。Pt-Fe ナノ粒子連結触媒においては高規則化することで Fe イオンの溶出を抑制させるが、Fe フリーとすることで、Fe イオンの問題を完全に除くことが可能となる。そこで、本研究では、新たに Fe フリーの Pt、Pt-Co ナノ粒子連結触媒の開発にも取り組んだ。

## 2. 実験、結果及び考察

### 2. 1. Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒における規則度制御

図 2b に示すシリカコート法を用いて、規則度の異なる Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒を合成した。まず、ポリオール反応によって、シリカテンプレート粒子 (直径 300 nm) 上に高密度に Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子を形成させる。その後、オルトケイ酸テトラエチルをシリカ源に用いて、触媒表面をシリカ層でコートする。そして、異なる温度 (500–700°C、H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 雰囲気下、処理時間は 1 h で固定) で処理することで、規則度の異なるナノサイズのネットワーク構造を形成させた。最後にアルカリ処理によって、表面と内部のシリカを除去して、中空カプセル状の Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>x</sub> ナノ粒子連結触媒を得た。

表 1 に異なる熱処理温度で合成した Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>x</sub> ナノ粒子連結触媒の構造特性を示す。比較として、従来の超臨界処理法 (図 2a、超臨界エタノール処理、330°C、約 20 MPa) で合成した結果も示している。表 1 から、500 °C 以上の高温処理を施すことで、従来の超臨界処理法 (規則度 = 46%) よりも高い規則度 (58–76 %) を達成することが確認された。さらに、高温熱処理を用いても結晶子径は 10 nm 前後であり、ナノサイズの結晶子径を有することも確認された。続いて、図 3 に示す TEM 像から、いずれの処理温度においても、ナノサイズのネットワークで形成された均一なカプセル構造が観察された。このことから、シリカコート法を用いることで、高い規則度とナノサイズのネットワーク

を形成することが示され、さらに熱処理温度を調整することで、異なる規則度の触媒合成にも成功した。

表 1. 異なる条件で合成した Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒の構造特性

合成法	処理条件	結晶子径 (nm)	規則度 (%)
超臨界処理法	330 °C, ca. 20 MPa	7.4 ± 0.4	46 ± 3
	500 °C	7.9 ± 0.7	58 ± 4
シリカコート法	600 °C	10.7 ± 2.2	70 ± 3
	700 °C	15.7 ± 2.4	76 ± 4

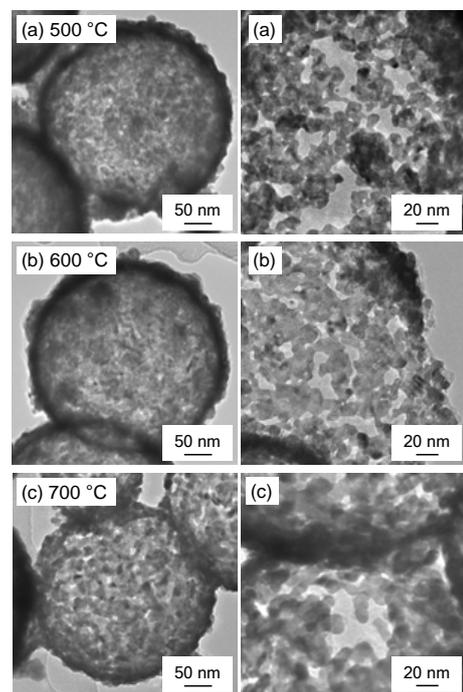


図 3. シリカコート法を用いて異なる熱処理温度 (500–700 °C) で合成した Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒の TEM 像

続いて、作製した触媒の酸電解液 (0.1 M HClO<sub>4</sub> 水溶液) 中での ORR 活性・負荷応答耐久性評価を行った。まず初期の ORR 表面比活性 (Pt 表面積あたりの ORR 活性) は、いずれの Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒において、市販の Pt/C よりも 8–10 倍高いことが確認された。この高い触媒活性は、本触媒の構造的な特徴であるカーボンフリーのナノ粒子連結ネットワーク構造が大きく貢献している (後述の Pt ナノ粒子連結触媒の結果を参照)。

次に、PEFC の標準プロトコル<sup>10</sup> (60°C、0.1 M HClO<sub>4</sub> aq.、0.6 V ⇄ 1.0 V の電位サイクル) を用いた加速劣化試験によって、触媒の負荷応答耐久性を評価した。ここでは、超臨界処理法で合成した規則度 46%、シリカコート法で合成した規則度 58%、76% の 3 種類の Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒を用いた。図 4 に負荷応答サイクル数に対する ORR 表面比活性の変化を示す。比較として、市販 Pt/C の結果も

示している。前述したように、初期の Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒は Pt/C よりも高い ORR 活性を示し、負荷応答一万サイクル後においても Pt/C より高い活性のままである。一方で、規則度の低い Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒は、負荷応答サイクルに対する活性の保持率が低く、規則度が高くなるに伴い活性保持率が高い傾向を示した。

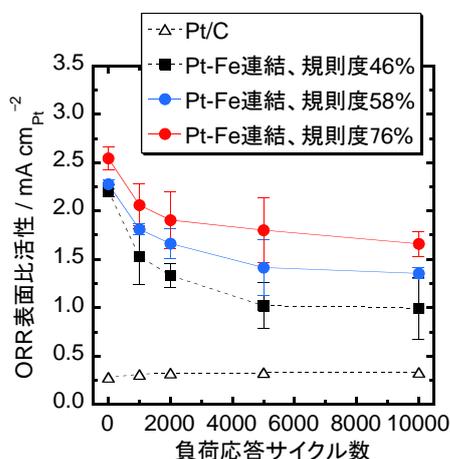


図4. 規則度の異なる Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒の負荷応答耐久性. 60°C、酸電解液中での負荷応答サイクルに対する ORR 表面比活性の変化

この活性保持率の違いを調査するために、規則度 46%と 76%の触媒に関して、詳細な構造解析を行った。図 5A, 5B に示す TEM および STEM 像から、規則度に関係なく、負荷応答一万サイクル後もナノサイズのネットワークと中空カプセル構造を維持することが分かった。一方で、図 5C に示す EDX ラインマッピング測定結果から、規則度の違いにより、触媒内部に保持される Fe の量が大きく異なることが確認された。図 5 に示す Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒の初期は、Pt と同程度の Fe を有している。しかしながら、規則度の低い触媒では負荷応答一万サイクル後に Fe の量が 3 割程度まで減少していた。この Fe の顕著な溶出が触媒の表面構造を変化させ、ORR 表面比活性の大きな低下につながったと考えられる。一方で、規則度の高い触媒においては、負荷応答一万サイクル後も 8 割近い Fe を保持しており、原子レベルでの触媒構造の安定性が示された。以上の結果から、規則度の高い触媒は Fe の溶出を抑えることが分かり、負荷応答運転に対して高い ORR 活性を維持するためには高規則化が有効であることが実証された。

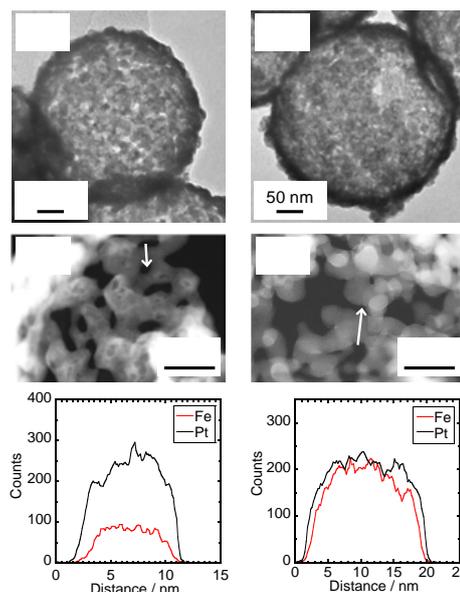


図 5. (a) 規則度 46%、または(b) 規則度 76%の Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>1</sub> ナノ粒子連結触媒における負荷応答一万サイクル後の触媒構造. (A) TEM 像、(B) STEM 像、(C) EDX ラインマッピング

## 2. 2. 金属種・組成の異なる Pt 系ナノ粒子連結触媒の開発

### 2. 2. 1. 金属組成比の異なる Pt<sub>1</sub>-Fe<sub>x</sub> ナノ粒子連結触媒の開発

本グループでは、従来の超臨界処理法を用いた取り組みにおいて、ナノサイズのネットワーク形成は金属種に依存することを確認している。特に、Pt-Fe を含む限られた金属種以外において超臨界処理時にナノ粒子の脱離や凝集が容易に起こり、良好なネットワークを形成できなかった。この問題に対して、シリカコート法は、ネットワーク形成における熱処理の際、シリカコート層がナノ粒子の脱離や凝集を抑制できる。そこで、シリカコート法の汎用性を実証するために、これまで作製できなかった Pt のみを用いた純 Pt ナノ粒子連結触媒の合成を行った。図 6 にシリカコート法(熱処理温度 500°C)で作製した Pt ナノ粒子連結触媒の TEM 像を示す。TEM 像から分かるように、シリカコート法を用いることで、Pt ナノネットワークで構成される中空カプセル構造を形成することに初めて成功した。

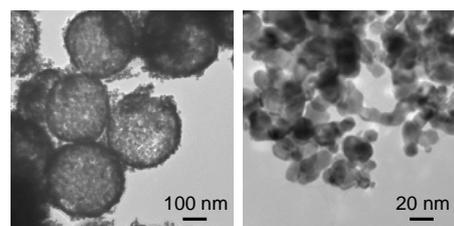


図 6. シリカコート法により作製した純 Pt ナノ粒子連結触媒の TEM 像

さらに重要な点として Pt ナノ粒子連結触媒は、Pt/C に比べて約 4 倍高い ORR 表面比活性を示した (図 7)。このことから、Pt ナノ粒子連結触媒と Pt/C の構造的な違いが ORR 活性に強く影響することが示唆された。即ち、本グループの触媒の特徴であるカーボンフリーのネットワーク構造は ORR 活性を大きく向上させる重要な要因であることが明らかになった。

続いて Fe との合金化の効果を議論するために、シリカコート法を用いて金属組成比 ( $Pt_1-Fe_x$ ,  $x = 3, 1, 1/3$ ) の異なる  $Pt_1-Fe_x$  ナノ粒子連結触媒を作製した。図 7 に示すように、 $Pt_1-Fe_x$  ナノ粒子連結触媒の白金間結合 (Pt-Pt) 距離が ORR 表面比活性と強く相関があることが示された。このことから、 $Pt_1-Fe_x$  ナノ粒子連結触媒は、カーボンフリーのネットワーク構造による約 4 倍の活性向上に加えて、Fe との合金化でさらに 2~3 倍活性が向上し、Pt/C よりも約 10 倍高い、優れた ORR 活性を発現することが示された。

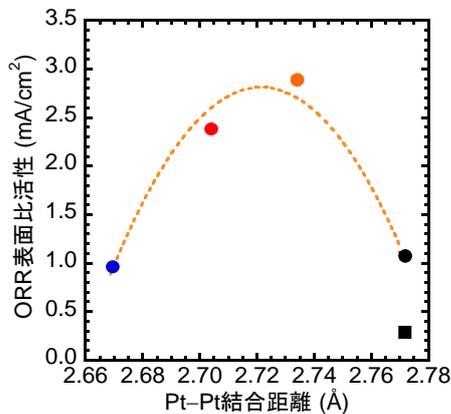


図 7. 市販 Pt/C と  $Pt_1-Fe_x$  ( $x = 3, 1, 1/3, 0$ ) ナノ粒子連結触媒における ORR 表面比活性の比較

### 2. 2. 2. Fe フリー Pt-Co ナノ粒子連結触媒の開発

前述した Fe を含む触媒は、溶出した Fe イオンがフェントン反応により OH ラジカルを生成し、電解質材料の劣化を引き起こす可能性がある。そこで本研究は、Fe フリーの Pt-Co ナノ粒子連結触媒の開発に取り組んでいる。Pt-Co ナノ粒子連結触媒は、従来の超臨界法では作製が困難であったが、シリカコート法を用いることで、初めてナノサイズのネットワーク構造 (図 8) を有する Pt-Co ナノ粒子連結触媒の作製に成功した。さらに、熱処理温度を変えることで、異なる規則度 (0~60%) の Pt-Co 連結触媒が得られた。規則度 58% の Pt-Co ナノ粒子連結触媒は、Pt/C よりも約 10 倍高い ORR 表面比活性を示した。現在、Pt-Co ナノ粒子連結触媒に関して、さらなる触媒構造の制御と触媒性能 (ORR 活性、負荷応答耐久性) の評価を進めている。

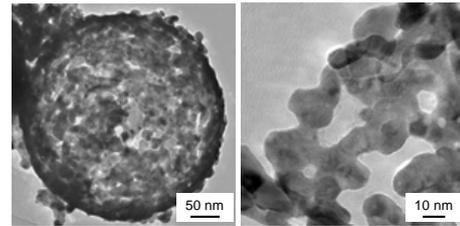


図 8. シリカコート法により作製した Pt-Co ナノ粒子連結触媒の TEM 像

### 3. まとめ及び今後の展望

本研究は、図 2b に示すシリカコート法で、高い原子配列規則度を有するカーボンフリー  $Pt_1-Fe_1$  ナノ粒子連結触媒を開発した。高い規則度により Fe の溶出は抑制され、高い負荷応答耐久性を有することを実証した。さらに、本触媒はカーボンフリーであるため、起動停止耐久性にも優れている。即ち、高い原子配列規則度とカーボンフリー構造を併せ持つ  $Pt_1-Fe_1$  ナノ粒子連結触媒は、高い ORR 活性を示すだけでなく、従来の触媒では実現できなかった起動停止と負荷応答の両方の運転モード対して高い耐久性を示す。

さらに、シリカコート法を用いることで、従来の超臨界法では困難であった純 Pt ナノ粒子連結触媒の開発に成功した。Pt ナノ粒子連結触媒は、従来の Pt/C よりも約 4 倍高い ORR 表面比活性を示し、カーボンフリーのネットワーク構造は ORR 活性の向上に大きく寄与することが明らかになった。また、組成比の異なる  $Pt_1-Fe_x$  ナノ粒子連結触媒を開発し、適切な量の Fe と合金化することでさらに 2~3 倍 ORR 活性が向上することを示した。これらの結果は、ORR 触媒の構造を設計する上で非常に有用な知見である。

本研究は、異なる合金種を用いた Fe フリーの Pt-Co ナノ粒子連結触媒の開発にも初めて成功している。今後、Pt-Co ナノ粒子連結触媒に関するさらなる検討を行い、触媒構造 (規則度など) と触媒性能 (ORR 活性、負荷応答耐久性) の関係性を明らかにすることで、さらなる高性能化を図る。また、開発した Pt-Co ナノ粒子連結触媒は外部企業での評価を進めており、実用化への課題の抽出・改良にも取り組んでいる。今後も、本グループが開発した白金系ナノ粒子連結触媒の実用化に向けた取り組みを精力的に進めていく。

## 【参考文献】

1. T. Tamaki, H. Kuroki, S. Ogura, T. Fuchigami, Y. Kitamoto, and T. Yamaguchi, “Connected nanoparticle catalysts possessing a porous, hollow capsule structure as carbon-free electrocatalysts for oxygen reduction in polymer electrolyte fuel cells”, *Energy Environ. Sci.*, 8, 3545–3549, **2015**.
2. H. Kuroki, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, “Nanostructural Control and Performance Analysis of Carbon-free Catalyst Layers using Nanoparticle-connected Hollow Capsules for PEFCs”, *J. Electrochem. Soc.*, 163 (8), F927–F932, **2016**.
3. H. Kuroki, T. Tamaki, M. Matsumoto, M. Arao, Y. Takahashi, H. Imai, Y. Yoshitaka, and T. Yamaguchi, “Refined Structural Analysis of Connected Platinum-Iron Nanoparticle Catalysts with Enhanced Oxygen Reduction Activity”, *ACS Appl. Energy Mater.*, 1 (2), 324–330, **2018**.
4. Y. Hashimasa, T. Shimizu, Y. Matsuda, D. Imamura, and M. Akai, “Verification of Durability Test Methods of an MEA for Automotive Application”, *ECS Trans.*, 50 (2), 723–732, **2012**.
5. B. Arumugam, B. A. Kakade, T. Tamaki, M. Arao, H. Imai, and T. Yamaguchi, “Enhanced activity and durability for the electroreduction of oxygen at a chemically ordered intermetallic PtFeCo catalyst”, *RSC Adv.*, 4 (52), 27510–27517, **2014**.
6. T. Tamaki, A. Minagawa, B. Arumugam, B. Kakade and T. Yamaguchi, “Highly active and durable chemically ordered Pt-Fe-Co intermetallics as cathode catalysts of membrane-electrode assemblies in polymer electrolyte fuel cells”, *J. Power Sources*, 271, 346–353, **2014**.
7. B. Arumugam, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, “Beneficial Role of Copper in the Enhancement of Durability of Ordered Intermetallic PtFeCu Catalyst for Electrocatalytic Oxygen Reduction”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 16311–16321, **2015**.
8. H. Kuroki, T. Tamaki, M. Matsumoto, M. Arao, K. Kubobuchi, H. Imai, and T. Yamaguchi, “Platinum–Iron–Nickel Trimetallic Catalyst with Superlattice Structure for Enhanced Oxygen Reduction Activity and Durability”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 55 (44), 11458–11466, **2016**.
9. T. Tamaki, A. Koshiishi, Y. Sugawara, H. Kuroki, Y. Oshiba, and T. Yamaguchi, “Evaluation of Performance and Durability of Platinum–Iron–Copper with L1<sub>0</sub> Ordered Face-Centered Tetragonal Structure as Cathode Catalysts in Polymer Electrolyte Fuel Cells”, *J. Appl. Electrochem.*, 48(7), 773–782, **2018**.
10. New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), “Cell Evaluation and Analysis Protocol Guideline”, **2012**.

# 酸高密度型細孔フィリング薄膜 および高温低湿度対応膜電極接合体の開発

大柴 雄平、小坂 恵夢、日産アーク、山口 猛央

## 1. はじめに

固体高分子形燃料電池（Polymer electrolyte fuel cell: PEFC）用の電解質材料（電解質膜、触媒層アイオノマー）は、発電性能や発電環境を左右する重要な中枢部材の一つである。広い湿度および温度範囲で高いプロトン伝導性を発現する電解質材料の開発が、この分野のブレイクスルーに必要不可欠である。従来の電解質材料では、水を介したプロトン伝導が主であるため、水の少ない低湿度環境では著しくプロトン伝導性が低下する。この問題に対して、本グループは、スルホン酸基が高密度に密集した構造（酸高密度構造）を持つ電解質材料において、低湿度環境でもプロトンを高速に伝導する現象（Packed acid mechanism）を実験と量子化学計算の双方から明らかにしてきた。<sup>1-5</sup> この現象は、酸高密度構造により、プロトン移動と再配向がそれぞれ起こりやすい距離が形成され、水が大きく運動しなくても、プロトンが連続的に移動し得る。

この研究成果を活かし、本グループでは、図 1a に示す酸高密度構造を持つ高 IEC（Ion exchange capacity: IEC）細孔フィリング薄膜を開発し、高温低湿度環境で高いプロトン伝導性を示すことに成功した。<sup>6</sup> この膜は、高い機械強度を有する超高分子量ポリエチレン多孔質基材細孔内に、高いスルホン酸基密度（高 IEC）のパーフルオロスルホン酸ポリマー（poly-perfluorosulfonic acid: PFSA）を充填した膜厚 7 μm の非常に薄い電解質膜である。市販の低 IEC キャスト膜（Nafion 211）では、低湿度下で低いプロトン伝導性を示す。一方で、高 IEC キャスト膜の場合、低湿度で高いプロトン伝導性を示すものの、水に対して極度に膨潤するため、燃料電池への応用が困難である。本グループの細孔フィリング薄膜は、機械強度の高い基材で電解質ポリマーの膨潤を抑えるため、湿潤時でもほぼ膨潤しない（面積変化率が小さい、図 1b）。さらに、高いスルホン酸基密度を有するため、高温低湿度においても優れたプロトン伝導性（図 1c）を示す。このように、多孔質基材の微小な細孔空間内へ電解質ポリマーを充填する細孔フィリング法は、酸高密度構造の構築や膨潤抑制の観点から非常に有用なアプローチである。<sup>7-9</sup>

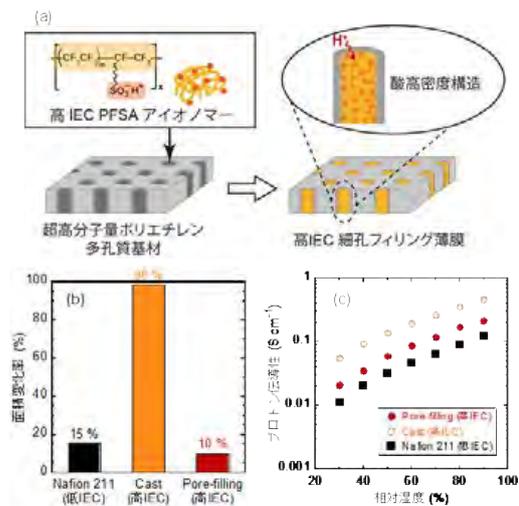


図 1. (a) ポリエチレン多孔質基材に高 IEC の PFSA ポリマーを充填した高 IEC 細孔フィリング薄膜の模式図。市販の低 IEC ナフィオン膜、高 IEC キャスト膜、高 IEC 細孔フィリング薄膜の (b) 湿潤時の面積変化率と (c) プロトン伝導性の湿度依存性

そこで、2019 年度は、日産アークと共同で、高 IEC 細孔フィリング薄膜の構造解析を行った。高温低湿度環境下での高速プロトン伝導に必要な構造因子を理解することで、電解質膜のさらなる高性能化へフィードバックできる。

さらに、本グループは、高 IEC 細孔フィリング薄膜を組み込んだ膜電極接合体（Membrane-electrode assembly: MEA）を開発し、従来の MEA では実現できなかった高温低湿度運転での高い発電性能を達成している。<sup>6</sup> さらに、実用化を見据えて、高温低湿度（110°C、30% RH）での燃料電池運転における高 IEC 細孔フィリング薄膜の耐久性を評価し、従来のナフィオン膜よりも薄いにも関わらず、同程度の高い膜耐久性を有することを実証した。<sup>10</sup> そこで、この高い膜耐久性を明らかにするために、試験後の膜の構造解析を行い、MEA 運転中における高 IEC 細孔フィリング薄膜の劣化機構を議論した。

## 2. 実験、結果及び考察

### 2.1. 酸高密度型細孔フィリング薄膜の構造解析

市販ナフィオン膜に代表される PFSA キャスト膜はスル

ホン酸基が集合したチャンネル構造を有しており、そのチャンネル構造を介してプロトンを伝導することが知られている。しかしながら、高 IEC 細孔フィリング薄膜に関しては、ポリエチレン多孔質基材のマイクロな細孔内部に充填されたポリマー構造はこれまで不明であった。そこで、日産アークにおいて、クライオプラズマ集束イオンビーム (Cryo-PFIB) を用いて、冷却下で高 IEC 細孔フィリング薄膜の薄い切片を作製し、膜内部のナノ構造を TEM-EDX 測定から観察した。高 IEC 細孔フィリング薄膜は、高 IEC の PFSA ポリマーの溶液 (溶媒には、水/エタノール混合溶媒 (H<sub>2</sub>O:EtOH = 2/1 重量比) を使用) を膜厚 6 μm のポリエチレン多孔質基材上に滴下し、徐々に乾燥させることで、細孔内部までポリマーを充填させることで作製した。

図 2b, c に示す EDX マッピングから内部に充填した高 IEC の PFSA ポリマー由来の F, S 元素の分布が観察された。F 元素は PFSA ポリマーの主鎖骨格に由来し、S 元素は PFSA ポリマーのプロトン伝導を担うスルホン酸基に由来する。黄色の点線で囲んだ箇所が基材細孔に対応する部分であり、その細孔内部にはスルホン酸基が集合した構造 (S 元素が濃い部分) が観察され、充填ポリマーはチャンネル構造を形成することが示唆された。

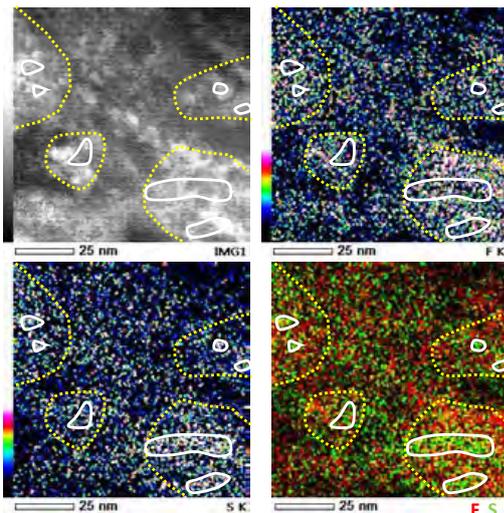


図 2. 高 IEC 細孔フィリング薄膜の膜内部における TEM-EDX 測定結果. (a) TEM 像, (b) F 元素と (c) S 元素の EDX マッピング. (d) F と S 元素のマッピングを重ね合わせた像

このように、日産アークとの共同研究において、細孔フィリング膜内部のマイクロ構造を解析することに成功した。また、2018 年度の研究報告で示したように、本研究は、細孔フィリング薄膜作製時の PFSA ポリマー溶液に用いる溶媒によってプロトン伝導性が異なることを明らかにしている。プロトン伝導性の違いは、細孔内部の PFSA ポリマー構造が異なるためと推測される。このことから、高 IEC 細孔フィリング薄膜の構造解析を引き続き進め、細孔内のプロトン伝導チャンネル構造とプロトン伝導性の関係性を明らかにすることで、細孔フィリング薄膜のさらなる高性能化にフィードバックさせる。

## 2. 2. 酸高密度型細孔フィリング薄膜を用いた MEA の耐久性評価

本研究では、高 IEC 細孔フィリング薄膜 (膜厚 7 μm) を用いた MEA において高温低湿度運転での高い発電性能と良好な OCV 保持性能を実証してきた。<sup>6, 10</sup> 図 3b-d にこれまでの成果をまとめている。図 3a に示すように、高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA は、低 IEC の市販ナフィオン膜 (Nafion 211、膜厚 25 μm) よりも高温低湿度環境で高い電池性能 (セル温度 80°C、ガス入口湿度を低湿度の 20% RH で運転) を発現する。膜 IR 損 (図 3b) を比較すると、高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA では、ナフィオン膜の MEA よりも顕著に IR 損が小さい。さらに、ナフィオン膜の場合、電流密度に対して、線形に IR 損が増加するのに対して、細孔フィリング薄膜の場合は、電流密度が高くなると IR 損の増加が小さくなる。これは、細孔フィリング薄膜の低湿度での高いプロトン伝導性と高い水透過度に起因する。細孔フィリング薄膜は、ナフィオン膜よりも薄膜であるため、高い水透過度を有し、カソードでの生成水によって MEA 全体で高い湿度を維持し、膜 IR 損の低減につながる。

さらに、細孔フィリング薄膜の発電条件下における化学耐久性を、110°C、30% RH における開回路電圧 (OCV) 保持試験によって評価した。市販ナフィオン膜を用いた MEA では、水素クロスオーバー電流密度が約 35 時間で劇的に増加し、それに伴い OCV が低下した。一方で、細孔フィリング薄膜では OCV が時間とともに緩やかに減少した。電解質膜劣化の目安となる水素クロスオーバー電流密度が初期値の 10 倍となる時間については、市販膜では 40 時間、細孔フィリング膜では 55 時間であったことから、細孔フィリング膜の方が薄膜であるにも関わらず、高い化学耐久性を有することが示された。

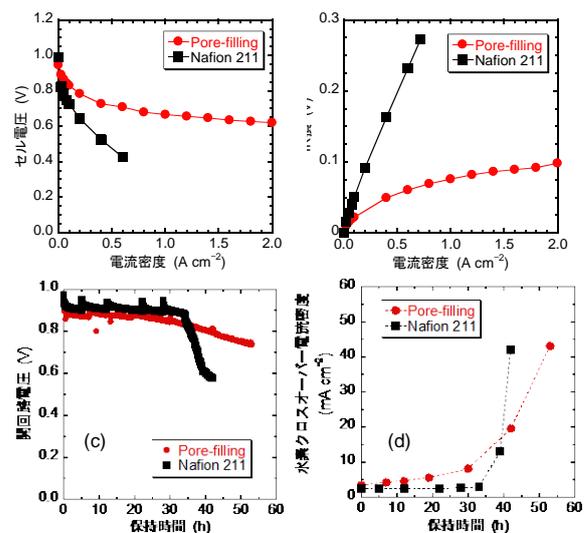


図 3. (●) 高 IEC 細孔フィリング薄膜及び (■) 低 IEC 市販ナフィオン膜 (Nafion 211) を用いた MEA の発電性能と OCV 保持耐久性. (a, b) 高温低湿度 (80°C, 20% RH) 運転における (a) 燃料電池発電性能と (b) 膜 IR 損. (c, d) 110°C, 30% RH での OCV 保持試験における (c) OCV と (d) 水素クロスオーバー電流密度の時間変化

そこで、2019年度はOCV保持試験前後の膜構造の解析を行い、膜劣化機構を議論した。図4aの膜断面SEM像で示すように、初期のナフィオン膜は29 $\mu\text{m}$ の膜厚を有する。一方で、OCV保持試験後のMEA断面SEM像（図4b）から、膜厚は約6 $\mu\text{m}$ まで大きく減少することが分かった。市販ナフィオン膜を用いたMEAでは、OCV保持試験中の膜の分解生成物に起因するフッ化物イオンの排出速度が大きく、膜自体が化学的に劣化し、膜厚が減少したと示唆された。細孔フィリング薄膜においては、図5a, cに示すように、OCV保持試験後も膜厚が保持されていることが確認された。さらに、OCV保持試験中のフッ素放出量も極めて少なかった。これは、図5b, dに示す膜のF元素マッピングからもサポートされており、細孔フィリング薄膜においてはOCV試験後のPFSAポリマーに起因するFの漏出は僅かであった。以上の結果から、従来のナフィオン膜と細孔フィリング薄膜は、MEA運転時に異なるメカニズムで劣化することが示唆された。

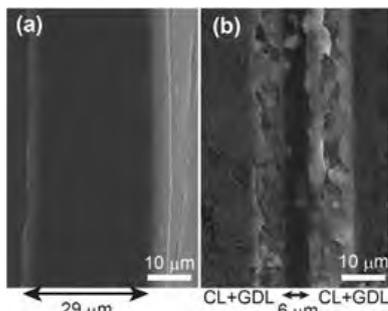


図4. (a) 市販ナフィオン膜の断面SEM像、(b) 110°C、30% RHでのOCV保持試験後におけるナフィオン膜を用いたMEAの断面SEM像

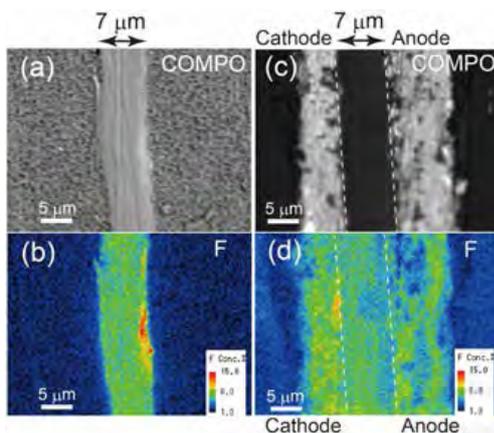


図5. (a, b) 高 IEC 細孔フィリング薄膜の断面SEM像とF元素マッピング、(c, d) 110°C、30% RHでのOCV保持試験後における高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いたMEAの断面SEM像とF元素マッピング

### 3. まとめ及び今後の展望

本研究は、高 IEC の PFSA ポリマーを膜厚 7  $\mu\text{m}$  のポリエチレン多孔質基材に充填した高 IEC 細孔フィリング薄膜が、細孔内部にプロトン伝導チャンネル構造（酸高密度構造）を有することを明らかにした。さらに、高 IEC 細孔フィリング薄膜を組み込んだMEAは、高温低湿度での高い発電性能に加えて、高いOCV保持（化学的）耐久性を有する。薄膜であるにも関わらず細孔フィリング薄膜において高い化学耐久性を示すのは、機械強度の高い超高分子量ポリエチレン多孔質基材を用いたためと考えられる。

このように、高 IEC 細孔フィリング薄膜は、従来膜では実現できなかった高温低湿度での高い発電性能と高い化学的耐久性を両立する膜材料である。開発した高 IEC 細孔フィリング薄膜の実用化に向けて、外部企業での評価を進めている。得られた結果から実用化に対する課題の抽出、改良を行うことで、次世代PEFCへの細孔フィリング薄膜の導入を積極的に推進していく。

#### 【参考文献】

1. G. M. Anilkumar, S. Nakazawa, T. Okubo, and T. Yamaguchi, "Proton conducting phosphated zirconia-sulfonated polyether sulfone nanohybrid electrolyte for low humidity, wide temperature PEMFC operation", *Electrochem. Commun.*, 8, 133–136, **2006**.
2. T. Ogawa, T. Aonuma, T. Tamaki, H. Ohashi, H. Ushiyama, K. Yamashita, and T. Yamaguchi, "The proton conduction mechanism in a material consisting of packed acids", *Chem. Sci.*, 5, 4878–4887, **2014**.
3. T. Ogawa, K. Kamiguchi, T. Tamaki, H. Imai and T. Yamaguchi, "Differentiating Grotthuss Proton Conduction Mechanisms by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Analysis of Frozen Samples", *Anal. Chem.*, 86 (19), 9362–9366, **2014**.
4. T. Ogawa, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, "Proton Conductivity of Organic-Inorganic Electrolyte for Polymer Electrolyte Fuel Cell", *Chem. Lett.*, 46, 204–206, **2017**.
5. T. Ogawa, H. Ohashi, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, "Proton Diffusion Facilitated by Indirect Interactions Between Proton Donors Through Several Hydrogen Bonds", *Chem. Phys. Lett.*, 731, 136627, **2019**.
6. Y. Oshiba, J. Tomatsu, and T. Yamaguchi, "Thin pore-filling membrane with highly packed-acid structure for high temperature and low humidity operating polymer electrolyte fuel cells", *J. Power Sources*, 394, 67–73, **2018**.
7. T. Yamaguchi, F. Miyata, and S. Nakao, "Polymer electrolyte membranes with pore-filling structure for a direct methanol fuel cell", *Adv. Mater.*, 15, 1198–1201, **2003**.
8. T. Yamaguchi, Z. Hua, T. Nakazawa, and N. Hara, "An

- Extremely Low Methanol Crossover and Highly Durable Aromatic Pore-Filling Electrolyte Membrane for Direct Methanol Fuel Cells”, *Adv. Mater.*, 19, 592–596, **2007**.
9. N. Hara, H. Ohashi, T. Ito, and T. Yamaguchi, “Rapid proton conduction through unfreezable and bound water in a wholly aromatic pore-filling electrolyte membrane”, *J. Phys. Chem. B*, 113, 4656–4663, **2009**.
  10. Y. Oshiba, M. Kosaka, and T. Yamaguchi, “Chemical durability of thin pore-filling membrane in open-circuit voltage hold test”, *Int. J. Hydrogen Energy*, 44, 28996–29001, **2019**.

## 業 績

### 【原著論文】

1. Yuhei Oshiba, Meguru Kosaka, and Takeo Yamaguchi  
“Chemical Durability of Thin Pore-filling Membrane in Open-circuit Voltage Hold Test”  
*International Journal of Hydrogen Energy*, 44(54), 28996–29001 (2019).
2. Hidenori Kuroki, Keiichiro Onishi, Keiichi Asami, and Takeo Yamaguchi  
“Catalyst Slurry Preparation Using a Hydrodynamic Cavitation Dispersion Method for Polymer Electrolyte Fuel Cells”  
*Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(42), 19545–19550 (2019).
3. Hidenori Kuroki, Miyanishi Shoji, Ayaka Sakakibara, Yuhei Oshiba, and Takeo Yamaguchi  
“Highly Stable Membrane Electrode Assembly Using Ether-Linkage-Free Spirofluorene-Based Aromatic Polyelectrolyte for Direct Formate Solid Alkaline Fuel Cells”  
*Journal of Power Sources*, 438, 226997 (2019).
4. Takaya Ogawa, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi  
“Proton Diffusion Facilitated by Indirect Interactions Between Proton Donors Through Several Hydrogen Bonds”  
*Chemical Physics Letters*, 731(16), 136627 (2019).
5. Yoshiyuki Sugita, Takanori Tamaki, Hidenori Kuroki, and Takeo Yamaguchi  
“Connected Iridium Nanoparticle Catalysts Coated onto Silica with High Density for Oxygen Evolution in Polymer Electrolyte Water Electrolysis”  
*Nanoscale Advances*, 2(1), 171–175 (2020).

### 【総説】

6. 山口猛央  
「細孔フィリング膜のシステム的な設計と展開」  
*成形加工*, 31(12), 442–446 (2019).
7. 山口猛央、宮西将史  
「固体高分子形および固体アルカリ型燃料電池の進化を支える高分子電解質膜の展開」  
*高分子*, 69(3), 98–100 (2020).

### 【口頭発表】

### 【招待・依頼講演】

#### ・国際学会

1. Yuhei Oshiba  
“Design of Thin Pore-filling Polymer Electrolyte Membranes for Next-generation Fuel Cells”  
*International Conference on Separation Science and Technology (ICST2019)*, Kerala, India, December, 15<sup>th</sup> (2019).
2. Takeo Yamaguchi  
“Systematic Membrane Design for Fuel Cells and Bio-inspired Materials”  
*International Conference on Separation Science and Technology (ICST2019)*, Kerala, India, December, 14<sup>th</sup> (2019).
3. Yuhei Oshiba  
“Systematic Design of Thin Pore-filling Polymer Electrolyte Membranes for Next-generation Fuel Cells”  
*PSRT Lecture Series-2 at CUSAT*, Kerala, India, December, 13<sup>th</sup> (2019).
4. Takeo Yamaguchi  
“Systematic material design for energy applications”  
*International Conference on Energy and Environment (iCEE 2K19)*, Kerala, India, December, 12<sup>th</sup> (2019).
5. Takeo Yamaguchi  
“Hydrogen Economy and Systematic Material Design for Energy Applications”  
*International Conference on Advanced Functional Materials (ICAFM 2019)*, Kerala, India, December 9<sup>th</sup> (2019).
6. Takeo Yamaguchi  
“Systematic Membrane Design for Fuel Cells, Bio-inspired Membranes and Anti-fouling Membranes for water purification”  
*MIRAI short course for PhD*, Lund, Sweden, November 18<sup>th</sup> (2019).
7. Takeo Yamaguchi  
“Necessity of hydrogen society and systematic material design for fuel cells and water electrolysis”  
*18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019)*, Sapporo, Japan, September 24<sup>th</sup> (2019).

8. Takeo Yamaguchi  
 “Systematic material design for fuel cells, water electrolysis, bio-inspired membranes, and forward osmosis processes”  
*Seminar at National Taiwan University of Science and Technology*, Taiwan, China, September 3<sup>rd</sup> (2019).
9. Takeo Yamaguchi  
 “Highly durable aromatic anion exchange membranes and direct formate solid alkaline fuel cells”  
*12th conference of the Aseanian Membrane Society (AMS 12)*, Jeju, Korea, July 3<sup>rd</sup> (2019).
- ・国内学会
10. 山口猛央  
 「2050年から考えるエネルギー・医療・水技術～水素・燃料電池材料、Point of Care、水処理膜～」  
 第2回ナノ・マイクロ計測化学セミナー、東北大学、宮城、2019年10月4日
11. 山口猛央  
 「エネルギー・水技術の将来展望 ～水素・燃料電池および正浸透海水淡水化技術の未来～」  
 食品膜・分離技術研究会第31回春季研究例会、川口、埼玉、2019年6月13日
- (一般講演)
- ・国際学会
12. Hidenori Kuroki, Shoji Miyaniishi, Takanori Tamaki, Sankear Sasidharan, Gopinathan M. Anilkumar, and Takeo Yamaguchi  
 “Highly Durable Membrane Electrode Assembly Using Carbon-Free Connected Platinum–Iron Catalyst for Direct Formate Solid Alkaline Fuel Cells”  
*18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019)*, Sapporo, Japan, September 24<sup>th</sup> (2019).
13. Yu Imura, Hidenori Kuroki, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi  
 “Highly Active and Durable Carbon-Free Connected Platinum–Iron Catalyst with an Enhanced Chemical Ordering Structure for Oxygen Reduction Reaction in PEFCs”  
*18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019)*, Sapporo, Japan, September 24<sup>th</sup> (2019).
14. Liao Qiancheng, Hidenori Kuroki, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi  
 “Development and Structural Control of Carbon-Free Connected Platinum–Cobalt Catalysts for Oxygen Reduction Reaction in PEFCs”  
*18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019)*, Sapporo, Japan, September 24<sup>th</sup> (2019).
15. Yoshiyuki Sugita, Takanori Tamaki, Hidenori Kuroki, and Takeo Yamaguchi  
 “Carbon-Free Connected Ir Nanoparticle Catalysts for Oxygen Evolution Reaction in Polymer Electrolyte Water Electrolysis”  
*18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019)*, Sapporo, Japan, September 26<sup>th</sup> (2019).
16. Takeo Yamaguchi  
 “Systematic Material Design and Development for Fuel Cells and Water Electrolysis”  
*RWTH - Tokyo Tech Joint Workshop on Sustainable Energy*, Aachen, Germany, May 22<sup>nd</sup> (2019).
- ・国内学会
17. 黒木秀記、大西慶一郎、浅見圭一、山口猛央  
 「流体力学的キャビテーション分散法を用いた触媒スラリーの調製とPEFC発電性能」  
 化学工学会第85年会、関西大学、大阪、2019年3月17日
18. 大柴雄平、小坂恵夢、山口猛央  
 「高スルホン酸基密度アイオノマー充填細孔フィリಂಗ電解質薄膜を用いた膜電極接合体の化学耐久性評価」  
 化学工学会第85年会、関西大学、大阪、2019年3月17日
19. 井村悠、黒木秀記、田巻孝敬、山口猛央  
 「シリカコート法によるPEFC用Pt-Feナノ粒子連結触媒の構造制御と酸素還元特性の向上」  
 化学工学会第85年会、関西大学、大阪、2019年3月16日
20. 杉田佳之、田巻孝敬、黒木秀記、山口猛央  
 「固体高分子形水電解用Ir-Ruナノ粒子連結触媒の開発」  
 化学工学会第85年会、関西大学、大阪、2019年3月15日
21. Liao Qiancheng, Hidenori Kuroki, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi  
 “Connected Pt-Co Catalysts Possessing Chemically Ordered Structures for Improved Oxygen Reduction Performances”  
 化学工学会第85年会、関西大学、大阪、2019年3月

## 【研究開発部】高効率燃料電池開発

15 日

22. 黒木秀記、藤田遼介、田巻孝敬、山口猛央  
「固体高分子形燃料電池における高活性・高耐久カーボンフリー白金合金ナノ粒子連結触媒の開発」  
第8回 JACI/GSC シンポジウム、東京国際フォーラム、  
東京、2019年6月24日
  
23. 大柴雄平、戸松仁、小坂恵夢、山口猛央  
「高温低湿度作動に向けた固体高分子形燃料電池用細孔フィリング電解質薄膜の開発と電池特性評価」  
第8回 JACI/GSC シンポジウム、東京国際フォーラム、  
東京、2019年6月24日

### 【特許】

- (1) 国内特許出願 1 件

# 「抗菌・抗ウイルス研究」グループ

グループリーダー 窪田 吉信、石黒 齊

## 【基本構想】

本プロジェクトでは、地域イノベーション戦略支援プログラム以降のテーマとして、引き続き「KISTEC 機器の共用化」により、光触媒加工品やその他抗ウイルス加工品による抗ウイルス性能評価試験を行い、様々な企業や研究機関による抗ウイルス加工品の研究開発を推進することを目的とした取り組みを行っている。また、抗ウイルス加工品に限らず、抗菌加工品に関しても性能評価試験の提供も行っている。提供している性能評価試験は JIS/ISO に基づいた抗菌・抗ウイルス性能評価が主であるが、JIS/ISO では対応できない加工品についても、それぞれの製品開発の特徴に合わせて、JIS/ISO を応用させた性能評価試験方法を提供している。また、本プロジェクトでは抗菌分野について ISO 17025 を取得しており、国際的に通用する評価機関として、日々その技術や品質の向上に努めながら、KISTEC で展開していく評価技術センター機能の構築に向けた取り組みを行っている。また、新たな試験方法の提供に向けた取り組みや共同研究を通じた新規 ISO/JIS の作成などへの取組を続けている。

## 1. 2019 年度の研究目的

プロジェクト 15 年目となる 2019 年度は、以下の各項目について、検討を行った。

### (1) KISTEC 機器の共用化(受託試験)と ISO 17025 改訂に伴う試験室運営

ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)は、試験所及び校正機関がある試験や校正等を実施する能力があるとして認められる認定を受けるための規格である。我々は以前より、抗菌分野の中で、繊維状製品の抗菌性能評価試験方法である JIS L 1902 について、ISO/IEC 17025 の認定を取得し、抗菌試験の提供を行っている。一方、抗菌分野に関しては、平板上製品の抗菌性能評価方法である JIS Z 2801 という規格についても、ISO/IEC 17025 の認定取得が可能である。そこで、本年は JIS Z 2801 について、ISO/IEC 17025 の取得を行うと共に、2017 年の ISO/IEC 17025 の大幅な改訂を受けて、2017 年版に適合した運用を開始し、再認定の審査を受けることで、ISO/IEC 17025 を継続して取得することを目的とした活動を行った。

地域イノベーション戦略支援プログラムでは、KISTEC 機器の共用化として、KISTEC 保有の機器を用いた抗菌・抗ウイルス性能評価試験方法の確立と提供により、県内外や国内外の多くの企業や研究機関の研究開発を推進することを目的として活動を行ってきた。また、微生物を取り扱う試験の為、KISTEC 研究員が各種作業を代行して行いながら活動を行った。今年度についても、地域イノベーション戦略支援プログラム終了後も引き続き、抗菌・抗ウイルス性能評価試験の提供を行うことを目的として活動を行った。

また、試験品の形状によっては、通常の JIS/ISO では対応できない試験品が多くあることから、オーダーメイドの性能評価試験方法を作成し、試験を行った。その他、空気

清浄機等を用いた試験のために整備したグローブボックスを用いた試験やそれを更に応用させた実環境中のウイルス含有飛沫の付着状況を想定した試験方法の提供も開始した。

### (2) 防藻性能評価試験方法の JIS 化に向けた取り組み

我々は 2018 年度より、光触媒加工品を用いた防藻性能評価方法である ISO 19635 を国内規格である JIS として制定するための基礎検討を行っている。また、本テーマは、光触媒工業会との共同研究及び経済産業省「平成 31 年度戦略的国際標準化加速事業：産業基盤分野に係る国際標準開発活動 光触媒の防藻性能試験法に関する JIS 開発」として、光触媒工業会より委託を受けて推進した。具体的な内容として、防藻性能試験方法素案のブラッシュアップ、防藻剤併用の光触媒加工品による防藻性能評価試験、光触媒加工品が実際の環境下でどの程度の防藻性能を発揮するかの実証試験を行った。

### (3) 新規機能性物質の探索と抗ウイルス性能

昨年度、銅化合物や銀化合物以外で、高い抗菌・抗ウイルス活性を持つ金属化合物の探索を行い、三酸化モリブデン( $\text{MoO}_3$ )に高い抗ウイルス活性があることを見出しており、酸化モリブデン担持酸化チタン( $\text{Mo/TiO}_2$ )を作製し、高い抗ウイルス性能を持つ可視光応答形光触媒の作製に成功している。今年度は、 $\text{MoO}_3$  が持つ高い抗ウイルス性の発生メカニズムの探索について、検討を行った。

## 2. 2019 年度の研究成果

以下に挙げるのは、2019 年度の具体的な研究成果であり、それぞれの項目について順調な成果を上げることが出来た。

(1) KISTEC 機器の共用化(受託試験)と ISO 17025 改訂に伴う試験室運営

2017 年の ISO/IEC 17025 の改訂内容として、①文章の構成、②他の関連企画との整合性、③要求事項の記載方法、④リスクと公平性及び⑤その他として不確かさやトレーサビリティの徹底、などが挙げられる。また、ISO/IEC 17025 の改訂後は速やかに、移行作業を完了する必要があるため、我々は各規程の見直し等の作業により新しい ISO/IEC 17025 に対応した運営を開始した。また、再認定審査に関しても、対応し再認定を取得していた。このように認定を維持した ISO/IEC 17025 をベースとして、以下の KISTEC 機器の共用化について、活動を進めた。

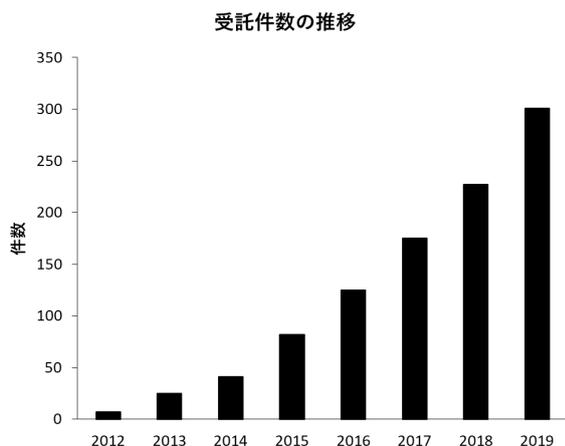


図 1. 年度毎の受託件数の推移

図 1 に示すように、KISTEC 機器の共用化として行った依頼件数(のべ試験数ではないことに注意)は 300 件を超えることとなった。これは、昨年度を大幅に超える依頼数であったが、国内外における新型コロナウイルスの流行によることも影響していると考えられる。

試験の対象となった抗菌・抗ウイルス加工品については、昨年度に引き続き、可視光応答形光触媒を用いた加工品による抗ウイルス性能評価が最も多かった。それに続いて、光触媒加工品以外の抗ウイルス加工品を用いて、抗バクテリオファージ性能評価が多い傾向であった。バクテリオファージは光触媒加工品の抗ウイルス性能評価方法でモデルウイルスとして使用されている宿主を大腸菌とするウイルスであり、簡便な方法で性能評価を行うことが可能となっている。そのため、インフルエンザウイルスやネコカリシウイルス(ノロウイルス代替)を用いる前の試験として利用されたと考えられる。また、その他、グローブボックスを用いたウイルス噴霧試験や花粉アレルギーを標的とした試験等の応用試験も行った。今後、取り扱う微生物の種類を拡充、新規評価方法の開発などにより、更に多くのニーズに合った試験を提供できるように活動を続けていく予定である。

(2) 防藻性能評価方法の JIS 化に向けた取り組み

光触媒による防藻性能評価試験として、ISO 19635 が 2016 年に制定されており、その JIS 化に向けた取り組みを

行っている。その中で、本年度は防藻剤を併用した光触媒加工品による ISO 19635 試験及び防藻性能実証試験を行った。

表 1. ISO 19635 試験による防藻活性値

(%)	防藻剤無し	防藻剤1併用	防藻剤2併用	防藻剤3併用
24 時間	光触媒加工品	光触媒加工品	光触媒加工品	光触媒加工品
0.0 mW/cm <sup>2</sup>	-15.7	-10.8	-1.9	-9.4
1.0 mW/cm <sup>2</sup>	100	96.6	99.1	101.6

防藻剤を併用した ISO 19635 試験の結果を表 1 に示すが、24 時間暗所の条件下では防藻剤の有無に関わらず、防藻活性は得られなかったが、1.0 mW/cm<sup>2</sup> で 24 時間の紫外光照射を行った群では、高い防藻活性が得られた。また、紫外光照射を行った群についても、防藻剤併用の効果は認められなかった。ISO 19635 では、葉緑素の吸光度から防藻活性を計算する方法であることから、防藻剤による防藻メカニズムが葉緑素の吸光度に影響を与えない場合があるため、暗所における防藻活性が認められていない可能性が示唆された。

防藻性能実証試験では、昨年度末に設置した試験品の状況をモニタリングすることで確認を行った。設置後半年後の状況を図 2 に示す。



図 2. 防藻性能実証試験の確認

図 2 に明らかなように、一部の試験片にのみ緑色の藻類の増殖が認められている。この試験片は光触媒未加工の親水処理試験片であり、親水処理による水分の保持とそれに伴う汚れ等の付着が藻類の増殖に有意な状況を作り出したと思われる。一方で、光触媒加工試験片及び親水処理未処理試験片には藻類の付着が認められなかった。親水処理未処理加工試験片では水分等の保持が足りず、光触媒加工試験片では、親水性があったとしても光触媒による防汚効果が藻類の増殖を抑制したと考えられる。

(3) 新規機能性物質の探索と抗ウイルス性能

MoO<sub>3</sub> の抗ウイルス活性機構を検討するために、二酸化モリブデン(MoO<sub>2</sub>)や酸化タングステン(WO<sub>3</sub>)による抗ウイルス活性と比較試験を行った。抗ウイルス活性の確認はバクテリオファージ、インフルエンザウイルス、ネコカリシウイルスを用いて行った。

その結果、MoO<sub>3</sub> の抗ウイルス活性は、ガラスに担持し

た状態だけではなく、粉末を4時間浸して、その成分を抽出した液についても高い抗ウイルス活性が得られることが明らかとなった(図3)。そこで、その抽出液の詳細について、更に検討を行った結果、水素イオンやMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>などのイオン成分が高い抗ウイルス活性を発揮する可能性であることを明らかとした。

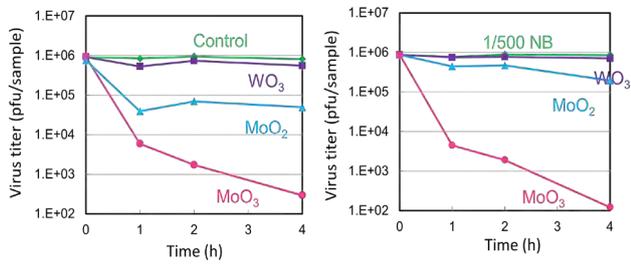


図3. バクテリオファージQβに対する抗ウイルス活性  
 左図：ガラスに担持した材料の抗ウイルス活性、  
 右図：1/500NBで粉末を抽出した液の抗ウイルス活性

# KISTEC 機器の共用化と ISO 17025 改正に伴う試験室運営

永井 武、砂田 香矢乃、畑山 靖佳、石黒 斉

## 1. はじめに

我々は、地域イノベーション戦略支援プログラム終了後も、引き続き、「KISTEC 機器の共用化」として、KISTEC が保有する機器を用いて、数多くの抗菌・抗ウイルス研究開発支援を行っている。特に、病原性微生物を使用することから、KISTEC 研究員が評価技術サービスの提供を行っている。昨年度は、ウイルス噴霧試験の提供を開始しており、今後さらに新しい評価方法を提供するべく、活動を行っている。このような、評価技術サービスの品質や技量を維持向上させていくことが非常に重要であることから、我々は ISO/IEC 17025(JIS Q 17025)を取得し、認定試験所としての活動を行っている。

ISO/IEC 17025(JIS Q 17025)とは、「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」として、特定の試験や校正業務を行う機関がその能力、公平性及び一貫した運営を遂行するための規格である。これまで ISO/IEC 17025:2005 として、運用がされてきた本規格であり、この規格について、製品技術基盤機構では抗菌分野の認定が行われている。我々を始め、幾つかの試験機関、企業はこの抗菌分野において試験所としての能力の認定を受けながら、抗菌試験を行っている、更に、光触媒工業会(PIAJ)や(一社)抗菌製品技術協議会(SIAA)等は、その試験所認定により試験の技量や運営の確認をすることで、各社による PIAJ マークや SIAA マークの取得に向けた試験データの提供を許可している。このように、ISO/IEC 17025 は試験所にとって、重要な規格であるが、これまでその運用規格は 2005 年に制定されたものが用いられてきた。一方で近年、国内外の状況は 2005 年から大きく変わっており、現在の状況に合わせた新しい改訂版の作成が重要となった。その結果、2017 年 11 月 30 日にその内容を大幅に変更し、近年の状況に合わせた改訂版(ISO/IEC 17025:2017)が制定された。

ISO/IEC 17025 は国際間における試験報告書や校正証明書の相互認証としても用いられており、この改訂により、速やかに 2017 年版の ISO/IEC 17025 への移行が必要となった。更に、本邦においてもその対応規格である JIS Q 17025 の改訂が進められ、JIS Q 17025:2018 として、新しい改訂版が制定、新たな規格に対応した管理体制を整えることで、改めて試験所として ISO 17025 の認定機関となる必要がある。

本報告では ISO/IEC 17025 の重要な改訂の概要を知っていただくと共に、2019 年度の KISTEC 機器の共有化の状況について報告する。

## 2. ISO/IEC 17025:2017 で新たに規定された項目と KISTEC 機器共用化の取り組み

### 2.1 ISO/IEC 17025 の重要な改訂について

ISO/IEC 17025 の制定から 10 年後の 2005 年に、定期見直しが行われ、主に技術的要求事項に関して見直しが必要であることが提案され、そこから、全体の見直しを行うこととなった。改訂の必要性として、以下のような意見があった。

- ・ いくつかの引用規格が現存していない、もしくは最新版ではない
- ・ 用語の定義が古く、混乱を生じている。
- ・ 規範的要求が多く、パフォーマンス及びプロセススペースである他の最新国際規格と同調していない。
- ・ コンピュータによる電子的な管理を取り込むべき

そこで、他の関連規格と整合性を図り、より実用的になるよう、ISO/IEC 17025 の改定が行われた。主な改定点を以下に示す。

#### ① 文書の構成

文書の構成は、旧版「4 項：品質全般、5 項：技術全般」から、新版「4 一般要求事項、5 組織構成、6 資源、7 プロセス、8 マネジメントシステム」に変更された。また、企業及び法人として、ISO 9001 / JIS Q 9001 (品質マネジメントシステム) に適合している組織は、マネジメントシステム (4 一般要求事項、5 組織構成に関する要求事項、6 資源に関する要求事項、7 プロセスに関する要求事項) の項目を ISO 9001 / JIS Q 9001 で運用することができるようになった (選択肢 B)。当試験所は、ISO 9001 / JIS Q 9001 の認定を受けていないため、選択肢 A (ISO/IEC 17025 の通り) を採用する。

#### ② 他の関連規格との整合性

他の国際規格と整合性をはかるため、随所に要求事項が引用されている。旧 17000 シリーズ (1 公平性、2 機密保持、3 苦情 5 マネジメントシステム) は現在、ISO/CASCO 内部文書 (QS-CAS-PROC 33) に組み込まれており、ISO/IEC 17025 の新版にもそのまま盛り込まれている。また、4.1 公平性及び 4.2 機密保持は、ISO/CASCO の強制要求事項として、独立した項目が新設された。

#### ③ 要求事項

要求事項内容は、旧版のような細かい規範的な書き下し文 (～しなければならない、～すべきである) ではなく、

各試験所及び校正機関が独自の判断で要求事項を満たせるよう、パフォーマンススペースの書き方となっている。その根底にある理念は、常に各試験所及び校正機関が自ら、“リスク”を考慮しながらマネジメントシステムを構築し、適切にPDCAサイクルを回していくことにある。

#### ④ リスクと公平性

試験所は、常にリスクの同定及び排除を徹底すること、また、公平性や機密保持を維持していくことを、より厳密に要求されている。

#### ⑤ その他

品質マニュアル及び試験手順書に関しては、多くの試験所で、規格の条文をそのまま引用しながら作成していたため、作成義務がなくなった。ただし、必要に応じて作成しても良い。手順書を作成しないときは、登録JIS規格を参照すればよい。「最高経営層」の呼称が、「ラボラトリマネジメント」となった。「品質管理者」、「技術管理者」などの呼称も使用する必要性がなくなった（同等の資格者の設置は必要である。）不確かさやトレーサビリティの徹底が、より厳密に要求されている。

我々はこれらの改訂ポイントについて、適切な対応を取ることによって、昨年度に行われたISO 17025の再認定審査に対応し、無事に認定を受けることが出来た。

## 2. 2 2019年度 KISTEC 機器の共有化の状況

図1に各年度の受託件数の推移を示す。

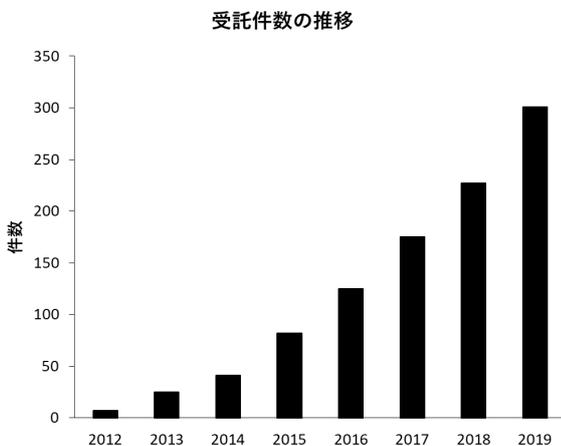


図1. 年度毎の受託件数の推移

図1を見て明らかのように、試験数は毎年度増加の一步をたどっており、非常に高い関心をもって、抗菌・抗ウイルス加工製品の研究開発が強く推進されていることがわかる。2019年度は300件を超える件数であった。このように、抗菌・抗ウイルス加工品の製品開発が国内外で非常に精力的に進められていると考えられる。また、2月に急激な受託依頼、相談件数の増加が認められた。このことは、昨年より世界的な問題となっている新型コロナウイルスの流行も影響している可能性が示唆された。

光触媒加工品の中では、昨年度と同様に可視光応答形光触媒加工品が圧倒的に多く、また抗バクテリオファージ、抗ウイルスの依頼が非常に多い傾向にあった。それと同時に、PIAJマークの相談も増えてきており、今後は、PIAJマーク認証を受け、確実な抗菌・抗ウイルス性能を持つ加工品が市場を活性化させていくことが期待できる。

更に、PIAJの認証取得を始め、光触媒に関する相談に関しては、以前よりKISTEC川崎技術支援部と共に光触媒総合サポートを展開している。2019年度についても、抗菌・抗ウイルス評価と共に空気浄化に関する評価を考えた製品開発を推進している企業や研究団体からの相談に対しては、適時川崎技術支援部への連絡を行い、スムーズな試験提供に向けて取り組みを行った。

光触媒以外の加工品による抗菌加工品については、SIAAによるSIAAマーク取得の相談件数が増えている。また、取得は行わないが、SIAAマーク認証取得と同様の試験を行いたいという相談も増えている。

試験項目については、通常のJISやISO規格試験のみならず、応用的な性能評価試験の相談、依頼が多くなっている。その中でも、2019年度は噴霧試験、防藻試験、花粉や花粉アレルギーを用いた試験、液体加工品を用いた試験の相談が多くなってきた。

新規試験方法に関しては、2019年度にグローブボックスを用いた噴霧試験の提供から、その方法を応用させた飛沫等の付着を想定した平板状加工品に対する抗ウイルス試験方法や我々が主体となって進めてきた実環境を想定した抗菌試験方法(ISO 22551:2020)の提供整備を進めた。その他、相談内容によっては、依頼者と共にオーダーメイドの試験仕様を組み立てながら、工夫を施した性能評価試験を行う必要があったが、十分な打ち合わせを行うことで、応用的な性能評価を行い、好評を得ることが出来た。

## 3. 今後の展望

以上、ISO/IEC 17025の認定と試験機関の関係や改訂されたISO/IEC 17025:2017のポイントについて概要を説明すると共に、2019年度のKISTEC機器の共有化の状況について概要の報告を行った。

本報告を作成している時点では、いまだに新型コロナウイルスが世界中で猛威を振るっている状況が続いている国内外ではワクチン開発や診断方法の迅速化等、医学薬学的なアプローチでの研究開発が強力に推進されている。一方で、感染リスクの低減という観点から、消毒剤やマスクの安定供給といった国内外の経済的なアプローチ、ニュースでも度々取り上げられるような抗ウイルス性能を持つマスク、医薬品としてではない抗ウイルス液剤の開発等の工学的なアプローチでの研究開発も大変重要である。これらの研究開発を行うためには、抗ウイルス加工製品の確かな性能評価試験を提供することが重要と考えており、我々は今後も更に高品質で的確な抗ウイルス性能評価試験を提供していただけるように整備を進めていく。

また残念ながら、我々は試験設備の関係から新型コロナウイルスを用いた性能評価試験の提供を行うことは出来

## 【研究開発部】抗菌・抗ウイルス

ないが、一般的に入手可能なコロナウイルスについては、我々が所有している試験設備での対応が可能である。そこで、現在一般的に入手可能なコロナウイルスを用いた性能評価試験の提供に向けて取り組みを開始している。今後、性能評価試験を提供する体制が整い次第、皆様へ提供する予定であり、是非多くのご利用を頂きながら、新しい抗ウイルス加工製品の開発につなげていただきたいと考えている。

その他、これまでの試験に関する相談から、各規格で用いられる微生物だけではなく、使用箇所や標的を想定して、個別に性能評価試験を行っていくことが重要という市場ニーズが明らかとなっている。その為、様々な微生物を対象とした相談（例えば、O-157、コクサッキーウイルス、カビ、レジオネラ等）に対応できる体制の構築についても、取り組みを開始していきたいと考えている。

### 【参考文献】

1. ISO/IEC 17025: 2017. M. Ohtsu, *Optoelectronics*, **10**, 147 (1995).
2. ISO/IEC 17025:2017 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項. 要求事項の解説. ISO/IEC 17025 対応 WG 監修. 藤間一郎, 大高広明 編著. 日本規格協会, 2018.

# 防藻性能評価試験方法の JIS 化に向けた取り組み

石黒 齊、永井 武、砂田 香矢乃

## 1. はじめに

光触媒反応による強い酸化力は有機物の分解や超親水性を発揮することで、空気浄化、水浄化、防汚、防曇、抗菌、抗ウイルス、抗かび等の様々な機能を発揮することから、数多くの光触媒加工製品が市場に出てきている。更に、従来の紫外光応答形光触媒に加えて、可視光応答形光触媒や暗所下における作用も発揮できるようなハイブリッドタイプの加工製品の開発が進められてきた。それらの開発と共に、製品の性能評価を進めるための ISO や JIS 規格などの標準化も進められてきた(表 1)。

表1. 光触媒性能評価試験法のJIS/ISO規格

評価分類	紫外光応答型		可視光応答型	
	JIS	ISO	JIS	ISO
セルフクリーニング	JIS R 1703-1	ISO 27448	JIS R 1753	ISO 19810
	JIS R 1703-2	ISO 10678	-	-
	-	ISO 21066	-	-
空気浄化	JIS R 1701-1	ISO 22197-1	JIS R 1751-1	ISO 17168-1
	JIS R 1701-2	ISO 22197-2	JIS R 1751-2	ISO 17168-2
	JIS R 1701-3	ISO 22197-3	JIS R 1751-3	ISO 17168-3
	JIS R 1701-4	ISO 22197-4	JIS R 1751-4	ISO 17168-4
	JIS R 1701-5	ISO 22197-5	JIS R 1751-5	ISO 17168-5
	-	-	JIS R 1751-6	ISO 18560-1
水浄化	JIS R 1704	ISO 10676	-	-
	JIS R 1711	-	-	-
酸化反応活性	JIS R 1708	ISO 19722	-	-
	-	ISO 22601	-	-
完全分解	-	-	JIS R 1757	ISO 19652
抗菌	JIS R 1702	ISO 27447	JIS R 1752	ISO 17094
	-	-	-	ISO 22551
抗カビ	JIS R 1705	ISO 13125	-	-
防藻	-	ISO 19635	-	-
抗ウイルス	JIS R 1706	ISO 18061	JIS R 1756	ISO 18071
	JIS R 1709	ISO 10677	JIS R 1750	ISO 14605
標準光源	-	-	-	AWI 24448

これらの性能評価試験の利用により、さらに研究開発が盛んにおこなわれている。更に、2020 年には実環境を想定した抗菌試験方法として、ISO 22551 が制定され、全世界で急速に普及が進んでいる LED を用いるための標準光源の規格の作成が始まるなど、より実環境に近い条件下での性能評価が重要である。

藻類による住環境の景観の悪化は、現在非常に大きな問題となっている。藻類に対する光触媒性能評価については、ISO 19635 が制定されているが、国内規格である JIS については、いまだ制定されていない。そのため、国内状況も加味した JIS の制定が非常に重要である。

本報告では、昨年度より開始されている光触媒工業会との共同研究及び光触媒工業会が平成 30 年度より経済産業

省から委託事業として受けている「戦略的国際標準化加速事業：産業基盤分野に係る国際標準開発活動 光触媒の防藻性能試験法に関する JIS 開発」として、取り組んだ成果の報告を行う。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 2018 年度の取組概要

#### 2. 1. 1 ISO 19635 試験

2018 年度は ISO 19635 の JIS 化に向けて、ISO 19635 の試験手順を実際に行うことで、JIS 化に向けて注意すべきことや国内の状況に合わせる方法の検討を行った。試験としては、ISO 19635 の制定時に仕様したものと同等の紫外光応答形加工光触媒ガラス板を用いて試験を行った。試験水準としては、表 2 に示すとおりである。

表2. 試験水準表

	0時間	24時間	
		0.0 mW/cm <sup>2</sup>	1.0 mW/cm <sup>2</sup>
未加工品	#1	#4	#10
	#2	#5	#11
	#3	#6	#12
光触媒加工品	-	#7	#13
	-	#8	#14
	-	#9	#15

この試験を行った結果、紫外光を照射した光触媒加工品に接種した藻類(クロレラ)に対する防藻活性を認めることが出来た。また、試験を行った結果、明らかとなった課題として、①培地組成が国内で容易に入手できるものと若干異なる、②試験液測定等の藻類の定量方法、その他幾つかの課題が明らかとなった。

#### 2. 1. 2 防藻性能実証試験

光触媒による防藻性能実証試験として、海老名本部にある池周辺及び溝の口支所光触媒ミュージアム中庭に光触媒加工品及びその対照として未加工品を設置し、防藻性能を確認する試験を開始した。図 1 は昨年度に報告した実際の試験例である。このように設置した試験品の藻類付着状況を月に 1 度程度観測するとともに、温湿度、紫外光及び可視光量を測定し、藻類の付着状況について確認を開始している。



図 1. 防藻性能実証試験の実際

## 2. 2 2019 年度の取組概要

### 2. 2. 1 ISO 19635 試験

2019 年度については、光触媒と防藻剤の併用による性能評価の違いについて検討を行った。その結果、用いたものと同等の試験品を用いて、ISO 19635 試験を試みた。光照射条件としては 0 時間、24 時間で 1.0 mW/cm<sup>2</sup> の紫外光照射及び暗所下とした。その結果を表 3 に示す。24 時間

表3. ISO 19635試験による防藻活性値

(%)	防藻剤無し	防藻剤1併用	防藻剤2併用	防藻剤3併用
24 時間	光触媒加工品	光触媒加工品	光触媒加工品	光触媒加工品
0.0 mW/cm <sup>2</sup>	-15.7	-10.8	-1.9	-9.4
1.0 mW/cm <sup>2</sup>	100	96.6	99.1	101.6

暗所の群においては、防藻剤の併用の有無に関わらず、大きな防藻活性は見られなかった。一方で、紫外光照射を 24 時間行った群では、防藻剤の併用の有無に関わらず、大きな防藻活性が確認された。このことから、光触媒反応による防藻活性は防藻剤の有無に関わらず、十分に確認可能であることが明らかとなった。また、多くの防藻剤はそのメカニズムとして、藻類の増殖や生存に関わる伝達系を止めることにより発揮されることが知られている。そのため、その活性が現れるまでには時間が必要だった可能性が認められる。その他、ISO 19635 による防藻性能の評価方法はクロレラが持つ葉緑素を光触媒反応がどれだけ分解するかに依存することが挙げられる。仮に、暗所において、藻類の増殖が抑制されていたとしても、光触媒反応が進まないため、葉緑素が残存した状態を維持している可能性がある。その場合、防藻性能が発揮されていたとしても、ISO 19635 の検出方法では正確に、防藻性能を確認できていなかった可能性がある。本検討は ISO 19635 の JIS 制定に向けた取り組みであることから、防藻剤の併用効果を含めた規格化は現状では不要と考えられるが、留意しておく必要があると考えられる。

### 2. 2. 2 防藻性能実証試験

昨年度、開始した防藻性能試験の定期的な観測を行った。その結果、観測当初は、明確な汚れの確認は出来なかった

が、月を追うごとに汚れの付着が認められた。図 2 及び図 3 は 10 月末の時点での状況を示す。

図 2 及び 3 に示すように左より 3 番目、4 番目の親水性の



図 2. 開始から半年後の防藻性能実証試験の状況



図 3. 防藻性能実証試験の確認拡大図

処理を行った試験品に緑色が付着していることがわかる。一方で、左側 5 番目以降には光触媒を塗布しているが、明らかな緑色は認められない。このことから、光触媒加工品では藻類の付着が抑制された可能性がある。しかしながら、左寄り 1 番目、2 番目の親水処理及び光触媒加工を行わなかった試験品についても、強い緑色の変色はなかった。このため、親水性が高い場合、水分が保水され、また汚れ成分等の栄養分が保持されることで、藻類の増殖が活発に行われたと考えられる。光触媒加工品についても、親水性が高くなることは知られているが、超親水性の発揮により、基材表面の藻類の胞子、汚れや栄養分が洗い流される作用により、藻類の増殖が認められなかったと推測される。このことから、光触媒加工による防藻性能が発揮されていると考えられる。今後は、さらに実証試験を行い、その差を確認していくことが重要と考えられる。

## 3. 今後の展望

以上、ISO 19635 を基にした、JIS 化への取り組みについて報告を行った。現在、既に JIS 原案の作成が進められており、ISO 19635 では規定されていないような内容を含めた、試験従事者、試験機関が使用しやすい JIS の制定に向

けて取り組みをつつけていく予定である。また、我々は ISO 19635 を参考にした防藻性能評価試験の提供を開始しているが、上記に記載したように、JIS が制定されることにより、JIS 準拠として防藻性能評価試験の提供も可能になると考えている。また、国内の多くの他試験機関においても、JIS が普及していくことで、より国内における防藻加工品の研究開発が進むことを期待する。

**【謝辞】**

本研究は、光触媒工業会との共同研究及び光触媒工業会が経済産業省委託事業「度戦略的国際標準化加速事業：産業基盤分野に係る国際標準開発活動 光触媒の防藻性能試験法に関する JIS 開発」として、一般財団法人日本規格協会から再委託を受け、取り組んだ一環として行った。

# 可視光下でのモリブデン酸化物の抗ウイルス活性に関する研究

砂田 香矢乃、畑山 靖佳、永井 武、石黒 斉

## 1. はじめに

昨年度においては、銅化合物や銀化合物以外の金属化合物の中に、抗菌・抗ウイルス活性が高い化合物が見出せないかについて検討するために、金属酸化物を対象に、抗ウイルス活性評価を行った。すなわち、水に溶解しない固体の金属酸化物である  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{MoO}_3$ ,  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{NiO}$ ,  $\text{ZnO}$  の7種の酸化物の抗ウイルス活性について、バクテリオファージを対象に調べたところ、三酸化モリブデン ( $\text{MoO}_3$ ) に高い抗ウイルス活性があることを見出した(図 1)。

また、その知見をもとに、酸化チタンに酸化モリブデンを担持し、高い抗ウイルス活性をもつ新規の可視光応答型光触媒材料(以下、 $\text{Mo/TiO}_2$  と記載する)を作製した(図 2)。

本報告では、高い抗ウイルス活性をもつことを見出した

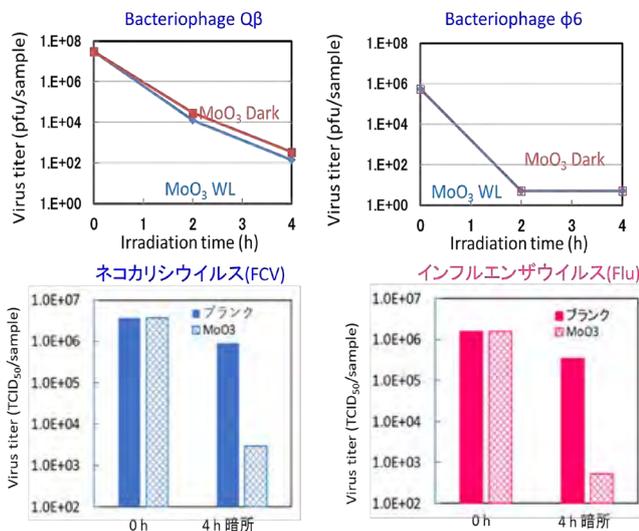


図 1.  $\text{MoO}_3$  の抗ウイルス活性(左上 ; バクテリオファージ Q $\beta$  に対して、右上 ; バクテリオファージ  $\phi 6$  に対して、左下 : ネコカリシウイルスに対して、下 : インフルエンザウイルスに対して)

$\text{MoO}_3$  が、どのようにその抗ウイルス活性を發揮するかを明らかにするために、二酸化モリブデン( $\text{MoO}_2$ )や酸化タングステン( $\text{WO}_3$ )の抗ウイルス活性と比較しながら検討を行った。また、酸化チタンに酸化モリブデンを担持して作製した新規の可視光応答型光触媒材料( $\text{Mo/TiO}_2$ )の物性とそ

の抗ウイルス活性との関係性についても報告する。

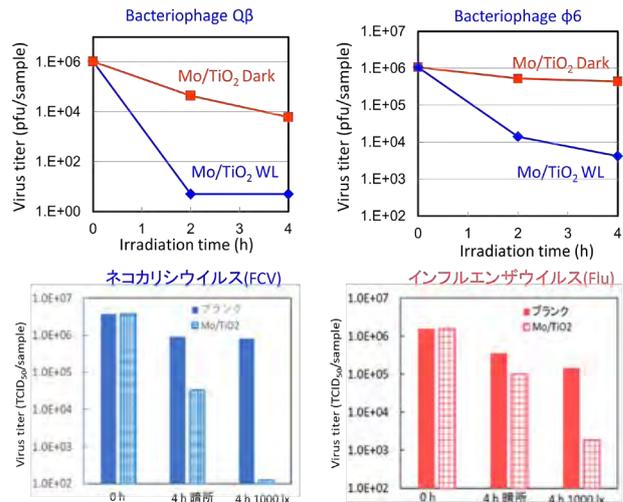


図 2.  $\text{Mo/TiO}_2$  の抗ウイルス活性(左上 ; バクテリオファージ Q $\beta$  に対して、右上 ; バクテリオファージ  $\phi 6$  に対して、左下 : ネコカリシウイルスに対して、下 : インフルエンザウイルスに対して)

## 2. 実験と結果

### 2. 1. 金属酸化物の抗ウイルス活性評価方法

抗ウイルス活性評価は、 $\text{MoO}_3$ ,  $\text{MoO}_2$ ,  $\text{WO}_3$  など、それぞれの粉末を 25 mm×25 mm のガラスに 6  $\mu\text{mol}$  の量を担持し、抗ウイルス活性評価を行った。活性評価は、基本的には JIS R 1756 にそって行い、バクテリオファージ Q $\beta$  (NBRC20012、宿主大腸菌(NBRC106373))とバクテリオファージ  $\phi 6$  (NBRC105899、宿主菌(NBRC14084))、並びにネコカリシウイルス F-9 株(ATCC VR-782、宿主:CRFK 細胞(ATCC CCL-94))、インフルエンザウイルス (H1N1) A/PR/8/34 株(ATCC VR-1469、宿主:MDCK 細胞(ATCC CCL-34))を対象に行った。ネコカリシウイルスやインフルエンザウイルスを対象にした試験では、その感染価は、TCID<sub>50</sub> として求めた。

$\text{Mo/TiO}_2$  の抗ウイルス活性は、暗所と光照射下で行い、光照射は、白色蛍光灯を用いて、Type B (N169:380nm 以下の波長をカット)のフィルター下、1000 lx の照度で行った。

$\text{MoO}_3$  の高い抗ウイルス活性のメカニズムを明らかにするために、粉末を 1/500NB に 4 時間、浸漬し、その後、粉末を除去し、その抽出液の抗ウイルス活性についても評価した。

## 2. 2. MoO<sub>3</sub>の抗ウイルス活性

図1に示したように、MoO<sub>3</sub>は、エンベロープがあるウイルスに対しても、エンベロープがないウイルスに対しても、高い抗ウイルス活性を示す。特に、インフルエンザウイルスのようなエンベロープを持つウイルスに対して、より高い抗ウイルス活性を示す特徴をもっている。

このようなMoO<sub>3</sub>の高い抗ウイルス活性は、どのようにもたらされるのかを調べるために、まず、MoO<sub>2</sub>やWO<sub>3</sub>の抗ウイルス活性と比較を行い、バクテリオファージQβを対象とした場合の結果を図3に示した。

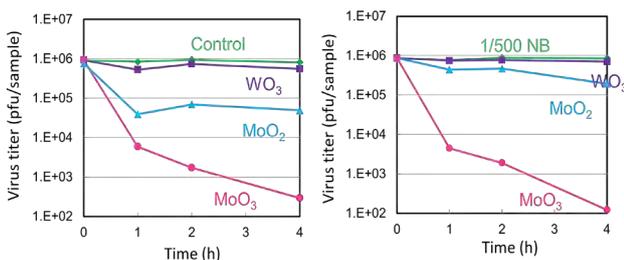


図3. バクテリオファージQβに対する抗ウイルス活性  
左図：ガラスに担持した材料の抗ウイルス活性、  
右図：1/500NBで粉末を抽出した液の抗ウイルス活性

図3の左図は、粉末をガラスに担持したサンプルの抗ウイルス活性を示しており、MoO<sub>3</sub>は、WO<sub>3</sub>やMoO<sub>2</sub>に比較しても高い抗ウイルス活性をもち、また、モリブデン化合物で比較した場合、酸化数が高いMoO<sub>3</sub>の方が、MoO<sub>2</sub>より高い抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった。一方で、右図は、それぞれの粉末を1/500NBで4時間浸漬後の抽出液にバクテリオファージQβを添加した場合の抗ウイルス活性を示している。MoO<sub>3</sub>に関しては、ガラスに担持した場合と抽出液の場合が、同様の抗ウイルス活性を示していることから、MoO<sub>3</sub>の抗ウイルス活性は、粉体から抽出される成分によって、もたらされていることが示唆された。この抽出液のpHは、約3.0であったことと、抽出液のICPによる分析で、MoO<sub>2</sub>より20倍高いMo成分が観察されたことから、水素イオンとMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>などのイオン成分が、高い抗ウイルス活性をもたらすのではないかと、という可能性が考えられた。

## 2. 3. 可視光応答型光触媒の抗ウイルス活性

高い抗ウイルス活性をもつMoO<sub>3</sub>を利用して、可視光応答型光触媒が作製できないかと、酸化チタンとモリブデン化合物を組み合わせた材料(Mo/TiO<sub>2</sub>)を調製したところ、図2に示した通り、暗所下よりも可視光照射下で抗ウイルス活性が増加し、抗ウイルス活性をもつ新規の可視光応答型光触媒が作製できた。

このMo/TiO<sub>2</sub>の材料について、紫外光・可視光の吸収測定や、SEM観察を行った結果を図4に示した。紫外光・可視光吸収の測定結果から、400 nm～500 nmにかけてベースの酸化チタンより大きな吸収がみられ、確かに可視光を吸収できていることが明らかとなり、可視光に

応答することができる材料であることが示された。また、SEM観察からは、モリブデンを担持した酸化チタンは、50 nm～200 nm くらいの粒径をもつ粉末であることもわかった。

さらに、Mo/TiO<sub>2</sub>材料において、酸化チタンにモリブデンはどのような形で担持されているかを明らかにするために、XPS分析を行った(図4右)。酸化チタンに担持されたモリブデンは、モリブデン金属やモリブデンイオンの形ではなく、酸化物の形で担持されており、MoO<sub>2</sub>よりは、MoO<sub>3</sub>の形で担持されていることが明らかとなった。

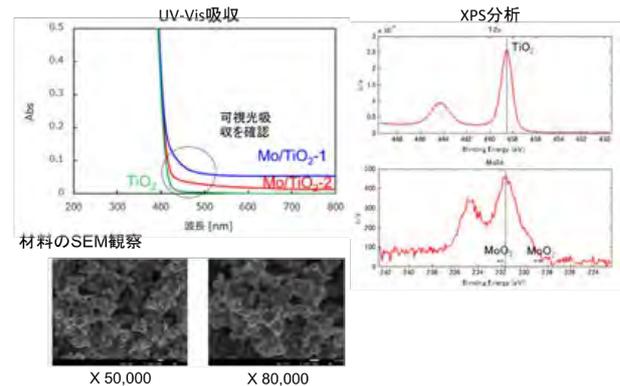


図4. 可視光応答型光触媒 Mo/TiO<sub>2</sub>の物性評価  
左上図：紫外光・可視光吸収、左下図：SEM観察写真  
右図：XPSによる材料表面分析

## 3. 考察及び今後の展望

以上、高い抗ウイルス活性があることを見出した酸化モリブデン(MoO<sub>3</sub>)について、その活性のメカニズムの一端を示した。今後も、MoO<sub>3</sub>のタンパク変性の性能を評価するなど、種々の側面からMoO<sub>3</sub>の抗ウイルス活性について明らかにしていきたいと考えている。

次に、モリブデン化合物と酸化チタンを組み合わせた可視光応答型光触媒材料(Mo/TiO<sub>2</sub>)の材料物性について調べたところ、確かに可視光吸収が観察され、抗ウイルス活性をもつ新規の可視光応答型光触媒であることが示せたと考えている。今後は、これらのデータを元に、モリブデン化合物と酸化チタンの量比を変化させるなど、種々のMo/TiO<sub>2</sub>材料を作製し、より可視光応答性の高い材料を探していきたいと考えている。

さらに、現在、新型コロナウイルスによるパンデミックから、日常空間で感染リスクを低減できる材料が求められている。そのためには、JISやISOの規格に準じた評価方法だけでなく、日常空間すなわち実環境で真に抗ウイルス活性をもつことを示すことが重要であると考えている。ウイルス噴霧空間でモリブデン化合物がもつ抗ウイルス活性を評価するなど、真に高い抗ウイルス活性をもつ材料の創製を目指していければと思っている。

本研究は、科研費(JSPS JP17K00633)のサポートによって行った。ここに、感謝申し上げます。

【参考文献】

1. M. Minoshima, H. Ishiguro, K. Hashimoto, K. Sunada, *et al.*, *J. Haz. Mat.*, **2016**, 312, 1-7.
2. T. Matsumoto, K. Sunada, T. Nagai, H. Ishiguro, A. Nakajima *et al.*, *J. Haz. Mat.*, **2019**, 378, 120610.

## 業 績

## 【原著論文】

1. Yasui M, Kawahara T, Izumi K, Yao M, Ishiguro Y, Ishiguro H, Uemura H, Miyoshi Y. Androgen receptor mRNA expression is a predictor for recurrence-free survival in non-muscle invasive bladder cancer. BMC cancer. 19:331, 2019.
2. Kato C, Shiohara M, Sunada K, Isobe T, Yamaguchi A, Matsushita S, Ishiguro H, Miyauchi M, Nakajima A. Decomposition of 2-naphthol in water and antibacterial property by NiO and CeOx modified TiO<sub>2</sub> in the dark or under visible light. J. Ceram. Soc. Jpn. 127:688-695, 2019.
3. Matsumoto T, Sunada K, Isobe T, Matsushita S, Ishiguro H, Nagai T, Nakajima A. Preparation of hydrophobic La<sub>2</sub>Mo<sub>2</sub>O<sub>9</sub> ceramics with antibacterial and antiviral properties. J. Hazardous Mater. 378:120610, 2019.
4. Motomura H, Ozaki A, Tamori S, Nozaki Y, Takasawa R, Sasaki K, Ishiguro H, Miyagi Y, Nagasihima Y, Tanuma S, Ohno S, Akimoto K. Correlation between GLO 1 and PKCλ contributes to prediction for poor clinical outcome at late stage of breast cancer. 第78回日本癌学会学術総会. 2019.9.28. 京都.
5. Ishiguro H. Mutual recognition accreditation. The Committee of Asian Standardization for Photocatalytic Materials and Products. (CASP2019). 2019.11.23. 仁川 (韓国).
6. Sunada K, Hatayama Y, Nagai T, Nakajima A, Ishiguro H. Antiviral activity of molybdenum oxide grafted on TiO<sub>2</sub> under visible light irradiation. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Recent Progress of Energy and Environmental Photocatalysis. 2019.11.29. 東京.

## 【総説】

1. 落合 剛, 石黒 斎, 砂田 香矢乃, 永井 武, 青木 大輔, 阿久津 康久. 最先端の研究現場から～(地独)神奈川県立産業技術総合研究所(KISTEC)における材料から製品までの光触媒評価総合サポート～. 電気化学. 87(Winter):356-357, 2019.
7. 畑山 靖佳, 西 真由子, 立石 健祐, 永井 武, 石黒 斎, 山本 哲哉, 梁 明秀. ニューカッスル病ウイルス感染によるグリオーマ幹細胞の細胞障害性の検討. 第42回日本分子生物学会年会. 2019.12.3. 福岡.

## 【書籍】

1. 砂田 香矢乃. 光触媒による制御. 「最新の抗菌・防臭・空気室制御技術」第1章 第2節テクノシステム, 57-64, 2019.
8. 石黒 斎. 光触媒の環境浄化機能の評価方法とKISTECの支援体制. 光触媒工業会 2019年度技術研究会. 2019.7.18. 東京.
9. 砂田 香矢乃, 畑山 靖佳, 永井 武, 中島 章, 石黒 斎. 可視光下でのモリブデン酸化物の抗ウイルス活性について. 防菌防黴学会 第46回年次大会. 2019.9.26. 大阪.

## 【口頭発表】

1. Ishiguro H. Standardized tests for antimicrobial materials. 韓国セラミックス学会春季学術大会. 2019.4.12. 済州 (韓国).
2. Kato C, Shiohara M, Sunada K, Isobe T, Yamaguchi A, Matsushita S, Ishiguro H, Miyauchi M, Nakajima A. Decomposition of 2-naphthol in water and antibacterial property by NiO and CeOx modified TiO<sub>2</sub> in the dark or under visible light. The 13<sup>th</sup> Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13). 2019.10.29. 沖縄.
3. Matsumoto T, Nagai T, Sunada K, Isobe T, Matsushita S, Ishiguro H, Nakajima A. Preparation of hydrophobic La<sub>2</sub>Mo<sub>2</sub>O<sub>9</sub> ceramics with antibacterial and antiviral properties. The 13<sup>th</sup> Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13). 2019.10.31. 沖縄.
10. 石黒 斎. KISTECにおける抗菌・抗ウイルス性能評価技術. KISTEC Innovation Hub 2019 in Ebina. 2019.10.31. 海老名.
11. 石黒 斎. 光触媒性能評価に関する JIS/ISO の状況と KISTEC における評価. KISTEC Innovation Hub 2019 in Mizonokuchi. 2019.11.7. 川崎.

## 【特許】

- (1) 国内特許出願 1件



# 「食品機能性評価」グループ

グループリーダー 阿部 啓子

## 【基本構想】

食は健康な生体を築き上げ、それを維持する上で限りなく重要である。適正な食生活は“quality of life”(QOL)の向上に寄与し、生活習慣病を防ぎ、健康寿命を延ばす手段としても高い関心が寄せられている。わが国ではまもなく 65 歳以上の高齢者が人口の 30%に達すると予想されており、健康を保ち、エイジング（加齢）に伴う生活習慣病の発症や認知機能・運動機能の低下を遅らせる機能性食品の開発は国際的にも注目されている。本テーマの出口としては、科学的エビデンスに基づく商品を開発するための公的機能性評価システム機関を世界に先駆けて構築し、この日本発の領域を、学術的・産業的・社会的に発展させ世界に発信していくことにある。

## 1. 2019 年度の研究目的

グループ 3 年目となる 2019 年度は、以下の各項目を重点項目として実施した。

### (1) 国際評価技術センター

#### (1)-1 動物とヒトのシームレス研究

食品は私たちが日常的に摂取するものである。機能性成分は複数の成分から成り、それらが相加・相乗・拮抗作用を呈することから、機能性は多岐に亘るという特徴を持つ。食品の有する機能性は、未病の維持・改善に働く効果が期待されるため、本グループでは、未病評価という観点から食品機能性の評価技術センター構想を描き、実現に向けて取り組んでいる。

食品には、長い食経験という歴史を持つものが多いが、昨今の研究開発により、特定の成分の高含有作物や、特定の成分を抽出したサプリメント食品等が普及し始めてい

る。そのため、現在の食品の機能性評価においては安全性の確認が必須条件であり、さらにその理解のためには作用メカニズムを明らかにすることが不可欠であることから、動物を対象とする実験を中心に進めてきた。一方で、2015 年に始まった食品の機能性表示制度においては、ヒトにおける評価研究が求められることから、ヒトにおける食品機能性評価の需要も高まってきた。現状のヒトを対象とする食品機能性評価研究では、健康な方を対象にすることとされており、血液の生化学データ等、健康診断に用いられる指標にて評価を行っている。しかしこれら指標は病気を検出するためのものであり、健康な方を対象とし、かつ病気の治癒を目的としない食品の機能性評価においては、非常に狭い範囲の中での変動を追うことになるため、指標としての有効性が低い。食品機能性評価のためには、より高感度かつ鋭敏に応答し、ヒトにも応用可能な評価試験手法や指標が必要である。現在、動物からヒトへ、研究展開を図

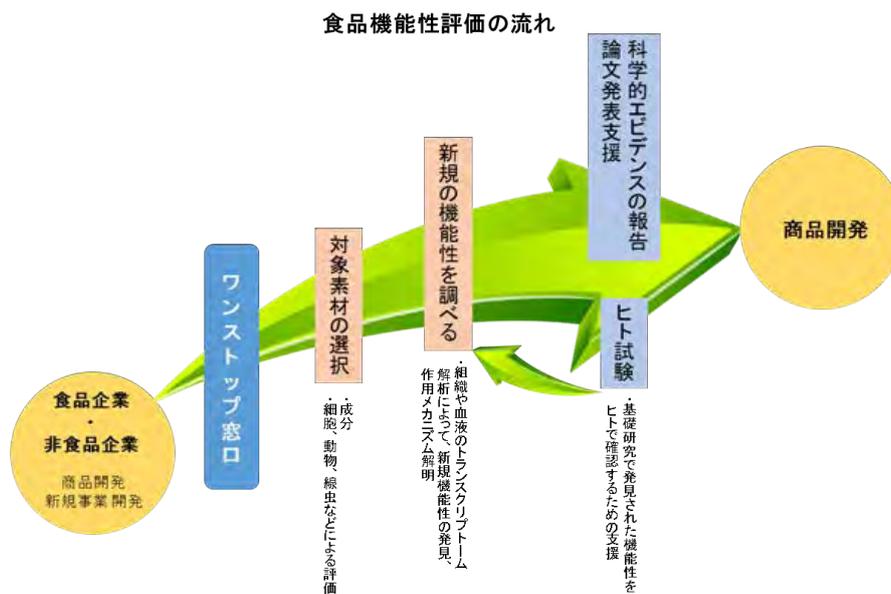


図 1 食品機能性評価の流れ

るための取り組みを進めているが、その一方で、ヒトで得られた結果について、動物でメカニズム解明をする研究も進めており（図1）、その成果について紹介する。

(1)-2 脳機能への作用評価研究

食品の機能性評価研究は、特定保健用食品（トクホ）においてはメタボリックシンドロームに対する作用が中心であったが、機能性表示制度の対象が脳機能、運動機能（ロコモティブシンドローム）等多岐に亘るようになったことを受け（図2）、脳機能評価にも重点を置いて進めており、その成果についても紹介する。

<実施項目>

(1)-2-1 トランスクリプトーム解析との組み合わせによる脳機能評価試験方法の確立：ヒト試験

(1)-2-2 脳機能評価方法の展開：動物試験

(1)-3 新規未病マーカーの探索と活用

食品の機能性評価研究においては、その作用の結果として生じるわずかな変化を検出する必要があり、生体内変化に対してより鋭敏に反応する因子（未病マーカー）の探索を試みている。これまで未病マーカーとして解析をしてきたのは mRNA であるが、タンパク質をコードしない non-coding RNA のうち micro RNA (miRNA) の活用についても検討を進め、今回、ヒトを対象とした試験においても検証を行い、有効性を示すデータを得たため報告する。

(2) 受託・共同研究

企業との共同研究、受託研究を推進している。すでに確立しているメタボリックシンドロームに対する機能の評

価方法、また 2018 年度より着手し、更新を続けている脳機能評価手法を活用しつつ、依頼に基づき、新たな機能性探索のためのカスタマイズ研究にも随時対応をしている。

2. 2019 年度の研究成果

(1) 食品機能性評価技術センター

(1)-1 動物とヒトのシームレス研究

当グループでは、動物を対象とする脳機能測定のための手法の高精度化を検討しており、食品摂取によるわずかな差の検出を試みている。これまでは主にメタボリックシンドロームへの作用についての研究を積み重ねてきた実績があるが、脳機能に関しても同様に動物を対象とする試験（主にメカニズム解明）とヒト試験（現象）とを組み合わせ、両者を行き来しながら評価を進めていくことで、より効率的に、かつより詳細に食品の機能性を明らかにすることができると考えている。

(1)-2 脳機能への作用評価研究

食品の機能性評価研究は、特定保健用食品（トクホ）においてはメタボリックシンドロームに対する作用が中心であったが、機能性表示制度の対象が脳機能、運動機能（ロコモティブシンドローム）等多岐に亘るようになったことを受け、脳機能評価にも重点を置いて進めており、その成果についても紹介する。

(1)-2-1 トランスクリプトーム解析との組み合わせによる脳機能評価試験方法の確立：ヒト試験

2018 年度に、ヒトを対象とした試験において、食品の単回摂取で脳機能（計算テスト成績や疲労度）の差異を検



図2 脳、代謝、免疫、運動機能の相関と食品に期待される機能

出するための試験方法を確立し、脳機能に対する作用を明らかにするためのヒト試験の基盤を構築した。これはプラセボ食と試験食との比較にて試験食の機能性を評価する試験方法であり、計算テストについては3種類を用意して評価を行ったが、食品によって成績に差を生じる試験項目が異なる結果を得ており、それぞれの機能性成分の特性に合わせて計算テストと組み合わせることの重要性が示されている。この方法では、計算テスト等を実行し、その成績や Visual Analogue Scale (VAS) による主観的な疲労度の差異から食品摂取に伴う脳機能の変化を捉えることに成功しているが、一方でストレス、疲労についての客観的指標には乏しい。そこで2019年度には、この試験方法に血液トランスクリプトーム解析を組み合わせ、計算テストに伴うストレス・疲労と、それに対する食品摂取の作用について客観的に捉える試みを実施した。その結果、計算テスト実施に伴いストレス、疲労に関連する遺伝子群が変化すること、また、計算テスト成績（正答率等）を上げる作用を持つ食品を摂取した際には、このストレス、疲労関連遺伝子群の変化が軽減されることが示された。

本研究を通じて、計算テストと血液トランスクリプトーム解析とを組み合わせることにより、食品の機能性評価に適した比較的軽微な疲労、ストレス負荷と、それに対する客観的指標と主観的指標に基づく評価方法を確立した。本試験方法は、ヒトを対象とした脳機能に対する食品の評価試験であり、既に企業からの依頼に基づいた評価試験も開始している。

#### (1)-2-2 脳機能評価方法の導入：動物試験

食品の機能性成分が脳機能に与える影響を評価する為、実験動物を用いた行動試験を導入している。実験動物を用いた行動試験では認知、不安様行動をはじめとした様々な項目の脳機能評価が可能である。2018年度には行動試験の高精度化を図り、認知、不安様行動測定について手法の改良を行い、これまでの手法よりもさらに詳細な解析とかつ顕著な差異の検出に成功した。2019年度には、食品の機能性成分摂取が脳機能に及ぼす影響を評価するために、動物への軽微なストレス負荷となる試験手法を検討し、高精度化した行動試験と組み合わせることにより、軽微なストレス状態を作り出すこと、また行動試験によるストレス負荷の表現型の検出に成功した。今後、食品によるストレス緩和作用についての検証を行い、(1)-2-1のヒト試験との組み合わせ等による詳細な作用メカニズム解明のための試験法としての確立を目指す。

#### (1)-3 新規未病マーカーの探索と活用

ヒトを対象とした試験にて、micro RNA (miRNA) の未病マーカーとしての有効性を検証した。その結果、摂取する食品により、発現変動する miRNA が異なることが明確に示された。したがって、miRNA も mRNA と同様に食品機能評価における指標のひとつになる。食品の種類や特徴毎に変動する miRNA をマーカーとして活用することで、食品機能性評価や疾病予防のためのメニュー作りなどに貢献すると期待される。

#### (2) 受託・共同研究

企業との共同研究、受託研究を推進している。2019年度には、代謝機能（メタボリックシンドローム）への作用についての評価課題2件、着衣と組み合わせた総合的な未病改善評価のためのカスタマイズド課題1件、ヒトを対象とする脳機能評価課題1件を実施した。得られた成果のうち一部については、研究論文としてまとめ、投稿を行った。また、知財化についても検討を進めている。引き続き受託・共同研究を進めていく。なお、受託・共同研究を通し、機器の共用化も推進しているが、2019年度は、前年度を上回る4000時間超であり、年々増加して活用の幅が広がっている。

#### (3) その他

平成28年10月1日から日本学術振興会（JSPS）先導的研究開発委員会「食による生体恒常性維持の指標となる未病マーカーの探索戦略」（委員長：阿部啓子）が発足し、活動を続けてきた。この活動の成果が評価され、令和2年3月に日本学術振興会 産学協力委員会において R021「食と未病マーカー委員会」の採択が決まり、令和2年4月より活動が開始された。未病マーカーの開発研究には、本グループの研究者も参画し、全国の大学、企業との連携により、最新のマーカー探索に向けての情報共有、情報収集、開発研究を進めている。

また、平成30年3月に、本グループの研究手法を基盤とする「ワンストップ型食品機能性評価サービス」が神奈川県 ME-BYO BRAND に認定された。これを受けたお問い合わせもいただいているが、今後一層の周知を図り、評価センターでの食品機能性評価の受託あるいは共同研究拡大を目指し、得られた成果を広く還元し、国内外を問わず生活の質（QOL）の向上を目指していく。

# 食品機能性評価に特化したモデル動物の開発

嶋田 耕育、篠崎 文夏、亀井 飛鳥

## 1. はじめに

不安感は鬱や様々な精神疾患で認められる所見でもあり、さらに断続的な不安感は精神疾患の引き金となる。ストレス起因性の精神疾患患者数は近年増加傾向にあり、その対策は喫緊の課題である(図1)。一般的に不安感は環境的要因の影響が大きく、その原因としては脳内神経伝達物質であるセロトニンの分泌、合成が関与していると示唆されている<sup>1</sup>。セロトニンは必須アミノ酸であるトリプトファンを合成基質とし脳幹の縫線核(raphe nucleus)を中心とし合成される<sup>2</sup>。必須アミノ酸であるトリプトファンは体内で合成することができず日々の食事などから摂取する必要がある。したがって、不安感の緩和、もしくは減弱するために日々の食事内容は重要な要因の1つであるとされている。近年、食品及び食品素材が持つ機能性に注目が集まっている。食品には主に3つの機能性があるがとりわけ栄養機能、感覚機能以外の三次機能(生体調節機能)としての食品非栄養成分の持つ新たな機能性の探索、及びその効果検証が鋭意進められている。その機能の1つとしてストレス軽減・予防効果が期待されている<sup>3</sup>。食品の機能性成分の作用の特徴は、薬物(特に人工的な化合物)のように少数の作用点に強く働きかけるのではなく、複数の作用点に対して穏やかに働きかけることである。食品ポリフェノールの多くが有する抗酸化作用は多面的な作用の一例である。現在、薬物(医薬品など)の効果を対象としたストレス軽減・予防効果を検証するための動物実験系がいくつか存在する。一般的に動物を対象とした実験系の多くは実験動物に対して一定のストレス源を負荷することによってストレス起因性疾患を誘起するモデルが多い。しかしながら作用点が明確な医薬品や化合物などの効果を推定する場合、これらモデル動物による評価は有用であるが、作用点が複数存在し、また全体として緩やかな効果を期待する

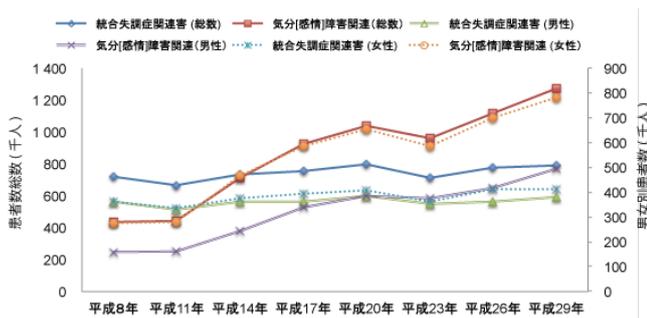


図1: ストレス起因性精神疾患患者数の年次推移

食品機能性成分の評価においては必ずしも有用とは限らない。その理由として、モデル動物作出時に使用されるストレス負荷が過大である場合、食品機能性成分による効果がマスクされてしまうことが懸念される。そこで、本グループでは食品の機能性評価に適したモデル動物の構築について検討を行なっている。今後、我々がこれまで蓄積してきた従来の遺伝子発現解析技術の手法と行動学的解析を合わせた総合的な食品機能性解析を用いて、ストレス・不安感に対する食品または機能性成分の網羅的・多角的な評価を遂行することを目指している。

## 2. 実験と結果

### 2.1 新規食品機能性評価モデルマウスの作出

一般的に不安やうつ症状を誘導するモデル動物作出に用いられるストレス源はトラウマティックな精神的侵襲度の高い(高侵襲ストレス)ストレス源が広く使用されている(図2)。しかしながら既存の動物モデルの多くは使用されるストレス源の影響が過大であると考えられ、食品もしくは機能性成分の機能性を評価するモデルとしては不適である。そこで我々のグループはモデル動物としてマウスを利用し、食品機能性評価に適した新たな動物モデルの作出を試みた。群飼育されたマウスを長期間隔離飼育することで社会隔離ストレス負荷がかかり鬱様症状を呈することは知られている<sup>4</sup>。したがって、社会的隔離という環境因子がマウスにとって1種のストレス源となり、不安様・鬱様行動を誘導すると考えられている。今回、ストレス源として社会的隔離による方法を採用し、不安様行動を誘導する飼育頭数調整の条件を精査・検討することで

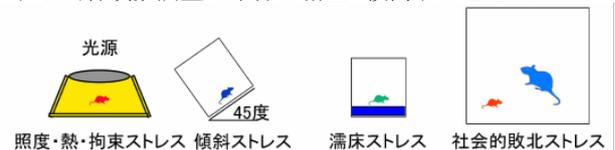


図2: 不安やうつ症状を誘導するモデル動物作出に用いられる一般的なストレス源の例

食品機能性素材等による効果を検証することが可能な新規食品機能性評価モデルマウスの作出を試みた。

### 2.2 行動学的試験による表現型の確認

我々が作出した新規評価モデルの脳機能行動への表現

型を確認するため複数の行動学的試験を実施した。行動学的試験は当研究グループで整備された以下の項目について検討を実施し、脳機能行動への影響について検討した。行動学的試験は複数の行動試験による評価を行うため、他の行動試験への影響が懸念される条件付け行動ではなく生得的行動による行動テストバッテリーを実施した。

- A: 広場試験 (オープンフィールド試験)
- B: Y 路迷路試験
- C: 高架式十字迷路試験
- D: 新規物体認識試験
- E: 社会性行動評価試験 (ソーシャルインタラクション試験)

## 2. 2-A 広場試験

広場試験は新規環境に対する反応を評価する試験である。広場には 40cm 四方の箱型フィールドを用い、マウスをフィールド内に静置後、数分間の行動記録により評価した。フィールドを複数のエリアに分割し各エリアでの移動距離、滞在時間、交差回数や不動時間または総移動距離を試験時間の間、経時的に記録を実施した(図3)。一般的にマウス等の齧歯類は新規環境に対して好奇心行動・探索行動を行うが、一方で閉鎖された空間を好み、フィールド中心より壁際の周辺領域での行動する傾向にある。鬱様症状を呈するマウスでは好奇心行動が低下し中心領域での行動量が減少する表現型が認められる。したがって広場試験での中心領域での行動量は不安様行動の行動指標の1つとされている。新規評価モデルマウスを用いて広場試験を実施した結果、中心領域での行動量の減少が認められた(図4)。したがって、ストレス負荷マウスは不安様症状が誘導されたことを認めた。

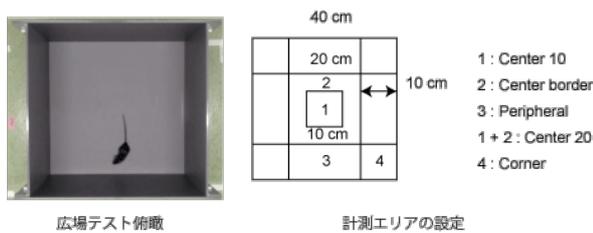


図3：広場テスト概略

## 2. 2-B Y 路経路試験

Y 路迷路試験は3方向のアームからなる迷路試験であり、直前に侵入したアームとは異なる別のアームに侵入・選択する齧歯類の持ちうる特性を利用した行動試験であり、短期記憶・作業記憶・自発運動量を評価することが可能である。評価項目として各アームへの侵入回数及び自発的交替行動率(3回連続して別のアームに侵入した回数 / 総侵入回数により算出)を計測し、作業記憶・自発運動量の評価を実施した。新規評価モデルマウスを用いて Y 路迷路試験を実施した結果、作業記憶の行動指標である自発的交替行動率には差異は認められなかったが、アームへの総侵

入回数がストレス負荷マウスで有意な増加が認められた。したがって新規評価モデルのストレス負荷マウスは作業記憶に影響を及ぼさないが自発運動量に影響することが確認された(図5)。Y 路迷路試験での自発的運動量の増加は統合失調症モデル動物の作出に用いられる選択的 NMDA アゴニストである MK801 の投与によっても確認されている表現型である<sup>5</sup>。

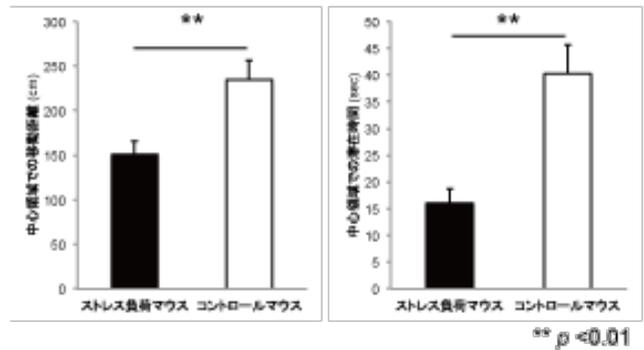
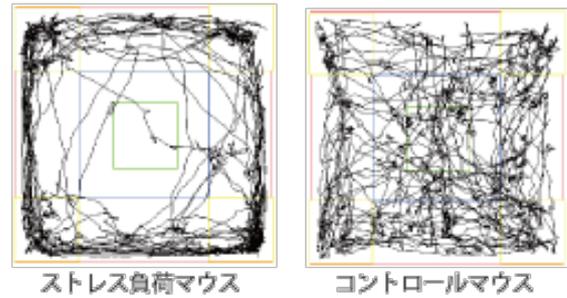


図4：広場テストによる行動評価

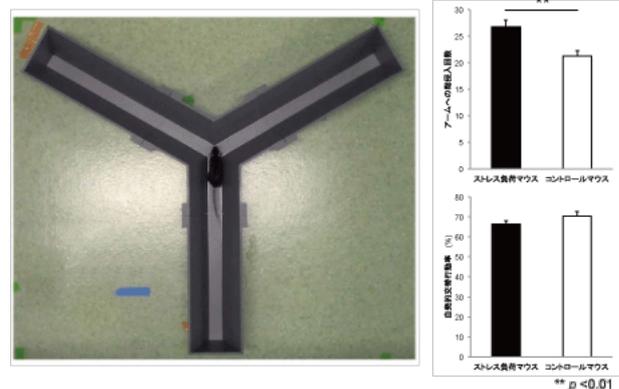


図5：Y 路迷路試験による行動評価

## 2. 2-C 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は探索行動(好奇心行動)と不安感などに起因する回避行動を評価する行動試験である。一般的に不安感を有するマウスは壁に囲まれていない解放アーム(open arm)よりも壁に囲まれた閉鎖アーム(closed arm)に長くとどまる表現型を示し、各アームへの侵入回数や滞在時間が不安様行動の行動指標の1つとされている。新規評価モデルマウスを用いて高架式十字迷路試験を実施し

た結果、ストレス負荷マウスで open arm への侵入回数及び滞在時間が増加する表現型を認めた(図 6)。高架式十字迷路試験での open arm での滞在時間の増加は MK801 の投与によっても確認されている表現型である<sup>6</sup>。

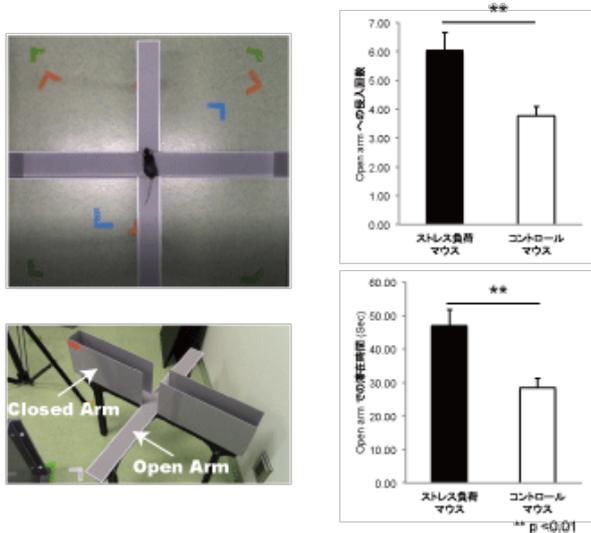


図 6：高架式十字迷路試験による行動評価

## 2. 2-D 新規物体認識試験

新規物体認識試験はマウスの好奇心行動及び短期記憶能を検討する試験である。2つの同一の物体(オブジェクト:F)を配置したフィールドを用い、マウスのオブジェクトに対する好奇心行動を検討しつつオブジェクトを記憶させる暴露試験と一定時間経過後に一方のオブジェクトを形状の異なる新規オブジェクト(N)に置換することによる新規オブジェクトへの指向性行動を評価する試験期間からなる(図 7)。一般的なマウスの行動として暴露試験時に配置されたオブジェクトを記憶し、試験期間での新規のオブジェクトに対しては興味行動を示す表現型を示し、短期記憶の評価が可能となる。新規オブジェクトへの指向性の低下はアルツハイマーモデルマウス<sup>7</sup>や poly(I:C)投与自閉症モデルマウス<sup>8</sup>などで確認される表現型である。新規評価モデルマウスを用いて新規物体認識試験を実施した結果、暴露期間でのオブジェクトへの指向性に差異は認められないが試験期間において新規物体への指向性が

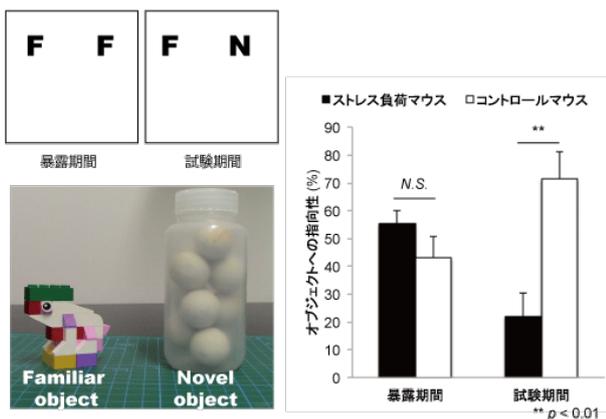


図 7：新規物体認識試験による行動評価

ストレス負荷マウスで有意に低下する表現型を認めた(図 7)。

## 2. 2-E ソーシャルインタラクション試験

ソーシャルインタラクション試験はマウスの社会行動を確認するための試験である。試験対象のマウスに対して専用のグリッドケージに初対面のマウスを配置することで試験対象のマウスの行動(毛づくろい行動、追尾行動など)より社会性の評価が可能である。今回の試験では3チャンバーフィールドを用い、1つのチャンバーにはグリッドケージに入れたマウスを配置、対面のチャンバーにはからのグリッドケージを配置し、各チャンバーでの試験対象マウスの行動を観察した。新規評価モデルマウスを用いてソーシャルインタラクション試験を実施した結果、初対面へのマウスへの興味行動に大きな差異は認められなかった(図 8)。

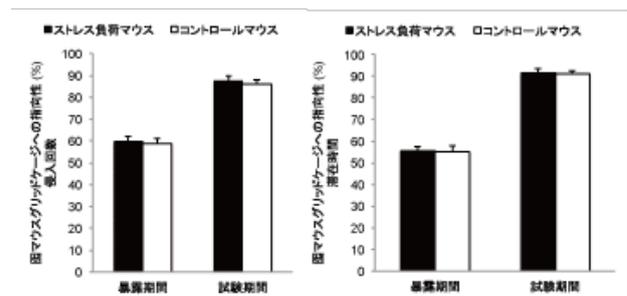
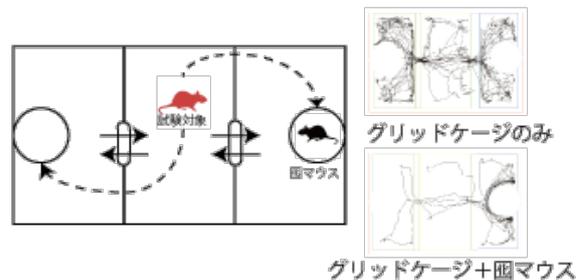
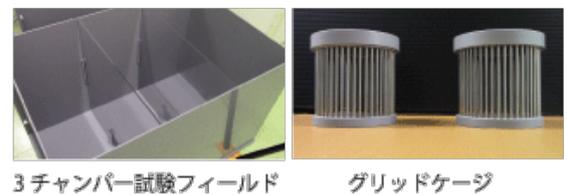


図 8：ソーシャルインタラクション試験による行動評価

## 3. 考察及び今後の展望

今回、我々のグループは飼育頭数調整によって食品機能性評価に最適な動物モデルの作出を試みた。各種行動試験を本動物モデルに対して実施した結果、軽度の不安及び精神疾患罹病に起因する表現型が確認された。新規評価モデルマウスの作出方法はこれまで広く使用されてきた精神疾患動物モデルと比較し、精神的負荷の少ないストレス源の選択やモデル作出に要する時間が短い。このことから本モデルは疾病と健康状態の間であるいわゆる“未病”状

態を維持していることが推定される。したがって穏やかな効果が期待される食品機能性素材の効果について検討することが可能であると期待される。現在、新規評価モデルマウスについて行動解析のみではなく、脳内遺伝子発現への影響など多目的に解析を実施し、論文作成を鋭意進めている。今後、今回作出した新規評価モデルマウスを用い、抗ストレス効果が期待される食品素材を使用し、その効果及び詳細な作用メカニズムについても検討を重ねることで食品機能性素材の脳機能評価実用化に向けた取り組みを進める予定である。

#### 【参考文献】

1. Julien Bacqué-Cazenave et al. *Int J Mol Sci.*, **21**(5):1649 (2020)
2. Diána Balázsfi et al. *Front Behav Neurosci.*, , **12**: 163 (2018).
3. Laura R LaChance, and Drew Ramsey. *World J Psychiatr.*, **20**; 8(3): 97-104 (2018).
4. Yuichi Deguchi et al. *Cell Rep.*, **17**(9):2405-2417. (2016)
5. Yasushi Hasegawa et al. *Asian Pac J Trop Med.* **9**(7):662-7. (2016)
6. Neslihan Pınar. *Bosn J Basic Med Sci.* **15**(3):74-9. (2015)
7. Christian J Miedel et al. *J Vis Exp*, **123**:55523. (2017)
8. Natalia V Malkova et al. *Brain Behav Immun.* **26**(4):607-16. (2012)

# 食品機能性評価研究

## 一脳機能評価と血液トランスクリプトーム解析

亀井 飛鳥、篠崎 文夏、嶋田 耕育

### 1. はじめに

神奈川県立産業技術総合研究所では、これまでに食品機能性研究として、主に動物を対象とする評価を実施してきた。これらの研究成果や評価技術を応用し、現在はヒト試験、特に未病という観点から評価する研究へと展開しつつある。これまでの研究対象の多くは、メタボリックシンドロームの緩和・改善作用を期待し、その作用メカニズム等を明らかにすることを目指すものであった。一方、昨今ではメタボリックシンドロームに加えて、脳や運動機能に対する作用への期待も高まっている。例えば、機能性表示食品には、体脂肪等に加えて記憶、ストレス、疲労、関節といったキーワードが並ぶ。食品の多岐に亘る機能性について少しずつ解明し、その情報を活用して生活に取り入れることで、健康寿命の延伸や生活の質(QOL)の向上に繋がると期待される。本稿では、食品の機能性評価研究の一環として、脳機能、なかでもストレスや疲労に対する作用を評価する実験系とトランスクリプトーム解析とを融合させた評価方法の確立に向けての取り組みを紹介する。

#### 1. 1 未病とその評価

未病は、病気ではないが、健康でもない状態であり、日本未病システム学会では「自覚症状はないが検査では異常がある状態」と「自覚症状はあるが検査では異常がない状態」とを合わせたものと定義している。健康状態から病気に至るまで、身体の中は徐々に変化するが、このわずかな変化、すなわち病気に至る兆しを捉え、対策を講じることが病気の予防の一つであると考えられる。このわずかな変化は、既存的手法では検出が難しいため、未病を評価するにあたり新たなマーカー分子の探索が必須である。

#### 1. 2 未病と食品

1. 1にて述べたように、未病は病気に至る前の状態である。そのため、医薬に頼る段階ではないが、未病から病気に至ることのないように講じるべき対策として、食品の機能性への期待が高い。食品にはそれぞれに様々な機能があるが、そのほとんどにおいて、摂取することによる身体の中の変化はわずかである。しかし食品は日常的に摂取するものであるため、そのわずかな変化が重要な意味を持つと考えられる。例えばわずかな変化の積み重ねにより大きな変化となる、あるいはわずかな変化を繰り返すことにより、病気への進行を遅らせるといっ

たことなどが期待される。

KISTEC ではこれまで、主にメタボリックシンドロームやその予備軍を想定した条件下において、食品による改善作用とその作用メカニズムを明らかにしてきた。いずれもトランスクリプトーム解析(網羅的な遺伝子発現解析)により実施してきた。例えば、桑の葉の脂質代謝に及ぼす作用(1, 2)、サラシア属植物の免疫に及ぼす作用(3, 4)、ビフィズス菌の脂質代謝に及ぼす作用(5, 6)、短鎖フルクトオリゴ糖の脂質代謝に及ぼす作用(7)、アミノ酸混合液の作用(8)、栄養素の一つである鉄の摂取量の違いが身体に及ぼす作用(9, 10)などである。さらに、食品の機能性成分について、その効果を発揮する至適量があることも明らかにした。これはメープルシロップの機能性評価研究において見出された(11, 12, 13)。

### 1. 3 脳機能と食品

私たちは日常生活の中で様々なストレスを受けている。例えば厚生労働省の平成28年国民生活基礎調査の概況によると、世代に関わらず日本人の約半数がストレスを抱えながら生活をしているとあることから、ストレスは非常に身近にあり、認識されていることがわかる。ストレスは必ずしも身体にとって負の影響を及ぼすものではなく、うまく活用することで健康維持に貢献するものでもあるが、それを逸脱するような過度のストレスや継続的なストレス負荷によって健康を損なうものでもある。また、ストレスと密接な関係にある疲労についても2004年の文部科学省の大阪地区を対象にした調査によれば、半数以上が疲労を感じているという結果であった。疲労は作業効率の低下やひいては病気の原因にもなり得る。すなわち、ストレスや疲労は脳の未病状態であり、その軽減は現代社会において急務である。そのためには生活習慣の改善が不可避であり、そこには食事が大いに貢献すると期待される。

2018年度には、2つの食品素材を用い、3種類の脳機能テストを実施し、食材によって成績に影響を及ぼす脳機能テストの種類が異なることを示し、報告した。

2019年度には、2018年度に作成、実施した試験にて最も成績のよい組み合わせの食品素材+脳機能テストにて再度試験を実施するとともに、そこに血液トランスクリプトーム情報を組み込み、詳細な解析へと展開した。本稿では、ヒトを対象とした食品の疲労・ストレス軽減作用の検出と応答マーカー分子の探索を試みた研究成果について報告する。

## 2. 方法と結果

### 2. 1 方法

#### 2. 1. 1 試験食と脳機能テストの選定

2018年度に作成、実施した試験にて最も成績のよい組み合わせの食品素材と脳機能テスト(図1)を選抜した。

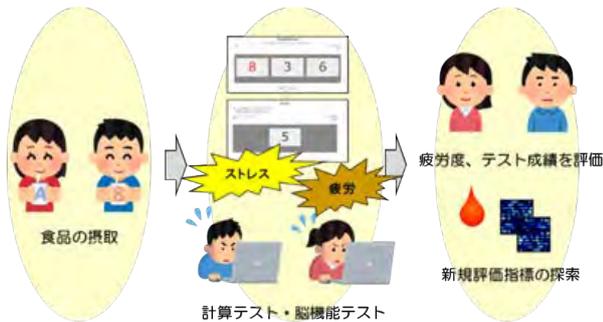


図1 脳機能評価試験の流れ

#### 2. 1. 2 試験実施（脳機能テスト）

試験方法については KISTEC 立案とし、実施機関は東海大学とする共同研究にて実施した。本試験は、単回摂取の効果を測定すること、そのため効果を長期にわたって持ち越すことがないと想定されること、試験成績には個人差が大きいことが予備テストにより示されていたことから、単回摂取の二期クロスオーバー比較試験として実施した。長期的な持続は想定されないものの、ウォッシュアウト期間として、2回の試験の間を3日以上と設定した。

介入試験実施機関である東海大学では、伊勢原キャンパスにて学生を対象に募集を行い、試験説明に同意を得た方26名に参加いただいた。

本試験を通して得られたデータを KISTEC にて集計し、東海大学の統計解析責任者を中心とする担当チームにて結論の確認を行った。

#### 2. 1. 3 試験実施（血液トランスクリプトーム解析）

生命現象を、タンパク質合成のセントラルドグマにおける流れから解釈すると、遺伝子 DNA はその生物固有の情報をもち、この遺伝子 DNA を転写した mRNA(トランスクリプト)を翻訳してタンパク質(プロテイン)が作られる。タンパク質が酵素であれば、代謝産物(メタボライト)が生成されることになる。それぞれの群を特に、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームと呼ぶ。私たちの身体の中ではこれら膨大な種類の遺伝子 DNA、mRNA、タンパク質、代謝産物が質的、量的に様々に変化し、生命活動が維持されている。

生体内で起こる変化を多角的に解析する手法として、網羅性の高いトランスクリプトーム解析がある。これは、細胞内で発現する数万種の転写産物(mRNA)量を網羅的に解析するもので、mRNA 量の変化の内容を解読することで、現時点とこ

れから起こる生体の変化を予測しようという手法である。本研究では、血液(主に血球細胞)のトランスクリプトームの変化を解析し、食品摂取や脳機能関連指標評価テストの実施に対する生体応答について探ることとした。

介入試験にて得られた血液より RNA を抽出し、その RNA を用いて DNA マイクロアレイ実験を行い、そこから得られたトランスクリプトームデータについての解析を行った。RNA 抽出については SRL 社に外注し、DNA マイクロアレイ実験とトランスクリプトーム解析については KISTEC にて実施した。SRL 社から KISTEC に納品された RNA のクオリティチェックを実施したところ、26名分の検体のうち9名が解析条件を満たさなかったため解析対象外とし、合計17名、また各自、試験食2種類、試験実施前後、の4ポイントの採血を行っているため、17×2×2の合計68検体をトランスクリプトーム実験、解析の対象とした。

DNA マイクロアレイは、Thermo Fisher Scientific 社の Clariom S Array, Human を用い、定法に従ってトランスクリプトームデータを取得した。Clariom S Array, Human は1サンプルあたり20,800の遺伝子発現情報を得られるツールである。得られたデータをもとに階層的クラスター解析を実施した。また、試験食摂取、プラセボ食摂取のそれぞれにおいて、試験前後での変動遺伝子を抽出し、解析に供した。

## 2. 2 結果

### 2. 1. 1 試験実施（脳機能テスト）

本試験は26名を対象に実施したが、脳機能テストにおいては、3名が解析条件を満たさなかったため、23名のデータを解析対象とした。その結果、2018年度に実施した試験と同様の結果を示す項目が複数あることが確認された。すなわち試験の正答数、正答率、回答にかかる時間等である。これらの結果から、本手法により試験食の脳機能に対する効果について、再現性高く検出可能であることが示された。

### 2. 1. 2 試験実施（血液トランスクリプトーム解析）

階層的クラスター解析では、遺伝子発現パターンの近い ID どうしが近くに配置されることから、各検体の持つ特徴を抽出しやすい(図2)。ここでは、数検体が他とは異なる遺伝子発現パターンを持つことを示す結果が得られた。続いて、試験食摂取、プラセボ食摂取のそれぞれにおいて、試験前後での変動遺伝子を抽出した。主な発現変動要因には、試験食摂取、脳機能テストの負荷、時間経過等が考えられる。変動遺伝子を抽出し、プラセボ食摂取と試験食摂取とで比較した結果、試験食摂取において特徴的に変動する遺伝子が抽出された。これらの変動遺伝子について遺伝子オントロジー(gene ontology, GO)に基づく機能性解析を実施した結果、免疫システムプロセス、細胞内タンパク質代謝、ストレス応答等の多岐に亘る応答を示していることが見出された(図3)。続いてさらに詳細に掘り下げる目的で、遺伝子発現解析用ソフトウェア Ingenuity Pathway Analysis(以下 IPA, Qiagen 社)を用いた解析を行った。GOに基づく解析にて免疫システムに関する分子が濃縮されていることが明らかになったことから、免疫や炎症

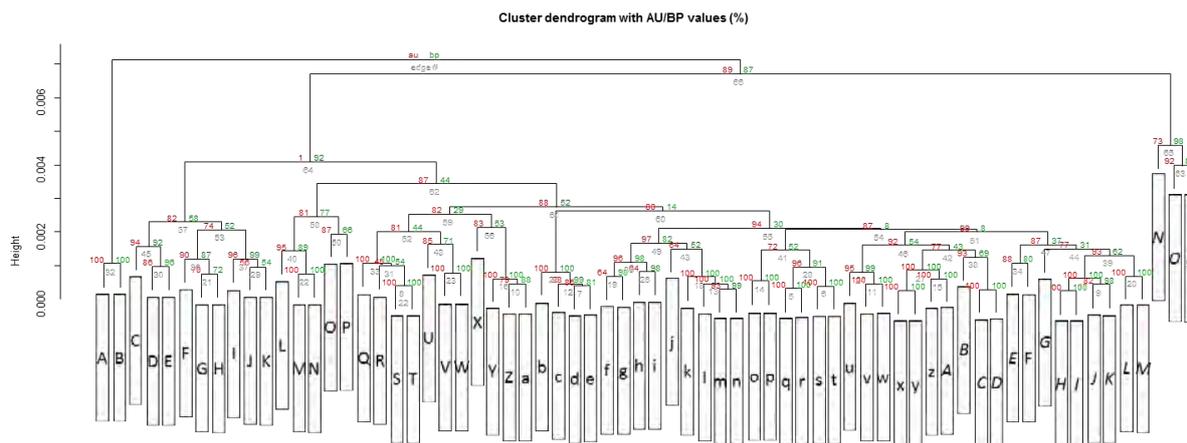


図2 血液トランスクリプトーム解析結果 階層的クラスター解析  
IDは仮のもので、個人と採血時期（試験食試験前・後、プラセボ食試験前・後）別に割り振ってある。遺伝子発現パターンの近いID どうしが近くに配置される

に関連する分子群や応答・伝達経路を中心に解析を進めたところ、プラセボ食摂取時と試験食摂取時とで試験前後の遺伝子発現パターンが大きくことなる応答・伝達経路が複数見出された。ここでは白血球の血管外遊出のシグナル伝達経路を例に示すが、プラセボ飲料摂取では発現増加する遺伝子群が試験食摂取では低下しているといった特徴が見出され、摂取した食品の種類によって、脳機能テスト実施と時間経過といった因子負荷後の生体内応答が異なることが明確に示された(図4)。

### 3. 考察と今後の展望

本研究により、食品により、その単回摂取、脳機能関連指標評価テストの実施を経て変動する血液のトランスクリプトームの様相が異なることが示され、メタボリックシンドロームのみならず、脳機能に関する未病評価や、それに対する食品の機能性の評価ツールとしての血液トランスクリプトームの有効性が示唆された。疲労やストレスに対する特定の食品の効果を検出するためには、本試験に用いた諸手法を駆使することが有効であると考えられる。食品は多成分からなり、それぞれに得意とする機能性分野が存在する。手法のブラッシュアップや新規評価手法の導入等を検討、食品の機能性評価システムとしてより広く適用・対応できるような展開を視野に、さらに追究、深耕して行く。

当グループでは、動物を対象とする脳機能測定のための手法の高精度化を検討しており、食品摂取によるわずかな差の検出を試みている。これまでには主にメタボリックシンドロームへの作用についての研究を積み重ねてきた実績があるが、脳機能に関しても同様に動物を対象とする試験（主にメカニズム解明）とヒト試験（現象）とを組み合わせ、両者を行き来しながら評価を進めていくことで、より効率的に、かつより詳細に食品の機能性を明らかにすることを目指す。

#### 【参考文献】

1. Kobayashi Y, Miyazawa M, Araki M et al. (2015) Effects of *Morus alba* L. (Mulberry) Leaf Extract in

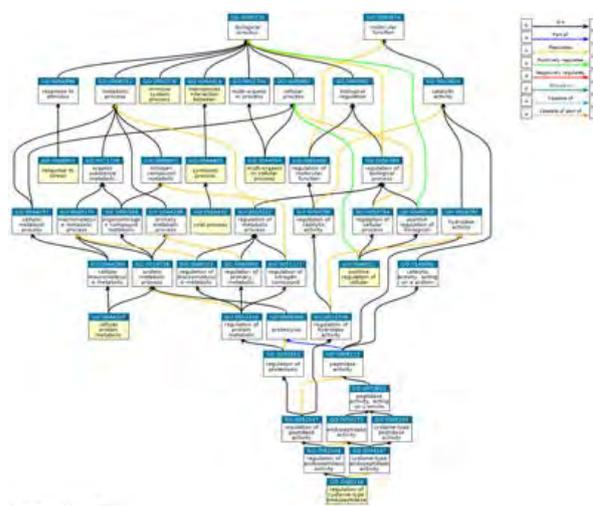


図3 血液トランスクリプトーム解析 変動遺伝子の特徴を示す遺伝子オントロジー解析結果  
黄色でハイライトされたタームが、変動遺伝子が濃縮度高く含まれる GO terms である。

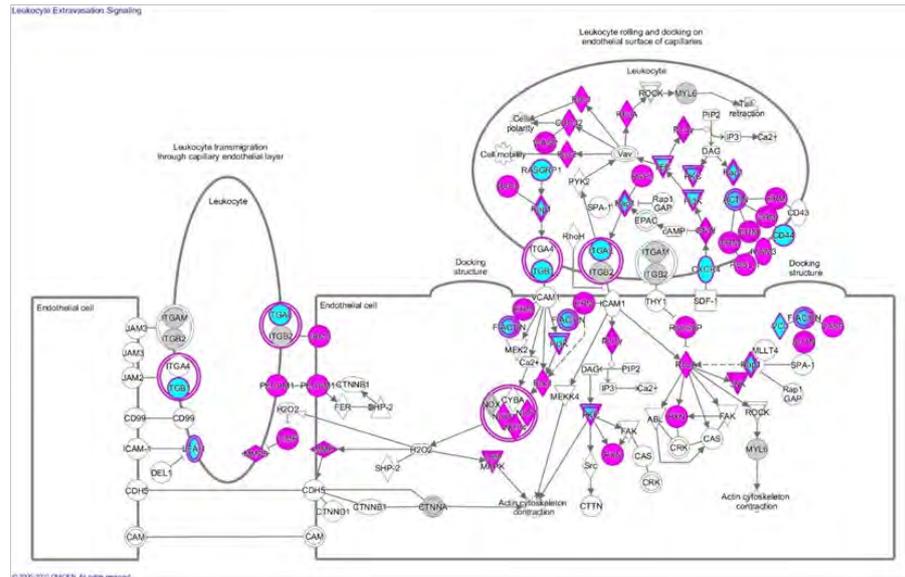
Hypercholesterolemic Mice on Suppression of Cholesterol Synthesis. *J Pharmacogn Nat Prod* 1:113.

2. Kobayashi Y, Miyazawa M, Kamei A et al. (2010) Ameliorative effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet: induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis and suppression of oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:2385-2395

3. Oda Y, Ueda F, Utsuyama M et al. (2015) Improvement in Human Immune Function with Changes in Intestinal Microbiota by *Salacia reticulata* Extract Ingestion: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *PLoS One* 10:e0142909.

4. Oda Y, Ueda F, Kamei A et al. (2011) Biochemical investigation and gene expression analysis of the immunostimulatory functions of an edible *Salacia*

(A)



(B)

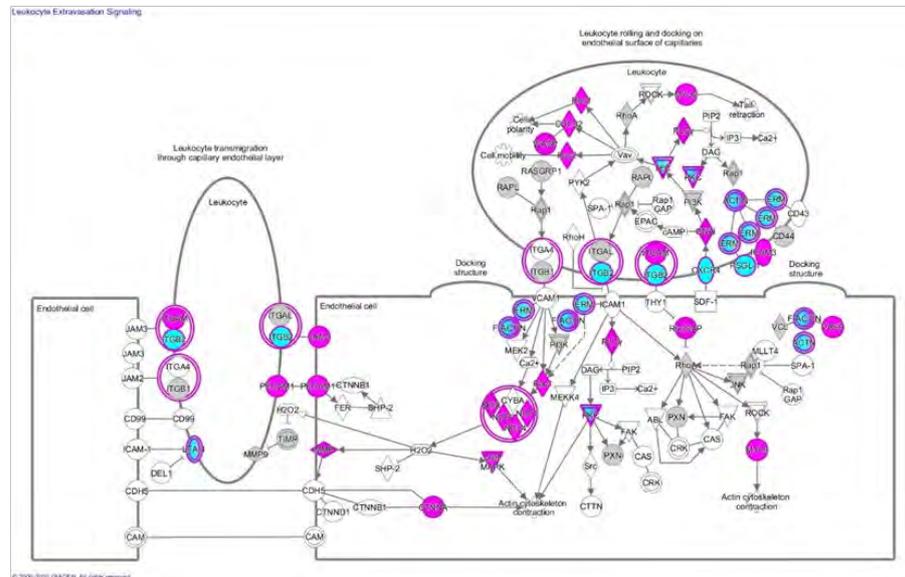


図4 プラセボ食摂取と試験食摂取の試験前後の遺伝子発現変動の違い

試験の前後における遺伝子発現変動パターンの変化を IPA の canonical pathway 解析に基づき、白血球の血管外遊出のシグナル伝達経路の関連因子を例に表示した。(A) プラセボ食、(B) 試験食の試験前後比較結果である。ピンク色にハイライトされた遺伝子は試験前に比べて試験後で発現増加したものの、水色にハイライトされた遺伝子は試験前に比べて試験後で発現減少したものの、白色の遺伝子は発現変動が認められなかったものを示す。

- extract in rat small intestine. *BioFactors* 37:31-39
5. Kondo S, Kamei A, Xiao JX et al. (2013) *Bifidobacterium breve* B-3 exerts metabolic syndrome-suppressing effects in the liver of diet-induced obese mice: a DNA microarray analysis. *Beneficial Microbes* 4:247-251
6. Kondo S, Xiao JZ, Satoh T et al. (2010) Antiobesity effects of *bifidobacterium breve* strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1656-1661
7. Fukasawa T, Kamei A, Watanabe Y et al. (2010)

- Short-chain fructooligosaccharide regulates hepatic PPARα and FXR target gene expression in rats. *J Agric Food Chem* 58:7007-7012
8. Shinozaki F, Abe T, Kamei A et al. (2016) Coordinated regulation of hepatic and adipose tissue transcriptomes by the oral administration of an amino acid mixture simulating the larval saliva of *Vespa* species. *Genes Nutrition* 11:21.
9. Kamei A, Watanabe Y, Kondo K et al. (2013) Influence of a short-term iron-deficient diet on hepatic gene expression profiles in rats. *PLoS One* 8:e65732
10. Kamei A, Watanabe Y, Ishijima T et al. (2010) Dietary

iron deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. *Physiol Genomics* 42:149-156.

11. Watanabe Y, Kamei A, Shinozaki F et al. (2011) Ingested Maple syrup evokes a possible liver-protecting effort —physiologic and genomic investigations with rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:2408-2410
12. Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F et al. (2015) Administration of a maple syrup extract to mitigate their hepatic inflammation induced by a high-fat diet: a transcriptome analysis. *Biosci Biotechnol Biochem* 79:1893-1897.
13. Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F et al. (2017) Quantitative deviating effects of maple syrup extract supplementation on the hepatic gene expression of mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 61.

# 摂取物の違いとマイクロRNAの変動

篠崎 文夏、嶋田 耕育、亀井 飛鳥

## 1. はじめに

食品は薬品とは異なり即効性がなく、効果が恒常的に働くことから、従来利用されてきた健康診断項目（例えば、血中コレステロールなど）では健常人でその効果を検出するのが難しく、食品の機能性評価を難しくしている。そのため、食品機能性評価グループは新規の指標として遺伝子発現レベルの食品摂取後の変化を捉え、その結果を発表してきた（Mol Nutr Food Res (2017), Genes Nutrition (2016), Biosci Biotechnol Biochem (2015), Biosci Biotechnol Biochem (2011)）。これまでの研究から食品が遺伝子発現に影響することは明確である。しかし、遺伝子発現はDNAからRNAに転写される段階からタンパク質の翻訳後修飾までの間の様々な段階で調節されている。食品機能性を評価するためのより鋭敏に応答する新規指標を定めるためには様々な遺伝子発現調節段階を考慮する必要がある。

ヒトの場合、ゲノムのほとんどが転写されるが、タンパク質コード領域はゲノム全体の2%程度であり、転写産物の多くはタンパク質をコードしていないRNA（non-coding RNA; ncRNA）である。ncRNAのひとつにmicroRNA(miRNA)がある。miRNAはメッセンジャーRNA（mRNA）の発現制御に関与するとともに、血液に乗って全身を巡ることから疾患や治療のバイオマーカー候補と考えられている。miRNAは発現不良などで疾病を誘発することが示唆されている。さらに、miRNAは遺伝子発現の各段階に影響し、食品や食品成分によっても発現変動すると推察されている。

そこで本研究では、小麦食品と自然薯ムカゴ含有食品の摂取前後の血中のmiRNAの発現を比較し、摂取物が血中のmiRNAに影響するのか、機能性評価の指標となり得るかを検討した。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 実験方法

#### 2. 1. 1 ヒト介入試験

ヒト介入試験は特定非営利活動法人環瀬戸内自然免疫ネットワーク(NPO-LSIN)に依頼し、2017年から2018年かけて実施された。

研究の種類は2群のランダム化クロスオーバー試験とした。また、試験自体はオープンだが、測定者がブラインド化されている状態で実施した。小麦含有食品および自然薯ムカゴ含有食品を2週間連続摂取した前後のデータを蓄積し、質問紙調

査、身体検査、血液検査の結果および全血遺伝子発現解析を実施した。研究対象者は同意取得時の満年齢が20歳以上75歳未満の男女とした。試験は次のように進められた。まず、試験開始前に試験参加検討者への説明会を行い、同意を得られた試験参加検討者へ問診と血液検査による研究対象者決定のためのスクリーニングを行い、スクリーニングされた被験者による試験品および対照品摂取期間を各2週間、ウォッシュアウト期間を2週間として、前期摂取開始前(摂取開始前)、前期摂取終了後(摂取開始2週後)、後期摂取開始前(摂取開始4週後)、後期摂取終了後(摂取開始6週後)に、評価項目の検査を実施した。

主要評価項目は、肝機能マーカー（ALT、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、ガンマグルタミールトランスペプチターゼ（ $\gamma$ -GT）、アルカリホスファターゼ（ALP）、乳酸脱水素酵素（LD）、総ビリルビン（T-Bil））とし、他に身体検査、血液検査、全血遺伝子発現、腸内菌叢、VASアンケートを実施した。

倫理委員会の承認ののち、UMIN登録（ID: UMIN000029619）を行い、研究対象者を募集した。応募者の中から、選択基準（試験参加に際し、事前に当該試験の説明を受け、その内容が理解でき、試験参加に同意できる者。同意取得時の満年齢が20歳以上の男女で、スクリーニング時の血液検査値が次の範囲内の者。ALT(U/L):30~50, AST(U/L):~50,  $\gamma$ -GT(U/L):~100, ALP(U/L):~499, LD(U/L):~280, T-Bil(mg/dL):~2.9, RBC( $10^4$ /microL):male 400~599, female 360~549, Hb(g/dL):male 13.1~17.9, female 12.1~15.9, Ht(%):male 38.5~50.9, female 35.5~47.9, Cre(mg/dL):male ~1.09, female ~0.79, T-cho(mg/dL):140~219, TG(mg/dL): 30-199, LDL-Cho(mg/dL): 60-133, HDL-Cho(mg/dL): 40-119, FPG(mg/dL):~109, HbA1c(%):~5.9)に合致するALTが通常よりも高め、かつ、治療を要しない、未病の状態に近いと考えられる方を選抜した。また、スクリーニング時の血液検査で日本人間ドック学会判定区分表の空腹時血糖、HbA1c、T-Cho、TG、LDL-Cho、HDL-Cho、CRE、赤血球数、Hb、Htに、C;要経過観察・生活改善、D1;要治療およびD2;要精検に相当する項目がある方、脂質異常症、または、糖尿病により治療、投薬を受けている方、薬物または食品（特にヤマノイモ類、小麦）に対しアレルギー症状を示す恐れのある方、試験担当医師が試験参加に影響があると判断する医薬品およびサプリメントを使用中の方、他の臨床試験に参加している、もしくは参加予定の方、同意取得日より3ヶ月前までに400mL以上、もしくは1ヶ月前までに200mL以上の献血を行った方、その他、試験担当医師により試験参加が不適であると判断された方は除外とした。

## 2. 1. 2 miRNA 分析

採取した全血からトータル RNA を抽出し、GeneChip™ miRNA 4.0 Array (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で分析した。得られた CEL データは、サーモフィッシャーサイエンティフィックの Transcriptome Analysis Console 4.0 ソフトウェアを用いて正規化した。正規化したデータは R を用いて階層的クラスター解析を行い、miRNA 発現の全体像を調べた。また、各食品の摂取前後で Fold change (FC) が 1.5 以上、p-value が 0.05 以下で変動する miRNA を抽出し、共通性を調べた。また、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて、得られた変動 miRNA の機能性を分類した。

## 2. 2 実験結果

階層的クラスター解析の結果、小麦およびムカゴともに摂取前後で miRNA の発現パターンが大きく異なった (図 1)。各食品の摂取前後で変動した miRNA は小麦およびムカゴともに発現上昇低下を合わせて 30 個であった。これらの遺伝子を用いてヒートマップを作成した (図 2)。小麦食品摂取とムカゴ食品摂取で共通して変動する miRNA は 3 個のみであり、それぞれの食品摂取で変動する miRNA は特徴的であることが明らかとなった。共通して変動していたもののひとつは Small nucleolar RNA であ

った。残りの 2 つは近年同定された miRNA であったため、機能については明らかではなかった。

IPA によって機能分類をした結果、小麦とムカゴで同様のカテゴリーが上位に出現したが、制御の方向性をみると逆であるものもあった。このため、miRNA の発現は両者で異なると考えられ、それらの miRNA が発現制御に関係する遺伝子に関しては mRNA 発現も異なるだろうと推察された。

## 3. 考察及び今後の展望

miRNA は数が少ないが、摂取物の違いに鋭敏に反応することがわかった。したがって、miRNA も食品機能評価における指標のひとつになり得ると考えられた。食品の種類や特徴毎に変動する miRNA が明確になれば、食品機能性評価や疾病予防のためのメニュー作りなどに貢献すると期待される。

### 【参考文献】

1. A. Kamei *et al.*, *Mol Nutr Food Res*, **61** (2017)
2. F. Shinozaki *et al.*, *Genes Nutrition*, **11**, 21 (2016)
3. A. Kamei *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **79**, 1893-1897 (2015)
- 4 Y Watanabe *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**, 2408-2410 (2011)

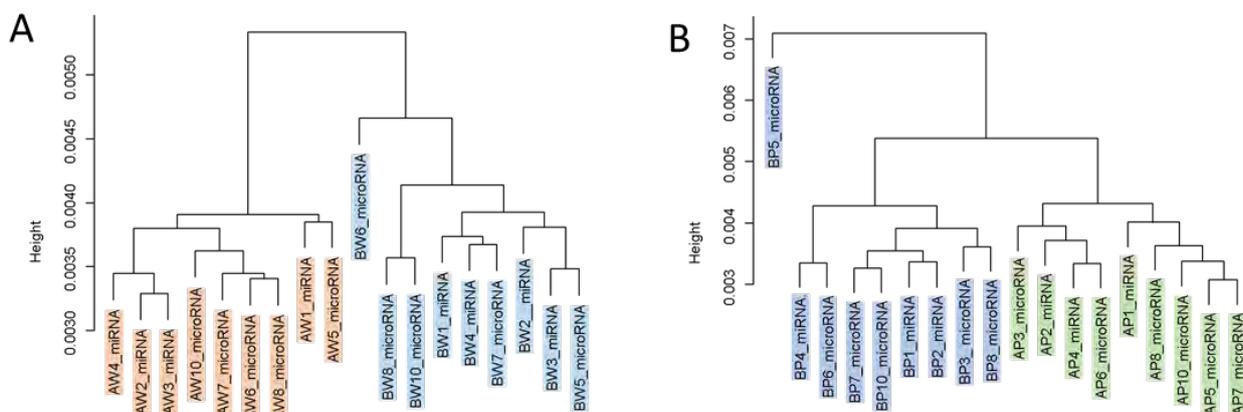


図 1 階層的クラスター解析結果

A: 小麦食品摂取, B: ムカゴ食品摂取, AW: 小麦食品摂取後, BW: 小麦食品摂取前, AP: ムカゴ食品摂取後, BP: ムカゴ食品摂取前

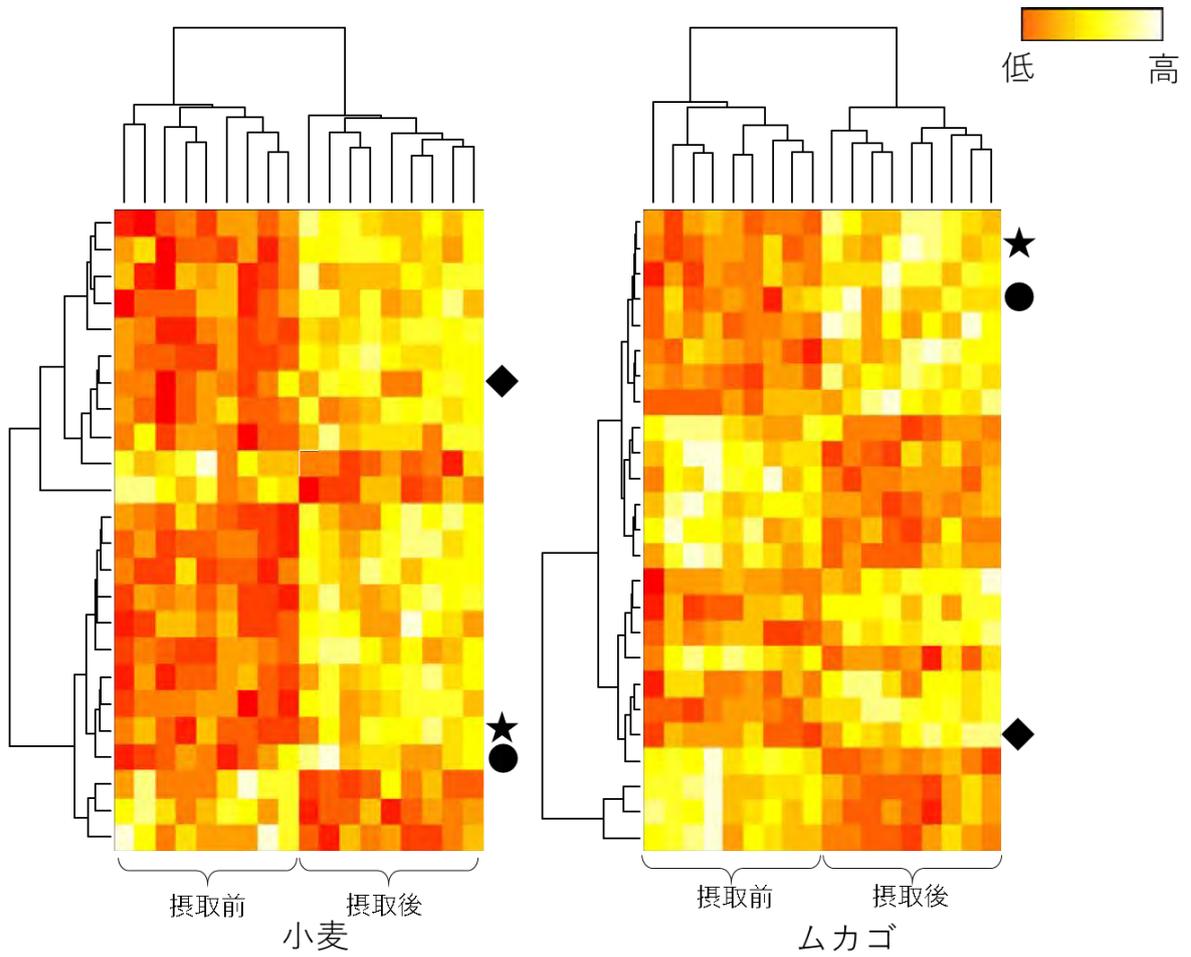


図 2 食品摂取で変動した miRNA  
同じシンボルは同じ miRNA であることを示す。

## 業 績

### 【原著論文】

1. Midorikawa, K., Kuroda, M., Yamashita, H., Tamura, T., Abe, K., and Asakura, T. *Oryza sativa* Brittle Culm 1-like 6 modulates  $\beta$ -glucan levels in the endosperm cell wall. *PLoS One*. 14(5):e0217212. doi: 10.1371 (2019)
2. Hase, T., Shishido, S., Yamamoto, S., Yamashita, R., Nukima, H., Taira, S., Toyoda, T., Abe, K., Hamaguchi, T., Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Yamada, M., Kobayashi, S. Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid  $\beta$  aggregation by increasing monoamine secretion. *Sci Rep*. 9(1):8711. doi: 10.1038 (2019)
3. Toyoda, T., Kamei, A., Ishijima, T., Abe, K., and Okada, S. A maple syrup extract alters lipid metabolism in obese type 2 diabetic model mice *Nutr Metab*. 16, 84 doi:10.1186 (2019)
4. Toyoda, T., Iida, K., Ishijima, T., Abe, K., Okada, S. and Nakai, Y. A maple syrup extract alleviates liver injury in type 2 diabetic model mice *Nutr Res*. 73, 97-101, doi: 10.1186/s12986-019-0403-2. 10.1016 (2019)
5. Kawakami, S., Ito, R., Maruki-Uchida, H., Kamei, A., Yasuoka, A., Toyoda, T., Ishijima, T., Nishimura, E., Morita, M., Sai, M., Abe, K., and Okada, S. Intake of sake-cake and rice-koji mixture improves intestinal barrier function in mouse *Nutrients* 12, 449. doi: 10.3390/nu12020449 (2020)
6. Takahashi, M., Takahashi, K., Abe, S., Yamada, K., Suzuki, M., Masahisa, M., Endo, M., Abe, K., Inoue, R., and Hoshi, H. Improvement of Psoriasis by Alteration of the Gut Environment by Oral Administration of Fucoidan from *Cladosiphon Okamuraanus*. *Mar Drugs*. 10;18(3). pii: E154. doi: 10.3390/md18030154. (2020)

### 【総説】

1. 廣川隆彦、篠崎文夏、神奈川県発フーズイノベーション 食品の機能性評価と機能性食品の開発、*FoodStyle21*、vol.23, No.5, p27-29, 2019

### 【その他】

1. 亀井飛鳥、食品の機能性を評価するために、日本食糧

新聞 2019年5月27日発行 新技術開発への寄稿

### 【口頭発表】

1. Hideo Satsu, Mizuki Honda, Asuka Kamei, Mio Aida Development of a NF  $\kappa$  B-responsive cell system and anti-inflammatory effect of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (2019年12月1-5日、兵庫)
2. 亀井飛鳥、食品の機能性を評価するために、「食品ニューテクノロジー研究会」例会、(2019年4月9日、東京)
3. 阿部啓子、食で健康を創造する～未病状態を測れるか？～、BioJapan2019/再生医療 JAPAN2019 (2019年10月11日、神奈川)
4. 亀井飛鳥、食品の機能性評価～わずかな差の検出への試み、BioJapan2019/再生医療 JAPAN2019 (2019年10月11日、神奈川)
5. 亀井飛鳥、未病と食品の機能性、第84回日本技術士会神奈川県支部 CPD 講座講座食の機能性を活かした病気の予防・改善—医食農同源：未病・改善— (2019年11月16日、神奈川)
6. 嶋田耕育、野原正勝、篠崎文夏、亀井飛鳥、立田みどり、渡邊隆之、徳田充孝、阿部啓子、体幹への着圧が代謝・生理機能に及ぼす影響、日本農芸化学会 2020年大会 (2020年3月27日、福岡)
7. 篠崎文夏、嶋田耕育、亀井飛鳥、野原正勝、立田みどり、渡邊隆之、徳田充孝、阿部啓子、着圧がマウス肝臓遺伝子発現に及ぼす影響、日本農芸化学会 2020年大会 (2020年3月27日、福岡)

### 【記者発表】

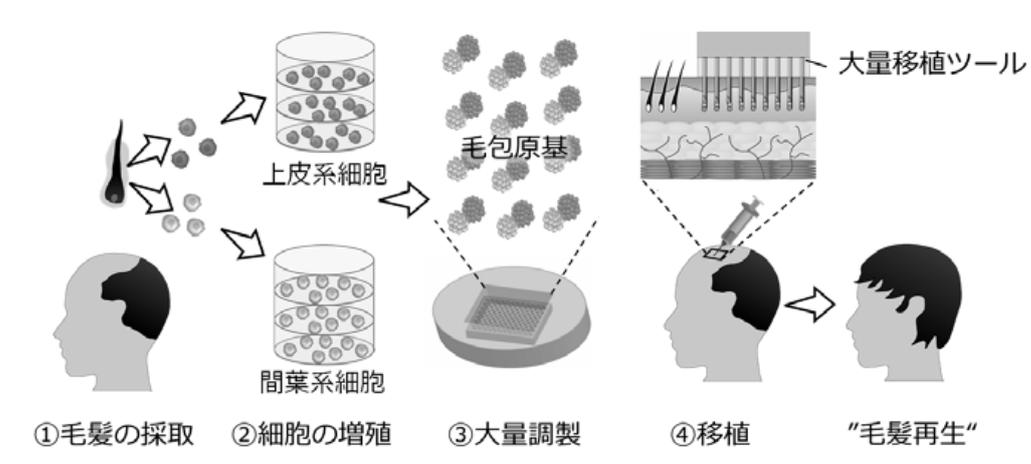
1. KISTEC が関わった研究成果のニュースリリース：メープルシロップに含まれる成分のひとつ、ポリフェノールが脂肪肝を軽減する可能性が明らかになりました、ケベック・メープルシロップ生産者協会 (2020年1月16日)

# 毛包原基の大量調製法を用いた毛髪再生医療

研究代表者：横浜国立大学 福田 淳二

## 【基本構想】

近年、毛を作り出す器官である毛包を構成している細胞そのものを用いて、脱毛症の治療を行う毛髪再生医療に期待が寄せられている。この治療法は、患者本人の髪の毛数本を取り出し、その根本にある毛包組織から毛包の幹細胞を採取して例えば 100 本分に増殖させ移植するというものである。近年、毛包を構成する 2 種類の幹細胞を用い、それぞれの細胞凝集塊を作製して接合させた上で、移植するというアプローチが提案された。この毛包原基では、胎児期に見られる上皮・間葉相互作用を誘導できるため、移植後に毛包を効率よく再生できることが報告された。しかしながら、毛包原基は顕微鏡下で 1 つずつ接合することで作られており、この手法をヒト臨床に必要な数千個の毛包原基の作製に応用することは、現実的ではなかった。一方、本プロジェクトリーダーらは、上皮系細胞と間葉系細胞の懸濁液を混ぜて 1 つの凝集体を形成させると、培養初期は 2 種類の細胞がバラバラの状態状態で凝集体内に存在するものの、培養 3 日間のうちにそれぞれの細胞が自発的に分離して毛包原基と同様の凝集体が形成されることを発見し、これを応用して独自の細胞培養器を開発することで毛包原基を大量調製する技術を確認した。その成果は新聞・メディアでも大きく取り上げられ、国内外へ特許申請を済ませたところである。本研究提案では、この技術シーズをもとに、医療機関と連携してヒト患者細胞を用いて基盤技術の確認を行い、毛髪再生医療の実用化を目指す。



毛包原基の大量調製法を用いた毛髪再生医療

## 1. 研究目的

プロジェクト 2 年目となる令和元年度は、以下の各項目を重点項目として研究を進めた。また、動物実験については、横浜国立大学動物実験専門委員会の承認を得て実施し、患者組織の利用については、横浜国立大学倫理委員会（人を対象とする医学系研究）の承認を得て実施した。

### (1) 毛包の幹細胞の採取・培養方法の検討

重点項目の 1 つ目は、毛包の幹細胞の採取方法の検討である。毛髪再生医療の細胞源には、患者本人の毛包から間

葉系細胞である毛乳頭細胞および上皮系細胞である毛包上皮幹細胞を分離して用いるアプローチが最も有力である。そこで、前年度に引き続き、クリニックより提供された毛包組織からそれぞれの細胞を高い生存率で回収・初代培養する条件の最適化を行った。

また、毛髪再生医療を実現するには、患者の毛包から得た幹細胞を、生体外で細胞数あたり 100 倍以上に増殖させる必要がある。しかしながら、この増殖培養中に細胞の毛髪再生能力が急激に低下するという課題がある。我々は、前年度の研究で、電気刺激を付与しながら培養する方法、

及び、ハイドロゲル内で三次元培養する方法が毛包幹細胞の機能維持培養に適していることをマウスの細胞を用いて示してきた。今年度は、初代培養を行った患者の毛包幹細胞について、これらの独自の継代培養法が適用できるかを評価した。

(2) 毛髪再生能の高い毛包原基の調製条件の検討

重点項目の2つ目は、毛髪再生能の高い毛包原基を調製する技術の開発である。前年度の検討で、毛髪周囲環境を模倣することを目的とし、血管内皮細胞、色素細胞、脂肪幹細胞、多血小板血漿を毛包原基作製時に組み込むことで毛髪再生能を向上させるアプローチを開発してきた。今年度は、毛髪再生能を向上させる毛包周囲のマトリクスについて検討を行った。

2. 研究成果

以下に、令和元年度の研究成果の一部を示す。

(1) 毛包の幹細胞の採取・培養方法の検討

患者の毛包組織から毛乳頭を分離し、培養ディッシュに接着させたのち、展開培養を行った。この際、培養ディッシュへのコーティング、培養液・添加因子の種類や濃度の組み合わせを検討することで、毛乳頭細胞の機能を維持しながら増殖する初代培養条件を見出した。この最適化した培養条件では、毛乳頭細胞はディッシュに接着した後、同心円状に広がるように増殖し、約1週間の初代培養で10本程度の毛髪から約 $1 \times 10^5$  cells程度の細胞が回収できることが確認された(図1A)。一方、毛包上皮幹細胞は、毛乳頭を切除した毛幹から酵素処理により回収し、初代培養を行った。こちらも同様に、培養ディッシュへのコーティング、培養液・添加因子の種類や濃度の組み合わせを検討することで、毛包上皮幹細胞の機能を維持しながら増殖する初代培養条件を見出した。最適化した培養条件におい

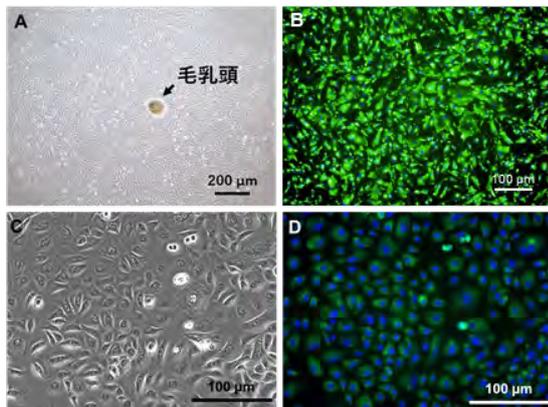


図1 毛乳頭細胞と毛包上皮幹細胞の培養 (A) 培養ディッシュに接着した毛乳頭と増殖した毛乳頭細胞、(B) 毛乳頭細胞の Versican 染色 (緑: Versican, 青: 細胞核) (C) 培養ディッシュに接着した毛包上皮幹細胞、(D) 毛包上皮幹細胞の CD200 染色 (緑: CD200, 青: 細胞核)

て、毛包上皮幹細胞は80%以上の生存率で回収することが可能であり、初代培養を行うことで10本程度の毛髪から約 $2 \times 10^5$  cells程度の細胞が回収できることが確認された(図1C)。このようにして、初代培養した細胞の幹細胞性を確認するため、毛乳頭細胞マーカーである Versican と毛包上皮幹細胞マーカーである CD200 を染色したところ、いずれも陽性細胞が多く存在することが観察された(図1B, D)。

続いて、毛乳頭細胞および毛包上皮幹細胞の継代培養を行うための培養方法の検討を行った。毛乳頭細胞は、継代培養技術の開発が比較的進んでおり、培地も専用品がいくつか開発されている。しかしながら、実際にこの培地で継代培養を行うと、4回程度の継代培養であっても毛乳頭の機能が急激に低下することが明らかになった(図2)。

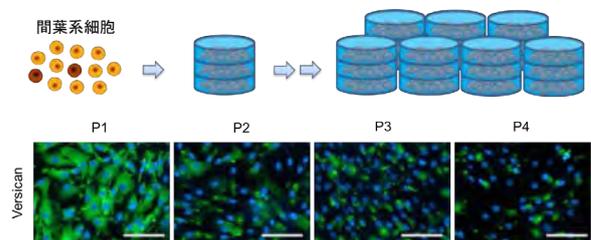


図2 毛乳頭細胞の継代培養

そこで、新たな培養方法として、電気刺激を与えながら培養を行う培養技術を開発した(PCT/JP2019/038934)。この技術では、電極上に接着させた毛乳頭細胞にパルス電流を印加することで(図3)、毛乳頭細胞の毛髪再生に関わる遺伝子発現を通常の継代培養と比較して2倍以上向上させることが可能である。最近では、患者由来の毛乳頭細胞に電気刺激を適用しても、毛髪再生能の向上が遺伝子レベルで向上することを確認している。この開発により、毛乳頭細胞は、機能を維持した状態で増殖培養することが可能になると考えている。

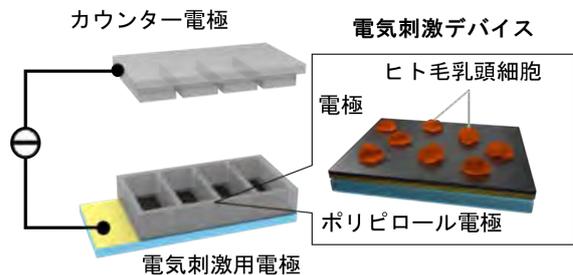


図3 毛乳頭細胞の電気刺激培養方法

一方、毛包上皮幹細胞は、通常の培養ディッシュ上での増殖培養中に脱分化しやすいために、幹細胞性を維持しながら、大量培養を行うことが毛髪再生医療の実現に向けた大きな課題の一つとなっている。そのため、培地も最適化されたものがなく、自ら調製する必要があった。そこで、培地の種類、添加因子の最適化を行った結果、平面培養に

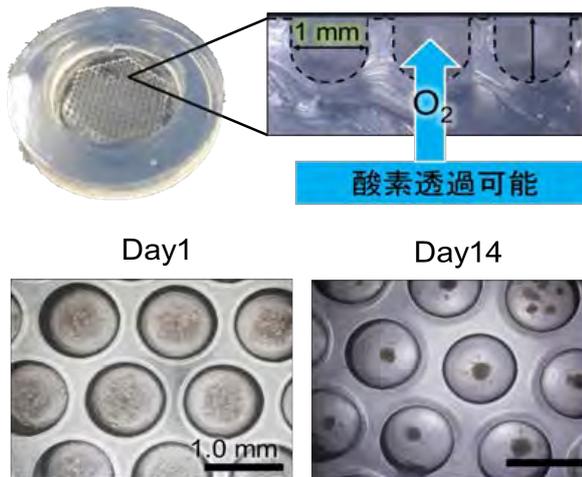


図4 毛包上皮幹細胞の培養  
スフェロイドアレイ培養器と培養 1、14 日目の毛包上皮幹細胞スフェロイド

おいても、上皮系細胞の幹細胞性を急激に落とすことなく増殖可能な培地条件を見出した。一方、前年度行ったマウスの細胞を用いた検討では、独自のスフェロイドアレイ培養器(図4)で毛包上皮幹細胞の三次元培養を行うことで、平面培養よりも有意に幹細胞性を維持しながら、細胞増殖できることを示してきた(PCT/JP2019/003903)。そこで、この三次元培養系で細胞をヒト毛包上皮幹細胞に置換し、上述の最適化した培地で培養を行ったところ、マウスの結果と同様に幹細胞性を示すマーカー遺伝子の発現が2次元培養と比較して有意に高値を示すことが確認され、毛包上皮幹細胞の維持培養に有効な結果が示された。

(2) 毛髪再生能の高い毛包原基を調製する条件の検討

毛髪再生医療を実現するためには、いかに毛髪再生能が高い移植組織を作製するかが重要となる。我々は、これまでに微細加工技術を用いて作製した独自のマイクロウェルアレイ培養器を用いて、毛包原基を均一かつ大量に作製し(図5i)、これを移植することで、生体と同等の毛髪を再生させる技術を開発してきた(JP6425319B2)。また、マウス細胞で得られた結果がヒト細胞を用いても再現できるかを確認するため、ヒト毛包組織から初代培養した毛乳頭細胞と毛包上皮幹細胞を培養器に播種したところ、マウス細胞を用いた場合と同様に毛包原基が自発的に形成されること、ヌードマウス皮下へ移植すると毛髪が再生することを確認している。

続いて、より再生効率を向上させることを目的とし、毛包原基を作製するためのいくつかのアプローチを開発した。発生過程の細胞周囲環境の再現は、生体外でより毛髪再生能の高い良質な毛包原基を構築するために有効なアイデアであろう。例えば、毛包原基は上皮の陥入後にコラーゲンを豊富に含む真皮層に間葉系細胞が凝集する過程を経ることが知られている。我々は、コラーゲンを含む間葉凝集塊を毛包原基の構成成分とすることで、毛髪再生能の向上が期待できるのではないかと考えた。これを培養液に懸濁し浮遊培養を行うと、発生初期でみられるような凝集プロセスが確認された(図5ii)。つまり、細胞けん引力によりゲルビーズの直径が3日間の培養中に約3~4分の1まで収縮し、コラーゲン濃度及び細胞密度が培養初期に比べて大幅に増加する様子が観察された。続いて、このビーズと上皮系細胞塊を三次元培養することで毛包原基構造を構築し、毛髪再生能をPCR法による遺伝子発現解析とヌードマウスへの移植実験より評価した。その結果、VersicanやWnt10bなどの毛髪再生能に関連する遺伝子の発現は、独自の培養器で調製した毛包原基と比較して有意に向上し、移植後の再生毛髪数も2倍程度向上することが確認された(T. Kageyama et al. Biomaterials, 2019,

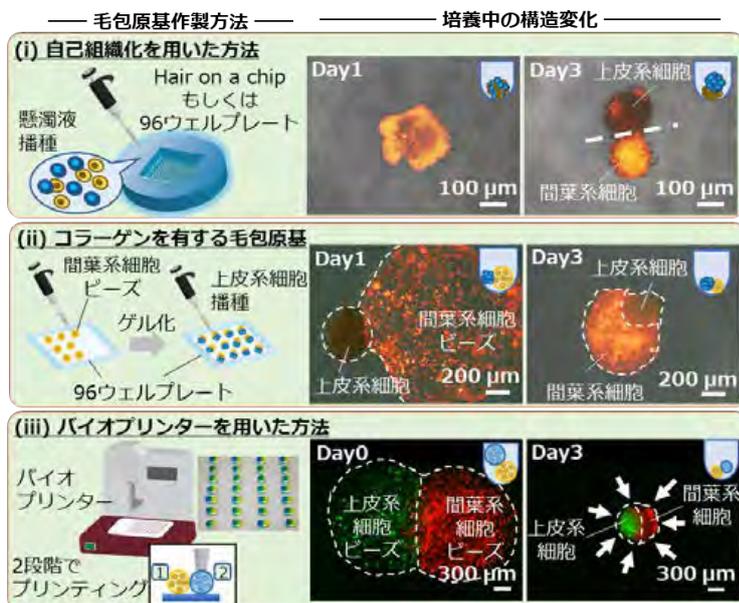


図5 毛包原基の大量調製方法 (i) マイクロウェルアレイ培養器内で自発的に形成させる方法、上皮系細胞と間葉系細胞の懸濁液を播種すると、培養1日目に細胞はランダムに1つの凝集体を形成し、3日間の培養中に同種の細胞同士が凝集しあうことで毛包原基構造を形成する (ii) コラーゲンビーズを利用した方法、間葉系細胞を包埋した微小コラーゲングルと上皮系細胞の懸濁液を丸底ウェル内で培養すると、3日間の培養中に間葉ビーズが収縮し、上皮系細胞塊と融合することで毛包原基構造を形成する (iii) バイオプリンティングを利用した方法、間葉系細胞および上皮系細胞を包埋した微小コラーゲングルを隣接させて、毛包原基構造を形成する。

PCT/JP2017/021770)。また、このアプローチにおいて、上皮系細胞もゲルビーズに置き換え、バイオプリンティング技術を用いることで、毛包原基の大量調製も実現している。つまり、上皮系及び間葉系細胞をそれぞれコラーゲンゲルに懸濁し、バイオプリンターを用いて撥水性表面にドロップレットとして隣接するように打ち出すことで、毛包原基様構造を作製した(図 5iii)。この方法では、24 個のノズルを並列に設置したバイオプリンターを用いることで、毛包原基 100 個あたりを約 15 秒で作製でき、わずか 10 分程度で数千個の均一な毛包原基を大量調製可能である。作製した毛包原基を 3 日間培養すると、自身の細胞けん引力により、長径約 3.5 mm から約 0.8 mm にまで収縮し、細胞が自発的に高濃度にコラーゲンを含んだ組織体を形成した。さらに、この毛包原基をヌードマウスへ移植すると、一定の毛周期を繰り返す毛髪を再生することを確認した(PCT/JP2019/016332)。

また、我々は生体外で毛包組織そのものを再生し、これを植毛と同様に移植するアプローチについても開発を進めてきた。上述の毛包原基をそのまま長期間培養すると、培養系において毛幹様の構造が徐々に伸長する現象を発見した(図 6A, B)。培養 23 日目の毛幹様構造の電子顕微鏡像からは、生体の毛幹の基本的な構造であるマイクロフィブリルも確認されている(図 6C)。また、美容クリニックで発毛効果が認められ使用されている Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) を培養液に添加したところ、FGF-2 を添加した場合は添加しなかった場合と比べて、毛幹様構造の形成効率が約 6 倍向上することが分かった。

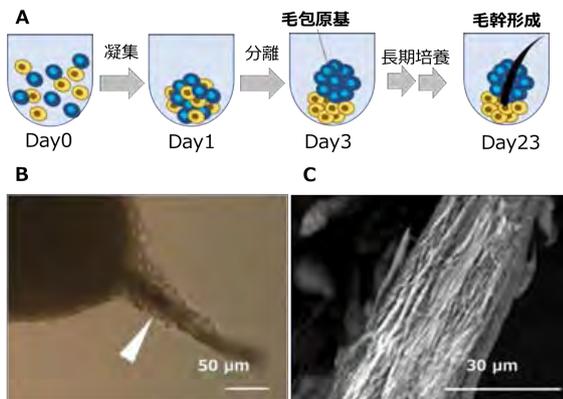


図 6 毛包原基の長期培養による生体外毛髪再生 A: 自己組織化を利用した毛包原基作製法 B: 形成された毛幹様構造, C: 毛幹様構造のコルテックス

さらに、毛包原基を様々な成長因子を含む培地で長期間培養することで、in vitro で毛髪を再生できる条件を見出し、これを移植することで高効率に毛髪を再生させる技術を開発した(PCT/JP2019/031142)。この技術では 2 種類の細胞は、数時間で 1 つの凝集体を形成した後、2 日間の培養中に各種細胞が自発的に分離することで毛包原基を形成し、培養 4 日目に毛髪を形成した。さらに培養を行うと

この毛髪が伸長する様子が観察され、形成した毛髪は特徴的なキューティクル、コルテックス、メラニンなどの毛髪の基本構造を有していた(図 7)。

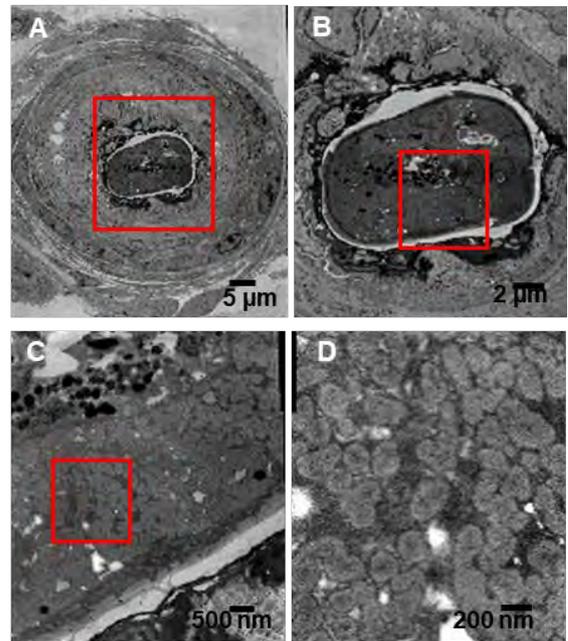


図 7 再生毛髪断面の走査型電子顕微鏡画像 A: 全体図 B: A の赤枠の拡大図, C: B の赤枠の拡大図, D: C の赤枠の拡大図

そこで、この再生毛包組織をヌードマウスの背部に移植したところ、移植 8 日後には、移植部位から毛髪の再生が確認され(図 8)、その毛髪再生効率は 8-9 割程度と、単に毛包原基を移植する場合と比較して優位に向上していた。このように、移植組織の作製方法を最適化することで、現在の植毛治療の再生効率に匹敵するレベルまで再生効率を改善することができた。



図 8 生体外再生毛髪の移植により再生した毛髪

## 業 績

## 【原著論文】

1. Tatsuto Kageyama, Lei Yan, Akihiro Shimizu, Shoji Maruo, Junji Fukuda, Preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine, *Biomaterials*, 212, 55-63, 2019

## 【書籍】

1. 平野杉, 景山達斗, 福田淳二, 毛髪再生医療の現状と実用化へ向けた課題, 再生医療の開発戦略と最新研究事例集, 第2章, 第1節, 技術情報協会, 2019
2. 中嶋陸満, 景山達斗, 福田淳二, 毛髪科学の新展開, 毛包原基の大量調製技術の開発, 第11章, 監修 岩渕徳郎, シーエムシー出版, 2019
3. 南茂彩華, 景山達斗, 福田淳二, Hair on a chipのための生体外における毛包誘導技術, 月刊「細胞」4月号, ニュー・サイエンス社, 2020

## 【口頭発表】

1. Tatsuto Kageyama, Chisa Yoshimura, Sugi Hirano, Keiichiro Kasai and J. Fukuda, Hair follicle germ formation on oxygen-permeable microwell array chips for hair regenerative medicine. 11th world congress hair research, Sitges, Barcelona, Apr. 2019
2. Tatsuto Kageyama and J. Fukuda, Dermal papilla cells-encapsulated hair beads for hair regenerative medicine. ISSCR 2019 Annual Meeting, Los Angeles, California, U.S. Jun. 2019
3. Sugi Hirano, Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda, Expansion of hair follicle stem cells in microfabricated oxygen-permeable culture vessel for hair regenerative medicine. ISSCR 2019 Annual Meeting, Los Angeles, California, U.S. Jun. 2019
4. Rikuma Nakajima, Akihiro Shimizu, Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda, In vitro hair shaft generation from 3D cell aggregate for hair regenerative medicine, 2019 MRS fall meeting & exhibit, Boston (USA), Des.2019
5. 景山達斗, 微細加工技術を用いた三次元組織構築技術の開発, 化学とマイクロナノシステム学会第39回研究会(受賞講演) 2019年5月
6. 景山達斗, 骨・毛髪再生医療のための細胞包埋ゲルビ

ーズ、ものづくりライフイノベーション・シンポジウム 2019 (招待講演) 2019年6月

7. 中嶋陸満, 清水亮啓, 景山達斗, 福田淳二, In vitro 毛幹形成技術とこれを利用した毛髪の再生医療、第71回日本生物工学会大会 2019年9月
8. 南茂彩華, 景山達斗, 福田淳二, 毛髪再生医療のための毛包原基のバイオプリンティング, 第41回日本バイオマテリアル学会大会 2019年11月
9. 景山達斗, 福田淳二, 薬剤スクリーニングのための毛包オルガノイド, 第29回日本色素細胞学会(口頭) 2019年11月
10. 平野杉, 景山達斗, 福田淳二, 毛髪再生医療に向けた毛包幹細胞の増殖培養技術の開発, 第7回細胞凝集研究会 2019年11月
11. 景山達斗, 毛髪再生医療のための三次元培養技術の開発, 2019年度 材料技術研究協会討論会(招待講演) 2019年12月
12. 中嶋陸満, 清水亮啓, 景山達斗, 福田淳二, In vitro 毛幹形成技術を用いた毛髪の再生医療, 第19回日本再生医療学会総会 2020年5月
13. 南茂彩華, 景山達斗, 福田淳二, バイオプリンティング技術を用いた毛包原基作製, 第19回日本再生医療学会総会 2020年5月

## 【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 5件

# ナノカーボン光源分析装置開発

研究代表者：慶應義塾大学 牧 英之

## 【基本構想】

本研究では、カーボンナノチューブやグラフェンといったナノカーボン材料を用いたチップ上の超小型・超高速ナノカーボン光源を用いて、従来のマクロな光源では実現できない全く新しい原理の分析装置開発を行う。ここでは、ナノカーボン光源を用いた分析技術の原理実証を行うとともに、分析装置に最適化したナノカーボン光源の開発も行う。また、これらの技術を融合して、新規分析装置のプロトタイプ開発まで進めて、ナノカーボン光源の優れた特性を生かした新しい分析装置の基盤技術を構築する。これにより、現在の分析装置では達成できない高い空間分解能や時間分解能を有する新たな分析装置システムの実現を目指すとともに、本技術を広い分野で応用することを目指す。プロジェクト2年目となる令和元年度は、高空間分解能分析に向けた超小型グラフェン発光素子の開発と、従来に比べて少ない工程で安価に量産可能なグラフェン作製法として、多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に直接パターンニング成長させる方法の開発の開発とその黒体放射発光素子応用に成功した。

## 1. 研究目的

カーボンナノチューブやグラフェンといったナノカーボン材料を用いたナノカーボン光源は、シリコン基板上に集積可能な、超小型で超高速な光源として期待されている。これまでに我々は、カーボンナノチューブやグラフェンを用いた超小型黒体放射発光素子の作製や、これらの超高速変調メカニズムの起因の解明に成功した。本戦略シーズ育成事業においては、研究代表者が開発してきたナノカーボン発光素子を用いて、従来のマクロな光源では実現できない全く新しい原理に基づく分析装置の開発を行う。さらに、実用化も視野に、ナノカーボン発光素子の量産技術の構築やさらにオリジナリティの高い新たなナノカーボン光源の開発も平行して進める。プロジェクト2年目となる令和元年度は、高空間分解能分析に向けた超小型グラフェン発光素子の開発と、従来に比べて少ない工程で安価に量産可能なグラフェン作製法として、多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に直接パターンニング成長させる方法の開発の開発とその黒体放射発光素子応用に成功した。

## 2. 研究成果

### (1) 高空間分解能分析に向けた超小型グラフェン発光素子の開発

グラフェンへの通電加熱による発光デバイスであるグラフェン発光素子は、(i) 黒体放射によるブロードな赤外発光が得られる、(ii) 微細加工技術による超小型化・高集積化などの加工が可能、(iii) シリコン基板上に安価に作製が可能、(iv) 100 ps 未満の応答速度（周波数 10 GHz）で直接変調可能なことから、赤外領域における新規光源として期待されている（戦略的研究シーズ育成事業開始前に Nature Communications 誌に掲載）。

本研究では、従来の分析装置の空間分解能を大きく上回る高分解能な分析装置を開発することから、超小型のグラ

フェン発光素子の開発に着手した。そこで、従来のグラフェン発光素子の約 10 分の 1 のサイズとなる  $1\ \mu\text{m}$  角の超小型グラフェン発光素子の作製を試みた。作製した超小型グラフェン発光素子の光学顕微鏡像と赤外カメラ像をそれぞれ、図 1 に示す。

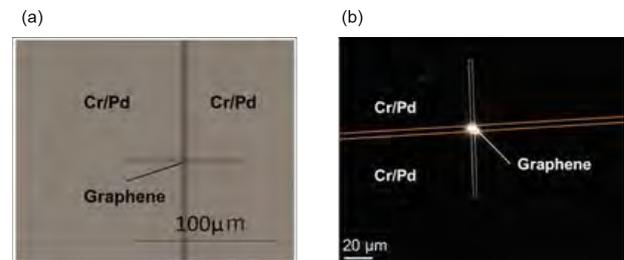


図 1  $1\ \mu\text{m}$  角の超小型グラフェン発光素子の光学顕微鏡像 (a) と赤外カメラ像 (b)。

図 1 (a) に示すように、従来と同等な方法で、 $1\ \mu\text{m}$  角の超小型グラフェン発光素子の作製が可能となったことが明らかとなった。また、図 1 (b) に示すように、2つの電極間のグラフェン領域に高く局在した高輝度発光の観察に成功した。これから、従来の分析装置を上回る高空間分解能分析装置に必要な光源が、作製可能なことが明らかとなった。

### (2) 多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に直接成長させる方法の開発

一般に、グラフェンは、機械的剥離法または化学気相成長 (CVD) 法により得られる。機械的剥離法では、グラフェンを高配向性熱分解グラファイトから機械的に剥離し、シリコン基板に転写する。この簡単な方法で得られたグラフェンは、高い結晶性を示すが、グラフェンの転写位置、サイズ、形状、および層数を制御することは不可能であり、実際の応用および集積化には不適である。一方、CVD 法では、 $\text{CH}_4$  などの炭化水素ガスと Cu 単結晶などの金属触

媒基板を高温で化学反応させてグラフェンを合成する。この方法で得られたグラフェンは、大面積かつ均一であるが、グラフェンを導電性金属触媒基板からシリコン基板に転写するために、追加の処理ステップが必要となる。上記いずれの方法にもシリコン基板への転写のプロセスが必要であるが、これこそがグラフェン発光素子の量産化を阻む大きな原因となっている。本研究で開発する分析装置の実用化では、分析装置自体の開発に加えて、量産化可能な発光素子開発が研究成功のキーテクノロジーの一つである。そこで、多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に直接させる方法 (図 2) を開発した。

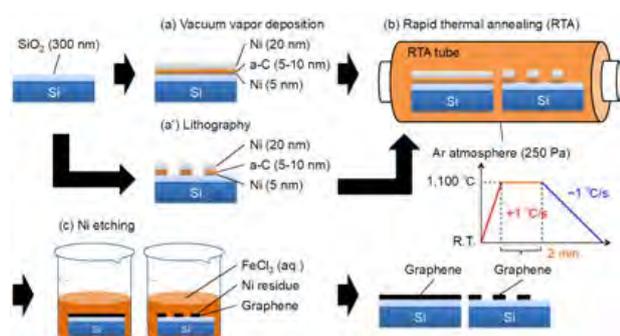


図 2 多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に直接成長させる方法。リソグラフィーにより Ni と a-C をあらかじめパターンニングしておくことにより、グラフェンを任意のサイズ・大きさで、任意の位置に直接パターンニング成長させることができる。本図は著作権者である Royal Society of Chemistry の許可のもとに掲載した。

本手法は、(a) 真空蒸着、(b) 急速熱アニール、(c) 金属触媒エッチングの 3 つのステップから構成される。(a) 真空蒸着では、金属触媒及び固体炭素源として用いる Ni と a-C を真空蒸着により成膜する。ここで、a-C に比べ Ni の方がシリコン基板との接着が強いので、薄い Ni (5 nm) をシリコン基板上に堆積させた。(b) 急速熱アニールでは、原材料を成膜した基板を急速熱アニール炉に導入し、250 Pa の Ar 雰囲気下で急速昇温 (+15°C/s)・急速降温 (-1°C/s)、及び高温での熱処理 (1100°C、2 分間) を行う。急速熱アニール炉は、CVD 法で一般的に用いられる電気炉に比べ温度の高速かつ正確な制御が可能のため、短時間でグラフェンの合成が再現性高く可能である。(c) 金属触媒エッチングでは、急速熱アニールによりグラフェンが合成された基板を酸溶液 (FeCl<sub>3</sub>(aq.)) に浸漬させることにより、金属触媒である Ni を溶解させ除去した。

本手法により成長させたグラフェンの光学顕微鏡像、ラマンスペクトル、ラマンマッピングをそれぞれ、図 3 に示す。

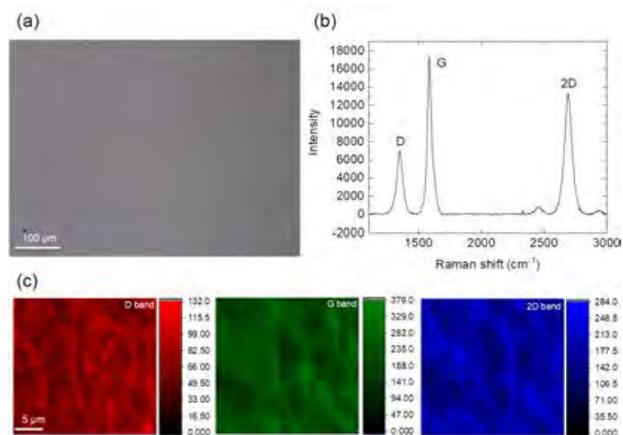


図 3 成長したグラフェンの光学顕微鏡像 (a)、ラマンスペクトル (b)、ラマンマッピング (c)。本図は著作権者である Royal Society of Chemistry の許可のもとに掲載した。

図 3 (a) に示すように、基板全面を覆う大面積なグラフェンが明らかな欠陥やシワなしに成長したことが分かる。また、図 3 (b) に示すように、グラフェンの D バンド、G バンド及び 2D バンドに起因するラマンピークがそれぞれ、1346 cm<sup>-1</sup>、1584 cm<sup>-1</sup>、2691 cm<sup>-1</sup> に観測され、2D バンドと G バンドの強度比 ( $I_{2D}/I_G=0.757$ ) 及び D バンドの存在から、成長したグラフェンは数層の多結晶グラフェンであることが明らかとなった。また、図 3 (c) に示すラマンマッピングにおいて、それぞれのラマンバンドの強度がグラフェン領域内ではほぼ同じであることから、成長したグラフェンが均一であることが明らかとなった。

金属触媒エッチング前後の SEM 像、EDX 結果、XRD 結果をそれぞれ、図 4 に示す。

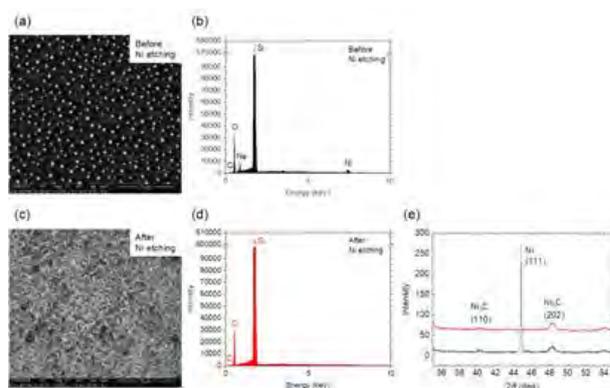


図 4 金属触媒エッチング前後の成長したグラフェンの SEM 像 (a, c)、EDX 結果 (b, d)、XRD 結果 (e)。EDX 結果から、金属触媒エッチング前 (後) の C、O、Si、及び Ni 原子数の割合 (%) は、それぞれ、3.43 (1.93)、28.44 (28.22)、65.98 (69.81)、及び 1.28 (0.04) であった。本図は著作権者である Royal Society of Chemistry の許可のもとに掲載した。

図 4 (a) に示すように、金属触媒エッチング前のグラフェン表面に多数の球形の粒子が観察された。図 4 (b) から

分かるように、これらの粒子は、Ni や Ne 不純物を含むことが明らかとなった。一方、図 4 (c)、(d) から、金属触媒エッチングにより、これら粒子の除去に成功し、残留 Ni がほとんど存在しないことが明らかとなった。(これは、図 4 (e) において、Ni (111) に起因する  $2\theta=44.6$  deg のピークが金属触媒エッチングにより完全に消失したことから分かる。) 一方、図 4 (e) において、ニッケルカーバイド  $Ni_3C$  の (110) 及び (202) に起因する  $2\theta=40.1$  deg、 $48.0$  deg のピークが金属触媒エッチングにより不変であることから、副生成物として同時に生成する  $Ni_3C$  は  $FeCl_3$  (aq.) により除去不能であることが明らかとなった。しかし、EDX 結果から、Ni 原子の割合は少ないと考えられ、後述の (4) に示すように、表面に  $Ni_3C$  が残留していても、黒体放射発光素子応用は可能であるため、大きな問題はないと考えた。

(3) 多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に任意のサイズ・大きさと、任意の位置に直接パターンニング成長させる方法の開発

(2) で述べたように、多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に直接成長させる方法の開発に成功した。さらに、本研究では、従来必須なプロセスであったグラフェン成形のためのドライエッチングが不要で、任意のサイズ・大きさと、任意の位置に直接パターンニング成長させる方法の開発も進めた。ここでは、図 2 に示すように、リソグラフィーにより Ni と a-C をあらかじめパターンニングしておくことにより、任意のサイズ・大きさと、任意の位置に直接パターンニング成長させることを目指した。

本手法により成長させたグラフェンの光学顕微鏡像、ラマンスペクトル、ラマンマッピング、金属触媒エッチング後の SEM 像、EDX 結果をそれぞれ、図 5 に示す。

図 5 (a) に示すように、任意のサイズ・形状を有するグラフェンを、シリコン上に直接パターンニング成長することに成功した。非常に大きなパターンにおいても、明確な欠陥やシワなしに成長していることや、正方形・長方形といった単純な形状のみならず、渦巻き状などの複雑な形状も再現性高く成長できることが分かる。さらに、作製できるグラフェンの最小線幅は少なくとも  $5 \mu m$  以下であることが明らかとなった。また、図 5 (b) に示すように、グラフェンの D バンド、G バンド及び 2D バンドに起因するラマンピークがそれぞれ、 $1348 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1588 \text{ cm}^{-1}$ 、 $2695 \text{ cm}^{-1}$  に観測され、2D バンドと G バンドの強度比 ( $I_{2D}/I_G=0.953$ ) 及び D バンドの存在から、成長したグラフェンは二層の多結晶グラフェンであることが明らかとなった。また、図 4 (c) に示すラマンマッピングにおいて、それぞれのラマンバンドの強度がグラフェン領域内でほぼ同じであることから、成長したグラフェンが均一であることが明らかとなった。また、図 5 (d) 及び 5 (e) から、球形の Ni 粒子は、酸処理により除去されており、残留 Ni がほとんど存在しないことが明らかとなった。

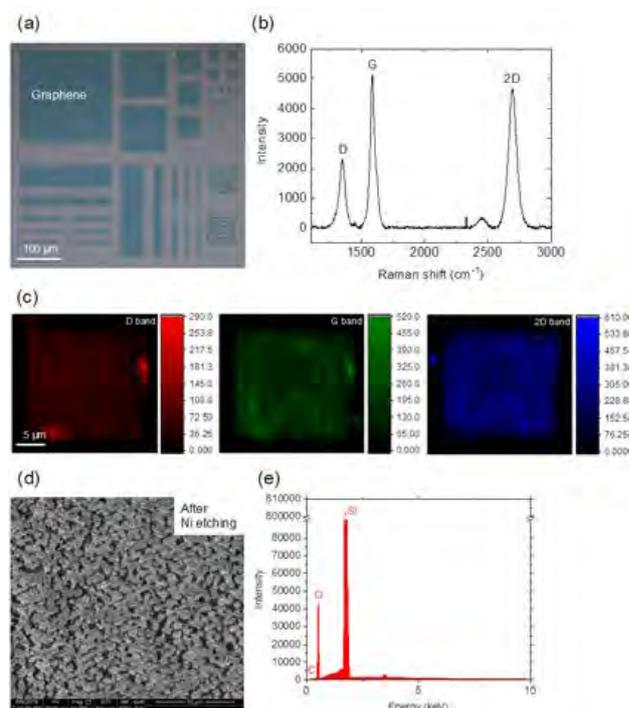


図 5 成長した直接パターンニンググラフェンの光学顕微鏡像 (a)、ラマンスペクトル (b)、ラマンマッピング (c)、金属触媒エッチング後の SEM 像 (d)、EDX 結果 (e)。EDX 結果から、C、O、Si、及び Ni 原子数の割合 (%) は、それぞれ、2.44、28.69、68.86、及び 0.02 であった。本図は著作権者である Royal Society of Chemistry の許可のもとに掲載した。

本手法により、急速熱アニールの前にあらかじめ、リソグラフィーによる原材料のパターンニングを行うだけで、基板上に直接成長させるグラフェンのサイズ・形状、及び位置を制御できる。そのため、本手法は、従来必須なプロセスであったグラフェン成形のためのドライエッチングが不要な点や、プロセスの複雑さ・ステップ数、及びコストの削減の点で有利である。そのため、従来に比べて少ない工程で安価に量産可能なグラフェン作製法として、(3) に後述する黒体放射発光素子応用のみならず、検出素子などの他の光電子デバイスや、トランジスタ・センサ・回路といった電子デバイスへの応用も期待される。

(4) 多結晶直接パターンニンググラフェンの黒体放射発光素子応用

(2) 及び (3) で開発した直接パターンニンググラフェンの発光素子応用可能性を評価するため、ソース及びドレイン電極として Pd (145 nm)/Cr (5 nm) を真空蒸着によりグラフェン上に堆積することにより、発光素子化した。その発光素子の光学顕微鏡像、電流の DC バイアス依存性 ( $I-V_{ds}$  曲線)、赤外発光像、発光スペクトルをそれぞれ、図 6 に示す。

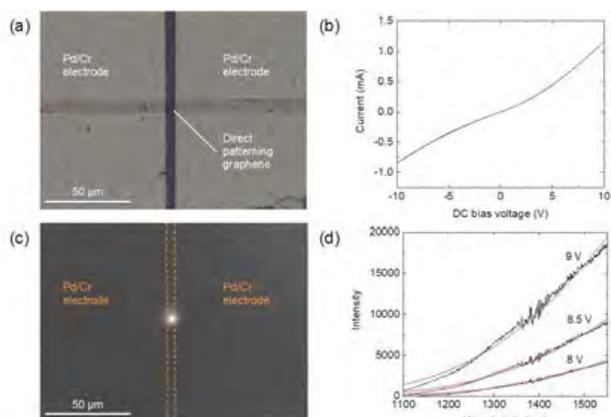


図6 直接パターニンググラフェン発光素子の光学顕微鏡像 (a)、 $I$ - $V_{ds}$  曲線(b)、赤外発光像 ( $V_{ds}=9V$ ) (c)、発光スペクトル (d)。本図は著作権者である Royal Society of Chemistry の許可のもとに掲載した。

図6(a)に示すように、 $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ のサイズの正方形の発光部を持つ発光素子を作製した。図6(b)に示すように、 $I$ - $V_{ds}$ 曲線は、測定した  $V_{ds}$  範囲内においてほぼオーミックな挙動を示すことが明らかとなり、 $V_{ds}=9V$ における抵抗値は  $8914 \Omega$ であった。また、図6(c)に示すように、2つの電極間の直接パターニンググラフェン領域に高く局在した高輝度発光の観察に成功した。また、図6(d)に示すように、近赤外領域のブロードな発光スペクトルは、Planckの法則でフィッティングすることが可能なことから、直接パターニンググラフェンからの発光は、ジュール加熱による黒体放射であることが明らかとなった。Planckの法則でフィッティングすることにより推定されたグラフェンの温度は、 $V_{ds}=8V$ 、 $8.5V$ 、 $9V$ において、それぞれ、 $748K$ 、 $819K$ 、 $920K$ であった。以上の結果は、直接パターニンググラフェンのような多結晶グラフェンであっても、機械的剥離法やCVD法によって得られる高結晶性グラフェンに基づく発光デバイスと同様に動作することを示している。

以上に示すように、本研究事業で最も重要となる発光素子の量産化でブレイクスルーとなる技術を獲得したことから、計画以上のペースで量産化技術の確立に成功し、本事業の分析装置開発を産業的に実用化する目途をつけることに成功した。なお、これらの研究に関する成果を元に特許申請を行った。また、本研究成果は RSC Advances 誌に掲載された(業績の【原著論文】の1.)。

### 3. まとめと今後の展望

以上に示すように、令和元年度は、高空間分解能分析に向けた超小型グラフェン発光素子の開発と、従来に比べて少ない工程で安価に量産可能なグラフェン作製法として、多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に直接パターニング成長させる方法の開発とその黒体放射発光素子応用に成功した。

今後は、新規分析装置に最適なナノカーボン光源の開発

を更に進め、ナノカーボン光源による超高分解分析技術の原理実証を世界に先駆けて達成する。とくに、これまで研究代表者が開発してきたナノカーボン光源を用いた分析技術を、光学系や測定プログラムなどの測定系構築を進めることにより更に発展させ、局所分析および超高分解分析を実証する。

一方、開発した新規分析装置の実用化を可能とする量産型のナノカーボン光源も開発する。既に、多結晶グラフェンを固体炭素源からシリコン基板上に直接パターニング成長させる方法の開発とその黒体放射発光素子応用に成功したことから、これを更に発展させ、分析に適した構造を持つ量産型のナノカーボン光源の開発も進める。

## 業 績

### 【原著論文】

1. K. Nakagawa, H. Takahashi, Y. Shimura, H. Maki, A light emitter based on practicable and mass-producible polycrystalline graphene patterned directly on silicon substrates from a solid-state carbon source, *RSC Advances*, **9**, 37906-37910 (2019).
2. R. Kawabe, H. Takaki, T. Ibi, Y. Maeda, K. Nakagawa, H. Maki, Pure and Efficient Single-Photon Sources by Shortening and Functionalizing Air-Suspended Carbon Nanotubes, *ACS Appl. Nano Mater.*, **3**, 682 (2020).

### 【総説】

1. 牧英之、中川鉄馬、高橋英統、ナノカーボン発光素子の開発とその応用展開、*固体物理*、**54**, 315 (2019).

### 【口頭発表】

(口頭発表・国内)

1. 《招待有り》牧英之，“ナノカーボン光電子デバイス開発”，二次元材料に関する第3回 KOINE ミーティング，2019年7月12日，九州大。
2. 牧英之，高橋英統，志村惟，深澤佑介，三好勇輔，河原憲治，吾郷浩樹，中川鉄馬，“ナノカーボン材料を用いたシリコンチップ上高集積光源開発”，第46回炭素材料学会年会，2019年11月28日，岡山大。
3. 牧英之，“低次元材料成長を用いた量子デバイス開発”，スピントロニクス学術基盤と連携ネットワーク拠点 Spin Research Network of Japan 【Spin-RNJ】2019年度（令和元年度）年次報告会，2019年12月9日，大阪大。
4. 《招待有り》牧英之，“ナノカーボン材料を用いた光電子デバイス開発”，東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究会，2020年2月19日，東北大。
5. 《招待有り、シンポジウム》牧英之，“ナノカーボン材料を用いたチップ上光電子デバイス開発”，第67回応用物理学会春季学術講演会，2020年3月13日，上智大。

(口頭発表・国際)

1. H. Takahashi, Y. Suzuki, N. Yoshida, K. Nakagawa and H. Maki, “Trion-Based High-Speed Electroluminescence Emitters with Carbon Nanotube Films”, 32nd

International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2019), October 31, 2019, International Conference Center Hiroshima (Japan).

2. 《招待有り》H. Maki, “Nanocarbon-based optoelectronic devices on silicon chips”, The 4th Graphene Flagship EU-Japan Workshop on Graphene and related 2D materials, November 19, 2019, Palazzo della Carovana, Scuola Normale Superiore, Pisa (Italy).

(ポスター発表・国際)

1. H. Takahashi, Y. Suzuki, N. Yoshida, K. Nakagawa and H. Maki, “Trion-based High-speed Carbon Nanotube Films Electroluminescence Emitters”, Materials Research Meeting 2019 (MRM 2019), December 11, 2019, Yokohama Symposia.

(ポスター発表・国内)

1. 高橋英統，鈴木祐司，中川鉄馬，牧英之，“トリオン発光によるカーボンナノチューブ薄膜高速 EL 素子”，第57回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム，2019年9月5日，名古屋大学。
2. 中川鉄馬，高橋英統，志村惟，牧英之，“シリコン上グラフェン黒体放射発光素子の発光特性”，2019年第80回応用物理学会秋季学術講演会，2019年9月21日，北海道大学。
3. 河部倫太郎，加藤浩太，中川鉄馬，牧英之，“ナノカーボン材料による量子デバイス開発”，スピントロニクス学術基盤と連携ネットワーク拠点 Spin Research Network of Japan 【Spin-RNJ】2019年度（令和元年度）年次報告会，2019年12月9日，大阪大。
4. 志村惟，高橋英統，中川鉄馬，牧英之，“量子熱輸送を用いたナノカーボン発光素子開発”，スピントロニクス学術基盤と連携ネットワーク拠点 Spin Research Network of Japan 【Spin-RNJ】2019年度（令和元年度）年次報告会，2019年12月9日，大阪大。

### 【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 2件

# 3D ナノ界面を有する異種接合技術の開発

研究代表者：早稲田大学 細井 厚志

## 【基本構想】

本プロジェクトは、自己組織化により金属表面に高秩序、高密度なナノ空間構造体を創製し、炭素繊維強化熱可塑性プラスチック積層板と金属の新しい接合技術を開発し、力学的特性と接合・破壊メカニズムを明らかにしたうえで、ボルトレス構造のための異種材料直接接合技術を確立することを目的とする。2015年8月に国連で持続可能な開発目標(SDGs)が掲げられ、我が国は2030年度までにエネルギー起源CO<sub>2</sub>の排出量を2013年度比26%削減し9億2700万トンに減らすことを明言している。輸送部門はCO<sub>2</sub>総排出量の約18%を占め、輸送機器によるCO<sub>2</sub>排出を削減することは喫緊の課題となっている。そのような背景の中、輸送機器の電動化が進められているが、それに伴う車両重量の増加が指摘されている。炭素繊維強化プラスチック(CFRP)と金属を組み合わせたマルチマテリアル構造により車両重量を軽量化する試みがなされており、CFRPと金属の異種接合技術の開発が重要課題と位置づけられている。CFRPの中でも熱可塑性樹脂を母材にしたCFRP(CFRTP)は、大掛かりな設備となるオートクレーブが不要で、一体成型によるスタンピング成形も可能となり生産性を向上できるばかりでなく、加熱すると軟化する性質を利用しリサイクル性に優れる。現在CFRPと金属の接合技術は、リベットやボルトなどを用いた機械的締結や接着剤による接合が行われているが、ボルトによる重量増加や応力集中により破壊起点となる課題がある。また、接着剤を用いた接合では、接着剤の硬化に時間を要し生産性が悪いことや、品質保証が困難であること、CFRTPは化学的に不活性で接着強度が低いという課題がある。そこで、本研究では新規に開発した異種材接合技術について接合強度等の力学的特性を定量的に評価し、そのメカニズムを明らかにすることによって、格段に接合強度の高い異種材接合技術とその長期信頼性を確立する。本研究の成果によって、一次構造にCFRTPを用いる航空機や自動車の接合技術や、スマートフォンやPCの筐体、電子デバイス等への異種材接合技術への実用化への展開を目指す。

## 1. 研究目的

プロジェクト1年目は、①アルミニウム合金表面上の金属酸化物ナノ空間構造体の創製、②引張せん断試験における接着強度と破壊形態へ及ぼす表面ナノ構造の影響評価、③静的双片持ち梁(Double Cantilever Beam: DCB)試験による層間破壊靱性へ及ぼすナノ構造の影響評価、④疲労DCB試験による層間剥離進展へ及ぼすナノ構造の影響評価を行い、3D ナノ界面を有する異種接合について基礎となる技術の開発を行った。プロジェクト2年目となる令和元年度は、開発した技術を深化させるために、⑤層間破壊靱性試験における純モードI層間破壊靱性を取得する新たな試験方法の開発、⑥量子化学シミュレーションによるシランカップリング処理の影響評価、⑦実用展開に向けたプレス成形品の試作を行った。

## 2. 研究成果

(1) 層間破壊靱性試験における純モードI層間破壊靱性値を取得する新たな試験方法の開発

異なる線膨張係数を持つ異種材料を熱によって接合した際に、常温環境下では各材料の収縮率が異なるため熱残留応力が生じる。これによって接合試験片は反り、DCB試験により取得する層間破壊靱性値は混合モードとなり、

純モードの層間破壊靱性値を取得できないことが課題であった。そこで、Nairn[1]とYokozeki[2,3]の理論をもとに熱残留応力が混合モードに及ぼす影響を除去し、純モードI層間破壊靱性値を取得する解析的なモデルを構築した。

図1はモードIとモードIIの混合モードの時に試験片に作用する負荷をモデル化したものである。 $P_{ENF}=0$ の時DCB試験と同様である。図2に示すようなき裂先端の力のつり合いモデルを考え、混合モード層間破壊靱性値をモードI、モードII層間破壊靱性値にそれぞれ分解し、計算を行った。モードI、モードII層間破壊靱性値 $G_I$ 、 $G_{II}$ を式(1)、(2)に示す。

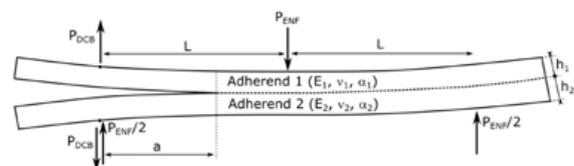


Fig. 1 Geometry and loading of an mixed mode bending (MMB) specimen.

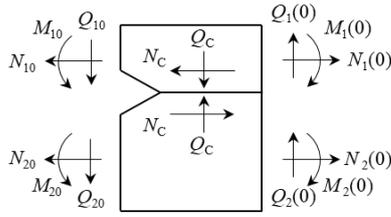


Fig. 2 Forces at crack tip.

$$G_I = \frac{1}{2B} \left( \frac{1}{\kappa C_1} + \frac{1}{\kappa C_2} \right) Q_c^2 \quad (1)$$

$$G_{II} = \frac{1}{2B} \left( a_1 + a_2 + \frac{h_1^2}{4} d_1 + \frac{h_2^2}{4} d_2 \right) N_c^2 \quad (2)$$

また、 $Q_c$ 、 $N_c$ は図2に示すようにき裂先端の力であり、式(3)、(4)のように表される。

$$Q_c = P_{DCB} (1 + \lambda a) - \frac{P_{ENF}}{2} (1 + \lambda a) C_a + C_b \quad (3)$$

$$N_c = \frac{2}{h_1 \xi - 2\eta} \left( - \left( \xi P_{DCB} + \frac{h_2 d_2}{2} \frac{P_{ENF}}{2} \right) a + (a_2 - a_1) \Delta T \right) \quad (4)$$

式(1)-(4)において  $B$  は板幅、 $h$  は板厚、 $a$  はき裂長さを示しており、 $C_i$ 、 $a_i$ 、 $d_i$ 、 $\eta$ 、 $\xi$  は  $i$  ( $i=1, 2$ ) 層における材料物性からなる係数を示している。また  $\Delta T$  は成形温度と試験温度の差、つまり応力フリー温度を表している。上式から分かるように、異種接合材においては、従来の DCB 試験を行うだけでは混合モードになってしまうことが分かる。さらに、熱残留応力はモード II として作用していることが分かる。そこで、 $N_c=0$  となる  $P_{ENF}$  を適当に選ぶことで  $G_{II}=0$  となり熱残留応力による層間破壊靱性値を除去することができる。この考えをもとに、DCB 試験中に一定荷重  $P_{offset}$  及び  $P_{ENF}$  を加えることで純モード I 層間破壊靱性値を得ることができる。この試験方法を constant load DCB (CL-DCB) 試験と呼び、図3にその概略図を示す。図3において、(c)と(d)によって得られる層間破壊靱性値は一致する。また、CL-DCB 試験における引張荷重  $P_{CL-DCB}$  は式(5)のように表される。

$$P_{CL-DCB} = P_{DCB} + P_{offset} \quad (5)$$

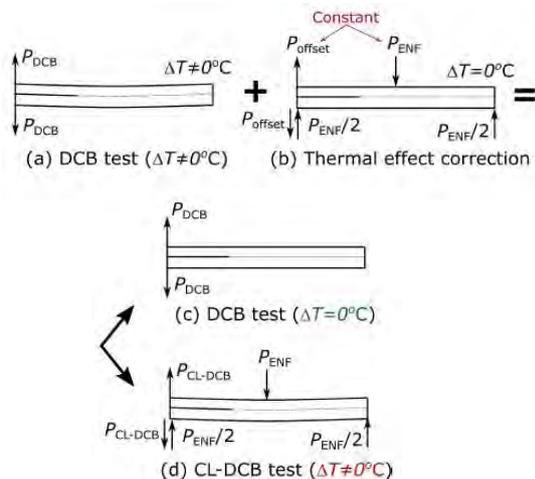


Fig. 3 Superposition principle for cancelling thermal contribution to the energy release rate.

なお、実際に試験を行う場合には図4に示すように、DCB試験中に任意の一定荷重  $P_{offset}$  及び  $P_{ENF}$  を加えることができるような負荷機構を試験機に組み込むことで容易に純モードの破壊靱性の評価を行うことができる。

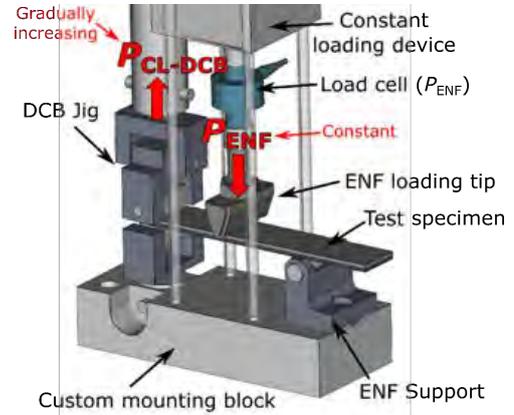


Fig. 4 Possible test setup of the CL-DCB test.

開発した試験法の確からしさを検証するために数値シミュレーションによる評価を行った。作製した数値解析モデルを図5に示す。図5(a)には DCB 試験のモデル、図5(b)には CL-DCB 試験のモデルを示し、最小メッシュサイズはき裂先端付近で 0.2 mm であり収束した解が得られた。また、試験片作製時の試験片の冷却は初期荷重ステップにおいて再現を行った。CL-DCB 試験における  $P_{ENF}$  及び  $P_{offset}$  は別の負荷ステップで一定負荷により適用し、その後  $P_{DCB}$  を徐々に変位制御によって負荷した。剛性特性が異なる場合 (Case A:  $E_1 h_1^2 \neq E_2 h_2^2$ ) の計算においては、試験片高さ  $h_1=3.0$  mm、 $h_2=2.0$  mm を用い、剛性特性が等しい場合 (Case B:  $E_1 h_1^2 = E_2 h_2^2$ ) には、試験片高さ  $h_1=2.0$  mm、 $h_2=2.24$  mm を用いた。使用した物性値は表1に示した。

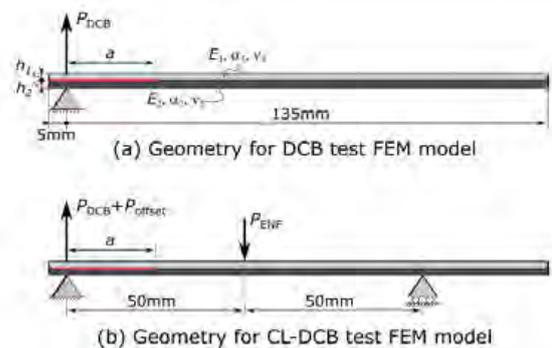


Fig. 5 Specimen geometry for (a) DCB and (b) CL-DCB specimen used for the FEM analyses.

材料の界面には混合モードの結合力モデル (Cohesive Zone Model: CZM) を適用し、本研究では異なる3つの特性を用いて数値解析計算を行った。用いた界面の cohesive law を表2に示す。表2において、 $T_I$  及び  $T_{II}$  は cohesive law における各モードの最大応力を示し、パラメータ  $\eta$  は

Benzegagh-Kenane(BK)の破壊基準[4]で用いられる混合モード破壊を記述するパラメータである。モード I における特性は  $G_I=0.2 \text{ N/mm}$  と統一され、CL-DCB 試験によって熱残留応力の影響を除去できていれば、得られる層間破壊靱性値は  $0.2 \text{ N/mm}$  に近い値になっているはずである。

Table 1 Properties of aluminum alloy and CFRTP laminates.

	Aluminum alloy	CFRTP laminate
Elastic modulus $E$ GPa	67.1	53.4
Thermal expansion $\alpha$ $10^{-6}/\text{K}$	25.8	2.8
Specimen width $B$ mm	25	
Stress-free temperature $^{\circ}\text{C}$	206	

Table 2 Interface properties used for BK mixed mode cohesive law.

	$G_I$ N/mm	$G_{II}$ N/mm	$T_I$ MPa	$T_{II}$ MPa	$\eta$
Interface a	0.2	1.0	10	20	1.8
Interface b	0.2	0.5	10	20	1.8
Interface c	0.2	1.0	10	20	1.2

Case A, B における各界面特性(Interface a, b, c)について、荷重-変位線図からコンプライアンス較正法によって計算した層間破壊靱性値の計算結果を図 6 にそれぞれ示す。図 6 には、界面特性として設定したモード I 層間破壊靱性値  $G_I=0.2 \text{ N/mm}$  を比較のため併記し、モード混合率  $\phi$  をそれぞれ示す。

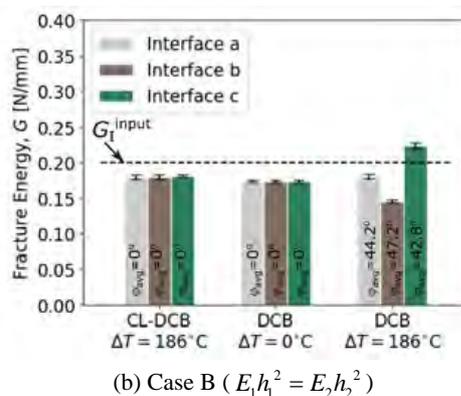
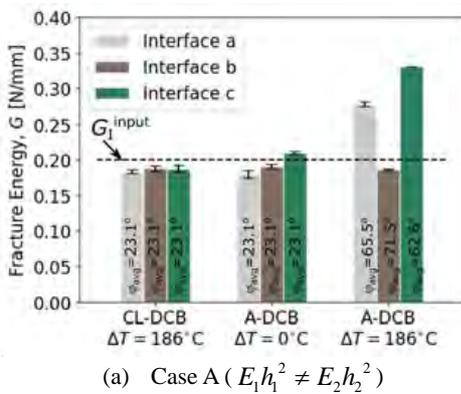


Fig. 6 Fracture energies calculated based on the virtual CC test compared to the input fracture energy.

図 6(a)より、Case A において熱残留応力の影響によって層間破壊靱性値が過大評価される可能性があることが分かる。また、Case A においては熱残留応力のない DCB 試験においても剛性特性が異なるため混合モードとなり、CL-DCB 試験によって純モード I 層間破壊靱性値を取得することはできないが、モード I 層間破壊靱性値に対して剛性特性の影響よりも熱残留応力の方が大きいことが示唆された。図 6(b)より、Case B では熱残留応力が層間破壊靱性値に及ぼす影響は Case A よりも小さくなっていることが分かる。また、CL-DCB 試験の計算結果は Case A, Case B ともに用いた界面特性に大きく依存しないことが分かる。界面特性として設定したモード I 層間破壊靱性値  $G_I=0.2 \text{ N/mm}$  と比較すると、CL-DCB 試験及び熱残留応力のない DCB 試験の結果は全てわずかに小さい値を示しているが、剛性特性が等しい DCB 試験の結果においても同様に  $0.2 \text{ N/mm}$  よりも小さい値を示しているため整合性はとれていると考えられる。したがって、CL-DCB 試験によって熱残留応力の影響を十分に除去できることが示された。

(2) 量子化学シミュレーションによるシランカップリング処理の影響評価

1年目の研究で金属表面ナノ構造に加えて、シランカップリング処理によって化学的な共有結合を付与することで接合強度が大幅に改善できることを示した。しかし、シランカップリング剤の官能基と CFRTP の母材樹脂との化学結合性が非常に重要であるが、その結合メカニズムは明らかにされていなかった。そこで、シランカップリング剤による強度発現のメカニズム解明を目的として、量子化学計算を行った。

本研究では量子化学計算のためのソフトウェアは Gaussian16 を使い、GUI として GaussView6 を用いた。計算方法としては広く利用される密度汎関数 (DFT) 法の B3LYP を使い、基底関数には 6-31G(d,p) を用いた。全体の計算フローを図 7 に示す。主な計算としては、①単分子の最適化計算では Opt 計算、②単分子の重合計算と③異種分子の結合計算では Opt 計算・TS 計算・Freq 計算を用いた。反応経路計算については、活性化エネルギーと反応熱に注目し進みやすい反応の経路を調査した。

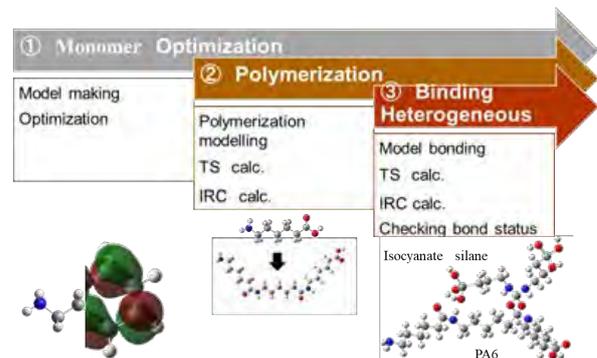


Fig. 7 Calculation flowchart of quantum chemistry simulation for PA6 and silane coupling agent.

量子化学計算において初期構造の設定は重要である。GaussView6 を用いて PA6 の三量体とイソシアネートシランの単分子の構造作製を行った。その後、Gaussian16 を用いて分子構造の最適化計算を行い、系のエネルギーが収束する安定状態を確認した。計算における溶媒条件は PA6 では空気、イソシアネートシランでは純水を用いた。イソシアネートシランの処理工程の中には図 8 のように純水希釈行程と、乾燥工程が存在する。実際の処理を模し、シランカップリング剤溶液中の分子構造の確認を目的として各処理工程における反応経路を調査した。さらに PA6 の三量体とイソシアネートシランの反応経路計算を行った。系はエネルギーの低い方向へ反応を進める傾向があるため、分子の様々な構造状態と位置関係において計算を行い、各反応経路において活性化エネルギーと結合状態の確認を行った。また、結合強度の評価としては、反応物に対する生成物の相対エネルギーを表す反応熱に注目し、生成物の安定状態を確認した。

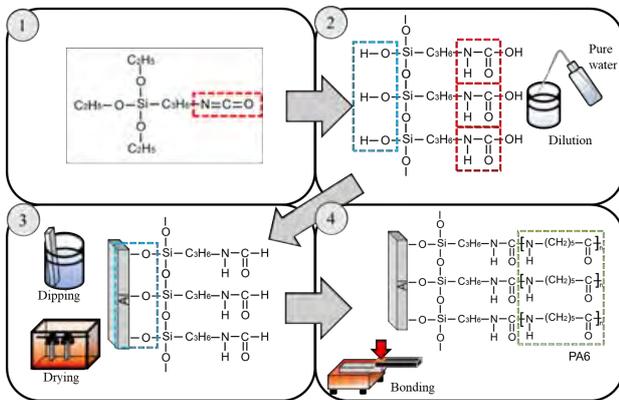
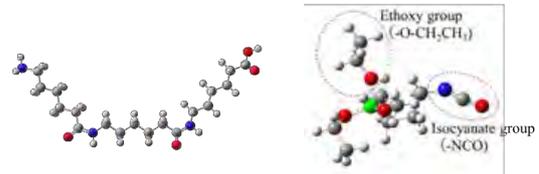


Fig. 8 Process of silane coupling treatment.

図 9 は作製及び最適化した PA6 の三量体とイソシアネートシランの単分子構造を示している。最適化計算後の系のエネルギーは初期構造よりも低い値に収束し安定していることを確認した。また、図 10 は純水希釈したイソシアネートシランの主な反応経路計算結果を示している。黒の実線はイソシアネートシランが水分子を伴い反応する経路を示す。初期構造の(i)のエトキシ基が加水分解しエタノールと、シラノール基を有する(ii)を生成した。その後、他の水分子とイソシアネートシランと反応し二量体(iv)を形成した。一方、赤の破線はイソシアネートシランがエタノールと反応する経路を示す。(ii)と、(i)から(ii)への反応時に生成したエタノールが反応しウレタン化した(iii)を生成した。エネルギーが低い(iii)や(iv)は存在し易いと言えるが、1 wt%に純水希釈した分子同士の反応は少ないと考えられる。また、分子量の大きい分子は熱により乖離する可能性が高いため、PA6 と反応する分子は主に(ii)であると考えられる。図 10 における(ii)と(iii)のイソシアネートシラン分子の点線で囲われた部分と PA6 の反応計算後の結合状態を図 11 に示す。イソシアネートシランは、PA6 の三量体と各分子の反応における活性化エネルギーと反応熱はそれ

ぞれ(ii)では 35.7、11.13 kcal/mol、(iii)では 47.6、40.16 kcal/mol であった。両反応ともに吸熱反応であり、活性化エネルギーの低い(ii)と PA6 の反応が進む可能性が高いことが示唆された。また、両反応ともにイソシアネートシランと PA6 の C 原子同士が O 原子を介して四員環の結合を生じ、A5052 と PA6 の高い接合強度に起因すると示唆された。



(a) PA6 trimer. (b) Isocyanate silane (i).

Fig. 9 Molecular structure of PA6 and isocyanate silane (H, white; C, gray; N, blue; O, red; Si, green).

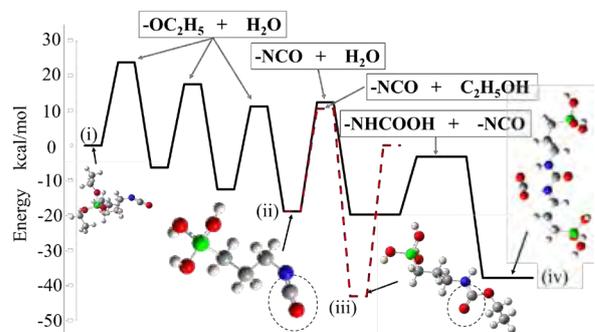
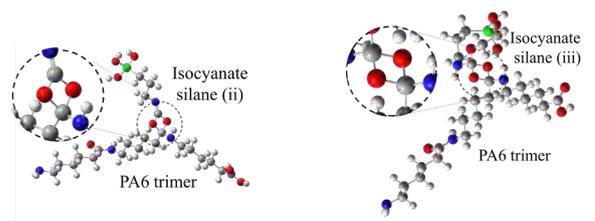


Fig. 10 Reaction path of isocyanate silane in water dilution.



(a) Isocyanate silane (ii).

(b) Isocyanate silane (iii).

Fig. 11 Bonding state of isocyanate silane in Fig. 10 and PA6 from quantum chemical simulation.

### (3) 実用展開に向けたプレス成形品の試作

本技術を応用して、スピーク株式会社と共同でアルミニウムと母材に PA6 を用いた CFRTP を接合させプレス成形品を試作した。試作品の写真を図 12 に示す。アルミニウムや CFRTP が損傷することなく深絞りの半球形状を作製することができた。提案している接合技術による成形は先に接合させた後に成形することも可能であるし、プレス成形と同時に接合させることも可能であることから、設計に自由度ができるメリットがある。



Fig. 12 Hemispherical press-formed product made of aluminum and CFRTP.

### 3. 今後の展望

本プロジェクトでは、CFRTP と金属の異種接合において、接合界面の金属表面に作製したナノ構造によって、接合強度と破壊靱性の両方を向上できる接合技術の開発に成功した。また、表面ナノ構造によって疲労き裂進展抵抗を格段に向上することに明らかにした。さらに、純モードの層間破壊靱性を評価する手法を新規に開発した。この成果によって、異種材接合における正確なき裂進展シミュレーションの実施が可能となった。これに加えて、シランカップリング剤を用いた化学的処理による接合強度向上メカニズムを量子化学計算により原子・分子スケールで明ら

かにし、種々の樹脂で構成される CFRTP への応用展開の可能性も示唆された。実用展開においてはプレス成形の試作に成功し、自動車や航空機、電子機器部品への応用展開が期待できる。今後は、開発した接合技術の実用展開を図るために、CFRTP 自動積層技術と組み合わせた接合技術の開発に取り組む。

### 【参考文献】

- [1] J.A. Nairn, International Journal of Fracture 139, 267-293, 2006.
- [2] T. Yokozeki, T. Ogasawara, and T. Aoki, Composites Science and Technology 68, 760-767, 2008.
- [3] T. Yokozeki, Engineering Fracture Mechanics 77, 84-93, 2010.
- [4] M. L. Benzeggagh and M. Kenane, Composites Science and Technology 56, 439-449, 1996.

### 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 18H01342 の研究事業の一環として行われたものである。ここに記し謝意を表する。

## 業 績

### 【原著論文】

1. H. Abe, J.C. Chung, T. Mori, A. Hosoi, K.M. Jespersen, H. Kawada  
The effect of nanospikes on direct bonding strength properties between aluminum and carbon fiber reinforced thermoplastics  
Compos. Part B, **172**, 1, 26-32 (2019)
2. 和田啓汰, 大田宙起, 齊藤慧, クリスティーン イエスパーセン ムンク, 細井厚志, 川田宏之  
アルミニウム合金と CFRTP 積層板の異種接合の強度と破壊形態に及ぼす表面ナノ構造の影響  
日本複合材料学会誌, **46**, 4, 162-169 (2020)
3. K. M. Jespersen, H. Ota, K. Harada, A. Hosoi, H. Kawada  
Method for experimentally measuring the pure mode I fracture toughness for dissimilar material joints with significant thermal residual stresses  
Eng. Fract. Mech., (2020) submitted.
4. H. Ota, K. M. Jespersen, K. Saito, K. Wada, K. Okamoto, A. Hosoi, H. Kawada  
Effect of the interfacial nanostructure on the interlaminar fracture toughness and damage mechanisms of directly bonded carbon fiber reinforced thermoplastics and aluminum  
Compos. Part A, (2020), submitted.
2. K. M. Jespersen, H. Abe, H. Ota, K. Saito, K. Wada, A. Hosoi, H. Kawada  
Damage mechanisms and mechanical properties of directly bonded CFRTP and aluminium with nano-structured surface  
36th Conference & 30th Symposium of the International Committee on Aeronautical Fatigue and Structural Integrity (ICAF2019), 2019年6月, ポーランド
3. 大田宙起, K. M. Jespersen, 齊藤慧, 和田啓汰, 岡本和起, 細井厚志, 川田宏之  
CFRTP 積層板とアルミニウム合金の直接接着における層間破壊靱性へ及ぼす界面ナノ構造の影響  
第61回構造強度に関する講演会, 2019年8月, 長野
4. J. M. Kristine, 阿部暉, 齊藤慧, 大田宙起, 和田啓汰, 細井厚志, 川田宏之  
直接接合されたナノ構造を有するアルミニウム合金と CF/PA 積層板の強度発現及び損傷メカニズム  
日本機械学会 2019年度年次大会, 2019年9月, 秋田
5. K. Saito, K. M. Jespersen, H. Ota, K. Wada, K. Okamoto, A. Hosoi, H. Kawada  
The effect of nano-structured surface of aluminum alloy directly bonded to CFRTP on fatigue delamination growth properties  
1st Russia-Japan Joint Workshop on Composite Materials (RJCM-1), 2019年10月, ロシア

### 【総説】

1. 細井厚志  
CFRTP と AI の異種接合材料 (2020), 印刷中
6. 原田和樹, Jespersen Kristine Munk, 大田宙起, 齊藤慧, 和田啓汰, 細井厚志, 川田宏之  
CFRTP 積層板とアルミニウム合金の直接接合における層間破壊靱性の評価  
日本機械学会関東支部第26期総会・講演会, 2020年3月, 東京

### 【書籍】

1. 細井厚志, Kristine Munk Jespersen,  
アルミニウム合金へのシランカップリング処理による CFRTP との接合強度の向上, シランカップリング剤の使い方と応用事例,  
サイエンス&テクノロジー社, 第8章, 273-279, (2019)
7. 岡本和起, 曾澤諒, 空岡利奈, 細井厚志, 国吉ニルソン, リコウ, K. M. Jespersen, 川田宏之  
熱溶着による CF/PA6 積層板と AI 合金板の接合強度に及ぼす表面処理の影響及び量子化学シミュレーションによる評価  
第11回日本複合材料会議 (JCCM-11), 2020年3月, 大阪

### 【口頭発表】

1. 和田啓汰, Kristine Munk Jespersen, 大田宙起, 齊藤慧, 細井厚志, 川田宏之  
アルミニウム合金と CFRTP 積層板の接着強度と破壊形態に及ぼす表面ナノ構造の影響  
日本繊維機械学会第72回年次大会, 2019年5月, 大阪

### 【特許】

- (1) 国内特許出願 1件
- (2) 国外特許出願 0件

# 新産業創出に向けた無標識 AI セルソーター

研究代表者：東京大学 合田 圭介

## 【基本構想】

本プロジェクトでは、「スマートセル産業」の基盤となる指向性進化法の適用範囲を大幅に拡張する無標識・ハイスループットな品種改良法を確立する。DNA シーケンシング技術やゲノム編集技術、IT 技術の発展に伴い、細胞を自由自在に改変して産業利用するスマートセル産業（市場規模は 200 兆円以上）の時代が幕開けつつある。スマートセルは、その細胞が持つポテンシャルを最大限利用しつつ、物質生産などに人為的に最適化された細胞である。細胞内化合物は例えば、栄養成分や匂い分子が代表的であるが、それに加えて、各種生物が持つ機能性生体分子も対象として、それらが増加、もしくは減少した品種改良株を作出することを目指す。この方法の確立により、各種微生物・細胞において、ゲノム編集技術適用の有無によらず迅速に品種改良を進める事が可能となる。具体的には、研究代表者らがこれまでに構築した分子振動に基づく細胞内分子の高速定量法を応用し、細胞内に含まれるターゲット分子を 1 細胞毎に計測し、その含有量に基づき目的細胞を分取する技術を開発する。遺伝子の変異導入と組み合わせることにより、産業的価値の高い細胞を創出することが可能となる。この方法の確立により、各種微生物・細胞において、ゲノム編集技術適用の有無によらず迅速に品種改良を進める事が可能となる。

## 1. 研究目的

本研究では、蛍光標識を導入することなく細胞内分子量や細胞の機能を定量し、細胞分取を可能にする無標識 AI セルソーターの開発と実証を行う。最近研究代表者らの研究室で開発された高スループット FT-CARS (Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering) フローサイトメーター (図 1) を基盤技術とし、マイクロ流路を用いた細胞分取技術、人工知能(AI)によるスペクトル解析技術と組み合わせることによって、高スループット (1,000 細胞/秒)・無標識・広帯域 (10 種類以上の細胞形質を測定可能) でのリアルタイム細胞分取を目指す。さらに、本技術をスマートセル産業に展開することで、細胞内の任意成分の多寡を指標にして生物の品種改良 (指向性進化) を実現する (図 2)。本技術を試作し、実践的品種改良が可能であることを実証し、革新的品種改良サービス提供の基礎とする。プロジェクト 1 年目となる令和元年度は、以下の研究項目を達成目標として研究を推進した。

- (1) AI スペクトル分類器の開発
- (2) 高精度マイクロ流路チップの開発
- (3) 技術統合による無標識 AI セルソーターの開発

## 2. 研究成果

上記研究目的に沿って研究を遂行し、令和元年度は以下の研究成果を得た。

### (1) AI スペクトル分類器の開発

無標識 AI セルソーターで取得したデータの系統的理解に向け、ヘマトコッカス及びユーグレナを対象としてスペクトル分類を実施した。これらの細胞は細胞内に含有されるカロテノイドや多糖類が食品や医薬品への応用が期待されているが、従来の蛍光を用いた計測では定量が難しくスマートセル産業への応用が困難とされていた。図 3 に様々

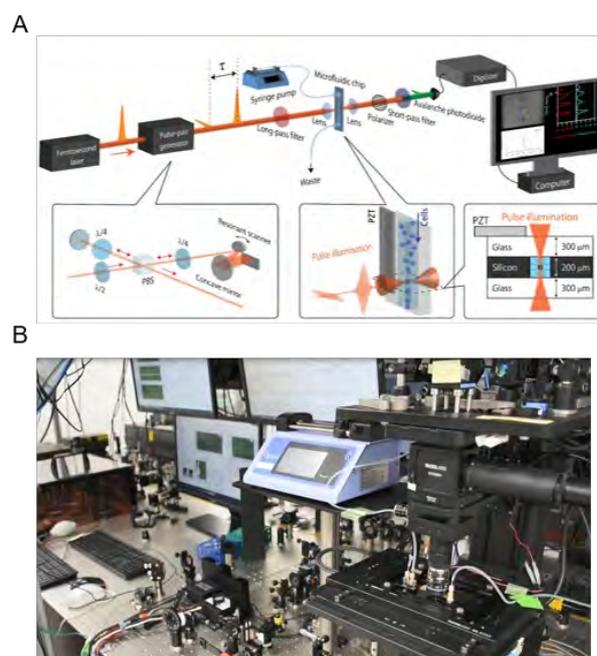


図 1. FT-CARS フローサイトメーター。(A) FT-CARS フローサイトメーターの概略図。超短パルスレーザーを用いて分子振動を高速にリアルタイム計測する。(B) FT-CARS フローサイトメーターの外観。FT-CARS 分光装置とマイクロ流体デバイスと融合することで細胞内に含有される目的分子の量に基づいた細胞分取を実施する。

な条件で培養したヘマトコッカス細胞 (各条件で 500 細胞を測定) から取得した平均の FT-CARS スペクトルを示す。得られた 10 通りのスペクトルを化学的に解釈するためにスペクトル分類アルゴリズムの一つである Multivariate curve resolution alternating least-square (MCR-ALS)法を適用し、各スペクトルが独立な 2 成分から構成されていること

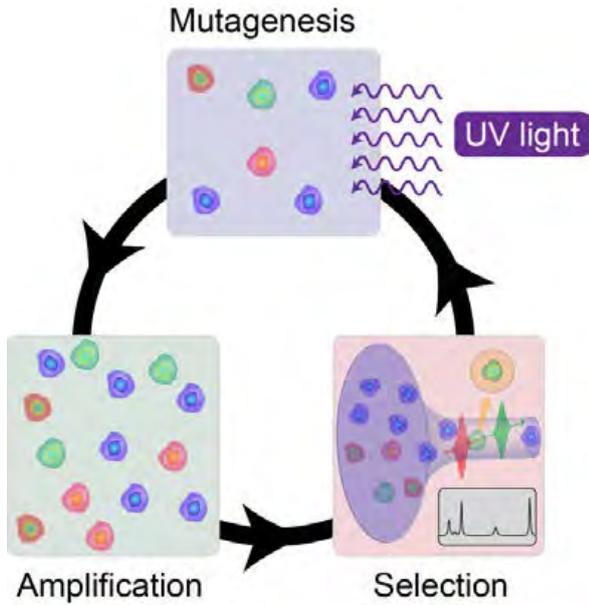


図 2. 無標識 AI セルソーターに基づく指向性進化の概要. 細胞への変異導入, 培養, 分取を繰り返すことで目的形質を有する細胞を創出する.

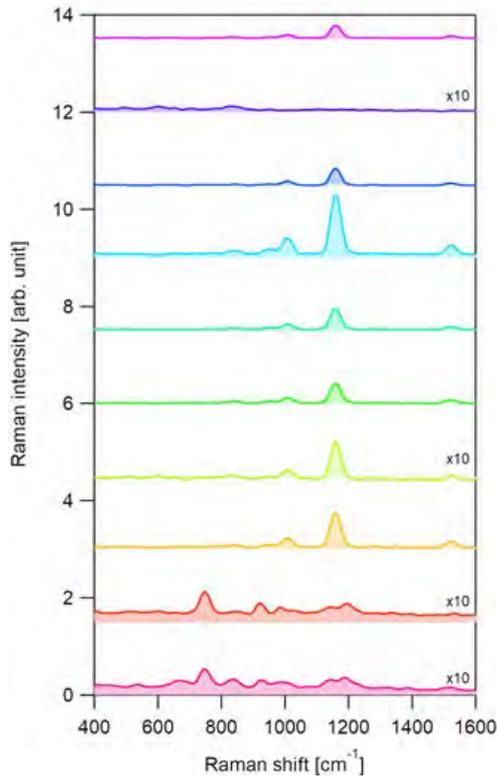


図 3. 10 通りの異なる条件で培養したヘマトコッカス細胞から測定した FT-CARS スペクトルの平均

を明らかにした (図 4)。得られたスペクトルを振動分光学的に解析すると、それぞれ主にアスタキサンチンとクロロフィルに帰属されることがわかる。このように、多数のスペクトルから独立に変化する成分を多変量解析によって抽出することで、化学的に意味のあるスペクトル成分を議論することができるようになる。FT-CARS フローサイトメーターでは、多数細胞からの膨大なスペクトルを短時

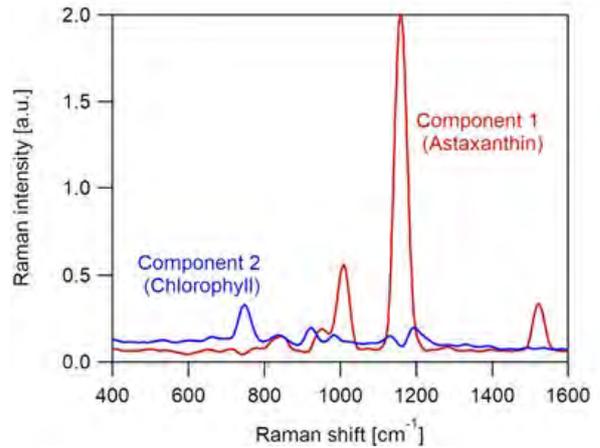


図 4. MCR-ALS 法によるスペクトル分解. 得られた 2 成分はスペクトル形状からそれぞれアスタキサンチン, クロロフィルに帰属される

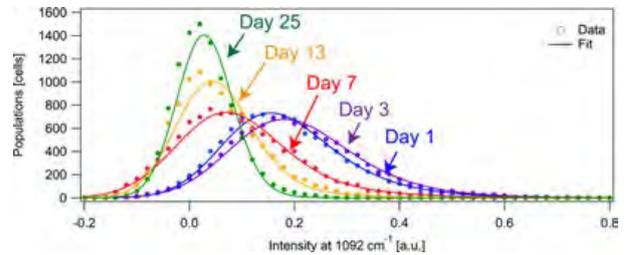


図 5. 培地交換後 1-25 日におけるユーグレナ細胞中のパラミロン含有量の分布. 実線は対数正規分布と正規分布の畳み込みによる回帰曲線.

間に測定できるが、多変量解析を用いそのデータを最大限議論するための準備が整ったといえる。

また、測定した大量のスペクトルからの物質分布を定量的に解析するフレームワークの構築も実施した。図 5 は FT-CARS フローサイトメーターを用いて測定した、ユーグレナ細胞に含まれるパラミロン分子の含有量分布である (各条件につき 10,000 細胞測定)。ここでは、ユーグレナ細胞中のパラミロン含有量が培地交換後 1-25 日にどのように変化するかを定量的に解析した。各条件下でのパラミロン含有量の分布は対数正規分布と正規分布の畳み込みでよく再現されることが明らかとなった。このことから、各条件において、パラミロンの生成・消費は定常的な状態にあることが示唆される。FT-CARS フローサイトメーターを用いることで大規模細胞集団中の代謝物分布を定量的に解析できることを示した。将来的に指向性進化を行う際に、細胞集団としての差を抽出して分取することが重要となってくるが、このような統計的解析はその基礎として重要な意味を持つ。

さらに、より多元的な計測に基づく細胞分取を可能にするために、蛍光とラマン分光情報を同時に計測できる光学系の開発を実施した。本研究で主に取得しているラマン分光スペクトルは細胞内の代謝生成物を無標識に計測できるという利点があるが、一方で蛍光計測が得意とする特定のタンパク質の特異的な検出などは一般に困難である。ラマン・蛍光計測を融合することで細胞内のタンパク質の発現とそれによる代謝生成物の生成の相関などを研究する

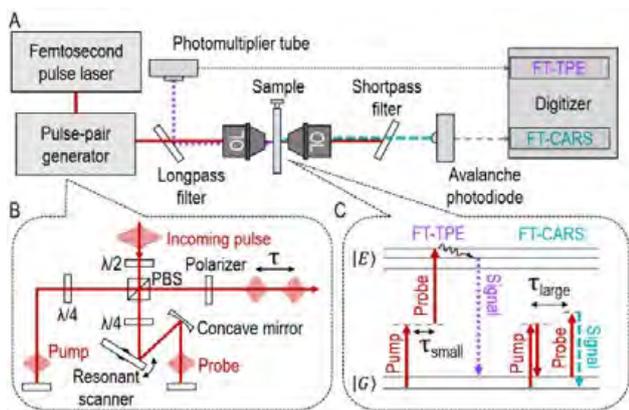


図 6. 蛍光・ラマン同時計測フローサイトメトリーの概要と計測原理 (A) 蛍光・ラマン同時計測フローサイトメーターの装置概略図 (B) 超短パルスペア生成光学系の概略図 (C) 蛍光・ラマン計測の原理. 蛍光はフーリエ変換 2光子蛍光 (FT-TPE) 計測に基づきその励起スペクトルを計測, ラマンは FT-CARS 計測に基づきラマンスペクトルを検出する.

ことができ、より効率的なスマートセル創出が可能になると期待される。図 6 に開発した蛍光・ラマン同時計測フローサイトメーターの概略図を示す。これまでに開発した FT-CARS フローサイトメーターに蛍光検出部を追加することで、ラマンスペクトルだけでなく、蛍光励起スペクトルの検出も可能となった。ヘマトコッカス細胞内のアスタキサンチン量及び酸化ストレスマーカーである Fluorescence chlorophyll catabolite (FCC) をターゲットとして高スループットフローサイトメトリー計測を実施した (図 7)。様々な酸化ストレス下で培養したヘマトコッカス細胞 (図 7A) を測定したところ、本手法によって細胞内アスタキサンチン及び FCC 量を同時に定量することが出来た (図 7B)。さらに 1 細胞ごとのアスタキサンチン及び FCC 量を解析することでこれらの含有量の間に負の相関があることが示された (図 7C)。様々な測定量に基づいた細胞分取を行うことで産業的需要により合致するスマートセルの創出が可能になると期待される。

(2) 高精度マイクロ流路チップの開発

測定・解析した FT-CARS スペクトルデータをもとに細胞分取を行うために分取機能を備えたマイクロ流体デバイスの実装を行った。マイクロ流体デバイス上に固定したピエゾ素子に交流電圧を印加することにより、流体チャンネル中に音響定在波を発生させ、細胞が流路の中心を流れるように調整した。また、細胞分取部では、マイクロ粒子中の細胞や粒子の流れる方向とは直交する方向に流れを作り出すことで、高速かつ高精度にサンプルを分取することができる。マイクロ流路中を高速 (> 1 cm/s) に流れる粒子を、直交するマイクロ流によって、高精度に分取できることを実証した。本プロジェクトの目標値 10 events/s に対し、実際には 30 events/s を超えるスループットでの分取を実現した。

また、音響定在波を用いた細胞位置制御が難しい、小さな細胞に関しても計測が可能となるように、粘弾性フォー

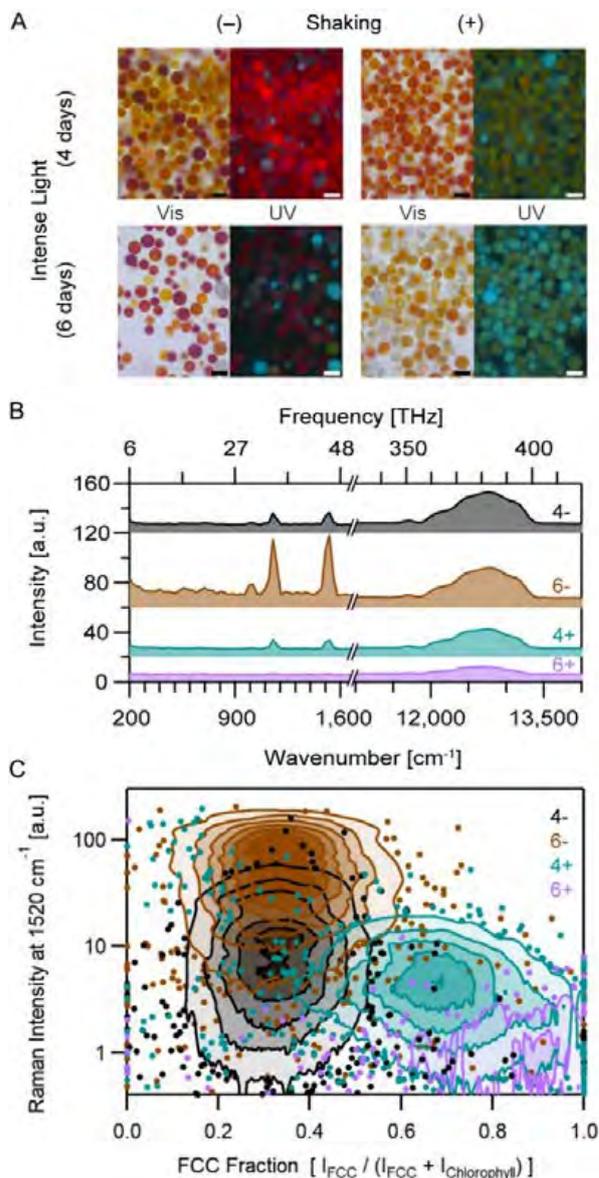


図 7. 蛍光・ラマン同時計測フローサイトメトリーによるヘマトコッカス細胞の分類 (A) 計測に用いたヘマトコッカス細胞の明視野及び蛍光イメージ. 振とう有/無及び強光有/無の 4 条件で細胞を培養し、それぞれの条件におけるアスタキサンチン量及び酸化ストレスマーカーである Fluorescence chlorophyll catabolite (FCC) の相関を計測することを目的とした。スケールバー = 40 μm. (B) 各条件で培養した細胞から計測したラマン及び蛍光励起スペクトルの平均 (C) 各条件で培養した細胞から計測したアスタキサンチン量及び FCC 量の 2 次元散布図

カシング法を用いた細胞制御法の開発も実施した。細胞をマイクロ流体に導入する際に用いる液体の粘弾性を制御することで、音響波などの外力を加えずに細胞が流路の中心を流れるように制御することが出来る。本手法はクロレラなどの比較的サイズの小さい細胞の測定・分取において有用なだけでなく、将来的に装置を実用化する際のコストの低減・装置の安定化にも繋がると期待される。

(3) 技術統合による無標識 AI セルソーターの開発

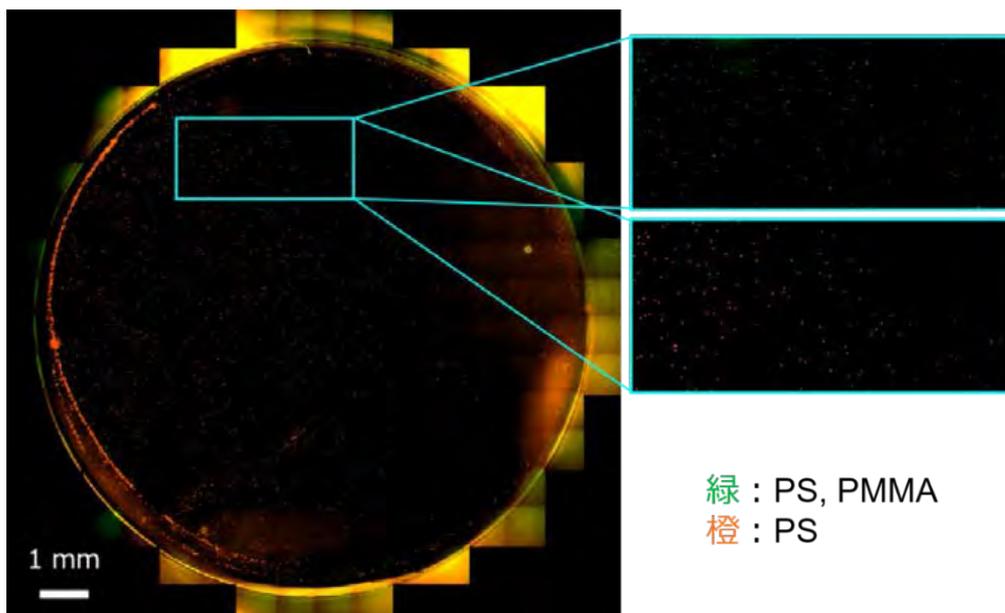


図 8. 無標識 AI セルソーターを用いて分取したサンプル(Collection ポート)の蛍光顕微鏡画像. 分取した 4,114 粒子のうち 3,690 個が PS ビーズであり, 分取の purity は 89.7%であった.

上記で開発した技術の統合によって、無標識 AI セルソーターを開発した。フェムト秒レーザーを光源とする FT-CARS 光学系、顕微鏡上に設置されたマイクロ流体デバイス、Field-programmable gate array (FPGA)を用いたスペクトル解析部から構成されており、一度の分取実験に要する時間はサンプルの準備、光学調整、分取、片付け等を含め 3-5 時間程度である。細胞の前処理が不要で、従来法に比べ高速な細胞の選別が可能であることも本手法の特徴である。流路中を高速に流れる細胞において、FT-CARS 信号の計測から分取信号の生成までをシームレスに行うために、スペクトルの計算、解析、分取信号の生成を 1 ミリ秒以内に行う必要がある。そのために本プロジェクトでは FPGA 上で動作する高速スペクトル解析器を開発し、FT-CARS フローサイトメーターとマイクロ流路デバイスと統合することで、細胞内分子の化学組成に基づくリアルタイム細胞分取を実現した。

まず、原理検証として PS (polystyrene) と PMMA (Polymethyl methacrylate) からなるマイクロビーズの混合物をサンプルとして用い PS の分取を行った。PS と PMMA ビーズでは、光学像上での見た目はほとんど同じだが、それぞれラマンスpekトル上 1003 および 810  $\text{cm}^{-1}$  にピークを有しており本手法によって分離することが可能である。それぞれのピーク強度を見積もり、PS ビーズを分取するように設定し分取実験を実施した。分取したマイクロ粒子の purity と yield を見積もるために、前もってサンプルを FT-CARS 計測に影響しない蛍光色素で染色しておき、分取したサンプルを蛍光顕微鏡で計測した。図 8 は分取したサンプルの蛍光画像である。34 eps のスループットで分取したサンプルに関して、4,114 粒子のうち 3,690 個が PS ビーズであり、分取の purity は 89.7%であった。また、waste ポートで集めた粒子で同様の測定を行ったところ、yield は 35.4%であった。より低いスループット (13 eps) にお

いては、97.9%の purity, 42.7%の yield を達成することができた。

### 3. まとめと今後の展開

以上に示すように、令和元年度は FT-CARS フローサイトメーターをベースとしてスマートセル創出プラットフォームの基盤整備を行った。当初研究計画に挙げた項目に対して順調に進捗しており、また、無標識 AI セルソーターの更なる高性能化のための追加項目も実施した。開発した各要素はそれ自身、研究としてのインパクトも大きいいため、個別に論文化を進め、Analytical Chemistry 誌等の複数の国際誌で発表するとともに、国内外の学会で発表し第 47 回 (2019 年秋季) 応用物理学会講演奨励賞を受賞するなど高く評価された。

令和 2 年度はこれまでに開発した技術をベースに細胞分取、更には指向性進化の実証を行う。野生株細胞に化学的または物理的にランダム変異を導入し、変異前後における有用分子含有量の変化を FT-CARS フローサイトメーターを用いて検出する。ランダム変異に依存する有用分子含有量の違いを最も明瞭に検出できるように、培地や細胞密度といった培養条件を最適化する。その後、変異導入、無標識 AI セルソーターによる有用分子含有量の多い細胞の分取及び細胞培養を 2、3 回程度繰り返す、新規細胞株を樹立することを目指す。

これまでに FT-CARS フローサイトメーターを用いて 1 細胞から有意な信号が得られているユーグレナやヘマトコッカス細胞においては、本手法を用いた指向性進化を実現できる可能性が高い。一方で哺乳類細胞等のこれまでに測定実績のない細胞に関しては、装置の高感度などさらなるシステムの最適化が必要になると考えられる。そこで、2021 年度以降の有望シーズ展開事業では装置の高感度化を行い、様々な細胞 (微細藻類、哺乳類、昆虫類、菌類等) における指向性進化の実現を目指す。

## 業 績

## 【原著論文】

1. K. Hiramatsu, K. Yamada, M. Lindley, K. Suzuki, and K. Goda, Large-scale label-free single-cell analysis of paramylon in *Euglena gracilis* by high-throughput broadband Raman flow cytometry, *Biomed. Opt. Express* 11, 1752 (2020).
2. S. Takizawa, K. Hiramatsu, K. Goda, Compressed time-domain coherent Raman spectroscopy with real-time random sampling, *Vib. Spectrosc.* 107, 103042 (2020).
3. M. Lindley, K. Hiramatsu, H. Nomoto, F. Shibata, T. Takeshita, S. Kawano, and K. Goda, Ultrafast Simultaneous Raman-Fluorescence Spectroscopy, *Anal. Chem.* 91, 15563 (2019).
4. W. Peterson, K. Hiramatsu, and K. Goda, Sagnac-enhanced impulsive stimulated Raman scattering for highly sensitive low-frequency Raman spectroscopy, *Opt. Lett.* 44, 5282 (2019).
5. R. Kinogawa, K. Hiramatsu, K. Hashimoto, V. R. Badarla, T. Ideguchi, and K. Goda, Broadband Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering spectral microscopy at over 1 fps, *J. Raman Spectrosc.* 50, 1141 (2019).

## 【総説】

1. 中川 敦寛, 新田 尚, 杉村 武昭, 磯崎 瑛宏, 小関 泰之, 合田 圭介, “インテリジェント画像活性細胞選抜法 —医療・生命科学分野への展開,” *医学のあゆみ*, 2020年 3月 10日, Vol.273 No.4 page(s): 20524-20525 year: 2020
2. 磯崎 瑛宏, “大規模単一細胞解析の普及へ向けた音響型細胞整列マイクロ流路プラットフォームの構築,” *機関誌「サウンド」*, 2019年 10月 22日
3. 磯崎 瑛宏, 中川 悠太, Mun Hong Loo, 芝田 悠大, 田中 直樹, Dwi Larasati Setyaningrum, Jee-Woong Park, 白崎 善隆, 三上 秀治, 上村 想太郎, Dino Di Carlo, 合田 圭介, “電極アレイを用いた高速液滴分取,” *化学とマイクロ・ナノシステム学会誌*, 2019年 8月 26日, vol. 18, No.2, pp.33-36, 2019.
4. 磯崎瑛宏, 三上秀治, 平松光太郎, 合田圭介, “高速蛍光イメージング・ラマン分光法と生物学・医学への展開,” *OPTRONICS*, 2019年 10月 1日, Vol.38, No.9, page(s) 72-79, year 2019

## 【口頭発表】

1. 合田圭介, 「細胞のウォーリーを探せ!」, 第43回 日本嚙下医学会総会ならびに学術講演会, 東京, 日本, 2020年 3月 14日
2. Keisuke Goda, “High-throughput vibrational flow cytometry and beyond,” *SPIE Photonics West 2020*, San Francisco, USA, 2020年 2月 2日
3. Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “High-throughput vibrational flow cytometry,” *SPIE Photonics West 2020*, San Francisco, USA, 2020年 2月 1日
4. Keisuke Goda, “AI cell sorting,” *SPIE Photonics West 2020*, San Francisco, USA, 2020年 2月 1日
5. Keisuke Goda, “Intelligent Image-Activated Cell Sorting & Beyond,” *Seminar*, San Francisco, USA, 2020年 1月 31日
6. Keisuke Goda, “Intelligent Image-Activated Cell Sorting & Beyond,” *Seminar*, Stanford, USA, 2020年 1月 30日
7. 合田圭介, 「細胞のウォーリーを探せ!」, 第60回 SCJSF&JABA フォーラム, UCLA, USA, 2020年 1月 26日
8. 平松光太郎, 合田圭介, 高スループット振動分光フローサイトメトリー, レーザー学会 学術講演会 第40回年次大会, 仙台, 日本, 2020年 1月 21日
9. 合田圭介, AI で細胞のウォーリーを探せ!, 第40回 メディコピア教育講演シンポジウム, 新宿, 日本, 2020年 1月 12日
10. Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “Large-scale single-cell analysis by multiplex spectroscopy,” *分光学会生細胞分光部会*, Ibaraki, Japan, 2019年 12月 12日
11. 合田 圭介, “インテリジェント画像活性細胞選抜法が拓く新世界,” *日本光学会年次学術講演会 (OSJ2019)*, 大阪, 日本, 2019年 12月 3日
12. Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “Vibrational flow cytometry for label-free large-scale single-cell analysis,” *MHS 2019*, Nagoya, Japan, 2019年 12月 2日
13. 合田 圭介, “AI 細胞選抜装置が拓く新世界,” *LAC-SYS 研究所 第2回シンポジウム*, 大阪, 日本, 2019年 11月 29日
14. Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “High-throughput Broadband Vibrational Flow Cytometry,” *Biomedical Raman Imaging 2019*, Osaka, Japan, 2019年 11月 26日
15. Kazushige Takizawa, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “Compressed time-domain Raman spectroscopy toward video-rate molecular fingerprint imaging,” *Biomedical Raman Imaging 2019*, Osaka, Japan, 2019年 11月 25日
16. Matthew Lindley, Kotaro Hiramatsu, Fukashi Shibata,

- Tsuyoshi Takeshita, Shigeyuki Kawano,, Keisuke Goda, “Single laser Raman-fluorescence flow cytometry,” *Biomedical Raman Imaging 2019*, Osaka, Japan, 2019年11月25日
17. Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “Large-scale single-cell analysis by rapid Raman spectroscopy,” *医用分光科学研究会*, Kanagawa, Japan, 2019年11月21日
  18. 磯崎瑛宏, Dunhou Huang, 合田圭介, “電極アレイを用いた多分岐高速液滴分取,” *化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会*, 浜松, 日本, 2019年11月21日
  19. Chenqi Zhang, Mun Houg Loo, Yuta Nakagawa, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, “Low-Loss Droplet Picking for High-Throughput Rare-Cell Sorting,” *化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会*, 浜松, 日本, 2019年11月21日
  20. Yuta Nakagawa, Mun Hong Loo, Shinsuke Ohnuki, Yoshikazu Ohya, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, “A droplet microfluidic platform for separation of cells with low proliferative activity,” *化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会*, 浜松, 日本, 2019年11月21日
  21. 合田 圭介, “細胞検索エンジンが拓く新世界,” *JCHSIP2019*, 名古屋, 日本, 2019年11月16日
  22. Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “High-throughput Raman flow cytometry,” *SelectBio*, Chiba, Japan, 2019年11月15日
  23. Akihiro Isozaki, “High-throughput large-droplet sorting,” *Microfluidics & Organ-on-a-Chip Asia 2019*, Narita, Japan, 2019年11月15日
  24. Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “Large-scale single-cell analysis by ultra-rapid time-domain Raman spectroscopy,” *12th International Photonics and OptoElectronics Meetings*, Wuhan, China, 2019年11月11日
  25. Keisuke Goda, “Intelligent Image-Activated Cell Sorting & Beyond” *Next Generation Cytometry*, 仁川, South Korea, 2019年11月8日
  26. Keisuke Goda, “AI Cell Sorter” *University of Leeds*, Leeds, UK, 2019年11月1日
  27. Keisuke Goda, “Intelligent Image- Activated Cell Sorting & Beyond” *Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2019)*, Basel, Switzerland, 2019年10月28日
  28. Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “High-throughput vibrational flow cytometry,” *SPIE Photonics West*, San Francisco, USA, 2020年2月1日
  29. Keisuke Goda, “AI Cell Sorting,” *産業科学AIセンター国際シンポジウム*, 大阪, 日本, 2019年10月26日
  30. 合田 圭介, “AI セルソーターが拓く新世界,” *第40回日本レーザー医学会総会*, 浜松, 日本, 2019年10月19日
  31. 平松 光太郎, Matthew Lindley, 山田 康嗣, 鈴木 健吾, 合田 圭介, “振動分光フローサイトメトリーによる大規模無標識1細胞解析,” *第80回応用物理学会秋季学術講演会*, 札幌, 日本, 2019年9月21日
  32. Matthew Lindley, Kotaro Hiramatsu, Fukashi Shibata, Tsuyoshi Takeshita, Shigeyuki Kawano,, Keisuke Goda, “Simultaneous Raman-fluorescence flow cytometry,” *第80回応用物理学会秋季学術講演会*, 札幌, 日本, 2019年9月21日
  33. 滝沢繁和, 平松光太郎, 合田圭介, “圧縮センシングを用いた時間領域コヒーレントラマン分光,” *第80回応用物理学会秋季学術講演会*, 札幌, 日本, 2019年9月20日
  34. 磯崎 瑛宏, 新田 尚, 杉村 武昭, 三上 秀治, 佐久間 臣耶, 笠井宥佑, 新井史人, Dino Di Carlo, 細川 陽一郎, 上村 想太郎, 小関 泰之, 合田 圭介, “AI 細胞選抜法,” *第37回日本ロボット学会学術講演会*, 東京, 日本, 2019年9月3日
  35. (招待講演) Keisuke Goda, “Intelligent Image-Activated Cell Sorting,” *Sydney Nano Distinguished Lecture (シドニー大学)*, Sydney, Australia, 2019年9月5日
  36. 平松光太郎, “高速ラマン分光フローサイトメトリー,” *第9回光科学異分野横断萌芽研究会*, 京都, 日本, 2019年8月6日
  37. Kotaro Hiramatsu, Yusuke Yonamine, Takuro Ito, Yu Hoshino, Keisuke Goda, “Coherent Raman spectroscopic flow cytometry for large-scale single cell analysis,” *10th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy*, Auckland, New Zealand, 2019年7月11日
  38. (招待講演) 合田圭介, “インテリジェント画像活性細胞選抜法が拓く生物学の新展開,” *第7回「機能性バイオ」ミニシンポ*, 千葉, 東京, 2019年7月4日
  39. (招待講演) Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “High-throughput Raman spectroscopic flow cytometry,” *The Australia and New Zealand Nano and Microfluidics Meeting 2019*, Wollongong, Australia, 2019年7月2日
  40. (招待講演) Keisuke Goda, “Intelligent Image-Activated Cell Sorting,” *10th Australia and New Zealand Nano and Microfluidics Symposium (ANZNM2019)*, Wollongong, Australia, 2019年7月1日
  41. Walker Peterson, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “Sagnac-enhanced impulsive stimulated Raman scattering for highly sensitive low-frequency Raman spectroscopy,” *日本学術会議主催「国際光デーシンポジウム2019」*, 東京, 日本, 2019年6月28日
  42. 平松光太郎, 与那嶺雄介, 伊藤卓郎, 星野友, 合田圭介, “無標識フローサイトメーター,” *日本学術会議主催「国際光デーシンポジウム2019」*, 東京, 日本, 2019年6月28日
  43. (招待講演) 合田圭介, “細胞検索エンジンが拓く生物学・医学の新世界,” *国際光デーシンポジウム2019*, 東京都, 日本, 2019年6月28日
  44. Kotaro Hiramatsu, Yusuke Yonamine, Takuro Ito, Yu

Hoshino, Keisuke Goda, "Label-free molecularly specific flow cytometry and beyond," *34th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry*, Vancouver, Canada, 2019年6月25日

photonics meets microfluidics and AI," *The 8th Advanced Lasers and Photon Sources (ALPS2019)*, 横浜, 日本, 2019年4月22日

45. (招待講演) Keisuke Goda, "Intelligent Image-Activated Cell Sorting & Beyond," *34th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (CYTO2019)*, Vancouver, Canada, 2019年6月23日
46. (招待講演) Keisuke Goda, "Intelligent Image-Activated Cell Sorting & Beyond," *University of Alberta*, Edmonton, Canada, 2019年6月19日
47. (招待講演) Keisuke Goda, "Intelligent Image-Activated Cell Sorting & Beyond," *CANADIAN CYTOMETRY&MICROSCOPY ASSOCIATION(CCMA2019)*, Edmonton, Canada, 2019年6月18日
48. (招待講演) Keisuke Goda, "Image-Activated Cell Sorting and Beyond," *The 9th International Multidisciplinary Conference on Optofluidics (IMCO2019)*, Hong Kong, China, 2019年6月15日
49. (招待講演) Keisuke Goda, "Image-Activated Cell Sorting and Beyond," *The Hong Kong University of Science and Technology*, Hong Kong, China, 2019年6月14日
50. 磯崎瑛宏, 中川悠太, Mun Hong Loo, 芝田悠大, 田中直樹, Dwi Larasati Setyaningrum, Jee-Woong Park, 白崎善隆, 三上秀治, 上村想太郎, Dino Di Carlo, 合田圭介, "電極アレイを用いた高速液滴分取," *化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会*, 金沢, 日本, 2019年5月28日
51. 磯崎 瑛宏, 新田 尚, 杉村 武昭, 三上 秀治, 佐久間 臣耶, 笠井宥佑, 新井史人, Dino Di Carlo, 細川 陽一郎, 上村 想太郎, 小関 泰之, 合田 圭介, "インテリジェント画像活性細胞選抜法とその応用," *化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会*, 金沢, 日本, 2019年5月28日
52. Hayashi Mika, Isozaki Akihiro, Hiramatsu Kotaro, Keisuke Goda, "Glass- Capillary-based Acoustic Cell Focusing for Raman Flow Cytometry," *化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会*, 金沢, 日本, 2019年5月28日
53. (招待講演) 合田圭介, "インテリジェント画像活性細胞選抜法がもたらす生物学の新展開," *第17回幹細胞シンポジウム*, 兵庫, 日本, 2019年5月25日
54. (招待講演) Keisuke Goda, "Image-activated Cell Sorting," *IEEE International Conference on Computational Photography 2019 (ICCP2019)*, 東京, 日本, 2019年5月16日
55. (招待講演) 合田圭介, "人工知能で細胞を選抜!," *読売テクノ・フォーラム「ゴールド・メダル賞」受賞記念講演会*, 東京, 日本, 2019年5月11日
56. (招待講演) Keisuke Goda, "AI cell sorting - where

#### 【特許】

- (1) 国内特許出願 1件

# 脳梗塞治療のためのスキャフォールド材料

研究代表者：東京医科歯科大学 味岡 逸樹

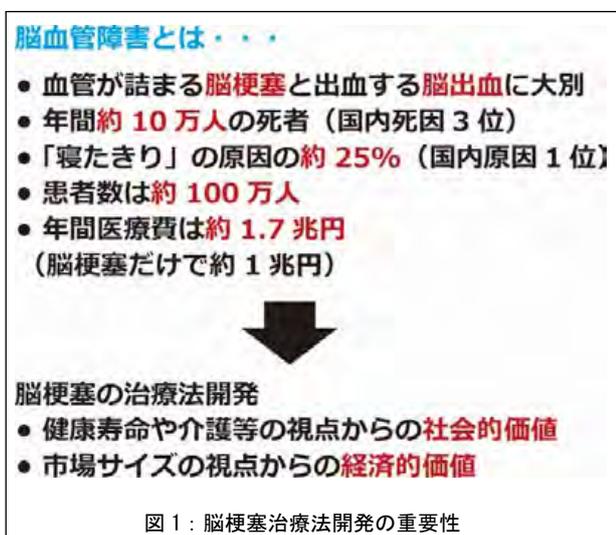
## 【基本構想】

脳梗塞は手足の麻痺などの後遺症が残ることが多く、患者や家族の QOL を著しく低下させる社会問題となっている。脳梗塞には血栓溶解治療と血栓回収治療が有効であるものの、それぞれ発症から 4.5 時間以内、8 時間以内に治療が限定され、特に、概ね発症 3 日後から 1 週間後の亜急性期から慢性期かつ重度の患者に対して治療効果のある、革新的な治療法開発が待ち望まれている。本研究では、亜急性期から慢性期の脳梗塞治療を目的とし、脳梗塞モデルマウスの運動機能回復能を發揮し、臨床応用可能な人工足場を開発する。上記目的を達成するために、脳内投与後に細胞足場として機能するペプチド分子集合体を創製し、機能性タンパク質を細胞足場に配向・徐放させる技術を開発し、脳梗塞モデルマウスにおける運動機能回復を目指す。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を連続投与すると齧歯類脳梗塞モデルで生じる運動機能障害が回復すると報告されていることから、本研究開発では、VEGF を細胞足場から徐放させ、単回投与で治療効果を發揮する人工足場を開発する。

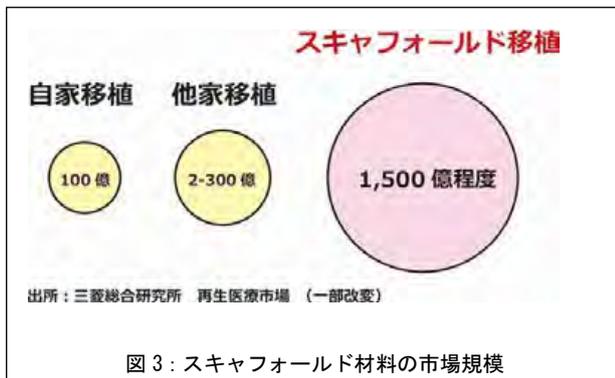
## 1. 研究目的

国内死因の第 3 位となっている脳血管障害は、虚血性の脳梗塞と出血性の脳出血とに大別される。中でも脳梗塞は全体の 75% 以上を占め、一命をとりとめた場合でも後遺症が残る場合が多く、「寝たきり」の原因の 25% を占めている。脳機能發揮の中心的役割を担う神経細胞(ニューロン)には、血管を介して酸素や栄養分などが供給されているが、脳梗塞虚血によりニューロンの細胞死が起きる。脳ニューロンは皮膚の細胞や肝臓の実質細胞とは異なり増殖能に乏しく、脳組織がほとんど再生しないため、手足の麻痺や言語障害などの後遺症が残ることが多い。脳血管障害の国内の患者数は約 100 万人、年間医療費は約 1.7 兆円であるが、20 年後には患者数が 2 倍になると予想されており、脳梗塞患者の健康寿命の延伸が社会的にも経済的にも渴望されている (図 1)。

最近、血栓溶解治療と血栓回収治療の進歩がめざましく、発症から 8 時間以内の急性期治療の成績が向上している。血栓溶解治療は、2005 年に国内で使用承認された組織型プラスミノゲン・アクティベータ (recombinant tissue-type plasminogen activator: rtPA) を静脈内に投与することで、閉塞した血栓を化学的に溶解させ、脳血流を再開させる治療法である。しかしながら、発症から 4.5 時間以内に使用が制限されており、実施率は約 5%、再貫通率は約 40%にとどまり、2%程度の患者にしか治療効果が得られていない。一方、血栓回収治療は、2010 年に国内で使用承認された血栓除去デバイスを用いて、閉塞した血栓を物理的に取り除き、脳血流を再開させる治療法である。しかしながら、こちらも発症から 8 時間以内に使用が制限されており、再貫通率は約 80%と高いものの、実施率は約 3%にとどまり、2%程度の患者にしか治療効果が得られていない (図 2)。



血栓溶解治療や血栓回収治療の対象外、あるいは治療効果が認められなかった約 96%の患者に対する治療法開発が世界中で繰り広げられている。中でも、多能性幹細胞や間葉系幹細胞を損傷脳内あるいは静脈内投与する再生医療の治験が国内外で最近開始した。しかしながら、自家移植の場合には品質安定性の問題、他家移植の場合には拒絶反応のリスクの高さから、細胞を利用しない人工物のみで完結する治療法が望ましい。具体的には、生体内に残存している細胞の潜在的再生能力を發揮させる材料が望ましく、細胞の足場として機能する足場（スキャフォールド）材料が注目を浴びている。実際、再生医療の市場規模という視点からも、自家移植や他家移植に比べても規模が大きい（図 3）。



損傷組織が再生する際には、再生組織に酸素や栄養などを供給する血管網の再生も同時進行する。また、血管網の再生を促進することで、損傷組織の再生自体が促進される。脳梗塞による損傷領域は、損傷した脳の潜在的再生能力を發揮させるために必要な機能的な血管網に欠く。したがって、損傷した領域に血管網を再生させる戦略は再生環境を整備するという観点からも重要だと考えられる。実際、脳梗塞治療効果のある多能性幹細胞や間葉系幹細胞の移植では、幹細胞が分泌する因子による血管新生促進が重要だと考えられている。血管新生は既存の血管から新しい血管が生み出される現象で、新たに作られた新生血管は、細胞の生存や機能發揮に効果のある酸素や栄養素などを運搬する。血管新生に関与する因子は多数あるが、中でも血管内皮細胞増殖因子（VEGF）は血管内皮細胞の受容体に結合し、増殖や遊走などを促進し、血管新生に重要な様々な生物活性を担う。齧歯類の脳梗塞モデルにおいて、VEGF を脳室内に連続投与すると運動機能障害が回復することが知られており<sup>1,2</sup>、本研究では、VEGF を細胞足場から徐放させ、単回投与で治療効果を發揮する人工足場を開発することを目的とした。

本研究開発におけるタンパク質徐放型細胞足場の分子設計の特徴として、従来のドラッグデリバリーシステム（DDS）材料でよく使われる化学架橋材料ではなく、分子同士の非共有結合で徐放効果を發揮する材料とする点を挙げる。これはヒトへの臨床応用を指向する場合、生体内での分解産物に安全性が求められるが、化学架橋材料では分解産物の安全性を証明するのが困難で、臨床応用への壁が高いという点からの発想である。本研究開発で着目した

自己集合型ペプチドゲルは生体内の分解産物が均一なペプチドとなるため、安全性評価が容易で、臨床応用展開が容易となる。

プロジェクト 1 年目となる 2019 年度は、以下の各項目を重点項目として研究開発を行なった。

- ①ペプチド分子集合体の開発
- ②VEGF を細胞足場に配向させる技術の開発
- ③脳梗塞モデルマウスの機能評価系開発

## 2. 研究成果

以下に挙げるのは、2019 年度の具体的な研究成果である。

### ①ペプチド分子集合体の開発

我々は人工足場の材料として、ペプチドに着目した。両親媒性ペプチドは疎水性結合やイオン結合により集合体を形成するが、一部のペプチド集合体は、pH やイオン強度の変化でアミノ酸側鎖同士の相互作用が強まりゲル化する。すなわち、試験管内では溶液状で、体内投与後にゲル化するインジェクタブル人工足場としても機能する。最もよく知られているペプチド分子集合体の 1 つに、アミノ酸 16 個からなる RADA16 (RADARADARADARADA) がある。しかしながら、RADA16 は粘弾性が高すぎるため、ガラスキャピラリーによる脳内投与が困難であった。そこで我々は、RADA16 よりも粘弾性が低く、脳内投与が容易な RADA16 変異体の同定を試みた。

まずはじめに、超分子化学を専門とする東京農工大学・村岡貴博准教授と計算物理学を専門とする北里大学・渡辺豪講師の協力を得て、自己集合化した RADA16 の構造を分子動力学（MD）シミュレーションにて解析した。この解析では、1 辺 10 nm の立方体の中に 32 分子の RADA16 ペプチドと 30,000 分子の水分子をランダムに配置させ、300 ns 間のシミュレーションを行った。その結果、電子顕微鏡解析の結果と同様にシミュレーションでもファイバー状の集合体形状を示した。次に、RADA16 のアラニンをグリシンに変えた変異体についても同様の解析を行い、16 番目のアラニンをグリシンに置換した RADA16 (A16G) が短い分岐構造を持ったファイバー形状を示すことが明らかとなり、分子間相互作用が弱いながらもファイバー形成することが示唆された。

そこで、村岡らの協力を得て、RADA16 と RADA16 (A16G) を F-moc 法で合成し、CD スペクトル解析、粘弾性解析、電子顕微鏡解析を行い、MD シミュレーション解析の結果で合致するかどうか検討した。CD スペクトル解析では、どちらも  $\beta$  シート構造を取ることが示唆された。また、粘弾性解析では、RADA16 (A16G) が RADA16 の 16.6% のずり弾性率を示し（図 4）、実際に RADA16 より粘弾性が低いことが明らかとなった。

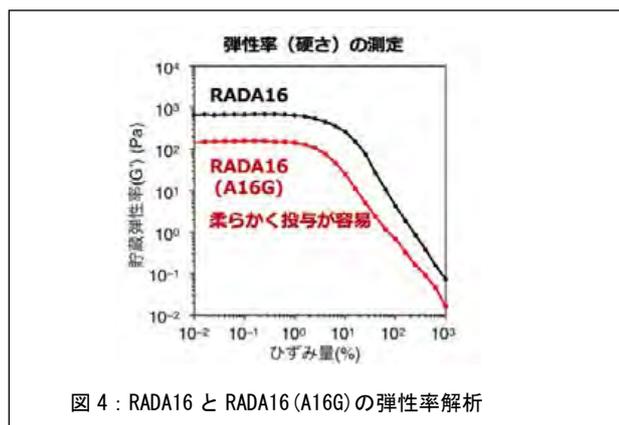


図 4 : RADA16 と RADA16 (A16G) の弾性率解析

電子顕微鏡解析においてもシミュレーション解析で予想されたように、RADA16 (A16G)ファイバーには多数の分岐構造が認められた。実際、RADA 16 (A16G)はガラスキャピラリーを使って容易に脳内投与することができた。

次に、RADA16 (A16G)が RADA16 と同様に細胞接着性を持つかどうか検討した。具体的には、1%の RADA16 (A16G)および RADA16 溶液をカバーガラスに塗布し、乾燥後に線維芽細胞を播種した。培養 3 時間後に接着した細胞数を測定するため、DAPI で核を染色し、ステレオロジーにて細胞数を計測した。その結果、RADA16 (A16G)は RADA16 と同様な細胞接着能を持つことが示唆された。

以上の結果から、細胞接着能を持ち、RADA16 よりも粘弾性が低く、脳内投与が容易な RADA16 変異体、RADA16 (A16G)を同定した<sup>3</sup>。

## ② VEGF を細胞足場に配向させる技術の開発

RADA16 (A16G)足場に VEGF を非共有結合で配向させ、徐放させる技術開発を試みた。具体的な方法は知財保護の観点から記載を省くが、はじめに緑色蛍光タンパク質 GFP を用いて RADA16 (A16G)集合体に非共有結合で配向させる技術と徐放させる技術を確立した。試験管内での GFP 徐放量は ELISA 法にて評価し、徐放効果を確認した (特願 2020-045109) (図 5)。また、データを示していないが、VEGF も同様の技術で配向および徐放させることに成功した (特願 2020-045109)。

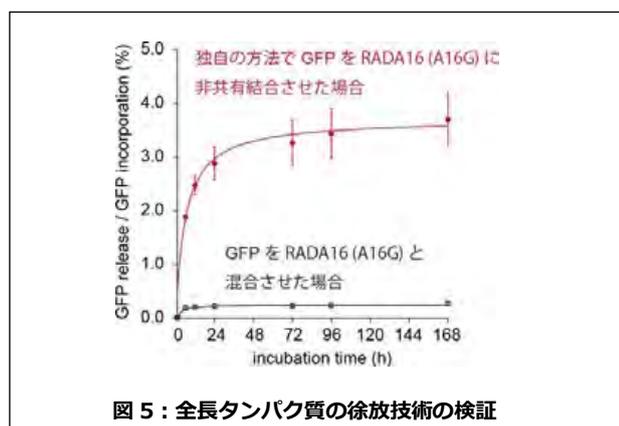


図 5 : 全長タンパク質の徐放技術の検証

## ③ 脳梗塞モデルマウスの機能評価系開発

VEGF を徐放する RADA16 (A16G)を投与する損傷脳モデルとして、中大脳動脈遠位部梗塞モデルとローズベンガル投与モデルを検討した。

中大脳動脈遠位部梗塞モデルは以下のように作製した。6 週齢の C57BL/6J マウスを 3%イソフルランで麻酔をかけ、右耳の下から目の付近まで皮膚を開けた。次に、側頭筋を切断し脳前方に向けて頭蓋骨から切り離し、頭蓋骨の上から右中大脳動脈遠位部が確認できるようにした。中大脳動脈遠位部を覆う頭蓋骨をマイクロドリルを使って直径 1 mm 程度の穴をあけ、中大脳動脈遠位部にアクセスできるようにした。微小ピンセットと微小血管焼灼器を用いて中大脳動脈遠位部を切断し、止血ガーゼを当てて止血した。2-3 分後に止血ガーゼを取り除き、ヒーターマットの上でマウスの回復を待った。

ローズベンガルモデルは以下のように作製した。6 週齢の C57BL/6J マウスを 3%イソフルランで麻酔をかけ、脳定位装置にセットした。ブレグマの上下 4 mm が露出するように、頭蓋骨を覆う皮膚を開いた。ブレグマから「右方 0.7 mm、前方 2.5 mm」、「右方 0.7 mm、後方 1.0 mm」、「右方 2.7 mm、後方 1.0 mm」、「右方 2.7 mm、前方 2.5 mm」の 4 点に印を付け、その周辺部を遮光テープで覆った。その後、10 mg/ml のローズベンガル溶液を 100  $\mu$ L 腹腔内投与し、5 分後にハロゲンランプで上記長方形領域を 10 分間照射した。照射後は皮膚を閉じ、ヒーターマットの上でマウスの回復を待った。

手術 7 日後に歩行機能解析を行い、その後、4% PFA で灌流固定した。歩行機能解析は、名古屋市立大学・澤本和延教授と金子奈穂子准教授の協力を得て、実験系を立ち上げた。具体的には、亀甲金網の上で術後マウスを 10 分間自由に歩かせ、動画を記録し、総歩数と亀甲金網から足を滑らせた回数を測定し、足を滑らした割合を算出した。形態学的解析は、ニューロンのマーカー NeuN と活性化ミクログリアのマーカー Iba1 の免疫組織染色で損傷領域を観察した。ローズベンガルモデルでは、大脳皮質運動野を光照射したが、形態学的解析でも大脳皮質運動野の傷害が確認された。一方、中大脳動脈遠位部梗塞モデルでは、血管支配領域である大脳皮質連合野の傷害が確認された。歩行機能解析では、どちらのモデルでも歩行機能異常が認められ、どちらのモデルの実験系確立にも成功した。なお本研究では、ヒト脳梗塞に近い血管梗塞モデルを選択することにした。

今後の展開を以下に述べる。

## ① ペプチド分子集合体の開発

抗原性の低いペプチド分子集合体を創製する。具体的には、免疫系細胞に認識されにくい 12 アミノ酸あるいはそれ以下のアミノ酸でゲル化するペプチド分子集合体を開

発する。また、RADA16 (A16G)は酸性から中性への変化でゲル化するため、実用化するには RADA (A16G)を付加した生理活性タンパク質を酸性条件下で精製する必要があり、タンパク質が失活する可能性が高い。そこで今後は実用化を見据えて、中性条件下でゲル化し、12 アミノ酸以下のペプチド分子集合体を開発する。

#### ②VEGF を細胞足場に配向させる技術の開発

上記で開発した中性ペプチド分子集合体を用い、VEGF を配向結合させる。

#### ③脳梗塞モデルマウスの歩行機能回復達成

VEGF を結合させたペプチド分子集合体を投与し、投与 7, 14, 28, 56 日後における歩行機能テストにて脳梗塞回復能を評価する。また、形態学的解析や逆遺伝学的解析により作用機序を解明する。なお、本研究における達成目標を歩行機能テストでの 50%回復とする。

#### 参考文献

1. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest.* 2000;106(7):829-838. doi:10.1172/JCI9369
2. Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest.* 2003;111(12):1843-1851. doi:10.1172/JCI17977
3. Ishida A, Watanabe G, Oshikawa M, Ajioka I, Muraoka T. Glycine Substitution Effects on the Supramolecular Morphology and Rigidity of Cell-Adhesive Amphiphilic Peptides. *Chem Eur J.* 2019;25(59):13523-13530. doi:10.1002/chem.201902083

## 業 績

### 【原著論文】

1. Ishida A, Watanabe G, Oshikawa M, Ajioka I, Muraoka T.  
Glycine Substitution Effects on the Supramolecular Morphology and Rigidity of Cell-Adhesive Amphiphilic Peptides.  
Chem Eur J. 2019 Oct 22;25(59):13523-13530.  
(Cover Picture に採用され Profile として紹介された  
<https://doi.org/10.1002/chem.201903871> )

### 【口頭発表】

1. Itsuki Ajioka  
Cell Cycle Dysregulation: Understanding Neuropathology of Degeneration and Tumor  
XXVII Annual Meeting of Indian Academy of Neurosciences  
2019.11.20 ニューデリー (インド)
2. 味岡 逸樹, 佐々木 陽一, 押川 未央, 君塚 信夫, 楊井 伸浩.  
フォトン・アップコンバージョンゲルの創製による近赤外光オプトジェネティクス.  
第92回日本生化学大会  
2019.09.20 横浜
3. Itsuki Ajioka, Yoichi Sasaki, Mio Oshikawa, Nobuhiro Yanai.  
Near-infrared optogenetics by photon upconversion hydrogels.  
第11回光操作研究会 2019.09.11 名古屋
4. Itsuki Ajioka, Mio Oshikawa, Yoichi Sasaki, Nobuhiro Yanai.  
Near-infrared optogenetics by photon upconversion hydrogels.  
ISN-ASN Meeting 2019.08.07 モントリオール (カナダ)
5. Itsuki Ajioka.  
Molecular technology regulating the vascular environment for injured brain regeneration.  
Neuro2019 2019.07.28 新潟

### 【特許】

1. 国内特許出願 2件

# セキュア量子基盤技術の研究

研究代表者：横浜国立大学 堀切 智之

## 【基本構想】

本プロジェクトは、グローバル情報通信の無条件安全性獲得を基本目標に、それを可能にする量子通信の長距離化技術開発を実施する。特に長距離量子通信用中継技術である、量子中継器の開発を、その要素技術となる量子もつれ光源・量子メモリ・波長変換システム・周波数安定化システムの各開発から統合まで実施することを具体的な目標とする。量子通信の長距離化とは、その基本リソースである量子もつれを、いかに長距離間で効率的に共有できるかが重要である。量子もつれが共有できれば、それをを用いた量子暗号通信（量子鍵配送）や量子状態事象を伝送する量子テレポーテーションが可能となる。さらに、遠隔地に配置された量子コンピュータ同士をつなぐ分散量子計算やクラウド量子計算の秘匿化（ブラインド量子計算）といった将来的に大きな期待を抱かれる技術群の基盤ともなる。

量子もつれ光源は量子もつれを離れた地点まで光ファイバーを用いて運ぶために必要である。また、量子メモリは送られてきた光（光子）の量子状態を一時保存しておくために用いる。さらに波長変換システムは、光ファイバーを低損失で長距離伝送するため通信波長帯（波長 1.5 マイクロメートル）に生成された量子もつれ光子を可視光帯（0.6 マイクロメートル近辺）にある量子メモリ波長に変換するために用いる。最後に周波数安定化は、量子もつれ光子が安定的に狭い遷移周波数幅を持つ量子メモリに吸収保存されるために必須の技術である。これら各要素を結合することが量子中継器の基礎になる。本研究では、その設計のもと各パートを開発し統合する。

## 1. 研究目的

プロジェクト1年目となる2019年度は、以下の各項目を重点項目として開発を実施した。

### (1) 量子もつれ光源の開発

量子中継器において光の量子状態を高レート・高効率伝送する量子もつれ光源が必要である。光ファイバー伝送後、伝送先中継ノードに設置される量子メモリへの高効率量子状態保存を可能にするためには、狭い量子メモリ遷移周波数幅に対応した、狭スペクトル幅量子もつれ光源が必要である。加えて該当スペクトルにおいて高い光子スペクトル密度をもつために、光共振器内で量子もつれ光子対発生を起こすシステムを採用する。これにより、量子メモリ結合効率100%を目指し、かつ低損失光ファイバー伝送可能な通信波長における量子もつれ光源を開発する。

### (2) 量子メモリの開発

量子中継器内に設置し、光量子状態を一時保存・再生する機能を持つ量子メモリ開発が必要である。中継器は、基本的に中継ノードの反対側からくる通信の送信側と受信側からの光子の量子状態を保存する。片側の光子が早く到着した場合、一時保存することによってもう片方の光子を待ち、タイミングを合わせて量子通信の必須要素であり量子中継器の目的である量子もつれ生成用の量子もつれ交換操作（ベル測定）を行うためである。本研究では、高スループット・長距離化へと重要な多重化通信用量子メモリ開発を希土類添加物質を用いて実施する。

### (3) 波長変換技術開発

上記通信波長量子もつれ光源からの光子が、量子メモリ搭載中継ノードに届いても、量子メモリの吸収波長からの

隔たりが問題となる。そのため、多重化量子メモリ Pr:YSO の吸収波長およそ 606 nm に通信波長光子を波長変換するシステムが必要となる。その際、強い変換用励起レーザー由来のノイズが発生してしまうため、そのノイズ除去機構の搭載も重要になる。

### (4) 周波数安定化技術開発

量子メモリの遷移周波数幅は 10MHz 以下であり、通常光信号は長時間その程度の幅の中に居続けることができない。そのような周波数ドリフトをキャンセルし周波数を安定化するシステムをフィードバック制御により、各要素に実装する。

## 2. 研究成果

以下に挙げるのは、令和元年度の具体的な研究成果である。

### (1) 量子もつれ光源の開発

量子中継に用いる量子もつれ光源に必要な性能として、中継ノードで用いられる量子メモリとの結合効率が高いことがある。本研究で開発する多重化量子通信用メモリ Pr:YSO はその励起準位間隔隔によって決定される最大のメモリ可能吸収領域幅約 5 MHz を持つ。よって、量子もつれ光源はそれよりも狭いスペクトル幅をもつ必要がある。本研究では 1 MHz を切るスペクトル幅を達成し、100%結合効率を目標とする。そのために、光共振器内での量子もつれ光の発生を利用した。

図1は、開発もつれ光源の実験系セットアップである。

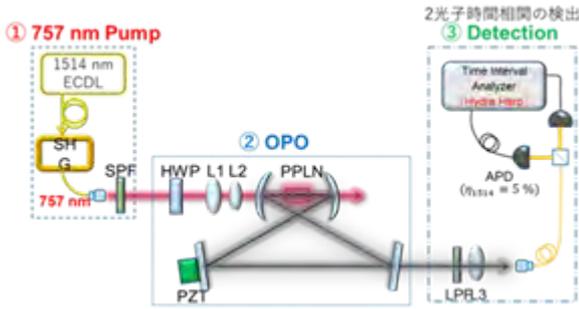


図 1：量子もつれ光源概略図。

まず、通信波長での量子もつれ光子対を生成するために、その倍のエネルギーを持つ光子（波長 757 nm）からなる励起レーザーを用意する（図中①）。その励起レーザーを図中②の光共振器に入射させ、量子もつれ光子対を生成する非線形光学媒質である周期極反転ニオブ酸リチウム（PPLN）を励起する。ここで確率的に通信波長 2 光子が生成される。PPLN は 2 つ直列に並んでおり、どちらの PPLN で生成されたかによって、2 光子が鉛直偏光か水平偏光をもつかが異なる。よってこれらの偏光を測定するまでは確定せず、2 つの偏光の重ね合わせである量子もつれ状態が生じる。これらの 2 光子は、共振器を周回したのち、いずれ右下の出力鏡から外に出ていく。図中③が、生成した 2 光子の検出系である。この検出系で 2 光子の時間相関を測定した結果が、図 2 である。

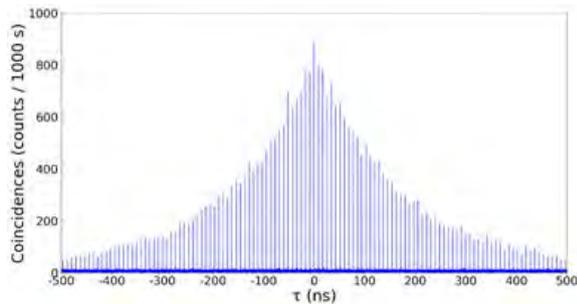


図 2：2 光子時間相関測定結果。横軸：2 光子時間差、縦軸：2 光子カウント数。共振器 2 光子源特有の櫛構造が保存されている。

図の横軸は、共振器から 2 光子が出てきた時間差に対応している。中央の一番高いピークが同時に出来たことに対応する。各ピーク間隔は、共振器を 1 周するのにかかる時間であり、周回長を反映して約 8 ns となっている。これら櫛で構成されている全体の包絡線は、共振器 2 光子の寿命となっており、この逆数が 2 光子の線幅となる。本研究で、我々は 1MHz を下回る線幅を達成した。この結果によると、共振器スペクトルにローレンツ関数を仮定した場合、90%以上の量子メモリ結合効率が得られることがわかった。

更に、量子もつれの質を決定する忠実度測定のため量子状態トモグラフィを実施し、理想的な量子もつれであるベル状態との忠実度 90%を得た（図 3）。

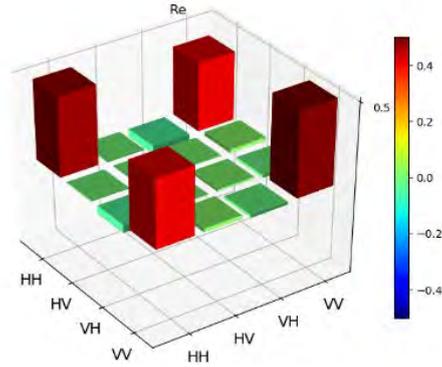


図 3. 量子状態トモグラフィ結果。（実部のみ掲載）。

(2)量子メモリの開発

Pr:YSO 結晶を多重化量子通信量子メモリとして開発すべく、単一光子信号の確定時間保存・再生実験を実施した。1 パルス辺り平均光子数を 1 程度まで弱めたレーザー光を入力にもちいた。Pr:YSO の吸収スペクトルに櫛上の吸収スペクトルを生成するため、制御レーザーの周波数変調をほどこし、レーザー周波数において吸収飽和が起きてそれ以上吸収されない状態「ホールバーニング」領域を生成する。この透明領域に、鋭い吸収スペクトルピーク群をつくることで、時分割多重量子メモリとしての機能が獲得できる。

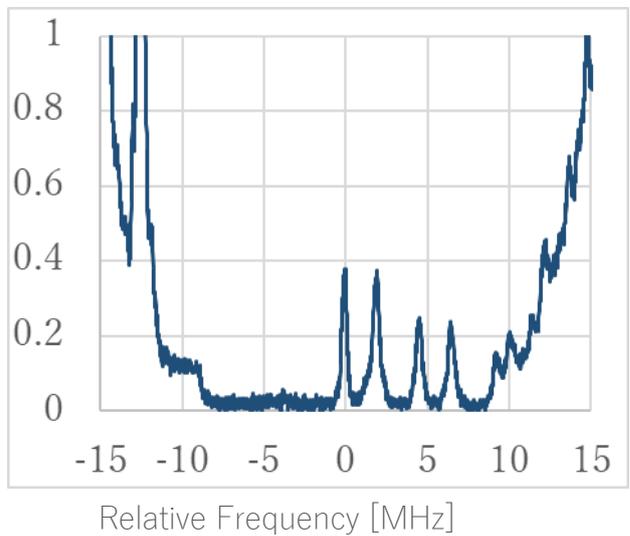


図 4：Pr:YSO 吸収スペクトルに生成された櫛構造。縦軸：吸収係数 (arbitrary unit.)、横軸：周波数。

図 4 に量子メモリ結晶 Pr:YSO に生成された幅およそ 15MHz の透明領域とそこに形成された櫛構造を示す。この櫛構造をまたぐスペクトルを持つ光信号が入射し吸収されると、いずれかの櫛で吸収される状態の量子力学的重ね合わせになり、その場合櫛間隔周波数の逆数時間で元の状態にもどる、つまり入射光子が再生放出されることになる。つまりここで再生時間が確定されたメモリ機能を持たせることができる。この櫛構造をより集密にしていくこと

で、時分割多重度を大幅に増やせるし、かつこのような楯構造のある透明領域を Pr:YSO の広い吸収スペクトル内に大量につくことで、波長分割多重能力獲得も可能である。

続いて、本研究では単一光子信号受入れ能力実証の為、単一光子レベルに弱めたレーザー光を、Pr:YSO 結晶に入射、その後楯間隔の逆数時間で再生されるフォトンエコー信号を単一光子検出器で測定した (図5)。

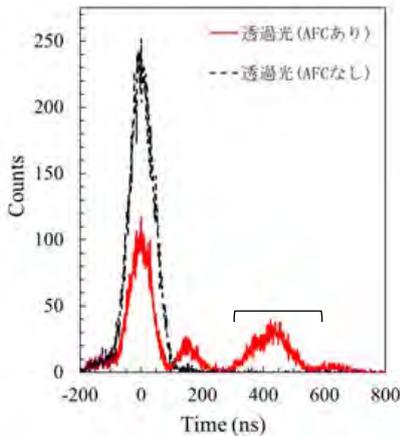


図5：単一光子レベルフォトンエコー測定結果。横軸：時間 (ns)，縦軸：単一光子検出器カウント数。

図5 黒プロットは吸収スペクトルの操作をせずに透過光のみ見た場合であり、みやすさのため赤線と原点を合わせてある。赤プロットは吸収スペクトルに楯状構造を生成した場合で、時間0のピークは、吸収されず透過した光、400 ns 付近のピークが吸収されフォトンエコーとして再生された光である。黒プロットの積分値との比較から、吸収再生効率は約 10%程度であった。これにより単一光子信号の一定時間保存・再生能力を実証できた。

また任意時間メモリのための実験系構築を始め、スピンフリップを起こしメモリ時間を伸ばすための AC 磁場、および DC 磁場によって超微細遷移の不均一幅を狭め数 ms 以上のメモリ時間を得るための磁場印加システム開発を開始した。

### (3) 波長変換技術開発

通信波長量子もつれ光源からの光子は光ファイバー中を数 km から数 10km 伝送したのち、量子中継ノードにて量子メモリに量子状態保存される必要がある。その過程で多重化量子メモリ Pr:YSO のメモリ波長 606nm に波長変換を施す必要がある。本研究では、通信波長もつれ光子 (1514nm) から量子メモリ波長 (606nm) に高効率変換する波長変換システム構築を実施した。

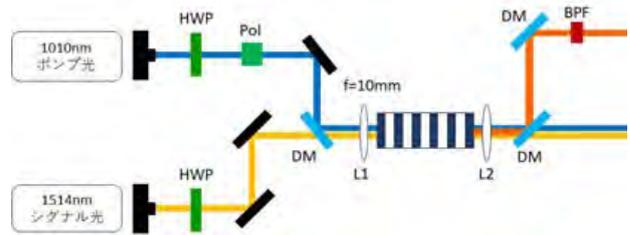


図6：波長変換実験系。

図6はその実験系であり、1514nm シグナル光を 1010nm ポンプ光によって 606nm に波長変換する系である。変換デバイスは周期分極反転ニオブ酸リチウム導波路を用いている。光ファイバコア系と同程度の幅 (<10 マイクロメートル) の導波路内にシグナル光とポンプ光を結合すると、疑似位相整合条件を満たす (エネルギー保存則および運動量保存則が満たされる) 光が生成される。この場合それが 606nm の光である。強いポンプ光を用いた場合、ほぼ 100%近い内部変換効率を得ることが可能であり、変換された光は右上の光路から取り出され、測定される。

図7が波長変換効率測定結果である。ポンプ光パワーおよそ 300mW で最高効率 60%以上を達成した。現在の PPLN 導波路であれば内部変換効率は 100%近くを得られることがわかっているが、数マイクロメートル四方の端面をもつ導波路への入力効率を 100%に近付けることが難しい点、またポンプ光とシグナル光が内部でモードが完全に一致していないと変換されない点などから、効率低下が生じる。しかしながら、60%は世界的にもトップレベルの数

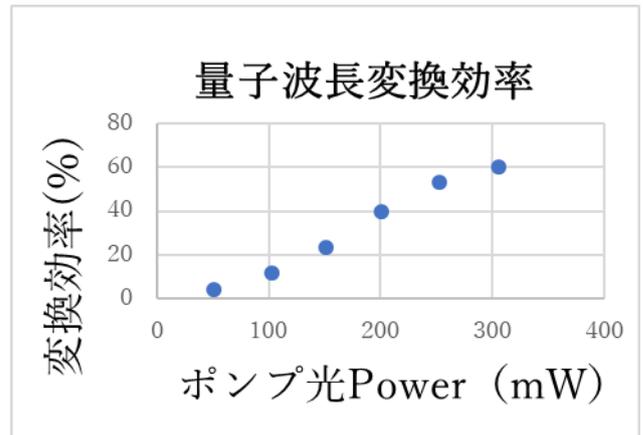


図7：波長変換効率測定結果

値である。

また、波長変換時に主にポンプ光由来で生じるノイズを除去するフィルタリングシステム開発を開始した。波長変換は、数百 mW のポンプ光 (光子数にすると 1 秒当たり  $10^{18}$  個程度) と単一光子レベルのシグナル光 (1 秒当たり  $10^6$  個程度以下) という極めて強度の異なる 2 つの光が寄与するため、ポンプ光自身のみによる非線形光学過程 (パラメトリック下方変換やストークス散乱など) によって通

信波長にノイズ光が生じ、そのノイズと元のポンプ光がさらに波長変換を起こし量子メモリ波長に現れてしまう(図8参照)。したがって、このノイズを除去することが信号雑音比向上に重要となる。

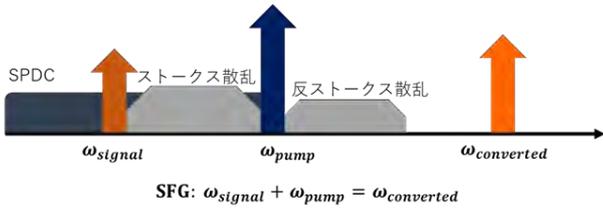


図8：波長変換におけるノイズ源。ポンプから発生するストークス散乱光やパラメトリック下方変換 (SPDC) 光がシグナル光の通信波長にも生じてしまう。

このノイズを除去するには、周波数フィルタリングを用いる。図8の概念図からわかるように、ノイズは非常に広い帯域 (>THz) にわたるため、周波数領域を狭めて測定すれば大幅に減少させることが可能である。一方本研究で開発する量子もつれ光源はおよそ 1MHz 程度の線幅をもつため、それに近い幅のみ透過するフィルタを用意できれば、ノイズは当初より 6桁程度以上減少させられると見込める。そのために、量子メモリとしても用いる Pr:YSO をフィルタ用結晶として用意し、その吸収率の高さを利用し、また制御レーザーで飽和させることでもつれ光子のスペクトルにおいてのみ透明領域を作り出すことで、ノイズ除去フィルタを作成することにした。

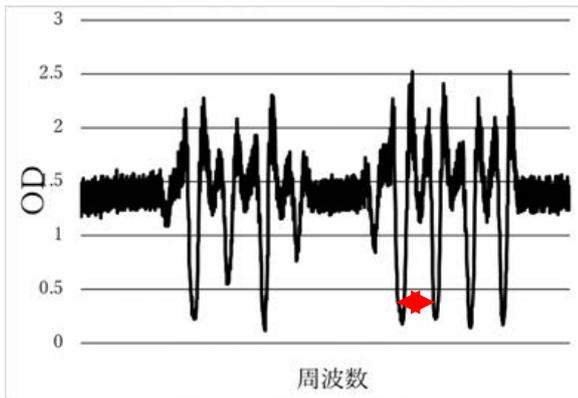


図9：ノイズ除去用フィルタ結晶に生成された吸収スペクトル。

図9が Pr:YSO に生成された吸収スペクトルである。縦軸は吸収率に対応し、0に近いほど透明である。横軸は周波数である。下方向への鋭いピーク群は、116MHz 間隔 (赤矢印) で形成されており、共振器量子もつれ光源の周波数間隔と一致する。ここでは 10 本以下の透過ピーク生成にとどまっているが、より透明度を上げたピークを多数形成することで、波長変換におけるノイズを除去するシステムとして実装する予定である。

(4) 周波数安定化技術開発

量子メモリとなる吸収スペクトル領域は 5MHz 以下であり、量子もつれ光源の線幅がそれ以下である必要だけでなく、中心波長がその領域に安定的に存在し続けなければ、長期の量子通信に用いることができない。そのためには、量子もつれ光源 (励起レーザーおよび共振器)、波長変換ポンプレーザー、量子メモリ制御レーザーのそれぞれの周波数を安定化させておく必要がある。

本研究では、量子もつれ光源励起レーザー、量子メモリ制御レーザーは光周波数コムへの相対周波数ロックにより、波長変換ポンプレーザーはヨウ素吸収線への周波数ロックを用いて安定化達成した。

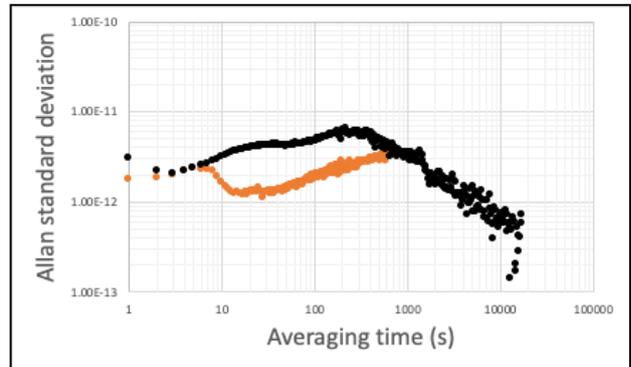


図10：通信波長レーザーの周波数安定度測定結果。黒：基準となる光コムの安定性。オレンジ：レーザーの安定度。光コムに非常に良く追随し、光コム自体の安定度から、十分なことがわかる。

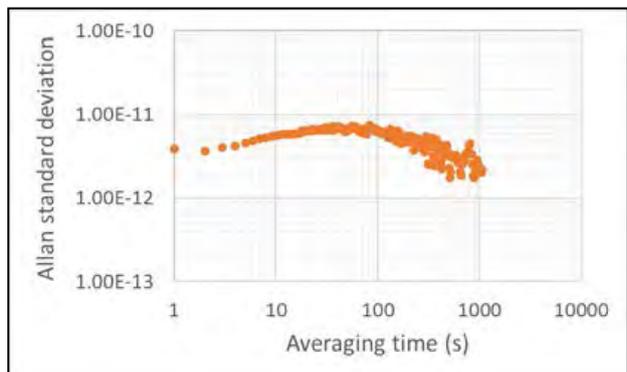


図11：1010nm レーザーの周波数安定度測定結果。

図10および図11は、例としてそれぞれ通信波長レーザー (量子もつれ光源励起レーザー) および 1010nm レーザー (波長変換励起レーザー) の周波数安定度測定結果である。縦軸はアラン分散という安定度の指標であり、 $10^{-10}$  というのは光周波数が数百 THz であることから、およそ数 10 kHz 程度の安定度に相当する。我々は 5MHz の領域内に安定化したいわけなので、十分な安定度を得られたことがわかる。量子通信への実装には、長時間にわたる安定化が必要であるが、それが可能なことも横軸の時間からわかる。

### (5)2 光子源と波長変換システムの結合

最後に、開発した量子もつれ光源を長距離光ファイバー伝送し、そののちに波長変換して量子メモリに吸収保存できるかたちにするところまで進んだことを示す。

狭線幅量子もつれ光源からの2光子を10km長の光ファイバー伝送し、量子中継ノードと見立てた光ファイバー出口で波長変換デバイスに入射し、606nmの光子に変換した。ここでは波長変換前には偏光が確定している必要があるため、量子もつれ性には着目せず偏光を確定して実験を実施した。

波長変換後の2光子時間相関測定の結果、波長変換および10km伝送後でも明確な2光子時間相関を得ることに成功した。

### 3. まとめと今後の展望

量子中継器に必要な各要素（量子もつれ光源、量子メモリ、波長変換、周波数安定技術）の開発を進めた。量子もつれ光源は、通信波長・1MHzを下回る線幅・高い忠実度(>0.9)という、長距離伝送・量子メモリとの高効率結合量子通信に必要な要素を満たす成果である。

量子メモリは、単一光子信号の確定時間メモリ機能の実証まで進み、今後は保存・再生効率の向上、任意時間メモリ機能の実装へと進む計画である。

波長変換は効率60%以上を得られ、周波数安定化は各要素の安定化に成功した。今後は、波長変換は効率そのものの改善よりもノイズ除去システムの充実に進み、周波数安定化に関しては各要素の相対周波数安定化によるもつれ光源とメモリ周波数との長時間安定結合へと進む。

通信波長2光子のメモリ波長への変換及び2光子性の確認ができたので、今後は量子メモリとの結合へと進む。

## 業 績

### 【原著論文】

なし

### 【総説】

なし

### 【書籍】

なし

### 【口頭発表】

1. 万浪香子, 都野智暉, 近藤健史, 郷治侑真, 新関和哉, 中村 一平, 洪 鋒雷, 堀切智之  
希土類イオン添加結晶を用いた微弱光のフォトンエコーの観測  
応用物理学会, 2019年9月, 北海道
2. 伊藤洸, 新関和哉, 吉田大輔, 小野沢涼, Mingyang Zheng, Xiuping Xie, 岡村幸太郎, 堀切智之  
量子メモリ結合へ向けた和周波発生におけるノイズ低減に関する研究  
日本物理学会, 2019年9月, 岐阜
3. 小野沢涼, 吉田大輔, 新関和哉, 伊藤洸, Mingyang Zheng, Xiuping Xie, 岡村幸太郎, 堀切智之  
通信波長狭線幅2光子源から量子メモリへの結合へ向けた研究 2  
日本物理学会, 2019年9月, 岐阜
4. 新関和哉, 吉田大輔, 伊藤洸, 小野沢涼, Mingyang Zheng, Xiuping Xie, 岡村幸太郎, 武井宣幸, 堀切智之  
長距離量子通信に向けた通信波長狭線幅2光子源と波長変換  
Optics & Photonics Japan 2019, 2019年12月, 大阪
5. 伊藤洸, 新関和哉, 吉田大輔, 小野沢涼, 堀切智之  
Pr<sup>3+</sup>:Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub> 量子メモリ結合へ向けた和周波発生による波長変換とノイズ低減化へ向けたフィルターの作成  
第15回ナノテク交流シンポジウム(対面開催中止のため、概要集で発表扱い), 2020年3月, 神奈川
6. 近藤健史, 宮下拓士, 新関和哉, 郷治侑真, 洪鋒雷, 堀切智之  
量子情報のための光周波数コム  
第15回ナノテク交流シンポジウム(対面開催中止のため、概要集で発表扱い), 2020年3月, 神奈川

7. 小野沢涼, 新関和哉, 伊藤洸, 吉田大輔, Mingyang Zheng, Xiuping Xie, 岡村幸太郎, 堀切智之  
長距離量子通信に向けた狭線幅非縮退2光子源の作成  
第15回ナノテク交流シンポジウム(対面開催中止のため、概要集で発表扱い), 2020年3月, 神奈川
8. 万浪香子, 都野智暉, 近藤健史, 新関和哉, 中村一平, 洪 鋒雷, 堀切智之  
Pr:YSO結晶を用いた量子メモリにおける微弱光のフォトンエコー観測  
第15回ナノテク交流シンポジウム(対面開催中止のため、概要集で発表扱い), 2020年3月, 神奈川

### 【特許】

- (1) 国内特許出願 1件
- (2) 国外特許出願 0件

# 「グローバルヘルスリサーチコーディネーティングセンター（GHRCC）」プロジェクト

ディレクター 毛利 光子

## 基本構想

GHRCC プロジェクトは、以下の理念と6つの事業方針に基づき、研究活動を行っている。

## 理念

臨床研究の実施により得られる「知」と患者・家族・一般市民（コミュニティ）の「生活」を融合することにより、「神奈川県から」医療の発展と世界の人々のより健康な暮らしに貢献する。

## 事業方針（6つの柱）

- 1) 臨床研究のマネジメント支援
- 2) わが国におけるグローバル臨床研究の推進
- 3) 未病の知識と対応の普及
- 4) 臨床研究のコンサルテーション
- 5) 臨床研究専門職の人材育成
- 6) 臨床研究方法論に関する研究活動

### 1. 2019年度の研究目的

プロジェクト5年目を迎えた。設立時に掲げた6つの事業方針に基づく研究を継続的に推進し、臨床研究支援を通じて医療の発展に寄与することを目的に活動した。

### 2. 2019年度の研究成果

2019年度の具体的な研究成果は以下のとおりである。

#### 1) 臨床研究のマネジメント支援

臨床研究マネジメントの重点支援領域を「希少がん」「精神・神経難病」「再生医療」としている。2019年度は、婦人科がん、小児がん領域の治験・特定臨床研究・臨床試験あわせて17試験の多施設共同試験のマネジメントを行った。GHRCCで支援している試験一覧を図1に、国際共同試験の支援体制を図2に示す。

17試験のうち15試験は多施設共同国際共同試験（医師主導治験4、医師主導臨床試験11）であった。2019年度に新規に治験調整事務局を受託した試験が2本あり、毎年着実に受託実績を積み上げていると判断できる。

国内で実施している2試験は、2018年4月の臨床研究法の施行に伴い、多施設共同医師主導臨床試験から積み替えた特定臨床研究「GOTIC-VTE」試験、および初発の子宮頸癌患者に対し化学放射線療法に免疫チェックポイント阻害剤のオプジーボを併用する「GOTIC-018」試験である。いずれも支援業務を順調に継続している。

フランスの婦人科癌臨床試験グループ ARCAJY-RESEARCH がリードし国際共同で実施している「PAOLA-1」試験、アメリカ国立がん研究所 National Cancer Institute (NCI) の主導する「NRG-GY004」試験は

いずれも卵巣がん患者を対象とし、日本では医師主導治験として実施しているが、日本における症例登録を無事に完了した。これら試験の成果をうけて、前者のグループからは子宮頸がん患者を対象とした「SENTICOLIII」試験、後者のグループからはプラチナ抵抗性の再発卵巣がん患者を対象とした「NRG-GY005」試験における、試験調整事務局の受託が可能となった。

再生医療製品は、早期開発段階であることが多く、GHRCCが開発の後期フェーズを得意とすることも相まって具体的な受託実績には至らなかったが、基礎研究者との情報交換を重ねている。

NRG Oncology-Japan(米国がん臨床研究グループの日本側コンタクト組織)、GOTIC(婦人科悪性腫瘍がんコンソーシアム)という2つの研究者グループの専属コーディネーティングセンターの受託は今後も継続する。加えて、小児領域、神経難病領域の試験支援も継続する意向である。

医師主導治験は、承認申請のために実施され出口戦略が明確である。今後、GHRCCの社会貢献が見える形になるものと期待できる。国際共同で実施する医師主導臨床試験の経験は、医師研究者のみならず、臨床研究を支援する者にとってもニッチを知り国際標準を学ぶ貴重な場となっている。

#### 2) わが国におけるグローバル臨床研究の推進

研究者および医療スタッフが国際共同研究に参画しモチベーションを高める活動を継続した。国内外の研究機関や製薬企業/医療機器企業に対して、学会発表、セミナーあるいは面談を通じ、米国NCI傘下のNRG Oncology

と Children Oncology Group の2つの臨床研究グループに対する支援活動の実際を紹介した。「国際的な研究ネットワーク」が企画運営する国際共同試験を医師主導治験として実施し、国内での新薬承認や適応拡大へと発展させる意義や、そのメリットを強調したい。GHRCC 研究員が定期的に米国 NRG Oncology や欧州 GCIG の研究グループ会議に出張し、最新情報の入手に努めている。

アカデミアの臨床研究グループとして、グローバル製薬企業が行う企業治験において、症例登録情報配信や研究者会議開催支援等を行っている。

### 3) 未病の知識と対応の普及

未病の知識、すなわち正しい疾患情報や予防・治療方法を届けるべく、一般市民を対象として「臨床研究おしゃべりサロン」と題した講演会を2015年度から継続開催している。2019年度は「腫瘍内科医のしごと」「上手な婦人科がん検診の受け方」と題するサロンを実施した。臨床医による講演は好評を得ている。放射線治療専門医による「困った時には放射線治療～がん治療のユーティリティプレーヤー～」は、新型コロナ肺炎対策のために開催を延期した。現在は、新しい日常にむけ、一般市民を対象としたサロンの開催様式を模索中である。

### 4) 臨床研究のコンサルテーション

GHRCC では、研究者や企業からの臨床試験実施上の問題点や研究実施体制整備と必要な準備、確認すべき規制要件、品質管理方法等の実務的側面からの相談を受け付け、コンサルテーションを行っている。2019年度の相談実績は10件、相談者は、製薬企業や研究者・研究グループだった。

相談案件の中に、県内医療機関から、臨床研究の実施費用含めて試験全体のマネジメントに関するものがあった。GHRCC は、これまでどちらかという海外研究機関の求めに応じ海外組織の方を向いて活動してきたが、足元の県内の医療機関と共調することの重要性を認識する好機になったと考えている。

### 5) 臨床研究専門職の人材育成

本邦における臨床研究の実務を支援し、品質向上をおこなうにあたり必要な人材の育成を目指し、GHRCC の経験を学会やセミナーを通じて紹介した。臨床試験を実際に行っている医師および支援組織のリーダーを講師として迎え、研究室セミナーを行った。国際共同試験に関わる人材の育成方法として、環境が許せば、将来的にはインターンの受け入れ検討も開始したい。

### 6) 臨床研究方法論に関する研究活動

承認取得までのプロセスを鑑みたレギュラトリーサイエンス研究は、ますますその重要性を増している。日本臨床試験学会、日本レギュラトリーサイエンス学会を軸として GHRCC から発信する場を持ち続けたいと考えている。

2019年度は、NCI 監査における指摘事項を考察した研究、ゲノム解析研究の課題を考察した研究、医療経済に関する研究においてそれぞれ研究発表を行った。

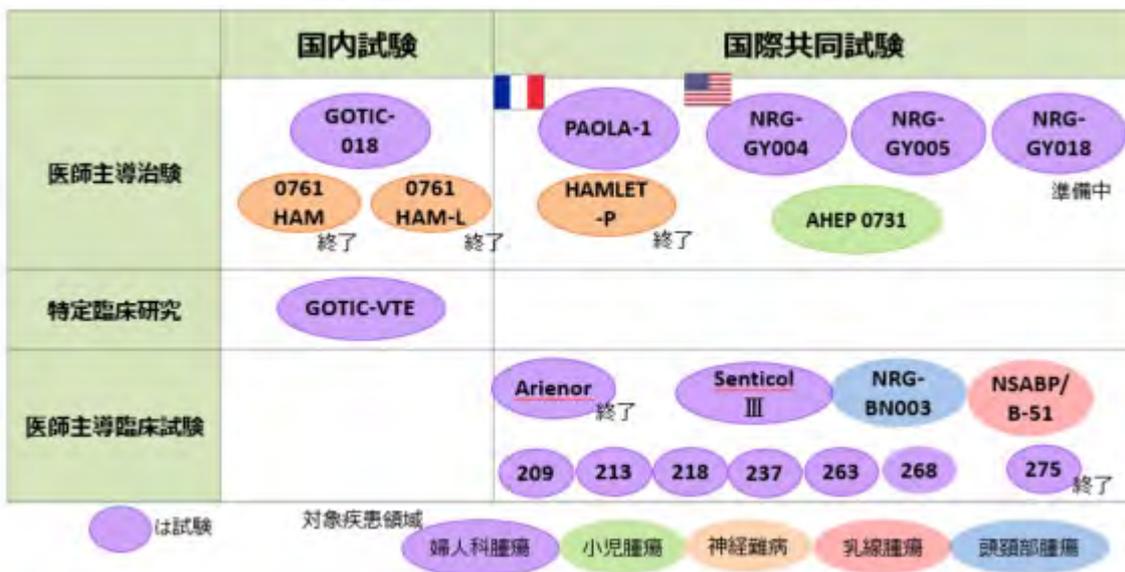


図1 GHRCCで支援している試験一覧



図2 国際共同試験の支援体制

## 業 績

### 【口頭発表】

1. 梶本裕介, 沼上奈美, 林聖子, 橋爪智恵, 高野忠夫, 藤原恵一, 米国国立がん研究所 (National Cancer Institute, NCI) 監査ガイドラインに基づいた監査指摘から考察する, 日本における NCI 主導臨床試験実施の注意点と品質管理. 日本臨床試験学会第 11 回学術集会総会. 東京. 2020 年 2 月 15 日.
  2. 毛利光子, 中村文子. ゲノム解析研究の医療機関審査の課題と考察. 日本生体医工学会. 第 18 回レギュラトリーサイエンス研究会. 埼玉, 2019 年 8 月 25 日
  3. 梶本裕介, Monica Bacon, Bette Stonebraker, Benedicte Votan, Julie Martyn, Jane Bryce, Laura Farrelly, Karen Carly, Anastasia Negrouk, Gagrela Elser, Eriko Aotani, 国際婦人科腫瘍研究コンソーシアム Gynecologic Cancer InterGroup における国際共同試験の問題解決を目的としたハーモナイゼーション活動: 2014-2017. 日本臨床試験学会第 11 回学術集会総会. 東京. 2020 年 2 月 15 日. ポスター発表
  4. Y Kajimoto, H Honda, K Fujiwara, M Mizuno, T Nishimura, H Fujiwara, T Koyanagi, I Kohara, S Tamaki, A Igarashi. Development of the COmprehensive Score for financial Toxicity (COST) tool and assessment of financial toxicity in patients with gynecologic cancer in Japan. Gynecologic Cancer InterGroup 2019. Rio de Janeiro, 2019 年 9 月 19 日-21 日 ポスター発表
- The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, **102**(1), 2020, 191-4
2. 梶本裕介, 北島勉, レセプトデータベースを利用した、本邦におけるデング熱の経済的負担に関する研究, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, **102**(6), 2020, 1237-43

### 【論文】

1. 梶本裕介, 北島勉. レセプトデータを用いた、日本におけるデング熱患者の臨床管理調査,



## 研究報告 2020

2020年8月24日発行

発行 地方独立行政法人  
神奈川県立産業技術総合研究所 (KISTEC)  
研究開発部橋渡し研究課  
海老名市下今泉705-1 / 〒 243-0435  
TEL (046) 236 - 1500

---

●無断転載・複製を禁じます。