<u>ISSN 2434-5873</u>



研究報告 2021

(KISTEC Annual Research Report, 2021)



Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology

研究報告2021 目次

【機械・材料技術部】

◆虹のような色彩を放つ人工オパール構造色・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
◆グラスウールの垂直入射吸音率の理論予測・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3
◆SS-0CTを用いた材料の内部構造の非破壊評価技術・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	5
◆高い近赤外遮蔽特性を有する化粧品用酸化亜鉛顔料の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	10

【電子技術部】

◆生体応用を目指したチタン基板上へのダイヤモンドライクカーボンのコーティング・・・・・・	13
◆フォトリソグラフィによる微細加工におけるハイブリッドレーザー顕微鏡の計測事例・・・・・	15
◆Vバンド(60GHz帯)における材料定数測定に関する基礎的な検討結果について・・・・・・・・・・・	18
◆ ECRプラズマを用いたドライエッチングについて・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	21
◆HSQを用いた試作用ナノ金型の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	23

【情報・生産技術部】

◆三次元座標測定におけるスタイラス延長シャフトの測定精度への影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・	25
◆IoTデバイスによるセンサデータの取得蓄積に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	28
◆NCフライス盤の切削加工における面粗さ予測に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	30
◆光造形方式3Dプリンターの精度に関する報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	33
◆座面板に使用される木質素材の強度性能・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	35
◆NCフライス加工機の異常検知システムの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	37
◆レーザ照射によるレーザ粉体肉盛層の組織制御・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	40
◆チタン合金加工におけるドリルへのブラスト処理の効果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	44

【化学技術部】

◆ 有機溶媒がポリメチルメタクリレートの破壊現象に及ぼす影響について・・・・・・・・・・・・・・・・	47
◆非線形粘弾性解析によるクリームの塗り心地評価への応用・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	51
◆アミロースによるフタル酸エステル類の分子吸着挙動・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	54
◆透明樹脂材料の劣化に関する総合的解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	57

【川崎技術支援部】

◆オゾン水と紫外線を用いた環境にやさしい綿布や麻布の漂白方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	63
【抄録】	65

【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「革新的高信頼性セラミックス創製」プロジェクト

◆総括·····	69	
◆透明蛍光Ca-α SiAlON: Eu2+バルクセラミックスの作製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	73	
◆常温緻密化プロセスによる窒化物蛍光体粒子分散MgOバルクセラミックスの作製・・・・・・・・・・・	80	
◆マイクロカンチレバー曲げ試験によるLNKNセラミックスのメソスケール機械的特性評価・・・・・・	84	
◆ 波長掃引型光コヒーレンストモグラフィーを基軸とする内部構造の非破壊観察・評価システムの開発・・・・・・	87	
◆業績·····	96	
「腸内細菌叢」プロジェクト 細括ツール問題がループ		

解析ツール開発グループ

◆総括······	99	
◆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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	103	
◆ 業績·····	106	
腸内環境制御グループ		
◆総括·····	107	
◆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培養法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	110	
▲明古理控制御甘馳壮先の明務に向けた孤宏ツ、九の明務	113	

•	・腸内環境制御基盤技術の開発に回けた研究シールの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	115
•	業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	116

「次世代機能性酸化物材料」プロジェクト

•	▶総括·····	119
٠	▶ 新規負熱膨張材料開発手法の確立、及び鉛含有ペロブスカイト型酸化物の特異な電荷分布の解明・・・・・・・・	122
•	▶業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	127

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

٠	▶総括······	131
٠	▶マイクロニードル機能向上に向けたゲル組成の改良とin vivo評価系の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	134
٠	▶吸水性と力学的強度を向上させるポリグリセロール融合型ゲルマイクロニードルの開発・・・・・	136
•	▶業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	138

「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト

٠	・総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	141
٠	◆毛包上皮幹細胞の増殖培養技術の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	144
٠	Electrical stimulation of human follicle dermal papilla cells to promote hair regeneration	146
٠	▶業績······	149

実用化実証事業

	「人工細胞膜システム」グループ	
٠	総括••••••	151

◆イオンチャネル機能評価システムの多様な細胞内イオンチャネルへの適用検討・・・・・・・・・・・	153
◆呼気診断のための昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	156
◆業績·····	159

「高効率燃料電池開発」グループ

4	▶総括·····	163
4	▶酸素還元特性向上に向けたPt-Feナノ粒子連結触媒の原子配列規則性制御・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	171
•	▶簡易な合成法による高規則度Pt-Feナノ粒子連結触媒の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	177
•	▶酸高密度型細孔フィリング薄膜の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	183
4	▶酸高密度構造型細孔フィリング薄膜を用いた高温低湿度対応膜電極接合体の開発・・・・・・・・・・	187
•	▶業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	192

「次世代医療福祉ロボット」グループ

٠	→総括····································	195
٠	▶環境情報に基づいた仮想環境提示の機能を有する2自由度力触覚ドリルの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	198
٠	▶貫通検知機能を有する整形外科用力触覚ドリルの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	201
٠	▶業績·····	204

国際評価技術サービス提供事業

「食品機能性評価」グループ

◆総括·····	207
◆間欠絶食がもたらす代謝機能、脳機能への影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	211
◆食品機能性評価用新規指標開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	215
◆未病と食の脳活動評価試験法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	218
◆ 業績······	221

「抗菌・抗ウイルス研究」グループ

4	▶総括······	222
•	▶新型コロナウイルスを用いた性能評価の取り組み・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	224
•	▶光触媒を用いたバイオフィルム形成抑制効果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	227
•	▶酸化チタンと酸化モリブデンを組み合わせた可視光応答型光触媒材料の抗ウイルス活性に関する研究・・・・・・	230
•	▶業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	233

戦略的研究シーズ育成事業

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	235
研究テーマ:「セキュア量子基盤技術の研究」プロジェクト ◆総括・業績・・・・・	241
研究テーマ:新産業創出に向けた無標識AIセルソーター ◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	247

 ◆ #310 米順 研究テーマ:貴金属フリー新規触媒技術の開発 ◆ 総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	259
 ◆ 松石・米禎 研究テーマ:超高空間分解を実現するナノカーボン光分析装置 ◆ 松石・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	264
▼₩310 米順 政策課題受託研究	201

「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・・・・・・・ 271

虹のような色彩を放つ人工オパール構造色

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

本来無色の物質であっても、特定の色の光を強め合うよ うに反射する構造を形成すると、色を発現する(構造色)。 つまり、化学組成に縛られることなく、資源豊富で環境に やさしい材料を選択して色を発現することができる。その 代表例として、数百ナノメートルの単分散粒子を密充填し て作製される「人工オパール」が広く知られている。

人工オパールは、砂や窓ガラスの主成分である酸化ケイ 素で作ることもできる。また、国宝「曜変天目茶碗」のよ うな、見る角度(光の角度)によって色が変わるユニーク な特徴を発現することも可能である。技術と美術の両面で メリットがあると考え、人工オパール技術を陶芸に応用す ることを目的として、美工連携となる女子美術大学との共 同研究を実施した¹⁾。研究を進める中で、粒径の大きい人 工オパール粒子を合成することに成功し、これを塗布した 場合に、わずかな光の角度の違いで色が変わる多彩な発色 となることを発見した。ここでは、その理論的な考察を中 心に述べる。

2. 実験方法

オルトケイ酸テトラエチル (TEOS; Si(OC₂H₅)₄)をエタ ノール水溶液と混合し、室温で撹拌しながら1mol/Lのア ンモニア水を添加して粒子を析出させた。TEOS 10g:エ タノール 20g:水5g:アンモニア水 10gを標準条件としな がら混合比率を変えて、粒径の異なる人工オパール分散液 を得た。これらの分散液を1種類ずつ市販の陶器(東急ハ ンズ、カタログ No. 2401026303928)に筆で塗布し、室温 で乾燥した。走査型電子顕微鏡(SEM;日本電子 JSM-IT200)を用いて、陶器表面の微構造を倍率 50,000倍 で観察した。SEM 像の中から境界が鮮明な 10 個の粒子の 直径を計測し、その個数平均径を求めた。上記実験を通し て選定した人工オパール分散液を陶器に筆で塗り、大気中 850℃で1時間焼成して焼き付け、作品を制作した。

3. 結果と考察

試薬を室温で1晩混ぜた結果、牛乳のような白色の分散 液が得られた。陶器の内面に筆で塗布したところ、エタノ ールを多く含むため室温でも1分程度で液が乾き、乾くと ともに色を発現した。合成条件の異なる6種の分散液を用 いて得られた、陶器表面のSEM像と陶器の外観写真を図 1に示す。直径316 nmの人工オパールは赤紫、357 nm で は青のほぼ単色であったが、375 nmの場合は青を基調と し側面にかけて緑のグラデーションが見られた。より大き な415 nm では緑〜黄緑を基調とし側面にかけて黄、橙、 赤となる虹のような色彩が現れ、442 nm、473 nm の場合 も底面付近に紫~青、緑や薄い橙を挟んで、側面が赤とな る多彩な発色となった。角度を変えて撮影した写真から、 同じ領域であっても視点(撮影点)の角度によって色が変 わることが分かった。特に、(C)~(F)の陶器では、視方向 と面が平行に近い手前側と、角度がついている奥側とで色 の見え方が大きく異なった。人工オパールの構造色を発現 するためには、図1のSEM像のように粒子の大きさを高 度に揃える必要があり、大きい粒子を合成しようとすると、 粒子がゲル化(凝集)してしまう課題があった。我々は、 ノウハウを積み重ねて実験条件を最適化し、図1(C)~(F) に示したような多彩な構造色を発現する粗大な人工オパ ールの合成に成功した。



図1.6種の人工オパール分散液を塗布した陶器のSEM像と、 異なる角度からデジカメで撮影した外観写真.



図2. 発現した構造色に関する考察図. 上段: 図1に示した陶器外観(再掲)、下段左:陶器の曲面に塗布した人工オパール粒子の積層方向を表す模式図、下段右:粒径 Rの粒子が作る周期構造が強め合うように反射する光の波長 Aの計算結果.

続いて、図2により前記の現象を考察する。陶器を真上 から見た場合、底面に塗布された人工オパール粒子の積層 方向は視方向と平行となり、側面では垂直となる。視方向 に対する積層方向が異なると、粒子が作る構造の周期間距 離も異なり、その結果、強め合って反射される光の波長も 異なる。色が陶器内側の曲面の角度に依存することは、真 上から撮影した写真において同心円状に色が異なってい た結果からも裏付けられる。理論上、強め合って反射され る光の波長 λ は、周期構造の間隔D、整数 m、屈折率 n及 び光の入射角度 θ の関数として次式で表される¹。

 $\lambda = 2(D/m)(n^2 - \sin^2 \theta)^{1/2}$ (1) 周期構造の間隔 D は粒子の積層方向に応じて底面では $\sqrt{6R/3}$ 、側面では R/2 と表すことができ (R は直径)、この 他に斜め方向にも周期構造は存在する。(1)式から計算した $\lambda \ge R$ の関係を図 2 のグラフに示す。粒径が大きいと、整 数 m が 2 やそれ以上となる条件においても(1)式を満たす 可視光域の λ が存在する。具体的には、粒径 378 nm では 底面で青の光 (m=2) が強められ、側面にかけて緑の光

(m=1)が強められる計算となる。そのため、陶器(C)で は青から緑のグラデーションが確認されたと思われる。同 様に、415 nm では底面の青緑から側面にかけて赤の光が 強められる計算となり、陶器(D)の外観とよく一致した。 陶器(E)、(F)では、m=3 条件下でも可視光が強められる 計算となり複雑ではあるが、概ね外観と一致した。

近年、国宝「曜変天目茶碗」の美しい色彩が構造色と言われている。そこで、曜変天目茶碗の色彩をモチーフとした作品を制作した。図3に示すように、光の角度によって 青↔緑と色が変わる特徴の発現を確認することができた。



図3. 曜変天目の色彩をモチーフとした作品.1種類の人工オ パールを塗布して焼成.光の角度に依存して青↔緑と 色が変わる.

4. 今後の展開

サステナビリティ時代の潮流に乗り、環境にやさしいレ アメタルフリー顔料として、新しいデザインを可能とする 高機能顔料として、人工オパールが実用化されるよう取り 組む。随時、KISTECメール技術相談フォーム等で、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, 8, 578-585 (2020).

【外部発表】ポスター発表1件

グラスウールの垂直入射吸音率の理論予測

小島 真路 (機械・材料技術部 機械計測グループ) 板谷 透、岡村 和馬 (旭ファイバーグラス株式会社)

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。吸音材として多 く利用されるグラスウールは、繊維径や嵩密度が複数通り あり、利用者が適切なグラスウールを選定することは容易 であるとは言えない。

本研究では、利用者が簡単にグラスウールを選定できるこ とを目指し、嵩密度と材厚から垂直入射吸音率を理論予測 するプログラムを作成する。グラスウールの繊維径は3、4、 7µmの三種類を対象としたが、ここでは7µmの結果につ いて述べる。はじめに、嵩密度と流れ抵抗の関係を明らか にし、次に、流れ抵抗から音響パラメータを算出する独自 モデルを作成する。最後に、音響パラメータから垂直入射 吸音率を算出する。

2 嵩密度と流れ抵抗の関係

嵩密度と空気流れ抵抗の関係には、相関があることが知られている。カトーテック社製の通気性試験機(KES-F8-AP1)を用いて通気抵抗を測定し、材厚で除算することで流 れ抵抗を求めた。表1に示すグラスウールの嵩密度Dと流れ 抵抗σとの関係を検証した(図1)。その結果、強い相関が認め られたので累乗近似を行い、グラスウールの嵩密度から流 れ抵抗を算出する以下の推定式(1)を得た。

 $\sigma = 16.638 \, D^{1.193}$

3 音響パラメータの推定

3.1 音響パラメータの実測

音響パラメータ(特性インピーダンスおよび伝搬定数) の推定にあたり、表1に示す嵩密度の異なるグラスウールを 用意し、実測値を得た。これらの値は、グラスウールの背 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 求めた。図 2(a)、(b)に特性インピーダンス Z_c の実数部 Rと虚数部 X を、図 2(c)、(d)に伝搬定数 γ の実数部 α と虚 数部 β を示す。横軸は周波数 f を流れ抵抗 σ で規準化し た値である。また、縦軸は、特性インピーダンスについて は、その実数部 R と虚数部 X をそれぞれ空気の音響抵抗 ρc で規準化し、実数部から1を引いた値と虚数部の符号を 反転した値で、伝搬定数では、その実数部 α と虚数部 β

表 1 グラスウールのサンプル

材厚(mm)	嵩密度(kg/m ³)	流れ抵抗(Pa•s/m²)	
10	20.4	690.0	
10	21.5	660.0	
10	22.9	756.7	
10	24.8	756.7	
15	36.3	1033.3	
15	39.1	1188.9	
15	50.9	1653.3	
15	62.1	2200.0	
15	77.3	3040.0	
15	77.8	3048.9	
15	87.3	3342.2	
15	90.5	3648.9	
15	95.4	4031.1	
15	100.8	4531.1	



をそれぞれ波数 ^ω/c で規準化し、虚数部については1を引 いた値となっている。

3.2 流れ抵抗から音響パラメータを予測する独自モデル の作成

前節で求めた音響パラメータの実測値を用いて独自モデ ルを作成した。Delany-Bazley モデルや Miki モデルが導かれ る過程で用いられている複数の音響パラメータの実測値か ら近似する手法¹⁾を採用した。実測値には、おそらくは、 サンプルサイズの影響だと思われる落ち込みが、主に $f_{\sigma} < 0.2$ の範囲にみられる。しかしながら、それ以外の部 分に着目すると、同じ傾きを持った直線の集まりであるこ とが推察されるので、落ち込みの範囲を除いて累乗近似を

(1)

行った。その結果、周波数を流れ抵抗で規準化した $f/_{\sigma}$ から音響パラメータを求める以下の推定式(2)~(3)を得た。

$$\frac{Z_c}{\rho c} = R(f) + jX(f) \tag{2}$$

$$R(f) = 1 + 0.2834 \left(\frac{f}{\sigma}\right)^{-0.695}$$

$$X(f) = -0.472 \left(\frac{f}{\sigma}\right)^{-0.633}$$

$$\gamma = \alpha(f) + j\beta(f) \qquad (3)$$

$$\alpha(f) = \frac{\omega}{c} \left\{ 0.7041 \left(\frac{f}{\sigma}\right)^{-0.586} \right\}$$

$$\beta(f) = \frac{\omega}{c} \left\{ 1 + 0.4336 \left(\frac{f}{\omega}\right)^{-0.73} \right\}$$

4 垂直入射吸音率の算出と独自モデルの検証

剛壁面に密着した吸音材の垂直入射吸音率は、特性インピ ーダンスと伝搬定数を用いて求めることができる²⁾。

式(1)-(3)を用いて、嵩密度から任意の材厚の垂直入射吸音 率を求めるプログラムを Excel で作成した。例として、材厚 10mm・嵩密度 20.4kg/m³、および材厚 15mm・嵩密度 39.1kg/m³の2つの場合の予測と実測を比較した結果を図3に 示す。周波数帯域によって、やや差がみられるものの、良 好な結果を示している。

5 まとめ

グラスウールを対象として、嵩密度から垂直入射吸音率 を理論予測するプログラムを作成した。最初に、様々な嵩 密度のグラスウールの嵩密度と流れ抵抗の関係について検 証し、強い相関が認められたので、累乗近似により定式化 した。

次に、背後空気層を二通りとして、音響パラメータの測 定を行った。ここでは、限られた領域に値の落ち込みが現 れた。この落ち込みは、これまでの経験から、サンプルサ イズの調整によって対処できると思われるが、今後、検証 する必要がある。しかしながら、その領域を除いた部分を みると、同じ傾きを持った直線の集まりであることが推察 されたので、累乗近似を行い流れ抵抗と音響パラメータの 関係式を求めた。

これらの関係式を組み合わせることで、嵩密度から垂直 入射吸音率を求めるプログラムを完成させた。最後に、予 測と実測の結果を比較し、良好な結果が得られていること を確認した。

【参考文献】

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



SS-OCT を用いた材料の内部構造の非破壊評価技術

高橋 拓実(機械・材料技術部 材料物性グループ)

多々見 純一 (横浜国立大学)

1. はじめに

特性を劣化させる悪質な不均質構造(以下、欠陥)の低 減は、材料の高信頼性化と高機能化のために不可欠なアプ ローチである。従来、仕掛品や製品の特性や構造を点で評 価し、これらに相関する多様なプロセス因子の影響を長年 の経験と勘に基づいて推測し、諸条件を決定する場合が多 い。しかし、原材料や装置、温湿度などの製造環境、人な どが変わることで問題に対する認識が複雑化し、一からの 最適化が必要になるケースも少なくはない。重要なことは、 製造工程のいつ・どこで・どのように欠陥が形成したかと いう実態を直接的に理解して、得られた情報をプロセスへ フィードバックし、的確に制御することである。このため には、実使用環境に近い環境下において、観察や測定を非 破壊で行う新しい評価技術が必要である。

筆者はこれまで、セラミックス材料の高信頼性化や高機 能化に資するプロセス技術や評価技術の研究開発に従事 してきた。セラミックス材料は、粉体に始まり、高温での 焼結や、応力場や化学反応場の作用に起因した顕著な内部 構造変化を伴う多段階プロセスを経て製造される。このた め、プロセス中で起こる現象の実態はほとんどがブラック ボックスであり、多岐にわたるプロセス因子の相関関係は 十分に解明されていない。信頼性や機能性の観点で問題と なる欠陥のスケールは、数 µm~サブ mm (メソスケール) のである。これは、原料粉体を構成する粒子の形態とも密 接に関係する。また、高温下、あるいは化学反応場や応力 場が作用する環境下での内部構造変化も同様のスケール である。これらの観点から、メソスケール現象を的確に捉 えうる高い時空間分解能が求められる。さらに、実使用環 境に近い環境下での評価のためには、評価システムの高い 拡張性が不可欠である。これらの要求の全てを満たす基盤 技術として、筆者らは波長掃引型光コヒーレンストモグラ フィー(以下、SS-OCT)に着目した。

SS-OCT は、医療分野で発達した非侵襲の内部構造観察 技術で、身近には眼底検査装置として普及している¹⁻³⁾。 筆者らの研究目的における SS-OCT の実用的な特長は以 下の通りである。

- 物質透過性が高い近赤外光を光源とするため、多様 な材料に対して適用可能である。
- 3次元観察が可能である。
- μm オーダーの高分解能である。
- ビデオレート以上の動的 2D 観察と秒スケールの高速 3D 観察が可能である。
- 光源と同じ位相と波長の反射光のみを検出するため、
 高温下の輻射など、周囲の散乱光の影響を受けない。

- 装置が PC ラックに積載できる程度にコンパクトで 可搬性がある。
- 家庭用ビデオカメラのようなプローブ部は、干渉計 と接続する光ファイバーを含むケーブル長の範囲で 自由に取り回せる可動性がある。

これらの特長を活かして、筆者らはこれまでセラミック ス材料の製造に関わる多様な形態の粉体材料(粒子が液中 に分散したスラリーや顆粒、成形体など)の内部構造変化 をその場観察し、報告してきた⁴⁻¹⁰。これらの詳細につい ては既報を参照いただくとして、本稿では用いた SS-OCT の観察原理や、基本的な観察性能を決定する光源の仕様に ついて簡単に説明し、身近で一般的な観察対象として、以 下の4つの事例を紹介する。

2. SS-OCT

2.1 観察原理¹¹⁾

SS-OCT の光学系の模式図を図1に示す。光源から出た 光は、ビームスプリッターで反射光(参照光)と透過光に 分けられる。透過光は観察対象へ照射され、内部構造情報 を反映した散乱光としてビームスプリッターに戻ってく る。この時、ミラーで反射されてビームスプリッターに戻 ってきた参照光と同じ位相と波長を保った反射光のみが 干渉するので、光干渉信号として検出される。光干渉は、 OCT=Optical Coherence Tomography(光干渉断層法)の名 前通りに全ての方式の OCT で共通する基本原理で、光が 持つ深さ方向情報を取り出す手法である。SS-OCT は光源 が波長可変レーザー(Tunable laser)であるため、周波数 を直線的に変えながら深さ方向を計測する。得られる情報 は周波数に対する光干渉信号強度(スペクトル干渉信号)



図1 SS-ОСТの光学系の模式図



図2 冷凍イチゴの断面像

であるから、これを逆フーリエ変換することで深さ方向の 位置情報が得られる。

2.2 光源の仕様

光源の波長は、内部構造観察では重要な因子である。生体観察を主として開発されてきた経緯から、市販の OCT 装置では水による吸収がない「生体の窓」と呼ばれる近赤 外の波長帯が選択される。たとえば、眼底検査装置では 1000 nm が多いようである。筆者らは、中心波長 1300 と 1700 nm の光源を採用した SS-OCT 装置 (IVS-4000、santec ㈱製)をこれまで用いてきた。大まかには、高深達な観察 では長波長,空間分解能では短波長が有利である。また、 水による吸収の影響は 1700 nm の方が大きい。

波長可変レーザーの場合、光源の掃引周波数がスキャン 速度を決定する。市販装置の掃引周波数は 20-100 kHz で あり、これは深さ方向スキャン (A-scan) が毎秒 2-10 万回 行われることを意味する。A-scan を水平方向に繰り返す

(B-scan) と 2D 断面像を取得でき、B-scan を奥行方向に 繰り返すと 3D 情報を取得できる。今、掃引周波数 20 kHz の光源からなる SS-OCT で $1 \times 1 \times 1$ mm の空間情報を空間 分解能 5 µm/pixel で取得する場合を考えてみる。本条件に おいて、B-scan を 1 回完了するための A-scan の繰り返し 数は 200 回である。すなわち、100 fps で 2D 像を表示可能 である。さらに、C-scan を 1 回完了して 3 次元情報を取得 するための B-scan の繰り返し数も 200 回であり、計算上 の所要時間は 2 s である。

3. 観察事例

3.1 イチゴ

図 2 は、OCT で観察した冷凍イチゴの断面像である。 OCT のプローブと観察対象の位置関係、ならびに画像間 の対応は図中に黄色のラインで示した。OCT 像において、 コントラストは信号強度の高低と対応する。すなわち、光 学的に不均質な界面が存在すると反射が起こるので、高コ ントラストで表示される。図 2 で見られるように、イチゴ の内部では、大きな楕円体の構造と、これを囲む微細組織 から構成されている様子が観察された。前者は粒状の痩果



図3 食品用のプラスチック容器の壁の断面像

(Achene)で、後者は赤色の花床(Receptacle)である。 さらに花床の内部では、表皮細胞や皮層細胞などで構成さ れる皮層(Cortex)側と、中心近傍の髄(Pith)側とで組 織の形態が異なる様子が明瞭に観察された¹²⁾。また、イチ ゴの痩果は子房壁(Ovary wall)で胚珠(Ovule)を覆った 構造である¹³⁾。図2のいずれにおいても、痩果の内部に外 形に沿った線状信号が観察されたことから、これは子房壁 と胚珠の界面に相当すると考えられる。イチゴに限らず、 植物の大部分を構成する植物細胞は細胞壁や細胞質で構 成される。これらの屈折率は、無機物や人体の皮膚等と比 べると小さく(細胞壁が1.46、細胞質が1.36)、主成分の 水の屈折率(1.33)との差も小さい¹⁴⁾。すなわち、内在す る光学的不均質構造での散乱が小さく、内部構造が鮮明に 観察されたと考えられる。

3.2 食品用のプラスチック容器の壁

図3は、OCT で観察したフルーツの果肉入りゼリーの





図4 保温ボトル表面の(A)表面反射像(B)OCT観察で取得した3次元像(C)塗膜の断面像(D)塗膜の内部構造

プラスチック容器の壁の断面像である。OCT のプローブ と観察対象の位置関係は図中に示した。高強度の平行な線 状信号は、容器の外壁面と空気、内壁面とゼリーの界面で の反射に起因すると考えられる。また、容器の壁の内部に おいて、破線の円で囲った箇所で局所的に強い信号が観察 された。これらは奥行方向(C-scan 方向)に連続している ため、たとえば空気を内包する球状、あるいは面状の欠陥 と樹脂との界面での反射に起因すると考えられる。さらに、 外壁面と内壁面の間のちょうど中心付近に低強度の線状 信号が観察された。これは酸素を遮断するためのガスバリ ア層と考えられ、肉眼ではわからない容器の多層構造が OCT 像では明確に検出できることが分かった。また、ゼ リーの内部においては、様々な大きさの塊状信号が観察さ れた。これは、ゼリーとゼリーに含まれる果肉との界面で の反射に起因すると考えられる。

3.3 保温ボトル表面の塗膜

図4は、保温ボトル表面の(A)表面反射像(B)OCT 観察で取得した3次元像(C)塗膜の断面像(D)塗膜の 内部構造である。まず、図4(A)において、多数のスク ラッチや汚れに加え、塗膜の一部が剥がれ落ちて再付着 (図中、破線の円で囲った領域の周辺)した箇所も確認し た。図4(B)は、図4(A)の黄色の破線で囲った10×10 mmの領域に対して、8.9 µm/pixelの空間分解能でOCT 観 察して取得した3次元像である。所要時間は約11秒だっ た。図4(B)に示したように、肉眼では確認しづらいス クラッチや汚れなども含め、図4(A)の表面反射像とよ く対応していることがわかった。さらに、剥がれ落ちた塗 膜が再付着した領域においては、塗膜に隠れて表面反射像

では認識できなかったスクラッチが明瞭に観察された。こ の結果は、塗膜下の情報を非破壊で取得できていることを 意味する。さらに、水色の破線部における深さ方向の断面 像を図4(C)に示した。ここで、図4(C)は視認性を考 慮し、画像処理で LUT (ルックアップテーブル)を調整 してカラー化した。色は図中のカラーバーの信号強度と対 応する。また、▽マークは図4(B)の3次元像との位置 関係を示す。塗膜下のステンレス鋼部分は近赤外光を吸収 するため構造情報を取得できないが、塗膜内においては光 学的に不均質な構造を有していることがわかった。詳細な 解析のために、塗膜内部の拡大図を図 4(D) に示した。 図 4 (D) において、空気に接している表面側から深さ方 向に向かって紫色、橙色と線状信号の色が変化しているこ とがわかった。紫色の線状信号は空気と塗膜の界面での反 射に起因すると考えられる。一方、さらに高強度の橙色の 線状信号は、より屈折率差が大きい界面の存在を示唆して いる。すなわち、塗膜とステンレス鋼の界面での反射に起 因すると考えられる。また、塗膜中に高強度の点状信号が 観察された。本信号は奥行方向(C-scan 方向)に連続性を 示したことから、塗膜中に内在する欠陥に起因すると考え られる。以上の結果から、OCT 観察は金属を含む製品に 対しても、評価目的によっては素早く、高分解能かつ3次 元で内部構造情報を評価できる有用な手法であることが わかった。

3. 4 医薬品錠剤

錠剤の崩壊性は、狙った場所やタイミングで人体に原薬 を吸収させる第一歩となる重要な特性の一つである。とり わけ、口腔内崩壊錠の普及に伴い、的確な錠剤の定量設計



図5 水中での崩壊に伴う錠剤の内部構造変化のリアルタイム動的2D観察

に基づく品質管理の必要性が高まっている。しかし、錠剤 の崩壊性評価は従来、外観変化による崩壊時間の測定しか 行われておらず、液中で崩壊する現象の実態はブラックボ ックスだった。図5は、市販の医薬品錠剤の水中での崩壊 に伴う内部構造変化過程を動的に観察した結果である。観 察時のフレームレートは 82 fps、面内分解能は 8.9 μm/pixel とした。図5のOCT像の経時変化から、浸水直後の水と 錠剤の界面位置が徐々に上昇したことがわかった。これは 錠剤が吸水し、膨潤しているためである。一方、赤色の破 線で囲った錠剤端部では、より顕著な体積膨張が短時間で 進行する様子が観察された。このような不均質な膨潤は、 吸水経路を決める錠剤の内部構造と密接に関係すると考 えられる。打錠は一軸加圧成形で行うため、加圧方向(図 5の A-scan 方向に相当) に粒子が充填しやすくなる。すな わち、粒子と空気の界面の数が増える。また、異方的な加 圧は粉体層に応力分布をもたらすため、錠剤の表面近傍と 内部とで粗密差を生じさせる。こうした製造工程のプロセ ス因子の影響で生じた構造不均質性は、図5において側面 から膨潤が顕著に進行した結果と相関すると考えられる。

4. まとめと今後の展望

果物、プラスチック容器、塗膜、錠剤と、多様な観察対 象での観察事例の紹介を通して、OCT 観察で得られる構 造情報の「質」は、観察対象に内在する光学的な不均質構 造と密接に関係することがわかった。果物やプラスチック 容器は内包する光学的に不均質な界面での屈折率差が小 さいため、深さ方向への信号強度の低下(減衰)は小さく、 内部構造を鮮明に観察することができた。塗膜は、果物や プラスチック容器と比べて深さ方向の距離が圧倒的に短 いものの、内在する光学的な不均質構造を明確に検出する ことができた。本結果は、類似した材料構成であるインフ ラ構造物の塗膜の非破壊検査などに対しても同様に有効 性を示すことが期待され、OCT 観察の新たな応用の可能 性を示唆している。錠剤は圧粉体であるため、粒子同士の 界面や顆粒間の空隙など、多数の光学的に不均質な界面を 内包する。したがって、内部散乱が大きくなり、OCT 像 は不鮮明化する。このような散乱体の内部構造を鮮明にす るためには、X線CTのように既に確立した手法での並行 評価に基づく的確な画像処理プロセスを確立する必要が ある。筆者らは、機械学習による画像処理プロセスの最適 化も検討を進めている。一方で、構造の可視化ではなく、 構造変化の定量的な理解であれば、スペックルパターンの 変位量の解析でも可能である。スペックルパターンは、反 射光同士の干渉で OCT 像に一様に生じる粒状のランダム パターン(ノイズ)である。その反面、光を散乱させる要 因を全て同一としなければ同じパターンが得られない構 造敏感な性質をもち、「光の指紋」としてセキュリティキ ーにも利用されている。筆者らは、SS-OCT による動的 2D 観察と重量変化の同時測定を両立する評価システムを構 築し、さらにスペックルパターンの変位量をデジタル画像 相関(DIC)法で解析することで、吸水を起点とした錠剤 の崩壊に伴う内部構造変化過程の定量的な可視化にも成 功した。本成果については、今後、別紙で報告する。また、 散乱体の内部構造を OCT 観察すると、信号強度は表面で の反射が最も高く、深さ方向に減衰する。減衰の大きさ(減 衰率)は、内在する光学的な不均質構造の存在形態によっ て決まる。そのため、減衰率の分布を3次元的にマッピン グすれば、光学的な構造不均質性をミリ範囲で定量評価す ることもできる。筆者らは、異なる内部構造をもつ Al2O3 成形体や焼結体に対して上述した評価を行うことにより、 原料粉体を構成する粒子の形態や成形方法などで導入さ れた構造不均質が、最終製品である焼結体中の不均質構造 の存在形態とよく相関することを定量的に示すことにも 成功した。今後はさらに検討を進め、従来の密度や微構造 評価だけでは理解しきれなかった材料中の構造不均質性 とプロセス因子との相関関係の解明に尽力していく。

【参考文献】

 D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Chang, M.R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C.A. Puliafito, J.G. Fujimoto: Science, 254, 1178-1181 (1991).

- M. Haruna, M. Ohmi, J. Soc. Insturum. Control Engnr., 45, 915-921 (2006).
- 3. M. Haruna, Medical Photonics, 1, 1-5 (2010).
- 高橋拓実,多々見純一,波長掃引型光コヒーレンス トモグラフィーによるセラミックス内部構造の非破 壊評価技術, CERAMICS JAPAN, 56 (1), 7-10 (2021)
- 5. 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 Al₂O₃ 顆粒の一軸加圧下における粉体層 中の空隙の形態変化過程のその場観察, 粉体および 粉末冶金, 67 (11), 615-620 (2020)
- T. Takahashi, Control of the Particle-Assembled Structure and a Novel Evaluation Technique for High-Performance Ceramics, Journal of the Ceramic Society of Japan, 128 (10), 738-746 (2020)
- 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 Al₂O₃焼結体の内部構造観察, CERAMICS JAPAN, 55 (2), 103-107 (2020)
- F. Sakamoto, T. Takahashi, J. Tatami, M. Iijima, Prediction of strength based on defect analysis in Al₂O₃ ceramics via non-destructive and three-dimensional observation using optical coherence tomography, Journal of the Ceramic Society of Japan, 127 (7), 462-468 (2019)

- 高橋拓実、多々見純一、坂本文香、伊東秀高、飯島志 行、光コヒーレンストモグラフィーによるセラミッ クス焼結体とスラリーの内部構造観察、粉体および 粉末冶金、65, 10, 659-663 (2018)
- 高橋拓実,多々見純一,飯島志行,伊東秀高,田口勇, セラミックスプロセスチェーンの最適化のための光 コヒーレンストモグラフィー観察,FC Report 春号, 36 (2), 62-67 (2018)
- 山成正宏, OCT 技術の基本を紐解こう, 視覚の化学, 39 (3), 37-44 (2018)
- J. Suutarinen, K. Heiska, P. Moss, K. Autio, The effect of calcium chloride and sucrose prefreezing treatment on the structure of strawberry tissues, LWT - Food Science and Technology, 33 (2), 89-102 (2000)
- C. Kang, O. Darwish, A. Geretz, R. Shahan, N. Alkharouf, Z. Liu, Genome-Scale Transcriptomic Insights into Early-Stage Fruit Development in Woodland Strawberry Fragaria vesca, The Plant Cell, 25 (6), 1960-1978 (2013)
- 平原大輔,水多陽子,透明化技術を用いた植物組織 傾向観察のすすめ, Plant Morphology, 29, 8-86 (2017)

【外部発表】口頭発表 3件, 論文等発表 4件

高い近赤外遮蔽特性を有する化粧品用酸化亜鉛顔料の開発

1. はじめに

太陽光に含まれる紫外線が肌の炎症や黒化をもたらす ことは一般によく知られている。また紫外線を繰り返し浴 びることにより、シワやシミといった肌の光老化が生じた り、将来的に皮膚がんにつながることもある。このような 作用を持つ紫外線から肌を守るため、紫外線を遮蔽する機 能を持つ紫外線防止化粧品が販売されている。さらに近年 は紫外線だけでなく、肌のより深層まで到達する近赤外線 も光老化の原因となることが指摘されるようになり、近赤 外線遮蔽性を付与した紫外線防止化粧品も見られるよう になってきた¹⁾。

そこで本研究では、化粧品への適用が可能で市販品より も高い近赤外遮蔽性を示す酸化亜鉛顔料の開発を目指し た。液相合成法により酸化亜鉛粒子を作製し、作製条件が 粒子の形状・粒径に与える影響を評価した。

2. 実験方法

2.1 酸化亜鉛粒子形状の pH 依存性

酸化亜鉛粒子の形状に与える pH の影響について調べた。 硝酸亜鉛六水和物水溶液(50 ml、 0.1 M)と水酸化ナト リウム水溶液(45 ml、 0.2 M)の混合液に、さらに水酸 化ナトリウム水溶液(1.5 M)を加え、pH が 10、 11、 12 となるように調整した²⁻⁵⁾。室温で 6 時間静置した後、沈 殿物を乾燥させて酸化亜鉛粒子を得た。

2.2 酸化亜鉛粒子径の反応時間依存性

酸化亜鉛粒子の大きさに与える反応時間の影響につい て調べた。前節と同様の条件でpH12に調整し、反応時間



2.3 酸化亜鉛粒子形状の作製原料依存性

サブミクロン径の酸化亜鉛粒子を作製する目的で水溶 液濃度を低下させるとともに、作製原料を変化させること による粒子形状への影響について調べた。強酸の硝酸亜鉛 六水和物もしくは弱酸の酢酸亜鉛二水和物水溶液に、強塩 基の水酸化ナトリウムもしくは弱塩基のヘキサメチレン テトラミン水溶液を加えた。各水溶液はすべて 50 ml 0.01M とし、80-90℃で4 時間反応させた後、沈殿物を乾 燥させて酸化亜鉛粒子を得た。

結果及び考察

pH10-12における酸化亜鉛粒子のSEM像を図1に示す。 pH10、11では突起の大きい形状をしているが、pH12では 球状に近い形をしていることがわかる。そのため、形状か らはpH12で得られた粒子が肌への刺激が比較的小さいと 期待される。また、粒子による光の遮蔽メカニズムには吸 収と散乱が考えられるが、近赤外領域ではそのうち散乱が 支配的となる。Mie 散乱の理論から、球状粒子による光の 散乱効率因子 K(p)は近似的に次のように表される⁶。

$$K(\rho) = 2 - \frac{4}{\rho} \sin \rho + \frac{4}{\rho^2} (1 - \cos \rho)$$

ここで ρ =4 π a(n-1) λ であり、aは球状粒子の半径、nは粒子の内外での屈折率比、 λ は光の波長である。この式から、近赤外線(900-1800 nm)の散乱効率が高くなる理想的な



図1pHの異なる水溶液中で合成した酸化亜鉛粒子のSEM像



図2 異なる反応時間で作製した酸化亜鉛粒子の SEM 像



図3反応時間3 min、 240 min 試料のX線回析パターン

粒径は 100 - 300 nm であるⁿ。これに対し、得られた粒子 の粒径はいずれも数 μm であり、最も粒径が小さい pH12 でも 1.5 μm 程度であった。そこで次に反応時間を短くす ることにより、サブミクロン径の酸化亜鉛粒子の作製を試 みた。

pH12の条件下で反応時間を3、60、120、240 min と 変化させて得られた粒子の SEM 像を図 2 に示す。いずれ の反応時間でも針状の酸化亜鉛種結晶が絡み合った綿あ め状の粒子と酸化亜鉛が凝集した粒径数 µm のマイクロ粒 子が見られる。反応時間3minでは綿あめ状粒子が多くみ られるが、反応時間とともに徐々にマイクロ粒子の割合が 増加し、240minではマイクロ粒子が支配的になる。綿あ め状粒子とマイクロ粒子の結晶相について確認するため、 これらの試料のX線回折パターンを測定した(図3)。3min では炭酸水酸化亜鉛と酸化亜鉛の結晶相が見られるのに 対し、240 min ではほぼ酸化亜鉛の結晶相であった。した がって綿あめ状粒子が炭酸水酸化亜鉛、マイクロ粒子が酸 化亜鉛と推察される。また、以上から単に反応時間を短く しただけではサブミクロンの酸化亜鉛粒子を得ることは 困難であることがわかる。そこで、今度は原料濃度を低く するとともに、原料の種類およびその組み合わせを変える ことで、粒径の小さな酸化亜鉛粒子を得ることを試みた。

異なる原料から作製した酸化亜鉛粒子の SEM 像を図 4 に示す。これまでと同じ硝酸亜鉛と水酸化ナトリウムの組 み合わせでは、粒径約 300 nm の球状粒子が得られた (a)。 酢酸亜鉛に水酸化ナトリウムを加えた場合も球状に近い 粒子であり、粒径は約 800 nm であった (b)。これらに対 し、硝酸亜鉛とヘキサメチレンテトラミンでは針状の粒子 (c)、酢酸亜鉛とヘキサメチレンテトラミンでは六角柱状



図 4 異なる原料から作製した酸化亜鉛粒子の SEM 像 ((a)硝酸亜鉛+水酸化ナトリウム、(b)酢酸亜鉛+水酸 化ナトリウム、(c)硝酸亜鉛+ヘキサメチレンテトラミン、 (d)酢酸亜鉛+ヘキサメチレンテトラミン)

の粒子(d)が得られた。そのため、今回作製した粒子で は形状および粒径から(a)、(b)が高い近赤外遮蔽性特性 を示す化粧品用顔料として期待される。今後はこれらの粒 子について近赤外遮蔽特性を評価するとともに、粒子コー ティングによる生体適合性の付与についても検討する。

4. まとめ

市販品よりも高い近赤外遮蔽性を示す酸化亜鉛顔料の 開発を目指し、液相合成法により酸化亜鉛粒子を作製した。 pHや反応時間、作製原料が粒子の形状および粒径へ与え る影響を評価し、それらを制御することでサブミクロン径 の球状粒子を得た。今後は近赤外遮蔽特性の評価を行うと ともに、粒子コーティングによる生体適合性の付与につい ても検討する。

【参考文献】

- 1. https://www.sunstar.com/wp-content/uploads/2018/02/
- 180214_2.pdf, サンスター株式会社他 (2018).
- 2. N. Uekawa et al., Phys. Chem Chem. Phys., 6, 442 (2004).
- 3. N. Uekawa et al., Matter. Lett., 64, 1729 (2007).
- 4. H Quang et al., J, Phys. D: Appl. Phys., 44, 125104 (2011).
- 5. J. Zhang et al., Chem. Master., 14, 4172 (2002).

6. H. C. van de Hulst, Light scattering by small particles, John Wiley & Sons, Inc. (1957).

7. Y. Tabata et al., Trans. Mat. Res. Soc. Japan, 39, 313 (2014).

生体応用を目指したチタン基板上への ダイヤモンドライクカーボンのコーティング ~テトラメチルシラン(TMS)の効果~

金子 智、黒内 正仁、安井 学(電子技術部 電子材料グループ)

1. はじめに

多くの金属は汗や体液などでイオン化して溶け出して しまうため、人工関節や埋め込み型の心臓ペースメーカ ーの材料としては不向きである。しかし、チタンは酸化 しやすく表面に不動態皮膜という酸化膜を瞬時に形成す る。なんらかの理由で酸化膜コーティングが剥がれて も、直ぐに酸化膜で覆わられて人体への悪い影響はな い。また、ダイヤモンド・ライク・カーボン(DLC)は炭素 から成るダイヤモンド・ライク・カーボン(DLC)は炭素 から成るダイヤモンドと黒煙の中間のアモルファス(非晶 質)の材料である。ドリルなどの工具やペットボトルのコ ーティングにも利用されている。人体埋込みには非金属 が使われることが多いが耐久性が問題である。本研究で は、人体に優しいチタン基板に DLC コーティング¹を施 し、その密着性や結晶性を評価したので報告する。

2. 実験

チタン膜は物理気相法(PVD)であるホローカソード PVD によりシリコン(001)基板上に成膜した。成膜時間は最大 30 分とし、成膜後には原子間力顕微鏡(AFM)と X 線反射 率測定(XRR)により膜粗さと膜厚および堆積速度を評価 した。さらに X 線回折(XRD)により結晶性も評価してい る。DLC 成膜はチタン膜上に行ったが、緩衝膜としてテ トラメチルシラン(TMS)を用いている。

TMS 緩衝膜は化学的気相法であるプラズマ CVD で成膜 され、その膜厚は 0~0.5µm であった。成膜時のガス雰囲 気はアルゴン:水素で 1:10 であり、その流量はそれぞ れ、10 と 100scem であり、全圧は 0.0016Pa であった。 DLC もプラズマ CVD で TMS 緩衝膜上に積層され、成膜後 には AFM で表面観察とスクラッチ試験法による密着性の 評価を行った。AFM 像からは ImageJ を用いた粒子サイズ の評価を行った。ImageJ はアメリカ国立衛生研究所(NIH)



図1:シリコン基板上のチタン緩衝膜のX線回折結 果。基板であるシリコンのピークとチタンからは 様々なピークが観察され多結晶成長している。



図2:チタン膜のX線反射率測定。X線を底角入射する ことで、膜の密度、膜厚や表面粗さが評価できる。

テーブル1:シリコン基板上にチタン緩衝膜を用いて作成した DLC コーティングの成膜条件。

膜種	膜厚 (μm)	表面粗さ(nm)	粒径 (nm)
チタン膜	0 - 1.5	0.5 - 15	11 (膜厚 0.6µm)
TMS	0 - 0.5	5 - 6	110 (膜厚 0.5μm)
DLC	1	3 - 4	200





図3: DLC 表面の AFM 像。Ra で 4nm 程度の平坦な膜が形成 されている。

図4:スクラッチ試験による密着度評価。TMS 緩衝膜を 50nm 以上積層することで密着が飛躍的に向上している。

膜種	膜厚 (μm)	手法	温度
チタン膜	0.6	カソード PVD	350°C
TMS	0 - 0.5	プラズマ CVD	室温
DLC	1	プラズマ CVD	170°C 以下

テーブル2: DLC 積層膜の各層表面粗さと粒径。

が無償で配布する解析アプリケーションソフトであり、 (https://imagej.nih.gov/ij/index.html)である。テーブル1に 実験条件をまとめた。

3. 結果

シリコン(001) 基板上にカソード PVD で成膜したチタン 膜の θ -2 θ の XRD 結果を図1示す。成膜時間は30分で基 板温度は350°C であった。X線回折結果からチタン膜は 多結晶であることが分かった。また、AFM像の観察からチ タン膜の表面粗さはRa^{~0.5nm}と見積もられた。更に、X 線反射率測定によりチタン膜を評価し、膜厚が18.5nmで 表面粗さを1nm程度と見積もった(図2)。1nm程度という 評価はAFMの評価とほぼ近いものとなっていた。

チタン膜上へは TMS を緩衝膜として積層し、その表面 を AFM で評価した。図3には TMS 緩衝膜 0.5μm の上に積 層した DLC 膜の AFM 像を示している。Ra で 4nm 程度の平 坦な膜成長していることが分かる。次に TMS の膜厚を変 化させて密着性との相関を調べた。TMSを積層しないでチ タン上に直接 DLC を成長させた場合は DLC の密着性が非 常に低く簡単に剥がれてしまった。TMS 緩衝膜の膜厚が 10nm でも密着性は悪かった。図4に TMS 緩衝膜と DLC 積 層膜との密着性をまとめた図を示す。これから TMS 緩衝 膜の膜厚が 50nm 以上で DLC 密着性が急激に向上すること が分かった²。

DLC 膜の密着性の増加に TMS の膜厚が影響することか ら、TMS 緩衝膜の初期成長での表面形態を AFM で観察しし たところ、TMS 緩衝膜 5nm の初期成長の表面粗さはかなり 大きいことが分かった。この膜厚では TMS がチタン層全 体をカバーし切れていないことが予想され、このことが 積層膜の剥離の原因と考えられる。テーブル2には ImageJを用いた粒径サイズの評価を示している。チタン の細かい粒子から TMS、DLC と積層すると粒子サイズが大 きくなっていることが分かる。

4. まとめ

生体適合性の高い DLC とチタンを積層したコーティン グをシリコン基板上で行った。ホローカソード PVD によ りシリコン基板(001)上には多結晶チタン膜が成長した。 更に TMS 緩衝膜と DLC 膜を積層したコーティング膜の密 着性をスクラッチ試験で評価したところ、TMS を 0.5μm 積層することで表面粗さが向上し、その上に積層される DLC 膜の密着性が向上することが分かった。

謝辞

本研究においてチタンと DLC の成膜で協力いただいた 日本電子工業の池永氏と不二 WPC の熊谷博士に感謝しま す。

【参考文献】

1. 中谷達行、表面技術、67、279 (2016).

2. S. Kaneko, T. Horiuchi, T. Ito, S. Takagi, M. Yasui, M. Saitoh, T. Matsunaga, K. Ikenaga, S. Yasuhara, K. Mihirogi, Jpn J. Appl. Phys., 52, 11NA02 (2013).

フォトリソグラフィによる微細加工における

ハイブリッドレーザー顕微鏡の計測事例

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

レーザー顕微鏡はコンフォーカル光学系を利用して高 精細な光学顕微鏡像を取得できる光学顕微鏡であり,電子 部品をはじめとした微小な構造をもつ試料の表面の三次 元形状を非接触で測定することが可能である。こうした特 徴から材料や加工品のミクロンレベルでの幅や高さ,3D 表面粗さなどの計測に利用されている。非接触測定が可能 な特徴から,触針式の表面形状測定機では扱いづらい樹脂 などの柔らかい試料の表面和さ計測や表面形状測定に用 いられている。また,カラーの顕微鏡像を観察しながらそ の場で3次元形状測定が行えるので,変色箇所の異物の調 査に有用である。微細加工分野においては MEMS (Micro Electro Mechanical Systems)素子やセンサー類など半導体 微細加工技術を使用した微細加工品の形状評価や試作品 のプロセス評価にレーザー顕微鏡が使われている。

本研究所では図1 に示すレーザーテック社製のハイブ リッドレーザー顕微鏡が 2018 年に導入され,幅や高さの 正確さや測定速度において高水準の測定が可能である。そ こで本報告では、レーザー顕微鏡の計測事例として、フォ トリソグラフィに関連する微細加工品の計測事例を紹介 する。

2. 実験

フォトリソグラフィに関連する試料作製および計測を 行った。電子線描画装置で作製したフォトマスクの線幅評 価と、フォトリソグラフィで作製した Al の細線パターン の線幅評価を行う。





図 1. ハイブリッドレーザー顕微鏡の装置外観

線描画装置(エリオニクス社製, ELS-S50)を用いて作製した。マスクブランクスに電子線レジスト(日本ゼオン社製, ZEP-520A)を塗布して,加速電圧 50kV の描画条件を用いて電子線レジストのパターニングを行った。描画パターンは線幅 0.7µm 以上のラインアンドスペースパターンであ



図 2. 電子線描画で作製した解像度評価用フォトマスクの白 色コンフォーカル像



図 3. 作製したフォトマスクの (a) 線幅の設計値と幅の測定との関係と (b) 設計値との設計値との差の関係



(a) 線幅 0.75µm



(b) 線幅 1µm



(c) 線幅 2µm 図 4. 走査型電子顕微鏡で観察したフォトレジスト細線パタ ーンの断面

り、ドーズ量は160μC/cm²であった。描画後は現像液(日本ゼオン社製,ZED-N50)を用いて現像を行い、電子線レジストパターンを形成した。その後、マスクブランクス上の不要なCr層をウェットエッチングで除去した。最後に、電子線レジストパターンは剥離液(日本ゼオン社製,ZDMAC)を用いて除去した。ここで、出来上がりのフォトマスクの線幅は電子線描画の近接効果の影響やウェットエッチングのサイドエッチの影響を受けるため、電子線描画パターンのサイズ補正を行った。予備実験のSi基板上のパターン形成の結果では0.4μm以上の線幅のパターンでは近接効果の影響は幅40nm程度であった。ウェットエッチングのサイドエッチの影響は40nm程度受けると想定して、サイズ補正の幅は80nmを選択した。作製したフォトマスクはハイブリッドレーザー顕微鏡を用いて白色コンフォーカル像を取得して、寸法計測を行った。

解像度評価用マスクを用いて Si 基板上にフォトレジス トパターンを形成して、パターン形成を確認した。Si 基板 上に膜厚 1µm のポジ型フォトレジスト(東京応化製, OFPR-800LB)を塗布して、マスクアライナー(ズースマイ クロテック製, MA6 BSA)を用いて露光を行った。その後 現像液(東京応化製, NMD-W)に浸して、レジストパター ン形成を行った。作製した試料はへき開処理をして断面を 形成して、走査型電子顕微鏡(SEM: Scanning Electron Microscope)を用いて観察をした。また、作製した試料をハ イブリッドレーザー顕微鏡で白色コンフォーカル像を取 得して、観察した。

次に,フォトリソグラフィによって Al の細線パターン 形成を行った。真空蒸着により Si 基板上に Al 薄膜を蒸着



図 5. フォトリソグラフィで作製したフォトレジストの細線 パターンの白色コンフォーカル像

した試料にポジ型フォトレジストを塗布した後, ラインア ンドスペースパターンのフォトマスクを使用して, マスク アライナーを用いて露光を行った。現像を行ってレジスト パターンを形成後, ウェットエッチングによって不要な AI 膜を除去した。最後にレジストパターンをアセトンで 除去した。作製した AI 細線パターンはハイブリッドレー ザー顕微鏡を用いて白色コンフォーカル像を取得して, 寸 法計測を行った。また, 得られた表面形状から断面プロフ ァイルを作製して, AI 膜の膜厚を計測した。得られた膜 厚は信頼性の高い触針式段差計の結果と比較した。

3. 結果

電子線描画で作製した解像度評価用フォトマスクの白 色コンフォーカル像を図2に示す。作製した 0.7μm までの 線幅のパターンは明瞭に解像できていることが確認でき る。レーザー顕微鏡の2次元的な解像力は約150nm(波長 405nm のレーザーを用いたラインアンドスペース観察時) であることを考慮すると¹⁾, 0.7µm 以上の線幅のパターン の観察は十分に行えると考えられる。図3(a)は設計値と測 定した線幅の関係であり、1対1対応を示す点線に近い線 幅が得られた。図3(b)に示す設計値との差はいずれの線幅 においても 5%以内であり、作製したパターン幅が精度よ く形成されていることが確認されたことで、今回適用した 80nm のサイズ補正は妥当な値であったことが分かった。 フォトマスクは主にガラスから構成され、一般的な SEM ではチャージアップ用のコートを必要とするが,そうした 前処理なしに光学的に高精細な観察が行え,線幅の測定が できるレーザー顕微鏡は強力な評価手段である。

解像度評価用マスクを用いて作製したレジストパター ンの断面 SEM 像を図 4 に示す。作製したレジストパター ンは線幅 0.75μm 以上のパターンでパターン倒れやレジス



図 6. AI 細線ハターンの(a) 日色コンフォーカル像およひ(d, 断面プロファイル

ト残渣の発生がなく良好な状態で形成されていることが 分かった。密着露光の限界は2~3µm程度²⁾といわれていた ことを考えると、今回の試料は密着露光によるパターン形 成としては高精細なパターン形成が行えていることが確 認できた。

フォトレジストの細線パターンの白色コンフォーカル 像を図5に示す。フォトレジストの細線は1.5µm以上の線 幅では明瞭に見えているが、1µm以下の線幅ではコントラ ストが低下して細線が見えづらくなっている様子が見ら れる。これはフォトマスクでは0.7µm以上の線幅で明瞭に 細線が解像していることを考えると、レジスト線パターン は膜厚1µmの透明膜であることの影響を受けて線幅1µm 以下の細線のコントラストが低下したと考えられる。

フォトリソグラフィで作製した Al の細線パターンの白 色コンフォーカル像を図 6(a)に示す。設計値が 10µm の Al 細線パターンの線幅は 10.25µm であり,設計値との差が 3%以内でパターン形成できていることが確認できる。同 時に取得した表面形状の断面プロファイルを図 6(b)に示 す。幅が 10µm と狭く,触針式膜厚計(標準プローブ先端半 径 R=2µm)では測るには難しい段差が計測できていて,膜 厚は 0.16µm であることが確認できる。触針式段差計で測 定した膜厚は 0.15µm であり,レーザー顕微鏡で得られた 膜厚は信頼性が高い触針式段差計で得られた膜厚とほぼ 一致する結果が得られた。

4. まとめ

ハイブリッドレーザー顕微鏡を用いた微細加工品の評 価事例として、フォトマスクの線幅評価やフォトレジスト の観察、フォトリソグラフィで作製した A1 細線パターンの線幅評価や膜厚測定を紹介した。

【参考文献】

Vバンド(60GHz帯)における材料定数測定に関する

基礎的な検討結果について

鶴田 誠(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、ミリ波利用の拡大に伴い、車載レーダーの樹 脂カバー(レドーム)や自動車用ガラスなど各種素材のミ リ波帯における電波透過特性や材料定数(誘電率、誘電正 接など)測定の必要性が高まっているが、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(Vバンド;60GHz帯) の電波透過測定システムを構築することで、材料定数の算 出に必要な高精度な位相測定ついて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。

- 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 ディ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、ディジタル信号処理を適用 することにより、ミリ波部品の 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、ディジタル通 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. 測定系の構成

本報告で検討した材料定数測定のための電波透過測定 系の概要を図1に示す。評価する試料に 60GHz 帯のミリ 波を照射して透過したミリ波を受信して、振幅と位相の周 波数特性を測定する。



2.2. 測定系の課題

ミリ波帯の評価では極めて廉価な COTS 製品を活用し た実験系を構築している。この主たる目的は、ミリ波帯の コスト面の参入障壁の解消が必要と考える。

一般的なミリ波帯における送受信アンテナを1本で構成する SISO(single-input single-output)を考える。この場合は、高周波領域の位相が定まらない課題が内在する。このために、振幅・位相の測定を実現することが SISO 構成では、原理的に不可能であることが、昨年までの検討で明らかになっていた(COTS 製品固有の特性であり、位相制御が不可能である)。昨年度までの検討では、振幅の測定の技術的な見込みまでは得られていた。

この課題を解決すために、図 2のミリ波帯の SIMO(Single-input and multiple-output)構成を導入する。こ のSIMO構成であるならば、前述の位相の曖昧性を解消す ることが可能となると考えられる。



図 2 ミリ波帯の SIMO 構成

なぜならば、経路における未確定の位相情報を SIMO 構成とすることにより、相対的な位相情報として取り扱うことが可能になるからである。

3. 実験結果

測定周波数は、61.02[GHz]である。本検討では、SIMO 構成及び SIMO 構成による位相特性を実測した結果を図 3に示す。従来方式の1と2(SIMO 構成)は、青色と赤色の 点で示している。他方、提案方式(SIMO 構成)は黄色い実 線で示している。この両者を比較すれば、SIMO 構成の提 案方式の位相安定度は、100 回の試行で明らかに改善して いることが確認できる。



図3 SIMO構成による位相の実測結果



図 4 位相測定結果(CDF)

図 3の位相測定結果を整理して、CDF(cumulative distribution function)を図 4に示す。従来方式は、両結果ともに広く位相が分布している。他方、提案方式は、位相分布が局所的であり、ほとんど垂直にグラフが立上っている。この CDF から SIMO 構成により、位相の曖昧性を解消で

きることが確認できた。

つまり、SIMO 構成とすることで、位相分布は、3 度未 満を達成可能であることが確認された。この3 度未満は、 測定誤差ではなくて測定時の位相分布である。つまり、推 定位相に対する位相誤差は、一般に、3 度よりも遥かに小 さな値となる。従って、SIMO 構成による位相測定は、廉 価なミリ帯の COTS 製品を活用した場合においても技術 的に可能となったと考えられる。

4. 材料定数の測定の基礎検討

4.1. 測定対象の材料の設定

SIMO構成による材料定数の測定方法の基礎検討につい て説明する。基本的には、測定対象の材料を図 5の緑色の 四角の領域に設置する。2本の受信アンテナの受信された IQ(In-Phase/Quadrature-Phase)信号を解析することで、材料 定数を推定することが可能となる。



図 5 材料定数の測定の概念図

4.2. 外部環境要因

ミリ波の領域では波長が短くなるために、波長が長い領 域に比較して外部環境要因に関する広い検討が必要にな る。

代表的な外部環境要因に関して触れる。ドップラ周波数 は波長が短いために、大きなドップラ周波数が発生する。 このドップラ周波数に関しては、実験系の局所的なエリア を想定した場合には、SIMO構成とすれば解消することが できる。この結果として、実験系における室内の風の流れ を大きな誤差要因として排除することが可能となる。

次に、材料測定における測定する材料の設置に関しては、 電磁波の入射角と密接に関係している。そのために、設置 及び設置後の重力等の外部環境の影響を考慮した再現性 のよい環境が必要になる。この外部環境要因は、再現性を 補償する上で極めて大切なポイントとなる。

このように外部環境要因を2種類上げるだけでも、影響 の有無が異なることが理解できる。

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結果から、材料定数測定における位相測定においては、SISO構成でなく SIMO構成による測定が必要であることが明らかになった。これにより、振幅と位相を用いて材料定数(誘電率及び誘電正接)の算出が可能となる。

今後は、位相誤差の更なる改善方法の検討・重力・大気 等の外部環境要因の影響などを含めて測定方法等の検討 を含めて前進させていきたい。 ミリ波帯の応用は、レーダー・通信が応用として、一般 に想像されるが、これ以外の応用も多く考えることができ る。このように新領域の電磁波の応用を活発に議論・検討 することにより、ミリ波の応用がより広がりを見せるもの と期待される。

なお、本技術は、ソフトウェア無線技術等のソフトウェ アベースの装置であり、広い業種業態・幅広い職種におい て導入障壁(参入障壁)が小さい技術である。

ECR プラズマを用いたドライエッチングについて

~ECR 発散磁場型プラズマ流ドライエッチング~

三橋 雅彦 (電子技術部)

1 はじめに

マイクロ・ナノオーダーでの微細加工技術は半導体デバ イスや各種センサー作製、あるいは MEMS (Micro Electro Mechanical Systems)を支える重要なプロセスで、大きく分 けると金属や絶縁物などの薄膜材料を作製する成膜技術、 ナノレベルの形状を作製するパターニング、このパターン に従い薄膜や基材などを加工・除去するエッチング(蝕刻) 技術を組み合わせての工程となる。エッチングには薬液の 化学反応を用いたウェットエッチングと導入ガスのプラ ズマ分解種との反応を用いたドライエッチングに分けら れる。当部ではどちらのエッチングにも対応可能ではある が、ここでは主に高密度プラズマである ECR プラズマ流方 式を用いたドライエッチングについて紹介する。

2 ECR プラズマエッチング装置

当所のドライエッチング装置としては、現在、バレル型 プラズマエッチング装置、平行平板型プラズマエッチング 装置、ECR プラズマエッチング装置の3方式がある。

バレル型プラズマエッチング装置の動作圧力は 10~10³ Pa 程度であり、ラジカル反応が主となり**等方的なエッチ** ングとなる。主には加工精度を要しないプラズマ処理、レ ジスト・アッシング(除去)などが主な用途である。

平行平板型プラズマエッチング装置は容量結合型プラ ズマ:CCP(Capacitively Coupled Plasma)を活用、具体 的には対向した平行平板の電極に RF電力を印加すること によりプラズマを発生させ、本格的なパターン加工などに も広く用いられていた一般的なエッチング装置である。動 作圧力は数 Pa~数 10 Pa 程度で用いられることが多い。 プラズマ密度は 10¹⁰ cm⁻³台程度である。

ECR プラズマエッチング装置では動作圧力は 10⁻²~1 Pa 前後と低圧であり、プラズマ密度は 10¹¹ cm⁻³ 以上の高密度 プラズマとなる。更にプラズマ励起条件とは独立にイオン エネルギーが制御可能などの要素も加わり、CCP プラズマ と比較しても平均自由工程が長く、イオンの直進性が高ま ることにより、より**異方性のエッチング**が可能となるなど、 微細加工に適したポテンシャルがある。ECR (Electron Cyclotron Resonance) は電子サイクロトロン共鳴を意味 する。図1には ECR エッチング装置の基本的な構造と 2 つ の方式を示した¹⁾。ECR プラズマは 2.45GHz のマイクロ波 を、石英ガラス・ウィンドウを通してプラズマ室に導入す る。プラズマ室は電磁コイルに囲まれており、プラズマ室 内の電子はマイクロ波の電界とそれに垂直方向の磁界に



よりサイクロトロン運動を行う。2.45GHz のマイクロ波の 場合、磁東密度 875G で電子サイクロトロン共鳴が起こり、 衝突確立が増加し低圧力下でも高密度なプラズマが維持 できる。左図はリアクティブイオンビームエッチング (RIBE) 方式である。プラズマ室出口の引出し電極により反 応性イオンのみを積極的に引出すが、200V 以上の高電圧 印加でないと実用的なイオン電流が得られないことや高 電圧によるデバイスダメージなどの点から、あまり使われ ていない。一方、右図は ECR プラズマ流 (イオンシャワー) 方式である。イオン引出し電極は用いずにマグネットコイ ルの発散磁場 (磁場勾配) による電界を用いている。この 場合はイオンだけでなく、電子やラジカルなどと共に流れ 出てくる。この時のイオンエネルギーはおよそ 30eV 程度 である。



図2 実際の ECR エッチング装置とプラズマ流の写真

当部の装置ではどちらの方式も対応可能ですが、基本的 には発散磁場型プラズマ流方式を活用している。図2に装 置写真とプラズマ流の写真を示す。装置写真での円柱形状 がプラズマ室を囲む電磁コイルであり、その横の直方体の チャンバーがエッチング室である。この様に実際にはプラ ズマ室やプラズマ流は水平に出てくる構造であり、基板ホ ルダーは垂直な状況での設置となる。この基板ホルダーには 16.56MHz の RF 電力を印加することが可能であり、これによりエッチング速度は確実に向上する。

3 実験及び結果

本装置のエッチング中の基板温度を調べた結果を示す。 本装置はロードロック方式での基板ホルダーをセットし、 通常ではエッチング室を大気に開放しない機構となって いる。その事もあり、基板ホルダーはほとんど冷却機能が 働いていない状況である。エッチング時の基板温度の上昇 を以下の条件で確認した。

ガス種:Ar、ガス流量:10SCCM、

プラズマ励起マイクロ波電力:300W

基板バイアス(13.56MHz)RF 電力:25W

エッチング室圧力:1.33×10⁻¹Pa



エッチング開始時から、5分間隔で基板温度をモニター した結果を図3に示す。エッチングはシャッターの開閉を

5分間隔で行った。グラフの横軸では冷却時間は含まずに、 プラズマ流を照射した累積時間で示した。基板温度は 50 ~120℃、10℃間隔の温度表示素子(サーモラベル)をホ ルダー表面にとして、目視による指標の変化を観察し、読 み取った。これから20分ほどで100℃以上になっている ことが分かる。

次に実際のエッチング事例を示す。シリコン単結晶、石 英ガラス、サファイア、セラミックス(Al₂0₃系、AlN系)、 ポリイミドを各ガス種でのエッチングを行った。主なエッ チング条件は以下のとおりである。

ガス種:Ar、CF₄、SF₆、 0_2 、ガス流量:10SCCM、

プラズマ励起マイクロ波電力:700W

基板バイアス(13.56MHz)RF 電力:80W

エッチング室圧力:1.33×10⁻¹Pa、時間:30分

試料である板材にシリコンウェハーの小片にてマスク固 定し、エッチング後の複数個所の段差を触診式段差計 Sloan 社、Dektak3030ST にて測定し、エッチング速度の平 均値としてまとめたものを表1に示す。ポリイミドとのエ ッチング速度の比較データから、レジストをマスクとして 用いた場合の対マスク選択比(被エッチ膜 E とマスク Er のエッチング速度比: E/Er)を検討する上での参考データ となる。

表1 各ガス種によりエッチング結果

試料	エッチング速度 (nm/min)			
ガス種	Ar	CF_4	SF_6	O_2
シリコン	77.7	86.7	276.7	6.5
石英ガラス	77.7	137.7	222.7	12.6
サファイア	13.2	54.3	19.3	6.7
Al ₂ O ₃ 系セラ	6.5	56.0	20.6	6.3
AlN 系セラ	7.4	30.0	19.7	8.6
ポリイミド	90.0	216.7	316.7	656.7

更には Pt 薄膜、圧電材料である PZT (Pb(Zr, Ti) 0_3) 薄膜を 被エッチング材として、混合ガス C₄F₈、Ar の混合比率によ るエッチング速度への影響を調べた。エッチング条件を以 下に示す。

ガス種: C₄F₈、Ar 混合、トータルガス流量: 10SCCM、 プラズマ励起マイクロ波電力: 300W 基板バイアス(13.56MH z)RF 電力: 20W

エッチング室圧力:1.33×10⁻¹Pa、時間:30~60分

その結果を図4に示す。化学的に安定である Pt 薄膜で は混合ガスの影響は見られず、むしろ元素としての質量が 大きい Ar100%でのエッチング速度がもっとも大きくなっ た。また、PZT 薄膜では C4F8の場合では Ar とほぼ同等の エッチング速度であったが、Ar を混合し25%の場合は ほぼ2倍の速度の増加が見られた。Ar は不活性ガスであ るので、Ar イオンアシスト効果として考えられる²⁰、ただ し、それ以外の比率の場合にはむしろエッチング速度が低 下しており、これはこのエッチング機構について、電気的、 物理的、化学的など総合的に検討を進める必要があること と考えている。



【参考文献】

1. 鈴木、鵜飼、表面技術、vol.41, No.9, 6 (1990).

2. J. W. Coburn, H. F. Winters, J. Appl. Phys., 50, 3189 (1979).

HSQ を用いた試作用ナノ金型の検討

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

最近、ナノ周期構造体を用いた光学センサや光学フィル ターが検討されている。例えば、光の波長の1/4 程度のナ ノ周期構造体に生じる表面プラズモンを用いて、白色光か ら各周期に対応した色を取り出すカラーフィルターが開 発されている¹⁾。

ー般的なナノ構造体の作製手順は、電子線描画などのリ ソグラフィーを用いてドライエッチングマスクを作製す る。そして、ドライエッチングによりエッチングマスクの 形状を被加工物に転写する。しかしながら、ナノオーダー のリソグラフィーには、非常に高価な装置の使用、レジス ト塗布・露光・現像などの工程数が多いなどの理由により、 多額の費用がかかる。そのため、リソグラフィーの安価な 代替え技術として、熱ナノインプリント技術が提案されて いる。

熱ナノインプリント技術は、1995年に現プリンストン 大学教授のS.Y.Chou 教授が開発した"ハンコのように金型 上の微細な形状を樹脂などの粘弾性体に転写する"技術で あり²⁾、パターン転写において金型が重要な役割を果たす。 しかしながら、金型の作製には図1に示すように、ナノ構 造体の作製工程と同様に多くの工程を要するため、特に金 型を頻繁に作り直す試作段階では、低コストな加工法が望 まれている。

そこで、本研究では、電子線により硬化し、高硬度・高 耐熱性を示す Si 含有樹脂の一種で水素シルセスキオキサ ン(Hydrogen Silsesquioxane: HSQ)³⁾ に着目して、図2に示 すような低コストが期待できる熱ナノインプリント用試 作金型を検討したので、その結果を報告する。



2. 実験方法

本研究で提案する HSQ 製試作金型の工程図を図 2 に示 す。HSQ には、デュポン・東レ・スペシャルティ・マテ リアル株式会製 FOx15 を用いた。厚み 1mm の4 インチシ リコン基板上に 4000rpm で Fox15 を塗布した後、90°Cで 2 分間プリベイクを行った。その後、ハーフピッチ (hp) が 100nm、200nm、300nm、400nm のナノパターンをそれぞ れ 2mm 角一杯に描画した。使用した装置は(株) エリオ ニクス製 ELS-S50 である。そして、2.38%の水酸化テトラ メ チ ル ア ン モ ニ ウ ム (Tetramethylammonium hydroxide: TMAH)を用いて、30 分間現像し、超純水を用いて洗浄し た。





次に、熱可塑性樹脂(micro resist technology GmbH 製 mr-I 8020E)を石英基板上に 4000rpm で塗布し、140℃で 2 分間 プリベイクを行った。そして、HSQ 製試作金型を用いて、 熱ナノインプリントを行った。

3. 実験結果と考察

HSQ 製試作金型の写真を図 3 に示す。HSQ のパターン の高さは図 4 に示すように 0.82µm である。この金型を用 いて、熱ナノインプリントを行った。しかしながら、1 回 目の熱ナノインプリント時に HSQ 製試作金型の基材であ るシリコン基板に応力集中が生じ、図 5 に示すように割れ てしまった。



図 3 HSQ 製試作金型





図 5 割れた HSQ 製試作金型

小片を集め、熱ナノインプリントを7回繰り返した。6 回目の熱ナノインプリントを行ったサンプル写真を図6 に示す。また、各寸法における金型と転写したパターンの SEM 写真を図7に示す。熱ナノインプリントの条件は、 加圧:1MPa、加熱温度:210℃、加圧時間:10分であった。

図6に示すように、ナノパターンの転写部分に欠損が生 じた理由として、割れた金型では、十分に加圧できなかっ た箇所が生じたこと、金型とガラス基板との平行度が低下 し、金型が接触できなかった部分が生じたことが考えられ る。



図6 熱ナノインプリントサンプル

図7において、hp:100nmでは、樹脂上のパターンが剥がれ、HSQパターンに食い込んでいた。HSQパターンの 高さが約800nmであり、アスペクト比が8と高いため、 樹脂上のパターンが抜けにくかったと推察できる。一方、 hp:200nm 以上のパターンでは、HSQ パターンが樹脂パ ターンとして転写できていることを確認できた。アスペク ト比が小さくなったことにより、樹脂パターンが抜けやす くなったと考えられる。アスペクト比に留意しながら HSQ パターンの高さを決める必要がある。

今後は金型の基材を靭性のある金属板に変更し、アスペ クト比に留意しながら、本研究内容を更に進展させ、微細 加工技術関連の企業支援に活用する予定である。



(a) hp:100nm(左:転写パターン,右:金型)



(b) hp:200nm(左:転写パターン,右:金型)



(c) hp:300nm(左:転写パターン,右:金型)



(d) hp:400nm(左:転写パターン,右:金型)図7各寸法における金型と転写したパターンの SEM 写真

【参考文献】

1) S. Yokogawa, S. P. Burgos, and H. A. Atwater, *Nano Lett.*, **12**, 4349 (2012).

2) 松井真二, 古室昌徳: ナノインプリントの開発と応用 (CMC 出版, 2005) p. 1.

M. Yasui, Y. Sugiyama, M. Takahashi, S. Kaneko, J. Uegaki,
 Y. Hirabayashi, K. Sugimoto, R. Maeda, *Jpn J. Appl. Phys.*, 47, 5167 (2008).

三次元座標測定におけるスタイラス延長シャフトの

測定精度への影響

阿部 顕一(情報・生産技術部 試作加工グループ) 大澤 寿(情報・生産技術部 デザイン・設計グループ)

1. はじめに

製造業において、加工品の寸法は設計寸法通りである事 が求められる。加工品の寸法を測定する手段は種々あるが、 汎用性や測定精度から、多くの場面で三次元座標測定機が 利用されている。三次元座標測定機は測定物に接触子を接 触させ測定を行うが、大型の部品や組立済みの機械を測定 する際、長い接触子を利用する。接触子が長くなると測定 精度が低下することは経験的にわかっているが、程度や様 相は不明である.そこで本研究では、延長シャフトを利用 した際、延長シャフトの振動やたわみが測定にどのような 影響がどの程度あるか、シャフトをどの程度まで長くでき るのかを、複数の延長シャフトを用いて比較し、その影響 を具体的に把握することを目的とした。

2. 検証方法

検証用に使用した三次元座標測定機 ZEISS UPMC850 CARAT を図1に示す。測定精度は $U_3 = 0.8 + L/600 \mu m$ (L mm:測定長さ)である。評価ソフトは UMESS-6.01LX を使用した。

検証方法は、リングゲージを図2のように縦置きし、円 測定を実施した。

+分、高精度に測定できる条件で測定した結果を基準と し、各種延長シャフトを利用して測定した結果を比較し、 長さや材質による測定結果への影響について検証するこ ととした。基準の測定として、SUS の 20 mm 長さのシャ フトで測定した結果、直径は 30.0005 mm、真円度は 0.0003 mm で、これを基準値とした。

使用した延長シャフトを図3に示す。

円の測定方法は、16 点測定、スキャニング測定(フィル タ無し)、スキャニング測定(フィルタ有り)、動的補正、 の4 種類を各3回測定し、平均したものを測定値とした。 動的補正は測定対象となるリングゲージ自身に対して行 なった。

さらに参照情報として、スキャニング測定結果に発生す る振動とスタイラスの振動の関係を調べるために、スタイ ラスの振動について調査した。スタイラスを測定機に接続 し、ハンマリングによって静止時の固有振動数を測定した。 また、図4のように、リングゲージの代わりとなる試料に 接触させ、スキャニング時の振動特性や周波数分析を行な った。



図1 三次元座標測定機



図2 検証方法



図3 延長シャフト



図4振動検証方法(スキャン方向)



図5 サーモフィットによる直径測定結果



図6 サーモフィットによる真円度測定結果



3. 検証結果

各材質、各長さの延長シャフトで測定した。一例として サーモフィットの直径の結果を図5に、真円度の結果を図 6に示す。図中の凡例は、多点:16点測定、SC無:スキ ャニング測定(フィルタ無し)、SC有:スキャニング測定 (フィルタ有り)、動補:動的補正、基準:基準測定、をそ れぞれ表す。

SUS はサーモフィットと類似した結果となったが、カー ボンはサーモフィットに対して、直径の縮小量が 2~3 倍、 真円度の増大が 4~5 倍、それぞれ悪化した。

直径に関して、動的補正は測定対象自身を基準としたた め、最長の600mmでも基準値に近い測定ができた。多点 測定は動的補正より小さく測定される傾向があり、スキャ ニング測定はさらに小さく測定される傾向があった。また、 シャフトが長くなると直径が小さく測定される傾向があ ったが、カーボンでは600mmで大きく測定された。

真円度は、カーボンで大きく測定された。300 mm、400 mm においては、SUS とサーモフィットは同等の結果が得られた。材料によらず、シャフトの長さが長くなると真円 度は大きく測定される傾向があった。

次に振動測定の結果を示す。図7はスキャン方向と接触 方向の振動速度の結果である。スキャン方向に対しては大 きく振動しているが、接触方向には、振動が小さいことが わかった。また、スキャン方向の振動測定結果を図8に示 す。材料に関わらず、延長シャフトの長さが長くなると、 固有振動数が低下した。また、ハンマリングによって求め た固有振動数とスキャニング時の振動周波数は、ほぼ一致 した。接触方向での周波数分析では、特徴的な周波数成分 は検出できなかった。

減衰率については、対象が複雑だったためか、ハンマリ ング後の減衰特性に再現性が低く、特定の傾向を見出すこ とはできなかった。

4. 考察及び今後の展開

今回の振動実験の条件と内径測定の条件には差異があ るが、内径測定の場合、接触子が振動した場合、外側方向 には制限されるが内側方向には自由に振動できるため、振 動の中心(円軌道)が円中心側に移動し、直径が減少する と想定していた。振動測定の結果からは、接触子は接触方 向に振動しているようには見えなかった。一方、スキャニ



ング測定の結果は振動している結果が得られているので、 接触子が振動しているのではなく、それ以外のプローブシ ステムでの振動が支配的であったと思われる。

- 今後の測定においては、本研究で得られた知見として、
- ・スタイラスは制振対策(硬く・短く)に注意。
- ・シャフト長は300 mm 超で材質に注意。
- ・スキャニングはシャフトのたわみに注意。
- ・多点測定は測定の方向性に注意。
- ・ゲージによる動的補正機能の活用が効果的。 を留意して実施していく。

5. おわりに

延長シャフトによる内径測定への影響に関する検証を 行なった。得られた結果を以下に記す。

- 1) 内径は、延長シャフトが長いほど小さく測定された。
- 2) 多点測定より、スキャニング測定の方が小さく測定 された。
- 3) 動的補正を利用した場合、延長シャフトの材質、長さに関わらず、最も高精度に測定された。振動測定を行ったところ、スキャン方向には大きく振動し、接触方向には振動が小さかった。
- シャフトの固有振動数とスキャニング時の振動周波 数が、ほぼ一致した。
- 5) 接触方向の振動はスキャン方向の振動よりかなり小 さかった。

IoT デバイスによるセンサデータの取得蓄積に関する研究

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 DX (デジタルトランスフォーメーション) を背景に、センサなどのデバイスは増加傾向にある。産業 用途としては、装置の故障診断や工具の劣化予測などを目 的として、振動や音響、電力などのセンサデータを活用し た研究¹⁾が行われている。また IoT は、業務改善や課題解 決を目的とする手段であるが、IoT 導入が目的となってい る場合がある。この場合、必要なセンサの種類や設置位置、 サンプリング周期などを深く考慮せずに IoT システムが 構築されることが多い。そうすると、取得したデータは、 故障診断や劣化予測には不十分となり、データが無駄にな ってしまう可能性がある。データを有効に活用するために は、あらかじめ、加工現象の解析に適したセンサの種類や 設置位置、サンプリング周期を検討する必要がある。さら に、データを漏れなく必要なサンプリング周期で蓄積する ためには、データサーバや IoT デバイスのハードウェア性 能、データベースの種類やデータ通信方式などを適切に選 定しなければならない。

そこで本研究では、簡易的な IoT システムでセンサデー タのサンプリング周期の実態を調査することを目的とし て、データサーバ、IoT デバイスおよびセンサで構成させ る IoT システムを構築し、簡易的なデータ取得実験を行っ た。本稿では、IoT システムの一例およびセンサデータの サンプリング周期について報告する。

2. 実験方法

2.1 実験構成

本実験の構成を図1に示す。IoT デバイスには、イーサ ネットコネクタが付属しておりセンサの取り付けが容易 な Raspberry Pi を用いた。センサには、装置の故障診断で 多く用いられており、かつ変化を与えやすく簡易的な実験 に適している、加速度センサを用いた。Raspberry Pi には、 その標準的な OS である Raspberry Pi OS を導入している。 Raspberry Pi に Grove AI (Artificial Intelligence) HAT (Hardware Attached on Top)を接続し、Grove AI HAT に実装 されている加速度センサ ADXL345 を活用する。ADXL345 の仕様と本実験での設定を表1に示す。データサーバには、 センサデータ蓄積のために、データベースを構築する。デ ータベースの種類は主に、関係データベース (Relational Database: RDB)と NoSQL (Not Only SQL) データベースが 存在する。センサデータを取り扱う場合は、拡張性や処理 速度が優れている NoSQL が適している。さらに NoSQL デ ータベースには、表2に示すように、複数の種類が存在す る。本実験では、センサデータの高速サンプリングを想定



図1 実験構成

表 1 ADXL345 の仕様と設定

	単位	仕様	設定
測定範囲	m/s ²	±19.6, ±39.2, ±78.4 or ±156.9	±19.6
出力 データレート	Hz	$0.1\sim3200$	3200
通信方式	-	SPI or I ² C	I^2C
通信速度	Hz	任意	2M

表 2 NoSQL DBの種類

種類	特徴	主な製品	
時系列	時系列データを効率的	InfluxDB	
	に処理可能		
キーバリュー型	キーとバリューをペア	Dadia	
	にして格納	Reuis	
ドキュメント型	ドキュメントをそのま	MongoDB	
	ま格納可能		
列指向型	列単位で処理	Cassandra	
グラフ型	グラフ構造で格納	Neo4j	
オブジェクト型	オブジェクト指向に基	Cachá	
	づくデータモデル	Cacile	

しているため、時系列データの処理に特化した時系列 DB である InfluxDB を利用することにした。

2.2 実験手順

Raspberry Pi から Grove AI HAT 上の ADXL345 の加速度 データを取得し、データを保存する実験を、以下のように 実施した。

(1) Raspberry Pi上のストレージにテキスト保存

(2) データサーバの InfluxDB に1 サンプリング毎転送

(3) データサーバの InfluxDB にデータをまとめて転送

データ取得中は、断続的に振動を与え、合わせて Raspberry



図2 実験(1)の加速度センサのデータ







Piの CPU 使用率も取得した。

3. 解析結果および考察

実験(1)、(2)、(3)で取得した加速度データをそれぞれ図 2、3、4 に示す。横軸を経過時間、縦軸を重力加速度とし た。ADXL345の出力データレート、いわゆる単位時間あ たりにセンサが出力する個数は 3200 Hz である。実験(1)で は図 2 に示すとおり平均 2625 Hz であるため、センサ性能 の 80%以上のサンプリング周期でデータを取得できてい る。一方、実験(2)では、図 3 に示すように平均 117 Hz で あるため、センサ性能の 4%弱しか活かせていない。これ は、InfluxDBへのデータ転送のオーバーヘッドが大きいた めであると考えられる。そこで、実験(3)では、Raspberry Pi 上で一時的にデータを蓄積し、まとまったデータ(本実験 では 10,000 サンプリング)毎に InfluxDBへ転送するよう



図 5 データ取得間隔(インターバル)と CPU 使用率

改良した。その結果、図4に示すように、平均5213 Hz で のデータ取得が可能となった。センサ性能である3200Hz を越えているのは、通信の速度が出力データレートを上回 り、連続して同じ値を取得している場合があるためである。

しかし、2点のデータ間の時間間隔(インターバル)を 詳しく調査すると、図5に示すように、インターバルが最 大で約0.043 s (23.3 Hz)となることがあった。CPU使用率 が高くなる直前にインターバルが大きくなっていること から、Raspberry PiOSの割り込み処理が原因となって、デ ータ取得の処理が中断されていると推測できる。したがっ て、割り込み処理の影響を分離できないOSでは、高速サ ンプリングでのデータ取得を安定的に行うのは難しく、最 大でも20 Hz 程度のサンプリング周波数で、加工現象が捉 えられる装置に対して有効であることが分かった。

より高速なサンプリングでのデータ取得を行う場合は、 データ取得の処理に対して割り込み処理の影響を受けな いシステム構築が必要である。本システムに対しては、 Raspberry Pi にリアルタイム OS²⁾を導入することや、セン サデータの取得処理を行うデバイスを Raspberry Pi の代わ りに Arduino³⁾や Raspberry Pi Pico⁴⁾のようなマイコンを用 いることが考えられる。

4. まとめ

Raspberry Pi を用いて、加速度センサである ADXL345 に 対して I²C 通信によってセンサデータを取得し、そのデー タをサーバに導入した InfluxDB へ蓄積するシステムを構 築した。高速サンプリングでデータ取得する場合、1 サン プリング毎ではなく、まとめてデータ転送する必要がある ことを示した。また、割り込み処理が原因でデータ取得イ ンターバルが大きくなることを示し、より高速なサンプリ ングでデータを取得する方法について提案した。

装置の故障解析や工具の劣化予測を目的とする場合、そ の加工現象を捉えるために必要なサンプリング周期を把 握し、適切なシステム構築を行うことが重要である。

【参考文献】

1) 芝田和雄, 音響・振動に基づく最近の故障診断技術, 騒音制御, Vol.31, No.3, 219-224 (2007)

2) https://aws.amazon.com/jp/freertos/

- 3) https://www.arduino.cc/
- 4) https://www.raspberrypi.org/products/raspberry-pi-pico/

NC フライス盤の切削加工における面粗さ予測に関する研究

奥田 誠、長尾 達明(情報・生産技術部 システム技術グループ) 高橋 和仁、横田 知宏(情報・生産技術部 試作加工グループ)

1. はじめに

熟練技術者の高齢化に伴い、熟練者の技能・ノウハウを 非熟練者に伝承することが求められている。熟練者は使用 設備から発生する音や振動によって異常発生などを判断 しており、これら技術情報をデジタル化する場合、既存の 設備に加速度センサやアコースティックエミッション (AE)などを後付けしてデータを取得する場合が多い。高精 度な仕上がりが要求される切削加工においても、熟練者の 技能・ノウハウによって、目標となる加工精度を得るため の加工条件が選定されている。そのため、非熟練者が熟練 者のように加工精度を選定するためには、加工精度を予測 するシステムが有効である。

これまで、高精度な加工面仕上がりが要求される旋盤加 工において、面粗さの高精度な予測を目指した多項式モデ ルおよびニューラルネットワークを用いた研究¹⁾や、 Kriging 法を用いた予測モデルの研究²⁾が行われている。

本稿では、同じく高精度な加工面仕上がりが要求される エンドミルによる切削加工において、加工条件などを与え ることで面粗さを予測する機械学習モデルを構築し、評価 を行ったため、これについて報告する。

2. 実験方法

2.1 実験設備

実験に用いた加工機は、イワシタ社製ラム型立フライス 盤 NR2 である。工具には直径 10 mm 刃数 2 枚のスクエア エンドミルを用いて、突出しを 45 mm として、被削材 (S50C)に対して側面切削をダウンカットで行った。図 1 に 示すように、被削材のサイズは幅 150 mm、高さ 40 mm、 奥行き 11 mm とし、奥行き方向のびびりを軽減させるた め、被削材と合わせて治具を挟んで固定している。また、 主軸モータの電源に対して、クランプ電流計を取り付けて、 0.1 s 間隔で PLC に保存が可能である。

2.2 実験手順

加工実験を行った切削条件を表1に示す。それぞれの条件の組合せで、計144種類の条件で実験を行った。また、図1に示すように、異なる径方向切込みは、1個の被削材に対して降順に加工を行った。加工中には、主軸モータの 電源供給電流を測定している。

実験は2段階に分けて実施した。第1実験では切削速度 50,70,100 m/min で実施した。第2実験では、切削速度60, 80,90 m/min で、加速度センサを設置して実施した。加速 度センサの向きは、フライス盤に向かって、X:左右、Y: 前後、Z:上下である。加工後、加工面の仕上がり精度の



図1 被削材とその固定方法および切削方法

表1 切削条件

条件名	記号	単位	条件値
切削速度	V	m/min	50,70,100(第1実験)
刃当たり送り	f	mm/tooth	60,80,90(第2美陳)
径方向切込み	ae	mm	0.5, 1.0, 3.0, 5.0
軸方向切込み	ap	mm	1.0, 5.0

指標として、算術平均粗さ Ra (µm)を測定した。1 加工条 件当たり6点測定している。

3. 解析結果および考察

2.2 節の実験によるデータを用いて、ランダムフォレスト ³⁾による学習モデルを評価した。説明変数を切削条件(切削速度、刃当たり送り、径方向切込み、軸方向込み)とし、目的変数を測定した6点のRaの平均値とした。予 測精度の指標として、以下で表される平均絶対誤差MAEを用いる。

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} |y_i - \hat{y}_i|$$

ここで、 y_i は面粗さの実測値、 \hat{y}_i は予測値である。

3.1 電流特徴量と変位量の有無による評価

第1実験では、電流特徴量の有無による予測精度を評価 した。評価結果を図2に示す。ここでの電流特徴量とは、 加工中の電流値の平均と加工前後の電流値の平均との差 分値である。

図2に示すように、説明変数に電流特徴量を追加した場 合、電流特徴量なしと比較して、学習および評価共に MAE の数値が大きくなった。重要度においては、刃当たり送り、 径方向切込み、軸方向切込みの割合が減り、電流特徴量の 重要度が一番高かった。また、電流特徴量の有無によって 値の変化が少なく、比較的割合が高かったのは、切削速度 であった。これらのことから、電流特徴量は、刃当たり送 り、径方向切込み、軸方向切込みと相関があり、これらと


図2 電流特徴量の有無による解析結果の比較

同等程度に面粗さとの相関があり、切削速度が面粗さの予 測精度向上に一番寄与していると推測できる。

そこで、第2実験においては、切削速度の重要度が高い ことを考慮し、びびり振動が影響すると考え、加速度を取 得しながら実験を行った。加速度データから算出した変位 量の有無による予測精度を評価した結果を図3に示す。こ こでの変位量とは、各軸 X, Y, Z それぞれの加工中の加速 度データを、時間の2重積分によって計算された変位量で ある。図3に示すように、「Y軸のみ」「X軸、Y軸」「Y 軸、Z軸」「X軸、Y軸、Z軸」は、「変位量なし」と比較 すると、評価 MAE の数値が小さく、予測精度が向上した。 これにより、Y 軸の変位量が面粗さを予測するのに有効で あることが分かった。Y軸は、加工面に対して垂直な方向 であるため、面粗さとの相関が高いということは想定通り である。今回一番効果のあった変位量は「X 軸、Y 軸」で あり、「変位量なし」と比較して、評価 MAE が 0.420 μm から 0.342 µm と、約 20% 改善した。各条件での実測値 vs 予測値グラフを図4に示す。また、「X軸、Y軸」モデル における、評価用データ 22 条件の実測値と予測値との絶 対誤差率を図5に示す。最大で約100%の誤差が発生する 場合があるため、実用に向けて改善が必要である。絶対誤 差率の平均値 (Mean Absolute Percentage Error: MAPE)は 26.7%であった。

3.2 Ra 測定位置毎の面粗さ予測

第1実験、第2実験を合わせた各加工条件で測定した6 点のRaの最小値、最大値および平均値を図6に示す。実 験No.1-72が第1実験、実験No.73-152が第2実験である。 同一加工条件でも、測定位置によるバラつき幅が一定では ないことが分かる。そこで、面粗さ予測精度を向上させる ために、前節のように実験毎のRaの平均値を算出するの



図4 変位量の有無による Ra 予測値 vs 実測値の比較



図5 「X軸、Y軸」モデルの各評価用データの誤差率

ではなく、各測定位置の面粗さを目的変数とする。測定位 置毎の面粗さを説明変数によって区別するために、次の説 明変数をし、評価した結果を図7に示す。

(1) 累積切削時間

加工開始から Ra 測定位置までの切削時間

(2) 累積除去体積 加工開始から Ra 測定位置までの除去体積



図6 各加工条件における6点の Raの最小値、最大値および平均値



図7 各測定位置での面粗さ予測

評価 MAE は 0.295 μm と図 2(a)の評価 MAE 0.458 μm と 比較して改善している。重要度は変わらず切削速度と径方 向切込みが高いため、単純にデータ量が増えたために改善 したものであると考えられる。

さらに、送り速度と加工条件毎の除去体積を説明変数に 追加した結果を図8に示す。図7と比較して、評価 MAE が0.026 μm 改善した。図8の重要度から、切削速度より も送り速度、径方向切込みよりも除去体積の方が、面粗さ を予測するのに適していると推測できる。なお、図8での 評価 MAPE は22.2%であり、図5の変位量を追加した場 合と比較しても4.5%改善している。

しかし、実用化に向けては、現状の予測モデルでは実測 値と予測値の誤差が大きいため、改善が必要である。改善 策としては以下が考えられる。

(1) より高速なサンプリングでの主軸モータ電流の取得

- (2) 面粗さに相関のある電流特徴量の検討
- (3) 有効な説明変数(切削抵抗など)の追加
- (4) ニューラルネットワークを用いた予測モデルの構築

4. まとめ

本研究では、フライス盤でのエンドミルによる側面切削 を行い、ランダムフォレストによる面粗さ予測モデルを構 築・評価し、機械学習における面粗さ予測の有効性を示し た。以下の特徴量が、面粗さ予測精度の向上に効果的であ ることが分かった。

- (1)-1 加工面に対して垂直方向の変位量
- (1)-2 送り速度
- (1)-3 総除去体積

train: 663, test: 285 0.40 Train: MAE=0.114 Test: MAE=0.269 0.32 6 0.24 -#M 围5 重要 0.16 迴 4 一副子3 0.08 Ra Ra 0.00 速度体精 1 0 送除 12.0 Ó 2 3 4 5 6 Ra 実測値 [um]

図8 送り速度・総除去体積の効果

また、同一加工条件でも測定位置による面粗さのバラつ き幅が一定ではないことを示し、目的変数を測定位置毎の 面粗さとし、以下を説明変数に追加することで面粗さ予測 モデルの精度を向上させた。

- (2)-1 加工開始から測定位置までの切削時間
- (2)-2 加工開始から測定位置までの除去体積

本研究で構築した面粗さ予測モデルは MAPE: 22.2%で あり、実用化に向けた予測精度向上の改善策を示した。

今後実用化に向けて、より剛性の高いマシニングセンタ にて同様の実験を行い、切削抵抗・放射温度や高速サンプ リングの加速度などを測定する予定である。そして、本研 究で得られた知見を活用し、センサデータの特徴量の追加 や、ニューラルネットワークの活用を検討し、面粗さ予測 精度の向上を目的とした研究を実施する予定である。

【参考文献】

1. Neelesh Kumar Sahul Atul B. Andhare2 Sandip Andhale3 Roja Raju Abraham, Prediction of surface roughness in turning of Ti-6Al-4V using cutting parameters, forces and tool vibration", IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering, 346 (2018).

2. 三坂孝志ほか:振動計測データと簡易モデルに基づく 表面粗さの推定手法の検討,日本機械学会生産システム 部門研究発表講演会講演論文集,606 (2019).

3. 佐久間太志ほか:機械学習を導入した工具カタログ のデータマイニングプロセスの提案,日本機械学会論文 集,85,877 (2019).

【外部発表】口頭発表1件

光造形方式3Dプリンターの精度に関する報告

佐々 知栄子、斉藤 光弘(情報・生産技術部 デザイン・設計グループ)

1. はじめに

当所では、3D プリンターによる試作支援や製品開発、 受託研究などを実施している。支援開始以降、柔らかい素 材のエラストマーライクを使用した造形依頼が増えてい る。さらに多様な要望に応えるために、人肌のような柔ら かさ(ショア A2 ゴムライク樹脂)からプラスチックのよ うな硬さ(アクリル樹脂)まで造形可能な図1の超軟性造 形対応光造形3Dプリンター「M3DS-SA5/4KHi」(ミッツ 社)を 2020 年度末に導入した。本稿では、光造形3Dプ リンターの特長の紹介と精度について報告する。



図 1 M3DS-SA5/4KHi

2. 導入装置「M3DS-SA5/4Khi」の特長

導入した装置は、図2のコーター方式と呼ばれる機構で、 樹脂槽が移動してコーディングシート上に樹脂を均一に 塗布させ、下部のプロジェクターの LED によりスライス データを投影し固め、一層ずつ積層される。吊り下げ方式 で、造形物が逆さまに造形される。これにより柔らかな造 形物にかかる負担を軽減している。主な仕様を表1に示す。 以下に特長を示す。

- ・ゴムライクの柔らかい素材から硬いアクリルライクの 素材までが造形可能
- ・伸縮性が必要とされる部品の作製が可能

・造形ピッチ・XY 分解能が細く、滑らかな造形が可能

・造形物の形状や特徴に合わせて照射時間の調整が可能



表1 主な仕様

出力方式	光造形方式
積層ピッチ	25μ m $\sim 50\mu$ m
造形範囲	150×85×180 mm
材料	ゴムライク樹脂(ショア A2、A5、
(柔らかい	A13, A50),
順に記載)	ゴム弾性樹脂(ショア A25、A55)
	耐熱性アクリル樹脂
サポート	造形物の樹脂と同じ、
材料	もしくは造形形状によって無し

3. 造形物の精度評価

微細造形をテストで造形した際、細部に樹脂が入り込ん で埋まることがあること、造形ステージに対して水平方向 の面と吊り下がりで積層される垂直方向の面に違いが生 じることの懸念があった。その課題とメーカーの推奨値な どを踏まえたテスト造形形状を考案し、精度を確認した。

微細造形の限界は、樹脂の種類、色、照射時間、気温等 の影響があるため一概には決められないが、メーカーの推 奨値、限界値の目安は、ゴムライクの場合、推奨値1.0 mm、 限界値0.7 mm、アクリル樹脂の場合、推奨値1.0 mm、限界 値0.6 mmである。また、角度45°以上のオーバーハングが 発生する場合は、事前に専用のソフトでサポート付加を作 成するか、3D-CADで設計する必要がある。

今回精度評価に使用した樹脂の種類は、ショア A25 弾 性樹脂、アクリル樹脂である。

3.1 評価方法1 穴径、厚さ、隙間の検証

図3の穴径を評価する造形物と、図4の厚さ、隙間を評価する造形物を作製した。垂直方向の面と水平方向の面における精度の違いも確認するため、L字形状とした。

安定しない形状や柔らかな素材は、樹脂槽が移動する際 に造形物が揺れ動き、歪みが生じるため、揺れ防止として サポート付加した。

図3の造形ステージの付着部の水平面の穴径は、ショア A25弾性樹脂では、φ1.5 mm以上、アクリル樹脂では、φ2 mm以上が必要となるが、垂直方向には、ショアA25弾性 樹脂、アクリル樹脂共にφ3 mm以上が造形可能であった。

図4の水平面の溝は、ショアA25弾性樹脂では、1.0 mm 幅以上、アクリル樹脂では、0.5 mm幅以上が必要となるが、 垂直方向には、ショアA25弾性樹脂、アクリル樹脂共に φ0.5 mm幅以上が造形可能であった。水平面の厚みは、シ ョアA25弾性樹脂、アクリル樹脂共に0.7 mm厚まで造形可 能で、垂直方向には、A25弾性樹脂は、1.0 mm厚以上、ア クリル樹脂は、0.7 mm厚まで造形可能であることがわかり、 図3、4 共に水平面と垂直面に違いが生じることを確認した。



図5 チューブ形状穴径評価造形物

3.2 評価方法2 チューブ形状穴径の検証

チューブ形状の穴径を確認するため、T字を逆さまにし た状態で造形したが、ステージ面に対し平行するチューブ の穴部分が埋まってしまったため、図5に示すT字形状の 造形を行った。サポート付加形状2種、穴径を変えた8種 (ϕ 0.7、0.8、1.0、2.0、2.2、2.5、3.0 mm)を造形した。サ ポート付加部分の右図は、サポート付加部分がステージ面 に対して吊り下がる状態で、チューブ形状がステージに対 して平行に造形される。左図は、サポート付加部分がステ ージ面に吊り下がる状態で、チューブ形状がステージに対 して斜めに造形される。

穴径が小さい場合、細部に樹脂が入り込んで埋まってし まうことがあり、右図のサポート付加による造形の方が穴 が埋まらずに造形できる。ショア A25 弾性樹脂の場合、 ¢2.0以上は造形が可能であるが、アクリル樹脂の場合、 ¢4.5 mm以上が造形可能であると確認できた。

3.3 評価方法3 オーバーハングの検証

図6の5種の造形を行い確認した。角度45°以上のオ ーバーハングが発生する場合は、メーカーからの情報によ るとサポート付加の必要があるとのことだったが、角度 35°までの造形が可能であった。



図6 オーバーハング評価造形物

4. まとめ

メーカーの推奨値、限界値の検証と細部へ樹脂が入り込 みや造形ステージに対して水平方向の面と吊り下がりで 積層される垂直方向の面の違いを検証し、以下の知見を得 た。

- 穴径、隙間、厚み評価では、水平方向の面と垂直方向の面に違いが生じることがわかり、ステージ面に付着している水平方向の面の方が精度が高いことがわかった。
- 2) チューブ形状評価では、T 字形状で穴の造形を重視す る場合、サポート付加し配置を斜めに造形した方が有効 であった。
- オーバーハング形状では、メーカーの推奨角度より鋭 角の角度を造形することができた。

形状や素材の柔らかさによって、造形前に、出力方向や サポート付加の検討するのと共に、照射時間の細かい設定 が必要であることもわかった。今後、更なる機械特性を把 握する必要がある。

座面板に使用される木質素材の強度性能

中島 岳彦(情報・生産技術部 試作加工グループ)

1. はじめに

木製スツールの座面板には様々な種類の木質材料が使 用されているが、近年は接着剤で集成加工した座面が多く 制作され、使用されている。強度性能としては一枚板や幅 接ぎ材などが優れているが、意匠性を高めるために多種類 の木材を細かいブロック状に使用した座面が製作されて いる。座面は体重を支える重要な部分であり、JIS でも必 要な強度は規定されている。椅子およびスツールの座面の 強度に関する JIS 規定は、構造体に対する試験であり、座 面の強度だけを調べる試験ではない。そこで本研究では、 座面の強度だけに注目し、座面を構成する集成加工の要素 が強度性能に与える影響について調べた。

2. 実験

集成された座面の多くは上面部に板目面を向けたもの と木口面向けたものの2種類に大別される。模式図を図1 に示す。集成する際のブロックサイズが小さいと材中の欠 点が排除され、より均一化していく。集成の組み方とブロ ックサイズを条件として設定し、強度性能に与える影響に ついて調べた。接着剤には酢酸ビニル系を使用し、接着条 件はメーカー推奨の塗布量と圧締圧で行った。



図1 木口組と板目組の違い

2. 1. 集成の仕方とブロックサイズ

座面上面に木口面を向けて集成する方法と、板目面を向 けて集成する方法の2種類を条件とした。板目面の場合、 ブロックの繊維方向が縦横になるように並べた。ブロック サイズをあまり小さくすると、歩留まりが低下する。さら に接着回数が増えるため作業性が悪くなる。そこで集成す るブロックのサイズを市販されているものを参考に 20mm、30mm、40mmの3条件に絞った。板目組用ブロッ ク試験片を図2に、木口用を図3に示す。このブロックを 集成した板(試験体)の大きさは幅120mm、長さ240mm とした。樹種はスギを用いた。



図2 板目組用ブロック試験片



図3 木口組用ブロック試験片

2.2. 樹種の違い

針葉樹と広葉樹では一般的に広葉樹の方が密度が高い。 家具には広葉樹が多く使われるが、近年は地産材である針 葉樹での家具も多く制作されている。広葉樹のホオノキと ナラを使用し、30mm サイズのブロックで試験を行い、ス ギとの強度の比較を行った。ブロックの外観を図4に示す。



図4 広葉樹ブロック試験片

3. 実験結果

3. 1. ブロックサイズの影響

表1に曲げ試験の結果を示す。組み方では木口組より も板目組の方がヤング率で2倍程度高いことが分かった。 スギの繊維方向のヤング率が文献値⁽¹⁾で 7.5GPa 程度であ ることから、板目組で10分の1まで強度が低下した。集 成加工によって強度は下がったが、縦横に組んであるため 異方性がなくなり、背もたれのある椅子と異なり前後の区 別なく座るスツールに適した材と言える。

板目組のブロックサイズでは 30mm サイズでヤング率 と曲げ強さで最も高い値を示した。図5に示すように破壊 はどの試験体でも接着層で起こり、木部での破壊が少なく、 接着層が露出している状態であった。これは木口と板目を 接着するため、接着力が低下することが原因である。両面 塗布を念入りに行ったが、木口面は接着剤を吸収しやすい ため、良好な接着面を得ることができなかった。サイズ間 で差が出る原因であるが、試験体の長さ方向にはブロック が偶数個配列しおり、ブロックの偏りはない。接着層の数 が強度に影響を与えている可能性あると推察されたが、こ こでは接着層の影響を調べる実験は行わなかった。今後の 検討課題としたい。

木口組では同じく 30mm サイズでヤング率が最も高い 値を示し、曲げ強さでは 40mm サイズが最も高かった。木 口組の板の破壊は板目組と異なり、図6に示すように接着 層からの破壊ではなかった。これは良好な接着が得られる 板目面での接着であるため、ブロック間が強固に接着され ていることを示している。各サイズ間の差が小さいことか ら、サイズによる影響は板目組よりも少ないと考えられる。

\searrow		ブロックサイズ (樹種:スギ)								
	20mm	ı	30mm	ı	40mm					
而已万山	曲げヤング係数	曲げ強さ	曲げヤング係数	曲げ強さ	曲げヤング係数	曲げ強さ				
自亡27月	(GPa)	(MPa)	(GPa)	(MPa)	(GPa)	(MPa)				
板目	0.786	4.39	0.976	4.39	0.759	2.94				
木口	0.332	2.74	0.467	3.41	0.339	3.52				

表 1 各ブロックサイズの曲げヤング率と曲げ強度



図5 破壊(中央部)した板目組の試験体



図6 破壊した木口組の試験体

3.2. 樹種の影響

表2にホオノキとナラの試験結果を示す。2樹種ともス ギに比べて高い値を示した。曲げ強さに関してはスギに対 してホオノキで152%、ナラで188%上昇しており、ヤン グ率の増加に比べるとより高くなる傾向が見られた。破断 面を観察すると、木部での破壊の割合が増えていることか ら、木口と板目の接着性が向上した。密度が高いため、木 材実質の量も多いことから木材実質との接着面積が多く なり、接着強度が向上していると思われた。

表2 各樹種の曲げヤング率と曲げ強度

	樹	種(ブロッ:	クサイズ:30mm)	
	ナラ	,		
配列	曲げヤング係数	曲げ強さ	曲げヤング係数	曲げ強さ
	(GPa)	(MPa)	(GPa)	(MPa)
板目	1.23	6.68	1.40	8.27
木口	0.556	7.59	0.711	8.82

4. まとめ

スツール座面の製作方法と使用樹種による違いが強度 に及ぼす影響について調べた。得られた結果を以下に示す。 1)板目組のヤング率は木口組の2倍程度高い。

2) 板目組の曲げ強さでは、スギに対してホオノキで 1.5 倍、ナラで 1.9 倍程度高い。

以上の結果から、スギ板目組を曲げ強さ 2.9MPa とする と、 φ 350mm 程度のスツールを製作する場合、厚みは 40mm あれば予想最大荷重はおよそ 3000N になることが分 かった。同じように、ホオ (6.7MPa)の場合で厚み 26mm、 ナラ (8.3MPa) で 24mm の厚みが必要である。次年度で は実際にスツールを試作し、想定通りの強度があるかどう か調べていく予定である。

【参考文献】

1. 木材工業ハンドブック (2004).

NC フライス加工機の異常検知システムの開発

長尾 達明、奥田 誠(情報・生産技術部 システム技術グループ) 高橋 和仁、横田 知宏(情報・生産技術部 試作加工グループ)

1. はじめに

NC フライス加工機での切削加工において、切削工具の 摩耗による劣化や加工条件が不適切な場合には、ワークの 加工面の仕上がりの低下、切削工具の折損、加工機の故障 に結びつくことがある。異常検知システムは、様々なもの が市販されているが、切削動力計を用いた高価な物や主軸 モータの電流値の正常値からの差分で判断する物が多い のが現状である。

本研究では、切削動力計などの高価な装置を使用せずに 異常検知できる安価なシステムの開発を目的とした。方法 として、NCフライス加工機から取り出せるデータ(主軸 回転速度、主軸負荷率、送り速度など)と、簡易に接続で きる電流クランプで取得した電流値を利用した。これによ り、切削加工の効率化を目指している企業に導入しやすい システムとなることを目指した。

2. 異常検知システムの開発

本章では、開発した異常検知システムの概要を述べる。

2.1 システム全体

今回使用する NC フライス加工機は、図1の(株) イワ シタ製、NR2 で、NC コントローラにオプションとして、 CC-Link¹⁾のスレーブ局の機能がある。これにより、主軸 回転速度などのデータを PLC (Programmable Logic Controller)の CC-Link のマスタ局ユニットへ受け渡すこと ができる。また、主軸モータのケーブルに電流クランプを 接続して、PLC の CT (Current Transformer)入力ユニット で電流値を受け取り、さらに、放射温度計のデータを電流 値として、PLC の A/D 変換ユニットで受け取る構成とし た。図2にシステム構成図を示す。



図1 フライス盤



2.2 PLCの構成

PLC は、図 3 に示すように三菱電機、MELSEC-Q シリ ーズを使用した。表 1 のユニットを組み合わせて必要なデ ータを取り込める構成とした。



図 3 PLC

表1 PLC (の詳細	
ユニット名	型名	
CPUユニット	Q00UJCPU	
CC-Link ネットワーク	QJ61BT11N	
ユニット		
Web サーバユニット	QJ71WS96	
入出力ユニット	QX48Y57	
CT 入力ユニット	Q68CT	
アナログユニット	Q62AD-DGH	

CC-Link ネットワークユニットは、マスタ局の機能を持っており、スレーブ局のデータを吸い上げることができる。 フライス盤のNCコントローラがスレーブ局の機能を持っ ているため、主軸回転数のデータなどをワードデータとし て受け取っている。また、逆にNCコントローラへワード データを書き込むことも可能である。CC-Link 通信をする ための設定としては、局番、占有局数、ボーレートなどが

必要となる。

Web サーバユニットを所内ネットワークに接続するに あたり、当所のネットワーク管理者の許可を得て、所内用 のIP アドレスが配賦された。デフォルトのIP アドレスか ら所内用のIP アドレスへ設定変更した。DHCP サーバか ら自動取得する方法もあるが、固定IP アドレスでの設定 の方が確実である。

パソコンの Web ブラウザで Web サーバユニットへアク セスして、PLC のデータをモニタする場合、Web ブラウザ 画面を逐次更新するためにはパソコンに Java VM(Virtual Machine)インストールしておく必要がある。これは、Web サーバユニットのデフォルトの Web サーバが、Java で作 成されているためである。最近の多くのパソコンは、Java VM をインストールしていないため、それを必要としない HTML ファイルを作成することにした。

Web サーバユニットは、CPU ユニットの内部メモリの 複数個を指定して1つのデータのかたまり(タグデータ)と して扱うタグ機能がある。そのタグデータにアクセスでき るような HTML ファイルを作成して、Web サーバユニッ トへ書き込むことにより、所内ネットワークに接続してい るパソコンの Web ブラウザで図 4 のようにタグデータを 見ることを可能とした。

	_ B _X
🧲 🗧 🦉 http://=	~ 8
ロフライス登データ	
【ビットデータ	1
項目	値
自動運転中信号	0
アラーム状態信号	0
非常停止信号	0
「ワードデータ	1
項目	値
主軸負荷情報	26
主軸回転速度	5000
X電流値	0
∀電流値	0
Z電流値	-2
3軸合成速度	0
X絶対座標	40276
Y絶対座標	1 34583
Z絶対座標	1 04030

図 4 Web ブラウザ画面

タグデータを 0.1 秒間隔で csv ファイルに保存するため には、高速ロギングの機能が必要であり、そのために Web サーバユニットにコンパクトフラッシュカードを挿入し て、そこに保存できるようにした。また、ロギングを自動 で開始するためにイベント監視機能を使用して、主軸回転 数が 10 を超えた時に保存を始めるようにした。保存され た csv ファイルは、1 回の加工終了毎に FTP サーバへ自動 転送されるようにした。

CT 入力ユニットは、主軸モータのケーブルに設置した クランプ式の分割形電流センサの電流を取り込んで、主軸 モータの電流値を測定している。 アナログユニットは、放射温度計(HORIBA 製、IT-480) から出力される 4~20mA の電流を取り込んでいる。

最終的に csv ファイルには、19 種類のデータを 0.1 秒間 隔で保存することになった。

2.3 データ取得の動作確認

実際のフライス加工において、データ取得が可能である ことを確認した。

図5のように直径10mmのスクエアエンドミルでSS400 の被削材の150mmの長さを側面切削し、切削速度(V)、 送り量(f)、径方向切込(ae)、軸方向切込(ap)の4条件 の組み合わせを変えることにした。

まず、図6のようにフライス盤の主軸モータの電流値が 安定するまで、回転開始から2分程度必要であることが分 かった。また、径方向切込(ae)の違いにより、加工中の 主軸モータの電流値に差があることを確認した。



図5 エンドミルと加工部分の拡大



3. 異常検知ができるパラメータの検証

直径 10mm のスクエアエンドミルで S50C の被削材の側 面切削について、表 2 に示す条件で加工を行った。

表 2	実験条件
切削速度 (V)	50~100 m/min
送り量 (f)	0.05、0.1、0.15 mm/t
径方向切込(ae)	0.5、1、3、5 mm
軸方向切込 (ap)	1、5 mm

V:100 m/min、f:0.05 mm/t、ae:5 mm、ap:5 mmの時 に、図7の赤丸部分のように主軸電流値の変化を記録し、 また、その時の工具の状態をマイクロスコープで観察する と図 8 のように黄金色のコーティング部分が剥がれて破 損していることが確認できた。なお、それ以外の加工条件 においては、主軸モータの電流値の急激な変動はなく、ま た、工具の破損も見られなかった。



図7 破損時の主軸電流波形



(a) 新品工具(b) 破損工具図8 新品の工具と破損した工具の写真

また、図9のように加工時間経過および径方向切込(ae) に応じて、工具温度が増加することを確認できた。しかし、 温度からは破損時における変化を捉えることはできなか った。





4. まとめ

本研究では、NCフライス加工機の異常検知システムを 安価に開発するという目的において、次のような成果が得 られた。

 PLC の Web サーバユニットを用いることは、データ 取得のシステムを自作でカスタマイズする場合にお いて、有効な手段であることを確認できた。 2) 異常検知について、主軸モータの電流が急激に変動 した時に工具が破損することが確認出来た。

【参考文献】

1. CLPA:「CC-Link 仕様書 (概要, プロトコル編)」, (一社) CC-Link 協会, BAP-05026-M (2011)

【外部発表】口頭発表1件

レーザ照射によるレーザ粉体肉盛層の組織制御

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)

1. はじめに

ものづくりのデジタル化に伴い、3DCADの設計データ を直接入力して部品を得る積層造形技術(Additive manufacturing)への注目が高まっている。金属材料を用い た積層造形においては、2030年には造形品の市場規模は 約2兆円とされており、現在では医療、航空・宇宙、発電 などの部品単価が高い分野で社会的実装化が先行してい る¹⁾。金属積層造形の中でも、レーザ粉体肉盛溶接(Laser Metal Deposition: LMD) はレーザ照射してできた溶融池 に金属粉末を投入し、肉盛溶接を行う加工である。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 2)。例えば、安価な低合金鋼に高速度工具鋼等や、耐熱性 や耐蝕性などの特性を持つ金属を付着させる等の新たな 付加価値をつけることが可能となる 3。しかしながら、 LMD は良好な品質を得るためのレーザ出力、レーザ走査 速度、ビーム径、粉末供給量などの加工条件の選定が難し く、ブローホールや融合不良などの内部欠陥が生じ易い。 本プロセスと同じく金属を堆積させる溶射においては、こ れらの内部欠陥を除去するために別工程で高周波誘導加 熱やバーナー加熱等で再溶融処理が行っているが、作業者 による技能差あるいは高価な装置の導入が必要となり、技 術的あるいはコスト的に問題は多い4~5)。そこで、本研究 ではLMD後に連続で同一装置を用いたレーザ再溶融処理 を試み、内部欠陥の除去できる再溶融処理条件の選定を検 討した。

2. 実験方法

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光(ディスクレ ーザ、波長 1030 nm)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 の表面を溶融する。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。

粉末は粒径 53~150 μm の高速度工具鋼粉末を用いた。 化学成分を表 1 示す。基材は寸法 100×50×10 mm^tの低合 金鋼 SCM440 板を用いた。化学成分を表 2 に示す。基材に は前処理としてアルミナ粉末によりブラスト処理をした。

表3にLMDの積層条件を示す。肉盛高さが異なり、融 合不良やブローホールが形成される3種類の積層条件を 選択した。 表4に再溶融処理条件を示す。LMDによる肉盛層を造 形直後に、LMDと同一の装置で粉末を供給せず、造形さ れた各パスの真上からレーザ照射のみすることにより再 溶融処理を行った。レーザの走査方法は肉盛層造形時と同 様であり、出力と走査速度を変化させた。再溶融処理のレ ーザのパス数は5パスとし、再溶融処理の回数は5パスで 1回と定義し、これを1、2、4回繰り返した。

表1. 高速度工具鋼粉末の化学成分

С	Si	Р	S	V	Cr	Mn	Fe	Со	Cu	Mo
1.4	0.96	0.009	0.003	2.89	7.7	0.41	81.9	1.77	0.03	2.93

表 2. SCM440 の化学成分

С	Si	Р	S	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Мо
0.41	0.17	0.01	0.005	1.04	0.62	97.39	0.08	0.11	0.17

表 3. LMD の積層条件

conditions	Sample 1 Lack of fusion + Blowhole	Sample 2 Blowhole	Sample 3 Blowhole
Beam diameter mm		φ4	
Overlap width mm		2	
Carrier gas ℓ /min		2.1	
Shield gas ℓ/min		23	
Laser scanning velocity mn	16	8	16
Powder flow g/min	19.8	15.1	13.5
Laser power kW	1.8	2	1.8
Height mm	3.0	4.7	1.7

Beam diameter mm	φ4
Overlap width mm	2
Laser scanning velocity mm/s	2, 4, 8
Laser power kW	1.5, 2, 2.5
Pass	5
Number of times	1, 2, 4

図1 に放射温度計を用いた溶融池の温度測定の概略図を示 す。加工ヘッドに測定温度範囲 140~2000 °Cの放射温度計を 取り付け、レーザの焦点位置に集光部を合わせることで、リア ルタイムの溶融池温度を測定した。本研究では、再溶融処理に おける溶融池形成前のパスの直前温度(以下パス間温度と示 す)と溶接品質の関係を調べた。



図1. 放射温度計を用いた溶融池の温度測定の概略図

3. 実験結果および考察

図2に再溶融処理前のLMDの断面マクロ組織を示す。 Sample 1 は入熱不足および粉末供給量過多のため融合不 良とブローホールが形成されている。また、Sample 2 と Sample 3 は入熱不足によりブローホールが形成されてい る。肉盛時に形成されたブローホールは粉末溶融時に予め 粉末自身に蓄えられたガスや、外部から混入したガスによ る気泡が生じ、自身の浮力によって外部に抜け出る前に溶 融池が凝固したためと報告されている⁶⁻⁷⁾。従って、ブロ ーホール周辺を溶解し、ガスを肉盛層外へ放出させる再溶 融処理は有効と考えられ、本研究では Sample 1~3 の肉盛 層をその後の再溶融処理により内部欠陥を除去する。

図3に再溶融処理後の代表的な断面マクロ組織を示す。 横方向にSample 1~3、縦方向に再溶融処理条件となって おり、走査速度は4 mm/s で統一し、出力やパスの繰り返 し回数を変えた結果である。

出力が2.5 kW の条件ではSample 1 は良好な断面品質を 得られたが、高入熱量であるためSample 2、3 は外観不良 となっており、肉盛高さが低いSample 3 は割れている。 これは肉盛層が薄いためレーザ照射により肉盛層と共に SCM440 母材の一部が溶融し、母材からの希釈により粉末 の合金成分量が低下し、割れ感受性が高くなったためだと 考えられる⁸⁾。また、Sample 3 は体積的には他のSample 1、 2 に比べ小さく母材希釈の影響が大きく作用するため割れ に繋がったと考えられる。

一方で、出力が 1.5 kW では低入熱量の条件であるため、 ブローホールや融合不良を再溶融処理によって除去でき ていない。

今回ベースとした Sample 1~3 の肉盛条件においては、 出力2kW、レーザ照射5パス×4回の条件において外観不 良や割れに繋がらず、ブローホールや融合不良を除去した 良好な品質の断面を得ることができた。

上記の結果より、同一の再溶融処理条件でSample 1~3 全て良好となる場合もあるが、出力 2.5 kW の条件のよう にSample 1 のみ良好となる場合もある。この理由として、 ベースの肉盛条件により体積が異なるため、熱容量、蓄熱 量、放熱量の差により最適な再溶融処理条件が異なると考 えられる。従って、ベースの肉盛条件に応じた再溶融処理 時の出力、走査速度、パスの繰り返し回数を制御しなけれ ばならない。これらの条件は試験片のパス間温度に大きく 影響すると考えられ、パス間温度と溶接品質の関係を調べた。

図 4 に再溶融処理条件におけるパス間温度と溶接品質 の関係を示す。再溶融処理を繰り返すことでパス間温度は 増加し、入熱量の大きい再溶融処理条件であればパス間温 度の増加幅は大きくなる。断面品質が良好か否かを示す指 標としてパス間温度の上昇幅がある。急激な温度上昇では 外観不良となり、緩慢な温度上昇ではブローホールや融合 不良を解消されていない。良好な断面品質を得るためには、 その中間となるパス間温度の上昇幅をレーザ出力および 走査速度での制御で調整する必要がある。また、再溶融処 理回数の最終回のパス間温度に注目すると、Sample 1(再 溶融前の肉盛高さ: 3.0 mm) は 340~390 ℃、Sample 2(再 溶融前の肉盛高さ: 4.7 mm)は390~410 ℃、Sample 3(再 溶融前の肉盛高さ:1.7 mm)は300~390 ℃で良好な断面 品質を得られた。肉盛高さが高くなることで、基材近くに あるブローホールまで再溶融処理による熱が届きにくく なるため、外観不良にならない程度の高いパス間温度が必 要となる。



図 2. 再溶融処理前のLMDの断面マクロ組織; (a) Sample 1, (b) Sample 2, (c) Sample 3

4. おわりに



図 4. 再溶融処理条件におけるパス間温度と溶接品質の関係

本研究では、高速度工具鋼粉末を用いた LMD 後に連続 で同一装置を用いたレーザ再溶融処理を試み、パス間温度 に着目した内部欠陥の除去できる再溶融処理条件の選定 について検討した。レーザのパス数および繰り返し回数、 出力、走査速度が溶接品質に与える影響を評価し、以下の 結果を得た。

- (1) 溶接欠陥とならない再溶融時の最適なパス間温度は 約 300~400℃にワークが予熱されている条件であっ た。しかし、肉盛条件により有する熱容量が異なる ため、最適な再溶融処理条件が異なる。従って、肉 盛条件に応じた再溶融処理時のレーザ走査速度・出 力等でパス間温度を制御しなければいけない。
- (2) 今回ベースとした肉盛条件では、レーザ出力2 kW、 走査速度は4 mm/s、レーザ照射5パス×4回の条件 において外観不良や割れに繋がらず、ブローホール や融合不良を除去した良好な品質の断面を得ること ができた。

【参考文献】

- 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).
- 2) 森橋遼, 岩崎勇人: Laser Metal Deposition (LMD) に よる積層・補修技術の開発, 溶接学会誌, 90, 2 (2021) 177.
- 3) 木寺正晃: レーザを用いた AM 技術, 溶接学会誌, 89, 1 (2020) 85.
- 曙紘之,伊藤量平,福本昌弘,小茂島潤,清水真佐 男:自溶合金溶射部材の疲労特性に及ぼす再溶融処 理時間の影響,日本機械学会論文集,70,694 (2004) 843.
- 5) 園家啓嗣,香川遼太郎,中村正信,永田智司:高周 波誘導加熱による自溶合金溶射皮膜の再溶融組織の 評価,溶射,49,4 (2012) 117.
- Shun Izutani et al.: Blowhole Generation Phenomenon and Quality Improvement in GMAW of Galvanized Steel Sheet, Int. J. of Automation Technology, 71, 1 (2013) 103-104.

- Yimin YUAN : Development of Hybrid Tandem GMAW process, Journal of The Japan Welding Society, 86 (2017) 90-94.
- 岡内宏憲,才田一幸,西本和俊:690 合金と316Lス テンレス鋼異材多層盛溶接部のミクロ割れ発生抑制 に対する REM 添加効果,溶接学会論文集,29,3 (2011)228.

チタン合金加工におけるドリルへのブラスト処理の効果

横田 知宏(情報・生産技術部 試作加工グループ)

横内 正洋(機械・材料技術部)

石橋 正三、近藤 祐介、小島 隆(株式会社不二製作所)

1. はじめに

近年、切削工具においては難削材に対応した高性能な工 具が開発されてきており、特にコーティングの性能が向上 している¹⁾。一方でコーティングに加えて工具の性能を向 上させる表面処理法があれば、コーティング工具のさらな る性能向上を図ることが可能となると考えられる。

本研究ではブラスト処理に着目した。チタン合金のドリ ル加工を対象に、切削抵抗や工具損耗に及ぼすブラスト処 理の効果を検証した。

2. 実験方法

切削実験に直径 5 mm の超硬合金製ツイストドリルを使 用した。工具内部には切削油剤供給のための円形のオイル ホールがあいている。またドリル表面には厚さ約 3 μm の Cr 系コーティングが施されている。

上述したコーティング付き超硬ドリルに 2 種類のブラ スト処理を行い、未処理ドリルと切削性能を比較した。ブ ラスト A は(株)不二製作所の a 処理®である。セラミック ス製の超微粒球形メディアを 0.2 MPa でドリルに噴射した。 ブラスト B は(株)不二製作所のシリウス Z[®]である。特殊 高分子を核にして周囲に砥粒 (ダイヤモンド)を坦持して あるメディア (メディア径 450 µm、砥粒寸法 1 µm)を、 0.3 MPa でドリルに噴射した。

図1に、未処理ドリルとブラスト処理したドリルの刃先 および溝部の SEM 像を示す。図1の下部には溝部の面粗 さも示した。ブラスト処理によりドリルのエッジ部がやや 丸みを帯びているが、切れ刃稜線にはチッピングなど生じ ていないことがわかる。溝部の面粗さは、ブラスト A に より大きくなり、ブラスト B により小さくなっている。

切削実験の手順を以下に述べる。マシニングセンタ (OKK 製 VC-X350) にてチタン合金(Ti-6Al-4V) に多数 の穴加工を行い、2009 穴までは 500 穴毎、2010 穴以降は 100 穴毎にデジタルマイクロスコープ(キーエンス製 VHX-600) でドリル刃先の観察を行った。穴加工はドリル の刃先に欠けが生じるまで実施した。また、新品時および 1003 穴加工後、2006 穴加工後に切削動力計(三保電機製 作所製 AST-BH)を用いて各ドリル3回ずつ切削抵抗測定 を行った。切削条件は、1~2009 穴については工具メーカ 推奨条件とし、2010 穴以降は送り量を推奨条件の 1.5 倍と した。各ドリル2本ずつ実験を行った。切削条件を表1に 示す。



図1 ドリルの刃先および溝部の SEM 像と溝部の面粗さ

	表1 切削条件	
	1~2009 穴	2010 穴~欠けまで
切削速度(m/min)	40	40
送り量(mm/rev)	0.12	0.18
加工深さ(mm)	15	15
公 油久世	内部給油(2MPa)	内部給油(2MPa)
和油朱件	エマルション	エマルション

3. 結果および考察

3.1 切削抵抗

工具メーカ推奨条件で加工した1穴目、および3穴目の 切削抵抗(トルク)の時間変化を図2に示す。1穴目にお いて、未処理とブラストAについては加工の途中からト ルクが著しく上昇した。これは、穴が深くなるにつれてド リルの溝部に切りくずが溜まり、ドリルの回転を阻害した ためと考えられる。一方、ブラストBについては加工途 中でのトルクの著しい上昇はみられなかった。以上から、 未処理およびブラストAに対し、ブラストBの切りくず 流出性が良好であったといえる。これは図1に示した通り、 ブラストBによって溝部の面粗さが小さくなったことに 起因すると推察される。

しかしながら、3 穴目の切削抵抗をみると未処理、ブラ スト A ともトルクの著しい上昇はほとんど無くなってい る。1 穴加工したときにドリルの溝部の細かい凹凸が切り くずによって埋まり、その後の穴加工時には切りくず流出 を阻害しなくなるのではないかと考えられる。

3.2 工具損耗

工具メーカ推奨条件で 2009 穴加工した後のドリルでは、 逃げ面摩耗幅はいずれの工具も約 50 μm と同程度であり、



引き続きドリルの使用が可能な程度であった。ブラストB の1本のみマージンに僅かに欠けがみられたが、残りの1 本と未処理およびブラストAの2本に欠けはなかった。 以上から、メーカ推奨条件ではブラスト処理の有無の差は ほとんどないと判断した。

そこで、2010 穴以降は送り量を推奨条件の 1.5 倍とし、 切れ刃の欠けを確認するまで加工を行った。刃先に欠けを 確認して加工を終了した時点の加工穴数を図 3 に示す。未 処理に対し、ブラストAは2本とも加工穴数が多くなり、 平均で約 30%増加した。ブラストBについても、1本は 加工穴数が未処理よりも多くなった。このことから、ブラ ストBについては明確でないが、ブラストAには工具寿 命延長の効果があるといえる。

図4に、未処理およびブラストAのドリル表面の残留 応力を示す。測定はドリルの刃先やシャンク部など4箇所 で実施し、図4にはそれらの平均値を示した。図より、ブ ラストAが未処理より圧縮残留応力が大きくなっている ことがわかる。これは、ブラストAによりドリル表面に 圧縮残留応力が付与されたことを示している。この圧縮残 留応力の上昇により、き裂の進展を抑制し、欠けの発生タ イミングを遅らせたと考える。

以上のように、切削条件を送り量 1.5 倍としたときにブ ラスト処理の効果が明確にあらわれた。これは、条件変更 の仕方が大きく寄与したと考えている。ドリル加工の場合、 高能率な条件に変更するパラメータには切削速度と送り 量が考えられる。いずれを変更しても加工能率を上げるこ とは可能であるが、切削時の現象には違いが生じる。既往 の研究報告²⁰によると、切削速度を増加すると切削温度が 著しく上昇するが、送り量を増加しても切削温度は大きく は変化しない。今回検討対象としたブラスト処理は、切削 温度上昇への耐性効果は低いと考えられた。そのため、切



図3 刃先に欠けを確認した加工穴数



図4 ドリル表面の残留応力

削速度を増加させるのではなく、送り量を増加させること でブラスト処理の効果が発揮される可能性があると考え た。実際、実験の結果、ブラスト A による工具寿命延長 の効果を確認し、加工能率向上が可能であることを見出す ことができた。

4. まとめ

本研究では、チタン合金(Ti-6Al-4V)のドリル加工を 対象に、切削抵抗や工具損耗に与えるブラスト処理の効果 を検証した。その結果、以下の結論を得た。

- (1) ブラストB(不二製作所製シリウスZ[®])では、1穴目の切削抵抗が加工途中で上昇することなく切削することができた。これは、ブラストBにより溝部の面粗さが小さくなり切りくず流出性が向上したためと考えられた。
- (2) ブラストA(不二製作所製α処理[®])では、未処理に 比べ約30%多くの穴数を加工することができた。こ れは、ドリル表面への圧縮残留応力の付与に起因し てき裂の進展が抑制されたためと考えられた。ブラ ストAにより送り量を高くした加工能率向上が可能 であることを見出した。

【参考文献】

1) 臼杵年, 精密工学会誌, 86, 11, 839-843 (2020).

2) 永禮哲生, 精密工学会秋季大会講演論文集, 885-886
 (2017).

【外部発表】口頭発表1件

有機溶媒がポリメチルメタクリレートの破壊現象に

及ぼす影響について

荒木 真由美(化学技術部 環境安全グループ)
 田中 聡美(化学技術部 環境安全グループ)
 羽田 孔明(化学技術部 材料化学グループ)
 栃木 勲(川崎技術支援部 材料解析グループ)
 阿久津 康久(事業化支援部)

1. はじめに

ポリメチルメタクリレート樹脂 (PMMA) はその高い 透明性や硬度、耐候性に優れていることなどから様々な 用途に用いられている。一方で、非晶性プラスチックで ある PMMA においては、応力存在下、有機溶媒が存在す ると、いわゆる環境応力き裂が生じることが知られてお り¹⁻⁵、その発生過程について議論されている。本研究で は、極性の異なる 2 種類の有機溶媒により、PMMA 板に 環境応力き裂を生じさせた時の破断面及び、PMMA 板を 有機溶媒に浸漬した後に引張破壊した時の破断面形状を 観察し、それぞれの破壊メカニズムについて考察する。

2. 実験

2-1. 試料

市販の PMMA の厚さ1 mm の押出成形板(デラグラス ™ A、旭化成テクノプラス㈱)を用いた。溶媒は非極性 溶媒および極性溶媒としてヘプタンおよびエタノール (いずれも試薬特級、ナカライテスク㈱)を用いた。

2-2. 環境応力き裂試験

以降の実験は室温で行った。155×20×1 mm の短冊型 試験片を切り出し、図1に示すようなハタ金を加工した 治具を用いた。A、Bの2箇所で試験片を固定してたわま せ、破断するまでAB間の距離を縮めつつ溶媒を滴下した。



図1 試験片を固定した状態 2-3. 溶媒浸漬後の引張破壊試験

JIS K7139の多目的試験片タイプ A2の厚さを1mmに変 更したダンベル型試験片を切削加工し、溶媒に10日間浸 漬後、取り出して1日風乾させた。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)) にて、引張速度10mm/min、試験数各n=10で実施した。 溶媒に浸漬していない試験片を対照試験片として、同様 に引張試験を実施した。

2-4. 観察

得られた破断面について、実体顕微鏡 (SteREO Discovery V20、カールツァイス㈱)による観察を行った。

結果及び考察

3-1. 環境応力き裂試験

ヘプタンを滴下した場合はAB間距離40~70mm、液量 300~1200µLで破断した。一方、エタノールを滴下した 場合はAB間距離60~150mm、液量200~400µLで破断 した。アルコール環境下ではアルカン環境下より PMMA のクレイズ発生応力が低く、また、クレイズが急速に成 長して破断に至ることが報告されており¹、本研究でも、 エタノールと接触させた場合、小さいたわみ且つ少ない 液量で破断することが確認できた。得られた破断面を図 2、3に示す。いずれの溶媒でも、環境応力き裂の特徴 である、起点付近が無特徴な鏡面となる破断面^{2,3}が得ら れた。



図2 ヘブタンによる環境応力割れ



図3 エタノールによる環境応力割れ

環境応力き裂が生じる機構としては、応力により歪みや 配向が生じている箇所へ溶媒分子が浸透し、高分子鎖と 溶媒分子とが相互作用することにより分子の運動性が高 まり、高分子鎖間のファンデルワールス結合に乖離が生 じ、き裂に至ると考えられている¹⁻⁵。

3-2. 溶媒浸漬後の引張破壊試験

図4に引張試験で得られた応力-ひずみ曲線の例を示 す。引張試験初期では、いずれの試験片でも一致した弾 性変形挙動を示した。対照試験片では、降伏点に達する とまもなく破断した。ヘプタン浸漬は、対照試験片に近 い挙動を示したものが多かった。エタノール浸漬におい ては、降伏点で一箇所にくびれが生じて、そのくびれ箇 所が両方向に伸展して広がるネッキング現象が観察され るものが多かった。有機溶媒に浸漬することによって、 脆い PMMA が粘りのある性質に変化したと考えられる。



図4 応カーひずみ曲線の例

図5に引張試験で得られた降伏応力の箱ひげ図を示す。 ヘプタン浸漬では対照試験片と比較して降伏応力の中央 値に変化は見られなかったが、エタノール浸漬では降伏 応力の中央値は低下した。ヘプタンと PMMA の間ではフ ァンデルワールス力が働くのみだが、エタノールは PMMA のエステル部位と水素結合しうるため、エタノー ルの高分子鎖間への浸透・拡散による分子間力の低下・ 分子の絡み合いの減少が起こり、軟化し、降伏応力が低 下したと推察される^{1,2,4,6}。



図5 溶媒による降伏応力の違い

図6に引張試験で得られた破断ひずみの箱ひげ図を示 す。ヘプタン浸漬では、対照試験片と比較して、破断ひ ずみの中央値に変化は見られなかった。一方、エタノー ル浸漬によって、破断ひずみの中央値は増大した。メ タノールに PMMA を浸漬すると、破壊に要するモーメン トが増大したという川越らの報告がある¹。その理由とし ては、メタノールが PMMA 表面に膨潤層を形成すると、 表面キズからのクレイズ発生が抑制され、せん断による 流動とき裂発生に変形・破壊モードが遷移するため、と 述べられている。本研究においても、同様に、エタノー ルによる膨潤によって流動性が高まり、クレイズの発生 に対する抵抗性が生じ、破断ひずみが増大したことが示 唆される。破断ひずみのバラつきは、溶媒分子の吸着・ 浸透を含む試験片の表面状態に関する個体差に起因する と考えられる。



箱ひげ図において箱の下端は分布の25%点、上端は 75%点を示し、箱の中の線は分布の50%点(中央値) を示す。ひげの下端は10%点、上端は90%点を示し、 そこから外れた点は〇で示す。

図6 溶媒による破断ひずみの違い

引張破壊後の破断面を図7~9に示す。対照試験片の破

断面では、図7のように、平坦な起点と、塑性変形を伴いつつ亀裂の進展と停止が繰り返されるスティックスリップ模様が観察された³。溶媒に浸漬したものでは、図8、 9のように、起点付近で放射状模様を示す破断面が見られた。この放射状模様は、溶媒に浸漬していないポリカ ーボネートの引張破断面に類似するものであった^{3,7}。



図7 対照試験片の引張破断面 (降伏応力 73.8,破断ひずみ 11)



図8 ヘプタン浸漬後の引張破断面 (降伏応力 73.3,破断ひずみ 23)



図9 エタノール浸漬後の引張破断面 (降伏応力 67.1, 破断ひずみ 6.6)

破断面のパターンと破断ひずみの関係をプロットしたも のが図10である。ヘプタン浸漬のうち、7割は破断ひず みが15%未満であり、それらは対照試験片と同様のステ ィックスリップ模様を示した。残り3割は破断ひずみが 15%以上であり、それらは放射状模様を示した。エタノ ール浸漬では、破断ひずみと破断面パターンとの間に相 関はなかったが、全体の 7 割の破断面が放射状模様を示 した。PMMA を予め溶媒に浸漬することによって破断面 が変化した理由としては、図4の応力-ひずみ曲線から も解釈されたように、脆い PMMA が粘りのある性質に変 化したことが示唆され、その傾向はエタノール浸漬にお いてより強く見られた。



図10 破断面のパターンと破断ひずみの

4. まとめと今後の展開

本研究では、極性の異なる2種類の有機溶媒により、 PMMA板に環境応力き裂を生じさせた時の破断面及び、 PMMA板を有機溶媒に浸漬した後に引張破壊した時の破 断面形状を観察した。

たわませた PMMA 板にエタノール或いはヘプタンを滴 下すると、起点付近が無特徴な鏡面となる、典型的な環 境応力き裂の破断面が得られた。一方、PMMA 板をこれ らの有機溶媒に浸漬後、引張試験を行ったところ、ネッ キング現象を生じ、起点付近に放射状模様を呈するもの が観察された。硬くて脆い PMMA に有機溶媒が浸透する ことによって膨潤し、軟らかく粘りのある性質に変化し たことが示唆された。

上記の実験から、応力と有機溶媒が同時に存在する時 に起こる環境応力き裂と、有機溶媒浸漬後に引張応力を 負荷することによる引張破壊とでは、破壊過程が異なり、 それが破断面の違いに現れることが明らかになった。

今回の結果は、有機溶媒を使用する環境下での、プラ スチックの割れトラブルの把握に役立つものである。

今後も、種々の環境因子により、プラスチック材料が どのような影響を受けるのか、引き続き検討を行う。

【参考文献】

1. 川越誠ほか、高分子論文集、Vol. 51, No. 3, pp.149-156 (1994)

2. 成澤郁夫ほか、「高分子材料のフラクトグラフィ」S&T 出版 (2011) 3. 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)

4. 徳満勝久ほか、成型加工、第 29 巻、第 8 号、pp. 302-308 (2017)

5. 高橋 秀明、成形加工、32 巻、2 号、 pp. 38-42 (2020) 6. 中野詔彦、長谷川澄子、繊維学会誌、 Vol.42, No.7,

pp.59-66 (1986)

7. 荒木真由美ほか、(地独) 神奈川県立産業技術総合研究 所 研究報告、pp. 59-60 (2020)

非線形粘弾性解析によるクリームの塗り心地評価への応用

武田 理香、津留崎 恭一(化学技術部材料化学グループ) 鈴木 皓介(横浜国立大学大学院)、小林 廉(横浜国立大学)

1. はじめに

化粧品クリームには様々な感触があり、その塗り心地評価はパネリストによる官能試験が主となる。しかし、官能試験では、結果の表現の曖昧さやパネリストの嗜好の違いが結果に影響することから、客観的かつ定量的な物性試験による評価が求められている。クリームの感触は、エマルションの構造などが関与し、塗布時の歪により初期構造が変形・崩壊することで変化する¹⁾。

定量的な評価方法のひとつに、動的粘弾性測定がある。 歪走査測定においては、微小歪の範囲内であれば線形粘弾 性(LVE)指標 G'は歪に依らず一定となるが、その範囲 を超えると一定とはならない非線形粘弾性(NLVE)が現 れる。一般に NLVE 領域がエマルションの構造変化を表す とされている²⁻³⁾。図1にクリームの歪依存性結果を示す。 最大歪_nが 30%あたりから G'は低下しているが、領域を 断定することは難しい。

我々はこれまで、ゴム材料を対象に歪γ・歪速度γ・応力 σの3次元リサージュ曲線(3D-Lis)の形状を数値化する ことで NLVE 特性を評価してきた⁴⁹⁾。本研究では、この NLVE 指標を用い、化粧品クリームの塗り心評価への応用 を検討する。

2. 解析方法

解析方法として、3D-Lis の等時間間隔の 3 点を局所部分 の円弧とみなし、曲率 κ を求める。 κ は曲率半径 ρ 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。 \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 (図 2)。

$$\mathbf{e}_1 = \frac{d\mathbf{r}}{ds} \tag{1}$$

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

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

 e_1 '方向の単位ベクトルを主法線ベクトル e_2 とし、 e_1 'の 大きさを κ で表す。

$$\mathbf{e}_1' = \kappa \, \mathbf{e}_2 \equiv \mathbf{\kappa} \tag{3}$$

(1)と(3)より、Kは位置ベクトルの二階微分で与えられる。 e1と e2に対する直角方向の単位ベクトル e3とする。この様に設定した e1、 e2、 e3をフレネの標識と呼び、公式からKを求めることができる。r は捩率と呼ばれ,曲線が平面上にあるときは0となる。

$$\begin{pmatrix} \mathbf{e}_{1}' \\ \mathbf{e}_{2}' \\ \mathbf{e}_{3}' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & \kappa & 0 \\ -\kappa & 0 & \tau \\ 0 & -\tau & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{e}_{1} \\ \mathbf{e}_{2} \\ \mathbf{e}_{3} \end{pmatrix}$$
(4)

規格化した 3D-Lis のパラメータ (χ, χ, σ) は以下のように表示できる。

$$\mathbf{r}(t) = \left(\sin \omega t \quad \cos \omega t \quad \sigma(t)\right)$$
(5)
(1)、(4)、(5)より、_K = |d²**r**/ds²| が得られる。

曲率ベクトル κの時間変化の公式は次のようになる。

$$\mathbf{\kappa} = \dot{\mathbf{e}}_{1} / \dot{s} = \left(-\vec{\omega}^{2} \sin \omega t - \frac{\omega \dot{\sigma}^{2}}{\omega^{2} + \dot{\sigma}^{2}} \cos \omega t - \vec{\omega}^{2} \cos \omega t + \frac{\omega \dot{\sigma}^{2}}{\omega^{2} + \dot{\sigma}^{2}} \sin \omega t - \vec{\sigma}^{2} - \frac{\dot{\sigma}^{2} \ddot{\sigma}}{\omega^{2} + \dot{\sigma}^{2}} \right) / \left(\omega^{2} + \dot{\sigma}^{2} \right)$$
(6)

曲率 κ は κ の絶対値で与えられる。

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

また、円とみなした 3D-Lis が平面であれば外角の総和 Θ は 2 π となるが、ゆがむと 2 π 以上になる幾何学定理を用いる ⁸⁾。 Θ は、3D-Lis 全体のゆがみ具合の評価に有効である。

$$\Theta = \oint_{\text{3D-Lis}} \kappa ds = \oint_{\text{3D-Lis}} \sqrt{\omega^2 + \frac{\ddot{\sigma}^2}{\omega^2 + \dot{\sigma}^2}} \frac{\omega}{\left(\omega^2 + \dot{\sigma}^2\right)^{3/2}} dt \quad (8)$$



3. 実験

試料には、株式会社コーセーから提供頂いた化粧品クリ ームを用いた。データ取得には、捩じり振動型の動的粘弾 性測定装置(TA Instruments 社製 ARES-G2)を使用した。 測定条件として、振動数は1 Hz、最大歪 μ は10%から 100%までは10%刻み、100%から1000%までは100%刻 みで走査した。各 μ において、 μ が1周する間に σ を等時 間間隔で512点測定した。温度は室温とした。

4. 結果

先ず、図 3 に 3D-Lis 全体のゆがみ度合いを表す Θ (●) と、G' (▲) のp依存性を示す。 Θ は、p=30%までは 6.28 ($\approx 2\pi$) となり、LVE であることが分かる。

その後、 Θ はp=40%からp=100%まで急激に増加する。 p=200%以降の Θ は、緩やかに増加している。このように、 NLVEの始まりや2段階の振舞いを Θ によって明確に示す ことが出来る。

一方、G'はn=30%辺りから単調に減少するが、明確な NLVEの開始や、Oでみられたような段階的な NLVE 変化 を読み取ることは難しい。

次に、3D-Lisの形状を詳細に把握するため κの1周期分 布を図4に示す。紫矢印はγが最大の時間(0.25 s と 0.75 s)、 緑矢印はγが0の時間(0.5 s)となる。

図 5 にp=30%からp=100%における κ の時間変化を示 す。p=30%は、左右対称の山・谷がみられ、視覚によっ ても LVE であることが確認できる。p=40%以降になると ピーク位置が右(0.3 s と 0.8 s 付近)にシフトし始め、シ フトしたピークとは別に左(0.1 s と 0.6 s 付近)も κ が増 大し(p=80%)、ダブルピークとなる(p=100%)。

図 6 にn=200%からn=1000%における κ の時間変化を示す。n=200%以降ではダブルピークが徐々にフラットになっていくが、その形状変化は緩やかである。

このように k を追うことでも、段階的に変化する NLVE の振舞いを詳細に把握することが出来る。



図3 ΘとG'の% 依存性



図 4 クリームの 3D-Lis(左上) と κ の 1 周期分布(右下) _%=1000 %



図 5 κ 時間変化 (γ_0 =30%、40%、80%、100%)



5. 考察とまとめ

NLVE 指標を用いてクリームの感触評価への応用を試 みた。 Θ のp依存性については、NLVE が 2 段階に変化す ることが分かった。また、 κ の時間変化を調べたところ、 1 周期の振舞い(ピーク形状)がpにより大きく異なるこ とが分かった。

κの時間による形状変化(図5と図6)からクリームの 構造について以下のように考察する。クリームは、大きな μを与えることで初期構造から変形し、崩壊することで感 触が変わるといわれている。図7に歪による構造変化のイ メージ図を示す。κ形状変化の1段階目では、初期構造か らの変形を、2段階目では構造の崩壊を捉えていると想像 する。

今後、初期構造がどの程度の歪まで保たれているかを確認する必要がある。具体的には、μ0=100%と1000%で測定したサンプルに対してそれよりも低歪で再度測定し、κの時間による形状変化が元に戻るかを確認する。これにより、構造の変形が可逆的か否か判断することができる。

κは官能評価と結びつけることで塗り心地の指標とな り得る。さらに、製品設計や品質管理の応用も期待できる と考える。このため、塗り心地の異なるクリームの比較評 価や温度を変えたときの評価についても研究を進めてい る。



図7 歪による構造変化のイメージ図

謝辞

本研究を進めるにあたり、株式会社コーセーから化粧品 クリームのサンプルをご提供いただき、同社 末松 健氏 からは貴重なご助言を賜りました。深謝の意を表します。

【参考文献】

- 1. 岡本亨、日本化粧品技術者会誌、44(3),199 (2010)
- 2. 山縣、仙名、日本レオロジー学会誌、27,155 (1999)
- 3. 中川泰治、日本レオロジー学会誌、41,189 (2013)
- 4. 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).
- 5. 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).
- 6. 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).
- 7. 武田、柴田、津留崎、KISTEC研究報告、2019.
- 8. 武田、津留崎、KISTEC研究報告、2020.
- 9. 津留崎、武田、高分子学会誌、Vol.70,No.5,238-239 (2021)

【外部発表】口頭発表 2件、 論文等発表 1件

アミロースによるフタル酸エステル類の分子吸着挙動

1. はじめに

フタル酸エステル類は樹脂の可塑剤として広く用いら れているが内分泌かく乱物質として懸念されており、近 年、EUの RoHS 指令¹に記載されるなど環境規制の対象 物質となっている。そのため、フタル酸エステルを検出 する技術の需要が高まっている。現在の規制は樹脂製品 へのフタル酸エステル類含有量を対象としたものであり、 固体に対する含有率の算出²や検出を目的としたものが積 極的に開発・規定されている。一方で水環境へのフタル 酸エステル類の流出も懸念すべき問題の1つである。し かし、フタル酸エステル類の水環境への流出については、 現状管理目標程度にとどまっている。その検出方法は濃 縮を伴う GC-MS 測定による煩雑なバッチ式であり³、積 極的に検討されている検出方法も同じくバッチ式のクロ マトグラフィーを用いたものである。しかし、製品と異 なり水環境は絶えず変化するため、流出量を簡便で連続 的に測定可能な技術が望まれる。

そこで本研究は多糖類のアミロースを用いたフタル酸 エステル類の分子吸着について検討した。アミロース分 子鎖はらせん構造を形成し、らせん内部に様々な分子を 包接できる^{4.5}。この分子吸着可能なアミロースとナノグ ラムオーダーで質量変化の検出可能な水晶振動子マイク ロバランス(QCM)法を組み合わせることで、水環境中の 微量分子の検出がリアルタイムで可能になる⁶。しかし、 アミロースによるフタル酸エステル類の吸着挙動はこれ までに報告されておらず、その可能性について精査する 必要がある。そのため、本研究では水中におけるアミロ ースフタル酸エステル類の複合体形成について、物質添 加により生じる沈殿量および沈殿物の X 線構造解析によ り検討した。また、QCM センサー上にアミロース膜を塗 布し、QCM 法によって水中に存在するフタル酸エステル 類の吸着挙動について明らかにした。

2. 実験

2.1 試料

アミロースは市販のでんぷん(北海道産ジャガイモ使 用)を Schoch のブタノール法 ^{7,8}で精製して得た。青価 ⁹ は1.14であった。超純水にはMilli-Q水(Merck)を用いた。 その他の試薬は購入したものをそのまま用いた。

 2.2 水溶液中でのアミロース複合体形成実験 1.11gのアミロースを50mLのイオン交換水に分散し、
 15mLの1MNaOH水溶液を加えて溶解した。1M塩酸で pH6まで中和し、500mLに定容した。調製したアミロー 水野陽介(化学技術部 材料化学グループ)

ス溶液は 45 mL 分取し、密閉容器中で沸騰させた。添加 する物質を1 mLのメタノールまたはエタノールに溶解し 4 mLのイオン交換水で乳化させ、分取したアミロース溶 液に添加した。添加後、90℃程度のお湯で満たしたデュ ワー瓶の中で徐冷した。2-3 日後に水溶液中に沈殿が生じ ているか、目視で確認を行った。生じた沈殿物は 10000 rpm で遠心分離を 15 分間行い回収した。さらに、メタノ ールで数回洗浄して 40 ℃で真空乾燥を行った。その後、 沈殿物を秤量してアミロース添加量との重量比を得た。 添加物質にはフタル酸エステル類 6 種およびセバシン酸 エステル類 2 種を用いた。

2. 3 X 線回折 (XRD)

乾燥した沈殿物を粉末状にした後、ガラス板製の試料 ホルダー(試料部深さ 0.2 mm)に充填し、Ultima-IV(リ ガク)で室温にて測定を行った。検出器はシンチレーシ ョンカウンターまたは高速一次元検出器 D/teX Ultra を用 いた。X 線源は Cu 封入管球(波長 λ = 1.54187 Å)で管電 流、管電圧はそれぞれ 40 mA および 40 kV とした。スキ ャン範囲は 2 θ = 5-25(deg)とした。

2. 4 アミロース塗布 QCM センサーの作成

100 mgのアミロースを沸騰したイオン交換水 50 mLに 加え溶解させる。10 vol%程度のブタノールを添加し、徐 冷することで生じた沈殿を遠心分離により回収し、ブタ ノール複合体を得た。次に、ブタノール複合体がアミロ ースの乾燥重量換算で 1 µg となるように超純水に分散し た上でセンサー電極上に30 µL 滴下し、さらにブタノール を 5 µL 滴下した。滴下した溶液を自然乾燥させた後にメ タノールで数回洗浄し、真空乾燥することでアミロース 塗布 QCM センサーを作成した。

2. 5 QCM 法

測定には NAPiCOS システム(日本電波工業)および 30MHz ツインセンサーを用いた。そのシステムの概略図 をFig.1に示す。測定温度は恒温チャンバーを用いて25 °C とした。キャリヤーは超純水を真空脱気して用いた。流 量は10 μL/minとした。重量変化量 Δm は周波数の変化量 ΔF から Sauerbrey の式¹⁰より求めた。

$$\Delta m = \frac{S\sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}}{2N \cdot F_0^2} \left(-\Delta F\right)$$

ここで、 F_0 : 公称周波数 (30.834 MHz)、S: 電極面積 (0.075 cm²)、 ρ_q : 水晶の密度 (2.65 g/cm³)、 μ_q : 水晶のせん 断応力(2.95×10¹¹ g·cm^{-1·s⁻²})、N:オーバートーン次数(1)で ある。つまり、 $\Delta m/\Delta F = -0.035$ (ng/ Hz)となる。



Fig.1 QCM system.

3. 結果·考察

3.1 水溶液中でのアミロースのフタル酸エス テル類との複合体形成

添加物質濃度が 0.02 %(w/v)の場合、添加物質を加えて いない参照試料も含めてすべての試料で沈殿が生成した。 そこで参照試料よりも多くの沈殿が生じた試料において 添加物質による沈殿が生成していることとした。添加物 質による沈殿生成の有無を Table 1 にまとめた。

Table 1 アミロース水溶液への物質添加による沈殿生成の有無

添加物質	沈殿の生成
フタル酸ジブチル	×
フタル酸ブチルベンジル	\bigtriangleup
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	×
フタル酸ジシクロヘキシル	×
フタル酸ジイソデシル	×
フタル酸ジメチル	×
セバシン酸ジ(2-エチルヘキシル)	×
セバシン酸ジブチル	\bigcirc

特異的に沈殿が生成したと考えられるのはセバシン酸 ジブチル(DBS)のみであった。その沈殿量は 32.5wt %であ り、参照試料の 4.6 wt%に対して多くの沈殿が生じた。フ タル酸エステル類に関して添加物質濃度を 1 %(w/v)とし た場合では、フタル酸ブチルベンジル(BBP)を添加した系 における沈殿量がアミロース添加量に対して 9.1 wt%であ った。この沈殿量は、リファレンスの沈殿量(7.8 wt%) に対してわずかながら大きく、BBP において特異的な沈 殿が生じた可能性がある。

DBS および BBP 添加により生成した沈殿物 (それぞれ AM-DBS、AM-BBP とする)の XRD 測定結果を Fig.2 に 示す。AM-DBS では 2 θ = 7.71, 13.09, 20.08 (deg)において回 折ピークが観測され、左巻き 6/5 らせんのシングルへリッ クスの V₆-amylose¹¹ とよく似た回折パターンであった。こ のことから水中のアミロース分子は DBS を包接し V₆amylose を形成することが示唆された。一方で、AM-BBP ではピークがブロードなことから、多くの成分はアモル ファスである。検出された主要なピークは 2 θ = 5.39, 8.60, 16.97 (deg)であった。ここで、20= 5.39 (deg)のピークはシ ンチレーションカウンターを検出器に用いた測定で観測 されている。20= 5.39, 16.97 (deg)のピークは、右巻き 6/1 らせんの 2 本らせん構造を形成した B-amylose¹²の回折パ ターンにおける高強度のピークと一致していた。この結 果から、BBP 添加時の沈殿物はアミロース分子の多くが ランダムコイルであり、一部 2 本のアミロース分子が絡 まりあっている状態であることが示唆された。そのため、 水中においてアミロース分子は BBP を包接しないと考え られる。

DBS の添加時のみアミロースによる包接が示唆された 結果を踏まえて分子包接選択性を考察する。DBS はエス テル基、セバシン酸骨格ともに柔軟であり、アミロース 分子によって包接が容易であったと考えられる。一方で フタル酸骨格は剛直であり、オルト位にエステル基が存 在してかさ高いため、フタル酸エステル類は十分に包接 されなかったと考えられる。



Fig.2 XRD patterns of (A) AM-DBS and (B) AM-BBP.

3.2 アミロース薄膜への物質吸着

QCM 法において DBS および BBP 飽和水溶液をそれぞ れ 100 μL 注入した際のアミロース塗布電極と参照電極の 周波数差分 F_{CH1}-F_{CH2}の時間変化を Fig.3 に示す。DBS を 注入した系では参照電極、アミロース塗布電極ともに周 波数の低下が見られ FcH1-FCH2の変化量 Δ Fは-1.2 Hzであった。これはアミロース塗布電極において 4.2 pg の物質吸着を示している。BBP を添加した系においても同様にFcH1-FCH2の減少が見られた。 Δ Fは-2.4 Hzであり、8.4 pg の物質吸着が起こった。BBPの水溶解度(25°C)は2.69 ppm と知られており¹³、アミロース塗布センサーを用いることで水中に低濃度で存在する BBP の検出が可能であった。

QCM 法で検出された物質の吸着は、水溶液中でのアミ ロースと添加物質の複合体形成の有無に関わらず起こっ た。そのため、アミロース薄膜における DBS や BBP の分 子吸着メカニズムは水中でのアミロース分子の包接と異 なると考えられ、更なる検討が必要である。



Fig.3 Frequency responses of amylose coated QCM sensors to injections of 100 μ l of saturated aqueous solutions of (A) DBS and (B) BBP. Arrows indicate the sample injection points.

4. 結論と今後の展望

じゃがいもでんぷんより精製したアミロースを用いて フタル酸エステル類を中心とした分子吸着の検討を行っ た。アミロース水溶液中ではフタル酸エステル類の添加 による沈殿量は参照試料と同等であった。また、BBP を 添加した系の沈殿物の多くはアモルファスであり、一部2 本らせん構造の B-amyloseを形成していた。このことから、 水中においてアミロース分子はフタル酸エステルを包接 しなかったと考えられる。一方、DBS を添加した場合、 アミロース分子によって包接され 1 本らせん構造の V₆amylose を形成することが示唆されたことから、フタル酸 エステル分子のかさ高さが包接の障壁となったと考えら れる。QCM 法を用いたアミロース膜への分子吸着評価で は DBS だけでなく BBP を注入した系においても、わずか ながら対象分子が吸着されることが明らかになった。こ のことから、アミロース塗布 QCM センサーによるフタル 酸エステル類の検出可能性が示された。

今後の展開として、アミロース膜への分子吸着メカニ ズムが不明であるため、温度や濃度といった条件検討に より吸着挙動の時間依存性や吸着量の変化を検討する。 得られた結果から吸着様式を明らかにし、そのメカニズ ムを解明していく。さらに、吸着挙動が最大となる条件 を検討することでフタル酸エステル類の環境モニタリン グシステムへの応用へとつなげていきたい。

【謝辞】

QCM 法において貴重なご助言をいただきました関西大 学 伊藤 健 教授に感謝いたします。

【参考文献】

(1) European Union, *O. J. E. U.*, L 174, 1. 7. 2011, 88-110 (2021).
 (2) IEC 62321-8:2017, Determination of certain substances in electrotechnical products – Part 8: Phthalates in polymers by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography-mass spectrometry using a pyrolyzer/thermal desorption accessory (Py/TD-GC-MS).

(3) JIS K0450-30-10, 工業用水・工業排水中のフタル酸エス テル類試験法(2006).

(4) T. Kuge, K. Takeo, *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1232-1238 (1968).
(5) C. A. K. Le, *Doctoral Thesis*, University of Grenoble Alpes,

(5) C. A. K. Le, *Doctoral Thesis*, University of Grenoble Alpes, Grenoble (2018).

(6) Z. Cao, T. Tsoufis, T. Svaldo-Lanero, A.-S. Duwez, P. Rudolf, and K. Loos, *Biomacromolecules*, 14, 3713-3722 (2013).

(7) 福場 博保:アミロースとアミロペクチンの分別. 澱粉 科学ハンドブック(中村道徳、鈴木繁男 編), p.170-173 (1977).

(8) T. J. Schoch, Method in Enzymol., 3, 5-6 (1954).

(9) R. M. McCready and W. Z. Hassid, J. Am. Chem. Soc., 65, 1154-1157 (1943).

(10) G. Sauerbrey, Z. Phys. 155, 206-222 (1959).

(11) R. E. Rundle, F. C. Edwards, J. Am. Chem. Soc., 65, 2200-2203 (1943).

(12) A. Imberty, S. Perez, Biopolymers, 27, 1205-1221(1988).

(13) D. Mackay, W. Y. Shiu and K. C. Ma ed.: Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, Vol. IV: Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Containing Compounds, Boca Raton, CRC Press, p.668-676 (1995).

透明樹脂材料の劣化に関する総合的解析

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、製品トラブルとなることが少なくない。

プラスチックの劣化に関す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 速に把握し、原因究明につながる情報を提供することが求 められている。

そこで、筆者らは、プラスチックの劣化について、状況 に応じた適切な解析法選定のための指針を得ることを目 的とし、種々の評価手法を用いて総合的に劣化解析を進め てきた¹⁻³⁾。プラスチックとしては、ガラス代替材料とし て、レンズや窓ガラス、光ファイバーなど幅広く光学用途 に使用される透明プラスチックに着目した。本報では、代 表的な透明プラスチックであるポリカーボネート (PC) とポリメタクリル酸メチル (PMMA)の耐候劣化について、 力学特性、光学特性、ならびに、化学構造を分析評価し、 材料の違いによる劣化現象の差異や特徴について、新たな 結果や知見も加えて報告する。

2. 実験

2.1 試料

PC は、三菱ガス化学(株)から提供された、ユーピロ ン・フィルム FS-2000 (厚さ 100 μ m)を、PMMA は、 三菱ケミカル(株)から提供された、アクリプレン・フィ ルム HBS006 (厚さ 50 μ m)を、そのまま試験・分析に 供した。

2.2 促進耐候性試験

キセノンアークランプを光源とし、表1の通り水噴霧を 行わない条件(a)と水噴霧を行う条件(b)で試験を行っ 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、示差熱熱重量測定装置 TGA/SDTA851(メト

	条件 a 水噴霧無	条件 b 水喑靄右	
試験機	FAL-25X-HC-B・EC (スガ試験機㈱製)	WEL-75XS-LHP-BEC (スガ試験機㈱製)	
放射照度 (300~400 nm)	48 W/m ²	$60\pm3~\mathrm{W/m^2}$	
ブラック パネル温度	63°C	63°C	
水噴霧条件	_	60 分照射中 12 分噴霧 噴霧圧 0.8~1.2 kgf/c ㎡	

表1. 促進耐候性試験条件

ラー・トレド(株)製)により昇温に伴う重量減少を評価 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µm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

表2に空気雰囲気でのTGA 測定から求めた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認 められ、PCの方がPMMAより顕著であった。またPCで は水噴霧を行った場合の方が行わない場合より重量減少 温度の低下が大きく認められた。

重量減少温度の低下は主鎖の切断により分子量が低下 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。PCの方が PMMAより重量減少温度の低下が顕著で あったことから、PCの方が PMMAより低分子化が進んで いることが示唆された。この低分子化については、主鎖の 切断反応の違いに起因する可能性が考えられる。樹脂の

	2%重量減少温度 [℃]			
星雲時間	PC		PMMA	
來路时间	水噴霧	水噴霧	水噴霧	水噴霧
	有	無	有	無
0h (暴露前)	41	7.5	29	3.4
100 h	395.6	408.9	289.9	290.7
200 h	388.4	402.0	289.3	289.6
400 h	370.7	384.8	287.2	287.8
800 h	323.1	349.5	286.6	285.9

表 2. TGA 測定から求めた各暴露時間における 2%重量減少温度



図1. 予測されるポリカーボネートの劣化反応

熱分解過程に着目すると、PC はランダム分解型、PMMA は解重合型で主鎖が切断されることが知られている⁴⁾。光 劣化過程においても、熱分解過程と同様のメカニズムで主 鎖の切断が進むため、主鎖の切断がランダムに起こる PC では低分子化が進み、重量減少温度の低下が顕著であった と推察される。また、PC で水噴霧を行った場合には、図 1 に示すように、光・熱による酸化劣化反応に加え、加水 分解反応が起きるため、低分子化がより進行したと考えら れる⁵)。

図2に赤外吸収スペクトルの変化を示す。PCにおいて は、3500 cm⁻¹付近にバンドの生成と1765 cm⁻¹のバンド幅 の低波数側への広がりが観測された。ここで、3500 cm⁻¹ は水酸基の吸収に帰属される。また、1765 cm⁻¹はPCの炭 酸エステル基(O-CO-O)の吸収に帰属され、その低波数 側へのバンド幅の広がりは、図1に示すフェニルサリチレ ートの生成に伴うエステル基(COOR;吸収ピーク1730 cm⁻¹近傍)、やジヒロドキシベンゾフェノンの生成に伴う ケトン基(C=O;吸収ピーク1620 cm⁻¹近傍)の吸収に由 来すると推察される。これより、PCでは、炭酸エステル 結合の切断や、光フリース転位反応により、劣化が進行し ていることがわかった。また、赤外吸収スペクトルの変化 は水噴霧無しで暴露した場合の方が顕著であった。加水分 解は、より不安定な光フリース転位生成物を起点として進



図 2. 800h 暴露後の赤外吸収スペクトルの変化



図 3. 暴露時間に伴う PMMA の赤外スペクトルにおける カルボニルバンドの半値全幅の変化

行しやすいと考えられることから、水噴霧無しの方が見か け上、最終的な光フリース転位生成物の量が多くなったと 推察される。

一方、PMMA では、1720cm⁻¹ 付近のカルボニルバンド が僅かに増大していたものの、測定波数領域全体では、顕 著な変化は見られなかった。エステルより 10cm⁻¹ 強、低 波数側に赤外吸収を示すケトンやアルデヒド基の生成、あ るいは極性基の増加に伴う分子間相互作用の変化により カルボニル半値幅が増大したことが考えられるが、PMMA の劣化は単位構造の変化を伴わない主鎖の切断が主な反 応であったと考えられる。

図4に XPS C1s スペクトルを示す。PC では炭酸エステ ル基(291 eV)のバンド強度の減少と、C=O(288 eV)、 COO(289.3 eV)バンドの生成ならびに C-O(286.8 eV) バンドの上昇が観測された。一方、PMMA では C=Oバン ドの生成、COO ならびに C-O(~287 eV)バンドの上昇 が観測された。XPS 分析の結果は、PC と PMMA、いずれ の材料においても赤外分光分析の結果と矛盾しないもの であった。

次に、上述の劣化現象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に引張試験による引張強さならびに破断伸びの変 化を示す。PCでは、図中に示したように、暴露200時間 までは塑性変形した後、破断に至ったが、暴露400時間以 降は塑性変形を伴わず破断した。TGA測定から求めた2% 重量減少温度は400時間以降大きく減じており、低分子化



図 4. 800h 暴露後の XPS C1s スペクトルの変化

により、脆化が進み、塑性変形せずに破断したと考えられる。

また、引張強さは暴露に伴い徐々に低下したが、破断伸 びについては、水噴霧を行わない場合には400時間で、水 噴霧を行った場合には200時間で急激な低下が認められ た。PCでは400時間で、塑性変形後に破断するモードか ら脆性的な破壊挙動に転じるため、破断伸びがほぼ0%に なったと考えられるが、水噴霧を行った場合には、水がカ ルボニルなどの極性基を有する分子鎖に侵入・吸着するこ とで、分子鎖の絡み合いの一部をほどき、200時間で塑性 変形時の伸びが低下したと推察される。

一方、PMMA では、いずれの条件においても塑性変形 を起こした後、破断に至った。また、引張強さに変化はほ ぼ見られなかったが、水噴霧を行った場合のみ、破断伸び が、暴露 100 時間で大きく低下した。破断伸びの低下は、 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



図 5. 暴露時間に伴う引張強度ならびに破断伸びの変化

になっている状況下で引張応力をかけた場合に、応力を緩 和することができず、構造内部でミクロボイドが発生し、 繊維状高分子鎖の束(フィブリル)と空げきから構成され るクレイズに成長し、破壊に至ったためと推察される⁶⁷。 水噴霧を行った場合では、PCの時と同じく、水が分子鎖 に侵入し・吸着し、分子鎖の絡み合いを変化させることに より、ボイドの形成を加速した可能性があると考えられる。

一方、PMMA でほぼ変化がなかった引張強さは、フィ ブリルの強度に対応すると考えられる。このフィブリルの 強度は数平均分子量に依存することが知られている⁸。す なわち、PMMA では暴露による分子量の大きな変化はな かったと推察され、TGA 測定において重量減少温度の低 下が小さかったことと矛盾しないものであった。

図6に可視吸収スペクトルの変化を示す。PCでは暴露 により400nm近傍の吸光度が上昇し、試料の黄変が認め られた。吸光度の上昇は、PCの紫外線照射に伴う光フリ ース転位反応による生成物であるフェニルサリチレート

(吸収の極大:320 nm)ならびにジヒドロキシベンゾフェ ノン(吸収の極大:355 nm)に起因する⁴。一方、PMMA の劣化は主鎖の切断が主たるもので、黄変物質は生成され ないことから、可視域の吸光度に変化は見られなかった。



図 6. 800h 暴露後の可視吸収スペクトルの変化

評価項目	劣化として観測された事象	劣化の度合い	劣化を確認できた 暴露時間
熱分析	重量減少温度の低下	水噴霧有 >水噴霧無	100 時間
赤外分光測定	炭酸エステル結合の切断	水噴霧有< 水噴霧無	800 時間
X線光電子分光測定	エステル、ケトンの生成	水噴霧有< 水噴霧無	800 時間
引張試験	破断伸びの低下	水噴霧有 >水噴霧無	200 時間(水噴霧有) 400 時間(水噴霧無)
紫外可視分光測定	吸光度の上昇 (黄変)	水噴霧有≈水噴霧無 ※水噴霧無の方がやや大	100 時間

ポリカーボネート

ポリメタクリル酸メチル

評価項目	劣化として観測された事象	劣化の度合い	劣化を確認できた 暴露時間
熱分析	重量減少温度の低下	水噴霧有≈水噴霧無	100 時間
赤外分光測定	カルボニルバンドの半値幅 上昇	水噴霧有≈水噴霧無	200 時間
X線光電子分光測定	C=O(ケトン、アルデヒド)の 生成	水噴霧有≈水噴霧無	200 時間
引張試験	破断伸びの低下	水噴霧有のみ	100 時間(水噴霧有)
紫外可視分光測定	_	_	_

表 3. 各評価法で観測された劣化現象

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、透明 プラスチック材料である PC と PMMA を対象に、促進耐 候性試験を行い、各種分析、評価を行った。表3に今回検 討した5つの評価法により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。評価法によって、劣化進 行を検出可能な暴露時間が異なっており、劣化進行の各ス テージにおいて適した評価手法の選択が重要であること が示唆された。

ただし、本研究では厚さ 50 µm、あるいは 100 µm の フィルムを対象としている。厚みのある試料では、引張試 験などで観測される強度の低下は劣化の後期に観測され ると推察され、光学特性や試料表面採取物の熱特性、ある いは表面の化学構造の変化から劣化の進行を予測する必 要があると考えられる。

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りたい。

【参考文献】

- 1. 村上他, KISTEC 研究報告, 59 (2018).
- 2. 村上他, KISTEC 研究報告, 60 (2019).
- 3. 村上他, KISTEC 研究報告, 61 (2020).
- 4. 三方他, 新日鉄技報,360,38 (1996)
- 5. A. Rivaton, Polym. Degrad. Stab., 49, 163 (1995).
- 6. 成沢郁夫, 日本金属学会会報, 27, 650 (1998).
- 7. 新田晃平, 高分子論文集, 73, 281 (2016)
- 8. 石川優, 高分子, 47, 326 (1998).

オゾン水と紫外線を用いた

環境にやさしい綿布や麻布の漂白方法

濱田健吾、落合 剛(川崎技術支援部 材料解析グループ)

1. はじめに

天然繊維製品の製造工程では、アルカリ薬剤や界面活性 剤を用いる精練プロセス、塩素系薬剤を用いて高温処理を 行う漂白プロセス等がある。これらの処理過程はエネルギ ー多消費型であり、加えて、環境負荷の観点からも改善が 求められる。近年、これら処理に代わる新たな処理技術と して AOT(Advanced oxidation technology)が期待されている。 しかし、オゾン水と紫外線を組み合わせた AOT 処理では、 その後の高温乾燥時に生地の色が白から黄に変色する(色 戻り)問題がある。色戻りの原因としては、AOT 処理と加 熱によりセルロースが酸化されることで生じる共役結合 が考えられている。そこで、色戻りの防止を目的に AOT 処理と還元剤処理を組み合わせた処理技術を確立した。処 理前の綿布に、AOT 処理および還元処剤理を行い、生地 の色の変化を反射スペクトル測定によって評価した。還元 剤には、ハロゲンフリーで知られるロンガリット試薬を用 いた。

2. 実験及び結果

図1のように、電解生成されたオゾン水(1.0 ppm)を流量 1.5 L/min で漂白前の綿布に滴下した。同時に UV スポット 光をオゾン水の滴下位置に照射した。



図 1. AOT 処理方法

図2には、各AOT処理時間における綿布の反射スペクトルを示す。処理時間が増えるにしたがい反射スペクトル は増加した。60分間の処理で従来法と同程度まで漂白された。図3には各試験条件での、綿布の反射スペクトルを 示す。ロンガリット処理なしで高温乾燥したサンプル(緑) はAOT処理後のスペクトル(黒)から反射スペクトルが減少したのに対して、ロンガリット処理後に高温乾燥したサ ンプル(赤)では、スペクトルの減少はなく、AOT処理後の サンプル(黒)と同等の反射スペクトルを示した。



図 2. 各 AOT 処理時間による 綿布の漂白過程における反射スペ クトルおよび外観の変化。比較として従来法で漂白した綿布(黒 線)を示す。



図 3. 各試験条件での、綿布の反射スペクトルと外観図。緑線: ロンガリット処理なしで高温乾燥した。赤線:ロンガリット処理 後に高温乾燥した。黒線:60分の AOT 処理後。



図 4. 水滴による撥水性試験。精練および漂白前の綿布(左)と 30分の AOT 処理後の綿布(右)。

図 4 は、精練および漂白前の綿布と AOT 処理後の綿布 の撥水性を検証した写真である。精練および漂白前の綿布 (左)では、水滴が生地に浸透しないのに対して、AOT 処理 後の綿布(右)は、水滴が生地に浸透した。

3. 考察及び今後の展開

本研究の結果、オゾン水とUV を組み合わせた AOT 処 理では、綿布を従来法と同程度まで漂白することが可能で あった。また、AOT 処理後の高温乾燥処理時に生じる色 戻りについては、還元剤であるロンガリットによる処理で 防止できた。また、精練前の綿布に実施した AOT 処理で は、綿布表面が親水性となった。これは、精練前の綿布に 含まれるワックス成分が AOT 処理により除去されたため であると考えられる。したがって、オゾン水と紫外線を組 み合わせた AOT 処理は、精練と漂白の2 つのプロセスを 1度に行うことができる処理方法であることが示唆された。 本研究の成果は、天然繊維製品の精練および漂白工程の代 替となる極めて環境負荷の少ない処理技術であるといえ る。

4. 謝辞

本研究では、日清紡テキスタイル株式会社の名倉俊成様、 石川洋輔様、見矢野恭平様、長岡技科大学の木村悟隆准教 授、土田康之様、鯉渕礼門様のご協力を賜りました。ここ に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

 Hamada, K.; Ochiai, T.; Tsuchida, Y.; Miyano, K.; Ishikawa, Y.; Nagura, T.; Kimura, N., Eco-Friendly Cotton/Linen Fabric Treatment Using Aqueous Ozone and Ultraviolet Photolysis. *Catalysts* 2020, *10* (11), 1265.

【外部発表】

学会等発表3件, 論文等発表3件

◆Application of silica opals to ceramic pottery

掲載誌: Journal of Asian Ceramic Societies, Vol.8, No.3, pp.578-585 (2020)

人工オパールの分散液を陶器表面に塗り 900℃で焼成し て焼き付けることにより、構造色を発現する陶器を作製し た。人工オパールの色は、900℃焼成に伴い変化した。高 温焼成により粒子が収縮し、粒子充填構造の周期間距離が 変化したことが理由と考えられる。本研究では、構造色特 有の"見る角度(光の角度)によって色が変わる"発色と、 従来顔料のような角度依存性の無い発色を、コントロール する方法を確立した。また、人工オパール塗布面が水に濡 れた際に、変色するケースと、無色透明になるケースとの 違いを実験データで裏付けて明らかにした。

既存の無機顔料にはクロムやコバルト等のレアメタルが 使われている。人工オパールがレアメタルフリー顔料とし てこれらに置き替わり、陶芸の世界に革新的な変化をもた らすことを期待する。

• Improvement of drilling performance by overcoating diamond-like carbon films on diamond-coated drills for carbon fiber reinforced plastics processing

DLC コーティングしたドリルの炭素複合材料への効果

Toru Harigai Satoshi Degai Yuya Sugie Hirofumi Takikawa Tsuyosi Takimoto Hidenobu Gonda Satoru Kaneko Shinsuke Kunitsugu Kohtaku Suzuki Masao Kamiya Makoto Taki

掲載誌: Vacuum, Vol.183, pp.109755 (2021)

DLC フィルムの硬さと水素含有量は成膜の手法に強く依存する。本研究では DLC でコーティングされたドリルを用いて炭素繊維強化プラスチックを加工して、硬さと水素含有量との相関を調べた。著者らが提案している T型フールドアーク法を用いて、様々な DLC フィルムでドリルへのコーティングを施した。その結果、水素含有量の少ない ta-C:H を用いたコーティングに顕著な効果が認められた。

◆Electrical resistivity and mechanical properties of nitrogen-containing diamondlike carbon/tungsten and nitrogen-containing diamondlike carbon/tungsten carbide multilayer films prepared under low substrate temperature

低温度で作製した窒素含有多層膜DLCの特性評価

Koki Tamekuni Toru Harigai Takafumi Toya Hirofumi Takikawa Tsuyosi Takimoto Shigeki Takago Satoru Kaneko Shinsuke Kunitsugu Masao Kamiya Makoto Taki Hidenobu Gonda

掲載誌: Journal of Vacuum Science and Technology B, Vol.38, pp.011801 (2020)

窒素含有ダイアモンドライクカーボン(DLC)は耐久性と 低電気抵抗体として優れた特性を持つ。本報告では、窒素 含有 DLC(N-DLC)とタングステン(W)、または、タングス テン・カーバイト(WC)との多層膜を形成し、その特性評 価を行った。その結果、単層膜に比較して N-DLC/WC 多 層膜は、高い耐久性と抵抗が半減することが確認できた。

◆Fabrication of ultra-flat c-axis oriented ZnO thin films on atomically stepped cyclo- olefin polymer (COP) substrates by pulsed laser deposition at RT

室温でのパルスレーザー蒸着法による ZnO 薄膜 の作製

> Tomoaki Oga Shiori Yamada Naho Kaneko Akifumi Matsuda Mamoru Yoshimoto Satoru Kaneko

掲載誌: Japanes Journal of Applied Physcs, Vol.59, pp.128001 (2020)

パルスレーザー蒸着法により酸化亜鉛(ZnO)薄膜の作成を 室温でシクロオレフィンポリマー(COP)上で行った。ナノ インプリントによりサファイアの転写を行い、COP は 0.3nm のステップを持つステップ基板として用いていた ところ、成長したZnO膜にもステップ構造が確認できた。 更に、X線回折評価によりZnO膜はc軸配向しているこ とが分かった。

◆ P-type amorphous vanadium oxide thin film fabricated by pulsed laser

パルスレーザー蒸着法による P 型アモルファス VO 薄膜の作製

> Subaru Nakanishi Yoshiharu Shinozaki Akifumi Matsuda Mamoru Yoshimoto Satoru Kaneko

掲載誌: Japanes Journal of Applied Physcs, Vol.59, pp.078004 (2020)

パルスレーザー蒸着法により酸化シリコンガラス上へア モルファス酸化バナジウム(VxOy)の作成を超高真空の室 温で行った。電気伝導率と 更に、X 線回折評価により ZnO 膜は c 軸配向していることが分かった。また、X 線光 電子分光法(XPS)の評価では薄膜表面に V⁺⁴ と V⁺⁵ が比 V⁺⁴/V⁺⁵= 0.2 で存在することを確認した。

◆環状オレフィンポリマー上のダイレクトパタ ーニングにおける無電解銅めっき浴中への 2-メ ルカプトベンゾチアゾール添加の効果

> 関東学院大学材料・表面工学研究所 堀内義夫 亀井恒汰 渡辺充広 本間英夫 株式会社アゾマ 高木道則 電子技術部電子材料グループ 安井 学

掲載誌: Materials Research Bulletin, Vol.58, pp.29-33 (2021)

本論文では、大気 UV 処理法によるダイレクトパターニ ング法を用いて、環状オレフィンポリマー(Cyclic Olefin Polymer: COP)樹脂上に異方性めっきによるラインパター ンを形成する検討を行った。大気 UV 処理およびアルカ リ処理を施した COP 樹脂は、水接触角の低下および表面 自由エネルギーの増加から表面改質されていることが確 認された。このことから、フォトマスクを介して選択的領 域にのみ表面改質を施すことで、ダイレクトパターニング が可能になる。また、無電解 Cu めっき浴に 2-メルカプト ベンゾチオール(2-MBT)を添加する事により、横方向の 析出が抑制され、縦方向の成長が促進された。これは、非 線形拡散効果により 2-MBT がラインのエッジ部に多く 吸着していることを示唆している。また、2-MBT 無添加 浴に比べ添加浴の浸漬電位は短時間で定常電位に達した ことから、ライン中心領域では促進効果が発現したため、 縦方向の成長が促進したと考えられる。

•Effect of high glucose concentration on aging and glycation in Caenorhabditis elegans

化学技術部バイオ技術グループ 瀬戸山央

掲載誌: International journal of analytical bio-science, Vol.8, No30, pp.59-64 (2020)

高濃度のグルコースは、肥満や2型糖尿病の原因となるこ とが指摘されており、高血糖は体内での糖化最終産物 AGEsの生成を促進する。線虫は老化研究のモデル生物と して用いられており、近年では糖尿病研究のモデルとして の研究もされている。

本研究では、線虫を高グルコース条件で培養し、体内の ROS 発生量、カルボニル化タンパク質量および蛍光性 AGEs 量の変化を調べ、高グルコース条件が線虫の体内糖 化および老化に及ぼす影響を明らかにすることとした。 その結果、高グルコース条件は、線虫の体内グルコース濃 度を上昇させ、それに伴う ROS 発生量、カルボニル化タ ンパク質量および蛍光性 AGEs 量を増加させることを明 らかにし、線虫において体内の糖化と老化の関係の一端を 明らかにすることができた。

◆LC-MS/MS 法による非蛍光性 AGEs 生成抑制作 用評価法の検討

> 化学技術部バイオ技術グループ 瀬戸山央

掲載誌:科学・技術研究,9巻1号,pp.37-40 (2020)

糖化によって体内で生成する AGEs は、加齢性疾患に関与 していることが明らかとなっており、AGEs の生成を抑制 する機能性食品が数多く開発されている。機能性食品の AGEs 生成抑制作用評価法のうち、非蛍光性 AGEs 生成抑 制作用評価は主に ELISA 法によって行われているが、高 価な抗体を使用するため多検体の食品素材スクリーニン グには向いていない。そこで本研究では非蛍光性 AGEs のうち CML、CMA に着目し、多検体の食品素材スクリー ニングを容易にするために LC-MS/MS を用いた CML 生成 抑制作用評価法および CMA 生成抑制作用評価法について 検討を行った。その結果、既知抗糖化化合物である塩酸ア ミノグアニジンに対して、LC-MS/MS 法は ELISA 法と同 等の結果を示すことが明らかとなった。
◆光触媒の実用的な性能評価方法 -産業界との 対話から-

> 川崎技術支援部材料解析グループ 落合 剛 濱田 健吾 川崎技術支援部太陽電池評価グループ 青木 大輔

掲載誌:材料表面 2020, 5, 115-122

環境浄化は、私たちの生活にとって最も重要な技術の一つ である。光触媒の強い酸化力を利用した環境浄化への応用 が注目されている。しかし、光触媒による環境浄化を効果 的に行うためには、いくつかのキーとなる科学的・技術的 要件がある。それぞれの実環境に近い条件で、空気清浄機 等の製品が最も効果を発揮するために、設計指針を確立す る必要がある。そこで、本レビューでは、産業界からの相 談に基づいたニーズを把握し、光触媒作用の基本メカニズ ムに立脚した材料・モジュール・製品の実用的な評価方法 を確立するために、我々の最近の活動を紹介する。

◆ Enhanced Solar Photothermal Catalysis over Solution Plasma Activated TiO2

Fei YU Changhua WANG Yingying LI He MA Rui WANG Yichun LIU Norihiro SUZUKI Chiaki TERASHIMA Bunsho OHTANI Tsuyoshi OCHIAI Akira FUJISHIMA

掲載誌: Advanced Science 2020, 7, 2000204

Colored wide-bandgap semiconductor oxides with abundant mid-gap states have long been regarded as promising visible light responsive photocatalysts. However, their catalytic activities are hampered by charge recombination at deep level defects, which constitutes the critical challenge to practical applications of these oxide photocatalysts. To address the challenge, a strategy is proposed here that includes creating shallow-level defects above the deep-level defects and thermal activating the migration of trapped electrons out of the deep-level defects via these shallow defects. A simple and scalable solution plasma processing (SPP) technique is developed to process the presynthesized yellow TiO2 with numerous oxygen vacancies (Ov), which incorporates hydrogen dopants into the TiO2 lattice and creates shallow-level defects above deep level of Ov, meanwhile retaining the original visible absorption of the colored TiO2. At elevated temperature, the SPP-treated TiO2 exhibits a 300 times higher conversion rate for CO2 reduction under solar light irradiation and a 7.5 times higher removal rate of acetaldehyde under UV light irradiation, suggesting the effectiveness of the proposed strategy to enhance the photoactivity of colored wide-bandgap oxides for energy and environmental applications.

◆Eco-Friendly Cotton/Linen Fabric Treatment Using Aqueous Ozone and Ultraviolet Photolysis

Kengo Hamada Tsuyoshi Ochiai Yasuyuki Tsuchida Kyohei Miyano Yosuke Ishikawa Toshinari Nagura Noritaka Kimura

揭載誌: Catalysts 2020, 10, 1265

Chemicals for the scouring and bleaching of fabrics have a high environmental load. In addition, in recent years, the high consumption of these products has become a problem in the manufacture of natural fabric products. Therefore, environmentally friendly, low-waste processes for fabric treatment are required. In this paper, we discuss the bleaching of fabrics using advanced oxidation processes (AOP). These processes use electrochemically generated aqueous ozone and ultraviolet (UV) irradiation to achieve bleaching. However, colour reversion often occurs. In this study, we suppressed unwanted colour reversion by treatment with rongalite. After treatment, changes in fabric colour were determined by measuring the colour difference and reflectance spectra. The best bleaching effect was obtained when ozone and UV irradiation treatments were combined, achieving results similar to those of a conventional bleaching method after 60 min of UV irradiation. In addition, the AOP treatment resulted in the simultaneous scouring of the fabric, as shown by the increased hydrophilicity of the fabric after AOP treatment. Thus, this AOP process represents a new fabric bleaching process that has an extremely low environmental impact.

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

○ 自動車やスマートグリッドなどで利用される大電流電力変換用パワーモジュールを実現するための高 熱伝導性配向材料の開発

および、これら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の開発

○ 光コヒーレンストモグラフィー(00T)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の抑制とともに、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。

令和2年度末で本プロジェクトが終了したため、これまでの主な研究成果を本稿にまとめるとともに、今 後の展望について述べる

1. プロジェクトの研究目的

前述の通り、本プロジェクトでは、以下のような計画で 4つの研究を遂行した。

(1) 透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体の開発

高出力 LED 照明等に適用するための、高密度・均質成 形体および焼結体製造技術を開発する。本研究のために、 冷間静水圧加圧装置による成形条件の最適化を軸に粉体 プロセスの高度化を進め、透明蛍光サイアロンセラミック ス、AIN セラミックス、ガラスセラミックス、無焼成セラ ミックスについても研究を進め、実用レベルの完成度を目 指す。

(2) 高熱伝導配向材料の開発

高い信頼性を有する放熱基板材料に適用することを目 指して、機械的特性に優れる Si₃N₄ セラミックスを対象と した研究を進める。β-Si₃N₄の熱伝導率は、*c*軸方向が高い 値を有することが知られていることから、その*c*軸を配向 させたβ-Si₃N₄ セラミックスを作製することが高熱伝導率 化に有効である。このために、グラフェンを被覆した複合 種粒子を利用した低磁場配向プロセスを開発して、*c*軸配 向 Si₃N₄ セラミックスを実現する。

(3) 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

戦略的研究シーズ育成事業で見いだしたマイクロカン 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。各種セラミックス、単結晶、コーテ ィング材料を対象としたマイクロカンチレバー試験を行 うと共に、実材料の使用環境を念頭に置いた雰囲気の影響 についても検討する。最終的に本手法の KISTEC 機械材料 技術部と川崎技術支援部に技術移転を進める。

(4) 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

眼科等で利用が進んでいる OCT を利用した内部構造観 察とその3次元構造解析をセラミックスに適用する。さら には、この知見を活用して、これまでブラックボックスと してきたセラミックスの製造プロセス中の内部構造の動 的変化過程を明らかにする。得られた成果を KISTEC 機械 材料技術部および KISTEC 全体に展開する。

2. これまでの成果

(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。

本プロジェクトでは、まず、透明蛍光サイアロンセラ ミックスバルク体(図1)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 ついて検討を進め、黄色に発光するセラミックスバルク体



図1 透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体の概念図

の透光性向上について検討した。また、低温での緻密化を 目指した窒化物蛍光体粒子分散 h-BN/ガラス複合体につ いて、ガラスと蛍光体、高熱伝導フィラーの反応性検証を 行い、高熱伝導で光学的特性にも優れる波長変換部材の開 発に成功した。さらに、透明蛍光サイアロンセラミックス バルク体開発のために導入した冷間静水圧加圧装置を活 用して、セラミックスの常温緻密化プロセスを開発した。 これにより、蛍光体粒子が分散した MgO セラミックスを 作製することができた。このプロセスと材料は、従来のセ ラミックスで大きなエネルギー消費プロセスである焼成 を行うことがないという点で省ネルギーであることと、室 温でのプロセスであることで蛍光体が劣化しないこと、従 来の樹脂やガラスと比較してマトリックスがセラミック スであることに起因して高熱伝導率であると言うことで、 極めて革新的な成果であり、照明用途をはじめとした各種 用途で活用できる重要な知見を得ることができた。

(2) 低磁場中成形法による高熱伝導配向材料の開発 パワー半導体は、低炭素社会を実現するためのキーと



図2 グラフェン被覆粒子を用いた低磁場配向プロセス

なる電力変換素子として、家電などから HV・EV やパワ ートレインなどの車両、さらには再生可能エネルギーを利 用したスマートグリッドのためのインフラまで多岐にわ たり応用が期待されている。特に、自動車関連のパワーデ バイスは CO₂削減効果とともに市場も大きい分野である。 このような SiC や GaN パワー半導体デバイスを実現する ためには、それを構成する材料の高度化が克服すべき課題 である。このうち、パワーチップについては多数の企業、 大学、研究機関などにおいて研究開発が活発になされてい る。一方、周辺技術、特に樹脂や絶縁セラミックスなどの 耐熱サーマルマネジメントに必要な高熱伝導材料の開発 は進展していないのが現状である。

本プロジェクトでは、巨大な反磁性磁気異方性を有する 多層グラフェンを被覆した種粒子を用いた低磁場配向プ ロセス(図2)をSi₃N₄セラミックスの作製に適用した。 その結果、Nd 磁石程度の低磁場中で湿式成形することで、 多層グラフェンを被覆したβ-Si₃N₄粒子が回転して配向し、 さらにこれを起点とした粒成長によって、*c*軸配向Si₃N₄ セラミックスを得ることができた。得られた材料は、配向 していないものと比較して高い熱伝導率となった。



図3 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

(3) 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かっ た。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 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。

Al 合金の鋳造に利用されつつある Si₃N₄ セラミックス の信頼性向上を目指して、Al 融液に浸漬した Si₃N₄ セラ ミックス表面にマイクロカンチレバー試験片を作製し、ト ライボインデンターにて曲げ試験を行うことで機械的特 性をピンポイントで測定した。その結果、Al 融液と短時 間接触させたことにより、Si₃N₄ 表面の強度と破壊靱性、 ヤング率が低下することを明らかにすることができた。ま た、MEMS 等に利用されている単結晶シリコンに対して も、マイクロカンチレバー試験片を用いた曲げ試験により 機械的特性評価を行い、微小領域では非線形変形があらわ



図4 光コヒーレンストモグラフィーの概略図

れると共に理論強度に近い強度があらわれることがわか った。荷重印加後の試験片の TEM 観察を行ったところ、 曲げ応力下にて単結晶シリコンに転位の発生・運動に起因 した塑性変形が生じていることを明らかにした。また、こ の手法をディーゼルパティキュレートフィルターに用い られる多孔質 SiC セラミックスの粒界強度測定に適用し、 粒界強度がバルクな多孔質セラミックスの強度を支配す る大きな要因であることを明らかにした。

(4) 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

表1 光コヒーレンスと他の観察手法の比較

手法	3D	非破壞	深さ	速度	分解能	価格
光学顕微鏡	×	×	×	ビデオレートロ	数μm O	0
共焦点顕微鏡	0	0	×	数min△	数μm O	0
X線CT	0	0	0	数十min~10h×	数μm O	×
超音波CT	0	0	0	ビデオレート〇	約100µm ×	0
FIB-SEM	0	×	×	破壊観察×	<1µm O	×
ОСТ	0	0	0	ビデオレートロ	数μm O	0

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 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次元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(図 4)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(表 1)。

本プロジェクトでは、OCT 観察により強度を支配する 欠陥を非破壊で高速、3 次元で抽出可能であることから、 非破壊検査として有用であることや、セラミックスの焼結 過程、乾式成形過程、脱脂過程、スラリーの混合過程など、 従来の手法で観察することの難しかった内部構造の動的 変化を、OCT を用いて観察することに成功した。特に、 焼結に伴うセラミックス成形体の内部構造の変化を世界 で初めてリアルタイムに3次元に観察することができ、高 い信頼性を得るための強力なツールとして確立すること ができた。

3. 今後の展望

以上の成果を踏まえ、各研究における課題と今後の展望 は以下の通りである。

(1) 透明蛍光サイアロンセラミックスバルク体の開発

これまでに開発した透明蛍光サイアロンセラミックス、 窒化物蛍光体粒子を分散したガラスセラミックス、常温緻 密化セラミックスに関して、プロジェクト期間中に実施で きなかったさらなる高熱伝導率化や材料の長期信頼性に 関する研究をさらに進めることで、高出力照明への搭載を めざす。

(2) 低磁場中成形法による高熱伝導配向材料の開発

低磁場配向のキーポイントは被覆したグラフェンの結 晶性の維持であることが見いだされている。このためには、 グラフェン被覆複合粒子の磁化率異方性の実測とプロセ ス因子との相関を科学的な視点から解明していくことが 必要である。今後は、モデル粒子などを用いた検討やプロ セスの改善により、プロセス面も含めた高信頼性化の検討 を進めることが肝要であると考えている。

(3) 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

本手法は、極めてユニバーサルな手法であることから、 その適用範囲は極めて大きい。プロジェクト期間中に KISTEC 機械・材料技術部と川崎技術支援部とともにラウ ンドロビン試験も行ったが、さらに協力機関を増やして、 より精度の高い計測法として確立して国際標準化を進め る。また、KISTEC で研究・開発を進める各種セコーティ ング材料、ガラスに対してマイクロカンチレバー試験を行 うと共に、実材料の使用環境を念頭に置いた雰囲気の影響 についてもさらに検討することが、実用面としては今後強 く求められると考えられる。さらに、メソスケール破壊特 性の発現原理を解明するための第一原理計算手法を進め ると共に、得られた破壊特性をパラメーターとした有限要 素解析手法を開発することで、マルチスケールな高信頼性 材料設計手法として展開していくことで、ユーザーニーズ に即応可能な体制を確立できると考えている。

(4) 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

画像処理は有効なツールであり、プロジェクト期間中に 導入した画像処理ソフトウェアと中心波長 1.7 μm の OCT を利用して、X線 CT 等と比較しながら同一視野観察を通 じて得た教師画像セットによる機械学習などを進め、各種 物質・材料に展開することで OCT 像データベースの構築 を進めていくことが肝要である。また、OCT の特長を活 かした外場印可下での内部構造観察は、本プロジェクトで 対象としたセラミックス以外にも、ポリマー、複合材料、 医薬品、バイオなど多岐にわたる分野で求められており、 KISTEC 内部の連携と共に、外部にも広く周知していくこ とで、本プロジェクトで得た成果を展開していく。

透明蛍光 Ca-α SiAlON: Eu²⁺バルクセラミックスの作製 Fabrication of Transparent and Fluorescent Ca-α SiAlON: Eu²⁺ Bulk Ceramics

李 潁, 高橋 拓実, 横内 正洋, 多々見 純一 Ying Li, Takuma Takahashi, Masahiro Yokouchi, Junichi Tatami

1. はじめに (Introduction)

The white light-emitting diodes (LEDs) have attracted increasing attention as the new-generation light source in the recent years, which can replace conventional incandescent and fluorescent lamps due to their long lifetime, energy savings and positive environment effects [1, 2]. It was reported that the first white LED, which was commercialized in 1996, mainly composed of a blue LED chip and a yellow phosphor (Y1-aGda)3(Al1-bGab)O12 :Ce3+ (YAG: Ce3+) [1]. Currently as shown in Fig. 1(a) [3], the most common approach for producing white LEDs has been to use a broadband yellow-emitting powder phosphor dispersed in epoxy resin with a blue LED chip, where YAG: Ce3+ yellow phosphor has been used in industry for general lighting [4-6]. In this kind of device, phosphors usually play a pivotal role because they down-convert the blue light from p-n chip to generate a whitish light. However, for high power LEDs lights we know that a large amount of heat (almost 70% of lighting energy) is produced in the process of luminescence, which results in the thermal degradation of resin. Over time the LEDs will become invalid gradually, such as degradation of luminous intensity and change of emission color. Therefore, a new kind of resin-free bulk ceramic plate phosphor is demanded in the high-power LEDs instead of the conventional powder phosphors as shown in Fig. 1(b). It is known that compared to the structure of powder phosphors dispersed in resin, the appropriate ceramic plate phosphor has many advantages, such as high mechanical properties and excellent temperature resistance, which can dramatically improve the service life of LEDs. Therefore, finding out a bulk ceramic that meets the phosphor's requirements: transparency, yellow light emission and high fluorescence intensity, is the key to solve the existing problem.

Competitive to the commercial YAG: Ce^{3+} yellow phosphors, α -SiAlON has been found to be excellent host lattices for Eu²⁺ showing yellow-orange light and high luminescence efficiency [7–12]. As well known, α -SiAlON is a solid solution isostructural with α -Si₃N₄, stabilized by the interstitial dissolution of a cation (M), such as Li, Ca, Mg, Y or some lanthanides [12, 13]. Its general formula can be given as $M_xSi_{12-(m+n)}Al_{m+n}O_nN_{16-n}$ (x = m/v, x and v are the solubility and valence of the M ion, respectively) in which (m+n) Si–N bonds are replaced by m Al–N and n Al–O bonds. Based on the strong covalent bonds of (Si, Al)–(N, O), α -SiAlON has been used as a promising engineering ceramic material as well as α -Si₃N₄ and has superior mechanical properties, chemical inertness, and thermal shock resistance [14]. Moreover, α -SiAlON has also been discovered as a promising host material for RE-doped phosphors (such as Eu²⁺, Ce³⁺, Sm³⁺, Nd³⁺, Yb³⁺,





Dy³⁺, Tb³⁺ and Yb²⁺) over conventional oxide phosphors due to their excellent mechanical properties and good fluorescence properties, such as visible light excitation, narrow half width, high durability, and a good temperature dependence for the emission intensity [7–13, 15–17].

Among these RE-doped a-SiAlON phosphors, a series of intense research on α-SiAlON: Eu2+ yellow phosphor has been carried out [8-12]. Xie et al. [10] developed a yellow Eu2+-doped Ca-a-SiAlON phosphor with the formula $(Ca_x Eu_y)Si_{12-2x-3y}Al_{2x+3y}O_yN_{16-y}$ (x = 0.2–2.2, y = 0–0.25) from the starting powders of α -Si₃N₄, AlN, Ca₃N₂ and Eu₂O₃ by gas-pressure sintering at 1800 °C for 2 h under 10 atm of N2. The absorption edge shifted to longer wavelength with increasing Eu2+ concentration, resulting in changes in color from light yellow to orange. Xie et al. [11] also prepared a yellow Ca-α-SiAlON: Eu²⁺ phosphor with compositions of Ca_{0.625}Eu_xSi_{10.75-3.0x}Al_{1.25+3.0x}O_{1.0x}N_{16-1.0x} (x = 0-0.25) by gas-pressure sintering at 1800°C for 2 h under 0.925 MPa N₂, showing a single intense broadband emission at 583-603 nm. Michalik and Pawlik et al. [12] synthesized a series of phosphor powders about $Ca_{(m/2)-x}Eu_xSi_{12-(m+n)}Al_{m+n}O_nN_{16-n}$ (m = 1.6, n = 0.8, x in the range of 0-0.08) in flowing nitrogen in a carbon resistant furnace and reported that the emission peak position shifted toward longer wavelengths with rising Eu2+ concentration from 565 nm (0.1 mol % Eu2+) to 585 nm (10 mol % Eu2+).

The objective of this research is to fabricate transparent and fluorescent Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ yellow phosphor plate. In order to achieve good properties (high transparency, high luminescent properties and so on) of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ bulk ceramics, scattering sources such as pores, grain boundaries and other defects should be removed as much as possible. Therefore, the preparation processing firstly should be optimized. For instance, cyclic high-pressure cold isostatic pressing (CIP) and hot isostatic pressing (HIP) before and after gas pressure sintering (GPS) were applied to improve packing structure of powder compact and achieve higher densification. Another is to use much finer raw powders with more uniform particle size distributions, which are expected to improve the sinterability of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ ceramics. Ball milling was usually used to mix and grind ceramics powders, while bead milling is a well-known technique to pulverize ceramic powders to the size ranged from nanometer to sub-micron and to disperse nanoparticles using a fine grinding medium (<1 mm), which has been used in TiO₂, ZrO₂, CNT-dispersed Si₃N₄ and Si₃N₄ powders [18–21]. However, there is no research about preparation of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ ceramics using bead-milled raw powders. About bead-milling, we will investigate it systematically in the near future.

In this study, ball-milled raw powders of Si₃N₄, AlN, CaCO₃ and Eu₂O₃ were used to fabricate Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ ceramics with a composition of Eu_{0.1}Ca_{0.9}Si₉Al₃O₁N₁₅ by gas-pressure sintering (GPS) and hot isostatically pressing (HIP). The effects of preparation parameters (such as CIP pressure, the numbers of CIP replication and sintering temperatures) on the phase purity, microstructure, relative densities, optical and luminescent properties of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ were investigated in detail.

2. 実験 (Experimental procedure)

Ca-\alpha-SiAlON: Eu^{2+} with compositions of $Eu_{0.1}Ca_{0.9}Si_9Al_3O_1N_{15}$ were synthesized from the starting powders of Si₃N₄(SN-E10, Ube Co., Ltd., Japan), AlN (H grade, Tokuyama Co., Japan), CaCO3 (Particle size: 100 nm, Shiraishi Central Laboratories Co., Ltd., Japan) and Eu2O3 (Shinetsu Chemical Со., Japan). The composition of Eu0.1Ca0.9Si9Al3O1N15 was selected in this study to investigate because with increasing the contents of Ca ion in the M (Ca and Eu) ions of α-SiAlON from 0 to 0.9, the external quantum efficiency (EQE) of Eu1-xCaxSi9Al3O1N15 increased from 14.8% to 38.4% as shown in Table. 1. The four kinds of raw powders were ball-milled using Si₃N₄ balls as mixing media (Φ 5 mm; the weighting ratio of balls to powders: 3: 1) at a speed of 110 rpm in a polyethylene bottle with an added dispersant (Celuna E-503, Chukyo Yushi Co., Ltd, Japan) in ethanol for 48 h. In order to make granules, 4 mass% paraffin (melting point: 46-48 °C; Junsei Chemical Co., Japan), 2 mass% dioctyl phthalate (DOP, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) and 3.5 ml/g cyclohexane (S grade, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) were added to these mixed powders as binder and lubricant, respectively. After that, the powder mixture was obtained by sieving using a 250-µm-mesh nylon sieve.

The sieved powder mixture was then molded into cylindrical pellets at the size of $\Phi 15 \times 2$ mm by uniaxial pressing at a pressure of 50 MPa for 30 s. Following, the pellets were isostatically cold pressed at pressure range of 200-1000 MPa for 60 s and then the process was repeated to 1-10 times using an ultra-high pressure CIP machine (Dr. CHEF, Highest pressure: 1000 MPa, Kobe Steel, Ltd., Japan). After binder burnout in air at 833 K for 3 h, the green bodies were fired at 1823-1923 K in 0.9 MPa N₂ atmosphere for 2-4 h using a gas pressure sintering furnace (GPS, Himulti 5000, Fujidenpa Kogyo Co., Japan). The sintered bodies were then hot isostatically pressed at 1873 K (according to the GPS temperature) for 1 h under 100 MPa mixed atmosphere of Ar and N₂.

The density of green bodies and sintered bodies was measured by weight-volume method and Archimedes method, respectively. The phase present was examined by X-ray diffraction (XRD; 0-20, CuKα; RINT2000, Rigaku Co., Japan). All the samples were cut and mirror-polished for two sides and the final size was 6.5 mm × 6.5 mm × 0.1 mm in thickness. The images of appearance were photographed at visible light. The internal structures of green compact by CIP and sintered bodies after HIP were observed by infrared microscope (MX63/MX63L microscope system of Olympus and Light source: LA-100 IR, Hayashi-Repic Co., LTD.) The fracture surface of green compact and sintered bodies prepared at different CIP pressures were observed by SEM (JXA 8100, JEOL). The in-line transmittance, total transmittance, and reflection spectra of the prepared samples over the wavelength range from 200 to 800 nm were evaluated by a UV-VIS-NIR spectrophotometer (UV-3100PC, Shimadazu Co., Ltd., Japan). The absorption spectra were calculated by the following Equation 1:

Absorption (%)=100% - total transmittance - reflection (1) A fluorescence spectrometer (QE-2000, Otsuka Electronics Co., Ltd., Japan) was used to test the emission and excitation spectra and the quantum efficiency.

3. 結果と考察 (Results and discussion)

Figure 2 shows the effect of CIP pressure (200-1000 MPa) on the XRD patterns of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered by GPS at 1873 K for 4 h and by HIP at 1873 K for 1 h. With increasing the CIP pressure from 200 to 1000 MPa as shown in Fig. 2(a)-(d), no phase transformation and no secondary phase formation were observed and only peaks of α -SiAlON were identified after sintering. These suggested that Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ with compositions of Eu_{0.1}Ca_{0.9}Si₉Al₃O₁N₁₅ were successfully prepared in this study. Xie. et al. [9] prepared Eu²⁺-doped

Table 1 External quantum efficiency (EQE) of $Eu_{1\text{-}x}Ca_xSi_9Al_3O_1N_{15}$ (x



Fig. 2 XRD patterns of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ ceramics sintered at 1873 K by GPS and HIP, where before sintering the green body was prepared at different CIP pressure of 200 MPa (a), 500 MPa (b), 800 MPa (c) and 1000 MPa (d).

Ca- α -SiAlON powder phosphors with the composition of Ca_{0.625}Eu_xSi_{0.75-3x}Al_{1.25+3x}O_xN_{16-x} (Ca- α -SiAlON: Eu, x = 0-0.25) and the XRD pattern showed the samples had the single-phase crystal structure of α -SiAlON (see JCPDS card No. 33-0261), which was similar with our results.

Figure 3 shows the effect of CIP pressure on the relative densities of green compacts and sintered bodies of Ca-α-SiAlON: Eu²⁺. For comparison, the relative densities of sintered bodies at different GPS temperature and holding time were also included. The theoretical density of Eu0.1Ca0.9Si9Al3O1N15 was 3.2852 g/cm3 calculated by the unit cell parameters from the XRD pattern. With increasing the CIP pressure from 200 to 1000 MPa, the relative density of green compacts prepared by CIP increased from 58% to 68%. Corresponding with this, the relative density of Ca-α-SiAlON: Eu2+ after sintering by GPS for 4 h and post-HIP for 1 h at 1873 K increased from 86% to 93% and from 88% to 98%, respectively. With increasing the GPS sintering temperature from 1823 to 1873 K and elongating the holding time from 2 to 4 h, the relative density also increased by 7% and 1%, respectively. This indicated for the density the sintering temperature is more important factor than the holding time. As shown in the insert appearance images of the sintered body after HIP photographed at visible light, the samples in Fig. 3(a) and (b) were yellow but not transparent because the relative density was below 90% even after post-HIP. While, the samples in Fig. 3(c) and (d) with high relative densities above 98% were transparent with yellow color.

Figure 4 depicts the effect of the number of CIP replications at 1000 MPa on the relative densities of green and sintered bodies of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺. The effect of different GPS sintering temperatures of 1873-1923 K on the relative densities was also shown for comparison. Similar to the effect of GPS sintering temperature on the relative density



Fig. 3 Relationship between CIP pressure and relative density of compact/ceramics of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺, where the insert photograph is bulk ceramics sintered by GPS and HIP at 1873 K for 4 h and 1 h with different CIP pressure of (a) 200, (b) 500, (c) 800 and (d) 1000 MPa.

in Fig. 3, the higher GPS temperature, the higher relative densities. However, above 1898 K, no change in the relative density was observed with increasing sintering temperature. Compared with the effect of CIP pressure on the relative density in Fig. 3, the number of CIP replications had little influence on the relative density. With increasing the number of CIP replications from 1 to 10, the relative density slightly increased from 65% to 68%, from 91% to 93% after CIP and GPS at 1873 K, respectively. Moreover, the relative density almost kept constant at 98% after HIP at different numbers of CIP replications and at different GPS sintering temperature. As shown in the insert appearance images of the sintered body after HIP, all the samples in Fig. 4(a)-(d) were transparent with yellow color at different numbers of CIP replications of 1-10. Generally, the fully densified samples with transparency and yellow color were successfully prepared at a CIP pressure of 800-1000MPa where the CIP process repeated 1 to 10 times and sintered by GPS at 1873 K for 4 h and then by post-HIP at 1873 K for 1 h. Post-HIP is necessary for increasing the relative densities.

Figure 5 shows the internal structures ((a) and (b)) and fracture surface ((c) and (d)) of the green body of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ prepared by CIP at 200 MPa ((a) and (c)) and 1000 MPa ((b) and (d)) repeated 10 times, respectively. In the internal structure (Fig. 5 (a)) at 200 MPa (58% of relative density), a lot of small black pores were dispersed in the grain or grain boundary. While at 1000 MPa (Fig. 5(b)), the relative density increased up to 68%, and the internal structure showed less pores and more homogeneous as well as the grain size became smaller than the green body of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ at 200 MPa. Corresponding to the internal structures, small pores were clearly observed at the grain boundary of fracture surface and the grain size of green body at 200 MPa was about 1 µm (Fig. 5(c)). While at 1000 MPa (Fig. 5(d)), less pores and smaller grain size (below 0.7 µm) were observed.



Fig. 4 Relationship between number of CIP replications at pressure of 1000 MPa and relative density of compact/ceramics, where the insert photograph is bulk ceramics sintered by GPS and HIP at 1873 K for 4 h and 1 h with different number of CIP replications of (a) 1, (b) 4, (c) 7 and (d) 10.



Fig. 5 Internal structures (Fig. 5(a) and (b)) and fracture surface (Fig. 5(c) and (d)) of the green body of $Ca-\alpha$ -SiAION: Eu²⁺ prepared by CIP at 200 MPa (Fig. 5(a) and (c)) and 1000 MPa (Fig. 5(b) and (d)) repeated 10 times.



Fig. 6 Internal structures of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered body after HIP at different CIP pressure of 200 (a), 500 (b), 800 (c) and 1000 MPa (d).



Fig. 7 SEM images of fracture surfaces of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered body after HIP at different CIP pressure of 200 (a), 500 (b), 800 (c) and 1000 MPa (d).

Figure 6 shows the internal structures of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered body after HIP at different CIP pressure of 200 (a), 500 (b), 800 (c) and 1000 MPa (d), respectively. When the CIP pressure was less than 500 MPa as shown in Fig. 6(a) and (b), a lot of small black pores were observed in the internal structures, which are the main reason for the low transparency with relative density below 90% as shown in the insert Fig. 3 (a) and (b). While with increasing the CIP pressure to 800 and 1000 MPa (Fig. 6(c) and (d)), pores were almost not observed, and the sintered body was almost fully densified with high relative density of 98% and was transparent as shown in the insert Fig. 3(c) and (d). With increasing the CIP pressure, the shape of pores changed from circle to line gradually, indicating that the CIP pressure had great influence on the densification of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered bodies.

Figure 7 shows the SEM images of fracture surfaces of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺sintered body after HIP at different CIP pressure of 200 (a), 500 (b), 800 (c) and 1000 MPa (d), respectively. When the CIP pressure was 200 MPa in Fig.7 (a), lots of pores in size of 2-3 μ m were observed. With increasing the CIP pressure to 500 MPa (Fig.7 (b)), the number of pores slightly decreased, and the size of pores decreased into 1-2 μ m. With further increasing the CIP pressure to 800 and 1000 MPa (Fig. 7(c) and (d)), the microstructures were more homogeneous where pores were almost not observed, and the grain size dramatically decreased. Moreover, the fracture mode was mainly transgranular.

Figure 8 depicts the in-line transmittance at the wavelength of 200-800 nm of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered body after HIP prepared at CIP pressure of 200-1000 MPa repeated for 10 times and at number of CIP replications of 1-10 when loaded at CIP pressure of 1000 MPa, respectively. For the samples at CIP pressure of 200 and 500 MPa, the transmittance was close to 0. For other transparent samples, the transmittance almost linearly increased from 2% to 33% with the wavelength increased from 490 nm to 800 nm. If the samples were fully densified, the CIP processing parameters did not have great influence on the in-line transmittance. Considering the measurement error, the effect of CIP processing parameters on the in-line transmittance can be negligible for the fully densified samples.



Fig. 8 In-line transmittance at the wavelength of 200-800 nm of Ca-α-SiAION: Eu²⁺ sintered body after HIP prepared at CIP pressure of 200-1000 MPa repeated for 10 times and at number of CIP replications of 1-10 when loaded at CIP pressure of 1000 MPa.

Figures. 9-11 depict the total transmittance, reflection spectra and absorption spectra at the wavelength of 200-800 nm of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered body after HIP at CIP pressure of 200-1000 MPa repeated for 10 times and at number of CIP replications of 1-10 when loaded at

CIP pressure of 1000 MPa, respectively. At CIP pressure of 200 and 500 MPa, the sintered body was not fully densified with relative density below 90%, therefore there are lots of pores which are the main scattering sources for low transparency. In Fig. 9, the total transmittance of samples at 200 and 500 MPa was low which increased from 0 to 7% and 12% when the wavelength increased from 500 to 800 nm, respectively. Because of the open pores in the surface, the reflection of samples at 200 and 500 MPa in Fig. 10 was very high and increased from 30% to 58% and from 32% to 61% with increasing the wavelength from 400 nm to 800 nm. Therefore, the absorption of samples at 200 and 500 MPa in Fig. 11 decreased from 60% to 40% and 30% with increasing the wavelength from 400 nm to 800 nm, respectively. Because the relative density at 500 MPa is higher than that at 200 MPa, the total transmittance at 500 MPa is higher than that at 200 MPa. Because the number of open pores at 500 MPa in the surface is more than that at 200 MPa, the reflection at 500 MPa is higher than that at 200 MPa. Then the absorption at 500 MPa is lower than that at 200 MPa. While for the transparent samples, with increasing the CIP pressure from 800 to 1000 MPa and decreasing the number of CIP replications from 10 to 1, because of the slightly increasing of relative density in Fig. 3 and Fig. 4, the total transmittance in Fig. 9 gradually increased, where the highest value increased from 35% to 67% with increasing the wavelength from 500 to 800 nm. In Fig. 10, with increasing the CIP pressure from 800 to 1000 MPa and decreasing the number of CIP replications from 10 to 1, the reflection also increased because of the increasing of the number of open pores in the surface. The reflection increased from 35% to 45% with increasing the wavelength from 350 nm to 590 nm and further decreased to 40% with increasing the wavelength to 800 nm. Then, with increasing the CIP pressure from 800 to 1000 MPa and decreasing the number of CIP replications from 10 to 1 in Fig. 11, the absorption gradually decreased.



Fig. 9 Total transmittance at the wavelength of 200-800 nm of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ after HIP prepared at CIP pressure of 200-1000 MPa repeated for 10 times and at number of CIP replications of 1-10 when loaded at CIP pressure of 1000 MPa.



Fig. 10 Reflection spectra at the wavelength of 200-800 nm of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ after HIP prepared at CIP pressure of 200-1000 MPa repeated for 10 times and at number of CIP replications of 1-10 when loaded at CIP pressure of 1000 MPa.



Fig. 11 Absorption spectra at the wavelength of 200-800 nm of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ after HIP prepared at CIP pressure of 200-1000 MPa repeated for 10 times and at number of CIP replications of 1-10 when loaded at CIP pressure of 1000 MPa.



Fig. 12 Emission spectra emitted by the blue light at wavelength of 455 nm of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ after HIP at CIP pressure of 200-1000 MPa repeated for 10 times and at number of CIP replications of 1-10 when loaded at CIP pressure of 1000 MPa.

Table 2 The internal quantum efficiency	(IQE)	of	Ca-c	γ−Si	AION:	Eu ²
sintered body after HIP						

Sa	amples	Internal quantum		
CIP pressure (MPa)	Number of CIP replications	efficiency, IQE (%)		
200	10	25.0%		
500	10	28.3%		
800	10	36.0%		
1000	10	41.1%		
1000	7	40.3%		
1000	4	41.5%		
1000	1	47.7%		

Figure 12 shows the emission spectra emitted by the blue light at wavelength of 455 nm of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered body after HIP at CIP pressure of 200-1000 MPa repeated for 10 times and at number of CIP replications of 1-10 when loaded at CIP pressure of 1000 MPa, respectively. The yellow light at wavelength of 585 nm was emitted by the blue light at wavelength of 455 nm. With increasing the CIP pressure from 200 to 1000 MPa and decreasing the number of CIP replications from 10 to 1, the intensity of emission spectra increased, and the peak position kept no change at 585 nm. Table 2 shows the internal quantum efficiency of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ sintered body after HIP. The IQE of transparent samples was above 40% at 455 nm. Tables position provide that Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ were successfully prepared for yellow phosphors.

4. 結論 (Summary)

A single a-SiAION phase was identified at the composition of Eu0.1Ca0.9Si9Al3O1N15. The relative density of Ca-α-SiAlON: Eu2+ green compact was improved up to 68% by applying CIP over 800 MPa repeated 10 times and achieved over 98% after post-HIP sintering. With increasing CIP pressure from 200 MPa to 1000 MPa, the numbers and the size of pores in the microstructure decreased and the shape of pores changed from circle to line gradually. At the same time, the microstructure became more homogeneous with smaller grain size with increasing the CIP pressure. The in-line transmittance of Ca-α-SiAlON: Eu²⁺ was up to 30% in the visible range. For transparent Ca- α -SiAlON: Eu²⁺, with increasing the CIP pressure from 800 to 1000 MPa and decreasing the number of CIP replications from 10 to 1, the total transmittance increased, the reflection also increased, therefore the absorption gradually decreased at the wavelength of 500-800 nm. The yellow light at wavelength of 585 nm was emitted by the blue light at wavelength of 455 nm. With increasing the CIP pressure from 200 to 1000 MPa and decreasing the number of CIP replications from 10 to 1, the intensity of emission spectra increased, and the peak position kept no change at 585 nm. The internal quantum efficiency of transparent Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ was above 40% at 455 nm, which is promising served as yellow phosphor plate in the white LED.

5. 今後の展望 (Research in the future)

In order to obtain better properties, such as higher transparency and higher luminescent properties of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ bulk ceramics, much finer raw powders with more uniform particle size distributions should be used. Ball milling was usually used to mix and grind ceramics powders, while bead milling is a well-known technique to pulverize ceramic powders to the size ranged from nanometer to sub-micron and to disperse nanoparticles using a fine grinding medium (<1 mm). However, there is no research about preparation of Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ ceramics using bead-milled raw powders. Therefore, the bead milled raw powders mixture would be carried out to synthesize Ca- α -SiAlON: Eu²⁺ ceramics at lower GPS sintering temperature, compared with those using the ball-milled raw powders.

Then, using the N-rich powders (EuN and Ca_3N_2) in a glove box replacing of Eu_2O_3 and $CaCO_3$ to reduce the oxygen contents in the starting powders would change the color of transparent sample, which is interesting and necessary for the future study.

〔参考文献〕References

- S. Nakamura, G. Fasol, The Blue Laser Diode: GaN Based Light Emitters and Lasers, Springer, Berlin, 1997.
- [2] D. Zhu, C.J. Humphreys, Solid-State Lighting Based on Light Emitting Diode Technology, (2016) 87–118, In: M.D. Al-Amri, M. El-Gomati, M.S. Zubairy (eds) Optics in Our Time, Springer, Cham.
- [3] J.B. Talbota, J. McKittrick, Review—Electrophoretic Deposition of Phosphors for Solid-State Lighting, ECS J. Solid State Sc. 5 (1) (2016) R3107–R3120.
- [4] S. Nishiura, S. Tanabe, K. Fujioka, and Y. Fujimoto, Properties of Transparent Ce:YAG Ceramic Phosphors for White LED, Opt. Mater. 33(5) (2011) 688–691.
- [5] N. Wei, T. Lu, F. Li, W. Zhang, B. Ma, Z. Lu, J Qi, Transparent Ce:Y₃Al₅O₁₂ Ceramic Phosphors for White Light-Emitting Diodes, Appl. Phys. Lett. 101 (2012) 061902.
- [6] Q. Yao, P. Hu, P. Sun, M. Liu, R. Dong, K. Chao, Y. Liu, J. Jiang, H. Jiang, YAG: Ce³⁺ Transparent Ceramic Phosphors Brighten the Next-Generation Laser-Driven Lighting, Adv. Mater. 32 (19) (2020) 1907888.
- [7] R. Xie, H.T. Hintzen, Optical Properties of (Oxy)Nitride Materials: A Review. J. Am. Ceram. Soc. 96 (2013) 665–687.
- [8] R. Xie, M. Mitomo, K. Uheda, F. Xu, Y. Akimune, Preparation and Luminescence Spectra of Calcium-and Rare-Earth (R = Eu, Tb, and Pr)-Codoped α-SiAION Ceramics. J. Am. Ceram. Soc. 85 (2002) 1229–1234.
- [9] K. Sakuma, K. Omichi, N. Kimura, M. Ohashi, D. Tanaka, N. Hirosaki, Y. Yamamoto, R. Xie, T. Suehiro, Warm-White Light-Emitting Diode with Yellowish Orange SiAION Ceramic Phosphor, Opt. Lett. 29 (2004) 2001–2003.
- [10] R. Xie, N. Hirosaki, M. Mitomo, Y. Yamamoto, T. Suehiro, K. Sakuma, Optical Properties of Eu²⁺ in α-SiAlON, J. Phys. Chem. B 108 (32) (2004) 12027–12031.

- [11] R. Xie, N. Hirosaki, K. Sakuma, Y. Yamamoto, M. Mitomo, Eu²⁺-Doped Ca-α-SiAlON : A Yellow Phosphor for White Light-Emitting Diodes, Appl. Phys. Lett. 84 (2004) 5404–5406.
- [12] D. Michalik, T. Pawlik, B. Kukliński, A. Lazarowska, T. Leśniewski, J. Barzowska, S. Mahlik, M. Grinberg, B. Adamczyk, M. Pławecki, M. Sopicka-Lizer, Dopant Concentration Induced Optical Changes in Ca, Eu-α-Sialon, Crystals 7 (11) (2017) 342.
- [13] L. Gan, Z. Mao, Y. Wang, F. Xu, Y. Zhu, Q. Huang, X. Liu, Photoluminescence Properties of Ca–α-SiAlON:Ce³⁺ Phosphors as Function of Composition and Microstructure, Ceram. Int. 39 (7) (2013) 8319–8326.
- [14] F.L. Riley, Silicon Nitride and Related Materials, J. Am. Ceram. Soc. 83 (2000) 245–265.
- [15] T. Chan, C. Lin, R. Liu, R. Xie, N. Hirosaki, B. Cheng, Photoluminescent and Thermal Stable Properties of Tb³⁺-Doped Ca-α-SiAlON under VUV Excitation, J. Electrochem. Soc. 156 (7) (2009) J189.
- [16] C. Liu, F. Ye, Y.Zhou, Y. Wang, J. Rao, Effect of Different Rare-Earth on Microstructure and Properties of α-Sialon Ceramics, J. Mater. Sci. Technol. 24 (2008) 878–882.
- [17] W. Chen, X. Su, P. Wang, D. Yan, Y. Cheng, K. Watari, Comparison of the Luminescence Properties of Dy^{3+} in α -Sialon and Oxynitride Glass, J. Am. Ceram. Soc. 88 (2005) 2955–2956.
- [18] M. Inkyo, T.Tahara, T. Iwaki, F. Iskandar, C.J. Hogan, K. Okuyama, Experimental Investigation of Nanoparticle Dispersion by Beads Milling with Centrifugal Bead Separation, J. Colloid Interface Sci. 304 (2006) 535–540.
- [19] G. Suárez, Y. Sakka, T. S. Suzuki, T. Uchikoshi, X. Zhu, E. F. Aglietti, Effect of Starting Powders on the Sintering of Nanostructured ZrO2 Ceramics by Colloidal Processing, Sci. Technol. Adv. Mater. 10 (2009) 025004.
- [20] M. Matsuoka, J. Tatami, T.Wakihara, K. Komeya, T. Meguro, Improvement of Strength of Carbon Nanotube-Dispersed Si₃N₄ Ceramics by Bead Milling and Adding Lower-Temperature Sintering Aids, J. Asian Ceram. Soc. 2 (2014) 199–203.
- [21] J. Tatami, S. Fukuda, Fabrication of Si₃N₄ Ceramics Using Raw Materials Prepared by Bead Milling, J. Soc. Powder Technol. Japan 51 (2014) 430–435.

常温緻密化プロセスによる 窒化物蛍光体粒子分散 MgO バルクセラミックスの作製

1. はじめに

高出力半導体照明の需要の高まりに伴い、従来の樹脂に 代わる耐熱性と熱伝導性に優れた蛍光部材が望まれてい る。セラミックスは樹脂と比べて高い熱伝導性を有するた め、代替マトリックスとして有望な材料の一つであるが、 高熱伝導率の発現のためには高度な緻密化が必要である。 他方、可視光透光性を発現するためには、所望の波長の光 の散乱を極力低減しなければならず、粒子径の微細化と高 度な緻密化の両立という精緻な微構造制御が求められる。 このような観点から、本プロジェクトでは SiAlON を基軸 とした透明蛍光バルクセラミックスの開発[1-2]を行って きたものの、一部の蛍光体については高温下での変質や失 活が起こるため[3]、1000 ℃ を超える高温焼結を伴う従来 のセラミックスプロセスでは解決の難しい課題があった。 これらを解決するためには、低温、究極的には室温での緻 密化というセラミックス=焼き物という既成概念を打ち 破る新しいプロセスの確立が求められる。

セラミックスの低温緻密化は、エネルギー以外の外場エ ネルギーによって物質移動を促進すれば可能である。水熱 ホットプレス法[4]や Cold sintering 法[5]は、化学反応場と 応力場の重畳によって数百℃の低温で緻密化を図る手法 である。既に、これらの手法については機能性セラミック ス材料分野を中心に高温焼結に代わる有望性が多々示さ れている。他方、蛍光性、可視光透光性、高熱伝導率性と いう異なる機能を共発現させる観点で、光散乱の抑制と熱 伝導パス形成の両立は必須である。すなわち、内在する気 孔やき裂といった不均質構造を極力低減し、高緻密化しな ければならないが、上述した手法はいずれも高緻密化のた めに数百℃の加温が必要であり、さらに多量の水が共存 するなど、蛍光体が劣化や変質を起こす[6]過酷な環境へ の暴露を回避できない。加温が必要となる原因は、物質移 動を促進するための駆動力が十分でないためである。すな わち、十分に大きな外場エネルギーが導入されれば、常温 の高緻密化は実現できるはずである。また、最終的な焼結 体の微構造形態の基盤となる成形体中の粒子集合構造を 精緻に制御できない点も、不均質構造の生成抑制という観 点で不利である。

本研究では、最大 1000 MPa の静水圧加圧 (Cold Isostatic Press: CIP) により①成形プロセスで粒子集合構造の高均 質化を図るとともに、②緻密化に必要十分な微量の液相を 導入して粒子との化学反応を同時に促進する、独自の常温 緻密化技術の基礎的知見(原料粉体の正常、成形体の粒子 径分布や密度、液相導入量などの相関関係)を得て、基盤

髙橋 絵美、髙橋 拓実、多々見 純一

プロセスを確立させるとともに、常温で高密度な蛍光バル クセラミックスを実現することを目的とした。マトリック スとなる物質としては、可視光透過性と優れた熱伝導率を 有する MgO を選定した。また、MgO は水に対して僅かに 溶解性を示し、水酸化物を形成する、化学ポテンシャルの 観点で、MgO と水がそれぞれ単独で存在するよりも Mg(OH)2 を形成した方が系のモル体積としては小さくな ることから、応力場印加により反応が促進され、高密度化 に寄与するものと期待できる。

実験と結果

2.1 実験

2. 1. 1. マトリックスの緻密化

市販の酸化マグネシウム粉体 (DISPERMAG TN-1、タテ ホ化学工業株式会社製)と酸化マグネシウム顆粒粉体 (PUREMAG FNM-G、タテホ化学工業株式会社製)を原 料粉体として用いた。図1に各粉体の粒子と顆粒の形態を 示す。顆粒の割合が0-100 wt%となるように秤量し、鉄 心入りのナイロンボールとともに容器に入れ、自転・公転 ミキサー(あわとり練太郎、株式会社シンキー製)で2000

ミキサー(あわとり練太郎、株式会社シンキー製)で2000 rpm、1 min の条件で遊星混合を行った。成形は、CIP 処理 前の予備成形と本成形(予備 CIP 処理)の二段階で行っ た。予備成形は、混合粉体を φ 15 mm の金型にいれ、一軸 加圧(50 MPa、30 sec)で行った。予備 CIP 処理は、静水 圧加圧装置(Dr.CHEF、株式会社神戸製鋼所製)で1000 MPa、1 min 保持の条件で行った。緻密化のための水添加 CIP 処理は、MgO の重量に対して9 wt%の水を成形体に添 加し、1000 MPa、60 min の条件で行った。比較のため、水 添加なしで CIP 処理を行ったサンプルも作製した。密度は 寸法密度測定により算出した。微構造は走査型電子顕微鏡 (SEM、JSM-6390LV、日本電子株式会社製)及び、多機



図1 原料粉の SEM 写真 (a) TN-1 (b) FNM-G(顆粒)

能分析透過電子顕微鏡 (JSM-F200、日本電子株式会社製) で観察した。結晶相の同定は XRD 測定 (Multiflex、株式 会社リガク製)により行った。熱伝導率はレーザーフラッ シュ法熱定数測定装置 (TC-9000H、アドバンス理工株式会 社製)で測定した。

2.1.2 蛍光体の添加

決定した顆粒添加率の混合粉に赤色蛍光体(株式会社サ イアロン製、Eu²⁺:CaAlSiN₃、以下 CASN)を内掛けで 10 vol%添加し、乳鉢で混合した。その後、マトリックスと同 様に予備成形、予備 CIP 処理、水添加 CIP 処理を行い、 CASN 粒子分散 MgO バルクセラミックスを作製した。ま た、他の蛍光体でも同様に蛍光体分散型 MgO バルクセラ ミックスの作製が可能かを確かめるため、黄色蛍光体(株 式会社サイアロン製、a-SiAlON:Eu²⁺、以下 a サイアロン) 及び緑色蛍光体(株式会社サイアロン製、β-SiAlON:Eu²⁺、 以下βサイアロン)を内掛けで10 vol%添加したサンプル の作製も行った。次に緻密化方法を比較するため、CASN を 10 vol%添加した予備 CIP 処理体を本プロセス(常温緻 密化)と1300 ℃、1 時間大気焼成したサンプルを作製し た。また、CASN 粒子を同量添加したエポキシ樹脂マトリ ックスプレートも作製した。微構造は走査型電子顕微鏡 (JSM-IT200、日本電子株式会社製)で観察し、蛍光特性 は、量子効率測定システム(QE-2000、大塚電子株式会社 製) で、励起波長455 nm、反射モードを用いて測定した。

2.2.結果と考察

2.2.1 マトリックスの緻密化

1 顆粒の添加率の決定と微構造観察

最適な顆粒量を決定するため、添加量を変えて作製した予 備 CIP 処理体と水添加 CIP 処理体の密度を図 2 に示す。 予備 CIP 体の密度は、どの混合割合においても 2.37-2.43 g·cm-3(相対密度 66-68 %) と高い値であった。また、水 添加 CIP 処理後の密度が最も高い割合は顆粒が 30%の時 で、その時の密度は 3.01 g·cm-3(添加した水が全て反応し たと仮定して計算した相対密度は96%)と常温で緻密化さ せた場合でも極めて高い密度を有していた。比較のため、 予備 CIP 体に水を添加しない以外は同じ方法で CIP 処理 を行ったサンプルの密度は、予備 CIP 後と変わらず、緻密 化していなかった。図3に(a)予備成形体、(b)予備 CIP 体 および(c)水添加 CIP 体の破面の SEM 写真を示す。この写 真から予備 CIP 後は、予備成形後と比較して個々の粒子が 密に詰まっている様子が確認できた。また、水添加 CIP 後 には高温焼成された焼結体のように緻密なファセットが 観察された。SEM 写真から粒子径を測定した結果、予備 成形体の粒子径 0.3 µm に対し、緻密化後の粒子径も 0.3 um と変わらず、高温焼成を行った場合とは異なり、粒成 長なく緻密化していた。以上の結果から、本プロセスにお ける最適な顆粒添加量を決定し、常温で粒成長することな く高度に緻密化させることに成功した。また、本プロセス



図2 顆粒の添加率と密度



図3 破面の SEM 写真 (a)予備成形体(b)予備 CIP 体(c)水添加 CIP 体



図4 水添加後のサンプルの構成相





では水の添加が不可欠であり、水を添加しない場合は緻密 化しないことが明らかとなった。

② サンプルの構成相の定性評価

水添加 CIP 後の構成相を明らかにするため XRD 測定を 行った。図4に水添加1GPaでCIPしたサンプルと水添加 後加圧しなかったサンプルの XRD 測定結果を示す。●は MgO を、▼は Mg(OH)2 のピークをそれぞれ示している。 図から、1GPa で加圧したサンプルは原料の MgO と Mg(OH)2のピークが確認された。一方、水添加後加圧なし で1h経過したサンプルからはMg(OH)2のピークは確認で きず、加圧により水和反応が促進したことが明らかになっ た。続いて、生成した Mg(OH)2の存在位置を明らかにす るため、TEM-EDX 分析を行った。Mg(OH)2 が存在してい る場所は、MgO より酸素が多いため、酸素分布を調べる ことで Mg(OH)2の存在位置を間接的に調べることができ る。図5に HAADF-STEM 像(a)と、酸素マッピング分析結 果(b)を示す。また、視認性をあげるために両者を重ね合わ せた合成画像を(c)に示す。(a)で明るい灰色の部分は MgO の粒子を表しており、粒子と粒子の間の粒界や空隙等は粒 子より暗く見えている。また、粒界は通常のセラミックス 焼結体より粒界が広いことが分かる。(b)のマッピング画 像では、黒から黄緑、黄色、赤、ピンク、白の順に酸素の モル濃度が高い領域を示している。合成画像(c)を見ると、 粒界や三重点に顕著に酸素の多い白い部分が分布してい る。以上の結果から、粒界に Mg(OH)2 が存在しているこ とが分かった。続いて、粒界に存在する水酸化物の形態を 観察するため、粒界部分の観察を行った(図6)。図5の HAADF-STEM 像と同様に、明るい灰色の部分は MgO 粒 子を示している。少し色の濃い部分は板状に粒子表面にく っつくように存在している。つまり、生成した Mg(OH)2は 粒界に板状で存在していることが明らかになった。以上の ことから、緻密化プロセスは、外部応力により粒子接触点 で MgO の溶解が促進し、粒子間の空隙に Mg2+が移動し て Mg(OH)2 が析出して緻密化すると推測される。

表 サンブルの特性						
マトリックス	螢光休 洒加量 [vol%]	密度 [g·cm*]	熱伝導率 [W-m ⁻¹ ·K ⁻¹]	内部 量子効率 [%]	外観 (UV365nm)	
MgO	0	3.01	7.8	-1		
	10 (CASN)	3.00	6.3	86		
	10 (a#+7PD)	2.97	5.6	73	0	
	10 (61/1705)	2.78	4.0	65		
エポキシ 樹脂	0	1.12	0.2	1		

2.2.2 蛍光体の添加

常温での緻密化プロセスにより、マトリックスの緻密化 が可能であることが明らかとなったので、蛍光体粒子を添 加した実験を行った。図7に CASN を 10vol%添加したサ ンプルの破面の SEM 写真を示す。CASN を添加した場合 も、マトリックスは緻密化し(b)、蛍光体粒子を保持するこ とに成功した。その時の密度は 3.00 g·cm-3 であった。表1 に CASN、α サイアロン、β サイアロンをそれぞれ添加し たサンプルの密度と熱伝導率、量子効率、および外観を示 す。比較として、エポキシ樹脂の特性値も記載した。サン プルに 365nm の UV ライトを照射したところ、蛍光が確 認できた(表1外観)。このことから、どの蛍光体を添加 した場合でも失活させることなく固定化できることが明 らかとなった。一方で、大気焼成したサンプルは常温緻密 化させたサンプルと比較して明らかに発光がなく、添加し た蛍光体は失活していた(図8)。マトリックスの熱伝導 率を比較すると、MgOはエポキシ樹脂の約40倍大きかっ た。また、蛍光体粒子を添加すると、蛍光体の種類によら ず密度は少し下がり、それに伴って熱伝導率も低くなるこ とが分かった。続いて、蛍光体が変質して蛍光波長が変わ っていないかを確かめるために各サンプルの蛍光スペク トル測定を行った。図9に結果を示す。それぞれ、赤色が CASN、黄色が α サイアロン、緑が β サイアロンを表し、 実線が蛍光体 10vol%を添加したサンプル、点線が蛍光体 粉体のみを表している。この結果から、常温緻密化プロセ スで作製したサンプルの蛍光スペクトルは、元の蛍光体原 料粉体と比較してピークシフトはなく、蛍光体が変質して いないことが証明された。

3. 今後の展望

今回開発した蛍光部材は、照明だけでなく商業用の大型 ディスプレイやプロジェクターなどへの利用が期待でき る。また、セラミックス製造において、最もエネルギー消 費の多い「焼成」を必要としない常温プロセスのため、環 境へ配慮や製造の低コスト化にも大きく貢献できる。







【参考文献】

- [1] 高橋拓実, 多々見純一, OPTRONICS, 6 (2016).
- [2] 高橋拓実, 多々見純一, 横内正洋, セラミックス, 52 (4), 245-248 (2017).
- [3] M. Oishi, S. Shiomi, T. Yamamoto, T. Ueki, Y. Kai, S.F. Chichibu, A. Takatori, and K. Kojima, J. Appl. Phys. 122, 113104 (2017).
- [4] N. Yamasaki, K. Yanagisawa, M. Nishioka, and S. Kanahara, J. Mater. Sci. Lett., 5, 355-356 (1986).
- [5] J. Guo, H. Guo, A.L. Baker, M.T. Lanagan, E.R. Kupp, G.L. Messing, and C.A. Randall, Angew. Chem. Int. Ed., 55, 11457-11461 (2016).
- [6] J. Fan, L. Zhou, Z. Cui, S. Chen, X. Fan, and G. Zhang, J. Lumin. 219, 116874 (2020).

マイクロカンチレバー曲げ試験による

LNKN セラミックスのメソスケール機械的特性評価

小野 悠綺、高橋 拓実、矢矧 束穂、多々見 純一

1. はじめに

圧電材料は振動や応力を電気信号に変換し、逆に電気信 号を機械的駆動力へと変換することができる機能性材料 である。近年は、スマートフォンやデジタルカメラに代表 される電子機器のたゆまぬ高性能化の需要増加に伴い、搭 載されているアクチュエータ、センサー、ブザーなどの圧 電デバイスもまた、さらなる高性能化が強く求められてい る 1。他方、デバイスの核心である圧電セラミックスは、 応力とひずみが繰り返し印加され、過酷な高負荷環境での 継続的な使用によって疲労が生じて破壊に至る。そのため、 圧電特性を左右するセラミックスの微構造を適切に制御 し、高性能化とともに高信頼性化を達成することは極めて 重要である²⁾。セラミックスの破壊の素過程は、微構造を 構成する粒子や粒界の破壊である。すなわち、材料の信頼 性はこれらの機械的特性に左右されるため、定量的な材料 設計を行うために直接評価する必要がある。圧電セラミッ クスの機械的特性は、マクロスケールにおいてはビッカー ス試験による評価を行った例があるが、粒子や粒界といっ た局所領域での特性を直接評価した例は手法がなく、確認 できなかった 3)。

本プロジェクトではこれまで、粒子や粒界のスケールに 相当するサブマイクロメートルから数十マイクロメート ル(メソスケール)の局所領域の機械的特性を評価する手 法として、セラミックスの微構造中に片持ち梁状の微小試 験片(マイクロカンチレバー)を作製して破壊試験を行う マイクロカンチレバー試験を開発し、Si₃N₄ セラミックス や単結晶 Si、SiO₂ ガラスなどに適用した結果を報告して きた⁴⁷。また、圧電セラミックスとして、積層セラミッ クスコンデンサ中の BaTiO₃ (BT)セラミックスに適用し た結果、応力誘起相転移が示唆される特異的な応カーひず み曲線を示すことを報告してきた⁸。この報告は、圧電特 性、特にひずみ特性が優位な種類の圧電セラミックスの設 計において重要な情報である。

本研究においては圧電セラミックスの中でも高いひず み特性を有する非鉛系の圧電セラミックスである (Li,Na,K)NbO3 (LNKN)に注目した。LNKNは、室温で単 斜晶もしくは正方晶をとる材料であり、圧電材料として普 及している Pb(Zr,Ti)O3 (PZT)に匹敵する非常に高い圧電 特性を持つことが知られている ⁹。そのため、BT 同様、 非鉛圧電デバイスとして応用が期待されている。しかし、 LNKN セラミックスの機械的信頼性を確保するための微 構造制御の検討は行われてきていない。 本研究では、マイクロカンチレバー試験を LNKN セラ ミックスに適用し、メソスケールの機械的特性を評価する ことを目的とした。測定用試料として、特に高い弾性コン プライアンス定数を有する分極軸の[101]が高度に一軸配 向した LNKN セラミックス(平均粒子径 15µm)¹⁰⁾を用い た。

2. 実験結果と考察

2.1 LNKN セラミックスのマイクロカンチレバー 試験片

マイクロカンチレバーを作製するために、[101]配向軸 に対して垂直な面をクロスセクションポリッシャ(日本電 子(株):IB-19520CCP)で処理して平滑化した。次に、集 束イオンビーム加工装置(SII ナノテクノロジー(株): XVision 200TB)を用いて、幅 1µm、長さ 12µm、高さ 2µm、 断面形状が五角形のマイクロカンチレバーを粒界や気孔、 き裂といった欠陥がないと予想される箇所に選択的に作 製した(図 1)。

このカンチレバーを試験片中に5本作製し、そのうちの 4本(1)、(2)、(3)、(4)において破壊に成功した。図2は、 SEMで観察したマイクロカンチレバーの(A)試験片作製箇 所の俯瞰図と(B)上面、(C)側面、(D)正面の拡大像である。 また、(E)にカンチレバーの観察方向を図に示す。いずれの 試験片も、外観からは強度に影響する可能性がある大きな 欠陥等の存在が認められなかった。

2.2 LNKN セラミックスのメソスケール機械的特

マイクロカンチレバー試験片の曲げ試験は、トライボイ ンデンター(Bruker: TI premier)で行った。荷重点は、試 験片の端から10µm離れた位置とし、破壊に至るまで荷重 を連続的に印加した。図3に今回破壊に成功した4本の試 験片(1)、(2)、(3)、(4)から得られた荷重-変位曲線と、図 4に梁理論を用いて計算した応力-ひずみ曲線を示す。

これらの図から求められた変位と荷重に加えて、曲げ強度、変位が 100nm 程度までの領域から求めたヤング率を表1に示す。また、破面の SEM 観察像を図5に示す。

試験片(1)は曲げ強度が 3.84GPa、ヤング率が 248GPa と 非常に高い値を示した。この値は、過去に報告された LNKN の弾性コンプライアンス定数から求められたヤン グ率 70GPa よりも著しく高い値となった¹⁰。この破面を 観察すると、破面に対して垂直な方向に界面が存在してい



図1 試験片を作製した LNKN セラミックスの CP 処理面



図 2 作製したマイクロカンチレバーの SEM 観察像 (A) 試験片作製箇所の俯瞰図、(B) 試験片の上面、 (C) 試験片の側面、(D) 試験片の正面、 (E) 試験片の観察方向図

ることがわかる。これは、カンチレバー内部に結晶粒界が 引張面と垂直に存在したことが予想される。これにより変 形が妨げられた結果、曲げ強度とヤング率が著しく高い値 となったと考えられる。加えて、カンチレバーが根本から 離れた位置で破壊していることが確認された。これは、破 壊箇所において SEM 上で確認できなかった欠陥が存在し ていたことが考えられる。

試験片(2)、(3)は応力-ひずみ曲線に変曲点が観察され たものの、曲げ強度が1.29GPa(試験片(2))、0.75GPa(試 験片(3))と低い強度で破壊されていた。この試験片の破面 を観察すると、いずれも3粒子界面らしきえぐれた破面が 観察されたため、これらの試験片は結晶粒界の影響で強度 が著しく低下したことがわかる。一方で、試験片(2)は破壊 後もカンチレバーが完全に分離せず、局所的につながって



Sample No.		(1)	(2)	(3)	(4)
Displacement	[µm]	0.70	0.64	0.81	2.04
Load	[µN]	131	72.9	70.3	140
Max stress	[GPa]	3.84	1.29	0.75	1.57
Young's modulus	[GPa]	254	86.6	52.0	26.9

いる形状が観察された。これは、結晶粒界と比べて非常に 変形しやすい相が存在することを示唆している。ヤング率 に関しては、試験片(2)が 86.6GPa、試験片(3)が 52.0GPa と LNKN の既報のヤング率と近い値となった。

試験片(4)においては、曲げ強度が 1.57GPa と試験片(1) を除けば高い値を示した。この試験片の破面を観察すると、 カンチレバー破面が垂直に切り立っていることがわかる。 この破面形状となった原因として、2粒子界面が試験片内 に存在した可能性が考えられる。この試験片のヤング率は 26.9GPa と低い値となった。LNKN は室温付近に単斜晶と 正方晶相の相転移境界があることが知られており、ヤング 率の変化は相転移が影響している可能性が考えられる¹¹)。



図5 破壊後のカンチレバー破面

応力の印加により材料の硬さが変化していることを示し ている。このような現象は、応力に誘起されたドメインス イッチングあるいは相変態に起因しているものと考えら れる。本試料は、CP処理を行った面と並行に(101)が配向 した試料を用いている。このため、引張方向に対しては (101)に直行する結晶軸、すなわち[010]もしくは[011]、 [110]、[101]、[101]が配向していることが予想される。 LNKN は[101]に高い弾性コンプライアンス定数を有して いることから、90°方向のドメインが関与していると予想 されるこれらの結晶方位において高いひずみ量を許容で きたと考えられる¹⁰⁾。

また、この材料における荷重一変位曲線の線形領域において、ヤング率は既報の値に近い数値であった。このことから、メソスケールでの粒子一個分の機械特性とバルク体の特性が一致するという傾向が改めて示された。一方で、ヤング率が極めて高い値となる試験片も存在しており、その原因としてはカンチレバー内部にあった結晶粒界及び相転移の影響であることが示唆されている。特に相転移については、LNKN は室温付近に単斜晶と正方晶の相転移境界が存在することが知られているため、室温下では局所的に結晶相の異なる箇所が存在する可能性が存在する。そのため、試験箇所の相状態を改めて検討する必要がある¹¹。

過去にBTセラミックスへのマイクロカンチレバーを用 いた曲げ試験が行われており、本研究で得られた結果と同 じく応カーひずみ曲線に変曲点が表れたことが報告され ている⁸。このことから、他のペロブスカイト構造を有す る圧電材料に対しても、応力による非線形な変形挙動が同 様に発生しうる可能性が示された。

本研究において、LNKN は最大の許容ひずみ量が 5%以 上というユニークな機械的特性を持つという結果が得ら れている。過去に報告された BT セラミックスの曲げ強度 が約 4GPa、ひずみ量が 3-4%であったことから、LNKN が 非常に変形しやすい材料であることが示されている。この 結果は、LNKN において電気的に測定された高いヤング率 とは矛盾しない¹⁰。

3. 今後の展望

今回の研究により、LNKN はメソスケールにおいて特異 な力学特性を持っていることが示唆された。同時に、同じ ペロブスカイト構造を持つ材料系においても、応力に対し て類似した挙動をする可能性が示されている。このような 圧電セラミックス材料における特異な力学特性は、将来的 に応力センサーや振動発電デバイスのような過酷な環境 下で使用するデバイスを設計する上で重要な情報である と考えられる。

今回の研究を通して得られた知見を活かして、圧電セラ ミックスにおける材料設計の新たなる指針を示すことが 期待される。将来的には、結晶方位とひずみ方向の関係に ついて明らかにすることを検討している。応力--ひずみ曲 線の挙動が引張面(101)と直行する結晶軸と密接に関係し ていることが予想されるが、どの軸の寄与が大きいかにつ いては明らかになっていない。加えて、LNKN は異なる結 晶相が混在している可能性があり、試験箇所の結晶相を正 確に把握することが必要である。よって、結晶相及び結晶 方位と機械特性の影響について明らかにすることができ れば、圧電セラミックスにおける結晶方位と応力の関係を 明らかにするとともに、高特性・高信頼性圧電セラミック スの設計指針を与えることが期待される。この結晶方位及 び結晶相を評価するために、EBSD 測定を行い、改めて結 晶相・結晶方位と応力--ひずみ曲線の関係について評価す ることを検討している。

【参考文献】

- 今中佳彦,佐野晴信,長田実,土屋哲男,柿本健一, 森分博紀,セラミックス,51,12,830-835 (2016)
- 2) 多々見純一, セラミックス, 56, 1, 1-6 (2021)
- Y. Chen, C. Miao, S. Xie, L. Xu, Q. Wang, J. Zhu, Z. Guan, J. Am. Ceram. Soc., 1–7 (2016)
- J. Tatami, M. Katayama, M. Ohnishi, T. Yahagi,
 T. Takahashi, T. Horiuchi, M. Yokouchi, K. Yasuda,
 D. K. Kim, T. Wakihara, K. Komeya, J. Am. Ceram. Soc,
 98, 3, 965-971 (2015)
- S. Fujita, J. Tatami, T. Yahagi, T. Takahashi, M. Iijima, J. Eur. Ceram. Soc., 37, 14, 4351-4356 (2017)
- J. Tatami, M. Katayama, M. Iijima, T. Yahagi, T. takahashi, NEW GLASS, Vol.30, No.114, 30-33 (2015)
- 高橋拓実, 矢矧束穂, 飯島志行, 多々見純一, KISTEC 研究報告 2019, 95-98 (2019)
- H. Yamaguchi, J. Tatami, M. Iijima, J. Ceram. Soc. Jpn., 127, 6, 335-338 (2019)
- Y. Guo, K. Kakimoto, H. Ohsato, Appl. Phys. Lett., 85, 4121-4123 (2004)
- Y. Ono, T. Harada, H. Shimizu, Y. Doshida, T. Honma, S. Tanaka, J. Ceram. Soc. Jpn., 127, 12, 887-892 (2019)
- 11) K. Hatano, K. Kobayashi, T. Hagiwara, H. Shimizu,Y. Doshida, Y. Mizuno, Jpn. J. Appl. Phys., 49, 09MD11 (2010)

波長掃引型光コヒーレンストモグラフィーを基軸とする

内部構造の非破壊観察・評価システムの開発

1. はじめに

セラミックスの機能や信頼性を低下させる気孔やき裂 といった欠陥は、粉体から焼結体に至るプロセスの過程で 生じる粒子集合体や空隙といった不均質構造に由来する。 しかし、いつ・どこで・どのように生成するのか?という 現象の実態は未だブラックボックスである。不均質構造の 的確な制御は、高機能化と高信頼性化の要であるため、ブ ラックボックス化した不均質構造の生成過程の直接的な 解明は、セラミックス分野の今後を左右する喫緊の課題で ある。しかし、高温や応力場、せん断場などの外場が作用 した環境下で起こる、多様な系(粉体、スラリー、成形体、 焼結体)での内部構造変化過程の実態を一貫して評価する 手法はなかった。これを実現するためには、非破壊+高速 +3D で内部構造情報を取得することが求められる。

波長掃引型光コヒーレンストモグラフィー(Swept Source Optical Coherence: SS-OCT)は、医療分野を中心に 発達した非侵襲の光干渉断層計である¹⁻³⁾。身近には眼底 検査装置として実用されている。生体観察を基盤とするこ とから、既製品の光源は「生体の窓」と呼ばれる近赤外域 のレーザー光を採用しており、内在する屈折率が異なる界 面での反射光を検出する。近赤外光は生体に限らず、金属 を除く幅広い物質に対して透過性を示すため、本質的には 非常に汎用性に長ける観察技術であるが、セラミックスを はじめ、構造中に多くの散乱体を含む不透明材料に対して は積極的に展開されていない。

SS-OCT は、既に産業利用が確立している X 線 CT や超 音波顕微鏡などの非破壊観察技術にはない様々な特長が ある。大きな特長の一つは、観察速度である。SS-OCT の 観察速度は、光源の掃引周波数と観察空間の大きさ、空間 分解能で決まる。現状、市販装置に搭載されている光源の 掃引周波数は 20-100 kHz で、これは深さ方向スキャン

(A-scan) が毎秒 2-10 万回行われることになる。A-scan を水平方向に繰り返して断層像を取得する B-scan の速度 は、A-scan 数と掃引周波数より見積もることができる。例 えば、20 kHz 光源で水平方向に 1 mm の範囲を 200 分割

(B-scan 方向の分解能は 5 µm/pixel) して観察する場合、 B-scan のフレームレートは 100 fps である。すなわち、ビ デオレート以上の高速で断層像を取得でき、リアルタイム 2D 観察が可能である。さらに、奥行き方向の B-scan 数を 同じ(=1 mm³の観察空間)とすれば、3D 情報の取得に 要する時間はわずか 10s である。さらに SS-OCT は、光干 渉により光源と同じ波長と位相の反射光のみを検出する ことから、周囲からの迷光を原理的に検出しない。すなわ

高橋 拓実、多々見 純一

ち、高温での輻射も検出しないため、室温から一貫したそ の場観察が可能である。ハード面では、反射光を捉えるプ ローブ部が家庭用ビデオカメラのように取り回しが可能 (干渉計と接続している光ファイバーの長さの範囲内)で あるため、可動性に優れる。また、装置の構成が一般的な パソコンラックに積載できる程度の大きさと重量なので、 可搬性もよい。こうした特長から、SS-OCT 装置は電気炉 や材料試験機などの異種装置との融合性も高く、組み合わ せ次第で様々な環境でのオペランド観察が実現できる。

以上の特色から、我々はSS-OCT がセラミックス製造プロセス中で起こる不均質構造の生成過程を解明し、観察情報のフィードバックによる的確なプロセス制御を実現する大きな一助になり得ると考えた。そこで本研究では、SS-OCT を基軸とした内部構造の非破壊観察・評価システムを開発し、製造プロセス中で起こる内部構造変化過程を明らかとすることを目的とした。本稿ではまず、OCT の有用性を検証するための基盤的知見として、焼結体中の球状欠陥と面状欠陥の静的観察と非破壊検査への展開について述べる。次に、動的観察として、スラリー中の内部構造変化過程と、脱脂、焼成中の成形体の内部構造変化過程の観察について述べる。さらに、より高度な情報を取得するための3D構造変化過程の観察として、せん断場印加によるスラリー中の粒子集合構造の変化、一軸加圧下の顆粒粉体層中の空隙形態の変化について述べる。

SS-OCT装置の概要

本研究で用いた SS-OCT 装置(IVS-2000WR、santec 株 式会社製)の主な仕様を表1に示す。光軸方向の分解能は 光源の中心波長と波長掃引幅、試料の屈折率より決定され る。面内方向の分解能は光源の中心波長とレンズの焦点距 離と開口数から決定される。表1に示すように、本研究で 用いた SS-OCT 装置は、いずれも µm オーダーの高分解能 である。また、光源の掃引周波数も20 kHz と高速である ため、内部構造のリアルタイム 2D 観察や高速 3D 観察が

表 1 SS-OCT 装置の主な仕様	
Center wavelength / nm	1300
Sweep width / nm	170
A-scan rate / kHz	20
Axial resolution (n=1) / µm	4.4
Lateral resolution / µm	9
Scanning range / mm	20×20





в



図2 深さ方向に連続する輝点の形態変化の一例.中 心部の輝点の集合体が環状に広がるにつれ,内側に輝 度の低い領域が出現する.

可能である。

3. 実験結果

3.1 静的観察

3.1.1 焼結体中の球状欠陥と面状欠陥

図1に、球状カーボン粒子を造孔剤として添加して作製 した Al₂O₃ 焼結体で観察された深さ方向(A-scan 方向)に 連続性をもつ信号を含む OCT 原画像(左)と画像処理後 の OCT 像(右)を示す。前述の通り、OCT 観察では試料 に内在する屈折率が異なる界面での反射光を検出する。原 画像中で輝度の高い領域は信号強度が高いことを意味し、 屈折率差が大きい界面が存在していることを示唆する。こ の点に着目すると、多くの内在する光学的に不均質な構造 を検出できていることが定性的に理解できる。他方、OCT 原画像は画像処理後の OCT 像と比べると不鮮明に見える。 これは、スペックルパターンと呼ばれる信号光同士の干渉 による粒状ノイズであり、観察像に一様に現れる。ただし、 内部構造を直接的に反映した信号ではないため、強度は弱 く、画像間に連続性がない(=内部構造が僅かでも変化す るとパターンが一変する)という特徴がある。したがって、 Image J 等の画像処理ソフトウェアによりスペックルパタ ーンを大幅に低減することは可能である。画像処理後の OCT 像は、原画像に対して平均化や輝度コントラスト調 整を行ったものであるが、信号の視認性は大幅に向上して いることが分かる。図2は、画像処理後のOCT像のうち、 深さ方向に連続的な形態変化を示す一部の信号を拡大表 示した図である。中心部に存在する輝度の高い領域(輝点 の集合体)が深さ位置を変えるにつれて環状に広がるとと

図3 同一の観察領域,同一のスケールで比較した(A)深さ方向に積算した 画像処理後の OCT 像と(B)透過モードの近赤外線顕微鏡像,(C)超音波顕微 鏡像,(D)X線 CT 像.

D

もに、その内側に輝度の低い領域が出現していく様子が見 えた。輝度の低い領域は、光学的に不均質な構造が存在し ないことを示唆する。Al₂O₃焼結体中で想定される光学的 に不均質な構造は、粒子と粒子がなす粒界と、粒子と空気 がなす気孔やき裂といった欠陥であるが、図2のような形 態変化の場合は、粒子と空気からなる強い反射を伴う界面 と、界面がなく透過する開いた空洞部をもつ欠陥に起因す ると考えられる。そこで、欠陥の形態を明らかにするため に、既に技術的に確立した手法である近赤外線顕微鏡の透 過モード、超音波顕微鏡、X線CTを用いて、同一の領域 を観察した。その結果を図3に示す。近赤外線顕微鏡像で は試料背面からの透過光を検出しているため、輝度の低い 領域は光が散乱する光学的に不均質な構造である。超音波 顕微鏡像は、試料上部から照射した超音波の反射波を検出 しているため、周囲と密度が異なる不均質構造を可視化す る。X線CT像はX線吸収率差を可視化するため、輝度の 低い領域は吸収するような物質が存在しないことを示す。 こうした異なる観察像の性状を勘案した結果、OCT 像で 連続的な形態変化を示した信号(図3中、▼や▲でマーク) は、いずれも球状欠陥(気孔)の界面での反射と内部での 透過に起因することが明らかとなった。

図4は、実部材で破壊源となり得る微小欠陥を人工的に 導入したAl₂O₃焼結体中で観察された(A)球状欠陥と(B) 面状欠陥のOCT像と、対応する同一断面のX線CT像で ある。図1-3は、入射方向から観察したOCT像であるの に対して、図4は入射方向に垂直な方向(C-scan方向)か ら見たOCT像である。図4(A)に示すように、試料の表 面から0.74mm、端部から0.67mm離れた位置に「こ」の



図 4 Al₂0₃焼結体に内在する(A)球状欠陥と(B)面状欠陥の OCT 像と比較用の同一断面の X 線 CT 像.



図 5 3D 可視化した Al₂O₃焼結体に内在する球状欠陥群.

字型の信号が見られた。奥行方向(C-scan 方向)への連続 性を確認したところ、図1に類似した形態変化(この場合 は環状ではなく「こ」の字型)が確認された。これに対し て、 X線 CT による観察からは全く同じ空間位置に球状 欠陥が存在することが確認された。球状の界面では反射光 の強度に分布が生じる。すなわち、入射方向と界面との成 す角が 180°に近づくほどプローブに返ってくる反射光強 度は低下するため、入射方向と平行な断面では「こ」の字 型として検出されたと考えられる。他方、図4(B)では、 試料の表面から1.15 mm、端部から0.51 mm離れた位置に 線状の信号が見られた。そこで同一断面の X線 CT 像を比 較した結果、面状欠陥が存在することが確認された。特筆 すべきは、医療用に特化した仕様の SS-OCT 装置による簡 便な非破壊観察にも関わらず、1mmを超える内部の欠陥 も検出できている点であり、内部構造の散乱状態によって は、かなりの高深達が期待できると考えられる。

図5は、球状欠陥を含む Al₂O₃焼結体の OCT 原画像に 対して、機械学習で自動最適化した画像処理プロセスを適



図 6 0CT 観察で検出された Al₂0₃試験片の引張面側に内在す る粗大欠陥と予測強度.



図 7 最低予測強度を示した粗大欠陥の 0CT 像と三点曲げ試 験後の破面の SEM 像の比較.

用した後に再構築した 3D 像である。3D 像中の構造体の 色は、カラーバーの通り同体積の球の直径で近似した大き さと対応している。図4で示したように、人工的に導入し た球状欠陥に起因する粗大な「こ」の字型の信号はもちろ ん、これらと同等の信号強度で様々な大きさの光学的不均 質構造を多数検出できた。これらは不定形で広く分布して 存在していることから、原料粉体の不均質性や製造プロセ スに起因して生じた「意図していない光学的不均質構造」 に由来する信号と考えられる。

3.1.2 非破壊検査への展開

図5までの結果から、OCT像上の信号の形態と実際の 不均質構造の形態(球状欠陥と面状欠陥)との相関関係が 明らかとなった。そこで、本知見を非破壊検査へと展開す べく、明確に破壊源となり得る粗大欠陥を人工的に導入し たAl2O3試験片を作製し、荷重印加点に対応する範囲の引 張面側をSS-OCTで非破壊観察し、粗大欠陥に起因すると 考えられる信号を抽出した。さらに、それらの寸法と形状、



図 8 水系スラリーの乾燥に伴う体積収縮とき裂生成過程 (固体含有率:30 vol%,分散粒子:Al₂O₃,分散媒:水,分散 剤:ポリカルボン酸を主成分とする市販品).



図 9 体積が収縮した後に厚さ方向に進展したき裂を内包す る乾燥スラリーの表面近傍の拡大図

SCF 法で求めた破壊靭性から試験片の最低強度を予測した。その結果を図6に示す。予測された本試験片の最低強度は300 MPa だった。そこで、本試験片を三点曲げ試験に供したところ、299 MPa の曲げ強度が得られ、OCT 観察に基づいて予測した最低強度と非常によく一致した。図7は、最低予測強度を示した粗大欠陥のOCT 像と三点曲げ試験後の破面の走査型電子顕微鏡(SEM)像の比較である。図7より、OCT 像で観察された欠陥と破壊試験後の試験片の破面で観察された破壊源の寸法と位置が非常によく整合していることがわかる。以上の結果から、OCT 観察がセラミックスの非破壊検査技術として有用であることが明らかとなった。

3. 2 動的観察

3. 2. 1 スラリー中の内部構造変化過程

液体の分散媒に固体の粒子が分散したスラリーは、複雑 形状の付与や、電場や磁場といった外場エネルギーを利用 した粒子集積構造の制御など、セラミックス製造プロセス の機能向上に欠かせない湿式成形プロセスの要である。ス ラリー中の粒子集合構造は成形体の内部構造に強く反映 されるため、これを直接的に評価できれば、粘度やレオロ ジー特性など間接的に評価された情報から経験的に制御 されてきたスラリー中の粒子の分散・凝集を的確に制御す ることが可能となる。そこで、まず基本となるスラリーの 乾燥中の内部構造変化過程について、OCT 観察を試みた。

図8は、スライドガラス上に滴下した水系スラリーの乾 燥中の内部構造変化過程を動的観察した結果である。乾燥 は、液面が揺れないように液滴から十分に離れた上方にド ライヤーを設置し、温風を流して行った。観察面は液滴と スライドガラスの界面に対して垂直な断面である。まず、 乾燥開始から 80 s までの期間では、液面の高さが経時で 低下し、やがて曲面だった液滴の表面は平坦化した。本実 験ではスラリーの重量変化を測定していないが、この変化 はスラリー中から分散媒である水が蒸発により除去され たことに起因しており、恒率乾燥に相当すると考えられる。 また、80s時点では表面が一層明るく観察された。これは、 液滴表面が平坦化したことで、表面反射率が大きくなった ためである。さらに乾燥が進行すると、96s時点で乾燥体 の内部に輝点が現れ、ほぼ同時に輝点から平坦化した表面 に暗い縦線が走る様子が観察された。この輝点から表面周 辺の拡大図を図9に示す。これまでの結果で示してきたよ うに、OCT 像では反射が多数起こる領域はより信号強度 が高く、反射が起こらず光が透過する領域は信号強度が低 くなり、通常は信号強度の高低と画像の輝度の高低とが対 応する。図9に示すように、深部にある輝点から表面に至 るまで、輝度の低い直線状の信号が観察された。これは、 Al₂O₃スラリーの乾燥体の表面から内部まで連通したき裂 であり、外観の目視でも確認できた。以上の結果から、OCT によりき裂の発生過程を観察できることが明らかとなっ た。なお、き裂先端の輝度が特に高い理由については、周 囲と屈折率が異なる点を想定するに、アルミナの凝集構造 や、分散剤(有機物)が偏析した領域であり、本実験での き裂発生に大きく関与したと推測される。

3.2.2 脱脂中の成形体の外形変化と内部構造 変化

脱脂プロセスは、成形プロセスに至る過程で様々な目的 で添加した有機物を熱分解で除去し、焼結を阻害するよう な粒子間の介在物を取り除くための必須工程である。しか し、処理温度は数百℃と低く、また添加した有機物も粉 体に対しては数 wt%と相対的には量が少ないことから、顕 著な内部構造変化は起こらないだろうと考えられてきた。 しかし、とりわけテープ成形やゲルキャスティングのよう に、多量の有機物を含む成形体や、熱分解で生じたガスが 系外に排出されにくい大型の成形体などでは割れが起こ ることは経験的に知られていたものの、何が起こっている のかという現象の実態の理解までは積極的に検討されて いなかった。そこで本研究では、SS-OCT 装置とガスフロ ー可能な小型電気炉、重量変化のリアルタイム測定のため の電子天秤、ガス分析のための FT-IR を組み合わせた新規 評価システムを開発し、脱脂中の成形体の内部構造変化の オペランド観察を試みた。

図 10 は、PVB バインダーを 10 wt%含む成形体の脱脂 中の外形変化と内部構造変化過程をオペランド観察し、図 11 に示すように重量変化が特徴的な温度での断面像であ る。(A) は基準となる室温での OCT 像である。200°C を



図 10 PVB バインダーを含む成形体の脱脂中の外形変化と内 部構造変化のオペランド観察.



図 11 OCT 観察と同時測定した脱脂中の成形体の重量変化.



図 12 焼結温度が異なる Al₂0₃ 粉体を積層(単体での焼結温 度は上層が 1300 °C, 下層が 1600 °C)した成形体の焼結中 の外形変化と内部構造変化のオペランド観察.

超えた(B)の時点では、外形や内部構造の変化が見られ ないものの、成形体の上部に激しく流動する細かい輝点の 集合体が生じた。この時、緩やかな重量減少が始まってい たことから、有機物の揮発でエアロゾルが生じ、成形体の 外を流動していたと考えられる。さらに 270 ℃ を超過し た(C)の時点では、急激な重量減少とともに成形体の外 形が凸状に膨らみ始め、重量減少が続く(D)290°C時点 では表面近傍にき裂が生じるなど、劇的な変化が起こった。 このような脱脂過程における膨張、き裂生成の過程のリア ルタイム観察は、世界初である。さらに温度が上昇し、(E) 520 ℃を超えると、成形体内部の信号強度が急激に低下し て黒化したが、(F) 590 ℃ を超えると内部の信号強度が再 び高くなった。これは、有機物の炭化による近赤外光の吸 収と、温度上昇により熱分解が進行し、吸収の影響が低減 したためと考えられる。重量減少は、600℃を超えて終了 した。なお、詳細は割愛するが、本観察中に生じたガスは FT-IR で同時分析しており、重量減少に対応しながら段階 的に PVB の熱分解が進行していくことも明らかにした。 以上のように、脱脂過程をオペランド観察してみると、有

機物の熱分解挙動の影響を受けて、非常に顕著な構造変化 が起こっていることが実験的に明らかにされた。こうした 知見は、これまで本質が見えなかった脱脂過程での製造エ ラーを根本的に取り除く大きな一助になるものと期待で きる。

3.2.3 焼成中の成形体の外形変化と内部構造 変化

焼結プロセスは、セラミックス=焼き物というイメージ があるように象徴的な主要工程である。焼結現象を解明す るために、これまで透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いたナ ノスケールの粒子の焼結の動的観察 4,5)や、高温環境走査 型電子顕微鏡を用いた粒成長と気孔除去のその場観察 の などが行われてきたが、微構造形成に大きく影響するミク ロスケールの焼結現象の実態はブラックボックスのまま である。その要因の一つは、高温下での散乱光や輻射の影 響を低減し、高熱による損傷から検出器を保護するか、と いう技術的な巨壁であった。本研究では、SS-OCT 装置と 焼成炉を組み合わせた評価システムを開発し、様々な物質 や構造の成形体の焼結中の外形変化と内部構造変化の観 察に成功するのみならず、外形寸法の変化から高精度な収 縮率測定も同時に可能であることを見出してきた。本稿で は、その中でもとりわけ興味深い変化が見られた事例につ いて述べる。

図 12 は、焼結温度が異なる Al2O3 粉体を積層(単体で の焼結温度は上層が1300°C、下層が1600°C)した成形体 の焼結中の外形変化と内部構造変化をオペランド観察し、 特に変化が大きかった温度における断面像である。昇温速 度は100°C/minとした。室温での断面像を基準とすると、 まず 1300 ℃ を超えて外形が凹状に大きく変形した。これ は上層の低温焼結層の緻密化に起因すると考えられる。さ らに1600°Cに到達すると、全体が収縮すると同時に反り が戻った。さらに5min保持すると、反りはほぼ元通りに 戻った。これは、下層の高温焼結層の緻密化が起こったた めと考えられる。図 12 の結果で特筆すべきは、固相焼結 にもかかわらず、大きな変形を繰り返してなお、層間で剥 離することもなく全体が緻密化した点である。また、OCT 観察で異方的な焼結収縮に起因する変形挙動のその場観 察ができたことは、異種物質の共焼結が不可欠な圧電材料 や電池材料といった機能性セラミックス材料の高機能化 と高信頼性化に資する定量的な材料設計を図る上で重要 な知見が得られるものと期待できる。

3.3 動的観察と3D可視化による4次元評価

3.3.1 せん断場印加によるスラリー中の粒子 集合構造の変化

3.2.1 で述べたように、スラリーはセラミックス産業を 支える重要な粉体制御形態の一つである。従来、動的粘弾 性測定装置(レオメーター)で得られるスラリーのレオロ ジー特性と粒子の分散・凝集状態は密接に関係すると考え られてきたが、せん断場下での粒子集合構造の実態はブラ ックボックスだった。そのため、同じレオロジー特性のス







図 14 せん断速度の上昇に伴う大きな粒子集合構造の解砕 の様子の定量可視化.

ラリーでも成形体に個体差が生じ、最終製品である焼結体の機能や信頼性が低下するなどの問題が生じていた。そこで本研究では、SS-OCTの時空間的な高分解能を活かしたスラリーの内部構造変化とレオロジー特性の同時測定によるオペランド観察と、特定のせん断速度での3D構造情

報の取得による4次元評価を行うことで、せん断場下にお ける粒子集合構造変化過程の実態の解明を試みた。評価シ ステムは、SS-OCT装置とレオメーター(試料室の底板を 石英プレートで置換)を融合して構築された。

図13に、せん断場下におけるレオロジー特性の異なる スラリー中の粒子集合構造の変化過程を動的観察し、せん 断粘度が大きく異なるせん断速度での OCT 像を代表とし て示した。観察用スラリーは、水系の 10 vol%の Al₂O₃ス ラリーであり、pH 調整によりレオロジー特性を制御した。 したがって、スラリー中の散乱源は水と粒子の界面と凝集 粒子に内在する粒子と空気の界面が考えられる。また、画 像処理により粒子と液体の界面での反射に起因する輝度 の高い信号を抽出した。OCT 像の下方に見える白線は、 レオメーターの石英プレートとスラリーの界面であり、こ れよりも上がスラリー部である。せん断速度の上昇に対し てせん断粘度が変わらないニュートニアン挙動を示した 青色で囲ったスラリーにおいて、せん断速度の上昇に対し て輝点の数や大きさの分布に顕著な変化は見られなかっ た。一方、せん断速度が上がるにつれてせん断粘度が低下 する非ニュートニアン挙動を示した橙色で囲ったスラリ ーにおいては、せん断速度の上昇とともに輝点の数や大き さに変化が見られた。動画ではこの変化がより顕著に理解 できた。こうした OCT 像の差異は、せん断速度の上昇に より粒子集合構造が変化していることを示唆する。そこで、 低せん断速度域で 3D 観察を行い、抽出した輝点を 3D 構 築して粒子集合構造変化の定量評価を行った。その結果を 図 14 に示す。不定形の輝点の大きさは同じ体積の球の直 径で近似し、さらに 10 µm を境に色分けして表示した。図 14から、3D 可視化によって、10 µm 以上の球相当径の粒 子集合構造(黄色)がせん断場を印加するコーンプレート 側からせん断速度の上昇に伴って段階的に減る様子を明 らかにすることができた。また、ヒストグラムで示した粒 子集合構造の体積分率の変化からも、せん断速度の上昇に 伴って大きな粒子集合構造が解砕される様子が定量的に 示された。以上のように、OCT 観察を基盤としたスラリ ーの4次元評価は本研究が世界初の試みであるが、多くの 結果が従来の粉体プロセス科学で積み重ねられてきた知 見とよい一致を示した。その一方で、コーンプレートと石 英プレートの間に必然的に生じるせん断速度の分布の影 響を強く受けた粒子集合構造変化など、既存のスラリー特 性の理解と制御に一石を投じる興味深い知見が得られた ことは大変有意義であり、湿式成形プロセスの高度化の大 きな一助になるものと期待できる。

3.3.2 一軸加圧下の顆粒粉体層中の空隙形態の 変化の3D観察

ー軸加圧成形は、セラミックス分野のみならず、食品や 医薬品といった錠剤製品の製造にも欠かせない古典的で 生産性の良い乾式の成形プロセスである。原料として、金 型への充填性がよい顆粒を用いることが一般的である。顆 粒は、一次粒子からなる粉体と、バインダーや滑剤といっ た顆粒特性を左右する有機系添加物とをスラリー化して



図 15 浸液透光法で観察した原料に用いた市販 Al₂0₃顆粒の 内部構造.



図 16 SS-OCT 装置と材料試験機を融合した評価システム.



図 17 一軸加圧下の顆粒からなる粉体層中の 2D 断面におけ る空隙形態の連続的な変化.

混合し、種々の方法で造粒して作製するが、その製造過程 に応じて顆粒内構造は大きく異なる。また、一軸加圧とい う異方的な応力場の作用や、金型を使用することによる粉 体層中の応力分布に起因して不均質な粒子充填を生じる ことはよく知られている^{7.8}。圧縮成形で起こる現象の実

態解明のために、成形圧力と成形体密度の関係の実験的解 明によるモデルの妥当性の検証
のや、一個顆粒の圧縮試験 による顆粒特性評価と成形特性の相関解明 10、離散要素 法 (Discrete Element Method: DEM) や有限要素法 (Finite Element Method: FEM) によるシミュレーションなどのア プローチが行われてきた¹¹⁻¹³⁾。近年では、DEM を基とす る粉体シミュレーションにおいて、単粒子圧縮試験などで 顆粒特性を明らかにし、これらの実験結果にフィッティン グしたパラメータを用いて圧縮挙動を予測するとともに、 X線CTで可視化されたモデル圧粉体の内部構造と比較し てモデルの妥当性を検証した報告もある14%。しかし、応力 場下の粉体層中の粒子充填過程を直接的に観察した報告 はない。そこで本研究では、一軸加圧中の顆粒からなる粉 体層の 2D 断面を動的に観察し、さらに断続的な 3D 情報 の取得と画像処理によって粗大な空隙部を抽出し、加圧に 伴う空隙形態の変化過程の3D可視化と定量評価を行うこ とを目的とした。評価システムは SS-OCT 装置と材料試験 器を融合して構築された。

図 15 は、浸液透光法で観察した原料に用いた市販 Al2O3 顆粒の内部構造である。浸液透光法は、Al2O3と屈折率が 近い浸液 (今回はジョードメタン)を含浸させることで顆 粒内の散乱を低減し、透過性を向上させることで、内部構 造を可視化する手法である。したがって、暗く見える領域 は Al₂O₃ 粒子と屈折率差が大きく異なる界面が存在する ことを意味する。図 15 より、顆粒径は 20-80 µm で、顆 粒の中心部に数十 µm 級のヘソ状の窪み(中空構造)を有 することが分かった。また、顆粒内にも点状、あるいは線 状の暗部が存在するが、顆粒を構成する平均の一次粒子径 は 0.1 µm であることから、顆粒内空隙はサブミクロン以 下と考えられる。したがって、OCT 観察では顆粒径に対 応したミクロンスケールの顆粒間空隙や、顆粒内の中空構 造に起因した空隙が観察されると考えられる。図 16 はオ ペランド観察中の評価システムの外観である。近赤外光を 吸収する金属の代わりに、アクリル樹脂製の型を使用した。 プローブの位置は、粉体層の中心付近が観察領域となるよ うな高さで、型の側面に設定した。したがって、深さ方向 (A-scan 方向)は型の径方向に、B-scan 方向は加圧方向に 相当する。

図17(A)は0.5s間隔のOCT原画像、(B)は原画像中 で黄色の枠で囲った領域内において、信号強度が近赤外光 を透過するアクリル樹脂型の壁内部と同等に低く、粉体層 中の空隙に対応すると考えられる領域を画像処理で抽出 し、二値化後、白黒反転させた画像である。この1秒間の 印加圧力は0.2 MPaである。また、(B)に示した白い破線 は、アクリル樹脂製の型と粉体層がなす界面位置であり、 カラーの破線円はそれぞれ同じ箇所に存在する空隙をマ ークしたものである。図17より、加圧に伴って空隙形態 が連続的かつ複雑に変化していることがわかった。以上か ら、SS-OCTを基盤とする本評価システムにより、一軸加 圧下の粉体層中の空隙形態の変化過程を動的に観察でき ることが明らかとなった。

図18(A)は3D観察と同時に測定した荷重-変位曲線



図 18 SS-OCT での 3D 観察と同時に測定した (A) 荷重 – 変位曲線と (B) 3D 可視化した一軸加圧下の同一空間における空隙形態の変化 過程.3D 構造中の色は同一体積の球の直径に相当するカラースケールの大きさに対応.

である。アクリル樹脂製の型を使用するため、一般的な一 軸加圧成形の条件よりもかなり低い設定荷重だが、荷重-変位曲線の形状に着目すると、変位が2mm を超えたあた りに降伏点をもち、その前後で荷重が変位の増加とともに 直線的かつ、緩やかに、そして急激に増加する領域が認め られた。このような挙動は、粉体層中の顆粒の再配列と顆 粒の変形・破壊の影響に起因することが報告されている¹⁵⁾ ことから、本研究で目的とする情報は十分取得できている と考え、緑色の斜線部で 3D 観察を行い、同一空間におけ る空隙形態の 3D 可視化を行った。その結果を図 18(B) に示す。なお、定量評価するにあたり、壁効果の影響がな い型の内壁面と粉体層の界面から 0.3 mm 離れた位置から 1.1 mm の深さ方向までを構築対象とした。図 18 (B) よ り、3D 可視化によって、加圧に伴う空隙形態の空間的な 変化が顕著に変化している様子が容易に理解できた。さら に本結果より、印加圧力に対する全空隙の体積分率の変化、 さらにカラースケールの大きさ毎の体積分率の変化を解 析した。その結果、全空隙率は印加圧力が大きくなるにつ れて減少し、その内訳としては、30 µm 以上の粗大な空隙 は減少し続け、30 µm 未満のより小さい空隙は増減を繰り 返すことを定量的に明らかにすることができた。より詳細 については別紙に報告 10しているので、そちらを参照い ただきたい。

4. 今後の展望

SS-OCT の高い時空間分解能を活かして、セラミックス 製造プロセスを支える粉体、スラリー、成形体、焼結体の 内部構造、そしてその変化過程を非破壊でリアルタイム 2D 観察や高速 3D 観察が可能であることを明らかにした。 応用展開の一つとして、非破壊検査技術として有用である ことも明らかにした。事情により割愛したが、より高度な 定量評価として、深さ方向への信号強度の減衰の大きさを 表す減衰率の分布を3D解析して成形体や焼結体の均質性 を評価するなど、本稿で述べた以外にも先進的な成果が多 数得られている。また、セラミックス分野での成果を支援 技術として展開する他、粉体制御が要素技術となるセラミ ックス以外の周辺分野にも技術拡張を図るなど、プロジェ クト成果の展開も積極的に進められている最中である。こ れらについては、引き続き学会や論文等で精力的に報告し ていきたい。

【参考文献】

- D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Chang, M.R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C.A. Puliafito, J.G. Fujimoto: Science, 254, 1178-1181 (1991).
- M. Haruna, M. Ohmi, J. Soc. Insturum. Control Engnr., 45, 915-921 (2006).
- 3) M. Haruna, Medical Photonics, 1, 1-5 (2010).
- J. Rankin, B.W. Sheldon, Mater. Sci. Eng., A204, 48–53 (1995).
- S.B. Simonsen, I Chorkendorff, S. Dahl, M. Skoglundh, J. Sehested, S. Helveg, J. Am. Chem. Soc., 132, 7698–7975 (2010).
- R. Podor, N. Clavier, J. Ravaux, L. Claparede, N. Dacheux, D. Bernache-Assollant, J. Eur. Ceram. Soc., 32, 353–362 (2012).
- 7) D. Train, C.J. Lewis, Trans. Inst. Chem. Eng., 40, 235 (1962).
- S. Tanaka, Y. Kuwano, K. Uematsu, J. Am. Ceram. Soc., 90, 3717-3719 (2007).
- K. Chino, M. Matsuda, K. Kudo, S. Horiuchi, J. Jpn. Soc. Powder Metall., 29, 195–200 (1982).
- 10) M. Takahashi, S. Suzuki, Am. Ceram. Soc. Bull., 64, 1257-

1261 (1985).

- 11) A. Shimosaka, T. Suzukawa, Y. Shirakawa, J. Hidaka, Kagaku Kogaku Ronbunshu, 29, 802–810 (2003).
- 12) J. Nordstrom, G. Alberborm, G. Frenning, Int. J. Pharm., 540, 120–131 (2018).
- 13) F. Huang, X. An, Y. Zhang, A. B. Yu, Powder Technol., 314, 39–48 (2017).
- 14) S. Ishihara, K. Kushimoto, J. Kano, M. Naito, J. Soc. Powder. Technol., Japan, 55, 492-498 (2018).
- 15) N. Miyata, Y. Ishida, T. Shiogai, Y. Matsuo, J. Ceram. Soc. Jpn., 103, 1275-1281 (1995).
- 16) T. Takahashi, J. Tatami, J. Jpn. Soc. Powder Powder Metall., 67, 615-620 (2020).

業績

【原著論文】

- 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)
- 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 Al₂O₃ 焼結 体の内部構造観察、セラミックス(CERAMICS JAPAN)、55 (2), 103-107 (2020)
- 山口拓志、多々見純一、矢矧束穂、中野裕美、飯 島志行、高近藤敏之
 Dislocation-controlled microscopic mechanical phenomena in single crystal silicon under bending stress at room temperature, Journal of Materials Science, 55 (17), 7359-7372 (2020)
- 多々見純一、井本有美、矢矧束穂、高橋拓実、飯 島志行

Relationship between bending strength of bulk porous silicon carbide ceramics and grain boundary strength measured using microcantilever beam specimens, Journal of the European Ceramic Society, 40, 2634-2641 (2020).

5. 高橋拓実

Control of the Particle-Assembled Structure and a Novel Evaluation Technique for High-Performance Ceramics, Journal of the Ceramic Society of Japan, 128, 10, 738-746 (2020)

- 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 Al₂O₃ 顆粒 の一軸加圧下における粉体層中の空隙の形態変化 過程のその場観察、粉体および粉末冶金、67,11, 615-620 (2020)
- 高橋絵美、高橋拓実、多々見純一 Room-temperature densification of MgO bulk ceramics with dispersed nitride phosphor particles, Ceramics International, 47, 4, 5013-5018 (2021)
- 8. 多々見純一 マイクロカンチレバー曲げ試験によるセラミック スのメソ領域力学特性評価、CERAMICS JAPAN, 56,1,3-6 (2021)
- 高橋拓実、多々見純一 波長掃引型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の非破壊評価技術、 CERAMICS JAPAN, 56, 1, 7-10 (2021)

【書籍】

 多々見純一 蛍光体粒子分散用セラミックスの常温緻密化に成 功、Yano E plus, 154,100-111(2021)

【口頭発表】

- 高橋絵美、多々見純一、高橋拓実 MgO バルクセラミックスの常温緻密化と窒化物蛍 光体粒子の固定化、第 33 回秋季シンポジウム、2020 年9月、オンライン開催
- 高橋拓実、多々見純一
 1.7μmの長波長光コヒーレンストモグラフィーによる Al₂O₃ 成形体、焼結体の内部構造観察、第33
 回秋季シンポジウム、2020 年9月 オンライン開催
- 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によって作製した多層グラ フェン被覆ガラス短繊維の磁化率異方性、第33回 秋季シンポジウム、2020年9月 オンライン開催
- 多々見純一、山口拓志、矢矧束穂、中野裕美、飯島 志行、高橋拓実、近藤敏行 マイクロカンチレバー試験片を用いて微粒子スケ ールで測定した単結晶シリコンの強度と変形、第 33回秋季シンポジウム、2020年9月 オンライン開 催
- 多々見純一、加藤真由、飯島志行、高橋拓実 成形体の脱脂挙動その場観測のための TG/FT-IR/OCT 複合システムの開発、第33回秋季 シンポジウム、2020年9月オンライン開催
- 6. 田島充稀、多々見純一、飯島志行、高橋拓実、高橋 絵美 光コヒーレンストモグラフィーによるアルミナセ ラミックスの焼成過程における密度分布の可視化、 第33回秋季シンポジウム、2020年9月 オンライ ン開催
- 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た 水中でのシリカガラスの曲げ強度、第 33 回秋季シ ンポジウム、2020 年 9 月 オンライン開催
- 網中康平、多々見純一、飯島志行、高橋拓実、横内 正洋

α-SiAION セラミックスの透明性に及ぼす希土類添 加物の影響、第 33 回秋季シンポジウム、2020 年 9 月 オンライン開催

- 多々見純一、梶井健司、飯島志行、高橋拓実 成形プロセスの異なる 8YSZ 成形体のマスターシ ンタリングカーブ、第 33 回秋季シンポジウム、2020 年9月 オンライン開催
- 10. 高橋拓実

光コヒーレンストモグラフィーを用いた非金属材 料の非破壊評価、ETS-2 委員会、2020 年 9 月 オン ライン開催

- 高橋拓実、多々見純一 波長掃引型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の非破壊評価技術、2020 年 度第 1 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、2021 年 1 月 オンライン開催
- 3々見純一 マイクロカンチレバー曲げ試験によるセラミック スのメソスケール力学特性評価、2020年度第1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、2021年1月 オンライン開催
- 3. 多々見純一、山口拓志、飯島志行、高橋拓実 Strength measurement of BaTiO₃ single crystal using microcantilever beam specimens, ICACC2021, 2021 年 2月 オンライン開催
- 多々見純一、田島充稀、飯島志行、高橋拓実, Visualization of density distribution of alumina ceramics during sintering estimated by optical coherence tomography, ICACC2021, 2021年2月 オン ライン開催
- 15. 高橋拓実、多々見純一 波長掃引型光コヒーレンストモグラフィーによる Al₂O₃成形体と焼結体の光学的な構造均質性の定量 可視化、日本セラミックス協会 2021 年年会、2021 年3月 オンライン開催
- 16. 小野悠綺、高橋拓実、多々見純一、田中諭、土信田豊
 マイクロカンチレバー法による[101]配向 LNKN セラミックスのメソスケール力学特性評価、日本セラミックス協会 2021 年年会、2021 年 3 月 オンライン開催
- 17. 黒田啓真、多々見純一、飯島志行、高橋拓実 OCT-TG 複合システムを用いたアルミナスラリー

の乾燥過程のリアルタイム観察、日本セラミックス 協会 2021 年年会、2021 年 3 月 オンライン開催

- 18. 南真利子、多々見純一、飯島志行、高橋拓実 Al₂O₃成形体の脱脂過程における内部構造と機械的 特性のその場観測、日本セラミックス協会 2021 年 年会、2021 年 3 月 オンライン開催
- 多々見純一、山口拓志、飯島志行、高橋拓実 マイクロカンチレバー試験片を用いた曲げ試験に よる 単結晶 BaTiO3のメソスケール力学特性評価、 日本セラミックス協会 2021 年年会、2021 年3月 オ ンライン開催

【表彰】

 2020 年度米国セラミックス学会 Society Fellow 多々見純一
 2020 年 6 月

【特許】

国外特許出願 2件

「腸内細菌叢」プロジェクト 解析ツール開発グループ

プロジェクトリーダー/グループリーダー 大野 博司

【基本構想】

我が国において2型糖尿病患者は増加の一途をたどり、罹患者数は約1000万人を数えるに到っている。 2 型糖尿病は高齢者における主要な疾患であり、肥満・脂質異常症・高血圧などメタボリックシンドローム の病態に関与する諸疾患とともに動脈硬化を促進させる。更には心筋梗塞・脳卒中などの合併症のリスク 増大を介して日本人の健康寿命を短縮する重大な原因となっており、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 型糖尿病の病態に関与するのではないかと考えられている。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)全ゲノムシークエ 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. 研究目的

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110mg/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、同数の非肥満で非耐糖能異常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。被験者の食事・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エアの 開発を行うことを目的とした (本研究における調査項目を 下記に示す)。さらに、この統合データベースと解析ソフ トウエアを用いて、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 (図1)。

<調査項目>

通常の検診項目

身長、体重、腹囲、体脂肪率、血圧、脈拍、総蛋白、アル ブミン、AST (GOT)、ALT (GPT)、γ-GTP、総ビリルビ ン、ALP、LDH、コリンエステラーゼ、血清アミラーゼ、 Na、K、Cl、Ca、P、Fe、総コレステロール、HDL コレス テロール、中性脂肪、LDL コレステロール、BUN、クレア チニン、尿酸、空腹時血糖値、ヘモグロビン A1c、赤血球 数、白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、尿蛋白、 尿糖、腹部エコー

食事・栄養調査

簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査、 活動量計

3) 血中サイトカインの測定

Adiponectin, MCP-1, CRP, Adipsin, Leptin, Resistin, SerpinE 1 、 TNFa, NGF, IL-6, Insulin, IL-8, HGF

- 4) ヒトゲノム DNA を用いた遺伝子多型解析
- 5) 便を用いたメタ 16S 解析、メタゲノム解析
- 6) 血液・便を用いたメタボローム解析
- 7) 単核球(PBMC)から抽出した RNA を用いた CAGE 解析



2. 研究成果

(1) 被験者のリクルートと臨床情報の収集

2017年7月より生活習慣データのリクルートを開始し311 名(健常者111名、肥満者100名、耐糖能異常者100名) のリクルートが終了した。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 の測定については、219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解析を完了した。

(2) 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(図2)。さらにデータベースの機能として、デー タベースとして利用する際に、研究者側の興味のある被験 者のデータを取り出せるようにデータマート機能を実装 した(図3)。取得したい臨床情報やオミクスデータを選択 し、被験者の背景(年齢、性別、BMIなど)の設定値を入 力して被験者の絞り込みを行い、出力することが可能とな った。

図 2. 統合データベースの作成



図3. 統合データベースのデータマート機能

(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 検体の糞便中から 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) 腸内細菌叢解析

健常者、肥満者、耐糖能異常者の糞便検体を用いて、DNA 抽出し、16S rRNA 遺伝子の V1-2 領域を PCR で増幅しシ ークエンシングを行い、菌種の同定を試みた。門レベルに おいて肥満者で Bacteroidetes が健常者、耐糖能異常と比較 し有意に減少していた。更に肥満者では健常者と比較し Actinobacteria が有意に増加していた。以前の日本人の肥満 属レベルで有意差検定を行った結果、Collinsella 属のみ が肥満群と耐糖能異常群で有意に増加していることがわ かった。Collinsella 属の基準株である C. aerofaciene はヒト の主要な腸内細菌の1つとして知られている。Collinsella 属が肥満者で増加し、食物繊維摂取量の低下により増加す るという報告[2]があるため、Collinsella 属は肥満により増 加する細菌である可能性が考えられた。

(5) 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。まず、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 (インスリン抵抗 性指数:早朝空腹時の血中インスリン値と空腹時血糖値か ら算出され、インスリン抵抗性の簡便な指標として臨床上 よく使用される)、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は、単糖や糖代謝物のクラスター が 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。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、単糖や糖代謝物のクラスターは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[3]。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[4]、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代 謝物は動脈硬化性疾患との関連が示唆されており[5]、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。

(6) 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 290 検体の糞便から DNA を再抽出し、ショットガンシー クエ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 6.5M の 遺伝子を同定した(図 4)。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) [6]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 4. 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

メタゲノム解析の結果、糞便糖代謝物は Phosphotransferase system やStarch and sucrose metabolism な ど糖代謝に関わる KEGG pathwayに含まれる遺伝子と強く 相関しており、またこれらの遺伝子はHOMA-IR、中性脂肪などの代謝異常マーカーとも関連していた。以上の結果 から、糞便代謝物と腸内細菌の機能変化が関連しているこ とが示された。

(7) マウス試験によるインスリン抵抗性に関わる腸内細菌の評価

相関解析により、Dorea 属、Coprococcus 属などの腸内細 菌はインスリン抵抗性の指標と正の相関を示し、 Bacteroides 属、Alistipes 属などの細菌は負の相関を示した。 このヒトのデータから示唆された細菌とインスリン抵抗 性との因果関係を解析するため、高脂肪食誘発性肥満モデ ルマウスを用いて上記の腸内細菌を投与したマウスのイ ンスリン抵抗性の評価を行った。C57BL/6N マウスに高脂 肪食(HFD)負荷を行い、3週間、計6回腸内細菌を経口 投与した。その結果、体重増加には影響はなかったものの、 インスリン負荷試験ではヒト由来検体の結果と同様の結 果が得られた。

(8)PBMC の CAGE 手法による遺伝子発現解析

PBMC の CAGE 解析(理化学研究所が開発した mRNA の 5'末端から約 20 塩基をタグとして切り出す技術で、高

速シーケンシング技術と組み合わせることによりゲノム ワイドな遺伝子発現プロファイルを得ることができる)が 完了した。この PBMC の遺伝子発現データと血漿中のサ イトカインやアディポネクチンのデータとの相関解析を 行ったところ、炎症性サイトカインやアディポネクチンと 有意な相関のある遺伝子を明らかにした。また、その中で インスリン抵抗性(IR)と有意な相関が見られた遺伝子は 特に炎症に関わる遺伝子であることが分かった。この結果 から、インスリン抵抗性の被験者は全身性の炎症状態にあ ることが推察された。

(9) メタデータを使用した IR と MetS 予測

取得した便中の腸内細菌メタ 16S データ、メタゲノムデ ータ、メタボロームデータを使用し、IR と MetS の診断の 予測精度について ROC (receiver operating characteristic) 曲 線を作成し、曲線下の面積 (AUC: area under the curve) か ら評価した。鑑別能力が高いデータであれば AUC の値は 1 に近づく。IR と MetS の診断において、メタ 16S データ だけでは AUC は 0.6 前後で予測精度は低い結果であった。 メタゲノムデータとメタボロームデータの AUC は 0.8 前 後であり中程度の予測精度が得られた事がわかった。また、 最も高い AUC はメタボロームデータであった事から、便 中のメタボロームデータが最も IR や MetS の状態を反映 していると考えられた。

3. 今後の展望

統合データベースについてはこれまでにリクルートし た健常者、肥満者、耐糖能異常者のサンプルから、臨床情 報、簡易型食事頻度アンケート(BDHQ)、CAGE 手法を用 いた血中単核球の RNA-Seq データ、糞便中と血中の代謝 物データ、糞便中の腸内細菌叢とメタゲノムデータの取得 を完了しており、これらのデータを順次統合データベース に集約している。さらに、データ公開や提供に向けたイン ターフェース構築や運用方法について、現在、研究者から 意見を聞き、運用にあたり必要なツールを実装するように 開発を進めている。さらに、それぞれオミクス階層におけ る単回帰分析や多重ロジスチィック解析、腸内細菌解析特 有の α 多様性、β 多様性などの解析ツールを上記の統合デ ータベースに組み込むとともに、横断的解析である相関解 析、主成分解析、クラスター解析やランダムフォレストな どの機械学習のアルゴリズムなどの解析手法を取り入れ る。また、被験者の全ゲノムシークエンスの解析を進め、 個別化に向けた解析システムを構築する。

横断的解析ツールを用いて解析した結果、インスリン抵 抗性やメタボリックシンドロームに関与する腸内細菌や 代謝物を同定しており、インスリン抵抗性に関してはマウ スモデルへの腸内細菌投与によりインスリン抵抗性の悪 化、もしくは、インスリン感受性の改善を証明することが できた。これらの結果について論文を投稿中である。

今後、本プロジェクトにより作成したデータベースや解 析ツールを公開することにより、健常者、及び、生活習慣 病発症に関する日本人特有の腸内細菌叢の変化、代謝物デ ータ、臨床データ等を他の疾患と比較することも可能となり、他の疾患に対する新規バイオマーカーなどの探索や予防薬等の開発につながることが期待できる。

【参考文献】

- Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, 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.* 2015;15:100.
- Gomez-Arango LF, Barrett HL, Wilkinson SA, Callaway LK, McIntyre HD, Morrison M, et al. Low dietary fiber intake increases Collinsella abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes*. 2018;9(3):189-201.
- Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia*. 2018;61(4):810-20.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57-63.
- Nishijima S, Suda W, Oshima K, Kim SW, Hirose Y, Morita H, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA research* 2016;23(2):125-33.
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

腸内細菌叢プロジェクト 解析ツール開発グループ

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/Bacteroide[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 mucinphila 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 年に発表された健常者 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 に関しては健常者 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。

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。2017年7月よりリクルートを開始し311名(健 常者111名、肥満者100名、耐糖能異常者100名)をリク ルートした。

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(llumina)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. 3 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ガスクロ マトグラフィー質量分析計 (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-Ntrimethylsilyl-trifluoroacetamide を加え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は、水:HCI: 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-Nmethyltrifluoroacetamide 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。



図1. 分析の概要

2.2 結果

2.2.1 腸内細菌叢解析の結果

腸内細菌叢の全体的な変化を比較するため、データのグ ループ間の距離の指標である Weighted unifrac distance を計 算し Principal coordinate analysis (PCoA) プロットを行った ところ、3 群は分かれることはなかったため、全体的な細 菌叢において変化は見られなかった。また、腸内細菌叢の 多様性の低下が疾患に関連するなどの報告があるが、多様 性についても3 群では変化がなかった。次に、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 群で有意に増加していることが分かった。

2. 2. 2 メタボローム解析の結果

血液、及び、糞便から水溶性代謝物を抽出し、水溶性代 謝物は GCMS を用いて分析を行い、306 検体の糞便中から 124 種類、血清中から 102 種類の代謝物を同定した。まず、 代謝物に関しても全体的な傾向を調べるため、主成分分析

(Principal component analysis: PCA)を行った結果、血漿中 代謝物は IGT 群が他の2群と比較しクラスターが分離し ており、全体的に代謝物に変化がみられた。一方で糞便中 代謝物についてはあまり3群が分離しておらず、全体的な 傾向に違いは見られなかった。次に、血漿中代謝物につい て、多群検定を行い3群間で有意に異なる代謝物を調べた。 その結果、64化合物に有意差(P値が0.05以下)が見ら れた。有意差が見られた血漿中代謝物の種類について着目 するとアミノ酸や単糖が IGT 群で多く、短鎖脂肪酸が健 常者群で多いことが分かった。

糞便中代謝物についても、多群検定を行い3 群間で有意 に異なる代謝物を調べた。その結果、34 化合物に有意差 (P値が 0.05以下)が見られた。血漿中代謝物ではアミノ 酸や単糖が IGT 群で多かったが、糞便中代謝物では肥満 群で特にそれらの物質が多い傾向にあり、血漿中と糞便中 では異なる傾向にある事が分かった。

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 GCMS 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 GCMS 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(LCMS)を使用し計測する代謝物を増やし解析するた め、新たな LCMS 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、腸内細菌が介在し動脈硬化を誘発す る報告がある代謝物 4 物質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 GCMS のシステムで 310 物質、 LCMS のシステムで 22 物質を計測することが可能となっ た。

2.2.4 動脈硬化関連代謝物と HOMA-IR との 関連性

LCMS で計測した動脈硬化を誘発する代謝物について、 健常者群、肥満群、IGT 群で比較した結果、血漿中の代謝 物 A が健常者群と比較し IGT 群で有意に増加していた (*P=0.0008*, Kruskal-Wallis test followed by Dann's multiple comparison test)。その他の関連代謝物は IGT 群で高い傾向 にあるものの有意差はなかった。次に、HOMA-IR(インス リン抵抗性指数:早朝空腹時の血中インスリン値と空腹時 血糖値から算出され、インスリン抵抗性の簡便な指標とし て臨床上よく使用される)を用いて、HOMA-IR と動脈硬 化関連物質の相関解析を行った。その結果、血漿中と糞便 中の代謝物 A、糞便中代謝物 B が HOMA-IR と有意な相関 を示す事がわかった(図2)。



図 2. 血漿中と糞便中の代謝物 A、糞便中代謝物 B と HOMA-IR と の相関プロット(代謝物 A、及び、B は動脈硬化に関連する報告が ある代謝物)

3. 考察及び今後の展望

糞便中の腸内細菌叢解析の結果から、門レベルでは肥満 者で Bacteroidetes が減少し、Actinobacteria が増加してい た。属レベルでは Collinsella 属が肥満者と IGT で有意に増 加していた。肥満者で Bacteroidetes 門の細菌が減少するこ とは過去の報告と一致していた。Actinobacteria や Collinsella 属の変化についてはあまり報告がないため、日 本人特有の腸内細菌叢の変化を示していると考えられる。

血漿メタボロームの結果からは、IGT 群ではアミノ酸の 増加や糖類の増加が見られ、血中アミノ酸の増加は2型糖 尿病のヒトで増加しているという過去の報告[9]と一致し ていた。また、肥満者とIGT の血漿で短鎖脂肪酸が減少し ていた。短鎖脂肪酸はインスリン感受性や代謝機能を上げ る報告があるため、そのような有用な代謝産物が減少して いることが、肥満や糖尿病の発症や悪化に関与している可 能性がある。糞便メタボローム解析の結果からは、血漿の 結果と比較し、グループ間に違いはあまりみられず、血漿 中とは異なる代謝物の変動をしていた。腸内の低分子代謝 物の多くは吸収され血中に入り、肝臓等で代謝を受けるた め、糞便中で変化していた代謝物が血中においても同じ変 動がみられなかったことが考えられた。

動脈硬化関連代謝物の分析からは、インスリン抵抗性の 指標である HOMA-IR と代謝物 A、及び、B が有意な相関 を示すことが分かった。これらの結果から、インスリン抵 抗性の高い被験者では代謝物 A または B などの動脈硬化 を誘発する代謝物が増加し、動脈硬化のリスクが高いこと が示唆された。これ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考えられ た。今後はメタゲノム解析の結果を統合し、代謝物産生に 関わる腸内細菌群を特定する。また、簡易型自記式食事歴 法質問票(BDHQ)を用いた食事調査の結果と比較し、食事 と動脈硬化関連代謝物の比較も行っていく予定である。

【参考文献】

 R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, J. I. Gordon, Human gut microbes associated with obesity. Nature 444, 1022-1023 (2006).
 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. R. Liu et al., Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. Nat Med 23, 859-868 (2017)

【原著論文】

- Zhu Y, Cui G, Miyauchi E, Nakanishi Y, Mukohira H, Shimba A, Abe S, Tani-Ichi S, Hara T, Nakase H, Chiba T, Sehara-Fujisawa A, Seno H, <u>Ohno H</u>, Ikuta K. Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intra-epithelial lymphocytes in the intestine.Int Immunol. 32(5):307-319 (2020)
- Beck K, <u>Ohno H</u>, Satoh-Takayama N. Innate Lymphoid Cells: Important Regulators of Host-Bacteria Interaction for Border Defense. Microorganisms. 8(9):E1342, (2020)
- <u>Ohno H</u>, Satoh-Takayama N. Stomach microbiota, Helicobacter pylori, and group 2 innate lymphoid cells. Exp Mol Med. doi: 52(9):1377-1382 (2020).
- Ohno H. The impact of metabolites derived from the gut microbiota on immune regulation and diseases. Int Immunol. 32(10):629-636 (2020)
- Satoh-Takayama N, <u>Ohno H</u>. Unraveling the Heterogeneity and Specialization of ILCs. Immunity. 53(4):699-701 (2020)
- Akama Y, Park EJ, Satoh-Takayama N, Gaowa A, Ito A, Kawamoto E, Darkwah S, Appiah MG, Myint PK, <u>Ohno</u> <u>H</u>, Imai H, Shimaoka M. Sepsis Induces Deregulation of IL-13 Production and PD-1 Expression in Lung Group 2 Innate Lymphoid Cells. Shock. 2020 Aug 20. doi: 10.1097/SHK.000000000001647. Online ahead of print.

【総説】

- 宮内栄治、大野博司、二種類の腸内細菌が相乗的に中 枢神経系炎症を促進する、実験医学 Vol.39 No.3, 2021
- <u>中西裕美子</u>、大野博司、腸内細菌分野へのメタボロミクスの応用、実験医学別冊 メタボロミクス実践ガイド、2021

【招待講演】

 <u>**窪田哲也**</u>、窪田直人、門脇孝 肥満における M2 マク ロファージ活性化障害機構 第 41 回日本肥満学会 2021.03 富山

業績

【口頭発表】

- Takeuchi T., <u>Nakanishi Y.</u>, Mizuno Y., Yamamichi N., Suda W., Hattori M., Kubota N., <u>Kubota T.</u>, <u>Ohno H</u>. Gut Microbial Fermentation of Polysaccharides Impacts Insulin Resistance in Humans. American Diabetes Association 80th Scientific Meeting. 2020, 6, Online meeting
- 對田尚、宮内栄治、内山幹、小井戸薫雄、荒川廣志、 大草敏史、大野博司、喫煙は炎症性腸疾患患者におい て口腔内細菌の腸管定着を促進し免疫応答を誘導す る、第6回 Gut Microbiota 研究会 2020,9、京都
- <u>Nakanishi Y., Ohno H</u>. Omics analysis revealed agingrelated alterations in the intestinal environment. MBSJ2020. 2020, 11, Online meeting

【記者発表・取材】

1. <u>大野博司</u>、「腸内細菌が中枢神経系炎症を促進する仕組 みを解明-多発性硬化症の予防・治療に新たな可能性-」 2020.8.27

【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)

グループリーダー 福田 真嗣

【基本構想】

本プロジェクトの目的は、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 ステムの基盤構築である。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 している。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、代謝疾患やアレルギー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や種類につい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、もしくはその培養法につい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唆されてきたが、それらがどのような腸内細菌に より産生されているかなど不明な点が多い。

腸内細菌叢をはじめとする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。これ らの腸内細菌を培養するために、グローブボックスなどの嫌気環境を構築する装置や、これらを用いた嫌 気培養による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基盤技術 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・培養することで、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開発が必要となる。そこで、本研究では、(1)難培養性 腸内細菌の新規培養法の確立、(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つの研究課題に取り組んだ。これらの課題に取 り組むことで、腸内環境を適切に制御するための基盤技術を確立し、将来的には腸内環境の乱れが素因と なるような疾患の新たな予防法や治療法開発への貢献が期待できる。

1. 2020 年度の研究目的

プロジェクト最終年度となる 2020 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主に 二つの方法がある。一つ目は、ヒトやマウスの便に含まれ る複数の腸内細菌を寒天培地プレートで培養し、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 である。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 と記載する)内の微生物材料開発室に保管・登録されてお り、入手できる(URL: http://jcm.brc.riken.jp/ja/)。プロジェ クト計画段階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、健康や疾患に関与することが想 定される細菌種の基準株を理研 BRC より購入した。入手 した腸内細菌基準株は、次項以降に示す研究にて使用する ため、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) ヒトもしくはマウス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、 腸内細菌叢の中でその割合が低く、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 存の方法とは異なる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で ある。加えて、われわれ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な課題 となっている。これらのことを踏まえ、新たな培地作製や 新規培養装置を使用した難培養性腸内細菌の培養法の検 討を行なった。開発した培地や培養法の検証をするために、 健常人の便試料から腸内細菌の単離・培養を試みた。

(3) 標的腸内細菌を単離するためのツール開発

腸内細菌叢を構成する腸内細菌の中には、ビフィズス菌 や乳酸菌などに代表される宿主の健康維持や免疫系の亢 進に作用する有用菌が存在する。その一方、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 腸内細菌なども存在する。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に播種 し、コロニーを形成させ単離する方法がある。選択培地や 培地に特定の物質を添加することで、ある程度の選択は可 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、標的腸内細菌を効率よく単離するための ツールの開発を実施した。

2. 2020 度の研究成果

2020 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からの報告書に記載しているため、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法の確立

プロジェクト計画段階およびプロジェクト中に蓄積し たヒトおよびマウスの腸内細菌叢の解析データから独自 に腸内細菌株のリストを作成し、理研 BRC から入手可能 な腸内細菌基準株を取得した。はじめに嫌気性細菌の一般 的な培養に広く用いられている GAM ブイヨン培地(以下 GAM)を用いて寒天培地および液体培地を作製し、腸内 細菌基準株の培養を実施した。本年度入手した2種類の腸 内細菌基準株は GAM により安定培養することができた。

しかしながら、昨年度までに安定培養法が構築できなか った6種類の腸内細菌基準株については、本プロジェクト で培ってきた嫌気培養法を用いても安定培養することは できなかった。表1はこれまでに本プロジェクトで安定培 養法を検証した腸内細菌基準株の数および安定培養の可 否をまとめたものである。

	基準株	培養	要培養条件
	入手数	成功数	検討
グラム陽性菌	48	46	2
グラム陰性菌	17	13	4

表1 安定培養法を構築した腸内細菌基準株の数

(2) ヒトもしくはマウス便由来の腸内細菌の単離・培養

これまで蓄積してきた嫌気培養法のノウハウを用いて、 ヒト便試料からの腸内細菌の単離・培養を試みた。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、 残った腸内細菌叢懸濁液を様々な非選択培地/選択培地に 播種し、嫌気チャンバー内にてコロニーを形成させた(図 1)。プレートに形成されたコロニー群からシングルコロニ ーを釣菌し、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、その配列をシークエンス解 析することで、菌種の同定を行った。



図 1 ヒトもしくはマウス由来便試料からの腸内細菌の単離・培 養の流れ

本年度はヒト便試料より3種類のグラム陰性菌の単離・ 培養に成功した。またマウスの便試料を選択培地に播種し、 グラム陽性菌を1種類単離した。表2は本プロジェクト期 間中にヒトもしくはマウスの便試料より単離した腸内細 菌の数を示したものである。

	グラム陽性菌	グラム陰性菌
単離数	3種 (7菌株)	9種 (15菌株)

表 2 単離したヒトもしくはマウス便由来のグラム陽性菌とグラ ム陰性菌の数

難培養性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双方もしくは 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物質 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。本培養装置器は細菌を通 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物質など 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(図 2)。昨年度までに、本培養装置を用い、難培養性



図 2 本プロジェクトで使用した二槽式透析培養法(左図)およ びヒト由来腸内細菌叢を培養した培養初日と培養4日目の装置の 様子(右図) 腸内細菌基準株の培養に成功している。そこで本年度は、 ヒト由来腸内細菌叢の培養を試みた。その結果、単独培地 を用いた培養法では増やすことが出来ない、もしくは単独 培養よりも効率よく増える菌を複数見出すことができた。

(3) 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を添 加した培地による培養を経る必要がある。そこで、より効 率良く標的細菌のみを単離・濃縮する方法を検討するツー ルとして抗体に着目した。抗体は抗体産生細胞が産生する 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。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、その特異性は低く分類学 的に類似の腸内細菌も認識してしまうという課題があっ た。このような課題を解決するために本プロジェクト独自 の抗体作製法を用い、腸内細菌に対する抗体の作製を試み た。本手法により昨年度、グラム陽性細菌に対する特異性 の高い抗体の作製に成功した。そこで本年度はグラム陰性 菌に対する抗体の作製を行った。様々な腸内細菌との交差 反応を検証し、標的となるグラム陰性細菌特異的な結合が ありながら、同種異株の腸内細菌には結合を示さない抗体 を作出することができた。また作製した抗体を用い、標的 細菌を含む複数の腸内細菌基準株を混合した腸内細菌混 合液から効率よく標的細菌を単離・濃縮することができた (図3)。



図 3 Magnetic-activated cell sorting と作製した腸内細菌特 異的抗体を用いた、腸内細菌混合液からの標的細菌分離の概念図

3. 研究体制

本プロジェクトでは、研究を円滑に進めるために様々な 研究機関との共同研究を実施してきた。共同研究先との綿 密な連携はプロジェクトを推進する上で重要な項目とな る。本プロジェクトではオンラインを活用し、常時研究室 同士を繋ぐ環境を構築していた。そのため、COVID-19 による制限下においても、共同研究先とも定期的に進捗状 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することができた。

4. 総括

本プロジェクトでは、 腸内環境制御基盤技術の構築の ための礎となる腸内細菌に関する新たな知見の取得、制御 技術・ツールの開発を4年間実施してきた。特に個々の腸 内細菌の特性を理解するため、一つでも多くの腸内細菌を 単離・培養するための手法の開発に注力した。さらに既存 の腸内細菌培養法を基にした新たな腸内細菌用培地など の開発により、59 種類の腸内細菌基準株の安定的培養法 を確立し、嫌気チャンバー並びに様々な種類の選択培地や、 市販の培地をベースとして独自に栄養素などを追加した 培地である mYCFA を組み合わせることによりヒトまたは マウス由来腸内細菌を12種類単離することができた。ま た、新規難培養性腸内細菌の培養法の検討を行い、二槽式 透析培養法を用いた独自の培養法にてヒト腸内細菌叢を 培養することで、これまで見出せなかった難培養性腸内細 菌を増やすことに成功した。安定的な培養法を確立した腸 内細菌については、腸内細菌単独定着マウスの構築や、腸 内細菌の投与実験により、腸管常在細菌についての新たな 知見を得ることができた。本プロジェクトでは数多くの腸 内細菌基準株やヒト由来腸内細菌の単離・培養に成功した が、腸内細菌の特性や宿主に及ぼす影響の解析は動物試験 を伴うため時間を要する。今後も、引き続き共同研究先と 連携しつつ、重要性が高いと考えられる腸内細菌の腸内細 菌単独定着マウスを構築し、代謝物質の網羅的解析、腸管 上皮細胞や免疫細胞の変化を検討することで、腸内細菌の 特性を理解し、腸内環境制御基盤技術開発のための知見を 深める。

腸内環境制御基盤術構築に向けたツールの一つとして、 腸内細菌特異的抗体の作製に着手し、独自に見出した作製 法を利用することで、標的細菌に対して高い特異性を有す る抗体の作製に成功した。本抗体は、数種類の腸内細菌を 混合した腸内細菌混合液から標的細菌を濃縮することが 可能である。次の課題としては、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 が必要だが、本抗体を活用することで、標的細菌を効率良 く単離・濃縮するための技術開発に繋がることが期待され る。本プロジェクトを通じて作製した抗体は、これまで作 製されてきた既報・販売されている細菌に対する抗体とは 異なり、標的細菌に対する特異性が高い。そのため、本プ ロジェクトで使用した新規抗体作製法は標的細菌に特異 性の高い抗体を作出する上で優れた方法であり、今後は、 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 性食品開発への応用や創薬の標的として活用することが できる腸内細菌に対する抗体の作製を進め、腸内環境制御 基盤技術開発ツールとして活用する。

今後は、プロジェクト実施中に蓄積したデータやツール を活用することで、腸内環境制御を目指した有用菌を用い たサプリメントや機能性食品の開発、病原性細菌や疾患に 対する予防・治療薬の開発など、医療やヘルスケア産業へ の応用を実施する。最終的には腸内環境を「意のままに」 制御するための基盤技術を構築し、健康寿命の延伸を目指 す。

109

腸内環境制御基盤技術の開発に向けた

難培養性腸内細菌培養法の確立

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 広げたり、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はなく、 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す 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各個人の腸内細菌叢の構成、種類お よび経時的変化が明らかとなってきた。また、項目1.1 で 述べ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いるのみならず、疾患とも深く関 わることが明らかになってきた。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などの腸 内細菌由来によるものであるかについては、不明な点が多 い。また、これらについての研究報告数が少ない一番の理 由は、腸内細菌の培養法が十分に確立されていないことが 挙げられる。腸内細菌の多くが偏性嫌気性細菌に分類され ており、わずかな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存在し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

腸内細菌業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法の確立
- 2. 難培養性腸内細菌の新規培養技術の開発
- 腸内細菌単独定着マウスの作製や腸内細菌の投 与が生体に与える影響の評価

個々の腸内細菌についての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 標的腸内細菌特異的抗体の作製

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2種類を入手した。これらの腸内細菌基準株に加 え、昨年度までに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8種類の腸内細菌基準株の 安定培養法の確立を試みた。

嫌気性菌の培養に一般的に用いられている GAM ブイヨ ン培地(GAM、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、嫌気チャンバー内にて本年度入 手した腸内細菌基準株の培養を行った。その結果、2 種類 の腸内細菌基準株については、GAM を用いた嫌気培養に より安定培養することができた(図1)。残り6種について はこれまでに本プロジェクトにて確立した様々な嫌気培 養法もしくは培地を用い、安定培養する方法を検討したが、 培養することができなかった。



図1 安定培養法を確立した腸内細菌基準株のグラム染色

2.2 ヒトもしくはマウス由来腸内細菌の単離・ 培養

昨年度に引き続き、ヒト便試料からの腸内細菌の単離を 試みた。これまでに蓄積したノウハウを用い、複数の培地 を選択することにより、腸内環境制御基盤技術への応用が 期待される腸内細菌の単離培養を行なった。

はじめに径の異なるフィルターを組み合わせ、そこにヒ ト便懸濁液を通すことで夾雑物を除いたヒト腸内細菌叢 溶液を調製した。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を添加した本グループ 独自の改良型 YCFA 培地(mYCFA)を用いてヒト腸内細菌 叢溶液を嫌気環境下において一晩培養した。前培養した培 養液を様々な選択培地プレートに播種し、嫌気環境下でコ ロニー形成させた。24-72 時間後に形成されたコロニー群 からシングルコロニーを分取し、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 16S rRNA 用ユニバーサルプライマーでシークエンス 解析することで、菌種の同定を行った。その結果、3 種類 のグラム陰性菌の単離・培養に成功した(図 2)。またマ ウスの便試料を選択培地に播種し、グラム陽性菌を1 種類 単離した(図 2)。



図2 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使用され る、二槽式透析培養器をベースとした新規腸内細菌培養法 の確立を行なってきた。これまで、構築した二槽式透析培 養法を使用することで、難培養性腸内細菌基準株の培養に 成功している。そこで本年度は、ヒト由来腸内細菌を継時 的に培養し、市販培地のみで培養した場合と二槽式透析培 養法を比較して有用性を検討した。

フィルターを用いてヒト便に含まれている未消化物を 除去し、ヒト腸内細菌叢を調製し、二槽式透析培養器の一 方に添加した。供給側培地にmYCFAもしくは腸内細菌含 有培地を加えた。嫌気環境下にて培養を行い、経時的にヒ ト腸内細菌叢培養液を回収した。比較解析用のために GAM、mYCFAにそれぞれヒト腸内細菌叢を加えたもの (以下、単独培地培養法と表記する)を同様に培養し、継 時的に培養液を回収した。各時点における培養液から DNAを抽出、16S-rRNA遺伝子アンプリコンを網羅的に解 析し、二槽式透析培養法と単独培地培養法との比較解析を 実施した。その結果、培養前のヒト腸内細菌叢に一番近い 種類の腸内細菌を培養するのに適した培養法は、mYCFA を用いた単独培地培養法であることが明らかとなった(図 3)。



図 3 二槽式透析培養法と単独培地培養法によるヒト腸内細菌叢 の Operational taxonomic unit (OTU)の比較。F は培養前のヒト 腸内細菌叢を示す

検出された細菌組成をより詳細に解析したところ、二槽 式透析培養法では検出される腸内細菌の種類は減少する ものの、単独培地培養法では増やせない菌を複数見出した。 これらの菌は供給培地側にmYCFAを用いた場合よりも腸 内細菌含有培地を用いる方がより効率よく増加すること を見出した(図 4)。



図 4 二槽式透析培養法を用いることで、効率よく増やすことが できる細菌の一例

3. 考察及び今後の展望

プロジェクト期間中に 59 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 6 種類の腸内細菌基準株については増殖に必 要な因子が足りていないことが予想された。これらの腸内 細菌基準株については、引き続き二槽式透析培養器を用い た培養もしくは増殖に必要な増殖因子の探索を続ける。

本年度はこれまでに培ってきた嫌気培養法を用い、ヒト便 由来のグラム陰性菌 3 種類およびマウス便由来のグラム 陽性菌を1種類単離・培養することに成功した。これらの 中には、有用な作用をもたらす細菌や疾患に関与する可能 性のある細菌も含まれているため、引き続き単離できた細 菌の詳細な機能解析を実施する。腸内細菌が生体に与える 影響の評価では、これまでに、グラム陰性常在腸内細菌の 免疫感作により引き起こされる強い炎症応答を見出した。 炎症を引き起こす因子やメカニズムの一旦は明らかとな ってきたが、腸管内に存在しているグラム陰性常在細菌が どのような働きを担っているのかについては明らかにな っていないことが多い。今後は、より詳細にノトバイオー トマウスを調べることによりグラム陰性常在細菌が生体 にどのような影響を及ぼすのか検討する。

本プロジェクトでは数多くの腸内細菌基準株やヒト由 来腸内細菌の単離・培養に成功した。今後は、これらの腸 内細菌の機能や宿主に対してどのような影響を与えるの か検討することが重要となる。今後も共同研究先と連携し ながら、一つでも多くの腸内細菌単独定着マウスを構築し、 代謝物質の網羅的解析、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を 検討することで腸内細菌の特性を理解し、腸内環境制御基 盤技術開発に繋げる。

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実子博士をはじめ多 くの方々の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.* Jul;90(3):859-904. (2010).

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開発

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細菌も存在しており、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撹乱される 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、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、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。注目すべきこととして、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、ヒトから分離した有用菌をヒトが摂取することで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。

大縄 悟志、中藤 学、井上 浄

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 のみを単離・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 菌に対する抗体の多くが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

腸内細菌業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の構築に向けて、特 異性の高い腸内細菌特異的抗体の取得、作製した腸内細菌 特異的抗体を用いた標的細菌の分離・濃縮法の検討を行っ た。

2. 実験と結果

2.1 標的腸内細菌特異的抗体の作製

昨年度、本プロジェクト独自の抗体作製方法を用いるこ とでグラム陽性菌に対する特異性が高い抗体の作製に成 功した。そこで本年度は、安定培養法を確立した細菌の中 からグラム陰性菌(以下、細菌 X と表記する)に対する抗体 の作製を行った。はじめに一般的に使用されている抗体の 作製方法(従来法)と本プロジェクト独自の抗体作製法(新 規法)を比較し、抗原感作後における血清中の細菌 X に 対する抗体価の上昇を 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細菌Xに対する抗体価の比較、 青は従来法、赤は新規法を示す。* p<0.05

2. 2 細菌 X 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25クローンのハイブリドーマの中から細菌X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、細菌Xに対する特異性を検証するために、細菌Xおよび細菌Xと同種異株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ーを用いて、各細菌と抗体との反応を検討したところ細菌X以外の同種異株の細菌に対して反応性を示さなかった(図2)。



図 2 フローサイトメーターによる抗体と細菌 X および同種異株 への結合の検証。赤色は細菌 X 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。

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。 4 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細菌に対して結合は 見られなかった(図 3)。これらの結果は、新規法を用いる ことで標的となるグラム陰性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段であることを示唆 するものであった。



図 3 フローサイトメーターによる抗体と代表的な腸内細菌への 結合の検証。赤色は細菌 X 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. 抗体の結合した標的細菌の再培養は可能か
- 複数の腸内細菌が存在する中から標的細菌のみを単 離・濃縮することができるか

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 嫌気チャンバ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。MACS 工程を 経たサンプルにおいてコロニー形成が確認された(図4)。 これらの結果は、作製した抗体と MACS を用いることで 標的細菌を生きたまま単離・濃縮することが可能であるこ とを示すものであった。

MACS処理後



図 4 MACS 処理した後の細菌 X 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

最後に細菌 X を含む 5 種類の腸内細菌を混合した、腸 内細菌混合液から作製した抗体を用いた MACS により細 菌 X の単離・濃縮を検討した。作製した抗体を腸内細菌 混合液に反応させたのち、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ー (FACS)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細菌 X が含まれず、標的分画に おいて細菌 X の割合が増加していた。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、細菌 X を検出するプライマー を利用した定量 PCR を実施した。フロースルーと比較し た結果、標的分画において細菌 X の濃縮が見られた。(図 5)。



図 5 MACS 前後におけるそれぞれの試料の FACS の結果(左)、 細菌 X 検出用プライマーを用いた q-PCR(右)

3. 考察及び今後の展望

腸内環境制御基盤技術の構築に向けたツールの一つと 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。 作製した抗体は既存の細菌に対する抗体とは異なり特異 性が高いものであった。本結果は、プロジェクト独自の新 規抗体作製法が、標的細菌に特異性の高い抗体を作出する ための優れた方法であることを示唆するものであった。ま た作製した抗体を利用して、標的細菌を含む腸内細菌混合 懸濁液からの標的細菌の分離・濃縮法を構築することにも 成功した。次の課題としては、作製した抗体を使用し、多 種多様な腸内細菌で構成される腸内細菌叢から標的細菌 の単離・濃縮の可否を検討する必要がある。今後は、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 品開発への応用や創薬の標的として活用することができ る腸内細菌に対する抗体の作製を進める。

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、富山香代氏、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 feacal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* Mar 25;389(10075):1218-1228 (2017).

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. Wu CJ, Lu, M, Feng X, Nakato G and Udey MC. Matriptase cleaves EpCAM and TROP2 in Keratinocytes, destabilizing both proteins and associated claudins. Cells Apr; 9(4): 1027 (2020).

2. Seo K., Tanaka K., Fukuda S., Arakawa K. Complete Genome Sequences of Two Cutibacterium acnes Strains Isolated from an Orthopedic Surgical Site. Microbiology Resource Announcements Apr; 9(17):e00290-20 (2020).

3. Tsukimi T., Watabe T., Tanaka K., Sato P. M., Suzuki H., Tomita M., *Fukuda S. Draft Genome Sequences of Bifidobacterium animalis Consecutively Isolated from Healthy Japanese Individuals. Journal of Genomics.8: 37-42, (2020).

4. Inoue H., Shibata S., Li K., Inoue J., Fukuda S and Arakawa K. Complete Genome Sequences of Bifidobacterium longum strain Jih1 isolated from human feces. Microbiology Resource Announcements May 28; 9(22):e00319-20 (2020).

5. Toju H., S Abe M., Ishii C., Hori Y., Fujita H., Fukuda S. Scoring Species for Synthetic Community Design: Network Analyses of Functional Core Microbiomes. Frontiers in Microbiology Jun 25;11:1361. (2020).

6. Yang J., Yang Y., Ishii M., Nagata M., Aw W., Obana N., Tomita M., Nomura N., *Fukuda S. Does the Gut Microbiota Modulate Host Physiology through Polymicrobial Biofilms? Microbes and Environments;35(3). (2020).

7. Caballero-Flores G., M Pickard J., Fukuda S., Inohara N., Núñez G. An Enteric Pathogen Subverts Colonization
Resistance by Evading Competition for Amino Acids in the Gut. Cell Host & Microbe Jul 17;S1931-3128(20)30359-0 (2020).

 *Nakato G., Morimura S., Lu M., Feng X., Wu CJ. and Udey MC. Amelioration of congenital tufting enteropathy in EpCAM(TROP1)-deficient mice via heterotopic expression of TROP2 in intestinal epithelial cells. Cells Aug; 9(8): 1847, (2020).

 Mishima E., Ichijo M., Kawabe T, Kikuchi K., Akiyama Y., Toyohara T., Suzuki T., Suzuki C., Asao A., Ishii N., Fukuda S., Abe T. Germ-Free Conditions Modulate Host Purine Metabolism, Exacerbating Adenine-Induced Kidney Damage. Toxins Aug 26;12(9):E547 (2020). Nakamura A., Yokoyama Y., Tanaka K., Benegiamo G., Hirayama A., Zhu Q., Kitamura N., Sugizaki T., Morimoto K., Itoh H., Fukuda S., Auwerx J., Tsubota K., Watanabe M. Asperuloside Improves Obesity and Type 2 Diabetes through Modulation of Gut Microbiota and Metabolic Signaling. iScience Sept; 23(9):101522 (2020).

11. Tomizawa Y., Kurokawa S., Ishii D., Miyaho K., Ishii C., Sanada K., Fukuda S., Mimura M., Kishimoto T. Effects of Psychotropics on the Microbiome in Patients with Depression and Anxiety: Considerations in a Naturalistic Clinical Setting. The International Journal of Neuropsychopharmacology Sep 25; pyaa070 (2020).

12. Ogawa Y, Miyoshi C, Obana N, Yajima K, Hotta-Hirashima N, Ikkyu A, Kanno S, Soga T, *Fukuda S, *Yanagisawa M. Gut microbiota depletion by chronic antibiotic treatment alters the sleep/wake architecture and sleep EEG power spectra in mice. Sci. Rep. 10: 19554, (2020).

【招待講演】

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24回腸内細菌学会 2020年6月11日(誌上開催)

2. 福田真嗣 消化管内細菌叢がもたらす生体恒常性と疾患

第 62 回歯科基礎医学会学術大会 2020 年 9 月 26 日 (オンライン開催)

3. 福田真嗣

消化管内細菌叢がもたらす生体恒常性と疾患 第63回秋季日本歯周病学会学術大会 2020年10月16日 (オンライン開催)

 4. 福田真嗣
 腸内環境の制御による感染症予防・治療基盤技術の創出
 第 10 回家畜感染症学会学術集会 2020 年 12 月 12 日 (オンライン開催)

【ポスター発表】

1. Hikaru Inoue, Gaku Nakato, Masaru Tomita, Joe Inoue, Shinji Fukuda.

Development of target bacteria-isolation method using anti-bacterial species specific monoclonal antibody 第43回日本分子生物学会 2020年12月4日 (オンライン開催) 2. 田中一己、Aw Wanping、鈴木健大、尾花望、楊佳約、 木村彰宏、冨田勝、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 43 回 日本分子生物学会 2020 年 12 月 4 日 (オンライン開催)

3.竹内奈穂、田中一己、アウ・ワンピン、尾花望、冨田勝、福田真嗣
希少糖摂取による腸内細菌叢の変化は抗肥満効果をもたらす
第 43 回 日本分子生物学会 2020 年 12 月 4 日 (オンライン開催)

【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 1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℃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. 2020 年度の研究目的

プロジェクト2年目となる2020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

BiNio.85Fe0.15O3 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¹⁾。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。令和1年度に特許申請した、収率低下の原因となる酸化剤を用いずに巨大負熱膨張材料BiNio.85Fe0.15O3の合成を可能とする、共沈法による前駆体合成のスケールアップを果たす。この手法をトーメイダイヤでの工業生産に展開し、低コスト化を推し進める。また、有望シーズで開発、特許申請した、温度履歴が抑制され、Bi1.xSbxNiO3の合成にも応用する。これらの応用研究と平行して、新しい負熱膨張材料の開発を進め、高インパクトファクタージャーナルへの論文掲載を目指す。



図1:BiNi_{0.85}Fe_{0.15}O₃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

昨年度に引き続き、超低消費電力磁気メモリへの応用が 期待できる、電場印加で磁化反転が可能な室温強磁性強誘 電体、BiFe0.9Co0.1O3薄膜の単一強誘電ドメイン化を行う²⁾。 陽極酸化ポーラスアルミナの孔径を拡大し、成膜時の酸素 分圧を低下することで、得られるナノドットのサイズと厚 さを増やし、強誘電ドメインの観察を可能とする。同時に、 深堀りレジストや陽極酸化ポーラスアルミナをマスクパ ターンとした、BiFe0.9Co0.1O3薄膜のエッチング条件の最適 化を、電子技術部と共同で行い、メモリデバイスの具体化 をすすめる。また、ナノギャップ電極についてはギャップ 距離を縮めて、低い印加電圧で分極反転が起こるようにす る。これにより、信頼性を向上させる。さらに、第一原理 計算を用いて、Co以外に弱強磁相を安定化する元素を探 索する。バルクの高圧合成と薄膜育成を行う。



図 2: GdSc0₃基板上の BiFe_{0.9}Co_{0.1}0₃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<111>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

現状では 42pC/N に留まっている、Na_{1/2}Bi_{1/2}V_{1-x}Ti_xO₃単斜 相相の d₃₃を向上させる。現状で d₃₃が低いのは絶縁性が低 く、分極処理が不完全なためである。絶縁性向上のため、 Na/Bi 比の変化や、V サイトへの Mn, Zn, Li の置換、さら には正方晶相の BaTiO₃ や K_{1/2}Bi_{1/2}TiO₃ の固溶を試す。これ らはいずれも特許申請済みである。

2. 2020 年度の研究成果

以下に挙げるのは、2020 年度の具体的な研究成果であ りる。

(1) 巨大負熱膨張材料高収率合成手法の開発

昨年度特許申請した、錯体重合法による巨大負熱膨張材料 BiNi0.85Fe0.15O3の前駆体調製が、日本材料技研の外注先によって可能となった。これで、前駆体から高圧処理まで、全ての工程を工業的に行えるようになった。また、環境負荷を低減すすると共に、酸化剤の添加を不要とする共沈法を Bi1-xSbxNiO3 に応用することに成功した。



図 3: Bi_{0.5-x}La,Na_{0.5}VO₃, Bi_{0.5}Na_{0.5-x}La,VO₃の負熱膨張。PbTiO₃型構 造を持つ Bi_{0.5}Na_{0.5}VO₃の Bi³⁺をLa³⁺で置換して 6s² 孤立電子対の立 体障害効果を減少させることでも、Na⁺を La³⁺で置換して V⁴⁺に電 子ドープすることでも負熱膨張が起こる。参考文献 3)より許諾を 得て転載。



図 4: BiIn_{1-x}Zn_{x/2}Ti_{x/2}O₃の負熱膨張。BiInO₃ではペロブスカイト の A サイトを占める Bi の変位が電気分極の起源であるのが、 Bi₂ZnTiO₆を固溶させることで B サイトの Zn_{1/2}Ti_{1/2}が変位するよ うに変化する。参考文献 4)より許諾を得て転載。

さらに次世代の負熱膨張材料として、電子ドープした Na_{1/2}Bi_{1/2}VO₃に関する論文と、強誘電一常誘電転移に伴う 負熱膨張を示す BiInO₃-Bi₂ZnTiO₆の論文が Chemistry of Materials に掲載された^{3,4)}。後者は Supplementary Cover page にも選出されている。また、PbFeO₃ が Pb²⁺ $_{0.5}$ Pb⁴⁺ $_{0.5}$ Fe³⁺O₃の電荷分布を持ち、BiNiO₃ 同様電荷移 動型負熱膨張物質の母物質として期待できることを明ら かにした論文が、Nature Communications に掲載された⁵。



図 5: PbFe03の結晶構造と、走査透過電子顕微鏡像の比較。参考 文献 5)より許諾を得て転載。

(2) 強磁性強誘電体の単一強誘電ドメイン化

強磁性強誘電体 BiFe0.9C00.103 薄膜において、ストライプ 状のドメイン構造を持つ領域では、電場印加によって電気 分極を反転した際に磁化の面外成分も反転できることを 確立し、超低消費電力磁気メモリデバイスの開発を進めて いる。PFM(圧電応答顕微鏡)の帯電したカンチレバーを 掃引する際に発生する、Trailing Field と呼ばれる実効的な 電界によってストライプドメイン構造を生成できること を昨年度見いだしたが、Trailing Filed には電気的な起源を 持つものと、機械的な起源のものがあり、それらが拮抗し ている事が明らかになった。



図 6 : BiFeo. 9Coo. 103 薄膜の電場印加前後の PFM 像。カンチレバー の帯電の符合と掃引方向で、電気的・機械的 Trailing Field の 方向を制御できる。



図 7: BiFe0.9C00.103ナノドットの面内 PFM(a, b: 矢印は分極識別方 向) と面外 PFM 像(c)。全ての方向でドット内にコントラストの反 転がないことから、シングルドメインになっていることがわかる。 (d) は MFM 像。点線はドットの外径を表している。横向きの単磁 区構造になっていることがわかる。

BiFe0.9Co0.1O3は、電力を消費する磁場を用いず、電場印加 によって磁化を反転できることから、超低消費電力磁気メ モリ材料として期待している。今年度は、陽極酸化アルミ 箔をマスクとして用いたレーザーアブレーション法によ って、70Gbit/inch²に相当する、直径 60nm のナノドット化 に成功した。さらに、圧電応答顕微鏡 (PFM)、磁気力顕 微鏡 (MFM) 観察によって、電気分極、磁化共にシング ルドメインになっていることを確認した。磁気メモリデバ イス化に向けた、大きな一歩である。

(3) 非鉛圧電体の研究

PbTiO3 などの変位型強誘電体で問題になるサイズ効果 (微粒子化すると強誘電性が失われてしまうこと)がない ことから、秩序一無秩序型の強誘電体 CaMnTi2O6が注目を 集めている。ここでは酸素に平面 4 配位された Mn²⁺の安 定位置が上下 2 カ所に存在し、それらが一方向に揃うこと で反転対称性が破れる。それが引き金となって Ti⁴⁺の変位 も起こる。d⁰電子配置の Ti⁴⁺を d¹の V⁴⁺で置換すると、ヤ ーンテラー効果によって(Ti,V)の変位が増加し、自発分極 を約 2 倍にできることを見いだした⁶。



図 8: CaMn (Ti_{1-x}V_x)₂ 0_6 の結晶構造と、V 置換量に対する自発分極。 参考文献 6)より許諾を得て転載。

鉛系圧電体 PbZr_{1-x}Ti_xO₃ (PZT) は、正方晶相と菱面体晶 相の間の相境界近傍に単斜相が存在し、そこでは電気分極 の方向が外場によって変化(回転)できるために良好な圧 電応答を示すと考えられている。正方晶の Na_{1/2}Bi_{1/2}VO₃ と菱面体晶の Na_{1/2}Bi_{1/2}TiO₃ の、2 種類の非鉛化合物の固 溶体において、この分極回転を示す単斜晶相を実現し、圧 電応答を向上させることに成功した ⁷。この成果は ACS Applied Materials and Interfaces 掲載された。





図 9: Na_{1/2}Bi_{1/2}V_{1-x}Ti_xO₃ (x = 0.90, 0/95, 0.98)の分極ヒステレ シスループ(a-c)と、圧電定数(d₃₃)の組成依存性(d)。参考文献 7) より許諾を得て転載。下図は分極回転による圧電特性増強のイメ ージ。

【参考文献】

- 1. K. Nabetani et al., , Appl. Phys. Lett., 106, 061912 (2015).
- 2. K. Shimizu et al., Nano Lett., 19, 1767 (2019).
- 3. H. Ishizaki et al., Chem, Mater., 32, 4832 (2020).
- 4. T. Nishikubo et al., Chem. Mater., 33, 1498 (2021).
- 5. X. Ye et al., Nat. Commun., 12, 1917 (2021).
- 6. M. Fukuda et al., Inorg. Chem., 59, 11749 (2020).

7. Zhao Pan et al., ACS Applied Materials & Interfaces, 13, 5208 (2021).

新規負熱膨張材料開発手法の確立、及び

鉛含有ペロブスカイト型酸化物の特異な電荷分布の解明

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¹⁻³)。

これまでに、反強磁性転移 4)、電荷移動 5-7)、極性-非極 性転移^{8,9}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。Bi³⁺0.5Bi⁵⁺0.5NiO3 の特異的な電荷分布を取る ペロブスカイト型酸化物 BiNiO3 は Bi への 3 価のランタ ノイド元素置換 ⁵⁾や Sb³⁺置換 ⁸⁾、Ni への Fe³⁺置換 ⁶⁾等を行 い、Bi³⁺Ni³⁺O₃の電荷分布を安定化させることで、温度誘 起の Bi-Ni 間電荷移動(Bi³⁺0.5Bi⁵⁺0.5NiO3→Bi³⁺Ni³⁺O3)が 可能となる。この際に、ペロブスカイト構造の骨格を担う NiO6八面体が、Niの高価数化により収縮することで負の 熱膨張が発現する。Pb²⁺の孤立電子対による立体化学効果 と Ti⁴⁺の二次ヤン・テラー効果に起因する、 $Ps = 59 \mu C/cm^2$ の巨大な自発分極(点電荷モデル)と、c/a=1.06の巨大正方 晶歪みを有する⁹、代表的な強誘電体である PbTiO₃(チタ ン酸鉛)も負の熱膨張を示す。PbTiO3 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の際に、電 気分極による構造歪みが解消されるため、a,b 軸長がわず かに増加する一方、c 軸長が大きく減少する。その結果、 全体の体積は約1%縮む¹⁰。Pb²⁺やPb²⁺と同様の6s² 孤立電 子対を持つ Bi³⁺を含むペロブスカイト型酸化物では、

BiCoO₃($P_{s} = 126 \mu C/cm^{2}$ 、c/a = 1.27)¹¹や PbVO₃($P_{s} = 101 \mu C/cm^{2}$ 、c/a = 1.229)¹²といった PbTiO₃ を遥かに凌ぐ自発 分極値と正方晶歪みを有する物質も見つかっており、同様 の極性-非極性転移を利用することで、より大きな負の熱 膨張が期待できる。しかし、大きすぎる分極歪みは極性構 造の安定化にも繋がっているため、負熱膨張に必要な極性 -非極性転移が生じなくなる。我々のグループは、化学置 換により分極歪みの大きさを低減し、相転移温度を下げる という方法により、PbVO₃の Bi³⁺置換体で、最大 8%もの 体積収縮を伴った負熱膨張を発現させることに成功した ¹³。

今回我々は、新たな負熱膨張材料化開発手法として、分 極歪みの大きさを減少させるのではなく、電気分極を発現 させる原子の変位を別々のイオンサイトに分散させると いう方法を新たに考案した。同じペロブスカイト型酸化物 でも、構造や元素の種類などにより、分極が発現する起源 は異なり、斜方晶構造をとる BiInOs¹⁴⁾ではAサイトの Bi の変位が、正方晶構造をとる BizZnTiO₆¹⁵⁾ではBサイトの 遷移金属の酸素八面体中心からの変位が分極の起源とな っている。1サイトにおける原子変位量が大きいことが極 性構造の高安定性に寄与していると考えると、全体の変位 量を複数サイトにうまく分配することができれば、体積収 縮の量を維持したまま、負の熱膨張を発現することが可能 となる。また、それぞれのサイトで変位のしやすさに差が あるため、相転移の散漫化や温度ヒステリシスの減少など も期待できる。

そこで本研究では、BiInO3 と Bi2ZnTiO6 の固溶体を作成 し、原子変位量の複数サイトへの分散が負熱膨張特性に与 える効果を明らかにすることを目的とした。 $0.00 \le x \le 0.3$ のでは、目的としていた負熱膨張の発現と温度ヒステリシ スの低減に成功した。また、 $0.60 \le x \le 0.80$ において、BiInO3 と Bi2ZnTiO6の両構造とも異なる、LiNbO3相が存在してい ることを発見し、この相が優れた強弾性特性を示すことも 明らかにした¹⁶。

また、放射光や中性子源を利用した精密結晶構造解析及 び電荷分布評価により、ペロブスカイト型酸化物鉄酸鉛 (PbFeO₃)が、BiNiO₃ 同様に元素置換を施すことによっ て電荷移動型の負熱膨張が期待できる、Pb²⁺0.5Pb⁴⁺0.5Fe³⁺O₃ の複雑な電荷分布を持っていることも明らかになった¹⁷⁾ ので、その研究結果についても報告する。

2. 実験と結果

2.1 BiIn_{1-x}Zn_{x/2}Ti_{x/2}O₃の負熱膨張及び強弾性特性

BiInO₃とBiZn_{1/2}Ti_{1/2}O₃の固溶体、BiIn_{1-x}Zn_{x/2}Ti_{x/2}O₃多結 晶体は、6万気圧・1100 ℃の高温高圧条件下で30分熱処 理後、常圧下500 ℃で2時間アニールすることで作成した。

図1に放射光 X 線回折パターンの組成依存性を示す。 0.0 $\leq x \leq 0.3$ の試料は、BilnO₃と同様の極性の斜方晶構造 (空間群 *Pna*₂)を、0.40 $\leq x \leq 0.80$ の試料は、菱面体晶構 造、そして x = 1.0の Bi₂ZnTiO₆では極性の正方晶構造 (*P4mm*)を取る。また、0.40 $\leq x \leq 0.80$ の試料で新たに見 つかった菱面体晶相は、放射光 X 線回折のリートベルト 解析及び第二次高調波発生測定の結果から、極性の LiNbO₃型構造(*R*3c)を有していることも明らかになった (図1)。 図2に $0.0 \le x \le 0.3$ の斜方晶相における、A サイトの Bi の分極方向の変位と、B サイトの遷移金属イオンの酸素八 面体の上下の酸素との距離、そして点電荷モデルで計算さ れた自発分極値の組成依存性を示す。置換量が増えるにつ れ、A サイトの Bi の変位は減少し、B サイトの遷移金属 の八面体中心からのズレが大きくなっていることがわか る。また、A サイト及び B サイトの原子変位の増減が拮抗 するため、全体の分極の大きさは組成を変化させても、ほ とんど変化がないことも明らかになった。以上の結果から、 目的としていた、全体の分極の大きさを維持したまま、分 極を発現させる原子変位の量を A サイトと B サイトに分 配させることに成功した。

また、温度可変の放射光 X 線回折データから求めた格 子体積の温度依存性の結果から、0.0 ≤ x ≤ 0.3 の斜方晶相 全ての組成において、負の熱膨張が発現することが明らか になった。また、置換量が増えるに従い、相転移が散漫化 され、温度ヒステリシスが減少することも確かめられた (図2)。この負熱膨張特性の変化は、分極に対する寄与 が複数のサイトに分散されることにより生じる、分極歪み によるエネルギー利得のサイトごとの大きさの違いに起 因していると考えられる。

0.40 $\leq x \leq 0.80$ の菱面体晶相は自発分極の値が 80 μ C/cm² 以上と大きく、900 K 以上の高い強誘電キュリー温度を持 つことから、温度誘起の極性-非極性転移を観測すること はできなかった。強誘電性の観測を試みたところ、積層欠 陥に起因するリーク電流により、電場による分極反転を起 こすことはできなかったが、強磁性や強誘電性と同様の強 的秩序であり、応力による結晶方位の変化を示す強弾性の 測定に成功した。

図3にBiIn1-xZnx/2Tix/2O3に対して行なった、一軸加圧時 の応力-歪み曲線を示す。歪みが応力に対して非線形な応 答をしていることがわかる。この非線形の歪みの振る舞い が、相転移に起因したものではなく、強弾性に起因してい ることを明らかにするため、X線回折データのテクスチャ ー解析を行った。図4は一軸加圧前後のx=0.5の試料に対 して行った、放射光 X 線回折データのテクスチャー解析 結果を示している。一軸加圧後に、擬立方晶表記 111 反射 の積分強度が減少し、11-1 反射の積分強度が増加している ことがわかる。この挙動は強弾性現象に起因するものであ り、図4のように説明することができる。LiNbO3相は、 <111>方向に向いている自発分極により、<111>方向に伸 びた構造歪みを有している。分極方向が加圧方向と平行に 揃っているドメインは、加圧方向の長さが縮むように、 <11-1>方向への 71°ドメインスイッチングが生じる。そ して、強弾性の履歴効果により、スイッチングした一部の ドメインは減圧時にも元の状態に戻らないため、11-1 反射 の積分強度が加圧後に増加することになる。以上の歪みの 応力に対する非線形の応答及び加圧前後での結晶方位の 変化から、LiNbO3相が強弾性を示すことを確認した。

強弾性の大きさの指標の一つである、最大歪み(本測定 では、-160 MPa 時の歪み)は、置換量が増えるに従い、 劇的に大きくなり、x=0.7 と 0.8 では、アクチュエータや



図 1. BiIn_{1-x}Zn_{w2}Ti_{w2}O₃の放射光 X 線回折パターン(左)と x=0.5 の試料の放射光 X 線回折データのリートベルト解析結果(右上) と第二次高調波発生測定結果(右下)。第二次高調波の強度がレ ーザー強度の2乗に比例する振る舞いは、菱面体晶相が極性構造 であることを示している。参考文献 16)より、American Chemical Society の許諾を得て転載。



図 2. BiIn_{1-x}Zn_{x/2}Ti_{x/2}O₃の Bi の原子変位量(左上)、遷移金属と 頂点酸素との結合長(左中)、自発分極値(左下)の組成依存性 及び格子体積の温度依存性(右)。頂点酸素との結合長の長短の 差は、八面体中心から変位量に相当している。参考文献 16)より、 American Chemical Society の許諾を得て転載。

センサー用途に歪み量が大きくなるようにチューニング された、ソフト系のチタン酸ジルコン酸鉛(PZT)¹⁸⁾の2倍 に相当する、1.0%もの巨大な最大歪みを示すことが明らか になった。これは LiNbO3相が示す巨大な自発分極の大き さに起因していると考えられる。また、x=0.8 の試料では 最大歪みの大きさが x=0.7 の試料よりも増加した一方、残 留歪み(減圧後に残る歪み)の大きさは、x=0.7 の試料よ りも減少した。この要因を調べるため、x=0.8 の試料に対 して、放射光 X 線全散乱データを利用した PDF 法による 局所構造解析を行ったところ、PbMg1/3Nb2/3O3 等のリラク サー強誘電体で見られるような、局所的な2相共存状態が 存在していることが明らかになった。71° スイッチングが 可能な LiNbO3 相の他に 90° スイッチングが可能な正方晶 相が局所的に共存することによる、ドメイン方向の自由度 が増加したため、x=0.8の試料では残留歪みが小さくなっ たのだと考えられる。



図 3. BiIn_{1-x}Zn_{x2}Ti_{x2}O₃の応力-歪み曲線。強弾性体特有の非線形 の応答を示す。参考文献 16)より、American Chemical Society の 許諾を得て転載。



図 4. Biln_{0.5}Zn_{0.25}Ti_{0.25}O₃ (*x*=0.5)の放射光 X 線回折データのテク スチャー解析結果(左)と LiNbO₃ 相で生じる 71°強弾性ドメ インスイッチング。参考文献 16)より、American Chemical Society の許諾を得て転載。



図 5. BiIn_{0.2}Zn_{0.4}Ti_{0.4}O₃ (*x*=0.8)の PDF 解析結果。2 Å 付近で見ら れる鋭いピークは、菱面体晶相(*R*)だけではなく、局所的には正 方晶(*T*)も共存していることを示している。参考文献 16)より、 American Chemical Society の許諾を得て転載。

2. 2 PbFeO3の電荷秩序とスピン再配列

PbFeO3 多結晶体は、8 万気圧・1150 ℃の高温高圧条件 下で 30 分熱処理することで作成した。

放射光施設 SPring-8 のビームライン BL02B2 での放射光 X線粉末回折結果から、PbFeO3はb軸に垂直なPb-O層が 短-長-短の間隔で積層した、2a_p×6a_p×2a_p(a_pは立方晶単 純ペロブスカイトの格子定数)の斜方晶構造を取っている ことが明らかになり、走査透過電子顕微鏡像でもこの積層 構造は観察された(図 6)。中性子回折により酸素の原子 座標を精密に求め、結合長と配位数から価数を見積もるボ ンドバレンスサム計算を行った。その結果、鉛は Pb²⁺のみ からなる層と、Pb²⁺と Pb⁴⁺を 1:3 で含んでいる層が積み重 なった、層状と岩塩型の中間のような電荷秩序をしている ことが明らかになり、Pb4+を含む層同士が向かい合ってい る箇所での、層間隔の拡大は Pb4+同士で働く巨大な静電反 発に起因していることがわかった。鉛が Pb²⁺と Pb⁴⁺に 1:1 で不均化していることは、SPring-8 のビームライン BL09XU での硬 X 線光電子分光実験(図 7) によって、鉄 イオンが Fe³⁺であることはメスバウアー分光実験でも確 認され、PbFeO3は Pb²⁺0.5Pb⁴⁺0.5Fe³⁺O3の複雑な電荷分布を 持つことが明らかになった。

また、PbFeO₃は600 K 以下で反強磁性を示すが、418 K で磁化の方向が a 軸方向から b 軸方向へと変化する、スピ ン再配列が発現することを中性子回折データのスピン構 造解析により明らかにした。鉄の価数は全て 3 価であるが、 Pb²⁺と Pb⁴⁺の特殊な秩序配列のために、周囲の環境の異な る 2 種類の鉄イオンが、PbFeO₃では存在している。我々



図 6. PbFeO₃の結晶構造と走査透過電子顕微鏡像。 参考文献 17)より転載。



図 7. PbFeO₃の硬 X 線光電子分光スペクトル(左)と Pb²⁺ と Pb⁴⁺それぞれのピーク成分の面積比から算出した Pb の平 均価数(右)。参考文献 17)より転載。



図8. PbFeO3の磁化率の温度依存性(上)と磁気散乱ピー クの各種磁気モデルでのフィッティング結果(下)。磁気散 乱ピークの形状から、スピン再配列温度(T_{SR})以下でスピン の向きがa軸方向からb軸方向へと変化していることが明ら かになった。参考文献17)より転載。



図9. 第一原理計算によるスピン再配列の機構解明。格子歪み により、a軸からb軸方向ヘスピンの向きが変化する計算結果は 実験を再現している。参考文献17)より転載。

は、熱膨張により格子が歪むことで、周囲の環境の異なる 2種類の鉄イオンの磁気異方性の強さが変化し、そのこと がスピン再配列につながることを第一原理計算により明 らかにした。

3. 考察及び今後の展望

本研究では、放射光や中性子を用いた回折および分光実 験により、BiIn_{1-x}Zn_{x2}Ti_{x2}O₃の負熱膨張及び強弾性の観察、 PbFeO₃の特異的な電荷分布の解明に成功した。 BiIn_{1-x}Zn_{x2}Ti_{x2}O₃の研究では $0.00 \le x \le 0.30$ の斜方晶相 において、電気分極の起源となる原子変位を A サイトと B サイトに分散することで、負熱膨張の散漫化と温度ヒステ リシスの低減に成功した。また、 $0.40 \le x \le 0.80$ で現れる LiNbO₃相では、ソフト系 PZT の 2 倍の最大歪みを示す強 弾性現象が観測された。さらに、局所的な 2 相共存状態に よるドメイン方向の自由度によって、残留歪みの大きさが 減少することも明らかにした。

PbFeO3の研究では、Pb²⁺0.5Fe³⁺O3という特異な電荷分布を持つこと、Fe³⁺の1種類の磁性イオンしか持っていないのにも関わらず、低温でスピン再配列が生じることを実験と理論計算から明らかにした。複雑な電荷分布を持っていることから、PbFeO3も化学置換によりPb²⁺Fe⁴⁺O3の価数状態を安定化させることで、BiNiO3同様に電荷移動型の負熱膨張の発現が期待される。また、負熱膨張材料目的以外でも、室温をはるかに超える高い転移温度を持つことから、外場で磁化の方向を制御する新しいスピントロニクスデバイスへの応用につながることも期待される。

【参考文献】

K. Takenaka, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **13**, 013001 (2012).
 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).

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 and Y. Shimakawa, *Nature*, **458**, 60-63 (2009).

8. T. Nishikubo, Y. Sakai, K. Oka, M. Mizumaki, T. Watanuki, A. Machida, N. Maejima, S. Ueda, T. Mizokawa and M.

Azuma, Appl. Phys. Express, 11, 061102 (2018).

9. S. C. Abrahams, S. K. Kurtz and P. B. Jamieson, *Phys. Rev.*, **172**, 551–553 (1968).

G. Shirane, S. Hoshino and K. Suzuki, *Phys. Rev.*, 80, 1105–1106 (1950).

11. A. A. Belik, S. Iikubo, K. Kodama, N. Igawa, S. Shamoto,

S. Niitaka, M. Azuma, Y. Shimakawa, M. Takano, F. Izumi and

E. Takayama-Muromachi, Chem. Mater., 18, 798-803 (2006).

12. R. V. Shpanchenko, V. V. Chernaya, A. A. Tsirlin, P. S.

Chizhov, D. E. Sklovsky, E. V. Antipov, E. P.Khlybov, V.

Pomjakushin, A. M. Balagurov, J. E. Medvedeva, E. E. Kaul, C. Geibel, *Chem. Mater.*, **16**, 3267–3273 (2004).

13. H. Yamamoto, T. Imai, Y. Sakai and M. Azuma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 8170-8173 (2018).

14. A. A. Belik, S. Yu. Stefanovich, B. I. Lazoryak, E.

Takayama- Muromachi, Chem. Mater., 18, 1964-1968 (2006).

15. M. R. Suchomel, A. M. Fogg, M. Allix, H. Niu, J. B. Claridge, M. J. Rosseinsky, *Chem. Mater.*, **18**, 4987–4989 (2006).

16. T. Nishikubo, T. Ogata, L. K. Venkataraman, D. Isaia, Z.

Pan, Y. Sakai, L. Hu, S. Kawaguchi, A. Machida, T. Watanuki, H. Yu, Y. Okimoto, S. Koshihara, S. Mori, J. Rödel and M.

Azuma, Chem. Mater., 33, 1498-1505 (2021).

17. X. Ye, J. Zhao, H. Das, D. Sheptyakov, J. Yang, Y. Sakai,

H. Hojo, Z. Liu, L. Zhou, L. Cao, T. Nishikubo, S. Wakazaki, C.

Dong, X. Wang, Z. Hu, H. Lin, C. Chen, C. Sahle, A. Efiminko, H. Cao, S. Calder, K. Mibu, M. Kenzelmann, L. H. Tjeng, R.

Yu, M. Azuma, C. Jin and Y. Long, *Nat. Commun.*, 12, 1917 (2021).

18. K. G. Webber, E. Aulbach, T. Key, M. Marsilius, T.

Granzow and J. Rödel, Acta Mater., 57, 4614-4623 (2009).

業績

【原著論文】

1.Zhao Pan, Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Takafumi Yamamoto, Shogo Kawaguchi and Masaki Azuma Observation of Stabilized Monoclinic Phase as a "Bridge" at the Morphotropic Phase Boundary between Tetragonal Perovskite PbVO₃ and Rhombohedral BiFeO₃ Chemistry of Materials (Vol.32, No.8)、 (2020)

 Hayato Ishzaki, Yuki Sakai, Takumi Nishikubo, Zhao Pan, Kengo Oka,Hajime Yamamoto and Masaki Azuma Negative thermal expansion in lead-free La-substituted Bi_{0.5}Na_{0.5}VO₃ Chemistry of Materials (Vol.32, No.11), (2020)

3. Mitsuru Nitta, Nobuaki Nagao, Yuki Nomura, Taku Hirasawa, Yuki Sakai, Takahiro Ogata, Masaki Azuma, Shuki Torii, Toru Ishigaki and Yasuhisa Inada High-Brightness Red-Emitting Phosphor La₃(Si,Al)₆(O,N)₁₁:Ce³⁺ for Next-Generation Solid-State Light Sources

ACS Applied Materials & Interfaces (Vol.12, No.28), (2020)

4. Yoshitaka Nakamura, Yuki Sakai, Masaki Azuma, Shin-ichi Ohkoshi

Long-term heat-storage ceramics absorbing thermal energy from hot water, Science Advances (Vol.6, No.27), (2020)

- 5. Kei Shigematsu, Haruki Shimizu, Marin Katsumata, Keisuke Shimizu, Hajime Yamamoto, Ko Mibu and Masaki Azuma Stable electric polarization switching accompanied by magnetization reversal in B-site-substituted multiferroic BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ thin films, Applied Physics Express (Vol.13, No.7), (2020)
- Hajime Yamamoto, Kaoru Toda, Yuki Sakai, Takumi Nishikubo, Ikuya Yamada, Kei Shigematsu, Masaki Azuma, Hajime Sagayama, Masaichiro Mizumaki, Kiyofumi Nitta and Hiroyuki Kimura

Emergence of a Cubic Phase Stabilized by Intermetallic Charge Transfer in (1-x)PbVO₃-xBiCoO₃ Solid Solutions, Chemistry of Materials, (Vol. 32, No. 16), (2020)

7. Masayuki Fukuda, Takumi Nishikubo, Zhao Pan, Yuki Sakai, Mao-Hua Zhang, Shogo Kawaguchi,

Hongwu Yu, Yoichi Okimoto, Shin-ya Koshihara, Mitsuru Itoh, Jürgen Rödel and Masaki Azuma

Enhanced Spontaneous Polarization by V^{4+} Substitution in a Lead-Free Perovskite CaMnTi_2O_6 $\,$

Inorganic Chemistry (Vol.59, No.16), (2020)

- Shogo Wakazaki, Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Kei Shigematsu, Hena Das, Depei Zhang, Qiang Zhang, Masaaki Matsuda and Masaki Azuma Stabilized Charge, Spin, and Orbital Ordering by the 6s² Lone Pair in Bi0.5Pb0.5MnO₃, Inorganic Chemistry (Vol.59, No.18), (2020)
- Hongwu Yu, Kou Takubo, Tadahiko Ishikawa, Shin-ya Koshihara, Masaki Hada, Toru Asaka, Keita Ozawa, Kei Shigematsu, Masaki Azuma and Yoichi Okimoto Ultrafast Nonlinear Spectroscopy in (111) Oriented Bismuth Ferrite Oxide, Journal of the Physical Society of Japan (Vol.89, No.6), (2020)
- Takumi Nishikubo, Takahiro Ogata, Lalitha Kodumudi Venkataraman, Daniel Isaia, Zhao Pan, Yuki Sakai, Lei Hu, Shogo Kawaguchi, Akihiko Machida, Tetsu Watanuki, Hongwu Yu, Yoichi Okimoto, Shin-ya Koshihara, Shigeo Mori, Jürgen Rödel and Masaki Azuma Polarization- and Strain- Mediated Control of Negative Thermal Expansion and Ferroelasticity in BiInO₃-BiZn_{1/2}Ti_{1/2}O₃, Chemistry of Materials (Vol. 141, No. 49), (2021)
- 11. Zhao Pan, Yuki Sakai, Mao-Hua Zhang, Masayuki Fukuda, Hayato Ishizaki, Takumi Nishikubo, Hajime Yamamoto, Hajime Hojo, Satoru Kaneno, Shogo Kawaguchi, Jurij Koruza, Jürgen Rödel and Masaki Azuma Polarization Rotation at Morphotropic Phase Boundary in New Lead-Free Na_{1/2}Bi_{1/2}V_{1-x}Ti_xO₃ Piezoceramics, ACS Applied Materials & Interfaces (vol. 13, No. 4), (2021)
- 12. Xubin Ye, Jianfa Zhao, Denis Sheptyakov, Junye Yang, Yuki Sakai, Hajime Hojo, Zhehong Liu, Long Zhou, Lipeng Cao, Takumi Nishikubo, Shogo Wakazaki, Hena Das, Cheng Dong, Xiao Wang, Zhiwei Hu, Hong-ji Lin, Chien-Te Chen, Christoph Sahle, Anna Efiminko, Huibo Cao, Stuart Calder, Ko Mibu, Michel Kenzelmann, Liu Hao Tjeng, Changqing Jin, Masaki Azuma, Runze Yu and Youwen Long Observation of novel charge ordering and spin reorientation in perovskite oxide PbFeO₃, Nature Communications (vol. 12), (2021)
- 13.Masaki Azuma, Hajime Hojo, Kengo Oka, Hajime Yamamoto, Keisuke Shimizu, Kei Shigematsu and Yuki Sakai

Functional Transition Metal Perovskite Oxides with $6s^2$ Lone Pair Activity Stabilized by High-Pressure Synthesis, Annual Review of Materials Research (vo. 51), (2021) in press

14.東 正樹
 巨大負熱膨張セラミックス
 金属(Vol. 91, No. 4)、(2021)

15.東 正樹,酒井 雄樹,西久保 匠,岡 研吾,山本 孟, 圧力誘起相転移を利用した巨大負熱膨張物質の開発 高圧力の科学と技術 (Vol. 30, No. 3)、(2021)

【口頭発表】

 Zhao Pan, Yuki Sakai, Maohua Zhang, Jurij Koruza, Hajime Yamamoto, Hajime Hojo, Shogo Kawaguchi, Jürgen Rödel and Masaki Azuma

Polarization Rotation at Morphotropic Phase Boundary in a New Lead-Free Piezoelectric Ceramic $Na_{1/2}Bi_{1/2}V_{1-x}Ti_xO_3$ 、 Electroceramics XII conference、2020 年 8 月 24 日 (Online 開催)

 Masaki Azuma, Keisuke Shimizu, Ryo Kawabe, Hajime Yamamoto, Kei Shigematsu, Hajime Hojo, Ko Mibu Magnetization reversal by electric field at room temperature in Co substituted bismuth ferrite thin film Electroceramics XII conference, 2020 年 8 月 28 日 (Online 開催)

- 重松圭,勝俣真綸,清水陽樹,清水啓佑,東正樹 面内電場印加における BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ 薄膜の強誘電・強 磁性ドメイン相関 第 37 回強誘電体会議(FMA37)、2020 年 5 月 28 日
- 小澤慶太,勝俣真綸,重松圭,東正樹 陽極酸化ポーラスアルミナを用いた強誘電強磁性 BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ナノドットの作製・評価 第 37 回強誘電体会議(FMA37)、2020 年 5 月 28 日
- 5. 重松圭 超低消費電力メモリにつながるマルチフェロイック材料 JST 新技術説明会、2020 年 6 月 2 日(Web 発表)
- 6. 東正樹
 巨大負熱膨張材料 BiNi_{1-x}Fe_xO₃の硝酸を用いない合成法、 JST 新技術説明会、2020 年 6 月 2 日(Web 発表)

 若崎翔吾,西久保匠,重松圭,山本隆文,Das Hena,東正樹, Zhao Guowei,鈴木耕太,菅野了次,Jalem Randy,館山 佳尚 層状逆ペロブスカイト型 Li₄0(Br,F)₂の高圧合成と Li イオン伝導 公益社団法人日本セラミックス協会第33回秋季シンポ ジウム、2020年9月3日(Online開催)

 福田真幸,西久保匠,PAN Zhao,酒井雄樹,ZHANG Mao-hua、,河口彰吾,YU Hongwu,沖本洋一,腰原伸也,伊 藤満,RODEL Jurgen,東正樹 非鉛強誘電体 CaMnTi₂O₆の V⁴⁺置換による自発分極の変 化 公益社団法人日本セラミックス協会第33回秋季シンポ ジウム、2020 年9月3日 (Online 開催)

9. 戸田薫,山本孟,木村宏之,酒井雄樹,重松圭,東正樹, 山田幾也,佐賀山基 PbV0₃-BiCoO₃固溶体における金属間電荷移動に伴う結 晶構造変化 公益社団法人日本セラミックス協会第33回秋季シンポ ジウム、2020年9月3日(Online開催)

- 10. 松野夏奈,酒井雄樹,西久保匠,東正樹
 PbCr0₃のTi置換による負熱膨張化の試み
 粉体粉末冶金協会 2020 年度秋季大会、2020 年 10 月 27
 日 (Online 開催)
- 11. 酒井雄樹,西久保匠,水牧仁一朗,溝川貴司,町田晃彦,綿貫徹,沖本洋一,東正樹ペロブスカイト型酸化物 Bi_{1-x}Pb_xNiO₃の負熱膨張第61回高圧討論会、2020年12月2日(Online 開催)
- 12. 若崎翔吾,西久保匠,酒井雄樹,松田雅昌,Das Hena、 東正樹
 Bi_{0.5}Pb_{0.5}MnO₃における電荷秩序と孤立電子対効果
 第 61回高圧討論会、2020年12月2日(Online開催)
- 13. 松野夏奈,酒井雄樹,西久保匠,東正樹
 PbCr0₃のTi置換による負熱膨張化の試み
 第61回高圧討論会、2020年12月2日(Online 開催)
- 14. 相澤遥奈,山本孟,戸田薫,山田幾也,野島勉,東正樹,酒井雄樹,西久保匠,木村宏之ペロブスカイト型酸化物(1-x)PbV03-xBiCr03 固溶体の結晶構造変化と金属電荷移動 第 61 回高圧討論会、2020 年 12 月 2 日 (Online 開催)
- 15. 福田真幸,東正樹, Yiran Wang、Kenneth Poppelmeier, 三宅厚志,徳永将史
 S=1/2 テトラマースピンギャップ物質 [Cu(4,4'-Me₂-bpy)(H₂0)]2[V₂0₂F₈]
 日本物理学会第76回年次大会、2020年3月12日 (Online開催)
- 16. 伊藤拓真, 勝俣真綸, 重松圭, 東正樹

強磁性・強誘電性が共存する BiFe_{0.9}Co_{0.1}0₃薄膜の
 trailing field を用いたドメイン制御
 応用物理学会春季学術講演会、2020 年 3 月 19 日 (Online
 開催)

17. 福田真幸,西久保匠, Hongwu Yu,沖本洋一,腰原伸也, 東正樹,酒井雄樹 新規Aサイト柱状秩序ダブルペロブスカイトCaZnV₂0₆の高 圧合成 公益社団法人日本セラミックス協会 2021 年年会、2020 年 3月23日 (Online 開催)

【記者発表】

鉄酸鉛の特異な電荷分布を解明 - 電荷秩序が磁化の方 向変化を誘起、負熱膨張への展開も-東京工業大学、KISTEC、九州大学、名古屋工業大学

【特許】

(1) 国内特許出願 1件(2) 国外特許出願 2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て投与し、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 ー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. 2020 年度の研究目的

2019年度、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」項目として実施したブタ実験を通じ、 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得られた一方、 皮膚刺入性の面での課題が浮き彫りとなった。そこで、こ れらを解決すべく、本年度は、デバイスの構造と作製方法 を抜本的に見直すこととした。具体的には、添付時の加圧 を容易にする構造への改良と光重合を組み合わせた新規 手法を検討した。並行して、マイクロニードルの力学強度 の向上と共に装着後の吸水性(放出特性の迅速回復)を顕 著に促すポリグリセロール誘導体による添加物材料を開 発し、本年度は特許出願するとともに、上記光重合による 新規製造プロセスの開発進展と併せ、その添加剤としての 効果を明らかにすることとした。また、光重合プロセスは、 量産性の面で大きなメリットを有する一方、一般に、仕込 み時の分子濃度(および架橋密度)を大きめに設定しない と十分な成形性が得られないという制約がある。仕込み時 の分子濃度が大きくなると、ゲル本来の性質として、放出 特性が著しく低下してしまうため、インスリンデリバリー の目的においては重要な課題となる。そこで、このジレン マを克服すべく、デバイス構造、重合条件、反応後の後処 理、洗浄条件等を系統的に検討し、刺入性、放出特性、製 造効率すべての観点を満足するデバイス製造法の確立を

目指した。また、本年度地域エコプロジェクト「加速費」 により「テレメトリーシステム」を」導入した。本システ ムでは、無麻酔・非拘束・非採血で3週間程度連続かつリ アルタイムでの血糖測定が可能なものである。今後、新型 デバイスの in vivo 評価を、ラットを中心に本格化させて いく予定であるため、本年度はその予備検討を行い、評価 プロトコールの確立を目指した。

2. 2020 年度の研究成果

デバイスの小型化・週単位の持続性・皮下刺入性を確保す るために必要な構造改変と周辺技術の開発

構造改変と光重合を組み合わせた新規手法を開発し、皮 膚刺入性と作製効率を格段に向上させることに成功した。 また、皮膚への装着の際にデバイスと組み合わせて使用す るアプリケータについて、3D プリンタを用いて試作し、 デバイスのプロトタイプを作製した(図1)。実際、ラット での皮膚刺入性を評価したところ(図2)、従来のデバイス と異なり、皮膚への刺入・固定は良好で、乾燥によるマイ クロニードル先端部、およびリザーバー部の変形も認めら れなかった。また、皮膚穿刺部位には刺入跡が明瞭に観察 されたが、2日後には外観上はほぼ消失しており、皮膚刺 入部の速やかな回復が示唆された。一般に、ゲルニードル のアプローチでは、ゲルの水和に伴う構造変形がボトルネ ックであり、我々が考案した方式は、この点をスマートに 解決するものである。



図1.アプリケータを組み合わせたデバイス.



図2.皮膚刺入部の病理組織学的評価.

<u>刺入性、放出特性、製造効率を満足するデバイス製造方法</u>の検討

上で述べた光重合による製造方式は、従来の熱や酸化還 元反応型の方式と比べて、製造効率の面で大きな優位性が ある。連携企業からの要望も考慮して、この方式を集中的 に検討することとした。ただし、光重合(ラジカル重合) 方式では、一般に、仕込み時のモノマーおよび架橋剤濃度

を比較的大きく設定しないと、十分 な成形性が得られないという制約が ある。結果的に、ゲル内部の分子ネ ットワークが混み合い(編み目のサ イズが小さくなり)、ゲル中での溶質 (インスリン)の透過性が著しく低 下してしまう。理論的には、分子・ 架橋密度が高く、ゲルの含水率(H) が小さくなると、その逆数(1/H)に 比例して、ゲル中での溶質の見かけ の拡散係数は指数関数的に減少する ことが知られている。我々は、ラジ カル重合時の(モノマー)/(開始剤) 比率等のパラメータを最適化するこ とで、「低分子密度」と「成形性」を 両立したマイクロニードル製造プロ トコールを確立した。



図3. テレメトリーシステムの概要.

<u>テレメトリーシステムを用いたリアルタイム血糖測定シ</u> <u>ステムの導入と予備検討</u>

デバイスを皮膚に貼付後、どの程度のタイムラグで効果 が発揮されるか、また糖尿病合併症の主要な原因となる血 糖日内変動に対してデバイスが有効性を示すかなどは、臨 床応用時に非常に重要な観点となる。そこで本年度、追加 予算を得てテレメトリーシステム(米国 DSI 社、図 3)を 新たに導入し、血糖値のリアルタイム連続測定を実施した。 血糖値センサーは SD ラットの腹部大動脈内、送信器は腹 部皮下に留置し、比較検討のため、背部皮膚に FreeStyle リ ブレ Pro を貼付した(図 4)。



図 4. テレメトリー送信器の装着.



図 5. グルコース負荷試験における血糖値変化.

グルコースを腹腔内投与したところ、テレメトリーシステム(動脈血)、FreeStyle リブレ Pro(皮下間質液)、尾静脈 採血(静脈血)のいずれの方法においても、一過性の血糖 上昇を観察した。テレメトリーシステムの利点として、リ アルタイムに連続測定が可能なこと、2~3週間の長期デ ータの取得が可能なこと、採血不要でラットのストレスが ないことなどが挙げられる(図 5)。

次に、ストレプトゾトシン (STZ) 投与による1型糖尿 病モデルを用いて、テレメトリーシステムと FreeStyle リ ブレ Pro、間欠的静脈採血の比較を行った。テレメトリー システムでは、STZ 投与後に軽度の血糖上昇、 β 細胞破壊 に伴うインスリン放出が誘導する低血糖を経て、24 時間 後までに 500 mg/dl 程度の高血糖を呈した。同様の血糖変 動パターンは FreeStyle リブレ Pro でも観察されたが、測 定上限が 500 mg/dl のため、重症高血糖個体では測定が困 難になる。間欠的静脈採血では、1~2 回/日の測定に止まる



図 6. STZ 投与後の血統日内変動.

ため、血糖変動パターンは明らかにすることはできない。 さらに、テレメトリーシステムを用いて、日内変動の評価 を行った(図 6)。ラットは夜行性のため、活動期の夜間に 摂餌する。正常ラットでは、摂餌や活動量に関係なく血糖 値はほぼ一定に保たれるが、糖尿病ラットでは、夜間(活 動期)に高く、昼間(非活動期)に低い明確な日内変動パ ターンを示すことを確認した。

3. 総括

2019年度、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」項目として実施したブタ実験を通じ、 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得られた一方、 皮膚刺入性の面での課題が浮き彫りとなった。そこで、本 年度は、デバイスの構造と作製方法を抜本的に見直し、ア プリケータの試作や光重合を用いた新規手法を開発した。 さらに、重合条件等を最適化することで、皮膚刺入性、放 出特性、作製効率を高次に満足する製造法を確立した。当 該プロトコールは、既に共同研究先の企業に共有されてお り、今後は量産化へ向けた課題抽出作業へ本格的に取り組 む予定である。

マイクロニードルの力学的強化と吸水性(放出特性の迅速回復)を促進する新規添加物材料を開発し、特許出願した。本材料技術はいわば「高密度に化学修飾可能なポリエ チレングリコール(PEG)代替物」であり、本プロジェクトの目的に限らず、バイオマテリアルの表面修飾、DDS、 生理活性物質の de novo 合成、近年 PEG 抗体が問題となっ ている製剤・化粧品添加物の代替材料等、幅広い展開が期 待される。

今後、新型デバイスの in vivo 評価を、ラットを中心に 本格化させていく予定である。特に、本年度地域エコプロ ジェクト「加速費」により導入した「テレメトリーシステ ム」による評価が目玉となる。最近の研究により、平均血 糖値の上昇に加えて、日内変動(血糖値スパイク)が心筋 梗塞や脳卒中などの糖尿病合併症の発症に深く関わるこ とが明らかになっている。我々のデバイスにより、その抑 制効果を示すエビデンスが得られれば、重要な付加価値を もたらすものとして大きな期待を寄せている。 マイクロニードル機能向上に向けた

ゲル組成の改良と in vivo 評価系の検討

伊藤 美智子

1. はじめに

本プロジェクトでは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。昨年度はマウスを 用いて、皮膚内におけるインスリン放出動態を ex vivo, in vivo にて検討した。皮膚組織に刺入したマイクロニードル や皮内のインスリンが共焦点顕微鏡によって観察可能な ことが明らかになったが、定量的にデータを解析するには 個体ごとのバラツキが大きく、安定したデータが得られな いことが問題であった。今年度はマイクロニードルデバイ ス機能の安定性向上を目指し、デバイスの構造やゲル組成 の改良に取り組んだ。

2. 実験と結果

マイクロニードルデバイスから安定したインスリン放 出を得るためには、ニードルの刺入性向上、有効表面積確 保(刺入状態の保持)、デバイスへのインスリンロード後 のインスリン浸透性向上に加え、ex vivo/in vivo 共焦点顕微 鏡観察時の実験条件を均一にすることが重要である。各項 目に関してこれまでの問題点と改善策を検討した。

2.1 インスリン浸透性向上を目指したゲル組成 の改良

マイクロニードル型デバイスはニードルの強度を確保す るためにモノマー濃度が高く、架橋密度が高い。しかしな がら、吸水性とのトレードオフになってしまうため、イン スリン浸透が悪く、生体内で効果が発揮されるまでに時間 がかかってしまう点が問題である。そこで、ボロン酸モノ マーを含むプリゲル溶液に親水基を有するポリグリセロ ールを配合することで吸水性の向上を目指した。また、重 合開始剤の濃度を調整することで吸水性に変化があるこ とを見出し、蛍光顕微鏡においても FITC 標識インスリン がゲルタブレット内部まで浸透していることが確認され た(図 1)。

マイクロニードルデバイスを生体に応用する前段階と して、背面にインスリンをロードした後に針先まで到達す る時間経過を把握する必要がある。既報を参考に、1%ア ガロースゲルを用いて色素の浸透とゲルへの拡散を観察 した(図2)^{1,2)}。しかしながら、針先への色素到達が不均 ーな場合や成形過程にできたクラックから漏出してしま うといった問題点が明らかになった。



図1.新規ゲル素材へのFITC標識インスリン浸透



図2.アガロースゲルを用いたMN観察

2.2 正常マウスにおけるマイクロニードル機能 評価

皮内のインスリン放出を共焦点顕微鏡によって観察す る際、デバイス機能の問題か観察条件の問題か判断が難し い場合がある。血糖値・インスリン値を経時的に測定する ことでデバイス機能評価を試みた。野生型マウスに対して インスリンをロードしたマイクロニードルを装着し、一晩



絶食の後にグルコースを投与し (2g/kg)、30 分おきに血糖 値測定と尾静脈から採血を行った。血漿を用いてヒトイン スリンを ELISA にて測定した。デバイスが良好に機能す る際にはインスリン非投与コントロールマウスと比較し て血糖値が低下し、グルコース投与後の血糖値上昇に反応 してインスリン放出が認められた (図 3)。顕微鏡観察時 に同様の検討を行うことで、デバイス機能を確認すること ができると考えられた。

2.3 共焦点顕微鏡観察時の皮膚温モニタリング マイクロニードルデバイスからのインスリン放出には 皮膚の温度・血流の温度が深く関わる。特に in vivo 共焦 点顕微鏡観察ではデバイス付きの皮膚弁を展開するため、 生理的な条件下とは大きく異なる可能性がある。顕微鏡観 察台の温度を保つホットプレートとサーモグラフィーを 導入し、予定している実験条件における皮膚温の変化を観 察した。実験環境を整えることで生理的な範囲内の皮膚温 を保持できることが明らかとなった(図4)。

3. 考察及び今後の展望

本年度の検討によりマイクロニードルデバイスの基本 構造が大幅に改善し、生体応用に向けた前進が見られた。 またデバイスの機能評価に重要な実験機器のセットアッ プ、実験系の構築も完了している。インスリン浸透性が向 上したゲル組成もほぼ固まっており、新規材料を用いたマ イクロニードルデバイスを作成し、基本性能を明らかにす るとともに、皮膚装着に適した形状や固定方法を模索する。 マウスにおけるインスリン放出が確認でき次第、病態モデ ルにおける効果を検討する。



図4.サーモグラフィーによる皮膚温観察

【参考文献】

1. S. Kim, H. Yang, J. Eum, et al. Implantable powder-carrying microneedles for transdermal delivery of high-dose insulin with enhanced activity. *Biomaterials* **232**: 119733, 202.

2. N. EI-Sayed, L. Vaut, M. Schneider. Customized fast-separable microneedles prepared with the aid of 3D printing for nanoparticle delivery. *Eur. J. Pharma. Biopharm...*, **154**: 166-174 (2020).

吸水性と力学的強度を向上させる

ポリグリセロール融合型ゲルマイクロニードルの開発

宮崎 拓也

1. 緒言

インスリン注射による糖尿病の治療が進められている が、投与量の制御が困難である1。そこで、グルコースに 応答してインスリンを放出する酵素搭載型マイクロニー ドル (MN) の開発が進められているが、安定性や持続性 が課題である²。一方で、我々はフェニルボロン酸搭載型 MNの開発を行っており、皮膚への貼付後に生体内のグル コースと反応してニードル表面に形成されるスキン層を 用い、その層の水和状態が血糖値に応じて変化することを 利用し、ゲルからのインスリン放出を制御している 3。こ の MN により、週レベルでの安定性および持続性を確認し ているが⁴、MNの理想形に求められる吸水性と力学的強 度の両立が課題である。そこで、本研究では吸水性と力学 的強度を向上させる MN の開発を行った。具体的には、吸 水性の高いポリエーテル骨格およびジオール構造を有す るポリグリセロールを MN に添加し、ジオールとフェニル ボロン酸の架橋により力学的強度を高め、皮膚刺入後に迅 速に高血糖を感知できる MN の開発を行った(図1)。ま ず、ジオールの価数の異なるポリグリシジルジオール (PGDiol)およびポリグリシジルテトラオール(PGTetraol) を合成し、調製したポリグリセロール融合型 MN の吸水性

および力学的強度を評価した。さらに、異なるグルコース 濃度における MN からのインスリン放出量を測定し、グル コース応答能を評価した。



ポリグリセロール融合型ゲルマイクロニードルの概念図.

実験結果と考察

2. 1 ポリグリセロールの化学合成

N-テトラオクチルアンモニウムブロミドを開始剤とし、 tert-ブチルグリシジルエーテルをモノマーとするエポキシ 開環重合法およびグリシドールによる側鎖構造の改質反応により PGDiol(**図2**)および PGTetraol(**図3**)を合成した。¹H-NMR およびゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)法より、分子量 20,000 Da の分子量分布の狭い(*M_w/M_n* < 1.1) PGDiol(**表1**)と PGTetraol(**表2**)の形成を確認した。





表1. PGDiol の構造解析.

run	[iBu₃Al]/[NOct₄Br]	<i>Mn</i> th (kDa)	Yield (%)ª	<i>Mn</i> exp (kDa)ª	Mw/Mn ^b
1	1.5	25	80	20	1.05
2	2	25	80	20	1.08
3	5	25	80	20	1.35
4	1.5	90	78	70	1.04
5	1.5	110	82	90	1.04
6	1.5	160	81	130	1.09
7	1.5	300	50	150	1.30

図3. PGTetraolの合成スキーム.

^{a)1}H-NMR 法により決定,^{b)}GPC 法により決定.

表2. PGTetraol の構造解析.

run	[iBu₃Al]/[NOct₄Br]	<i>Mn</i> th (kDa)	Yield (%)ª	<i>Mn</i> exp (kDa)ª	Mw/Mn ^b
1	1.5	25	80	20	1.06
2	1.5	90	78	70	1.03
3	1.5	110	82	90	1.08
4	1.5	160	81	130	1.09
5	1.5	300	50	150	1.33

^{a)1}H-NMR 法により決定,^{b)}GPC 法により決定.

2. 2 ポリグリセロール融合型 MN の調製

既報⁵に従ってボロン酸モノマーを含むプリゲル溶液に 開始剤を加え、PGDiolまたはPGTetraolとの単純混合後に ポリジメチルシロキサン(PDMS)の鋳型に添加し、UV を照射することでポリグリセロール融合型 MN を調製し た(図4)。その後、調製した MN は PDMS 鋳型から取り 出し、室温で乾燥することで溶媒を除去した。得られた MN の形状を光学顕微鏡により確認したところ、ポリマー 添加後にも MN の形状が保たれており、ポリグリセロール 中のジオールとゲル中のボロン酸との架橋によりゲル構 造が強化されていることが示唆された(図5)。また、走 査型電子顕微鏡による観察でも同様に、ポリマー添加後の 良好なニードル形状の維持が確認された(図6)。





図6. 走査型電子顕微鏡による MN の形状観察.

3 ポリグリセロール融合型 MN の力学的特性の評価

MNの破壊靭性を、ボンドテスターを用いた応力-ひずみ曲線の取得および曲線の積分により算出することで力学的強度の指標とした。ポリマー添加前のMNに比べて PGDiol融合型MN(図7A)およびPGTetraol融合型MN (図7B)が高い破壊靭性を示したことから、ポリグリセロール中のジオールとMN中のフェニルボロン酸との架 橋構造の形成による力学的強度の向上が示唆された。



2. 4 ポリグリセロール融合型 MN の吸水性の評 価

吸水性の評価に関して、既報⁶に従って合成した蛍光標 識グルコースを 500 mg/dL の濃度でアガロースゲルに添 加し、MN 貼付後の蛍光標識グルコースの取り込み量を共 焦点顕微鏡法により定量した。ポリマー添加前の MN に比 べて、PGDiol 融合型 MN では PGDiol の添加率の増大によ り蛍光標識グルコースの取り込み速度が増大し(図8A)、 PGTetraol の添加により取り込み速度がさらに増加したこ とから(図8B)、親水性のポリエーテル骨格および側鎖 のジオール構造による MN の吸水性の向上が示唆された。



図8.(A) PGDiol 融合型および(B) PGTetraol 融合型 MNの 蛍光標識グルコースの取り込み速度.

3. 結言

本研究により、新規構造を有する PGDiol および PGTetra の精密合成に成功した。また、合成したポリマーを MN に 添加することで、吸水性および力学的強度を同時に増大さ せた。これまでの MN では吸水性を増大させた一方で、ニ ードルの形状や強度の維持が困難であったが、本研究によ り開発したポリグリセロール融合型 MN は二律背反とさ れている吸水性と力学的強度の両方を兼ね備えたスマー トな材料であると考えられる。今後は、開発した MN を基 盤として、インスリンやサイトカインなどの治療用タンパ ク質を内包し、貼るだけで難治性疾患の治療を可能とする 「貼るだけ体内病院」の構築に向けて疾患モデルマウスを 用いた評価を進める。

【参考文献】

1. O. Veiseh et. al., Nat. Rev. Drug Discov. 14 (2015) 45-57.

2. J. Wang et. al., ACS Nano 12 (2018) 2466-2473.

3. A. Matsumoto et. al., Angew. Chem. Int. Ed. 51 (2011) 2124-2128.

- 4. S. Chen et. al., Adv. Funct. Mater: 29 (2018) 1807369.
- 5. S. Chen et. al., ACS Appl. Polym. Mater. 2 (2020) 2781-2790.
- 6. K. Yoshioka et. al., Biochim. Biophys. Acta. 1289 (1996) 5-9.

業績

【原著論文】

- Akira Matsumoto, Shigehito Osawa, Takahiro Arai, Yukie Maejima, Hidenori Otsuka, Yuji Miyahara Potentiometric Determination of Circulating Glycoproteins by Boronic Acid End-Functionalized Poly(ethylene glycol)-Modified Electrode Bioconjugate Chem., **32**, 239-244 (2021).
- Takuya Miyazaki, Satoshi Uchida, Satoru Nagatoishi, Kyoko Koji, Taehun Hong, Shigeto Fukushima, Kouhei Tsumoto, Kazuhiko Ishihara, Kazunori Kataoka, Horacio Cabral

Polymeric Nanocarriers with Controlled Chain Flexibility Boost mRNA Delivery In Vivo through Enhanced Structural Fastening

Adv. Healthc. Mater., 9, 2000538 (2020)

 Takuya Miyazaki, Satoshi Uchida, Hiroaki Hatano, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto, Horacio Cabral Guanidine-Phosphate Interactions Stabilize Polyion Complex Micelles based on Flexible Catiomers to Improve mRNA Delivery Eur. Polym. J., 140, 110028 (2020)

Kuaka Kaji Naata Vashinaga Vuki

 Kyoko Koji, Naoto Yoshinaga, Yuki Mochida, Taehun Hong, Takuya Miyazaki, Kazunori Kataoka, Kensuke Osada, Horacio Cabral, Satoshi Uchida Bundling of mRNA Strands Inside Polyion Complexes Improves mRNA Delivery Efficiency In Vitro and In Vivo

Biomaterials, 261, 120332 (2020)

- Siyuan Chen, Takuya Miyazaki, Michiko Itoh, Hiroko Matsumoto, Yuki Moro-oka, Miyako Tanaka, Yuji Miyahara, Takayoshi Suganami, Matsumoto Akira Temperature-Stable Boronate Gel-Based Microneedle Technology for Self-Regulated Insulin Delivery ACS Appl. Polym. Mater., 2, 2781-2790 (2020)
- 6. Akira Matsumoto, Hirohito Kuwata, Shinichiro Kimura, Hiroko Matsumoto, Kozue Ochi, Yuki Moro-oka, Akiko Watanabe, Hironori Yamada, Hitoshi Ishii, Taiki Miyazawa, Siyuan Chen, Toshiaki Baba, Hiroshi Yoshida, Taichi Nakamura, Hiroshi Inoue, Yoshihiro Ogawa, Miyako Tanaka, Yuji Miyahara, Takayoshi Suganami Hollow Fiber-Combined Glucose-Responsive Gel Technology as an In Vivo Electronics-Free Insulin Delivery System

Commun. Biol., 3, 313 (2020)

 Thahomina Khan, Kazunori Igarashi, Ami Tanabe, Taiki Miyazawa, Shigeto Fukushima, Yutaka Miura, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba, Akira Matsumoto, Horacio Cabral, Kazunori Kataoka Structural Control of Boronic Acid Ligands Enhances Intratumoral Targeting of Sialic Acid to Eradicate Cancer Stem-Like Cells

ACS Appl. Bio Mater., 3, 5030-5039 (2020)

- Miyako Tanaka, Marie Saka-Tanaka, Kozue Ochi, Kumiko Fujieda, Yuki Sugiura, Tomofumi Miyamoto, Hiro Kohda, Ayako Ito, Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Seiichiro Aoe, Yoshihiro Miyamoto, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Makoto Suematsu, Sho Yamasaki, Yoshihiro Ogawa, Takayoshi Suganami C-Type Lectin Mincle Mediates Cell Death-Triggered Inflammation in Acute Kidney Injury J. Exp. Med., 217, e20192230 (2020)
- Shigehito Osawa, Akira Matsumoto, Yukie Maejima, Toshihiro Suzuki, Yuji Miyahara, Hidenori Otsuka Direct Observation of Cell Surface Sialylation by Atomic Force Microscopy Employing Boronic Acid-Sialic Acid Reversible Interaction Anal. Chem., 92, 11714-11720 (2020)
- Tomoaki Yoshida, Atsunori Tsuchiya, Masaru Kumagai, Suguru Takeuchi, Shunsuke Nojiri, Takayuki Watanabe, Masahiro Ogawa, Michiko Itoh, Masaaki Takamura, Takayoshi Suganami, Yoshihiro Ogawa, Shuji Terai Blocking Sphingosine 1-phosphate receptor 2 Accelerates Hepatocellular Carcinoma Progression in a Mouse Model of NASH

Biochem. Biophys. Res. Commun., 530, 665-672 (2020)

 Takayuki Watanabe, Atsunori Tsuchiya, Suguru Takeuchi, Shunsuke Nojiri, Tomoaki Yoshida, Masahiro Ogawa, Michiko Itoh, Masaaki Takamura, Takayoshi Suganami, Yoshihiro Ogawa, Shuji Terai Development of a non-alcoholic steatohepatitis model with rapid accumulation of fibrosis, and its treatment using mesenchymal stem cell and their small extracellular vesicles

Regen. Ther., 14, 252-261 (2020)

 Hiroko Oda, Takeshi Namagatsu, Danny J. Schust, Horacio Cabral, Takuya Miyazaki, Keiichi Kumasawa, Takayuki Iriyama, Kei Kawana, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii
 Basamkinant Thrombomodulin Attenuates Pressantia

Recombinant Thrombomodulin Attenuates Preecamptic Symptoms by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 Mice

Endocrinology, 162, bqaa248 (2021)

 Takuya Miyazaki, Thahomina Khan, Michiko Ito, Taiki Miyazawa, Takayoshi Suganami, Yuji Miyahara, Horacio Cabral, Akira Matsumoto Boronic Acid Ligands Can Target Multiple Subpopulations
of Pancreatic Cancer Stem Cells via pH-Dependent Glycan-Terminal Sialic Acid Recognition ACS Appl. Bio Mater., DOI: <u>10.1021/acsabm.1c00383</u>

【総説】

- Takuya Miyazaki, Satoshi Uchida, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto, Horacio Cabral Development of Flexible Polycation-Based mRNA Delivery Systems for In Vivo Applications Mater. Proc., 4, 5 (2021)
- John D. Martin, Takuya Miyazaki, Horacio Cabral Remodeling Tumor Micro-Environment with Nanomedicines Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol., Accepted
- S. Chen, A. Matsumoto A Boronategel-Based Synthetic Platform for Closed-Loop Insulin Delivery Systems Polym. J., Accepted

【書籍】

 Takuya Miyazaki, Yasuhiro Nakagawa, Horacio Cabral Chapter 24 – Strategies for Ligand-Installed Nanocarriers Handbook of Nanotechnology Applications, 635-655 (2021)

【口頭発表】

- 伊藤美智子、菅波孝祥 Role of cholesterol metabolism in macrophages in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis 第 98 回日本生理学会大会、2021 年 3 月、オンライン
- 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏 新規 NASH マウスモデルの開発と病態形成機構の解 明 第 41 回日本肥満学会学術集会、2021 年 3 月、オンラ イン
- 伊藤美智子、金井紗綾香、金森耀平、田中都、松元亮、 宮原裕二、小川佳宏、菅波孝祥
 NASH 発症過程における死細胞貪食障害の病態生理 的意義
 第41回日本肥満学会学術集会、2021年3月、オンラ イン
- 松元亮
 「貼るだけ人工膵臓」技術の社会実装を目指して
 先端ナノデバイス・材料テクノロジー第151 委員会/
 令和2年度 第4回研究会:「ナノバイオテクノロジー
 の社会実装、ベンチャー創出へ」、2021年3月、オン
 ライン
- 松元亮
 「貼るだけ人工膵臓」で世界の糖尿病患者に希望の光 を届けよう!

 RINK FESTIVAL 2021、2021 年 2 月、オンライン

- 松元亮 高分子ゲルを応用した完全合成型人工膵臓デバイスの開発 旭化成株式会社講演会、2021年1月、オンライン
- 7. 宮崎拓也、Chen Siyuan、伊藤美智子、松元亮、諏澤杏香、宮原裕二、松本裕子、金井紗耶香、菅波孝祥吸水性と力学的強度を向上させるポリグリセロール融合型ゲルマイクロニードルの設計と評価第32回高分子ゲル研究討論会、2021年1月、オンライン
- 立原義宏、中川泰宏、アンキタオ、ファンジョージ、 宮崎拓也、五十嵐一紀、クォーダーサビーナ、安楽泰 孝、片岡一則、カブラルオラシオ 難治性膵臓癌を標的としたホストゲスト相互作用を 介した環状中分子薬剤担持型 pH 応答性高分子ミセル の開発 日本バイオマテリアル学会 2020 年度関東ブロック発 表会、2021 年1月、オンライン
- 9. Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Ayano Mukaida, Yuji Miyahara

Simplest and label-free determination of intra- and extra-cellular vitamin C dynamics by HPLC-DAD 4th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2020, December, 2020, Online

- Akira Matsumoto, Chen Siyuan, Takuya Miyazaki, Michiko Ito, Hiroko Matsumoto Yuki Moro-oka, Miyako Tanaka, Takayoshi Suganami, Yuji Miyahara Polymer gel-based totally synthetic pancreas device The 30th Frontier Scientists Workshop, Recent Advances in Medical Polymers for Therapeutic Applications, November, 2020, Online
- 11. 松元亮
 <糖尿病>機械を使わず、安く、痛みのない治療を目 指して
 第7回 COINS シンポジウム~小さく寄り添い大きく
 守る、未来の医療はすぐそこに~、2020 年 12 月、オ ンライン
- Wenqian Yang, Takuya Miyazaki, Yasuhiro Nakagawa, Pengwen Chen, Taehun Hong, Horacio Cabral Effect of PEG-Polycation Chain Flexibility on siRNA loaded Polyion Complex Micelles Assembly 3rd G'Lowing Polymer Symposium in KANTO, November, 2020, Online
- 13. Yoshihiro Tachihara, Yasuhiro Nakagawa, Anqi Tao, George Huang, Takuya Miyazaki, Kazunori Iagarashi, Sabina Quader, Yasutaka Anraku, Kazunori Kataoka, Horacio Cabral
 Development of Macrocyclic Drug Loaded pH-sensitive Polymeric Micelles via Host Guest Chemistry
 3rd G'Lowing Polymer Symposium in KANTO, November, 2020, Online
- 14. Takuya Miyazaki

Development of flexible polycation-based mRNA delivery systems for *in vivo* applications

2nd International Online-Conference on Nanomaterials, November, 2020, Online

 松元亮 非機械型で完全合成型「貼るだけ人工膵臓」開発の最 前線

第58回人工臓器学会大会、特別企画「日本から発信 する人工臓器学」、2020年11月、高知

- 16. 伊藤美智子
 新規マウスモデルの確立による非アルコール性脂肪
 性肝炎の病態生理の解明第93回日本内分泌学会(第30回日本内分泌学会臨床内分泌代謝 Update 内にて発表)、2020年11月、オンライン
- Taehun Hong, Takuya Miyazaki, Kazunori Igarashi, Yasuhiro Nakagawa, Eger Rigte Boonstar, Koji Kyoko, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba, Horacio Cabral Development of phosphocoline-based ligands for in vivo mitochondria targeting

The 36th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System, November, 2020, Online

- 宮崎拓也
 妊娠期の化学療法に向けた高分子ミセル型ナノキャリアの構造最適化
- 第 28 回日本胎盤学会学術集会、2020 年 10 月、東京 19. 松元亮

合成分子のみで完結した「インスリンがやってくる」 技術

CSJ 化学フェスタ 2020、2020 年 10 月、オンライン
20. 伊藤美智子
マクロファージにおける脂質代謝障害に着目した

NASH 発症機構の解明 第1回 NAFLD/NASH と糖脂質代謝シンポジウム、 2020 年 10 月

 Wenqian Yang, Takuya Miyazaki, Yasuhiro Nakagawa, Pengwen Chen, Taehun Hong, Horacio Cabral Effect of PEG-Polycation Chain Flexibility on siRNA loaded Polyion Complex Micelles Assembly
 2nd International online conference on nanomedicine, October, 2020, Online

 22. 松元亮 拡散制御性におけるゲルのやわらか機能デザインを 通じた「人工膵臓」の開発 第 69 回高分子討論会、2020 年 9 月、オンライン

- 23. 松元亮
 高分子ゲルを応用した完全合成型人工膵臓デバイスの開発
 第 69 回高分子討論会、2020 年 9 月、オンライン
- 24. 金森耀平、田中都、伊藤美智子、越智梢、渡辺亜希子、 菅波孝祥 鉄負荷による肝マクロファージの機能変容の機序解 明:NASHの新たな病態メカニズム解明に向けて

第93回日本生化学会大会、2020年9月、オンライン

- 25. 吉岡直輝、田中都、越智梢、渡辺亜希子、辰川弥生、 伊藤美智子、石上雅敏、藤城光弘、菅波孝祥 新しい肥満関連肝がんモデルの確立 第93回日本生化学会大会、2020年9月、オンライン
- 26. Taehun Hong, Takuya Miyazaki, Kazunori Igarashi, Yasuhiro Nakagawa, Eger Rigte Boonstar, Koji Kyoko, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba, Horacio Cabral Phosphocoline ligands target tumor cell mitochondria in vivo

33rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, August, 2020, Online

- 27. 金森耀平、田中都、伊藤美智子、越智梢、渡辺亜希子、 菅波孝祥
 NASHにおけるクッパー細胞鉄代謝と機能変容の関係
 第93回日本内分泌学会学術総会、2020年7月、オン ライン
- 28. 宮崎拓也、内田智士、片岡一則、カブラルオラシオ
 柔軟なポリエーテル骨格ポリカチオンによる mRNA 内包
 高分子ミセルの安定化
 第66回高分子研究発表会、2020年7月10日、オンライン
- 29. 松元亮 革新的な高尿病治療を実現する「貼るだけ人工膵臓」 の開発 有機機能材料のリソグラフィ加工コンソーシアム・第 36回定例会、2020年6月、オンライン
- Wenqian Yang, Takuya Miyazaki, Yasuhiro Nakagawa, Satoshi Uchida, Kazunori Kataoka, Horacio Cabral Bioinspired design of stable siRNA-loaded polyion complex micelles from strong Tryptophan/Tyrosine-RNA interactions for siRNA delivery 69th Society of Polymer Science (SPSJ) Annual Meeting, May, 2020, Online
- 31. 松元亮

 「"貼るだけ"人工膵臓」開発の最前線
 第74回日本栄養・食糧学会大会、2020年5月、宮城

【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 2件

「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト

プロジェクトリーダー 福田 淳二

【基本構想】

毛髪を生み出す毛包組織は、胎児期において、上皮系と間葉系の2種類の幹細胞からなる原基を形成し、 これらの細胞の相互作用がトリガーとなり生み出される。他の臓器では、この胎児期にしか原基が作られ ないが、毛包組織は唯一、誕生後も一定間隔(毛周期)で一生涯再生を繰り返すという特徴がある。した がって、毛包組織は臓器発生プロセスを理解するための有用な実験系となる可能性がある。一方、毛包原 基から始まる毛包組織形成プロセスを人為的に再現することで、脱毛症の治療を行う毛髪再生医療に期待 が集まっている。我々が考えている毛髪再生医療の手順を図1に示す。ここでは、患者本人の毛髪を毛包 組織ごと数本を取り出し、そこから上皮系と間葉系の2種類の幹細胞を単離する。そしてこれらの細胞を、 例えば 100 本分に増殖させた上で、毛包原基様の移植体を生体外で作製し、これを脱毛部に移植する。 我々の研究プロジェクトの出発点は、毛包原基様の移植体が細胞の自己組織化により形成されることを発 見したことに始まる。すなわち、上皮系と間葉系の細胞を混ぜて 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 が凝集体内で自発的に分離し毛包原基様の構造が形成されることを発見した。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立した。毛髪再生医療では、患者1名に数千個 の移植体が必要であり、細胞の自己組織化を利用する本手法は、毛包原基の大量調製へとスケールアップ 可能である点が技術的な有意性である。本研究プロジェクトでは、この技術をもとに毛包原基の作製以外 の手順も含めて技術開発に取り組む。そして、連携企業や医療機関などと協力し、脱毛症患者の毛包由来 細胞へと当該技術を適用することで、毛髪再生医療の実用化を目指す。



図1 毛包原基の大量調製法を用いた毛髪再生医療

1. 2020 年度の研究目的

プロジェクト1年目となる2020年度は、以下の各項目 を重点項目として研究を進めた。ただし、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) ヒト毛包上皮幹細胞の増殖培養
- (2) ヒト毛乳頭細胞の増殖培養
- (3) ヒト毛包原基の形成とマウス移植実験
- (4) ヒト毛母細胞の分離と発毛活性の評価

これまでにシーズ育成事業では、主にマウスの細胞を用 いて毛髪再生医療の手順を確認してきた。本研究プロジェ クトではこれをヒト細胞を用いて実現する。(1)では、ヒト 毛包上皮幹細胞に適した培養条件の最適化により,毛包幹 細胞マーカー(CD200等)陽性細胞を複数回の継代で約 1000万個程度まで増殖させることを目標とする。(2)では、 毛髪再生医療に必要な大量(約1000万個)の毛乳頭細胞 を増殖させる培養技術を開発する。そして、(3)では、これ ら毛包上皮幹細胞と毛乳頭細胞を用いて,毛包原基を作製 し発毛を評価する。また、再生した毛髪がヒト由来のもの か否を明らかにする。この(1)から(3)のプロセスを繰り返 すことによって、高い発毛効率の得られる各ステップの条 件を見出す。(4)については、当初の研究計画からの変更点 であるが、上皮系細胞の細胞源として、毛包上皮幹細胞に 限定していたが、毛母細胞についても検討を加えることと した。これは、他者の文献や特許より得られた情報により 可能性が浮上したためである。

本報告書では、(1), (2)については、それぞれ景山研究員、 Zhang 研究員が報告することから、ここでは主に(3), (4)に ついて報告する。

2. 2020 年度の研究成果

(1) ヒト毛包原基の形成とマウス移植実験

シーズ育成事業では、ヒト毛包原基を免疫不全マウスに 移植すると発毛が見られる場合があるものの、その頻度は 非常に低いことが分かった。その原因として、1) ヒト毛 包由来細胞が培養系において毛髪再生能を失ってしまっ たこと、2) マウス皮膚では毛髪再生に必要な因子が供給 されないこと、が考えられた。1)については、発毛関連遺 伝子を指標として継続的に培養技術の向上を図っている が、2)については種差に関連することである。実際、ヒト とマウスでは、毛周期の長さそのものや毛周期に関連する メカニズムに違いがあることが分かっている。そこで、移 植後もいくつかの因子が供給されることを期待して、毛包 上皮幹細胞と毛乳頭細胞に加えて、第3の細胞を加えるな どの工夫を行った。第3の細胞としては、ヒト脂肪由来幹 細胞、ヒト血管内皮細胞、多血小板血漿などである。特に、 ヒト脂肪由来幹細胞は、高い発毛活性の向上を誘導した(R. Nakajima, et al., J. Biosci. Bioeng., in press, 2021)。この実験 では、毛乳頭細胞と脂肪由来幹細胞はヒト由来であるが、 実験上の都合で上皮系細胞はマウス由来のものを使用し た。これは、上皮細胞がヒト由来の場合には発毛試験に数

カ月を要するのに対して、マウス由来では2週間程度で結 果が得られるためである。ただし、上述した通り、すべて ヒト由来細胞を使用した毛包原基に対して発毛効率の向 上を評価する必要があり、これは次の実験である。

(2) 伸長した毛幹におけるヒト由来ミトコンドリアの検出

前年度までに、脱毛症患者由来の細胞を用いて毛包原基 を作製し、これを免疫不全マウスに移植することで毛髪が 再生することを示してきた。しかし、マウスに移植したヒ トの毛包原基が、"ヒトの毛髪を形成しているのか"、それ とも"ホスト (マウス)の毛包の活性化を促しているのみ なのか"は明らかになっていなかった。そこで、再生毛髪 のミトコンドリア DNA を解析することで再生毛髪の由来 (マウスかヒトか)を解析した。そもそも毛幹は毛母細胞 が角化してできる組織であり、生きた細胞は存在しない。 そのため、他の組織で解析されるような RNA や DNA か ら由来を同定することが難しい。そこで、我々は毛幹に保 存されているミトコンドリア DNA から由来を判定する手 法を選択した。予備検討として、ヒトとマウスの毛髪から ミトコンドリア DNA を回収し、RT-PCR によるミトコン ドリア DNA の解析を行った結果、マウスおよびヒト特異 的な配列で由来を同定できることが確認された(図2)。 実際にこの系で再生毛髪を評価してみると、ヒト特異的な ミトコンドリア DNA 配列とマウス特異的なミトコンドリ ア DNA 配列がともに同定され、ヒトとマウスの両方の細 胞を含む毛髪が形成されていることが確認された(図2)。 これまでに、脱毛症患者由来の細胞を用いて毛髪再生に成 功した例はなく、再生毛髪にヒト細胞が含まれていたこと は評価に値するが、マウス細胞も含まれていることから、 今後さらなる最適化を行う必要性があることが明らかに なった。

マウス毛髪のmDNA発現



再生毛髪のmDNA発現

Gene

(human mtDNA)

(human mtDNA)

D-loop non

code gene

(mouse mtDNA)

HV1b

ND5

ヒト毛髪のmDNA発現

Expression Expression Gene Gene Expression HV1b HV1b Undetermined Determined Determined (human mtDNA) (human mtDNA) ND5 ND5 Undetermined Determined Determined (human mtDNA) (human mtDNA) D-loop non D-loop non Determined Undetermined Determined code gene code gene (mouse mtDNA) (mouse mtDNA)

図2 伸長した毛幹におけるヒト由来ミトコンドリアの検出

(3) 遠心式の毛包原基形成法

上述したように、我々は上皮系と間葉系細胞の自己組織 化による毛包原基の形成を利用した手法を用いてきた。今 後もこの手法を中心にプロジェクトを推進するが、次世代 型のより良い方法の開発は継続している。特にヒト細胞で は発毛効率の低下という課題があることから、自己組織化 を利用した毛包原基作製にのみ依存することなく、いくつ かの作製手法を検討してきた。自己組織化を利用する方法 では2種類の細胞を同時に培養するための培養液の最適 化が必要となる。一般に2種類の細胞のいずれにも適した 培養液の開発は難しく、時間を要する。そこで、この培養 プロセスそのものを省略できる方法として遠心力を利用 した毛包原基作製法を検討した。また、毛髪再生医療では、 一人の患者に、数百 µm サイズの毛包原基を数百から数千 個移植するが、これにも熟練者が必要で手間とコストを伴 う。つまり、より簡便な操作で毛包原基を移植する技術も 毛髪再生医療を実現する上で重要である。これらを踏まえ、 遠心充填により移植針内に毛包原基を形成させる手法を 確立し、医療現場ではこれを皮膚に打ち込むのみで毛髪を 再生可能となる技術の開発を目指した。

具体的には、図3に示すようにシリンジの先端に遠心充 填部(直径300 µm、高さ1 mm)を備えたデバイスを作製 した。遠心充填部の周囲は、犠牲層となる20 wt%ゼラチ ン層が形成されている。このデバイスにマウス胎児皮膚由



図3 遠心充填デバイス (a) 遠心充填後に形成した毛包原基 構造、(b) ゼラチンを溶解しシリンジを押し込むことで組織回 収



図4 毛包原基の移植により再生した毛髪とキューティクル 構造

来の間葉系細胞、上皮系細胞を順に導入して、それぞれ3 分間遠心充填した。そして、37℃に加温してゼラチンを溶 解し、ヌードマウスの背部に形成した移植穴にデバイスの 先端を挿入し、毛包原基を移植した(図4)。この一連の 組織作製プロセスは準備等を含めても、30分以内に完了 することから、非常に素早い毛包原基構築法といえる。そ して、この組織体をヌードマウスの皮下に移植したところ、 移植後3週間後に毛髪伸長が観察された。今後、本手法を マルチニードルへと応用し、大量の毛包原基を一括作製す る技術を確立する。また、さらに実際の臨床現場を想定す ると、このニードルが凍結保存できれば、クリニックに輸 送したあと、必要な本数を解凍して移植するという方法が 可能となる。これは、操作性やコストの面からも有用であ ると考えられることから、引き続き検討する予定である。

毛包上皮幹細胞の増殖培養技術の開発

景山 達斗

1. はじめに

毛髪再生医療は、植毛や薬剤治療にかわる脱毛症の新た な治療法として期待されている。この治療法は、数本の毛 髪から、毛包上皮幹細胞と毛乳頭細胞という2種類の細胞 を分離・増殖させ、大量の毛包原基を調製した後、これを 頭皮に移植することで毛髪を再生する方法であり、毛髪の 本数を増やせることが最大の利点である。この分野の研究 開発は急速に加速しているものの、毛髪再生医療を臨床応 用まで持っていくには未だ大きな課題が残されている。特 に、ヒト毛包上皮幹細胞は、培養基板上で増殖培養中に発 毛能力を急激に失ってしまうため、世界的に見ても増殖培 養に成功した例はほとんど報告されていない。近年、マウ スの毛包上皮幹細胞をマトリゲルに包埋して三次元培養 することで、機能維持培養する方法が提案された1)。この 方法で増殖した細胞を免疫不全マウスに移植すると、発毛 することも確認されている。本研究では、この三次元培養 技術を改良し、独自のスフェロイドアレイ培養器を使用し た新たな増殖培養技術を提案する。さらに、この培養法が 脱毛症患者から採取した毛包上皮幹細胞においても有効 かについても検討を行った。

2. 実験と結果

2.1 毛包上皮幹細胞の三次元培養

C.A. Chacon-Martinez らは、毛包上皮幹細胞をマトリゲ ル内で三次元培養することで機能を維持したまま培養す る方法を提案した¹⁾(図1)。この方法では、マトリゲル に包埋した毛包上皮幹細胞が、培養中に近接する細胞と凝 集体を形成しながら増殖する。しかし、この凝集体のサイ ズや配置、組織形成に要する時間には、ばらつきがみられ



図 1. 先行研究と本研究の 3 次元培養法

た。我々は、この凝集体形成プロセスを制御することが毛 包上皮幹細胞の機能維持培養の鍵となると仮説を立て、研 究室でこれまでに開発を進めてきた微小ウェルアレイチ ップ²⁻⁴⁾を毛包上皮幹細胞の増殖に利用しようと考えた (図 1)。なぜなら、チップのウェル直径やピッチ、ウェ ルの曲率を調整することで、凝集体のサイズ、配置、組織 形成に要する時間などを容易に制御できるためである。

毛包上皮幹細胞の培養のために最適化したチップでは、 直径1mm、深さ1mmの丸底微小ウェルを培養器底面に 複数個配置した。このチップに細胞懸濁液を注ぐと細胞は それぞれのウェル内で均一な粒径をもつ細胞凝集体を数 時間で形成することができる。チップの材質には、酸素透 過性に優れたポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いて おり、PDMS 膜を介した底面からの酸素供給が可能である (図 2A)。そのため、培養液中の酸素濃度勾配の変化が最 小限に抑えられ、三次元培養の最大の課題である細胞の低 酸素障害も抑制することが可能となる。

実際にチップの表面に細胞非接着処理を施した上で、マ ウスの毛包上皮幹細胞を懸濁した培養液を注ぐと、各ウェ ル内で直径 100 µm の粒径をもつ均一な細胞凝集体が形成 した。培養液をマトリゲルに置換して培養を続けると、凝 集体の直径は 14 日間で約 350 µm まで増大し(図 2B)、細 胞数は播種前の約 15 倍まで増加した。免疫染色より、凝 集体を構成するほとんどの細胞が CD34 (マウス毛包上皮



図 2. 微小ウェルアレイチップを用いた増殖培養

(A) 微小ウェルアレイチップと酸素供給、(B) 培養 14 日後の毛
 包上皮幹細胞スフェロイド、(C) 培養 14 日後の CD34 陽性細胞

幹細胞マーカー)陽性であることも確認している(図2C)。 興味深いことに、我々の培養法と C.A. Chacon-Martinez らの手法を比較すると、培養 14 日目の毛包上皮幹細胞の 細胞数は、我々の培養法で2倍増加しており、幹細胞マー カーである CD34、Tcf3、 Nfatcl の遺伝子発現においても 我々の培養法で有意に向上していた。さらに、増殖した毛 包上皮幹細胞の毛髪再生能を評価するため、マウス胎児の 間葉系細胞と共にヌードマウス皮下へ移植を行ったとこ ろ、我々の培養法で増殖した毛包上皮幹細胞を移植した皮 膚からは C.A. Chacon-Martinez らの方法よりも毛髪が3倍 も多く再生した(図3)。以上より、微小ウェルアレイチ ップを用いて凝集体形成を制御することで、毛包上皮幹細 胞の増殖培養の効率を向上できることが示された。



図 3. 本手法で培養した毛包上皮幹細胞の毛髪再生能

(A) チャンバー法により再生した毛髪(B) 再生毛髪本数

2.2 ヒト毛包上皮幹細胞の増殖培養

毛髪再生医療の細胞源には、脱毛症患者本人の毛包から 毛包上皮幹細胞を分離して用いることが想定される。本手 法が毛髪再生医療のための細胞増殖法として適用できる か検証するため、倫理委員会の承認の下で脱毛症患者から 毛包上皮幹細胞を採取し、増殖培養を行った。

まずクリニックより提供された毛包組織から毛包上皮 幹細胞を高い生存率で回収する方法について検討したと



図 4. ヒト毛包上皮幹細胞の培養

(A) 培養ディッシュに接着した毛包上皮幹細胞、(B) 毛包上皮
 幹細胞の CD200 染色(緑: CD200, 青: 細胞核)

ころ、酵素の種類および処理時間の最適化により、80%以

上の生存率で毛包上皮幹細胞が回収でき、CD200(毛包上 皮幹細胞マーカー)陽性の毛包上皮幹細胞が初代培養でき ることが確認された(図4)。

このように回収した毛包上皮幹細胞を微小ウェルアレ イチップに播種し、マトリゲル内で増殖培養を行った。そ の結果、凝集体の直径は培養時間経過とともに増加し、 CD200(ヒト毛包上皮幹細胞マーカー)の発現が平面培養 やC.A. Chacon-Martinezらの手法と比較して2倍以上増加 した。以上の結果より、本手法がヒトの毛包上皮幹細胞の 増殖培養においても、有用であることが示された。

3. 今後の展望

本研究では、脱毛症患者の毛包上皮幹細胞の機能を維持 しながら増殖培養が可能な三次元培養技術を開発した。今 後、この技術を実用化につなげるためには、マトリゲルを 生物由来原料基準を満たした材料に置換する必要がある。 ごく最近の研究では、マトリゲルをアテロコラーゲンに置 換して、三次元培養を行う方法も開発されている⁵⁰。本手 法においても、アテロコラーゲンへの代替が可能かどうか 検討していきたい。他にも、継代数による増殖効率はどの ように変化するか、増殖した細胞を用いて毛包原基の構築 が可能かなど、今後検証すべき内容は山積みである。これ らを1つずつ検証し、実用化レベルの増殖技術に仕上げて いきたいと考えている。毛髪再生医療が脱毛症の効果的な 治療法として選ばれるようになる日を少しでも早く実現 できるように引き続き努力していきたい。

【参考文献】

1. C.A. Chacon-Martinez et al., Hair follicle stem cell cultures reveal self-organizing plasticity of stem cells and their progeny, The *EMBO Journal*, **36**, 151-164 (2017).

2. T. Kageyama et al., Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation in vitro, enabling the large-scale production of HFGs for regenerative medicine, *Biomaterials*, **154**, 291-300 (2018)

3. T. Kageyama et al., Effects of platelet-rich plasma on in vitro hair follicle germ preparation for hair regenerative medicine, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **130**, 6, 666-671 (2020)

4. T. Kageyama et al., Hair follicle germs containing vascular endothelial cells for hair regenerative medicine, *Scientific reports*, **11**, 624 (2021)

5. M. Takeo et al., Expansion and characterization of epithelial stem cells with potential for cyclical hair regeneration, *Scientific reports*, **11**, 1173 (2021)

Electrical stimulation of human follicle dermal papilla cells to promote hair regeneration

ZHANG Binbin

1. Introduction

Hair loss is a prevailing and distressing problem for both men and women around the world. Hair follicles (HFs) are complex mini-organs that form during embryonic skin development stages, and cannot regenerate on their own after damages caused by diseases, chemotherapy or severe burn injuries¹. Current clinical treatments for hair loss are limited to pharmaceutical drugs and autologous transplantation. However, both approaches have their limitations, such as low effectiveness, side effects or the inability to increase the total hair numbers. In recent years, approaches through tissue engineering and regenerative medicine have attracted growing interest in the research field for hair regeneration.

Hair developments and hair growth cycle requires epithelial-mesenchymal cell interactions. Among the mesenchymal cells, dermal papilla cells (DPC) have been proved to be crucial for this process. DPC functions are critical to excrete molecular signaling to surrounding matrix and bulge area. In order to manufacture adequate amount of hair follicles by few dermal papillae extracted from the patients, cell expansion techniques are desired². However, the problem of drastic loss of DPCs' hair induction ability along cell expansion process remains as the biggest challenge. Efforts have been made to maintain the intrinsic properties of the DPCs during its expansion, including mimicking in vivo environment for DPCs such as 3D culture and/or spheroid culture approaches³ or providing extracellular matrix materials such as collagen⁴.

Electrical stimulation treatment has been applied to male patients' scalp, demonstrating increased hair number compared to placebo groups in clinical trials⁵. However, the application of electrical stimulation *in vitro* for the purpose of maintaining and promoting DPC functionalities has not been well studied. On the other hand, the application of electrical stimulation for the culture of neural and muscular cells have been developed, as they are seen to be prone to electrical signals. Among such studies, conductive polymers such as polypyrrole (PPy) have attracted increasing interest to be used as culturing surface due to its inherent biocompatibility compared to the traditional conductors such as gold and platinum⁶.

In this experiment, we fabricated the electrical stimulation

culture device using PPy and optimized the conditions of electrical stimulation to achieve the optimal human DPC (hDPC) functionality. The stimulated hDPCs were then formed the hair follicle germs through the method developed in Fukuda Lab and transplanted into the back of the nude mouse to analysis the *in vivo* hair generating ability.

2. Results and Discussion

2.1 Fabrication of the electrical stimulation device and study of the experiment conditions

We have fabricated the electrical stimulation devices as shown in Figure 1A&B. The electrical stimulation devices consist of two major parts, a cell culture chamber fixed onto the



Figure 1 (A)Schematic of the device set-up for electrical stimulation. (B) Illustration (left) and photo (right) of the cell culture chamber assembly for the electrical stimulation device. (C) Design of the electrical stimulation protocols (i) and the potential response from different stimulation currents (ii).

working electrode, and the counter electrode, which is attached to the lid of the culture chamber. The culture chamber has a dimension of 10mm x 20mm. The working electrode was fabricated by first sputter coating a gold layer on to a glass slide (using chromium as adhesive layer), followed by electrical polymerizing polypyrrole (PPy) on the gold layer. The culture chamber was then glued directly onto the PPy surface. The counter electrode was made of platinum mesh.

Electrical stimulation was performed by applying a biphasic waveform of 100ms pulse (50ms x 2) with 100ms interphase open circuit potential (5Hz) using an Autolab Potentiostat (Figure 1C-i). The voltage waveform in response to the stimulation current was also recorded, and it showed that with the highest current (1.0mA/cm²) set-up in this experiment, the voltage was under 1V, which is unharmful to the cells (Figure 1C-ii).

2.2 Investigation and optimization of the electrical stimulation conditions

We have cultured the hDPC on the PPy surface compared to gold and tissue culture plate (TCP). After 6h, cells attached to all the surfaces, and showed no obvious difference in the morphology. During a 3-day culture, the cell proliferation was significantly slower on the PPy surface. However, the gene expression of ALP showed significant increase for the cells



Figure 2 (A)Cell morphology after culturing 6h on TCP, gold, and PPy surfaces. (B) Cell proliferation on TCP, gold and PPy surfaces. (C) ALP gene expression of cells culture on TCP (no electrical stimulation), and on gold and PPy surface after electrical stimulation. P<0.001

being electrically stimulated on the PPy surface, compared to those stimulated on gold surface and un-stimulated cells culture on TCP.

We further studied hDPC electrically stimulated on PPy under different stimulation conditions and characterized the results using ALP gene expression (Figure 3). We have stimulated the cells on D0 (6h after cell attachment), D1, D2 and D3, and it showed that the electrical stimulation was most effective on D1 and D2 after cell seeding. Thereafter, we have performed electrical stimulation on D1 with a series of different stimulation currents, periods and frequency applied to the hDPC. Although the difference between different stimulation currents was not significant, they have all demonstrated higher gene expression than the un-stimulated cells. Furthermore, it was shown the optimal electrical conditions were achieved with 5000 cycles (16min) and at a frequency of 5Hz (Figure 3C&D).



Figure 3 ALP gene expression of hDPC after electrical stimulation at different timing (A), and with different current (B), overall period (C) and frequency (D). P<0.001

2.3 Co-culture hDPC with embryonic mice epithelial cells to form hair follicle germs

To demonstrate the effect of electrical stimulation on hDPCs in terms of trichogenic ability *in vivo*, we co-cultured hDPCs stimulated at the optimal condition with embryonic mouse epithelial cells (mEC) in the U-bottom 96 well plates to form hair follicle germs (Figure 4). At the seeding density of 1×10^4 of hDPCs and 1×10^4 mECs per well, uniform spheroid structures were formed, with the mECs in the out layer surrounding the hDPC and no obvious difference was observed between the hair follicle germs formed with stimulated (ES(+)) and un-stimulated (ES(-)) hDPCs (Figure 4A right). After transplantation, both hair follicle germs formed with stimulated and un-stimulated hDPCs showed hair regeneration, compared to no hair regenerated from transplanting mECs alone. However, the hair follicle germs with stimulated hDPCs generated twice amount of hairs than the un-stimulated ones, 40 hairs (ES(+)) on average vs 19 hairs (ES(-)) per 10 hair follicle germs transplanted.



Figure 4 (A) Co-culture of hDPC with mEC to form hair follicle germs. (B) Photos of the transplantation side from the back of the nude mouse, and the number of hairs generated from every 10 hair follicle germs formed with un-stimulated ES(-) and stimulated ES(+) hDPCs. P<0.001

3. Conclusion and Future Plan

In this study, we demonstrated the capability of culturing and electrically stimulating hDPCs on the surface of conductive polymer polypyrrole. The electrical stimulation conditions were optimized, and hDPCs showed improved functionality with the optimal stimulation condition. Furthermore, we produced hair follicle germs using hDPCs and mECs, and transplanted onto the back of nude mice. Hair follicle germs with stimulated hDPCs demonstrated enhanced trichogenic ability after transplantation.

In the future, we will continue this work to investigate the mechanism as how the electrical stimulation affects and promotes the hDPC functions. Approaches such as addition of ion channel inhibitors and transcriptome analysis will be explored to achieve this goal.

[References]

A. Castro, et al, *Stem Cells Transl. Med.*, 9, 342-350 (2020).
 C.A. Higgins, et al, *Experimental Dermatology*, 19, 546-548 (2010).

- 3. T. Kageyama, et al, Biomaterials, 154, 291-300 (2018)
- 4. T. Kageyama, et al, Biomaterials, 212, 55-63 (2019).
- 5. W.S. Maddin, et al, Int. J. Dermatol., 31, 878-880 (1992)
- 6. B. Zhang, et al, Front. Med. Technol., 3, 20 (2021)

業績

【原著論文】

- Tatsuto Kageyama, Aayaka Nanmo, Lei Yan, Tadashi Nittamiand Junji Fukuda. Effects of platelet rich plasma on in vitro hair follicle germ preparation for hair regenerative medicine. Journal of Bioscience and Bioengineering, 130, 6, 2020. (IF:2.366)
- Tatsuto Kageyama, Yang Sook Chun and Junji Fukuda. Hair follicle germs containing vascular endothelial cells for hair regenerative medicine. Scientific reports,11, 624, 2021. (IF: 3.998)
- Rikuma Nakajima, Yoshiki Tate, Lei Yan, Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda. Impact of adipose-derived stem cells on engineering hair follicle germ-like tissue grafts for hair regenerative medicine. Journal of Bioscience and Bioengineering, in press, 2021, https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.02.001. (IF:2.366)

【書籍】

 南茂彩華,景山達斗,福田淳二,バイオプリンターを 用いた毛包原基の調製と毛髪再生医療への応用 日 本人工臓器学会誌,2021,in press

【口頭発表】

- 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 2020/5/18-5/29※オンライン開催
- 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、2020/5/18-5/29 ※オンライン開催
- Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda, Generation of a pigmented hair organoid model for drug screening. 第24 回国際色素細胞学会 2020/6/8 (オンライン開催 要旨 公開)
- 穴竃理樹、景山達斗、福田淳二、ヒト iPS 細胞由来
 毛包上皮細胞を用いた毛髪モデルの構築、化学工学
 会第 51 回秋季大会 2020/9/24-26 (オンライン開催)
- 5. Zhang Binbin、Wu Yumeng、景山達斗、福田淳二、Gelatin acrylamide as novel material for 3D biofabrication、化学 工学会第 51 回秋季大会 2020/9/24-26 (オンライン開 催)

- 6. 中嶋陸満、清水亮啓、景山達斗、福田淳二、毛包オル ガノイドを用いた薬剤試験モデルの開発、第 33 回大 会動物実験代替法学会 2020/11/12-13 (オンライン開 催)
- 南茂彩華、景山達斗、福田淳二 バイオプリンターを用いた毛包原基の調製と毛髪再 生医療への応用 第 58 回日本人工臓器学大会 2020/11/12-14 (ポスター)
- Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Large-scale preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine. 11th World Biomaterials Congress, 2020/12/11-15 (オンライン)
- 9. Ayaka Nanmo, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Large-scale preparation of hair follicle germs using spontaneous shrinkage of cell-embedded hydrogels, 11th World Biomaterials Congress, 2020/12/11-15 (オンライ ン)
- 10. Riki Anakama, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Organoid culture for in vitro hair follicle model, 11th World Biomaterials Congress, 2020/12/11-15 (オンライン)
- 福田淳二,培養基板の加工と毛髪の再生医療,モノづくり企業のための細胞培養研修,2020/12/11 (オンライン開催)
- 福田淳二,細胞培養マイクロデバイスと毛髪再生医療,進化を遂げる μ-TAS, 2020/12/18 (オンライン開催)
- 穴竃理樹、景山達斗、福田淳二、ヒト iPS 細胞由来
 毛包上皮細胞を用いた毛髪オルガノイドの構築、第
 20 回日本再生医療学会 2020/3/11-13 (オンライン開催)
- 14. 山根 萌奈実、景山達斗、福田淳二、コラーゲンゲル ビーズを用いたヒト毛乳頭細胞の機能回復のための 培養法の開発、第20回日本再生医療学会 2020/3/11-13 (オンライン開催)
- 伊藤 直哉、景山達斗、福田淳二、遠心充填による毛 包原基の作製方法の開発、化学工学会 86 年会 2021/03/20-22
- 16. 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 3D バイオプリンティング、化学工学会 86 年会 2021/03/20-22

【特許】

(1) 国内特許出願 4件

【受賞】

- 化学とマイクロナノシステム学会奨励賞、微細加工 と表面修飾を用いた細胞培養チップデバイスの開発、 福田淳二、2020年05月26日
- バイオインダストリー協会奨励賞、毛包幹細胞の自 己組織化培養法と毛髪再生医療への応用、福田淳二、 2020年10月14日
- 第51回化学工学会秋季大会、バイオ部会優秀ポスタ 一賞、ヒト iPS 細胞由来上皮系を用いた毛髪モデル の構築、穴竃理樹、2020年9月26日
- 日本動物実験代替法学会第33回、板垣宏学生奨励賞、
 毛包オルガノイドを用いた薬剤試験モデルの開発、
 中嶋陸満、清水亮啓、景山達斗、福田淳二、2020年
 11月12日
- 5. 第58回日本人工臓器学会大会、最優秀賞、バイオプ リンターを用いた毛包原基の調製と毛髪再生医療への応用、南茂彩華、景山達斗、福田淳二、2020年11 月13日
- 6. 化学工学会第86年会、学生奨励賞、毛髪再生医療のための毛包原基の3Dバイオプリンティング、南茂彩華、景山達斗、福田淳二、2021年3月21日

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)電気的 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年度に実用化実証事業に移行後は、地域イノベーション戦略支援プログラムの支援も受けながら、 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きた。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・研究機関などで 使用できるシステムや製薬企業から薬剤候補化合物の評価を受託できる評価法の開発を目標としている。 ー方で、NEDO事業(2015-2019年度)および地域イノベーション・エコシステム形成プログラム(2018年度開 始)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。2020年度には、JSTのCREST 事業において、細胞をセンサ素子として用いる研究開発も開始した。周辺技術も含め、小型・高性能な次 世代センサの実用化技術の開発を目標としている。

1. 2020 年度の研究目的

実用化実証事業8年目となる2020年度は、イオンチャ ネル機能評価システムの開発については引き続き事業化 に向けた研究開発を推進することを目的とした。一方で、 人工細胞膜を利用したセンサ開発に関しては、昨年度まで に開発した匂いセンサプラットフォーム基盤技術を利用 して、実用化にむけた研究開発を開始することを目標とし 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となる技術の開発を目標と して研究開発を行っている。

2020 年度は、前年度に試作を行ったイオンチャネル計 測チップおよび計測システムについて、その性能評価の結 果にもとづいて、事業化のための改良および高機能化を行 うことを目標とした。また、イオンチャネルに対する化合 物の活性評価を確認する実証試験を引き続き行い、開発シ ステムの実用性評価を行うことも目標とした。

(2) 人工細胞膜センサの開発

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 利用する研究ができるようになった。「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」の開発を目 標に取り組んだ NEDO事業(2015-2019年度)では、膜タ ンパク質機能を脂質二重膜に組み込んだ人工細胞膜セン サの基盤となる技術について研究開発を進めることがで きた。地域イノベーション・エコシステム形成プログラム でも、この人工細胞膜センサの要素技術の研究を行ってい る。2020年度は、低濃度の標的物質を迅速に検出するた めのデバイス研究を行うとともに、採択を受けたJST事業 において細胞センサの計測システムの基礎実験を行うこ とを目標とした。

2. 2020 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

JST 大学発新産業創出プログラム (START、2018-2021 年度)において、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の研究開発を進めている。 細胞内イオンチャネルを標的とした製薬企業に向けた高 品質なバリデーション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に関しては、引き続き東レエ ンジニアリング社と共同開発を進めている。前年度、量産 型の試作チップを作製し、その性能評価を行った。その結 果を受け、2020年度はチップの各部品について改良のた めの研究開発を実施した。脂質二重膜を担持する部品(セ パレータ部品)に関しては、イオンチャネルから得られる 信号の信頼性を向上させるための設計変更や材料検討を 行った。また、チップのベースとなるプラスチック部品に 関しても、再現性を向上させるための設計変更を行ってい る。計測システムに関しても、前年度の企業と共同実施し た実証試験の結果を受け、計測機能の付加を検討した。計 測時の脂質二重膜の性能評価を行うための機能や、計測デ ータの信頼性を担保するための機能について、既存の計測 器に試作回路を付加する形で検証を進めた。2021年度は、 これらの検証結果にもとづいて、新たに試作機を製作する 予定である。また、イオンチャネル計測システムの実用化 における課題を把握するため、前年度に引き続き企業との 実証実験を行った。

これらシステム全体の改良を進めることで、イオンチャ ネル創薬支援の事業化に向けた技術課題を着実に解決で きていると考えている。 成果展開として、外部研究期間との共同研究についても 継続して実施した。その成果は、Nature Physics 誌や Sensors & Actuators B 誌などに掲載された。また、国際医療福祉大 相馬研究室との科研費研究や、東大豊田研究室との共同研 究に関しても継続して実施し、論文掲載等の成果が得られ ている。

(2) 人工細胞膜センサの開発

2019 年度に終了した NEDO 事業では、昆虫の嗅覚受容 体を用いた匂いセンサプラットフォームの基盤技術とし て、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。2020 年度、同成果をとり まとめた論文が Science Advances 誌に掲載された。気中の 標的匂い物質を高感度・高確度に検出し、呼気診断への可 能性を示した同成果は、ニュース番組での紹介や新聞・ Web など 20 紙以上に掲載されるなど大きな反響が得られ た。

また人工細胞膜センサの要素技術については、センサ素 子となる人工細胞膜の並列化による検出時間の迅速化に ついて研究を行った。センサ素子の並列化は、計測回路の 並列化も伴うためコストやサイズが課題となる。そこで、 人工細胞膜と直列に抵抗器を挿入することで、並列化した センサ素子を1つの計測器で計測することを可能にした。 本成果については Small 誌に掲載された(当該号の裏表紙 絵に採用)。

2020 年度は、昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞に よる匂いセンサについて、東京大学・住友化学との共同研 究として JST CREST 事業(情報担体を活用した集積デバ イス・システム、2020-2025 年度)の採択を受けた。竹内 G ではセンサ細胞を搭載する計測システムの研究を担当 する。今年度は、センサ細胞から生じるシグナルを電気的 に検出するための基礎実験を実施した。

(3) 共同研究による成果

受託研究に関して、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。同 CREST では東京大 学大杉研究室と共同で、人工細胞核を封入したリポソーム を作製するためのデバイスを設計・開発している。

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の 多様な細胞内イオンチャネルへの適用検討

三村 久敏、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。生体機能の維持に必要なだけでなく、神経疾患や 心血管疾患、癌といった様々な疾病の創薬ターゲットにも なりうると考えられている[1]。ヒトには少なくとも 400 種以上のイオンチャネルが存在し[2]、創薬に関連したヒト 遺伝子ファミリーにおける重要な創薬ターゲットのう ち 19%を占める[3]。しかしながら、イオンチャネルの薬 剤探索は、思うようには進んでいない。

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難しい理由の1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。この方法では、細胞膜に微小ガラ ス管を押し当て、開口先端部の微小膜領域に含まれるイオ ンチャネルのイオン電流を計測する。これに対して、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]。この システムでは、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クリーニングを 効率的に行うことを目指している。この人工細胞膜チップ 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 とボリュームに対応している。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。イオンチャネルを再構成するた 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を利用して形成できる[6]。人工細胞膜 チップのウェルに、リン脂質を分散した有機溶媒と水滴を 滴下することにより、両者の界面にはリン脂質が規則的に 並んだ単分子膜が形成される。このような液滴を2個接触 させると、それらの界面にはリン脂質二重膜が形成される。 これにより、人工平面リン脂質二重膜が再現性よく容易に 形成できる。

1.3 細胞内イオンチャネル

前述のパッチクランプ法により細胞内イオンチャネル を調べる場合は、微小ガラス管を細胞内にある細胞小器官 まで到達させねばならないため、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。細 胞内イオンチャネルは重要な創薬ターゲットの1つであ るものの、パッチクランプ法で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、そ の探索余地は大きい。本研究では、当研究室で開発されて いるイオンチャネル機能評価システムの細胞内イオンチ ャネルへの適用可能性を調査した。

イオン電流の計測対象としては、当研究室で構築を手が けているヒトの細胞内イオンチャネルライブラリから、 TRPML1 (transient receptor potential mucolipin 1), TRIC-A (Trimeric Intracellular Cation Channel Type A), RyR2 (Ryanodine receptor 2)の3種類を選んだ。TRPML1は細胞 内のリソソーム膜と後期エンドソーム膜に局在し、 TRIC-A と RyR2 は小胞体に局在する。いずれも陽イオン チャネルとして機能し、ヒトの疾患にも関係する。 TRPML1の遺伝子変異は、指定難病のライソゾーム病の一 種であるムコ多糖症 IV 型を引き起こすことが知られてお り[7]、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[8]、アルツハイマー病への関与も示唆されている [9]。TRIC-A は高血圧への関与が示唆されており[10]、RyR2 は心臓の筋小胞体に局在し、不整脈などの心疾患への関与 が示唆されている[11]。これらの細胞内イオンチャネルの 分子構造に着目すると、TRPML1 は分子量約 65,000 の単 量体が4量体を形成し、TRIC-Aは分子量約33.000の単量 体が3量体を、RyR2は分子量約565,000の単量体が4量 体を形成する。機能的な多量体の分子量はそれぞれ、 TRPML1 (255 kDa), TRIC-A (132 kDa), RyR2 (2,2 MDa) となる (図 2)。本研究では、これらの細胞内イオンチャ





図 2 計測を行った細胞内イオンチャネル。(a) TRPML1 (255 kDa)。(b) TRIC-A (132 kDa)。(c) RyR2 (2.2 MDa)。

2. 実験方法

2.1 ヒト細胞内イオンチャネルの調製

ヒトの細胞内イオンチャネルの発現には、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細胞内イオン チャネル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、イオンチャネルの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、細胞内イオンチャネルを含む膜タンパ れると、イオン電流が観察されるようになる。活性化剤や 阻害剤といった化合物の添加は、計測を開始してから一定 時間後に、両ウェルの液滴の水溶液中に加えた。

3. 結果と考察

本研究で調製した細胞内イオンチャネルを 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3に示す。最終精製産物に含まれるタンパク質を色素 染色により検出している。バンドパターンから、対象とし た細胞内イオンチャネルは高純度に精製できたことがわ かる。TRPML1では、複数本のバンドが観察された。動物 細胞で発現したタンパク質は不均一な糖鎖修飾を受ける ことが多いため、分子量の異なるバンドが観察される場合



図 3 精製したヒトの細胞内イオンチャネルの SDS-PAGE 分 析。電気泳動後、CBB (Coomassie Brilliant Blue) でタンパ ク質を染色した。(a) TRPML1。(b) TRIC-A。(c) RyR2。矢印 は目的のイオンチャネルのバンドを示す。アステリスク(*) はTRPML1の分解産物を示す。

があることが知られている。TRPML1 も糖鎖修飾により、 分子量が僅かに異なる分子が合成されたと考えられる。50 kDa 付近に見えるバンドは、TRPML1 の分解産物であると 考えられる。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、精製の過程で分解されたものが一部含 まれることが知られている[12]。TRIC-A と RyR2 に関して も、目的の大きさのバンドが観察されたことを確認してい る。

精製した細胞内イオンチャネルのイオン電流を、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 4 に示す。TRPML1 では、特異的活性化剤である ML-SA1 の添加により TRPML1 が活性化されることを確 認できた。TRIC-A では、分子構造に由来すると考えられ る3段階のイオン電流が観察された。TRIC-Aは3量体構 造を形成し、その構成要素である単量体にはイオン透過孔 がそれぞれ 1 個ずつ存在することが知られている。RyR2 では、活性化剤である Caffeine と ATP の添加による活性 化、遮断薬である Ryanodine による半開き状態のサブコン ダクタンス、不活性化剤である Ruthenium red による不活 性化が観察された。このことにより、検出されたイオン電 流はそれぞれの細胞内イオンチャネルに由来するもので 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。この結果、本計測システム は、様々な大きさの細胞内イオンチャネルへ適用可能であ ることが確認されたと考えられる。今後も引き続き、計測 対象とする細胞内イオンチャネルの適用範囲を広げるこ 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の検討を進めていく。

【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) による支援を受け て行われました。ここに記して感謝申し上げます。



図 4 イオンチャネル機能評価システムを用いて計測したヒ ト細胞内イオンチャネルの活性。(a) TRPML1 のイオン電流。 特異的活性化剤である ML-SA1 の添加前後の様子を示す。10 μM ML-SA1 の添加により、イオンチャネルが開いていることを示 す電気信号(0)の割合が、閉じていることを示す電気信号(C) の割合に比べて増加していることがわかる。(b) Tric-A のイ オン電流。イオンチャネルが開いていることを示す電気信号 が3段階(01から03)で計測されていることがわかる。Tric-A 分子内の3 つのイオン透過孔に対応するイオン電流と考えら れる。(c) RyR2 のイオン電流。20 µM Ca²⁺のみに比べ、活性 化剤である 5 mM Caffein と 5 mM ATP の添加により、イオン チャネルが開いていることを示す電気信号の割合が増加して いることがわかる。さらに、10 µM Ryanodine の添加により、 サブコンダクタンス(ここでは半開き状態を示す)が観察さ れ、不活性化剤である 30 µM Ruthenium red の添加により、 イオンチャネル活性が阻害されていることがわかる。

【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] Bargal R, et al., Nature genetics 2000, 26, 118-123.
- [8] Shen D, et al., Nat Commun 2012, 3, 731.
- [9] Zhang L, et al., Cell Physiol Biochem 2017, 43, 2446-2456.
- [10] Yamazaki D, et al., Cell Metabolism 2011, 14, 231-241
- [11] Blayney LM, et al., Pharmacol Ther 2009, 123, 151-177
- [12] Schmiege P, et al., Nature 2017, 550, 366-370

呼気診断のための昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサ

大崎 寿久、山田 哲也、杉浦 広峻、三村 久敏、神谷 厚輝、竹内 昌治

1. はじめに

1. 1 昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサ

生物の嗅覚は、空気中のわずかな匂いを認識できる優れ た感度と選択性をもつ。この匂い認識の分子機構は、細胞 の膜上に存在する嗅覚受容体が、標的の匂い分子と結合す るところから始まる。その後のシグナル伝達は哺乳類と昆 虫では異なるが、昆虫の場合、嗅覚受容体がリガンド依存 型イオンチャネルを形成しており、匂い分子(基質)の結 合によってイオンチャネルが開いて陽イオンの細胞内へ の流入が生じる仕組みになっているとされる[1]。

近年、この昆虫の嗅覚受容体の機能は、優れたセンサの 素子として注目されている。匂い分子に対する①高い選択 性と、1分子の結合を毎秒1千万個のイオン電流に変換す ることで得られる②1分子レベルの感度とを、1タンパク 質の中に併せ持つという特長により、次世代の匂いセンサ として研究が盛んに行われている[2]。

1. 2 液滴接触法

昆虫嗅覚受容体のような膜タンパク質の機能を生体外 で利用するためには、細胞膜(脂質二重膜)を人工的に作 製する技術が必要となる。古典的には、高分子薄膜に微小 な孔を設け、そこに脂質を分散した有機溶媒を塗布して薄 膜化させることで脂質二重膜を得る刷毛塗り法や、気液界 面に展開した脂質単分子膜を貼り合わせることで脂質二 重膜を得る Montal-Mueller 法などがある。2000 年代以降に なると、マイクロ流体デバイスを用いる方法が報告される ようになった[3]。

液滴接触法は、脂質を分散した油中において、水滴表面 に自発的に脂質単分子膜が形成される原理を利用する。脂 質単分子膜が表面に形成された油中水滴 2 つを接触させ ることで、その界面に脂質二重膜構造が形成される[4]。こ の方法は液滴サイズと液滴間距離を規定すれば滴下操作 のみで迅速に再現良く脂質二重膜を形成できる点が優れ る。我々は、本法を用いて膜タンパク質の機能評価システ ム[5]や細胞膜センサ[6]の研究を行ってきた。

1.3 嗅覚受容体を用いた匂いセンサの課題

人工細胞膜上に嗅覚受容体を搭載した匂いセンサは、上 述の通り、分子間の特異的相互作用を利用するため、選択 性に優れる。また、受容体の信号変換・増幅効率を利用す れば、電気的計測技術によって標的の匂い分子1分子を検 出することも理論的には可能である。先行研究において、 液滴接触法で作製した人工細胞膜に昆虫嗅覚受容体を組 み込み、こうした選択性や感度について報告した[6]。分子 レベルの大きさに高い選択性と感度を内封するこのセン サは、呼気診断や環境計測など、従来の人工物センサでは 対応が困難だった分野への活用が期待される。

しかしながら、匂い分子を空気中から直接検知すること には課題も残されている。匂い分子は、分子量100から300 Da 程度までの揮発性有機化合物であり、一般的に脂溶性 である。すなわち、空気中の匂い分子は水には難溶である ため、人工細胞膜や嗅覚受容体が活性を維持するために必 要な水溶液に対する溶解度は小さい。受動的な方法では匂 い分子が水溶液中に十分溶け込むまでには長い時間を要 することが推測される。また、液滴接触法のように油中に 水滴がある場合、気相と接する油(有機溶媒)に匂い分子 が溶解し、水滴中へは匂い分子は分配されない[6]。そこで 本研究では、空気中の匂い分子を効率的に水溶液中に分 配・溶解するためのガス導入機構を考案し、その概念実証 として、開発したデバイスを用いて呼気に混入させた疾患 マーカーの検出を行った。

2. 実験方法

2. 1 昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサの作製

匂いセンサの基盤となる脂質二重膜の作製には前述の 液滴接触法を用いた。実際のデバイスでは、8字状に2つ の円筒ウェルが接したダブルウェルを設け、その境界に直 径 100 ミクロン程度の微小孔をもつセパレータフィルム を配置している。ウェルは液滴の位置・接触圧力を制御し ており、液滴は微小孔において接触し、面積が制御された 安定な膜が形成される。センサ素子となる昆虫嗅覚受容体 は、無細胞タンパク質合成系を利用して作製した。本研究 では、蚊の嗅覚受容体 OR8 の配列をコードする DNA を細 胞抽出液や翻訳因子から再構成したシステムに添加する ことで作製した。作製の際にリポソーム(脂質二重膜小胞) を混合することで、嗅覚受容体が再構成したプロテオリポ ソームを得ることができる。プロテオリポソームは、脂質 二重膜と自発的に融合するため、嗅覚受容体を脂質二重膜 に組み込むことができる。本研究では、このダブルウェル を16個並列化したデバイスを用いた(図1)。

空気中の匂い分子を効率的に水溶液中に分配・溶解する ため、上記の液滴接触法デバイスにガス導入機構を組み込 んだ。デバイスの片側の円筒ウェル底面に微細なスリット 状のマイクロ流路を作製した。また、流路表面は撥水・撥



図1 (A) 16 チャンネル匂いセンサデバイスの模式図。(B) マイクロスリットを使った匂い分子導入機構の模式図。(C) 嗅覚受容体を 人工細胞膜に再構成させた模式図。(文献7より改変)

油コートを施した(図1B)。マイクロスリットのあるウェ ルには水溶液のみを滴下し、もう片方の円筒ウェルに脂質 分散油と水滴を滴下することで脂質二重膜を作製した。ス リットを撥水処理したことにより、ウェルに滴下した水溶 液はスリット内部に侵入しない。マイクロスリットは、上 面を水溶液に接したマイクロ流路を形成する(図1C)。こ のマイクロ流路に匂い分子を含む気体を流すことで、匂い 分子を液滴中に導入する機構を考案した[7]。マイクロ流路 に導入された気体は気液界面にせん断力を生み、その力に よって液滴内部が攪拌される。この攪拌が起こることによ り、匂い分子が液滴に効率よく溶解すると考えた。

2.2 呼気サンプルの計測方法

呼気サンプルは、市販のガス採取バックに採取した。本 研究では、標的匂い分子として、肝臓ガンのバイオマーカ ーとの報告があるオクテノール(1-octen-3-ol)を使用した [8,9]。健常者の呼気をガス採取バックに採取し、そこにオ クテノールを添加したものを呼気サンプルとして使用し た。ガス採取バックはポンプに接続し、呼気サンプルは流 量調整器を介して前述の匂いセンサデバイスに導入した (図 2A)。デバイスには中央部分にガス導入口があり、そ こから 16 個のダブルウェル底面のマイクロスリットにガ スを導入した (図 1A)。ダブルウェル底面に配置した銀/塩 化銀電極により、人工細胞膜を流れるイオン電流を計測し た。昆虫嗅覚受容体はリガンド依存型イオンチャネルであ るため、標的となる匂い分子の結合に伴って、膜電位に応 じたイオン電流を生じる。このイオン電流を計測すること で、オクテノールが試料中に存在するかを検知することが できる。

3. 結果と考察

まず、ガス導入機構を使用した場合の匂い分子オクテノ ールの気相から液相への溶解について観測した。マイクロ スリットに導入するガスの流速が増加するにつれて、液滴 内部の攪拌速度が大きくなることがマイクロビーズを用 いた観測から分かった。また、オクテノールガス(濃度 5 ppm)を導入し、10分後に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により定量したところ、 従来のガス導入機構を持たないデバイスと比較して、約4 倍の濃度まで溶解させることができた。

このガス導入機構を用いて、呼気サンプル中の標的に負 い分子の観測を行った。ヒトの体内で産生される代謝物は 体の状態を反映しているとされ、この代謝物を分析するこ とはガンや糖尿病などの疾患の早期診断に繋がると考え られている。呼気診断は、代謝物を非侵襲的に調べるため の方法として近年注目されている。一方で、ヒトの呼気中 には約3000種の代謝物が含まれており[9,10]、その中から 疾患のバイオマーカーとなる特定の分子を正確に検出す るには、生物の持つ嗅覚のような優れた選択性が必要とな る。本研究では、蚊の嗅覚受容体を人工細胞膜に組み込ん だ匂いセンサを用いて、呼気サンプル中のオクテノール (肝臓ガンマーカー)の検出を試みた(図2A)。被験者の 呼気にオクテノールを混合しなかった場合、図 2B に示す ように電流シグナルは観測されなかった。一方で、被験者 の呼気とオクテノールをそれぞれ 0.5 ppb、5 ppb を混合し た呼気サンプルの場合、嗅覚受容体由来の矩形波状の電流 シグナルが観測された(図 2C,D)。また、電流シグナルに おける開状態の頻度(開確率)はオクテノール濃度ととも に増加することも分かった(図 2E)。この結果は、本研究 の嗅覚受容体を用いた匂いセンサが、呼気サンプルに含ま



図 2 (A) 呼気サンプル測定の概略図。(B-D) 呼気に混合したオクテノール計測結果。混合したオクテノール濃度: (B) 0 ppb、(C) 0.5 ppb、(E) オクテノール濃度と嗅覚受容体の開確率の関係。(文献 7 より改変)

れる ppb レベルのオクテノールを、雑多な匂い分子の混合物である呼気中から検出できたことを示している。

本研究では、空気中の匂い分子を水溶液中に取り込むた めのガス導入機構を、昆虫嗅覚受容体を用いる匂いセンサ に搭載し、呼気サンプル中の標的匂い分子の検出の概念実 証を行った。この成果は、今後、こうした匂いセンサの呼 気診断への応用に繋がるものと考えている。

【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 S 16H06329 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】

- K. Sato, M. Pellegrino, T. Nakagawa, T. Nakagawa, L. B. Vosshall, and K. Touhara, "Insect Olfactory Receptors Are Heteromeric Ligand-Gated Ion Channels," Nature, vol. 452, pp. 1002-1006, 2008.
- [2] N. Misawa, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Membrane Proteinbased Biosensors," J. R. Soc. Interface, vol. 15, 20170952, 2018.
- [3] T. Osaki and S. Takeuchi, "Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications," Anal. Chem., vol. 89, no. 1, pp. 216–231, 2017.
- [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] K. Kamiya, T. Osaki, K. Nakao, R. Kawano, S. Fujii, N. Misawa, M. Hayakawa, and S. Takeuchi, "Electrophysiological Measurement of Ion Channels on Plasma/Organelle Membranes Using an On-Chip Lipid Bilayer System," Sci. Rep. vol. 8, 17498, 2018.
- [6] 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 Sens. vol. 4, no. 3, pp. 711-716, 2019.
- [7] T. Yamada, H. Sugiura, H. Mimura, K. Kamiya, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Highly sensitive VOC detectors using insect olfactory receptors reconstituted into lipid bilayers," Sci. Adv., vol. 7, eabd2013, 2021.
- [8] R. Xue, L. Dong, S. Zhang, C. Deng, T. Liu, J. Wang, and X. Shen, "Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry," Rapid Commun. Mass Spectrom., vol 22, pp. 1181–1186, 2008.
- [9] 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, pp. 1423–1449, 2014.
- [10] Y. Y. Broza, X. Zhou, M. Yuan, D. Qu, Y. Zheng, R. Vishinkin, M. Khatib, W. Wu, H. Haick, "Disease detection with molecular biomarkers: from chemistry of body fluids to nature-inspired chemical sensors," Chem. Rev., vol. 119, pp. 11761–11817, 2019.

業績

【原著論文】

 Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Taro Toyota Perfusion Chamber for Observing a Liposome-Based Cell

Model Prepared by a Water-in-Oil Emulsion Transfer Method

ACS Omega, Vol.5, pp.19429-19436 (2020).

- Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi Formation of Nano-Sized Lipid Vesicles with Asymmetric Lipid Components Using a Pulsed-Jet Flow Method Sensors and Actuators: B. Chemical, Vol.327, 128917 (2021).
- Yoshihisa Ito, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Tetsuya Yamada, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi Rapid and Resilient Detection of Toxin Pore Formation Using a Lipid Bilayer Array Small, Vol.16, 2005550 (2020).
- Yoshihisa Ito, Yusuke Izawa, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Nobuo Misawa, Satoshi Fujii, Hisatoshi Mimura, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi A Lipid-Bilayer-On-A-Cup Device for Pumpless Sample Exchange Micromachines, Vol.11, 1123 (2020).
- Nobuo Misawa, Satoshi Fujii, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi Efficient Lipid Bilayer Formation by Dipping Lipid-Loaded Microperforated Sheet in Aqueous Solution Micromachines, Vol.12, 53 (2021).
- Tetsuya Yamada, Hirotaka Sugiura, Hisatoshi Mimura, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi Highly Sensitive VOC Detectors Using Insect Olfactory Receptors Reconstituted into Lipid Bilayers Science Advances, Vol.7, eabd2013 (2021).
- Taishi Tonooka, Toshihisa Osaki, Koji Sato, Ryuji Kawano, and Shoji Takeuchi Lipid Bilayer on a Microdroplet Integrated with a Patterned Ag/AgCl Microelectrode for Voltage-Clamp Fluorometry of Membrane Transport Sensors and Actuators: B. Chemical, Vol.334, 129643 (2021).
- 8. Hiroki Yasuga, Emre Iseri, Xi Wei, Kerem Kaya, Giacomo

Di Dio, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Polyxeni Nikolakopoulou, Sebastian Buchmann, Johan Sundin, Shervin Bagheri, Shoji Takeuchi, Anna Herland, Norihisa Miki, and Wouter van der Wijngaart

Fluid Interfacial Energy Drives the Emergence of Three-Dimensional Periodic Structures in Micropillar Scaffolds

Nature Physics, Vol.17, pp.794-800 (2021). (doi:10.1038/s41567-021-01204-4)

【総説】

 大崎寿久、竹内昌治 MEMS技術との融合により実現する人工細胞膜センサ センサイト(Web ジャーナル) 株式会社オプトロニクス社 センサイト・プロジェク ト、2020年11月

【書籍】

- 山田哲也、大崎寿久、竹内昌治 人工細胞膜を利用したセンサ開発 膜タンパク質工学ハンドブック 株式会社エヌ・ティー・エス、2020年4月
- 杉浦広峻、大崎寿久、山田哲也、竹内昌治 人工細胞膜を用いた匂いセンサ 匂いのセンシング技術 株式会社シーエムシー出版、2020年8月
- 3. 山田哲也、杉浦広峻、大崎寿久、竹内昌治 嗅覚受容体を利用したバイオハイブリッド匂いセンサ においのセンシング、分析とその可視化,数値化 株式会社技術情報協会、2020年10月

【口頭発表】

- 杉浦広峻、大崎寿久、三村久敏、山田哲也、竹内昌治 誘電泳動力を用いた平面脂質平面膜に対する高速リポ ソーム導入 ロボティクス・メカトロニクス講演会 2020 2020 年 5 月、石川 (Online)
- 2. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Taro Toyota Abiotic Accumulation of Small Molecules and Ions into Cellular Compartment against a Concentration Gradient Molecular Origins of Life, Munich 2020 2020 年 7 月、ドイツ (Online)
- 3. 三村久敏、大崎寿久、杉浦広峻、神谷厚輝、竹内昌治 細胞内イオンチャネルの薬剤スクリーニングのための

平面脂質二重膜アレイ 第93回日本生化学会大会 分野を超えて~守る生化学, 攻める生化学~ 2020年9月、神奈川(Online)

- 4. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Taro Toyota
 Automated Direct Observation Unveiled Hydrodynamic Accumulation of Molecules into Cell-Sized Liposomes against a Concentration Gradient
 第 58 回日本生物物理学会年会
 2020 年 9 月、群馬 (Online)
- 5. 大崎寿久

 細胞内イオンチャネル創薬のためのスクリーニングシステムの研究開発
 第 64 回日本薬学会 関東支部大会「令和新時代の薬学 アイデンティティーを考える」
 2020 年 9 月、東京 (Online)

- 6. 竹内昌治
 膜をはり、分子をはかる
 生理学研究会 on ZOOM「イオンチャネルと生体膜のダイナミズム:構造生物学の先にあるもの」
 2020 年 10 月、愛知 (Online)
- 7. 菅原啓亮、大崎寿久、新富美雪、新富圭史、森本雄矢、 大杉美穂、竹内昌治 3次元マイクロ流路によるカエル卵抽出液内封液滴の 作製 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会 2020年10月、熊本(Online)
- 8. 三村久敏、杉浦広峻、大崎寿久、小田悠加、竹内昌治 細胞センサのための電気生理学的検出技術の開発 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会 2020年10月、熊本(Online)
- 9. 伊藤嘉玖、大崎寿久、三村久敏、三木則尚、竹内昌治 液滴の攪拌を利用したナノポアセンサの検出迅速化 日本機械学会第11回マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2020年10月、熊本(Online)
- 10.中根卓馬、三村久敏、大崎寿久、三木則尚、竹内昌治 細胞を用いた匂いセンサのためのガスフロー機構 日本機械学会第11回マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2020年10月、熊本(Online)
- 杉山博紀、大崎寿久、竹内昌治、豊田太郎 定常流れ場中での細胞サイズのリポソームへの分子濃 縮に関する分子論的考察 「細胞を創る」研究会 13.0

2020年11月、東京 (Online)

12.竹内昌治
 次世代健康医療分野を拓くバイオハイブリッドセンシング
 センサ&IoT コンソーシアム 公開シンポジウム
 2020"バイオメディカル計測と健康医療センシング"
 2020 年 12 月、東京 (Online)

13.竹内昌治

バイオハイブリッドが拓く未来のモノづくり
 第5回 BJRF in Japan ボストン日本人研究者交流会 日本支部
 2020年12月、東京(Online)

【記者発表、取材】

2021年1月13日オンライン記者説明会(東京大学 大学院情報理工学研究科、KISTEC 共同発表) 「蚊の嗅覚受容体で呼気診断!?~蚊の嗅覚受容体を用い たセンサにより 0.5ppb レベルの匂いの検出に成功~」 ※以下は上記記者説明会に対する報道

Shoji Takeuchi

How does your computer smell? Researchers create a highly sensitive biohybrid olfactory sensor EurekAlert! (Web)、2021 年 1 月 13 日

- Shoji Takeuchi Researchers create a highly sensitive biohybrid olfactory sensor Tech Xplore (Web)、2021 年 1 月 13 日
- 山田哲也(研究当時)、竹内昌治 東大とKISTEC、蚊の嗅覚受容体を用いたセンサにより0.5ppbレベルの匂いの検出に成功 日本経済新聞(Web)、2021年1月14日
- 竹内昌治
 「蚊の嗅覚」で呼気中の肝臓がんバイオマーカーを検
 出、東大 がんや糖尿病の「呼気診断」への応用目指
 す
 日経 BP (Web)、1月14日
- 竹内昌治 蚊の嗅覚、がん診断に利用 小型高精度のセンサー開 発--東大など 時事ドットコム (Web)、1月14日

- 5. 蚊の嗅覚用いたがん診断技術—関連企業に住友化株式新聞(Web)、1月14日(会員限定記事)
- 8. Shoji Takeuchi The Smell of Progress: Researchers Create Biohybrid Scents Sensor TECHNOLOGY NETWORKS(Web)、1月14日
- 山田哲也(研究当時)、竹内昌治
 0.5ppb レベルの匂いを検出:蚊の嗅覚受容体を用いた
 匂いセンサーを高精度化
 EE Times Japan (Web)、1月15日
- 10. Shoji Takeuchi Highly Sensitive, Biobased Detectors for Volatile Organic Compounds Chemistry Views (Web)、1月15日
- Shoji Takeuchi Japanese team develops cancer detector using mosquito's sense of smell The japan times (Web)、1月15日
- 12. Shoji Takeuchi How to give computers a sense of smell nanowerk (Web)、1 月 15 日
- Shoji Takeuchi
 Wie kann Ihr Computer riechen? Forscher schaffen einen hochempfindlichen biohybriden Geruchssensorl CHEMIE.DE (Web)、1月15日
- 14. Shoji Takeuchi
 How does your computer smell? Researchers create a highly sensitive biohybrid olfactory sensor
 CHEM Europe.com (Web)、1月15日
- Shoji Takeuchi Japonlardan çığır açan buluş: Sivrisineklerden kanser dedektörü geliştirildi! gidahatti (Web)、1月16日
- 16. 山田哲也(研究当時)、竹内昌治 東大など、蚊の嗅覚受容体を組み込んだ高感度匂いセンサの開発に成功 マイナビニュース(Web)、1月18日
- 17. 竹内昌治
 "蚊のタンパク質"人工的に作り高感度の臭いセンサー
 開発
 おはよう日本(TV)、1月18日

- 18. 竹内昌治
 "蚊のタンパク質"人工的に作り高感度の臭いセンサー
 開発
 NHK News Web (Web)、1月18日
- 19. 竹内昌治
 肝がん目印 低濃度でも検出 東大、小型においセン サー
 日刊工業新聞(21 面)、1月18日
- 20. Shoji Takeuchi Mosquitos can be an early warning system for cancer, repoort finds 7News(Web)、1月19日
- 21. 蚊の嗅覚の仕組みで肝臓がんを感知 東大などのチーム、呼気に含まれるにおい物質検出 朝日新聞デジタル(Web)、1月21日(会員限定)
- 22. 竹内昌治 蚊の嗅覚の仕組みで肝臓がんを感知 東大などのチーム 呼気に含まれるにおい物質検出 朝日新聞(19面)、1月21日
- 23. Los mosquitos son capaces de oler los primeros signos de cáncer humano La Vanguardia (Web)、1月21日
- 24. 蚊のしくみで肝臓がん感知 におい感じる感覚を再現 朝日小学生新聞(3面)、1月23日
- 25. 微量の匂い分子を検出する、蚊の嗅覚受容体を利用した匂いセンサーを開発
 MONOist (Web)、2月9日
- 26. 竹内昌治 蚊の嗅覚システム利用 がん検知 しんぶん赤旗(12 面)、2月22日

他 Web 転載記事 26 社

【特許】

(1) 国内特許出願 3件
 (2) 国外特許出願 3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】

2050年の世界では経済規模は現在の4倍、エネルギー消費は1.8倍、人口90億人以上であり、世界人口の70%が都市に居住していると予測されている。一方で、IPCC報告は2050年に世界全体でCO2排出量を現状の半分以下に削減する必要性を示している。これらを踏まえて考えると、2050年のエネルギー消費(現状の)180%を50%以下にしなければならないことになる。根本的な削減には、再生可能エネルギーへの大規模なシフトが最も安全で現実的な解と考えられる。

現在、日本の電気代が 25 円/kWh の現状に対し、インドや中東などの風力発電は 3 円/kWh 程度にであり、 海外の再生可能エネルギーコストは大幅に下がっている。再生可能エネルギーで生産される電気エネルギ ーを一度化学物質に置き換えれば、大規模な貯蔵・輸送が可能となる。海外の安い風力や太陽光発電でで きる電気を水素または水素キャリアで貯蔵・輸送し、必要な時間・場所で燃料電池または水素タービンな どで電気として利用することで、再生可能エネルギーを大規模に利用する世界を実現できる。ただし、2 度の変換を経るために、水電解や燃料電池・水素タービンの効率が低ければ、折角の電気が無駄になる。 総合的に半分以上の電気を利用すべきであり、どちらも変換効率 70~80%を目指すべきである。固体高分 子形燃料電池 (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 35 万台以上が設置され、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℃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、自家用車だけで無く、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、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固体高分 子形燃料電池の設計・開発を行った。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 積極的に推進した。



図 1. 触媒・電解質膜材料およびシステム的燃料電池設計・開発

1. 研究目的

本グループは、デバイスにとって真に必要な材料機能を 分子・ナノ・メソ・マクロとシステム的に設計し、固体高 分子形燃料電池(Polymr electrolyte fuel cell: PEFC)のための 触媒・触媒層と電解質膜の協奏的開発(図 1)を進めてきた。 そして、開発した材料をコーディネートさせ新しい性能を デバイス全体として発現することで、広い温度・湿度・電 流密度領域で高い性能を示す次世代の高効率燃料電池の 実現を目指した。

2017 年度から開始した本実用化実証事業では、戦略的 研究シーズ育成事業 (2011 年 10 月~2013 年 3 月)、有望シ ーズ展開事業 (2013 年 4 月~2017 年 3 月)における成果か ら、特に有望な材料である(1) カーボンフリー白金(Pt)系ナ ノ粒子連結触媒、(2) 酸高密度型高分子電解質に注力して、 実用化に向けた取り組みを行った。また、次世代燃料電池 としての有用性を示すために、(3) 開発した材料を組み合 わせ膜電極接合体(Membrane-electrode assembly: MEA)の 設計・開発にも取り組んだ。本稿では、(1)~(3)の重点項目 に関する主な研究成果を概説する。さらに、(4) ナノ粒子 連結触媒の他のエネルギーデバイスへの展開として、固体 高分子形水電解のためのイリジウム(Ir)ナノ粒子連結触媒 の開発についても紹介する。最後に、こららの成果を踏ま えた今後の展望について述べる。

(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 PEFC 用触媒(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、Pt₁-Fe₁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。カーボン担体の除去は、触媒層の薄層化にもつながる ため、物質移動に有利な薄い触媒層も形成できる。



図 2. (a) 従来の Pt/C 触媒、(b) Pt-Fe 合金ナノ粒子が連結したナノ ネットワークで構成される中空カプセル状のカーボンフリー触 媒の模式図と TEM 像

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。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_I-Fe₁ナノ粒子 連結触媒の原子配列規則度(fct の割合)を向上させる触媒 合成法(図 4b)を新たに提案・実証した。さらに実用化を推 進するために、企業と連携し、量産プロセスが可能な、よ り簡易な合成法(図 4c)の検討も行った。そして、規則度が 負荷応答耐久性に与える影響を調査し、起動停止および負 荷応答の両方に対して高耐久な Pt_I-Fe₁ナノ粒子連結触媒 の開発に取り組んだ。



図 4. Pt-Fe ナノ粒子連結触媒の合成法(a) 従来の合成法: 超臨界 処理を用いる低規則度触媒の合成法、(b) 新規合成法①: 超臨界 処理、およびシリカコートと熱処理を用いる高規則度触媒の合成 法、(c) 新規合成法②: 超臨界処理を必要としない、シリカコー

トと熱処理を用いる高規則度触媒の簡易合成法 (2)酸高密度型細孔フィリング薄膜の開発

従来の電解質材料は、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、有望シー ズ展開事業において、スルホン酸基が高密度に密集した構 造(酸高密度構造)を持つ電解質材料が低湿度環境でもプロ トンを高速に伝導する現象(Packed acid mechanism, 図5)を 実験と量子化学計算の双方から明らかにした。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。



図 5. ホッピングによるプロトン伝導機構 (Packed acid mechanism)

この研究成果を活かし、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 6)を開 発した。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。



図 6. (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

本事業では、高 IEC 細孔フィリング薄膜の作製条件の検 討を行い、作製条件がプロトン伝導性に与える影響を調査 した。さらに、開発した膜の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、 膜内部のミクロ構造の観察を行った。

(3) 高温低湿度対応 MEA の開発

本グループは、開発した材料の PEFC デバイスとしての 性能を評価するために、膜電極接合体(MEA)の開発にも取 り組んできた。特に、有望シーズ展開事業において、高 IEC 細孔フィリング薄膜(膜厚 7 μ m)を組み込んだ MEA(図 7) は、従来の低 IEC の市販膜(Nafion 211, 膜厚 25 μ m)を用い た MEA では実現できなかった高温低湿運転(80°C, 20~60% RH、80~100°C, 30% RH)での高い発電性能を発現 することに成功した(図 8)。

そこで、本事業では、MEA 内部の水移動に着目して高 温低湿度条件での高い発電性能の要因を調査した。さらに、 高 IEC 細孔フィリング薄膜の実用化を推進するために、燃 料電池運転環境下での MEA の耐久性評価および劣化メカ ニズムの解明に取り組んだ。







図 8. 高温低湿度運転での燃料電池発電性能 (80°C, 20~60% RH). (a) 低 IEC 市販膜、(b) 高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA

(4) 金属ナノ粒子連結触媒の他のエネルギーデバイスへの展開

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、他のエネルギーデバイスへの応 用にも取り組んできた。

応用の一つとして、固体アルカリ燃料電池(Solid alkaline fuel cell: SAFC)用カソード触媒が挙げられる。酸環境で動 作する PEFC とは異なり、SAFC はアルカリ環境で動作す る燃料電池である。SAFC は PEFC に比べ、性能・耐久性 ともに低く、まだ研究開発段階である。特に、高温アルカ リ環境での MEA の低耐久性は大きな課題であり、SAFC の研究開発を遅滞させる要因となっている。本事業は、 CREST「再生可能エネルギーからのエネルギーキャリアの 製造とその利用のための革新的基盤技術の創出」、研究課 題「液体燃料直接型固体アルカリ燃料電池用触媒層および MEA 基盤技術の構築」(代表:東京工業大学 山口猛央 教 授)において、SAFC カソード触媒用の白金合金ナノ粒子連 結触媒の開発に取り組んだ。開発した触媒のアルカリ環境 での活性・耐久性評価、さらに MEA に組み込んだギ酸塩 水溶液直接型 SAFC(図 9)での長時間耐久性試験を実施し、 ナノ粒子連結触媒の SAFC としての有用性を検証した。





さらに、ナノ粒子連結触媒の応用として、固体高分子形 水電解の酸素発生反応用 Ir ナノ粒子連結触媒の研究開発 にも取り組んだ。この研究開発は、NEDO「水素利用等先 導研究開発事業/水電解水素製造技術高度化のための基盤 技術研究開発/高性能・高耐久な固体高分子形および固体 アルカリ水電解の材料・セルの設計開発」(代表:東京工 業大学山口猛央教授)において、東工大との共同研究で 実施した。水電解は燃料電池とは異なり、1.2 V以上の高 電位で動作するため、深刻なカーボン腐食が起こり、カー ボン担体を使用することはできない。導電性の金属酸化物 担体の使用や担体フリーの Ir 触媒が開発されてきたが、低 い反応表面積が課題の一つであった。そこで、本事業では、 図 10 に示すように、約 1.8 nm の非常に小さい Ir ナノ粒子 が連結した高表面積の Ir 系ナノ粒子連結触媒を開発した。 そして、開発した触媒の酸素発生反応活性と MEA での水 電解性能を評価することで、水電解触媒としての有用性を 検証した。



図 10. 酸素発生触媒用 Ir ナノ粒子連結触媒の模式図

この様に、本事業では、ナノ粒子連結触媒の実用化を推 進するために、積極的に他のエネルギーデバイスへの応用 にも取り組んだ。

2. 実用化実証事業(2017~2020年度)の研究成果

以下に挙げるのは、本実用化実証事業における主な研究 成果の概要であり、詳細は各研究員の報告書に記載する。 以下に示す研究成果は、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。 記載は、2020 年度分のみ)

(1) カーボンフリー白金系ナノ粒子連結触媒の開発

本研究は、図 4b に示す新しい触媒合成法(超臨界処理で ナノネットワークを形成後、触媒表面をシリカで被覆し、 高温処理を施す合成法)を用いて、原子配列規則度の向上 に成功した。シリカ被覆により、Pt₁-Fe₁ ネットワークを 固めた状態にすることで、高温処理による凝集を抑制し、 高表面積のナノサイズネットワークを維持できる。本手法 はコンセプト通り、700~900℃の高温処理でもナノサイズ のネットワーク構造を維持することに成功した。さらに、 高温処理によって、規則度増加が確認され、800℃以上の 高温処理では、熱処理なしの通常の触媒よりも約2倍高い 規則度80%以上を達成した。

しかしながら、図 4b に示す合成法は、ステップ数が多 く、またバッチ式の超臨界(高温・高圧)処理を用いる。そ こで、本事業は企業と連携し、図 4c に示す超臨界処理を 必要としない、より簡易な合成法の実証を行った。本合成 法では、Pt-Fe ナノ粒子をシリカ粒子上に生成させた後、 超臨界処理を行わず、表面をシリカで被覆する。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 成させる。図 4c の合成法は、超臨界処理を用いず簡易で あるため、量産化に適した合成プロセスを構築できる。

本研究は、図 4c に示す新規合成法の実証、および合成 条件の検討を行った。その結果、熱処理温度 400°C 以上で 規則構造を形成し、温度を上げるに連れて規則化度は増加 し、70~80%の高い規則度を達成した。また、高温処理後 もナノサイズのネットワークを維持することも確認され た。作製した高規則度の Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒は、市 販 Pt/C の 10 倍高い ORR 表面比活性を示すことが分かっ た(図 11a)。さらに、図 11b に示すように、高い規則度(約 70~80%)を持つ Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒は金属の溶出を 加速する負荷応答耐久性試験において、低規則度(40~50%) 触媒よりも高い耐久性を示すことを確認した。この様に、 高い原子配列規則度を有するカーボンフリーPt₁-Fe₁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すること を実証した。



図 11. 規則度の異なる Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒の(a) ORR 表面比 活性および(b) 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

さらに、本研究では図4cに示す合成法を用いることで、 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Pt₃-Fe₁,Pt₁-Fe₃ナノ粒子連結 触媒の開発に成功している。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 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。

(2) 酸高密度型細孔フィリング薄膜の開発

本事業では、高 IEC 細孔フィリング薄膜の作製条件が高 温低湿度でのプロトン伝導性に強く影響を及ぼすことを 見出した。図 12 に示すように、多孔質基材の細孔内に高 IEC の PFSA アイオノマーを充填する際に用いる溶媒(水/ エタノール混合溶媒、または N,N-ジメチルホルムアミド (DMF))によって、プロトン伝導性に顕著な違いが確認され た。PFSA 系のアイオノマーは、溶媒によってモルフォロ ジーが異なることが知られている。そのため、異なる溶媒 を用いることで、細孔内に充填された PFSA アイオノマー の構造も変化したと推測される。特に、プロトン伝導には、 スルホン酸基が密集したナノサイズのチャネル構造が重 要である。



図 12. 異なる溶媒 (H₂O/EtOH または DMF) を用いて作製した高 IEC 細孔フィリング薄膜のプロトン伝導性

そこで、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、膜内部のミ クロ構造を TEM-EDX 測定から観察した。EDX マッピン グから、細孔内に充填された PFSA ポリマー由来のF,S元 素の分布が観察された。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 はチャネル構造を形成することが示唆された。細孔内のプ ロトン伝導チャネル構造とプロトン伝導性の関係性は、さ らなる高性能な膜を設計する上で必要不可欠である。その ため、本研究では引き続き、高 IEC 細孔フィリング薄膜の 詳細な構造解析に取り組んでいる。

(3) 高温低湿度対応 MEA の開発

高温低湿度運転(80℃、20% RH)における MEA の電気化 学測定から、高 IEC 細孔フィリング薄膜は市販のナフィオ ン膜(Nafion 211)に比べ、IR 損が顕著に小さいことが確認 された(図 13)。高 IEC 細孔フィリング膜は酸高密度構造を 持つため、高温低湿度でもプロトン伝導性が高い。さらに、 膜厚 7 µm と非常に薄いため水透過度が高く、カソードで の生成水がアノードへより透過し、MEA 全体で適した湿 度管理を可能とする。実際に、発電時における MEA 内部 の水移動現象の評価・解析から、高 IEC 細孔フィリング薄 膜を用いた MEA のアノード・カソードではバランスのと れた湿度になっていることが確認されている。これらの要 因により、IR 損を大幅に低減し、高い電池性能を発現し たと示唆された。

一方で、高 IEC 細孔フィリング薄膜は、市販膜よりも薄

いにも関わらず、水素クロスオーバー量が同程度であり、 ガス透過阻止性に優れた膜であることが示された。

このことから、細孔フィリング薄膜はプロトンと水は効 果的に通し、一方で、ガスの透過は阻止する、燃料電池電 解質膜の必要性能を満たした非常に有望な膜であること が示された。



図 13. (●) 高 IEC 細孔フィリング薄膜および(■) 低 IEC 市販膜 (Nafion 211)を用いた MEA の高温低湿度運転における MEA の IR 損. 運転条件: (a) 80℃, 20% RH, (b) 100℃, 30% RH

本事業では、高 IEC 細孔フィリング薄膜の実用化を推進 するために、細孔フィリング薄膜を用いた MEA の高耐久 性も実証した。ここでは、膜の化学的耐久性を評価する開 回路電圧(OCV)保持試験を行った。図 14 に示すように、 110℃、30% RH の高温低湿度条件での OCV 保持試験にお いて、細孔フィリング薄膜は薄膜化したにもかかわらず、 市販ナフィオン膜と同程度の OCV 保持性能を示し、高い 化学的耐久性を有することが確認された。

OCV 保持試験前後の膜構造の解析から、市販ナフィオ ン膜(初期の膜厚約25 µm)は、OCV 保持試験後に膜厚が約 6 µm まで大きく減少したことが分かった。市販膜を用い 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。一方で、細孔フィ リング薄膜は、OCV 保持試験後も膜厚を保持しているこ とが確認され、OCV 保持試験中のフッ素放出量も極めて 少なかった。以上の結果から、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。

この様に、細孔フィリング薄膜を用いた MEA は、従来 の膜では実現できなかった高温低湿度運転での高い発電 性能と高い化学的耐久性を両立することが実証された。



図 14. (●) 高 IEC 細孔フィリング薄膜及び(■) 低 IEC 市販膜を用 いた MEA の OCV 保持耐久性. (a, b) 110°C, 30% RH での OCV 保 持試験における(a) OCV と(b) 水素クロスオーバー電流密度の時 間変化

(4) 金属ナノ粒子連結触媒の他のエネルギーデバイスへの展開

CREST 事業において、ギ酸塩溶液型 SAFC のカソード 触媒に、Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒を応用した。高耐久全 芳香族系電解質(東工大山ログループで開発)と Pt₁-Fe₁ ナ ノ粒子連結触媒を組み合わせた MEA は、ギ酸塩溶液型 SAFC において高い発電性能を示した。さらに、高温(80° C) アルカリ環境で 200 時間以上発電しても、Pt₁-Fe₁ ナノ粒 子連結触媒はネットワークやカプセル構造を維持し、規則 度の低下はみられるものの規則構造も保持していること が確認された。このことから、Pt-Fe ナノ粒子連結触媒は、 高温アルカリ環境での発電に対して高耐久であり、SAFC においても有用な触媒であることが実証された。

NEDO 事業において、水電解アノード用酸素発生反応 (OER)触媒として、Ir 系ナノ粒子連結触媒(SiO2 テンプレー ト上)の開発を行った。本触媒はカーボンフリーであるた め、高電位でのカーボン腐食による劣化がない。さらに、 図 15 に示すように、1.8 nm の Ir ナノ粒子が連結した構造 であるため、高表面積を有する。この高表面積によって、 開発した Ir ナノ粒子連結触媒は、市販の Ir 触媒(Ir black (AA))よりも5 倍程度高い OER 活性を示した。本グループ では Ir 合金のナノ粒子連結触媒の合成にも成功しており、 さらなる OER 活性向上も達成している。このことから、 ナノ粒子連結触媒は、水電解システムに対しても有望な材 料であることが示されている。

この様に、金属ナノ粒子連結触媒は、PEFC に留まらず、 固体アルカリ燃料電池や固体高分子形水電解への展開に 成功しており、他のエネルギーデバイスにおいても実用化 が期待される材料である。 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。高効率燃料電池を世界規模で展開・普及させることで、 温暖化ガス排出量抑制、エネルギー資源の有効利用にも大 きく貢献できる。大型発電所に頼らない、「エネルギー資 源を大切に使う社会」を構築できると考えている。



図 15. Ir ナノ粒子連結触媒(Ir/SiO₂)の(a) TEM 像およぼ (b) 高解像 STEM 像. (c) 酸素発生反応(OER)に対する質量活性の比較

3. 今後の展望

本実用化実証事業を通して、カーボンフリーナノ粒子連 結触媒と高IEC細孔フィリング薄膜の開発、これと同時に、 開発した材料を組み込んだ高温低湿度対応MEAの設計開 発に取り組んだ。さらに、本事業で開発した触媒、電解質 膜材料は、次世代PEFCへの導入に向けて、外部企業での 評価を行い、実用化に向けた課題の抽出にも取り組んだ。 ナノ粒子連結触媒はPEFCに限らず、固体アルカリ燃料電 池や固体高分子形水電解にも有望な材料であることを実 証した。

この様に、本事業で得られた成果をさらに発展させるこ とで、高効率な燃料電池や水電解システムの実現に大きく 貢献できると期待される。今後、KISTEC での事業で培っ た材料や知見を発展させ、NEDO「燃料電池等利用の飛躍 的拡大に向けた共通課題解決型産学官連携研究開発事業 /II 水素利用等高度化先端技術開発/カーボンフリー白金合 金ナノ粒子連結触媒とポリフェニレン系細孔フィリング 電解質膜の開発および高電圧・高出力 MEA への展開」(代 表:東京工業大学 山口猛央 教授)において、ナノ粒子連 結触媒、細孔フィリング電解質膜の研究開発、実用化に向 けた取り組みを進めていく。

本事業で開発した材料や技術を基盤とし、高効率燃料電

酸素還元特性向上に向けた

Pt-Fe ナノ粒子連結触媒の原子配列規則性制御

黒木 秀記、藤田 遼介、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(Polymer Electrolyte Fuel Cell: PEFC)の普及拡大には、カソード触媒における酸素還元反応(Oxygen Reduction Reaction: ORR)活性と耐久性の向上が必要不可欠である。本グループは、これまでの触媒とは異なる発想で、白金鉄(Pt₁-Fe₁)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 Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒(図 1)の開発に取り組んできた¹⁻⁵。本触媒は、図 2に示すように、従来の燃料電池触媒の白金ナノ粒子担持カーボンブラック(Pt/C)に比べて、ORR に対する表面比活性が約9倍高い値を示すため、燃料電池の低白金化が実現できる。Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒は、カーボンブラック担持Pt₁-Fe₁ナノ粒子(Pt₁-Fe₁/C, ナノ粒子同士の連結なし)と比較して、ORR 表面比活性は2~3倍高い。このことから、ナノ粒子連結触媒の特異な構造が活性向上に寄与している可能性が示唆されている。



図 1. 中空カプセル状 Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒とカーボンフリー 触媒層の模式図



図2. カーボンブラック上に担持させた白金ナノ粒子(Pt/C)または

白金鉄合金ナノ粒子(Pt₁-Fe₁/C)触媒と、Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒の ORR 表面比活性の比較

加えて、金属ネットワークは導電性を有するため、導電 性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⁶。本グループは、Pt₁-Fe₁ナ ノ粒子連結触媒をカソード触媒層に用いた MEA において、 80℃での起動停止耐久性試験を実施し、起動停止 10000 サ イクル後においても電気化学的活性表面積 (Electrochemical surface area: ECSA)と電池性能は変化せず、 初期性能を維持することが分かった。カーボン担体を含む Pt/C においては、カーボン腐食によって4000 サイクル後 には ECSA が 50%以下になり、大幅に電池性能が低下する。 このことから、Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒を用いたカーボ ンフリー触媒層は、カーボン腐食の問題を回避できるため、 高耐久性であることを実証した。



図 3. (A) 起動停止サイクルに対する ECSA の保持率 (■) カーボ ンフリーPt₁-Fe₁ カプセル触媒層、(▲) 市販の Pt/C 触媒層, (B) カ ーボンフリーPt₁-Fe₁ カプセル触媒層を用いた MEA の 80°Cにおけ る電流電圧曲線. (■) 初期、起動停止試験前、(〇) 起動停止試験 10000 サイクル後

また、中空カプセル状の Pt₁–Fe₁ ナノ粒子連結触媒を用 いたカーボンフリー触媒層の断面構造観察(図 4)から、触 媒層厚みは 1~1.5 μm であることが分かり、従来のカーボ ン担体を含む触媒層の厚み約 10 μm と比べて、非常に薄い ことが確認された。触媒層の薄層化は物質移動抵抗の低減 が期待できる。



図 4. Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒を用いたカーボンフリー触媒層の 拡大図, (b) カーボンフリーカソード触媒層・電解質膜・Pt/C アノ ード触媒層で構成される MEA の断面図

以上のように、本グループは有望シーズ展開プロジェクトにおいて、カーボンフリーPt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒は、 従来のカーボン担体を含む白金触媒層が抱える低い触媒 活性、低い耐久性、高い物質移動抵抗による性能低下といった様々な問題を解決し得る有望な触媒層材料であるこ とを実証した。

しかしながら、燃料電池触媒は、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ことが必要である。

本グループは有望シーズ展開プロジェクトにおいて、図 5a に示す原子配列規則(超格子)構造を持つ白金合金ナノ 粒子触媒(カーボン担持)の開発を行い、不規則配列構造(図 5b)の触媒よりも高い ORR 活性と優れた負荷応答耐久性 を示すことを見出した⁷⁻¹¹。そこで本研究は、規則配列構 造に着目し、Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒における原子規則 配列構造及び表面構造の制御を行い、これらの構造が耐久 性及び ORR 活性に与える影響を議論した。



図 5. (a) Pt と合金(M)層が規則的に配列した規則配列構造、(b) Pt と合金(M)がランダムに配置している不規則配列構造

2. 実験、結果及び結果

2.1 原子配列規則性制御

本研究は、 Pt_1 - Fe_1 ナノ粒子連結触媒の原子配列規則度 向上を行った。規則配列構造である $L1_0$ 型 face centered tetragonal (fct)相は、不規則配列構造の face centered cubic (fcc)相よりも熱力学的に安定であり、高温処理により fct 相に変態する。しかしながら、 Pt_1 - Fe_1 ナノ粒子連結触媒 を 800°Cで焼成すると、図 6b に示すようにネットワーク 構造が凝集し、高表面積を維持できない。



図 6. (a) 焼成前の Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒の TEM 像、(b) 800℃ で焼成後の TEM 像

そこで、Pt_I-Fe_I連結ネットワークをシリカで被覆し、 ネットワークを固めた状態で熱処理を施し、ネットワーク の凝集を抑制する新規合成法①(図 7b)を提案した。

図 7b の合成法は、まず、ポリオール反応と超臨界処理 を用いた従来の合成法(図 3a)でシリカ粒子担体上に Pt₁--Fe₁ ナノ粒子連結構造(Pt₁-Fe₁ ネットワーク/SiO₂)を形 成させる。その後、触媒表面をシリカで被覆し、高温処理 を行い、熱力学的に安定な規則配列(L1₀型 fet)構造に変移 させる。最後に、10 M NaOH 水溶液で処理し、触媒表面 と担体のシリカを完全に除去することで、中空カプセル形 状を得る。



図 7. Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒の合成法.(a) 従来の合成法:超臨界処理を用いる低規則度触媒の合成法、(b) 新規合成法①:超臨界処理、およびシリカコートと熱処理を用いる高規則度触媒の合成法

図8にPt₁-Fe₁ネットワーク/SiO₂の表面にシリカ被覆を 行ったサンプルのTEM像を示す。TEM像から、触媒表面 をシリカで概ね均一に被覆されたことが確認され、シリカ 層の厚みは約50nmであった。



図 8. シリカ被覆 Pt₁-Fe₁ ネットワーク/SiO₂の TEM 像

続いて、Pt₁−Fe₁ ネットワーク/SiO₂ を H₂/N₂ 雰囲気下、 800℃で熱処理を行い、90℃、10 M NaOH 水溶液中で被覆 層と担体のシリカを除去した。得られたサンプルの TEM 観察(図 9)から、中空カプセル構造とナノサイズのネット ワーク構造が確認された。このことから、ネットワークを シリカで固めることにより、高温処理における触媒金属の 融着を抑制し、ナノサイズのネットワーク構造を維持する ことが示唆された。



図 9. 図 3b の合成法で作製した Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒(熱処理 温度 = 800 °C)の TEM 像

熱処理が原子配列規則度に与える影響を調査するため に、熱処理温度(700℃、800℃、900℃)の異なるサンプル を作製し、XRD 測定を行った。図 10 に示す XRD パター ンから、熱処理による規則配列 fct 構造に由来するピーク (図 10 の*で示したピーク)の強度増加が確認された。fct と fcc を含む 40°付近の(111)面の基本ピークに対する 33° の fct 由来の(110)面のピークの比から規則度を算出したと ころ、熱処理なしの通常の合成法で作製した触媒における 規則度は 44%であるのに対して、新規合成法を用いて 700℃、800℃、900℃の熱処理を施した触媒の規則度は各々 64%, 83%, 80%であり、熱処理に伴う規則度の増加が確認 された。特に、800℃、900℃の熱処理においては、通常の 2 倍近い高い規則度が得られた。



図 10. Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒の XRD パターン: (a) 通常の合成 法(図 3a, 熱処理なし)で作製した触媒. (b-d) 図 3b の合成法を作 製した触媒. 熱処理温度: (b) 700 °C, (c) 800 °C, (d) 900 °C. *規則 配列 fct 構造由来のピーク

以上の結果から、本研究が提案した合成法(図 3b)を用いることで、ナノサイズのネットワークで、且つ高い原子配列規則性を持つ Pt_I-Fe_I ナノ粒子連結触媒を得ることに成功した。

2.2 負荷応答耐久性

上記で得られた規則度の高い触媒を用いて、規則構造が 負荷応答耐久性に与える影響を評価した。金属の溶出を加 速する負荷応答耐久性試験は、燃料電池触媒における標準 プロトコル(0.6 Vで3秒間、1.0 Vで3秒間の保持を1サ イクルとして、この電位サイクルを繰り返す試験)を用い た¹²。負荷応答電位サイクルは、60℃、N2雰囲気下0.1 M HClO4 電解液で行った。サンプルは、通常の合成法(熱処 理なし、3 M NaOH によるシリカ除去)で作製した低規則度 (Low fct, 44%)の触媒と図 3b の合成法(800℃熱処理、10 M NaOH によるシリカ除去)により作製した高規則度の触媒 (High fct, 83%)を用い、負荷応答サイクル後の ORR 表面比 活性から耐久性を議論した。

図11に負荷応答サイクルに対するORR表面比活性の変 化を示す。比較として、市販 Pt/C の結果も示す。高い規 則度の Pti-Fei ナノ粒子連結触媒は、低い規則度の触媒に 比べて、初期の表面比活性が低いものの、Pt/C より高活性 な触媒であることが確認された。一方で、高規則度の触媒 は、非常に耐久性に優れ、一万サイクル後も初期と同程度 の活性を維持した。一方で、低規則度の触媒は負荷応答サ イクルに対する活性の減少が顕著であった。一万サイクル 後の表面比活性で比較すると、高規則度の Pti-Fei ナノ粒 子連結触媒が最も高い活性を示した。



図 11. 負荷応答電位サイクル(60℃、0.1 M HClO₄ 電解液中)に対す る ORR 表面比活性の変化: (●) 高規則度(High fct, 83%)、(▲) 低 規則度(Low fct, 44%)の Pt₁–Fe₁ナノ粒子連結触媒と(■)市販 Pt/C の結果

高規則度の Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒における高耐久性 の要因を調査するために、負荷応答試験後の触媒に関して 構造解析を行った。TEM 観察から、低規則度、高規則度 の双方において、負荷応答一万サイクル後もナノサイズの ネットワークで形成された中空カプセル構造が観察され た。一方で、ネットワーク内部の Fe の残存量と分布に関 して、規則度に依る顕著な違いが確認された。図 12 に STEM-EDX 線分析による負荷応答一万サイクル後のネッ トワーク内部の元素分布を示す。規則度の低い触媒では Fe の残存量が少なく、表面に厚い白金リッチ層が確認さ れ、負荷応答サイクルによる Fe の顕著な溶出が示唆され た。一方で、高規則度の触媒に関しては、Fe がほぼ溶出 しておらず、初期の触媒構造を維持していることが分かっ た。

以上の結果から、高い原子配列規則性は合金金属の溶出 を抑え、負荷応答サイクルに対する耐久性向上に大きく寄 与することが示された。


図 12. 負荷応答-万サイクル後 Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒の (左) HAADF-STEM 像と(右) EDX 線分析結果: (a) 低規則度(Low fct, 44%)、(b) 高規則度(High fct, 83%)

2.3 アルカリ処理条件の影響

図 11 で得られた結果から、800℃熱処理と10 M NaOH 処理を経て作製した高規則度 Pt_1 - Fe_1 ナノ粒子連結触媒の 初期 ORR 表面比活性は、従来の連結触媒(熱処理無し、3 M NaOH 処理)の 6 割程度であることが確認された。触媒活 性は、反応が生じる触媒の表面構造が重要となるため、高 濃度のアルカリ処理により表面構造が変化し、活性が低下 したと推測された。そこで、熱処理後のシリカ除去で使用 する NaOH 濃度を 10 M から 3 M に変更し、触媒活性を 評価した。

図 13 に示すように、800℃熱処理後に 3M NaOH 水溶液 でシリカ除去を行った触媒(High fct, 3 M NaOH, 89%)は、 従来の連結触媒(Low fct, 3 M NaOH, 44%)と同程度の高い 触媒活性を発現することが分かった。このことから、アル カリ処理条件は触媒の表面構造、延いては ORR 活性に強 く影響することが示唆された。

続いて、得られた高規則度で且つ高い初期活性を持つ Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒について、上記と同様の手法で 負荷応答耐久性試験を行った。規則度とアルカリ処理条件 の異なる Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒の初期と負荷応答一万 サイクル後のORR表面比活性の比較を図13に示す。800℃ 熱処理+3M NaOH 処理で合成した高規則度(High fct)の触 媒は、初期活性が高く、一万サイクル後もその高活性を約 8 割維持しており、市販 Pt/C、他の条件で合成した Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒と比べて、耐久性試験後に最も高い触媒 活性を示した。図 14 に示す EDX 線分析結果から、本触媒 は耐久性試験後もネットワーク内の Fe が 8 割程度保持さ れており、高規則度による Fe の溶出抑制が高活性の維持 につながったと示唆された。

以上の結果から、適切なアルカリ処理を施した高規則度のPt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒は高いORR初期活性と優れた 負荷応答耐久性を両立することが示された。



図 13. 規則度とアルカリ処理条件の異なる Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結 触媒と市販 Pt/C における初期と負荷応答一万サイクル後の ORR 表面比活性の比較



図 14. 800℃熱処理+3 M NaOH 処理で合成した高規則度 Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒(High fct, 3M NaOH)における負荷応答ー万サイ クル後の(左) HAADF-STEM 像と(右) EDX 線分析結果

3. まとめ及び今後の展望

本研究では、シリカコートを用いた新規合成法①(図 3b) を用いて、Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒の原子配列規則度の 向上に成功し、さらに、アルカリ処理による表面構造制御 から、高い負荷応答耐久性と高い ORR 活性の両立を初め て実現した。Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒はカーボンフリー であり、起動停止耐久性にも優れている。本触媒は、燃料 電池運転中における触媒劣化の問題を解決する材料であ り、高い ORR 活性を有することから低白金化も可能であ る。

一方で、高規則度を実現する新規合成法①(図 3b)はステ ップ数が多く、またバッチ式の超臨界(高温・高圧)処理を 用いるため、量産プロセスに適さないと考えれらる。そこ で、この有用な触媒の量産化に向けて、企業と連携して、 高規則度の Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒のより簡易な合成法 の確立に取り組んだ。この取り組みに関しては、次項の研 究報告に示す。

【参考文献】

- 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 & Environmental Science*, 2015, 8, 3545–3549.
- H. Kuroki, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, "Nanostructural Control and Performance Analysis of Carbon-free Catalyst Layers using Nanoparticle-connected Hollow Capsules for PEFCs", *Journal of The Electrochemical Society*, 2016, 163(8), F927–F932.
- 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 Applied Energy Materials, 2018, 1(2), 324–330.
- 山口 猛央,小倉 俊,田巻 孝敬, 渕上 輝顕,北本 仁 孝,黒木 秀記,"ガス拡散電極用触媒層、その製造方 法、膜電極接合体および燃料電池",特許第 6086497 号. 2017-2-10.
- T. Yamaguchi, S. Ogura, T. Tamaki, T. Fuchigami, Y. Kitamoto, H. Kuroki, "Catalyst Layer For Gas Diffusion Electrode, Method For Manufacturing The Same, Membrane Electrode Assembly, And Fuel Cell", U.S. Patent, US9799894B2. 2017-10-24.
- Y. Hashimasa, T. Shimizu, Y. Matsuda, D. Imamura, and M. Akai, "Verification of Durability Test Methods of an MEA for Automotive Application", *ECS Transactions*, 2012, 50 (2), 723–732.
- 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 Advances*, 2014, 4(52), 27510–27517.
- 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", *Journal of Power Sources*, 2014, 271, 346–353.
- 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 Applied Materials & Interfaces, 2015, 7, 16311–16321.
- 10. 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", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2016, 55(44), 11458–11466.

- T. Tamaki, A. Koshiishi, Y. Sugawara, H. Kuroki, Y. Oshiba, and T. Yamaguchi, "Evaluation of Performance and Durability of Platinum–Iron–Copper with L1_0 Ordered Face-Centered Tetragonal Structure as Cathode Catalysts in Polymer Electrolyte Fuel Cells", *Journal of Applied Electrochemistry*, 2018, 48(7), 773–782.
- 12. New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), "Cell Evaluation and Analysis Protocol Guideline", 2012.

簡易な合成法による

高規則度 Pt-Fe ナノ粒子連結触媒の開発

黒木 秀記、井村 悠、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、前項で示したように、Pt₁-Fe₁ ナノ粒子 が連結したネットワークから成る、中空カプセル状カーボ ンフリーPt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒の開発に取り組んでい る¹⁻⁵。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、ORR 表面比活性 が約9倍高く、カーボン腐食の問題が回避できるため、 PEFCの起動停止サイクルに対して高耐久である。さらに、 本事業では、より実用的な触媒を目指し、PEFCの負荷応 答サイクルにおける触媒金属の溶出の問題も解決する高 規則度Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒を開発した。

前項で示した新規合成法①(図 1b、以下 SCT & SiO2-AT

法と記載)は、シリカ層で触媒表面を覆うことで、熱処理時における触媒の凝集を抑制し、ナノサイズのネットワークと高規則度を両立した Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒を合成できる。しかしながら、図 1b に示す合成法は、ステップ数が多く、またバッチ式の超臨界(高温・高圧)処理を用いる。そこで、本事業では、企業と連携し、超臨界処理を必要としない、より簡易な合成法(図 1c、新規合成法②、以下 SiO₂-AT 法と記載)を提案した。

SiO₂-AT 法では、まず Pt₁-Fe₁ 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 SiO₂-AT 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 1. (a) 超臨界処理を用いる低規則度触媒の合成法 (SCT 法). (b, c) 高規則度 Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒の合成法: (b) 超臨界処理を 用いる合成法①(SCT & SiO₂-AT 法)、(c) 熱処理のみで高規則度とネットワーク構造を形成する合成法②(SiO₂-AT 法) 本研究では、SiO₂-AT 法による高規則度 Pt₁-Fe₁ ナノ粒 子連結触媒の合成を実証し、さらに規則度の異なる Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒を合成し、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調査した⁶。また、金 属組成比の異なる Pt₁-Fe_x 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。

2. 実験、結果及び考察

SiO₂-AT 法を用いた高規則度 Pt₁-Fe₁ ナノ粒 子連結触媒の開発

図 1b に示す SiO2-AT 法を用いて、規則度の異なる Pt₁-Fe₁ 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 Pt₁-Fe₁ 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℃、 H2/N2雰囲気下、処理時間は1h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 Pt₁-Fe₁ 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_1 - Fe_1 ナノ粒子連結触媒の構造特性(XRDパターンから算出した結晶子径と規則度)を示す。比較として、図1aで示した従来の超臨界処理(SCT)法(超臨界エタノール処理、330℃、約20 MPa)で合成した結果も示す。表1から、500℃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ナノサイズの結晶子径を有することも確認された。

表 1. 異なる条件で合成した Pt₁-Fe₁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 (%)
SCT 法	330°C, <i>ca.</i> 20 MPa	8.5 ± 0.5	46 ± 3
SCT 法 SiO2-AT 法	500°C	9.0 ± 0.8	58 ± 4
	600°C	12.2 ± 2.5	70 ± 3
	700°C	17.9 ± 2.8	76 ± 4

図 2 に超臨界処理法、または SiO₂-AT 法で合成した Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒 TEM 像を示す。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 ーなカプセル構造が観察された。このことから、SiO₂-AT 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。



図 2. (a) SCT 法及び(b-d) SiO₂-AT 法で合成した Pt₁-Fe₁ナノ粒子連 結触媒の TEM 像. SiO₂-AT における熱処理温度: (b) 500°C, (c) 600°C, (d) 700°C

続いて、作製した触媒の酸電解液(0.1 M HClO4 水溶液) 中での電気化学的活性表面積(Electrochemical surface area: ECSA)とORR活性の評価を行った。図3に市販のPt/Cと、 SCT 法と SiO₂-AT 法で合成した Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒 の ECSA、ORR 質量活性(Pt 重量あたりの ORR 活性)およ び表面比活性(Pt 表面積あたりの ORR 活性)の比較を示す。 約2 nm の Pt ナノ粒子を有する Pt/C に比べ、Pt₁-Fe₁ ナノ 粒子連結触媒の ECSA は小さいものの、Pt/C よりも 2~3 倍高い ORR 質量活性を示した(図 3A)。これは、いずれの Pt₁-Fe₁ ナノ粒子連結触媒において ORR 表面比活性が Pt/C よりも 8~10 倍高いことに起因する(図 3B)。本グループの 先行研究において ^{1,3}、本触媒の構造的特徴であるカーボン



図 3. (a) SCT 法及び(b-d) SiO₂-AT 法で合成した Pt₁-Fe₁ナノ粒子連 結触媒の(A) ECSA と ORR 質量活性、および(B) ORR 表面比活性

次に、PEFCの標準プロトコル⁷(60[°]C、0.1 M HClO₄ aq. 0.6 V \Leftrightarrow 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、SCT 法で合成した規則度 46%、SiO₂-AT 法で合成した規則度 58%、76%の3種類の Pt₁-Fe₁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 ECSA、ORR 質量活性、 ORR 表面比活性の変化を示す。比較として、市販 Pt/C の 結果も示す。

図4aに示すように、Pt/Cは初期のECSAが高いものの、 負荷応答一万サイクル後は、初期の50%程度まで減少する。 一方で、Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒の場合、ネットワーク 構造で安定であるため、負荷応答一万サイクル後も 70~90%の高いECSA保持率を示した。さらに、図4cに示 す ORR 表面比活性の変化を見ると、Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結 触媒は規則度が高いほど、高い活性保持率を示すことが確認された。即ち、高規則度のPt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒は、 ECSAとORR表面比活性において高い保持率を示すため、 ORR 質量活性の保持率も高く、一万サイクル後において もPt/Cよりも2~3倍高い質量活性を示した(図4b)。



図4. 規則度の異なる Pt_1 - Fe_1 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(a) ECSA, (b) ORR 質量活性, (c) ORR 表面比活性の変化

図5には、負荷応答一万サイクル後のECSAとORR活

図5には、負荷応答一万サイクル後のECSAとORR活性の保持率をまとめている。規則度の低いPt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒は、負荷応答サイクルに対する活性のECSAとORR保持率が低く、規則度が高くなるに伴い保持率が高い傾向を示した。



図 5. 規則度の異なる Pt₁-Fe₁ナノ粒子連結触媒の負荷応答ー万サ イクル後における ECSA および ORR 活性の保持率. (灰色) ECSA, (水色) ORR 質量活性, (オレンジ) ORR 表面比活性の保持率

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 6A,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 6C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6に示す Pt1-Fe1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でも 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示 された。



図 6. (a) 規則度 46%、または(b) 規則度 76%の Pt₁-Fe₁ナノ粒子連 結触媒における負荷応答-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 金属組成の異なる Pt₁-Fe_x 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、SiO₂-AT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7にSiO₂-AT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 7. SiO₂-AT 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 8)。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 ことを示している。



図 8.純 Pt ナノ粒子連結触媒と市販 Pt/C の ORR 表面比活性の比較

続いて Fe との合金化の効果を議論するために、SiO₂-AT 法を用いて金属組成比(Pt₁-Fe_x, x = 3, 1, 1/3)の異なる Pt₁-Fe_xナノ粒子連結触媒を作製した。図9に示すように、 Pt₁-Fe_xの金属組成は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、Pt₁-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、適切な量の 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 9. Pt₁-Fe_x (x = 3, 1, 1/3, 0)ナノ 粒子連結触媒と市販 Pt/C の ORR 表面比活性の比較

3. まとめ及び今後の展望

本研究は、図 lc に示す超臨界処理を用いない、より簡 便な合成法である SiO₂-AT 法で、高い原子配列規則度を有 するカーボンフリーPt₁-Fe₁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 Pt₁-Fe₁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、SiO₂-AT 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示された。また、 組成比の異なる Pt₁-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。

さらに、SiO₂-AT 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。そのため、 Fe 以外の金属と合金化した Pt 合金ナノ粒子連結触媒の開 発も可能となる。今後、KISTEC での事業で培った知見や 技術を発展させることで、次世代 PEFC でのナノ粒子連結 触媒の実用化が期待される。

【参考文献】

- 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 & Environmental Science*, 2015, 8, 3545–3549.
- H. Kuroki, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, "Nanostructural Control and Performance Analysis of Carbon-free Catalyst Layers using Nanoparticle-connected Hollow Capsules for PEFCs", *Journal of The Electrochemical Society*, 2016, 163(8), F927–F932.
- 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 Applied Energy Materials, 2018, 1(2), 324–330.
- 山口 猛央,小倉 俊,田巻 孝敬, 渕上 輝顕,北本 仁 孝,黒木 秀記,"ガス拡散電極用触媒層、その製造方 法、膜電極接合体および燃料電池",特許第 6086497 号.2017-2-10.
- T. Yamaguchi, S. Ogura, T. Tamaki, T. Fuchigami, Y. Kitamoto, H. Kuroki, "Catalyst Layer For Gas Diffusion Electrode, Method For Manufacturing The Same, Membrane Electrode Assembly, And Fuel Cell", U.S. Patent, US9799894B2. 2017-10-24.
- H. Kuroki, Y. Imura, R. Fujita, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, "Carbon-free Platinum–Iron Nanonetworks with Chemically Ordered Structures as Durable Oxygen Reduction Electrocatalysts for Polymer Electrolyte Fuel Cells", ACS Applied Nano Materials, 2020, 3(10), 9912–9923.
- 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の開発

大柴 雄平、戸松 仁、株式会社日産アーク、山口 猛央

1. はじめに

近年注目を集める燃料電池は、高効率・低環境負荷型の 次世代発電システムとして非常に期待されている分野で ある。とりわけ、固体高分子形燃料電池(Polymer electrolyte fuel cell: PEFC)は、他の燃料電池システムと比較しても、 出力密度が高いことや室温付近での発電が可能であるこ とから、定置用・移動用などの電源として、活発に研究開 発が進められている。その中で 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,図1)を実験と量子化学計算 の双方から明らかにしてきた¹⁻⁵。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。



図 1. ホッピングによるプロトン伝導機構 (Packed acid mechanism)

この研究成果を活かし、本グループでは、図2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⁶。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 (polyperfluorosulfonic acid: PFSA)ポリマーを充填した膜厚 7 µm の非常に薄い電解質膜である。



図 2. 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.

図 3 に市販の低 IEC キャスト膜(Nafion 211)、高 IEC キ ャスト膜、高 IEC 細孔フィリング薄膜の湿潤時の面積変化 率(図 3a)と 80℃でのプロトン伝導性の湿度依存性(図 3b) を示す。図3に結果から分かるように、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 3a)。さらに、高いスルホン酸基酸密を有 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 3b)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 7-10。



図 3. 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(a) 湿潤時の面積変化率と(b) 80℃でのプロ トン伝導性の湿度依存性

本実用化実証事業では、高 IEC 細孔フィリング薄膜の構 造制御およびプロトン伝導チャネル構造の解析を行った。 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 子を明確にすることで、膜のさらなる高性能化へフィード バックできる。

2. 実験、結果及び考察

2.1. 高 IEC 細孔フィリング薄膜の作製条件の検討

高 IEC 細孔フィリング薄膜の作製は、高 IEC の PFSA ポ リマーの溶液を膜厚 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。そこで、本研究は、PFSA ポリマーを多孔 質基材に充填する条件を検討し、膜作製条件がプロトン伝 導性に与える影響を調査した。

まず、異なる溶媒に溶解させた高 IEC の PFSA ポリマー 溶液を用い、細孔フィリング薄膜の作製を行った。ここで は、溶媒として、水/エタノール混合溶媒(H2O:EtOH = 2/1 重量比)と N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を用い、20℃ で乾燥させ、PFSA ポリマーを多孔質基材細孔内に充填さ せた。図 4a に異なる溶媒で作製した高 IEC 細孔フィリン グ薄膜の 80℃でのプロトン伝導性を示す。興味深いこと に、同じ材料を用いたにも関わらず、充填溶媒の違いによ って、異なるプロトン伝導性が示し、水/エタノール混合 溶媒を用いた膜が高い伝導性を示した。特に、低湿度での 伝導性の差が顕著である。図 4b に示すように、40% RH の低湿度において、DMF 溶媒よりも水/エタノール混合溶 媒を用いた方がプロトン伝導における活性化エネルギー は低い値を示した。すなわち、水/エタノール混合溶媒を 用いた細孔フィリング薄膜は低湿度で、よりプロトンを伝 導しやすいことが示唆された。既往の文献において、PFSA ポリマーは溶媒中で異なるモルフォロジー(シリンダー型、 凝集型など)を取ることが報告されている¹¹。このことか ら、充填する際の溶媒は、細孔内のポリマー構造(酸高密 度構造)、延いてはプロトン伝導性に強く影響を及ぼすと 推測された。



図 4. 異なる溶媒(H₂O/EtOH または DMF)を用いて作製した高 IEC 細孔フィリング薄膜の(a) 80℃でのプロトン伝導性と(b) 90% RH, 40% RH での活性化エネルギー

続いて、水/エタノール混合溶媒を用いて、PFSA ポリマ ーを充填する際の乾燥温度(20,60,100°C)を変化させて高 IEC 細孔フィリング薄膜を作製した。その結果、図5に示 すように、より低温の乾燥温度でポリマーを充填させた細 孔フィリング薄膜が高いプロトン伝導性を示した。このこ とから、高温での急速な乾燥では細孔内でプロトン伝導パ スが十分に形成されず、低温で緩やかに乾燥させると連続 的なプロトン伝導パスが発達しやすい可能性が示唆され た。



図 5. 異なる乾燥温度(20,60,100 °C)で作製した高 IEC 細孔フィリ ング薄膜の 80℃でのプロトン伝導性

以上の結果から、高 IEC 細孔フィリング薄膜のプロトン 伝導性は、同じ材料を用いたとしても、その作製条件に大 きく影響されることを見出した。プロトン伝導性の違いは 細孔内部のプロトン伝導チャネル構造(酸高密度構造)が 異なるためと考えられる。そこで、本研究では、日産アー クと共同で、高 IEC 細孔フィリング薄膜の詳細な構造解析 を行った。

2.2. 高 IEC 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ネル構造を有しており、そのチャ 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ミ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。

そこで本研究は、日産アークとの共同研究で、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 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(H₂O: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。

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。TEM-EDX の結果から、基材細孔内部に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ネル 構造を形成することが示唆された。この様に、高 IEC 細孔 フィリング薄膜内部のミクロ構造を解析することに初め て成功した。

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 6 µm 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 膜において、その作製条件(充填時の溶媒や乾燥温度)がプ ロトン伝導性に大きく影響することを見出した。さらに、 日産アークとの共同研究において、高 IEC 細孔フィリング 薄膜は、細孔内部にプロトン伝導チャネル構造(酸高密度 構造)を有することを明らかにした。

本研究は、高 IEC 細孔フィリング薄膜の詳細な構造解析 を引き続き進めており、細孔内のプロトン伝導チャネル構 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。

【参考文献】

- 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", *Electrochemical Communications*, 2006, 8, 133–136.
- 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", *Chemical Science*, 2014, 5, 4878–4887.
- 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", *Analytical Chemistry*, 2014, 86(19), 9362–9366.
- T. Ogawa, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, "Proton Conductivity of Organic–Inorganic Electrolyte for Polymer Electrolyte Fuel Cell", *Chemistry Letters*, 2017, 46, 204–206.
- T. Ogawa, H. Ohashi, T. Tamaki, and T. Yamaguchi, "Proton Diffusion Facilitated by Indirect Interactions Between Proton Donors Through Several Hydrogen Bonds", *Chemical Physics Letters*, 2019, 731, 136627.
- 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", *Journal of Power Sources*, 2018, 394, 67–73.

- T. Yamaguchi, S. Nakao, and S. Kimura, "Plasma-graft filling polymerization: preparation of a new type of pervaporation membrane for organic liquid mixtures", *Macromolecules*, 1991, 24, 5522–5527.
- T. Yamaguchi, F. Miyata, and S. Nakao, "Polymer electrolyte membranes with pore-filling structure for a direct methanol fuel cell", *Advanced Materials*, 2003, 15, 1198–1201.
- 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", *Advanced Materials*, 2007, 19, 592–596.
- 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", *The Journal of Physical Chemistry B*, 113, 2009, 4656–4663.
- C. Ma, T. Yu, H. Lin, Y. Huang, Y. Chen, U. Jeng, Y. Lai, and Y. Sun, "Morphology and properties of Nafion membranes prepared by solution casting", *Polymer*, 2009, 50, 1764–1777.

酸高密度構造型細孔フィリング薄膜を用いた

高温低湿度対応膜電極接合体の開発

大柴 雄平、戸松 仁、小坂 恵夢、山口 猛央

1. はじめに

本グループでは、前項で示したように、高温・低湿度環 境下で優れたプロトン輸送特性を示す高 IEC 細孔フィリ ング薄膜の開発に成功している¹。PEFC においては水管 理が重要であり、幅広い湿度および低温から 100℃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。本グループで開発した高 IEC 細孔フィリン グ薄膜は、高い膨潤抑制能と高温低湿度での高いプロトン 伝導性を両立する膜であり、さらに薄膜化も達成している。 電解質膜の薄膜化は、膜電極接合体(Membrane-electrode assembly: MEA)での運転において非常に重要な要素であ る。PEFC の高温・低湿度運転を行う際、電解質膜の薄膜 化は、拡散距離が短くなることからアノード・カソード間 の水透過を促進し、MEA 全体での湿度管理を容易にする。 さらに薄膜化はイオン伝導抵抗の低減にもつながる。

本グループは、有望シーズ展開事業において、高 IEC 細 孔フィリング薄膜(膜厚 7 µm)を組み込んだ MEA(図 1)の開 発にも取り組んできた¹。



図 1. 酸高密度型高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた膜電極接合 体(MEA)の模式図

図 2a,b にセル温度 80℃、アノード側に H2、カソード側 に O2 を供給し、ガス入口湿度を変化させた発電試験結果 (IV カーブ)を示す。比較として、市販ナフィオン膜(Nafion 211、膜厚 25 µm)を用いた結果も示す。図 2b から、細孔 フィリング薄膜を用いた場合、アノード、カソード共に相 対湿度 20%, 30%の低湿度環境においても、高い発電性能 を示しており、相対湿度の依存性が小さい。一方で、市販 膜においては、湿度が下がるに従い、顕著な性能低下が確 認された(図 2a)。



図 2. (a) 低 IEC 市販膜、(b) 高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA の高温低湿度運転での燃料電池発電性能.運転条件:80°C, 20~60% RH

更なる高温運転での発電試験結果を図 3a, b に示す。こ こでは、ガス入口湿度を 30% RH で一定とし、セル温度を 80~100℃と変化させた。90℃、100℃の高温運転において も、高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA(図 3a)は、 市販膜(図 3b)よりも高い電池性能を示した。高 IEC 細孔フ ィリング薄膜を用いることで、100℃、30% RH の高温低 湿度運転において出力密度は1 W cm⁻²に達した。この様 に、高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA は、従来の 膜では実現できなかった高温低湿運転での高い発電性能 を発現することに成功した。



図 3. (a) 低 IEC 市販膜、(b) 高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA の高温低湿度運転での燃料電池発電性能. 運転条件: 80~100℃, 30% RH.

そこで、本実用化実証事業では、高温低湿運転での高い 発電性能の要因を詳細に探るために、MEA 内部の水移動 に着目した評価・解析を行った。さらに、高 IEC 細孔フィ リング薄膜の実用化に向けて、MEA 実作動環境下での高 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だ²。

2. 実験、結果及び考察

2.1. 高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA の 高温低湿度運転

図 2,3 で示した高温低湿度運転での高い発電性能の要 因を調査するために、電流遮断法から求めた膜 IR 損を比 較すると、高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA では、 市販ナフィオン膜の MEA よりも顕著に IR 損が小さいこ とが確認された(図 4)。この IR 損の低減が高温低湿度運転 での電池性能の向上につながったと示唆された。また、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傾向が観察され

た。そこで、本研究は、MEA 内部の水移動に着目して、 IR 損低減の要因を調査した。高温低湿度で電流を印加し、 アノードおよびカソード出口の湿度を精密露点計で評価 したところ、細孔フィリング薄膜を用いた MEA では、ア ノードとカソードの湿度は同程度であり、MEA 全体でバ ランスのとれた湿度であることが確認された。一方で、膜 厚の厚いナフィオン膜においては、アノード側で低い湿度 を示した。カソード側では反応により水が生成する。細孔 フィリング薄膜の場合、ナフィオン膜よりも薄膜であるた め、高い水透過度を示す。つまり、細孔フィリング薄膜を 用いた MEA では、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 損の低減につながったと 示唆された。このことから、細孔フィリング薄膜を用いた MEA における高温低湿度運転での高い発電性能は、薄膜 化による水透過の促進が要因の一つであることが明らか となった。



図 4. (●) 高 IEC 細孔フィリング薄膜、(●) 市販ナフィオン膜 (Nafion 211)を用いた MEA の高温低湿運転における膜 IR 損. 運転 条件: (a) 80°C, 20% RH, (b) 100°C, 30% RH

さらに、膜を透過する水素クロスオーバー量(膜を通っ てアノードからカソードに透過する水素の量)を MEA で の電気化学測定から評価した。市販ナフィオン膜(膜厚 25 μm)または低 EW 細孔フィリング薄膜(膜厚 7 μm)を用い た MEA の水素クロスオーバー電流値の相対湿度依存性を 図 5 に示す。一般的に、膜が薄くなれば、水素クロスオー バー量は増加するが、細孔フィリング薄膜は、膜厚が市販 膜の 1/4 ほどであるにも関わらず、市販膜と同程度の水素 クロスオーバー量を示した。これは、細孔フィリング薄膜 では、超高分子量ポリエチレン基材が内部の電解質ポリマ ーの膨潤を効果的に抑制したことにより、水素クロスオー バー量を低減したと考えられる。



図 5. (●) 高 IEC 細孔フィリング薄膜、(●) 市販ナフィオン膜 (Nafion 211)を用いた MEA における水素クロスオーバー電流密度. 運転条件: 80℃, 30~100% RH

2. 2. 高 IEC 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、実用化を見据えて、高温低湿度運転におけ る高 IEC 細孔フィリング薄膜の耐久性を評価した。ここで は、膜の化学的耐久性を評価する加速試験として、開回路 電圧(Open circuit voltage: OCV)保持試験を行った。OCV 保 持試験の標準プロトコル³は、90°C、30% RH であるが、 本研究では 100°C 以上の高温運転を指向し、より過酷な 110°C、30% RH の条件で OCV 保持試験を行った。

図 6a に示すように、高 IEC 細孔フィリング薄膜(膜厚 9 µm)は、市販ナフィオン膜(膜厚 25 µm)よりも薄膜である にも関わらず、同程度の OCV 保持性能を示した。また、 膜を介してアノードからカソードに透過する水素クロス オーバー量(水素クロスオーバー電流密度)においても、同 程度の保持時間でクロスオーバー量の増加が確認された (図 6b)。

さらに、アノード、カソード出口側の排出水に含まれる フッ化物イオンの量から膜劣化を評価した。図7に示すよ うに、ナフィオン膜を用いた MEA では高いフッ化物イオ ン排出速度を示しており、膜の著しい化学的劣化が示唆さ れた。一方で、細孔フィリング薄膜では、非常に低いフッ 化物イオン排出速度を示した。



図 6. (●) 高 IEC 細孔フィリング薄膜及び(■) 低 IEC 市販膜を用い た MEA の OCV 保持耐久性. (a, b) 110°C, 30% RH での OCV 保持 試験における(a) OCV と(b) 水素クロスオーバー電流密度の時間 変化



図 7. (●) 高 IEC 細孔フィリング薄膜および (■) 市販ナフィオン 膜を用いた MEA の OCV 保持試験におけるフッ化物イオン排出速 度の時間変化

続いて、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 8a の膜断面 SEM 像で示すように、 初期のナフィオン膜は 29 µm の膜厚を有する。一方で、 OCV 保持試験後の MEA 断面 SEM 像(図 8b)から、膜厚は 約 6 µm 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、既往の文献⁴においても OCV 保持後に膜厚が減少することが報告されている。これは、 OCV 保持試験中に生成するラジカル種により膜が化学的 に劣化することに起因する。ナフィオン膜の化学的劣化は、 膜の分解生成物に由来するフッ化物イオンの排出速度が 大きいことからも示唆されている。



図 8. (a) 市販ナフィオン膜の断面 SEM 像、(b) 110℃、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

一方で、細孔フィリング薄膜においては、図 9a, 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 9b, 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。細孔フィリング膜は、基材による 高い膨潤抑制能が燃料の透過を抑制する^{1,5,6}。このことか ら、劣化を引き起こすラジカル種も同様に、細孔フィリン グ膜の内部への拡散は抑制され、内部に充填された PFSA ポリマーの劣化が抑えられたと考えられる。この様に、従 来のナフィオン膜と細孔フィリング薄膜は、MEA 運転 (OCV 保持)時に異なるメカニズムで劣化することが示唆 された。



図 9. (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℃、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 細孔フィリング薄膜を組み込んだ MEA に関して、水移動に着目した調査を行い、薄膜化に よる高い水透過度が MEA 全体での適切な湿度管理を実現 し、高温低湿度運転での高い発電性能につながったことを 明らかにした。さらに、高 IEC 細孔フィリング薄膜は市販 膜より薄いにも関わらず、同程度の水素クロスオーバー量 であり、ガス透過阻止性に優れた膜であることも確認され た。

加えて、細孔フィリング薄膜を用いた MEA は、市販の ナフィオン膜よりも薄いにも関わらず、同程度の OCV 保 持性能を有する化学的耐久性に優れた膜であることを実 証した。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、化学的に強い超高分子量ポリエチレン多孔基材を 用いたためと考えられる。

高 IEC 細孔フィリング薄膜を用いた MEA は、従来の膜 では実現できなかった 100℃、低湿度での高い電池性能を 実現している。100℃以上の高温運転は水の潜熱を回収で きるため、発電効率の向上につながる重要な結果である。 さらに、細孔フィリング薄膜は高い膨潤抑制能と高いプロ トン伝導性に加え、薄膜であるにも関わらず、ガス透過阻 止性も高いことが分かった。このことから、高 IEC 細孔フ ィリング薄膜は、燃料電池電解質膜の必要性能を満たして おり、次世代 PEFC に対して非常に有望な膜であることが 示された。

【参考文献】

- 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", *Journal of Power Sources*, 2018, 394, 67–73.
- Y. Oshiba, M. Kosaka, and T. Yamaguchi, "Chemical Durability of Thin Pore-filling Membrane in Open-circuit Voltage Hold Test", *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, 44(54), 28996–29001.
- 3. New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), "Cell Evaluation and Analysis Protocol Guideline", 2012.
- W. Liu and M. Crum, "Effective Testing Matrix for Studying Membrane Durability in PEM Fuel Cells: Part I. Chemical Durability", *ECS Transactions*, 2006, 3(1), 531–540.
- 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", *Advanced Materials*, 2007, 19, 592–596.
- H. Jung, H. Ohashi, T. Tamaki, and, T. Yamaguchi, "Improvement in Thermal Stability of Anion-exchange Membranes for Fuel Cell Applications by Controlling Water State", *Chemistry Letters*, 2013, 42(1), 14–16.

業績

【原著論文】

 Hidenori Kuroki, Yu Imura, Ryosuke Fujita, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi "Carbon-free Platinum–Iron Nanonetworks with Chemically Ordered Structures as Durable Oxygen Reduction Electrocatalysts for Polymer Electrolyte Fuel Cells" ACS Applied Nano Materials, 3(10), 9912–9923 (2020).

ACS Applied Nano Materials, 3(10), 9912–9923 (2020) DOI: 10.1021/acsanm.0c01962

 Roby Soni, Shoji Miyanishi, Hidenori Kuroki, and Takeo Yamaguchi
 "Pure Water Solid Alkaline Water Electrolyzer Using Fully Aromatic and High-Molecular-Weight Poly-(fluorene-alt-tetrafluorophenylene)-Trimethyl Ammonium Anion Exchange Membranes and Ionomers", ACS Applied Energy Materials, in press, (2021). DOI: 10.1021/acsaem.0c01938

【総説】

- 田巻孝敬、山口猛央
 「高性能・高耐久な担体フリー・ナノ粒子連結触媒 燃料電池・水電解への展開-」
 クリーンエネルギー, 29(5), 6-9 (2020).
- 黒木秀記 「固体高分子形燃料電池におけるナノ構造体触媒の 研究動向」 化学工学会誌, 84(11), 598 (2020).
- 黒木秀記、田巻孝敬、山口猛央 「水素・燃料電池・水電解技術の未来とナノ粒子を連 結した担体フリー電気化学触媒」 鉱山, 73(9), 20–31 (2020).

【口頭発表】

(招待・依頼講演)

・国内学会

- 山口猛央
 「水素・燃料電池・水電解技術の未来と金属ナノ粒 子を連結した担体を用いない電気化学触媒」
 日本鉱業協会、新材料部会研究会 2020 年度第1回講 演会、オンライン開催、2020 年9月 29 日
- 山口猛央
 「水素・燃料電池技術の必要性と高性能・高耐久燃

料電池のシステム的な設計および開発」 燃料電池開発情報センター(FCDIC)、研究会「燃料電 池・水素技術の基礎と応用」、オンライン開催、2020 年 10 月 14 日

(一般講演)

・国際学会

- Hidenori Kuroki, Yu Imura, Ryosuke Fujita, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi "Carbon-Free Connected Platinum–Iron Catalysts with Enhanced Chemically Ordered Structures as Durable Oxygen Reduction Electrocatalysts for PEFCs" PRiME 2020, Digital meeting, October 4–9 (2020).
- Yoshiyuki Sugita, Takanori Tamaki, Hidenori Kuroki, and Takeo Yamaguchi "Carbon-free connected Ir-Ru nanoparticle catalysts for polymer-electrolyte water electrolysis" PRiME 2020, Digital meeting, October 4–9 (2020).
- Yuhei Oshiba, Jin Tomatsu, Meguru Kosaka, and Takeo Yamaguchi
 "Thin pore-filling polymer electrolyte membranes and

their chemical durability for polymer electrolyte fuel cells" ICOM 2020, Digital meeting, December 9 (2020).

・国内学会

- Liao Qiancheng、黒木秀記、田巻孝敬、山口猛央 「Structural Control of Connected Pt-Co Catalysts for Enhanced Oxygen Reduction Performances」 化学工学会第 51 回秋季大会、オンライン開催、2020 年9月 24 日
- 大平啓志郎、黒木秀記、大柴雄平、山口猛央 「固体高分子形燃料電池の高電圧運転に向けた水に よる白金酸化挙動の評価」 化学工学会第 51 回秋季大会、オンライン開催、2020 年9月24日
- 3. 黒木秀記、井村悠、藤田遼介、田巻孝敬、山口猛央 「PEFC 用高耐久酸素還元触媒のための超格子 Pt-Fe ナノ粒子連結触媒の開発」 化学工学会第 51 回秋季大会、オンライン開催、2020 年9月 25 日
- 4. 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構造制御」 化学工学会第 51 回秋季大会、オンライン開催、2020 年 9 月 25 日

- 5. 鈴木瑛斗、黒木秀記、田巻孝敬、山口猛央 「固体アルカリ燃料電池におけるギ酸塩酸化用 Pd 系 コアシェル型ナノ粒子連結触媒の開発」 化学工学会第 51 回秋季大会、オンライン開催、2020 年9月 25 日
- 6. 田巻孝敬、黒木秀記、山口猛央
 「固体高分子形燃料電池カソード用ナノ粒子連結触媒の開発」
 第46回固体イオニクス討論会、オンライン開催、2020年12月9日
- 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 IrRu ナノ粒子連結触媒の表 面構造制御」 化学工学会第86年会、オンライン開催、2021年3月 20日
- 黒木秀記、Roby Soni、宮西将史、山口猛央 「高分子量全芳香族高分子電解質を用いた固体アル カリ水電解用膜電極接合体の開発」 化学工学会第86年会、オンライン開催、2021年3月 21日
- 9. 鈴木瑛斗、黒木秀記、田巻孝敬、山口猛央 「固体アルカリ燃料電池におけるギ酸塩酸化用担体 フリーPdRuナノ粒子連結触媒の構造制御」 化学工学会第86年会、オンライン開催、2021年3月 22日
- 10. 黒木秀記、田巻孝敬、山口猛央 「PEFC 酸素還元反応用カーボンフリーナノ粒子連結 触媒の開発」 日本化学会第 101 春季大会、オンライン開催、2021 年3月22日
- 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のための IrRu ナノ粒子連結触 媒の表面構造制御」 電気化学会第88回大会、オンライン開催、2021年3 月23日

【特許】

(1) 国内特許出願 1件

「次世代医療福祉ロボット」グループ

グループリーダー 下野 誠通

【基本構想】

本研究グループでは、平成28年度~平成31年度に実施した有望シーズ展開事業で得られた研究開発成 果を基に、リアルハプティクスを援用したヘルスケアシステムの実用化研究を推進する。特に、力触覚情 報を活用することによって高い安全性や新しい診断機能を獲得した高付加価値な医療デバイス、遠隔触診 を実現するネットワークシステム技術、革新的な手術支援ロボットなどの開発を行う。そして、殿町(川 崎市川崎区)に新しく設置した本研究グループの産学公連携拠点において産業界とも密に連携することで、 開発技術の社会実装へと繋げることを目指す。

1. 2020 年度の研究目的

実用化実証事業としてのプロジェクトー年目となる 2020年度では、以下の項目を重点研究テーマとして定め、 開発技術の実用化研究を実施する。これにより、これまで のプロジェクト研究で得られた研究成果の社会実装へと 繋げていくことを目的とする。

(1) 医療デバイスの開発研究

整形外科応用領域においては、日本医療研究開発機構 (AMED)医療分野研究成果展開事業「産学連携医療イノベ ーション創出プログラム」セットアップスキーム(ACT-MS) による支援の下、リアルハプティクスを援用した脊椎貫通 検知と自動停止機能を有する骨ドリルの開発研究を行い、 慶應義塾大学医学部整形外科学教室とセットアップ企業 と連携して、開発技術の有用性を明らかにする非臨床実験 を実施する。

脳神経外科応用領域においては、慶應義塾大学医学部脳 神経外科学教室との連携により、力触覚を有する脳神経外 科手術支援デバイスの改良研究を実施すると共に、非臨床 実験により正常脳組織と腫瘍組織との判別機能の有用性 を実証する。さらに、2020年度は特に臨床実験への移行 準備を進める。

呼吸器内科領域においては、慶應義塾大学医学部呼吸器 内科および同大学薬学部との連携により、慢性呼吸器疾患 治療の高度化に向けた吸引動作センシングデバイスの改 良研究を実施する。

そのほか、鋭敏な力触覚伝送機能を持った診断装置や、 画像情報や力情報を活用した新しい動作ナビゲーション 機能を持った手術支援ロボットの開発研究を継続して実 施する。

(2) 医療シミュレータの開発研究

前述の AMED・ACT-MS の支援の下、骨ドリルを通して得 られた力触覚を再現し、切削動作のトレーニング応用が可 能なドリルシミュレータの開発を行う。また、AMED 未来 医療を実現する医療機器・システム研究開発事業「術者の 技能に依存しない高度かつ精密な手術システムの開発」に おける分担研究として、マイクロサージャリー支援ロボッ トを通じた動作訓練を可能とするシミュレータインタフ ェースの開発を進める。

(3) 人間支援ロボットの開発研究

有望シーズ展開事業で得られたリハビリテーション支援ロボットや介護支援ロボットなど、人間支援ロボットの 試作開発成果を基に、グループリーダーが所属する横浜国 立大学の理工系、社会科学系、人文学系の様々な分野の研 究者らと協力して、実証フィールドとしての地域連携体制 を構築する。産業界との連携を通して、研究成果や開発要 素技術の社会実装へと段階的に移行することを目指す。

2. 2020 年度の研究成果

2020 年度においては、各重点研究テーマにおいて、以 下の具体的な研究成果を得ることができた。

(1) 医療デバイスの開発研究

整形外科応用領域においては、AMED・ACT-MS のプロジ ェクト研究として、ハプティック骨ドリルの改良開発を行 った。昨年度末に試作した骨ドリル試験機(図1)を用い た豚脊椎に対する検証実験を慶應義塾大学医学部と協力 して実施した。さらに実用化に向けた装置改良を行い、脊 椎貫通時の自動検知機能、ドリル緊急停止機能といったア ルゴリズム開発を行った。改良試作機を用いた評価試験結 果より、人が検知するよりも速く貫通を自動検出すること が可能であり、また貫通後のドリル進行を飛躍的に低減す うることができることを実証するなど、開発技術の有用性 を確認することができた。さらに、これらの技術をボーン ソーやハンディドリルにも応用可能であることを、各種試 作機を用いた検証実験から示した。

脳神経外科領域では、これまでのハプティック鑷子研究 を通じて得られた知見を活かし、腫瘍組織の剛性測定を円 滑に実施するための新たなデバイス試作を行った(図2)。 また、基礎検証実験から、腫瘍組織領域の自動判別の実行 可能性を確認することができた。

呼吸器内科領域においては、開発した吸引動作センシン グデバイスを用いた臨床試験を実施した。吸引装置の操作 誤りを、センサ情報から判別可能であることが示唆される 実験結果を得ることができた。



図1 試作した力触覚ドリル



図2 試作したペン型組織剛性計測装置



AMED・ACT-MS の支援を受けて、開発したハプティック ドリルを通して得られた力触覚情報から切削環境をモデ ル化し、バーチャル環境からの力触覚を再現可能なドリル シミュレータの開発を行った(図4)。特にドリルを回転 していないときの接触感や、ドリル回転時の切削抵抗感な どを再現可能であることを確認した。

また、マイクロサージャリー支援ロボットを通じた動作 訓練を可能とするシミュレータインタフェースの開発に おいては、屈曲針の刺入動作を再現可能なシミュレータ開 発や、マイクロサージャリーにおける微細な動作を実現可 能な操作インタフェースの設計試作を完了した。



図4 ハプティックドリルシミュレータ



図5 屈曲針の刺入シミュレータ

(3) 人間支援ロボットの開発研究

リハビリテーション支援ロボットや介護支援ロボット といった人間支援ロボット研究に関する地域連携体制を 構築するために、本研究グループのグループリーダーが所 属する横浜国立大学の若手・中堅研究者によって組織され る若手研究拠点と密に連携することで、リビングラボの立 ち上げを行った。今後は、有望シーズ展開事業で開発した



図3 画像情報を活用した AR による動作支援

そのほか、遠隔触診等への画像情報と力触覚情報を統合 利用に関するネットワークシステム研究では、両情報に基 づいた機械学習により対象物の二値分類精度が向上する ことを明らかにした。また、画像情報を動作ナビゲーショ ンに活用するための拡張現実感技術の開発を行った(図 3)。 下肢機能支援装置などの有用性の評価研究をリビングラ ボ活動を通じて実施する予定である。

3. 今後の展望

本研究グループでは、これまでの KISTEC プロジェクト 研究で得られた研究成果を発展させる形で、リアルハプテ ィクスを援用した様々なヘルスケアシステムの社会実装 研究を推進している。特に医療デバイス応用に関する研究 テーマでは、産業界との連携体制が構築できてきており、 今後も外部資金を活用しながら実用化に向けた開発研究 を進めていく予定である。また、これまでの人間支援ロボ ットの開発研究を通して得られた動作支援技術や動作評 価技術については、今後の様々な機器開発のための要素技 術として利活用することができるよう、地域連携/産学公 連携活動を展開していく予定である。

環境情報に基づいた仮想環境提示の機能を有する

2自由度力触覚ドリルの開発

松永 卓也

1. はじめに

整形外科手術では脊椎の切削のために医療用ドリルが 用いられる。脊椎内部には中枢神経を構成する脊髄が存在 し、脊髄損傷は患者の身体に障害が生じる原因となる。執 刀医は医療用ドリルを精細に扱う技能が要求され、かつ慎 重に切削を進める必要があり、手術が大きな負担となる。 したがって、整形外科手術における治療行為支援や医師の 技能向上等に貢献する技術の実現が期待されている。

医療分野では手術支援のためにロボット技術の研究開 発が進められており、整形外科分野においても CT データ に基づいた術前の計画に従って大腿骨を切削する多自由 度ロボット[1]や、高精度な椎弓根スクリュー挿入のための ガイド装置[2],[3]が開発されている。また、技能向上のた めのトレーニングシステムに応用可能な技術として、アク チュエータを備えた装置を介して仮想空間の力触覚情報 を提示する力触覚レンダリングの研究がおこなわれてい る[4][5]。さらに、マスタ・スレーブシステムを介した作 業で得た接触対象物(環境)の力触覚情報を利用し、マス タロボットで力触覚レンダリングをおこなうシミュレー タの研究[6][7]が進められている。

1. 1 2自由度力触覚ドリル

本研究では、実空間の環境(実環境)の切削における操 作者支援が可能なドリル装置および実環境に対する接触 動作で得られる情報に基づいて構築した仮想空間の環境 (仮想環境)を提示するドリルシミュレータとして利用可 能な2自由度力触覚ドリル(図1)を開発する[8]。

1.1.1 機構

本研究で試作した2自由度力触覚ドリルは図2に示す構造を有し、筐体内部にリニアモータ、回転モータ、二つの 直動関節を備える。リニアモータのコイルハウジングを含む可動部(可動部1)は直動関節1、シャフトを含む可動部(可動部2)は直動関節2を介して筐体に接続される。 医療用ドリルビットの回転に使用する回転モータは可動部2に含まれる。可動部1の一部はハンドルとして筐体外にあり、ドリル先端位置の操作やシミュレータにおけるインターフェースとなる。回転モータはエンコーダを内蔵し、ドリルビットの回転角度を取得する。一方、リニアモータで駆動する可動部は二台のエンコーダを備える。エンコーダ1は筐体に対する可動部1の位置、エンコーダ2は可動



図1.2自由度ドリル試作機



部1に対する可動部2の位置を計測する。リニアモータは 制御、直動関節は機構による固定が可能であり、固定部を 切り替えることで装置の機能が変化する。

1.1.2 機能

ドリル試作機の機能は4種類に分類される。直動関節1 が機構的に固定され、かつリニアモータのコイルハウジン グに対するシャフトの位置が制御で固定される場合、装置 の可動部は回転モータで駆動するドリルビットのみであ る。従来の医療用ドリルと同様に筐体を保持し、先端を環 境に接触させることで使用可能である。一方、リニアモー タのシャフトの位置が制御によって変化する場合には、筐 体に対する先端部の位置を自動的に変化させて切削を進 めることができる。直動関節1が固定されない場合、作業 者はハンドルを介して可動部 1 をマニュアル操作するこ とが可能である。このとき、リニアモータが制御で固定さ れている状態では、ハンドルの移動距離は先端部の移動距 離と等しい。制御で固定しない場合にはハンドルを介して 伝達される動作を加工することが可能である。いずれの機 能においてもドリル回転時は切削動作、停止時は接触動作 となる。

実環境を対象とした3つの機能に対して、シミュレータ では仮想環境を切削、接触の対象とする。直動関節2を機 構的に固定することで、リニアモータで発生する力を可動 部1のハンドルを介して作業者に提示する力触覚レンダ リングが可能となる。

1. 2 動作制御

装置が内蔵する各アクチュエータは外乱オブザーバ[9] を用いたロバストな加速度制御によって駆動する。回転モ ータは速度制御で駆動し、速度指令値を変化させることで ドリルビットの回転と停止を切り替える。一方、リニアモ ータの制御は2自由度力触覚ドリルの機能に応じて変化 する。

実環境を対象とした機能では、リニアモータは位置制御 で動作する。加速度参照値 s²X^{ref}は次式で与えられる。

 $s^2 X^{ref} = C_p(s) (X^{cmd} - X_2^{res})$ (1) $C_p(s), X^{cmd}, X_2^{res}$ は位置制御器、位置指令値、位置応答値を 表す。リニアモータの位置制御において、応答値にはエン コーダ2で取得した情報が用いられる。指令値を一定値に 設定することで、リニアモータのコイルハウジングに対す るシャフトの位置が固定される。一方、直動関節1が固定 されている場合、指令値を変化させることで先端部を自動 的に前進させることができる。マニュアル操作ではハンド ルの動作を計測するエンコーダ1の情報 X_1^{res} に応じて指 令値を変化させることで位置情報の増幅がおこなわれる。 マニュアル操作における位置指令値は次式で与えられる。

 $X^{\text{rmd}} = (1 - \alpha) X_1^{\text{res}} / \alpha$ (2) α は位置スケーリングを表す。また、エンコーダ1とエン コーダ2の値の和が先端部の位置となる。

2自由度力触覚ドリルは力センサレスであるため、反力 推定オブザーバにより力情報を得る[10]。実環境に対する 接触や切削において位置情報と力情報を得ることで環境 情報の抽出が可能となる。仮想環境を対象としたシミュレ ータでは、抽出された環境情報に基づいてパラメータを設 計したコンプライアンス制御で力触覚情報を提示する。す なわち、直動方向については2自由度力触覚ドリルのみで 実環境に対する接触、切削による情報取得と、シミュレー タとしての力触覚情報提示が可能である。本研究では、仮 想環境に対する接触で発生する反力をコンプライアンス 制御の仮想剛性で提示する。切削動作では仮想粘性で擬似 的な切削力を提示し、同時に仮想環境の位置を更新するこ とで切削の進行を表現する。

2. 実験と結果

2自由度力触覚ドリルの試作機を使用し、マニュアル操作による接触動作とシミュレータによる仮想環境提示をおこなった。

2.1 マニュアル操作による接触動作

発泡スチロールを実環境として使用し、位置スケーリン グα=1,2の条件下でマニュアル操作による接触をおこな



図3. マニュアル操作による接触動作





図 5. ドリルシミュレータによる仮想環境提示

った(図 3)。各条件について 2 度の自由動作と接触動作 をおこなった。

実験結果として位置応答値、力応答値を図4に示す。図 4(a), (b)に示す位置スケーリング α =1の結果では、ハンド ルの動作を示すエンコーダ 1 の値と先端位置の動作が一 致した。そして、0 秒から 10 秒における自由動作で発生 した反力が小さく、操作力が無視できる大きさであること を確認できる。10 秒から 25 秒における接触動作では環境 反力が推定された。図4(c), (d)に示した位置スケーリング α =2の結果では、ハンドルの変位が先端部の変位の2倍 となり、位置情報が増幅された。

2.2 シミュレータによる仮想環境提示

2自由度力触覚ドリルの試作機にグラフィックインター フェースを加えたシミュレータを用いて、仮想環境に対す る接触動作と切削動作をおこなった(図 5)。予備実験に おいてマニュアル操作で発泡スチロールに対する接触、切 削動作をおこない、コンプライアンス制御の仮想剛性と仮



想粘性の値を決定した。グラフィックインターフェースで は試作機と同期して変化するドリルビットと仮想環境を OpenGL で描写した。

シミュレータの実験における位置、力応答値を図6に示 す。実験前半の接触動作では押し込み量に応じた反力が発 生し、仮想環境の剛性が提示された。後半の切削動作では 移動速度に応じた反力が仮想粘性によって発生し、擬似的 な切削力が提示された。また、仮想環境の位置が更新され たことで、切削後にドリルビットが仮想環境から離れる際 には反力が発生しなかった。

3. 考察及び今後の展望

2自由度力触覚ドリルの試作機を用いた検証実験の結果 から、実環境を対象としたマニュアル操作では先端部が接 触した環境の力触覚が操作者に伝達され、また、位置スケ ーリングによる動作の加工が可能であることが確認され た。さらに、マニュアル操作で得た環境情報に基づいて仮 想環境を構築し、ドリル試作機を用いたシミュレータで提 示可能であることを確認した。

本研究では、ドリル回転軸と平行な一自由度の直線運動 のみを環境情報抽出や仮想環境提示の対象としたが、3次 元空間の運動を対象とする場合にはアクチュエータ数の 増加による大型化や質量増加等の問題を考慮する必要が ある。また、仮想環境提示において単純なモデルを使用し たが、シミュレータの性能を高めるためには、より詳細な 仮想環境モデルを構築する必要がある。

今後はドリル試作機の機構改良と並行して、シミュレー タで提示する仮想環境の詳細なモデル化をおこなう計画 である。 本研究は, AMED の課題番号 JP20im0210818 の支援を 受けた. ここに謝意を表する.

【参考文献】

1. W. L. Bargar, A. Bauer, and M. B⁻orner, Clinical Orthopaedics and Related Research, vol. 354, pp. 82–91, Sep. 1998.

N. Lonjon, E. Chan-Seng, V. Costalat, B. Bonnafoux, M. Vassal, and J. Boetto, European Spine Jorunal, vol. 25, no. 3, pp. 947–955, Mar. 2016.

3. W. Sukovich, S. Brink-Danan, and M. Hardenbrook, The International Journal of Medical Robotics and Computer Assisted Surgery, vol. 2, no. 2, pp. 114–122, Jun. 2006.

4. V. B. Chial, S. Greenish, and A. M. Okamura, in Proceedings of 10th Symposium on Haptic Interfaces for Virtual Environment and Teleoperator Systems, Mar. 2002, pp. 80–87.

5. K. E. MacLean, in Proceedings of Haptic Interfaces for Virtual Environments and Teleoperator Systems, Nov. 1996, pp. 459–467.

6. T. Shimono, S. Katsura, and K. Ohnishi, IEEE Transactions on Industrial Electronics, Vol. 54, No. 2, pp. 907–918, Apr. 2007.

7. K. Yu, T. Matsunaga, H. Kawana, S. Usuda, and K. Ohnishi, IEEJ Journal of Industry Applications, vol. 6, no. 1, pp. 66–72, Jan. 2017.

8. T. Matsunaga, T. Shimono, K. Ohnishi, S. Takano, H. Kobayashi, M. Yagi, and M. Nakamura, in Proceedings of 2021 IEEE International Conference on Mechatronics, Mar. 2021.

9. K. Ohnishi, M. Shibata, and T. Murakami, IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, vol. 1, no. 1, pp. 56–67, Mar. 1996.

10. T. Murakami, F. Yu, and K. Ohnishi, IEEE Transactions on Industrial Electronics, vol. 40, no. 2, pp. 259–265, Apr. 1993.

貫通検知機能を有する整形外科用力触覚ドリルの開発

高野 俊也

1. はじめに

整形外科手術では脊椎切削時に医療用ハンドドリルを 用いて切削を行う。しかしながら,脊椎の中には脊髄が通 っており,傷付けると下半身不随等の後遺症を起こす場合 がある。そのため,脊椎切削時には医師は脊髄を損傷しな いよう,慎重に手術を進める必要がある。現在では,手の 感覚と目視により医師の判断で切削を止めているが,手に 力が入ってしまい手の感覚を感じにくくなってしまうな ど困難が伴う。

このような背景から, 鋭敏に力触覚を伝え, かつ脊椎貫 通時に自動停止する機能を搭載した, 高い安全性を有する ドリルの開発が期待されている。

ロボット技術を応用したドリル研究は数多く行われて おり、貫通停止の試みも行われている。Lee らは、推力、 回転トルクを用いて閾値を設けることによって貫通停止 を行うドリルシステムを開発している[1]。長らは、加速度 やドリルの回転速度などから SVM(Support Vector Machine)を用いた整形外科用ドリルによって、模擬骨を 用いて貫通停止を行った[2]。Diaz らは、センサを用いず、 位置制御での誤差を基に貫通の検知を行い、豚の骨を用い て貫通実験を行った[3]。Aziz らは、センサで力を測定し て、その力の変位分を用いることで貫通の検知ができるこ とを示した[4]。

しかしながら、これらの研究はロボットによる切削であ り、医師の操作によるものではない。そのため、従来の手 術方法と異なり、使用する場合はトレーニングが必要とな る。

よって本研究では、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 ーブー体型の整形外科用ハンドドリルを開発する。

1. 1. 力触覚伝達

マスタ・スレーブシステムにおける力触覚の伝達には加 速度制御に基づくバイラテラル制御を使用する。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の伝達を実現している [5, 6]。 バイラテラル制御の制御目標は式(1), (2)となる。式(1)よ りマスタの位置 Xmとスレーブの位置 Xsを一致させ,式(2) よりマスタに加わる反力 Fmとスレーブに加わる反力 Fsに 作用反作用の法則を成立させる。式(1), (2)を同時に満た すことでマスタ・スレーブ間に力触覚が伝達される。

$$X_m - X_s = 0 \tag{1}$$

 $F_m + F_s = 0 \tag{2}$



図 1. マスタ・スレーブー体型ドリル



図 2. マスタ・スレーブー体型ドリルの概略図

バイラテラル制御では各モータの位置及び力を高精度 に制御する必要があるため、外乱オブザーバ(DOB)を用い たロバストな加速度制御を行う[7]。

1.2.マスタ・スレーブー体型ドリル

図1,2に開発したマスタ・スレーブー体型ドリルの構造を示す。2つの直動モータを一直線状に配置し、スイッチを搭載した持ち手側をマスタ、ドリル刃と回転モータを搭載した側をスレーブとして、マスタ・スレーブ間でバイラテラル制御を行う。これによりスレーブ側のドリルで削った感覚がマスタ側の手元に伝達される。ドリル刃と回転モータはスレーブ側の直動モータに取り付けており、直動モータと共に前後に動作を行う。

ドリル刃はマスタ側のスイッチを押している間回転を 行う。これは従来のハンドドリルが手元のスイッチを押す ことで回転する構造となっているため,同様の操作となる ようスイッチでの操作とした。

2. 実験と結果

2. 1. 実験内容

開発したマスタ・スレーブー体型ドリルについて,以下 の実験を行った。

- (1) バイラテラル制御によるマスタ・スレーブ間の 力触覚伝達の確認
- 〈2〉 木材切削による貫通時の動作確認及び貫通検知 条件の設定
- 〈3〉 貫通検知及び停止動作の確認

表 1. バイラテラル制御のパラメータ

Sampling time [ms]	0.1
DOB cut-off frequency [rad/s]	150
Position gain K_P [1/s ²]	6400
Velocity gain K_v [1/s]	160
Force gain $K_f[s^2/Nm]$	0.8







また,バイラテラル制御で設定した各パラメータを表1 に示す。

2. 2. 実験結果

〈1〉バイラテラル制御によるマスタ・スレーブ間の カ触覚伝達の確認

この実験ではマスタ・スレーブ間にバイラテラル制御を 適用し、実際に動作した際のバイラテラル制御の検証を行 った。マスタ側を操作して、マスタ側の直動モータに対す るスレーブ側の直動モータの追従性を確認した。なおこの 実験では回転モータは動作させずに行った。

図 3,4 にマスタ・スレーブの直動モータの位置と反力 の結果を示す。図 3 では 2 つのモータの位置が追従してお り,図4 では作用反作用の法則が成立していることがわか る。よって式(1)(2)を満たしていることから,バイラテラ ル制御により力触覚伝達が実現していることが確認でき た。

〈2〉木材切削による貫通時の動作確認及び貫通検知 条件の設定

この実験では木材を切削し、貫通時の位置と反力の推移 を測定した。図5に実験環境の概略図を示す。木材とドリ ルは固定し、ドリルを木材に対し垂直に当てながらマスタ 側を操作して切削を行った。木材は厚さ5mmのヒノキを 使用した。

図 6,7に木材切削時のマスタ・スレーブの位置と反力



図 5. 実験 <2> <3> での実験環境







の結果を示す。切削中は反力が徐々に増加したが,貫通時 は位置及び反力が急激に変化した。このことから,貫通検 知には位置及び反力の変化を観測することが有効と考え られる。

変化量を観測するため、位置及び反力の微分(Velocity, Jerk)を用いる。図8に位置と反力の結果を微分したグラフ を示す。切削中においては0付近を示しているが、貫通時 に2つの値がピーク値を示した。よって、それぞれに閾値 を設け、閾値を超えた時点を貫通と判断することで、検知 が可能である。

(3) 貫通検知及び停止動作の確認

実際に位置と反力の微分を用いて貫通が検知可能か検 証を行った。実験〈2〉の結果より、以下のいずれかの条 件を満たした際に装置側に貫通と判断させた。

- ・位置の微分値(Velocity)が 0.04m/s 以上
- ・反力の微分値(Jerk)が-0.2kN/s以下











図 11. 実験〈3〉貫通時のスレーブの 位置応答拡大図

切削中はマスタ・スレーブ間でバイラテラル制御を適用 し、貫通後はスレーブ側の直動モータは位置制御に切り替 え、マスタ側の直動モータは制御を行わずフリー状態とし た。また、回転モータは貫通検知後停止させた。実験〈2〉 と同様にドリルと木材を固定して実験を行った。

図9にマスタ・スレーブの位置応答を示す。貫通時にマ スタのみ位置が急激に増加し、スレーブの位置が一定とな っている。すなわちドリルが貫通を検知して、スレーブ側 の直動モータが位置制御に切り替わり、ドリルが停止した ことを示している。

図 10 に位置,反力の微分の結果を示す。貫通時にいず れの値もピークを示しており,位置の微分値は 0.044m/s, 反力の微分値は-0.180kN/sを示した。よってこの実験では 位置の微分により貫通を検知した。

図 11 に貫通時のスレーブの位置応答の拡大図を示す。

グラフより, 位置が急激に増加し始めてから停止するまで の時間は 0.02s かかり, 停止するまでに進んだ距離は 0.49mm であった。よって, 位置と反力の微分を用いるこ とで貫通を検知することができ, かつ高速に停止が可能で あることが確認できた。

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・スレーブー体型ドリルを用い た実験において、マスタ・スレーブ間でバイラテラル制御 を適用し、力触覚が伝達されることを確認できた。また、 スレーブ側の直動モータの位置と反力の変位を観測する ことで、装置が貫通を検知し、自動停止することを確認で きた。

3.2.今後の展望

今回木材を用いた貫通検知実験では,貫通を検知するための閾値を切削対象の硬さに応じて適宜設定している。今後は切削時に切削対象の硬さを推定し,閾値を自動的に設定することを計画している。

本研究は, AMED の課題番号 JP20im0210818 の支援を 受けた。ここに謝意を表する。

【参考文献】

1.Wen-Yo Lee, Ching-Long Shih, IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, Vol. 9, No. 1, pp. 20–29, 2004.

2.Takayuki Osa, Christian Farid Abawi, Naohiko Sugita, Hirotaka Chikuda, Shurei Sugita, Takeyuki Tanaka, Hirofumi Oshima, Toru Motro, SakaeTanaka, Mamoru Mitsuishi, IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, Vol. 20, No. 6, pp. 3018–3027, 2015.

3. M. Louredo, I. Díaz and J. J. Gil, 2012 4th IEEE RAS & EMBS International Conference on Biomedical Robotics and Biomechatronics (BioRob), pp. 1155-1160, 2012.

4. Mohd Hazny Aziz, Muhammad Azmi Ayub, Roseleena Jaafar , Procedia Engineering, Vol. 41, No. 1, pp. 352–359 2012.

5. Kouhei Ohnishi, Journal of the Robotics Society of Japan, Vol. 11, No. 4, pp. 486–493 1993.

6. Wataru Iida, Kouhei Ohnishi, The 8th IEEE International Workshop on Advanced Motion Control - AMC'04. pp. 217–222 2004.

7. Kouhei Ohnishi, Masaaki Shibata, Toshiyuki Murakami,

IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, Vol. 1, No. 1, pp. 56–67, 1996.

業績

【原著論文】

- T. Matsunaga, T. Shimono, and K. Ohnishi Development of Multi Degrees-of-Freedom Haptic Forceps Robot with Three Actuated Fingers IEEJ Journal of Industry Applications, 10, 2, 247-253 (2021).
- K. Yatabe, S. Ozawa, J. Oguma, S. Hirakawa, S. Tomita, T. Matsunaga, N. Togashi, M. Yokoyama, T. Shimono, and K. Ohnishi.
 A study on safe forceps grip force for the intestinal tract using haptic technology
 Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies, online (2021)
- 松永 卓也,下野 誠通,大西 公平 画像情報に基づく情報拡張機能を有するバイラテラル 遠隔制御システム 精密工学会誌.,87,4,380-387 (2021)
- 4. 三好優輝,下野誠通,大西公平,松永卓也,溝口貴弘, 國分元樹,行形毅,宇井恵美 ハプティック超音波プローブを用いた力触覚・画像の 統合利用による二値分類精度の向上 日本ロボット学会誌,採録決定(2021).

【総説】

- 下野 誠通,大西 公平 モーションコントロール概論 機械設計,64,5,4-8 (2020).
- 下野 誠通,大西 公平 リアルハプティクスの医療支援応用 機械設計,64,5,38-41 (2020).
- 3. 下野 誠通,大西 公平 力触覚のディジタル化を実現する医療デバイス 月刊化学工業,**71,8**,478-482 (2020).
- 和田 則仁,大西 公平,北川雄光 触覚をもった超低侵襲手術支援ロボットの開発 Pharma Medica, 39, 4,45-48 (2021).
- 下野 誠通,溝口 貴弘,大西 公平 遠隔医療に向けたリアルハプティクス 映像情報メディア学会誌,71,8,478-482 (2021).

【招待講演】

 下野誠通 人間支援システム応用を指向したアクチュエー タ 第10回 電気学会東京支部神奈川支所研究会,オンラ イン,2021年2月16日

【口頭発表】

- 1. S. Yajima, T. Shimono, T. Mizoguchi, and K. Ohnishi Automatic Grasping Position Adjustment for Robotic Hand by Estimating Center of Gravity Using Disturbance Observer International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics, AIM2020, 2020 年 7 月, オンライン
- 2. H. Asai, T. Shimono, T. Deguchi, Y. Fujii, H. Yamamoto, and K. Ohnishi Development and Basic Analysis of Novel Flexible Linear Motor International Workshop on Advanced Motion Control, AMC2020, 2020 年 9 月, オンライン.
- 3. T. Matsunaga, T. Shimono, and K. Ohnishi Verification of Double Hand Teleoperation System Using Haptic Forceps Robots and LCLM Platform International Workshop on Advanced Motion Control, AMC2020, 2020 年 9 月, オンライン
- 4. S. Nagai and A. Kawamura Development of Compact Linear Actuator Combining DC motor and Cylindrical Cam for Tactile Display International Workshop on Advanced Motion Control, AMC2020, 2020 年9月, オンライン
- 5. 三好優輝,下野誠通,大西公平,松永卓也,溝口貴弘, 國分元樹,行成毅,宇井恵美 ハプティック超音波プローブを用いた力触覚・画像の 統合利用による二値分類精度の向上 第38回日本ロボット学会学術講演会,2020年10月, オンライン
- 6. S. Toriumi, K. Sakuma, H. Asai, and T. Shimono
 Finite Element Analysis and Experimental Validation of
 Core-less Multi-layered Radial Motor
 International Power Electronics and Motion Control
 Conference, IPEMC2020, 2020 年 11 月、オンライン
- 7. S. T. Matsunaga, T. Shimono, K. Ohnishi, S. Takano, H. Kobayashi, M. Yagi, and M. Nakamura

Multi Functional Drill Incorporating Linear Motor for Haptic Surgical Instrument and Simulator

International Conference on Mechatronics, ICM2021, 2021 年3月、オンライン

 H. Kobayashi, T. Matsunaga, H. Asai, S. Takano, T. Shimono, M. Yagi, K. Ohnishi, and M. Nakamura

Development of Orthopedic Haptic Drill for Detection of Penetration

The7th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization, SAMCON2021, 2021 年 3 月, オンライン

 T. Shimono, S. Tanaka, Y. Hatta, H. Asai, and Y. Fujimoto Mathematical Modeling, Finite Element Analysis, and Experimental Verification of Cross–Coupled 2–DOF Tubular SPMSM

The7th IEEJ International Workshop on Sensing, Actuation, Motion Control, and Optimization, SAMCON2021, 2021 年 3月, オンライン

【記者発表・取材】

読売新聞,2021年1月7日,朝刊26面
 「未来はそこに」
 『遠隔操作「感触」伝送』

【受賞・受章】

 SAMCON2021 Outstanding Paper Awards, 下野誠通, 田 中翔大, 八田禎之, 浅井洋, 藤本康孝, 2021 年 3 月 11 日

【特許】

国外特許出願 1件

 発明の名称:医療機器及び医療用プログラム 国際出願番号:PCT/JP2021/13428 出願日:2021年3月29日 発明者:下野誠通、大西公平、中村雅也、八木満、 松永卓也、浅井洋、小林宏尚 出願人:KISTEC,慶応義塾大学

「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り、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. 2020 年度の研究目的

グループ4年目となる2020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

<食品と未病>

日本は超高齢社会を迎えて久しく、平均寿命が延伸した ことに伴う健康寿命延伸への要求が高まっている。わが国 の平均寿命と健康寿命の隔たりは平均で10歳以上と大き く、個人やその周囲の生活の質(QOL)の向上や、医療費 の削減といった観点からも、平均寿命と健康寿命の差の短 縮は喫緊の解決課題のひとつである。私たちの身体は、生 体恒常性のはたらきから健康と疾病の手前(未病)を絶え ず行き来しており、健康寿命延伸を見据えると、疾病に至 る前にこのバランスを調節することが重要であり、その調 節には生活習慣、とりわけ食品や運動の寄与が期待される (図 1)。自身がどのような食品を摂取すると良いか判断 するためには、食品やその含有成分がどのような生体機能 性、作用メカニズムを持つかという情報が必要である。し かし食品は医薬品と異なり、生体調節作用の多くは健康か ら未病の範囲内のわずかな変化として現れ、さらに複数成 分から構成されていることからその作用点は単一ではな い。これが機能性解明を難しくする要因であるため、食品 摂取時の生体内の変化を捉えるには評価に適した未病状 態を作り出し、より広く、より高感度に検出し、評価する ための手法と組み合わせる必要がある。本グループでは、



図1 食品と未病の関係

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、未病、食品機能性についての評価法開発を経 て、産学官連携で科学的エビデンスを取得する難事業に取 り組んできた。本稿では 2020 年度の実績を中心に、研究 成果を紹介する。

(1)-1 動物とヒトのシームレス評価

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、 動物を対象とする非臨床研究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、食品機能性評 価の臨床研究の需要も高まっている。安全性や機能性の確 認や詳細なメカニズム解明を非臨床研究にて、ヒトでの科 学的エビデンスを臨床研究にて捉えるという両輪を回し ていくことで、食品の機能性評価を推進している。

(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)、2020年に第一号が届出受理さ れた免疫機能等、多岐に亘るようになった(図2)。本グ ループではメタボリックシンドロームに対する機能性解 明・評価に加え、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 脳波解析との組み合わせによる軽度の疲労・ストレス時の脳活動評価試験方法の確立:ヒト試験
 (1)-2-2 脳機能評価の展開:動物試験

(1)-3 未病評価指標の活用例

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分子を解析する必要がある。 これまで未病マーカーとして解析対象としてきたのは mRNA であり、その成果を複数の論文にて報告している。 mRNA はひとつの遺伝子から構造の異なる複数成がされ る場合があり、この機構は様々な刺激によって働くことが 知られている。2020 年度には、食品刺激で転写後の調節 過程を経て生じる構造の異なる mRNA を比較解析するこ とで新規の食品機能性評価用指標としての活用可能性を 探った。

(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。これまで



図2 食品に期待される機能性

に確立してきた動物およびヒトを対象とするシームレス 評価として、メタボリックシンドロームに対する機能の評 価(生体ガス分析、トランスクリプトーム解析等)、脳活 動評価(トランスクリプトーム解析、脳波計測)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。対象は食品を中心とし ているが、ここ数年では衣食住環境を包括した未病への作 用という視点での試験依頼・相談も受けている。

2. 2020年度の研究成果

以下に挙げるのは、2020 年度の具体的な研究成果である。

(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

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

(1)-2-1 脳波解析との組み合わせによる軽度の疲労・スト レス時の脳活動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 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、東海大学医学部、健 康学部との連携により構築した。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有意な差を生じる試験項目が異な るという結果を得ており、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。

トランスクリプトーム解析から、計算テスト実行するこ とによって生じた生体の変化(時間変化への応答も含む)、 及びそれに対する食品による作用としての変化、また計算 テストの成績の差異を有意な差をもって明確に捉えるこ とに成功したが、一方で、それらと相関するであろう計算 テスト実行中のリアルタイムな脳活動変化については未 解明のままであった。そこで 2020 年度は計算テスト実行 に伴うリアルタイムの脳活動変化を捉えるべく、簡易型脳 波計を用いた脳波計測を実施した。その結果、計算テスト の種類により応答する脳波の周波数帯が異なることや、計 算テスト実施中・実施前後での有意な差の検出に成功した。

これらの研究を通じて、計算テストと血液トランスクリ プトーム解析、さらに脳波計測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 価試験も実施している。

(1)-2-2 脳機能評価の展開: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。これまでに複数の検討を 経て、環境因子の変化が脳機能に及ぼす影響について複数 の行動試験を組み合わせて評価し、差異の検出と、その機 序を説明するトランスクリプトーム解析結果を得るに至 っていた。2020年度は、食の因子が脳機能に及ぼす影響 を明らかにすべく、摂餌パターンの違いという系を実践し、 評価を行った。この試験では同時に代謝変化についての評 価(生体ガス分析、遺伝子発現解析、腸内細菌叢解析)も 実施しており、メタボリックシンドローム等への作用と、 脳機能への作用との総合比較解析にも取り組んだ。その結 果、摂餌パターンの変化は、代謝に劇的な変化を及ぼすも のの一過的なものである一方、脳機能についてはその影響 を長期的に残すことが示され、食への生体応答の組織特異 的な差異を明確に捉えるに至った。

本研究成果は、食環境、食育の観点から、想定されやす い代謝の課題(肥満、痩身等)のみならず、脳機能(短期 記憶、興味及び社会性等)にも影響を及ぼすことを考慮に 入れることの重要性を示すものである。

(1)-3 未病評価指標の活用例

マウスを対象とした試験により、食品に起因する転写後の調節過程を経て生じる mRNA 構造の違いの解析を行った。高脂肪食という刺激が与えられた後に複数の構造の mRNA が生成される遺伝子が検出された。そのような遺伝子のなかにはこれまで実施してきた遺伝子発現解析では発現変動を認めない、つまり食品に応答しない遺伝子であると判断されていたものもあった。このことから、 mRNA 発現量は変わらないが複数の構造の mRNA を生成する遺伝子が、これまでにはない食品機能性評価用の新規の指標として利用できる可能性がある。

(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 ちー部については、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 て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、 本グループの研究員も参画し、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 取、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。
間欠絶食がもたらす代謝機能、脳機能への影響

1. はじめに

間欠絶食は短期間の絶食を複数回実施することによっ て体重減少効果を生むダイエットとしての意義が強調さ れる一方で2型糖尿病発症リスクの減少や酸化ストレス 軽減効果、心疾患予防など多くの副次的な効果が認められ 注目されている1。近年では"脳、神経系"疾患に対する 間欠絶食の効果も報告され、アルツハイマー型認知症予防 など脳・精神疾患への効果が認められている²。しかしな がら間欠絶食による平常時の脳機能への影響については 未だ不明な点が多い。我々は予備的検討により、単回の絶 食による体重の劇的な増減(図 1)及び、代謝機能の劇的な 変化(糖質・脂質利用率)が同時に生じることを見出した。 興味深いことに、代謝機能に対する影響は、絶食期間中の 一時的なものではなく、絶食終了後も継続的に影響するこ とが確認された(図 2)。脳は人体の中でも最大のエネルギ ー消費器官であり、代謝的な変化に対して鋭敏に応答する と考えられている。これらの観察から、間欠絶食による急 激な代謝機能の連続的・継続的変化は"脳"とその"機能" にも影響を及ぼすと想定される。しかしながら間欠絶食と 平時脳機能についてその効果・作用メカニズムに関する知 見は少ない。過去の研究では、脳由来神経栄養因子 BDNF などの単一分子が絶食条件によって変動することが確認 されている³。以上のことから、継続的な代謝機能変化を 伴う絶食を複数回実施する間欠絶食は、平時脳機能活動に 対しても何らかの影響を及ぼしうるのではないかと発想 し、本研究を実施した。

1. 1 実験動物

本実験では主に実験動物であるマウスを用いて検討を 行った。実験動物は5週齢のC57BL/6N雄性マウスを日本 チャールス・リバー株式会社より購入し、数日間にわたり 飼育室での環境馴化をした後、本実験に供した。飼育室内 の温度は21℃前後、湿度は50%前後を維持し、 AM8:00-PM20:00を明周期とした。飼育期間中の飼料及び 水は自由摂取・摂水とし隔日で飼料交換及び体重・摂餌量 測定を実施した。本実験に用いた飼料は精製飼料である AIN-93Gをオリエンタル酵母工業株式会社より購入し給 餌した。動物実験は大きく3つの実験を独立して実施した。 主に代謝機能(盲腸内容物細菌叢解析含む)への影響を検討 するための呼気ガス分析を中心とした試験、脳機能への影 響を検討するための行動学試験を中心とした試験また各 種臓器での遺伝子発現への影響を検討するための遺伝子 発現解析用のサンプリングを実施する3つの実験となる。 嶋田 耕育、亀井 飛鳥、篠﨑 文夏

1. 2 間欠絶食

間欠絶食は環境馴化後の個体において実施した。PM4 時(16時)に飼料給餌を停止し、翌日AM8時に再給餌す る絶食サイクルを週に2度実施し、2週間で計4回の絶食 操作を行った。呼気ガス分析は間欠絶食を実施した2週間 及び普通給餌に戻した1週間の計3週間の分析を実施し た。行動学的試験においては2週間の間欠絶食後、普通給 餌に戻した3週目において実施した。

1.3 呼気ガス分析

呼気ガス分析は動物用エネルギー代謝測定システム [ARCO-2000](有限会社アルコシステム)を用いて測定した。 呼気ガス測定時は飼料・床敷替え及び摂餌量・体重測定を 連日実施した。呼気ガスの計測において専用のチャンバー での測定が必要となるため呼気ガス測定の個体はあらか じめ専用チャンバーでの環境馴化を実施し、馴化後に計測 を行った。測定項目は呼吸商(RQ)、酸素消費量、二酸化炭 素排出量及びエネルギー消費量を測定し、得られた値につ いて1時間の平均値として算出した。

1. 4 腸内細菌叢解析

腸内細菌 業解析は呼気ガス分析後のサンプルについて 実施した。解析サンプルは盲腸内容物を用い、次世代シー クエンサーによるメタゲノム解析を実施し、メタゲノム解 析ツールである QIIME を用いてデータ解析を実施した。

1. 5 行動学試験

- 行動学試験として以下の5つの試験を実施した。
- 1:広場試験(自発的行動量及び不安関連評価)
- 2:Y 路迷路試験(作業記憶評価)
- 3:新規物体認識試験(短期記憶評価)
- 4:高架式十字迷路試驗(不安関連評価)
- 5:社会的相互作用試験(興味行動及び社会性評価)

1. 6 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析として代謝臓器の代表格である肝臓組 織を用いて実施した。サンプル臓器は間欠絶食後に1週間 通常給餌を行った個体及び間欠絶食期間終了2日後の個 体よりサンプリングし、RNAをTRI Reagent(R)(Molecular Research Center)を用いて定法により抽出した。肝臓由来 RNA サンプルについては磁気ビーズによる精製を実施し た。抽出した RNA は Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて RNA 精製度の確認を行い、Bioanalyzer より計算された RNA Integrity Number (RIN)が 8.5 以上であることを確認し た。

抽出した RNA より相補的 DNA(cDNA)を合成し、 RT-PCR にて各種代謝調節遺伝子の発現量を確認した。

1.7 統計処理

全てのデータは mean±SEM で表す。全てのデータに対して 2 群間比較検定として unpaired Student's *t*-test または Welch's *t*-test を実施し、p < 0.05を統計的に有意と定義した。 グラフにおいて*:p < 0.05,**:p < 0.01と図示する。



図1:単回絶食は急激な体重変化を誘導する。



図 2:単回絶食は代謝変動を誘導し、継続的に代謝機能に影響を 与える

2. 実験と結果

2. 1 間欠絶食による体重及び摂餌量への影響

間欠絶食により絶食時の一時的な体重減少は確認され たが間欠絶食を実施した2週間の体重増加量は間欠絶食 群(Fasting 群)と間欠絶食を実施していない群(ad lib 群)間 で有意な差異は認められなかった。また摂餌量に関しては 間欠絶食後の再給餌時に間欠絶食を実施していない群と の比較で有意に摂餌量の増加及び継続的な増加を確認し たが間欠絶食を実施した2週間での総摂餌量は両群間で 有意な影響は認められなかった(図3)。このことから複数 回の間欠絶食は一過的に体重及び摂餌量に影響を及ぼす が期間中の体重増加量及び総摂餌量には影響しないこと が確認された。

2.2 間欠絶食による一時的な代謝変化表現型は 間欠絶食終了後に速やかに解消される

間欠絶食による代謝機能への影響を確認するため、呼気 ガス分析装置を用いた検討を行った。複数回にわたる間欠 絶食により RQ(呼吸商:酸素消費量に対する二酸化炭素排 出量の体積比であり糖質や脂肪の燃焼の比率指標として 用いられる)及びエネルギー消費量が一過的に大きく変動 し、さらにその変化は1日程度継続的に影響することを確 認した。またこれら間欠絶食に伴う急激な代謝機能の変調 は普通給餌に戻すことで速やかに解消することを確認し た(図 4)。このことから複数回にわたる間欠絶食の期間に おいては代謝機能が大きく変化するが普通給餌に戻すこ とで速やかに正常化することが確認された。



図3:間欠絶食による体重及び摂餌量の経時的影響



図4:間欠絶食2週目及び普通給餌以降の代謝変動

2.3 複数回の間欠絶食は脳機能にも影響を及 ぼす

複数回にわたる間欠絶食後に行動試験を実施した結果、 行動様式に影響があることが確認された。新規物体認識試 験において、間欠絶食群(Fasting 群)は通常摂餌群(ad lib 群) と比較し、新規物体への認識能・興味行動が低下する表現 型が得られた。また社会的相互作用試験において他個体へ の興味行動に影響は認められないが、他個体の存在しない エリアでの滞在時間が減少する傾向を示しさらに、neutral area での滞在時間が有意に増加する表現型が得られた(図 5)。その他、行動試験における測定項目では有意な差異 は確認されなかった。以上のことから複数回にわたる間欠 絶食は特定の脳機能(短期記憶、興味行動及び社会性行動) に対して影響を及ぼすことが確認された。



図5:間欠絶食による脳機能行動への影響



図6:間欠絶食による肝臓遺伝子発現への時期特異的な影響

2. 4 複数回の間欠絶食は代謝臓器の遺伝子発

現に影響を及ぼすが間欠絶食終了一定期間後には解 消される

代謝臓器である肝臓組織において代謝調節(糖代謝や脂 質代謝関連遺伝子)に寄与する複数の遺伝子発現を RT-PCR で確認した。結果、複数の遺伝子において間欠絶 食終了後のサンプルが間欠絶食を実施していない群との 比較で有意な発現変動が確認された。これら発現変動が確 認された遺伝子は単回絶食でも変動が誘導された遺伝子 であった。一方でこれら発現変動が認められた遺伝子にお いて間欠絶食後に普通給餌に戻したのち1週間後の肝臓 組織では確認されていた有意な発現変動は認められなか った(図6)。以上のことより、肝臓組織では間欠絶食に伴 って単回絶食によって発現変動が確認された遺伝子につ いて発現変動が認められたが間欠絶食終了一定期間後に はこれら発現変動は解消されることが確認された。



図7:間欠絶食による盲腸内菌叢への影響

2.5 間欠絶食は盲腸内菌叢の存在比に影響を及 ぼす

間欠絶食後に1週間通常給餌を実施した実験群(Fasting 群)と間欠絶食を実施しなかった群(ad lib 群)の盲腸内容物 を用いて16S rRNAシーケンスによる菌叢解析を実施した。 結果、代謝機能に影響を与える腸内細菌叢の変化指標であ るPhylum(門)でのFirmicutes / Bacteroidetes 比は両群間で有 意な差異は認めなかった(図7)。一方、Genus(属)での非存 在度を用いて主成分分析を行った結果、通常食群では個体 間のばらつきが大きく確認されたが間欠絶食群では個体 間のばらつきがまとまる傾向を認めた(図7)。また Genus レベルでの非存在度において複数の菌で有意な変動が認 められたことから間欠絶食は Genus レベルでの盲腸内菌 叢に影響を及ぼすことが確認された(図8)。







図 9:本研究まとめ

3. 考察及び今後の展望

今回我々はマウスを用いた検討により、間欠絶食による 一過的で急激な代謝機能の変動とそれに伴う摂餌量の変 化、肝臓内遺伝子発現への影響やさらには盲腸内菌叢への 影響があることが確認された。また脳機能に関しても記憶 行動、興味行動さらには社会行動に関する行動指標で間欠 絶食による影響があることが認められた。これらのことよ

り間欠絶食は代謝機能のみではなく脳機能や菌叢にも影 響することが確認された。また興味深いことにこれら間欠 絶食による影響は間欠絶食後、通常給餌に戻すことで変動 が解消する表現型と間欠絶食の影響が継続する表現型が あることを見出した。とりわけ代謝変動(呼気ガス実験及 び肝臓内遺伝子発現)においては間欠絶食による一過的な 変動が普通給餌後には直ちにもしくは時間経過とともに 解消されるのに対して脳機能及び盲腸内菌叢への影響は 普通給餌後も継続して間欠絶食による影響が認められた (図9)。脳機能と腸内菌叢については複数の報告で関連性 (脳腸相関)があることが知られている4,5。絶食による影響 は腸内菌叢にも多くの影響を及ぼすことから、今回確認さ れた間欠絶食による脳機能への影響は脳腸相関による可 能性が示唆された。近年、1ヶ月にわたる断食を実施する 「ラマダン」後の腸内菌叢において腸内環境、代謝、免疫 さらには脳機能において重要な役割を有する酪酸産生菌 である Lachnospiraceae が断食によって増加することが確 認されている 6。しかしながら今回の間欠絶食実験では Lachnospiraceae の非存在度に有意な差異は認められなか った(Lachnospiraceae 科の一部は変動を確認)。つまりマウ スにおいての間欠絶食の脳機能への影響は腸内菌叢以外 の要因もあることが示唆された。しかし継続的な影響が確 認された脳機能に関してその作用メカニズムに関する知 見は未だ得られていない。脳機能制御は複雑なシステム下 で制御され、多くの分子による同調や反駁による調節によ り制御されているものと推定される。今後は脳部位での網 羅的な遺伝子発現解析を行うことで間欠絶食による脳機 能への影響についての作用メカニズムが明らかになるこ とが期待される。近年、マウスを用いた研究で絶食によっ て嗜好性が変化することが報告されており7、絶食は摂餌 量のみではなく嗜好機能にまで影響を及ぼすことが知ら れている。急激な代謝変動を伴う絶食後の回復期での摂餌 量の増加と嗜好性の変化を伴う食事内容への介入は間欠 絶食により誘導される様々な表現型にも影響しうる可能 性が示唆される。したがって、絶食後の回復期に摂取する 食事内容への介入が間欠絶食による相乗効果を誘導する 因子の1つと期待される。 絶食後の回復期に当たる食事内 容(エネルギーバランスや機能性成分の追加など)を考慮す ることで、さらなる相乗効果を誘導する間欠絶食法のトー タルコーディネートの提案も今後期待される。

【参考文献】

1. Adrienne R et al *Translational Research* **164**(4): 302-311 (2014)

- 2. Halagappa VK et al Neurobiol Dis 26(1): 212-20 (2007)
- 3. Mattson MP Annu Rev Nutr 25: 237-60 (2005)
- Marilia Carabotti et al Ann Gastroenterol. 28(2): 203–209.
 (2015)
- 5. Gilliard Lach et al Neurotherapeutics 15(1):36-59 (2018)
- 6. Junhong Su et al Am J Clin Nutr 113(5):1332-1342 (2021)
- 7. Okamoto Cell reports 22(3): 706-721 (2018)

1. はじめに

日本人の食生活が従来の米と魚を中心とした日本型の 食生活から肉、卵、牛乳を多く摂取する欧米型の食生活と 変化したことによって、これまで不足がちであった栄養が 補われ、健康的な食事内容になり体格がよくなるなど良好 な変化がもたらされた。しかし、行き過ぎた肉食などバラ ンスが偏った食事を続けることで、これまでは少なかった 大腸がんなどの疾病や生活習慣病が増加している。

疾病を回避するには食生活や生活習慣の改善が効果的 で、食生活においては機能性食品を用いて積極的に健康維 持を図ることも考えられる。理想的には個々人の身体状態 に合わせた食品を摂取することがよいだろう。しかし、そ のためには食品の機能を正しく知らなくてはならない。食 品は薬品とは異なり即効性がない場合が多く、劇的な変化 をもたらさないことから、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)ではその効果を検 出するのが難しいという問題があり、食品機能性評価に適 した指標が必要である。

1. 1 遺伝子発現

食品機能性評価グループでは、新規の指標として遺伝子 発現に着目し、遺伝子発現レベルの食品摂取後の変化を捉 えてきた。これまでにメープルシロップやその抽出液、自 然薯ムカゴおよびアミノ酸混合溶液などの摂取後の遺伝 子発現変動を捉え、発表してきた¹⁻⁵⁾。

1. 2 遺伝子発現調節

これまでの研究から食品が遺伝子発現に影響すること は明らかであるが、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 子発現調節段階をターゲットとしてとらえる必要がある と考えられる。

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 miRNA があり、 mRNA の発現制御に関与するとともに、血液に乗って全身 を巡る特性から疾患や治療のバイオマーカー候補でもあ る。また、long non-coding RNA (lncRNA)は、100~200 塩 基以上の ncRNA であり、タンパク質をコードする mRNA と同等かそれ以上の数が存在するといわれている。 lncRNA は未知の部分が多いが、クロマチンルーピングや 篠崎 文夏,嶋田 耕育,亀井 飛鳥

mRNA 安定性の制御など複数の細胞維持機能に役割を担っていることが明らかになりつつある。miRNA、lncRNA のいずれも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、これらは遺伝子発現の各段階に影響し 遺伝子発現調節を行う。また、食品や食品成分によっても これらの non-coding RNA の発現が変動すると考えられて いる。

また、遺伝子はアミノ酸配列がコードされているエキソ ンが非コード領域であるイントロンによって複数に分断 されており、DNA から mRNA への転写の際には mRNA 前駆体からイントロン部分の切り捨て(スプライシング) が行われてエキソン部分が連結し成熟 mRNA となる。ス プライシングの位置・組み合わせによって、複数の成熟 mRNA ができ、構造の異なるタンパク質 (スプライシング バリアント)ができる。スプライシングバリアントも疾病 と関連しており、そのほとんどが遺伝子産物異常によるも のと報告されている。つまり、スプライシング異常によっ てできた機能欠損タンパク質や細胞障害性タンパク質に よって疾病が引き起こされる。また、老化やメタボリック シンドロームの原因のひとつとなる肥満においてもスプ ライシング異常が引き起こされることが報告されており、 選択的スプライシングの破綻が加齢や代謝疾患の重要な プログラムを規定する可能性がある 6,7)。

本研究では遺伝子発現調節に着目し、遺伝子発現調節に 関連する因子やスプライシングバリアントが新規の食品 機能性評価用指標として利用可能であるかを検討した。

2. 実験と結果

2. 1 遺伝子発現解析

実験には高脂肪負荷により生活習慣病を模倣した未病 モデル動物を用いた。動物は通常脂肪餌で一週間馴化した のち2群に分け、それぞれに通常脂肪餌(通常脂肪群)ま たは高脂肪餌(エネルギー比45%、高脂肪群)を投与し、 4週間飼育した。なお、飼育期間中の餌と水は自由摂取と した。4週間飼育後、採血および採材した。採材した肝臓 からは Total RNA を抽出し DNA マイクロアレイ (Clariom D, mouse, Thrmo Fisher Scientific)を用いて mRNA を分析 した。

階層的クラスター解析の結果、高脂肪群と通常脂肪群で クラスターに分離され、高脂肪の影響が肝臓の遺伝子発現 に影響していることが確認された。変動遺伝子については、 これまで実施してきた実験結果と同様に脂質代謝特にコ レステロール関連が多数得られた(図1)。



図1 階層的クラスターと変動遺伝子



図 2 選択的スプライシングが起きている遺伝子 HF: 高脂肪群, LF: 通常脂肪群

2. 2. スプライシングバリアント分析

スプライシングバリアント分析は Thermo Fisher Scientific の Transcriptome Analysis Console 4.0 ソフトウェ アを用いて行った。

その結果、選択的スプライシングが起こっている遺伝子 は約1,250 個得られた。この中で、non-coding ではなく遺 伝子発現解析で変動なしの遺伝子は約1,000 個であった。 発現変動しない遺伝子はこれまでは摂取物の影響を受け ない遺伝子であるとされてきたが、このように選択的スプ ライシングが起きており、複数のバリアントが生成されて いることがわかった(図2)。また、変動遺伝子であって も複数のスプライシングバリアントが生成される例もあ った。

本試験で得られた遺伝子発現変動がなく、選択的スプラ イシングが起きた遺伝子は指標候補と考えられた。

3. 考察及び今後の展望

以上の結果から、食品摂取後に発現変動しないとされて いた遺伝子であっても、転写後の制御を受けていることが 明らかとなった。スプライシングバリアントは機能的に変 化が生じる場合もあるため、その生成が生体への影響を測 るための指標となる可能性があると考えられた。

今後、さらに詳細な解析を進めるとともに、経時的な変 化や今回得られた新規の食品機能性評価用指標候補が実 際に食品や食品成分でどのような動きとなるか検討予定 である。

【参考文献】

1. A Kamei et al., *Mol Nutr Food Res*, **61**, doi: 10.1002/mnfr.201600477. (2017).

2. F Shinozaki et al, *Mol Nutr Food Res.*, **64**, doi: 10.1002/mnfr.202000284 (2020).

3. F Shinozaki et al, Genes Nutr, 11, 21 (2016).

4. A. Kamei et al, *Biosci Biotechnol Biochem*, **79**, 1893-1897 (2015)

5. Y Watanabe et al, *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**, 2408-2410 (2011)

6. E Latorre, LW Harries, Aging Res Rev, 36, 165-170 (2017)

7. D Kaminska et al, Obesity, 24, 2033-2037 (2016)

未病と食の脳活動評価試験法の確立

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、免 疫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試験と脳波計測技術とを融合させた 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、例 えば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、既存の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に、食品の機能 性の寄与への期待が高い。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

亀井 飛鳥、篠崎 文夏、嶋田 耕育

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な量があることも 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も、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疫学調査によれば、対象者の半 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(それぞれの対照食との 比較)、PC上で実施する3種類の脳活動指標テストを準備 し、それぞれの組み合わせの合計6パターンをそれぞれ実 施した。その結果、脳活動指標テストの成績に食品によっ て成績に影響を及ぼす脳活動指標テストの種類が異なる ことが示され、報告した。一つの素材はテスト成績の向上、 主観的疲労蓄積の低下等の期待していた作用であり、もう 一つの素材は、主観的疲労度には作用しないもののテスト 成績に影響を及ぼすというものであった。2019年度には、 2018年度に作成、実施した試験において疲労度回復に加 えてより顕著な試験成績向上を示した組み合わせの食品 素材+脳活動指標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、報告した。血液トランスクリプトー ム解析では、疲労時に変動するとの報告のあるタンパク質 への翻訳制御関連因子の動き等が抽出され、早期疲労の変 化を捉えたことが示された。

このようにトランスクリプトーム解析から、計算テスト 実行することによって生じた生体の変化(時間変化への応 答も含む)、及びそれに対する食品による作用としての変 化、また計算テストの成績の差異を有意な差をもって明確 に捉えることに成功したが、一方で、それらと相関するで あろう計算テスト実行中のリアルタイムな脳活動変化に ついては未解明のままであった。そこで 2020 年度は計算 テスト実行に伴うリアルタイムの脳活動変化を捉えるべ く、簡易型脳波計を用いた脳波計測を実施した。その結果 について報告する。

2. 実験と結果

2.1 方法

2. 1. 1 脳活動指標テストの選定

本試験では、PCを用いた2つの脳活動指標テストを選 定して実施した。それぞれのテストは、次に示す3つの小 テストを1単位とし、それを複数回実行することにより、 疲労、ストレスを引き起こすものである。(1)テストA: 計算方式の小テスト2つ、押ボタン方式の小テスト1つで 1単位を構成、(2)テストB:異なるタイプの押ボタン方 式の小テスト3つで1単位を構成、としている。テストA は主に注意の持続性を、テストBは思考セットの変換を 評価する系であり、互いに試験の性質が大きく異なる。ま た、それぞれのテストでは、複数回の繰り返し実施に伴う 疲労度を、visual analog scale (VAS)アンケートにより評 価し、主観的な疲労蓄積を測定する。評価対象はそれぞれ のテスト成績と疲労度 VAS アンケートの成績である。

2.1.2 脳波計の選定

脳波は周波数分析を行う際、周波数帯域ごとに心の状態 と相関する特徴が報告されている。例えばα波、β波、γ 波は順に高い周波数帯域を示し、多くは、α波ではリラッ クス状態、β波は覚醒時の意識との関連づけ、γ波はスト レス、緊張や視覚情報処理などとの関連づけがなされてい る。本研究では、PCを用いたテストを実行することから、 視覚情報処理の要素も含まれること、緊張やストレス状態 の測定も想定していることから、γ波の周波数帯域の測定 もできること、また装着そのものがストレスとなることを 避けること、を考慮し、簡易型脳波計 (PGV 社)を採用 することにした。(図1)

2. 1. 3 試験実施

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。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 10 名(途中辞退があり、最終的には 8 名)に参 加いただいた。本試験は、2 つのテストのそれぞれの特徴 を別々に抽出することを目指すものであるが、一方で脳波 には個体差が大きいことから、今回は同一の方に、テスト



図1 簡易型脳波計装着のようす

A、テストBの双方を別日に実行いただき、データを取得 した。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。

なお、試験結果は、それぞれの脳活動指標テストの成績 のほか、繰り返し試験実施に伴う疲労度の変化を主観的 VAS アンケートおよび脳波データを評価した。脳波の測定 データは、ノイズフィルター、フーリエ変換を経て周波数 帯ごとのパワースペクトルを算出したものを解析に用い た。脳波データの計算については PGV 社にて実施した。

2.2 結果

まず、脳活動指標テスト実行中の脳活動変化を捉える 目的で、周波数帯域毎のパワー値を算出した。下記は、脳 活動指標テスト実行中のα波のパワー値の平均値の一例 を示したグラフであるが、大別して計算テストと押ボタン テストとで異なることが示された(図2)。計算テスト実 行中はα波が全体的に低値を示す傾向にあり、押ボタンテ ストにおいてはほぼ同程度の値に保たれていることが分 かる。このようにテストの性質の違いが検出されることが 示された。

興味深いことに、脳活動指標テストの種類によって変動



図2 脳活動指標テスト実行中のα波パワー値の違い

する周波数帯域が異なることが示される一方、これまでに 疲労度の指標としてきた VAS アンケートの結果について は、テストA、テストBともにほぼ同程度の値での推移を 示しており、主観的な疲労感については両テストで同程度 であることが示された。そこで VAS アンケートのデータ と相関を示す脳波のデータを探索したところ、テストA についてはいくつかの周波数帯域において VAS アンケー トの結果との有意な相関が見出された。一方でテストB については VAS アンケートの結果との相関は見出されな かった。脳波の変化は、疲労やストレスだけでなく、視覚 情報処理(y波が出現しやすい)や計算等、複雑な情報処 理過程の結果をも反映したものであるため、一義的な解釈 は難しいが、2つのテスト実行への脳波の応答が明確に異 なること、それがリアルタイムに明確に検出されることが 示され、その一部には、主観的疲労度が同程度でも、その 質が異なることを如実に示す情報が含まれていたと考え られる。

本結果は、食品介入試験において、脳活動指標テストに 脳波計測の組み合わせることの有効性をも示すものであ る。過去に実施した食品介入試験では、脳活動指標テスト 実施に伴う主観的疲労度の VAS アンケートの結果から食 品摂取による疲労軽減作用が示され、さらにテスト A に おいては血液トランスクリプトーム解析から疲労度・スト レス軽減を裏付ける結果を得ていたが、本研究により見出 された、VAS アンケートと脳波データの一部が相関すると いう結果は、脳波の解析結果が食品の疲労度軽減を示す客 観的指標の一つとなることを示すものであった。

3. 考察及び今後の展望

本研究により、これまでに食品の機能性評価系として確 立した脳活動指標テストについて、実行に伴う疲労蓄積や ストレス惹起に対する特定の食品の効果を検出する際に、 リアルタイムで測定できる客観的指標のひとつとして脳 波データが有効であることが示された。過去にも、血液ト ランスクリプトーム解析も客観的指標や作用メカニズム 解明のために有効であることを示してきたが、それぞれに 特徴があることから、食品の種類により、あるいは評価す る対象により組み合わせを変えながら使い分けていくこ とが重要であると考えられる。なお、脳活動指標テストに 血液トランスクリプトーム解析との組み合わせる評価方 法については、既に企業等からの評価依頼を受けて実施し ている。

当グループでは、動物を対象とする脳機能測定のための 手法の高精度化も実施し、食品摂取によるわずかな差の検 出を進めている。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、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 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 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-sippressing effects in the liver of diet-induced obese mice: a DNA microarray analysis. Beneficial Microbes 4:247-251 Kondo S, Xiao JZ, Satoh T et al. (2010)

6. 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 PPARa 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. 業

【原著論文】

- F.Shinozaki, A.Kamei, Y.Watanabe, A.Yasuoka, 1. K.Shimada, K.Kondo, S.Arai, T. Kndo, K.Abe Propagule powder of Japanese yam (Dioscorea japonica) reduces high-fat diet-induced metabolic stress in mice through the regulation of hepatic gane expression. Mol. Nutr. Food Res., 67, e2000284 (2020)
- T.Ichinose, H.Murasawa, T.Ishijim, S.Okada, K.Abe, 2 S.Matsumoto, T.Matsui, S.Furuya Tyr-Trp administration facilitates brain norepinephrine metabolism and ameliorates a short-term memory deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. PLOS ONE, 15, e0232233 (2020)
- S.Yamamoto, T.Kayama, M.Noguchi,-Shinohara, 3. Hamaguchi, M.Yamada, K.Abe, S.Kobayashi Rosmarinic acid suppresses tau phosphorylation and cognitive decline by downregulating the JNK signaling pathway. NPJ Sci. Food, 5, 1 (2021)
- H.Asakura, T.Yamakawa, T.Tamura, R.Ueda, S.Taira, 4. Y.Saito, K.Abe, T.Asakura Transcriptomic and metabolomic analyses provide insights into the upregulation of fatty acid and phospholipid metabolism in tomato fruit under drought stress. J. Agric. Food Chem. 69, 28 (2021)

【口頭発表】

- 1. 阿部啓子 "食と健康"の研究が拓く新側面 ロッテセミナー・企業セミナー、2020年9月、埼玉
- 2. 阿部啓子 "食と未病マーカー" 同志社大学・授業サイエンスナウ「組換え、食、エセ 科学」、2020年10月
- 3. 阿部啓子 R021「食と未病マーカー委員会」第1回研究会(キ ックオフ) にあたって 日本学術振興会産学協力委員会 R021「食と未病マー カー委員会」第1回研究会(キックオフ)、2020年11 月、リモート
- 4. 亀井飛鳥 食品の機能性を明らかにするために、第1回フードサ イエンス情報共有セミナー、2021年2月、 オンライン開催
- 5. 篠﨑文夏、亀井飛鳥、嶋田耕育、荒井綜一、阿部啓子 自然薯ムカゴ摂取の代謝に対する影響 日本農芸化学会 2021 年度大会、2021 年 3 月、 オンライン開催

績

- 貫間春圭、家山智子、長谷知輝、山下玲、山田正仁、 三坂巧、阿部啓子、小林彰子 ロスマリン酸摂取によるアルツハイマー病予防効果 に伴い変動する microRNA のミクログリアに対する 機能解析 日本農芸化学会 2021 年度大会、2021 年 3 月、 オンライン開催
- 7. 永井俊匡、齊藤美佳、清水愛恵、齋藤芳和、安岡顕人、 阿部啓子、朝倉富子 長期間の咀嚼は視床下部の遺伝子発現の変化と血圧 の低下をもたらす 日本農芸化学会 2021 年度大会、2021 年 3 月、 オンライン開催
- 8. 李善美、安岡顕人、永井俊匡、齋藤芳和、阿部啓子、 朝倉富子 幼若期における咀嚼刺激が記憶に与える影響 日本農芸化学会 2021 年度大会、2021 年 3 月、 オンライン開催
- 9. 森安珠、上田玲子、朝倉富子、阿部啓子 官能評価値をオトガイ舌骨筋の表面筋電位を用いて 可視化する 日本農芸化学会 2021 年度大会、2021 年 3 月、 オンライン開催
- 10. 小松澤里帆、平修、岡田憲典、阿部啓子、山田正仁、 小林彰子 シソ科植物に含まれるロスマリン酸とその代謝物の マウスにおける体内分布 日本農芸化学会 2021 年度大会、2021 年 3 月、 オンライン開催

【取材】

1. 阿部啓子 インタビュー 免疫を考える ヘルスケアビジネス (株式会社ヘルスビジネスメディ ア)、2021年1月

「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 斉

【基本構想】

本プロジェクトでは、「KISTEC 機器の共用化」による光触媒加工品やその他抗菌・抗ウイルス加工品に よる性能評価試験を行い、様々な企業や研究機関による抗菌・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、JIS/ISO に基づいた性能評価試験だけではなく、それぞれ の加工品や製品の特徴に合わせたオーダーメードの性能評価試験方法を提供している。性能評価の提供に あたっては、抗菌分野(JIS Z 2801)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。その他、新たな試験方法の提供に向けた取り組みや共同研究、自主研究を通じ た新規 ISO/JIS の作成や抗菌・抗ウイルス効果を持つ新規物質の探索などの取組を続けている。

1. 2020年度の研究目的

プロジェクト 16 年目となる 2020 年度についても、様々 な活動を行ってきている。その中から、以下の各項目につ いて、検討を行ってきた。

(1) 抗菌試験室の ISO 17025 管理体制の整備・維持とKISTEC 機器の共用化

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、抗菌分野の中で、 JIS Z 2801 について、ISO/IEC 17025 の取得しており、その 管理維持を行った。

KISTEC 機器の共用化としては、昨年度より引き続き、 各企業や研究機関の研究開発に向けて、抗菌・抗ウイルス 性能評価の提供を行った。研究開発を進めている各企業や 研究機関からは SARS-CoV-2 を用いた性能評価の要望が 非常に多いことから、SARS-CoV-2 を使用出来る BSL3 施 設を整備し、SARS-CoV-2 を用いた性能評価の提供に向け た取り組みを行った。

(2) 光触媒による抗バイオフィルム効果の検証

現在、抗菌製品技術協議会では抗バイオフィルム試験 法の ISO 化に向けた取り組みが、進められている。一方 で、光触媒加工品を用いた抗バイオフィルム試験方法は 現在確立されていない。そこで、本検討では、光触媒加 工品を用いて、細菌が形成するバイオフィルムを抑制す ることが出来るかを確認し、標準試験方法開発に向けた 検討を行った。

(3) 新しい光触媒材料の抗ウイルス活性に関する研究

これまでに、銅化合物や銀化合物以外に、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、酸化モ リブデン(MoO₃、MoO₂)に高い抗ウイルス活性があること を見出している。一方で、酸化モリブデンには可視光応答 性がほとんどないことも明らかとしている。本検討では、 酸化モリブデンの高い抗ウイルス活性を維持したまま、可 視光応答性を示す材料の作成について、検討を行った。更 に、実環境に近い状態のウイルス付着状況における抗ウイ ルス性能についても検討を行った。

2. 2020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) 抗菌試験室の ISO 17025 管理体制の整備・維持とKISTEC 機器の共用化

KISTEC機器の共用化として、提供した評価件数を図1 に示す。図1にあるように、年々と件数が増加しており、 さらにコロナウイルスの感染拡大により、2019、2020年 と大きな伸びとなった。このような急激な伸びは、国内に



おける感染リスク低減に向けて、各企業、研究機関が精力

的に抗菌・抗ウイルス加工製品の開発に取り組んだ結果と 考えられる。また、KISTECを始め、国内の試験機関全体 に性能評価の問い合わせや依頼が殺到したことにより、性 能評価の結果報告まで、非常に時間を要することとなった。 そのため、出来るだけ迅速に結果の報告を行うための対応 が KISTECを始め、国内試験機関の新たな課題となると考 えている。

また、これまでに提供している抗ウイルス性能評価では インフルエンザウイルス、ネコカリシウイルス、バクテリ オファージを対象に抗ウイルス評価となっている。一方で、 これらの性能評価を行う中で、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)を用いた性能評価の要望が非常に高まって きていた。そこで、その要望に応え、SARS-CoV-2を用い た性能評価を可能とするために、SARS-CoV-2の取り扱い が可能な施設(BSL3 施設)の整備を進め、性能評価の提供 に向けた取り組みを行った。具体的には既存の BSL2 施設 の条件に加えて、個人認証による開錠とした二重扉の設置、 差圧管理による BSL3 施設内を陰圧とした空調の整備など である。また、SARS-CoV-2 については、神奈川県衛生研 究所より、臨床分離株の供与を受け、その増殖条件の検討 や性能評価への応用について検討を行った。その結果、 KISTEC にて SARS-CoV-2 の取り扱いを可能とし、12 月 25 日より、SARS-CoV-2 を用いた性能評価試験の問い合わ せに対応することが可能となった。現時点では、性能評価 の対象となる加工品は平板状及び繊維状の状態に限って いるが、今後液体加工品などについても、対象を広げるよ う取り組みを続けている。

(2) 光触媒を用いた抗バイオフィルム形成抑制効果

光触媒は紫外光や可視光の照射下において、抗菌・抗ウ イルス性能を発揮する。これまでに、その性能を応用して、 様々な加工品の開発が進められてきた。また、バイオフィ ルムに関しても、その抑制効果について、研究が進められ てきているが、これまでの抗バイオフィルム研究は、それ ぞれの研究機関の独自の方法によっている為、その効果の 比較が困難な状況であった。そこで、本検討で試験法の標 準化を進めるための検討を行った。用いた光触媒は紫外光 応答形光触媒加工品及び無加工ガラス板であり、そこに、 表皮ブドウ球菌を用いて、バイオフィルムの形成を確認し た。その際に、紫外光を照射し、バイオフィルムの形成抑 制を確認した。その結果、紫外光を照射した紫外光応答形 光触媒加工品において、バイオフィルム形成抑制効果が得 られた。一方で、紫外線強度を高くした場合、無加工ガラ ス板及び紫外光応答形光触媒加工品の間で、大きなバイオ フィルム形成抑制効果の違いは得られなかった。このとこ から、光照射の条件や接種する細菌数など、今後より詳細 を検討することで、光触媒加工品による抗バイオフィルム 抑制効果を評価する試験方法の開発へ結び付けていくこ とが重要と考えられた。

(3) 新規機能性物質の探索と抗ウイルス性能

MoO3の可視光応答性を付与するために、酸化モリブデ

ンと酸化チタンを組み合わせた材料(MoO3/TiO2)を作成し、 その抗ウイルス効果の確認を行った。その結果、ネコカリ シウイルス及びインフルエンザウイルスに対して、可視光 照射下での高い抗ウイルス効果を認めた。このことから、 新しい可視光応答形光触媒を作製することが出来ている。 更に、試験室内の評価方法である JIS での評価方法に加え て、グローブボックス内に、各種試験サンプルを設置後、 ウイルスを噴霧し、各種試験サンプルにウイルスを吸着さ せた上での抗ウイルス効果の確認を行った。この方法によ り、実環境中におけるウイルスを含む飛沫がサンプルに付 着する状況を模擬した試験を行うことが出来た。その結果 から、実環境中に近い条件下においても、MoO₃/TiO₂はは 抗ウイルス活性を発揮することを見出した。更に、酸化モ リブデンを始め、幾つかの酸化物について、共同研究を通 じて SARS-CoV-2 に対する性能評価を行い、これまでに開 発してきた各種酸化物の抗ウイルス活性を確認すること が出来た。今後は、この材料の抗ウイルス活性を更に高め る方法について検討を進めていく予定である。

新型コロナウイルスを用いた性能評価の取り組み

永井 武

1. はじめに

2019 年末に中国の武漢で、新型のコロナウイルス (SARS-CoV-2) による感染事例が報告され、その後、瞬 く間に世界中に拡散された。そして、2020 年 3 月 11 日、 WHO が世界的な流行であるパンデミック宣言を出すに至 った。日本でも、感染が拡大し、2020 年 4 月 7 日に一回 目の緊急事態宣言が出された。この時、未知なる感染症の 混乱の中、マスクや消毒剤などの感染症対策製品が全国的 に品薄状態になった。ここで改めて、抗菌・抗ウイルス製 品の重要性が認識されるとともに、これらの製品に対する 信頼性が問われることとなった。特に市販の抗菌・抗ウイ ルス製品の多くは、「雑品」の扱いとなり、医薬品医療機 器等法の適用範囲外であることから、中には効果の低い製 品も販売されている。そこで、抗ウイルスを謳う製品につ いて、性能評価を行える試験機関の重要性が高まりつつあ る。

当研究所(旧公益財団法人 神奈川科学技術アカデミ ー)は、2016年より、インフルエンザウイルス及びネコ カリシウイルス(ノロウイルスの代替)を用いた抗ウイル ス試験を開始しており、平板、繊維、光触媒及び液体など の様々な形状の試験品について抗菌・抗ウイルス性能評価 を行ってきた。また、2020年初旬より、抗菌・抗ウイル ス製品を扱う企業からの評価依頼が急増し、さらに、これ らの企業の多くが SARS-CoV-2 での評価を要望していた。 そのため、これまでの経験を活かし、2020年度に、 SARS-CoV-2を用いた抗ウイルス性能評価を立ち上げるた め、以下のように、BSL3実験室の整備及び、SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス評価系の構築を行った。

1. 1 SARS-CoV-2の分類

SARS-CoV-2 は、感染症法の分類では四種病原体等であり、また、バイオセーフティレベル(BSL)の分類では、 BSL3 に該当するため、これらの基準を満たした実験室が 必要となる。そのため、当初使用していた BSL2 実験室に 加えて、新たに BSL3 実験室を新設することとなった。

1. 2 BSL3 実験室について

BSL3 の実験室は、厚生労働省が推奨している「感染症 法に基づく特定病原体等の管理規制」に基づいて設計を行 った。特に、既存の BSL2 の施設基準に加え、主に、以下 の仕様を追加し、BSL3 実験室を新設した。

- ① 個人認証及び二重扉を有する BSL3 専用前室の設置
- ② BSL2 実験室と BSL3 実験室の間にパスボックスを設置

 ③ HEPA フィルターを搭載し、差圧管理(BSL3 専用前 室と BSL3 実験室が陰圧)できる空調設備の設置
 各実験室の概略図を図1に示す。





図 1 BSL3 及び BSL2 実験室の概略図と BSL3 の様子

2. 実験と結果

ARS-CoV-2の培養及び感染価の測定

SARS-CoV-2を用いた抗ウイルス性能評価を行うために は、まず、ウイルスを培養し増やす必要がある。本検討で 用いた SARS-CoV-2 は、神奈川県衛生研究所より協力を受 け、分与された臨床分離株を使用した (SARS-CoV-2/Hu/KngFJ/23RD5株)。宿主細胞は、Vero 細 胞(ATCC CCL-81)及び Vero E6 細胞(ATCC CRL-1586) を用いて検討した¹。方法として、培養フラスコ(75 cm²) に宿主細胞を 100%コンフルエントになるように培養し、 培地を除去した後、SARS-CoV-2のウイルス液 1 ml を加え た(multiplicity of infection (moi) = 0.01)。33℃の CO₂イン キュベーターで、1時間培養した。(15分おきに振盪する) その後、MEM 培地(血清不含)10 ml を加え、33℃の CO₂ インキュベーターで、5日間培養した。この間の細胞の様 子を図2に示す。



図 2 SARS-CoV-2 感染後の Vero 細胞

ウイルス感染後、はがれた細胞を含む培養液を-80℃の フリーザーを用いて、凍結融解を2回行った。そして、遠 心分離後、細胞沈査を除去し、上清を SARS-CoV-2 原液と して-80℃に保存した。

次に、ウイルスの感染価を測定するため、ISO21702² を 参考に、プラーク法を用いて感染価の測定を行った。上記 のウイルス原液を MEM 培地で 10 倍の段階希釈系列を作 製した。細胞用 6 穴プレートに、宿主細胞を 100%コンフ ルエントになるように培養し、培地を除いた後、ウイルス 原液、及び各希釈液を 100 µl 加えた。33℃の CO₂インキュ ベーターで、1 時間培養した。(15 分おきに振盪する) そ の後、寒天培地を重層し、33℃の CO₂インキュベーターで、 5 日間培養した。そして、ホルマリン固定後、寒天培地を 除去し、メチレンブルーで染色した。ウイルスによって形 成されたプラークの数を測定し、感染価を求めた。(図 3)

図3 Vero 細胞で培養した SARS-CoV-2 によるプラーク 10²倍希釈 10³倍希釈 10⁴倍希釈



105倍希釈 104倍希釈 ウイルス無し

その結果、Vero 細胞で培養した方が、Vero E6 細胞で培養したものより、高い感染価の SARS-CoV-2 ウイルス原液が得られた。(5.0×10^7 pfu/ml、pfu : plaque-forming units)。 これをウイルス液として性能評価に用いることとした。

2. 2 光触媒サンプルによる抗ウイルス性能評価 光触媒サンプルによる抗ウイルス性能評価は、バクテリ

オファージを用いる JIS R 1706³ (紫外光) 及び JIS R 1756⁴ (可視光) があり、これらと ISO21702 を参考に試験を行 った。紫外光応答型光触媒加工ガラス、可視光応答型光触 媒加工ガラス及び無加工品に、滅菌水で 10 倍に希釈した SARS-CoV-2 ウイルス液 150 µl を接種し、密着フィルムで 密着させる。これらを安全キャビネット内の暗幕(図 4) にセットし、所定の照度または暗所で 2 時間静置した。そ して、SCDLP 培地 1 ml によりウイルスを回収し、10 倍の 段階希釈系列を作製した。これらを 6 穴プレートに培養し た Vero 細胞に接種し、プラーク法によりウイルスの感染 価を測定した。(図 5)



図4 安全キャビネット内の光照射装置







得られたプラークから、それぞれの感染価を計算した結果 を図6に示す。

図 6 SARS-CoV-2 を用いた光触媒抗ウイルス性能評価の結果

無加工品では、接種したウイルスがあまり減少することな く回収されていた。また、紫外光及び可視光応答型光触媒 によって、ウイルス感染価が大きく減少する結果となった。 特に、可視光応答型光触媒は、ハイブリッド加工であるた め、暗所においてもウイルスの減少が見られた。

次に、同じサンプルを用いて、インフルエンザウイルス を用いて抗ウイルス性能評価を行った。SARS-CoV-2 とイ ンフルエンザウイルスはともにエンベロープを有する RNA ウイルスであり、構造上の類似性が見られる。その ため、これらを用いた抗ウイルス試験では、相関性のある 結果が得られると考えられる。図7に、インフルエンザウ イルス(A型、H3N2株)を用いた抗ウイルス性能評価の 結果を示す。



図 7 インフルエンザウイルスを用いた光触媒抗ウイルス性能評 価の結果

その結果、抗ウイルス活性自体は、SARS-CoV-2 よりも低いものの、暗所及び明所の感染価の関係性を見ると、高い相関があることが明らかとなった。

3. 考察及び今後の展望

上記の通り、SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス性能評価 を行える体制が整ったと考えられる。SARS-CoV-2 を用い た抗ウイルス性能評価系で重要と考えられる点は、既存の ISO 及び JIS 規格と同等の条件であることである。特に、 抗ウイルス製品を開発・販売する企業は、ISO21702(平板)、 ISO18184(繊維)、JIS R 1706 及び 1756(光触媒)をもと に開発している。そのため、これらの試験規格と試験条件 が大きく異なると、これまでの知見を活かすことができず、 一からの開発となってしまう可能性が高い。そこで、当研 究所では、これらの試験規格に準用する形で行える体制を 整えた。特に、上記試験規格と同じ条件とすべき、重要な 点は以下が挙げられる。

- 試験ウイルス液は、無血清で、かつ同じ培地で調整し、 滅菌水で10倍に希釈したものを用いる
- ② 試験サンプルからウイルスを回収する際は、SCDLP 培地を用いる
- ③ ウイルスの感染価は、プラーク法(もしくは TCID50 法)で測定する。特に、試験ウイルス液の調整については、抗ウイルス活性に大きく影響を与えると考えられるので、最も重要な点である

一方、SARS-CoV-2 を用いた性能評価の場合、既存の 規格と条件を合わせることが出来ない点もあり、当研究所 では以下が挙げられる。

- ① ウイルス及び宿主細胞が異なっている
- ② ウイルス液の濃度が、既存の規格に比べ約 1/10 程度 である
- ③ 回収液の量を1mlとした(繊維サンプルでは10ml)

しかし、これらの点は、抗ウイルス活性にはほとんど影響しないと考えられるため、当研究所では、今後 SARS-CoV-2を用いた抗ウイルスは、上記の試験規格に準 用する形で運用していく予定である。

なお、SARS-CoV-2を用いた抗ウイルス性能評価サービ スは、当研究所の広報誌である KISTEC NEWS(図 8) でも取り挙げられている。また、現在は、SARS-CoV-2を 用いた抗ウイルス性能評価は、平板及び繊維状のサンプル に限定しているが、今後、液体サンプルでも評価できるよ うに整備していく予定であり、サービスを拡大していく予 定である。



図 8 KISTEC NEWS Vol15の表紙

【参考文献】

- Jennifer Harcourt, Azaibi Tamin, Xiaoyan Lu, Shifaq Kamili, et al., *Emerg. Infect. Dis.*, 26(6):1266 (2020)
- 2. ISO 21702 (2019) "Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces."
- JIS R 1706 (2020) "ファインセラミックス—光触媒材 料の抗ウイルス性試験方法—バクテリオファージQβ を用いる方法"
- JIS R 1756 (2020) "ファインセラミックス—可視光応 答形光触媒材料の抗ウイルス性試験方法—バクテリ オファージQβを用いる方法"
- 5. ISO18184 (2014) " Textiles-Determination of antiviral activity of textile products"

光触媒を用いたバイオフィルム形成抑制効果

石黒 斉

1. はじめに

多くの細菌は、一般的な生活環境において、様々な表面 に付着し、増殖していく。その結果として、水回りのぬめ りなどのバイオフィルムが形成される。このようなバイオ フィルム内で増殖した細菌が基材表面から剥離し、エアロ ゾル等として環境中に放出されることにより、院内感染の 原因や循環式浴槽、公衆浴場等におけるレジオネラ症の原 因となっている。そのことから、バイオフィルム形成の抑 制や除去方法の確立は医療分野や公衆衛生分野における 重要な課題となっている。

光触媒は光があたる事で、抗菌効果や超親水性を発揮す る機能性物質であり、様々な分野で応用されており、その 機能を評価する各種標準試験法も開発されており、実際の 研究開発の現場で使用されている。一方で、バイオフィル ムの形成に関する標準試験方法は確立されていない。そこ で、本検討では、標準試験方法の作成に向けた取り組みと して、光触媒によるバイオフィルム形成抑制効果を検討し た。

2. 実験と結果

2. 1 実験方法

基本的な実験方法としては、抗菌技術製品協議会より報告されている試験方法⁽¹⁾を参考にして行った。具体的に使用した材料等は以下の通りである。

2.1.1 材料

対象とした細菌は表皮ブドウ球菌(S. epiderimidis, ATCC 35984)を用いた。細菌液の作製方法は、以下の通りである。 始めに、細菌を寒天培地で一晩培養し、増殖したコロニー を 1/5TSB 培地に移植して、一晩培養した。得られた培養 液の細菌数を 10⁶/ml 程度になるように 1/5TSB 培地で希釈 し、細菌液とした。

本検討で用いた試験片は、光触媒加工品は酸化チタンを コートしたガラスを用い、対照として、酸化チタンをコー トしていないガラス(無加工品)を用いた。それぞれのサイ ズは 2.5 cm 角として、他の細菌等の汚染を防ぐため、こ れら表面をエタノールで拭いてから、検討に用いた。

2. 1. 2 光照射条件

各試験片は5 cm 角のプラスチックケースに入れた後、 細菌液を20 ml 入れてから、光触媒加工品の抗菌効果を評 価する規格である JIS R 1702⁽²⁾に規定されている保湿ガラ スをかぶせ、光照射を行った。光照射は恒温培養器の中で 行い、10WのBLB ランプを恒温培養器内に設置し、その 下部に細菌液を入れたプラスチックケースを置いてから、 48 時間 35℃の条件で光照射を行った。照射強度は、0.4 mW/cm²及び 0.8 mW/cm²の条件とした。

2. 1. 3 バイオフィルムの確認

48 時間光照射を行った後、バイオフィルムの形成について、確認を行った。始めに水で試験片を洗浄し、その試験片を 0.1%のクリスタルバイオレットで染色した。染色後、クリスタルバイオレットを溶出し、その吸光度を測定した。

2.2 結果

図1に、48時間反応後の試験片の一例を示す。図にあ るように、試験片の表面が白っぽくなっており、バイオフ ィルムが形成されていることが確認できる。



図1. 48時間反応後の試験片の様子

これらの試験片をクリスタルバイオレットで染色、風乾さ せたものが図2となる。それぞれ、図2(a)は無加工品の暗 所静置群、図2(b)は無加工品の光照射群、図2(c)は光触媒 加工品の暗所静置群及び図2(d)は光触媒加工品の光照射 群である。無加工品については、図にあるようにクリスタ ルバイオレットにより、はっきりと染色されており、バイ オフィルムの形成が認められる。また、光触媒加工品につ いても、暗所静置群ではしっかりとクリスタルバイオレッ トによる染色が認められており、バイオフィルムが形成さ れていることは明らかである。一方で、光触媒加工品に光 照射を行った群では、多少の染色がみられるものの、明ら かにバイオフィルムの形成が抑制されていることが見て 取れる。

次に、これらの染色した試験品からクリスタルバイオレ ットを溶出し、その吸光度を測定することで、バイオフィ ルムの形成量を確認した。その結果を図3に示す。無加工 品及び光触媒加工品の暗所群については、2群の間に大き な差は認められなかった。0.4 mW/cm²、0.8 mW/cm²の光 照射を行った群については、暗所群と比較して、すべての 群で吸光度の値が減少していた。また、0.4 mW/cm²の光 照射群では、同じ光照射を行った無加工品の群と比較して、 光触媒加工品における吸光度の値がより減少しているこ とが確認できた。一方で、0.8 mW/cm²の光照射を行った 群においては、無加工品及び光触媒加工品との間に明確な 差は認めず、またその吸光度の値は 0.4 mW/cm²の光照射 を行った光触媒加工品と同程度の値であった。



図2. クリスタルバイオレット染色結果

3. 考察及び今後の展望

以上の結果から、光触媒反応により、バイオフィルム抑 制効果を得ることが出来ることが明らかとなった。一方で、 強い光を照射した群においては、無加工品及び光触媒加工 品のどちらについても、明確な差を認めなかった。このこ とから、光照射の強さが、バイオフィルムの形成に影響を 与える可能性が示唆された。また、光触媒加工品に光照射 を行った群について、薄いながらもバイオフィルムの形成 が認められている。このことから、光触媒反応によって、 バイオフィルムの形成を抑制する機構としては、表面上の 抗菌作用によって、バイオフィルムの形成時間を遅らせて いることによるものと推測された。そのため、一度バイオ フィルムの形成が開始された場合、その形成を遅らせるこ とは出来るが、形成されたバイオフィルム自身を分解する





ためには、更に強い光照射や反応時間が必要と考えられる。 今後、本検討を基に、様々な条件下での検証をさらに進 めていく。具体的には、以下の通りである。

- ・
 接種する細菌数の違いによる影響 本検討では、確実にバイオフィルムが形成されるよう、 非常に多くの細菌数を接種した。そのため、細菌数を 減らした条件で検討を行い、より効果を確認しやすい 細菌数を探索する。
- ② 光照射の時間の違いによる影響 本検討では、48時間の照射時間におけるバイオフィ ルムの形成について確認した。今回の結果から、暗所 群について、48時間で十分なバイオフィルムの形成 が認められた。そこで、より短い時間での評価を行う。
- ③ 光照射の照度の違いによる影響 本検討では2条件での光照射条件での検討を行った。 一方で、0.8 mW/cm²では、光照射による影響と思われ るバイオフィルム形成抑制が認められている。そこで、 照度を更に細かくした条件で検討を行い、無加工品に おけるバイオフィルム形成能を抑制しない照度の探 索を行う。
- ④ 光触媒の種類の違いによる影響 今回用いた光触媒は紫外光応答形光触媒である。一方 で、現在は可視光応答形光触媒の開発が進んでおり、 更にはハイブリッド型と呼ばれる、暗所においても抗 菌効果を発揮する光触媒加工製品も開発されている。 これら様々な光触媒加工品を用いて、バイオフィルム 形成抑制効果の検討を進める。

以上のような、項目について、更に検討を進めていき、 光触媒加工品による抗バイオフィルム性能評価方法の開 発へとつなげていくことを計画している。また、抗菌製品 技術協議会が進めている抗バイオフィルム試験法の ISO 化について、ISO 規格として成立した際には、それらの試 験方法も取り入れながら、新しい光触媒性能評価方法とし て、確立を目指していく予定としている。

【参考文献】

- 抗バイオフィルム試験法について.2017 年 度 SIAA 委員会活動報告会.平成 30 年 01 月 29 日.
- 2. JIS R 1702:2020 ファインセラミックスー光 触媒抗菌加工材料の抗菌性試験方法及び抗 菌効果. 一般財団法人 日本規格協会.

【謝辞】

本検討にあたっては、公益財団法人東京応化科学技術振興 財団からの第34回「研究費の助成」として、助成を受け て行った。

酸化チタンと酸化モリブデンを組み合わせた可視光応答型

光触媒材料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

2020年から新型コロナウイルスによる感染症が世界中 で蔓延し、パンデミックとなった。最後の切り札であるワ クチン接種が進行しているが、感染症対策がまだまだ必要 とされる社会状況である。感染症対策の一つとしてエタノ ールなどによる手指の消毒やドアノブに代表される人が 触る物の清拭による消毒が行われている。エタノールによ る消毒は、即効性があるものの持続性はないため、1日に 何度も清拭が必要となる。そこで、持続性のある抗ウイル ス剤でドアノブなどの表面をコーティングしておけば、エ タノール清拭と組み合わせることにより、持続性のある感 染症リスク低減となる。本稿では、持続性のある新規の抗 ウイルス剤を開発しようとこれまで取り組んできた金属 酸化物の抗ウイルス活性について報告する^{1,2)}。

1.1 金属酸化物の抗ウイルス活性

これまで、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を見出すために、 抗菌効果を示す金属イオン、たとえば Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Sn^{4+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} をふくむ金属酸化物を中心に抗ウイルス 活性を評価した。評価に供した金属酸化物は、 Fe_2O_3 , MnO_2 , CeO_2 , MoO_3 , MoO_2 , WO_3 , SnO_2 , NiO, ZnO の9種であり、こ れらの粉体の抗ウイルス活性を、エンベロープをもたない バクテリオファージ Qβ、ネコカリシウイルスならびにエ ンベロープをもつバクテリオファージ $\phi6$ 、インフルエンザ ウイルスを対象に、可視光応答性も調べるため白色蛍光灯 照射下と暗所下で評価した。結果として、光照射下、暗所 下ともに、酸化亜鉛(ZnO)で弱い抗ウイルス活性が認めら れ、さらに、酸化モリブデン(MoO_3 , MoO_2)において、非 常に高い抗ウイルス活性が認められた。また、MnO₂は、 バクテリオファージ Qβに対しては、ほとんど効果を示さ なかったのに対し、バクテリオファージφ6 に対しては、 暗所下、光照射下とも低い抗ウイルス活性が認められた。 これらの結果は、抗菌活性を示すイオンをもつ金属酸化物 でも、抗ウイルス活性を示す金属酸化物は少なく、抗菌活 性があっても、抗ウイルス活性をもつとは限らないことを 示している。また、高い抗ウイルス活性を示した酸化モリ ブデンは、光照射効果すなわち可視光応答性はほとんどな いことも判明した。なお、酸化モリブデンは、抗菌効果を 示すことは、すでに報告されている^{3),4}。

酸化モリブデンの高い抗ウイルス活性を生かしながら 可視光応答性を示す材料を作製できないかと、酸化チタン と酸化モリブデンを組み合わせた材料を調製した。その材 料の抗ウイルス活性について実環境に近い状態のウイル スを対象に評価したので、紹介する。

2. 実験と結果

2. 1. 抗ウイルス活性評価方法

モリブデン酸化物と酸化チタンを組み合わせた材料は、 酸化チタンを Na2MoO4水溶液に浸漬、加温して 3 時間攪 拌しながら作製した。その後、水で洗浄し、100℃で乾燥 し、それをサンプルとした。この粉体をガラスに担持して、 抗ウイルス活性を評価した。

抗ウイルス活性評価は、基本的には JIS R 1756 に従って 行った。対象ウイルスとしては、バクテリオファージ Qβ (NBRC20012、宿主大腸菌(NBRC106373))、バクテリオフ ァージφ6(NBRC105899、宿主菌(NBRC14084))、ネコカリ シウイルス F-9 株(ATCC VR-782、宿主:CRFK 細胞(ATCC



図 1. MoO_3/TiO_2 の抗ウイルス活性(左;ネコカリシウイルスに対して、右;インフルエンザウイルスに対して)

CCL-94)) 並びに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))を用いた。ネコカリシウイルスやインフルエンザ ウイルスの感染価は、TCID₅₀として求めた。光照射は、光 源として白色蛍光灯(FL20SSW/18, MITSUBISHI)を TypeB filter(380nm 以下の波長をカット)のもとで照射し、1000 lx の照度で行った。

2. 2. MoO₃/TiO₂の抗ウイルス活性

酸化チタンとモリブデン酸化物を組み合わせた材料 (MoO₃/TiO₂)を調製し、ネコカリシウイルス、インフルエ ンザウイルスを対象として評価した結果を図1に示した。 MoO₃単独での暗所下の活性が生かされ、暗所でも低い抗 ウイルス活性が認められたが、1000 lx の可視光照射下で は、ネコカリシウイルスについては、4時間で検出限界ま で感染価が低下し、高い抗ウイルス効果が観察された。ま た、インフルエンザウイルスに対しても光照射下で2.0以 上の抗ウイルス活性を示した。これらの結果は、本材料が 可視光応答性を示すことを明らかにした。

2.3.実環境に近い存在状態でのウイルスに対す る抗ウイルス活性

図1で示した抗ウイルス活性は、JIS R 1756 を参考に評価を行っているが、サンプル粉末にウイルス液を滴下し、 密着フィルムで覆うことで、液中のウイルスをサンプルに 接触させ、反応させる。一方で、実際の生活空間でのウイ ルスは、液中に存在しているのではなく、材料表面に吸着 した状態で存在し、JIS での評価方法より水分が少ない状 態で存在していると考えられる。そのため、JIS で測定し た活性が、実際の生活空間に存在するウイルスに有効であ るかを示すことは、真の抗ウイルス活性を知るうえで重要 なことと思われる。以前携わっていた NEDO プロジェク ト(2007 年~2012 年 東京大学で行われた NEDO の「循環 社会構築型光触媒産業創成プロジェクト」(PL:橋本和仁 教授(現 NIMS 理事長))で、病院や空港といった実空間 で可視光応答型光触媒をコーティングした材料の抗菌活 性を測定したところ、JIS では、99.99%の抗菌活性をもっ ていた材料でも、実環境では1年を通して平均すると、50 ~95%の抗菌活性しか示さなかった。それは、上述したよ うに、実環境での菌やウイルスは、たとえばテーブル表面 にホコリや手の皮脂などの他の有機物と共存し、水分もあ まりない状態で付着しており、菌やウイルスの存在状態が JIS の場合とは異なるためと考えられた。

そこで、実環境に近い存在状態でのウイルスを対象にし て、作製した MoO₃/TiO₂の抗ウイルス活性を調べることを 試みた。実環境に近い状態のウイルスは、図 2 の左図に示 した装置で調製した。すなわち、10-20%程度の湿度を保 った 370 L のグローブボックス内に、MoO₃と MoO₃/TiO₂ の粉末を担持したガラスサンプルを設置し、ネブライザー でバクテリオファージ Qβ(2×10⁹ pfu)をグローブボックス 内に噴霧した。噴霧後、グローブボックス内のファンで攪 拌し、ガラスサンプルにファージを吸着させた。吸着させ たそのままの状態で、MoO₃/TiO₂のサンプルは可視光 1000 lx 照射下と暗所下に置き、MoO₃のサンプルとコントロー ルのガラスサンプルも暗所下に置き、それぞれの感染価を 測定した。

図2右図にその測定結果を示した。コントロールのガラ スサンプルとMoO3サンプルは、24時間放置しても、感染 価はおよそ1桁弱しか減少しなかった。また、MoO3/TiO2 の暗所下に置いたサンプルも同様の減少率を示したのに 対し、可視光照射下のMoO3/TiO2サンプルは、24時間で2 桁以上の感染価減少が観察され、実環境に近いウイルスに 対しても一定の抗ウイルス活性を示すことが明らかとな った。

MoO₃単独の抗菌活性は、水分があれば漏出する MoO₄²⁻のイオンと低い pH になる酸性(H₃O⁺)によるものと報告が あり⁴⁾、MoO₃の抗ウイルス活性も同様の活性種が働いて いると示唆されるデータを昨年報告している。そのため、 MoO₃の抗ウイルス活性を発現させるためには、水分の存 在が不可欠であり、乾燥した表面では効果が得にくいと考



図 2. 実環境に近いウイルスでの抗ウイルス活性 左図:ウイルスを噴霧し、サンプルにウイルスを吸着させたグローブボックス装置、 右図: MoO₃, MoO₃/TiO₂の実環境に近いウイルスでの抗ウイルス活性 えられ、今回の測定結果もそのメカニズムを支持している。 一方で、その MoO3 と酸化チタンと組み合わせた MoO3/TiO2は、生活空間にある可視光が照射されれば、実 環境に近いウイルスに対しても抗ウイルス活性を示し、 MoO3 の弱点が克服できたデータで得られた。MoO3/TiO2 が真に抗ウイルス活性を持つことを示せたことは非常に 重要な知見であると考えている。

3. 考察及び今後の展望

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(MoO₃)と酸化チタンを組み合わせた新規の可視光応 答型光触媒材料 MoO₃/TiO₂を創製し、その抗ウイルス活性 を JIS の評価方法でのウイルスと、実環境に近い存在状態 でのウイルスとを対象に評価を行い、実環境でのウイルス に対しても抗ウイルス活性を示すことを報告した。現在の コロナ禍に役立つ真に高い抗ウイルス活性をもつ材料の 創製を目指して、今後も本材料の抗ウイルス活性を高める 改善を行っていきたいと考えている。

なお、本材料に関する特許が成立し、またある企業との 共同研究により、フィルム材料として実用化を目指した研 究も行った。

また、東京工業大学中島研究室、奈良県立医科大学との 共同研究の中で、セリウムとモリブデンの複合酸化物 (γ-Ce₂Mo₃O₁₃: CMO)の新型コロナウイルス(SARS-Cov-2) に対する抗ウイルス活性²⁾を測定した際に、MoO₃単独の 活性についても調べた。CMO には及ばなかったものの **MoO**₃も6時間の反応でSARS-Cov-2の感染価が検出限界 となる抗ウイルス活性を示した⁵。

実環境に近い存在状態のウイルスを調製した図 2 左図 に示したグローブボックス装置は、空間にウイルスを噴霧 できるので、空気清浄機などの抗ウイルス活性の性能も測 定できる。当試験室では、そのような試験も受託している ので、開発されている企業の方々に大いに利用して頂けれ ばと思っている。

また、実環境に近い存在状態の細菌に対する抗菌活性の 評価方法は、可視光応答型光触媒材料に対して、日本が提 案した方法が ISO 化され、2020 年に ISO 22551 が成立し ている。

本研究は、科研費(JSPS JP20K12251)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. Miyauchi, K. Sunada, K. Hashimoto, *Catalysts* 10(9), 1093 (2020).

2. T. Ito, K. Sunada, T. Nagai, H. Ishiguro, A. Nakajima *et al., Materials Letters*. 290, 129510 (2021).

3. K. Krishnamoorthy, M. Premanathan, M. Veerapandian, S. J. Kim, *Nanotechnology*, **25**, 315101 1-10 (2014).

4. C. Zollfrank, K. Gutbrod, P. Wechsler, J. P. Guggenbichler, *Mater. Sci. Eng. C*, **32**, 47–54 (2012).

5. https://www.titech.ac.jp/news/2021/049124

績 業

【原著論文】

- Motomura H, Ozaki A, Tamori S, Onaga C, Nozaki Y, Waki Y, Takasawa R, Yoshizawa K, Mano Y, Sato T, Sasaki K, <u>Ishiguro H</u>, Miyagi Y, Nagashima Y, Yamamoto K, Sato K, Hanawa T, Tanuma S, Ohno S, Akimoto K. Correlation between Glyoxalase 1 and Protein kinase C λ is predictive of poor clinical outcomes in late-stage breast cancer. Oncol lett. accepted.
- Miyauchi M, <u>Sunada K</u>, Hashimoto K.Antiviral Effect of Visible Light-Sensitive Cu_xO/TiO₂ Photocatalyst. Catalysis, **10**, 1093 (2020).
- Nozaki Y, Motomura H, Tamori S, Kimura Y, Onaga C, Kanai S, Ishihara Y, Ozaki A, Hara Y, Harada Y, Mano Y, Sato K, Sasaki K, <u>Ishiguro H</u>, Ohno S, Akimoto K. High PKCl expression is required for ALDH1A3-postive cancer stem cell function and indicates a poor clinical outcome in late-stage basal-like breast cancer patients. PLoS One, 15, e0235747 (2020).
- Matsumoto T, <u>Sunada K</u>, <u>Nagai T</u>, Isobe T, Matsushita S, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A. Effects of cerium and tungsten substitution on antiviral and antibacterial properties of lanthanum molybdate. Materials Science and Engineering C, **117**, 111323 (2020).
- Kawahara T, Teramoto Y, Li Y, <u>Ishiguro H</u>, Gordetsky J, Yang Z, Miyamoto H. Impact of Vasectomy on the Development and Progression of Prostate Cancer: Preclinical Evidence. Cancers, **12**, 2295 (2020).
- Ito T, <u>Sunada K, Nagai T, Ishiguro H</u>, Nakano R, Suzuki Y, Nakano A, Yano H, Isobe T, Matsushita S, Nakajima A. Preparation and evaluation of cerium molybdates with antiviral activity. Materials Letters. **290**, 129510 (2021).

【総説】

- 中島 章、砂田 香矢乃、永井 武、石黒 斉. 抗菌・抗 ウイルス活性を有する撥水性複合酸化物. バイオイ ンダストリー 37(11):10-19, 2020.
- 中島 章、<u>砂田 香矢乃、永井 武、石黒 斉</u>. 抗菌・抗 ウイルス活性を有する撥水性複合酸化物. 塗装工学. 55(11):1-12, 2020.
- 3. 石黒 斉、砂田 香矢乃、永井 武、濱田 健吾、青木 大

輔、落合 剛. 光触媒の DDS マテリアルとしての可能 性と医療応用. Drug Delivery System. 36(1):10-17, 2021.

- 岡本 隆太、石黒 斉、砂田 香矢乃. 飛沫粒子の拡散 分布シミュレーション技術. クリーンテクノロジー. 31(1):1-5, 2021.
- <u>砂田香矢乃</u>、宮内雅浩. 銅担持酸化チタン光触媒材料の抗ウイルス活性とその評価. 技術情報協会 雑誌
 「研究開発リーダー」18(1), 18-21, 2021.
- 6. 宮内 雅浩、砂田 香矢乃. 可視光応答形光触媒とその 抗菌・抗ウイルス機能. AndTech 書籍「抗菌・抗ウイ ルス技術の開発・評価と樹脂、繊維、塗料、フィル ム等への製品応用」第6節 ISBN978-4-909118-23-3

【書籍】

- 酒井 宗寿、石黒 斉、中島 章. 第3章 材料・表面の 化学的効果を利用した撥水・撥油・親水化. 4 酸化 チタン光触媒による光誘起超親水性コーティング. 撥水・撥油・親水性材料の開発動向. CMC 出版, 151-162, 2021.
- <u>砂田 香矢乃</u>、宮内 雅浩. 光触媒材料の抗菌・抗ウイ ルス活性とそのメカニズム. 技術情報協会書籍「抗 菌・抗ウイルス性能の材料への付与、加工技術と評 価」269-278, 2021.
- 3. <u>石黒 斉</u>. 第10章 抗菌・抗ウイルス系性能評価方法. 光触媒実験法. 北野出版. 161-175, 2021.

【口頭発表】

- 椎名(本村) 瞳、尾崎 綾栞、多森 翔馬、野崎 優香、 高澤 涼子、佐々木 和教、<u>石黒 斉</u>、宮城 洋平、長嶋 洋治、田沼 靖一、大野 茂男、秋本 和憲. ステージ III-IV 乳癌における GLO 1 - PKCλ 共発現患 者は予後不良である.
 第79回日本癌学会学術総会. 10 月,広島.
- 3. <u>砂田 香矢乃、畑山 靖佳、永井 武</u>、中島 章、<u>石黒 斉</u>. 可視光下での酸化モリブデン担持酸化チタンの抗ウ

イルス活性について. 第 25 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」.11 月,オンライン.

- 伊東 拓朗、磯部 敏宏、松下 祥子、中島 章、<u>砂田 香 矢乃、永井 武、石黒 斉</u>.
 モリブデン酸セリウムの作製とその抗ウイルス活性.
 日本セラミックス協会 2021 年会. 3 月, 大阪, オンラ イン.
- 5. 加藤 千尋、磯部 敏宏、松下 祥子、中島 章、砂田 香 <u>矢乃、石黒 斉、永井 武</u>.
 CoOx 担持 Ceo.8Bio.2O2-8, Ceo.8Lao.2O2-8 による水中 2-ナ フトール分解および抗ウイルス活性.
 日本セラミックス協会 2021 年会.3月,大阪,オンラ イン.
- 中島 章、<u>砂田 香矢乃</u>、<u>永井 武</u>、石黒 <u>斉</u>. 撥水性と抗ウイルス活性を併せ持つ新規セラミック ス材料. 日本セラミックス協会 2021 年会. 3 月, 大阪, オンラ イン.

【特許】

(1) 国内特許出願 2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発揮し、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^{1,2}、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 療効果を発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。脳機能発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渇 望されている(図1)。

 脳血管障害とは・・・

 ・血管が詰まる脳梗塞と出血する脳出血に大別

 ・年間約 10 万人の死者(国内死因 3 位)

 ・「寝たきり」の原因の約 25%(国内原因 1 位)

 ・患者数は約 100 万人

 ・年間医療費は約 1.7 兆円 (脳梗塞だけで約 1 兆円)

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 ・

 <t

図1:脳梗塞治療法開発の重要性

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。その中でも、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発揮させる材料が望 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分な 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 力を発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 胞の生存や機能発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^{1,2}、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発揮する人工足場を 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発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2年目となる2020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。

新規ペプチド分子集合体の開発

②全長タンパク質を細胞足場から徐放させる技術の開発 ③脳梗塞モデルマウスの治療効果の検討

2. 研究成果

以下に挙げるのは、2020 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 2019 年度に、RADA16 よりも粘弾性が低く、脳 内投与が容易な RADA16 変異体で 16 番目のアラニンをグ リシンに置換した RADA16(A16G)を創製した³。しかしな がら、RADA16 関連ペプチドは、酸性から中性に変化する と相互作用が強まるため、生理活性物質の失活や生体組織 の損傷を惹起する酸性条件下で投与せざるを得ないとい う問題点があった。そこで我々は、超分子化学を専門とす る東京農工大学・村岡貴博教授と計算物理学を専門とする 北里大学・渡辺豪講師との共同研究にて、中性において炭 酸イオン存在下でゲル化する超分子ペプチド X を開発し た(特願 2020-128805)。なお、知財保護の観点から、本研 究報告書ではペプチド X の詳細な情報は割愛する。

まずはじめに、ペプチド X の分子集合体構造を分子動 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10nmの立方体の中にペプチド X が水分子中で濃 度15%となるように初期構造を作成して、シミュレーショ ンを行った。その結果、ペプチド X がファイバー状の集 合体形状を示し(図4)、ゲル化することが予想された。

そこで、ペプチドXをFmoc法で合成し、炭酸イオン存 在下における物性をCDスペクトル解析、動的粘弾性解析、 電子顕微鏡解析にて検証し、MDシミュレーション解析の 結果と合致するかどうか検討した。その結果、シミュレー ションで予想されたように、ファイバー状の集合体形状を 示し、ゲル化することが明らかとなった(図5)。



次に、ペプチドXの細胞接着性を検討した。1%のペプチドX溶液 50 uLをチャンバースライドに滴下し、減圧乾燥でコートした。1.8x10⁵個の3T3細胞を10%血清の含まれたDMEM培地に懸濁し、ペプチドをコートしたチャンバースライドに播種し、CO2インキュベーターで30分間培養して接着させた。非接着細胞をPBSで洗浄して取り除き、接着細胞を4%PFAで固定してDAPI染色した。その結果、シリコナイズ処理や未処理のチャンバースライドに比べ、ペプチドXコートで接着細胞数が増加し(図6)、

図5:合成ペプチドXのゲル化(上)と、電子顕

微鏡解析(下)

ペプチドXが細胞接着性を持つことが明らかとなった。

シリコナイズ処理	無処理	ペプチド X 処理		
図 6 : ペプチド X の細胞接着能の評価				

②全長タンパク質を細胞足場に配向させる技術の開発

自己集合化したペプチド X に VGEF 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 を用いてペプチド X 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 2020-146597)(図 7)。その結果、RADA16 に比べ てペプチド X の方が GFP 徐放量が多いことが明らかとな った。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 2020-146597)。



③脳梗塞モデルマウスの治療効果の検討

VEGF を徐放するペプチド X を投与する実験では、中 大脳動脈遠位部梗塞(dMAO)モデルとローズベンガル投 与モデルの異なる 2 つの脳梗塞モデルにおける治療効果 を検討した。

dMCAO 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1mm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。手術7日後に歩行機能解析を行い、その後、 VEGF を徐放させる処理をしたペプチド X を損傷脳領域 に2 uL 投与し、投与7日後に歩行機能解析を行った。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(図 8)。な お、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。解析 の結果、VEGF 徐放群は対照群(PBS 投与群)に比べて歩 行機能が顕著に回復していることが判明した(図9)。



図8:脳梗塞モデルの歩行機能解析



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4mm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 0.7mm,前方2.5mm」、「右方0.7mm、後方1.0mm」、「右 方2.7mm、後方1.0mm」、「右方2.7mm、前方2.5mm」 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、10mg/mlのローズベンガル溶液を100uL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。

dMCAO モデル実験と同様に、手術7日後に歩行機能解 析を行い、その後、VEGFを徐放させる処理をしたペプチ ドXを損傷脳領域に2uL投与した。歩行解析の結果、ロ ーズベンガル投与モデルにおいても、VEGF徐放群は対照 群(PBS投与群)に比べて歩行機能が顕著に回復している ことが判明した(図10)。



以上まとめると、新規ペプチド X の開発により、全長 タンパク質を細胞足場から効果的に徐放させることに成 功し、VEGF を徐放するペプチド X の脳内単回投与で治 療効果を発揮することを明らかにした。本研究プロジェク トは、2021 年度より有望シーズ展開事業「超分子ペプチ ドを用いた脳梗塞の再生医療プロジェクト」として引き続 き研究開発を進めていく。

今後の展開を以下に述べる。

①ペプチドXを用いた脳梗塞再生治療への展開

非臨床 POC 取得を目指した開発を進めていく。具体的 には、投与時期の確定、投与方法の確定、投与量の確定、 製造方法の確定に加えて、再生メカニズムの解明も進めて いく。投与時期に関しては、現在、慢性期脳梗塞患者への 介入はリハビリに限られており、ペプチドの投与が慢性期 でも効果があれば、本技術の価値が高まる。そこで、発症 7日後以降にペプチドを投与し、機能回復効果のある最も 遅い時期を決定する。投与方法に関しては、損傷中心部、 損傷周辺部 (ペナンブラ)、脳室内投与の3つを検討し、 投与部位を決定する。製造方法に関しては、GMP レベル

での製造を行う。

②超分子ペプチド (ペプチド分子集合体) のプラットフォ ーム技術化

高分子は低分子の共有結合で作られる。したがって、 生体内での分解産物の分子構造が不明確で多様性に富み、 生体内での安全性を証明することが難しい。一方、超分子 ペプチドはペプチドの非共有結合で作られるため、生体内 での分解産物が原材料のペプチドとなる。我々は、物理/ 化学/生物学の叡智を結集させて、所望の物性を持つ超分 子ペプチドの設計方法を確立してきた。超分子ペプチドは 脳梗塞治療薬以外への展開も期待され、今後は超分子ペプ チドを多方面に展開させることも目指す。

参考文献

- 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
- 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
- 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】

 Ishida A, Oshikawa M, Ajioka I, Muraoka T. Sequence-Dependent Bioactivity and Self-Assembling Properties of RGD-Containing Amphiphilic Peptides as Extracellular Scaffolds ACS Applied Bio Materials, 3, 6, 3605–3611, 2020,

【口頭発表】

- 1. 味岡 逸樹 化学に立脚した神経再生研究
 第13回 神経化学の若手研究者育成セミナー 2020.9.9 オンライン
- 1. 味岡 逸樹,村岡 貴博,渡辺 豪 神経と血管の相互作用を人為操作する超分子ペプチド 材料
 第 63 回日本神経化学会大会
 2020.9.12 ライブ配信
- 3. 味岡 逸樹,村岡 貴博,渡辺 豪 損傷脳の機能回復を能動的に制御するペプチド分子集 合体材料の設計と評価 第69回高分子討論会 2020.9.17 オンライン
- 4. 矢口 敦也, 押川 未央, 渡辺 豪, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博 高い強度と刺激応答性を兼ね備えた超分子ペプチドゲ ル化剤の開発と応用 第10回 CSJ 化学フェスタ 2020 2020.10.20-22 オンライン
- 5. 矢口 敦也, 押川 未央, 渡辺 豪, 平松 弘嗣, 味岡 逸 樹, 村岡 貴博 膜タンパク質から着想した両親媒性ペプチドのゲル化 挙動
 2020 年 繊維学会秋季研究発表会
 2020.11.6 オンライン
- ・ 味岡 逸樹 超分子ペプチドを利用した脳梗塞再生治療研究 -分野 融合研究の難しさと面白さ-北里大学・第 35 回 若手 Lab・第 7 回 北里材料科学セ ミナー 2020.11.27 神奈川
- 7. 矢口 敦也, 押川 未央, 渡辺 豪, 平松 弘嗣, 味岡 逸

樹,村岡 貴博 二次構造変化を示す自己集合性ペプチドの開発と高強 度ゲルの構築 日本化学会第 10 春季年会 2021.3.21 オンライン

【特許】

- 1. 国内特許出願 2件
- 2. 外国特許出願 1件

「セキュア量子基盤技術の研究」プロジェクト

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、それを用いた量子暗 号通信(量子鍵配送)や量子状態事態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2年目となる 2020 年度は、以下の各項目 を重点項目として開発を実施した。

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 2 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 はその励起準位間間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分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てきたことに対 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用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パルス当り平均光子数を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 成した。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:YS0 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、かつこのような櫛構造 のある透明領域を Pr:YSO の広い吸収スペクトル内に大量 につくることで、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、その後櫛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櫛状構造を生成し 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。光ファイバー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 び運動量保存則がみたされる)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 10¹⁸個程度)と単一光子レベルのシグナル光(1秒当たり 10⁶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。



SFG: $\omega_{signal} + \omega_{pump} = \omega_{converted}$

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 っため、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である 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、606 nm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 あるので、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光子時間相関測定結果が図12であり、 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。



図12:光ファイバー伝送+波長変換後の2光子相関。

図 12 において、比較的大きなノイズフロアが生じている。この主な要因は波長変換時にポンプ光由来で生じるノ イズと考えている。

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、周波数安定かは各 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。

績 業

【原著論文】

 Kazuya Niizeki, Daisuke Yoshida, Kou Ito, Ippei Nakamura, Nobuyuki Takei, Kotaro Okamura, Mingyang Zheng, Xiuping Xie, Tomoyuki Horikiri Two-photon comb with wavelength conversion and 20-km distribution for quantum communication Communications Physics, 3, 138 (2020)

2. Daisuke Yoshida, Kazuya Niizeki, Shuhei Tamura, Tomoyuki Horikiri

Entanglement distribution between quantum repeater nodes with an absorptive type memory

International Journal of Quantum Information, vol18, No.05 2050026(2020)

【総説】

堀切智之,新関和哉,中村一平
 長距離量子通信実現のための量子中継技術の研究開発
 電子情報通信学会(IEICE)通信ソサイエティマガジン
 「B plus」, 2020 年秋号, No54, 133-141.

【書籍】

【口頭発表】

- Kazuya Niizeki, Daisuke Yoshida, Ko Ito, Ippei Nakamura, Nobuyuki Takei, Kotaro Okamura, Ming-Yang Zheng, Xiu-Ping Xie, Tomoyuki Horikiri Two-photon Comb with Wavelength Conversion for Long-distance Quantum Communication CLEO Pacific Rim Conference 2020, August 2020, Virtual Conference
- 2. 新関和哉,吉田大輔,伊藤洸,中村一平,武井宣幸, 岡村幸太郎, Mingyang Zheng, Xiuping Xie, 堀切智之 長距離量子通信に向けた2光子源のスペクトル制御と 波長変換 日本物理学会第76回年次大会,2021年3月,ポッライン開催
- 3. 中村一平,池田幸平,洪鋒雷,堀切智之 原子周波数コム型量子メモリの高性能化に向けた 補助光共振器によるレーザー線幅狭窄化 日本物理学会 第76回年次大会,2021年3月,オンライン開催
- 4. 吉田大輔,都野智暉,万浪香子,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パルスのシング

ルショット分光 第68回応用物理学会春季学術講演会,2021年3月, オンライン開催

- 5. 宮下拓士,近藤健史,池田幸平,吉井一倫,堀切智之, 洪鋒雷 AFC 量子メモリ結合に向けたレーザーの周波数安定化 第68 回応用物理学会春季学術講演会,2021 年 3 月, ポンライン開催
- 6. 都野智暉, 万浪香子, 吉田大輔, 郷治侑真, 池田幸平, 洪鋒雷, 中村一平, 堀切智之
 希土類イオン添加結晶を用いた量子メモリの保存時間の向上、及び任意時間読み出しに向けたシーケンス開発
 第 68 回応用物理学会春季学術講演会, 2021 年 3 月, ポンライン開催
- 7. 万浪香子,都野智暉,吉田大輔,伊藤洸,新関和哉, 宮下拓士,近藤健史,洪鋒雷,中村一平,堀切智之 希土類イオン添加 結晶量子メモリを用いた通信波長光 の単一光子レベルフォトンエコー観測 第68回応用物理学会春季学術講演会,2021年3月, ポンラ行開催

【特許】

(1)	国内特許出願	0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 (Fouriertransform coherent anti-Stokes Raman scattering)フローサイ トメーター [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. 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2年目となる令和2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) 細胞分取実証
- (2) FT-CARS 分光計測の高速・高感度化
- (3) 藻類の指向性進化の実証

2. 研究成果

上記研究目的に沿って研究を遂行し,令和2年度は以下 の研究成果を得た.

(1) 細胞分取実証

前年度までに開発した無標識 AI セルソーター(図 1) を用いた細胞分取を実証した.当初の計画通り,2形質以 上の情報をもとに10細胞/秒を超えるスループットでの細 胞分取を目標値として実験を行った.分取対象として,こ れまでに FT-CARS による測定実績 [1,2]のあるヘマトコッ カス,ユーグレナ,クロレラ細胞を用いた.これらの細胞 はバイオ医薬品,バイオ燃料といった物質生産や,環境中



図 1. FT-CARS セルソーターの概略図. 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し,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.

の有害物質を蓄積することによる水質改善に応用するこ とが期待されている.そのため、本項目で取り組む実証は 単なる Proof-of-concept ではなく、直接的に応用研究へと 繋げることが出来ると予想される.異なる条件で培養した 細胞群を対象として無標識 AI セルソーターによって細胞 分取が可能であることを実証する.

具体的には,以下の3つの条件において細胞分取実験を 実施した.

1. *Euglena gracilis* 細胞集団からパラミロン含有量の多い細胞を分取する

2. Chromochloris zofingiensis 細胞集団からデンプン含有 量の多い細胞を分取する

3. *Haematococcus lacustris* 細胞と *Euglena gracilis* 細胞を 混合した集団からアスタキサンチン含有量の多い



図 2. 無標識 A I セルソーターによる細胞分取. (a) 流路中を流れる異なる 1 細胞から取得したラマンスペクトル (b) 実験 3 において *H. lacustris* を分取する様子 (c) 実験 3 において *E. graci l is* が分取されずに流路を通過する様子



図 3. Quasi-dual-comb CARS 分光装置(a) 装置全体の概略図 CM: チャープミラー, LPF: ロングパスフィルター, SPF:ショートパス フィルター, AL: アクロマートレンズ. (b) 光源部分における繰り返し周波数制御部の概略図. FG: ファンクションジェネレータ SC: サーボコントローラー, PD: フォトダイオード, PS: 位相シフタ

Haematococcus lacustris 細胞を分取する

マイクロ流路中を流れるこれらの細胞から計測した典型的なラマンスペクトルを図2aに示す.異なる細胞内分子に由来するラマンスペクトルの特徴量が検出されており,スペクトル形状に基づいた細胞判別が可能であることが分かる.測定したスペクトルはField-Programmable Gate array (FPGA)によってリアルタイムに解析され,マイクロ流体チップ下流において細胞を分取する(図2b-c).細胞分取にあたっては,ラマンスペクトル中のターゲット分子の特徴的なピークが観測される波数およびラマン信号が観測されない波数における信号強度を用いて2次元散布図を作成し,散布図上で線を引くことで分取/非分取の判断を実施した.細胞によってはターゲット分子が含まれないにも関わらず,スペクトルのバックグラウンド全体で信号強度が高くなるようなイベントがあり,ターゲット分子を正しく定量するためには複数波数における強度で分取

判断を行うことが重要となる. それぞれの条件における分 取性能を評価するために, Sort および Unsort チャネルに 集めた細胞を顕微鏡観察し, それぞれのチャネルにおける 目的/非目的細胞を計数した. すべての条件において 2 形 質の情報(2 次元散布図)をもとに, 20 細胞/秒を超える スループットでの分取を行っており, 2 形質を用いて 10 細胞/秒で分取するという本プロジェクトの数値目標を達 成した. 細胞分取の Purity も各条件で 80%を超えており, 本手法を用いた指向性進化の実現に向け十分な性能を実 証することができた.

(2)FT-CARS 分光計測の高速・高感度化

本研究ではレゾナントスキャナーによる光学遅延の高速 走査を用いた FT-CARS 法を用いて細胞内分子の計測を行 ってきた.本手法で判別できる細胞形質の数は FT-CARS 計測の感度によって決まるため, 無標識セルソーターの適 用範囲を拡張するために FT-CARS 計測の高感度化は不可 欠である.本研究では,新たに"quasi-dual-comb"法を開発 し,それによりラマン分光計測の高速化及び高感度化を実 現した.



図 4. Quasi-dual-comb CARS 計測 (a) TCIs, (b) ポンプ-プロー ブ遅延 (c) Time-domain CARS interferogram (d) TCIs から求め た遅延による Time-domain CARS interferogram の校正 (e) ラマ ンスペクトル

dual-comb 分光法は、2 台のモードロックレーザーの周 波数を精密に制御して分子分光計測を行う計測法である が、高い周波数分解能で広帯域の分光スペクトルが得られ る方法として広く用いられている手法である. dual-comb 法を CARS 計測へと応用した dual-comb CARS 法は広帯域 ラマン分光計測が比較的高速に出来るとして近年注目を 集めている. dual-comb CARS 法の測定速度は 2 つのモー ドロックレーザーの繰り返し周波数の差によって決まる が、測定速度を大きくするために繰り返し周波数差を大き くすると、サンプリングが疎になり、感度が下がるととも にスペクトルの帯域が狭くなるというトレードオフがあ る. そのため、これまでの dual-comb CARS 分光法では、 指紋領域 (200 – 1600 cm⁻¹) を計測する場合は 10,000 spectra/s が測定速度の限界であった [3].

本研究で開発した quasi-dual-comb CARS 法では,2台の レーザーの繰り返し周波数のうち,一方は固定し,もう一 方を高速に変調して計測を行う.そのため,2パルス間の 遅延は任意の範囲で変調でき,上述のトレードオフの関係 に制限されることなく測定速度を向上させることが出来 る.開発した quasi-dual-comb CARS 分光計を図3 に示す.

2 台の高繰り返し (~1 GHz) チタンサファイアレーザーを 光源としてポンプープローブ方式で分子振動を時間領域 で計測する装置である. レーザーの繰り返し周波数の変調 は, チタンサファイア結晶を励起する光の強度を変調する ことで, チタンサファイア結晶中の実効的な光路長を変調 し(光カー効果),実現した.また,変調によって引き起 こされるパルス間の(非再現的な)遅延は,2 色干渉(Twocolor interferogram: TCI)計測によってリアルタイムに計測 した [4].

開発した quasi-dual-comb CARS 法によって計測したトル エンの TCI, TCI から求めた遅延時間, CARS 信号(時間領 域),及び CARS スペクトルを図 4a, b, c, e にそれぞれ示 す.1回の広帯域(200-1600 cm⁻¹) ラマン分光計測が10 µs で完了しており,従来の dual-comb CARS 法に比べて10 倍の高速化が達成されていることが分かる.さらに,図5 に示すように従来法と同じ計測速度で比べたとき,20 倍 程度の信号雑音比の向上が見られ,速度のみならず大幅な 感度向上も実現した.本成果によってラマン分光計測の応 用範囲を拡げることができると期待される.



図 5.様々な測定レートにおける Quasi-dual-comb CARS 法及び dual-comb CARS 法で計測したスペクトルの信号雑音比

(3)藻類の指向性進化の実証

無標識 AI セルソーターを用いた指向性進化では図 6 に 示すプロセスを繰り返すことで高付加価値細胞を産生す ることを目指す.研究項目(1)においてラマンスペクトル プロファイルに基づく分取が可能となった.培養は通常の 実験室培養ですすめる事ができるため,残るプロセスであ るランダム変異導入の実証を本項目では実施した.本実証 で用いる *E.gracilis* は遺伝子変異への耐性が高く,薬物や 紫外線では効率的な変異導入が難しい [5].そこで本研究



図 6: 標識 AI セルソーターによる指向性進化の概略



図 7: 理化学研究所仁科センターにおける *E. graci l is* 細胞への 鉄イオンビーム照射実験の様子.

では理化学研究所・生物照射チーム(チームリーダー:阿 部知子博士)及び量子科学技術研究開発機構・イオンビー ム変異誘発研究(プロジェクトリーダー:大野豊博士)と の協同によって鉄イオンビーム及び炭素イオンビームを 細胞に照射し,遺伝子変異導入を試みた(図7).

まず,照射した細胞群から FACS 装置を用い,19 クロ ーンを単離した.それぞれのクローンを同一の条件で一定 期間培養した後に,無標識 AI セルソーターを用いてパラ ミロン含有量を定量した.図 8A 各クローンで計測したラ マンスペクトルの平均を,図 8B に1 細胞ラマンスペクト ルから見積もったパラミロン含有量の分布を示す.特に鉄





図 8: 変異導入後の *E.gracilis* 細胞に含まれるパラミロン量の 定量 A. 各クローンから測定した平均のラマンスペクトル B. 各クローンの 1 細胞ラマンスペクトルから見積もったパラミロ ン含有量分布

イオンビームを照射したクローンにおいてパラミロン含 有量の違いが見られ,遺伝子変異導入および無標識 AI セ ルソーターによるその定量ができている事が実証された.

3. 今後の展望

本プロジェクトでは,広帯域ラマンスペクトルに基づく高 速細胞分取を実現した.今後は本手法の応用によって以下 の研究を展開していく.

藻類の指向性進化の性能評価および実用化

上記で産生した E.gracilis のいくつかのクローン群に 対して DNA 解析などを行い,新たな細胞株が樹立できて いることの実証を行うとともに,長期培養によって獲得形 質が失われない事などを実証する.更に,C.zofingiensis な どの細胞に関しても同様に指向性進化の実証を進めてい く.また,大腸菌や酵母を用いた指向性進化にも取り掛か る.これらの種は藻類に比べ小さいため,分取のスループ ットは落とす必要があるが,培養速度が速いため,比較的 少数の細胞の分取でも実用的であると期待される.

② 装置のさらなる高性能化

本手法では試問領域のラマンスペクトル形状に基づ く細胞分取を実施したが、今後より広帯域スペクトルの取 得によってさらに多くの形質に基づく細胞分取を実現す る.具体的には2台のレーザーを同期発振することで、CH 伸縮領域(2800-3200 cm⁻¹)を同時に計測できる手法の開 発を進めていく.

【参考文献】

- K. Hiramatsu, T. Ideguchi, Y. Yonamine, S. Lee, Y. Luo, K. Hashimoto, T. Ito, M. Hase, J.-W. Park, Y. Kasai, S. Sakuma, T. Hayakawa, F. Arai, Y. Hoshino, and K. Goda, Sci. Adv. 5, eaau0241 (2019).
- [2] K. Hiramatsu, K. Yamada, M. Lindley, K. Suzuki, and K. Goda, Biomed. Opt. Express 11, 1752 (2020).
- T. Ideguchi, T. Nakamura, S. Takizawa, M.
 Tamamitsu, S. Lee, K. Hiramatsu, V. Ramaiah-Badarla, J. Park, Y. Kasai, T. Hayakawa, S. Sakuma, F. Arai, and K. Goda, Opt. Lett. 43, 4057 (2018).
- [4] R. Kameyama, S. Takizawa, K. Hiramatsu, and K. Goda, ACS Photonics 8, 975 (2021).
- [5] K. Yamada, H. Suzuki, T. Takeuchi, Y. Kazama, S. Mitra, T. Abe, K. Goda, K. Suzuki, and O. Iwata, Sci. Rep. 6, 26327 (2016).

業績

【原著論文】

- Muzhen Xu, Dan Yuan, Sheng Yan, Cheng Lei, Kotaro Hiramatsu, Jeffrey Harmon, Yuqi Zhou, Mun Hong Loo, Tomohisa Hasunuma, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, "A morphological indicator for directed evolution of Euglena gracilis with high heavy metal removal efficiency," Environmental Science & Technology, in press (2021).
- R. Kameyama, S. Takizawa, K. Hiramatsu, and K. Goda, "Dual-Comb Coherent Raman Spectroscopy with near 100% Duty Cycle," ACS Photonics 8, 975–981 (2021).
- N. Chen, T. H. Xiao, Z. Luo, Y. Kitahama, K. Hiramatsu, N. Kishimoto, T. Itoh, Z. Cheng, and K. Goda, "Porous carbon nanowire array for surface-enhanced Raman spectroscopy," Nat. Commun. 11, 1–8 (2020).
- A. Isozaki, D. Huang, Y. Nakagawa, and K. Goda, "Dual sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput, scalable, multiplexed droplet sorting," Microfluid. Nanofluidics 25, 32 (2021).
- N. Nitta, T. Iino, A. Isozaki, M. Yamagishi, Y. Kitahama, S. Sakuma, Y. Suzuki, H. Tezuka, M. Oikawa, F. Arai, T. Asai, D. Deng, H. Fukuzawa, M. Hase, T. Hasunuma, T. Hayakawa, K. Hiraki, K. Hiramatsu, Y. Hoshino, M. Inaba, Y. Inoue, T. Ito, M. Kajikawa, H. Karakawa, Y. Kasai, Y. Kato, H. Kobayashi, C. Lei, S. Matsusaka, H. Mikami, A. Nakagawa, K. Numata, T. Ota, T. Sekiya, K. Shiba, Y. Shirasaki, N. Suzuki, S. Tanaka, S. Ueno, H. Watarai, T. Yamano, M. Yazawa, Y. Yonamine, D. Di Carlo, Y. Hosokawa, S. Uemura, T. Sugimura, Y. Ozeki, and K. Goda, "Raman image-activated cell sorting," Nat. Commun. 11, 1–16 (2020).
- 6. A. Isozaki, Y. Nakagawa, M. H. Loo, Y. Shibata, N. Tanaka, D. L. Setyaningrum, J.-W. Park, Y. Shirasaki, H. Mikami, D. Huang, H. Tsoi, C. T. Riche, T. Ota, H. Miwa, Y. Kanda, T. Ito, K. Yamada, O. Iwata, K. Suzuki, S. Ohnuki, Y. Ohya, Y. Kato, T. Hasunuma, S. Matsusaka, M. Yamagishi, M. Yazawa, S. Uemura, K. Nagasawa, H. Watarai, D. Di Carlo, and K. Goda, "Sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput sorting of large-volume biological compartments," Sci. Adv. 6, eaba6712 (2020).
- A. Isozaki, H. Mikami, H. Tezuka, H. Matsumura, K. Huang, M. Akamine, K. Hiramatsu, T. Iino, T. Ito, H. Karakawa, Y. Kasai, Y. Li, Y. Nakagawa, S. Ohnuki, T. Ota, Y. Qian, S. Sakuma, T. Sekiya, Y. Shirasaki, N. Suzuki, E. Tayyabi, T. Wakamiya, M. Xu, M. Yamagishi, H. Yan, Q. Yu, S. Yan, D. Yuan, W. Zhang, Y. Zhao, F. Arai, R. E. Campbell, C. Danelon, D. Di Carlo, K. Hiraki,

Y. Hoshino, Y. Hosokawa, M. Inaba, A. Nakagawa, Y. Ohya, M. Oikawa, S. Uemura, Y. Ozeki, T. Sugimura, N. Nitta, and K. Goda, "Intelligent image-activated cell sorting 2.0," Lab Chip 20, 2263–2273 (2020).

【総説】

- J. Gala de Pablo, M. Lindley, K. Hiramatsu, and K. Goda, "High-Throughput Raman Flow Cytometry and Beyond," Acc. Chem. Res., in press (2021).
- Yuqi Zhou, Akihiro Isozaki, Atsushi Yasumoto, Ting-Hui Xiao, Yutaka Yatomi, Cheng Lei, Keisuke Goda, "Intelligent Platelet Morphometry," Trends in Biotechnolgy, 2020 年 9 月 28 日
- A. Isozaki, J. Harmon, Y. Zhou, S. Li, Y. Nakagawa, M. Hayashi, H. Mikami, C. Lei, and K. Goda, "AI on a chip," Lab Chip 20, (2020).

【口頭発表】

- Muzhen Xu, Jeffrey Harmon, Tomohisa Hasunuma, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, "AI ON A CHIP FOR IDENTIFYING MICROALGAL CELLS WITH HIGH HEAVY METAL REMOVAL EFFICIENCY," Transducers 2021, Online, 2021 年 10 月 26 日
- Philip McCann, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, "Fluorescence-encoded time-domain coherent Raman spectroscopy through single-photon counting," Photonics West, Online, 2021 年 3 月 6 日
- Risako Kameyama, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, "Fast, sensitive dual-comb CARS spectroscopy with a quasi-dual-comb laser," Photonics West, San Francisco, Online, 2021 年 3 月 6 日
- Keisuke Goda, "Emerging opportunities of AI with lab-on-a-chip technology", REM-2021, 東京 Online, 2021年2月3日
- 合田圭介、「ナノテクと AI で新型コロナの重症化を 防げ!」, nano tech 2021,東京ビックサイト, 2020 年12月9日
- 6. 合田圭介、「ナノテクと AI で新型コロナの重症化を 防げ!」、コロナウィルス感染症とナノメディシン 学会、東京 Online、 2020 年 12 月 5 日
- Keisuke Goda, "Intelligent Image-Activated Cell Sorter 2.0", OPTIC-2020, 東京 Online, 2020 年 12 月 5 日
- Muzhen Xu, Dan Yuan, Sheng Yan, Cheng Lei, Kotaro Hiramatsu, Jeffrey Harmon, Yuqi Zhou, Mun Hong Loo, Tomohisa Hasunuma, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, "A cellular morphological indicator toward directed evolution of microalgae for highly efficient wastewater treatment," 化学とマイクロ・ナノシステム学会第

42 回研究会, Tokyo, Japan (Online), 2020 年 10 月 26 日

- Yuta Nakagawa, Shinsuke Ohnuki, Akihiro Isozaki, Naoko Kondo, Yoshikazu Ohya, Keisuke Goda, "Exploring the advantage of large droplets for single-cell analysis," 化学とマイクロ・ナノシステム 学会第 42 回研究会, Tokyo, Japan (Online),2020 年 10 月 26 日
- 10. 松村 洋貴, 磯崎 瑛宏, 赵 雅祺, 黄 康睿, 若宮 翼, 袁 丹, 三上 秀治, 大貫 慎輔(1) 上村 想太郎, 大矢 禎一, 合田 圭介, "出芽酵母の大規模な遺伝子解析 のための高スループット細胞形態分取法," 化学と マイクロ・ナノシステム学会第 42 回研究会, Tokyo, Japan (Online),2020 年 10 月 26 日
- 11. Dan Yuan, Julia Gala de Pablo, Matt Lindley, Mun Hong Loo, Mika Hayashi, Yaqi Zhao, Kotaro Hiramatsu, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, "Viscoelastic-fluid-based single-particle analyzer with Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy," 化学とマ イクロ・ナノシステム学会第 42 回研究会, Tokyo, Japan, Online,2020 年 10 月 26 日
- 12. 合田圭介、「細胞のウォーリーを探せ!」、日本学術 会議「次世代統合バイオイメージングと数理の協働 の展望」シンポジウム、東京 Online、 2020 年 10 月 14 日
- Mun Hong Loo, Yuta Nakagawa, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, "High-throughput sorting of nanoliter droplets using an electrode array with a slanted microchannel." MicroTAS 2020, Online, 2020 年 10 月 8 日
- 14. Keisuke Goda, "Vibrational Flow Cytometry and Beyond," IEEE photonics 2020, Online, 2020 年 9 月 29 日
- 15. Risako Kameyama, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, "High-speed coherent Raman spectroscopy by repetition-rate modulation," 分子科学オンライン討論 会, Online, 2020 年 9 月 17 日
- Keisuke Goda, "Intelligent IAC," スーパー酵母 2020 が拓く未来, 東京, Online, 2020 年 8 月 24 日
- 17. Keisuke Goda, "Vibrational Flow Cytometry and Beyond," CYTO 2020, Online, 2020 年 8 月 5 日
- Keisuke Goda, "How can biophotonics research be efficiently translated to clinical practice? What role do biomedical institutes play in this translation?" CLEO Pacific Rim 2020, Online, 2020 年 8 月 4 日
- Akihiro Isozaki, Yuta Nakagawa, Mun Hong Loo, Dino Di Carlo, Keisuke Goda, "Sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput large-droplet sorting," CYTO 2020, Online, 2020 年 8 月 5 日
- Akihiro Isozaki, Hideharu Mikami, Hiroshi Tezuka, Hiroki Matsumura, Kangrui Huang, Yasuyuki Ozeki, Takeaki Sugimura, Nao Nitta, and Keisuke Goda,

"iIACS2.0: intelligent image-activated cell sorting upgraded," CYTO 2020, Online, 2020 年 8 月 5 日

- Keisuke Goda, "Find cellular Wally with the power of photonics and AI," IONS OPUMA 2020, Tokyo, Japan, Online, 2020 年 6 月 11 日
- 22. Keisuke Goda, "Intelligent Image-Activated Cell Sorting," ICDIP 2020, Tokyo, Japan, Online, 2020 年 5 月 21 日
- 【特許】
- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 1件

光操作に基づく医療技術の創出

研究代表者:東京大学 佐藤 守俊

【基本構想】

本プロジェクトは、光操作に基づいて新たな医療技術を創出することを目的としている(図1)。医薬品 として用いられる分子(化合物、ペプチド、抗体、酵素など)や細胞、ウィルス等は、いったん生体の中に 入ってしまうと、その働きを生体の外からコントロールするのが極めて困難である。このことが、薬効が 高く副作用が低い優れた医薬品を開発する上での大きなハードルとなっている。本プロジェクトでは、乗 用車に取り付けられたアクセルやブレーキのように、生体の中に入った医薬品の働きを光で、特に、生体 組織の透過性が極めて高い長波長の光で自由自在に操作するための、一般性・汎用性の高い基盤技術を開 発する。さらに、この基盤技術を用いて、ゲノムの働きを光刺激でコントロールしたり、がん細胞を光刺 激で破壊することで、革新的なゲノム治療やがん治療を実現する新たな技術を開発する。ゲノム治療につ いては、生体組織に光を照射して変異遺伝子の塩基配列を正確に書き換えることができるようになったり、 生体組織の遺伝子の発現を自由自在に光照射でコントロールできるようになれば、今までに治療法がなか った様々な難病(遺伝子疾患)の治療に大きく貢献し、アンメット・メディカル・ニーズに応えることが可 能になる。DNA を標的とした光操作技術に加えて、RNA を標的とした光操作技術(RNA の転写レベルの 光操作技術)を開発できれば、ゲノム治療の安全性をさらに高めるだけでなく、ゲノム治療の適用範囲を 大幅に拡張できる。このような生体(in vivo)におけるゲノムの光操作だけでなく、例えば、人工多能性幹 細胞(iPS 細胞)のゲノム DNA の塩基配列を、光で正確に書き換えることができるようになれば、遺伝子 疾患を有する患者への再生医療にも大きく貢献できると考えている。またがん治療についても、本プロジ ェクトで開発する技術は、光照射を施した部位でのみ薬効を発揮させることができるため、従来のがん治 療技術よりも大幅に薬効を高めるためのアイディアを導入しても安全性を担保できるのが大きな特長であ る。本プロジェクトで開発する技術により、今まで治療法がなかった難病の治療に加えて、長波長の光照 射による革新的ながん治療が実現すれば、医療分野へのインパクトは非常に大きく、関連産業の振興に大 きく貢献することが期待される。

1. 研究目的

蛍光タンパク質の実用化を契機として、1990年代以降、 光を使ったバイオイメージング技術が世界中の研究室で 利用されるようになった。しかし、ライフサイエンスにお ける光技術の将来は、必ずしもバイオイメージングに限定 されない。光を使って生命現象を「見る」だけでなく、そ れらを光で「操る」ことができるとしたら、ライフサイエ ンスや医療はどうなるだろう?例えば、細胞内シグナル伝 達を光で操作できるようになれば、代謝、分泌、細胞増殖、 細胞分化、細胞死等の生命機能を自由自在にコントロール できるようになるかもしれない。ゲノムの塩基配列を光で 自由自在に書き換えたり、遺伝子のはたらきを自由自在に 制御できるようになったらどうだろう?光が得意とする 高い時間・空間制御能をもってすれば、狙った time window でのみ、狙った生体部位でのみ、生命現象をコントロール できるかもしれない。さらには、疾患の新しい治療法とし て役立つかもしれない。このような未来を実現すべく、研 究代表者らは新技術の開発を行ってきた。

生命現象の光操作を実現する上で、研究代表者らが最も 重要と考えたのは、操り人形で言えばヒモとか棒に相当す る基盤技術の開発である。植物や菌類のように光を利用し て生きている生物は、光受容体と呼ばれるタンパク質を持 っている。光受容体は、光を吸収すると大きく構造変化し たり、別のタンパク質と結合したりすることにより情報を 伝えている。つまり光受容体は、光による入力をタンパク 質の構造変化や結合といった力学的シグナルとして出力 できるのだ。しかし、野生型の光受容体は、反応速度が遅 いなどの問題を抱えていることが多い。研究代表者らは糸 状菌の一種であるアカパンカビ (Neurospora crassa)が持 っている光受容体に着目し、これに対して様々なアミノ酸 変異を導入してその性質を大幅に改良したり、新しい機能 を付与したりするなどして、Magnet システムと名付けた 光スイッチタンパク質を開発した(図 2)(参考文献 1)。 Magnet システムは、青色の光を照射すると互いに結合し、 光照射をやめると解離するタンパク質のペアである。



図1. 光操作に基づく医療技術の概念図。



図 2. 研究代表者が先行研究で開発した青色光スイッチタン パク質 "Magnet システム"。青色光に応答して二量体を形成 し、暗所に戻すと単量体に戻る。任意のタンパク質 A・B を 連結することにより、その結合・解離を光照射の ON/OFF で コントロールできる。

Magnet システムにタンパク質 A とタンパク質 B を連結す れば、A と B の結合・解離を青色光のオン・オフでコント ロールすることができる。この Magnet システムの特長を 利用することで、光で指令を与えて、酵素などのあらゆる タンパク質の働きを私たちの意のままに操作できるよう になった。

例えば、Magnet システムを様々なゲノムエンジニアリ ングツール (ゲノム編集で利用される CRISPR-Cas9 シス テムなど)と組み合わせて、多様な光操作技術を開発して きた。これにより、光が得意とする高い空間・時間制御能 に基づいて、生体組織の中の狙った部位や狙ったタイミン グで、ゲノム DNA の塩基配列を書き換えたり(参考文献 2、3)、ゲノムにコードされた遺伝子の組換えを実行した り(参考文献 4)、ゲノム遺伝子の発現を自由自在に操作 できるようになった(参考文献 5)。さらに最近では、ゲノ ムエンジニアリングツールに限らず、がん治療に応用可能 なタンパク質の光操作にも Magnet システムを展開してい る。例えば、腫瘍溶解性ウィルスのゲノム RNA を複製す る RNA ポリメラーゼに Magnet システムを組み込んで、 光照射でウィルスの増殖を自由自在に光操作することに より、生体内で効率よくかつ安全にがん細胞を破壊できる 光駆動型の腫瘍溶解性ウィルスを開発した(参考文献 6)。 このような研究代表者の一連の研究は、基礎生命科学を革 新する強力なリサーチツールを提供するとともに、既存の 治療技術とは全く異なる、次世代の治療技術(ゲノム治療、 がん治療など)につながる可能性を秘めている。

上述のゲノムの光操作技術や光駆動型の腫瘍溶解性ウ ィルスはいずれも、研究代表者が開発した光スイッチタン パク質 "Magnet システム"に立脚している。Magnet シス テムは、光操作のためのツールを我々が制御するための 「アクセル」や「ブレーキ」であり、様々な生命現象の光 操作を実現する極めて汎用性の高い基盤技術として位置 付けることができる。しかし、Magnet システムは生体組 織透過性が比較的低い青色光を使って制御する光スイッ チタンパク質である。このため、Magnet システムを組み 込んだ光操作技術では、生体外からの光照射で効率よく操 作可能な部位は皮膚や筋肉、肝臓の腹側など、生体表面か ら近い組織・器官に限定されてしまい、青色光が届きにく い生体深部に位置する臓器や骨の中の骨髄、頭蓋骨に覆わ れた脳などの操作が困難なことが明らかになりつつある。 このような Magnet システムの特性は、光操作技術を次世 代の治療技術として応用する上での大きな制約となると 考えられる。従って、本プロジェクトでは、Magnet システ ムに代わる新たな基盤技術として、生体組織透過性が極め て高い長波長の光照射でコントロール可能な光スイッチ タンパク質を創出し、これを新たなゲノム治療技術とがん 治療技術に展開することを目的とする。プロジェクト1年 目となる 2020 年度は、以下の各項目を重点項目として開 発研究を実施した。

(1) 光合成細菌の相互作用タンパク質に基づく長波長の 光スイッチタンパク質の開発

(2) 進化分子光学的手法に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

2. 研究成果

以下に挙げるのは、2020 年度の具体的な研究成果である。

(1) 光合成細菌の相互作用タンパク質に基づく長波長の 光スイッチタンパク質の開発

上述のように、青色光はヘモグロビンに吸収されてしま うため、生体組織での透過性が低い。一方、650 nm から 800 nm の光はヘモグロビンに吸収されず、生体組織透過 性が高いことが知られている。このため、この波長領域で 利用できる光スイッチタンパク質の開発ニーズは極めて 高い。この観点から、光合成細菌が有する近赤外光受容体 とその結合タンパク質が、近赤外光スイッチタンパク質と して注目を集めている。研究代表者らは、前述のゲノム遺 伝子の光活性化システムで利用した Magnet システムをこ の近赤外光スイッチタンパク質で置き換えてみたところ、 この近赤外光スイッチタンパク質には致命的な欠点があ ることが明らかになった。その詳細を以下に述べる。

研究代表者らが開発したゲノム遺伝子の光活性化シス テムは、CRISPR-Cas9システムを利用しており、次のよう な動作原理となっている(図3)。Cas9の10番目のアミノ 酸と840番目のアミノ酸位変異を導入してDNA切断活性 を欠損させた変異体(Cas9DIOA/H840A; dCas9)とガイド RNA の複合体を、ゲノム遺伝子の上流に結合させておく。この



図 3. ゲノム遺伝子の光活性化システム (CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system: CPTS)の原理図。

ガイド RNA には、MS2 タンパク質が結合するアプタマー 配列が挿入してある。MS2 タンパク質と光スイッチタン パク質の一方を繋ぎ、もう一方の光スイッチタンパク質に は転写活性化因子を繋いでおく。こうすることで、光照射 によって光スイッチタンパク質を結合させた時にのみ、転 写活性化因子をゲノム遺伝子直上に近接させて、遺伝子活 性化を誘起させることができる。ここに近赤外光スイッチ タンパク質を導入したところ、光照射を行なった場合のみ ならず、暗所に保持した場合においても遺伝子活性化を誘 起することが明らかになった。Magnet システムを利用し た場合にはこの暗所での活性化は観察されなかったこと から、近赤外光スイッチタンパク質を導入した場合に観察 された活性化は、近赤外光スイッチタンパク質の暗所での 結合活性(リーク活性)に原因があると考えられる。近赤 外光スイッチタンパク質を導入した遺伝子活性化システ ムのリーク活性は非常に高いため、光照射を行なっても、 僅かに 1.6 倍しか遺伝子活性化を誘起できない。理想的な 光スイッチタンパク質は、光を照射した時のみに、光操作 を実現できるというものである。しかし、現状の近赤外光 スイッチタンパク質のように、暗所でも高いリーク活性を 持つことは、光照射を行う前から活性化が起こっているこ とを意味しており、この性質は光操作の基盤技術としては 致命的な欠点となる。

そこで、研究代表者らは近赤外光スイッチタンパク質に アミノ酸変異を導入することで暗所でのリーク活性を低 減させることを目的に研究を行なった。さまざまな変異体 を作製し、それぞれの変異体をゲノム遺伝子の光活性化シ ステムに導入して、光照射条件と暗所条件での比較を行っ た。その結果、現時点で、暗所リーク活性を野生型の10分 の1に低減させることに成功している。このように近赤外 光スイッチタンパク質の改良版を導入した遺伝子活性化 システムを NIR-CPTS (CRISPR-Cas9-based photoactivatable



⊠ Mock in NIR ■ NIR-CPTS in dark ■ NIR-CPTS in NIR

図 4. NIR-CPTS によるゲノム遺伝子の光活性化。ヒト胎児腎 臓細胞(HEK293T 細胞)のゲノム遺伝子(*ASCL1*遺伝子(a)、 *HBG1*遺伝子(b))を光照射(NIR)によって活性化した。暗 所条件下(dark)でのリーク活性は、対照群(Mock: ガイド RNA を入れていない群)と同程度に低い。 transcription system by near-infrared light) と名付けた。

上述の変異体のスクリーニング実験では、生物発光タン パク質 (ルシフェラーゼ)を遺伝子活性化のレポーターと して用いた。次に、実際に細胞の核内に折りたたまれパッ キングされたゲノム遺伝子に対しても、NIR-CPTS が使用 可能かどうかを検討した。その結果、ASCLI遺伝子をター ゲットしたガイド RNA を用いたところ、NIR-CPTS は、 暗所でのリーク活性がほとんど見られず、光照射によって 193 倍の遺伝子活性化を誘導できることがわかった(図 4a)。ガイド RNA として HBG1 遺伝子をターゲットした 場合も、暗所でのリーク活性が見られず、光照射によって 1,366 倍もの遺伝子活性化を誘導できることがわかった (図4b)。このように、細胞核内の実際のゲノム遺伝子に 対しても近赤外光スイッチタンパク質の改良版を用いた NIR-CPTS は、光照射依存的に非常に効率よく遺伝子活性 化を起こせることがわかった。NIR-CPTS によるゲノム遺 伝子活性化は、光照射を開始して 90 分後には、18 倍にま で上昇する(図 5a)。また、光照射を止めると、NIR-CPTS による遺伝子活性化は停止し、ガイド RNA でターゲット したゲノム遺伝子の mRNA 量は暗所の時のレベルまで戻 っていく(図 5b)。これは、近赤外光スイッチタンパク質 の改良版が暗所時には可逆的に解離していくという性質 を保持していることを示している。CRISPR-Cas9 の最大 の特長は、様々な遺伝子をターゲットするガイド RNA を 同時に用いて、様々な遺伝子を同時にコントロールできる ことである。NIR-CPTS においても、多種類のゲノム遺伝 子を同時に光活性化できるかどうか検討した。その結果、 4 種類のゲノム遺伝子(ASCL1 遺伝子、HBG1 遺伝子、 MYOD1 遺伝子、IL1R2 遺伝子) をそれぞれターゲットす



図 5. NIR-CPTS による光活性化の時間変化。(a) 光照射 (NIR) を開始して 90 分後には、暗所条件下 (Dark) の 18 倍の活性 上昇を起こすことができる。(b) 光照射 (NIR) を止めると、 NIR-CPTS の活性化も止まる。また、再び光照射を行うと、 NIR-CPTS は再び活性化する。

[■]NIR-CPTS in dark ■NIR-CPTS in NIR



図 6. NIR-CPTS の活性の波長依存性。800 nm 以上の長波長光 でも光活性化できる。

るガイド RNA を同時に用いて、これらの遺伝子を同時に 光刺激で活性化できることがわかった。

上述のように、650 nm から 800 nm の光は生体組織透過 性が高い。近赤外光スイッチタンパク質の改良版の波長依 存性を、NIR-CPTS の遺伝子活性化を指標として調べたと ころ、当該システムは、780 nm が最適の波長であり、800 nm でも十分な遺伝子活性化を誘導できることがわかった (図 6)。そこで研究代表者らは、NIR-CPTS を用いてマウ スの生体(in vivo)で遺伝子活性化を制御できるかどうか 調べた。まず、hydrodynamic tail vein injection 法でマウス の肝臓に NIR-CPTS を導入した。マウスへの光照射は、生 体外から LED パネルを使って行なった(図7)。このよう な非侵襲的な光照射方法でも、マウス肝臓において、レポ ーター遺伝子の活性化を誘起することができた(図 8a)。 さらに、NIR-CPTS を用いて、マウスのゲノムにコードさ れた遺伝子 (ASCL1 を例に)を非侵襲的な光照射で活性化 できることも明らかになった(図 8b)。このように、研究 代表者らは、開発した近赤外光スイッチタンパク質の改良 版の特性を、NIR-CPTS というゲノム遺伝子の活性化技術 として評価した。その結果、近赤外光スイッチタンパク質 の改良版は生体内でも光操作の基盤技術として利用でき ることがわかった。プロジェクト2年目となる2021年度 は、近赤外光スイッチタンパク質への変異導入を継続して 実施し、さらに光制御能が向上した光スイッチタンパク質 として完成させたいと考えている。



図 7. LED アレイを用いてマウスの生体外から光照射。

(2) 進化分子光学的手法に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

研究項目(1)の光スイッチタンパク質は、光合成細菌 の細胞の中で実際に使われている天然のタンパク質を改 変して開発する光スイッチタンパク質である。研究項目(2) では、研究項目(1)とは全く異なり、進化分子工学的手 法に基づいて、全く新しい長波長の光スイッチタンパク質 を開発することを目標とする。進化分子工学的手法に基づ いて、全く新しいタンパク質相互作用に基づいて光スイッ チタンパク質を開発することにより、天然のタンパク質相 互作用のデメリットを克服するような、新たな光スイッチ タンパク質が開発できるとの期待を持ってこの研究項目 (2)を遂行している。光スイッチタンパク質は、様々な 光操作技術を開発する上での基盤技術となる。研究項目(1) (2)により、質の高い長波長の光スイッチタンパク質を 開発することが、光操作に基づく医療技術を創出する上で の鍵となる。

研究項目(2)では、進化分子工学的手法に基づいて、 全く新しい長波長の光スイッチタンパク質の開発を行な っている。この光スイッチタンパク質は、近赤外光を受容 するドメインとその結合タンパク質からなっている。当該 光受容ドメインとして様々な選択肢がある中で、研究代表 者らは研究項目(1)とは別の細菌由来の赤色光受容体を 選択した。これは、赤色光受容体の光反応特性や暗反転の キネティクスが非常に優れており、かつ光照射依存的な構 造変化に関する知見が十分に蓄積しているためである。結



図 8. (a) NIR-CPTS を導入したマウス肝臓における生物発光 レポーター遺伝子の光活性化。(b) NIR-CPTS を導入したマウ ス肝臓におけるゲノム遺伝子(マウス ASCL1 遺伝子)の光活 性化。

合タンパク質としては、ペプチドに加えて様々な分子を検 討し、選んだ分子に対してランダム変異を導入することで、 赤色光受容体に対して光照射依存的に結合する変異体を 選抜した。選抜した分子に対して、さらに二次的なスクリ ーニングや更なる変異導入等を導入した結果、光照射依存 的に赤色光受容体に強く結合する分子を開発することが できた。現在、この赤色光スイッチタンパク質(赤色光受 容体と結合分子のペア)を、研究項目(1)の場合と同様 に、遺伝子発現の光操作技術に導入して評価を行なってい る。現在までに、この進化分子工学に基づく新しい赤色光 スイッチタンパク質が、暗所での反応性をほとんど示さず、 極めて高い光制御能することが明らかになっている。

3. **今後の**展望

研究項目(1)および研究項目(2)の光スイッチタンパ ク質を完成させることが 2021 年度の大きな目標となる。 上述のように、研究項目(1)および研究項目(2)の新た な光スイッチタンパク質を遺伝子発現の光操作技術に導 入して、ゲノムにコードされた任意の遺伝子の働きを自由 自在にコントローするする技術の創出し、マウスの生体 (in vivo) で十分な検証を行うことを目指している。一方 で、最も重要なのは、光スイッチタンパク質が極めて一般 性が高く、様々な光操作技術を実現できる基盤技術(core technology/platform technology) になり得ることであると研 究代表者らは考えている。そして、光スイッチタンパク質 によって、幅広い創薬モダリティを大きく革新できると考 えている。この観点から、戦略的研究シーズ育成事業の開 始と共に、様々な研究グループと共同で、様々な創薬モダ リティに光操作技術を導入するための研究を実施してい る。その範囲は、ゲノム編集医療や遺伝子治療、腫瘍溶解 性ウイルス療法のような「遺伝子医薬」に限定されない。 2022 年度以降は、この様に幅広く展開する探索研究の結 果を踏まえて、事業としてより大きな価値を持つ技術を絞 り込み、光操作に基づく医療技術として、社会実装に向け て非臨床研究、臨床研究を進めていくことが重要と考えて いる。さらに、光スイッチタンパク質は、医療技術として のみならず、幅広い分野に応用可能と考えているため、光 スイッチタンパク質を用いたさらなる応用展開について も開拓したいと考えている。

【参考文献】

- F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, "Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins" *Nat. Commun.*, 6, 6256 (2015).
- Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima and M. Sato, "Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing" *Nat. Biotechnol.*, 33, 755-760 (2015).
- Y. Nihongaki, T. Otabe, Y. Ueda and M. Sato, "A split CRISPR–Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation" *Nat. Chem. Biol.*, 15, 882-888 (2019).

- F. Kawano, R. Okazaki, M. Yazawa and M. Sato, "A photoactivatable Cre–*loxP* recombination system for optogenetic genome engineering" *Nat. Chem. Biol.*, 12, 1059-1064 (2016).
- Y. Nihongaki, Y. Furuhata, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto and M. Sato, "CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation" *Nat. Methods*, 14, 963-966 (2017).
- M. Tahara, Y. Takishima, S. Miyamoto, Y. Nakatsu, K. Someya, M. Sato, K. Tani and M. Takeda, "Photocontrollable mononegaviruses" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 11587-11589 (2019)

業績

【原著論文】

 T. Takao, M. Sato and T. Maruyama Optogenetic regulation of embryo implantation in mice using photoactivatable CRISPR–Cas9 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **117**, 28579-28581 (2020).

【総説】

1. 佐藤守俊「光操作に基づくゲノムのリプログラミング 技術の創出」, 医学のあゆみ, 2020年, 第 275巻, 1号, p21291-21296.

【口頭発表】

- 佐藤守俊「生命の設計図を書き換えるゲノム編集」, 岡山県立笠岡高校科学講演会,2020年11月6日
- 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」,名古屋 大学大学院工学研究科講演会,2020年11月20日
- 佐藤守俊「生命の設計図を書き換えるゲノム編集」, 里庄町立志式特別講演,2021年1月27日
- 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」,岡山大 学大学院医歯薬学総合研究科特別講演,2021年2月 9日

佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」,欧州製 薬団体連合会(EFPIA Japan), 2021 年 2 月 26 日佐藤 守俊「細胞をデザインする光操作技術」,第9回 LINK-J オンライン・ネットワーキング・トーク, 2021 年 2 月 26 日

 中嶋隆浩,佐藤守俊「近赤外光スイッチタンパク質 によるゲノム遺伝子活性化システム」,日本化学会 第101春季年会,2021年3月20日

【特許】

- (1) 国内特許出願 0件
- (2) 国外特許出願 0件

貴金属フリー新規触媒技術の開発

研究代表者:東京大学 砂田 祐輔

【基本構想】

現在の科学技術では、工業的な化成品の触媒的合成や、燃料電池などにおけるエネルギー活用技術など、 多くのプロセスにおいて貴金属触媒が活用されている。しかし、これら貴金属類は希少資源であり高価で あることに加え、触媒用途以外の他分野からも多くのニーズがあることなどから、貴金属の活用を必要と しない貴金属フリーの触媒技術の開発が求められている。そこで本研究では、地球上に豊富に存在するた め安価で入手可能な普遍金属のみから構成される独自の触媒合成技術に立脚し、貴金属を使用しない新規 触媒技術を開発し、貴金属フリーな物質変換・化成品合成・エネルギー活用技術の開発を行うことを目的 とした研究を行っている。

1. 研究目的

本研究では、貴金属化合物が触媒として活用されている、 化成品合成もしくはエネルギー活用技術において、これら を貴金属フリー触媒で実現できる技術の開発を行うこと を目的としている。プロジェクト1年目となる令和2年度 では、有用化成品合成における貴金属フリー触媒技術の開 発として、シリコーン材料の合成において用いられる必須 の化学変換であるアルケンのヒドロシリル化を実現でき る貴金属フリー触媒の開発に注目した。

現在、世界におけるシリコーン関連製品の需要は1兆円 超の規模であり、シリコーン関連製品は、建築・土木産業 や電気・電子材料・食品関連・医療・車両や化学用途など、 多岐に渡る分野からのニーズのある、現代社会を支える基 盤材料の一つとなっている。シリコーン製品は主として、 i)シランカップリング剤、ii) シリコーンオイル、iii)シリ コーンゴム、の3つに大別される。これらのシリコーン材 料はいずれも多くの場合、アルケン類のヒドロシリル化 (図1)を経て合成されるが、従来技術では本反応には白 金化合物が触媒として活用されている。しかし、白金は貴 金属であるため高価であることから、白金に依存しない触 媒技術の開発が求められている。そのため世界的にも、白 金に依存しない貴金属フリーでのヒドロシリル化触媒技 術の開発は注目を集めており、近年、活発な研究が行われ ているが、ほとんどは特殊な補助配位子や合成条件を必要 とし、かつ空気や水に対し不安定であるため、合成・取り 扱いの困難な均一系錯体触媒の開発に留まっている。これ らはしばしば高活性を示すが、耐久性が低く、再使用も困 難である。これらを勘案すると、現在までのところ、実用 性の高いヒドロシリル化用貴金属フリー触媒の合成は未 踏である。そこで本プロジェクトでは、独自の普遍金属触 媒を開発し、白金フリーでのシリコーン材料合成法を開発 することを目的として研究を行った。

本プロジェクトを遂行するにあたって、令和2年度は、 以下の各項目を重点項目として行った。

(1) 触媒設計指針の確立

(2) 普遍金属・ケイ素複合型固体触媒の開発

(3) 普遍金属触媒による貴金属フリーヒドロシリル化の 開発

まず(1)については、研究代表者はこれまでの均一系触 媒開発に関連する研究において、鉄などの普遍金属上にケ イ素部位を配位子として導入した分子状錯体を開発する ことで、ヒドロシリル化に対して中~高活性を示す触媒と して機能することを見出している。この研究基盤を基に本 研究では、普遍金属とケイ素を併せ持つ普遍金属・ケイ素 複合型触媒を開発することで、貴金属フリーで機能するヒ ドロシリル化用触媒の開発を行うことを着想した。普遍金 属触媒によるヒドロシリル化を実現するためには、反応剤 であるヒドロシランにおける"H-Si"結合を効率的に活性 化できる触媒の開発が必要となる。そこで本研究では、ヒ ドロシリル化を実現しうる普遍金属・ケイ素複合型触媒の 設計・開発指針を得るべく、分子状の普遍金属・ケイ素複 合型化合物の合成と構造決定、ならびにヒドロシランにお ける"H-Si"結合の活性化能の評価として、カルボニル化合 物のヒドロシリル化への適用を行い、触媒構造の設計指針 を得ることを第一の目的として研究を遂行した。

C=C + H-SiR₃
$$\xrightarrow{\text{Pt cat.}}$$
 H $C-C$ SiR₃
アルケン ヒドロシラン

図 1. アルケンのヒドロシリル化の一般式

次に(2)として、(1)で得られた設計・合成指針を基にし た触媒開発へと展開するが、その際、実用性の高い固体触 媒として開発することを目的とした。(1)で開発する分子 状触媒と比較して、(2)でターゲットとする固体触媒は安 定性が高く、取り扱いが容易であるという特徴を有する。 そのため本研究では、分子状触媒での設計指針を基にした 固体触媒の開発を行った。

その後(3)として、開発した触媒を用いたアルケンのヒ ドロシリル化へと展開し、各種シリコーン製品の貴金属フ リーでの合成法の確立を目的として研究を行った。特に、 開発するシリコーン製品として、上述の(i)~(iii)のいずれの シリコーン製品・材料も合成可能な、汎用性の広い触媒技 術としての応用展開を行うことを目的とした。

2. 研究成果

以下に挙げるのは、令和2年度の具体的な研究成果であ る。

(1) 触媒設計指針の確立

本研究では、これまでの研究代表者の研究基盤を基に、 普遍金属・ケイ素複合型の触媒開発に立脚した研究を行う。 まず、触媒設計指針についての知見を得るべく、分子状の 普遍金属・ケイ素複合型化合物の合成と、ヒドロシランに おける"H-Si"結合活性化能の評価に関する検討を行った。



図2. 研究代表者の以前の研究:鉄・ケイ素複合型触媒1の合成

研究代表者はこれまでの研究において、鉄中心に2つの ケイ素部位を配位子として導入することで、貴金属触媒と 類似の触媒機能を発現することを見出している。¹例えば、 図2に示す反応から得られる鉄・ケイ素複合型分子(1)は、 ヒドロシランにおける"H-Si"基を効率的に活性化し、カル ボニル化合物のヒドロシリル化に対し、貴金属触媒と同程 度の高活性を示す触媒として機能する。この成果は、普遍 金属中心に対しケイ素部位を導入することで、ヒドロシラ ンにおける"H-Si"部位を活性化しうる触媒として機能し うることを示唆している。そこで本研究ではまず、普遍金 属として、一般に反応性が低いことが知られているマンガ ンを用い、マンガン中心に触媒(1)と同様のケイ素部位を 導入した分子を合成し、得られた分子がヒドロシランにお ける"H-Si"部位を活性化可能な触媒として機能しうるか についての検討をまず行った。

まずケイ素部位の前駆体である K{Si(SiMe3)3}に対し、 入手容易なマンガン前駆体である MnBr2 を THF 中で反応 させることで、目的とするマンガン中心に 2 つのケイ素部 位を導入した化合物 Mn[Si(SiMe3)3]2(THF)2 (2)を高収率で 得た(図 3)。この化合物は単結晶 X 線構造解析、元素分 析などにより構造決定を行った。



図 3. マンガン・ケイ素複合型分子2の合成

次に、得られた化合物(2)を触媒として用いて、ヒドロ シランを用いたカルボニル化合物のヒドロシリル化へと 適用した。この際、ヒドロシランとしては、安価で入手容 易なため汎用原料として用いられる 1,1,3,3-tetramethyldisiloxaneを用いた検討を行った(図4)。 本反応に適用可能な代表的なカルボニル化合物の例を図 4・下段に示すが、いずれの場合においても反応は定量的 に進行し、対応するヒドロシリル化生成物から誘導される アルコールを高収率で得た。これらのカルボニル化合物の ヒドロシリル化は、多くの場合、貴金属化合物を触媒とし て用いることで達成される。一方、今回の一連の結果より、 マンガン中心にケイ素部位を導入し、マンガン・ケイ素複 合型触媒とすることで、ヒドロシランにおける"H-Si"部位 を効果的な活性化可能な触媒として機能しうることを明 らかにした。すなわち、普遍金属とケイ素の複合型触媒を 開発することで、ヒドロシランにおける"H-Si"結合を活性 可能な触媒として機能することを見出した。



図4. マンガン触媒2によるケトンのヒドロシリル化

(2) 普遍金属・ケイ素複合型固体触媒の開発

(1)での知見をまとめると、普遍金属に対しケイ素部位 を導入し、普遍金属・ケイ素複合型化合物とすることで、 従来では貴金属化合物により達成されていた"H-Si"部位 の活性化が可能となる、貴金属と類似の機能を発現しうる 触媒として機能することが明らかとなった。そこで次に、 本研究の基盤となる普遍金属・ケイ素複合型の固体触媒の 開発へと展開した。この際、特に実用性の高い触媒として 開発すべく、触媒活性・耐久性・使用性などに優れる固体 触媒としての開発を指向した研究を行った。アルケンのヒ ドロシリル化に対し活性を示す、貴金属代替となる普遍金 属触媒の開発は、近年、世界的に活発な研究が行われてい るが、その大部分は、均一系触媒としての開発である。均 一系触媒は、しばしば高い触媒活性を示すが、一般に不安 定であるため耐久性・使用性に課題が残されている。また ほとんどの場合、合成が煩雑な配位子を必要とするなど、 簡便に入手可能な普遍金属触媒の開発の例は極めて限定 的である。これらの研究背景を踏まえて本研究では、普遍 金属・ケイ素複合型化合物の開発に立脚し、合成・取り扱 いが容易、高活性、再使用も可能、な実用性の高い固体触 媒としての開発を指向した研究を行った。またこの際、上 述した(i)~(iii)の代表的なシリコーン製品のいずれも合成 可能な触媒技術としての開発を目指した検討を行った。

まずケイ素材料として、固体状ケイ素材料を安価な市販 品を原料として1段階で簡便な操作から合成した。次に、 普遍金属としてマンガン、鉄、コバルト、ニッケルの活用 に注目し、これらの適切な前駆体を用い、合成した固体状 ケイ素材料と複合化させることを検討した。その結果、い ずれの金属種においても、適切な市販品の金属前駆体を用 い、固体状ケイ素材料と室温~100度程度で攪拌すること で、普遍金属・ケイ素複合型化合物を簡便かつ高収率で合 成できることを見出した。得られた一連の化合物は、蛍光 X線やIRスペクトルなどの各種スペクトルにより同定を 行った。これら一連の結果より、固体状ケイ素材料をケイ 素前駆体として用い、適切な普遍金属前駆体と混合させる ことで、簡便に一連の普遍金属・ケイ素複合型化合物が合 成できることを明らかにした。本手法の特徴として、特殊 な装置・操作、ならびに特別な補助配位子等を活用する必 要がなく、合成・取り扱いが簡便であること、ならびにマ ンガン・鉄・コバルト・ニッケルのいずれの普遍金属触媒 も同様の手順で活用できること、などが挙げられる。

(3) 普遍金属触媒による貴金属フリーヒドロシリル化の開発

アルケンのヒドロシリル化反応は、シリコーン材料合成 における鍵反応であり、本反応を経由した多様な製品群の シリコーン材料が工業的に合成されている。これらの反応 では、従来法では白金化合物が触媒として活用されており、 例えば、塩化白金酸や Karstedt 触媒などの白金触媒が活用 されている。これらは、高い活性を示すため高効率的にシ リコーン製品を合成可能であるが、高価であるという課題 が残されている(参考:塩化白金酸:24,000円/g Aldrich 社での価格)。このような背景のもと本研究では、(2)で合 成した普遍金属・ケイ素複合型化合物を触媒として用い、 各種アルケンのヒドロシリル化へと適用し、貴金属フリー でのシリコーン製品の合成法の開発を行った。



図 5. コバルト・ケイ素複合型触媒によるα-methylstyrene のヒ ドロシリル化

まず、モデル反応として、アルケンとして α-methylstyrene、ケイ素反応剤としてモデルとして汎用さ れヒドロシランである 1,1,1,3,3-pentamethyldisiloxane を用 い、普遍金属・ケイ素複合型化合物を触媒として用い、触 媒性能について精査したところ、コバルトから構成される 触媒が、高い触媒活性を示すことを見出した(図 5)。本 触媒の触媒活性について評価すべく、この反応において用 いるアルケンおよびケイ素反応剤と触媒とのモル比を変 化させ、本触媒の最大の触媒回転数を評価したところ、最 大触媒回転数(Turn Over Number: TON)は7,300であり、 普遍金属触媒としては、既報の触媒と比較しても非常に高 いことが明らかとなった。一方、従来法で用いられる白金 触媒も、TON は一般に 1,000~10,000 程度であるとされて おり、本触媒は、白金触媒と比較して遜色ない触媒活性を 示すことを見出した。

次に、本触媒の再使用性について検討を行った。この検 討においても、アルケンとして α -methylstyrene を用い、ケ イ素反応剤として 1,1,1,3,3-pentamethyldisiloxane を用いて 反応を行った。まず、1回目の反応を、1mol%の触媒を用 いて反応温度 60 度、反応時間 24 時間の反応条件で行った ところ、原料の完全な消失が確認され、目的物が定量的に 得られていることが、¹H NMR スペクトルにより確認され た。次に、反応終了後の反応容器を遠心分離し、上澄み液 を除去することで触媒のみを残差として回収し、ここに再 び反応剤としてα-methylstyrene と 1,1,1,3,3-pentamethyl disiloxane を添加して反応を行ったところ、1 回目と同一 の反応条件において、アルケン基質の転化率が95%で反応 が進行することが確認された。さらに、先程と同様の操作 により触媒を回収した後、再び反応剤を添加して3回目の 反応を同一条件下で実施したところ、アルケンの転化率 81%で反応が進行していることが確認された(図6)。これ らの検討から、合成した触媒は、最低でも3回の再使用が 可能であることが示され、十分な安定性と高い再使用性を 示すことが明らかとなった。



図 6. 触媒の再使用性についての検討

次に、合成したコバルト・ケイ素複合型化合物を触媒と して、上述の3種の代表的なシリコーン材料であるi)シラ ンカップリング材、ii)シリコーンオイル、iii)シリコーン ゴムの合成反応へと適用した。白金触媒での反応において は、これら3種のシリコーン材料はいずれも効率的に合成 可能であるが、普遍金属触媒において、これらの合成を可 能するものの例は極めて限定的である。そこで本研究では、 上記i)~iii)のシリコーン材料の合成反応に、今回開発した 触媒を適用し、本触媒の応用範囲についての評価を行った。

まず、i)としてシランカップリング剤の合成反応への展開を行った。シランカップリング剤は、用いるアルケンお よびケイ素反応剤の構造により、数百種以上におよぶ多種 多様な製品群が存在する。そのため本研究では、代表的な アルケンおよびケイ素反応剤を用いて、多様なシリコーン 製品の合成へと展開し、合成した触媒の性能評価を行った。



図7.本触媒系で合成可能なシリコーン化合物の例

本触媒系で合成可能なシリコーン製品の一例を図 7 に 示 す 。 ま ず ケ イ 素 反 応 剤 と し て 、 1,1,1,3,3-pentamethyldisiloxane を用いた検討を行ったとこ ろ、アルケンとして、単純アルケンである α -methylstyrene や 1-decene、styrene を用いた場合、本触媒系はいずれの反

応においても高い触媒活性を示し、60度~80度の加熱条 件下、24時間の反応条件で、目的とするケイ素化合物(a), (b), (c)を高収率で得ることに成功した。次に、官能基を有 するアルケンとして、エポキシ部位を持つアルケンを基質 として用いた反応を検討したところ、60度の加熱条件下、 24 時間の反応条件で、目的とするケイ素化合物(e)が定量 的に得られることを明らかにした。またアルケンとして、 vinylsiloxane 構造を持つものを用いた場合においても、同 様の反応条件下において、目的とする生成物(d)が定量的 に得られることを見出した。このアルケンは、後述するシ リコーンゴムの合成反応に対するモデル基質として使わ れるものであり、本触媒系は、様々なアルケンを用いた場 合においても、いずれも良好な触媒性能を示すことを明ら かにした。また用いるケイ素反応剤についても 1,1,1,3,3-pentamethyldisiloxane 以外のヒドロシランも適用 可能であることを見出しており、本触媒系は広い基質適用 範囲を示す。



図 8. コバルト・ケイ素複合型触媒によるシリコーンオイル合成 への展開

次に上述の(ii)への展開として、高分子状ケイ素反応剤 をヒドロシランとして用いた、シリコーンオイルの製造反 応へと本触媒を適用した。アルケンとして styrene を用い、 図 8 に示す高分子状ヒドロシロキサンを用いた検討を行 ったところ、反応時間 24 時間以内に反応は完結し、目的 とする生成物のみを定量的に与えることを見出した。また、 その他のアルケンならびに高分子状ヒドロシロキサンを 用いた場合においても、反応は同様に高効率で進行するこ とも見出している。これらの検討から今回開発した触媒は、 シリコーンオイルの製造用触媒としても適用可能である ことを見出した。



図 9. コバルト・ケイ素複合型触媒によるシリコーンゴム合成への展開

次に、(iii)で示したシリコーンゴムの合成反応へと本触 媒を適用した。シリコーンゴムは、シリコーン材料の応用 用途として最も広く用いられているものであり、これらの 合成においても従来法では白金触媒によって合成が達成 されている。一方、今回開発したコバルト・ケイ素複合型 触媒を用いて、図9に示すように、高分子状アルケンと高 分子状ヒドロシロキサンとの反応を検討したところから、 目的とするシリコーンゴムの生成が確認された。

以上より、本研究では、固体状ケイ素材料と、適切なマ ンガン・鉄・コバルト・ニッケル前駆体との反応から、簡 便な操作で一連の複合型触媒を開発し、特に、コバルト・ ケイ素複合型触媒が、アルケンのヒドロシリル化によるシ リコーン材料合成において、シランカップリング剤・シリ コーンオイル・シリコーンゴム、の全ての用途に対して高 活性を示す優れた貴金属フリー触媒として機能すること を明らかとした。なお、今回開発したこれらの普遍金属・ ケイ素複合型触媒に関する技術は、特許出願済みである (特願 2021-5602)。

参考文献

1. Arata, S.; Sunada, Y. An isolable iron(II) bis(supersilyl) complex as an effective catalyst for reduction reactions, *Dalton Trans.* 48, 2891-2895, 201

績 業

【原著論文】

1.Saito K, Ito T, Arata S, Sunada Y
Four-Coordinated Manganese(II) Disilyl Complexes for the Hydrosilylation of Aldehydes and Ketones with 1,1,3,3-Tetramethyldisiloxane *ChemCatChem*, 13, 1152-1156, 2021

2.Arata S, Suzuki K, Yamaguchi K, Sunada Y Supersilyl as an Effective Monodentate Ligand to Stabilize Four-Coordinate Manganese(II) Complexes Dalton Trans, 49, 17537-17541, 2020

【口頭発表】

 砂田祐輔、荒田彰吾、齋藤京花、小林由尚、伊藤龍好
 4 配位構造を持つ鉄(II)およびマンガン(II)スーパーシ リル錯体
 錯体化学会第 70 回討論会、2020 年 9 月 28 日(Online

頭体化子云第70回韵論云、2020年9月28日(0n11ne 開催)

2. 石井玲音、砂田祐輔

ルイス酸性部位を導入した有機ケイ素化合物の合成と機 能開拓 第 47 回有機典型元素化学討論会、ポスター発表、2020 年 12 月 4 日 (Online 開催)

3. 伊藤龍好、砂田祐輔

ポリシラン担持コバルト触媒によるアルケンのヒドロシ リル化反応 日本化学会第 101 春季年会、2021 年 3 月 19 日 (Online 開催)

小林由尚、砂田祐輔
 鉄触媒によるアンモニアボランおよびヒドロシラン脱
 水素化反応の開発

日本化学会第 101 春季年会、2021 年 3 月 19 日 (Online 開催)

- 5. 石井玲音、砂田祐輔
 第 12,13 族元素を導入したオリゴシランの合成と機能
 開拓
 日本化学会第 101 春季年会、2021 年 3 月 19 日 (Online
 開催)
- 6. 中川峰里、砂田祐輔
 配位不飽和鉄(II)ジシリル錯体における配位子交換、
 日本化学会第101春季年会、ポスター発表、2021年3月21日(0nline開催)

【特許】

(1) 国内特許出願 1件(2) 国外特許出願 1件

超高空間分解を実現するナノカーボン光分析装置

研究代表者:慶應義塾大学 牧 英之

【基本構想】

カーボンナノチューブやグラフェンを用いた光源は、超小型で超高速な光源をシリコンなどのあらゆるチ ップ上に集積化できることから、本光源を用いることで、従来の電球や半導体光源では実現できない新た な分析装置を開発することができる。本プロジェクトでは、ナノカーボン材料のナノ構造に注目し、従来 の光分析での空間分解能の壁を打ち破る、全く新しい高空間分解能の光分析装置を開発する。このような 全く新しい高分解能の光分析装置を実現することにより、従来の光分析装置では困難であった微小領域の 分析や高分解能のイメージング装置を開発することが可能となることから、化学、物理、材料、バイオ領 域といった幅広い分野で利用可能な新しい光分析技術を構築する。令和2年度は、シリコンチップ上に集 積可能な高性能なナノカーボン光源の開発を進め、カーボンナノチューブを用いた電流注入型のEL発光素 子開発、カーボンナノチューブとシリコン光デバイスを融合したチップ上の狭線幅赤外光源の開発、カー ボンナノチューブ配向膜と黒体放射光源開発などに関する研究を進めた。これらの光源は、従来の電球な どによる光源とは異なり、チップ上の光源として分析技術をはじめとする様々な分野への応用が期待され る。

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、これらの発 光メカニズムの起因の解明に成功するなど、世界に先駆け てナノカーボン材料を用いた光源の開発に成功してきた。 特に、ナノカーボン光源は、従来の半導体光源や電球など とは異なり、シリコンチップ上にダイレクトに集積できる ことから、従来の光源では実現できない新しい原理や構造 の光デバイスやその応用を展開可能である。また、ナノカ ーボン光源は、最高で1GHz以上の超高速変調が可能であ ることが示されており、これは、従来の熱光源と比べて 100万倍以上も高速であることから、従来の熱光源では実 現できない新たな機能や原理による光デバイス応用が実 現できる。本戦略シーズ育成事業においては、研究代表者 が独自に開発してきたこれらの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。ここでは、新しい分 析技術に最適化した構造や性能の光源開発を進めるとと もに、それらの実用化も視野に入れ、ナノカーボン発光素 子の量産技術の構築を行う。さらに、これまでのナノカー ボン光源とは異なる、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ことで、全く新しい原 理の分析応用を実現する光源技術の開発も進める。

本研究に関連し、これまでに我々は、様々なナノカーボ ン光源の開発やそのメカニズム解明に加えて、最近では、 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 開発にも成功してきた。さらに、光源の量産化に向けた研 究としては、従来に比べて少ない工程で安価に量産可能な グラフェン成長法として、固体炭素源による多結晶グラフ ェン成長に成功するとともに、それらをシリコン基板上に 直接パターニング成長させる方法の開発にも成功してき た。さらに、量産可能なグラフェンを用いた発光素子のデ モンストレーションにも成功するなど、基礎研究から応用 研究まで幅広く光源開発を進めてきた。これらの成果を踏 まえ、令和2年度は、シリコンチップ上に集積可能な高性 能なナノカーボン光源の開発を進め、カーボンナノチュー ブを用いた電流注入型のエレクトロルミネッセンス(EL) 発光素子開発、カーボンナノチューブとシリコン光デバイ スを融合したチップ上の狭線幅赤外光源の開発、カーボン ナノチューブ配向膜と黒体放射光源開発などに関する研 究を進めた。これらの成果に関して、下記に簡単に報告す る。

2. 研究成果

(1)カーボンナノチューブを用いた EL 発光素子開発

シリコン上にダイレクトに形成できる次世代の光素子 用材料として、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に注目し、原子オーダーの低次元構造 を利用して、通常の半導体光材料などでは見られない特異 な物性や性質を用いた新しい赤外光源を開発する。ナノカ ーボン光源は、優れた加工性によってチップ上でも集積化 も容易であることから、将来的には、従来の固体半導体光 源では実現できない全く新しいデバイス応用を提案する ことを目指す。本研究では、一次元材料である半導体カー ボンナノチューブに注目し、電流駆動が可能で赤外領域で 発光するカーボンナノチューブ EL 発光素子開発を行った。

開発したカーボンナノチューブ EL 発光素子を図1に示 す。半導体リッチのカーボンナノチューブを溶液に分散し てスピンコートすることによってカーボンナノチューブ 薄膜を形成し、その両端に電極を形成するという簡単なプ ロセスでシリコンチップ上に EL 発光素子を作製すること



図1半導体カーボンナノチューブを用いた EL 発光素子の模式図。



図2得られたEL発光スペクトルと詳細なカイラリティーの同定。

ができる。このデバイスに電圧を印加することによって、 カーボンナノチューブ内に電子と正孔が電気的に励起さ れて、発光させることができる。これまでのカーボンナノ チューブ EL 発光素子の研究で、電子と正孔の励起機構と しては、「電子・正孔注入励起」または「衝突励起」とい った 2 つの励起機構が存在することが知られているが、 我々が開発した発光素子では、得られた発光の発光スペク トル、発光強度や電流のバイアス電圧依存性、発光のカメ ラ像などから、「衝突励起」機構による励起であることが 明らかとなった。

さらに我々は、詳細に発光スペクトルを解析したところ、 一つの素子の発光から複数のピークの EL 発光が得られる ことが明らかとなった (図 2)。得られた複数のピークは、 複数のカイラリティーによるものであることが予想され たが、本研究で用いたカーボンナノチューブに含有される カイラリティーを詳細に調べるとともに、それらの情報を 基にして、カイラリティーと得られる発光エネルギーを詳 細に対応させて解析したところ、得られた EL 発光には、 主に(8,7), (8,6), (7,6), (10,2), (7,5)のカイラリティーのカー ボンナノチューブからの発光が重ね合わさっていること



図3EL発光・PL発光・吸収のスペクトルの比較。

を明らかにし、これらの重ね合わせにより実験で得られる 発光スペクトルが再現可能であることを示した。さらに、 得られる EL 発光スペクトルは、従来報告されていた PL 発光スペクトルや吸収スペクトルとは異なっていること が分かっており、およそ 0.2eV 程度のシフトがあると予想 されていたが、本研究では、図3に示すように、カイラリ ティーが詳しく同定された EL スペクトルを用いて、同じ くカイラリティーが同定された PL スペクトルや吸収スペ クトルと比較することで、それぞれのカイラリティーの発 光がどの程度シフトしているのかを詳細に解析した。その 結果、PL と吸収のスペクトル間では、それぞれのカイラ リティーに対応した発光・吸収ピークが完全に一致してい ることが明らかとなり、従来知られているようにこれらが 「励起子」に起因した発光・吸収であることが示された一 方、EL 発光に関しては、全てのカイラリティーのピーク が全て同程度にシフトしていることが明瞭に示された。詳 細な解析の結果、それぞれのカイラリティーによってシフ ト量は若干異なるものの、全てにピークが約150meV程度 のエネルギーシフトしていることが明らかとなった。この エネルギーシフトの観測により、我々が開発した EL 発光 素子では、従来知られている励起子からの発光とは異なる 機構での発光が得られていることが明らかとなった。詳細 な解析の結果、この EL 発光は、励起子に対してさらにも う一つ正孔が結合した「トリオン」による発光であること が明らかとなった。

従来報告されたトリオンからの発光としては、PL 発光 や EL 発光のものが報告されてきたが、いずれも、大きな ゲート電界を印加して、高密度な正孔を発生させることに よって、励起子よりもトリオンの生成を安定化させること によってトリオンを生成して発光を得ていた。一方、我々 が開発したデバイスからのトリオン発光では、ゲート電圧 を一切印加することなく、トリオンからの発光を得ること に成功しており、従来のゲート電界によらないトリオン生 成メカニズムの解明が必要となる。そこで、本発光素子の 電気特性や発光特性を踏まえて、トリオンの生成機構と発



図4トリオン発生と発光機構。

光機構について詳細に解析した。その結果、図4に示すよ うに、電極ーカーボンナノチューブ界面に生じるショット キーバリアに起因して、電極から高効率に正孔が注入され て、電極界面付近のカーボンナノチューブ内に高密度な正 孔が生成されると同時に、ショットキーバリアに伴うバン ドの曲がりに起因して注入された正孔は加速されること から、加速された正孔の運動エネルギーによって励起子を ダイレクトに励起する衝突励起機構が関与していること が明らかとなった。その結果、衝突励起機構により高効率 に励起子が生成されると同時に、その領域近辺では高い正 孔密度も同時に実現していることから、従来のゲート電界 によるトリオン生成と同様にトリオン生成と発光が実現 していることが示された。これより、本デバイスは、従来 必要とされるゲート電界を必要とせずにトリオン発光が 得られるため、より簡易的にトリオンを得る優れた手法と なることが示され、新たなトリオン発生法と赤外領域での 発光素子開発手法となることを示した。本研究内容と技術 に関しては、Journal of Applied Physics 誌に掲載された。

(2) シシリコンチップ上での高効率・狭線幅カーボンナノ チューブ発光素子の作製

現在、半導体を用いた赤外領域での発光素子の材料としては、GaAs 系、InP 系やそれらの混晶などの化合物半導体が用いられているが、pn 接合などの素子作製プロセスが複雑であることや素子サイズが大きいといった課題が挙げられ、さらにシリコンとの親和性が悪く基板上に直接成長が困難といった大きな欠点がある。そこで、化合物半導体に変わる新たな赤外領域での発光材料としてカーボンナノチューブが報告されている。

半導体カーボンナノチューブは直接遷移型のバンドギ ャップを有しているとともに、室温において近赤外発光 が得られる。また、シリコン基板への直接成長が可能でナ ノスケールの材料であることから、シリコンチップ上での 光デバイスとの相性が良いといった特徴がある。特に、近



図5 実際に作製したシリコンフォトニクス素子。



図 6 シリコンフォトニクス上 CNT 光デバイスの模式図。

年、シリコンフォトニクスなどの高集積なシリコン光デバ イスが注目されているが、このようなシリコンフォトニク スデバイスでは、通信波長でも使われる波長 1.3µm 以上 の近赤外光を用いる必要があり、このような波長で発光可 能なカーボンナノチューブとは極めて相性が良い。そのた め、近年になり、カーボンナノチューブとシリコンフォト ニクスを融合した光デバイスの報告が増えており、例えば、 カーボンナノチューブの発光をシリコン光導波路で伝搬 した研究や、シリコンフォトニック結晶やリング共振器な どの共振器と結合させた研究も報告され、それらを用いて 狭線化された発光を得る研究も報告されてきている。しか し、これらの先行研究においては、共振器とカーボンナノ チューブが結合はしているものの、外部レーザー光源から の励起光入力やカーボンナノチューブ発光の取り出しは、 シリコンチップ上面から顕微鏡を用いて行われることが 殆どであり、励起光の入力と発光の取り出しを全てチップ 上で行った例は殆ど報告されていない。将来的に、シリコ ンチップ上に集積化されたナノカーボンデバイスを実用 化するためには、光の入出力全てをシリコンチップ上で行 って、全てをチップ上に組み込む必要があり、励起から発



図 7 励起光がリング共振器に閉じ込められた様子 (共振励起時の近赤外カメラ像)。

光取り出しをチップ上でインラインで行う技術の構築が 望まれる。本研究では、SOI 基板上にシリコン導波路とリ ング共振器・ディスク共振器を作製し、近赤外領域のみで 駆動し、インラインシステムで動作可能なカーボンナノチ ューブ赤外発光デバイスを開発した。

図 5 に作製したシリコンフォトニクスデバイスの光学 顕微鏡像を示すが、幅 440nm の直線シリコン導波路に対 して、10 または 20µm のリング共振器やディスク共振器 を配置したシリコンフォトニクスデバイスを作製した。さ らに、この共振器上の一部にカーボンナノチューブを局所 的に散布するための窓を形成した。このようなシリコンフ ォトニクスデバイスに対して、カーボンナノチューブを散 布することによって、共振器の一部にダイレクトにカーボ ンナノチューブを形成した。

このように作製したシリコンフォトニクス上カーボン ナノチューブデバイスに対して、励起光として通信波長帯 の波長1.3µmの光をシリコン光導波路に入射する(図6)。 この場合、図7で観測されるように、共振器の共振波長を 満たす励起光がシリコン導波路を通じてインラインで共 振器に入射され、励起光が共振器内に閉じ込められる。そ のため、共振器に閉じ込められた励起光によってカーボン ナノチューブが高効率で光励起することが可能となる。こ のようにして共振器に閉じ込められた励起光によって、カ ーボンナノチューブを高効率に励起した結果、カーボンナ ノチューブから 1.55µm 帯の近赤外領域において、増強さ れた PL 発光を得ることに成功した。ここでは、カーボン ナノチューブからの PL 発光も共振器内で閉じ込められる ことから、共振波長を満たす PL 発光のみがシリコン光導 波路へ取り出される。狭線幅化された近赤外の発光は、共 振器から導波路へ取り出されたのちに、チップ外へ導出で きたことから、励起光だけではなくカーボンナノチューブ からの発光もチップ上からインラインで取り出すことに 成功した。

本素子によって得られたカーボンナノチューブの発光 スペクトルを図8に示すが、この図には、励起光が共振器 に共振した時のスペクトルに加えて、励起光の非共振時の 発光スペクトルや、共振器外でのフォトルミネッセンスス ペクトルも示している。この結果より、励起光の非共振条 件では全くカーボンナノチューブからの発光が全く得ら れないのに対して、共振条件では、非常に強く狭線幅の発 光が得られることが明らかとなった。これは、励起光の非 共振時では、リング共振器内に励起光が入り込めないため、



図8リング共振器からの狭線幅 CNT-PL 発光のスペクトル。



図9 ディスク共振器からの狭線幅発光。

カーボンナノチューブを励起することが出来ず、全く発光 が得られないのに対して、励起光の共振時には、逆に励起 光が強く共振器に閉じ込められることによって、高効率に カーボンナノチューブが励起されて、高輝度な発光が得ら れることを示している。また、共振時に得られた発光スペ クトルは、励起光と同様に共振器内に閉じこめられること から、共振条件を満たす波長のみで極めて鋭い発光スペク トルを有しており、周期的に発光ピークを有する発光がイ ンラインで取り出せることが明らかとなった。この発光ス ペクトルは、共振器が無い通常のPL発光と比べて、極め て細い線幅の発光が得られており、狭線幅の発光を得るこ とに成功した。さらに、共振器内外のPL発光強度の定量



図 10 カーボンナノチューブ配向膜からの発光の様子。

的な実験を行った結果、共振器内の PL 発光は、共振器外 と比べて 34 倍の発光増強が得られることも明らかとなっ た。また、上述のリング共振器に加えて、ディスク形状を 有するディスク共振器を用いて同様の PL 発光測定を行っ た結果、さらなる狭線幅化に成功した。得られた狭線幅発 光は、発光の線幅の指標となる Q 値(Q 値が大きいほど 狭線幅化している)を算出したところ、5700 という極め て高い Q 値が得られおり、実用的に重要となるインライ ンでのデバイスとしては、これまでで最も高い Q 値であ った。このように、従来デバイスと比べて高品質な光デバ イスをインライン動作で得られることが示されたことか ら、今後、本技術を用いたシリコンチップ上での赤外光源 応用が進むと期待される。本研究と技術は、ACS Applied Nano Materials に掲載された。

(3) カーボンナノチューブ配向膜による赤外光源開発 これまでの研究では、黒体放射による赤外光源としては、 主にグラフェンに注目して開発を進めてきたが、本研究で は、カーボンナノチューブを用いた赤外光源開発も進めて いる。これまでに、従来のグラフェンと同様の高輝度な赤 外発光が得られることを示しており(図 10)、今後、本素子 を用いた機能的な赤外光源の開発を進める。

3. まとめと今後の展望

本研究プロジェクトでは、ナノカーボン光源を用いた分 析技術構築に関する研究を進め、本稿では特に本技術の実 現に重要となる赤外光源の開発や評価について示した。戦 略的シーズ育成事業開始直前には、我々が開発したグラフ ェンを用いた発光素子に関する研究成果が「Nature Communications」に掲載されたが、その後もナノカーボン 光源に関する成果が得られており、論文誌にも掲載されて 専門家からも高い評価を得ている。今後は、引き続きオリ ジナリティーの高い独自のナノカーボン光源開発を進め るとともに、その高性能化や実用化技術を構築していく。

業績

【原著論文】

- Hidenori Takahashi, Yuji Suzuki, Norito Yoshida, Kenta Nakagawa and Hideyuki Maki, High-speed electroluminescence from semiconducting carbon nanotube films, Jounal of Applied Physics, 127, 164301-164307 (2020).
- Naoto Higuchi, Hiroto Niiyama, Kenta Nakagawa and Hideyuki Maki, Efficient and Narrow-Linewidth Photoluminescence Devices Based on Single-Walled Carbon Nanotubes and Silicon Photonics, ACS Applied Nano Materials, 3, 7678-7684 (2020).

【総説】

1. 牧英之,中川鉄馬,ナノカーボン材料を用いた光電子 デバイス開発,炭素材料の研究開発動向 2021,2021 年6月発刊予定.

【口頭発表】

- (招待講演) 牧英之, チップ上ナノカーボン光電子デ バイス開発, 阪大 CSRN 第二回異分野研究交流会 「半導体・ナノカーボン系」, 2020 年 8 月 28 日, オ ンライン.
- 中川鉄馬,高橋英統,志村惟,牧英之,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発光素子化,第81回応用物理学会秋季学術講演会,2020年9月9日, オンライン.
- (招待講演)牧英之、シリコンチップ上でのナノカーボン光・電子デバイス開発、第81回応用物理学会秋季学術講演会、2020年9月10日、オンライン.
- (招待講演)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, Pre-KEIO TECHNO-MALL 2020 セ ミナーシリーズ(第3回), 2020年11月4日,オン ライン.
- 5. (招待講演)牧英之,ナノカーボン材料を用いた光電子 デバイス開発,第5回CPC研究会,2020年11月9-13 日,オンライン開催.
- (招待講演)牧英之、ナノカーボン材料によるチップ上 光電子デバイス開発、グラフェンコンソーシアム、 2020年12月4日、オンライン開催。
- 7. 下村健太,今井要,川合暁,橋本和樹,井手口拓郎, 中川鉄馬,牧英之,非対称構造グラフェン光検出器開 発とマクロ可視・赤外光検出,第68回応用物理学会 春季学術講演会,2021年3月16日,オンライン.
- 8. 樋口直人,新山央人,中川鉄馬,牧英之,高効率·狭

線幅カーボンナノチューブ PL 発光素子, 第68回応 用物理学会春季学術講演会,2021 年3月16日,オン ライン.

- Kenta Nakagawa, Hidenori Takahashi, Yui Shimura and Hideyuki Maki, A light emitter based on polycrystalline graphene patterned directly on silicon substrates from a solid-state carbon source, 2020 International Conference on Solid State Devices and Materials, 2020 年 9 月 30 日, On-line.
- (招待講演) Hideyuki Maki, Yui Shimura and Kenta Nakagawa, Nanocarbon-based optoelectronic devices on silicon chips, The 7th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University (ISFAR-SU 2021), 2021 年 3 月 5 日, On-line.

【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 2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. 2020 年度の研究目的

プロジェクト6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. 2020 年度の研究成果

2015年研究室が開設された年度に受託した国際共同医師主導治験 PAOLA-1 において、製薬企業がオラパリブの 初発卵巣癌の適応追加承認申請を実施したことに伴い、 2020年8月に、治験調整事務局業務を担った組織として、 規制当局のGCP適合性書面調査を受け入れた。その結果、 指摘事項なしの評価を受けた。12月には適応追加承認に ついて、企業からプレスリリースされた。GHRCC研究室 が出来て6年目に得られた、目に見える形での大きな成 果である。

2020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。2020 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 14 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。

14 試験のうち2 試験は国内医療機関で実施する試験だ が、残り12 試験は国際共同試験(医師主導治験4,医師 主導臨床試験8)であり、研究室の特徴がよく表われて いる。2020 年度に新規案件として相談をうけた国際共同 試験が3 試験あり、2021 年度早々に治験届、倫理審査等 を開始する予定である。

国内医療機関で実施している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、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 医師主導 治験である。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

ARCAGY-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。2020 年度は NCIの NRG-LU005 試験、NRG-GY018 試験をともに医師主導治 験として実施する準備を開始した他、ドイツの婦人科腫 瘍グループが主導する ECLAT 試験を多施設共同臨床試 験として実施する準備を行った。

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。COVID-19 影響 下で、GHRCC 研究員が米国 NRG Oncology や欧州 GCIG の研究グループ会議に出張することはかなわなかったけ れども、Virtual 開催となった国際会議には積極的に参加 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 薬企業の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。2020 年度は COVID-19 の影響があり集合形式 の開催を避け、WEB 会議システムを用いたサロンを開催 した。今後も、新しい形態での開催を模索したい。

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。2020年度の相談 実績は9件,相談者は,製薬企業や研究者・臨床研究ル ープだった。企業立の医療機関から検診研究のデザイン について複数回の相談をうけた。臨床に近い環境におい て研究デザインを相談できる機能を充実させたい。

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を検討したい。

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。

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。

以上



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

кізтес 研究報告 2021

2021年7月28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。