<u>ISSN 2434-5873</u>



研究報告 2022

(KISTEC Annual Research Report, 2022)



Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology

研究報告2022 目次

【企画部】	3
【機械・材料技術部】 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6
【電子技術部】	21
【情報·生産技術部】	34
【化学技術部】	43
【抄録】・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	48
【研究開発部】	
有望シーズ展開事業	
「次世代機能性酸化物材料」プロジェクト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	53
「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	67
「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	81
「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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	91
実用化実証事業	
「人工細胞膜システム」グループ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	103
「次世代医療福祉ロボット」グループ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	118
「腸内環境デザイン」グループ・・・・・	131
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	142
「抗菌・抗ウイルス研究」グループ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	153

戦略的研究シーズ育成事業

研究テーマ:光操作に基づく医療技術の創出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	171
研究テーマ:貴金属フリー新規触媒技術の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	178
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・・・・・・	183
研究テーマ:光技術を用いた超広帯域テラヘルツオシロスコープの開発・・・・・	189
研究テーマ:ゲノム構築技術による創薬研究基盤の開発・・・・・・・・・・・・	195
研究テーマ:化学ボロフェンによるフレキシブル素子の開発・・・・・	201

政策課題受託研究

「グローバルヘルスリサーチコーディネーティングセンター (GHRCC) 」プロジェクト・・・・・・ 205

研究報告2022 目次 【企画部】

◆5Gネットワークを用いるCPS/IoT向け 制御システムへの暗号化制御の適用可能性・・・・・・・・・4

水矢 亨、千家 雅之(企画部 経営戦略課 新事業戦略グループ) 阿部 顕一(企画部 経営戦略課)

5G ネットワークを用いる CPS/IoT 向け 制御システムへの暗号化制御の適用可能性

水矢 亨,千家 雅之(企画部 経営戦略課 新事業戦略グループ) 阿部 顕一(企画部 経営戦略課)

1. はじめに

5Gは、超高速・大容量、超低遅延、多数同時接続を特長 とするモバイル向けの無線通信として注目されている。製 造業をはじめとする産業分野においては、低遅延を特徴と する無線通信であることに加え、一般企業や自治体等で自 営できるローカル 5G の制度が設けられていることから、 CPS(Cyber Physical System)/IoT への活用も期待されている。 当研究所でも、2020年度にローカル 5G の無線局免許を取 得し、2021年度から海老名本部でローカル 5G(以下、「L5G」 と記す。)の通信環境を運用している⁽¹⁾。

5Gに限らず、デジタル技術を駆使する CPS/IoT では、デ ータ通信は欠かせない要素技術であり、それに伴ってセキ ュリティ対策もまた重要である。CPS/IoT におけるセキュ リティ対策は、センサーや制御対象などが実在するフィジ カル空間(現実空間)に損害を与えうる重要度の高いデー タを扱うこと⁽²⁾、及び端末数の増加等によりネットワーク の複雑性が増すことによって通常のセキュリティ対策では 満足しない可能性がある。このような懸念に対し、フィジ カル空間内に制御対象がある制御システムのセキュリティ 対策として暗号化制御が提案されている^{(3)、(4)}。暗号化制御 では、準同型性を持つ暗号アルゴリズムを利用し、制御器 での処理を暗号データのまま実行できる演算(秘密計算) に限定することで、サイバー攻撃の予防と検知に強い制御 器を実現する。

本稿では、当研究所の L5G 環境を利用し、高速性や低遅 延性が期待される L5G における暗号化制御の適用可能性 を検討する。そのために、L5G ネットワーク上で暗号化制 御の演算処理を実行し、その処理時間を測定・評価する。

2. CPS/IoT と暗号化制御

2.1 サイバー空間とフィジカル空間

ー般的に CPS/IoT は、データが集積されるサイバー空間 (仮想空間) とセンサーや制御対象機器などが配置される フィジカル空間(現実空間)の両者に跨る⁽²⁾。スマート工場 など産業分野での L5G も、サイバー・フィジカル間での利 用が期待されている。サイバー・フィジカル・セキュリテ ィ・フレームワーク(CPSF)⁽²⁾では、これをふまえたセキ ュリティ対策の全体像が示されている。CPSFでは、産業社 会を3層構造と捉え、各層で求められる信頼性を図1のよ うに示している。このうち、第2層がサイバー空間とフィ ジカル空間の相互作用が生じる部分であり、IoT や CPS に 由来する部分となっている⁽⁵⁾。



2.2 ElGamal 暗号による暗号化制御

暗号化制御^{(3)、(4)}では、制御対象において入出力信号デー タや制御パラメータの暗号化・復号化等を行い、制御器で は秘密計算処理だけになるように制御系を構成する。CPSF でいえば、サイバー空間にある制御器には暗号化された値 しか提供しない暗号化制御は、第2層でのセキュリティ対 策と捉えることができる。

この暗号化制御は準同型性をもつ暗号を用いて実現できる。暗号化の操作 Enc に対し、暗号化される前と後のデー タそれぞれに対して(加減乗除のような)演算子•*p*と•*E*が 定められているとき、次式が成立すれば、暗号化 Enc は演 算• について準同型性をもつといわれる。

$\operatorname{Enc}(m \bullet_P n) = \operatorname{Enc}(m) \bullet_F \operatorname{Enc}(n)$

例えば、公開鍵暗号の一つである ElGamal 暗号は、乗法に ついて準同型性をもつ。

一般的な線形制御は、時間を離散化した場合、次式のように表現される。

$\left\lceil x(t+1) \right\rceil$	A	B	$\begin{bmatrix} x(t) \end{bmatrix}$
$\begin{bmatrix} u(t) \end{bmatrix}^{=}$	C	D	$\left\lfloor v(t) \right\rfloor$

ここで、xは制御器の状態変数、uは制御入力、vは制御器 への入力であり、A、B、C、Dは制御器のパラメータであ る。上式が ElGamal 暗号化可能な形に量子化されている場 合、乗法準同型性をもつ ElGamal 暗号の暗号化と復号化の 操作を Enc と Dec とすると、次式が成立する。

 $\begin{bmatrix} Ax(t) + Bv(t) \\ Cx(t) + Dv(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{Dec}[\text{Enc}(Ax(t))] + \text{Dec}[\text{Enc}(Bv(t))] \\ \text{Dec}[\text{Enc}(Cx(t))] + \text{Dec}[\text{Enc}(Dv(t))] \end{bmatrix}$ $= \begin{bmatrix} \text{Dec}[\text{Enc}(A) \text{Enc}(x(t))] + \text{Dec}[\text{Enc}(B) \text{Enc}(v(t))] \\ \text{Dec}[\text{Enc}(C) \text{Enc}(x(t)] + \text{Dec}[\text{Enc}(D) \text{Enc}(v(t))] \end{bmatrix}$

ここで、最初の等号は、Enc に続いて Dec を行うと暗号化 前の値が得られることによる。右辺のうち、暗号データの 乗算とそれ以外(暗号化/複合化/平文の加算)の実行を 制御器と制御対象に分離すれば暗号化制御が実現される。

3. 評価方法

3.1 計測方法

2.2 節で紹介した線形制御の ElGamal 暗号による暗号化 制御は、ElGamal 暗号化可能な量子化が必要ではあるが、 一般的なベクトルと行列の乗算

y_1^{-1}		A_{11}	•••	A_{1n}	$\int x_1$
÷	=	÷	·.	÷	:
y_n		A_{n1}		A_{nn}	x_n

を対象と考えることができる。ここでは、上式で n=3 の場 合について、制御対象に相当する PC#1 と制御器に相当す る PC#2 の 2 台の PC を L5G ネットワークに接続して、

- 0) PC#1 で鍵長を指定して、公開鍵と秘密鍵を生成
- 1) PC#1 で 3×3 行列[*A_{ij}*]の各成分を暗号化し、 [Enc(*A_{ij}*)]を PC#2 に UDP で転送
- PC#1 で 3 次元ベクトル[x_i]の各成分を暗号化し、 [Enc(x₁)、 …、 Enc(x_n)]を PC#2 に UDP で転送
- 3) PC#2 で、[Enc(A_{il})Enc(x_l), …, Enc(A_{in})Enc(x_n)]を暗号 データの乗法のみで計算し、PC#1 に UDP で転送。 これを、各 *i*(=1~*n*)に対して繰り返す。
- 4) PC#1 で、3)で転送されたベクトルの各成分を復号し、復号された各成分の和を計算する。これが [y_i]の 各成分に対応する。

の各処理を行い、2)から 4) の処理 100 回分の時間を計測 した。

3.2 システム構成

計測に用いた 2 台の PC は、いずれも CPU に Core i5-1135G7 を搭載し、メモリは 16GB である。また、そのソフ トウェア構成は次のとおりである。

- OS : Ubuntu 20.04 LTS 64bit
- ・プログラミング言語: Python 3.8.10

(Pycryptdome 3.15.0 と Numpy 1.23.1 も利用) なお、L5G 接続の場合に用いた L5G のシステムは図 2 のようにオンプレミスでの構成となっている。





4. 結果及び考察

3.1 節で示した処理時間の計測を、L5G 接続下での計測 結果を図3に示す。図中のエラーバーは標準偏差を示して いる。L5G 接続下では、鍵長の値にかかわらず処理時間の 最大値が200~300 msとなる結果となった。これは、暗号 化制御の処理を周期的に実行させる場合、短い鍵長 64 ビ ットを選択したとしても、200 ms 以上の周期を設定する必 要があることを意味する。また、鍵長が64~256 ビットの 範囲では、処理時間に対する鍵長の影響は小さく、暗号化 制御の演算処理に比べ L5G 通信の遅延の影響が大きくな っていると考えられる。512 ビット以上の鍵長では、暗号 化制御の演算処理の影響も現れていると推測される。

5. おわりに

本稿では 5G ネットワークを用いる CPS/IoT を想定し、 その中で動作する制御システムへの暗号化制御の適用可能 性を、当研究所の L5G を用いた処理時間の測定と評価を通 じて検証した。暗号化制御の演算処理を L5G ネットワーク 上で実行し、その処理時間を計測したところ、L5G の通信 遅延の影響が大きいことが分かった。特に、鍵長の値にか かわらず処理時間の最大値が 200~300 ms となったことか ら、制御周期を考えると制御系への適用は制御周期を見な がら慎重に検討する必要があることも分かった。

【謝辞】

2021 年度の電気通信大学との共同研究において小木曽先 生ならびに小木曽研究室の皆様には暗号化制御についてご 指導・ご助言をいただきました。記して謝意を表します。

【参考文献】

- 1. 神奈川県立産業技術総合研究所: KISTEC ANNUAL REPORT 2022 (2022).
- 経済産業省:サイバー・フィジカル・セキュリティ対策 フレームワーク Version 1.0 (2019).
- K. Kogiso and T. Fujita: "Cyber-security enhancement of networked control systems using homomorphic encryption", Proc. IEEE Conf. Decis. Control, pp.6836-6843 (2015).
- 4. 藤田,小木曽:「ElGamal 暗号を用いた制御器の暗号化」, 計測自動制御学会論文集, Vol. 51, No.9, pp.661-666 (2015).
- 5. 経済産業省: IoT セキュリティ・セーフティ・フレーム ワーク Version 1.0 (2020).

研究報告2022 目次 【機械・材料技術部】

- ◆DLC膜の混合および流体潤滑における摩擦特性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
 - 吉田 健太郎 (機械・材料技術部 材料物性グループ)
- ◆セラミックス材料のミクロスケール力学特性の直接測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・...9
 - 高橋 拓実、南 大地(機械・材料技術部 材料物性グループ)

矢矧 束穂(川崎技術支援部 微細 構造解析グループ)

多々見 純一 (横浜国立大学)

- ◆「ゼオライト軽石」 軽石の高機能化技術 ・・・・・ 15 小野 洋介 (機械・材料技術部 ナノ材料グループ)

増永 卓朗、袖山 研一(鹿児島県工業技術センター)

岡村 和馬(旭ファイバーグラス株式会社)

DLC 膜の混合および流体潤滑における摩擦特性

吉田 健太郎 (機械・材料技術部 材料物性グループ)

1. はじめに

DLC 膜は、動弁系バルブリフター、ピストンリング等の 自動車エンジン部品への適用が始まっており¹⁾、近年にな って弾性流体潤滑(以下 EHL)下における摩擦特性が報告 され始めた^{2)、3)}。本報告では、各種 DLC 膜と環境負荷の 小さいエステル系生分解油等を用いた混合および流体潤 滑の摩擦評価結果について述べる。

2. 実験方法

摩擦評価は、トライボロジー多機能試験機(Bruker 製 UMT – TriboLab)のブロック・オン・リングモジュール(図 1)を用いて評価した。潤滑油として、ポリアルファオレ フィン 50 (100℃動粘度が 50 mm²/s の合成系炭化水素基 油、以下 PAO50)、PAO50+グリセリンモノオレート(以 下 GMO) 1wt%、エステル系生分解性油として、トリメ チロールプロパントリオレート(以下 TMPTO)を用い、 油温は 80 ℃で評価した。荷重は 32 N(ヘルツ接触面圧: 100 MPa)とし、リングの回転数を変化させることにより、 滑り速度を最小 0.04 m/s から最大 9.2 m/s まで、段階的に 変化させて摩擦係数を測定した。各滑り速度における保持 時間は 30 s とした。

試験片は FALEX 製ブロックオンリング型摩擦摩耗試験 機(LFW-1)用のブロックとリングを用いた。ブロックの 材質は SAE O1 鋼(JIS SKS3 相当)、リングの材質は SAE 4620 鋼(軸受用ニッケルモリブデン鋼)である。ブロック およびリングのしゅう動面は、Ra≦0.01 µm になるように 研磨した。ブロックのしゅう動面に DLC を成膜し、成膜 していない(ノンコート)リングとしゅう動させた。DLC 膜はプラズマ CVD 法により成膜した a-C:H、真空アーク 蒸着法により成膜した ta-C、スパークレス・アーク法⁴と 呼ばれるマクロパーティクルを発生しない真空アーク蒸 着法により成膜した平滑 ta-C の3種類を評価した。ta-C の み成膜後に膜表面の研磨を行った。

摩擦評価後の試験片は、走査型電子顕微鏡 (SEM) によ りしゅう動痕の観察を行った。また、ブロックの未しゅう 動部、およびしゅう動部、リングのしゅう動部および未評 価のリングについて、レーザ顕微鏡を用いてしゅう動方向 に垂直な方向の表面粗さを測定した。

3. 実験結果と考察

TMPTOのDLC膜の摩擦評価結果を図2に示す。a-C:H と平滑 ta-C は、試験した滑り速度の全域においてノンコ ートよりも低い摩擦係数を示した。混合潤滑においては平 滑 ta-C が a-C:H に比べ低い摩擦係数を示したが、EHL か ら流体潤滑においては a-C:H が平滑 ta-C よりも低い摩擦 係数を示し、特に EHL において a-C:H は最小で 0.0006 と いう極めて低い摩擦係数を示した。ta-C は混合潤滑におい



図1 ブロック・オン・リングモジュール概略図



図2 TMPTO における DLC 膜の摩擦係数



図3 各種油潤滑下 a-C:H 膜の摩擦係数

てはノンコートよりも低い摩擦係数を示したが、EHL から流体潤滑においては高い摩擦係数を示した。

各種油潤滑下における a-C:Hの摩擦評価結果を図3に示 す。試験した滑り速度のほぼ全域において、TMPTO が最 も低い摩擦係数を示した。PAO50 に比べ PAO50+GMO 1wt%では全速度域において摩擦係数が増加した。

各種油潤滑下における平滑 ta-C の摩擦評価結果を図 4 に示す。平滑 ta-C もほぼすべての速度域において、TMPTO が最も低い摩擦係数を示した。平滑 ta-C では GMO 添加により全速度域において摩擦係数が低下した。

TMPTO でしゅう動試験後のブロックのしゅう動痕を SEM で観察した結果を図5に示す。ノンコートおよびta-C では、しゅう動方向に平行な傷が多数見られた。a-C:H および平滑ta-C では傷はほとんど見られなかった。

TMPTO でしゅう動試験後のしゅう動部および非しゅう 動部のブロックの算術平均粗さとリングの算術平均粗さ の合成表面粗さ $[Ra = (Ra \ block^2 + Ra \ ring^2)^{0.5}]$ を図6に 示す。混合潤滑から流体潤滑において低い摩擦係数を示し た a-C:H と平滑 ta-C の合成面粗さは、ノンコート、ta-C に 比べ小さくなっている。ta-C と平滑 ta-C の摩擦係数の差 はしゅう動後の合成表面粗さが大きく影響しているもの と考えられる。

4. まとめ

DLC 膜は鋼とのしゅう動において、混合潤滑および流 体潤滑においても摩擦低減効果があることが確認された。 EHL から流体潤滑においては、表面の平滑な a-C:H、平滑 ta-C が摩擦低減に有効であることが確認された。また、潤 滑油による摩擦係数の違いが確認され、特にエステル系の 生分解性油である TMPTO は混合潤滑から流体潤滑の全域 において最も低摩擦を示すことが確認された。以上の結果 は、これまで主に境界潤滑で適用されてきた DLC 膜の用 途を軸受等、混合から流体潤滑で使用される部品へ拡大で きる可能性を示唆しており、更に生分解性油と組み合わせ た環境に優しいトライボロジーシステム実現の可能性を 大いに示唆するものであると思われる。

【参考文献】

- 1. 馬渕, トライボロジスト, 58, 8(2013)557.
- 2. K.Bobzin, et al., Surf. Coat. Technol., 284(2015)290.
- 3. K.Bobzin, et al., Lubr. Sci., 30(2018)285.
- 4. 高橋ら, 日新電機技報, 61, 1(2016)41.







図5 しゅう動痕表面観察



セラミックス材料のミクロスケール力学特性の直接測定

高橋 拓実、南 大地(機械・材料技術 材料物性グループ) 矢矧 束穂(川崎技術支援部微細 構造解析グループ) 多々見 純一(横浜国立大学)

1. はじめに

次世代エネルギー社会を支えるセラミックス材料の開 発が進められており、信頼性や耐久性の向上の要求が年々 高まっている。一方、定量的な材料設計の基盤となる破壊 現象への理解は十分ではない。現象を理解するためには、 その素過程を明らかにする必要がある。

破壊の素過程は構成要素の破壊である。一般的なセラミ ックス材料の構成要素はミクロスケールの粒子や粒界で ある。また、SOFC やコンデンサのように数 µm 厚のセラ ミックス材料が異種材料と積層した構造をもつ部材では、 積層界面も重要な構成要素である。すなわち、ミクロスケ ールの力学特性の直接評価は多様なセラミックス材料の 破壊の素過程を解明する強力な手段であり、破壊現象を理 解する大きな一助になると期待できる。

近年、材料のミクロスケール力学特性を評価する手法と して、集束イオンビーム(Focused Ion Beam: FIB)加工と ナノインデンテーション装置を組み合わせた手法が様々 提案されている。著者らはこれまで、マイクロカンチレバ ー法によりセラミックス中の粒子や粒界の力学特性の測 定を初めて報告して以来、様々なセラミックス材料に本法 を展開してきた¹⁻⁴。成果の詳細はそれぞれの報告を参照 いただきたい。本稿では、本法の基本的な原理と試験方法 について説明するとともに、現在取り組んでいる研究およ び並行して進めている国際標準化での取り組みを評価事 例として簡単に紹介する。

2. マイクロカンチレバー法の原理

マイクロカンチレバー法の構成を図1に示す。測定した い局所領域を最大の引張応力が作用する固定端に設定し た片持ち梁状試験片(カンチレバー)の先端に集中荷重(P) を印加し、破断するまでの荷重、荷重点変位(d)、さらに 試験片の形状と寸法を用いて、梁理論よりヤング率と曲げ 強度を算出する。梁理論の対象は等方的な連続体の対称曲 げであるため、荷重印加方向の横断面の対称性が高くなる ようにカンチレバーの形状を設計し、荷重点距離(ℓ)の 横断面において幾何学的対称性と負荷対称性とを両立す る対称軸の延長線上に荷重印加点を設定する必要がある。 また、線形弾性理論による断面不変、平面保持、微小ひず み、微小変形の仮定の成立が前提条件である。

ー般的なセラミックス材料は、構成粒子の結晶方位がラ ンダムであるために必ずしも等方体でなく、また高荷重側 では室温での塑性変形など非線形弾性が現れる場合があ る。したがって、構成要素(粒子や粒界)とカンチレバーの相対的な大きさや、ZrO2でみられるように応力場が作用することで結晶相が変化(応力誘起相変態)する物質では、その影響を考慮する必要がある。

3. マイクロカンチレバー法の試験方法

マイクロカンチレバー法は曲げ試験であるため、従来の マクロな試験法である三点曲げや四点曲げ試験と同様、材 料表面の凹凸が試験結果に影響する。そこで、カンチレバ ーを作製したい面を機械研磨で鏡面仕上げにするか、また はクロスセクションポリッシャー (Cross section Polisher: CP) で平滑な断面とする。

加工面に適切な導電処理(コーティング層が分厚くなる と、曲げ試験結果に影響を及ぼす)を施した後、FIB 加工 装置や FIB 機能が付属する走査電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope: SEM)により加工を行う。カンチレ バーの形状や寸法は、梁理論を適用して算出する力学特性





図1 マイクロカンチレバー法の構成



図2 カンチレバーの横断面の形状



図3 カンチレバーの外観

値を左右する重要な因子である。そのため、使用する装置 のイオンビームの軸調整などを行い、加工中の座標ズレを 回避する対策をとることが重要である。カンチレバーの横 断面の形状を図2に示す。横断面の形状は、前述した梁理 論の適用範囲、FIB加工の難易や効率を考慮すると、四角 形や五角形が望ましい。五角形の場合、梁理論による応力 分布から、下部の頂点(図2の2~4)が横断面の高さ(h) の半分(カンチレバーの長軸方向を横断する中立面に対応) よりも下に位置するように注意する。

著者らが実際に作製したカンチレバーの外観を図3に 示す。設計寸法は、幅 1µm、高さ 1.5 µm、長さ 12 µm であ るが、概ね所望の寸法で作製できている。また、正面像で 確認できるように、FIB 加工ではエッチング物質の再付着 (リデポ)も起こる。リデポ層がカンチレバーの高さに対 して十分に薄い場合は大きな影響はないと考えられるが、 必要に応じて(あるいは理想的には)除去することが望ま しい。また、ナノインデンテーション装置で適切に荷重を 印加するために、荷重点マーカーを付与する。マーカーの 形状は特に制限されないが、ナノインデンテーション装置 の走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope: SPM) モードで探索しやすい形状が望ましい。図3では点状とし たが、先端ならびに側部の三ヶ所に浅い線状マーカーを付 与して、これらの延長線上の交点を荷重印加点としてもよ い。いずれのマーカーでも、圧子圧入で試験片を破壊する 破壊源にならないように深さや大きさに注意する。なお、 カンチレバーの正面像、俯瞰像、側面像から形状と寸法の 測定を行うため、必ず取得する。また、同一条件の加工で もバラつきが生じるので、カンチレバーそれぞれで観察、 画像解析を行い、曲げ試験結果と対応させる必要がある。

カンチレバーの曲げ試験を行うナノインデンテーショ ン装置は、μNオーダーの荷重とnmオーダーの変位の制 御と同時計測を行い、材料のミクロスケールの硬さや弾性 率、密着性などを測定、評価するために用いられる装置で ある。市場に流通している製品ラインナップも様々あるが、 マイクロカンチレバー法による力学特性評価においては、

- 長時間の測定でドリフトがなく、小荷重領域での安定性が高い測定ができること
- カンチレバーごとに設定された先端近傍の荷重印加点

の素早い探索機能をもつこと

 押し込み位置を高精度かつピンポイントで設定できる こと

という性能が特に重要である。実際の試験時間を大きく左 右するプロセスは荷重印加点の探索である。最近は SEM の中に設置するナノインデンテーションシステムも市場 展開されている。観察しながら曲げ試験を行えるため、よ り正確性の高い試験が期待できる。

ここで、弊所のナノインデンテーション装置(ブルカー ジャパン㈱製、Hysitron TI 980) について、簡単に紹介す る。荷重と変位を検出するトランスデューサーは静電アク チュエーター式で、駆動電圧が低く、長時間測定での発熱 によるドリフトが生じにくい。また、質量が小さく、小荷 重領域での感度や応答性に優れる特長がある。荷重を印加 する圧子と同じ圧子で取得した表面形状像上で押し込み 位置をピンポイントで指定できる SPM モードも搭載して いる。これにより、ミクロスケールのカンチレバーの損傷 を回避しながら、先端近傍に設けられた小さな荷重印加点 のマーカーを円滑に探索し、数十 nm の精度でアプローチ することができる。さらにオプションとして、大荷重試験 用のトランスデューサーも利用でき、従来のマクロな力学 特性とミクロスケールの力学特性とを接続する領域の試 験も可能である。

曲げ試験で使用する圧子は、バーコビッチ、キューブコ ーナー、コニカル圧子のいずれでもよいが、集中荷重を印 加する点で、より先鋭なキューブコーナー圧子が望ましい。 試験条件は、荷重または変位制御のいずれでも良いが、ミ クロスケールのカンチレバーが破壊に至る荷重(荷重が大 きく低下するまでの最大荷重)は数百 µN オーダーと小さ いため、荷重印加速度(µN/s または nm/s)に注意が必要 である。なお、曲げ試験でもカンチレバーへの圧子の圧入 は起こるため、生データだけでは真の荷重点変位(*d*)は 得られない。そこで、カンチレバーがない領域でインデン テーション試験を行って、カンチレバーに圧子が圧入され た分の変位を補正する必要がある。

試験後のカンチレバーの破面は SEM で観察し、破壊し た場所と破面の情報を取得しておく。また、応力とひずみ の関係に変換して、曲げ強度とヤング率を算出する方法は 本稿では割愛するが、梁理論から容易に導出できる。 既報 を参照いただきたい¹⁻⁴。

3. 評価事例

最近取り組んでいる 2 つの事例を紹介する。1 つは、 3mol%-Y₂O₃安定化正方晶 ZrO₂(3Y-TZP)を対象にした研 究である。3Y-TZP は、高強度と優れた破壊靭性を示す材 料であり、身近には医療用のインプラント材料や光ファイ バーなどに応用され、産業分野でも広く用いられている重 要なセラミックス材料の一つである。他方、3Y-TZP のア キレス腱として、水との化学反応が起点となり、体積膨張 を伴う正方晶相(t相)から単斜晶相(m相)への相変態 で粒界にマイクロクラックが発生し、マクロな力学特性が 著しく低下する低温劣化(Low Temperature Degradation: LTD) 現象が知られている。安定化剤を添加された ZrO2 セ ラミックス材料のLTD現象は1984年に初めて報告5され、 以来、40年近く精力的に研究されているが、未だに全容 が明らかになっていない。特に、LTD 現象が起こる表面近 傍の力学特性の変化については、これまで評価する手法が なく未解明である。著者は、共同研究者の多々見純一教授 がチームリーダーであるセラミックス材料の劣化の学理 構築を目指す研究(科学技術振興機構の戦略的創造研究推 進事業 CREST) の一環で、3Y-TZP の LTD 現象にミクロ スケールの力学的特性の変化からアプローチし、ナノ構造 やマクロな力学特性との相関解明を進めている。

3Y-TZP の LTD 現象は水熱下で進行する。そこで、水熱 処理(HT)前後の 3Y-TZP を作製し、LTD 現象の進行の目 安となる m 相分率を XRD 解析から評価した。本実験で作 製した 3Y-TZP の HT 前後の m 相分率は 0%と 36%であり、 HT 中に相変態が進行したことを確認した。また、SEM に よる微構造観察から、HT 後の 3Y-TZP では粒界にマイク ロクラックが発生していることを確認した。カンチレバー (幅 1µm、高さ 1.7µm、長さ 12µm)は、いずれの場合も き裂や気孔などの表面欠陥がない領域を選定し、かつ特定 の粒子や粒界は狙わずに作製した。

図4は、HT前後の3Y-TZP表面に作製したカンチレバ ーの荷重変位曲線である(破線が生データ、実線が圧子圧 入分を補正したデータ)。HT前は変位の増加とともに荷重 が線形に増加した後、非線形に変形して破壊した。HT後 は、変位の増加とともに荷重が線形に増加する過程で破壊 した。梁理論を適用して応力とひずみの関係に変換し、平 均曲げ強度を算出した結果、HT後は表面近傍の強度が大 幅に低下(HT前の38%)していることがわかった。図5 は、HT前後のカンチレバーの曲げ試験後の破面である。 HT前の破面には平均粒子径(0.36µm)よりも微細な凹凸 が形成されたが、HT後の破面は典型的な粒界破壊を示し た。このように、カンチレバーの破面形態はHT前後で大 きく異なり、破壊の過程(き裂の進展経路)が全く違うこ とが見て取れる。すなわち、HTによって粒界強度が顕著 に低下したことが強く示唆された。

もう1つの事例として、マイクロカンチレバー法の国際 標準化(ISO化)に向けた取り組みについて紹介する。著



図4 HT 前後の 3Y-TZP 表面に作製したカンチレバーの荷 重変位曲線



図5 HT 前後の 3Y-TZP 表面に作製したカンチレバーの曲 げ試験後の破面観察



図6 市販 SOFC 単セルの電解質層(1µm)に作製したカ ンチレバーの外観

者は現在、「固体酸化物形燃料電池セル用セラミックス材料の弾性率試験方法と構造評価法に関する国際標準化」のWG3 微小部力学特性評価方法の委員としても活動している(多々見純一教授がWG3 委員長)。WG3 では、SOFC の構成要素の中で最も力学特性が重要な電解質層(8YSZ)を対象にしている。最終的に目指す規格では、パワーエレクトロニクス基板材料、耐摩耗硬質コーティング、超軽量・高強度構造材料、蓄電池、MLCC等の電子材料など、広範なセラミックス材料への適用を目指している。

事業が始動した令和3年度は、マイクロカンチレバー法 の試験プロトコルを作成し、さらに弊所のFIB加工装置で 3種類の市販SOFC単セル中の電解質層にカンチレバーを 作製して3機関(横浜国立大学、産業技術総合研究所、神 奈川県立産業技術総合研究所)でのラウンドロビン試験を 実施した。図6は、作製したカンチレバーの一例である。 図6の製品はアノード支持型で、微構造が異なる3つの層 が観察された。試験のターゲットである電解質層は中心部 にあり、加工面内では1µm程度だったが、幅0.5µm、高さ 0.8µm、長さ5µmのカンチレバーを電解質層にピンポイン トで作製することに成功した。得られた曲げ強度、ヤング 率を機関間で比較すると、第一原理計算から見積もられる 電解質層(8YSZ)の力学特性の結晶方位依存性を考慮す れば、概ね良い一致を示すことがわかった。

4. 今後の展開

マイクロカンチレバー法を駆使した先端的な研究として、CRESTでは 3Y-TZP の LTD 現象の解明に取り組んでいる。現在、本成果の論文化を進めている都合上、紹介できるデータはごく一部に限られてしまう点は恐縮だが、

「粒界」が鍵となる興味深い結果が様々得られているので、 引き続き報告していく。また、セラミックス材料を構成す る粒子の結晶方位は通常、ランダムであるが、粒子や粒界 の大きさに対応するミクロスケールの力学特性を評価す るマイクロカンチレバー法では、結晶方位依存性が顕在化 する。そこで、後方散乱電子回折(Electron Back Scatter Diffraction: EBSD)とマイクロカンチレバー法を組み合わ せ、結晶方位を特定した粒子や粒子間の粒界を狙ったカン チレバー(図7)を作製し、ミクロスケール力学特性との 相関解明を進めている。本成果は令和4年度の日本セラミ ックス協会秋季シンポジウムなどで発表する。さらに高応 力を印加したカンチレバーの TEM 観察も行い、ミクロス ケールの力学特性とナノ構造の相関解明も進める。

国際標準化では、各機関でカンチレバーの作製から試験 までを一貫して取り組み、規格化する上での課題抽出を進 めている。また単結晶での試験も行い、試験法としての精 度と材料としてのバラつき、試験装置の影響等を切り分け て整理していく。これらの結実として、先端ナノ計測拠点 としての弊所のプレゼンスを向上させていく。

【参考文献】

- 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)
- T. Yamaguchi, J. Tatami, T. Yahagi, H. Nakano, M. Iijima, T. Takahashi, T. Kondo, J. Mater. Sci., 55 (17), 7359-7372 (2020)
- 4. J. Tatami, Y. Imoto, T. Yahagi, T. Takahashi, M. Iijima, J. Eur. Ceram. Soc., 40 (7), 2634-2641 (2020)
- K. Kobayashi, H. Kuwajima, T. Masaki, Solid State Ionics, 3-4, 489-493 (1984)

【外部発表】口頭発表2件、 論文発表4件



図7 3Y-TZP 中で結晶方位を特定した粒子間の粒界をター ゲットにしたカンチレバー

異形平板試料のゼータ電位

奥田 徹也(機械・材料技術部 ナノ材料グループ)

1. はじめに

KISTEC では 2008 年に平板形状試料のゼータ電位が測 定できる装置を導入し、多数のお客様にご利用いただいて いる。測定が可能な試料の要件として、(a)全面均一な材質、 (b)目視レベルの平坦性、(c)導電性をもたない等が挙げら れる。しかし基板上の膜の一部が剥がれているなど、上記 の要件を満たさない異形の平板試料のご依頼を承ること もあり、その場合は測定値の信頼性や解釈が問題となる。

当所の装置(大塚電子製 ELSZ-2)の平板試料測定の概 要を以下に記す。石英製のセルは、中央に長さ23 x 幅5 x 深さ1mmの直方体の溝を持つ。試料はこの溝の上面に蓋 をする格好で設置して、長手方向に開いた長方形断面のト ンネル型の流路を形成させる(図1)。次にその流路にモ ニター粒子が分散した水溶液を充填し、トンネルの両端に ある電極から直流電場を印可して、長手方向にモニター粒 子を電気泳動させる。そして側面中央から入射したレーザ ー光を、上面(試料)から下面まで上下方向にスキャンし ながら、モニター粒子によって散乱されたレーザー光を検 出する。散乱光のドップラーシフトから、電気浸透流の上 下方向の流速分布を求め、試料位置(上面)の電気浸透流 の速度を Smoluchowski 式でゼータ電位に換算する。

トンネル内の電気浸透流の流速分布には、森・岡本の理 論式¹⁾を適用する。この式の導出において、流れは電気 泳動方向のみで、上下方向および側面方向への流れはない と仮定する。上面・下面はそれぞれ全面均一で、また左と 右の側面の材質は同一である。トンネルの上下面と左右側 面には境界条件を課すが、電気泳動方向には境界条件を付 けないので、近似的に無限長の均一性を仮定している。し たがって試料(上面)が異形をもち、全面均一でない場合 は上記の仮定が成り立たなくなるが、装置からは森・岡本 の式を使った解析結果しか得ることができない。

そこで本研究では、試料の不均一性が測定値に与える影響を把握するため、異なるゼータ電位をもつ部分が同一面 内に混在する試料を作製し、試料面のどの部分がどのよう に寄与するか調べた。





2. 実験方法

不均一試料のモデルとして、大きな正電位と負電位をも つ領域が、様々なパターンで混在する試料を作製した。試 料の基材は、中性 pH 域で負に帯電するスライドガラス (MATSUNAMI 製 S1126)とした。この基材に対し、パタ ーンに従って部分的にマスキングを施した後、正電位をも つ膜を形成するジメチルポリシロキサン系のガラスコー ティング剤を塗布した。乾燥後にマスキングを剥がすと、 マスク部分から再び元のスライドガラス基材が現れる。

図2に、測定セル上方から見たイメージを示す。長方形 の内側は試料の接液部を表し、黒い領域は正に帯電したコ ーティング部分、白い領域は負に帯電したスライドガラス 基材の露出部分である。この図2の例は、モニター粒子の 電気泳動方向に対して直交して不均一パターンが形成さ れており、レーザー光が通過するセル中央付近はコーティ ングされてないので負電位をもつ場合を示している。

ゼータ電位測定は、モニター粒子(大塚電子製)を10 mM の NaCl 水溶液で100 倍希釈して電気泳動液とし、約16 V/cm の電場を印可して行った。

3. 結果及び考察

図3から図6に、作製した4種の不均一パターン系列図 と、各々のゼータ電位の測定値を示す。図3は電気泳動方 向に直交して均等に約4.6 mm幅で5分割し、正電位領域 を片側から少しずつ増加させていった不均一パターン系 列である。全面にスライドガラス基材が露出した図 3①の 場合はゼータ電位が-48(mV)、全面に正電位コートを施し た⑥の場合は+46(mV)であるが、この両端の間の②から⑤ までが本研究が目的とする不均一試料である。まず図 32 の、一番端の領域だけ正電位コートされている場合、ゼー タ電位は-26(mV)で基材よりも正電位方向へ変化している。 上面(試料)から下面までの測定ポイントにおける、モニ ター粒子の見かけのゼータ電位分布をカーブフィッティ ングした電気浸透流プロットを見ると、森・岡本の理論式 通りの放物線である(図 7)。また他の測定パラメータも 正常値の範囲に収まっているので、図3②の測定ではレー ザー光が通過するセル中央付近の電気浸透流に乱れはな いと考えられ、測定値の信頼性は高い。よってレーザー光 が通過しない端部の不均一性が、中央付近にまで影響を及 ぼしていると断定して良い。なお、モニター粒子の電気泳 動速度は最大でも 100 (μm/s)程度で、測定中はほとんどが 上面(試料)の正電位または負電位領域の片方だけをゆっ くり泳動しているため、一つのモニター粒子が試料全面を 一気に通過して泳動速度が平均化されたためではない。



図 2 セル上方から接液部を見たイメージ(白:負に帯電、黒:正に帯電)

	サンプル	ゼータ電位 (mV)
1		-48
2		-26
3		+ 4
4		+ 29
5		+ 37
6		+ 46

図3 不均一パターン系列(1)

サンプル		ゼータ電位 (mV)
1		-48
2		-22
3		+ 8
4		+ 46
5		+ 26
6		+ 16

図4 不均一パターン系列(2)

	サンプル	ゼータ電位
		(mV)
1		-48
2		-34
3		-14
4		-8
5		+ 4

図5 不均一パターン系列(3)



図 6 不均一パターン系列(4)

図3の不均一パターン系列の③から⑤を見ると、正電位 をもつ領域が増加するにつれて、測定値も連続的に正電位 方向へ変化していくことが分かる。ただし図3の系列から は、不均一領域が占める面積と位置のどちらが強く測定値 に影響するかを知ることができない。

そこで図4に、電気泳動方向に対称なパターンを形成し て評価した結果を示す。例えば逆パターンになっている③ と⑥を比較すると、正電位と負電位の面積比よりは、どち らがセル中央付近にあるという位置の方が、測定値に強く 影響することが分かる。⑥の正電位領域の面積は③の4分 の1に過ぎないが、より大きな正電位を示すのは、レーザ ー光が通過する中央付近に正電位をもつ⑥の方である。

位置分解能を上げるため、図5に均等に約2.5 mm幅で 9分割した一つの領域だけに正電位コートしたパターン系 列の測定結果を示す。正電位と負電位領域の面積比はいず れも1:8 であるが、正電位領域がセル中央に近づくほど 測定値も正電位方向に変化し、⑤では基材の負電位を打ち 消してほぼゼロ電位になっている。

図6は、電気泳動方向に平行に均等に1mm幅で5分割 して、正電位領域を片側から少しずつ増加させていった不 均一パターン系列である。正電位領域が増加するほど、測 定値が正電位方向に変化する傾向は予想通りである。しか し例えば図6③の場合、電気浸透流プロット(図8)は、 上面(試料)に近いほど森・岡本の理論式の放物線から外 れている。また他の測定パラメータを調べると、ゼロ電位 に近い値を示すはずのセル下面のゼータ電位は+12(mV)、 モニター粒子の真のゼータ電位は+11(mV)であり、いずれ も正常値の範囲から逸脱していた。よって、セル中央付近 の電気浸透流が乱れていると考えられ、測定の信頼性に問 題が生じていることが分かった。



4. まとめ

異形試料の一例として、全面均一な材質という仮定が成 り立たないモデル試料を作製して評価した。電気泳動方向 に直交する不均一性では、不均一部分の位置が強く影響す ることが分かった。また電気泳動方向に平行な不均一性は、 電気浸透流の乱れが生じて測定の信頼性に影響すること が分かった。現実的な試料と比べると、大きな正電位と負 電位が混在する極端なモデルであるが、そのことで不均一 性が測定値に与える影響を明確に抽出することができた。

【参考文献】

1. 森裕行, 岡本嘉夫, 浮選, 27, 117-126 (1980).

「ゼオライト軽石」 - 軽石の高機能化技術 -

小野 洋介(機械・材料技術部 ナノ材料グループ) 増永 卓朗、袖山 研一(鹿児島県工業技術センター)

1. はじめに

日本は世界有数の火山大国である。鹿児島県は本土面積 のおよそ半分がシラスと呼ばれる火山噴出物で覆われて おり¹⁾、これを有効利用しようと半世紀以上前から研究開 発がなされてきた。代表例の一つとして、シラスからゼオ ライトという機能性材料を作製する技術が知られている。 ゼオライトは分子サイズの細孔を有しており、吸着材や触 媒として広く利用されている。従来はゼオライト化しやす い粉末状の原料が用いられてきたが、我々は軽石状のシラ スに注目した。意図的に表面のみをゼオライト化すること によって、"水に浮く"といった軽石の特徴と、"汚染物質 を選択的に吸着する"といったゼオライトの特徴を併せ持 つ新材料が得られると考えた。このようなコンセプトに基 づき作製した「ゼオライト軽石」について、既に論文発表 ²⁾した内容に、新たな実験結果や考察を加えて報告する。

2. 実験方法

鹿児島県工業技術センターから提供された SiO₂: Al₂O₃: Fe₂O₃: Na₂O: K₂O: CaO の重量比が約72:13:2:4:4:2 であるシラス軽石を、蒸留水を張ったビーカーに入れた。 このうち、水面に浮いた約83 mass%のシラス軽石を回収 し、以下の手順で水熱処理を施した。シラス軽石原料1.0g を、濃度1~4 Mの水酸化ナトリウム水溶液6 mL に投入 し、耐圧容器で密閉して70~100℃で加熱した(図1)。20 時間加熱後に、ろ過により固液分離した固相を蒸留水で水 洗し、ホットプレートで乾燥して試料を得た。水熱処理の ほかに、容器を開放状態とし常圧下で加熱した場合につい ても、同様にして試料を得た。

試料の微構造を走査電子顕微鏡(JEOL JSM-IT200)で観 察し、試料に含まれる結晶相を粉末 X 線回折装置(リガク Ultima IV)で調査した。また、比表面積・細孔分布測定装 置(マイクロトラック・ベル BELSORP-max II)を用いて窒 素ガスを吸着質とした吸着等温線を測定し、BET 法により 試料の比表面積を求めた。さらに、各試料 0.1 gを 10 mM のリン酸二水素アンモニウム水溶液 25 mL に投入し、撹拌 せずに室温にて 24 時間静置した。静置前後の水溶液のア ンモニウムイオン濃度を、イオンクロマトグラフィーシス テム(東ソー IC-2001)で測定することにより、試料のアン モニウムイオン吸着能を評価した。

4. 結果と考察

水熱処理によって作製した試料の外観は、原料に用いた シラス軽石と類似しており、軽石の多孔構造を維持してい た。蒸留水を張ったビーカーに試料を投入したところ、試料は水面に浮いたが、数分後に水中に沈むものもあり、試料の多孔構造や投入前の乾燥状態が浮水性に影響することが示唆された。

粉末 X 線回折による結晶相調査の結果を図 2 に示す。 濃度 1~3 M の水酸化ナトリウム水溶液で水熱処理した試 料では、CHA 型ゼオライトに帰属されるピークが確認さ れた。3 M100℃試料では、GIS 型ゼオライトに帰属される ピークも確認された。高濃度の4 M 条件とした場合には、



図1 水熱処理によるゼオライト軽石の作製手順



図2 粉末X線回折による結晶相調査の結果



図3 吸着等温線、BET 比表面積測定と走査電子顕微鏡観察の結果; 左:1~3 M 試料(CHA 型ゼオライトがメイン相)、右:4M 試料 (FAU 型ゼオライトがメイン相)

FAU 型ゼオライトに帰属されるピークが強く、90℃条件 では GIS 型ゼオライト、100℃条件では LTA 型ゼオライト のピークも確認された。このように、骨格構造や細孔径の 異なるゼオライトが生成していることが分かった。これら 水熱処理試料では、原料に含まれるアノーサイト(灰長石) やアルバイト(曹長石)に帰属されるピークも見られた。す なわち、シラス軽石の結晶質成分の一部は、水熱処理後に も結晶構造を維持していることが分かった。マグマが急冷 して作られる軽石には結晶質成分とガラス質成分の両者 が含まれており、この天然由来の不均一な性質が、軽石の 多孔構造の維持とゼオライトの生成の両立を可能にした と思われる。

窒素ガスを吸着質とした吸着等温線とBET 法による比 表面積の値、走査電子顕微鏡による観察像を図3に示す。 シラス軽石の比表面積が1.4 m²/g であったのに対し、水熱 処理によって作製した試料は、軽石の数十~数百倍となる 高い比表面積を示した。特に4M80℃試料の比表面積(439 m²/g)は、複合体であるにもかかわらず粉末状のゼオライ トと比べても遜色のない高い値であった。吸着等温線にお いて、低圧領域で吸着量が急激に上昇したことから、ゼオ ライトのマイクロ孔の存在が裏付けられた。また、4M80℃ 試料や4M90℃試料では、相対圧0.4~1.0の範囲でヒステ リシスが確認され、メソ孔の存在も示唆された。電子顕微 鏡像から、ミクロンサイズのゼオライトが表面に緻密に生 成しており、シラス軽石の反応残部を支持体として、軽石 とゼオライトが一体構造を形成していることが分かった。 アンモニウムイオン吸着実験の結果、シラス軽石のアン

モニウムイオン除去率がほぼゼロであった(測定誤差によ

り、-1%となった)。これに対し、水熱処理によって作製し た試料のアンモニウムイオン除去率は29~48%であり、市 販のゼオライト粉末(15%)よりも高い除去率を示した。撹 拌無しとした実験条件が、軽石状の試料に有利に働いたと 思われる。

常圧下で加熱し作製した試料についても、水熱処理後の 試料と同様の微構造を持つことを確認した。また、1~3 M 条件で CHA 型ゼオライトが、4 M 条件で FAU 型ゼオライ トが、それぞれメインの結晶相として含有されていること が分かり、水熱処理試料の実験結果とよく一致した。

4. 今後の展開

「ゼオライト軽石」がアンモニウムイオンに対する高い 吸着能を示したことから、赤潮対策への活用を見込んでい る。また、CHA型ゼオライトはセシウムイオンに対する 吸着の選択性が高いことから、放射性物質除去への活用も 期待できる。本研究のオリジナリティである軽石の形態と、 ゼオライトの吸着能を組み合わせて、新しい使い方を提案 し潜在ニーズを掘り起こしながら、実用化につなげていく。

【参考文献】

- 1. 袖山研一, かごしまシラス産業おこし企業ガイドブッ ク, 70-76 (2011)
- Y. Ono, T. Masunaga, K. Sodeyama, *Microporous and Mesoporous Materials*, 328, 111500 (2021)

【外部発表】口頭発表3件、論文等発表1件

高い近赤外遮蔽性と生体適合性を有する

化粧品用酸化亜鉛顔料の開発

良知 健(機械・材料技術部 ナノ材料グループ) 廣芝 伸哉(大阪工業大学)

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 じる他、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⁾。

著者らはこれまで、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材料の開発を目指し、液相 合成法により酸化亜鉛粒子の作製に取り組んできた。そ して前報では、pHや反応時間、作製原料が粒子の形状及 び粒径へ与える影響について報告した²⁾。濃度を低くす ることでサブミクロン径の球状粒子が得られたが、一方 で収量が少なく、近赤外反射率を評価することができな かった。そこで本研究では、原料となる溶液の濃度をや や高くするとともに混合条件を検討することで、あらた めてサブミクロン径の球状粒子の作製を試みた。更に生 体適合性の付与を目的として、粒子表面を蚕の絹糸(シ ルク)の主成分で繊維状のタンパク質であるフィブロイ ンでコーティングすることを検討した。

2. 実験方法

硝酸亜鉛六水和物水溶液(150 ml、0.05 M)と水酸化 ナトリウム水溶液(150 ml、0.05 M)を下記(a)-(c)の3条 件で混合し、70℃の恒温水槽で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³⁻⁶⁾。

- (a) 硝酸亜鉛六水和物水溶液を恒温水槽で液温が安定するまで保持した後、水酸化ナトリウム水溶液をゆっくり滴下
- (b) 2つの水溶液を予め混合してから恒温水槽に投入
- (c) (b)と同様の混合条件とし、液の蒸発による濃度変化 を防ぐためにパラフィルムを使用

次に得られた酸化亜鉛粒子に、フィブロインコーティ ングを行った。まず、IPA (2-プロパノール) と純水 9:1 の混合溶液を溶媒として用い、3-アミノプロピルトリメ トキシシランを 0.1 M となるように調整した⁷)。そこに 酸化亜鉛粒子を入れ、4 時間撹拌した。酸化亜鉛粒子表 面に物理吸着している有機分子を除去するため IPA で洗 浄し、その後純水に置換してからフィブロイン水溶液を 添加した。60 時間静置した後、IPA を添加して物理吸着 したフィブロインを除去し、沈殿物を自然乾燥してフィ ブロインコート酸化亜鉛粒子を得た。

得られた粒子の粒径および形状は走査電子顕微鏡 (SEM)[日本電子、JSM-IT200LA]で評価した。また、 紫外可視分光光度計[島津製作所、SolidSpec3700i]により



図1 酸化亜鉛粒子の SEM 像



図2 酸化亜鉛粒子の拡散反射スペクトル



図3 粒子 (c) のフィブロインコート前後におけるラマン スペクトル

拡散反射スペクトルを測定した。フィブロインコート酸 化亜鉛粒子については、顕微レーザーラマン分光装置[堀 場製作所、XploRA Plus]を用い、粒子表面におけるフィ ブロインの存在を確認した。

3. 結果および考察

液相合成により得られた、フィブロインコーティング 前の酸化亜鉛粒子の SEM 像を図1に示す。粒子(a)-

(c) はいずれも1ミクロン前後のほぼ球状の粒子で、作 製条件により大きさが異なっていることがわかる。次に これらの粒子の拡散反射スペクトルを図2に示す。近赤 外領域(780-2500 nm)において粒子(c)の反射率が最 も高く概ね80%以上の反射率を示している。そこで粒 子 (c) についてフィブロインコーティングを行った。フ ィブロインコーティング処理後の粒子(c)のラマンスペ クトルを図3に示す。また比較としてコーティング前の ラマンスペクトルも同図に載せてある。コーティング後 の粒子では酸化亜鉛のピークに加え、フィブロインのピ ーク⁸⁾が複数確認でき、粒子の表面にフィブロインが存 在していることがわかる。図4に粒子(c)のフィブロイ ンコート後の拡散反射スペクトルを示す。コーティング により広い波長領域で反射率の低下が見られるものの、 フィブロインコーティング後も近赤外領域における反射 率は概ね70%以上であり、高い近赤外反射率を維持し ていることがわかる。



4. まとめ

高い近赤外遮蔽性と生体適合性を有する化粧品用顔料 の開発を目指し、液相合成法により酸化亜鉛粒子の表面 をシルクフィブロインで被覆した粒子の作製を試みた。 その結果、フィブロインをコートした酸化亜鉛粒子にお いて、近赤外領域で概ね70%以上の反射率を示す粒子 が得られた。

【参考文献】

- 1. https://www.sunstar.com/wp-content/uploads/2018/02/
- 2. 180214 2.pdf, サンスター株式会社他 (2018).
- 3. 良知健, 小野洋介, 廣芝伸哉, KISTEC 研究報告, 10 (2021).
- 4. N. Uekawa et al., Phys. Chem Chem. Phys., 6, 442 (2004).
- 5. N. Uekawa et al., Matter. Lett., 64, 1729 (2007).
- 6. H Quang et al., J, Phys. D: Appl. Phys., 44, 125104 (2011).
- 7. J. Zhang et al., Chem. Master., 14, 4172 (2002).
- 尾形健一,小池一歩,平田泰之,佐々誠彦,井上正崇, 矢野満明,材料,55159 (2006).
- 9. M. Zhao et al., Int. J. Mol. Sci., 22, 4136 (2021).

グラスウールの吸音特性予測と従来モデルとの比較

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

1. はじめに

音響材料の吸音特性の評価には一般に音響管による垂 直入射吸音率の測定と、残響室法によるランダム入射吸 音率の測定がある。残響室法は、実際の使用状態に近い 吸音特性が得られるものの、試験体の準備や取り付けに 多くの手間がかかる。一方、音響管による方法は、垂直 入射に限定しているものの、試験体が小さく利用しやす い。また、音響パラメータ(特性インピーダンスや伝搬定 数)などの複素数情報が得られるため音響材料の設計に役 立つ。

著者らはこれまでに、グラスウールの垂直入射吸音率 を理論予測するプログラムを作成し、良好な予測結果を 得た¹⁾。しかし、従来から用いられているモデルとの比 較は行っていなかった。本研究では、平均繊維径 3µmの グラスウールを対象として、流れ抵抗から音響パラメー タを予測する独自モデルを作成し、実測や従来のモデル (Miki モデル)を用いて得られる垂直入射吸音率と比較し 結果を検証する。なお、音響パラメータから垂直入射吸 音率の算出には 2×2 伝達マトリックス法を用いる。

2. 嵩密度と流れ抵抗の関係

嵩密度の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。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)。サンプル数は14 個で、厚さの範 囲は14~23mm、嵩密度の範囲は20.2~70.7(kg/m³)であっ た。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。

$$\sigma = 316.97 \, D^{1.5912} \tag{1}$$

3. 音響パラメータの推定





·----i-----j

を測定した。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 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。

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³⁾を採用し、流れ抵抗から音響パラメータを予 測する独自モデルを作成した。実測値には、主に $f/_{\sigma} < 0.005$ の範囲に落ち込みが見られるため、その範囲を除い て累乗近似を行った。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。

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

$$R(f) = 1 + 0.0833 \left(\frac{f}{\sigma}\right)^{-0.641}$$

$$X(f) = -0.2303 \left(\frac{f}{\sigma}\right)^{-0.405}$$

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

$$\alpha(f) = \frac{\omega}{c} \left\{ 0.2862 \left(\frac{f}{\sigma}\right)^{-0.421} \right\}$$

$$\beta(f) = \frac{\omega}{c} \left\{ 1 + 0.1347 \left(\frac{f}{\omega}\right)^{-0.635} \right\}$$
(2)

4. 独自モデルの検証

独自モデルを用いて垂直入射吸音率を予測し、Mikiモ デルでの予測値及び実測値と比較した。図3(a)、(b)は、 それぞれ流れ抵抗37,883.5、101,670.0(Pa・s/m²)、厚さ 15、20mmの結果である。流れ抵抗が大きい、すなわ ち、嵩密度が大きい場合、実測結果に凹凸が現れ、予測 値との誤差が大きくなる。この凹凸は、グラスウールの 嵩密度が大きくなることによって、固体伝搬音特性が生 じているためと考えられる。本研究で用いている2×2伝 達マトリックス法は、空気伝搬音特性のみを考慮してお り、固体伝搬音特性が無視できることを条件としている ので³、これは、避けられない現象である。

実測値と二つのモデルから得られる予測値との最小二 乗誤差を8個のサンプルで算出した結果を図4に示す。 流れ抵抗が小さい場合には、独自モデルとMikiモデルで 顕著な差は見られないが、流れ抵抗が100,000(Pa・s/m²) 以上になると独自モデルの誤差がMikiモデルに比べ小さ く抑えられていることが明らかとなった。



5. まとめ

本研究では、平均繊維径 3µm の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した。周波 数を流れ抵抗で規準化した値の範囲を限定することで、 妥当な音響パラメータのデータのみを用いて、独自モデ ルを作成した。

その結果、流れ抵抗が小さい場合には顕著な差が現れ なかったが、100,000(Pa・s/m²)以上という比較的大きい 範囲において、従来の Miki モデルに比べて良好な予測結 果が得られた。今後は、音響パラメータの実測値をいか に精度よく求めるかが課題となる。

【参考文献】

- 1. 小島真路ほか, KISTEC 研究報告, 3-4(2021)
- 2. M.E.Delany and E.N.Bazley, Apl.Acost, 3, 105-116(1970)
- 3. 加藤大輔, 日本音響学会誌, 68, 463-468(2012)

研究報告2022 目次 【電子技術部】

◆ S D R (ソフトウェア無線)を用いたローカル5G (Sub6帯)における・・・・・・・・ 22 マイクロ波測定システムの開発

菅間 秀晃 (電子技術部)

土屋 明久 (電子技術部 電磁環境グループ)

水矢 亨(企画部 経営戦略課 新事業戦略グループ)

今井 大貴、橋本 修、須賀 良介(青山学院大学)

◆パワーデバイス向けたCu-Pdスパッタ膜の評価方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27

根本 俊介,八坂 慎一(電子技術部 電子デバイスグループ)

◆Ni板の親水化に対するプラズマ照射の影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

安井 学、黒内 正仁、金子 智(電子技術部 電子材料グループ)

長沼 康弘(機械材料技術部 解析評価グループ)

田中 聡美、加藤 千尋(化学技術部 環境安全グループ)

◆ 基板厚の異なるマイクロストリップ線路上に装荷したノイズ抑制シートの・・・・・・ 31 伝送減衰率の評価

土屋 明久(電子技術部 電磁環境グループ)

菅間 秀晃 (電子技術部)

SDR(ソフトウェア無線)を用いた

ローカル5G(Sub6帯)におけるマイクロ波測定システムの開発

菅間 秀晃(電子技術部) 土屋 明久(電子技術部 電磁環境グループ) 水矢 亨(企画部 経営戦略課 新事業戦略グループ) 今井 大貴、橋本 修、須賀 良介(青山学院大学)

1. はじめに

KISTEC では県内中小企業への DX (デジタルトランス フォーメーション)支援サービス提供を目指して、2021 年3月にローカル5G(Sub6帯)の無線局を開設した。 ローカル 5G は最新の無線通信技術を活用して高速・高 セキュリティな無線ネットワークを構築できる。図書室 (図1)および試作実験棟の3つの実験室に設置したロ ーカル 5G を活用して企業や大学と共同研究を実施して いる。設置したローカル 5G 基地局は Sub6 帯と呼ばれる 中心周波数 4.85GHz、占有帯域幅 100MHz のマイクロ波 を使って規格上最大1.9Gbps(上り・下りの合計)の高 速無線通信が可能である。しかし、従来の4Gの主要周 波数 800MHz 帯に比べて5 倍以上高い周波数帯であるた め、電波の直進性が強く、障害物による反射・減衰が大 きいなど通信品質の劣化が懸念されている。そこでロー カル 5G 通信エリアの電波状況を評価するために簡便に 電波強度測定できる小型スペクトラムアナライザが有用 である。近年、SDR (Software Defined Radio; ソフトウ ェア無線)を用いた低価格の無線通信機器やスペクトラ ムアナライザ(周波数 4.4GHz まで)などの高周波計測 器などが市販されるようになった¹⁾。SDR はソフトウェ アで無線機能を自由に追加・変更できるため、低コス ト・短期間で測定システムの開発が可能である。

本報告は、SDR を用いたローカル 5G (Sub6 帯) のマ イクロ波測定システムについて報告する。



図1 ローカル 5G (Sub6 帯) 基地局

2. 実験及び結果

2.1 SDR と GNU Radio によるスペクトラムアナラ イザ

ローカル 5G(Sub6帯)の周波数に対応した安価な SDR機器は少数ではあるが市販されている²⁾。本研究で





項目	仕様
トランシーバ	AD9363 RFアジャイル・トランシーバ ※AD9364相当に拡張設定
RFポート	$1 \times TX$, $1 \times RX$
周波数範囲	70 M ~ 6 GHz ※拡張設定後
帯域幅	56 MHz ※拡張設定後
ADC/DAC分解能	12ビット
送信電力	+ 7 dBm
受信雑音指数	< 3.5 dB
FPGA	Zynq-7010
インターフェース	USB2.0 , micro USB Type-B
寸法/重量	117 mm $ imes$ 79 mm $ imes$ 24 mm / 114 g

は、ADALM-PLUTO(アナログ・デバイセズ製;以下、 PlutoSDR)を採用した。PlutoSDRは、図2に示すような ブロック構成で、非公式ではあるが拡張設定後の諸性能 は表1に示す通りである³⁾。周波数範囲が70 MHz から 6GHz、帯域幅が最大56MHz、AD コンバータ(ADC)の 分解能が12bit とローカル5G(Sub6帯)で使用される中 心周波数4.85GHz、帯域幅100MHz、基地局出力50mW の測定に適している。

また、SDR と接続する PC は安価で小型な Raspberry Pi 4B を用いて、オープンソースソフトウェアの GNU Radio でスペクトラム解析プログラムを作成した。Raspberry Pi 4B は Wi-Fi5(IEEE802.11ac)と Bluetooth の無線機能を標準 で搭載しており、簡単に無線通信システムを構築でき る。開発環境は全てオープンソースであるため低コスト というメリットがあるが、開発に必要な情報が乏しく、 ソフトウェアのバージョン違いにより SDR が動作しない など難しい一面もある。

今回は、主要な SDR 機器のドライバや GNU Radio を 含む SDR 制御ソフトウェアをバンドルした Raspberry Pi OS のディストリビューションである PiSDR (Ver.6.1, 64 bit 版) を利用して開発を行った⁴⁾。この PiSDR をコピー した SD カードを Raspberry Pi に挿入して起動すると、サ ポート対象の SDR 機器を USB 接続するだけで、ドライ バのインストール不要で使用できる。本測定システムは 広い空間で効率的に測定を行う必要があるため、台車ロ ボットに搭載することを考慮した。Raspberry Pi の電源定 格は電圧 5 V・電流 3 A となっているので、長時間動作 (目標 2 時間) させるために、定格出力が電圧 5 V・電 流 3 A で容量が 10,000 mAh (37 Wh) のモバイルバッテ リー (ANKER 製 PowerCore 10000 Redux) を採用した。

GNU Radio は GNU Radio Companion (GRC) を使用し てフローグラフによるプログラミングによりスペクトラ ム解析ソフトウェアを短時間で開発することができる。 必要な信号処理ブロックをフローグラフ上で配線接続す ることで、任意の受信システムを開発できる。SDR では FFT 信号処理を行うと、FFT の中心周波数に DC 成分が 現れるため、DC カットの信号処理ブロックを挿入する 必要がある。本研究では図3に示すように4.85 GHzを中 心周波数として帯域幅 50MHz でパワースペクトラム測定 と Waterfall 表示する GUI を作成した。PlutoSDR は周波 数拡張設定をしているが、インターフェースが USB2.0 (480 Mbps) であるため、帯域幅 50 MHz では信号処理 速度が不足して十分な性能が得られていないので、Max Hold の測定時間を長くとることで測定精度を高めてい る。また、トリガー・モードを使用して測定の取りこぼ しを減らしている。

2.2 台車ロボットと制御プログラム

図4に示す電波を受信するホーン・アンテナ(マイク ロウェーブファクトリー製 MDH0218)を取り付けた台車 ロボット(Nexus Robot 製 3WD 100mm Omni Wheel Robot Kit 10013)はオムニホイール3輪で移動するタイプであ る⁵⁾。Arduino328 互換ボードを搭載しているので、外部 PC から台車ロボットをシリアル通信で制御できるように するために図 5 に示すオープンソースの Arduino IDE で プログラムを作成し、Arduino328 互換ボードのソフトウ ェアを書き換えた。外部 PC からのシリアル通信で前 進・後退・右移動・左移動・右回転・左回転・停止と移 動速度・回転速度の制御が可能である。

Raspberry Piから台車ロボットを操作するプログラムは Thonny(オープンソース Python IDE)を使用して図6の ように作成した。GUIはPySimpleGUIライブラリを使用 し、前進・後退・右移動・左移動・右回転・左回転・停



図3 SDRとGRCによるスペクトラムアナライザ



図4 ホーン・アンテナを搭載した台車ロボット

止のボタンスイッチと移動速度・回転速度の数値入力ボ ックスを配置した。シリアル通信(通信速度9600bps) は PySerial ライブラリを使用した。台車ロボット前方に Web カメラ(解像度1K)を搭載し、Raspberry Piと USB 接続した。Web カメラのリフレッシュレートは15Hz 以 上を確保するために画面解像度を640×480pix としてい る。

2.3 SDR 機器の電磁干渉対策

PlutoSDR の本体ケースがプラスチック製であるた め、図7に示すように台車ロボットに搭載したときに、 Raspberry Pi や Arduino ボードなどから発生する無線電波 や電磁ノイズなどを受信してしまう EMI(電磁干渉)問 題が発生した。 PlutoSDR はアンテナを未接続の状態で も様々な周波数の電波を受信しており、正確な電波強度 測定が困難であった。このため、図8に示すように PlutoSDR の本体ケースの内側に電磁シールド塗料(プラ スコート製 PCS-107AgCu)を塗布することで、4.8GHz 帯において 30dB 以上のシールド効果を確認した。

2.4 スマートグラスを活用したリモート操作シス テム

台車ロボットの遠隔操作は、図9に示すスマートグラ



図5 Arduino IDE によるロボット制御プログラム

Feeter (Artal: 2003), feeter (Artal: 2003), feeter (Artal: 2003), feet, start), feet, start), feet, start), c ロボット制器	***
feeter (Arial (2001)), feeter (Arial (2001)), feeter (Arial (2001)), feet, size)), feet, size)), feet, size)), 0) 0) 0) 0) 0) 0)	× X
forte("Arial"、3000), forte("Arial"、3000), fort("Arial"、2000), fort(store), fort(s	v ~ X
feeter (36/14)、30000, feeter (36/14)、30000, feeter (36/14)、30000, feet, 31000, feet, 31000, fe	• • × X
fore(36/24)、30000 fore(36/24)、30000 fore(36/24)、 fore(36/24), fore(3	• ^ X
Americania Fantistani)), Fantistani), Fantistani), Fantistani), Fantistani), Fantistani), Fantistani), Fantistani), Fantistani, Fantista	* ~ X
Fest_size)), Fest_size)), , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	
Feet_size)), Feet_size)), , , 11 1 ロボット新部	·
fert size)). , 1 ロボット新師 - ・コン	
	· · · · ·
	· · · · ·
ロボット制御 ・コン	· · · ·
・コン	
· • コン	
・コン	
・コン	
. 5	
	_
. 2	
. 3	
	D
word	D_rot
wwwind	IN-IUL
	and the second se
+	Diabt
	RION
	I NIGHT
201	_
auk	
	word top-

図6 Python によるロボット・コントロール GUI

ス (エプソン製 BT-30E; 1280×720 pix) を装着して、実 空間に仮想スクリーンを融合した映像を見ながら行うこ とができる。スマートグラスと Raspberry Pi を HDMI 接 続しすることで、実空間に 40 型相当の仮想スクリーン (仮想視聴距離 2.5 m 時)を表示して効率的な電波測定が可



図7 SDR と制御機器との電磁ノイズ干渉





PlutoSDR





図8 電磁シールド塗料による SDR の電磁ノイズ対策



図9 スマートグラスと遠隔制御



図 10 SDR を用いたローカル 5G (Sub6 帯) におけるマイクロ波測定システム

能である。ウエストポーチに入れた Raspberry Pi から台 車ロボットに搭載した Raspberry Pi に無線ネットワーク 接続して、空中マウス(エレコム製 M-RT1BR; Bluetooth 2.4 GHz)でリモート操作が可能である。スマートグラス を装着しての台車ロボットの操縦と電波強度の測定は訓 練を要するが、見えない電波の可視化により、現場での 作業効率が高まり、信頼性の高い無線通信システムの実 現に貢献できる。

具体的には図 10 に示すように 2 台の Raspberry Pi (PC-1 と PC-2) を Wi-Fi 5 (IEEE802.11ac; 5 GHz 帯) で VNC (Virtual Network Computing) 接続してリモート 制御を行った ⁰。 PiSDR には RealVNC Server が標準イン ストールされており、PC-2 に RealVNC Viewer を追加イ ンストールすることで、PC-1 の画面を PC-2 から直接制 御できる。Wi-Fi 5 は MIMO を活用していて、広い範囲 で通信可能であり、図書室内での無線通信に問題がない ことを確認した。初期段階で台車ロボットのリモート制 御はラジコン用アプリをインストールしたスマートフォ ンから Bluetooth (2.4 GHz 帯)通信で試みたが、基地局 から一番離れた本棚の奥(距離 約 15 m)では、制御不 能に陥ることが確認されたため、Wi-Fi 5 でのリモート 制御に変更した。

2.5 図書室におけるローカル 5G の電波強度測定

ローカル 5G を設置した図書室において、図 11 に示す
電波伝搬経路の異なる A 点と B 点で測定を行った。
PlutoSDR 内蔵の LNA 利得を 40 dB、トリガーレベルを
-60 dB に設定し、台車ロボットを連続回転させ、Max
Hold で電波強度を測定した結果の最大値を比較すると、
A 点は約-37 dB (図 12)、B 点は約-47 dB であり(図



図11 図書室と測定点

13)、約10dBの差異があることがわかる。なお、測定系の校正を実施していないため、電波強度の単位はdBとしている。B点は本棚により電波強度が約10dB減衰しているがローカル5Gの通信安定性に影響ないことが、共同実験等を通して確認できている。

3. 考察及び今後の展開

KISTECの図書室に設置したローカル 5G(Sub6帯)の 電波状況について PlutoSDR を用いたマイクロ波測定シス





図 12 測定点 A における電波強度測定

テムを開発して実測を行った。本測定システムはローカル 5G (Sub6帯) だけでなく、Wi-Fi6(IEEE802.11ax)、
 Bluetooth、プライベート LTE など周波数 6GHz までの無線通信システムの電波強度測定に利用できる。

PlutoSDR 以外にも 6GHz までの周波数に対応した HackRF One (GREAT SCOTT GADGETS 製;以下、 HackRF)と NI-USRP 2900 (日本ナショナルインスツル メンツ製;以下、USRP)も購入して検討を行っている。

HackRF は、Linux 環境と Windows 環境のどちらでも安定して動作し、多数のフリーソフトウェアがサポートしているため SDR の入門機として最適である⁷。また、掃引型スペクトラムアナライザのような広帯域測定も可能なフリーソフトウェアも公開されている。ただし、ADCが 8bit であるためローカル 5G(Sub6 帯)の電波測定には感度不足であるので LNA(利得 20dB 程度)の追加が必要となる。

USRP は高価であるが、高速信号処理用の FPGA が搭 載されていて、測定精度と効率性が高く、Windows PC と グラフィカル・プログラミング言語 LabVIEW(日本ナシ ョナルインスツルメンツ製)の開発環境でフレキシビリ ティの高い測定システムが実現できるため、高精度を要 求する測定には USRP を使用している。

今後の展開として、コンピュータ・シミュレーション を用いて、大規模空間の電磁界解析を行うために、令和 4年2月にレイトレース法による電波伝搬解析シミュレ ータ(構造計画研究所製 RapLab)を導入した。図11に 示す図書室の3次元モデルを作成して解析精度向上を模





図 13 測定点 B における電波強度測定

索している。実測とシミュレーションを併用すること で、ローカル 5G(Sub6帯)をはじめ、マイクロ波を利 用する Wi-Fi6、プライベート LTE、LoRaWAN などを使 った無線 IoT システムの安定性向上に貢献できるよう に、デジタルツイン環境の構築を目指す。

【参考文献】

- 1. 高橋知宏, 富井里一, 通販ガジェッツで広がる RF 測 定の世界, RF ワールド, 54, 8-41(2021)
- 2. 高橋知宏, GRC で広がる SDR の世界, *RF ワールド*, 44, 7-91(2018)
- 3. 藤井義巳, RF 送受信機 ADALM-PLUTO の準備, *Interface*, 5, 63-66 (2021)
- 4. https://github.com/luigifcruz/pisdr-image/releases, PiSDR Version 6.1 (64-bits)
- 5. https://www.vstone.co.jp/robotshop/index.php?main_page=p roduct_info&products_id=3753, 3WD100mm オムニホイ ールロボット 10013
- 6. https://www.indoorcorgielec.com/resources/raspberrypi/raspberry-pi-vnc/, VNC で Raspberry Pi にリモートデス クトップ接続 (Windows/Mac/Linux 対応)
- 7. https://engineer-climb.com/hackrf-one-2/, HackRF One を Windows で動かす

【外部発表】口頭発表 1件

パワーデバイス向けた Cu-Pd スパッタ膜の評価方法

Method of evaluating Cu-Pd sputtered films for power device applications 根本 俊介,八坂 慎一 (電子技術部 電子デバイスグループ)

1. はじめに

ガソリン自動車から電気自動車や燃料電池車への転換 に向けて、SiCパワーデバイスの研究活動が活発になって いる。SiCパワーデバイスは、高温動作可能なデバイスで あり、自動車の冷却機構の簡素化が期待できる。現在、パ ワーデバイスの実装技術として、Ag、Cu、Au等の、高温 環境下(250 ℃)での試験事例が報告されている^{1,2,3)}。さら に将来、パワーデバイスのジャンクション温度(Tj)の要求 は、300 ℃以上と言われている⁴⁾。また、パワーデバイス 以外にも電気自動車の急速充電(10 min)でのバッテリーセ ル温度は、270 ℃に達するシミュレーションの結果も報告 され、バッテリーパック ECU (Electronic Control Unit)内の 実装等、パワーデバイスのみならず高温耐性のある実装技 術が必要と考えられる⁵)。

実装材料として、Au は高温耐性が高く、Au-Ge 共晶は んだで実装したサンプルでは、330 ℃環境下 1600 時間の 高温保存試験で良好な実装結果が得られたことが報告さ れている⁶。しかし、Au は、高価であるため、安価でか つ耐腐食性のある実装材料の検討を行った。

車載用半導体に使用するワイヤーボンディング材料の 研究開発は、Cuを中心に2009年頃から活発に進められ、 AuワイヤからCuワイヤへ移行が行われてきた。それは、 CuがAuに対して安価であり、PdをCuワイヤにコーティ ングしたPdコーテッドCuワイヤの耐腐食性やCu-Pd合 金の材料評価などがなされ、200℃の環境下で車載用半導 体に対して十分な信頼性が得られたことが挙げられる^{7,8)}。

Cu-Pd 膜の先行事例としては、3 %以上の Pd 原子濃度の Cu-Pd 合金で耐腐食性が得られることが報告されている ⁹。 また、Cu は 300℃の拡散係数が、250 ℃時の Ag の拡散係 数と同等であるなど高温耐性が見込める ¹⁰。さらに、耐腐 食性を向上するために添加する Pd は、Cu より 6 桁拡散係 数は小さく、Cu に Pd を添加することで高温環境下(300℃) での拡散が抑えられ、長期信頼性が期待できると考え研究 開発を進めてきた ¹¹)。本報告では、Cu-Pd スパッタ膜の作 製および接合を実施し、接合サンプルを大気環境下で接合 試験後、接合部の評価を実施したので報告する。

2. 実験及び結果

2.1 Cu-Pd スパッタ膜の作製方法

Cu-Pdの成膜は、キヤノンアネルバ社製 L-332S-FH で作 製した。はじめに Ti を Si ウェハ上に密着層として 20 nm 成膜を行った。次に、3%以上の Pd 原子濃度にするため、 Pd 原子濃度 5%とし、Cu-Pd をスパッタ膜厚 1000 nm 成膜 した。



図1 Cu-Pd スパッタ膜の Pd 濃度制御方法

図1にCu-Pdスパッタ膜のPd濃度制御方法を示す。 Cu-Pdスパッタ膜のPd濃度は、3インチCuターゲット のエロージョン上に2mmφ - 5mmのPd小片を載せてそ の個数を増減することで制御できる。事前評価した結果で は、Pd小片1個当たり、およそPd原子濃度1%であった。 図1の様に5個のPd小片を載せるとPd原子濃度5%の Cu-Pdスパッタ膜ができる。次に、スパッタ法で作製した サンプルをダイヤモンドペンでウェハサンプルの個片化 (5mm□ - 10mm□)をした。サンプルの一部はCu-Pd スパッタ膜のPd濃度評価に用いた。

2.2 接合方法

個片化した Cu-Pd スパッタ膜サンプルの Cu 面を重ね合わせて接合を行った。接合条件はセラミックネジとナットで個片化したチップを挟み込み、300 ℃ 2 h 大気中で接合を実施した。

2.3 断面研磨

接合を実施したサンプルをエポキシ樹脂で樹脂埋めを した。その後、研磨機(ムサシノ電子社製 MA-200)を使用 し、5 mm□程度までサンプルを研磨後、評価対象の接合 部近傍まで断面研磨を実施した。その後、接合部の研磨に よるダメージ層を除去するため、イオンミリング(JEOL 社製 IB-19500CP)で加工を実施した。

2.4 断面観察および EDX

接合後の実装面を評価するために、SEM-EDS(JEOL 社 製 JSM-IT200LA)で評価を行った。図2にイオンミリング 後の Cu-Pd 接合部の断面図を示す。Cu-Pd 接合部は3層構 造が観察され、また、接合界面とみられる位置では、ボイドがほぼ見られなかった。3層構造がどのような物質で構成されているかを評価するために EDX を使用して点分析と線分析を実施した。事前に加熱前の個片化したチップについて EDX 点分析を実施すると Cu-Pd スパッタ膜の Pd 濃度は 6%であり、ほぼ想定通りのスパッタ膜が形成できていた。接合を実施した図 2 のそれぞれの層についても点分析を実施すると Cu-Pd 層はおよそ 10%の Pd 濃度になっており、酸素はほぼ検出しなかった、接合界面近傍は Cu に酸素濃度が 33%程度あり、Pd は検出できなかった。

次に図 3 に Cu-Pd 接合部の EDX 線分析の評価結果を示 す。

図2のCu-Pd接合部をに対して垂直に線分析を行った結 果とSEM像を比較すると接合界面とCu-Pd層を比較する と接合界面にPdは存在せずCu₂Oを形成し、Cu-Pd層には 酸素がほぼ存在しないことがわかった。

3. 考察及び今後の展開

本報告では、Cu-Pd スパッタ膜でサンプルを大気中で 300 ℃で 2 h 接合を行った。これらサンプルの断面 SEM-EDSで評価を行い、次の結果が得られた。

・大気環境下(300 ℃)で行ったサンプルの接合は、接合界
 面に数十 nm 前後のボイドが若干見られものの良好な接
 合が行われた。

・Cu-Pd 層について、300℃で2h 接合を行った結果、Cu-Pd 層が初期のPd濃度6%から10%に上昇していた。これは、 接合界面に向かって Cu が Pd に対して速い拡散が行われ たためと考える。

・接合界面では、接合直後から拡散によって接合界面に達した Cuは、Cu₂Oと考えられる酸化物を形成したが、Cu-Pd 層においては酸化されていなかった。

本報告の結果から Cu-6at%Pd 固溶体に高温耐酸化性が あることが分かった。本断面研磨手法と EDX を実施する ことで、一定の接合過程と合金評価ができることが分かっ た。



図2 Cu-Pd 接合部の断面観察および点分析結果

【参考文献】

- S. Noh, H. Zhang, and K. Suganuma, *3D-PEIM*, 10.1109/3DPEIM.2018.8525232, (2018).
- F.Lang, H. Yamaguchi, H Nakagawa, H.Sato, *CPMT*, Vol. 5, No. 8, pp.1069-1074, (2015).
- H. Nishikawa, K Matsunaga, M. S. Kim, M. Saito and J. Mizuno, *HiTEC*, pp. 143-147 (2016).
- 山本秀和, エレクトロニクス実装学会, Vol. 20, No. 7, pp. 442-448, (2017)
- M. Keyer, A. Pesaran, Q Li, S. Santhanagopalan, K. Smith, E. Wood, S. Ahmed, I. Bloom, E. Dufek, M. Shirk, A. Meintz, C. Kreuzer, C. Michelbacher, A. Burnham, T. Stephens, J. Francfort, B.Carlson, J. Zhang, R. Vijagopal, K. Hardy, F. Dias, M. Mohanpurkar, D. Scoffield, A. Jansen, T. Tanim, A. Markel, *Journal of Power Sources*, Vol. 367, pp. 228-236, (2017)
- F. Lang, S. Tanimoto, H. Ohashi, H. Yamaguchi, *EMPC*, (2009)
- T. Uno, S. Terashima and T. Yamada, *ECTC*, pp. 1486-1495, (2009)
- M.Eto, T. Uno, T. Haibara, R. Oishi, T. Yamada, T. Oyamada, *ECTC*, pp.1297-1302, (2017)
- S. Nemoto, T. Maeda, M. Miyajima, Y. Akaike, K. Kitagawa, H. Ishii, H. Shimamoto, and K. Kikuchi, *ICEP*, pp. 56-60, (2019)
- 10.NIMS, https://diffusion.nims.go.jp/, Accessed: 2022/06/27
- 11.根本 俊介, 八坂 慎一, 三橋 雅彦, MES2021, pp. 231-234 (2021)

Ni 板の親水化に対するプラズマ照射の影響

安井 学、黒内 正仁、金子 智(電子技術部 電子材料グループ) 長沼 康弘(機械材料技術部 解析評価グループ) 田中 聡美、加藤 千尋(化学技術部 環境安全グループ)

1. はじめに

ナノインプリント用金型として,著者らは耐熱性と離型 性に優れる Ni-W めっき膜を用いた Ni-W 電鋳金型を研究 している¹⁾. 具体的には,ナノパターンを形成した Ni 板 上に 80 µ m 前後の厚みの Ni-W めっきを行い,その後, Ni 板から剥がした Ni-W 膜を Ni-W 電鋳金型に使用すること を目指している.ナノパターンを形成した Ni 板は超撥水 を示すため,プラズマ照射で Ni 板表面を親水化し, Ni 板 に対する Ni-W めっき膜の密着力を確保する必要がある.

しかし,図1に示す通り,Ni表面の接触角が超親水性 を示す状態であっても、プラズマの照射時間によって,Ni-Wめっき膜の析出形状に大きな差が生じた²⁾.この原因を 究明するため、プラズマ照射時間を変化させたNi板表面 を分析し、検討した結果³⁾を報告する.

2. 実験

1) フーリエ変換赤外分光光度計分析

プラズマ照射により Ni 板表面に生じる官能基を特定す るため、フーリエ変換赤外分光光度計(日本分光 IRT-7000) に、高感度反射装置(日本分光 RAS PRO410-H型)を取 り付け、入射角 85 度で高感度赤外反射スペクトルを測定 した.

基板は鏡面研磨を行った純度が99.9%のNi板を用いた. プラズマ装置にはSEDE-GE (Meiwafosis)を用いた.放電 方式はグロー放電であり,2Pa まで真空引きを行った後, 大気を導入してチャンバー内の圧力は8Pa に調整した.電 流値は3.5~4mA であった.プラズマ照射時間の影響を見 るため,プラズマ照射時間は2分と20分に設定した.

2) X 線光電子分光分析

プラズマ照射により Ni 板表面に影響を与えた元素を特

定 す る た め , X 線 光 電 子 分 光 (X-ray photoelectron spectroscopy : XPS) 分析により,表面数 nm の元素組成と 化学結合状態を評価した.使用装置は X 線光電子分光装 置 (アルバック・ファイ PHI5000 VersaProbe II) であった. プラズマ照射時間は未照射,2分と4分の3条件であり, その他のプラズマ照射条件は FT-IR 分析と同じであった.

結果及び考察

1) FT-IR 分析結果

未処理のNi基板を参照サンプルとして測定したプラズ マ照射時間が2分と20分のNi板の高感度赤外反射スペ クトルを図2に示す.3500 cm⁻¹付近にブロードな吸収バ ンド,ならびに730 cm⁻¹付近より低波数側に吸収の立ち上 がりを観測した.これらは、O-H 結合とNi-O 結合に由来 すると推察される⁴⁾.そして,水酸基(-OH)が導入された Ni表面の濡れ性は向上し,Ni-W めっきのつきまわりを改 善したと考えられる.また、プラズマ照射時間に対するO-H 結合の吸収ピークに顕著な変化が見られなかったこと から、2分間のプラズマ照射によりO-H 結合の導入量は飽 和したと考えられる.この結果は、2分以上のプラズマ照 射において,接触角が5°以下に収束する点と一致する.

図 2 プラズマ照射時間が 2 分と 20 分の Ni 板の高感度赤 外反射スペクトル

2) XPS 分析結果

図 3(a) に示すようにワイドスキャン測定では、Ni,O,F,C,Nを観測した.そして、プラズマ照射時間の増加に伴い、F1s ピーク強度が増加した.Fはプラズマ装置の絶縁体に使われているテフロンから発生したと考えられる.

図 3(b)に示す Cls スペクトルでは、プラズマ照射により 285eV のピークが大きく減少した.このピークは炭化水素 に対応しており⁵)、プラズマ照射で導入した大気中の酸素

図 3 (a)Ni 板のワイドスキャン測定結果、(b)Ni 板の C1s スペクトル、(c)Ni 板の Ni2p スペクトル、(d) Ni 板の O1s スペクトル

から生じた酸素プラズマが Ni 板表面に吸着していた炭化 水素を分解し, Ni 板の親水化が進んだと考えられる^の.

図 3(c)に示す正規化した Ni2p スペクトルにおけるプラ ズマ照射前の Ni 板では,852.5eV 付近のピークである Ni(金属)が主成分であり,その左側にショルダーピークを 形成したブロード部分を伴う NiO⁷が一部存在すると考え られる. NiO は疎水性⁸⁾を示すため,未照射では Ni-W め っき膜が剥落し易かったと考えられる.そして,プラズマ 照射から生じた酸素プラズマによる酸化が進行し,NiO と Ni(金属)の大部分は親水性を示す Ni₂O₃⁹に変化し,Ni(金 属)のピークが低下したと考えられる.FT-IR 測定で Ni₂O₃ を構成する Ni-O 結合が検出されており,この推論の妥当 性を示している.そして,Ni 板の親水性の向上の原因の 一つとして,Ni 板表面が Ni(金属)と NiO から Ni₂O₃に変 化したことが考えられる.

図 3(d)に示す正規化した O1s スペクトルにおけるプラ ズマ照射前の Ni 板では,531.6eV と 529.9eV で 2 つのピ ークを検出した.結合エネルギーの値¹⁰⁾と図 3(c)から 531.6eV のピークは NiO であり,プラズマ照射により, NiO は更に酸化されて, Ni₂O₃に変化したと考えられる.

4. まとめ

FT-IR と XPS を用いて、プラズマ照射後の Ni 板の表面 を分析した.FT-IR の分析結果では、水酸基により Ni 板 の表面が親水化されたと考えられる.また、XPS の分析 結果では、酸素プラズマによる Ni 板表面の炭化水素の除 去と Ni 板表面が親水性を示す Ni₂O₃に変化したことの 2 点が Ni 板表面の親水性を変化させた一要因と考えられ る. そして, プラズマ照射による Ni 板表面の親水化が, Ni-W めっき膜のつきまわりを改善し, Ni-W めっき膜の 析出状態の改善に寄与したと考えられる.

【参考文献】

- 安井学,金子智,黒内正仁,伊藤寛明,荒井政大,電気 学会論文誌C(電子・情報・システム部門誌), 139(5),644(2019)
- M. Yasui, M. Kurouchi, S. Kaneko ; Isplasma2020, 10P3-33(2020)
- 安井学,長沼康弘,田中聡美,加藤千尋,黒内正仁,金子智,表面技術,72,716-718(2021)
- 4. Y.-L. T. Ngo, S. H. Hur ; Materials Research Bulletin, 84(10), 168(2016)
- 5. 伊東威安, 色材協会誌, 64, 396-403 (1991)
- 6. 江黒徹, 村田功, 大橋功, 前川修一郎, 吉成正雄, 日本 ロ腔インプラント学会誌, 24, 215(2011)
- A. Agrawal, H. R. Habibi, R. K. Agrawal, J. P. Cronin, D. M. Roberts, Thin Solid Films, 221, 239(1992)
- A. A. Jabbar, A. J. Haider, M. J. Haider, K. F. Al-azawi, Journal of Materials Research and Technology, 9(6), 15123(2020)
- 9. C. Negin, S. Ali, Q. Xie ; Petroleum, 2(4), 324(2016)
- 10.J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E.' Sobol, K. D. Bomben, Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy, p.231 (Perkin-Elmer Corp. Phys. Electron. Div. Pub. Ltd., 1992)

【外部発表】論文発表1件

基板厚の異なるマイクロストリップ線路上に装荷した

ノイズ抑制シートの伝送減衰率の評価

土屋 明久(電子技術部 電磁環境グループ) 菅間 秀晃(電子技術部)

1. はじめに

EMC 対策部品として、軟磁性材料をシート状に形成した Noise Suppression Sheet (NSS)が広く利用されている[1]。 NSS は強磁性共鳴を利用することで発生する電磁ノイズ を抑制することができる。NSS の利用方法としては主にプ リント基板上や IC チップなどのノイズ源近傍に貼り付け て使用される[2,3]。

近年の小型軽量化に伴い、スマートフォンやノート PC など情報通信機器においては多層プリント基板やフレキ シブルプリント基板 (FPC) など従来の基板に比べ薄く、 配線パターンも細くなるものが採用されている。このため、 NSS をこれらの基板に使用した場合のノイズ抑制効果に ついて検討する必要がある。これを踏まえ、本研究では異 なる基板厚のマイクロストリップ線路(MSL)上に NSS を 装荷した場合のノイズ抑制効果について確認するため、電 磁界シミュレーションによる解析を行ったので報告する。

2. 解析条件

現在、NSS の評価方法として国際規格が定められており、 この規格の中において、プリント配線板上に NSS を装荷 した場合のノイズ抑制効果についての評価方法として伝 送減衰率がある[4]。この国際規格を参考とした伝送減衰率 の解析モデルを図1に示す。図に示すように、両面基板上 に作製したマイクロストリップ線路にエンドランチコネ クタを取り付け、線路上に信号を入力する。伝送減衰率は この線路上に NSS を貼り付けた場合の反射特性及び透過 特性から求められる。国際規格においては NSS を装荷す る MSL の基板厚は 1.6 mmと定められているが、今回多層 基板や FPC など薄型化する基板厚を想定し、この基板厚 d を変化させた場合について解析を行った。この時、基板厚 を変化させた MSL の線路幅は特性インピーダンスが 50Ω となるように設定した。したがって、基板厚が薄くなるに つれて線路幅は細くなる。解析には市販されている2種類 のNSSを用意した。ここで、この2種類のNSSの材料定 数を図 2 に示す。この NSS の材料定数は同軸管法用いて 測定した[5]。両 NSS ともに複素比透磁率 μ_r'、μ_r"は低周波 から高周波に向けて、大きく緩和が見られていることがわ かる。また、複素比誘電率 εr'、εr"については、NSS 上の 磁性材料が導電性を持つことから人工誘電体のように振 る舞うため、高い誘電率を示した。今回の解析には電磁界 シミュレータ AET 社 MW-STUDIO を用いた[6]。

31

(b) NSS#2

図3 異なる基板厚における伝送減衰率(解析)

3. 解析結果

異なる基板厚における伝送減衰率 R_{tp}の解析結果を図 3 に示す。基板厚が国際規格と同じ 1.6 mmとした場合、 NSS#1の伝送減衰率が 30 dB以上となる周波数は 3.35 GHz であったのに対し、これより基板厚を薄くするに従い伝送 減衰率のピークは高周波側にシフトしていくことがわか る。また、NSS#2 の場合においても同様に基板厚を薄くす るに従い、高周波側にシフトしていくことが確認できる。 以上のことから、NSS を配置するマイクロストリップ線路 の基板厚を薄くすることにより、伝送減衰率のピークは高 周波側にシフトすることを確認した。

ここで、この伝送減衰率の振る舞いについて考察する。 NSS のノイズの抑制帯域は強磁性共鳴周波数と一致する。 ここで、NSS も含む磁性材料の強磁性共鳴周波数 frd は次 式で書くことができる[7]。

$$f_{rd} = \frac{\gamma}{2\pi} \sqrt{\frac{M_s(H_k + N_d M_s)}{\mu_0}}$$

γは磁気回転比、M_sは飽和磁化、H_kは異方性磁界、N_dは 反磁界係数、μ0は真空の透磁率を表す。次の式からわかる ように、飽和磁化、異方性磁界は NSS によるもので線路 形状に依らず一定であるのに対し、反磁界係数は線路形状

図4 測定系

図5 伝送減衰率(実測)

に依存する。これより基板厚を薄くすることにより反磁界 成分が増加し、強磁性共鳴周波数が高くなることで、伝送 減衰率のピークが高周波側へと移行したと考えられる。

解析結果の妥当性について確認するため、実際に厚さ 0.05 mmの MSL 上に NSS を配置し、伝送減衰率を測定し た。図4に測定系を示す。国際規格においては、50 mmの 線路の先端にエンドランチコネクタを取り付けて信号を 掃引するが、この MSL は基板厚が薄くエンドランチコネ クタの取り付けが困難なため、線路長 100 mmの MSL の両 端をプローブで接触し、線路上に配置する NSS の長さは 50 mmとして測定を行った。伝送減衰率の測定結果につい て図5に示す。ここで、国際規格に準拠した方法で測定し た伝送減衰率も合わせて示す。0.05 mmの基板上に作製した MSL 上に配置した NSS の伝送減衰率のピークは 10GHz 以 上にみられ、国際規格による方法に比べ高周波側に移行し ている。この振る舞いは解析においても同様に見られてい ることから、本解析による結果の妥当性について確認した。

4. むすび

基板厚の異なるマイクロストリップ線路上にノイズ抑 制シートを配置した場合の効果について確認するため、ノ イズ抑制効果を表す伝送減衰率について解析を行った。そ の結果、NSSの伝送減衰率のピークは基板厚を薄くするに 従い、高周波側にシフトすることを確認した。これはプリ ント基板の厚みは薄くなるに従い、反磁界成分が大きくな り、強磁性共鳴周波数が高周波側に移行するためであると 考えられる。更に、解析結果の妥当性について検証するため、実際に測定をした結果、基板厚を薄くすることで、伝送減衰率のピークは高周波側に移行することを確認した。これより、NSSを EMC 対策部品として基板等に使用する際には、使用する基板の特性も考慮する必要がある。

【参考文献】

- 1. 平塚信之, "ノイズ抑制用磁性材料とその応用,"三松株 式会社, May 2008.
- 2. 橋本修,"*電波吸収体のはなし*,"日刊工業新聞社, pp.2-6,Jun. 2001
- 松尾良夫,"スピネル型ソフトフェライト,"電磁環境工 学情報 EMC,No.232,pp.46-48,Aug,2007
- 4. IEC62333-1, Ed.1, IEC62333-2 Ed.1, "Noise suppression Sheet for digital devices and equipment,"2006.
- 5. 橋本修, "*高周波領域における材料定数測定法*,"森北出版株式会社, pp.30-44, Aug. 2003.
- 6. The homepage of EAT Corporation [Online]. Available: https://aetjapan.com/software/CST/Overview.php
- 7.山口正洋,室賀翔,浅妻裕己,"*複素透磁率の周波数分散* に対する反磁界の影響,"信学技報,EMCJ2013-21,pp.52-56, Jun.2013

研究報告2022 目次 【情報・生産技術部】

千家 雅之(情報・生産技術部 システム技術グループ)

福山 遼(情報・生産技術部 加工評価グループ)

中村 紀夫(情報・生産技術部 システム技術グループ)

ローカル 5G による生産現場の遠隔モニタリング 阿部 顕一、千家 雅之(情報・生産技術部 システム技術グループ) 水矢 亨(企画部 経営戦略課 新事業戦略グループ) 長尾 達明(情報・生産技術部) 松日楽 信人、加藤 宏一朗(芝浦工業大学)

1. はじめに

コロナ禍により、人と人との接触を避けるためにも、IoT 機器やリモートロボットを介した作業の実現が求められ ている。特に、リモートロボットで遠隔作業を行うには移 動の束縛とならない無線での通信が必要になるが、画像通 信は不安定であり、時間遅れも大きく、作業が効率的にで きないことが問題となる。無線通信の主力は、多接続、高 速、低遅延の5G通信へと切り替わろうとしているが、現 場での実性能は十分明らかになってはおらず、性能の把握 が課題となっている。神奈川県立産業技術総合研究所 (KISTEC)では令和3年度より、通信範囲が特定領域に 限定されたローカル5G(L5G)通信設備を開設している。

本開発の目的は、KISTEC内に仮想の生産現場を設定し、 各種機器をL5Gで接続し、接続機器を一元管理できる遠隔 モニタリングシステム構築することである。L5Gを用いた 隔モニタリングシステムの現状での実用性や問題点を明 らかにする。

2. 実験システム

2.1. 実験環境

L5G による遠隔モニタリングを実現し効果を測るため の実験環境として、KISTEC 内の各種工作機械が設置され ている実験室を利用した。実験室を工場製造現場と見立て、 現場を遠隔モニタリングできるシステムを構築する。実験 室のレイアウトを図1に示す。

実験室には、13台の加工機が設置されている。今回、環 境カメラ1台、台車ロボット2台、監視対象となる加工機 1台、ロボットアーム1台、オペレータ用 PC1台をL5G に接続し、遠隔モニタリングシステムとして構築した。

2.2. ローカル 5G 通信機器仕様

5G は、多接続、高速、低遅延を特徴とする第5世代移動 通信システムである。KISTEC の L5G は、4.8~4.9GHz の 周波数帯(いわゆるサブ6GHz帯に含まれる)を利用する スタンドアロン(SA)構成のものである。

2.3. 通信規約

本研究計画で求めるネットワーク環境下における複数 台のセンサーやロボットなどのリモート制御を実現する ためには、異なるメーカーの多種多様な装置とデータを送 受信できる共通の通信規約を利用する必要がある。

本研究計画では過去の実績から RSi (Robot Service initiative)が策定した RSNP (Robot Service Network Protocol) を採用することとした。XML ベースの通信で、仕様が簡易 であり、機器毎にレコードの定義を自由に設定できるので 拡張性が高い。リアルタイム性は無いが、同期をとらない ため機器間の調整は不要であり、機器の追加や削除が容易 である。RSNP の構成を図 2 に示す。

2.4. 環境カメラ

環境カメラは、自律走行するロボットの動作確認やロボ ット周囲の状況確認のための固定設置された遠隔監視用 カメラである。本研究では、パナソニック社製の広角 4K ネ ットワークカメラ AW-UE4KGN を採用した。環境カメラ の外観を図3に示す。

図3 環境カメラ
映像配信プロトコルとして RTMP を選択した。RTMP サ ーバーは 5G コアネットワークと有線で接続する方法を採 用した。RTMP サーバーの仕様を表 1 に示す。

表 1 RTMP サーバー仕様		
名称	Raspberry Pi 3 Model B+	
OS	Raspberry Pi OS Lite (Legacy)	
ソフトウェア	Nginx, nginx-rtmp-module	

2.5. 台車ロボット

環境カメラでは認識できない詳細な状況把握をするために2台の台車ロボット(①、②)を配置した。2台の台 車ロボットの外観を図3、4に、2台の台車ロボットの仕様 を表2に示す。



図3 台車ロボット ①



図4 台車ロボット ② 表2 台車ロボット仕様

台車ロボット ①	台車ロボット ②
ヴィストン	イクシス
メガローバー Ver2.0	iWS09-MS
L396 mm x W353 mm x	φ 45 mm x H277 mm
H166 mm	
40 kg	15 kg
2 輪駆動	2 輪駆動
1.4 m/s	1.0 m/s
LRF1個	LRF1個
バンパーセンサー 2 個	位置検出素子センサー
デプスカメラ 1個	6 個
	 台車ロボット① ヴィストン メガローバー Ver2.0 L396 mm x W353 mm x H166 mm 40 kg 2 輪駆動 1.4 m/s LRF 1 個 バンパーセンサー 2 個 デプスカメラ 1 個

台車ロボットは、オープンライセンスソフトウェアのロ ボット制御ソフトウェアである ROS で制御し、外界セン サーとして LRF センサー、内界センサーとして駆動輪の回 転情報から、マッピングやナビゲーションを実現している。 ROS に RSNP ノードを組み込むことで、RSNP ユニット不 要で、L5G で RSNP サーバーと接続され、センサーデータ の送信、オペレータからの指令の受信を行う。

2.6. 監視対象加工機

実験室には 13 台の加工機が配置されており、その内の NC フライス加工機 (イワシタ社 NR2) を監視対象とした。

NCフライス加工機はUDPのソケット通信のプロトコル でRSNPユニットヘデータを送信する。RSNPユニットに よりUDPのソケット通信データをMQTTに変換してから、 L5GでRSNPサーバーヘデータを送信する。NCフライス の外観を図5、システム構成を図6に示す。



図 5 監視対象加工機



2.7. リモートロボットアーム

監視対象加工機には、遠隔操作が可能なロボットアーム を配置した。ロボットアームの外観を図7、ロボットアームの仕様を表3に示す。



図7 ロボットアーム

名称	ROBOTIS OpenMANIPULATOR-X
自由度	4 軸+グリッパ
リーチ長	380 mm
可搬重量	500 g
軸角速度	46 RPM
繰返し精度	0.2 mm 以下

表3 ロボットアーム仕様

制御用ノート PC の ROS で制御し、ROS に RSNP ノー ドを組み込むことで、L5GでRSNP サーバーと接続される。

2.8. 制御システム

遠隔モニタリングシステム全体の情報管理は、RSNP サ ーバーで行う。RSNP サーバーは、OS を含め、複数のオー プンライセンスソフトウェアを組み合わせた環境に、 RSNP サーバーソフトウェアを組み込んだものである。 RSNP サーバーの仕様を表4に示す。

表 4 RSNP サーバー仕様			
OS	Ubuntu 20.04.3 LTS		
Web サーバー	Apache 2.4.41		
APP サーバー	Apache Tomcat 9.0.31		
RDB 管理システム	MySQL 8.0.26-0ubuntu0.20.04.3 for Linux on x86_64		
RSNP サーバー	RSNP 2.3.0r49		

オペレータはオペレータ用 PC を通じて遠隔モニタリン グシステムを利用する。オペレータ用 PC は WEB アプリ で RSNP サーバーにアクセスできる。PC やタブレット、 スマートホンで利用できる。

3. 実験

3.1. 実験方法

仮想設定した状況対応に沿って、遠隔モニタリングシス テムの活用を試みることとした。発生事象および対応行動 を時系列順に以下に示す。

- ① オペレータは、生産現場に設置された環境カメラを監 視中、作業中のある加工機の異常に気付く。
- ② オペレータは、異常が発生した加工機の状況を、加工 機自身から送信される状態データにより異常が発生 していることを認識する。
- ③ オペレータは、より詳細な情報を得るために、台車ロ ボット(台車ロボット)を異常状態の加工機に向かわ せる。
- ④ 台車ロボットが、異常状態の加工機に到着する。
- ⑤ オペレータは、台車ロボットを遠隔手動操作し、搭載 した WEB カメラからの遠隔画像で状況(加工機への 材料装填不良)を認識する。
- ⑥ オペレータは、加工機に設置された遠隔作業用ロボッ トアームを遠隔操作し、ロボットアーム手先 WEB カ メラからの遠隔画像で詳細な状況を確認し、加工機を 遠隔停止させる。その後、ロボットアームにより材料 を再装填する。
- ⑦ オペレータは、加工機からの状態データが正常になっ たこと、さらに台車ロボットやロボットアームからの 遠隔画像からも確認する。
- ⑧ オペレータは、台車ロボットを待機位置に帰還させる。

3.2. 実験結果

環境カメラ、加工機、台車ロボット(+Webカメラ)2台、 ロボットアーム (+Web カメラ)、オペレータ用 PC、すべ てを同時にL5Gでネットワークに接続した。

その内、台車ロボット(+Webカメラ)2台、加工機、ロ ボットアーム (+Web カメラ)、合計7台を同時に RSNP サ ーバーに接続した。図8にサーバーへの接続状態を示す。

ロボット一覧	× 🗅 Camera	加工機	
$\leftarrow \rightarrow$ C \land	セキュリティ保護なし 192.16	8.1.51/PontrolSystem/	
		Webカメラ(アーム)	
ロボット一覧		台車ロボット②	
更新する 2022/02/08 13:59	9:26.464	ロボットアーム	
Dagai2	w24707025		
arm camera	1824797033	- 台車ロボット①	
iws09	1873142888	W_{ab} + $\chi = (\Delta \pm 2)$	
arm	-1883443279		
megarover	010906831	$M_{-} + \gamma = (\Delta = 0)$	
iws09_camera	-1209553634	- Webガメラ(台車①)	
megarover_camera	553467421	 <u>リンク</u>	
図8 RSNP サーバーへの同時接続			

異常事態に対する実験結果を時系列順に以下に示す。

 環境カメラから出力される画像データはオペレータ 用 PC の WEB アプリから収得できた。視覚的にはフ レーム欠落は認識できず、画像情報は安定して受信で きたが、5~10 秒程度の時間遅れが発生した。環境カ メラからの画像データを図9に示す。



図9 環境カメラ 4K 画像

- ② 加工機の制御装置から出力される状態データは RSNP ユニット経由で RSNP サーバーに送信された。状態デ ータはオペレータ用 PC の WEB アプリから収得でき t-
- ③ オペレータ用 PC の WEB アプリから RSNP サーバー 経由で台車ロボットに巡回を指示、さらに任意の加工 機への移動を指示し、指示通りに動作することを確認 した。動作開始に数秒の時間遅れが発生した。台車ロ ボットに搭載した Web カメラからの画像データは RSNP サーバー経由でオペレータ用 PC の Web アプリ で取得できた。フレームレートは 10 fps 程度であった。 台車ロボットカメラからの画像データを図10に示す。



図10 台車ロボットカメラ画像と台車ロボット移動指示

④ 台車ロボットは移動に際し、LRFで外界を認識し、自律的に障害物を避けて目的地に達することができた。 走行は蛇行が見られた。台車ロボットから出力される 位置データは RSNP ノード経由で RSNP サーバーに送 信された。位置データはオペレータ用 PC の WEB ア プリから収得できた。台車ロボット位置情報を図 11 に 示す。



⑤ ロボットアーム手先カメラから出力される画像デー タは RSNP ノードを経由で RSNP サーバーに送信され た。画像データはオペレータ用 PC の WEB アプリか ら収得できた。手先カメラからの画像データを図 12 に 示す。



図12 手先カメラ画像

- ⑥ オペレータ用 PC の WEB アプリから RSNP サーバー 経由でロボットアームに動作指示を与え、指示通りに 動作することを確認した。動作開始に数秒間の時間遅 れが発生した。ロボットアームは加工機の停止ボタン を押下し、模擬的な材料装填動作が実行できた。
- ⑦ 台車ロボットの画像データや加工機の状態データで 加工機の状態を確認できた。
- ⑧ オペレータ用 PC の WEB アプリから RSNP サーバー 経由で台車ロボットに待機位置への復帰を指示し、指 示通りに動作することを確認した。

3.3. 実験結果からの問題点と改善

実験により明らかになった問題点および今後の改善点 は以下のとおりである。

L5Gの応答速度:

端末とサーバー間で 50 ms の遅れがあり、リアルタイム 遠隔制御での障害となっている。KISTEC 内の L5G 機材に 由来するものであるため、改善には機材の改修や交換が必 要である。

・環境カメラの時間遅れ:

環境カメラの画像データは、L5Gでネットワークに接続 され画像データを保管する RTMP サーバーに送信される。 時間遅れの原因は RTMP サーバーの処理能力不足が考え られため、追加実験として RTMP サーバーを変更して検証 した。RTMP サーバーのハードウェアを Raspberry Piから、 より処理能力の高い PC に変更した所、時間遅れは軽減さ れたため、Raspberry Pi では性能不足であることがわかっ た。

・台車ロボットやロボットアームへの指示の時間遅れ:

オペレータ用 PC から台車ロボットやロボットアームへ RSNP サーバー経由で指示を送信し、実行が開始されるま でに数秒の時間遅れが発生する。時間遅れの原因は、RSNP の仕様、RSNP の使用方法、ROS 等の制御プログラムの設 定等が考えられる。今後、問題点を特定し改良していく予 定である。

・台車ロボットの蛇行:

実験室の床は、油が飛散しやすい環境ではあるが、車輪 のスリップは見られない。

台車ロボットの制御にはROSを利用しているが、LRFの 性能不足による位置情報の精度不足と走行に関わる制御 パラメータの調整不足と考えられる。今後、LRFを変更、 制御パラメータを調整し、蛇行を低減する予定である。

4. おわりに

本開発の成果は以下のとおりである。

・L5G を利用した遠隔モニタリングシステムを構築した。

・ロボット、センサー、加工機を一元的に監視・制御でき るようになった。

RSNP、ROS、Raspberry Pi 等のサービスロボット等に活用できる技術の取得ができた。

また、今後は得られた成果により以下の展開を検討して いる。

- ・新たな L5G 開発・支援事業のテストベッド
- ・サービスロボットの開発支援
- ・RSNP 技術利用の拡大

今後、あらゆるものが IoT 化していく中で、5G 通信技術 を用いた技術開発の重要性は増していく。5G 通信技術は、 多接続、高速、低遅延の特徴から、将来的にはロボットの リアルタイム制御にも活用できると思われる。

本開発により、いち早く、種々のロボット等を 5G 通信 技術で活用するための知見を集積しつつある。今後は、情 報提供や技術支援により、関連企業の技術、製品開発に貢 献する。

謝辞:

本開発は公益財団法人 JKA による競輪の補助を受けて 実施しました。

テクノツール株式会社 島田 努氏、株式会社 MEMO テ クノス 渡邊 将文氏には、本研究の開始にあたり、研究内 容において有益なご提案をたまわりましたこと、お礼申し 上げます。

ローカル 5G ネットワークにおけるロボット用ミドルウェア ROS 2 のリアルタイム性に関する初期評価

千家 雅之(情報・生産技術部 システム技術グループ)

1. はじめに

ロボットの遠隔制御において無線通信を用いることは有 線通信と比べてケーブル敷設作業が不要になる等利便性の 面で大きなメリットを有するが、通信の即時応答性や安定 性の面でデメリットがある。そのため、近年、超高速、多 数同時接続、高信頼・低遅延を特徴とする 5G は大きな注 目を集めており、産業分野での期待は大きい。ローカル5G はモバイル向け通信規格である 5G に則った無線通信ネッ トワークであり、通信事業者以外の一般企業や自治体等に よって構築・運用される。当研究所では、2020年度にロー カル 5G の無線局免許を取得し、2021 年度に海老名本部で ローカル5Gの通信環境の運用を開始している。本稿では、 ロボットの無線遠隔制御に焦点を当て、ロボット用ミドル ウェアの中で大きなシェアを有している ROS (Robot Operating System)⁽¹⁾の次世代バージョンである ROS 2 を対 象に、当研究所のローカル 5G ネットワークを用いてリア ルタイム性に関する測定と評価を行う。具体的には、ユー ザ端末から物理的に近い場所にサーバー等のコンピュータ を設置して応答性能を向上(低遅延化)させるエッジコン ピューティングを想定したシステム構成で、通信の応答性 能を従来バージョンである ROS 1 と ROS 2 それぞれで測 定し、リアルタイム性を評価する。

2. 要素技術の紹介

2.1 エッジコンピューティング

モバイル向け通信におけるエッジコンピューティングと は、基地局付近にエッジサーバーを設置し、機械学習や画 像処理といった負荷が高い処理を基地局内で実施すること で、遅延低減や帯域節約を図る手法のことである。エッジ コンピューティングアーキテクチャの有用性は様々な研究 で検証されている⁽²⁾。

2.2 ROS1とROS2のアーキテクチャ

ROS1とROS2はミドルウェアが担う範囲が異なっている。図1に示す通り、ROS1は独自のプロトコルである TCPROS/UDPROS上にライブラリがあり、その上でROSマスターが動作するという構成であるが、ROS2は通信の大部分をDDS (Data Distribution Service)が担い、共通のインターフェースを通してROSノードとDDSの橋渡しをするという構成である。ROS2はDDSの性能に依存する構成と言えるが、DDSが独立しているため別のベンダーのDDSに容易に変更することができる。

3. 評価方法

3.1 システム構成

評価システムのシステム構成は図 2 の通りである。ロボ ットに搭載されることを想定した PC #1 は LAN ケーブル を介してローカル 5G 端末に接続されている。エッジサー バーとして機能する PC #2 は LAN ケーブルでローカル 5G の上位ネットワークに接続されている。PC #1 および PC #2 の仕様を表 1 に、ソフトウェア構成を表 2 に示す。各 PC は ROS 1 インストール済み Linux と ROS 2 インストール済 み Linux を PC 起動時に切り替えられる構成となっている。 どちらの構成も OS の処理遅延を低減させるために lowlatency カーネルを用い、さらに構成 B では DDS をリアル タイム性が高いとされる RTI 社製 DDS に変更している。

3.2 測定方法

ROS 1 および ROS 2 で用意されている ROS サービスリ クエストを用いて、PC #1 と PC #2 間の応答性能を測定す る。具体的には、クライアントである PC #1 から二つの整 数を含む ROS サービスリクエストを送信し、サーバーであ る PC #2 で二つの整数を合計しレスポンスとして返すとい う処理において、ROS サービスの応答時間(送信から受信 までの所要時間)及びその送信処理のジッター(送信タイ







図2 評価システムの構成

ミングの揺らぎ)の測定を行う。送信処理のループは Rate クラスの sleep 関数を用い、周期は 500 ms と 100 ms の 2 パ ターンで、送信回数は 1000 回とする。

4. 結果及び考察

ROS サービスの応答時間をヒストグラムで図3に、その 送信処理のジッターを箱ひげ図で図4に示す。

図3より、ROSサービスの応答時間はROS2の方が短い ことがわかる。ROS1では横軸100ms前後に、ROS2では 50ms未満の区間にヒストグラムの棒が集中しているが、 このROS1とROS2の違いはTCPベースの独自プロトコ ルであるTCPROSとUDPを用いるDDSとの違いから生じ ているものと考えられる。また、図3(a)と(b)の応答時間の 分布や最大値の違いは、通信環境の変動だけでなくクライ アント側の送信処理でのRateクラスのsleep 関数の影響に よるものと考えられる。この sleep 関数は既定の周期に沿 うように次の周期までの残り時間分だけ待機する関数であ るが、既定の周期を超えて残り時間が負になった場合は待 機しない。つまり、サービスレスポンス受信後すぐにサー ビスリクエスト送信処理が行われるため、サーバー側で処 理遅延が生じている可能性がある。

図4より、送信時のジッターは、周期 500 ms では±0.2 ms 程度で ROS 1 と ROS 2 の間に大きな差はないと考えら えるが、周期 100 ms では ROS 1 の方が非常に大きい。こ れは ROS 1 では ROS サービスの応答時間が周期 100 ms を 超える場合があるためである。なお、この測定は送信処理 に入る前のタイムスタンプを利用しているため、厳密な比較のためにはパケットキャプチャ装置を用いる必要がある。

5. おわりに

評価システムを用いた測定より、ローカル 5G ネットワ ーク上で ROS の通信を行う場合、ROS 2 は ROS 1 よりも 即時応答性が高いため、リアルタイム性の確保と短い周期 での通信に利点があることがわかった。当研究所のローカ ル 5G ではエッジコンピューティングのアーキテクチャと ROS 2 を用いることで周期 100 ms 程度のリアルタイム通 信が可能であることが分かった。

今後は、リアルタイム性の向上が期待できる ROS 2 の Executor クラス⁽⁴⁾を用いた検証やロボットに実装しての検 証に取り組む予定である。

【参考文献】

- Open Robotics: "ROS Robot Operating System", https://www.ros.org/
- 山口弘純,安本慶一,"エッジコンピューティング環境 における知的分散データ処理の実現", *電子情報通信学 会論文誌 B*, Vol.J101-B, No.5, pp.298-309 (2018)
- 3. Y. Maruyama, S. Kato and T. Azumi, "Exploring the Performance of ROS2", 2016 International Conference on Embedded Software (EMSOFT 2016) (2016)
- Y. Yuqing and T. Azumi, "Exploring Real-Time Executor on ROS 2", In 2020 IEEE International Conference on

Embedded Software and Systems (ICESS), 1-8 (2020)

表 1 PC の仕様				
	PC #1 (Client)	PC #2 (Server)		
Model	Intel NUC11 Pro	Shuttle SH370R6		
CPU	Core i5-1145G7	Core i7-8700K		
RAM	32GB	32GB		
Disc	NVMe SSD 256GB	NVMe SSD 256GB		

表 2	PC 0	カソフ	トウェ	ア構成
	10.0	////	1 2 4	· / IIII///

	構成 A	構成 B
OS	Ubuntu 18.04.6 LTS	Ubuntu 20.04.4 LTS
Kernel	5.4.0-104-lowlatency	5.13.0-35-lowlatency
ROS	ROS Melodic	ROS 2 Foxy
Protocol	TCPROS	RTI Connext DDS



ランダムフォレストを用いた LMD 時における投入粉末の

歩留りにおよぼす影響度に関する研究

福山 遼(情報・生産技術部 加工評価グループ) 中村 紀夫(情報・生産技術部 システム技術グループ)

1. はじめに

レーザ粉体肉盛溶接(Laser metal deposition; LMD)はレ ーザ照射により形成される溶融部に金属粉末を投入し、肉 盛溶接を行うことで金属積層造形、あるいは部分的な機能 性付与(Laser cladding)が可能な近年注目の技術である。 このLMD加工時に投入する粉末は非常に高価であり、加 工条件によっては投入粉末が溶融池に入らなかったもの やスパッタとして外に飛び出すものがあり、全ての粉末が 溶着されるわけではない。また、使用した粉末は酸化や塵 の付着により再利用できないため、粉末の溶着率(歩留り) が加工コストに直結している。

しかしながら、LMD の加工条件にはレーザ出力、レー ザ走査速度、粉末供給量等の複雑で様々な組合せがあり、 これらの加工条件が歩留りに及ぼす因子であるか明らか ではない。

そこで、機械学習のアルゴリズムの一つであるランダム フォレストを用いて様々な加工条件から歩留りにおよぼ す重要度の導出を試みた。ランダムフォレストはアンサン ブル学習の一つで学習用データから多数の決定木を作成 し、その決定木による予測値の平均から最終的な予測値を 導出する。さらに、ランダムフォレストでは予測に用いら れる各説明変数の重要度がどの程度なのかを導出できる 特徴がある。

本研究では、ランダムフォレストを用いて LMD におけ る多種類の説明変数から歩留りを予測するモデルを構築 した。そして、説明変数の重要度の導出により歩留りの予 測精度を向上させる因子の探索を目的とした。また、加工 現象を踏まえた複合説明変数を加えることで予測精度を 向上させ、検討を行った。

2. 実験及び結果

本研究で用いた LMD 装置はレーザ発振器(TRUMPF 製: TruDisk3006)、ロボット(KUKA 製: KR C4)、粉末供給装 置(GTV 製: GTV PF 2/2)の構成となっている。発振器か ら出たレーザ光(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、母材表面を溶融する。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 肉盛層を造形する。 まず、LMDによる歩留りの実データとして 391 サンプ ル取得した。LMDの積層条件と説明変数名を表1に示す。 レーザ出力、レーザ走査速度、粉末供給量は表1に示す範 囲内の乱数で行った。また、層数は3層盛(1層目5パス、 2層目4パス、3層目3パス)と2層盛(1層目5パス、2 層目4パス)の2種類、粉末はCo基のステライト4種類、 基材はSCM440、S45Cの2種類で行った。その他の積層 条件は固定とした。また、放射温度計によりレーザ加工点 の温度測定を行った。測定箇所は最終パスの加工直前の基 材温度と平均溶融池温度である。

次に歩留りの測定方法について説明する。LMD 前後の 基材の重さより、肉盛された重さの実測値 W_m (gf)を測定 した。肉盛重さの理論値 W_t (gf)は、Lを総ビード長さ(mm)、 v を走査速度 (mm/s)、p を粉末供給量 (gf/s)として、式(1) のように定義し、歩留り N(%)は、 $W_m を W_t$ で除した値と した。

$$W_t = (L \cdot p)/\nu \tag{1}$$

機械学習のライブラリは Python で使用可能な scikitlearn。ensemble の RandomForestRegressor (以下ランダムフ ォレストと記す)を用いた。実験で得た 391 のデータの前 処理として、数値データ以外の基材の種類や粉末の種類な どの連続量ではないカテゴリーデータはダミー変数とし て 0、1 に変換した。これらの前処理したデータを学習用 と評価用として 8 対 2 に分割した。ランダムフォレストの ハイパーパラメータは決定木を 5000 本、層の最大深さを 30 層とした。枝分かれの際の判断基準として平均二乗誤 差 (Mean Squared Error; MSE) で学習させ、予測精度は平 均絶対誤差 (Mean Absolute Error; MAE) で評価し、各説明 変数の重要度を導出した。

加工条件のみで予測を行った場合、評価用データでの予 測精度の指標である MAE は 0.032 であった。レーザ出力 と走査速度の重要度が高いことから、単位長さあたりの入 熱量(HF)の計算値と加工現象で重要な因子である温度の 実験値を新たに説明変数に加えると、MAE は 0.028 に向 上した。このときの重要度は入熱量(HF)、レーザ出力(Pw)、 溶融池温度(Mpt)、基材温度(Pass_temp)の順で高い。こ れら 4 つの説明変数から表 1 の下部に示す新たな 4 つの 複合説明変数を加えたところ、図 1 の相関図に示すように 予測と実際の結果が一致する 45 度線上に集まっているこ とがわかり、MAE は 0.026 とさらに向上した。このとき、

表1 LMD の積層条件と説明変数名			
項目	説明変数名	条件	
レーザ出力 kW	Pw	1.2~3	
レーザ走査速度 mm/s	Velo	3~28	
層間垂直移動距離 mm	Pz	0.5~1.5	
粉末供給量 g/min	P_feed	7.5~23.8	
層数とパス数	pass_seq	2層9パス, 3層12パス	
ステイライト粉末の種類	Powder_ID	1, 6, 12, 12H	
基材(予熱無の室温)	Work_ID	SCM440, S45C	
スポット径 mm	-	φ4(固定)	
シールドガス流量 Umin	-	23 (固定)	
キャリアガス流量 0/min	-	2.1 (固定)	
ラップ幅 mm	-	2(固定)	
1パスの長さ mm	-	50(固定)	
最終パス基材温度 ℃	Pass_temp	実験値	
最終パス平均溶融池温度 ℃	Mpt	実験値	
単位長さあたりの入熱量 J/mm	HF	計算値	
溶融池温度/入熱量 °C/(J/mm)	Mpt/HF	計算値	
基材温度/入熱量 °C/(J/mm)	Pt/HF	計算値	
溶融池温度ルーザ出力 °C/W	Mpt/Pw	計算値	
基材温度/レーザ出力 ℃/W	Pt/Pw	計算値	





図2 各説明変数の重要度



図3 溶融池温度/レーザ出力(Mpt/Pw)と歩留りの関係

各説明変数の重要度は図 2 に示すように溶融池温度/レー ザ出力(Mpt/Pw)が最も高い。この Mpt/Pw と歩留りの関 係を図 3 に示すと、Mpt/Pw が低いほど歩留りが高い負の 線形関係が見られた。この相関関係より、粉末を効率的に 溶融する一因はレーザ出力が高いときであり、そのとき溶 融粉末は多くなるため熱エネルギーが粉末に奪われ溶融 池温度が減少する。したがって、Mpt/Pw の意味するとこ ろは単位時間あたりに溶融池に投入される熱量と、溶融池 温度の低さ、つまり粉末が溶融するために使用された熱量 との比であり、熱効率を意味していると考えられる。

また、2 番目に高い重要度はレーザ出力(Pw)であり、 上位の各説明変数の重要度にも多く内包されている。この Pw 増加に伴う加工現象として、溶融池サイズが大きくな ることが想定され、粉末の集束径が同じであれば溶融池に 投入されやすくなると考えられる。そのうえ、本研究で使 用したレーザのビームプロファイルはガウス分布である。 したがって、照射されたレーザは端部になるほどパワーが 弱くなるため、端部付近に投入された粉末は未溶融になり やすい。しかし、Pw が高出力時には低出力時に比べ有効 パワー密度が大きくなり、端部付近に投入された粉末も溶 融されやすくなると考えられる。

3. おわりに

ランダムフォレストを用いて LMD 時における投入粉末 の歩留りを予測するモデルを構築した。加工現象を踏まえ 複合説明変数を用いて構築したモデルの予測精度は 94.8 % (MAE2.6 %) であった。最も高い重要度を得た Mpt/Pw は熱効率を意味していると推察され、歩留りとの 線形関係が見られた。この線形性が予測精度に大きく寄与 していると考えられる。 また、歩留りにおよぼす上位の 重要度にはレーザ出力 (Pw) が内包される溶融池温度/レ ーザ出力 (Mpt/Pw) や入熱量 (HF) であり、 溶融池サイ ズの大小に直結する変数が重要と考えられる。

研究報告2022 目次 【化学技術部】

◆アミロース塗布膜の分子構造に由来した分子吸着挙動の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44

水野 陽介 (化学技術部 材料化学グループ)

瀬戸山 央(化学技術部 バイオ技術グループ)

アミロース塗布膜の分子構造に由来した

分子吸着挙動の検討

水野 陽介(化学技術部 材料化学グループ)

1. はじめに

これまでにナノグラムオーダーで質量変化を検出可能 な水晶振動子マイクロバランス(QCM)法を用いた、フロー 系の分子検出システムの検討を行っているし。具体的には、 特異的な分子の吸着を示す、多糖類のアミロースを QCM センサーに塗布し、アミロース膜による水中の有機分子の 吸着を評価した。この時、アミロースを塗布したセンサー と未修飾のセンサーを有する QCM ツインセンサーを用い ている。QCM ツインセンサーは、2 つのセンサーの測定 値の差分をとることで温度変化や溶液の粘性の変化の影 響を打ち消すことができるため、定量性や取り扱いの観点 で単一のセンサーに比べて優れている。しかし、アミロー スによる有機分子の吸着のほか、参照する未修飾センサー 表面への物理吸着も同時に確認されており、検出した質量 変化の要因は、アミロースの選択的な分子吸着に限定され ない。そのため、非選択的な分子検出や測定値と濃度の相 関の複雑化が予想され、改善すべき課題となっている。

そこで本研究は、センサー表面の性状の違いによる物理 吸着の差異の影響を除き、アミロースの分子構造に由来し た選択的な吸着による分子検出方法の確立を目的とした。 アミロース分子は複数の二次構造を形成する。その中でも シングルらせん構造を有した V-アミロースは、らせん構 造内部にゲスト分子を包接することが知られている^{2,3}。一 方で、二重らせん構造を有した B-アミロースや老化アミ ロースは分子包接が不可能である。つまり、V-アミロース と老化アミロースをそれぞれのセンサーに塗布した QCM ツインセンサーを用いることで、分子包接に由来する分子 吸着による質量変化のみの検出が期待できる。本研究では、 上記センサーを作製し、V-アミロースが包接可能なカプリ ル酸の分子吸着挙動を QCM 法により検討した。

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) から既報¹の方法で合成した。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 アミロース塗布 QCM センサーの作成

20 mg のアミロースを DMSO 2 mL に加え溶解した。そ の溶液を 50 mL に定容し、さらに 12 倍に希釈した。希釈 液 30 mL を QCM ツインセンサーの 2 つの電極表面にそ れぞれ滴下し、一方のセンサーにのみ 10 mL のブタノー ルを添加した。自然乾燥した後にメタノールで数回洗浄し、 真空乾燥することで両方のセンサーにアミロースを塗布 した QCM ツインセンサー(Twin-AM)を作製した。この時、 ブタノールを添加した膜では V-アミロースが形成し、無 添加の膜では老化アミロースが形成する。片方のセンサー にのみ V-アミロースを塗布した QCM ツインセンサー (Single-AM)の作製は、同様の方法でアミロースの重量の みを 100 mg に増やして行った。

2.3 QCM 法

測定には NAPiCOS システム(日本電波工業)および 30 MHz ツインセンサーを用いた。測定セルにはフローセ ルを用いた。測定温度は恒温チャンバーを用いて 25 ℃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 mL/min とした。注入するカプリル酸水溶液は濃度の低 いものから順に 100 mL ずつ注入した。

3. 結果と考察

3.1 Single-AM のカプリル酸水溶液に対する応答

飽和カプリル酸水溶液およびその希釈液(飽和濃度 Cmax, 1/2Cmax, 1/4Cmax, 1/8Cmax, 1/16Cmax)を濃度の低い順に注入 し、Single-AM で QCM 測定を行った。その時のアミロー ス塗布センサー(CH1)と未修飾センサー(CH2)の周波数の 経時変化 DF を図 1(a)に示す。カプリル酸水溶液の注入に



飾)(b) 周波数差分の変化ΔF_{CH1-CH2,}s.

より、アミロースの塗布の有無に関わらず、質量増加を意 味する周波数の減少が起き、水での洗浄により質量減少を 意味する周波数の増加が起こった。この時、注入前の周波 数までは戻らず、不可逆的な分子吸着が示唆された。

CH1 と CH2 の周波数の差分の変化(DF_{CH1-CH2,S})を図 1 (b)に示す。カプリル酸水溶液の注入時、注入後ともに DF_{CH1-CH2,S}の明確な減少が見られ、可逆的、不可逆的な分 子吸着量がともに CH1 センサー表面で大きいことが示さ れた。

これらの結果から、アミロース塗布センサーは未修飾センサーよりもカプリル酸の吸着量が明らかに大きいことがわかる。しかし、未修飾センサーにおいても物理吸着が起きているため、DF_{CH1-CH2,S}には両センサーの物理吸着の差異の影響も含まれている。

3.2 Twin-AM のカプリル酸水溶液に対する応答

濃度の異なるカプリル酸水溶液(10,50,100,200, 400 ppm)を注入した際の、Twin-AM(CH1:V-アミロース塗 布、CH2:老化アミロース塗布)のDF_{CH1-CH2,T}の経時変化 を図2に示す。カプリル酸水溶液を注入後、DF_{CH1-CH2,T}は わずかに減少し、洗浄過程で更なる減少が起こった。この 周波数変化の傾向は、Single-AMでの測定と異なるもので あった。これは、カプリル酸水溶液と接触している間は、 両センサーでほぼ同量の吸着が起こるが、洗浄過程後に残 存するカプリル酸分子がV-アミロースに多いことを示し ている。つまり、DF_{CH1-CH2,T}の減少が示すセンサー表面の 質量増加は、V-アミロースの分子構造によって、特異的に 吸着されたカプリル酸によるものだと考えられる。





カプリル酸水溶液を注入する前から、洗浄後までに減少 した DF_{CH1-CH2,T}の値を濃度ごとに算出し、それぞれの濃度 に達するまでの減少値を積算した値を F_{Twin-AM} とした。そ の際、ベースラインが傾斜していたため、ベースラインの 影響を補正している。F_{Twin-AM} の注入したカプリル酸水溶 液に対する濃度依存性を図3に示す。10-400 ppm のカプ リル酸水溶液では、溶液濃度の増加に伴い、F_{Twin-AM} が減 少した。その相関には直線性があったことから、分子検出 手法としての有効性が示唆された。しかし、今回の測定は Single-AM および Twin-AM で測定条件が異なっており、 また、ベースラインがドリフトしているため、より信頼性 の高い評価が必要である。



4. まとめ

分子構造の異なるアミロースを塗布した QCM ツインセ ンサーを用いることで、センサー間の物理吸着の違いによ る影響を最小限にし、アミロースの分子構造に由来した不 可逆的な分子吸着による周波数減少の評価が可能である ことを示した。また、周波数減少量と注入したカプリル酸 水溶液濃度の相関には直線性があり、アミロース分子が特 異的に吸着可能な有機化合物を対象とした水溶液の濃度 測定手法として有効性が示唆された。ただし、10 ppm の 濃度で数 Hz という小さな変化になるため、より低濃度の 分子検出を行うには高感度化が課題である。

本研究の改善により、通常、バッチ式の測定が行われて いる水道水の水質管理において、ppm、ppbオーダーの濃 度の有機化合物の検出が連続的に行えるようになり、リア ルタイムの水質モニタリングの実現が期待できる。

【参考文献】

- 1. 水野 陽介, KISTEC 研究報告, 54-56(2021).
- 2. T. Kuge, K. Takeo, Agr. Biol. Chem., 32, 1232-1238 (1968).
- C. A. K. Le, *Doctoral Thesis*, University of Grenoble Alpes, Grenoble (2018).

食品の各種酵素阻害活性試験における試料溶解溶媒の影響

瀬戸山 央(化学技術部 バイオ技術グループ)

1. はじめに

in vitro 食品機能性評価は、主に各種酵素阻害活性試験 を行うことで評価される。各種酵素阻害活性試験に用い られる試料は、熱水抽出液や含水有機溶媒抽出液など 様々だが、有機溶媒は酵素反応を阻害するなどの悪影響 が懸念される^{1,2)}。しかし、食品機能性評価で対象とする 酵素に対する有機溶媒の種類や濃度の影響について詳細 に検討した事例はない。そこで本研究では、いくつかの 酵素阻害活性試験を対象として許容される有機溶媒の種 類とその濃度について検討を行い、試料溶解に許容され る有機溶媒の種類や濃度を把握することを目的とした。

2. 材料および方法

2.1 試料溶解溶媒

試料溶解溶媒として、メタノール、エタノール、 DMSOを用い、溶媒ごとに100、50、10 vol %の濃度に調 製し各種酵素阻害活性試験に用いた。

2.2 チロシナーゼ阻害活性試験

マッシュルーム由来チロシナーゼを 300 units / mL で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) に溶解したものを酵素溶 液、L - DOPA を 1 mM で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) に溶解したものを基質溶液とした。96 穴マイクロプレー トを用いて各溶媒 25 μ L 酵素溶液 100 μ L を入れ攪拌 後、基質溶液 125 μ L を加え、37℃で 10 分間インキュベ ートした後、475 nm における吸光度を測定した。溶媒の 代わりに純水を加えたものをコントロールとした。

2.3 コラゲナーゼ阻害活性試験^{3,4)}

コラゲナーゼを 0.02 mg/mL で 50 mM Tris 緩衝液 (pH 7.3) に溶解したものを酵素溶液、MOCAc-Pro-Leu-Gly-Leu-A2pr (Dnp) -Ala-Arg-NH2 を 1 mM で DMSO に溶解 し、使用直前に 50 mM Tris 緩衝液 (pH 7.3) で 200 倍希 釈したものを基質溶液とした。96 穴マイクロプレート

(黒色)を用いて各溶媒 50 µL、酵素溶液 100 µl を入れ 攪拌し 37℃で 10 分間インキュベートした後、基質溶液 50 µL を入れ攪拌後、37℃で 1 分ごとに 60 分間蛍光強度 (励起波長 320 nm、蛍光波長 405 nm)を測定した。溶媒 の代わりに純水を加えたものをコントロールとした。

2.4 エラスターゼ阻害活性試験

STANA (N - Succinyl - Ala - Ala - Ala - p - nitroanilide) を 1 mM で Tris 緩衝液 (pH 8.8) に溶解したものを基質 溶液、ブタ由来膵臓エラスターゼを 0.5 units / mL で Tris 緩衝液 (pH 8.8) に溶解したものを酵素溶液とした。96 穴マイクロプレートを用いて各溶媒 25 µL、酵素溶液 50 µl、基質溶液 100 µL を入れ攪拌し、37℃で 30 分間イン キュベートした後、405 nm における吸光度を測定した。 溶媒の代わりに純水を加えたものをコントロールとし た。

3. 結果および考察

3.1 チロシナーゼ阻害活性試験

各溶媒を用いてチロシナーゼ阻害活性試験を行った結 果を図1に示す。DMSOおよびエタノールを用いた場 合、100 vol%においてコントロールに対して有意に吸光 度の低下が見られた。またエタノールを用いた場合、100 vol%においてコントロールに対して有意に吸光度の低下 が見られた。一方、メタノールを用いた場合、すべての 濃度で吸光度は若干低下する傾向が見られたが、有意差 は認められなかった。これらの結果から、チロシナーゼ 阻害活性試験において許容される試料溶解溶媒とその濃 度については、DMSOおよびエタノールは 50 vol%まで の濃度、メタノールは 100 vol%までの濃度であると考え られる。



図1 チロシナーゼ阻害活性試験の結果

3.2 コラゲナーゼ阻害活性試験

各溶媒を用いてコラゲナーゼ阻害活性試験を行った結 果を図2に示す。用いたすべての溶媒、すべての濃度に おいてコントロールに対して有意に蛍光強度の低下が見 られた。これらの結果から、コラゲナーゼ阻害活性試験 においてメタノール、エタノールおよび DMSO のすべて 溶媒で濃度にかかわらず不適であると考えられる。



図2 コラゲナーゼ阻害活性試験の結果

3.3 エラスターゼ阻害活性試験

各溶媒を用いてエラスターゼ阻害活性試験を行った結 果を図3に示す。DMSOおよびメタノールを用いた場 合、50 vol%および100 vol%においてコントロールに対 して有意に吸光度の低下が見られた。またエタノールを 用いた場合、すべての濃度においてコントロールに対し て有意に吸光度の低下が見られた。これらの結果から、 エラスターゼ阻害活性試験において許容される試料溶解 溶媒とその濃度については、DMSOおよびメタノールは 10 vol%までの濃度であり、エタノールはすべての濃度で 不適であると考えられる。



図3 エラスターゼ阻害活性試験の結果

4. まとめと今後の展開

本研究では、チロシナーゼ阻害活性試験、コラゲナー ゼ阻害活性試験およびエラスターゼ阻害活性試験におけ る試料溶解に許容される有機溶媒の種類や濃度について 検討を行った。

チロシナーゼ阻害活性試験において許容される試料溶 解溶媒とその濃度については、DMSO およびエタノール は 50 vol%までの濃度、メタノールは 100 vol%までの濃 度であることが明らかとなった。チロシナーゼは、今回 の反応条件において、比較的高濃度の有機溶媒において も酵素反応が阻害されないことが示唆された。 コラゲナーゼ阻害活性試験においては、メタノール、 エタノールおよび DMSO のすべて溶媒で濃度にかかわら ず不適であることが明らかとなった。コラゲナーゼは、 今回の反応条件において 10 vol%程度の低濃度の有機溶 媒においても酵素反応が阻害されることが示唆された。

エラスターゼ阻害活性試験において許容される試料溶 解溶媒とその濃度については、DMSO およびメタノール は10 vol%までの濃度であることが明らかとなった。一 方、エタノールはすべての濃度で不適であることが明ら かとなった。エラスターゼは、今回の反応条件において 10 vol%程度の低濃度の DMSO、メタノールにおいて酵素 反応が阻害されないことが示唆された。

今後は今回の結果から許容可能であると考えられた溶 媒および濃度において、すでに酵素阻害活性が確認され ている食品成分を用いて確認試験を行うことが必要であ り、研究を進めていきたいと考えている。

【参考文献】

- 1. 木瀬秀夫, 日本醸造協会誌, 86(8), 581 (1991)
- 2. 木瀬秀夫, 日本油化学会誌, 46(12),1447 (1997)
- 3. 杉本幸子, コスメトロジー研究報告, Vol.25,9(2017)
- 4. 石橋正己, コスメトロジー研究報告, Vol.12, 31 (2004)

【外部発表】口頭発表 1件、 論文発表0件

研究報告2022 目次 【抄録】

機械・材料技術部

- Effect of Degree of Unsaturation in Vegetable Oils on Friction Properties of DLC Coatings
- ♦ In situ crystallization of CHA / FAU zeolites on volcanic stone in the absence of organic agents
- ♦ In situ observation of evolution of internal structure of alumina during sintering by swept-source OCT
- Transparent Y-alpha SiAlON:Ce3+ Ceramics Fabricated by Low-Temperature Liquid Phase Sintering Technique

電子技術部

◆Ni板の親水化に対するプラズマ照射の効果

化学技術部

- ◆ Lysine-glucose Maillard reaction products promote longevity and stress tolerance in Caenorhabditis elegans via the insulin/IGF-1 signaling pathway
- ◆パラコート処理が線虫の体内活性酸素および抗酸化酵素活性に与える影響
- ◆ボイセンベリーおよびボイセンベリー含有アントシアニン類の抗糖化作用

川崎技術支援部

- ♦ Decomposition of Gaseous Styrene Using Photocatalyst and Ozone Treatment
- ◆光触媒式小型空気清浄機による飛沫除去挙動の評価

◆ Effect of Degree of Unsaturation in Vegetable Oils on Friction Properties of DLC Coatings

機械・材料技術部 材料物性グループ 吉田 健太郎 解析評価グループ 長沼 康弘 東京工業大学 加納 眞

掲載紙: Tribology Online, Vol. 16, No. 4 (2021)210.

近年、有機酸を含む様々な種類の植物油と DLC 膜の組み合わせが摩擦を減らすのに効果的である ことが報告されているが、植物油潤滑剤の化学構 造の違いと摩擦低減との関係についての詳細な報 告はほとんどない。そこで著者らは、不飽和度の異 なる植物油について、水素含有 DLC(a-C:H)膜と水 素フリーDLC(ta-C)膜2種類の摩擦特性への影響を 評価した。 評価した全植物油において ta-C 膜は、 a-C:H 膜および未コート材よりも著しく低い摩擦 係数を示した。 ta-C 膜については、一価不飽和脂 肪酸の含有量が高い植物油で最も低い摩擦係数を 示した。X線光電子分光分析(XPS)および飛行時間 型二次イオン質量分析(ToF-SIMS)を用いて、ta-C 膜 の摩擦面を分析した結果、C-OH 結合からなる表面 層の形成を確認し、これらの結合の検出強度が増 加するにつれて、より低い摩擦係数を示すことが わかった。

◆In situ crystallization of CHA / FAU zeolites on volcanic stone in the absence of organic agents

> 機械・材料技術部 ナノ材料グループ 小野 洋介
> 鹿児島県工業技術センター
> 増永 卓朗、袖山 研一

掲載紙: Microporous and Mesoporous Materials, Vol.328, 111500 (2021)

日本は100以上の活火山を持つ火山大国である。 本研究では、火山噴出物である軽石の新規な有効 利用法を提案する。軽石を水酸化ナトリウム水溶 液に投入して100℃程度で加熱することにより、軽 石表面にゼオライトを生成させ軽石と複合化した。 この手法において、軽石はゼオライトの原料とし ての役割と多孔質な支持体としての役割を担って おり、作製するゼオライト複合体は軽石のマクロ 孔とゼオライトのマイクロ孔を併せ持つ。本研究 の結果、マイクロ孔の径が 0.38 nm に揃った CHA 型ゼオライトと、0.74 nm に揃った FAU 型ゼオラ イトを作り分けることができた。また、ゼオライト の生成に伴い、複合体の比表面積が軽石原料の数 十〜数百倍に向上した。さらに、アンモニウムイオ ンを対象とした吸着実験において、ゼオライト複 合体が市販のゼオライト粉末よりも高い除去能を 示した。

◆ In situ observation of evolution of internal structure of alumina during sintering by swept-source OCT

機械・材料技術部 材料物性グループ 高橋 拓実 横浜国立大学 坂本 文香、多々見 純一、飯島 志行

掲載紙: Int. J. Appl. Ceram. Tec., 19(2), 1171-1179 (2022)

セラミックスの焼結をその場で観察することは、 内部構造の発達を含む焼結挙動を理解し、優れた 特性を有するセラミックスを作製するために重要 である。しかし、高温の成形体や焼結体の内部構造 をマイクロメートルオーダーの分解能で高速その 場観察する研究はこれまで行われていませんでし た。ここでは、波長掃引型の光コヒーレンストモグ ラフィー (OCT) を用いて、Al₂O₃ 成形体の焼結中 の内部構造の変化を観察した。OCT によるその場 観察により、密度分布の発達や粗大な気孔の成長 など、焼結中に内部構造が変化することが明らか になった。また、OCT 像から焼結収縮率や相対密 度を得ることができた。一次粒子径の異なる造粒 物を添加、積層した成形体の焼結中の内部構造を OCT で観察した結果、高温での緻密化の進行に伴 い、不均一な領域が発達していることが確認され た。これらの結果は、波長掃引型 OCT を用いた成 形体の焼結挙動のその場観察が、焼結中の内部構 造の変化をリアルタイムで観察することができる 新規な技術であることを示している。

◆ Transparent Y-alpha SiAlON:Ce³⁺ Ceramics Fabricated by Low-Temperature Liquid Phase Sintering Technique

機械・材料技術部 材料物性グループ 高橋 拓実、横内 正洋 横浜国立大学 佐野 由紀、多々見 純一、飯島 志行

掲載紙: ECS J. Solid State Sci. Technol. 10 086008 (2021)

固体照明や光源の高出力化に伴い、耐熱性に優 れた透明性と蛍光性を兼備するセラミックス基板 が求められている。エンジニアリングセラミック スである α-SiAlON は、安定化イオンの導入でフォ トルミネッセンスを示すことが知られているが、α-SiAlONのバルク単結晶を得ることは不可能である。 そこで本研究では、高出力固体半導体光源用の波 長変換部材として、透明な Y-α SiAlON:Ce³⁺セラミ ックスを作製した。この目的のために、均質で緻密 な成形体を用いて、ガス加圧焼結、次いで低温での 熱間等方加圧を実施した。特に、周期的な冷間等方 圧加圧により、成形体の密度と均質性が高まり、低 温での緻密化が促進され、焼結時の気孔の消失が 効率的に行われるようになった。低温緻密化によ り結晶粒成長が抑制された結果、高い直線透過率 を有する Y-α SiAlON:Ce³⁺セラミックスを得ること に成功した。この透明な Y-α SiAlON:Ce³⁺セラミッ クスは、Ce³⁺の 5d-4f 遷移によるフォトルミネセン スを示した。発光強度のピーク波長は Ce³⁺の濃度 に依存し、発光色は青色から青緑色の範囲であっ た。

◆Ni 板の親水化に対するプラズマ照射の効 果

> 電子技術部 電子材料グループ 安井 学、黒内 正仁、金子 智 機械・材料技術部 解析評価グループ 長沼 康弘 化学技術部 環境安全グループ 田中 聡美、加藤 千尋

揭載紙:表面技術, Vol.72 No.12, pp.716-718(2021)

プラズマ照射時間によって、Ni 板上の Ni-W めっ き膜の剥離の有無が変化した.親水性とめっき膜 の剥離の有無の関係を調べるため、プラズマ照射 時間を変化させた Ni 板表面を FT-IR と XPS を用 いて分析・検討した.FT-IR の分析結果では、水酸 基により Ni 板の表面が親水化されたと考えられる. また、XPS の分析結果では、酸素プラズマによる Ni 板表面の炭化水素の除去と Ni 板表面が親水性 を示す Ni₂O₃に変化したことの 2 点が Ni 板表面の 親水性を変化させた一要因と考えられる.そして、 プラズマ照射による Ni 板表面の親水化が、Ni-W め っき膜のつきまわりを改善し、Ni-W めっき膜の密 着性の改善に寄与したと考えられる.

◆ Lysine-glucose Maillard reaction products promote longevity and stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* via the insulin/IGF-1 signaling pathway

> Issei Yokoyama Ou Setoyama Ayumi Urakawa Momo Sugawara Yaqi Jia Yusuke Komiya Jun Nagasao Keizo Arihara

掲載紙: Journal of Functional Foods Vol.87, pp.104750 (2021)

The Maillard reaction is associated with the development of distinct flavors and colors during food processing and cooking. This reaction generates numerous chemical compounds, including antioxidants. Caenorhabditis elegans is a model organism for studying aging; its lifespan is prolonged by antioxidants. In this study, we investigated the effects of lysineglucose Maillard reaction products (LG MRPs) on C. elegans lifespan. Our results showed that LG MRPs prolonged the lifespan in a dose-dependent (0.001-0.1 M) and improved the reduction of age-related movements. Reactive oxygen species and fat accumulation were decreased upon treatment with LG MRPs. LG MRPs treatment also improved oxidative and heat stress tolerance. Furthermore, mRNA expression of daf-16 which relates to the longevity and its target genes (sod-3, ctl-1, hsp-12.6, and hsp-16.2) was increased. These results suggest that LG MRPs might contribute to longevity via the insulin/insulin-like growth factor signaling pathway in *C. elegans*.

◆パラコート処理が線虫の体内活性酸素お よび抗酸化酵素活性に与える影響

> 化学技術部 バイオ技術グループ 瀬戸山 央

掲載紙:科学・技術研究,10巻,1号,pp.41-44 (2021)

ヒトの体内で過剰に生じた活性酸素(ROS)は 酸化ストレスとして作用し、老化の要因となるこ とが明らかになっている。モデル生物である線虫 においても、ROSと老化に深い関わりがあること が明らかとなっている。本研究では2.5~10 mM のパラコート処理が線虫に与える影響について、 体内のROS生成及び抗酸化酵素(SOD、CAT)活 性に着目して解析を行った。その結果、パラコー ト処理の期間が長いほど、またパラコート濃度が 高いほど体内ROS生成量が増加し、SOD活性が 上昇することを明らかにした。

◆ボイセンベリーおよびボイセンベリー含 有アントシアニン類の抗糖化作用

> 化学技術部 バイオ技術グループ 瀬戸山 央

掲載紙: 食生活研究, 41 巻, 6 号, pp.338-346 (2021)

ボイセンベリーはベリー類の中でも大きく加工 性に優れている。本研究は、ボイセンベリーの抗 糖化性およびボイセンベリー含有アントシアニン 類の抗糖化性への寄与を明らかにすることを目的 とした。その結果、ボイセンベリーには蛍光性 AGEs 生成抑制作用および CMA 生成抑制作用が 認められ、抗糖化作用があることが明らかとなっ た。また、ボイセンベリーに含まれるアントシア ニン類が蛍光性 AGEs 生成抑制作用に関与してい ることが明らかとなった。 • Decomposition of Gaseous Styrene Using Photocatalyst and Ozone Treatment

川崎技術支援部 材料解析グループ 濱田 健吾 落合 剛 青木 大輔 阿久津 康久 平林 康男

揭載紙: Catalysts, Vol.12, No.3, pp.316(2022)

Because photocatalysis has strong oxidation abilities in redox systems, it has been applied to indoor air purification. However, intermediate products are produced during the photocatalytic oxidative decomposition of aromatic compounds with benzene rings. Therefore, it is essential to improve decomposition performance and evaluate the intermediate products produced for practical applications. Herein, we describe the decomposition performance of ozone, photocatalyst, and their combination, under the target gas of styrene. Using a one-pass mini reactor, decomposition performance was evaluated by analyzing the output gas in the reactor and observing the styrene removal, the amount of carbon dioxide produced, and the composition of a small amount of intermediate products. The combination of ozone and photocatalyst showed the most significant performance, completely decomposing in the photocatalyst and removing odor components in ozone. Moreover, we demonstrated that decomposition performance could be evaluated by observing slight amounts of intermediate products in the exhaust gas. We believe that this research provides insights into the practical application of photocatalysis and ozone oxidation technologies in air purifiers and their performance management, with particular emphasis on the decomposition of odor compounds.

◆ 光触媒式小型空気清浄機による飛沫除去 挙動の評価

> 川崎技術支援部 材料解析グループ 落合 剛 大阪府立大学工学研究科 秋吉 優史

綿野 哲

掲載紙:エアロゾル研究, Vol.36, No.4, pp.263-272(2021)

A small air cleaner with the visible-light-responding photocatalyst was developed. This air cleaner is specialized in removal of the splashed droplets which flies between facing peoples to cope with various infectious diseases. Photocatalyst of a tungsten trioxide system which response efficiently to visible-light was sprayed on a conventional nonwoven fabric filter with a visible-light LED module and a silent type fan are applied. The photocatalyst was excited by visible-light to generate active oxygen that oxidizes and decompose various organic matters. In this study, the physical performance of the air purifier was estimated, 1) the removal action of splashed droplets from the oral cavity with special motion-picture system, 2) evaluation of the transmittance of droplets to the filter and 3) droplets capture performance in a clean bench. Furthermore, performance of the photocatalyst system was evaluated by formaldehyde gas decomposition rate in a small chamber. As a result, droplets of 5 micrometers or more can be removed effectively by the small air purifier, and it is considered that the virus contained in the droplets caught by the filter will be inactivated with the photocatalyst by degrees.

研究報告2022 目次 【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「次世代機能性酸化物材料」プロジェクト

◆総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	• • • • • • • • • • • • • • • • • •	54
◆新奇ペロブスカイト化合物Bi0.5Pb0.5FeO3の電荷分布の解明・・・・・・・・・・・・・・	• • • • • • • • • • • • • • •	57
◆PbVO3の圧力下巨大体積変化を活かした負熱膨張材料の設計と分域構造の観察・		60
◆業績·····		64

「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 のゲート幅は 10nm 以下であり、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. 2021 年度の研究目的

プロジェクト3年目となる2021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

BiNi_{0.85}Fe_{0.15}O₃ 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この巨大負熱膨張材料 の生産コスト削減のため、酸化剤を不要とし収率の向上に 繋がる、共沈法による前駆体作成手法を、工業的合成法と して確立する。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、理想的な負熱膨張特性を持つ Bi_{1-x}Sb_xNiO₃ についても、共沈法での前駆体作製を行い、 工業化への道を拓く。新物質開発については、PbFeO₃ に 続き、Pb-3d 遷移金属で最後に残った PbMnO₃の電荷分布 を解明する。また、10%もの巨大な体積収縮を示す PbVO₃ ベースの負熱膨張材料において、低温相と高温相が共存す るドメイン構造の解明を目指す。これらに加えて、Ca₂RuO₄ 焼結体の巨大負熱膨張のメカニズムを解明し、新負熱膨張 材料探索に展開する。



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

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、 BiFe0.9C00.1O3薄膜の単一強誘電ドメイン化を行う²⁾。電子 技術部のドライエッチング装置使用の目処が立ったので、 いよいよ BiFe0.9C00.1O3薄膜のエッチングでの微細加工に よる単一ドメイン化に挑戦する。また、BiFe0.9C00.1O3薄膜 上への InSe ホールセンサーの形成を行う。



図 2:GdScO3基板上の BiFe09C001O3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、(1-x)Na1/2Bi1/2VO3 - xNa1/2Bi1/2TiO3 単斜相相の d33 を向上させる。これは絶縁性 が低く、分極処理が不完全なためである。引き続き、V サ イトへの Mn, Zn, Li の置換、さらには正方晶相の BaTiO3 や K1/2Bi1/2TiO3 の固溶による絶縁性の向上と、圧電特性の 向上を図る。これらはいずれも特許申請済みである。また、Na1/2Bi1/2VO3 の薄膜化に挑戦する。

2. 2021 年度の研究成果

以下に挙げるのは、2021年度の具体的な研究成果である。

(1) 巨大負熱膨張材料高収率合成手法の開発 BiNio.85Feo.15O3 の共沈法による前駆体調整については、原 料である硝酸鉄に吸着した空気中の CO2 が反応すること で、炭酸ビスマスが生成してしまうことが問題であること が分かった。グローブバッグ内で作業することで、遠心分 離の代わりに濾過で脱水できることが判明し、技術移転に 大きく前進した。BiNio.85Feo.15O3 に加えて動作温度の高い BiNio.90Feo.10O3 をラインアップに加えるべく、日本材料技 研がエチレングリコール法で調整した前駆体の評価を行 い、問題なく負熱膨張材料が得られることを確認した。製 品としての提供が始まり、さらなる販路拡大に繋がると期 待される。

PbVO₃は、V⁴⁺の d_{sy}軌道秩序のために c/a=1.23 という強 大な正方晶歪みを持つ PbTiO₃型化合物で、圧力を印加す ると 11%もの体積減少を伴って立方晶の常誘電相に転移 する。Pbを一部 Bi³⁺, La³⁺で置換して電子をドープすると 昇温で転移が起こるようになり、負熱膨張物質化出来る事 を戦略シーズの成果として報告した。しかしながら、電子 ドープによって c/a 比が減少するため、室温近傍で負熱膨 張を起こす Pb0.76La0.04Bi0.20VO₃ では体積変化は 6.7%に減 少してしまう。これに対し、Pb²⁺を Sr²⁺で置換すると、c/a を減少させる事なく突然立方晶への変化が起こることを 見いだし、Bi³⁺置換と組み合わせた Pb0.8Bi0.1Sr0.1VO₃ で、 9.3%の体積減少を伴う負熱膨張を実現した。さらに、電子 顕微鏡観察と、ブラッグコヒーレントX線イメージングの 手法で、11%の体積差を持つ立方晶相と正方晶相の相境界、 そしてドメイン構造を明らかにする事に成功した³。



図 3 : Pb_{0.8}Bi_{0.1}Sr_{0.1}VO₃の X 線回折パターンの温度変化(a)と、負 熱膨張(b)

還元処理した層状ルテニウム酸化物 Ca2RuO4 の焼結体 が、345K 以下の 200K に渡る温度範囲で 6.7%もの体積収 縮を示す事が、平成 29 年に名古屋大学の竹中教授と KISTEC の酒井常勤研究員らによって発見されたが、その メカニズムは不明であった。放射光を用いた精密な構造・ 電子状態解析と第一原理計算で、4 価のルテニウムが持つ d 電子が、低温では横方向に張り出した dxy 軌道を優先的 に占有するために、ルテニウムを囲む酸素 8 面体が縦に収 縮しており、さらにそれらが互いに傾斜するために縦方向 (c 軸方向) に縮み、横方向 (b 軸方向) に伸長している こと、昇温すると、この結晶構造の歪みが徐々に解消する ため、c軸方向に伸長し、b軸方向に収縮する異方的な熱 膨張が起こることを明らかにした。材料組織を形成する針 状の結晶粒は、長手方向がb軸に対応しているため、昇温 に伴って太鼓型に変形し、それによって結晶粒間の空隙が 減少することで全体として大きく体積が収縮する。また、 合成直後の材料は格子間位置に過剰な酸素を取り込んで おり、これが低温での選択的な電子軌道の占有と酸素8面 体の傾斜を阻害してることもわかった4。



図4:(上) Ca₂RuO₄の低温(左)と高温(右)の結晶構造。低温 ではd_{xy}軌道のみが2つの電子を持つため、酸素八面体が横に伸 びている。八面体が傾斜することでもc軸(縦)方向に収縮して いる。昇温すると、これらの歪みが解消することで、c軸(縦) 方向に膨張、b軸(横)方向に収縮する。(下)結晶粒の異方的な 熱膨張による材料組織の変化と負熱膨張の模式図。

PbMnO₃は、PbMO₃(M:3d 遷移金属) で唯一その電荷 分布が不明であった。第一原理計算、硬X線光電子分光、 放射光X線全散乱データ PDF 解析を組み合わせることで、 PbCrO₃ 同様、局所的には Pb²⁺と Pb⁴⁺が岩塩型に配列した、 Pb²⁺0.5Pb⁴⁺0.5Mn³⁺O₃ の電荷分布を持つ事を明らかにした。 これにより、PbMO₃ における系統的な電荷分布変化の全 容が明らかになった。



図 5 : 硬X線光電子分光による PbMO₃(M:3d 遷移金属)の系 統的な電荷分布の解明

(2) 強磁性強誘電体の単一強誘電ドメイン化

NANOBIC と海老名の電子技術部の装置を併用して、ド ライエッチングによる BiFe0.9Co0.1O3 ナノドットの作製に 成功した。BiFe0.9Co0.1O3 はエッチング耐性が高く微細加工 に困難があったが、シリコンの深堀り反応性イオンエッチ ング (DeepRIE) 用に使用されるフォトレジストを用いる ことで、数十 nm の深さの加工プロセスが実現できるよう になった。図 6 に原子間力顕微鏡によって観察した BiFe0.9Co0.1O3 ナノドットの形状像を示す。直径 1.2-1.5µm 程度のドット形状が規則的に整列している様子が見て取 れる。また、この形状像から得られたドットの厚みは 25-30 nm であった。

このナノドットに対して、圧電応答顕微鏡による強誘電 ドメイン、ならびに磁気力顕微鏡による磁気ドメイン像の 観察を試みたが、繰り返しスキャンをしていくと像が不明 瞭になり、信頼性のあるデータを取得することはできなか った。これは、微細加工プロセスの最中に形成される側壁 防護膜(図6のナノドットの外縁に存在すると思われる) や、レジストの残留物などが、測定中にプローブの探針に 付着する影響と考えられる。



図 6:ドライエッチングで作製した BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ ナノドットの AFM 像

上記のように、BiFeo.9Coo.1O3のナノドット形状による単 一強誘電ドメイン化が進行しているため、今後の電場印加 磁化反転の特性評価を見据えて、磁化反転を電気的に検出 するホール素子材料の作成に着手した。まず BiFeo.9Coo.1O3 薄膜の弱強磁性が表面近傍につくる磁場の強さを見積も ると、およそ 10mT と算出された。この磁場を検出するた めには、移動度にして 10³-10⁴ cm²V⁻¹s⁻¹の材料が必要であ ると予想された。そこで、現存する市販のホール素子でも っとも感度が高い材料であるインジウムアンチモン InSb

(移動度>30000 cm² V⁻¹s⁻¹)を、BiFe0.9C00.1O3の成膜プロ セスに組み込めるように、パルスレーザー堆積法で合成す ることを試みた。基板には、SrTiO3(001)と GdScO3(110)を 選定した。基板温度や成膜速度などの検討を行い、いずれ の基板上でも InSb のエピタキシャル成長が確認された。 面内配向を調べるために X 線回折のφスキャンを行った ところ、六方晶 InSb が互いに 30°回転したダブルドメイ ンをもつ薄膜であることがわかった。これらの InSb 薄膜 に対して、外部磁場±1 Oe 下のホール抵抗の変化を検証し たところ、磁場の反転によって符合が変化することを確認 した。さらに、BiFe0.9C00.1O3 薄膜上にバッファー層として **SrTiO**3 を成膜し、その上に InSb を成長させる事にも成功 した。こちらでも±10 Oe の外部磁場の反転を検出出来て いる。

また、Co 以外の元素で Fe を置換する事で自発磁化を増 大させるために、Co が果たす役割を第一原理計算とモン テカルロシミュレーションで調べ、Co³⁺が一部高スピン状 態になる事が鍵であるとわかった^の。



図 7: STO 上に成膜した InSb 薄膜のホール抵抗の外部磁場依存 性

(3)非鉛圧電体の研究

Nao.5Bio.5VO3 薄膜の作製を開始した。Na の揮発に伴う組 成ずれが激しいため、室温でのレーザーアブレーション後 に加熱することで結晶化させる、固相エピタキシー法を取 り入れている。一方で、分極回転メカニズムを持つ BiFe1-xCoxO3 薄膜の電場印加による構造変化を、韓国のグ ループと共同で、放射光X線を用いて観察することに成功 した。また、同様の構造を持つ BiFe1-xGaxO3 薄膜は、配向 を変化させて、分極回転の余地を大きくすることで、圧電 特性が 1.6 倍にも増大することを明らかにした⁷。



図8:BiFe1xCoxO3薄膜の配向と圧電応答

【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. T. Nishikubo, submitted.
- 4. L. Hu et al., Chem. Mater., 33, 7665 (2021).
- 5. K. Lee et al., J. Jpn. Appl. Phys., 61 080902 (2022).
- 6. K. Lee et al, Phys. Rev. Mater., 6, 064401 (2022).
- K. Shimizu *et al.*, ACS Appl. Electron. Mater., 3, 4459 (2021).

新奇ペロブスカイト化合物 Bi0.5Pb0.5FeO3の電荷分布の解明

1. はじめに

ビスマスや鉛は典型元素であるが、6s⁰(Bi⁵⁺、Pb⁴⁺)と 6s²(Bi³⁺、Pb²⁺)の電子配置を取り、その間の6s¹(Bi⁴⁺、Pb³⁺) の電子配置を取らないバレンススキッパーと呼ばれる電 荷の自由度をもつ。ペロブスカイト構造の A サイトをビ スマスや鉛が、Bサイトを 3d 遷移金属が占有する、ビス マス・鉛含有ペロブスカイト酸化物では、ビスマスや鉛の 6s 軌道、遷移金属の 3d 軌道、酸素の 2p 軌道のエネルギ 一準位が互いに近いことから、ビスマスや鉛と遷移金属の エネルギー準位差に応じて、さまざまな電荷分布が発現す る。我々のグループはこれまで、Aサイトにビスマスや鉛 を単独で含む、BiMO3 及び PbMO3 (M: 3d 遷移金属)の結 晶構造と電荷分布を、放射光 X 線回折と硬 X 線光電子分 光、X線吸収分光等により系統的に調べ、これらの物質が 周期表に沿った電荷分布変化を示すことを明らかにして きた¹⁾。BiMO3は、MがCrからCoまではBi³⁺M³⁺O3の価 数状態を取り、BiNiO3では Bi が 3+と 5+に電荷秩序した Bi³⁺0.5Bi⁵⁺0.5M²⁺O₃という特徴的な電荷分布へと変わる。 BiMO3に現れる電荷分布はこの二通りだけだが、PbMO3は さらに複雑な電荷分布の変化を示す。Pb の価数は、M が Ti 及びV では2価(Pb²⁺M⁴⁺O₃)、Cr 及びFe では2価と4 価に不均化した平均3価(Pb²⁺0.5Pb⁴⁺0.5M³⁺O₃)、CoではPb²⁺ と Pb⁴⁺ が 1:3 で電荷秩序した平均 3.5 価 (Pb²⁺Pb⁴⁺3Co²⁺0.5Co³⁺0.5O3)、Niでは4価(Pb⁴⁺Ni²⁺O3)をとる。 このようにBiMO3とPbMO3では、元素周期表を右に進む、 つまり遷移金属の d レベルが深くなるにつれて、遷移金属 の価数が減少し、ビスマスや鉛の価数は増加する。

このような電荷分布の変化は, 遷移金属の種類を変える だけではなく、温度や圧力印加によっても起こすことが可 能である。BiNiO3を加圧するとBiとNiの間で電荷移動 が起き(Bi³⁺0.5Bi⁵⁺0.5Ni²⁺O3 → Bi³⁺Ni³⁺O3)、格子の収縮を伴 った金属絶縁体転移を示す²⁾。我々のグループは、Biの 一部を3価のランタノイドイオン³⁾やSb³⁺に⁴⁾、Niの一部 を Fe³⁺で置換することで ⁵⁾、Bi³⁺Ni³⁺O₃の電荷分布を安定 化させ、体積収縮を伴う温度誘起の電荷移動、つまり温め ると収縮する負の熱膨張を発現させることに成功した。室 温近傍で-187ppm/K と大きな負熱膨張率を示す、 BiNi0.85Fe0.15O3 に関しては、日本材料技研のもとで試験的 な工業生産が既に始まっており、樹脂コンポジット材料な どの熱膨張抑制用フィラーやスイッチング材料、センサー 材料としての利用が期待されている。ビスマスや鉛のペロ ブスカイト酸化物は、6s² 孤立電子対の立体障害効果に注 目した、強誘電体としての研究が盛んに行われきたが、電 荷分布が変化する際には、超伝導や巨大磁気抵抗効果、負

「次世代機能性酸化物材料」プロジェクト 酒井 雄樹

熱膨張が発現することが多いことから、電荷自由度の観点 からも興味深い物質群である。

我々のグループは近年、電荷自由度を有するビスマスと 鉛を 1:1 の割合で固溶させた $Bi_{0.5}Pb_{0.5}MO_3$ では、ビスマス と鉛の両方に価数変化の可能性があることから、 $BiMO_3$ と $PbMO_3$ よりもさらに複雑な結晶構造や電荷分布を取りう るのではと考え、これらの物質の結晶構造及び電荷分布に 関する研究を進めている。 M = Mn については、 $La_{0.5}Ca_{0.5}MnO_3$ と同様、平均 3.5 価の Mn が 3+と 4+に秩序 化しており、CE 型の電荷・軌道・磁気秩序を持つことを ⁶、 M = Ni では Bi が電荷不均化した $Bi^{3+}_{0.25}Bi^{5+}_{0.25}Pb^{4+}_{0.5}NiO_3$ の電荷分布を取ること ⁷⁰をこれまで報告してきた。今回 我々は、新たに $Bi_{0.5}Pb_{0.5}FeO_3$ の合成に成功し、放射光を利 用した回折及び分光手法により、結晶構造及び電荷分布を 明らかにした。この結果により、Mn から Ni に及ぶ、 $Bi_{0.5}Pb_{0.5}MO_3$ の系統的な電荷分布変化が明らかになった ので、その研究結果について報告する。

実験方法と結果

Bi0.5Pb0.5FeO3多結晶体は、6万気圧・1000℃の高温高圧 条件下で 30 分熱処理することで作成した。図1に放射光 X線回折パターンのリートベルト解析結果を示す。リート ベルト解析と第二次高調波発生測定の結果から、 Bi0.5Pb0.5FeO3 はペロブスカイト基本格子の[001]Pc 方向に 沿った反位相の酸素八面体のチルト(a⁰a⁰c⁻)を有する、空間 群 I4/mcm の非極性の正方晶構造を取ることが明らかにな った(図2)。この構造では、ビスマスと鉛が占有する A サイトと鉄が占有する B サイトが結晶学的にそれぞれ単 一のサイトしか持ちえないことから、ビスマスと鉛の秩序 配列や鉄の電荷秩序などは長距離的には存在しない。しか し、リートベルト解析によって精密化された異方性原子変 位パラメーターを反映させた酸素イオンは、O1 サイトは [001]Pc 方向に、O2 サイトが[100]Pc と[010]Pc 方向(I4/mcm 格子での[110]r 方向)に大きな伸びた形状をしており、 [100]Pc と[010]Pc 方向に沿った八面体のチルトが局所的に は存在していることを示唆している。このような局所的な 構造歪みはビスマスや鉛を含むペロブスカイト型酸化物 で多くみられ、ビスマスが3価と5価に電荷秩序している BiNiO3では、ビスマスサイトを鉛で一部置換すると、鉛が ビスマスの長距離秩序を阻害するため、局所構造歪みを伴 う短距離秩序へと変わることが知られている⁸⁾。 Bio.5Pbo.5FeO3の局所構造歪みも、ビスマスと鉛の短距離秩 序に起因するものだと考えられ、A サイトイオンと B サ イトイオンともに平均構造的には単一のサイトしか持た

ないが、局所的には環境が異なる複数のサイトを有してい ると思われる。また、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の結果は、鉄の価数が3価である ことを示唆しており、前述したバレンススキッパーという 特徴により鉛は3価を取れないため、Bio.5Pbo.5FeO3は鉛が 2価と4価に電荷秩序したBi³⁺0.5Pb²⁺0.25Pb⁴⁺0.25Fe³⁺O3とい った電荷分布を取っていると予測できる。そこで、次に ⁵⁷Fe メスバウバー分光法による鉄の価数状態とスピン状 態の、硬X線光電子分光によるビスマスと鉛の電荷分布 の直接観察を行った。



図1: Bi_{0.5}Pb_{0.5}FeO₃の放射光 X 線回折データのリートベルト解 析結果。



図 2: Bi_{0.5}Pb_{0.5}FeO₃の結晶構造。平均構造的には、[001]_{PC}方向 に沿った反位相の酸素八面体のチルト(赤矢印)しか存在しない が、異方性原子変位パラメーターを反映した酸素イオンの形状 は、局所的な[100]_{PC} と[010]_{PC}方向のチルト(青矢印)の存在を示 唆している。

図3は室温でのメスバウアー分光スペクトルを示している。主成分は磁気分裂した6本のピークで構成されていることから、Bio.5Pbo.5FeO3は室温でも磁気秩序を有していることが明らかになった。また、スペクトル全体の重心位置の原点からのズレを示す、アイソマーシフトの値は鉄の価数とスピン状態を反映しており、今回得られた0.4 mm/sという値は鉄が3価の高スピン状態であることを示して

いる。また、内側に少し裾を引くようなピークブロードニ ングは、鉄の局所環境に磁気的な乱れが生じていることを 示唆しており、結晶構造解析の箇所で述べた局所構造乱れ の存在と整合している。また、磁化曲線と磁化率測定の結 果から(図4)、Bio.sPbo.sFeO3はスピン傾角に起因する弱い 強磁性成分を持つ反強磁性体であること、磁気転移温度は 400 K 以上であることが明らかになった。(250 K 付近で見 られるキンクは、不純物相である α-Fe2O3 のモーリン転移 に由来する。)



図3:Bi_{0.5}Pb_{0.5}FeO₃のメスバウアー分光スペクトル。磁気分裂 した6本のピークは、室温でも磁気秩序を持つことを、アイソ マーシフトの値は、鉄が3価の高スピン状態であることを示し ている。



図4:Bi_{0.5}Pb_{0.5}FeO₃の磁化率の温度依存性と磁化曲線(挿入図)。 磁場中冷却と零磁場冷却時での磁化率の値のズレは、400Kま で磁気秩序が安定であることを示している。 図5は、Bio.sPbo.sFeO3と、ビスマス及び鉛のそれぞれの 価数状態のレファレンス試料の硬X線光電子分光スペク トルを示している。ビスマスのスペクトルは、BiFeO3 同様 にビスマス3価1成分から成り立っていることから、3価 であることがわかる。一方、鉛のスペクトルは、2価と4 価の2つの成分から構成されており、ピーク面積比から、 2価と4価の割合はおおよそ1:1であることも分かった。 したがって、結晶構造解析から予測されていたように、 Bio.sPbo.sFeO3 は鉛が2 価と4 価に電荷不均化した Bi³⁺0.5Pb²⁺0.2sPb⁴⁺0.2sFe³⁺O3 の特異的な電荷分布を取ってい ることが明らかになった。局所的な構造乱れも、Bi³⁺と Pb²⁺、 Pb⁴⁺といった、価数もイオンサイズも異なる3つのイオン が同一のAサイトを占有しているからだと考えると、う まく説明することができる。



図 5: Bi_{0.5}Pb_{0.5}FeO₃の硬 X 線光電子分光スペクトル。ビスマス は 3 価、鉛は 2 価と 4 価に 1:1 で電荷不均化した平均価数 3 価 であることを示している。

3. 考察及び今後の展望

本研究では、放射光を用いた回折及び分光実験により、 電荷の自由度を有するビスマスと鉛を同時に含んだ、新規 ペロブスカイト型酸化物 Bi0.5Pb0.5FeO3 の結晶構造及び電 荷分布の解明に成功した。Bio.5Pbo.5FeO3は鉛が電荷不均化 した Bi³⁺0.5Pb²⁺0.25Pb⁴⁺0.25Fe³⁺O3 といった特異的な電荷分布 を取り、スピン傾角による弱い強磁性成分を持つ反強磁性 体であることが明らかになった。本研究結果により、 Bi0.5Pb0.5MO3の電荷分布は、MnからFeそしてNiへと、 周期表を左から右に行くにかけて(遷移金属の d レベルが 深くなるにつれ)、遷移金属の価数は3.5価から3価、2価 と系統的に変化していくとこが明らかになった。また、ビ スマスと鉛の電子配置に注目すると、鉛の方がビスマスよ り先に6s²(Pb²⁺)から6s⁰(Pb⁴⁺)へと変化することも分かった (図 6)。電荷不均化した系では、BiNiO3 同様に化学置換 による電荷移動型の負熱膨張の発現が期待される。そこで、 今後は Bi0.5Pb0.5FeO3 の負熱膨張化を目指していく。



図 6: Bi_{0.5}Pb_{0.5}MO₃の系統的な電荷分布変化。

【参考文献】

- 1. M. Azuma et al., Annu. Rev. Mater. Res., 51, 329-349(2021).
- M. Azuma et al., J. Am. Chem. Soc., 129(46), 14433– 14436(2007).
- 3. K. Oka et al., Appl. Phys. Lett., 103(6), 061909 (2013).
- T. Nishikubo *et al.*, *Appl. Phys. Express*, 11(6), 061102(2018).
- 5. K. Nabetani et al., Appl. Phys. Lett., 106(6), 061912(2015).
- S. Wakazaki et al., Inorg. Chem., 59(18), 13390– 13397(2020).
- 7. Y. Sakai et al., Chem. Mater., 31(13), 4748-4758(2019).
- 8. K. Nakano et al.. Chem. Mater. 28(17), 6062-6067(2016).

PbVO3の圧力下巨大体積変化を活かした

負熱膨張材料の設計と分域構造の観察

「次世代機能性酸化物材料」プロジェクト 西久保 匠

1. はじめに

航空宇宙分野など温度幅の広い環境下で用いられる材 料や、半導体製造など小さな変位でも致命的となるような 分野では、熱膨張による位置決めのずれや、異種接合界面 の剥離が大きな問題となる。そのため、熱膨張を制御する 技術が求められており、多くの研究がなされている。この 熱膨張抑制技術の一つとして、負熱膨張物質の利用がある。 構造材料と混合することで熱膨張の抑制・制御ができる負 熱膨張材料は様々な産業分野での応用が期待されている」。 負熱膨張という物性は実は身近なものである。例えば、水 の固相である氷が水面に浮くことは、液相よりも固相の密 度が低く、固相から液相に相転移する際に負熱膨張を伴う ことを表している。既に応用されている負熱膨張物質とし ては、ガラスの熱膨張を補償しているβ-ユークリプタイト などが挙げられる²。この数十年で多くの負熱膨張材料が 報告されており、特にペロブスカイト構造とその関連構造 (逆ペロブスカイト、ルドルスデン・ポッパー型層状ペロ ブスカイト、ReO3 型構造など)を持つ化合物が挙げられ る。これらは、強誘電体から常誘電体への転移、金属間電 荷移動、磁気体積効果、軌道秩序転移、フレキシブルネッ トワークなど、多種多様な負熱膨張の起源を有している 3-7。中でも近年注目されているのは、相転移による大きな 体積変化を利用した材料である。相転移型負熱膨張では、 低温相と高温相の体積変化量は母物質によって決まって いるため、転移温度幅と熱膨張係数はトレードオフの関係 となる。そこで、体積変化量が大きい母物質を選んで、化 学置換で相転移温度を調整することになるが、この際、一 般に体積変化量の減少を伴ってしまう。本研究では、圧力 下で極性-非極性相転移によって体積の減少を示すペロブ スカイト酸化物 PbVO3 に着目し、最適なドープを施すこ とで巨大な体積変化量を持つ負熱膨張物質を設計した。高 圧高温下で合成されるペロブスカイト型化合物 PbVO3は、 Pb²⁺の 6s² 孤立電子対の立体障害効果および d¹ 電子配置を 持つ V⁴⁺による Jahn-Teller 効果により c/a ~1.23 という巨 大な正方晶歪みをもち、高圧下で-10.6%という非常に大き な体積減少を伴う極性正方晶(P4mm)から非極性立方晶

(*Pm-3m*) への構造相転移を示す⁸⁻¹⁰。Pb²⁺サイトへのBi³⁺ 置換によりV⁴⁺への電子ドープを行うことで、常圧下での 昇温での負熱膨張を伴う構造相転移が観測され、さらに Bi³⁺, La³⁺の両置換により、負熱膨張の動作温度を室温域ま で低減可能であることが報告されている¹¹。しかしながら、 この電子ドープは c/a の低下を招くことから体積変化量の 減少を伴うものである。そこで本研究では、Pb²⁺や Bi³⁺の 持つ 6s² 孤立電子対の量を調節することで大きな c/a を保 ちつつ温度誘起相転移を狙い、巨大な体積変化を伴う負熱 膨張物質の設計を図った。このように設計された Pb0.8Bi0.1Sr0.1VO3 において、低温相と高温相の体積差が高 圧下での体積収縮に匹敵する-11.1%となる負熱膨張を実 現した。さらに 10%以上の巨大な体積差を持つ 2 相の共 存状態の観察を、高角散乱環状暗視野走査透過電子顕微鏡 観察(HAADF-STEM)と Bragg コヒーレント X 線回折イメ ージング(Bragg-CDI)により初めて成功した。

2. 実験と結果

(1) 電子ドープおよび孤立電子対低減の寄与

V⁴⁺へ電子ドープした Pb_{1x}Bi_xVO₃、Pb²⁺の持つ 6s² 孤 立電子対の量を低減した Pb1-xSrxVO3、および両者の寄与を 併せ持つ Pb1-xLaxVO3は、キュービックアンビル型高圧装 置を用いて8万気圧・1200℃の高温高圧条件で合成した。 図 1(a)-(c)に放射光 X 線回折パターンの組成依存を、(d) には正方晶と立方晶の結晶構造を示す。電子ドープしたBi 置換試料では、極性正方晶相の001と100のピークの分裂 が置換度の増加とともに減少し、c/a 比が減少しているこ とを示している。c/a 比は Bi 置換で 1.23 から 1.07 に減少 し、x=0.3 以上で飽和している。x=0.3 付近から微量の不 純物ピークが現れ始め、x=0.4 でさらに大きくなることか ら、x=0.3 付近が溶解限界であることがわかる。0≤x≤0.4 では立方晶相への転移は見られなかった。Bi 置換と同様 に電子をドープしながら 6s² 孤立電子対の量を減らす La³⁺ 置換では、Bi置換と同様に c/a が減少していることがわか る。一方で、Sr²⁺ 置換の場合、001 ピークと 100 ピークの 位置はほとんど変わらず、x=0.18 で PbVO3の高圧安定相 である立方相への相転移が急激に起こることが確認され た。これらのことから、PbVO3の c/a は電子ドープ量によ って支配され、6s² 孤立電子対の量は相転移温度を低下さ せると考えられる。



図 1: (a-c)Pb_{1-x}M_xVO₃ (M=Bi, La, Sr)の放射光 XRD パターン。 (d)正方晶(上図)と立方晶(下図)の結晶構造。(e)c/a 比の組成変化

(2) HAADF-STEM によるドメイン境界の観察

上述の通り Sr 置換した試料では 001 と 100 のピークの 位置はほとんど変わらず、x =0.18 で正方晶から立方晶へ の転移が起こった。この系では、温度による相転移は観察 されなかったため、この温度的に安定な二相共存状態を利 用して、HAADF-STEM による原子分解能でのドメイン境 界の観察を行った。ターゲット物質として、68%が正方晶、 32%が立方晶の Pb0.82Sr0.18VO3を選択した。図 2(a) に示す HAADF-STEM 像には、相境界のような構造が確認できる。 この領域の拡大図を図 4(b)に示す。黄色の丸で示した Pb

(Sr) 原子の距離は矢印に沿って 0.45 nm であり、これが 正方晶相の c 軸方向であることがわかる。赤の破線は 90 度ドメインの境界を示している。一方、図2(c)では同一の 視野内に正方晶相と立方晶相の両方が存在している。図 2(d)および(e)に示す、図 2(c)の領域 d および e のフーリエ 変換像から、領域 d は a=0.37 nm、c=0.45 nm の正方晶相、 領域 e は a =c =0.38 nm の立方晶相であり、これらの格子 定数は、放射光 X 線回折 (SXRD) データのリートベルト 解析の結果とよく一致する。観察された立方体状の相は 001 方向から見た正方晶相である可能性もあるが、正方晶 -正方晶ドメインは前述のように 90°ドメインを形成した 方が安定なので、正方晶-立方晶の境界が観察されたと結 論づけられる。図2(f)に示すドメイン境界の拡大図から、 正方晶相と立方晶相は{110}面を共有して境界を接してい るが、{101}T面と{110}C面の間隔はそれぞれ 0.291nmと 0.262nm で 10%の差があり、10 間隔ごとに欠陥が導入さ れてミスマッチが緩和されていると推測される。図2(f)の 緑破線で示した刃状転移の余剰半面は 11 セルに 1 個の周 期で見られる。



図 2: Pb_{0.82}Sr_{0.18}VO₃の HAADF-STEM 像。(a)正方晶-正方晶境界、 (b)90°ドメイン付近の拡大図、(c)正方晶-立方晶境界、(d,e)領域 d と e での FFT パターン、(f)正方晶-立方晶境界付近の拡大図。黄 色は正方晶、赤は立方晶の Pb 原子位置、緑の破線は余剰半面を 示す。

(3) Bragg-CDI による粒子内サブミクロンドメイン の観察

Bragg-CDI はサブミクロンサイズの粒子内のドメイン 構造を3次元的に可視化する強力な手法である12,13。孤立 粒子内のドメイン構造を調べるために本手法を採用した。 図 3 (a)は、立方晶 200c の 3 次元ブラッグ回折パターンを 観察したものである。ブラッグ位置から散乱ベクトル Q200 に垂直に伸びる筋状のテールは、Q200に垂直な法線ベクト ルを持つ界面の存在を、ストリーク状のスポットの間隔 0.0045 nm⁻¹ は、粒子外径 が 220 nm であることを示して いる。これは図 3(d)に示した位相回復像のサイズと一致す る。図 3(b)は、図 3(a)の断面高速フーリエ変換(FFT)像 である。FFT 像は粒子画像の自己相関関数に相当するため、 図 3(c)に模式的に示すように、縦縞は複数の界面が平行に 存在していることを示している。前述の HAADF-STEM 像 は、Q200方向に対応している。図 3(d)は、図 3(a)のデータ を用いて位相差計算を行い、粒子の三次元像を再構成した ものである。内部の等密度面は、立方晶 200 の反射密度が 高い領域を示している。図 3(e)、(f)に示す Bragg-CDI 像の 断面図は、図3(c)に示すように、011-接続界面と平行でQ200 方向と垂直な方向から見たものである。図5(d)の水平面 における立方晶 200 の反射密度をプロットしたものが図 3(e)である。立方晶と正方晶が滑らかに接続するためには、 弾性エネルギーが最小となる {110} 接続となると考えられ る¹⁴。また、立方晶密度の高い領域に挟まれた立方晶密度



図 3: Pb_{0.82}Sr_{0.18}VO₃の Bragg-CDI (a)回折パターンと(b) FFT 像。(c)立方晶-正方晶界面の模式図。(d)粒子の位相回復 3D 像。 (e)(c)で示した段面における立方晶 200 反射密度。(f)(e)と同一面 での位相像。

(4) 11.1%の体積変化量を持つ巨大負熱膨張物質の設計

Pb1-xBixVO3と Pb1-xLaxVO3では、置換に伴う電子ドーピ ングが起こり、置換量の増加とともに c/a 比が大きく減少 する一方で、6s²孤立電子対の量が減少するのみである Pb₁xSrxVO3では、c/a比の減少は無視できる程度である。冒頭 で述べたように、c/a 比が小さいと正味の体積収縮率 (ΔV/V) が小さくなるため、大きな負熱膨張を実現するに は大きな c/a 比が必要である。大きな体積収縮率を保ちつ つ負熱膨張を実現するために、c/a が大きく、温度誘起相 転移のない Pb_{0.9}Bi_{0.1}VO₃ と Pb_{0.875}Bi_{0.125}VO₃ を選択し、Pb の Sr 置換により正方晶相の不安定化を図った。このよう に設計された Pb0.8Bi0.1Sr0.1VO3 と Pb0.775Bi0.125Sr0.1VO3 は 図 4(a), (b)に示すように加熱により2相が共存して立方晶 相へ一次相転移し、相分割率で重み付けした平均単位胞体 積は大きな体積収縮を示している。特に、Pb0.8Bi0.1Sr0.1VO3 と Pb0.775Bi0.125Sr0.1VO3 では、同じ温度での低温相と高温相 の体積差はそれぞれ 11.1%と 10.8%と非常に大きく、

PbVO3 の圧力誘起体積収縮の 10.6%に匹敵する値となっ た。結晶学的な体積変化量は 9.3%と 8.4%に達し、相転移 型負熱膨張材料の中で最も大きいものである。HAADF-STEM と Bragg-CDI 観察により、1 つの結晶粒の中に正 方晶と立方晶のドメインが共存していることが確認され たことから、加熱/冷却サイクルを繰り返すことでドメイ ン構造が変化し,温度ヒステリシスが抑制されると考えら れる。そこで、Pb0.775Bi0.125Sr0.1VO3について、5 回の加熱-冷却サイクルの XRD パターンの温度変化を測定した。大 きな体積収縮は維持され、温度ヒステリシスは 5 回目の温 度サイクルで 200 K から 150 K に減少することがわかっ た(図 4(d))。



図 4: Pb_{0.8}Bi_{0.1}Sr_{0.1}VO₃(a) と Pb_{0.775}Bi_{0.125}Sr_{0.1}VO₃(b) の 110_T、101_T、 110_C付近での放射光 XRD パターンの温度変化。Pb_{0.8}Bi_{0.1}Sr_{0.1}VO₃ (c)と Pb_{0.775}Bi_{0.125}Sr_{0.1}VO₃ (d)のユニットセル体積の温度依存。青 は正方晶、赤は立方晶、黒は加重平均を示す。Pb_{0.775}Bi_{0.125}Sr_{0.1}VO₃ は緑で示す 5 回目の加熱/冷却サイクルも合わせてプロットして いる。

3. 考察及び今後の展望

本研究では d¹ 電子配置に起因する d_{sv} 軌道秩序による 大きな正方晶歪み (*c/a*=1.23)を持つ PbVO₃に対して、電 子ドープと 6s² 孤立電子対の減少の影響を明らかにし、巨 大な体積変化量をもつ負熱膨張物質を設計した。電子ドー プは *c/a* 比を減少させ、6s² 孤立電子対の提言は立方晶相 への転移を誘起することが判明し、これらの知見から、 9.3%の巨大な体積収縮を伴う負熱膨張を実現した。さらに 10%以上の巨大な体積差を持つ 2 相の共存状態の観察を、 HAADF-STEM と Bragg-CDI により初めて成功した。これ らの知見は、新しい巨大な負熱膨張材料の設計に道を開く ものである。今後は温度変化によるドメイン構造の変化と、 それが特性にどのように寄与するかを詳細に調査するこ とが求められる。

【参考文献】

- 1. Takenaka, K. Negative Thermal Expansion Materials: Technological Key for Control of Thermal Expansion. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2012, *13* (1), 013001.
- 2. Schulz, H. Thermal Expansion of Beta Eucryptite. J. Am. Ceram. Soc.1974, 57 (7), 313–318.
- Azuma, M.; Chen, W.; Seki, H.; Czapski, M.; Olga, S.; Oka, K.; Mizumaki, M.; Watanuki, T.; Ishimatsu, N.; Kawamura, N. Colossal Negative Thermal Expansion in BiNiO₃ Induced by Intermetallic Charge Transfer. *Nat. Commun.* 2011, 2, 347.
- Takenaka, K.; Takagi, H. Giant Negative Thermal Expansion in Ge-Doped Anti-Perovskite Manganese Nitrides. *Appl. Phys. Lett.* 2005, 87 (26), 261902.
- Long, Y. W.; Hayashi, N.; Saito, T.; Azuma, M.; Muranaka, S.; Shimakawa, Y. Temperature-Induced A–B Intersite Charge Transfer in an A-Site-Ordered LaCu3Fe4O12 Perovskite. *Nature* 2009, *458*, 60.
- Greve, B. K.; Martin, K. L.; Lee, P. L.; Chupas, P. J.; Chapman, K. W.; Wilkinson, A. P. Pronounced Negative Thermal Expansion from a Simple Structure: Cubic ScF₃. *J.e Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 15496–15498.
- Takenaka, K.; Okamoto, Y.; Shinoda, T.; Katayama, N.; Sakai, Y. Colossal Negative Thermal Expansion in Reduced Layered Ruthenate. *Nat. Commun.* 2017, *8*, 14102.
- Belik, A. A.; Azuma, M.; Saito, T.; Shimakawa, Y.; Takano, M. Crystallographic Features and Tetragonal Phase Stability of PbVO3, a New Member of PbTiO3 Family. *Chem. Mater.* 2005, *17* (2), 269–273.
- Shpanchenko, R. V.; Chernaya, V. V.; Tsirlin, A. A.; Chizhov, P. S.; Sklovsky, D. E.; Antipov, E. V.; Khlybov, E. P.; Pomjakushin, V.; Balagurov, A. M.; Medvedeva, J. E. Synthesis, Structure, and Properties of New Perovskite PbVO3. *Chem. Mater.* 2004, *16* (17), 3267–3273.
- 10.Oka, K.; Yamauchi, T.; Kanungo, S.; Shimazu, T.; Oh-ishi, K.; Uwatoko, Y.; Azuma, M.; Saha-Dasgupta, T. Experimental and Theoretical Studies of the Metallic Conductivity in Cubic PbVO3 under High Pressure. *J. Phys. Soc. Jpn.* 2018, *87* (2), 024801.
- Yamamoto, H.; Imai, T.; Sakai, Y.; Azuma, M. Colossal Negative Thermal Expansion in Electron-Doped PbVO3 Perovskites. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, *57* (27), 8170– 8173.
- 12.Ohwada, K.; Sugawara, K.; Abe, T.; Ueno, T.; Machida, A.; Watanuki, T.; Ueno, S.; Fujii, I.; Wada, S.; Kuroiwa, Y. Development of an Apparatus for Bragg Coherent X-Ray Diffraction Imaging, and Its Application to the Three Dimensional Imaging of BaTiO₃ nano-Crystals. *Japanese J. Appl. Phys.*2019, *58* (SL), SLLA05.
- 13.Oshime, N.; Ohwada, K.; Sugawara, K.; Abe, T.; Yamauchi, R.; Ueno, T.; Machida, A.; Watanuki, T.; Ueno, S.; Fujii, I.; Wada, S.; Sato, R.; Teranishi, T.; Yamauchi, M.; Ishii, K.; Toyokawa, H.; Momma, K.; Kuroiwa, Y. Bragg Coherent Diffraction Imaging Allowing Simultaneous Retrieval of Three-Dimensional Shape and Strain Distribution for 40– 500-Nm Particles. *Jap. J. Appl. Phys.*2021.
- 14.Cao, W.; Cross, L. E. Theory of Tetragonal Twin Structures in Ferroelectric Perovskites with a First-Order Phase

Transition. Phys. Rev. B 1991, 44 (1), 5-12.

業績

【原著論文】

- Marin Katsumata、Kei Shigematsu、Takuma Itoh、 Haruki Shimizu、Keisuke Shimizu and Masaki Azuma、 Stabilization of correlated ferroelectric and ferromagnetic domain structures in BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ films、Applied Physics Letters (Vol.119)、(2021)
- Takahiro Ogata, Yuki Sakai, Takumi Nishikubo, Takashi Mizokawa, Masaichiro Mizumaki, Koomok Lee, Qiumin Liu and Masaki Azuma, Intermetallic Charge Transfer in V-Substituted PbCrO₃, Inorganic Chemistry (Vol.60 No.13), (2021)
- Masaki Azuma, Hajime Hojo, Kengo Oka, Hajime Yamamoto, Keisuke Shimizu, Kei Shigematsu, Yuki Sakai, Functional Transition Metal Perovskite Oxides with 6s² Lone Pair Activity Stabilized by High-Pressure Synthesis, Annual Review of Materials Research (Vol.51), (2021)
- Keisuke Shimizu, Hajime Hojo and Masaki Azuma, Enhanced Piezoelectric Response in Orientation-Controlled BiFe_{1-x}Ga_xO₃ Thin Films with Polarization Rotation, ACS Applied Electronic Materials (Vol.3 No.10), (2021)
- Lei Hu, Yingcai Zhu, Yue-wen Fang, Masayuki Fukuda, Takumi Nishikubo, Zhao Pan, Yuki Sakai, Shogo Kawaguchi, Hena Das, Akihiko Machida, Tetsu Watanuki, Shigeo Mori, Koshi Takenaka and Masaki Azuma, Origin and Absence of Giant Negative Thermal Expansion in Reduced and Oxidized Ca₂RuO₄, Chemistry of Materials (Vol.33 No.19), (2021)
- Hajime Yamamoto, Haruna Aizawa, Ikuya Yamada, Kaoru Toda, Atsushi Tanaka, Masaki Azuma, Yuki Sakai, Takumi Nishikubo and Hiroyuki Kimura, Crystal Structures and Electronic States of High-Pressure-Synthesized (1-*x*)PbVO₃-*x*BiCrO₃ Solid Solutions, Journal of Asian Ceramic Societies (Vol.9 No.3), (2021)
- Kazumasa Miyazaki, Masayuki Ochi, Takumi Nishikubo, Jinya Suzuki, Takashi Saito, Takashi Kamiyama, Kazuhiko Kuroki, Takafumi Yamamoto, and Masaki Azuma, High-Pressure and High-Temperature Synthesis of Anion-Disordered

Vanadium Perovskite Oxyhydrides、Inorganic Chemistry (Vol.60 No.20)、(2021)

- Takuma Itoh, Marin Katsumata, Kei Shigematsu, and Masaki Azuma, Control of ferroelectric and ferromagnetic domains in BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ thin films by utilizing trailing fields, Applied Physics Express (Vol.15 No.2), (2022)
- Shogo Wakazaki, Liu Qiumin, Randy Jalem, Takumi Nishikubo, Yuki Sakai, Naoki Matsui, Guowei Zhao, Kota Suzuki, Kei Shigematsu, Takafumi Yamamoto, Ryoji Kanno, Hena Das, Yoshitaka Tateyama and Masaki Azuma, High-Pressure Synthesis and Lithium Ionic Conduction of Li₄OBr₂ Derivatives with a Layered Inverse-Perovskite Structure, Chemistry of Material (Vol.33 No.23), (2021)
- Zhao Pan, Takehiro Koike, Takumi Nishikubo, Lei Hu, Qiumin Liu, Yuki Sakai, Shogo Kawaguchi, Masaki Azuma, Realization of Negative Thermal Expansion in Lead-Free Bi_{0.5}K_{0.5}VO₃ by the Suppression of Tetragonality, Inorganic Chemistry (Vol.61 No.28), (2022)
- Jianfa Zhao、Xiao Wang、Xi Shen、Christoph J Sahle、Cheng Dong、Hajime Hojo、Yuki Sakai、 Jun Zhang、Wenmin Li、Lei Duan、Ting-Shan Chan、Chien-Te Chen、Johannes Falke、Cheng-En Liu、Chang-Yang Kuo、Zheng Deng、Xiancheng Wang、Richeng Yu、Runze Yu、Zhiwei Hu、 Martha Greenblatt、Changqing Jin、Magnetic Ordering and Structural Transition in the Ordered Double-Perovskite Pb₂NiMoO₆、Chemistry of Materials (Vol.34 No.1)、(2022)
- Zhao Pan, Yue-Wen Fang, Takumi Nishikubo, Lei Hu, Shogo Kawaguchi, Masaki Azuma, Tolerance Factor Control of Tetragonality and Negative ThermalExpansion in PbTiO₃-Based Ferroelectrics, Chemistry of Materials, [Online early access] DOI: 10.1021/acs.chemmater.2c00076, (2022)

【口頭発表】

 Kei Shigematsu, Masaki Azuma, Direct Observation of Magnetization Reversal by Polarization Switching in Multiferroic Cobalt-Substituted Bismuth Ferrite Thin Film、8th International Congress on Ceramics(ICC8)、 2021 年 4 月 25 日

- Takuma Itoh、Marin Katsumata、Kei Shigematsu、 Masaki Azuma、Control of ferromagnetic and ferroelectric domains in BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ thin films by utilizing trailing fields、International Symposium on Applications of Ferroelectrics (ISAF2021)、2021年5 月 21 日
- Lei Hu、Koshi Takenaka 、 Masaki Azuma、Origin and Absence of Giant Negative Thermal Expansion in Ca₂RuO₄、 The Twelfth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC12)、2021 年 7 月 7 日
- Masaki Azuma、Giant Negative Thermal Expansion Materials Derived from Pressure Induced Phase Transitions、10th Asian Conference on High Pressure Research(ACHPR-10)、2021年11月23日
- Kei Shigematsu、Keita Ozawa、 Marin Katsumata、 Masaki Azuma、Observation of ferroelectric and ferromagnetic domains of BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ nanodot array by using anodic porous alumina mask、MATERIALS RESEARCH MEETING(MRM)2021、2021 年 12 月 15 日
- 東正樹、Co置換 BiFeO3 薄膜における電場印加磁化 反転、ナノ学会第 19 回大会、2021 年 5 月 22 日
- 伊藤拓真、勝俣 真綸、重松 圭、東 正樹、強誘電 性・強磁性が共存する BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ 薄膜の trailing field を用いたドメイン制御、強誘電体会議 FMA、 2021 年 6 月 1 日
- 東 正樹、巨大負熱膨張材料を用いた熱膨張制御、 ニューセラミックス懇話会 第245回研究会、2021 年8月31日
- 木原 汐里(酒井 雄樹、東 正樹、西久保 匠、若崎 翔吾)、ペロブスカイト Bi0.5Pb0.5MO3(M=3d 遷移金 属)の電荷分布変化、日本セラミックス協会秋季シ ンポジウム、2021 年 9 月 2 日
- Koomok Lee、重松圭、東正樹、酸化物基板上への InSb エピタキシャル薄膜の製作、応用物理学会秋季 学術講演会、2021 年9月12日
- 西久保 匠、酒井 雄樹、水牧 仁一朗、今井 孝、東 正樹、巨大な体積変化を伴う負熱膨張物質の設計、
 第62回高圧討論会、2021年10月19日

- 東 正樹、西久保 匠、酒井 雄樹、山本 孟、岡 研 吾、Bi、Pb-3d 遷移金属ペロブスカイトの圧力誘起 相転移と負熱膨張、第 62 回高圧討論会、2021 年 10 月 20 日
- 伊藤 拓真、勝俣 真綸、 重松 圭、東 正樹、マル チフェロイック BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ 薄膜における trailing field を用いた強誘電性・強磁性ストライプドメイン 形成と制御、粉体粉末冶金 2021 年度秋季大会、 2021 年 11 月 9 日
- 重松 圭、西久保 匠、酒井 雄樹、東 正樹 、清水 啓佑、山本 一理、Nikoleav Sergey、Hena Das、室温 フェリ磁性体四重ペロブスカイト CeCu₃Mn₄O₁₂薄膜 の垂直磁化、粉体粉末冶金 2021 年度秋季大会、 2021 年 11 月 9 日
- 東 正樹、岡 研吾、山本 孟、 酒井雄樹、巨大 負熱膨張材料の研究、粉体粉末冶金 2021 年度秋季 大会、2021 年 11 月 9 日
- 西久保 匠、酒井 雄樹、Lalitha K.V.、Jürgen Rödel、 東 正樹、分極・歪みによる BiInO₃-BiZn_{1/2}Ti_{1/2}O₃の 負熱膨張と強弾性の制御、日本結晶学会令和 3 年度 年会、2021 年 11 月 20 日
- 酒井雄樹、松野夏奈、西久保匠、森茂生、中島宏、 久留島康輔、町田晃彦、綿貫徹、東正樹、PbCrO3
 の立方晶—立方晶転移における局所構造の変化、日本結晶学会令和3年度年会、2021年11月19日
- 18. 鈴木仁哉、西久保匠、酒井雄樹、Pan Zhao、齋藤寛 之、東正樹、山本隆文、フラックスを用いたバナジ ウム酸水素化物の高圧合成と反応経路のその場観 察、日本セラミックス協会 第 60 回基礎科学討論 会、2022 年1月9日
- 19. 長瀬 鉄平、西久保 匠、重松 圭、東 正樹、山本 隆文、壬生 攻、南部 雄亮、池田 陽一、松田 雅 昌、(111)面に酸素欠損が秩序化したペロブスカイト 型酸化物の合成・同定、日本セラミックス協会 2022 年年会、2022 年 3 月 10 日
- 西久保 匠、今井 孝 、酒井 雄樹 、水牧 仁一 朗 、大和田 謙二 、町田 晃彦 、綿貫 徹 、押目 典宏 、島田 歩 、菅原 健人 、久留島 康輔 、森 茂生 、溝川 貴司 、東 正樹、PbVO3 の圧力下巨 大体積変化を活かした負熱膨張設計と分域構造の観 察、日本物理学会第 77 回年次大会、2022 年 3 月 16 日

- 酒井雄樹、木原汐里、若崎翔吾、西久保匠、福田真 幸、水牧仁一郎、東正樹、ペロブスカイト型酸化物 Bi0.5Pb0.5MO3(M=3d 遷移金属)の電荷分布変化、日本 物理学会第77回年次大会、2022年3月16日
- Koomok Lee、Hena Das、 Kei Shigematsu、 Masaki Azuma、Theoretical investigations of the canted antiferromagnetism in Co doped BiFeO₃、第 69 回応用 物理学会春季学術講演会、2022 年 3 月 22 日
- 伊藤 拓真、重松 圭 、東 正樹、Water printing に よる マルチフェロイック BiFe_{0.9}Co_{0.1}O₃ 薄膜の面外 分極反転と強誘電性・強磁性 ドメイン制御、第 69 回応用物理学会春季学術講演会、2022 年 3 月 25 日

【特許】

(1)国内特許出願 2件

研究報告2022 目次 【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

•	▶総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	68
•	▶マイクロニードル融合型デバイスのリアルタイム機能評価と穿刺性評価法の確立・・・・・・・・	71
•	▶複数のすい臓がん幹細胞の標的化に向けたボロン酸リガンドによるpH依存的な・・・・・・・・・	73
	糖鎖末端シアル酸認識	
•	Porous Microneedles filled with a Glucose-responsive Hydrogel for Self-Regulated ······	76
	Insulin Delivery	
•	▶業績・・・・・	78

「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 一切用いない上記目的のインスリン供給機構を実証してきた。本プロジェクトでは、究極的な低侵襲性を 志向したマイクロニードル融合型(「貼るだけ人工膵臓」)デバイスの開発を進めている。生活習慣病を中 心とする非感染性疾患(non-communicable disease: NCD)は世界の医療費の43%を占め、2020年には60% に増加するとともに、全死亡の73%に関与すると予測されている。世界に類を見ない速度で高齢化が進行 する本邦では、糖尿病等の生活習慣病が国民医療費の約 15%、死亡数割合では約 30%を占める。「貼るだ け人工膵臓」の技術は、糖尿病治療におけるアンメットメディカルニーズ(長期的な血糖管理、低血糖の 回避、患者負担の軽減)を解決し、「健康寿命」と「平均寿命」の差"ゼロ"の実現を図る革新的な医療技 術として期待される。

1. 2021 年度の研究目的

(1) 製造プロセスの最適化とプロトタイプの開発

共同研究先企業と協議の上、マイクロニードルの製造方 法としては、量産性に優れた光重合方式にフォーカスして いる。中心的な課題は、「刺入性」、「放出特性」、「製造効 率」の全てを高次に満足する製造プロセスの開発である。 この目的のため、ゲル重合時の反応条件を最適化するとと もに、これまでに開発してきた被覆剤や添加材等を利用し て取り組むこととした。

(2) 次世代型徐放性マクロニードル材料および製造 プロセスの開発

デバイスからのインスリン放出性能を最大化すること が、デバイスの小型化と持続性の延長につながる。ゲルマ イクロニードルでは一般に、低密度化するほど薬物放出性 能が向上するが、力学的特性の維持には不利となる。この ような二律背反の命題を解決する一つのアプローチとし て、スマートゲル内包多孔質 MNs を検討した。具体的に は、マイクロニードル先端部でインスリン拡散制御を担う ゲル成分と力学的強度を補強する成分との相分離構造を 高次に制御することで目的の材料とし、その製造プロセス を最適化した。力学的に強固かつインスリンの拡散性を妨 げない共連続構造のマトリックスを活用し、機能部位(ゲ ルニードル)との層構造とすることで、ニードルー本単位 で均一かつ十分な加圧が可能な構造とする。本検討は、イ ンスリンデリバリーにとどまらず、ワクチン等他の薬剤の 経皮的デリバリーにおけるアンメットニーズ解決を見据 えたものである。

(3) ボロン酸によるシアル酸認識を利用したがん幹 細胞標的化のための分子技術の検討

シアル酸(Neu5Ac)は、細胞糖鎖中に最も高頻度かつ糖 鎖末端に多く存在し、その動態は、発生、分化、疾病等の 細胞現象と関連している。特に、がん細胞、高転移性のが ん細胞、がん幹細胞(Cancer Stem Cells: CSCs) 表面におい ては、ほぼ普遍的に過剰発現することが知られる。シアル 酸は正常組織にも存在するため、シアル酸ターゲティング を実現するためには、腫瘍内で特異的に活性化されるよう な戦略的設計が必要である。ボロン酸は、グルコースに限 らず多様な生体分子と相互作用し、その強度と選択性は合 成化学的に可変である。シアル酸に対する人工リガンドと して用いることもできる。我々は、ピリジル系へテロ環含 有ボロン酸誘導体の一種(5-boronopicolinic acid (5-BPA)) が、従来知られる水準と比べて数十倍強力かつ選択的にシ アル酸と結合し、さらに、この挙動は腫瘍内低酸素環境に 特徴的な弱酸性条件下においてのみ顕在化し、生理的条件 下(pH7.4)では完全に失効することを発見していた^{1,2)}。 そこで、膵臓がん幹細胞亜集団に対する並列的標的化を果

たす分子技術への展開妥当性について検討した。

2. 2021 年度の研究成果

(1) リアルタイム機能評価と穿刺性評価法の確立

2021 年度までに、テレメトリーシステムを導入し、ラットの血糖値をストレスフリーに 24 時間リアルタイムにモニタリングできるシステムを確立していた。今年度は、血糖日内変動の把握に加え、日常診療で一般的に行われているインスリン間欠投与による糖尿病治療を再現し、テレメトリーシステムにより観測する手技を確立した。

本デバイスが十分な効果を発揮するには、表皮バリアを 破って留置されるマイクロニードルの表面積が十分に確 保される必要があり、穿刺性の向上が重要な課題である。 そこで、種々形状のマイクロニードルを用いて皮膚の穿刺 性や肉眼的な変化を比較検討した(図1)。SD ラットの皮 膚にデバイスを貼付し、すぐに剥がして1時間後まで観察 した。その結果、いずれのデバイスも明確な穿刺痕が観察 され、1時間後には概ね消失することが確認された。肉眼 的所見に加えて、角質や上皮のバリア機能を反映する水分 蒸散量 TEWL (transepidermal water loss) を計測すること で、マイクロニードル穿刺性(数・深さ)の数値化を試み た 3,4)。マウスに対してデバイスを貼付し、その前後で TEWL を測定した。その結果、穿刺の程度(数・深さ)応 じてこれが再現性良く上昇したことから、TEWL 計測系に より、穿刺性を「面」として連続評価することの妥当性が 示された。



図1:針長による穿刺性の違い.

(2) 次世代型徐放性マイクロニードル材料および製造プロセスの開発デバイス

我々の開発したマイクロニードル (MN) では、週レベ ルでの安定性およびインスリン放出持続性を確認してい るが、ゲルマイクロニードル一般において、力学的強度と



図 2: PES ハイブリッド型 MN.

薬剤放出能の両立が課題である。また近年、インスリンデ リバリーに関わらず、免疫治療の分野で除法型 MN に対す るニーズが高まっている。我々は、これらの課題に対し、 いくつかのアプローチ (ボトムアップ及びトップダウン成 型法)により多孔性 MN 製造技術の開発に取り組んでい る。ここでは、2021年度に特許出願を果たしたボトムアッ プ型成型法の一例について述べる。貧溶媒中での相分離を 介して多孔質構造を形成するポリエーテルスルホン (PES) を用いて力学的特性の優れた多孔質 MN (PES MNs) を作 製し、薬剤放出能の高い低密度ボロン酸ゲルを PES MNs に添加し、皮膚刺入後にインスリン放出できるハイブリッ ド型 MNs (Hybrid MNs) を検討した (図 2)。 調製した PES MNsの表面構造を SEM 観察したところ、多数の空隙が確 認され、ベンゼン中での PES の相分離に伴う多孔質構造 の形成が確認された。また、PES の相分離速度の制御に向 けて PES 濃度とベンゼン濃度を最適化することで、PES MNs のニードル部分の成形性が高まった。その後、PES MNs 表面の親水化およびボロン酸モノマー含有プリゲル 溶液の添加により Hybrid MNs を作製し、最大応力をボン ドテスターにより評価したところ、ボロン酸ゲルと多孔質 PES のハイブリッド化により力学的特性が大幅に向上し た。ここで、乾燥前後の Hybrid MNs に関して最大応力が 変化しなかったことから、内包したゲルの水和率に依存す ることなく力学的強度が維持されることを確認した。その 結果、マウス皮膚に対して優れた刺入性を示した。さらに、 異なるグルコース濃度における Hybrid MNs からの蛍光標 識インスリンの放出を共焦点顕微鏡により評価したとこ ろ、グルコース依存的なインスリン放出も確認された。以 上より、力学的強度と薬剤放出能を両立した Hybrid MNs の妥当性を示した。

(3) 複数のすい臓がん幹細胞の標的化に向けたボロン酸リガンドによる pH 依存的な糖鎖末端シアル酸 認識の実証

ボロン酸リガンドの重要な利点の一つに、シアリル化に 依存する複数タイプのエピトープ(CSCの亜集団)を並列 的に標的可能なことが挙げられる。実際、このような複数 のエピトープが発現する事象は、膵臓 CSC において知ら



図3ボロン酸による CSC ターゲティング.

れている。なお、抗体リガンドではこれらを独立に標的す る必要がある。本研究では、まずフローサイトメトリーに より、すい臓がん CSCs のバイオマーカーである CD44 や CD133と、糖鎖末端シアル酸との交差性を確認した。つい で、5-BPAと蛍光物質のコンジュゲートを合成し、すい臓 がん細胞表面シアル酸の標的能およびCD44陽性細胞群お よび CD133 陽性細胞群への取り込み量を評価した。その 結果、BPA コンジュゲートがすい臓がん細胞へ pH 依存的 に取り込まれ、さらに、複数のすい臓がん CSCs を同時に 標的化できることが明らかになった。さらにこの傾向は、 弱酸性化条件下でより顕著となった⁵⁾。これらの結果は、 低酸素および酸性の腫瘍微小環境に存在する複数の CSCs の標的化におけるボロン酸リガンドの化学構造制御の重 要性を明らかにし、難治性すい臓がんの治療を目指した有 効なアクティブターゲティングシステムの開発をさらに 促進するものである。

【参考文献】

- Alexander H, Brown S, Danby S, Flohr C. Research techniques made simple: transepidermal water loss measurement as a research tool. J Invest Dermatol 138: 2295-2300, 2018.
- 2. 太田広毅. 皮膚バリア機能評価の現状と最新型 TewameterTMHex. COSMETIC STAGE vol. 12, 2020.
- Matsumoto, A.; Stephenson-Brown, A. J.; Khan, T.; Miyazawa, T.; Cabral, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., Heterocyclic boronic acids display sialic acid selective binding in a hypoxic tumor relevant acidic environment. Chemical Science 2017, 8 (9), 6165-6170.
- Khan, T.; Igarashi, K.; Tanabe, A.; Miyazawa, T.; Fukushima, S.; Miura, Y.; Matsumoto, Y.; Yamasoba, T.; Matsumoto, A.; Cabral, H.; Kataoka, K., Structural Control of Boronic Acid Ligands Enhances Intratumoral Targeting of Sialic Acid To Eradicate Cancer Stem-like Cells. ACS Applied Bio Materials 2020, 3 (8), 5030-5039.
- Miyazaki, T.; Khan, T.; Tachihara, Y.; Itoh, M.; Miyazawa, T.; Suganami, T.; Miyahara, Y.; Cabral, H.; Matsumoto, A., Boronic Acid Ligands Can Target Multiple Subpopulations of Pancreatic Cancer Stem Cells via pH-Dependent Glycan-Terminal Sialic Acid Recognition. ACS Applied Bio Materials 2021, 4 (9), 6647-6651.

マイクロニードル融合型デバイスのリアルタイム機能評価

と穿刺性評価法の確立

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

伊藤 美智子

1. はじめに

本プロジェクトで取り組んでいる「貼るだけ人工膵臓」 は、マイクロニードルの針自体にグルコール応答性を持 たせ、皮膚に貼付するだけでインスリンが分泌される画 期的なデバイスである。これまでに開発されているマイ クロニードルは皮膚に刺入後、溶解・吸収されるタイプ のものであったが、本プロジェクトで目指すマイクロニ ードルは皮膚留置型で長期間にわたって効果を発揮する という挑戦的な取り組みである。生体内での効果を期待 できるゲルの組成や基本的な構造が確立しつつあり、今 年度は今後のスケールアップと安定性向上に必要な基礎 データの取得に取り組んだ。

2. 実験と結果

テレメトリーシステムを用いた血糖モニタリング

昨年度テレメトリーシステムを導入し、ラットの血糖 値をストレスフリーの状態で24時間リアルタイムにモニ タリングできるシステムを確立した。血糖日内変動の把 握に有用であることは既に確認できているため、今年度 はデバイスの機能評価に先立ち、日常診療で一般的に行 われているインスリン間欠投与による糖尿病治療を再現 し、テレメトリーシステムによる観察を行った。具体的 には、ストレプトゾトシン(STZ)を用いて1型糖尿病モ デルを作成し、テレメトリーを装着の上、即効型ヒトイ ンスリン製剤 Humulin R を間欠的に皮下投与した。

STZ 投与によってラットの血糖値は 400 から 600 mg/dl に上昇していたが、Humulin R 投与後に血糖値が 200 mg/dl 程度まで低下し、その後の元に戻る過程が観察され



図1. STZラットへのインスリン間欠的投与による血糖値変化例

た(図 1)。また、STZ 投与ラットを絶食下におき、再摂 食させると血糖上昇が認められ、再摂食前に Humulin R を投与することで血糖上昇が抑制されることを確認した (図 2)。今後、マイクロニードルデバイスを用いて同様 の実験を実施し、ゲルから放出されたインスリンによる 血糖コントロール効果を検討していく。



図2. STZラットへのインスリン単回投与のタイミング と血糖値変化

(2) マイクロニードル皮膚穿刺性の評価

本デバイスが十分な効果を発揮するには、表皮バリア を破って留置されるマイクロニードルの表面積が十分に 確保される必要があり、穿刺性の向上が重要な課題であ る。また、本デバイスは最大 1 週間の連続使用を予定し ているため、かぶれや痒みなど皮膚の恒常性に及ぼす影 響も考慮する必要がある。本年度は異なる形状のマイク ロニードルを用いて皮膚の穿刺性や肉眼的な変化を比較 検討した。マイクロニードルの針長はヒトにおいて痛点 に届かないことを企図して、1 mm 長のモールドを使用し ていたが、マイクロニードル成形中に 20-30%程度短縮す るため、2 mm 長のモールドについても評価を行った。 SD ラットの皮膚にデバイスを貼付し、すぐに剥がして 1 時間後まで観察した。その結果、いずれのデバイスも明 確な穿刺痕が観察され、1 時間後には概ね消失すること
が分かった(図3)。病理組織像を観察すると、1mmモー ルドタイプでは表皮の陥凹はあるものの、必ずしも表皮 を穿破していない部分が多く、2mmモールドタイプの方 が真皮まで確実に穿刺されていることが明らかになった (図3)。針長が長くなることで強度が不十分になったり、 皮膚に垂直に刺さりにくくなるといった問題があり、刺 入性と有効面積のバランスを慎重に検討する必要がある。



図3. 針長による穿刺性の違い

肉眼的所見では穿刺痕の数を根拠に判断するが、穿刺の 深さについては評価できないこと、また病理組織像では 切片上に捉えられる穿刺部位がごく限られることに加え、 評価に時間がかかるという問題点がある。そこで、角質 や上皮のバリア機能を反映する水分蒸散量 TEWL (transepidermal water loss)を計測することで、マイクロ ニードル穿刺性(数・深さ)の数値化を試みた^{1,2)}。マウ スに対してデバイスを貼付し、その前後で TEWL を測定 した。正常な皮膚では10-20 g/m²/h 程度が基礎値となるが、 マイクロニードルの穿刺によってその数値が上昇し、ニ



TEWL +38.09 (単位:g/m²/h) 図4. マイクロニードル刺入効率と皮膚水分蒸 散量(TEWL)の変化 マイクロニードル貼付前後で比較 ードル欠損のために穿刺痕が少ない場合には上昇は軽度 にとどまっていた(図 4)。また、マイクロニードルを除 去して1時間後には穿刺痕の消失とともに TEWL 値の低 下が認められた(図 5)。TEWL 計測計を用いることで、 穿刺性を面として評価することが可能になると考えられ た。一方で、マウスでは除毛によって皮膚の乾燥とバリ ア機能の破綻が誘導されてしまうため、除毛してから長 時間経過後に健常部位と穿刺部位を比較することが難し く、短時間での貼付前後での比較が適していると考えら れた。



(単位:g/m²/h)



3. 考察及び今後の展望

これまでに基本的なゲル組成は検討が終了しており、 現在はマイクロニードルデバイスの形状について、強度 の確保、有効面積を確保するための針長の調整、インス リン浸透性の改善、微細な亀裂からのインスリン漏出防 止といった改良に取り組んでいる。血糖値は摂食や運動 によって大きな日内変動があるが、テレメトリーシステ ムの確立によって、デバイスの性能を詳細に評価できる 準備が整った。血糖値あるいはインスリン値といったア ウトプットに加えて、組織学的解析および TEWL によっ て局所の情報を得ることで、新規デバイスの性能を正確 に捉え、生体において十分な治療効果を発揮できるデバ イスの確立を加速化させたいと考えている。

【参考文献】

- Alexander H, Brown S, Danby S, Flohr C. Research techniques made simple: transepidermal water loss measurement as a research tool. J Invest Dermatol 138: 2295-2300, 2018.
- 2. 太田広毅. 皮膚バリア機能評価の現状と最新型 TewameterTMHex. COSMETIC STAGE vol. 12, 2020.

複数のすい臓がん幹細胞の標的化に向けた

ボロン酸リガンドによる pH 依存的な糖鎖末端シアル酸認識

1. はじめに

がん幹細胞 (CSCs) は、がんの発生や転移に関与してい ることから、がんの根治に向けては CSCs の標的化が必要 である^{1,2}。一方で、CD133 などの膜タンパク質が CSCs の バイオマーカーとして同定されており、抗 CD133 抗体に 抗がん剤を導入した抗体薬物複合体による CSCs の標的化 および治療効果の増大が確認されている³。しかしながら、 CD133 などのバイオマーカーは正常組織においても発現 しており、正常組織に対する毒性が課題である⁴。

一方で、細胞表面の糖鎖末端シアル酸の標的化に向けて ボロン酸リガンドの開発が進められている 5-8。これまで に、5-boronopicolinic acid (5-BPA) が pH 依存的にシアル 酸に結合することを見出しており、正常 pH (pH 7.4) にお いてはシアル酸に対する結合定数が低い一方で、腫瘍内 pH (pH 6.5) においてはシアル酸に強く結合することを確 認している⁹。また、5-BPA をダハプラチン内包高分子ミ セルの表面に搭載することで、ミセルの正常組織への集積 を抑制しながら、乳がん腫瘍への集積性を高め、特に、 CD44 発現 CSCs 標的能を向上させた¹⁰。しかしながら、 すい臓がんなどの難治性がん CSCs においては CD44¹¹や CD133^{12, 13} などの複数の抗原を発現していることが知ら れており、5-BPAのすい臓がん CSCsの標的能は不明であ る。そこで、本研究では、すい臓がん CSCs のバイオマー カーである CD44 や CD133 と、糖鎖末端シアル酸との交 差性を確認し、蛍光標識 5-BPA のすい臓がん細胞表面シ アル酸の標的能および CD44 陽性細胞群および CD133 陽 性細胞群への取り込み量を評価した(図1)。



2. 実験と結果

 シアル酸陽性すい臓がん細胞における CD44、 CD133 の発現性の評価 「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト宮崎 拓也

すい臓がん CSCs のバイオマーカーである CD44 や CD133 と、糖鎖末端シアル酸との交差性を評価するため に、すい臓がん BxPC-3 細胞に Alexa647 標識抗 CD44 抗 体、Alexa647 標識抗 CD133 抗体および FITC 標識 Sambucus Nigra (SNA) を添加し、フローサイトメトリー法により Alexa647 および FITC を発現する細胞群を同定した。ここ で、SNA は糖鎖末端シアル酸に結合することが知られて おり、シアル酸陽性細胞群の同定に用いた。その結果、 CD44 陽性およびシアル酸陽性の細胞群が 12.5%である一 方で、CD44 陽性およびシアル酸陰性の細胞群が 0.36%で あることから、ほぼ全ての CD44 陽性細胞群がシアル酸を 発現していることが明らかとなった(図2)。また、CD133 に関しても CD44 と同様の傾向が確認され、ほぼ全ての CD133 陽性細胞群がシアル酸を発現していることが明ら かとなった(図2)。よって、シアル酸を標的化すること により、CD44陽性すい臓がん細胞とCD133陽性すい臓が ん細胞を同時に標的化できることが示唆された。



図 2 : すい臓がん BxPC-3 細胞における CD44、CD133 およびシ アル酸陽性細胞群の同定

(2) すい臓がん細胞における 5-BPA のシアル酸標的 能の評価

5-BPA のすい臓がん細胞への pH 依存的な取り込みを評 価するために、すい臓がん BxPC-3 細胞にローダミン標識 5-BPA を添加し、共焦点顕微鏡法により細胞内に取り込ま れた 5-BPA を観察した。ここで、シアル酸標的能および pH 応答能の無い Phenylboronic acids (PBA) をコントロー ルとした。その結果、PBA が pH 7.4 および pH 6.5 におい て低い取り込み量を示した一方で、5-BPA は pH 6.5 にお いて pH 7.4 の約 4 倍の取り込み量を示した(図 3)。また、 細胞表面のシアル酸を分解するシアリダーゼを添加した ところ、5-BPA の取り込み量が減少したことから、5-BPA はシアル酸への結合を介して BxPC-3 細胞に取り込まれて いることが示唆された(図 3)。このシアル酸を介した 5-BPA の細胞取り込みは、pH 6.5 において 5-BPA と SNA が 共局在していることからも示唆された(図 3)。よって、 臨床での腫瘍を反映した細胞株である BxPC-3 細胞におい ても、5-BPA が細胞表面のシアル酸を pH 依存的に標的化 できることが示された。



図 3: すい臓がん BxPC-3 細胞に対する PBA、5-BPA の取り込 みおよび SNA との局在

(3) すい臓がん細胞における 5-BPA の CD44/CD133陽性細胞群標的能の評価

5-BPA の CD44/CD133 陽性すい臓がん細胞への pH 依存 的な取り込みを評価するために、すい臓がん BxPC-3 細胞 にローダミン標識 5-BPA、Alexa647 標識抗 CD44 抗体およ び Alexa647 標識抗 CD133 抗体添加し、フローサイトメト リー法によりローダミンおよび Alexa647 を発現する細胞 群を同定した。その結果、PBA が pH 6.5 において低い取 り込み量を示した一方で、5-BPA は pH 6.5 において CD44/CD133 陽性細胞群に対して高い取り込み量を示し た (図 4)。また、5-BPA は pH 7.4 において CD44/CD133 陽性細胞群に対する取り込み量が減少したことから、pH 依存的にすい臓がんCSCsを標的化できることが示唆された(図4)。



図 4 : CD44/CD133 陽性すい臓がん BxPC-3 細胞に対する PBA、5-BPA の取り込み.

3. 考察及び今後の展望

5-BPA を含む複素環式ボロン酸が芳香族窒素とシアル 酸上のカルボキシル基との水素結合を介してシアル酸に 強く結合するという独自の知見を基に、本研究では、標準 的なボロン酸である PBA に比べて 5-BPA がすい臓がん細 胞を pH 依存的に取り込まれ、さらに、複数のすい臓がん CSCs を同時に標的化できることを示した。これらの結果 は、低酸素および酸性の腫瘍微小環境に存在する複数の CSCs の標的化におけるボロン酸リガンドの化学構造制御 の重要性を明らかにし、難治性すい臓がんの治療を目指し た有効なアクティブターゲティングシステムの開発をさ らに促進するものである¹⁴。

【参考文献】

- Batlle, E.; Clevers, H., Cancer stem cells revisited. *Nat Med* 2017, *23* (10), 1124-1134.
- Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S., Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005, 5 (4), 275-84.
- Swaminathan, S. K.; Roger, E.; Toti, U.; Niu, L.; Ohlfest, J. R.; Panyam, J., CD133-targeted paclitaxel

delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer. *Journal of Controlled Release* 2013, *171* (3), 280-287.

- 4. Kim, W.-T.; Ryu, C. J., Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Rep* 2017, *50* (6), 285-298.
- Djanashvili, K.; Frullano, L.; Peters, J. A., Molecular Recognition of Sialic Acid End Groups by Phenylboronates. *Chemistry – A European Journal* 2005, *11* (13), 4010-4018.
- Peters, J. A., Interactions between boric acid derivatives and saccharides in aqueous media: Structures and stabilities of resulting esters. *Coordination Chemistry Reviews* 2014, 268, 1-22.
- Uchimura, E.; Otsuka, H.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K., Totally synthetic polymer with lectin-like function: Induction of killer cells by the copolymer of 3acrylamidophenylboronic acid with N,Ndimethylacrylamide. *Biotechnology and Bioengineering* 2001, *72* (3), 307-314.
- Otsuka, H.; Uchimura, E.; Koshino, H.; Okano, T.; Kataoka, K., Anomalous binding profile of phenylboronic acid with N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in aqueous solution with varying pH. *J Am Chem Soc* 2003, *125* (12), 3493-502.
- Matsumoto, A.; Stephenson-Brown, A. J.; Khan, T.; Miyazawa, T.; Cabral, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., Heterocyclic boronic acids display sialic acid selective binding in a hypoxic tumor relevant acidic environment. *Chemical Science* 2017, 8 (9), 6165-6170.
- 10.Khan, T.; Igarashi, K.; Tanabe, A.; Miyazawa, T.; Fukushima, S.; Miura, Y.; Matsumoto, Y.; Yamasoba, T.; Matsumoto, A.; Cabral, H.; Kataoka, K., Structural Control of Boronic Acid Ligands Enhances Intratumoral Targeting of Sialic Acid To Eradicate Cancer Stem-like Cells. ACS Applied Bio Materials 2020, 3 (8), 5030-5039.
- 11.Li, C.; Lee, C. J.; Simeone, D. M., Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol* 2009, *568*, 161-73.
- 12.Maeda, S.; Shinchi, H.; Kurahara, H.; Mataki, Y.; Maemura, K.; Sato, M.; Natsugoe, S.; Aikou, T.; Takao, S., CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008, *98* (8), 1389-1397.
- 13.Immervoll, H.; Hoem, D.; Sakariassen, P.; Steffensen, O. J.; Molven, A., Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2008, *8*, 48.
- 14.Miyazaki, T.; Khan, T.; Tachihara, Y.; Itoh, M.; Miyazawa, T.; Suganami, T.; Miyahara, Y.; Cabral, H.; Matsumoto, A., Boronic Acid Ligands Can Target Multiple Subpopulations of Pancreatic Cancer Stem Cells via pH-Dependent Glycan-Terminal Sialic Acid Recognition. ACS

Applied Bio Materials 2021, 4 (9), 6647-6651.

Porous Microneedles filled with a Glucose-responsive Hydrogel

for Self-Regulated Insulin Delivery

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

Barthelmes Kevin

1. Introduction

The microneedle (MN) array, a two-dimensional array has recently attracted increasing interest as minimally invasive tool for transdermal drug delivery. A MN patch, which contain sharp needles with length ranging from 25 to 2000 μ m, can penetrate skin to bypass the diffusion barrier of the stratum corneum, the outermost layer of skin, and transient microchannels without touching nerve fibers and blood vessels are formed. Therefore, macromolecules (e.g., vaccines or insulin) could be effectively transported across the skin barrier in a pain-free, risk-free and self-administered way.

(1) Porous microneedles

Microneedles can be classified according to their morphology, and recently porous microneedles (PMN) became of interest as they are advantageous for fast liquid absorption and drug release. PMN containing a large network of interconnected pores, which enables efficient fluid transportation into and from inside the skin. They are, however, intrinsically fragile because of a large volume of the void, and usually hard materials, like metals or ceramics are used. Recently polymers have been applied as well and they possess several advantages e.g., good biocompatibility, increased permeability, tunable molecular weight, and facile fabrication processes like molding and UV-polymerization. Nonetheless, a sustain and long-term drug release through the microchannels of a PMN is still challenging. PMN pose the risk of breakage and leave the debris of needles underneath the skin and inflammation of the tissue can happen. Moreover, cloggage of the pores by body fluid absorption could result in discontinuity of the drug flow.

(2) Filling of pores

A denser network structure is one approach to increase the mechanical strength of PMNs; however, this usually result in less porosity and a reduced permeability of the material. On the other hand, increased permeability could be achieved by higher porosity resulting in a more fragile material.¹ One approach is to fill the interconnected pores with a hydrophilic and permeable polymer to further increase the mechanical stability.²

This new type of hybrid MNs structures could significantly improve the sustain and long-term drug release after skin penetration.

2. Results and discussion

At first PMN arrays consisting of a stable, non-biodegradable polymer material with high porosity (>50%) were produced and subsequently, the pores were filled by a glucose-responsive hydrogel.³ The novel hybrid MNs were analyzed in vitro in terms of mechanical strength, skin punctuation and insulin release.

(1) PES Microneedles

We have investigated polyether sulfone (PES) as a polymeric material for the PMN fabrication.⁴ PDMS molds were filled with a PES solution in DMF and benzene was added on the backside of the solution. The benzene diffuses slowly into the solution and can interact with the aromatic rings of PES by pi stacking. The PES solution solidified overnight and was subsequently washed by methanol to remove the intercalated benzene (Figure 1A). By this method, μ m-size pores (Figure 1B) remain in the polymer structure, whereby the PES and benzene concentration are crucial parameters for a good MN morphology (Figure 1C).



Figure 1: (A) Schematic representation of the PMN fabrication process. (B) Pore size characterized by SEM images.(C) Morphology of MNs characterized by optical microscopy.

Moreover, the porosity could be adjusted between 60-80% depending on the polymer concentration.

(2) Hybrid Microneedles

Since PES is a hydrophobic polymer, plasma treatment and surface coating by poly(acrylic acids) was applied to facilitate pore filling process by the hydrophilic pre-gel solution (Figure 2). The pre-gel solution contains a mixture of various acrylate-based monomers, crosslinker and initiator in methanol and was added on the backside of the PES MNs. The solution was soaked in by capillary force and could be thermally polymerized afterwards (i.e., Gelation process).



Figure 2: Schematic representation of the hybrid MN fabrication process.

The morphology of the novel hybrid MNs was confirmed by optical microscopy showing sharp and uniform needles (Figure 3A). The mechanicals strength was investigated by shear stress-strain tests of a single microneedle. It was shown that the maximum stress in the PES MNs was significantly higher than the dry or wet MNs consisting of only hydrogel (i.e., naked MNs) (Figure 3B). Moreover, the mechanical strength increased from around 0.6 N (PES MNs) to 1 N (hybrid MNs) which clearly shows the reinforcement effect by the pore filling process.

The hybrid MNs were analyzed in vitro by skin punctuation test. It was shown that the new material could efficiently penetrate the stratum corneum of mouse skin. A uniform microchannel formation was confirmed by trypan blue staining. The glucose-responsive insulin release was analyzed by immersing the hybrid MNs in а fluorescein isothiocyanate-labeled (FITC) insulin solution overnight, whereby the hydrogel absorbed the insulin. Subsequently, the insulin soaked MNs were immersed buffer solution with different amount of glucose. The hydrogel can interact with glucose and the resultant change in counterionic osmotic pressure translates into a change in the hydration state of the gel. A localized dehydration of the gel surface occurs and forms a so-called "skin layer" which enables release of insulin from the gel. The released amount of FITC insulin in the buffer solution was estimated by fluorescence spectroscopy and it could be shown that the hybrid MNs still show the glucose concentration-dependent release profile (Figure 3D).



Figure 3: (A) Morphology of MNs characterized by optical microscopy. (B) Mechanical strength of MNs. (C) Trypan blue staining showing the formation of microchannels in mouse skin after MNs treatment. (D) Glucose-dependent FITC insulin release vs. time.

3. Conclusion and future plan

We could produce hybrid MNs comprising PES as a scaffolding polymer and a hydrogel as a permeable material. The combination of both materials further strengthened the stability of the microneedles and at the same time the drug release capability could be preserved. Nonetheless, a persistent diffusion-controlled insulin release remained challenging. Presumably surface detachment of PES and hydrogel caused small microchannels which result in leakage of the insulin soaked MNs. For this purpose, we are looking for other scaffolding materials which can interact with the hydrogel by covalent bonds.

References

- H. Chang, M. Zheng, X. Yu, A. Than, R. Z. Seeni, R. Kang, J. Tian, D. P. Khanh, L. Liu, P. Chen, C. Xu, *Adv. Mater.*, 29, 1702243 (2017).
- S. Kusama, K. Sato, Y. Matsui, N. Kimura, H. Abe, S. Yoshida, M. Nishizawa, *Nat. Commun.*, 12, 658 (2021).
- S. Chen, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto, *Adv. Funct. Mater.*, 29, 1807369 (2019).
- 4. S. Samitsu, Macromolecules, 51, 151-160 (2018).

業

績

【原著論文】

- Siyuan Chen (Takuya Miyazaki, Michiko Itoh, Hiroko Matsumoto, Yuki Morooka, Miyako Tanaka, Yuji Miyahara, Takayoshi Suganami, Akira Matsumoto), A porous reservoirbacked boronate gel microneedle for efficient skin penetration and sustained glucose-responsive insulin delivery" Gels, 8 (2), 74 (2022).
- Hiroaki Hatano (Fanlu Meng, Momoko, Sakata, Akira Matsumoto, Kazuhiko Ishihara, Yuji Miyahara, Tatsuro Goda) Transepithelial Delivery of Insulin Conjugated with

Phospholipid-Mimicking Polymers via Biomembrane Fusion-Mediated Transcellular Pathways, Acta Biomaterialia, accepted (2021).

 Hideki Fujisaki (Aom Tongchatra, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Tatsuro Goda)
 In-situ chemical modification of printed conducting polymer films for specific glucose biosensing,
 Sensors and Actuators B: Chemical, 349, 130829, (2021), [7.335]

- Kazunori Igarashi (Horacio Cabral, Taehun Hong, Yasutaka Anraku, Fotios Mpekris, Triantafyllos Stylianopoulos, Thahomina Khan, Akira Matsumoto, Kazunori Kataoka, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba)
 Vascular Bursts Act as a Versatile Tumor Vessel Permeation Route for Blood-Borne Particles and Cells, Small, 17 2103751, (2021).
- 5. Miyuki Tabata (Chiho Kataoka-Hamai, Kozue Nogami, Daiju Tsuya, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara) Organic and inorganic mixed phase modification of silver surface for functionalization with biomolecules and stabilization of electromotive force, RSC Advances (11) (2021).
- Yoshioka N (Tanaka M, Ochi K, Watanabe A, Ono K, Sawada M, Ogi T, Itoh M, Ito A, Shiraki Y, Enomoto A, Ishigami M, Fujishiro M, Ogawa Y, Suganami T) The sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor Tofogliflozin

prevents the progression of nonalcoholic steatohepatitisassociated liver tumors in a novel murine model, Biomed. Pharmacother. (140), (2021).

- Takuya Miyazaki (Thahomina Khan, Yoshihiro Tachihara, Michiko Itoh, 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 glycanterminal sialic acid recognition, ACS Applied Bio Materials (4, 9) (2021).
- Taehun Hong (Takuya Miyazaki, Akira Matsumoto, Kyoko Koji,Yuji Miyahara,Yasutaka Anraku, Horacio Cabral) Phosphorylcholine-installed nanocarriers target pancreatic cancer cells through the phospholipid transfer protein, ACS Biomaterials Science & Engineering (7, 9) (2021).
- 9. Wenqian Yang (Takuya Miyazaki, Pengwen Chen, Taehun Hong, Mitsuru Naito, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata, Horacio Cabral) Block Catiomer with Flexible Cationic Segment Enhances Complexation with siRNA and the Delivery Performance in Vitro,

Science and Technology of Advanced Materials (2021).

- 10.Hiroko Oda (Takeshi Namagatsu, Horacio Cabral, Takuya Miyazaki, Takayuki Iriyama, Kei Kawana, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii)
 Thrombomodulin promotes Placental Function by Up-Regulating Placental Growth Factor via Inhibition of Highmobility-group box 1 and Hypoxia-inducible factor 1a, Placenta (111) (2021).
- John D. Martin (Takuya Miyazaki, Horacio Cabral) Remodeling tumor micro-environment with nanomedicines, WIREs Nanomedicine & Nanobiotechnology (2021).
- 12.Hiroko Oda (Takeshi Namagatsu, Danny J. Schust, Horacio Cabral, Takuya Miyazaki, Keiichi Kumasawa, Takayuki Iriyama, Kei Kawana, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii) Recombinant Thrombomodulin Attenuates Preecamptic Symptoms by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 Mice, Endocrinology (162, 4), (2021).
- 13.Yukichi Horiguchi (Kevin Barthelmes, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto)

pH-responsive Adsorption and Dissociation of Sialic Acid Expressed Protein on Boronic Acid Immobilized Surface, Chem. Lett. (50), (2021), [1.389]

- 14.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(1), 5) (2021).
- 15.伊藤美智子、金井紗綾香、田村篤志、白川伊吹、金森耀 平、田中都、松元亮、宮原裕二、小川佳宏、菅波孝祥 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, 日本内分泌学会雑誌,97(1),282 (2021),

【総説】

- 松元亮(宮崎拓也、伊藤美智子、菅波孝祥、宮原裕二) ボロン酸ゲルを用いた糖尿病治療デバイスの社会実装, バイオマテリアル (2021).
- Akira Matsumoto (Siyuan Chen) A boronate gel-based synthetic platform for closed-loop insulin delivery systems Polym. J. (53), (2021).

【口頭発表】

 Akira Matsumoto, "Borono-lectin" based bioengineering, The

8th Joint Symposium between IBB/TMDU and Chulalongkorn University on "Biomedical Materials and Engineering", January 25, 2022 (Online).

- 松元亮,完全合成材料による「エレクトロニクスフリー」な人工膵臓の開発,令和3年度生体医歯工学共同研究拠点(第1期) 最終成果報告会,オンライン,2022年3月4日
- 3. 松元亮、「貼るだけ人工膵臓」開発の最前線、東京都医 工連携 HUB 機構 連携セミナー、2021 年 11 月 30 日
- 松元亮、ボロノレクチンを駆使した次世代医工学、第25 回次世代医工学研究会、2021年10月29日
- 5. 松元亮、ボロン酸化学を駆使した医工学研究の最前線、 高分子学会 2021 年度 Webinar (第5回)、2021 年 10 月 5日
- 松元亮、機能性高分子を応用した ドラッグデリバリーシステムの研究、MLS-IBB-DSC Collaborative Workshop、 2021 年 8 月 17 日
- 7. 伊藤美智子(松元亮)「貼るだけ人工膵臓」の開発、第
 8 回 COINS シンポジウム(オンライン開催) 2022 年1
 月 21 日

- 伊藤美智子(田村篤志、金井紗綾香、白川伊吹、田中都、 金森耀平、小川佳宏、菅波孝祥) NASH 発症におけるマ クロファージのコレステロール代謝障害と機能変容、 第94回日本生化学会大会(オンライン開催) 2021 年11 月3日
- 9. 伊藤美智子(小川佳宏、菅波孝祥) 死細胞を起点とする 慢性炎症と非アルコール脂肪性肝炎、第36回日本糖尿 病合併症学会(オンライン開催)2021年10月5日
- 10.伊藤美智子(田中都、小川佳宏、菅波孝祥) NASH 発症 における死細胞貪食・処理の病態生理的意義、日本 Cell Death 学会第 29 回学術集会 (オンライン開催) 2021 年 7 月 26 日
- 11.伊藤美智子(小川佳宏、菅波孝祥) NASH マウスモデル の確立を通じた病態解析・治療戦略開発への挑戦、第64 回日本糖尿病学会学術集会、富山(オンライン開催) 2021年5月20日
- 12.伊藤美智子(金井紗綾香、田村篤志、白川伊吹、金森耀 平、田中都、松元亮、宮原裕二、小川佳宏、菅波孝祥) 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94回日本内分泌学会学術総 会、(オンライン開催) 2021年4月22日
- 13.宮崎 拓也 (Barthelmes Kevin、池原 清、宮原 裕二、松元 亮)、力学的強度と薬剤放出能を両立させるスマートゲル内包多孔質マイクロニードルの設計と評価、第33回高分子ゲル研究討論会(オンライン開催)、2022年1月21日
- 14.宮崎 拓也、炎症性サイトカインの安全性と有効性を高 める pH 応答性プロドラッグの開発、第28回次世代医 工学研究会、兵庫、2021年10月29日
- 15.松元 亮(宮崎 拓也、Khan Thahomina、宮澤 大樹、Cabral Horacio、宮原 裕二)、ボロン酸を生体対話の基盤とし た「はたらく高分子」、第70回高分子討論会(オンライ ン開催)、2021年9月7日
- 16.松元亮(Chen Siyuan、宮崎 拓也、伊藤 美智子、 Barthelmes Kevin、松本裕子、金井紗綾香、池原清、諸 岡由佳、木村 真一郎、田中都、菅波孝祥、宮原裕二)、 高分子ゲルの階層的エンジニアリングによる持続型マ イクロニードルデバイスの開発、第70回高分子討論会 (オンライン開催)、2021年9月8日
- 17.宮崎拓也、妊娠期の化学療法に向けたナノ医薬の開発、
 Life Science Connect 2021 (オンライン開催)、2021 年 8
 月 26 日

- 18.宮崎拓也(内田智士、カブラルオラシオ)、効率的な mRNA送達に向けた柔軟性高分子の開発、第31回バイ オ・高分子シンポジウム(オンライン開催)、2021年6 月24日
- 19.Wenqian Yang (Takuya Miyazaki, Pengwen Chen, Taehun Hong, Horacio Cabral), Influence of PEG-Polycation Chain Flexibility on the Assembly of siRNA into Polyion Complexes, The 12th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, July 6, 2021 (Online).
- 20.Taehun Hong (Takuya Miyazaki, Kazunori Igarashi, Pengwen Chen, Keita Masuda, Yasuhiro Nakagawa, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba, Horacio Cabral), Phosphorylcholine-installed polymers target pancreatic tumors through their exacerbated lipid metabolism, The 12th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, July 6, 2021 (Online).

【特許】

(1)国内特許出願 4件(2)国際特許出願 1件

研究報告2022 目次 【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト

٠	総括	82
٠	・毛乳頭細胞の電気刺激培養・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	85
٠	・毛髪再生医療のための毛包オルガノイド・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	86
٠	業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	89

「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。近年、 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 の手順も含めて実用化を目指した基盤技術を確立する。



図1:毛包原基の大量調製法を用いた毛髪再生医療

一方、本国で唯一行われている毛髪再生医療の臨床試験では、弱った毛包を活性化する目的で間葉系細胞の移植を行っている。しかし、間葉系細胞は移植に必要な数まで増殖させる中でその機能を急激に失う ことが知られており、この治療での毛髪数の増加は全体の5%にとどまる。我々は、ごく最近、間葉系細胞の機能を維持しながら細胞数を増加させる培養技術を開発した。この培養技術で増殖させた間葉系細胞 を移植することで細胞移植による毛髪再生の治療効果を増加できる可能性がある。本研究プロジェクトで は、当初計画に追加して細胞移植による毛髪再生の実用化を目指した基盤技術についても確立を目指す。 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。

82

1. 2021 年度の研究目的

プロジェクト2年目となる2021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) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生
- (2) 毛包原基の移植による毛髪再生
- (3) 生体外再生毛髪の移植による毛髪再生

前年度は、主に(2)の実用化を目指した毛髪再生医療の 基盤技術の確立を検証してきた。脱毛症患者由来の細胞を 用いて毛包原基を作製し、これを移植することで毛髪が再 生することも確認した。しかし、実用化を目指す上で、大 量の毛包原基を作製するために必要な上皮系細胞の増殖 技術が確立できておらず、実用化に向けたハードルとなっ ている。一方で、間葉系細胞(特に毛乳頭細胞)の増殖技 術については、これまでに様々なアプローチを開発し、細 胞の機能を維持しながら増殖させることが可能になった。 本研究プロジェクトでは、毛髪再生医療の早期実用化を実 現するため、当初の研究計画からの変更であるが、(1)の "毛乳頭細胞の移植による毛髪再生"を課題に追加し、研 究開発を進めた。また、(2)の実用化も継続して目指してお り、現状の課題である毛包上皮幹細胞の増殖培養技術の開 発に重点を置き、研究開発を進めた。 (3)では、我々が開 発した生体外で毛髪を再生する技術において、毛髪再生医 療への応用可能性について検討を行った。

(3)については、景山研究員が報告することから、本報告書では主に(1),(2)について報告する。

2. 2021 年度の研究成果

(1) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生

細胞移植による毛髪再生は、資生堂が東京医科大学と共 に臨床研究をスタートしている。この研究では、患者の毛 包から採取した毛球部毛根鞘細胞を増殖培養し、これを弱 った毛包の周辺に投与する。但し、臨床試験の結果では毛 髪増加率5%と有効性は低い。臨床試験2段階目も進行予 定であるが、有効性をさらに向上させるためには新たな工 夫が必要と考えられる。そもそも細胞移植では、細胞培養 プロセスにおいて、細胞機能をいかに維持できるかが成功 の鍵となる。我々は、これまでに患者毛包から細胞移植の 細胞源の1つである毛乳頭細胞を分離する技術を確立し、 その細胞の機能を維持しながら培養する技術として、電気 刺激培養 (L. Yan et al. J. Biosci. Bioeng. 133(3) 281-290, 2022, ZHANG 研究員が報告)、ゲルビーズ培養(T. Kageyama et al. Biomaterials, 212, 55-63, 2019)、PI3k/Akt パスウェイ活性 化剤の添加培養(M. Yamane et al. J. Biosci. Bioeng., 134, 1, 55-61,2022)、重層化培養(特願 2022-031086)を開発して きた。なかでも、重層化培養は作業プロセスの簡便性から 実用化が期待できる。本稿では、このアプローチの概要と 実用化を目指した取り組みについて紹介する。

毛乳頭細胞は培養ディッシュで増殖させると、その機能 は培養と共に失われる。この機能はスフェロイド培養など の三次元培養により、回復させることが可能だが、培養デ ィッシュに比べ、細胞が増殖しにくいという課題がある。 我々が開発した重層化培養は、細胞の機能回復と細胞数の 増加を両立させた培養法である。通常の細胞培養では、細 胞が培養ディッシュ表面を埋め尽くすと新しい培養ディ ッシュに継代する。3-5日おきにこのプロセスを繰り返す が、我々は継代を行わず30日間同じ培養ディッシュで毛 乳頭細胞を培養した(図2)。

すると、表面を埋め尽くした毛乳頭細胞は培養5日を過ぎたあたりで重層しはじめ、それと共に毛髪再生能を示す マーカー遺伝子の発現が増加する様子が確認された。興味 深いことに、培養30日目のマーカー遺伝子の発現量はス



図2:毛乳頭細胞の重層化培養

フェロイド培養と比較して有意に増加していた。網羅的な 遺伝子解析では、重層化培養した細胞の遺伝子プロファイ ルが培養前の毛乳頭の遺伝子プロファイルと類似してお り、本手法で細胞機能をかなり維持できることを確認して いる。また細胞数は、スフェロイド培養では 30 日間の培 養で約2、3 倍しか増加しないのに対し、重層化培養では 約 20 倍まで増加した。さらに、マウスを用いた移植実験 において、重層化培養した毛乳頭細胞がスフェロイド培養 や培養ディッシュでの培養と比べ、より多くの毛髪を再生 できることを確認した。以上の結果より、重層化培養は毛 乳頭細胞の機能を維持・回復しながら細胞数を増やすため に適した方法と考えられる。 我々は実用化を目指した取り組みとして、生物由来原料 基準(生原基)を満たした培地への置換も進めている。予 備検討では、生原基対応培地で重層化培養が適用可能なこ とが確認できている。現在、重層化培養した細胞の移植方 法や保存方法について検討を進めており、これらの周辺技 術を確立させ、細胞移植による毛髪再生の実用化(図3) を目指していきたい。

細胞移植による毛髪再生



図3 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生

(2) 毛包原基の移植による毛髪再生

毛包原基の移植による毛髪再生には、毛乳頭細胞と毛包 上皮幹細胞を細胞源として用いるが、世界的に見ても毛包 上皮幹細胞の培養技術は確立できていない。そこで今年度 は、毛包上皮幹細胞の機能を維持しながら培養する方法の 検討を進めた。これまで我々は、毛包上皮幹細胞の機能を 維持しながら培養する技術として、培養ディッシュ上での 平面培養と三次元培養を検討してきた。三次元培養(特許 第7078925号)では、毛包上皮幹細胞の機能を維持するこ とが可能だが、継代の際に、凝集体の細胞を分散するため の長時間の酵素処理が必要であり、細胞に深刻なダメージ を与えてしまう。平面培養は、培養と共に機能が低下する が,患者1人の施術に必要な数千個の毛包原基を作製する ための107オーダーの細胞数を短期間(2週間)の培養で 調製することが可能である。そこで今年度は、平面培養で 毛包上皮幹細胞の機能を維持しながら培養する技術の開 発に取り組んだ。平面培養において、細胞は基材表面にコ ートされた細胞外マトリクス (ECM) やタンパク質を介し て接着する。生体では、細胞が組織特有の ECM と接着し、 機能を維持していることを考えると、培養基材表面のコー ティング剤を細胞ごとに適したものに最適化する必要が ある。我々は、ECM アレイとよばれる 36 パターンの ECM を 1 枚のスライドガラスに配置した培養基材に毛包上皮 幹細胞を播種し、3日間培養を行った。その結果、パター ンごとに初期接着や細胞増殖に違いがみられ、接着、増殖、 機能維持の観点で優れた ECM の組み合わせの候補を4つ 見出した(図4)。今後は、このコーティング剤で培養した 毛包上皮幹細胞の遺伝子を網羅的に解析し、生体の毛包上 皮幹細胞の遺伝子プロファイルとの類似性を解析すると ともに、ヌードマウスへの移植により、その毛髪再生能を 検証していく予定である。

我々は、毛包上皮幹細胞の培養方法の最適化と並行して、 毛包原基の作製技術についても改良を進め、これまでにマ



図4: ECM アレイによるコーティング剤の検討

イクロウェルアレイ法(K. Suzuki et al. AATEX, 2022)、バ イオプリンティング法(A. Nanmo et al. Acta Biomaterialia, 2022)、マイクロ流体デバイス法、遠心集積法を含む4つ の手法を開発してきた。いずれの手法もそれぞれの利点が あり、毛包上皮幹細胞の培養技術が確立し次第、培地や添 加因子の最適化を進める予定である。

本研究の一部は、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、JSPS 科学研究費助成事業・基 盤Bにより実施した。

毛乳頭細胞の電気刺激培養

「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト ZHANG Binbin、景山 達斗

1. はじめに

毛髪再生医療の実現には、毛包の幹細胞である毛乳頭細胞を移植に十分な数まで増殖させる技術が必要不可欠である。しかし、毛乳頭細胞は培養ディッシュでの平面培養中に毛髪再生機能を急速に失う。そのため、毛乳頭細胞の機能を維持しながら増殖させるための様々なアプローチが開発されてきた。三次元培養は、毛乳頭細胞の機能を維持・回復するのに有効な方法として知られている(1,2)。スフェロイドやゲルビーズ内で培養された毛乳頭細胞は発毛関連遺伝子を向上させ、その移植でより多くの毛髪を再生させることが可能になる。しかし、三次元培養では、細胞の増殖率が平面培養と比較しても低いこと、細胞継代の際に必要な長時間の酵素処理が細胞に深刻なダメージを与えることなどの課題が残る。

電気刺激は、ヒトの脱毛症治療において一定の効果があ ることが報告されている(3)。しかし、培養中の毛乳頭細胞 にどのような影響をもたらすかは、我々の知る限り、明ら かになっていない。我々は、毛乳頭細胞に電気刺激を与え ることで毛髪再生機能を維持・回復しながら培養すること ができないかと考えた。そこで本研究では、毛乳頭細胞に 電気刺激を付与しながら、平面培養するための培養容器を 開発し、そこで培養した毛乳頭細胞の機能を評価した。

2. 実験と結果

作製したデバイスを図1に示す。培養容器のサイズは10 mm×20 mm であり、その底面は導電性ポリマーのポリピロールがコーティングされている。また容器の上蓋には対極として白金メッシュを設置した(図1)。



図1:作製した電気刺激デバイス

このデバイスに毛乳頭細胞を播種し、電気刺激を与えな がら3日間培養を行った。細胞は基板表面に接着し、増殖 する様子が観察され、発毛関連遺伝子は従来の平面培養と 比較して有意に増加していた。 さらに、電気刺激した細胞が毛髪再生能を有するかについて、移植実験により評価した。電気刺激あり/なしで培養した毛乳頭細胞とマウス胎児上皮系細胞をスフェロイド 培養容器に播種し、毛包原基を形成させたのち、これをマ ウス皮内に形成した移植創に挿入した。移植3週間後に形 成した毛髪をカウントすると、電気刺激ありの毛乳頭細胞 を用いた系で毛髪数が2倍増加していた(図2)。以上の 結果より、電気刺激により毛乳頭細胞の機能を維持・回復 しながら増殖できることが示された(4)。



図2:移植による毛髪再生効率の評価

3. 考察及び今後の展望

本研究では、毛乳頭細胞への電気刺激が毛髪再生機能の 維持に有効であることを示した。この現象は脱毛症患者の 細胞を用いた検討でも実証している。本技術は、毛髪再生 医療のための新しい培養方法として期待できる。

【参考文献】

- 1. C.A. Higgins, et al, *Experimental Dermatology*, 19, 546-548 (2010).
- 2. T. Kageyama, et al, Biomaterials, 212, 55-63 (2019).
- 3. W.S. Maddin, et al, Int. J. Dermatol., 31, 878-880 (1992)
- 4. L. Yan, et al, J Biosci Bioeng., 133(3), 281-290 (2022)

毛髪再生医療のための毛包オルガノイド

「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロジェクト

景山 達斗

1. はじめに

毛髪再生医療の分野では、毛髪再生能を有する上皮系細 胞と間葉系細胞を移植するアプローチが注目を集めてい る。この方法では、移植した2種類の細胞が毛髪を新しく 形成するため、末期の脱毛症患者においても毛髪の数を増 やすことが可能である。先行研究では、上皮系細胞と間葉 系細胞を用いて、生体の毛包原基に類似した構造を再構築 し、これを移植することで毛髪を効率よく再生する方法が 提案された[1]。このアプローチでは、コラーゲンゲルの液 滴内で上皮系細胞と間葉系細胞のペレットを顕微鏡下で 接合させ、毛包原基に類似した構造を形成させる。免疫不 全マウスに移植すると毛髪を再生することができるが、作 製プロセスには熟練した技術が必要となる。我々は、より 簡便に毛包原基を大量調製するために、細胞の自己組織化 を利用した組織作製方法を開発した[2]。上皮系細胞と間 葉系細胞の混合懸濁液を培養器に播種し凝集体を形成さ 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 体内に存在するが、培養3日間でそれぞれの細胞が分離 し、自発的に毛包原基の形成に至ることを発見した。この プロセスは非常にシンプルであり、数千個のウェルを有す る大量培養容器を利用することで、患者1人当たりの治療 に必要な数千個の毛包原基を細胞播種のみで作製できる。 この毛包原基を移植すると毛髪が再生することも確認し ており、さらに毛包周囲に存在するコラーゲン[3,4,5]や多 血小板血漿[6]、血管内皮細胞[7]、脂肪幹細胞[8]を毛包原 基の作製時に混合すると、周囲環境がリプログラミングさ れ、毛髪再生能が向上することも見出している。

近年、我々は毛包原基の培養条件の最適化を進める中で、 低濃度のマトリゲルを添加した際に、毛包が生体外で高効 率(100%)に再生する現象を見出した[9]。毛包原基の移植 を種まきと仮定すれば、生体外で再生した毛包組織の移植 は苗を植えるようなものである。再生毛包はより高い効率 で移植部に生着すると予想され、理想の配置で審美性の高 い毛髪再生が可能となる。本稿では、生体外で再生した毛 包組織を利用した毛髪再生について、昨年度までの進捗状 況を報告する。

2. 実験と結果

(1) 毛髪を生体外で再生するアプローチ

生体外での毛髪再生を実現するために、我々はまず毛包 原基を長期間培養する実験を試みた。実際に、一部の毛包 原基から毛幹様の組織が形成される様子が確認されたが、 再生効率は非常にわずか(0.3%,300個中1個程度)であ り、生体外での毛髪再生を実現にするには重要な何かが欠 けているようであった。

添加因子、培地、培養条件など様々な条件を検討するな かで、低濃度のマトリゲルを培地に添加した条件で毛髪が ほぼ確実に生体外で再生することを見出した。すなわち、 上皮系細胞と間葉系細胞を1:1の比率で混合し、96well 丸底プレートに播種したのち、2v/v%マトリゲルを混合し た培地で培養すると、培養6日目には毛包が生体外で高効 率(100%)に再生した(図1)。以後、この組織を毛包オル ガノイドと呼ぶ。毛包オルガノイドから再生した毛包には、 毛包上皮幹細胞や毛乳頭細胞、色素細胞、色素幹細胞、毛 母細胞などの毛包を構成する細胞が存在しており、毛幹の 表面には、うろこ状のキューティクル構造が観察された。 このように再生した毛包が生体の毛包と類似した構造を 有していることが確認された。



図1:生体外で再生した毛包オルガノイド

(2) マトリゲル代替物の探索

生体外での毛髪再生に有効であったマトリゲルは、マウ ス肉腫由来の細胞外マトリクス抽出物であり、ヒトへ移植 する際には安全性の観点で課題が残る。そこで、マトリゲ ルの代替となる材料の探索を行った。成長因子や細胞外マ トリクスの種類や組み合わせを検討した結果、マトリゲル の主要成分であるコラーゲン IV やラミニン+エンタクチ ン混合物(PCT/JP2019/031142)のみでなく、マトリゲルにほ とんど含まれないコラーゲン Iやフィブロネクチン(特願 2021-165888)でも毛髪が再生した。特にコラーゲンIは、 生物由来原料基準を満たした製品がヒトの治療に用いら れている。毛髪再生効率を詳しく評価すると、マトリゲル 同等に高い再生効率を示したことから、コラーゲンIは有 望なマトリゲル代替材料になると考えられる。 興味深いことに、生体外の毛髪再生に成功した条件で共 通していたのは、培養2日目における上皮系細胞と間葉系 細胞の細胞分布である。通常、これら2種類の細胞を凝集 体として培養すると、同種細胞どうしが分離したダンベル 型の構造を形成する(図2)。しかし、マトリゲルやコラー ゲンIなどの細胞外マトリクス(ECM)を添加した場合、 上皮系細胞が内核、間葉系細胞が外殻となるコアシェル型 の構造を形成した(図2)。この自己組織化の変化は、ECM の添加が同種および異種細胞間の相互作用のバランスを 変えたために生じた現象と考えられる。今後、自己組織化 と毛髪再生の関係について、より詳細なメカニズムについ て調べていく予定である。



図 2:上皮系細胞と間葉系細胞の自己組織化と毛髪再生の関係 (緑:上皮系細胞、赤:間葉系細胞)

(3) 再生毛包の移植による毛髪再生

生体外で再生した毛包組織の移植による毛髪再生の可 能性を評価した。毛包オルガノイドをヌードマウスの皮膚 に移植したところ、ほとんどの移植部で毛包が生着し、毛 幹が伸長する様子が観察された。また経時的に観察を行う と、生着した毛包は少なくとも 333 日は毛の生え代わりを 繰り返した(図3)。



図3: ヌードマウス皮下に移植後に生着した毛髪

(4) 長毛化した毛髪の移植実験

毛包オルガノイドでは複数の毛包が再生するため、その 移植では、1つの毛穴から複数の毛髪がランダムな向きに 再生する。審美性の高い毛髪再生を実現するためには、1 つの毛穴から再生する毛包の数やその向きを制御できる 技術が必要となる。我々は、毛包オルガノイドから再生し た毛包組織を切断し、それを1本ずつマウス皮下に移植す るアプローチを考案した。この方法では、切断・移植を可 能とする十分な長さの毛包を調製する技術が必要となる。 そこで我々は、生体外で長毛を形成する培養系を考案した。 これは、培養1日目の毛包オルガノイドをゲル内に包埋 し、長期間培養するものである。6 well 丸底プレートでの 浮遊培養では、毛幹の伸長は培養8日目で止まり、その長 さは200 μm 程度だが、包埋培養では、培養23日目でも毛 幹が伸長を続けており、その長さは約3mmに達した(図 4)。このようにゲル包埋培養で伸長した毛包を、実体顕微 鏡下でマイクロ剪刀を用いて切断し、ヌードマウスの背部 へ移植すると、ヌードマウス皮下で生着する様子が観察さ れた(特願 2021-165889)。この方法では、植毛で用いる自 家毛包とほぼ同様の移植体を作製できるため、植毛術と同 様に毛の方向をコントロールすることが可能になると考 えられる。



図4:ゲル包埋培養による長毛化

3. 考察及び今後の展望

本稿では、毛髪を生体外で再生する技術とその移植によ る毛髪再生について紹介した。しかし、本稿で紹介した内 容はマウス細胞での検証であり、今後ヒト細胞を用いた検 討を進めていく必要がある。現在、マウス上皮系細胞をヒ ト iPS 細胞から誘導した上皮系細に置換しても、生体外で 毛髪が再生することを確認している。また、脱毛症患者由 来の上皮系細胞と間葉系細胞から毛包オルガノイドを形 成し、10 日間培養を行うと、細長い毛幹様構造が伸長す る様子が観察され、その組織体が未熟ではあるが、毛髪コ ルテックスタンパクを形成していることも観察されてい る。今後、さらにヒト細胞に適した培養条件へと最適化を 進めることで、本技術を毛髪再生医療の基盤技術へと成長 させていきたい。

本研究の一部は、JST-さきがけ、 AMED 戦略的国際共 同研究プログラム(SICORP) 日・シンガポール共同研究、 JSPS 科学研究費助成事業・若手研究により実施した。

【参考文献】

- K.-e. Toyoshima, K. Asakawa, N. Ishibashi, H. Toki, M. Ogawa, T. Hasegawa, T. Irie, T. Tachikawa, A. Sato, A. Takeda, T. Tsuji, Nature Communications 3 (2012).
- T. Kageyama, C. Yoshimura, D. Myasnikova, K. Kataoka, T. Nittami, S. Maruo, J. Fukuda, Biomaterials 154, 291-300. (2018)
- T. Kageyama, L. Yan, A. Shimizu, S. Maruo, J. Fukuda, Biomaterials 212,55-63 (2019).
- M. Yamane, J. Seo, Y. Zhou, T. Asaba, S. Tu, A. Nanmo, T. Kageyama, J. Fukuda, J Biosci Bioeng 134(1), 55-61 (2022).
- 5. A. Nanmo, L. Yan, T. Asaba, L. Wan, T. Kageyama, J.

Fukuda, , Acta Biomater in press (2022).

- T. Kageyama, A. Nanmo, L. Yan, T. Nittami, J. Fukuda, Journal of bioscience and bioengineering 130(6), 666-671 (2020).
- T. Kageyama, Y.S. Chun, J. Fukuda, Scientific Reports 11(1) (2021).
- R. Nakajima, Y. Tate, L. Yan, T. Kageyama, J. Fukuda, J Biosci Bioeng 131(6), 679-685 (2021).
- 9. T. Kageyama, A. Shimizu, R. Anakama, R. Nakajima, K. Suzuki, Y. Okubo, J. Fukuda, bioRxiv

10.https://doi.org/10.1101/2022.06.13.495917.

業

績

【原著論文】

- Yukihito Moritoki, Taichi Furukawa, Jinyi Sun, Minoru Yokoyama, Tomoyuki Shimono, Takayuki Yamada, Shinji Nishiwaki, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Masaru Mukai and Shoji Maruo. 3D-Printed Micro-Tweezers with a Compliant Mechanism Designed Using Topology Optimization. Micromachines, 12, 579, 2021
- Minami Masumoto, Ittetsu Fukuda, Suguru Furihata, Takahiro Arai, Tatsuto Kageyama, Kiyomi Ohmori, Shinichi Shirakawa, Junji Fukuda, Deep neural network for the determination of transformed foci in Bhas 42 cell transformation assay. Scientific reports, 11, 23344, 2021
- Lei Yan, Tatsuto Kageyama, Binbin Zhang, Seiya Yamashita, Paul J Molino, Gordon G. Wallace, Junji Fukuda. Electrical stimulation to human dermal papilla cells for hair regenerative medicine. Journal of Bioscience and Bioengineering. 133, 3, pp281-290, 2022
- Monami Yamane, Yinghui Zhou, Tomoki Asaba, Shan Tu, Ayaka Nanmo, Tatsuto Kageyama, and Junji Fukuda, Effects of the PI3K/Akt signaling pathway on the hair inductivity of human dermal papilla cells in hair beads. Journal of Bioscience and Bioengineering, 134, 1, pp55-61, 2022

【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、人工 臓器, 50, 1, pp51, 2021
- 2. 景山達斗、福田淳二、髪の色を決めるメラノソーム— 白髪の発生機序とその治療に向けたアプローチ,実験 医学増刊号 『EVs 細胞外小胞の生物学』39,20,pp112-118,2021
- 南茂彩華、景山達斗、福田淳二、3D バイオプリンティングによる培養皮膚や毛包の再生技術、BIO INDUSTRY, 38, 10, pp32-39, 2021
- 4. 南茂彩華,景山達斗,福田淳二,毛髪再生のカギは生 体模倣?-毛髪再生医療のための培養技術,月刊化学 2021

【口頭発表】

1. 青木美緒、景山達斗、福田淳二 毛髪再生医療のため

の移植組織凍結保存法 化学工学会第 52 回秋季大会 (2021/9/22-24 *オンラインオンサイト併用)

- 杉山衣蓮、景山達斗、福田淳二 マイクロ流体デバイ スを用いた毛包原基の調製 化学工学会第 52 回秋季 大会(2021/9/22-9/24 ※オンライン開催)
- 3. 南茂彩華、景山達斗、福田淳二 コラーゲンゲルビー ズの自己収縮を用いた毛包原基の作製法 化学工学会 第52回秋季大会(2021/9/22-9/24 ※オンライン開催)
- 4. Ayaka Nanmo, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda Largescale preparation of collagen-containing hair follicle germs using 3D bioprinting Biofabrication2021 (2021/9/27-9/29 ※オンライン開催)
- 5. Riki Anakama, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda In vitro hair models using human iPS derived follicular epithelial stem cells for drug screening BIOFABRICATION 2021 CONFERENCE (2021/9/27-9/29 ※オンライン開催)
- 6. 景山達斗,福田 淳二,創薬及び毛髪再生医療のための毛包オルガノイド,第30回日本色素細胞学会(2021/10/23-24 シンポジウム講演※オンライン開催)
- Monami Yamane, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Restoration of the hair-inductive capacity of human dermal papilla cells embedded in collagen microgel, TERMIS 6TH WORLD CONGRESS 2021, (2021/11/15-19 ※オンライ ン開催)
- 8. Lei Yan, Tatsuto Kageyama, Binbin Zhang, Junji Fukuda, ELECTRICAL STIMULATION VIA CONDUCTIVE POLYMER BED FOR HAIR FOLLICLE STEM CELL CULTURE, TERMIS 6TH WORLD CONGRESS 2021, (2021/11/15-19 ※オンライン開催)
- 9. 穴竃理樹、肥高龍彦、景山達斗、福田淳二 毛髪再生 医療に向けた毛包オルガノイドの構築,第43回日本バ イオマテリアル学会大会,(2021/11/28-30)
- 10.景山達斗,福田 淳二, Hair organoid model for melanosome production and transport, 第 44 回日本分子生物学会(シ ンポジウム講演 2021/12/1-3 ※オンラインオンサイト 併用)

- 11.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 第10回日本 生物工学会東日本支部コロキウム (2022/3/10 ※オン ライン開催)
- 12.Tu Shan、景山達斗、福田淳二, in vitro hair follicle models for study of hair graying 化学工学会第 87 年会 (2022/3/16-18*オンラインオンサイト併用)
- 13.Seo Jieun, Junji Fukuda, Chun Yang Sook, A 3D cell culture system for investigating crosstalk mechanisms in the tumor microenvironment, 化学工学会第 87 年会(2022/3/16-18 *オンラインオンサイト併用)
- 14.福田淳二、細胞組織の作製と臓器チップ、第43回未 来医学研究会大会(2021/7/10 ※オンライン開催)
- 15.福田淳二、毛髪再生医療のための微小環境制御、第70 回高分子討論会(2021/9/6 ※オンライン開催)
- 16.福田淳二、化学物質の in vitro 細胞アッセイ法の開発、情報計算化学生物学会(CBI学会)2021年大会(2021/10/27 ※オンライン開催)
- 17.Junji Fukuda, Engineering 3D tissues in vitro based on oxygen supply, MRSTIC2021(2021/11/4 ※オンライン開 催)
- 18.福田淳二、培養基板の微細加工と毛髪の再生医療、高 分子学会印刷・情報・電子用材料研究会(2021/11/25 ※オンライン開催)
- 19.福田淳二、「再生毛髪の大量調製革新技術開発」プロ ジェクト、Innovation Hub 2021 (2021/12/3 ※オンライ ン開催)
- 20.福田淳二、再生・細胞医療の可能性を、ものづくり工
 学と評価法開発との融合から挑戦!、RINK FESTIVAL
 2022 (2022/2/18 *オンラインオンサイト併用)
- 21.福田淳二、毛髪再生医療のための工学的アプローチ、 第 21 回日本再生医療学会総会(2022/3/17-19 ※オン ライン開催)

【特許】

(1)国内特許出願 5件

(2)国際特許出願 2件

研究報告2022 目次 【研究開発部】

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

٠	総括	92
٠	JigSAPによる亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた齧歯類での実証実験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	95
•	JigSAPによる亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた形態学的定量解析系の確立・・・・・・・・・	98
٠	業績	101

「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

プロジェクトリーダー 味岡 逸樹

【基本構想】

国内死因の第3位となっている脳血管障害のうち、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、我が国の「寝たきり」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)は、皮膚や肝臓の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。

一方、医師の側にも悩みがある。脳梗塞発症後 4.5 時間以内であれば血栓溶解治療薬を投与できるが、 2%程度の患者にしか治療効果が得られていない。発症8時間以上の患者に対しては安定期まで見守ること しかできず、医師もまた、亜急性期の重度脳梗塞患者に効果のある何らかの治療法を求めているのが現状 である。

戦略的研究シーズ育成事業(「脳梗塞治療のためのスキャフォールド材料」)では、生体適合性が高く、 脳内投与に適した硬さに分子設計した16アミノ酸からなる両親媒性ペプチド (RADA)3-RADG を開発した。 本プロジェクトでは、この超分子ペプチドを革新的な医薬品へと開花させるため、低免疫原性の短いア ミノ酸からなる両親媒性ペプチドを開発し、「細胞フリー再生治療医薬品」への展開を実現する。なお本プ ロジェクトは神奈川県が掲げる「ヘルスケア・ニューフロンティア」事業の一角としても研究を進めてい く。

1. 2021 年度の研究目的

プロジェクト1年目となる 2021 年度は、以下の各項目 を重点項目として開発を進めた。

(1) 11 アミノ酸からなる JigSAP (Jigsaw-shaped selfassembling pepitide)の開発

細胞外マトリックス (ECM) は生体内で細胞足場として の機能に加えて、吸着した生理活性物質を局所的に放出し、 細胞の分化増殖を精密に制御する機能を持つ。損傷した生 体組織の再生研究開発において、様々な人工 ECM が開発 されてきたが、体内安全性の高い両親媒性ペプチドを材料 にした超分子ペプチドゲルが注目を浴びている。最もよく 知られている (RADA)4 ペプチド (Ac-RADARADARADA-NH2)は、PuraMatrix®という商 品名で研究用の人工 ECM として販売され、PuraStat®とい う商品名で臨床用の止血剤として販売されている。しかし ながら、脳内に投与するには硬すぎるという問題があり、 本プロジェクトの非常勤研究員で計算物理学を専門とす る北里大・渡辺准教授と有機化学を専門とする農工大・村 岡教授との共同研究にて、分子集合体構造を予測する分子 動力学(MD)シミュレーションを新たに確立し、脳内投 与に適した硬さに分子設計した 16 アミノ酸からなる両親 媒性ペプチド (RADA)₃-RADG (Ac-RADARADARADG-NH2) を開発した (Ishida et al., Chem Eur J 2019, doi: 10.1002/chem.201902083)

しかしながら、(RADA)4 および(RADA)3-RADG は酸性

条件では流動性の高いゲル状態であるため、酸性状態で生 理活性物質と共存させる必要があり、活性状態を保持する という観点から中性で扱えるペプチドの開発が必要とさ れていた。また、体内投与する際に免疫原性を可能な限り 抑えるため、短いアミノ酸配列でゲル化するペプチドの開 発が必要であった。

そこで本プロジェクトでは、中性でゲル化し、短いアミノ酸でゲル化するペプチドの開発を目的とした。

(2) JigSAP ゲルからの修飾タンパク質徐放効果の検討

前述したように、人工 ECM には細胞足場としての機能 の他に、生理活性物質を局所的に徐放する機能が重要であ る。しかしながら、生理活性物質の吸着と放出はトレード オフの関係にあり、実際、予備実験の結果から、(RADA)4 あるいは(RADA)3-RADG 配列を付加した生理活性タンパ ク質を(RADA)4 あるいは(RADA)3-RADG に取り込ませた ところ、ペプチド配列付加によりゲルへの取り込みが顕著 に増加したものの、ほとんどゲルから放出されないという 知見を得た。この理由として、(RADA)4 あるいは(RADA)3-RADG ペプチドでは、アラニン側鎖からなる疎水面が平面 形状であるため、疎水性相互作用が強固になり、一度取り 込んだペプチドタグ付きタンパク質を放出しにくいこと が考えられた。そこで、新規ペプチド開発では両親媒性ペ プチドの疎水面に、吸着と放出の起こりやすい分子設計を 行い、新規ペプチドタグを付加したタンパク質の取り込み と徐放を達成する新規ペプチドの開発を目的とした。

(3) 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を使ったマウス 脳梗塞モデルの治療効果検討とその作用機序解析

齧歯類脳梗塞モデルにおいて、VEGF を亜急性期に脳内
 連続投与すると運動機能障害が回復すると報告されている(Zhang et al., J Clin Invest 2000,
 https://doi.org/10.1172/JCI9369)。そこで本プロジェクトでは、新規ペプチドタグを付加した VEGF を超分子ペプチドゲルから徐放させ、単回投与で治療効果を発揮させることを目的とした。

(4) 形態学的な再生を定量的に評価する実験系の開発

非臨床 POC 取得には、脳梗塞後の再生メカニズム解明 が必要不可欠であり、特に形態学的な解析が鍵となるため、 2021 年度には超高解像度顕微鏡と三次元画像解析ソフト ウエアを研究室に設置し、定量解析の実験系確立を行った。

2. 2021 年度の研究成果

(1) 11 アミノ酸からなる JigSAP (Jigsaw-shaped Selfassembling pepitide)の開発

短いアミノ酸からなり、中性でゲル化し、タンパク質の 取り込みと徐放を達成する新規 11 アミノ酸からなるペプ チド (Ac-RIDARMRADIR-NH2) JigSAP を開発した (図 1ad)。JigSAP は、凹凸を持つ組木状の疎水面を有しており、 合致する凹凸部との選択的疎水性相互作用と、水素結合に よるβシート形成によって自己選択的に一次元集積する。 凹凸状疎水面は、グリコホリン A などのホモ二量体蛋白 質に広く見られる構造であり、その特徴的な構造モチーフ である AXXXA 配列や GXXXG 配列は、αヘリックスか らβストランドへとコンフォメーション変化することが 知られている。実際に JigSAP は、水中でヘリックスから βシートへの構造変化を示してゲル化し、この動的変化と





図1: JigSAP によるハイドロゲル形成

a, Ac-RIDARMRADIR-NH₂ (JigSAP) の空間充填モデル、凹 凸状の疎水性表面を示す. b, MD シミュレーションにより 得られた JigSAP の水中超分子構造のスナップショット. c, 37℃で 48 時間培養した JigSAP の写真 (ペプチド濃度: 1.0 wt%, pH 7.4)。矢印はハイドロゲルを示す. d, JigSAP の透過 型電子顕微鏡写真. e, f, JigSAP の貯蔵弾性率 (G', 赤) と損 失弾性率 (G'', 青) の時間変化. g,h, JigSAP の円二色性 (CD) スペクトル. h, JigSAP の CD シグナル強度の時間変 化 (217.6 nm).

並行して粘弾性も増加した(図 le-h)。JigSAP はこの動的 特性のため、溶解直後に脳内投与しやすい柔らかさを有し ている点が特徴である。

また、JigSAP の細胞接着能を 3T3 細胞を用いた細胞接 着実験で検討し、(RADA)4(=RADA16)と同等の細胞接着 能を有していることが判明した(図2)。



図 2 : JigSAP ペプチドの細胞接着性

a-e,Sigmacote (a), 非コート対照 (b), Fibronectin (FN) (c), RADA16 (d), JigSAP (e) でコートしたチャンバースライドに 接着した線維芽細胞の DAPI 蛍光像. f,接着した線維芽細胞 の細胞数. *P<0.05

凹凸形状の疎水性表面が超分子特性へ与える影響を調べるために、疎水性表面が平面の両親媒性ペプチドである 5V (Ac-RVDVRVRVDVR-NH₂)を合成した(図 3a)。5V は



図 3: 平面形状の疎水性表面を持つ 5V ペプチドの特性 a,5V ペプチドの FSAP としての特性. Ac-RVDVRVDVR-NH2 (5V)の空間充填モデル. b,MD シミュレーションで得られた、 5V の超分子構造スナップショット. C,5V の写真.

MD シミュレーションにより、非一方向性のメッシュ状構 造を形成することが予測され(図3b)。実際、5V は溶液中 で懸濁液のままであり、ゲル化しなかった(図3c)。

以上の結果より、独自に開発した JigSAP は、11 アミノ 酸という短いペプチドでありながらも、中性でゲル化し、 脳内投与に適した動的特性を示し、人工 ECM としての重 要な細胞接着性も有することが明らかとなった。

(2) JigSAP ゲルからの修飾タンパク質徐放効果の検討

JigSAP 配列を付加したタンパク質の吸着と徐放を評価 するために、緑色蛍光タンパク質 EGFP を用いて検討した。 吸着に関しては、従来の(RADA)4 配列を付加した場合と同 様に JigSAP 配列の付加でゲルへの取り込み効率が顕著に 増加したが、放出に関しては従来の(RADA)4 配列タグの10 倍以上のタンパク質を約1週間かけて徐放することが判 明し、吸着と放出の起こりやすい分子設計に成功した。な お、この詳細は研究員・原の研究報告欄に記載した。

(3) 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を使ったマウス 脳梗塞モデルの治療効果検討とその作用機序解析

JigSAP 配列を付加した VEGF も、EGFP と同様に約1週 間かけて徐放することを確認し、戦略的研究シーズ育成事 業で確立した、マウス中大脳動脈遠位部梗塞(dMCAO) モデルと光化学反応誘発性血栓形成(PT)モデルの2種類 の脳梗塞モデルマウスを用いて、VEGF-JigSAPの治療効果 を検討し、脳梗塞発症1週間後の脳内単回投与で歩行機能 改善を認めた。また、血管内皮細胞の増殖促進と数の増加、 および、ニューロン数減少の抑制を認め、VEGF-JigSAP に よる亜急性期脳梗塞モデルの治療効果は血管新生とニュ ーロン細胞死抑制効果の影響によるものと示唆された。こ の詳細は研究員・原と準研究員・秋本の研究報告欄に記載 した。

(4) 形態学的な再生を定量的に評価する実験系の開発

非臨床 POC 取得には、損傷脳の再生メカニズム解明が 必要不可欠である。特に形態学的な解析が鍵となるため、 超高解像度顕微鏡と三次元画像解析ソフトウエアを駆使 し、定量解析の実験系確立を行い、血管体積と血管分岐を 定量化に成功した。また、損傷領域近傍でのミクログリア による貪食活性を評価できる観察系を確立した。この詳細 は準研究員・秋本の研究報告欄に記載した。

JigSAP による亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた

齧歯類での実証実験

「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

原 央子

1. はじめに

人工細胞外マトリックス (ECM) には細胞足場としての 機能の他に、生理活性物質を局所的に放出する機能が重要 である。11 アミノ酸からなる JigSAP (Jigsaw-shaped selfassembling peptide) (Ac-RIDARMRADIR-NH₂) は、凹凸形 状を持つ組木状の疎水面を有しており、JigSAP 配列を付 加したタンパク質と混合してゲル化することで、タグ付き タンパク質を効率的に取り込み、数日かけて徐放すること を狙って開発した両親媒性ペプチドである。そこで 2021 年度は、タンパク質の吸着と徐放を評価し、血管内皮細胞 増殖因子 (VEGF) を使った亜急性期脳梗塞治療の実現に 向けた齧歯類での実証実験を行った。

2. 実験と結果

(1) JigSAP ゲルからの修飾タンパク質の徐放効果検討

C 末端側に、疎水性表面が凹凸形状を持つ JigSAP およ び疎水性表面が従来の平面形状を持つペプチド 5V (Ac-RVDVRVRVDVR-NH₂) 及 てド RADA16 (Ac-RADARADARADA-NH2) を付加した EGFP-JigSAP、 EGFP-5V、EGFP-RADA16のペプチドゲルへの取り込みを 検討した (図 1a)。ペプチドタグ付き EGFP を対応する両 親媒性ペプチドと混合し、ペプチドタグ付き EGFP のペ プチドゲルへの取り込み効率を、ELISA 法によって評価し た (図 1b-d)。JigSAP 付加 EGFP タンパク質とタグなし EGFP タンパク質の間では、取り込み効率に顕著な差を認 めた (図 1b)。同様に、5V と RADA16 付加 EGFP タン パク質も、タグなし EGFP よりも対応するペプチドゲル への高い取り込み効率を示した(図 1 c,d)。これらの結果 より、タンパク質の取り込みにペプチドタグが重要な役割 を果たすことが示唆された。

放出に関しては、JigSAP ペプチドゲルは、従来の疎水性 表面が平面形状のペプチドゲルよりも、タグ付きタンパク 質の長期放出能を発揮することが生体外実験により明ら かとなった(図1e)。

次に、生体内において JigSAP タグ付きタンパク質が in vivo 注入部位から放出されるかどうかを調べるために、 EGFP-JigSAP と EGFP-RADA16 をそれぞれ混合した JigSAP と RADA16 ペプチドを非損傷マウス脳内に投与し



図 1 : JigSAP タグ付き EGFP タンパク質の効率的な組み込 みと徐放化

a,実験デザイン:JigSAP ペプチドをコードする配列を EGFP cDNA の C-末端に付加した.EGFP-JigSAP を発現す るプラスミドを 293T 細胞に遺伝子導入し、粗精製した EGFP-JigSAP タンパク質を過剰量の JigSAP と混合した. b-d,ペプチドタグ付き GFP と非タグ付き GFP の取り込み 比率を示す.EGFP-JigSAP (b,赤色),EGFP-5V (c,青色), EGFP-RADA16 (d,灰色) はそれぞれ JigSAP, 5V, RADA16 ペプチドと混合してゲル化した.タグなし EGFP (b-d、黒 色) をコントロールとして用いた.e,GFP の放出量と取り 込まれた GFP との比率.EGFP-JigSAP (赤色)、EGFP-5V (青色)、EGFP-RADA16 (灰色) は、それぞれ JigSAP、5V、 RADA16 ゲルからの放出である.

た(図 2)。投与 3 時間後で、EGFP-JigSAP および EGFP-RADA16 注入脳の両方で、投与した部位に EGFP 蛍光シグ ナルが明確に検出された(図 2 a, b)。一方、投与 72 時間 後では、EGFP-RADA16 投与脳でのみ明確な EGFP シグナ ルが検出され、EGFP-JigSAP の注入部位からの放出が示唆 された。

投与した JigSAP ペプチドの免疫原性を検討するために、 JigSAP と RADA16 投与 7 日目後にニューロンマーカー NeuN、活性化アストロサイトマーカーGFAP、ミクログリ



図 2: EGFP-JigSAP および EGFP-RADA16 の脳への注入 a-d、注入後 3 時間 (a、b) および 24 時間 (c、d) の脳の EGFP 蛍光画像(緑色) および DAPI (青色) 画像。(a,b,d) の矢印は EGFP シグナルを示す。



図 3: JigSAP と RADA16 の脳内注入後の異物反応評価 4-ペンチノイル基を有する JigSAP と RADA16 (Alkyne-JigSAP と Alkyne-RADA16) を用いて、in vivo でのペプチド ゲルを可視化した.活性化アストロサイトマーカーGFAP (緑色) (a-d),ミクログリアマーカーIba1 (マゼンタ色) (e-h)、ペプチドゲル (黄色) (i-l).

アマーカーIbal で免疫染色した (図 3)。JigSAP 投与部位 において Ibal、GFAP 陽性細胞が検出されたが、異物反応 レベルは軽度であり、ヒトで既に臨床応用されている RADA16 投与部位と同程度であった。以上の結果から、 JigSAP 付加タンパク質を JigSAP と混合投与することで、 重大な異物反応を引き起こすことなく、生体内徐放の達成 に成功した。

(2) 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を使ったマウス 脳梗塞モデルの治療効果検討

このような JigSAP システムの動的特性を踏まえ、血管





図 4: JigSAP タグ付き VEGF タンパク質の持続的な放出 と in vitro 血管新生

a, ペプチドゲルへの VEGF の取り込み比率。VEGF-JigSAP (赤色) とタグなし VEGF (黒色). b, VEGF の放出量と取 り込まれた VEGF の比率. c-j, 血管内皮細胞マーカー Lycopersicon esculentum lectin (LEL) (マゼンタ色) および DAPI (青色) による HUVEC. (d) および (h) の矢印は、 管腔様構造を示す. (e) と (i) の矢印は、死細胞の特徴であ る核の凝縮を示す. k、HUVEC の細胞数測定.

内皮細胞増殖因子(VEGF)タンパク質を用いたマウス脳 梗塞モデルの治療効果検討を行った。EGFP-JigSAPのデー タから予想された通り、JigSAP 付加 VEGF タンパク質 (VEGF-JigSAP)は、タグなし VEGF よりも効率的に JigSAP ペプチドゲルに取り込まれ(図 4a)、さらに、VEGF-JigSAP は、EGFP-JigSAP 同様の長期放出が認められた(図 4b)。VEGF-JigSAP を取り込んだ JigSAP ペプチドゲルが in vitro 血管新生を促進するかどうかを調べるために、コ ラーゲンゲル中でヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の管 腔様形成アッセイを実施し、ゲル内に取り込まれた VEGF-JigSAP が溶液に添加したリコンビナント VEGF と同程度 の活性が認められ、VEGF-JigSAP が VEGF 同様の生物活 性を持つことが示された(図 4 c-k)。

そこで、マウス中大脳動脈遠位部梗塞(dMCAO)モデ ルと光化学反応誘発性血栓形成(PT)モデルの2種類の脳 梗塞モデルマウスを用いて、VEGF-JigSAPの治療効果を検 討した。図5に示すように、dMCAO作製7日後の歩行機 能解析テスト(FFT)を行った直後にペプチドゲルを脳内 に単回投与し、投与7日後にFFTを行った。その結果、 JigSAPゲル単独、VEGF-JigSAP単独、タグなしVEGF+ JigSAP混合投与群では歩行機能改善効果が認められなか ったが、VEGF-JigSAP+JigSAPの単回投与群では顕著な歩 行機能改善効果が認められた(図5a)。さらに、VEGF-JigSAPとVEGF-RADA16の効果を比較するために、VEGF-JigSAPとVEGF-RADA16を取り込ませたJigSAPと



図 5: VEGF-JigSAP を組み込んだ JigSAP ペプチドゲルの 単回注入による脳梗塞モデルマウスの機能回復. a, dMCAO モデル b, 光血栓 PT モデル。*P<0.05 n=7.

RADA16 ペプチドゲルをそれぞれ注入した。この実験では、 VEGF-JigSAP+JigSAP が dMCAO モデルでのみ機能回復 を促進した可能性を排除するために、PT モデルを使用し た。VEGF-JigSAP+JigSAP は PT モデルでの行動回復も改 善したが、VEGF-RADA16+RADA16 は改善しなかった (図5b)。これらの結果より、脳梗塞発症1週間後のVEGF-JigSAP+JigSAP の脳内単回投与が、亜急性期マウス脳梗 塞モデルの治療効果を持つことが判明した。

今後の展望

亜急性期脳梗塞の治療効果を持つ VEGF には血管透過 能もあることから、未だ臨床応用されていない。また、化 学合成では製造できない分子量の大きいタンパク質のた め、臨床応用に向けて莫大な製造費用を要するという問題 点もある。今後は臨床応用に適した化学合成可能な生理活 性物質を用いて、開発研究を進めていく。

JigSAP による亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた

形態学的定量解析系の確立

「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 秋本 沙織

1. はじめに

JigSAP の医薬品展開に必要不可欠となる非臨床 POC 取 得には、脳梗塞後の再生メカニズム解明が必要不可欠であ り、特に形態学的な解析が鍵となる。有望シーズ展開事業 の初年度となる 2021 年度は、超高解像度顕微鏡と三次元 画像解析ソフトウエアを研究室に設置し、定量解析の実験 系確立を行った。

2. 実験と結果

(1) 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を使った脳梗 塞治療効果の作用機序解析

マウス脳梗塞モデルとして、本研究では中大脳動脈遠位部 梗塞(dMCAO)モデルを用いた。dMCAO 作製1週間後に VEGF-JigSAP+JigSAP を脳内単回投与し、さらに1週間 後に脳組織切片を作製して、組織学的解析を行った。損傷 中心部や損傷周囲のペナンブラ領域の体積には影響を与 えず、また、Iba1 陽性領域で測定される病変サイズの減少 も認められなかった(図1)。



図1:ペプチド注入後の病変領域評価。 a,対照群(PBS 投与)損傷部位の Iba1 染色画像.b, Iba1 強 陽性部位の体積測定

そこで、血管内皮細胞のマーカーラミニンの免疫組織染 色を行ったところ、VEGF-JigSAP+JigSAPの脳内単回投与 により、ペナンブラにおけるラミニン陽性細胞の数が増加 した(図2b-f,v)。また、チミジンアナログのEdUを8時 間おきに7日間腹腔内注射して増殖細胞を標識し、増殖血 管内皮細胞の数を調べた。VEGF-JigSAP+JigSAPの投与 で、EdU/ラミニン共陽性細胞数が有意に増加し(図2g-u、 w)、ペナンブラでの血管新生促進が示唆された。次に、神 経保護効果を評価するために、変性したニューロンを標識 するFluoro-Jade C (FJC) 染色とニューロンマーカーNeuN の抗体染色を行った。VEGF-JigSAP+JigSAPの投与によ



a,実験デザイン.dMCAO 後7日目に、ペプチドゲルを脳 内に単回投与し、EdU を8時間置き1週間投与して増殖細 胞をラベルした.b-f、ラミニン(緑色)、g-k、EdU(マゼン タ色)、l-p、損傷中心部とペナンブラの境界におけるラミニ ン(緑色)とEdU(マゼンタ色)染色画像。q-u、ペナンブ ラでのラミニン(緑色)、EdU(マゼンタ色)、DAPI(青色) の高倍率画像.v、w、ペナンブラでのラミニン陽性(v)お よびEdU/ラミニン共陽性(w)細胞の細胞数測定.

り、ペナンブラでのNeuN 陽性細胞数が増加し(図3a-j)、 FJC 陽性細胞数が顕著に減少した(図3k-t)ことから、ペ ナンブラでの神経細胞死を抑制していることが示唆され た。過去の報告において、VEGF が脳損傷後の成体ニュー ロン新生を促進することが知られている。我々は、 EdU/NeuN 共陽性細胞の数を調べることで、成体ニューロ ン新生への影響を評価したが、共陽性細胞は観察されなか った。したがって、VEGF-JigSAP+JigSAPの脳内単回投与 は、成体ニューロン新生を促進することなく、血管新生と 神経保護を促進することが示唆された。



図3: VEGF-JigSAP を組み込んだ JigSAP ペプチドゲルの 単回注入による脳梗塞モデルマウスの神経保護作用. a-f、損傷中心部とペナンブラの境界における NeuN (マゼン タ色) (a-c) および NeuN (マゼンタ色) /LEL (緑色) (d-f) 染色画像. g-i、ペナンブラにおける NeuN (マゼンタ色)、 LEL (緑色) および DAPI (青色)の高倍率画像。j、ペナン ブラにおける NeuN 陽性細胞の細胞数測定 k-p、損傷中心部とペナンブラの境界における FJC (緑色)

k-p, 頃 (本中) についた (本色) (カーア) (本中) についた (本色) (ホーア) および FJC (緑色) /DAPI (青色) (n-P) 画像、q-s、ペナンブラにおける FJC (緑色) /DAPI (青色) の高倍率 画像.t、ペナンブラにおける FJC 陽性細胞の細胞数測定.

(2) 形態学的な再生を定量的に評価する実験系の開発

非臨床 POC 取得には、損傷脳の再生メカニズム解明が必 要不可欠である。特に形態学的な解析が鍵となるため、 2021 年度上半期には超高解像度顕微鏡と三次元画像解析 ソフトウエアを研究室に設置し、定量解析の実験系確立を 行った。図4は、ペナンブラと反対側の非損傷部位の血管 体積と血管分岐を定量化し、観察系を確立したことを示す 図である。具体的には、生体組織と屈折率が近いシリコン オイルとシリコンオイル対応25倍対物レンズを用いて、 200µm x 200µm x100µm の血管画像を顕微鏡で取得し、三 次元画像解析ソフトウエアにて血管表面をオブジェクト 化した。なお、血管画像の取得には、タモキシフェン投与 により血管内皮細胞で赤色蛍光タンパク質が発現する遺 伝子改変マウスを利用し、血管の体積の定量化は血管表面 のオブジェクト画像(図4の上の画像)を用いた。その解 析の結果、損傷部は非損傷部に比べて顕著に血管が発達し ていることが定量的に示された(図4表)。一方、血管分 岐の程度を定量化するために、血管分岐間の平均距離を定 量化するプロトコルを作製した(図4の下の画像で緑色で 示されている血管)。このプロトコルにより、血管までの 距離を正確に測定することができ、実際、損傷部の方が血 管分岐までの距離が短く、損傷後に新たな血管分岐が生じ



	損傷部	非損傷部	
血管の体積	697,283	278,253	um3
血管分岐間の平均距離	39.18	32.41	um



図4: 血管体積の定量化と血管分岐間の平均距離測定

図5: ミクログリア活性評価

た可能性が示された (図4表)。

さらに、損傷領域と非損傷領域の識別を試みた。形態学 的な解析による損傷再生メカニズム解明において、損傷領 域と非損傷領域の区別の指標が有用だが、ペナンブラと呼 ばれる損傷領域周辺部は、その知見が重要な意味を持つに も関わらず、境界が不明瞭であることから厳密に調査する ことが難しい。我々の脳梗塞モデルマウスにおいても、脳 組織染色により損傷領域を特定できるが、損傷中心部や損 傷周辺部であるペナンブラ、非損傷領域の境界を明確にす ることは難しいため、指標を作り一定の条件で領域を区別 してより明瞭な形態学的解析データを得たい。

一方で、損傷が強い領域においてミクログリアが活発に 活動し、損傷による細胞死などから発生した老廃物を貪食 することは、これまでの多くの研究で明らかにされてきた。 ミクログリアの形態や貪食程度により損傷領域の境界の 指標を設定できれば、本研究で行う損傷脳再生メカニズム の解明の形態学的な定量解析で、より明瞭な結果を得られ ると期待できる。

損傷部と反対側の非損傷部位のミクログリアの食食程 度を可視化したところ、食食程度の比較に成功した。具体 的には、脳梗塞モデルマウスの Ibal 陽性細胞内にニュー ロン由来の老廃物が蓄積しているかを可視化した。恒常的 にニューロンで蛍光タンパク質 YFP を発現するトランス ジェニックマウスで脳梗塞モデルを作製し、損傷領域を含 む組織をミクログリアのマーカーである抗 Ibal 抗体染色 を行った。

共焦点蛍光顕微鏡でXYZの撮影をして得られた Ibal 陽 性のミクログリアの細胞質内に蓄積された神経細胞由来 の蛍光タンパク質 YFP の有無を xyz の 3 次元画像解析に より検証しところ、損傷領域近傍の Ibal 陽性細胞内に多 数の YFP シグナルを検出し、非損傷領域では Ibal 陽性細 胞内の YFP シグナルはほとんど得られなかった (図 5)。 この観察方法により、まず損傷領域近傍でミクログリアに よる貪食活性を評価できる観察系を確立した。

3. **今後の展望**

本研究で確立した形態学的な再生を定量的に評価でき る実験系は、多検体サンプルの解析を可能にする。本研究 で明らかとなった亜急性期脳梗塞の治療効果を持つ VEGFには血管透過能もあることから、未だ臨床応用され ていない。また、化学合成では製造できない分子量の大き いタンパク質のため、臨床応用に向けて莫大な製造費用を 要するという問題点がある。今後は臨床応用に適した化学 合成可能な生理活性物質を用いて開発研究を進めていく が、本研究で確立した形態学的再生の定量評価で研究開発 の加速化を図る。

業

績

【原著論文】

 Atsuya Yaguchi, Mio Oshikawa, Go Watanabe, Hirotsugu Hiramatsu, Noriyuki Uchida, Chikako Hara, Naoko Kaneko, Kazunobu Sawamoto, Takahiro Muraoka, and Itsuki Ajioka Efficient protein incorporation and release by a jigsaw-shaped self-assembling peptide hydrogel for injured brain regeneration.

Nature Commun. **12**, 6623 (2021)

2. Jindan Sheng, Susumu Kohno, Nobuhiro Okada, Nobuyuki Okahashi, Kana Teranishi, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, Paing Linn, Naoko Nagatani, Minako Yamamura, Kenichi Harada, Shin-ichi Horike, Hiroshi Inoue, Seiji Yano, Sharad Kumar, Shunsuke Kitajima, Itsuki Ajioka, and Chiaki Takahashi

Treatment of Retinoblastoma 1–Intact Hepatocellular Carcinoma With Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Combination Therapy.

Hepatology 74, 4, 1971-1993 (2021)

 Chiharu Ueda, Junsu Park, Kazuya Hirose, Subaru Konishi, Yuka Ikemoto, Motofumi Osaki, Hiroyasu Yamaguchi, Akira Harada, Masaru Tanaka, Go Watanabe, Yoshinori Takashima, Behavior of Supramolecular Cross-Links Formed by Host-Guest Interactions in Hydrogels Responding to Water Contents.

Supramolecular Materials 1 100001 (2021)

 Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu, Atsuya Ishida, Mio Oshikawa, Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka, Hydrogel-Stiffening and Non-Cell Adhesive Properties of Amphiphilic Peptides with Central Alkylene Chains. *Chem Eur J* 27, 36, 9295-9301 (2021)

【口頭発表】

- 露木 弘美、上田 智也、西村 慎之介、塩本 昌平、村 上 大樹、田中 賢、渡辺 豪、 分子動力学シミュレーションを用いた生体親和性ポリ マーブラシのミクロダイナミクス解明 日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
- 石井 佐和、西村 達也、前田 勝浩、渡辺 豪 分子動力学シミュレーションによる外部刺激応答性ら せん高分子の構造解明
 日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
- 3. 河北杏樹、内田紀之、村岡貴博 リン脂質膜変形分子素子の開発(2):チューブ状リン

脂質膜の形成を誘導する CaRL ペプチドの設計と応用

 三浦恵理香、奥村正樹、村岡貴博 液液相分離を利用した酸化的タンパク質フォールディ ング操作

日本化学会 第102 春季年会, 2022 年3月, オンライン

- 日本化学会 第102春季年会, 2022年3月, オンライン
- 5. 野尻涼矢、村岡貴博 凝集抑制効果を併せ持った酸化的タンパク質フォール ディング促進剤の開発 日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
- 6. 松本陽佑、松崎元紀、稲葉謙次、奥村正樹、村岡貴博 芳香族化合物による酸化的タンパク質フォールディン グ促進効果 日本化学会 第102春季年会,2022年3月、オンライン
- 西野隼人、三宅亮介、村岡貴博 酸化的タンパク質フォールディングを操作するポリカ チオン化合物の開発 日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
- 矢口敦也、平松弘嗣、味岡逸樹、村岡貴博 高次構造転移特性を有するヒドロゲル化ペプチドの開 発と組織再生への応用 日本化学会 第102春季年会,2022年3月,オンライン
- 9. 岡田隼輔、奥村正樹、村岡貴博 生体酵素模倣を指向したタンパク質酸化的フォールディング促進剤の開発 日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
- 10.内田紀之、村岡貴博 リン脂質膜変形分子素子の開発(1):光応答性両親媒性 分子を用いたエンドサイトーシス様ベシクル分裂 日本化学会 第102春季年会,2022年3月、オンライン
- 11.Go Watanabe, Mitsuo Hara, Jun Yoshida、 Visualizing helical stacking of propeller-shaped metallomesogen molecules: a molecular dynamics study. Pacifichem 2021、2021 年 12 月, オンライン
- 12.Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu, Mio Oshikawa, Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka Development of synthetic amphiphilic peptides with bio-functions and stimuli-responses Pacifichem 2021, 2021 年 12 月, オンライン

13.Itsuki AjiokaArtificial Scaffolds Mimicking The ExtracellularEnvironment of Developing Brainthe 16th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for

Neurochemistry (APSN), 2021 年 12 月, オンライン

- 14.味岡 逸樹、村岡 貴博、渡辺 豪
 粘弾性を調節した超分子ペプチドゲルの開発と脳梗塞
 の再生治療
 第 44 回日本分子生物学会年会,2021 年 12 月, 横浜・
 オンライン
- 15.味岡 逸樹、矢口 敦也、押川 未央、渡辺 豪、村岡 貴博 VEGF を徐放する超分子ペプチドの開発と亜急性期脳梗 塞の再生治療 第43回日本バイオマテリアル学会大会,2021年11月, 名古屋・オンライン

16.渡辺豪、關拓和、石井宏幸、竹谷純一、岡本敏宏 革新的有機半導体分子創製を目指した計算科学的手法 の確立 2021年分子シミュレーション討論会,2021年11月,岡山

- 17.矢口敦也、平松弘嗣、味岡逸樹、村岡貴博
 高次構造転移し超分子ゲルを形成する新規自己集合性
 ペプチドの開発と応用
 第11回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, オンラ
 イン
- 18.付若瀛、内田紀之、村岡貴博
 二次構造転移を伴う自己集合性ペプチドの開発とゲル
 形成特性
 第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, オンラ
 イン
- 19.渡辺 豪
 シミュレーションで水圏機能材料における分子の動きを"視る"
 第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, オンライン
- 20.關 拓和、渡辺 豪、竹谷 純一、岡本 敏宏
 有機半導体分子が示す結晶多形を再現する分子動力学
 計算手法の確立
 第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, オンラ
 イン
- 21.味岡 逸樹、村岡 貴博、渡辺 豪 超分子ペプチドの設計と脳梗塞の再生治療

第64回日本神経化学会大会,2021年9月,オンライン

- 22.Go Watanabe, Mitsuo Hara, Jun Yoshida A Molecular Dynamics Study of Helical Columnar Liquid Crystals Based on Propeller-Shaped Metallomesogens Optics of Liquid Crystals 2021, 2021 年 9 月, 沖縄
- 23.渡辺 豪、栄村 弘希、アボット ニコラス、加藤 隆史 生体分子認識部位を持つ両親媒性メソゲンの水面上単 分子膜におけるタンパク質吸着の分子動力学シミュレ ーション 2021年日本液晶学会討論会,2021年9月、オンライン
- 24.矢口 敦也、平松 弘嗣、味岡 逸樹、村岡 貴博 アルキレン鎖導入ペプチドの超分子ファイバー形態と 機能 日本化学会 生体機能関連化学部会 若手の会 第 32 回 サマースクール, 2021 年 7 月, オンライン
- 25.矢口 敦也、石田 敦也、押川 未央、味岡 逸樹、平松 弘 嗣、村岡 貴博 自己集合性ペプチド中央へのアルキレン鎖導入効果 2021 年繊維学会年次大会,2021 年 6 月,オンライン

【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 1件

研究報告2022 目次 【研究開発部】

実用化実証事業

「人工細胞膜システム」グループ

•	総括	104
•	微小気泡を用いる脂質二重膜の再形成技術・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	106
•	昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞の機能評価技術の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	109
•	DNAを用いた脂質二重膜接着・融合技術・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	112
٠	業績	115

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た。2021 年度、このイオンチャネルの機能評価技術を基盤とするベンチャーの起業に至った。一方で、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。JST-CREST事業(2020年度開始)、科研費研究 (2021年度開始)において、細胞をセンサ素子として用いる研究開発も企業と共同で進めている。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. 2021 年度の研究目的

実用化実証事業9年目となる2021年度は、イオンチャ ネル機能評価システムについて、事業化に向けた実用化研 究開発を推進し、起業への道筋を立てることを目標とした。 一方で、センサ開発に関しては、これまでの細胞膜センサ 研究の成果を応用・展開して、標的物質に応答する細胞を センサ素子とするバイオハイブリッドセンサの概念実証 に向けた基盤研究を開始した。

(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実現を目標と して研究開発を行ってきた。

2021 年度は、これまで継続してきたイオンチャネル機 能評価システムについて、量産性や機能性向上に関する実 用化研究開発を完遂し、ベンチャー企業の設立につなげる ことを目標とした。

(2) バイオハイブリッドセンサの開発

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 能の化学量センサを実現できると考えられる。

イオンチャネル機能評価システムの開発成果により、マ イクロチップ上での脂質二重膜を再現良く形成し、そこに 再構成したイオンチャネルの機能を活用できるようにな った。NEDO事業(2015-2019年度)では、昆虫嗅覚受容 体を脂質二重膜に組み込んだ人工細胞膜センサのプラッ トフォーム技術を確立し、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 術の研究を行ってきた。その成果のデモンストレーション として、ヒトの呼気中に混合したごく微量の疾患マーカの 検出を実証し、新聞・TV等で取り上げられるなど注目さ れた。その結果、生体機能と機械を融合したバイオハイブ リッドセンサの基盤研究および概念実証を目的とする科 研費研究、JST事業の採択につながった。

2021 年度は、標的物質に応答する細胞をセンサ素子と する細胞センサについて、その計測技術に関する基礎研究 を開始した。光学的計測技術と電気的計測技術について、 比較検討することを目的とした。

2. 2021 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実用化研究開発を進め てきた。計測チップに関しては、東レエンジニアリング社 と共同で性能向上を目指して改良を行った。特にチップベ ースとなるプラスチック部品については、設計変更した射 出成形品を完成させ、計測データの信頼性・再現性を向上 できることが確認された。こうしたシステム開発成果に加 え、製薬企業との薬剤候補化合物評価の実証実験の結果を 踏まえ、2021年8月、同技術を活用し、イオンチャネル 創薬支援の事業化を行う「株式会社 MAQsys」が KISTEC 発ベンチャーとして設立された。 形質膜や細胞内イオンチ ャネルを標的とした薬剤候補化合物の評価を通して、新た な創薬市場の創出を目指す。KISTEC では、起業後も MAQsys 社の事業開始を支援するため、共同開発を継続す る。

成果展開として、協力研究員による萌芽研究を実施し、 その成果が Lab on a Chip 誌に掲載された。外部研究機関 との共同研究も行っており、東大豊田研究室との成果は Langmuir 誌に採択された。国際医療福祉大相馬研究室と の科研費研究や東工大松浦研究室との共同研究について も継続して実施している。 生体機能と機械を融合したバイオハイブリッドセンサ に関しては、科研費研究(2021-2025年度)による学術基 盤確立、JST-CREST事業(情報担体;2020-2025年度)に よる実用性実証を目的とした研究開発を本格的に開始し た。細胞上に発現させた受容体をセンサ素子とする細胞セ ンサに関して、東京大学、住友化学と共同で実施する。竹 内 G では、センサ細胞が標的物質に応答して発する微小 シグナルをデバイスで検出するための計測基盤について 研究を行い、概念実証のための計測システムを製作・開発 する。

2021 年度は、微小シグナルの検出技術について、光学 的技術および電気的技術それぞれの感度や応答性に関す る比較検討を開始した。標的物質と細胞表面の受容体が結 合すると、細胞内へのカルシウムイオンの流入が生じる。 光学的計測では、例えばこのカルシウムイオン濃度を蛍光 輝度に変換することで標的物質を検出する。電気的計測で は、細胞内へのイオン流入(イオン電流)や膜電位変化を 直接・間接的に検出する方法がある。こうした計測技術の 感度や応答性能などの特長について、それぞれ検討を行っ ている。また、こうした細胞や細胞膜機能を活用するバイ オハイブリッドセンサに関する研究をまとめた総説が Lab on a Chip 誌に掲載された。

(3) 共同研究による成果

JST-CREST 事業(ゲノム合成:2018-2023 年度、東大白 髭教授代表、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 では東大大杉研と共 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。カエル卵抽出液中で細胞 核様構造が形成される機能を利用し、リポソーム中に細胞 核を封入する。2021 年度は、細胞核封入リポソームの作 製に関して進展があり、学術論文への投稿に向けて同成果 をまとめているところである。

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。また、コア技術・要素技術とし て重要な成果については特許出願も行っている。

(2) バイオハイブリッドセンサの開発

微小気泡を用いる脂質二重膜の再形成技術

「人工細胞膜システム」グループ 大崎 寿久、橋本 和泉、三村 久敏、三木 則尚、竹内 昌治

1. はじめに

(1) 細胞膜モデルとしての平面脂質二重膜

細胞膜は、主に脂質二重膜と膜タンパク質から構成され る。脂質二重膜は、両親媒性の脂質分子が疎水性相互作用 により炭化水素鎖を内側に向かい合わせた構造をもつ。極 性分子やイオン等の透過を抑制し、細胞内外を隔てる役割 を主に果たす。一方、膜タンパク質は細胞内外への物質輸 送や情報の伝達に関与している。膜タンパク質は、細胞の 生理学的機能に対する寄与は大きく、その機能評価は創薬 においても不可欠になっている。

細胞膜モデルとしての平面脂質二重膜の研究は、1960年 代から行われてきた。油水界面における脂質分子の単分子 膜形成を利用した刷毛塗り法や、気液界面に形成される単 分子膜を貼り合わせる Montal Mueller 法など、脂質分子の 両親媒性の性質を使った親疎水界面における自発的な膜 形成過程を利用する脂質二重膜形成原理が多く報告され ている[1,2]。

平面脂質二重膜は、2 つのウェル間に設けられた高分子 フィルムの微小な孔に作られることが多い。微小孔周縁部 と脂質二重膜との界面は油相で保持され、ウェル間で電気 的な絶縁が保たれた状況であることから、電気的な計測に 適する。膜の静電容量など、電気的性質を明らかにする研 究や、膜タンパク質の中でイオンの透過制御に関わるイオ ンチャネルの電気生理学的研究に至るまで、細胞膜モデル、 細胞膜機能計測のプラットフォーム技術として平面脂質 二重膜は利用されている。一方で、これらの古典的な平面 脂質二重膜技術は、手順の煩雑さや並列化の困難さから、 実験室での利用にとどまっていた。

そうした中で、2000年頃より、細胞膜モデルの作製やイ オンチャネルをはじめ膜タンパク質の機能評価を細胞外 でスループット良く行うための方法として、MEMS 技術 の活用に着目が集まるようになった。MEMS 技術を使い 作製するマイクロ流体デバイスは、微小流路や微小容器を 設計することで、サンプル溶液などの希釈・混合といった 操作を迅速・効率的に行うことができる。また自動化や並 列化といった特長も併せもつ。こうしたデバイス技術の研 究の進展により、細胞外での平面脂質二重膜の形成、すな わち細胞膜を人工的に再現する「人工膜法」の研究が盛ん に行われた。こうした成果を受けて、イオンチャネルをは じめとした膜タンパク質の機能評価や機能活用といった 成果展開が期待されている[3]。 我々の研究グループでは、一対の微小液滴の間に脂質二 重膜を形成する人工膜法「液滴接触法」を発明し、その実 用化を目指した研究を続けてきた。液滴接触法も脂質分子 の両親媒性を利用した膜形成法である。デカンなどの油相 に脂質を分散しておき、そこに水滴を滴下するとその表面 には自発的に脂質単分子膜が形成される。単分子膜が表面 に形成されたこの油中水滴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 の滴下操作のみで簡便・迅速に再現良く平面脂質二重膜を 形成できる点で優れる。我々は、本方法をイオンチャネル 機能評価システム[5]や細胞膜センサ[6,7]へと応用すべく、 これまで研究開発を行ってきた。

(3) 脂質二重膜の不安定性

平面脂質二重膜を工学利用する上での課題として、膜を 作製する際の煩雑さや再現性に加えて、脂質二重膜の物理 的不安定性が挙げられている。脂質二重膜は厚さがわずか 5 nm ほどしかなく、また非共有結合性の疎水性相互作用 により膜構造を維持している。そのため、わずかな衝撃や 振動などの物理的外乱や電気的揺動が加わることで、容易 に破壊される。こうした脂質二重膜の不安定性は、セパレ ータ微小孔の縮小による膜サイズの微細化や、微小孔周縁 部の表面物性を最適化することで改善できることが報告 されている[8]。また、平面脂質二重膜に隣接しているウェ ル水溶液が揺動し、外乱となって膜破壊が生じることもあ る。これを避けるため、我々のグループでは微小液滴のス ロッシング現象に関する研究も行った[9]。しかしながら、 こうした脂質二重膜の安定化にも限度はあり、膜の破壊を 未然に防ぐことは難しい。

そこで、破壊された脂質二重膜を簡便・迅速に再現性良 く再形成する技術について検討を行っている。液滴接触法 デバイスでは、セパレータ微小孔において脂質二重膜が破 壊されると液滴同士が融合した状況となる。これまでの研 究により、融合した液滴同士を物理的に分断し、再度、接 触させることで脂質二重膜を再形成できることが分かっ ている[10]。液滴の分断と再接触はモータ等を利用すれば 自動化が可能である[11]。ただし、並列処理におけるデバ イスの複雑化は避けられない。

本研究では、破壊された脂質二重膜の再形成方法として、 微小気泡を用いて融合液滴を分断する技術について提案 した。

(2) 液滴接触法



図1: 微小気泡による平面脂質二重膜の再形成のコンセプト図。(左) デバイスのイメージ図。マイクロ流路を設け、外部のポンプから 気泡を導入する。(1) ~ (4) 膜が破壊された状態から、微小気泡により再形成されるまでの状態図。

2.実験方法

(1) 微小気泡発生デバイスの作製

脂質二重膜再形成のための微小気泡発生デバイスは、前述の液滴接触法を基盤とした[5]。8 字状に2つの円筒ウェル(直径4mm、深さ3mm)が接したダブルウェルを設け、その境界に直径600ミクロンの微小孔をもつセパレータを配置している。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て、面積が制御された平面脂質二重膜が形成される。微小気泡は、ウェル底面に設計した流路を介して発生させた。本研究では、気泡出口は直径0.5 mmとした。また、電気計測のための銀ー塩化銀電極もそれぞれのウェル底面に配置した。デバイスの模式図を図1に示す。

微小気泡発生デバイスは CAD で構造設計を行い、小型 NC 切削機を用いて作製した。材料にはアクリル板 (3 mm 厚、および 1 mm 厚)を用いた。切削したアクリル部品は ウェル、ウェル底部、マイクロ流路をそれぞれ設計した 3 層からなる。これらは、アラインメントを施した上で熱圧 着により接合した。セパレータ部品は別途アクリルフィル ムから切削し、2 つのウェル境界に挿入して接着した。気 泡導入流路は、テフロンチューブを介してシリンジに接続 した。シリンジに空気を満たし、シリンジポンプによって 気泡を吐出させた。ポンプを用いることで、吐出速度、お よび吐出時間を制御することができる。電極は銀線をウェ ル裏面から挿入し、ウェル底部側の表面は銀ー塩化銀ペー ストを塗布・乾燥させた。

(2) 微小気泡の発生による膜再形成

微小気泡発生デバイスを用いた脂質二重膜の破壊や再 形成の検証は、ナノポア形成ペプチド(アルファーヘモリシン)の膜への再構成を電気生理学的に観測することで行っ た。まず、各ウェルに 20 mg/mL DPhPC 脂質/デカン溶液、 および 1 M KCl バッファ溶液を逐次滴下することで平面 脂質二重膜を作製した。次に、デバイスに物理的振動を外 部から故意に加えて脂質二重膜を破壊した。破壊が確認で きたら、シリンジポンプを稼働させ、マイクロ流路を通し てウェル底面より微小気泡を発生させた。平面脂質二重膜 の破壊や気泡の発生、その後の脂質二重膜再形成の成否と いった一連の過程について、電気計測を行った。計測には パッチクランプ増幅器を用い、50mV 定電圧印加下で、電 流変化を観測した。観測時はアルミ箔で作製したファラデ ーケージでデバイスを覆うことで、周囲の電磁波ノイズの 影響を低減させた。

3. 結果と考察 微小気泡発生による平面脂質二重膜の 再形成過程の模式図を図1に示す。前述の通り、液滴接触 法デバイスではセパレータ微小孔に脂質二重膜が形成さ れ、膜が破壊されると、この微小孔において各ウェルの2 つの液滴が融合した状態となる(図1-1)。本研究では、セ パレータ近傍のウェル底面より微小気泡を発生させ、片側 のウェル中に微小気泡を導入する(図1-2)。導入された気 泡は、セパレータ微小孔に達すると融合した液滴を分断す る(図1-3)。その後、気泡はウェル底面より分離して液滴 表面から気中に解放される。これに伴い、セパレータ微小 孔からも気泡が離れることで、液滴同士が再度接触し、脂 質二重膜が再形成される(図1-4)。

図2に、本デバイスを用いて微小気泡により平面脂質二 重膜が再形成されたときの電流応答の結果を示す。図中 A-1は、脂質二重膜が破壊された状況を示す。液滴同士が 融合し、銀ー塩化銀電極間が1MKCI溶液でショートした 状態であるため、電流値はオーバーフローしている(図1-1に対応)。A-2において、微小気泡の発生のため、シリン ジポンプを稼働させた(図1-2に対応)。直後のA-3では、 気泡がセパレータに到達したことで、電極間が絶縁された 状態となる。そのため、オーバーフローしていた電流値が ゼロとなっている(図1-3に対応)。A-4における鋭いピー ク信号は、微小気泡がウェル底面を離れて気中に解放され、 セパレータ微小孔において液滴同士が再接触した際に生 じたものと考えられる。その後、一定の待ち時間の後、A-5においてステップ状の電流値上昇が観測されている。こ


図2:脂質二重膜の再形成プロセスにおける典型的な電流応答。

れは、アルファーヘモリシンが脂質二重膜に再構成し、ナノ ポアを形成した際に生じる信号である。本実験条件におけ るステップサイズ (コンダクタンス)も先行研究と一致し ており、少なくとも A-5 の信号が観測されるまでに平面脂 質二重膜が再形成されたと考えられる (図 1-4 に対応)。

本研究では、微小気泡を利用した平面脂質二重膜の再形 成法について試作したデバイスによる実証を行った。電流 値変化の観測結果より、微小気泡により脂質二重膜が再形 成できることを示した。一方で、微小気泡による液滴分断 などで課題があることも明らかとなり、気泡発生条件の検 討やデバイス構造の改良を進める予定である。本成果は、 物理的に不安定な脂質二重膜の再形成を簡便・迅速に行え ることを示したものであり、今後、自動化や複数の脂質二 重膜への適用など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、および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(START) の支援により行われました。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

- P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, "Methods for the Formation of Single Biomolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution," J. Phys. Chem., vol. 67, pp. 534-535, 1963.
- M. Montal and P. Mueller, "Formation of Biomolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 69, pp. 3561-3566, 1972.
- T. Osaki and S. Takeuchi, "Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications," Anal. Chem., vol. 89, pp. 216– 231, 2017.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- L. K. Bright, C. A. Baker, M. T. Agasid, L. Ma, and C. A. Aspinwall, "Decreased aperture Surface Energy Enhances Electrical, Mechanical, and Temporal Stability of Suspended Lipid Membranes," ACS Appl. Mater. Interface, vol. 5, pp. 11918–11926, 2013.
- Y. Izawa, T. Osaki, K. Kamiya, S. Fujii, N. Misawa, S. Takeuchi, and N. Miki, "Suppression of Sloshing by Utilizing Surface Energy and Geometry in Microliter Cylindrical Well," Sens. Actuators B Chem., vol. 258, pp. 1036-1041, 2018.
- 10.Y. Tsuji, R. Kawano, T. Osaki, K. Kamiya, N. Miki, and S. Takeuchi, "Droplet Split-and-Contact Method for High-Throughput Transmembrane Electrical Recording," Anal. Chem., vol. 85, pp. 10913-10919, 2013.
- M. Gotanda, K. Kamiya, T. Osaki, N. Miki, and S. Takeuchi, "Automated Generation System of Cell-Sized Liposomes," Sens. Actuators B Chem., vol. 292, pp. 57-63, 2019.

昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞の 機能評価技術の開発

「人工細胞膜システム」グループ 三村 久敏、大崎 寿久、高森 翔、竹内 昌治

1. はじめに(1) 昆虫の嗅覚受容体

生物における匂いの感知は、嗅覚器官に存在する細胞に よって行われ、細胞膜に局在する嗅覚受容体タンパク質を 通して行われる。嗅覚受容のメカニズムは脊椎動物と無脊 椎動物では異なっており、昆虫の場合は、膜タンパク質で ある嗅覚受容体 OR (Olfactory receptor) と嗅覚受容体共受 容体 Orco (Olfactory receptor co-receptor) が相互作用する ことによってその役割を果たしている [1,2]。OR は、匂 い物質を識別する役割を担い、様々な匂い物質を受容する 必要から、蚊では80種類前後が存在することが知られて いる [3,4]。Orco は、膜を介してナトリウムイオン (Na⁺) やカルシウムイオン (Ca²⁺) などの陽イオンを輸送するイ オンチャネルとしての役割を担い、OR と相互作用するこ とにより、匂い物質に反応して活性化されるリガンド依存 性陽イオンチャネルとして機能する。細胞表面に局在する 嗅覚受容体に匂い物質が結合すると、活性化された嗅覚受 容体を通して、細胞内への陽イオンの流入が濃度勾配に従 って起こり、細胞膜の脱分極が引き起こされる。細胞の脱 分極は、信号として神経細胞系を伝達され、匂いの関知が 行われる。現在では、匂い物質の検知を目的として昆虫な どの嗅覚受容体を発現させた培養細胞はセンサ細胞と呼 ばれ、次世代の匂いセンサへの応用を目指した研究が盛ん に行われている [5]。

(2) センサ細胞

匂い物質に対するセンサ細胞の応答検出には、蛍光反応 が利用されることが多い。この目的のため、センサ細胞を 作製する際には、OR と Orco の遺伝子に加え、カルシウム センサタンパク質 (GCaMP)の遺伝子が培養細胞に導入 される[6]。GCaMPは、緑色蛍光タンパク質である GFP、 Ca²⁺結合タンパク質であるカルモジュリン、ミオシン軽鎖 ペプチドフラグメントの3つを遺伝子工学的に融合した タンパク質であり、Ca²⁺がカルモジュリンに結合すること により、GFPの蛍光強度が変化する。これを利用すること により、センサ細胞内のCa²⁺濃度の変化を、GCaMPの蛍 光強度変化としてモニターすることが可能となっている [7]。そのため、センサ細胞に発現させた嗅覚受容体にリ ガンドである匂い物質が結合すると、活性化された嗅覚受 容体を通して細胞外の Ca²⁺が細胞内に流入し、細胞質の Ca²⁺濃度の上昇が起こり、GCaMP の蛍光強度も増加する。 その結果、センサ細胞では、溶液中の匂い物質の有無を蛍 光強度の変化として検知することが可能となる。

(3) センサ細胞を利用した匂いセンサ

生物の嗅覚受容体は、分子構造を認識することにより、 匂い物質を特異的に結合する。そのため、センサ細胞を利 用した匂いセンサは、人工物である従来の酸化物半導体セ ンサなどに比べ、高い選択性と感度を有すると考えられる。 細胞センサを利用した匂いセンサの用途としては、匂い診 断による病気の早期発見など、将来的には健康医療分野で の応用が期待されている。生物の嗅覚を利用した最近の例 としては、匂いに対する線虫の化学走性を利用することに より、早期がんの検出法が実用化されている[8]。さらに、 がんに関連すると考えられる匂い物質のデータベースの 整備も進められており [9]、 匂い物質に対する蚊の嗅覚受 容体の反応特異性も明らかにされていることから [3,4]、 それらを比較参照することにより、がんに関連した匂い物 質検出における昆虫嗅覚受容体の応用可能性についても 議論されている [5]。このように、昆虫の嗅覚受容体を発 現させたセンサ細胞は、次世代の匂いセンサにおける基盤 要素として大きな注目を集めており、前述の蛍光反応を利 用した光学的方法による匂いセンサだけでなく、センサ細 胞の応答を電気的に検出する匂いセンサの開発も進めら れている [10,11]。その一方で、センサ細胞の応答検出法 には、光学的方法と電気的方法があることからも分かるよ うに、これまでに作製された匂いセンサの設計思想は開発 グループごとに異なっている。そのため、光学的方法と電 気的方法による応答性能の比較はもちろんのこと、異なっ たデバイスを用いて行われたセンサ細胞自体の性能評価 も単純に比較できるものではなかった。本研究では、細胞 センサの応答強度や反応特性といった機能評価を同一条 件下で行うため、光学的方法または電気的方法、あるいは その両方でセンサ細胞の応答を検出するためのデバイス 開発を行った。



図1:作製した機能評価デバイス。(A)光学的方法で用いるもの。(B) 電気的方法で用いるもの。

2. 実験方法

(1)機能評価デバイスの作製

本研究で作製した機能評価デバイスは、匂い物質に対す るセンサ細胞の応答を、同一条件下で光学的及び電気的に 検出することを目的としている。光学的方法では、匂い物 質に応答したセンサ細胞中のGCaMPの蛍光変化を検出す る。電気的方法では、固定化標本法により[12]、匂い物 質で活性化された嗅覚受容体を通して輸送される陽イオ ンを、電荷移動に伴う容量性電流として検出する。機能評 価デバイスの構造は、センサ細胞を注入するためのウェル と、そこに匂い物質を含む溶液を送液するためのマイクロ 流路で構成されている。ウェルの底面は、光学的方法と電 気的方法に応じて、スライドガラスまたは金電極をそれぞ れ配置して固定する構造となっている。電気的方法で参照 電極として使用するため、マイクロ流路には、銀ー塩化銀 電極も配置した。

機能評価デバイスは、CAD で構造設計を行い、小型 NC 切削機と熱圧着プレス機を用いて作製した。材料にはアク リル板 (4 mm 厚と、1 mm 厚)を用いた。切削したアクリ ル部品は、マイクロ流路とウェルからなる上層部、スライ ドガラスまたは金電極を固定するための下層部からなる。 上層部のマイクロ流路とウェルは熱圧着により接合した。 上層部と下層部の固定にはネジを用いた。光学的方法で用 いるスライドガラスには、ガラスカッターを用いて所定の 大きさに切断した No.3 厚ガラス (0.25~0.35 mm)を使用 した。電気的方法で用いる金電極は、所定の大きさに切断 した No.3 厚ガラス基盤に、アクリル板を切削して作製し たマスクをポリイミド耐熱テープで密着固定し、クロム、 金の順でスパッタすることによって作製した。銀-塩化銀 電極は、銀線に銀-塩化銀ペーストを塗布して作製した。 マイクロ流路の入口と出口には、匂い物質を含む溶液のウ ェルへの送液と廃液を行うため、テフロンチューブ(φ0.5 mm)を接続し、接着剤を用いて固定した。

(2) 光学的方法による検出

光学的方法で用いる機能評価デバイスの検証は、昆虫嗅 覚受容体を一過性発現させたセンサ細胞を作製し、その匂 い物質への応答を検出することによって行った。ヒトスジ シマカ (Aedes albopictus) の嗅覚受容体 (AaOR8) と共受 容体 (AaOrco)、カルシウムセンサタンパク質 (GCaMP) の遺伝子を動物細胞(HEK293)に導入し、匂い物質 (1-octen-3-ol) に反応するセンサ細胞を作製した。センサ 細胞は、培養で用いた培地をハンクス平衡塩溶液(0.1% BSA 含む)に置換し、機能評価デバイスのウェルに添加 した。機能評価デバイスは、37℃の CO2インキュベータ内 に 30 分間静置することにより、ウェル底面のスライドガ ラスにセンサ細胞を接着させた。機能評価デバイスの入口 側テフロンチューブには、分岐したテフロンチューブを介 して、2台のシリンジポンプを接続した。機能評価デバイ ス内のセンサ細胞の観察は、倒立顕微鏡を用いて行った。 匂い物質に対するセンサ細胞の応答は、匂い物質を含まな いハンクス平衡塩溶液(0.1% BSA 含む)に続けて、匂い 物質を含む同様液を連続して送液し、その際に起こる、青 色光で励起され、緑色光で検出される GCaMP の蛍光変化 を記録した。





(3) 電気的方法による検出

電気的方法で用いる機能評価デバイスの検証は、検体応 答の確実性を保証するため、昆虫嗅覚受容体を再構成した 脂質ベシクル(センサベシクルと呼ぶ)を用いて行った。 センサベシクルの合成には、無細胞合成系を利用した。ま ず、試験管内転写反応により、AaOR8 と AaOrco の DNA を鋳型として、それぞれの mRNA を合成した。次に、両 方の mRNA を、脂質と一緒に無細胞翻訳系に加えること により、匂い物質(1-octen-3-ol)に反応するセンサベシク ルを試験管内で合成した。センサベシクルは、遠心操作に よって簡易精製し、機能評価デバイスのウェルに添加した。 機能評価デバイスは、スイングロータのバケットの中心に 置いて遠心することにより、センサベシクルをウェル底面 の金電極に吸着させた。センサベシクルの吸着と金電極の 絶縁のため、金電極表面には、チオール層と脂質層からな る自己組織化単分子膜層を予め形成した。機能評価デバイ スの入口側テフロンチューブには、分岐したテフロンチュ ーブを介し、3台のシリンジポンプを接続した。電流計測 を行うため、金電極と銀一塩化銀電極はパッチクランプア ンプに接続した。匂い物質に対するセンサベシクルの応答 は、塩濃度と匂い物質の有無が異なる3種類の溶液を送液 することにより検出した。① 低塩濃度溶液、② 高塩濃度 溶液、③ 匂い物質を含む高塩濃度溶液、を順番に送液す ることにより、昆虫嗅覚受容体は匂い物質によって塩濃度 勾配存在下で活性化される。その結果、活性化された昆虫 嗅覚受容体を通して陽イオンの輸送が起こり、これによっ て誘起されたと考えられる容量性電流を記録した。

3. 結果と考察

作製した機能評価デバイスを図1に示す。同一のデバイ ス構造を用いて、スライドガラスと金電極を交換するこ とにより、匂い物質に対するセンサ細胞またはセンサベ シクルの応答を検出することが可能である。これにより、 光学的方法と電気的方法による検出手法の比較に加え、 評価対象の匂いセンサ素子を同一条件下で直接に比較す ることが可能になると考えられる。

図2に、本研究で作製した機能評価デバイスを用いて 検出した、匂い物質に対するセンサ細胞またはセンサベ シクルの応答結果を示す。図2Aは、機能評価デバイス のウェル中における、匂い物質の添加前後のセンサ細胞 の蛍光観察像を示す。匂い物質の添加によって緑色蛍光 の輝度が増し、センサ細胞が反応していることが分かる。 粒子状の構造体それぞれが一個のセンサ細胞に相当する。 緑色蛍光はセンサ細胞に発現しているGCaMPに由来す る。蛍光強度の増加は、匂い物質の添加によって活性化 された昆虫嗅覚受容体を通し、細胞外から細胞内にCa²⁺ が輸送され、細胞質のCa²⁺濃度の上昇を検知したGCaMP の蛍光強度が増加したことによる。図2Bは、匂い物質 の添加によって起こった、センサ細胞の蛍光強度の時間 変化を示す。匂い物質の添加から、およそ2分後に蛍光 強度は最大に達している。

図 2C に、機能評価デバイスを用いて検出した、匂い

物質に対するセンサベシクルの応答結果を示す。匂い物 質を含まない溶液(コントロール)に比べ、匂い物質を 含む溶液を送液した際には、計測された電流値が増加し ていることを示している。溶液中の匂い物質に対し、セ ンサベシクルが反応していることが分かる。電流値の増 加は、匂い物質によって昆虫嗅覚受容体が活性化され、 これを通して運ばれる Ca²⁺が増加したためと考えられる。 輸送される Ca²⁺が増加したことにより、それによって誘 起される容量性電流も増加したと考えられる。 本研究では、次世代の匂いセンサ素子となり得るセンサ 細胞やセンサベシクルの検証や比較のため、これに利用 できる機能評価デバイスを作製した。作製したデバイス は、顕微鏡を利用した光学的方法と、パッチクランプア ンプを利用した電気的方法により、匂い物質に対するセ ンサ細胞やセンサベシクルの応答を検出することができ る。昆虫嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞とセンサベ シクルを用いた実証試験により、前者は蛍光観察により、 後者は容量性電流計測によって、匂い物質に対する応答 をそれぞれ検出できることを示した。今後は、電気的方 法によるセンサ細胞の応答検出や、光学的方法と電気的 方法による同時検出についても検討する。本デバイスの 活用により、光学的方法と電気的方法の詳細な比較を行 うと共に、匂い物質に対するセンサ細胞とセンサベシク ルの応答特性を明らかにすることにより、昆虫嗅覚受容 体を利用した次世代匂いセンサ素子の詳細な解析が可能 になるものと考えられる。

【謝辞】

本研究は、JST、CREST、JPMJCR18S5の支援を受けたものです。ここに記して感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1. Sato K, et al., Nature 2008, 452, 1002-1006
- 2. Wicher D, et al., Nature 2008, 452, 1007-1011
- 3. Carey AF, et al., Nature 2010, 464, 66-71
- Wang G, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 2010, 107, 4418-4423
- 5. Hirata Y, et al., Lab Chip 2021, 21, 2643-2657
- 6. Mitsuno H, et al., Biosens. Bioelectron 2015, 65, 287-294
- 7. Tian L, et al., Nat. Methods 2009, 6, 875-881
- 8. Hirotsu T, et al., PLOS ONE 2015, 10, e0118699
- 9. Janfaza S, et al., Database 2017, bax055
- 10.Lee M, et al., ACS Nano 2015, 9, 11728-11736
- 11.Bazzone A, et al., Methods Enzymol 2017, 594, 31-83

DNA を用いた脂質二重膜接着・融合技術

「人工細胞膜システム」グループ

高森 翔、三村 久敏、大崎 寿久、竹内 昌治

1. はじめに

(1) 脂質二重膜の融合

脂質二重膜(脂質膜)は両親媒分子である脂質が水溶液 中で炭化水素鎖間の疎水性相互作用を介して構成する構 造であり、原核細胞から真核細胞まであらゆる細胞膜の基 本構造として知られている。

脂質膜は細胞膜だけでなく、細胞内の様々な細胞小器官 の基本構造でもある。核や葉緑体、ミトコンドリアは二層 の脂質膜で、小胞体やゴルジ体などは一層の脂質膜で覆わ れている。これら脂質膜で分画された構造体は細胞内で物 質勾配を生じさせ、この物質の偏りが細胞小器官ごとに異 なる生化学的な機能性を生み出している。

脂質膜は細胞外物質の細胞内への取り込み、細胞間情報 伝達などにも関係している。神経細胞間の情報伝達は、神 経伝達物質を内封したシナプス小胞膜が細胞膜に融合(膜 融合)し、神経伝達物質を細胞外へ放出することで行われ る。この膜融合現象は細胞外でも頻繁に見られ、筋芽細胞 の多核筋管への分化、受精における卵と精子の融合などが 有名である。

膜融合現象を人為的に誘導することで、細胞融合やリポ ソーム(脂質二重膜小胞)融合、細胞・リポソーム融合を起 こすことができる。特に、リポソーム・細胞融合は新しい 細胞内物質導入法として近年注目されている[1]。 膜融合 の分子メカニズムについては現在も活発に研究が行われ ているが、図1のような流れだと考えられている。標的脂 質膜が近接し、近接膜が同時局所破壊され、脂質膜の自発 的再形成の特性によって融合膜が形成される。

(2) 電気融合

人為的に膜融合を起こす技術には様々なものがあるが、 最も一般的な方法は電気融合だろう[2]。まず、リポソーム や細胞などの標的サンプルに交流電場を印加し、誘電泳動 現象の一つであるパールチェーン形成が誘導される。形成 されたパールチェーンにパルス電場を印加すると、近接し たリポソーム膜や細胞膜に電気穿孔が誘起され、自発的な 脂質膜の再形成を経て膜融合が起こる。電気融合は専用の 電場発生装置を用いることで比較的容易かつ短時間で行 うことができる方法だが、パールチェーン形成による標的 膜のペアリングが本質的にランダムなプロセスであり、狙 った膜ペア以外の融合(膜Aと膜Bを融合させる際に膜 A同士、膜B同士の融合も同時に起こってしまう)も頻繁 に起こる(低い選択性)という欠点がある。また、リポソ ームや細胞の種類・組成に依存して交流電場への応答性に 違いが生じるため、そもそも目的の膜ペアのパールチェー ンを形成することが難しいことも多い。さらに、過度な強 度の電場は細胞を損傷させてしまうことも知られている。

(3) SNARE 模倣デバイスを用いた膜融合

細胞内では SNARE と呼ばれるタンパク質複合体が膜融 合を誘起することが知られている[3]。そして、この SNARE タンパク質は出芽酵母からヒトまで様々な真核細胞で見 つかっている。近年、ペプチドの人工合成を用い、SNARE タンパク質の構造と融合メカニズムを模倣したペプチド デバイスも開発されている[4]。これら SNARE タンパク質 や SNARE 模倣ペプチドを用いた膜融合はその原理から選 択性に優れている。また、電場の印加を必要としないとい う点で電気融合よりも細胞への害も少ない。しかし、複数 種類の膜融合を選択に誘導するための複数種類のペプチ ドデバイスの設計などは原理的に難しい。

近年、ペプチドデバイス設計の低い自由度を克服する方 法として DNA を用いた SNARE 模倣デバイスも開発され ている[5]。DNA を用いた場合も、ペプチドと同じように 高い膜融合の選択性を実現することができる。さらに、ワ トソン・クリック塩基対 (A/T、G/C)の選択性に起因する、 配列設計における高い自由度を利用することで、選択性の 高い膜融合デバイスを同時に複数種類設計することがで きる。この自由度の高さは DNA のプログラマビリティと 言われ、DNA ナノテクノロジーの分野では様々なデバイ スが開発されている。しかし、これら SNARE 模倣デバイ スを用いた膜融合は総じてデバイス単体では電気融合な どに比較すると膜融合効率が低いことが知られている[6]。

(4) DNA と電気を組み合わせた膜融合

前述した DNA のプログラマビリティを活かしつつ、融 合効率を改善する方法として、DNA と電気融合を組み合 わせた方法も提案されている。この方法は DNA-assisted selective electrofusion (DASE) 法と呼ばれ、DNA で脂質膜 の選択的接着を実現し、そこへパルス電場を印加すること で接着膜の融合だけを誘起する[7]。この DASE 法を用い ればリポソームと培養細胞の膜融合を実現できる可能性 がある。前述したようにリポソームと培養細胞の融合法は 注目を集めている技術であり、本研究では DASE 法を用 いたリポソームと培養細胞の融合を目指し、DNA ナノデ バイスを用いたリポソームと細胞の接着に関する実験を 行った。



図1:脂質二重膜の融合手順.標的脂質二重膜を近接させ、同時 局所破壊を行うことで、脂質二重膜の自己修復能を利用した膜融 合を誘導することができる.

2. 実験方法

(1) DNA ナノデバイスの設計と構築

SNARE 模倣 DNA デバイスとして図 2 のような構造の DNA を設計した。各々のデバイスは 2 本鎖 DNA のスペ ーサー (γ/γ*)を中心とし、一方の末端の鎖に脂質膜への アンカー用コレステロールが修飾されている。反対末端に は相補鎖と選択的結合を起こすための 1 本鎖 DNA (α/α*、 γ/γ*)が付与されている。コレステロール修飾された 1 本 鎖 DNA を購入し、ハイブリダイゼーション用バッファー

(100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) にそれぞれの1 本鎖 DNA を 6.4 μ M となるように溶解した。このバッフ ァーに溶解した DNA を PCR チューブに 40 μ L ずつ分注 し、サーマルサイクラーを用いて 75℃から 4℃まで9 時間 かけてゆっくりと温度降下し、DNA ハイブリダイゼーシ ョン反応を行った。

(2) DNA を用いたリポソーム膜の機能化

まず、リポソーム(POPC/ATTO565-DOPE=100/0.1 モル 比)を界面通過法で作製した(リポソーム内液:340 mM の スクロース溶液を、外液:140 mM グルコース+100 mM NaCl)。DNA による膜の機能化にはリポソーム内外の浸透 圧を維持した上で DNA デバイスを加え(0/64/128/192/256 nM)、室温で4時間培養した。脂質膜に固定されなかった 遊離 DNA については、遠心分離(1000g,5 min)と上清の リポソーム外液への置換を2回繰り返すことで除去した。 その後、5 μM の YOYO-1を加え、共焦点顕微鏡を用いた 蛍光観察を行った。

(3) DNA を用いた細胞膜の機能化

培養した HEK293T 細胞をトリプシン処理し、HBSS(-) に分散した。その後、DNA を加え(0/64/128/192/256 nM)、 氷上で 4 時間培養した。脂質膜に固定されなかった遊離 DNA については、遠心分離(200g, 5 min)と上清の HBSS(-) への置換を 2 回繰り返すことで除去した。その後、5 µM の YOYO-1 と 5 µM の SYTO17 を加え、共焦点顕微鏡を用 いた蛍光観察を行った。

(4) DNA を用いたリポソーム・培養細胞接着

リポソームと HEK293T 細胞を 2.2 – 3 の手順で DNA を用いて機能化した(ただし、DNA 濃度は 512 nM とし た)。この際、リポソーム膜の機能化には α と β を持つ DNA を、HEK293T の機能化には α *と β *を持つ DNA を



図2 本研究で作製した DNA ナノデバイスの構造と DNA を介 した脂質二重膜接着のメカニズム.

用いた。DNA で機能化したリポソームと HEK293T 細胞 を 1.5 mL チューブで等体積混合し、室温で 4 時間培養し た。その後、5 μM YOYO-1、5 μM SYTO17、5 μM WGA-CF405S を加えて蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡で蛍光観 察を行った。

結果と考察

DNA デバイスで機能化したリポソームを図3に示す。 リポソーム膜の機能化には前述の濃度条件のDNAを加え、 室温で4時間培養した。リポソーム膜に挿入されたDNA をYOYO-1 で染色して観察したところ、DNA 濃度の増加 とともにリポソーム膜のYOYO-1 強度が上昇していく様 子が見られた。リポソーム膜上のYOYO-1 強度の平均値 をプロットしたところ、機能家の際のDNA 濃度の増加と ともにYOYO-1 強度の平均値が上昇する傾向が見られた。 なお、プロット各点の算出につき、40 個以上のリポソー ム膜上のYOYO-1 強度の平均値と、そのSDをプロットし た。先行研究より100 nM 前後でリポソーム膜状に導入で きる類似のDNA デバイスの量が飽和することがわかって おり、今回の実験でも同じ傾向を期待したが、エラーバー が大きくYOYO-1 強度の飽和の蛍光は見られなかった。

次に、DNA で細胞膜を機能化した HEK293T 細胞を図 4Aに示す。前述のDNA濃度条件で機能化を行い、YOYO-1 染色により DNA を可視化したが、DNA 濃度が 0 nM の 時点で細胞表面に YOYO-1 シグナルが観察された。さら に、DNA 濃度の増加させていったところ、YOYO-1 シグ ナル強度に明確な変化は見られなかった。また、すべての DNA 濃度条件において細胞膜表面に YOYO-1 シグナルが 局在した箇所が多く見られた。一方、SYTO17 で可視化し た核酸 (SYTO は DNA と RNA の両方を染色することが 知られている) については、細胞内の大部分の細胞質が染 色されており、かつ核と考えられる箇所がより強く染色さ れている様子が見られた。この実験では YOYO-1 染色に よって細胞膜上に挿入される DNA デバイスの量が変化す る様子が観察されると予想されたが、その様子を観察する ことはできなかった。この結果の解釈として、一つには細 胞膜に DNA がほとんど導入できていないということが考



図3 DNAを用いたリポソーム膜の機能化. プロットはリポソ ーム膜上の YOYO-1 強度の平均値±SD(各平均値の算出に付き 40 以上のリポソームの平均を算出). スケールバー:10 µm.

えられる。もう一つの可能性としては、氷上の HBSS(-)中 で4時間培養している最中に細胞が劣化し、何らかの原因 で溶液中に流出した DNA が細胞表面に局在してしまった ということが考えられる。より明確な結果を得るためには、 蛍光色素が修飾された DNA がデバイスを用いて細胞膜の 機能化の実験を行うことが必要だと考えている。

図4Bに DNA デバイスで機能化したリポソームと HEK293T 細胞の接着の様子を示す。図中の矢印はリポソ ームを示しており、矢印のないものは HEK293T 細胞であ る。YOYO-1 強度より、リポソーム膜が DNA で強く機能 化できていることがわかる。一方の HEK293T の膜上の YOYO-1 強度は非常に弱いこともわかる。これらのリポソ ーム膜と HEK293T 細胞膜の接着については界面のリポソ ーム膜が大きく湾曲していることから明らかだが、細胞膜 を DNA で機能化する際の条件については検討が必要ある ことが示唆される。

本研究では DASE 法を用いたリポソームと培養細胞の 融合を実現するために、リポソーム膜と HEK293T 細胞膜 を DNA ナノデバイスで接着する実験を行った。その結果、 リポソーム膜を DNA で機能化できることがわかった。一 方、DNA を用いた HEK293T 細胞膜の機能化にはリポソ ームのそれとは大きな違いがある可能性が示唆された。ま た、機能化したリポソームと HEK293T 細胞を接着させる ことにも成功した。本成果を受け、今後は DASE 法を用い たリポソーム・培養細胞融合に取り組みたいと考えている。 具体的には細胞膜の機能化の条件検討・最適化を行い、 DASE 法を用いてリポソーム・培養細胞融合実験に取り組 む。その後、従来の融合方法と比較してどの程度選択的な 融合が可能になるのか、細胞の生存率に対する変化につい て解析し、将来的には細胞内への物質導入に挑戦したい。



図4 (A) DNA で細胞膜を機能化した HEK293T 細胞. 緑: YOYO-1、赤: SYTO17 赤. スケールバー: 10 μm. (B) DNA で機能化 したリポソームと HEK293T 細胞の接着. 矢印はリポソーム. ス ケールバー: 10 μm.

【謝辞】

本研究内容の一部は、戦略的創造研究推進事業 CREST 「機能的人工染色体の設計と利用のための革新的研究」 (JPMJCR18S5)の支援により行われました。ここに感謝 申し上げます。

【参考文献】

- Saito, Akira C., *et al.* "Introducing micrometer-sized artificial objects into live cells: A method for cell–giant unilamellar vesicle electrofusion." *PloS one* 9.9 (2014): e106853.
- Zimmermann, U. "Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena." *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA)-Reviews on Biomembranes 694. 3 (1982): 227-277.
- Chen, Yu A., and Richard H. Scheller. "SNARE-mediated membrane fusion." Nature reviews Molecular cell biology 2.2 (2001): 98-106.
- Robson Marsden, Hana, et al. "A reduced SNARE model for membrane fusion." Angewandte Chemie 121.13 (2009): 2366-2369.
- Löffler, Philipp MG, et al. "A DNA-Programmed Liposome Fusion Cascade." Angewandte Chemie International Edition 56.43 (2017): 13228-13231.
- Stengel, Gudrun, Raphael Zahn, and Fredrik Höök. "DNAinduced programmable fusion of phospholipid vesicles." *Journal of the American Chemical Society* 129.31 (2007): 9584-9585.
- Takamori, Sho. Electrofusion of Escherichia coli with Giant Lipid Vesicles and the Compaction of Escherichia coli Nucleoid. Diss. University of Cambridge, 2021.

業

績

【原著論文】

 Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Taro Toyota Role of negatively charged lipids achieving rapid accumulation of water-soluble molecules and macromolecules into cell-sized liposomes against a concentration gradient

Langmuir, 38, 112-121 (2022).

 Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto and Shoji Takeuchi
 3D printed microfluidic devices for lipid bilayer recordings

Lab on a Chip, 22, 890-898 (2022).

【総説】

- 伊藤嘉玖,大崎寿久,三木則尚,竹内昌治 膜タンパク質を組み込んだ人工細胞膜センサ 表面と真空,64(4),162-167 (2021).
- 山田哲也,大崎寿久,竹内昌治 蚊の嗅覚受容体を組み込んだ高感度匂いセンサの開発 AROMA RESEARCH 第86号,22(2),37-42(2021).
- 山田哲也,大崎寿久,竹内昌治
 呼気に含まれる匂い分子をppbレベルで検出!- 蚊の
 嗅覚受容体を組み込んだ高感度匂いセンサーの開発
 化学 6月号,76 (6),12-16 (2021).

4. Yusuke Hirata, Haruka Oda, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi Biohybrid sensor for odor detection Lab on a Chip, 21, 2643-2657 (2021).

5. 山田哲也,大崎寿久,竹内昌治 蚊の嗅覚受容体を再構成した人工細胞膜センサ におい・かおり環境学会誌2022年1月号,53(1),17-24 (2022).

【書籍】

- 杉浦広峻、大崎寿久、竹内昌治 脂質二重膜による膜タンパク機能計測デバイス マイクロ・ナノ熱工学の進展、587-592 (2021).
- 山田哲也,大崎寿久,竹内昌治 昆虫の嗅覚受容体センサとは? におい分析評価・対策事例と頻出 Q&A 集, 393-398 (2022).

【口頭発表】

 Shoji Takeuchi Biohybrid Devices—Harnessing Biofunctional Materials in Micro-Devices 2021 Virtual MRS Spring Meeting & Exhibit, 2021 年 4 月, Online

2. 竹内昌治

生物×機械 第13回理研・未来戦略室フォーラム,2021年5月, Online

- 中根卓馬,大崎寿久,三村久敏,高森翔,三木則尚, 竹内昌治 匂いガス検出のための高効率ガス導入流路を有するバ イオハイブリッドセンサ 化学とマイクロ・ナノシステム学会第43回研究会 (CHEMINAS43),2021年5月,0nline
- 竹内昌治 Think Hybrid! 生物と機械を融合する 関東高分子若手研究会 2021 春の講演会, 2021 年 6 月, Online
- Takuma Nakane, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi Efficient gas-to-liquid partition using gas-flow channels for cell-based gaseous odorant detection The 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators And Microsystems (TRANSDUCERS 2021), 2021 年 6 月, Online
- Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi Monolithic fabrication of a lipid bilayer device using stereolithography The 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators And Microsystems (TRANSDUCERS 2021), 2021 年 6 月, Online
- 竹内昌治 異分野融合研究で近づく SF の世界 東進トップリーダーと学ぶワークショップ,2021 年 7 月,東京及び Online

8. 竹内昌治

バイオハイブリッドが拓く新たなセンシング 第4回デジタルバイオ分析研究会, 2021年8月, Online

- 竹内昌治 三次元組織を作って使うバイオハイブリッド技術 第9回 Chem-Bio Joint Seminar 2021, 2021年8月, Online
- 10. 竹内昌治

バイオハイブリッドが拓く超高機能デバイス 第82回応用物理学会秋季学術講演会,2021年9月, Online

11.竹内昌治

バイオハイブリッド技術が切り拓く未来 ~体内埋め 込みデバイスから培養肉まで~ 先端技術セミナー(ソニーグループ(株)R&D センター), 2021 年 9 月, Online

12.Shoji Takeuchi

Emerging technology for Biohybrid devices

NTT Research Upgrade 2021 Summit, 2021 年 9 月, アメ リカ及び Online

13.Izumi Hashimoto, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sugiura, Hisatoshi Mimura, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi Reliable re-formation of a lipid bilayer using a geometrically guided air bubble

The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021), 2021 年 10 月, アメリカ及び Online

14.Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi

Rapid fabrication of arrayed lipid bilayer devices using stereolithography

The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021), 2021 年 10 月, アメリカ及び Online

15.Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi

DNA-mediated adhesion of giant liposomes with cells towards the transplantation of artificial organelles The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021), 2021 年 10月, アメリカ及び Online

16.Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, and Shoji TakeuchiDual-function device for detection of insect olfactory

receptor activity

The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021), 2021 年 10月, アメリカ及び Online

- 17.竹内昌治"バイオハイブリッド"が拓く次世代センシング第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, Online
- 18.Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi 脂質共役型 DNA を用いた油中水滴界面上での脂質膜形 成 「細胞を創る」研究会 14.0, 2021 年 11 月, Online
- 19.三村久敏,大崎寿久,高森翔,竹内昌治 匂いセンサ開発に向けた昆虫嗅覚受容体ベシクルを用 いた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44回研究会 (CHEMINAS44),2021年11月,0nline

20.田中葵,高森翔,三村久敏,大崎寿久,三木則尚,竹 内昌治
毛細管を有する複数センサ細胞作製カセットの開発
第 12 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム,2021 年 11 月,0nline

21.竹内昌治 バイオハイブリッド技術が切り拓く未来~体内埋め込 みデバイスから培養肉まで~ 第 37 回けいはんな「エジソンの会」,2021年11月, Online

22.竹内昌治

バイオハイブリッドが拓く高感度センシング 第9回 iSyMs 全体会議, 2021 年 11 月, Online

23.Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Taro Toyota

Abiotic molecular transport against a concentration gradient caused by flow-induced membrane asymmetry between the inner/outer leaflets of cell-sized liposomes 第 59 回日本生物物理学会年会, 2021 年 11 月, Online

24.Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi Adhesion of giant liposomes with cells using

lipid-conjugated DNA towards DNA-mediated fusion 第 59 回日本生物物理学会年会, 2021 年 11 月, Online

25. 大崎寿久

昆虫嗅覚受容体を用いた高感度匂いセンサの開発 日本技術士会神奈川県支部講演会(第104回 CPD 講 座),2021年11月,横浜及び Online 26.竹内昌治
SFの世界に近づく先端工学~筋肉をまとうバイオハイブリッドロボットから培養肉まで~
第17回日立財団科学技術セミナー,2021年11月, Online

- 27.高森翔, 三村久敏, 大崎寿久, 竹内昌治 細胞小器官スケールリポソームの細胞内導入へ向けた マイクロスケールリポソーム内包ジャイアントリポソ ームと培養細胞の脂質共役型 DNA を用いた接着 第44回日本分子生物学会年会, 2021年12月, 横浜及 び Online
- 28.橋本和泉,大崎寿久,三村久敏,三木則尚,竹内昌治 微小気泡による脂質二重膜の再形成 令和3年度生体膜デザインコンファレンス・ミニ研究 会,2021年12月,0nline

29.大崎寿久

人工細胞膜技術を用いた創薬支援と次世代センサ開発 日本海水学会電気透析および膜技術研究会第50回荷電 膜コロキウム,2021年12月,0nline

30.Aoi Tanaka, Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi Cartridge device capable of spontaneous solution exchange for sensor cell production The 35th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2022), 2022 年1月, 東 京及び Online

31.Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi

On-site formation of lipid bilayer arrays with an air/liquid interface

The 35th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2022), 2022 年 1 月, 東 京及び Online

32.Shoji Takeuchi

3D tissue fabrication for biohybrid robots MaP Distinguished Lecture Series 'Additive Manufacturing', 2022 年 3 月, Online

33.杉山博紀,大崎寿久,竹内昌治,豊田太郎 膜タンパク質なしにリポソーム内部に分子が濃縮され る:リン脂質二分子膜が生命起源に果たしうる役割 第46回生命の起原および進化学会学術講演会,2022 年3月,0nline

【記者発表、取材】

- 竹内昌治,大崎寿久 薬開発からバイオマシンまで! "タンパク質"人工合 成の世界 日本放送協会 (NHK),サイエンス ZERO, 2021 年 6 月 27 日
- 2. 竹内昌治

Growing Steak Meat in the Lab 日本放送協会 (NHK)、NHK World-JAPAN Science View, 2021 年 8 月 10 日 番組 HP 上で 2022 年 8 月 10 日まで閲覧可能

【特許】

- (1) 国内特許出願 3件
- (2) 国外特許出願 0件

研究報告2022 目次 【研究開発部】

実用化実証事業

「次世代医療福祉ロボット」グループ

٠	総括	119
٠	拡張現実提示機能を備えた遠隔操作システムにおける仮想物体を介した・・・・・・・・・・・・・・	122
	実環境への接触の表現	
٠	Dynamic programmingマッチングを用いた吸入動作正誤判別・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	126
٠	業績	129

「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、実世界での力触覚の伝送・記録・再現を可能とするリアルハプティクスを援用した様々な医療 デバイスの実用化研究を推進することを目的として、令和2年度より開始している。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、産学公連携拠 点としての殿町(川崎市川崎区)の研究室において、医療機器を中心とした産業界とも密に連携した共同 研究を推進し、開発技術の社会実装へと繋げることを目指す。

1. 2021 年度の研究目的

2021 度は、実用化実証事業「次世代医療福祉ロボット」研究グループの研究活動二年目にあたり、前年度に引き続いて特に医療デバイスへの応用研究を主軸として研究を推進する。産学公連携拠点としての殿町研究室を本拠地とし、産業界とも密に連携した実用化研究を実施する。これにより、医療機器メーカー等との協働による開発技術の事業化へと繋げる。

昨年度まで実施した AMED ACT-MS によって得られた ハプティック骨ドリルの開発研究の成果を基に、さらな る性能改善に向けたドリル研究に取り組む。骨ドリル試 作機やボーンソー試作機を用いた動物実験を慶應義塾大 学医学部、同大学 HRC、日本メドトロニック株式会社と 協力して実施することで、実用化に向けた非臨床 POC を 段階的に達成する。

脳神経外科用のハプティック鑷子研究については、引 き続き動物実験などを実施し、データ収集と有用性評価 を行う。

また、鷺沼診療所と連携し、遠隔触診に向けたハプテ ィック超音波プローブの開発研究を継続し、精細な超音 波画像の取得支援を行う誘導アルゴリズムの開発研究な どを実施する。

慶應義塾大学医学部、薬学部との吸入動作解析に関す る研究については、臨床試験によるデータ収集を継続 し、吸入器操作におけるクリティカルエラーの自動診断 技術の開発を進める。

さらに、AMED 先進的医療機器・システム等技術開発 事業の研究分担機関として、マイクロサージャリー用シ ミュレータの開発研究を実施する。実システムを用いた シミュレータ環境を構築すると共に、実験評価まで達成 することを目指す。

2. 2021 年度の研究成果

(1) ハプティック骨ドリルの開発研究

本テーマでは、脊椎掘削・切削時のリアルタイム貫通 検知と瞬時自動停止機能を有する安全安心な骨ドリルの 実用化を目指した研究開発を進めている(図1)。2021年 度では、昨年度に製作した改良機を用いることで、貫通 検知アルゴリズムの発展的研究を実施した。

昨年度では、AMED ACT-MS の支援を受けて、脊椎を 垂直方向に掘削した際の貫通検知及び自動停止の機能検 証を達成し、開発アルゴリズムの有効性を確認した。 2021 年度では、実際の手術動作と同様に、骨の表面に沿 ってドリルを水平に移動させながら切削を行った際の、



(a) ハプティック骨ドリル試作機



(b) 貫通検知・自動停止の有用性実証 図1:ハプティック骨ドリルによる試験

貫通検知機能についての検証を行った。慶應義塾大学医 学部整形外科教室との共同実験において、人の術者によ り実際の施術と同様に切削を行ったところ、装置が正常 に貫通を検知し、自動停止することが十分に可能である ことが確認された。さらに、本アルゴリズムをボーンソ ーにも応用したモデルを試作し、模擬骨を用いた試験に よって貫通検知・自動停止機能が骨ドリルと同様に十分 に機能することを確認した。

(2) ハプティック鑷子の開発研究

脳神経外科支援用ハプティック鑷子(図2)の開発研 究では、腫瘍組織と正常組織の剛性計測実験を実施し、 新たなバイオマーカーとしての力触覚情報の有用性につ いて検討を深めた。非臨床試験によって、腫瘍組織と正 常組織の剛性推定結果に有意な差があることを確認し、 診断技術への応用性を実証することができた。



(a) ハプティック鑷子試作機



(b) ペンホールド型試験機 図 2: 脳神経外科支援デバイス

(3) ハプティック超音波プローブの開発研究

リアルハプティクスの遠隔触診応用を目指し、超音波 プローブによる画像データと力触覚データとの統合解析 研究を実施している。特に2021年度では、3自由度を有 する超音波プローブシステムを試作し(図3)、画像デー タと力触覚データのクラスタリングと二次元マッピング によるマニピュレーション誘導アルゴリズムの開発を行 った。画像の一致度と接触対象物のインピーダンスの一 致度を二つの独立な軸として表現する二次元マップの生 成法を考案し、実際の接触状況に関する相対位置をマッ プ上にリアルタイム表示することで、適切な力加減やプ ローブ操作角度等を誘導することが可能であることを実 験的に示した。



図3:自由度超音波プローブシステム

(4) 吸入支援デバイスの開発研究

慶應義塾大学医学部及び同附属病院薬剤部の研究者と 共同で、IMUを用いた吸入動作モニタリングデバイスの 改良開発を行った(図4)。

2 つの IMU を活用することで、蓋の開閉動作や吸入器 の傾け角度を測定可能となるようにし、吸入動作の適切 性のより詳細な把握を実現した。また、薬剤充填動作の 不備など、クリティカルエラーを自動判別するためのア ルゴリズム研究も並行して実施し、動的計画法を応用し た手法によって薬剤師と同等の評価精度が得られるとの 結果を示すことで、その有用性を確認した。



図4:吸入動作モニタリングデバイス

(5) マイクロサージャリー用シミュレータの開発研究

AMED・先進的医療機器・システム等技術開発事業 (研究代表機関:慶應義塾大学)の分担研究機関とし て、マイクロサージャリー支援ロボットを用いたトレー ニングシミュレータの開発研究を実施した(図5)。ロボ ットに内蔵する各モータの位置情報を基にシミュレータ 側のヴァーチャルモデルを同期させ、またシミュレータ 側に設定された仮想環境から得られる反力情報をロボッ ト側において出力することで、視覚情報と力触覚情報と を提示可能なシミュレータ環境を構築した。

さらに、精密な動作が要求される場面を想定し、力制 御に基づいて手先の位置を目標値へと誘導するナビゲー ションシステムを開発した。実際のマイクロサージャリ ー支援ロボットを用いた検証実験により、手先位置を目 標位置へと誘導可能であると共に、手ブレの抑制や、位 置ズレの防止に効果的であることが確認された。



(a) マイクロサージャリーロボット試作機



(b) 構築したシミュレータ環境 図5:マイクロサージャリーシミュレータ

3. 今後の展望

本研究グループでは、これまでの KISTEC 有望シーズ 展開事業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医療デバイスの社会実装 研究を推進している。医療機器メーカーを中心とした産 業界との連携体制の構築、拡張ができてきており、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。特に 2022 年からは、AMED 医療 機器等における先進的研究開発・開発体制強靭化事業に 分担研究機関として参画する骨ドリル開発の提案課題が 採択されており、この支援を活用して開発技術の実用化 を目指す。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、引き続き地域連携/産学公 連携活動を展開していく予定である。

拡張現実提示機能を備えた遠隔操作システムにおける

仮想物体を介した実環境への接触の表現

「次世代医療福祉ロボット」グループ 松永 卓也

1. はじめに

マスタ・スレーブ型遠隔操作ロボットは、人間の能力 拡張による高難度な作業の支援や危険な作業における人 間の安全確保等に有用である。マスタ・スレーブシステ ムの制御はロボット間における位置情報の伝送で実現可 能であるが、より安全で直感的な作業をおこなうために は力触覚情報が必要となる。さらに、ロボット間で伝達 される力触覚情報に加えて視覚情報や聴覚情報を活用す ることで、より高度な人間支援が可能となる。

バイラテラル制御はマスタ・スレーブシステムにおい て力触覚伝達をおこなう制御手法である。加速度制御に 基づくバイラテラル制御[1]は双方向の位置、力情報の伝 送とロバストな加速度制御によって鮮明な力触覚伝達を 可能とする。バイラテラル制御の制御目標は拡張可能で あり、カメラで画像として得られる視覚情報を活用した ナビゲーションシステム[2]やモーションキャンセリング システム[3]、拡張現実(AR: Augmented Reality)提示シ ステム[4]が提案されている。

(1) 拡張現実を提示可能な遠隔操作システム

本研究では、マスタ・スレーブ型遠隔操作ロボットと 映像機器を組み合わせた遠隔操作システム(図1)にお いて、仮想環境を介した実環境への接触を拡張現実にお いて表現する手法を提案し、遠隔操作システムにおける 拡張現実の応用範囲を拡張する[5]。図1のシステムにお いて、バイラテラル制御を実装した遠隔操作ロボットは リニアモータの1自由度の動作で力触覚情報を伝達す る。映像機器はカメラ、画像処理装置、ディスプレイで 構成され、2次元画像として得られる視覚情報の伝送と 処理をおこなう。

(1)-1 力触覚情報の伝達

1自由度マスタ・スレーブ型遠隔操作ロボットにおい て、加速度制御に基づくバイラテラル制御[1]の制御目標 は次式で与えられる。

$$X_{\rm M} - X_{\rm S} = X_{\rm D} \tag{1}$$

$$F_{\rm M} + F_{\rm S} = F_{\rm C} \tag{2}$$

XとFはモータの位置と力であり、下添え字のM、S、 D、Cはマスタ、スレーブ、差のモード、和のモードを 表す。ロボット間で双方向に伝送される位置、力情報を



図1:視覚・力触覚伝達が可能な遠隔操作システム

利用し、(1)式で $X_D = 0$ とすることで位置の追従,(2)式で $F_C = 0$ とすることで作用力と反作用力の大きさの一致を実現する。さらに、(1)式または(2)式を拡張することで様々な機能をバイラテラル制御に付加することが可能となる。

バイラテラル制御における鮮明な力触覚伝達の実現に は位置と力の高精度な制御が必要であるため、外乱オブ ザーバ (DOB: Disturbance Observer) [6]によるロバストな 加速度制御をおこなう。また、力センサレスの遠隔操作 ロボットを使用するため、力情報の取得には反力推定オ ブザーバ (RFOB: Reaction Force Observer) [7]を用いる。

(1)-2 視覚情報の提示

エンドエフェクタや環境等を含むスレーブ側視覚情報 の取得にはカメラを使用し、画像処理装置を介してディ スプレイに提示する。システムの単純化のため、2次元 画像を視覚情報として扱う。画像処理装置では OpenCV による環境情報抽出や画像加工をおこなう。また、遠隔 操作ロボットの制御装置との通信により、視覚情報に応 じた力触覚拡張や、力触覚情報に応じた視覚拡張が可能 となる。

(2) 仮想環境を介した実環境への接触

拡張現実提示機能を備えた遠隔操作システムにおける 仮想環境に対する接触動作では、実環境に対する接触動 作と同様にスレーブロボットによる仮想環境の移動や変 形が可能であり、操作者の視覚および力触覚に提示でき る。一方、拡張現実における実環境と仮想環境の接触に は制限が存在する。仮想環境の表現は実環境との位置関 係や接触状況に応じた演算により変化させることが可能 である。しかし、仮想環境は実環境に力を加えることが できず、仮想環境との関係性が実環境に変化を与えるこ とが無い。したがって、実環境同士、または仮想環境同 士の接触と同様の表現が困難である。本研究では、かた さが剛性のみで表現される環境について、遠隔操作シス テムによる仮想環境を介した実環境への接触を視覚およ び力触覚拡張で擬似的に表現する。

(2)-1 力触覚の拡張

スレーブ側エンドエフェクタ先端に仮想環境が付加さ れた遠隔操作ロボット(図2)において、バイラテラル 制御の位置の制御目標を拡張し、仮想環境を介した実環 境への接触で得られる力触覚情報を表現する。提案手法 ではスレーブロボットの代わりに仮想スレーブロボット を使用して制御系を構築する。そして、実環境への接触 時にバイラテラル制御とコンプライアンス制御を組み合 わせた力触覚伝達をおこない、操作者に環境のかたさを 提示する。



図2:仮想スレーブロボットによる力触覚拡張

スレーブロボットの位置は次式により仮想スレーブロ ボットの位置に変換される。

$$X_{\rm SV} = X_{\rm SR} - L \tag{3}$$

Lはモータ可動部の移動方向の軸における仮想環境の長 さ、下添え字のRとVはそれぞれ実空間と仮想空間を表 す。位置の追従を表す(1)式の制御目標は次式となる。

$$X_{\rm MR} - X_{\rm SV} = X_{\rm D}$$

したがって、仮想環境の先端位置がマスタロボットの位 置に追従することを目標とした制御となる。

力触覚伝達下における遠隔操作ロボットの操作は自由 動作と接触動作に分けられる。自由動作は環境に非接触 な状態における操作であり、(2)式と(4)式の制御目標を達 成することで実行可能である。接触動作では接触した環 境の剛性が伝達されるが、従来のバイラテラル制御は仮 想環境の剛性を表現できない。したがって、差のモード を位置制御からコンプライアンス制御に切り替えること で仮想環境の剛性を提示する。コンプライアンス制御器 において次式の加速度 $s^2 X_k$ を計算し、差のモードの加速 度参照値に加える。

$$s^{2}X_{k} = M_{c}^{-1}(F_{S} - F_{th} - k_{c}X_{k})$$
(5)

*M*_c、*k*_c、*F*_{th}は仮想慣性、仮想剛性、接触動作の開始を検知するための力の閾値である。

(2)-2 視覚の拡張

カメラで取得した2次元画像において、スレーブロボ ットの代わりに仮想スレーブロボットのエンドエフェク タと仮想環境をAR画像として提示し、仮想環境を介し た実環境への接触で得られる視覚情報を表現する。AR 画像の生成には接触動作前の実環境周辺画像とリアルタ イム画像を使用する(図3)。



AR 画像に表示される仮想スレーブロボットのエンド エフェクタと仮想環境はマスタ・スレーブシステムと同 期して移動する。画像に表示する仮想環境の長さは次式 で得られる。

$$p_{\rm E} = G_{\rm pm}^{-1} (L - X_{\rm D}) \tag{6}$$

pEは画像座標系における仮想環境の長さを表す。Gpmは モータ座標系から画像座標系への位置情報の変換係数で ある。

2. 実験と結果

視覚と力触覚の拡張現実提示機能を備えた遠隔操作シ ステム(図4)による接触動作で提案手法の評価をおこ なった。

(1) 実験方法

マスタ・スレーブシステムを用いて仮想環境を介した 実環境に対する押し込み動作をおこない、視覚および力 触覚の拡張現実を提示した。スレーブロボットおよび仮 想スレーブロボットのエンドエフェクタには赤色の樹脂 製ロッドを使用した。実環境には緑色のスポンジを用い た。仮想環境は青色のバネとして提示し、画像上で120

(4)

ピクセルとなる値に長さLを設定した。提案手法では、 仮想環境の剛性を 500.0 N/m に設定した。提案手法と比 較する従来手法では、(1)式、(2)式を制御目標とするバイ ラテラル制御を実装し、スレーブロボットの先端に仮想 環境を表示した AR 画像を提示した。



図4:実験機器

(2) 実験結果

視覚拡張の結果を図5に示す。従来手法では(a)のリア ルタイム画像を用いて(b)の AR 画像を生成した。仮想環 境は変形せず、実環境に重なって表示された。提案手法 では(c)のリアルタイム画像を用いて(d)の AR 画像を生成 した。エンドエフェクタ先端の仮想環境が接触により変 形し、同時に実環境も力を加えられたことで変形した。



(a) 従来手法加工前画像



(c) 提案手法加工前画像(d) 提案図 5 : 実験結果(視覚情報)



(b) 従来手法 AR 画像



(d) 提案手法 AR 画像 (視覚情報)

力触覚拡張の結果を図6、図7に示す。従来手法の結 果では仮想環境のみが実環境に接触しているため実環境 には力が加わっておらず、自由動作と同じ結果となった ことが確認できる。一方、提案手法の結果では仮想環境 が実環境に接触した際に、実際にはエンドエフェクタが 接触しているため力が発生した。また、差のモードの制 御が切り替わったことでマスタロボットと仮想スレーブ ロボットの位置に差が生じており、コンプライアンス制 御の効果が確認できる。





図7:実験結果(提案手法、力触覚情報)

3. 考察及び今後の展望

提案手法において操作者に提示される剛性 $k_{\rm E}$ は実環境の剛性 $k_{\rm R}$ と仮想環境の剛性 $k_{\rm N}$ の合成により次式で表される。

$$\frac{1}{k_E} = \frac{1}{k_R} + \frac{1}{k_V} \tag{7}$$

keはマスタロボットにおける位置、力応答、kkはスレー

ブロボットにおける位置、力応答から推定可能である。 実験結果においてマスタ側の推定剛性は 0.3777 kN/m、ス レーブ側の推定剛性は 1.420 kN/m であり、(7)式から求め られる仮想環境の剛性は 0.5146 kN/m となる。したがっ て、コンプライアンス制御で設定した仮想環境の剛性が 操作者に提示されたことが確認できる。

本研究ではシステムの単純化のために遠隔操作ロボットの動作を1自由度に限定し、視覚情報は2次元画像としたが、実際には6自由度、視覚は3次元画像への拡張が必要である。また、エンドエフェクタ、仮想環境、実環境の形状がより複雑となる場合等についても今後の課題として検討が必要である。

【参考文献】

- W. Iida and K. Ohnishi, Proceedings of the 8th IEEE International Workshop on Advanced Motion Control, Mar. 2004, pp. 217–222.
- 2. M. H. Jamaluddin, T. Shimono, and N. Motoi, *IEEJ Journal* of *Industry Applications*, vol. 3, no. 3, pp. 227–235, 2014.
- Y. Nakajima, T. Nozaki, and K. Ohnishi, *IEEE Transactions* on *Industrial Electronics*, vol. 61, no. 7, pp. 3753–3764, Jul. 2014.
- 4. 松永卓也, 下野誠通, 大西公平, 精密工学会誌, vol. 87, no. 4, pp. 380-387, Apr. 2021.
- T. Matsunaga, T. Shimono and K. Ohnishi, Proceedings of 2021 IEEE 30th International Symposium on Industrial Electronics, June 2021, pp. 1-6.
- K. Ohnishi, M. Shibata, and T. Murakami, *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, vol. 1, no. 1, pp. 56–67, Mar. 1996.
- T. Murakami, F. Yu, and K. Ohnishi, *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, vol. 40, no. 2, pp. 259–265, Apr. 1993.

Dynamic programming マッチングを用いた吸入動作正誤判別

「次世代医療福祉ロボット」グループ 高野 俊也

1. はじめに

気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患の治療には、主に吸入器を用いた吸入薬治療が行われている。効果的な治療には吸入器を正しく、継続的に使用することが重要であるが、約70%の患者が正しく使用できていないことが知られている[1,2]。その理由として、使用方法の理解不足や時間経過により正しい使用方法を忘れてしまうこと等が挙げられる。そのため、治療効果が低減し治療の長期化を招いている。

現状、有効的な対策は医師や薬剤師による綿密な対面 指導のみである。そのため、指導を行う医師や薬剤師の 負担増大が問題となっている。その解決手法として、先 行研究では吸入器に各種センサを搭載し、吸入手技をモ ニタリングする手法が提案されている[3,4]。

本研究では、慣性計測装置(IMU: Inertial measurement unit)を搭載した吸入器により得られた患者の吸入手技の 観測データに DP マッチング(DP: Dynamic programming)を 用いることで吸入手技の自動判別を行う手法を提案す る。

(1) 慣性計測装置を搭載した吸入動作モニタリングデバイス

本研究ではエリプタを用いて検証を行う。エリプタは 一般的に使用されているドライパウダー吸入器(DPI: dry powder inhaler)である。図1にエリプタに IMUを搭載し た吸入動作モニタリングデバイスを示す。IMU は 3D プ リンタにより作成したアタッチメント内に搭載し、エリ プタの蓋に固定している。IMU は 3 軸の地磁気、加速 度、角速度の測定が可能であり、図中の ω_x、ω_y、ω_zは IMU の角速度の軸方向を示す。吸入動作の観測には角速 度を積分して得られた角度情報を用いる。

表1にエリプタの使用手順を示す。手順1の蓋を開け る動作及び、手順3の薬剤を吸入する動作については IMUのY、Z軸の回転角度により観測が可能である。ま た、息吐き、息止めについては各動作のインターバルか ら観測可能である。図2に正常に吸入を行った際のY、Z 軸角度の波形を示す。このデバイスにより得られた波形 を観測することにより、各手順が適切に行われていたか が判別可能となる。よって、吸入動作の正誤判別が可能 となる。



図1:吸入動作モニタリングデバイス及びセンサ角速度 軸方向

表1:エリプタの使用手順

- 1 蓋をカチッと音がするまでしっかり開く。
 - 息を吐き出す。
- 3 吸入口を咥え、深く吸い込む。
- 4 5秒程度息を止める。
- 5 ゆっくりと息を吐く。
- 6 蓋を閉じる。

2

(2) DP マッチングアルゴリズム

吸入動作の自動正誤判別には予め用意した正常に吸引 を行った際の波形(標準波形)に、測定により得られた波 形(入力波形)を重ね合わせることで評価を行う。しか し、吸入動作の速度やタイミングは毎回異なってしまう ため、そのまま重ね合わせてしまうと、時間軸方向にず れが生じてしまう。そのため、この時間のずれの影響を 取り除く必要がある。その手法として DP マッチングを 用いる。DP マッチングは主に筆跡鑑定や音声認識に用い られるアルゴリズムであり、非線形データの伸縮を行う ことで時間軸のずれを除外し、2 つの波形を重ね合わせ ることが可能となる。



図 2: 正常吸引時波形(標準波形)



図3:DPマッチングイメージ

式(1)、(2)に標準波形、入力波形の各サンプリングデー タを表す。

r(i) =	$(\boldsymbol{\theta}_{Y}^{r}(i), \boldsymbol{\theta}_{Z}^{r}(i)) \ (1 \leq i \leq I)$	(1)
()		

$$\boldsymbol{o}(\boldsymbol{j}) = (\boldsymbol{\theta}_{\boldsymbol{Y}}^{\boldsymbol{v}}(\boldsymbol{j}), \boldsymbol{\theta}_{\boldsymbol{Z}}^{\boldsymbol{v}}(\boldsymbol{j})) \quad (1 \le \boldsymbol{j} \le \boldsymbol{J})$$

$$(2)$$

$$d(i,j) = |r_i - o_j| \tag{3}$$

*I、J*は各データのサンプル数を表し、*r(i)、o(j)*は標準 波形及び入力波形の測定値を表す。θ_Y、θ_Zは IMUより得 られた Y 軸及び Z 軸回転角度を表す。よって式(1)の*r(i)* は、i番目のサンプルにおける標準波形の Y、Z 角度を表 す。標準波形と入力波形間の距離は式(3)により表され る。2 つの波形間の距離 d(*i*,*j*)の合計を小さくすることに より、波形間の時間軸のずれを取り除くことが可能とな る。

DP マッチングに用いられる漸化式を式(4)に表す。式 (5)は DP マッチングの初期状態を表す。すなわち、2つ の波形の初期位置を一致させることを示す。図3に DP マッチングのイメージ図を示す。横軸は標準波形の値を 示し、縦軸は入力波形の値を表している。3本の線は式 (4)の min を表している。もし2つの波形が完全に等しい 場合、図2の線は直線を示す。

また、式(6)は時間正規化距離と呼ばれ、g(I,J)を標準波

形のサンプル数で割ることで求める。時間正規化距離が 小さいほど2つの波形が類似していることを表す。DPマ ッチングではこの時間正規化距離が最小となるように2 つの波形を重ね合わせる。



$$g(i,j) = d(i,j) + \min \begin{cases} g(i-1,j) \\ g(i-1,j-1) \\ g(i-1,j-2) \end{cases}$$
(4)

$$g(1,1) = d(1,1)$$
 (5)

$$L(r,o) = \frac{g(I,J)}{I}$$
(6)

2. 実験と結果

図4:臨床試験データ

DP マッチングにより測定データから吸入動作の正誤 判定が可能か、臨床試験による検証を行った。

(1) 実験方法

実験にはエリプタを使用している4名の入院患者の吸入動作を測定し、薬剤師による目視判定とDPマッチン グにより得られた時間正規化距離との比較を行った。なお、DPマッチングの標準波形には図2の波形を用いてマ ッチングを行った。また、この臨床試験は共同研究先の 慶應義塾大学医学部の倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号 20190308)。

(2) 実験結果

図4に4名の患者の測定結果を示す。薬剤師の判定で は患者 A、Cは正常に吸引を行ったが、患者 B、D は吸 入前の息吐きが不十分であり、正常に吸引が行えていな いエラー吸引となった。

この各波形に DP マッチングを行った結果を図5に示 す。また、表1に DP マッチングにより求めた時間正規 化距離の結果を示す。結果から、正常に吸引を行った患

者 A、Cにおいては時間正規化距離がそれぞれ 5.377、 10.345 と小さい値となったが、エラー吸引を行った患者









(d)患者 D: エラー吸引

表 2:時間正規化距離算出結果

データ	時間正規化距離	目視判定
А	5.377	正常
В	16.650	エラー
С	10.345	正常
D	27.905	エラー

B、Dにおいては時間正規化距離が 16.650、27.905 と比較 的大きい結果となった。すなわち、時間正規化距離の大 小と薬剤師の目視判定結果に相関があることを示してい る。よって、DPマッチングにより求めた時間正規化距離 から正常吸引とエラーを含む吸引動作を識別可能である ことを示すことができた。

3. 考察及び今後の展望

本研究では DP マッチングアルゴリズムを用いた、吸 入動作の自動正誤判別について提案した。臨床試験によ る実験では、DP マッチングにより求めた時間正規化距離 が薬剤師の目視判定結果と一致した。これにより DP マ ッチングアルゴリズムは吸入動作の正誤判別に有効であ ることが実証された。

現状では吸入動作にエラーがあったかどうかのみの判 定しか示せていないため、今後はどのようなエラーが発 生していたかについて詳細に判別可能なアルゴリズムを 構築する。また、pMDIやタービュへイラーといった他 の各種吸入器においても同様に判別可能であることを検 証する。

【参考文献】

- V. G. Press, V. M. Arora, L. M. Shah, S. L. Lewis, K. Ivy, J. Charbeneau, S. Badlani, E. Naurekas, A. Mazurek, J. A. Krishnan, "Misuse of respiratory inhalers in hospitalized patients with asthma or COPD," Journal of General Internal Medicine, Vol. 26, pp. 635–642, 2011.
- S. Schantz, N. Katajavuori, O. Antikainen, A. Juppo, "Evaluation of dry powder inhalers with a focus on ease of use and user preference in inhaler-na"ive individuals," International Journal of Pharmaceutics, Vol. 509, Issues 1–2, pp. 50–58, Jul. 2016.
- T.Ezaki, K.Masaki, M.Nishie, H.Nakada, J.Hakamata, S.Takano, K.Sunata, Y.Akiyama, M.Irie, S.Okuzumi, T.Tanosaki, H.Kabata, T.Shimono, S.Tsuda, T.Aomori, and K.Fukunaga, "Accelerometer-equipped external attachments to detect critical errors while using inhalation devices", American Thoracic Society 2021 International Conference, ATS2021, May. 2021.
- D. Baba, S. Uchida, H. Sakoe, "Predictive DP Matching for On-Line Character Recognition," Ninth International Conference on Document Analysis and Recognition (ICDAR 2007), pp. 674–678, 2007.

績 業

【原著論文】

- 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).
- 西江美幸,正木克宜,中田英夫,袴田潤,江崎大航, 冨保紗希,笹原広太郎,浅岡雅人,砂田啓英也,秋山 勇人,入江美聡,奥隅真一,田野崎貴絵,加畑宏樹, 富樫信之,高野俊也,下野誠通,津田壮一郎,青森 達,福永興壱 吸入手技エラー判別用慣性計測装置搭載アタッチメン トの開発 日本呼吸器学会誌,10(増刊),195 (2021).
- Y. Moritoki, T. Furukawa, J. Sun, M. Yokoyama, T.Shimono, T. Yamada, S. Nishiwaki, T. Kageyama, J. Fukuda, M.Mukai and S. Maruo
 3D-Printed Micro-Tweezers with a Compliant Mechanism Designed Using Topology Optimization Micromachines, 12(5:579), 10 (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, 39(8), 83-86 (2021).
- S. Takano, T. Shimono, K. Masaki, K. Fukunaga, H. Kabata, M. Nishie, T. Ezaki, H. Nakada, J. Hakamata, and A. Hasegawa An Inhalation Device with Inertial Measurement Unit for

Monitoring Inhaler Technique IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, 採録決定

【総説】

- 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 映像メディア学会誌,75 (3),330-333 (2021).
- 桑原央明,國分元樹,溝口貴弘,下野誠通,大西公平 構造物の内部欠陥を検出するカセンサレス打振検査デ バイスの開発 検査技術,26(6),13-16 (2021).
- 3. 松永卓也,下野誠通,大西公平 映像機器と力触覚装置の連携により情報を拡張する遠

隔操作システム 画像ラボ, 32 (10), 11-15 (2021).

4. 下野誠通

力触覚を有する安全安心な整形外科ドリルの開発 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 2020 年度研 究事業成果集, 16 (2022).

【口頭発表】

- 西江美幸,正木克宜,中田英夫,袴田潤,江崎大航, 富保紗希,笹原広太郎,浅岡雅人,砂田啓英也,秋山 勇人,入江美聡,奥隅真一,田野崎貴絵,加畑宏樹, 富樫信之,高野俊也,下野誠通,津田壮一郎,青森 達,福永興壱 吸入手技エラー判別用慣性計測装置搭載アタッチメン トの開発 第61回日本呼吸器学会学術講演会,2021年4月,東京
- T. Ezaki, K. Masaki, M. Nishie, H. Nakada, J. Hakamata, S. Takano, K.Sunata, Y.Akiyama, M.Irie, S.Okuzumi, T. Tanosaki, H. Kabata, T. Shimono, S. Tsuda, T. Aomori, and K. Fukunaga Accelerometer-equipped external attachments to detect critical errors while using inhalation devices American Thoracic Society 2021 International Conference, 2021 年 5 月, オンライン
- 3. T. Matsunaga, T. Shimono, and K. Ohnishi A Method to Contact with Real Environment through Virtual Object by Hidden End Effector in Teleoperation with Augmented Reality International Symposium on Industrial Electronics, 2021 年 6月, オンライン
- 下野誠通 リニアドライブ技術のヘルスケア機器応用
 2021 年電気学会産業応用部門大会
 2021 年 8 月, オンライン
- 5. 土屋萌南,下野誠通
 3D 映像の知覚奥行に合わせた遠隔操作のスケーリング設計法
 2021 年電気学会産業応用部門大会
 2021 年 8 月,オンライン
- 6.田村剛,松永卓也,下野誠通,大西公平,臼田慎,河 奈裕正

ロ腔外科手術ロボットの操作支援に向けた 3DCG イン ターフェースの開発 2021 年電気学会産業応用部門大会 2021 年 8 月, オンライン

- 7. 下野誠通,松永卓也,高野俊也,大西公平,八木満, 中村雅也 リアルハプティクス技術の整形外科支援応用 第29回日本腰痛学会,2021年10月,東京
- 下野誠通 再生細胞医療支援に向けたリアルハプティクス モノづくり企業のための細胞培養研修,2021年12月, オンライン
- ア野誠通 リアルハプティクスを援用した貫通検知・自動停止機 能を有する骨ドリルの開発 第16回 CAOS 研究会,2022年3月,東京
- 10. A. Hasegawa, T. Shimono, S. Takano, K. Masaki, H. Nakada, and M. Nishie Inhaler Motion Evaluation by Weighted DP Matching The 8th IEEJ International Workshop on Sensing Actuation, Motion Control, and Optimization,2022 年 3 月, オンライン
- 11. G. Tamura, T. Matsunaga, T. Shimono, K. Ohnishi, S. Usuda, and H. Kawana Development of Operation Support System for Dental Surgery Robot The 8th IEEJ International Workshop on Sensing Actuation, Motion Control, and Optimization 2022 年 3 月, オンライン
- 12. M. Tsuchiya, and T. Shimono Scaling Method of Operation Distance Affected by Perceived Depth During Image Zooming in Bilateral Teleoperation The 8th IEEJ International Workshop on Sensing Actuation, Motion Control, and Optimization, 2022 年 3 月, オンライン

研究報告2022 目次 【研究開発部】

実用化実証事業

「腸内環境デザイン」グループ

•	▶総括·····	132
•	▶腸内細菌の単離・培養法の確立および腸内細菌特異的抗体の実用化に向けた評価・・・・・・・・・・	135
•	▶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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	138
•	▶業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	140

腸内環境デザイングループ

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 ことで、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向けた基盤技術の構築を目的として いる。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こと で腸管内の恒常性を維持している。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消 化器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 細菌来の代謝物質も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 うな腸内細菌から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、構築した嫌気培 養方法を用いた腸内細菌の単離および安定培養方法の確立、標的となる腸内細菌を選択的に取得するため のツール開発、およびその有用性の検証に取り組んだ。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. 2021 年度の研究目的

2021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分離・培養する には二つの方法がある。一つ目は、ヒトやマウスの便に含 まれる腸内細菌叢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等に保管・登録されて おり、入手可能である(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。これまでに開発した腸内細菌培 地や嫌気培養法を活用することによりヒトの便試料から 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およ びその有効性の評価

腸内細菌叢を構成する腸内細菌の中には、ビフィズス菌

や乳酸桿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(参考文献1-3)。その一 方、病原性大腸菌などの消化器関連疾患や代謝疾患やアレ ルギー疾患に関与する腸内細菌などが存在することも報 告されている(参考文献 2-4)。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・培養す るには、便試料懸濁液を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採用されることが多い。選択培 地や培地に特定の物質を添加することにより、ある程度の 選択は可能であるが、標的細菌のみを単離する効率は低い ことが課題となっている。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、その有効性を評 価した。

2. 2021 度の研究成果

2021 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 に腸内細菌株をリスト化し、理研 BRC より入手可能な腸 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 培地)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。GAM 培地により培養できな かったものについては本研究室で独自に調製した改良型 YCFA 培地 (mYCFA) により培養することで安定的に培 養可能とした。本年度は 15 種類の腸内細菌基準株の安定 培養に成功した。表1はこれまでにグループ内にて安定培 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。

表1:腸内細菌基準株の入手数および安定培養方法構築の可否を まとめたもの

	基準株	培養	要培養条件
	入手数	成功数	検討
グラム陽性菌	52	50	2
グラム陰性菌	25	21	4

(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。認められた ものから 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。本年度はヒト便試料より



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・安 定培養法構築の流れ、疾患関連細菌Xの単離・安定培養法の構築 手順

4 種類のグラム陰性菌の単離・培養に成功した。これらに 加えて、疾患関連腸内細菌 2 種類の単離・安定培養法の確 立に成功した。

(3) 標的腸内細菌単離に向けたツールの開発とその 応用利用法の検証

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・培養するには、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などの課題 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。本年度は疾患に関連する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 ことに成功した。また、標的の疾患関連グラム陰性菌属に 広く交差性を示す抗体も同時に取得できた。

次に、これまでに作製した腸内細菌特異的抗体について も有用性の検討を実施した。昨年度までに標的細菌を含む 腸内細菌混合液から図 2 に示す Magnetic-activated cell sorting 法の一つである MojoSort により標的細菌の濃縮に 成功していた。本年度はより複雑な環境から標的細菌の分 離を試みるため、ヒト便試料から夾雑物を除いた溶液に標 的細菌を添加し、MojoSort を用いることで標的細菌を濃縮 可能かどうかの検討を実施した。その結果、腸内細菌混合 液よりは効率が落ちるものの、標的分画に細菌を濃縮できた。



図2: MojoSort と作製した腸内細菌特異的抗体を用いた、便懸濁 溶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、研究室同士を繋ぐ 環境を構築していた。昨年度から続く COVID-19 による制 限下においても、共同研究先と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し、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前身となる腸内細菌叢プロジェク トから引き続き、 腸内環境制御基盤技術の構築への礎と なる腸内細菌に関する新たな知見の取得、制御技術・ツー ルの開発を実施している。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、その方法を活用することで腸内 細菌の単離・安定培養法の確立を進めている。本年度は新 たに 14 種類の腸内細菌基準株の安定培養に成功し、累計 で 71 種類の腸内細菌基準株の安定的培養法を確立した。 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本年度はヒト腸内細 菌を6種類単離することができた。安定的な培養法を確立 した腸内細菌の中で有用性が示唆されるものについては、 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検討を進める。一方で、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。

腸内環境制御基盤技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、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 法についても有効であることが示された。本結果は腸内細 菌標的抗体を活用することで、標的となる細菌を効率良く 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引き続き進め、腸内環境 制御基盤技術開発ツールとして活用する。

将来的には、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。

【参考文献】

- Zheng, D., Liwinski, T., Elinav, E. Cell Res. Jun;30(6):492-506. (2020)
- Sanders, ME., Merenstein, DJ., Gibson, GR., Nat Rev Gastroenterol. Oct; 16(10):605-616, (2019).
- Fan, Y., Pedersen, O. Nat Rev Microbiol. Jan;19(1):55-71, (2021).
- Chen, Y., Zhou, J., Wang, L. Front cell Infect MIcrobiol. Mar 17;11:625913 (2021).

腸内細菌の単離・培養法の確立および腸内細菌特異的抗体の

実用化に向けた評価

「腸内環境デザイン」グループ 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) 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 質である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病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。

(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、各種疾患とも 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。これらについての研究報告数が少ない一番の要因は、 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 法の開発が進んでいるものの、依然として単離・培養が困 難な腸内細菌が数多く存在している。

(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、以下に示す課題 に取り組む必要がある。

- 1. 腸内細菌の安定的培養方法の確立
- 2. ヒトやマウスからの腸内細菌の単離
- 3. 単独腸内細菌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
- 4. 構築した腸内細菌研究ツールの評価

個々の腸内細菌についての基礎データやその培養方法 のノウハウの蓄積は、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のみ ならず基礎研究の発展にも大きな役割を果たすことが考 えられる。

2. 実験と結果

本年度は腸内細菌基準株の安定培養法の構築、ヒト便試 料からの腸内細菌の単離および培養方法の確立、本プロジ ェクトにて作製した腸内細菌特異的抗体の実用化に向け た応用利用法の検討の3つの項目に取り組んだ。

(1) 腸内細菌基準株の安定培養方法の構築

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 14 種類を新たに入手し安定培養法の検討を行っ 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)もしくは本プロジ ェクト独自に改良を加えた改良型 YCFA 培地の寒天培地 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5種類のグラム陽性菌および9種類のグラム陰性菌 の培養を行った。その結果、全ての腸内細菌基準株につい ては、GAM および mYCFA を使用し、嫌気環境下にて培 養することで安定培養にできることを見出した(図 1)。



図 1:安定培養法を確立した腸内細菌基準株グラム染色像

(2) ヒト由来腸内細菌の単離・培養法の確立

これまでに引き続き、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嫌気培養技術と選択培地を 組み合わせることで、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を実施した。

径の異なるフィルターを複数種類組み合わせ、そこに健 常人由来の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 16 時間培養した。 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を形成させた。24-72 時間後に形成さ れたコロニー群から単コロニーを釣菌し、液体培地内にて 培養を継続した。その中から増殖が認められたものは DNA を抽出し、その配列を 16S rRNA 遺伝子増幅用ユニバ ーサルプライマーで遺伝子増幅した後にシークエンス解 析を実施し、菌種の同定を行った。その結果、本年度は4 種類のグラム陽性菌の単離・培養に成功した(図 2)。



図2:本年度ヒト便試料より単離した腸内細菌のグラム染色画像

(3) 腸内細菌特異的抗体の有用性の検討

本プロジェクトにおいてこれまで腸内細菌特異的抗体 を作製し、標的細菌を含む腸内細菌混合液から標的の腸内 細菌を分離濃縮する方法を確立していた。しかしながら、 カラムへの標的細菌以外の吸着が起こり、標的分画を調製 する際にこれらの細菌が混入する課題があった。そこで本 年度は類似した方法ではあるがカラムを使用しない MojoSort を使用することでより純度を上げられるかどう か検討を行った。MojoSort後の各分画からDNAを抽出し、 標的腸内細菌数を定量 PCR により検討した。その結果、 抗体を含まないNA およびコントロール抗体の IgG では不 要分画 (Flow) にて標的細菌が検出されたが標的分画(Elu) ではほとんど細菌は検出されなかった(図 3)。一方で、作 製した標的腸内細菌特異的抗体を用いると Flow でもわず かに検出されたが、標的分画においてほぼ全ての標的細菌 が検出された、MojoSort により腸内細菌混合液から標的細 菌の単離・濃縮の効率を上げることが明らかとなった(図 3)。



図 3:標的細菌を添加した腸内細菌混合液からの標的細菌の分離 NA は磁気ビーズのみ、IgG はコントロール、Ab は腸内細菌特異 的抗体を示す。 ***p<0.001, ****p<0.0001

そこで次に標的細菌を含むヒト腸内細菌叢混合液から 同手法を用いて、標的となる腸内細菌の単離・濃縮を検討 した。分画したそれぞれのサンプルより DNA を抽出し、 次世代シークエンサーにより各分画中に含まれる腸内細 菌の割合を検討した。NA および IgG では標的画分(Elu) とフロースルー(Flow)において腸内細菌は同程度の割合 で存在していた。一方で、腸内細菌特異的抗体(Ab)を 使用すると標的分画において標的細菌を濃縮することに 成功した(図4)。



図4:標的細菌を添加したヒト腸内細菌叢混合液からの標的細菌 の分離

NA は磁気ビーズのみ、IgG はコントロール抗体、Ab は腸内細菌 特異的抗体をそれぞれ示す。

3. 考察及び今後の展望

本年度新たに 14 種類の腸内細菌基準株の安定培養に成 功し、累計 71 種類の腸内細菌基準株の安定的培養法を確 立した。一方で、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、培地の改良や二槽式透析培養 器を用いた培養を続けることで安定培養法の構築をめざ す。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4 種類の腸内細菌を単離・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。

これらに加え、作製した腸内細菌特異的抗体を用いた標 的細菌の分離・濃縮法の改良、より複雑な環境からの標的 細菌の分離を検討した。腸内細菌特異的抗体を用いること で標的細菌を含む腸内細菌混合液からは高純度の標的細 菌の分離に成功した。一方で、標的腸内細菌を含むヒト腸 内細菌叢からの分離においては、標的分画において濃縮は 見られたものの、標的以外の腸内細菌も含まれていた。今 後は抗体と標的腸内細菌の非特異的な反応を抑える手法 を検討し、精度を上げることに取り組む。

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する。またこれらの 情報と作製している腸内細菌特異的抗体をうまく活用す ることで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。

本研究は、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、神奈川県委託事業先進異分野融合プロ ジェクト研究立案・推進事業により実施しました。

【参考文献】

- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.Z., Abe, F., Osawa, R., *BMC Microbiol.* 25:16:90, (2016).
- 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. *Nat. Commun.* 4: 1654, (2013).
- ^TFurusawa, 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. *Nature* 504: 446-450, (2013).
- 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. *Nature* 500: 232-236, (2013).
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., Finlay, B.B. *Physiol Rev.* Jul;90(3):859-904. (2010).
- 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. *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 クスの開発や、疾患に関連する腸内細菌を標的とした創薬 を効率よく進めるには、標的となる腸内細菌を宿主の腸内 細菌叢から効率よく分離するツールの開発が必要不可欠 である。

(1) 腸内環境を整える方法と課題

腸内細菌叢を含む腸内環境を整える方法として、ヨーグ ルトや発酵食品等の機能性食品の摂取が一般に浸透して おり、これは日常的に実施可能という観点から予防的アプ ローチとして広く利用されている。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人が摂取することで 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、臨床的面においては、潰 瘍性大腸炎やクローン病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「便微生物叢移植療法」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。そこで腸内環境を整 え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のではないかと考えた。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単離するツールの開発が重要となっ てくる。

(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

「腸内環境デザイン」グループ 大縄 悟志、中藤 学、井上 浄

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つ。細菌も抗原としての性質 を有しており、実際に特定の細菌を認識する抗体も報告さ 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 多くが標的細菌以外の細菌に反応するという問題がある。 そのため、腸内細菌叢を構成する多種多様な腸内細菌の中 から標的となる細菌のみを単離するには、より特異性の高 い抗体の使用が求められる。

(3) 腸内環境制御基盤技術の構築のための研究ツー ル作成

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御する基盤技術 の構築は、我々の健康維持や疾患予防、治療もしくは診断 への有効な手段となる可能性がある。これまで本プロジェ クトにおいて、独自の抗体作製方法を構築し、複数の腸内 細菌に対して特異性の高い抗体の作製に成功している。本 年度は疾病の新規診断法開発に向け、疾病に関与する腸内 細菌に対する抗体の取得を試みた。

2. 実験と結果

(1)標的腸内細菌特異的抗体の作製

これまでに構築した独自の抗体作製方法を用いること でグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する特異性が高 い抗体作製に成功している。そこで本年度は、安定培養法 を確立した腸内細菌の中から特定の疾病時に増加が認め られる細菌(以下、細菌 X と表記する)を標的とした特異的 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)を比較した。抗原感作後における血清中に含 まれる細菌 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 差は認められなかったが高い傾向を示した。(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。

(2) 細菌 X に対する特異的な抗体の選抜

血清中の細菌 X に対する抗体価の上昇が認められたマ 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。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 および同属種の腸内細菌に対する 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、 各細菌との反応を検討したところ多くのハイブリドーマ クローンは図 2A に示すように細菌 X に特異的な反応性を 同種異株の細菌に対して反応性を示さなかった。一方で、 ハイブリドーマの中には細菌 X のみならず同属菌にも幅 広く交差反応を示すものも含まれていた(図 2B)。



図2:フローサイトメーターによる抗体と細菌Xおよび同属菌への結合の検証。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。

(3) ヒト便試料からの細菌 X 単離の検討

項目 2.の(2)で作製した抗体の交差反応性の検討や、他の X 属細菌に対する抗体作製に向け、ヒト便試料より X 属 細菌の単離を試みた。嫌気チャンバー内において本研究室 独自に調製した腸内細菌培養培地と細菌 X 属単離用のプ レートを組み合わせることで、2 種類の X 属細菌の単離に 成功した(図 3)。



図3: ヒト便試料より単離したX属細菌のグラム染色像

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。X 属細菌は一つの種類の腸内細菌のみならず、同属に含まれ る細菌も同様に疾病への寄与が示唆されている。次の課題 としては、細菌 X に特異的抗体のみならず X 属細菌を広 く認識する抗体の作製も行い、用途に応じた使い分けをで きるようにする。また、これまでに蓄積した腸内細菌の基 礎データの中から機能性食品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 製についても引き続き進めていく。

4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、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。

本研究は、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、神奈川県委託事業先進異分野融合プロ ジェクト研究立案・推進事業により実施しました。

【参考文献】

- 1 Kim, S., Suda, W., Kim, S., Oshima, K., Fukuda, S., Ohno, H., Morita, H., Hattori, M., *DNA Res.* Jun;20(3):241-53, (2013).
- 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. Cell Host Microbe*. Oct 12; 20(4):515-526, (2016).
- Ishikawa, D., Sasaki, T., Osada, T., Kuwahara-Arai, K., Haga, K., Shibuya, T., Hiramatsu, K., Watanabe, S. *Inflamm Bowel Dis.* Jan;23(1):116-125, (2017).
- 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. *Lancet*. Mar 25;389(10075):1218-1228 (2017).

業績

【原著論文】

- Ishihara S, Sato T, Fujikado N, Miyazaki H, Yoshimoto T, Yamamoto H, Fukuda S, Katagiri K. Rap1 prevents colitogenic Th17 cell expansion and facilitates Treg cell differentiation and distal TCR signaling. Commun. Biol. 5: 206, 2022
- Jangid A, Fukuda S, Kato T, Seki M, Suzuki Y, Taylor TD, Ohno H, Prakash T. Impact of dietary fructooligosaccharides (FOS) on murine gut microbiota and intestinal IgA secretion. 3Biotech 12: 56, 2022
- Maruyama Y, Nishimoto Y, Umezawa K, Kawamata R, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, *Fukuda S. Comparison of oral metabolome profiles of stimulated saliva, unstimulated saliva, and mouth-rinsed water. Sci. Rep. 12: 689, 2022.
- *Furusawa C, Tanabe K, Ishii C, Kagata N, Tomita M,
 *Fukuda S. Decoding gut microbiota by imaging analysis of fecal samples. iScience 24: 103481, 2021.
- Yang Y, Kumrungsee T, Kato N, Fukuda S, Kuroda M, Yamaguchi S. Supplemental Aspergillus lipase and protease preparations display powerful bifidogenic effects and modulate the gut microbiota community of rats. Fermentation 7: 294, 2021.
- Connell S, Kawashima M, Nakamura S, Imada T, Yamamoto H, *Tsubota K, *Fukuda S. Lactoferrin ameliorates dry eye disease potentially through enhancement of short-chain fatty acid production by gut microbiota in mice. Int. J. Mol. Sci. 22: 12384, 2021.
- Yokoyama Y, Shinohara K, Kitamura N, Nakamura A, Onoue A, Tanaka K, Hirayama A, Aw W, Nakamura S, Ogawa Y, Fukuda S, Tsubota K, Watanabe M. Metabolic effects of bee larva-derived protein in mice: Assessment of an alternative protein source. Foods 10: 2642, 2021.
- Ejima R, Akiyama M, Sato H, Tomioka S, Yakabe K, Kimizuka T, Seki N, Fujimura Y, Hirayama A, <u>Fukuda S</u>, Hase K, Kim YG. Seaweed dietary fiber sodium alginate suppresses the migration of colonic inflammatory monocytes and diet-induced metabolic syndrome via the gut microbiota. Nutrients 13: 2812, 2021.
- 9. Watanabe Y, Takeuchi N, Yang J, Obana N, Morinaga K,

Kusada H, Tamaki H, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of Atopobiaceae bacterium strain P1, isolated from mouse feces. Microbiol. Resour. Announc. 10: e0062721, 2021.

- Suzuki K, Nakaoka S, Fukuda S, Masuya H. Energy landscape analysis elucidates the multistability of ecological communities across environmental gradients Ecol. Monogr. 91: e01469, 2021.
- Takahashi H, Yang J, Yamamoto H, Fukuda S, Arakawa K. C Complete Genome Sequence of *Adlercreutzia equolifaciens* subsp. celatus JCM 14811T Microbiol. Resour. Announc. 10: e0050721, 2021.
- Kurokawa S, Tomizawa Y, Miyaho K, Ishii D, Takamiya A, Ishii C, Sanada K, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T. Fecal Microbial and Metabolomic Change during Treatment Course for Depression: An Observational Study. J. Psychiatr. Res. 140: 45-52, 2021.
- Nishimoto Y, Nomaguchi T, Mori Y, Ito M, Nakamura Y, Fujishima M, Murakami S, *Yamada T, *Fukuda S. Nutritional efficacy of Chlorella supplementation depends on the individual gut environment: randomized control study. Front. Nutri. 8: 648073, 2021.
- Sato S, *Shimizu E, He J, Ogawa M, Asai K, Yazu H, Rusch R, Yamane M, Yang F, *Fukuda S, Kawakami Y, *Tsubota K, Ogawa Y. Positive effects of oral antibiotic administration in murine chronic graft-versus-host disease. Int. J. Mol. Sci. 22: 3745, 2021.
- 15. Nakamura A, Kurihara S, Takahashi D, Ohashi W, Nakamura Y, Kimura S, Onuki M, Kume A, Sasazawa Y, Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Saiki S, Matsumoto M, Hase K. Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon. Nat. Commun. 12: 2105, 2021.
- 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. Int. J. Neuropsychopharmacol. 24: 97-107, 2021.

【招待講演・指定演者】

 福田真嗣 腸内細菌叢がもたらす宿主恒常性と疾患
 第21回日本分類学会連合公開シンポジウム 2022年1月 8日(オンライン開催)

2. 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73回日本生物工学会 2021年10月28日(オンライン 開催)

3. 福田真嗣

腸内デザインによるがんの予防・治療 第80回日本癌学会学術総会 2021年 10月2日(オンラ イン開催)

4. 福田真嗣

腸内環境に基づく食の層別化がもたらす未来 日本食品科学工学会第68回大会 2021年8月27日(オ ンライン開催)

5. 福田真嗣

マウス腸内における大腸菌共生進化機構の解明 日本進化学会第23回大会 2021年8月20日(オンライン開催)

6. 福田真嗣

ヒトマイクロバイオームがもたらす健康と疾患 第48回日本毒性学会学術年会 2021年7月9日(オンラ イン開催)

7. 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25回腸内細菌学会 2021年6月1日(オンライン開催)

8. 福田真嗣
 腸内細菌叢由来アミノ酸代謝物質がもたらす宿主恒常性と疾患
 日本アミノ酸学会第6回産官学連携シンポジウム 2021
 年5月31日(オンライン開催)

【口頭発表】

 田中一己
 米ぬか摂取による大腸炎抑制効果はトリプトファン代謝
 物質がもたらす
 第1回腸内デザイン学会年会 2021年11月18日(オン ライン開催)

【ポスター発表】

1. 田中一己 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75回日本栄養・食糧学会大会 2021年7月4日(オン ライン開催)

【特許】

(1) 国内特許出願 1件

研究報告2022 目次 【研究開発部】

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·····	••••• 143
◆未病と食の脳活動評価試験法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	••••• 147
◆ 業績·····	••••• 151

「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. 2021 年度の研究目的

グループ最終年度にあたる 2021 年度は、以下の各項目 を重点項目として実施した。これまでに精力的に取り組 み、築き上げてきた研究成果や開発した評価技術につい ては、継続的にブラッシュアップし、新たな取り組みと ともに広く展開していくことを目指す。本稿において は、2021 年度の活動を中心に、過去の事例も一部再掲し ながらご紹介する。

(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



図1:食品と未病の関係
(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、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2021年度の実績を中心に、研究成果を紹介 する。

(1)-1 食品機能性解明に向けた取り組み

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。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。 我々はこれまで、未病マーカーとして mRNA 発現変化を 解析対象とし、検討および検証を重ね、その成果を複数の 論文にて報告している。一方、mRNA の発現には様々な制 御機構がある。2021 年度には、食品刺激により変動する エピジェネティックな調節の解明を組み合わせつつ、より 健康に近い未病状態を想定した試験を実施し、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 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、新たに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. 2021 年度の研究成果

以下に挙げるのは、2021 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 食品機能性解明に向けた取り組み

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。KISTEC での評価に適し たタイムスケジュール、実行内容等のプロトコル作成を経 て東海大学にて実行・検証し、完成させたものである。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。

この手法を駆使し、ポリフェノールの一種であるタキシフォリンを用いた研究を実施したところ、タキシフォリン 含有食品摂取は少なくとも女性の計算速度を上昇させる ことが明らかとなり、主観的疲労を軽減させることが期待 される結果を得た (*Jpn Pharmacol Ther* Vol.50, 93-107 (2022))。

一方、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、それらと相関すると考えられる 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年度から2021年度 にかけて。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、計算テスト実施中・実施前後での有意な差 の検出や、周波数帯域ごとの変化の違いの検出に成功した (図 2)。この手法を活用し、食品介入を通じて、脳の活動 状態のリアルタイムな変化に対する作用を評価すること が可能となる。 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。一方、行動試験については、その実施環境、実 施者、実施手順等の違いにより、同じ試験ツールを用いて も異なる結果が得られることが知られている。これまで開 発、検証してきた評価技術をより広く展開するために、 2021 年度は、これまでに確立した行動試験を他機関でも 実施し、食餌条件の違いによる行動の差異を検出可能であ るかを検証した。その結果、栄養素条件を調節した食餌摂 取により、広場テスト(不安様行動や活動性の評価とされ る)等における差異を検出するに至った。動物の行動試験 は、評価する食品や評価したい事象により、都度、条件検 討が必須であるが、本試験成果およびこれまでの検討成果 によって、研究を推進することが可能となった。

(1)-3 未病評価指標の活用例

動物を対象とし、食品刺激により変動するエピジェネテ イックな調節の解明を組み合わせつつ、より健康に近い未 病状態を想定した試験を実施した。その結果、高脂肪は短



図2:脳活動指標テストと脳波計測

図は KISTEC アニュアルレポート 2022 より

期的な負荷であっても遺伝子発現を変動させること、発現 変動した遺伝子のなかには、特定の食品成分の摂取により 変動がキャンセルされるものが複数含まれることを見出 した。また、同様のエピジェネティックな変化も見出して おり、未病のなかでもより健康に近い比較的初期の応答の 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 を示した。

(2) 受託·共同研究

企業や大学との共同研究、受託研究を推進している。 2021 年度には、得られた成果のうち一部にあたる5件が 研究論文として掲載された他、現在投稿中の論文もある。 外部発表も積極的に進め、広く成果の発表に努めている。 また、特許出願2件の他、出願について検討を進めている 案件もある。継続的に実施し、未病、食品の機能性評価の 研究を広く推進していく。

(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 集、開発研究を進めている。

また、平成30年3月に、本グループの研究手法を基盤 とする「ワンストップ型食品機能性評価サービス」が神奈 川県 ME-BYO BRAND に認定された。これを受けたお問 い合わせもいただいているが、今後一層の周知を図り、評 価センターでの食品機能性評価の受託あるいは共同研究 拡大を目指し、得られた成果を広く還元し、国内外を問わ ず生活の質(QOL)の向上を目指していく。

2019年6月から(一財)日本バイオインダストリー協会(JBA)会長に就任した。2021年度、JBAでは関東圏(東京都、神奈川県、千葉県、埼玉県。筑波)にGreater Tokyo Biocommunity (GTB)構想を立ち上げ、国際的バイオコミュニテイづくりを行った。この過程で、KISTECなど殿町地区の神奈川県の活動を高く評価する意見を述べた。

【最後に】

本研究グループでは、旧 神奈川科学技術アカデミー における研究プロジェクトから通算して 200 を超える論 文・外部発表、海外、国家、民間を問わない多くの競争 的資金の獲得、産学官連携を継続的かつ精力的に行うこ とによって研究を推進してきた。築き上げてきた多くの 研究成果や開発した評価技術については、継続的にブラ ッシュアップし、新たな取り組みとともに広く展開して いくことを目指す。

なお、2017年度以降の当グループの研究成果について

は、(一財)バイオインダストリー協会(JBA)の機関誌、 バイオサイエンスとインダストリー(B&I)にて特集を組 み、2022年3月号、5月号、7月号、11月号(予定)に て掲載している。

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。なお、本報告の一部は 2020年度の研究報告にて記した研究の結果を 2021年度 にさらに詳細に解析したものであり、研究概要説明のた め、2020年度の報告内容を一部再掲載する。

(1) 未病とその評価

未病は、病気ではないが、健康でもない状態であり、 日本未病システム学会では「自覚症状はないが検査では 異常がある状態」と「自覚症状はあるが検査では異常が ない状態」とを合わせたものと定義している。健康状態 から病気に至るまで、身体の中は徐々に変化するが、こ のわずかな変化、すなわち病気に至る兆しを捉え、対策 を講じることが病気の予防の一つであると考えられる。 このわずかな変化は、既存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。

(2) 未病と食品

(1)にて述べたように、未病は病気に至る前の状態であ る。そのため、医薬に頼る段階ではないが、未病から病 気に至ることのないように講じるべき対策として、食品 の機能性への期待が高い。食品にはそれぞれに様々な機 能があるが、そのほとんどにおいて、摂取することによ る身体の中の変化はわずかである。しかし食品は日常的 に摂取するものであるため、そのわずかな変化が重要な

「食品機能性評価」グループ 亀井 飛鳥、篠崎 文夏

意味を持つと考えられる。例えばわずかな変化の積み重 ねにより大きな変化となる、あるいはわずかな変化を繰 り返すことにより、病気への進行を遅らせるといったこ となどが期待される。

KISTEC ではこれまで、主にメタボリックシンドロームやその予備軍を想定した条件下において、食品による 改善作用とその作用メカニズムを明らかにしてきた。い ずれもトランスクリプトーム解析(網羅的な遺伝子発現 解析)により実施してきた。例えば、桑の葉の脂質代謝 に及ぼす作用(1,2)、サラシア属植物の免疫に及ぼす作 用(3,4)、ビフィズス菌の脂質代謝に及ぼす作用(5,6)、 短鎖フルクトオリゴ糖の脂質代謝に及ぼす作用(7)、ア ミノ酸混合液の作用(8)、栄養素の一つである鉄の摂取 量の違いが身体に及ぼす作用(9,10)などである。さら に、食品の機能性成分について、その効果を発揮する至 適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)。

(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調査によれ ば、半数以上が疲労を感じているという結果であった。 疲労は作業効率の低下やひいては病気の原因にもなり得 る。すなわち、ストレスや疲労は脳の未病状態であり、 その軽減は現代社会において急務である。そのためには 生活習慣の改善が不可避であり、そこには食が大いに貢 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 関すると考えられる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。

本稿では、食品の機能性について脳活動指標テストを 用いて評価した研究事例に加え、脳活動指標テストと脳 波計測とを組み合わせた取り組みについて報告する。

2. 実験と結果

(1)ではポリフェノールの一種であるタキシフォリンを 例に食品の機能性について脳活動指標テストを用いた評 価について、(2)では脳活動指標テストと脳波計測とを組 み合わせた取り組みのうち、2020年度結果をもとに 2021 年度に整理した内容について紹介する。

なお、「(1) タキシフォリンの研究」は、次々世代イノ ベーション開発、加齢・栄養研究所からの受託研究とし て実施し、その成果は Jpn Pharmacol Ther Vol.50, (2022)(14)に掲載された。本稿では、論文の概要につい て、図を一部改変しつつ記述する。

(1) タキシフォリンの脳機能評価

シベリア、北欧、北米などの人々はかつて、冬季の食 物が乏しくなる時期にカラマツの内樹皮等をおかゆやパ ンにして食べていた。カラマツの抽出物にはポリフェノ ールの一種であるタキシフォリンが多く含まれる。タキ シフォリンは、マツの他にも果物、野菜、ワイン、茶、 ココアなどの植物由来の食物に含まれる植物フラボノイ ドである。植物に多く含まれるポリフェノールは強い抗 酸化作用を有し、炎症や免疫機能などに影響することが 明らかとなっている。タキシフォリンについても抗酸 化、肝臓保護作用などが調べられており、多彩な機能が あると考えられている。近年、ポリフェノールは脳機能 に対しても影響することが指摘されており、タキシフォ リンについても脳血流量を増大作用等が報告されてい る。これらの背景をもとに、本研究では、健康な若年成 人を対象に、カラマツ由来のタキシフォリン含有食品の 単回摂取が脳活動指標テストのパフォーマンスに及ぼす 影響について検討した。なお、本研究は、株式会社次々 世代イノベーション開発、株式会社加齢・栄養研究所か らの受託研究として実施した。

(1)-1 方法

試験はランダム化プラセボ対照二重盲検クロスオーバ



ー比較試験で、25人の健康な若年成人に対してプラセボ 食品またはタキシフォリン(108 mg)を含む食品を単回 摂取、その後、脳活動指標試験と「疲労」の視覚的アナ ログ尺度(VAS)アンケートとの組み合わせを4セット 実施した(図1))。なお、試験立案および解析はKISTEC にて(KISTEC倫理委員会 J-2019-03, S-2019-06, S-2019-07 承認)、ヒトを対象とする介入試験は東海大学にて実 施した(東海大学医学部臨床研究審査委員会 19R-082 号承認)。本試験は、University Hospital IMedical Information Network Center(UMIN000038223)に登録し た。

(1)-2 結果および考察

女性でタキシフォリン摂取時に計算問題における回答 および正答にかかる時間が短くなり、単回(初回)の脳 活動指標テスト実施後の主観的疲労度が軽減される傾向 がみられた。

以上より、タキシフォリン含有食品摂取は少なくとも 女性の計算速度を上昇させることが明らかとなり、ま た、主観的疲労を軽減させると期待された。

なお、本研究の詳細については、Shinozaki F, Kamei A, et al. (2022) Single administration of taxifolin-rich extract to young adults improves their sequential performance- A randomized, placebo- controlled, double- blind crossover trial. *Jpn Pharmacol Ther*, 50, 93-107 を参照いただきたい。

(2) 脳活動指標テストと脳波計測(2)-1 方法

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:引き算方式の小テスト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、主観的VASアンケートにより評価し、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。

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 A、テスト B をそれぞれ実行いただ 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。 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。ここまでの脳波データの計算については PGV 株式会 社に委託し、以降は KISTEC にて実施した解析結果を示 す。

なお、本研究は、神奈川県先進異分野融合プロジェクト研究立案・推進事業により実施された。

(2)-2 結果

2020年度報告では、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。脳活動指標テスト実行中のα波のパワー値の平均値 を比較したところ、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ことを紹介した。すなわち 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 ており、テストの性質の違いが検出されることが示され た。

2021年度には、2020年度の結果を整理した成果として、テストBの実行中における脳波の変化について解析結果を紹介する。テストBは、①単純な応答課題、② 複数の情報の統合判断課題、③複数の情報の総合判断だが、②とは異なる条件による課題、の3つの小テストの組み合わせより構成しており、それを6回繰り返す設計としていた。6回繰り返しにおける周波数帯ごとのパワー値の平均値の推移を観察したところ、α波において



図2:脳活動指標テスト実行時の脳波の周波数帯別変化

緑の枠内の数字は① 単純な応答課題、② 複数の情報の統 合判断課題、③ 複数の情報の総合判断を示す は、単純な応答課題では高値を示す一方で複雑な課題で は単純な応答課題実行時より必ず低値を示すこと、また そのパターンを繰り返すことが示された。一方、 β 波や γ 波では α 波のような規則性は見出されなかった(図 2)。

α波は、脳波のうち 8~13 Hz の成分であり、安静・覚 醒・閉眼状態において出現すると言われている。また、 視覚情報処理との関係性も報告されている。本試験にお いて、①は②や③に比べてより単純な応答を求める課題 であることから、心理的あるいは視覚情報処理状態とし て②、③とは異なることが推定され、それを反映した結 果のひとつがα波の推移であると推測される。2020 年度 報告のように試験の種類によって応答する周波数帯が異 なることに加え、特にα波の周波数帯域において、その 変化が顕著であることが示されたことは興味深い。

3. 考察及び今後の展望

本稿にて報告した研究により、食品の機能性評価系と しての脳活動指標テストを確立したこと、さらに実行に 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 の検出を進めてきた。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】

- 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.
- 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.

- 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
- 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) 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
- 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
- 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.
- 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.
- 14.Shinozaki F, Kamei A, et al. (2022) Single administration of taxifolin-rich extract to young adults improves their sequential performance- A randomized, placebo- controlled, double- blind crossover trial. Jpn Pharmacol Ther, 50, 93-107

業

績

【原著論文】

- Satoshi Oukubo, Kaede Terauchi, Shinji Okada, Yoshikazu Saito, Takao Yamaura, Takumi Misaka, Ken-Ichiro Nakajima, Keiko Abe, Tomiko Asakura. De novo transcriptome analysis and comparative expression profiling of genes associated with the taste-modifying protein neoculin in Curculigo latifolia and Curculigo capitulata fruits. *BMC Genomics* Vol.22, (2021)
- Geethika S G Liyanage, Ryo Inoue, Mina Fujitani, Tomoko Ishijima, Taisei Shibutani, Keiko Abe, Taro Kishida, Shinji Okada. Effects of Soy Isoflavones, Resistant Starch and Antibiotics on Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)-Like Features in Letrozole- Treated Rats. *Nutrients* Vol.13,(2021)
- Yoichi Kasahara, Masataka Narukawa, Tomoya Nakagita, Keiko Abe, Takumi Misaka, Tomiko Asakura. Ibuprofen inhibits oral NaCl response through transmembrane channel-like 4. J.BBRC Vol.573,(2021)
- 4. Fumika Shinozaki, Asuka Kamei, Kousuke Shimada, Hiroshi Matsuura, Takeo Shibata, Mayumi Ikeuchi, Kayo Yasuda, Takashige Oroguchi, Noriaki Kishimoto, Shinji Takashimizu, Yasuhiro Nishizaki, Keiko Abe. Single administration of taxifolin-rich extract to young adults improves their sequential performance- A randomized, placebo- controlled, double- blind crossover trial-. *Jpn Pharmacol Ther* Vol.50, 93-107 (2022)
- Kiyomi Ohmori, Asuka Kamei, Yuki Watanabe and Keiko Abe. Changes in gene expression over time during cell transformation due to TPA treatment of Bhas 42 cells. *Int J Mol Sci* Vol.23, 3216 (2022)

【総説】

- 阿部啓子、神奈川県の"食品機能性"国際評価技術センターの特徴、B&I、vol.2 (2022)
- 2. 亀井飛鳥、未病と食品機能性の評価システムの確立への挑戦、B & I、vol.2 (2022)
- 3. 篠﨑文夏、基礎研究・ヒト介入試験とトランスクリプ トーム、B & I、vol.3 (2022) 掲載予定 *研究報告
- 4. 嶋田耕育、機能性食品評価のための脳機能評価系導入 と確立に向けて、B & I、vol.3 (2022) 掲載予定 * 研究報告

5. 野原正勝、血液を用いた未病評価システムの開発、B & *I*、vol.3 (2022) 掲載予定

【口頭発表】

- 阿部啓子、2021年食品基礎講座 食品化学とは 食の 研究と沿革"、ロッテセミナー 埼玉 令和3年6月 30日
- 阿部啓子、はじめに・総括、日本学術振興会 R021 食 と未病マーカー産学協力委員会 第4回定例研究会・ 総会(2021 年度第1回)東京大学(オンライン) 令 和3年7月27日
- 阿部啓子、はじめに・総括、日本学術振興会 R021 食 と未病マーカー産学協力委員会 第5回定例研究会・ 総会(2021 年度第2回) 東京大学(オンライン) 令和3年8月30日
- 4. 阿部啓子、はじめに・総括、日本学術振興会 R021「食 と未病マーカー産学協力委員会」 栄養代謝分科会 キックオフ会議 東京大学(オンライン)令和3年9 月 29日
- 5. 阿部啓子、食品を取りまく世界のトレンド-2 Global な食品研究の未来像、天野エンザイム株式会社 セミ ナー 東京大学(オンライン)令和3年9月30日
- 6. 阿部啓子、食と未病マーカー、太陽化学株式会社セミナー 東京大学(オンライン)令和3年10月1日
- ・阿部啓子、食によるヒトの健康状態を計測するデー タサイエンス~いま注目の先端バイオ技術、食品ニュ ーテクノロジー研究会10月例会 東京大学(オン ライン)令和3年10月19日
- 8. 阿部啓子、食品を取りまく世界のトレンド Global な 食品研究の未来像、同志社大学 サイエンスナウ 東 京サテライトキャンパス中央区京橋 令和3年10月 25日
- 9. 阿部啓子、栄養代謝分科会報告、日本学術振興会 R021 「食と未病マーカー産学協力委員会」第6回定例研究 会・総会 東京大学(オンライン)令和3年11月2 日
- 10.・阿部啓子、栄養代謝分科会報告、日本学術振興会
 R021「食と未病マーカー産学協力委員会」第7回定例
 研究会・総会 東京大学(オンライン)令和3年12
 月15日
- 11.阿部啓子、味の不思議 その謎を解く、日本農芸化
 学会出前授業 東京都立農芸高等学校 東京都、令和 3年12月23日
- 12.阿部啓子、はじめに・総括、日本学術振興会 R021 食 と未病マーカー産学協力委員会 第5回定例研究会・ 総会(2021 年度第8回) 分科会報告 東京大学(オ

ンライン) 令和4年3月9日

【特許】

(1)国内特許出願 2件

(2) 国際特許出願 0件

研究報告2022 目次 【研究開発部】

国際評価技術サービス提供事業

「抗菌・抗ウイルス研究」グループ

◆総括······	154
◆新型コロナウイルスを用いた性能評価の取り組み・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	156
◆抗菌・抗ウイルス性能評価の提供について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	159
◆金属酸化物の新型コロナウイルスに対する抗ウイルス活性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	162
◆光触媒による防藻性能評価実証試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	165
◆ 業績······	168

光触媒グループ 抗菌・抗ウイルス研究グループ

グループリーダー 藤嶋 昭

【基本構想】

本プロジェクトでは、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の提供を通じて、 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に活動している。 提供する性能評価方法は JIS/ISO として制定されている方法に加えて、標準規格で対応できない形状や性 質の加工品についてもオーダーメードの性能評価方法を提供している。また、抗菌分野(JIS Z 2801)の ISO 17025 を取得し、光触媒工業会や(一社)抗菌製品技術協議会が定めている認証マークの取得に向けた試験 結果の提供を可能としている。その他、共同研究や自主研究を行うことで、新しい評価方法の開発や抗 菌・抗ウイルス効果を持つ新規物質の探索等に取り組んでいる。

1. 2021 年度の研究目的

我々は様々な研究を行っているが、本年度について は、下記の取り組みに注力して行ってきた。

(1) 抗菌・抗ウイルス性能評価の提供について

これまでに、数多くの抗菌・抗ウイルス性能評価の提供を通して、様々な企業や研究機関の抗菌・抗ウイルス 加工製品の製品開発を促進している。また、試験方法と して確立されている JIS や ISO 等の試験方法では対応で きない形状や性質の加工品に関しても、オーダーメード の試験方法を提案することで対応している。本年度につ いても、引き続き性能評価試験の提供を続けた。

(2) 新型コロナウイルスを用いた性能評価の提供

新型コロナウイルスの感染拡大により、数多くの抗ウ イルス製品の研究開発が進められている。これまで評価 対象ウイルスとして、インフルエンザウイルス及びネコ カリシウイルスが主要なものとして使用されてきた。一 方で、実際の標的とするウイルスを用いた性能評価を行 うことが、製品開発では重要である。そこで、2020年度 に新型コロナウイルスを取り扱うための BSL3 を整備 し、2021年に新型コロナウイルスを用いた性能評価の提 供を開始した。また、基材や光照射による新型コロナウ イルスへの影響について、検討を行った。

(3) 光触媒による防藻性能評価試験

光触媒反応を応用した防藻性能評価方法として、ISO 19635 が制定されており、また国内では 2022 年に JIS R 1712 が制定された。これらの評価方法を活用すること で、光触媒による防藻性能を評価することが可能となっ ている一方、実際の環境下における防藻性能を確認する ことも製品開発をするために重要である。

本研究では、光触媒工業会との共同研究を通じて、実

際の環境下における光触媒の防藻性能の実証試験をおこ なうと共に、ISO や JIS の性能評価方法との関連性につ いて、検討を行った。

(4) 新規機能材料の探索

我々はこれまでに、持続性を持つ抗ウイルス剤とし て、金属酸化物に注目し、研究を行ってきた。本年度 は、我々が国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総 合開発機構(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JST 理事長))の中で開 発した可視光応答型光触媒材料 Cu_xO/TiO₂ 可視光応答形 光触媒及び東京工業大学、中島研究室で開発された希土 類を含む複合酸化物(γ-Ce₂Mo₃O₁₃、CMO)の新型コロナウ イルスに対する抗ウイルス活性を奈良県立医科大学との 共に評価した。

2. 2021 年度の研究成果

(1) 抗菌・抗ウイルス性能評価の提供について

本年度についても、非常に多くの抗菌・抗ウイルス加 工製品の性能評価を行った。



154

図1にこれまでの評価件数の推移を示す。図にあるよう に、毎年度、その評価件数が増加しており、特に新型コ ロナウイルスの感染拡大に伴い、数多くの抗ウイルス加 工製品の研究開発が加速したと思われる。

(2) 新型コロナウイルスを用いた性能評価の提供

2021 年度は平板状及び繊維状の抗ウイルス加工品を対象に、新型コロナウイルスを用いた性能評価を提供した。その内訳としては、75%が平板状の加工品であった。また、性能評価を行った中で65%が光触媒による抗ウイルス加工品であった。

また、光照射による影響などを確認したところ、新型 コロナウイルスは紫外光に対して、抵抗性が低いことを 明らかとした。

(3) 光触媒による防藻性能評価試験

光触媒を塗布したサンプル及びブランクを海老名本部 及び溝の口支所に設置し、防藻性能の評価を行ったとこ ろ、ブランクと比較して、光触媒塗布サンプルでは汚れ や藻類の付着量が抑制されていることが明らかとなった (図 2)。



図2:光触媒による防藻性能実証試験結果

左から順番に4枚がブランク、8枚が光触媒塗布サンプル

また、実証試験で用いた各サンプルについて ISO 19635 による性能評価を行った結果、高いメチレンブルー分解 活性を持つ光触媒サンプルは防藻性能についても、高い 効果を持つことが明らかとなった。

(4) 新規機能材料の探索

本研究で用いた可視光応答形光触媒、CuxO/TiO2に含ま れるCuは1<x<2の価数を持ち、1価が暗所においても高 い抗ウイルス性能を示し、2価が可視光照射による光触 媒反応に寄与する。また、本材料の特徴的な反応とし て、環境中において容易に1価のCuが酸化され、2価に なる状況を可視光の照射を行う事により、1価に戻すこ とが可能である。このことから、暗所及び、可視光照射 下のいずれにおいても、高い抗ウイルス活性を保持する ことが可能な材料と考えられた。 実際に新型コロナウイルスに対する性能を評価した結 果が、図3である



図3:新型コロナウイルスに対する効果

図3に示す通り、暗所または光照射をおこなうことで、 新型コロナウイルスの不活化が起こることを明らかとした。

希土類を含む複合酸化物である CMO に関しても、同様に新型コロナウイルスに対する効果を確認したところ、図4に示す通り、新型コロナウイルスを不活化することが明らかとなった。





以上のように、我々は抗菌・抗ウイルス性能評価の提 供と共に新しい評価方法の開発や新規機能材料の探索に より、より良い生活環境の構築に向けて取り組んでい る。また、食品機能性評価グループと共に2022年度から は新たに「次世代ライフサイエンス技術開発プロジェク ト」として、抗菌・抗ウイルスだけではなく、未病改善 に向けた取り組みや再生・細胞医療の評価方法開発に向 けた研究活動を開始する予定である。

新型コロナウイルスを用いた性能評価の取り組み

「抗菌・抗ウイルス研究」グループ 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。2021年度は、第4波(4月 ~5月)、第5波(6月~10月)及び第6波(1月より)に 見舞われ、全く収束する気配を見せない。感染拡大初期に 比べ、消毒薬及びマスクの品不足は解消されてきたが、今 後のウイズコロナの生活において、抗菌抗ウイルス製品は、 欠かすことのできない物となっている。そして、市場が急 拡大したため、新たな製品が次々と発売されている。しか しながら、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、中には抗ウイルス効果の低い、もしくは疑わしい 製品も販売されている。そこで、抗ウイルス効果を謳う製 品について、適切に性能評価を行える試験機関の重要性が 高まりつつある。

我々は、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 の様々な素材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、新型コロナウイルスの感染拡大に伴 い、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た。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、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、急遽 BSL3実験室の整備を行い、平板状及び繊 維状サンプルについての評価系を構築した。そして、2021 年度より、正式に抗ウイルス評価の受付を開始することが できたので、これらについて下記の通り報告する。

(1) 新型コロナウイルス評価の内訳

2021 年度に新型コロナウイルスを用いた抗ウイルス性 評価を行ったときの試験品の内訳を図1に示す。75%が平 板状製品で、残る25%が繊維状製品であった。平板製品に おいては、フィルム、鋼板、内装材及びガラスなど、製品 の基材はさまざまであった。繊維状製品についても、カー テン生地、フィルター及び化学繊維などであった。また、 全体の65%が光触媒加工製品であり、紫外光応答型より も可視光応答型の方が多かった。抗ウイルス製品の多くは、 室内での使用が想定されるため、可視光応答型の製品が多 かったと思われる。



図1:新型コロナウイルス評価の試験品の内訳

(2) 評価方法について

SARS-CoV-2を用いた試験規格がないため、試験方法は、 下記に示す既存の抗ウイルス試験規格を準用する形で行った。

- ・ISO 21702 (平板製品)¹
- ・JIS R 1706 (紫外光応答型、平板及び繊維)²
- ・JIS R 1756 (可視光応答型、平板及び繊維)³
- ・JISL1922(繊維状製品)⁴
- ・試験ウイルス: SARS-CoV-2/Hu/KngFJ/232RD5 (神奈川衛生研究所より分与されたもの)
 - 宿主細胞: Vero 細胞(ATCC CCL-81)
- ・感染価の測定方法:プラーク法

各試験規格と異なる点は、下記の通りである

- ・SARS-CoV-2を用いている。
- ・ウイルス感染価が約 2.0×10⁷ pfu/ml
- (ISO 21702 では、1.0×10⁸ pfu/ml~5.0×10⁸ pfu/ml)
- ・ 平板製品の場合、ウイルス回収時の SCDLP の量を合計 1 ml で行う。

・光触媒抗ウイルス試験規格では、バクテリオファージQβ を使用しているため、光触媒規格と ISO21702 または JIS L 1922 を組み合わせた方法で行う。

一方、抗ウイルス活性値に直接影響を与えると考えられ ている、試験ウイルス液の調製方法は、既存の規格と同様 にし、ウイルス原液を滅菌水で10倍希釈したものを使用 する。その他、作用時間、照射強度、照射時間などの作用 条件は、既存の規格に準じて行った。(顧客からの要望で、 これらから逸脱した条件で評価を行った事例もある) 光触媒試験の概要図を図2に示す。



図2:光触媒サンプルによる抗ウイルス性評価の流れ

2. 実験と結果

(1) SARS-CoV-2 のフィルム上での安定性について

SARS-CoV-2を用いた抗ウイルス性能評価を行うなかで、 評価毎に試験ウイルス液の感染価を測定する。この時の感 染価については、ウイルスのストック液を作成後、半年以 上経過しても、特に変化はなかった。しかしながら、無加 工品の作用後の感染価が減少してくる印象があった。そこ



図 3: OHP フィルム上でのウイルスの安定性

で、コントロールとして測定(暗所及び1000 lx 24 時間)

していた OHP フィルムのデータを経時的にグラフ化した。 (図 3)

OHP フィルムにウイルス液を接種後、同様の OHP フィ ルムで密着した後、暗所または可視光 1000 lx 照射し、 SARS-CoV-2 のウイルス感染価を測定した。その結果、ウ イルス原液を作成してからおおよそ 5 か月程度で一桁以 上の減少が見られた。しかしながら、試験ウイルス液自体 の濃度の低下は見られていない。おそらく何らかの理由で、 時間が経つにつれ、OHP フィルム上での安定性が低下し ているのではないかと推測される。今後、同様の現象が起 きることが考えられるため、定期的にチェックを行い、必 要に応じてウイルスのストックを更新する必要があると 考えられる。

(2) SARS-CoV-2 の光照射に対する安定性について

SARS-CoV-2 を用いた評価を行っていると、紫外線照射 だけでも感染価の低下が見られる事例があった。そこで、 フィルムやガラス板上での光照射に対する安定性を確認 した。ガラス板は SLG (ソーダライムガラス)、フィルム は OHP フィルムを用いて、その上にウイルス液を接種し、 OHP フィルムで密着させそれぞれ暗所もしくは光照射(紫 外光・可視光)し、6時間後ウイルスの感染価を測定した (図4)



図4:光照射したときのウイルスの安定性

その結果、特にガラス板上での紫外線照射(0.25 mW/cm²) は、検出限界まで低下してしまうことが明らかになった。 また、フィルム上でも、二桁程度の減少が見られた。一方、 可視光(1000 lx)では、あまり大きな減少は見られなかっ た。つまり、SARS-CoV-2は、紫外線自体に対して他のウ イルスよりも抵抗性が低く、さらに、ガラス板上ではより 感染価が減少してしまうということが明らかとなった。今 後、試験品の基材の選定や、評価を行う上でも注意が必要 となる。

3. 考察及び今後の展望

新型コロナウイルスを用いた性能評価については、上

記のように個別に対応しながら進めることができた。 SARS-CoV-2 は新しいウイルスのため、まだ、その性質 や感受性などについては、不明な点が多いと思われる。 また、試験規格では、材料、条件及び方法が詳細に記載 されている一方、取り扱う試験品は多種多様であるた め、注意深くそれぞれの評価を観察していく必要性があ る。今後、平板状または繊維状以外のサンプル(例え ば、吸湿性素材、紙、フィルター及びそれらの光触媒製 品など)にも対応できるように検討していく。このよう な検討には、インフルエンザウイルスやネコカリシウイ ルスでの試験の経験を生かしていくのも重要であると考 えられる。このように、ウイルス種や試験品の素材につ いての様々な情報を集約させることで、試験所としての 経験値を上げ、より信頼性の高い評価サービスを提供で きるように整備していくことが重要である。

2022 年度は、液体サンプルにも対応できるように、評価方法を整備していく予定である。液体サンプルの種類 としては、無機系、有機系、塩素系及びアルコール系な どが一般的であるが、これら以外のサンプルや組成非開 示の場合も考えられる。特に、液体サンプルの場合、作 用時間が短いため、適切な中和剤の選定が非常に重要と なる。例えば、塩素系であれば、中和剤にはチオ硫酸ナ トリウム水溶液、有機系(界面活性剤系)であれば、吸 着ビーズ処理、組成非開示の場合は、汎用性の高い SCDLP 培地などが有効であると考えられる。次年度、上 記の項目について、新型コロナウイルスを用いた性能評 価サービスを提供していく予定である。

【参考文献】

- 1. 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"
- 3. 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"
- 4. JISL 1922 (2016)"繊維製品の抗ウイルス試験方法"

抗菌・抗ウイルス性能評価の提供について

1. はじめに

本研究テーマでは、光触媒加工品やその他の抗菌・抗 ウイルス加工品の性能評価を行い、様々な企業や研究機 関による研究開発の推進させることを目的として、活動 をおこなっている。具体的に用いる方法としては、ISO や JIS 規格等の標準方法であるが、その一方で、ISO や JIS では対応できない形状の加工品が様々開発されてい る。我々はそのような加工品に対しても、可能な限り対 応するために、最適な評価方法をオーダーメードで提案 し、提供を行っている。ここでは、抗菌・抗ウイルス性 能評価としての、JIS や ISO について説明しながら、 我々が行ってきた評価の内容について、報告する。

(1) 光触媒加工品に対する性能評価方法

以前より光触媒加工品による抗菌・抗ウイルス性能評価方法の確立に向けた研究活動をおこなっており、その成果として、紫外光応答形光触媒及び可視光応答形光触 媒を用いた光触媒加工品による抗菌・抗ウイルス性能評価試験方法が規格として制定されており¹⁾⁻⁴、これらの 規格は定期的に内容の見直しもおこなわれている。これらの規格で対象となる形状の加工品は平板状又は繊維状の2種類となっている。

更に、これまでに得られた研究結果より、既に制定さ れている JIS や ISO を用いた評価結果は実環境で使用し た際の抗菌効果を十分に反映していない可能性が明らか となってきた。そこで、実環境を想定した条件による抗 菌性能評価方法の確立に向けて取り組みがなされ、2020 年に ISO 22551 として制定された ⁵⁾。その他にも、2022 年には光触媒加工品による防藻性能評価方法である JIS R 1712 が制定されているが ⁶⁾、いずれについても平板状の 形状を対象としている。なお、これらの新しい規格につ いても性能評価の提供をすでに開始している。

(1)-1 光触媒加工品の抗菌・抗ウイルス方法概要

光触媒加工品が抗菌・抗ウイルス効果を発揮するため には、光を当てる必要あるため、図1に示すように、シ ャーレの内部に試験片を設置、試験菌液を接種した光触 媒加工品に対して、上からフィルムをのせて菌液をと試 験品を密着させたものを準備し、上部より光照射をおこ なう。その後、一定時間経過した接種菌・ウイルス液を 回収し、その生菌数や感染価を測定する方法となってい る。また、接種液の乾燥を防ぐために、シャーレ内に水 で湿らせたろ紙を設置していること、また光を透過させ る必要があるために、上部をシャーレのふたではなく、 「抗菌・抗ウイルス研究」グループ 畑山 靖佳

ガラス板で蓋をすること、暗幕内で光を照射するため、 後述する光触媒加工品の性能評価とは異なり、室温で反 応させること、などいくつかの点で光触媒加工品独自の 方法をとっている(図 2)。



図1:光触媒加工品のサンプルの設置方法 *菌液の代わりに色を付けた水をのせてあります。



図2:光照射で用いる暗幕の例

また、光触媒加工品のうち、繊維状の形状に関して は、ガラス状に評価をおこなう光触媒加工品をのせ、フ ィルムで密着させるのではなく、ガラス板によって密着 させることとなっている。この方法は光触媒加工品以外 の抗菌・抗ウイルス加工品と大きく異なる点である。

(2) 光触媒加工品以外に対する性能評価方法

光触媒加工品以外に対する抗菌・抗ウイルス性能評価 方法に関しても、平板状と繊維状の2種類の形状に対し て、JIS や ISO が制定されている。光触媒加工品とは異 なり、平板状と繊維状の規格が別々に存在している。平 板状の加工品では、抗菌性能評価方法(JIS Z 2801)⁷及び 抗ウイルス性能評価方法(ISO 21702)⁸)があり、繊維状に ついては抗菌製品評価方法(JIS L 1902)⁹及び抗ウイルス 性能評価方法(JIS L 1922)¹⁰)がある。このうち、我々は JIS Z 2801 について、JNLA の登録試験所認定を取得して いる。これにより、光触媒工業会や一般社団法人抗菌製 品技術協議会が認証しているマーク申請に必要なデータ を提供することが可能となっている。

(2)-1 光触媒加工品以外に対する性能評価方法概要

光触媒以外の加工品による性能評価方法は平板状については、ほとんどの点で光触媒加工品の性能評価方法と 同様の流れとなっており、異なる点は光照射が不要であることや試験時の温度を35℃に保つこと、などの違いである。

繊維状の抗菌・抗ウイルス加工品については、光触媒 加工品とは大きく異なっており、0.4g程度に裁断した抗 菌・抗ウイルス加工品をバイアル瓶にいれ、菌液・ウイ ルス液を接種し、培養器に入れて、一定時間反応させる 方法である。

平板状、繊維状どちらも、一定時間の反応時間が経過 後、接種液を回収し、生菌数や感染価を測定する点は光 触媒加工品の性能評価と同様である。

2. 実験と結果

我々が、これまでに提供してきた性能評価件数の推移 を図3に示す。機器の共用化として、抗菌性能評価の提 供を開始してから、毎年、利用件数が増加してきた。特 に、2020年は新型コロナウイルスの感染拡大により、大 幅な利用件数の増加があり、その傾向は、2021年度も続 いていた。

2021 年度の利用件数の状況を図4に示す。図4で明ら かなように、利用件数の内、標的をウイルスとしたもの が80%という内容であった。また、その目的に関して は、研究開発だけではなく、最終製品の評価や材料の探 索といった目的での利用が主であった。

光触媒加工品の抗ウイルス性能評価に関しては、紫外 光応答形と可視光応答形の2種類の光触媒材料の内、 90%超が可視光応答形光触媒を用いた光触媒加工品の利 用であった。

3. 考察及び今後の展望

結果に示したように、性能評価の受託を開始してか



図3:性能評価提供件数の推移



図4:性能評価提供件数の内容

ら、利用件数が増加を続けてきている。特に、新型コロ ナウイルスの感染拡大に伴い、2020年度より大幅な件数 の増加が認められ、特にウイルスを対象とした研究開発 目的が最も多い利用目的であった。このことから、新型 コロナウイルス感染の拡大を防ぐために、この数年で数 多くの企業や研究機関が抗ウイルス加工品の研究開発を 加速させていると考えられる。

光触媒に関しては、90%超が可視光応答形を対象とし た抗ウイルス性能評価試験であったが、細菌やウイルス の感染予防に関しては、特に室内環境などの生活空間で 使用されることを念頭に置いた研究開発が進められてい ると考えられる。また、可視光応答形光触媒は光があた らない場所でも抗菌・抗ウイルス性能が発揮されるハイ ブリッド形と呼ばれるものが開発されている。これによ り、暗所においても抗菌・抗ウイルス効果を発揮し、ま た光が当たる環境下で、その効果が更に高まるような製 品開発が進められていると思われる。

残念ながら、現在も新型コロナウイルスは変異を続け ながら、依然として感染が続いている。一方で、人々の 生活は、新型コロナウイルスの感染拡大前の生活に近づ くように多くの試みや試行が続けられている。その中の ツールの一つとして、抗ウイルス加工品の研究開発が進 められていくことは非常に重要なことと考えられる。

抗菌加工製品や抗ウイルス加工製品の大きな課題とし

て、対照としている微生物である細菌やウイルスなどを 通常の生活環境で目に見たり感じたりすることが難しい ことである。そのため、抗菌・抗ウイルス効果を実感す ることが難しく、消費者にとって、本当に効果が出てい るかの判断をすることが出来ない点である。そのような 課題に対し、これまでに制定されてきた JIS や ISO を始 め、その他我々が行っているオーダーメードの性能評価 を利用していただくことで、抗菌・抗ウイルス効果が確 実に発揮されている加工品であることを数値として確認 することは非常に有効な手段である。是非、今後も皆様 には抗菌・抗ウイルス加工品の研究開発をおこなう中 で、KISTEC の性能評価を利用していただき、良い抗 菌・抗ウイルス製品の開発につなげていっていただきた い。

【参考文献】

- 1.JIS R 1702:2020. ファインセラミックス-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.
- 2.JIS R 1752 ファインセラミックス-可視光応答形光触媒 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.
- 3.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. 一般財団法人日本規格協会.
- 4.JIS R 1756 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.一般財団法人日本規格協会.
- 5.ISO 22551:2020. Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Determination of bacterial reduction rate by semiconducting photocatalytic materials under indoor lighting environment — Semi-dry method for estimating antibacterial activity on the actual environmental bacteria contamination surface.
- 6.JIS R 1712:2022. ファインセラミックス-光触媒材料の 防薬性試験方法.一般財団法人日本規格協会.
- 7.JIS Z 2801:2012. 抗菌加工製品→抗菌性試験方法・抗菌 効果. 一般財団法人日本規格協会.
- 8.ISO 21702:2019. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces.
- 9.JISL 1902:2015. 繊維製品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.

10.JISL 1922. 繊維製品の抗ウイルス性試験方法. 一般財 団法人日本規格協会.

金属酸化物の新型コロナウイルスに対する抗ウイルス活性

「抗菌・抗ウイルス研究」グループ 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てから、すでに2年以上が経 過している。このパンデミックが長引いている原因の一つ は、変異株が次々に生まれ、ワクチン接種の効果が低下し てしまう点にある。

我々はこれまで、持続性のある抗ウイルス剤として金属 酸化物を中心とした材料について開発を行い、抗ウイルス 活性を評価してきた。本稿では、奈良県立医科大学、東京 工業大学と三者での共同研究で行った金属酸化物材料の 新型コロナウイルスに対する抗ウイルス活性について、新 型コロナウイルスの野生株だけでなく、その変異株に対す る効果もふくめて報告する^{1),2)}。

(1) 可視光応答型光触媒材料

奈良県立医科大学と東京工業大学宮内研究室との共同 研究で扱った材料は、2007~2012 年度に東京大学を中心 に行われていた国立研究開発法人新エネルギー・産業技術 総合開発機構(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 JST 理事長))の中で 創製された可視光応答型光触媒材料 CuxO/TiO2 である³⁾。 本材料は、酸化銅と二酸化チタンの複合体で、大きさが数 ナノメートルの CuxO が TiO2 粒子表面に分散して担持さ れている。Cu_xOのxは、1<x<2の範囲をとり、銅の1価 と2価が混合状態で存在し、1価の銅は暗所での抗ウイル ス効果、2価の銅は可視光照射下で光触媒反応に寄与する。 すなわち、暗所においても高い抗ウイルス活性を示し、室 内光などの可視光が照射されれば、さらに高い抗ウイルス 活性を発揮する。この材料について、新型コロナウイルス の野生株だけでなく、変異株であるアルファ株、ベータ株、 ガンマ株、デルタ株に対する抗ウイルス活性を調べた。

(2) 希土類を含んだ酸化物材料

もう一つの材料として、東京工業大学中島研究室で創製 された希土類を含んだ酸化物材料であるセリウムとモリ ブデンの複合酸化物(γ-Ce2Mo3O13、以下 CMO)の新型コロ ナウイルスに対する抗ウイルス活性を評価した。中島研究 室では、CMO 以外にもランタンとモリブデン、セリウム とランタンなど希土類を含んだ酸化物、たとえば La2Mo2O9 や Ceo.sLao.2O2-δ などが種々合成され、水中での 有機物分解やバクテリオファージを対象とした抗ウイル ス活性が調べられてきた^{4),5)}。希土類を含んだ化合物の抗 ウイルス活性は、これまでほとんど調べられていなかった ので、新規でオリジナリティのある研究となっている。

2. 実験と結果

(1) 可視光応答型光触媒 CuxO/TiO2 の抗ウイルス活性

CuxO/TiO2は、NEDO プロジェクトで合成したものを使 い、その粉体をソーダライムガラスに担持して、抗ウイル ス評価に供した。新型コロナウイルスに対する抗ウイルス 活性は奈良県立医科大学で行われ、JIS R 1756 並びに ISO 21702 を参考に野生株だけでなく、変異株であるアルファ 株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株を使って評価された。 可視光照射は、光源として白色蛍光灯(FL20SSW/18, MITSUBISHI)を用いて、Type A filter(400 nm 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。



図 1: Cu_xO/TiO₂の新型コロナウイルス変異株に対する抗ウイ ルス活性(上図: アルファ、ベータ、ガンマのそれぞれの変異株に 対する可視光下での抗ウイルス活性、下図: デルタ株に対して暗 所と光照射下での抗ウイルス活性)

評価結果を図1に示したが、CuxO/TiO2は、イギリス型 変異株として知られるアルファ株、南アフリカ型変異株の ベータ株、ブラジル型変異株のガンマ株のそれぞれに対し て、2時間の可視光照射で、ウイルスの感染価を検出限界 以下まで不活化できることが明らかとなった。また、日本 でも流行のメインとなったデルタ株に対しても、 CuxO/TiO2は、可視光下2時間で、暗所下でも3時間で、 感染価が検出限界となり、可視光照射下だけでなく、暗所 でも高い抗ウイルス活性を発揮することが示された。

この抗ウイルス活性がどのように発揮されるかを明ら かにするために、新型コロナウイルスの表面にある感染に 関与するスパイクタンパク質(S1)の変性を、抗原抗体反応 を利用してタンパク質定量を行う ELISA 法によって調べ た。結果を図2に示した。図1の感染価減少と同様に、暗 所でも光照射下でも1時間から2時間でCu_xO/TiO₂上のス パイクタンパク質(S1)の濃度が急激に減少した。この結果 から、新型コロナウイルスがヒトの細胞に感染する際に必 要なタンパク質であるスパイクタンパク質をCu_xO/TiO₂が 変性させることによって、その抗ウイルス活性が発揮され ると示唆された。

また、新型コロナウイルス表面のスパイクタンパク質だ けでなくウイルスが持つ RNA 量についても RT-qPCR 法 で測定した。その結果、暗所でも RNA が断片化し、RNA 量は減少したが、可視光照射下では、暗所下よりも RNA 量の減少度合いが大きく、可視光での光触媒反応により、 RNA の酸化分解が起こっていると考えられた。この RNA の分解も Cu_xO/TiO₂の抗ウイルス活性をもたらしているメ カニズムの一つと考えている。



図 2:新型コロナウイルス表面のスパイクタンパク質(S1)の変 性のようす

(2) 希土類を含んだ酸化物の抗ウイルス活性

前述した通り、中島研究室では、希土類を含む種々の酸 化物が創製されているが、はじめは、自己撥水性が報告さ れていた酸化ランタンと、抗菌活性が報告されていた酸化 モリブデンを組み合わせた複合酸化物である La2Mo2O9 (以下 LMO)の粉体合成がきっかけとなっている。LMO の 大腸菌と黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を調べたとこ ろ、高い活性を示した。一方で、バクテリオファージに対 しての抗ウイルス活性を調べたところ、エンベロープをも たないバクテリオファージ Qβに対しては高い抗ウイルス 活性を示したものの、新型コロナウイルスやインフルエン ザウイルスと同様のエンベロープをもつバクテリオファ ージ Φ6 に対しては、バクテリオファージ Qβ ほど、高い 活性を示さなかった⁴⁾。そこで、中島研究室では、ランタ ン(La)をセリウム(Ce)に置換し、モリブデン(Mo)と複合さ せた酸化物である CMO を水熱法により合成し、単相の CMO を創製することに成功した。

この CMO の抗ウイルス活性を、まずはバクテリオファ ージ Φ6 について調べたところ、LMO よりも高い抗ウイ ルス活性を示し、La を Ce に変えることによりエンベロー プをもつウイルスに対しても高い活性を示すことが明ら かとなった²⁾。

次に、奈良県立医科大学で野生株の新型コロナウイルス に対する CMO の抗ウイルス活性を評価し、結果を図 3 に 示した。CMO は、暗所で 4 時間作用させると、感染価が 検出限界となる高い抗ウイルス活性を示した。一方、Ce と 複合していない MoO₃ 単独では、CMO より遅い 6 時間で 検出限界となり、LMO の La の一部のみ Ce に置換してい る LCMO では、6 時間の作用でコントロールのガラス上 のウイルスに比較して 1 桁感染価が低下したのみの低い 抗ウイルス活性を示した。この結果より、LMO の La の一 部ではなく、すべて Ce に置換した CMO が、新型コロナ ウイルスに対して、一番高い抗ウイルス活性を発揮するこ とが明らかとなった。



図3: CMOの新型コロナウイルスに対する抗ウイルス活性

3. 考察及び今後の展望

以上、新型コロナウイルスに対して高い抗ウイルス活性 を示す2種類の材料について報告した。一つ目の可視光応 答型光触媒材料である CuxO/TiO2は、1価と2価の銅が酸 化チタン表面にナノクラスターで担持されていることで、 1価の銅が暗所でも抗ウイルス活性を発揮し、可視光が照 射されれば、さらに高い抗ウイルス活性を発揮するという 特徴を持つ。一方で、1価の銅は、空気中の水分などで自 然に酸化され2価になってしまうため、暗所での活性は持 続性がないとも考えられる。しかし、この CuxO/TiO2 は、 光触媒材料であるため、可視光が照射されれば、銅のナノ クラスターに電子が励起され、酸化した2価の銅は1価に 戻ることができるのである³⁾。このことも、CuxO/TiO2の 大きな特徴であり、非常に持続性のある抗ウイルス剤であ ると言える。また、この材料は、すでに安全性も調べられ ており、感染リスクを低減できる製品に応用されはじめて いる。

二つ目の希土類を含む酸化物の抗菌・抗ウイルス活性に ついては注目されはじめているため、CMOより高い抗ウ イルス活性を発揮する新しい材料が今後も合成されてく ると思われる。それらの材料の抗ウイルス活性と希土類を 含む複合化合物の電子配置との関係性を明らかにするこ とが、今後の新規な抗菌・抗ウイルス材料創製にとって、 重要と考えている。

本稿での新型コロナウイルスに対する抗ウイルス評価 は、奈良県立医科大学で行われたが、昨年度から弊所でも 新型コロナウイルスに対する抗ウイルス評価は、可能とな っている。抗ウイルス材料を開発されている方々にぜひ利 用して頂ければと思っている。

最後になりましたが、共同研究を一緒に進めて頂きまし た奈良県立医科大学 中野竜一准教授、東京工業大学 中 島 章教授、同じく東京工業大学 宮内雅浩教授をはじめ、 関係者各位に深謝申し上げます。

【参考文献】

- R. Nakano, A. Yamaguchi, K. Sunada, T. Nagai, A. Nakano, Y. Suzuki, H. Yano, H. Ishiguro, M. Miyauchi, *Scientific Reports* 12, 1-10 (2022).
- T. Ito, K. Sunada, T. Nagai, H. Ishiguro, A. Nakajima et al., Materials Letters. 290, 129510 (2021).
- M. Miyauchi, K. Sunada, K. Hashimoto, *Catalysts* 10(9), 1093 (2020).
- 4. T. Matsumoto, K. Sunada, T. Nagai, H. Ishiguro, A. Nakajima, et al., J. Hazard. Mater., 378, 120610 (2019).
- 5. C. Kato, K. Sunada, T. Nagai, H. Ishiguro, A. Nakajima, et al.,

JCS- Japan, 129, 607-615 (2021).

光触媒による防藻性能評価実証試験

1. はじめに

光触媒とは酸化チタンを始めとした物質に対して、太 陽光などの光があたる事により、酸化還元反応や超親水 性を発揮する物質である。この光触媒反応を利用するこ とで、防汚、防曇、空気浄化、抗菌や抗ウイルス性能等 の様々な機能を発揮することが可能となることから、光 触媒を用いた様々な製品開発が進められている。その一 つとして、外壁や住宅の汚れを抑えるために用いるコー ティング剤の開発が挙げられる。

外壁や住宅の汚れには土埃などに起因される物質的な 汚染だけでなく、藻類の付着や繁殖による生物的な汚染 が挙げられる。特に藻類の付着は日当たりの悪い面で多 く見られる汚れであり、このことが景観の悪化につなが っており、大変大きな問題となっている。

この問題を解消するために、光触媒反応を用いた防藻 性能を発揮する製品開発が進められており、その評価方 法として、2016年に ISO 19635⁽¹⁾が国際標準規格として制 定された。更に、光触媒工業会を中心に国内標準化が進 められ、2022年に JIS R 1712⁽²⁾が制定、試験機関におけ る運用が開始されている。

一方で、上記 ISO や JIS による性能評価方法に関し て、実際の環境下における性能との比較はなされておら ず、この両者の相関性を知ることは製品開発をおこなう 上で、非常に重要な課題である。

そこで、光触媒工業会と共に、2018年度より防藻性能 評価の実証試験について検討を開始し、実際に光触媒を 塗布した基材を外部環境に設置し、藻類の付着状況を検 討している。その中から、本年度の成果について、報告 する。

2. 実験と結果

本実験では、KISTEC 海老名本部及び溝の口支所に架 台を設置し、藻類の付着状況の確認と実験室内でおこな った防藻性能評価の結果との関連について、検討をおこ なった。

(1)外部環境における藻類付着についての実証試験 (1)-1 方法

300 mm×1000 mm のブランク及び光触媒塗布試験サン プルを斜面または垂直に設置し、外部環境にさらした状 態で保持し、藻類や汚れの付着状況を確認した。ブラン クについては、表面をエナメル処理したもの及びクリア 塗装後に親水化剤を塗装したものとした。光触媒塗布サ ンプルについては、エナメル処理を施した表面に、光触 「抗菌・抗ウイルス研究」グループ 石黒 斉

媒を塗装したものとした。光触媒塗装については、光触 媒反応による効果の違いを確認するため、メチレンブル ーの分解活性をあらかじめ確認したものを準備した。ま た、サンプル表面については、平滑な表面だけでなく、 リシン処理をすることでざらつきを持たせたサンプルを 作成した。

(1)-2 実証試験結果

図1に溝の口支所にて、2019年より曝露を開始した試 験サンプルの状態を示す。



図1:斜面に設置した試験サンプルの様子

図1の左より順に、平滑面エナメル処理、リシンエナメ ル処理、平滑面親水処理、リシン親水処理のブランクサ ンプルを設置しており、その隣から平滑面光触媒1、リ シン光触媒1、平滑面光触媒2、リシン光触媒2、平滑面 光触媒3、リシン光触媒3、平滑面光触媒4、リシン光触 媒4のサンプルを設置した。光触媒サンプルの1-4の違 いについては、1が最も光触媒活性が強く、数字が大き くなるほど、光触媒のメチレンブルー分解活性を低く設 定したサンプルとなっている。図1に示されるように、 最も汚れが目立っている試験サンプルはリシン処理をし た親水性の試験サンプル(左から4番目に設置)であっ た。また、すべての光触媒サンプルに付着した汚れ、藻 類の付着量はブランクサンプルと比較すると少ない状況 であった。

海老名本部に関しては、8月に新たに試験サンプルを 設置しており、その状況については 2022 年度に検証する 予定としている。

(2) ISO 19635 を用いた光触媒加工品の防薬性能試 験

(2)-1 方法

この検討では、外部環境における藻類付着の状況を確認しているサンプルと同等のブランク及び光触媒塗布サンプルを用いて、ISO 19635を参考とした防藻性能評価を行った。具体的な方法として、始めに Chlorella vulgaris (NIES-227)を蛍光灯下におき、液体培地内で1週間増殖させた。培養した液は遠心により、Chlorella vulgarisを回収してから、水で洗浄した後、濃縮して、約10⁶個/ml程度の Chlorella vulgarisを液体培地中に入れて、再度培養を行った。1週間経過後に、Chlorella vulgarisを遠心により回収した後、洗浄、濃縮を行い、10⁸個/ml程度の濃度にしたものを試験液とした。試験サンプルは50 mm のサイズとし、それぞれ1水準につき3枚を使用した。表1に水準表を示す。また、基材として、実証試験で用いているスレートだけでなく、ガラス板にスレートと同様の塗布をしたサンプルの評価もおこなった。

表1 試験水準表

		時間	0時間	6時間	
		光照射の有無	-	0.0 mW/cm ²	1.0 mW/cm ²
基材	ガラス	ブランク	0	0	0
		光触媒加工品(活性低)	-	0	0
		光触媒加工品(活性中)	-	0	0
		光触媒加工品(活性高)	-	0	0
	スレート	ブランク	0	0	0
		光触媒加工品(活性低)	-	0	0
		光触媒加工品(活性中)	-	0	0
		光触媒加工品(活性高)	-	0	0

光照射方法は湿らせたろ紙を入れたシャーレ内にガラ ス管を入れ、その上にサンプルを設置した後、試験液を 0.1 ml 接種し、密着フィルムをかぶせてからガラス板で 蓋をし、目的の紫外光強度(1.0 mW/cm²)となる箇所に設 置した。また、同時に紫外光を照射しない群も準備し、 設置した。紫外光の照射時間は6時間とした。

6時間経過後、サンプルを取り出し、密着フィルムを はがした後、5 ml の洗い出し液を用いて、ピペッティン グによるかけ流しで、回収した。回収した試験液の吸光 度(660 nm、692 nm 及び 750 nm)を測定し、以下の式によ って、防藻活性値を算出した。始めに式(1)を用いて、波 長 660 nm と波長 750 nm の吸光度の値(W660 及び W750)を 結んだラインをベースラインとしたときの 692 nm の吸光 度(Wbase692)を求めた。続いて、式(2)により、692 nm の吸 光度の値(W692)から Wbase692 を差し引くことで、各サンプ ルより回収した試験液の波長 692 nm の吸光度を補正した 値(Wpeak)を算出した。また、接種直後に試験液を回収し た試験液の波長 692 nm の吸光度を補正した値は、 Wpeak(0h)としている。

式(1) $W_{base692} = W_{660} + (W_{750} - W_{660})/(750 - 660) \times (692 - 660)$

式(2) $W_{peak}=W_{692}-W_{base692}$

すべてのサンプルの Wpeakを算出、その平均値を用い

て、式(3)によって光触媒の防藻活性値を算出した。

 $\overrightarrow{\text{rl}}(3)$ Rs=(1-W_{peak})/W_{peak(0h)})×100

(2)-2 防藻性能評価結果

評価をおこなった結果は、表2に示す通りメチレンブ ルー活性が高いほど、防藻活性値も高くなる傾向が認め られた。一方で、回収方法に関しては、*Chlorella vulgaris* を回収できていない可能性があったため、従来の ISO 19635 で用いられる歯ブラシによる回収方法を試みた が、特にスレートを基材としたサンプルでは防藻活性値 を計算できる吸光度を取得することが出来なかった。

衣2 谷り ノノルの防凍活 住他				
基材	ガラス	光触媒加工品(活性低)	37.3%	
		光触媒加工品(活性中)	90.6%	
		光触媒加工品(活性高)	89.5%	
	スレート	光触媒加工品(活性低)	9.3%	
		光触媒加工品(活性中)	92.5%	
		光触媒加工品(活性高)	96.6%	

表2 各サンプルの防藻活性値

3. 考察及び今後の展望

以上、実環境下に暴露した藻類の付着状況の確認と試 験室内でおこなった光触媒による防藻性能評価の検討を 行った。その考察及び今後の展望について述べる。

(1)外部環境における藻類付着の実証試験結果について

藻類の付着が起こると考えられた場所に試験サンプル を設置し、長期間外部環境に暴露した結果、光触媒サン プルとブランクサンプルの間に顕著な汚染の違いがみら れた。このことから、光触媒を塗布したサンプルには防 汚だけでなく、防藻性能を発揮することが可能と考えら れた。一方で、光触媒のメチレンブルー分解活性の違い と防藻効果の違いについては、大きな相関は認められな かった。この原因として、長期間に渡る風雨や日照状況 など外的な要因が大きいと考えられる。更に、サンプル の設置場所に関しても、設置時に水分が非常に多い場所 を選定していたが、周囲環境の状況が変わり、水分がほ とんどない状況となってしまったため、より負荷が高い 環境下に設置した場合に、光触媒のメチレンブルー活性 の違いが顕著に表れると考えている。

(2) ISO 19635 を用いた光触媒加工品の防薬性能試 験結果について

本検討結果から、光触媒による防藻性能とメチレンブ ルー分解活性には相関関係があると考えられる。一方、 今回の試験では ISO 19635 では規定されていないピペッ ティングによる回収をおこなった。その理由として、以 前の研究結果より、基材や光触媒の組み合わせによって は、正確な吸光度を測定することが困難であることを示 唆するデータが得られている。そのため、ピペッティン グによる回収方法をおこなったが、歯ブラシによる回収 方法とは異なり、基材に Chlorella vulgaris が残ってしま う現象を認めた。そのため、残った Chlorella vulgaris を 歯ブラシによって回収したところ、予想通りに吸光度の 測定が出来ないという結果となった。このことから、今 後新しい回収方法を作成することが重要と考える。

(3) 今後の展望

光触媒による防藻性能を応用することで、生活環境の 景観を悪化させない製品の開発に関しては、日本国内に 留まらず、広くアジア圏の各国においても非常に期待さ れているところである。また、光触媒は防藻剤などの薬 剤とは異なり、セルフクリーニング性能と複合的に働き 美観を損ねないこと、感染症のリスク低減として抗菌・ 抗ウイルス性能を発揮するなど非常に有用な技術であ る。そのため、今後更に光触媒を使用した製品開発が進 んでいくことを期待している。

光触媒の性能評価方法の観点からは、抗菌・抗ウイル ス性能評価では平板状に加えて、繊維状のサンプルを対 象とした評価方法となっているが、その他の形状や対象 外の性質を持つサンプルに対しては、標準的な評価方法 がない状況である。防藻性能試験に関しても同様に ISO 19635 では対応できないサンプルが多数あると考えられ る。そのため、そのようなサンプルに対する評価方法の 開発も今後は大きな課題と考えている。その点で、我々 は日常から様々なサンプルを扱い、サンプルの形状や性 質に合わせた抗菌・抗ウイルス性能評価をおこなってい る。この知見を応用した防藻性能評価方法の開発につな げていく予定である。

最後に、本検討をおこなう上で、光触媒工業会には多 大なるご協力を頂いており、ここに感謝いたします。

【参考文献】

- ISO 19635:2016 Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antialgal activity of semiconducting photocatalytic materials.
- 2. JIS R 1712:2022. ファインセラミックス—光触媒材料 の防藻性試験方法. 一般財団法人日本規格協会.

業

績

【原著論文】

 Kato C, Otsuka N, <u>Sunada K</u>, Isobe T, Matsudhita S, <u>Nagai</u> <u>T, Ishiguro H</u>, Nakajima A.

Decomposition of 2-naphthol in water and antiviral activity by CoO_x modified ($Ce_{0.8}$, $Bi_{0.2}$) $O_{2-\delta}$ and ($Ce_{0.8}$, $La_{0.2}$) $O_{2-\delta}$ in the dark or under visible light.

Journal of the Ceramic Society of Japan. 129: 607-615, 2021.

 Saruwatari A, <u>Sunada K</u>, Isobe T, Matsushita S, <u>Nagai T</u>, <u>Ishiguro H</u>, Nakajima A.

Transparent porous La₂Mo₂O₉ thin film preparation and antibacterial and antiviral activities.

Journal of the Ceramic Society of Japan. 129: 485-488, 2021.

【総説】

- 宮内 雅浩、<u>砂田 香矢乃</u>. 第2章6節 可視光応答形 光触媒とその抗菌・抗ウイルス機能、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. AndTech.2021 年1月13日発 刊.
- 砂田 香矢乃、永井 武、中島 章、石黒 斉. 感染リス クの低減をめざした金属酸化物の抗ウイルス活性につ いて. 無機マテリアル Vol.28, 146-151, 2021.
- 3. 砂田 香矢乃、宮内 雅浩. ウイルスフリーで安心・安 全な生活空間の創出 ~光触媒による抗ウイルス材料 の新展開~. 日本能率協会総合研究所 (JMAR)『2020 年度 MDB 技術予測レポート』
- <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. 雑誌『研究開発リー ダー』Vol.18, 18-21, 2021. 技術情報協会.

【書籍】

- <u>石黒 斉</u>. 第1節 光触媒素材の抗菌・抗ウイルス性能 評価. 抗菌・抗ウイルス性能の材料への付与、加工技 術と評価. 技術情報協会. 2021 年 3 月 31 日発刊. 527-532.
- 砂田 香矢乃、宮内 雅浩.第4章 第1節 光触媒材 料の抗菌・抗ウイルス活性とそのメカニズム.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.技術情報協会.2021年3月31日発刊.

- <u>石黒 斉</u>. 第11章 抗菌・抗ウイルス性能評価 4 光触媒素材の抗ウイルス試験法と性能評価. 抗菌・抗 ウイルス剤の最新動向. CMC 出版. 2121 年 5 月 10 日 発刊. 321-326.
- 4. <u>砂田 香矢乃</u>. 第6章 銅や銀を用いた抗菌・抗ウイル ス剤 3. 金属酸化物の抗菌・抗ウイルス活性とその 評価. 抗菌・抗ウイルス剤の最新動向. CMC 出版.
 2121 年 5 月 10 日発刊. 128-135.
- 5. 宮内 雅浩、<u>砂田 香矢乃</u>. 可視光型光触媒による抗 菌・抗ウイルス. 抗菌・抗ウイルス剤の最新動向.
 CMC 出版. 2121 年 5 月 10 日発刊. 157-163.
- 6. <u>砂田 香矢乃</u>、宮内 雅浩.第2編 第1章 第2節 紫 外光型・可視光型光触媒材料の抗菌・抗ウイルス効 果.書籍.抗ウイルス・抗菌製品開発 基礎、作用メカ ニズムから評価、認証、商品化まで.株式会社 NTS. 2021年3月31日発刊.
- 7. <u>石黒 斉</u>. 光触媒材料による抗ウイルス性能評価方法. 書籍. 抗ウイルス・抗菌製品開発 基礎、作用メカニズ ムから評価、認証、商品化まで. 株式会社 NTS. 2021 年 3 月 31 日発刊.

【口頭発表】

- 岩倉 俊太、望月 泰英、磯部 敏宏、松下 祥子、中島 章、<u>砂田 香矢乃、永井 武、石黒 斉</u>.
 固体表面の静的撥水性とモリブデン酸セリウムの漏出 イオンが抗ウイルス活性に及ぼす影響.
 日本セラミックス協会 2021 年会. 2022 年 3 月、オンラ イン.
- 猿渡 輝良、磯部 敏宏、松下 祥子、中島 章、<u>砂田</u>

 <u>香矢乃、永井 武、石黒 斉</u>.

 希土類モリブデン酸複合酸化物薄膜の作製とその抗ウ
 イルス活性.

 日本セラミックス協会 2021 年会. 2022 年 3 月、オンラ
 イン.
- 伊藤 拓朗、望月 泰英、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 (*y*-Ce₂Mo₃O₁₃)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. 2022 年 3 月.
- 4. 砂田 香矢乃、畑山 靖佳、永井 武、中島 章、石黒

<u>斉</u>. 実環境下での酸化モリブデン担持酸化チタンの抗 ウイルス効果について. 第26回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」. 2022年3月、オンライン.

- 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.
 Glyoxalase 1 and protein kinase Cλ as potential therapeutic targets for late-stage breast cancer.
 第 80 回日本癌学会学術総会. 2021 年 10 月、横浜.
- 石黒 斉. 抗菌剤の性能評価方法(公的試験規格の種類 と概要).
 日本防菌防黴学会第48回年次大会.2021年9月、オン ライン.
- 9. <u>砂田 香矢乃、畑山 靖佳、永井 武</u>、中島 章、石黒 <u>斉</u>. モリブデン酸化物と酸化チタンを組み合わせた材料の 抗ウイルス活性について. 日本防菌防黴学会第48回年次大会.2021年9月、オン ライン.
- 10.<u>石黒 斉</u>.

抗微生物材料とその性能評価.高分子学会講演会.2021 年7月、オンライン.

- 11.中野 竜一、鈴木 由希、中野 章代、矢野 寿一(会員 外共同研究者:宮内 雅浩、砂田 香矢乃、石黒 斉). 可視光応答形光触媒による新型コロナウイルス不活化 効果の検証.
 第 95 回日本感染症学会学術講演会.第 69 回日本化学 療法学会総会 合同学会.2021 年 5 月、横浜.
- 12.中島 章、砂田 香矢乃、石黒 斉、永井 武. 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. 2021 年 3 月、オンラ イン.
- 13.加藤 千尋、磯部 敏宏、松下 祥子、中島 章、<u>砂田</u> 香矢乃、石黒 斉、永井 武.

CoOx 担持 Ce0.8Bi0.2O2.8, Ce0.8La0.2O2.8 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. 2021 年 3 月オンライン.

14.伊東 拓朗、磯部 敏宏、松下 祥子、中島 章、砂田 香矢乃、石黒 斉、永井 武. 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. 2021 年 3 月、オンラ イン.

【特許】

(1)国内特許出願 3件(2)国際特許出願 1件

研究報告2022 目次 【研究開発部】

戦略的研究シーズ育成事業

研究テーマ:光操作に基づく医療技術の創出	
◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	171
研究テーマ:貴金属フリー新規触媒技術の開発	
◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	178
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	
◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	183
研究テーマ:光技術を用いた超広帯域テラヘルツオシロスコープの開発	
◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	189
研究テーマ:ゲノム構築技術による創薬研究基盤の開発	
◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	195
研究テーマ : 化学ボロフェンによるフレキシブル素子の開発	
◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	201

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、5、6、7)、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 8)。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 9)。がん以外にも、上述のゲノム編集の光操作技術を 着床の光操作に応用するなど、光操作技術の応用を進めて いる(参考文献10)。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2年 目となる 2021 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、2021 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(参考文献 8)において、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。その結果、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。

研究代表者らは、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を用いて、光照射依存的に遺伝子 の活性化を誘起できるかを調べた。その結果、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 伝子活性化を誘起してしまうことが明らかになった。この 暗所での活性化の程度は非常に高いため、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。 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。そこで研究代表者らは、この暗所リー ク活性について、さらに追求した。その結果、この近赤外 光スイッチタンパク質は、細胞内で発現させた際に、不完 全な形態のものが混ざっていることがわかった。一般に、 光スイッチタンパク質は光を受容する部分として補因子

と呼ばれる小分子を、そのタンパク質内部に持っている。 この近赤外光スイッチタンパク質の場合は、ビリベルジン と呼ばれる小分子が補因子にあたる。細胞内で近赤外光ス イッチタンパク質が発現すると、まずは補因子を含まない タンパク質(アポタンパク質という)として生成する。そ の後、ビリベルジンが取り込まれて、完成品のタンパク質 (ホロタンパク質という)ができあがる。研究代表者らは、 細胞内には近赤外光スイッチのアポタンパク質が少なか らず存在してしまっており、さらに悪いことに、このアポ タンパク質が高い結合活性を持っていることを明らかに した。すなわち、これを乗用車に例えると、アクセルやブ レーキといった制動装置を付け忘れた不良品であり、しか も常に全速力で暴走しているということである。この性質 は光操作の基盤技術としては致命的な欠点である。

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、暗所リーク活性を大幅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 transcription system by near-infrared light) と名付けた。

研究代表者らはまず NIR-CPTS が培養細胞で使用可能 かどうかを検討した。その結果、ヒト ASCL1 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。ガイ ド RNA としてヒト 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。このよう に、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ゲノム遺伝子の



図 3:本研究で開発した赤色光スイッチタンパク質"MagRed" (マグレッド)。MagRed は放射線抵抗性細菌が持つ赤色光受 容体 (DrBphP) とその結合タンパク質 (アフィボディ)から なる。DrBphP (Pr型、暗状態)は赤色光 (~660 nm)を吸収 すると構造変化して Pfr型 (明状態)となりアフィボディと 結合する。ここで 800 nm の光を照射することや、暗環境下 に放置することで、DrBphP が元の構造 (Pr型、暗状態)に 戻り、アフィボディは解離する。 活性化を起こせることがわかった。

次に研究代表者らは、NIR-CPTS を用いてマウスの生体 (*in vivo*) でゲノム遺伝子の活性化を制御できるかどうか 調べた。マウスの肝臓に Hydrodynamic tail vein injection 法 で NIR-CPTS を導入して、生体外から LED パネルを使っ て光照射を行った。その結果、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が明らかになった。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。

(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



図 4: MagRed を用いて開発した赤色光による遺伝子発現の 光操作技術"Red-CPTS"。ゲノム上の狙った遺伝子の発現を 操作するために、変異を加えて DNA 切断活性を失わせた Cas9 (dCas9)を用いる。dCas9を DNA に結合させるための 案内役となるガイド RNA として、MS2 RNA アプタマーを 挿入したものを用いる。MS2 タンパク質と転写活性化ドメイ ン (p65-HSF1)には MagRed を連結しておく。赤色光を照射 すると MagRed が結合し、dCas9 が結合している遺伝子領域 に転写活性化ドメインが呼び寄せられるため、当該遺伝子の 発現を狙って活性化できる。



図 5: MagRed を用いた Red-CPTS は暗環境下ではほとんど 遺伝子発現活性を持たず、赤色光の照射強度に応答して高い 遺伝子発現活性を示すことを生物発光レポーターを用いて示 した。

っている。さまざまなバクテリアが持つ赤色光受容体タン パク質のバクテリオフィトクロム (BphP) の中で、特に放 射線抵抗性細菌(Deinococcus radiodurans)が有する BphP (DrBphP) に着目した。DrBphP は哺乳類細胞に内在する 色素のビリベルジン(BV)を補因子として結合し、赤色 光(~660 nm)に応答して構造が大きく変化する性質を持 っている。この DrBphP の構造変化を認識して結合するタ ンパク質(以下、バインダー)を開発することで、赤色光 スイッチタンパク質を開発できると考えた(図1)。抗体 様分子であるアフィボディの変異体ライブラリを作製し、 リボソームディスプレイ法を用いて、赤色光を照射した条 件でのみ DrBphP と結合するアフィボディをバインダー候 補として単離した。この進化分子工学的アプローチで得ら れたバインダー候補に対してアミノ酸変異や末端のアミ ノ酸の削除といった改変を加えることで、赤色光照射時の 結合効率を改善したバインダーの開発に成功した。この DrBphP とアフィボディ (バインダー) からなる光スイッ チタンパク質は、本研究グループが先行研究で開発した青 色光スイッチタンパク質"Magnet" (マグネット) (図 2) の 赤色バージョンという意味を込めて"MagRed"(マグレッ ド)と名付けた(図3)。

次に、遺伝子発現の光操作技術(CPTS、参考文献 8) への MagRed の応用を検討した(図 4)。CPTS は本研究グル ープが先行研究で、青色光スイッチタンパク質と CRISPR-Cas9 システムを用いて報告した遺伝子発現の光操作技術 である。MagRed を用いた CPTS(Red-CPTS)は、暗環境 下で遺伝子発現の活性がほとんど検出されず、赤色光照射 で非常に効率良く遺伝子発現を誘導できることから、

MagRed が極めて高い光制御能を有することがわかった (図 5)。また Red-CPTS を用いることで、赤色光照射によ ってゲノムにコードされた複数の内在性遺伝子でも同時 に活性化することに成功した(赤色光照射によって内在性 遺伝子の発現を最大で 378 倍活性化)。

さらに、MagRed を用いた赤色光による DNA 組換え反応の光操作技術への応用も検討した。DNA 組換え反応を



図 6: MagRed を用いて開発した赤色光による DNA 組換え反応の光操作技術"RedPA-Cre"。Cre リコンビナーゼを2つに分割・不活性化して作製した split-Cre に MagRed を連結することで、赤色によって会合し、DNA 組換え活性が出現する酵素 (RedPA-Cre)を開発した。赤色光で活性化した RedPA-Creは、loxP と呼ばれる34 塩基の配列で挟まれた塩基配列(遺伝子など)をゲノムから削除することができる。この DNA 組換え反応を使って、赤色光で狙って遺伝子をノックアウトすることや、遺伝子を活性化することが可能になった。

触媒する Cre リコンビナーゼは、狙った遺伝子の塩基配列 をゲノムからノックアウト(削除)するための酵素として 世界中の研究室で広く利用されている。そこで Cre リコン ビナーゼを 2 つに分割して不活性化し、この分割体(split-Cre)に MagRed を連結することで、暗環境下では DNA 組 換え活性を持たず、赤色光照射によって高い活性が出現す る DNA 組換え酵素(RedPA-Cre)を開発した(図 6)。赤 色光で制御する 4 種類の従来技術と今回開発した RedPA-Cre を比較したところ、RedPA-Cre の方がはるかに効率良 く DNA 組換え反応を光操作できることがわかった(赤色 光と暗環境下での応答の比率を比べると、RedPA-Cre は既 存の技術よりも 27 倍から 46 倍効率良く DNA 組換え反応



図 7: RedPA-Cre を用いて、マウスの生体深部 (肝臓) で DNA 組換え反応を光操作。

(a) LED でマウスの生体外から非侵襲的に赤色光を照射している様子。

(b) 肝臓に RedPA-Cre と生物発光レポーター(活性化した RedPA-Cre と反応し、生物発光を生起するレポーター)を導 入したマウスは、生体外からの赤色光照射によって肝臓から の生物発光シグナルが観察された。この結果は、生体外から の光照射であってもマウスの生体深部において、RedPA-Cre が高い効率で DNA 組換え反応を誘導できることを示してい る。図中の「P」は P 値を示す。「N.S.」は有意差が無いこと を示す。



図 8: Red-CPTS を用いて、マウスの生体深部(肝臓)で遺伝 子の発現を光操作。

(a) 肝臓に Red-CPTS と生物発光レポーター(GAL4UAS: 活性化した Red-CPTS と反応し、生物発光を生起するレポー ター)を導入したマウスは暗環境下では生物発光シグナルを 示さないが、生体外から非侵襲的に赤色光を照射すると当該 マウスの肝臓から生物発光シグナルが観察された。

(b) (a) の実験で得られた画像データを数値データとして示 し、統計的処理を加えた。生物発光レポーター (GAL4UAS) の代わりに空のベクター (Empty)を用いたコントロール実 験の結果も示す。暗環境下での生物発光シグナルとコントロ ール実験の生物発光シグナルに有意差がないことから、Red-CPTS には暗環境下での活性がほとんどなく、マウスの生体 (in vivo) でも高い光制御能を有することが示された。

(c) Red-CPTS を用いてマウスの肝臓のゲノムにコードされ た内在性遺伝子(mASCL1を例に)の発現を生体外からの非 侵襲的な赤色光照射で光操作できることを示した。

を操作できた)。さらに、RedPA-Creと上述のRed-CPTSを それぞれマウスの肝臓に導入し、生体外から非侵襲的に赤 色光を照射することで、いずれも当該臓器において遺伝子 の働きを効率良く操作できることを明らかにした(図7、 図8)。

上述のように、赤色光による生命現象の光操作の基盤技術(プラットホーム・テクノロジー)として、赤色光に応答する光スイッチタンパク質"MagRed"を開発するとともに、MagRed を応用した遺伝子発現の光操作技術"Red-CPTS"と DNA 組換え反応の光操作技術"RedPA-Cre"の開発に成功した。本成果は、生体深部における生命現象の解明や、遺伝子疾患や細胞治療など生命科学・医学分野を含む幅広い研究分野において役立つことが期待される。

3. **今後の展望**

上述のように、2021 年度までの研究によって、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 質を開発することができた。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。研究代表者は、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医療技術 と光操作技術を組み合わせて、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).
- T. Takao, Y. Hiraoka, K. Kawabe, D. Yamada, L. Ming, K. Tanaka, M. Sato and T. Takarada, "Establishment of a tTAdependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 526, 213-217 (2020).
- K. Morikawa, K. Furuhashi, C. de Sena-Tomas, A. L. Garcia-Garcia, R. Bekdash, A. D. Klein, N. Gallerani, H. E. Yamamoto, S.-H. E. Park, G. S. Collins, F. Kawano, M. Sato, C.-S. Lin, K. L. Targoff, E. Au, M. Salling and M. Yazawa, "Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for in vivo mouse applications" *Nat. Commun.*, 11, 2141 (2020).
- K. Yoshimi, Y. Yamauchi, T. Tanaka, T. Shimada, M. Sato and T. Mashimo, "Photoactivatable Cre knock-in mice for spatiotemporal control of genetic engineering in vivo" *Lab. Invest.*, **101**, 125-135 (2021).
- 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).
- 9. 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).

10.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).

業績

【口頭発表】

- 中嶋隆浩,佐藤守俊「近赤外光作動型のゲノム遺伝子 活性化システムの開発」,日本分析化学会第70年会, 2021年9月23日
- 2. 中嶋隆浩, 佐藤守俊「近赤外によってゲノム上の遺伝 子を活性化する光操作ツール」, 第94回日本生化学大 会, 2021年11月4日
- 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」,北海道大 学ニコンイメージングセンター学術講演会,2021年11 月 29 日
- 4. 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」,北海道大
 学ニコンイメージングセンター学術講演会,2021年11
 月 29 日
- 5. 中嶋隆浩, 佐藤守俊「CRISPR-Cas9 技術を基盤とした近 赤外光作動型のゲノム遺伝子活性化ツール」,第44回 日本分子生物学会年会,2021年12月1日,2日
- 6. 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」,日本分子 生物学会,2021年12月3日
- 7. Moritoshi Sato, "Manipulating living systems by light", Pacifichem 2021, 2021年12月21日
- 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」,大阪大学・ ニコンイメージングセンターシリーズセミナー, 2022年2月16日
- 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」,日本再生 医療学会,2022年3月17日

【特許】

- (1) 国内特許出願 1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 とした研究を行った。

1. 研究目的

工業的な化成品の触媒的合成や、燃料電池などにおける 水素エネルギー活用技術など、触媒は様々な科学技術にお いて機能発現の鍵を担っている。これらの触媒技術におい て、多くの場合、貴金属化合物が必須の触媒として活用さ れている。しかし貴金属類は希少資源であるため高価であ り、地殻中での偏在性も高い元素である。さらに貴金属類 は、自動車の排ガス分解用触媒に代表されるように、化成 品合成やエネルギー活用以外の多用途でも広く用いられ るため、将来に渡って安定的な供給が可能な触媒材料であ るとは言い難い。そのため、貴金属に依存しない持続可能 な次世代の科学技術の開発に向けて、貴金属代替となる新 触媒の開発が強く望まれている。

一方、鉄に代表される普遍金属は、地殻中に豊富に存在 するため安価で容易に入手可能であり、かつ地球上に普遍 的に存在するため、貴金属代替として最も有望な元素であ ると位置づけられる。そのため近年、鉄などの普遍金属か ら構成される化合物の合成と、貴金属代替触媒としての活 用に関する研究が世界的に活発に行われている。しかし現 在まで、貴金属触媒を真に代替する機能を発現する普遍金 属触媒の開発は未踏である。その理由の一つとして、鉄な どの普遍金属から構成される化合物の多くは、貴金属化合 物と異なり、反応基質の捕捉と活性化に対し低活性である ことが挙げられる。

化成品合成や水素活用技術においては、貴金属は反応基 質における化学結合や、水素分子における水素--水素結合 を効果的に捕捉・活性化可能である。そのため、貴金属化 合物はこれらの用途において高機能性触媒として機能す る。一方、鉄に代表される普遍金属類は一般に、化学結合 の捕捉と活性化能が低いため、貴金属触媒と類似もしくは これらを凌駕する機能を有し、貴金属触媒を代替しうる普 逼金属触媒の開発は困難であるとされてきた。一方、研究 代表者は最近、独自に合成した鉄とケイ素の複合型構造を 持つ錯体分子が、貴金属化合物と同等もしくはそれ以上の 触媒性能を示すことを見出してきた。例えば、水素分子と 等電子構造を有することが知られている、ヒドロシラン (R₃Si-H)における"Si-H"結合の切断と、引き続く不飽和 有機基質への付加反応において、研究代表者らが開発した、 鉄-ケイ素複合型分子触媒は、非常に高い触媒活性を示す ことを見いだしている。これは、鉄-ケイ素複合型触媒に おける、"鉄-ケイ素結合"が、"Si-H"結合の捕捉と活性化 を可能にするためであることが、これまでの研究により示 唆されている。

これらの研究基盤を基に本年度は、水素分子の効率的な 活用を可能にする貴金属フリー触媒の開発を指向し、鉄-ケイ素複合型触媒の開発と、炭素--炭素二重結合への付加 反応による、触媒活性評価を行うことを目的とした研究を 行った。さらに、この知見を、水素の新しい貯蔵・運搬法 として注目を集めている有機ハイドライド法の開発へと 展開し、新しい水素キャリアおよび貴金属フリー触媒の合 成を行うことで効率的に水素貯蔵・発生が可能な手法の開 発へも展開した。

本プロジェクトを遂行するにあたって、令和3年度は、 以下の各項目を重点項目として行った。

(1) 鉄・ケイ素複合型触媒による水素活用

(2) 独自の水素キャリアと貴金属フリー触媒の活用による新しい有機ハイドライド法の開発

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、 立体的にかさ高く、電子供与性の高いケイ素部位を配位子 として導入した分子状錯体を開発した。この触媒は、鉄中 心に十分な基質捕捉部位を有するため、水素分子の活性化 や、引き続くアルケンへの水素付加に対し、高い活性を示 しうると着想した。

一方、(2)としては、新しい水素貯蔵・運搬法の開発を 指向し、独自の水素キャリアの開発を行った。さらに、貴 金属フリー触媒の合成も行うことで、貴金属フリーで水素 を貯蔵および発生することができる、新しい有機ハイドラ イド法の開発を行った。

2. 研究成果

以下に挙げるのは、令和3年度の具体的な研究成果である。

(1) 鉄・ケイ素複合型触媒による水素活用

本研究では、これまでの研究代表者の研究基盤を基に、 鉄・ケイ素複合型の分子触媒の開発と、水素分子の活性化 を経由したアルケンの触媒的水素化反応の開発に立脚し た研究を行う。まず、かさ高いケイ素配位子として -Si(SiMe3)3に注目し、この配位子を鉄上に2つ有する鉄・ ケイ素複合型錯体触媒1を図1に示す反応に従い、単離収 率89%で合成した。



図1:.鉄・ケイ素複合型錯体触媒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。例えば、 図1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、この錯 体1を触媒として活用し、ヒドロシランにおける"Si-H"結 合と等電子構造である"H-H"結合の活性化を経由した、ア ルケンの触媒的水素化反応の開発を行った。

まず、アルケンとして末端アルケンである syrene を用 いて、鉄触媒 1 による水素化を、トルエン中、80 度の条 件下で行った。その結果、1 気圧の水素圧雰囲気下、鉄触 媒 1 mol%の存在下においても反応は速やかに進行し、対 応する水素化体である ethylbenzene を選択的かつ定量的に 与えることを見いだした。さらにこの反応についてより詳 細に検討を行ったところ、反応は室温下でも高効率的に進 行し、ethylbenzene のみを選択的に高収率で与えることを 明らかにした。



図2:鉄触媒1によるアルケンの触媒的水素化の一般式

次に、同様に末端アルケンである 1-decene を用いた反応開発へと展開したところ、styrene を基質とした場合と同様に、80度の条件下において水素化は速やかに進行し、1時間後において、生成物である *n*-decane のみを選択的に与えた。またこの反応も室温下でも高効率的に進行し、反

応時間 20 時間後において、目的とする生成物のみを定量 的に与えることも併せて見いだした。

表1:鉄触媒1を用いた各種末端アルケンの水素化

entry	Substrate	Temp (°C)	time (h)	Yield (%)
1	Ph	80	1	>99
2	Ph	r.t	20	80
3	<i>₩7</i>	80	1	>99
4	×++7	r.t	20	>99
5	Si ^O Si	80	20	>99
6	$Me_3Si^{O}\left(+ \right)_4$	80	1	>99
7	Ph_O	80	20	0
8	O V V B	80	20	0
9		r.t.	20	0
10	O ₂ N	r.t.	20	0
11	CI CI	r.t.	20	0
12	Br	r.t.	20	0

これらの結果より、鉄・ケイ素複合型触媒1は、アルケ ンの触媒的水素化に対し、高活性を示すことが明らかとな った。そこで次に、他の末端アルケンを活用した検討を行 った。まず両末端にアルケン部位をもつシロキサンを用い た検討を行った(Table 1, entry 5)。その結果、1気圧の水 素雰囲気下において、反応温度 80度、反応時間 20時間で 反応は完結し、目的とする水素化体が定量的に得られるこ とを見いだした。この際、2つのアルケン部位はいずれも 水素化された生成物のみが得られる。さらに、シリルエー テル部位をもつ末端アルケンを基質として活用した検討 を行ったところ、この場合においても1気圧の水素雰囲気 下において反応は速やかに進行し、反応温度 80度、反応 時間1時間で反応は完結し、所望の水素化物のみが定量的 に得られることを確認した(entry 6)。一方、類似のエー テル構造をもつ末端アルケンを基質として用いた場合に
は、反応は全く進行しなかった (entry 7)。さらに、基質 として、pyridyl 基をもつものや、NO₂, Cl, Br 基を持つも のを用いて、同様の条件下で、触媒1による水素化反応を 検討したところ、いずれの場合においても水素化反応の進 行は見られなかった。これらの結果は、非共有電子対を基 質内に有するもの、換言すると鉄中心への配位性を示す基 質を用いた場合は、反応が進行しないことを示唆している。 一方、entry 5,6 で用いたシロキサンもしくはシリルエーテ ルにおいては、酸素官能基に隣接したかさだかいシリル基 を有するため、酸素部位からの鉄への配位が阻害されるた め、触媒反応が進行したものと考えられる。

これまでの結果より、今回用いた鉄触媒1は、配位性部 位を分子内に有しない末端アルケンの水素化に対し、良好 な触媒活性を示すことが明らかとなった。そこで次に、基 質適用範囲の拡大を指向し、多置換アルケンの水素化へと 展開した。まず、基質として 2 置換アルケンである trans-stilbene を用いた検討を行ったところ、5 mol%の触媒 1存在下、1気圧の水素雰囲気下において、80度2時間の 反応条件下で反応は完結し、目的とする水素化体である dibenzyl のみが定量的に得られた。同様に、基質として cis-stilebene を用いても、同様の条件下、1時間で反応は完 結し、生成物である dibenzyl のみを定量的に与える。さら に、2 置換アルケンとして cyclohexene を用いても、 trans-stilbene と同様の反応条件下で反応は完結し、 cyclohexane を生成物として定量的に与えた。これら一連 の結果より、鉄触媒1は2置換アルケンの水素化に対して も、高活性を示すことが見いだされた。

そこで次に、より困難であることが知られている3置換 アルケンへの本反応の適用を指向した検討を行った。一般 にアルケンの触媒的水素化は、アルケンの置換数が増える ほど困難になることが知られている。中でも、3置換もし くは4置換アルケンは、水素化が困難な基質であることが 知られており、従来法においては、RhやIrなどの貴金属 触媒を用いることで、これらの水素化は達成されてきた。 しかし、これら貴金属触媒を用いても、多くの場合反応効 率が低いことや、触媒活性種が反応途中で失活するなどの 課題が残されてる。例えば、末端アルケンの水素化に対し 高活性を示すため、アルケンの触媒的水素化に有効な均一 系触媒として代表的なものとして知られている wilkinson 触媒 Rh(PPh3)3Cl は、3 置換アルケンの触媒的水素化に対 しては低活性を示すのみである。さらに4置換アルケンの 触媒的水素化用触媒として最も汎用される Crabtree 触媒 $[(cod)Ir(PCy_3)(pyridine)]^+$ (cod = 1,5-cyclooctadine, Cy = cyclohexyl)は、4 置換アルケンである 2,3-dimethyl-2-butene の水素化に対して触媒活性を示すが、触媒反応中に活性種 の失活が併発するため、基質の転化率が40%程度で反応が とまってしまうことが知られている。これらの背景を勘案 すると、貴金属触媒を用いた場合においても、3、4置換の 多置換アルケンの水素化は課題が残されていると位置づ けることができる。一方、貴金属フリー触媒として、これ までに多置換アルカンの水素化に対して良好な触媒活性 を示す鉄触媒が開発されているが、特殊な補助配位子の活 用が必要であったり、Al ヒドリド還元剤などの発火性の ある還元剤の活用が必要であるなど、合成・操作性上の観 点から、課題が残されている。これらの現状を鑑み、本研 究では、容易に合成・取り扱い可能な鉄触媒1を用いて、 3,4 置換アルケンの触媒的水素化の反応開発へと展開し た。

表2:鉄触媒1を用いた各種多置換アルケンの水素化

entry	Substrate	Temp (°C)	time (h)	Yield (%)
1	Ph	5	2	>99
2	Ph LPh	5	1	>99
3	\bigcirc	5	2	>99
4	\bigcup	5	20	>99
5	Ph	5	2	>99
6	Ph	1	2	>99
7		5	20	>99
8		5	20	19
9	\searrow	5	20	50

まず、3置換アルケンとして、1-methylcyclohexene を用 いた検討を行った。その結果、5 mol%の鉄触媒1存在下、 1気圧の水素雰囲気、80度、20時間の反応条件下で反応 は定量的に進行し、目的とする 1-methylcyclohexane のみ を選択的に与えた。本反応は1気圧の水素化という非常に 温和な条件下で進行する点が特徴的である。さらに、他の 3置換アルケンとして、1-phenylcyclohexeneを用いた場合、 1-methylcyclohexene を用いた反応よりも短時間で反応は 完結し、目的とする水素化体のみを定量的に与えることを 見いだした。さらに、trans-□-methylstilbene を用いた場合 においては、1 mol%という少ない触媒量においても反応 は進行し、さらに反応時間2時間で反応は関係することを 明らかにした。これらの結果をふまえて、次に分子内に2 置換アルケン部位と3置換アルケン部位の両方を有する 基質を用いた水素化反応を検討したところ、両方アルケン 部位の効率的な水素化が進行し、5 mol%の触媒存在下、 80 度、20 時間の反応条件において、単一生成物を定量的 に与えた。この結果は、鉄触媒1が多置換アルケンの水素

化に対して高活性をしめすことを裏付けたものである。さらに、より多置換なアルケンとして4置換アルケンである 2,3-dimethyl-2-buteneを基質として用いた反応を行った。 その結果、1気圧の水素雰囲気下の条件においても、原料 の転化率19%で反応が進行し、さらに10気圧の水素雰囲 気下で反応を行ったところ、転化率50%で反応が進行する ことが確認された。以上の結果より、鉄触媒1は、多置換 アルケンも含めた多様なアルケンの触媒的水素化に対し、 高活性を示すことを明らかにした。



図3:系中で発生させた触媒による水素化反応

以上より、鉄触媒1は良好な水素化活性を示すことを確認した。一方、鉄触媒1は空気中の酸素および水に対して 不安定であるため、取り扱いが困難であるという課題を有 している。そこで、より取り扱いおよび操作性に優れた触 媒系の開発を指向した検討を行った。

図1でも示した通り、鉄触媒1は、FeBr2と2当量の KSi(SiMe3)3との反応から合成される。さらに、KSi(SiMe3)3 は、Si(SiMe3)4とKO'Buとの反応から調整される。これら の合成反応は、いずれもほぼ定量的に、かつ室温下・短時 間では進行することが、これまでの研究代表者らの検討で 明らかとなっている。そこで我々は、鉄触媒1の原料であ る、FeBr2, Si(SiMe3)4, KO'Buを混合することで、反応系中 で鉄触媒1を発生させ、これを触媒として活用することが 可能ではないか、と着想した。

そこで、アルケンとして styrene を用い、5 mol%の FeBr2、 10mol%の Si(SiMe3)4、10mol%の KO'Bu を混合させ、1 気 圧の水素雰囲気下で水素化反応を行ったところ、80度、 20 時間で反応は完結し、ethylbenene が定量的に得られる ことを見いだした。対照的に、FeBr2のみ、もしくは FeBr2 と KO'Bu の混合物、Si(SiMe3)4 と KO'Bu の混合物、を触 媒として用いた場合には、水素化反応はほとんど進行しな いことから、FeBr2、Si(SiMe3)4、KO'Buの3種を混合する ことが、反応の進行のためには必須であることが示唆され た。すなわち、これらを混合することで、反応系中で触媒 1 が発生することで、本反応が達成されたと考えられる。 この styrene の水素化と同様に、1-decene を基質として用 いた場合においても、FeBr2、Si(SiMe3)4、KO'Buの3種を 混合した触媒を用いて、1気圧の水素雰囲気下、80度、20 時間の反応条件において、反応は定量的に進行することを 確認している。FeBr2、Si(SiMe3)4、KO'Buは、いずれも市 販品として入手可能であり、また安定性も高く取り扱い易 いものである。すなわち本研究では、取り扱い容易な試薬 のみを用いて、アルケンの触媒的水素化反応を開発するこ とに成功し、実用性の高い触媒系を構築することを達成し

た。

(2) 独自の水素キャリアの開発に立脚した新しい有機ハイドライド法の開発

持続可能な未来社会の実現に向けて、石油・石炭等の化 石燃料以外のエネルギー源の、安価で高効率的な活用法の 開発は、現代科学における最重要課題の一つである。水素 は、低炭素社会の構築を実現するクリーンなエネルギーで あり、また多様な一次エネルギーから作り出せるため、資 源・環境問題の無い未来社会の実現を可能にするエネルギ ー源として最も有望であると考えられている。そのため現 在、水素社会の構築に向けた、効率的な水素の貯蔵・運搬 に関する技術の開発や、燃料電池に代表される水素のエネ ルギーとしての活用に関する技術の開発と高度化に関す る研究が、世界的に活発に行われている。水素エネルギー の一般社会への広範な普及には、安価で高効率的な水素運 搬技術が必要とされる。しかし現状では、現状の水素運搬 技術が高コストであることが指摘されている

そこで近年、メチルシクロヘキサン (MCH) やアンモ ニアなどを水素キャリアとして活用する手法が開発され、 注目を集めている。これらの手法は、多量の水素を効率的 に貯蔵・運搬が可能であり、特に大規模な水素貯蔵・運搬 において優位性がある。MCH を用いた化学的水素貯蔵・ 運搬法は、有機ハイドライド法と呼称され、様々な研究が 行われているが、多くは、水素発生過程などにおいて多く のエネルギーが必要とされるという課題を有する。そこで 本研究では、次世代エネルギーとして注目を集めている水 素の効率的な貯蔵・運搬法の開発を指向し、新しい有機ハ イドライド法の開発も併行して行ってきた。この際の達成 目標として、1) 貴金属フリー触媒により作動すること、 2) 省エネルギーな条件で高効率に作動すること、を挙げ 研究を行ってきた。

本研究では、2種の水素キャリア A, B の開発を行った。 これらはいずれも常温・常圧で液体であり、輸送性に優れ るのに加え、毒性がなく安全、安定性が高く長期保管が可 能であるという特徴を有する。水素キャリア A を用いた 場合、ある種の鉄触媒存在下において、温和な条件下で水 素発生・吸着が可能であることを見いだした。特に水素発 生においては、100 度程度で作動することから、従来法で ある MCH を用いた手法と比較しても、省エネルギー性に 優れる。

一方、キャリア B を用いた場合は、ニッケル触媒を用 いることで、水素発生・貯蔵が可能である。こちらは、150 度・10 気圧程度での水素吸蔵が可能であるという特徴を 有する。さらに、不揮発性であることから、高純度水素の 効率的な活用観点から、優位性のある技術であると位置づ けられる。これらの新たに開発した技術について、キャリ ア A を用いた水素貯蔵技術は特願 2022-23080 として、キ ャリア B を用いた水素貯蔵技術は特願 2021-203630 とし て、いずれも特許出願済みである。 業績

【原著論文】

1. Kobayashi, Y., Sunada Y, Iron Disilyl Complex as an Effective Catalyst for Hydrogenation of Unfunctionalized Multisubstituted Alkenes, ACS Sustain. Chem. Eng., 10, 1078-1082 (2022).

【口頭発表】

- 1. 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、第67回有機金 属化学討論会、発表日 2021 年 9 月 7 日
- 2. 石井玲音、砂田祐輔、ベースメタルを導入した有機ケ イ素化合物の合成、第67回有機金属化学討論会、発 表日 2021 年 9 月 7 日
- 3. 中川峰里、砂田祐輔、配位不飽和鉄(II)錯体における 配位子交换、錯体化学会第71回討論会、発表日2021 年9月16日
- 4. 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、第128回触媒討論 会、発表日 2021 年 9 月 17 日
- 5. 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、第9回 CSJ 化学フェスタ 2021、発表日 2021 年 10 月 19 日
- 6. 佐藤太一、砂田祐輔、 コバルトジシリル錯体の合成 と触媒機能開拓、第9回 CSJ 化学フェスタ 2021、発 表日 2021 年 10 月 19 日
- 7. 小林 由尚、砂田祐輔、鉄触媒を用いた第14 族水素化 物の脱水素カップリング、第9回 CSJ 化学フェスタ 2021、発表日 2021 年 10 月 20 日
- 8. 伊藤龍好、砂田祐輔、ポリシラン担持コバルト触媒の 開発とアルケンのヒドロシリル化への応用、第24回 ケイ素化学協会シンポジウム、発表日 2021 年 10 月 28 H
- 9. 小林 由尚、砂田祐輔、14 族元素配位子を持つ鉄錯体 を鍵とする水素化・脱水素化反応の開発、日本化学会 第102 春季年会、発表日 2022 年 3 月 24 日
- 10.佐藤太一、砂田祐輔、コバルトジシリル錯体の合成と 触媒的ヒドロシリル化への応用、日本化学会 第102 春季年会、発表日 2022 年 3 月 25 日

【特許】

(1)国内特許出願 2件 (2)国際特許出願 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3年度は、多層グラフェン光源チ ップによる新しい原理の赤外分析技術を開発し、グラフェン光源チップを用いたことで安価かつ小型な赤 外分析を可能とするだけでなく、従来のフーリエ変換赤外線分光装置(FT-IR)の空間分解能や理論限界の 「回折限界」を超える、極めて高い空間分解能の赤外イメージングを実現した。

1. 研究目的

カーボンナノチューブやグラフェンといったナノカー ボン材料を用いたナノカーボン光源は、シリコン基板上に 集積可能な、超小型で超高速な光源として期待されている。 これまでに我々は、カーボンナノチューブやグラフェンを 用いた超小型黒体放射発光素子の作製や、これらの発光メ 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 エ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3年度は、多層グラフェン光源チップによる新 しい原理の赤外分析技術を開発し、グラフェン光源チップ を用いたことで安価かつ小型な赤外分析を可能とするだ けでなく、従来のフーリエ変換赤外線分光装置(FTIR) の空間分解能や理論限界の「回折限界」(顕微鏡などにお いて、光の回折現象によって生じる空間分解能の理論限界。 光の波長に比例することから、波長の長い赤外光では、回 折限界によって空間分解能が下がる)を超える、極めて高 い空間分解能の赤外イメージングを実現した。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) グラフェン光源による赤外分析技術

鉛筆の芯などの原料であるグラファイトの一層はグラ フェンと呼ばれ、本研究では、これが多層に積層した多層 グラフェンを用いて赤外光源を作製している。ハロゲンラ ンプなどの赤外光源と違い、半導体リソグラフィー技術を 使って、シリコンや石英チップ上に高集積に作製すること が可能である。今回、新たな赤外分析技術として、サブミ クロンオーダーの超微小なグラフェン光源チップを開発 するとともに、この光源を利用した新しい原理の赤外分析 により、理論的な回折限界を超える高い空間分解能を有す る赤外分析システムの開発に成功した(図 1-3)。



図1:開発したグラフェン光源チップ。本図は、American Chemical Soceitry からの承諾を得て転載した。



図 2: グラフェン光源チップを用いた赤外分析技術の概念図。本 図は、American Chemical Soceitry からの承諾を得て転載した。





図 3:開発した赤外分析装置。本図は、American Chemical Soceitry からの承諾を得て転載した。

(2) グラフェン光源を用いた赤外吸収スペクトル測 定

グラフェン光源チップは、小型・高速・安価なチップ上 の全く新しい赤外光源として、2018 年の Nature

Communications 誌に掲載されるなど、本研究グループが独 自に開発を続けている新しい赤外光源である。本研究では、 最小で 500 nm 角の超小型なグラフェン光源チップを新た に開発した。さらに、この光源に対して測定サンプルを近 接させることにより、微小なグラフェン光源チップからの 赤外光を利用した新しい赤外分析システムを実現した。多 層グラフェン光源は、従来の FTIR でも用いられている赤 外熱光源と比べて数千倍も高速に直接変調が可能(1秒間 に10万回点滅が可能)なことから、本分析システムでは、 グラフェン光源を変調させて赤外分析を行うことにより、 高感度分析を実現した。これにより、グラフェン光源は、 従来の赤外光源と比べて100万分の1程度の超微小な光源 であるにもかかわらず、現行の FT-IR と同様の赤外分析が 可能であることを示した(図4)。



図4:市販のFTIR とグラフェン光源を用いたポリスチレンの赤 外吸収スペクトル測定。本図は、American Chemical Soceitry か らの承諾を得て転載した。

(3) グラフェン光源を用いた二次元赤外イメージン グ

サンプルをスキャンすることで赤外イメージング測定 を行ったところ、従来のFT-IRの空間分解能をはるかに超 える高空間分解能(1 µm)の赤外イメージングも実証した。 また、この高空間分解能は、グラフェン光源自体に生じる 近接場(物体表面において波長に比べて十分近い距離に発 生する非伝搬光。物質表面に局在するとともに、そのサイ ズが物体の寸法程度であることから、プローブ先端へのレ ーザー照射などによって発生させて、光の回折限界を超え た顕微鏡技術に応用されている)によって、理論的な限界 である回折限界を超える空間分解能が実現されているこ とも明らかとなった(図5)。本技術では、グラフェンを 用いることで、光源に直接発生する近接場を用いており、 新しい原理の分析・イメージング技術となる。



図 5:市販の FTIR とグラフェン光源を用いた 2 μm 幅の「5」の 形状の Ni パターンの二次元赤外イメージング。本図は、American Chemical Soceitry からの承諾を得て転載した。

(4) グラフェン光源を用いた二次元化学イメージン グ

特定の化学構造(官能基)に特有の波長でイメージング を行ったところ、物質の化学構造の空間分布を示す化学イ メージング観測にも成功した(図 6)。

3. まとめと今後の展望

本技術は、高空間分解能分析技術である走査型近接場光 学顕微(SNOM)とは異なり、高価で大型な波長可変レー ザーなどの外部光源やプローブを一切用いることなく、光 源自体に生じる近接場を直接用いることで高空間分解能 を実現しており、新しい原理に基づいた赤外分析技術にな る。本技術を用いることにより、可視光並みのイメージン グや微小・微量分析を、赤外領域でも安価で簡便に利用で きるようになることから、これまで赤外光が利用できなか った新しい分野で赤外分析が適用できるようになり、全く 新しい赤外分析技術を創出することが可能となる。



図 6: グラフェン光源を用いた 50 µm 幅の「6」の形状のフォト レジストパターンの二次元化学イメージング。本図は、American Chemical Soceitry からの承諾を得て転載した。

業

【原著論文】

- 1. K. Shimomura, K. Imai, K. Nakagawa, A. Kawai, K. Hashimoto, T. Ideguchi & H. Maki, "Graphene photodetectors with asymmetric device structures on silicon chips", Carbon Trends, 5, 100100 (2021).
- 2. Shoma Nakamura, Kota Sekiya, Shinichiro Matano, Yui Shimura, Yuuki Nakade, Kenta Nakagawa, Yasuaki Monnai, Hideyuki Maki, "High-Speed and On-Chip Optical Switch Based on a Graphene Microheater", ACS Nano, 16, 2690-2698 (2022).
- 3. Shinichiro Matano, Hidenori Takahashi, Natsumi Komatsu, Yui Shimura, Kenta Nakagawa, Junichiro Kono, Hideyuki Maki, "Electrical Generation of Polarized Broadband Radiation from an On-Chip Aligned Carbon Nanotube Film", ACS Materials Letters 626-633 (2022).
- 4. 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, 58-69, 2021年6月.
- 5. 牧英之,中川鉄馬,"チップ上光電子デバイスに向けた ナノカーボン材料", Nanofiber, 第12巻1・2合冊号, 31-36, 2021年7月.
- 6. 牧英之,志村惟,中川鉄馬,"ナノカーボン材料を用い たシリコンチップ上光電子デバイス",光学,第50巻 第9号, 379-385, 2021年9月.
- 7. 牧英之,志村惟,中川鉄馬,"シリコンチップ上ナノカ ーボン光デバイス",応用物理,第91巻第2号,86-90, 2022年2月.
- 8. 大矢秀真,牧英之,中川鉄馬,"カーボンナノチューブ 室温・通信波長単一光子源とチップ上光素子への展望", 光アライアンス 第33巻第3号, 25-28, 2022年3月

【口頭発表】

- 1. K. Nakagawa, H. Takahashi, Y. Shimura & H. Maki, "A light emitter based on polycrystalline graphene patterned directly on silicon substrates from a solid-state carbon source", International Conference on the Science and Application of Nanotubes and Low-Dimensional Materials (NT21), On-line, 2021年6月8-10日.
- 2. Shuma Oya, Rintaro Kawabe, Hiroshi Takaki, Takayuki Ibi,

績

Yutaka Maeda, Kenta Nakagawa & Hideyuki Maki, "Pure and Efficient Single-Photon Sources by Shortening and Functionalizing Air-Suspended Carbon Nanotubes", 第 61 回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポ ジウム, On-line, 2021年9月1日.

- 3. Ryohei Imafuku, Naoto Higuchi, Hiroto Niiyama, Kenta Nakagawa & Hideyuki Maki, "Efficient and Narrow-Linewidth Photoluminescence Devices Based on Single-Walled Carbon Nanotubes and Silicon Photonics", 第61回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合 シンポジウム, On-line, 2021 年 9 月 1 日.
- 4. K. Nakagawa, H. Takahashi, Y. Shimura & H. Maki, "A light emitter based on polycrystalline graphene patterned directly on silicon substrates from a solid-state carbon source", RPGR2021 (The 12th Recent Progress in Graphene and Two-dimensional Materials Research Conference), On-line, 2021 年 10 月 12 日.
- 5. S. Matano, H. Takahashi, N. Komatsu, Y. Shimura, K. Nakagawa, J. Kono, and H. Maki, "Electrically Driven Broadband Emitter with A Macroscopically Aligned Carbon Nanotube Film on Silicon Chips", MNC (Micro Nano Conference) 2021, On-line, 2021 年 10 月 26-29 日.
- 6. 中川鉄馬,高橋英統,志村惟,牧英之,"シリコン基板 上の多結晶グラフェン直接パターニング成長と発光素 子化", 第48回炭素材料学会年会, On-line, 2021年12 月 1-3 日.
- 7. 侯野眞一朗, 高橋英統, 小松夏実, 志村惟, 中川鉄馬, 河野淳一郎,牧英之,"カーボンナノチューブ配向膜を 用いた黒体放射光源の開発",第48回炭素材料学会年 会, On-line, 2021年12月1-3日.
- 8. 大矢秀真,河部倫太郎,高木宏,井樋孝行,前田優, 中川鉄馬,牧英之,"カーボンナノチューブを用いた高 純度高効率単一光子源の開発",第48回炭素材料学会 年会, On-line, 2021年12月1-3日.
- 9. 今福諒平, 樋口直人, 新山央人, 中川鉄馬, 牧英之, "シ リコンフォトニクスを用いた高効率・狭線幅カーボン ナノチューブ発光素子の開発",第48回炭素材料学会 年会, On-line, 2021年12月1-3日.
- 10.S. Matano, H. Takahashi, N. Komatsu, Y. Shimura, K.

Nakagawa, J. Kono, and H. Maki, "Electrically Driven On-Chip Broadband Emitter with A Macroscopically Aligned Carbon Nanotube Film", MRM 2021 (Materials Research Meeting 2021), Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, 2021 年 12 月 13-17 日.

光技術を用いた超広帯域テラヘルツオシロスコープの開発

研究代表者:横浜国立大学 片山 郁文

【基本構想】

テラヘルツ領域はエレクトロニクスとフォトニクスのそれぞれ得意とする周波数領域のちょうど中間に 位置しており、大容量高速通信を担う周波数として注目を集めている。しかしながらこの領域の電磁波は 非常に速い速度で変化するために、その電場波形を計測することはこれまでは難しかった。電場波形計測 は、材料の誘電率計測などの物性評価に有用なだけではなく、様々なテラヘルツデバイスの位相雑音評価 や、テラヘルツ領域のダイナミクスの評価、高速なイメージング等に必要である。そこで本プロジェクト では、このようなテラヘルツ領域の電磁波の波形を、超短パルスレーザーを用いた光技術を活用すること によってリアルタイムに計測する技術を確立し、それをファイバー技術と融合することによって、堅牢で 高精度・広帯域・高感度なテラヘルツ波形検出技術を開発することを目指している。本稿では、令和3年 度の成果として、高精度・広帯域なテラヘルツ波形検出の実証に成功したので報告する。

1. 研究目的

テラヘルツ領域とは、周波数 10¹² Hz 程度の電磁波の総称であり、近年科学技術振興機構の戦略プロポーザル[1] や、総務省の戦略文書[2]などで取り上げられる等、注目 を集めている。例えば、光通信分野では、次世代大容量 通信に用いる周波数として、100 GHz (0.1 THz)や、300 GHz (0.3 THz)などの利用が検討されており、様々なデバ イス技術の開発や、材料特性の評価、応用などが研究さ れている。また、テラヘルツ領域の電磁波は多くの材質 を透過することから、新たなイメージング周波数領域と しても期待されている[3,4]。

一方で、デバイス開発や分光応用には、電場波形の計 測できるオシロスコープのようなシステムが極めて有効 であるが、テラヘルツ領域は極めて高周波数であるた め、汎用のオシロスコープが存在しないのが現状であ

め、汎用のオシロスコーフか存在 る。一方で超短パルスレーザー を用いた分光技術はテラヘルツ 領域の電磁波計測を容易にし、 現在では、テラヘルツ分光測定 技術として、計測器が市販され る状況になっている[4]。しかし ながら、通常のテラヘルツ時間 領域分光技術では、電場波形の 計測に繰り返し測定が必要とな るため、不可逆な現象や、突発 的な現象をリアルタイムに計測 することはできなかった。

本プロジェクトの目的は、こ のような超短パルスレーザーを 用いた時間領域テラヘルツ分光 法を高度化し、レーザーパルス 1パルスで、テラヘルツ電場波 形を計測できるシステムを開発 することである。そのために、著者らを含めて様々な研 究グループが開発してきたシングルショット分光法を改 良することによって、高精度・広帯域なテラヘルツ電場 波形計測を実現することを目的とした。さらに、開発し た光学系をファイバー化することによって、堅牢なリア ルタイムテラヘルツ時間領域分光計を開発し、様々な応 用が可能なテラヘルツ領域のリアルタイムオシロスコー プを実現することを目指す。本稿ではこれらの取組のう ち、令和3年度に実証実験に成功した高帯域・高精度な シングルショットテラヘルツ検出技術について報告す る。

2. リアルタイム波形検出技術

レーザーパルス1パルスでテラヘルツ領域の時間領域 信号を計測する技術は、図1に示したように、主に三つ



図1:シングルショット波形検出技術:(a) 斜め交差型。(b) 階段状光学素子を利用する技術。 (c) チャープパルスを利用する技術。



図 2:歪み補正チャープパルスシングルショット波形検出技術:チャープパルスに変調波形を書き込んだ後、位相補償を行ったうえで チャープパルスとの和周波発生によってスペクトルを読み出すことで、元の変調波形に対応した波形を得ることができる。

の種類が存在する。一つは、図 1(a)のようにテラへルツ 領域の電磁波に対して、斜め、もしくは垂直にプローブ 光を交差させ、テラヘルツの電場によって電気光学結晶 内に生じる屈折率の変化を空間的に検出するものである [5]。この場合、テラヘルツ波とプローブ光との時間差は 場所ごとに異なることになるので、生じた屈折率変化を カメラに結像させれば、結晶上の位置が時間情報を与え ることになる。この手法は、結晶の大きさが時間窓の長 さに対応することになるため、あまり長い時間の情報を 得ることができない点と、テラヘルツ波を広げたまま電 磁波の波形を計測するため、電場強度をかせぐことが難 しい点が問題であった。

次に図1(b)のような、階段状の光学素子を用いる手法 が提案された[6,7]。この手法では、階段状のプリズム、 もしくはミラーを透過したプローブ光を電気光学結晶に 集光し、生じた屈折率変化を検出する。この手法では、 プローブ光を比較的小さく集光することができるため、 計測したいテラヘルツ波を集光することが可能であり、 比較的大きな信号を計測することが可能である。しかし この場合も階段状光学素子の画像をカメラに結像させ、 フーリエ面に電気光学結晶を置く必要があることから、 光学系の精密な調整が必要な点が課題であった。

一方で本研究では、図1(c)にあるような、チャープパ ルスを用いる手法を研究している[8]。この手法では、波 長ごとに到達時間の異なるチャープパルスと呼ばれるパ ルスを用いて、時間情報を波長にマッピングする。これ によって、プローブ光のスペクトルを観測すれば、時間 情報をシングルショットで計測することができるように なる。この手法の特徴は、波長という光の内部自由度で 時間情報を検出することから、回折限界まで集光可能で あること、時間窓幅を、チャープ量を変えることで可変 にできること、また、ファイバー技術などと融合するこ とにより、高速なスペクトル読み出しが可能であること などがある。一方で本手法の重大な問題点としては、ス ペクトルに書き込んだ時間波形が実際の波形から大きく ゆがんでしまう点があった[9]。

そこで本研究では、チャープパルス検出法においても 波形ゆがみなくテラヘルツ波形を書き込める手法を開発 し、さらに、ファイバベースの技術の組み合わせを進め ることによって、リアルタイムのテラヘルツ波形検出技 術を実証することを目指した。

3. テラヘルツ波形検出の原理

チャープパルス検出法における波形歪みを解消するた めに、今回提案するチャープパルス検出法の原理を図2 にまとめた。通常のチャープパルス検出法では、チャー プパルスに直接波形を書き込むため、書き込み過程で生 じたチャープパルスと信号の和周波成分、差周波成分が 元のチャープパルスと同じ周波数領域に発生する。この ため、信号と元のチャープパルスとの干渉が発生し、こ れによってスペクトルに干渉パターンがのるのが問題で あった。これを解消するために、我々は波形の書き込み 過程と読み出し過程を分離し、信号の書き込み直後に位 相補正を行い、その後、プローブ光と同様のチャープパ ルスとの和周波発生スペクトルを検出することで波形歪 みのない変調波形を得ることができる技術[10]をテラへ ルツ測定に適用することを提案した。このように二段階 の変調過程を利用することによって、もともと周波数領 域に広がっていた変調成分が、時間領域に広がる形にマ ッピングされており、実際に観測される波形も歪みのな いものとなる。

図3に今回構築した実験系の概略図を示す。光源としては、パルス幅150fs、繰り返し周波数1kHz、出力1.9W、波長800nmのTi: sapphire 再生増幅レーザーを用いた。用いたレーザーの出力は、ポンプ光とプローブ光に分けられ、ポンプ光はテラヘルツ波発生用の有機非線形結晶BNAに照射し、テラヘルツを発生させた。プローブ光は、回折格子対を用いたパルス幅伸長器を通し、正



図3: 歪み補正チャープパルスシングルショット波形検出実験系:分散補償には、回折格子対を用いた位相制御技術を用いた。

の分散を付与し、試料位置で光やテラヘルツ波による変 調を可能とした。書き込み(変調)後に波形歪みが生じ ないように負分散を持つ回折格子対で位相を制御したう えで、読み出し用のチャープパルスとの和周波発生を行 い、得られたスペクトルから波形を検出した。和周波発 生には、BBOを用いた。スペクトルは 50 cm の分光器で 波長を分散させ高速リニアセンサで検出した。

また、今回の測定では、検出感度を高めるために、EO 結晶の前後に偏光子を設置し、クロスニコル配置とし、 その間に挟んだλ/4を微小に回転させることで、検出感 度を最大限向上させる試みも行った。このような手法は 位相オフセット法と呼ばれているが、これによって、テ ラヘルツ波形検出系を高感度化することができる。

図4に典型的に得られた、テラヘルツ電場波形計測結 果を示す。参考までに従来の波形補正をしない手法で計 測したテラヘルツ波形と、シングルショットではなく通 常のステージ掃引を用いる手法で測定したテラヘルツ波 形の測定結果についても示した。図4を見ると明らかな ように、従来の手法では大きな波形歪みが観測されてお り、通常のステージスキャン法と全く異なる波形が得ら れてしまっている。一方で、我々の提案した書き込み過 程と読み出し過程を分離し、位相補正を行う手法におい ては、観測されるテラヘルツ波形は、ステージ掃引を用 いる方法とほぼ同等であることがわかる。このように、 本提案技術は、テラヘルツ領域の電磁波の可視化に極め て有望な技術であると言える。

4. 窓幅可変性・検出帯域

3章で述べたように、位相オフセット法を用いること によって、高感度なテラヘルツ波形検出が可能となっ



図4:位相補正シングルショット波形検出技術実証結果:(a) 位相補正を行ったテラヘルツは検出波形。四半波長板(QWP)の角度を± 3°に設定した際の波形を示した。(b) 位相補正を行わない、従来のテラヘルツ検出波形。(c) 正負の波形の差分を取った波形。(d) 通 常のステージ掃引法で得られた波形との比較。(e) 検出された波形のフーリエスペクトル。



図 5: LiNbO3単結晶における光誘起偏光回転の測定結果:(a) 窓幅 8 ps の場合の時間波形。位相補 正を行った場合と行わなかった場合の波形を示した。(b) 窓幅 20 ps の場合の測定結果。位相補正す ることで、窓幅に関わらず歪みのない波形が得られている。斜め交差型。(c) 結晶軸に対して偏光配 置を変えて測定した結果。偏光によって波形が異なることがわかる。(d)(c)で得られた結果のフーリ エスペクトル。

するポンプ光・プローブ光 の偏光配置によって、3 THzから4THz程度のポラ リトン振動が観測されるこ とが分かっている。

図 5(c), (d)は、観測され た、ポラリトン振動の振動 波形とスペクトルを示して いる。まず振動波形を見る とわかるように、ポンプパ ルスが入射すると、偏光の 変化が誘起され、その時間 波形には振動する成分が観 測されることがわかった。 この時間波形から、時間原 点近傍の成分を差し引きフ ーリエ変換したところ、偏 光配置によって観測された 信号は3THz、4THzのフ オノンポラリトンであるこ とが分かった。このこと は、今回構築した波形補正 の技術が少なくとも数 THz の周波数領域にまで適用可 能であることを示唆してい る。したがって、本提案技 術は、高感度かつ広帯域に

た。一方で、シングルショットのテラヘルツ分光技術が 実応用を見出すためには、その特徴である、窓幅可変性 やファイバー技術との融合についても調べていく必要が ある。そのためにまず、書き込み・読み出し用のチャー プパルスと位相補正用の回折格子対、などの分散を変え ながら、変調信号の現れ方を調べた。

図 5(a), (b)にその結果を示す。ここでは、光励起によっ て生じる偏光回転を測定する実験配置を取った。この実 験では、チャープパルスのチャープ量、すなわち窓幅を 変更した場合、位相補正においてもチャープ量を変化さ せる必要があるため、これらの調整に時間がかかり、二 つの実験で完全に同じ実験条件とすることが難しい。こ のため、これらの観測される波形には微妙に違いが見ら れるが、おおむね同様の信号が異なる窓幅でも観測でき ていることがわかる。これはチャープパルスを用いた検 出法が広い窓幅範囲を連続的に調べることのできる手法 であることを示している。

次に、今回提案しているシングルショット検出手法の 広帯域性の実証を目指した。現状のテラヘルツ検出で は、検出帯域が電気光学結晶として用いている ZnTeで 制限されてしまうため、図 5(a),(b)と同様に、光パルスを 照射した際に生じる偏光回転を検出する実験系を用い、 その時間波形を計測することを試みた。試料としては高 周波数にポラリトン分枝を持つことが知られている LiNiO3単結晶を用いた[11]。この結晶においては、入射 テラヘルツ領域の波形検出を実現できることがわかる。

5. リアルタイム波形検出の応用

最後に、今回開発した技術ではないが、一世代前のシ ングルショットテラヘルツ検出技術(図1(b))を用いた リアルタイム波形検出の応用について紹介する。実験で は、反射型エシェロンと呼ばれる階段状の光学素子を用 いた図6(a)のような光学系を用いた。この実験では、レ ーザー加工の初期過程において重要な寄与をもたらすと 考えられる電荷分離過程から生じるテラヘルツ波の検出 を試みた。レーザー加工では、光パルスの照射と共に、 表面の形状が変化していくため、レーザー1パルスごと の波形を検出することが極めて重要となる。一方で、レ ーザー加工初期過程からのテラヘルツ波は電場強度が小 さいため、感度を向上させるために、前節でも用いた位 相オフセット法を採用した。

フェムト秒レーザー加工は、フェムト秒レーザーの応 用として最も重要なものの一つであり、非接触に高い精 度で加工することが可能であり、加工対象を選ばず、高 精度な加工が実現できることから、筐体などの加工か ら、インフラの塗装や錆の除去、表面改質による機能性 の付与や性能改善など、様々な応用が盛んに研究され、 有効性が実証されている。これらの応用には高精度かつ 高効率な加工が重要であるが、現状のレーザー加工で は、加工深さの制御や、加工効率(スループット)の向



図 6: LiNbO3単結晶における光誘起偏光回転の測定結果:(a) 窓幅 8 ps の場合の時間波形。位相補正を行った場合と行わなかった場 合の波形を示した。(b) 窓幅 20 ps の場合の測定結果。位相補正することで、窓幅に関わらず歪みのない波形が得られている。斜め交 差型。(c) 結晶軸に対して偏光配置を変えて測定した結果。偏光によって波形が異なることがわかる。(d)(c)で得られた結果のフーリ エスペクトル。[12] Copyright 2022, Optica Publishing Group. All right reserved.

上が課題であった。これらを実現するためには、加工プ ロセスをモニタリングし、かつメカニズムを理解した上 で、パルスごとに加工を制御する必要がある。そこで 我々は、テラヘルツ波の検出がフェムト秒レーザー加工 の初期過程の理解に重要であるとの観点から、レーザー 加工時のテラヘルツ波をパルスごとに検出することを試 みた[12]。

フェムト秒レーザー加工時に発生するテラヘルツ波に ついては、すでに報告があるが[13]、パルスごとの計測 はこれまでに実現されていない。図 6(b)は実際に今回の 測定系で計測したテラヘルツパルスの電場波形である。 これはレーザー1パルスで測定したものであるが、高い 信号雑音比で波形検出が行えていることがわかる。(c)は この信号をフーリエ変換したものであるが、数 THz まで の帯域の信号が得られている。さらに、このテラヘルツ 波形の励起密度依存性やパルス数依存性を測定すること で、放射テラヘルツ波の電場波形が徐々に変化してお り、その形状がレーザー加工量との相関を持つことも分 かった。これらのことは、リアルタイムのテラヘルツ計 測がレーザー加工のモニタリングに有効であることを示 す結果である[12]。

6. まとめ

以上のように、位相補正も加えた新たなシングルショ ットテラヘルツ時間領域分技術の開発に成功し、高い精 度でテラヘルツ波形を得ることができることを示した。 また、リアルタイムテラヘルツ波形計測が、レーザー加 工の初期過程のモニタリングに応用可能であることが分 かった。今後は、本技術の高度化を進めるとともに、シ ングルショット技術の応用展開をさらに進め、テラヘル ツオシロスコープ技術の確立を目指したい。

【参考文献】

- 1. JST CRDS、戦略プロポーザル「次世代通信技術の高 度化に向けた無線・光融合基盤技術」、2022 年 3 月。
- 総務省、「Beyond 5G 推進戦略 -6G へのロードマップ -」、2020 年 6 月。
- 3. E. Castro-Camus et al., Appl. Phys. B 128, 12 (2022).
- 4. 斗内政吉編、「テラヘルツ波産業創成の課題と展望」、 シーエムシー出版、2022。
- 5. M. Bonn et al., Opt. Lett. 25, 426 (2000).
- 6. G. P. Wakeham et al., Opt. Lett. 25 505 (2000).
- 7. Y. Minami et al., Appl. Phys. Lett. 103, 051103 (2007).
- 8. Z. Jiang et al., Opt. Lett. 23, 1114 (1998).
- 9. I. A. Shkrob, et al., J. Appl. Phys. 96, 25 (2004).
- 10.P. Suret et al., Nat. Commun. 7, 13136 (2016).
- 11.T. Kuribayashi et al., J. Appl. Phys. 123, 174103 (2018).
- 12.R. Tamaki et al., Opt. Exp. 30, 23622 (2022).
- 13.S. Tani et al., Proc. SPIE 10252, 102520H (2017).

業績

【口頭発表】

- 笠井 達基、玉置 亮、浅井 岳、秦 大樹、久保 肇、 片山 郁文、「光加工プロセスにおけるテラヘルツ放射 のシングルショット計測」、応用物理学会秋季学術講 演会(2021年9月、オンライン)
- 玉置 亮、笠井 達基、浅井 岳、秦 大樹、久保 肇、 片山 郁文、「フェムト秒レーザー加工におけるテラへ ルツ放射計測」、OPJ 日本光学会年次学術講演会 (2021 年 10 月、東京)
- 3. 玉置 亮、笠井 達基、浅井 岳、秦 大樹、久保 肇、 瀧川 雄一、片山 郁文、「フェムト秒レーザー加工に おけるテラヘルツ放射の CEP 解析」、日本物理学会年 次大会(2022年3月、オンライン)
- 4. 笠井 達基、玉置 亮、浅井 岳、秦 大樹、久保 肇、 瀧川 雄一、武田 淳、片山 郁文、「テラヘルツ波放射 を用いたレーザーアブレーション初期過程における電 荷分離ダイナミクスの可視化」、応用物理学会春季学 術講演会(2022年3月、相模原)
- 5. 玉置 亮、鈴木 雅史、武田 淳、片山 郁文、「分散補 償チャープパルス分光法によるシングルショット超高 速応答計測」、応用物理学会春季学術講演会(2022年 3月、相模原)
- 6. 鈴木 雅史、玉置 亮、武田 淳、片山 郁文、「分散補 償チャープパルス分光法による強誘電体フォノンポラ リトンの観測」、応用物理学会春季学術講演会(2022 年3月、相模原)
- 7. 片山 郁文(招待講演)、「フェムト秒レーザー加工初 期過程におけるテラヘルツ放射」、多元技術融合光プ ロセス研究会(2022年3月、オンライン)

【特許】

(1)国内特許出願 1件(2)国際特許出願 0件

ゲノム構築技術による創薬研究基盤の開発

研究代表者:東京工業大学 相澤 康則

【基本構想】

相澤研究室では世界に先駆けて、ヒトゲノムを大規模に改変できる技術を開発している。このゲノム工 学技術は、ノーベル賞を受賞したゲノム編集技術単独では不可能なヒトゲノム改変を可能とすることから、 本新法を使って創出されるヒト細胞は画期的な創薬研究の基盤となると期待されている。また相澤研は、 世界で初となる真核生物ゲノムの全合成プロジェクトに日本から唯一に参加し、世界水準のゲノム合成技 術を培ってきている。本研究プロジェクトでは、これらゲノム工学技術を活用して、2つの新しい創薬プ ラットフォームの構築を目指している。1つめは疾患モデル iPS 細胞の開発である。健常者 iPS 細胞のゲ ノムを改変し、疾患原因遺伝子に実際の患者に見られる変異を導入した iPS 細胞を人工的に作るプロジェ クトである。疾患に見られるゲノム変異を導入した人工ヒト細胞は疾患原因解明や新薬探索に活用できる。 本研究では、ある神経性疾患のモデル iPS 細胞の作成を通して本実験系を開発する。2つめは新型コロナ ウイルスに対する創薬基盤技術の開発である。相澤研の長鎖 DNA 合成技術を活用して SARS-CoV-2 人工ゲ ノムを構築し、来るべきウイルスパンデミックに備えるために本感染症に対する高速並列型の新薬探索シ ステムにつながる基盤技術を開発する。本研究によって県内の創薬研究開発をさらに活性化させ、バイオ スタートアップ企業が神奈川から次々と生まれる未来創造に貢献する。

1. 研究目的

本研究では、ヒトゲノム大規模改変技術を活用して、2 つの創薬プラットフォームを構築している(図1)。



図1:本研究プロジェクトの概要。

1つめは疾患モデル細胞の開発である。疾患モデル細胞 とは、健常者由来細胞のゲノムを改変し、遺伝性患者に実 際に見られる変異をゲノムに導入したヒト細胞株を指す。 現在 iPS 細胞を活用した創薬研究が成果を出し始めてい るものの、健常者由来 iPS 細胞と患者由来 iPS 細胞は遺伝 的背景が異なるため、それらの比較による創薬探索には 元々困難なものであり、それを克服するために、多くの iPS 細胞検体を用意する必要がある。しかし疾患モデル細胞は、 健常者細胞に注目する遺伝子変異を導入するものである ため、それ以外のゲノム領域は完全同一であり、遺伝的背 景の差異は大きく軽減される。そのため疾患モデル細胞は、 遺伝子変異の影響を調べる上で便利な細胞となり、疾患原 因解明や新薬探索を加速させるメリットがある。本研究で は相澤研が開発した大規模ゲノム改変技術(Universal Knock-in System法; UKiS法; 図2;7月13日に Nature Communications 誌への正式な論文受理)を活用し、遺伝性 疾患のモデル iPS 細胞を開発している¹。

2つめの創薬プラットフォーム開発では、新型コロナウ イルス感染症に対する創薬技術の開発を目標としている。 依然として収束が見えないコロナ禍における社会貢献だ けでなく、今後世界を再び混乱に陥れるような別種ウイル スによる感染症に対する迅速な技術的対応を可能にすべ く、本プロジェクトではコロナウイルス人工ゲノム構築の ルーチン化を目指している。ウイルスゲノム全合成の基盤 技術を確立することで、ウイルス全般による感染症に対す る創薬技術基盤の確立を目指している。

プロジェクト1年目となる 2021 年度は、以下の3つの 研究項目を推進した:

(1) ゲノム構築技術を活用した疾患モデル iPS 細胞 の作製

本年度は、ある脳神経系の遺伝性疾患(以下、疾患X;) の患者によく見られるゲノム変異をもつ iPS 細胞の作成 を目指した。疾患 X の原因遺伝子として知られている遺 伝子 Y の部位に特異的に、疾患特異的な変異の導入を試 みた。(なお、特許出願前のため疾患名および遺伝子名を 伏せておく)

(2) 疾患 iPS モデル細胞の神経前駆細胞への分化 (1)で作成する疾患モデル iPS 細胞の機能特性を評価する ための実験系の確立を目的とし、コントロールとなる健常 者由来 iPS 細胞の神経細胞への分化を実施した。

(3) 新型コロナウイルス人工ゲノムの構築

コロナウイルス SARS-CoV-2 (武漢型)を対象に、その 一部を改変した人工ゲノムの合成を目標とした(図3)。 本改変を施すことで、本ゲノムをヒト細胞に導入しても最 終的にウイルス粒子を作らないため、この人工ゲノムを使 った感染経路の解明研究や治療薬の開発には、バイオセー フティーレベル3の施設を使う必要がなく、より多くのユ ーザーの使用が可能となる。

UKiS法: ヒトゲノムの大規模精密改変法



図2: UKiS 法の概要¹。2段階の相同組換えによって、狙ったゲノム領域の両アリルを好きな配列に置換が可能である。

図3:本研究対象のコロナウイルスゲノムの概略図。実際は、 一部のゲノム部位を改変したゲノムの全合成を進めている。

酵母を使った長鎖DNA合成法 (Gap repairing method)



図4:本研究で用いる長鎖 DNA 合成法(ギャップリペアーク ローニング)の概略図。末端が同じ配列を持つ9本前後の DNA 断片と、YAC-BAC ベクターを同時に酵母に導入することで、 一気に全 DNA 断片が連結される。連結されたベクターは大腸 菌に形質転換して大量調製するスキームである。

本ゲノム合成では、相澤研ですでに確立している長鎖 DNA 合成技術を活用する。相澤研は、約 1,200 万塩基対 もの長さの出芽酵母ゲノムの全合成を推進している国際 コンソーシアム Sc2.0に日本から唯一参加している研究グ ループであり、これまでに出芽酵母の最も長い第4染色体 (150 万塩基対)の全合成を米国グループの共同で完了し ている。この国際共同研究で培った長鎖 DNA 合成技術の 一つ、ギャップリペアークローニングを全長3万塩基対の コロナウイルスゲノム全合成においても活用する(図4)。

2. 研究成果

以下に挙げるのは、令和3年度の具体的な研究成果であ る。ほぼ計画通り順調に進んでいる。

(1) ゲノム構築技術を活用した疾患モデル iPS 細胞 の作製

図2に示したUKiS法を用いて、健常者由来iPS細胞に 対して2段階の相同組換えを介して、遺伝子Yへの変異 導入を試みた。UKiS法の2段階目で実施したセルソート 後に得られた iPS 細胞クローンをそれぞれ拡大培養した のち、それぞれのクローンからゲノム DNA を抽出した。 これらゲノム DNA を鋳型に、今回変異を導入したゲノム 部位を挟むように PCR を実施して、期待する変異が入っ ているかどうかを検証した。得られた4クローン細胞に対 する PCR の結果を図5に示す。



図 5:4 種類の iPS 細胞クローン(#4、#6、#9、#16)と、改変 前の iPS 細胞から抽出されたゲノム DNA に対する PCR の結果。

左と真ん中のゲルで電気泳動したサンプルは、改変前の iPS 細胞ゲノムを用いた場合に増幅が起こる PCR 産物で あり、これらゲル上では、改変前 iPS 細胞に相当するレー ンでのみ増幅が起きている。一方、右のゲルでは、期待す る変異導入に成功していることを示す1,400塩基対くらい の PCR 産物が確認できていた。この結果から、本年度の 実験により、疾患 X のモデル細胞が4クローン得られた ことになる。

この疾患Xモデル細胞開発の過程では、UKiS法でもち いるプロモーターの最適化も実施した。UKiS法の1段階 目でターゲットゲノム部位に挿入するUKiSマーカー遺伝 子がより安定に発現するように、新しいプロモーターを今 回開発した。

これまで使っていた全長約 210 塩基対のプロモーター の代わりに、全長約 2,500 塩基対のプロモーターを使って、 遺伝子Yのターゲット領域の両アリルをUKiSマーカー遺 伝子に置換した iPS 細胞を薬剤選択により得た。これら細 胞を13日間連続で培養し、その結果マーカー遺伝子であ る GFP および RFP の発現を消失した細胞の割合をセルソ ーターで解析した(図6)。その結果、期待通りに新しい プロモーターで転写されるマーカー遺伝子は両アリルに おいて、13日後もほぼ100%安定に発現していることが確 認された。これまでの210塩基対のプロモーターでは、13 日後には50%以上の細胞で GFP マーカー遺伝子の発現が 優位に消失してしまっていたことから、このプロモーター の有用性は顕著であった。

新旧カセットの比較



図 6: UKiS マーカー遺伝子を発現させるためのプロモーター の最適化。FACS によって、マーカー遺伝子である GFP および RFP を発現している細胞比の変化を解析した。

(2) 疾患 iPS モデル細胞の神経前駆細胞への分化

本年度開発できた疾患 iPS 細胞の有用性を評価する実 験の準備として、未分化 iPS 細胞を神経前駆細胞 (NPC) に分化させる実験系の導入を行った。専用培地に交換後、 7日間毎日培地交換を行った後、細胞から全 RNA を抽出 し、6種類の遺伝子に対する定量 RT-PCR を実施した。そ の結果図7に示すように、期待通りに2種類の未分化マー





図 7: 定量 RT-PCR による iPS 細胞の神経前駆細胞への分化評 価実験。 カー遺伝子(POU5F1 および NANOG)の発現は7日後細 胞では失われた一方、4 種類の NPCマーカー遺伝子(NES、 PAX6、SOX1、SOX2)の発現は7日後に顕著に増加してい ることが、確認された。

令和4年度では、NPC をさらにニューロンやアストロ サイトに分化させるプロトコールも導入し、本研究で作成 する疾患 X モデル細胞の活用事例を増やし、創薬研究で の有用性を示せるようなデータの蓄積を計画している。

(3)新型コロナウイルス人工ゲノムの構築

本プロジェクトで合成するコロナウイルスゲノムは武 漢型の塩基配列を有するものをベースに設計されている (図8)。上述のように、バイオセーフティーレベル2の 施設でも本ゲノムを使った研究開発が可能になるように、 ヒト細胞の感染に不可欠なスパイクタンパク質部分を改 変し、その安全性を下げる工夫がされている。また、実際 のコロナウイルスは RNA ゲノムを有するため、本プロジ ェクトでは、コロナウイルスの塩基配列を有する長鎖 DNA を合成した上で、それをインビトロ転写することで ゲノム RNA を調製する実験系の構築を進めている。



図8:コロナウイルスゲノム合成のスキーム。約50種類の数百 塩基対のDNA断片を3段階で連結し、全長ゲノム断片を得る。 図の一部を伏せてある。

以上のようなコンセプトで設計された人工コロナウイ ルスゲノム DNA は図8に示すように、短い DNA 断片を 3ステップで段階的に連結することで合成するスキーム を採用した:

①:ウイルスゲノムの DNA 断片(300-900 塩基対長) を2本あるいは3本ずつ混ぜ、オーバーラップ PCR によ って連結させた。これら短い DNA 断片は、ウイルスゲノ ム上では隣り合った配列に相当しているため、連結によっ て1,000-2,000 塩基対長のウイルスゲノム断片が得られた。 得られた連結 DNA は全てクローニング後、配列確認して 期待するウイルスゲノム配列であることを確認している。

②:第1段階で得られた断片のうちウイルスゲノム上で 隣り合ったものを2本ずつ混ぜ、さらなるオーバーラップ PCRによって連結を試みた。その結果、全てのPCR後に 期待する長さの DNA 断片が得られたため(図9)、それ らをプラズミドにクローニングし、配列確認を行った。



図 9: 第2段階後に得られた 11 本の DNA 断片をアガロース電 気泳動解析の結果。

その結果、前ページの図中で三角括弧(<>)内に示す 塩基数で、コロナウイルスゲノム配列(武漢型)と異なる 塩基がそれぞれの DNA 断片で確認された。そのため、こ れら塩基対は全てプラズミド上で塩基置換法によって改 変し、全て武漢型の配列へと修正を行った。

③:第2段階で配列修正を完了した DNA 断片を、 YAC-BACベクターと共に出芽酵母に細胞導入することで ギャップリペアークローニング法によって全 11 種類の DNA 断片を同時に連結させ、最終目的である人工ウイル スゲノム (SARS-COV-2_ver1.0)の作成を試みた。このゲ ノムの上流下流にはそれぞれプロモーターとポリ A 付加 シグナルがつくように YAC-BAC ベクターを加工してあ る。YAC-BAC ベクターのバックボーンにあるカナマイシ ン耐性遺伝子によって薬剤選択を行い、66 個のコロニー が得られた。

これら全コロニーに対して、ジャンクション PCR を実施し、第3段階目で YAC-BAC ベクターと混ぜた 11 種類の DNA 断片全てが正しい方向で連結しているクローンの 選別を実施した。まずはゲノム配列に中央に相当する#5 と#6 の DNA 断片の境界を増やす PCR をまずは行ったと ころ、66 クローンのうち8クローンで期待する長さの PCR 増幅が確認された。そこでこれら8クローンに対し て、残りの9境界に対する PCR 増幅テスト(ジャンクシ ョン PCR)を実施し、1 断片全てが設計通りの順番で連結 しているかどうかを調べたところ、3クローンで PCR 増 幅が確認されたことから、これら3クローンでは 11 種類 の DNA 断片が全て期待する順番で連結している可能性が 示された(図9)。

以上の結果から、SARS-CoV-2 ゲノム全合成を本年度中 に完了することができた。

その後令和3年度ではさらに、得られたYAC-BACベク ターを大量調製する実験系の構築に進んでいる。これまで の結果から、図4に示したように酵母で作ったYAC-BAC ベクターを大腸菌で大量調製することを試みたが、定法で は不可能であることが判明した。その後、様々なアイデア を試し現時点ではその最適実験スキームの確立に成功し ているため現在、特許出願に向けた実験データの取得を進



めている。

図 10:ジャンクション PCR による DNA 断片連結評価実験。 3つのクローンで9つのジャンクションで期待する連結が起 きていることが確認された。図の一部を伏せてある。

3. 今後の展望

開発項目①:ゲノム構築技術を活用した疾患モデル iPS細胞の創出とその活用

疾患 X に見られる遺伝子変異は多種多様であるため、 令和4年度は、3年度に確立した技術基盤を活用し、別の タイプの疾患 X モデル iPS 細胞株を作製し、疾患 X での 創薬研究開発での細胞株レパートリーを充実させる。これ までのところ最低合計7種類の細胞株を作製する。

一方で、疾患 X が脳神経系疾患であることから、モデ ル iPS 細胞を様々な神経細胞へ分化させて、その細胞機能 を調べることも計画している。仮説通りであれば、疾患 X 発症の原因だと考えられている変異を導入した iPS 細胞 では、疾患 X から予想される表現型を示すことになる。 もしそうなれば、本疾患モデル細胞は直ちに疾患発症メカ ニズムの解明に向けた研究での貴重な資源であることの 証明となる。

そこでこの実証に向けて研究を加速させるために、細胞 の機能解析を多角的に実施し、本疾患モデル iPS 細胞の学 術的優位性と産業的有用性を実証するための共同研究を 加速させる。現時点では3大学との共同研究実施に向け協 議を開始している。各大学とはそれぞれ異なる観点から、 疾患 X モデル細胞に対する解析を実施できることから、 本細胞の新しい有用性を明らかにできると期待される。

開発項目②:新型コロナウイルスに対する創薬スク リーニング系の開発

上述のように、当初予期していなかった「コロナウイル スベクターの大量調製の失敗」は、新しい知財獲得に繋が りつつある。ここで得られた新しいゲノム DNA 調製のた めの方法論は、コロナウイルスゲノムの合成のためだけの ものではなく、他の数万塩基対長のウイルスゲノムの合成 にも優となる可能性を秘めている。すなわちこの知財は、 今後また起こるであろうウイルスパンデミックに備える ための重要な知財となる可能性がある。そのため当初の計 画にはない項目ではあるが、このウイルスベクター大量調 製のための方法の特許出願にむけた実験実施にも注力し ていく予定である。

この実験と並行して、合成したコロナウイルス人工ゲノ ムを実際にヒト細胞に導入し、コロナウイルスの感染プロ セスが実際に誘発されるかどうかという、本来計画してい た検証実験も進める。感染プロセスの一部でも誘発される ようであれば、そのプロセスを阻害する薬剤スクリーニン グに活用するための研究開発も予定通り進める。

【参考文献】

1. Tomoyuki Ohno, Taichi Akase, Shunya Kono, Hikaru Kurasawa, Takuto Takashima, Shinya Kaneko and Yasunori Aizawa. *Nature. Communications.*, *In press.*

業績

【口頭発表】

- (招待講演)相澤康則 ゲノム構築技術開発のロードマップ JBA「発酵と代謝」研究会、2021年7月21日、 オンライン
- (招待講演)相澤康則
 ヒトゲノム大規模改変プラットフォームの開発
 第12回中分子創薬に関わる次世代産業研究会、2021
 年8月27日、オンライン
- (招待講演)相澤康則
 「アーキテクツゲノム」を活用した再生・細胞医療破壊的イノベーション!
 BioJapan 2021、2021 年 10 月 13 日、パシフィコ横浜
- 4. 相澤康則、大野知幸、倉澤光 ヒト染色体上でのレトロエレメント欠損解析 日本人類遺伝学会第66回大会、2021年10月16日、 パシフィコ横浜
- 5. 相澤康則、大野知幸、倉澤光 ヒト細胞ゲノム大規模改変技術の開発とその応用 第73回 日本生物工学会大会、2021年10月26日、オ ンライン
- Yasunori Aizawa Pilot Project Update 2021 GP-write 5.0、2021 年 10 月 21 日、On-line
- 7. 倉澤光、石津由紀、駒崎里奈、宇野愛海、冨塚一磨、 鈴木輝彦、大亀祐介、高田修汰、相澤康則 染色体工学技術応用(21):細胞増殖に必須なゲノム 領域の定量探索法とそのヒト iPS 細胞への応用 第44回日本分子生物学会、2021年12月3日、 パシフィコ横浜

化学ボロフェンによるフレキシブル素子の開発

研究代表者:東京工業大学 神戸 徹也

【基本構想】

本プロジェクトは、ホウ素単原子層かららなる材料「化学ボロフェン」の応用展開を開拓することで既 存の二次元材料を凌駕する機能およびデバイスの創製を目標としている。

ホウ素は多彩な化学構造を取り得る元素として魅力的である。なかでも単原子層からなる物質(ボロフ エン)はグラフェンには無い二次元機能が発現できる新材料として期待されている。本研究ではこのボロ フェンに相当する新物質およびその類縁体(化学ボロフェン)の液相での合成法を開発し、二次元構造に基づ く特殊な機能を発現できる新材料として提案することを目指す。

この研究において化学ボロフェンは液相で分子から合成する。これにより元素種の変更などによるバリ エーション構築し物性のチューニングや機能の付与を行う。化学ボロフェンによる液晶機能について特に 着目して研究する。これは二次元の単層ホウ素構造が発現できる物性であり、無機物として初の熱駆動で きる液晶としての特性を有する。これを活かした新規デバイスの構築を目指す。

1. 研究目的

炭素の単原子層からなる物質はグラフェンとよばれ、極 めて高い物理強度やディラック電子系に基づいた特異物 性から基礎科学だけでなく応用分野でも注目されてきた。

近年になり構成元素を変えた単原子層物質が Xenes と して報告され始めている。これは 13-16 族の元素を用いた 合成が可能であり、ケイ素によるシリセン、ゲルマニウム によるゲルマネン、スズによるスタネンなどが有名である。 これらは完全な平面構造ではなく屈曲した構造を有して いる。こうした Xenes の中でホウ素からなる単層物質がボ ロフェンとよばれている。炭素と異なりホウ素は sp²混成 軌道において電子が不足しているため、単原子層の構築に おいて 3 中心 2 電子結合などの結合状態が存在し、そのた め二次元材料に空孔が存在するなど、グラフェンには無い 物理特性が研究されてきた。しかしながら気相蒸着等で合 成されるボロフェンは不安定であり、材料としての利用は 見込めないとされていた。

我々の研究グループはこれまでボロフェンに相当する ホウ素ネットワークを有する単層構造を結晶で合成でき ることを見出した。これは酸素によりホウ素ネットワーク が安定化されており、単層材料とカリウムカチオンとが交 互に積層した構造を有しているものである。

本プロジェクトでは化学ボロフェンの合成手法を確立 し、バリエーションを増やすとともに、次世代のデバイス 構築を可能にする二次元ホウ素材料の新規機能の発現を 目指す。特に化学ボロフェンからなる液晶は、無機物のみ からなる初の液晶であり、有機物には無い安定性や高耐久 性を兼ね備えた新規液晶材料となり得る。

プロジェクト1年目となる 2021年度は、以下の各項目 を重点項目として研究した。

(1) 化学ボロフェンからなる結晶および液晶の合成

- (2) 化学ボロフェン類縁体バリエーションの開発
- (3) 化学ボロフェンと低分子との複合

(1)は本研究の基礎となる化学ボロフェン結晶の合成手 法を確立し、化学ボロフェンによる液晶機能の発現を目指 したものである。(2)は化学ボロフェン積層結晶のバリエー ションを層間の金属を変更することで増やすものである。 (3)は本研究で開発した化学ボロフェン液晶に低分子を反 応させることで、液晶相の低温化を可能にしたものである。

2. 研究成果

以下に挙げるのは、2021 年度の具体的な研究成果である。

(1) 化学ボロフェン液晶の合成

水素化ホウ素カリウムを原料として有機溶媒中でホウ 素-ホウ素結合生成反応と結晶化とを同時に行うことでホ ウ素ネットワーク構造を有する結晶を合成した。この結晶 はホウ素と酸素からなる単層の構造とカリウムカチオン とが交互に単層で積層した構造を有している。このホウ素 のネットワーク構造はボロフェンに相当するものであり、 シート面内での強い電子的な相互作用が期待できる。実際 に電気伝導特性における活性化エネルギーは、面内におい て殆どゼロに近い値となることを見出しており、高いモビ リティ特性の発現が期待できる。

図1は合成した化学ボロフェン積層結晶の写真である。 この結晶合成法を確立することが、続く液晶化に対して重 要である。純度の評価法として赤外分光測定と粉末X線回 折が利用できることが分かった。それぞれのデータを図2 に示す。これを基準として結晶合成を行うことが可能とな った。



図1:化学ボロフェン積層結晶の写真



図 2:化学ボロフェンの a)赤外分光スペクトルと b) 粉末 X線回折ピーク

この化学ボロフェンを加熱処理することで液晶へと変 化した。熱分析測定により100から130℃付近で質量 の減少が確認され、質量分析のより水(H2O)が脱離してい ることが明らかとなった。

赤外分光測定によりBO-Hの伸縮振動のピークが消失 していることから、化学ボロフェン末端部位に存在するB -OHから脱水反応が生じていることが示された。さらに、 液晶化後の構造解析をX線回折から行った結果、層間の距 離がわずかに広がっていることが示された。この変化は末 端部位の脱水反応により平面性が阻害され、化学ボロフェ ンに流動性が生じたと考えられる。

(2) 化学ボロフェンのバリエーションの開発

化学ボロフェンのバリエーションの開発を層間に導入 されているカチオンを変更することで行った。ホウ素と酸 素からなる化学ボロフェンに相当する骨格は酸化ボロフ ェンとみなすことができるため、その結晶を Borophene-oxide crystal (BoC)と表記する。カリウムカチオ ンを有する結晶(K-BoC)他に、リチウム(Li-BoC)、ナトリ ウム(Na-BoC)、ルビジウム(Rb-BoC)、セシウム(Cs-BoC) およびマグネシウム(Mg-BoC)をカチオンとして導入した 化学ボロフェン積層結晶を合成した。また、アルカリ金属 カチオンがクラウンエーテルに強く内包される特性を活 かして、カチオン内包錯体を有する化学ボロフェンも合成 した。これらはボロフェン間の相互作用を弱くすることが 期待されるため、液晶特性を変化できることが期待される。 こうしたバリエーションについて得られた結晶を図3に まとめた。Rb-BoC の熱分析の結果を図4に示したが、 K-BoC の場合と同様に脱水反応による質量減少が確認さ れており、液晶への変化が示唆された。このように、これ ら類縁体も K-BoC の場合と同様に液晶化することが期待 される。



Cs-BoC Mg-BoC

図3:新たに合成した化学ボロフェンのバリエーション



図4: K-BoC および Rb-BoC の熱分析結果

(3) 化学ボロフェンと低分子との複合

化学ボロフェンと低分子との複合によるホウ素液晶の 流動性の向上を検討した。エタノールを化学ボロフェン結 晶と反応させ、その後液晶化させた。その結果、化学ボロ フェンの流動性の高い液晶相を室温付近でも保持できる ことを見出した。エタノールと複合させた液晶の写真を図 5に示す。この成果は 2022 年 2 月に掲載された Nature Communications の中で報告しており、室温駆動できる無機 液晶の実現につながるものである。



図 5:エタノールと反応させた K-BoC からなる化学ボロフ ェン液晶の温度変化を示す偏光顕微鏡像. 室温付近まで液 晶相が保持されていることがわかる

績 業

【原著論文】

 T. Kambe, S. Imaoka, M. Shimizu, R. Hosono, D. Yan, H. Taya, M. Katakura, H. Nakamura, S. Kubo, A. Shishido, K. Yamamoto Liquid crystalline 2D borophene oxide for inorganic optical devices

Nature Commun. 13, 1037 (2022). (Editors' Highlights)

【口頭発表】

- M. Katakura, T. Kambe, D. Yan, H. Taya, K. Yamamoto Solubility and thin film formation of a chemically synthesized boron sheet Pacifichem 2021: A Creative Vision for the Future, 2021 年 12月, オンライン
- 神戸徹也, Dongwan Yan,山元公寿 ホウ素二次元構造体の合成と特性 第48回有機典型元素化学討論会,2021年12月, オンライン
- 片倉 聖大,神戸 徹也, Yan Dongwan,山元 公寿 液相合成したホウ素二次元シートの電気電子物性 第11回 CSJ 化学フェスタ, 2021 年 10 月, オンライン
- 4. Dongwan Yan, Tetsuya Kambe, Masahiro Katakura, Hinayo Taya, Kimihisa Yamamoto Solution phase synthesis of borophene analogs 第15回分子科学討論会, 2021年9月, オンライン
- 5. 片倉聖大,神戸徹也, Yan Dongwan,山元公寿 ボロフェン類縁体の液相合成と物性 第70回高分子討論会, 2021 年9月, オンライン
- 6. 片倉聖大,神戸徹也, 閆冬婉,山元公寿 ボロフェン類縁体の液相合成と誘電的性質 第102回春季化学年会,2022年3月,オンライン
- 7. 閆冬婉、神戸徹也、山元公寿 ボロフェン類縁体の液相合成と誘電的性質
 第 102 回春季化学年会, 2022 年 3 月, オンライン

研究報告2022 目次 【研究開発部】

政策課題受託研究

「グローバルヘルスリサーチコーディネーティングセンター (GHRCC)」プロジェクト・・・・・ 206

【基本構想】

GHRCC プロジェクトは、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 するという理念のもと、平成15年から7年間の研究活動を継続した。活動の基本方針は「臨床研究のマネ ジメント支援」「わが国におけるグローバル臨床研究の推進」「未病の知識と対応の普及」「臨床研究のコ ンサルテーション」「臨床研究専門職の人材育成」「臨床研究方法論に関する研究活動」の6つである。

1. 2021 年度の研究目的

プロジェクト7年目は、6つの基本方針に基づく研究活動を継続した。加えて、プロジェクトの最終年度として、 これまでの7年間の活動や成果を総括・整理・記録し、次のプロジェクトへ繋がる活動とすることを心掛けた。

2. 2021 年度の研究成果

2021 年度の具体的な研究成果を基本方針にそって報告 する。

(1) 臨床研究のマネジメント支援

GHRCCは、重点的に臨床研究マネジメントを支援する 領域を「希少がん」「精神・神経難病」「再生医療」として いる。これらの領域はマネジメント支援が必要であっても、 営利企業は採算性の問題から参入に消極的な分野であり、 規模は小さいが細やかなマネジメントを身上とする GHRCCに適していると考えられる。

7年間に GHRCC が試験調整事務局を担った試験一覧を 図1に示す。2021 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13 試験の多施設 共同試験のマネジメントを行った。13 試験のうち11 試験 は、国際共同試験である。国際共同試験の比重の大きさは 研究室の特徴をよく表している。2021 年度に新規案件と して調整事務局業務を開始した国際共同試験が3 試験あ り、米国 National Cancer Institute (NCI) がスポンサーとな る2本の医師主導治験は2021 年度に治験計画届を提出し、 ドイツの婦人科腫瘍グループがスポンサーとなる医師主 導臨床試験は、新指針下で倫理審査委員会承認を得て試験 を開始した。

これら国際共同試験に対する GHRCC の支援体制を図 2 に示す。 承認申請を見据えた国際製薬企業との調整、海 外規制にも準拠した安全性情報の取扱い、海外から届けら れる治験薬の通関調整、海外への検体発送など支援範囲は 多岐にわたり、社会情勢や規制の変化にも柔軟に対応すべ く活動している。

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、および「NRG-GY005」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、子宮頸がん患者を対象とした「SENTICOLIII」 試験、子宮体癌患者を対象とした国際共同・医師主導治験

「NRG-GY018」試験、ドイツの婦人科腫瘍グループが主 導する国際共同・臨床試験「ECLAT」試験を開始した。ま た新しく呼吸器癌領域の臨床研究グループが組織化され、 国際共同・医師主導治験として実施する「NRG-LU005」 試験の調整業務も開始した。

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。

国内臨床研究グループが主導する2試験は、2018年4 月の臨床研究法の施行に伴い、多施設共同医師主導臨床試 験から積み替えた特定臨床研究「GOTIC-VTE」試験、お よび初発の子宮頸癌患者に対し化学放射線療法に免疫チ ェックポイント阻害剤のオプジーボを併用する 「GOTIC-018」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。

(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。前年に続き、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。

(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た。 2021年度も前年に続き 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。7年間で16回開催した。

(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。相談者は、製薬企業や 研究者・臨床研究グループだった。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 に近い環境で、研究デザインを相談する場に乏しいであろ うことを想像した。

(5) 臨床研究専門職の人材育成

本邦における臨床研究の実務を支援し、品質向上をおこ なうにあたり必要な人材の育成を目指し、GHRCCの経験 を学会やセミナーを通じて紹介した。臨床試験を実際に行 っている医師および支援組織のリーダーを講師として迎 え、研究室セミナーを行った。国際共同試験に関わる人材 の育成方法として、環境が許せば、将来的にはインターン の受け入れ検討も開始したい。

(6) 臨床研究方法論に関する研究活動

承認取得までのプロセスを鑑みたレギュラトリーサイ エンス研究は、ますますその重要性を増している。7年間 の論文数は13、学会や研究会等での発表数は36であった。 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。

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図

績 業

【口頭発表】

 毛利光子,橋爪智恵 National Cancer Institute の求める倫理審査についての 検討 生体医工学会第23回レギュラトリーサイエンス研究 会,2021年2月,東京

- 松川深玲,毛利光子,林聖子,橋爪智恵,押切由美 PAOLA-1 試験での日本の規制当局によるリモート査 察の経験について Gynecologic Cancer Intergroup meeting, 2021 年 5 月 Virtual
- 3. 松川深玲,

Gynecologic Cancer Intergroup 参加報告, GOTIC 教育セミナー, 2021 年 6 月, Virtual

4. 松川深玲,

Gynecologic Cancer Intergroup 参加報告, GOTIC 教育セミナー, 2022 年 2 月, Virtual

ківтес 研究報告 2022

2022年9月30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)
 事業化支援部橋渡し支援課
 海老名市下今泉705-1 /〒 243-0435
 TEL(046) 236 - 1500