

平成23年度研究概要

(KAST Annual Research Report, 2011)

平成 24 年 7 月

(財)神奈川科学技術アカデミー

Kanagawa Academy of Science and Technology

平成 23 年度研究概要目次

竹内「バイオマイクロシステム」プロジェクト

総括

プロジェクトリーダー 竹内 昌治	1
人工細胞膜を用いた創薬スクリーニングデバイスの開発	
川野 竜司	3
均一サイズ異種リボソームアレイの形成技術	
大崎 寿久	6
GPCR リン脂質球面膜アレイの構築と機能	
神谷 厚輝	9
蛍光によるマイクロ流路系での ABC トランスポータ機能計測	
佐々木 啓孝	12
業績	15

相澤「次世代バイオセラミックス」プロジェクト

総括

プロジェクトリーダー 相澤 守	19
生体内安定性アパタイトセメントの実用化研究	
水本 みのり、本田 みちよ、相澤 守	22
生体内吸収性リン酸三カルシウムセメントの実用化研究	
小西 敏功、高橋 周平、永田 幸平、長嶋 比呂志、相澤 守	26
骨誘導能を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発	
相澤 守、千布 悠貴、中島 佑亮、長嶋 比呂志、水本 みのり、 小西 敏功、本田 みちよ	30
抗菌性を備えた骨修復セメントの開発	
本田 みちよ、川延 勇介、神澤 信行、石井 賢、相澤 守	34
抗腫瘍効果を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発	
本田 みちよ、相澤 守	38
業績	41

重点研究室 光触媒グループ

総括

プロジェクトリーダー 藤嶋 昭	45
-----------------------	----

機能性材料を用いた物質・エネルギー変換	
中田 一弥	48
光触媒および導電性ダイヤモンド電極を用いた環境浄化	
落合 剛	52
有機モノリス構造体を用いた新陳代謝機能を有する高撥水性表面	
酒井 宗寿、中島 章	56
光触媒による抗菌・抗ウイルス性能評価に向けた基礎的検討	
石黒 斉、中野 竜一、姚 燕燕、梶岡 実雄、窪田 吉信	58
業 績	62

重点研究室 光機能材料グループ

総 括	
プロジェクトリーダー 益田 秀樹	71
陽極酸化ポーラスアルミナをテンプレートとした金属-ポリマーナノコンポジット構造の作製	
近藤 敏彰	74
ポーラスアルミナを用いたナノインプリントプロセスによるモスアイ型反射防止構造の形成	
柳下 崇、近藤 敏彰	77
しゅう酸水溶液中での金のアノード酸化によるナノポーラス皮膜の形成	
西尾 和之、益田 秀樹	80
業 績	84

重点研究室 透明機能材料グループ

総 括	
プロジェクトリーダー 長谷川 哲也	87
Nb:TiO ₂ スパッタ非晶質薄膜の結晶化過程	
ホァン・ゴク・ラン・フン、中尾 祥一郎	90
青色発光ダイオード用電極作製プロセスの開発	
岡崎 壮平	93
歪を誘起する基板上の Nb:SnO ₂ 薄膜のキャリア量増大	
中尾 祥一郎	96
ペロブスカイト酸窒化物 SrTaO ₂ N のエピタキシャル歪と誘電特性	
廣瀬 靖、岡 大地	99
業 績	102

有機系太陽電池評価プロジェクト

総括

プロジェクトリーダー 高木 克彦	105
有機系太陽電池性能評価方法の標準化に向けた検討	
斎藤 英純、青木 智子、青木 大輔	109
有機系太陽電池における電気特性の評価	
酒井 宗寿、内藤 恭兵、片山 建二	113
色素増感太陽電池の高効率化	
中田 一弥	115
業績	119

地域マクロニーズ即応プロジェクト 健康・アンチエイジングプロジェクト

総括

プロジェクトリーダー 阿部 啓子	121
ラット肝臓および血球細胞の網羅的遺伝子発現解析による鉄摂取量安全性基準の アセスメント	
亀井 飛鳥	125
特殊な組成のアミノ酸混合液の生理機能解析	
篠崎 文夏	129
メープルシロップの健康機能性評価研究	
渡部 由貴	132
発がんプロモーション関連遺伝子の探索	
大森 清美 (神奈川県衛生研究所)	135
桑葉ポリフェノール画分の高コレステロール血症進行抑制効果における作用機序の解明	
小林 征洋 (神奈川県衛生研究所/東京海洋大学)、 宮澤 真紀 (神奈川県衛生研究所)	140
ナノサイズ二酸化チタンが皮膚に与える影響の検討	
宮澤 真紀 (神奈川県衛生研究所)、 小林 征洋 (神奈川県衛生研究所/東京海洋大)	142
高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液投与の効果	
荒木 真由美、青木 信義、廣川 隆彦、瀬戸山 央 (神奈川県産業技術センター)	144
湘南ゴールドの機能性評価	
曽我 綾香、吉田 誠 (神奈川県農業技術センター)	147
業績	149

竹内「バイオマイクロシステム」

研究期間：平成 21 年 4 月～平成 25 年 3 月

竹内「バイオマイクロシステム」プロジェクト

プロジェクトリーダー 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いる。したがって、創薬の半数以上がこれら膜タンパク質をターゲットにしていると言われている。たとえば膜タンパク質の一種であるGタンパク質共役型受容体（GPCR）に関する薬の世界市場規模は年間約600億ドルに上り、他にもイオンチャネルやトランスポーターなど、各種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次世代の創薬・医療分野における重要な課題となっている。

しかしながら、現在、水溶性タンパク質に比べ、膜タンパク質の研究は必ずしもめざましい進展を遂げているとはいえない。これは膜タンパク質が細胞膜中に存在するため、構造決定や機能解析が困難なためである。機能解析についていえば、現在は培養細胞に目的の膜タンパク質を多量発現させておき、その細胞を電気生理学的手法（パッチクランプ法）や蛍光イメージング法を用いて解析することが一般的である。しかし、生細胞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を受けるため、一つの標的タンパク質に限定した機能を探ることは難しかった。

これに対して注目されているのが「人工平面膜法」である。本方法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できる。理想的な方法であるが、現状では基盤となる脂質膜形成の技術は確立されておらず、再現性・安定性は非常に悪い。

そこで本プロジェクトでは、微細加工技術（MEMS）を利用して、安定な脂質膜を効率良く再構成できるマイクロチップを開発し、膜タンパク質機能の高速解析処理を実現することを最終目標としている。具体的には、①人工平面膜の形成について再現性・安定性を高める技術とこれを集積化する技術、②膜タンパク質と膜との融合技術、③膜タンパク質の機能解析手法、を探索・開発してシステム化を行っていく。また、これら革新的なシーズ技術を創薬など産業界に展開していくことも目標としている。

1. 平成23年度の研究目的

プロジェクト開始3年目となる23年度は、下記研究課題を設定し、それぞれについて精力的に研究を推進した。

(1) 【人工脂質二重膜の形成】 安定で再現性の高い人工脂質二重膜をアレイ化する技術の開発

我々の目指す膜タンパク質アレイチップは、まず細胞膜モデルである脂質二重膜をアレイ化し、膜タンパク質の活性保持のためのプラットフォームを確立する。そこに精製された膜タンパク質を再構成することで、機能解析が可能な膜タンパク質アレイを得るといったものである。

本年度は、22年度までに積み上げてきた人工脂質二重膜アレイプラットフォーム（①平面膜デバイス、②球面膜デバイス、③トランスポーター解析デバイス）の確立を目的とした。

(2) 【膜タンパク質導入】 種々の膜タンパク質を脂質膜に導入する技術の開発

現在、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。本プロジェクトで提案する膜タンパク質アレイチップは標的タンパク質のみ融合・再構成することを目指しており、これらの課題は解決できる。

本年度は、昨年度までに着手した膜タンパク質再構成法について、実用性も含めた検討を進めることを目標とした。

(3) 【計測評価】 脂質膜に導入した膜タンパク質の機能計測による評価

本年度は、創薬の標的として重要な膜タンパク質を、上記の人工脂質二重膜アレイプラットフォームに実際に再構成し、機能の計測を行うことを目的とした。

2. 平成23年度の研究成果

(1) 安定で再現性の高い人工脂質二重膜をアレイ化する技術の開発

平面膜デバイスについて、デバイスのアレイ化、センサ用途のためのポータブル化に関する研究を重点的に行った。平面膜形成法は接触法を基盤とした。接触法での膜形成はピペットで溶液を滴下するだけの非常に簡便な方法であり、形成された脂質膜は物理的衝撃に対し安定である。

今年度はチャンネルシグナルの全自動計測のため、接触法16ch アレイデバイスの構造最適化を行った。ウェルや電極配線の設計などを検討し、ロボットデバイス上で90%以上の効率でヒトカルシウム依存型カリウムチャンネル(hBK)の再構成が可能になった。また、企業と共同で小型膜チップの試作を行い、フィールドテストを行った(展示会出展)。

球面膜デバイスについて、昨年度考案した均一径の球面膜アレイをより実用的なものとするための検討を行った。球面膜アレイは微細加工技術とエレクトロスプレー技術を併用し、微細ウェル構造の底部のみに乾燥脂質をパターンニングすることで実現できた。しかし乾燥脂質を水和する溶媒は純水のみで、電解質やアミノ酸、タンパク質などが含まれる水溶液を使用することはできなかった。これは電解質などによる静電的遮蔽効果が水和の初期段階を妨げているためと考えられ、本年度は水和を促進する方法について研究を行った。その結果、アガロースの効果が高く、生理食塩水中や無細胞タンパク質発現溶液中における球面膜形成に成功した。また、電解質やタンパク質が含まれる溶液の交換も確立し、後述の膜タンパク質の機能解析が可能となった。

トランスポータデバイスについて、トランスポータの基質輸送特性を高速評価できるデバイスの開発を行った。薬剤の競合阻害実験では、薬剤の濃度依存性のデータ取得が必須である。従来法では、放射性同位体ラベルした薬剤分子を準備し、標的となるトランスポータベシクルと共にチューブやプレート中でインキュベートや洗浄操作を繰り返して分析する必要があった。これを簡便化・高速化するためのマイクロデバイスの設計・評価を行った。薬剤濃度依存性を一度に評価するため、薬剤濃度0と1から5種の濃度勾配をつくることのできる多流路濃度勾配型デバイスと、洗浄操作などを容易にするためトランスポータベシクルを多孔ゲルに包埋した多孔ゲル型アレイデバイスの2つのアプローチで行った。その結果、いずれのデバイスにおいても特性評価を従来の12時間から3時間程度に短縮できた。

(2)種々の膜タンパク質を脂質膜に導入する技術の開発

平面膜デバイスについて、浸透圧法と誘電泳動法の検討を行った。一般的に膜タンパク質は細胞膜中でのみ構造・活性を保つことができる。人工脂質膜に再構成する場合、膜タンパク質が膜に埋め込まれた細胞膜画分(プロテオリポソーム)の状態に再構成する手法があるが簡単ではなかった。本年度は平滑筋など生体に広く発現しているBKチャンネルなど、モデルタンパク質の平面膜デバイスへの導入を試みた。浸透圧法は、膜タンパク質の精製過程において溶媒濃度を調整することでプロテオリポソーム内外の浸透圧を厳密に制御し、人工平面膜とプロテオリポソームの融合を促進する。16ch液滴接触法デバイスとロボットインジェクタを組み合わせた自動膜形成システム上で浸透圧法の研究を進め、リポソーム濃度や液滴量などの条件最適化によりhBKチャンネルに関して90%以上の効率でシグ

ナルを得ることができた。誘電泳動法については、前年度までの結果から膜タンパク質を含まないリポソームを平面膜に誘導できることが分かっている。本年度はBKチャンネルタンパク質を含む細胞膜画分を用いて手法の検討を行った。細胞膜画分においても平面膜表面に誘導することができ、融合後のシグナル計測にも成功した。

球面膜デバイスにおいてはウイルス融合法の検討を開始した。膜タンパク質の再構成手法として、上述の融合法のほかにも界面活性剤を用いる方法がある。しかし、これらは精製過程で膜タンパク質の失活や配向性制御に短所があった。そこでこの課題を解決できるバキュロウイルス-リポソーム融合法の検討を行った。Gタンパク質共役受容体(GPCR)の一つであるアドレナリン受容体(ADRB2)を遺伝子組換えにより昆虫細胞膜上へ発現させた。さらに、出芽ウイルス膜上にADRB2を得た。これを球面膜アレイに酸性下で播種することで融合させ、ADRB2再構成球面膜アレイを形成することに成功した。

(3)脂質膜に導入した膜タンパク質の機能計測による評価

平面膜デバイスについて、16chアレイデバイスを用いて、hBKチャンネルの詳細な電気生理学的挙動について解析を行った。その結果自動形成、並列計測可能な本システムにおいても、従来の報告と同様のデータが得られることがわかってきている。

球面膜デバイスに再構成したADRB2について蛍光観察を行った。GPCR群はホルモン、神経伝達物質、細胞増殖因子と結合し細胞応答を促す。また様々な薬剤と結合することも知られており、薬剤標的分子の中心として製薬企業においても重点的な研究が行われている。生理条件下において形成したADRB2再構成球面膜アレイに対し、蛍光アゴニスト(作用薬)を添加し、ADRB2へのアゴニストの結合を顕微鏡にて観察した。その結果、ADRB2再構成球面膜アレイにのみアゴニストが特異的に結合していることが示され、結合の定量化に成功した。

トランスポータデバイスについて、ABCトランスポータであるMDR1の競合阻害試験結果の定量性を評価した。開発法はMDR1を多量発現したプロテオリポソームをDNA相補鎖により観察エリア(流路底面)に固定化後、基質の輸送に伴うリポソーム内の蛍光強度変化により輸送を定量化する。標準基質(蛍光性)と競合薬剤(非蛍光性)の阻害関係を定量的に評価した。その結果、デバイスで決定された50%阻害濃度(IC50)が既知の放射性同位体を用いた文献値と同程度であることが分かり、開発法の信頼度が証明された。また、従来の輸送解析手法では観測困難である単一トランスポータ当たりの輸送活性の抽出にも成功した。

上記のそれぞれの研究成果は、末尾に示す通り、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、企業との共同研究についても推進中である。

人工細胞膜を用いた創薬スクリーニングデバイスの開発

川野 竜司

1. はじめに

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、創薬の半数以上が膜タンパク質をターゲットにしていると言われている。たとえば膜タンパク質の一種である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に関する製薬の世界市場規模は年間約 600 億ドルに上り、他にもイオンチャンネルやトランスポーターなど、各種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次世代の創薬・医療分野における重要な課題となっている。しかしながら一般的に膜タンパク質は細胞膜中にしか存在できないため、構造決定や機能解析が困難である。そのため水溶性タンパク質に比べ、膜タンパク質に関する研究は現在のところ、めざましい進展を遂げているとはいえない。

これまで生物物理学や生化学といった分野において、膜タンパク質の物理化学的な性質やその構造を明らかにするために様々な研究が行われてきた。膜タンパク質の機能解析を行う場合、培養細胞に目的の膜タンパク質を多量発現させ、その細胞をパッチクランプ法や蛍光イメージング法を用いて解析することが一般的である。しかし、生細胞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を受けるため、標的タンパク質に限定した機能を探ることは難しかった。「人工平面膜法」は生細胞を用いた場合の問題を解決できる可能性があるため、最近注目されている。この方法は人工細胞膜である脂質二重膜 (bilayer lipid membranes, BLMs) を形成した後、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詳細に解析できる。本手法は実現できれば理想的な方法であるが、現状では基盤となる脂質膜形成の技術は確立されておらず、再現性・安定性は非常に悪い。本研究では液滴接触法を用い、高い安定性を有する脂質二分子膜を作製し、膜タンパク質アレイの開発を行う^{1,3)}。

2. デバイス作製

これまでの研究において、接触法を利用し容易に BLMs 形成ができるデバイス double well chip (DWC; 図 1(a)) を提案してきた。はじめに DWC を用いた BLMs 形成の方法について述べる。脂質分子を含有した有機溶媒を DWC に滴

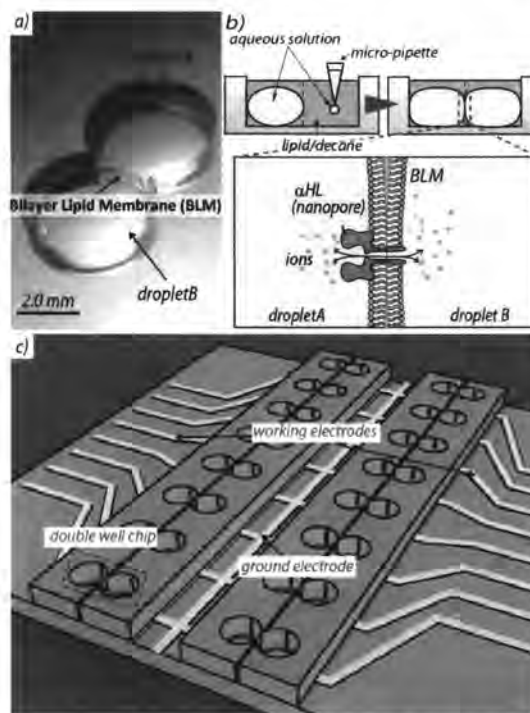


Fig.1. a) Enlarged view of a double-well chip. b) Procedure of BLM formation in DWC. c) An illustration of 16ch bilayer lipid membranes (BLMs) array device for 16ch electro-analytical measurements.

たし、さらに DWC の各ウェルにバッファをマイクロピペットで加えると、液滴表面に脂質分子が配向し、2つの脂質単分子膜が形成する。この状態でしばらく放置すると、これらの脂質単分子膜は互いに接触し、BLMs が形成する (図 1(b))。アレイ化には安定な BLMs 形成が必須であるが、先に述べたように DWC で形成される BLMs は膜形成時間や振動に対する安定性に関して問題がある。そこで、脂質単分子膜が接触する界面に微細加工技術を利用し形成したマイクロ孔を配置し、BLMs 形成面積を小さくすることで安定化を試みた。マイクロ孔はマイクロオーダーの加工が可能でハンドリングが容易なパリレン C を用いて形成した。以下にパリレンの加工プロセスを述べる (図 2(a))。シリコンウェハ上に厚さ 5 μm のパリレンを気相重合によりコンフォーマルコーティングし、次にアルミニウム薄膜及びフォトレジストを順次コーティングした。次に、マスクレス露光装置で作製したガラスマスクを利用してマイクロ孔を形成する部分に選択的に紫外線を露光し、現像液により現像してフォトレジストにパターンニングした。このフォトレジストをマスクとして、下層のアルミ層を混

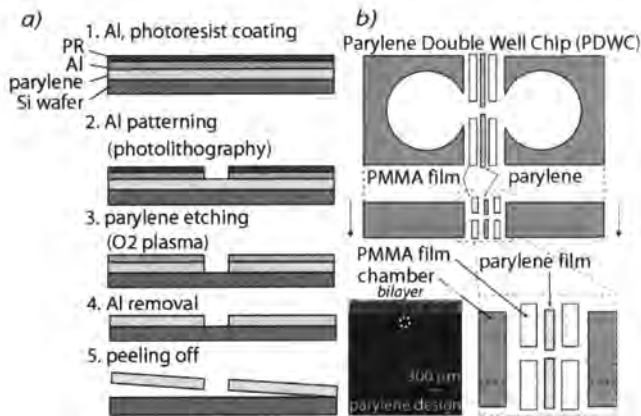


Fig.2. a) Parylene fabrication process. b) Fabrication process of DWC with parylene micropores (Parylene Double Well Chip; PDWC).

酸アルミ液によりウェットエッチングすることでアルミ層に透孔を形成し、これをマスクに酸素プラズマエッチングによりパリエレンに貫通孔を形成した。最後に残ったアルミ層を混酸アルミ液で除去した。1枚のパリエレンフィルム (3 mm × 3 mm) に5個の貫通孔 (直径 150 μm) を形成した。5個の貫通孔は、正方形の4個の頂点と、正方形の中心にそれぞれ位置するように配置した (図 2(b)insert)。

これを DWC のウェルの境界に組み込み、液滴が接触する面積を小さくする。パリエレンフィルムは 5 μm と薄く、自己支持性がないため、パリエレンフィルムの両側を厚さ 0.2 mm のアクリル (PMMA) フィルムで挟んだ。アクリルフィルムは、透孔を有しており、この中にパリエレンフィルムの貫通孔が位置するように配置した。この状態で図 2(b)のように各要素を接着剤で接着することで、マイクロ孔を有した DWC を作製した。このとき、接着剤でマイクロ孔を塞がないよう使用する接着剤の量は最小限とし、且つ液漏れがないよう接触面に均一に接着剤を塗布した。以下、パリエレンマイクロ孔を有した DWC を PDWC (parylene double well chip) と呼ぶ。形成した BLMs および膜タンパク質の評価のために、パッチクランプアンプによりチャンネル電流を計測する。特にチャンネル電流同時複数計測のため、PDWC をアレイ化し、そこに電極を配線した。電極は基板上に真空蒸着装置を用いてシャドウマスク越しに Ag を蒸着することで配線し、その上に、底を貫通させた PDWC アレイを熱圧着により接着した (Pa, 120 deg, 20 min)。さらに、各ウェルの底部に露出した銀電極の端部に参照電極用銀塩化銀インクを塗布して Ag/AgCl 電極を構成することで、16 ch 同時に膜タンパク質のチャンネル電流計測が可能なアレイデバイスを作製した。本デバイスは流路系のアレイデバイスとは異なり、各 BLM が独立しているため、ウェルごとに異なる膜タンパク質や薬剤を用いることが

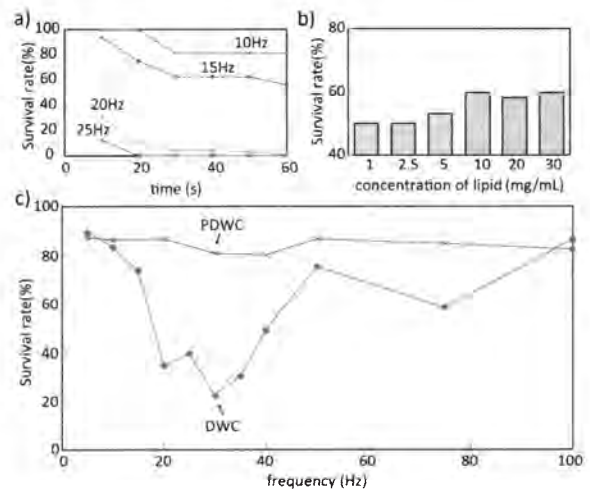


Fig.3. a) Relationship between vibration-time and survival rate of BLMs. b) Relationship between lipid concentration and survival rate of BLMs. c) Vibrational experiment result. This result indicate that BLMs formed in DWC are easy to break at around 30 Hz, but this problem is improved with PDWC.

できる。また、安定に BLMs を形成できる PDWC をアレイ化することで従来のアレイデバイスよりも高い歩留まりで BLMs を形成できると考える。

3. 結果・考察

本実験系において BLMs の生存率が一定になるまでの時間を調べたところ、どの周波数でも 30 s でほぼ一定になるという結果を得た (図 3(a))。DWC を用いて脂質の濃度と生存率の関係性を調べる実験を行ったところ図 3(b)の結果が得られた。脂質濃度が 10 mg/mL より濃いものは BLMs の生存率に大きな違いが観測されなかった。振動周波数と BLMs の生存率との関係性は図 3(c)のようになった。DWC では周波数 30 Hz 付近で BLMs が壊れやすい周波数領域があることが分かるが、PDWC では本測定範囲内においてそのような周波数域は観測されず、低周波数の振動に強い BLMs が形成できることが分かった。これは BLMs 膜面積が小さくなることにより、膜の垂直方向振動における固有振動数が高周波数側にシフトしたためだと考えられる。実際にチップの使用を考えた場合、輸送等の振動に対応する周波数は 2-20 Hz 程度なので、PDWC を用いることにより実用的に十分な安定性を有する BLMs を形成することができたといえる。次に、DWC と PDWC を用いた場合の電気計測時のノイズの違いについて評価する。BLMs が形成し、 α -ヘモリシンが再構成された直後から 0.5 s 間の時間と電流値のグラフを図 4(a)に示す。PDWC で得られたノイズは DWC で得られたものの半分以下になっていることがわかる。一般的に膜面積が小さくなると膜抵抗値および膜容量値が小さくなり、ノイズが小さくなることが知られて

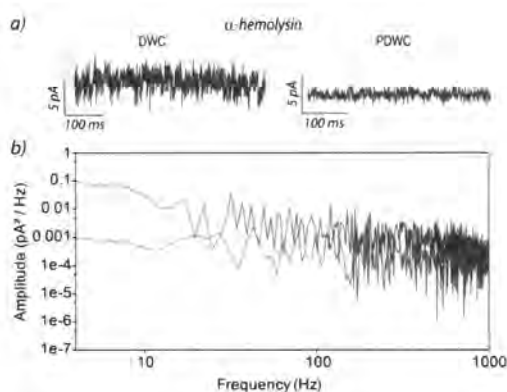


Fig.4. a) Current-time trace after reconstitution of α -HL. b) Power spectra of the channel of α -HL.

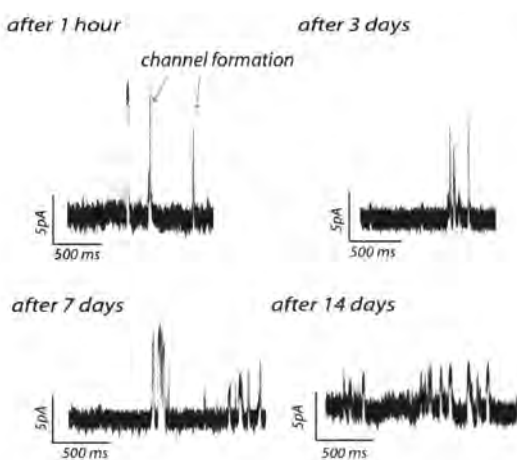


Fig.5. Current-time trace of alamethicin channel. We succeeded in observing the protein channel conductance for 2 weeks in 1 M KCl buffer at 10 mV applied.

いる。これを詳しく評価するために、パワースペクトル解析を行った。パワースペクトルによりノイズに含まれる波の周波数とエネルギーとの関係をコンピュータによるフーリエ解析を経ることで得た。図 4(b)のパワースペクトルは図 4(a)のデータを変換したものである。PDWCにより、低周波数領域 (5 Hz 付近) における α -ヘモリシンチャンネル電流のノイズエネルギー (振幅の 2 乗/周波数) を約 1/100 倍にまで小さくすることができた。

PDWC アレイデバイス内でチャンネル膜タンパク質であるアラメチシンを再構成させた BLMs を保持した。その結果図 5 に示すように測定開始から 14 日後もアラメチシンのチャンネル電流が観測できた。これまでの文献値では数時間~数日であった BLMs の寿命を、本デバイスを用いることで大幅に改善できた。2 週間後にチャンネル電流値が小さくなっているが、これはアラメチシン自身の活性が低下し

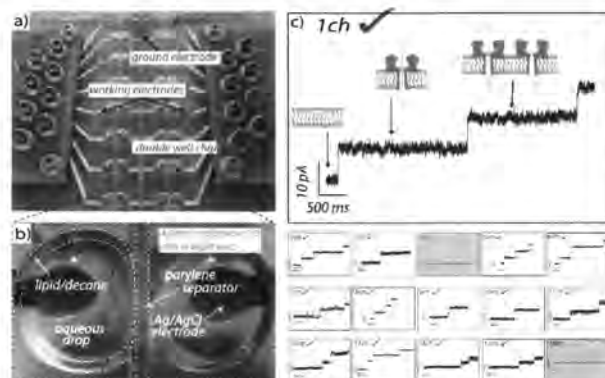


Fig.6. a) A photograph of 16ch electro-analytical measurements device integrated Ag electrodes and an amp head of a multi-patch clamp system. b) Enlarged view of PDWC. c) Multi-channel current-time trace of α -HL within the 16ch double-well system. Fourteen individual α -HL channels formed simultaneously in the BLMs in 0.1 M KCl buffer at 100 mV applied.

たためと考えられる。今後、異なる膜タンパク質を用いることで、より長期の試験をおこなうことができると考えられる。

DWC の 16ch アレイデバイスを用いた電気測定の結果、アレイデバイス中の平均 40 % (N=3) の DWC で BLMs が形成し、さらに α -ヘモリシンが再構成された。また最大 9 ch で α -ヘモリシンのチャンネル電流を同時に観測することができた。一方 PDWC(図 6(b))をアレイ化した 16 ch アレイデバイス(図 6(a))を用いた電気測定の結果、アレイデバイス中の平均 76 % (N=6) の PDWC で α -ヘモリシンが再構成され、また最大 14 ch で α -ヘモリシンのチャンネル電流を同時に観測することができた図 6(c)。このことから今回作製したデバイスは、従来のものより高い歩留まりで膜タンパク質のチャンネル電流を観測することができ、創薬スクリーニングデバイスに求められる、安定な BLMs を再現性よく形成するという条件を満たしたデバイスであるといえる。

【参考文献】

- 1) R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, S. Takeuchi *Small* **2010**, *6*, 2100-2104.
- 2) R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, M. Takinoue, S. Yoshizawa, S. Takeuchi *J. Am. Chem. Soc.*, **2011** *133*, 8474-8477.
- 3) Y. Tsuji, R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, N. Miki, S. Takeuchi *IEEE Trans. E.* **2011**, *131*, 419-424.

均一サイズ異種リポソームアレイの形成技術

大崎 寿久

1. はじめに

創薬の標的として重要な GPCR やトランスポータなどの膜タンパク質については、光学的観測技術の向上と共に培養細胞上での機能解析が盛んに行われている。しかしながら、細胞上では単一の膜タンパク質の機能を観測・評価することは困難であるため、近年、人工の脂質二重膜が注目され、利用されるようになってきている。人工の脂質二重膜の中で、顕微鏡観察に適した大きさであるジャイアントリポソームも古くから用いられているものの一つであるが、これまでの一般的な形成手法ではリポソームの径を制御したり、均一に揃えたりすることは難しかった。また、浮遊しているリポソームでは経時的な観察を行う上で課題があった。そこで本研究は、微細加工技術 (MEMS) を利用することでこの問題を解決し、膜タンパク質研究に資する均一径・細胞サイズリポソームアレイを得ることを目的としている。

脂質二重膜が水相を内包した形状のリポソーム (ベシクル) は、水中において脂質分子が自己組織化により形成する構造の一つである^[1]。その球状膜において直径が数〜数百マイクロメートルのものはジャイアントリポソームと呼ばれ、上述の膜タンパク質研究や人工細胞研究に多く利用されている^[2]。

ジャイアントリポソームの形成には図 1a に示す静置水和法やエレクトロフォーメーション法が一般的に用いられてきた^[1]。どちらの手法も乾燥脂質を水和させることでリポソームを自発的に形成させるが、これらの手法では形状やサイズの整ったジャイアントリポソームを得ることはできなかった^[1, 3, 4]。他方、図 1b に示すように脂質分子を分散させた W/O 液滴を水相に移すことによりリポソームを得る遠沈法も開発されているが、本法では脂質二重膜中に有機溶媒が残る W/O/W 液滴になってしまう問題が指摘されている^[5]。

そこで、形状・サイズの整ったジャイアントリポソームを効率よく形成できる手法の開発を行っている。昨年までの研究により、乾燥脂質薄膜を基板上に微細パターニングすることで、均一径の細胞サイズリポソームを静置水和法により形成・アレイ化できることが分かってきた。具体的には、脂質パターニングは図 2 に示す次のような方法で行った。まず MEMS 技術を用いて ITO ガラス上に高分子フィルムを蒸着・パターニングして基板を作製する。(パターニングにより、井戸の底面部分は ITO が露出した構造となる。) 次に、エレクトロスプレー技術^[6]により基板の ITO 露出表面のみに脂質をパターニングした。エレクトロスプレーを用いることで、導電性である ITO 表面に選択

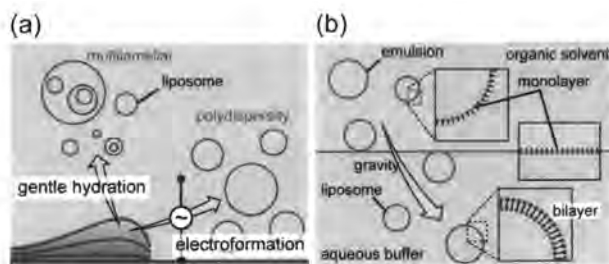


図 1 従来のジャイアントリポソーム形成手法 (a) 静置水和法とエレクトロフォーメーション法 (b) 遠沈法

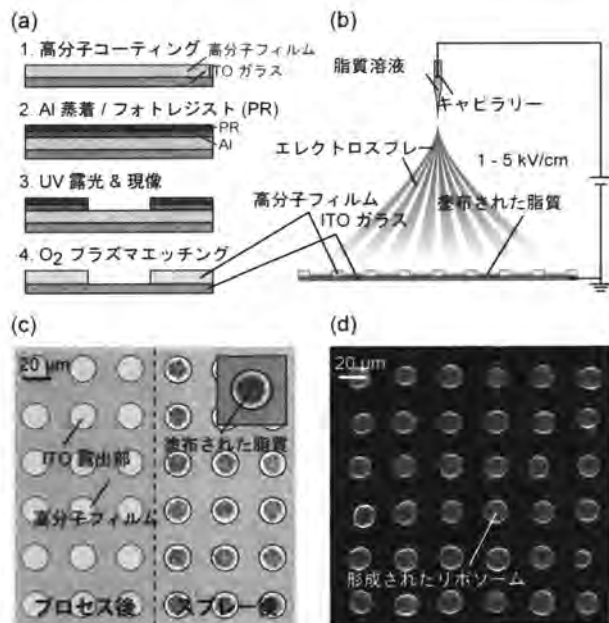


図 2 開発した均一サイズリポソームアレイ形成法 (a) 高分子フィルムのフォトリソグラフィプロセス (b) エレクトロスプレーモード図(断面) (c) 作製された基板の顕微鏡写真とエレクトロスプレーによる脂質塗布後の写真 (d) 形成されたリポソームアレイの蛍光顕微鏡写真

的に脂質を塗布することが可能となる。この脂質パターンに水溶液を滴下し、水和を促すことでパターン上に均一径リポソームを得ることができる。高分子フィルムのパターニング直径を変えることにより、直径 5-30 μm のジャイアントリポソームを、それぞれ変動係数 (CV) 10%程度以下の高い均一性で形成できた^[7]。

本研究では、この均一径リポソームアレイ形成技術を更に発展させ、異種のリポソームを交互に配列させるための応用技術を開発した。

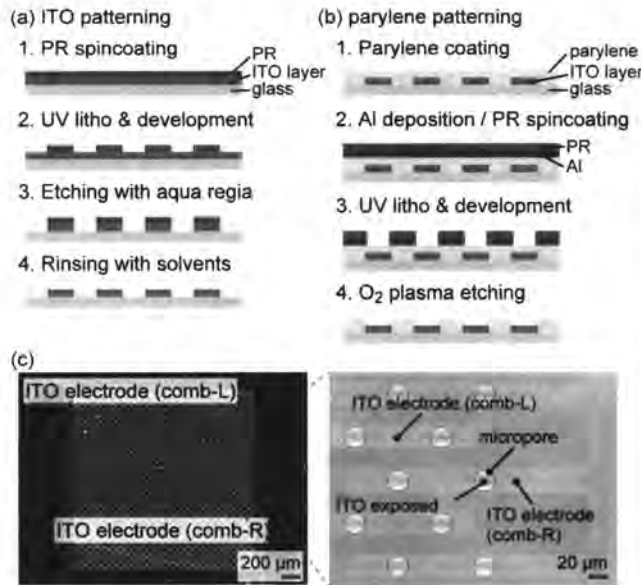


図3 櫛状電極を有する基板の作製プロセス (a) ITO 薄膜の王水によるパターニング (b) 櫛状ITO電極上での高分子フィルムのパターニング (c) 完成した基板の顕微鏡写真(左右の幹から水平方向に枝状に電極が伸びており、電極上にマイクロ孔がアラインメントされている)

2. 実験

異種のリポソームを交互に配列するには、まず異なる脂質をエレクトロスプレーにより特定のパターンに塗布する必要がある。そこで本研究では、基板上的 ITO 電極を二極に分割することで二種の脂質の塗り分けを試みた。

2. 1 櫛状電極をもつ基板の作製

図 3a, 3b に基板の作製プロセスを示す。まず、ガラス表面に均一にコートされている ITO 薄膜を、王水を用いたプロセスにより櫛型の形状にパターニングを行った。次に poly(chloro-*p*-xylylene) 高分子フィルムを CVD プロセスにより蒸着し、一般的なフォトリソグラフィプロセスを用いて高分子にマイクロ孔を形成した。フィルム厚は 1 μm 、マイクロ孔の直径は 5~20 μm とした。この際、ITO の櫛状電極上にマイクロ孔がパターニングされるようにアラインメントを行った。図 3c に作製された基板の顕微鏡写真を示す。左右より櫛状電極が伸びており、円形のマイクロ孔がパターニングされていることが分かる。

2. 2 脂質のエレクトロスプレー

エレクトロスプレーの模式図を図 4 に示す。昨年度の報告と同様の方法で行った。簡単には、内径 15 μm のガラスキャピラリーを先端に接続したシリンジに脂質のクロロホルム溶液を満し、このシリンジと基板との間に直流高電圧を印加してキャピラリー先端から脂質をスプレーする。スプレーされた脂質は基盤の導電性部分である ITO が露出した表面にのみ堆積し、高分子フィルムによりマスクされた部分は回避される。本研究では脂質には生体中によく見られる DOPC (0.5 mg/mL) を、スプレー条件と

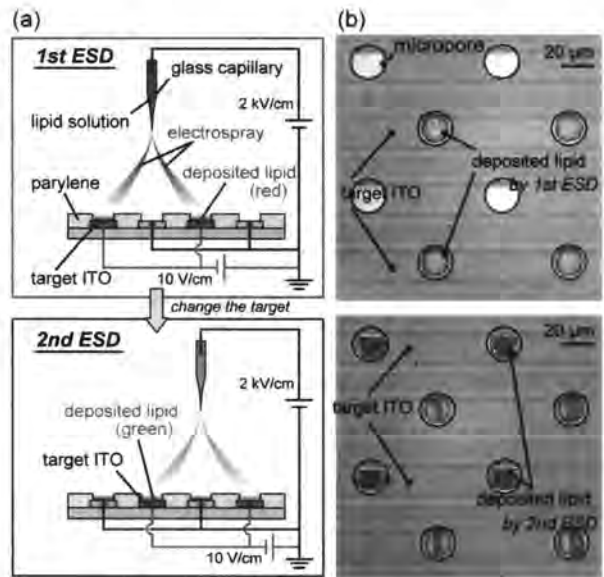


図4 櫛状電極を用いた二種の脂質の塗り分け (a) 塗り分けを行うためのエレクトロスプレー法の模式図(スプレーを誘導するため ITO 電極に負電圧を印加している) (b) 一種類目および二種類目の脂質を塗布した際の顕微鏡写真(交互に塗布されている)

して印加電圧 1~2 kV/cm、塗布時間 15 秒を用いた。また二種のリポソームの交互配列を確認するために DOPC に対して 1% の赤色または緑色の蛍光脂質 (Rhod-DPPE、NBD-DPPE) を混合した。脂質の塗り分けを行うため、エレクトロスプレー時に対象とする電極にのみ、10 V の負電圧を印加した (図 4a)。

2. 3 静置水和法によるリポソーム形成

エレクトロスプレーによりパターニングされた脂質はデシケータ中で 1 時間以上真空乾燥し、その後、シリコンゴムの枠を取り付けて静置水和を行った。水和とリポソーム形成の様子は倒立型共焦点顕微鏡により行った。

3. 結果と考察

3. 1 二種の脂質の選択的塗布

図 4b に二種の脂質を塗り分けた顕微鏡写真を示す。スプレーは、一度に図 3c の左図写真のパターン全体を覆う範囲に飛散する。しかし、図 4a に示したようにわずかな負電圧の印加を片方の電極に対して行うことで、飛散中の脂質分子を誘導し、選択的に塗布位置を制御できることが分かった。この手法を用いて、赤色・緑色の蛍光脂質を含む脂質のパターニングを行った。

3. 2 二種のリポソームの交互配列

図 4 に水和により形成されたジャイアントリポソームの共焦点顕微鏡画像を示す。MilliQ 水の滴下直後より脂質パターンの水和が始まり、ドーム状のジャイアントリポソームが形成される。

図から分かるように、二種の脂質を交互に選択的に塗布



図 5 水和により形成された異種リポソームアレイの共焦点顕微鏡写真（左より、緑色と赤色のチャンネル画像であり、両色を統合した場合の写真）本法により、異なるリポソームを近接させて形成できることが明らかとなった

した基板においては、形成されたりポソームも赤色、緑色と交互に配列したアレイ状になっており、本法によって二種のリポソームを隣り合わせて形成できることが明らかとなった。

4. 今後の展望

このように、エレクトロスプレー法と複合材料基板を用いた本パターンニング法は、異種のジャイアントリポソームを交互に配列するといった高い拡張性をもつことが明らかになった。本法を応用し、ITO 電極を更に複雑なものにすることで、3 種以上のリポソームを隣り合わせて形成することも可能と考えられる。

【謝辞】

本研究内容の一部は、科学研究費補助金（若手研究（B）23710154）の助成を受け行われました。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] P. L. Luisi, P. Walde, Giant Vesicles, John Willy and Sons Inc., New York, 2000; N. Duzgunes, *Methods in Enzymology* Vol. 367 Liposomes Part A, Academic Press, California, 2003.
- [2] A. Karlsson, R. Karlsson, M. Karlsson, A-S. Cans, A. Strömberg, F. Ryttsén, O. Orwar, “Networks of Nanotubes and Containers”, *Nature* **2001**, *409*, 150- 152.; I. A. Chen, K. Salehi-Ashtiani, J. W. Szostak, “RNA Catalysis in Model Protocell Vesicles”, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13213-13219.; G. Tresset, S. Takeuchi, “Utilization of Cell-sized Lipid Containers for Nanostructure and Macromolecule Handling in Microfabricated Devices”, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2795- 2801.
- [3] K. Kuribayashi, G. Tresset, H. Fujita, S. Takeuchi, “Electroformation of Giant Liposomes in Microfluidic Channels”, *Meas. Sci. Technol.* **2006**, *17*, 3121-3126.
- [4] M. Le Berre, A. Yamada, L. Rech, Y. Chen, D. Baigl, “Electroformation of Giant Phospholipid Vesicles on a Silicon Substrate: Advantages of Controllable Surface Properties”, *Langmuir* **2008**, *24*, 2643-2649.
- [5] H. Saito, Y. Kato, M. Le Berre, A. Yamada, T. Inoue, K. Yoshikawa, D. Baigl, “Time-Resolved Tracking of a Minimum Gene Expression System Reconstituted in Giant Liposomes”, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1640- 1643.; V. Noireaux, A. Libchaber, “A Vesicle Bioreactor as a Step toward an Artificial Cell Assembly”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17669-17674.; S. Ota, S. Yoshizawa, S. Takeuchi, “Microfluidic Formation of Monodisperse, Cell-sized, and Unilamellar Vesicles”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6533-6537.
- [6] O. V. Salata, “Tools of Nanotechnology: Electrospray”, *Curr. Nanosci.* **2005**, *1*, 25-33.
- [7] T. Osaki, K. S. Kuribayashi, R. Kawano, H. Sasaki, S. Takeuchi, “Uniformly-Sized Giant Liposome Formation with Gentle Hydration”, *Proc. IEEE MEMS 2011*, Cancun, 103-106.

GPCR リン脂質球面膜アレイの構築と機能

神谷 厚輝

1. はじめに

Gタンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor; GPCR)は7回膜貫通膜タンパク質で細胞外にリガンド結合部位、細胞内にGタンパク質ヘシグナル伝達部位を有している。GPCRは内分泌系、中枢神経系、循環器系等の重要な疾患と関連しており重要な薬物標的の1つである^[1]。現在市販されている医薬品の中で、GPCRを標的としている薬物は非常に多い^[2]。GPCRは約700種存在しているといわれているが、リガンド未知なGPCR(オーファン受容体)は未だ多数存在している。そこで、GPCR研究において生理現象機構を理解するための基礎研究や創薬創出の応用研究がなされている。それ故にGPCRのみを細胞膜表面から取り出した簡便な評価法等が求められる。

この目的に好適な素材にプロテオリポソームがある。プロテオリポソームは、膜貫通型タンパク質が組み込まれた(再構成された)脂質2分子膜からなる人工脂質小胞(リポソーム)である。通常、界面活性剤により生物試料から膜タンパク質を可溶化し、リン脂質と混合、透析等で界面活性剤を除去することにより調製される。しかし、この界面活性剤を用いる方法では、機能発現に重要な膜タンパク質の配向性が制御できず、また、界面活性剤に長時間晒されることにより変性・失活しやすくなる。そこで、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系を用いるバキュロウイルス-リポソーム融合法によるプロテオリポソーム作製を行った。ヤガ科の幼虫を宿主とする核多角体病ウイルス(*Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus; AcNPV)は、バキュロウイルス科に特徴的なウイルス包埋タンパク質であるポリヘドリン(polyhedron)を、感染後期の宿主に大量に産生させる。ポリヘドリンの役割は、昆虫体外でのウイルス粒子の保護であるため、培養細胞を宿主とする場合、感染と増殖に必須でない。そのため、強力なプロモーターに支配されたポリヘドリン遺伝子を、外来遺伝子と置き換えることによって、大量に組換えタンパク質を発現することができる。AcNPVは、宿主細胞膜から出芽して増殖するエンベロープウイルス(budded virus; BV)である。興味深いことに、外来遺伝子として膜タンパク質遺伝子を導入すると、宿主細胞膜へ強発現された組換え膜タンパク質は、ウイルスの出芽に伴いウイルスエンベロープ上へ移行する。BVのエンベロープには、膜融合誘起性のタンパク質gp64があり、BVがエンドサイトーシスにより細胞へ取り込まれるとエンドソーム内の低pH環境下で活性化することのgp64の機能を制御することで、組換え膜タンパク質を提示したBVとリポソームを融合させプロテオリポソームを作製する(図1)^[3]。可溶化が不要で、配向性は維持

される。現在までにコネクシン^[4]、カドヘリン^[5]等の膜タンパク質のプロテオリポソームの作製に成功し、機能も確認している。汎用性の高いプロテオリポソーム作製法として期待される。

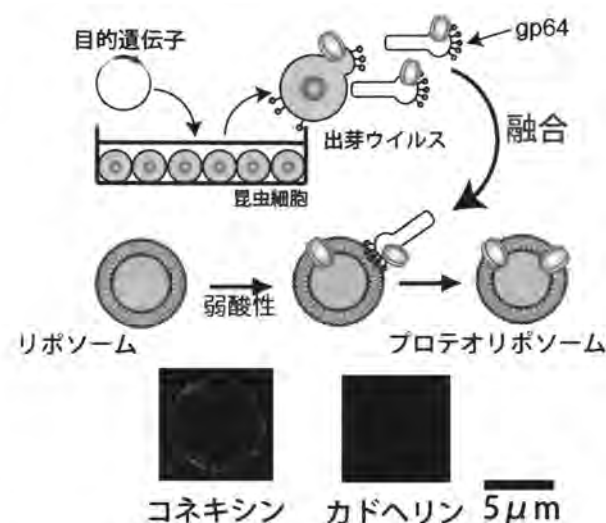


図1. バキュロウイルス-リポソーム融合法

今回、本プロジェクトで開発された脂質球面膜デバイス^[6]へバキュロウイルス-リポソーム融合法を用い、GPCRの一つであるアドレナリン受容体(ADRB2)を再構成した(図2)。さらに、ADRB2再構成球面膜アレイへ蛍光アゴニスト(作用薬)を添加し顕微鏡観察を行い、ADRB2再構成球面膜アレイの有効性を評価した。

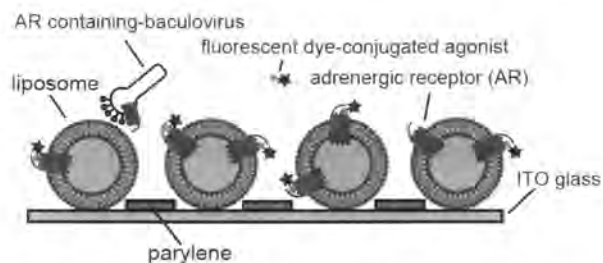


図2. ADRB2再構成球面膜アレイにおけるアゴニスト検出模式図
脂質球面膜アレイにバキュロウイルス-リポソーム融合法にてADRB2発現出芽ウイルスを融合させ、ADRB2再構成球面膜アレイを作製し、蛍光アゴニストの結合を観察した。

2. 実験と結果

2. 1. 球面膜デバイスへの野生型出芽ウイルスの融合

導電性の ITO (indium-tin-oxide) ガラス表面をパリレンでパターンニングし、エレクトロスプレー法により ITO ガラス表面上にリン脂質(ホスファチジルコリン/ホスファチジルセリン)を塗布し、乾燥させた。そして、緩衝溶液を加え水和し、リン脂質球面膜アレイを作製した。球面膜デバイスへの出芽ウイルス融合を確認するために、出芽ウイルスのエンベロープ膜に塩化オクタデシルローダミンを標識し共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。その結果、pH4.5 に晒した球面膜デバイスのみ R18 の蛍光が観察されたことから、出芽ウイルスが球面膜アレイに融合することが分かった (図 3)。これは先行研究におけるリポソームと出芽ウイルス融合挙動と一致したことから、リン脂質球面膜デバイスにおいても膜タンパク質を再構成可能であると考えられる。

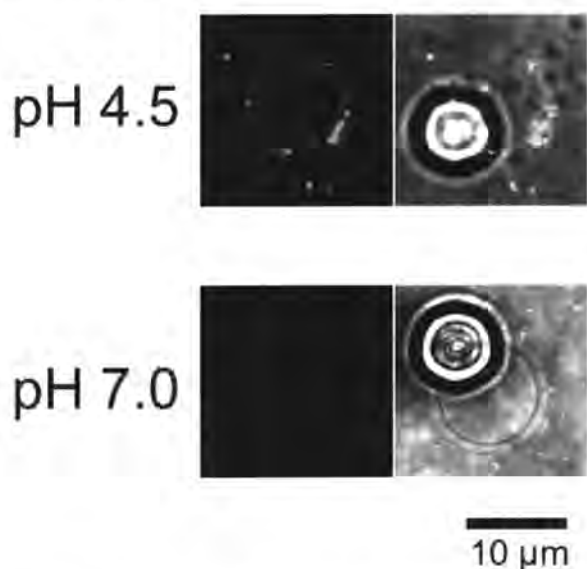


図 3. R18 標識野生型出芽ウイルスと球面膜の融合像

2. 2. ADRB2 再構成球面膜アレイ作製とアゴニスト検出

球面膜アレイに出芽ウイルスが融合することが確認されたので、ADRB2 再構成球面膜デバイスを作製した。ADRB2 再構成球面膜デバイス作製手順及びアゴニスト検出は以下の通りである。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で水和した球面膜デバイスを pH4.5 の緩衝液へ溶液を交換した。そして、ADRB2 発現出芽ウイルスと融合させた。融合させた後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) へ溶液を交換した。そして、ADRB2 に対する蛍光アゴニストを添加し共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った (図 2)。ADRB2 再構成球面膜デバイスのみ蛍光アゴニスト由来の蛍光が観察された (図 4a)。この結果より、球面膜に再構成されたアドレナリンレセプターのフォールディングが維持され、リガンド結合能を有することが分かった。

また、得られた画像からアゴニスト由来の蛍光強度を算出した結果、ADRB2 を再構成した球面膜と再構成していない球面膜に有意な蛍光強度の差が存在した (図 4b)。この ADRB2 再構成球面膜デバイスを用いることにより、新規薬剤のレセプターへの結合をハイスループットに検出可能であると考えられる。

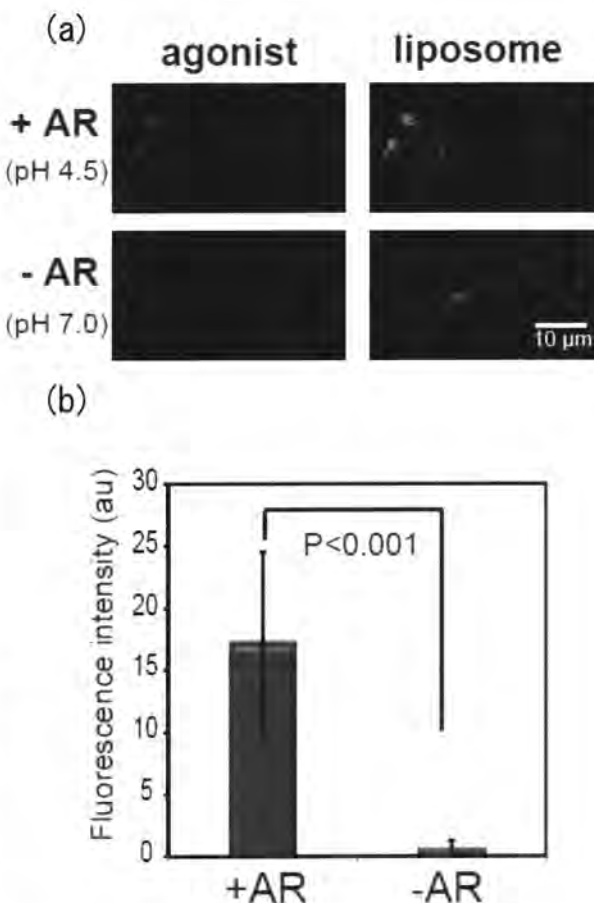


図 4. 球面膜デバイスによる ADRB2 に対する蛍光アゴニスト結合像と定量化 (a) 蛍光アゴニスト結合球面膜の顕微鏡像 (b) アドレナリンレセプター有無による球面膜上での蛍光アゴニストの結合 (n=30)

3. まとめ及び今後の展望

以上本年度の研究では、リン脂質球面膜デバイスを用い、ADRB2再構成球面膜デバイスを作製し、球面膜上に存在する ADRB2 のアゴニスト検出に成功した。新規薬剤等を用い、蛍光アゴニストとの競合アッセイを行い、新規薬剤の結合評価に用いることも可能であると考えられる。また、バキュロウイルス-リポソーム融合法は汎用性の高いプロテオリポソーム作製法であるため、種々な膜タンパク質をこのリン脂質球面膜アレイに再構成可能である。よって、このリン脂質球面膜アレイを用いて、様々な膜タンパク質スクリーニングチップの作製が可能であると考えられる。

【参考文献】

1. S.G. Mussen, H.J. Choi, D.M. Rosenbaum, T.S. Kobilka, F.S. Thian, P.C. Edwards, M. Burghammer, V.R. Ratnala, R. Sanishvili, R.F. Fischetti, G.F. Schertler, W.I. Weis, B.K. Kobilka, *Nature* vol. 450 (2007) pp.383-387.
2. J. Drews, *Science*, vol. 287 (2000) pp.1960-1964.
3. K. Kamiya, J. Kobayashi, T. Yoshimura, and K. Tsumoto, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, vol. 1798 (2010) pp. 1625-1631.
4. K. Kamiya, K. Tsumoto, S. Arakawa, S. Shimizu, I. Morita, T. Yoshimura, and K. Akiyoshi, *Biotechnology and bioengineering*, vol. 107 (2010) pp. 836-843.
5. K. Kamiya, K. Tsumoto, T. Yoshimura, and K. Akiyoshi, *Biomaterials* 32 (2011) pp.9899-9907.
6. T. Osaki, R Kawano, H. Sasaki and S Takeuchi, Proc IEEE MEMS 2011, Cancun, 103-106.

蛍光によるマイクロ流路系での ABC トランスポータ機能計測

佐々木 啓孝

1. はじめに

ATP-binding cassette (ABC) トランスポータは生体膜を介した能動的物質輸送を役割とし、アデノシン三リン酸 (ATP) 依存的に様々な代謝物質、脂質、薬剤などを輸送することが知られている^[1,2]。ABC トランスポータの機能異常が癌、嚢胞性繊維症などの疾病に関与する^[3]ことから重要な薬剤ターゲットとして扱われるとともに、一般的に薬剤の細胞内濃度を制御して薬効を左右することから、新薬開発時にこれらトランスポータと薬剤候補の相互作用を確認することが推奨されている^[4]。これを受け、トランスポータの基質輸送特性を簡便かつ高速で評価できるシステム開発の要求が高まっている。我々は蛍光を利用したマイクロ流路系での評価システムの開発に取り組んでいる (図 1)。このアプローチの利点は、従来の放射性同位体を用いたバルク系アッセイに比べて高速の溶媒置換が可能であり、必要サンプル量も少なく、さらには特殊な施設も必要としない点である。

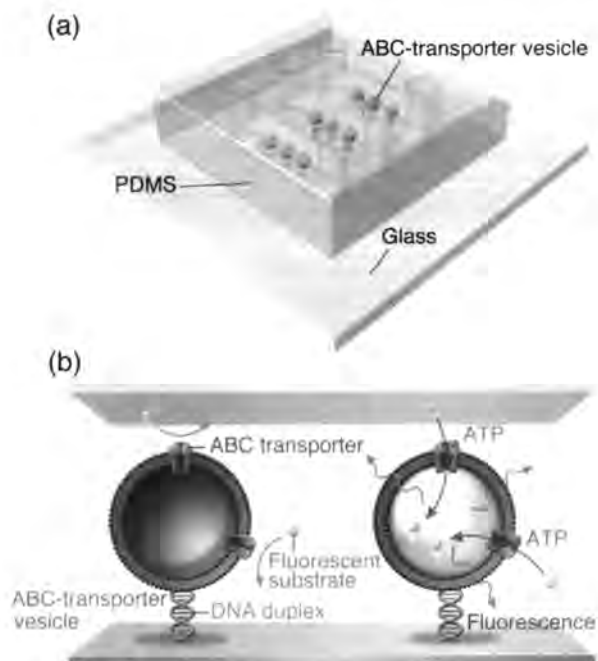


図 1. (a) ABCトランスポータ担持ベシクルを固定化したマイクロデバイス (b) 蛍光を利用したマイクロ流路系での高速評価模式図

2. 実験と結果

2. 1. ABC トランスポータ担持ベシクルを固定化したマイクロ流路の作製

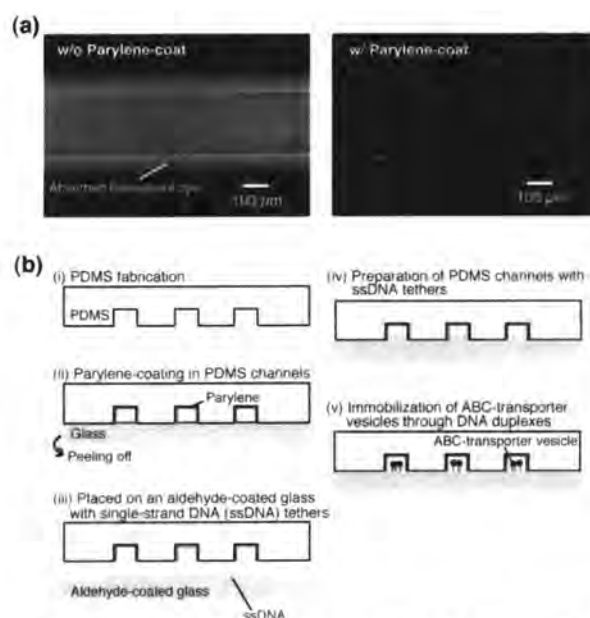


図 2. (a) PDMS 流路表面による蛍光剤吸収に対するパリレン被覆の効果 (b) PDMS 流路の作製および ABCトランスポータ担持ベシクル固定化の作業工程

ポリジメチルシロキサン (PDMS) は、安価で加工が容易であるという点から、マイクロ流路の材料として魅力的である^[5-7]。しかしながら蛍光剤を含めた疎水性小分子を吸収してしまう性質があり^[8,9]、本研究で求められる定量的蛍光観測には適さない。そこで我々は PDMS の表面にパラキシリレン系ポリマー (パリレン) を蒸着することでこの問題を克服し (図 2a)^[10]、作製したマイクロ流路に DNA を介して ABC トランスポータ担持ベシクルを固定化することに成功した (図 2b)。

2. 2. 蛍光を用いた ABCトランスポータの輸送活性評価

2. 2. 1. 基質輸送の ATP 依存性

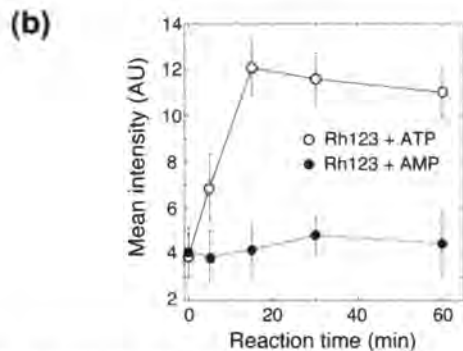


図 3. (a) ATP(左)および AMP(右)共存下、ローダミン 123 とインキュベートしたマイクロ流路固定化ベシクルの蛍光顕微鏡写真 (b) マイクロ流路系で観測されたローダミン 123 の時間依存的輸送曲線

上記のように作製したパリレン被覆 PDMS 流路を用いて蛍光性基質の輸送活性を評価した。蛍光性基質ローダミン 123 (Rh123) の輸送活性を MDR1 担持固定化ベシクル由来の蛍光強度で比較したところ、基質輸送の ATP 依存性を観測することに成功した(図 3a)。時間依存的輸送挙動(図 3b)に関してバルク系実験のデータと比較したところ、ほぼ同様の輸送挙動を示している事が明らかとなった^[11]。

2. 2. 2. マイクロ流路デバイスによる競争的輸送阻害の定量化

複数の基質が共存する場合、ABC トランスポータはそれらを競争的に輸送する場合がある。その挙動を観測することは特に薬剤の「飲み合わせ」を議論する際には重要な意味を持つ。顕微鏡による蛍光強度観測により ATP 依存的な輸送挙動が定量化できることを受けて、MDR1 によるローダミン 123 輸送に対する薬剤の競争的阻害定量化を試みた。具体的には、ローダミン 123 に非蛍光性薬剤を共存させてインキュベートすることにより、ローダミン 123 の輸



図 4. マイクロ流路固定化ベシクルにおけるローダミン 123 の競争的輸送の観測原理

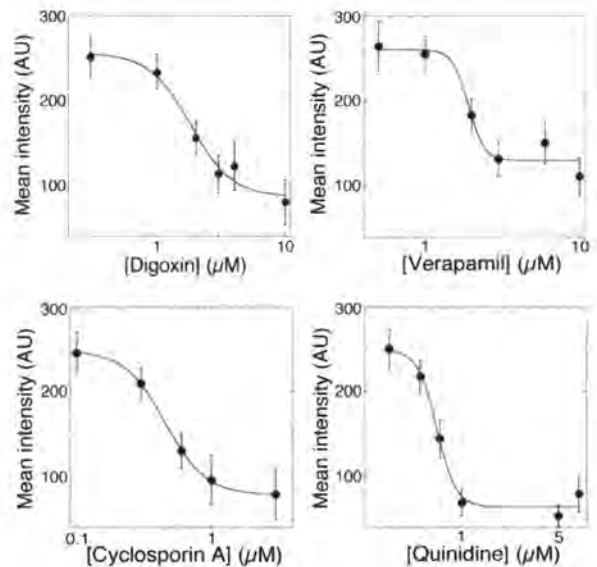


図 5. ABC トランスポータ固定化マイクロ流路で観測された、薬剤によるローダミン 123 輸送の阻害

送阻害をベシクル由来蛍光強度の減少量により定量化することとした(図 4)。一例として、ジゴキシン、ベラパミル、シクロスポリン A、キノジンのローダミン 123 輸送に対する阻害挙動を定量化したところ、予想通り輸送阻害挙動がベシクル由来蛍光の減少に反映され、ローダミン 123 の 50% 輸送阻害に必要な濃度 (IC_{50}) をそれぞれ $1.82 \pm 0.36 \mu\text{M}$ (ジゴキシン)、 $1.91 \pm 0.28 \mu\text{M}$ (ベラパミル)、 $0.45 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (シクロスポリン A)、 $0.66 \pm 0.04 \mu\text{M}$ (キノジン) と決定した^[11](図 5)。これは、先に報告された文献値^[12, 13]とほぼ一致するものであった。

3. まとめ及び今後の展望

以上本年度の研究では、表面をパリレンで被覆した PDMS 流路中において蛍光観測を利用した ABC トランスポータ機能解析を達成した^[11]。具体的には ATP 依存的な基質輸送を検知することに加え、複数基質存在下、競争的輸送挙動も ABC トランスポータ担持ベシクルの蛍光強度変化として捉えることに成功した。このことにより、薬剤間相互作用による 50% 輸送阻害濃度 (IC_{50}) も簡便に決定できることを明らかにした。

今後の展望としては、固定化したベシクルを観測対象としている利点を生かし、単一ベシクルレベルでの ABC トランスポータ基質輸送解析を試みる。また、多チャンネルを有したシステムの設計にも着手し、ABC トランスポータ機能計測のハイスループット化を目指した研究も開始していく計画である。

【参考文献】

1. S. V. Ambudkar, S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan and M. M. Gottesman, *Annu. Rev. Pharmacol.*

- Toxicol.*, 39, 361 (1999).
2. P. D. W. Eckford and F. J. Sharom, *Chem. Rev.*, 109, 2989 (2009).
 3. M. M. Gottesman and S. V. Ambudkar, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 33, 453 (2001).
 4. K. M. Giacomini, S.-M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. R. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y. Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. W. Yee, M. J. Zamek-Gliszczynski and L. Zhang, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 9, 215 (2010).
 5. R. Mukhopadhyay, *Anal. Chem.*, 79, 3248 (2007).
 6. S. K. Sia and G. M. Whitesides, *Electrophoresis*, 24, 3563 (2003).
 7. H. Makamba, J. H. Kim, K. Lim, N. Park and J. H. Hahn, *Electrophoresis*, 24, 3607 (2003).
 8. M. W. Toepke and D. J. Beebe, *Lab Chip*, 6, 1484 (2006).
 9. J. N. Lee, C. Park and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 75, 6544 (2003).
 10. H. Sasaki, H. Onoe, T. Osaki, R. Kawano and S. Takeuchi, *Sens. Actuators B*, 150, 478 (2010).
 11. H. Sasaki, R. Kawano, T. Osaki, K. Kamiya and S. Takeuchi, *Lab Chip*, 12, 702 (2012).
 12. E.-J. Wang, C. N. Casciano, R. P. Clement and W. W. Johnson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 580 (2001).
 13. J. A. Cook, B. Feng, K. S. Fenner, S. Kempshall, R. Liu, C. Rotter, D. A. Smith, M. D. Troutman, M. Ullah and C. A. Lee, *Mol. Pharm.* 7, 398 (2010).

業績

【原著論文】

1. Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sasaki, Masahiro Takinoue, Satoko Yoshizawa, Shoji Takeuchi, "Rapid Detection of a Cocaine-Binding Aptamer Using Biological Nanopores on a Chip", *Journal of American Chemical Society*, Vol. 133, No. 22, p. 8474-8477, 2011.
2. Toshihisa Osaki, Yoshihiko Watanabe, Ryuji Kawano, Hirotaka Sasaki, Shoji Takeuchi, "Electrical Access to Lipid Bilayer Membrane Microchambers for Transmembrane Analysis", *Journal of Microelectromechanical Systems*, Vol. 20, No. 4, p. 797-799, 2011.
3. Sadao Ota, Hiroaki Suzuki, Shoji Takeuchi, "Microfluidic Lipid Membrane Formation on Microchamber Arrays", *Lab on a Chip*, Vol. 11, No.15,
4. Hirotaka Sasaki, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, "Single-Vesicle Analysis of ATP-binding cassette transporters in microfluidic Channels", *Lab on a Chip*, Vol. 12, No.4, p. 702-704, 2012
5. 渡辺吉彦、大崎寿久、竹内昌治、"MEMS デバイスと人工細胞膜を融合する技術の開発"、*生産研究*, Vol. 63, No. 3, p. 354-357, 2011.
6. 辻祐太郎、川野竜司、大崎寿久、佐々木啓孝、三木則尚、竹内昌治、"接触法による膜タンパク質のアレイ化"、*電気学会論文誌E*, Vol. 13, No. 12, p 419-424, 2011.
7. 渡辺吉彦、大崎寿久、竹内昌治、"細胞サイズの脂質二重膜マイクロチャンパーにおける電流シグナル計測と経時安定性向上"、*電気学会論文誌 E*, Vol. 13, No.12, p 414-418, 2011.
8. Kamiya, Bruno Le Pioufle, Shoji Takeuchi, "Artificial Bilayer Lipid Membrane Platforms for Membrane Protein Analyses", *LIMMS Review Meeting for 2008-2011*, September 29, 2011.
9. Ryuji Kawano, Yutaro Tsuji, Minako Hirano, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sasaki, Koki Kamiya, Norihisa Miki, Toru Ide, Shoji Takeuchi, "Automated Drug Screening System for Ion Channel Proteins", *MicroTAS 2011*, October 03, 2011.
10. Hirotaka Sasaki, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, "On-Chip Single Vesicle Analyses of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters", *MicroTAS 2011*, October 03, 2011.
11. Yuta Abe, Hirotaka Sasaki, Ryosuke Yamamoto, Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Koki Kamiya, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, "A High-Throughput Drug-Screening System Targeting ABC-Transporters: An Application of a Microfluidic Gradient Generator", *MicroTAS 2011*, October 03, 2011.
12. Toshihisa Osaki, Kaori S. Kuribayasi, Ryuji Kawano, Hirotaka Sasaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, "Selective Lipid-Patterning for Heterologous Giant Liposome Array", *MicroTAS 2011*, October 04, 2011.
13. Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Kanta Tsumoto, Ryuji Kawano, Hirotaka Sasaki, Shoji Takeuchi, "Reconstitution of G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) into Giant Liposome Array", *MicroTAS 2011*, October 04, 2011.
14. Yutaro Tsuji, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sasaki, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, "Parallel Recognition of Single-Stranded DNA Using a Biological Nanopore Array", *MicroTAS 2011*, October 04, 2011.
15. Shoji Takeuchi, "Microfluidic assembly with molecules and cells", *MNC 2011*, October 25, 2011.
16. Yutaro Tsuji, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sasaki, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, "Solution Exchange of Droplet Contacting Lipid Bilayer System", *IEEE MEMS 2012*, January, 31, 2012.
17. Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Hirotaka Sasaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, "Towards Artificial Cell Array System: Encapsulation and Hydration Technologies", *IEEE MEMS 2012*, January, 31, 2012.

【学会発表】

1. Yutaro Tsuji, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sasaki, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, "Easy and Stable Lipid Bilayer Formation: A Drop-lets-Contacting-Method in Parylene Micropores for Multiple Ion Channel Recordings", *Transducers 2011*, June 06, 2011.
2. Shoji Takeuchi, "MEMS/Microfluidic technology for Synthetic Biology ~Toward synthetic cells and synthetic tissues~, *JFFoS 2011*, July 20, 2011.
3. Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Hirotaka Sasaki, Koki

13. Taishi Tonooka, Shoji Takeuchi, "Lipid Bilayer on a Droplet: Formation of Lipid Bilayers on a Droplet Array", *IEEE MEMS 2012*, January 31, 2012.
14. Taiga Kodama, Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Hirota Sasaki, Koki Kamiya, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, "Dielectrophoresis-Based Tweezers for Cell-Sized Liposome Manipulation", *IEEE MEMS 2012*, January 31, 2012.
15. 大崎寿久、栗林(繁富)香織、川野竜司、佐々木啓孝、竹内昌治、"水和法を用いた均一サイズリポソームの形成"、*日本膜学会第33年会*、May 13, 2011.
16. 竹内昌治、"医療用/バイオMEMSの最新動向"、*電子ジャーナル Technical Seminar*、June 10, 2011.
17. 竹内昌治、"BioMEMS 技術が拓く異分野融合研究"、*ライフサイエンス技術部講演会*、June 15, 2011.
18. 川野竜司、竹内昌治、"バイオとMEMSの融合—チャンネル膜タンパクアレイデバイスの創製"、*第2回融合マテリアルシンポジウム*、June 18, 2011.
19. 竹内昌治、"細胞や分子を操るマイクロ流体デバイス技術"、*第1回ブレインウェア工学研究会*、July 08, 2011.
20. 竹内昌治、"マイクロデバイス技術が拓く異分野融合研究"、*生物工学若手研究者の集い*、July 16, 2011.
21. 竹内昌治、"マイクロ流体デバイス技術が拓く創薬・医療研究"、*ヒューマンサイエンス振興財団第155回情報交換会*、August 11, 2011.
22. 竹内昌治、"生体分子・細胞を操るMEMS技術"、*生化学若い研究者の会 第51回夏の学校*、September 04, 2011.
23. 竹内昌治、"バイオMEMSの拓く異分野融合研究"、*医学研究の基礎を語り合う集い*、September 15, 2011.
24. 佐々木啓孝、川野竜司、大崎寿久、神谷厚輝、竹内昌治、"ABC トランスポーターのオンチップ機能解析"、*日本生物物理学会第49回年会*、September 18, 2011.
25. 辻祐太郎、川野竜司、大崎寿久、佐々木啓孝、三木則尚、竹内昌治、"膜たんぱく質ナノポアアレイを用いたDNAの1分子認識"、*第28回センサマイクロシンポジウム*、September 26, 2011.
26. 川野竜司、大崎寿久、佐々木啓孝、神谷厚輝、竹内昌治、"MEMS 技術を用いた膜たんぱく質アレイによるバイオセンシング"、*第60回高分子討論会*、September 29, 2011.
27. 神谷厚輝、大崎寿久、湊元幹太、川野竜司、佐々木啓孝、竹内昌治、"アドレナリンレセプター再構成巨大リポソームアレイの作製"、*第60回高分子討論会*、September 29, 2011.
28. 辻祐太郎、川野竜司、大崎寿久、佐々木啓孝、三木則尚、竹内昌治、"MEMS 技術によるチャンネル膜タンパク質のアレイ化"、*第60回高分子討論会*、September 29, 2011.
29. 川野竜司、平野美奈子、大崎寿久、佐々木啓孝、神谷厚輝、井出徹、竹内昌治、"MEMS とバイオの融合：膜たんぱく質をもちいたハイスループットスクリーニングス"、*第3回融合マテリアルシンポジウム*、October 17, 2011.
30. 佐々木啓孝、大崎寿久、川野竜司、神谷厚輝、竹内昌治、"薬剤—ABC トランスポーター間相互作用のオンチップ単一ベシクル解析"、*薬物動態学会第26回年会*、November 16, 2011.
31. 川野竜司、平野美奈子、井出徹、大崎寿久、神谷厚輝、佐々木啓孝、竹内昌治、"人工膜を用いた創薬の為にイオンチャンネル自動計測システム開発"、*薬物動態学会第26回年会*、November 17, 2011.
32. 神谷厚輝、大崎寿久、湊元幹太、栗林(繁富)香織、川野竜司、佐々木啓孝、竹内昌治、"アゴニスト検出のための均一サイズ GPCR リポソームアレイ"、*薬物動態学会第26回年会*、November 17, 2011.
33. 竹内昌治、"小さなモノづくりが拓く未来の健康医療社会"、*ゲノム徳島第8回公開公演会*、November 19, 2011.
34. 川野竜司、大崎寿久、佐々木啓孝、神谷厚輝、竹内昌治、"バイオとMEMSの融合—チャンネル膜タンパクアレイデバイスの創製"、*第4回融合マテリアルシンポジウム*、January 30, 2012.
35. 阿部裕太、佐々木啓孝、大崎寿久、川野竜司、神谷厚輝、三木則久、竹内昌治、"濃度グラジエント生成マイクロデバイスを用いたハイスループット創薬スクリーニングシステム"、*第51回日本機械学会関東学生学会*、March 09, 2012.

【記者発表、取材】

1. 竹内昌治、川野竜司、日本経済新聞、5月18日朝刊、社会面「コカイン、25秒で検出～微量でもほぼ100%」

2. 竹内昌治、川野竜司、日刊工業新聞、5月18日朝刊、「1分でコカイン検出～手のひらサイズの装置開発」
3. 竹内昌治、佐々木啓孝、日経産業新聞、2月7日朝刊、「医薬候補物質評価 3時間 東大・KAST新手法開発」
4. 竹内昌治、佐々木啓孝、化学工業日報、2月10日、「医薬候補化合物を効率選別 細胞への取り込まれやすさ着目—輸送たんぱく活用」
5. 竹内昌治、佐々木啓孝、化学工業日報、2月15日、「低分子化合物 迅速・高精度に評価—輸送型膜たんぱく質活用、医薬候補など選択に道」
6. 竹内昌治、佐々木啓孝、薬事日報、2月17日、「創薬スクリーニングに新手法—従来法より高い処理能力」

相澤「次世代バイオセラミックス」

研究期間：平成 21 年 10 月～平成 25 年 9 月

相澤「次世代バイオセラミックス」プロジェクト

プロジェクトリーダー 相澤 守

【基本構想】

平成 22 年総務省統計局の調べによると、我が国は 65 歳人口が 23.1%に達し、既に超高齢社会に突入している。他の先進国に先駆けて、超高齢社会を迎えた我が国においては、骨粗鬆症などの疾患に対する高度先進医療を実現することが急務な課題である。本プロジェクトでは、例えば、高齢者特有の骨粗鬆症などの骨疾患に対して、注射器などで注入可能な低侵襲治療を具現化する「次世代ペースト状人工骨」を開発する。

骨移植を伴う疾患に対する現在の治療法は自家骨を補填する方法がゴールドスタンダードであるが、採取量の限界や二次的な侵襲などの問題がある。その代替手段としては、水酸アパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp)などのバイオセラミックスを利用する方法がある。実際、HAp は骨組織と直接結合する「生体活性」を有するため、整形外科や口腔外科などの領域で骨充填材として臨床応用されている。水酸アパタイトの材料形態には緻密体・多孔体・顆粒・セメント(ペースト状人工骨)などがあるが、これらの材料形態のなかで任意形状に成形可能なペースト状人工骨、すなわち「アパタイトセメント」は今後の発展が期待される材料である。しかしながら、現行のアパタイトセメントは酸性物質のリン酸水素カルシウム(CaHPO_4)と塩基性物質のリン酸四カルシウム($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$)との酸-塩基反応を利用することが多く、セメントの硬化にはリン酸水素カルシウムの溶解が律速となるためにかなりの時間を要する。また、硬化時に pH の変動を伴うため、組織周辺の炎症反応を惹起する恐れもある。さらに、硬化時に血液が介在すると硬化時間が遅れる、あるいは硬化しなくなるという報告もあり、現行製品はユーザの要求を十分に満たしているとはいえない。

そこで、現在、我々は強力な「医工連携」により従来の骨修復セメントの問題点をすべて解決した新しいメカニズムで硬化する「ペースト状人工骨」を開発している。本プロジェクトでは、このペースト状人工骨の実用化を指向した研究を推進する。さらに、骨粗しょう症の患者に臨床的に適用しても確実な骨癒合を得、さらに医者が安心して使用し、患者の方々の QOL を向上させるには、このセメントに新たな機能を付与させる必要がある。本プロジェクトでは、「次世代型ペースト状人工骨」の開発を指向し、「骨誘導」・「抗菌性(感染防止)」・「抗腫瘍効果」の3つの機能を単独あるいは複数同時に付与させた新規な「多機能性キレート硬化型骨修復セメント」を創製し、それらの材料化学的評価および生物学的評価を実施する。

1. 平成 23 年度の研究目的

相澤「次世代バイオセラミックス」プロジェクトは、平成21年10月1日より発足し、その研究課題名は「多機能性キレート硬化型骨修復セメントの開発」である。平成23年度終了時点で、プロジェクト開始後2.5年を経過する。また、4年間のプロジェクトであるため、平成23年9月に折り返し地点を迎え、有識者による中間評価も実施された。その評価報告にもあったように、着実に研究成果を上げつつあり、平成23年度には特許出願(3件)も行なっている。

本研究の目的は、例えば、高齢者の「圧迫骨折」を適用症例とする注射器などで患部に注入可能な低侵襲治療を実現するセメント(ペースト状人工骨)を開発することである。これまでに我々は「医工連携」により従来の骨修復セメントの問題点をすべて解決した新しいメカニズムで硬化する「ペースト状人工骨」を開発している。その硬化メカニズムが「イノシトールリン酸(IP6)」のキレート結合によることから、我々はこのセメントを「キレート硬化型骨修復セメント」と呼んでいる。

このペースト状人工骨の実用化を目指し、本プロジェクトの枠組みの中で実用化に向けた研究開発に取り組んでいる。また、骨粗鬆症の患者に臨床的に適用しても確実な骨癒合を得、さらに医者が安心して使用し、患者の生活の質(Quality of life; QOL)を向上させるには、このセメントに

新たな機能を付与させる必要がある。そこで、本研究プロジェクトでは、「次世代型ペースト状人工骨」の開発を指向し、「骨誘導」・「抗菌性(感染防止)」・「抗腫瘍効果」の3つの機能を単独あるいは複数同時に付与させた新規な「多機能性キレート硬化型骨修復セメント」の開発にも取り組んでいる。

以下、本プロジェクトで実施しているサブテーマを列記するとともに、それらの研究内容を概説する。

- ① 生体内安定性アパタイト(HAp)セメントの実用化研究
- ② 生体内吸収性リン酸三カルシウム(TCP)セメントの実用化研究
- ③ 骨誘導性を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発
- ④ インテリジェント薬剤送達システム(DDS)の構築(抗菌性の付与)
- ⑤ イノシトールリン酸の抗腫瘍効果の検証

これらのサブテーマは、平成 21 年 10 月から 23 年 9 月までの 2 年間(フェーズ I)に併行して推進した。

まず、①および②では、セメントの材料特性を実用化可能なレベルまで引き上げ、さらにそれらの試料片の *in vitro* および *in vivo* における生体適合性と生体吸収性を確認した。③では、骨誘導性の付与を目的とし、生体必須微量元素などを含有した生体活性のより高いセメント原料の合

成方法を確立し、セメント試料片を試製した。④では、抗菌性付与を目的とし、薬剤の二段階徐放を可能にする「ナノサイズの孔をその表面に備えた中空微小球」を調製した。この微小球に抗生物質などを担持させ、その抗菌活性を評価した。また、抗菌性をもつ金属イオンである銀(Ag)を担持させた HAp 微小球を合成し、その粉体を出発原料として抗菌性セメントの試作も行なった。⑤では、抗腫瘍効果の検証を目的とし、試製したセメントと腫瘍モデル細胞との共存培養を行い、その増殖性や形態とともに、アポトーシスの誘導や p53 遺伝子の発現など生化学的な評価を行なった。

上記のようなペースト状で使用する人工骨は、高齢者特有の骨粗鬆症性圧迫骨折などに対して低侵襲治療を可能にする。本研究は、今後の超高齢社会において非常に重要な研究であり、県民の QOL 向上にも大きく貢献するとともに、産業的な波及効果も大きいと考えられる。

なお、平成 23 年 10 月以降は、「フェーズ II」にはいったため、より実用化を意識して、①および②のテーマを昇華させて「非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメントの開発と評価」を、また③④⑤のテーマを融合させて「多機能性アパタイトセメントの開発と評価」を推進している。

2. 平成 23 年度の研究成果

平成 23 年度は上記の 5 つのサブテーマを展開した。得られた研究成果について①から⑤に区別して報告する。

① 生体内安定性アパタイトセメントの実用化研究

これまでの研究実績を基盤として、実用化を指向した研究を展開した。ここでは、最終的な製品の形として、低侵襲治療を可能とする「インジェクション型デバイス」を想定している。そこで、ペースト状人工骨の材料特性を臨床的に使用可能な特性に最適化する実験を推進した。

評価項目として、ハンドリング性、圧縮強度、生体適合性および非崩壊性を掲げ、フェーズ I 終了時に達成する目標値を表 1 のように設定した。これまでに粉体の調製方法やイノシトールリン酸の表面修飾条件、適切な混練液の選択などを行ない、注射器でインジェクション可能であり、非崩壊性で、硬化時間 ~17 min、圧縮強度 ~22 MPa のセメントの開発に成功している。

より具体的には、湿式法で合成したアパタイト粉体を 8000 ppm のイノシトールリン酸水溶液を媒体とし、ボールミル粉碎することで、粉碎とイノシトールリン酸による表面修飾を同時に行なって「セメント原料粉体」を調製した。これを 10 mass%キトサンおよび 2.5 mass%リン酸二水素ナトリウムを含む混練液と混ぜることで、上記のようなバランスの良い材料特性を備えたセメント試験の創製に成功している。

以下、表 1 に平成 23 年度の評価項目、それらの目標値、成果(到達度)および自己評価をまとめて示す。概ね目標値を越える成果を上げている。今後は、「非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメント」の創製を目指し、さらに高いスペックのセメントに作りこむとともに、その生体適合性を確認する。

表 1 インジェクション型 HAp セメントの研究成果

評価項目	ハンドリング性	圧縮強度	生体適合性	非崩壊性
目標値 (フェーズ I 終了時)	初期硬化 20 min 以内	ヒト脊椎の約 2 倍の 30 MPa 以上	<i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> での検証	水中にいれても崩壊せずに形状を維持
到達度	17 min	22 MPa	<i>In vitro</i> → OK <i>In vivo</i> → 実施中	OK
自己評価	◎	○	○	○

② 生体内吸収性リン酸三カルシウムセメントの実用化研究

このサブプロジェクトにおいても、これまでの研究実績を基盤として、実用化を指向した研究を展開した。これまでに、徒手混練や注射器で注入可能なセメントペーストを試作し、臨床に不可欠な特性である「非崩壊性」を担保したセメントの作製に成功した。なお、この研究成果は、2012 年 3 月 22 日発行の日経産業新聞に「人工骨 ペースト状材料」としてプレスリリースされている。

評価項目として、HAp 系で前述した四項目：ハンドリング性、圧縮強度、生体適合性および非崩壊性に「生体吸収性」を加え、フェーズ I 終了時に達成する目標値を表 2 のように設定した。概ね目標値を超える成果を上げている。より具体的には、これまでに粉体の調製方法やイノシトールリン酸の表面修飾条件、適切な混練液の選択などを行ない、注射器でインジェクション可能であり、非崩壊性で、硬化時間 ~25 min、圧縮強度 ~25 MPa のセメントの開発に成功している。

今後は、「非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメント」の創製を目指し、より実用化を意識してより高いスペックを備えたセメントに作りこむべく、生体吸収性に関わるセメント試験片の *in vitro* と *in vivo* での相関関係を明らかにする。

表 2 インジェクション型 TCP セメントの研究成果

評価項目	ハンドリング性	圧縮強度	生体適合性	生体吸収性	非崩壊性
目標値 (フェーズ I 終了時)	初期硬化 20 min 以内	ヒト脊椎よりも高い 20 MPa 程度	<i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> での検証	<i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> での確認	水中にいれても崩壊せずに形状を維持
到達度	25 min	25 MPa	<i>In vitro</i> → OK <i>In vivo</i> → OK	<i>In vitro</i> → OK <i>In vivo</i> → OK	OK
自己評価	○	◎	○	○	○

③ 骨誘導能を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発

ここではフェーズ II で実施する「多機能性キレート硬化型アパタイトセメント」を開発するための要素技術のひとつである「骨誘導能 (より高い骨形成能) の付与」を目指した研究を展開した。このサブテーマでは、骨形成を促進する元素であるケイ素を添加した「ケイ素含有アパタイト

ト」と生体骨と類似した化学組成をもつ「骨ミネラル含有アパタイト」を、それぞれ、セメントの出発原料に使用する2つのアプローチで研究を推進したが、ここでは「骨ミネラル含有アパタイト」について記載する。

「骨ミネラル含有アパタイト」を出発物質とし、これにイノシトールリン酸を表面修飾して、セメントを試作したところ、圧縮強度 15 MPa 以上を備えたセメント試料片の試作に成功した。ついで、得られた試験片をモデルとして、実際にアパタイトよりも優れた生体活性を備えているかどうかを骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 やラット骨髄由来間葉系幹細胞などにより *in vitro* での生体適合性評価を行なった。ここでは、試験片表面の粗さによる影響を取り除くため、緻密な骨ミネラル含有アパタイトセラミックスを別に作製し評価したが、純粋なアパタイトよりも骨ミネラル含有アパタイトの方がより高い骨芽細胞の分化誘導能(特に、初期・中期の分化を促進)を示すことが明らかとなった。さらに、ウサギ脛骨にモデル試験片をインプラントし、その生体硬組織反応を比較検討したところ、インプラント4週の予備的研究では、骨ミネラル含有アパタイトの方が純粋なアパタイトよりも材料周囲での高い骨形成量が約30%も多いことが分かった。これは極めて優れた骨形成能であり、現在、追試を行なっているところである。

④ インテリジェント DDS の構築(抗菌性)

ここではフェーズ II で実施する「多機能性キレート硬化型アパタイトセメント」を開発するための要素技術のひとつである「抗菌性の付与」を目指した研究を展開した。このサブテーマでは、2つのアプローチで研究を推進した。

一つは、i) 表面にナノサイズの細孔を備えた中空微小球を合成し、これをバンコマイシンなどの抗生物質のキャリアとして利用し、バンコマイシン担持中空微小球をセメント原料に添加して「抗菌性セメント」を創製する研究である。もう一つは、ii) 抗菌性のある銀(Ag)に着目し、Ag 担持リン酸カルシウム粉末を合成し、これをセメント原料に添加することで、「抗菌性セメント」を創製するアプローチである。

まず、i)のアプローチでは、「塩添加法超音波噴霧熱分解法」により表面にナノサイズの気孔を備えたアパタイト系中空微小球の合成に成功し、特に抗菌剤の担持と徐放の観点から、微小球の表面構造の最適化を進め、抗生物質(バンコマイシン)の二段階徐放可能な微小球の調製に成功している。このバンコマイシン担持リン酸カルシウム微小球を用いて、セメント試作も進めている。

また、ii)のアプローチにより、上記の方法により、銀を担持させたアパタイト(Ag-HAp)微小球を調製し、その抗菌性を *in vitro* および *in vivo* で調査し、その抗菌性を確認している。*In vivo* においても抗菌性の発現が認められたため、その結果をもとに、②で確立したセメント作製のプロトコルに Ag-HAp 粉末を添加し、「抗菌性セメント」の試作を行ない、非崩壊性かつ抗菌性を備え、細胞毒性のほとんどないセメント試験片の試作にも成功している。なお、この研究はバイオセラミックスの分野で唯一の国際会議である 23rd International Symposium Ceramics in Medicine において、Best Poster Award を受賞している(Y. Kawanobe, M.

Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa and M. Aizawa, "Preparation of silver-containing hydroxyapatite powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its antibacterial property", *Bioceramics*23, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011.)

⑤ イノシトールリン酸の抗腫瘍効果の検証

ここではフェーズ II で実施する「多機能性キレート硬化型アパタイトセメント」を開発するための要素技術のひとつである「抗腫瘍効果の付与」を目指した研究を展開した。

まず、ヒト骨腫瘍由来の細胞種 HOS (human osteosarcoma)細胞をモデルとしてイノシトールリン酸(IP6)単独および IP6 で表面修飾したキレート硬化型アパタイトセメント(IP6-HAp セメント)上での細胞応答性について検証した。その結果、HOS 細胞に対し IP6 を処理することにより、アポトーシスが誘導され、濃度依存的に細胞増殖性が抑制されることが明らかになった。なお、この結果は HeLa 細胞における検証結果とも一致している。

また、IP6 の表面修飾濃度を変え、異なる IP6 濃度をもつ IP6-HAp セメントを作製した。それらをモデル材料として上記と同様な評価を行なったところ、IP6 の表面修飾濃度が高濃度(5000 ppm 以上)になるとセメント上の細胞に形態異常が認められ、細胞増殖性にも影響を与えることが分かった。また、DNA マイクロアレイ法により、アポトーシス関連遺伝子の発現を調べたところ、IP6-HAp セメントにおいて、アポトーシス関連遺伝子の発現が亢進していることが明らかとなった。したがって、IP6 による表面修飾濃度をコントロールすることにより、がん細胞の増殖性を制御できることが分かった。

⑥ フェーズ II に向けた取り組み

フェーズ II の2年間では、より実用化を意識して、以下の研究を推進することとした。

- 多機能型アパタイトセメントの開発と評価
- Non-fragmentation モデルの作成とその検証
- 非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメントの開発と評価

⑥では、従来の計画通り、生体内安定性のアパタイトを出発原料として、フェーズ I で確立させた③-⑤の基盤技術を融合し、骨誘導・抗菌性・抗腫瘍効果の3つの機能を単独あるいは複数同時に付与させた「多機能性骨修復セメント」として作り込む。また、⑦および⑧では、臨床医が求めるニーズをすべて満たしたスペックを備えたペースト状人工骨を開発するため、血液介在時での確実な硬化および硬化後に fragmentation を生じない革新的なセメントの開発を推進する。

上記のようなペースト状で使用する人工骨は、高齢者特有の骨粗鬆症性圧迫骨折などに対し、低侵襲な治療を可能にする。本研究は、今後の高齢化社会において非常に重要な研究であり、県民の QOL 向上にも大きく貢献するとともに、産業的な波及効果も大きいと考えている。

生体内安定性アパタイトセメントの実用化研究

水本みのり、本田みちよ、相澤 守

1. はじめに

現在、「超高齢社会」に突入した我が国において、高齢者の生活の質(QOL)の向上を目指す上で、骨粗鬆症などの疾患に対する低侵襲な医療を実現させることは、早急に解決すべき重要な課題である。当プロジェクトでは、骨組織と直接結合する「生体活性」を有する水酸アパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp)の表面をイノシトールリン酸(IP6)で表面修飾し、IP6のキレート能により硬化する新しい硬化メカニズムをもった「生体内安定性骨修復セメント」、すなわち「キレート硬化型 HAp セメント」の開発を推進してきた。本研究では、高齢者特有の脊椎圧迫骨折などを適用症例とし、低侵襲治療を実現する骨修復セメントを開発する。これまでに本プロジェクトで開発した基盤技術 [1,2]を応用し、インジェクション型ペースト状人工骨の実用化に向けて、1) ハンドリング性、2) 圧縮強度、3) 生体適合性について目標値を設定し、研究を推進している。本年度は、硬化時間の短縮・非崩壊性のセメント作製を目的として、HAp原料粉体の粉碎・調製方法を再検討した。具体的には、種々の濃度の IP6 溶液を用いて HAp 粉体の粉碎と表面修飾の同時処理を行うことで表面修飾粉体を調製し、その粉体性状を調べた。ついで、その粉体を用いてセメントを作製し、セメントの材料特性を評価した。

2. 実験と結果

2.1 ボールミル中での粉碎および表面修飾粉体の同時調製とその評価

2.1.1 湿式合成 HAp の調製

$0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 水酸化カルシウム懸濁液に、Ca/P 比が 1.67 になるように $0.3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ リン酸水溶液を攪拌しながら滴下し、25 mass% NH_4OH 溶液で pH 調整後、1 h 攪拌した。インキュベータ内で 24 h 熟成させた後、吸引ろ過・凍結乾燥させ「湿式合成 HAp 粉体」を得た。

2.1.2 ボールミル径の違いによる粉碎の効果

2.1.1 項で調製した湿式合成 HAp 粉体を $\phi 10 \text{ mm}$ (50 個) または $\phi 2 \text{ mm}$ (180 個) の ZrO_2 ボールを用いて遊星型ボールミル(Fritsch 製)で純水を溶媒として粉碎し、経時的にボールミル中のスラリーの粒径(メジアン径)をレーザー回折/散乱式粒子径分布装置 LA-300(堀場製作所製)を用いて測定した。図 1 に時間毎の粒度分布測定の結果を示す。 $\phi 10 \text{ mm}$ のボールを用いて粉碎したスラリーは時間とともにその粒径は小さくなっていき、粉碎 180 min 程度で粒径が変化しなくなったのに対し、 $\phi 2 \text{ mm}$ のボールを用いて粉碎したスラリーは粉碎 60 min 程度で粒径が変化しなくなった。 $\phi 2 \text{ mm}$ に変更することで、粉碎時の ZrO_2 ボールが

小さくなり、数が増加する。HAp 粉体との衝突回数が増えたことにより短時間で粒径が小さくなったと考えられる。また一定の粒径まで粉碎されると粉碎時間を長くしても粒径はそれ以上変わらないことがわかった。以上の結果より、湿式合成 HAp 粉体は $\phi 2 \text{ mm}$ の ZrO_2 ボールを用いて 60 min 粉碎することで、より効率的に微粒子化できることがわかった。

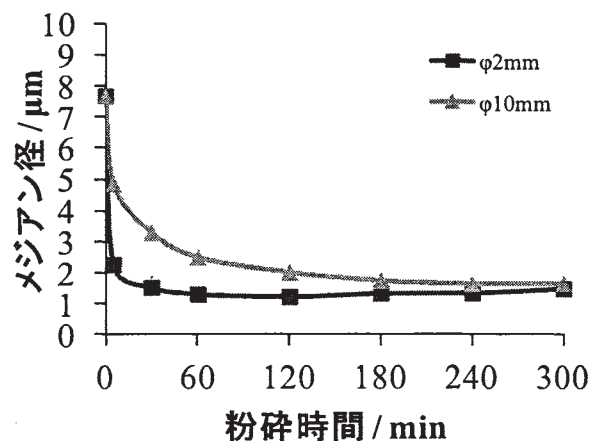


図 1 粉碎後スラリーのメジアン径

2.1.3 湿式合成 HAp 粉体の表面修飾粉体条件の検討

湿式合成 HAp 粉体と IP6 溶液 40 cm^3 , $\phi 2 \text{ mm}$ ZrO_2 を遊星型ボールミルで 60 min 粉碎するとともに、IP6 の表面修飾処理を同時に行った。IP6 は 0, 1000, 4000, 8000, 12000 ppm の濃度を用いた。粉碎後に得られたスラリーを吸引ろ過・凍結乾燥することで「bmIP6-HAp 粉体」を得た。bmIP6-HAp 粉体に対する IP6 吸着量を図 2 に示す。IP6 吸着量は粉碎後のスラリーを遠心分離し、上清に含まれるリン(P)量を測定することで算出した。IP6 濃度の増加に従い IP6 吸着量は増加し、8000 ppm 以上の濃度で飽和吸着に達することがわかった。

つぎに、レーザードップラー法を用いて bmIP6-HAp 粉体の表面電位を測定した(図 3)。IP6 濃度の増加に伴い、表面電位は負電荷側にシフトしていき、8000 ppm 程度で平衡に達していることがわかった。IP6 が HAp 粒子に吸着することにより、HAp 粒子表面の OH^- 基が増加していくためだと考えられる。つぎに、bmIP6-HAp 粉体の Ca/P 比を測定した結果を図 4 に示す。湿式合成 HAp 粉体の Ca/P 比は仕込み組成である 1.67 であった。IP6 濃度の増加に

もない、Ca/P 比が低下していき、IP6 濃度が 8000 ppm 以上で平衡に達することがわかった。これは、IP6 が HAp 粒子に吸着したことにより粉体中のリン(P)量が増加したためと考えられる。IP6 吸着量および表面電位、Ca/P 比の結果はほぼ一致しており、これらの結果より HAp 粉体の IP6 吸着量は IP6 濃度が 8000 ppm 以上になると飽和に達すると考えられる。

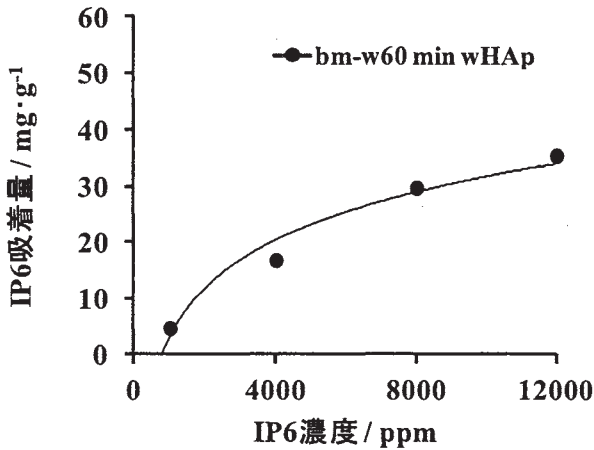


図2 湿式合成 HAp 粉体の IP6 吸着量

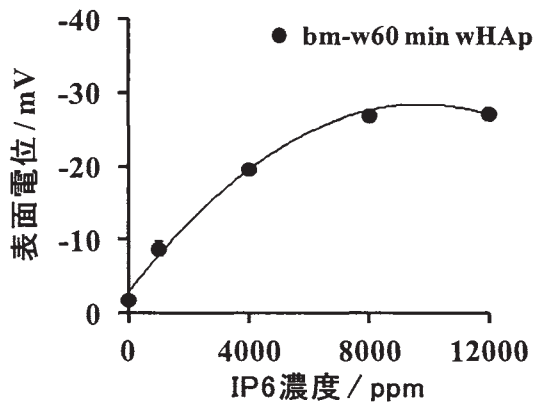


図3 湿式合成 HAp 粉体の表面電位

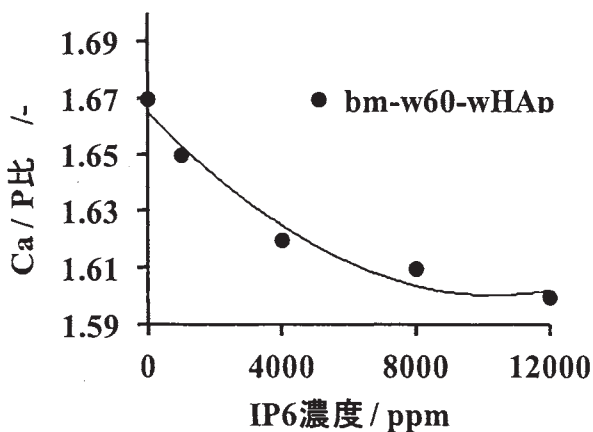


図4 湿式合成 HAp 粉体の Ca/P 比

2. 1. 4 湿式合成 HAp セメントの作製とその評価

0, 1000, 4000, 8000 および 12000 ppm IP6 溶液で表面修飾した bmIP6-HAp 粉体を用いてセメントを作製し、それらの材料特性を評価した。まず、セメントの圧縮強度試験を行った。セメントは純水を混練液として用い、インジェクション可能な固液比で作製した。インキュベータ中で 24 h 養生した後、圧縮強度を測定した。図 5 にセメントの圧縮強度と相対密度の結果を示す。IP6 濃度 0-4000 ppm では圧縮強度が 5 MPa 程度であったのに対し、8000 ppm 以上になると最大強度が 10 MPa と高くなるのがわかった(図 5 上)。また、相対密度が向上するにつれて圧縮強度も向上することがわかった(図 5 下)。

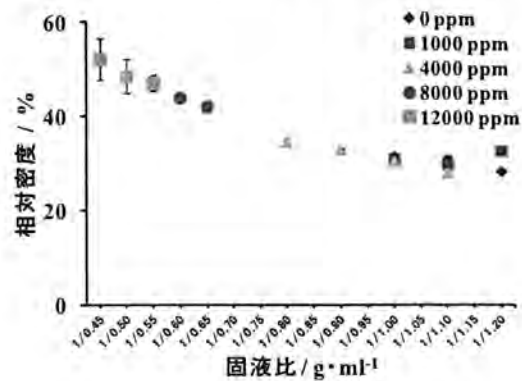
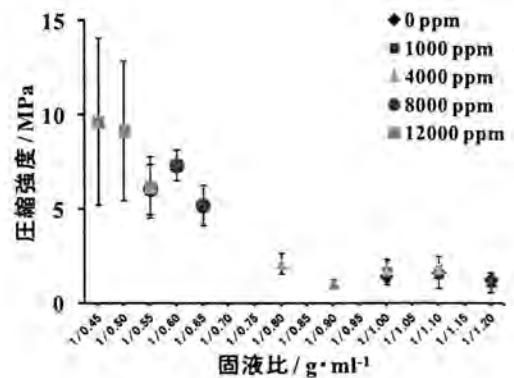


図5 IP6 濃度の異なる湿式合成 HAp セメントの圧縮強度(上)および相対密度(下)

つぎに、セメントペーストのハンドリング性を確認するために、JIST6602[3]に準じてちよう度試験を行った。調製したセメントペーストの上にガラス板を乗せ、セメントペーストの広がり面積からちよう度を算出した。図 6 に湿式合成 HAp セメントの固液比とちよう度の関係を示す。IP6 濃度が高くなるにつれてインジェクションが可能な固液比は高くなり、IP6 の濃度が 8000 ppm 以上になると調製したセメントペーストがより少ない混練液量でペースト状になることがわかった。IP6 中で粉砕と表面修飾を同時に行うことにより、HAp 粉体への IP6 吸着量が増えるため、セメントペースト中では HAp 粒子間の摩擦が減り、より少ない固液比でのインジェクションが可能になったと考えられる。以上のことから、IP6 濃度が 8000 ppm 以

上で粉碎および表面修飾の同時処理をした粉体を用いることで、より少ない混練液量でインジェクション可能なセメントペーストを調製でき、そのセメントは高い圧縮強度を有することがわかった。

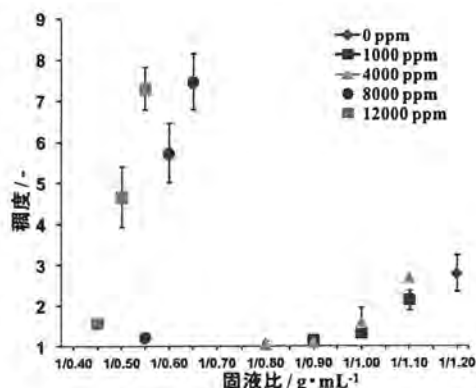


図6 IP6濃度の異なる湿式合成HApセメントペーストの稠度

2.2 非崩壊型湿式合成HApセメントの作製とその評価

2.2.1 セメントの非崩壊性試験

本項では、非崩壊性を担保するためにIP6溶液中で粉碎・表面修飾したbmIP6-HAp粉体および α -TCP粉体の混合粉体を用いてセメントを作製し、それらの材料特性を評価した。粉体は2.1.3項と同様に8000 ppm IP6溶液中で60 min 粉碎したbmIP6-HAp粉体(8000 ppm bmIP6-HAp)を用いた。 α -TCP粉体は純水中で120 min(ϕ 10 mm, 50個)粉碎し調製した。8000 ppm bmIP6-HAp粉体と α -TCP粉体を重量比(8:2)となるようにV形混合機(筒井理学器械製)に入れ、混合した調製粉体を使用した。セメントは2.5 mass% リン酸二水素ナトリウム(NaH_2PO_4)を混練液として用い、固液比1/0.70 [g/mL]で作製した。図7に湿式合成HApセメント崩壊性試験の結果を示す。これまでの従来法[4]で作製したIP6-HApセメント(a), (a')は純水中では硬化していないのに対し、粉碎および表面修飾の同時処理を行った8000 ppm bmIP6-HApセメント(b), (b')は硬化していることが確認された。

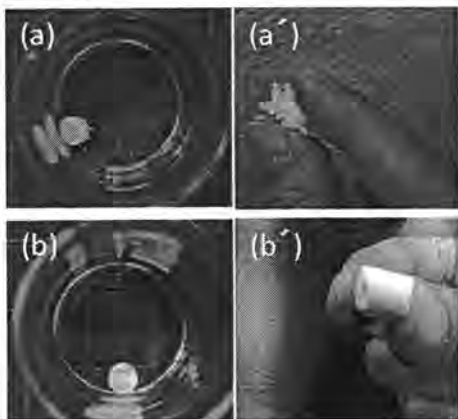


図7 湿式合成HApセメントの非崩壊性試験
(a), (a'): 従来法HApセメント
(b), (b'): bmIP6-HApセメント

2.2.2 混練液に多糖類を用いた湿式合成HApセメントの作製とその評価

本項では、非崩壊性を担保したセメントのハンドリング性および圧縮強度の向上を目的として、セメント作製時に使用する混練液に多糖類を加え検討した。混練液は2.5 mass%リン酸二水素ナトリウム(2.5% NaH_2PO_4)および、2.5 mass% NaH_2PO_4 溶液に10 mass% キトサンGL(10%chit+2.5% NaH_2PO_4), 25 mass%コンドロイチン硫酸(25%cond+2.5% NaH_2PO_4), 25 mass%デキストラン硫酸イオウ5 (25%dex+2.5% NaH_2PO_4)をそれぞれ添加した溶液を用いた。粉体は2.2.1項で混合調製した粉体を用いて、各混練液を固液比1/0.60-1/0.80 [g/mL]となるように加え、混練・成形後、24 h 室温で養生した。

図8にbmIP6-HApセメントの圧縮強度の結果を示す。混練液に多糖類を加えることにより、ハンドリング性および圧縮強度が向上した。混練液に10%chit+2.5% NaH_2PO_4 を用いて作製したセメントは固液比1/0.70において22 MPaであった。これは他の混練液と比較して高い圧縮強度であった。つぎに、混練液に多糖類を添加したセメントの非崩壊性試験を行った(図9)。その結果、混練液に多糖類が含まれていても非崩壊性を担保していることがわかった。

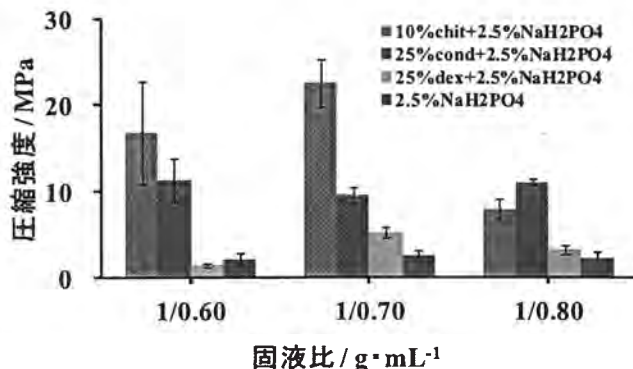


図8 混練液に多糖類を用いたセメントの圧縮強度

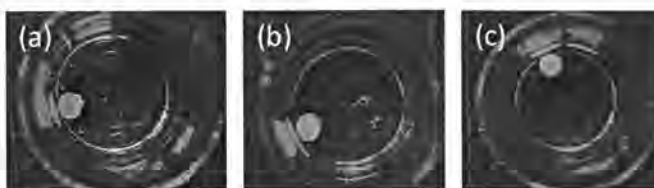


図9 混練液に多糖類を用いたセメントの非崩壊性
(a) 10%chit+2.5% NaH_2PO_4 セメント
(b) 25%cond+2.5% NaH_2PO_4 セメント
(c) 25%dex+2.5% NaH_2PO_4 セメント

つぎに、ギルモア針を用いてセメントペーストの初期硬化試験を行った。測定はJIS規格(JIS T6602)[3]に準じて行った。作製したセメントペーストを容器に均一に充填し、インキュベータ中で養生した。一定時間毎に取り出しギルモア針を静かに下ろし、表面に圧痕がつかなくなるまでの時間を「初期硬化時間」とした。図10にbmIP6-HApセメントの硬化時間を示す。これまでに報告したように、原料

粉体を従来法で調製した IP6-HAp セメントの初期硬化は固液比 1/0.95 の時に 87 min [4]であったが、bmIP6-HAp セメントペーストの初期硬化はどの混練液でも 20 min 以下と大幅に短縮された。調製粉体の IP6 吸着量が増加したこと、またセメント作製時の混練液量が減少したことにより、HAp 粒子がより密になりキレート作用による硬化時間が短縮されたためと考えられる。

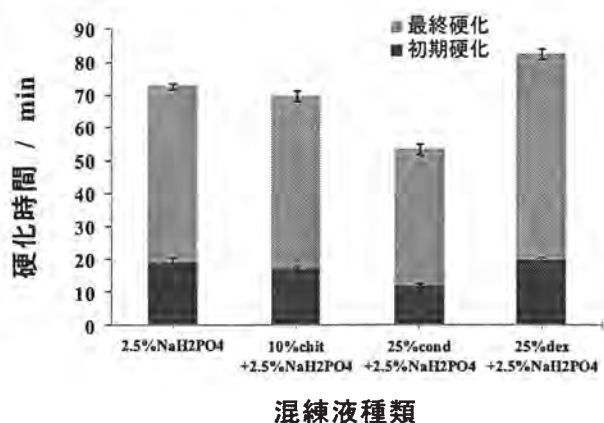


図 10 混練液に多糖類を用いたセメントの硬化時間

以上の結果より、セメント作製時の混練液に 10%chit+2.5%NaH₂PO₄ を固液比 1/0.70 で使用した場合、非崩壊性であり、22 MPa の強度を得られることがわかった。またその初期硬化時間は 20 分以内であった。

3. 考察及び今後の展望

本研究では、湿式合成により得られた HAp 粉体を出発原料として研究を推進している。平成 23 年度は硬化時間の短縮および非崩壊性セメントの作製を目的として、粉碎条件と IP6 表面修飾条件の検討を行った。湿式合成 HAp 粉体をφ2 mm の ZrO₂ を用いて 8000 ppmIP6 溶液中で 60 min 粉碎・表面修飾の同時処理をすることで、より短時間で HAp が微粒子化され、また IP6 吸着量が増加することがわかった。作製したセメントペーストは、より少ない混練液量でインジェクション可能となり、α-TCP を添加することにより、非崩壊性で硬化していることが確認された。10%chit+2.5%NaH₂PO₄ を混練液としてセメントを作製することで 22 MPa という高強度のセメントが得られた。なお、この時セメントペーストの初期硬化時間は 20 min 以内であった。プロジェクトでは、本年度でフェーズ I が終了しており、今後はこれまでの研究実績を基盤とし、生体内吸収性リン酸カルシウムセメントを主体とした、Non-fragmentation を担保したリン酸カルシウムセメントの作製に応用展開していく予定である。

【参考文献】

- [1] M. Aizawa, Y. Haruta and I. Okada, *Arch. BioCeram. Res.*, 3, 134 (2003).
- [2] Y. Horiguchi, A. Yoshikawa, K. Oribe and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 116, 50 (2008).

- [3] 歯科用りん酸亜鉛セメント, JIS T 6602 (1993). 福原元一編集 日本規格協会
- [4] 水本みのり, 佐藤静磨, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤 守, “平成 22 年度研究概要”, (2011) p.36-39.

生体内吸収性リン酸三カルシウムセメントの実用化研究

小西敏功・高橋周平・永田幸平・長嶋比呂志・相澤 守

1. はじめに

近年、ハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp)およびリン酸三カルシウム($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; TCP)は、生体適合性・骨親和性を有することから、バイオセラミックスとして整形外科領域において広く臨床応用されている。しかしながら、それらは顆粒状やブロック状の自形を有することから、補填に際して、欠損形状に合わせて製品形状を選択するか、しばしば製品自身を加工する必要がある。また、顆粒の散乱や欠損部に形状通りに充填できない問題[1]、ある程度大きな手術侵襲は避けられず、患者の負担が大きいという問題などもある。そうしたことから、補填時には小さな孔から注入可能で、体内で欠損形状に合わせて硬化する「ペースト状人工骨(以下、セメント)」が待望され、開発されてきた。

現行のセメントは、酸性のリン酸水素カルシウム(CaHPO_4)と塩基性のリン酸四カルシウム($\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$)から HAp を形成する酸-塩基反応を利用することが多く、硬化に時間がかかるほか、硬化時に pH 変動を伴うため、組織周辺に炎症反応を起こす恐れもある[2]。また、硬化時に血液が介在すると硬化時間がさらに遅れ、硬化しないという報告もある[3]。さらに、酸-塩基反応により形成される上述のアパタイトセメントは生体内でほとんど吸収されない欠点もある[4]。そのため、最終的にホストに吸収されて自家骨と置換するような素材による「生体吸収性ペースト状人工骨」の開発が医療の現場から強く望まれている。

そこで、本研究では、全く新しい硬化メカニズムを導入し、従来の骨修復セメントの問題点を全て解決した「次世代型ペースト状人工骨」を開発する。具体的には、イノシトールリン酸($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$; IP6)で TCP の表面を修飾し、IP6 とカルシウムのキレート結合により硬化する生体吸収性セメントを創製する。このセメントは、IP6 のキレート結合で硬化するため、硬化時間も短く、炎症反応の心配もないほか、化学反応を伴わずに TCP のまま直接硬化するという特長を持っている。

我々は、H22 年度までに β -TCP を出発粉体とした非崩壊性セメントの作製に成功している[5]。以下では、まず、セメントの硬化メカニズムを詳細に検討した。ついで、セメントを作製し、その材料特性を評価した。さらに、セメントの生体適合性を *in vitro* および *in vivo* で評価した。

2. 実験と結果

2.1 セメント原料粉体の調製とその評価

市販 β -TCP-100 粉体 10 g および 3000 ppm IP6 水溶液(pH 7.3) 40 cm^3 、 ϕ 2 mm ZrO_2 ボール(180 g)を遊星型ボールミル内に入れ 1-6 h 湿式粉碎するとともに、IP6 による表面修飾処理を同時に行った。粉碎後に得られたスラリーを吸引過、凍結

乾燥し、表面修飾 β -TCP 粉体を得た。

ここで、例えば 3000 ppm IP6 を用いて、 ϕ 2 mm ZrO_2 ボールで 3 h 粉碎した粉体を「 β -TCP-3h(3000)」とする。

図 1 に調製した β -TCP 粉体の X 線回折(XRD)パターンを示す。粉碎時間 3 h までは、ほぼ β -TCP 単一相であったが、4-6 h の粉碎時間では β -TCP/HAp 混合相であることがわかった。4 h 以上の粉碎時間では、 β -TCP が IP6 中で加水分解されたためである。

次に、トリスヒドロキシメタン-塩酸(Tris-HCl)バッファー(pH7.3)中での β -TCP 粉体の溶解性をカルシウムイオン電極を用いて調べた(図 2)。1-3 h の粉碎時間では、粉碎時間の増加とともに溶解性が高まり、3 h 粉碎粉体(β -TCP-3h(3000))では、最も溶解性が高いことが明らかとなった。一方、4 h の粉碎粉体は 1 h のそれよりも溶解性が低下した。4 h 粉碎粉体は β -TCP/HAp 混合相であり、低結晶性 HAp は中性溶液中で溶解しにくいいため溶解性が低下したと考えられる。

β -TCP の粒子形態を透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察した(図 3)。 β -TCP-0h(3000)はスムーズな表面からなる大きな焼結粒子(図 3a)であり、拡大像(図 3e)から一次粒子は 10 nm 以下であることがわかった。粉碎時間の増加に伴って粒子径が明らかに減少していることが確認できた(図 3 b-d)。また、 β -TCP-2h(3000)および β -TCP-3h(3000)では、それらの粒子表面は β -TCP-0h(3000)と比較して凹凸が増加していた(図 3f および g)。このことから、 β -TCP-2h(3000)および β -TCP-3h(3000)

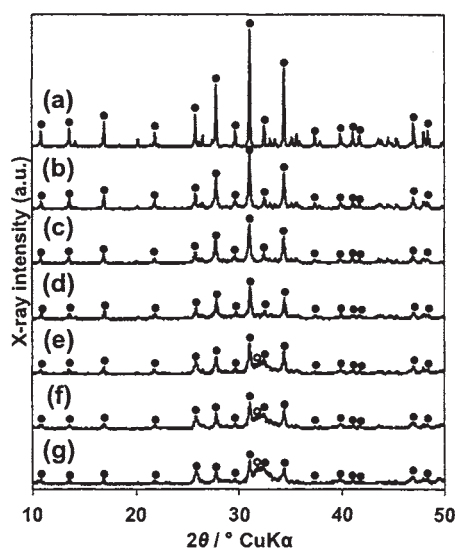


図 1 β -TCP 粉体の XRD パターン

(a) β -TCP-0h(3000), (b) β -TCP-1h(3000), (c) β -TCP-2h(3000), (d) β -TCP-3h(3000), (e) β -TCP-4h(3000), (f) β -TCP-5h(3000), (g) β -TCP-6h(3000). ●: β -TCP, ○: HAp

では、粒子表面は極めて非晶質に近い状態になっていることがわかる。一方、 β -TCP-4h(3000)では、粒子径は減少したものの(図 3d)、その粒子表面は微細な針状粒子の凝集体であることがわかった(図 3h)。これは、IP6 中で β -TCP が加水分解され、低結晶性 HAp 粒子が析出したためであると考えられる。実際に、 β -TCP-3h(3000)と β -TCP-4h(3000)を比較すると、比表面積(SSA)は $19.6 \text{ m}^2/\text{g}$ から $105.2 \text{ m}^2/\text{g}$ に、 β -TCP 粉体中の HAp 含有率は 7.1% から 28.0% に増加することを確認しており、これらの結果は TEM 観察結果とよく一致している。

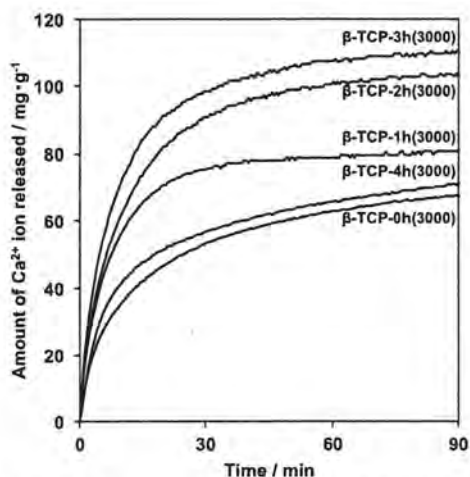


図 2 Tris-HCl バッファーにおける β -TCP 粉体の溶解性

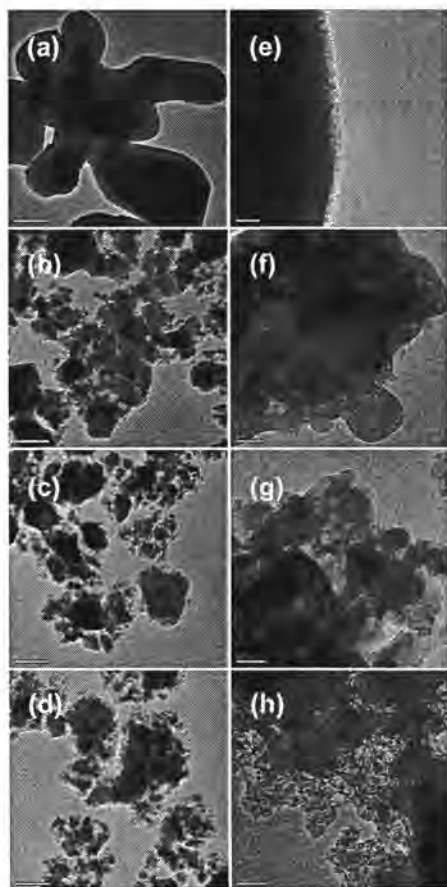


図 3 β -TCP 粒子の TEM 像

(a, e) β -TCP-0h(3000), (b, f) β -TCP-2h(3000), (c, g) β -TCP-3h(3000), (d, h) β -TCP-4h(3000). a-d: 500 nm, e-h: 50 nm.

さらに、粉体性状に及ぼす IP6 濃度の影響を検討するため、粉砕時間を 3 h に固定し、0-10,000 ppm IP6 水溶液(pH 7.3) 中で市販 β -TCP-100 粉体を上記と同様な方法で粉砕した。粉砕後、得られたスラリーを吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾 β -TCP 粉体を得た。調製粉体の XRD パターンを測定した結果、すべての調製粉体で β -TCP 単一相であることが確認できた。また、1000-10,000 ppm IP6 中で粉砕した粉体では、メジアン径および SSA はほとんど変化しないことがわかった。一方で、0 ppm IP6(純水)中で粉砕した粉体の SSA は、IP6 中で粉砕した粉体のそれよりも増加した。このことから、XRD パターンでは検出されなかったが、0 ppm IP6 中で粉砕した粉体表面は微細な HAp 結晶が析出したため、SSA が増加したのかもしれない。

2.2 セメントの作製とその評価

本項では、0 および 1000, 3000, 5000, 10000 ppm で表面修飾した β -TCP-3h 粉体からセメントを作製し、それらの材料特性を評価した。

セメントは、2.5 mass%リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)を混練液として用い、各 β -TCP 粉体に固液比(P/L)が 1/0.5-1/1.1 [g/cm^3]となるように混練液を加え、混練することで作製した。インキュベータ中で 24 時間養生した後、圧縮強度および相対密度、XRD パターンを測定した。また、XRD パターンのピーク強度から HAp 転化率を算出した。さらに、圧縮強度試験後のセメント破断面を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。

図 4 に β -TCP セメントの圧縮強度を示す。圧縮強度は固液比の減少とともに低下した。また、相対密度についても同様な傾向が確認された。最も圧縮強度が高いセメント($13.4 \pm 0.8 \text{ MPa}$)は、 β -TCP-3h(3000) (P/L=1/0.7)であり、その相対密度についても最も高い値(53%)であった。XRD パターン測定の結果から、このセメントの HAp 含有率は 24%程度であった。つまり、粒子同士が密にパッキングされ、高い相対密度となったこと、 β -TCP から HAp への相転移によって、粒子同士の絡まりが起こったことによって高い圧縮強度が得られたと考えられる。

さらに、 β -TCP-3h(3000)セメントの破断面の微細構造を SEM を用いて観察したところ、矢印で示したように未反応の大きな β -TCP 塊(図 5a)および析出した針状 HAp 粒子(図 5b)の

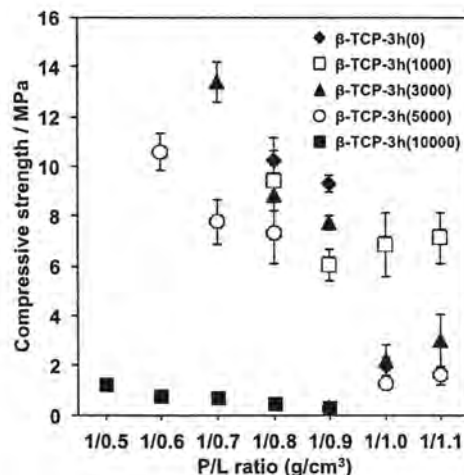


図 4 β -TCP セメントの圧縮強度

存在が確認できた。この結果は、粉碎によって β -TCP 粒子表面に形成した極めて非晶質に近い微細粒子のみが加水分解され、図 5b に示したような針状 HAp に転化することでセメント硬化に寄与し、十分に粉碎されずに残った大きな β -TCP 塊はセメント硬化に寄与しなかったことを意味している。また、 β -TCP-3h(3000)の溶解性が粉碎により高まった結果(図 2)、 β -TCP-3h(3000)セメントは24%程度の HAp を含む結果ともよく一致している。

次に、酢酸-酢酸ナトリウムバッファー中での β -TCP-3h(0)および β -TCP-3h(3000)、 β -TCP-3h(10000)セメントの溶解性をカルシウムイオン電極を用いて調べた(図 6)。溶解性の比較として、純水を混練液として作製した HAp セメント(P/L=1/0.3)も同様に測定した。180 min 浸漬後、 β -TCP セメントは HAp セメントの3倍以上の溶解性を示した。また、IP6 濃度によってセメントの溶解性に違いがあることがわかった。XRD パターンの測定から、IP6 濃度が高くなるにつれて HAp 転化率が抑制される(β -TCP 相の割合が増加する)ことを確認している。そのため、IP6 濃度の最も高い β -TCP-3h(10000)セメントが最も高い溶解性を示したと考えられる。

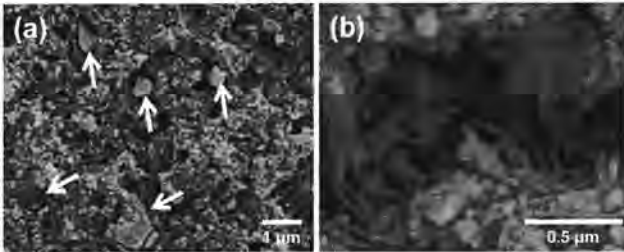


図 5 β -TCP-3h(3000)セメント破断面の微細構造 (a) 低倍像, (b) 高倍像、矢印は未反応の β -TCP

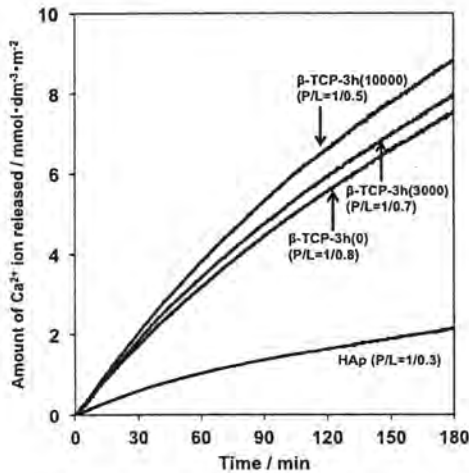


図 6 酢酸バッファーにおける β -TCP セメントの溶解性 (a) Control, (b) β -TCP-3h(0), (c) β -TCP-3h(10000)

2.3 β -TCP セメントの *in vitro* 評価

β -TCP セメント試料片上に細胞を播種し、セメントの細胞毒性を評価した。対照試料には β -TCP-3h(0) (P/L=1/0.2 [g/cm^3]) および β -TCP-3h(3000) (P/L=1/0.2 [g/cm^3])セメントを用いた。図 7 に β -TCP セメント上で培養した細胞の増殖性を示す。コントロール(ポリスチレンプレート)上では、細胞は良好に成長した。

一方で、 β -TCP-3h(0)および β -TCP-3h(3000)セメントでは、1day で細胞数が減少し、3days で播種した細胞数まで増殖後、5days でわずかに増加した。ポリスチレンプレートおよび β -TCP-3h(0)、 β -TCP-3h(3000)セメントの表面粗さは、それぞれ $0.06 \pm 0.002 \mu\text{m}$ 、 $0.27 \pm 0.10 \mu\text{m}$ 、 $0.25 \pm 0.05 \mu\text{m}$ であることから、1day での細胞数減少の要因は、細胞の初期接着によるものと考えられる。また、 β -TCP-3h(0)および β -TCP-3h(3000)セメント上の細胞は5day まで増殖したことから、より長期の培養を行い、細胞増殖性を検討する必要があると思われる。さらに、 β -TCP-3h(0)および β -TCP-3h(3000)セメント間で細胞増殖性に顕著な差が見られなかったことから、3000 ppm IP6 中での β -TCP の表面修飾は細胞に影響を及ぼさないと考えられる。

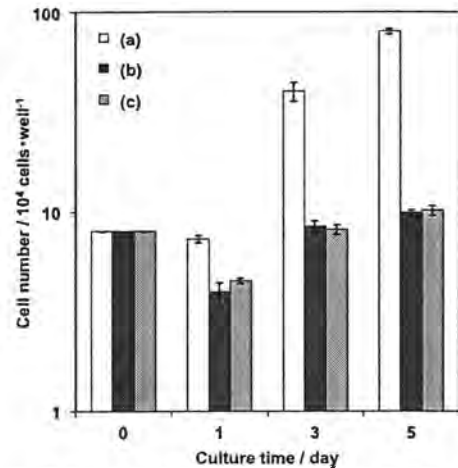


図 7 β -TCP セメント上で培養した細胞の増殖性 (a) Control, (b) β -TCP-3h(0), (c) β -TCP-3h(3000)

2.4 β -TCP セメントの *in vivo* 評価

In vivo での β -TCP セメントの生体適合性を評価するために、 β -TCP-3h(0) (P/L=1/1.0 [g/cm^3]) および β -TCP-3h(3000) (P/L=1/1.1 [g/cm^3])セメントをブタ脛骨骨端部に4週間埋入し、組織学的観察を行った。

図 8 にトルイジンブルー染色した凍結薄切切片像を示す。図 8a および c から、 β -TCP-3h(0)、 β -TCP-3h(3000)両セメントセメント(C)ともに周囲の骨および新生骨と直接結合している様子が確認できる。また、その拡大像(図 8b および d)から、セメントの表面上では破骨細胞(白矢印)による材料の吸収が、セメントとは反対側で骨芽細胞(黒矢印)による骨形成が行われている様子が確認できる。この結果から、埋入した β -TCP-3h(0)、 β -TCP-3h(3000)両セメントは、生体内で骨リモデリングサイクルの状態にあるといえる。さらに、図 8d では、血管や神経が通るハーバース管(*)が形成されつつあることが確認できる。このことから4週間という短い埋入期間でありながらも形成された新生骨は良好に成熟していることがわかる。

以上の結果から、 β -TCP-3h(0)および β -TCP-3h(3000)セメントは良好な生体適合性を有するといえる。

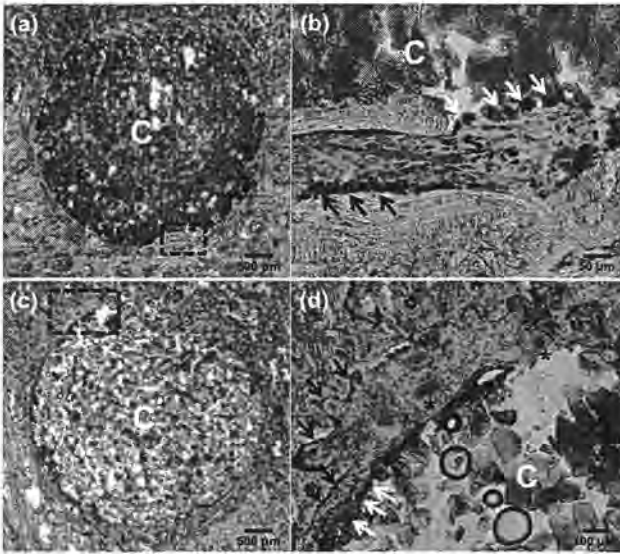


図 8 β -TCP セメントの組織学的観察(TB 染色)

(a, b) β -TCP-3h(0), (c, d) β -TCP-3h(3000). (b)および(d)はそれぞれ(a)および(c)中の拡大像。セメント(C)は周囲の骨および新生骨と直接結合している(a, c)。また、骨芽細胞(黒矢印)による骨形成および破骨細胞(白矢印)による骨吸収が確認できる。(d)では、ハーバース管(*)が形成されつつある。

3. 考察及び今後の展望

生体内で安定な現行のアパタイトセメントや PMMA セメントは、患者の骨代謝や骨格変化に対応できず、アパタイトセメントや PMMA に代わる「生体内吸収性ペースト状人工骨」を開発することは重要な課題であり、医療の現場からも切望されている。

H22年度までに β -TCPをIP6中で粉砕および表面修飾したセメント粉体を用いることで、「非崩壊性セメント」の作製に成功している[5]。しかしながら、その詳細なセメント硬化メカニズムについては、これまでに検討されていない。そこで本研究では、まず、セメントの硬化メカニズムを詳細に検討した。

IP6中での β -TCPの粉砕時間を検討した結果、1-3hの粉砕時間では、粉砕時間の増加とともに β -TCP粉体の溶解性が高まり、3h粉砕粉体では最も溶解性が高いことがわかった。また、TEMを用いた粒子形態観察から、3h粉砕した β -TCP-3h(3000)の粒子表面は極めて非晶質に近い状態にあることが確認された。 β -TCP-3h(3000)および2.5 mass% Na_2HPO_4 を用いて作製したセメント(P/L=1/0.7)から、最も高い圧縮強度(13.4 \pm 0.8 MPa)が得られた。また、24h後のHAp含有率は24%程度(76% β -TCP)であった。このことから、 β -TCP-3h(3000)粒子表面に形成された溶解性の高い非晶質相が、HApへ転化することでセメントは硬化したと考えられる。実際に、 β -TCP-3h(3000)セメントの破断面のSEM観察からも、十分に粉砕されずにセメントの硬化に寄与しなかった大きな β -TCP塊(図5a)および析出した針状HAp粒子(図5b)の存在を確認している。

セメントの溶解性試験では、 β -TCPセメントの溶解性は、HApセメントの3倍以上であった。また、IP6濃度が高くなるにつれてHAp転化率が抑制されることが明らかとなった。その結

果を反映して、IP6濃度の最も高い β -TCP-3h(10000)セメントが最も高い溶解性を示した。この結果から、 β -TCP-3hセメントは*in vivo*での吸収も期待できる。

ついで、セメントの生体適合性を*in vitro*および*in vivo*で評価した。 β -TCP-3h(0)および β -TCP-3h(3000)セメント上での細胞増殖性は、細胞の初期接着の影響を受けて1dayで細胞数が減少したが、3daysで播種した細胞数まで増殖後、5daysでわずかに増加した。より長期の培養を行い、細胞増殖性を検討する必要があると思われる。また、 β -TCP-3h(0)および β -TCP-3h(3000)セメントは、*in vivo*において、骨リモデリングサイクルの状態にあり、優れた生体適合性を示した。

以上の結果から、生体適合性を有する非崩壊型 β -TCPセメントはペースト状人工骨としての応用が期待できる。今後は、非崩壊性および生体適合性を担保した上で、より実用化を意識した高いスペック(圧縮強度・硬化時間・ハンドリング性など)を備えたセメントを作り込む予定である。

一方で、アパタイトセメントは、一度硬化しても術後に荷重に耐えきれず崩壊してしまうこと(fragmentation)が問題視されている[6]。そこでH24年度以降は、この β -TCPセメントがfragmentationを起こさないセメントであるか否かも検証し、「non-fragmentationを担保した非崩壊型 β -TCPセメント」を作り込む予定である。

【参考文献】

- [1] A. R. M. Wittkamp, *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, **46**, 1019 (1988).
- [2] Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takechi, T. Toh, T. Yuasa, M. Nagayama and K. Suzuki, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, **48**, 36 (1999).
- [3] T. Umeda, K. Itatani, H. Endo, H. Takeuchi, K. Mizutani and Y. Musha, *J. Euro. Ceram. Soc.*, **26**, 525 (2006).
- [4] D. Apelt, F. Theiss, A.O. El-Warrak, K. Zlinszky, R. Bettschart-Wolfisberger, M. Bohner, S. Matter, J.A. Auer and B. Von Rechenberg, *Biomaterials*, **25**, 1439 (2004).
- [5] 小西敏功, 高橋周平, 相澤守, “平成22年度研究概要” (2010) p.40-43.
- [6] S. Nouda, S. Tomita, A. Kin, K. Kawahara and M. Kinoshita, *Spine*, **34**, 2613 (2009).

骨誘導能を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発

相澤 守、千布悠貴、中島佑亮、長嶋比呂志、水本みのり、小西敏功、本田みちよ

1. はじめに

骨肉腫や外傷を含む種々の骨の疾患やその治療において病変部を外科的に切除することにより骨に欠損が生じる。この骨欠損部の再建や補填には、現在、①自家骨移植(患者自らの骨を正常部より摘出移植する)、②他家骨移植(骨バンクで保存されている他人から提供された骨を移植する)、③人工骨移植などが行われている。

このうち自家骨移植は移植片に骨芽細胞など骨形成に関わる細胞が多く含まれていることから、皮下や筋肉内など骨のないところで骨形成を促進させる能力、すなわち“骨誘導能”が備わっているだけでなく、力学特性も周囲の骨に適していることから、現在のところ最も効果の望める治療法である。しかしながら、自分の健全な骨の一部を削り取って移植するため、採取部の疼痛や摘出量の制限などの問題が残る。一方、他家骨移植は骨の入手が困難なことと安全性が疑問視されている点から、我が国においてはあまり実施されていない。

そこで、上記の問題を克服させるために開発されたのが、骨の無機成分であり、骨と直接結合する水酸アパタイト(HAp)などの人工骨である。この人工骨は一般に材料を骨の上や中に移植した際に新生骨を材料表面に沿って形成させる能力、すなわち“骨伝導能”を有するものの骨誘導能は保持しておらず、自家骨移植の代替方法となるまでには至っていないのが現状である。

したがって、自家骨に匹敵する骨誘導能を持ち、十分な骨再建を実施できる骨再生医療技術の開発が急務とされている。そこで、本研究では、骨誘導能を備えたペースト状人工骨の開発を指向し、今年度は、① 生体骨の成分に酷似した組成からなる骨ミネラル含有アパタイトから作製したセメント試験片のウサギおよびブタ脛骨埋入による生体内反応の検討および② 骨形成を促進させる生体必須元素「ケイ素」を添加したケイ素含有アパタイトからのセメント試験片の作製とその評価を行なった。

1.1 骨ミネラル含有アパタイト(Bone HAp)

我々の生体骨の無機成分は HAp に類似しているが、生体骨中のアパタイト構造中には、ナトリウムやマグネシウム、炭酸イオンなど多くのイオン種が固溶している。これらのイオン種の固溶はアパタイト構造を歪ませるため、生体骨は多くの欠陥を包含している。我々はその欠陥構造が HAp の生体活性を誘起していると考えており、そのようなナノレベルの欠陥構造を積極的に HAp に導入することができれば、HAp の生体活性を大幅に向上させることが可能であると推測している[1]。

そこで、前年度、次世代型ペースト状人工骨の開発に先立

ち、骨ミネラルを含有した緻密な HAp セラミックス(Bone HAp セラミックス)を試製し、そのセラミックス上でラット骨髄由来間葉系幹細胞(RBMC)を培養し、そのナノ欠陥構造を備えたモデル材料と骨芽細胞との分化誘導について調査したところ、Bone HAp セラミックスが純粋な HAp セラミックスよりも高い骨芽細胞の分化誘導能を備えていることを明らかにした[2]。前年度は、この Bone HAp 粉体からセメント試験片を試作し、それをウサギ脛骨にインプラントし、組織学的評価を行ない、優れた硬組織適合性を有することを明らかにした。今年度は、大型動物であるブタを用いて硬組織適合性を調べたので報告する。

1.2 ケイ素含有アパタイト(Si-HAp)

ケイ素は生体必須微量元素のひとつで、人の健康を保つためには欠くことができない重要な元素である。高等動物の骨格はリン酸カルシウムからなるが、その形成にはケイ素が必須であることがニワトリやラットを用いた研究から明らかにされている[3,4]。ケイ素が不足するとニワトリでは骨格の発達が悪く、頭蓋骨の奇形が生じる[4]。また、Gibson らは Si を HAp に置換固溶させると、HAp の骨伝導性が向上することを報告している[5]。

そこで、本研究では、この骨形成能を促進させると考えられているケイ素を HAp に含有させることにより、骨誘導能を保持した新規のペースト状人工骨の開発を進めている。これまで超音波熱噴霧分解(USSP)法によりケイ素を置換したアパタイト(ケイ素含有アパタイト; Si-HAp)粉体を合成し、得られた粉体のキャラクタリゼーションを行なうとともに、緻密なセラミックスを作製し、その上で骨芽細胞を培養して、作製した Si-HAp セラミックスは細胞毒性がないことを明らかにした[6]。なお、USSP 法は合成粉体の組成制御を行うことが容易であり、水蒸気雰囲気下で直接粉体を合成できるため HAp などの水酸基を含む化合物の合成に有利な方法である。

昨年度は、この USSP 法により合成した Si-HAp 粉体を利用して、キレート硬化型セメントを試作し、その材料特性について調べたが、この方法で合成される微粒子は「球状」であり、所望の材料特性を得るに至らなかった。そこで、本年度は、Si-HAp の合成方法を見直し、湿式法により微細な粉体を合成して、これをセメント原料に適用し、その材料特性と骨芽細胞による *in vitro* 評価を行なったので報告する。

2. 実験と結果

2.1 骨ミネラル含有アパタイト(Bone HAp)セメントの作製とその評価

Bone HAp 粉体は、既報[7]に従って、出発物質として $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KCl , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, H_3PO_4 および NH_4F を用いて湿式法により合成した。 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl および KCl を含む $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 懸濁液を攪拌し、そこにマイクロチューブポンプで $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ および NH_4F を含む H_3PO_4 水溶液を滴下した。得られた白色沈殿を 37°C にて3日間熟成し、ろ過および凍結乾燥して「Bone HAp 粉体」を得た。なお、対照試料として、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ および H_3PO_4 を出発原料として、骨ミネラルを含まない Pure HAp 粉体も同様な方法で合成した。

ついで、得られた Bone HAp 粉体をボールミルを用いて5 min 湿式粉砕し、1000 ppm に調整した IP6 溶液で5 h 表面修飾させた。その後、吸引ろ過、24 h 凍結乾燥させ、表面修飾した粉体(IP6-Bone HAp)を得た。また、対照試料の Pure HAp 粉体にも同様な操作を施した。

上記の IP6-Pure HAp 粉体および IP6-Bone HAp 粉体を用いて、ブタ脛骨インプラント用の試験片(直径4 mm, 高さ7-8 mm)を作製した。まず、IP6-Pure HAp 粉体に固液比(粉体[w]/水[w])が1/0.35 となるように混練液(水)を加え、混練・成形し、24 h 養生して「IP6-Pure HAp セメント」を作製した。同様に、IP6-Bone HAp 粉体を用いて固液比が1/0.40 となるように水を加えて「IP6-Bone HAp セメント」を作製した。作製した IP6-Pure HAp セメントの相対密度および圧縮強度は $43.0 \pm 1.0\%$ および $13.2 \pm 0.6 \text{ MPa}$ であり、IP6-Bone HAp セメントのそれらは $43.1 \pm 0.7\%$ および $13.4 \pm 0.7 \text{ MPa}$ であった。これら2つの試験片の相対密度および圧縮強度はほぼ同レベルであり、*in vivo* 実験に際し、材料間の影響はほとんど無視できるものと考えられる。

セメント試験片の生体硬組織に対する組織反応を調べるために、所定の期間(4, 24 w; 各 n=4)、ブタの左足脛骨骨端部

に埋入した。実験動物には、体重約110 kg, 188 週齢のブタ(Wild type)を用いた。まず、ソムノペンチルを静脈注射により投与して麻酔を行った後、ブタ後肢の膝内側部を切開し、骨膜を剥がして脛骨を露出させ、ドリルで穿孔(4.2 mm ϕ)し、8つのセメント試料片を埋入した。所定の期間経過後(4 w)、周囲の骨組織とともに試験片を取り出し、凍結薄切標本および非脱灰研磨標本を作製し、組織学的評価を行なった。凍結薄切標本では、トルイジンブルー(TB)染色、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色を行なった。

図1はTB染色した組織像である。IP6-Pure HAp および IP6-Bone HAp セメントいずれもセメント周囲での旺盛な骨形成が認められた。また、セメントと新生骨とが直接結合している様子も観察された。今回の組織学的所見では、IP6-Pure HAp よりも IP6-Bone HAp の方がその周囲において、旺盛な石灰化骨の接触が見受けられた。現在、24 w 群については切片を作製中であり、別の機会に報告する。

図2は連続切片を作成し、それらをTB、ALP および TRAP 染色した結果である。TB 染色では新生骨がセメント試料片と結合している様子が確認できる。また、ALP 染色で陽性の部分(←でマーク)は骨芽細胞が、TRAP 染色で陽性の部分(←でマーク)は破骨細胞が存在していることを示している。IP6-Pure HAp および IP6-Bone HAp セメントいずれも ALP 陽性および TRAP 陽性の部分が散見され、これらのセメントが骨のリモデリングサイクルに適応していることが分かった。

今後、追試を行ない、これらの知見を精査していく予定である。

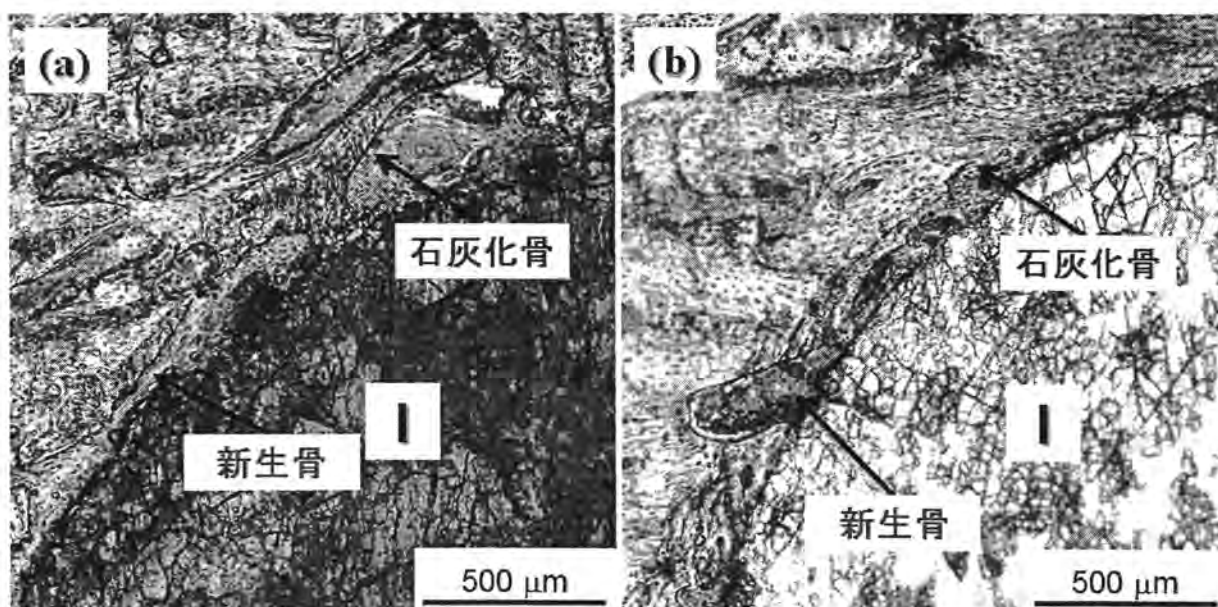


図1. ブタ脛骨に4週間埋入したセメント試料片の組織学的所見(TB染色)
(a) IP6-pure HAp セメント, (b) IP6-bone HAp セメント

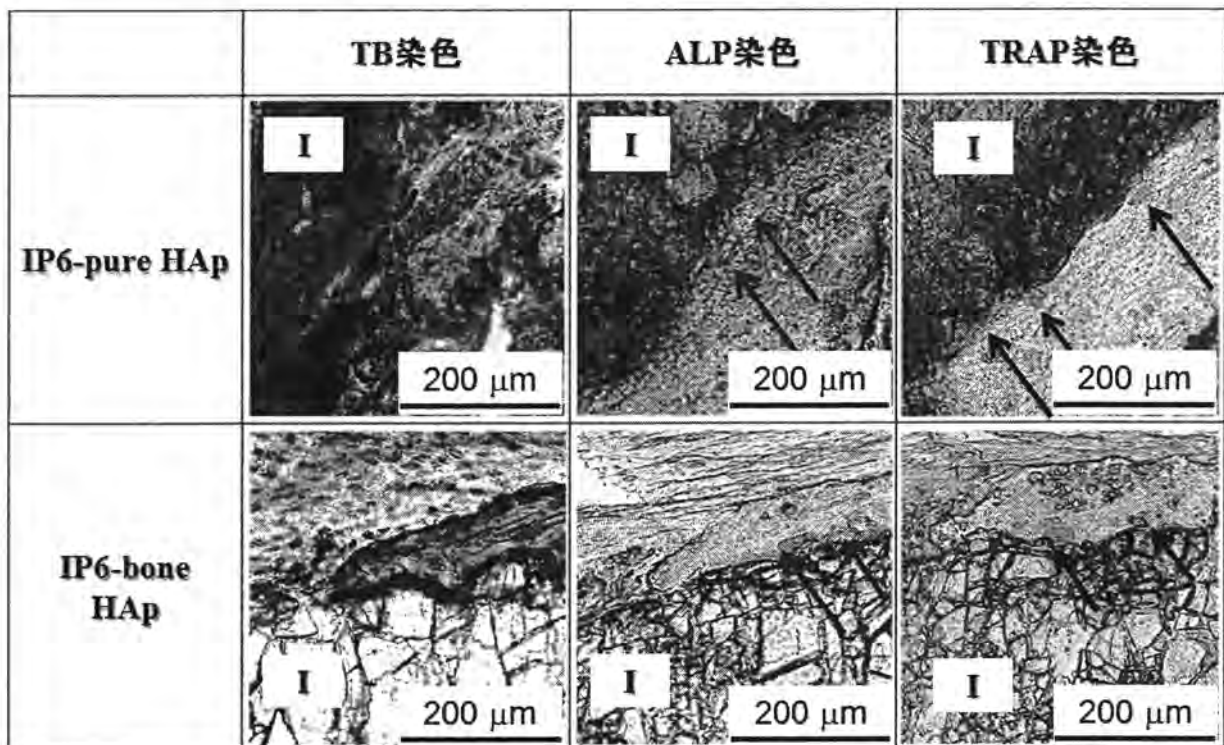


図 2. 骨髄に 4 週間埋入したセメント試料片の組織学的所見 (連続切片を作製後、TB 染色、ALP 染色、TRAP 染色で観察)

2.2 ケイ素含有アパタイト(Si-HAp)セメントの作製とその評価

Si-HAp は湿式法により、水酸化カルシウム(Ca(OH)₂)懸濁液に、オルトリン酸水溶液(H₃PO₄)ならびテトラオルトケイ酸(Si(OC₂H₅)₄:TEOS)混合水溶液を滴下して合成した[8]。仕込みの Si 含有量は 0, 0.4, 0.8, 1.6 および 2.4 mass%とした。得られた粉体は遊星ボールミルを用いて湿式粉碎し、その後 1000 ppm に調製した IP6 溶液 200 cm³ 中で攪拌、表面修飾した。表面修飾された粉体は濾過洗浄後、凍結乾燥した。この IP6-Si-HAp 粉体を原料粉体として粉剤と純水とを固液比(粉/液)が 1/0.4 (w/w)となるように混練しセメント試料片を作製し、圧縮強度試験を行った。

湿式法により合成した Si-HAp はケイ素含有量にかかわらず、全てアパタイト単一相であった。ついで、ICP によって Ca, P, Si の含有量を求めた。これらの粉体には仕込み量に相当する Si が取り込まれていた。また、Ca/P 比は Si 含有量に比例して増加し、Ca/(P+Si)比は Si 含有量にかかわらず一定の値であった。これは Si が P に置換していることを示唆している。

図 3 は作製したセメント試料片の圧縮強度を示している。IP6 による表面修飾前後でセメント試料片の圧縮強度は向上した。また、Si 含有量は IP6-Si-HAp セメントの圧縮強度に大きな影響は与えなかった。

これらの試験片の細胞増殖性の評価は、i) Transwell®を用いた間接試験および ii) 試験片への細胞の直接播種の 2 つの方法で検討した。

まず、間接培養試験では、12 well プレート上に 3.0×10⁴ 個の細胞を播種後、予備培養を 1 日行い、次に Transwell® およびセメント試料片を設置し、5 日間培養した。直接播

種による培養試験では、22 mmφに作製された Si-HAp セメント試料片上に 6.0×10⁴ cells の細胞を播種し、経時的に細胞数をカウントした。いずれの試験も培養培地には 10%FBS を含むα-MEM を使用し、37 °C, 5%CO₂ に維持したインキュベーター内で培養を行なった。培地交換は 1 日毎に行い、回収した培地中の Si 量を高周波誘導結合プラズマ分光分析(ICP-AES)を用いて測定した。

まず、間接培養試験では、いずれの Si 含有量の試験片においても細胞は良好に増殖していた。特に、セメント周辺での細胞増殖が旺盛であることが確認された(図 4)。また、試験片上への直接播種による培養試験では、Si を 0.8 mass%以上含有させた試料片において、特に優れた細胞増殖性を示した。培地中の Si 濃度を ICP により調べたところ、Si の仕込み量に

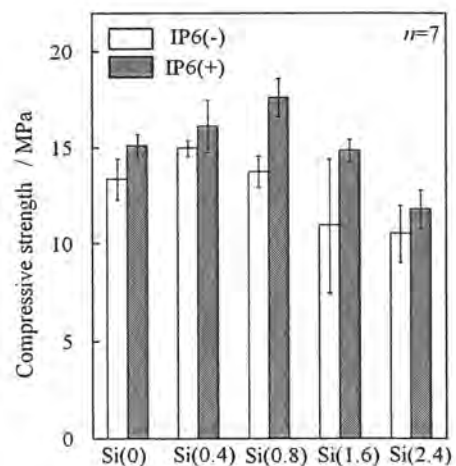


図 3. IP6-Si-HAp セメントの圧縮強度

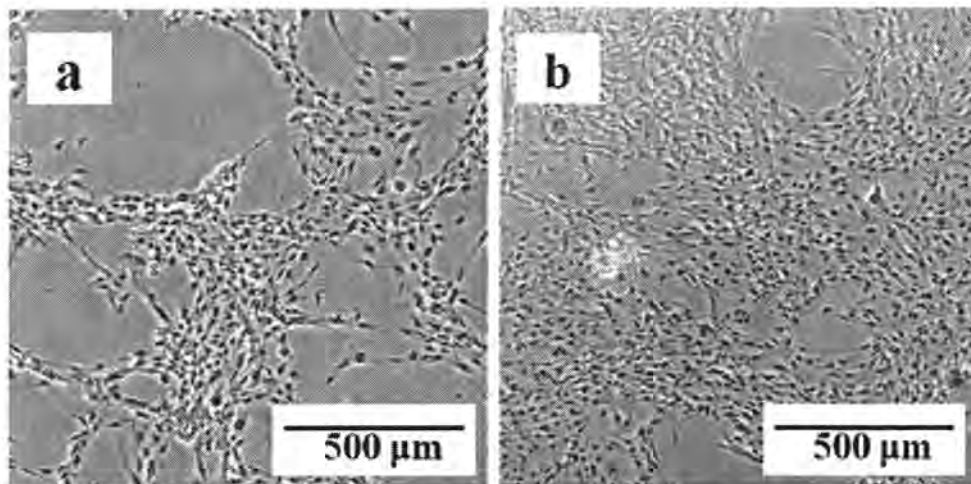


図4. 間接培養試験におけるセメント付近の細胞の光学顕微鏡像:
(a) 仕込み組成: Si = 0 mass%, (b) 仕込み組成: Si = 2.4 mass%

比例して、その濃度は増加した。今回、調べた結果では、培地中に溶出する Si 量が多い試験片ほど細胞増殖性に優れていることが分かった。

以上の結果より、湿式法により合成された Si-HAp 粉体を用いてキレート硬化型セメントが作製できることが分かった。このセメントはより高い生体活性を備えたセメントとして期待される。

3. 考察及び今後の展望

自家骨移植の問題点を解決する目的で生体親和性に優れたリン酸カルシウム系セラミックスを用いた人工骨が開発され、広く臨床応用されている。骨移植に際し、人工骨の利用は年々増加傾向にあるが、人工骨は現在のところ、自家骨の持つ“骨誘導”がまだ備わっていないため、人工骨だけの骨再建は難しい。

そこで、本研究では、生体骨の成分に酷似した組成からなる骨ミネラル含有アパタイトと骨形成を促進するとの報告があるケイ素を HAp に含有させた 2 種のアパタイトを合成した。

骨ミネラル含有アパタイト(Bone HAp)では、これまでにウサギ脛骨にセメント試験片をインプラントし、その生体硬組織反応を比較検討したところ、インプラント 4 週の予備的研究では、骨ミネラル含有アパタイトの方が純粋なアパタイトよりも材料周囲での高い骨形成量が約 1.5 倍も多いことが分かった。これは極めて優れた骨形成能である。また、今回、行なったブタへのインプラント実験においても良好な硬組織適合性を示している。今後は、セメントの材料特性の向上とともに、より詳細な *in vitro* および *in vivo* 評価を進めていく。

また、ケイ素含有アパタイトについては、これまでに超音波噴霧熱分解法により合成したケイ素含有させたアパタイト(Si-HAp)粉体を、別に湿式法で調製したアパタイト粉体と混合して、セメント試験片の試作には成功していた。しかしながら、超音波噴霧熱分解法により合成したケイ素含有させたアパタイトは「球状」であったため、最終的なセメントの強度が目的とする強度に達しない場合があった。そこで、今回は、

Si-HAp 粉体の合成方法を改善し、湿式法により微細な Si-HAp 粉体を合成し、ほぼ目的とする強度を備えたセメント試験片の試作に成功した。また、このセメントは骨芽細胞の増殖性を向上させることも明らかにしている。

今後は、これらの骨ミネラル含有アパタイトおよびケイ素含有アパタイトが骨誘導能を有するかどうか(あるいは従来の HAp を凌駕する骨形成能を備えているかどうか)を大型動物などを用いて評価し、これまでにない“骨誘導能”を保持した次世代型ペースト状人工骨の創製につなげたい。

【引用文献】

- [1] 相澤 守, 神澤信行, 松本守雄, *バイオマテリアル*, **23**, 336-342(2005).
- [2] M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda and H. Yoshimura, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 320-324 (2012).
- [3] K. Schwarz, D.B. Milne, *Nature*, **239**, 333 (1972).
- [4] E.D. Carrisle, *J. Nutr.*, **106**, 478 (1976).
- [5] I. R. Gibson, J. Huang, S. M. Best and W. Bonfield, *Bioceramics*, **12**, 191(1999).
- [6] M. Honda, K. Kikushima, T. Konishi, M. Mizumoto, H. Matsunari, H. Nagashima, M. Aizawa, *J. Aust. Ceram. Soc.*, **47**, 37-41(2011).
- [7] T. Fujino and M. Aizawa, *Archives of BioCeramics Research*, **7**, 175-178(2007).
- [8] Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto and M. Aizawa, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 370-374 (2012).

抗菌性を備えた骨修復セメントの開発

本田みちよ、川延勇介、神澤信行、石井賢、相澤 守

1. はじめに

当該プロジェクトは5つのサブプロジェクトから構成されており、ここでは医者や患者が安心して使用できるような感染を予防できる「抗菌性を備えたペースト状人工骨」を開発することを目的としている。以下、本研究の背景およびその目的について記載する。

微粒子粉体の合成方法の一つである超音波噴霧熱分解法は、合成粉体の組成制御を行なうことが容易であり、さらに内部を中空とするセラミックス微小球を合成することが可能である[1]。我々はこれまでに本法を用いて、水酸アパタイト(HAp)など種々のアパタイト関連化合物の合成に成功している[1]。

HApは整形外科領域で緻密体、顆粒、多孔体、セメントなどの形状で広く利用され、その中でアパタイトセメントは、骨欠損部位の形状に合わせて任意に加工できるという特長をもつ。我々はこれまでにイノシールリン酸(IP6)のキレート作用で硬化する新規なペースト状人工骨(セメント)の開発に成功している[2]。一般的に、リン酸カルシウムは感染に弱いため、我々はこのキレート硬化型セメントに抗菌性を付与させる研究を進めている。この時、抗菌性を発現させるために、セメント原料中へ抗菌性を保持するよう作製した微小球を添加し、セメントを創製する材料設計を考えている。そのために、本年度は2つのアプローチを選択した。より具体的には、セメント原料中に①抗菌性を有する銀を含有させた微小球、②抗菌性を有するプロタミンを吸着させた微小球を各々添加して、セメントを作製した。つまり、本研究では、抗菌性セメントの開発を行うための要素技術の一つとして、①銀含有リン酸カルシウム微小球、②プロタミン担持微小球を各々作製し、それらを用いて抗菌性セメントを開発することを目的とした。特に、本報告では、合成した2つの材料の特性評価およびその抗菌性の *in vitro*, *in vivo* 評価を実施したので紹介する。

2. 実験と結果

2.1 銀含有リン酸カルシウム中空微小球の合成と特性評価

試料溶液は Ca/P 比が 1.67 となるように、 $0.50 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.30 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $0.40 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 および AgNO_3 を混合して調製した。なお、Ag 添加量は HAp に対して 0, 1, 2, 5 および 20 mol% とした。上記の5種類の試料溶液について、熱分解条件を上部電気炉温度 850°C 、下部電気炉温度 300°C とし、超音波振動数は 2.4 MHz に設定して超音波噴霧熱分解を行い、銀含有 HAp (Ag-HAp) 微小球を得た。過剰な硝酸塩は、微小球を合成後、純水中で超音波洗浄することで除去した。これを「洗浄粉体」とした。

Ag⁺ イオンの添加量が異なる5種類の試料溶液 (0, 1, 2, 5 および 20 mol%) から得られた粉体の結晶相を XRD により同

定したところ、Ag⁺イオン添加、無添加の洗浄粉体ともに HAp に帰属される回折ピークのみ認められた。この時、格子定数の値も大きく変動していなかった。また、SEM および TEM による形態観察の結果より、Ag⁺イオンの添加、無添加いずれの場合も、粒子径約 1.0-2.0 μm の球状粒子で構成されていることが確認された (図 1)。さらに、試料粉体について EDX を測定した結果、この粉体には HAp を構成する Ca, P および O に加えて Ag も含まれていることが示された (図 1a-1c)。これらの結果をまとめて考えると、合成した Ag-HAp 微小球中で Ag は HAp 格子内に取り込まれておらず、微小球の表面および内部に分散していることがわかった。

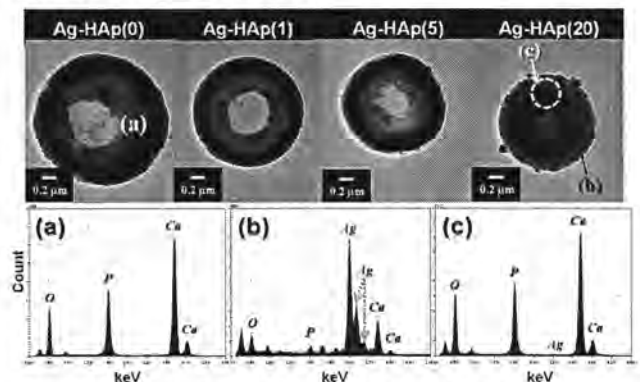


図 1. Ag-HAp 微小球の形態および EDX スペクトル

2.2 銀含有リン酸カルシウム中空微小球からの Ag⁺イオン放出挙動の調査

5種類の Ag-HAp 粉体 0.1 g を 15 cm^3 チューブに秤取り、それに HEPES バッファー (pH 7.3) を 10 cm^3 加えて、Ag-HAp 微小球からの Ag⁺イオン放出挙動調査を 30 日間にわたって行った。Ag⁺イオンの量は、放出試験後に遠心分離を行い、上清に含まれる Ag⁺イオンを ICP-AES により定量した。図 2 に Ag⁺イオンの放出量測定結果を示す。Ag の添加量に比例し、Ag⁺イオンの量が増加していることがわかる。また、時間経過に比例し、総計 Ag⁺イオンの放出量が増加していることが確認できた。さらに、Ca²⁺イオンと PO₄³⁻イオンの放出についても調べたところ、いずれのイオンも時間経過と共にその放出量の増加が観察された。つまり、Ag⁺イオンは表面からだけではなく、微小球の溶解に伴い、内部からも放出されたものであると推測された。以上の結果より、合成した微小球はその溶解性を利用し、Ag⁺イオンを長期にわたり、リリースさせることが可能な材料で、抗菌性セメント開発の出発材料として期待できる。なお、Ag⁺イオン放出試験後の粉体を回収し、特性評価を行ったところ、表面形態には大きな変化はなかったが、Ag 添加量が 5 mol% 以上の粉体では表面に Ag ナノ粒子の存在が確認できた。これは、微小球の溶解により、内部に担持されていた

Ag ナノ粒子が表面に現れたものと考えられる。また、XRD の結果から、結晶相の変化は確認されなかったが、いずれの粉体も結晶性が低下することが分かった。

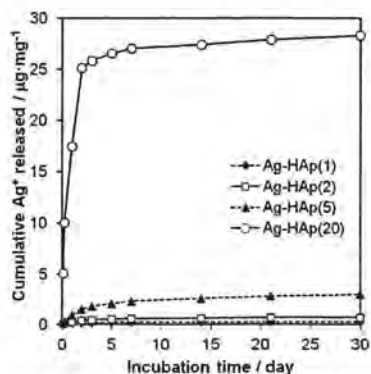


図 2. Ag-HAp 微小球からの Ag⁺イオン放出挙動

2.3 銀含有リン酸カルシウム中空微小球の *in vivo* 抗菌性評価

Ag-HAp(0)および(5) 洗浄粉体 0.35 g に対し、純水を固液比 1 / 0.3[w/v]の割合で加え、直径 10 mm の成形器を用いて、成形圧 100 MPa で一軸加圧成形を行った。24 h 室温で養生後、180°C、3 h の条件で乾熱滅菌を行ったディスクを「IVIS 評価用ディスク」とした。Balb/c 12 w 歳のマウスを用いて皮下ポケット内で「IVIS 評価用ディスク」および 9.6×10^5 CFU · cm⁻³ に調製したメチシリン感受性黄色ブドウ球菌とともに共培養し、所定の時間で IVIS を用いて生物発光イメージング (BLI) を経時的に観察した。さらに、BLI のフォトンカウントから細菌数を定量した。Ag-HAp 微小球を圧縮成形したディスクでの抗菌性を *in vivo* で調査した結果を図 3 に示す。その結果、Ag⁺イオンを添加していないサンプル Ag-HAp(0)では、術後直後から菌数が増加し続けており、抗菌性が発現し

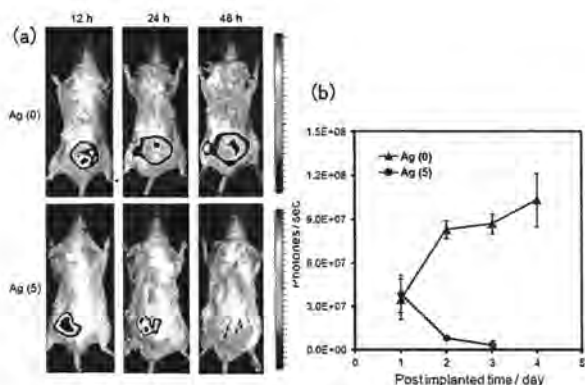


図 3. Ag-HAp 微小球の *in vivo* 抗菌性評価
(a) IVIS による *in vivo* イメージング
(b) 黄色ブドウ球菌の増殖曲線

ていないことがわかる。一方、Ag⁺イオンを添加したサンプル Ag-HAp(5)は術後 2 日目までに菌数が激減しており、顕著な抗菌性を発現していることが分かる。つまり、Ag-HAp ディスクは *in vitro* [3]だけではなく、*in vivo* においても強い抗菌性を発現する優れた材料であることが明らかになった。しかし、現行のディスクでは強度に問題があり、長期的な観察および評価は難しい。また、背部皮下への埋入は感染巣を覆う組織がな

いため、細菌増殖と炎症が局在化せず広く分布してしまう可能性がある。そこで、サンプルの高強度化を図ると共に、*in vivo* における評価方法を検討する必要がある。

2.4 プロタミン担持リン酸カルシウム中空微小球の合成と特性評価

試料溶液は Ca/P 比が 1.50 となるように、 $0.60 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.40 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $0.40 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HNO_3 を混合して調製した。それを熱分解条件を上部電気炉温度 850 °C、下部電気炉温度 300 °C とし、超音波振動数は 2.4 MHz に設定して超音波噴霧熱分解を行い、リン酸カルシウム微小球を得た。得られた粉体を純水で洗浄し、硝酸イオンを除去したものを洗浄粉体として用いた。続いて、洗浄した微小球粉体を抗菌性を有するプロタミン [4] 溶液 (1.0 mg/mL) に加えた後、室温にて一定時間振とうし (120 rpm)、これを遠心分離 (9000 rpm) により、上清と沈殿に区別した。プロタミンはサケ白子より精製されたものを用いた (マルハニチロ提供)。上清のプロタミン濃度を測定することにより、担持前後の溶液の濃度差を求めることで微小球へのプロタミンの吸着量を算出した。一方、沈殿は 24 時間凍結乾燥し、これをプロタミン担持微小球として以降の実験に用いた。なお、上清中のプロタミン量は Bradford 法により測定した。得られた粉体性状については XRD, SEM, X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) などを用いて調べた。

リン酸カルシウム微小球粉体とプロタミン溶液を共に tube へ入れ、振とうさせることにより、微小球へのプロタミン担持を試みた結果、微小球へのプロタミンの吸着量は振とう時間に依存して増加し、反応 24 時間程度でほぼ一定となることが分かった。吸着後のプロタミン担持微小球粉体の結晶相を XRD により同定した結果、担持前の微小球と同様に、HAp および β -TCP に帰属される回折ピークが認められた (図 4)。しかし、プロタミン溶液と微小球粉体とを 24 時間反応させたため、 β -TCP は水和反応により一部が HAp へ相転移した。また、プロタミン担持後の粉体は担持前に比べ、結晶性が低下することが分かった。

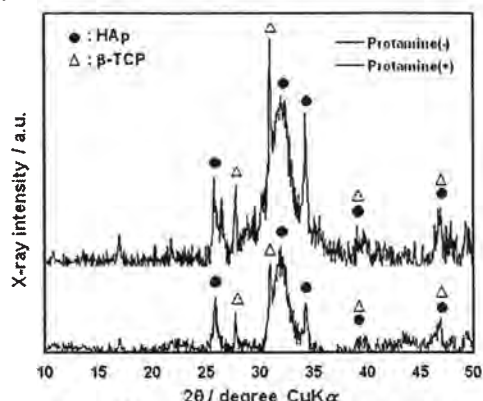


図 4. プロタミン担持微小球の XRD パターン

次に、粉体形態を SEM により観察した結果、粉体はプロタミンの有無に関わらず、球状粒子であった (図 5)。しかし、プロタミン担持微小球は微小球表面にプロタミンのコーティング膜状の層が形成された上に、 β -TCP が HAp へ転移したことにより、針状の析出物が観察された。この粉体の表面電位

(ζ -potential)を測定した結果、プロタミンを担持させたことにより、 ζ -potential は吸着したプロタミンに相応して、正電荷側へシフトした。吸着および表面電位の結果から、プロタミンは微小球粉体に吸着していると考えられる。そこで、プロタミンと微小球との吸着挙動を詳細に調べるためにXPSによりプロタミン微小球の表面状態を解析した。その結果、N 1s スペクトルにおいてプロタミン担持微小球は、コントロールのリン酸カルシウム微小球に比べ強いピークが認められた。さらに、このN 1s スペクトルを詳細に解析した結果、プロタミンに由来するアミド態窒素、アミノ態窒素、アンモニア態窒素のピークが確認され、プロタミンと微小球との吸着が裏付けられる結果となった。この吸着は微小球の HAp もしくは β -TCP のリン酸基(PO_4^{3-})とプロタミンのアミノ基(NH_2^+)がイオン結合したものと推測される。

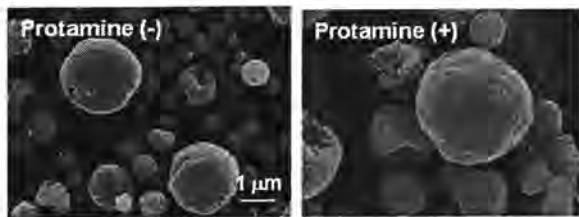


図 5. プロタミン担持微小球の表面形態

2.5 プロタミン担持リン酸カルシウム中空微小球の *in vitro* 抗菌性評価

プロタミンは微生物に対する抗菌性を保持していることから、リン酸カルシウム微小球へ担持させた場合にも同様に抗菌性を示すことが期待できる。そこで、プロタミン担持微小球粉体からセメントを作製し、その抗菌性を阻止円法を用いて評価した。その結果、予想に反して阻止円の形成は認められず、抗菌活性を示さなかった(data not shown)。これは、プロタミンが微小球へ吸着しているため、寒天培地中へ放出されるプロタミン量が僅かとなり、阻止円を形成することができなかったと考えられる。そこで、抗菌性の評価方法を変更し、バイオフィーム形成の有無でプロタミン担持微小球の抗菌性評価を行った。詳細な実験方法は以下の通りである。黄色ブドウ球菌を LB 培地中で 18 時間前培養し、これを $\text{OD}_{600}=0.05$ となるよう希釈した。希釈した菌液 1.2 mL を 24 well plate へ設置したセメント上へ播種し、25°C インキュベータ中で 24 時間静置培養した。培養後、バイオフィームの形成を評価するために LIVE/DEAD BacLight dye で黄色ブドウ球菌を染色し、蛍光顕微鏡により菌の生死の状態を観察した。サンプルには、プロタミン担持微小球粉体及び β -TCP 粉体からなるセメントを用いた。具体的には、プロタミン担持微小球粉体と β -TCP 粉体を重量比 1:1 となるよう混合した粉体をセメントの原料粉体とし、この粉体を固液比 1/0.3 (w/w)となるよう 2.5 mass% Na_2HPO_4 と混練後、100 MPa で一軸加圧成形し、 $\phi 15\text{mm}$ のセメントを作製した。

その結果、コントロールの β -TCP セメント上では、菌が大量に付着しバイオフィームが形成されたのに対し、微小球との混合セメント上では菌が僅かにしか存在せず、バイオフィームの形成を阻害できた(図 6)。これはセメントからの僅かな未吸着プロタミンの放出と微小球に吸着したプロタミンと菌とが接触するこ

とで細胞内の電子分布の不均衡が起こることにより細胞壁が破壊され、バイオフィームが形成されなかったものと考えられる。



図 6. バイオフィーム形成法による抗菌性評価

3. 考察及び今後の展望

本研究では、超音波噴霧熱分解法を用い、銀含有リン酸カルシウム中空微小球およびリン酸カルシウム中空微小球を合成し、 β -TCP 粉体と混合してセメントを作製した。銀含有リン酸カルシウム中空微小球はキャラクタリゼーションの結果より、合成したすべての Ag-HAp 粉体が、HAp に帰属される回折ピークのみ認められたため、 Ag^+ イオンの添加量の増加に伴う結晶相の変化はないと考えられる。さらに、HAp 格子内に Ag を取り込んでいなく、微小球中に分散していることがわかった。そして、Ag-HAp 粉体は微小球が溶解することにより、 Ag^+ イオンを放出するため、長期にわたり Ag^+ イオンを徐放可能な材料であることが確認された [3]。さらに、その徐放量については、黄色ブドウ球菌に対する Ag^+ イオンの最小殺菌濃度 (0.0078 ppm)、最小発育阻止濃度 (2.0 ppm) [5]と比較すると、HEPES 中で 48 時間後に Ag-HAp 粉体から溶出した Ag^+ イオン濃度は、Ag-HAp(1)では 1.5 ppm であり、Ag-HAp(2)では 4.2 ppm であることから、Ag-HAp(2)、Ag-HAp(5)および Ag-HAp(20)サンプルは、十分に抗菌作用を発現するサンプルであると考えられる。実際、*in vivo* における抗菌性試験でも埋入 48 時間後には菌の増殖が著しく低下したことから、Ag-HAp 粉体は優れた強い抗菌性を有することがわかる。しかし、銀ナノ粒子の毒性は、銀ナノ粒子自身のサイズと形状が毒性をもたらすのか、あるいは、銀ナノ粒子が銀イオンを放出するために毒性をもたらすのか定かではないが、銀ナノ粒子の毒性について議論がある[6]。本研究においても Ag-HAp の培養細胞に対する影響を今後十分に検討する必要がある。

一方、プロタミン担持微小球は、リン酸カルシウムの有する静電相互作用により、HAp もしくは β -TCP のリン酸基(PO_4^{3-})とプロタミンのアミノ基(NH_2^+)のイオン結合により吸着が起こっていると推測される。このプロタミン担持微小球は、阻止円法による抗菌性評価の結果からも分かるように、抗菌剤であるプロタミンを放出せずに、その抗菌性を発揮する。これまで、抗菌性を有する生体材料の多くは、プロタミンなどの抗菌剤や抗生物質を多孔質の材料などから徐放することによりその抗菌性を発揮するものが多かったのに対し、本研究で作製したセメントはプロタミンがリン酸カルシウム微小球の表面上に徐放されないように吸着されているので、時間が経過しても該物質が枯渇することなく、継続的に抗菌効果を発揮する可能性が高い。その結果、遅発性感染によるバイオフィームの形成を防止することができると考えられ、骨や歯のインプラントを用いる医

療分野に大いに貢献するものと期待できる [7]。

以上のことから、本研究で合成した微小球は、キレート硬化型セメントに抗菌性を付与させるための有用な DDS キャリアとなり得ると評価できる。また、本微小球に他の抗菌剤を添加することで、さらなる高機能材料を創製できると考えられる。今回作製した 2 つのセメントはそれぞれ薬剤を徐放し、殺菌するタイプと吸着した薬剤と菌が接触し、細胞内の電子分布の不均衡が起こることにより殺菌するタイプに大別できる(図 7)。特に、後者のプロタミン微小球セメントは、菌と接触することによりその抗菌性を発現することが可能な上に、微小球からのプロタミンの放出は僅かであることから、安全性も非常に高いと考えられる。したがって、本研究で作製した「プロタミン担持リン酸カルシウム微小球」はバイオフィーム形成を阻害可能な優れた生体材料として活用されることが期待できる。

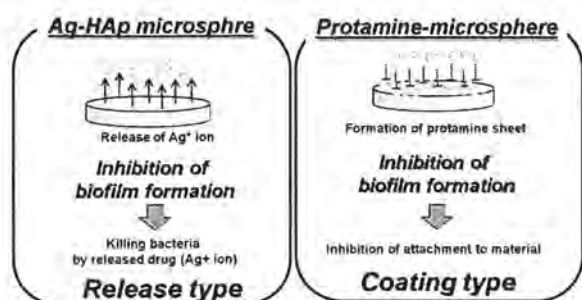


図 7. 抗菌性セメントの作用メカニズム

今後は、作製した 2 つのリン酸カルシウム微小球セメントをモデル動物へインプラントし、長期的な抗菌性試験を実施し、その有効性を評価する。また、菌だけではなく、細胞に対する毒性についても検証する必要がある。

【参考文献】

- [1] M. Aizawa, K. Itatani and I. Okada, *Phosphorous Res. Bull.*, **20**, 61 (2006).
- [2] Y. Horiguchi, A. Yoshikawa, K. Oribe and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 50 (2008).
- [3] Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, and M. Aizawa, *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 678 (2012).
- [4] T. Fukushima, J. Ohno, R. Imayoshi, M. Kawaguchi, Y. Doi, K. Kanaya, M. Mitarai, *Dent. Mater. J.*, **29**, 529 (2010).
- [5] 菊池靖志, *まてりあ*, **39**, 146 (2000).
- [6] C. Carlson, SM Hussain, et al., *J. Physical. Chem. B*, **112**, 13608 (2008).
- [7] 特願 2012-026921・本田みちよ、相澤守・「抗菌性材料」・財団法人神奈川科学技術アカデミー・2012.2.10

抗腫瘍効果を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発

本田みちよ、相澤 守

1. はじめに

日本人の死亡原因の第一位はガンで、現在では死亡数の30%を超えて、3人に1人はガンで死亡する状況であり、社会問題ともいえる。そのガンは様々な組織から血管を通過して、骨に転移する可能性を持っている。骨転移を起こすと疼痛や脆弱化による病的骨折を引き起こし、quality of life (QOL)が著しく低下する。疼痛、麻痺の進行や病的骨折を起こしてしまった場合には、早期の離床を目指し、骨修復セメントで補強する治療を基本とし、症状に合わせ様々な人工材料で再建する治療方法が行われている。

そこで、近年、病変部の骨欠損に移植するために様々な材質、形状の人工骨が開発されている。水酸アパタイト(hydroxy apatite; HAp)に代表される骨充填剤には、緻密体、多孔体、顆粒、セメントなどがあるが、中でも任意の形状に成形可能なセメントは臨床現場からのニーズも高い。しかしながら、現在臨床現場で利用されているセメントは硬化時における力学特性や生体適合性を含め、多くの問題を抱えているのが現状である。そこで、本プロジェクトでは現状の硬化時の問題を解決するために、「イノシトールリン酸(inositol hexaphosphate; IP6)」のキレート作用を利用して従来の反応とは異なったメカニズムで硬化する新規の骨修復セメントの開発を試みている。

この IP6 は米や小麦、豆類などの穀物繊維に多く含まれ、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)に匹敵するほどの強いキレート能を有しており、様々な金属イオンを強く結合する。IP6 は多くの動植物の細胞内に普遍的に発現し、細胞の増殖や分化など極めて重要な細胞機能を制御していると考えられている。また、抗酸化作用や高度の抗腫瘍効果を示すだけでなく、化学療法、薬物療法を含む現在のガン治療法の多くで問題となっている重篤な副作用を引き起こしにくい物質と考えられており、ガン治療への応用が期待されている[1]。

本研究では、IP6 の持つ利点を応用し、従来の骨修復セメントを用いた「骨の強度を高め、疼痛緩和させる治療」に使用するだけでなく、「転移したガン細胞の増殖抑制やガンの予防など」を付加し、単なる骨セメントとしてではなく、その用途を拡充させた高機能セメントを作製し、その有用性を生物学的に証明することを目的としている。本年度は湿式法[2]により合成した粉体(wHAp)を用いてセメントを作製し、さらにセメント上での細胞応答性について分子生物学的手法を用いて調査した。具体的には、様々な濃度の IP6 溶液で表面修飾した IP6-wHAp 粉体を用いて、IP6-wHAp セメントを作製し、セメント上でターゲットとなる骨の腫瘍細胞であるヒト骨肉腫由来細胞(human osteocarcinoma; HOS)を培養することにより、IP6-wHAp セメントに対する HOS 細胞の応答性を生物学的に検証した。また、細胞種により IP6-wHAp セメントに対する感受性が異なることが考えられるため、正常骨芽細胞のモデルとし、

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を IP6-wHAp セメントへ播種し、その細胞形態や増殖性についても調査した。

2. 実験と結果

2.1 セメント原料粉体の調製とセメントの作製

セメント原料粉体には、湿式法により合成した水酸アパタイト(wHAp)を用い、その粉体を 1000, 2000, 3000, 5000 ppm に調製した IP6 溶液中で 5 h 表面修飾した。その後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾 wHAp 粉体(IP6-wHAp)を得た。XRD パターンより、表面修飾に用いた IP6 溶液の濃度に関わらず、得られた粉体はいずれも HAp 単一相であり、IP6 による表面修飾は粉体の結晶性に影響を与えないことを確認した。さらに、wHAp 粉体に対する IP6 の吸着量について調べたところ、IP6 は wHAp 粉体に対しても典型的な Langmuir 型の単分子層吸着し、5000 ppm 以上で飽和に達することが示された。この結果は、昨年度実施した HAp-100 粉体を用いた場合と同様な結果であったが、湿式合成した wHAp の方が粒子が微小化されたことから、粉体に対する IP6 吸着量は増加した。しかしながら、IP6 の粉体への吸着様式は粉体の種類を問わず Langmuir 型の単分子層吸着であり、同様であることが分かった。また各種評価を行うために、固液比が $1/0.3$ [g/cm^3] となるように、IP6-wHAp 粉体と水を混練し、一軸加圧成形することにより、セメントを作製した。なお、各セメントの表面粗さはほぼ一定となるよう作製した。

2.2 セメントにおける細胞応答性

各セメント試料片における細胞の増殖性を調べるために、ヒト骨肉腫細胞(HOS)をセメント($\phi 22$ mm)上へ 6×10^4 cells となるように播種し、CO₂ インキュベータ内で一定期間培養した後、細胞数をカウントすることにより増殖曲線を作成した(図 1)。

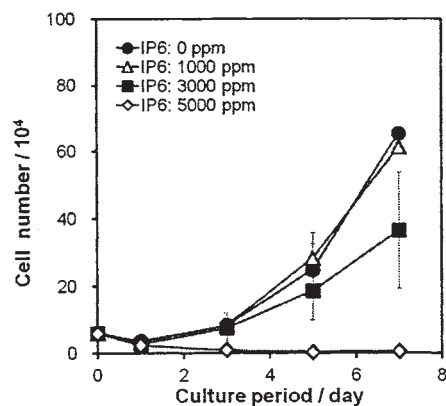


図 1. IP6-HAp セメント上での HOS 細胞の増殖曲線

その結果、1000 ppm IP6 溶液で表面修飾した粉体(1000IP6-wHAp)を用いて作製したセメント上で培養した HOS

細胞は表面修飾をしていない wHAp セメント上で培養した細胞と同程度の増殖性を示した。これに対し、3000IP6-wHAp セメントにおいては、5 日目以降増殖性が低減し、培養 7 日目における生細胞数は wHAp に対し、57.06%にまで低下した。一方、5000IP6-wHAp セメントでは、培養 3 日目より著しくその増殖性が低下し、wHAp に対し 3 日目では 11.06%、5 日目は 1.42%、7 日目は 1.12%にまで細胞増殖が抑制されていた。次に、この時の細胞形態について細胞骨格タンパク質であるアクチンをファロイジンによりを染色し、落斜型蛍光顕微鏡で観察した(図 2)。その結果、培養 3 日目以降 3000 ppm 以上の IP6 で表面修飾したセメント上では細胞数が著しく減少していたのが分かる。さらにそれらの形態を詳細に観察したところ、細胞膜が崩壊したものや楕円形や紡錘形に変形した細胞が多く認められ、形態に異常が見られる細胞が多数存在することが明らかになった。また、播種 1 日後に関しても 3000、5000IP6-wHAp セメント上で培養した場合は細胞増殖が抑制された(data not shown)。しかし、その増殖抑制率は 3 日目以降に比べると小さかった。これらの結果より、セメント上での細胞増殖性に関しては、初期の培養環境に加え、培養過程における環境の変化が大きく影響することが考えられた。

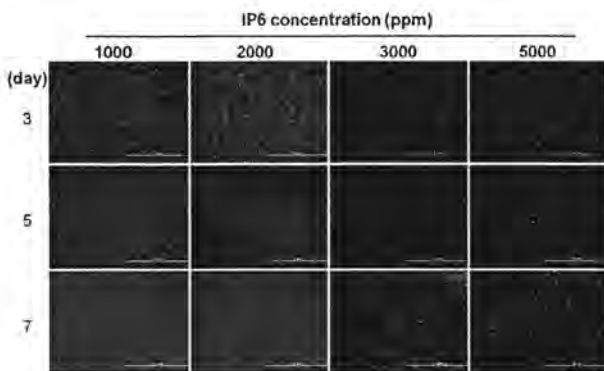


図 2. IP6-HAp セメント上での HOS 細胞の形態観察

次に、細胞増殖性に最も違いが認められた 5000IP6-wHAp セメントと wHAp および 1000IP6-wHAp セメントにおける HOS 細胞の遺伝子発現変動について、DNA マイクロアレイを用いて解析した。各セメントに HOS 細胞を播種し、24 時間培養した細胞から得た cDNA を解析用のサンプルとした。その結果、変動が認められた遺伝子群は、1) 細胞間シグナル伝達・細胞増殖や分化・形態形成など生物学的に重要な工程に関わる遺伝子や 2) 細胞内や細胞外・細胞外マトリックスを含む細胞構成成分に関わる遺伝子、また 3) アポトーシス調節・様々な分子との結合・細胞接着分子・転写因子など分子機能に関わる遺伝子と多岐にわたった。中でも、高濃度の IP6-wHAp セメント上で細胞死が誘導されたことから、今回はアポトーシスに関連する遺伝子に注目し、その変動を解析した(図 3)。

アポトーシスが誘導されるには多くの経路が存在する[3]。TNF (tumor necrosis factor) と呼ばれるサイトカインは炎症性サイトカインであると同時にアポトーシス誘導因子(=デス因子)としても知られる[4]。今回、この TNF は 5000IP6-wHAp セメント上で培養した細胞において、コントロール(wHAp)と比較し、発現レベルが約 5 倍に増加した。また、それに伴い TNF 受容

体の発現レベルも増加した。これらの現象は 1000IP6-wHAp セメントにおいては確認されていないことから、高濃度の IP6 で表面修飾した際にアポトーシス誘導因子である TNF の発現が亢進するということが示された。次に、アポトーシスを促進する遺伝子(Bax)及び抑制する遺伝子(BCL-2)に注目した。マイクロアレイの解析による結果、5000 IP6-wHAp セメント上で培養した HOS 細胞において、Bax はコントロールに対し 2.63 倍、BCL-2 は 0.226 倍の発現レベルであった。つまり、5000 ppm IP6 溶液で表面修飾したセメントで HOS 細胞を培養することにより、アポトーシスが促進されたことが分かる。また他のアポトーシス誘導因子も複数発現レベルの向上が認められた。しかしながら、アポトーシスの検出によく使用される caspase 群[5]の遺伝子発現に関しては、caspase14 のみ増加が認められたが、他は増加せず、むしろ減少していた。高濃度の IP6 で wHAp 粉体を表面修飾した場合、アポトーシスが誘導されることは確かであるが、24 時間の培養時間ではカスケードの最終ポイントまで達していない可能性もある。調べる遺伝子を絞り込み、時系列を追って遺伝子発現を定量することにより詳細を解明することが重要であると考えられる。

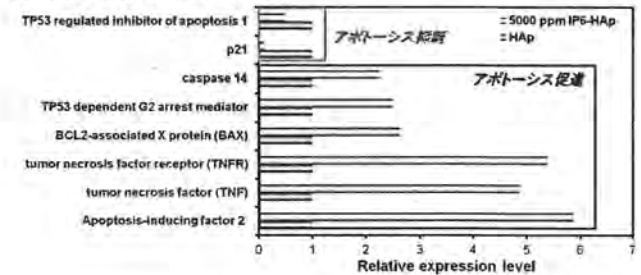


図 3. IP6-HAp セメント上での遺伝子発現変動(アポトーシス)

2.3 セメントと細胞の相互作用

2.2 節の結果より、3000 ppm 以上の IP6 溶液で表面修飾した粉体を用いて作製した IP6-wHAp セメント上で HOS 細胞を培養すると、細胞形態の異常、細胞増殖の抑制が生じ、アポトーシスに関連する種々の遺伝子発現に変動が認められることが分かった。そこで、セメント上で確認されたアポトーシスを介した抗腫瘍性という機能がどのように発現されているのかということについて検証するために、2.1 節で作製した IP6-wHAp セメント(1000, 3000, 5000 ppm)を水中に一定時間浸漬させ、溶出する IP6 量について調べた(図 4)。

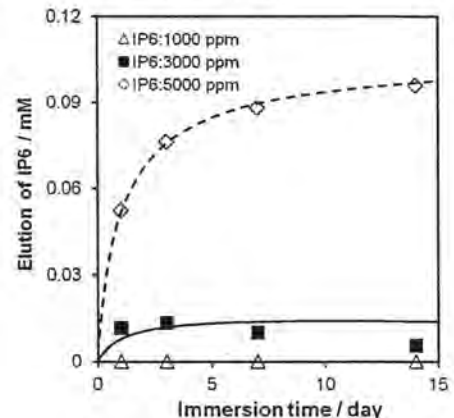


図 4. IP6-HAp セメントからの IP6 の溶出

その結果、1000IP6-wHAp セメントからは IP6 の溶出が認められなかったが、3000IP6-wHAp セメントからは 0.01mM 程度の IP6 が溶出することが分かった。また、5000IP6-wHAp セメントからは約 0.1 mM の IP6 が溶出することが確認された。検出された IP6 は一度 wHAp へ吸着した IP6 が脱着後に溶出したというより、粉体を表面修飾する際に用いた IP6 のうち wHAp 粉体へ未吸着であったものが徐々に溶出したと推測できる。ここで、IP6 溶液単独で HOS 細胞の増殖性に影響を及ぼす濃度が 1 mM 以上であるのに対し、増殖抑制が認められた 5000IP6-wHAp セメントから溶出した IP6 の濃度は最大でも 0.1 mM 程度であり、両者に大きな違いが生じた。この違いは、セメント表面上では溶出された IP6 が局所的に高濃度となり、その IP6 を細胞が取り込んだことで、細胞死が引き起こされたと推測することができる。すなわち、IP6-wHAp セメントにおけるアポトーシスを介した細胞増殖抑制は 1) IP6 の表面修飾によるセメント材料表面の構造変化に対する応答、2) 溶出された局所的に高濃度となった IP6 を細胞が取り込んだことに対する応答により引き起こされたと考えられる。つまりこの時、セメントは薬剤を担持した DDS (drug delivery system) キャリアの様に機能していると思われる(図 5)。

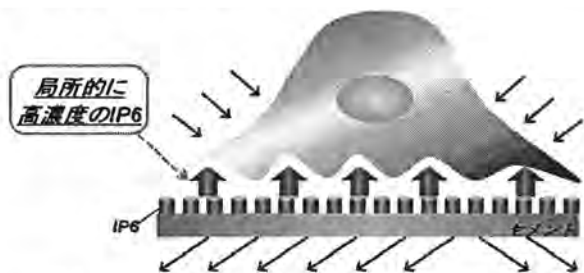


図 5. IP6-HAp セメントからの IP6 の溶出と細胞への作用

続いて、IP6-wHAp セメントに対する応答性が細胞種により異なるという仮説を立て、腫瘍細胞と正常細胞をセメント上で培養することにより応答性を比較した。3000IP6-wHAp セメントへ HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞を播種し、その形態と増殖性について解析した(図 6)。その結果、3000IP6-wHAp セメントにおいて HOS 細胞では増殖抑制、形態異常が誘発されたのに対し、MC3T3-E1 細胞ではそのような異常は観察されず、良好な細胞形態を維持したまま、旺盛な増殖を続けた。つまり、細胞種によって IP6 や IP6-wHAp セメントに対する感受性が異なることが明らかになった。この細胞種による IP6 への感受性の違いを利用し、粉体への表面修飾時の IP6 濃度を変化させ、セメントを作製することで、正常細胞へは影響を与えず、腫瘍細胞のみの増殖を抑制することが可能なセメントの作製が実現できると示唆された。

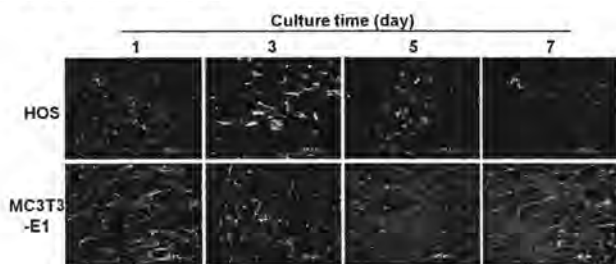


図 6. 細胞種による IP6-wHAp セメントへの応答性の違い

3. 考察及び今後の展望

本研究では、キレート硬化型骨修復セメントの開発において、IP6 の有するキレート能を利用し、新規のメカニズムでセメントの硬化を促進させるだけでなく、IP6 の抗腫瘍効果を応用し、ガン細胞の増殖を特異的に抑制するこれまでにない付加価値を有する高機能性セメントの創製を試みている。

本年度は湿式法により微粒子化した粉体を合成し、IP6 の吸着量を増加させた IP6-wHAp 粉体を調製後、セメントを作製し、そのセメント上での細胞の応答性について解析した。その結果、3000 ppm 以上の IP6 で表面修飾すると細胞増殖性に影響を与え、その細胞増殖抑制はアポトーシスを介した細胞死により引き起こされたものであることがわかった。この時セメントから溶出した IP6 は溶液単独で HOS 細胞の増殖性に影響を及ぼす濃度よりも低濃度であった。この結果は、溶出された IP6 がセメント表面上で局所的に高濃度となり、細胞増殖に影響を及ぼしたと推測できる。つまり、セメント内部の IP6 が徐々に溶出し、DDS キャリア様に機能したことが抗腫瘍性の発現に関与したと考えられる。また、これまでの研究結果より、IP6 の表面修飾に伴った材料表面の構造変化も細胞へ影響を及ぼすことが示唆されており、IP6-wHAp セメントにおいては、2 つの作用が抗腫瘍性に寄与すると思われる。また、正常細胞と腫瘍細胞において IP6-wHAp セメントに対する感受性が異なることが明らかになり、IP6 による表面修飾濃度をコントロールすることにより、細胞の応答性を制御でき、腫瘍細胞特異的に機能性を発現させる材料創製が可能であるということが示された。

今後は、本法を応用し、生体内で吸収されるリン酸三カルシウム系の出発材料を選択し、セメントの溶解と共に IP6 が放出されるような新たな材料設計を行い、より機能性の高いセメントの作製の実現を目指す。

【参考文献】

- [1] I. Veucenic and A.M. Shamsuddin, *J. Nutr.*, 133, 3778 (2003).
- [2] Y. Horiguchi, A. Yoshikawa, K. Oribe and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 116, 50 (2008).
- [3] M.O. Hengartner, *Nature*, 407, 770 (2000).
- [4] H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, *Cell death and differ.*, 10, 45 (2003).
- [5] Y.G. Shi, *Mol. Cell.*, 9, 459 (2002).

業績

【原著論文】

- (1) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Z. Zhuang, and M. Aizawa, "Fabrication of calcium-phosphate cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various concentrations of sodium inositol hexaphosphate and their material properties", *World Journal of Engineering, Supplement 1*, 595-596 (2011).
- (2) Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, and M. Aizawa, "Preparation of silver-containing hydroxyapatite powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its antibacterial property", *Key Eng. Mater.*, 493-494, 678-683 (2012).
- (3) Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "Fabrication of chelate-setting cement using silicon-substituted hydroxyapatite and its property", *Key Eng. Mater.*, 493-494, 370-374 (2012).
- (4) H. Konishi, M. Honda, M. Aizawa, and N. Kanzawa, "Biochemical Studies of the Potential Anti-tumor Activity of Novel Chelate-Setting Apatite Cements", *Key Eng. Mater.*, 493-494, 315-319 (2012).
- (5) M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda and H. Yoshimura, "Hydroxyapatite Ceramics Including Bone Minerals Promote Differentiation of Osteoblasts Derived from Rat Bone Marrow Cells", *Key Eng. Mater.*, 493-494, 320-324 (2012).
- (6) H. Funao, K. Ishii, S. Nagai, A. Sasaki, T. Hoshikawa, M. Aizawa, Y. Okada, K. Chiba, S. Koyasu, Y. Toyama and M. Matsumoto, "Establishment of a Real-Time, Quantitative, and Reproducible Mouse Model of Staphylococcus Osteomyelitis Using Bioluminescence Imaging", *Infect. Immun.*, 80, 733-741 (2012).
- (7) T. Konishi, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Fabrication of Chelate-setting Cement from Hydroxyapatite Powder Prepared by Simultaneously Grinding and Surface-modifying with Sodium Inositol Hexaphosphate and Their Material Properties", *J. Ceram. Soc. Jpn*, 120, 159-165 (2012).
- (8) T. Konishi, S. Takahashi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Oribe, and M. Aizawa, "Effect of the addition of various polysaccharides on the material properties and cytotoxicity of chelate-setting β -tricalcium phosphate cement", *Phosphorus Research Bulletin* (Accepted).
- (9) Z. Zhuang, T. Konishi, H. Yoshimura, and M. Aizawa, "Ultrastructural analysis of hydroxyapatite nano particles synthesized under different initial pH conditions using high-resolution transmission electron microscopy", *Phosphorus Research Bulletin* (Accepted).
- (10) T. Konishi, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Fabrication of chelate-setting cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various sodium inositol hexaphosphate concentrations and their mechanical properties", *Procedia Engineering* (Accepted).
- (11) Z. Zhuang, T. Miki, M. Yumoto, T. Konishi, and M. Aizawa, "Ultrastructural observation of hydroxyapatite ceramics with preferred orientation to a-plane using high-resolution transmission electron microscopy", *Procedia Engineering* (Accepted).

【総説】

- (1) 相澤 守, 小西敏功, 松本守雄, 低侵襲治療を指向したペースト状人工骨の開発, *工業材料*, 60, (2012). (in press)

【口頭発表】

- (1) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Z. Zhuang, and M. Aizawa, "Fabrication of calcium-phosphate cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various concentrations of sodium inositol hexaphosphate and their material properties", 19th International Conference on Composites/Nano Engineering (ICCE-19), 2011/7/27 (Invited).
- (2) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Fabrication of Chelate-setting Cements from Hydroxyapatite Powders Surface-modified with Various Sodium Inositol Hexaphosphate Concentrations and Their Mechanical Properties", IUMRS International Conference in Asia 2011 (IUMRS-ICA 2011), 2011/9/19.
- (3) M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda, and H. Yoshimura, "Hydroxyapatite ceramics including bone minerals promote differentiation of osteoblasts derived from rat bone marrow cells", 23rd International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 2011/11/7.
- (4) H. Konishi, M. Honda, M. Aizawa and N. Kanzawa, Biochemical studies on novel chelate-setting

- apatite cements in antitumor action”, 23rd International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 2011/11/7.
- (5) Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, Z. Zhuang and M. Aizawa, “Preparation of silver-containing hydroxyapatite powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its antibacterial property”, 23rd International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 2011/11/7.
- (6) Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting cement using silicon-substituted hydroxyapatite and its property”, 23rd International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 2011/11/8.
- (7) H. Manabe, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Evaluation of in vitro bioresorbability of chelate-setting calcium phosphates cements”, 11th Asian BioCeramics Symposium (ABC2011), 2011/11/30.
- (8) T. Ganmoto, M. Honda, M. Mizumoto, H. Matsunari, Y. Takeuchi, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Hard tissue compatibility of apatite-fiber scaffold with enhanced mechanical property using pig model by implanting into tibia”, 11th Asian BioCeramics Symposium (ABC2011), 2011/11/30.
- (9) Z. Zhuang, M. Yumoto, T. Miki, T. Konishi, and M. Aizawa, “Development of Hydroxyapatite Ceramics with Preferred Orientation to a-plane”, 11th Asian BioCeramics Symposium (ABC2011), 2011/12/1.
- (10) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Z. Zhuang, and M. Aizawa, “Effect of concentration of inositol hexaphosphate on material properties of chelate-setting apatite cement”, 11th Asian BioCeramics Symposium (ABC2011), 2011/12/2.
- (11) 本田みちよ, 小西敏功, 水本みのり, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 相澤 守, 「ケイ素含有アパタイトセラミックス上でのクサビラオレンジブタ頭蓋骨由来骨芽細胞の骨分化過程の解析、無機マテリアル学会第122回講演会、2011/6/2
- (12) 鷹本拓也, 本田みちよ, 水本みのり, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤 守, 「ブタの脛骨埋入による高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの生体適合性評価」、第20回硬組織再生生物学会学術大会、2011/8/27
- (13) 本田みちよ, 小西敏功, 水本みのり, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 相澤 守, 「クサビラオレンジブタ頭蓋骨由来骨芽細胞の単離とその生物学的評価」、第20回硬組織再生生物学会学術大会、2011/8/27
- (14) 小西敏功, 水本みのり, 本田みちよ, 相澤 守, 「種々のイノシトールリン酸濃度で表面修飾したアパタイト粉体からの骨修復セメントの作製とその評価」、第24回日本セラミックス協会 秋季シンポジウム、2011/9/7
- (15) 眞部弘毅, 小西敏功, 水本みのり, 本田みちよ, 相澤 守, 「種々のリン酸カルシウム相からなるキレート硬化型セメントの in vitro における生体吸収性の評価」、第24回日本セラミックス協会 秋季シンポジウム、2011/9/7
- (16) 中島佑亮, 小西敏功, 水本みのり, 本田みちよ, 相澤 守, 「湿式法により調製したケイ素含有アパタイトによるキレート硬化型セメントの作製とその評価」、第24回日本セラミックス協会 秋季シンポジウム、2011/9/7
- (17) 千布悠貴, 小西敏功, 水本みのり, 本田みちよ, 松本守雄, 石井 賢, 相澤 守, 「骨ミネラル含有アパタイトから作製したキレート硬化型セメントのウサギ脛骨埋入による組織学的評価」、第24回日本セラミックス協会 秋季シンポジウム、2011/9/7
- (18) 三木拓也, 安富由美子, 本田みちよ, 吉村英恭, 相澤 守, 「骨ミネラル含有アパタイトセラミックスによるラット骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導」、第21回無機リン化学討論会、2011/9/29
- (19) 本田みちよ, 小西敏功, 水本みのり, 相澤 守, 「キレート硬化型骨アパタイトセメントにおける骨肉腫細胞の生化学的評価」、第33回日本バイオマテリアル学会大会、2011/11/21
- (20) 羽太優理, 相澤 守, 神澤信行, 「キレート硬化型骨修復セメントへの生理活性ペプチド添加による抗菌性付与」、第33回バイオマテリアル学会大会、2011/11/21
- (21) 水本みのり, 小西敏功, 本田みちよ, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤 守, 「キトサン添加によるインジェクション型アパタイトセメントの試作と大型動物による生体適合性の検証」、第33回バイオマテリアル学会大会、2011/11/22
- (22) 鷹本拓也, 安富由美子, 本田みちよ, 水本みのり, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤 守, 「大型動物であるブタの脛骨に埋入した高強度化アパタイトファイバースキャホルドの硬組織適合性」、第33回バイオマテリアル学会大会、2011/11/22
- (23) 川延勇介, 本田みちよ, 水本みのり, 小西敏功, 羽太優理, 神澤信行, 石井 賢, 松本守雄, 相澤 守, 「超音波噴霧熱分解法により合成した銀担持ハイドロキシアパタイト微小球の抗菌性評価」、第33回バイオマテリアル学会大会、2011/11/22
- (24) 千布悠貴, 小西敏功, 水本みのり, 本田みちよ, 松本守雄, 石井 賢, 相澤 守, 「骨ミネラル含有アパタイトから作製したキレート硬化型セメントの生体適合性評価」、第33回バイオマテリアル学会大会、

2011/11/22

- (25) 三木拓也、藤野匡敏、安富由美子、深澤倫子、吉村英恭、相澤守、「骨ミネラル含有アパタイトセラミックスの材料特性」、第 33 回バイオマテリアル学会大会、2011/11/22
- (26) 稲山哲哉、小西秀典、相澤 守、神澤信行、「腫瘍治療に有効なキレート硬化型骨修復セメントの評価」、第 33 回バイオマテリアル学会大会、2011/11/22
- (27) 水本みのり、小西敏功、本田みちよ、船尾陽生、石井 賢、戸山芳昭、松本守雄、相澤 守、「キトサンを添加したインジェクション型アパタイトセメントのウサギ脛骨への埋入による硬組織適合性評価」、セラミックス協会 2012 年年会、2012/3/19
- (28) 中島佑亮、小西敏功、水本みのり、本田みちよ、相澤 守、「ケイ素含有アパタイトから作製したキレート硬化型セメントの骨芽細胞を用いた in vitro 評価」、日本セラミックス協会 2012 年年会、2012/3/20

【取材】

日本経済新聞社

2011 年 4 月 13 日「蛍光タンパク質を用いた生体材料の骨誘導能評価システムの構築」神澤信行

日本経済産業新聞

2012 年 2 月 28 日「生体内吸収性の異なるキレート硬化型セメントおよび骨誘導能を備えたセメント」相澤 守

【特許】

- (1)国内特許出願 3 件
(2)国外特許出願 0 件

重点研究室 光触媒グループ

重点研究室「光触媒」グループ

グループリーダー 藤嶋 昭

【基本構想】

本グループは、光触媒技術および導電性ダイヤモンドに関する技術をベースとして、その基礎研究および応用研究を行うと共に企業との共同研究で実用化への研究開発および国の研究プロジェクトなどに応用展開している。また、光触媒オープンラボや光触媒ミュージアムの運営を通じて、光触媒技術の普及・啓蒙および出前教室などによる地域社会への貢献など行っている。

平成23年度は、研究開発として前年に引き続き、光触媒技術および導電性ダイヤモンド電極技術を用いた空気浄化や水質浄化など環境浄化への応用研究、また二酸化炭素を原料にした電気化学的還元法による固定化技術の研究開発などを行ってきた。また、「循環社会構築型光触媒産業創成プロジェクト」(NEDOプロジェクト)では5カ年プロジェクトの最終年度であり、本プロジェクトで研究開発された新規可視光応答型光触媒の実使用条件下での性能評価、県内病院施設の協力の下で抗菌性能の実証試験および二酸化チタンを用いた有機モノリス材料の開発など研究開発を進めてきた。さらに、シーズ技術である光触媒および導電性ダイヤモンド電極の技術をベースとして企業との共同研究を進め実用化に向けた応用研究開発を行ってきた。

光触媒オープンラボでは光触媒材料の性能評価試験機器の企業や大学等への開放利用サービスをはじめ、「光触媒技術情報」誌の編集・発行および技術相談、また可視光応答型光触媒の性能評価方法に関するJIS標準化委員会やISO標準化および光触媒工業会による性能基準設定のための標準化委員会などに参画し光触媒技術の基盤構築および発展に貢献してきた。

光触媒ミュージアムでは光触媒製品の展示および光触媒の原理や効果をデモ機や実用展示および酸化チタンに関する企画展を行うなど、光触媒に関する技術や効果を解りやすく解説し、また恒例となっている「光触媒実験教室」や出前授業などに積極的に取り組み、光触媒技術の普及・啓蒙に努めてきた。

1. 平成23年度の研究目的

重点研究室として7年目となる平成23年度は、以下の各項目を重点項目として研究開発を進めてきた。

(1) 光触媒およびその担持体を用いた応用研究

1) 光触媒担持体とそれを用いた環境浄化ユニットの研究開発

本研究は企業(ユーヴィックス(株)殿)との共同研究で今まで光触媒を塗布したチタンメッシュ材料(TMiP)を開発してきた。平成23年度はこの材料と種々の光源との組合せにより高効率な光触媒性能向上を目的とした。この技術は従来のセラミック多孔体に比べ軽量で加工し易く、またコンパクト設計できる特長を備えており、小型空気清浄機など製品開発を目指した。

2) ナノ構造制御による高活性光触媒材料の作製

エレクトロスピンニング法および水熱法を用いて酸化チタンのコアシェル微粒子を作製し、そのナノ構造制御することにより、光触媒性能の向上を目的として検討した。

(2) NEDOプロジェクト

室内でも十分効果が発揮できる高効率な可視光応答型光触媒の開発・実用化を目標とした「環境社会構築型光触媒産業創成プロジェクト」は5カ年計画で進められており、

平成23年度は最終年度であり、KASTとして3つのグループで以下の研究課題に取り組んできた。

1) 光触媒材料の性能評価試験(村上G)

- ① 実使用環境条件下での可視光応答性能評価
- ② アセトアルデヒドの完全分解試験方法の検討

2) 酸化チタン光触媒を用いた撥水性表面の新機能開発(中島G/東京工業大学)

- ① 撥水性修復機能を有する高度撥水材料の開発
- ② 誘起超親水性による流動制御

3) 抗ウイルス・抗菌性能評価方法の確立(窪田G/横浜市立大学)

- ① 新規可視光応答形光触媒材料の抗菌・抗ウイルス性能評価
- ② 抗菌・抗ウイルス性能評価試験方法のJIS標準化

(3) 導電性ダイヤモンド(BDD)電極を用いた電解法によるCO₂還元に関する研究

本研究では、BDD電極を用いて電気化学的還元法により二酸化炭素を還元処理することによってクリーンエネルギーになる液体燃料等に適用できる物質に高効率で変換(固定化)する技術を確立することを目的とする。

(4) BDD電極を用いた環境浄化への応用研究

本研究は企業（住友電工㈱）との共同研究の一環である。水中でBDD電極に5～10V程度の電圧を印加することによりオゾンが発生する。このオゾン水を利用して水中の除菌・抗菌性能等について検討した。

(5) 光触媒オープンラボ

光触媒材料の性能評価機器の開放利用および「光触媒技術情報」誌の編集・発行を行うとともに、平成23年度は昨年度に引き続き下記標準化事業に取り組んできた。

- 1) 可視光応答型光触媒の性能評価試験方法に関する標準化調査事業（JIS標準化）
- 2) 光触媒工業会・標準化委員会（性能基準策定）
- 3) アジア光触媒標準化会議（CASP会議・ISO標準化）

(6) 光触媒ミュージアム

光触媒技術の普及・啓蒙および地域社会への貢献を目的として、「光触媒ミュージアム」の運営を行っている。平成23年度は光触媒の原理・効果および光触媒応用製品等を展示し来館者への説明、技術相談を行うと共に、恒例となった「光触媒おもしろ実験教室」の開催や出前授業に取り組んできた。特に身近な生活の中で使用されている酸化チタンおよび光触媒を紹介する特別企画展「楽しくエコ生活～ここにも光触媒が?!～」を開催し、光触媒を解りやすく解説した。

2. 平成23年度の研究成果

以下に挙げるのは、平成23年度の具体的な研究成果の概要であり、詳細は各研究員の報告書を参照されたい。

(1) 光触媒およびその担持体を用いた応用研究

1) 光触媒担持体とそれを用いた環境浄化ユニットの研究開発

本研究は、ユーヴィックス㈱との共同研究によるものであり、前年度までに技術確立した光触媒担持チタンメッシュフィルター（TMiP）を用いて、環境浄化への応用開発を行った。

円筒状のアルミナセラミック製の沿面放電プラズマユニットにTMiPを巻き付けたTMiP-プラズマハイブリッド空気浄化ユニットを作製し、1000Lの密閉したボック

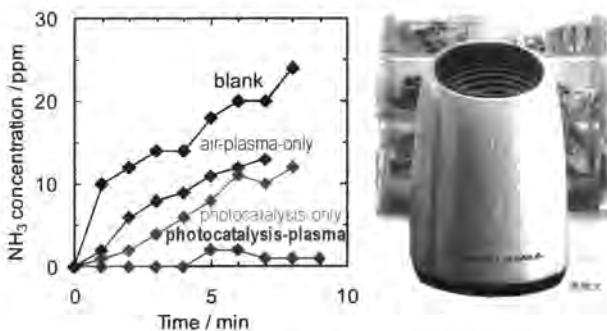


図1. NH₃浄化試験結果（左）および小型空気清浄機（右）

ス内で連続発生させたアンモニアの除去性能試験の結果、高い浄化効率を示した（図1左）。これはプラズマ自体の汚染物質分解性能とプラズマから発生される紫外線領域の電磁波によるTMiP表面での光触媒反応との相乗効果によって高い浄化性能が得られたと考えられる。

この成果を小型空気浄化ユニットとしてユーヴィックス社にて製品化・販売されている（図1右）。

また、TMiPとエキシマランプとを組み合わせた空気浄化ユニットを作製した。エキシマランプは光触媒反応を効果的に誘起する308nmの紫外線が放射される。メチルメルカプタンやジメチルスルホキシドを用いて分解試験を行った結果、効率よく分解できた。

2) ナノ構造制御による高活性光触媒材料の作製

TBT (Titanium Butoxide) および PVP (Poly (N-Vinyl-2-Pyrrolidone)) の混合液を用いてエレクトロスピング (ES) 法により TiO₂ 微粒子を作製し、500℃の加熱処理後、水熱法により球状のコアシェルメソポーラス TiO₂ を作製した（図2左）。PVP の量および ES 条件をコントロールすることにより TiO₂ 微粒子の粒子径および粒子構造の制御ができた。また、作製したコアシェルメソポーラス TiO₂ 微粒子の光触媒性能を評価した結果、高い光触媒性能が得られた（図2右）。

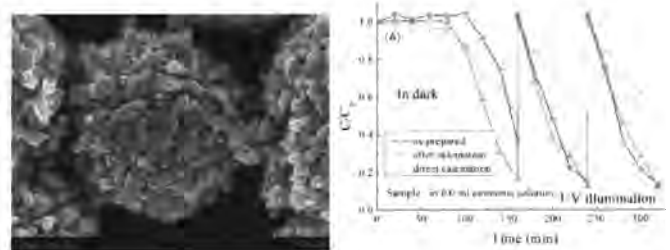


図2. 球状コアシェルメソポーラス TiO₂（左）およびその光触媒性能試験結果（右）

(2) NEDOプロジェクト

1) 光触媒材料の性能評価試験（村上G）

① 実使用環境条件下での可視光応答性能評価

本NEDOプロジェクトで開発された新規可視光応答型光触媒について実使用環境下での性能評価を行った。光源として白色蛍光灯を用いてアセトアルデヒドおよびトルエンの除去性能について照度による影響、湿度による影響および照射波長の影響など評価した。

② アセトアルデヒドの完全分解試験方法の検討

可視光応答型光触媒の酸化分解力を評価する試験方法として、アセトアルデヒドの完全分解法について、試験方法の確立をおよび JIS 標準化のための試験条件等について検討し、JIS 原案を作成した。

2) 酸化チタン光触媒を用いた撥水性表面の新機能開発（中島G/東京工業大学）

① 撥水性修復機能を有する高度撥水材料の開発

エポキシ樹脂と PTFE から成る高撥水性表面を有する有機モノリス構造体に TiO_2 微粒子を含有することにより、モノリス構造が物理的に破壊された場合にも TiO_2 光触媒により、自発的に高撥水性が回復される構造体を得ることができた。

② 誘起超親水性による流動制御

この研究は TiO_2 光触媒による光誘起親水化を用いて液体の流動抵抗低減や層流域の拡大効果の範囲を見極めることにより、これらの性質と流体を用いた新たな部材、機構を提案する。

3) 抗ウイルス・抗菌性能評価方法の確立 (窪田 G / 横浜市立大学)

① 新規可視光応答型光触媒材料の抗菌・抗ウイルス性能評価 (ラボ評価および実証試験)

本プロジェクトで開発された新規可視光応答型光触媒を用いて、抗菌効果および抗ウイルス効果についてラボ評価すると共に、研究協力病院施設の各所に光触媒材料を設置し、その抗菌効果の実用性について試験・評価した。

② 抗菌・抗ウイルス性能評価試験方法の JIS 標準化

抗ウイルス性能試験として、ヒトに感染しないファージを用いた抗ウイルス評価法を開発してきた。この抗ウイルス性能試験方法および抗菌性能試験方法について JIS 原案を作成した。

(3) 導電性ダイヤモンド (BDD) 電極を用いた電解法による CO_2 還元に関する研究

有機溶剤またはイオン性溶液中に導電性ダイヤモンド (BDD) を作用極、対極に白金を用いて二酸化炭素をバブリング注入させ電圧を印加することによる二酸化炭素の電解還元を検討してきている (図 3)。今までに還元生成物として蟻酸と一酸化炭素 (CO) が主に生成していることが解っており、現在、更に電解効率向上および BDD 電極の耐久性等の研究開発を進めている。

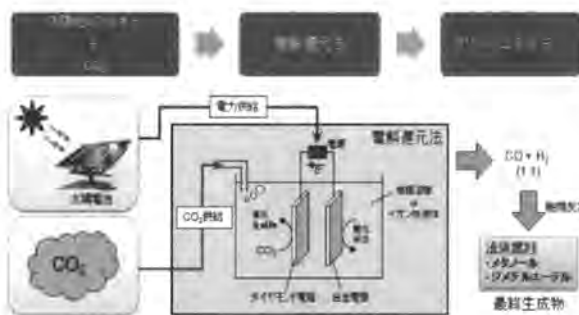


図 3. 電解還元システムの模式図

(4) BDD電極を用いた環境浄化への応用研究

水中で BDD 電極に 5 ~ 10 V の電圧を印加するとオゾンが発生する (図 4)。この BDD 電極を用いた水浄化に関する基礎・応用研究を進めている。生理食塩水を用いた試験ではオゾンの発生と共に次亜塩素酸も生成し、殺

菌性能が高まることが解った。

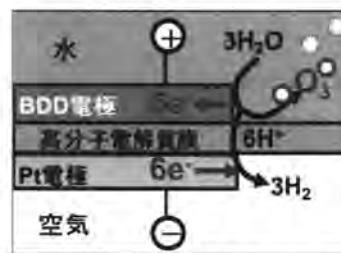


図 4. オゾン生成ユニットの模式図

(5) 光触媒オープンラボ

光触媒性能試験機器の開放利用は平成 23 年度の利用件数は 73 件で対前年度比約 50% 増の利用があった。特に可視光応答型光触媒の性能評価が多くなっている。

可視光応答型光触媒の抗菌・抗ウイルス性能評価方法およびアセトアルデヒド完全分解試験方法について JIS 案、ISO 案を作成し事務局である日本ファインセラミックス協会へ提出している。平成 24 年度はその案に対する JIS 制定および ISO 制定に向けた取り組みを行っていく。

(6) 光触媒ミュージアム

平成 23 年度の年間入館者数は 8,472 名で、平成 17 年開設時からの累計入館者数は 71,333 名となり、平成 23 年 1 月に 7 万人目の来館者を迎えることができた (図 5)。

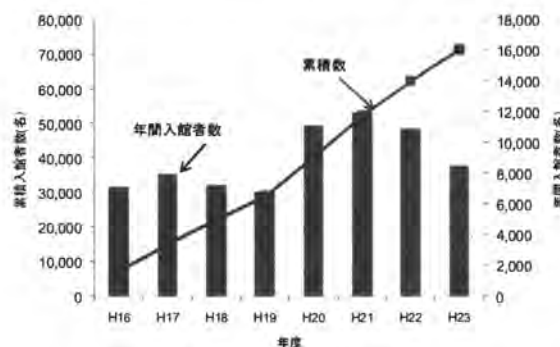


図 5. ミュージアム来館者推移

また、恒例となっている「光触媒おもしろ実験室」は平成 23 年度で第 7 回目となり、夏休み期間中に 8 回開催し、内 2 回は鎌倉文学館で開催した。また、企画展として「楽しくエコ生活～ここにも光触媒が?!～」をミュージアム内で開催した (図 6 左)。また、平成 22 年に刊行された絵本「太陽と光しよくばいものがたり」の英語版 (図 6 右) が平成 23 年 9 月に偕成社より発刊された。



図 6. 企画展 (左) および絵本英語版 (右)

機能性材料を用いた物質・エネルギー変換

中田 一弥

1. はじめに

環境・エネルギー問題に対する世界的な危機感から、大気中のCO₂の削減や、太陽光エネルギーなどの自然再生エネルギーの本格的な利用が喫緊の課題となっている。CO₂の削減に関しては従来から、そもそものCO₂の排出量を減らす方針がとられてきたが、最近ではその削減のみならず、排出されたCO₂を再資源化する研究が注目されてきている。一方、光触媒は光エネルギーを化学エネルギーに変換し、有機物を分解する機能がある。そのため、空気中の有害物質や汚染物質等を除去するといった環境浄化材料として大変注目されている。

本研究では、以下に示す2つのアプローチにより新しい機能材料の開発を行い、CO₂の再資源化と光触媒による環境浄化について検討した。

- 1) 二酸化炭素の電気化学的固定化技術の開発とクリーンエネルギー創出システムの構築
- 2) 酸化チタン光触媒のナノ構造制御と空気浄化

1. 1 二酸化炭素の電気化学的固定化技術の開発とクリーンエネルギー創出システムの構築

近年、CO₂の資源化や循環利用の観点からCO₂を原料とした物質合成が注目されている。中でも電気化学的還元(電解還元)法は、電極上での還元反応によってCO₂を資源性の高い物質に変換することができるため幅広く研究されてきた。しかしこれまでは、CO₂の電解還元効率が低いことが課題であったため、還元効率の向上を目指して諸種の電解条件が検討されてきた。例えば、電解液に関してはCO₂の溶解度が高く、かつ電位窓が広い有機溶媒を用いることが有効であることが明らかになっている。一方で電極に関しては、金属種を用いた報告例が多いが、競争反応であるH₂の生成がおこりやすく、CO₂の還元効率が低い問題があった。

ポロンドープダイヤモンド(BDD)電極は電位窓が広く、かつバックグラウンド電流が小さい特徴をもち、水素過電圧が高いためH₂の生成が少ない。そのため、電解還元を行う際にBDD電極を用いることで、効率的にCO₂の還元反応が進むことが期待される。

そこで、本研究ではBDD電極を用い、かつCO₂の溶解度が高いMeOH溶媒系でのCO₂の電解還元を行った。さらに、還元効率を向上させるために、BDD電極のポロンドープ量の最適化およびアミン種による表面修飾を行い、それらを用いた電解還元による生成物の評価を行った。

1. 2 酸化チタン光触媒のナノ構造制御と空気浄化

近年、室内における揮発性有機化合物(VOC)の有害性が問題となっている。代表的な光触媒であるTiO₂はVOCに対して優れた分解性能を示すため、空気清浄機などに応用されている。しかし、TiO₂は紫外光にしか応答しないため、室内ではその性能が大きく制限される。そのため、可視光を利用できる光触媒の研究が盛んに行われている。本研究では、可視光応答型光触媒であるRh(1.0%)ドープSrTiO₃(SrTiO₃:Rh)と、Rh(0.5%)-Sb(1.0%)共ドープTiO₂(TiO₂:Rh/Sb)を用いてCH₃CHO分解を行った。

2. 実験と結果

2. 1 二酸化炭素の電気化学的固定化技術の開発とクリーンエネルギー創出システムの構築

BDD電極の作製はマイクロ波CVD装置を用いた。前処理としてシリコン基板表面をダイヤモンドパウダーで核付けし、次に原料としてアセトンとトリメトキシボラン(ホウ素濃度:0.1%, 1%, 5%)を用いて、プラズマ出力5000W、水素下60 torr、製膜時間6hの条件で基板上に製膜した。作製したBDD電極は、ラマン分光法およびSEMにて確認した。

また、BDD電極のアミン修飾を行うために、作製したBDD電極上にアリルアミンを滴下し、N₂バージした容器内でUV照射(254 nm)を行った。評価はXPSによって行った。

電気化学測定は、作用極をBDD電極およびグラッシーカーボン(GC)電極とし、参照極はAg/Ag⁺、対極はPtメッシュ電極とした3電極系で行った。また、支持電解質は過塩素酸テトラブチルアンモニウム(TBAP)を用い、メタノールに溶解させて0.1Mの電解液とした。さらに電解液はCO₂をバブリングして、CO₂飽和メタノール溶液とした。CO₂の還元電位の測定は、CVを用いて行った。CO₂の電解還元は-1.5V vs. Ag/Ag⁺にて各々の時間行った。生成物の評価は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)およびガスクロマトグラフィー(GC)にて行った。

1. ポロンドープ量の影響

作製したBDD電極のSEM像を図1に示す。BDDの粒径は約10 μmであることが分かった。また、作製したBDD電極のラマンスペクトルを測定した結果、sp³炭素原子由来のフォノンバンドのピークが観測されたことから、ダイヤモンド構造を有することが確認された。



図 1. BDD 電極の SEM 像

BDD 電極を用いて CV 測定を行った。電解液に CO₂ を導入することにより、-1.4 V 付近に還元ピークが現れた(図 2)。また、ホウ素ドーパ量の異なる BDD 電極を用いて同様の実験を行った場合、電極中のホウ素ドーパ量が上昇すると、CO₂ の還元電位は正側へシフトする傾向があった (Table 1)。次に BDD 電極を用いてメタノール溶液中で定電位電解を行った。電解還元生成物はギ酸、水素、一酸化炭素、メタンであった。また、BDD 電極のホウ素ドーパ量の変化は、電解生成物の生成効率に影響を及ぼすことが分かった (図 3、図 4)。

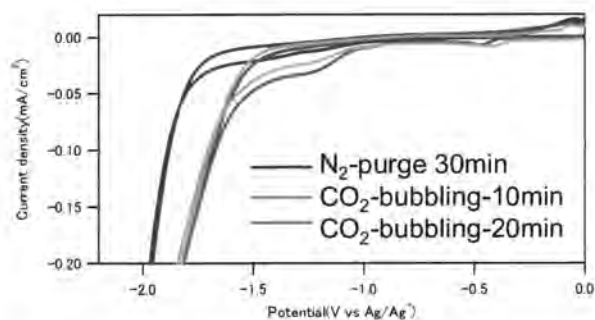


図 2. BDD 電極(1%)を用いた CV

Table 1 各電極の CV の値

	0.1%電極	1%電極	5%電極	GC電極
-2.0Vにおける電流値 (mA/cm ²)	-0.18	-0.41	-0.48	-0.62
二酸化炭素の還元電位(V)	—	-1.44	-1.3	-1.12
二酸化炭素の還元電位におけるピーク電流値 (mA/cm ²)	—	-0.41	-0.46	-0.58

2. 表面修飾の影響

まず、アリルアミンを電極上に滴下後、UV 照射を各時間行い、XPS によって電極の評価を行った。UV 照射後の XPS のスペクトルを図 5 に示す。アミン修飾によって N1s のピークが増大した。また、アミン修飾前後の BDD について接触角測定を行ったところ、修飾後の BDD では修飾前に比べて約 15~20° 接触角が減少していることが観測された。これは BDD 表面の官能基が親水性のアミンに改質されたからであると考えられる。

アミン修飾 BDD 電極を用いて上記と同様に電解還元を行った。電解電位 -1.5 V (vs. Ag/Ag⁺) で 2 h 電解を行った結果、アミン修飾 BDD 電極の場合ではギ酸の生成効率が 8.8% となり、未修飾の BDD 電極で電解を行った場合の生

成効率 (4.9%) と比較して約 1.8 倍に生成効率が向上していた (図 6)。アミン修飾 BDD が修飾前に比べてギ酸の生成効率が向上した理由は、電極表面の官能基であるアミンが電極表面近傍の CO₂ を吸着したためと推測した。

2. 2 酸化チタン光触媒のナノ構造制御と空気浄化

1. 酸化チタン光触媒のナノ構造制御



図 3. ギ酸の生成効率の比較

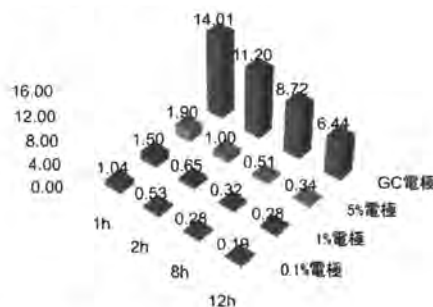


図 4. 水素の生成効率の比較

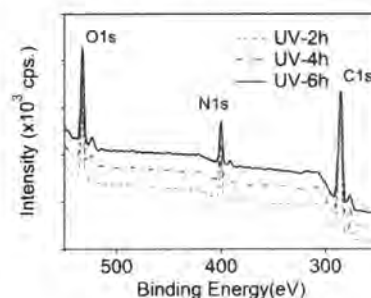


図 5. アミン修飾 BDD の XPS スペクトル

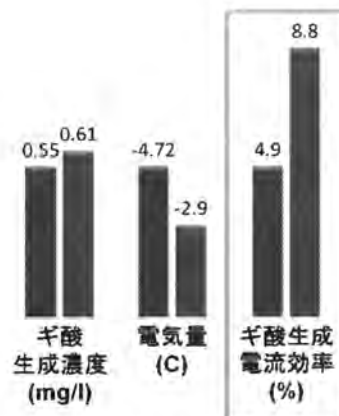


図 6. 電解還元の結果の比較

PVP、酢酸、エタノールを混合し1時間攪拌した後、暗所にて溶液を静置した。その後、得られた黄色溶液をエレクトロスプレー法（定電圧30kV以上）によってスプレーし微粒子を得た。また得られた微粒子は必要に応じて水熱処理を行った。

上記により得られた微粒子のFE-SEM像を図7に示す。溶液の静置時間によって様々な形状を有するTiO₂材料が作成されることがわかった。また溶液に水を少量添加することでもTiO₂材料の形状が大きく変化することがわかった。その理由は図8に示したように、TBTと水が反応した場合にはTBTの三次元ネットワークが形成され、PVPとTBTとでは、それらからなる二次元ネットワークが形成される。またTBTとPVP、水をすべて混合した場合にはPVPとTBTとからなる三次元ネットワークが形成されることが推測される。したがって、原料溶液の次元性が二次元もしくは三次元によって、エレクトロスプレーした後にできる微粒子の形状が大きく異なることが推察された（図9）

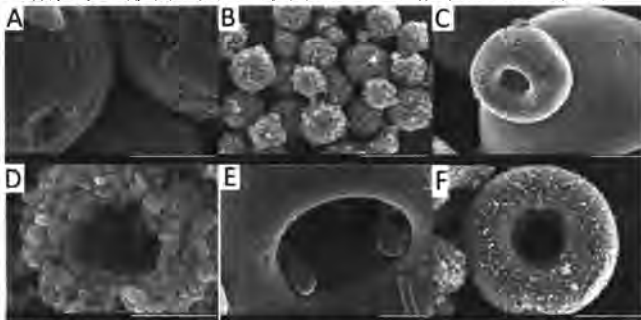


図7. 様々な形状を有するTiO₂ナノ材料のFE-SEM像

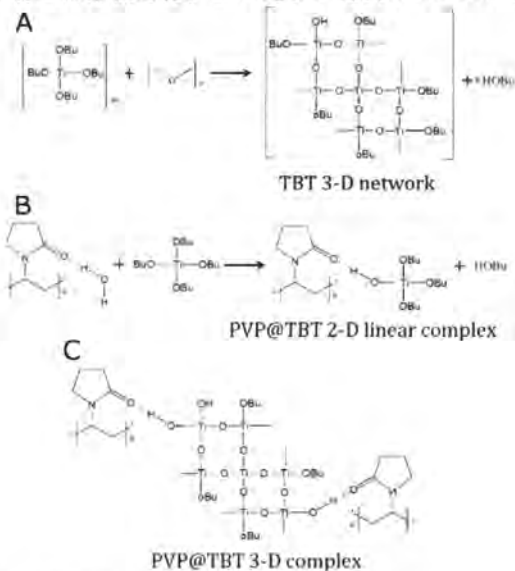


図8. TBTネットワークの形成メカニズム

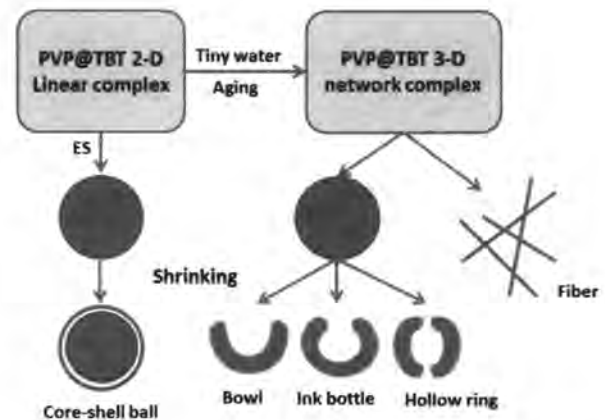


図9. 様々な形状を有するTiO₂ナノ材料の形成メカニズム

2. 可視光応答性光触媒による空気浄化

STR および TRS は既報に従い固相法により作製した。また、得られた STR および TRS は遊星ボールミルにより粉碎し(800 rpm、30 min×2)、その後、アニール処理(200℃、2時間)を行った。粉碎前後の粉末の結晶構造、バンドギャップ、粒子表面形状、比表面積をそれぞれ粉末 X 線回折(XRD)、拡散反射スペクトル(DRS)、電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM)、比表面積測定(BET法)により測定した。光触媒活性評価はガスクロマトグラフィー(GC)より行い、CH₃CHOとCO₂の濃度を測定した。光源は200 W-Xeランプ(光強度100 mW/cm²)を使用し、光触媒(500 mg)を反応容器(560 ml)に入れ、CH₃CHO(85 ppm)を注入し、光照射(照射面積10.2 cm²)した。光照射時にはカットオフフィルターとしてL-42(λ<420 nm)を用いた。

粉碎前後とアニール後のSTRおよびTRSをXRDおよびBETにより評価、比較したところ、粉碎後は結晶性が低下するものの比表面積は向上し、アニール処理後は結晶性、比表面積に大きな違いは現れなかった。またGC測定を行ったところ(図10, 11)、STRおよびTRSのいずれにおいてもボールミル粉碎後にCH₃CHOの吸着能が向上したが、CO₂濃度の増加は見られなかった。そこで、さらにアニール処理を行ったところCO₂濃度が増加し、CH₃CHO分解能が向上することがわかった。ボールミル粉碎後にCH₃CHO吸着能が向上した理由として比表面積が大幅に向上したことが挙げられる。

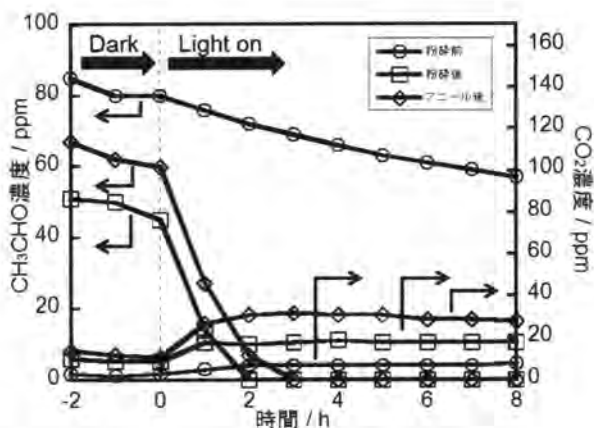


図 10. STR を用いた CH₃CHO 分解性能評価

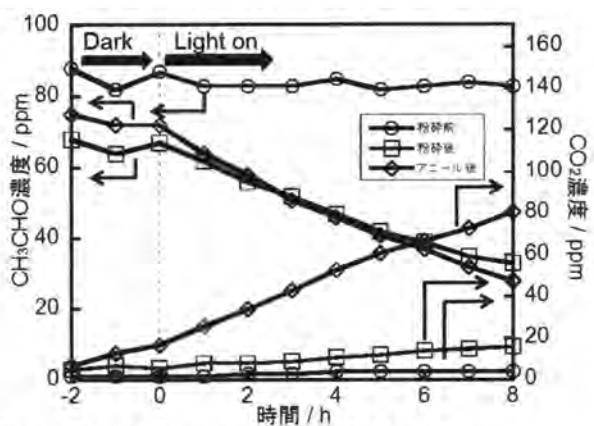


図 11. TRS を用いた CH₃CHO 分解性能評価

3. 考察及び今後の展望

以上、2つのアプローチによる新しい光機能材料の開発と応用検討を行った。なお、本研究は、科学研究費補助金（基盤研究(B)）、科学研究費補助金（基盤研究(C)）、科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）、矢崎科学技術振興記念財団研究助成、戦略的国際科学技術協力推進事業、最先端研究開発支援プログラム、JST-CREST のもとに行われた。

【参考文献】

1. K. Nakata, K. Udagawa, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, *Mater. Chem. Phys.*, 126, 484-487 (2011).
2. K. Nakata, M. Sakai, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, *Mater. Lett.*, 74, 68-70 (2012).
3. K. Nakata, M. Sakai, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi, A. Fujishima, *Mater. Lett.*, 70, 160-162 (2012).
4. K. Nakata, Y. Ishikawa, M. Sakai, T. Ochiai, B. Liu, H. Sakai, T. Murakami, M. Abe, A. Fujishima, *Chem. Lett.*, 40, 1229-1230 (2011).
5. K. Nakata, B. Liu, Y. Goto, T. Ochiai, M. Sakai, H. Sakai, T. Murakami, M. Abe, A. Fujishima, *Chem. Lett.*, 40, 1161-1162 (2011).
6. K. Nakata, B. Liu, Y. Ishikawa, M. Sakai, H. Saito, T. Ochiai, H. Sakai, T. Murakami, M. Abe, K. Takagi, A. Fujishima, *Chem. Lett.*, 40, 1107-1109 (2011).

7. K. Nakata, M. Sakai, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi, A. Fujishima, *Langmuir*, 27, 3275-3278 (2011).
8. B. Liu, K. Nakata, M. Sakai, H. Saito, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi, A. Fujishima, *Langmuir*, 27, 8500-8508 (2011).
9. K.R. Reddy, K. Nakata, T. Ochiai, T. Murakami, D.A. Tryk, A. Fujishima, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 11, 3692-3695 (2011).
10. B. Liu, K. Nakata, M. Sakai, H. Saito, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi, A. Fujishima, *Catal. Sci. Technol.*, accepted, (2012).
11. S. Liu, B. Liu, K. Nakata, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, *J. Nanomater.*, accepted, (2012).
12. B. Liu, L. Wen, K. Nakata, X. Zhao, S. Liu, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, *Chemistry - A European Journal*, accepted, (2012).
13. B. Liu, K. Nakata, S. Liu, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, *J. Phys. Chem. C*, 116, 7471-7479 (2012).
14. L. Wen, B. Liu, X.J. Zhao, K. Nakata, T. Murakami, A. Fujishima, *Int. J. Photoenergy*, 368750-368751-368710 (2012).
15. B. Liu, K. Nakata, X. Zhao, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, *J. Phys. Chem. C*, 115, 16037-16042 (2011).

光触媒および導電性ダイヤモンド電極を用いた環境浄化

落合 剛

1. はじめに

光触媒関連技術は我が国が発祥であり、酸化チタンに紫外光を照射すると水が酸素と水素に分解する本多・藤嶋効果の発見以来、実に40年以上にわたって研究開発が続けられている。建材や浄化機器、生活用品に至るまで幅広く応用されているが、光誘起超親水化機構の解明や高効率な可視光応答光触媒の創出など、学術的な追究の余地も多く、現在最も魅力的なテーマのひとつといえる。一方、本来絶縁体であるダイヤモンドにホウ素をドーピングした導電性ダイヤモンド (Boron-Doped Diamond, BDD) 電極も、センシングデバイスや高耐久性電極としての応用が期待されている新しい材料である。平成23年度は、これら2つの無機材料を環境浄化分野に応用展開することを目的とし、研究開発をすすめた。

1.1 新規光触媒フィルタ TMiP を用いた環境浄化ユニットの研究開発

現在実用化されている光触媒式空気清浄機は、一般的に、酸化チタンをコーティングした光触媒フィルタ、紫外光源、ファン等を組み込んだ構造になっている。室内の有害物質や微生物などは、ファンで取り込まれて光触媒フィルタ表面に吸着し、紫外光照射による光触媒反応で酸化分解される。しかも、光触媒フィルタは浄化処理の前後で変化しないため、煩雑な再生処理や交換を必要とせず、半永久的に使用できる。設計のポイントは、光触媒フィルタ表面の酸化チタンが剥離しないこと、光触媒フィルタの表面に紫外光が効率よく当たること、有害物質や分解生成物がファンの気流に乗って効率よく輸送されること、の3点である。これらの条件をすべて満たすものとして、多孔質セラミックフィルタに酸化チタン微粒子を焼き付けた光触媒フィルタが開発・実用化されているが、比較的軽く、加工しにくいといった課題がある。そこで、チタンメッシュを基材とし、酸化チタン微粒子を焼き付け、軽く加工しやすい新規光触媒フィルタ Titanium-Mesh impregnated Photocatalyst (TMiP) をユーヴィックス社と共同開発した。この成果は *Catal. Sci. Technol.* 誌に論文として発表し、同誌の中表紙を飾った (図1)。¹ TMiP は軽量でフレキシブルなので、形状をコルゲート状に加工したり、紫外線ランプに直接巻きつけることができる。また機械的強度も強く、プラズマ処理やオゾン処理でも破壊されない。この特性を活かし、TMiP を組みこんだ諸種の環境浄化ユニットを試作した。各ユニットの詳細は「2. 実験と結果」の項に述べる。

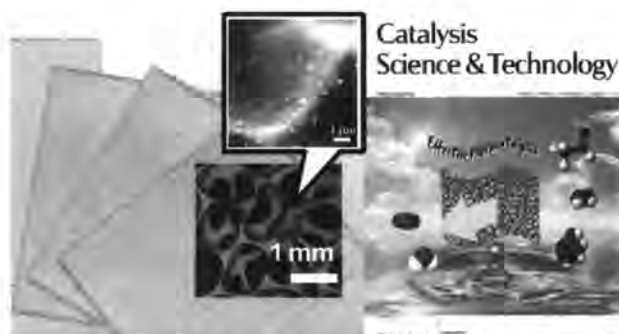


図1. TMiP (左) および *Catal. Sci. Technol.* 誌の中表紙 (右)

1.2 BDD 電極を用いた環境浄化ユニットの研究開発

我々は、平成18年度から20年度まで実施された、文部科学省振興調整費による日中共同研究「環境にやさしい水質浄化技術の研究開発」において、BDD電極-光触媒ハイブリッド水浄化システムを作製した。² 性能試験の結果、BDD電極による電気分解が高濃度の汚染物質や難分解性物質を分解し、その生成物が光触媒反応によって低エネルギーコストで分解される機構が示唆された。さらに、同様の方法で、平成22年度までに、代表的な難分解性有機フッ素化合物のひとつ、パーフルオロオクタン酸 (PFOA) の分解に成功した。³⁻⁵

平成23年度は、酸素過電圧が高く、水の電気分解でオゾンを生じやすいというBDD電極の特性をふまえ、特開2005-336607, 2009-007655などの資料を参考に、燃料電池セルの構造を模した小型オゾン生成ユニットの研究開発を実施した (図2)。

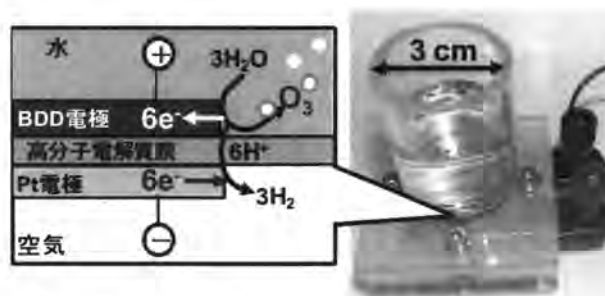


図2. 小型オゾン生成ユニットとその原理図

2. 実験と結果

2.1 新規光触媒フィルタ TMiP を用いた環境浄化装置の研究開発

2.1.1 TMiP-プラズマハイブリッド空気浄化ユニット

円筒状のアルミナセラミックチューブを主体とした沿面放電プラズマ発生ユニット・SPCP (Surface-discharge-induced Plasma Chemical Process) 素子に TMiP を巻き付けた構造の TMiP-プラズマハイブリッド空気浄化ユニット TitanPlasma™ を作製した (図3)。⁶ 1 m³ の密閉空間中で連続発生させたアンモニアの分解試験において、このユニットは、従来の UV ランプと TMiP を組み合わせた場合や、SPCP 素子単独の場合よりも高い空気浄化効率を示した (図4)。SPCP 素子が発生させる大気圧プラズマは、化学結合の切断やオゾン等の生成によって、汚染物質を効率よく分解する。さらに、光触媒反応に適した紫外線領域の電磁波を放射して、TMiP 表面での光触媒反応を誘起する。これらの相乗効果によって、高い浄化性能が得られたと考えられる。これを小型化した空気浄化ユニット TitanPlasmaMini™ を企業と共同で製品化・販売した (図5)。

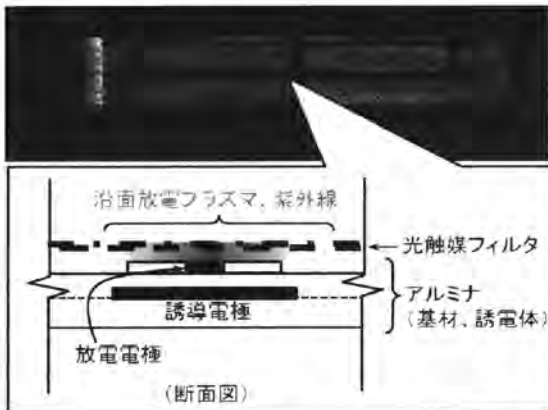


図3. TMiP-プラズマハイブリッド空気浄化ユニット

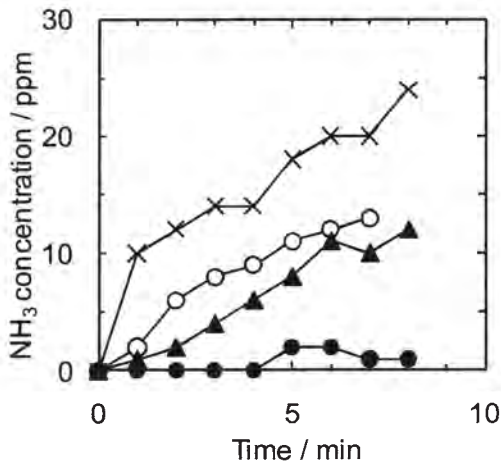


図4. Time course of NH₃ concentration in test box (crosses: blank; open circles: plasma only; filled triangles: UV-TMiP; filled circles: Titan-Plasma™).



図5. 小型 TMiP-プラズマハイブリッド空気浄化ユニット TitanPlasmaMini™ (<http://titanplasma.com/>)

2.1.2 TMiP-エキシマランプハイブリッド空気浄化ユニット

XeCl を封入した石英管を主体としたエキシマランプに TMiP を巻き付けた構造の TMiP-エキシマランプハイブリッド空気浄化ユニットを作製した (図6)。⁷ TMiP を光触媒フィルタとしてだけでなく電極としても用いている点がポイントである。これによって、光触媒反応に適した 308 nm の紫外線が効率よく照射され、汚染物質を分解する。分解試験では、メチルメルカプタンやジメチルスルホキシドを効率よく分解できた (図7)。今後、冷蔵庫用の脱臭ユニットなどとして有用と考えられる。

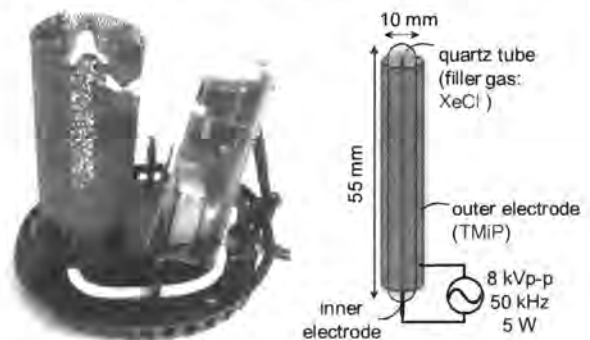


図6. TMiP-エキシマランプハイブリッド空気浄化ユニット

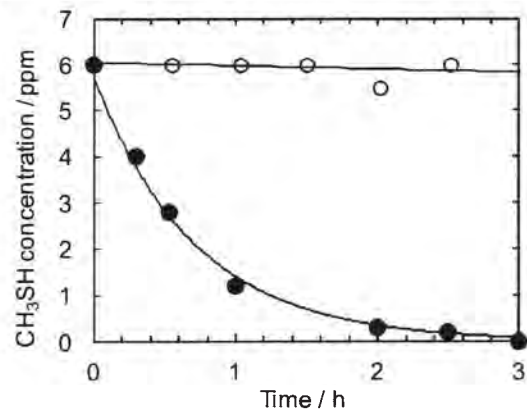


図7. Time course of CH₃SH concentration with the photocatalyst-excimer-lamp hybrid reactor turned off (open circles) and turned on (solid circles) in test box.

2. 1. 3 TMiP を用いた水浄化ユニット

UV ランプに TMiP を巻き付け、防水加工した構造の水浄化ユニットを作製し、オゾン処理と組み合わせてその浄化性能を評価した (図8)。⁸ フェノール、大腸菌、およびファージを用いた浄化試験では、いずれも高い浄化効率を示した (Table 1)。オゾンが光触媒反応で生成する励起電子を受け取り、活性酸素種の生成と正孔の酸化力の維持につながることで、浄化効率が向上していると考えられた。今後、下水処理場の最終工程などへの導入が期待できる。

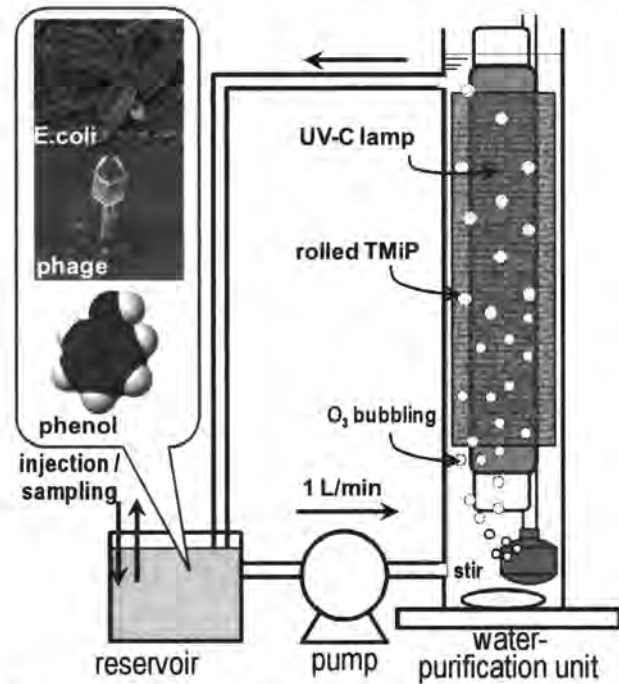


図8. TMiP を用いた水浄化ユニット

Table 1. Comparison of the purification efficiency of the units.

	log reduction of <i>E. coli</i> (CFU/mL) ^a	log reduction of phage (PFU/mL) ^a	decomposition amount of phenol (ng) ^b
UV-C only	0.25	ε	ε
UV-C - TMiP	0.84	0.0064	17
O ₃ only	3.7	0.50	53
UV-C - TMiP - O ₃	3.7	1.9	143

^a after 0.5 min of treatment, ^b after 20 min treatment, ^c no data

2. 2 BDD 電極を用いた環境浄化ユニットの研究開発

図2に示した小型オゾン水生成ユニットを用い、鶴見川河川水 50 mL を被処理水とし、浄化試験を行った。特に、抗菌効果や微生物の駆除効果を期待し、ボウフラ、大腸菌、一般細菌の殺滅効果を評価した。図9に、その試験結果を示す。大腸菌および一般細菌は、極めて短時間で不活化可

能であったが、ボウフラに対してはほとんど効果がなかった。この理由として、大腸菌などはオゾンによる細胞膜破壊で不活化されるが、ボウフラのような多細胞生物は多少の細胞膜破壊では殺滅されないことが考えられた。

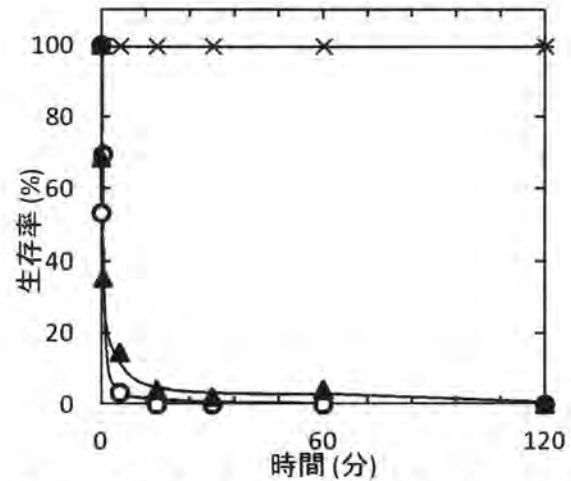


図9. オゾン生成ユニットによる微生物の不活化試験結果 (×: ボウフラ, ▲: 一般細菌, ○: 大腸菌)

3. 考察及び今後の展望

以上の結果から、新規光触媒フィルタ TMiP の環境浄化への応用可能性が示唆された。とくに、軽量でフレキシブルという特性は、浄化ユニットの設計自由度を飛躍的に高め、これまで困難であった小型で効率的な浄化機器の創製や、他の浄化方法とのハイブリッドなどを可能にすると期待できる。また、BDD 電極を用いた環境浄化についても、効率的なオゾン生成方法の確立に重要な知見が得られた。しかも、オゾンは最終的に酸素と水に分解するため、環境負荷の少ない水処理方法として有効であるといえる。

今後の展望としては、さらに多様な浄化技術との組み合わせを比較検討する。それをもとに、空気や水だけでなく土壌も浄化可能なユニットや、抗菌性能を強化したユニットなど、より効率的かつ汎用性の高い浄化技術の研究開発を進めていく。

4. 参考文献

- Ochiai, T.; Hoshi, T.; Slimen, H.; Nakata, K.; Murakami, T.; Tatejima, H.; Koide, Y.; Houas, A.; Horie, T.; Morito, Y.; Fujishima, A., Fabrication of TiO₂ Nanoparticles impregnated Titanium Mesh Filter and Its Application for Environmental Purification Unit. *Catalysis Science & Technology* **2011**, 1, (8), 1324-1327.
- Ochiai, T.; Nakata, K.; Murakami, T.; Fujishima, A.; Yao, Y. Y.; Tryk, D. A.; Kubota, Y., Development of solar-driven electrochemical and photocatalytic water treatment system using a boron-doped diamond electrode and TiO₂ photocatalyst. *Water Research* **2010**, 44, (3), 904-910.

3. Ochiai, T.; Iizuka, Y.; Nakata, K.; Murakami, T.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.; Koide, Y.; Morito, Y., Efficient electrochemical decomposition of perfluorocarboxylic acids by the use of a boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials* **2011**, 20, (2), 64-67.
4. Ochiai, T.; Iizuka, Y.; Nakata, K.; Murakami, T.; Tryk, D. A.; Koide, Y.; Morito, Y.; Fujishima, A., Efficient Decomposition of Perfluorocarboxylic Acids in Aqueous Suspensions of TiO₂ Photocatalyst with Medium-Pressure Ultraviolet Lamp Irradiation under Atmospheric Pressure. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2011**, 50, (19), 10943-10947.
5. Ochiai, T.; Moriyama, H.; Nakata, K.; Murakami, T.; Koide, Y.; Fujishima, A., Electrochemical and Photocatalytic Decomposition of Perfluorooctanoic Acid with a Hybrid Reactor Using a Boron-doped Diamond Electrode and TiO₂ Photocatalyst. *Chemistry Letters* **2011**, 40, (7), 682-683.
6. Ochiai, T.; Nakata, K.; Murakami, T.; Morito, Y.; Hosokawa, S.; Fujishima, A., Development of an Air-Purification Unit Using a Photocatalysis-Plasma Hybrid Reactor. *Electrochemistry* **2011**, 79, (10), 838-841.
7. Ochiai, T.; Niitsu, Y.; Kobayashi, G.; Kurano, M.; Serizawa, I.; Horio, K.; Nakata, K.; Murakami, T.; Morito, Y.; Fujishima, A., Compact and effective photocatalytic air-purification unit by using of mercury-free excimer lamps with TiO₂ coated titanium mesh filter. *Catalysis Science & Technology* **2011**, 1, (8), 1328-1330.
8. Ochiai, T.; Nanba, H.; Nakagawa, T.; Masuko, K.; Nakata, K.; Murakami, T.; Nakano, R.; Hara, M.; Koide, Y.; Suzuki, T.; Ikekita, M.; Morito, Y.; Fujishima, A., Development of an O₃-assisted photocatalytic water-purification unit by using a TiO₂ modified titanium mesh filter. *Catalysis Science & Technology* **2012**, 2, (1), 76-78.

有機モノリス構造体を用いた

新陳代謝機能を有する高撥水性表面

酒井宗寿・中島 章

1. はじめに

近年、高度な撥水性を示す表面の作製例が多数報告されているが^{1,2)}、実用化まで至った事例は極めて限定的である。高撥水性表面は、“表面粗さ”と“低表面エネルギー”の組み合わせで作製されるが、その表面構造を形成する基材に硬い素材を用いたとしても、耐摩耗性を担保させることが困難であることがその主たる原因である。さらに、表面エネルギーが小さい無機物で表面構造を形成した際には、撥水剤による表面改質が必須であり、その撥水剤の紫外線等による分解や脱離が発生した場合には、再度その撥水剤をコーティングする以外には、もとの状態に回復させることはできない。

一方、自然界に存在する“蓮の葉”などの高撥水性を有する植物は、新陳代謝を繰り返すことで、表面構造を再構成し、機能維持を図っている³⁾。本研究では、“新陳代謝による自己修復機能”を高撥水性表面の材料設計指針に取り入れ、優れた耐久性を有する高撥水性表面を実現した。その際、“表面粗さ”の付与に、有機モノリス構造体（3次元共連続構造）を用い⁴⁾、その骨格を酸化チタンの酸化分解力により自己エッチングさせ、降雨等の水流により洗い流すことから、常に新鮮な表面がさらされるようにした（図1）。今回は、この高撥水性表面の作製方法と、その耐候性物理及び耐久性について報告する。

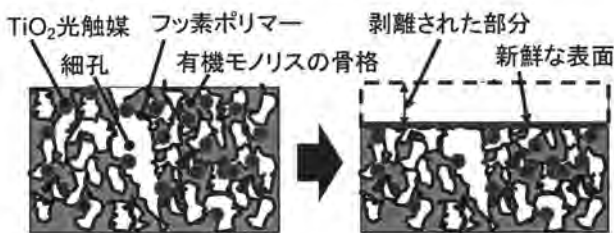


図1. 新陳代謝機能を有する高撥水性表面の材料設計コンセプト

2. 実験と結果

2.1 評価サンプルの作製方法と評価方法

図1aに、高撥水性表面の作製フローを示す。まず、エポキシ樹脂とPEGを所定の比率に混合し、分相構造を形成させて作製した有機モノリス構造体を準備した(図1b)。この構造体にTiO₂ゾル溶液を真空含浸し、モノリス構造体の骨格表面にTiO₂光触媒を配置した。また、有機モノリス構造を作製する際にTiO₂光触媒やPTFE粒子を練りこむことで、骨格内に配置することも行った(図1c)。その際は、ゾル溶液の真空含浸とその直後の乾燥は省略した

(図1a)。有機モノリス構造体の骨格を表面改質するためにフッ素ポリマー溶液に浸漬後(12h)、恒温槽内で乾燥させた(60°C, 2H)。作製された高撥水性表面は、接触角で耐久性及び耐候性を評価した。まず、機械的耐久性には、トラバース試験(100 g/cm²の荷重を掛けられたサンドペーパーを評価サンプル表面で摺動)を行い、摺動回数毎の接触角を測定した。同時に、屋外暴露試験及び耐候性促進試験を行い、接触角の経時変化を評価した。屋外暴露試験は、KSP内に設置された屋外暴露実験台を使用し、2009年5月に開始した。促進耐候性試験は、評価サンプルをUV照射と人工降雨による乾燥湿潤雰囲気により繰り返し曝すことで、約1年間の劣化を1000時間で再現した。試験条件は、JIS JIS K 7350-2に準じた(ブラックパネル温度: 65°C、乾燥時間・湿潤時間のサイクル: 102分 18分間、キセノンランプの放射強度: 60 mW/m²、乾燥時間中の相対湿度: 60 ~ 80%RH)。

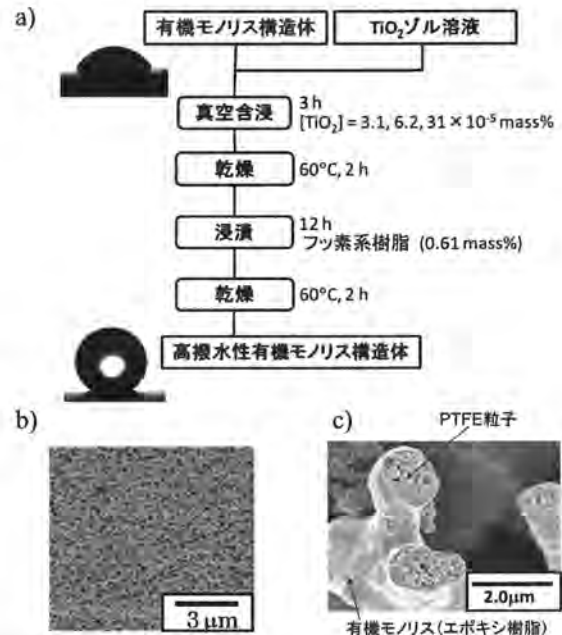


図2. 高撥水性表面の作製方法
a) 作製フロー、b) 有機モノリス構造体の表面SEM像、c) 骨格内のPTFE

2.2 滑水性無機酸化物表面の濡れ性

材料設計を最適化するために作製したサンプルの種類は、38種類に及ぶ。図3に、屋外暴露試験の結果を示す。評価サンプルには、有機モノリス構造体に骨格表面にTiO₂

光触媒を配置し、骨格表面をフッ素ポリマーコートしたものをを用いた (図 1a)。経過日数が 180 日までの段階で、少量の TiO_2 光触媒を添加した評価サンプルの接触角は 130° 以上を維持したが、 TiO_2 光触媒の添加量が多いものは、接触角が著しく増減した (図 3)。接触角の回復は降雨の時期とほぼ一致し、降雨が少ない時期に接触角は著しく低下した。これは、有機モノリス構造体やフッ素ポリマーの紫外線等による表層の劣化から、親水性のエポキシ樹脂が露出したことが主な原因である (図 4a)。その際、表

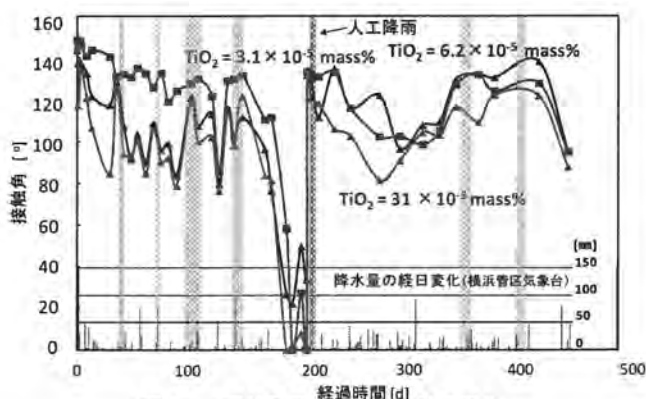


図 3. 屋外暴露試験での接触角変化

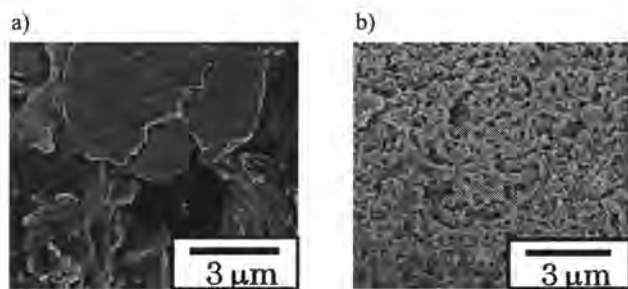


図 4. 人工降雨前後の表面 SEM 像
a) 人工降雨前 b) 人工降雨後

層に存在する TiO_2 光触媒は、劣化された部分が脱離しやすくなるように酸化分解力を発揮する。降雨時に、その表層部分が洗い流され、暴露前と同様なモノリス構造が出現することから、接触角が回復する (図 4b)。それ故、降雨が少ない冬場 (180 日経過時) には接触角が著しく低下するが、人工降雨 (210 日経過時) にさらすとほぼ初期値まで回復する (図 3)。また、雨量が多い春先は (300 日以降)、接触角が回復傾向になる。

一方、モノリス構造の骨格内部に PTFE 粒子を含有させると (図 2c)、表面劣化した部分がより撥水的になり、乾期・雨期に関わらず高撥水性の維持性が飛躍的に向上する。その耐候促進試験では、6000 時間経過 (屋外暴露の 6 年相当) した段階でも、接触角の低下は観察されなかった。一方、トラバース試験では、30 回以上表面を摺動した場合でも接触角が維持された。この機械的耐久性は、サンドペーパーで最表層は剥ぎ取られ、新たに同一構造の表面が現れたことによる。

3. 考察及び今後の展望

38 種類のサンプルを作製・評価することで、“新陳代謝による自己修復機能”を有する高撥水性表面の作製方法を最適化した。屋外暴露試験において、有機モノリス構造体を用いた高撥水性表面の新陳代謝機能を確認した。モノリス構造の内部に PTFE 粒子を含有させると、撥水性の耐候性及び物理的耐久性が飛躍的に向上させることを可能にした。今後、建築材料等への応用展開を模索していきたい。

【参考文献】

1. A. Nakajima, *NPG Asia Materials*, 3, 49 (2011).
2. J. P. Rothstein, *Annu. Rev. Fluid Mech.* 42, 89 (2009).
3. K. Koch, H. F. Bohn, W. Barthlott, *Langmuir*, 25, 24 14116 (2009).
4. N. Tsujioka, N. Ishizuka, N. Tanaka, T. Kubo, K. Hosoya, *Polymer Chemistry*, 46, 10, 3272 (2008).

光触媒による抗菌・抗ウイルス性能評価に向けた基礎的検討

石黒 斉、中野 竜一、姚 燕燕、梶岡 実雄、窪田 吉信

1. はじめに

院内感染は、感染者・保菌者（患者や医療従事者）からの感染源または細菌に汚染された環境面や機材類に直接触れることによって容易に広がる危険性がある。そのため、医療施設などでの院内感染の蔓延を防ぐためには接触感染を防ぐことが重要であり、環境面の清浄化が訴えられている。

我々はこれまでの検討から、酸化チタン (TiO_2) を用いた紫外光応答型光触媒を用いて抗菌・抗ウイルス効果が得られることを報告している¹⁾。一方で、紫外光応答型光触媒では室内など十分な紫外光が得られない環境中で抗菌・抗ウイルス効果を得ることが困難であると考えられる。そのため、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) による委託事業「循環社会構築型光触媒産業創成プロジェクト」として、可視光応答型光触媒の開発が進められており、 TiO_2 にさまざまな金属を担持した可視光応答型光触媒が開発されており、実用化へ向けた検討が行われている。

その中で、我々は本年度以下のテーマについて検討した。

1-1 可視光応答型光触媒の抗菌・抗ウイルス効果の性能評価

NEDO プロジェクトに於いて開発された高活性型可視光応答型光触媒サンプルを用いて、薬剤耐性菌、各種ウイルスに対する抗菌・抗ウイルス性能についてラボレベルでの評価を行った。

1-2 実空間における可視光応答型光触媒加工製品による抗菌効果

実空間における実証試験として病院施設の協力のもと可視光応答型光触媒加工製品を病院内の各所に設置し、その抗菌効果について試験を行った。

1-3 JIS 標準化委員会への参画

可視光応答型光触媒の JIS 制定に向けた試験方法の開発、ラウンドロビン試験を行った。

2. 実験と結果

2-1 薬剤耐性菌・ウイルスに対する抗菌効果

試験菌株として、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) を用いた。また、試験ウイルスとしてはインフルエンザウイルスを用いた。試験方法は、JIS R 1702²⁾ に準じた方法に従った。図 1 にその概要を示すが、試験品に菌液を添加し、其の上を密着フィルムでカバーし、保湿容器内に入れ保湿用ガラスでカバーした後、白色蛍光灯を用いて 0 lx 又は 1000 lx で最大 4 時間照射を行った。所定時間光照射した菌液を回収した後、平板寒天培地に塗

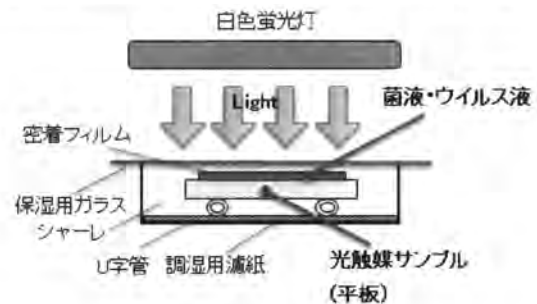


図 1. 試験方法の概略

沫し、37℃で 48 時間培養して発育した菌の集落 (コロニー) を計測した。インフルエンザウイルスについてはウイルス液を回収後、MDCK 細胞へ感染させて、その細胞変性を計測した。可視光応答型光触媒として 3 種類 (サンプル A、サンプル B、サンプル C) のサンプルを使用し、コントロールサンプルとして、光触媒を塗布していないガラス板を用いた。

2-1-1 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する抗菌効果

MRSA に対する抗菌効果を図 2 に示す。Dark 下もしくは 1000 lx の可視光を 4 時間照射したコントロールサンプルでは抗菌効果を認めなかった。一方で、光触媒を塗布したサンプルに可視光を照射した場合には、すべてのサンプルで抗菌性を示した。最も抗菌性の高いサンプルはサンプル C であり、光照射後 1 時間で初期菌数より約 2log の減少があり、2 時間後には菌は検出されなかった。また、サンプル A 及び C では 0 lx でも菌数の減少がみられた。

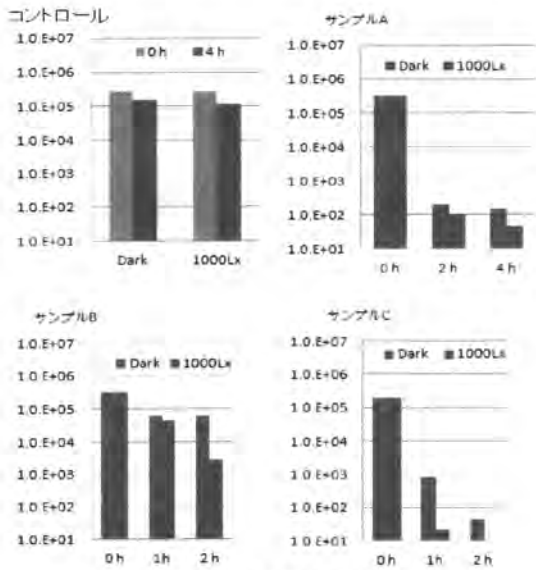


図 2. MRSA に対する抗菌効果

2-1-2 多剤耐性緑膿菌 (MDRP) に対する抗菌効果

MDRP に対する抗菌効果を図 3 に示す。MDRP に対しては、サンプル A が最も良い効果を示し、光照射後 2 時間で菌の検出が出来なくなった。MRSA に対する抗菌効果と比較すると MDRP に対する抗菌効果の方が高い傾向であった。その他の菌種として多剤耐性アシネトバクター、レジオネラに於いても抗菌効果の検討を行ったが、これらの結果とはほぼ同等であった。

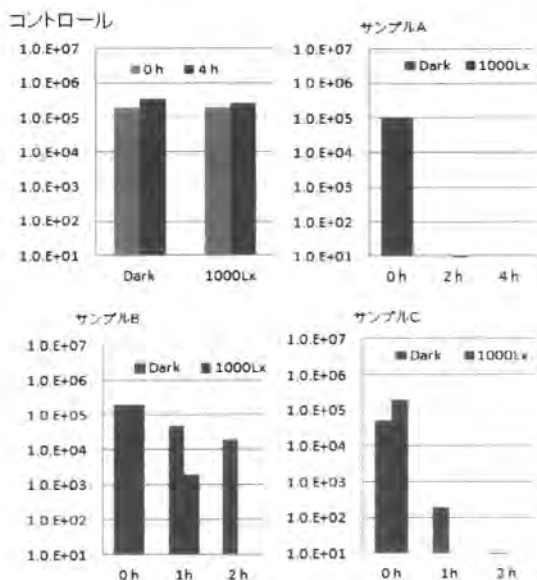


図 3. MDRP に対する抗菌効果

2-2 インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス効果

インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス効果はサンプル C が 1 時間で 0 lx 及び 1000 lx 共にウイルスが検出されず、最も高い抗ウイルス効果を示した (図 4)。また、サンプル B 及び C では Dark 下においても、抗ウイルス性

能が発揮されていた。

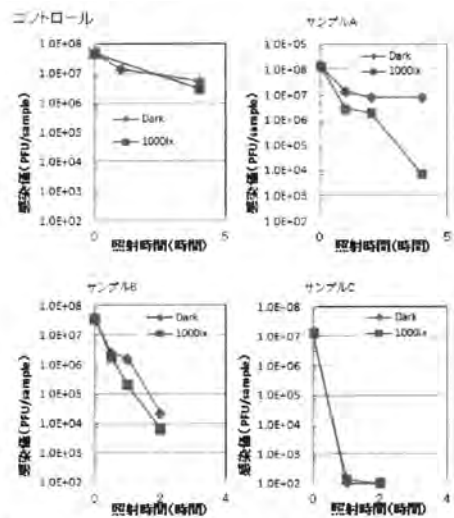


図 4. インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス効果

2-3 実空間における光触媒加工製品の環境細菌低減効果

実空間における光触媒加工製品の環境菌低減効果を図るために、NEDO で開発された光触媒加工製品を未加工品と共に病院内に設置し、加工製品と未加工製品における付着菌数の比較を行った。

環境菌の回収には、図 5 の様に 100mm×100mm 角の枠内を湿った綿棒で丁寧に拭き取り付着している菌を回収した。次にこの菌回収液を各種培地に塗抹し 48 時間 37℃ で培養後、培地上に発育してきた菌数を計測した。

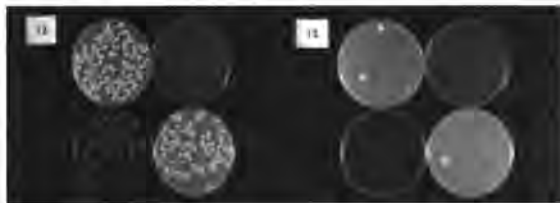


図 5. 環境菌の拭き取り試験

図 6 及び図 7 に測定結果を示す。明らかなように、未加工製品上から拭き取ったサンプルでは菌が多数認められるのに対して、光触媒加工製品ではほとんど菌が生育していない。受付窓口カウンターに設置したサンプル A はいずれの試験ポイントにおいても光触媒加工製品における付着菌数はコントロールとして用いた未加工品の菌数に比べて減少していた。しかし、サンプル B では光触媒加工製品上の菌数が減少しているもの、逆に未加工製品上の菌数が少ないもの、光触媒加工製品と未加工製品で差がないも

のがあった。設置場所の違いでは、床面に対して垂直なガラス扉や壁面では菌の付着量が少なく、効果判定が困難なところがあった。また、光触媒加工製品と未加工製品間で効果に違いが得られなかった箇所については、加工製品上の光触媒のはがれなどが一因ではないかと考えられた。

本実証試験についてはさらに調査を継続し試験例数を多くして解析する予定である。



未加工製品（コントロール） 光触媒加工製品
図 6. 回収液を 48 時間培養した結果

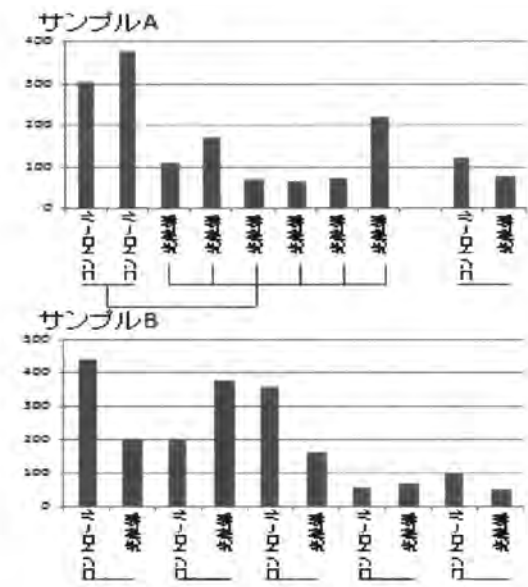


図 7. 実環境中における抗菌試験結果

2-4 実空間における環境菌の種類に関する調査

病院施設内に常在している環境菌の種類を調べるために拭き取り試験で発育した菌のコロニーを採取し、純培養した菌から遺伝子を抽出し 16S r RNA をターゲットとした PCR とシーケンスを行い、菌名の同定を行った。

その結果、Staphylococcus 属、Roseomonas 属、Moraxella 属、Micrococcus 属などの菌種を分離・同定した。菌種のうち、最も多く分離された菌種は Staphylococcus 属であった。場所別による生育菌数では、トイレ手すりから黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を最も多く検出した。

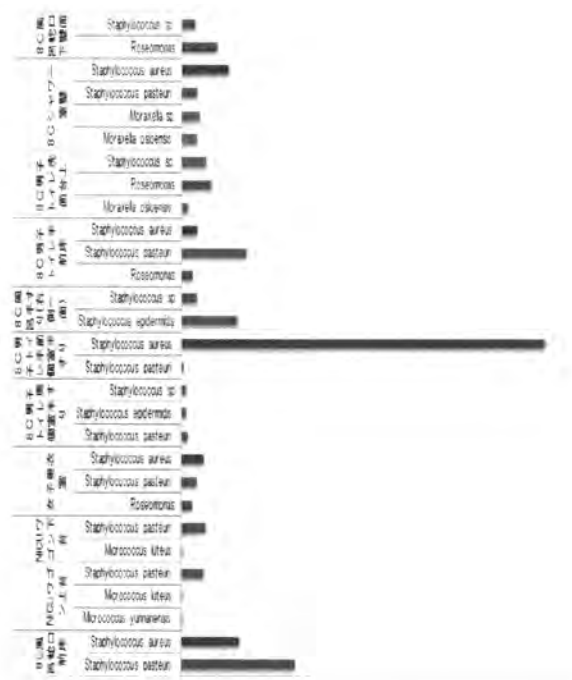


図 8. 実空間より回収された菌の種類

2-5 JIS 標準化委員会への参画

可視光応答型光触媒の抗菌・抗ウイルス試験法の JIS 化に協力し、試験方法の設定とラウンドロビン試験に参加し、表 1 に示す成果を得た。

表 1. 光触媒性能評価試験状況一覧
(JIS および ISO 化)

対象		JIS	ISO
紫外光 応答型	細菌	JIS R 1702	27447
	ウイルス	原案作成終了 (JIS R 170x)	投票中 ISO TC206/WG37 N887
可視光 応答型	細菌	原案作成終了 (JIS R 171x)	投票中 TC206/SC N886 (ISO/CD17094)
	ウイルス	原案作成終了 (JIS R 171z)	原案作成終了 ISO TC206/WG37 N000

3. まとめ

- ・ NEDO プロジェクトで開発された可視光応答型光触媒の薬剤耐性菌、インフルエンザウイルスに対する性能評価試験を行い抗菌・抗ウイルス効果を確認した。
- ・ 実空間における光触媒加工製品の抗菌効果の実証試験を行い環境菌の減少を確認した。
- ・ 実証試験で分離された環境菌は球菌類が多く Staphylococcus 属が最も多かった。
- ・ 光触媒性能試験法の JIS 化のため標準化委員会に協力し、紫外光応答型光触媒の抗ウイルス試験 JIS 原案、可視光応答型光触媒の抗菌と抗ウイルス試験 JIS 原案の作成を終了した。ISO についても中国と共同提案中である。

(参考文献)

1. 中野 竜一, 姚 燕燕, 石黒 斉, 平成 21 年度研究概要, 87-89, (2011).
2. ファインセラミックス-光照射下での光触媒抗菌加工製品の抗菌性能試験法・抗菌効果. JIS R 1702. (2006) 島弘志 編集 日本規格協会.

業 績

【国外】

(論文)

1. K. Nakata, Y. Ishikawa, M. Sakai, T. Ochiai, B. Liu, H. Sakai, T. Murakami, M. Abe and A. Fujishima
“ Anisotropic Photomechanical Motion of Semicircular-shaped Microfibers that Contain Dyes”
Chem. Lett.40,pp1229-1230,2011.
2. K. Nakata, B. Liu, Y. Goto, T. Ochiai, M. Sakai, H. Sakai, T. Murakami, M. Abe and A. Fujishima
“ Visible Light Responsive Electrospun TiO₂ Fibers Embedded with WO₃ Nanoparticles ”
Chem. Lett.40,pp1161-1162,2011.
3. K. Nakata, B. Liu, Y. Ishikawa, M. Sakai, H. Saito, T. Ochiai, H. Sakai, T. Murakami, M. Abe, K. Takagi and A. Fujishima
“ Fabrication and Photocatalytic Properties of TiO₂ Nanotube Arrays Modified with Phosphate”
Chem. Lett.40,pp1107-1109,2011.
4. K. Nakata, M. Sakai, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi and A. Fujishima
“ Antireflection and Self-Cleaning Properties of a Moth-Eye-Like Surface Coated with TiO₂ Particles”
Langmuir 2011, 27, 3278
5. K. Nakata, K. Udagawa, T. Ochiai, T. Murakami and A. Fujishima
“ Rapid Erasing of Wettability Patterns based on TiO₂-PDMS Composite Films”
Mater. Chem. Phys. 2011, 126, 487
6. B. Liu, K. Nakata, X. Zhao, T. Ochiai, T. Murakami and A. Fujishima
“ Theoretical Kinetic Analysis of Heterogeneous Photocatalysis: the Effects of Surface Trapping and Bulk Recombination through Defects”
J. Phys. Chem. C 2011, 115, 16042;
7. B. Liu, K. Nakata, M. Sakai, H. Saito, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi and A. Fujishima
“ Mesoporous TiO₂ Core Shell Spheres Composed of Nanocrystals with Exposed High-Energy Facets: Facile Synthesis and Formation Mechanism”
Langmuir 2011, 27, 8508
8. K. R. Reddy, K. Nakata, T. Ochiai, T. Murakami, D. A. Tryk and A. Fujishima
“ Facile Fabrication of Ag Nanoparticles-TiO₂ Nanofiber Composites and Their Photocatalytic Performance”
J. Nanosci. Nanotechnol. 2011, 11, 3695
9. B.K.Kaleji, R.Sarraf-Mamoozy, K. Nakata, A. Fujishima
“ The effect of Sn dopant on crystal structure and photocatalytic behavior of nanostructured titania thin films”
J.Sol-Gel Sci.Tech,60,pp99-107,2011
10. K. Nakata, M. Sakai, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi and A. Fujishima
“ Fabrication and characterization of self-organized porous TiO₂ particle layers”
Mater.Lett.,70,pp160-162,2012
11. K. Nakata, M. Sakai, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima
“ Bending motion of a polyacrylamide/graphite fiber driven by a wide range of light from UV to NIR”
Mater.Lett,accepted,2012
12. L. Wen, B. Liu, X. J.Zhao, K. Nakata, T. Murakami, A. Fujishima
“ Synthesis,Characterization,and Photocatalysis of Fe-Doped TiO₂ :Combined Experimental and Theoretical Study”
Int.J.Photoenergy,accepted,2012
13. B. Liu, K. Nakata, S. Liu, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima
“ Theoretical Kinetic Analysis of Heterogeneous Photocatalysis by TiO₂ Nanotube Arrays:The Effects of Nanotube Geometry on Photocatalytic Activity”
J.Phys.Chem.,accepted,2012
14. K. Nakata, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima
“ Photoenergy conversion with TiO₂ photocatalysis:new materials and recent applications”
Electrochimica Acta,accepted,2012
15. Ochiai, T.; Hoshi, T.; Slimen, H.; Nakata, K.;

- Murakami, T.; Tatejima, H.; Koide, Y.; Houas, A.; Horie, T.; Morito, Y.; Fujishima, A.,
 “ Fabrication of TiO₂ Nanoparticles impregnated Titanium Mesh Filter and Its Application for Environmental Purification Unit.”
Catalysis Science & Technology 2011,1,(8),1324-1327.
16. T. Ochiai, H. Nanba, T. Nakagawa, K. Masuko, K. Nakata, T. Murakami, R. Nakano, M. Hara, Y. Koide, T. Suzuki, M. Ikekita, Y. Morito, A. Fujishima,
 “ Development of Ozone-assisted Photocatalytic Water-purification Unit by Using of TiO₂ Nanoparticles Impregnated Titanium Mesh Filter for Decomposition of Biological and Chemical Contaminants.”
Catalysis Science & Technology 2012, 2,76-78.
17. T. Ochiai, K. Nakata, T. Murakami, Y. Morito, S. Hosokawa, A. Fujishima,
 “Development of an Air-Purification Unit Using a Photocatalysis-Plasma Hybrid Reactor. ”
Electrochemistry 2011,79,(10)838-841.
18. T. Ochiai, H. Moriyama, K. Nakata, T. Murakami, Y. Koide, A. Fujishima,
 “Electrochemical and Photocatalytic Decomposition of Perfluorooctanoic Acid with a Hybrid Reactor Using a Boron-doped Diamond Electrode and TiO₂ Photocatalyst.”
Chemistry Letters 2011, 40, (7), 682-683.
19. T. Ochiai, Y. Iizuka, K. Nakata, T. Murakami, D.A. Tryk, A. Fujishima, Y. Koide, Y. Morito,
 “ Efficient Electrochemical Decomposition of Perfluorocarboxylic Acids by Use of a Boron-Doped Diamond Electrode”
Diamond and Related Materials 2011, 20, 64-67.
20. T. Ochiai, Y. Niitsu, G. Kobayashi, M. Kurano, I. Serizawa, K. Horio, K. Nakata, T. Murakami, Y. Morito, A. Fujishima.,
 “ Compact and Effective Photocatalytic Air-Purification Unit by using of Mercury-Free Excimer Lamps with TiO₂ Coated Titanium Mesh Filter.”
Catalysis Science & Technology 2011, 1,(8),1328-1330.
21. Ochiai, T.; Nagata, M.; Shimoyama, K.; Kato, T.; Asaoka, T.; Kondo, M.; Dewa, T.; Yamashita, K.; Kashiwada, A.; Futaki, S.; Hashimoto, H.; Nango, M.
 “ Two-Dimensional Molecular Assembly of Bacteriochlorophyll a Derivatives Using Synthetic Poly(ethylene glycol)-Linked Light-Harvesting Model Polypeptides on a Gold Electrode Modified with Supported Lipid Bilayers. ”
ACS Macro Letters 2012, 1, 28-32.
22. Slimen, H.; Ochiai, T.; Nakata, K.; Murakami, T.; Houas, A.; Morito, Y.; Fujishima, A.
 “ Photocatalytic decomposition of cigarette smoke by using TiO₂ impregnated titanium mesh filter. ”
Industrial & Engineering Chemistry Research 2012, 51, (1), 587-590.
23. K. Yamauchi, Y. Yao, T. Ochiai, M. Sasaki, Y. Kubota, G Yamauchi
 “ Antibacterial Activity of Hydrophobic Composite Materials containing a Visible Light-Sensitive Photocatalyst.”
J. Nanotech., doi:10.1155,2011.
24. H. Ishiguro, R. Nakano, Y. Yao, J. Kajioka, A. Fujishima, Y. Kubota
 “ Inactivation of Q β bacteriophage by photocatalysis using TiO₂ thin film under weak with long wavelength UV irradiation.”
Photochem. Photobiol. Sci. 10:1825-1829,2011.
25. Y. Yao, T. Ochiai, H. Ishiguro, R. Nakano, Y. Kubota.
 “ Antibacterial Performance of a Novel Photocatalytic-coated Cordierite Foam for Use in Air Cleaners.”
Applied Catalysis B: Environmental. 106: 592-599, 2011.
26. Y. Yao, Y. Kubota, T. Murakami, T. Ochiai, H. Ishiguro, K. Nakata, A. Fujishima
 “Electrochemical Inactivation Kinetics of Boron-Doped Diamond Electrode on Waterborne Pathogens.”
J. Water Health, 9: 534-543, 2011.
27. Kato S, Kubota K, Shimamura T, Shinohara Y, Kobayashi N, Watanabe S, Yoneda M, Inamori N, Nakamura F, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Taguri M, Kubota Y, Goshima Y, Morita S, Endo I, Maeda S, Nakajima A, Nakagama H.
 “ Semaphorin 4D, a lymphocyte semaphorin, enhances tumor cell motility through binding its

- receptor, plexinB1, in pancreatic cancer.”
Cancer Sci. 102: 2029-2037, 2011.
28. Endoh K, Nishi M, Ishiguro H, Uemura H, Miyagi Y, Aoki I, Hirano H, Kubota Y, Ryo A.
“ Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis.”
Prostate, 2011, doi:10.1002/pros.21466.
29. Yao Y, Kubota Y, Murakami T, Ochiai T, Ishiguro H, Nakata K, Fujishima A.
“ Electrochemical Inactivation Kinetics of Boron-Doped Diamond Electrode on Waterborne Pathogens.”
J. Water Health, 9: 534-543, 2011.
30. Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kagawa E, Sasaki T, Sano JY, Takagawa R, Sasaki K, Fujinami K, Aoki I
“ Ohno S, Kubota Y, Uemura H. Co-expression of atypical protein kinase C λ / ι and interleukin-6 in prostate cancer tissue correlates with biochemical recurrence.”
Cancer Sci. 102: 1576-81, 2011.
31. Nakano R, Ishiguro H, Yao Y, Kajioka J, Fujishima A, Kubota Y.
“ Photocatalytic inactivation of Influenza virus by titanium dioxide thin film. Photochem.”
Photobiol. Sci. in preparation
32. Ishiguro H, Yao Y, Nakano R, Kajioka J, Fujishima A, Kubota Y.
“ Photocatalytic activity of Cu²⁺/TiO₂-coated cordierite foam inactivates bacteriophages and Legionella pneumophila.”
Appl. Catal. B: Environ. in preparation
33. Inoue Y, Akimoto K, Nagashima Y, Wada H, Miwa H, Seto K, Sasaki K, Okawa T, Yamane Y, Ishiguro H, Ohno S, Ikezawa Z.
“ The overexpression of atypical protein kinase C λ / ι correlates with pathologic type and metastatic lesions in malignant melanoma.”
in preparation
34. Kato S, Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Kubota K, Shimamura T, Shinohara Y, Kobayashi N, Watanabe S, Sato T, Sasaki K, Nakaigawa N, Kubota Y, Inayama Y, Endo I, Ohno S, Maeda S, Nakajima A.
“ aPKC λ / ι is a beneficial prognostic marker for pancreatic neoplasm.”
in preparation
35. Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Zheng YW, Kojima Y, Irie T, Asai-Sato M, Sawada H, Noda Y, Moriya M, Ishibashi N, Kurita H, Li B, Sasaki K, Kagawa E, Kim M, Ito M, Kiuch Y, Miyagi Y, Tachikawa T, Kubota Y, Aoki I, Taniguchi H, Ohno S, Noda T.
“ aPKC \square regulates mammary stem/progenitor cell propagation via an AP2/ErbB2 negative feedback pathway.”
in preparation
36. Yao Y, Yamauchi K, Murakami T, Ochiai T, Kubota Y, Yamauchi G
“ Enhanced Disinfection Efficiency of Cu-WO₃-added PTFE Particulate Superhydrophobic Composite under Visible-Light Exposure.”
in preparation
37. M. Sakai, T. Kato, A. Nakajima, A. Fujishima,
“ Superhydrophilic Surface with a Metabolic System using TiO₂ Photocatalyst”
in preparation (2011)
38. M. Sakai, M. Nishimura, Y. Morii, T. Furuta, A. Nakajima, A. Fujishima,
“Reduction of Fluid Friction on the Surface Coated with TiO₂ Photocatalyst under UV Illumination”,
Surface and Coatings Technology, submitted (2012)
39. K. Katsumata, Y. Ohno, K. Tomita, M. Sakai, A. Nakajima, M. Kakihana, A. Fujishima, N. Matsushita, K. Okada,
“ Preparation of TiO₂ Thin Films Using Water-soluble Titanium Complexes and Their Photoinduced Properties”,
Photochemistry and Photobiology, in press. (2011)
40. T. Furuta, M. Sakai, T. Isobe, S. Matsushita, A. Nakajima,
“ Sliding of Water Droplets on Hydrophobic Surfaces with Various Hydrophilic Region Sizes”,
Langmuir, 2011, 27/11, pp 7307-7313
41. H. Wagata, K. Katsumata, N. Ohashi, M. Sakai, A. Nakajima, A. Fujishima, K. Okada, N. Matsushita,
“Photocatalytic Activity and Related Surface Properties of Transparent ZnO Films Prepared by a Low-temperature”,

- Photochemistry and Photobiology, 10, p1751-1097.
(2011)
42. K. Katsumata, T. Wada, A. Inoue, M. Sakai, A. Nakajima, A. Fujishima, N. Matsushita, K. Okada, "Control of Wetting on Ti-based Bulk Metallic Glass Surfaces by a Hydrothermal Method", Journal of Materials Science, 46, p3430-3435. (2011)
43. T. Furuta, M. Sakai, T. Isobe, S. Matsushita, A. Nakajima, "Wetting Mode Transition of Water Droplets by Electrowetting on Highly Hydrophobic Surfaces Coated with Two Different Silanes" Chem.Lett.,41,23-25,2012
44. T. Furuta, T. Isobe, M. Sakai, S. Matsushita, A. Nakajima, "Wetting Mode Transition of Nanoliter Scale Water Droplets during Evaporation on Superhydrophobic Surfaces with Random Roughness Structure" Appl Surf.Sci.,258,2378-2383,2012
45. T. Furuta, T. Isobe, M. Sakai, S. Matsushita, A. Nakajima, "Direct Observation of the Wetting Mode Transition during Evaporation of Water Droplets on Superhydrophobic Surfaces with Random Roughness Structure" J.Jpn.Colour.Mater.,in press
- 【国内誌・国外誌】**
(書籍)
1. K. Nakata, S. Nishimoto, X. Zhang, A. Fujishima
SELF-CLEANING SURFACES AND MATERIALS
Wiley-VCH,2012 発刊予定
2. 中田一弥 (分担執筆)
光応答性ファイバーを用いた光 - 運動エネルギー変換
フォトクロミズムの新展開と光メカニカル機能材料
2011年11月シーエムシー出版 pp314-318 発刊
3. 中田一弥 (分担執筆)
エレクトロニクス・エネルギーデバイスにおける超撥水・超親水化技術
技術情報協会,2012年3月発刊予定
4. A.Fujishima, S. Kako, T. Murakami, K. Nakata, T. Ochiai, T. Nomura,
CLEAN AND GREEN : A STORY OF THE SUN AND PHOTOCATALYSTS;
Kaisei-sya: Tokyo, 2011年9月発刊
5. 落合剛 (森田英利編著)
『微生物機能学』
三共出版 第9章 2012年3月下旬刊行予定
6. 中野竜一, 石黒斉, 姚燕燕, 梶岡実雄, 窪田吉信
院内感染起炎菌に対する光触媒の効果
会報光触媒, 35: 52-55, 2011.
7. 石黒斉, 中野竜一, 姚燕燕, 梶岡実雄, 窪田吉信
紫外光応答型光触媒による抗ウイルス機構
会報光触媒, 35: 48-51, 2011.
8. 中野竜一, 石黒斉, 姚燕燕, 梶岡実雄, 窪田吉信
院内感染起炎菌に対する光触媒の効果
会報光触媒, 35: 52-55, 2011.
9. 中野竜一
第12章 可視光応答型光触媒による抗菌・抗ウイルス効果.感染症・シックハウス対策と太陽光水素生成のための可視光応答型半導体光触媒
橋本和仁 編.技術教育出版 p113-p123
10. 石黒斉
第13章 可視光応答型光触媒による抗菌・抗ウイルス効果の性能評価法
と標準化.感染症・シックハウス対策と太陽光水素生成のための可視光応答型半導体光触媒
橋本和仁 編.技術教育出版 p124-p132
11. 中野竜一,石黒斉
抗菌抗ウイルス.図解 光触媒のすべて
株式会社オーム社.2012.submitted
12. 中野竜一,落合剛
「微生物機能学」
三共出版.2012.submitted
13. A. Nakajima , M. Sakai
Self-Cleaning Surfaces And Materials
Wiley-VCH in progress 2011
- 【総説・解説】**
1. K. Nakata and A. Fujishima
“光触媒の歴史及び現状 - 将来動向総説”
光技術コンタクト 2011, 印刷中

2. K. Nakata
“酸化チタン光触媒を用いたセルフクリーニング性の付与”
Material Stage 2011, 11, 51

3. A. Fujishima, K. Nakata and T. Ochiai,
“産業を創出する光触媒”
工業材料 2011, 59, 72
“屈曲挙動をしめす光応答性ファイバーの開発”
特定領域研究ニュースレター 2011, 11, 20.

【国際学会・国際会議等】

1. K. Nakata
“Photo-mechanical motion in fibers based on hygroscopic polymers with dyes”
The 18th China-Japan Bilateral Symposium on Intelligent Electrohptonic Materials and Molecular Electronics, 2011.9.17, Tianjing, P.R. China

2. T. Ochiai, K. Nakata, T. Murakami, Y. Morito, A. Fujishima
“Development of Novel Environmental Purification Units by Using Flexible and Effective Titanium Mesh Filter Modified with TiO₂ Photocatalyst”,
The 18th China-Japan Bilateral Symposium on Intelligent Electrohptonic Materials and Molecular Electronics, 2011.9.17, Tianjing, P.R. China

3. T. Ochiai, K. Nakata, T. Murakami, Y. Morito, A. Fujishima
“Development of Novel Environmental Purification Units by Using Flexible and Effective Titanium Mesh Filter Modified with TiO₂ Photocatalyst”,
The 16th International Conference on TiO₂ Photocatalysis: Fundamentals and Applications (TiO₂-16), 2011.11.10, San Diego, California, USA

4. T. Ochiai, K. Nakata, T. Murakami, Y. Morito, S. Hosokawa, A. Fujishima
“Development of a Photocatalysis-Plasma Hybrid Reactor for Environmental Purification” The 62nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Electrochemical Frontiers in Global Environment and Energy, 2011.9.12, Niigata, Japan

5. Kubota Y, Ishiguro H, Nakano R, Yao Y, Kajioka J, Fujishima A.
“A. Study on antiviral activity of photocatalytic TiO₂ (III).”
SIEMME'18, 2011/9/17, Tianjin, China.

6. Yao Y, Ishiguro H, Nakano R, Kubota Y.
“Application of TiO₂ Photocatalyst as a Medical Antimicrobial: an Instance of Medical Device Development.”
BIT Life Sciences' 2nd Annual Nanomedicine-2011. 2011/11/3-5, 中国・深圳.

7. T. Murakami, K. Nakata, A. Fujishima
“Photocatalytic Removal Performance of VOC on Cu²⁺/WO₃ with Peroxo Titanic Acid”
The 18th China-Japan Bilateral Symposium on Intelligent Electrohptonic Materials and Molecular Electronics, 2011.9.17, Tianjing, P.R. China

8. T. Nomura, T. Murakami, A. Fujishima
“Investigation of Pretreatment Method for Degradation of Acetaldehyde with Visible Light Responsive Photocatalyst”
The 18th China-Japan Bilateral Symposium on Intelligent Electrohptonic Materials and Molecular Electronics, 2011.9.17, Tianjing, P.R. China

9. T. Adachi, K. Nakata, T. Ochiai, T. Murakami, Y. Einaga, A. Fujishima
Electrochemical Reduction of Carbon Dioxide Using Boron-doped Diamond Electrode
The 18th China-Japan Bilateral Symposium on Intelligent Electrohptonic Materials and Molecular Electronics, 2011, Beijing (China)

【国内講演等】

1. 中田一弥
“光触媒の現状と将来の課題”
油化学セミナー2011 (名古屋市工業研究所 (Nagoya, Japan)) 2011.6.17

2. 中田一弥
“酸化チタン光触媒による微細パターンニング技術の開発”
第8回日本写真学会 アンビエント技術研究会 東京ミッドタウン 2012.

3. 中田一弥
“光エネルギー変換に資する光機能性材料の創成と応用”
電気化学会第79回大会 アクトシティ浜松 2012.

4. 村上武利
“光触媒の現状と今後の展開”
第123回ラドテック研究会、学士会館、東京、

- 2011.9.27
5. 落合剛
“光触媒の基礎と応用、未来への展望～快適で持続可能な社会のために～
赤外・紫外・可視光応用技術展 2011 併設特別セミナー、パシフィコ横浜 2011.4.21
6. 中野竜一
“院内感染起炎菌に対する光触媒の効果”
第 11 回光触媒研究討論会、東京 2011 年 7 月。
7. 石黒斉
“紫外光応答型光触媒による抗ウイルス機構”
第 11 回光触媒研究討論会、東京 2011 年 7 月
8. 中野竜一
“感染症対策としての可視光応答型光触媒”
Biojapan2011、横浜 2011 年 10 月
9. 中野竜一、岡本了一
“プラスミド性 AmpC β -lactamase CFE-1 の高発現機構の解析”
第 58 回東日本化学療法学会、山形 2011 年 10 月
10. 絹川謙作、山本晃士、三木慎一郎、石黒斉、姚燕燕、窪田吉信、中野竜一、笹原武志、梶岡実雄、砂田香矢乃、葦島維文、橋本和仁
“光触媒による感染リスク低減の検討 第 3 報 銅化合物複合酸化チタン光触媒による抗菌効果の実フィールド検証”
第 27 回日本環境感染学会総会、福岡 2012 年 2 月
11. 三木慎一郎、山本晃士、絹川謙作、石黒斉、姚燕燕、窪田吉信、中野竜一、笹原武志、梶岡実雄、砂田香矢乃、葦島維文、橋本和仁
“光触媒による感染リスク低減の検討 第 4 報 バクテリオファージを含む飛沫核に対する銅化合物複合酸化チタンの抗ウイルス効果”
第 27 回日本環境感染学会総会、福岡 2012 年 2 月
12. 石黒斉、姚燕燕、中野竜一、三木慎一郎、絹川謙作、山本晃士、砂田香矢乃、葦島雅文、梶岡実雄、橋本和仁、窪田吉信
“銅化合物複合酸化チタン光触媒による抗菌効果”
第 18 回光触媒シンポジウム、東京 2011 年 12 月
13. 中野竜一、野島康弘、石黒斉、姚燕燕、三木慎一郎、絹川謙作、山本晃士、砂田香矢乃、葦島維文、梶岡実雄、橋本和仁、窪田吉信
“銅化合物複合酸化チタン光触媒による抗ウイルス効果”
第 18 回光触媒シンポジウム、東京 2011 年 12 月
14. 姚燕燕、石黒斉、中野竜一、梶岡実雄、藤嶋昭、窪田吉信
“光触媒の抗菌・抗ウイルス性能評価試験方法の確立”
第 18 回光触媒シンポジウム、東京 2011 年 12 月
15. 山本晃士、絹川謙作、三木慎一郎、石黒斉、中野竜一、弥永都、橋本和仁
“抗菌・抗ウイルス性能を有する可視光応答型光触媒の実環境中における抗菌性能評価”
第 18 回光触媒シンポジウム、東京 2011 年 12 月
16. 石黒斉、姚燕燕、中野竜一、三木慎一郎、絹川謙作、山本晃士、砂田香矢乃、葦島維文、梶岡実雄、橋本和仁、窪田吉信
“光触媒による感染リスク低減の検討 第 1 報 銅化合物複合酸化チタン光触媒による細菌及びウイルスに対する効果”
第 27 回日本環境感染学会総会、福岡 2012 年 2 月
17. 中野竜一、石黒斉、姚燕燕、絹川謙作、山本晃士、三木慎一郎、砂田香矢乃、葦島維文、笹原武志、梶岡実雄、橋本和仁、窪田吉信
“光触媒による感染リスク低減の検討 第 2 報 病院内から分離される環境菌の調査”
第 27 回日本環境感染学会総会、福岡 2012 年 2 月
18. 酒井宗
“固液界面付近における流動ダイナミクスの解明と新規濡れ性機能表面の創製 - 撥水・親水現象の新たな応用展開方法の確立 - ”
公益財団法人 日本板硝子材料工学助成会 第 29 回学術講演会 靄が関ビル (東京都) 2012 年 1 月 23 日
19. 酒井宗寿、中田一弥
“二酸化チタン光触媒におけるナノ構造制御による機能向上と超親水性の新規利用概念”
社団法人 表面技術協会 金属のアノード酸化皮膜の機能化部会 (ARS 研究会) 第 79 回例会 工学院大学 (東京都) 2011 年 9 月 16 日
20. 酒井宗寿
“表面濡れ性に関する最新研究の現状 - 二酸化チタン光触媒の親水性の新規利用概念と超撥水性表面上での流体の挙動 - ”
平成 22 年度 岡山大学次世代研究者・異分野研究連携育成支援事業 岡山大学 (岡山県) 2011 年 7

月 8 日

21. 酒井宗寿、加藤智也、中島章、藤嶋昭
「二酸化チタンモノリス構造体の構造制御と色素増感太陽電池への応用」
第 18 回光触媒シンポジウム, 東京 2011 年 12 月
22. テクノトランスファー in 川崎 2012
高撥水性有機モノリス構造体
7 月 6 日 ~ 8 日 KSP (展示会)
23. Nano tech 2012
高撥水性有機モノリス構造体
2 月 15 日 ~ 17 日 東京ビックサイト (展示会)
24. 落合剛, 南波勇人, 中野竜一, 新津康司, 小. 剛, 堀尾浩司, 中田一弥, 村上武利, 原. 正幸, 野島康弘, 小出芳弘, 森戸祐幸, 藤嶋昭
新規光触媒フィルタ TMiPTM とエキシマランプとを組み合わせた水浄化ユニットの作製
電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 31 日, アクトシティ浜松
25. 尾崎拓也, 中田一弥, 落合剛, 村上武利, 藤嶋昭, 栄長泰明
BDD 電極を用いた二酸化炭素の電解還元におけるホウ素ドーパ量の及ぼす影響
電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 31 日, アクトシティ浜松
26. 中田一弥, 安達大雅, 尾崎拓也, 落合剛, 村上武利, 栄長泰明, 藤嶋昭
ポロンドープダイヤモンド電極を用いた二酸化炭素の電気化学的固定化
電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 31 日, アクトシティ浜松
27. 安達大雅, 中田一弥, 落合剛, 村上武利, 藤嶋昭, 栄長泰明
アミン修飾ダイヤモンド電極を用いた CO₂ の電気化学的還元
電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 31 日, アクトシティ浜松
28. 中田一弥, 安達大雅, 尾崎拓也, 落合剛, 村上武利, 栄長泰明, 藤嶋昭
ポロンドープダイヤモンド電極を用いた二酸化炭素の電気化学的固定化
日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 26 日, 慶応義塾大学 日吉キャンパス・矢上キャンパス
29. 山口友一, 中田一弥, 劉保順, 工藤昭彦, 齊藤健二, 落合剛, 酒井秀樹, 村上武利, 阿部正彦, 藤嶋昭
可視光応答型光触媒の VOC 分解性能評価
日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 26 日, 慶応義塾大学 日吉キャンパス・矢上キャンパス
30. 香川智哉, 中田一弥, 安達大雅, 栄長泰明, 落合剛, 酒井秀樹, 村上武利, 阿部正彦, 藤嶋昭
ポリアニリン修飾ポロンドープダイヤモンド電極を用いた二酸化炭素の電気化学的還元
日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 26 日, 慶応義塾大学 日吉キャンパス・矢上キャンパス
31. 落合剛, 中田一弥, 村上武利, 森戸祐幸, 藤嶋昭
光触媒担持チタンメッシュフィルタ TMiPTM およびそれを応用した空気浄化ユニットの研究開発
第 18 回シンポジウム 光触媒反応の最近の展開, 2011 年 12 月 12 日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール
32. 木村洋明, 中田一弥, 落合剛, 酒井秀樹, 村上武利, 阿部正彦, 藤嶋昭
導電性ダイヤモンド電極を用いた電気化学的還元による二酸化炭素の固定化
第 18 回シンポジウム 光触媒反応の最近の展開, 2011 年 12 月 12 日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール
33. 南波勇人, 落合剛, 中田一弥, 村上武利, 小出芳弘, 森戸祐幸, 藤嶋昭
光触媒担持チタンメッシュフィルターとオゾンを組み合わせた水浄化システムの作製
第 18 回シンポジウム 光触媒反応の最近の展開, 2011 年 12 月 12 日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール
34. 中田一弥, 安達大雅, 尾崎拓也, 栄長泰明, 落合剛, 村上武利, 藤嶋昭
ポロンドープダイヤモンド電極を用いた二酸化炭素の電気化学的固定化
第 18 回シンポジウム 光触媒反応の最近の展開, 2011 年 12 月 12 日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール
35. 池北雅彦, 増子健, 落合剛, 中田一弥, 村上武利, 森戸祐幸, 藤嶋昭
新規光触媒担持チタンメッシュフィルタ (TMiP) の抗菌性能評価 (2)
第 18 回シンポジウム 光触媒反応の最近の展開, 2011 年 12 月 12 日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール

36. 増子健, 落合剛, 中田一弥, 村上武利, 池北雅彦, 森戸祐幸, 藤嶋昭
新規光触媒担持チタンメッシュフィルタ (TMiP) の抗菌性能評価 (1)
第18回シンポジウム 光触媒反応の最近の展開, 2011年12月12日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール
37. 山口友一, 中田一弥, L. Baoshun, 工藤昭彦, 齋藤健二, 落合剛, 酒井秀樹, 村上武利, 阿部正彦, 藤嶋昭
可視光応答型光触媒のVOC分解性能評価
第18回シンポジウム 光触媒反応の最近の展開, 2011年12月12日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール
38. 香川智哉, 中田一弥, 安達大雅, 栄長泰明, 落合剛, 酒井秀樹, 村上武利, 阿部正彦, 藤嶋昭
ポリアニリン修飾ポロンドープダイヤモンド電極を用いた二酸化炭素の電気化学的還元
第18回シンポジウム 光触媒反応の最近の展開, 2011年12月12日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール
39. 尾崎拓也, 中田一弥, 落. 剛, 村上武利, 藤. 昭, 栄長泰明
BDD電極を用いたCO₂の電解還元におけるホウ素ドーパ量の影響
第25回ダイヤモンドシンポジウム, 2011年12月7日, 産業技術総合研究所 共用講堂
40. 安達大雅, 中田一弥, 落. 剛, 村上武利, 藤. 昭, 栄長泰明
表面修飾ダイヤモンド電極を用いたCO₂の電気化学的還元
第25回ダイヤモンドシンポジウム, 2011年12月7日, 産業技術総合研究所 共用講堂

【受賞】

1. 中田一弥
“電気化学会 進歩賞・佐野賞”
電気化学会 2012.

【特許】

1. 国内特許出願 1件

重点研究室 光機能材料グループ

重点研究室光機能材料グループ益田グループ

グループリーダー 益田秀樹

【基本構想】

様々なナノデバイスを作製する上で、規則構造を自己組織的に形成可能なナノ構造材料の利用は、有効な手法と考えられている。Alを酸性電解液中で陽極酸化することにより得られる陽極酸化ポーラスアルミナは、代表的な自己組織化構造材料であり、近年、ナノ構造材料としての利用に関心が集まっている。本研究グループでは、グループ発足以来、陽極酸化ポーラスアルミナにおけるナノホールアレー構造の制御と機能的な応用に関し検討を行ってきた。陽極酸化ポーラスアルミナの幾何学構造は、陽極酸化条件に依存し、ナノメートル～サブマイクロメートルスケールで規則構造を有する試料が得られる。これまでの検討で、様々な細孔周期、細孔径で細孔が高度に規則配列したアルミナナノホールアレーの作製条件を明らかにしてきた。更に、これら規則アルミナナノホールアレーにもとづく種々の機能デバイスの作製に関して検討を加えてきた。平成23年度に主として検討を行った機能的応用分野として、高密度磁気記録媒体、ナノインプリントプロセス、膜乳化プロセス、プラズモンデバイス、ナノファイバー作製等を挙げる事ができる。これら機能的応用分野の検討に加え、これまでの研究成果にもとづく共同研究、技術移転化に関しても検討を行った。

1. 平成23年度の研究目的

本グループでは、陽極酸化条件にもとづくアルミナナノホールアレーの幾何学構造の制御と機能的な応用を目的に検討を行っている。本年度もこれらの目的に沿った種々の検討を行った。アルミナナノホールアレーの幾何学構造制御に関しては、今年度は、微細な細孔周期、細孔径で規則性を有する試料の作製条件を中心に検討を行った。アルミナナノホールアレーの機能デバイス作製への応用に関しては、高密度磁気記録媒体、プラズモニクデバイス、ナノインプリントプロセス用モールド作製、膜乳化プロセス用メンブレンを中心に検討を行った。

2. 平成23年度研究成果

1) アルミナナノホールアレー幾何学構造制御

アルミナナノホールアレーをナノデバイスへ応用する際、微細で規則性の高い構造の形成が必須となる。細孔周期、細孔径は、化成電圧に依存して微小化するが、それと同時に規則配列が保持される条件はこれまで明らかにされていない。本年度は、微細な周期において細孔規則配列が得られる条件を中心に検討を加えた。

陽極酸化に用いる電解液濃度、浴温を種々変化させ細孔配列の規則性を検討した。この結果、高濃度領域で細孔配列の規則化が進行することが明らかになった。

このほかアルミニウム以外の金属のアノード酸化による多孔性構造の形成についても検討を行った。これまでもAlのHCl電解液中におけるアノード酸化プロセスにもとづくポーラス構造形成に関して検討を加えてきたが、本年度は、Auのカルボン酸電解液中におけるアノード酸化による多孔質化に関して検討を行った。今回の検討では、カルボン酸としてシュウ酸を用い、比較的長時間アノード酸化を施すことにより、Au試料の多孔質化が進行することが見出された。得られた試料の外観は黒色を呈し、電顕観察からは、直径約30nmの網目状微細孔構造を有していることが明らかになった。得られた多孔性Auは、大面積特性を生かし、触媒やセンサ等への応用が期待される。

2) 光機能デバイスへの応用

アルミナナノホールアレーの光機能デバイスへの応用としては、各種反射防止構造、局在プラズモンデバイスの作製、高効率太陽電池応用につい

て検討を行った。

アルミナナノホールアレーをモールドとして用いるナノインプリントプロセスにもとづく反射防止構造の形成に関しては、Si表面への反射防止構造形成を中心に検討を加えた。Siは、その高い屈折率から表面反射率が著しく高く、反射防止構造の形成が重要な課題とされる。アルミナナノホールアレーを出発構造としてポリマーによるモールドの作製を行った。光透過性のポリマー製モールドをナノインプリントに用いることで、光を透過しないSi基板に対しても光ナノインプリントの適用が可能となる。Si基板上に光ナノインプリントによりポリマーパターンを形成後、湿式エッチングによりSi表面に反射防止構造を得た。この時、Siの結晶面に依存する異方性エッチングを用いた場合には、制御されたテーパー形状が形成され、良好な反射防止特性を示すことが確認された。

プラズモンデバイスにおいては、Au、Ag等の金属に光が照射された際、自由電子の集団運動であるプラズモンの励起にもとづき入射光電場の制御を行う。これまで局在プラズモンにもとづく入射光電場の増強を利用したラマン散乱強度の増強が可能なデバイスの作製を中心に検討を行ってきたが、本年度はプラズモンにもとづく光伝搬を利用した導波路構造の作製について検討を加えた。アルミナナノホールアレーを出発構造とし、金属の析出を順次実施することで、中心部にAuのコア、周囲にAuのシェルを有する同軸構造の形成を行った。一定サイズの開口を有する導波管構造が開口径に対応した遮断波長を示すのに対し、同軸構造では遮断波長が存在せず、長波長の光を伝搬可能なことが期待される。形成された導波管構造に対して透過特性の検討を行った結果、導波管における遮断波長に対し、より長波長の光を伝搬可能なことが確認された。また、同様の構造に対してFDTD法による理論計算を行った結果も良好な対応が得られた。

このほか、ナノホールアレーの光機能デバイスへの応用の一環として、反射防止構造を組み込んだ有機薄膜太陽電池の作製に関して検討を加えた。アルミナナノホールアレーにもとづいて形成したポリマー反射防止構造を基板として、真空蒸着法により有機薄膜からなるpn接合層を形成した。基板上に多層構造を形成した場合、基板の周期構造が上層に反映された構造が形成されることが観察された。得られた構造の光電変換効率は、平滑な基板上に形成した有機薄膜太陽電池に比較して

特性の向上が観察された。これは、反射防止構造を有機薄膜太陽電池に組み込んだことで、光取り込み効率が向上し、変換効率向上に結びついたものと考えられる。今後、より制御された構造を組み込むことで、より高効率な変換効率を有する有機薄膜太陽電池の作製が可能になるものと期待される。

3) 高密度磁気記録媒体の作製

アルミナナノホールアレーの細孔内に強磁性金属を充填することにより、高密度磁気記録媒体の実現が期待できる。本年度は、これまでの周期30nmのアルミナナノホールアレーを用いた媒体に代え、周期25nmのナノホールアレーを用いた記録媒体の作製について検討を行った。周期25nmのアルミナナノホールアレーにもとづいたコンボジット構造に対し、1ホールあたり1ビットの記録が可能となれば、平方インチ当たり1テラビットの記録容量を有する媒体の作製が実現することになる。自己組織化プロセスにもとづいて細孔が規則配列したアルミナナノホールアレーの細孔内にCoを電気化学的に充填し、表面研磨を行うことで媒体の作製を行った。得られた試料に対し、VSMを用い磁化特性の評価を行った。この結果、周期25nmの媒体に関しても良好な磁気特性が得られること、更には、幾何学構造の制御を行うことで磁化特性の最適化が可能なが確認された。

4) バイオデバイスの作製

酵素、DNA等の生体関連分子の規則配列を形成することにより生体反応特性の制御が期待できる。アルミナナノホールアレーを用いた生体関連分子の規則配列形成に関しては、前年度に引き続きアルミナナノホールアレーをマスクとするDNAの規則配列形成に関し検討を行った。マスクとするアルミナナノホールアレーの幾何学構造を変化させDNAパターンの制御を行い、ハイブリダイゼーション特性の検討を行った結果、パターンを微細化することによりハイブリダイゼーション速度の向上が観察された。これは、パターンの微細化にともない、パターン周辺部に存在するDNAの割合が増加し、ハイブリダイゼーション速度の増加を引き起こすものと考えられる。

5) アルミナナノホールアレーにもとづく膜乳化プロセス

アルミナナノホールアレーを乳化膜とする膜乳化プロセスに関しては、単分散ハイドロゲル微粒子の作製、Liイオン電池の正極活物質であるコバルト酸化物単分散微粒子の作製について検討を

行った。ハイドロゲル微粒子の作製に関しては、乳化条件の詳細な検討を行い、均一なハイドロゲル微粒子の作製が可能な条件を明らかにした。得られた単分散ハイドロゲルは、多くの水分を包含することから、今後、ドラッグデリバリーシステム等への応用が期待される。

膜乳化にもとづく金属単分散微粒子の作製に関しては、Liイオン2次電池の正極材料として期待されるコバルト系酸化物微粒子の作製に関し検討を行った。コバルト錯体を前駆体として用い、膜乳化を行った後固化させることで、粒径のそろった微粒子の形成が可能なが確認された。得られた単分散微粒子を電極素材に適用することで、電極上におけるよりスムーズな物質拡散が可能となり、Liイオン電池の特性向上が期待される。

6) アルミナナノホールアレーを口金とするナノワイヤ形成

均一な細孔を有するアルミナナノホールアレーを金属押し出し用の口金とし、金属ナノワイヤの連続押し出し加工を行う手法に関して検討を行った。Al, Au, Ag, Sn等の金属を軟化点温度以上に加温し、加圧・押し出しを行うことで、細孔径に対応した金属ナノワイヤの連続押し出し加工が可能なが確認された。本手法においては、得られるナノワイヤの太さは、口金として用いるアルミナナノホールアレーの細孔径により制御可能なことから、サイズの制御された金属ナノワイヤの高効率形成が期待できる。得られたナノワイヤは、大面積を有することから各種電極材料等への応用が期待される。

陽極酸化ポーラスアルミナをテンプレートとした 金属-ポリマーナノコンポジット構造の作製

近藤 敏彰

1. はじめに

ポリマー材料中に金属ナノ粒子の分散したコンポジット構造は、電気光学デバイスや磁気デバイスなど、様々な機能デバイスへの応用が提案されている¹⁻³。デバイスの性能は、金属粒子のサイズや均一性、ポリマー中での金属粒子の配列に依存する。金属ナノ粒子と誘電体のコンポジットは、負の屈折率材料などの新奇デバイスへの応用が提案されており、負の屈折率媒質からなる光学素子の特性は、ナノ粒子の配列により最適化される。金属-ポリマーコンポジット構造の作製手法は多数提案されているが⁴⁻⁶、金属粒子の幾何形状やポリマー中での配列が精密に制御可能な作製手法は未だ確立されていない。

本報告では、ポリマー媒質中に等間隔で配列した均質形状の金属ナノ粒子からなるコンポジット構造の作製手法に関する検討結果について述べる⁷。コンポジットの作製は、陽極酸化ポーラスアルミナの細孔中に金属ナノ粒子を規則配列させた構造を作製し、構造体中の空隙にポリマーを充填させることで行う。金属ナノ粒子の規則配列構造は、陽極酸化プロセスによる細孔形成と電析プロセスによる金属ナノ粒子形成を繰り返すことで得られる⁷⁻¹⁰。金属粒子は、陽極酸化時間を調節することで規則的な間隔で配列させることが可能である。金属粒子間には空隙が存在しており、この部分にモノマーを充填し重合させることで、ポリマー中にナノ粒子が数珠状に配列したコンポジット構造が得られる。ポーラスアルミナをテンプレートとしたコンポジット構造作製に関する報告は多数あるが¹¹⁻¹³、ナノ粒子の規則配列を有したコンポジットの形成に関する報告はない。本作製手法によれば、ポリマー中のナノ粒子の配列が制御可能である。また、様々な種類の金属とポリマーからなるコンポジット形成への応用も可能である。本手法により形成されたコンポジット構造は、ポリマー媒質中に金属ナノ粒子が配列した、ナノ構造に由来した光学特性を有する様々な機能デバイスの作製への応用が期待できる。

2. 金属ナノ粒子-ポリマーナノファイバーコンポジット構造の形成

図1には、金属-ポリマーコンポジット構造の作製プロセスを示す。作製は2つのプロセスにより行われる。陽極酸化ポーラスアルミナの細孔中への金属ナノ粒子の多層配列の形成と、その構造中の空隙にモノマーを充填し重合

させることによるコンポジット化である。

電解研磨を行ったAl板の表面に、ナノ突起配列を有する金属モールドを押し付け、ナノ窪み配列を形成した。この窪みは陽極酸化中に細孔発生の開始点として働くため、ナノ細孔の理想配列が得られる。陽極酸化後、交流電析によりナノ細孔の底部に金属ナノ粒子を形成した。その後、陽極酸化と電析を繰り返すことで、ポーラスアルミナ中に金属ナノ粒子の多層配列を形成した。陽極酸化と電析は、ポーラスアルミナのナノ細孔の壁と金属粒子間の微小な隙間を通して電解液が交換されることで行われた。金属ナノ粒子の多層配列を形成した後、光硬化性樹脂(PAK-02, 東京合成)を細孔中に充填し、UV光を照射することで重合させた。その後、Al, ポーラスアルミナを水酸化ナトリウム水溶液で溶解除去し、金属ナノ粒子とポリマーナノファイバーのコンポジットを得た。得られた構造は

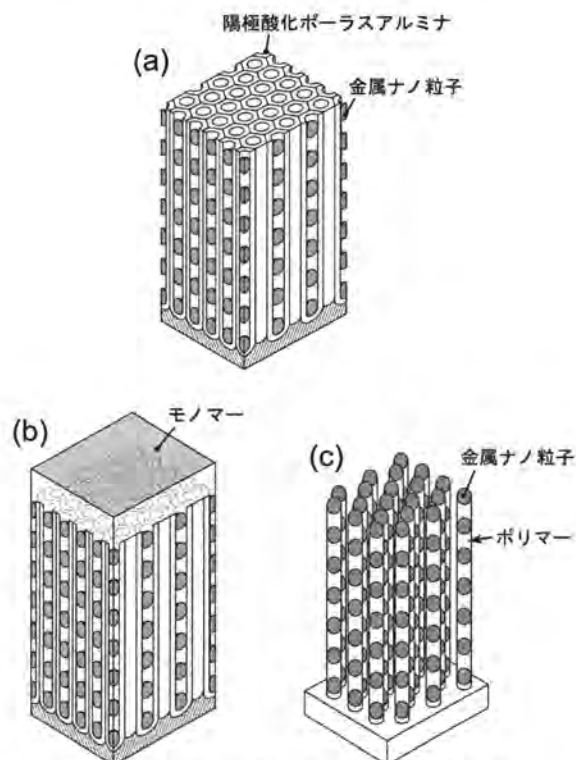


図1. 金属-ポリマーコンポジット構造の作製プロセス。
(a)金属ナノ粒子の多層配列構造, (b)モノマーの充填,
(c)金属ナノ粒子-ポリマーコンポジット構造。

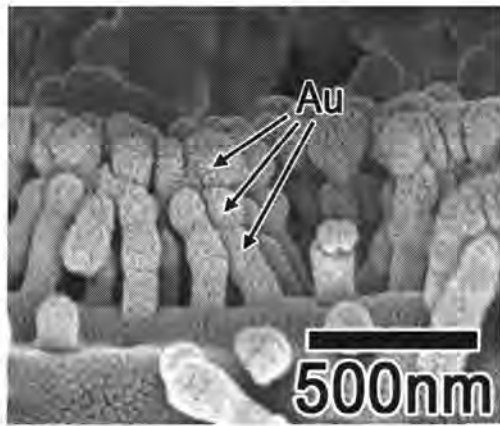


図2. 金ナノ粒子-ポリマーコンポジット構造のSEM観察像.

SEMを用いて観察した.

陽極酸化ポーラスアルミナのそれぞれのナノ細孔中に金ナノ粒子が3個形成された多層配列構造を用いてコンポジット構造を作製した. 図2には, 本プロセスにより作製した金ナノ粒子-ポリマーコンポジット構造のSEM観察像を示す. 均一形状の金ナノ粒子がポリマーナノファイバー中に数珠状に規則配列したコンポジット構造の形成が観察された. 図2に見られるコンポジット構造において, それぞれのポリマーナノファイバー中には金ナノ粒子が3個ずつ形成されていた. 1つのファイバー中における金ナノ粒子の配列間隔は, 陽極酸化時間を変化させることで制御した. 金ナノ粒子は楕円形状をしており, 長軸および短軸の直径はそれぞれ120 nmと80 nmであった. ファイバー状ポリマーの直径と高さは, テンプレートであるポーラスアルミナのナノ細孔の形状とほぼ一致していた. これは, 光硬化性樹脂のモノマーがそれぞれの細孔中の全ての空隙に充填されたことを示している. 図2より, 金ナノ粒子はナノファイバー中に等間隔で配列しており, これは, 光硬化性樹脂の充填, および重合反応によって粒子の位置が変化しないことを示している.

銀ナノ粒子を含むコンポジット構造の形成についても検討を行った. 図3には, ポーラスアルミナ中に形成され

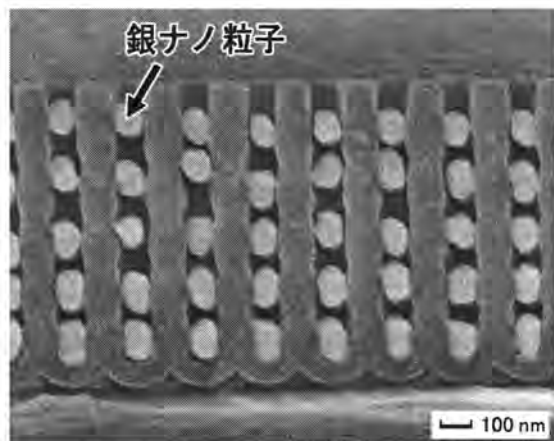


図3. 銀ナノ粒子の多層配列構造.

た銀ナノ粒子の多層配列構造を示している. それぞれの細孔中に銀ナノ粒子が等間隔で配列する様子が観察された. ナノ粒子の数は, 陽極酸化と電析プロセスの繰り返し回数によって決定される. 繰り返し可能なプロセス(ナノ粒子の個数)の最大回数は, 金の場合より銀の場合のほうが多かった. これは, 電析により形成された金ナノ粒子と銀ナノ粒子の結晶性の違いにより, 細孔壁とナノ粒子間の空隙の大きさが金より銀の場合のほうが大きかったためである. 詳細なSEM観察の結果, ナノ粒子は完全な楕円形状ではなく, 結晶性を反映した多角形構造であった. 銀の高い結晶性のため空隙は大きくなり, 金属粒子の下へ電解液が侵入し易くなり, 全ての細孔中で陽極酸化および電析が安定して行われ, 多層配列の形成が容易に行われたものと考えられる.

図4には, 配列間隔の制御された銀ナノ粒子の多層配列構造の断面SEM観察像を示す. 陽極酸化時間を変化させることで, 銀ナノ粒子配列の間隔を制御した. いずれの構造体においても, 一つの細孔中に7個の銀ナノ粒子が形成されている様子が観察された.

図5には, 銀ナノ粒子-ポリマーコンポジット構造のSEM観察像を示す. 金ナノ粒子の場合と同様に, 銀ナノ粒子の多層構造中に光硬化性樹脂を充填し, UV光を照射することでポリマーを重合させた後, Alとアルミナを溶解除去することで, コンポジット構造を得た. 図5(a)の高倍SEM観察像より, それぞれのポリマーナノファイバー中には均質形状の銀ナノ粒子が7個含まれており, ナノ粒子がポリマー媒質中に等間隔で配列している様子が観察された. 図5(b), (c)の低倍SEM観察像より, ファイバー状コンポジット構造が大面積にわたって形成されている様子が観察された. 銀ナノ粒子-ポリマーナノファイバー同士の凝集が見られた. これはファイバー構造が高アスペクト比であり, ポーラスアルミナを溶解後, 溶液が蒸発する際に, ナノファイバー間に毛管力が働いたためである. 凝集によりナノ粒子が近接することで, 近接する銀ナノ粒子間において表面プラズモンのカップリングが起ると考えられる.

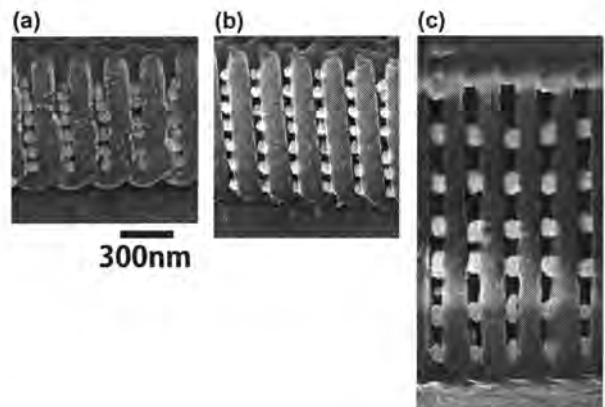


図4. 配列制御された銀ナノ粒子の多層配列構造. 陽極酸化時間: (a) 10 min, (b) 15 min, (c) 25 min.

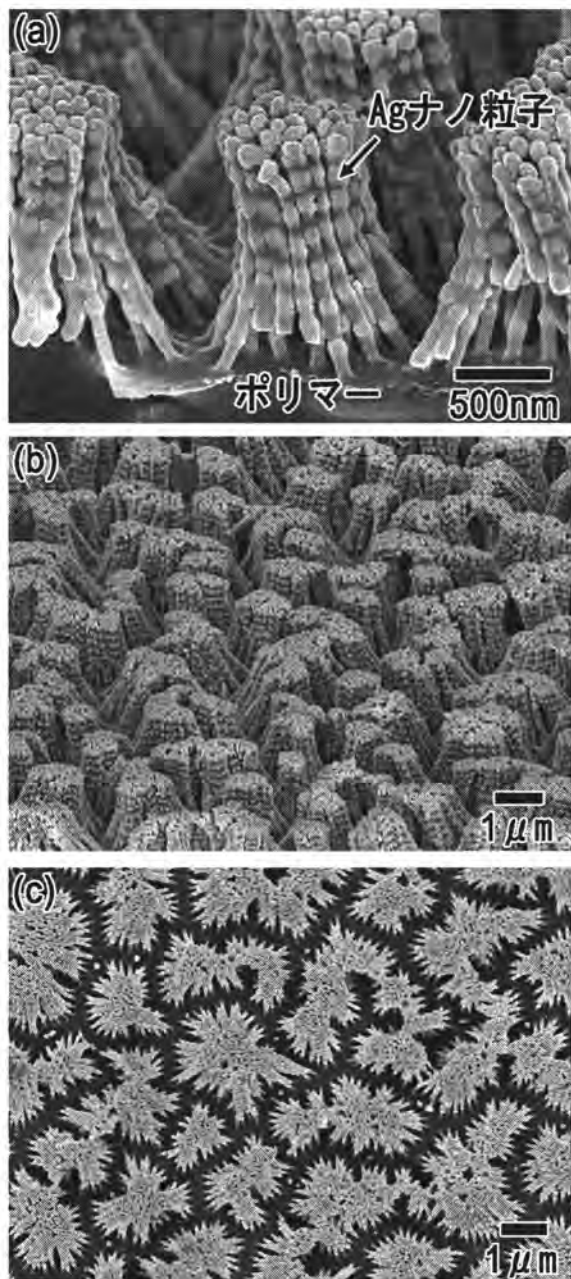


図5. 銀ナノ粒子-ポリマーコンポジット構造のSEM観察像. 傾斜像:(a)高倍像, (b)低倍像, (c)正面像.

3. まとめ

ポリマーナノファイバーとその中に数珠状に配列した金属(金, 銀)ナノ粒子からなるコンポジット構造は, 金属ナノ粒子の多層配列の形成と, ポリマー充填および重合プロセスとの組み合わせにより作製された. 得られたコンポジット構造において, 金属ナノ粒子はファイバー状のポリマー媒質中に等間隔で配列していた. 本手法により形成されたコンポジット構造は, 非線形光学デバイスやプラズモニックデバイスなど, 様々な機能性光デバイスへの応用が期待できる.

【参考文献】

1. Z. Guo, S. Park, H. T. Hahn, S. Wei, M. Moldovan, A. B. Karki, D. P. Young, *J. Appl. Phys.*, **101**, 09M511 (2007).
2. L. Shi, L. Gao, S. He, B. Li, *Phys. Rev. B*, **76**, 045116 (2007).
3. A. Biswas, O. C. Aktas, U. Schürmann, U. Saeed, V. Zaporozhchenko, F. Faupel, T. Strunskus, *Appl. Phys. Lett.*, **84**, 2655 (2004).
4. T. Onodera, H. Oikawa, A. Masuhara, H. Kasai, T. Sekiguchi, H. Nakanishi, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **46**, L336 (2007).
5. T. D. Castillo-Castro, E. Larios-Rodriguez, Z. Molina-Arenas, M. M. Castillo-Ortega, J. Tanori, *Composites Part A*, **38**, 107 (2007).
6. U. Schürmann, H. Takele, V. Zaporozhchenko, F. Faupel, *Thin Solid Films*, **515**, 801 (2006).
7. T. Kondo, K. Nishio, H. Masuda, *Chem. Lett.*, **39**, 238 (2010).
8. T. Kondo, M. Tanji, K. Nishio, H. Masuda, *Electrochem. Solid-State Lett.*, **9**, C189 (2006).
9. T. Kondo, K. Nishio, H. Masuda, *Appl. Phys. Express*, **2**, 032001 (2009).
10. T. Kondo, K. Nishio, H. Masuda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **49**, 025002 (2010).
11. M. J. Tierney, C. R. Martin, *J. Electrochem. Soc.*, **137**, 3789 (1990).
12. S.-H. Jeong, O.-J. Lee, K.-H. Lee, S. H. Oh, C.-G. Park, *Chem. Mater.*, **14**, 1859 (2002).
13. S. G. Yang, H. Zhu, G. Ni, D. L. Yu, S. L. Tang, Y. W. Du, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **33**, 2388 (2000).

ポーラスアルミナを用いたナノインプリントプロセスによる モスアイ型反射防止構造の形成

柳下 崇, 近藤敏彰

1. はじめに

基板の表面構造を制御し、ナノメートルスケールの凹凸構造の形成を行うと表面反射を抑制する効果が得られる。このような微細構造はモスアイ構造と呼ばれ、既存の反射防止膜に比べ波長依存性、入射角依存性が小さいために、様々な光学部品への応用が期待されている。モスアイ構造の作製法は、これまでも、様々なものが報告されてきているが、近年、高スループットな作製手法としてナノインプリント法が関心を集めている。ナノインプリント法とは、モールドを基板に押し付けることにより、微細な凹凸パターンを基板表面に一括形成可能な手法であり、モールドは繰り返し利用が可能であるため、高スループット処理が可能である。ナノインプリント法によるモスアイ構造の作製に用いられるモールドは、通常、電子ビームリソグラフィや干渉露光法によりレジストマスクを形成し、ドライエッチングを行う手法が用いられるが、これらの手法では、継ぎ目のない大面積のパターン形成が難しいことに加え、得られるモスアイ構造の突起形状を精密に制御することが困難であるため、モスアイ構造の特性最適化が容易でないといった問題点があった。我々のグループではこれまでに、アルミニウムを酸性浴中で陽極酸化することにより得られる陽極酸化ポーラスアルミナをモールドとしたナノインプリントプロセスにより、モスアイ構造の形成が可能であることを報告してきた¹。本報告では、ポーラスアルミナを用いたナノインプリントプロセスによるモスアイ構造の突起形状制御と反射防止特性に関し詳細に検討を行ったので、その結果を示す。

2. 突起形状を制御したモスアイ構造の作製

陽極酸化ポーラスアルミナの細孔形状は通常、円柱形状であるが、陽極酸化と孔径拡大処理を繰り返し行うことでモスアイ構造の形成に適したテーパ形状の細孔を形成することができる。この方法によれば、陽極酸化の時間と孔径拡大処理の時間や処理回数をそれぞれ調節することで、ポーラスアルミナの細孔形状をナノスケールで制御することが可能である²。図1には、作製条件と形成される細孔形状の関係の模式図を示す。それぞれの処理時間を調節することにより、直線的に細孔サイズが変化したテーパ形状や釣鐘型の形状など様々な形状に制御することが可能である。

図2には、本手法により細孔形状を制御したポーラスアルミナの断面SEM像を示す。陽極酸化の条件を変化させることにより、得られるポーラスアルミナの細孔形状が変化している様子が観察できる。図2の試料は、陽極酸化と孔

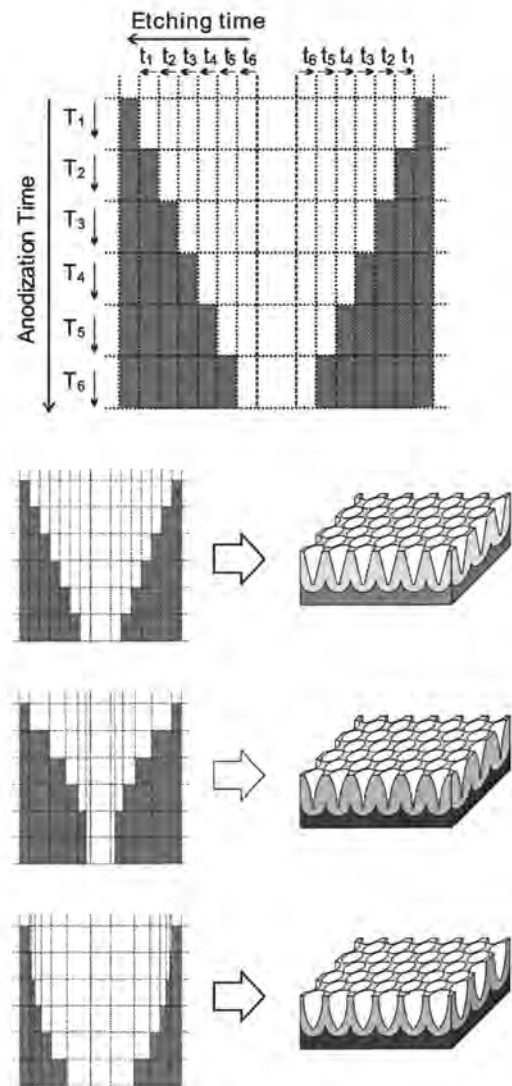


図1 陽極酸化条件と細孔形状の関係

径拡大処理を5回ずつ繰り返すことにより作製したものであるが、得られた細孔形状は階段状ではなくスムーズな細孔径変化を有していることも観察できる。

図3には、本検討で得られたポーラスアルミナを用いて光ナノインプリント法によりポリマーモスアイ構造の作製を行った結果を示す。それぞれ、図2に示したポーラスアルミナを用いて作製したピラーアレーのSEM像であるが、モールドの細孔形状に対応した突起が形成されている様子が観察された。本検討では、光硬化性樹脂としてPAK-02（東洋合成工業）、モールドの離型剤としてオプツールDSX（ダイキン工業）を用いた。

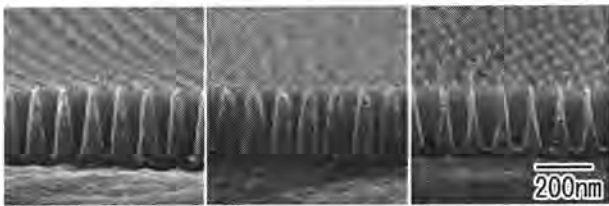


図2 細孔形状を制御したポーラスアルミナ

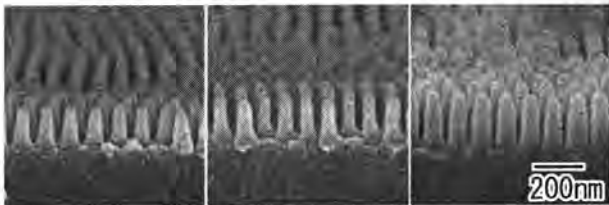


図3 突起形状を制御したポリマーモアイ構造

モアイ構造が示す反射防止特性は、基板表面での見かけの屈折率変化に依存して変化するため、反射防止特性を最適化するためには突起形状の制御が重要となる。図4 (a)には、ポーラスアルミナを用いたナノインプリントプロセスにより形成された突起形状を制御したモアイ構造の透過スペクトルを示す。図より、釣鐘型のモアイ構造が最も高い透過率を示している様子が観察できる。これは、3種類の突起形状において、釣鐘形状の場合に見かけの屈折率変化が最も直線的になるためである。この結果は、図4 (b)に示した、FDTD (Finite Difference Time Domain) 法によるシミュレーション結果とも良い対応を示すことが確認された。

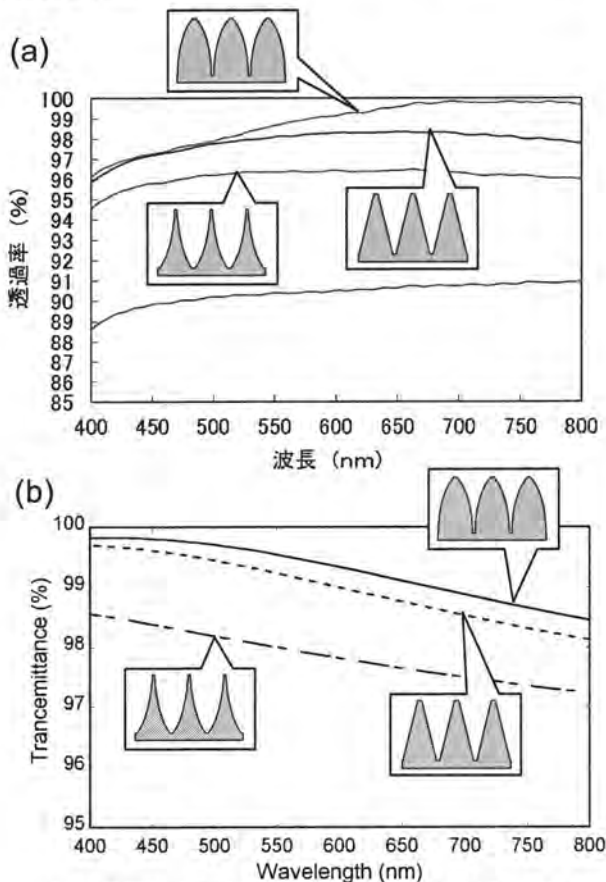


図4 突起形状を制御したモアイ構造の透過スペクトル
(a)実験結果, (b)シミュレーション結果

3. モアイ構造の形状最適化に関する検討

モアイ構造が示す反射防止特性は、突起のテーパ形状だけでなく、突起径や突起高さに対しても依存して変化する。陽極酸化ポーラスアルミナは、作製条件を調節することにより細孔径や細孔深さの制御が可能であることから、最適化された特性を有するモアイ構造作製用モールドとして有望である。ここでは、様々な表面幾何学構造を有するポーラスアルミナを用いたナノインプリントプロセスにより、突起形状を制御したモアイ構造を形成し、その特性評価を行った結果を示す³⁾。

図5には、突起径を変化させたモアイ構造のSEM像を示す。細孔周期100nmのポーラスアルミナをモールドとして、底部の突起径が50nm, 65nm, 90nmになるように制御した。突起の高さは、200nmになるようにアルミナの作製条件を調整した。SEM像より、どの試料においてもテーパ形状の突起が基板表面に直立している様子が観察できる。

図6には、図5に示した突起径の異なる3種類のモアイ構造の反射スペクトルを示す。得られた測定結果より、モアイ構造底部の突起径が大きい方が、より反射率が低下することが分かった。本検討で作製した最も突起径の太い90nmの試料では、測定波長域全域に渡って反射率が0.5%以下に抑えられている様子が確認された。

図7には、FDTD法により突起径の異なるモアイ構造の反射率をシミュレーションした結果を示すが、図6に示した実験結果と良い対応を示すことが確認された。突起径

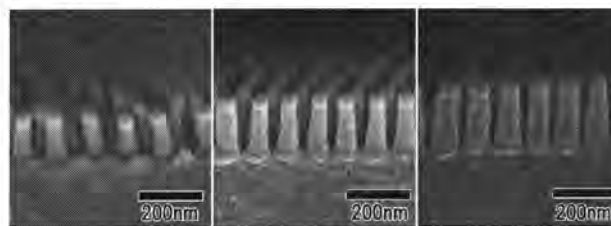


図5 突起径を制御したモアイ構造
(突起径: 左から50nm, 65nm, 90nm)

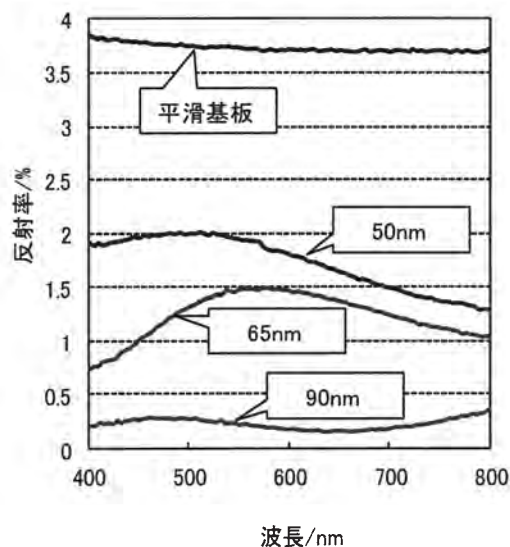


図6 反射スペクトル

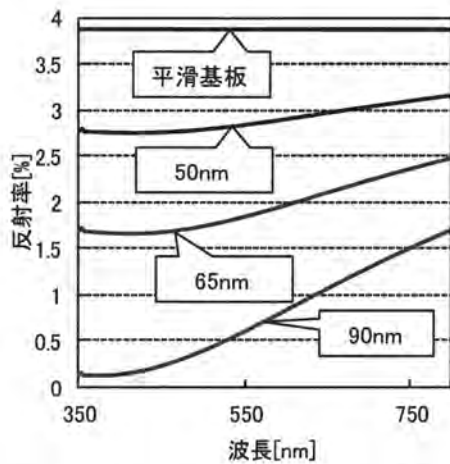


図7 反射スペクトルのシミュレーション結果

が小さいと反射率が高い原因は、周期に対して突起径が小さい場合には突起間に平坦な部分が形成され、この部分が反射面として機能するためである。

次に突起高さや反射防止特性の検討を行った結果を示す。図8は、ポーラスアルミナモールドの細孔深さを変化させることで得られた突起高さが異なるモスアイ構造のSEM像である。それぞれ、突起周期100nm、突起径部の直径を90nmとして、突起高さを120nm、150nm、200nmと変化させて作製を行った。SEM像より、突起高さを変化させた場合においても突起の直立構造は保持されている様子が確認できる。

図9は、突起高さが異なるモスアイ構造の反射率を測定した結果である。突起高さが高い方がより、反射率が低下し優れた反射防止層として機能している様子が観察できる。

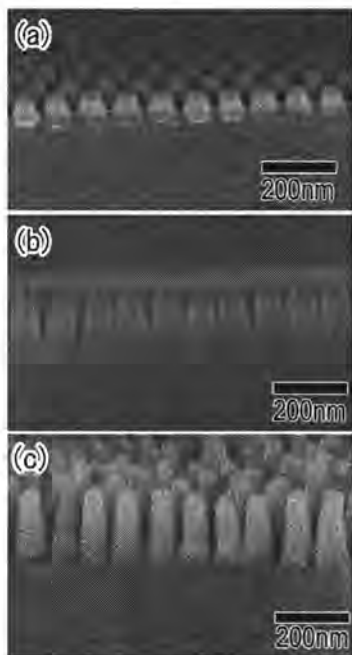


図8 突起高さを制御したモスアイ構造 SEM 像
a:120nm, b:150nm, c:200nm

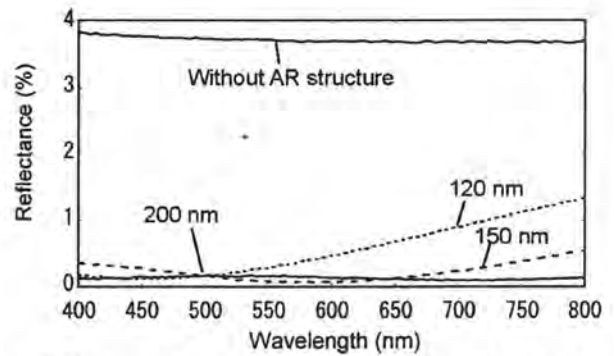


図9 突起高さが制御されたモスアイ構造の反射スペクトル

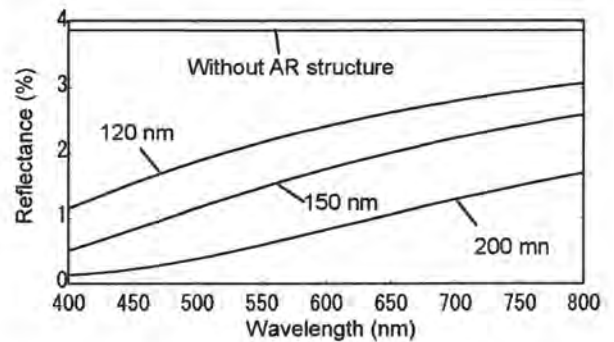


図10 反射スペクトルのシミュレーション結果

図10には、突起高さが制御されたモスアイ構造の反射スペクトルをFDTD法によりシミュレーションした結果を示す。この結果においても、突起が高い方がより、優れた反射防止層として機能していることが確認され、本検討で得られた実験結果と良い対応を示した。実験結果とシミュレーション結果に定量的な反射率のずれがみられる原因は、シミュレーションではコーン形状の突起で計算を行ったが、実際の突起形状は理想的なコーン形状ではなかったためであると考えられる。

4. まとめ

ポーラスアルミナを用いたナノインプリントプロセスにより形成されるモスアイ構造の突起形状と反射防止特性について詳細に検討を行った結果を示した。これらの実験結果はFDTD法によるシミュレーションと良い対応を示し、ポーラスアルミナの細孔形状を制御することで、反射防止特性の最適化が可能であることが示された。

【参考文献】

1. T. Yanagishita, K. Nishio, and H. Masuda, *Appl. Phys. Express*, **1**, 067004 (2008).
2. T. Yanagishita, T. Kondo, K. Nishio, and H. Masuda, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **26**, 1856 (2008).
3. T. Yanagishita, K. Nishio, and H. Masuda, *ECS Transactions*, **33**, 67 (2011).

しゅう酸水溶液中での金のアノード酸化によるナノポーラス皮膜の形成

西尾和之, 益田秀樹

1. はじめに

金のナノ構造は、その微細な形状に起因する特異的な触媒特性や光学特性を有することから多くの注目を集めている¹⁻⁴。近年、金合金中の卑金属成分を化学的或いは電気化学的に溶出させ、スポンジ状の金のナノポーラス構造を形成する脱合金手法が活発に研究されている⁵⁻¹⁰。脱合金手法は、バルクの表面に金ナノ構造を直接形成することを可能としたが、卑金属の残留による汚染の可能性がある上、組成及び結晶構造の均質な合金の作製の困難さが課題となっている。従って、金ナノ構造の応用を容易にするためには、純金の表面で金の微細構造を自発的に形成する手法が望ましい。

アノード酸化は、金属の腐食過程で特有の微細構造を得る手法として知られており、「バルブ金属」と呼ばれる特定の金属で高アスペクト比のマイクロ～ナノスケールの多孔質構造の形成が可能となっている¹¹⁻¹⁶。我々は、しゅう酸イオンを含む電解液中で純金をアノード酸化すると、ナノスケールの金の黒色多孔質膜（以下、しゅう酸皮膜）が得られることを見出した。

2. 実験

多結晶の金箔（ニラコ、厚さ 0.05mm、純度 99.95%）の表面をアルミナペースト（3.0, 0.3, 0.1 μm）で順に研磨した。アノード酸化は 500ml ビーカー中で、ポテンシostat とファンクションジェネレーターを用いた 3 電極システムで実施した。電解液の温度は、冷却/加熱システムを備えた水槽により制御した。全ての電気化学測定は、塩化物イオンの影響を防ぐために、Hg/Hg₂SO₄ 参照電極（+0.64V vs SHE at 20°C）を用いて行った。（以下、電位は Hg/Hg₂SO₄ 参照電極に対する値とする。）対極には炭素板を使用し、陽極酸化後、試料を念入りに蒸留水で洗浄した。皮膜の構造は、SEM あるいは TEM で観察した。化学状態は XPS 測定により確認した。

TEM 観察用の金ナノポーラス薄膜の作製では、膜厚約 50nm の金を、スパッタリング装置を用いて Ti 基板の表面に析出させた。この試料の陽極酸化中に、ナノ細孔は金の薄膜を貫通し Ti 基板まで到達した。続いて、試料に純水を噴射することにより、金ナノポーラス膜を機械的に Ti 基板から剥離した。

3. 結果及び考察

図 1 に、0°C、0.3M のしゅう酸水溶液中での金のアノード酸化の代表的な結果を示す。図 1a はアノード酸化時の電流値の変化であるが、電位を 0V から 1.8V まで 0.5mVs⁻¹ の速度で 60 分間走引し、その後 1.8V で 90min 保持した（図 1a の点線）。このとき、2 つの特徴的な挙動が見られた（図 1a の実線）。第 1 に、電位の掃引中に立ち上がった電流が 1.0V 付近で急激に低下し、その後回復した。第 2 に、電位を 1.8V に保持している時に電流値が約 3 倍増加した。電位掃引中の電流の減衰は、金属表面が酸化皮膜で不動態化される際に一般的に見られる挙動であるが、カルボン酸の中でもしゅう酸に特有の現象であり、他の水溶性カルボン酸では観察されなかった。図 1b に、アノード酸化後の金箔の写真を示す。陽極酸化された領域（“TMU”の文字部分）は、光沢のある黒色へと変化し、アノード酸化後は安定であった。

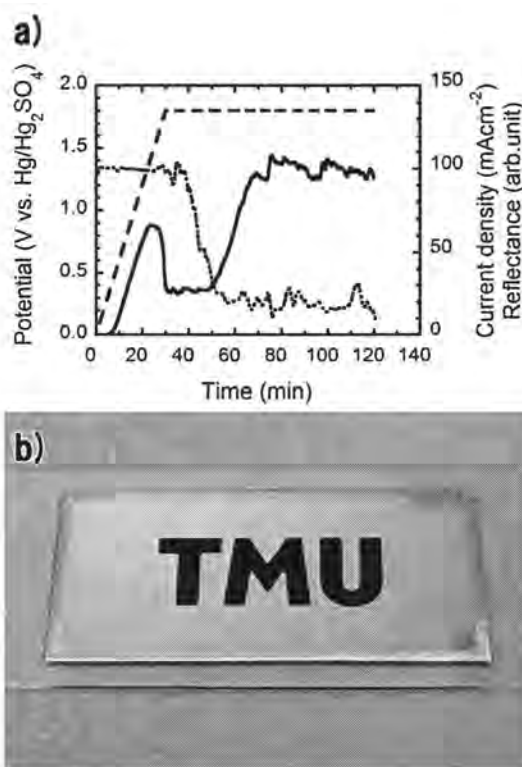


図 1 しゅう酸水溶液中での金のアノード酸化時の電流値と反射率の変化(a), 得られた黒皮膜(b, “TMU”の文字部分)

図2に、図1に示した条件でアノード酸化を行った黒色膜のSEM像を示す。図2aの低倍像から、厚さ約1 μm の均質な網目状多孔質膜が形成されていることが確認された。アルミナペースト(～0.1 μm)を用いた研磨によって金の表面に残存していたアルミナ粒子も、図2aの多孔質皮膜の表面に観察された。この結果は、金箔の表面がアノード酸化後の多孔質皮膜の表面に対応している事、つまり、微細な細孔が金の表面で発生し、箔の内部へ成長していったことを示している。図2bの高倍像から、黒色皮膜が約30nmの均一なサイズの細孔を有する、高度に多孔質化された構造であることがわかった。この多孔質構造が多結晶性の金陽極の全面で均一であったことから、多孔質皮膜の形成は金の結晶方位に依存しないこともわかった。

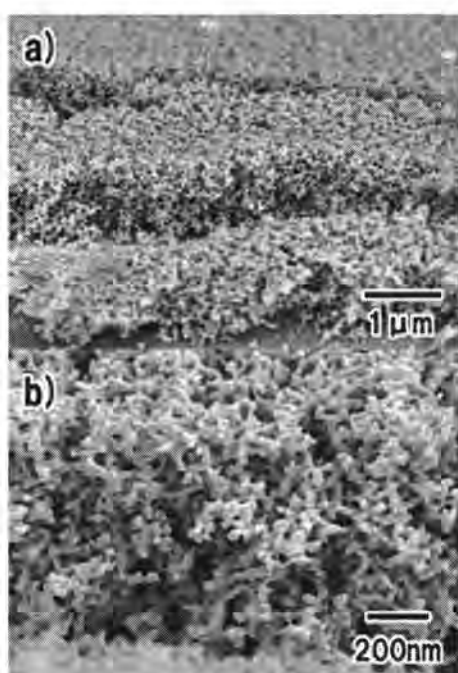


図2 図1に示したアノード酸化により得られた多孔質皮膜の破断面SEM像:(a)低倍、(b)高倍。

アノード酸化時に深い細孔が金属に形成される場合、多孔質層が全体的に酸化されるか、細孔壁がその金属の溶解に対して効果的に不動態化される。その一方で、細孔底部では金属の電気化学的活性が維持される。本研究で得られた黒色のナノスケール多孔質皮膜の成長メカニズムを解明するために、X線光電子分光スペクトル(XPS)測定を行い皮膜の化学特性を調べた。図3にナノポーラス皮膜のAu4f, O1s, C1sのXPS深さプロファイルを示す。図3aの全てのAu4fスペクトルで2重項ピークが0価の金(Au4f_{5/2}: 87.7eV, Au4f_{7/2}: 84.0eV)に相当し、3価の金に由来するピーク(Au4f_{5/2}: 89.6eV, Au4f_{7/2}: 85.9eV)は観察されなかった。図4はアノード酸化後1時間以内にAu4fスペクトルを測定し、金箔のスペクトルと重ねた結果であるが、3価のAu4fの結合エネルギー(89.6, 85.9eV)を含

めてスペクトル形状が一致し、酸化物を全く含まないことが確認された。図3bのO1sのスペクトルでは、わずかなAr⁺イオンエッチングでピークが消失したことから、炭化水素系の表面の汚染物質に由来するものと推測される。図3cに見られる様に、エッチング前のC1sスペクトルから炭素成分の存在が確認されたが、アノード酸化前の金箔のXPSスペクトルにも同様のスペクトルが見られたことから、表面の汚染物質であることがわかった。

金の酸化状態が確認されなかったXPS測定結果にもとづき、細孔の成長機構を以下のように推測した。電位掃引時に見られる電流の減衰(擬似的不動態化挙動)は、しゅう酸の電気分解によって生成した炭素系物質が金表面に吸着したことによる。金表面の炭素系不動態皮膜は更なる電位掃引によって絶縁破壊され、大量のガス発生を伴った電流の回復をもたらす。細孔は、表面に発生したナノスケールの絶縁破壊部で成長する。電位を1.8Vに維持した時に現れる電流の増大は、深く成長した細孔の底部で不動態化の効率が下がり、活性な金の面積が拡大したためと考えられる。我々の研究では、ナノポーラス皮膜の厚さは約1 μm が限界であった。これは、より細孔が深い領域では、細孔壁への炭素系物質の吸着効率が低下する事に起因するものと思われる。

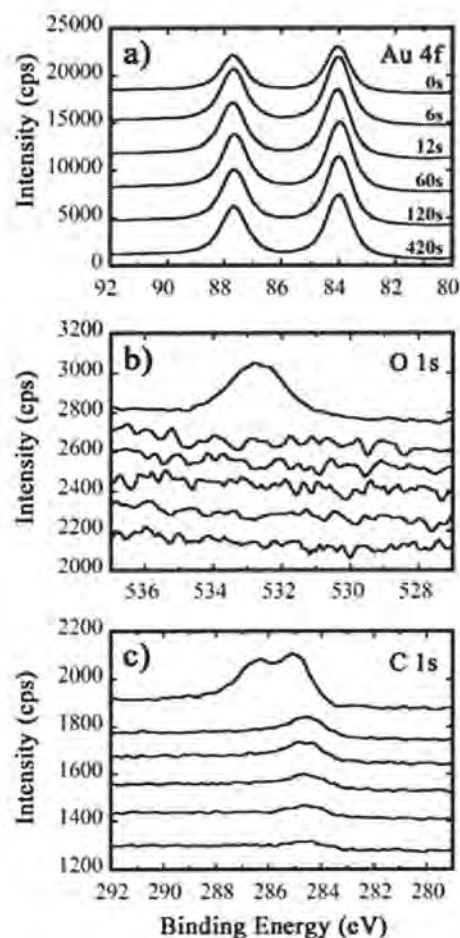


図3 しゅう酸皮膜のXPSスペクトル(スペクトル中の数値はAr⁺イオンによるエッチング時間)

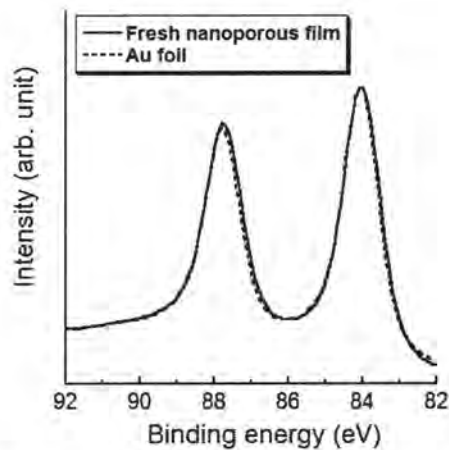


図4 アノード酸化後1時間以内に測定したしゅう酸皮膜のXPSスペクトル(点線は金箔のXPSスペクトル)

図5に、ナノポーラスAu薄膜のTEM観察結果を示す。この試料はTi板の表面にスパッタしたAu薄膜をアノード酸化したものであり、細孔がTi基板に到達して電流値が減衰したところで反応を終了した。図5aは高倍のTEM像であるが、細孔の壁面に特定の吸着物質は観察されなかった。しかし、細孔壁のEDS点分析(測定サイズ約1nm)では27at.%の炭素が検出されたことから、炭素質の層が壁面に存在することが示唆された(図5b)。

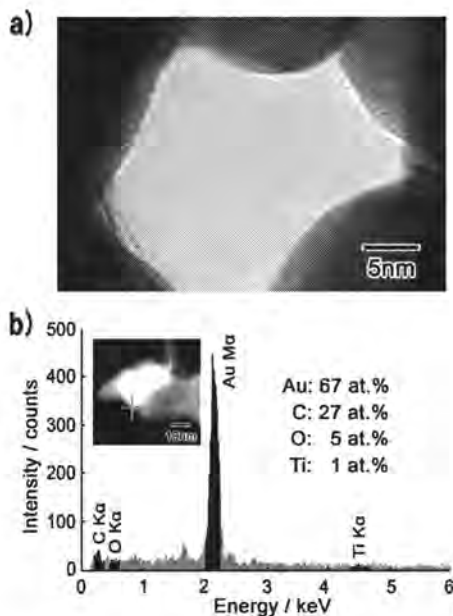


図5 しゅう酸皮膜のTEM像(a)と細孔壁のEDS点分析結果(b)

図6に、図5のしゅう酸皮膜を固定したNiグリッドの端部のEDS点分析結果を示す。TEMグリッドには大気中の汚染物質が吸着しているが、その炭素濃度は5at.%以下であった。しゅう酸皮膜細孔壁には30at.%程度の炭素が存在しており、細孔壁に存在する炭素系物質が試料の汚染物

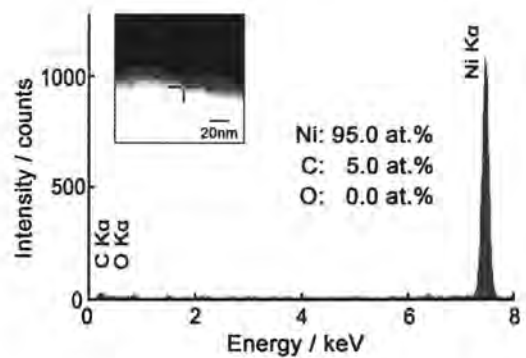


図6 図5のしゅう酸皮膜を固定したNiグリッド端部のEDS点分析結果

質のみでは無い事が確認された。

本研究のしゅう酸水溶液中での金のアノード酸化の特徴に、電解液が中性あるいは塩基性であってもナノスケールの多孔質皮膜が形成されることが挙げられる。図7に、しゅう酸イオンの濃度を0.1Mに固定し、しゅう酸ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを用いてpHを変化させた電解液中で得られた電位-電流(V-I)曲線を示す。電流が立ち上がる電位にはpH依存性が見られなかったが、電流が減衰する電位がpHに大きく依存し、pHが高くなるにつれてより低い電位で減衰することがわかった。特に、pH9.3の時には約0.5V、電流密度約 2mAcm^{-2} で減衰が始まり、極小での電流値はほぼ0となった。この原因は現在のところ不明であるが、炭素系の不動態化皮膜の生成あるいは吸着の効率がpHに依存し、高いpH、すなわちプロトン濃度が低いときに擬似的不動態化が容易に進行するものと考えられる。図8にpH7.0のしゅう酸ナトリウム水溶液(0.25M)中で形成した金のアノード酸化皮膜のSEM像を示すが、しゅう酸水溶液中で形成される皮膜同様の、網目状細孔を有する多孔質皮膜であることがわかる。

従来の金属のアノード酸化で多孔質構造を形成させる際は、酸化皮膜を化学的に溶解させるために酸性電解液が必要とされる。しゅう酸水溶液中での金のアノード酸化は中性あるいは塩基性でも多孔質構造が形成される点でも特異的であり、メカニズムの解明と他の金属材料への適用が期待される。

以上をまとめると、しゅう酸水溶液中での純金のアノード酸化により、黒色のナノスケール金多孔質膜が得られた。この皮膜は直径約30nmの網目状細孔を有する、膜厚約 $1\mu\text{m}$ の均質な構造であった。XPS, TEMによる解析結果から、この細孔は、しゅう酸の電気分解によって金の表面に吸着した炭素系不動態化皮膜の絶縁破壊を通して成長するものと推測される。更に、金の多孔質膜の形成には、電解液を酸性とする必要が無いことも判明した。表面積が大きく均質なナノスケールの多孔質膜が金の表面に容易に形成できることから、金を電極として利用する様々な研究分野で応用されることが期待される。

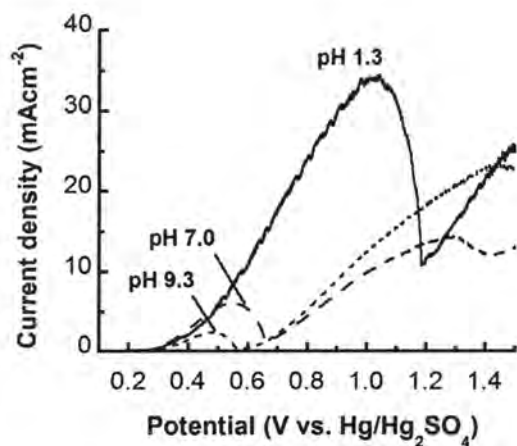


図7 0°C, 0.1M しょう酸イオン水溶液中での V-I 曲線の pH 依存性

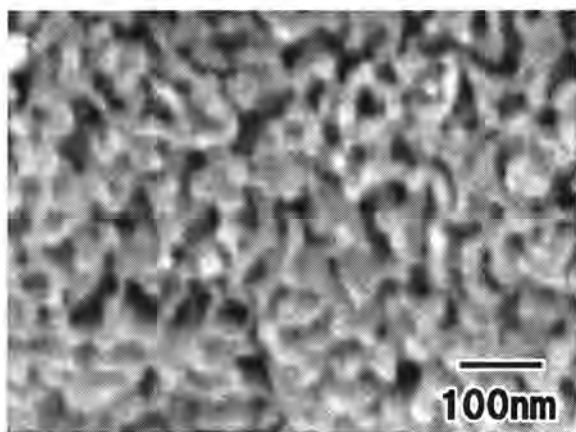


図8 しょう酸ナトリウム水溶液(pH7.0)中での金のアノード酸化により得られた多孔質皮膜の破断面 SEM 像

【参考文献】

1. M. Haruta, *Chem. Rec.*, **3**, 75 (2003).
2. C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature*, **382**, 607 (1996).
3. A. Henglein, *Langmuir*, **15**, 6738 (1999).
4. P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 7729 (2002).
5. J. P. Candy, P. Fouilloux, M. Keddad, H. Takenouti *Electrochim. Acta*, **26**, 1029 (1981).
6. R. Li, K. Sieradzki, *Phys. Rev. Lett.*, **68**, 1168 (1992).
7. J. Erlebacher, M. J. Aziz, A. Karma, N. Dimitrov, K. Sieradzki, *Nature*, **410**, 450 (2001).
8. M. B. Cortie, A. I. Maaroo, G. B. Smith, *Gold Bull.*, **38**, 14 (2005).
9. J. Biener, A. M. Hodge, A. Hamza, *Appl. Phys. Lett.*, **87**, 121908 (2005).
10. C. A. Volkert, E. T. Lilleodden, D. Kramer, J. Weissmüller, *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 061920 (2006).
11. Keller, M. S. Hunter, D. L. Robinson, *J. Electrochem. Soc.*, **100**, 411 (1953).
12. H. Masuda, K. Fukuda, *Science*, **268**, 1466 (1995).
13. H. Masuda, H. Yamada, M. Satoh, H. Asoh, N. Nakao, T. Tamamura, *Appl. Phys. Lett.*, **71**, 2770 (1997).
14. D. Gong, C. A. Grimes, O. K. Varghese, W. Hu, R. S. Singh, Z. Chen, E. C. Dickey, *J. Mater. Res.*, **16**, 3331 (2001).
15. J. M. Macak, H. Tsuchiya, L. Taveira, S. Aldabergerova, P. Schmuki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 7463 (2005).
16. H. Tsuchiya, J. M. Macak, I. Sieber, P. Schmuki, *Small*, **1**, 722 (2005).

業績

【原著論文】

1. Kazuyuki Nishio, Suguru Tagawa, Tatsuro Fukushima, Hideki Masuda
Highly Ordered Nanoporous Si for Negative Electrode of Rechargeable Lithium Ion Battery
Electrochem. Solid-State Lett., 15(4), A41 (2012).
2. Hideki Masuda, Toshiaki Kondo, Kazuyuki Nishio
Functional optical devices using highly ordered hole array architectures of anodic porous alumina
Proc. of SPIE, vol. 8204, p.820414 (2011).
3. Toshiaki Kondo, Kazuyuki Nishio, Hideki Masuda
Surface-enhanced Raman scattering in three-dimensional ordered Au nanoparticles in anodic porous alumina matrix
Proc. of SPIE, vol. 8204, p.82041V (2011).
4. Jeonghyeon Yang, Takashi Ichii, Kuniaki Murase, Hiroyuki Sugimura, Toshiaki Kondo, Hideki Masuda
Nanotemplate Prepared by Means of Vacuum Ultraviolet Patterning of Alkylsilane Self-assembled Monolayer on ITO Using a Porous Alumina Mask: Application to the Fabrication of Gold Nanoparticle Arrays
Chemistry Letters, 41, 392 (2012).

【総説】

1. 益田秀樹, 柳下崇, 近藤敏彰, 西尾和之
「アルミナナノホールアレイの構造制御と機能デバイスへの応用展開」
表面技術, 63, 2, 82 (2012).
2. 近藤敏彰, 益田秀樹
「規則ポーラス構造によるナノ・マイクロ空間の形成と光電場制御」
化学工業, 2012年 Vol. 63, No. 3

【書籍】

1. 柳下崇, 近藤敏彰, 益田秀樹
「陽極酸化ポーラスアルミナにもとづくナノインプリント用モールドの作製と光学素子への応用」
『ナノ構造光学素子開発の最前線』シーエムシー出版, 2011年7月

【口頭発表】

1. Hideki Masuda, Takashi Yanagishita, Toshiaki Kondo, Kazuyuki Nishio
High Throughput Preparation Processes for Metal and Semiconductor Nanostructures by Using Anodic Porous

Alumina

219th ECS Meeting, 2011.5.2 (依頼講演)

2. Takashi Yanagishita, Kazuyuki Nishio, Hideki Masuda
Fabrication of Antireflection Structures by Nanoimprinting Using Anodic Porous Alumina
The 62nd Annual Meeting of ISE, 2011.9.13
3. Toshiaki Kondo, Kazuyuki Nishio, Hideki Masuda
High Throughput Fabrication of Localized Surface Plasmon Devices Using Ordered Porous Structures
The 30th PIERS, 2011.9.14
4. Hideki Masuda
Fabrication of Functional Nanostructures for Electrochemical Systems Using Ordered Anodic Porous Alumina
BIT's 1st Annual World Congress of Nano-S&T, 2011.10.25 (依頼講演)
5. Takashi Yanagishita, Masahiko Imaizumi, Kazuyuki Nishio, Hideki Masuda
Hollow Metal Oxide Spheres with Porous Structures Fabricated by Anodization of Small Metal Particles
2011 MRS Fall Meeting, 2011.11.2
6. Toshiaki Kondo, Hideki Masuda
Surface-enhanced Raman scattering on multilayered nanodot prepared by using anodic porous alumina membrane
2011 MRS Fall Meeting, 2011.11.28
7. Toshiaki Kondo, Kazuyuki Nishio, Hideki Masuda
Surface-Enhanced Raman scattering in three-dimensional ordered Au nanoparticles in anodic porous alumina matrix
Smart Nano+Micro Materials and Devices, 2011.12.6
8. Hideki Masuda, Toshiaki Kondo, Kazuyuki Nishio
Function optical devices using highly ordered hole array architectures of anodic porous alumina
Smart Nano-Micro Materials and Devices, 2011.12.6 (依頼講演)
9. Hideki Masuda
Fabrication of Hollow Porous TiO₂ Spheres by Anodization of Ti Particles
8th International Conference PSST-2012, 2012.3.26 (依頼講演)

10. 柳下崇, 益田秀樹
高規則性ポーラスアルミナにもとづく射出成形による
反射防止構造の作製
応用物理学会次世代リソグラフィワークショップ
2011, 2011年7月11日(依頼講演)
11. 成山哲平, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
高規則性ポーラスアルミナを用いた光ナノインプリン
ト法によるレジストパターンの形成
2011年秋季第72回 応用物理学会学術講演会, 2011
年8月30日
12. 柳下崇, 榎井幹夫, 池川直人, 益田秀樹
高規則性ポーラスアルミナの形成と反射防止特性評価
2011年周期第72回 応用物理学会学術講演会, 2011
年8月30日
13. 梁正賢, 一井崇, 邑瀬邦明, 杉村博之, 近藤敏彰,
益田秀樹
ポーラスアルミナマスクを用いた真空紫外光リソグラ
フィによる金ナノ粒子アレイ作製
2011年周期第72回 応用物理学会学術講演会, 2011
年8月31日
14. 近藤敏彰, 鈴木健也, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
太陽電池への応用を目的としたモスアイ構造上への有
機薄膜積層構造の形成
2011年周期第72回 応用物理学会学術講演会, 2011
年8月31日
15. 山本孟, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
アルミナナノホールアレーにもとづくピラーアレ
ー構造の形成とDNA分離への応用
2011年周期第72回 応用物理学会学術講演会,
2011年9月1日
16. 石川康幸, 西尾和之, 益田秀樹
ポーラスアルミナマスクにもとづくDNAのパタ
ーニングとハイブリダイゼーション特性のパター
ン依存性
2011年周期第72回 応用物理学会学術講演会,
2011年9月1日
17. 川本碧, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
高規則性ポーラスアルミナを用いた膜乳化法によ
る単分散ハイドロゲル微粒子の作製
第63回コロイドおよび界面化学討論会, 2011年9
月7日
18. 小林健一, 柳下崇, 魚津吉弘, 西尾和之, 益田
秀樹
ポーラスアルミナを口金としたポリマーナノファ
イバーの連続形成
第63回コロイド及び界面化学討論会, 2011年9月
7日
19. 高木昌史, 近藤敏彰, 西尾和之, 益田秀樹
陽極酸化ポーラスアルミナにもとづく光ナノ導波
路の形成と光学特性評価
2011年電気化学秋季大会, 2011年9月9日
20. 吉田正広, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
ポーラスアルミナを用いたナノインプリント法に
よる新生特性を有するナノ規則表面の形成
2011年電気化学秋季大会, 2011年9月9日
21. 田川卓, 近藤敏彰, 西尾和之, 益田秀樹
金属ナノワイヤーの高スループト形成とLiイ
オン二次電池負極への応用
2011年電気化学秋季大会, 2011年9月10日
22. 原田知明, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
Alの陽極酸化に及ぼす地金微量成分の影響
2011年電気化学秋季大会, 2011年9月10日
23. 塩見幸平, 西尾和之, 益田秀樹
自立マスクを用いたAl電解エッチングによるト
ンネルピット配列制御
2011年電気化学秋季大会, 2011年9月10日
24. 柳下崇, 今泉正彦, 西尾和之, 益田秀樹
バレル電解プロセスによる多孔性微粒子の形成
2011年電気化学秋季大会, 2011年9月10日
25. 柳下崇, 今泉正彦, 西尾和之, 益田秀樹
バルブ金属微粒子の陽極酸化による多孔性微粒子
の作製
第55回日本学術会議材料工学連合講演会, 2011年
10月20日
26. 益田秀樹
ポーラスアルミナにもとづく高スループトナノ
構造形成プロセス
第28回金属アノード酸化皮膜の機能化部会(ARS),
2011年11月11日(依頼講演)
27. 小林祐貴, 西尾和之, 益田秀樹
微細周期陽極酸化ポーラスアルミナを用いたパタ
ーンド磁気記録媒体の作製
第31回表面科学学術講演会, 2011年12月17日
28. 柳下崇
蛾の目を模した反射防止フィルムの開発
高分子学会講演会 生物に学ぶものづくり, 2012
年2月10日(依頼講演)

29. 益田秀樹
アノード酸化にもとづく規則ナノ構造の形成と機能的応用
第 56 回ナノ・スピ工学研究会講演会, 2012 年 2 月 29 日 (依頼講演)
30. 近藤敏彰, 高木昌史, 西尾和之, 益田秀樹
陽極酸化プロセスにもとづく同軸ナノケーブルアレーの作製と光伝搬特性
第 59 回応用物理学関係連合講演会, 2012 年 3 月 18 日
31. 鈴木健也, 近藤敏彰, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
微細構造が制御された基板上への有機薄膜太陽電池の形成
第 59 回応用物理学関係連合講演会, 2012 年 3 月 18 日
32. 柳下崇, 日高猛, 鈴木真理, 益田秀樹
ポーラスアルミナを用いた射出成形によるモスアイ構造賦形レンズの一括形成
第 59 回応用物理学関係連合講演会, 2012 年 3 月 18 日
33. 山本孟, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
ポーラスアルミナを用いたナノインプリントプロセスにもとづく DNA 分離デバイスの作製
日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25 日
34. 井上泰斗, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
ポーラスアルミナを用いた膜乳化プロセスによる単分散酸化物微粒子の作製
日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 27 日
35. 小林健一, 柳下崇, 魚津吉弘, 西尾和之, 益田秀樹
高規則性ポーラスアルミナを口金とするポリマーナノファイバーの連続紡糸
日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 27 日
36. 近藤敏彰, 長尾沙奈美, 西尾和之, 益田秀樹
格子変形にもとづくアルミナナノホールアレーの細孔周期制御
電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 29 日
37. 柳下崇, 植野将太, 西尾和之, 益田秀樹
微細粒子陽極酸化プロセスにもとづく高規則性ポーラスアルミナ微粒子の作製
電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 29 日
38. 塩見幸平, 西尾和之, 益田秀樹
- 自立ポリマーマスクによる Al 電解エッチングのピット位置制御
電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 31 日
39. 植野将太, 柳下崇, 西尾和之, 益田秀樹
バレル電解プロセスによるポーラスシリコン微粒子の作製
電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 31 日

【特許】

- (1)国内特許出願 5 件
(2)国外特許出願 0 件

重点研究室 透明機能材料グループ

「透明機能材料」グループ

グループリーダー 長谷川 哲也

【基本構想】

長谷川「光磁気デバイス」プロジェクト(平成15年度~20年度)において独自に開発した透明機能性材料を実用化するための技術開発を進める。ニオブを添加した二酸化チタン(TNO)が低い電気抵抗率と高い透明性を有することを見出したが、これをITO代替材料として確立すべく、大面積成膜に適したスパッタリング法を用いて、良好な透明導電性を有するTNO膜の作製を行う。また、屈折率が高い、赤外領域での透明性が高いなど、TNOに特有の性質を利用し、透明導電体として新たな応用領域の開発を目指す。さらに、透明酸化物を母体とした新奇な透明電子機能(強磁性、強誘電性、蛍光特性など)の開拓、デバイス応用に取り組む。

1. 平成23年度の研究目的

平成23年度は、以下の各項目を重点課題として研究開発を行った。

- (1) ニオブ添加二酸化チタン系透明導電体のガラス基板上へのスパッタ成膜
- (2) ニオブ添加二酸化チタン系透明導電体の低温成膜技術の開発
- (3) ニオブ添加二酸化チタン系透明導電体のLED用電極としての応用
- (4) 新奇透明機能材料の開発

本グループの前身である流動プロジェクト「光磁気デバイス」(平成15年度~20年度)において、ニオブを添加したアナターゼ型二酸化チタン薄膜($Ti_{1-x}Nb_xO_2$; TNO)が、ITOに匹敵する透明導電性を示すことを見出した。平成19年度から文部科学省「元素戦略プロジェクト」の支援を受け、同材料の実用化に関する研究を行ってきた。

透明導電体を実用化する場合、ガラスやプラスチックなどの安価な基板上に、成膜するプロセスを開発する必要がある。我々は、大面積化が容易で、ITOでの実用法でもあるスパッタ法に注目し、ガラス基板上への成膜を試みてきた。その結果、一旦室温でアモルファス体を合成し、これを還元雰囲気下でアニールして結晶化させることにより、ガラス上多結晶膜でも 10^{-4} Ωcm 台中盤の電気抵抗率を達成した。

上記アモルファスを経る合成法では、結晶化後の膜質はアニール過程に大きく左右される。そこで平成22年度には、アモルファスの結晶化過程の速度論的解析を行った。すなわち、アモルファス膜を一定温度で保持し、時間経過とともに結晶化していく過程を、光学顕微鏡およびX線回折により追跡した。

結晶化温度を下げることに取り組んだ。通常TNOの結晶化には300℃以上の温度でのアニールが必要であるが、この温度を200℃以下まで下げられれば、プラスチック上への成膜が可能となり、応用の可能性が格段に広がる。

平成23年度は、極薄い金属コンタクト層を用いる方法について検討した。

高移動度の透明導電体の開発にも、引き続き取り組んだ。次世代の太陽電池では、赤外光を有効に利用することが求められ、透明電極にも、赤外領域までの透明性が必要となる。赤外まで波長領域を拡大するには、100 cm₂/Vs 程度の高い移動度が求められる。酸化スズは有力な高移動度材料の候補であり、バッファ層を用いて配向制御を行うことで、移動度が大幅に向上することをすでに見出している。本年度は、上記目標を目指し、ドーパントの検討を行った。

このほか、マルチフェロイック特性が期待されるチタン酸化物や、強誘電性の酸窒化物の開発を行った。

2. 平成23年度の研究成果

以下に挙げるのは、平成23年度の具体的な研究成果である。

(1) TNOの結晶化過程の速度論的解析

アナターゼ型 Nb:TiO₂ (TNO) 薄膜は次世代の透明導電膜として期待されている。我々は、低温で堆積したアモルファス薄膜をアニールにより結晶化するポストアニール法を開発し、成膜法としてパルスレーザー堆積(PLD)法を用いることで無アルカリガラス上において 4.6×10^{-4} Ωcmを示す薄膜を実現した。しかし、成膜法としてスパッタ法を用いた薄膜の抵抗率は 1.1×10^{-3} Ωcmにとどまっており、この抵抗率の違いの原因として、結晶粒径が考えられる。そこで、スパッタ法を用いて作製したTNO薄膜について、Johnson-Melt-Avrami (JMA)式を用いて結晶化過程を解析し、結晶粒の生成および成長速度と粒径の関係について詳細に検討した。

偏光顕微鏡観察により、成膜時の酸素流量比 $f(O_2) = [O_2 / (Ar+O_2)]$ を増やすことで結晶粒径が大きくなることが分かった(図)。そこで、温度一定の条件の下でアモルファス膜をアニールし、結晶粒成長過程を高温XRD測定装置により追跡した。回折強度をJMA式を用いて解析し、反応次数 n の評価を行ったところ、還元側の薄膜($f(O_2) = 0\%$)では $n = 2.65$ という結果が得られた。これは、結晶粒の

生成と成長が同時に起こり、結晶化過程の進行に伴って粒生成速度が増大することを示している。一方、酸化側の薄膜 ($f(O_2) = 1\%, 5\%$) では $1.5 < n < 2.5$ となり、結晶化過程の進行に伴って粒生成速度が減少することが示された。すなわち、後者の薄膜の大きな粒径は、結晶化過程において粒成長が粒生成よりも支配的に起こるためと結論した。

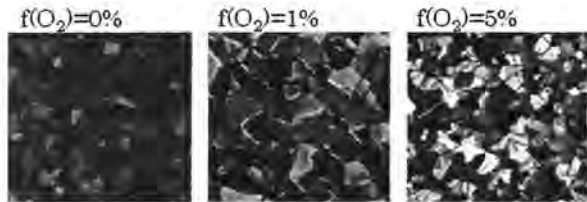


図 様々な $f(O_2)$ で作製した TNO 膜の偏光顕微鏡写真 (結晶化後)

(2) TNO の低温合成プロセスの開発

低抵抗 TNO 膜を得る実用的な方法が、アモルファス膜をアニールして結晶化させる方法である。通常電気炉によるアニールでは、TNO の結晶化には 300°C 以上の温度が必要であるが、もし結晶化温度をさらに下げることができれば、PET などのプラスチック基板への成膜が可能となる。我々はこれまで、レーザーアニールなど様々な方法を試みてきたが、ここでは、薄い金属コンタクト層を用いる方法について検討した。Si では、同様の方法により 400°C 近く結晶化温度を低減できることが知られている。

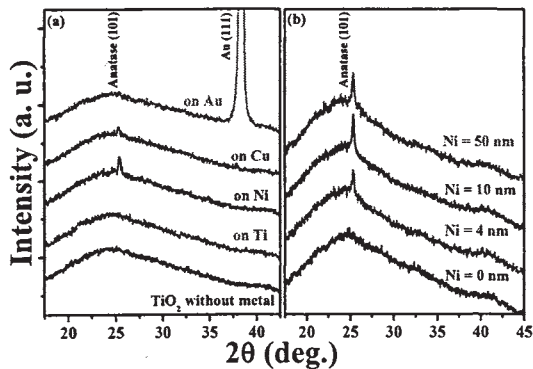


図 TNO/金属コンタクト層の X 線回折パターン (250°Cでのアニール後)

ガラス基板上に金属コンタクト層 (Au, Cu, Ni および Ti) を蒸着し、その上にアモルファス TiO_2 膜 (膜厚 100 nm) を PLD 法により室温で堆積した。これを窒素雰囲気の下でアニールしたところ、Ni および Cu コンタクト層を用いた場合に、顕著な結晶化温度の低下を確認した (図)。特に Ni コンタクト層では、結晶化温度が 260°C から 220°C まで大きく低下した。Ni 層の厚さは 4 nm でも十分である。金属層誘起による結晶化は、偏光顕微鏡観察の結果からも明らかである。これに対し、Au や Ti では、結晶化温度を下げる効果は見られなかった。従って、ある特別な金属のみが、結晶化温度の低減に有効であると結論できる。結晶化

後、表面に Ni 金属が検出されたことから、Ni と TiO_2 とが反応して中間体を生じ、これが低温で分解する際に TiO_2 が結晶化するものと考えられる。

(3) TNO の LED 用電極への応用

TNO は、高屈折率を有する事から GaN 系 LED の透明電極として応用が期待されている。しかし、我々がこれまで開発してきたプロセスでは真空雰囲気下でのアニールが必要なため、p-GaN の劣化が懸念される。そこで、p 型 GaN の高いキャリア活性を保つため、窒素雰囲気下でのアニール処理によって TiO_2 系透明導電体を形成することを目指し、ガラス上の多結晶薄膜において低抵抗性を検討した。

酸素流量比 0.75% の薄膜について様々な温度で窒素アニールを行なった結果、 350°C の時に抵抗率は最低となった。また、酸素流量比 0.15% の時に最も低い抵抗率 $8.4 \times 10^{-4} \Omega\text{cm}$ を示した。この薄膜の波長 460 nm における吸収率は 5 % 以下であり、光学特性も良好である。

以上、窒素アニールによって得られた試料は、真空アニールしたものと同等であり、本プロセスを p-GaN 上の TNO へと適用すれば、良好な透明導電薄膜が得られると期待される。

(4) 高移動度 SnO_2 膜の開発

次世代の高効率太陽電池では、赤外光の有効利用が必須であり、透明電極にも、赤外領域までの透明性が求められる。赤外領域の透明性を確保するには、キャリア濃度を低く抑える一方、移動度を向上させる必要がある。

我々はこれまで、Ta: SnO_2 系を対象として、高移動度材料の開発を行ってきた。その結果、格子マッチングしたルチル型 TiO_2 - NbO_2 混晶系で、移動度 $136 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ を達成した。この値は、透明導電体としては最高値である。

ただし、Ta は希少で高価な元素の一つであり、できれば他の元素への代替を進めたい。本研究では、同族元素である Nb に注目し、Nb: SnO_2 の電気特性を詳細に調べた。その結果、ガラス基板上の無配向膜では、ドーパントである Nb は十分な活性を示さなかったが、配向膜では高い活性化率が得られた。従って、Nb: SnO_2 の実用化においては、配向制御が鍵を握ると考えられる。

(5) 強誘電性酸窒化物薄膜の合成

B サイトに d^0 遷移金属イオンを含むペロブスカイト型酸窒化物 $\text{ABO}_{3-y}\text{N}_y$ は、高誘電率材料として期待されている。しかし、同物質は従来、酸化物のアモニア処理により合成されてきたため、高密度な焼結体や単結晶を得ることが難しく、正確な電気物性は不明である。

我々は、パルスレーザー蒸着 (PLD) 法を用いて $\text{SrTaO}_{3-y}\text{N}_y$ エピタキシャル薄膜の作製を行った。ここで重要となるのが窒素の導入法であり、電子サイクロトロン共鳴装置 (ECR) により励起したラジカルを含む N_2 ガスを用いた。

得られた膜の組成分析から、窒素量 y は、合成条件に応じて、 $0 < y < 1.2$ の範囲で制御できることがわかった。また、 $y \approx 1$ の薄膜について、共鳴ピエゾ応答顕微鏡 (PFM) 観察

を行ったところ、明瞭な分域像を得ることに成功し、また直流電圧印加による分極反転を確認した。さらに、誘電率測定からもヒステリシスを観測した。バルク体では強誘電性の報告はなく、薄膜では、窒素のオーダーにより、強誘電性が発現した可能性が考えられる。

Nb:TiO₂ スパッタ非晶質薄膜の結晶化過程

ホァン・ゴク・ラン・フン 中尾 祥一郎

1. はじめに

透明導電体はフラットパネルディスプレイやタッチパネル、太陽電池等に使用され、近年需要が高まっている。しかしながら実用に使われている透明導電体の Sn ドープ In₂O₃(ITO)は主材料である In が希少金属であり、In 資源の枯渇とそれに伴う価格の高騰という大きな問題に直面している。その為、現在 In を用いない透明導電体の研究が盛んに行なわれている。

我々のグループが発見した Nb ドープ TiO₂ (Nb:TiO₂,TNO)は、主原料である Ti がクラーク数(地殻に含まれる元素の割合)が 0.46(第 10 位)と地球上に豊富に存在し、資源の枯渇の問題が存在しない。また TiO₂ は光触媒として長い研究の歴史があり、人体に無害で環境負荷の少ない優れた材料である事が分かっている。また TNO は、高い屈折率、還元雰囲気への強い耐性等、ITO 等の従来の材料に無い特徴を持つ。これまで我々は非加熱のガラス基板上にパルスレーザー堆積(PLD)法で非晶質 TNO を作製し、還元雰囲気ですトアニールを行う事で導電性の良い多結晶 TNO を得る事が出来る事を報告し、また同様の手法を実用的な成膜法であるスパッタ法に適用出来る事を明らかにした。この手法(固相成長法)は加熱されたガラス基板上に直接多結晶 TNO 薄膜を作製する方法より 2 倍程度高い導電性が得られるため非常に重要な方法である。しかしながら非晶質からの結晶化、例えば核生成や結晶核からの粒成長の成長モードやその速度などはこれまで殆ど研究されていなかった。数少ない研究例としてはゾルゲル法によって作製された TiO₂ 薄膜の結晶化速度パラメータの報告がある。TNO 薄膜は物理気相法(PVD)であるスパッタ法や PLD 法では固相成長法で高い導電性の多結晶が得られる一方、ゾルゲル法の TNO では固相成長法でも導電性は非常に悪い。その為、PVD 薄膜の非晶質からの結晶化の機構に関する研究が大いに待たれていた。

本研究において、非晶質からの結晶化を調べるには非常に強力な方法である in-situ 高温 XRD 測定を用いて、スパッタ非晶質 TNO の等温アニールにおける結晶化過程を調べた。この方法は TiNi 合金や Ni 珪化物、二酸化チタン、ITO などの酸化物の結晶化過程を調べる為にこれまで広く使われていた方法である。結晶化過程の解析には結晶核の生成とその後の結晶成長およびその競合を考慮した Johnson-Mehl-Avrami (JMA)の式を用いた。

2. 実験と結果

2.1 実験

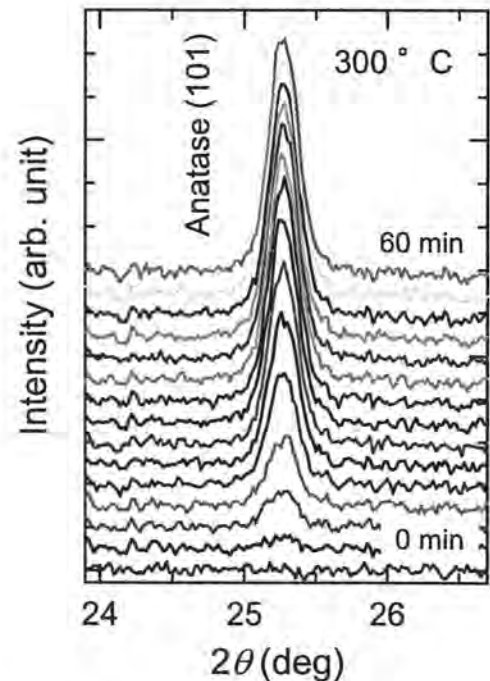


図 1. in-situ 高温測定による XRD パターンの変化

RF マグネトロンスパッタ装置(キャノンアネルバ E200S)を用いて非加熱の熱酸化シリコン基板上に非晶質 TNO 薄膜を作製した。ターゲットには Ar 雰囲気ですトプレスにて作製した 2 インチ Ti_{0.973}Nb_{0.37}O_x 焼結体(フルウチ化学)を用いた。ターゲットに投入した電力は 120W である。Ar と O₂ をプロセスガスとして用い全ガス流量は 20SCCM とした。酸素流量比は 0,1,5% とした。膜厚は 300 nm である。XRD 測定によって as-depo の薄膜は非晶質である事を確認している。

in-situ 高温 XRD 測定は高温ステージ(Anton Paar, DHS1100)を装着した XRD(Bruker, D8 DISCOVER with GADDS)で行った。測定中の雰囲気は、1x10⁻¹ Pa 程度の真空である。本研究では測定温度が非常に重要であり、十分に有意な解析結果を得るためには適当な温度で測定する必要がある。すなわち、高温では結晶化進行が早すぎて、十分な解析が行えず、低温では現実的な測定時間で測定が完了しない。本研究では典型的には 1 時間程度で結晶化が完了する温度を選択し、具体的には酸素 0% に対しては 335 度、1% に対しては 300 度、5% に対しては 285 度で測定を

行った。結晶粒の粒構造は偏光顕微鏡(POM)を用いて評価した。比較の為に非等温アニールによる TNO 多結晶薄膜を水素雰囲気中で 100 度/分の昇温で 600 度まで加熱する事で作製した。

2.2 結果と考察

図 1 に酸素流量比 1% の TNO 薄膜における測定温度 300 度でのアナターゼ(101)回折ピークの変化を示した。測定開始直後はピークの無いアモルファス状態が、徐々にアナターゼ構造に変化し、回折強度が大きくなる様子が見られる。結晶化過程の解析に必要な結晶化率をあるアニール時間 t における回折強度の積分値 $I(t)$ を用いて $x(t) = I(t)/I(\infty)$ と定義した。得られた結晶化率 $x(t)$ の時間 t に対するプロットを図 2(a) に示した。本データを JMA の式に基づいて解析を行った。

JMA の式

$$x(t) = 1 - \exp(-kt^n)$$

k : 時定数, n : Avrami 指数

であり、 k は核生成および粒成長の両方の寄与からなる。 n は結晶成長の次元性と結晶成長に対する核生成割合の比率を表す。ここで Avrami 指数 n は図 2(b) に示した通り、 $\ln(-\ln(1-x))$ 対 $\ln(t)$ のプロットによって、その傾きを求めることで決定出来る。得られた Avrami 指数は酸素 0% に対しては 2.7、1% に対しては 2.0、5% に対しては 2.2 となった。なおこの値は、スパッタ法による無置換 TiO_2 薄膜における文献値(2.0-2.4)と良い一致を示している。結晶成長が 3 次元成長の場合は Avrami 指数は 3-4、二次元成長の場合は Avrami 指数は 2-3 である事が知られており、本研究においては TNO の結晶成長は 2 次元であると結論できる。また 2 次元成長においては Avrami 指数は結晶核生成が結晶成長の最中も常に起こる成長(continuous nucleation, 連続核生成成長)の場合は 3、結晶核生成は初期のみであり、結晶成長中は核生成が起こらない場合(site saturation, 核サイト飽和成長)は 2 であることが知られている。その為、酸素流量比 1 および 5% の場合はほぼ核サイト飽和成長であり、核生成はごく初期に殆ど終了し、そこから二次元的な結晶成長が起こっている事が分かる。酸素流量比 0% の場合は、連続核成長であり、結晶成長中も残った非晶質の母体中では核生成が続いている事が分かる。以上の結果とは対照的にゾルゲル法の TiO_2 においては 2 以下の Avrami 指数が報告されており、物質拡散が支配的な結晶成長である事が指摘されている。この成長モードの違いがスパッタ TNO とゾルゲル TNO の特性の違いを生んでいる可能性がある。

高温 XRD 測定で示唆された二次元成長は、図 3(a)-(c) の POM 像から直接的に明らかになった。即ち、全ての試料で数 μm 以上の結晶粒が観測されているが、これは膜厚(300nm)より十分に大きく、これは二次元的な結晶粒と言えるからである。

最後に、等アニールと非等温アニールの比較を行いたい。図 3(d)-(f) は非等温アニールの TNO 薄膜の POM 像である。全ての試料において等温アニールの試料と同様に数 μm 以

上の結晶粒が観測されており、結晶成長は二次元的である。特筆すべき点は酸素流量比は 1% の試料の粒構造が等温アニールの場合と酷似している点である。これは等温アニール(in-situ 高温 XRD 測定)で、核サイト飽和成長である事を

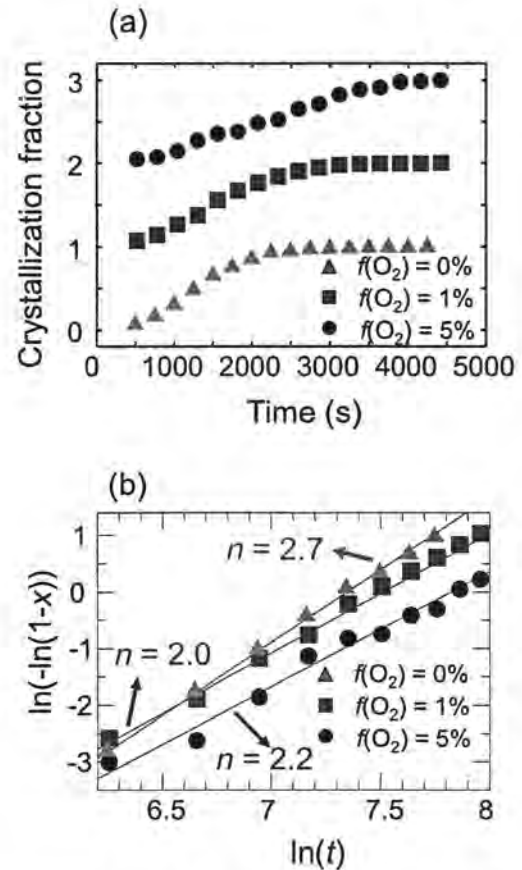


図 2. (a)結晶化率の時間依存性と(b)得られた Avrami 指数

よく裏付けている。即ちアニール温度が何度であろうと、核サイト数は一定であるからである。一般的に核サイト飽和成長は均一な粒構造をもたらすので導電性の観点からは有利である。その為、核サイト飽和成長になるように酸素流量比を制御することは低抵抗 TNO を作製する上で重要であると考えられる。

3. まとめと今後の展開

以上、まとめると in-situ 高温 XRD 測定を用いて TNO 薄膜の等温アニールによる固相成長の結晶化過程を調べた。得られた Avrami 指数は 2.0-2.7 であり結晶成長が二次元的である事が示唆された。これは POM 観察による結晶粒構造によって裏付けられた。今後の展開としては成長モードの違いをもたらす非晶質状態の違いを正しく理解する事が低抵抗 TNO 薄膜作製に繋がると考えられる。

【参考文献】

1. G. Exarhos and M. Aloji: Thin Solid Films 193-194 (1990) 42.
2. L. Zhao, X. Zhao, J. Liu, A. Zhang, D. Wang, and B. Wei: J. Sol-Gel Sci. Technol. 53 (2010) 475.

3. M. Avrami: J. Chem. Phys. 9 (1941) 177. and references there in

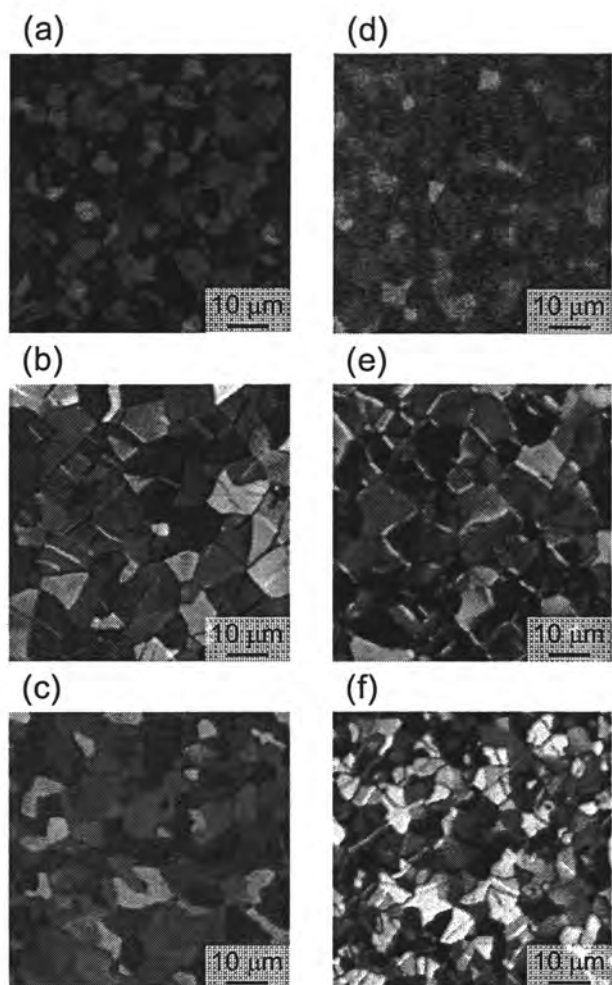


図 3. (a)等温アニールと(b)非等温アニールのTNOのPOM像

青色発光ダイオード用電極作製プロセスの開発

岡崎 壮平

1. はじめに

近年、液晶ディスプレイや太陽電池などの電極材料として、透明導電体の需要が拡大している。絶縁体であるTiO₂にNbを添加したNb:TiO₂は透明導電体となり¹⁾、電気抵抗率($\sim 4 \times 10^{-4} \Omega\text{cm}$)や可視光吸収率(<5%)などについて、広く実用化されている透明導電体であるスズ添加酸化インジウム(ITO)に匹敵する物性値を有する。Nb:TiO₂は屈折率が約2.4と高く、これは窒化ガリウム(GaN)の値に近い。GaNベースの青色LEDの上部透明電極の材料として用いた時に光学特性の向上が期待される。

GaNを用いた青色LEDのデバイス構造を図1に示す²⁾。発光部上層のMgをドーパしたp型のGaNは仕事関数が非常に高いため、上部の透明電極との間にショットキー障壁が形成されて界面の電気抵抗が大きくなり、消費電力が増大してしまう事が問題となっている³⁾。

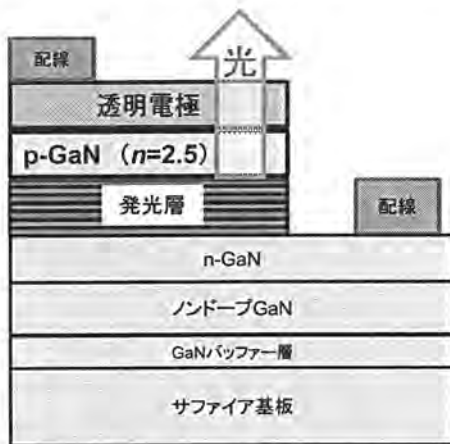


図1. GaInを用いたLEDの模式図

1.1 GaN/Nb:TiO₂の界面特性改善

青色LEDの電気・光学特性を改善する上で、GaNと透明電極との界面特性が非常に重要となってくる。Nb:TiO₂は上述のように光学的マッチングに優れており、また工業的に広く利用されているスパッタリング法によってGaNにアナターゼ構造の薄膜を成膜する事が可能である⁴⁾。一方で、スパッタリング成膜後に結晶化させるために真空などの還元雰囲気中で加熱処理を行い、この際にp型GaNのキャリア濃度が低下して界面における電気的な接触抵抗に悪影響を与えるという問題があった。

このため、本研究ではGaNのキャリア特性への悪影響を避けられる窒素雰囲気中でNb:TiO₂を加熱することによって、界面の接触抵抗を低減させる事を目的とした。また、

成膜および熱処理のプロセスが界面特性に与える影響を明らかにし、界面の低抵抗化への知見を得る事を目指した。

1.2 実験方法

化学気相蒸着法によりAl₂O₃ウエハ-の上に成長させたp型GaN(市販品)を基板として用いた。マグネトロンスパッタによってNb:TiO₂薄膜(Nb = 4%)を室温で基板上に成膜し、赤外線ランプ加熱装置によってアニール処理を行なって結晶化させた。得られた試料についてはI-V測定から薄膜および界面の電気抵抗を評価した。

さらにTLM(Transmission Line Model)法によって接触抵抗を定量的に評価するため、薄膜表面を微細加工し電極構造を形成した。また、透過型電子顕微鏡(TEM)によりアニール前後の界面構造の変化を観察した。

2. 実験と結果

2.1 実験手順

実験は以下の手順により行なった。

p型GaNおよび無アルカリガラスの上にマグネトロンスパッタ(キヤノンアネルパ製E-200S)によってNb:TiO₂薄膜(Nb = 4%)を室温で成膜した。成膜時の全圧は1.0 Pa、ArとO₂の総流量は20 sccm、薄膜の膜厚は100 nmであった。薄膜は赤外線集光炉によってアニール処理を行ない結晶化させた。この試料について、I-V測定から薄膜抵抗および界面の接触抵抗を評価した。

TLM測定用試料の作製にあたっては、室温成膜後のNb:TiO₂上に下地にヘキサメチルジシラン(HMDS)、上層にフォトレジストのPMERをスピコートで塗布した。塗布時の回転速度はともに5,000 rpmであり、130 °Cで6分間ベークした後にフォトマスクを用いて露光処理($\lambda = 405 \text{ nm}$, 450 mJ/cm^2)を行った。P-7Gで4分間現像し、140 °Cでポストベークした後に酢酸とフッ酸の混合液(HNA)でエッチング処理をした。エッチング後、剥離剤104で40 °C、3分間の剥離処理を行なった後、純水で洗浄した。

さらに銀電極をリフトオフによって最表面に形成するため、PMGIとTSMRの2層のフォトレジストをスピコート法により、ともに回転速度3,000rpmで塗布した。ベーク温度と膜厚はそれぞれ200 °C・620 nm、90 °C・420 nmである。露光処理($\lambda = 405 \text{ nm}$, 50 mJ/cm^2)の後にSF-5で2分30秒間現像処理を行い、110 °Cで90秒間ポストベークした。酸素プラズマ中で未硬化の残留レジストを除去した後、抵抗加熱により銀を蒸着した。蒸着時の真空度は $7 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ 、成膜速度は6 Å/minで膜厚は400 nmとなっている。リフトオフ処理として、アセトンおよびメタノ

ールにより超音波洗浄を行なった。微細電極を形成した後に、Nb:TiO₂ を結晶化させるため赤外線集光炉を用いて窒素雰囲気下で試料を熱処理した。

続いて透過型電子顕微鏡装置 (TEM) によって断面を観察するため、集束イオンビーム (FIB) により形状を加工した。FIB 加工には SII 製 SMI2050 を使用し、5×10×0.1 μm の形状となるよう切り出しを行った。これを支持膜付グリッド (JEOL 製 Cu200 メッシュ) 上に固定し、TEM (JEOL 製 JEM-2200FS) を用いて観察した。また、エネルギー分散形 X 線分析装置 (EDS、JEOL 製 LED-2300) によって断面の組成分布を評価した。

2. 2 実験結果

2. 1. 1 電気特性の変化

窒素雰囲気下 (全圧: 0.5 atm)、350 °C で無アルカリガラス上の Nb:TiO₂ 薄膜をアニールしたところ、成膜時の酸素流量比と薄膜抵抗率の関係は図 2 のようになった。

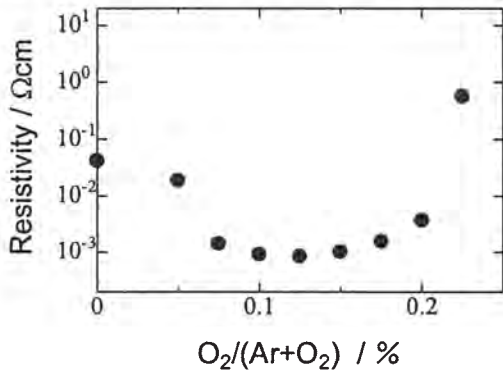


図 2. 成膜時の酸素流量比と薄膜抵抗率の相関

O₂/(Ar+O₂) = 0.1 - 0.15% において Nb:TiO₂ の抵抗率は 1 × 10⁻³ Ωcm 以下、また O₂/(Ar+O₂) > 0.1% の領域では λ = 460 nm における吸収率が 5% 以下となり、窒素アニールにより透明導電性を有するアナターゼ型の Nb:TiO₂ の薄膜が得られた。

真空 (= 1 × 10⁻² Pa) ならびに窒素雰囲気中で 500 °C のアニール処理をした Nb:TiO₂/p 型 GaN/Nb:TiO₂ の I-V 測定の結果を図 3 に示す。真空アニールによって Nb:TiO₂ を結晶化させた試料はショットキー的な特性を示したのに対し、窒素アニールを行なった試料はオーミック的な特性を示しており、全抵抗ならびに接触抵抗の低減が確認された。

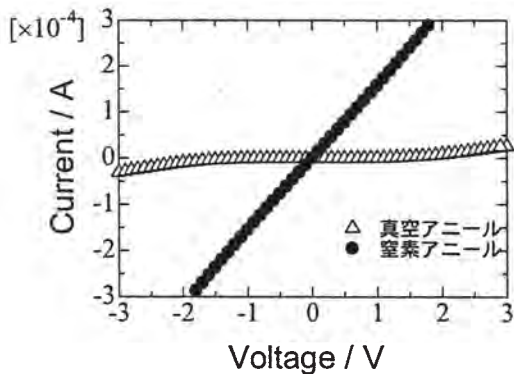


図 3. Nb:TiO₂/p 型 GaN 界面を含む I-V 特性

2. 2. 2 TLM 測定および TEM 観察

フォトリソグラフィーにより微細加工を行なった試料表面の光学顕微鏡写真、および触診式段差計で測定したラインプロファイルを図 4 に示す。Nb:TiO₂ は φ = 0.5、1.5 mm の同心円状にエッチングし、その間の間隔は 2 - 30 μm とした。

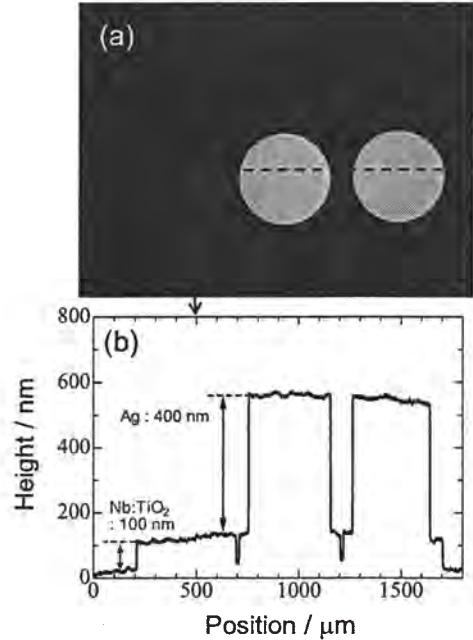


図 4. (a) 銀電極形成後の試料表面像 (b) 表面形状

この試料を窒素雰囲気中でアニール処理したところ、電気抵抗が大きく TLM 法による接触抵抗の定量評価が行えなかった。

透過型電子顕微鏡によるアニール前後の試料断面の観察結果を図 5 に示す。

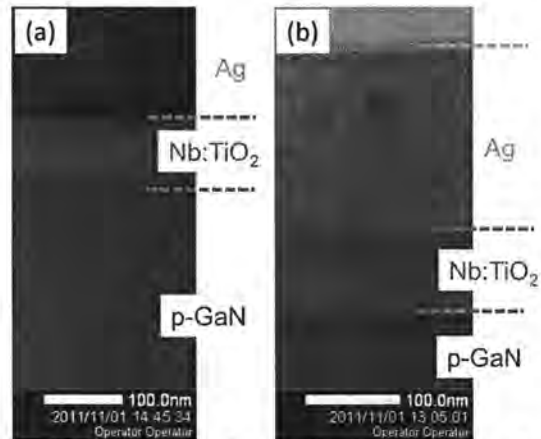


図 5. (a) アニール前 および (b) アニール後の断面 TEM 像

アニール後は Ag/Nb:TiO₂ の界面では混合が広く進んでいるのに対し、Nb:TiO₂/GaN の界面では構造に大きな変化が見られない。また、TEM 像だけでなく EDS による組成分析からも、同様の傾向が確認された。

3. 考察及び今後の展望

窒素雰囲気中での熱処理プロセスにより、従来用いていた真空雰囲気下で熱処理した場合と同等以上の透明導電

性を有する Nb:TiO₂ 薄膜の作製に成功した。また、p 型 GaN 上に成膜した試料の I-V 特性より接触抵抗の小さいオーミック的な界面が得られており、窒素アニールが GaN 中のキャリア濃度を相対的に高くする効果があった事が示唆される。また I-V 特性はアニール時の昇温速度に依存しており、昇温中に界面付近で構造などに変化が起きている可能性がある。

TLM 法による定量評価が行えなかった原因については究明を進めている。その結果を踏まえて今後再び接触抵抗の定量評価を行うとともに、Nb:TiO₂/GaN 界面付近についてさらに空間分解能の高い TEM 観察や EDS 評価を行うことを検討したい。

謝辞

本研究においては、試料表面の微細加工および TEM 観察のため、東洋大学バイオ・ナノイノベーション創出事業の設備を利用し、多くの貴重な助言を頂きました。ここに

御礼を申し上げます。

【参考文献】

1. Y. Furubayashi, T. Hitosugi, Y. Yamamoto, K. Inaba, G. Kinoda, Y. Hirose, T. Shimada and T. Hasegawa, *Appl. Phys. Lett.* 86, 252101, (2005).
2. J. T. Trexler, S. J. Pearton, P. H. Holloway, M. G. Mier, K. R. Evans, and R. F. Karlicek, *Proc. Mater. Soc. Symp.*, 449, 1091 (1997).
3. J.S. Jang, D. Kim and T.-Y. Seong, *IEEE Photonic Lett.*, 18, 1536 (2006)
3. J. Kasai, T. Hitosugi, M. Moriyama, K. Goshonoo, N. L. H. Hoang, S. Nakao, N. Yamada, and T. Hasegawa, *J. Appl. Phys.* 107, 053110 (2010).

歪を誘起する基板上的 Nb:SnO₂ 薄膜のキャリア量増大

中尾 祥一郎

1. はじめに

ドーピングされた SnO₂ 薄膜は太陽電池電極や熱線反射ガラス等で広く使われ、持続可能社会を縁の下で支える重要な物質である。有効なドーパントの探索と、それに適した薄膜の作成方法は、基礎研究の観点からも応用研究の観点からも重要であり、これまで盛んに研究されてきた。例えば F ドーピングが最もよく使われるドーパントであるが、化学気相成長法(CVD)によって $3 \times 10^{-4} \Omega\text{cm}$ 程度の低い抵抗率が得られている一方、物理気相成長法(PVD)であるパルスレーザー蒸着法(PLD)法では、やや高い抵抗率 $5 \times 10^{-4} \Omega\text{cm}$ しか得られていない。その一方、Ta ドーピングでは CVD, PVD ともに $3 \times 10^{-4} \Omega\text{cm}$ 以下の低抵抗率が得られている。このように Ta は、非常に有効なドーパントであるが、希少金属という欠点があり、より資源的に豊富なドーパントで同様の特性を達成することが望ましい。

Nb は Ta の同族元素であり、物理的・化学的性質は非常に似通っている。実際、第一原理計算¹⁾からは Ta と同様に Nb も高い活性化率でキャリアを放出する良いドーパントである事が予想されている。理論的な予想に反して、実験的²⁾には Nb:SnO₂ 薄膜のキャリア濃度は $6 \times 10^{19} \text{cm}^{-3}$ と低く矛盾がある。また低キャリア濃度を反映して抵抗率も $10^{-3} \Omega\text{cm}$ 台の高いものしか得られていなかった。Ta がほぼ活性化率 100% の非常に良いドーパントである事と対照的であった。 $6 \times 10^{19} \text{cm}^{-3}$ 程度のキャリア濃度であれば酸素欠損の意図しない欠陥からの寄与でも説明できることから、Nb がキャリアを放出しドーパントとして働いているかどうかはこれまで不明のままであった。今回、我々は幾つかの単結晶基板やシード層付きのガラス基板、通常のガラス基板の上に Nb:SnO₂ 薄膜を作製し、その輸送特性と膜構造を調べた。その結果、基板から誘起された歪がキャリア生成に大きな影響を持っていることが分かった。面内引張歪をもたらす基板上的においては Nb は 65% 程度と F と同程度の高い活性化率の良いドーパントとして振る舞う事が分かった。またキャリア濃度の温度依存性を調べた結果、低いキャリア濃度の試料は、熱活性化型の振る舞いを示すことがわかった。

2. 実験と結果

2.1 実験

Sn_{1-x}Nb_xO₂ (NTO, x=0-0.05) 薄膜は、KrF エキシマレーザー(フルエンス 1-2 J/cm², 繰り返し周波数 2Hz)を用いたパルスレーザー蒸着(PLD)法によって作製した。³⁾酸素分圧 $5 \times 10^{-3} \text{Torr}$, 基板温度 600°C とした。典型的な膜厚は 130 ± 20

nm であった。基板には無アルカリガラス基板(コーニング 17237)、30nm の ZnO シード層付きガラス基板、10nm のアナターゼ TiO₂ シード層付きガラス基板、c 面サファイア単結晶基板を用いた。アナターゼ TiO₂ シード層の作製条件は既報の通り、ZnO シード層の作製条件は基板非加熱、酸素分圧 $1 \times 10^{-6} \text{Torr}$ である。薄膜の結晶構造は X 線回折(XRD)、抵抗率、キャリア濃度、移動度は 6 端子法を用いて、ホールバー形状試料を用いて測定した。

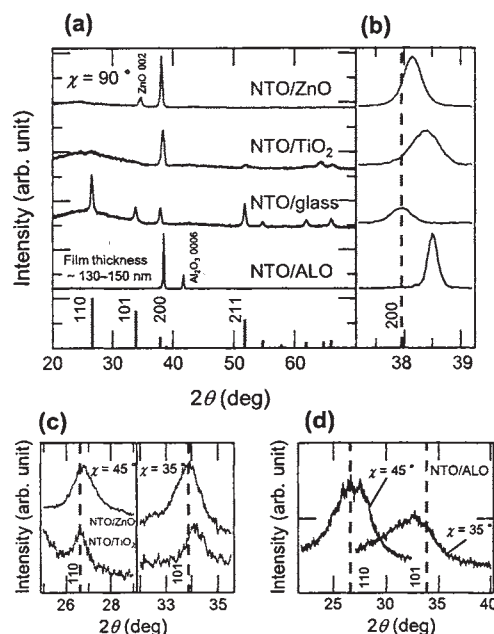


図 1. 様々な基板上的 NTO 薄膜の XRD パターン

2.2 結果と考察

図 1 は NTO(x=0.01) 薄膜の XRD パターンの比較である。以後、ガラス上薄膜を NTO/glass、ZnO シード層付きガラス基板上薄膜を NTO/ZnO、アナターゼ TiO₂ シード層付きガラス基板上薄膜を NTO/TiO₂、c 面サファイア単結晶基板上薄膜を NTO/ALO と略す。図 1 から明らかなように NTO/glass はバルクのパターンに酷似しており、ランダム配向多結晶である事が分かる。その一方に NTO/ALO は既報と同じく(100)配向のエピタキシャル薄膜である。NTO/ZnO、NTO/TiO₂ は両方共に面内はランダムな(100)配向多結晶薄膜である。図 1(b)の拡大図に示した通り(200)のピークは NTO/TiO₂、NTO/ALO 両方において明瞭にバルクの位置より広角側にシフトしており、面内の歪が存在する事を強く示唆している。その一方、アモルファスの基板

上の NTO/glass ではピークのシフトは全く観測されず、エピタキシャル歪が存在しない事を示している。

表 1 様々な NTO 薄膜の格子定数とキャリア濃度

Sample	Crystal	Lattice parameters				n_e (cm^{-3})
		a_{\perp} (nm)	a_{\parallel} (nm)	c_{\parallel} (nm)	$a_{\parallel} \times c_{\parallel}$ (nm^2)	
文献値	Bulk	0.4738	0.3187	0.1510	-	-
NTO/ALO	(100) epi	0.466 ₇	(0.45) ₂	(0.33) ₉	(0.15) ₃	1.8×10^{20}
NTO/glass	random poly	0.473 ₀	0.318 ₁	0.150 ₄	0.150 ₄	5.3×10^{19}
NTO/TiO ₂	(100) poly	0.468 ₇	0.479 ₇	0.317 ₆	0.152 ₃	1.9×10^{20}
NTO/ZnO	(100) poly	0.470 ₈	0.471 ₆	0.319 ₃	0.150 ₅	8.2×10^{19}

面内の格子定数は図 1(c)(d)に示す通り、様々な χ における XRD 測定によって求められた。表 1 に面直の a 軸長 a_{\perp} 、面内の a 軸長 a_{\parallel} 、 c 軸長 c_{\parallel} 、および面内の面積 $a_{\parallel} \times c_{\parallel}$ をキャリア濃度 n_e と共にまとめた。NTO/TiO₂ はバルクや NTO/glass より大きな $a_{\parallel} \times c_{\parallel}$ の値を示し、NTO/TiO₂ が実際に面内引っ張り歪のもとで成長している事を示している。残念ながら、NTO/ALO においては面内のピークが非常にブロードなため正確に $a_{\parallel} \times c_{\parallel}$ を決定することは不可能であった。しかしながら、面直 a_{\perp} が縮んでいることを考えれば、NTO/TiO₂ と同様に面内引っ張り歪に晒されていると考えるのは合理的である。その一方、NTO/ZnO は面内歪はあまり顕著ではない。

次に、輸送特性について議論したい。表 1 に示した通り、NTO/ZnO と NTO/glass は、 $1 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ 以下の低い n_e であるのに対し NTO/TiO₂ と NTO/ALO は $2 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ 程度の高い n_e を示す。この高いキャリア濃度が大きな抵抗率の減少を持たすが、これについては後ほど詳細に示す。この特筆すべきキャリア濃度の増大は先程示した基板からの歪に関わっているように見える。この仮説を検証するために、 n_e と格子定数の膜厚依存性を調べた(図 2)。NTO/glass はバルクの SnO₂ の格子定数に近く、 n_e は全ての膜厚の範囲で $5 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ 程度であり、アモルファス基板から歪を受けていない事が示唆される。一方 NTO/ALO の a_{\perp} もまた膜厚に依存しないが、明らかに NTO/glass より小さい。これは少なくとも膜厚 500 nm までエピタキシャル歪が緩和していない事を示唆している。NTO/ALO の n_e はわずかに膜厚の増加とともに減少するが、それでも $1.8\text{-}2.0 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ の高い値を示す。これらの振る舞いと対照的に NTO/TiO₂ は、膜厚の増加と共に a_{\perp} の増加と a_{\parallel} の減少が見られ、しかもその値は NTO/glass の a に漸近する。NTO/TiO₂ の基板歪は僅か 10 nm のシード層によってもたらされているため、膜厚の増加と共に緩和するのだと考えられる。

注目すべきことは、 n_e が膜厚の緩和と共に減少しており、基板歪に由来するキャリアの生成を支持している。

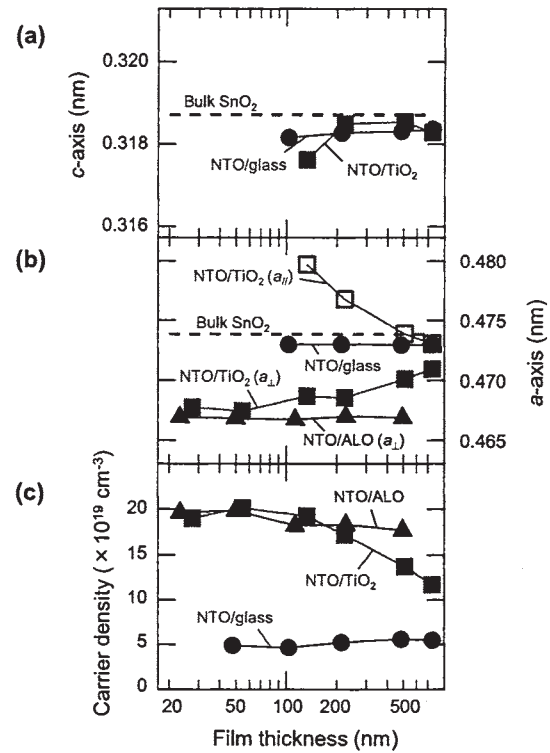


図 2. NTO 薄膜の格子定数とキャリア濃度の膜厚依存性

次に、輸送特性の詳細について述べる。図 3(a)-(c)は NTO/glass、NTO/TiO₂、NTO/ALO の室温での輸送特性の Nb 濃度依存性を示した物である。NTO/glass は過去の報告と同様に $10^{-3} \Omega \text{ cm}$ 台の高い値になっている。その一方で、NTO/TiO₂ と NTO/ALO では $10^{-4} \Omega \text{ cm}$ 台の低い抵抗率が得られている。特に NTO/TiO₂ においては Nb 濃度が 1-2% のドーパ量で $5 \times 10^{-4} \Omega \text{ cm}$ が得られており、これは同じ成膜方法で作製した F ドープや Sb ドープの薄膜と同じ程度の抵抗率である。これらの低抵抗化の起源は図 3(b)にあるように大幅なキャリア濃度の増加である。NTO/glass のキャリア濃度は過去の報告と同様、Nb 濃度に対してベル型となり、しかもその最高値は $5 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ 程度である。その一方、NTO/TiO₂ と NTO/ALO では Nb のドーパに対してキャリア濃度は単調に増加し、最大で $3 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ が得られている。特に活性化率が 1% 以下の低ドーパ領域においては 65% 以上と高い値になっており、典型的なドーパントであるフッ素の活性化率(70%)と同等である。以上の事実から、Nb は SnO₂ に対して有効なドーパントと言える。

最後に NTO/glass の低いキャリア濃度の起源について議論する。図 4(a)は NTO/glass および NTO/TiO₂ のキャリア濃度の温度依存性である。キャリア濃度の温度依存性は基板の種類によって大きな違いを示す。NTO/TiO₂ は縮退半導体に特有の温度に依存しない振る舞いを示す一方、NTO/glass は熱活性型の振る舞いを示す。NTO/glass の温度依存性を次の経験的式でフィッティングを行った。

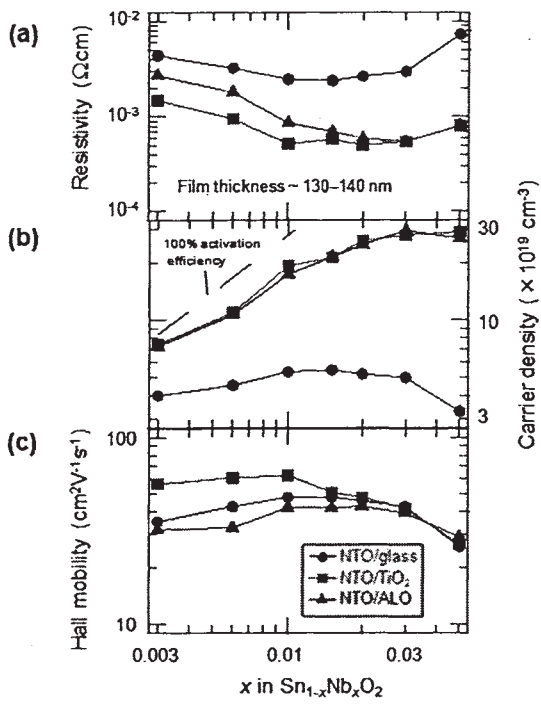


図 3. NTO 薄膜の輸送特性の Nb 濃度依存性

$n_e(T) = n_0 + n_1 \exp[-E_1/(k_B T)] + n_2 \exp[-E_2/(k_B T)]$
 ここで n_0 は縮退キャリアのキャリア濃度、 n_1 および n_2 は熱活性型のドナー濃度、 E_1 および E_2 はその活性化エネルギーである。フィッティングの結果は非常に良好であり、得られたパラメータを図 4(b)(c) に示した。なお比較の為に NTO/TiO₂ のキャリア濃度も示している。特筆すべき点は、より大きな活性化エネルギーを持つドナー濃度 n_2 が NTO/TiO₂ のキャリア濃度と非常に良く一致し、ドーパした Nb の濃度に対して比例するという事である。この事実は、ドーパされた Nb が NTO/glass に対しては、伝導体の下端に潜り込まず、50meV 低い場所に位置することを示唆する。またこのような高い濃度の不純物量は酸素欠損や原料由来の不純物(例えば Sb)などからでは達成不可能だと考えられるが、実際、Nb を置換しない SnO₂ 薄膜のそれは、キャリア濃度の温度依存性から見積もると高々 $1.0 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ 程度である。それ故、 n_2 は Nb 由来であると結論付ける事が出来る。その活性化エネルギーは Nb 濃度に依存せず常に室温のそれより大きい 50meV 程であり、その結果室温では殆ど活性化されない。以上の事が NTO/glass が NTO/TiO₂ や NTO/ALO よりキャリア濃度が低い事の起源となっている。

今の所、なぜこのような劇的な変化が基板歪によって引

き起こされるのかは明らかではない。一つの可能性としては、引張歪が掛ると、キャリア生成に有利な格子位置に Nb が入る等、考えられ、更なる研究が必要である。

3. まとめと今後の展望

以上、NTO 薄膜のキャリア生成に与える歪の影響を調べた。引張歪を誘起する基板上に成長させた NTO 薄膜では最高で $3.0 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ もの高いキャリア濃度が生成される。その一方で、歪の無いガラス基板上 NTO 薄膜は、 $5 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ 程度にキャリア濃度が抑制されるが、これは Nb のドナー準位が 50meV と深い為である。以上の結果から基板由来の歪をキャリア生成のコントロールに用いるという、これまでの透明導電膜の研究には無かった手法の有用性が示された。

今後の展望としては、歪に由来するキャリアの生成の機構は依然として不明であり、第一原理計算等との比較からその解明が望まれる。その際、成長中に歪が掛かっている事が原因で、例えばドーパントの格子位置が変わっているのか、格子位置はそのまま、歪によってバンド構造の変化が起きているのかが明らかになると思われる。また以上の事を実験的に検証することも重要であろう。具体的には電気抵抗率の圧力依存性の測定が有望であるが、薄膜試料に対しては実験的な困難がある。この対策として単結晶育成などが考えられる。

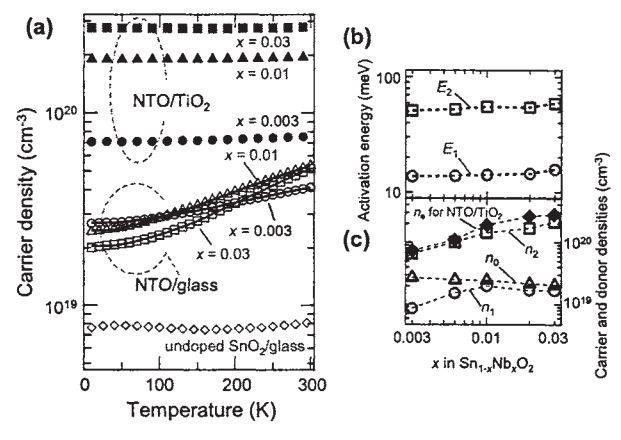


図 4. NTO 薄膜の輸送特性の温度依存性

【参考文献】

1. V. M. Zainullina: Physica B **391** (2007) 280.
2. N. Kikuchi, E. Kusano, E. Kishio, and A. Kinbara: Vacuum **66** (2002) 365.
3. S. Nakao, N. Yamada, T. Hitosugi, Y. Hirose, T. Shimada, and T. Hasegawa: Thin Solid Films **518** (2010) 3093.

ペロブスカイト酸窒化物 SrTaO₂N のエピタキシャル歪と誘電特性

廣瀬 靖、岡 大地

1. はじめに

遷移金属酸窒化物は、その名の通り、窒素と酸素の2種類の陰イオンが金属と結合してできる化合物である。酸窒化物では、酸素よりも電気陰性度の小さな窒素 2p 軌道が価電子帯の上端を形成しており、酸化物と比較して狭いバンドギャップを持つ。このため、可視光応答性の光触媒材料[1]や、鉛などの有害元素を含まない顔料[2]として研究されてきた。

一方、ごく最近、ペロブスカイト型酸窒化物(一般式 ABO_{3-y}N_y)を中心に、その電気・磁気機能が注目を集めている。中でも、B サイトに d⁰ 電子配置の遷移金属イオンを含む BaTaO₂N および SrTaO₂N は高い誘電率と小さな温度係数を持つ常誘電体であることが報告されており[3]、新規誘電体材料として興味深い。しかしながら、ペロブスカイト型酸窒化物は一般に焼結温度以下で分解するため、正確な誘電物性の評価に必要な高密度焼結体や単結晶を得ることが難しかった。我々は、この問題の解決策として格子整合した単結晶基板上でのエピタキシャル成長に取り組んできた。

昨年度までの成果として、窒素ソースとして、窒素ラジカルを使ったプラズマ支援パルスレーザー堆積(PLD)法により、高品質なペロブスカイト型酸窒化物薄膜の成長が可能であることを見出した。さらに、得られた SrTaO₂N 薄膜が、バルク試料に関する従来の報告とは異なり、強誘電性を示すことを明らかにした[4]。そこで、本年度は、SrTaO₂N エピタキシャル薄膜の誘電特性について格子歪みとの関係に注目して研究を行った。

2. 実験

2.1 試料作製

SrTaO₂N 薄膜は、窒素プラズマ支援 PLD 法を用いて作製した。ターゲットには Sr₂Ta₂O₇ 焼結体を用い、基板には導電性の Nb ドープ SrTiO₃(100)面を用いた。Kr:F エキシマレーザーのエネルギーと繰り返し周波数、およびラジカルソースの出力を制御することで試料中の窒素含有量を制御した。基板からのエピタキシャル歪の効果を検討するために、40-300 nm の範囲で膜厚の異なる試料を作製した。

2.2 構造・組成評価

作製した試料は X 線回折(XRD)測定により、ペロブスカイト型 SrTaO_xN_y の(001)エピタキシャル成長を確認した。また、筑波大学研究基盤総合センター応用加速器部門(Uttac)において、¹⁵N(p, α)¹²C 共鳴核反応分析(NRA)測定を行い、薄膜中の窒素量を定量した。窒素定量の際の標準試料には、TiN 薄膜を用いた。

2.2 誘電特性評価

誘電特性の評価は、NRA 測定でほぼ化学量論組成の窒素を含むことを確認した試料について行った。強誘電性に関しては、走査プローブ顕微鏡とロックインアンプを組み合わせた共鳴圧電応答顕微鏡(PFM)システムを用いて評価した。さらに、スパッタリング法で試料表面に Pt 電極を形成し、得られた Pt/SrTaO₂N/Nb:SrTiO₃ キャパシタ構造の電気容量を LCR メーターで測定して誘電率を評価した。

3. 結果

Fig. 1 に SrTaO₂N 薄膜の膜厚と格子定数の関係を示す。いずれの試料も、面直方向の格子定数 *c* が面内方向の格子定数 *a* よりも大きい正方晶歪みを有した。これは、SrTiO₃ 基板(*a* = 3.905 Å, ミスマッチ-3.28%)からのエピタキシャル歪みによるものである。ただし、面内方向の格子定数は、SrTiO₃ 基板とは完全には一致しておらず、部分的に緩和していることも明らかになった。正方晶歪みの緩和は、膜厚の増大とともに進行し、膜厚が 150 nm 付近で *c/a* ~ 1.015 に収束した。このような部分的な正方晶歪みは、断面透過電子顕微鏡観察の電子線回折像からも確認された(Fig. 2)。

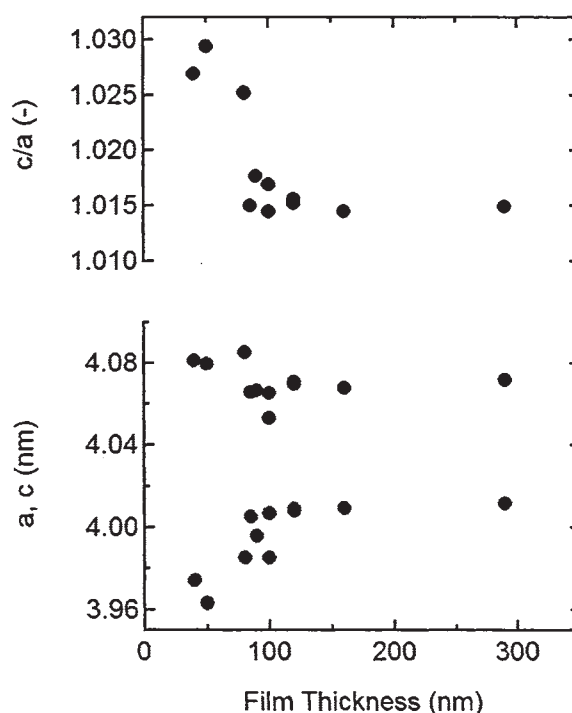


Fig. 1 SrTaO₂N 薄膜の格子定数と膜厚の関係

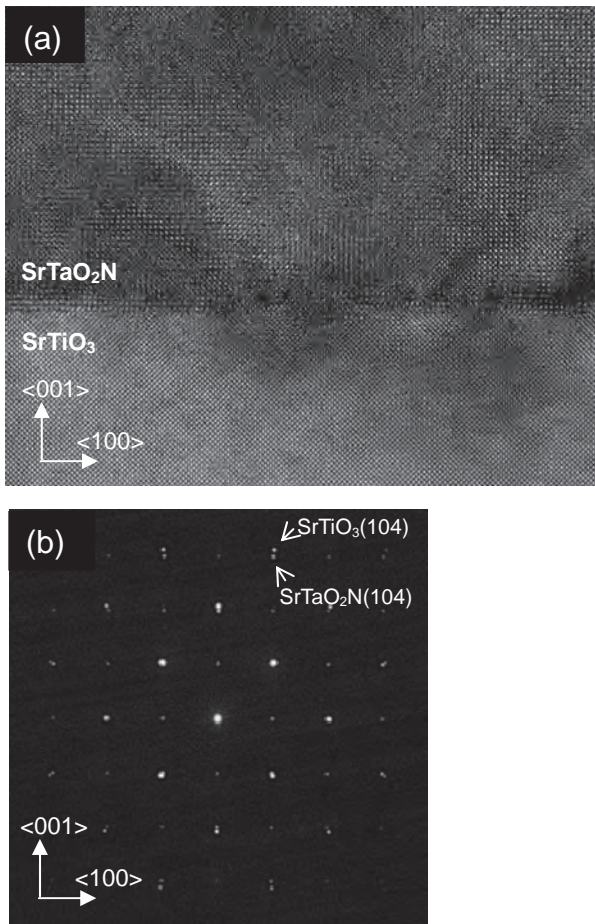


Fig. 2 SrTaO₂N 薄膜の断面 TEM 像(a)と電子線回折像(b)

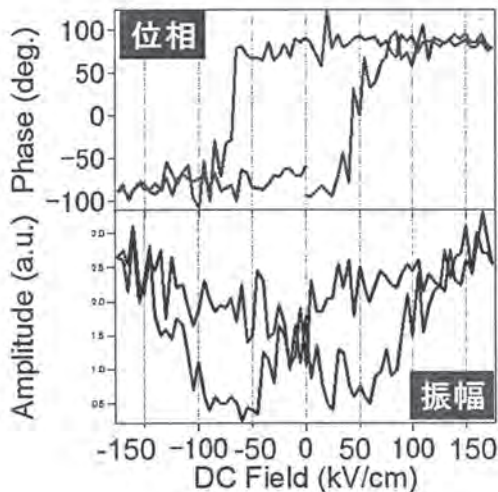


Fig. 3 SrTaO₂N 薄膜の圧電応答のヒステリシスループ

また、これらの薄膜について、共鳴 PFM 測定を行ったところ、いずれの試料においても、明瞭な分域像を書き込むことができた。また、圧電応答のヒステリシスループを得ることも成功した(Fig. 3)。従って、作成した SrTaO₂N 薄膜はいずれも強誘電性を示すことが確認された。

次に、SrTaO₂N の比誘電率 ϵ と膜厚の関係を Fig. 4 に示す。膜厚が 50nm 程度では、 ϵ は約 200 で、バルク体のほぼ 1/10

の値しか示さない。しかし、 ϵ は膜厚の増加に伴って急激な増大を示し、膜厚が 300 nm ではバルク体と同程度の大きな値 (>2000) に達した。

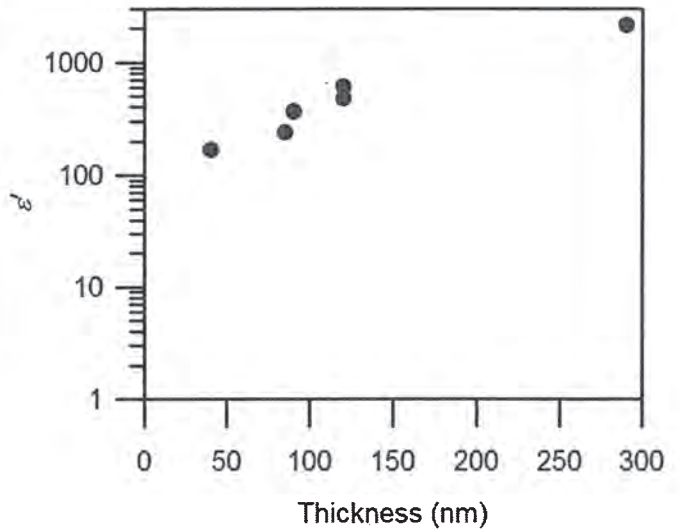


Fig. 4 SrTaO₂N 薄膜の比誘電率 ϵ と膜厚の関係

4. 考察

上記の実験結果より、膜厚の増加に伴って、エピタキシャル歪が緩和し、比誘電率の値がバルク体に近づくことがわかった。これは、SrTaO₂N の誘電物性とエピタキシャル歪の間に何らかの相関があることを示唆している。このような相関の微視的な起源について、現時点では完全な理解に至っていないが、一つの候補として、結晶格子中の窒素と酸素の配列と格子歪の関係を検討している。

SrTaO₂N の結晶は TaO₂N 八面体が 3 次元的に連なったネットワークから構成される。各 TaO₂N 八面体には窒素が隣り合った頂点を占める *cis* 型と向かい合った頂点を占める *trans* 型の 2 通りがあるが(Fig. 5)、安定な結晶構造は両者で異なる。Page らによる第一原理計算によると、バルク体で安定な *cis* 型では $cla < 1$ となるのに対して、強誘電性を示す可能性がある *trans* 型では $cla > 1$ となる[5]。ここから、SrTiO₃ 基板上に作成した SrTaO₂N 薄膜では、基板からの面内圧縮歪みによって $cla > 1$ となるため、*trans* 体が安定化されるのではないかと考えた。

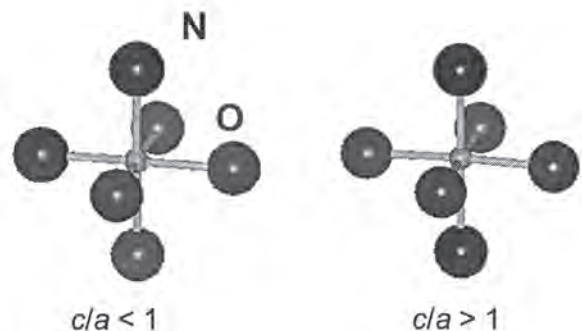


Fig. 5 (左)*cis* 型 (右)*trans* 型 TaO₂N 八面体

5. まとめと展望

SrTaO₂N のエピタキシャル薄膜を SrTiO₃ 基板上に作製し、格子定数と比誘電率の関係を評価した。その結果、基板からの面内圧縮歪が膜厚の増加に伴って緩和し、それとともに比誘電率の値も増大することが分かった。

このような誘電特性の特異な振舞の起源として、基板からのエピタキシャル歪によって、結晶構造、特に結晶中での酸素と窒素の配列が変化する可能性が挙げられる。この可能性を検証するための手段としては、①エピタキシャル歪を考慮した第一原理計算による安定構造の決定や、②走査型透過電子顕

微鏡や中性子線回折測定を用いたアニオン配列の直接観察などを検討している。

【参考文献】

- [1] A. Kasahara *et al.*, J. Phys. Chem. A 106 (2002) 6750.
- [2] M. Jansen *et al.*, Nature 404 (2000) 980.
- [3] Y.-I. Kim *et al.*, Chem. Mater. 19 (2007) 618
- [4] 岡他、2010 年秋季応用物理学会
- [5] Page *et al.*, Chem. Mater. 19 (2007) 4037.

業 績

【原著論文】

1. B. R. Myoung, C. M. Kim, S. J. Kim, T. Kouh, Y. Hirose, T. Hasegawa, and C. S. Kim
Investigation of Electrical and Magnetic Properties of Triangular Antiferromagnets
J. Appl. Phys., 109, 07E133 (2011).
2. H. Nogawa, A. Chikamatsu, Y. Hirose, S. Nakao, H. Kumigashira, M. Oshima, and T. Hasegawa
Carrier Compensation Mechanism in Heavily Nb-doped Anatase $Ti_{1-x}Nb_xO_{2+\delta}$ Epitaxial Thin Films
J. Phys. D: Appl. Phys., 44, 365404 (2011).
3. N. L. H. Hoang, Y. Hirose, S. Nakao, and T. Hasegawa
Crystallization Kinetics of Amorphous Sputtered Nb-Doped TiO₂ Thin Films
Appl. Phys. Express, 4, 105601 (2011).
4. A. Chikamatsua, T. Matsuyama, Y. Hirose, H. Kumigashira, M. Oshima and T. Hasegawa
Investigation of electronic states of infinite-layer SrFeO₂ epitaxial thin films by x-ray photoemission and absorption spectroscopies
J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom., 184, 547 (2012).
5. S. Mohri, S. Nakao, N. Yamada, T. Shimada, and T. Hasegawa
Transparent Conductivity of Fluorine-doped Anatase TiO₂ Epitaxial Thin Films
J. Appl. Phys., in press
4. 大瀧未帆、近松彰、重松圭、中尾祥一郎、廣瀬靖、福村知昭、長谷川哲也
LSAT 基板上に堆積させた SrLaVMoO₆ 薄膜の輸送・磁気特性
第 72 回応用物理学会学術講演会、山形大学、2011 年 8 月 29 日 - 9 月 2 日
5. 島本憲太、廣瀬靖、畑林邦忠、中尾祥一郎、福村知昭、長谷川哲也
量子常誘電体 EuTiO₃ 薄膜に対する電場効果
第 72 回応用物理学会学術講演会、山形大学、2011 年 8 月 29 日 - 9 月 2 日
6. 片山司、近松彰、廣瀬靖、福村知昭、長谷川哲也
Sr_{1-x}Sm_xFeO₂ 薄膜の構造と輸送特性
第 72 回応用物理学会学術講演会、山形大学、2011 年 8 月 29 日 - 9 月 2 日
7. 岡大地、廣瀬靖、伊藤誠二、森田明、松崎浩之、福谷克之、石井聡、笹公和、関場大一郎、長谷川哲也
新奇強誘電体ペロブスカイト型 SrTaO_{3-y}N_y 薄膜の誘電特性評価 II
第 72 回応用物理学会学術講演会、山形大学、2011 年 8 月 29 日 - 9 月 2 日
8. 重松圭、近松彰、廣瀬靖、福村知昭、和田恭雄、長谷川哲也
NdGaO₃ 基板上的 La_{0.7}Sr_{0.3}MnO₃ 薄膜に対する Ru 置換効果
第 72 回応用物理学会学術講演会、山形大学、2011 年 8 月 29 日 - 9 月 2 日
9. 中尾祥一郎、山田直臣、廣瀬靖、長谷川哲也
ルチル(Ti,Nb)O₂ 固溶体シート層を用いた高移動度 W:SnO₂ 透明導電膜(2)
第 72 回応用物理学会学術講演会、山形大学、2011 年 8 月 29 日 - 9 月 2 日
10. 楊長、廣瀬靖、中尾祥一郎、長谷川哲也
Enhanced Solid-phase Crystallization of Amorphous TiO₂ by Oxide-metal Interactions
2012 年春季第 59 回応用物理関係連合講演会、東京、2012 年 3 月 16 日
11. 島本憲太、廣瀬靖、中尾祥一郎、福村知昭、長谷川哲

【口頭発表】

1. T. Hasegawa
Fundamental Properties and Applications of TiO₂-based Transparent Conducting Thin Films
2011 MRS Spring Meeting, San Francisco, U.S.A, April 25-29 (2011).
2. Y. Hirose, S. Nakao, N. L. Huong, K. Taira, N. Yamada and T. Hasegawa
Recent progress on TiO₂-based transparent conducting thin films
E-MRS 2011 Fall Meeting, Warsaw, Poland, Sept. 19-23 (2011).
3. 岡崎壮平、大久保純平、中尾祥一郎、廣瀬靖、福村知昭、一杉太郎、長谷川哲也
窒素アニールによる Nb ドープ TiO₂ 透明導電膜の作製

也

EuTiO₃(111)薄膜の合成とその磁気特性

2012年春季第59回応用物理関係連合講演会、東京、2012年3月16日

12. 近松彰、片山司、廣瀬靖、組頭広志、尾嶋正治、福村知昭、長谷川哲也
放射光電子分光による無限層構造 Sr_{1-x}Sm_xFeO₂ 薄膜の電子状態
2012年春季第59回応用物理関係連合講演会、東京、2012年3月16日
13. 渡部愛理、池宮桂、近松彰、廣瀬靖、長谷川哲也
(Ag,Co)共添加 TiO₂ 薄膜における局在プラズモン共鳴
2012年春季第59回応用物理関係連合講演会、東京、2012年3月18日

【ポスター発表】

1. K. Shigematsu, A. Chikamatsu, Y. Hirose, T. Fukumura and T. Hasegawa
Enhanced Coercivity of Half-metallic La_{0.7}Sr_{0.3}MnO₃ Enhanced by Both Ru Doping and Anisotropic Epitaxial Strain
56th Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials, Scottsdale, U.S.A, Nov. 1 (2011).
2. T. Ukita, Y. Hirose, S. Ohno, K. Hatabayashi, T. Fukumura and T. Hasegawa
Magnetic and dielectric properties of layered perovskite Gd₂Ti₂O₇ thin film epitaxially stabilized on a perovskite single crystal
56th Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials, Scottsdale, U.S.A, Nov. 2 (2011).
3. S. Nakao, Y. Hirose and T. Hasegawa
SnO-mediated (100) oriented growth of SnO₂ thin films on polycrystalline anatase TiO₂ seed layer
International Symposium Surface Science, Tokyo, Dec. 12 (2011).
4. A. Chikamatsu, T. Matsuyama, Y. Hirose, H. Kumigashira, M. Oshima and T. Hasegawa
Investigation of electronic states of infinite-layer SrFeO₂ epitaxial thin films by x-ray photoemission and absorption spectroscopies
International Symposium Surface Science, Tokyo, Dec. 12 (2011).
5. K. Shigematsu, A. Chikamatsu, Y. Hirose, T. Fukumura and T. Hasegawa
Effect of Ru-doping on the Magnetic Properties of La_{0.7}Sr_{0.3}MnO₃ on NdGaO₃(110)
International Symposium Surface Science, Tokyo, Dec. 12 (2011).
6. K. Shimamoto, Y. Hirose, K. Hatabayashi, S. Nakao, T. Fukumura and T. Hasegawa
Effect of electric field on quantum paraelectricity in EuTiO₃ epitaxial thin film
International Symposium Surface Science, Tokyo, Dec. 12 (2011).
7. Y. Park, Y. Hirose and T. Hasegawa
Effect of Surface Morphology of Aluminum Thin Film on the Growth of Porous Alumina Structure
International Symposium Surface Science, Tokyo, Dec. 12 (2011).
8. C. Yang, Y. Park, Y. Hirose and T. Hasegawa
Enhanced Solid-phase Crystallization of Amorphous TiO₂ by Oxide-metal Interactions
International Symposium Surface Science, Tokyo, Dec. 12 (2011).
9. K. Taira, Y. Hirose, S. Nakao, N. Yamada, T. Kogure, T. Shibata, T. Sasaki and T. Hasegawa
Lateral Epitaxial Crystallization of Oxide Thin Films on Glass Substrates with Sparsely Located Inorganic Nanosheet Templates
International Symposium Surface Science, Tokyo, Dec. 12 (2011).
10. 相澤和樹、廣瀬靖、岡大地、中尾祥一郎、近松彰、福村知昭、長谷川哲也
YMnO₃ 強誘電体薄膜の光起電力効果
2012年春季第59回応用物理関係連合講演会、東京、2012年3月15日
11. 鈴木温、岡大地、廣瀬靖、伊藤誠二、森田明、松崎浩之、福谷克之、石井聡、笹公和、関場大一郎、福村知昭、長谷川哲也
アナターゼ型 TaON エピタキシャル薄膜の物理特性
2012年春季第59回応用物理関係連合講演会、東京、2012年3月15日

【特許】

- | | |
|-----------|----|
| (1)国内特許出願 | 0件 |
| (2)国外特許出願 | 0件 |

有機系太陽電池評價

有機系太陽電池評価プロジェクト

プロジェクトリーダー 高木 克彦

【基本構想】

本プロジェクトは、内閣府の最先端研究開発支援プログラム（FIRST プログラム）のひとつとして採択された「低炭素社会実現に資する有機系太陽電池の開発（中心研究者：東大先端研 瀬川浩司教授）」に参画するものである。これは産官学を結集したオールジャパン体制のコンソーシアムで行う4年間の研究開発テーマで、平成22、23年度はサブテマリーダー、藤嶋 昭 重点研究室長（東京理科大学学長）のもと「認証データ計測センター機能構築と要素技術の開発・評価」を、平成24、25年度はサブテマリーダー、富田孝司 東京大学先端科学技術研究センター教授のもと「計測法の開発と標準化活動の推進」を実施する。本プロジェクトは実施主体として高度計測センター及びイノベーションセンターの研究者による評価・開発のほか、コーディネート機能や技術普及講習会の開催など、オールKAST体制で取り組む。

有機系太陽電池は従来のシリコン太陽電池に比べ、カラー化・フレキシブル化・大面積化や高速印刷製造が可能といわれており、製造時のCO₂排出量が少なく原材料の資源的制約も少ないため低価格で大量生産し易い利点がある。反面、素材が有機物であるため、基本的に加熱や酸化雰囲気下での堅牢性に難点があり、変換効率と耐久性の改善が実用化の課題となっている。

高度計測センターにおいては、有機系太陽電池の標準化に取り組むとともに、有機系太陽電池の特徴を活かした性能評価方法の開発に取り組む。KASTではすでにISO標準に適合した認証データや光触媒JIS規格に準じた測定値を大企業・中小企業に提供しており、このような実績の上で有機系太陽電池評価・計測センター機能を確認することは極めて有意義な事と思われる。

一方、有機系太陽電池の耐久性評価も重要な課題であり、FIRSTプログラムの各参画機関と連携を取りつつ、加速劣化試験の条件検討や劣化要因を探るための解析等にも併せて取り組んでいくこととしている。

1. 平成23年度の研究目的

本プロジェクトでは、FIRSTプログラム参加機関等からの有機系太陽電池の評価業務を新規に確立する。太陽電池の種類は非常に多様で、屋内・屋外等、利用環境や用途も多岐にわたるが、特に特性評価の基準も未確定な有機系太陽電池に注目し、その性能や寿命の評価法を確定する。

同時に、利害関係のない中立な第三者的立場から、今後市場を形成してゆく製品の性能評価や、国際的な評価基準の策定などに取り組む。これは、現在こうした業務を行っている（独）産業技術総合研究所を補完するものであり、相互の協力により、有機系太陽電池の研究開発の大幅な加速が期待できる。

また、有機系太陽電池の耐久性向上のための新素材開発や、太陽電池セル・モジュールの構成素材評価等も併せて実施する。

プロジェクト2年目となる23年度は、以下の各項目を重点項目として実施した。

(1) 有機系太陽電池性能評価方法の検討および素材等の基本特性評価の実施

太陽電池素材ならびにセル・モジュールの評価と性能向上を目的として、平成22年度に引き続き、疑似太陽光源等を使用した太陽電池の性能評価と、各種装置を用いた素材やセル・モジュールの基本特性評価を実施する。

(2) 有機系太陽電池の要素技術の開発・評価

有機系太陽電池を構成する要素技術の開発については、有機薄膜太陽電池については抵抗加熱式真空蒸着装置を導入し、色素増感太陽電池については酸化チタンナノチューブを電荷輸送層として用いた太陽電池セルの試作を行い、その実用性を評価する。

また、ナノ構造構築や解析に関する専門家との協体制として、有機系太陽電池作製の経験と実績を有する東京理科大学に再委託して色素増感太陽電池の部品の作製を行い、作製手法・作製環境などに依存しない評価法の検討を平成22年度に引き続き行う。

要素技術の開発・評価については、平成22年度に作製した「高分解能ライフタイム計測装置」および「有機系太陽電池対応型ライフタイム計測用光学システム」を拡張し、市販品を含む各種有機系太陽電池セルでキャリアライフタイム計測を検討することに注力する。同時に、過渡電流法と μ -PCD法によるキャリアライフタイムのクロスキャリアレーションによるシグナルの定性・定量性の信頼を吟味する。

(3) その他

有機系太陽電池の技術普及のため、年1回程度の講習会を開催するとともに、地域の中小企業等とともに新たな用途開拓のための試作品開発を行う。

2. 平成 23 年度の研究成果

以下に挙げるのは 23 年度の研究成果の概要であり、(3) 以外の詳細については各研究員の報告書を参照されたい。

(1) 有機系太陽電池性能評価方法の検討および素材等の基本特性評価の実施

平成 22 年に導入した大面積モジュール評価装置（ソーラーシミュレーター：SS）および分光感度測定装置（IPCE）を使用して測定標準化に向けた検討を引き続き行った。また、これら測定精度の向上と不確かさの程度の減少により、太陽電池性能評価の信頼性向上に取り組んだ。この目的のため、平成 23 年度には、可視光領域を限度とする非常に高いスペクトル合致度を持つ LED シミュレータや、高精度分光放射照度測定装置・照度分布測定装置などの校正装置類、a-Si 型・DSC 型など複数の基準電池、冷却試料台などの温調機器等を導入した。

また、FIRST 参加機関から DSC（2 社、4 種類）と OPV（2 社、2 種類）の提供を受けることができた。

これらを用いて、(財) 光産業技術振興協会 (OITDA) より提案されている「色素増感太陽電池の性能評価方法 (OITDA PV01-2009)」の各項目について測定を行い、その結果を整理し、測定上の課題を把握した。なお、この研究概要では Z907 色素と有機溶媒を用いた 2 種の DSC (A, B)、同じ色素にイオン液体を用いた 2 種の DSC (C, D) のデータを掲載している。

また、FIRST 全体会議で指摘された角度依存性及び光量依存性の検証に着手した。光量依存性に関しては、複数のフィルタを組み合わせることで、スペクトルの強度分布は保持したまま、現在 1/100 程度までの減光が実現している。角度依存性に関しては、高精度な制御系を有した傾斜ステージを特注品として購入した。各種室内光源の特性も検討した。

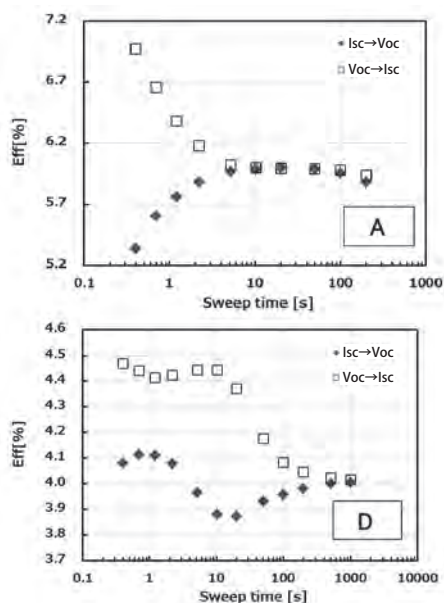


図 1 : DSC を用いた I-V 測定の例
(上) 有機溶媒セル : 10 秒程度で適切な測定が可能
(下) イオン液体セル : 1000 秒程度の時間が必要

DSC の I-V 測定では、DSC に使用する要素材料により掃引時間等の設定幅を変更する必要があることを確認した (図 1)。その他、セル性能の温度依存性・照射強度依存性等も検証し、信頼性の高い測定値の取得に努めた (図 2)。

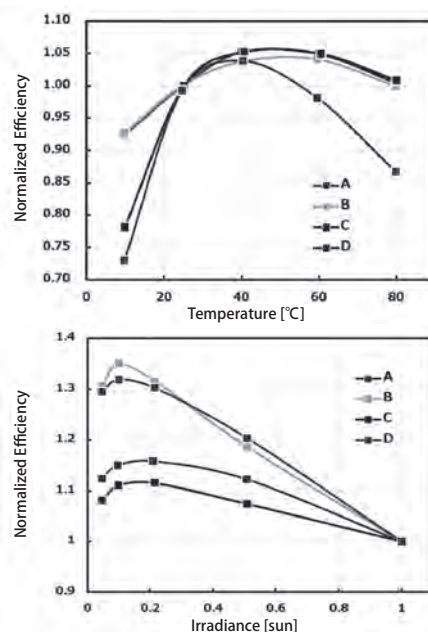


図 2 : DSC を用いた I-V 測定の (上) 温度依存性 (25°C で規格化) 及び (下) 光量依存性 (1sun で規格化)

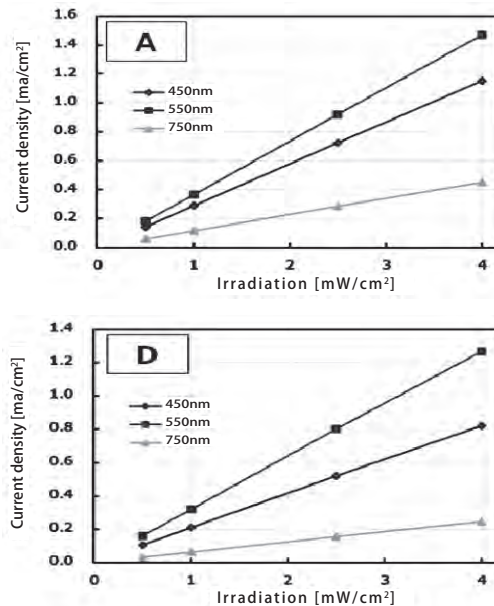
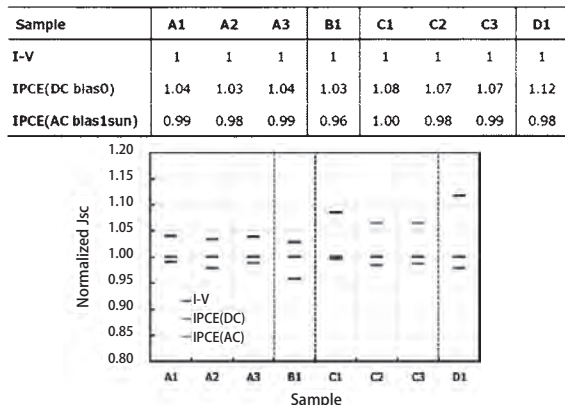


図 3 : DSC を用いた IPCE 測定 (DC 法) における単色光光量依存性 (波長によらず線形を示す)

一方、IPCE に関しては、太陽電池として実際に使用する環境を考慮した「白色バイアス光重畳条件下」での評価法に関して検討した。今回測定したサンプルについては、単色光のみによる直流 (DC) 法の測定では、 $0.5\text{mW/cm}^2 \sim 4\text{mW/cm}^2$ の範囲において、ほぼ直線的な光量依存性を示した (図 3)。IPCE より計算した J_{sc} 値は、

ソーラシミュレータによる I-V 測定の短絡電流値に比べ 1sun の白色バイアス光を重畳した交流 (AC) 法では低め、DC 法では高めに算出される傾向があった (図 4)。

なお、2011 年末に国際電気標準会議 (IEC) TC113 (ナノエレクトロニクス) において規格化を提案されている OPV の信頼性評価方法に対応するため、OPV の耐久性・劣化解析に関しても評価を進めることとし、具体的な試験内容等を確認・検討しているところである。



※ソーラシミュレータ光量調整：a-Si, c-Si用基準セル どちらでも 1 sun(100 mW/cm²)になるように調整

図 4：DSC における I-V 測定の Jsc 値と IPCE 測定 (DC 法、AC 法) から算出される Jsc 値との比較

(2) 有機系太陽電池の要素技術の開発・評価

i) 東京理科大学との連携による各種色素増感太陽電池 (DSC) の作製

東京理科大学から提供された新規ナノ構造の酸化チタン材料や新規な (増感) 色素を用い、KAST において ①多孔性酸化チタン粒子を用いた DSC セルの試作、②近赤外光吸収をしめす金クラスター増感太陽電池を検討した。

①については、空隙を有する酸化チタン粒子を作製し、DSC の電子輸送層として利用することで、高いエネルギー変換効率を持つ DSC を開発した。多孔性酸化チタン粒子は、通常の粒子に比べて、比表面積や光拡散長が増加し、再結合中心の減少など、DSC の構成要素として優れた潜在力をもつ。また反射層としても利用でき、優れた反射率をしめすことが明らかになっている。実際にエレクトロスピンニング法と水熱法を組み合わせることで、空隙を有する酸化チタン粒子の作製を行い、太陽電池への応用を検討した (図 5)。表記の多孔性酸化チタン粒子を利用した DSC を作製しその I-V 測定の結果、4~5% 程度のエネルギー変換効率を得た。



図 5：多孔性酸化チタン粒子の SEM 像

また②については、現状、一般的に DSC に使用されている可視光励起の色素のみならず、太陽光の有効利用のためには赤外光を吸収する色素を開発、利用することが求められている。そこで本研究では、近赤外光を吸収する金クラスターに着目し、光吸収により金クラスター内の電子が励起し、酸化チタンへ電子注入することを発電原理とする DSC の構築を検討した。その結果、金クラスターを酸化チタン上に塗布することに成功し、また IPCE の測定では 1200nm まで光電変換を行うことに成功した。(図 6)

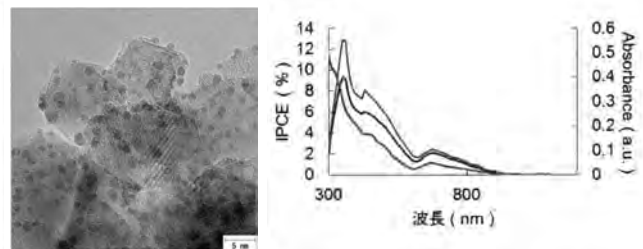


図 6：金クラスターを塗布した酸化チタンの TEM 像 (左)、IPCE の結果 (右)

なお、作製元や作製法の異なるサンプルが複数あることは、作製法などに依存しない評価法の検討を行うために不可欠であるため、東京理科大学でも DSC の組み立てを行った。KAST 及び東京理科大学で作製した DSC の性能を比較し、作製環境の違いによる影響を検討したが、現状ではあまり差異は見られなかった。今後も比較条件等を引き続き検討していく。

ii) 有機系太陽電池セルの空間的電気特性評価法の開発

マイクロ波光導電減衰法「Microwave Photo Conductivity Decay (μ -PCD 法)： μ -PCD 法とは、プローブ光としてマイクロ波を用い、光照射により発生したキャリア (電子、正孔、エキシトンなどの活性種) の濃度変化をマイクロ波の反射強度の時間変化として検出する手法であり、シリコン系太陽電池の性能評価に用いられているスクリーニング法である。この電気配線が不必要な非接触方式計測法は、太陽電池セルの電流値を測定する場合のように界面の影響がないことから、発電層である pn 界面での半導体特性を非破壊計測が出来る。それ故、その活性種の時間経過を捉えることも容易であるが、特有な吸収波長や励起子の種類をもつシリコン系太陽電池と違って、有機薄膜太陽電池 (OPV) は様々な励起光照射に対する耐久性や熱緩和特性を持つため、シリコン系太陽電池の計測方法・諸条件をそのまま適用することはできない。平成 23 年度までに、 μ -PCD 法を用いたシステムの最適化を検討し、OPV 性能評価が可能であることを確認し、応答信号の由来を検討した。

ここで用いた評価用セルは、スピンコートによる P3HT/PCBM (PCBM 含有率 0.4) 混合膜である。励起光には、Nd-YAG レーザー 2 倍高調波 (波長：532nm、パル

ス幅：5 ns、励起光照射強度：16~85 μJ 、スポット径：2mm) を使用し、プローブ光のマイクロ波は 10GHz 帯を用いた。図 7a は、P3HT/PCBM の混合膜を光励起させた際のマイクロ波の信号強度の時間変化の一例である。レーザー照射後、マイクロ波反射強度が増加し、40 μs 程度で完全緩和する応答を観測した。この応答は指数関数で回帰解析することが可能であり、励起光強度と周波数に応答強度が依存する (図 7b)。加えて、これらの時定数は PCBM 含有率の増加につれて減少する (図 7c)。故に、Photo-CELIV 法によるキャリア寿命の傾向と類似しており、得られる信号強度が励起光強度と PCBM 濃度に依存することから、キャリア由来の信号であると判断出来た。なお、色素増感太陽電池については、透明導電膜 (FTO) との信号と識別する課題が残っているが、応答時間帯が異なることから、本手法の DSC への適応も可能であろう。

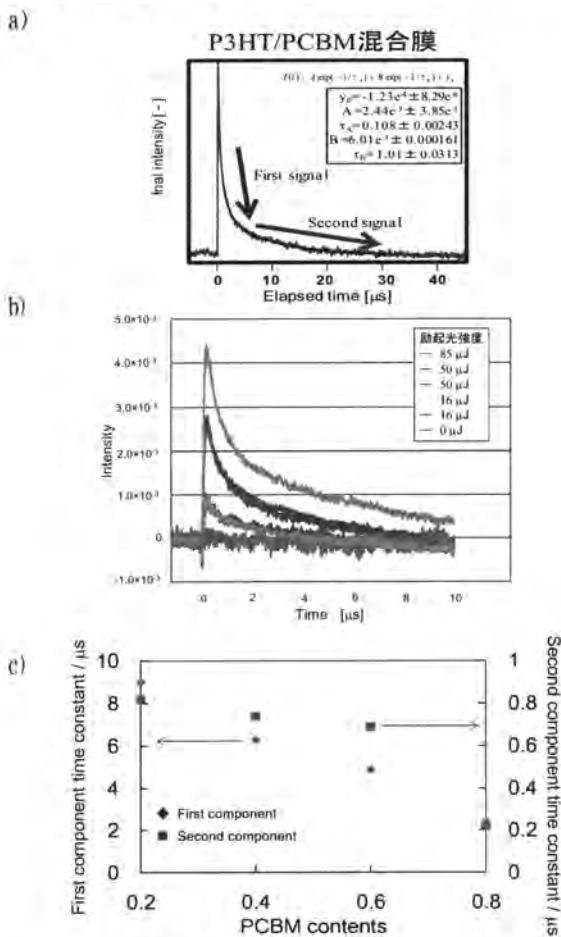


図 7：有機薄膜太陽電池とキャリアライフタイム

- P3HT/PCBM 混合膜の反射率変化の例
- P3HT 及び PCBM 混合層励起の際のマイクロ波時間緩和 (励起光強度の依存性)
- P3HT 及び PCBM 混合層励起の際のマイクロ波時間緩和 (P3HT/PCBM 濃度比と時定数の関係)

(3) その他

・教育講座開催 平成 24 年 3 月 8 日

「有機薄膜太陽電池 最新の動向」、受講申込者 107 名。有機薄膜太陽電池分野における研究者・技術者を対象に、(独)産業技術総合研究所 吉田郵司氏のコーディネートで、吉田氏ほか筑波大学 櫻井岳暁氏、大阪大学 佐伯昭紀氏、JX 日鉱日石エネルギー株式会社 朝野剛氏を講師とし、有機薄膜太陽電池の電気特性評価、構造評価、耐久性の現状について講演を行った。



図 8：教育講座の様子

・用途開拓試作開発

(バクセル・テクノロジーズ株式会社)

有機系太陽電池は使用する材料 (色素、ポリマー等) により分光感度が各々異なることから、適切な基準電池の作製・選定が困難である。そのため、「フィルタ交換できるユニット組立型ワーキングセル」として、分光感度の異なる 2 種類の Si フォトダイオードを受光部とし、フィルタ差替可能な機構を取り付けた。また、ブラックダイを用いた色素増感太陽電池の分光感度を模した 2 種類のフィルタを新たに開発し、これらを備えたワーキングセルとして組み立てられるよう試作した。

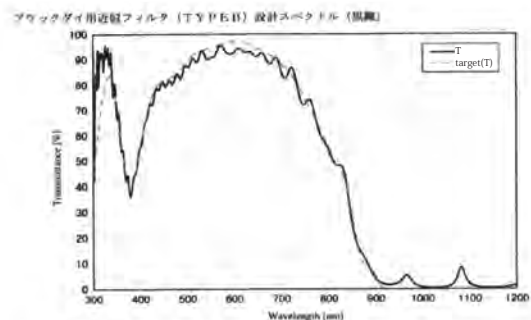


図 9：交換用フィルタの設計仕様書の一例

なお、平成 23 年度末より FIRST プログラムにおける「計測・標準化分科会」の運営を KAST で行うこととなり、有機系太陽電池の評価方法の国際規格化に向け、今後ますます活動の充実が求められている。また、新たに発足した有機系太陽電池技術研究組合 (RATO) とも十分な連携を図りつつ、測定・評価技術の確立とその標準化に取り組んでいくこととしている。

有機系太陽電池性能評価方法の 標準化に向けた検討

斎藤 英純, 青木 智子, 青木 大輔

1. はじめに

有機系太陽電池は、従来型シリコン太陽電池に比べ製造時のCO₂排出量が少なく、原材料の資源的制約も少ないというえカラー化・フレキシブル化・大面積化・高速印刷製造が可能であり、低価格化を実現できる可能性を有している。

しかし、有機系太陽電池の評価に関して個別には様々な手順・方法が検討されているが、多種類の太陽電池の性能を比較検討するための統一的な方法は未だ確定していない状況にある。それは、特にDSCにおいて顕著な傾向であるが、波長域に対する分光感度特性や応答速度など有機系太陽電池特有の問題があり、既存のJIS規格をそのまま適用することができないためである。

本研究では、有機系太陽電池分野における産業界での公平な競争やそれに伴う市場拡大に対応するために、信頼性の高いデータを得られるように検討された統一的な評価方法・基準の規格作りとそれらを用いた評価技術を構築し、中立な第三者機関としての「計測センター」機能を確立することを目的とする。

2. 太陽電池性能評価用機器の導入

平成22年度に引き続き、太陽電池の性能評価および耐久試験を行うための機器を導入した。

●高性能分光放射計

オプトリサーチ：採虹 OKL-HSSR-1500N

スペクトル合致度を高精度に評価するための装置であり、ソーラシミュレータほか各種光源の分光放射照度を測定し、JIS・IEC規格への合致度を判定するプログラムが付属している。

測定波長範囲が250-1500nm、波長分解能は全域で4nmと高性能な機器である。

また、ファイバを水冷することでノイズを可能な限り減少させられる。

FIRSTプログラムにおいて共通基盤となる「計測センター」業務を確立するに当たり、必要不可欠な装置であり、本装置によりトレーサビリティを確保した高精度な太陽電池評価が可能となる。

●LED式可視光ソーラーシミュレーター

セルシステム：Iris-1

現在、太陽電池のI-V評価用に使用している山下電装社のソーラシミュレーターYSS-T150Aは、キセノンランプに加えてハロゲンランプを使用することにより、通常のキセノン型ソーラシミュレーターに見られる800nm以上の輝線を避けたハイスpek的な光源装置である。

しかし、キセノンランプの光量・スペクトルを自由に變えることが困難であることや、ランプ寿命が短いこと（平均1000時間）から、例えば有機系太陽電池の特色を生かす低光量下での性能評価、実際の使用環境を想定したスペクトル（西日の赤みを帯びたスペクトル、曇天時のスペクトル、春先の霞んだ天候のスペクトルなど）での性能評価、耐久性試験を兼ねた長時間の光照射試験等に用いることができないという欠点があった。

本装置は、400~900nmの領域においてスペクトルそのものが基準太陽光に非常に近い値を示し、ランプ寿命が長く（保証寿命8000時間）、消費電力が低いという特徴を有する。

また、LEDおよび制御系の設定を変更することで低光量、スペクトル変化など有機系太陽電池の特色を生かす光源としても活用できる。

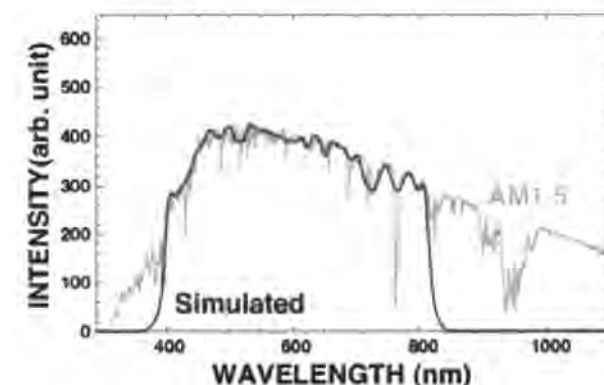


図1 LED式可視光ソーラーシミュレーターのスペクトル

●耐久性評価用紫外線照射試験装置

東洋精機製作所製：Atlas

本装置は、紫外線蛍光ランプを用いた加速寿命試験を行うための装置である。プラスチック、塗料等の分野ではこのような紫外線蛍光ランプ型の加速寿命装置が多く使われており、これらに対するJIS、ISO、ASTM規格も多く存在する。

既存の規格を有機太陽電池に対応させ、耐久性の定量的な評価手法を確立できるよう検討を行っていく予定である。

●ソーラシミュレーター用ペルチェ式温度調節試料台

●IPCE用傾斜機構付きペルチェ式温度調節試料台
ともにセルシステム

色素増感太陽電池の I-V 評価において問題となっているのは、その応答速度の遅さから定常光ソーラシミュレータを用いてある程度時間を掛けた測定を行わなければならない点である。

しかし、時間を掛けて測定を行うと 1sun の照射光において 8℃ 程度の温度上昇を伴う。

また、試料の大きさにより恒温槽の設定だけでは試料温度のコントロールができない場合もある。

現状では光照射後の温度上昇を見越して恒温槽の温度を 10℃ 程度低めに設定しておき、ソーラシミュレータのシャッターを開いてから 25℃ 付近で温度が安定するのを待つという方法を用いているが、この方法でも実際に温度が安定するまでには 30 分近くを要し、太陽電池セルの状態によってはこの間の性能劣化についても無視できなくなる場合がある。

恒温槽による雰囲気制御に加えて、ヘルテック試料台を併用することで、より厳密な温度管理を行い、より信頼性の高い測定を実現できる条件を確立する。

● 傾斜試料台
シグマ光機

DSC は Si 系太陽電池に比べて照射角度依存性が低いといわれている。

実際の使用環境においても直達光のみという状況は少なく、照射光角度と発電性能の関係を明らかにすることは重要な課題である。

この試料台はソーラシミュレーター付属の恒温槽内に設置できるもので、傾斜機構に加えて Z 軸調整機構を備え、試料の厚みが変わっても試料表面が回転中心に一致するように組み合わせてある。

これまでに数回実験を行ったが、セルを固定する端子の位置が変わるだけで出力が変動（端子からの反射光の影響と考えられる）し、水平状態での測定よりもかなりデリケートであることが判明した。

現在、影響をおよぼす要因をピックアップし、再現性の高い測定を行えるよう検討中である。

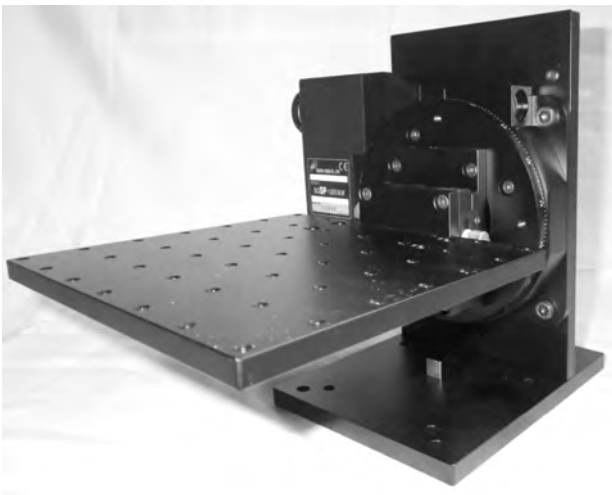


図2 傾斜試料台

3. 実験と結果

3.1 分光感度測定

分光感度測定はセルの特性を把握するための重要な評価であるが、DSC においては反応速度が遅いことにより測定条件による変動が大きい。

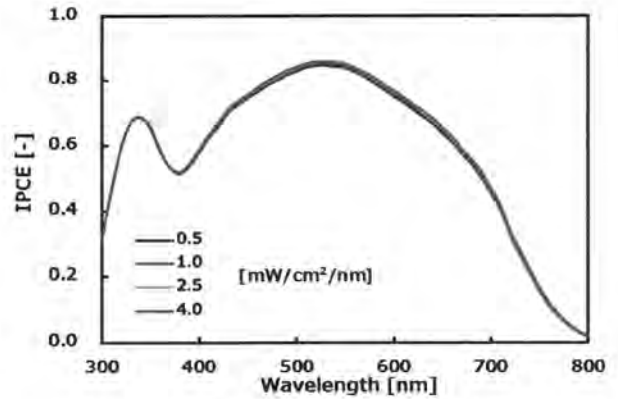
そのため、DC 法・AC 法両方の測定を行い、各手法における違いに関して検討を続けてきた。

その結果、作製時に酸素や水分の混入を極力防ぎ、適切な封止を行った場合、つまり理想的な仕上がりのセルであれば、あまり大きな影響がないことが判明した。

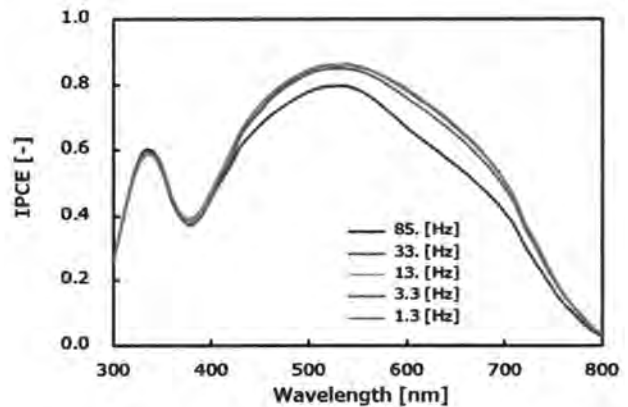
図 3 (a) に DC 法における単色光光量依存性を示す。

基本的には単色光の光強度が強いほど IPCE が大きくなる光強度依存性が見られるが、セルが安定していればその差は非常に小さくなることが明らかとなった。

また、図 3 (b) には 1sun の白色光を重畳した場合のチョッピング周波数依存性を示す。こちらは周波数が高いほど IPCE の値が低下するが、13Hz~3.3Hz の間では非常に良く一致している。



(a) DC 法での光量依存性



(b) AC 法での周波数依存性

図3 分光感度測定結果

3.2 I-V 測定

現在検討している I-V 測定のパラメータは、①電圧掃引方向・速度、②温度、③予備光照射（安定化）の 3 項目である。

本来であれば、これに遮蔽マスクの適切な大きさ等についての検討が加わるが、遮蔽マスクを使用することにより

発生する誤差を排除したいので現時点ではマスク無しでの測定で統一している。この点は今後の課題である。

現時点における I-V 測定手順を図 4 に示す。

OITDA の推奨条件に沿って、順方向 (Jsc から Voc) および逆方向 (Voc から Jsc) の掃引で同等の特性が得られるように充分長いサンプリング遅延時間を設定している。

一般的な DSC の場合は 20 秒程度の掃引で測定が完了するが、高耐久を目指したセルの場合には図 5 に示すようにかなり長い掃引時間が必要になることが明らかになった。

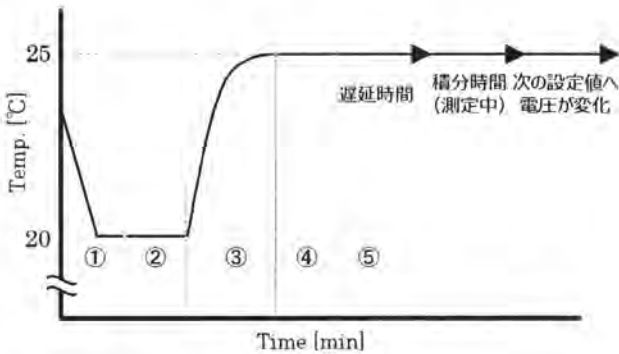
また、このセルは測定開始から時間とともに性能が向上する傾向がある (図 6) ため、安定化時間が必要である。

この安定化時間の要因に関しては、照射による効果なのか、照射に伴う温度上昇の効果なのか等を調査中である。

今後、使用する材料によって更に複雑な挙動を示すセルが出現する可能性がある。発展途上である DSC に対して高精度の測定を行うためには様々な種類のセルを測定し、知見を蓄えることが重要である。そのためにも FIRST プログラム参画機関とのさらなる連携強化が必要である。

3.3 有機系太陽電池の挙動解析

DSC セルの応答速度が遅いことに関しては昨年度の報告にも述べているが、その挙動を詳細に調査するために無抵抗電流計とデジタルオシロスコープを組み合わせて測定を行った。図 7 は電圧が変化した際の電流値だが、この他にも IPCE 測定時における単色光の波長による応答の違いなど個々のセル特有の問題に関して検討を行っている。



①恒温槽温度の設定

測定時に恒温槽内の温度が 25°C になるように設定。
小さい単セルは 20°C、10cm 角のモジュールの場合は 10°C に設定し、5~10 分程度で完了。

②測定セルのセット

セル裏面にセットした熱電対の温度が恒温槽の温度とほぼ一致するまでの時間、これも 5~10 分程度で完了。

③光照射

光の照射により、セル温度が 25°C になるまでの時間。
小さい単セルであれば 2~5 分程度。

④予備照射 (安定化時間)

セルによっては設定する必要あり。

⑤I-V 測定開始

標準的な DSC であれば一回 20 秒程度で完了する。

図 4 KAST における I-V 測定手順

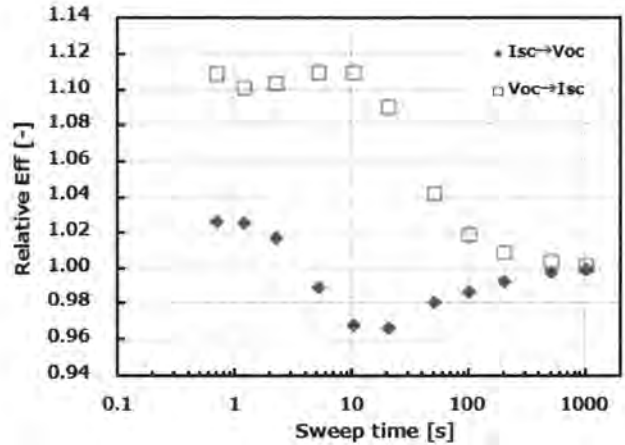


図 5 掃引時間が 1000 秒のセルでの測定結果

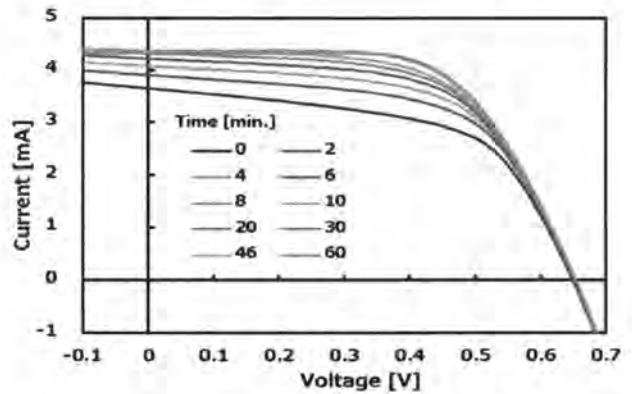


図 6 予備照射 (安定化時間) が必要な例

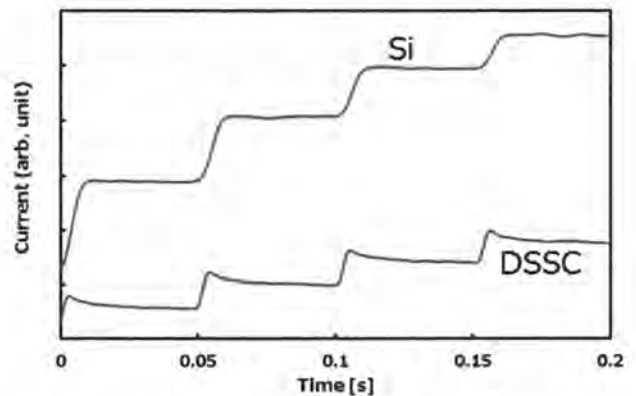


図 7 DSC 単セルのステップ電圧応答性 (Si 太陽電池との比較)

4. 今後の課題

4.1 交流インピーダンス測定

現在、神奈川県産業技術センターとの協力で交流インピーダンス測定を進めている最中である。

インピーダンス測定は個々のセルの特性を把握するうえでも非常に有効な手段であり、過去に多くの報告もなされている。

これまでは光照射下での測定 (I-V 測定, IPCE 測定) を中心に行ってきたが、光照射はセルにダメージを与える可

性能もあるうえに温度上昇も伴う。暗状態でのインピーダンス測定を組み合わせることにより、多角的且つロスの少ない測定を確立できるものと考えている。

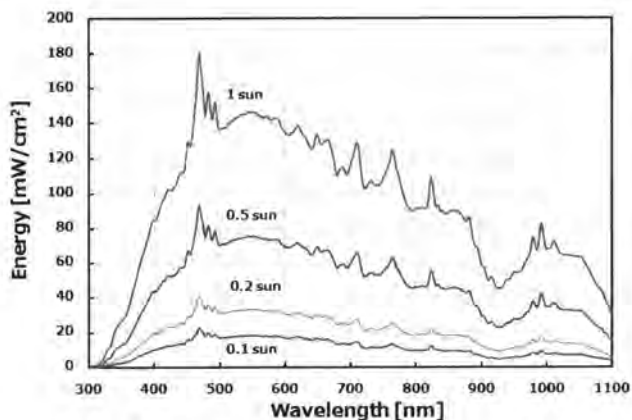
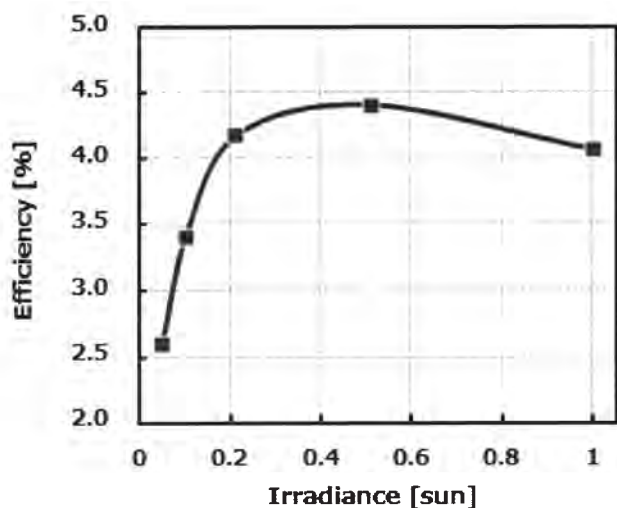
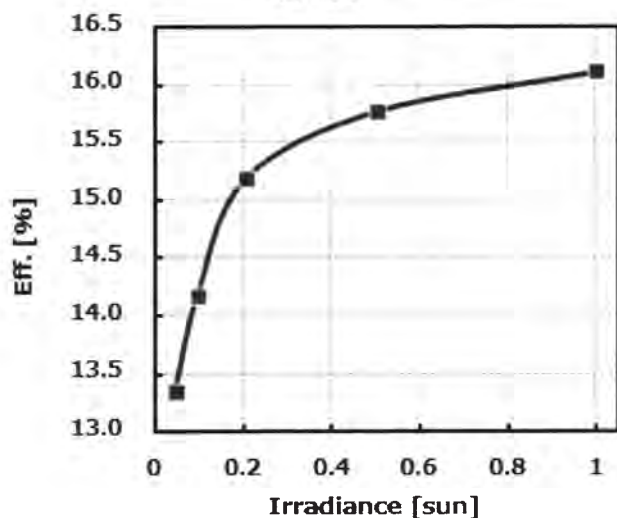


図8 金属メッシュによるソーラーシミュレーターの減光例



(a) DSC



(b) 単結晶 Si 太陽電池

図9 変換効率と照射光量の関係

4.2 実使用環境を模した条件での測定

これまでの測定はソーラーシミュレーターによる 1sun の照射光を基準に行ってきた。しかし、実際には朝夕や曇天時など 1sun に満たない状態で使用される場合も多いはずで、そのような状態での特性についても検討する必要がある。

第一段階として、基準太陽光のスペクトルをそのままに減光できるように金属メッシュを使用したフィルターを作製した。

図8にそのスペクトルを、図9には変換効率の光量依存性を測定した例を示す。

DSC と単結晶 Si 太陽電池とでは特性が大きく違うことが明らかである。

4.3 室内使用を考慮した測定

室内で使用される状態を考え、近年注目されている LED 電球下での発電特性を図10に示す。

交流 50Hz の挙動がそのまま反映されていることが解る。IPCE の AC 法 (白色光+チョッピングされた単色光) とは若干違うが、光が断続的に照射されている点では同様である。このような状態で使用された場合の挙動、特に一定時間経過後の挙動について検討を行っていく予定である。

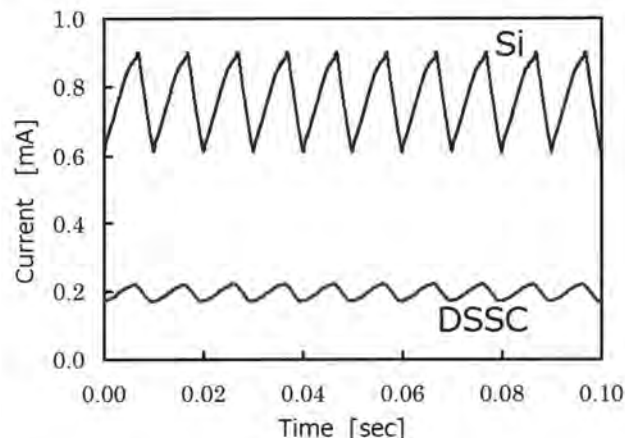


図10 LED 電球下における発電挙動

4.4 有機薄膜太陽電池 (OPV) の評価

これまで主に DSC を中心に測定を行ってきたが、H23 年度途中から OPV も提供され始めている。

OPV は DSC と違い、応答速度が速いため Si 太陽電池と同様の測定が適用できるが、耐久性に、特に紫外線による性能低下に関する問題が大きい。

前述した紫外線照射装置と組み合わせたの耐久性評価を進めていく予定である。

有機系太陽電池における電気特性の評価

酒井宗寿・内藤恭兵・片山建二

1. はじめに

化石燃料に代わる再生可能エネルギーの開発が社会的に求められており、その解決策の一つとして太陽電池の普及が期待されている。その発電方式は、これまでに実用化されているシリコン系太陽電池を始め、化合物系太陽電池、量子ドット型太陽電池、有機(色素増感・有機薄膜)太陽電池などが提案されている¹⁻³⁾。中でも、安価・柔軟性などの利点を持つ有機薄膜太陽電池は次世代の太陽電池として広く注目を集めている。しかしながら、実用化の目途となる変換効率 10%を得られるようになったのはごく最近で、その発電機構の全容解明までには程遠いのが現状である。その原因は、有機薄膜太陽電池の評価法が確立されていないことが挙げられる。本研究では、シリコン系で用いられてきたマイクロ波光導電減衰(μ -PCD)法を⁴⁾、有機薄膜太陽電池のキャリアライフタイム計測に適応させ、空間的な電気特性分布を知ることから、発電機構の解明や欠陥検出を可能にすることを目標としている。今回は、有機薄膜太陽電池のキャリアライフタイムを μ -PCD法を用いて測定した結果について報告する。

1.1 計測原理

半導体試料がパルスレーザーにより励起され、キャリアが生成することから導電率が増加する。生成されたキャリアは、それぞれ物質固有の寿命で再結合し、導電率は基底状態に緩和していく。マイクロ波の反射強度は試料の導電率に依存するため、この導電率変化をマイクロ波の反射強度を時間分解計測することでキャリアライフタイムを測定する。

2. 実験と結果

2.1 評価サンプルの作製方法とその評価方法

2.1.1 評価サンプルの作製方法

ガラス基板上の透明導電膜(ITO)を、界面活性剤・アセトン・超純水の順で10分間ずつ超音波洗浄し、真空VUVを30分間照射することで表面の汚染除去及び親水化を行った。正孔輸送層にはPEDOT:PSSを用い、透明導電膜にスピコートした(500 rpm, 5 s \Rightarrow 3000 rpm, 180 s)。発電層は、P3HT (Regioregular poly(3-hexylthiophene-2,5-diyl))とPCBM ([6,6]-Phenyl-C61-Butyric Acid Methyl Ester)をジクロロベンゼンに溶解させた溶液(PCBM含有率 0.2, 0.4, 0.6, 0.8)を用い、スピコート(2000 rpm, 120 s)して形成した。その上層にAlを真空蒸着することで、電極を設置した(図1)。

2.1.2 評価方法

図2に、 μ -PCD法の実験図を示す。励起光にはNd:YAGレーザー(波長:532 nm、パルス幅:6 ns、強度:50 μ J、繰り返し率:8 Hz)を用いた。その際のスポット径は、約3 mmである。反射率の時間変化を検出するマイクロ波は、広範囲の抵抗率に対応できる10.0~10.5 GHz帯(Xバンド)を使用し⁴⁾、得られた応答をオシロスコープに出力させた。それぞれの混合比率の有機薄膜太陽電池は、マイクロ波照射・検出器の近傍に設置した。

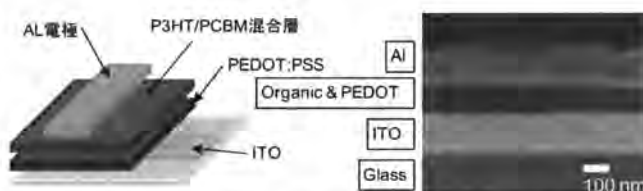


図1. 有機薄膜太陽電池の構造と断面 SEM 像

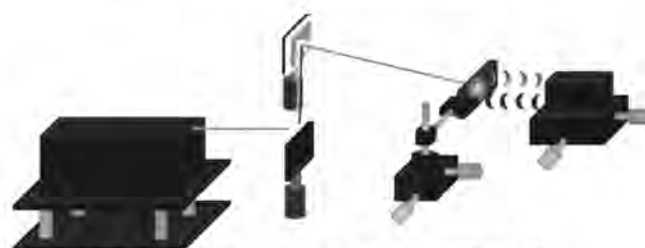


図2. μ -PCD法を用いる際の実験装置概念図

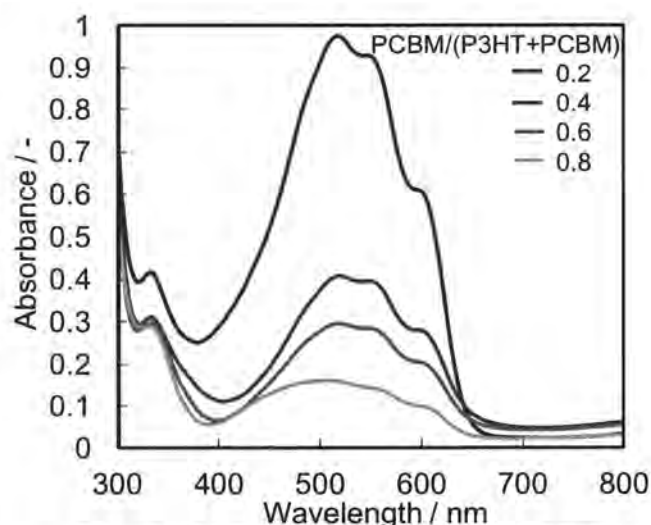


図3. 各混合比のP3HT/PCBMを発電層に用いた有機薄膜太陽電池のUV-VISによる光吸収測定

2. 2 評価サンプルの基本特性

図3は、各混合比のP3HT/PCBMを発電層に用いた有機薄膜太陽電池の光吸収スペクトルであり、ほぼ520 nm付近に吸収ピークを有する。P3HTの含有率が大きくなる程、光吸収が大きくなる。図4のI/V特性から得られた変換効率は、混合比0.4の場合が最も高く(1.52%)、Fill Factor: 0.486、短絡電流 J_{sc} : 5.94 mA/cm²、開放電圧 V_{oc} : 0.527 Vであった。一方、IPCEによる各吸収波長における変換効率は、UV-VISのスペクトル分布と必ずしも一致しない(図5)。

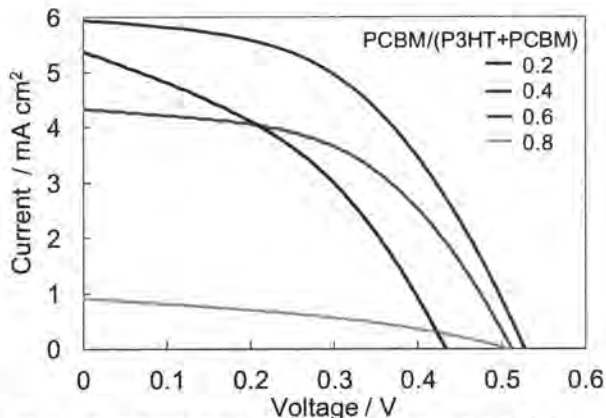


図4. 各混合比のP3HT/PCBMを発電層に用いた有機薄膜太陽電池のI/V特性 (Temp.: 25°C, Sample area: 0.04 cm²)

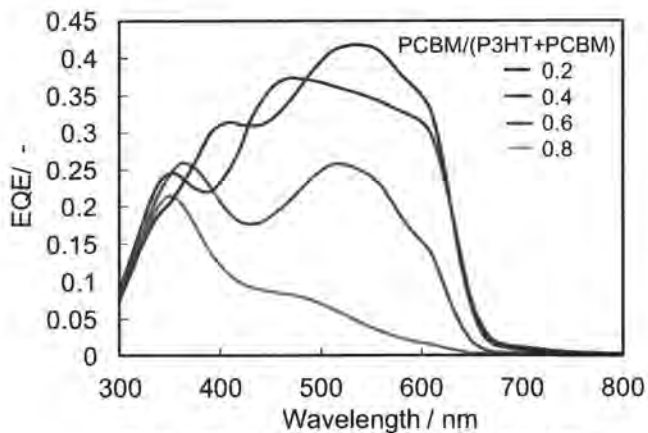


図5. IPCEによる各吸収波長における変換効率 (Temp.: 25°C, Sample area: 0.04 cm²)

2. 3 μ -PCD法による時間分解導電率変化

図6に、PCBM含有率0.4の有機薄膜太陽電池において、 μ -PCDにより得られた応答を示す。レーザー照射後、マイクロ波反射強度が増加し、40 μ s程度で完全緩和する応答が観測された。この応答は指数関数でフィッティングをすることができ、2成分の信号からなる。時定数は、1成分目で0.63 μ s、2成分目が7.4 μ sであった。両成分の時定数は、PCBM含有率が増加するにつれ減少する傾向が見られた(図7)。この時定数のPCBM濃度依存性は、Photo-CELIV

法で得られたキャリアライフタイムの傾向と類似しており、この信号はキャリア由来のものであると考えられる。

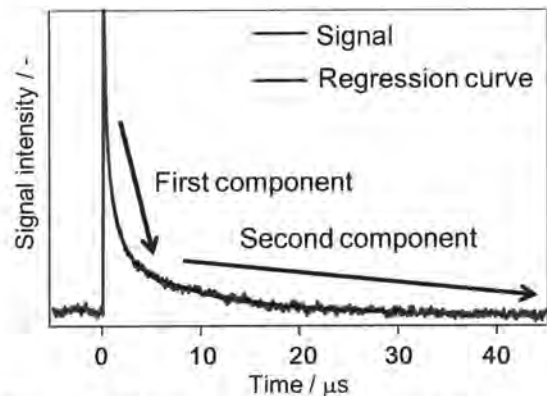


図6. μ -PCDにより得られた応答 (PCBM含有率0.4)

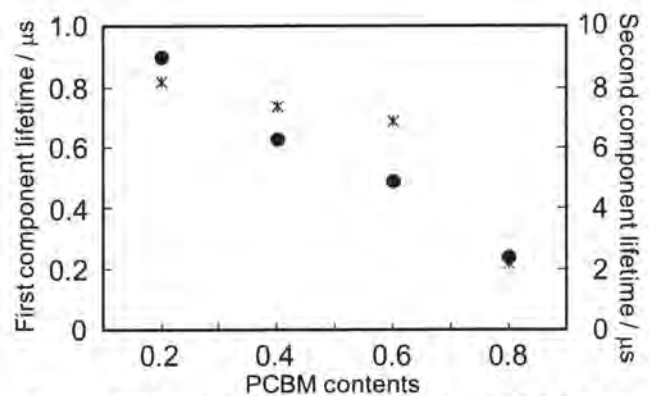


図7. 各混合比のP3HT/PCBMを発電層に用いた有機薄膜太陽電池のキャリアライフタイム

3. 考察及び今後の展望

μ -PCD法を用いて、有機薄膜太陽電池の発電層内におけるキャリア挙動と思われる信号を捉えた。この信号がキャリア起源であることを示すように、励起光強度変化による信号強度や、P型/N型半導体の混合比を変化させた際の依存性を確認した。本研究成果は、非接触式でライフタイム計測が可能であることから、製造時の発電層の歩留まり把握(太陽電池セル内の欠陥検出)に繋げていく。

【参考文献】

1. J. Bredas, J. E. Norton, J. Cornil, and V. Coropceanu, *Accounts Chem. Res.*, 42, 11, 1691 (2009).
2. L. Liang, et al., *Adv. Matter.*, E135 (2010).
3. T. Yamanari, T. Taima, J. Sakai, J. Tsukamoto and Y. Yoshida, *Chem. Phys. Lett.*, 419, 464 (2005).
4. R. K. Ahrenkiela, S. W. Johnston, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 26, 4, 1508 (2008).

色素増感太陽電池の高効率化

中田 一弥

1. はじめに

太陽電池はクリーンな次世代のエネルギー供給源として大変注目されており、近年の環境・エネルギー問題と相まって、その開発・導入に対する期待はますます加速している。ところが現在の太陽電池のおもな原料である高純度シリコンはもともと高価であるうえに、地球上で偏在しているため、その確保が問題となる。一方、これらの問題を解決できる太陽電池として最近では有機系太陽電池が注目されており、中でも色素増感太陽電池は実用化に近いと言われている。しかし、エネルギー変換効率の面で未だ不十分であり、その原因は幅広い波長をもつ太陽光を十分に吸収しておらず、発電に使用されている光が可視光域に限られていることにある。そこで本研究では、近赤外光を吸収する金クラスターを利用した有機系太陽電池の作製を目指すとともに、酸化チタン層の改良によるエネルギー変換効率の向上を試みた。

本研究では、以下に示す2つのアプローチにより、新しい太陽電池の開発と性能を評価した。

- 1) 金クラスター増感太陽電池の開発
- 2) ナノチューブ構造を有するチタンメッシュを用いた色素増感太陽電池の開発

1. 1 金クラスター増感太陽電池の開発

色素増感太陽電池は軽量かつ低コストで作製でき、次世代の太陽電池として期待が高まっている。しかし、色素増感太陽電池はシリコン系太陽電池に比べてエネルギー変換率が低い。その原因の一つは色素増感太陽電池に用いられている色素の多くが可視光しか吸収せず、太陽光を十分に利用できないことにある。一方、最近では金クラスターを利用した光電変換が報告されている。金クラスターは離散的な準位を持ち、可視光から赤外光まで幅広く光吸収する。また、ナノサイズであることから TiO₂ 層の隙間に浸透しやすい。こうした特性から色素増感太陽電池の作製の際に金クラスターを用いることで、赤外光の利用およびそれに伴う変換効率の向上が期待される。そこで本研究では金クラスターを用いた色素増感太陽電池を作製し、太陽電池としての評価を行った。

1. 2 ナノチューブ構造を有するチタンメッシュを用いた色素増感太陽電池の開発

色素増感太陽電池は低コストで製造できる次世代太陽電池として関心が持たれているが、その構成材料の一つである透明導電膜 (TCO) は金属板などと比べると抵抗が大

きく高価であるといった問題点がある。そこで本研究では TCO レスの色素増感太陽電池の構築を目指し、チタンメッシュを用いた色素増感太陽電池の作製およびその評価を目的とした。今回はチタンメッシュの表面に陽極酸化により TiO₂ ナノチューブを作製し、これをフォトアノードとして用いることで色素増感太陽電池セルを構築し、その太陽電池としての性能を評価した。

2. 実験と結果

2. 1 金クラスター増感太陽電池の開発

金クラスター(Au25)は下記の手順で合成した。まず塩化金(III)水溶液 (HAuCl₄)、テトラオクチルアンモニウムブロミド(ToABr)、トルエンを混合・攪拌後、分液により有機相を取り出した。その後、配位子であるトリフェニルホスフィンを加え、水素化ホウ素ナトリウムで還元することによってホスフィン保護 Au11 クラスターを合成した。その後、過剰に加えた水素化ホウ素ナトリウム、トリフェニルホスフィンを除去するために超純水およびヘキサンにより洗浄を行った。得られた Au11 クラスターをクロロホルムに分散させ、グルタチオンを含む水と混合し、55 °C で5時間攪拌することによって配位子交換法により Au25 クラスターを得た。得られた Au11、Au25 クラスターを紫外可視分光法(UV-vis)により評価した(図 1)。Au11 クラスターは 350, 430 nm、Au25 クラスターは 450, 680 nm に特有のピークがそれぞれ現れたことから、目的の金クラスターが合成されたことが確認された。

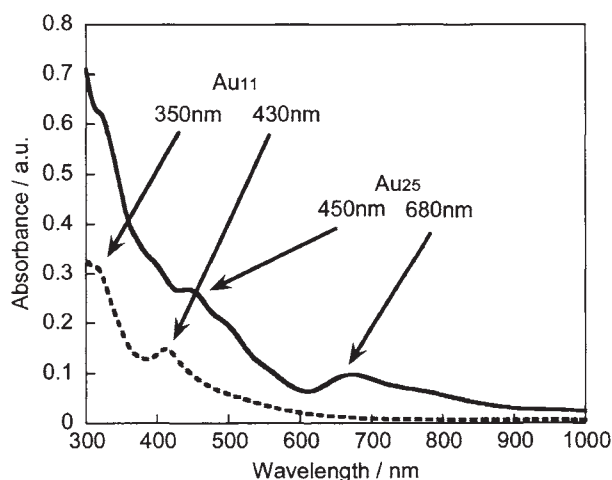


図 1. Au11 および Au25 クラスターの UV 吸収スペクトル

色素増感太陽電池の作製法は下記のとおりである。ITO

基板をそれぞれスキャット、アセトン、超純水中で超音波を用いて洗浄し、続けてオゾン処理を行った。その後、スクリーン印刷法を用いて ITO 基板上に TiO₂ 微粒子(15~20 nm)を含むペーストを塗布した。続けて大気中 500 °C で焼成し、TiO₂ 電極を作製した。その後、TiO₂ 電極を Au25 クラスタ水溶液に暗所で吸着させた。作製した TiO₂ 電極は Au 対極との間に電解質溶液(0.5 M ヒドロキノンおよび 0.1 M 過塩素酸テトラブチルアンモニウムを溶解したアセトニトリル)を浸透させた。作製後、太陽電池としての性能評価を行った。

作製した TiO₂ 電極を透過型電子顕微鏡(TEM)によって観察した(図 2)。Au25 クラスタの粒径が約 1 nm であることが知られているのに対して、今回の測定結果では平均粒径が約 1.7 nm であった。次に、レーザー脱離イオン化法(LDI)により TiO₂ 表面の測定を行った。その結果、Au25 クラスタに由来するピークが観測された(図 3)。これらの結果から TiO₂ 表面に Au25 クラスタが吸着されていることがわかった。

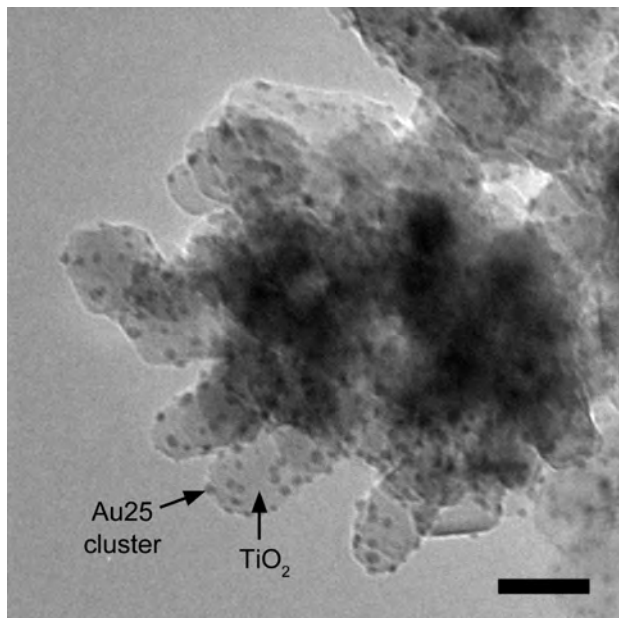


図 2. TiO₂ 上の Au25 クラスタの TEM 像

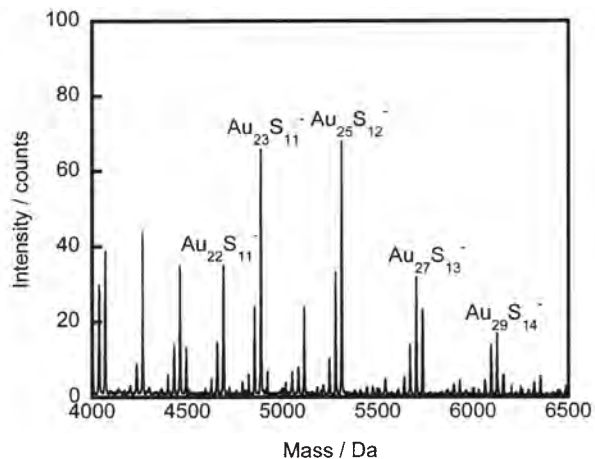


図 3. Au25 クラスタの LDI-MS スペクトル

作製した太陽電池の性能を光電流作用スペクトル(IPCE)にて評価した。はじめに、作製した太陽電池の IPCE の形状は、Au25 クラスタの UV-vis 吸収スペクトルのそれと良く一致し、450、680 nm に Au25 クラスタ由来であるピークが確認できた(図 4)。また、IPCE 値は 1000 nm 付近まで確認され、近赤外光が光電変換に寄与していることがわかった。

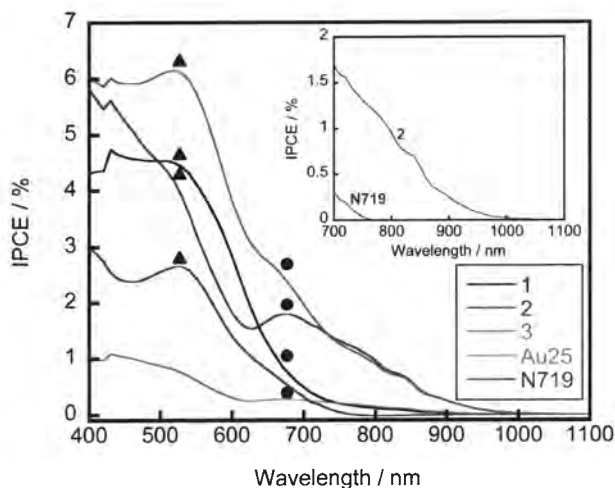


図 4. IPCE スペクトル (1: Au25 クラスタと N719 の同時吸着、2: Au25 クラスタ、N719 の順に吸着、3: N719、Au25 クラスタの順に吸着)

次に TiO₂ 表面上に Au25 クラスタを吸着させる際の pH を変化させた時の IPCE を図 5 に示す。pH が 5 の時に最大の IPCE 値を示した。一方、pH が 9 以上の時にはほとんど発電が見られなかった。これはグルタチオンの pKa と酸化チタンのゼータ電位との組み合わせから説明することができ、グルタチオンの pKa が 2.05 と 3.40 であり、酸化チタンの等電点が 6.89 であるため、pH が低すぎたり高すぎたりするときにカルボキシル基と酸化チタンとの間の結合が起こりにくいと考えられる。

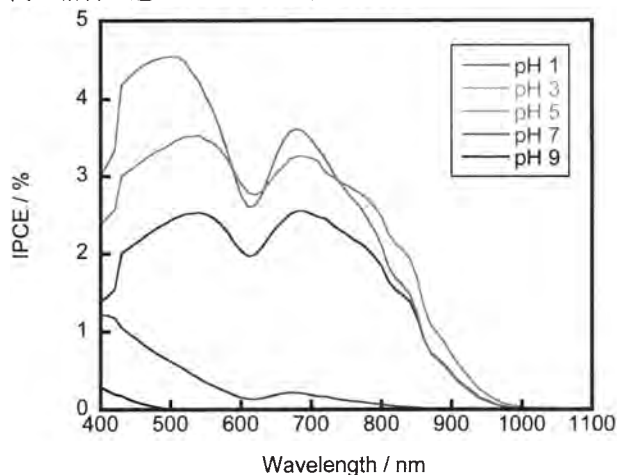


図 5. IPCE スペクトルと吸着時の pH 依存性

また、Au25 クラスターと色素 (N719) を共吸着させた際の IPCE の変化を調べた (図 4)。Au25 クラスターと N719 を同時に吸着させた場合よりも、Au25 クラスターもしくは N719 を順番に吸着させた場合のほうが IPCE 値が高かった。一般的には共吸着によって IPCE 値が大幅に減少する場合があるが、今回に関しては見られなかった。

2. 2 多孔・中空酸化チタンの色素増感太陽電池への応用

チタンメッシュを陽極酸化し (30 V, 室温, 10~40 時間)、その後 500 °C で 3 時間焼成した。電解液にはエチレングリコール (48.76 wt%), ポリエチレングリコール 600 (49.50 wt%), H₂O (1.31 wt%), NH₄F (0.43 wt%) の混合液を用いた。焼成後、N719 色素溶液に 12 時間浸漬させてフォトアノードを作製し、白金を蒸着させたチタン板を対極としてセルを作製した (図 6)。セル内に電解質溶液 (I⁻/I₃⁻) を浸透させた後、太陽電池としての性能評価を行った。

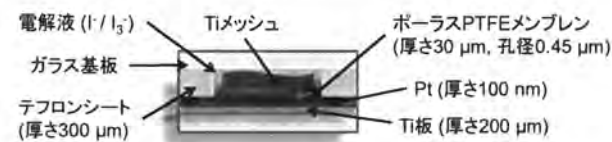


図 6. チタンメッシュを用いた色素増感太陽電池の概要図



図 7. チタンメッシュの SEM 像

陽極酸化したチタンメッシュの SEM 像を図 7 にしめす。チタンメッシュは構造が維持されていた。またチタンメッシュ表面の FE-SEM 像を図 8 にしめす。ナノチューブが形成されており、ナノチューブの内径は 47 nm、壁厚は 7 nm であり、長さは陽極酸化の時間に依存しておよそ 12~20 μm であった。

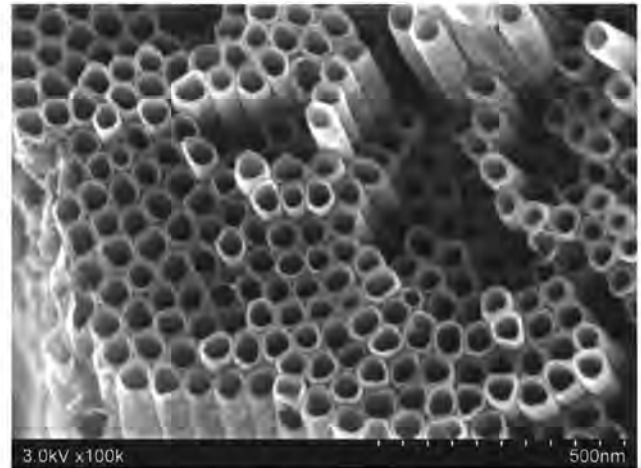


図 8. TiO₂ ナノチューブの FE-SEM 像

陽極酸化を行ったチタンメッシュを用いた色素増感太陽電池の I-V 曲線を図 9 に示す。変換効率は陽極酸化の時間によって変化し (10 h: 1.34 %, 20 h: 1.46 %, 30 h: 1.61 %, 40 h: 1.49 %), 10~30 時間では陽極酸化時間が長くなるにつれて変換効率が向上した。これは、ナノチューブ層が厚くなることから色素の吸着量が増大し、短絡電流が上昇することで変換効率が向上したからと考えられる。以上から陽極酸化時間は 30 時間が最適であると結論した。

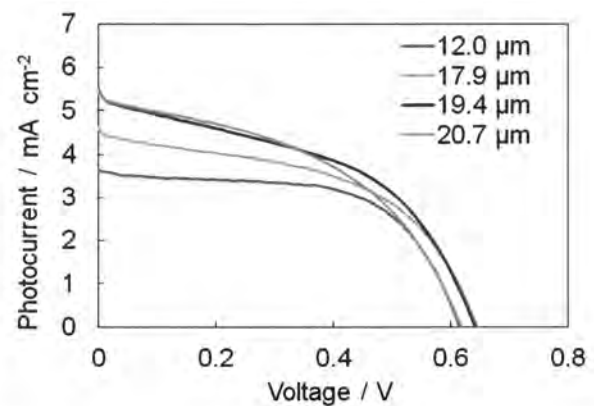


図 9. チタンメッシュを用いた色素増感太陽電池の I-V 曲線

最後に色素増感太陽電池の入射角依存性について評価した (図 10)。多結晶シリコン太陽電池では入射角に依存して大幅に光電流値が低下した。一方、一般的な色素増感太陽電池では多結晶シリコン太陽電池に比べて光電流値の低減が少なかった。また、今回作製したチタンメッシュからなる太陽電池では、上記の中間的な挙動を示した。これはチタンメッシュからなる太陽電池は一般的な色素増感太陽電池と同様に斜め方向からの入射に対して光を吸収しやすいものの、メッシュの形状により入射角によっては光の当たらない部分ができるために、入射角が低い場合には光電流値が急激に減少すると推察された。

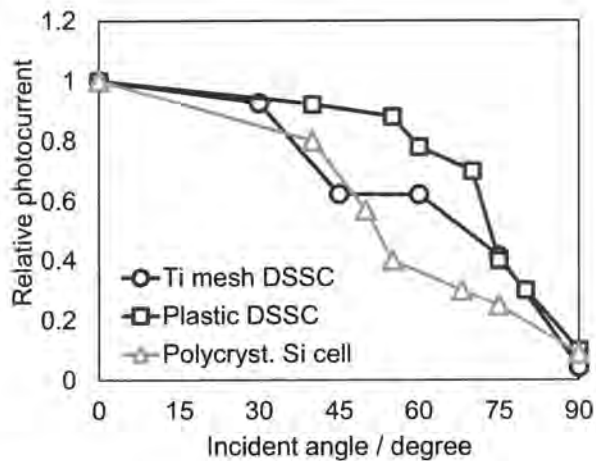


図 10. 各太陽電池の光電流の入射角依存性

3. 考察及び今後の展望

以上、2つのアプローチにより金クラスター増感太陽電池、およびチタンメッシュから鳴る色素増感太陽電池を製作し、エネルギー変換効率の向上について検討を行った。なお、本研究は、最先端研究開発支援プログラム (FIRST) のもとに行われた。

業績

【原著論文】

1. H. Kono, M. Sakai, X. Zhang, H. Yoshiki, K. Nakata, T. Murakami, H. Sakai, M. Abe, K. Takagi and A. Fujishima, "Electroless Deposition of Metal Micropatterns Using Ink-Jetted ZnO Thin Films as Templates", Chemistry Letters, vol.41, No.5, pp.558-560(2012)
2. B. Liu, K. Nakata, S. Liu, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, "Theoretical Kinetic Analysis of Heterogeneous Photocatalysis by TiO₂ Nanotube Arrays: The Effects of Nanotube Geometry on Photocatalytic Activity" J. Phys. Chem. 116(13),7471-7479(2012)
3. L. Wen, B. Liu, X. J. Zhao, K. Nakata, T. Murakami, A. Fujishima, "Synthesis, Characterization, and Photocatalysis of Fe-Doped TiO₂: Combined Experimental and Theoretical Study" Int. J. Photoenergy, vol.2012(2012)
4. K. Nakata, M. Sakai, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi, A. Fujishima, "Fabrication and characterization of self-organized porous TiO₂ particle layers" Mater. Lett., 70 (1), 160-162(2012)
5. B. Liu, K. Nakata, X. Zhao, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, "Theoretical Kinetic Analysis of Heterogeneous Photocatalysis: the Effects of Surface Trapping and Bulk Recombination through Defects" J. Phys. Chem. C, 115, 16037-16042(2011)
6. B. Liu, K. Nakata, M. Sakai, H. Saito, T. Ochiai, T. Murakami, K. Takagi, A. Fujishima, "Mesoporous TiO₂ Core Shell Spheres Composed of Nanocrystals with Exposed High-Energy Facets: Facile Synthesis and Formation Mechanism" Langmuir 27, 8500-8508(2011)
7. K. Nakata, B. Liu, Y. Ishikawa, M. Sakai, H. Saito, T. Ochiai, H. Sakai, T. Murakami, M. Abe, K. Takagi, A. Fujishima "Fabrication and Photocatalytic Properties of TiO₂ Nanotube Arrays Modified with Phosphate," Chemistry Letters, vol.40, No.10, pp1107-1109(2011)

【総説】

1. 藤嶋 昭, 中田 一弥, 落合 剛, 「産業を創出する光触媒」、工業材料 Vol.59 No.6, pp68-72(2011)
2. 中田 一弥, 「セルフクリーニング機能を有する反射防止フィルムの開発」、Material stage, Vol.11 No.4 pp49-51 (2011)

3. 斎藤 英純, 青木 智子, 青木 大輔, 高木 克彦, 「有機系太陽電池の特性と標準化の試み」、機能材料 11 月号(2011)

【口頭発表】

1. 斎藤 英純, 青木 智子, 青木 大輔, 高木 克彦, 藤嶋 昭 Evaluation and Standardization of Organic Photovoltaics, 第 18 回日中知能材料学会, 9 月 17 日, 中国
2. 斎藤 英純, 青木 智子, 青木 大輔, 高木 克彦, 藤嶋 昭, The development of the evaluation method for Organic Photovoltaics, The 6th Aca Nian Concerece on Dye-sensitized and Organic Solar Cells-DSC-6, 10月17日, 別府
3. K. Naito, M. Sakai, H. Takei, K. Nakata, K. Katayama, K. Takagi, A. Fujishima, "Development of Analysis System for Evaluating Carrier Lifetime in Organic Thin Film Solar Cell", AVS 58th International Symposium, Nashville (USA), Nov 3.(2011)、アメリカ
4. M. Sakai, K. Naito, H. Takei, K. Nakata, K. Katayama, K. Takagi, A. Fujishima, "Carrier Life Time of Several Organic Photovoltaic Cells by using Micro Wave Photoconductive Decay", AVS 58th International Symposium, Nashville (USA), Nov 3. (2011)、アメリカ
5. M. Sakai, K. Naito, H. Takei, K. Nakata, K. Katayama, K. Takagi, A. Fujishima, Evaluation approach of Several Organic Photovoltaic Cells by using Micro Wave Photoconductive Decay, PVSEC-21, Fukuoka (Japan), Nov 30. (2011)、福岡
6. 青木 大輔, 青木 智子, 斎藤 英純, 高木 克彦, 「有機系太陽電池評価における計測センター機能の構築」、神奈川県ものづくり技術交流会, 2011 年 11 月 10 日, 海老名
7. 青木 智子, 青木 大輔, 斎藤 英純, 高木 克彦 「有機系太陽電池等に対する機器分析例の紹介」、神奈川県ものづくり技術交流会, 2011 年 11 月 10 日, 海老名
8. 内藤 恭兵, 酒井 宗寿, 竹井 寛子, 中田 一弥, 片山 建二, 高木 克彦, 藤嶋 昭, 「有機薄膜太陽電池のキャリアライフタイム評価システムの開発」、第 18 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」、2011 年 12 月 12 日, 東京
9. 竹井 寛子, 内藤 恭兵, 酒井 宗寿, 中田 一弥, 片山 建二, 高木 克彦, 藤嶋 昭, 「チタニアモリス構造体の構造制御と色

- 素増感太陽電池への応用」、第 18 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」、2011 年 12 月 12 日、東京
10. 松原朋弘、中田一弥、酒井宗寿、竹井寛子、落合剛、酒井秀樹、村上武利、阿部正彦、高木克彦、藤嶋昭、「チタニアモリス多孔体を用いた色素増感太陽電池の開発」、第 18 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」、2011 年 12 月 12 日、東京
 11. 兼為直道、中田一弥、酒井宗寿、落合剛、村上武利、高木克彦、近藤剛史、湯浅真、藤嶋昭、「Ti メッシュを用いた色素増感太陽電池の作製と評価」、第 18 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」、2011 年 12 月 12 日、東京
 12. 菅原章、中田一弥、根岸雄一、蔵重亘、酒井宗寿、落合剛、村上武利、高木克彦、近藤剛史、湯浅真、藤嶋昭、「金クラスター増感太陽電池の作製と評価」、第 18 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」、2011 年 12 月 12 日、東京
 13. L. Baoshun、中田一弥、酒井宗寿、斎藤英純、落合剛、村上武利、藤嶋昭、「In Fabrication of DSSCs using TiO₂ nanoparticles and nanospheres prepared by electrospray and post-hydrothermal treatment」、第 18 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」2011 年 12 月 12 日、東京
 14. 斎藤英純、青木智子、青木大輔、高木克彦、「有機系太陽電池の性能評価法について-DSCの標準化に向けて-」、川崎国際環境技術展 2012、2012 年 2 月 10 日、川崎
 15. 松原朋弘、中田一弥、酒井宗寿、竹井寛子、落合剛、酒井秀樹、村上武利、阿部正彦、高木克彦、藤嶋昭、「チタニアモリス多孔体を用いた色素増感太陽電池の開発」、日本化学会第 92 春季年回(2012)、2012 年 3 月 25 日、川崎
 16. 兼為直道、中田一弥、酒井宗寿、落合剛、村上武利、高木克彦、近藤剛史、湯浅真、藤嶋昭、「Ti メッシュを用いた色素増感太陽電池の作製と評価」、日本化学会第 92 春季年回(2012)、2012 年 3 月 25 日、横浜
 17. 菅原章、中田一弥、根岸雄一、蔵重亘、酒井宗寿、落合剛、村上武利、高木克彦、近藤剛史、湯浅真、藤嶋昭、「金クラスター色素増感太陽電池の作製と評価」、日本化学会第 92 春季年回(2012)、2012 年 3 月 26 日、横浜
2. 新聞掲載、「知事、産学公の連携視察 KAST 太陽電池研究を評価」、東京新聞 Web 版、2012 年 1 月 27 日
 3. 参考送付、「最先端研究開発支援プログラムのもと 教育講座「有機薄膜太陽電池 最新の動向」を無料で開催！」、掲載紙なし、2012 年 2 月 17 日

【記者発表・取材】

1. 新聞掲載、「福島電機 照明光発電を利用 ZigBee 計測システム 1 年後めど販売」、日刊工業新聞、2011 年 5 月 26 日

健康・アンチエイジング

健康・アンチエイジングプロジェクト

プロジェクトリーダー 阿部 啓子

【基本構想】

本プロジェクトは、健康・アンチエイジングのための機能性食品・化粧品等の効果・効能を、科学的エビデンスに基づいて評価解析する。具体的には、ニュートリゲノミクスを含めたオミクスにより、製品の生体機能を検証し、結果を商品設計およびヒト試験に向けた基盤研究へ適用する。KASTを中心に神奈川県公設試（産技センター、衛生研、農技センター）、さらには神奈川県下の複数の企業（富士フィルム、長谷川香料、森永製菓）と連携して課題に取り組む。

プロジェクトの出口としては、科学的エビデンスに基づく「健康、アンチエイジング」の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することにある。

1. 平成 23 年度の研究目的

本プロジェクトは、健康・アンチエイジングを目指す製品の開発と、それらの効果・効能の評価解析を行い、幅広い科学的エビデンスを実証することを目的としている。



本プロジェクト研究は下記小テーマにより構成される。

①研究素材の機能性評価

神奈川県（県企業）発の食品（加工技術を含む）素材を基にした機能性食品の開発に向けてエビデンスに基づいた評価をニュートリゲノミクス（オミクス）により行う。

②機能性効果のバイオマーカーの探索

脂質代謝、糖尿病、肥満、整腸作用、アレルギー・がんなどの生活習慣病の予防の指標となるバイオマーカー（遺伝子）群を抽出する。

③ヒト試験へのニュートリゲノミクス解析の検討

ヒトにおける機能性評価系を構築するために、ヒト培養細胞系での評価やラット・マウスの血液サンプルとターゲット組織の遺伝子発現の関連性解析を行う。また、ヒト臨床試験（トクホの取得等）に向けた基盤データを取得する。

④安全性評価解析

機能性食品・化粧品等の量的（投与期間も含めた）・質的（精製度など）安全性試験を行い、これまで長期間を要するとされていた安全性（毒性）テストの事前予測を短期

に実施する。

⑤相互作用解析

複数の機能性成分による効果の相乗（相加・相殺）作用を検証する。

⑥生活習慣病（とくにストレス・メタボリックシンドローム）を予防する機能性食品の開発

現代社会では、ストレスから生活習慣病、加齢からメタボリックシンドロームを発症することが知られている。これらの疾病に関してはその因果関係の基礎解析に基づいて構築した評価系により機能性食品因子をスクリーニングし、多数の候補物質を見出す。

⑦バイオインフォーマテクスを基盤とする評価体系の構築

最先端となるバイオインフォーマテクス技術を駆使してニュートリゲノミクスのデータ解析を行う。ゲノミクスデータを基に抗体チップなどのプロテオーム解析、メタボローム解析（例えば感性メタボロミクス）へと進める。

2. 平成 23 年度の研究成果

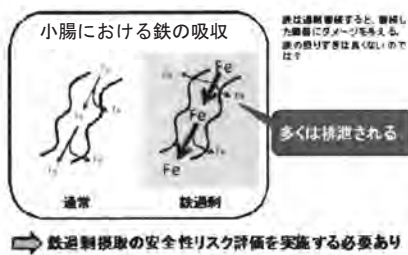
(1) ラット肝臓および血球細胞の網羅的遺伝子発現解析による鉄摂取量安全性基準のアセスメント

必須栄養素のうちマイクロ栄養素のひとつである鉄に着目し、鉄欠乏、鉄過剰が引き起こす生体の変化について、その分子メカニズムの解明を目的とした実験を実施した。

これまで貧血の、あるいは貧血を伴わない鉄欠乏状態のラット肝臓の遺伝子発現を解析したところ、両者に共通の変化として糖代謝やヘモグロビン代謝が観察された。

本年度は、鉄過剰の生理作用について解析した。ラットに通常の 10 倍の鉄を添加した食餌を 9 日間投与し、肝臓組織および血球細胞の遺伝子発現を解析した。

鉄過剰実験実施の背景

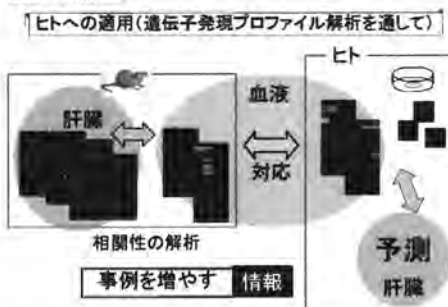


階層的クラスター解析の結果、2群間で異なるクラスターを形成することが明らかになり、2群間の肝臓における遺伝子発現パターンが異なることが示唆された。

変動 probe sets には、モノカルボン酸代謝、糖代謝、脂質代謝、酸化還元、刺激応答に関する遺伝子が濃縮されていることが明らかになった。

栄養素・食品の評価のためには、ヒトにおける評価系を視野に入れた研究が必須である。ヒトにおけるニュートリゲノミクスの評価対象は主に血液（血球細胞）である。しかし、ヒトへの応用を行うには、モデル動物における血球細胞の評価系を確立する必要がある。そこで、ケーススタディとして、鉄過剰食摂取ラットの血液を対象とした遺伝子発現解析に着手した。

評価系の構築



階層的クラスター解析の結果、両群間で異なるクラスターを形成することが明らかになったことから、鉄過剰群の血球細胞の遺伝子発現パターンは通常群と異なることが示唆された。変動 probe sets には、ポルフィリン代謝、血液凝集、細胞機能の制御、タンパク質分解等に関する遺伝子が濃縮されていることが明らかになった。

(2) 特殊な組成のアミノ酸混合液の生理機能解析

アミノ酸は食物に含まれる栄養素のひとつで、身体を作り、また生命活動のエネルギー源となる。アミノ酸混合液は特に運動時において持久力を増進させる効果が確認されており、運動をする際に飲料やサプリメントとして利用されている。さらに、近年では肥満をはじめとするメタボリックシンドロームの改善や健康維持に役立つサプリメントとして摂取されることが多くなっているが、アミノ酸は通常、食事から摂取可能であるため、運動をしない平常時には投与したアミノ酸混合液の効果を捉えるのは難しく、これまでアミノ酸の機能は運動時や病態モデルを用いて研究されている場合が多く、平常時におけるアミノ酸混

合液の作用は明確ではない。

本研究では、平常時のアミノ酸混合液の効果を調べるために DNA マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子レベルで解析を行い、特殊アミノ酸混合液 VA の新たな生理機能を明らかにすることを試みた。

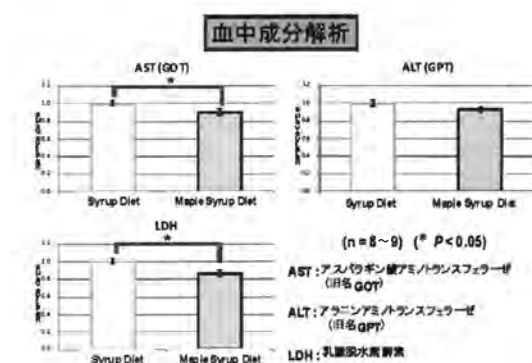
VA(1.8%)を1日1回、数十μlずつ、5日間マウスに与え、その後、肝臓を摘出し DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、Rankproducts法によって得られたVA群とWater群の変動プローブセット数はVA群の方が発現上昇したものは1083セット、発現低下したものは513セットであった。

VA群においてWater群よりも発現上昇したプローブセットがどのようなBiological processに関係するものが多いのかを調べたところ、免疫系と代謝系の遺伝子が集まっていた。免疫系では抗原プロセッシングと抗原提示など、また、外因性の刺激に対する応答に関係するものが多く含まれていた。また、代謝系ではモノカルボン酸代謝プロセス、コレステロール代謝プロセスおよびステロイド合成プロセスに関係するものであり、これらの代謝系に関する遺伝子が多く発現上昇していることがわかった。

(3) メープルシロップの健康機能性評価研究

メープルシロップの組成はスクロース 66.2%、グルコース 0.5%、フルクトース 0.3%であり、全体の約70%がこれらの糖で、約30%が水である。そのほかにポリフェノール、ミネラル、アミノ酸等が微量含まれている。本プロジェクトは、メープルシロップの糖・水と、同じ配合比の砂糖水溶液を作成した。

AIN-93Gをベースに、メープルシロップまたは砂糖水溶液を20%混ぜた餌をラットに投与した。血中成分の測定結果から、メープルシロップ食群において、臓器障害時に上昇する血中マーカー分子であるAST(GOT)、LDHの有意な減少が確認された。また、肝臓障害時に特異的に上昇するALT(GPT)も減少傾向にあった。

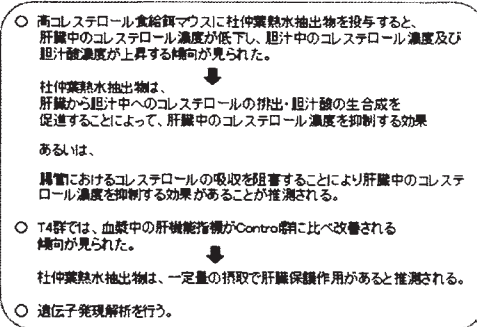


DNA マイクロアレイの結果から、メープルシロップ食群において、アミノ酸の脱アミノ反応を触媒する serine/threonine dehydratase と histidine ammonia lyase の遺伝子発現減少したことから、アンモニア生成が抑制された可能性が示唆された。

(4) 高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液投与の効果

神奈川県内では、現在は休耕地となっている桑畑の活用方法の一つとして杜仲の栽培が試みられている。これまで高脂肪食及び高フルクトース水給餌ラットにおける血中トリグリセリドの上昇が、杜仲葉熱水抽出液の摂取によって有意に抑制されることを見出した。

本プロジェクトは、様々な要因が重積して発症するメタボリックシンドロームに注目し、その要因の一つであるコレステロールの過剰摂取に対する杜仲葉の作用を検討した。具体的には、高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液の生理効果を解析した。

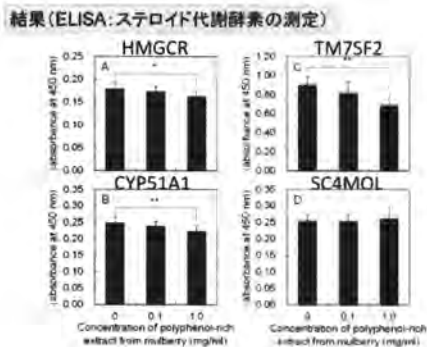


(5) 桑葉ポリフェノール画分の高コレステロール血症進行抑制効果における作用機序の解明

近年、動脈硬化性疾患の予防を目的として、機能性食品の利用が着目されつつある。未利用素材であった桑葉を機能性食品として利用する試みがなされ始めている。

これまでに、食の安全・安心プロジェクトにおいて桑葉ポリフェノールが高コレステロール血症に対する予防効果を持つこと、HMG-CoA からコレステロール合成に関わる各種遺伝子 (*Hmgcr*, *Cyp51a1*, *Tm7sf2*, *Sc4mol*) の発現量が低下することを明らかにした。

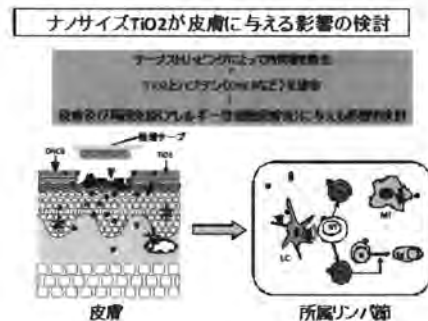
本プロジェクトでは、桑葉ポリフェノール投与により各種コレステロール合成酵素のタンパク質発現を抑制するかについてELISA法により測定した。その結果、4種の酵素のタンパク質量はいずれも有意な低下を示し、遺伝子レベルと同様の結果が得られた。桑葉ポリフェノール投与による病態の進行抑制効果の一部にはケルセチンが関与しているものと考えられる。



(6) ナノサイズ二酸化チタンが皮膚に与える影響の検討

二酸化チタン (TiO₂) は、紫外線散乱剤として化粧品等で汎用されており、ナノ化 (直径 100nm 以下) することによって透明性が向上し、紫外線防止効果も高まることから、近年では、平均粒径 20~50nm のものが多く配合されている。我々は、以前の研究において、ナノサイズの TiO₂ のほとんどが皮膚角質層でブロックされて表皮細胞内には侵入しないが、損傷皮膚では、TiO₂ は感受性は有しないものの、粒子径に依存して軽度のアジュバント効果および刺激性を有し、炎症を増悪させ、免疫系を賦活化する可能性があることを明らかにした。

本研究では、TiO₂ を塗布した皮膚についてトランスクリプトーム解析を行い、接触皮膚炎増強のメカニズムを解明することを目的に本研究を実施した。

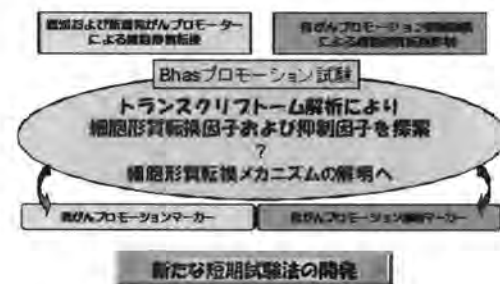


(7) 発がんプロモーション関連遺伝子の探索

化学物質による多段階発がんの機構において、発がんプロモーションは腫瘍形成を回避するための重要な過程である。大森らは非変異がん原性物質ならびに発がんプロモーター検出のための細胞形質転換試験法である Bhas42 細胞形質転換試験法を開発した。Bhas42 細胞形質転換試験法は、多くの非変異がん原性物質ならびに発がんプロモーションを高感度に検出することが可能である。

平成 23 年度は、既知発がんプロモーター (p-1) による経時的な遺伝子発現変動について DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。

p-1 処理後 1 時間、6 時間、24 時間および 12 日間により得られた DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、1 時間と 6 時間、24 時間と 12 日間はそれぞれクラスター間の距離が小さく、発現変動した遺伝子が近似していることが示唆された。



(8) 湘南ゴールドの機能性評価

‘湘南ゴールド’は2003年に神奈川県農業技術センターで品種登録した柑橘である。‘湘南ゴールド’に含まれる機能性関連物質を、他の柑橘類と比較して定量した。アスコルビン酸は、‘黄金柑’と同等であり一般的な温州ミカンと同程度であった。 β -クリプトキサンチンは、果皮・果肉が黄色である‘湘南ゴールド’、‘黄金柑’は含まれていなかったが、橙色の‘清見’は含まれていた。また、 β -カロテンは、3品種とも含まれていた。フラボノイドは、ナリルチンとヘスペリジンが主要成分であった。これまで行った *in vitro* 解析から、‘湘南ゴールド’には図1に示す機能が示唆された。

本プロジェクトでは、‘湘南ゴールド’の機能性評価研究(図2)について実施中である。

<p>抗酸化活性(H-ORAC法) 果皮:900、果肉:250 μ mole of TE/(g.d.w)と高い 血圧降下作用→アンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性 果皮の方が果肉よりも活性があるが、強い活性は認められない 血糖値上昇抑制→α-グルコシダーゼ阻害活性 試料添加濃度に依存して抑制が強くなる傾向はあったが、活性は認められない アレルギー抑制→脱顆粒抑制試験 試料添加濃度を上げると、抑制効果が低下</p> <p>果皮と可食部に分け、凍結乾燥したものを粉砕して試料とした MWVにて抽出し、そのまま使用するか、乾燥させてDMSOに溶解して使用 (MWV: MeOH:water:acetic acid=90:9:9)</p>

図1 ‘湘南ゴールド’の *in vitro* 機能性解析


<p>実験飼料 果皮凍結乾燥物</p> <p>研究計画 ‘湘南ゴールド’の機能性評価として動物実験とニュートリゲノム解析(衛生研究所・KASTと共同)を行う。</p> <p>経過 動物実験の供試材料は、フラボノイド含量の多い‘湘南ゴールド’果皮の粉末を用いること、機能性評価のターゲットは、いわゆるメタボリックシンドロームの抑制に関するものとし、予備試験を行った。</p>	
---	---

図2 ‘湘南ゴールド’を中心とした神奈川県産柑橘類の機能性評価

ラット肝臓および血球細胞の網羅的遺伝子発現解析による 鉄摂取量安全性基準のアセスメント

亀井飛鳥

1. はじめに

鉄はマイクロ栄養素の1つであり、酸素の運搬担体として、また様々な酵素の補欠分子として、生体機能を正常に保つために必須のミネラルである。鉄は摂取量の低下などによって欠乏した状態が続くと、やがて貧血に至る。一方で、過剰に蓄積すると貯蔵臓器に酸化ダメージを与えることが知られている。すなわち、鉄が欠乏状態、過剰状態のいずれの場合にも、身体はダメージを受ける。

鉄の摂取量が低下することで起こる鉄欠乏や、鉄の過剰摂取が身体に及ぼす影響についての研究はこれまでに多く実施されている。しかし、様々な代謝系や細胞機能への影響を網羅的に解析した報告はほとんどない。つまり、鉄欠乏や鉄過剰状態において、これまで着目されていない代謝系や細胞機能においても変化が起こっている可能性がある。鉄の摂取量が低下すること、また摂取量が過剰になることの安全性を評価するためには、この未解明の代謝系や細胞機能の変化も含めた総合的な解析が必須であると考えられる。そこで我々は、鉄欠乏あるいは過剰状態での生体内変化を総合的に評価することにした(図1)。総合評価の手法として、DNAマイクロアレイを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析を採用した。

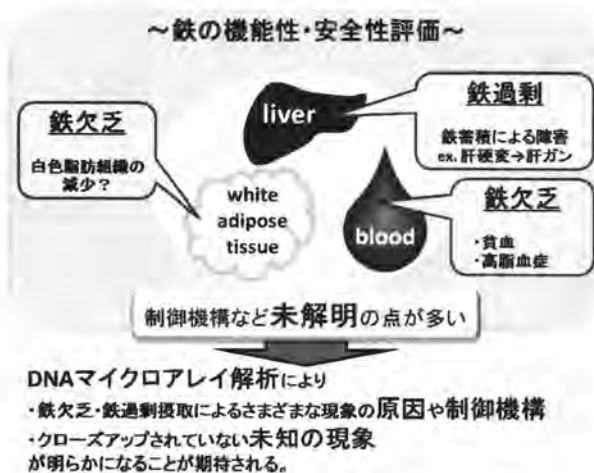


図1 鉄の機能性・安全性評価について

1. 1 鉄欠乏の生理作用

摂取量の低下や臓器からの出血などにより鉄が欠乏す

ると、まず、肝臓などの臓器に貯蔵されている鉄が優先的に利用され、減少する。これに応答し、血清中のTIBC(総鉄結合能)が増加し、フェリチンが減少するが、ヘモグロビンは正常値を保ったままである。この状態を「貧血のない鉄欠乏」とよぶ。一方、この鉄欠乏状態がつづく、貯蔵鉄の減少に引き続いて血中のヘモグロビン量が低下し、「貧血」に至る(鉄欠乏性貧血)。

鉄欠乏性貧血時には、血清や肝臓の脂質プロファイルに変動があることが報告されており、鉄欠乏により、高脂血症を発症する可能性を示唆する結果や、血清中の中性脂肪、リン脂質、LDL+VLDL コレステロール量、肝臓で総脂質、中性脂肪、リン脂質量が増加する結果が報告されている

(1)。しかしこれらの変化は、飼育条件によって異なる結果となっており、その機構について十分な情報が得られているとは言い難い。また、鉄欠乏により、ミネラルバランスが変動し(2)、これによって脂質過酸化が亢進し、ダメージを与えることが示されている(2,3)。このように、鉄欠乏時には、鉄貯蔵の中心臓器である肝臓において、様々な代謝変動が起こり得る。そこで我々は、17日の鉄欠乏食摂取ラットの肝臓の網羅的な遺伝子発現解析に着手し、様々な栄養素代謝系の変動やアポトーシス誘導などを見出し、報告した(4)。

1. 2 鉄過剰の生理作用

鉄は、小腸における吸収が厳密に制御されているため、過剰に経口摂取した場合には、その多くが吸収されずに排泄される。一方、一旦吸収されると、積極的に排除する機構が存在しないため、肝臓などの臓器内に蓄積されていく。臓器に蓄積する鉄の多くは、フェリチンタンパクと結合して安定な状態で存在するが、一部はタンパク質と結合しない不安定鉄(自由鉄)として存在する。不安定鉄は、Fenton反応によりヒドロキシルラジカルを産生して酸化ストレスを誘導し、臓器にダメージを与える。鉄が過剰になると、この不安定鉄が増し、種々の臓器不全を引き起こす。C型肝炎などの肝疾患においても肝臓内鉄過剰蓄積が認められ、肝硬変、肝がんのリスクファクターのひとつとなる。鉄過剰は、上記のような疾患や鉄剤の過剰摂取のほか、輸血などによっても引き起こされる。

1. 3 DNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

生命現象を、タンパク質合成のセントラルドグマにおける流れから解釈すると、遺伝子 DNA はその生物固有の情報を持ち、この遺伝子 DNA を転写した mRNA (トランスクリプト) を翻訳してタンパク質 (プロテイン) が作られる。タンパク質が酵素であれば、代謝産物 (メタボライト) が生成されることになる。それぞれの群を特に、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームと呼ぶ (図 2)。



図 2 セントラルドグマ

生体内で起こる変化を多角的に解析する手法として、網羅性の高い DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析がある。これは、細胞内で発現する数万種の転写産物 (mRNA) 量を網羅的に解析するもので、mRNA 量の変化の内容を解読することで、これから起こる生体の変化を予測しようという手法である。

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析は、ニュートリゲノミクス (栄養ゲノム科学) の観点から食品や食品成分の健康機能性評価 (5-9) や、栄養素欠乏の安全性評価 (10) に広く活用されている。

鉄欠乏時の生体内の変化のトランスクリプトーム解析として、鉄の吸収活性の高い十二指腸や空腸をターゲットとした報告があり (11、12)、肝臓に関してはすでに我々が報告している (4)。一方、食餌性鉄過剰が身体に及ぼす影響について、脳 (13)、心臓や筋肉 (14) を対象にした網羅的な遺伝子発現解析の報告はあるが、鉄の主要貯蔵臓器である肝臓を対象とした研究報告はない。

肝臓は様々な代謝の中心的な臓器である。また、鉄は代謝に関わる一部の酵素の活性に関与している。すなわち、鉄の量の変動は、肝臓を中心にして生体の代謝に大きな影響を及ぼすと考えられる。前述 (1. 1) のように、鉄欠乏時には肝臓を中心とした脂質代謝関連の変動が報告されているが、その他の代謝とあわせて総合的に解析することで、鉄欠乏あるいは鉄過剰が身体に及ぼす影響への理解が深まると考えられる。

鉄などの栄養素の欠乏・過剰や食品成分の摂取時の生体内の変化を評価する研究においては、ラットやマウスといったモデル動物を用いるのが一般的である。一方、モデル動物を用いての評価後には、ヒトにおける評価も必要である。ヒトでは、肝臓などの組織の摘出は難しいため、評価対象は血液、尿、皮膚などに限られ、体重や官能試験などのデータとの組み合わせで栄養素や食品の作用を考察す

ることになる。モデル動物における栄養素、食品の摂取効果を臓器の遺伝子発現で明らかにし、さらに血液 (血球細胞) の遺伝子発現を明らかにする。一方で、ヒトの血液 (血球細胞) の遺伝子発現を解析し、モデル動物の血液のデータと照らし合わせることで、ヒトの臓器の応答を予測することが期待される。さらに、生体の変化にตอบสนองする血球細胞の遺伝子マーカーをモデル動物実験にて見出し、ヒトに適用することができれば、栄養素や食品成分の機能性をヒトで確認したり、貧血・鉄過剰といった生体の症状を早期に見出したりすることが可能だと考えられる。

2. 実験と結果

2. 1 鉄過剰食摂取 9 日

鉄は小腸における吸収の制御によって体内への過剰蓄積が起こりにくく、これまでの鉄過剰に焦点を当てた研究は、C 型肝炎などの病態における肝臓への鉄過剰蓄積に関するものが主であった。現在、サプリメント剤などの普及により、容易に鉄の補給が可能となっていることを考慮すると、食事からの鉄過剰摂取が身体に及ぼす影響について、検証しておくことは必須であると考えた。そこで、通常の 10 倍の鉄を添加した食餌を与える実験を行い、鉄過剰食摂取開始 9 日目の肝臓の遺伝子発現解析を行った。

2. 1. 1 方法

a) 動物実験

3 週齢の雄性 SD ラットを 4 日間の予備飼育の後、AIN93G 食 (鉄含量 48 ppm) を与える通常食群 (n = 7)、AIN93G 食に鉄を添加した食餌 (鉄含量 500 ppm) を与える鉄過剰食群 (n = 7) の 2 群に分けた。各群、自由摂食、自由飲水とした。実験食摂取開始後 8 日目の夜から 16 時間絶食の後、麻酔下にて解剖を行い、頸動脈より採血後、肝臓を摘出した。血液からは血清あるいは血漿を採取した。血清あるいは血漿、さらに肝臓の一部を用いて成分分析を行った。体重および成分分析結果の統計的な差を Student' s *t*-test により確認し、 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。また、肝臓より TRIzol Reagent (Invitrogen 社) の定法に従って total RNA を抽出した。

b) DNA マイクロアレイ実験

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array を用いた。肝臓より抽出した total RNA は、Affymetrix 社の定法に従って DNA マイクロアレイ用に調製し、データを取得した。なお、DNA マイクロアレイ実験は各群 n = 6 にて実施した。

得られたデータ (CEL データ) に対し、採用する正規化 (summarization, normalization) 手法の検討を行った。この点が本プロジェクトの特徴の一つである。通常、Affymetrix 社の DNA マイクロアレイを使用する際、装置付属のコンピュータに搭載されているソフトウェアには GCOS (GeneChip® Operating Software) あるいは AGCC (Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software) があるが、GCOS では Micro Array Suite (MAS5)、AGCC で

は Robust Multiarray Average (RMA)、Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER)、MAS5 が正規化アルゴリズムとして採用されている。実験者は、これらの中から自分の実験に最適な正規化アルゴリズムを選択する。現在、バイオインフォマティクスの発展に伴い、Affymetrix 社の DNA マイクロアレイに適用される正規化アルゴリズムに関してはいくつも報告されている。本プロジェクトでは上記アルゴリズムのほかにもいくつかのアルゴリズムによる正規化を「R」(<http://www.r-project.org/>) という統計環境下にて実行し、比較検討を行っている。

本研究では、Distribution Free Weighted method (DFW) にて正規化を行ったデータを解析に採用した。正規化データの全体像を把握するため、階層的クラスター解析を実施した。

続いて、2 群間で発現変動の度合いが高い遺伝子を抽出する目的で、2 群間比較解析を実施した。今回、Rank Products という統計手法を選択し、通常食群に対して鉄欠乏食群で発現が増加していた 205、減少していた 198 の合計 403 の転写産物を抽出した。転写産物は各々タンパク質をコードしており、タンパク質にはそれぞれ機能がある(未解明のものも含む)。例えば、代謝に関わる酵素もタンパク質から成り立っているし、皮膚に多く存在するコラーゲンもタンパク質そのものである。今回、変動の度合いが高い転写産物(上記の増加した 205 と減少した 198)中にどのような機能を持つものが濃縮されているかを明らかにするため、我々はオンラインツール DAVID Bioinformatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) による解析を行った。本研究では、Functional Annotation Tool を用いた Gene Ontology という概念に基づく解析を実施した。Gene Ontology は、遺伝子の機能情報を、生物種を超えて統一して記述するための語彙を管理するものであり、Biological Process (生物学的プロセス)、Cellular Component (細胞の構成要素)、Molecular Function (分子機能)の3つのカテゴリからなる。今回、Gene Ontology における Biological Process に基づく解析を実施した。

2. 1. 2 結果

a) 飼育期間中の体重、血中、肝臓中成分の変化

飼育期間中、2 群間で体重、摂食量に差は認められなかった。血清 TIBC の有意な降下および血中ヘモグロビンの有意な上昇が認められた他には、血中生化学パラメータの変化は認められなかった。

b) DNA マイクロアレイ実験データ

階層的クラスター解析の結果、2 群間で 2 つの異なるクラスターを形成することが明らかになった(図 3)。このことから、2 群間の肝臓における遺伝子発現パターンが異なることが示唆された。

続いて 2 群間の発現比較解析を行った結果、変動 probe sets には、モノカルボン酸代謝、糖代謝、脂質代謝、酸化還元、刺激応答に関する遺伝子が濃縮されていることが明らかになった。

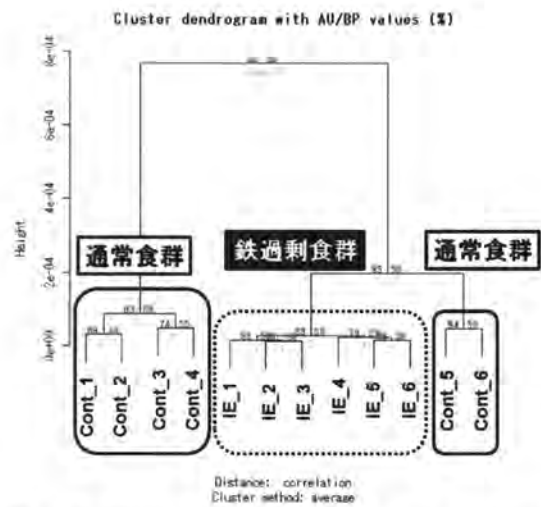


図 3 鉄過剰食群および通常食群の肝臓 DNA マイクロアレイデータの階層的クラスター解析結果

IE_O: 鉄過剰食群の個体、cont_O: 通常食群の個体

2. 2 血球細胞の評価

2. 1 は、ラット肝臓を対象とした遺伝子発現解析結果である。冒頭に記載したように、栄養素・食品の評価のためには、ヒトにおける評価系を視野に入れた研究が必須である。ヒトにおけるニュートリゲノミクスの評価対象は主に血液(血球細胞)である。しかし、ヒトへの応用の前に、まずはモデル動物にて血球細胞の評価系を確立する必要がある。そこで我々は、ケーススタディとして、鉄過剰食摂取ラットの血液を対象とした遺伝子発現解析に着手した。

2. 2. 1 方法

a) 動物実験

2. 1. 1 a) と同様である。なお、血液は、200 μ l の全血を 800 μ l の TRIzol LS Reagent (Invitrogen 社) に懸濁後、定法に従って total RNA を抽出した。

b) DNA マイクロアレイ実験

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array を用いた。血液より抽出した total RNA は、Affymetrix 社の定法に従って DNA マイクロアレイ用に調製し、データを取得した。なお、DNA マイクロアレイ実験は各群 n = 3 にて実施した。

得られたデータ (CEL データ) に対し、採用する正規化 (summarization, normalization) 手法の検討を行い、DFW にて正規化を行ったデータを解析に採用した。

続いて、2 群間で有意に発現変動した遺伝子を抽出する目的で、2 群間比較解析を実施した。今回、Rank Products という統計手法を選択し、通常食群に対して鉄欠乏食群で発現が増加していた 201、減少していた 105 の合計 306 の転写産物を抽出した。これらの転写産物に対し、Gene

Ontology の Biological Process (生物学的プロセス) に基づく濃縮度解析を実施した。

2. 2. 2 結果

b) DNA マイクロアレイ実験データ

階層的クラスター解析の結果、2群間で2つの異なるクラスターを形成することが明らかになった(図4)。このことから、2群間の血球細胞における遺伝子発現パターンが異なることが示唆された。

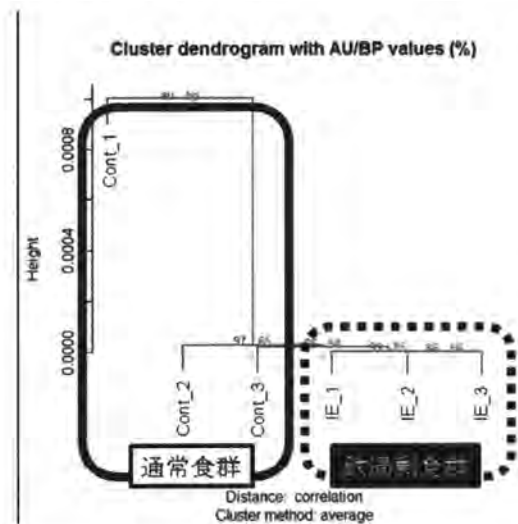


図4 鉄過剰食群および通常食群の血液 DNA マイクロアレイデータの階層的クラスター解析結果

IE_O: 鉄過剰食群の個体、cont_O: 通常食群の個体

続いて2群間の発現比較解析を行った結果、変動 probe sets には、ポルフィリン代謝、血液凝集、細胞機能の制御、タンパク質分解等に関する遺伝子が濃縮されていることが明らかになった。

3. 考察及び今後の展望

本研究は、DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析の「網羅性」という特性を大いに活用した好例である。鉄の過剰摂取という観点から、血中成分のうちヘモグロビン、血清 TIBC を除く生化学パラメータは変化していなかったが、表現型の差がわずかなものであっても、鉄の貯蔵臓器である肝臓の遺伝子発現は大きく変動していることが示された。

日本における鉄摂取の推奨量は、年齢、性別により異なるが、成人男性で 10 mg、女性で 12 mg である。これに対し、摂取量の上限は約 4 倍の 40 mg とされている。今回行った実験では、通常食の 10 倍の鉄過剰食を摂取させたが、今後、鉄所要量を通常の 5 倍、2.5 倍と段階的に減らしながら鉄過剰食摂取の影響を観察し、鉄過剰摂取の安全性を評価することが課題だと考えている。また、貧血時に処方される鉄剤は 1 日当たり 50~210 mg と多量であることを

考慮し、貧血時の鉄過剰摂取の安全性評価を実施することも重要である。

また、本研究から試験的に、血液(血球細胞)のニュートリゲノミクス研究を開始した。まずは、血球細胞において、生体内の鉄量を反映する遺伝子マーカーを探索することが目標であるが、そのためには、生体内の鉄量を段階的に設定した実験を行い、データを蓄積する必要がある、今後の課題である。

本研究は、身体に必須の栄養素である鉄を例にして、摂取量の安全性を解明することを目的として実施した。それにより、鉄の摂取量や摂取期間の違いに対し、生体が機敏に反応することが明らかになった。すなわち、貧血のみならず、「鉄の過剰摂取」した場合においても、遺伝子発現レベルでは実に多くの代謝系、細胞機能に変化が見られるという結果である。また、本研究は鉄を題材にしたが、その他のミネラルやビタミンにも摂取量不足、過剰の問題の全貌が未解明のまま残されているものが多い。本研究と同様の方法は他の多くの重要な栄養素の摂取安全性基準のアセスメントにも適用し得るため、今後、他の栄養素へと視野を広げた研究を実施し、情報を蓄積することで、健康を維持するための食生活の基盤としたい。

本研究を実施するにあたり、神奈川県衛生研究所、神奈川県産業技術センター、東京大学、東京農業大学の皆様のご協力をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

【参考文献】

1. Sherman A. R. et al. *J Nutr.* **108**:152-62 (1978)
2. Uehara M. et al. *J Nutr Biochem.* **8**:385-391 (1997)
3. Knutson M. D. et al. *J Nutr.* **130**:621-628 (2000)
4. Kamei A. et al. *Physiol Genomics* **42**:149-156 (2010)
5. Kobayashi Y. et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**:2385-2395 (2010)
6. Oda Y. et al. *BioFactors.* (2010) in press
7. Kondo S. et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**:1656-1661 (2010)
8. Fukasawa, T. et al. *J. Agric. Food Chem.* **58**:7007-7012 (2010)
9. Yao, R. et al. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 2168-2173 (2010)
10. Endo Y. et al., *J Nutr.* **132**:3632-3637 (2002)
11. Collins J. F. *Biol Res.* **39**:25-37 (2006)
12. Collins J. F. et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **288**:G964 (2005)
13. Johnstone D. et al. *Neurochem Int.* **56**:856-863 (2010)
14. Rodriguez A. et al. *BMC Genomics.* **8**:379 (2007)

特殊な組成のアミノ酸混合液の生理機能解析

篠崎 文夏

1. はじめに

アミノ酸は食物に含まれる栄養素のひとつで、身体を作り、また生命活動のエネルギー源となる。アミノ酸混合液は特に運動時において持久力を増進させる効果が確認されており、運動をする際に飲料やサプリメントとして利用されている。さらに、近年では肥満をはじめとするメタボリックシンドロームの改善や健康維持に役立つサプリメントとして摂取されることが多くなっているが、アミノ酸は通常食事から摂取可能であるため、運動をしない平常時では投与したアミノ酸混合液の効果を捉えるのは難しく、これまでアミノ酸の機能は運動時や病態モデルを用いて研究されている場合が多い。そのため平常時におけるアミノ酸混合液の作用は明確ではない。

我々がアミノ酸混合液として注目したスズメバチの幼虫が分泌する栄養液のアミノ酸組成を模倣して作製した特殊な組成のアミノ酸の混合溶液 (VA) は 17 種類のアミノ酸の混合溶液である。VA は先行研究において摂取後に運動をした際に血中乳酸が溜まりにくく、グルコースが減りにくい、また血中遊離脂肪酸量が高くなること、さらにマウス投与すると遊泳運動時間が延長するなど、運動時には顕著な効果が報告されている^{1, 2}。また、単離白色脂肪細胞を用いた実験では VA 処理は中性脂肪の分解を誘導することが示されている^{3, 4}。細胞は運動しないことから、VA は運動刺激が伴わない場合においても様々な効果を示すと推測される。そこで本研究では、平常時のアミノ酸混合液の効果を調べるために DNA マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子レベルで解析を行い、アミノ酸混合液 VA の新たな生理機能を明らかにすることを試みた。

2. 実験と結果

2. 1 実験動物

供試動物はマウス (ddY, オス, 日本 SLC) とした。マウスはプラスチックケージで通常飼料 (MF, オリエンタル酵母) および脱イオン水を自由摂取させた。飼育環境は 23°C、明期 12 時間、暗期 12 時間で飼育を行った。

2. 2 実験材料

投与する溶液はアミノ酸混合液 VA と脱イオン水 (Water)、それに加えてアミノ酸混合溶液のリファレンスとしてカゼインのアミノ酸組成を模倣したカゼインアミノ酸混合溶液 (CA) とした。

VA および CA はそれぞれのアミノ酸 (Wako) を組成は表 1 に示す割合で脱イオン水に溶解して作製した。

表1. VAとCAのアミノ酸組成 (Mol%)

Amino acids	VA	CA
Asp	0.2	7.5
Thr	7.2	2.5
Ser	2.5	8.0
Glu	3.2	19.6
Pro	18.0	8.5
Gly	19.1	4.5
Cys	-	0.4
Ala	6.0	4.5
Val	5.9	5.5
Met	0.5	2.5
Ile	4.5	5.5
Leu	6.2	8.5
Tyr	6.0	5.0
Phe	3.8	4.0
Lys	8.6	7.0
Trp	2.2	1.0
His	2.6	2.5
Arg	3.5	3.0

2. 3 実験方法

マウスは通常飼料および脱イオン水で一週間馴化し、3 群に分けた。通常飼料および脱イオン水を自由摂取させておき、VA, Water および CA を一日一回の合計 5 日間、強制投与した (図 1)。投与量は先行研究において最も効果的であった量と同量の 1.8%VA および CA を 37.5 μ l/g 体重とした。Water 群には同量の脱イオン水を投与した。最後の投与から 4 時間後に採血し、肝臓を摘出した。血液から血清を採取し、肝臓から TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いた方法によって Total RNA を抽出し、さらに RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA の精製を行った。

Total RNA は DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。DNA マイクロアレイは GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて行った。DNA マイクロアレイデータは統計解析言語・環境「R」で正規化した。正規化したデータを用いて

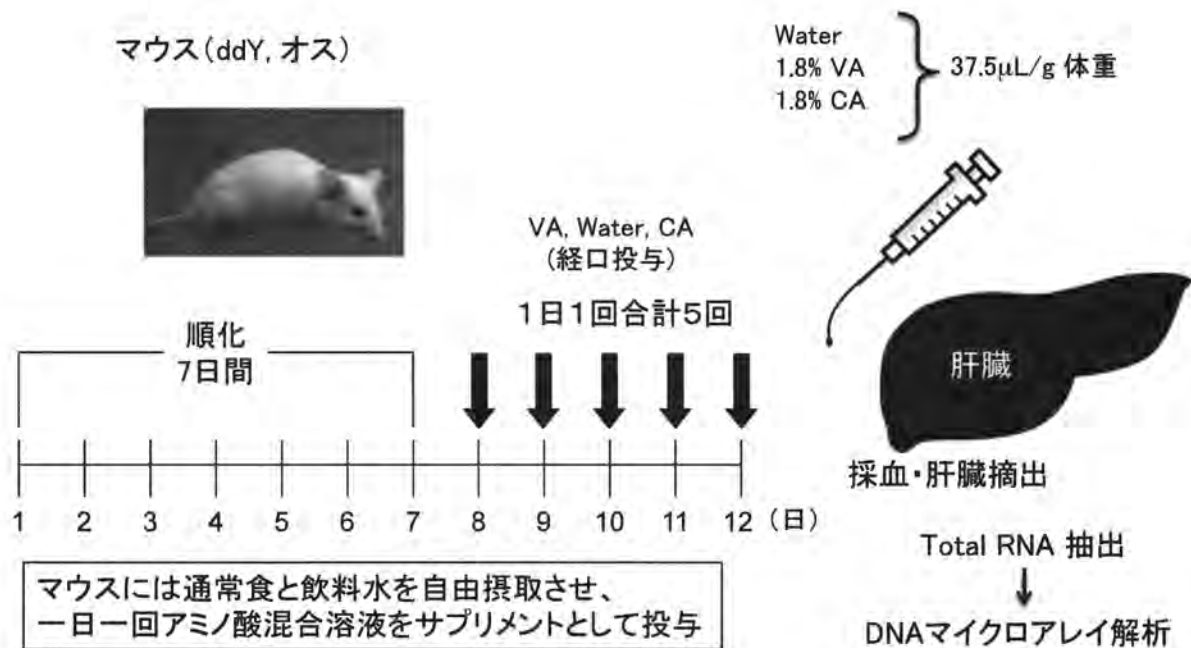


図1 実験方法

Rankproducts 法によって False Discovery Rate (FDR)が 0.05 以下で VA 群と Water 群で発現が変動するプローブセットを抽出し、The Database for Annotation and Integrated Discovery (DAVID) のウェブツールでどのような機能を持った遺伝子が有意に集まっているかを調べるため、Gene Ontology に基づいた Gene functional enrichment analysis を行った。

同様にリファレンスである CA 群と Water 群を解析し、VA 群と Water 群との比較を行った。

2. 4 実験結果

Rankproducts 法によって得られた VA 群と Water 群の変動プローブセット数は VA 群の方が発現上昇したものは 1083 セット、発現低下したものは 513 セットであった。CA 群と Water 群との比較では CA の方が発現上昇したものは 672 セット、発現低下したものは 472 セットであった。

VA 群と CA 群で共通して発現上昇したものは 363 セット、共通して発現低下したものは 176 セットであった。一方で、VA 群特異的に発現上昇したプローブセット数は 669 セット、VA 群特異的に発現低下したものは 318 セットであったことから、遺伝子発現変動はアミノ酸組成によ

表2 発現変動したプローブセット数

	発現上昇	発現低下
VA	1083	513
CA	672	472
共通	363	176

て大きく異なり、組成比による特異性があることが分かっ

た(表2)。

VA 群において Water 群よりも発現上昇したプローブセットがどのような Biological process に関係するものが多いのかを調べたところ、免疫系と代謝系の遺伝子が集まっていた。免疫系では抗原プロセッシングと抗原提示など、また、外因性の刺激に対する応答に関係するものが多く含まれていた。また、代謝系ではモノカルボン酸代謝プロセス、コレステロール代謝プロセスおよびステロイド生合成プロセスに関係するものであり、これらの代謝系に関係する遺伝子が多く発現上昇していることがわかった。

また VA 群の方が Water 群よりも発現低下したのは脂質アシル CoA 代謝プロセス、カルボン酸生合成、ステロール代謝プロセス、ステロイド生合成プロセスなどであった。発現上昇と低下のいずれにもステロイド生合成に関連する Biological process が存在したため、これらの Biological process に含まれる遺伝子を調べたところ、コレステロール生合成と代謝に関わる酵素の遺伝子の一部であった。そこで、コレステロール生合成経路に当てはめると、VA 群ではいくつかの酵素の遺伝子発現が低下しており、逆にコレステロール代謝の方ではコレステロール異化の律速酵素遺伝子が発現上昇していた。CA 群と Water 群の比較ではコレステロール生合成系路は律速酵素(スクアレンエポキシターゼ)を含むいくつかの酵素の遺伝子発現が上昇し、低下したものはなく、コレステロール異化(胆汁酸合成)の律速酵素遺伝子の発現は変動していなかった。以上のことから、VA 群で得られたコレステロール生合成酵素遺伝子の発現低下およびコレステロール異化の律速酵素遺伝子の発現上昇は VA のアミノ酸組成によるものであると考えられた。

コレステロールの代謝に関連の遺伝子発現に変化が認

められたため、血清中の生化学成分（総脂質、中性脂肪、総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、ケトン体およびグルコース）を測定したが、いずれの項目についてもVA群、CA群およびWater群の間に有意な差は認められなかったが、総脂質、中性脂肪、総コレステロールおよびHDL-コレステロールのVA群の平均値はCA群やWater群よりも低い傾向であった。

3. 考察及び今後の展望

コレステロール生合成経路の関連酵素の遺伝子発現の低下およびコレステロール異化の律速酵素の遺伝子発現の上昇から、平常時においてVAは遺伝子レベルではコレステロールの生合成を抑制するとともにコレステロールの異化を促進することによって、体内のコレステロールを排出するように機能するのではないかと考えられた。このような遺伝子発現の変化はCA群では認められなかったことから、投与したアミノ酸の組成比がコレステロール関連遺伝子の発現に影響することを示している。本研究では平常時でVAがコレステロールに影響する可能性が示唆されたが、本実験条件においては血中生化学成分測定では血

中コレステロールなどの血中脂質成分は総脂質や中性脂肪は低下する傾向であったものの有意な差はなかった。動物の体内では血中のコレステロール濃度は通常であれば大きく変動しないように厳密にコントロールされているのでわずかな変化は検出しにくいとだと考えられる。したがって、実際に体内のコレステロールを低下させるかは、脂質負荷やコレステロール負荷などの条件を設定して検証する必要がある。

今後は肝臓以外の組織での解析を行い、さらに平常時のアミノ酸混合液の効果を調べる予定である。

【参考文献】

1. Abe T. et al., Jpn. J. Physical Fitness and Sports Medicine, 44, 225-238. (1995)
2. Abe T. et al. Adv. Exerc. Sports Physiol., 3, 35-44 (1997)
3. Ogasawara J. and Abe T. Food Sci. Technol. Res., 14, 95-98 (2008)
4. Shinozaki F and Abe T., Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 1860-1868 (2008)

メープルシロップの健康機能性評価研究

渡部 由貴

1. 背景

メープルシロップはサトウカエデなどの樹液を濃縮した甘味料で、世界シェアの約 8 割がカナダ産のものである。メープルシロップにはグレードが存在する。収穫時期が早く、透過率の高いものからエキストラライト、ライト、ミディウム、アンバー、ダークの 5 段階に格付けされている¹ (図 1)。それぞれ、色や香りが少しずつ異なる。いずれのグレードであってもメープルシロップは日常的に使用される甘味料である。

炭水化物を単糖に分解し、小腸への吸収に働く酵素 (α -グルコシダーゼ) の活性を、カエデ樹液が阻害するという *in vitro* 実験の報告がある²。血糖値を下げる効果が期待されるが、その摂取が生体に及ぼす影響についての *in vivo* 実験の報告はない。本研究では、メープルシロップの健康機能性評価のため、ラットにこれを与える実験を行った。今回実験に使用したグレードはミディウムであり、日本でも菓子などによくつかわれている、ポピュラーなものである。

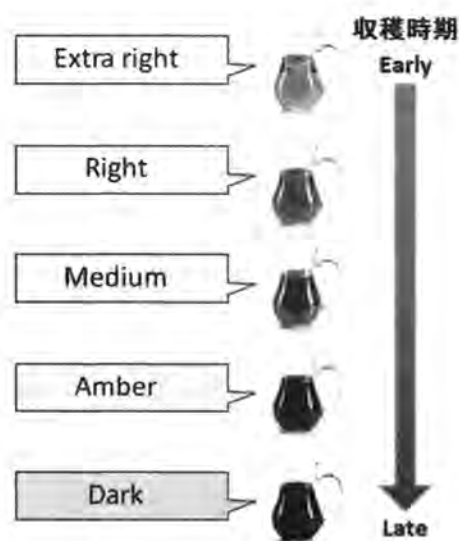


図 1. メープルシロップのグレード

メープルシロップの組成はスクロース 66.2%、グルコース 0.5%、フルクトース 0.3% であり、全体の約 70% がこれらの糖で、約 30% が水である。そのほかにポリフェノール^{3,4,5}、ミネラル、アミノ酸等が微量含まれている (図 2)。本研究では、この微量成分の健康機能性に着目した。微量成分の同定、単離が現段階では困難であるため、次の方法にて評価を行うことにした。メープルシロップの糖と水と、同じ配合比の砂糖水溶液を作成、砂糖水溶液とメー

プルシロップをそれぞれ混ぜた粉餌を調製し、ラットに給餌して、その 2 つを比較する実験を行った。これによりメープルシロップの固有成分の機能性が解明できると考えたからである (図 3)。

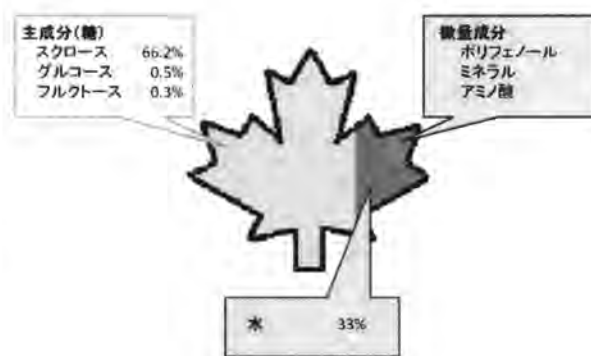


図 2. メープルシロップの配合比

2-1. 方法

げっ歯類の成長用標準飼料である AIN-93G をベースに、メープルシロップまたは砂糖水溶液を 20% 混ぜた餌を作製した。前者をメープルシロップ食、後者を砂糖水溶液食とした。

2-1-1. 動物飼育

Wistar 系雄性ラット 3 週齢 ($n = 8$) を、4 日間の予備飼育後、2 群に分け、それぞれにメープルシロップ食と砂糖水溶液食を 11 日間与えた。16 時間絶食後、12 日目に解剖を行った。頸動脈から血液を採取し、血糖値や中性脂肪などの血中成分を 31 項目について測定した。2 群間の統計的な差は Student's *t*-test によって確認した。 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。また、解剖時に採取した肝臓を用い、DNA マイクロアレイに供した。

2-1-2. DNA マイクロアレイ実験

解剖時に採取した肝臓 ($n = 6$) から、Total RNA を抽出後、Affymetrix 社の定法に従って DNA マイクロアレイ用に調製した。DNA マイクロアレイは約 3 万の遺伝子情報が搭載されている Gene Chip[®] Rat Genome 230 2.0 Array を使用した。得られた画像データ (CEL files) を「R」 (<http://cran.r-project.org/>) を用いて Distribution Free Weighted method (DFW) のアルゴリズムにて正規化した。2 群間の階層的クラスター解析を行い、Rank products を用いて 2 群間比較を行った。false discovery rate (FDR) < 0.05 の条件下で、メープルシロップ食群において、発現

が増加した 246、発現が減少した 236 の合計 482 の転写産物を抽出した。抽出したプローブセットを DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) の Functional Annotation Tool を用いて Gene Ontology に基づいて濃縮度解析を行った。

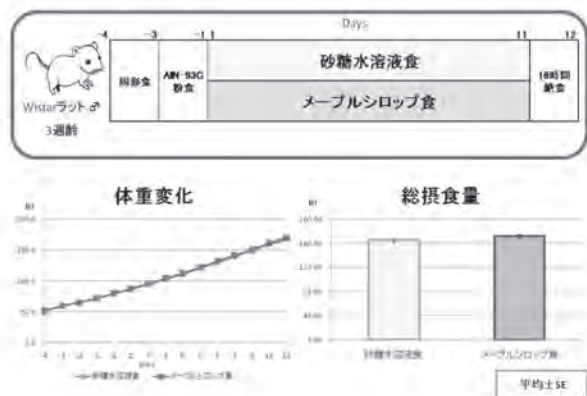


図 3. 動物飼育詳細と結果

2-2. 結果

2-2-1. 生化学データ解析

メイプルシロップ食群と砂糖水溶液食群の 2 群間で体重、総摂食量に差はなかった。このことから、ラットはスクロース同様、メイプルシロップも好んで食べることがわかった。

血中成分の測定結果から、臓器障害時に上昇する血中マーカー分子である AST(GOT)、LDH の有意な減少が、メイプルシロップ食群において確認された。また、肝臓障害時に特異的に上昇する ALT(GPT) が減少傾向であることがわかった (図 4)。

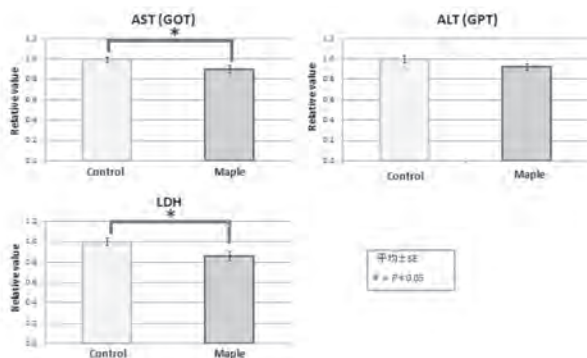


図 4. 血中成分データ解析

2-2-2. DNA マイクロアレイ解析

階層的クラスタ解析を行った結果、図 5 のように、砂糖水溶液食群とメイプルシロップ食群で異なるクラスターを形成する傾向が見られた。

濃縮度解析を行った結果、発現上昇には免疫系、炭水化物代謝、ホルモン代謝関連が含まれ、発現減少には免疫系、アミノ酸代謝関連が含まれていた。発現減少したアミ

ノ酸代謝の遺伝子を精査した結果、serine/threonine dehydratase と histidine ammonia lyase の脱アミノ反応に関与する酵素の遺伝子と、glutamate oxaloacetate transaminase 1 の発現減少が見出された。

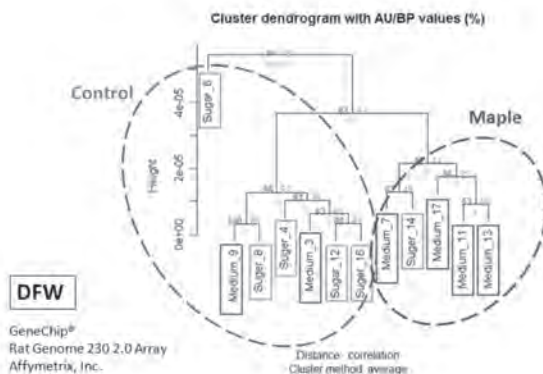


図 5. 階層的クラスタ解析

3. 考察

血中成分の解析結果から、臓器障害マーカーの AST・LDH と肝臓障害マーカーの ALT がメイプルシロップ食群において、有意に減少、もしくは減少傾向であることから、メイプルシロップによる肝臓障害緩和作用の可能性が示唆された。

DNA マイクロアレイの結果から、メイプルシロップ食群において、アミノ酸の脱アミノ反応を触媒する serine/threonine dehydratase と histidine ammonia lyase の遺伝子発現減少が見出されたことから、アンモニア生産が抑制された可能性が示唆された。アンモニアは細胞毒性が強いため、肝臓で代謝され、無毒化される。この反応を触媒する酵素の遺伝子発現が減少したことから、肝臓障害マーカーが減少した可能性が示唆された。また、AST(GOT)については、遺伝子(glutamate oxaloacetate transaminase 1)の発現が減少したことも、血中濃度減少の要因の一つであったと考えられる⁶ (図 6)。

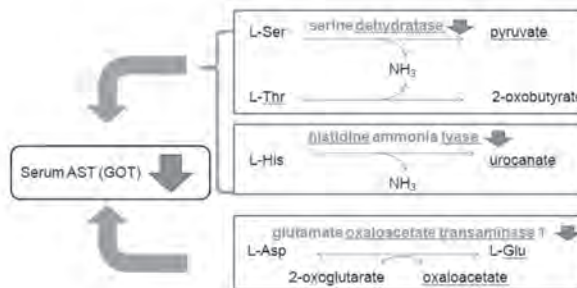


図 6. 発現変動遺伝子

現段階では、臓器障害緩和作用に関与する成分などは不明である。しかし、主成分である糖と水の比率を模倣した砂糖水溶液を比較対象としたことから、肝臓障害緩和作用はメイプルシロップの微量成分であるポリフェノール、ミネラル、アミノ酸等の単体成分、もしくは複数の成分による相互作用(相加、相乗、拮抗作用)によって生じた現象

であると考えられる。

肝臓障害緩和作用はラットの食事の 20%をメープルシロップに置き換えて摂取することで初めて明らかになった作用である。しかし、ラットが摂取したメープルシロップの量を人間の食生活に置き換えると、非常に多くの量を摂取することになる。食事量から換算すると一日 100～200 g、体重当たりに換算すると 50 kg の人で一日 1 kg 摂取するのに相当する量である。この量のメープルシロップを毎日摂取するのは困難である。そこで現在、メープルシロップの水溶性画分(糖や水)をほぼ除去した抽出物を用いた実験も検討中である。これにメープルシロップと同様の機能が確認されれば、機能性成分のみを濃縮し、サプリメントや、他の食品への添加等のように応用することが可能である。

今回明らかになった肝臓障害緩和作用は、ラットの臓器等に負荷をかけずに得られたが、肝臓障害緩和作用を検証するためには、臓器に負荷をかけて、障害を誘導した状態で、同様の効果が得られるかを調べる必要がある。そして、メープルシロップ内の有効成分を同定することも、今後の課題である。

This project was supported by the Conseil pour le développement de l'agriculture du Québec (CDAQ), with funding provided by Agriculture and Agri-Food Canada's Advancing Canadian Agriculture and Agri-Food (ACAAF) program. The Federation of Quebec Maple Syrup Producers participated in the collection and donation of maple syrup samples from Quebec and Canada.

この研究は、カナダ農務・農産食品省のカナダ農務・農産食品推進プログラム (ACAAF) から財政的援助をうけたケベック農業開発評議会 (CDAQ) からの援助によるものです。ケベック・メープル製品生産者協会は、ケベックおよびカナダのメープルシロップをサンプルとして集め、提供しました。

【参考文献】

1. Perkins TD, van den Berg AK. *Adv Food Nutr. Res.*, 56, 101-143. Epub 2009 April 21
2. 生理活性フェノール性化合物およびそれを含有してなる食品
特開 2006-8523 (P2006-8523A)
特願 2004-183433 (P2004-183433)
3. Li L, Seeram NP. *J Agric Food Chem.* 2010 Nov 24;58(22):11673-11679. Epub 2010 Oct 29.
4. Li L, Seeram NP. *J Agric Food Chem.* 2011 Jul 27;59(14):7708-7716. Epub 2011 Jun 22.
5. Liya Li, Navindra P. Seeram *J Funct Foods.*

Volume 3, Issue 2, April 2011, Pages 125-128

6. Watanabe Y, Kamei A, Shinozaki F, Ishijima T, Iida K, Nakai Y, Arai S, Abe K. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(12):2408-2410. Epub 2011 Dec

発がんプロモーション関連遺伝子の探索

大森 清美

1. はじめに

食品添加物および医薬品等、化学物質の発がん性を予測するための試験法として、Ames 試験、小核試験および染色体異常試験(またはマウスリンフォーマ試験)のいわゆる「変異原試験 3 点セット」を実施することが法的に義務づけられている。しかし、これらの試験法では検出できない発がん物質が少なからず存在することが近年問題となっており、そのような非変異がん原性物質の多くは、発がんプロモーターであることも予測されている。化学物質による発がんリスクを低減させるためには、多段階発がんの機構における発がんプロモーターによる暴露を避け、腫瘍形成を回避することが重要となる。しかしながら、公的に認定された高感度かつ汎用性の高い発がんプロモーション試験法が存在しなかったことから、ほとんどの化合物について、発がんプロモーション活性の評価は行われてこなかった。そこで、大森らは重点基礎研究において、発がんプロモーター検出のための細胞形質転換試験法である Bhas42 細胞形質転換試験法を開発した¹⁾。Bhas42 細胞形質転換試験法は、多くの発がんプロモーターを高感度に検出することが可能であり¹⁾、食品に係わる化学物質^{2,3)}をはじめ様々な試料^{4,5)}の発がんプロモーション活性の検出が可能である。また、試験結果の室間再現性も良好であることから⁶⁾、経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) の国際標準試験法としての認定に向けて国際的な専門組織で審議が行われている。Bhas42 細胞形質転換試験法では、腫瘍細胞で認められる形質を特徴とした形質転換フォーカスの形成をエンドポイントとしているため、確度の高い試験法であると考えられる。しかし、形質転換フォーカスの形成メカニズムについては、報告がほとんど無いことから、Bhas42 細胞形質転換試験法の有用性を提示するためには、メカニズムに関する研究データが不可欠であると考えられる。

そこで、平成 23 年度は、既知発がんプロモーター (P-1) による経時的な遺伝子発現変動について DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。

2. 実験と結果

2.1 既知発がんプロモーター (P-1) 処理による経時的な細胞形態の変化

2.1.1 細胞試料の調製および細胞観察

新たに保存細胞株を解凍し、5%牛胎児血清 (FBS) を添加した DMEM/F12 培地 (DF5F) で前培養を行った。同

培地を用いて Bhas42 細胞の 7×10^3 cells/mL 細胞浮遊液を調製し、6well プレートに 2mL/well ずつ播種した。細胞播種 4 日後に、既知発がんプロモーター (P-1) の DMSO 溶液を添加した DF5F で、溶媒対照群は、DMSO 溶液 (0.1%) を添加した DF5F で培地交換を行った。1 時間後、6 時間後および 12 日後に細胞観察と RNA 抽出用細胞試料液を調製し、 -80°C で保存した。なお、保存凍結細胞の解凍から RNA 抽出用細胞試料液の調製までは、完全繰り返し実験 3 回を実施し、各回の試料液を $n=1$ として 1 群 $n=3$ とした。

P-1 処理後の経時的な細胞観察の結果、DMSO 0.1% (溶媒対照) 群に対して、P-1 処理 1 時間および 6 時間後の Bhas42 細胞は、細胞密度には変化はないが、プレートへの接着状態と顕著な形態変化が認められた。24 時間後および 12 日後は、溶媒対照群に対して、細胞密度および形態の変化と細胞の重なり合いが、さらに 12 日後の細胞には、初期の形質転換フォーカス形成が認められた (図 1)。

2.2 既知発がんプロモーター (P-1) 処理による経時的な遺伝子発現変動

2.2.1 RNA 試料の抽出精製

凍結保存した細胞試料液を解凍し、クロロホルム分配およびイソプロパノール沈殿によりトータル RNA を抽出し、RNeasy Mini (QIAGEN 社) により精製を行った。得られたトータル RNA 試料について、RNA 濃度および Agilent 2100 バイオアナライザによりクオリティー評価を行った。その結果、RNA Integrity Number (RIN) 値は、いずれも 9.0 以上であり、高いクオリティーのトータル RNA 試料が得られていることが確認された。

2.2.2 DNA マイクロアレイ分析用 RNA 試料の調製および分析 RNA 試料の抽出精製

精製後のトータル RNA について、3' IVT Express Kit (アフィメトリクス(株)) を用いて、cDNA に逆転写後、ラベル化 aRNA を調製し、精製した後、フラグメンテーションを行った。GeneChip Hybridization, Wash, and stain Kit (アフィメトリクス(株)) の試薬と混合し、Mouse Genome 430 2.0 アレイ (アフィメトリクス(株)) に注入後、 45°C で 16 時間、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの終了後、アレイの中の溶液を除去し、同キットを用いて GeneTitan (アフィメトリクス(株)) で洗浄および染色後、DNA マイクロアレイ分析を行った。

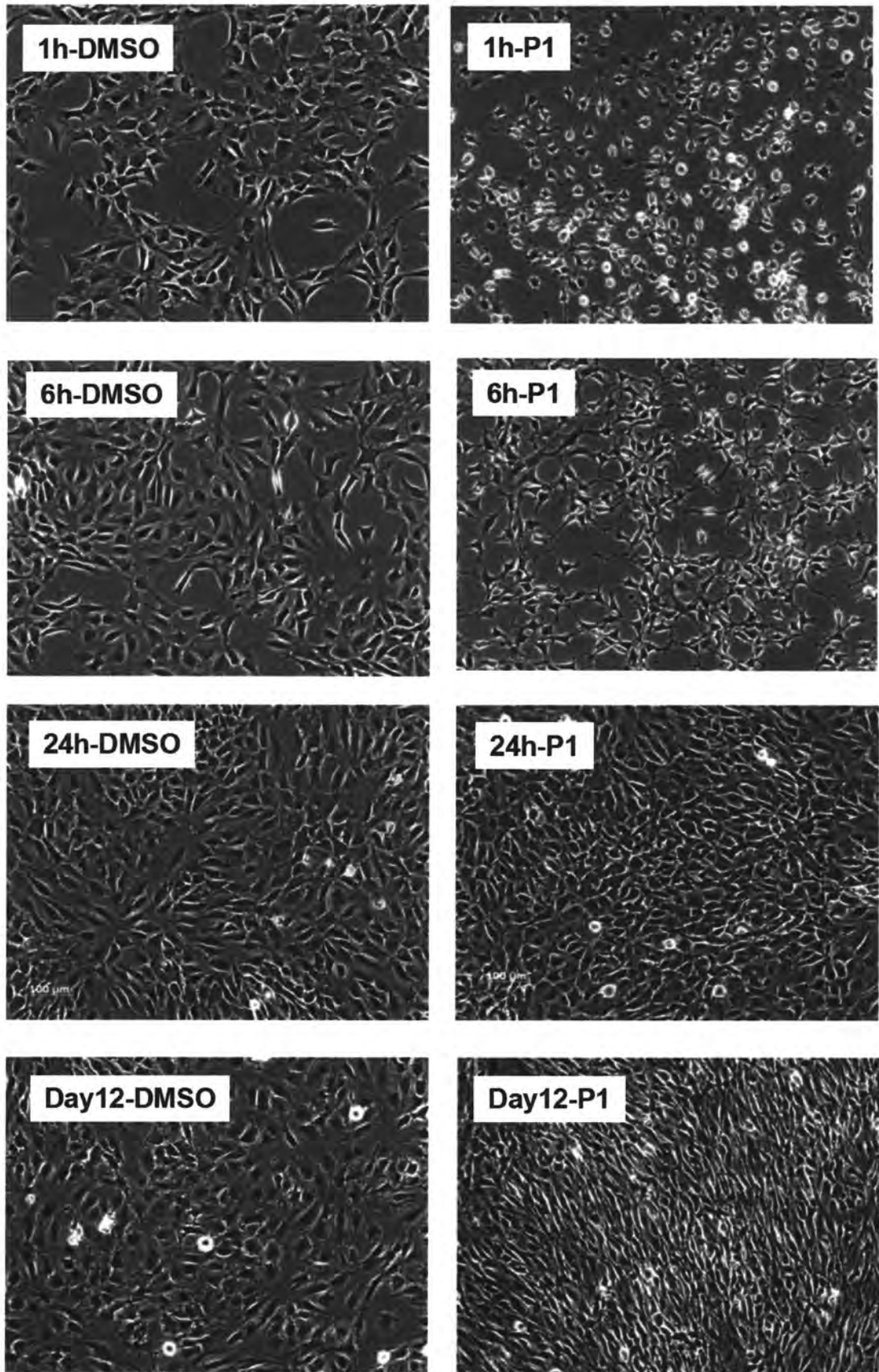


図1. 溶媒対照群およびP-1処理群のBhas42細胞形態

2.2.3 マイクロアレイ分析結果の階層的クラスタ解析

P-1 処理後 1 時間、6 時間、24 時間および 12 日間により得られた DNA マイクロアレイ分析の CEL データについて、3 種の正規化手法(DFW, RMA および qFARMS) で正規化し、階層的クラスタ解析を行った結果、DFW および RMA では、処理時間のあいだに異なるクラスターを形成

し、1 時間および 6 時間、24 時間および 12 日間はそれぞれクラスター間の距離が小さく、発現変動した遺伝子が近似していることが示唆された。qFARMS については、6 時間処理の溶媒対照群と P-1 処理群のあいだに大きく異なるクラスターを形成し、1 時間および 24 時間処理群とも異なるクラスターを形成した(図 2)。

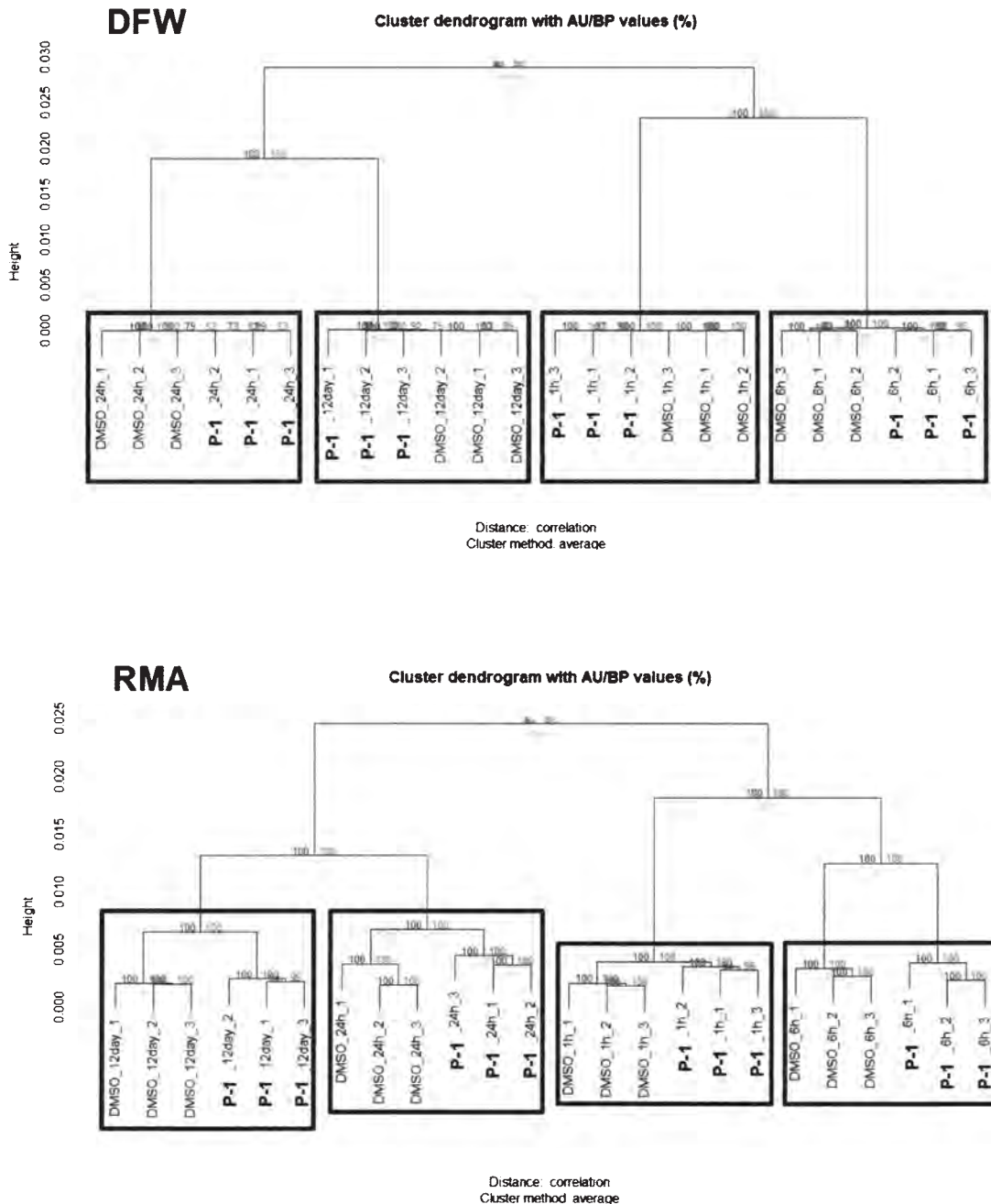


図 2. P-1 処理群および溶媒対照群の階層的クラスタ解析結果

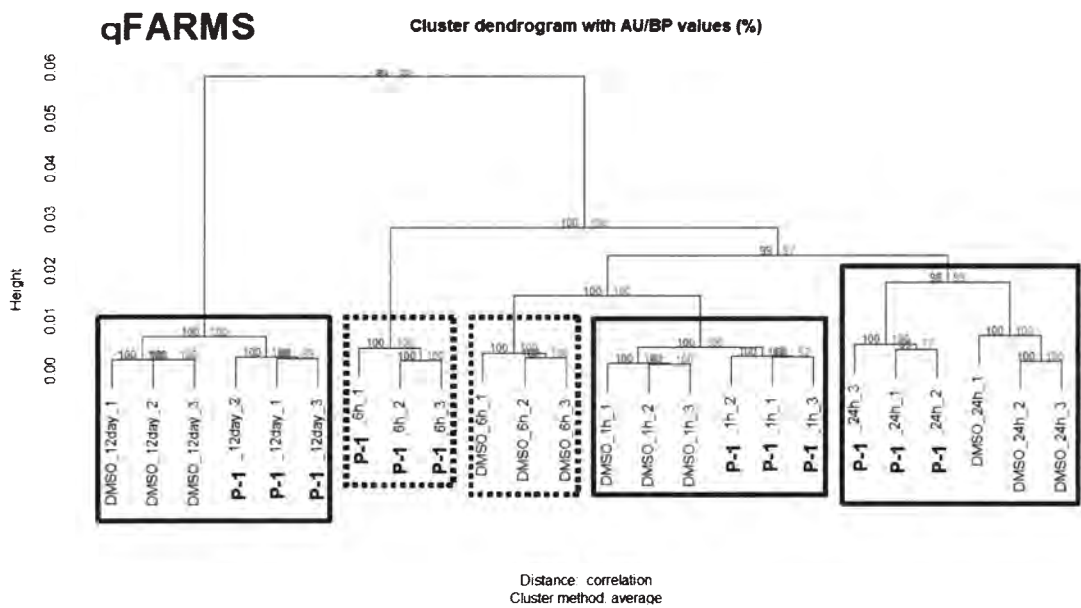


図2. P-1処理群および溶媒対照群の階層的クラスター解析結果 (つづき)

2.2.4 2群間比較における発現変動遺伝子数

qFARMSにより正規化したCELデータについて、それぞれ Rank Products を実施した。溶媒対照群に対して各被験化学物質処理群で有意 (FDR < 0.05, 0.01) に mRNA の発現が増大もしくは減少したプローブセットを抽出し、遺伝子数を求めた。FDR < 0.05 もしくは 0.01 で増大した遺伝子数は、24 時間処理が最も多く、FDR < 0.05 も

しくは 0.01 で増大した遺伝子数は、6 時間処理が最も多かった (図3)。また、有意 (FDR < 0.05, 0.01) に mRNA の発現が増大もしくは減少したプローブセットを抽出し、1 時間、6 時間および 24 時間処理の共通するプローブ数を求めた。その結果、1 時間処理群と 6 時間処理群の共通プローブ数は、増大および減少ともに 24 時間処理との共通プローブ数よりも多く、24 時間処理群は、12 日間処理群との共通プローブ数が増大および減少ともに多かった。

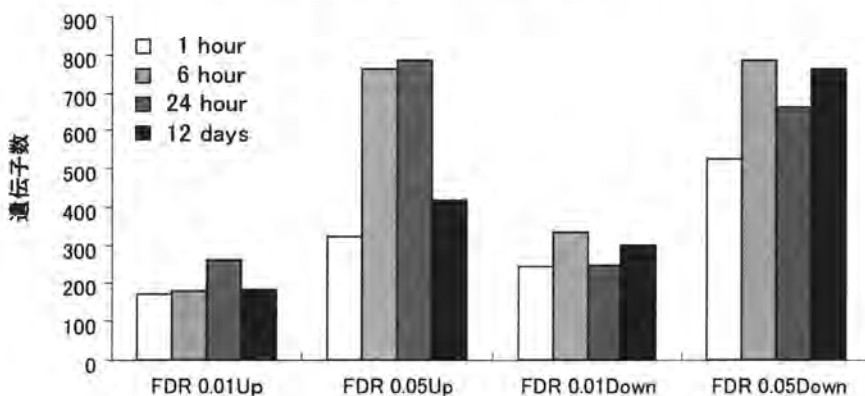


図3. 発現変動遺伝子数

今後の展望としては、解析を更に進め、既知発がんプロモーター (P-1) による経時的な遺伝子発現変動と細胞形質転換の関わりについて解明する。

【参考文献】

1 Ohmori, K., Sasaki, K., Asada, S., Tanaka, N., and Umeda, M., An assay method for the prediction of tumor promoting

potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, *Mutation. Research*, 557, 191 (2004)

2. Sakai, A., Suzuki, C., Masui, Y., Kuramashi, A., Takatori, K., Tanaka, N., The activities of mycotoxins derived from *Fusarium* and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutation. Research*, 630, 103 (2007)

3. Ohmori K, Kawamura Y., Cell transformation activities of abietic acid and dehydroabietic acid: safety assessment of possible contaminants in paper and paperboard for food contact use, *Food Addit Contam*, 26, 568 (2009)
4. Ezo, Y., Ohkubo, T., Ohmori, K., Fushiwaki, Y., Mori, Y., Umeda, M. and Goto, S., Promoter and mutagenic activity of particulate matter collected from urban air, *Journal of Health Science*, 50, 181 (2004)
5. 大森清美, 中島大介, 江副優香, 森康明, 伏脇裕一, 遠藤治, 武田健, 後藤純雄, 粒径別に分級採取した空気浮遊粒子の発がんプロモーション活性, *環境化学*, 16, 119-123 (2006)
6. Ohmori, K., Umeda, M., Tanaka, N., Takagi, H., Yoshimura, I., Sasaki, K., Asada, S., Sakai, A., Asakura, M., Baba, H., Fushiwaki, Y., Hamada, S., Kitou, N., Nakamura, T., Nakamura, Y., Oishi, H., Sasaki, S., Shimada, S., Tsuchiya, T., Uno, Y., Washizuka, M., Yajima, S., Yamamoto, Y., Yamamura, E., and Yatsushiro, T., An inter-laboratory collaborative study by the non-genotoxic carcinogen study group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33, 619 (2005)

桑葉ポリフェノール画分の高コレステロール

血症進行抑制効果における作用機序の解明

小林 征洋(神奈川県衛生研究所/東京海洋大学)、宮澤 真紀(神奈川県衛生研究所)

1. はじめに

近年、食生活の変化などにより高コレステロール血症の患者が増加しているが、高コレステロール血症は日本人の死因の主要因である動脈硬化性疾患に深く関わっている。日本人の三大死因は、がん、心筋梗塞および脳梗塞であり、このうち動脈硬化性疾患である心筋梗塞と脳梗塞は合わせると死因の1/3を占めている。

高コレステロール血症の状態が続くと、動脈硬化を引き起こして血管が細くなり、様々な動脈硬化性疾患を引き起こす。動脈硬化性疾患の例としては、狭心症や心筋梗塞、脳梗塞などが挙げられる。狭心症とは血管が狭くなって血流量が減り、心筋が一時的に貧血状態になることを指す。心筋梗塞とは心臓の血管が詰まって血流が途絶えてしまう状態で、最悪のケースでは心臓が止まって死亡する。そして、脳梗塞とは脳の血管に血栓、血の塊、石灰片、腫瘍の塊などが詰まることによって血流を遮断し、脳細胞を死滅させる疾患である。

近年、動脈硬化性疾患の予防を目的として、機能性食品の利用が着目されつつある。最近では、未利用素材であった桑葉を機能性食品として利用する試みがなされ始めている。これまでに桑葉の生体影響についての研究が数多く行われ、桑葉の生活習慣に対する予防効果が解明されつつある。桑葉には、血糖値や血圧の上昇抑制効果や抗酸化

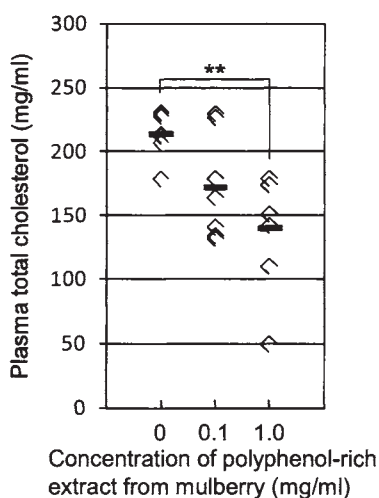


図1. 桑葉ポリフェノール画分を摂取した高コレステロール食給餌マウスの血中総コレステロール値。—平均値, ** $p < 0.01$.

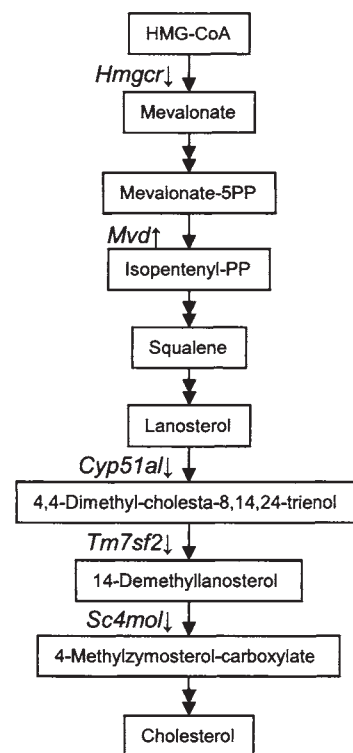


図2. コレステロール合成経路および桑葉ポリフェノール画分摂取により発現量が上昇(↑)または低下(↓)した遺伝

作用などがあることがわかってきている [1-3]。さらに、血中トリグリセリドの上昇抑制作用やアテローム性動脈硬化の予防効果なども報告されている [4, 5]。さらに、我々は食の安全安心プロジェクト [6] において桑葉が高コレステロール血症に対する予防効果を持つことを明らかにしている(図1)。さらに、DNAマイクロアレイ解析により、HMG-CoAからのコレステロール合成に関わる各種遺伝子(*Hmgcr*, *Cyp51a1*, *Tm7sf2*, *Sc4mol*)の発現量が低下することも明らかにしている(図2) [6]。

そこで本研究では、肝臓中でのコレステロール生合成に関与する酵素の発現量を調べ、桑葉の高コレステロール血症進行抑制効果における作用機序を解明することを目的とした。

2. 実験と結果

2.1 実験試料

試料として先行研究で用いたマウスの肝臓 [6] を用いた。この肝臓は以下の実験により得られたものである。6週齢の C57BL/6Cr Slc 雄マウス (日本 SLC、静岡、日本) 28 匹を 1 週間普通食 (CE-2; 日本クレア、東京、日本) で予備飼育後実験に用いた。試験期間中、動物には粉末化した Quick Fat (日本クレア) に 2% コレステロールおよび 0.4% コール酸を添加した高コレステロール食を給餌した。この間、10 匹には水道水を、9 匹ずつには 0.1 または 1 mg/ml に溶解した桑葉ポリフェノール画分 [7] を飲料水として与えた。4 週間後に 14 時間絶食させてから解剖し、肝臓を摘出した。

2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

マウス肝臓 (尾状突起) から粗抽出液を調製し、肝臓抽出液中に存在する各種コレステロール合成酵素量を ELISA 法で調べた。マウスの肝臓抽出液をマイクロタイタープレートに固相化した後、各種コレステロール合成酵素に対する一次抗体、および一次抗体に対するホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗体に順次反応させ、テトラメチルベンジジン発色基質を用いて検出を行った。

2.3 各種コレステロール合成酵素の検出

ELISA 法を用いて肝臓抽出液中の各種コレステロール合成酵素 HMGCR、CYP51A1、TM7SF2 および SC4MOL のタンパク質発現量を調べた (図3)。まず、コレステロール合成の最初の段階を触媒し、律速酵素として機能する HMGCR のタンパク質発現量を調べた。HMGCR は桑葉ポリフェノールの投与量に依存して発現量が低下する傾向がみられ、1.0 mg/ml 桑葉ポリフェノール画分投与で有意差が認められた。また、コレステロール合成の中間段階を触媒する CYP51A1 および TM7SF2 も同様に桑葉ポリフェノール濃度に依存して発現量が低下していた。特に、桑葉ポリフェノールを 1 mg/ml の濃度で投与した群では有意差が認められた。一方、コレステロール合成の中間段階に関与する SC4MOL は各群で差がみられなかった。

3. 考察及び今後の展望

以前の実験から、桑葉ポリフェノール投与によるコレステロール代謝異常の進行抑制効果が確認できており、DNA マイクロアレイ解析より桑葉ポリフェノール画分の摂取は各種コレステロール合成酵素をコードする遺伝子の発現を抑制

することで高コレステロール血症進行抑制効果を発揮しているものと予想されていた [6]。今回の実験結果から、桑葉ポリフェノール画分が各種コレステロール合成酵素のタンパク質発現を抑制するという裏付けを取ることができた。桑葉ポリフェノールの主要成分はケルセチンをアグリコンとするフラボノイド配糖体であることが報告されている [8]。最近、ケルセチンがウサギの高コレステロール血症を改善させることが報告されている [9]。このことから、桑葉ポリフェノール投与による病態の進行抑制効果の一部にはケルセチンが関与しているものと考えられる。今後、ケルセチンに焦点を当てた研究が必要であるだろう。

【参考文献】

1. C. Miyahara, et al., J Nutr Sci Vitaminol, 50, 161-4 (2004).
2. J. Duarte, et al., Br J Pharmacol, 133, 117-24 (2001).
3. K. Doi, et al., Biol Pharm Bull, 23, 1066-71 (2000).
4. Y Kobayashi, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 74, 2385-95 (2010).
5. B. Enkhmaa, et al., J Nutr, 135, 729-34 (2005).
6. 小林征洋ら. 神奈川科学技術アカデミー平成 21 年度研究概要, 200-2 (2010).
7. 酒井案理ら. 機能性食品に関する共同研究事業報告, 2, 72-3 (1996).
8. B. Enkhmaa, et al., J Nutr, 135, 729-34 (2005).
9. Juźwiak, S., Pharmacol Rep, 57, 604-9 (2005).

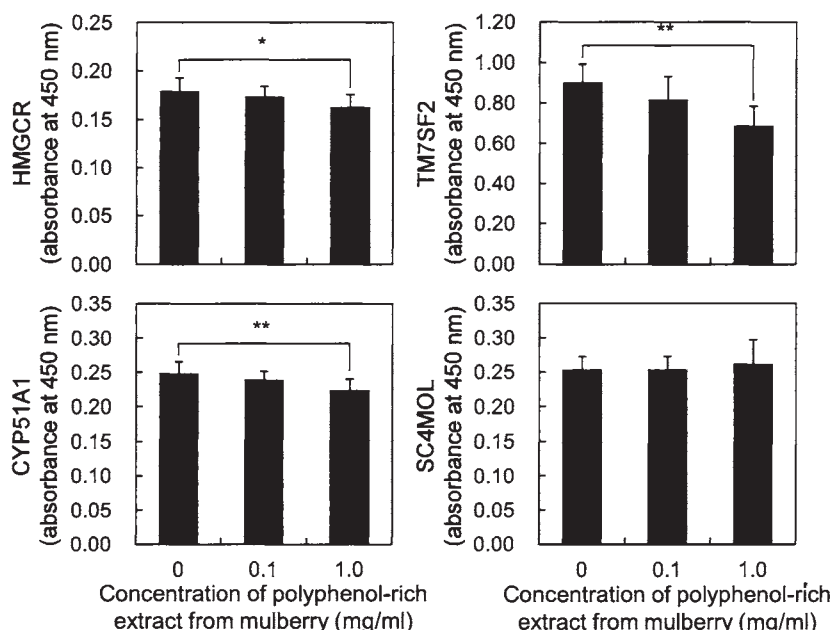


図3. 桑葉ポリフェノール画分摂取した高コレステロール食給仕マウスの肝臓における各種コレステロール合成酵素のタンパク質発現量。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

ナノサイズ二酸化チタンが皮膚に与える影響の検討

宮澤 真紀(神奈川県衛生研究所)、小林 征洋(神奈川県衛生研究所/東京海洋大)

1. はじめに

二酸化チタン(TiO_2)は、紫外線散乱剤として化粧品等で汎用されており、ナノ化(直径 100nm 以下)することによって透明性が向上し、紫外線防止効果も高まることから、近年では、平均粒径 20~50nm のものが多く配合されている。ヒトにおける TiO_2 の経皮毒性は軽微であることが報告され、動物実験などの毒性値もこれに矛盾するものではない。これらの安全性データから TiO_2 の配合量が決められているが、金属粒子はナノ化することで物性が変化することが知られており、従来の毒性データをそのまま適用することに疑問が呈されるようになった。すなわち、ナノ化することによって TiO_2 の皮膚透過性等が変化し、毒性が高まるのではないかという懸念が 2003 年頃よりおこり、これに伴って、ナノ TiO_2 に関する様々な調査、研究が行われている。

我々は、以前の研究において、ナノサイズの TiO_2 のほとんどが皮膚角質層でブロックされて表皮細胞内には侵入しないが、損傷皮膚では、 TiO_2 は感受性は有しないものの、粒子径に依存して軽度のアジュバント効果および刺激性を有し、炎症を増悪させ、免疫系を賦活化する可能性があることを明らかにした(1)。これは、ナノ化することで表面積が増大し、感受性物質をトラップすることにより暴露時間が長くなったことによる影響と考えられたが、 TiO_2 のみの連続投与によっても表皮細胞層の肥厚が引き起こされることから、ナノ化した TiO_2 は刺激性を有し、皮膚に対して直接および間接的に免疫を増強させる作用を有している可能性が示唆された。

そこで、 TiO_2 を塗布した皮膚についてトランスクリプトーム解析を行い、接触皮膚炎増強のメカニズムを解明することを目的に本研究を実施した。

2. 実験と結果

2.1 方法

2.1.1 検体

一次粒子径 35nm の TiO_2 (シリカ・アルミナ・シリコンコーティング)および一次粒子径 250nm の TiO_2 (シリコンコーティング)を走査型電子顕微鏡を用い観察した。動物実験にはシリコンを媒体として、35nm TiO_2 の 20%(w/w)分散液を調製し、使用した。

2.1.2 動物実験

10 週齢の CBA/JN 雌性マウス (日本チャールズリバー株)を、温度 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、明暗 12 時間の

conventional 環境下で固形飼料(CE-2 日本クレア)及び水(水道水)を自由摂取させた。

マウスの耳介背側部の角質層をセロテープを用いて除去した後、3 日間、シリコンで分散した 20% TiO_2 を塗布した。対照群はシリコンのみを塗布した。最終塗布の翌日解剖し、耳介を市販の化粧落とし用洗浄剤で洗い、両耳介の背側部の表皮および真皮を剥離し、RNAlater に浸漬したのち -20°C で保存した。この材料から各群 4 匹について total RNA を抽出した。定法に従い、DNA Microarray Scanner(Agilent)を用いて遺伝子発現量を測定した。

2.2 結果

2.2.1 走査型電子顕微鏡観察

ナノサイズの TiO_2 の凝集性は従来サイズのものより高く、分散性が皮膚移行に影響を与えるという報告があることから、表面処理を行って分散性を高めた 35nm および 250nm の TiO_2 について、走査電子顕微鏡による表面構造、凝集塊のサイズについて観察を行った。

その結果、粉体では、表面処理を行っていても 35nm TiO_2 は μ 単位の凝集塊を形成していることが明らかになった(図 1)。

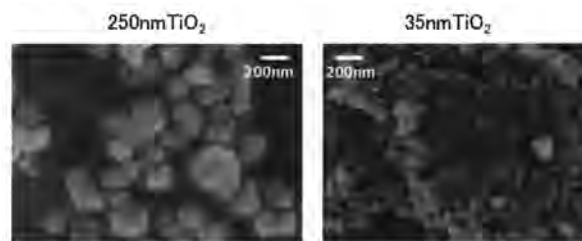


図 1 TiO_2 粉末の走査電子顕微鏡写真

表 1 DNA マイクロアレイ実験に使用した皮膚の RIN

群	No	RIN
シリコン	1	6.1
	2	7.3
	3	6.1
35nm TiO_2	1	7.2
	2	6.1
	3	7.3
	4	6.2

2.2.2 遺伝子発現の測定および解析

精製した mRNA の品質をバイオアナライザを用いて検定した。対照群の 1 匹で、RNA が DNA マイクロアレイに使用できない品質であったため、対照群 3 匹、TiO₂ 群 4 匹について、トランスクリプトーム解析を行った。DNA マイクロアレイ実験に使用したマウスの RIN を表 1 に示す。発現が増加した遺伝子では、サイトカイン活性、ケモカイン活性、角化細胞や表皮細胞の分化、急性の炎症反応、血管新生などに関与する遺伝子の濃縮度が高かった。発現が減少した遺伝子では、好中球、単角球、リンパ球などの増殖、活性化に関わる遺伝子の濃縮度が高かった。

3. 考察及び今後の展望

TiO₂ の粉体は凝集塊を形成していたが、液体内での分散性と皮膚に塗布した場合の分散性は異なると考えられる。今後、皮膚上での酸化チタンの挙動について、走査電子顕微鏡を用いて観察し、凝集塊の大きさ等を測定する必要がある。

テープストリッピング後 TiO₂ 3 回の塗布では、表皮の肥厚等は観察されないにもかかわらず、表皮細胞の増殖、急性炎症に関係する遺伝子が TiO₂ 塗布群で有意に発現していたことから、TiO₂ には炎症を増強し、表皮細胞を肥

厚させる作用があることが明らかになった。しかし、今回 DNA マイクロアレイに使用した RNA の品質は良好なものではなかったため、発現量が多く大きな変動があった遺伝子しか有意差がつかなかった可能性がある。そのため、良好な品質の RNA を抽出する方法の検討を現在行っている。また、テープストリッピングをしない場合も、ナノサイズの TiO₂ の長期塗布により表皮が肥厚することが先行研究において確認されているため、より純粋な TiO₂ の影響を明らかにするために、テープストリッピングを行わないマウス皮膚を用い、ナノおよびミクロンサイズの TiO₂ での変動遺伝子の比較を今後検討する予定である。

謝辞

走査電子顕微鏡写真を撮影していただいた帝京科学大学生命環境学部 井上 嘉氏に深謝します。

【参考文献】

1. 津田洋幸 厚生労働科学研究費補助金研究報告 化学物質リスク研究事業 ナノマテリアルの経皮毒性に関わる評価手法の開発に関する研究, 26-31(2010)

高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液投与の効果

荒木 真由美、青木 信義、廣川 隆彦、瀬戸山 央／神奈川県産業技術センター

1. はじめに

杜仲(トチュウ、*Eucommia ulmoides*)は中国原産の落葉樹であり、その樹皮は古くから生薬として利用され、肝機能、腎機能の強化や高血圧の改善などに効果があるとされている。近年、日本では杜仲の葉を焙煎した健康茶が知られるようになっており、例えば、血圧降下作用⁽¹⁾や血糖値及び血中トリグリセリドの抑制効果⁽²⁾などが報告されている。杜仲の主な有効成分としては、イリドイド化合物のゲニポシド酸、アスペルロシドが知られている他、抗酸化性を有するクロロゲン酸も豊富に含まれている。神奈川県内では、現在は休耕地となっている桑畑の活用方法の一つとして杜仲の栽培が試みられており、産業技術センターも他の機関と連携しながらその活動を支援している。これまでの我々の検討では、高脂肪食及び高フルクトース水給餌ラットにおける血中トリグリセリドの上昇が、杜仲葉熱水抽出液の摂取によって有意に抑制されることを見出した⁽³⁾。

我々は、本プロジェクトにおいて、様々な要因が重積して発症するメタボリックシンドロームに注目しており、本研究では、その要因の一つであるコレステロールの過剰摂取に対する杜仲葉の作用を検討するため、高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液の投与実験を行い、その影響を評価した。

2. 実験と結果

2.1 方法

2.1.1 杜仲葉熱水抽出液の調製

予め沸騰させた蒸留水に、杜仲の生葉を48g/Lの比で加え、30分間煮沸して、杜仲葉熱水抽出液の原液を調製した。この原液を、2.4倍及び5倍に希釈し、水に対する杜仲葉湿重量の比率がそれぞれ4g/L及び20g/Lとなる杜仲葉熱水抽出液を調製した。

2.1.1 モデル動物による機能性評価

4週齢の雄性C57BL/6NCrSlcマウスを普通食(CE-2、日本クレア株式会社)と水で2週間予備飼育後、12匹ずつコントロール群(C群)、杜仲4g/L投与群(T4群)、杜仲20g/L投与群(T20群)の3群に分けた。予備飼育後さ

らに4週間を投与期間とし、全群に2%コレステロール、1%コール酸、5%ヤシ油を含む高コレステロール食D15001、日本クレア株式会社)を4週間自由摂取させた。投与期間中、C群には水を、T4群及びT20群には各杜仲葉抽出液を自由摂水させた。投与期間中、数日おきに各個体の体重及びケージごと(3匹/ケージ)の摂餌量と摂水量を測定した。

表1 モデル実験における各群の飼育条件

	給餌	給水
C群	高コレステロール食	水道水
T4群	高コレステロール食	4g/L 杜仲葉熱水抽出液
T20群	高コレステロール食	20g/L 杜仲葉熱水抽出液

投与期間終了後に血液、胆嚢、胆汁、肝臓を採取し、各種の評価に供した。血液はヘパリン採血後遠心分離して血漿とし、脂質(総コレステロール(TC)、HDL、トリグリセリド(TG)の定量及び肝機能検査項目(GOT、GPT、ALP、LDH、総ビリルビン(TBIL)、直接ビリルビン(DBIL))の測定を行った。また、肝臓中脂質(TC、TG、遊離脂肪酸(FFA)、胆汁中脂質(TC、胆汁酸(TBA))の定量を行った。結果の評価においては、投与期間中の怪我や死亡等のため、数匹の個体を除外し、各群の平均値及び標準誤差を算出した。C群の値を1とし、他の2群はC群に対する相対値を示した。群間の平均値の比較はDunnettの多重比較検定により行い、両側検定で $P < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

2.2 結果

2.2.1 体重及び肝臓の所見

投与期間中の群間の総摂餌量、総摂水量に有意な差はなかった。図1に体重当たりの肝臓重量を示した。以前に我々が行った実験における普通食・水投与群のデータと比較すると、高コレステロール食の投与により体重当たりの肝臓重量は大きくなった。今回の群間で比較すると、C群に比べ2つの杜仲投与群では体重、肝臓重量が大きい傾向が見られたが、群間に有意な差は見られなかった。

各群の肝臓の外観を比較すると、T4、T20群に比べ、C群では白みがかっている肝臓が多かった。どの群において

も、脾臓が黒っぽく収縮している個体や胆嚢が肥大している個体が見られた。

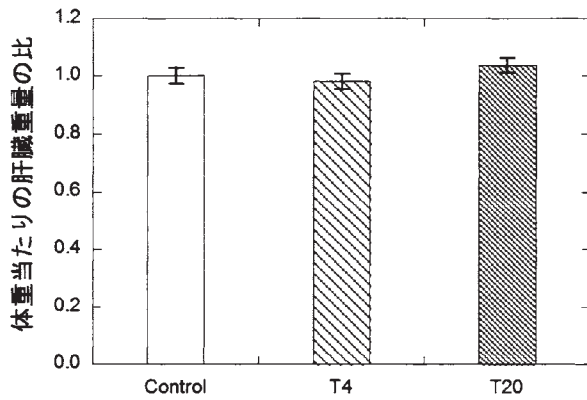


図1 体重当たりの肝臓重量に対する杜仲葉熱水抽出液の影響

2.2.2 肝臓及び胆汁の生化学検査

各群の肝臓中 TC を図2 に示した。C 群に比べて杜仲投与群では濃度依存的に肝臓中 TC が低い傾向が認められたが、有意差はなかった。

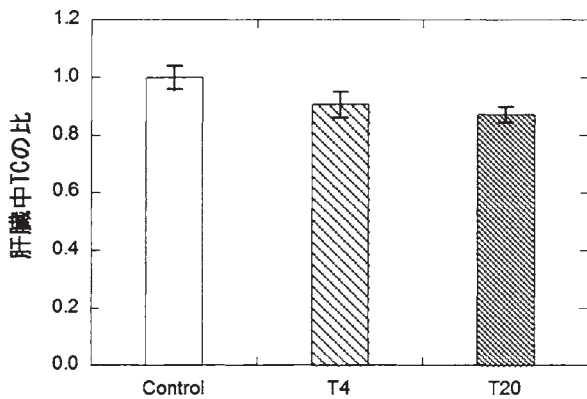


図2 肝臓中 TC に対する杜仲葉熱水抽出液の影響

各群の肝臓中 TG 及び肝臓中 FFA をそれぞれ図3 及び図4 に示した。これらの値は、TC の場合よりも杜仲葉熱水抽出液の影響がさらに明確に認められ、杜仲葉熱水抽出液を与えた場合、TG の場合1 割から3 割、FFA の場合 C 群に比べて2 割から3 割、杜仲葉抽出液の濃度が高いほど値が低かった。特に FFA の T20 群では C 群に比べ FFA が有意に低く抑えられていた。

一方、胆汁中 TC 及び TBA は、C 群に比べ杜仲投与群の値が高い傾向が認められた。図5 に胆汁中 TC を示した。T4 群及び T20 群は C 群に比べて5 割以上高い値を示したが、有意な差はなかった。

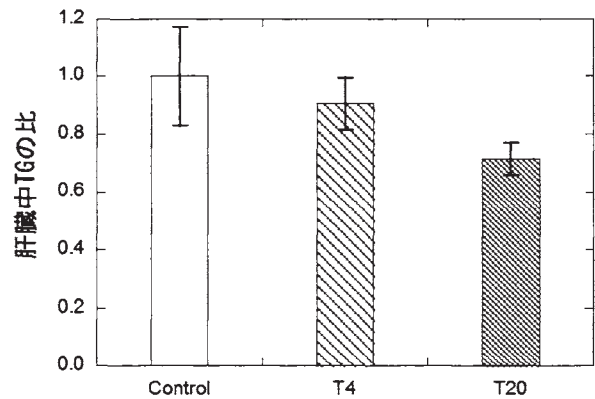


図3 肝臓中 TG に対する杜仲葉熱水抽出液の影響

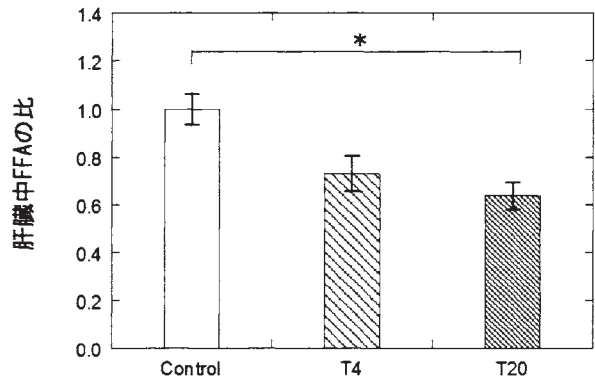


図4 肝臓中 FFA に対する杜仲葉熱水抽出液の影響

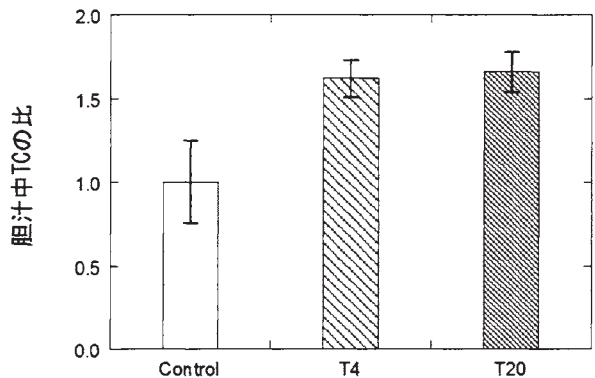


図5 胆汁中 TC に対する杜仲葉熱水抽出液の影響

2.2.1 血漿の生化学検査

血漿中脂質濃度を表2 に示した。この2 項目のうち TC については図6 にも示した。TC 及び TG は C 群及び T20 群より T4 群の方が低い傾向が見られた。TC については C 群と T20 群は同等、TG については T20 群の値が C 群に比べ

2 割程度低かった。HDLCはC群及びT4群よりT20群が高い傾向が見られた。ただし、上記の群間の比較には何れも有意差はなかった。

表2 血漿中脂質濃度に対する杜仲葉熱水抽出液の影響

検査項目	T4群	T20群
TC*	0.82	1.01
HDLC	1.03	1.21
TG	0.60	0.78

* 図6にも示した。

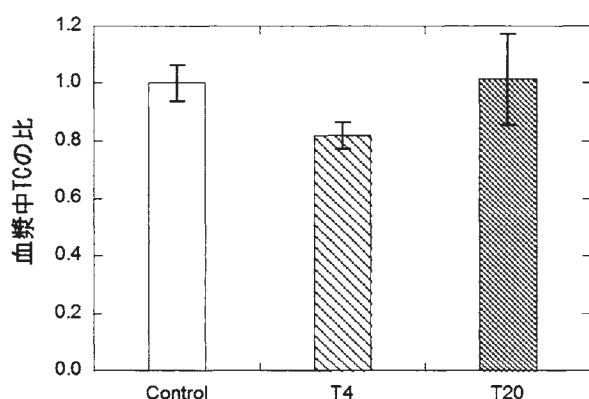


図6 血漿中TCに対する杜仲葉熱水抽出液の影響

血漿中肝機能検査項目値を表3に示した。何れもC群及びT20群に比べT4群で値が低い傾向だった。ほとんどの項目は、C群に比べT4群で顕著に低く、特にGOTやGPT、DEI LはC群の二分の一程度の値であった。ALPについては、T20群はC群に比べ2割程度値が低かったが、その他の項目ではT20群はC群と同等又は同等以上であった。上記の群間の比較において有意な差は認められなかった。

表3 血漿中肝機能検査項目値に対する杜仲葉熱水抽出液の影響

検査項目	T4群	T20群
GOT	0.53	1.18
GPT	0.48	1.34
ALP	0.69	0.78
LDH	0.71	1.37
TEI L	0.75	1.15
DEI L	0.57	1.35

いずれもC群の値に対する比を示した。

3. 考察及び今後の展望

高コレステロール食給餌マウスに杜仲葉熱水抽出液を投与すると、有意な差は無いものの、濃度依存的に肝臓中TC、肝臓中TG及び肝臓中FFAが低くなり、逆に胆汁中TC及びTBAが高くなる傾向が見られた。この現象のメカニズムとしては、杜仲投与群では、コレステロールの肝臓から胆汁中への排出及びコレステロールの胆汁酸への変換が促進されることにより、肝臓中のコレステロール濃度が低く抑えられ、胆汁中のコレステロール及び胆汁酸濃度が高くなったことが考えられる。肝臓中のコレステロール濃度の低下については、杜仲投与群では腸管におけるコレステロールの吸収が阻害されるメカニズムも想定され、今後、フン中脂質の定量やDNAマイクロアレイを活用した遺伝子発現の検討により明らかにしていく予定である。

我々が以前に行った実験での普通食・水投与群のデータと比較すると、高コレステロール食を摂取することで、肝機能検査項目値及び血漿中TCは高くなり、血漿中TG、HDLCは低くなった。これらの項目値に対する杜仲葉熱水抽出液摂取の影響については、有意差はないものの、特にT4群で肝機能検査項目値がC群やT20群に比べて改善する傾向が見られ、杜仲葉熱水抽出液は一定量の摂取で肝臓保護作用があることが示唆された。この傾向は、血漿中TCとよく一致していることから、何らかの関連がある可能性も考えられる。一方、肝臓中脂質の杜仲投与量に依存した傾向とは異なっている。すなわち、肝機能検査項目及び血漿中TCに対する杜仲葉熱水抽出液の影響は、肝臓中脂質への作用とは異なるメカニズムに由来していることが推定される。これらのことについても、詳細については未解明であり、こちらについても遺伝子発現解析を含めた検討を進めていく予定である。

【参考文献】

1. 中沢慶久他、Natural Medicines, 51(5)392-398 (1997).
2. 仲佐輝子他、日本農芸化学会誌 Vol. 69, No. 11, 1491-1498 (1995).
3. Kobayashi Y., et al., J. Sci. Food Agric., 92(2), 358-65 (2012).

湘南ゴールドの機能性評価

神奈川県農業技術センター

曾我綾香・吉田誠

1. はじめに

‘湘南ゴールド’は2003年に神奈川県農業技術センターで品種登録した柑橘である。1988年に‘今村温州’と‘黄金柑’を交配して得られた実生の中から選抜・育種した品種で、樹や果実の特性から‘黄金柑’の珠心胚実生と考えられている。果形は球形で、‘黄金柑’より大きく、平均77gである。果皮は黄色で、薄く、果面が滑らかで剥皮しやすい。果肉も黄色く、柔軟多汁で、風味がよい。収穫期は3月であり、神奈川県の新しい柑橘として注目を集めている¹⁾。現在、‘湘南ゴールド’について、栽培、品質特性²⁾、品質保持³⁾、非破壊品質評価⁴⁾などの研究を行い、その普及振興を図っている。その一環として‘湘南ゴールド’の機能性評価研究を行っているのでその一部を報告する。

2. 湘南ゴールドの品質

‘湘南ゴールド’の一般成分評価を行いその特徴を把握するとともに、機能性成分として期待されるフラボノイド類等の分析調査を行った。

2.1 湘南ゴールドの一般成分

‘湘南ゴールド’の一般成分として食味関連物質の分析を行い、交配親系統‘黄金柑’、同時期に収穫される晩柑‘清見’、そして普通温州ミカン‘大津四号’と比較した。柑橘類の食味関連成分は、収穫時期や栽培条件等により変化するため、分析結果の一例を表1に示した。糖度は、普通温州ミカンと同等であり、クエン酸含有量は比較的高い。構成糖の比は、温州ミカンが概ねショ糖：ブドウ糖：果糖＝70:15:15であるのに対し、‘湘南ゴールド’では、おおよそ60:20:20であった。

2.2 湘南ゴールドの香り

‘湘南ゴールド’は爽やかな柑橘の香りが特徴の一つである。そこで、香り成分の特徴を明らかにするため、ヘッドスペース法により香り成分の分析を行った。分析は、果皮と果汁について行った。果皮で10成分、果汁で5成分

の主な物質が定性できた(図1)。果皮の主な成分は、リモネン、 α -ピネン、 β -ミルセン、3-カレンであり、組成は‘黄金柑’と類似していた。果汁では、リモネン、酢酸エチルが多く含まれ、リモネンの存在割合は‘黄金柑’よりも高かった。一般成分同様に、‘黄金柑’、‘清見’と比較すると、果皮香り成分は‘黄金柑’と類似していたが、‘果汁’では異なっていた。

2.3 湘南ゴールドの機能性関連物質

機能性関連物質として、柑橘類で想定される、アスコルビン酸、カロテン類(β -クリプトキサンチン、 β -カロテン)、フラボノイド類(ナリルチン、ヘスペリジン)の分析調査を行った。アスコルビン酸は、‘黄金柑’と同等であり一般的な温州ミカンと同程度であった。 β -クリプトキサンチンは、果皮・果肉が黄色である‘湘南ゴールド’、‘黄金柑’は含まれていなかったが、橙色の‘清見’は含まれていた。また、 β -カロテンは、3品種とも含まれていた(表2)。フラボノイドは、ナリルチンとヘスペリジンが主要成分であった。

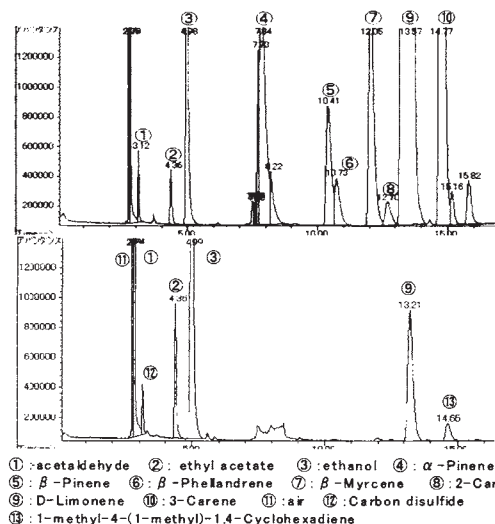


図1 湘南ゴールド果皮(上), 果汁(下)のヘッドスペースガストータルイオンクロマトグラム

品種	糖度	ショ糖	ブドウ糖	果糖	遊離糖	クエン酸
湘南ゴールド	12.9	6.5	1.9	2.2	10.6	1.69
黄金柑	14.4	8.6	2.0	2.4	13.0	2.34
清見	11.2	5.3	1.6	2.1	9.0	1.45
温州ミカン	12.7	7.7	1.6	1.9	11.2	0.89

表2 湘南ゴールド等柑橘果汁中のカロテノイド

品種	カロテノイド		
	アスコルビン酸 (mg/100ml)	β -クリプトキサンチン (μ g/100ml)	β -カロテン
湘南ゴールド	36	0	181
黄金柑	37	0	358
清見	61	134	433

表3 湘南ゴールド等柑橘のフラボノイド (mg/g d.w)

品種	果皮		果肉	
	ナリルチン	ヘスペリジン	ナリルチン	ヘスペリジン
湘南ゴールド	65.3	54.6	12.7	5.8
宮川早生 ²⁾	10.3	60.8	3.3	6.1
青島温州	8.5	39.5	5.1	6.4
清見	7.8	38.3	2.8	5.2

2) 宮川早生、青島温州、清見のデータは平成19年度関東東海北陸農業研究成果情報(三重県)より引用

表4 湘南ゴールドと黄金柑のORAC値
(μ mol Trolox当量/g d.w)

品種	ORAC値	
	果皮	可食部
湘南ゴールド	959	250
黄金柑	913	302

他の柑橘と比較すると果皮、果肉ともナリルチンが多く含まれていた。また、果皮ヘスペリジンは、‘清見’、普通温州ミカンである‘青島’よりも多く、‘宮川早生’と同程度であった(表3)。

‘湘南ゴールド’の部位別フラボノイド含有量は、ナリルチン、ヘスペリジンともに、アルベド(内果皮) > じょうのう膜 > フラベド(外果皮) > 砂じょう(果肉)の順であった。また、未熟果と成熟果では、若干未熟果でフラボノイド類が多い傾向にあった。

2.4 機能性の検索

‘湘南ゴールド’の機能性の探索の一環として、抗酸化活性評価を行った。‘湘南ゴールド’及び‘黄金柑’の果皮と可食部それぞれについてORAC法により抗酸化活性を評価した。その結果、ORAC値は表4のとおりであった。果皮では‘湘南ゴールド’が、可食部では‘黄金柑’がORAC値が若干高く抗酸化活性が高かった。食品のORACデータベースによるとネーブルオレンジ可食部のORAC値は120(μ mol TE/g d.w)となっている。この値と比較すると‘湘南ゴールド’可食部は約2倍の抗酸化活性を有していた。

3. 考察及び今後の展望

神奈川県農業技術センターで育成したカンキツ新品種‘湘南ゴールド’の特性を明らかにするために種々の品質評価を行った。一般成分等では、糖組成が普通温州ミカンと異なっていること、クエン酸含有量が高いこと、香氣成分組成が‘黄金柑’に近いことなどがその食味の特徴を決めていると思われた。現在、‘湘南ゴールド’の良食味判定基準の策定のため、官能検査を実施している。また高品質果実の選別のための非破壊評価法の開発を行っている。

カンキツ類には、アスコルビン酸やカロテノイド類以外にもフラボノイドが多く含まれ、オレンジやグレープフルーツにはヘスペリジンやナリルチンが多く含まれている。フラボノイド類には、抗酸化性、抗変異原性、抗がん性、血圧上昇抑制作用、血清脂質低下作用、抗菌・抗ウイルス作用、抗アレルギー作用等が報告されている⁵⁾。また、欧米の疫学調査から、これらのフラボノイドの摂取量が多いグループでは、がんや心筋梗塞等による死亡率が低下することなどが報告されている⁶⁾。

‘湘南ゴールド’においても、ヘスペリジンやナリルチンが多く含まれ機能

性が期待される。また、木村らはカンキツ‘ジャバラ’が強い脱顆粒抑制効果があり、‘ジャバラ’に多く含まれるナリルチンが抑制物質のひとつであると報告している⁷⁾。‘ジャバラ’のナリルチン含有量は、果皮、果汁でそれぞれ66、11mg/g d.w.という報告がある⁸⁾。‘湘南ゴールド’もほぼ同等のナリルチンを含んでおり、脱顆粒抑制いわゆる抗アレルギー作用も期待される。今後検討を行いたい。

本報告では、強い抗酸化活性を持っていることを報告した。これは、アスコルビン酸や β -カロテン、フラボノイド類など様々な物質の複合作用であると考えられる。他のカンキツや食品との比較評価を行い、その評価を確実なものとしたい。

‘湘南ゴールド’には、成分評価あるいは抗酸化活性評価の結果からも様々な機能性が期待される。今後、DNAマイクロアレイによるゲノミクス解析によりその機能性を明らかにしたい。

神奈川県農業技術センターでは、新カンキツ‘湘南ゴールド’の増産のため、栽培方法、品質評価、品質保持方法の研究など多方面からその研究にあっている。

【参考文献】

- 1) 真子正史, 鈴木真一, 鈴木誠, 他, 神奈川農総報 145,35-41(2004)
- 2) 曾我綾香, 吉田誠, 浅田真一, 園学研7別2, 633(2008)
- 3) 曾我綾香, 平成20年度助成による研究成果要約, (財)園芸振興松島財団, 10-13(2011)
- 4) M.Yoshida, A.Soga, S.Kawano, Proceeding of the 14th International Conference on NIR Spectroscopy, 281-284(2010)
- 5) Middleton E Jr, et al., Pharmacol. Rev., 52, 673-751(2000)
- 6) 食品機能性の科学, 食品機能性の科学編集委員会, フジ・テクノシステム p185(2008)
- 7) 木村美和子, 山西妃早子, 尾崎嘉彦, 実宝智子, 和歌山工技研報, H15, p1-2(2003)
- 8) 農水産物機能性活用推進事業報告書, (財)食品産業センター, 60(2010)

業 績

【原著論文】

1. Oda, Y., Ueda, F., Kamei, A., Kakinuma, C., and Abe, K. Biochemical investigation and gene expression analysis of the immunostimulatory functions of an edible *Salacia* extract in rat small intestine. *BioFactors*. 37, 31-39(2011)
2. Nakai, Y., Sato, B., Ushiyama, S., Okada, S., Abe, K., and Arai, S. Hepatic oxidoreduction-related genes are upregulated by administration of hydrogen-saturated drinking water. *Biosci Biotechnol Biochem*. 75, 774-776 (2011)
3. Ueno, Y., Sakurai, T., Okada, S., Abe, K., and Misaka, T. Human bitter taste receptors hTAS2R8 and hTAS2R39 with differential functions to recognize bitter peptides. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75, 1188-1190(2011)
4. Nakajima, K., Yokoyama, K., Koizumi, T., Koizumi, A., Asakura, T., Terada, T., Masuda, K., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., and Abe, K. Identification and modulation of the key amino acid residue responsible for the pH sensitivity of Neoculin, a taste-modifying protein. *PLoS One* 6, e19448(2011)
5. Yao, R., Yasuoka, A., Kamei, A., Kitagawa, Y., Rogi, T., Taieishi, N., Tsuruoka, N., Kiso, Y., Misaka, T., and Abe, K. Polyphenols in alcoholic beverages activating constitutive androstane receptor CAR. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75, 1635-1637(2011)
6. Nakajima, K., Koizumi, A., Iizuka, K., Ito, K., Morita, Y., Koizumi, T., Asakura, T., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., and Abe, K. Non-acidic compounds induce the intense sweet taste of neoculin, a taste-modifying protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75, 1600-1602(2011)
7. Watanabe, Y., Kamei, A., Shinozaki, F., Ishijima, T., Iida, K., Nakai, Y., Arai, S., and Abe, K. Ingested Maple syrup evokes a possible liver-protecting effort — physiologic and genomic investigations with rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 75, 2408-2410(2011)
8. Koizumi, A., Tsuchiya, A., Nakajima, K., Ito, K., Terada, T., Shimizu-Ibuka, A., Briand, L., Asakura, T., Misaka, T., and Abe, K. Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(40):16819-24(2011)
9. Ishii, S., Kishi, M., Yamagami, K., Okada, S., Abe, K., and Misaka, T. The use of Mammalian cultured cells loaded with a fluorescent dye shows specific membrane penetration of undissociated acetic Acid. *Biosci Biotechnol Biochem*. 76(3):523-9. (2012)

【口頭発表】

1. 亀井飛鳥、鉄摂取量安全性基準の考証—ラット肝臓遺伝子発現解析より、ILSI Japan 30周年記念 第6回「栄養とエイジング」国際会議（機関誌「イルシー」108号にプロシーディングス掲載）（2011年9月30日 東京）
2. Keiko Abe: Studies on Food Functionality and Safety in Japan- Evaluation by Genomics. ICoFF2011 (International Conference on Food Factors) (2011.11.20 Taiwan)
3. Keiko Abe: Effect of maple syrup extract (MSE)—Global analysis of hepatic gene expression profiles in diabetes model KK-Ay mice. Canada メープル製品生産者協会 (2012.3.15 Canada)
4. 牛尼翔太、石島智子、阿部啓子、中井雄治、摂食によりラット末梢組織で生じる遺伝子発現変動の時系列解析、日本農芸化学会 2012年度大会 (2012年3月23日 京都)
5. 原田尚志、牛尼翔太、石島智子、阿部啓子、中井雄治、人工甘味料の長期的摂取によるラット生体への影響、日本農芸化学会 2012年度大会 (2012年3月23日 京都)
6. 飯田晃太、林 ちひろ、渡部由貴、亀井飛鳥、石島智子、阿部啓子、中井雄治、メープルシロップ抽出物が糖尿病モデルマウス肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響、日本農芸化学会 2012年度大会 (2012年3月24日 京都)
7. 姚 瑞卿、安岡顕人、櫛木智裕、北川義徳、柴田浩志、阿部啓子、三坂 巧、セサミンとエピセサミンの投与によるマウス肝臓の遺伝子発現変動の比較解析、日本農芸化学会 2012年度大会 (2012年3月24日 京都)
8. 養田直倫、星 雅子、田村倫子、石丸喜朗、阿部啓子、朝倉富子、シロイヌナズナ由来シグナルペプチドペプチダーゼ (AtSPP) の過剰発現株を用いた網羅的遺伝子発現解析、日本農芸化学会 2012年度大会 (2012年3月24日 京都)
9. 阿部美樹、石丸喜朗、朝倉富子、今井啓雄、阿部啓子、アカゲザル味覚関連遺伝子群の茸状・有郭乳頭味蕾における発現解析、日本農芸化学会 2012年度大会 (2012年3月24日 京都)
10. 亀井飛鳥、渡部由貴、篠崎文夏、荒井綜一、阿部啓子、ニュートリゲノミクスによる鉄安全摂取基準アセスメント、日本農芸化学会 2012年度大会 (2012年3月25日 京都)
11. 篠崎文夏、亀井飛鳥、渡部由貴、荒井綜一、熊谷弘太、阿部 岳、阿部啓子、特殊な組成のアミノ酸サプリメントを経口投与したマウスの肝臓発現プロファイリング、日本農芸化学会 2012年度大会 (2012年3月25日 京都)

月 25 日 京都)

12. 林 ちひろ、石島智子、阿部啓子、中井雄治、高リン食摂取ラット腎臓の遺伝子発現に対するホエイタンパク質の影響、日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012 年 3 月 25 日 京都)
13. 中村紀章、石島智子、阿部啓子、中井雄治、短期間のマグネシウム欠乏食摂取ラットにおける肝臓の遺伝子発現解析、日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012 年 3 月 25 日 京都)
14. 千 善宇、石島智子、陶山達也、阿部啓子、中井雄治、高リン食摂取がラット肝臓に及ぼす影響の DNA マイクロアレイによる解析、日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012 年 3 月 25 日 京都)
15. 米光翔吾、石島智子、中村紀章、阿部啓子、中井雄治、分離大豆タンパク質がマグネシウム欠乏ラットに及ぼす生理効果の解析、日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012 年 3 月 25 日 京都)
16. 荒木 真由美、宮澤 真紀、瀬戸山 央、廣川 隆彦、青木 信義、安間 智慧子、小林 征洋、亀井 飛鳥、阿部 啓子、高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液投与の効果、日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012 年 3 月 24 日 京都)

【記者発表】

阿部啓子、メープルの機能性-ニュートリゲノミクスに基づく成果報告、ケベック・メープル製品生産者協会による Maple Press Seminar(2011 年 9 月 12 日:報道向け記者会見、恵比寿、13 日:企業向け記者会見、カナダ大使館)

平成 23 年 度 研 究 概 要

平成24年 7月24日発行

発 行 財団法人神奈川科学技術アカデミー
川崎市高津区坂戸 3 - 2 - 1 / 〒213-0012
TEL (044) 819 - 2034
印 刷 株式会社ポートサイド印刷
TEL (045) 776 - 2671

● 無断転載・複製を禁じます。