

短期集中型実用化プロジェクト  
安田「オンチップ・セラミクス」  
プロジェクト

# オンチップ・セロミクスプロジェクト

プロジェクトリーダー 安田 賢二

## 【基本構想】

平成 20 年度より開始した 4 年間の創造展開プロジェクトで開発を推進した 1 細胞分子計測技術の各要素技術に関する開発成果を受け、平成 24 年度よりこれを受け継いでスタートした短期集中型実用化プロジェクトでは、この応用展開として「がん診断」を主要なターゲットとした診断システムの開発を推進している。具体的には、(1) がんの予防診断、がん細胞種同定による薬物療法診断、術後再発予防診断としての展開の可能性がある血中循環がん細胞 (Circulating tumor cell, CTC) の検出解析技術の開発と、(2) がんの原発巣と転移巣を同定し、かつ、がんの発生転移メカニズム解明を進めるための組織中がん細胞精密空間分布計測技術の開発を推進する。

具体的には、①サンプル中に存在する微量の標的細胞を非侵襲で、特異的かつ精密に標識することが可能なサンプル前処理プロトコルの開発、②標識を行った細胞を多量の血液から 1 細胞レベルで高精度に検出し、この標的細胞を高速かつ高収率で回収する技術の開発に加えて、サンプルに全く標識を施すことなく、画像取得による細胞の形状情報をもとに標的細胞を発見する細胞認識技術の開発、③回収した微量の標的細胞の種類や分子発現状態、細胞機能を 1 細胞単位で超高速解析する技術の開発、④組織切片中のヘテロな細胞集団の中から様々な特徴を持った標的細胞の空間分布を、蛋白質や遺伝子レベルでの分子発現計測により精密に分類同定する技術の開発、の 4 つの課題について研究を推進する。

これらの技術の開発によって、次世代のがん診断技術に必要な技術の原理開発を進め、実用化に必要な原理技術を確立した上で、産業化の可能性を明らかにすることが本プロジェクトの目的である。

## 1. 本研究の目的と平成 24 年度の目標

平成 20 年度より開始した 4 年プロジェクトである「1 細胞分子計測」創造展開プロジェクトでは、「ナノメートルスケールでの細胞の時空間情報の計測」を実現する 1 細胞解析技術の開発と、その解析技術による「生命システムの理解」「医療・創薬への応用展開」を目的に研究開発を進めてきた。特に、4 年間のプロジェクトを、前半 2 年間は要素技術の原理検証と基本技術の開発、後半 2 年は要素技術の融合と解析技術の完成という 2 段階での研究開発ステップで計画し、その計画に沿って開発を推進してきた。特にプロジェクト後半 2 年間は、開発した要素技術の応用用途候補として、血中循環がん細胞 (Circulating tumor cells, 以下 CTC) 計測システムの開発を推進した。その開発推進の延長として平成 24 年度より開始した 2 年のプロジェクトである「オンチップ・セロミクス」短期集中型実用化プロジェクトでは、引き続き CTC 計測システムの開発を推進しつつ、産業化への橋渡しのための道標をより具体的に示すべく、各要素技術の課題抽出と解決のための技術評価を進めている。

以下に、短期集中型実用化プロジェクトで設定した 4 つの研究課題と平成 24 年度の各研究項目に対する目標について、具体的に説明する。

### (1) 課題 1 : 標的細胞前処理技術の開発

本課題では、血液中に存在する CTC など、微量の細胞を取りこぼすことなく効率的に発見することが可能なサン

プル前処理プロトコルを開発する。多量に存在する不要細胞の効率的除去技術、標的細胞にのみ標識を施すための標識作製技術と選択的標識技術、さらには回収後を見据えて標識した細胞から標識物を取り除くことが可能な可逆的細胞標識技術について、開発を推進する。

平成 24 年度の目標としては、CTC の可逆的標識の実現を見据えた新しいアプタマー精製技術の評価を開発目標とした。

### (2) 課題 2 : 末標的細胞画像ベース識別・回収技術の開発

本課題では、蛍光標識による細胞の検出に加えて、細胞に全く標識を施すことなくインタクトな状態のまま、細胞の形状情報に基づいて標的細胞を同定する技術を開発する。さらに検出のみでなく、発見した標的細胞の回収技術についても、マイクロファブリケーション技術に基づいた細胞回収法により細胞を選択回収する技術を開発する。

平成 24 年度の目標としては、多様な種類の CTC を網羅的に識別検出するための細胞同定条件の探索と、それを実現するための装置試作を開発目標とした。

### (3) 課題 3 : 標的細胞機能解析技術の開発

本課題では、回収した微量の細胞に対して遺伝子発現やマーカー分子発現、生理機能などの解析を行うことにより、回収した細胞の種類や機能的特徴を特定する技術開発を行う。特に微量の細胞から効率的かつ高い信頼性で機能解析を行うための、高速遺伝子解析技術開発を推進する。

平成 24 年度の目標としては、遺伝子解析技術として高速 PCR システムの機能検討と原理検証、さらに組織切片中の微量細胞を機能保持したまま回収して機能解析を行う技術評価を、開発目標とした。

#### (4) 課題 4 : 組織切片中の 1 細胞の機能情報を分子レベルで解析するためのマルチレベル技術と電顕技術の開発技術の開発

本課題では、組織切片中でヘテロに分布する細胞集団からターゲット細胞の空間分布を、細胞表面に発現している多数の蛋白質の構成の組み合わせや、細胞内発現遺伝子の組み合わせから、1 細胞レベルで詳細に解析する技術を開発する。このため、ひとつの細胞が発現する DNA やタンパク質等の標的分子を金属微粒子で標識し定量同時検出するプロトコルを開発する。

平成 24 年度の目標としては、検出対象の細胞表面ターゲット分子を金属微粒子で標識した後、電界放射形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) で識別検出を行う際、粒径や粒子作製法の違いによる誤差の精度評価を、開発目標とした。

## 2. 平成 24 年度の研究成果

平成 24 年度目標に対する研究成果の概要を、課題ごとにまとめて報告する。

#### (1) 課題 1 の成果 : 標的細胞前処理技術の開発

これまでの研究成果からモデル DNA アプタマーを利用して細胞を選択的に標識した後、DNA 分解酵素処理を行うとアプタマー分解により脱標識を行うことが可能で、かつ細胞へのダメージも無いため再培養と増殖が可能であることが示されている (特許成立済)。次の課題としては、標識を望むターゲット細胞表面に特異的に結合するアプタマーを如何に精製するかという、細胞表面ベースの DNA アプタマー精製方法の開発と原理検証であったが、我々はオリジナルの精製法を考案することに成功し (特許出願済)、今回、モデル培養細胞を用いて原理検証を行った結果、標識を望む細胞の表面にのみ選択的に結合する DNA アプタマーを精製可能であることが実証された。

#### (2) 課題 2 の成果 : 標的細胞画像ベース識別・回収技術の開発

多様なバラエティを有するがん細胞を如何に網羅的に検出同定するかが、CTC 診断技術の実現への鍵である。従来から利用されている、がん細胞のみが発現するがんマーカー分子を選択的に蛍光標識して検出する技術に加えて、今回我々はがん細胞の形状的な特徴を画像情報から取得して正常な血液細胞と識別し検出するためのプロトコル開発と装置改良を進めた。多角的な視点からがん細胞の特徴を抽出するために、マルチビュー計測システムの開発を進めた結果、サンプル中に含まれる細胞の明視野画像情報 (通常の顕微鏡画像情報) と細胞核形状情報 (細胞核を蛍光染色した蛍光画像) を同時取得し、かつリアルタイム画

像処理により細胞全体と細胞内小器官の形状の特徴を抽出した上で、条件に合致する細胞を回収する装置システム試作に成功した。培養がん細胞をモデルとして計測を行った結果、細胞核の形状が異常な細胞を明確に検出可能であることが実証された。

#### (3) 課題 3 の成果 : 標的細胞機能解析技術の開発

これまでの研究により、PCR 増幅を行う際の温度変化時間を極限まで短縮することにより、40 サイクルの増幅を 3 分未満で完了するリアルタイム PCR 装置の試作に成功しているが (特許成立済)、今回、装置の実用化に向けたより多彩な測定プロトコルに対応するために、2 温度ステップ PCR システムの改良として 3 温度ステップ型 PCR システムの試作と動作検証に成功した。また、操作が簡単で誰でも扱うことができ、スペースもとらずコンパクトな普及型装置の試作開発を推進した結果、デスクトップ型のオールイン小型リアルタイム PCR 装置製作に成功した。

また細胞機能を保持したまま微量細胞を回収して機能解析を行う技術開発では、アルギン酸レイヤー上に細胞を培養した上で目的の細胞近傍のアルギン酸のみを分解しピペットで細胞を回収する技術を開発した (特許出願済)。神経細胞や心筋細胞などをモデルとして実験を行った結果、神経発火や心筋拍動といった細胞機能を保持したまま細胞回収を行うことができることが実証された。

#### (4) 課題 4 の成果 : 組織切片中の 1 細胞の機能情報を分子レベルで解析するためのマルチレベル技術と電顕技術の開発技術の開発

平成 20 年度より創造展開プロジェクトにおいて様々な粒径、元素のナノ粒子標識セットの開発、および FE-SEM 反射電子計測による識別解析技術の開発推進成果 (特許出願済) について、特に膜厚や粒径が異なる金属ナノ粒子を FE-SEM 反射電子計測した際の誤差について定量評価した。その結果、粒径が 1.5 倍異なる場合の同元素種金属ナノ粒子の反射電子輝度コントラスト差は 15%程度であるため、粒子作製の際に正確な粒径コントロールを行う必要性が示唆されたが、我々の微粒子作製技術を用いれば誤差 3%以下で同一粒径微粒子を作製可能であり、我々の技術が FE-SEM 反射電子計測用標識プローブ作製に適していることが実証された。

## 3. まとめ

以上、平成 24 年度の成果概要をまとめたが、当初研究計画に沿って要素開発技術は予定通り進行している。今後は一層の開発推進と各課題開発成果の融合を進め、前処理から解析までが一体となった CTC 診断システムの試作開発と原理検証、実用化への橋渡しを進める予定である。

最後に、本プロジェクト推進にあたり、スタッフとして精力的に協力してくださった研究補助員の皆様、KAST 研究支援グループ、知財グループの皆様の御協力に、プロジェクトグループを代表して心よりお礼を申し上げます。

# 細胞表面特異的結合 DNA アプタマーの開発

寺菌 英之、金 賢徹、竹井 弘之、安田 賢二

## 1. はじめに

アプタマーとはDNAあるいはRNA等の核酸の一本鎖からなる物質で、その配列によりタンパクを含む様々な物質に特異的に結合し、抗体に似た性質を示す。そのため、アプタマーに蛍光標識を施すことによりある特徴を持った細胞を標識することができる。

アプタマーの大きな特徴として、①人工核酸で合成可能なため、抗体に比べ品質が安定で大量に生産可能なこと、②核酸分解酵素 (DNase/RNase) によって分解すること、である。②の核酸分解酵素による分解はアプタマーを薬剤として使用する場合など効果の持続を目的とした用途としては分解されにくい処理を施されるが、逆に、細胞を特定する標識剤として利用する場合などにおいては、細胞への障害性が少ない可逆的な細胞標識方法として利用することが出来る。抗体など一度ラベリングしてしまえば剥がすことが難しく、タンパク分解酵素や pH 変化が脱標識使用すると細胞へ障害を与える。我々はこれまでに②の性質を活かして一度標識した細胞に負荷を与えることなく脱標識する新規の技術を開発した[1]。その結果、前年度に報告したとおり、アプタマーによる細胞表面の標識・脱標識を細胞障害性なく可逆的に行う事が出来た。

近年、iPS 細胞、ES 細胞、がん幹細胞の研究領域において、細胞集団は同じ性質を持った細胞集まりではなく一細胞毎に個性を持った細胞の集まりであり、それぞれの細胞周期や分化程度は異なることが明らかとなってきた。また、集団の中で鍵となる極少数の細胞が極めて重要な役割を果たすことが近年明らかになりつつある[2, 3]。

そこで、我々は様々な種類が混在する細胞集団から特定の細胞を非侵襲的に回収するため細胞表面特異的に結合する DNA アプタマーの作製を試みた。

## 2. 実験と結果

### 2.1 Cell-surface-SELEX 法による細胞表面特異的 DNA アプタマーの作製

DNA アプタマーを作製する手法としては対象物と約  $10^{24}$  種類の一本鎖 DNA からなる核酸ライブラリーを混ぜ、結合した物だけを回収する試験管内進化法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment: SELEX 法) を用いて行われる。対象物が細胞であり細胞表面物質をターゲットにした場合で行う事を Cell-SELEX と呼んでいる。通常の Cell-SELEX 法は核酸ライブラリーと細胞を反応させた後、結合したアプタマーと細胞を丸ごと

回収し、精製作業を行っていた。しかしながらこの作業は核酸ライブラリーが細胞内部のタンパク質と反応するため細胞表面以外のアプタマーも回収してしまう。そのため、我々は SELEX による精製過程において細胞をつぶさずにタンパク分解酵素で細胞表面のタンパク質を分解するだけで細胞表面に結合した DNA アプタマーを回収する作業を行い、SELEX を行った。さらに、SELEX の工程を終えたあと、回収した DNA アプタマーの塩基配列をその工程を以下に示す

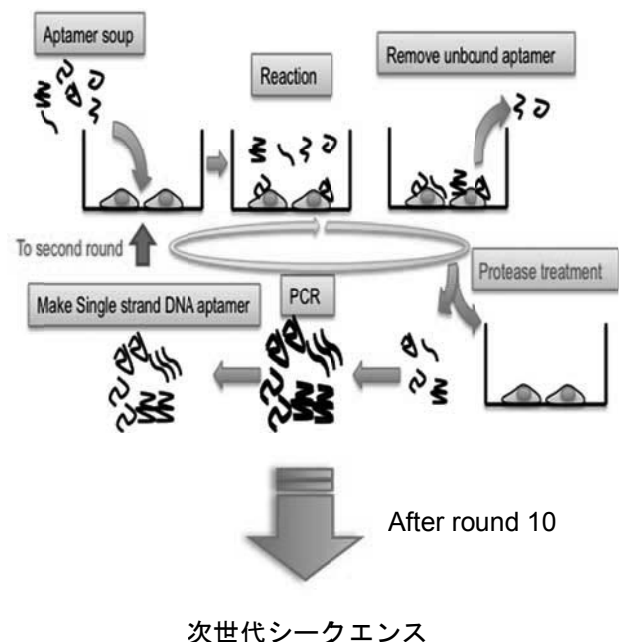


図 1. Cell-surface-SELEX の方法。アプタマースープと呼ばれる核酸ライブラリーをターゲット細胞に暴露させ結合してないアプタマーを除いた後、タンパク分解酵素にて細胞表面のタンパク質のみ消化し、結合アプタマーを回収する。その後、遺伝子増幅を行い、増幅したアプタマーを改めてターゲット細胞に暴露する。この一連の流れを 1 ラウンドとして 10 ラウンド繰り返すことで結合 DNA アプタマーを精製する。精製したアプタマーを次世代シークエンスで網羅的に読みとることで細胞表面アプタマーの配列を解析する。

結果としてターゲットになる細胞が様々な細胞の種類から構成されること、また、細胞表面にも様々なターゲット物質が存在することから、次世代シークエンスで読み取った配列は数十万種類の配列を読み取ることが出来た。得られた配列の相同性を検討した結果、数百種類のカテゴリ

一に分類することが出来た。

## 2. 2 DNA アプタマーによる細胞染色

Cell-surface-SELEX により得られた DNA アプタマー配列を基に代表的な配列 4 種類を人工的に合成し、ターゲット細胞表面に結合するか検討した。

その結果を図 2 に示す。

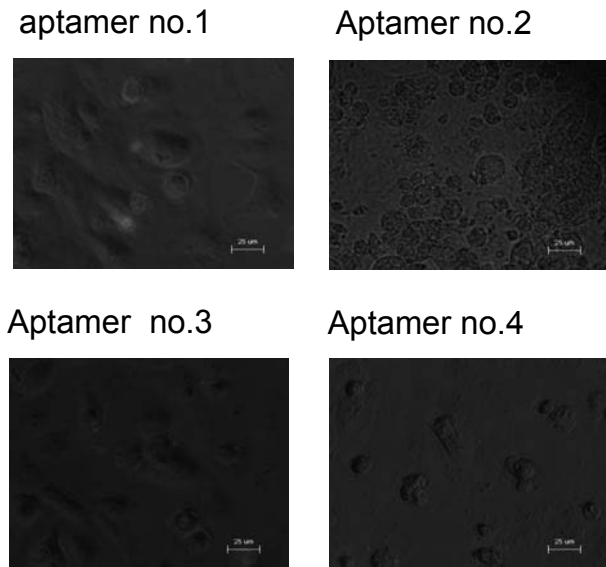


図 2. Cell-surface-SELEX を用いて取得した細胞表面結合性 DNA アプタマーによる細胞染色。得られた代表的アプタマー4 種類共に細胞染色できることが確認された。

手法として合成 DNA の 5' 側に biotin 標識を施し、蛍光ラベル剤であるストレプトアビジン標識 Q-dot 655 を用いてアプタマーを蛍光標識しその上でターゲット細胞に暴露した。その結果、代表的配列 4 種類共に細胞染色が確認された。また、それぞれ細胞膜全体的に染まるタイプ、局所的に染まるタイプなど機能的に異なる染色を行う事が出来た。また、各アプタマー共に全種類の細胞に均一に染まるわけではなく、特定の細胞が染色される様子が確認された。この結果より、様々な細胞が混在する細胞種の中で、特定の細胞のみ回収できる“DNA アプタマーによるセルソーティング”技術を開発できる可能性が示唆された。

### 3. 考察及び今後の展望

今回行った方法により、細胞表面をターゲットにした DNA アプタマーを作製出来る事に成功した。

また、様々な細胞種が混在するリソースの中でも特定の細胞のみを染め分ける事が出来る可能性が示唆された。今回はアプタマーの結合性を可視化するため Qdot による染色を行ったが、これを磁気ビーズに替えることで、特定の細胞のみを回収できる技術にも発展することが出来る。DNA アプタマーは人工的に簡便に勝田医療に合成すること

出来る。これは、動物を用いて作製する抗体とは異なりロット差が少なく安定的に供給できるという点で優位である。また、前年度報告したとおり、アプタマーは核酸分解酵素で簡便に分解することができ、精製前の細胞表面状態に戻ることが出来る。これは抗体では出来ない技術である。我々が開発した技術を組み合わせることで、特定の細胞を非侵襲的に精製することが可能になる。本技術はこれから発展していく再生医療に欠かせない技術なる。

#### 【参考文献】

1. H. Terazono, *J. Nanobiotech.*, 8:8 (2010)
2. P. B. Dirks, *Nature*, 444, 687 (2006)
3. J. E. Dick, *Nat. Biotech.*, 27, 44 (2009)

# 画像認識型オンチップ細胞精製技術開発と

## 血中循環がん細胞診断への応用

金 賢徹、寺菌 英之、服部 明弘、安田 賢二

### 1. はじめに

高齢化社会が進んだ現在の日本において、がんは2人に1人がかかる病気となっており、その対策が急務となっている。具体的に対応すべき課題としては、がん早期発見のための診断法開発、転移の有無の判定法開発、適切な抗がん剤選択方法の開発、がん切除後再発有無の診断法開発など多岐に渡るが、いずれも開発状況が十分であるとは言い難いのが現状であり、その原因のひとつは、がん細胞の多様なバラエティによるものである [1]。例えばがん早期発見の診断方法としてはがんマーカーを調べる方法があるが、同じ臓器由来のがんでもがんマーカー値が上昇する場合もあれば変化しない場合もあるなど、全てのがんを網羅的に検出できるわけではないことが課題となっている。また PET (Positron emission tomography) 検査でも発見が難しいがんの種類や炎症との誤認の問題などが分かっており、検査費用も高く現状では普遍的であると言いき難い。検査を受ける患者の精神的、身体的負担が少なく、安価であり、かつ由来臓器に依存せず網羅的にがんを発見できる次世代がん診断技術の開発が待ち望まれている。

そのような中で注目を集めている技術のひとつが、血中循環がん細胞 (Circulating tumor cells, 以下 CTC) 診断である。原発巣で変異を獲得し別の部位へと転移する悪性がんは、転移する際に血流中を移動して別の臓器へと漂着し転移することに着目して、患者から数 mL 程度の少量の血液を採取し、その中にがん細胞が含まれているかを調べる診断技術で、従来法に比べて患者への侵襲性が低いため身体的負担が少なく、また大掛かりな装置も不要であることから検査費用も抑制できる可能性が高いなどの特長がある。本技術の実用化と普及にあたり、要となるのが血液中の正常細胞と CTC の判別であるが、現状ではいくつかのがんマーカー分子を標的として CTC のみを染色し発見する方法が採用されているため、ある種のがん発見には大きな威力を発揮する一方、別の種類のがんは見落とされてしまうといった問題点があった。そこで我々はこれまでに開発を進めてきた画像認識型オンチップ細胞精製技術 [2] を応用し、がんマーカー分子標識でのがん診断に加えて、血液中の細胞画像情報から CTC を発見する新たなアプローチについて検討を進めており、以下ではその開発進捗状況について報告する。

### 2. 実験と結果

#### 2. 1 画像認識型オンチップ細胞精製技術

溶液中に存在する多数の細胞中から目的の細胞を発見し精製する技術のうち、フローサイトメトリーを利用する方法は大量の細胞を高速に全量検査できるという観点から優れている。一般的なフローサイトメトリーでは目的の細胞を蛍光色素で選択的に標識し検出するのが主流であるが、先述のとおり CTC は由来する臓器の種類や獲得した遺伝子変異の種類に依存してバラエティが極めて豊富であるため、全種類の CTC の画一的な蛍光染色は難しい。そこで我々は、従来の蛍光輝度計測に加えて、マイクロチップ中で細胞の画像情報を高速カメラで取得し、リアルタイム画像処理により細胞の形態的特徴を抽出した上で、がん細胞の特徴と一致した場合 (あるいは正常な血球細胞の特徴と一致しなかった場合) にフィードバック制御によりその細胞を回収する原理技術開発と試作機の制作を行った。図 1 は開発した試作機とマイクロチップである。マイクロチップには直径数十ミクロンの微細流路が作製されており、試料導入口に血液を挿入した後、加圧によりマイクロチップ中に血液が導入されるようになっている。微細流路中流部には蛍光計測用の励起レーザと明視野画像計測用の LED パルス光が照射されており、チップ下方にセットした対物レンズを通して蛍光は蛍光検出器で、明視野画像は高速 CCD カメラでそれぞれ検出する。得られた蛍光輝度情報と明視野画像情報は全て 10,000fps の頻度でリアルタ

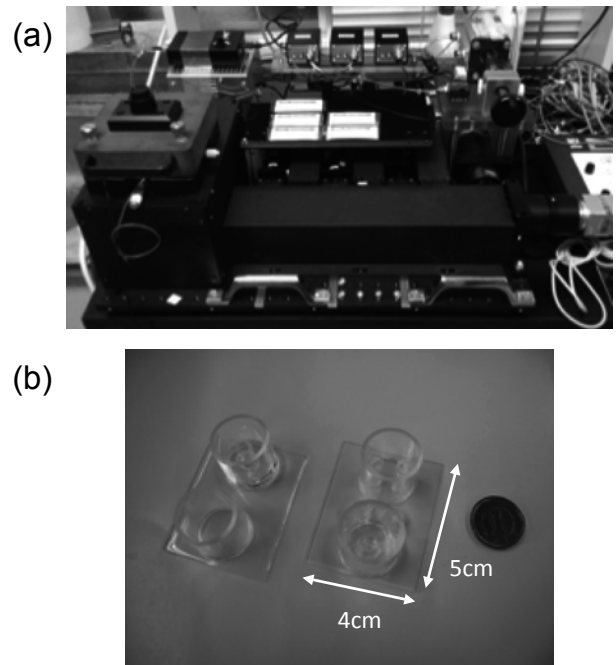


図 1 画像認識型オンチップ細胞精製システム試作機 (a) と搭載するマイクロチップ (b)。

イム処理され、目的の細胞の条件と一致した場合は微細流路中流部の蛍光・明視野画像検出領域のすぐ下流に配置した電極に電圧が印加され、直流パルス電圧を細胞に印加して微細流路中での流路進行方向を変化させることにより、目的細胞を回収口へと導き回収する。試作機には現在 3本の蛍光励起レーザ（375nm, 488nm, 515nm）と高速カメラが同時に設置されており、それぞれの蛍光輝度値と画像パラメータ値（細胞面積や周囲長など）の組み合わせから目的細胞を複合的に判定回収できるようになっている。

また我々は、細胞の明視野画像情報に加えて細胞内小器官（細胞核やミトコンドリアなど）の形状情報を合わせて取得し、細胞全体の情報と細胞内微細構造情報を組み合わせることでより複合的な視点から目的細胞を同定するために、マルチビュー計測システムの開発を推進した。図2はそのシステムの原理図である。これは、ある波長（例えば赤色）の画像情報と別の波長（例えば青色）の画像情報の光を共に高速 CCD カメラ方向に導き、カメラ前方に取り付けたミラーユニット内でふたつの波長の光をそれぞれ別の光路へと分けた後、反射ミラーの角度を調節して最終的にふたつの波長の画像が CCD カメラ素子の異なる部分にそれぞれ投影されるよう調整することにより、ふたつの波長の画像情報を同時取得できるようにしたシステムである。現在、我々が開発した試作機では赤色 LED 光源による明視野画像と青色蛍光による蛍光画像（細胞内小器官形状像）を同時取得できるようになっており、ソフトウェアも試作機に最適化して新規製作したためふたつの画像の組み合わせから目的細胞をリアルタイム選別でき、さらにはミラーユニットを拡張することで 3 つ以上の異なる色の画像も同時取得できるよう改良を進めている。

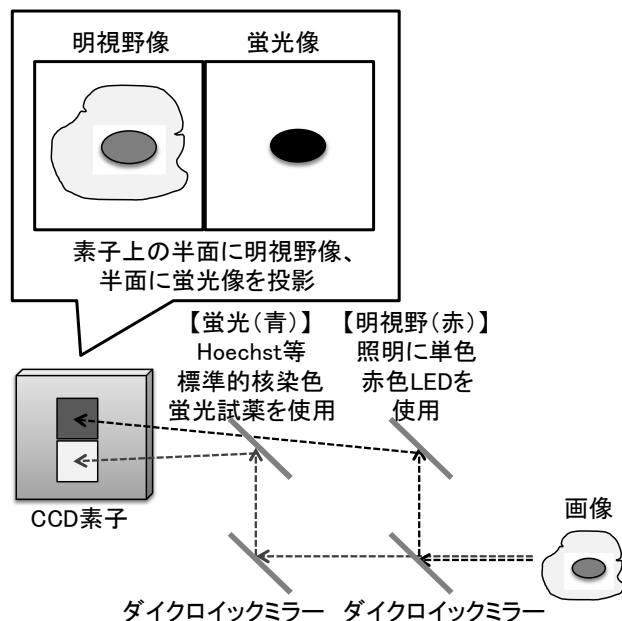


図2 マルチビューユニット計測による多数の画像情報同時取得の原理。図では2画像同時取得の例を示している。

## 2. 2 マルチビュー計測によるがん細胞の検出

以上の新規試作改良した細胞精製システムを用いて、がん細胞を選択的に検出するための原理検討を行った。正常な血球細胞と比べた場合のがん細胞の形態的特徴を明らかにするために、まずはヒト白血病細胞株（HL60）を用いてがん細胞の画像情報取得を行った。明視野画像情報に加えて細胞核の形状情報取得を行うために、HL60細胞を10  $\mu$ g/mL濃度のHoechst33258で5分間処理することにより細胞核を蛍光染色した上で、マイクロ流路中に細胞を流し、明視野像と蛍光像（細胞核像）の同時取得を行った。図3はマルチビュー計測により得られた細胞画像の代表的な例である。がん細胞は無限増殖能の獲得により細胞核形状に異常をきたしている場合があるが[3]、計測の結果、一般的な形状に加えて1細胞内に細胞核が複数個存在する多核細胞（図3b）が存在することが確認された。また、従来の蛍光輝度計測や蛍光画像のみの計測では識別することが困難である、1細胞内に複数個の核が存在する多核細胞（図3b）と、単核の2つの細胞が単に近接している場合（図3c）を容易に識別することができた。これは蛍光画像と同時に明視野画像を同時取得して1対1対応で確認することができるため実現できたことである。以上のとおり、マルチビュー計測によりがん細胞の明視野画像情報と細胞核形状情報を同時取得することで、多核化といった異常な細胞核形状を持つ細胞を選択的に検出回収することが、血液中からCTCを選択的に回収するための新たな指標候補のひとつとなり得ることを実証できた。

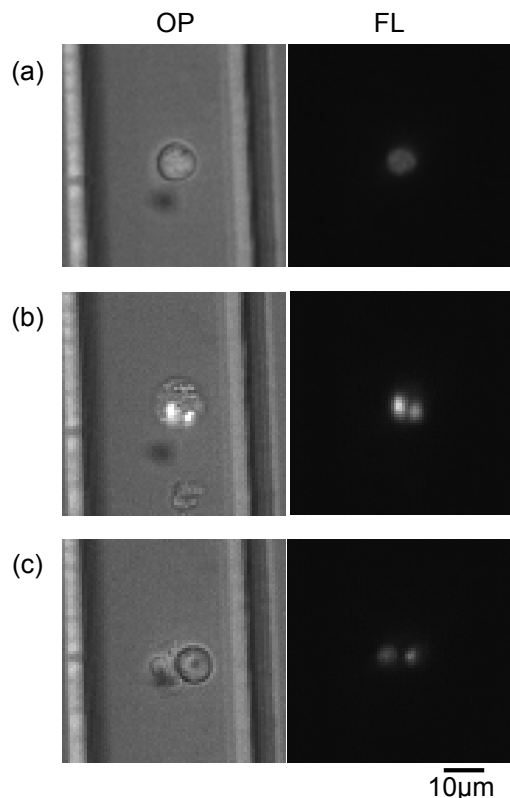


図3 マルチビュー計測によるHL60細胞の明視野像と蛍光像の同時取得。(a)一般的な核形状の細胞、(b)多核細胞、(c)単核の2細胞。左(OP)：明視野像、右(FL)：細胞核染色像。

### 3. 考察および今後の展望

CTC 診断は実現した場合の恩恵の大きさから期待値が極めて高いにもかかわらず、研究進捗としては CTC が血液循環中にどのような細胞生物学的特徴を持つのか、がんのどのステージから CTC が何細胞程度流れるのかなど、ほとんど明らかになっていないのが実情である。その原因の一端は CTC の豊富なバラエティにあり、様々な臓器由来のがん細胞を網羅的に検出することを一層困難にしている。今回の研究推進により、血中を流れる細胞の核形状を指標とすることが CTC 発見の有効なパラメータとなり得ることが示唆されたが、全ての CTC が細胞核形状に特徴的な異常をきたしているわけではなく、従来のがんマーカー検出やその他のパラメータと共に組み合わせて複合的な視点から計測してこそ、網羅的な CTC 検出技術になり得ると考えている。その観点から、我々が試作した装置システムは複数の画像情報と蛍光輝度情報を全て同時に取得でき、かつリアルタイム処理によるフィードバック制御で回収まで可能となっているため、まさに CTC 網羅的検出回収に向けたシステムとしてふさわしいものであると考えている。すでにいくつかのモデル動物を使用した CTC 検出回収実験評価にも着手しており、今後はより複雑な未知の性質のがん細胞を血中から効率的に発見回収すべく、技術評価を進めていく予定である。

#### 【参考文献】

- [1] N. Sethi, Y. Kang, *Nat. Rev. Cancer*, 11, 735 (2011)
- [2] K. Yasuda, A. Hattori, H. Kim, H. Terazono, M. Hayashi, T. Kaneko, F. Nomura, *Microflu. Nanoflu.*, DOI 10.1007/s10404-012-1112-6 (2012, published online)
- [3] F. Abdalla, J. Boder, R. Markus, H. Hashmi, A. Buhmeida, Y. Collan, *Anticancer res.*, 29, 1771 (2009)



# デスクトップ型超高速リアルタイム PCR 装置、

## 3 温度型超高速 PCR 装置の開発

寺菌 英之、竹井 弘之、金 賢徹、安田 賢二

### 1. はじめに

近年、多く遺伝子検査技術が進歩してきている。ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction: PCR)はそのナックでも細胞が持つ遺伝子情報(DNA, mRNA)を簡易的に調べる手段として有用な計測方法である。その応用範囲は分子生物学といった生命科学の分野に留まるだけでなく、インフルエンザやがん細胞の同定、食品の微生物検査にも及ぶ。

現在、我々は、細胞内で起こる生命現象や疾患メカニズムの解明を推進するため、生命を構成する基本単位である細胞内の生体分子の発現量・空間分布を一細胞レベルから把握することに取り組んできた。そこで、我々は現在までに PCR の原理を利用し一細胞単位でターゲット遺伝子の発現を超高速に高精度に解析する装置を開発してきた。具体的には、高温条件下と低温条件下をできる限り迅速に変化し、温度勾配を急激に行う事で非特異的な遺伝子増幅を防ぎ、一細胞内の極微量な DNA あるいは mRNA を特異的に高感度検出すること、PCR を高速に行う事により多種類の遺伝子発現をより多く解析することができることを目的としている。

我々はこれまでに近赤外線集束光レーザーを利用した光加熱型、循環水を利用した超高速 PCR 方法の開発に成功した [1,2]。さらに簡便に利用しやすいように小型高速 PCR 装置を開発してきた。

今回は、循環水を用いた超高速 PCR の安定化に関する検討、超高速 PCR 装置の高速性という優位性を高めるためリアルタイム PCR に利用する蛍光検出装置を独自に開発し一体型の装置を開発した。また、新たに遺伝子増幅の応用範囲を広げるためこれまでシャトル PCR と呼ばれる2温度型に1温度追加した3温度型高速 PCR 装置の開発を行った結果について報告する。

### 2. 実験と結果

#### 2. 1 循環水スピードの違いにおける反応槽での熱安定性の検討

通常の PCR 装置で使用されているペルチエ素子や温風を用いた装置に比べ、循環水を用いたタイプは流速に依存して反応槽の熱安定性に影響を及ぼす可能性がある。そこで、

2温度型における反応槽での熱安定性について流速を変えることで確かめた。方法として赤外線カメラを用いて反応槽を2次的に測定し温度変化における温度分布を測定した。高温を94℃、低温を60℃に設定し流速を2, 4, 6, 8, 10mL/秒で検討した。

その結果、流速10mL/秒の時、測定領域全体が設定温度に急激に変化し、安定的に推移した。一方、流速を落とすに従い、設定温度に到達するまで時間がかかるようになりさらに測定領域の温度分布にムラが発生した。2mL/秒においては設定温度に到達しない領域まで発生した。これらの結果によりおおよそ10mL/秒において安定して超高速 PCR ができる事が明らかとなった。

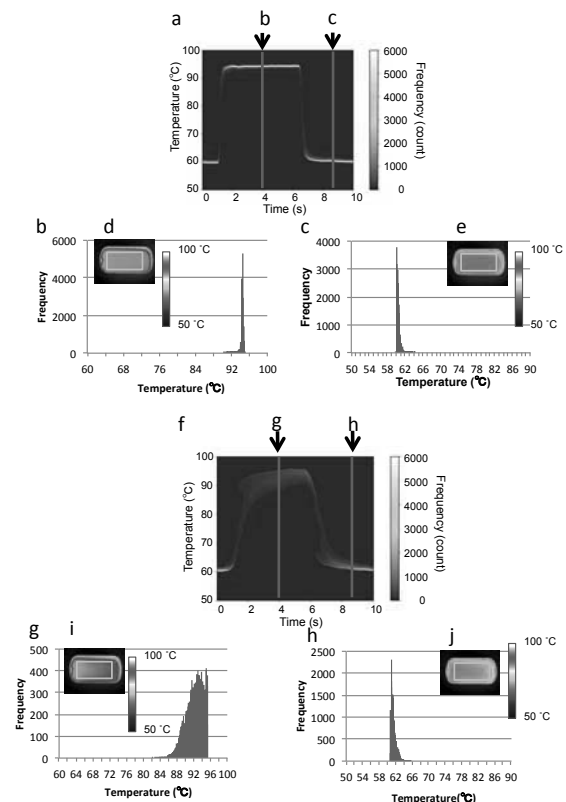


図1. 循環水の流速の違いによる反応槽での温度分布安定性  
a-e までは10mL/秒での温度分布、f-h までは2mL/秒における温度分布。b と c は各反応領域内での温度分布をヒストグラムにした物。a は分布のヒストグラムを時系列にまとめたもの。f-h は2mL/秒における同様の表示。循環水の流速を下げることで温度分

布にムラが起きることが明らかになった。

## 2. 2 小型超高速リアルタイム PCR 装置の開発

これまで開発を進めてきた原理検討の結果を踏まえて、より熱変換の安定を目指した配管の設計、装置構成の変更を行った。また、さらなる小型化と実用化を目指し、原理検討機では装置の外部にあった温度コントローラーを装置内に組み込むことで実用に耐える装置構成を目指した。さらに、本装置の利点である構成を活かすために蛍光色素によるリアルタイム計測が出来るように、今回独自に蛍光検出器を開発し、装置内部に組み込むことに成功した。

結果として、組み上げた装置で原理検討機と同様のスピードで超高速 PCR を行う事に成功した。また、新たな蛍光検出器で検出にも成功した。

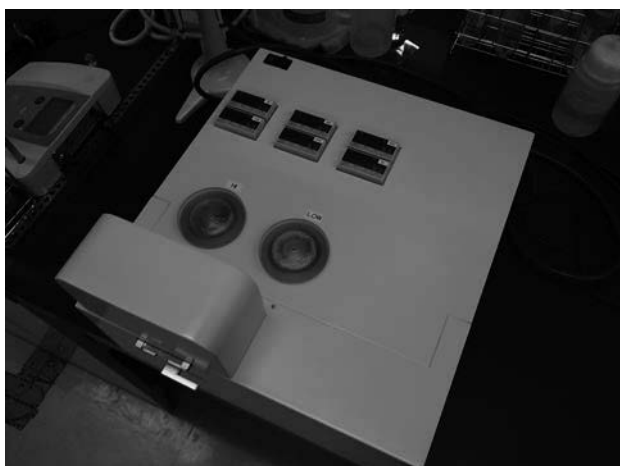


図 2. 一体型超高速リアルタイム PCR 装置実機。新規に開発した蛍光検出器を内蔵している。

## 2. 3 3 温度型超高速 PCR 装置原理検討機の開発

これまで、検討を進めてきた 2 温度型高速 PCR 装置で培ってきた技術を活かし、PCR で普段行われる 3 温度置換型の高速 PCR 装置の開発を行った。その中で特に配管のルート、ポンプ性能の向上、熱源の構造に改良を加えることで温度安定化を図った。液体循環型の構造として 3 つの経路が PCR 反応槽で一旦合流するため、お互いの循環水が一部他の流路系に入ってしまう課題があるが、今回の装置は配管を工夫することにより、極力避ける構造を取る事で温度の安定化に成功した。



図 3 3 温度型超高速 PCR 装置原理検討機。通常 PCR を行う温度変化プロトコルを高速で行う事が出来るようになった。

## 3. 考察及び今後の展望

今回の改良により、安定した超高速 PCR 装置の実用化の可能性、測定できる遺伝子の種類を拡大できる可能性を明らかにした。今後の課題としては逆転写も自動で行う 3 温度系、融解曲線を測定するための機構を取り入れる必要がある。これにより従来のリアルタイム PCR 装置を上回る性能をデスクトップサイズで実現することが可能となる。また、今後の取り組みとして、1 細胞内の生体分子の発現量を迅速に検出できる感度を向上させるキャリブレーション技術の実用化に向けた具体的な装置開発を目指す。近年、PCR の高速検出はトピックになりつつあり、装置だけではなく、高速 PCR に対応した試薬も開発されつつある。これら試薬との相乗効果によりより応用範囲の広い装置の開発を目指す。

### 【参考文献】

1. H. Terazono, A. Hattori, H. Takei, K. Takeda and K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.* 47 no. 6 5212 (2008)
2. H. Terazono, H. Takei, A. Hattori, K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.* 49 no. 6 06GM05 (2010)

# 薄膜状金属ナノ粒子の FE-SEM 反射電子像コントラストに 対する膜厚と曲率の寄与

金 賢徹、竹井 弘之、寺菌 英之、安田 賢二

## 1. はじめに

生命を構成する基本単位である細胞は多数のタンパク質や核酸分子などで構成されており、それらが自己組織化や選択的分子認識を繰り返す結果が細胞の応答として反映される。例えばがん細胞では、正常細胞と比較した場合に特徴的ながんマーカー分子の発現数が顕著に増加もしくは減少しており、このことから細胞を構成する各分子の発現数や分布、それらの働きが細胞の性質を特徴付けることは明らかである。したがって、分子認識や分子間の選択的結合と細胞応答の関係という生命の基本過程を理解するためには、細胞を構成する多数の生体分子の結合・解離状態、さらにそれら分子の数と空間局在分布を個々の細胞単位で定量計測することが必須となる。

我々は、生体分子の空間局在分布を 1 細胞単位で網羅的に計測するために、様々な粒径・元素の微粒子状標識プローブを作製して標的分子を網羅的に標識し、電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) でその存在位置と微粒子状標識の材質を高空間分解能で計測する方法の開発を進めてきた。その結果、ポリスチレン球表面に金属を真空蒸着により堆積させることで様々な粒径・元素のナノ粒子を作製できること[1]、作製したナノ粒子に対してさらに有機物分解処理を行うことにより、カップのような形状をした薄膜状中空金属ナノ粒子を作製できること[2]、これら薄膜状金属ナノ粒子に対して FE-SEM 反射電子計測を行うことにより、像中の輝度コントラストの差として金属の種類を識別可能 (一般に原子番号が大きい元素ほど電子を多く反射するため明るくなる) であること[3]を明らかにしてきた。これまでの研究では FE-SEM 反射電子計測により薄膜金属の種類を識別特定できることが分かったが、同じ種類の金属で薄膜ナノ粒子の膜厚が異なる場合、FE-SEM 反射電子輝度コントラストにどのような影響が表れるか定量的な評価が為されていなかったため、本研究では金属薄膜の膜厚と FE-SEM 反射電子像コントラストの関係の定量評価を行った。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 薄膜状金属ナノ粒子の作製

金属ナノ粒子は基板上に単層配置したポリスチレン球

表面に真空蒸着により金属を堆積させた後、有機物分解処理を行いポリスチレン球を分解除去することで作製した[2]。ポリスチレン球はサイズスタンダードとして用いられる粒径 200nm と 300nm の市販品を利用しており、変動係数 (CV 値) は 3%以下である。それらの表面に Au を 5, 10, 15 または 20nm 堆積させたものをそれぞれ作製した上で UV-オゾン処理を行いポリスチレン球を分解除去した。それにより、粒径が 200nm または 300nm、膜厚が 5, 10, 15 または 20nm の、合計 8 種類の半球カップ状 Au 薄膜ナノ粒子を作製した。作製した薄膜状 Au ナノ粒子は一旦水中に分散させた上で平坦な Si 基板上に滴下し再度乾燥させた上で FE-SEM 計測を行った。また比較のために、平坦な Si 基板上に Au 薄膜を同様の膜厚で堆積させた物 (以下、Au 平坦膜) を作製し、半球カップ状薄膜ナノ粒子と反射電子輝度を比較することにより、ナノ立体構造の反射電子輝度への寄与を評価した。

### 2. 2 FE-SEM 反射電子像の輝度定量化方法

作製した薄膜状金属ナノ粒子はそれぞれ加速電圧 5kV の条件で FE-SEM 反射電子計測を行った。画像は 8 ビットグレースケールとして得られ、画像解析ソフトを利用して背景の Si 基板や Au 薄膜ナノ粒子の輝度値をそれぞれ定量化した。各反射電子像中の Au ナノ粒子輝度コントラストを比較する際、装置の設定条件や試料表面の帯電状態など各測定条件間での差を排除するために、次の様な規格化を行った上で、同じ粒径で異なる膜厚の Au ナノ粒子 (と Au 平坦膜) 間での輝度値の定量的比較を行った[3]。

まず、反射電子像中で最も明るい 20nm 膜厚の Au 薄膜の輝度実測値を  $I_{max}$ 、最も暗い背景の Si 基板部分の輝度値を  $I_{min}$  とし、任意の膜厚 (この実験では 5, 10 または 15nm) の Au 薄膜輝度実測値を  $I_Z$  とした上で、次の式から任意の膜厚の Au 薄膜の相対輝度値  $\tilde{I}_Z$  を計算した。

$$\tilde{I}_Z \equiv (I_Z - I_{min}) / (I_{max} - I_{min})$$

得られた  $\tilde{I}_Z$  は規格化補正されたものであり、異なる膜厚間の  $\tilde{I}_Z$  を膜厚の関数としてプロットし、膜厚増加に対する FE-SEM 反射電子コントラストの変化を求めた。

### 2. 3 薄膜状金属ナノ粒子の膜厚と FE-SEM 反射

## 電子像輝度の関係

以上のような試料作製と解析方法の検討を行った上で、膜厚が 5, 10, 15, 20nm の Au 平坦膜、粒径 200nm の Au ナノ粒子、粒径 300nm の Au ナノ粒子それぞれの FE-SEM 反射電子計測を行った。図 1 は得られた各試料の反射電子像であるが、Au 膜厚が 5nm から 20nm へ増加するにつれて反射電子像中の輝度が明るくなる様子が観察された[4]。これらを定量比較するために各粒径、各膜厚のナノ粒子および平坦膜の  $I_z$  を計算し、Au 膜厚の関数としてプロットした。図 2 はその結果をグラフとしてまとめたものであり、同時に線形近似直線を示した[4]。図 2 が示すように、Au 膜厚が増加するにつれて相対的反射電子輝度  $I_z$  もほぼ線形に増加 ( $R^2 > 0.93$ ) し、その輝度の増加の傾きは Au 平坦膜が 3.61%/nm、200nm Au ナノ粒子が 2.24%/nm、300nm Au ナノ粒子が 2.58%/nm であった。

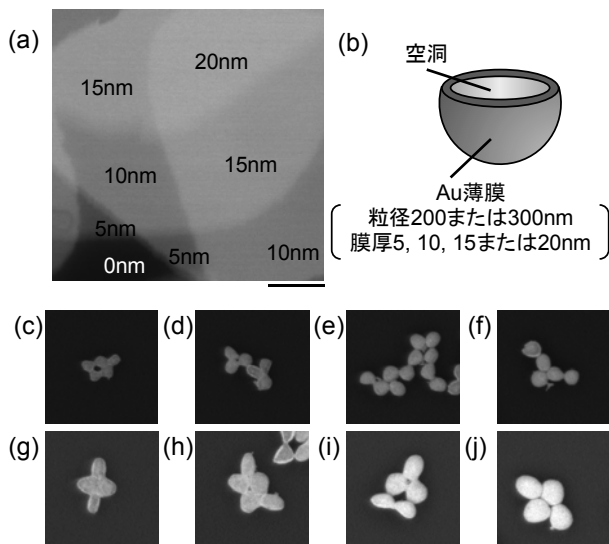


図 1 作製した薄膜状 Au ナノ粒子および平坦膜の FE-SEM 反射電子計測像。(a) Si 基板 (0nm) 上に作製した 5, 10, 15, 20nm の Au 平坦膜。Bar, 50  $\mu\text{m}$ 。(b) 作製した中空状薄膜 Au ナノ粒子の模式図。(c-j) 粒径 200nm の膜厚 5nm (c), 10nm (d), 15nm (e), 20nm (f)、および 300nm の膜厚 5nm (g), 10nm (h), 15nm (i), 20nm (j) の薄膜 Au ナノ粒子。Bar, 500nm。

はじめに、200nm 粒子と 300nm 粒子の輝度増加分の平均値 (2.41%/nm) に対して、平坦膜の輝度増加分 (3.61%/nm) は 1.5 倍大きかったが、この差は Au ナノ粒子の内部空洞の影響によると考えることができる。図 1 に示したとおり、作製した Au ナノ粒子は半球状で内部に空洞を有するカップ状構造をしているが、FE-SEM 反射電子計測では計測した領域に入射電子が侵入してそこから反射された電子量の平均値が輝度として反映されるため、中空状の構造体を計測した場合は空洞部分の存在が反射電子輝度コントラストに寄与し、その結果平坦膜との差として表れたと考えられる。次に、200nm 粒子と 300nm 粒子間の輝度増加分の差は 15%であったが、これらは共に空洞を有する同等の構造体から得られた結果であることから、輝度増加分の差はナノ粒子曲率の差を反映したのものであると考えることができる。即ち、粒径が 1.5 倍異なること

により、反射電子輝度には 15%の誤差が生じることが分かった。以上をまとめると、FE-SEM 反射電子像コントラストにおいて、薄膜状ナノ構造体の膜厚が増加すると輝度が概ね線形に増加すること、ナノ構造体のサイズが 1.5 倍になると輝度が約 15%変化することが分かった。

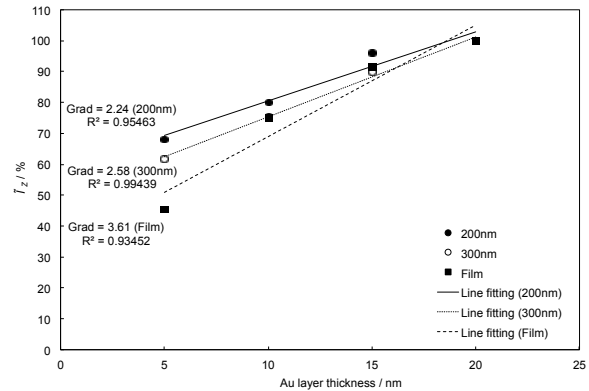


図 2 薄膜状 Au ナノ粒子および平坦膜の FE-SEM 反射電子相対輝度  $I_z$  と Au 膜厚の関係。

## 3. 考察及び今後の展望

FE-SEM 反射電子計測において、様々な粒径、元素で作製した薄膜状金属ナノ粒子を生体分子に対する標識として同時利用することを想定した場合、同一条件 (同粒径、同元素) のナノ粒子は全て同じ輝度コントラストである必要があり、同一粒子の輝度ばらつきを抑えることが標識のパラエティ増加につながる。本研究の結果から、Au を例とした場合、1nm の膜厚差が約 2.4%の反射電子輝度誤差となり、また 1.5 倍の粒径差が約 15%の反射電子輝度誤差となることが明らかになったことから、標識ナノ粒子を作製する際に、如何に粒径や金属膜厚を均一にするかが鍵となることが明確になった。我々のナノ粒子作製法では、真空蒸着を利用してサブナノメートルレベルで膜厚を制御しつつ金属薄膜を作製しており、またサイズスタンダードとして利用されているポリスチレン球を鋳型として利用しているため粒径誤差は 3%以下と均一であることから、まさに FE-SEM 反射電子計測における標識用ナノ粒子を作製するのに適したプロセスであることが確認された。今後はこの利点を生かして、同時識別使用が可能なナノ粒子標識のパラエティを一層増やしていく予定である。

### 【参考文献】

1. H. Kim, K. Yasuda, H. Takei, *Sens. Actuators B*, 142, 1 (2009).
2. H. Kim, H. Takei, K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 49, 048004 (2010).
3. H. Kim, T. Negishi, M. Kudo, H. Takei, K. Yasuda, *J. Electr. Microsc.*, 59, 379 (2010).
4. H. Kim, H. Takei, T. Negishi, M. Kudo, H. Terazono, K. Yasuda, *e-J. Surf. Sci. Nano Technol.*, 10, 301 (2012).

## 業 績

### 【原著論文】

1. H. Kim, H. Takei, T. Negishi, M. Kudo, H. Terazono, K. Yasuda  
Contribution of Metal Layer Thickness for Quantitative Backscattered Electron Imaging of Field Emission Scanning Electron Microscopy  
e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, 10, 301-304 (2012)
2. H. Terazono, H. Kim, M. Hayashi, A. Hattori, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda  
A Non-destructive Culturing and Cell Sorting Method for Cardiomyocytes and Neurons Using a Double Alginate Layer  
PLoS One, 7 (8) e442485 (2012)
3. K. Yasuda, A. Hattori, H. Kim, H. Terazono, M. Hayashi, H. Takei, T. Kaneko, F. Nomura  
Non-Destructive On-Chip Imaging Flow Cell-Sorting System for On-Chip Cellomics  
Microfluidics and Nanofluidics, DOI 10.1007/s10404-012-1112-6 (2012, published online)
4. H. Terazono, A. Hattori, H. Kim, H. Takei, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda  
Reduction of Non-specific Amplification of Polymerase Chain Reaction Examined by 1480nm Photothermal Transition Speed Controllable High-Speed Polymerase Chain Reaction System  
Japanese Journal of Applied Physics, in press.

### 【口頭発表】

1. 金賢徹、竹井弘之、寺菌英之、安田賢二  
1 細胞 *in situ* ゲノムプロテオーム計測のための FE-SEM 定量反射電子分析法の開発  
日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会、2012 年 5 月、筑波
2. 金賢徹、竹井弘之、寺菌英之、安田賢二  
様々な粒径・材質のヤヌス粒子に対する機能付加法の検討  
第 73 回応用物理学学会学術講演会、2012 年 9 月、愛媛
3. K. Yasuda, H. Kim, H. Terazono, T. Arao, T. Ohtsu, Y. Nakamura, Y. Miyagi, K. Nishio  
Development of on-chip imaging flow cytometry technology for circulating tumor cell  
第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月、札幌

4. H. Terazono, M. Hayashi, H. Kim, A. Hattori, T. Kaneko, K. Yasuda  
A Non-destructive Culturing and Cell Sorting Method for Cardiomyocytes and Neurons Using an Alginate Layer  
第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月、名古屋
5. H. Kim, H. Takei, H. Terazono, K. Yasuda  
Fabrication of Superparamagnetic Janus Particles Having Various Size and Its Application for Non-Destructive Cell Sorting  
第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月、名古屋
6. H. Terazono, M. Hayashi, H. Kim, A. Hattori, T. Kaneko, K. Yasuda  
Toward Quasi-In Vivo from In Vitro Assay (V): Noninvasive Precise Purification of Ventricular Cells from Mixture of Differentiated Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using Spot Digestion of Double Alginate Layers on a Multielectrode Array Chip  
SPS2012、2012 年 10 月、アメリカ
7. H. Terazono, M. Hayashi, H. Takei, A. Hattori, T. Kaneko, K. Yasuda  
Ultra high-speed microdroplet polymerase chain reaction system for three-step reverse transcription of single cells using on-chip three-channel switching high-speed liquid circulating module  
MNC2012、2012 年 11 月、神戸
8. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda  
Fabrication of Superparamagnetic Nano-Particles Having Various Diameters by Strict Controlling of Magnetic Material Thickness  
MNC2012、2012 年 11 月、神戸
9. H. Terazono, H. Kim, A. Hattori, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda  
Non-invasive/destructive single cell purification method for re-cultivation of functionally identified specific cells using spot digestion of double alginate sol layers on a multi-electrode array chip  
2012 American Society for Cell Biology Annual Meeting、2012 年 12 月、アメリカ
10. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda  
Development of "Adaptive SEM" Technology for Genome/Proteome Expression Analysis in Single Cell Level  
57th American Biophysical Society Annual Meeting、2013 年 2 月、アメリカ

**【特許】**

- (1) 国内特許出願 2 件
- (2) 国外特許出願 6 件

# 有機系太陽電池評価プロジェクト

# 「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】

産官学を結集したオールジャパン体制のもと、H22年から4年間のプロジェクトとして「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）」がFIRSTプログラム（内閣府の最先端研究開発支援プログラム）に採択された。このうち、平成24、25年度には、有機系太陽電池評価に特化した「計測法の開発と標準化活動の推進」（サブテマリーダー、（東大先端科技研セ）富田孝司教授）がKASTに委託された。

有機系太陽電池は、シリコン系では実現困難なカラー化・フレキシブル化・大面積化や高速印刷製造が可能であり、低価格で大量生産し易い一方、基本的な構成成分が有機材料のため、水分や酸素による劣化が起り、耐久性・堅牢性に難点がある。構成成分に起因する多様さや耐久性の課題のため、国際規格化・標準化の取り組みが困難となっている。KASTでは、FIRST参加企業や再委託先から高安定性・高耐久性の太陽電池の提供を受け、国際標準への性能評価法を検討した。H24年度末には、上記の色素増感太陽電池(DSC)の性能評価を検討した結果を参加企業に示し、企業からのフィードバックにより、KAST案を作成した。また、この案を山形県蔵王での国際規格化・標準化ワークショップ(ICES2013)にて、国内企業や、欧米・アジア諸国の大学、太陽電池検証機関に提案した。そこで明らかとなった問題点については、H25年度、さらに多種類の試料セルを検討・検証し、問題の解決を図る事とした。

また、有機系太陽電池の実使用環境での耐久性評価も重要な課題であり、Krebs教授(Denmark)を中心とする欧米グループ(ISOS)が行う有機薄膜太陽電池(OPV)の安定性試験のラウンドロビン実証試験に、KASTも参加することになった。本試験に参画することにより、国際共同研究活動におけるKASTの立場を確かにすることが期待される。さらに、加速劣化試験の最適条件を検討するとともに劣化要因を探るため、東京理科大学、神奈川県産業技術センターと協力して、FIRSTプログラムの各参画機関から提供されたDSC、OPVの電気化学的インピーダンス解析(ECIA)を検討した。本ECIAが劣化要因を探る非破壊分析として極めて有効であることが明らかとなった。

## 1. 平成24年度の研究目的

プロジェクト3年目となるH24年度は、以下の各項目を重点目標とした。

### (1)国際電気標準会議(IEC)の発行する国際標準制定

色素増感太陽電池(DSC)については、平成21年3月に提案された光産業技術振興協会(OITDA)規格「色素増感太陽電池の性能評価方法」を基本にして、平成22、23年度に導入した各種測定装置を用いて、適切な性能評価方法の素案及び実際に評価を行う際の留意点などをまとめた。これらを性能評価方法の規格原案として、FIRSTプログラムの計測・標準化分科会、関係機関、関係企業、業界団体等との議論を経て、原案の改善、新規測定法を検討することとした。

有機薄膜太陽電池(OPV)については、性能評価方法が色素増感太陽電池(DSC)ほど問題となる部分は少なく、概ねアモルファスシリコン太陽電池の規格に沿うものとなったが、これに伴う「不確かさ」の算出や基準太陽電池の選定などを行っていく必要がある。

IECへの規格提案活動を行うにあたっては、東京大学先端科学技術研究センターとともに国際標準化の戦略を立案し、それに沿って進めるとともに、TC82とのリエゾンの接触、産業技術総合研究所や業界団体との折衝について、東京大学と密接な連携を取りながら進める。国際ワークショップ(ICES2013)の開催により国内外の主要な企業、研究機関、大学等との合意形成を図るとともに、

IEC/TC82国内委員会や産総研とも標準化のため、速やかに綿密な連携を行う。

### (2)色素増感太陽電池(DSC)の性能評価・耐久性評価法

色素増感太陽電池(DSC)の性能評価方法について、色素及び電解液の性質によりどこまで適用が可能かを検証するため、FIRSTプログラム内外の企業、大学等からさまざまな色素増感太陽電池を集めて評価し、性能評価方法原案を精査する。評価のためのモデルセル、たとえばTiO<sub>2</sub>膜の厚さや製膜方法を変えたセルや電解液の粘度のみを変えたセルなどの作製を、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「評価用太陽電池セル及び部品の作製」として再委託する。また、ソーラシミュレータのスペクトル合致度の違いが性能評価の不確かさに与える影響の大きさを見積もるため、スペクトル合致度の異なる各種光源を導入して比較する。

「耐久性試験及び電気化学特性評価」については、神奈川県産業技術センターに再委託し、温度、湿度、光などの劣化要因を探る。これには、たとえば紫外線照射、極端な低温・高温試験など過酷な条件下での測定も一部含める。

さらに、室内を想定した低光量下での性能評価方法、朝夕の斜め光や散乱光を想定した角度依存性や両面型太陽電池の評価方法、使用環境に即した温度環境による特性評価方法なども併せて検討する。

これらの成果は必要に応じてH25年度には規格案とし



て取りまとめ、国際標準化活動の成果として提示する予定である。

### (3)有機薄膜太陽電池(OPV)の耐久性評価法

FIRSTプログラム参加企業、大学等を越えたオールジャパンの機関より提供された有機薄膜太陽電池(OPV)に対し、KASTで導入予定の加速寿命装置、光環境試験測定システム、神奈川県産業技術センターの所有するキセノンウェザーメータ、塩水噴霧装置等の各種環境試験機・信頼性試験機を用いて、有機薄膜耐久性試験と劣化要因の検討を行う。この際、国際電気標準会議(IEC)TC113(ナノエレクトロニクス)においてドイツより提案されている有機太陽電池の信頼性評価方法についても実際にその手順どおりに評価を行い、妥当性を検討する。

また、産総研吉田グループとの協力の下、平成22～23年度に導入した各種太陽電池性能評価装置、既存の微細構造解析装置(SEM, TEM, AFM, XPS等)、神奈川県産業技術センターの交流インピーダンス測定装置等により、性能と密接に関連する構造解析や劣化要因解析を行う。

### (4)「分光技術を活用した次世代型太陽電池評価装置の実用化開発」(先端計測分析技術・機器開発プログラム、JST)

科学技術振興機構(JST)による先端計測分析技術・機器開発プログラム(H24.10-H27.3)に申請した課題「分光技術を活用した次世代型太陽電池評価装置の実用化開発」が採択され、H24年10月からプロジェクトを開始した。実施機関は、代表機関のコニカミノルタ(KM社)、東大先端研、KASTの3機関で、東大先端研が供給した安定セルを用いて、KM社が試作した分光型基準セルおよび絶対値分光感度測定装置の性能検証をKASTが実施する。得られたデータをKM社にフィードバックし、さらに試作装置の改善を行う計画である。このため、KASTとしては東大先端研からできるだけ安定したセルを受け取るべく、東大先端研、内田聡教授とセル情報を共有し安定性の向上をサポートする。さらに、国内外のメーカからサンプル提供やセル市販品を出来るだけ集め、試作装置の適用範囲を明らかにする。また、減光下でのDSC劣化解析を東大先端研と共同して、インピーダンス解析を含めて光照射前後の非破壊解析に取り組む。

### (5)その他

有機系太陽電池技術の普及のため、年1回程度の講習会を開催する(普及グループ、教育情報センター兼務)。

平成24年度の研究成果

#### (1)国際電気標準会議(IEC)の発行する国際標準制定

上述のように、DSCについては、平成21年3月にOITDA規格「色素増感太陽電池の性能評価方法」が提案されている。KASTではそれを基本にして、平成22、23年度にFIRST予算で導入した各種測定装置を用いて、各種のDSCセルに対応した性能評価方法を検討し、その成果に基づき、性能評価案をまとめた。これらを性能評価方法の規

格案として、FIRSTプログラムの計測・標準化分科会、関係機関、関係企業、業界団体等との議論を経て原案の修正を行った。本修正案については、H25年1月にM.Grätzel教授ら国内外の大学、研究機関、主要企業等の研究者が参加した有機太陽電池の評価・標準化国際ワークショップ(ICES2013)(山形県、ホテルルーセント)にて提案し、活発な意見交換を行った。その結果、さらに応答速度の遅い色素増感太陽電池の性能評価までスクリーニング試験の範囲を広げた一般的な測定方法を探索出来るように改良を加えることが要望された。

国際的に、現在TC113(場合によってはTC82)委員会で有機系太陽電池の安定性に関する新規作業項目提案(NWIP, New Work Item Proposal)が議論され、日本においても国内委員会で検証中である。順調に進めば今秋には、このNWIPは技術仕様書(TS)の形で国際的に公布される予定である。

しかしDSC, OPVの性能評価法については、NWIPに含まれておらず、性能評価法の制定が今後の課題として残り、上記ICES2013案を盛り込めるよう、東京大学先端科学技術研究センターと共同して国際標準化の戦略を立案している。産業技術総合研究所や業界団体との折衝を通して、TC113国内委員会エキスパートである東京大学の非常勤職員と連携のもとに規格案作りを進めている。

#### (2)色素増感太陽電池(DSC)の性能評価法・耐久性評価法

これまでに導入した機器を使用した性能評価試験を継続して行った。平成24年度は測定用セルとしてFIRST参画機関の3社および東大内田教授から提供を受けている。イオン液体を使用した高耐久性セルの場合、セル構造が最適化されていないと、I-V測定において正方向・逆方向への電圧掃引で往復測定の結果が一致しないという傾向が確認された。

これまでOITDAの推奨条件に沿った測定を行ってきたが、往復測定の条件を見つけるだけで数時間を要する場合もあった。今後は相対値測定および絶対値測定の確立を目指すとともに、セル構造との相関性も検討する。

また、色素及び電解液の種類を変えた場合、どこまで正確な測定が可能であるかを検証するため、東京理科大にてモデルセルの作製を行った。評価用モデルセルとして(i)TiO<sub>2</sub>膜の厚さの制御(1μ～40μメートル)、(ii)成膜方法(スクリーン印刷法、ディップコート法、スピコート法)、(iii)電解液の粘度(具体的には種々のイオン性液体の種類と量を変えることで行った)、(iv)TiO<sub>2</sub>膜の細孔径等、を変え太陽電池性能に与える影響を評価した。

耐久性評価については、神奈川県産業技術センターへの再委託により行うこととしていたが、本年度は測定可能セルが得られなかった。このため、H25年度に実施予定であった有機系太陽電池の電気化学評価に関して、交流インピーダンス測定法による基本特性の把握を行った。I-V測定の結果が往復で一致するセルはきれいな円弧を得ることを確認した。逆にI-V測定が一致しないセルは時間とともに特性が変化していることが認められた。今

後、これらの現象の解明を進める。

### (3)有機薄膜太陽電池 (OPV) の耐久性評価法

OPV は、性能評価法が DSC ほど問題となる部分は少なく、概ねアモルファスシリコン太陽電池の規格に沿った性能評価が可能なので、材料の異なる 2 つの OPV セルについて適切な分光感度特性評価法および I-V 特性評価法を検討した。

OPV セルの分光感度 (IPCE) 測定において、単色光のチョッピング周波数を変化させて測定した。チョッピング周波数を高くしても分光感度が一定であり、応答が速いことが確認された。また、バイアス光強度を変化させたときの分光感度を測定すると、バイアス光強度が小さいほど分光感度が大きくなるが、相対分光感度には変化がないことが分かった。このように、有機薄膜太陽電池の相対分光感度は単色光のチョッピング周波数およびバイアス光強度に依存せずに測定できることが確認された。

OPV セルの印加電圧の掃引方向および掃引速度を変えた場合、I-V 曲線は、掃引時間が速く (0.04 ミリ秒) ても、遅く (20 秒) ても、順方向掃引 (Isc→Voc) と逆方向掃引 (Voc→Isc) で I-V 曲線が一致しており、この範囲での電圧掃引速度に依存しない。このように OPV の光応答は、DSC とは対照的であって、シリコン系太陽電池に近いことが分かった。これは、OPV の発電メカニズムがシリコン系と同様に、PN 接合によるためである。

平成 23 年度までにほぼ完成した「キャリアライフタイム計測装置 ( $\mu$ -PCD 法による)」は、有機薄膜太陽電池内の発電層のみの性能評価を行うことが出来る。このため、本法に従来の電流計測による評価方法を併用することで、非破壊で劣化部位を特定することが可能である。それ故、当該装置を用いて各経過時間における劣化部位を特定することにより、高耐久性化に向けた太陽電池セルの設計指針や適切な評価方法の確立が出来るため、KAST においてノウハウ登録を行った。

この評価法では、計測時の光劣化が最も懸念される点であったが、現状での測定条件で、励起レーザを長時間照射し続けた場合でも、キャリアライフタイムや IV 特性への影響は見受けられないことが分かった。封止なしのセルのみならず封止済み有機薄膜太陽電池セルについても、キャリアライフタイム計測が可能であることを確認した。その値は、一定の誤差領域内に収まる。今後、技術移転で想定される生産ライン上での歩留まり把握に用いるには、短時間で計測上優位性を有する積算回数まで到達させることが必要であることから、励起光の周波数と積算回数による IV 特性への影響をさらに考察する必要がある。同様に、色素増感太陽電池 (DSC) へのキャリアライフタイムの評価法の取得も開始し、有機薄膜太陽電池と比較して長いキャリアライフタイム (ミリ秒スケール) の取得に成功した。

### (4)分光技術を活用した次世代型太陽電池評価装置の実用化開発 (先端計測分析技術・機器開発プログラム、JST)

KM 社の試作する分光感度測定装置を用いた絶対分光感度法 (DSR 法) により様々な DSC の性能評価を行う予定であった。しかし、現在のところ KM 社で試作 1 号機の作製

が遅れ、KAST に納入されていないため、KM 社にて内田教授 (東大先端研) が作成した DSC を用いて複数のソーラシミュレータ (疑似太陽光源) の照度・波長分布のスペクトルミスマッチの検討をしている段階である。今後、試作 2 号機が H25 年 9 月に KAST 納入予定であり、それまでに安定セルを確保し、測定に備えるとともに、各測定装置の「不確かさ」の計算法について検討する予定である。

### (5)その他

平成 24 年 12 月 11 日 (火) に有機系太陽電池分野における研究者・技術者を対象に「有機系太陽電池の実証・実用化」と題した教育講座を開催した。受講申込者 96 名、講座後の見学には 47 名が参加した。

早瀬修二氏 (九州工業大学)、杉生剛氏 (日立造船株式会社)、平本昌宏氏 (自然科学研究機構 分子科学研究所)、大西敏博氏 (大阪大学太陽エネルギー化学研究センター)、加藤千明氏 (英弘精機株式会社) を講師とし、色素増感太陽電池 (DSC)、有機薄膜太陽電池 (OPV) の最新研究、性能評価装置といった観点から講演を行った。

おわりに

有機系太陽電池には、発電機構や分光感度の異なる様々な電池がある。例えば、DSC や OPV の典型的な発電効率などの性能評価でもその測定法を、よく吟味して評価・標準化に用いなければならない。このことは、測定条件などについても、一律な条件設定は困難で、性能に応じた評価基準を考慮する必要がある。

# 有機系太陽電池の性能評価方法の確立に向けて

齋藤 英純, 青木 大輔

## 1. はじめに

本PJは統一的な性能評価方法が確定していない有機系太陽電池を対象に、信頼性の高いデータを得られるように検討された評価方法・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」機能の確立することを目的としている。

従来はI-V測定に代表される発電性能を主に測定してきたが、最近では耐久性についても評価を行っており、平成24年度からは、NEDO FIRSTプログラムに加えて、JST先端計測プログラムによる「絶対値分光感度測定」についても実験を行っている。

ここでは、これまでに取り組んできた性能評価に関して報告する。

## 2. 色素増感太陽電池における発電性能評価試験

昨年度に引き続き基準電池を追加購入し、様々なセルに対応できるよう準備を進めた。現在所有している基準電池のバリエーションを図1に示す。

また、連続照射用に株式会社三永電機製作所製小型ソーラーシミュレータ XES-40S1を購入した。(図2参照)

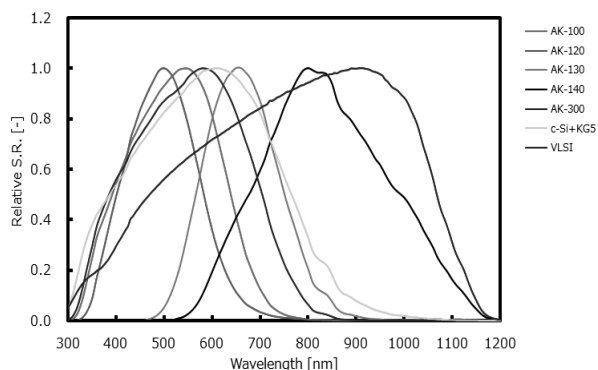


図1 基準電池のバリエーション



図2 小型ソーラーシミュレータ

照射面積が40mm角と小さく、消費電力も少ないため、主に単セルへの連続照射時のIsc値を測定し予備照射時間を特定するために使用している。

これまでのI-V測定において、【OITDA-PV01-2009 7. 色素増感太陽電池セル出力測定方法】に記載されている「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、十分に長いサンプリング遅延時間(例えば50~100ms程度)を設定する。」を満足するような条件を見つけ出すための実験を行ってきた。しかし、使用する材料に起因すると推定されるが、掃引時間を非常に長く設定しても一致しないセルがあるのも事実である。

図3はDSCに対して速い掃引を行った結果で、逆方向のI-Vカーブが持ち上がり、このままPmaxを算出すると過大評価になってしまう例である。

掃引速度を遅くするに従い、往復のI-Vカーブが近付いていくのだが、実際には、測定→往復の値が一致せず→掃引時間を遅くして測定→往復の値が一致せず。という作業の繰り返しとなり、この工程だけで5時間以上を要し、しかも測定条件を見つけないことができないということも珍しくない。

一方で、OITDA-PV01-2009には次のような記載も有り、往復測定の結果が一致しない場合も考慮されている。

「なお、セル出力特性は、上述のように掃引方向に依存しない条件下で測定されるべきものであるが、十分に長い掃引時間の確保が困難な場合には、測定誤差による過大評価回避の観点から、順方向でも測定する。」

順方向の掃引であれば、少なくとも過大評価することはないので、KAST内の測定ルールの一つとして定めてみたいと考えている。

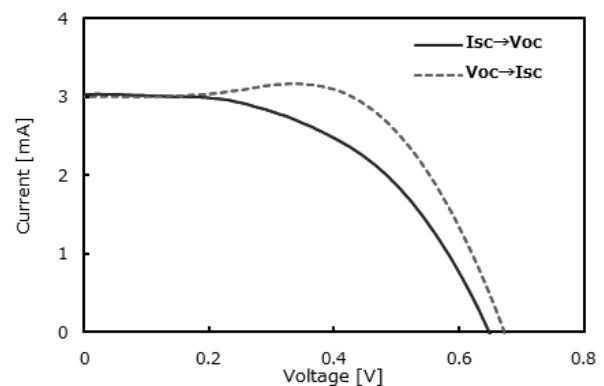


図3 速い掃引において往復測定の結果が一致しない例 (DSC有機溶媒セル)

太陽電池セルの挙動を詳細に追求する実験は重要であるが、性能評価を業務として考えた場合、現実的な測定時間で完了させるというのも重要な課題である。

これまで通りの、発電挙動を明らかにする実験と並行して、過大評価を避けた現実的な時間での測定、高い再現性という3点を満足するような条件を探し出す実験を行う予定である。

もう一つの課題である、「絶対値分光感度測定」においては、電流値の変動が少ない状態での測定が必須となる。

そのため、セル特性が安定するまでに要する予備照射時間および発電挙動の初期特性を把握する必要がある。

図4に連続照射時のIsc変化例を示す。

これまでの実験によって、DSCの場合は光照射後約30分間で電流値が大きく低下し、その後はほぼ一定または緩やかに上昇する傾向にある。

現時点では暫定的に、「1sunの光照射を開始した後、セル裏面で検出した温度が25°Cに安定した後に10分間におけるIscの変化率(傾き)が0.2%以内になったところ。」を安定と定義している。この考えも今後の実験により再現性の高い条件に詰めていく予定である。

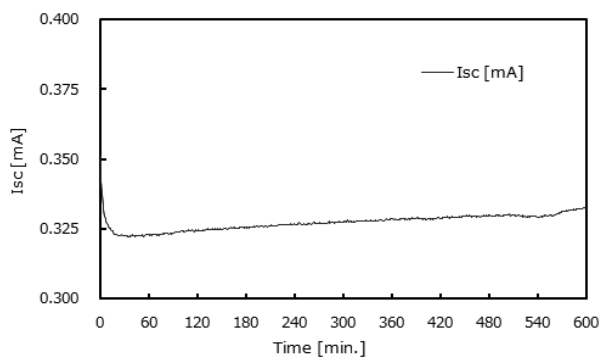


図4 短絡電流値の時間変化例  
(DSC イオン液体セル)

### 3. 光劣化試験

以前に購入したLEDシミュレーター(セルシステムIris-3)は、発生する光が異なる複数のLEDを組み合わせるため、制御系のプログラムを変更させることで、特定の波長域の光を発生させることができる。

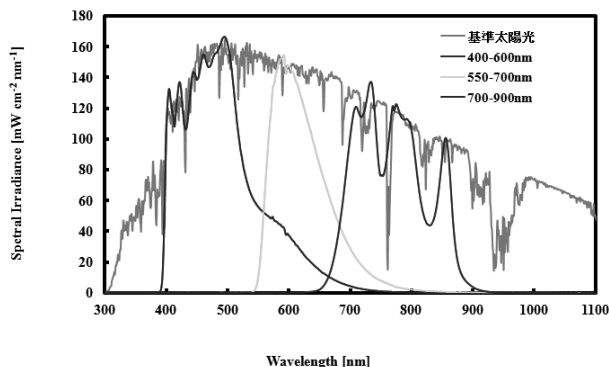


図5 プログラムの変更により異なるスペクトルの光が得られた例

図5はその例である。セルに特定の波長の光のみを照射させることで、どの波長の光が劣化に影響を与えているのかを特定することができる。

図に示してあるスペクトルは立ち上がり部分、落ち込み部分の傾斜が緩くシャープさに欠けるが、BPFとの組み合わせでかなり解消できることが判明している。

既にその実験を開始しているが、FIRSTプログラム参画企業のデータであるため公表することはできない。

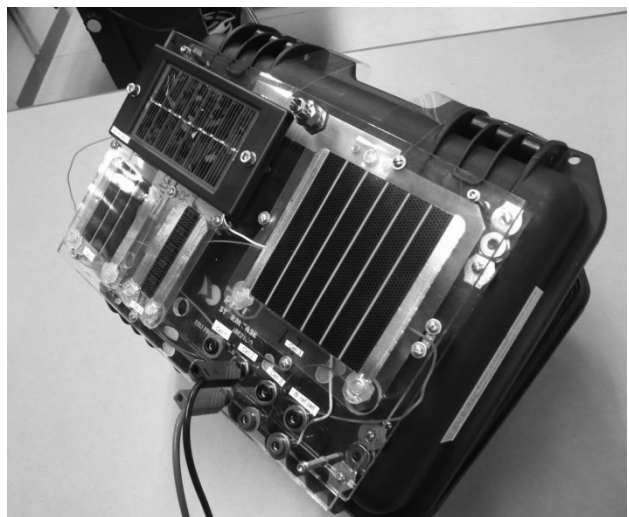
### 4. ラウンドロビンテストの実施

DTU(デンマーク工科大学)Frederik Christian Krebs教授から有機薄膜太陽電池(OPV)のラウンドロビンテストの提案があり、KASTもそれに参加した。

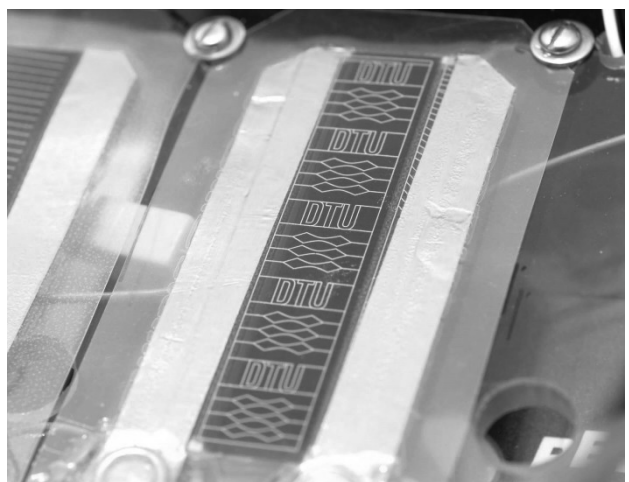
図6(a)は送られてきた複数のセル・モジュールを測定のためにセットした状態である。

準備されたOPVは3種類あり、いずれもフィルム型であった。また、(b)はNo.2セルの拡大であるが、集電電極を細かく配置し、さらにデザイン性を持たせてあり、完成度が高いという印象を受けた。

実際に測定した結果を図7に示す。



(a) 測定のためにセル・モジュールをセットした状態



(b) No.2セルの拡大画像

図6 DTUから送られてきた測定サンプル

今回のテストでは、一つの測定セットを順番に送っていき、各国において晴天時に測定することになっている。

試験時の太陽光照射量が異なる点は参照用多結晶 Si モジュールの電流値と比較することで解消しているが、測定時期が違うためにセルの劣化が進行していると予想される。従って測定値そのものはあまり安定していないと推察される。

しかしながら、有機太陽電池においてラウンドロビンテストが開始されたのは大きな進歩であるし、すでに今回の反省を元に第二回目の計画が議論されているという情報も得ている。

また、台湾国立中央大学との間に DSC による二国間ラウンドロビンテストを開始しようという計画も進められている。DSC は液体を使用しているため、その運搬方法などクリアしなければならない問題が複数あるが、是非実現させたい案件である。

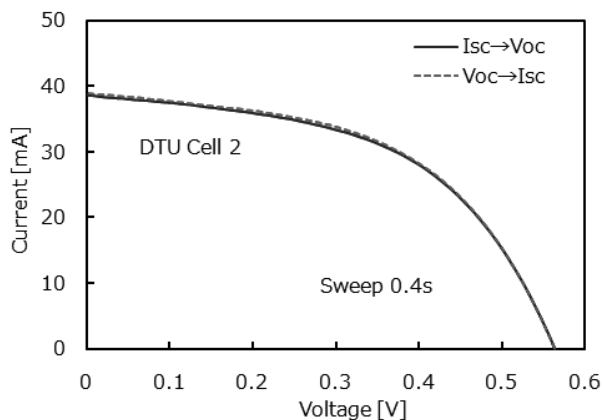


図 7 有機薄膜太陽電池の I-V 測定結果  
(片道 0.4 秒と速い掃引でも往復測定の結果が一致する)

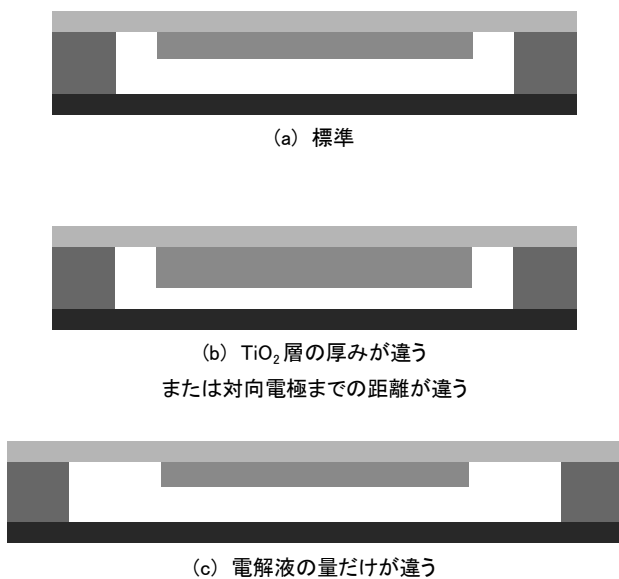


図 8 物理的寸法が違うセルの模式図

## 5. 今後の課題

これまではプロジェクト関係機関から提供されたセルを使用してきたが、基礎的な挙動把握のために物理的数値を変更させたセルを作製してもらい、各要因が発電挙動にどのような影響を与えるのかを解析する。図 8 に模式図を示す。

さらに、将来的には PJ で購入した機器を活用し、太陽電池に限定しない【光機能計測】を展開したいと考えている。また、既存の高度計測センター業務 (TEM, FIB, SEM, XPS 等) と連携することで付加価値の高い分析サービスを展開できると考えている。

# 有機系太陽電池における電気特性の評価と、 TiO<sub>2</sub>多孔体の機能性評価

酒井宗寿・竹井寛子

## 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。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<sup>1-3)</sup>。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( $\mu$ -PCD)法を、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 $\mu$ -PCD法を用いて測定した際の方法及び計測例について紹介する。

一方、二酸化チタンの多孔体は色素増感太陽電池の電極材料や環境浄化材料として期待されている。二酸化チタンモノリス構造体(以下、TiO<sub>2</sub>モノリス構造体)は比表面積が大きく連続孔を有する多孔体であることから、現存の環境浄化材料の処理速度を向上させ、光触媒の更なる高効率化をもたらす可能性がある。ここでは、細孔径が異なるTiO<sub>2</sub>モノリス構造体を作製し、光触媒活性を比較検討した結果を報告する。

## 2. $\mu$ -PCD法によるキャリアライフタイムの平面的測定

### 2.1 測定方法

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。図1に、 $\mu$ -PCD法の実験図を示す。励起光にはNd:YAGレーザー(波長:532nm、パルス幅:6ns、強度:50 $\mu$ J、繰り返し率:8Hz)を用いた。ファイバーを介してサンプル表面に照射することで、スポット径は1.2mm~5mmの範囲で制御することができる。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10.0~10.5GHz帯(Xバンド)を使用し<sup>4)</sup>、得られた応答をオシロスコープに出力させた。そのセンサーヘッドとファイバーはXYステージで任意に移動させることができる。各機器は、Lab Viewを搭載したPC内の制御アプリケーション操作で稼働させた。

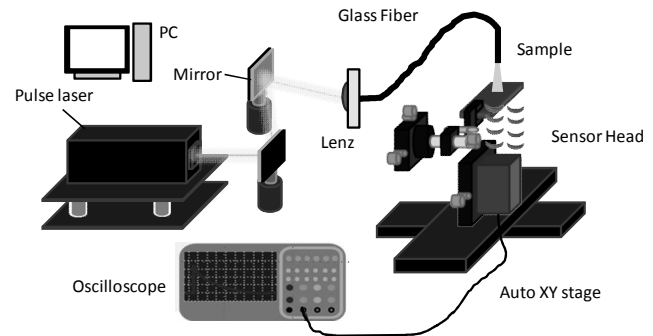


図1.  $\mu$ -PCD法による測定システムの概念図

### 2.2 励起光照射による評価サンプルへの影響

$\mu$ -PCD法は信号を積算する際に励起光を照射することから、光劣化が最も懸念される点である。現状での測定条件(波長:532nm、パルス幅:6ns、強度:50 $\mu$ J、繰り返し率:8Hz)において、励起光を連続照射(7時間)することで、有機薄膜太陽電池への影響を評価した。その結果、外見上の劣化点は観察されず、太陽電池セルのキャリアライフタイムやIV特性への影響は見受けられない(図2)。

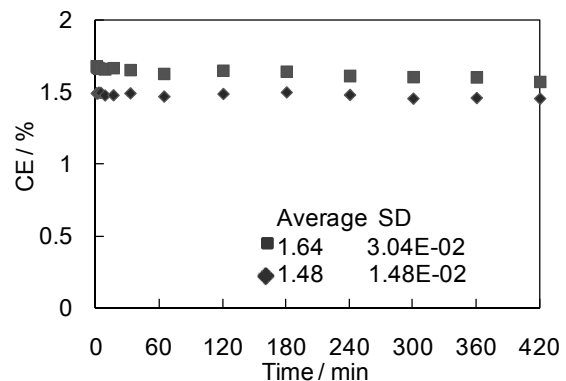


図2. 励起光を連続照射した際の変換効率変化

### 2.2 ライフタイムのマッピング

有機薄膜太陽電池の電極付近のライフタイムを走査させて計測した場合、有機層が露出している部分はキャリア由来の信号が得られるが、電極が設置されている部分は信号が発生しないはずである。S/N比で3を閾値とした場合、現状のシステムでも電極の形状が繁栄された分布図を描くことができる。しかしながら、励起光のスポットの一部や散乱光が有機半導体を励起させることから、電極部分を狭く描画してしまう(図3)。今後、より小さいスポットサイズでの計測可能条件を探索することから、描画精度をさらに向上させる必要がある。

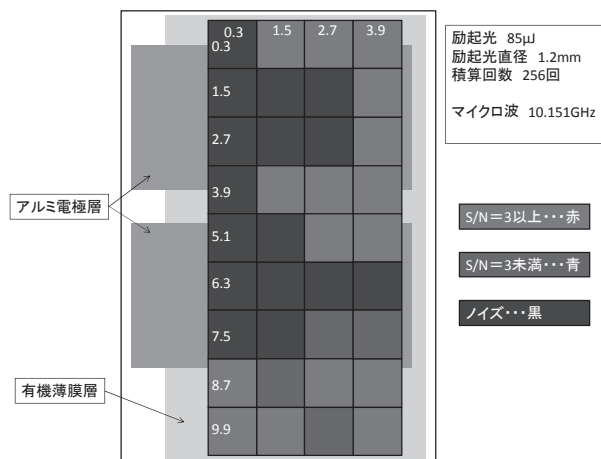


図3. μ-PCD 法によるキャリアライフタイム分布図

### 3. 二酸化チタンモノリス構造体

#### 3. 1 多孔体（モノリス構造体）の作製方法

TiO<sub>2</sub> モノリス構造体は、数百 nm ～ 数μm 程度のマイクロ孔と数十 nm 程度のメソ孔を有することが、細孔径分布の計測から示唆されている。それ故、比表面積が大きい多孔体構造であることから、高効率の光触媒活性を有する環境浄化材料として期待される<sup>5)</sup>。評価サンプルとして、チタンプロポキシド・塩酸・PEG・水・N-メチルホルムアミドを加えたゾルゲル溶液を適宜調整し、耐圧容器内でチタンプロポキシドを加水分解（60℃）することでチタニア多孔体を作製した<sup>6)</sup>。この時、チタンプロポキシドと PEG が分相し、チタンプロポキシドが加水分解することで粘性が増加して、共連続構造が形成される。さらに、200℃で固化させ、洗浄乾燥をしたのち、500℃で焼成してアナターゼ型 TiO<sub>2</sub> モノリス構造体を作製した。その際、モノリス液の組成比を変更することでマイクロ孔のサイズを制御し、光触媒活性を確認した。

#### 2. 2 光触媒活性

TiO<sub>2</sub> の結晶サイズは、いずれのマイクロ孔を有するモノリス構造体でも、20nm 程度であることが確認できる（図4a）。さらに、結晶と結晶の間にナノスケールの空隙（メソ孔）が、一部の領域で観察することができた（図4a）。この特徴は、マイクロ孔のサイズに関わらず同様である。また、モノリス構造体を形成する際に使用するチタンプロポキシドや塩酸起源の物質（Na、Cl）が残存し、光触媒活性を低下させることを懸念材料としていたが、TiO<sub>2</sub> 光触媒活性を阻害する元素類は検出されていない（図4b）。ただし、一部、圧力容器由来と思われる不純物（Rh：ロジウム）が検出されており、作製手順の改善を図る必要性を確認した。これらの TiO<sub>2</sub> モノリス構造体の光触媒活性は、マイクロ孔のサイズに関わらず、ほぼ一定であることが伺える（図5）。これは、何れのマイクロ孔サイズを有するモノリス構造体でも、メソ孔のサイズと分布がほぼ同等であることによるとと思われる。

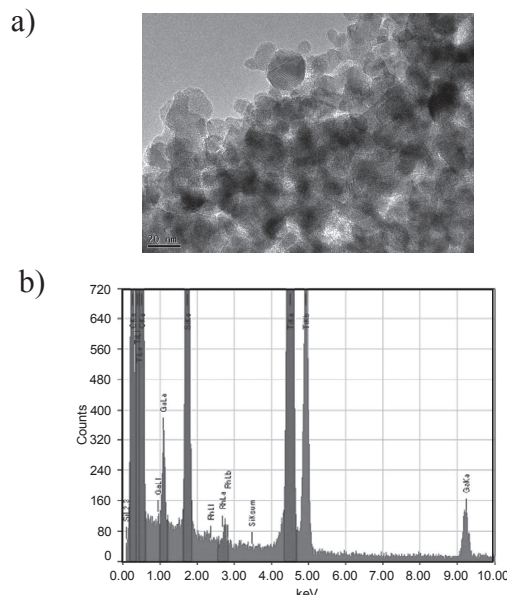


図4. TiO<sub>2</sub>モノリス構造体 a) TEM像 b) EDSスペクトル

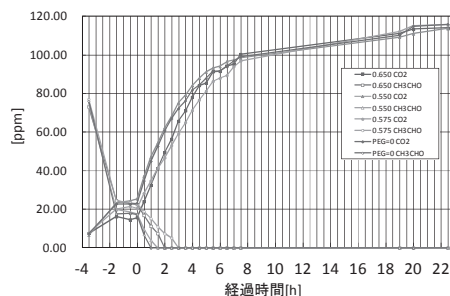


図5. CO<sub>2</sub> 及び CH<sub>3</sub>CHO 濃度の計時変化

### 3. 考察及び今後の展望

μ-PCD 法は信号を積算する際に励起光を照射することから、光劣化が最も懸念される点であったが、計測前後で有機薄膜太陽電池の性能低下は発生しない。また、現行のシステムで 1.2mm 程度での解像度（Si 太陽電池用として上梓されているμ-PCD 法での解像度と同等）でライフタイムのマッピングは可能であるが、今後、より小さいスポットサイズでの計測可能条件を探索することから、描画精度をさらに向上させる必要がある。一方、TiO<sub>2</sub> モノリス構造体の光触媒活性は、マイクロ孔のサイズに関わらず、ほぼ一定であることから、マイクロ孔が異なるが光触媒活性が同等である空気浄化フィルター等の部位として応用展開が期待される。

#### 【参考文献】

1. G. Dennler, A.J. Mozer, G. Juska, A. Pivrikas, R. Osterbacka,
2. A. Fuchsbaauer, N.S. Saricicfci, ORGANIC ELECTRONICS,, 7, 4 (2006)
3. T.S. Horanyi, T. Pavelka, P. Tutto, Appl. Surf. Sci., 63, 1, 306 (1993)
4. J. L. Bredas et al. Acc. Chem. Res., 42, 1691 (2009)
5. A. Fujishima et. al., Surface Science Reports, 63, 12, 515 (2008).
6. J.Konishi et al./J.Chromatogr.A 1216 (2009) 7375-7383.

## 業 績

### 【原著論文】

- 1.D. Aoki, T. Aoki, H. Saito, S. Magaino, K. Takagi  
”Methods for Spectral Responsivity Measurements  
of Dye-Sensitized Solar Cells”Electrochemistry,  
80(9),640-646(2012)
- 2.K. Takagi, S. Magaino, H. Saito, T. Aoki, D. Aoki  
“Measurements and Evaluation of Dye-sensitized Solar Cell  
Performance,”J. Photochemistry and Photobiology C:  
Photochemistry Reviews, 14, January, 1-12 (2013).

### 【口頭発表】

- 1.K.Takagi, S. Magaino, H. Saito, T.Aoki, D.Aoki,”Evaluat  
ion Methods of Dye-Sensitized Solar Cells”27<sup>th</sup> European  
Photovoltaic Solar Energy Conference and Exhibition,  
Frankfurt(Germany), Sep 27 (2012)
- 2.T.Aoki, S.Magaino, H.Saito, D.Aoki, K.Takagi, “Comparison  
of Measurement Methods for DSC and OPV Performance”  
International Conference on the Evaluation & Standardization  
of Organic Photovoltaics (ICES2013), Jan 26 (2013)
- 3.青木大輔、青木智子、斎藤英純、馬飼野信一、高木克彦  
“Method for evaluation of dye-sensitized solar cell  
performance”2012年光化学討論会、2012年9月12日、  
東京
- 4.斎藤英純、近藤敏之、青木大輔、青木智子、馬飼野信一、  
高木克彦、「有機系太陽電池の性能評価手法の確立」、神  
奈川県ものづくり技術交流会、2012年11月7日、神奈川県
- 5.斎藤英純、「有機系太陽電池の出力および耐久性の評価法  
について」、川崎国際環境技術展 2013、2013年2月1日、  
神奈川
- 6.斎藤英純、「有機系太陽電池の計測法について」、応用物  
理学会第5回有機薄膜太陽電池サテライトミーティング、  
2013年3月26日、神奈川
- 7.斎藤英純、青木大輔、馬飼野信一、高木克彦、藤嶋昭、「有  
機系太陽電池の性能評価方法に関する報告」、電気化学会  
第80回大会、2013年3月30日、仙台

### 【新聞発表・取材】

- 1.Web 記事掲載、「KAST、有機系太陽電池の特性評価法の  
確立めざす」、SJM blog、2012年9月3日
2. 新聞掲載、「有機系太陽電池半日で性能評価」、日本経済  
新聞、2013年2月26日



有望シーズ展開プロジェクト

山口「高効率次世代燃料電池」プロジェクト

# 山口「高効率次世代燃料電池」プロジェクト

プロジェクトリーダー 山口猛央

## 【基本構想】

本プロジェクトは、平成 23 年 10 月より実施した戦略的研究シーズ育成事業の成果をさらに展開し、広温・広湿・広電流密度型 PEFC 燃料電池の創生を目指した取り組みを実施する。

現在の科学技術では、化学物質から仕事（電気）への変換効率は低い。火力発電所における変換効率は平均 40%程度であり、自動車の移動仕事はガソリンエンジンで 15%程度、ハイブリッド車でも 35%程度である。熱力学的な到達点は、水素が水蒸気へとなる仕事量を有効に活かせれば、効率は 25°Cで 95%以上にもなる。現実世界で目指すべきは、60~70%の変換効率であろう。固体高分子形燃料電池（PEFC）は、低温、小型であり、必用な場所で、必用なときに、必用量だけの発電が可能であり、非常に有望な発電デバイスである。しかしながら、常温から 100°C程度の低温で高効率に発電できる PEFC は、電解質に必要な水分の調整が必要不可欠であり、高効率化、信頼性向上を妨げている。さらに、白金使用量の低減も大規模普及前に達成すべき課題である。

水管理が重要と言われる PEFC において、材料自身を変更することにより、低湿度から高湿度までの幅広い範囲での運転が可能となれば、複雑な補器が必要なくなりシステムが簡便となる。信頼性向上、低コスト化だけでなく、電池として重要な総合効率の向上が実現できる。さらに、110°C程度の高温運転が可能となれば、触媒反応が速くなるだけでなく、水を液体水ではなく気体の水蒸気として扱えるため、現状からの大幅な変換効率向上が見込める（定置型では天然ガスから電気への変換効率が現状 35~40%）。また、白金使用量の低減も普及のためには重要な課題であり、白金量を低減し、さらに触媒活性と耐久性を両立する触媒の開発も重要である。これらの技術により、大型発電所よりも高い効率で発電できれば、ピーク変動に対応した on-off 可能な家庭内発電はもちろん、燃料電池自動車が電気自動車よりも高い効率となる。安全で安心な電気エネルギーの供給が実現できる。

しかしながら、現状の燃料電池に用いられる電解質および触媒では目的性能を得られておらず、新たな材料または考え方が必要である。新しい電解質、電解質膜と触媒、触媒層の開発が必要である。有望シーズ展開プロジェクトでは、これまでの研究成果を発展させ、新しい触媒、触媒層開発と、電解質、電解質膜の更なる開発を行い、無加湿を含む広い湿度領域、110°C程度の高温での発電が可能な燃料電池開発を行う。さらに、従来よりも極めて高い出力を有する燃料電池の開発を行う。

## 戦略的研究シーズ育成事業での取組

### 1. 研究目的

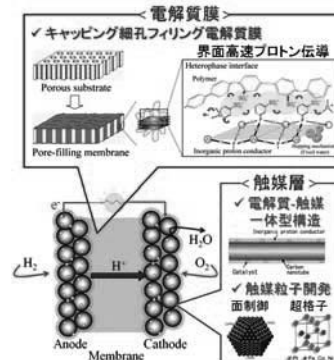
平成 23 年度 10 月から平成 25 年 3 月までの戦略的研究シーズ育成事業として、高効率エネルギー変換型固体高分子形燃料電池の実現へ向けて研究を推進した。

固体高分子形燃料電池は、低温でも高いエネルギー変換効率が達成できる小型で軽量の発電デバイスであるが、理論的な最高電圧が 1.2 V であるのに対し、現実には最高でも 1 V しか得られておらず、実際に仕事を取り出している発電状態での変換効率はさらに低い。しかし、現在の固体高分子形燃料電池の開発では、本来の特徴である高い変換効率の実現に向けた研究がほとんど行われていない。本研究グループではこれまでに、水を限りなく無くすことで高電位における白金触媒表面の酸化が抑えられると考え、極低湿度の発電において 90%以上の変換効率に相当する 1.17 V を得た。一方で、ナノ粒子とポリマーの異相界面では、水が介在しなくても高速にプロトン伝導することを発見した。しかし現状では、

発電により水が生成する燃料電池では、仕事を取り出しながら、すなわち電流を流しながら、極低湿度条件を維持することはできず、また界面高速プロトン伝導現象が発現する膜を用いた膜電極接合体

(MEA)は、高湿度・高電流密度領域ではフラッシングによると思われる性能低下が顕著である。高効率な固体高分子形燃料電池は、高電圧運転を高電流密度領域まで維持することで達成

されるが、そのためには水由来の白金の表面酸化を



抑制する触媒開発と、広湿度運転を可能とする電解質膜および触媒層の開発をコーディネートする必要がある。

そこで、戦略的研究シーズ育成事業では、高効率エネルギー変換型固体高分子形燃料電池の開発へ向けて、図1に示すように、電解質膜と触媒層の協奏的开发を行った。具体的には、①広湿度で高い性能を発現する触媒層構造として、電解質-触媒一体型の全無機触媒層を開発するとともに、②高電位で表面酸化されにくい白金合金系触媒粒子の開発へ向けた検討を行った。また、③無機ナノ粒子と電解質ポリマーの異相界面が連結した電解質を多孔質基材の細孔中に充填した細孔フィリング膜で発現する異相界面における高速プロトン伝導機構の機構解明へ向けた検討を行った。

## 2. 研究成果

以下に挙げるのは、戦略的研究シーズ育成事業で得られた具体的な研究成果であり、高効率エネルギー変換型燃料電池を実現するための重要な基盤技術となる。

### (1) 電解質-触媒一体型構造の全無機型触媒層の開発

広湿度で高い性能を発現する触媒層構造として、図2に示すように白金ナノ粒子を担持したカーボンナノチューブ(Pt/CNT)を、低湿度でもプロトン伝導性を維持する無機プロトン伝導体・硫酸ジルコニウム(ZrS)で被覆した全無機型触媒層を開発した。従来の触媒層は、親水的な電解質ポリマーが触媒層に存在するため、高湿度条件において水の凝縮に伴うガス拡散の阻害(フラッディング)により性能が低下し得るが、本研究で開発する無機電解質-触媒一体型の全無機型触媒層では、従来とは全く異なる構造を構築することにより、高湿度でのフラッディングを抑制する。また、高温耐性に課題を有する有機材料ではなく、無機化合物をプロトン伝導材料に用いていることから高温での使用にも耐え、さらに触媒-電解質一体型とすることにより、電子伝導性・イオン伝導性・反応場を持ち合わせることから、全ての白金触媒を電気化学反応に利用できる点も利点である。

触媒-電解質一体型材料は、Pt/CNT存在下でZrSを生成することにより作製した。ZrSで被覆する前後の透過電子顕微鏡(TEM)像より、Pt/CNTの表面がZrSで被覆されていることが示唆された。また、ZrSで被覆することによる触媒活性への影響を評価するために、電気化学測定を行ったところ、ZrSの被覆

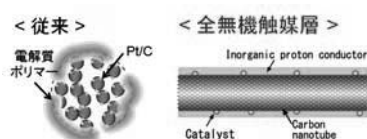


図2 従来触媒層と全無機触媒層の比較

前後で触媒表面積、酸素還元活性に大きな変化はなく、ZrSによる被覆は触媒活性に大きな影響を与えないことが示された。

そこで、開発したZr被覆Pt/CNTを触媒に用いて作製した全無機型触媒層と、市販の電解質膜であるNafion212膜を用いてMEAを作製し、発電試験を行ったところ、触媒層には他の電解質材料を加えていないにもかかわらず発電性能が得られた。この結果は、本事業で開発した触媒-電解質一体型材料を用いた全無機型触媒層により、無機プロトン伝導体-触媒間で三相界面が形成されていることを示唆している。

### (2) 白金合金系触媒粒子の開発

高電位で表面酸化されにくい白金合金触媒の開発へ向けた検討として、触媒粒子の特定面を成長させて形や大きさを制御した合金ナノ粒子、および規則的に原子が配列した合金構造である超格子構造を有する白金合金ナノ粒子触媒を合成した。

特定面を成長させて形や大きさを制御した合金ナノ粒子は、結晶の特定面に物理吸着するポリマーと還元性を有する溶媒を用いることで合成した。本手法により合成したコバルト白金合金(CoPt/C)は、Pt/Cや市販のCoPt/Cと比較して、ポジティブな電位から酸素還元電流が得られた。0.9V、0.85Vで得られた電流値を白金重量、白金比表面積あたりで規格化して比較した結果、本事業で合成したCoPt/Cは市販触媒と比較して、白金重量、白金表面積あたりで高い酸素還元活性を示した。

超格子構造は、FePt合金等において特定の組成比で高温熱処理することにより、通常の不規則な配列の構造から規則的な配列に変態した合金構造であり、構造的に安定であることが報告されている。超格子構造を有する白金鉄コバルト担持カーボン触媒粒子(PtFeCo/C)は熱還元法により合成し、X線回折パターン(XRD)等から面心正方(fct)規則構造であるL1<sub>0</sub>型超格子構造を有することが示された。酸素還元活性は酸溶液中の回転電極測定により評価した。0.9Vにおける電流値を白金重量当たりで規格化して比較したところ、fct規則構造を有するPtFeCo/Cは市販のPt/Cと比較して約5倍程度の活性を有することが分かった。また、溶液中お

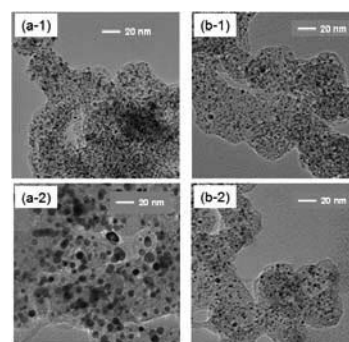


図3 MEAにおける耐久性評価前後のTEM像 (a) 市販Pt/C, (b) PtFeCo/C, 1: 評価前, 2: 評価後

よび膜 - 電極接合体(MEA)で、負荷応答型電位サイクル試験により耐久性評価を行ったところ、電気化学活性表面積の低下が大幅に抑制された。MEAにおける耐久性評価前後の TEM 像(図 3)より、超格子構造を有する白金合金は、不規則構造の PtFeCo/C や市販の Pt/C と比較して、耐久性試験による粒子の肥大化が抑制されたことが分かった。

### (3) 界面高速プロトン伝導現象の機構解明へ向けた検討

本研究グループが発見した無機ナノ粒子と電解質ポリマーの異相界面でプロトンが高速伝導する現象の機構解明へ向けて、界面状態の分析を行った。界面高速プロトン伝導は、表面修飾ジルコニアナノ粒子へ電解質ポリマーを多点吸着により巻きつけたキャッピング体を、多孔質基材の細孔へ充填したうえで、プロトン伝導体 Zirconium sulfophenylphosphonate (ZrSPP)へ変換したキャッピング細孔フィリング膜(図 4)で発現することが確認されている。従来は、細孔フィリング膜で検討を行ってきたが、分析を容易にするために、本研究ではキャッピング電解質を細孔へ充填せずキャスト膜の状態

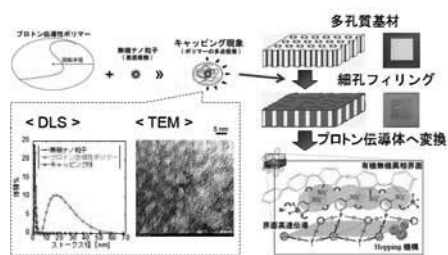


図 4 界面高速プロトン伝導現象を発現するキャッピング細孔フィリング膜

で評価した。また、電解質ポリマーには、芳香族炭化水素系電解質ポリマーの一種であるスルホン化ポリエーテルスルホン(SPES)を用いた。

細孔に充填していない状態でプロトン伝導性を評価した結果、キャッピング電解質膜は、ZrSPP を合成してから SPES と混合した単純混合膜や、SPES と ZrSPP それぞれの単体の和より高い伝導性を示した。このことから、キャスト膜においても、キャッピング電解質膜の無機粒子と電解質ポリマーの界面では高速プロトン伝導現象が発現していることが示唆される。

そこで、キャッピング電解質膜と単純混合膜について、低温下における  $^2\text{H}$ -固体 NMR 測定を行った。単純混合膜では温度降下に伴いピークが減少するとともに高周波数側へシフトしたのに対し、キャッピング電解質膜では、低温下でも鋭いピークが維持された。単純混合膜における挙動は、膜中に存在する水が凍ることに伴いプロトンの運動性が低下する挙動に相当しているのに対し、キャッピング電解質膜ではプロトンの運動性が低温下でも維持されていることを示している。キャッピング電解質膜の  $^{17}\text{O}$ -固体 NMR を同様に測定した結果、温度降下に伴い

ピーク強度が減少したことから、キャッピング電解質膜においても低温下において水は凍り運動性が抑制されることが示された。 $^2\text{H}$  は低温下でも運動性を維持していたことを考え合わせると、キャッピング電解質膜においては、水が動かなくてもプロトンが運動している可能性が示唆される。この現象は、有機無機異相界面を模した量子化学計算においても確認されており、異相界面では高密度にスルホン酸が存在する構造により、プロトン移動と再配向がそれぞれ起こりやすい距離が形成され、水が大きく運動しなくても、プロトンが連続的に移動し得ることが示されている。したがって、本研究で実施した分析の結果は、量子化学計算の結果とも傾向が一致しており、キャッピング電解質膜の異相界面における高速プロトン伝導現象の機構解明へ大きく近づいたといえる。

### 有望シーズ展開プロジェクトでの実施内容

有望シーズ展開プロジェクトでは、これまでの研究成果をさらに発展させ、新しい触媒、触媒層開発と、電解質、電解質膜のさらなる開発を行い、それぞれをコーディネートすることにより、無加湿を含む広い湿度領域、 $110^\circ\text{C}$ 程度の高温での発電、高い電流密度達成が可能な“広温・広湿・広電流密度型 PEFC 燃料電池”の創生を目指した取り組みを実施していく。

本事業は、以下に記す 4 つの研究項目から構成される。

#### (1) 新規触媒層材料の開発

##### (1-1) 高性能触媒開発

プロトンが移動する酸環境では、白金以外の金属触媒は溶解するため、コアシェルなどのナノレベルでの構造制御が必要であった。白金結晶の中に鉄やコバルト、ニッケルなどの安価な金属を挿入し超格子構造とすれば、安定であり、白金原子間距離を制御することができることを我々は見いだした。白金量を低減し、さらに高い活性および耐久性の両立に成功しており、燃料電池発電による耐久試験も実施し、さらに高い性能と実用的な耐久性を有する元素組成および超格子構造を見いだす。

##### (1-2) 新規触媒層材料の開発

触媒層では、燃料、プロトン、電子の移動(拡散)が必要であるが、イオン移動のための湿度が確保されているときには、最も遅いのは燃料の物質移動である。物質移動が律速とならない、新たな触媒層材料および構造を提案し、従来よりも極めて高い電流密度を達成する。

## (2) 電解質材料の開発

### (2-1) 高温低湿度対応アイオノマーの開発

高温低湿度領域でのプロトン伝導には、高密度に密集したスルホン酸基構造が有効であることを我々は見いだした。そこで、高密度にスルホン酸基を密集させたイオンチャンネル構造を有し、さらに自己組織的にチャンネルネットワークを材料内部で連結する電解質材料を開発する。自己組織化を利用し、スルホン酸基間距離を制御し、さらに明確なイオンチャンネル構造のネットワークを持つ材料を開発し、低湿度でも高いイオン伝導性を有し、さらに触媒層内部が高湿度になったときにも、材料の膨潤を抑制し、物質移動を妨げない新規な材料を開発する。

### (2-2) 高温低湿度対応細孔フィリング電解質膜の開発

電解質ポリマーの高いスルホン酸基密度に伴う水による膨潤を抑制するために、多孔基材の細孔内部に電解質ポリマーを充填した細孔フィリング電解質膜の開発を行う。基材は、従来のポリエチレン多孔基材から耐熱性の高いポリイミド多孔基材に変更し、高耐熱性電解質膜の開発を目指す。さらなるプロトン伝導性の向上と耐熱性の付与を同時に行うため、多孔性ポリイミド基材を独自プロセスの粘弾性相分離法により作成し、細孔フィリング電解質膜用に、膜構造（細孔径、空孔率など）を最適化する。さらに、図5に示すように、細孔内部に高密度なスルホン酸基ネットワークを自己組織的に構築し、高温低湿度においても、高いプロトン伝導性と耐久性を有する細孔フィリング電解質膜を開発する。

## (3) 新規 MEA の開発と燃料電池発電

開発した触媒層材料、アイオノマー、電解質膜をコーディネートさせ、さらに構造制御を行い、高温、低湿度に対応した MEA を開発する。また、カーボンフリー電極材料を用い、極薄触媒層を形成することにより、高電位運転で高い電流密度を実現する。発電試験により、問題点を突き詰め、材料開発にフィードバックを行う。

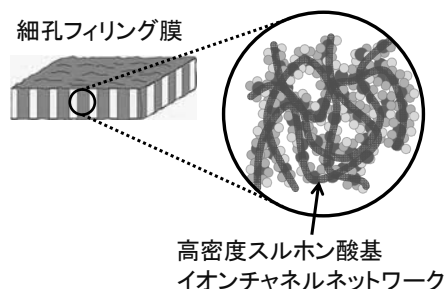


図5 細孔フィリング電解質膜の微細孔内精密マイクロ構造制御の概念

### (4) 細孔フィリング膜技術基盤の確立と省エネデバイスへの展開

様々な電解質材料を数十ナノメートル細孔に充填する技術、充填した細孔フィリング膜を用いて、空気透過は抑制し、水を選択的に透過する膜を開発し、例えば、エアコンなどの熱と水の移動を効率的に行うデバイスの心臓部となる膜開発を行う。これらの細孔フィリング膜技術基盤を確立し、様々な省エネルギーデバイスへの応用を目指していく。

以上の研究概要から、広い温度、広い湿度、広い電流密度領域で高効率な次世代燃料電池開発を実施する。触媒・触媒層と電解質・電解質膜の新規開発を同時に進め、問題点を総合的に補完し、真に有るべき姿のデバイス構築を行う。個々の要素技術開発も進めるが、それぞれの機能を連携させ新しい性能をデバイス全体としてシステム設計し、ブレークスルーを生み出す新しい試みである。

加えて、本事業で開発する次世代燃料電池は、大型発電所をしのぐ効率で低コストな家庭用発電・移動用発電を実現でき、現在の変換効率の低いエネルギー技術に替わる革新的技術となり得る。これは、日本初の世界標準技術として、世界へ展開・普及でき、世界の温暖化ガス排出量抑制、エネルギー資源の有効利用にも大きく貢献できるだろう。

## 業績

### 【原著論文】

1. Bhalchandra Kakade, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi  
Highly Active Bimetallic PdPt and CoPt Nanocrystals for Methanol Electrooxidation  
J. Phys. Chem. C, 116(13), 7464-7470 (2012)
2. Tatsuya Nakajima, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, and Takeo Yamaguchi  
Systematic Evaluation of Polymer Electrolyte Fuel Cell Electrodes with Hydrocarbon Polyelectrolytes by Considering the Polymer Properties  
J. Phys. Chem. C, 116(1), 1422-1428 (2012)
3. Tatsuya Nakajima, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi  
Introduction of Size-Controlled Nafion/ZrO<sub>2</sub> Nanocomposite Electrolyte into Primary Pores for High Pt Utilization in PEFCs  
J. Electrochem. Soc., 160(2), F129-F134 (2013)
4. Bhalchandra A. Kakade, Hailin Wang, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi  
Enhanced Oxygen Reduction Reaction by Bimetallic CoPt and PdPt Nanocrystals  
RSC Advances, in press (DOI: 10.1039/C3RA40920A)

### 【総説・解説】

1. 山口猛央  
自動車用電池技術における高分子化学の役割  
高分子, 60(8), 515-518 (2011)
2. 山口猛央  
まだまだ低すぎるエネルギー変換効率～燃料電池材料の開発をめぐる～  
化学, 67(4), 74-75 (2012)

### 【口頭発表・国内学会】

1. 中島達哉・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
炭化水素系電解質ポリマー物性が燃料電池電極性能へ与える影響の系統的評価  
化学工学会第 77 年会、東京、2012 年 3 月 15 日～17 日
2. 汪海林・B. Kakade・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
Synthesis and Characterization of Novel 3-D Graphite Oxide-Nanoribbon Supported Metal Electrocatalysts for Fuel Cells  
化学工学会第 77 年会、東京、2012 年 3 月 15 日～17 日
3. 汪海林・B. Kakade・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
Novel 3-D Graphite Oxide-Nanoribbon Supported Metal

### Catalysts for Fuel Cell Applications

- 電気化学会第 79 回大会、静岡、2012 年 3 月 29 日～31 日
4. 小川敬也・田巻孝敬・大橋秀伯・牛山浩・山下晃一・山口猛央  
有機-無機界面高速プロトン伝導現象を利用した固体高分子形燃料電池の開発  
化学工学会第 44 回秋季大会、宮城、2012 年 9 月 19 日～21 日
5. 中島達哉・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
Nafion キャッピング体を用いた電極触媒層の触媒利用率向上に向けた検討  
化学工学会第 44 回秋季大会、宮城、2012 年 9 月 19 日～21 日
6. 汪海林・B. A. Kakade・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
A Facile Thermal Method for Producing Novel 3-D Graphite Oxide-Nanoribbon Supported Metal Electrocatalysts for DMFC  
化学工学会第 44 回秋季大会、宮城、2012 年 9 月 19 日～21 日
7. 中島達哉・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
有機-無機ナノハイブリッド電解質を用いた燃料電池電極の開発  
第 2 回 CSJ 化学フェスタ 2012、東京、2012 年 10 月 14 日～17 日
8. 皆川貴彦・B. A. Kakade・汪海林・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
固体高分子形燃料電池における白金コバルト合金ナノ粒子触媒の構造制御と酸素還元活性の評価  
第 53 回電池討論会、福岡、2012 年 11 月 14 日～16 日
9. 皆川貴彦・A. Balamurugan・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
固体高分子形燃料電池における三元系白金合金ナノ粒子触媒構造制御と耐久性評価  
化学工学会第 78 年会、大阪、2013 年 3 月 17 日～19 日
10. 中島達哉・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
Zr 化合物-Nafion ナノハイブリッド電解質による PEFC 触媒層の開発  
日本化学会第 93 春季年会、滋賀、2013 年 3 月 22 日～25 日
11. 小川敬也・青沼堯・田巻孝敬・大橋秀伯・牛山浩・山下晃一・山口猛央  
有機-無機界面高速プロトン伝導現象の発現と解明  
電気化学会第 80 回大会、宮城、2013 年 3 月 29 日

日～31日

12. 皆川貴彦・A. Balamurugan・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
超格子構造を有する白金系合金の固体高分子形燃料電池カソード触媒としての耐久性評価  
電気化学会第80回大会、宮城、2013年3月29日～31日

#### 【口頭発表・招待講演】

1. Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi  
Using gPROMS models for fuel cell design  
PSE Japan User Meeting 2011, 横浜、2011年10月6日
2. 山口猛央  
細孔フィリング現象と界面伝導現象を利用した次世代燃料電池電解質膜の開発  
高分子コロキウム、宮城、2011年10月28日
3. 山口猛央  
機能膜の新展開 ～分離材料からバイオ材料・エネルギー材料へ～  
高分子学会 超分子研究会、東京、2012年1月23日
4. Takeo Yamaguchi  
Systematic material development for PEMFCs catalysts, membranes and membrane electrode assemblies  
CRC International Symposium on Green & sustainable catalysis: from theoretical and fundamental aspects to catalyst design, 北海道、2012年1月27日
5. Takeo Yamaguchi  
Functionalized membranes inspired from bio-systems  
化学工学会第77年会、東京、2012年3月15日～17日
6. 山口猛央  
エネルギー資源の有効利用と燃料電池技術の現状と未来  
ナノエレクトロニクス研究会、東京、2012年7月25日
7. 山口猛央  
生体システムから発想した機能膜 ～プラズマによる多孔膜細孔中での材料システムの構築～  
日本化学会 関東支部主催講演会、東京、2012年7月27日
8. 山口猛央  
自宅が発電所になる時代～燃料電池による高効率発電を目指して～  
四大学連合文化講演会、東京、2012年10月12日
9. 山口猛央  
大型発電所はもういない？～家庭や車で燃料

電池発電～

- 東工大の最先端研究、東京、2012年10月24日
10. Takeo Yamaguchi  
Bio-system inspired membranes and membranes for PEMFC  
Clarkson University, New York, USA, October 26<sup>th</sup>, 2012
  11. Takeo Yamaguchi  
Advanced membranes inspired from bio-systems  
ISAEM2012/AMDI-3, Toyohashi, November 6<sup>th</sup>, 2012
  12. 山口猛央  
燃料電池材料および燃料電池におけるシステム設計に関する研究  
化学工学会第78年会、研究賞【實吉雅郎記念賞】  
受賞記念講演、大阪、2013年3月17日～19日

#### 【口頭発表・国際学会】

1. Tatsuya Nakajima, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi and Takeo Yamaguchi  
Optimization of Electrodes Based On Polymer Properties of hydrocarbon polyelectrolyte for PEFCs  
2011 AIChE Annual Meeting, USA, October 16<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2011.
2. Takeo Yamaguchi, Takashi Aonuma, Takaya Ogawa, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi  
Novel proton conducting membranes utilizing nano-capping and pore-filling technologies for PEMFCs  
The 7th Conference of Aseanian Membrane Society, Busan, Korea, July 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup>, 2012.
3. Hailin Wang, B. A. Kakade, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi  
PtPd Nanoparticles Dispersed on 3-D Carbon Composite Materials as Electrocatalysts for Direct Methanol Fuel Cells  
6th International Fuel Cell Workshop 2012, Kofu, Japan, August 2<sup>nd</sup>-3<sup>rd</sup>, 2012.
4. B. A. Kakade, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi  
Enhanced ORR and MOR Activities by Bimetallic CoPt and PdPt Electrocatalysts  
Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science, Hawaii, USA, October 7<sup>th</sup>-12<sup>th</sup>, 2012.
5. Hailin Wang, B. A. Kakade, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi  
Novel 3-D Graphite Oxide-Nanoribbon Supported Metal Catalysts for Methanol Oxidation Reaction  
Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science, Hawaii, USA, October 7<sup>th</sup>-12<sup>th</sup>, 2012.
6. Hailin Wang, B. A. Kakade, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi  
PtPd Nanoparticles Dispersed on 3-D Graphite Oxide-Nanoribbon Composite As Electrocatalysts for Direct Methanol Fuel Cells

The First International Education Forum on Environment and Energy Science, Hawaii, USA, December 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup>, 2012.

**【特許】**

- (1) 国内特許出願 3 件



有望シーズ展開プロジェクト  
朴「革新的インフルエンザウイルス創薬」  
プロジェクト

# 朴「革新的インフルエンザウイルス創薬」プロジェクト

プロジェクトリーダー 朴 三用

## 【基本構想】

インフルエンザウイルスには、抗原性の大きな違いからウイルス粒子の外被表面のタンパク質であるHA(ヘマグルチニン)16種類とNA(ノイラミニダーゼ)9種類の組み合わせにより、144通りの亜型が存在し得る。20世紀に入り人類は複数回の新型インフルエンザの登場を経験した。1918年に出現したスペイン型インフルエンザ(H1N1)は、世界中で多くの死者が出た。このウイルスは様々な変異を引き起こしつつ、2009年には豚由来の新型H1N1が出現し、世界規模で大流行(パンデミック)した。新型インフルエンザが出現すれば、人類は過去にこの新型ウイルスの感染を受けたことがないため当然体内に中和抗体は存在せず、また対応するワクチンの開発にも時間がかかるため、新型ウイルスの感染者が一時的に増加し、パンデミックとなることは容易に予想される。

近年、高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)が世界中に広がりを見せ、特に、東南アジアやエジプトでは鳥におけるH5N1ウイルスの流行が毎年発生し、ヒトへの感染例も報告されている。国内でも、野鳥から鶏への感染事例は年々増え続けており、経済的損失や健康面での不安など社会へ深刻な影響を与えている。今のところ、H5N1ウイルスはヒトに感染しやすい型へ変異しておらず、ヒトへの大流行を起こす状態には至っていない。しかし、最近の研究からヒトに感染しやすい型への変異の危険性が報告されている。

2009年に大流行した新型インフルエンザウイルスの亜型はH1N1であった。今後、別の亜型の新型インフルエンザウイルスが出現する可能性はあるが、変異を繰り返してどのような亜型が出現するのかを予測することは不可能に近い。これに対して、RNAポリメラーゼはウイルスの複製(増殖)に必須であるため、RNAポリメラーゼの変異の多くをウイルスそのものが許容できない。実際、すべてのインフルエンザウイルス亜型のRNAポリメラーゼのタンパク質は、96%以上アミノ酸が保存されており、変異が極めて少ないタンパク質で創薬のターゲットとして注目をしている。

我々は、これまでの研究において、インフルエンザRNAポリメラーゼが持つ3つのサブユニット(PA, PB1, PB2)のうち、どれか1つのサブユニットでも欠けるとウイルスの増殖機構が失われる事に注目し、PA/PB1とPB1/PB2サブユニット複合体の構造解析に世界で初めて成功した(Nature, 2008; EMBO J, 2009)。本研究プロジェクトでは、その知見を基に、平成23年10月より実施した戦略的研究シーズ育成事業の研究成果をさらに展開し、これらのRNAポリメラーゼの断片に結合するモノクローナル抗体を作製し、ウイルス増殖の阻害抗体の開発とサブユニット間の相互作用部位を阻害する化合物の開発を目指す。

## 戦略的研究シーズ育成事業での取組

### 1. 研究目的

平成23年度10月から平成24年3月までの戦略的研究シーズ育成事業として、下記の項目について、研究を推進した。

我々は、これまでの研究において、創薬の基盤になるRNAポリメラーゼのPA/PB1とPB1/PB2サブユニット複合体の構造解明を世界で初めて成功(Nature, 2008; EMBO J, 2009)しており、本研究プロジェクトでは、その構造情報に基づき、新規抗インフルエンザ剤を開発する事を目標としている。

本育成事業において、200万個の化合物から、イン・シリコ(*in-silico*)手法により3個の化合物を得て、PA/PB1サブユニット間の結合阻害する事を確認する事に成功した。

また、インフルエンザウイルス亜型のRNAポリメラーゼのタンパク質は、96%以上の割合でアミノ酸が保存されている事から、宿主細胞内でインフルエンザウイルスの増殖を阻害できるRNAポリメラーゼを標的としたモノクロー

ナル抗体を開発し、RNAポリメラーゼタンパク質と抗体の立体構造を解明する事を目標とする。

このような抗インフルエンザ阻害剤や、ウイルス増殖を阻害抗体が開発されれば、インフルエンザウイルスの変異に強く、既存の抗インフルエンザウイルス剤やワクチンでは対応できないどんな新型インフルエンザにも対応できる画期的なものになることが期待される。

### (1) 化合物の探索

我々は、これまでの研究において、イン・シリコ手法により200万個の化合物の中から、有効な化合物数個を発見する事に成功しているが、さらに有効性化合物探索を行い、最適化に用いる構造基盤の構築を目指してきた。現在までに有効性化合物の*in-vitro*での探索方法は確立しており、その内容は以下に示す。その方法はPAタンパク質を単独で発現し、室温で1日放置するとタンパク質に沈殿が生じる。しかし、PAタンパク質に結合するPB1結合部分(81アミノ酸)を加えると、室温で2週間程度放置しても安定

に存在する。このような PA タンパク質の性質を利用し、各化合物と PA タンパク質を 2:1 の比率で混ぜ、沈殿の有無で結合の状態を判断する。このような方法により 200 万個の化合物から、最終的に 3 つの化合物が PA タンパク質に結合する事を確認し、GST ゲル移動実験にも選択的に結合する事を確認した。

## (2) RNA ポリメラーゼによるモノクローナル抗体作製

複数種のインフルエンザについて、それぞれの RNA ポリメラーゼの PA/PB1 タンパク質を抗原として、数十種類種類のモノクローナル抗体を作製した。また、マウス腹水から、モノクローナル抗体を大量精製する方法を確立した。

精製されたモノクローナル抗体と抗原タンパク質との複合体を作製し、抗原である RNA ポリメラーゼタンパク質との結合能の確認を行った結果、数種類のモノクローナル抗体が、抗原タンパク質と強く結合する抗体を選別する事を確認した。

## 2. 研究成果

以下に挙げるのは、平成 23 年度 10 月から平成 24 年 3 月までの戦略的研究シーズ育成事業の具体的な研究成果を報告する。

### (1) 化合物の探索

抗インフルエンザウイルス剤開発を目的として、RNA ポリメラーゼの PA/PB1 タンパク質の結合を阻害する化合物の開発を行った。イン・シリコ手法により探索された 4 千個あまりの化合物の中から、200 百個を購入し探索を行った。PA タンパク質と化合物との結合実験は、すでに確立している。その方法によりさらに、3 個の有効性化合物を見つける事ができた。また、ヒトの細胞による in-vivo 系によりウイルスの増殖を阻害する事も確認した。この方法に基づき、イン・シリコ計算により、多くの化合物との結合を調べるスクリーニングを迅速に行うことが可能になった。また、化合物が PA タンパク質と PB1 タンパク質の結合を選択的に阻害する事を確認するための、GST を用いた共沈殿法による技術も確立した。今後、化合物の最適化を行い、さらに有効性化合物の開発を目指す。

### (2) ウイルス増殖阻害抗体の開発

PA/PB1 タンパク質 (A/H1N1 由来) を抗原としたマウスモノクローナル抗体を作製し、さらに精製抗体を蛍光ラベル化し宿主細胞へ簡便に導入する方法やウイルスの増殖を簡便に確認する技術を開発しながら、阻害抗体の樹立に成功した。宿主細胞である MDCK 細胞にインフルエンザウイルス (A/H3N2) を感染させ 8 時間後、ウイルスの増殖を観察した。その結果、抗体が導入された細胞では、ウイルスの増殖は観察されなかった。一方、抗体が導入されていない細胞やコントロール抗体導入細胞では、ウイルスが増殖していることを確認した。また、抗体は、強毒性である H5N1 の PA/PB1 タンパク質とも強く結合することを確認し

ており、汎用性の高い阻害抗体であることが示唆された。

## 有望シーズ展開プロジェクトでの実施内容

RNA ポリメラーゼを標的としたモノクローナル抗体を作製し、宿主細胞内でインフルエンザウイルスの増殖を阻害する抗体開発とサブユニット間の相互作用部位を阻害する化合物の開発を目指す。さらに、抗体を応用したヒト宿主細胞内でのウイルス増殖メカニズムの解明、および抗体とのタンパク質複合体の構造解明による抗体から創薬基盤構築を目指す。作製した抗体を効率よく細胞内へ導入する技術の開発により、新たなウイルス剤の開発のアプローチであり、今までの抗インフルエンザの阻害剤開発と全く異なる試みである。また、得られる構造情報は、抗インフルエンザウイルスのペプチドおよび低分子創薬の基盤となり、将来的にどのインフルエンザウイルスにも効果のある画期的な創薬を目指す。具体的には以下の項目に示す。

### (1) 化合物の探索

① RNA ポリメラーゼの構造情報から、イン・シリコ手法により化合物の探索

RNA ポリメラーゼ PA/PB1 複合体の構造解明に成功しており、これらの構造情報を用いて、イン・シリコ手法により化合物の探索を行う。既に、PA/PB1 複合体の構造を基に 200 万個の化合物から、数千個程度の化合物に絞り込み、合計 13 個の有効性化合物の開発に成功している。これらの化合物の基本構造を基にさらに最適化を行い、化合物の探索やタンパク質と結合確認を行う。化合物の探索に必要な化合物の情報や技術は、既に本研究プロジェクトにより開発されており、さらに合理的な化合物の探索を実行していく。

### ② 化合物との結合確認、細胞実験

RNA ポリメラーゼのそれぞれのタンパク質単独での大量発現及び、イン・シリコ手法による得られた化合物とタンパク質との相互作用の結合実験や MDCK 細胞実験を行い、有効性化合物を探索する。また、化合物の合成、設計、再探索を繰り返しながら、合理的な化合物の開発を行う。

### (2) 抗原タンパク質の発現とモノクローナル抗体作製

#### ① 抗原タンパク質の発現

GST 融合 PA/PB1、PB2-RNA 結合部位、PA エンドヌクレアーゼ部分の発現系の構築、大量生産、精製を行う。精製された各種 GST 融合 RNA ポリメラーゼタンパク質をマウスに免疫し、ハイブリドーマを得る。ハイブリドーマのスクリーニングには、ELISA、ウエスタン法および免疫沈降法を行い、抗原との結合能が高いものを選択する。スクリーニング後得られたハイブリドーマからモノクローナル抗体を得る。

#### ② 抗体の精製及び、抗原タンパク質との結合実験

上記の方法により得られたモノクローナル抗体を抗体結合アフィニティーカラムで精製する。分析用超遠心機 (AUC: Analytical Ultracentrifuge) により、抗原である RNA ポリメラーゼタンパク質との結合能を確認する。抗原

タンパク質と結合する抗体をラベル化し細胞への投入技術を確立する。

③ 宿主細胞におけるウイルス増殖阻害抗体の選別

抗体を導入した MDCK 細胞を使ってウイルスの増殖の阻害確認実験を行う。この実験により、宿主細胞内でウイルスの増殖を阻害できる抗体を選別する。選別されたハイブリドーマから抗体の超可変領域遺伝子情報を決定する。さらにエピトープ解析を行い、結合部位の同定を試みる。

④ 抗原タンパク質と阻害抗体複合体の構造解析

選別された阻害抗体と抗原タンパク質との複合体での構造解析を行い、抗体の結合部位を決定する。また、抗原タンパク質の結合部位と抗体の超可変領域の構造情報は、新たな創薬の構造情報となり、創薬の基盤構築と共に、その構造情報から、ペプチドや低分子化合物設計、合成、最適化により、合理的な創薬を開発していく。

戦略的研究シーズ育成事業  
「病態モデル細胞」創成と解析システム開発」

# 戦略的研究シーズ育成事業

## 「病態モデル細胞」創成と解析システム開発」

研究代表者：東京大学大学院 教授 村田 昌之

### 【基本構想】

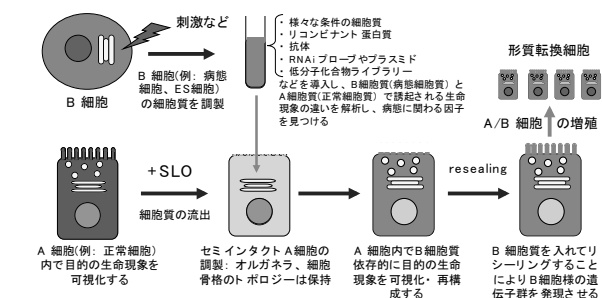
本事業では、われわれが開発してきたセミインタクト細胞リシール法を最大限に活用し、今まで解析が困難であった「真の病態細胞内環境」での細胞機能、遺伝子発現変動、タンパク質動態を解析することで、病態におけるそれらの攪乱原因因子を明らかにする細胞解析システムを創成することを目的とした。セミインタクト細胞とは、連鎖球菌の酵素感受性毒素ストレプトリシン O (SLO) を形質膜に作用させることにより、形質膜を部分的に透過性にした細胞である。オルガネラや細胞骨格及びそのトポロジーはインタクトに保持したまま、細胞質を流出させ「交換」することができるため、細胞を一個の試験管に見立てて、添加した細胞質に依存的な細胞内のイベントを光学顕微鏡下で分析的に再構成し解析することができる。最近、この細胞質添加後のセミインタクト細胞をリシール(再封入)し、続けて培養・継代可能とする技術(リシール技術)を確立した。これにより、例えば、セミインタクト正常細胞に病態細胞や組織より調製した「病態細胞質」を導入することにより「病態モデル細胞」を作成し、「病態細胞質環境」での細胞機能攪乱やその原因因子を解析することができるようになった。本事業では、標的病態を代表的な生活習慣病の高脂血症および糖尿病とし、高脂血症モデルマウスおよび糖尿病モデルマウスから調製した「病態細胞質」を用いて、「高脂血症病態のモデル細胞」、「糖尿病態の膵βモデル細胞」及び「糖尿病態の肝臓モデル細胞」を作成してその個々の細胞機能を測定した。「高脂血症病態のモデル細胞」では、病態モデル細胞の作成、解析、診断の3つの要素技術を含む汎用性の高い病態解析法を開発した。また「糖尿病態の膵βモデル細胞」では、グルコース依存的なインスリン分泌の攪乱が生起していること、「糖尿病態の肝臓モデル細胞」では、インスリン依存的な糖新生の攪乱(インスリン抵抗性)が細胞レベルで確認できた。これらのフェノタイプは糖尿病の典型的な細胞フェノタイプである。さらに、これらの糖尿病態モデル細胞を利用して、糖尿病態環境での遺伝子発現変動解析やタンパク質局在解析を行い、糖尿病態発現に関わる複数の鍵遺伝子・鍵タンパク質を同定した。

### 1. 研究目的

正常及び病態の網羅的マイクロアレイ解析や疾患プロテオミクス解析が進み、多数の疾患関連遺伝子やタンパク質が抽出され、その細胞内機能や病態との関連が遺伝子改変マウスなどを用い盛んに研究されようとしている。しかし、抽出される病態関連遺伝子の数は膨大であり、動物個体を使用した創薬・診断の前臨床研究のコストと時間のパフォーマンスが急増している。現在の創薬スキームにおいて、疾患に関わる「鍵タンパク質・遺伝子」を対象にした低分子化合物のスクリーニングやデザインは、バイオインフォマティクス、構造生物学やケミカ

その「鍵タンパク質・遺伝子」の絞り込みが困難な疾患に関しては、その絞り込みステップが大きな律速となり、整備された創薬の基本戦略が進まない状況にある。逆に、今後現れる様々な疾患に関して、「鍵タンパク質・遺伝子」の絞り込みを迅速に、かつ、的確に行うことができる汎用性の高い手法の開発は、有用な創薬・診断支援システムとなり得る。そのため、「細胞」を用いた新規の病態誘発遺伝子・タンパク質の絞り込み法の開発はますます重要となってきた。しかし、通常、細胞アッセイに使用される細胞の多くは「正常な」培養細胞であることが多く、「病態環境下」での細胞機能や遺伝子発現・タンパク質動態を細胞レベルで追跡することは困難な状況にある。

このような創薬・診断技術の現状を踏まえ、われわれは、「平成 23, 24 年度の戦略的研究シーズ育成事業」において、細胞内環境を「病態環境」に改変できる世界初の「病態モデル細胞」(特願 2012-083075)を駆使し、汎用性の高い「病態発現に関わる鍵タンパク質・遺伝子絞り込み・同定法」の開発を進めた。具体的には、糖尿病を標的とした「鍵タンパク質・遺伝子」の同定法の開発である。糖尿病は、まさしく膵β細胞の異常や細胞死が原因となりインスリン分泌攪乱(II型糖尿病では、分泌亢進が病態初期、分泌減少が病態後期)が起こり個体の病態が発現する代表的な生活習慣病である。また、肝臓や筋肉に



ルバイオロジーの急速な進展によってその基本戦略が整備されつつある。しかし、多くの生活習慣病のように、

図1: セミインタクト細胞リシール法の概念図

おけるインスリン感受性の攪乱は、細胞の糖・脂質代謝攪乱を引き起こし、そのまま個体の代謝・運動の機能を攪乱する。糖尿病態の進行に伴う脂肪細胞からのアディポサイトカインの分泌異常はそのまま個体にとって重篤な異常となる。この様に、糖尿病は、細胞の機能攪乱がそのまま個体の病態に投射される貴重な実験系でもある。

われわれが開発したセミインタクト細胞リシール法は、細胞膜を部分的に透過性にしたセミインタクト細胞に、病態モデルマウスやヒト患部から採取した病態細胞質を導入した後、再封入(リシール)して「病態モデル細胞」を作成することができる(図1)。これにより、病態環境に近い状態で様々な遺伝子・タンパク質ネットワークを可視化解析できる。本事業では、次の①および②について研究開発を進めた。①標的病態を高脂血症とした「病態モデル細胞」の作成とその解析(特願 2012-083075) ②標的病態を糖尿病とし、膵β細胞由来の培養細胞 MIN6 細胞及び肝臓由来の培養細胞 H4IIEC3 細胞を用いて「糖尿病態モデル細胞」を作成し、その細胞を用いて以下の研究開発項目に従って研究を進めた。

**研究開発項目(1)**: 膵β細胞由来 MIN6 細胞、肝臓由来 H4IIEC3 細胞を用いた「糖尿病態モデル細胞」の作成法の構築。

**研究開発項目(2)**: 「糖尿病態モデル細胞」のフェノタイプ解析系の構築。

**研究開発項目(3)**: ロカーリゾミクス解析法を用いた糖尿病態発現に関わるタンパク質分子の絞り込みおよび同定法の開発。

**研究開発項目(4)** (新規挑戦的課題): 正常・病態モデル細胞を用いた病態発現に関わる遺伝子情報・エピジェネティック動態情報の抽出・同定法の開発。

**研究開発項目(5)**: 代謝産物(メタボローム解析)情報を利用した病態発現に関わる鍵因子の抽出・同定法の構築。

**研究開発項目(6)**: 「病態モデル細胞」を用いて絞りこんだ糖尿病態発現に関わる鍵因子の機能検定による本開発システム全般の評価。

## 2. 研究成果

### 高脂血症病態モデル細胞

HeLa 細胞、Chinese hamster ovary cell (CHO 細胞) をセミインタクト細胞にし、外部より高脂血症モデルマウスの肝臓から調整した病態細胞質を導入した後、高効率に再現性良くリシール細胞を調製する方法を構築した。この高脂血症病態モデル細胞を用い、高脂血症病態時における EGF 刺激による細胞膜直下の特異的なシグナル伝達経路 (PI3K-Akt シグナル伝達経路) の攪乱、それに伴うアポトーシスに対する脆弱性の誘起を確認した。そして、高脂血症病態モデル細胞のアポトーシスに対する脆弱性は、リシール細胞内の初期エンドソーム膜の特定のタンパク質の量の減少や機能不全による PI3K-Akt シグナル伝達経路の攪乱とそれに続くミトコンドリアの形態や機能の攪乱によるものであることを発見した。

本開発技術は、(i)セミインタクト細胞リシール法を利

用した「病態モデル細胞」の基本作成法、(ii)病態モデル細胞を利用した細胞内情報伝達系の攪乱解析法、(iii)病態モデル細胞を利用したミトコンドリア形態を指標とした細胞病態診断法、の3つの要素技術を含んでおり、導入する病態細胞質を変えることにより汎用性の高い病態解析法になり得る。

### 糖尿病態モデル細胞

糖尿病態モデルマウス (db/db マウス) の肝臓より調製した「糖尿病態細胞質」を用い、リシール法により「糖尿病態モデル膵β細胞」(以下、病態モデルβ細胞)および「糖尿病態モデル肝細胞」(以下、病態モデル肝細胞)を、高効率で再現性良く作成できた。

**研究開発項目(3)(4)(5)**の抽出・同定法を用いて、作成した正常・病態モデルβ細胞または正常・病態モデル肝細胞から、病態発現に関わる遺伝子・タンパク質・代謝産物の絞り込み・同定を行った。その結果抽出できた分子群と絞り込まれた遺伝子・タンパク質・代謝産物が、実際に、糖尿病態の細胞のフェノタイプ(細胞機能攪乱)を示すかどうかを、**研究開発項目(2)**の解析系により実験的に検証した。その結果、新規で有望なタンパク質群を特定することができた。抽出されたタンパク質群は、糖尿病態の膵β細胞および肝細胞のフェノタイプを示すことから、本事業で開発した「糖尿病態発現に関わる鍵タンパク質抽出システム」は、十分ワークすると評価できた。

### 戦略的研究シーズ育成事業の成果のまとめ

本事業では、導入する病態細胞質を変えることにより汎用性の高い病態解析法になり得る要素技術の開発に成功した。また、**研究開発項目(1)~(6)**で構築された「糖尿病態発現に関わる鍵タンパク質抽出システム」は、病態発現に関わる鍵因子の抽出・同定において、十分ワークすると評価できた。

## 戦略的研究シーズ育成事業

不揮発性メモリ素子/CMOS 融合技術による低  
消費電力 CMOS ロジックシステム技術の創成



# 不揮発性メモリ素子/CMOS 融合技術による低消費電力 CMOS ロジックシステム技術の創成

研究代表者：東京工業大学 准教授 菅原 聡

## 【基本構想】

本研究課題では CMOS ロジックに不揮発性メモリ技術を融合して、従来技術およびその延長では達成できない CMOS ロジックシステムの大幅な低消費電力化を可能とする技術を開発する。不揮発性メモリ素子と CMOS との融合回路を用いて実現できる不揮発性パワーゲーティング(NVPG)に関する技術開発を行い、CMOS ロジックシステムにおけるメインストリームであるマイクロプロセッサ、SoC、FPGA に適応できる待機時電力の削減技術を開発する。具体的には、不揮発性メモリ素子としてMRAM(スピンRAM)の記憶素子である強磁性トンネル接合(MTJ)素子を主に用いて、不揮発性メモリ素子と CMOS との融合による不揮発性 SRAM(NV-SRAM)、不揮発性フリップフロップ(NV-FF)を実現して、これらを用いた NVPG に関する低消費電力アーキテクチャを開発する。本研究課題では CMOS/不揮発性メモリ素子融合技術による低消費電力技術の基盤を創出し、産業界への技術移転可能な技術を開発する。

## 1. 研究目的

マイクロプロセッサや SoC に代表される CMOS ロジックシステムの性能は MOSFET のスケールリングによる微細化と高密度集積化とともに著しく向上してきた。しかし、これと同時に微細な MOSFET のリーク電流に起因する待機時消費電力の増大が顕著となり、この削減が CMOS ロジックにおける重要な課題の 1 つとなっている。特にサブスレシヨルドリークの削減は、デバイス技術や材料技術では根本的には対処できないため、回路・アーキテクチャ技術からの対応が重要となる。

パワーゲーティング(Power-gating; PG)は、CMOS ロジックをパワードメインと呼ばれる領域に分割し、パワードメイン毎にパワーマネジメント(電源遮断)することによって、サブスレシヨルドリークによる待機時電力を効果的に抑える技術である。一般に、ロジックシステム内では、SRAM やフリップフロップ(FF)といった揮発性の双安定回路からなる記憶回路(キャッシュやレジスタなど)が用いられるが、PG の実行のためには、このような記憶回路の情報保持が重要な課題となる。既存の PG システムではいくつかの方法によってこの課題に対応している。レジスタなどのパワードメイン内の比較的容量の小さな記憶回路では、パワードメイン外に作り込んだバックアップ用の記憶回路に重要なデータを転送してから、電源遮断を行う方法や、パワードメインの電源遮断時においても記憶回路に関しては電源遮断を行わない方法などが用いられている。容量・面積の大きなキャッシュでは(チップの面積の半分以上を占めることも珍しくない)、SRAM セルがデータを保持できる程度に電圧を絞って、リークを抑える方法や、データ消去が許される場合

には電源遮断を行う方法などを適宜組み合わせている。このような記憶回路のデータ保持は、PG の時間的・空間的粒度に大きな制約をもたらす。PG 本来の能力を最大限に引き出すことを困難にしている。

本研究者は“不揮発”の機能を PG に導入した不揮発性 PG(NVPG)を提案した。この NVPG を実現するために、擬似スピントランジスタ・アーキテクチャに基づく不揮発性 SRAM(NV-SRAM)および不揮発性 FF(NV-FF)の提案を行ってきた。NV-SRAM、NV-FF によってパワードメイン内の記憶回路を不揮発にすることで電源遮断時の情報保持の問題を解消し、理想(最適)的な空間的・時間的粒度の(電力削減効率の高い)PG を実現することが可能となる。(ただし、メモリシステムの不揮発化には注意を要する。むやみに不揮発化を行うと性能劣化を引き起こし、不揮発化が不十分であっても最適な空間・時間的粒度を実現できない。)

本研究課題ではこれまでに、NV-SRAM のより詳細なエネルギー性能解析を行うとともに、NV-SRAM の各動作における安定性を、スタティックノイズマージン(SNM)などの評価により解析した。またこれらの特性を改善できるマイクロアーキテクチャを開発してきた。平成 23 年度 10 月から平成 25 年 3 月までの戦略的研究シーズ育成事業として、「NVPG に関するマイクロアーキテクチャの確立と性能予測」を目的として、研究を推進した。

本研究者の開発した高精度な回路シミュレーション技術を利用して、不揮発性メモリ素子と CMOS の融合による NV-SRAM およびこの関連回路の定量的なシミュレーションを行い、セルの設計技術およびこれをマイクロプロセッサや SoC

へ導入する際のマイクロアーキテクチャ技術を確立した。また、このマイクロアーキテクチャに基づき性能予測を行い、NVPGの有用性を明らかにした。特に、擬似スピン MOSFET (PS-MOSFET)を用いた NV-SRAM, 不揮発性ディレイフリップフロップ(NV-DFF)の電力削減効果に与えるシャットダウン時のリーク電流の影響を明らかにして、これらの回路の設計指針を確立した。また、NV-SRAMの応用上重要な不揮発性デュアルポートSRAMのNVPGへの適合性を明らかにした。以上の研究項目でNVPGの基礎に関する基盤技術がほぼ出揃ったことになる。

## 2. 研究成果

### (A) NV-SRAM, NV-DFFのエネルギー性能に関する電源遮断時リーク電流の影響

本研究者は、これまでにMTJと通常のMOSFETを用いて構成できる擬似スピンMOSFET(PS-MOSFET)を提案して、このPS-MOSFETを用いたNV-SRAM, NV-DFF(図1)の解析を進め、NV-SRAM, NV-DFFの動作、Break-even time(BET)を指標としたマイクロアーキテクチャの開発を行ってきた。本事業では、まず、NV-SRAM, NV-DFFのエネルギー性能から、NVPGの設計指針について検討を行った。特に、エネルギー削減効率の最適化に重要であると考えられるNV-SRAMをシャットダウンした場合に生じるリーク電流の影響を明らかにした。

近年、パワーゲーティングではシャットダウン時にリーク電流が完全に遮断できるようなことを言われることがあるが、これは大きな誤りである。パワードメインとスリープトランジスタで電源電圧を分圧しているだけで、実際にはパワードメインに有限の電圧が印加されている。このためパワードメインではシャットダウン時でもリーク電流が発生している(最近よく耳にすることのあるゼロスタンバイパワーなどは存在しない)。この影響について詳細に解析した。NV-SRAMでは、動作モードとして我々がこれまでに開発してきたBETの削減のための各種バイアス制御を行い(MTJへの書き込みについては電流制限を行い、また通常動作モード時におけるリーク電流削減のためのバイアス印加を行っている)、またBET以下のスタンバイ時には、電源電圧を少し落としたスリープモードを導入した(図2)。NV-SRAMが通常動作、スリープ、NVPGの各動作を行ったときの平均消費電力の削減率を求めた(通常の6T-SRAMと比較した削減率)。結果を図3(a)に示す。ここでは、シャットダウン時のNV-SRAMのリーク電流をゼロとしている。NVPGの導入によって効果的に平均消費電力が削減できることがわかった。また、スリープモードの導入によって、削減率はさらに増大することがわかった。図3(b)にNV-SRAMのシャットダウン時のリーク電流をパラメータとした平均消費電力の削減率を示す。このリーク電流の影響によって平均消費電力の削減率が大きく低下していることがわかった。また、BETもシャットダウン時の

リーク電流とともに急増することがわかった(図3(c))。以上のことは、十分なNVPGの効果を得るためには、NVPG自体の制御だけでなく、シャットダウン時におけるリーク電流を下げるためのパワードメインとスリープトランジスタの設計も極めて重要であることを示している。図3(b)から所望の平均電力削減率を得るために許されるリーク電流の許容値を決定することができ、これからパワードメインとスリープトランジスタの設計が可能となる。

次にNV-DFFについても同様にシャットダウン時のリーク電流の影響について調べた。図4にシャットダウン時にセーブされる正味のエネルギー(絶対値)のシャットダウン時間依存性を示す。ここでもシャットダウン時のリーク電流をパラメータとした。NV-DFFの場合でもこのリーク電流はNVPGによってセーブされるエネルギーに大きく影響していることがわかった。また、平均消費電力の削減率やBETについてもシャットダウン時のリーク電流に強く依存し劣化することがわかった。したがって、NV-DFFでもNV-SRAMの場合と同様に、セル単体だけではなく、パワードメイン、スリープトランジスタを含めた総合的な設計手法が必要になるが、この設計には以上の結果を用いれば良い。

これまでの本研究課題の成果をまとめると(H23, H24年度の結果)、PS-MOSFETによるNV-SRAMとNV-DFFを用いれば、回路性能を劣化することなくロジックシステムにNVPGを導入できることを示した。また、このNV-SRAMとNV-DFFを用いることで、通常のCMOSのみでは実現できない高効率のエネルギー削減が可能なNVPGが実現できるが、このエネルギー削減効率は、NV-SRAMとNV-DFFの設計、駆動方式に加え、さらにシャットダウン時のリーク電流も考慮して最適化する必要があることを明らかにした。この効果はこれまでの種々の不揮発を活用したロジック応用では全く検討されてこなかったものである。

### (B) 不揮発性デュアルポートSRAMの検討

次に、NV-SRAMのマイクロプロセッサやSoCへの重要な応用の1つであるレジスタファイルへの適用についても検討を行った。PS-MOSFETを用いた不揮発性デュアルポートSRAM(NV-DPSRAM)セルを提案し、NVPG応用への可能性を検証するため、BETの評価を行った。図5に今回提案するNV-DPSRAMの回路構成を示す。また、NV-DPSRAMの各動作モードにおけるセル電流、リーク電流等は図2におけるスリープモードがない場合に相当する。

NV-DPSRAMのBETはMTJへの書き込みに要するエネルギーに依存する $BET_{SR}$ と通常動作時におけるリーク電流の増加分による $BET_L$ の2成分からなる( $BET = BET_{SR} + BET_L$ )。これは前述のNV-SRAM, NV-DFFと同様である。この各々( $BET_{SR}$ ,  $BET_L$ )について詳細に調べ、NV-SRAMと同様の方法(先行研究で開発した)によってBET削減の可能性を検証した。

はじめに、 $BET_{SR}$ の削減法について検討した。これはMTJ

への書き込み電流を制御することで実現できる。書き込み時では、まず SR 線のバイアス ( $V_{SR}$ ) を印加し、次いで CTRL 線のバイアス ( $V_{CTRL}$ ) を印加する(回路図参照)。この動作によって一方の MTJ に平行状態から反平行状態 (P→AP) となる書き込み電流、もう一方の MTJ に反平行状態から平行状態 (AP→P) となる書き込み電流が生じる。まず、 $V_{SR}$  を下げることで、どちらの書き込み電流も制限することができる。詳細は省くが、この方法のみだと AP→P のための電流が過剰になるため、さらに  $V_{CTRL}$  を下げることで両者を同等の電流値まで下げることが可能となる。このバイアス制御によって  $BET_{SR}$  は削減できる。ただし、この  $BET_{SR}$  の値はシャットダウン時のリーク電流  $I_L^{SD}$  に強く依存することに注意が必要である。

次に、 $BET_L$  の削減方法であるリーク電流の制御法について示す。PS-MOSFET の追加により、通常 SRAM 動作時のリーク電流は増加するが、 $V_{CTRL}$  を印加すると、PS-MOSFET のリーク電流を効果的に抑制することができる(負ゲートバイアス効果)。ただし、バイアスが大きすぎると接合リークによってリーク電流が増加するため、適切なバイアスを印加する必要があるが、約 0.1V の  $V_{CTRL}$  の印加によって通常の DPSRAM のリーク電流に近い値まで減少可能である。この  $V_{CTRL}$  の制御によって

$BET_L$  も削減可能である。ただし、この  $BET_L$  も  $I_L^{SD}$  に依存する。

図 6(a) に  $BET (=BET_{SR}+BET_L)$  の通常の DPSRAM 動作実行時間  $\tau_{exe}$  依存性を示す。書き込みバイアス制御によって  $BET_{SR}$  が削減可能、またリーク電流制御によって  $BET_L$  が削減可能であることがわかる。さらに、本研究者の提案しているストアフリーシャットダウンを用いることで (MTJ の既記憶のデータと双安定回路部のデータが同じ場合は書き込み動作を行わないアーキテクチャ)、大きく  $BET$  を減少させることができる。図 6(b) に NV-DPSRAM と NV-SRAM の比較を示す。バイアス制御を行わない場合、書き込みバイアス制御および通常動作時におけるリーク電流制御を行った場合、ストアフリーシャットダウンを行った場合において、NV-DPSRAM では NV-SRAM に比べて、約 2 倍の  $BET$  の削減を達成できる。したがって、時間的により細粒度の NVPG に応用可能であることがわかった。

NV-DPSRAM セルにおける平均電力は NVPG の導入によって大きく削減できるが(削減率が增大する)、やはりシャットダウン時のリーク電流とともにこの効果は減少する(図 6(c))。したがって、前述の NV-SRAM や NV-DFF と同様に、シャットダウン時のリーク電流を考慮して設計することが重要となる。

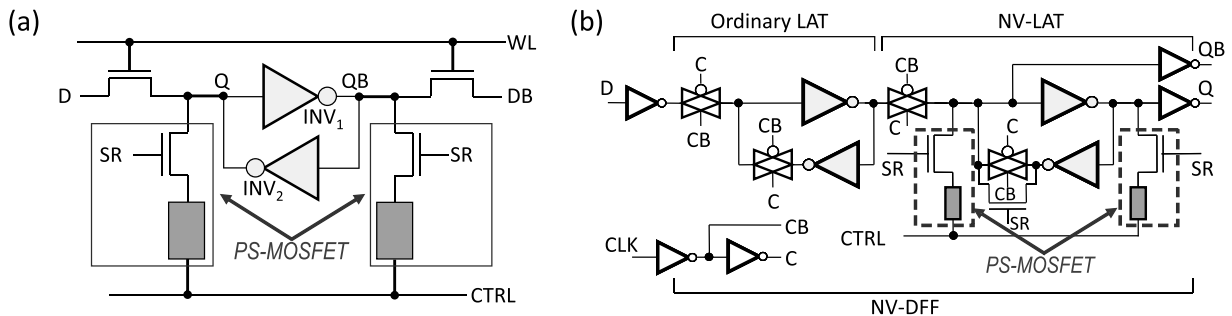


図 1 擬似スピン MOSFET (PS-MOSFET) を用いた (a) 不揮発性 SRAM (NV-SRAM) と (b) 不揮発性ディレイ FF (NV-DFF) の回路構成。どちらの場合でもインバータループによる双安定回路部の記憶ノードに擬似スピン MOSFET を接続することで構成できる。擬似スピン MOSFET を遮断することで、双安定回路を MTJ から電氣的に切り離し、通常の SRAM、DFF として動作することが可能である。不揮発性パワーゲーティング (NVPG) を行う場合のみ擬似スピン MOSFET を導通して、不揮発記憶を行う。この通常動作と不揮発記憶の機能分離によって、回路性能を劣化させることなくロジックシステムを不揮発化することが可能となる。

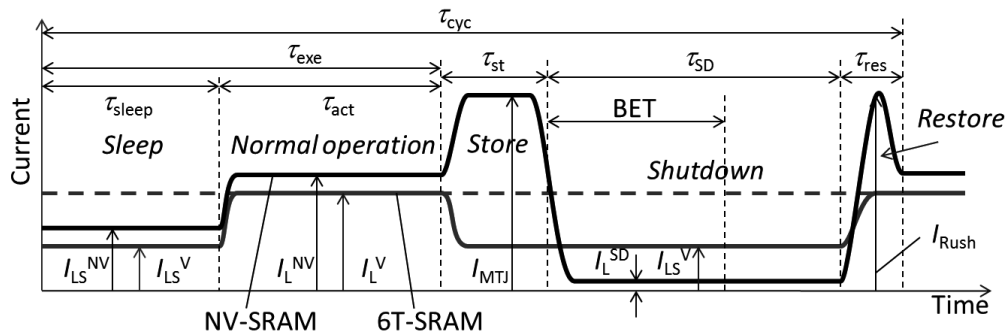


図 2 NV-SRAM のリーク電流の時間変化。NVPG を行うときに必要な電流(シャットダウンの直前に行う不揮発記憶に必要な電流と、電源遮断状態から復帰する際に生じる電流)も示してある。左から順にスリープモード、通常動作モード、ストアモード(不揮発記憶を行うモード)、シャットダウンモード、リストアモード(シャットダウンから復帰するモード)である。ストアモードとリストアモードに必要なエネルギーと通常動作/スリープモードにおけるリーク電流による消費エネルギーの増加分ををシャットダウン中に埋め合わせることができる時間が  $BET$  である。スリープモードは  $BET$  より短い時間のスタンバイ状態の時に用いる。通常動作モード、スリープモード時にはあるバイアス制御を行って、リーク電流を極力低く抑え、またストアモードでは別のバイアス制御によって不揮発記憶のエネルギーを最小限に抑えることで(どこまで小さくできるかは擬似スピン MOSFET に用いる強磁性トンネル接合のエラーレートによる。)、 $BET$  を最小化できる。シャットダウン中のリーク電流は、パワードメインの大きさやスリープトランジスタの設計などに依存し、これが NVPG の効果(電力削減率、 $BET$ )に大きな影響を与える。

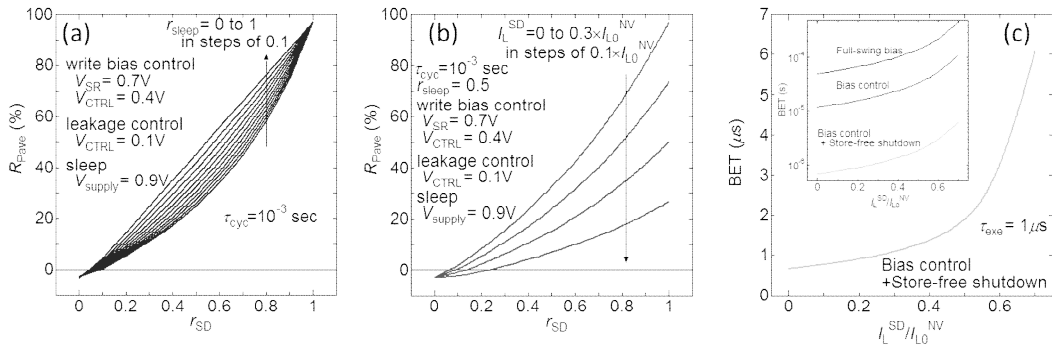


図3 (a) NV-SRAMにおける平均電力の削減率のシャットダウン時間比率  $r_{SD}$  依存性 (6T-SRAM との比較). パラメータはスリープモードの時間比率. (b) 平均電力削減率におけるシャットダウン時リーク電流の影響. (c) BET のシャットダウン時リーク電流依存性 (横軸は規格化されたシャットダウン時のリーク電流). NVPG によるシャットダウン時間が長くなると電力削減率は向上するが、シャットダウン時のリーク電流によってこの効果は低下してしまう. BET はこのリーク電流の増加に伴って急増する. このため、NVPG の効果を十分に発揮させるためには、電源遮断時のリーク電流が十分に小さくなるようにパワードメインやスリープトランジスタ等を設計することが重要になる.

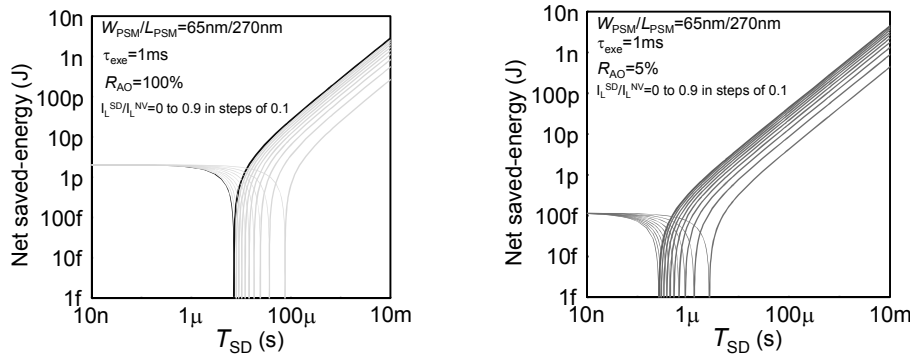


図4 不揮発性ディレイフリップフロップ(NV-DFF)におけるシャットダウン時にセーブされる正味のエネルギー(絶対値)のシャットダウン時間依存性.  $R_{AO}$  はロジック回路における NV-DFF の占有率. セーブされる正味のエネルギーは  $T_{SD}$  が BET に一致するところで、ゼロになる. また、 $T_{SD}$  が BET より短くなると、エネルギーはセーブされず、消費される. シャットダウン時のリーク電流が増加すると、セーブされるエネルギーは減少する.

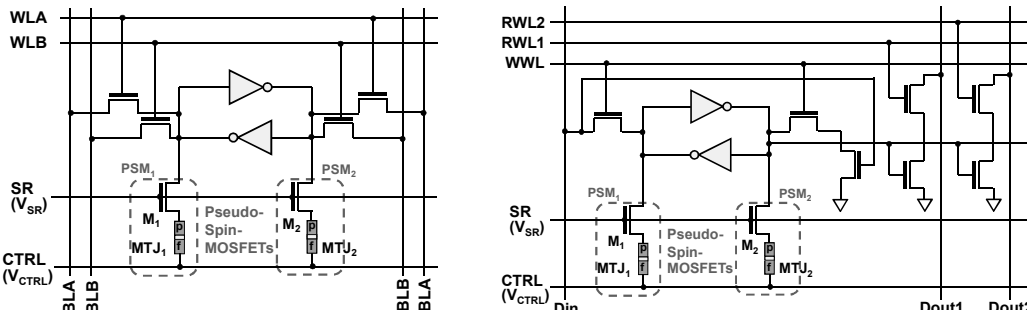


図5 擬似スピン MOSFET(PS-MOSFET)を用いた不揮発性デュアルポート SRAM(NV-DPSRAM)セルと不揮発性マルチポート SRAM セルの回路構成. これらの回路をマイクロプロセッサや SoC のレジスタファイルに用いることで NVPG が可能になる. PS-MOSFET を用いることで、通常動作モードと不揮発記憶の動作を完全に分離できる. このため、通常動作モードにおける性能劣化はほとんどなく、また既存のレジスタファイルのアーキテクチャに完全に整合できる.

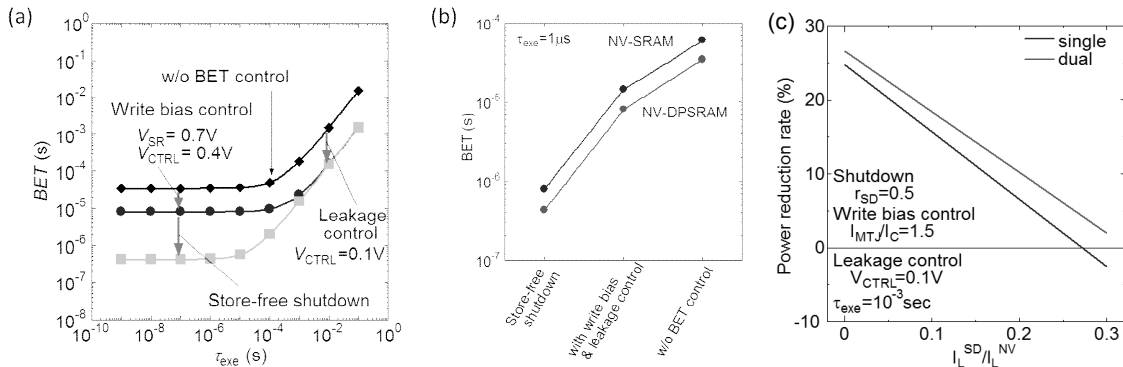


図6 (a) NV-DPSRAM における  $BET(=BET_{SR}+BET_L)$  の通常動作モード実行時間  $\tau_{exe}$  依存性.  $BET_L$  は  $\tau_{exe}$  に比例するが、 $BET_{SR}$  は  $\tau_{exe}$  に対して一定値をとる.  $BET_{SR}$  および  $BET_L$  はそれぞれ本文中で述べたバイアス制御によって効果的に削減できる. また、本研究者の提案しているストアフリーシャットダウン・アーキテクチャを用いることで、 $BET$  はさらに大きく減少する. (b) NV-DPSRAM と NV-SRAM の BET の比較. NV-DPSRAM では NV-SRAM に比べて2倍の BET 削減効果がある. (c) 平均電力削減率のシャットダウン時リーク電流  $I_L^{SD}$  依存性. 平均電力削減率は NVPG の効果によって増加するが(平均電力は減少)、シャットダウン時リーク電流  $I_L^{SD}$  によって平均電力削減率は減少(平均電力は増加)する. したがって、十分な NVPG の効果を得るためには、NVPG 自体の制御だけでなく、シャットダウン時におけるリーク電流を下げるためのパワードメインとスリープトランジスタの設計も極めて重要になる. この図から所望の平均電力削減率を得るために許されるリーク電流の許容値を決定することができる. これからパワードメインとスリープトランジスタの設計が可能となる.

---

## 平成 24 年度 研究 概要

平成25年 9 月 3 日 発行

発 行 公益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 サンニチ印刷  
TEL (055) 241-1111

---

● 無断転載・複製を禁じます。