ANNUAL REPORT NO. 31

工 学 院 大 学
総 合 研 究 所 年 報

第 31 号　2023 年度

令和 7 年 9 月発行

工学院大学総合研究所
RESEARCH INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
KOGAKUIN UNIVERSITY

次の研究、新しい工学

学長　今村　保忠

生き物は、自律的に組織を作ることができる。どのような要件を満たせば、自己組織化が起きるのか。要件を、要素の部品群や化合物群に分解し、それらの間の相互作用や反応を特定する。多くの場合には、重力や拡散速度などで決まる時間（時定数）など物理的な条件も大事になりそうである。この問題を生物で考えるのは、安心である。体づくりという組織化はすでに成功しているのであるから、その自己組織化の要件を探るのは答えがあるという点で安心できる。私は、そんなことを研究してきたようだ。しかしながら例えば、数ｎｍの分子と、ヒトの個体との間では、およそ 10 の９乗の開きがある。１つの水分子が、1 分子の大きさだけ移動する時間は数ピコ秒であり、ヒトの一瞬を１秒としたら、10 の 12 乗の開きがあることになる。寿命や健康といった、数ヶ月から数十年の範囲までには、さらに大きな開きがある。健康や寿命については、分子との関連は予想できても、そのことで分かるということにつながらないことは容易に想像できる。

私はコラーゲンという分子や細胞を単位に、どのように体作りに繋げられるのかを考えてきた。還元論的なアプローチは当然として、要素を総合して組み立てていく原理を探る総合的なアプローチの必要性を痛感しつつ、その発見にトライしている。そこで見出す原理は、他の問題にも適用可能であるだろうと期待し、他の人の研究に興味を持つように自分を仕向けてきた。こうすることで次の研究を作り上げていくことができると考えている。

工学は、多数の部品から巨大な装置を組み上げていくことを想像すると分かるように、元々、統合したり、総合する特徴を持っている。新たに見出した原理やアナロジーから、新しい工学を作り出すことは、工学に関わる人たちは得意なのではないかと、密かに思っている。最先端の学問と社会・産業をつなぐ「工の精神」では、そのことも言っているようにも思う。年報は、総合研究所プロジェクト研究費と科研費採択奨励研究費の成果報告書である。そこには、次の研究、新しい工学が隠れていないか？

異分野交流の必要性

総合研究所　所長　小林　元康

本学の総合研究所の目的に「科学技術の基礎および応用並びにこれらが直面する人間文化的側面に関する特色ある研究を行う」ことが掲げられています。「科学技術の基礎および応用」という点に本学のビジョンでもある工の精神が反映されております。換言すれば、理工系の学問や科学技術を産業や社会発展に活かし、社会実装や特許、大学発ベンチャーへの展開を目指す理念が含まれているように思います。また、「人間文化的側面に関する特色ある研究」には、歴史や文化、感性、社会学などを含む幅広い学問も対象にしていることを謳っております。21 世紀が始まって以降、世界が抱える多くの課題は、特定の専門分野の学問と技術で解決できるほど簡単ではなく、様々な分野の専門知識と協力が不可欠なものばかりです。ただ、こうした分野横断型の連携が進みにくいというのが日本の科学技術の特徴でもあります。

本学には 150 を超える研究室で多彩な基礎研究と専門的な応用研究が日々展開されております。産官を含む学外との共同研究の多数展開されており、特許申請も進んでおります。こうした研究を遂行する支援や、科学研究費に代表される外部資金の獲得のための支援を行うことも総合研究所の役割でありますが、せっかくある学内の研究リソースを連携させ、新たな研究創出に寄与することも重要な指命であります。イノベーションとは現行の研究を突き詰めていったその先にあるのではく、そこで得られた知見が異分野と出会ったときに生まれるものかと思います。また、そのイノベーションは何かの役に立つか否か、という視点も重要ではありますが、一研究者として面白いと思えるか否か、の価値判断こそ新しい発想を形にする上で大きな推進力となります。これは、人工知能 AI から提案される価値とは異なり、研究者の個性や感性、環境が反映するものでしょう。学内の研究成果や内容は、学術誌への投稿論文のみならず、JST 新技術説明会やイノベーション・ジャパンなどの展示会でも発信されていますが、もっと学内の教員に認知され、相互に交流する取り組みがあっても良いように思います。今後、総合研究所として学内の教員が互いの研究に知る機会や環境を増やすような企画を進めたいと考えております。

総合研究所が推進しているプロジェクト研究は、学内での研究室や学部・学科の枠を超えたコラボレーションをはじめ、学外の産官学との共同研究を活性化するための支援事業です。2023 年度は、プロジェクト研究として新規課題 3 件、継続課題 7 件が進められました。計 10 件のうち 8 件は 2024 年度へ継続し、成果を生んでおります。この他にも、医薬工連携や地域連携事業も支援しており、様々な場面で異分野交流を積極的に進めております。

最後に、本年報をまとめるにあたり、原稿執筆や編集等でご尽力いただいた教職員の皆様に御礼申し上げるとともに、研究者の皆様のさらなる発展を祈念いたします。

目　　次

学 長　　今村　保忠
総合研究所所長　小林　元康

１．総合研究所プロジェクト研究報告（２０２３年度研究終了）

・多様な食品廃棄物に対応できる汎用型バイオガス発酵プロセスの基盤研究
責任者　藤井　克彦‥‥‥‥‥‥‥‥　3

・短繊維強化自己治癒セラミックスの開発
責任者　柳迫　徹郎‥‥‥‥‥‥‥‥　12

２．総合研究所プロジェクト研究報告（２０２４年度継続研究）

・ナミビアで採掘された銅を利用した抗菌・抗ウイルスフィルターの製作（Ⅱ）
―金属銅からの溶液調製と銅膜形成―
責任者　永井　裕己‥‥‥‥‥‥‥‥　19

・μm オーダー 1 粒子の電極反応を直接観測する電気化学/ 分光オペランド測定システムの開発
責任者　関　　志朗‥‥‥‥‥‥‥‥　26

・165 nm～220 nm 帯の UV-C ランプの開発
責任者　尾沼　猛儀‥‥‥‥‥‥‥‥　34

・有機触媒によるらせん不斉化合物の合成とそれらの抗がん作用の調査
責任者　安井　英子‥‥‥‥‥‥‥‥　43

・ほ乳類キチナーゼの活性化とキトオリゴ糖の医療研究への展開
責任者　小山　文隆‥‥‥‥‥‥‥‥　47

・水素化物材料の『表面水素欠陥』を利用した固体触媒の設計開発
責任者　前野　　禅‥‥‥‥‥‥‥‥　54

・局所的構造秩序を有する酸化物ガラスの創製
責任者　橋本　英樹‥‥‥‥‥‥‥‥　58

・古細菌のトレハロース代謝に関わる酵素の機能解明と希少オリゴ糖合成への応用展開
責任者　坂口　政吉‥‥‥‥‥‥‥‥　65

３．総合研究所科学研究費採択奨励研究報告（２０２３年度）

・セルロースナノファイバー充填植物由来エンプラ系バイオマス複合材料の成形技術の構築
西谷　要介‥‥‥‥‥‥‥‥　75

・レプトジェネシスが機能する輻射シーソー模型の背後にある大統一理異論の探究
進藤　哲央‥‥‥‥‥‥‥‥　76

・都市・建築における水収支の動態分析とその環境影響評価
西川　豊宏‥‥‥‥‥‥‥‥　77

・高 In 組成 InGaN 自然形成ナノ構造の製作・秩序化と赤色発光素子応用
山口　智広‥‥‥‥‥‥‥‥　78

・磁力支持天秤による球に働く空気力の測定
瀬尾　和哉‥‥‥‥‥‥‥‥　79

・理想の電池形態を実現する高活量・低融点の固体電解質
関　　志朗‥‥‥‥‥‥‥‥　80

・超秩序構造を内包する中間酸化物ガラスの創製と原子構造および電子状態の解明
橋本　英樹‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　81
・リン酸異常現象を利用した放射性物質のガラス固化と相分離によるケミカルリサイクル
大倉　利典‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　82
・SEM の潜在能力を十分に発揮させるための Image denoising 活用技法
於保　英作‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　83
・食品ロス削減をサポートするメタボローム解析に基づく生鮮食材の鮮度予測の提案
飯島　陽子‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　84
・古細菌のトレハロース代謝に関わる酵素の機能解明と希少オリゴ糖合成への応用展開
坂口　政吉‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　85
・照明光の空間変容の分光記録と物体色知覚への影響
福田　一帆‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　86

２０２４度 総合研究所運営委員

学長	今村　保忠（生命化学科 教授）
総合研究所所長	小林　元康（応用化学科 教授）
所長代理	鷹野　一朗（電気電子工学科 教授）
大学院研究科長	桐山　善守（機械システム工学科 教授）
先進工学部（生命･応化･環境）互選	南雲　紳史（生命化学科 教授）
先進工学部（生命･応化･環境）互選	赤松　憲樹（環境化学科 教授）
先進工学部（応物）互選	坂本　哲夫（応用物理学科 教授）
先進工学部（機理）互選	白鳥　祐介（機械理工学科 教授）
工学部（機械・機シス）互選	金野　祥久（機械工学科 教授）
工学部（電気電子）互選	鷹野　一朗（電気電子工学科 教授）
建築学部 互選	久田　嘉章（まちづくり学科 教授）
建築学部 互選	境野　健太郎（建築学科 准教授）
情報学部 互選	高橋　泰樹（情報通信工学科 教授）
教育推進機構 互選	高見　知秀（基礎・教養科 教授）
ソーラービークル研究センター長（ＳＶ）	濱根　洋人（機械システム工学科 教授）

2023 年度 総合研究所研究一覧（学内研究費）

（プロジェクト研究）

研　究　課　題	研究責任者	所属学科・職名は 2023 年度
・2023 年度研究終了		
多様な食品廃棄物に対応できる汎用型バイオガス発酵プロセスの基盤研究	藤井　克彦	生命化学科　教授
短繊維強化自己治癒セラミックスの開発	柳迫　徹郎	機械工学科　准教授
・2024 年度継続研究		
ナミビアで採掘された銅を利用した抗菌・抗ウイルスフィルターの製作（Ⅱ）　　―金属銅からの溶液調製と銅膜形成―	永井　裕己	応用物理学科　准教授
μm オーダー 1 粒子の電極反応を直接観測する電気化学/ 分光 オペランド測定システムの開発	関　　志朗	環境化学科　准教授
165 nm～220 nm 帯の UV-C ランプの開発	尾沼　猛儀	応用物理学科　教授
有機触媒によるらせん不斉化合物の合成とそれらの抗がん作用の調査	安井　英子	生命化学科　准教授
ほ乳類キチナーゼの活性化とキトオリゴ糖の医療研究への展開	小山　文隆	生命化学科　教授
水素化物材料の『表面水素欠陥』を利用した固体触媒の設計開発	前野　　禅	環境化学科　准教授
局所的構造秩序を有する酸化物ガラスの創製	橋本　英樹	応用化学科　准教授
古細菌のトレハロース代謝に関わる酵素の機能解明と希少オリゴ糖合成への応用展開	坂口　政吉	生命化学科　准教授

（科学研究費採択奨励研究）

研　　究　　課　　題	研究者	所属学科・職名は 2023 年度
セルロースナノファイバー充填植物由来エンプラ系バイオマス複合材料の成形技術の構築	西谷　要介	機械工学科　教授
レプトジェネシスが機能する輻射シーソー模型の背後にある大統一理異論の探究	進藤　哲央	基礎・教養科　教授
都市・建築における水収支の動態分析とその環境影響評価	西川　豊宏	まちづくり学科　教授
高 In 組成 InGaN 自然形成ナノ構造の製作・秩序化と赤色発光素子応用	山口　智広	応用物理学科　教授
磁力支持天秤による球に働く空気力の測定	瀬尾　和哉	機械工学科　教授
理想の電池形態を実現する高活量・低融点の固体電解質	関　　志朗	環境化学科　准教授
超秩序構造を内包する中間酸化物ガラスの創製と原子構造および電子状態の解明	橋本　英樹	応用化学科　准教授
リン酸異常現象を利用した放射性物質のガラス固化と相分離によるケミカルリサイクル	大倉　利典	応用化学科　教授
SEM の潜在能力を十分に発揮させるための Image denoising 活用技法	於保　英作	電気電子工学科　教授
食品ロス削減をサポートするメタボローム解析に基づく生鮮食材の鮮度予測の提案	飯島　陽子	応用化学科　教授
古細菌のトレハロース代謝に関わる酵素の機能解明と希少オリゴ糖合成への応用展開	坂口　政吉	生命化学科　准教授
照明光の空間変容の分光記録と物体色知覚への影響	福田　一帆	情報デザイン学科　准教授

１．総合研究所プロジェクト研究報告

（２０２３年度研究終了）

多様な食品廃棄物に対応できる汎用型バイオガス発酵プロセスの基盤研究

工学院大学　生命化学科　藤井　克彦

工学院大学　応用化学科　杉山　健二郎

Study on Microbial Technology for Biogas Production from Food Wastes

Katsuhiko Fujii , Department of Chemistry and Life Science
Kenjiro Sugiyama, Department of Applied Chemistry

ABSTRACT : While food wastes are utilized for production of compost, their chemical composition varies depending on emission sources. Furthermore, a demand for the compost has been declined due to a decrease in farming population. Therefore, a novel application of food wastes remains to be developed in order to realize sustainable societies. Some food industries employ the anaerobic digestion to convert food wastes to biogas, but bacteria in a digester of a food factory is not necessarily applicable to food waste of other factories, because the florae are acclimated to a certain waste ingredient. Biogas is regarded as a renewable substitute for natural gas, but it is composed of 60% methane and 40% carbon dioxide (CO_2) with some minor constituents such as hydrogen and hydrogen sulfide, showing a low value for heat of combustion. Removal of CO_2 is therefore necessary to upgrade biogas. In the present study, we attempted to establish basic technologies for production of the upgraded biogas from a wide variety of food wastes, by using both the bacterial florae which can convert digested sludge to biogas with multiple hydrolase activity and high CO_2-acclimating alkaliphilic microalgae. It was found that the bacterial florae can be subcultured stably with various food wastes as substrates for biogas production. Ten strains of high CO_2-acclimating alkaliphilic microalgae were found to grow in extreme alkaline condition and some strains grew well under gas phase containing 20-30% CO_2. The glass vial-scale experiment in which the bacterial flora and the microalgal strains are co-cultivated showed that CO_2 in biogas generated by anaerobic digestion was completely removed, suggesting its fixation by the microalgae. The algal strains were found to contain essential amino acids for human, linoleic acid, and some carotenoids including lutein, implying their application potential in food, medicine, and cosmetic industries.

１．　はじめに

食品廃棄物は,一部が堆肥の原料として利用されるが,種類や発生源によって組成のばらつきが大きいことから,あらゆる食品廃棄物に共通して適用できる資源化法を見出すことが難しい[1)]. また, 就農人口の著しい減少から,堆肥としての需要は今後先細りになると予想され,新たな用途を模索することが求められている[2)]. 他方, 環境への配慮と廃棄物処分コストを抑制するために,嫌気消化法（メタン発酵)を用いて食品廃棄物からバイオガスを回収する事例が増えつつある ．一般に, メタン発酵は多様な微生物種から構成されているが,その役割に応じて「加水分解菌群」「酸・水素生産菌群」「メタン生成アーキア」に大きく分けることができる. 加水分解菌群は廃棄物等の基質を分解して低分子(単糖, アミノ酸, 脂肪酸等）にし, 酸・水素生産菌群はこれら低分子から水素や酢酸等を生産する. メタン生成アーキアは酸･水素生産菌群が生産した水素や酢酸を用いてメタンと二酸化炭素を生産する. このよ

うにして一連の発酵プロセスが成立している.しかし,ある食品廃棄物を分解してバイオガスを発酵生産できる菌叢が,他の食品廃棄物でも発酵能を持つとは限らず,食品業界では「この工場から出る食品廃棄物専用の菌」というようにケース・バイ・ケースで異なる発酵菌叢を育てて用いている現状にある.

以前より研究代表者は,消化汚泥を基質としてバイオガスを生産する微生物を研究してきた.消化汚泥とは,下水処理で発生する汚泥を嫌気消化した際に残る,「これ以上は発酵が進まない難消化性の残渣」である.下水汚泥の嫌気消化では減容率は一般に30% 程度であり, 残り 70% が消化汚泥として発酵槽内に残存する.研究代表者は一昨年,このような生分解しにくい基質からバイオガスを生産する菌叢を土壌および草食動物糞から 5 種取得した.保有する菌叢は,消化汚泥と水を入れた培養瓶に接種することでバイオガスを生産する.菌叢は多種類の属種から構成されており,セルラーゼ,キチナーゼ, プロテアーゼといった高分子 基質に対する加水分解酵素に加え,エステラーゼやホスファターゼ等の酵素活性も有している. このように,「最小限の栄養基質(消化汚泥以外は不要)でバイオガスを生産し」,「菌叢が多様な菌種で構成され(培養条件の変化に適用しやすい)」,「多種類の基質に対する酵素活性を持つ(様々な栄養基質を加水分解できる)」ことから, 種類や発生源で組成がばらつく食品廃棄物の嫌気消化にも菌叢がひろく応用できるのではないかと着想した.組成のバラツキに左右されずに様々な食品廃棄物を処理できる「ストライクゾーンが広い発酵菌叢」を開発できれば,バイオガス回収にむけた食品廃棄物の資源化が一層進み,焼却処分で発生する CO_2 を削減することができる.

そこで 本研究では2021年度より,消化汚泥分解菌叢を出発点として,広範な食品廃棄物からバイオガスを発酵生産する汎用型発酵菌叢を開発してきた. これまでの実験[3)]から, 汚泥分解菌叢は組成の異なる様々な食品廃棄物を基質としてバイオガスを生産し, 分解によってpHが酸性になるものからは水素ガス,中性～アルカリ性になるものからはメタンを生産した.菌叢は植継ぎ培養を繰り返しても安定してバイオガスを生産することもわかり, PCR-DGGE 法による解析から, その食品廃棄物の分解に適した菌種が馴化培養の過程で優占化してくることも明らかとなった. また, CO_2 はアルカリ性の水に溶解して炭酸塩や重炭酸塩になることから,アルカリ pH と高濃度二酸化炭素で生育できる微細藻類が効率良い炭酸固定に有用と考え,そのような性質の微細藻類野生株を探索し, 10 株得ることができた.今年度は, これら野生株を活用したバイオガス精製法の検討と固定 CO_2 の有効利用法の模索に取り組み,将来の実用化を目指した基盤研究を行った.

２． 今年度の研究成果

２．１ 野生微細藻類株の細胞成分の検討

藻類株の細胞成分(タンパク質,脂質,カロテノイド)を分析し,バイオガス改質後の増殖藻体が食品・飼料として利用可能かを検討した.タンパク質含量は乾燥藻体を 0.1 M NaOH で可溶化した後,細胞残渣を遠心分離で除去し,上清に含まれるタンパク質の濃度を BCA 法で定量することで,藻体のタンパク質含量を決定した. 実験の結果(図 1), TM 株や SG 株などは, クロレラなど良質なタンパク質源として商業生産される藻類に匹敵するタンパク質量を細胞に含むことがわかった.次にタンパク質を酸加水分解して得られたアミノ酸の組成をアミノ酸分析計で定量した. 分析の結果(表 1), すべての株でタンパク質を構成するアミノ酸のうち約40%あるいはそれ以上が必須アミノ酸であることがわかった.ヒトの必須アミノ酸はイソロイシン,ロイシン, リジン, メチオニン, フェニルアラニン, トレオニン, トリプトファン, バリン, ヒスチジンの 9 種類であるが,フェニルアラニン,ヒスチジン,トリプトファンは神経伝達物質セロトニンやビタミン類の前駆体になる重要な生体成分である[4)].ロイシン,イソロイシン,バリンといった分岐鎖アミノ酸はエネルギー代謝に必須であり,運動持久力のみならず,十分に食事を摂れない入院患者等への栄養補給剤としても活用されている[5)].トレオニンにはストレス性胃潰瘍の改善作用が[6)],メチオニンには肝機能改善作用や免疫増強作用が知られている[7,8)]. 本研究で見出した藻類株はトリプトファンの含量が低いものの,ロイシン,イソロイシン,バリン等の分岐鎖アミノ酸が多く,スポーツ飲料や栄養補助食品の原料として利用が期待できる.

他方, アルギニンは魚類の必須アミノ酸であり,これを含む藻類株は養殖魚の生育促進や斃死率改善にも効果が期待できる[9)].

脂肪酸組成についてもガスクロマトグラフーFID 計で解析した. 図 2 および表 2 に実験結果をまとめた. 解析の結果, 多くの株で脂質量が目標値の 150 mg/g 乾燥藻体以上であることがわかり, 脂肪酸のうち30%前後がリノール酸(ヒトの必須脂肪酸のひとつ)であることもわかった.リノール酸は細胞膜の流動性の維持[10)]に加えて, 女性の閉経後の更年期障害の軽減効果が動物実験で示唆され[11)], 皮膚の水分蒸発の軽減やメラニン生成の抑制効果も報告されている[12,13)]. 藻類脂質にはリノール酸を含め不飽和脂肪酸の含量が多かったことから,食品や医薬品はもちろんのこと,化粧品配合原料とし

ての利用も期待できる.

カロテノイド含量は紫外可視光分光器を検出器として付属したHPLCで解析した（図3）．実験の結果，いずれの藻類株も，分析したカロテノイド種の中でルテインを主要なカロテノイドとして含有し，幾つかの株は他の株よりも突出したルテイン含量を持つことが明らかとなった.ルテインはヒトの目の水晶体や黄斑部などに存在する,強力な抗酸化作用を持つカロテノイドであり,加齢黄斑変性や白内障の予防に効果が期待されている[14]．しかし，ヒトを含めた動物はルテインの生合成をできないことから,専ら果菜類等の食品を介して摂取する必要がある．他方，ルテインは卵黄の色調を改善する効果があり，淡水魚（イワナ，ヤマメ，ニジマス）の魚肉にも含まれていることから[15]，これら養殖魚の色調改善も効果が期待できる.

藻体の将来の食品・畜水産分野への利用可能性を検討するために，その最初の段階として，動物プランクトンを用いたマイクロプレートスケールの投餌試験を行い，藻体成分の安全性を検討した．具体的には，ブラインシュリンプを卵から孵化させた後マイクロプレートに分注し，そこに乾燥藻体 2 mgを添加し，48時間室温で飼育した．48時間後に一部を採集し顕微鏡で観察した際の写真を図 4にまとめた．いずれの藻体を与えた場合もブラインシュリンプの斃死は観察されず，活発に遊泳する様子が観察され，藻体の毒性を連想させるような挙動は見られなかった．ファイル容量の関係上，本報告書には掲載できないが，遊泳の様子を収めた短時間動画撮影も行い，データとして保管している.

２．２　野生微細藻類を用いたバイオガス改質試験

実在のバイオガスには約 1%の硫化水素も存在し,微細藻類の生育を阻害する可能性がある．そこで,実際の嫌気消化で生成されたバイオガスで前述の野生藻類株を培養し,硫化水素の影響を受けずに生育できるかを試験した.図5の実験方法概要に図示するように,ガラスバイアルの中に小型試験管を収め,試験管内には汚泥と汚泥分解菌叢を,試験管外のバイアル容器には野生微細藻類株と最適アルカリ pHの無機塩培養液(アルカリ培養液)を分注し,気相を窒素に置換して 25℃下で静置培養した．試験管内で進行する汚泥分解によりバイオガスが発生し,バイオガス中のCO_2が無機塩培養液に溶解し,藻類に光合成基質として吸収されることで,気相中のバイオガスからCO_2が除かれ，改質が達成されると期待した.

実験の結果を図6，図7，図8に示した．藻類株は，バイオガスの CO_2 を基質として良好に生育し,培養 1 週間目には培養液が藻類の増殖で濃い緑色に濁ってくる様子が観察された（図 6）．増殖した藻類株の細胞密度を計数したところ,順調に細胞数が増加していることがわかった（図 7）．培養液の中には炭素成分は入れておらず,バイオガス中のメタンは水に不溶である．従って，バイオガス中のCO_2がアルカリ性の培養液に溶解し，藻類株はそれを基質に光合成をして生育していることが確認された．バイオガス中には 1%程度の硫化水素が混在することが知られているが,藻類株はその影響を受けずに生育できることも示唆された．さらに，培養後のバイアル気相をガスクロマトグラフ-TCD 計で分析したところ,藻類株を接種しなかったバイアルでは CO_2 が気相に大量に残存しているのに対して,藻類を接種・培養したバイアル気相ではCO_2が検出限界以下にまで消失しており（図 8），バイオガスの改質に成功したことが裏付けられた.

バイオガス改質試験では，汚泥分解の区画（試験管内）と藻類増殖の区画（試験管外）は明確に隔てられている（図 5）．従って，藻類培養液には汚泥成分も菌叢も混入しない工夫が施されており,藻体の食品･飼料利用を想定する際の衛生面でのハードルは低いと考察される.

２．３　メタン生成菌の不活化による，水素生産菌叢の開発

嫌気消化は多様な微生物が寄与するプロセスであり，これらの微生物は「加水分解菌」「酸・水素生成菌」「メタン生成アーキア」に大きくグループ分けできる[16]．食品廃棄物や汚泥などの基質はまず「加水分解菌」によってアミノ酸・糖・脂肪酸等の低分子にまで分解される.次にこれらの低分子基質を「酸・水素生成菌」が受け取り，代謝物として酢酸，プロトン，CO_2を排出する．最後に，これら代謝物を基にして「メタン生成アーキア」がバイオガス（メタンとCO_2の混合物）を産生する．本研究で用いた汚泥分解菌叢の菌叢解析でもこれら三者の共存が確認できている.

他方，嫌気消化で発生するメタンは，天然ガスの主成分そのものであることから代替エネルギーとして有用であるが，これを燃焼することでCO_2が発生し，地球温暖化の要因となり得る．そこで新たな代替エネルギーとして水素に関心が寄せられている．上述のうち「メタン生成アーキア」だけを死滅あるいは不活性化させれば,水素を産生する菌叢へと変換できる場合がある[16]．そこで，本研究で用いている菌叢を水素生産菌叢へと変換できるか試験した.

実験の結果,菌叢を 80℃および 100℃で加熱処理したものを培養した際に,水素の発生が確認できた.水素発生が確認できた菌叢の植え継ぎ培養を行っ

たところ,安定して水素を産生することが観察された．加熱処理による菌叢メンバーの変遷をPCR-DGGE 法で解析した結果，親菌叢では優占種であった細菌が加熱処理後では検出されず，また，加熱処理後に優占種となった細菌種も見られた.加熱処理後の菌叢には主に水素生産菌として知られる*Clostridiu*m 属や *Enterobacteria* 属が多かった.

続いて，酵素活性を検討したところ，セルラーゼ活性とキチナーゼ活性が保持されていたことより，耐熱胞子を形成する加水分解菌が存在していることが判明した.従って，加熱後菌叢は廃棄物中の多糖類を分解して水素を産生していることが示唆された.

3． 図 表

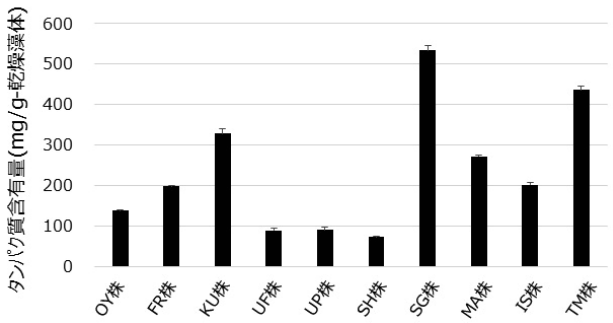


図 1 野生微細藻類株の藻体タンパク質含量

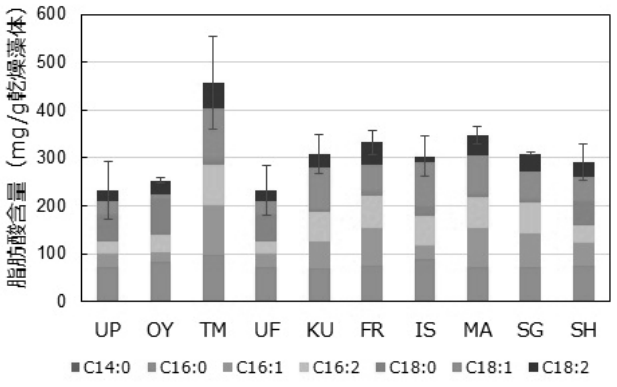


図 2 野生微細藻類株の藻体脂質含量

表 1 藻体タンパク質のアミノ酸組成（mol%比）

アミノ酸	OY株		FR株		KU株		UF株		UP株		SH株		SG株		MA株		IS株		TM株	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
His*	2.17	0.06	1.83	0.04	2.06	0.04	1.87	0.04	2.17	0.03	2.63	0.13	2.15	0.01	1.73	0.08	2.24	0.03	2.21	0.04
Ser	3.70	0.01	4.04	0.04	5.03	0.05	4.63	0.03	3.38	0.03	4.12	0.09	4.62	0.01	4.27	0.06	3.54	0.05	4.82	0.07
Arg	5.49	0.06	4.99	0.07	5.01	0.08	6.48	0.03	6.63	0.07	12.20	0.25	5.02	0.01	5.06	0.12	5.20	0.04	5.05	0.03
Gly	13.72	0.27	13.12	0.09	12.67	0.12	12.02	0.14	12.74	0.02	13.50	0.18	13.07	0.11	12.70	0.31	13.63	0.06	13.13	0.07
Asp+Asn	4.97	0.18	5.33	0.13	5.41	0.09	5.75	0.21	6.13	0.09	4.64	0.15	5.13	0.07	5.79	0.35	4.84	0.23	4.64	0.17
Glu+Gln	7.81	0.29	8.38	0.12	7.90	0.11	12.14	0.14	9.24	0.14	9.45	0.26	8.34	0.12	9.21	0.42	7.63	0.23	7.83	0.19
Thr*	4.97	0.01	4.65	0.07	4.92	0.06	4.91	0.06	4.69	0.04	5.16	0.15	4.63	0.03	4.77	0.08	4.75	0.10	4.94	0.10
Ala	11.51	0.25	11.04	0.11	11.08	0.12	10.97	0.15	10.80	0.08	8.73	0.33	11.02	0.05	10.86	0.39	9.84	0.12	10.59	0.05
Pro	6.18	0.01	6.27	0.02	6.22	0.04	5.84	0.04	5.95	0.08	5.12	0.16	6.13	0.07	6.01	0.08	6.36	0.08	6.23	0.08
Cys	0.25	0.01	0.08	0.00	0.10	0.00	0.13	0.00	0.20	0.00	0.01	0.03	0.08	0.00	0.07	0.00	0.08	0.00	0.09	0.00
Lys*	4.15	0.36	3.91	0.08	4.33	0.11	4.14	0.19	4.48	0.11	2.34	0.36	4.25	0.08	4.46	0.42	4.92	0.18	4.05	0.08
Tyr	2.98	0.14	2.87	0.03	2.98	0.03	2.35	0.04	2.85	0.01	2.96	0.16	2.72	0.05	2.89	0.17	3.13	0.08	2.85	0.04
Met*	2.93	0.09	2.74	0.02	2.69	0.02	2.51	0.02	2.73	0.01	2.85	0.10	2.78	0.02	2.66	0.10	2.70	0.03	2.79	0.01
Val*	7.47	0.02	7.98	0.05	7.47	0.03	7.17	0.02	7.40	0.08	6.75	0.07	7.61	0.01	7.62	0.10	7.86	0.09	7.65	0.05
Ile*	4.98	0.03	5.16	0.03	4.90	0.01	4.46	0.00	4.85	0.05	4.30	0.03	5.00	0.03	5.00	0.08	5.25	0.05	5.06	0.04
Leu*	10.18	0.12	11.12	0.09	10.79	0.00	9.35	0.02	9.83	0.09	8.79	0.08	10.93	0.04	10.71	0.13	10.99	0.12	11.14	0.07
Phe*	6.53	0.32	6.51	0.08	6.42	0.08	5.28	0.12	5.94	0.05	6.46	0.36	6.54	0.16	6.18	0.42	7.05	0.19	6.94	0.12
Trp*	<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01	
必須アミノ酸	43.39	1.02	43.89	0.47	43.58	0.35	39.69	0.47	42.09	0.46	39.27	1.28	43.89	0.38	43.13	1.42	45.76	0.80	44.76	0.49

表 2 藻体脂質の脂肪酸組成（wt%比）

脂肪酸	OY株		FR株		KU株		UF株		UP株		SH株		SG株		MA株		IS株		TM株	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
ミリスチン酸 (C14:0)	<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		0.27	0.02
パルミチン酸 (C16:0)	28.62	3.19	16.65	0.13	15.48	0.53	25.83	2.67	26.46	3.15	21.39	6.12	17.31	0.57	14.89	0.13	22.63	0.85	15.71	0.09
パルミトレイン酸 (C16:1)	6.50	0.53	17.33	0.05	12.24	2.86	9.45	0.85	11.46	1.79	12.15	2.72	16.54	0.50	16.83	1.16	7.07	0.24	15.76	0.18
ヘキデカン酸 (C16:2)	5.72	0.58	6.75	0.19	6.38	0.48	4.15	0.23	3.66	0.79	4.15	1.43	7.06	0.87	6.28	0.42	7.17	0.63	7.01	0.12
ステアリン酸 (C18:0)	18.83	0.78	1.46	0.03	0.92	0.53	15.28	0.34	10.09	0.86	11.75	9.36	1.36	0.42	0.86	0.07	4.03	0.08	1.68	0.02
オレイン酸 (C18:1)	4.47	0.38	15.98	0.09	24.72	2.01	13.43	0.50	9.31	0.20	16.98	4.78	18.02	0.63	21.61	0.50	30.92	0.11	22.38	0.27
リノール酸 (C18:2)*	30.34	0.93	32.45	0.19	20.41	1.61	25.13	1.19	32.97	0.37	26.54	2.40	28.28	0.72	28.11	0.68	9.11	0.04	26.68	0.25
リノレン酸 (C18:3)*	<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1	
未同定脂肪酸	5.52		9.38		19.84		6.73		6.05		7.03		11.43		11.42		19.06		10.50	
不飽和脂肪酸	47.03	2.42	72.51	0.51	63.76	6.96	52.16	2.78	57.39	3.15	59.83	11.33	69.90	2.72	72.83	2.76	54.28	1.02	71.83	0.82

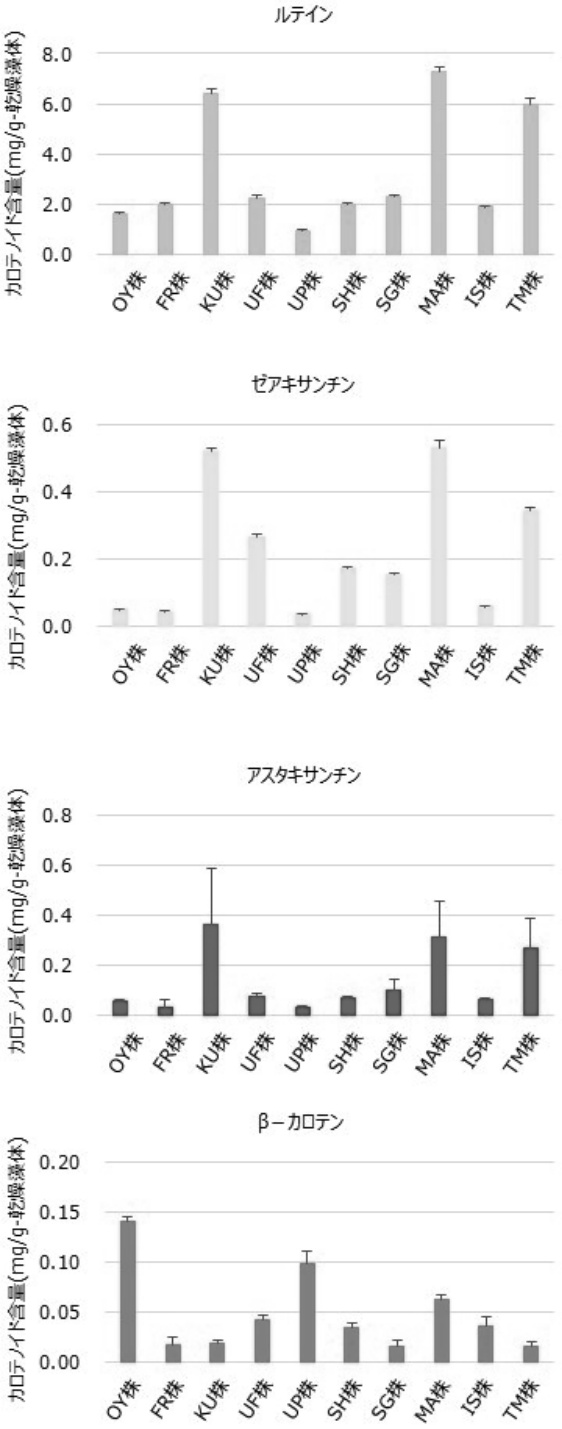


図 3 野生微細藻類株のカロテノイド含量

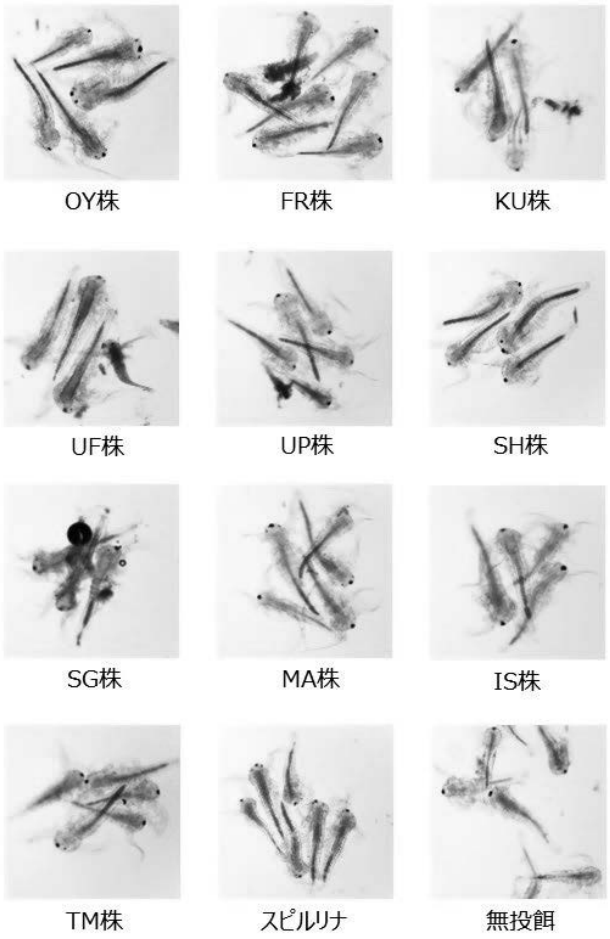


図 4 藻体を投餌したブラインシュリンプの様子



バイアル番号	培地／藻類株
1	なし／なし
2	滅菌水/なし
3	アルカリpH培養液／なし
4	アルカリpH培養液 ／ OY株
5	アルカリpH培養液 ／ FR株
6	アルカリpH培養液 ／ KU株
7	アルカリpH培養液 ／ UF株
8	アルカリpH培養液 ／ UP株
9	アルカリpH培養液 ／ SH株
10	アルカリpH培養液 ／ SG株
11	アルカリpH培養液 ／ MA株
12	アルカリpH培養液 ／ IS株
13	アルカリpH培養液 ／ TM株

図 5 野生藻類を用いたバイオガス改質試験の概要

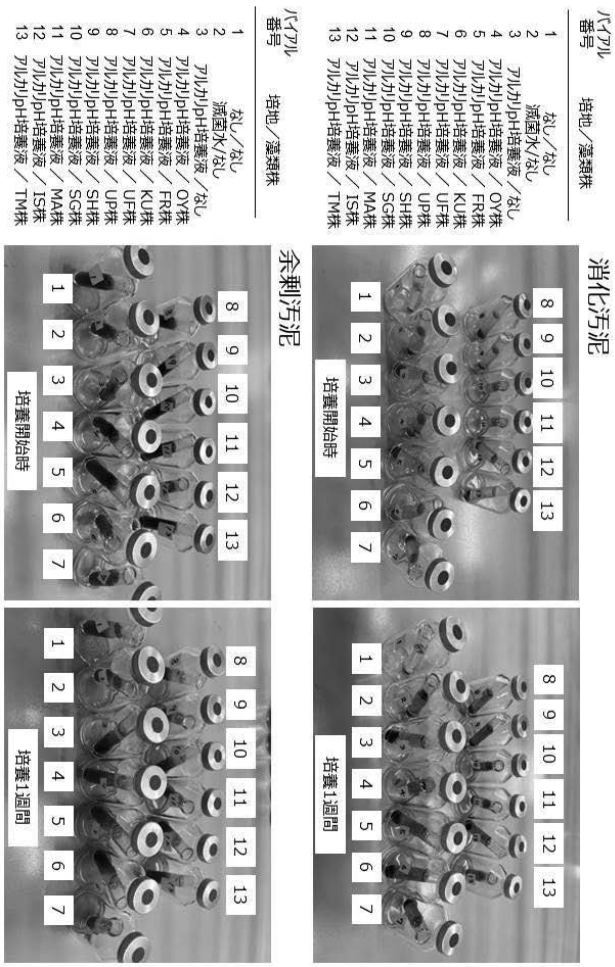


図 6 バイオガス改質試験の様子

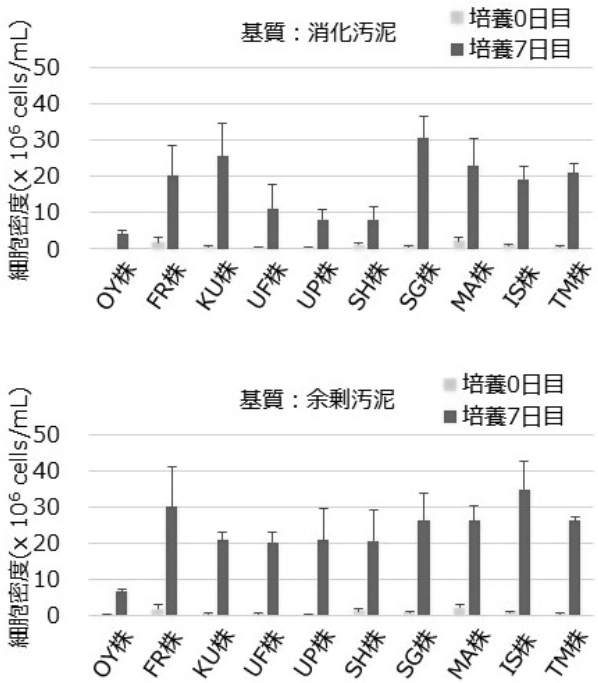


図 7 バイオガス改質試験における藻体密度

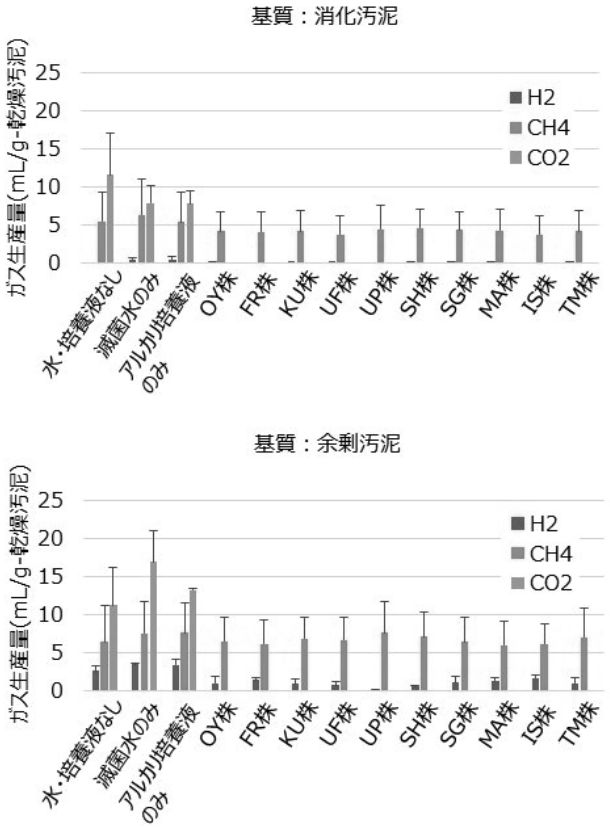


図 8 バイオガス改質による反応器中ガス組成

４．今後の展望

本研究で用いた汚泥分解菌叢は，下水汚泥に対して分解能を持つことを技術的優位性としていた．本研究結果から，食品廃棄物を基質とした場合には，本菌叢は，廃棄物の基質特性に適した微生物を優占種とした微生物組成へと変化し，バイオガスを生産できたことから，汎用性の高い廃棄物分解・バイオガス生産用シードカルチャー（種菌）として活用が期待できる．本研究成果の社会実装に際しては，現行の嫌気消化槽をそのまま転用できるので，新たな設備投資が不要であり，反応に要するエネルギーやコストの点でも，現行の嫌気消化や水熱処理よりも優位な点を備えている．

また，本研究の野生藻類は一般的な微細藻類が生育しにくい pH 範囲で良好に生育できたことから，厳密な無菌操作ができない屋外培養に適しており，雑菌繁殖リスクを抑えつつ培養スケールを商用規模にまで拡大することも可能である．バイオガス中の CO2 を有用物質へと変換できたことから，バイオガスの高カロリー化と有用物質の生産の両方を同時に進められる．

本研究のバイオガス改質試験の知見を基に，吸引ポンプを備え付けた発酵装置（図 9）を用いた場合に，容器内ガス分圧を抑えつつバイオガス増産と汚泥減容が達成できるか，試験する必要がある．

また，TM 株を含め上位の優良形質を示した藻類株のビタミン B/C 含量（本研究では分析機器の不調により未達）を検討するとともに，投餌によるブラインシュリンプの生育挙動と栄養強化の有無，さらにはそれを与えた仔魚への影響等までを試験し，農林水産利用での有用性を評価する必要がある．

さらに，食品への利用を想定する場合，長期に渡り様々な動物実験が必要になることに加え，藻体からの成分抽出法を検討する必要がある．しかし，食品分野での成分抽出法は安全性の観点から抽出方法が法律等により決められている（植物油脂の場合は，ヘキサン抽出および加熱による溶剤除去）ので，それら法的に許容された抽出法の中で，いずれの方法が藻類にも適用できるかを試験すればよく，開発はスムースに進むと期待される．

狭隘な大学研究室では上記の開発を進めるのに不十分であることから，関心を持つ企業と産学連携開発グループを作り，試験稼働は十分な敷地を持つ企業で，分析は大学研究室で，というように分担しつつ進めることが必要である．展示会等を通じて企業技術者の見解を聞きながら，培養プロセス等に要する反応コストについても現実的な試算が必要であると認識している．

本研究成果の事業化についても考察した．技術応用される製品としては，現在の嫌気消化槽に置き換わり，「廃棄物のさらなる減容（積極利用）」「高カロリーバイオガスの生産」「食品・飼料素材の生産」を目的とするプラントが想定される．従って，ターゲットユーザーとしては，各地域の下水処理公共事業団が挙げられるが，それ以外でも，食品工場や農業団体など自前の排水浄化設備を持つ事業体でも汚泥は発生するので，潜在的なユーザーと考えられる．汚泥を排出した場合は，産廃業者に処分を委託する必要があり，その処分費用は多くの事業者にとって悩みの多い問題である．従って，本研究成果が実用化されれば，ユーザー事業者は産廃処分費用の軽減が可能となり，その分，製品開発や事業開拓等に資金をまわせるというメリットがある．電力だけでなくガスについてもエネルギー事業の自由化が拡大していることから，高カロリーバイオガスは近隣地域の生活用ガスとして活用でき，新たな事業に結び付くと期待できる．

加えて，本研究で試験した野生藻類の中には高タンパク質含量であることに加えて，ヒトの必須脂肪酸であるリノール酸や，高い抗酸化作用を持つカロテノイドであるルテインが多く含まれる特徴が見出された．リノール酸は食用油の栄養強化に有効であることに加え，肌の保湿などの効用で化粧品にも使用されている．他方で，ルテイン摂取が白内障や

加齢黄斑変性症の発症リスクを下げることが示されており,これを配合したサプリメントは既に製品化されている. 従って, 原料コストのない下水汚泥を出発点とし,光合成のための太陽光さえ得られれば電力コストも不要であることから,持続可能型社会にフィットしたものづくりが可能である (図 10).

下水処理場は全国に 2000 箇所存在し, 24 時間休みなく年中稼働していることから,下水汚泥は全国各地で常に発生し続ける未利用資源であり,市街地や集落がある限り永続的に存在する問題でもあることから, 事業化の可能性は高いと期待される.

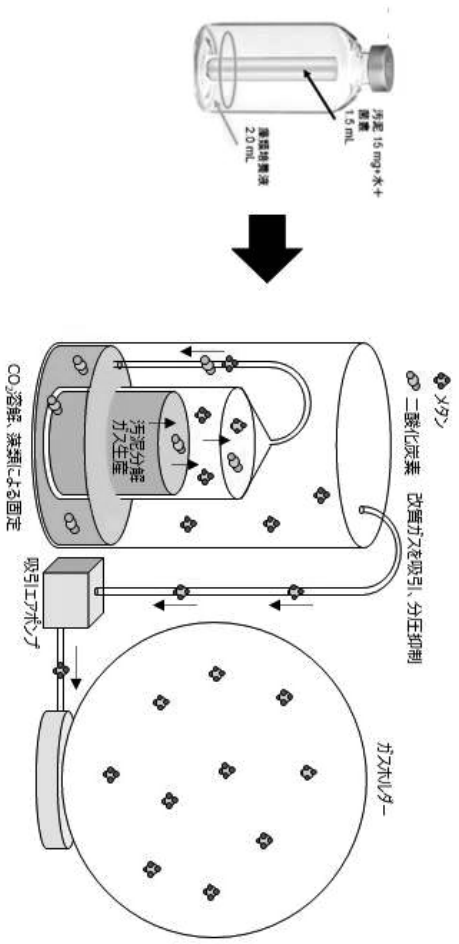


図 9 今後の技術開発で計画する, 食品廃棄物分解・バイオガス改質リアクター



図 10 本研究の社会実装イメージ

参 考 文 献

1) 環境省：食品廃棄物の利用状況等(平成 30 年度推計), https://www.env.go.jp/press/files/jp/116149.pdf (2018)
2) 農林水産省：平成 29 年度食品産業リサイクル状況等調査委託事業(食品関連事ぞ業者における食品廃棄物等の可食部・不可食部の量の把握等調査)報告書, 19-41 (2018)
3) 藤井克彦, 杉山健二郎：2022 年度総合研究所年報 (2022)
4) 渡辺恭良：疲労の分子神経メカニズムと疲労克服, 日本薬理学雑誌, 129, 94-98 (2007)
5) 下村吉治, 北浦靖之：スポーツ医学的観点からのアミノ酸機能, 化学と生物 , 52, 143-144 (2014)
6) An, JM., Kang, EA., Han, YM., et al. Dietary threonine prevented stress-related mucosal diseases in rats. J. Physiol. Pharmacol., 70, 2019 (DOI 10.26402/jpp.2019.3.14)
7) José, M., Mato, M., Martínez-Chantar, L., and Lu, SC. Methionine Metabolism and Liver Disease. Annual Rev. Nutrition, 28, 273-293, 2008
8) Tsiabge, VK., Cook, ME, Harper, AE, Sunde, ML. Enhanced immune responses in broiler

chicks fed methionine-supplemented diets. Poultry Sci., 66, 1147-1154, 1987
9) Seyyed, MH., Khan, MA., Yousefi, M., Costas, B. Roles of arginine in fish nutrition and health: insights for future research. Rev. Aquacult., 12, 2091-2108, 2020
10) Gu, C., Philipsen, MH., Ewing, AG. Omega-3 and -6 fatty acids alter the membrane lipid composition and vesicle size to regulate exocytosis and storage of catecholamines. ACS Chem. Neurosci., 15(4), 816-826, 2024.
11) Parhizkar, S., Latiff LA. Supplementary health benefits of linoleic acid by improvement of vaginal cornification of ovariectomized rats. Adv. Pharm. Bull., 3(1), 31- 36, 2013.
12) 安藤秀哉，橋本晃，政本幸三，市橋正光，三嶋豊：リノール酸のメラノジェネシスに対する抑制効果，日本化粧品技術者会誌，27 (3), 415-423 (1993)
13) 前田一仁：脂肪酸とその誘導体の香粧品における新しい応用，油化学，44 (4)，291-300 (1995)
14) 河口良子:ルテインとその機能性，ビタミン，89，537-539 (2015)
15) 松野隆男，永田誠一，勝山政明ら：魚類のカロテノイドに関する比較生化学的研究 XVIII，日本水産学会誌，46，473-478 (1980)
16) 野池達也 (編著)：メタン発酵，技報堂出版 (2009)

研究成果一覧

①発表論文

1. Kikuchi Y., Kanai D., Sugiyama K., Fujii K. (2024) Biogas Upgrading by Wild Alkaliphilic Microalgae and the Application Potential of Their Biomass in the Carbon Capture and Utilization Technology. Fermentation 10 (3), art. no. 134
2. Hasaka S., Sakamoto S., Fujii K. (2023) The Potential of Digested Sludge-Assimilating Microflora for Biogas Production from Food Processing Wastes. Microorganisms 11 (9), art. no. 2321
3. Hayakawa Y., Aburai N., Fujii K. (2023) Development of Digested Sludge-Assimilating and Biohydrogen-Yielding Microflorae. Fermentation 9 (2), art. no. 175

② 学会発表

1. 金井 大智，菊地 優李，杉山 健二郎，藤井 克彦．消化汚泥分解菌叢と微細藻類を用いた廃棄物資源化技術の検討．廃棄物資源循環学会 令和 5 年度関東支部主催講演会・研究発表会 (2024/03/01)
2. 菊地 優李，金井 大智，杉山 健二郎，藤井 克彦．高濃度 CO_2 とアルカリ pH に適応した微細藻類の探索． 日本農芸化学会 2023 年度大会 (2023/03/14)
3. 早川 雄平，油井 信弘，藤井 克彦．消化汚泥から水素を生産できる菌叢の開発．第 32 回廃棄物資源循環学会研究発表会 (2021/10/25)

短繊維強化自己治癒セラミックスの開発

工学院大学　機械工学科　柳迫徹郎

工学院大学　機械工学科　長谷川浩司

工学院大学　機械工学科　平塚将起

Development of Short Fiber Reinforced Self-Healing Ceramics

Tetsuro Yanaseko, Department of Mechanical Engineering
Koji Hasegawa, Department of Mechanical Engineering
Masaki Hiratsuka, Department of Mechanical Engineering

ABSTRACT : The purpose of the research is to develop short fiber reinforced self-healing ceramics that realize a complicated shape that can be injection molded and cost reduction. By analyzing from the material mixing process using fluid mechanics, the optimum process with reduced defects in the ceramics will be realized. In addition, although an oxidation reaction is used for crack self-healing, the bondability between the generated oxide and the matrix ceramics is evaluated by calculating the interfacial energy, as the result, an appropriate self-healing agent will be selected. Through these investigations, the material system that enables material and process design according to the application will be realized.

１．　緒言

次世代ジェットエンジンタービン材料である「長繊維強化自己治癒セラミックス」は，現在タービン翼に使われるニッケル系超合金と比較し，軽量（密度は 1/2 程度）かつ耐熱性に優れ，繊維強化による強靭化および自己治癒機能による強度回復を実現することで「運転時間中に破壊が生じない」ことを実現し，約 15%もの燃費向上を実現するものである[1]．しかし，長繊維強化自己治癒セラミックスは，そのプロセスの煩雑さから複雑形状への適用が難しい，作製プロセスが複雑かつ材料内部に欠陥が内包しやすいという問題点がある．加えて，セラミックス内に複合化した自己治癒エージェントと呼称される物質の酸化反応により生じた酸化生成物により自己治癒機能を発現するが，この酸化生成物と母相となるセラミックスとの結合性は未だ詳細に評価されていない．

本研究では，繊維強化の形態を短繊維強化とし，セラミックス材料と混合し型に注入可能なプロセスとすることで複雑形状・低コスト化の実現した短繊維強化自己治癒セラミックス（Self-healing Short Fiber Reinforced Ceramics, sh-SFRC，Fig. 1）の開発を行う．材料混合プロセスから流体力学を用いて解析することで，材料内部への欠陥導入が低減された最適プロセスを実現する．また，き裂の自己治癒には酸化反応を用いるが，生成する酸化物と母相となるセラミックスの接合性が強度回復のカギとなる．この接合性を界面エネルギー算出により評価し，適切な自己治癒物質の選定を行う．これらの検討により，用途に合わせた材料・プロセス設計を可能とした材料システムを実現化する．この材料・プロセス設計は，自己治癒材料の実用化を阻む要因である「用途によって材料系を設計しなおす」ことを解消し，他国に先駆けて自己治癒材料を産業ベースで実用化することを目的とする．

２．　実験方法

２．１　ボールミル内の固液混合プロセスの可視化

自己治癒セラミックスに限らず，セラミックスの製造においては，多くの場合，原料粉末をボールミル内などで混合・粉砕し得られたスラリーなどを用いる．この際の

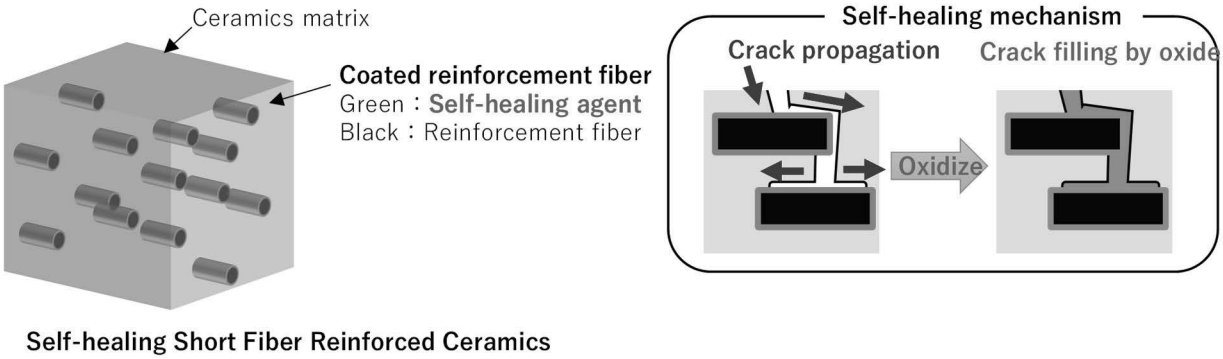


Fig. 1 Self-healing short fiber reinforced ceramics.

混合条件は，後工程である焼結後の相対密度や組織観察により評価され条件値が決定されるため出来栄えでの評価となっておりプロセス中に生じる現象からの最適化は未だなされていない．sh-SFRC のような極めて複雑な材料系における混合プロセスには，流体力学からの混合プロセスの理解が必須である．このため，Fig. 2 に示すように，内部観察可能なミルポットを用いて，回転数，液面高さ，ミルポット内へのアルミナボール充填数などを変化させた際の混合プロセスの可視化を行った．可視化手法としては，蛍光トレーサー粒子と紫外線レーザーを用いた PIV（粒子画像流速測定法）と高速度カメラにより取得した動画に対し画像解析を用いた．加えてボールを充填させない際に容器内の流れ場を得るため，ボールを充填せず，容器内の流体の流れ場を測定した．加えて，液面に固体球が衝突する際の流体挙動を確認するため，容器内に静止した流体液面にアルミナボールを衝突させた際の流れ場を PIV により計測した．なお，本来使用される予定の Al_2O_3 粉末（平均粒 : 0.1 μm 以下）と 1%ポリビニルアルコール水溶液を重量比で 3:1 で混合したスラリーだと $A1_2O_3$ 粉末が白色不透明を示していることにより，スラリーが白濁しており内部観察が不可能であったため，同程度の粘度を持つグリセリン水溶液を模擬流体として採用している．

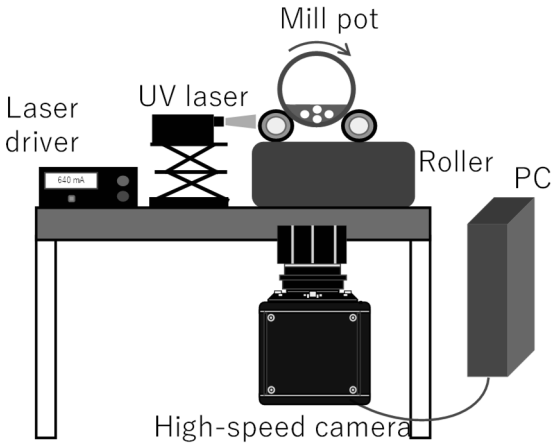


Fig. 2 Schematic of mixing visualization equipment.

２．２　シミュレーションによる接合強度評価

先述の通り，自己治癒エージェントの選定基準においては，生成される酸化物と母材のセラミックス間の接合強度が重要となる．しかしながら，極めて多数存在する自己治癒エージェントの候補材の全てを実験において検証することは非現実的であり，加えて実験方法も確立なされていない．このため，シミュレーションにおいて接合強度を評価できる手法が確立できれば，自己治癒エージェントの選定における時間的コストが大幅に削減することが可能である．シミュレーションにおいては，第一原理計算により界面エネルギーを算出することにより，接合強度の評価を試みた．また，界面の構造は，母材と治癒素材・酸化物の構造の表面を組み合わせて形成されるため，それぞれの安定な表面を用いて界面を作成することおよび構造間距離が接合エネルギーに影響を及ぼすことが考えられるため，これらの影響を調査した．なお， 母材には Al_2O_3，自己治癒エージェントに SiC を採用した代表的な自己治癒セラミックスである SiC/Al_2O_3 複合材料 [2,3]を想定し，SiC の酸化反応により生成される SiO_2 と $A1_2O_3$ の界面エネルギーを算出している．

２．３　アコースティックエミッション法による接合強度評価

生成物と母材の接着強度が異なると破壊形態が異なるため，この差異の評価にアコースティックエミッション（Acoustic Emission, AE）法の適用を検討した． AE 法を利用し，自己治癒セラミックスが破壊に至るまでの AE の振幅と構成する周波数成分を解析により，接着強度の差異が評価可能であることが予想される．

実験には，上記と同様，代表的な自己治癒セラミックスである $SiC30vol.\%/Al_2O_3$ 複合材料を用いた．Al_2O_3 粉末および SiC 粉末を湿式混合後，温度 : 2023 K，保持時間 : 3.6 ks，圧力 : 15 MPa で焼結し，試験片形状に加工した．試験片は，材料の元強度の基準となる「平滑材」，平滑材に予き裂を導入し，強度を低下させたものを「損傷材」，損傷材に対して治癒処理を行い，強度回復が見られるかを確認するための「治癒材」の 3 種類を作製した．これらの試験片に対し，3 点曲げ試験を行い AE の取得を行った．これらの治癒状況に対し，各 AE パラメータがどのように変化するかを調査した．

３．　実験結果

３．１　ボールミル内の固液混合プロセスの可視化

Fig. 3 にボール個数と液面高さを変化させた際のポットミル内部の画像を示す．液面高さが上昇することにより，ボールが容器回転に伴い容器上部へ移動し，そこから落下するという挙動から，液体に追随して周回もしくは容器下部の液体内に滞留するという挙動に変化した．ボールミルはボールの落下により混合・粉砕を促進させることから液面高さが高い，すなわち混合流体の体積の増加は混合を阻害することが判明した．加えて，ボールの充填量に着目すると，ボール個数が 15，30 および 45 個に増加するとともにボールが容器上部から落下する頻度が向上したことから，ボール個数の増加により混合が促進さえれることが示唆された．Fig. 4 にボール個数と回転数を変化させた際のポットミル内部の画像を示す．同図より回転数が 30，55 および 80 rpm と変化させることにより，ボールの挙動が滑落，落下，周回と変化することが判明した．前述の通り，混合においてはボール落下が望ましいことから，最適な回転数が存在することが示唆された．

Fig. 5 にボールを充填せずに液体の流れ場を PIV により測定した結果を示す．静止液面に単一固体球を衝突させた際に高速度カメラによって得られた画像を示す．

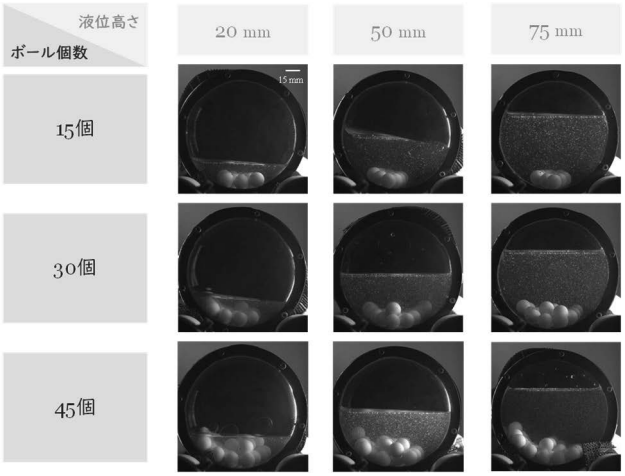


Fig. 3 Image of mill pot at mixing which changed number of ball and liquid height.

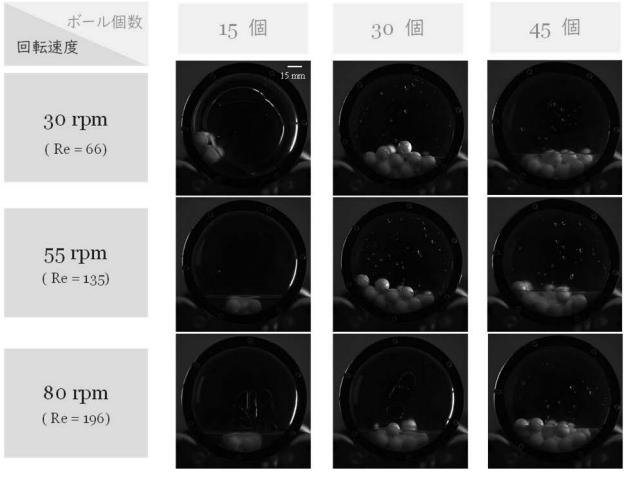


Fig. 4 Image of mill pot at mixing which changed number of ball and revolution per minute.

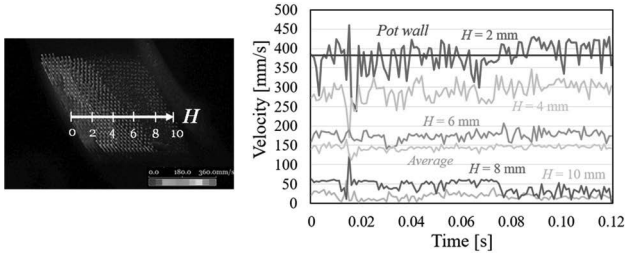


Fig. 5 PIV results and velocity change at each position when balls are not filled into vessel.

同図より容器回転に伴う時計周りの流れが生じていること，容器壁面近傍の流速が大きいこと，容器壁面の流れは上向きであるのに対し、容器内側の流れはほぼ静止している流れになっていることを確認できた．このような流れ場により混合が促進されることが期待される．

Fig. 6 にボールの落下高さを変化させ，静止液面に衝突させた際の PIV 結果を示す．同図よりボールの初期位置を高く設定することで流速の変化が大きくなることおよびボールの初期位置を高く設定することでボールの落下が流れ場に変化を及ぼす範囲が拡大することを確認された．これらのことからボール初期位置を高く設定することで，混合が促進することを示唆された．

３．２　シミュレーションによる接合強度評価

Table 1 に (100)，(010)，(001)の 3 つの面における表面エネルギーを示す．本研究では，すべて等価な面を持つ SiC は省略した．また，SiO_2 は(100)と(010)が等価な面となるため(010)は省略している．Al_2O_3 では，(010)面を表面とした場合の表面エネルギーが 1.73 J/m² で最も高く最安定であった．SiO_2 では，(100)面を表面とした場合の表面エネルギーが 1.73 J/m² で最も高く最安定であった．最大値と最小値の差は，Al_2O_3 では 0.65 J/m² ，SiO_2 では 0.48 J/m² となった．異なる面をとることで表面の安定性が変わるため，接合エネルギーにも影響を与える．これにより，治癒性能の評価が正しく行えなくなる可能性も考えられるため，分子モデル作成時の表面選択と界面作成方向は十分に検討する必要がある．

Fig. 7 に初期構造の構造間距離を，1.0Å から 3.0Å の間で 0.5 Å ずつ変更した際の全エネルギーの変化を示す．Al_2O_3/SiC では，構造間距離が 1.5Å で最小値となり，Al_2O_3/SiO_2 では，構造間距離が 2.0Å で最小値となった．，Al_2O_3/SiC では全エネルギーが最小値となる 1.5Å，Al_2O_3/SiO_2 では 2.0Å で最大となることが判明した．

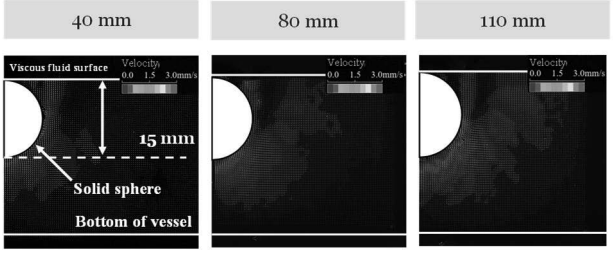


Fig. 6 PIV results for solid sphere impact on a state liquid surface

Table 1 Surface energy of three different surfaces of Al_2O_3 and SiO_2.

Surface energy[J/m²]	Al_2O_3	SiO_2
(100)	1.08	2.45
(010)	1.73	-
(001)	1.46	1.97

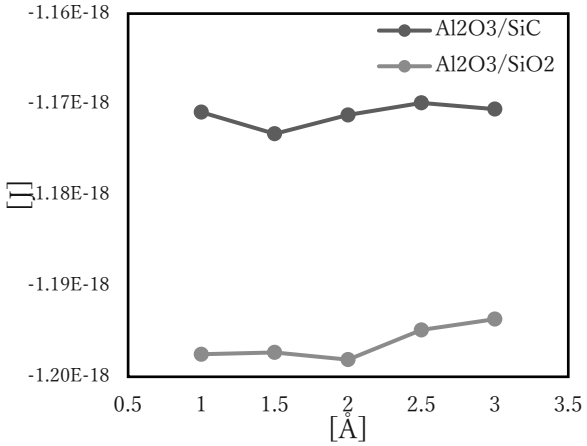


Fig. 7 Energy of Al_2O_3/SiC and Al_2O_3/SiO_2 changing distance between structures in increments 0.5 Å from 1.0Å to 3.0 Å.

構造間距離による全エネルギーの違いで，接合エネルギーの大小関係に影響が出る可能性があるため，界面モデルの作成を行う際には構造間距離を 1.0Å から 3.0Å 程度で変更して適切なものを選択する必要がある．

上記の結果から得た最安定の構造間距離を用いて界面分子モデルを作成し，接合エネルギーを算出して界面の接合性評価を行った．Table 2 に Al_2O_3/SiC と Al_2O_3/SiO_2 の接合エネルギーを示す．Al_2O_3/SiC 複合セラミックスの治癒前である Al_2O_3/SiC の接合エネルギーは 0.398 J/m² ，治癒後の Al_2O_3/ SiO_2 の接合エネルギーは 0.998 J/m² であった．この結果より，治癒後の接合強度が高いと言える．

Table 2 Adhesion energy of Al_2O_3/SiC and Al_2O_3/SiO_2.

	Al_2O_3/SiC		Al_2O_3/SiO_2	
	Al_2O_3	SiC	Al_2O_3	SiO_2
Slab[J]	-4.19E-16	-4.58E-16	-2.10E-16	-1.85E-16
Distance[Å]	1.50		2.00	
All[J]	-8.78E-16		-3.98E-16	
Adhesion[J/m²]	0.398		0.998	

３．３　アコースティックエミッション法による接合強度評価

試験片の治癒状況ごとの曲げ応力を Fig. 8 に示す．マーカーが黒塗りのものは予き裂から破断している試験片である． 同図より，損傷材は予き裂の導入により強度が低下しており，バラツキが極めて小さくなることが観察された．5 h 治癒においては，予き裂より破断した不完全治癒と予き裂外から破断した完全治癒に分かれた．24 h 治癒は全てに試験片において予き裂外より破断しており完全治癒を示していた． 24 h 治癒材は平滑材や 5 h 治癒材よりも平均的な強度が高いことが示されている．これは 5 h 治癒材よりもより治癒が進行し，より深い位置にある内部欠陥まで SiO_2 で治癒されたことで試験片全体の強度が上昇し，最弱部でも強度が高い状態となったため強度が高くなったと考えられる．

Fig. 9 に各試験片における累積 AE エネルギーを示す．それぞれ平均して比較すると，平滑材の平均累積エネルギーが約 394.73 V・μs．損傷材の平均累積エネルギーが約 0.00 V・μs．不完全治癒の 5 h 治癒材の平均累積エネルギーが約 26.84 V・μs．完全治癒の 5 h 治癒材の平均累積エネルギーが約 189.16 V・μs．24 h 治癒材の平均累積エネルギーが約 317.50 V・μs であった．このように破断までに累積する AE エネルギーは治癒が進行するにしたがって増加していく傾向がみられた．また，24 h 治癒材で大きなき裂発生から破断までの時間が短くなり，試験時間後半に大きくき裂成長するのは，治癒が十分に進み試験片の内部欠陥が SiO_2 で充填されたことが示唆される．SiO_2 は破壊靭性値が約 0.7 MPa・$m^{1/2}$ であり，SiC30vol.%/Al_2O_3 の破壊靭性値 4.77 MPa・$m_{1/2}$ より非常に低い．このことから，24 h 治癒材は強度が上がり大きなき裂が入るまでの時間が長くなるが，き裂の成長が早く破断までの時間が短くなると考えられる．以上の結果より，損傷材と不完全治癒の 5 h 治癒材では累積 AE エネルギーが著しく小さくなり，治癒が進むにつれて累積 AE エネルギーも増加傾向を示すことから，AE エネルギーおよびき裂成長タイミングを解析することで試験片の治癒進行度を評価することが可能であると分かった．

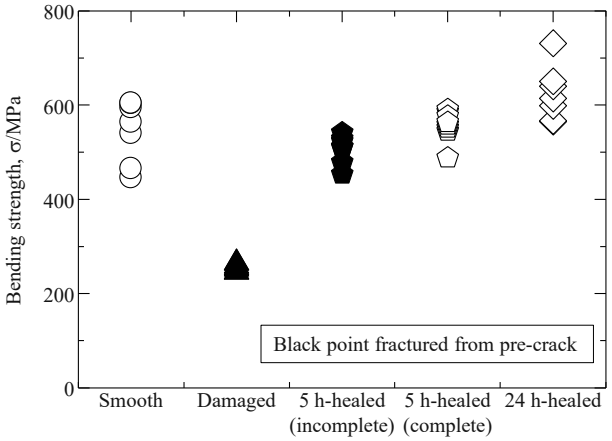


Fig. 7 Bending strength of each specimen (Smooth, Damaged and healed at 5 and 24 h).

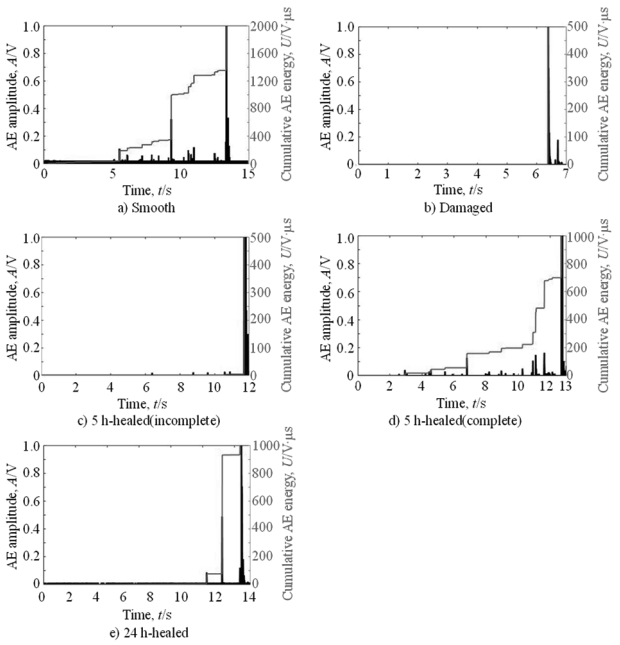


Fig. 8 AE amplitude and cumulative AE energy during three point bending test.

4．結言

短繊維強化自己治癒セラミックスの開発を目的とし，

1） ボールミル内の混合条件の可視化，

2） 第一原理計算に基づく接合強度の評価，

3） AE 法による治癒状態評価

について検討し，必要な評価システムおよび手法構築に目途をつけることができた．

参 考 文 献

（1）Nakao, W., Hayakawa, T., Yanaseko, T., Ozaki, S.: Advanced Fiber Reinforced Self-Healing Ceramics for Middle Range Temperature, Key Engineering Materials, Vol.810, (2019) pp.119-124.

（2）Osada, T., Hara, T., Mitome, M., Ozaki, S., Abe, T., Kamoda, K.: Self-healing by design: universal kinetic model of strength recovery in self-healing ceramics, Science and Technology of Advanced Materials, Vol.21, Issue 1 (2020), pp.593-608.

（3）Osada, T., Nakao, W., Takahashi, K., Ando, K., Saito, S: Strength recovery behavior of machined Al2O3/SiC nano-composite ceramics by crack-healing, Journal of the European Ceramics Soceity, Vol.27, Issue 10, pp. 3261-3267.

投稿論文，Proceedings(1 件)

(1) T. Yanaseko, T. Agata, M. Hiratsuka, K. Hasegawa, Method for evaluating healing state of self-healing ceramics using acoustic emission, Materials Chemistry and Physics, 328(2024), 129922.

学会発表(12 件)

(1) T. Yanaseko, T. Agata, M. Hiratsuka, K. Hasegawa, Evaluation of Healing State of Self-Healing Ceramics by Acoustic Emission, The 7th Asian Symposium on Materials and Processing (ASMP2024).

(2) T. Taguchi, T. Yanaseko, M. Hiratsuka, K. Hasegawa, Visualization Measurement of Mixing Process of Viscous Liquid Contained in a Rotating Cylindrical Vessel, 10th World Conference on Experimental Heat Transfer, Fluid Mechanics and Thermodynamics (ExHFT-10).

(3) 宮尾渓吾，柳迫徹郎，長谷川浩司，平塚将起，自己治癒セラミックスにおける酸化生成物の接合性評価，第 52 回可視化情報シンポジウム．

(4) 田口友也，柳迫徹郎，平塚将起，長谷川浩司，ボールミルに封入した粘性流体の混合プロセス，第 52 回 可視化情報シンポジウム．

(5) T. Agata, M. Hiratsuka, K. Hasegawa, T. Yanaseko, Investigation of Evaluation Indices for Bonding Strength of Healed Areas in Self-Healing Ceramics Using the Acoustic Emission Method, The 13th TSME International Conference on Mechanical Engineering (TSME-ICoME 2023).

(6) 宮尾渓吾，柳迫徹郎，長谷川浩司，平塚将起，自己治癒セラミックスにおける界面構造の可視化，第 37 回分子シミュレーション討論会．

(7) 縣豊樹，平塚将起，長谷川浩司，柳迫徹郎，アコースティックエミッションを用いた自己治癒セラミックスの治癒部接合強度評価指標の探索，M&M2023 材料力学カンファレンス．

(8) 田口友也，柳迫徹郎，平塚将起，長谷川浩司，回転円筒容器に封入した粘性流体の混合プロセスの可視化計測，第 51 回 可視化情報シンポジウム．

(9) 縣豊樹，平塚将起，長谷川浩司，柳迫徹郎，自己治癒セラミックスにおける治癒部強度評価指標の探索，日本機械学会 関東支部 第 29 期総会・講演会

(10) 田口友也，長谷川浩司，柳迫徹郎，平塚将起，固体球を含む回転円筒容器内の混合プロセスの可視化計測，日本機械学会 関東支部 第 62 回卒業研究発表講演会．

(11) T. Yanaseko, T. Agata, M. Hiratsuka, K. Hasegawa, Investigation of Fracture Behavior of Self-Healing Ceramics Using Acoustic Emission, The 21th International Symposium on Advanced Technology (ISAT-21).

(12) 柳迫徹郎，平塚将起，長谷川浩司，AE 法を用いた自己治癒セラミックスの治癒部強度評価，日本機械学会 2022 年度年次大会．

２．総合研究所プロジェクト研究報告

（２０２４年度継続研究）

ナミビアで採掘された銅を利用した抗菌・抗ウイルスフィルターの製作（Ⅱ）
―金属銅からの溶液調製と銅膜形成―

工学院大学　応用物理学科　永井　裕己

ナミビア大学　化学・生命化学科　フィリプス　ヒシモネ

星和電機株式会社　研究開発部　呉　向容

星和電機株式会社　研究開発部　吉川　幸治

大阪公立大学　機械工学科　川上　洋司

Fabrication of antibacterial and antiviral filters using copper mined in Namibia (I)

― Antiviral properties of copper films formed by complex reduction ―

Hiroki Nagai, Department of Applied Physics, Kogakuin University
Philipus N. Hishimone, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Namibia
Hsiang-Jung Wu, Koji Yoshikawa, Research and Development Department,
Seiwa Electric MFG Co. Ltd

ABSTRACT : This year, we attempted to prepare copper precursor solutions from copper formed by the complex reduction method. Three processes were investigated: (1) the formation of a copper precursor solution and a copper electrode film from copper formate, (2) the formation of a copper precursor solution and a copper film using the formed copper film as a copper source, and (3) a method to recover copper in the waste solution generated during copper film formation and the formation of a copper film. In (1), the film was a single phase of copper, with a resistance of 7Ω/1.5m, and a yield of copper was 53±5%. In (2), a precursor solution similar to (1) was obtained by oxygen bubbling with a high concentration of ammonium formate solution in contact with the film. After sonication of the solution for 10 min, ascorbic acid was added, and a copper single-phase film with a resistance of 9 Ω/1.5 m was obtained with 59% yield. (3), which is not described in this report. However, it was found that copper powder of 98% purity could be recovered in a high yield of 92% by adding 3.4 times the amount of ascorbic acid to the effluent generated during copper thin film formation. The copper thin film produced by the combined reduction method is expected to be a candidate for the development of copper film in a resource-recycling society.

１．はじめに

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は，人命はもとより，あらゆる社会活動の脅威である。歴史的にはペストやスペイン風邪などのパンデミックや，近年では，SARS（2003 年），新型インフルエンザ（2009 年），MERS（2012 年）と新たな感染症が実際に頻発している。アフターコロナ時代にあっても，さらなる新興感染症や再興感染症への備えは不可欠である。新たな科学技術の開発は，これらの発生時に有効なワクチンや治療薬のみならず，感染を抑制できる化学素材や抗ウイルス材料などの創出や生産に貢献できる。

機能性膜は，電気的，磁気的，光学的機能などの多様な機能を材料表面に付与できる。これらの形成法は，真空を要する気相法と，前駆体溶液を用いる液相法に大別でき，前世期に発展した半導体産業での成膜は主に前者が担ってきた。一方，1987 年に国連から発表されたブルントラント報告は，現代的なニーズを満たしつつ，未来のニーズも満足させられる開発（持続可能な開発）の重要性を提唱し，科学技術分野における世界的な取組みの基礎となっている。一般に，高真空が不要な液相法は，エネルギー効率がより高い。このような観点から，気相法に匹敵する高機能化を実現できる液相法の開発とその応用が望まれている。

銅や銅化合物は，インフルエンザ A やコロナウイルス 229E など，多種類のウイルスに対して不活性化作用があると種々の研究で報告されている[1–4]。このことから，様々な材料表面に形成した銅膜は，ウイルスを不活性化させ感染を抑制するのに実用的であると考えられる。これまで，銅膜の形成法として，真空蒸着法，スパッタリング法，化学気相成長法，無電解めっき法，分子プレカーサー法など報告されている[5–11]。液相法による産業的な銅膜の形成は，電解めっきや無電解めっきにより，いずれもミクロンオーダーの比較的厚い膜が用いられている。これらの薄膜形成法には，様々な課題がある。電解めっきは，その成膜原理からも基材の導電性が不可欠な方法である。無電解めっきは，ガラスなどの絶縁性基材上にも有効であるが，塩化パラジウムや塩化スズ等の触媒担持の必要性に起因する腐食などが重要課題である。また，銅ナノ粒子ペーストを用いる薄膜形成も試みられている。しかし，ナノ粒子ペーストは，分散剤の除去後に，副生する銅酸化物を水素雰囲気中で還元し，銅粒子同士を焼結・融合して連続体にする必要がある。このような還元焼結法は，銅膜がスポンジ状の焼結体となるために，低接着性による基板からの剥離，電気抵抗率の高さ，深部での未還元化合物の残留に問題があり，期待される機能材料に適用できない[12–14]。また，高真空を要するスパッタリング法などの気相法は，その成膜原理からも複雑な形状の基板に対し，均一に成膜することは困難である。

分子プレカーサー法は，液相法の薄膜形成法である。エチレンジアミン四酢酸（EDTA）やニトリロ三酢酸（NTA）などの汎用配位子の金属錯体をアルキルアミンと共にアルコールに溶解したコーティング溶液（プレカーサー溶液）を調製する。調製したプレカーサー溶液を基板に塗布，乾燥し，得られたプレカーサー膜を熱処理して，均一透明な金属酸化物や金属薄膜などを容易に形成できる。プレカーサー溶液中には，金属錯体が分子レベルで存在しているため，溶液成分同士の完全に均一な混和が可能で，溶液濃度により膜厚の制御も容易という大きな特徴がある。また，同様に熱処理を用いる液相法のゾル-ゲル法と異なり，溶液中で加水分解などの反応は原理的に起こらず，プレカーサー溶液の使用可能期間は飛躍的に長い。

本プロジェクト研究の構想は，アフリカ銅ベルトの南端部に位置する広大なツメブ銅鉱山等を有するナミビア国で採掘された銅を利用したプレカーサー溶液を調製して，その溶液を原料として抗菌・抗ウイルスフィルター材料に銅を製膜加工する。昨年度，試薬から銅プレカーサー溶液を調製し，無アルカリガラス基板上に強固に密着した銅膜の抗ウイルス性を報告した。形成した銅膜は，COVID-19 ウイルスとの接触で 2 時間以内に 99.94%も減少という，通常の銅板よりも速いウイルス不活性化を示した[15]。本報告書においては，ナミビアで採掘された銅からのプレカーサー溶液の調製を想定して，金属銅からの銅プレカーサー溶液の調製を試みた。

２．実験

２．１　使用試薬

銅標準液（1.001 g L^{-1}），ギ酸銅(II)四水和物，精製水，25-28%アンモニア水溶液は，三徳化学工業株式会社と富士フィルム和光純薬株式会社，共栄製薬株式会社，大成化学株式会社からそれぞれ購入した。アスコルビン酸（AsA）とギ酸アンモニウム塩は，関東化学株式会社から購入した。これらすべての試薬は，さらに精製することなく使用した。銅膜は，16 mmϕ × 1.5 m の片端封止ガラス管（以後，ガラス管と示す）内に形成した。このガラス管は，成膜前に，40°C に湯煎したアルカリ性洗浄剤で内部を 10 分間洗浄後，水道水で 8 回すすいだ後，精製水で 3 回置換した。洗浄後のガラス管は，開口端を下向

きにして乾燥してから使用した。

２.２　試薬からの銅プレカーサー水溶液の調製

リファレンスとして，銅(II)錯体を含む水溶液を試薬から調製した。ギ酸銅(II)四水和物と 25– 28%アンモニア水溶液を精製水中で 1 時間撹拌して青色透明溶液を調製した(S_{comp})。この溶液中の Cu^{2+} イオンの濃度を 0.2 mmol g^{-1} に調整した。この溶液に，AsA 粉末を添加して，20 分間撹拌して，銅プレカーサー水溶液（S_{Cu}）を調製した。

２.３　銅膜形成

先端径 9 mmΦ×6 mmΦのロートを用いて，S_{Cu} を洗浄したガラス管に注いだ。S_{Cu} を加えたガラス管を，床と垂直に 10 分間静置して，溶液中の気泡を脱気したのちに，ゴム栓とパラフィルムで密栓した。そのガラス管を約 24°C で 24 時間床と水平に静置した。その後，ガラス管から溶液を取り出し，精製水で 3 回洗浄した。洗浄後に開口端を下向きにして，風乾した。乾燥後のガラス管に新たな S_{Cu} を入れて，同様の操作で成膜した。ただし，水平の静置は，最初の操作から 180°回転させた向きで静置した。ガラス管内部に形成された膜を T_{Cu} と表記する。

２.４　銅膜を原料とした銅錯体水溶液の合成

形成した銅膜を溶解させて出発原料とするために 3 種類の溶液を調製した。まず，①精製水にギ酸アンモニウム塩と 25– 28%アンモニア水溶液を加えた溶液を 15 分撹拌して，ギ酸アンモニウム水溶液を調製した。②　①の溶液に 1.0 L min^{-1} の酸素ガスを 15 分間通気した溶液を調製した。③　①のギ酸アンモニウム水溶液濃度を高くした。①と②の溶液は，銅膜が完全溶解した際に銅，ギ酸，アンモニアの化学量論比が 1 : 2 : 6 で，銅イオン濃度が 0.2 mmol/g になるように調製した。また，③の溶液は，銅膜が完全溶解した際に銅，ギ酸，アンモニアの化学量論比が 1:2:6 で，銅イオン濃度が 0.5 mmol/g になるように調製した。調製した①と②の溶液は，T_{Cu} 付きガラス管に加えた後，ゴム栓をして常温で 3 日間静置した。調製した③は，T_{Cu} 付きガラス管に加えて，1.0 L min^{-1} の酸素ガスを 45 分間通気した。得られた溶液に対して銅イオン濃度が 0.2 mmol/g になるよう精製水とアンモニア水を加えて希釈した。希釈後の水溶液（TS_{comp-X}）は，銅，ギ酸，アンモニアの化学量論比が 1 : 2 : X (X = 6.0, 6.2, 6.4, 6.5)になるように調整した。

２.５　銅プレカーサー水溶液の合成と銅膜形成

TS_{comp-X} に含まれる銅に対して，3.4 倍の物質量の AsA 粉末を添加して，銅プレカーサー水溶液（TS_{Cu-X}, X はアンモニアの化学量論比）を合成した。合成した溶液から 2.3 項と同様の手順で溶液をガラス管に加えて 19±2°C または 25±1°C で静置した。得られた膜を TT_{Cu-X} とした。

２．６　溶液の分析

調製した溶液の性質は，紫外可視分光光度計（UV-Vis）と，原子吸光分光光度計（FAAS），pH メータ，溶存酸素計を用いて分析した。FAAS による溶液中の銅イオン濃度は，市販の銅イオン濃度標準液を 1 mol L^{-1} 硝酸（濃度：1030 g L^{-1}）で希釈した溶液（0.5-2.5 mg L^{-1}）の銅イオン濃度の検量線から決定した。

２．７　T_{Cu} と TT_{Cu-X} の分析

T_{Cu} と TT_{Cu-X} の結晶構造は，X 線回折装置（XRD）（Cu *Kα* 線源，45 kV，200 mA の出力）で決定した。ステンレス製の薬さじを用いてガラス管から剥離させた膜をメノウ乳鉢で 10 分間すりつぶして，入射角 1.0°の平行ビーム光学系を用い，10-80°の 2θ 範囲を 0.05°のステップ幅，5° min^{-1} の速度でスキャンした。さらに，33-48°の 2θ 範囲は，0.01°のステップ幅，1 sec /step の速度のステップスキャンを実施した。

T_{Cu} と TT_{Cu-X} 付きのガラス管の開口端から 70 cm 付近を金づちで割り，得られた約 25 mm^2 の破片の膜表面と断面を電界放出型走査電子顕微鏡（FE-SEM，加速電圧 5 kV，照射電流 10 μA）で観察した。また，X線光電子分光法（XPS）を用いて，得られた約 1 cm^2 程度の破片の T_{Cu} と TT_{Cu-X} の不純物元素を調べた。

３．　結果

３．１　S_{comp} と S_{Cu} の分析

S_{comp} と S_{Cu} の吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

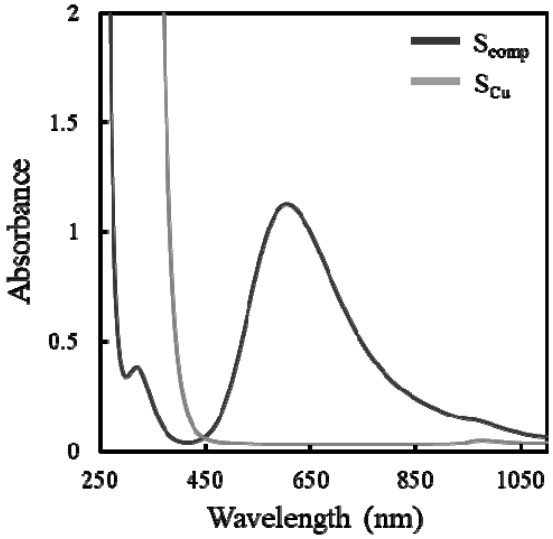


Fig. 1 S_{comp} と S_{Cu} の吸収スペクトル

S_{comp} は，605 nm に錯体特有の d-d 遷移吸収ピークを示した。AsA 添加後の S_{Cu} は，d-d 遷移吸収ピークを示さなかった。溶液の写真，溶液調製直後の液温，溶液調製直後の pH を Table 1 に示す。

Table 1 溶液の写真，溶液調製直後の液温，溶液調製直後の pH

	写真	液温 (°C)	pH	d-d遷移吸収 CT遷移吸収端
S_{comp}		20.8	10.7	d-d: 605 nm
S_{Cu}		24.2	8.0	CT: 393 nm

3．2 形成した銅膜（T_{Cu}）の物性

形成した T_{Cu} を回収して，すりつぶした粉末の XRD パターンを Fig. 2 に示す。

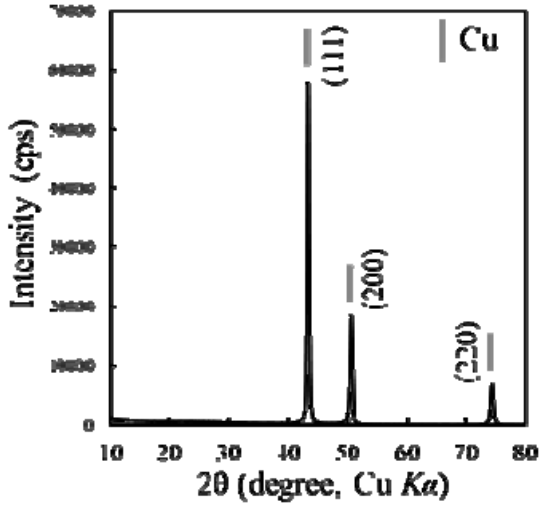


Fig. 2 T_{Cu} の XRD パターン

T_{Cu} の XRD パターンは，43.4，50.5，74.2°にピークを示し，立方晶系の銅（ICDD カート：00-004-0836）に帰属できた。

T_{Cu} の XPS を Fig. 3 に示す。

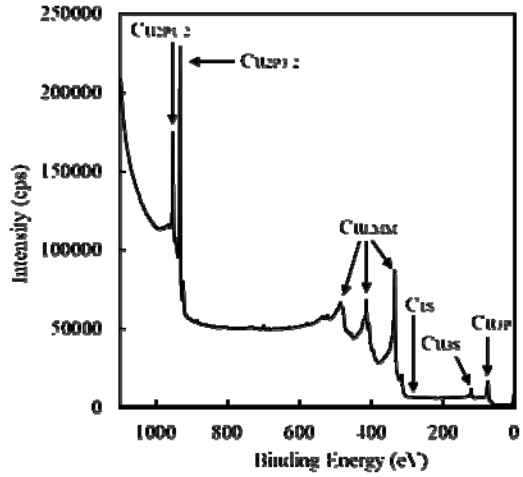


Fig. 3 T_{Cu} の XPS スペクトル

XPS は，わずかに炭素のピークを示す銅のピークを示した。

1 回目の成膜行程終了後の膜を 1 層目（L1），2 回目の成膜行程終了後の膜を 2 層目（L2）として SEM 像を観察した。また，図のピンクで示した部分は，その成膜行程で上になる部分であり，Top と定義した。同様に，緑で示した部分は，その成膜行程で下になる部分であり，Bottom と定義して観察した。粒径と膜厚は，3 サンプルずつ測定して得られた値の平均値をとった。なお，膜厚と粒子サイズの単位は断りがない限り，μ m とする。

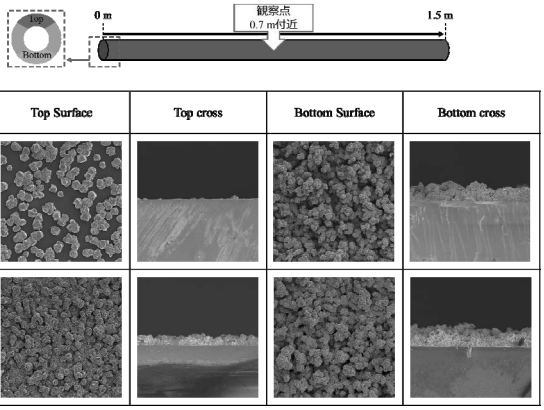


Fig. 4 T_{Cu} の FE-SEM 像

Table 2 T_{Cu} の粒径・膜厚一覧

	L1			L2		
	1次粒径	2次粒径	膜厚	1次粒径	2次粒径	膜厚
Top ave.	2.4±0.2	4.7±0.5	1.7±0.2	1.5±0.2	3.2±0.7	5.8±0.5
Bottom ave.	1.3±0.1	2.4±0.4	8.1±0.3	0.9±0.2	4.2±1.1	8.3±1.8

膜の表面状態は，緻密に 2 次粒子が集まっていた。また，Top と Bottom の膜厚は，それぞれ 5.8 ± 0.5 μm と 8.3 ± 1.8 μm であり，Bottom の方が 1.5 倍厚かった。

3．3 銅膜を原料とした銅錯体水溶液の合成

調製した①と②の溶液を T_{Cu} 付きガラス管に加えて，常温で 3 日間静置したところ，T_{Cu} は剥離して（Fig. 6），溶液はいずれも無色透明だった。

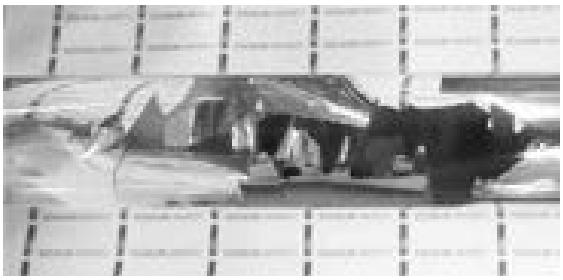


Fig. 5 静置中の膜と①の溶液の様子

その溶液を取り出して，空気に触れたところ，Fig. 6 に示すような青色に変化した。

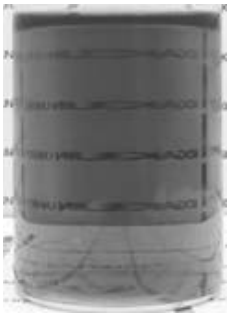


Fig. 6 ガラス管から取り出した後の①の溶液

この溶液の吸収スペクトルを Fig. 7 に示す。

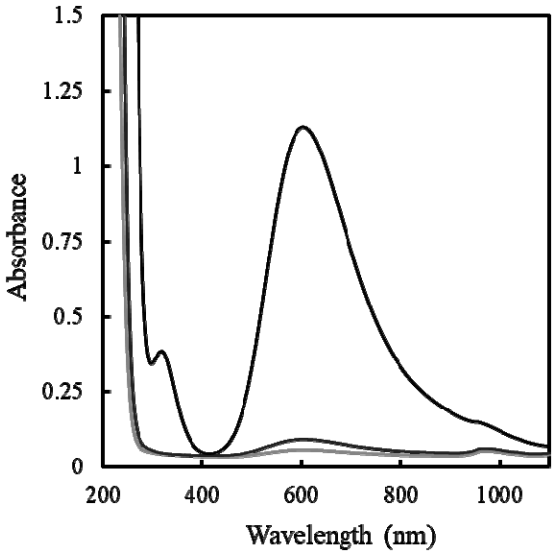


Fig. 7 得られた溶液（黒線；S_{comp}，緑線；①，青線；②）の吸収スペクトル

①と②の溶液は，ギ酸アンモニウム水溶液への酸素通気の有無に関係なく想定した濃度まで溶解しなかった。FAAS を用いて測定した溶液中の銅イオン濃度は，いずれも 0.02 mmol g^{-1} だった。

一方で，③から得た溶液の銅イオン濃度を FAAS で調べたところ，その濃度は，0.5 mmol/g mmol g^{-1} だった。この溶液を精製水と 2528%アンモニア水で希釈して，0.2 mmol g^{-1} に調整したところ，いずれの溶液も S_{comp} の吸収スペクトルと同じ 605 nm に d-d 遷移吸収ピークを示した。TS_{comp-X} と S_{comp} の吸収スペクトルを Fig. 8 に示す。

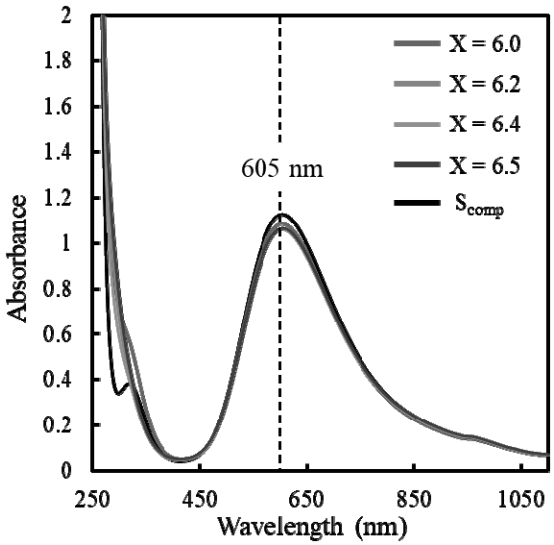


Fig. 8 TS_{comp-X} と S_{comp} の吸収スペクトル

さらに，TS_{comp-X} と S_{comp} の pH は，標準偏差の範囲内で一致した。これらの溶液に AsA 粉末を添加した銅プレカーサー水溶液の吸収スペクトルを Fig. 9 に示す。

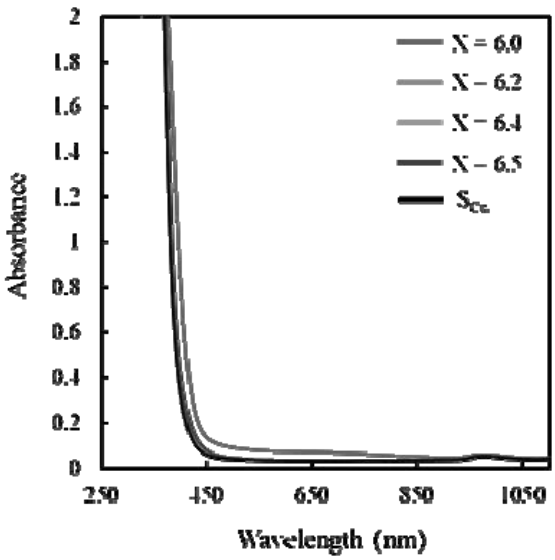


Fig. 9 TS_{Cu-X} と S_{Cu} の吸収スペクトル

TS_{Cu-X} の吸収スペクトルは，X≧6.2 以上において，S_{Cu} の吸収スペクトルと一致した。また，TS_{Cu-X} の pH を Table 3 にまとめた。

Table 3　S_{Cu} と TS_{Cu-X} の pH

NH_3/Cu X	pH
6.0	7.0(1)
6.2	7.6(1)
6.4	7.8(1)
6.5	8.3(1)
Reference: S_{Cu}	7.9(1)

TS_{comp-X} の pH は，標準偏差の範囲内でいずれも一致したのに対して，TS_{Cu-X} の pH は，X の増加で高くなり，X = 6.5 の時は，S_{Cu} より高い 8.3 を示した。

３．４　銅膜を原料とした銅電極膜の形成

合成した TS_{Cu-X} から 2.3 項と同様の手順で溶液をガラス管に加えて 19±2°C で静置して得られた T_{Cu} と TT_{Cu-X} の XRD パターンを Fig. 10 に示す。

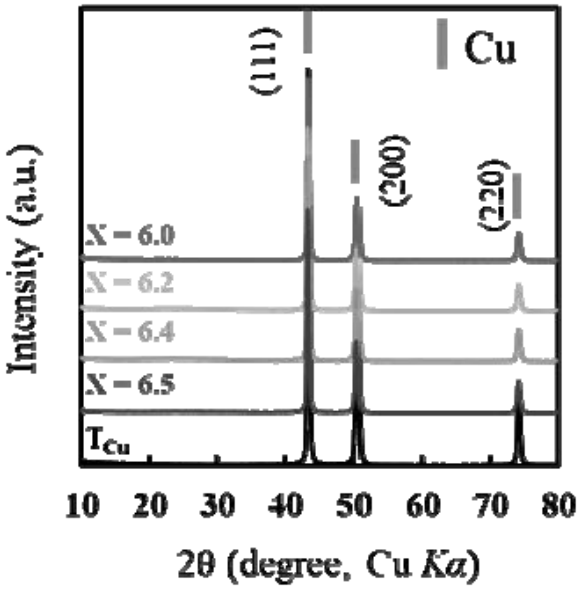


Fig. 10 T_{Cu} と TT_{Cu-X} の XRD パターン

いずれの膜も銅単一相に帰属された。得られた銅膜の析出量と 1.5 m あたりの抵抗値を Table 4 にまとめた。

Table 4 銅膜の析出量と抵抗値

NH_3/Cu X	銅析出量（g）	抵抗値（Ω/1.5 m）
6.0	2.4	117
6.2	3.8	21
6.4	3.0	162
6.5	2.4	45
(T_{Cu}) 6.0	4.2(4)	7(1)

銅膜析出量は，X = 6.2 のとき，最大で 3.8 g であり，抵抗値は 21 Ω と最も低抵抗だった。さらに，$TS_{Cu-6.2}$ をガラス管内に入れて，25±1°C で静置して得られた銅は 4.7 g 析出して，膜の抵抗値は，12 Ω/1.5 m まで低下した。

４．　考察

本研究では，試薬から調製した銅プレカーサー水溶液（S_{Cu}）と銅膜から合成した銅プレカーサー水溶液（TS_{Cu}）の性質と，これらの溶液から得た膜（T_{Cu}, TT_{Cu}）の物性を比較した。

４．１　銅からのプレカーサー溶液の合成

T_{Cu} 内にギ酸アンモニウム水溶液を入れて 3 日間静置すると，銅はわずかに溶解した。ギ酸アンモニウム水溶液の無色透明溶液から青色透明への変色は，わずかに溶解した銅によるものと考えられる。$[Cu(NH_3)_4]^+$は，銅(I)イオンが d 軌道を完全に満たしている d10 金属錯体であり，d-d 遷移可能な電子が存在しない。したがって，無色透明の溶液中では，$[Cu(NH_3)_4]^+$のような 1 価の銅イオンの錯体が形成されていると考える。その溶液が酸素に触れることで銅が酸化され，不安定な$[Cu(NH_3)_4]^+$は，$[Cu(NH_3)_4]^{2+}$のような錯体に変化して，青色の溶液が形成されたと考える。また，②の溶液の方が①よりわずかに吸光度が高い。これは，溶液中で形成された 2 価の銅アンミン錯体が，下記の（1）の反応式のように 0 価の銅と反応して，1 価の銅アンミン錯体を溶液中で形成していたと考えられる[16]。

$$Cu(NH_3)_4^{2+} + Cu \rightleftharpoons 2Cu(NH_3)_2^{+} \qquad (1)$$

Halpern らも金属銅のアンモニア水溶液への溶解プロセスは，酸素を必要とする（2）式のように銅アンミン錯体を形成すると報告している。[17]。

$$Cu + 4NH_3 + 1/2O_2 + H_2O \rightarrow [Cu(NH_3)_4]^{2+} + 2OH^- \qquad (2)$$

したがって，③溶液においては，（３）式で反応したと考えられる。

$$Cu + 2HCOONH_4 + 4NH_3 + 1/2O_2 \rightarrow [Cu(NH_3)_6]^{2+} + 2HCOO^- + H_2O \qquad (3)$$

したがって，0 価の銅を溶解させるためには，（2）式に必要な酸素を供給しなければならない。T_{Cu} 内は，閉鎖系であるため，溶存酸素のみで（2）の反応がおき，その後，（1）の反応が起きている。したがって，T_{Cu} 内でギ酸アンモニウム水溶液を 3 日間静置しても銅が溶け切らなかった要因は，反応時間ではなく反応に必要な酸素

によるものと考えられる。

４．２　銅膜の形成

形成した銅膜（TT_{Cu}）の XRD パターンは，帰属不能な２本の微弱ピークを含む銅膜だった。断面 FE-SEM 像より算出した膜厚は，T_{Cu} の膜厚分布と上下面で逆転した。また，TT_{Cu} の抵抗値は，最小で 21 Ω/1.5 m だった。しかし，XPS より，銅以外の金属元素に由来するピークを示さなかった。このことから，溶液調製方法で膜の形成メカニズムや物性が異なると示唆された。銅を溶解して調製した溶液の吸収スペクトルは，S_{comp} と d-d 遷移吸収ピークが一致した。したがって，酸素を通気することで，（２）の反応が進行して，S_{comp} と同一の錯体を含む溶液が得られた。S_{comp} では，アンモニア濃度によって pH の変化が見られなかった一方で，アスコルビン酸添加後の TS_{Cu-X} は，アンモニアの比率で pH が異なった。S_{comp} は，緩衝溶液となっていると考えられる。また，アンモニアの比率で銅膜の析出量と抵抗値が異なった。本稿で詳細の記載は省略するが，超音波を照射した $TS_{Cu-6.2}$ から形成した TT_{Cu} の抵抗値は，12 Ω/1.5 m まで低下して，T_{Cu} の 7 Ω/1.5 m と同程度の抵抗値を示した。そのことから，銅の溶解に必要な酸素が溶存酸素として銅の還元を阻害したと考えられる。

５．　結論

ギ酸アンモニウム水溶液に酸素をバブリングして，銅膜を 100%溶解させた水溶液を得た。その溶液を銅イオン濃度 0.2 mmol/g に希釈すると，S_{comp} と同じ UV-Vis スペクトルと pH を示し，同一錯体を含む溶液を調製できた。その溶液を用いて，アスコルビン酸を添加したところ，銅膜を形成した。以上のことから，銅を出発原料とするプレカーサー溶液を調製して，銅膜を形成した。

謝辞

本研究は，工学院大学電気電子工学科熊谷杏子氏が修士論文として実施した内容です。また，工学院大学名誉教授佐藤光史先生にもご助言いただきました。感謝申し上げます。

参 考 文 献

1. van Doremalen, N.; Bushmaker, T.; Morris, D.H.; Holbrook, M.G.; Gamble, A.; Williamson, B.N.; Tamin, A.; Harcourt, J.L.; Thornburg, N.J.; Gerber, S.I.; et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1564–1567, doi:10.1056/NEJMc2004973.
2. Noyce, J.O.; Michels, H.; Keevil, C.W. Inactivation of Influenza A Virus on Copper versus Stainless Steel Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2748–2750, doi:10.1128/AEM.01139-06.
3. Warnes, S.L.; Little, Z.R.; Keevil, C.W. Human Coronavirus 229E Remains Infectious on Common Touch Surface Materials. *MBio* **2015**, *6*, 1–10, doi:10.1128/mBio.01697-15.
4. Sunada, K.; Minoshima, M.; Hashimoto, K. Highly Efficient Antiviral and Antibacterial Activities of Solid-State Cuprous Compounds. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *235–236*, 265–270, doi:10.1016/j.jhazmat.2012.07.052.
5. Pal, A.K.; Sen, P.; Barua, A.K. Electrical Properties of Vacuum-Evaporated Copper Films. *Thin Solid Films* **1975**, *25*, S25–S28, doi:10.1016/0040-6090(75)90269-2.
6. Lee, S.; Kim, J.Y.; Lee, T.W.; Kim, W.K.; Kim, B.S.; Park, J.H.; Bae, J.S.; Cho, Y.C.; Kim, J.; Oh, M.W.; et al. Fabrication of High-Quality Single-Crystal Cu Thin Films Using Radio-Frequency Sputtering. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–6, doi:10.1038/srep06230.
7. Klöppel, A.; Kriegseis, W.; Meyer, B.K.; Scharmann, A.; Daube, C.; Stollenwerk, J.; Trube, J. Dependence of the Electrical and Optical Behaviour of ITO-Silver-ITO Multilayers on the Silver Properties. *Thin Solid Films* **2000**, *365*, 139–146, doi:10.1016/S0040-6090(99)00949-9.
8. Prud'homme, N.; Constantoudis, V.; Turgambaeva, A.E.; Krisyuk, V. V.; Samélor, D.; Senocq, F.; Vahlas, C. Chemical Vapor Deposition of Cu Films from Copper(I) Cyclopentadienyl Triethylphophine: Precursor Characteristics and Interplay between Growth Parameters and Films Morphology. *Thin Solid Films* **2020**, *701*, doi:10.1016/j.tsf.2020.137967.
9. Sharma, A.; Cheon, C.-S.; Jung, J.P. Recent Progress in Electroless Plating of Copper. *J. Microelectron. Packag. Soc.* **2016**, *23*, 1–6, doi:10.6117/kmeps.2016.23.4.001.
10. Nagai, H.; Suzuki, T.; Nakano, T.; Sato, M. Embedding of Copper into Submicrometer Trenches in a Silicon Substrate Using the Molecular Precursor Solutions with Copper Nano-Powder. *Mater. Lett.* **2016**, *182*, 206–209, doi:10.1016/j.matlet.2016.06.123.
11. Nagai, H.; Mita, S.; Takano, I.; Honda, T.; Sato, M. Conductive and Semi-Transparent Cu Thin Film Fabricated Using Molecular Precursor Solutions. *Mater. Lett.* **2015**, *141*, 235–237, doi:10.1016/j.matlet.2014.11.056.
12. Wu, S. Preparation of Ultra-Fine Copper Powder and Its Lead-Free Conductive Thick Film. *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 3526–3530, doi:10.1016/j.matlet.2006.11.128.
13. Wu, S. Preparation of Fine Copper Powder Using Ascorbic Acid as Reducing Agent and Its Application in MLCC. *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 1125–1129, doi:10.1016/j.matlet.2006.06.068.
14. Sinha, A.; Sharma, B.P. Preparation of Copper Powder by Glycerol Process. *Mater. Res. Bull.* **2002**, *37*, 407–416, doi:10.1016/S0025-5408(01)00819-4.
15. Wu, H.J.; Nagai, H.; Douura, T.; Ishii, M.; Kawakami, H.; Nakayama, E.E.; Shioda, T.; Sato, M. Coppers Film Fabrication on Glass Substrate by Complex Reduction Method for Rapid Inactivation of SARS-CoV-2 (COVID-19). *Funct. Mater. Lett.* **2022**, *15*, 1–8, doi:10.1142/S1793604722510316.
16. Habashi F. Kinetics and Mechanism of Copper Dissolution in Aqueous Ammonia. *Ber. Bunsen. Ges. Phys. Chem.* **1963**, 67, 402–406, doi:10.1002/bbpc.19630670412.
17 Halpern, J.; Milants, H.; Wiles, D. R. Kinetics of the Dissolution of Copper in Oxygen‐Containing Solutions of Various Chelating Agents. *J. Electrochem. Soc.* **1959**, 106, 647, doi:10.1149/1.2427464.

μm オーダー 1 粒子の電極反応を直接観測する電気化学/ 分光オペランド測定システムの開発

(単一粒子電気化学測定を用いた添加剤による電極/電解液界面の評価)

工学院大学　環境化学科　関 志朗

工学院大学　教育推進機構　高見 知秀

Direct Evaluation of Electrode / Electrolyte Interface with Additives by Single-particle Electrochemical Measurement

Shiro Seki, Department of Environmental Chemistry and Chemical Engineering, Kogakuin University
Tomohide Takami, Division of Liberal Arts, Kogakuin University

ABSTRACT : To improve lithium-ion battery (LIB) performance, chemical additives are added to the electrolyte to form a stable interphase film at the electrode/electrolyte interface, preventing capacity loss and overcharging. However, conventional composite electrodes hinder direct observation of interfacial film formation on active materials. In this study, single-particle electrochemical measurement (SPEM) was used with a $LiCoO_2$ single particle (LCO-SP) to directly observe resistance changes during in-situ additive introduction. Using 1.0 mol kg^{-1} EC-$LiN(SO_2F)_2$ with 1.0 wt.% $LiPO_2F_2$ as the additive, AC impedance spectra showed that, compared to the additive-free system, the additive caused changes in the semicircular arc's time constant and introduced a new low-frequency resistance component. This was attributed to interphase layer growth at the LCO SP/electrolyte interface. Thus, SPEM enables precise, real-time evaluation of interfacial resistance evolution at the single-particle level.

1．　概要

近年、リチウムイオン二次電池（LIB）は、スマートフォン、タブレット、ノートパソコンなどの小型電子機器から、電気自動車や再生可能エネルギーの蓄電システムに至るまで、幅広い分野で利用が拡大している[1,2]。このような背景のもと、LIB に求められる電気容量、動作電圧、入出力特性のさらなる向上に対応すべく、正極・負極活物質および電解液材料の高性能化に関する研究が精力的に進められている[3,4]。

現在広く使用されている正極活物質としては、$LiCoO_2$[5]、$LiNi_xCo_yMn_zO_2$($x+y+z=1$)[6]、$LiFePO_4$ および $LiMn_2O_4$[7] などが挙げられるが、さらなるエネルギー密度の向上を図るためには、$LiMnPO_4$ や $LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O_4$ のような高電圧作動型材料の導入が有効であると期待されている[8-10]。

しかしながら、高電圧での動作は、電解液の分解や副反応を誘発し、電極／電解液界面に不安定なパッシベーション膜（たとえば、正極電解液界面（CEI）や固体電解質界面（SEI））が形成されることで、LIB システム全体の寿命、容量、安全性が著しく低下する要因となる[11,12]。したがって、電解液の過剰分解を抑制しつつ、高品質なパッシベーション膜を形成することで、電極／電解液界面の反応を制御することが極めて重要である。

この課題に対する有効な対策の一つとして、電解液中への添加剤の導入が挙げられる[12,13]。ごく微量（5.0 wt.% 以下）の添加であっても、添加剤が電解質塩や有機溶媒よりも優先的に分解されることで、過剰な電解液分解を防ぎつつ、安定なパッシベーション膜が形成され、電極表面を過充電から保護する効果が得られる[14]。

これまでに、ビニレンカーボネート（VC）[15]、1,5,2,4-ジオキサジチアン-2,2,4,4-テトラオキシド（MMDS）16、ならびにジフルオロリン酸リチウム（$LiPO_2F_2$）[13,14,17-22] など、さまざまな電解液添加剤の有効性が検討されてきた。中でも $LiPO_2F_2$ は、電極/電解液界面に安定な保護膜

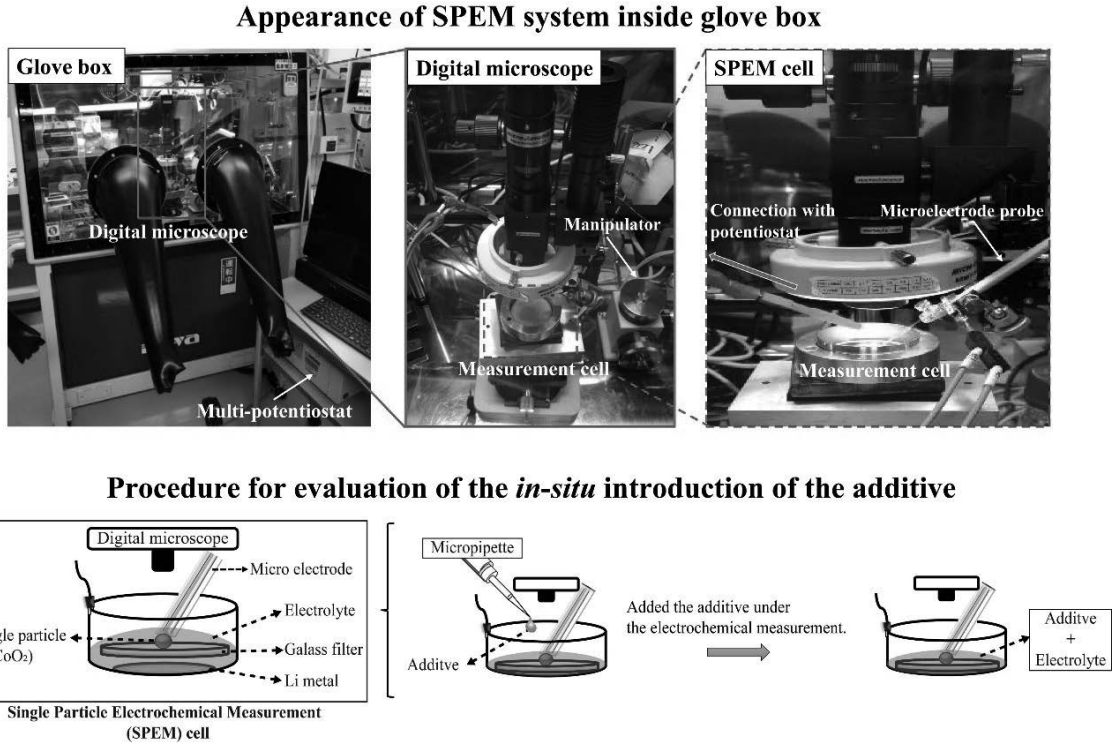


Fig. 1 Appearance of SPEM system inside glove box and schematic image of the SPEM analysis for evaluation of the *in-situ* introduction of the additive.

を形成し、正極金属の溶出を抑制することで、優れたサイクル容量保持率の向上や抵抗増加の抑制、高電圧でのセル動作の安定化に寄与することが、多くの研究により示されている[14-22]。

しかしながら、従来の LIB システムにおいては、電極活物質と直接反応する電解液との界面反応を、導電助剤やバインダーを含む複合電極系の中で厳密に評価することは容易ではない。複合電極構造では、添加剤の分解反応や界面膜形成の本質的なプロセスが阻害される可能性があるだけでなく、添加剤の役割を活物質との相互作用に限定して定量的に捉えることが困難である。ゆえに、分子構造や濃度の最適化といった電解液設計に資するためには、活物質に対する添加剤の直接的な効果を明確にする手法の確立が強く求められている。

このような背景のもと、我々は活物質単体の電気化学的特性を孤立状態で評価可能な手法として、単一粒子電気化学測定（single-particle electrochemical measurement: SPEM）に着目した[23-25]。SPEM 法を用いることで、導電助剤やバインダーの影響を排除した上で、単一の活物質粒子に由来する電気容量および抵抗成分を直接的に把握することが可能である。実際に我々は、正極活物質である $LiCoO_2$ 単一粒子（LCO-SP）において、交流インピーダンス測定を通じた電気化学特性および抵抗挙動の変化を報告してきた[23,24]。

さらに本研究に用いた SPEM システムでは、開放型セル構造を採用することで、測定中に電解液添加剤を *in-situ* で反応場に導入することができ（図 1）、充放電過程における電極／電解液界面の電気化学反応の変化をリアルタイムで観測することが可能である。

本研究ではまず、$LiPO_2F_2$ を含まない標準的な電解液を用い、さまざまな充電状態における LCO-SP の交流インピーダンス測定を行い、単一粒子の電気化学的性質を詳細に解析した。次いで、$LiPO_2F_2$ を添加した電解液系においても同様の測定を行い、添加剤の有無による界面反応の違いを明らかにした。さらに、充電中に $LiPO_2F_2$ 添加液をその場導入する *in-situ* 測定を実施し、LCO-SP/電解液界面における電気化学反応のダイナミクスを包括的に評価した。

２．　実験

２．１　微小電極および測定セルの作製

測定に用いる微小電極プローブは、ガラスキャピラリー（G-100L、内径：0.75 μm、ナリシゲ）を加熱し、プラー（PC-10、ナリシゲ）を用いて引き伸ばすことで、針状の形状に加工した。次に、細径の白金線（直径 30 μm、ニラコ）と太径の銅線（直径 0.1 mm、同）をスポット溶接装置（KTH-MWS、近藤テック）を用いて接合し、ハイブリッド導線を作製した。この導線を白金側から針状のガラスキャピラリー内に挿入し、マイクロフォージ（MF-900、ナリシゲ）を用いて白金線先端とガラスキャピラリー先端を融着した。

作製した微小電極の先端は、活物質粒子との十分な電気的接触を確保するため、回転研磨機（EG-402、ナリシゲ）により 50° の角度で研磨を施した。さらに、ガラスで覆われた白金先端の露出面は光学顕微鏡で観察し、形状と接触性を確認した。

SPEM（単一粒子電気化学測定）システムは、アルゴン雰囲気のグローブボックス（DBO-1B、美和製作所、酸素濃度 < 10 ppm、露点温度 < 193 K）内に構築した。電気化学測定には、nA 電流測定機能付きのマルチポテンショ・ガルバノスタット（HZ-7000、明電北斗）を用いた。負極（対電極兼参照電極）には、リチウム金属箔（直径 10 mm、本庄金属）を SUS304 製のカップに装着した。正極（作用電極）には、リチウム金属箔の上に 1.0 mol kg^{-1} のエチレンカーボネート（EC）＋$LiN(SO_2F)_2$（LiFSA、日本触媒）を浸み込ませたガラスフィルター（直径 21 mm、GC-50、アドバンテック）を配置し、その上に $LiCoO_2$（LCO）粒子を分散させた。次に、粒径 20～30 μm の LCO 粒子をデジタルマイクロスコープ下で観察しながらマイクロマニピュレーターを用いて微小電極と接触させた。測定開始前には、LCO 単一粒子と微小電極間の十分な接触を確認するため、開回路電位の測定を実施した。。

２．２　$LiCoO_2$ 単一粒子に対する精密電気化学評価

LCO 単一粒子の精密な電気化学特性を明らかにするため、添加剤を含む系と含まない系の 2 種類の電解液を用いて、SPEM を実施した（添加剤：ジフルオロリン酸リチウム（$LiPO_2F_2$）、三菱ケミカル）。充電状態（SOC）に応じた抵抗成分の変化を評価する目的で、粒径 24～27 μm の LCO 粒子を 5 nA の定電流で 4.0～4.2 V（vs. Li/Li^+）まで充電し、定電圧保持中に 30 分ごとに交流インピーダンス測定を行った。測定条件は、周波数範囲 20 kHz～10 mHz、印加電圧 50 mV とした。本研究では、定電流充電および交流インピーダンス測定の全てにおいて、この条件を適用した。

さらに、電極電位と対応する抵抗成分との関係を明らかにするため、粒径 27 μm の LCO 単一粒子を用い、3.90、3.92、3.95、3.97、4.0、4.1、および 4.2 V（vs. Li/Li^+）まで段階的に充電した。それぞれの定電圧保持中に、30 分ごとに交流インピーダンス測定を行い、303 K にて電極挙動を詳細に解析した。

２．３　$LiCoO_2$ 単一粒子への $LiPO_2F_2$ 添加剤の *in-situ* 導入に伴う電気化学的評価

活物質/電解液界面における抵抗成分の直接的変化に対する添加剤の影響を評価するため、3.0 wt.% $LiPO_2F_2$ を含む 1.0 mol kg^{-1} EC+LiFSA 電解液（添加剤有）を、$LiPO_2F_2$ を含まない同電解液（添加剤無）中に *in-situ* で導入した。この際、セル内の $LiPO_2F_2$ 濃度（C_{cell}）は、LiFSA 濃度を一定に保ったまま算出した。具体的には、添加剤無電解液（1.0 mol kg^{-1} LiFSA/EC）および添加剤有電解液（3.0 wt.% $LiPO_2F_2$）それぞれの密度を、スタビンガー型粘度・密度測定装置（SVM3000/G2、アントンパール製）を用いて測定し、以下の式 1 により C_{cell} を求めた。

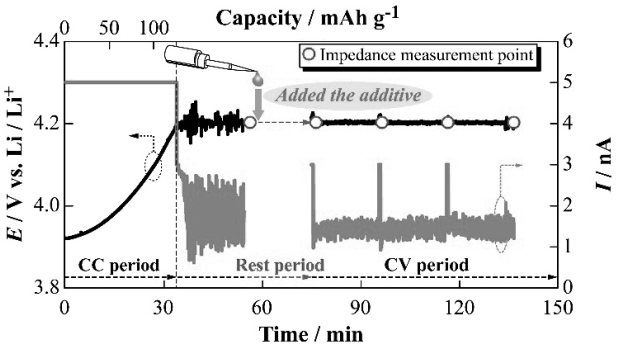


Fig. 2　The measurement flowchart of SPEM with the in-situ introduction of the additive.

$$C_{cell} = \frac{\rho_{pre} \times V_{pre} \times C_{pre}}{\rho_{pre} \times V_{pre} + \rho_{abs} \times V_{abs}}, \quad (1)$$

ここで、ρ_{pre}、V_{pre}、C_{pre} は添加剤有電解液の密度（1.430 g cm^{-3}）、体積（40 μL）、濃度（3.0 wt.%）を示す。一方、ρ_{abs}、V_{abs} は添加剤無電解液の密度（1.416 g cm^{-3}）および体積（150 μL）である。添加剤導入に伴う活物質/電解液界面の抵抗変化を直接的に評価するため、図 2 に示すように一定間隔で交流インピーダンス測定を行った。まず、粒径 22 μm の LCO 単一粒子を 4.2 V（vs. Li/Li^+）まで充電し、電位保持中に 20 分後の時点で最初の交流インピーダンス測定を行った。その後、20 分間の静置期間を設けた後、添加剤を含む電解液を導入し、定電圧状態を維持しながら 20 分間隔でインピーダンス測定を継続した。

３．　結果と考察

３．１　$LiCoO_2$ 単粒子に対する電気化学測定

本研究では、特定の直径と形状を有する最適化された $LiCoO_2$（LCO）粒子を用いて、様々な電気化学測定を実施した。LCO 単粒子（SP）の充電状態における抵抗成分を評価するために、4.0～4.2 V vs. Li/Li^+へ充電後、303 K において定電位を印加しつつ、30 分間隔で交流インピーダンス測定を行った。Fig. 3(a)は、4.0 V vs. Li/Li^+の印加電位下における SPEM セルのインピーダンススペクトルの時間依存性を示している。全てのスペクトルにおいて、125 Hz 付近の頂点周波数で半円弧が確認され、これは LCO 粒子内部への Li^+輸送抵抗（R_{LCO}-SP）および電解質と LCO 粒子との界面における電荷移動抵抗（R_{ct}）の両者に起因し、同程度の時間定数を持つと考えられる[23-25]。本測定系において、負極（Li 金属）の見かけの表面積（0.79 cm^2）は LCO-SP に比べて非常に大きいため、Li 負極由来の抵抗成分は無視できるほど小さく、図 3 に示される半円弧は LCO-SP に起因するものと判断される。印加電位を維持した条件下では、半円の直径や頂点周波数に明確な変化は見られず、LCO-SP の電気化学的性質は時間経過に対して安定であることが確認された。一方、図

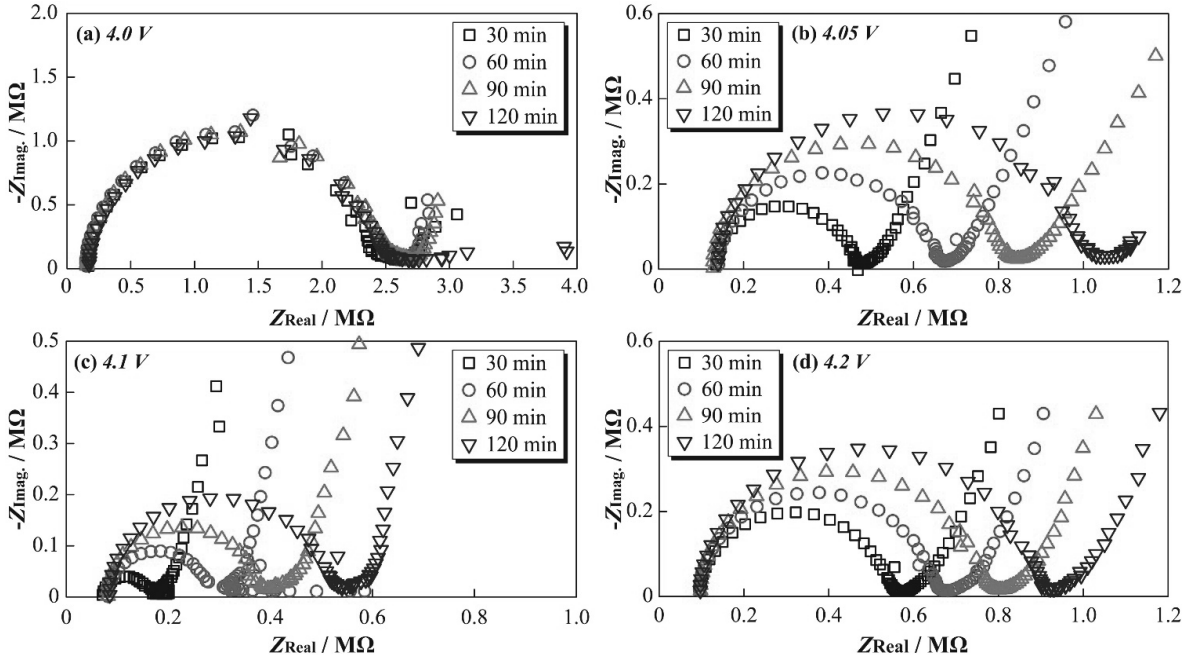


Fig. 3 Time dependence of impedance spectra for potential maintenance: (a) 4.0 V vs. Li/Li^+, LCO-SP diameter of 27 μm; (b) 4.05 V vs. Li/Li^+ LCO-SP diameter of 24 μm; (c) 4.1 V vs. Li/Li^+, LCO-SP diameter of 25 μm; and (d) 4.2 V vs. Li/Li^+, LCO-SP diameter of 26 μm.

3(b–d)では、他の LCO 粒子を用いて、4.05～4.20 V vs. Li/Li^+の異なる電極電位条件下で取得されたインピーダンススペクトルが示されている。4.0 V 以上の電位を印加した場合には、半円状弧のサイズが時間とともに明確に増加することが観察された。この抵抗増加は、電解液の酸化分解や LCO 粒子内への Li の緩和（不十分な充電による）によって、粒子表面における界面層が成長したことに起因するものと考えられる。これらの傾向から、4.0 V 以下の電位においては LCO-SP の界面が安定に形成される一方、4.0 V を超えると副反応や粒子の均一性に対する懸念が生じることが示唆される。次に、様々な充電状態における LCO-SP の抵抗変化を調べるため、3.90～4.20 V vs. Li/Li^+の電位に充電・保持しながらインピーダンス測定を実施した（図 4）。同一 LCO 粒子（直径：27 μm）を使用して得られたスペクトルからは、電極電位に応じて半円状弧の直径や頂点周波数が変化し、Li_xCoO_2 の構造変化に伴う反応性の変化が反映されていることがわかる。これらのインピーダンススペクトルを定量的に評価するため、以下に示す等価回路モデル（式 2）を用いたフィッティング解析を行い、各抵抗成分の分離と帰属を試みた。

$$R_{S1} + Q_{S2}/R_{S2} + Q_{S3}/R_{S3} + Q_{S4}/R_{S4} + Q_{S5} \qquad (2)$$

R_{S1} は電極電位に依存せず一定であり、電解液のバルク抵抗と同定された[26]。R_{S2} は 3.95～4.00 V で局所的最小値を示し、これは塗布電極型の系における R_{ct} の挙動と一致しており、溶媒和・脱溶媒和過程に由来する界面の電荷移動抵抗と解釈された。R_{S3} は電極電位の上昇に伴い一旦急激に減少し、その後緩やかに増加する挙動を示した。これは、LCO の内部伝導性（Li^+および電子の伝導）や粒子表面形態、凝集状態に由来するものと考えられる。R_{S4} は電位変化の影響を受けず、電解液に由来する界面層に関係する抵抗とされた。以上のように、SPEM を用いることで、単粒子レベルにおける抵抗成分の電極電位依存性を高精度に定義・定量評価することが可能となる。すなわち、SPEM は各反応過程に起因する抵抗変化とその大きさを精密に解析するための有効な手法である。

3．2　$LiPO_2F_2$ 添加剤を含む $LiCoO_2$ 単粒子に対する電気化学測定

次に、添加剤を含む電解液中における LCO SP の抵抗変化を調べるため、前述と同様の電位条件（3.90～4.20 V vs. Li/Li^+）において SPEM セルのインピーダンス測定を実施した（図 5）。ここでは、1.0 mol kg-1 EC + LiFSA 電解液（1.0 wt.% $LiPO_2F_2$ 含有）を用い、同一 LCO 粒子（直径：27 μm）に対して測定を行った。全てのスペクトルで半円弧が観察され、その直径および頂点周波数は電極電位に応じて変化し、添加剤非含有系と類似した挙動を示した。

また、半円弧に非対称性がわずかに見られ、R_{ct} および $R_{LCO\text{-}SP}$ を含む複数の抵抗成分が存在することが示唆された。ただし、時間定数が近いためフィッティング解析において抵抗成分の明確な分離は困難であった。図 4 との比較において、半円弧の直径は大きく、頂点周波数は低下していた。このことから、添加剤の存在が抵抗および時間定数に影響を与えていると考えられる。

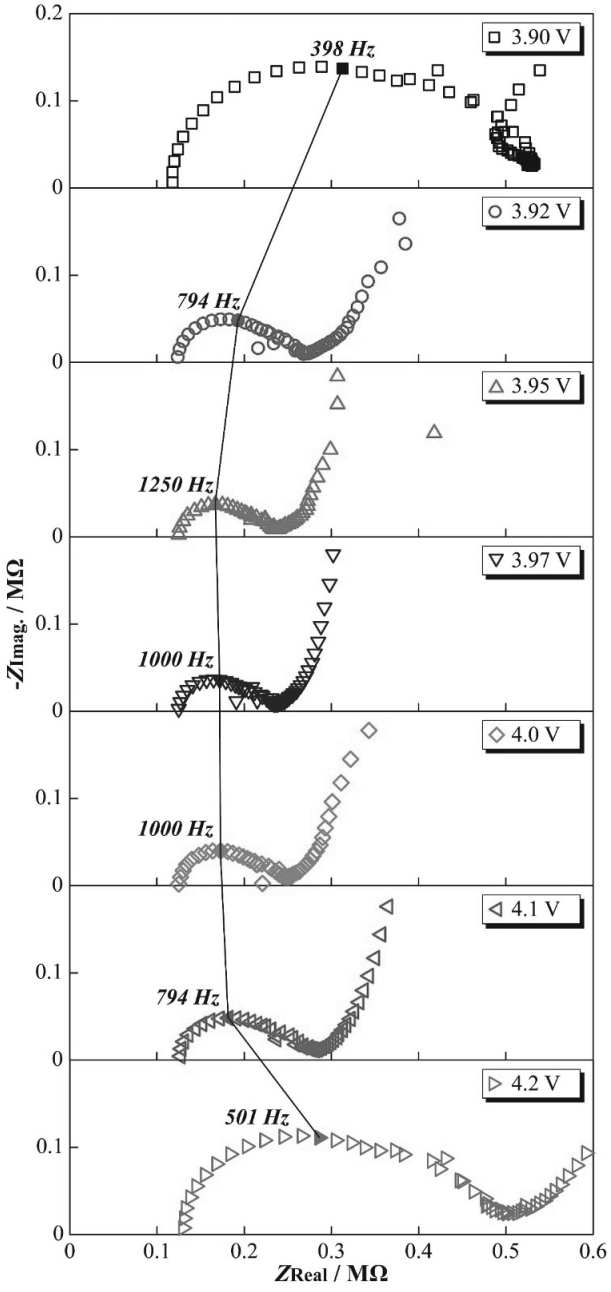


Fig. 4 Potential dependence of impedance spectra using an LCO SP with a diameter of 27 μm.

インピーダンススペクトルから得られた抵抗成分は R_{S2}（R_{ct}）および R_{S3}（$R_{LCO\text{-}SP}$）であり、LCO のバルク特性に起因する R_{S3} は添加剤の影響を受けにくいことから、R_{S2} の変化が主因と考えられる。R_{S4} は明確に観測されず、中低周波数領域にわずかなノイズが見られた。これは、$LiPO_2F_2$ の分解反応や LCO 表面との特異的反応による界面層の形成に起因する可能性がある。

一般的に、塗布電極を用いた系では、充放電に伴って形成される界面成分の評価は、正極（LCO）と負極（Li）双方の影響を受ける。一方、SPEM では負極の反応面積が LCO-SP より大きいため、測定される抵抗成分は主に LCO-SP 由来である。この点から、SPEM は LCO 粒子と添加剤の本質的な反応特性の理解を深める上で有効であると考えられる。以上の結果より、$LiPO_2F_2$（1.0 wt.%）の添加により、LCO SP における電荷移動反応の変化および不安定な界面形成が確認された。

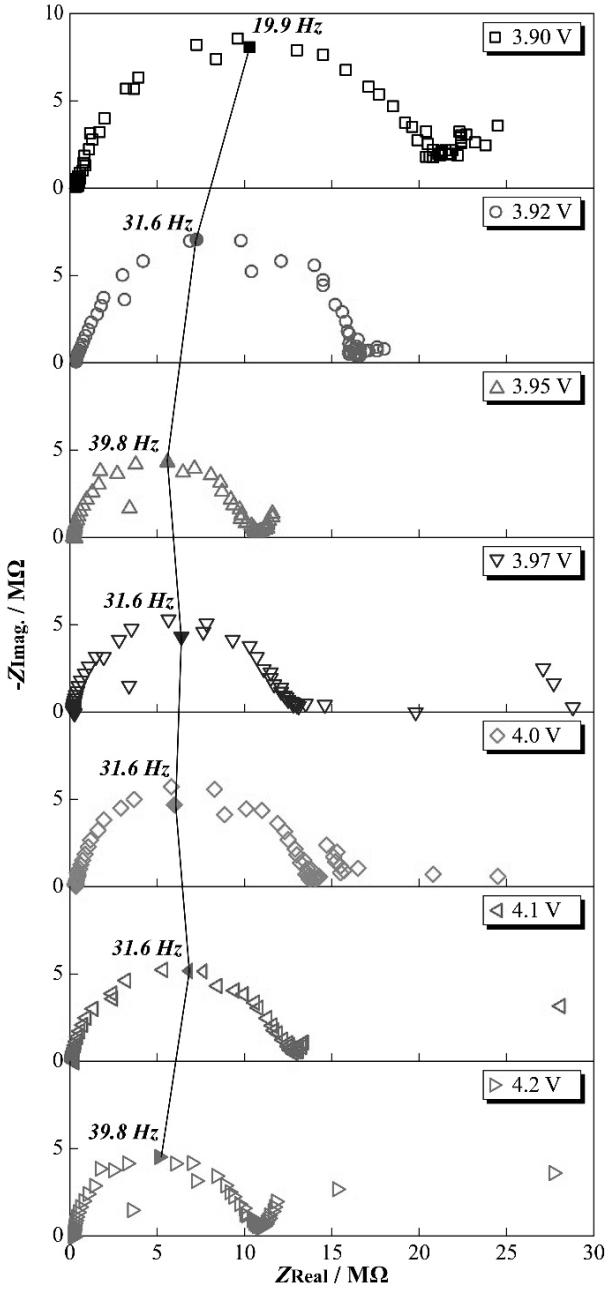


Fig. 5 Potential dependence of impedance spectra containing 1.0 wt.% $LiPO_2F_2$ additive (LCO-SP diameter: 27 μm).

さらに、添加剤をその場導入した際の抵抗変化を調べるため、図2に示すフローチャートに従い、4.2 V vs. Li/Li^+ への充電後、20 分間隔でインピーダンス測定を行った（図6）。このときの LiPO2F2 の C_{cell} は 0.64 wt.%であり、測定スペクトルには顕著なノイズが確認された。半円弧の直径は増加し、頂点周波数は減少した。これらの挙動は、図 5 に示す初期添加時と類似しており、LCO-SP と電解液の界面における一貫した反応機構を示唆している。

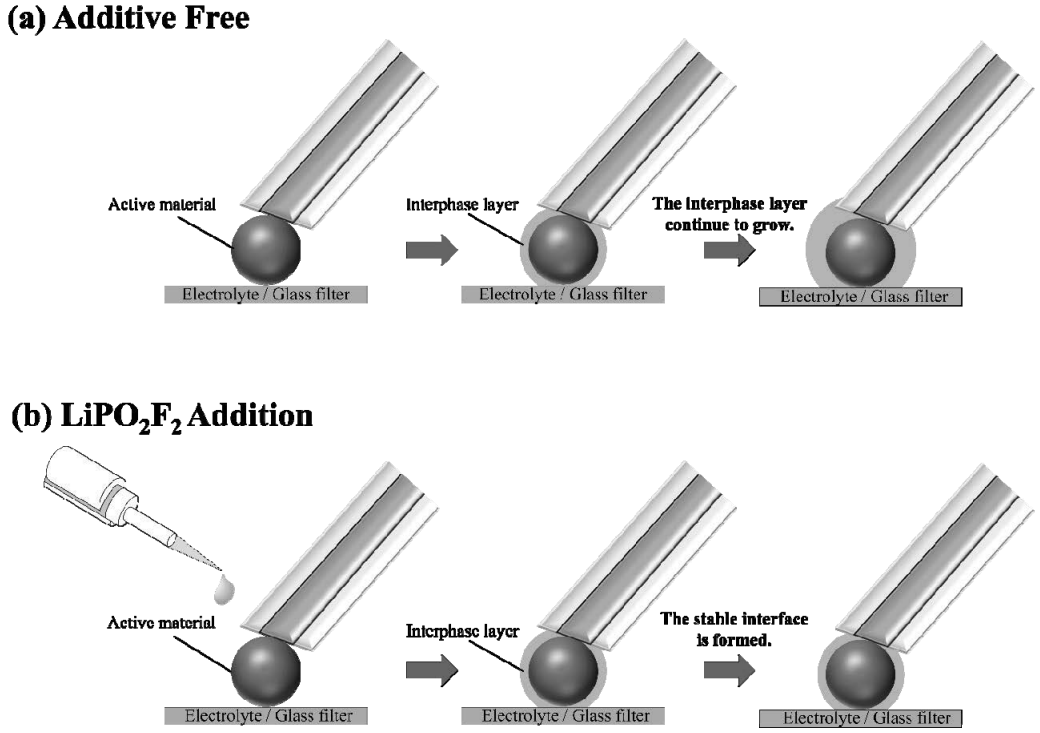


Fig. 7 A schematic illustration of the assumed interfacial formation mechanism on the LCO-SP surface: (a) without additive and (b) with additive.

特に、電圧保持 20 分後には、高周波（19.9 Hz）と低周波（251 Hz）における 2 つの明確な半円弧が分離して確認された。高周波側の半円弧は図 5 と類似の時定数を示し、R_{ct} に起因するものと考えられる。一方、低周波の半円弧の出現は、$LiPO_2F_2$ の酸化分解等によって形成された界面層に起因すると考えられる [35]。さらに、4.2 V における $LiPO_2F_2$ 添加時のインピーダンススペクトルは時間経過に対して非常に安定であり、図 3 に示した添加剤非含有系に比べて明らかな抵抗増加は抑制された。同様の実験で、VC や MMDS といった他の添加剤を 3.95 V で用いた場合には抵抗増加が確認された [36]。このことは、$LiPO_2F_2$ により LCO-SP 表面に安定な保護膜が形成されたことを示唆しており、従来の添加剤に比べて優れた性能を示す可能性がある。

図 7 に示すように、LCO-SP における界面形成機構は、4.0 V を超えると添加剤非含有系では界面層が連続的に成長するが、$LiPO_2F_2$ の添加により過剰な分解や副反応が抑制された安定な界面が形成されることが示された。SPEM による本結果は、電気化学的応答を精密に可視化するだけでなく、添加剤の *in-situ* 導入による反応傾向を明らかにすることができる手法であり、個々の粒子レベルでの電極表面保護技術への応用が期待される。今後は、ラマン分光などの分光学的手法との組み合わせによる解析も検討していく予定である。

４．　まとめ

本研究では、正極活物質として $LiCoO_2$ 単粒子（LCO SP）を用いた SPEM 法により、電解液添加剤の有無による電極/電解液界面での電気化学的特性および抵抗成分の変化を直接観察し、その影響を評価した。得られた結果は以下の通りである。

1. 添加剤を含まない系において定電位条件下で評価を行った結果、4.0 V vs. Li/Li^+では半円状アークおよびその抵抗値は安定に保持されたのに対し、4.05～4.2 V では抵抗の増加傾向が観察された。このことから、低電位領域（≦4.0 V）では LCO-SP と電解液との間に安定な界面が形成される一方で、高電位領域（＞4.0 V）では電解液の酸化分解によって LCO-SP 表面にパッシベーション膜（不動態被膜）が成長することが示唆された。

2. 添加剤を含まない系における電位依存性の評価では、フィッティング解析により、非対称な半円弧を粒子と電解液との電荷移動抵抗（R_{ct}）および LCO-SP 内部抵抗（$R_{LCO\text{-}SP}$）として分離することができた。これらの抵抗は電位の上昇に伴い一旦減少した後、再び増加する傾向を示した。一方、$LiPO_2F_2$ 添加剤を含む電解液中では、半円弧の抵抗値および時定数が無添加系と異なる挙動を示した。これは、添加剤の存在によって電解液中の溶媒和構造が変化し、LCO

-SP 表面に皮膜が形成されたことに起因して電荷移動抵抗が増加したことを示している。したがって、$LiPO_2F_2$ の有無により、LCO-SP と電解液界面における Li^+輸送メカニズムが異なると考えられる。

3. $LiPO_2F_2$ をその場で添加した系では、インピーダンススペクトルに、初期状態（無添加時）では見られなかった新たな抵抗成分が現れ、印加電位を維持したまま安定化した。この抵抗成分は、電解液の酸化分解により生成した界面層の成長に起因すると考えられ、$LiPO_2F_2$ 添加下では、一定電位において LCO-SP と電解液との間に安定な界面が形成されることが示唆された。すなわち、$LiPO_2F_2$ の添加により、電解液の過剰な分解や副反応の抑制が可能となることが示された。

以上より、SPEM 法は、活物質単粒子と電解液との界面における電気化学挙動を詳細に理解する上で有効な手法であるといえる。特に、添加剤の影響下において、充放電過程中の界面抵抗の変化を直接観察することができ、界面形成や電荷移動過程などの現象を明らかにする上で有用である。

謝辞

本研究の実験および考察を担当した大学院修士課程修了生の松本 慎史君（2023 年度修了）、大学院博士課程の平岡 紘次君、大学院修士課程の向深澤 颯君にそれぞれ謝意を表します。

参 考 文 献

（1）Xu, C.; Behrens, P.; Gasper, P.; Smith, K.; Hu, M.; Tukker, A.; Steubing, B. *Nat. Commun.* **2023**, 14, 119.
(2) Tarascon, J. M. *Nat. Chem.* **2010**, 2, 510.
(3) Nitta, N.; Wu, F.; Lee, J. T.; Yushin, G. *Mater. Today* **2015**, 18, 252-264.
(4) Yoshino, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5798-5800.
(5) Lyu, Y.; Wu, X.; Wang, K.; Feng, Z.; Cheng, T.; Liu, Y.; Wang, M.; Chen, R.; Xu, L.; Zhou, J.; Lu, Y.; Guo, B. *Adv. Energy Mater.* **2021**, 11, 2000982.
(6) Lv, H.; Zhu, X.; Mei, J.; Xia, Y; Wang, B. *Nano Res.* **2024**, 17, 1384-1401.
(7) Weichert, A.; Göken, V.; Fromm, O.; Beuse, T.; Winter, M.; Börner, M. *J. Power Sources* **2022**, 551, 232179.
(8) Nwachukwu, I. M.; Nwanya, A. C.; Ekwealor, A. B. C.; Ezema, F. I. *Appl. Surf. Sci. Adv.* **2023**, 18, 100505.
(9) Liu, H.; Wang, J.; Zhang, X.; Zhou, D.; Qi, X.; Qiu, B.; Fang, J.; Kloepsch, R.; Schumacher, G.; Liu, Z.; Li, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 4661-4675.
(10) Wang, Y.; Wang, E.; Zhang, X.; Yu, H. *Energy Fuels* **2021**, 35, 1918-1932.
(11) Xu, X.; Deng, S.; Wang, H.; Liu, J.; Yan, H. *Nano-Micro Lett.* **2017**, 9, 22.
(12) Chen, H.; Liu, B.; Wang, Y.; Guan, H.; Zhou, H. *J. Alloys Compd.* **2021**, 876, 159966.
(13) Zhao, W.; Zheng, G.; Lin, M.; Zhao, W.; Li, D.; Guan, X.; Ji, Y.; Ortiz, G. F.; Yang, Y. *J. Power Sources* **2018**, 380, 149-157.
(14) Ue, M. Ch.4, 75, M. Yoshio, R. J. Brodd, A. Kozawa (Eds.), Lithium-Ion Batteries, Springer, 2009.
(15) Aurbach, D.; Gamolsky, K.; Markovsky, B.; Gofer, Y.; Schmidt, M.; Heider, U. *Electrochim. Acta* **2002**, 47, 1423-1439.
(16) Zuo, X.; Fan, C.; Xiao, X.; Liu, J.; Nan, J. *J. Power Sources* **2012**, 219, 94-99.
(17) Shi, P.; Zhang, L.; Xiang, H.; Liang, X.; Sun, Y.; Xu, W. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, 10, 22201.
(18) Yang, G.; Shi, J.; Shen, C.; Wang, S.; Xia, L.; Hu, H.; Luo, H.; Xia, Y.; Liu, Z. *RSC Adv.* **2017**, 7, 26052-26059.
(19) Tan, S.; Shadike, Z.; Li, J.; Wang, X.; Yang, Y.; Lin, R.; Cresce, A.; Hu, J.; Hunt, A.; Waluyo, I.; Ma, L.; Monaco, F.; Cloetens, P.; Xiao, J.; Liu, Y.; Yang, X-Q.; Xu, K.; Hu, E. *Nature Energy* **2022**, 7, 484-494.
(20) Miyagi, H.; Kato, R.; Yokomizo, M.; Uono, H.; Matsumoto, H.; Satou, T.; Kotato, M.; Nakajima, T.; Suzuki, H.; Oshima, H. US 9 029 022 B2, 2015.
(21) Miyagi, H.; Kato, R.; Nakajima, T.; Suzuki, H.; Oshima, H. US 9 112 236 B2, 2015.
(22) Nishio, K.; Kim, J.-M. US 11 450 880, 2022.
(23) Saito, T.; Nishikawa, K.; Nakamura, T.; Seki, S. *J. Phys. Chem. C* **2020**, 124, 16758-16762.
(24) Sawahashi, T.; Hiraoka, K.; Seki, S. *RSC Adv.* **2023**, 13, 21667-21672.
(25) Dokko, K.; Mohamedi, M.; Fujita, Y.; Itoh, T.; Nishizawa, M.; Umeda M.; Uchida, I. *J. Electrochem. Soc.* **2001**, 148, A422-A426.
(26) Zhang, S. S.; Xu, K.; Jow, T. R. *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 1057-1061.
(27) Zheng, H.; Qin, J.; Zhao, Y.; Abe, T.; Ogumi, Z. *Solid State Ionics* **2005**, 176, 2219-2226.
(28) Yamada, I.; Iriyama, Y.; Abe, T.; Ogumi, Z. *J. Power Sources* **2007**, 172, 933-937.
(29) Ikezawa, A.; Fukunishi, G.; Okajima, T.; Kitamura, F.; Suzuki, K.; Hirayama, M.; Kanno, R.; Arai, H. *Electrochem. Commun.* **2020**, 116, 106743.
(30) Ohzuku, T.; Ueda, A. *J. Electrochem. Soc.* **1994**, 141, 2972-2977.
(31) Chao, Z. Q.; Mei, X. J.; Yong, F. X.; Feng, D. Q.; Xia, J. Y.; Ling, H.; Gang, S. S. *Chin. Sci. Bull.* **2007**, 52, 1187-1195.
(32) Nakayama, M.; Ikuta, H.; Uchimoto, Y.; Wakihara, M. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 10603-10607.
(33) Croce, F.; Nobili, F.; Deptula, A.; Lada, W.; Tossici, R.; D'Epifanio, A.; Scrosati, B.; Marassi, R. *Electrochem. Commun.* **1999**, 1, 605-608.
(34) Ménétrier, M.; Saadoune, I.; Levasseur, S.; Delmas, C. *J. Mater. Chem.* **1999**, 9, 1135-1140.
(35) Qian, Y.; Hu, S.; Zou, X.; Deng, Z.; Xu, Y.; Cao, Z.; Kang, Y.; Deng, Y.; Shi, Q.; Xu, K.; Deng, Y. *Energy Storage Mater.* **2019**, 20, 208-215.
(36) Matsumoto, S.; Hiraoka, K.; Tokuda, H.; Seki, S. *ACS*

Appl. Mater. Interfaces **2025**, 17, 9289-9296.

165 nm～220 nm 帯の UV-C ランプの開発

工学院大学　先進工学部 応用物理学科,

大学院工学研究科電気・電子工学専攻　尾沼 猛儀

（株）オーク製作所　諏訪工場，研究開発部　芹澤 和泉

Development of UV-C Lamp Operating in 165 nm-220 nm Spectral Range

Takeyoshi Onuma, Department of Applied Physics, School of Advanced Engineering and Department of Electrical Engineering and Electronics, Graduate School of Engineering, Kogakuin University

Izumi Serizawa, R&D Department, Suwa Factory, ORC Manufacturing Co., Ltd.

ABSTRACT : UV-C lamp operated at 202 nm was demonstrated by employing mist CVD grown rocksalt structured (RS) MgZnO as an emitting layer. External quantum efficiency was estimated to be 0.28% and 0.75% at excitation wavelengths of 146 nm and 168 nm, respectively. Small values were mainly attributted to low light extraction efficiency from the rear surface of the granular film grown on quartz glass substrate. By employing post-growth slow-cooling to suppress thermal stress during the mist CVD process, RS-$Mg_{0.99}Zn_{0.01}O$ film grown on MgO (100) substrate exhibited near-band-edge VUV emission peak at 187 nm at room temperature. The mist CVD system was upgraded so that the mist flow can control using multiple valve operation component. A benefit was clearly seen as an observation of satellite peaks in the X-ray diffraction pattern of RS-$Mg_{0.92}Zn_{0.08}O$/MgO multiple quantum well structure. By adjusting the susceptor position while maintaining the growth temperature, Al atomic concentration of 0.6% was achieved for the Al doped RS-MgZnO film. NiZnO and MgNiZnO films were fabricated by the RF magnetron sputtering. A p-type conductivity was confirmed for all the films having a resistivity in a range 1.16×10^{-1}-5.92×10^{1} Ω·cm. We believe that all of the achievements will pave a way to realize RS-MgZnO-based light-emitting-diodes.

1．　背景と目的

図 1 に示すように、波長 100 nm から 280 nm の紫外線は UV-C に分類され、さらに波長 200 nm から 280 nm は深紫外線(Deep ultraviolet: DUV)、波長 200 nm 以下の紫外線は、酸素により吸収され大気中を透過できないため、真空紫外線(Vacuum ultraviolet: VUV)と呼ばれる。UV-C は、酸素やオゾンにより吸収されるため地表に降り注ぐ太陽光には存在しないが、産業的には、殺菌、水処理、空気清浄、微細加工、表面改質、ドライ洗浄、光 CVD、オゾン清浄、眼科医療など幅広い分野で利用されている。近年では、207～222 nm の深紫外光により、人の組織を損傷することなく空中浮遊のウィルスを不活化できることが解明され[1]、UV-C 殺菌灯が注目を集めている。

DUV 域の半導体材料といえば AlGaN 系の窒化物半導体が挙げられる。しかし、**図** 2 に示すように実用に耐える外部量子効率が得られる波長域は 230 nm 以上に制限される[2]。主要因は c 面成長した AlGaN が面直偏光で発光し、光取り出し効率を著しく低減させることや、Al 組成増加に伴い Mg アクセプターの活性化エネルギーが増加し、p

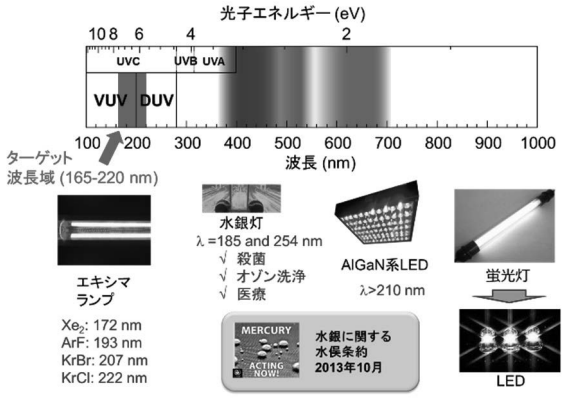


図 1. 主な真空・深紫外域の光源装置と本研究で開発するランプのターゲット波長域.

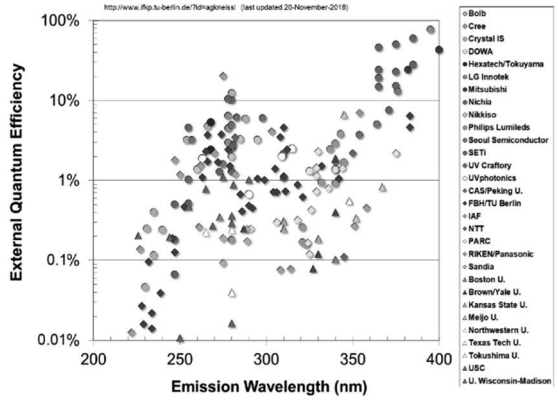


図 2. 窒化物半導体 UV-LED の外部量子効率[2].

型伝導性が低下してしまうことなどが挙げられる。さらに、発光波長は AlN のバンドギャップによって 210 nm 以上に制限される為、低圧水銀ランプの 185 nm やエキシマランプの 193 nm などの VUV 光を発光させることはできない。このため波長 220 nm 以下の光源としては、低圧水銀ランプやエキシマランプなどの放電ベースの光源が未だに主流となっている。特に、水処理や半導体プロセスなど市場規模の大きい分野では低コスト、大面積照射という観点から、未だ水銀ランプがシェアの大半を占めている。しかし、2017 年に「水銀に関する水俣条約」が発効され、2020 年末までに高圧水銀ランプの製造と輸出入が禁止された。また、2025 年末までに電球型蛍光ランプ、2027 年末までに直管型蛍光ランプの製造と輸出入が原則全面禁止となることが 2023 年に開催された第 5 回締約国会議で合意され、脱水銀への動きが加速している。低圧水銀灯は特例として認められているものの、水俣条約により将来的な使用制限に向けた取り組みが強く求められている。さらに、水銀ランプやエキシマランプは、元素により得られる波長が限られる上に、紫外から可視域まで幅広く輝線が分布する。このため、人体に影響の少ない UV-C 光だけを取り出すために、光学フィルターにより余分な光をカットする必要がある。また、放電管は破損する危険があるため、宇宙空間など極限環境用途には向かない。

このような背景から、本研究では、バンドギャップが 7.7 eV の MgO を起点とする岩塩構造(Rocksalt structured: RS) MgZnO により、波長域 165 nm～220 nm 帯で自由に波長選択可能な UV-C ランプを開発することを目的とする。

これまでに、MgO へ ZnO を混晶化させることで、室温で 205～253 nm、また極低温で 199～244 nm で発光することを実証してきた[3-7]。我々独自のキーテクノロジーが 2 点挙げられる。

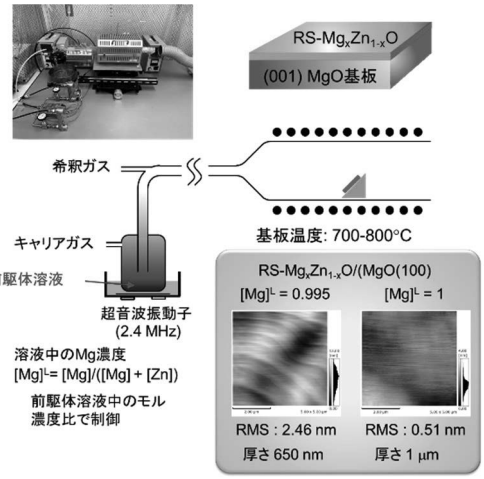


図 3. ミスト化学気相堆積装置の写真と概略図
結晶性・表面平坦性は極めて優れている.

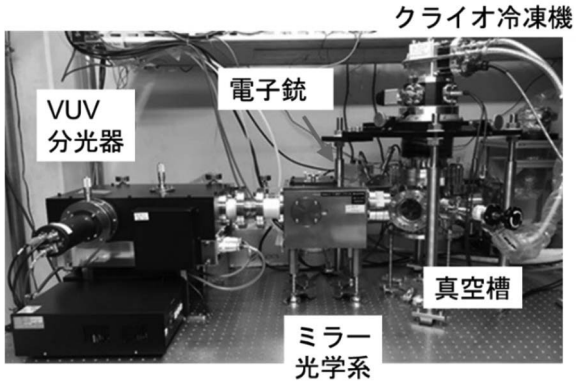


図 4. 真空・深紫外分光システムの構成.

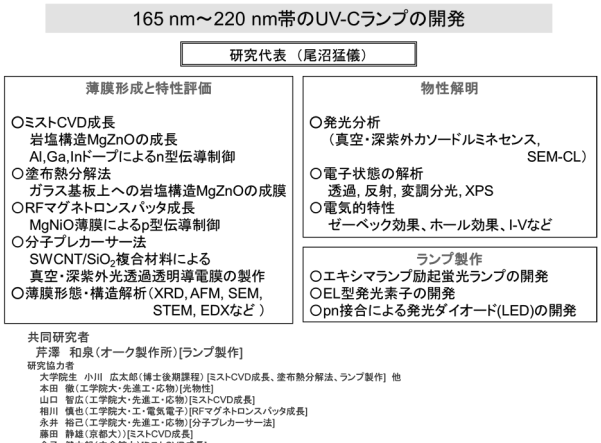


図 5. 本研究の実施体制.

～ キーテクノロジー 1 ミスト CVD 法の利用 ～

MgO などの酸化物薄膜の堆積には、一般にスパッタ堆積法や真空蒸着法が用いられるが、本研究ではミスト化学気相堆積(CVD)法を用いる。**図** 3 に示すように、目的の元素を含む原料溶液を超音波振動子で霧化し、発生したミスト微粒子をキャリアガスで輸送して基板上で CVD 反応を起こし成長させる。真空ポンプが必要ないので装置が比較的安価であり、原料は無害なので特別な排ガス

処理装置も必要ない。反応管を大口径化すれば、大型基板への成膜も可能となる。

～　キーテクノロジー２
真空・深紫外域での光物性評価技術　～

図 4 に示すように、試料は真空槽内に設置し、クライオ冷凍機で 6 K まで冷却することができる。真空槽と集光光学系は MgF_2 ビューポートで仕切られ、光路を全て窒素ガスで置換することで最短で 115 nm までの VUV 光の観測が可能となる。電子線励起によりカソードルミネセンス(CL)測定を行う他、重水素ランプと分光器を別途接続することで、透過・反射・フォトルミネセンス励起・光電流測定も行うこともできる。

これらをベースに、**図 5** に示す共同研究者ならびに研究協力者と共に以下の項目に取り組む。

1. エキシマ励起蛍光ランプの開発
2. 全固体エレクトロルミネセンス(EL)型発光素子の開発
3. pn 接合による発光ダイオード(LED)の開発

２．　研究成果

目的に掲げた各項目に対し、2023 年度に行った内容と主な成果を以下に記す。

〔1〕 190-220 nm で発光する Kr_2 エキシマ励起岩塩構造 MgZnO ランプの試作と外部量子効率評価

〔2〕 180 nm 台で発光する岩塩構造 MgZnO 薄膜の実現

〔3〕 積層構造の連続成膜に向けたミスト CVD 装置の構築と量子井戸構造の製作

〔4〕 反応炉内環境制御による Al ドープ MgZnO 薄膜のミスト CVD 成長

〔5〕 RF マグネトロンスパッタによるサファイア基板上への p 形 MgNiZnO の成膜と電気的特性の評価

以下に、詳細を記述する。

２．１　190-220 nm で発光する Kr_2 エキシマ励起岩塩構造 MgZnO ランプの試作と外部量子効率評価

2022 年度までに石英ガラス基板上への岩塩構造 MgZnO 膜のミスト CVD 成長と、エキシマ励起 RS-MgZnO ランプの試作を行った。2023 年度は、外部量子効率の評価を行った。

結晶成長では、酢酸マグネシウム 4 水和物 ($Mg(CH_3COO)_2{\cdot}4H_2O$) と酢酸亜鉛 2 水和物 ($Zn(CH_3COO)_2{\cdot}2H_2O$)の白色粉末 2 種を、5 倍希釈した酢酸水溶液(体積比 H_2O:CH_3COOH=4:1)に同時に加えて溶解させ、金属イオン濃度 0.01 mol/L のミスト前駆体溶液を

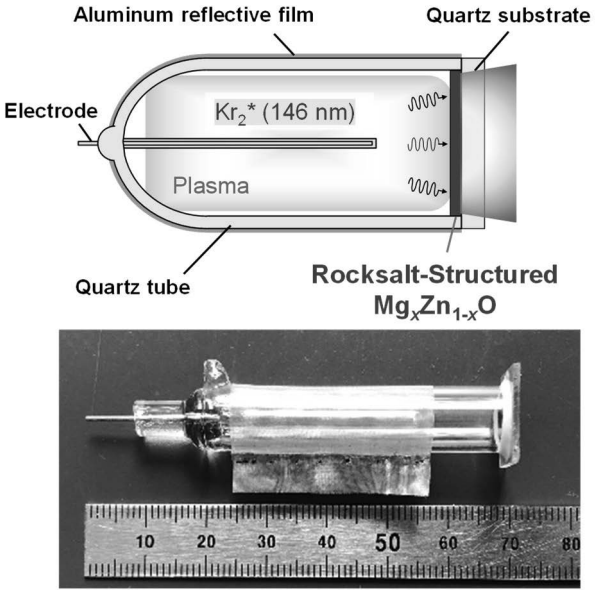


図 6. 試作したエキシマ励起 RS-MgZnO ランプの模式図と写真.



図 7. 点灯時のエキシマ励起 RS-MgZnO ランプの写真.

調整した。薄膜の混晶組成比は、前駆体溶液中の Mg と Zn の物質量比($[Mg]^L=[Mg]/([Mg]+[Zn])$)で調整し$[Mg]^L$=0.95 とした。前駆体溶液を 2.4 MHz の超音波振動子によって霧化し、O_2 ガス(ミストキャリアガス 4.0 L/min、希釈ガス 0.5 L/min)により反応部に輸送した。基板温度は 700℃とし、3 時間成長した。RS-MgZnO 薄膜は 500 nm ほどの大きさの微結晶が緻密に成膜され、膜厚はおよそ 870 nm であった。微小角入射 X 線回折測定結果から、RS-MgZnO 微結晶が複数の面方位に配向した多結晶膜であることが分かった。

15mm 角の石英ガラス基板上へ成膜した RS-MgZnO 微結晶薄膜を、**図 6** に示すように、ガラスフリット材を用いて石英ガラス管と溶着させ、Kr ガスを 300 Torr 封入して、Kr_2 エキシマ励起 RS-MgZnO ランプを試作した。9 kV_{p-p} の電圧を印加し、誘電体バリア放電により Kr_2 エキシマ光(波長 146 nm)を発光させた。これを励起光とし RS-MgZnO 発光層から放出された光を裏面側から外部へ取り出した。**図 7** に発光写真を示す。また、真空紫外分光光度計(VUV-201、分光計器)で観測した発光スペクトルを**図 8**(b)に示す。測定では、スリット幅を 2.5 mm、光電子増倍管の電圧を-1056 V とした。ここでは、光電子増倍管の窓部にサリチル酸ナトリウムを塗布することで、300 nm 以下波長域を

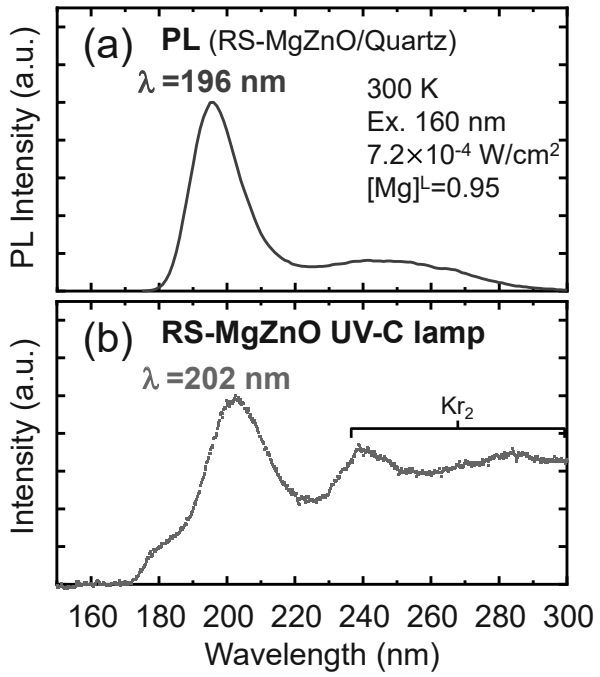


図 8. (a) RS-MgZnO 薄膜の室温 PL スペクトルと (b) Kr_2 エキシマ励起 RS-MgZnO ランプの発光スペクトルの比較.

可視光に変換して観測した。また、比較として RS-MgZnO 薄膜のフォトルミネセンス(PL)スペクトルを図 8(a)に示す。測定では重水素ランプ(浜松ホトニクス L11798)の 160 nm 発光を励起光とし、前節に示した真空・深紫外分光システムを用いた。ランプのスペクトルには、RS-MgZnO 薄膜に由来する 202 nm をピークとする発光が観測された。PL スペクトルに観測された発光波長と近いことから、RS-MgZnO ベースの UV-C ランプの動作実証に成功したことを確認した。

試作したランプの性能評価の指標とするため、石英ガラス基板上へ製作した RS-MgZnO 微結晶薄膜を用いて外部量子効率を評価した。図 9(a)に示すように、RS-MgZnO 微結晶薄膜が成膜された 15mm 角の石英ガラス基板を、ヘッドオン型ソラーブラインド光電子増倍管(R6836)の光電面直上へ設置した。重水素ランプの発光を真空紫外分光器(KV-200、分光計器)により分光し、RS-MgZnO 微結晶薄膜へ照射し、裏面から放出された光を検出した。得られた光電流と、微結晶薄膜の無い状態で測定した光電流から、下式に従い分光外部量子効率を算出した[8]。

$$\eta_{ext}(\lambda) = \frac{\frac{I_{MgZnO}(\lambda)}{Res(\lambda_{202\,nm})} \Big/ \frac{hc}{\lambda_{202\,nm}}}{\frac{I_{D_2\,lamp}(\lambda)}{Res(\lambda)} \Big/ \frac{hc}{\lambda}} \qquad (1)$$

ここで、λは入射した重水素ランプの励起光の波長を表し、$I(\lambda)$ [A]と $Res(\lambda)$ [A/W]は、それぞれ光電子増倍管で検出した光電流と光電子増倍管の受光感度を表す。h はプランク定数、c は光速を表し、分母から重水素ランプからの励起光の光子数、分子から RS-MgZnO 微結晶薄膜試料の裏面から放出された光の光子数が得られる。ただし、裏面から放出された光は分光していないため、図 8(b)の結果から 202 nm が支配的に観測されているものとした。ここで、重水素ランプから出力された 200 nm での光出力を、光電子増倍管とパワーメーター(ニューポート 843-R, UV Enhanced Silicon Photodetector 918D-UV-OD3R)の双方で検出することで $I(\lambda)/Res(\lambda)$ [W]を補正したが、この値は分母と分子に共通し相殺されるため(1)式には含まれない。得られた外部量子効率スペクトルを図 9(b)に示す。スペクトルの 168 nm 付近には RS-MgZnO 微結晶薄膜におけるバンド間遷移に伴うピークが現れ、η_{ext}=0.75%となった。一方、Kr_2 エキシマ光の波長 146 nm での値は η_{ext}=0.28%となった。図 9(b)には、照射面積 0.05×0.6 mm^2 から算出した波長 146 nm と 168 nm における励起パワー密度も示されている。η_{ext} はいずれも 1%以下と低く見積もられた。一般に光励起の外部量子効率は下式により与えられる。

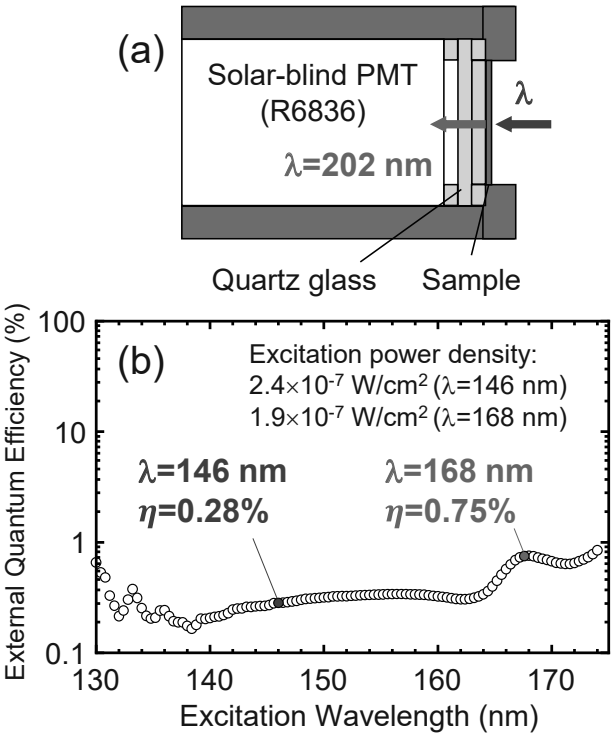


図 9. (a) RS-MgZnO 薄膜の外部量子効率評価の配置図と(b) 外部量子効率スペクトル.

$$\eta_{ext} = (1-R)\cdot\eta_{extract}\cdot\eta_{int} \qquad (2)$$

ここで R は試料表面での励起光の反射率、$\eta_{extract}$ は光取り出し効率、η_{int} は内部量子効率を表す。PL スペクトルの温度依存性から、極低温での内部量子効率を 100%と仮定することで、温度消光から室温での等価内部量子効率[9]を見積もったところ η_{int}^{eq}=11%となった。これより、$(1-R)\cdot\eta_{extract}$ は 5-15%と見積もられた。今回は、RS-MgZnO 発光層から放出された光を裏面側から外部へ取り出したために、自己吸収や微結晶粒界における散乱等により、$\eta_{extract}$ が著しく低下したと考えられる。このため、光取り出しの工夫により、外部量子効率の向上が見込まれる。

２．２　180 nm 台で発光する岩塩構造 MgZnO 薄膜の実現

RS-MgZnO はバンドギャップを MgO の 7.7 eV から連続的に変化させることができるものの、Zn 組成の減少に伴い発生するストークス様シフトが 190 nm 以下での発光波長制御の妨げになっていた。起源として、組成の不均一性[5,10]や等電子トラップの形成[9]が挙げられるが結論に至っていない。そこで、基板と成長層の熱膨張係数差に着目し、成長後に徐冷過程を導入した成長を行い、結晶のモザイクネスや組成分布、発光特性に与える影響を明らかにした。

MgO(100)基板上へ成長を行った。Mg、Znの前駆体には前節と同様に$Mg(CH_3COO)_2・4H_2O$及び$Zn(CH_3COO)_2・2H_2O$を使用し、5倍希釈した酢酸水溶液に溶解させた。原料溶液中の金属イオンモル濃度は0.01 mol/Lとし、MgとZnの物質量比($[Mg]^L=[Mg]/([Mg]+[Zn])$)を$[Mg]^L$=0.9、0.95、0.97、0.99で変化させた。原料溶液を超音波振動子によりミスト状にし、キャリアガス(O_2)4.0 L/min、希釈ガス(O_2)0.5 L/min の流量条件で、700℃に加熱された反応管へ供給して1時間の成長を行った。成長後、ミストの供給を停止し酸素雰囲気下で300℃まで平均降温速度-10℃/minで冷却したのち、大気雰囲気下で300℃まで徐冷した。成膜した$RS\text{-}Mg_xZn_{1-x}O$薄膜に対して、分光エリプソメトリー測定で膜厚を推定した。また、X線回折(XRD)測定による結晶性の評価を行い、逆格子空間マッピング(RSM)測定結果をもとにポアソン比から薄膜中のMgOモル分率xを推定した。VUV域のCL測定は光路を窒素で置換したVUV分光システムを使用した[9]。

図 10 に成膜した $RS\text{-}Mg_xZn_{1-x}O$ 薄膜のうち x=0.92、0.95、0.97 における MgO200 回折ピーク近傍の XRD θ-2θ パターンを示す。全ての試料において薄膜干渉振動が観られ、表面・界面ともに高い平坦性が維持されていることが示唆される。$RS\text{-}Mg_xZn_{1-x}O$ の 200 回折ピークは、薄膜中 Zn 組成の増加に伴い格子定数が大きくなるため、MgO 基板

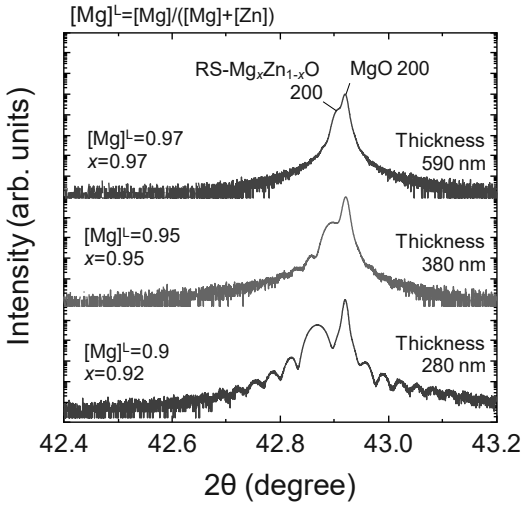


図 10. MgO(100)基板上へ成膜した $RS\text{-}Mg_xZn_{1-x}O$ 薄膜の XRD θ-2θ パターン.

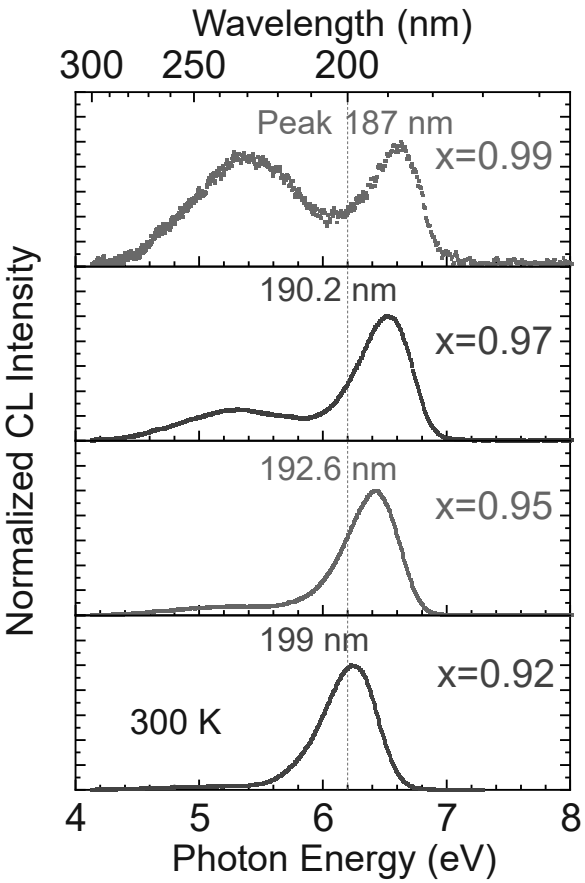


図 11. MgO(100)基板上へ成膜した $RS\text{-}Mg_xZn_{1-x}O$ 薄膜の室温における規格化 CL スペクトル.

のピーク(2θ=42.92°)より低角度側に観測された。Voigt 関数でピーク分離して求めた $RS\text{-}Mg_xZn_{1-x}O$ 薄膜の半値全幅(Δ2θ)は 61-110 arcsec と MgO(100)基板の Δ2θ=23 arcsec に近い値を示し、混晶組成揺らぎが小さいことが示唆された。また、X 線ロッキングカーブの半値全幅(Δω)も同様にピーク分離して求めたところ、x=0.92 の薄膜の Δω は 55 arcsec と、MgO(100)基板の Δω=41 arcsec と同等の値が得られた。これらの結果は、成長後徐冷の導入により、成長層に加えられる熱応力が低減され、結晶粒が拡大し、それに伴い組成均一性と結晶の配向性が向上したことを示唆していると考えられる。図 11 に室温 CL スペクトルを示す。発光ピークは x の増加に伴い高エネルギーシフトし、最短で 187 nm の発光が観測された。ストークス様シフトは 0.1-0.2 eV に低減された。以上より、成長後の徐冷は、組成不均一や欠陥の形成を抑制し、ストークス様シフトの低減に寄与することが示された。これらの内容は、JJAP special issue で出版された[11]。

２．３　積層構造の連続成膜に向けたミスト CVD 装置の構築と量子井戸構造の製作

LED などのデバイス試作においては、不純物濃度、混晶組成、膜厚に関する制御技術が求められる。n 型、p 型伝導層、量子井戸薄膜など LED 製作に必須となる積層構

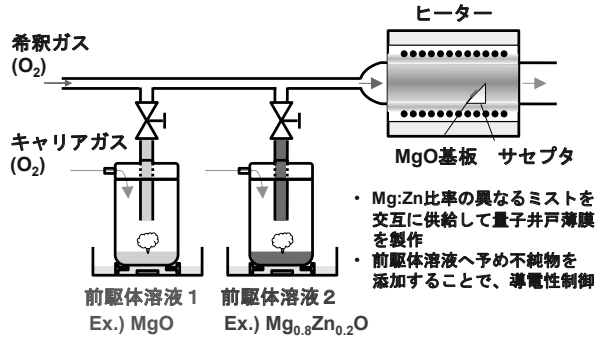


図 12. 拡張型ミスト CVD 装置の概念図.

造の成膜技術の確立を目指し、従来型ミスト CVD 装置の拡張について検討を進めている。通常のミスト CVD 装置は、発生筒は 1 つしか備えておらず、発生筒に前駆体溶液を準備し、超音波振動によってミスト状となった原料を反応管へ供給するシンプルな構成となっている。ミスト CVD 法は溶液ベースの結晶成長手法であるため、不純物濃度や混晶組成を変化させたい場合は、前駆体溶液のモル比を調整することとなる。このため、混合した際の溶液が副反応する場合、制御が困難となる。そこで、**図** 12 に示すような、拡張型ミスト CVD 装置の構築を行った。目的に応じた前駆体溶液を複数準備し、開閉バルブを用いて交互にミストを供給することで、量子井戸構造や、n 型、p 型伝導層の連続成膜が可能となる他、母材とドーピング材料の原料を分けて供給することで、副反応を低減させることも可能となる。2022 年度に、2 系統のミスト CVD システムを設計し、構成要素となる物品購入を行った。2023 年度は装置の構築を行い、量子井戸構造の製作検討を行った。

製作した量子井戸構造の模式図を図 13(a)に示す。前節までと同様に $Mg(CH_3COO)_2\cdot 4H_2O$ と $Zn(CH_3COO)_2\cdot 2H_2O$ を 5 倍希釈した酢酸水溶液(体積比 H_2O:CH_3COOH=4:1)に同時に加えて溶解させ、金属イオン濃度 0.01 mol/L のミスト前駆体溶液を調整した。井戸層と障壁層の Mg と Zn の物質量比をそれぞれ$[Mg]^L$=0.9、1 とした。成長温度は 725°C、キャリアガス(O_2)の流量は 4.0 slm、希釈ガス(O_2)の流量は 0.5 slm とした。MgZnO, MgO の成長レートはそれぞれ 9.6 nm/min, 17 nm/min であり、キャップ層 (MgO) 30 nm、障壁層(MgO) 10 nm、井戸層(RS-MgZnO) 3 nm、バッファ層(MgO) 200 nm を目標膜厚として、それぞれ 105, 35, 19, 720 sec でミストを供給した。なお、井戸層及び障壁層の周期数は 5 周期とした。表面原子間力顕微鏡(AFM)像を図 13(b) に示す。二乗平均平方根(RMS)粗さは 0.47 nm となり、単薄膜と同等の表面平坦性が得られた。XRD θ-2θ測定の結果とシミュレーションパターンを図 14 に示す。量子井戸構造による-1 次, +1 次のサテライトピークを観測し、-1 次のサテライトピークは 42.07°近傍、+1 次のサテライトピークは 43.84°近傍に現れた。シミュレーションより、井戸層厚は 2.8 nm、障壁層厚は 8 nm、キャップ層厚は 28 nm と設計値と概ね一致した。以上より、構築したシステムが量子井戸など超薄膜の積層構造製作に有効であることを実証した。

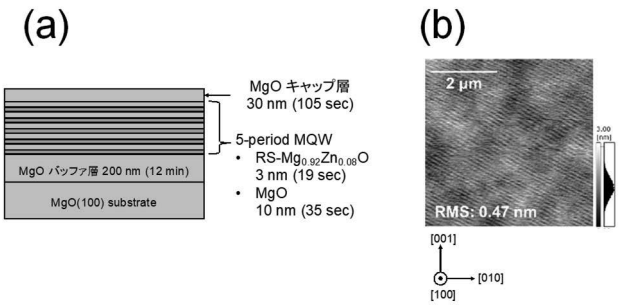


図 13. 5 周期 RS-$Mg_{0.92}Zn_{0.08}O$/MgO MQW の(a) 試料構造の模式図と(b) 表面 AFM 像.

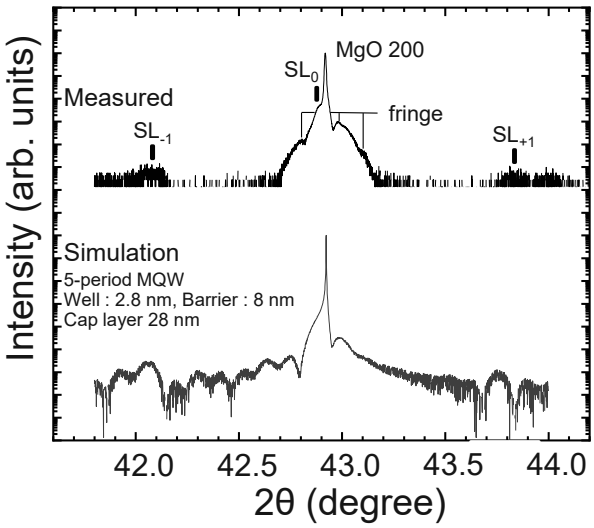


図 14. 5 周期 RS-$Mg_{0.92}Zn_{0.08}O$/MgO MQW の XRD θ-2θ パターン.

２．４　反応炉内環境制御による Al ドープ MgZnO 薄膜のミスト CVD 成長

RS-MgZnO を採用した LED を開発する上で、n 型伝導性制御は必須である。2022 年度は、ミスト CVD 法により Al、 Ga、 In 添加 RS-MgZnO の成膜を行い、その電気的特性を評価した。その結果、Al、 Ga、 In 添加 MgO 薄膜はいずれも高抵抗であったが、RS-MgZnO 薄膜へ添加することで伝導性が得られた。Al を 0.1 mol%添加した RS-MgZnO 薄膜において、電流-電圧-温度(I-V-T)測定を行った結果、昇温による抵抗率の増加傾向が観られ、室温の抵抗率は 13.3 k Ω·cm となった。

2023 年度は、薄膜中の Al 濃度増加による更なる抵抗率低減を目指し、反応炉内環境が Al 添加 RS-MgZnO 薄膜成長に与える影響を検討した。$Mg(CH_3COO)_2\cdot 4H_2O$、$Zn(CH_3COO)_2\cdot 2H_2O$、$Al(CH_3COCHCOCH_3)_3$ [Al(acac)$_3$]をを 5 倍希釈した酢酸水溶液(体積比 H_2O:CH_3COOH=4:1)に同時に加えて溶解させ、金属イオン濃度 0.01 mol/L のミスト前駆体溶液を調整した。$[Mg]^L$=0.6 とし、総金属イオン濃度 0.01 mol/L に対して、原料 Al 濃度を 10 mol%とした。成長温度は 725°C、キャリアガス(O_2)の流量は 4.0 slm、希釈ガス(O_2)の流量は 0.5 slm とした。

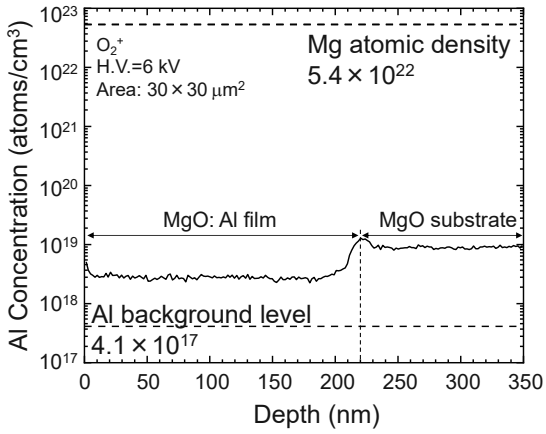


図 15. Al 添加 MgO 薄膜([Al]=0.1 mol%)の
SIMS 測定結果.

通常は均一な温度分布が得られる場所を最適位置とし 700°C で成長を行う。2022 年度に最適位置で成膜した Al 添加 MgO 薄膜の二次イオン質量分析(SIMS)結果を図 15 に示す。Al 添加 MgO 薄膜中の Al 濃度は 3.0×10^{18} cm^{-3} であり、MgO 基板中の Al 濃度は 9.0×10^{18} cm^{-3} よりも低く、$Al(acac)_3$ が、原料溶液中ないしは輸送過程において寄生反応する可能性が示唆された。そこで、2023 年度は最適位置の温度を 800°C に設定した上で、上流部の 700°C となる位置へサセプタを設置し成長を行った。成長時間は 1 時間とした。

Al 添加 RS-MgZnO 薄膜の膜厚は 860 nm、Al 添加 MgO 薄膜の膜厚は 220 nm であった。成長レートは、それぞれ 860 nm/h、220 nm/h となり、サセプタを上流部に設置することで比較的高い成長レートが得られた。エネルギー分散型 X 線分光(EDX)測定で得られた特性 X 線スペクトルを図 16 に示す。最適位置で成膜した Al 添加 MgO 薄膜ならびに MgO 基板においては 1.486 keV に Al Kα線は検出されなかった。一方、サセプタを上流部へ設置し成長した Al 添加 RS-MgZnO 薄膜では、Al Kα線のピークが明瞭に観測された。Al の原子組成比率[Al/(Mg+Zn+Al)]は 0.6 atom%であった。以上より、反応炉内の環境により不純物濃度が制御できることを実証した。

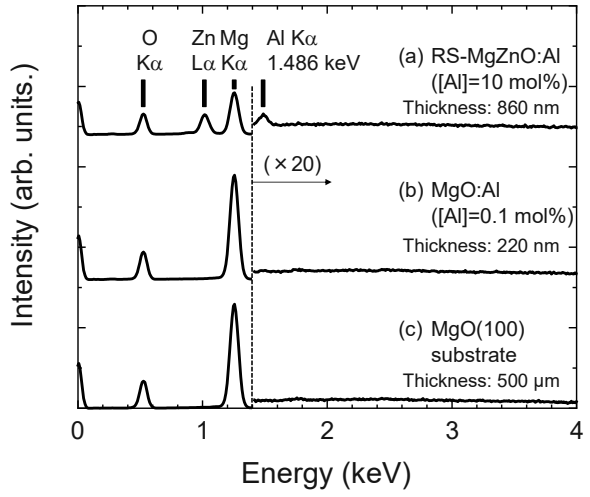


図 16. 特性 X 線スペクトル
(a) RS-MgZnO: Al ([Al]=10 mol%，サセプタ位置変更),
(b) RS-MgO: Al ([Al]=0.1 mol%)，(c) MgO (100) 基板.

2．5　RF マグネトロンスパッタによるサファイア基板上への p 形 MgNiZnO の成膜と電気的特性の評価

RS-MgZnO を採用した LED を開発する上で、RS-MgZnO における p 型伝導性制御が望ましい。しかし、現状では前述のように主に n 型伝導性制御に取り組んでいる。このため、代替する p 型酸化物材料として 2022 年度は p 型 MgNiO の成膜に取り組んだ。2023 年度は新たな p 型酸化物材料として p 型 NiZnO と MgNiZnO の成膜に取り組み、混晶モル比と電気的特性、光学的特性の関係を明らかにした。

NiO はバンドギャップが 3.7 eV で岩塩構造をとり、アンドープで p 型導伝導性を示す。一方、MgO はバンドギャップが 7.7 eV で岩塩構造をとるため、これらを混晶化させることで、$Mg_xNi_{1-x}O$ はワイドバンドギャップ p 型酸化物材料としての利用が期待される。これに対し、ZnO は安定構造としてウルツ鉱構造をとるが、本研究のように MgO と混晶化させることで岩塩構造の MgZnO を製作す

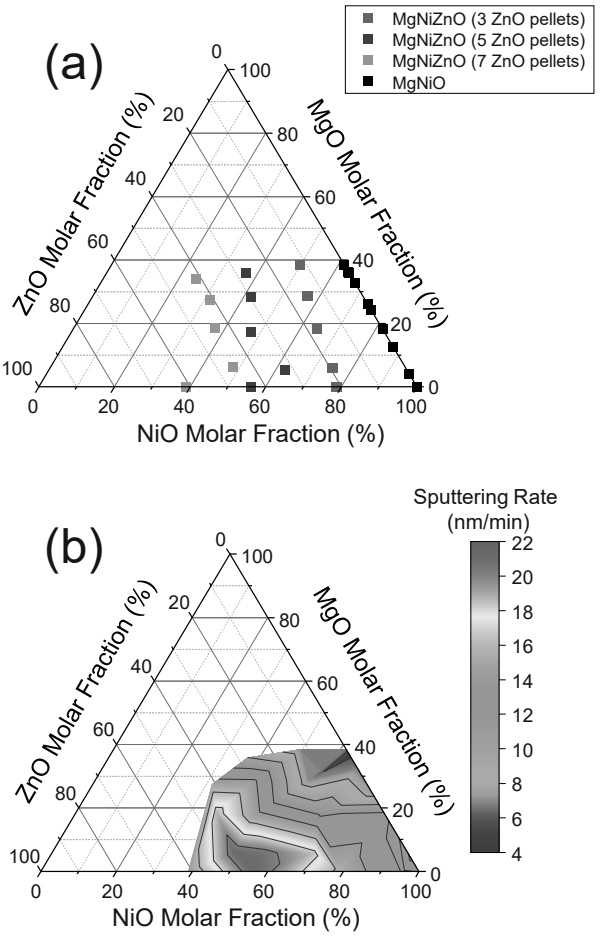


図 17. MgNiZnO 薄膜の(a) NiO, ZnO, MgO モル分率マッピングと(b) NiO, ZnO, MgO モル分率に対するスパッタレートマッピング.

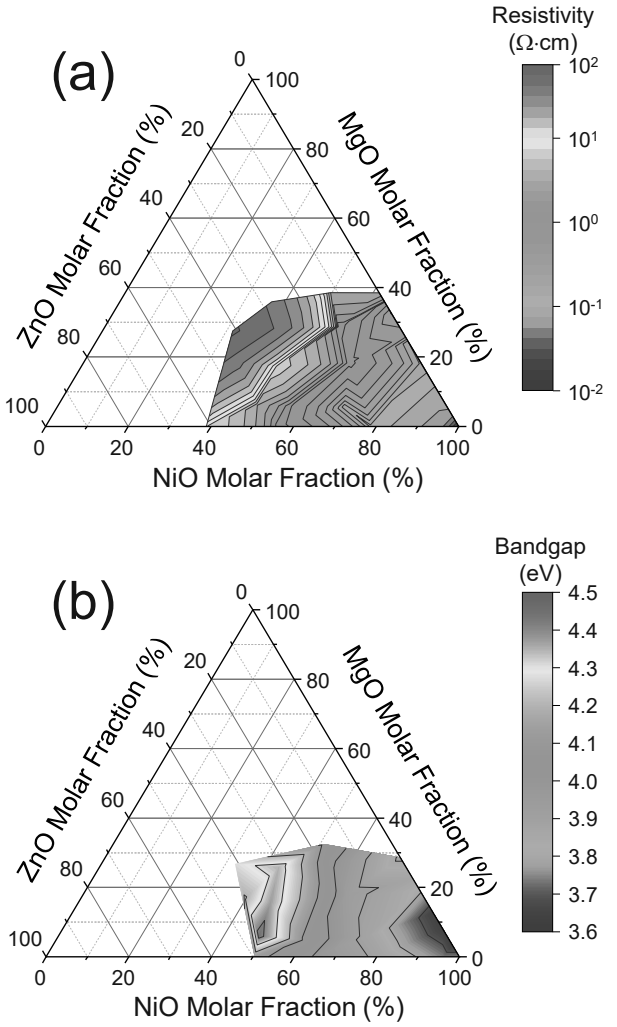


図 18. MgNiZnO 薄膜の NiO, ZnO, MgO モル分率に対する(a) 室温抵抗率マッピングと(b) 室温バンドギャップマッピング.

ることもできる。NiO へ ZnO を混晶化させた報告は少なく、詳細は明らかになっていない。

成膜には RF マグネトロンスパッタ装置(Canon-Anelva: L-332-FH)を用いた。3” の NiO 焼結ターゲット(99.9 mol%)と c 面サファイア基板を約 3 cm のスパッタ距離で対向させ、さらに 10×10 mm^2 の MgO(100)単結晶基板(>99.9%)やΦ=10 mm の ZnO 焼結体ペレット(99.99%)を NiO ターゲット上に枚数を変化させて配置し同時スパッタを行った。基板は非加熱とし、酸素流量を 5 sccm で固定した。また、NiO で抵抗率が極小となる条件として成膜圧力を 0.75 Pa、RF 出力を 150 W に固定した。

EDX 測定で得られた薄膜の NiO モル分率、ZnO モル分率、MgO モル分率の関係を図 17(a)に示す。MgNiO 薄膜では基板を増加させたが、MgO モル分率は 35%付近で飽和したが、NiZnO 薄膜ではペレットの増加により ZnO モル分率は 65%付近まで増加した。これは、図 17(b)に示すように MgO と ZnO のスパッタレートの違いを反映しているものと考えられる。図 18(a)に示すように、NiO 薄膜では室温抵抗率は最小で 1.73×10^{-2} Ω·cm となったが、両混晶薄膜ともに NiO モル分率減少に伴い室温抵抗率は増加傾向を示した。抵抗率は MgNiO 薄膜で 7.17×10^{-2} ~ 2.89 Ω·cm、NiZnO 薄膜で 1.16×10^{-1}~2.69×10^{1} Ω·cm の値をとった。また、同じ NiO モル分率で抵抗率を比較すると MgNiO よりも NiZnO 薄膜の方が低くなる傾向を示した。室温透過測定からバンドギャップを評価したところ、図 18(b)に示すように、NiO のバンドギャップは 3.74 eV となり NiO モル分率減少に伴い増加する傾向を示した。MgNiO のバンドギャップは 3.63~3.81 eV、NiZnO のバンドギャップは 3.74~4.13 eV の範囲で値をとり、同じ NiO モル分率で MgNiO と NiZnO 薄膜の値を比較すると、NiZnO 薄膜の方が MgNiO 薄膜よりも大きくなる傾向を示した。

NiO 焼結体ターゲットへ MgO 単結晶基板と ZnO 焼結体ペレットを、枚数を変えて配置し、同時スパッタにより MgNiZnO 四元薄膜を成膜した。MgNiZnO 薄膜の抵抗率は 8.04×10^{-1}~5.92×10^{1} Ω·cm の値をとった。三元混晶薄膜と同様に NiO モル分率の減少に伴い抵抗率は増加傾向を示し、NiO モル分率が 50%以上で抵抗率は 2 Ω·cm 以下となった。同じ NiO モル分率で MgNiZnO 薄膜と MgNiO 薄膜、NiZnO 薄膜の抵抗率を比較すると、NiZnO 薄膜の方が MgNiO 薄膜よりも低くなる傾向を示し、MgNiZnO 薄膜の値は MgNiO 薄膜と NiZnO 薄膜の値の間の値をとることが分かった。室温透過測定からバンドギャップを測定したところ、MgNiZnO のバンドギャップは 3.87~4.43 e V となった。同じ NiO モル分率で MgNiZnO 薄膜と MgNiO 薄膜、NiZnO 薄膜の値を比較すると、NiZnO 薄膜の方が MgNiO 薄膜よりも高くなる傾向を示し、MgNiZnO 薄膜の値は MgNiO 薄膜と NiZnO 薄膜の値の間の値をとることが分かった。

以上より、NiZnO ならびに MgNiZnO はヘテロ pn 接合形成用の材料として優れた特性を示すことが分かった。

３． まとめ

2022 年度までに石英ガラス基板上への岩塩構造 MgZnO 膜のミスト CVD 成長とエキシマ励起 RS-MgZnO ランプの試作を行った。本年度は、外部量子効率の評価を行った。外部量子効率は励起光の波長 146 nm と 168 nm でそれぞれ 0.28%と 0.75%となった。解析の結果、RS-MgZnO 発光層から放出された光を裏面側から外部へ取り出したために、自己吸収や微結晶粒界における散乱等により、光取り出し効率が著しく低下したことが分かった。光取り出しの工夫により、外部量子効率の向上が見込まれる。基板と成長層の熱膨張係数差に着目し、成長後に徐冷過程を導入した成長を行った。徐冷により結晶のモザイクネスや組成揺らぎが低減した。ストークス様シフトは 0.1-0.2 eV に低減し、室温で最短で 187 nm の発光が観測された。2 系統のミスト原料を同時または交互に供給できるミスト CVD システムを構築した。RS-$Mg_{0.92}Zn_{0.08}O$/MgO 多重量子井戸構造の XRD θ-2θパターンにはサテライトピークが観測され、構築したシステムが超薄膜の積層構造製作に有効であることを実証した。Al 添加による n 型導電性制御を行う上で、

$Al(acac)_3$ の原料溶液中ないしは輸送過程における寄生反応の制御が課題となっている。成長温度は 700°C のまま、サセプタを上流部へ設置することで、Al 濃度を増加させることができることが分かった。RS-MgZnO を採用した LED 開発の要素技術として、NiZnO と MgNiZnO による p 型導電性制御に取り組んだ。全ての薄膜で p 型伝導が確認され、1.16×10^{-1}-5.92×10^{1} Ω·cm.の範囲での p 型伝導制御に成功した。

謝　辞

ミスト CVD 成長に関してご助言いただいた京都大学藤田静雄名誉教授、立命館大学金子健太郎教授、工学院大学山口智広教授に感謝申し上げる。RF マグネトロンスパッタに関して協力頂いた工学院大学相川慎也教授に感謝いたします。DFT 計算に協力頂いた東京都立産業技術研究センター(現在 富山県立大学)の太田優一博士に感謝致します。光物性評価に関してご助言頂いた工学院大学本田徹教授に感謝申し上げます。研究遂行にあたり協力してくれた大学院電気・電子工学専攻博士後期課程小川広太郎氏他、学生諸君に感謝致します。本研究の一部は、JSPS 科研費 22K04952 の援助を受けて行われた。

参 考 文 献

［1］Laser Focus World Japan 2018 年 7 月号, p.11.

［2］M. Kneissl and J. Rass, *III-Nitride Ultraviolet Emitters* (Springer International Publishing, Cham, 2016).

［3］K. Kaneko, T. Onuma, K. Tsumura, T. Uchida, R. Jinno, T. Yamaguchi, T. Honda, and S. Fujita, Appl. Phys. Express 9, 111102 (2016).

［4］K. Kaneko, K. Tsumura, K. Ishii, T. Onuma, T. Honda, and S. Fujita, J. Electron. Mater. 47, 8 (2018).

［5］T. Onuma, M. Ono, K. Ishii, K. Kaneko, T. Yamaguchi, S. Fujita, and T. Honda, Appl. Phys. Lett. 113, 061903 (2018).

［6］K. Ishii, M. Ono, K. Kaneko, T. Onuma, T. Honda, and S. Fujita, Appl. Phys. Express 12, 052011 (2019).

［7］M. Ono, K. Ishii, K. Kaneko, T. Yamaguchi, T. Honda, S. Fujita, and T. Onuma, J. Appl. Phys. 125, 225108 (2019).

［8］K. Ohkubo and T. Shigeta, J. Illum. Engng. Inst. Jpn. 83, 87 (1999) [in Japanese].

［9］T. Onuma, K. Kudo, M. Ono, W. Kosaka, K. Shima, K. Ishii, K. Kaneko, Y. Ota, T. Yamaguchi, K. Kojima, S. Fujita, S. F. Chichibu, and T. Honda, J. Appl. Phys. 134, 025102 (2023).

［10］I. Gorczyca, M. Wierzbowska, D. Jarosz, J. Z. Domagala, A. Reszka, D. Le Si Dang, F. Donatini, N. E. Christensen, and H. Teisseyre, Phys. Rev. B 101, 245201 (2020).

［11］K. Ogawa, W. Kosaka, H. Kusaka, K. Kudo, S. Ohno, I. Serizawa, Y. Ota, T. Yamaguchi, T. Honda, K. Kaneko, S. Fujita and T. Onuma, Jpn. J. Appl. Phys. 63, 02SP30 (2024).

有機触媒によるらせん不斉化合物の合成とそれらの抗がん作用の調査

工学院大学先進工学部　生命化学科　安井　英子

慶應義塾大学薬学部　熊谷　直哉

工学院大学先進工学部　生命化学科　大野　修

Synthesis of helically chiral compound by asymmetric organic catalyst and their anticancer activity

Eiko Yasui,　Department of Chemistry and Life Sciences, Kogakuin University

Naoya Kumagai, Faculty of Pharmacy, Keio University

Osamu Ohno, Department of Chemistry and Life Sciences, Kogakuin University

ABSTRACT : In order to synthesize helical compounds, the substrate structures and reaction conditions that facilitate the progress of Fischer indole synthesis were investigated. As a result, it was found that alkylated hydrazines and cyclic ketones facilitated the cyclisation reaction. Based on these results, the synthesis of helical compounds was carried out, but no improvement were found. The method for asymmetric synthesis of helical compounds also needs to be reconsidered. Regarding the cell growth inhibitory activity of the compounds, the helical compounds derived from benzothiophene intermediates were found to be the most active.

１．　はじめに

１．１　ヘリセンについて

芳香環が結合を共有して連なりらせん構造を成す分子をヘリセンという。ベンゼン環のみから成るヘリセンのうち、室温でも安定なエナンチオマーとして存在できるものは、ベンゼン環が 6 個結合した[6]－ヘリセンである。らせん構造の巻き方を区別するには、右巻き（*P*）か左巻き（*M*）かを判別する。右回りに回転しながら進行方向に進むものを右巻き（*P*）、左回りに回転しながら進行方向に進むものを左巻き（*M*）という（Fig. 1）。

近年、ベンゼン環以外の複素芳香環を連結させたヘテロヘリセンの合成研究も盛んに行われており、そのうち硫黄原子を有するチオフェン環を含むヘリセン **1** は、DNA のテロメアに結合して複製を阻害するため、抗がん剤となる可能性があることが報告されている。[1] このヘリセン **1** は、右巻きのもの（***P*-1**）と左巻きのもの（***M*-1**）とでは活性が異なり、左巻きのみがテロメア阻害活性を阻害する（Fig. 2）。

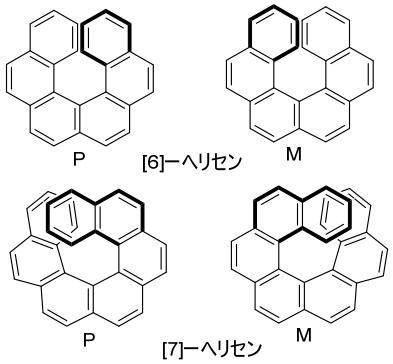


Fig. 1) [6]－ヘリセン

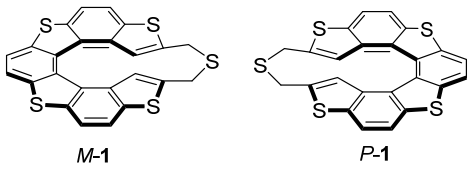
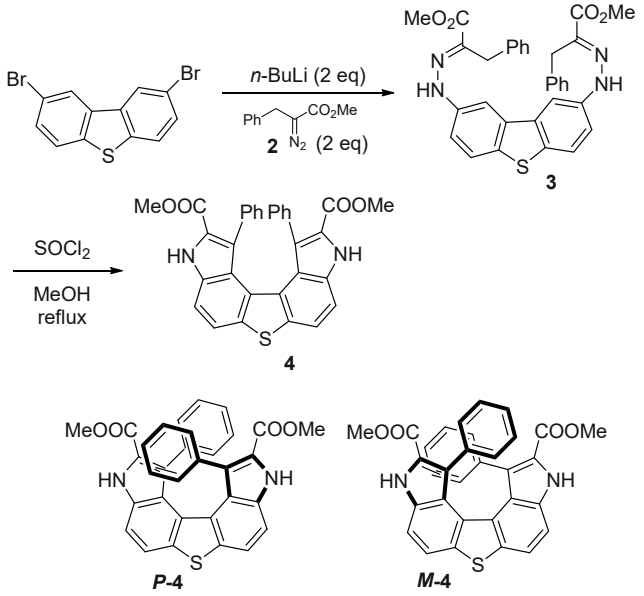


Fig. 2) 杉山らが合成したヘテロヘリセン

１．２　これまでの研究状況

これまでに、らせん状化合物 **4** の合成を行い、分割してエナンチオマーを得た後に、両異性体の細胞増殖阻害活性を調査した。すなわち、2,8－ジブロモジベンゾチオフェンを 2 当量の *n*－ブチルリチウムでリチオ化した後に、2 当量のジアゾエステル **2** を付加して化合物 **3** を得た。これを酸性条件下に加熱してらせん状構造を有する環化体 **4** を合成した。**4** はキラルカラムを用いて分割し、それぞれのエナンチオマーとして得た。



Scheme 1) らせん状化合物の合成

本研究の目的の 1 つは、らせん状化合物 **4** を不斉合成することである。別途合成した不斉触媒を用いた不斉合成を検討したが、今のところ達成できていない。

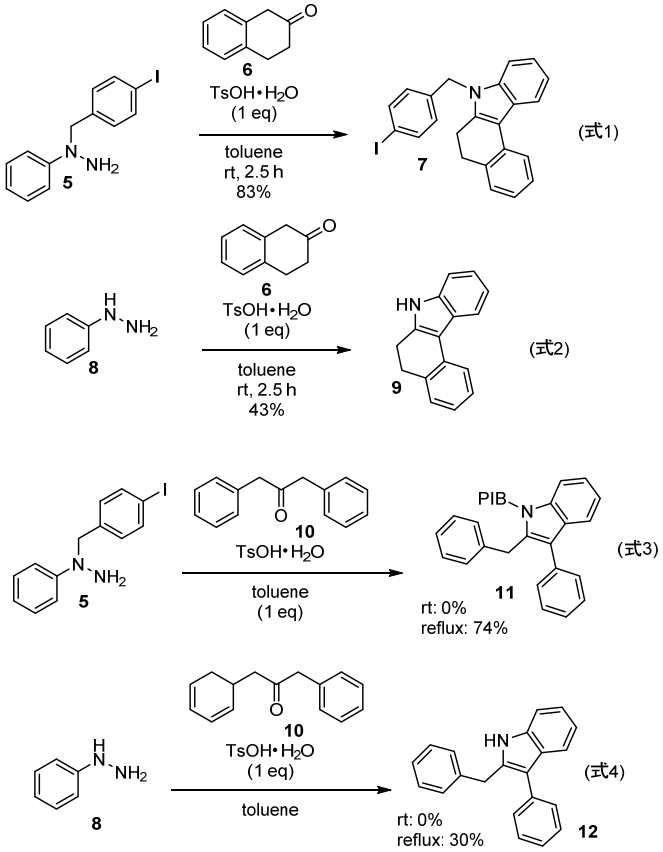
また、合成したらせん状化合物の細胞増殖阻害活性を評価することがもう 1 つの目的であり、その活性が **(+)-4** と **(-)-4** 間で差があることが分かっている。

２．　らせん状化合物の環化条件の検討

２．１　Fischer インドール合成の基質構造と反応条件の検討

現段階で環化の際に不斉収率が上がらない原因として、強い酸を当量以上用い、高温で加熱しないと環化が進行しないためであると考えた。そこで、酸の量を減らし、かつできるだけ低い温度で Fischer インドール合成を行う条件を検討した。

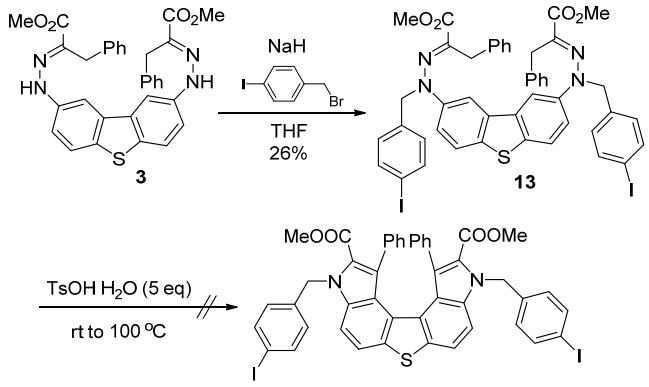
パラヨードベンジル化したフェニルヒドラジン **5** と、環状ケトンであるβ－テトラロン **6** を 1 当量のトシル酸とともに室温で反応させたところ、収率 83%で環化体が得られた（Scheme 2、式 1)。フェニルヒドラジン **8** とβ－テトラロン **6** を同様の条件で反応させたところ、環化体 **9** の収率は 43%であった（Scheme 2、式 2)。つぎに、パラヨードベンジルフェニルヒドラジン **5** と鎖状ケトン **10** を 1 当量のトシル酸とともに反応させたところ、室温では全く環化が進行せず、加熱還流下で環化体 **11** が生成した（74%、Scheme 2、式 3)。フェニルヒドラジン **8** とケトン **10** では、加熱しても環化体 **12** の収率は 30%であった（Scheme 2、式 4)。これらの結果から、Fischer インドール合成ではアルキル化したフェニルヒドラジンと環状ケトンを用いると、穏やかな条件で環化が進行することが分かった。



Scheme 2) Fischer インドール合成の基質構造と反応条件の検討

２．２　基質構造の変換①　パラヨードベンジル化

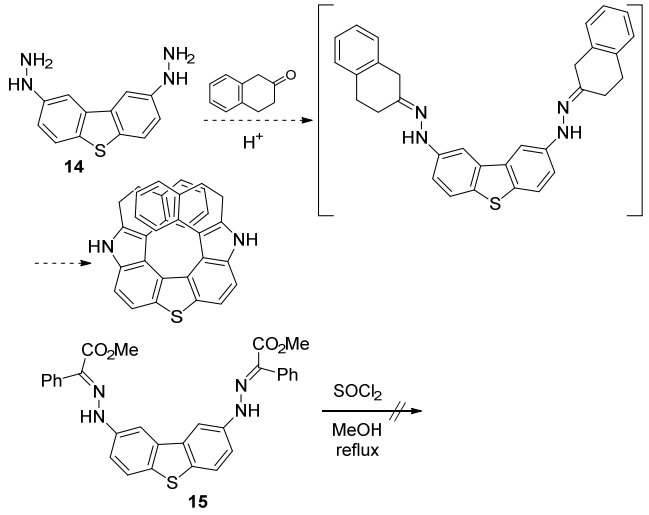
単純な化合物を用いた検討（Scheme 2）において、アリールヒドラジンのアルキル化は、環化を起こしやすくするために有効であることが分かったため、化合物 **3** をパラヨードベンジル化して環化を行った。しかし、トシル酸を 5 当量用いて加熱しても、環化は全く進行しなかった（Scheme 3)。



Scheme 3) パラヨードベンジル化の効果

２．３　基質構造の変換②　アリールヒドラジンの合成

単純な化合物を用いた検討（Scheme 2）において、環状ケトンを用いると環化が進行しやすくなることが分かった。そこで、ベンゾチオフェン環を有するヒドラジン **14** を合成することができれば、環状ケトンと環化させることができるため、環化しやすくなると期待できる。しかし、ヒドラゾンの加溶媒分解を検討したが、目的のヒドラジンを得ることができなかった（Scheme 4）。



Scheme 4) ヒドラジン合成の検討

２．４　基質構造の変換③　エステル部位の変換

末端エステルの構造を変換することで環化の起こりやすさに変化が見られるかを検討した。カルボン酸 16、アミド 17、アルコール 18 を合成して環化を行ったが、いずれも環化は進行しなかった（Fig. 3）。

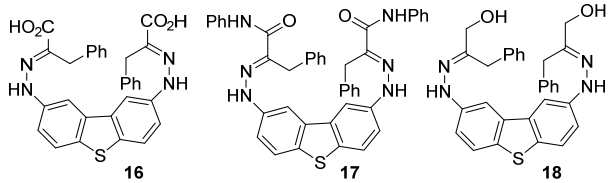


Fig. 3) 末端エステルの構造変換

３　らせん状化合物の細胞増殖阻害活性

ベントチオフェン環をもつ化合物(+)および(-)－**4**、ベンゾフラン環をもつ化合物(+)および(-)－**19**、**20**、**21** について、細胞増殖阻害活性を HeLa 細胞を用いて評価した。らせん状化合物は、キラルカラムを用いてそれぞれの異性体に分割して用いた。その結果、ベンゾフラン環よりもベンゾチオフェン環の方が阻害活性が強く、旋光度が(+)の化合物の方が、(-)のものよりも活性が強かった。また、構造が直線状に近づくほど、活性が低下した。

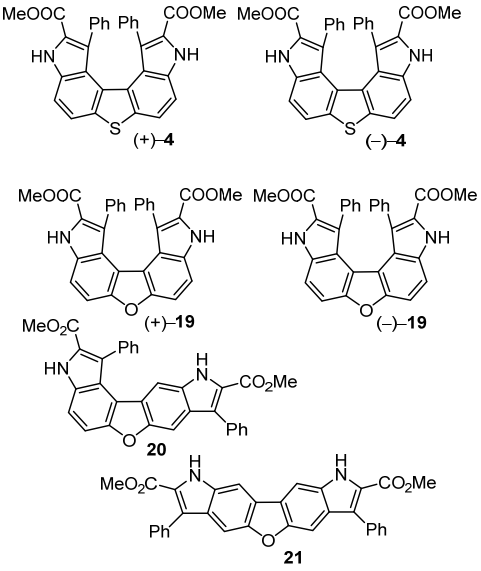
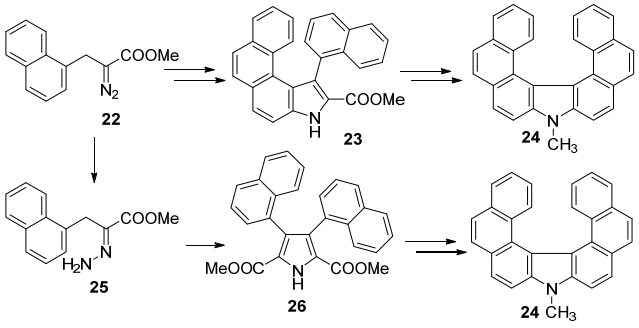


Fig. 4) 細胞増殖阻害活性を評価したサンプル

ところで、著者の研究室では近年 *N*－メチル－Aza[7]ヘリセン **24** の合成法を確立し、この両エナンチオマーの細胞増殖阻害活性について、HeLa 細胞を用いて調査している（Scheme 5、6）。[2]その結果、旋光度が(+)を示した化合物 **24** のほうが、旋光度が(-)を示した化合物 **24** よりも活性が強い、という結果であった。化合物 **4** と化合物 **24** では、どちらも旋光度が(+)のエナンチオマーのほうが、旋光度が(-)のものよりも細胞増殖阻害活性が強い、という点が共通している。旋光度の符号が同じだからといって、ヘリセンの巻き方が同じであるとは現段階で述べることができないが、らせん構造をとる化合物のエナンチオマー間で活性に違いがでることは共通しているといえる。



Scheme 5) *N*-メチル-アザ[7]－ヘリセンの合成

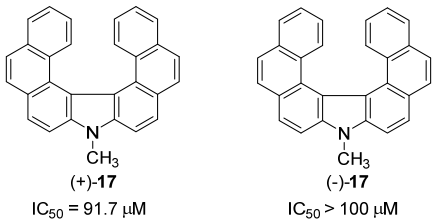


Fig. 5) *N*-メチル-アザ[7]ーヘリセンの活性評価

４．まとめ

らせん状化合物を合成するために、Fischer インドール合成が進行しやすくなる基質構造および反応条件を検討した。その結果、アルキル化したヒドラジンと環状ケトンを用いると環化反応が進行しやすいことが分かった。この結果をもとにらせん状化合物の合成を行ったが、改善策を見出すにはいたらなかった。らせん状化合物の不斉合成についても、その方法を再考する必要がある。化合物の細胞増殖阻害活性については、ベンゾチオフェン環由来のらせん状化合物が最も活性が強いことを確認できた。

参 考 文 献

（１）A Chiral Wedge Molecule Inhibits Telomerase Activity; Ken-ichi Shinohara, Yuta Sannohe, Shuji Kaieda, Ken-ichi Tanaka, Hideji Osuga, Hidetoshi Tahara, Yan Xu, Takashi Kawase, Toshikazu Bando, and Hiroshi Sugiyama *J. Am. Chem. Soc*., **2010**, *132*, 3778-3782.

（２）Synthesis of Azahelicenes via Friedel-Crafts-Type Ring-Closing Reaction of Axially Chiral Compounds; Sonau Oikawa, Yuki Utsugi, Osamu Ohno, Eiko Yasui *Asian J. Org. Chem.*, **2024**, 202400128.

ほ乳類キチナーゼの活性化とキトオリゴ糖の医療研究への展開

工学院大学　先進工学部　生命化学科　小山文隆

東京薬科大学 薬学部 免疫学教室　安達 禎之，山中　大輔

東京工科大学　応用生物学部　木村　将大

Activation of Mammalian Chitinase and Application of Chitooligosaccharides into Biomedical Research Field

Fumitaka Oyama: Department of Chemistry and Life Science, School of Advanced Engineering, Kogakuin University

Yoshiyuki Adachi and Daisuke Yamanaka: Laboratory for Immunopharmacology of Microbial Products, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Masahiro Kimura: School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology

ABSTRACT : YKL-40 is a protein similar to chitotriosidase (CHIT1), an active chitinase, but, in contrast to CHIT1, it lacks chitinase activity. Since YKL-40 is increased in inflammatory disorders and cancer, it has been used as a diagnostic marker. Elucidation of the biochemical properties of YKL-40 may lead to elucidating the causes of diseases and establishing treatments. Here, we report that YKL-40 has lost its ability to degrade chitin while maintaining its structural frame with affinity to chitin. The lack of chitinase activity in YKL-40 has been generally attributed to amino acid substitutions in the catalytic motif. Therefore, we first attempted to activate YKL-40 by introducing A138D and L140E mutations at this motif generating mutant YKL-40 (MT-YKL-40). However, this intervention did not lead to the activation of the protein. Next, we aimed to locate the exons responsible for the YKL-40 inactivation by creating various chimeras between the MT-YKL-40 and CHIT1. Introducing YKL-40 exons 3, 6, or 8 into CHIT1 led to enzyme inactivation. In reverse, introducing CHIT1 exons 3, 6, and 8 into MT-YKL-40 led to its activation. Interestingly, all mutant and chimeric proteins were able to bind chitin. Our data indicate that the lack of enzymatic activity in YKL-40 resulted from a massive change of sequence throughout the molecule rather than from sporadic amino acid mutations. The exact roles of YKL-40 still need to be fully understood, but our observations suggest that even though YKL-40 lacks chitinase activity, it maintains its structural frame with affinity to chitin.

1. はじめに

キチンは、β-1, 4-結合によって連結された *N*-アセチル-D-グルコサミン単位のポリマーであり、甲殻類や昆虫の外骨格、寄生線虫のミクロフィラリア鞘、真菌類の細胞壁の構造成分である[1-3]。キチナーゼは、キチンのβ-1、4 グリコシド結合を加水分解する[1, 3, 4]。ほ乳類はキチンを合成しないが、キチナーゼを合成している。ヒトとマウスでは、それぞれキトトリオシダーゼ (Chit1) と酸性キチナーゼ (Chia) の 2 種類のキチナーゼが発現している [5-8]。

キチナーゼ様タンパク質 (CLP) はキチナーゼに似ているが、キチナーゼ活性はない [3, 4, 9, 10]。CLP mRNA、タンパク質レベルの増加は、多くの炎症性疾患で報告されている [1, 4]。マウスは BRP-39 (Chi3l1)、Ym1 (Chl3)、

および Ym2 (Chil14) を発現するが、ヒトは YKL-40 (CHI3L1) および YKL-39 (CHI3L2) を発現する [11-17]。

YKL-40 は、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、炎症性腸疾患 (IBD)、アルコール性肝硬変、アルツハイマー病、およびがんで発現レベルが増加する [18-28]。したがって、YKL-40 は診断マーカーとして有望で、その病態生理学的役割が理解されると、これらの疾患の治療標的になる可能性がある [3]。

YKL-40 は、病原体に対する防御、抗原誘発性および虚血性損傷応答、炎症、および組織修復において重要な役割を果たす [29, 30]。さらに、YKL-40 は、アポトーシス、インフラマソーム活性化、酸化損傷、ECM 調節、M2 マクロファージ分化、Th1/Th2 炎症バランス、TGF-β1 発現、樹状細胞 (DC) 蓄積など、いくつかの生物学的プロセスを調節する。これらのプロセスの多くは、インターロイキン 13 受容体サブユニット α2 (IL-13Rα2) 依存性メカニズムを介して媒介されるため、YKL-40 はこれらの傷害に対する細胞および組織の応答において重要な役割を果たすことが報告されている [31, 32]。YKL-40 は、膜貫通タンパク質 219 (TMEM219)、ガレクチン 3 (Gal-3)、CD44、ヘパリン、およびキチンと相互作用することも示されている [11, 33-39]。したがって、YKL-40 の生物学的機能と作用メカニズムは研究されているが、その役割と相互作用のほとんどはまだ完全には解明されていない [3]。

ほ乳類のキチナーゼと CLP は、グリコシル加水分解酵素のファミリー18 に属する [9, 10, 40, 41]。YKL-40 と CHIT1 の触媒ドメイン (CatD) の間のアミノ酸配列の同一性と類似性は、それぞれ 53%、71% だが、YKL-40 にはキチナーゼ活性がない。これは一般に、活性キチナーゼ (D138、E140) のアミノ酸置換と比較して、触媒モチーフの YKL-40 (A138、L140) のアミノ酸置換が主な原因であると考えられてきた [4, 9, 10, 42, 43]。YKL-40 の生化学的性質の解明は、関連する疾患の原因解明や治療法の確立につながる。

今回の研究の目的は、YKL-40 のキチナーゼ活性の喪失の原因を特定することである。この目的のため、YKL-40 の触媒モチーフにアミノ酸変異を導入し、続いて YKL-40 と CHIT1 CatD 配列から構成されるキメラタンパク質を評価した。

2. 実験材料と方法

2.1 大腸菌での YKL-40 ベクターの構築

ヒト YKL-40 は、以前に報告されたように [44]、KOD Plus DNA ポリメラーゼと、BamHI および XhoI の認識部位をアンカーとするオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、マウス肺組織の cDNA から PCR により増幅した。増幅された cDNA を BamHI および Xhol で切断し、pET22b/protein A-サル AMCase-V5-His [45] の同じ部位にクローニングした。得られたプラスミド DNA (pET22b/YKL-40/V5-His) の塩基配列を確認した。MT-YKL-40 および MT-YKL-40-CHIT1 CatD キメラは、プライマー伸長法を用いた突然変異導入法で構築した [46]。

2.2 大腸菌で発現した組換え CHIT1 および YKL-40

E. coli から Protein A-CHIT1-V5-His および Protein A-YKL-40-V5-His の調製と精製を、Ni Sepharose を用いて、既報に従って行った [44]。

2.3 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロット

タンパク質分画は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を使用して分離し、続いて、抗 V5-HRP モノクローナル抗体を使用したウェスタンブロットで解析した。イムノブロットは、製造業者の指示に従って、イメージアナライザー (ImageQuant LAS 4000) を使用して分析および定量した。

2.4 キチナーゼ活性測定

キチナーゼ活性は、合成基質 4-MU β-D- *N, N'*-ジアセチルキトビオシド (シグマアルドリッチ) を McIlvaine バッファー (0.1 M クエン酸および 0.2 M Na_2HPO_4; pH 2.0, 5.0, 7.0) で、37° C で 30 分間インキュベートした [47]。放出された 4-MU の蛍光は、励起波長 365 nm、蛍光波長 415-445 nm で、GloMax® Discover System GM3000 (プロメガ) を使用して測定した。

2.5 キチン結合活性測定

キチン結合活性測定は、既報に従って行った [48, 49]。キチンビーズカラムカラムの平衡化は、McIlvaine バッファー (pH 7.0) および 0.5 M NaCl を使用して行い、結合したタンパク質は、8 M 尿素 / 2%-SDS / 2.5% 2-メルカプトエタノール溶液で溶出した。ウェスタンブロットで解析した。

3. 結果と考察

3.1 触媒モチーフの A138D および L140E 置換で YKL-40 は活性化しない

ファミリー 18 キチナーゼの触媒作用における触媒モチーフは DXXDXDXE である (図 1A) [9, 10, 40, 41]。一般に、このモチーフ内の 138 位と 140 位のアミノ酸変異が YKL-40 のキチナーゼ活性を決めていると考えられてきた。我々は、アミノ酸置換 A138D および L140E を導入することにより、YKL-40 の変異型 (MT-YKL-40) を調製した (図 1A)。ヒト CHIT1 CatD、WT-YKL-40、および MT-YKL-40 は、大腸菌を使用して Protein A および V5-His タグを含む融合タンパク質として発現した [47]。これらの組換えタンパク質のキチナーゼ活性を比較するために、蛍光発生基質 4-メチルウンベリフェリル *N, N'*-ジアセチル-β-D-キトビオシド [4-MU-$(GlcNAc)_2$]

を異なる pH で反応させた [46, 47]。

CHIT1 CatD は、pH 5.0 および 7.0 で活性が高く、pH 2.0 では活性が非常に低かった [50]。対照的に、WT-および MT-YKL-40 は、どの pH 条件でもキチン分解活性を示さなかった（図 1B)。次に、基質分解の欠如が、組換え YKL-40 タンパク質がキチンと相互作用できないために引き起こされる可能性を検討した。内因性 YKL-40 のキチンへの結合は報告されていた [38]。我々も WT-YKL-40 と MT-YKL-40 の両方がキチンに結合することを確認した(図 1C)。以上の結果は、YKL-40 におけるキチナーゼ活性の欠如は、保存された触媒モチーフにおける単純なアミノ酸置換によるものではないことを示唆していた。これらの結果は、YKL-40 の不活性化に関与する他の原因領域の存在を示していた（図 1D)。

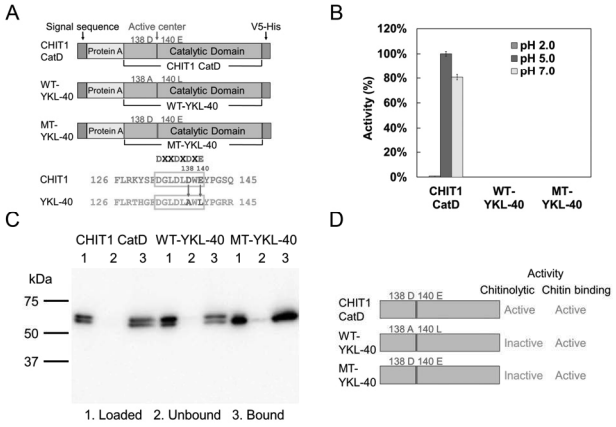


図 1. YKL-40 へのアミノ酸置換 A138D および L140E の導入. (A) 大腸菌で発現した CHIT1 CatD、WT-YKL-40、および MT-YKL-40 融合タンパク質の模式図。WT-YKL-40 に A138D および L140E を導入することで MT-YKL-40 を構築した。アミノ酸配列の色分け：ピンク、CHIT1 CatD；青、YKL-40 配列。(B) 蛍光基質を使用した組換えタンパク質のキチナーゼ活性の異なる pH 条件下での比較。グラフの色：pH 2.0、青；pH 5.0、赤；pH 7.0、黄。値は相対活性として表示した。エラーバーは、3 回の繰り返しを行った単一実験の平均±SD を表している。(C) キチンビーズに対するリコンビナントタンパク質の結合の分析。pH 7.0 の条件下で得られた結果を示した。SDS-PAGE で結合タンパク質を分離し、ウェスタンブロットで分析した。レーン 1、ロードサンプル；レーン 2、非結合分画；レーン 3、結合分画。(D) 図 1B および C の結果の要約。

3.2 YKL-40 キチナーゼ活性の喪失は、分子の複数の領域の変化によって引き起こされる

YKL-40 の不活性化に関与する領域を決定するために、MT-YKL-40（不活性）および CHIT1 CatD（活性）に基づくいくつかのキメラタンパク質を構築した（図 2A)。MT-YKL-40 に CHIT1 CatD exon 8-10 を導入したキメラ C1 は完全に不活性であった。YKL-40 exons 3 および 4 を有するキメラ C2 も活性を示さなかった。

対照的に、CHIT1 CatD exons 3-7 および YKL-40 exons 8-10 を持つキメラ C3 は、Chit1 CatD と比較してキチナーゼ活性が低かったが、pH 5.0 で CHIT1 CatD の 28%、pH 7.0 で 13%のキチナーゼ活性を示した。CHIT1 CatD exon 3 および 4 を持つキメラ C4 では、非常に低いが検出可能なキチン分解活性を示した（pH 5.0 で CHIT1 CatD の 1.5%、pH 7.0 で 0.4%)(図 2B)。したがって、exons 3 と 4 の変化が YKL-40 の不活性化の主な原因であると思われた。同時に、exons 5-10 の変化もキチン分解活性の喪失に寄与している可能性が示された（図 2B)。

不活化における exons 5-7 の関与を解明するために、MT-YKL-40 の exons 5-7 を CHIT1 CatD（キメラ C5）に置き換えられたキメラ、または CHIT1 CatD の exons 5-7 が MT-YKL-40 に置き換えられたキメラ(C6)をさらに構築した(図 2C)。キメラ C5 は不活性のままであり、exons 5-7 がキチナーゼ活性を部分的にしか制御していないことを示唆していた。一方、C6 では、MT-YKL-40 の exons 5-7 が CHIT1 CatD を完全に不活性化した（図 2D)。これらの結果は、キチナーゼ活性を不活性化する原因領域が YKL-40 分子全体に存在することを示唆している。

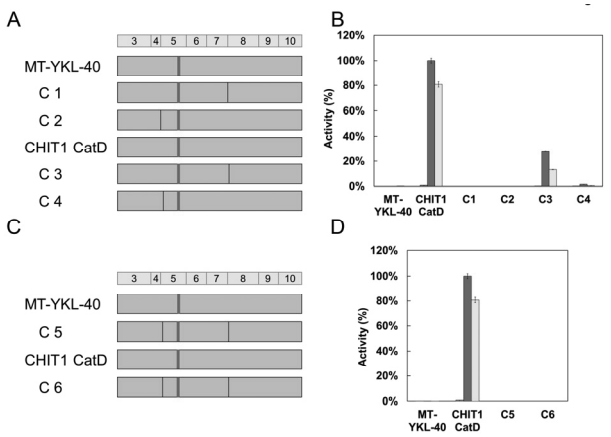


図 2. キメラ体を用いた MT-YKL-40 の不活性化原因の特定. (A) MT-YKL-40 と WT-CHIT1 CatD キメラタンパク質（C1-C4）の模式図。CHIT1 CatD と MT-YKL-40 のコーディング領域は exons 3-10 で構成される。各 exon のサイズはキメラの模式図の上に示した。アミノ酸配列は色分け：ピンク、CHIT1 CatD；青、YKL-40。(B) 異なる pH 条件下での MT-YKL-40-CHIT1 CatD キメラタンパク質（C1-C4)、MT-YKL-40 および CHIT1 CatD のキチナーゼ活性。(C) MT-YKL-40-CHIT1 CatD キメラ（C5 および C6）の模式図。(D) C5 および C6 のキチン分解活性の比較。

3.3 YKL-40 exon の CHIT1 活性抑制への寄与

主要な不活性化効果を持つ exon を特定するために、CHIT1 CatD の個々の exon を対応する YKL-40 に置き換えたキメラ C7-C14 を作製した（図 3A)。Exons 3（C7)、6（C10)、および 8（C12）の置換により、キチン分解活性がほぼ完全に失われた（pH 5.0 での CHIT1 CatD 活性の 1.5% 未満)。Exons 7（C11）および 10（C14）の置換は、pH 5.0 でそれぞれ 32% および 14% 以上の活性の低下をもたらした。CHIT1 CatD の exons 4、5、および 9 がそれぞれ YKL-40 に置換された C8、C9、および C13 は、多少の減少はあるものの、キチナーゼ活性を保持していた（図 3B)。

次に、これらのタンパク質のキチンへの親和性を調べた。すべてのキメラ体が基質に結合できた(図 3C)。これらの結果は、YKL-40 の exons 3、6、および 8 を CHIT1 に導入したキメラタンパク質は不活性化するが、キチンに結合することを示す（図 3D)。

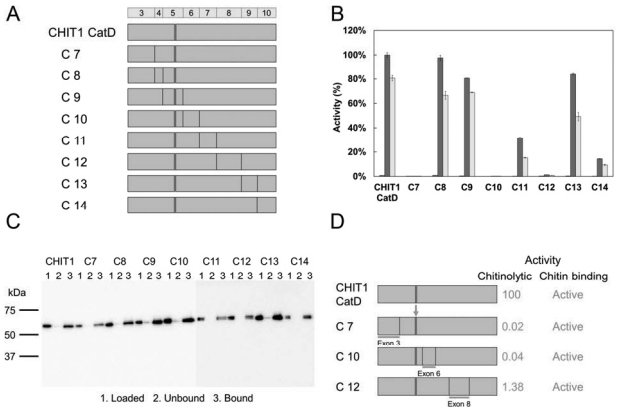


図 3. YKL-40 分子のほとんど全域が CHIT1 のキチナーゼ活性を抑制する. (A) MT-YKL-40-CHIT1 CatD キメラ (C7-C14) の模式図。(B) C7-C14 のキチン分解活性の比較。(C) キチンビーズに対する組換えタンパク質の結合分析。pH 7.0 の条件下で得られた結果である。SDS-PAGE で結合したタンパク質を分離し、ウェスタンブロット法で分析した。レーン 1、ロードサンプル；レーン 2、非結合分画；レーン 3、結合分画。

3.4 YKL-40 の活性化

MT-YKL-40 を活性化するために、A138D および L140E 置換と CHIT CatD exons 3、6、および 8 置換を含むキメラタンパク質 (C15) を作成した (図 4A)。このタンパク質の活性は、pH 5.0 で CHIT1 CatD の活性の約 49% だった (図 4B)。注目すべきは、キメラ C15 がキチンと結合したことである (図 4C)。キチナーゼ活性に大きな影響を与えることが示されている配列を置換することにより、CHIT1 CatD の約 49% の YKL-40 の活性化があった。この事は、YKL-40 がタンパク質のいくつかの部分のみを交換するだけでは完全に活性化できないことを示している (図 4D)。

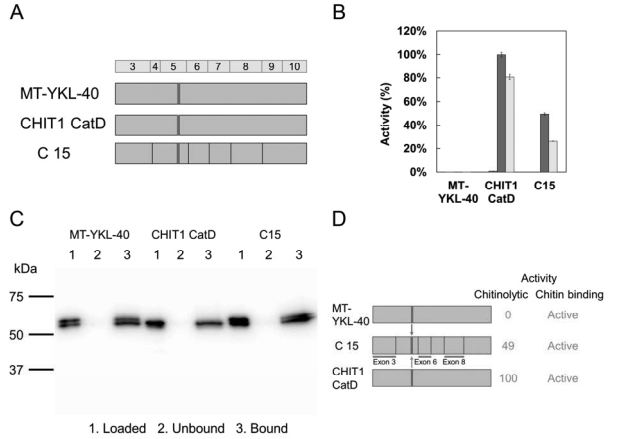


図 4. YKL-40 の活性化. (A) MT-YKL-40-CHIT1 CatD キメラ (C15) の模式図。(B) C15 のキチン分解活性の比較。(C) キチンビーズに対するリコンビナントタンパク質の結合分析。レーン 1、ロードサンプル；レーン 2、非結合分画；レーン 3、結合分画。(D) 図 4B および C の結果の要約。

3.5 YKL-40 はキチンへの結合を維持するが、キチン分解活性を失っている

ここで、YKL-40 の不活性化の原因は、a) 触媒残基、b) exons 3、6、および 8 のアミノ酸置換であることを示した。さらに、c) exons 7 および 10 のアミノ酸置換が関与していることを示した。さらに、キチン結合実験を行い、WT-および MT-YKL-40、ならびに CHIT1 CatD および YKL-40 のキメラタンパク質がキチンを認識して強く結合することを見出した。これらの結果は、YKL-40 がほ乳類のキチナーゼとしてのフレームを維持し、キチンを認識するが、キチン分解活性の機能のみを失っていることを示唆している (図 5)。

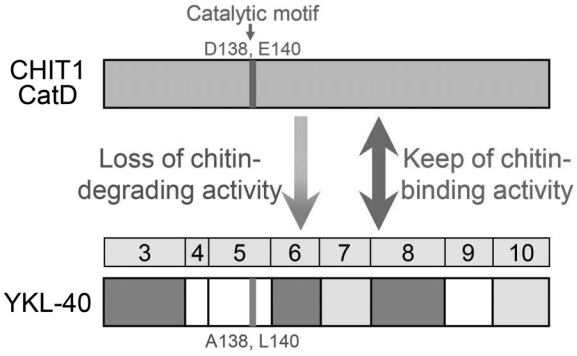


図 5. ヒト YKL-40 のキチン結合能とキチナーゼ活性の喪失. YKL-40 の不活性化の主要な原因は、i) exon 5 の触媒残基 (青線) および ii) exons 3、6、8 (青ボックス) でのアミノ酸置換であった。さらに、iii) exon 7 および 10 でのアミノ酸置換も弱く関与していた (薄青ボックス)。触媒モチーフの位置を赤い矢印で示した。CHIT1 の触媒モチーフ (D138, E140) とそのアミノ酸置換 (A138, L140) は、それぞれ赤と青で示した。CHIT1 CatD と YKL-40 cDNA 間で保存されている exon を黄色いボックスで示した。

YKL-40 と CHIT1 CatD は良く似ており、コード領域は exons 3-10 である。しかし、YKL-40 はキチンを認識して強く結合するが、キチン分解活性は検出できない。したがって、YKL-40 はアミノ酸残基の置換の導入でキチナーゼとしての機能を失い、進化的に不活性化された分子であることを示している。

YKL-40 が意図的に機能を失った分子である場合、キチナーゼとして機能する必要はないと考える。YKL-40 は非常に多くの疾患で過剰発現しているので、YKL-40 の構造フレームにはキチナーゼ以外の明確な役割があると考えられる。しかし、その役割は不明な点が多く、その解明は医学の進歩に貢献するだろう。この研究で報告された YKL-40 の不活化領域は、さまざまな疾患や生体内での YKL-40 の役割の解明に役立つ可能性がある[51]。

参 考 文 献

1. Bueter, C. L., Specht, C. A. & Levitz, S. M. (2013) Innate sensing of chitin and chitosan, *PLoS Pathog.* **9**, e1003080.

2. Wysokowski, M., Petrenko, I., Stelling, A. L., Stawski, D., Jesionowski, T. & Ehrlich, H. (2015) Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics, *Polymers.* **7**, 235-265.

3. Van Dyken, S. J. & Locksley, R. M. (2018) Chitins and chitinase activity in airway diseases, *J Allergy Clin Immunol.* **142**, 364-369.

4. Lee, C. G., Da Silva, C. A., Dela Cruz, C. S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M. J., He, C. H., Takyar, S. & Elias, J. A.

(2011) Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury, *Annu Rev Physiol.* **73**, 479-501.
5. Hollak, C. E., van Weely, S., van Oers, M. H. & Aerts, J. M. (1994) Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease, *J Clin Invest.* **93**, 1288-92.
6. Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E. & Aerts, J. M. (1995) Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins, *J Biol Chem.* **270**, 2198-202.
7. Boot, R. G., Renkema, G. H., Strijland, A., van Zonneveld, A. J. & Aerts, J. M. (1995) Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages, *J Biol Chem.* **270**, 26252-6.
8. Boot, R. G., Blommaart, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A. & Aerts, J. M. (2001) Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase, *J Biol Chem.* **276**, 6770-8.
9. Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. & Boot, R. G. (2007) Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases, *Genetics.* **177**, 959-70.
10. Kawada, M., Hachiya, Y., Arihiro, A. & Mizoguchi, E. (2007) Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions, *Keio J Med.* **56**, 21-7.
11. Hakala, B. E., White, C. & Recklies, A. D. (1993) Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family, *J Biol Chem.* **268**, 25803-10.
12. Rehli, M., Krause, S. W. & Andreesen, R. (1997) Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation, *Genomics.* **43**, 221-5.
13. Webb, D. C., McKenzie, A. N. & Foster, P. S. (2001) Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: identification of a novel allergy-associated protein, *J Biol Chem.* **276**, 41969-76.
14. Ward, J. M., Yoon, M., Anver, M. R., Haines, D. C., Kudo, G., Gonzalez, F. J. & Kimura, S. (2001) Hyalinosis and Ym1/Ym2 gene expression in the stomach and respiratory tract of 129S4/SvJae and wild-type and CYP1A2-null B6, 129 mice, *Am J Pathol.* **158**, 323-32.
15. Sun, Y. J., Chang, N. C., Hung, S. I., Chang, A. C., Chou, C. C. & Hsiao, C. D. (2001) The crystal structure of a novel mammalian lectin, Ym1, suggests a saccharide binding site, *J Biol Chem.* **276**, 17507-14.
16. Chang, N. C., Hung, S. I., Hwa, K. Y., Kato, I., Chen, J. E., Liu, C. H. & Chang, A. C. (2001) A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin, *J Biol Chem.* **276**, 17497-506.
17. Jin, H. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Kirkpatrick, R. B. & Rosenberg, M. (1998) Genetic characterization of the murine Ym1 gene and identification of a cluster of highly homologous genes, *Genomics.* **54**, 316-22.
18. Letuve, S., Kozhich, A., Arouche, N., Grandsaigne, M., Reed, J., Dombret, M. C., Kiener, P. A., Aubier, M., Coyle, A. J. & Pretolani, M. (2008) YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages, *J Immunol.* **181**, 5167-73.
19. Hector, A., Kormann, M. S., Mack, I., Latzin, P., Casaulta, C., Kieninger, E., Zhou, Z., Yildirim, A. O., Bohla, A., Rieber, N., Kappler, M., Koller, B., Eber, E., Eickmeier, O., Zielen, S., Eickelberg, O., Griese, M., Mall, M. A. & Hartl, D. (2011) The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease, *PLoS One.* **6**, e24399.
20. Johansen, J. S., Stoltenberg, M., Hansen, M., Florescu, A., Horslev-Petersen, K., Lorenzen, I. & Price, P. A. (1999) Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity, *Rheumatology (Oxford).* **38**, 618-26.
21. Bernardi, D., Podswiadek, M., Zaninotto, M., Punzi, L. & Plebani, M. (2003) YKL-40 as a marker of joint involvement in inflammatory bowel disease, *Clin Chem.* **49**, 1685-8.
22. Koutroubakis, I. E., Petinaki, E., Dimoulios, P., Vardas, E., Roussomoustakaki, M., Maniatis, A. N. & Kouroumalis, E. A. (2003) Increased serum levels of YKL-40 in patients with inflammatory bowel disease, *Int J Colorectal Dis.* **18**, 254-9.
23. Vind, I., Johansen, J. S., Price, P. A. & Munkholm, P. (2003) Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease, *Scand J Gastroenterol.* **38**, 599-605.
24. Chupp, G. L., Lee, C. G., Jarjour, N., Shim, Y. M., Holm, C. T., He, S., Dziura, J. D., Reed, J., Coyle, A. J., Kiener, P., Cullen, M., Grandsaigne, M., Dombret, M. C., Aubier, M., Pretolani, M. & Elias, J. A. (2007) A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma, *N Engl J Med.* **357**, 2016-27.
25. Vos, K., Steenbakkers, P., Miltenburg, A. M., Bos, E., van Den Heuvel, M. W., van Hogezand, R. A., de Vries, R. R., Breedveld, F. C. & Boots, A. M. (2000) Raised human cartilage glycoprotein-39 plasma levels in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions, *Ann Rheum Dis.* **59**, 544-8.
26. Johansen, J. S., Moller, S., Price, P. A., Bendtsen, F., Junge, J., Garbarsch, C. & Henriksen, J. H. (1997) Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis?, *Scand J Gastroenterol.* **32**, 582-90.
27. Johansen, J. S., Cintin, C., Jorgensen, M., Kamby, C. &

Price, P. A. (1995) Serum YKL-40: a new potential marker of prognosis and location of metastases of patients with recurrent breast cancer, *Eur J Cancer.* **31A**, 1437-42.
28. Cintin, C., Johansen, J. S., Christensen, I. J., Price, P. A., Sorensen, S. & Nielsen, H. J. (1999) Serum YKL-40 and colorectal cancer, *Br J Cancer.* **79**, 1494-9.
29. Dela Cruz, C. S., Liu, W., He, C. H., Jacoby, A., Gornitzky, A., Ma, B., Flavell, R., Lee, C. G. & Elias, J. A. (2012) Chitinase 3-like-1 promotes Streptococcus pneumoniae killing and augments host tolerance to lung antibacterial responses, *Cell host & microbe.* **12**, 34-46.
30. Schmidt, I. M., Hall, I. E., Kale, S., Lee, S., He, C. H., Lee, Y., Chupp, G. L., Moeckel, G. W., Lee, C. G., Elias, J. A., Parikh, C. R. & Cantley, L. G. (2013) Chitinase-like protein Brp-39/YKL-40 modulates the renal response to ischemic injury and predicts delayed allograft function, *J Am Soc Nephrol.* **24**, 309-19.
31. He, C. H., Lee, C. G., Dela Cruz, C. S., Lee, C. M., Zhou, Y., Ahangari, F., Ma, B., Herzog, E. L., Rosenberg, S. A., Li, Y., Nour, A. M., Parikh, C. R., Schmidt, I., Modis, Y., Cantley, L. & Elias, J. A. (2013) Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor alpha2, *Cell reports.* **4**, 830-41.
32. Xu, N., Bo, Q., Shao, R., Liang, J., Zhai, Y., Yang, S., Wang, F. & Sun, X. (2019) Chitinase-3-like-1 promotes M2 macrophage differentiation and induces choroidal neovascularization in neovascular age-related macular degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **60**, 4596-4605.
33. Lee, C. M., He, C. H., Nour, A. M., Zhou, Y., Ma, B., Park, J. W., Kim, K. H., Dela Cruz, C., Sharma, L., Nasr, M. L., Modis, Y., Lee, C. G. & Elias, J. A. (2016) IL-13Ralpha2 uses TMEM219 in chitinase 3-like-1-induced signalling and effector responses, *Nat Commun.* **7**, 12752.
34. Zhou, Y., He, C. H., Yang, D. S., Nguyen, T., Cao, Y., Kamle, S., Lee, C. M., Gochuico, B. R., Gahl, W. A., Shea, B. S., Lee, C. G. & Elias, J. A. (2018) Galectin-3 interacts with the CHI3L1 axis and contributes to Hermansky-Pudlak Syndrome Lung Disease, *J Immunol.* **200**, 2140-2153.
35. Geng, B., Pan, J., Zhao, T., Ji, J., Zhang, C., Che, Y., Yang, J., Shi, H., Li, J., Zhou, H., Mu, X., Xu, C., Wang, C., Xu, Y., Liu, Z., Wen, H. & You, Q. (2018) Chitinase 3-like 1-CD44 interaction promotes metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition through beta-catenin/Erk/Akt signaling in gastric cancer, *J Exp Clin Cancer Res.* **37**, 208.
36. Nishikawa, K. C. & Millis, A. J. (2003) gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells, *Exp Cell Res.* **287**, 79-87.
37. Ngernyuang, N., Yan, W., Schwartz, L. M., Oh, D., Liu, Y. B., Chen, H. & Shao, R. (2018) A heparin binding motif rich in arginine and lysine is the functional domain of YKL-40, *Neoplasia.* **20**, 182-192.
38. Renkema, G. H., Boot, R. G., Au, F. L., Donker-Koopman, W. E., Strijland, A., Muijsers, A. O., Hrebicek, M. & Aerts, J. M. (1998) Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages, *Eur J Biochem.* **251**, 504-9.
39. Zhao, T., Su, Z., Li, Y., Zhang, X. & You, Q. (2020) Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases, *Signal Transduct Target Ther.* **5**, 201.
40. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem J.* **280 (Pt 2)**, 309-16.
41. Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B. (2009) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics, *Nucleic Acids Res.* **37**, D233-8.
42. Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M. & Tanaka, H. (1993) Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of Bacillus circulans WL-12 as essential residues for chitinase activity, *J Biol Chem.* **268**, 18567-72.
43. Schimpl, M., Rush, C. L., Betou, M., Eggleston, I. M., Recklies, A. D. & van Aalten, D. M. (2012) Human YKL-39 is a pseudo-chitinase with retained chitooligosaccharide-binding properties, *Biochem J.* **446**, 149-57.
44. Kashimura, A., Okawa, K., Ishikawa, K., Kida, Y., Iwabuchi, K., Matsushima, Y., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. & Oyama, F. (2013) Protein A-mouse acidic mammalian chitinase-V5-His expressed in periplasmic space of Escherichia coli possesses chitinase functions comparable to CHO-expressed protein, *PLoS One.* **8**, e78669.
45. Uehara, M., Takasaki, C., Wakita, S., Sugahara, Y., Tabata, E., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2022) Crab-eating monkey acidic chitinase (CHIA) efficiently degrades chitin and chitosan under acidic and high-temperature conditions, *Molecules.* **27**.
46. Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kimura, M., Kobayashi, Y., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kamaya, M., Kino, Y., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2016) Loss and gain of human acidic mammalian chitinase activity by nonsynonymous SNPs, *Mol Biol Evol.* **33**, 3183-3193.
47. Tabata, E., Itoigawa, A., Koinuma, T., Tayama, H., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2022) Noninsect-based diet leads to structural and functional changes of acidic chitinase in Carnivora, *Mol Biol Evol.* **39**, msab331.
48. Kashimura, A., Kimura, M., Okawa, K., Suzuki, H., Ukita, A., Wakita, S., Okazaki, K., Ohno, M., Bauer, P. O.,

Sakaguchi, M., Sugahara, Y. & Oyama, F. (2015) Functional properties of the catalytic domain of mouse acidic mammalian chitinase expressed in Escherichia coli, *Int J Mol Sci.* **16**, 4028-42.
49. Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., Sugahara, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2019) Residues of acidic chitinase cause chitinolytic activity degrading chitosan in porcine pepsin preparations, *Sci Rep.* **9**, 15609.
50. Kimura, M., Watanabe, T., Sekine, K., Ishizuka, H., Ikejiri, A., Sakaguchi, M., Kamaya, M., Yamanaka, D., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2020) Comparative functional analysis between human and mouse chitotriosidase: Substitution at amino acid 218 modulates the chitinolytic and transglycosylation activity, *Int J Biol Macromol*.
51. Suzuki, K., Okawa, K., Ohkura, M., Kanaizumi, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Takei, H., Otsuka, M., Tabata, E., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2024) Evolutionary insights into sequence modifications governing chitin recognition and chitinase inactivity in YKL-40 (HC-gp39, CHI3L1), *J Biol Chem*, 107365.

水素化物材料の『表面水素欠陥』を利用した固体触媒の設計開発

工学院大学　先進工学部環境化学科　前野禅

芝浦工業大学　機械機能工学部　佐藤豊人

Design of heterogenous catalyst based on surface hydrogen vacancy of metal hydride materials

Zen Maeno, Kogakuin University

Toyoto Sato, Shibaura Institute University

ABSTRACT : Catalytic propane dehydrogenation (PDH) has mainly been studied using metal- and metal oxide-based catalysts. Studies on dehydrogenation catalysis by metal hydrides, however, have rarely been reported. In this study, PDH reactions using group 3 and 4 metal hydride catalysts were investigated under relatively low-temperature conditions of 450 °C. Lanthanum hydride exhibited the lowest activation energy for dehydrogenation and the highest propylene yield. Based on kinetics studies, a comparison between the reported calculation results and isotope experiments, the hydrogen vacancies of metal hydrides were involved in low-temperature PDH reactions.

１．　はじめに

触媒は物質変換を司るキーマテリアルであり、化成品合成プロセスの半数以上で利用される固体触媒の研究開発は、学術的にも工業的にも重要である。これまでの固体触媒化学は、金属および金属酸化物を基盤に展開されてきた。非金属・非酸化物系の物質群の触媒機能開拓は、触媒化学において挑戦的かつ未開拓な領域である。

申請者である前野は、固体触媒表面に生成するヒドリド種や金属水素化物を基盤とする高機能固体触媒の研究に取り組んできた。その中で、低級オレフィン製造の基盤技術であるアルカン脱水素反応において、バルク金属水素化物が工業触媒(Pt 系合金触媒)よりも低い活性化書壁で反応を促進することを見つけた。理論・実験的検討から金属水素化物の『表面水素欠陥』が重要な役割を担っている可能性を現在つかんでいる。

そこで本申請研究では、水素化物材料の『表面水素欠陥』を利用した固体触媒の設計開発に取り組むことを目的としている。未検討の金属水素化物の合成とその表面水素欠陥生成の実験・理論的検討により、さらに高活性が期待される金属水素化物を探索する。また、酸化物との複合化により、安定かつ取り扱い容易な水素化物触媒材料の創成に取り組む。

２．　研究内容および進捗状況

２．１　金属水素化物のプロパン脱水素触媒作用

金属水素化物の触媒研究は、1920-50 年代に CaH_2 や BaH_2 の水素化・脱水素触媒作用が報告されて以降、近年まで報告例がほとんどなかった。ごく最近になり、金属水素化物や格子水素を有する複合アニオン化合物が、アンモニア合成に有効な触媒あるいは担体として機能することを見出し、その機能発現機構が明らかにされてきている。一方で、金属水素化物の脱水素触媒作用に関する研究は我々の知る限り最近の報告例はなかった。

我々はこのような背景のもと、バルク金属水素化物のアルカン脱水素触媒作用の探索を開始した。初めにアンモニア合成に活性を示すことが報告されている TiH_2 を用いて、比較的低温である 450℃にてプロパン脱水素反応を検討した。TiH_2 は脱水素

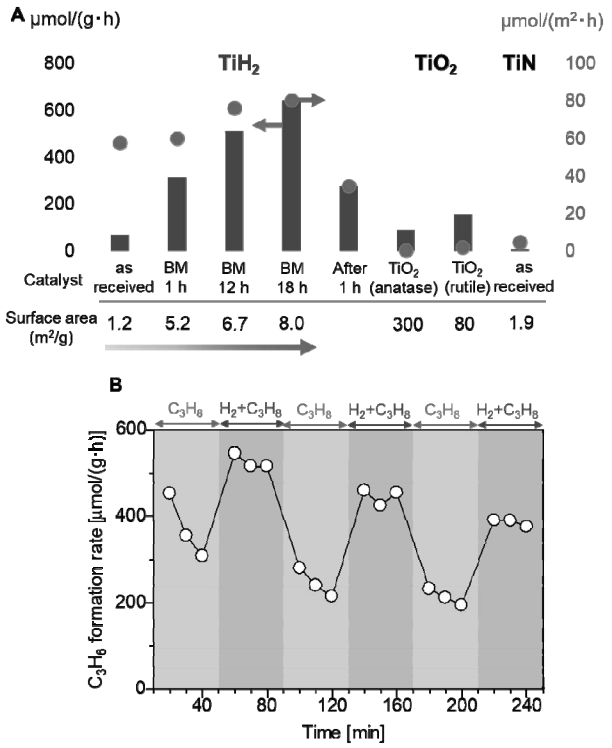


Fig. 1. (a) Propylene yield and formation rate in propane dehydrogenation using TiH_2, ball-milled ones, and other Ti compounds at 450 °C. (b) Time profile of propylene formation rate under controlled C_3H_8/He flow or C_3H_8/H_2/He flow.

反応を促進し, ボールミル処理により比表面積を増大させると，プロピレン生成速度も増大した(Fig. 1a)．高温でのプロパン脱水素反応の触媒として報告されている TiO_2 は低温条件では低活性であり、TiN は活性をほとんど示さなかったことから, 水素化物が特異的に低温でプロパン脱水素反応を促進できることが分かった．しかしながら，反応時間の延長に伴い，プロピレン生成速度が低下した．反応前後の XRD 測定から，TiH_2 の格子水素の放出により Ti metal へ構造が変化した．そこで、H_2 共存下でプロパン脱水素反応を検討したところ，H_2 分圧の増大に伴い反応速度が増大することが分かった．共存 H_2 あり・なしを周期的に繰り返すと，プロピレン生成速度が可逆的に増大・低下した(Fig. 1b)．

共存 H_2 あり・なしで TiH_2 によるプロパン脱水素反応の見かけの活性化エネルギーをアレニウスプロットにより算出した。共存 H_2 あり条件下では 37 kJ/mol であり，工業触媒である PtSn 合金系，Cr 系，Ga 系で報告されている値(約 100 kJ/mol)よりも著しく低かった(Fig.2a)．H_2 なしでは 180

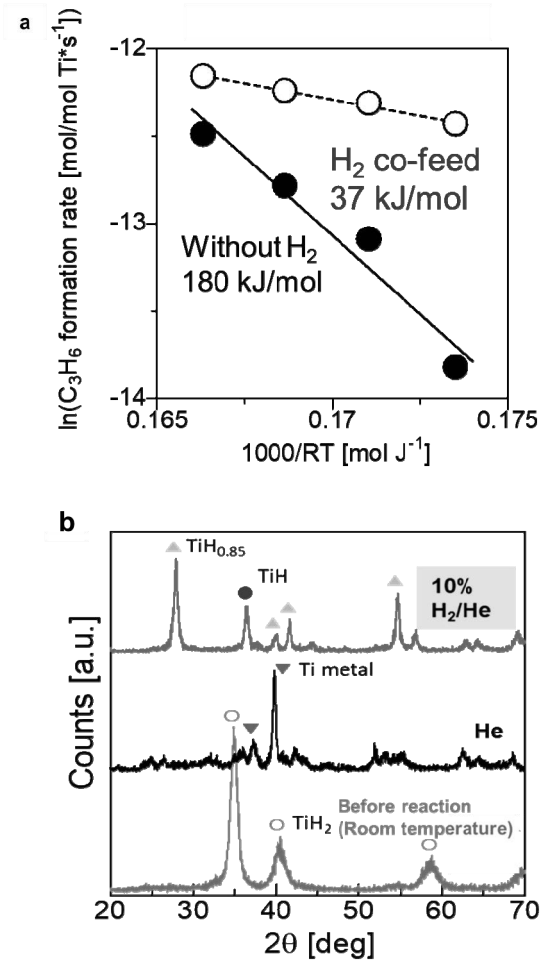


Figure 2. (a) Arrhenius plot for C_3H_8 dehydrogenation using TiH_2 (ball-milled for 12 h). (b) In situ XRD patterns of TiH_2 under He or 10% H_2/He flow at 450 °C.

kJ/mol であった．In situ XRD により，450 ˚C ，H_2 存在下・非存在下での TiH_2 の構造を調査した．非存在下では完全に H_2 が脱離して Ti metal になるのに対して，10% H_2/He 下では一部 H_2 が脱離した TiH や $TiH_{0.85}$ に帰属できる回折パターンが確認された(Fig.2b)．また，大気非暴露下の XPS 測定からは低原子価 Ti 種の存在が確認された．これらのデータは，Ti 水素化物の水素欠陥サイトが反応の活性点として作用している可能性を示唆している．

上述の結果を受けて, 第 3 および 4 族金属水素化物のプロパン脱水素能を網羅的に検討した． ScH_2, YH_3，LaH_3 の 3 族金属水素化物は，TiH_2，ZrH_2，HfH_2 の第 4 族金属水素化物より高い収率を示すことがわかった．収率を増加させるために，一連の金属水素化物を BM 処理で粉砕して脱水素反応に用いたところ，LaH_3 が最も良いプロピレン収率を与え, 比表面積で規格化した生成速度でも最も良い値

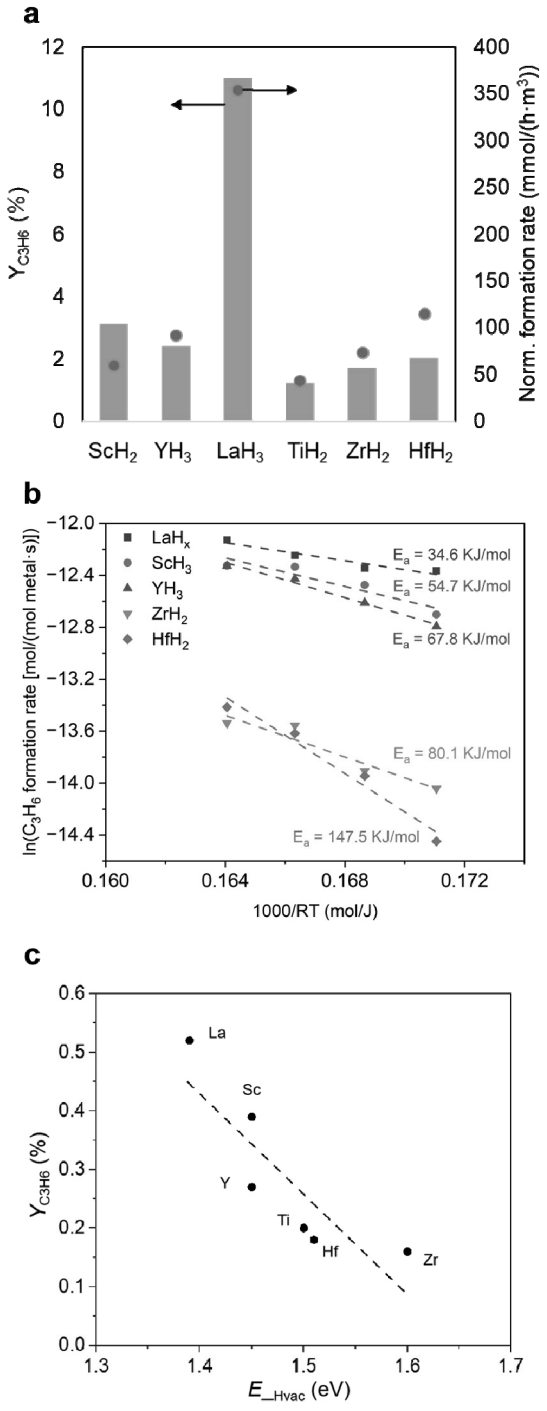


Figure 2. (a) Propylene yield (Y_{C3H6}) and formation rate in propane dehydrogenation using group 3 (Sc, Y, La) and 4 (Ti, Zr, Hf) metal hydrides and oxides at 450 °C. (b and c) Temperature dependence of propylene formation rate in propane dehydrogenation using (b) a series of metal hydrides and (c) PtSn- and CrOx-based catalysts. (d) Correlation of initial Y_{C3H6} with theoretical formation energy of surface hydrogen vacancies (E_Hvac) for a series of group 3 and 4 metal hydrides.

であった(Fig.2a). 酸化物系触媒の中で優れた触媒の一つである ZrO_2 を含む第 3, 4 族金属酸化物を同様の反応条件で比較したところ, いずれの元素についても対応する金属水素化物よりも低い収率と生成速度を示した. 一連の金属水素化物を用いたプロピレン生成速度の温度依存性をプロットし, 見かけの活性化障壁を比較した. 第 3 族金属水素化物の活性化障壁の値は第 4 族金属水素化物よりも低く, 上述の反応結果と矛盾しない結果であった(Fig.2b). LaH_3 で最も低い値(35 kJ/mol)を示し, 同様の条件で PtSn 系及び CrOx 系と比べても低い値であった(それぞれ 74 および 94 kJ/mol)であった. 第 3 および 4 族の金属水素化物のプロパン脱水素触媒としての可能性を示す結果である. さらに、理論計算により表面水素欠陥の生成エネルギーを求め、収率との相関関係を調査した。欠陥生成エネルギーの増大に伴い、収率が増大する傾向が得られた(Fig.2c)。以上の結果より、表面水素欠陥が低温でのプロパン脱水素の反応の進行に寄与していることが強く示唆された。

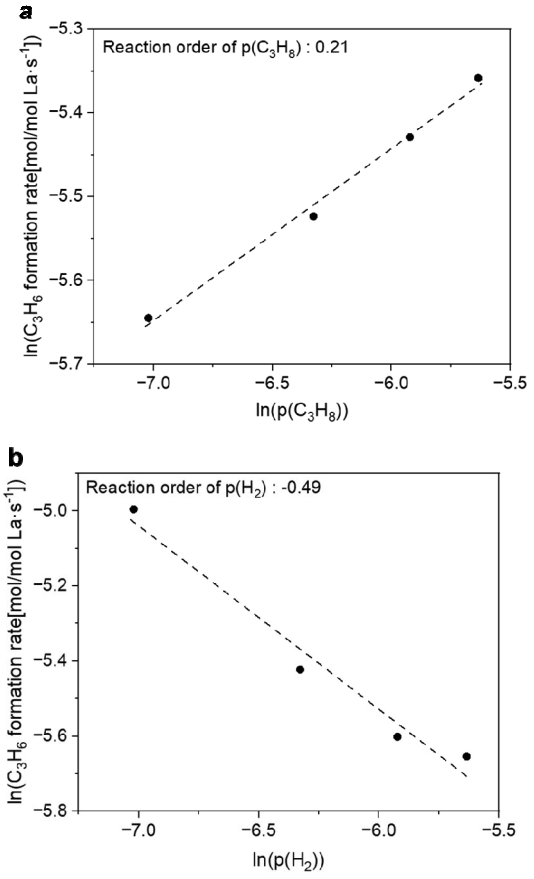


Figure 3. Effects of the partial pressures of C_3H_8 and H_2 ($p(C_3H_8)$ and $p(H_2)$) on PDH using LaH_3. (a) Effect of $p(C_3H_8)$ (C_3H_8 concentration: 2–8%, without H_2 co-feeding). (b) Effect of $p(H_2)$ (C_3H_8 concentration: 10% (fixed), H_2 concentration: 2–8%). 100 mg of LaH_3 was used, and the total flow rate was fixed at 50 mL/min.

TiO_2 や ZrO_2 などの 4 族金属酸化物上のプロパン脱水素反応, 酸素欠陥が C–H 結合開裂に重要な役割を担っていると考えられている. 本研究では, 分圧依存性及び同位体実験により, 水素欠陥の関与の可能性についても検討した. 最も良い活性を示した LaH_3 を用いて, プロパン分圧($(p(C_3H_8))$または水素分圧($p(H_2)$)が脱水素反応の反応速度に与える影響を調査した. $p(C_3H_8)$の反応次数はおよそ 0.2 と比較的低かったのに対し, $p(H_2)$の反応次数はおよそ -0.5 と負に大きい値であった(Fig.3a and b). 水素分圧の増加により欠陥生成が抑制され, 生成速度が低下したと解釈できる.

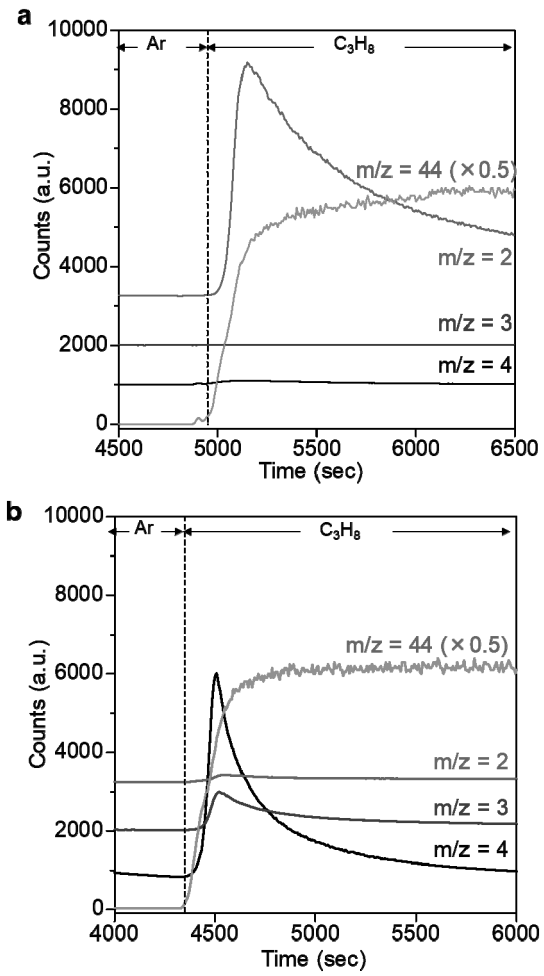


Figure 4. Gas products in propane dehydrogenation using (c) LaH_3 and (d) LaD_3 as monitored by mass spectrometry.

また, LaD_3 を用いたプロパン脱水素反応において, Ar 流通下での昇温中および脱水素反応中に生成した H_2, HD および D_2 を質量分析で調べ, LaH_3 を用いた場合と比較した. Ar 流通下での LaH_3 の前処理において, 室温から 450 ℃まで温度を上げると H_2 の脱離が起こり, 反応条件では水素欠陥が存在することが示唆された. 450 ℃でプロパンを導入すると, 脱水素反応の副生成物として H_2 が生成したが, D_2 や HD のピークはほとんど観測されなかった(Fig.4a). 次に, LaH_3 の代わりに LaD_3 を用いると, Ar 流通下での昇温中に D_2 の脱離が観測された. 次いでプロパンを導入すると, D_2 と HD が同時に生成し, H_2 のシグナル強度は LaH_3 の場合と比べて非常に低かった(Fig.4b). これらの結果は, プロパンの H 原子が LaD_3 の水素欠陥に取り込まれ, 格子状 D と交換あるいは結合し, D_2 や HD が生成していることを示している. 具体的な反応機構はまだわかっていないが, 上記の結果は水素欠陥がプロパン活性化に寄与していることを強く示唆するものである.

現在、上記研究で見出している La 水素化物の水素欠陥生成を定量的に議論する手法や他の希土類金属水素化物のプロパン脱水素触媒作用に関する検討を進めているところである。また、耐久性に課題があるため、酸化物との複合系の材料開発により高耐久性さらには再生可能な触媒開発への展開を目指す。

局所的構造秩序を有する酸化物ガラスの創製

工学院大学　応用化学科　橋本英樹

工学院大学　応用化学科　大倉利典

工学院大学　環境化学科　桑折　仁

Synthesis of oxide glasses having hyperfine local ordering

Hideki Hashimoto，Department of Applied Chemistry

Toshinori Okura, Department of Applied Chemistry

Hitoshi Kohri, Department of Environmental Chemistry and Chemical Engineering

ABSTRACT : The aim of this study is to prepare amorphous intermediate oxides (intermediate oxide glasses) by applying high pressure to the amorphous intermediate oxide precursors. In this study, we focused on alumina and investigated a simple and safe synthesis method of amorphous alumina porous thin film prepared by electrochemical oxidation of aluminum metal. Conventionally, we used highly toxic chromic acid electrolyte, and the development of alternative safe electrolyte was highly desired. We focused on the sodium hydroxide/glycerol electrolyte. By optimizing the concentration of sodium hydroxide, the amount of glycerol added, the voltage, the electrolysis time, and the area of the aluminum metal, the most rapid formation conditions were established. The structure of the produced amorphous alumina porous thin film was evaluated by X-ray diffractometry, density measurement, thermogravimetry-differential thermal analysis, and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. As a result, all the characteristics were similar to those of the amorphous alumina porous thin film obtained using chromic acid electrolyte, indicating that sodium hydroxide/glycerol electrolyte can sufficiently substitute for chromic acid electrolyte. In addition, when the obtained sample was compressed at 6.3 GPa using a multi-anvil high pressure apparatus, a grayish bulk sample can be obtained.

１．　はじめに

ガラスは，人類の日々の生活，文化，芸術，産業，いずれの観点から見ても持続的発展に欠かせない材料である。本研究は，ガラスの存在を更に意義深いものにするために従来の溶融急冷法に依存せずに新規酸化物ガラス群を創出することを試みるものである。それらの原子配列と諸特性の関係を解き明かして学理的基盤を築き，その上に立って新しいガラス材料科学を展開する。

酸化物ガラスの研究の歴史は長く，そこにはよく知られた構造化学的な法則がある[1]。金属カチオン（M）に対する酸化物イオンの配位数（n）が3または4に限られ，MO_n 多面体は稜や面ではなく，頂点を共有するという“Zachariasen 則”であり，通常の溶融急冷で得られるガラスの多くはこの法則に従う。また，酸化物は M-O 単結合強度に基づいて，強度の高い網目形成酸化物，強度の低い網目修飾酸化物，中間の強度を有する中山間化物に分類される[2]。アルミナに代表される中間酸化物は網目形成酸化物または網目修飾酸化物とともにガラスを形成す

るが，単独ではガラスにならないとされており，現在においてもバルクのアルミナガラスの合成は報告されていない。しかし，酸化物薄膜の分野においてはアルミナなどの中間酸化物薄膜が非晶質の状態，つまりガラス状態で得られることは良く知られた事実である[3]。本研究では，これらの事実に着目して，溶融急冷法とは異なる新しい手法を用いて，バルクの非晶質中間酸化物，すなわち中間酸化物ガラスを合成し，その物性と構造の関係を明らかにすることで，新しい酸化物ガラスの科学を展開することを目的としている。

これまでの研究でアルミニウム金属の電気化学的酸化により得られた非晶質アルミナ多孔質薄膜の構造解析を行った結果，配位数は n = 4, 5, 6 であり（5 が最多）で，これらの配位多面体は稜を多く共有するとともに空隙（3 次元構造中の原子が存在しない空間）が極端に少ない構造を有していることを明らかにしている[4]。つまり，非晶質アルミナはガラス科学で広く受け入れられている Zachariasen 則から完全に逸脱した構造的特徴を有することが明らかになった。この非晶質アルミナを高圧力で加圧することでバルク化することでバルクの非晶質アルミナ，すなわちアルミナガラスが合成できると期待され，事実予備研究の結果からバルク体を得ることに成功している。この手法をジルコニア，ガリア，チタニアなどの様々な中間酸化物に適用することで新奇中間酸化物ガラス群を創出することを目指す。

本報告ではアルミナに着目して研究を進めた成果を紹介する。非晶質酸化物を合成する手法を確立することは本研究の中心的課題となるため，アルミニウム金属の電気化学的酸化法を用いた非晶質アルミナ多孔質薄膜の簡便な合成手法の確立について検討した。これまでの研究では薄膜の作製に有毒な六価クロムを含むクロム酸電解液を用いており，生成した薄膜の剥離に過塩素酸-エタノール混合電解液を用いていた。いずれの電解液も取り扱いに注意が必要であるため，安全かつ簡単に実験が可能な電解液を検討した。

通常，アノードでの電気化学的酸化で生成する非晶質アルミナ多孔質薄膜には電解液のアニオン成分が混入することが知られている。例えば，硫酸，シュウ酸，リン酸は良く知られた電解液であるが，これらの電解液を使用するとアルミナ内に，硫酸イオン，シュウ酸イオン，リン酸イオンが取り込まれる[5]。一方，クロム酸電解液を用いるとアニオンの混入がない高純度アルミナが得られることが知られているため，これまでの研究ではクロム酸電解液を用いてきた。アニオンの混入の懸念がない電解液として水酸化ナトリウムが報告されているが，水酸化ナトリウムは生成したアルミナを過剰に溶解するため，厚い皮膜の作製が困難である[6]。しかし，アルコール類を水酸化ナトリウムに添加すると生成する薄膜が厚くなると報告されている[6]ため，本研究では水酸化ナトリウム水溶液にグリセリンを添加してアルミニウム金属を電気化学的に酸化し，高純度アルミナ試料が効率良く得られる条件を確立することを検討した。また，これまでは，剥離のための電解液として過塩素酸-エタノール混合電解液[7]を用いてきたが，最近，塩化ナトリウム-エチレングリコール電解液を剥離に用いる手法が報告されている[8]ため，この手法が本研究の高純度アルミナの合成に使用できるかどうかも検討した。

２．　実験方法

試料として純度 99.99％のアルミニウム板（堺アルミ株式会社）を用いた。自然酸化皮膜を除去するために以下に示した前処理を行った。時計皿に入れた適量のアセトン中で 3 分間超音波洗浄を行った後にアルミニウム板を約 60℃の 5 wt %の水酸化ナトリウム水溶液に 20 秒浸し，純水で洗浄した。その後 30 wt%の硝酸に 60 秒浸した，純水で洗浄した。前処理を施したアルミニウム板に対して，0.1~0.5 mol dm^{-3} NaOH/20~50 vol% グリセリン (Gly) 電解液を用いて，10~160 V で 30 min の定電圧電解を行い，生成した皮膜を 1.0 mol dm^{-3} NaCl/エチレングリコール (EG) 電解液中で電解剥離し，室温で真空乾燥させた。得られた試料を 300°C で 4 時間加熱することで脱水し，X 線回折法 (XRD)，真密度測定，固体核磁気共鳴分光法 (NMR)，熱重量示差熱分析 (TG-DTA)，示差走査熱量計(DSC)で評価した。比較の電解液として 0.01~0.2 mol dm-3 水酸化ナトリウム (NaOH) 電解液，0.3 mol dm^{-3} 硫酸 (H_2SO_4) 電解液，0.3 mol dm^{-3} クロム酸 (H_2CrO_4) 電解液，過塩素酸 ($HClO_4$, 60%)/99.5% エタノール (EtOH, 99.5%) 混合電解液 (1:4 vol %) を用いた。

３．　結果と考察

３．１　塩化ナトリウム/エチレングリコール溶液による非晶質アルミナ多孔質薄膜の剥離

まずは剥離のための電解液の検討を実施した。文献によると 0.3 mol dm^{-3} H_2SO_4 電解液を用いた 25 V の定電圧電解 2 時間で生成した多孔質薄膜を，1.0 mol dm^{-3} NaCl/EG 溶液を用いた 28~36 V の定電圧電解によって 10 秒で剥離できると記載されている[8]。同様の条件で薄膜を作成し，36 V で剥離実験を行ったところ，電解開始 1 秒後に約 900 A m^{-2} の電流が観測され，10 秒では剥離に至らなかったが 40 秒で剥離した。薄膜作成の電解時間を 30 分に変更すると，剥離の時間は約 10 秒に短縮された。$HClO_4$/EtOH 電解液を用いた場合，剥離には数分かかるため，剥離時間の観点から NaCl/EG 電解液は有利であることがわかった。ただし，剥離後のアルミニウム板を見ると黒い模様ができており，アルミニウム板の一部分に局所的に電流が集中している様子が確認された（図 1）ことから，アルミニウム板の再利用は難しいと考えられる。

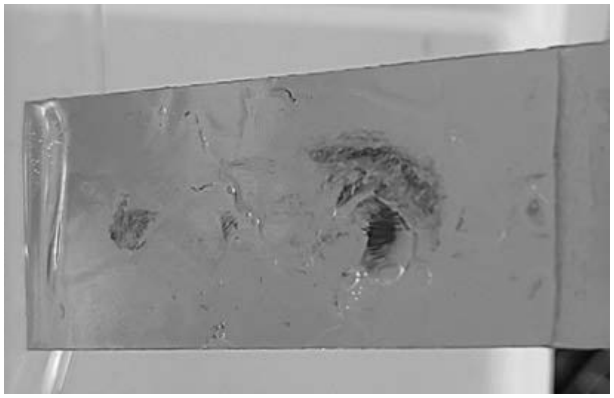


図 1　0.3 mol dm^{-3} H_2SO_4 (30 min) を用いて 25 V の定電圧電解を 30 分行って生成した多孔質薄膜を 1.0 mol dm^{-3} NaCl-EG 電解液を用いて 25 V の定電圧電解で剥離した後のアルミニウム板

３．２　水酸化ナトリウム電解液による多孔質薄膜の作製

0.01, 0.03, 0.05, 0.1 mol dm^{-3} NaOH 電解液を用いて 100 A m^{-2} の定電流電解を 30 分間実施した。0.01 mol dm^{-3} NaOH に関しては、電解開始約 1 分後に設定電圧の上限値 (160 V) に到達し，定電流電解から定電圧電解に切り替わった。電解液濃度を 0.03, 0.05, 0.1 mol dm^{-3} に上昇させると，定常電圧がそれぞれ 1.6, 1.2, 0.5 V となり，正常な皮膜の生成は確認されなかった。定電流電解では皮膜の作製が困難であることがわかった。

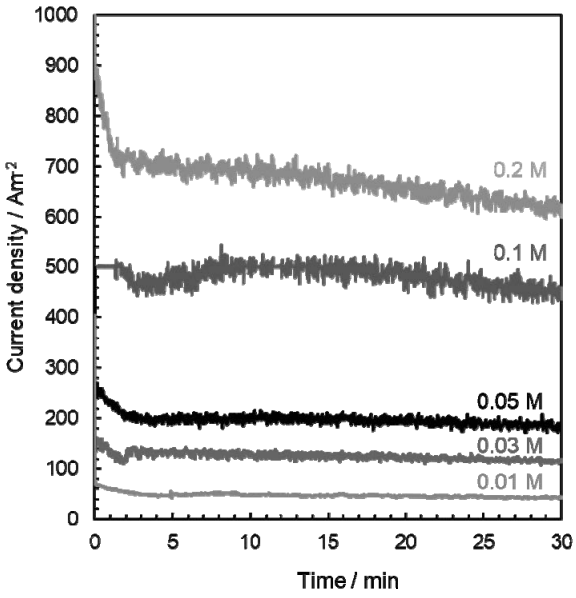


図 2　0.01~0.2 mol dm^{-3} NaOH 電解液を用いて 40 V の定電圧電解を 30 分間行った際の電流-時間曲線（0.2 mol dm^{-3} のみ 10 V で実施）

次に 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2 mol dm^{-3} NaOH 電解液を用いて 40 V の定電圧電解（0.2 mol dm^{-3} のみ 10 V で実施）を 30 分間実施した。図 2 に電流時間曲線を示す。電解直後に電流の上限値である 1000 A m^{-2} に達し，電流が下降し約 5 分以降で定常値を示した。電解開始 5 分後の電流値はそれぞれ約 50、120、200、500、660 Am^{-2} であり電解液濃度の上昇とともに電流値が上昇した。電流値が最も高かった 0.2 mol dm^{-3} NaOH 電解液で電解した後のアルミニウム板の外観写真を図 3 に示す。下地のアルミニウムの光沢が電解前と同様に確認されたことから，生成した多孔質薄膜が極めて薄いことがわかる。なお，水酸化ナトリウム電解液を用いた実験において電解前後の pH はほとんど変化しなかった（変化は概ね 0.1 未満）。

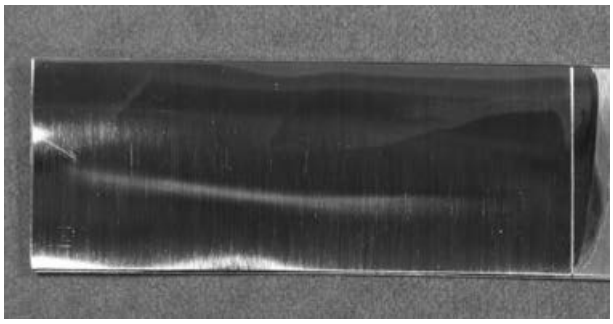


図 3　0.2 mol dm^{-3} NaOH を用いて 40 V の定電圧電解を 30 分間行った後のアルミニウム試料の外観写真

以上の結果から，水酸化ナトリウム単浴電解液を用いて，十分な厚さの膜を得ることは困難であることがわかり，これは先行研究の報告内容[6]とも良く一致した。

３．３　水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液による多孔質薄膜の作製

文献 6 を参考にして水酸化ナトリウム電解液の増膜効果が見込まれるグリセリンを電解液への添加剤として検討した。図 4 に 0.2 mol dm^{-3} NaOH 電解液にグリセリンを 0, 30, 40, 50 vol% 添加した電解液を用いて定電圧電解を行った際の電流-時間曲線を示す。電圧はそれぞれ 10, 40, 80, 130 V に設定した。5 分後の電流密度はそれぞれ約 660, 280, 200, 40 A m^{-2} であり，グリセリンの添加量の増加に伴い電圧を高く設定しているにも関わらず，電流値は大きく減少した。水の粘度は 20℃で 1 mPa s に対してグリセリンの粘度は 20℃で 1389 mPa s である。グリセリンの添加によって電解液の粘度が上昇し電気伝導度は低下すると考えられるため，グリセリンの添加によって電流値が大幅に減少したと考えられる。図 5 に 20 vol% のグリセリンを添加した電解液を用いて電解を行った後のアルミニウム試料の外観写真を示す。図 3 と比較すると明らかであるが，グリセリンを添加した電解液で電解したアルミニウム板は白色を帯びており膜が厚くなったことを示唆する結果となった。グリセリン添加による電解液粘度の上昇によって水酸化ナトリウムによる膜の過剰溶解が抑制され膜が厚くなったと考えられる。

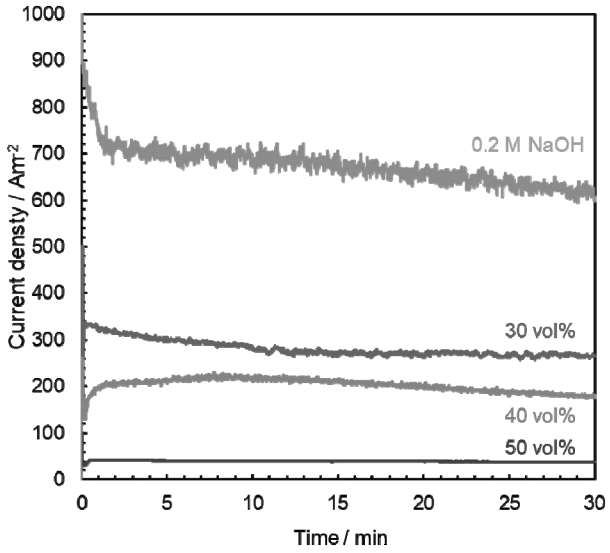


図 4　0.2 mol dm^{-3} NaOH にグリセリンを 30, 40, 50 vol%添加した電解液を用いて 40 V の定電圧電解を 30 分間行った際の電流-時間曲線（比較として 0.2 mol dm^{-3} NaOH 電解液の結果も掲載している）

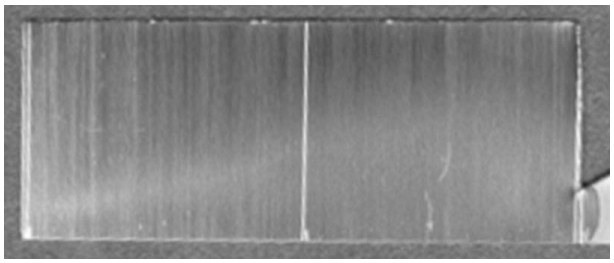


図 5　0.2 mol dm^{-3} NaOH/30 vol% Gly 電解液を用いて 40 V の定電圧電解を 30 分間行った後のアルミニウム試料の外観写真

水酸化ナトリウムへのグリセリンの添加によって増膜効果が認められたため，最も効率良く多孔質薄膜が生成する条件を探索した。この実験ではアルミニウム板(20 cm^2) 2 枚を 30 分間電解した後に 1.0 mol NaCl/EG 電解液を用いて 90 秒間電解することで剥離した皮膜を回収し真空乾燥後に質量を測定した。電圧が 40 V 以上の場合，30 分の電解後に 5 V 電圧を下げ定常電流になるまで待ち，更に 5 V 電圧を下げ定常電流になるまで待つことを 40 V まで繰り返した（電流回復）。皮膜の質量をアルミニウム板の反応面積と電解時間で規格化し，生成速度(mg cm^{-2} h^{-1})として評価した。この数値が電解条件（電解液濃度およびグリセリンの添加率）によってどのように変化するかを確認し，最適な電解液濃度とグリセリン添加率を割り出した。図 6 に 0.1~0.5 mol dm^{-3} NaOH に対してグリセリンを 20~50 vol%添加した電解液で得られた多孔質薄膜の生成速度を示す。縦軸は電解時間 1 時間あたりに 1 cm^2 のアルミニウム上に生成する多孔質薄膜の質量であり，横軸は水酸化ナトリウムの濃度である。各条件では水酸化ナトリウム電解液が安定的に電解を行える 100 Am^{-2} に近い値になる電解挙動を統一している。また、電解時間は 30 分であり、皮膜を採取する際に使用した Al 板の枚数は 2 枚である。定電圧電解を安定的に行うために定常電流値が 100~200 Am^{-2} の範囲に収まることを目標にして電圧を適宜設定した。グリセリン添加量が 20, 30 vol%と低い場合には生成速度は低くなる傾向にあったため，40, 50 vol%の高添加量領域において電解液を広く検討した。いずれのグリセリン添加量においても最適水酸化ナトリウム濃度があり，40 vol%では 0.2 mol dm^{-3}, 50 vol%では 0.3 mol dm^{-3} で生成速度の極大値が確認された。全条件中最も生成速度が高かったのは 0.2 mol dm^{-3} NaOH/40 vol% Gly 混合電解液であり, その際の電圧は 80 V であった。

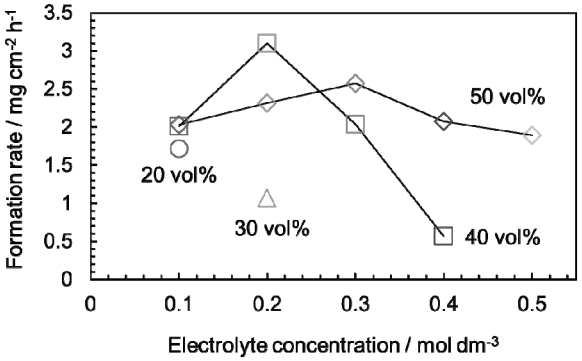


図 6　0.1~0.5 mol dm^{-3} NaOH/20~30 vol% Gly 電解液を用いて 10~160 V の定電圧電解を 30 分行った際の多孔質薄膜の生成速度。

0.1 mol dm^{-3} NaOH /20 vol% Gly: 40V, 94 A m^{-2}
0.1 mol dm^{-3} NaOH /40 vol% Gly: 110V, 131 A m^{-2}
0.1 mol dm^{-3} NaOH /50 vol% Gly: 160V, 86 A m^{-2}
0.2 mol dm^{-3} NaOH /30 vol% Gly :40V, 270 A m^{-2}
0.2 mol dm^{-3} NaOH /40 vol% Gly: 80V, 194 A m^{-2}
0.2 mol dm^{-3} NaOH /50 vol% Gly:130V, 116 A m^{-2}
0.3 mol dm^{-3} NaOH /40 vol% Gly: 40V, 209 A m^{-2}
0.3 mol dm^{-3} NaOH /50 vol% Gly: 70V, 147 A m^{-2}
0.4 mol dm^{-3} NaOH /40 vol% Gly: 10V, 195 A m^{-2}
0.4 mol dm^{-3} NaOH /50 vol% Gly: 60V, 142 A m^{-2}
0.5 mol dm^{-3} NaOH /50 vol% Gly: 40V, 161 A m^{-2}

ここまでで決定した条件で最適電解時間を検討したところ，15 分から 30 分に電解時間を延長したところ多孔質薄膜の生成量が 0.925 mg cm^{-2} から 1.550 mg cm^{-2} まで上昇したが，それ以降（60, 90, 120 分）はほぼ変化しないことがわかり, 最適電解時間は 30 分であった。また，この電解液は劣化が早いことがわかっている。一度使用した電解液を後日使用すると電流値が低くなり再現性を取ることができなくなるため，使用した電解液の保存はできない。また，同じ日に繰り返し電解することによっても電流値が下がることがわかっているが，多孔質薄膜

の採取量は大きく変化しなかった。試料量を多く採取したい場合には，電解液を大量に作っておき，同じ日に複数のビーカーを用いて複数のアルミニウム板を連続で処理することが好ましい。さらに，アルミニウム板の面積を 2 倍の 40 cm^2 で検討した結果，電流の上昇によって電解挙動の再現性が確保できないことや電解を制御できないといった問題点があるため，最適処理面積は 20 cm^2 であることもわかった。電解液の再利用ができない，処理面積を大きくできないという欠点はあるものの，安全な電解液を用いて温度制御をすることなく短時間で処理が可能であるという利点がある。

最適条件が決定したため，硫酸電解液とクロム酸電解液と生成速度の比較を行った。0.2 mol dm^{-3} NaOH/40 vol% Gly 電解液，0.3 mol dm-3 H2SO4 電解液，0.3 mol dm-3 H2CrO4 電解液それぞれについて，現時点での最適条件で多孔質薄膜を作製し生成速度を見積もった結果，それぞれ 3.10, 4.82, 1.01 mg cm^{-2} h^{-1} であった。今回検討した NaOH/Gly 電解液は，クロム酸電解液の約 3 倍であり，硫酸電解液の約 0.64 倍であることがわかり，非常に効率の良い電解液であることがわかった。

３．４　水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で合成した非晶質アルミナ多孔質薄膜のキャラクタリゼーションおよび高圧印加

水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で合成した非晶質アルミナ多孔質薄膜を 300℃で加熱して吸着水を脱離させた後に，X 線回折測定，真密度測定，TG-DTA 測定，NMR 測定，高圧印加実験を実施した。図 7 に XRD パターンを示す。

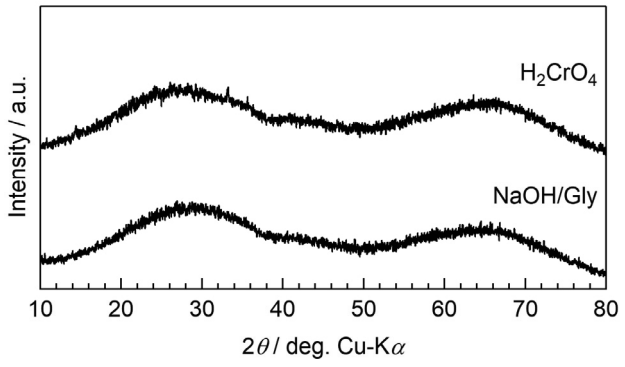


図 7　水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で合成した多孔質薄膜試料の XRD パターン

比較としてクロム酸電解液で合成した薄膜のパターンも示した。非晶質アルミナに特有の 3 つのブロードなパターンが得られ，クロム酸電解液で合成した試料とほぼ同じパターンであったことから，水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で合成した多孔質薄膜は非晶質アルミナであることが確認された。300℃で加熱脱水した試料を更にガラスチューブオーブンに封入し 200℃で 1 日間真空乾燥させた後にヘリウムピクノメーターを用いて真密度測定を行った。10 回測定した平均値は 3.0285±0.0082 g cm^{-3} であり，クロム酸電解液で合成した試料の 3.0501±0.0007 g cm^{-3} と近い値であった。標準偏差が大きく真密度の平均値が小さかった理由として測定に使用した試料の量が少なかった（約 0.27 g）ことが挙げられる。正確な真密度を見積もるためには少なくとも約 1 g の試料量が必要であると考えられる。図 8 に TG-DTA 曲線を示す。

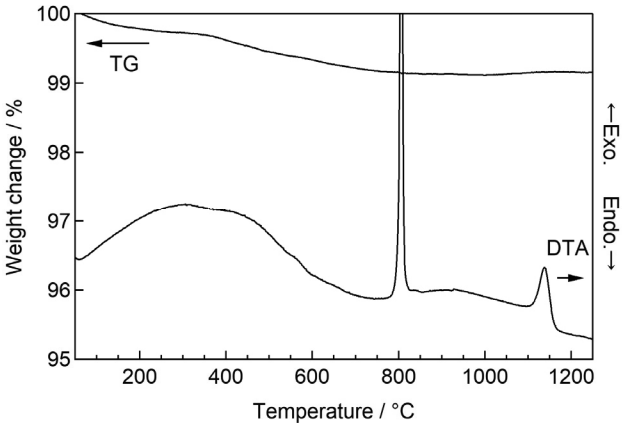


図 7　水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で合成した多孔質薄膜試料の TG-DTA 曲線。左軸が TG 曲線の軸で重量減少率を示しており，右軸が DTA の軸で上側が発熱を示しており，下側が急熱を示している。

TG 曲線の 300℃までの重量減少は吸着水の脱離によるもので約 0.3 wt%であり，それ以降の重量減少は主に水酸基の脱離によるものであり 0.55 wt%であった。DTA 曲線に見られる約 800℃の鋭い発熱ピークは非晶質アルミナから遷移アルミナへの相変化によるものであり，1130℃のブロードな発熱ピークは遷移アルミナから α-アルミナへの相変化によるものである[9]。これら TG-DTA 曲線の特徴はクロム酸電解液で得られた試料と類似していた。図 9 にシングルパルス ^{27}Al MAS NMR スペクトルを示す。赤と黒はそれぞれ水酸化ナトリウム/グリセリン電解液およびクロム酸電解液で合成した試料のスペクトルである。非晶質アルミナに特徴的な 3 つのピークが検出され，それぞれ高化学シフト側から 4 配位，5 配位，6 配位のアルミニウムに帰属される[3]。両スペクトルはほぼ一致していることから局所構造は同じであることがわかる。ピーク分離をして計算した平均配位数は水酸化ナトリウム/グリセリンで 4.63，クロム酸で 4.64 でありほぼ一致することがわかった。これらの結果から，水酸化ナトリウム/グリセリン電解液で生成する非晶質アルミナ多孔質薄膜はクロム酸電解液で得られる試料とほぼ同じ原子配列を有することが明らかになった。

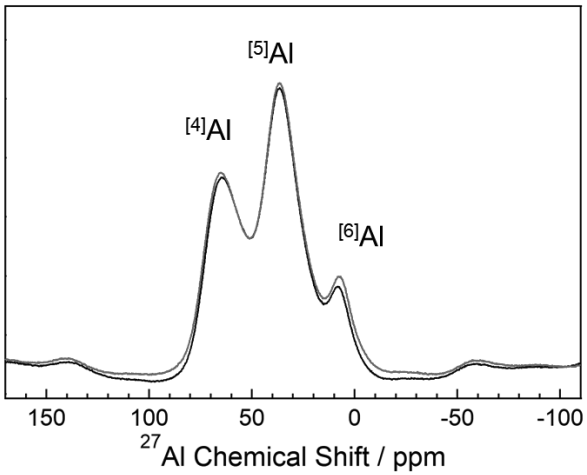


図 9　水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で合成した多孔質薄膜試料のシングルパルス ^{27}Al MAS NMR スペクトル（赤）。黒はクロム酸電解液で合成した試料のスペクトル。

表 1　クロム酸電解液および水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で合成した多孔質薄膜試料のシングルパルス ^{27}Al MAS NMR スペクトルのフィッティング結果から得られた NMR パラメーター。ピークフィッティングには DMFit[10]を用いた。

Sample	Site	δ_{iso} / ppm	ΔCS / ppm	CQ / MHz	Area /%	Average N_{Al-O}
	$^{[4]}$Al	72.81	16.24	8.7	43.43	
H_2CrO_4	$^{[5]}$Al	43.68	13.40	8.4	49.45	4.64
	$^{[6]}$Al	12.10	7.95	6.6	7.12	
	$^{[4]}$Al	73.76	15.84	9.3	45.36	
NaOH/Gly	$^{[5]}$Al	43.69	12.58	8.5	46.45	4.63
	$^{[6]}$Al	11.57	9.38	6.3	8.19	

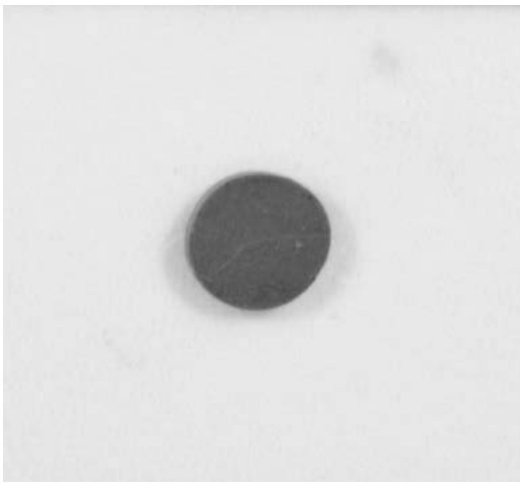


図 10　水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で合成した多孔質薄膜試料を 6.3GPa で押し固めた試料の外観写真。試料の直径は約 6 mm である。

水酸化ナトリウム/グリセリン電解液で合成した試料に対してマルチアンビル高圧発生装置を用いて 6.3 GPa の圧力を室温で印加したところ，灰色を呈するバルク体が得られた。このような色のバルク体はクロム酸電解液で合成した試料においても得られており，水酸化ナトリウム/グリセリン電解液はクロム酸電解液を代替可能であることが示された。今後，水酸化ナトリウム/グリセリン混合電解液で試料を大量に合成し，高圧印加によるバルク化実験を進める予定である。

４．　まとめ

本研究では非晶質中間酸化物を合成し，その試料に対して室温で高圧力を印加することでバルクの非晶質中間酸化物，すなわち中間酸化物ガラスを合成することを目的としている。1 年目はアルミナに対象を絞って研究を進めた。非晶質アルミナの合成は本研究の中心課題となるため，非晶質アルミナの合成方法の最適化について報告した。具体的には，クロム酸電解液を代替するための電解液として水酸化ナトリウム/グリセリン電解液を検討し，その最適合成条件を見極め，合成した試料のキャラクタリゼーションと高圧印加実験を行った結果，水酸化ナトリウム/グリセリン電解液で十分にクロム酸電解液を代替可能であることを見出した。

参 考 文 献

[1] W. H. Zachariasen, The Atomic Arrangement in Glass, J. Am. Chem. Soc. 54(10) (1932) 3841–3851.
[2] K. H. Sun, Fundamental Condition of Glass Formation, J. Am. Ceram. Soc. 30 (1947) 277–281.
[3] S. K. Lee, S. B. Lee, S. Y. Park, Y. S. Yi, C. W. Ahn, Structure of Amorphous Aluminum Oxide, Phys. Rev. Lett. 103 (2009) 095501.
[4] H. Hashimoto, Y. Onodera, S. Tahara, S. Kohara, K. Yazawa, H. Segawa, M. Murakami, K. Ohara, Structure of Alumina Glass, Scientific reports 12(1) (2022) 516.
[5] H. Hashimoto, Y. Fujita, K. Yazawa, H. Asoh, Effects Of Anion Incorporation on The Local Structure of Porous-Type Amorphous Alumina Prepared by Anodization: NMR Study of Al Coordination Numbers, Results in Physics 44 (2023) 106177.
[6] 吉村長蔵，岩佐剛政，アルコール類を含むアルカリ性浴中で生成するアルミニウムの陽極酸化皮膜について　アルミニウムのアルカリ性浴処理法の研究(第 11 報)，金属表面技術 25(4) (1974) 214–218.
[7] T. Masuda, H. Asoh, S. Haraguchi, S. Ono, Fabrication and Characterization of Single Phase α-Alumina Membranes with Tunable Pore Diameters, Materials 8(3) (2015) 1350–1368.
[8] K. Miyamoto, M. Iwai, T. Kikuchi, Rapid Electrochemical Separation of Anodic Porous Alumina Films from Aluminum Surfaces Using a Highly Safe Sodium Chloride–Ethylene Glycol Solution, Electrochim. Acta 427 (2022) 140865.

[9] H. Hashimoto, Y. Fujita, K. Yazawa, H. Asoh, Heat-Induced Local Structural Variation in Porous-Type Amorphous Alumina Prepared by Anodization, J. Phys. Chem. Solids 178 (2023) 111312.
[10] D. Massiot, F. Fayon, M. Capron, I. King, S. Le Calvé, B. Alonso, J. O. Durand, B. Bujoli, Z. Gan, G. Hoatson, Modelling One- and Two-Dimensional Solid-State NMR Spectra, Magn. Reson. Chem. 40 (2002) 70–76.

古細菌のトレハロース代謝に関わる酵素の機能解明と希少オリゴ糖合成への応用展開

工学院大学　先進工学部　生命化学科　坂口政吉

東京農工大学大学院　農学研究院　殿塚隆史

Functional research of archaeal trehalose-metabolizing enzymes and their applications toward synthesis of rare disaccharide with α-1,1 bond similar to trehalose

Masayoshi Sakaguchi, Department of Chemistry and Life science, Kogakuin University
Takashi Tonozuka, Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Agriculture and Technology

ABSTRACT : Trehalose plays parts as a source of carbon energy and as a protector against various stress condition. This saccharide has also additional functions in inducing mTOR-independent autophagy and in inhibiting the aggregation of pathogenetic factors and reduces their cytotoxicity *in vitro* recently. Trehalases can hydrolyze trehalose and belong to the glycoside hydrolase 37 (GH37), GH65, and GH15 families (Carbohydrate-Active enZyme database, CAZy, http:// www. cazy. org/). Recently, we found archaeal trehalose-hydrolyzing enzymes that belong to the GH15 family. To produce trehalose-like disaccharides with potential abilities, we investigated these enzymes in structures, activities, and their foldings. *Thermoplasma* enzyme (Tvn1315) constitutes an N-terminal domain with β-sandwiched structure (BD) and a C-terminal catalytic domain (CD) with $(\alpha/\alpha)_6$-barreled structure similar to GH15 family enzyme structure. In conserved regions of CD, which constitutes active site, some amino acid residues appear to be important for exhibiting activity as motif. In BD, aromatic residues contribute to the BD and the CD foldings, and the activity.

１．　はじめに

トレハロースは、2つのグルコース(Glc) がα-1,1グルコシド結合した二糖で、細胞への保水性、ストレス耐性付与などの生理活性をもち、食品や化粧品などに応用されている。また、アルツハイマー病などの神経変性疾患の進行を抑制する報告もあり、近年注目が集まっているオリゴ糖の1つである。 一方で、ヒトはトレハロースを加水分解する酵素を持っており、上記トレハロースの生理的効果が低減する懸念がある。

トレハロースを加水分解してグルコース(Glc)を生じるトレハラーゼは，細胞内外のトレハロース濃度を制御する。TreHについては，真核生物(酵母)酵素や，細菌(大腸菌)酵素の研究が特に進んでいる(1)。糖質関連酵素データベース(Cazy; http://www.cazy.org/)によると，酵母や大腸菌の酵素は，糖質分解酵素ファミリー37(GH37)やGH65に分類される(ヒトトレハラーゼはGH37である)。一方,本研究対象の古細菌TreHはGH15メンバーである。

GH15には，α-1,4グルコシド結合を主に加水分解するグルコアミラーゼ(GA)，α-1,6結合を主に分解するグルコデキストラナーゼ(GDase)やイソマルターゼといった，糖の結合様式が異なるオリゴ糖やその多糖へ特異的に作用する酵素が含まれる。我々は，好酸性好熱性古細菌から、酸性側でトレハロースを特異的に分解する新奇の酵素(トレハラーゼ)を見出した(2,3)。この酵素の機能を調査すると共に、オリゴ糖合成酵素化することで、トレハ

ロース類似体の合成を試みているが、反応がうまく進行しない。そこで、糖転移反応を保持するトレハロース合成酵素を新たに取得し、この酵素の機能調査や改変により、種々の生理活性をもつ可能性を秘めているトレハロースの類似糖を合成し、最終的にその生理活性をトレハロースと比較調査することを最終目的とする。

ここでは新規取得した古細菌トレハラーゼのうち、サーモプラズマ属酵素(Tvn1315)とスルフォロバス属酵素(Sa1816、Sa1250)を対象に機能を調査した。Tvn1315 と Sa1816 は高活性で基質親和性が低く、反対に Sa1250 は低活性で基質親和性が高い。基質を捕捉する方法、つまり基質認識に関わるアミノ酸が異なるため、酵素活性の差異が生じていると予測しているがどのアミノ酸が関与しているのか判別できていない。一方で、低分解能ながら、Tvn1315 酵素の立体構造解析に成功し、この酵素が N 末端側のドメイン(N-ドメイン、BD とする)と C 末端側の触媒ドメイン(C-ドメイン、CD とする)で構成されていることがわかった(低分解能のため未登録)。Tvn1315 の N-ドメインは不溶性多糖であるセルロースやキチンなどに結合する。C-ドメインには基質を捕まえて触媒反応を起こす活性部位があり、アミノ酸レベルで活性部位は、GH15 トレハラーゼでよく保存されている保存領域(1-5)で構成されている。今回の報告では、C-ドメインの活性部位を構成する保存領域 1 の調査、N-ドメインの多糖結合能に関与するアミノ酸の調査をしたので報告する。

２．　方法

２．１　発現プラスミドの構築

大腸菌や培地などは以前報告した方法(4)に従って使用した。トレハラーゼ遺伝子は、野生型酵素の発現プラスミドとして、そしてアミノ酸変換酵素作製のための PCR 法の鋳型として使用した。酵素のアミノ酸変換、いわゆる変異導入は ODA-PCR 法、重複 PCR 法で行った。

２．２　酵素の発現、精製と取得

組換え酵素の取得は、大腸菌 BL21(DE3)を該当する発現プラスミドで形質転換することで得た大腸菌を培養して行った。一晩培養した前培養液を一部本培養用の培地に植菌して、イソプロピルチオガラクトピラノシド(IPTG)による誘導をせずに 37℃で、20 時間培養した。遠心分離により菌体を回収し、適当量の緩衝液[20 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl (pH 7.5)]に懸濁し、超音波破砕した。遠心分離した上清をアフィニティクロマトグラフィー(Ni セファロース)に供した［吸着緩衝液：20 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl (pH 7.5)、溶出緩衝液 1：20 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl、0.025 M イミダゾール (pH 7.5)、溶出緩衝液 2：20 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl、0.5 M イミダゾール (pH 7.5)]。各画分の精製度は、SDS を含む電気泳動ゲルを CBB 染色して、1 本のタンパク質であることを検証した。溶出緩衝液 2 の画分を吸着緩衝液に対して一晩透析した後、4℃に保存して今後の実験に使用した。

２．３　タンパク質濃度と酵素活性測定

タンパク質濃度はバイオラッド社のミクロアッセイキットを用い、牛血清アルブミン(バイオラッド社)を標準タンパク質として算出した。酵素活性は以下のように算出した。トレハロースを加水分解して産生したグルコース濃度を F キットグルコース、もしくは E キットグルコース(どちらもロシュ社)を用いて測定した。グルコース濃度の算出は、グルコースによる検量線を作製し、それを基に行った。標準の酵素活性として、マッキルベイン緩衝液(pH 3.7)に溶解した 100 mM トレハロースを基質に、1 分間に 1 μmol のトレハロースを加水分解する酵素量を 1 U とした。pH の変化による酵素活性の変動はマッキルベイン緩衝液の pH を変更して 100 mM トレハロース基質溶液を調製し、測定、算出した。

２．４　不溶性多糖セルロースとの結合評価

粉末化したセルロース(400 メッシュ)を用い、不溶性多糖 3 mg に、タンパク質 (200 μg/mL) を含む結合緩衝液 [20 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl (pH 7.5)] 100 μL を加え、その混合液を 4℃で 60 分間静置し、15 分毎にボルテックスミキサーにて撹拌を行った。その後、遠心分離し、上清(非結合画分、F)と沈殿に分離した。沈殿は、結合緩衝液 100 μL で 5 回洗浄し、洗浄溶液は洗浄画分 (W) として回収し、多糖を含む沈殿に SDS サンプル緩衝液 50 μL と結合緩衝液 50 μL を加え(合計 100 μL)、結合画分(B)とした。最初に添加したタンパク質サンプル(S)は、SDS サンプル緩衝液と等量混合し、結合画分(B)と共にそれぞれ熱処理を施し、それぞれ 15 μL と 7.5 μL ずつ、12 % SDS を含む電気泳動で分析し、泳動後のゲルは、染色と脱色を行った。結合したタンパク質の量は、画像解析ソフト(imageJ)を用いて、最初に添加したタンパク質を含む結合緩衝液中のタンパク質バンド強度を対象(100 %)とし、結合画分のタンパク質バンド強度を算出した。

２．５　熱転移温度と熱安定性

精製酵素の熱転移温度(Tm 値)は、リアルタイム PCR システム(Mx3005p)と MxPro software(どちらもアジレントテクノロジー社)を用いて, DSF(Differential Scanning Fluorimetry)を行った。蛍光物質である希釈した SYPRO Orange (インビトロジェン社)1 μL, 酵素溶液 39 μL を混合した。25～95℃の間で毎分 1℃上昇させるプログラムで、励起光を 492 nm、蛍光を 610 nm の条件で蛍光強度変化を測定した。熱転移温度は、温度間の蛍光強度変化をグラフィックソフトウェアパッケージ (Delta Graph ver.6, Nihon Poladigital KK) を用いて非線形回帰を行い, 算出した

酵素活性の熱安定性は、精製酵素を 70℃と 75℃の湯浴

中でそれぞれ 1 時間熱処理を行った後，氷水浴中で 1 時間冷却した。その後，30℃，pH 3.7 条件でトレハラーゼ活性測定を行い，残存活性を算出した。

3． 結果

3．1 保存領域 1 の比較と調査

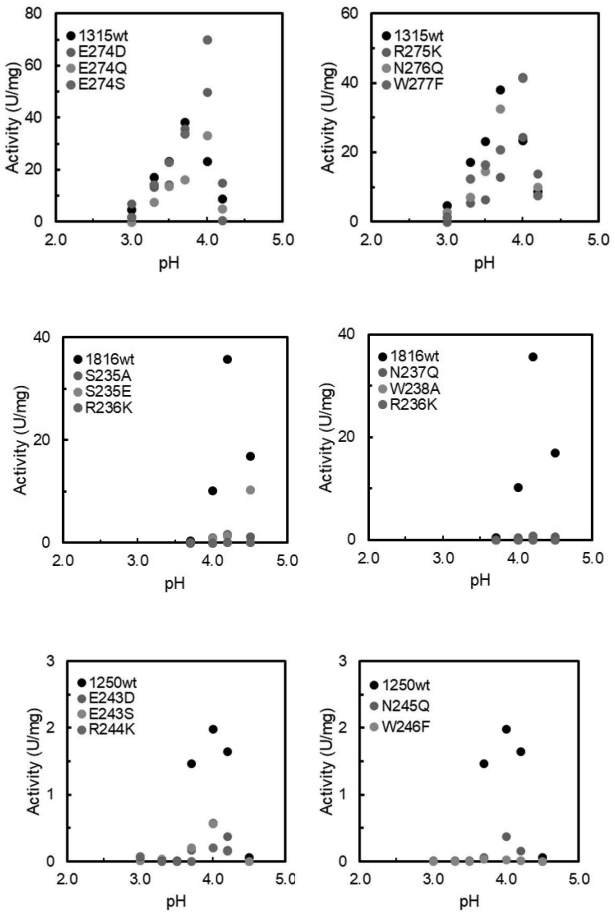
既報トレハラーゼの保存領域 1 を Figure 1 に示した。



Fig.1 GH15 トレハラーゼの保存領域 1 の配列比較

同一のアミノ酸は陰を付けている。列挙した酵素の由来は下に示す。Tvn1315, *Thermoplasma volcanium*; Ta0286, *T. acidophilum*; PicroTre, *Picrophilus torridos*; Sa1250, *Sulfolobus acidocaldarius*; Sa1816, *S. acidocaldarius*; MicspTre, *Microvirga* sp; MsTreH, *Mycolicibacterium smegmatis* MC2; MPTre15A, *Microbacterium phyllosphaerae*

Tvn1315、Sa1816、Sa1250 を対象に、よく保存されているアミノ酸[Glu(E)、Arg(R)、Asn(N)、Trp(W)、Asp(D)、Tyr(Y)、Arg(R)、Phe(F)、Trp(W)、Arg(R)、Asp(D)](Figure 1)を類似のアミノ酸へと変換し、それらの挙動変化を調査した(Figure 2)。



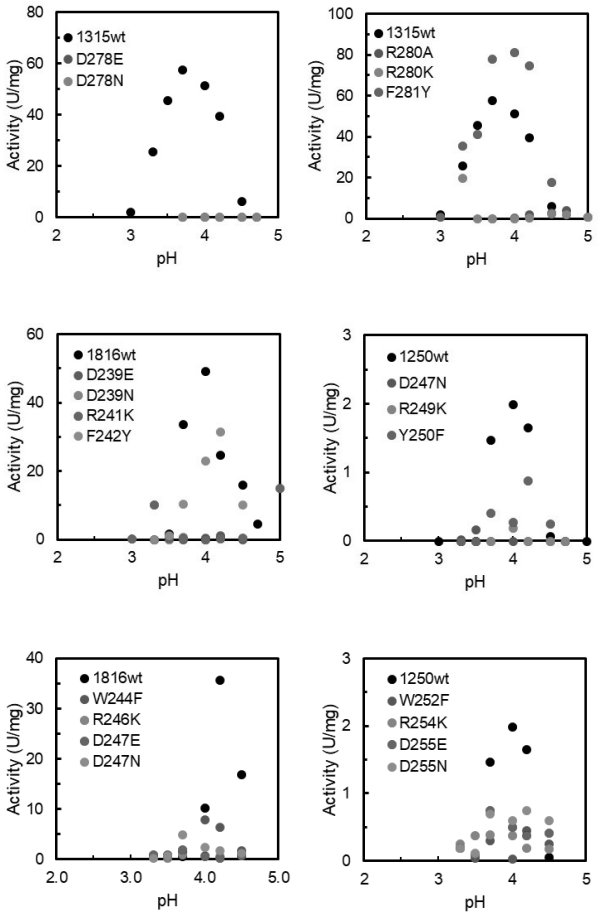


Fig.2 各変異体の pH 依存性

三分割して(例えば Tvn1315 なら ERNW、DYRF、WRD)、Tvn1315 野生型(1315wt と表記)、Sa1816 野生型(1816wt)、Sa1250 野生型(1250wt)、そして、それに対応するアミノ酸変換酵素を表記している。ただし、Tvn1315 の WxRD 各変異体は、ほぼ不活性であったためここには載せていない。

ERNW の場合、Tvn1315 ではある程度活性を維持しているのに対し、Sa1816、Sa1250 では活性は大きく減少した。Tvn1315E274S の活性上昇は目に付く結果である。

DYRF の場合、DYR 変換体はどの酵素も同じような活性減少の傾向を示した。しかし、F 変換体で Tvn1315 は上昇したのに対し、Sa1816 は活性が減少と相対する結果となった。

WxRD の場合、Tvn1315 は不活性となり、他の酵素も活性が減少した。これは GH15 酵素にとって不可欠なアミノ酸群であることを意味している。

これらの結果は同じアミノ酸といえども同じ役割を担っているわけではないことを示唆している。

3．2 BD の多糖結合能に関与するアミノ酸

Tvn1315 の BD は不溶性の多糖(セルロースやキチン)と弱く結合する(4)。糖との相互作用には芳香族アミノ酸が関与していることがよく知られており、Tvn1315 の BD には芳香族アミノ酸が、古細菌トレハラーゼの BD 間でよく保存されている。そこで多糖と結合に芳香族アミノ酸の

関与がどの程度かを調べるために、Tvn1315 の BD 中 32 個の芳香族アミノ酸をアラニンに変換したタンパク質を作製した(アラニンスキャニング、Figure 3)。多くの BD 変換体(CD 欠損体)は野生型 BD 同様、発現して精製できた。しかし、不溶性タンパク質になるものがあった(Figure 4)。可溶性で精製した BD 変異体のセルロース結合能を評価したところ、野生型と比べ、結合能が著しく減少した BD 変異体はなかった(Figure 5)。この結果は、芳香族アミノ酸が個々ではなく協同的に結合に関与していることを示唆している。

また、可溶性タンパク質が著しく減少したアミノ酸変換体においてアラニン置換ではなくロイシン置換すると、55 番目のフェニルアラニンをロイシンに置換した BD-F55L を除く 4 つの BD 変換体で取得、精製できたタンパク質量が増大した(Figure 6)。これは芳香族性と強調するより疎水性が可溶性タンパク質へのフォールディングに寄与していることを示唆し、その上で 55 番目においては嵩高さのある芳香族側鎖を持つアミノ酸が必須であることを意味した。

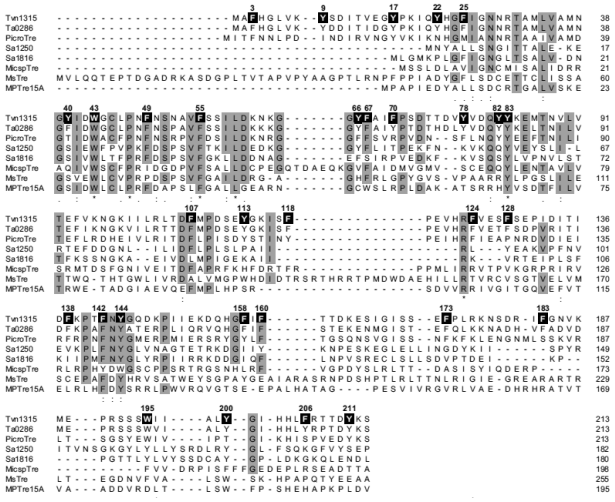


Fig. 3　GH15 トレハラーゼの BD 配列比較

列挙した推定 BD を持つ酵素は下に示す。Tvn1315, *Thermoplasma volcanium*; Ta0286, *T. acidophilum*; PicroTre, *Picrophilus torridos*; Sa1250, *Sulfolobus acidocaldarius*; Sa1816, *S. acidocaldarius*; MicspTre, *Microvirga* sp; MsTreH, *Mycolicibacterium smegmatis* MC2; MPTre15A, *Microbacterium phyllosphaerae*　5 個以上同一のアミノ酸は陰を付けている。変換したアミノ酸は黒塗りでアミノ酸番号を付けている。

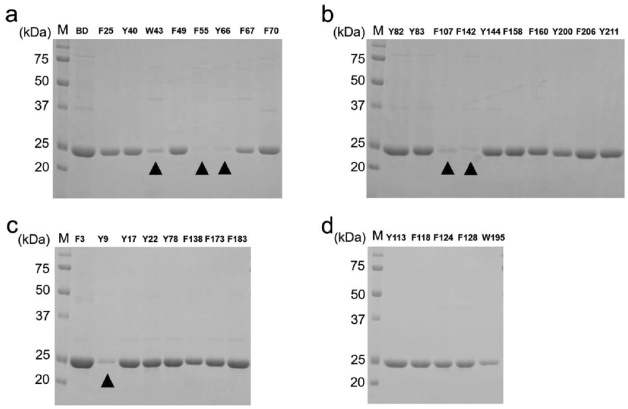


Fig. 4　精製 BD 変換体のポリアクリルアミドゲル電気泳動　▲は可溶性タンパク質が減少した BD 変換体

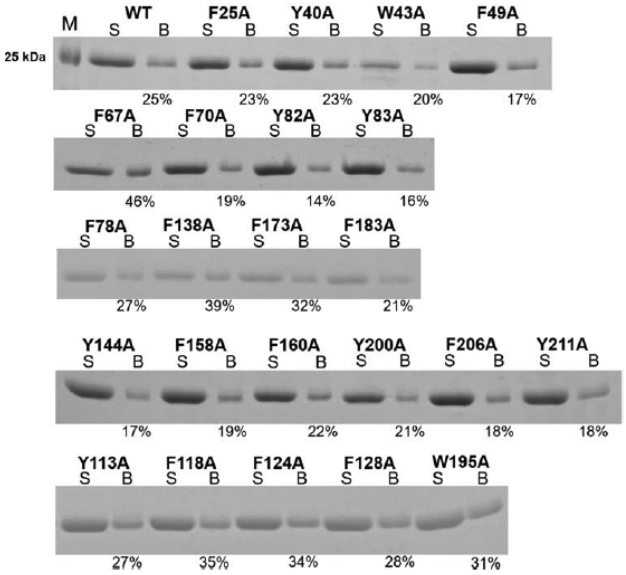


Fig. 5　精製 BD 変換体のセルロース結合分析

添加したタンパク質(S)と結合したタンパク質(B)を示す。数値は S のバンド強度を 100%とした時の多糖への結合度を示す。試験は 2 回実施し、結合度は平均値を示す。

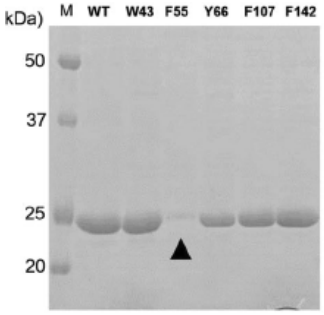


Fig. 6
精製 BD 変換体のポリアクリルアミドゲル電気泳動(ロイシン変換体)
▲は可溶性タンパク質が減少した BD 変換体

3．3　アミノ酸置換の全長酵素に対する影響

BD の芳香族アミノ酸置換の全長酵素に対する影響を CD フォールディングと酵素活性に注目して調査した。多くの全長変換酵素は可溶性タンパク質として取得でき、精製できた。しかしながら、F67A、Y83A, そして F173A が以前報告した Y9 よりも取得した可溶性タンパク質量が少なかった(4、Figure 7)。立体構造上、Y83 は CD 側

につきでており、BD－CD 間の表面相互作用に悪い影響を及ぼしたと考えられる。残る F67 と F173 は BD の内側に向いており、BD 単独で発現した場合は可溶性タンパク質として取得出来たのに対して CD と共に発現した時には不溶性タンパク質となった。この可溶性タンパク質減少の理由はまだわかっていない。

一方で W43A、F55A、Y66A、F107A、F142A は BD 単独では可溶性タンパク質量が減少したにもかかわらず、全長酵素では可溶性タンパク質として取得でき、効率良く精製できたことは興味深い。ヘリックス形成はタンパク質の凝集を阻害し、β-シートは凝集しやすくなると言う報告がある(5,6)。BD の N 末端領域が BD や CD の適切なフォールディングに関与するという結果(4)と併

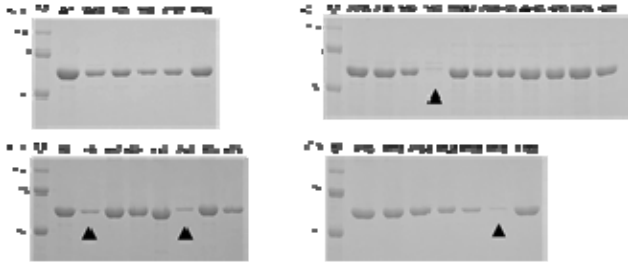


Fig. 7　精製全長酵素のポリアクリルアミドゲル電気泳動　矢印(▲)は取得量が減少した全長酵素

せると、ヘリックス構造の CD の一部にシート構造の BD の表面が相補って適切な形へとなり可溶性タンパク質になったことを示している。

変異を導入した全長酵素のトレハロース分解活性を調査したところ、W43A を含む酵素(W43A)がほんのわずかな活性を示し、Y17A、Y83A、Y113A は 20%以下の活性を示した(Figure 8)。これらの活性に影響を与えるアミノ酸はドメイン境界近くに位置している。酵素活性の要因を追究するためにアラニン以外のアミノ酸に変換してそれらの挙動を調査した。

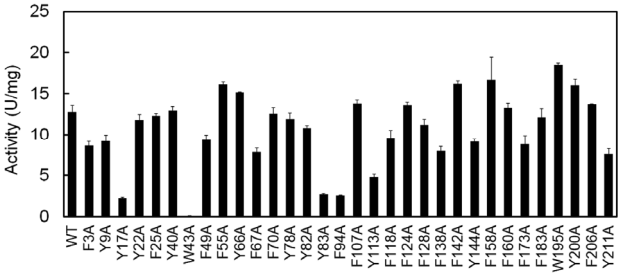


Fig. 8　全長酵素と変換体とトレハロース分解活性

３．４　Trp43 変換全長酵素

BD の 43 番目の Trp の意義を調べるためにアラニン変換体(W43A)以外の 5 つの変換体(W43F、W43Y、W43L、W43I、W43V)を作製し、取得・精製した(Figure 9)。取得量は上の順番で低くなり、このことは可溶性タンパク質としてフォールディングする際、この位置には嵩高い芳香族アミノ酸が必要とされることがわかった。トレハロース分解活性はというと、W43F は野生型酵素と同様な活性を示したが、W43Y は 20%位に減少した。他の疎水性アミノ酸に変換した酵素(W43L、W43I、W43V)は、ある程度可溶性タンパク質として取得できたにもかかわらず、ほとんど活性を示さなかった(不活性)。これらの結果から強調されることは活性を示すには 43 番目の位置には芳香族性側鎖が重要であるということである。

Figure 10 に 30℃での野生型酵素と W43F、W43Y,、W43A の pH 依存性を比較した結果を示した。pH 4.0 と 4.2 の条件で W43F は野生型の約 70%の活性を示すが、pH 3.5 以下になると野生型酵素と同等の活性を示す。これはおそらくインドール環をフェニル基へと変換したことで触媒残基(おそらく一般酸触媒残基)の pK_a が減少したことを示し、その結果 W43F の至適 pH が酸性側へと移動し、およそ pH 3.5 になった。W43Y の場合、この傾向が強まり至適 pH は pH 3.3 になった。Table 1 に 30℃の条件での各変換体の各 pH 上の速度論パラメータを示す。W43 変換体は、基質認識の親和性を示すミカエリス定数(K_M)ではなく、触媒定数(k_{cat})に強い効果を与えている。W43Y の場合では、付加されたヒドロキシ基がおそらく水素結合により触媒残基の位置を少し歪ませ、触媒残基の pK_a を下げると同時に酵素活性を減少させているのであろう。

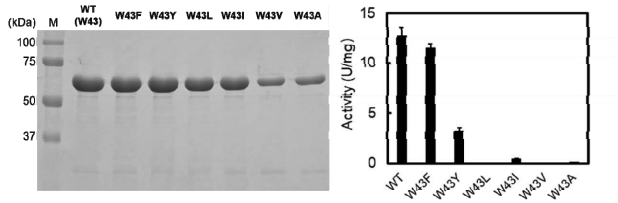


Fig. 9　精製 W43 変換体と活性

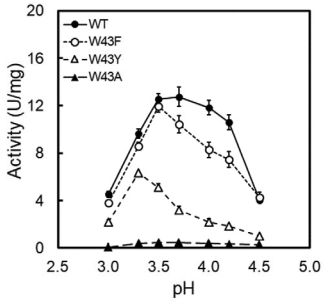


Fig. 10
Tvn1315(WT)、W43F、W43Y、W43A の活性の pH 依存性

Table 1 Steady-state kinetic parameters of Tvn1315, W43F, W43Y, and Y17L for hydrolysis of trehalose at 30 °C

Enzyme	pH	k_{cat}[a] (s^{-1})		K_M[a] (mM)		k_{cat}/K_M (s^{-1} mM^{-1})
Tvn1315	3.3	34.9	±1.3	148.3	±5.0	0.24
Tvn1315	3.5	33.4	±0.8	110.4	±1.2	0.30
Tvn1315	3.7	26.6	±0.3	66.4	±7.9	0.40
W43F	3.5	24.2	±0.03	72.9	±3.6	0.33
W43F	3.7	21.7	±0.1	66.5	±1.9	0.33
W43Y	3.3	11.6	±0.3	73.6	±2.3	0.16
W43Y	3.7	7.6	±0.1	84.2	±3.2	0.09
Y17L	3.7	2.6	±0.04	46.5	±0.5	0.06

３．５　全長酵素において Trp43 と相互作用する CD 中アミノ酸の評価

GH15 ファミリーGA の CD には 5 つの保存領域(Conserved regions、CR)を持っており、この CRs が活性部位を形成している。CR3 と CR5 に触媒残基が位置している(7,8)。GH15 トレハラーゼも同じように領域が備わっており、CR3 に Glu408、CR5 に Glu571 が触媒残基として反応に関与していると報告している(2)。結晶構造中、Trp43 は BD と CD との間に位置し、CR1 に近い場所で Pro263 の主鎖と水素結合しているように見える。よって、P263A、W43A/P263A、W43A/P263W の変換体を作製して調査してみた。P263A は可溶性タンパクとして取得でき WT と同じ活性を示したが、W43A/P263A と W43A/P263W は多くが不溶性タンパク質となり、得られた可溶性タンパク質も不活性であった(Figure 11)。

Protein Interactions Calculator (PIC) server (http:// pic. mbu. iisc. ernet.in/)による相互作用予測より、Trp43 は CR1 にある Arg280 とカチオン-π相互作用していると推定された。しかしながら、R280K と R280A を作製したところ、pH 3.0 から 3.7 までほぼ不活性で、pH 4.5 で活性が減少した値を示すだけであった(Figure 12)。R280 変換体の挙動は W43 で観察された結果と異なった。まとめると、W43 の芳香族アミノ酸は高めの pH に、R280 は低めの pH に必要であることがわかった。

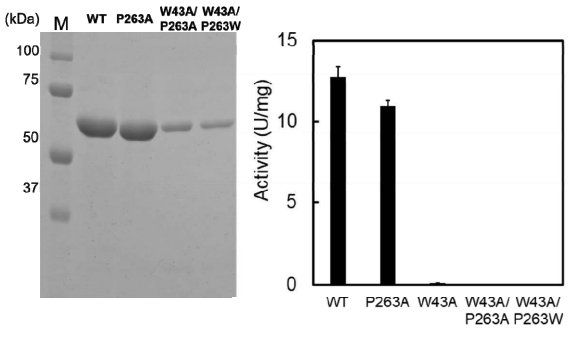


Fig. 11　P243 変換関連酵素の取得と精製(左)、P243 変換関連酵素の活性(右)

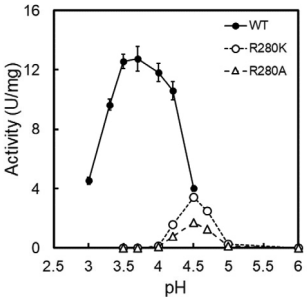


Fig. 12
Tvn1315(WT)、R280K、R280A の pH 依存性

３．６　Tyr17 変換酵素の評価

Tyr17 の機能的役割を調査するために、全長酵素 Y17 変換酵素 Y17F、Y17L、A17A を作製した。これらは充分量取得でき精製できた。Y17F は Tvn1315(WT)と同等かそれ以上の活性を示したが、Y17L は 10%、Y17A は 60%と活性が減少した(Figure 13)。何故 Y17A より Y17L が低いのか現時点ではわからないが、Y17L は k_{cat} 値が低くなっているため比活性に影響を与えていると考えられる(Table 1)。PIC 推測では、Tyr17 は CR2 に位置する Tyr342 と芳香族間相互作用していると予想している。Y342F は Tvn1315(WT)と同等の活性を示したが、Y342A が実質的に不活性であった(Figure 13)。これは、芳香族間相互作用は確かに存在していて、342 番目の位置に、側鎖に芳香環を持つアミノ酸は触媒作用を促すのに必要だと言うことを示している。

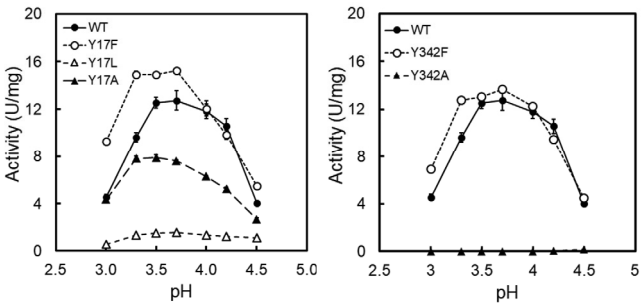


Fig. 13　Y17 変換酵素 (左)と Y342 変換酵素(右)の活性の pH 依存性

３．７　Tyr83 変換酵素と Tyr113 変換酵素の評価

酵素活性に、83 番目と 113 番目の Tyr 残基側鎖がどのような影響を与えるかを調べるために Y83F、Y83L、Y83A、Y113F、Y113L、Y113A を作製し、酵素活性を調べてみた。Y83F は Tvn1315(WT)より少し高い活性を示したが Y83L と Y83A は低めの活性を示した(Figure 14)。これは充分な活性を示すには、83 番目のこの場所が芳香環側鎖を持つアミノ酸が必要であることを示している。PIC によると、Tyr83 は BD と CD 間にあるヘリックス内にある Arg243 とカチオン-π相互用をしているようだが、R243A、R243T、R243K は若干 WT より活性が上昇した。これはこの相互作用が起こっていないことを示唆しており、Y83L と Y83A の低活性に他の要因があると考えられる。

Tyr113 変換酵素について、Y113F、Y113L は WT と同じような活性を示したが、Y113A の活性は半分まで減少した(Figure 14)。つまり、非極性側鎖が活性発揮しやすいことを意味している。ちなみに PIC は Tyr113 の主鎖が Ser111 の OH 基と相互作用していると予想したが、S111A の活性には変化がなかった(Figure 14)。

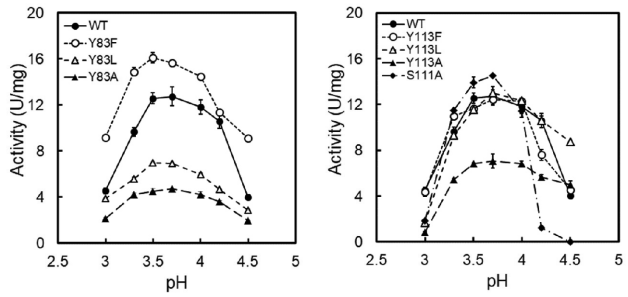


Fig. 14 Tvn1315(WT)、Tyr83 変換酵素、Tyr113 変換酵素、Ser111 変換酵素の pH 依存性

３．８　Tyr17、Trp43、Tyr83、Tyr113 変換酵素の熱安定性

CBM を、単一ドメインや異なる CD に付加させる(CBM 交換)と触媒効率や熱安定性が改善することがある。熱安定性の変化を調べるために 70℃の熱処理を施した後に残存活性を測り、活性部位の再構成に BD 中のアミノ酸変換がどう影響をもたらしているかを調査した。Figure 15 に示したように、Phe 変換体(Y17F, W43F, Y83F, Y113F)は熱処理後にもいくらか活性を保持しているのに対し、Y83L を除いた Leu 変換体は減少した(Figure 15)。熱安定性でも芳香族アミノ酸が寄与していることが示唆された。

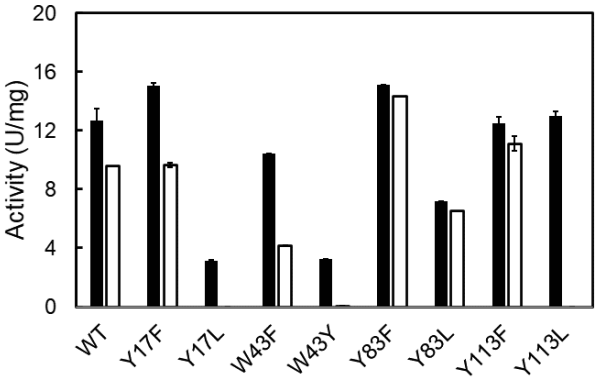


Fig. 15 Tvn1315(WT)、Tyr17、Trp43、Tyr83、Tyr113 変換酵素の熱安定性　熱処理(70℃, 1 時間)後の残存活性(白塗り)と熱処理前活性(黒塗り)で表示。3 回測定した平均値。

４　考察

古細菌 GH15 トレハラーゼは 1 つの BD と 1 つの CD で構成され、これは原核生物 GH15 ファミリー酵素と同じである。糖質代謝酵素の CBM はタイプ A-C に分類される(9)。タイプ A の CBM は平らな結合面で不溶性多糖に結合し、タイプ B は多糖中オリゴ糖内部をクレフト型の結合部位で認識して結合する。タイプ C の CBM は多糖の末端をポケット型結合部位で認識する。おそらく古細菌トレハラーゼの BD は、タイプ A の CBM の範疇に入るであろう。なぜなら古細菌トレハラーゼの BD は可溶性多糖ではなく不溶性の多糖と弱いながらも相互作用するからである。表面上の相互作用なら結合力は弱くなるという理由もある。これまで芳香族アミノ酸が多糖との相互作用に関与し、結合部位として寄与している報告もいくつかあること、いくつかのその芳香族アミノ酸が BD の表面上に位置していることから、芳香族アミノ酸を Ala 変換して結合部位を同定しようと試みた。しかしながら、1 つずつの変換では大きく結合力を減少させるものは見つからなかった。このことから、芳香族アミノ酸は結合に関わっていない、もしくは複数の部位が協同的に結合を担っていることが考えられた。例えば、枯草菌(*Bacillus subtilis*)のエクスパンシン(BsEXLX1)はタイプ A の CBM(CBM63)を持ち、3 つの芳香族アミノ酸(Trp125, Trp126, Tyr157)がセルロース結合部位と提唱されている。WT のセルロース結合活性と比べて、W125A と W126A は半分に減少し、T157A は 80%、三重変異体は 30%と低い減少度にとどまった(10)。

Trp43、Tyr66、Phe107、Phe142 を Ala に変換した BD 変換体は不溶性タンパク質となったが、Leu 変換した場合は可溶性となった。これらは BD タンパク質の内部に位置しており、これらの疎水性効果は可溶性へのフォールディングに充分だったと言える(4)。

芳香族アミノ酸を変換した BD 変換体を CD につなげた、いわゆる BD 変換全長酵素のいくつかには、そのフォールディング、触媒活性、熱安定性に影響が生じた。

糖質分解酵素の CBM 欠損は酵素活性に著しい減少を生じるという報告は多くあり、CBM の存在は CD の触媒活性に重要と言える。しかし、CBM 中のどのアミノ酸が影響を与えているかを論じた報告は限られている。Kim らは、クロストリジウム属 GH9 エンドグルカナーゼ(*Clostridium cellulovorans* EngZ)の CBM3c に良く保存されている Trp 残基(Trp483)を変換したところ、基質結合には影響を与えずに活性だけ減少するという結果を得た。CBM3c はセルロース表面に結合することから、タイプ A に属していて、EngZ の C 末端側に付加している。Trp483 は他の Cel9 酵素にも良く保存されていて、モデル構造では CD 表面に近いところに位置している、彼らはこの結果を受けて、Trp483 は活性部位の正しい位置に位置するのに貢献していると指摘した(11)。同じクロストリジウム属のグルコアミラーゼ(GH15 ファミリー)でも、N 末端ドメインの N 末端側の配列に存在する 26XaaXaaTrp28 の配列がこの酵素の活性部位に相互作用して、活性発揮に関わっていることを私たちは報告している(12)。

Tvn1315BD 内の Trp43 は、BD と CD の境界に位置し、GH15 トレハラーゼに良く保存されている。Trp43 は Pro263 主鎖のカルボニル基と水素結合しているように見えるが、モデル構造の PIC 予測では CR1 内にある Arg280 とカチオンπ相互作用しているとされた。P263A は活性を保ったことから 263 番目の Pro 残基は標準活性測定ではそれほど重要ではないことがわかり、二重変異体(W43P/P263W

や W43A/P263W)でも活性復活は見出せなかった。Trp43 と Pro263 の相互作用があったとしても、Trp43 変異体の振る舞いを左右することはないだろう。

W43F や W43Y は酸性側で活性を維持していたが、弱酸性側(pH が高くなると)活性が低くなった。対照的に R280K や R280A は弱酸性側の pH で低いがしっかりとした活性を示している。43 番目の芳香族アミノ酸は弱酸性側の活性発揮に重要で、280 番目の Arg 残基は酸性側の活性発揮に重要であるということを示唆しており、どちらかに変異を導入したとして二つの残基間の相互作用に変化が生じて pH 依存性に大きな変化が現れるであろう。モデル構造では Arg230 は活性中心の外側に向いている。つまり、活性が低下した理由は直接に触媒残基に相互作用したわけでなく、未同定のアミノ酸残基と関わっていると考えたほうが妥当である。Arg280 は外側から相互作用しているのかもしれない。Trp43 のインドール環をフェニル基に変換すると弱酸性側で活性減少が起こった。嵩高さの減少や窒素原子が存在しないことがわずかな変化を生じさせ、pH プロフィールに変化を生じさせたのであろう。Trp43 と相互作用しているアミノ酸は現時点でわかっていない、さらなる研究、追求が必要であろう。

興味深いことに、W43 変異体の K_M 値はある程度一定であるのに対し、WT の K_M 値は pH 3.3 から 3,7 の間で下がっている。これは周囲の pH が活性部位を構成する酸性アミノ酸の pK_a 値が変化し、その結果基質認識にも影響を与えたことを示している。W43 変異体ではこの減少は現れないので、活性部位中の相互作用ネットワークがインドール環を失った W43 変異体で失われていることを示している。

GH15 トレハラーゼの BD 内の芳香族アミノ酸のいくつかが BD そのもの、また(もしくは)CD の適切なフォールディングを補助していること、CD 内の活性部位の適切な配置に関与していることを示唆した。特に BD の Trp43 と CD の未同定のアミノ酸との相互作用は重要で、この相互作用の乱れは触媒機能に大きく影響を及ぼすことになった。酵素活性の付与と調節に寄与する BD と CD との間の相互作用には、まだまださらなる追究が必要だが、GH15 ファミリーや糖質関連酵素の知見に必要だと言える。

参 考 文 献

（1）Sakaguchi M.: Diverse and common features of trehalases and their contributions to microbial trehalose metabolism. Appl Microbiol Biotechnol. 104 (2020) 1837-1847.

（2）Sakaguchi M, Shimodaira S, Ishida SN, Amemiya M, Honda S, Sugahara Y, Oyama F, Kawakita M.: Identification of GH15 family thermophilic archaeal trehalases that function within a narrow acidic-pH range. Appl Environ Microbiol. 81(2015)4920-31

（3）Yuasa M, Okamura T, Kimura M, Honda S, Shin Y, Kawakita M, Oyama F, Sakaguchi M. : Two trehalose-hydrolyzing enzymes from Crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* exhibit distinct activities and affinities toward trehalose. Appl Microbiol Biotechnol. 102(2018)4445-4455.

（4）Sakaguchi M, Mukaeda H, Kume A, Toyoda Y, Sakoh T, Kawakita M.: Evaluation of the roles of hydrophobic residues in the N-terminal region of archaeal trehalase in its folding. Appl Microbiol Biotechnol 105 (2021) 3181–3194.

（5）Naeem A, Bhat SA, Iram A, Khan RH. : Aggregation of intrinsically disordered fibrinogen as the influence of backbone conformation. Arch Biochem Biophys 603 (2016) 38–47.

（6）Abidi M, Iram A, Furkan M, Naeem A. : Secondary structural alterations in glucoamylase as an influence of protein aggregation. Int J Biol Macromol 98 (2017) 459–468.

（7）Ohnishi H, Matsumoto H, Sakai H, Ohta T (1994) Functional roles of Trp337 and Glu632 in Clostridium glucoamylase, as determined by chemical modification, mutagenesis, and the stopped-flow method. J Biol Chem 269 (1994) 3503–3510.

（8）Aleshin AE, Feng PH, Honzatko RB, Reilly PJ Crystal structure and evolution of a prokaryotic glucoamylase. J Mol Biol 327 (2003) 61-73.

（9）Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ : Carbohydrate binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. Biochem J 382 (2004) 769–781

（10）Georgelis N, Yennawar NH, Cosgrove DJ : Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. Proc Natl Acad Sci USA 109 (2012) 14830–14835.

(11) Kim SJ, Kim SH, Shin SK, Hyeon JE, Han SO : Mutation of a conserved tryptophan residue in the CBM3c of a GH9 endoglucanase inhibits activity. Int J Biol Macromol 92 (2016) 159–166.

（12）Sakaguchi M, Matsushima Y, Nagamine Y, Matsuhashi T, Honda S, Okuda S, Ohno M, Sugahara Y, Shin Y, Oyama F, Kawakita M : Functional dissection of the N-terminal sequence of *Clostridium* sp. G0005 glucoamylase: identification of components critical for folding the catalytic domain and for constructing the active site structure. Appl Microbiol Biotechnol 101(2017)2415–2425.

３．総合研究所科学研究費採択奨励研究報告

（２０２３年度）

セルロースナノファイバー充填植物由来エンプラ系バイオマス複合材料の成形技術の構築

機械工学科　教授
西谷　要介

環境負荷低減や持続型社会形成のためには，プラスチックやプラスチック系複合材料においても機械的性質や耐熱性などの性能向上だけでなく，環境性能をもっと高めることが強く求められている．そのため，再生可能資源であるバイオマス由来原料を用いた高性能なバイオマスプラスチックや，それとバイオマス由来の充填材との複合化によるバイオマスプラスチック系複合材料の開発が急務である．しかしながら，現在多用されている石油・石炭などの化石資源由来のエンジニアリングプラスチック（エンプラ）と比べて，バイオマスプラスチックやバイオマスプラスチック系複合材料は耐熱性や機械的性質などが低いのが現状である．したがって，実際の機械部品などに適用するためには，耐熱性や機械的性質が従来のエンプラに匹敵する高性能なバイオマスプラスチック系複合材料の創製が必要不可欠である．本研究では，高性能な総植物由来エンプラ系バイオマス複合材料を創製するために，植物由来エンプラの１種である植物由来ポリアミド 1010（PA1010）をマトリックス樹脂とし，粉末状セルロースナノファイバー（CeNF）を充填材としたナノセルロース充填植物由来 PA1010 バイオマス複合材料（CeNF/PA1010）の成形技術を構築することを目的とした．具体的には，次に示す４つの要素技術を検討した．（１）CeNF を良分散させる表面処理技術および相容化技術の構築，（２）CeNF/PA1010 バイオマス複合材料の溶融状態におけるレオロジー的性質の把握，（３）二軸押出機を用いた溶融混練時におけるナノセルロースの分散・分配状態の把握，ならびに（４）二軸押出機のスクリュパターン変更による CeNF/PA1010 バイオマス複合材料の物性変化，の４つの技術を構築することである．本年度は，昨年度に検討した相容化剤（マレイン酸変性ポリプロピレン（PP-g-MA））に引き続き，エチレンーメタクリル酸グリシジル共重合体ーグラフトースチレンーアクリロニトリル共重合体（EGMA-g-AS）の添加が機械的性質に及ぼす影響を中心に検討した．EGMA-g-AS の添加量は 2 wt.%，CeNF の充填量は，0，1，5 および 10 vol. %である．CeNF/PA1010/EGMA-g-AS バイオマス複合材料の成形は二軸押出機を用いた溶融混練（220℃，85rpm）により複合化し，射出成形機（220℃）により各種試験片を成形した．機械的性質の評価としては，引張り試験およびデュロメータ硬さ試験などを評価した．これらの評価結果から，EGMA-g-AS 添加により強度や硬さなどが向上すること，特に昨年度検討した PP-g-MA よりも改質効果が高いことがわかった．これらは EGMA-g-AS 添加によりバイオマス複合材料中の CeNF の分散性が，PP-g-MA 添加よりも良分散を示すことを SEM 観察により確認した．今後は，より高性能化を図るためには，レオロジー的性質を把握した上で，成形加工技術と組み合わせていく必要があると考える．

レプトジェネシスが機能する輻射シーソー模型の背後にある大統一理異論の探究

基礎・教養科　教授
進藤　哲央

素粒子標準模型には、微小ニュートリノ質量の起源、暗黒物質の正体、宇宙のバリオン数非対称性（バリオジェネシス）などの重要な未解決問題があり、これらを説明するためには標準模型を超える物理が必要である。また、クォークやレプトンの電荷が量子化されていることから、電弱相互作用と強い相互作用が統一された基本理論の存在が強く示唆されている。本研究では、標準模型の３つの問題を解決するシナリオとして、ニュートリノ質量生成を、暗黒物質を含むような新粒子のループ効果によって説明できる、輻射シーソー模型に注目し、この模型において、レプトジェネシスによるバリオジェネシスを機能させる可能性についての研究を行った。また、このようなシナリオの背後にある大統一理論の有様を明らかにするため、低いエネルギースケールに導入される新粒子の寄与によって、ゲージ結合定数の統一が実現するような模型を構築し、B 物理などのフレーバー物理に対してどのような寄与があるかを綿密に解析して、将来の実験による大統一理論の検証可能性について議論した。これらの研究の結果として下記の成果を挙げた。

(1) ゲージ結合定数統一を実現する現象論模型の研究
本研究課題の中心をなす研究を行い，学術論文一本を出版した。
Toru Goto, Satoshi Mishima, Tetsuo Shindou, “Flavor physics in SU(5) GUT with scalar filed in the 45 representation”, Phys. Rev. D108(2023)9, 095012.

(2) 輻射シーソー模型におけるレプトンフレーバーを破る過程の研究
KNT 模型とよばれるニュートリノ質量の模型に関する研究を行い、学術論文一本を出版した。
O. Seto, T. Shindou, and T. Tsuyuki, “Low-scale leptogenesis and dark matter in a three-loop radiative seesaw model”, Phys. Rev. D108(2023), 055002.

都市・建築における水収支の動態分析とその環境影響評価

まちづくり学科　教授
西川　豊宏

1. 研究目的

我が国の国土は、急峻な地形で降水量も季節的・時刻的な偏在性があり、とりわけ近年の局所的なゲリラ豪雨や線状降水帯による長雨は、時間或いは日積算に基づく既存の設計クライテリアでは許容できない激甚降水となっているが雨水そのものはオンサイトで確保できる貴重な水源でもある。本研究は、建築物の水需要を敷地単位、街区単位で評価領域を定め、その水収支を動的に捉え、これに由来する二酸化炭素排出量を算定し、都市・建築における給排水機能の自律性と環境性能の二軸評価を行い、持続可能な水インフラのあり方を提言することを目的とする。これにより、ゼロウォータービルディング評価手法の確立、代替水利用建築の環境影響、降水特性変化に対する雨水利活用の最適化、生活スタイルの多様化と建物用途別の水使用実態を明らかにする。

2. 研究費の使途と研究成果

研究発表のため国内 1 件、国外 1 件の出張旅費申請及び学会参加費として執行したほか、研究課題を推進するために必要な消耗機器備品（残留塩素濃度計、被覆熱電対など）を購入し、実験計測に利用した。これらにより、口頭発表論文 3 件（日本建築学会 1 件、空気調和・衛生工学会 1 件、CIBW062 国際シンポジウム 1 件）、審査付き論文 1 件（空気調和・衛生工学会論文集）、専門誌における解説・報告 2 件において研究成果の外部発信を行った。また、これら研究課題の巣審に関連し、指導学生（大学院生）による学会賞受賞 1 件（空気調和・衛生工学会　篠原記念賞奨励賞）にも寄与した。

3. 2023 年度の科研費申請

審査結果開示によると、①研究課題の学術的重要性は 3.50（採択課題の平均点 3.16）、②研究方法の妥当性 2.83（同 3.29）、③研究遂行能力及び研究環境の適切性 3.50 （同 3.37）であったことから、研究分担者とともに研究課題内に設けた各テーマの研究方法について協議するとともに予算使途を明確にし、「降水特性と生活様式の変化に対する代替水利活用設備の水収支と環境負荷の動態分析」と研究題目を変更して基盤研究（B）に応募した。その結果、「審査区分における採択されなかった研究課題全体の中での書面審査の総合評点に基づくおおよその順位」はＡであったが、①2.67（採択課題の平均点 3）、②2.83（同 3.22）、③3.17（同 3.3）の不採択となった。

4. 今後の課題

研究課題の推進に伴い、研究分担者の研究テーマの範囲が広がり、やや総花的な申請内容になり、テーマの軸が不鮮明になったと検証している。研究課題の新規性と独創性に留意しつつ、テーマの絞り込みを行うなど、抜本的な研究計画の見直しを行い、次回申請に備えたい。

高 In 組成 InGaN 自然形成ナノ構造の製作・秩序化と赤色発光素子応用

応用物理学科　教授
山口　智広

窒化物半導体材料による赤色発光素子の実現は、同一材料系で素子小型化により実現可能なマイクロ LED や、高温動作時の安定性に優れたレーザが依然望まれている高出力レーザプロジェクタなどへの応用展開を可能にする。窒化物半導体材料を用いて赤色発光素子を実現するためには、InGaN の結晶成長技術向上が欠かせない。現状、InGaN に格子整合する高品質基板がないため、GaN 基板もしくは GaN/Al_2O_3 テンプレート(以降 GaN テンプレート)上に成長することが求められる。本研究では、赤色発光素子応用に向けた 「課題 I: GaN テンプレート上に高品質 InGaN 結晶を成長するための動的挙動観察とその制御」、および「課題 II: GaN テンプレート上への InGaN ナノコラム構造の結晶成長」を行った。

課題 I : GaN テンプレート上に高品質 InGaN 結晶を成長するための動的挙動観察とその制御では、大型放射光施設 SPring-8 にて、放射光 X 線回折を用いた結晶成長中の動的挙動その場観察を行った。またその知見を活かして、格子緩和制御技術を開発した。格子緩和制御を行うと、InGaN 結晶の高品質化(InGaN ピークサイズの減少)と InGaN 結晶性・表面平坦性の向上(縦軸に延びたストリーク)を確認(図 1)し、格子緩和制御技術を構築した。

課題 II : GaN テンプレート上への InGaN ナノコラム構造の結晶成長では、GaN テンプレート表面に FIB 加工で周期的な穴を形成、その穴に結晶核を形成し、InGaN ナノコラム構造の結晶成長を行ったところ、図 2 に示すように(0001)面(左)および(10-11)ファセット面(右)を有するナノコラムの成長制御に成功した。特に(10-11)ファセット面を有するナノコラム上に InGaN/InGaN 多重量子井戸(MQWs)構造を形成することにより、MQWs からの赤色発光(λ~645 nm)を確認(図 3)した。

本研究は、課題 I は量子科学技術研究開発機構(QST)、課題 II は上智大学との共同研究により行われた。

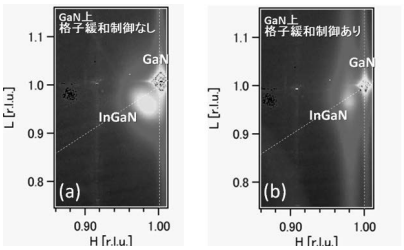


図 1. 格子緩和制御(a)なし(b)ありによる InGaN 結晶性の違いを示すその場観察結果.

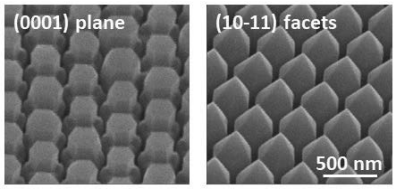


図 2. (0001)面(左)および(10-11)ファセット面(右)を有するナノコラムの鳥観図.

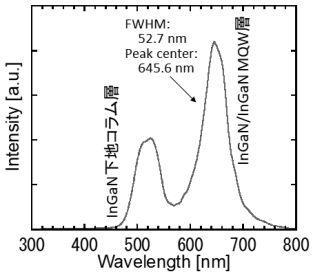


図 3. (10-11)ファセット面を持つ InGaN ナノコラム上 InGaN/InGaN MQWs の PL スペクトル.

磁力支持天秤による球に働く空気力の測定

機械工学科　教授
瀬尾　和哉

回転する球にはマグヌス力が作用する．回転するボールの飛行軌道は，マグナス力によって曲げられる．このため，回転するボールに作用する正確なマグヌス力測定は重要である．風洞実験によりマグヌス力を測定する場合，ボールを支持する必要があり，支持棒を用いるのが一般的である．この棒が流れを乱す（支持干渉）ため，マグナス力を正確に測定することができない問題がある．そこで，本研究では，回転する球に働く正確な空気力計測を行うために，磁力支持天秤を採用した．本稿では，実験装置の概要と試験結果を報告する．

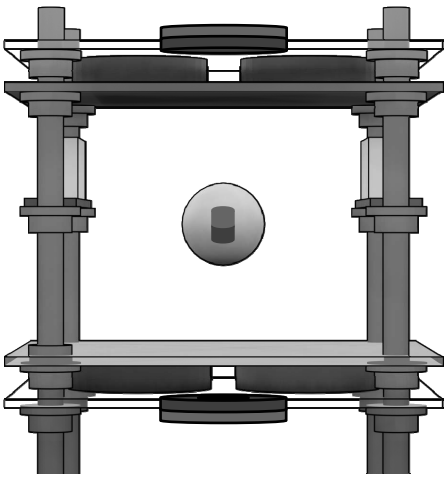


Fig.1 A schematic of the experimental set-up.

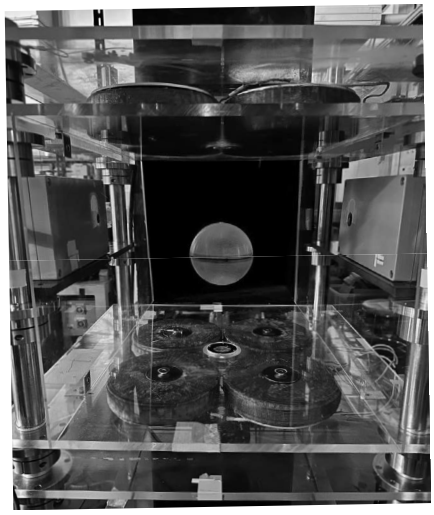


Fig.2 Experimental set-up.

Fig.1 と 2 は実験装置の概略図と写真である．図の真中に磁力支持された球がある．球の中心には，ネオジウム磁石が挿入されている．一方，試験空間の上下には，各 1 個のネオジウム磁石と各 4 個の電磁石（コイル）がある．前者は球の自重を指示できる程度の磁場勾配（磁気力）を発生させ，後者は流体力に対応した磁気力をフィードバック制御により発生させる．

Fig.3 は実験結果である．両軸共に無次元数であり，マグヌス力係数：C_Y のスピンパラメータ：Sp 依存性である．レイノルズ数（Re 数）を変数としてとった．Re 数によらず，マグヌス力係数は Sp の増加とともに増加し，Sp が大きい場合，C_Y は一定値に漸近しつつある．

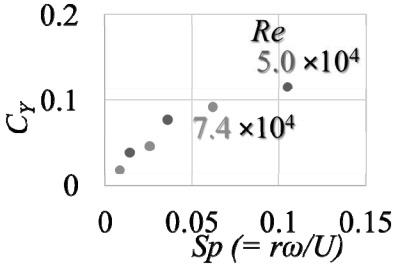


Fig.3 The spin parameter dependence of the Magnus force coefficient.

理想の電池形態を実現する高活量・低融点の固体電解質

環境化学科　准教授

関　志朗

高性能なNaイオン電池の開発に向けては、一般的に低融点かつ熱的・電気化学的に安定な溶融塩電解質が求められる。本研究では、Na ビス（フルオロスルホニル）アミド（NaFSA）と Na（フルオロスルホニル）（トリフルオロメチルスルホニル）アミド（NaFTA）の2種のNa塩を混合することで、それぞれ単独では得られない低融点の溶融塩が得られることを示した。具体的には、NaFSA と NaFTA をモル比 8:2 で混合した際、融点は 363 K にまで低下し、単一の陽イオン(Na^+)を含むイオン液体が形成された。この混合物は、容易に過冷却液状態をとる性質を持ち、ガラス転移のような挙動を示しました。

イオン伝導特性については、得られた混合塩 $Na[(FSA)_{0.8}(FTA)_{0.2}]$のイオン伝導度（・）は、融点をはさんで連続的に変化し、Vogel-Tamman-Fulcher（VTF）式に従うことが確認された。これは、同物質が過冷却液体として機能することを意味する。また、融点付近で測定されたイオン伝導度は 10^{-3}S cm^{-1}程度と比較的高く、陽イオン移動度の指標となる見かけの Na^+輸率は 0.92 と極めて高い値を示した。これは、電解質中でNaイオンが優先的に輸送されることを意味し、電池への応用において大きな利点となることが期待された。よって、低融点かつ高いNaイオン伝導性を兼ね備えた新しい溶融塩電解質の設計に関する知見を深めると共に、将来的なNaイオン電池の高性能化に貢献する可能性を示したと考えられる。

超秩序構造を内包する中間酸化物ガラスの創製と原子構造および電子状態の解明

応用化学科　准教授
橋本　英樹

酸化物ガラスの研究の歴史は長く，そこには 2 つのよく知られた法則がある。金属カチオン(M)に対する酸化物イオンの配位数(n)が 3 または 4 に限られ，MO_n 多面体は稜や面ではなく，頂点を共有するという“Zachariasen 則”が一つ。もう一つは，ガラス転移点 T_g と融点 T_m の間に $T_g/T_m = 2/3$ が成り立つという経験則（2/3 則）である。本申請は，我々のアルミナガラスの発見（Hashimoto et al. *Sci. Rep.* **12**, 516 (2022)）を出発点としている。そのガラスは $T_g/T_m \approx 1/3$ の極端に低い T_g をもつ。配位数は n = 4–6 であり，配位多面体は稜を多く共有するとともに空隙が極端に少なく局所的に結晶に近い高度な構造秩序（超秩序構造）を有する。つまり，この材料はガラス科学で広く受け入れられている 2 つの法則から完全に逸脱する特異性を有する。加えて，アルミナは，ガラスの網目構造を形成できる「網目形成酸化物」ではなく，添加すると網目構造の間に入ってガラスの特性を変化させる「修飾酸化物」でもない，単独では決してガラスにならない「中間酸化物」の一つであるが，そのアルミナが他元素の力を借りることなくガラス化することの発見は，その将来展開が基礎学理的にも材料科学的にも大変意義深いものになる可能性を示唆している。本研究では“Zachariasen 則”と“2/3 則”から完全に逸脱した，超秩序構造を有するガラス材料群―単成分中間酸化物ガラス―の諸物性，ガラス形成能，原子構造，電子状態，トポロジーを，計画班との綿密な連携によって解明することで，ガラス科学における新しい学理を構築することを目指す。

アルミニウム金属を電気化学的に酸化して合成した非晶質アルミナを出発物質として超高圧を印加することでバルクの非晶質アルミナ（アルミナガラス）を合成した。示唆走査熱量計（DSC）を用いた熱分析の結果から，我々が示差熱分析でガラス転移と同定したベースラインシフトのような挙動は，ガラス転移ではなく，ブロードな発熱と吸熱が重なった結果であることが明らかになった。前者は構造緩和もしくは初期に形成された酸素欠損の修復に起因すること，後者は試料内に僅かに残存した水酸基の脱離に起因すると考えられる。高圧印加によってバルク化した試料の DSC 曲線にも同様のブロードな発熱が観測されているが，更にブロードになり低温側に裾を引く形に変化した。一方で吸熱ピークの位置についてはほとんど変化しなかった。電子スピン共鳴分光法の測定結果から，加圧後には酸素欠損が新たに生じることが確認されているため，DSC のプロファイルが変化したのは，酸素欠損の種類と量が増えたことに起因すると考えられる。水酸基と酸素欠損をできる限り排除して試料を高純度化することが今後必要になると考えられる。

リン酸異常現象を利用した放射性物質のガラス固化と相分離によるケミカルリサイクル

応用化学科　教授
大倉　利典

原発事故により発生した放射性物質による汚染土壌の保管技術は確立しておらず、課題となっている。除染が困難な放射性物質としてCsが挙げられるが、これは土壌中の粘土鉱物が様々な陽イオンを吸着および収着する能力を持ち、とりわけCsに対して高い選択性を示すためである。そこで、Cs 吸着粘土鉱物ごとガラス固化を行うことで、減容化をした上で長期安定的な保管ができると考えた。ガラス溶融時の課題として、Csの揮発が挙げられる。そこで、Cs吸着粘土鉱物に対して焼成を行い、化学的安定性に優れたポルサイトを生成させることで、より安定的なCsの固定化が期待できる。当研究室ではこれまでに$MgO-P_2O_5$系ガラス(MPガラス)を用いた放射性廃棄物のガラス固化を検討してきた。MP ガラスはメタ組成 ($MgO/P_2O_5=1$)において、急激な密度低下(リン酸異常現象)が起こることから、より多くの廃棄物を取り込むことができる。したがって、汚染土壌の長期安定的な保管のため、Csを吸着させた粘土鉱物の焼成によるCsの固定化とMPガラスへの固化を検討した。

100-4000 ppmの$CsNO_3$溶液15 mLに対し、粉末状のモンモリロナイト(粘土学会標準試料：月布産、以下Mts)0.1 gを加え、24h振とうさせた。3500 rpmで1h遠心分離した後、上澄み液に対して原子吸光測定を行い、吸着等温線を作成してMtsのCs飽和吸着量を求めた。また、1Mの$CsNO_3$溶液500 mLに対し、Mtsを15 g混合し24h振とうさせ、Cs飽和吸着試料(以下CsMts)を作製した。Mts、CsMtsに対して1200℃で3h焼成を行い、X線回折(XRD)より結晶相の同定を行った。母ガラスとして種々の混合比のMgO、H_3PO_4よりMPガラスを作製し、粉砕したMPガラスと焼成済みのCsMtsを混合した(20 wt%、30 wt%)後、1450℃で2h溶融、流し出し、急冷して固化体試料を得た。得られた固化体試料に対して、XRD測定、熱重量示差熱分析(TG-DTA)、蛍光X線分析(XRF)を行った。以下、母ガラスとして$MgO:P_2O_5$=50:50(mol%)、CsMtsの含有率20 wt%の固化体試料をMP5050CsMts20と表記する。

吸着等温線より、Mtsの Cs飽和吸着量は119 mg g^{-1}であった。XRDより、焼成前のMtsとCsMtsではMtsの回折ピークのみが見られ、焼成後のMtsではムライト($3Al_2O_3 \cdot 2SiO_2$)、焼成後のCsMtsではポルサイト($Cs_{0.8}Al_{0.78}Si_{5.15}O_{12}$)が生成したことがわかった。CsMtsの含有率20 wt%の固化体すべてとMP4357CsMts30は、XRD、TG-DTAよりガラス化を確認した。また、MP4753CsMts30はガラス表面に失透、MP5050CsMts30は融液の粘度が高く、流し出しができなかった。XRFより、全ての固化体試料にCsが残存していることを確認した。

SEMの潜在能力を十分に発揮させるための Image denoising 活用技法

電気電子工学科　教授
於保　英作

最新の走査電子顕微鏡(SEM)は、十分な分解能・解像度を持つと考えがちである。しかし、取得されるSEM像の画質の観点から見ると、多種多様な性質を持つ観察試料群に対しては、期待する画像品質が得られないことが多い。言い換えれば、像コントラストが弱く、かつ電子ビーム照射に弱い観察困難試料群については、SEM 装置が持つ潜在的能力が発揮できていないことになる。加えて、視野探索・帯電抑制等で活躍する高速スキャンモードでは、ノイズの悪影響が非常に大きい。これらの装置オペレーション時に出くわす低画像品質の悩みは、正に解決すべき大きな問題の一つである。

本研究では､その解決法の有力候補として､深層学習によるDenoising手法を念頭に置いた。ただし、その内容はAIでデノイズする手法自身の研究ではない。最先端のAI Denoiser をSEM像に適用しても満足な結果が得られないことが判明しているので、SEM 像における有効活用を阻害するするボトルネックの特定（可視化）・解消を研究の主眼とした。具体的には、まず高速スキャンSEM像の連続取得システムを構築し､その一連の取得画像に対して既知のAI Denoiserを適用した。次に、新しく考案したSEM像中に含まれる信号S、ノイズN、そのSN比のマップ画像を利用して、AI 利用ノイズ除去技術の性能評価のための情報を提供できるシステムを作製・活用した。その結果として、最先端のAI Denoiserと位置づけられる手法の一つは、ノイズを除去しやすい領域（SとNを分離して評価しやすい高SN比の部分領域）のみで性能を発揮し､SとNの見分けがつきにくい低SN比領域ではほとんど役立っていないことが分かってきた。勿論、ノイズ除去画像全体としての評価を行えば、良好に画質改善できた部分が少なからず存在するので、AI Denoiser のノイズ除去効果は高いと言っても良いかも知れない。ただし、本研究でターゲットにしているSEM像では、各微小領域で観察される微弱コントラストの表面微細構造がどれほど正しく捉えられているのかが重要であり､前述の低SN比領域の議論に相当する。残念ながら、本分野での利用にはまだ大きな注意が必要であろう。

本研究のために考案したSN比マップ画像は、ノイズ除去技術の評価に止まらず、これまで可視化できなかったSEMの有用情報を利用可能とした。つまり､各微小領域からのSN比等の測定値を通して、微細構造情報の確かさを視覚的に評価できる。また、SEM ノイズについても、その信号依存性が可視化・数値化できた。更なるSN比マップ画像の応用範囲の拡大を期待する。

食品ロス削減をサポートするメタボローム解析に基づく生鮮食材の鮮度予測の提案

応用化学科　教授
飯島　陽子

野菜や果物、キノコなどの非動物性食材は、生肉などの動物性生鮮食材と異なり、消費期限が明確に記載されていない。そのため、実際の食べごろ、鮮度は、見た目やにおいで消費者によって感覚的に判断されているのが現状である。本研究の目的は、メタボロミクスを活用した一斉成分分析により、非動物性食材の保存における成分変動、生成制御を調べ、鮮度指標となるような成分変動をスクリーニングし、成分組成に基づく鮮度評価を考案し、“真”の可食期間を消費者に提案することである。これらの結果を消費者に還元することで、食材の見た目に囚われない鮮度の確認、見た目が悪くても食することが可能であることを示すことができれば、結果として食品ロスの削減に貢献できる。

本研究では、生鮮食材のうち、キノコ類に着目し、鮮度とそれに伴う代謝物の関係について調べた。5 種類（マイタケ、エリンギ、エノキタケ、ブナシメジ、シイタケ）のキノコ類について、スーパーで購入した市販品のキノコ 1 株を 2 つに分け、すぐに凍結乾燥・粉砕したものを 0 日サンプル、7 日間冷蔵庫保存した後、凍結乾燥・粉砕したものを 7 日サンプルとした(各 5 連)。水溶性不揮発性成分について、抽出溶媒で抽出後、TMS 誘導体化して GC-MS で分析を行い、糖、アミノ酸、有機酸などを分析した。GC-MS 分析により得られた生データから、糖やアミノ酸が 43 成分同定された。その他に糖の一種である糖アルコールも多く見受けられた。各キノコの 0 日サンプルで PCA 解析を行った結果、ブナシメジとエリンギについて組成が近いことが示された。Score Plot より判別された、各キノコの種類によって特徴的に多い成分は、エノキタケに ɤ-Aminobutyric acid(GABA)、ブナシメジに Inositol、マイタケに Galactose があったが、エリンギとシイタケでは確認できなかった。他にも Ctritic acid や Malic acid などの有機酸や、Arabitol、Mannitol など、キノコによって呈味成分の含有量は大きく異なり、これらがキノコを食した時に感じる呈味の差異要因の 1 つではないかと考えられる。次に、各キノコにおける保存の影響について調べた。PCA 解析を行った結果、0 日サンプルと 7 日サンプルの間でエノキタケ、ブナシメジ、マイタケは、成分組成が大きく異なっていたのに対し、エリンギ、シイタケについては組成に変化が見られなかった。このことから、エリンギ、シイタケは、保存による影響が少なく、他サンプルより比較的日持ちする食材である可能性が示唆された。

古細菌のトレハロース代謝に関わる酵素の機能解明と希少オリゴ糖合成への応用展開

生命化学科 准教授
坂口　政吉

トレハロースは、エネルギー源だけでなく、乾燥、凍結などの環境ストレスに対する重要な適応シグナル分子として知られ、食品、化粧品などに配合されている。さらに、認知症関連タンパク質の凝集阻害効果や除去促進効果も報告され、近年注目されている二糖である。応募者は、三種の古細菌(サーモプラズマ属2種、スルフォロバス属1種)から四種のトレハロース加水分解酵素(トレハラーゼ、Tvn1315, Ta0286, Sa1250, Sa1816)を見出し、新たな古細菌のトレハロース代謝経路（加水分解経路)を提唱した。そして最近、低分解能ながら、Tvn1315酵素の立体構造解析に成功し、この酵素がN末端側のドメイン(N-ドメイン)とC末端側の触媒ドメイン(C-ドメイン)で構成されていることがわかった。

本研究では、これらトレハラーゼの基礎的研究および産業利用を念頭に、活性の異なる古細菌トレハラーゼの基質認識に関わるアミノ酸の役割を含めた機能の解析、そしてN-ドメインとC-ドメインとの相互作用の解析、一方で古細菌のトレハロース合成酵素(TreT)も新規取得し、この酵素の機能研究と共に、この酵素を用いて、生理活性を示す可能性があるトレハロース類似のオリゴ糖合成を試みた。

活性部位を形成している5つの保存された領域中、保存度の高い保存領域1のアミノ酸変換により役割が共通する点と異なる点が観察され、酵素間で基質の捕まえ方(基質認識)が異なることを示唆した。Tvn1315のNドメインは多糖セルロースと結合する。グルコースとの相互作用には芳香族アミノ酸が関わっている。それらをアラニンに変換して調査した。残念ながら、セルロースとの相互作用には差異は観察されなかったが、不溶性タンパク質となる変換体が見られた。N-ドメイン単独でも調査したが、その傾向は引き続き観察された。これらの結果は、折りたたまれる際にN-ドメインが可溶性とならなければ、C-ドメインは可溶性となれないことを意味している。最後に、トレハロース類似体合成への展開では、加水分解酵素を合成酵素化することはできなかった。一方で、スルフォロバス属TreTを新規取得でき、融合タンパク質ではあるが、トレハロースはもちろんのこと、片方の単糖がマンノースであるマンノトレハロース、ガラクトースであるガラクトトレハロースを合成でき、今後に期待が持てる結果を得た。

照明光の空間変容の分光記録と物体色知覚への影響

情報デザイン学科　教授
福田　一帆

ヒトはシーンを観察するときに無意識に照明光を推定してその影響を差し引くことにより，多様な照明環境においても安定した色の見えを実現していると言われている．しかし特に自然光は空間による変容が非常に大きい．例えば晴天時の昼間の屋外の自然光は，主に太陽からの直射光は白色であり，太陽光が大気により拡散されて生じる天空光は寒色である．その結果，直射日光と天空光の両方に照らされる日なたの領域と，直射日光が遮られて天空光のみに照らされる日陰の領域とは照明光の色は大きく異なり，同様に立体物に生じる陰影も単に照明の明暗だけでなく色の変化もともなう．物体色知覚の性質を明らかにするためには，このような照明光の空間変容の影響を明らかにすることが必要である．また，照明光の空間変容自体を分析・記録することも重要である．

本年度は，昨年度までに構築した照明光の空間変容の分光計測手法と，その計測結果を利用した不均一な照明シミュレーション画像の作成手法について，実際に計測したデータを視覚化して検証する実験をおこなった．計測には，被写体として幾何学立体の石膏像を複数配置して，照明にはシーン全体を一様に照らす照明（一様照明）と一方向のみから強く照らす照明（指向性照明）を組み合わせて不均一な照明環境とした．このシーンに対してハイパースペクトルカメラを用いて座標ごとの分光計測を行った．計測は１つのシーンに対して指向性照明を点灯した混合照明条件と，指向性照明を消灯した一様照明条件の計２回実施して，それらの計測結果から，(1)被写体の分光反射率の空間分布，(2)指向性照明の空間分布を演算により導出した．また，これらのデータを利用して一様照明と指向性照明を任意の照明光のスペクトルデータに置き換えて照明シミュレーション画像を作成した．結果から，各照明の色度と輝度の分布を画像および色空間に示し，計測環境による誤差は生じるが，提案手法により照明の空間変容の記録および照明シミュレーション画像の作成が可能であることを実証できた．

次に，上記の手法により作成した照明シミュレーション画像を用いて，心理物理的手法により一様照明と指向性照明の光源色の組み合わせと物体色知覚の正確さの関係を示す実験を実施した．被写体としてモンドリアンパターンの背景に塗色した球体を設置して記録したハイパースペクトル画像を用いて，一様照明と指向性照明それぞれに物体色知覚の正確さが異なる３色の照明を設定した９条件の照明シミュレーション画像を作成した．被験者はシミュレーション画像から球体の知覚色をカラーパレットから選択した．各照明条件のシミュレーション画像に対して被験者が選択した色と，標準の照明条件における球体の反射光の色の色差を分析した結果，２種類の照明の一方が物体色知覚の正確さが高い照明色であっても，いずれかに物体色の知覚の正確さが低い照明色が含まれることにより色差が大きくなることが明らかになった．