

神奈川工科大学

次世代センシングシステム研究所研究報告

第7巻

2014

The Memoirs
of
Research Institute of Advanced Sensing System,
Kanagawa Institute of Technology
(1030 Shimoogino, Atugi-shi, Kanagawa, Japan)
Vol. 7 (2014)

次世代センシングシステム研究所は、文部科学省「ハイテク・リサーチ・センター整備事業」研究プロジェクトとして平成10年度より平成18年度まで取組んできた次世代センシングシステムに関する技術成果を継承し、本学の研究活動をより活性化するため、平成19年度からスタートし以下の研究開発に取り組んでいる。

研究内容と担当

第1研究室：“環境と健康に関する化学的・生物学的センシングシステムの開発”

研究内容	担当
環境水域生物に影響を与える生体関連物質の検出法の開発	応用化学科 教 授 齋藤 貴
酸性雨による陸水の酸性化および生物影響の早期検出と環境診断	応用バイオ科学科 教 授 菊地 幹夫
高感度分光法を利用した人体に有害な物質の検出法の開発	応用化学科 教 授 川嶋 良章
アロステリック酵素を用いたエフェクターのバイオセンシング	応用化学科 教 授 佐藤 生男
酵素法による生体アミノ化合物の高感度な網羅的測定法の開発と応用	栄養生命科学科 教 授 松本 邦男
生体関連アミノ化合物の酵素法による高感度分析に関する研究	応用バイオ科学科 准教授 山村 晃
食嗜好センシング	栄養生命科学科 准教授 飯島 陽子

第2研究室：“高機能センシングデバイスの研究開発”

研究内容	担当
3次元集積素子・3次元構造体のプロセス技術に関する研究	ホームエレクトロニクス開発学科 教 授 黄 啓新
新規画像デバイスを対象とした医療画像処理および診断支援機能に関する研究	電気電子情報工学科 教 授 武尾 英哉
Web とセンシングによる生活支援技術の研究	ホームエレクトロニクス開発学科 教 授 一色 正男
SiC ショットキーバリア接合ダイオード	電気電子情報工学科 准教授 工藤 嗣友

目 次

1. 第1研究室「環境と健康に関する化学的・生物学的センシングシステムの開発」	
(1) 環境水域生物に影響を与える生体関連物質の検出法の開発	
応用化学科 齋藤 貴 ・ ・ ・ ・ ・	1
(2) 酸性雨による陸水の酸性化および生物影響の早期検出と環境診断	
応用バイオ科学科 菊地 幹夫 ・ ・ ・ ・ ・	5
(3) 高感度分光法を利用した人体に有害な物質の検出法の開発	
応用化学科 川嶋 良章 ・ ・ ・ ・ ・	11
(4) アロステリック酵素を用いたエフェクターのバイオセンシング	
応用化学科 佐藤 生男 ・ ・ ・ ・ ・	15
(5) 酵素法による生体アミノ化合物の高感度な網羅的測定法の開発と応用 ープロテッシンオキシダーゼの遺伝子クローニングとセンシングへの応用ー	
応用バイオ科学科 山村 晃 ・ ・ ・ ・ ・	19
(6) 食嗜好センシングに関与する食品成分分析とその生成機構に基づく制御について ーショウガの色素性成分の構造と特性ー	
栄養生命科学科 飯島 陽子 ・ ・ ・	24
2. 第2研究室「高機能センシングデバイスの研究開発」	
(1) センサユニットの開発と応用技術の検討	
ホームエレクトロニクス開発学科 黄 啓新 ・ ・ ・	27
(2) 医用画像処理診断支援システムの高度化に関する研究	
電気電子情報工学科 武尾 英哉 ・ ・ ・ ・ ・	31
(3) Web とセンシング融合による生活支援技術の開発	
ホームエレクトロニクス開発学科 一色 正男 ・ ・ ・ ・ ・	35
(5) 触媒金属/SiC ショットキーバリア接合ダイオードガスセンサの開発	
電気電子情報工学科 工藤 嗣友 ・ ・ ・ ・ ・	40

環境水域生物に影響を与える生体関連物質の検出法の開発

研究者名：工学部応用化学科 齋藤 貴

1. 研究の目的

- (1) 目的：生物の性差に寄与する女性ホルモン17 β -エストラジオール(β -E2)は人以外の生物にとっては内分泌攪乱物質となりうる。この物質の簡易分析を目的に、 β -E2をテンプレート分子とした高分子薄膜を作製し、この分子識別吸着素材をデュアル型水晶振動子(QCM)の金電極表面に被覆して重みセンサーを構築する。これを検出部としたフローインジェクション分析法を開発した。
- (2) 研究期間内(平成25年度)に明らかにする事項： β -E2をテンプレート分子とする鋳型高分子薄膜(ナイロン6)をデュアル型水晶振動子の1チャンネル金電極部位に被覆して、この重みセンサーを液体クロマトグラフの検出部に組み込んだセンシングシステムを構築する。このセンシング機器を用いて、 β -E2を含む性ホルモン物質エストロン、エストリオール、プロゲステロン等に対する吸着能を評価し、応用分析への具現化を行う。

2. 研究の必要性及び従来研究

- (1) センシング部としての鋳型分子薄膜被覆水晶振動子センサ(QCM)の有用性

有害な化学物質の分子形状をインプリントした鋳型分子材料の合成の際、分析機器に利用する場合、素材を薄膜化することで、センサ材料としての利便性が高まる。さらにこの薄膜をQCM計測技術へ応用することで、極微量濃度レベル(分子レベル)での検出が可能となり得る。これは、通常、極低濃度(ppbレベル)で、 β -E2はエストロゲン活性を示すことが報告されていることから、環境水では低濃度分析が要求されることに対応できる。

さらにこのセンサ材料を液体クロマトグラフの検出部として用いることで、抗原抗体反応を模倣した流れ分析が可能となり、従来の大きな課題であった1センサーにつき複数回の連続使用の実現、センサー材料の再現性ある安定供給、低コスト化が可能となる。

- (2) ヒトの性ホルモン物質である β -E2の計測法の必要性

ヒトの性ホルモン物質である β -E2は高いエストロゲン活性を示し、下水処理過程を経て河川に放流されるが、誘導体となって代謝された β -E2複合体は微生物分解によりその一部が再び β -E2となり、河川に流入している報告例がある。そのため、魚類などの水域生態系にオスのメス化現象などを例として生態系の水生生物の性ホルモンに影響を与えている現状がある。環境省(SPEED98、ExTEND2005、ExTEND2010)においても、それらの物質のモニタリングの必要性を謳っている。

現在、性ホルモン物質の分析には次の手法があるが、課題もいくつか残っている。

- ① 液体クロマトグラフ(LC)、液体クロマトグラフ-質量分析法(LC-MS)による測定は、分析時間を要し、多検体分析には不向きである。
- ② 動物生体試料由来の抗原抗体反応を用いた分析キット(ELISA法)も市販されているが、動物産生由来の抗体を用いることから、高価(96穴マイクロプレート1枚あたり約8万円以上)で、動物保護の観点からも大きな利便性は期待できない。また生体試料ゆえ保存性が悪く、製造ロット間で感度や選択性が変動し、製造企業間での測定値は異なる。

3. 期待される効果

研究の特色・独創的な点と予想される結果と意義

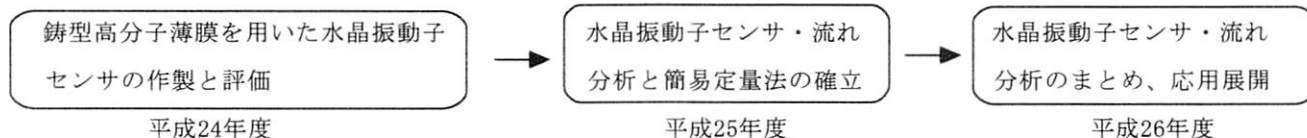
- ・人工抗体としての鋳型高分子薄膜材料のメリット

鋳型高分子薄膜は、水晶振動子センサ(QCM)への被覆や抗原抗体反応に基づく人工抗体として、ELISA法として測定用96穴プレートセルにコーティングできるなど、本来の素材に付加価値として

高機能化に適用できる。すなわち、元の素材の形状を維持したまま新たに分子識別能を付加することが可能である。応用面として、テンプレート分子として様々な生体分子や化学物質を適用することで多面的に応用面で広い利便性が生まれる。

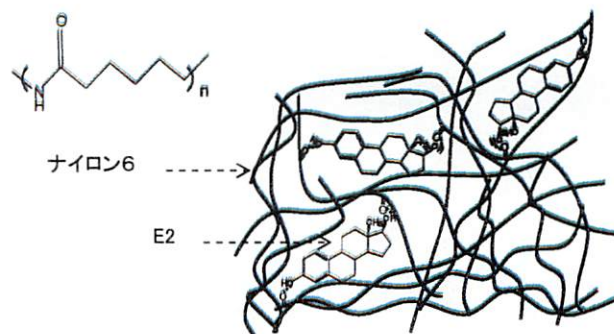
4. 研究の経過及び結果

今年度は、次の流れの計画に基づいて研究を進めた。



(1)E2キャスト薄膜の作製原理

17 β -エストラジオール(β -E2)をテンプレート分子として、ホスト分子をナイロン6としたキャスト薄膜の形成の概略図を右に示した。ナイロン6をギ酸溶液に溶解しこれに β -E2を加え、ナイロン6のアミド基と β -E2の水酸基と水素結合を形成させる。これを水晶振動子(QCM)の金電極面にコーティングする。



水晶振動子には、デュアル方式30MHz ATカットを用いた。振動子センサをフローセルに設置し、その後、MeOH水溶液を移動相とし、シリンジポンプで送液した。QCMの周波数減少量を計測することで、分析種の検出と定量を行った。下記にセンシングシステムの概略図を示す。

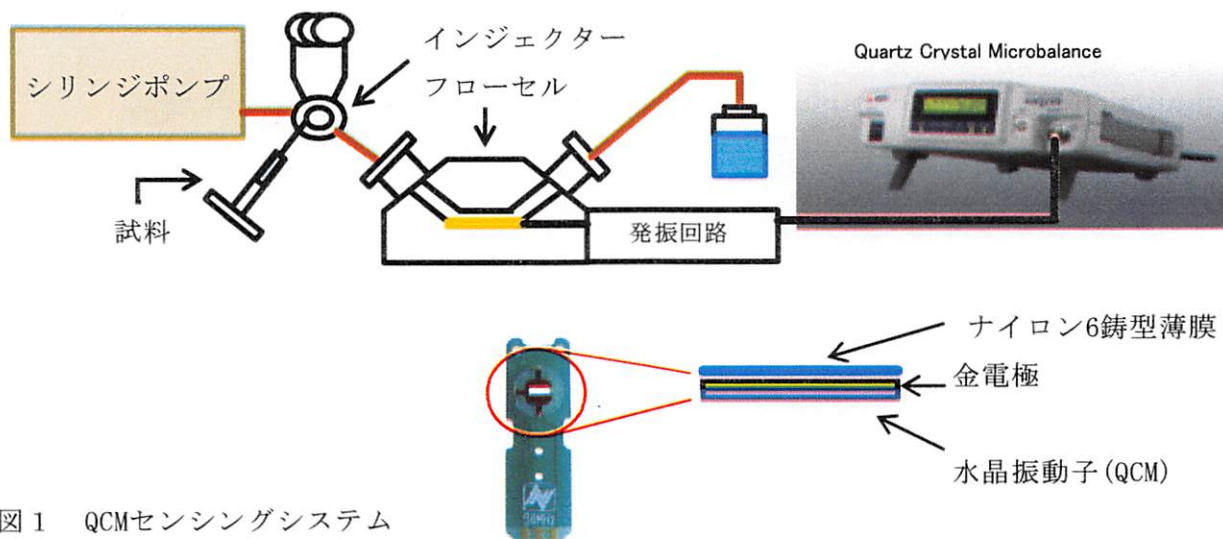
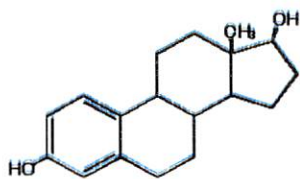


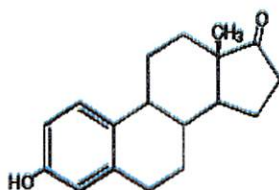
図1 QCMセンシングシステム

(2)テンプレート分子、ゲスト分子

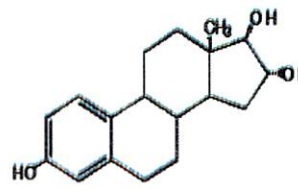
本実験で用いたゲスト分子を下記に示した。代表的な性ホルモン物質を用いた。



17 β -エストラジオール(β -E2)



エストロン(E1)



エストリオール(E3)

β -E2、E1、E3の分子構造の相違は、水酸基-OH基1個の違いからなり、立体的な構造の差は非常に

小さい。これらは、いずれも強いエストロゲン活性を示し、下水処理水にはその一部が含まれ、河川に流入し、水生生物などへ性ホルモンに影響を与えることが指摘されている。鋳型薄膜QCMの調製は、ギ酸30mlにナイロン6 0.05g、 β -E2 0.00423g を溶解し、その1 μ lをQCMの金電極表面に均一にコーティングした。

(3) β -E2分子に対する鋳型ナイロン6薄膜－水晶振動子センサへの応答

右図に、5ppmの β -E2に対して、移動相を5vol% MeOH水溶液としたときの周波数応答について示した。

QCMの2チャンネル(2ch)は、金電極表面に β -E2鋳型薄膜を被覆しない場合で、ノイズは見られるものの大きな周波数の増減は見られない。これに対して1チャンネル(1ch)は、金電極表面に鋳型薄膜を被覆した面で、 β -E2の吸着(注入約1分後)とともにその重みから周波数の減少が生じ、その後、薄膜より脱離して周波数が復帰している。

β -E2の応答(1ch)から応答しない(2ch)側を減算したもの(ch1-ch2)を目的物質の測定値として記録した。なお測定には、ベースラインからピークの谷(最低部)QCMセンサ部のディスポーザブル型チップまでの距離、すなわち最大減少周波数(Hz)を算出した。

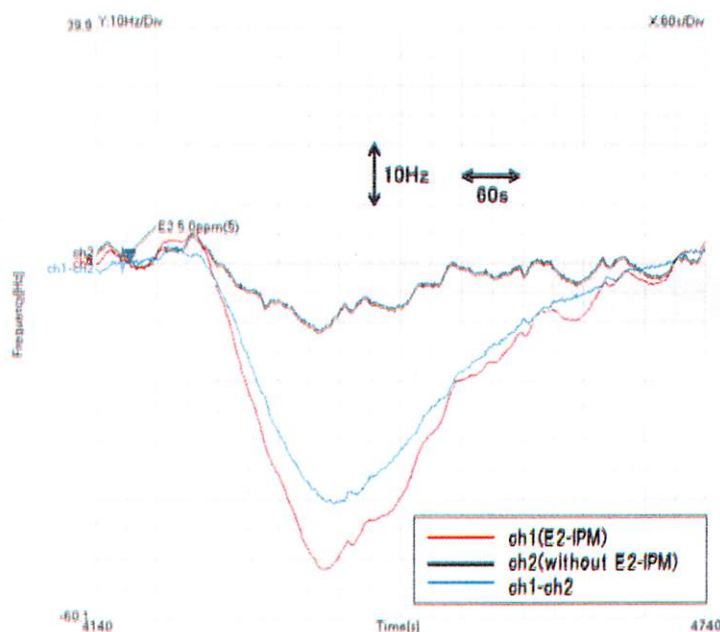


図2 β -E2の周波数応答

(4) E2濃度と周波数応答の関係

2～5ppmの β -E2水溶液を調製し、同条件で測定を行った。移動相組成は、5 vol% MeOHで、なお、注入する試料も移動相と同様に β -E2の5vol% MeOH溶液とした。注入量は100 μ L温度25℃で計測を行った。

その結果、2～5ppmの濃度範囲で β -E2濃度の増加とともに定量的に周波数応答の減少が生じ、両者は直線応答を示した。検出限界濃度は2ppmであった。また同一の鋳型薄膜被覆QCMセンサで再現性よく繰り返し測定できることがわかった。

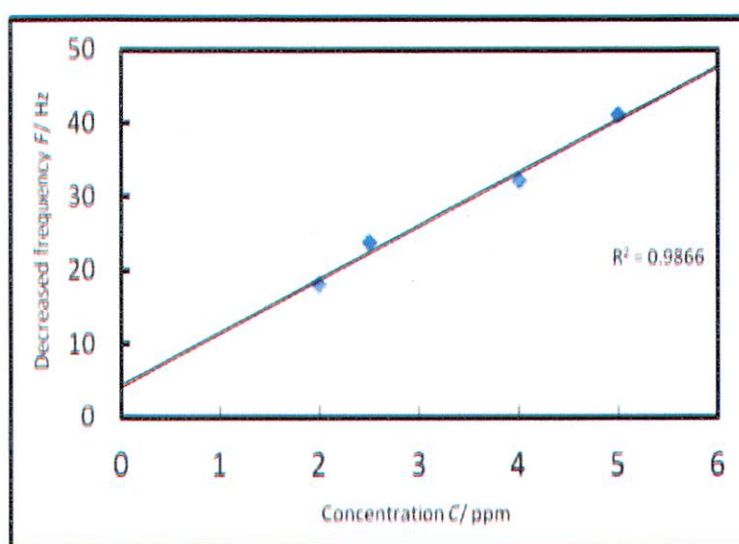


図3 β -E2濃度と周波数の減少量との関係

(5) ゲスト分子の応答能の比較

ゲスト分子として、E1、E2(β -E2)、E3、17 α -エストラジオール(α -E2)、テストステロン(男性ホルモン)の5種のエストロゲン、アンドロゲン物質について応答能を比較し評価を行った。

E1、E2、E3は前述の分子構造を持ち、E2とE3は-OH基の置換数が異なり、またE1とは-OH基数と=Oとの差で、分子構造は大差ない。さらに、 17α -体(α -E2)はE2の立体異性体で、LCによる分離分析が困難な物質である。

E2鋳型薄膜QCMセンサによる応答の差を右の表と図に示した。5ppmのエストロゲン物質について周波数変化を測定したところ、E2分子の周波数減少量は平均32.0 Hzに対して、 α -E2、E1、E3、テストステロンは、それぞれ、20.5、17.0、19.3Hzの応答となり、それぞれE2の応答能に対して36～47%の低下を示し、類似分子形を持つエストロゲン物質に約2倍の感度で検出されることが明らかとなった。

なおエストロゲン製剤として医薬品に使用される卵胞ホルモン剤(合成物)EE2は、大きな周波数減少を生じた。この現象に関しては、今後、さらに詳細に検討を行う必要がある。また立体異性体である 17α -体は、 β -E2に対して36%の検出低下が生じることがわかった。

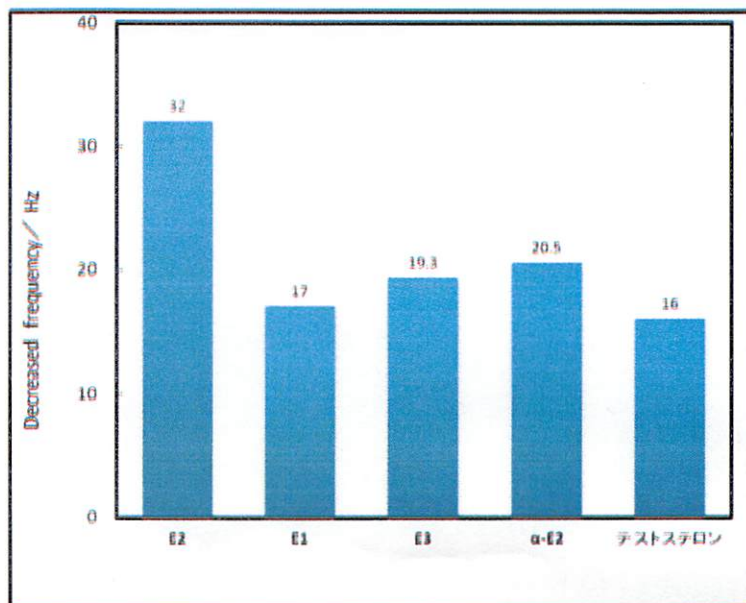


図4 エストロゲン物質の応答能

表1 ゲスト分子の応答能

	Run1	Run2	Run3	Run4
E2	31.0	33.0	34.0	30.0
E1	16.0	18.0	16.0	18.0
E3	20.2	20.0	19.0	18.0
α -E2	20.0	21.0	21.0	20.0
EE2	46.0	47.0	48.0	47.0
テストステロン	16.0	18.0	15.0	15.0

5. 今後の計画

これまでの検討で、鋳型薄膜技術をQCMセンシングに応用することで、エストロゲン物質の簡易な計測法を確立することができた。また前年とのからの課題であったQCMセンサ部のディスプレイ型チップ化が可能となった。そこで、本法のセンシング手法の応用面をより具体化するため、次の方針で展開を行う。(1)QCMセンサ部のディスプレイ型チップの製作、(2)多検体試料の連続及び迅速分析、(3)医療面の計測技術(コレステロール)としての定要請の検討。

6. 研究成果の発表

研究成果の主な公表に関しては次の通りである。本研究に関する論文は現在準備中である。なお、本研究の骨子になる研究成果の論文3)は、平成2010年度日本材料科学会「論文賞」、研究発表1)はプレゼンテーション賞を受賞し、評価される経緯がある。

- 1)「内分泌かく乱物質エストロゲン物質を認識する新規分子インプリントポリマー材料の分離能の評価」、坂井佑輔、斎藤貴、日本材料科学会第18回若手研究者討論会、プレゼンテーション賞、(第32号)、(2011)
- 2)「内分泌攪乱物質アトラジン分子を認識するインプリントポリマー吸着材の選択的吸着特性」、伊藤光寿、斎藤貴、材料の科学と工学、47巻No6、pp. 304～309 (2010)
- 3)「ビスフェノールA分子インプリントナイロン膜の合成と吸着特性」、斎藤貴、材料の科学と工学、46巻4号、pp. 29～34 (2009) (2010年度 日本材料科学会 論文賞)

酸性雨による陸水の酸性化および生物影響の早期検出と環境診断

研究者名： 応用バイオ科学科 菊地 幹夫

1. 研究成果の要約

谷川岳の沢の水質調査から、一部の溪流水は年間を通じて酸性であるが、水質は沢による差が大きいこと等を見だし、これまでの調査結果の特徴を裏付けることができた。また地形が似た中央アルプスでも水質調査を行い、谷川岳と同様に弱酸性の水が流れていることを見いだした。この地域に固有の水生生物（水生昆虫、付着ケイ藻類）の現場調査から、沢によって生物相に差があることを見いだした。これらの溪流水の生物試験結果と合わせると、谷川岳では溪流水の酸性化に伴い、生物相にすでに変化がでている可能性があることを確認した。

2. 研究の目的、必要性及び従来の研究

欧米の一部では、酸性雨によりすでに数十年前から陸水のうち特に山地の湖沼や溪流などが酸性化し、サケなどの内水面漁業が消滅するなど、大きな被害が出ている（日本水環境学会、1984）。一方日本では、欧米と同程度の酸性雨が降りながら、陸水生態系への影響は顕在化していないと環境白書は述べている。しかし最近になって、pHの長期的な低下傾向が見られることが長野県の河川や奈良県のダム湖、岐阜県の湖沼で報告されてきている。また降雨時に河川水でpHの低下が見られることが屋久島と西表島で観測され、福島県会津地方では融雪時にpHが低下して酸性となることが報告されてきた。これらの報告から、日本でも近い将来に河川水の酸性化が顕在化すると懸念されはじめた。

すでに水環境学会誌2012年1月号では、特集テーマとして「越境大気汚染研究の最新動向と水環境への影響」をとりあげている。その中で福原は「酸性雨による陸水生態系への影響」と題した総説の中で、「・・・"acid shock"の起こる河川、山岳地帯の湖沼や屋久島の溪流などでpH 6.5~6.0以下となる例も知られてきている。しかしこれらの地域で生物学的調査はほとんど行われていない。欧米等の研究で一度失った陸水生態系の回復の困難さがうかがえる。酸感受性の高い地域での継続的な調査が望まれる。・・・」と調査研究の必要性を指摘している。

著者らは、このような研究の必要性を早くから認識して本研究を実施してきた。「日本の一部の山岳地帯では、陸水の酸性化がすでに始まり、生息する水生生物へ影響が出始めている。」との作業仮説を立てて、化学的・生物学的センシングにより、酸性雨の陸水の水質と生物への影響の程度を検討してきた。具体的には

- ①モデル地域として選んだ利根川上流の谷川岳の溪流で、水質の酸性化の現状と進行状況を明らかにする。
- ②谷川岳の溪流水の生物試験と水生生物相の調査および室内実験から、水生生物への影響の

顕在化の現状を明らかにする。

③酸性化と生物影響の先行指標を見いだし、それが中央アルプス駒ヶ岳千畳敷カールなど日本の他の地域にも適用できるか検討する。

3. 期待される効果

酸性化して数十年もたった湖沼や河川の様子とそこでの水質の改善については、欧米で精力的に研究されてきた。しかし日本ではこれからどの水域で酸性化の恐れがあるか、また日本産のどの生物にどのような影響が出るかは、研究が始まったばかりである。陸水が広範囲に酸性化してしまってからでは、対策も間に合わない。酸性化の兆候の早期検出と生物影響の診断が重要である。

この研究を通じて、酸性化の現状を明らかにして酸性化しやすい水域を見いだし、酸性化とその生物影響の予兆をとらえる方法を開発できれば、早期に酸性雨対策を進めることができる。

4. 研究経過および結果

降水量の多いわが国では、これまでの欧米での知見を踏まえると、河川水や湖水が広範囲にわたって酸性化して生物影響がでる前の予兆として、多雨時や融雪時に酸感受性の高い地域（花崗岩を基盤岩とする地域）の山地溪流水が一時的に酸性化し、まず酸性に弱い生物種が減少すると考えられる。そこでそのような視点から調査・研究を行ってきた。

モデルとして選んだ谷川岳の水質調査から、融雪時に酸性化する溪流水があること、一部の溪流水はすでに年間を通じて酸性であること、また河川水の酸性化に先行する特徴的な水質項目として電気伝導率、アンモニウムイオン濃度等を見いだした。

4.1 谷川岳での調査結果

谷川岳の東側で半径5 km以内の沢（幽ノ沢、一ノ倉沢、マチガ沢、東黒沢）とそれらが流れ込む湯桧曽川（図1）で、7月から10月にかけて4回調査した。この際、流下に伴う水質変化の影響を見るために、幽ノ沢、一ノ倉沢とマチガ沢で複数の調査地点を設けた。

（1）水質調査

今年の調査でも、同じ雨が降りながらも沢ごとに特徴的な水質が形成されることを確認した。幽ノ沢、一ノ倉沢ではアルカリ度が低く、pHが5付近のことがあり、酸性化している。

（2）生物試験による水質の有害性調査

採取した水についてオオミジンコを用いた急性遊泳阻害試験を行った。幽ノ沢、一ノ倉沢の低いpHの溪流水では、例年と同様にオオミジンコに遊泳阻害・致死が見られた（図2）。したがって酸に感受性の高い水生生物種にとっては、これらの沢の水質が有害である可能性が高い。

（3）水生生物調査による生物多様性の検討

水生昆虫はカゲロウ目、カワゲラ目、トビケラ目、ハエ目など多種多様で、水産価値の高い魚介類の貴重な餌資源となる重要な生物群であり、水産動物の保護の観点からも水生昆虫に対する影響を明らかにすることは重要である。また水底の岩に付着したケイ藻類は沢や河川での一次生産を担い、これらの水生昆虫のエサとなり、河川における物質循環で重要な役割を果たしている。

これらの沢で、水生昆虫とケイ藻類の種類と個体数を調査した。これまでの調査で、水生昆虫と付着ケイ藻類の種類と個体数は、沢ごとに特徴があることを見だし、それは水質、特にpHと関係がある可能性を見いだした。このため調査地点を増やして調査したが、今年の調査でも同様な特徴があることを確認した。

1) 谷川岳の溪流では、7月～9月にかけてケイ藻類の細胞数が大きく増加し、優占種が見られた。水温の上昇による増殖条件が揃うことと、水量が安定し、物理的影響を受けにくくなったことが要因として挙げられる。また細胞数を同一調査日で沢ごとに比較すると、幽ノ沢、一ノ倉沢では非常に少なく、東黒沢では非常に多く、その他の沢では中位であった。

2) 水生昆虫については、幽ノ沢と一ノ倉沢のそれぞれ2地点では、個体数が非常に少なく、また東黒沢と湯檜曾川では非常に多く、マチガ沢の2地点ではその中間である。酸に弱い水生昆虫としてはカゲロウ目が知られているが、幽ノ沢と一ノ倉沢では個体数が少なく、水質の酸性化の影響を受けている可能性があるが、付着藻類が少ないことも関係している可能性がある。

4.2 中央アルプス駒ヶ岳千畳敷カールでの調査結果

1) 水質調査

谷川岳と似た地形の駒ヶ岳千畳敷カールの沢とその下流の日暮の滝で、7月から10月にかけて4回の調査をした。千畳敷カールの水質は、pH、電気伝導率、代表的なイオンの組成などから見て、谷川岳と同様であった。

低い電気伝導率は酸性雨による溪流水の酸性化の先行指標になるとともに、溪流水の酸性化が日本の複数の山岳地帯で起きている可能性を見いだした。

(2) 生物試験による水質の有害性調査

現場で採取した水についてのオオミジンコ急性遊泳阻害試験では、溪流水によってはオオミジンコに遊泳阻害・致死が見られ、これらの溪流の水質が有害である可能性があることがわかった。

(3) 水生生物調査による生物多様性の検討

これらの沢で、水生昆虫と付着藻類の種類と個体数を調査した。生物種には地点により特徴があるが、地点間の比較等については更なる調査が必要である。

4.3 人工的に調製した酸性水のオオミジンコ胚の発生への影響

酸性雨が流入すると、河川や湖沼では炭酸水素塩を主体とした水質から硫酸塩を主体とした水質へと変化する。

硬度の低い河川水(5 mg/L)で酸性化が起これと、高い硬度(120 mg/L)と比較して遊泳阻害が起これやすくなつた。急性遊泳阻害については、5 mg/Lの低い硬度ではpH 6で遊泳阻害が生じるのに対して、120 mg/Lと高い硬度ではpH 6で遊泳阻害数は1頭のみであり、pH 5になつて多くの遊泳阻害数が生じた。胚の発生については、pH 6 においても発生がほとんど阻害された。これらのことから、オオミジンコのpHに対する感受性は硬度によって大きく変化すること、幼体よりも胚に対して影響が強く現れることがわかつた。胚の段階で感受性が高いことは魚類と同じ傾向にある。

幼体の段階よりも胚に対する感受性が高いことから、オオミジンコへのpHの影響を見る上で胚を用いた試験が必須であることがわかつた。

5. 今後の計画

(1) 化学的水質調査

谷川岳の東側で半径5 km以内の沢（一ノ倉沢、幽ノ沢、マチガ沢、東黒沢）とそれらが流れ込む湯檜曾川で、初夏から秋にかけて調査する。

(2) 生物試験による水質の有害性調査

現場で採取した水と人工的に調製した（モデルの）酸性水について、オオミジンコを用いた急性遊泳阻害試験、胚発生阻害試験とヨコエビを用いた急性毒性試験を行い、pHと有害性の関係を検討する。

(3) 水生生物調査による生物多様性の検討

水生生物のうち、水生昆虫と付着藻類の種類と個体数を調査し、沢による多様性の変動について検討する。

(4) 酸性化及び生物影響の先行指標の適用調査

中央アルプス駒ヶ岳千畳敷カール及びその下流域で、水質と生物調査を行い、また生物試験による有害性調査を行う。

6. 研究成果の発表

印刷物

1) 富田和寿, 菊地幹夫, 澤井淳 (2013)

前培養の温度条件が微生物の活性炭への付着に及ぼす影響, 防菌防黴, **41**, 245-248.

2) Sawai, J., K. Nagasawa, K. and Kikuchi, M.(2013)

Ability of heated scallop-shell powder to disinfect *Staphylococcus aureus* biofilm.

Food Science and Technology Research, **19**, 561-568.

3) Miki Kubo, Yori Ohshima, Fumio Irie, Mikio Kikuchi, Jun Sawai (2013) Disinfection Treatment of Heated Scallop-Shell Powder on Biofilm of *Escherichia coli* ATCC 25922 Surrogated for *E. coli* O157:H7. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2013, 4, 10-19.

7. 参考文献

- 1) 川上智規 (2012) : 越境大気汚染による水環境への影響, 水環境学会誌, 35, 20~23.
- 2) 福原春夫 (2012) : 酸性雨による陸水生態系への影響, 水環境学会誌, 35, 24~28.

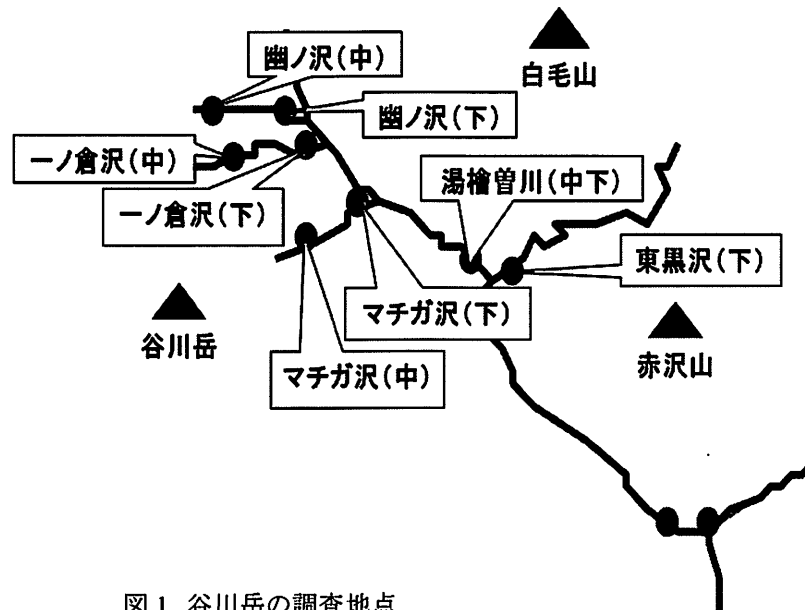


図1 谷川岳の調査地点

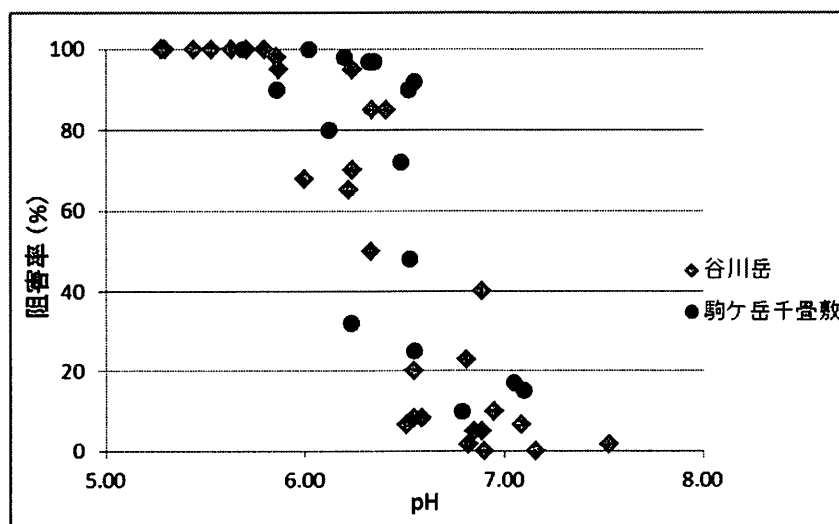


図2 渓流水の pH とオオミジンコ急性遊泳阻害の関係

表 1 谷川岳の溪流の水質(平均値±標準偏差)

	pH	EC (mS/m)	総アルカリ度(mg/L)
幽ノ沢(中)	4.9±0.4	0.97±0.44	0.86±0.04
幽ノ沢(下)	5.8±0.3	1.1±0.4	1.9±0.3
一ノ倉沢(中)	5.6±0.2	0.97±0.49	1.7±0.5
一ノ倉沢(下)	6.2±0.2	1.4±0.4	3.4±0.8
マチガ沢(中)	6.5±0.2	1.8±0.4	4.9±0.6
マチガ沢(下)	6.8±0.3	2.1±0.4	6.1±0.9
東黒沢	7.0±0.3	3.6±1.3	7.2±3.7
湯檜曾川	6.3±0.2	2.6±0.7	8.4±2.2

表 2 駒ヶ岳千畳敷カール及びその下流の溪流の水質(平均値±標準偏差)

	pH	EC (mS/m)	総アルカリ度(mg/L)
長谷部新道	6.7±0.3	0.71±0.02	2.8±0.2
水源地湧出点	5.8±0.4	1.04±0.04	3.5±0.2
剣ヶ池流出点	6.0±0.4	1.07±0.04	4.3±0.4
日暮の滝	6.8±0.2	1.79±0.09	7.5±0.6

高感度分光法を利用した人体に有害な物質の検出法の開発

応用化学科 川嶋良章

1. 研究の目的

- ①FTMW 分光法を用いてアルコールやチオール、環状オキシドやスルフィドさらには生体関連分子に焦点をあて、回転異性体を個別に検出するとともに、前処理をせずにそれらの回転異性体を分離し、微量検出の可能性を試す。
- ②開発してきた高感度・高分解能な特徴を有する F T M W 分光計を用いて、炭素原子が 3~5 個を含むアルコール、エーテル、メルカプタンやチオエーテル化合物など人体に有害な分子の検出を行う。また、エチレンオキシド、エチレンスルフィドと大気中に含まれる窒素分子や炭酸ガス、CO などとの分子錯体を検出し、酸素原子と硫黄原子での分子構造の相違や反応機構についての検討を行う。

2. 研究の必要性及び従来の研究

高感度・高分解能な特徴を有する F T M W 計を製作改良しながら、回転異性体を個別に検出するとともに、前処理をせずに分子を分離し、微量検出の可能性を探る必要がある。製作した F T M W 分光計を用いてファンデルワールス分子やペプチド結合を持つ生体関連分子などこれまでに 40 種類を超える分子種の回転スペクトルを測定し、分子構造や分子内運動に関する知見を得てきた。

3. 期待される効果

FTMW 分光法は、分子種、同位体種、さらには回転異性体を個別に識別できる精密な分光法である。高分解能な分光法なので前処理をせずに同時分析が可能である。地球温暖化で注目浴びている炭酸ガスを含む分子錯体の回転スペクトルを測定・帰属し、分子構造や分子運動を詳細に研究することは、炭酸ガスが地球大気に及ぼす影響を知るうえで重要な役割を果たす。

4. 研究の経過及び結果

4.1 3-メチル-4-オクタノリッド(ウィスキーラクトン)のフーリエ変換マイクロ波スペクトル

3-メチル-4-オクタノリッド(WL)はウィスキーに含まれた香りの成分として知られている。ウィスキーラクトンには 4 個の安定な幾何学的及び光学的異性体 *cis*-3S4S, *cis*-3R4R, *trans*-3S4R, *trans*-3R4S の存在が予想され、これまでに 2 種類の異性体が F T M W 分光によって測定・帰属されている。量子化学計算 MP2/6-311++G(*d*, *p*)レベルを併用して、2 種類の異性体は *cis*-3R4R の *TTG* 型と *cis* 3R4R の *TTT* 型で

あると結論した。多くの強度の強い未帰属線があり再検討を行った結果、*trans*-3S4R の *TTT* 型 (Fig. 1 に示す) として帰属できた。4 種類の光学異性体に対して量子化学計算を行った。これまで検出されている安定化エネルギーよりもさらに低い安定化エネルギーを持つ回転異性体が存在することが分かった。*trans*-3S4R の *TTT* 型は *b* 型遷移が強く測定されており 115 本を帰属し、強度の弱い *a* 型遷移も 54 本帰属できた。測定周波数を通常の剛体コマ近似のハミルトニアンで解析した結果、得られた回転定数は量子化学計算で予想された値とよく一致することが分かった。(Table 1 を参照)

Table 1 Obtained and calculated molecular parameters and number of transitions of the *trans*-3R4R *TTT* of the WL.

Parameter	Obtained	Calculated
A /MHz	1794.4979 (18)	1790.6
B /MHz	529.45008 (13)	531.2
C /MHz	425.410160 (68)	426.2
Δ_J /kHz	0.00718 (20)	
Δ_{JK} /kHz	0.268 (24)	
N_a /- or μ_a /D	54	-0.78
N_b /- or μ_b /D	115	5.34
N_c /- or μ_c /D	0	0.22

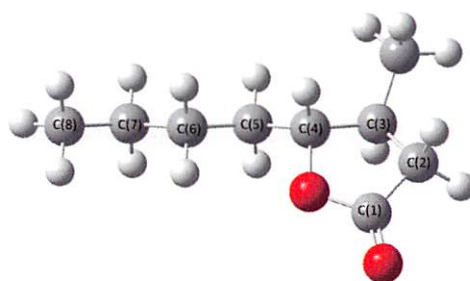


Fig.1 Molecular structure of the *trans*-3S4R *TTT* form of WL

4.2 H₂CO-DME と H₂CO-DMS 錯体

ホルムアルデヒド (H₂CO) はシックハウス症候群の要因物質として、ジメチルエーテル (DME、CH₃OCH₃) はガソリンの代替燃料として、ジメチルスルフィド (DMS、CH₃SCH₃) は自然起源の含有機硫黄化合物の中で最も多く大気中に存在する物質として知られている。DME 二量体は、3 本の C-H $\cdots$ Y (Y=O, F, S) 型の微弱な水素結合によって錯体を形成していることが知られており、これらの分子間相互作用の情報は、超分子化学や生体化学などの分野において有用なものであると考えられる。C-H $\cdots$ O 型の水素結合によって錯体を形成することが予想される、ホルムアルデヒド (H₂CO)-DME 錯体を取り上げ、フーリエ変換マイクロ波分光法により回転スペクトルを測定・帰属した。得られた分子定数から分子構造と錯体の分子間相互作用に関する詳細な知見を得ることを目的とした。

[分子構造] H₂CO-DME 錯体と H₂CO-DMS 錯体の平面慣性モーメント P_{bb} の値はそれぞれ、48.858 uÅ²、64.650 uÅ² であり、これらの値は計算値、 $P_{aa}(\text{DME 単量体}) + P_{bb}(\text{H}_2\text{CO 単量体}) = 48.867 \text{ uÅ}^2$ 、 $P_{aa}(\text{DMS 単量体}) + P_{bb}(\text{H}_2\text{CO 単量体}) = 64.983 \text{ uÅ}^2$ と

それぞれ良く一致していた。これら平面慣性モーメントの一致と、それぞれの錯体で *b*-型遷移が観測されなかったことから、 H_2CO -DME 錯体と H_2CO -DMS 錯体は、*ac* 平面において平面对称であることが言える。 H_2CO -DME 錯体と H_2CO -DMS 錯体の立体配置、分子間距離 R_{cm} 、結合エネルギー E_B 、電荷移動による安定化エネルギー CT の計算値を Fig. 2 に示す。

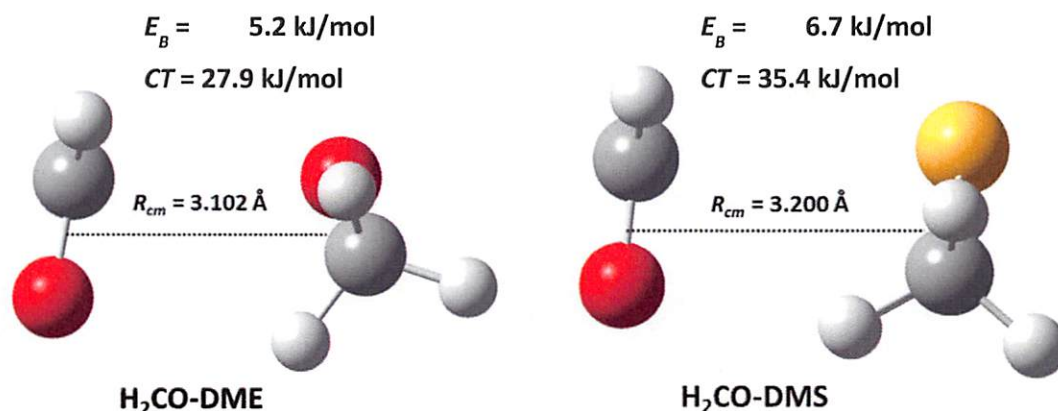


Fig.2 Intermolecular distance R_{cm} , bonding energy E_B , and calculated stabilized energy of the charge transfer CT of the H_2CO -DME and H_2CO -DMS.

H_2CO -DME 錯体と H_2CO -DMS 錯体の重心間距離 $R_{c.m.}$ は、それぞれ 3.10 Å 、 3.20 Å であり、これらの値は今までに報告されている DME 錯体や DMS 錯体の重心間距離と比較して、かなり短いものであった。また、 H_2CO -DME 錯体の $r(\text{O} \cdots \text{C})$ は 2.90 Å 、 H_2CO -DMS 錯体の $r(\text{S} \cdots \text{C})$ は 3.02 Å であり、S 原子の van der Waals(vdW)半径の値(1.85 Å)が O 原子の値(1.40 Å)よりも 0.45 Å も大きいにも関わらず、これらの錯体の $r(\text{X} \cdots \text{C})$ の値に差がないことから、 H_2CO -DMS 錯体は非常に強い力で結合していることが分かった。錯体の水素結合距離 r_1 、 r_2 の値から、と H_2CO -DMS 錯体は、4 個の水素結合でると考えられる。

H_2CO -DME と H_2CO -DMS と類似錯体で

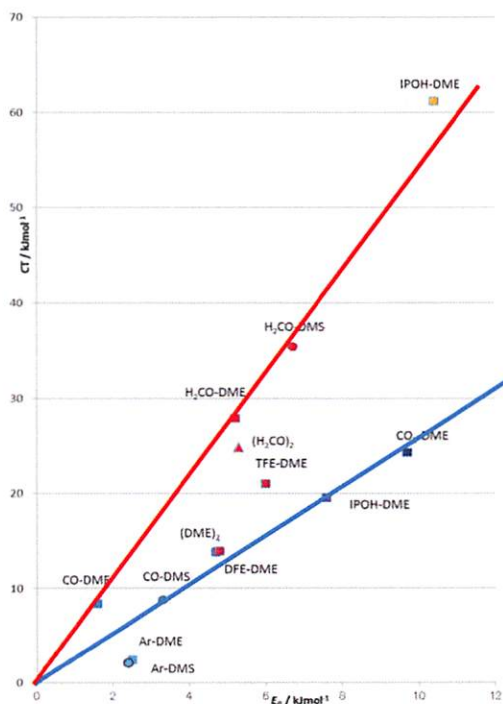


Fig. 3 Relationship between the bonding energy E_B and the calculated stabilized energy of the charge transfer CT of the H_2CO -DME, H_2CO -DMS, and related complexes.
 た。また、これらの H_2CO -DME 錯体錯体を形成している結合エネルギー E_B

を x 軸に電荷移動による安定化エネルギー CT を y 軸にとったグラフを Fig. 3 に示す。錯体の安定化エネルギーに CT の寄与が小さい場合は青線で示したように、また CT の寄与が大きい場合には赤線で示したように、 E_B と CT の間に極めてよい相関があることがわかる。

5. 今後の計画

① これまで高分解能で高感度な特徴を有する FTMW 分光計を用いて、いろいろな分子の回転スペクトルを測定し、分子構造を決めてきた。炭素原子数が 4 個のアルコールやチオエーテルを研究してきた。この研究をさらに発展させて、炭素数が 5 個以上の化合物(例えば、2-Methyl-1-butanol など)を対象として、回転スペクトルを測定し、数 10 種類ある回転異性体のうち、どの回転異性体が安定であるかを検討する。イソブチルメチルチオエーテルで低い振動励起状態が測定されているので、同様な現象がイソプロピルメチルエーテル(IPME)で起こっているかを調べるために、IPME を合成し、回転スペクトルを測定する。すでに IPME の *gauche* 型は報告されているが、*trans* 型を探す。

② 環境汚染物質での分子錯体、DME-DMS 錯体やエチレンオキシド-エチレンスルヒド錯体の回転スペクトルを測定・帰属し、分子構造や分子内運動についての知見を得る。また、地球温暖化ガスである炭酸ガスについて、その錯体分子を網羅的に調べる。これらの分子錯体は環境問題の軽減、炭酸ガスの削減に寄与すると期待できる。酸素原子および硫黄原子と錯体との構造や分子間結合について系統的な知見を得る。弱い分子間力を持つ分子錯体に注目して、未帰属線が多い N_2 -DME および CO_2 -DMS 錯体について研究を続け、分子軌道計算と実験結果を統一的に比較・検討して、弱い分子間相互作用に対する考え方を提案することを試みる。

6. 研究成果の発表

口頭発表

- 1) 川嶋良章・廣田榮治* N_2 -エチレンオキシド錯体のフーリエ変換マイクロ波分光：分子内運動(1)” 神奈川工大・総研大* 第 13 回分子分光研究会(岡山大学)
- 2) 山田耕一*・川嶋良章 “ N_2 -エチレンオキシド錯体のフーリエ変換マイクロ波分光：分子内運動(2)” 産総研*・神奈川工大 第 13 回分子分光研究会(岡山大学)
- 3) Yoshiyuki Kawashima and Eizi Hirota, “FOURIER TRANSFORM MICROWAVE SPECTRUM OF $N_2-(CH_2)_2O$ ”, 68th International Symposium on Molecular Spectroscopy (Columbus (Ohio) USA)
- 4) Yoshiyuki Kawashima and Eizi Hirota, “Fourier Transform Microwave Spectrum of the Nitrogen Molecule –Ethylene Oxide Complex; Intra-complex Motions”, 23rd International Conference on High Resolution Molecular Spectroscopy, Budapest.
- 5) 川嶋良章・廣田榮治* “ N_2 とジメチルエーテル錯体のフーリエ変換マイクロ波分光(第 2 報)” 神奈川工大・総研大*, 第 13 回分子分光研究会(東京大学)

アロステリック酵素を用いたエフェクターのバイオセンシング

研究者名： 応用化学科 佐藤 生 男

1. 研究成果の要約

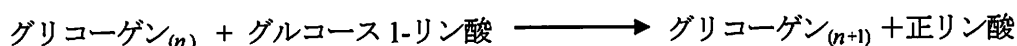
円盤状に加工した炭素繊維を酵素固定化用の担体に用い、予め表面を化学処理した後、酵素を共有結合させた。昨年度に引き続き、代表的なアロステリック酵素のグリコーゲンホスホリラーゼ *b* を利用し、フローインジェクション計測システムを用いて、微量計測を試行した。この酵素固定化繊維をプラスチック製のミニリアクターに充填し(内径：約 7.0 mm, 充填高さ：約 15 mm)、本リアクターを識別素子とし、分光測光法に基づいたフローインジェクション計測システムに設置した。グリコーゲン (α -1, 4-*O*-グリコシド結合を主とするグルコースのポリマーで α -1, 6-*O*-グリコシド結合を一部含む) 液とグルコース 1-リン酸液とを酵素の基質液に用いた。酵素触媒反応で遊離されるオルトリン酸をマラカイトグリーン液とのイオン会合体の形成に導き、フロー式の可視分光器 (光路長 10.0 mm) でフローインジェクション式に計測した。このようにして、本酵素の触媒活性の発現を指標に、フローインジェクション分析法により、エフェクター (アデノシンーリン酸, 以後 AMP と略す) を 0.05 ~ 3.0 mM の範囲で分光測光法的に定量することができた。

2. 研究概要

2.1 計測原理

糖代謝に関する酵素としてアロステリック酵素は一般に、知られている。同一タンパク質のその活性部位とは空間的に異なる部位 (エフェクター部位) へ、エフェクターとして作用する分子が結合することで、本酵素はその触媒活性が調節されることは既知である。代表的なアロステリック酵素として、グリコーゲンホスホリラーゼ *b* は公知であり、この酵素のエフェクターであるアデノシンーリン酸 (AMP) は、エフェクター結合部位に配位、結合することで、酵素触媒活性が変化する。一方、エレクトロニクス基礎事項として、電子デバイスのトランジスターが、グリッド電圧の調節を介して増幅作用が行われることもよく知られている。これらの関係に着目し、電子デバイスの特性を、生物素子に導入した計測法の開発を創案した。具体的に、エフェクターとして AMP 分子に注目し、酵素触媒にグリコーゲンホスホリラーゼ *b* を用い、次のグルコース鎖の拡張反応で生成される正リン酸を分光測光法的にモニタリングすることとした。

グリコーゲンホスホリラーゼ *b*



分光測光法的には、形成される正リン酸をさらに、リンモリブデン酸塩の誘導体とし、マラカイトグリーンと反応させて発色するイオン会合体を定量することにより、上記の反応をモニタリングすることで、間接的にエフェクターのフロー式定量がなされる。

2. 2 グリコーゲンホスホリラーゼの固定化

代表的なアロステリック酵素としてグリコーゲンホスホリラーゼ *b* (略称 GP*b*, EC 2.4.1.1, 11.8 U/mg 固体物, ウサギ筋肉起源, Sigma-Aldrich 社製) を用いた。

- (a) 炭素繊維の酸処理: まず、ポンチで円盤 (ディスク) 状 (内径 約 7.0 mm, 高さ 5.0 mm) に打ち抜いた炭素繊維 (日本カーボン (株) 製 No.シ 01007-044) 20 個をアセトン中で超音波洗浄 (15 分間) し、脱脂・乾燥することとした。次いで、10 mM 硝酸液 (75℃ に保温) に 30 分間、浸漬し、吸引濾過後、洗浄、分離して、110℃ で乾燥した。
- (b) 金酸液の含浸: 10 mL の純水中にテトラ金 (III) 酸四水和物 (0.33 g) を溶解し、50 mL 容の三角フラスコに移し、先の乾燥済の炭素繊維を保冷库内 (4℃) で、一晚 (約 20 時間) ゆっくりと往復振盪 (60 rpm, 振れ幅 25 mm) した。この金酸液で処理したディスク状の炭素繊維をろ過吸引、洗浄し、保冷库内で乾燥後、長方形の袋状に加工した 50 メッシュのナイロンネットの中に移した。このネットをユニシート (大きさ: B4, チャック付のビニール袋) に入れ、水素ガスで満たし、封入後、75℃ に設定した恒温槽上で 6 時間、金酸を固体状体の金に還元することとし、4℃ の保冷库内で一晚乾燥させた。
- (c) アミノエタンチオール化: この水素で還元処理した炭素繊維と 20 mM アミノエタンチオール (0.05M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 8.0, 50 mL) とを 50 mL 容の三角フラスコに入れ、予め室温で液中の気泡を可及的に減圧下で除去し、再び 4℃ の保冷库内で往復振盪 (16 時間以上, 60 rpm, 振れ幅 25 mm) した。その後、吸引ろ過して洗浄 (0.05M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 8.0, 50 mL) し、乾燥した。
- (d) グルタルアルデヒド活性化: 2.5% グルタルアルデヒド溶液 (25 mL) で架橋法 (0.1M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0, 60 min) により作用 (グルタルアルデヒド活性化) させた後、0.05 M リン酸ナトリウム液 (pH 7.0) で洗浄し、重量値が変化しなくなるまで室温で乾燥した。
- (e) 酵素とのカップリング: この乾燥済みのディスク状の炭素繊維に対し、10% の重さの GP*b* を最終濃度が 0.1M になるように調整したリン酸ナトリウム液 10 mL 中に溶解し、9.0 mL を固定化に適用した。72 時間 (昨年度は 50 時間), 4℃ の保冷库内で恒温振盪後、0.1 M リン酸ナトリウム、0.5 M 塩化ナトリウム、純水の順で各 1L ずつ洗浄し、酵素固定化物を得た (固定化収率: 41.8 %)。なお、シッフの塩基が残存していると、酸性条件下で固定化済の酵素が遊離されることを憂慮し、一端、水素化ホウ素ナトリウム液で還元処理後、酵素固定化炭素繊維 (3 個のディスク) をポリアセタール製のリアクターに詰め、さらにアクリル製の恒温ホルダーに取り付けた。

さらに、グリコーゲンというグルコースの高分子物質を基質とする本研究でも、炭素繊維表面への基質分子の拡散効率の向上、ひいては触媒活性の増大を期待した。

2. 3 酵素触媒反応のモニタリング

マラカイトグリーンを用いた正リン酸の分光測光法の測定条件の改善を既に図った。酵素触媒反応に適した中性付近の pH で、安定した計測条件を検討した結果、最適計測条件として、キャリアーの組成が 50 μ M グリセロリン酸と 15 mM メルカプトエタノールからなる緩衝液 (pH 6.2) の適用が最適であった。一方、発色試薬としては 0.11 M モリブデン酸液-0.22 mM マラカイトグリーン液を用いる事とした。

3. 結果

グリコーゲンとグルコース 1-リン酸からなる基質液を注入すると、酵素リアクターからの排出液と発色液との混合・反応が起こり、この混合液の発色が認められた。つまり、イオン会合体の生成に起因する応答が本計測条件で認められた。この結果、エフェクター (AMP) 濃度が 0.05 ~ 0.3 mM の範囲内では、酵素活性 (吸光度) が対応してそれらの増加 (約 0.01 ~ 約 0.04) が観察された。

4. 今後の展望

炭素繊維を担体とする新たなグリコーゲンホスホリラーゼ *b* の分光測光法によるエフェクターのフローインジェクション分析法を提唱し、何とか計測の可能性を例証した。さらに高活性な炭素繊維を取得するため、ガス状の水素が不要でしかも酵素タンパク質の固定化率の向上を予期して、次年度にはパラジウムで予め被覆済の炭素繊維を金酸液と振盪・攪拌し、金属状の金にイオン交換した標品を酵素固定化用の担体に適用する予定である。

研究発表リスト

印刷物発表

- (1) Ikuo SATOH, Eisaku TANAKA, and Yasushi KANZAKI: “Immobilization of Glycogen Phosphorylase *b* onto the Carbon Fibers and its Application to a Flow Sensor”, *Proceedings of the 55th Chemical Sensors Symposium*, 29, Supplement B, pp.7 - 9, 2013.
- (2) Ikuo SATOH, Ryoh GONDA, and Yasushi KANZAKI: “Flow-Injection Determination of Heavy Metal Ions Using Alkaline Phosphatase Immobilized onto Carbon Fibers”, “*Proceedings of the 56th Chemical Sensors Symposium*, 30, Supplement A, pp.61-63, 2014.

口頭発表

- (1) 佐藤生男, 神崎愷: 「炭素繊維に固定化した酵素のフローインジェクション分析」, 公益社団法人電気化学会, 化学センサ研究会 第56回講演会, 2013年, 9月27日, 東京.
- (2) 佐藤生男, 神崎愷: 「炭素繊維に固定化した酵素のフローインジェクション分析」, 公益社団法人日本分析化学会, フローインジェクション分析研究懇談会, 第51回フローインジェクション分析講演会, 2013年, 11月8日, 熊本.
- (3) 佐藤生男, 神崎愷: 「炭素繊維上に固定化したアルカリホスファターゼを用いる重金属イオンのフロー計測」, 公益社団法人電気化学会 化学センサ研究会 第56回講演会, 2014年, 3月30日, 大阪.

ポスター発表

- (1) 権田涼, 佐藤生男, 神崎愷: 「アルカリホスファターゼの炭素繊維への固定化とセンサへの応用」, 公益社団法人日本分析化学会 フローインジェクション分析研究懇談会, 第51回フローインジェクション分析講演会, 2013年, 11月8日, 熊本.

酵素法による生体アミノ化合物の高感度な網羅的測定法の開発とその応用
—プトレッシンオキシダーゼの遺伝子クローニングとセンシングへの応用—

研究者名： 応用バイオ科学科 准教授 山村 晃

1. 研究の目的

本研究室では、ヒスタミンオキシダーゼ、L-ヒスチジンオキシダーゼ、GABA オキシダーゼ、エチルアミンオキシダーゼなどの生体アミノ化合物に作用する酸化酵素を土壌微生物から見出し、酵素の特性評価と実試料の分析などに応用してきた¹⁾。

本研究室では、オルニチンを含有する寒天平板にて、土壌微生物を探索したところ、オルニチンが脱炭酸されて生じるプトレッシンに反応するプトレッシンオキシダーゼ産生能が非常に高い菌株を探索することができた。本酵素は、タイなどの白身魚や貝・ウニなどの腐敗過程で生じる腐敗アミンを検出できる重要な酵素であるが、現在のところ市販酵素がないため、本酵素を効率的に産生させ、精製する手法が必要である。しかしながら、現在のところ、本酵素の産生能は高いものの精製は簡便ではなく、遺伝子工学を用いたヒスチジントグの付着などの改良が必要である。

- 1) Kiba,N., Koga,A., Tachibana, M., Tani,K., Koyama,T., Yamamura,A., Matsumoto,K.,
Anal.Sci.,**22**,95-98,(2006)

2. 研究の必要性及び従来の研究

プトレッシンは、塩基性アミノ酸である L-オルニチンがオルニチンデカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.17) によって脱炭酸されて生成される最も単純なポリアミンの一種である。主に発酵食品に多く含まれており、アレルギー様食中毒の起因物質として知られているヒスタミンの毒性は、プトレッシンのようなポリアミン類の共存下でより強くなることが報告されている²⁾。したがって、食品中のプトレッシン含有量を簡便かつ迅速に測定することは、アレルギー様食中毒のより確かな予防にもつながると考えられる。ポリアミン類の測定は高速液体クロマトグラフィーが主流であるが、より簡便で迅速な分析法の一つとして酵素的測定法が注目されている。

現在、プトレッシンに対して基質特異性の高い酵素として、*Micrococcus roseus* 由来のプトレッシンオキシダーゼ (EC 1.4.3.10)³⁾ などが知られているが、*Arthrobacter* 属が産生するプトレッシンオキシダーゼの酵素化学的特性に関する報告はほとんどない。本研究室では、土壌微生物よりプトレッシンオキシダーゼ産生能の高い *Arthrobacter* sp. KAIT-B-420 株を見出した。この菌株は高いプトレッシンオキシダーゼ産生能を有しており、得られる酵素はプトレッシンに対して基質特異性が高いため、酵素的測定法によるプトレッシンの測定への応用が期待できる。

- 2) Chu,C.H., Bjeldanes,L.F., *J.Food Sci.*,**47**,79-80,(1982)

- 3) Adachi,O., Yamada,H., Ogata,K., *Agric.Biol.Chem.*,**30**,1201-1210,(1966)

3. 期待される効果

本研究により、プトレッシンオキシダーゼのアミノ酸配列が明らかになり、同属におけるプトレッシンオキシダーゼの配列と比較でき、遺伝子工学によって塩基配列を変異させて発現する酵素のアミノ酸置換を行い酵素化学的特性を改善することが可能となる。また、プトレッシンオキシダーゼを簡便に産生、分析するシステムを構築することができる。

4. 研究の経過及び結果

(1) プトレッシンオキシダーゼのアミノ酸置換による熱安定性の向上

Arthrobacter sp. KAIT-B-420 が産生するプトレッシンオキシダーゼ(PUO)は、 $K_m=49 \mu\text{M}$ と小さくプトレッシン濃度を測定するのに適した酵素である。しかしながら、熱安定が低いため長期保存ができず、4℃保存で2週間保存すると活性が半減するため、構造の安定化が必要である。また、加熱すると補酵素である FAD が酵素から溶出する欠点があり、ある温度以上になると急激に活性が低下する欠点があった。そこで、酵素の安定性を向上する目的で、システインに置換することによってジスルフィド結合を導入した。また、補酵素 FAD と共有結合するようにシステインもしくはヒスチジンにアミノ酸置換をおこなった。

まず、変異を導入するアミノ酸を決定するため、決定した酵素の一次構造から立体構造を予測した。酵素の外側に位置する 319 番目のシステインに近接する 373 番目のフェニルアラニンシステインに置換した F373C の立体構造を予測すると、ジスルフィド結合が形成できることが予測できた(図 1)。

本酵素は、補酵素の FAD と非共有結合によって結合している。構造が類似しているヒト由来のモノアミンオキシダーゼは、補酵素 FAD とシステインが共有結合しており、本酵素はシステインがアラニンに変異している。そこで、398 番目のアラニンをシステインにアミノ酸置換した A398C の変異体を作製した(図 2)。また、コハク酸デヒドロゲナーゼでも、FAD と共有結合しているが、この酵素はシステインの代わりにヒスチジンと共有結合することが示されていたため、A398H の変異体も作製した。変異体は、①F373C 変異体(C/A)、②A398C 変異体(F/C)、③A398H 変異体(F/H)、④F373C+A398C 変異体(C/C)、⑤F373C+A398H 変異体(C/H)の 5 種類を作製した。PUO 遺伝子を挿入した pCold II-PUO を鋳型として、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit によって部位特異的に変異を導入した。このプラスミドをコンピテントセルに形質転換して、アンピシリン添加 LB 寒天培地上にコロニーとして生育するものの中で、コロニー PCR によって変異が導入されている菌株を選択した。この菌株からプラスミドを精製して、DNA シークエンサーによって変異が導入されていることも確認した。この形質転換大腸菌をアンピシリン添加 LB 液体培地に植菌して 37℃で、濁度が 0.6 になるまで往復振とう培養した。終濃度 1 mM となるように IPTG を添加して、15℃で 1 日放置して、PUO を発現させた。培養菌体を、遠心分離(4℃, 3,000×g, 15 分)を行い集菌した。0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁して、氷冷しながら超音波破碎によって菌を破碎した後、遠心分離(4℃,

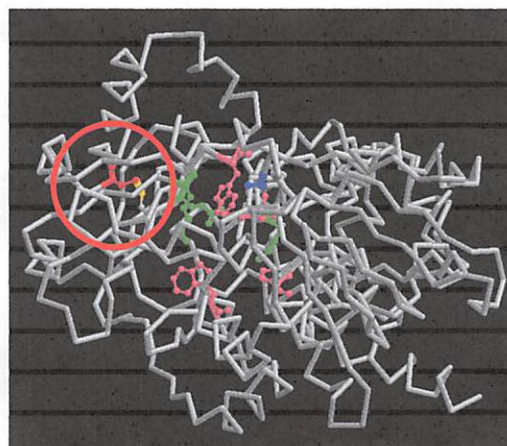


図 1 PUO のジスルフィド結合導入部
緑：基質結合部、ピンク：FAD 結合部

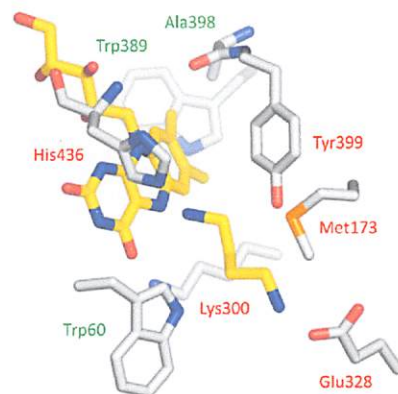


図 2 PUO の活性中心
黄：FAD およびプトレッシン

20,000×g, 15 分)を行い, 上清を酵素抽出液とした。酵素抽出液をニッケル担持キレートカラムに通液して, His-tag 融合プロテシノキシダーゼを吸着させた。イミダゾール添加緩衝液を通液することで, カラムから溶出させて精製を行った。

精製酵素のタンパク質濃度を一定にして, PUO 活性を測定して PUO-wild の活性を 100% として相対活性を評価した(表 1)。その結果, ジスルフィド結合を導入した PUO-C/A のみ 1.3 倍の活性が見られた。一方, FAD の共有結合を試みたものは, 活性が低下することが分かった。特に, 共有結合にヒスチジンをういた変異体の活性は 11%, 4% と低く, ヒスチジンの側鎖が大きい活性中心を狭くしたためであると考えられ, 測定用酵素の変異としては適切でない判断した。

次に, 精製酵素の熱安定性を評価した。各温度で 10 分間処理した後の酵素の残存活性により評価した(図 3)。その結果, ジスルフィド結合を導入した PUO-C/A のみ熱安定性の向上, つまり, 構造安定性が確認でき, 他の変異体は PUO-wild とほとんど変わらなかった。

補酵素の溶出の確認は, 50℃, 10 分間で加熱処理後, 酵素の限外ろ過で通過するろ液の吸光スペクトルを測定して FAD を定量した。PUO-wild で溶出する FAD を 100% として, 他の酵素の溶出量を比較した(表 2)。ジスルフィド結合を導入した PUO-C/A は, FAD が溶出したのに対し, 共有結合のため A398C を置換したものは, FAD の溶出が抑えられた。この結果から FAD の共有結合が成功していることが明らかになった。しかしながら, FAD の共有結合によって酵素の熱安定性は向上しないことが明らかになった。また, システインに 2 つ置換した PUO-C/C は, FAD を共有結合する能力が弱く, ジスルフィド結合が予想外の場所で行われていることが示唆された。

(2) プロテシノキシダーゼのアミノ酸置換による基質特異性の改変

Arthrobacter sp. KAIT-B-420 が産生するプロテシノキシダーゼ(PUO)は, 直鎖の両末端にアミンを持つプロテシノ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$)やカダベリン($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$)に反応する。プロテシノやカダベリンは, ヒスタミンの解毒酵素を阻害してヒスタミン中毒を重症化させる。また, プロテシノは細胞増殖に使われるポリアミンの原料になっており, 代謝活性が低下している高齢者にとって老化防止上有益な食事成分にもなる一方, 腫瘍の増殖にも関与するため, これらをモニタリングすることは重要である。そこで, PUO の活性中心のポケットを大きくすることで, カダベリンを測定することができ, PUO 変異体と wild 型 PUO で同時計測することで, プロテシノを正確に測定

表 1 PUO 変異体の相対活性

酵素	相対活性(%)
PUO-wild	100
PUO-C/A	130
PUO-F/C	66
PUO-C/C	60
PUO-F/H	11
PUO-C/H	4

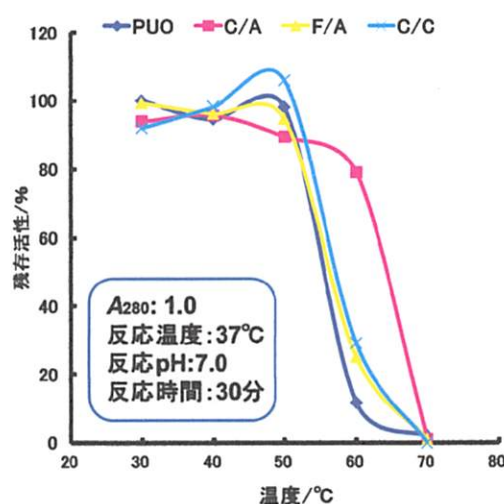


図 3 PUO 変異体の熱安定性

表 2 PUO 変異体の FAD の溶出

酵素	FAD 相対溶出率(%)
PUO-wild	100
PUO-C/A	100
PUO-F/C	28
PUO-C/C	81

できるのではないかと考えた。

実際には、PUO の 328 番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した PUO-E328D を作製することで炭素 1 個分の基質結合部位を大きくすることを試みた(図 2)。(1)と同様な方法によって変異体を合成した。本酵素を大腸菌にて大量発現してニッケル担持キレートカラムに通液して、PUO-wild と PUO-E328D を精製した。PUO-wild のプトレッシンに対する反応は、最適 pH が 8 であるのに対して、PUO-E328D は、最適 pH が 9 にアルカリシフトしていた。これは、基質結合部位が広くなり、プトレッシンをよりひきつける力が必要になったためであると考察できる。また、酵素の pH 安定性は PUO-wild が pH 5~10 まで安定であったのに対して、PUO-E328D は、pH 8~10 と安定性が悪くなっていた。これは、基質結合部位が広がっているため、安定性が下がったものと考察できる。一方、基質との反応性($V_{\max}$ が高いほど大)と基質親和性(K_m が低いほど大)は、PUO-E328D は長鎖のジアミンにも反応性を示し、プトレッシン($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$)との反応性および親和性が低下しているが、カダベリン($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$)との反応性は変化せず、PUO-wild で反応が起らなかった $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH}_2$ に反応性を示す予想外の改善に留まった(表 3)。今後、活性中心の構造を改変して改善していきたい。

表 2 PUO-wild と PUO-E328D の特性の比較

基質	PUO-wild			PUO-E328D		
	$K_m(\text{mM})$	$V_{\max}(\text{U/mg})$	$V_{\max}/K_m$	$K_m(\text{mM})$	$V_{\max}(\text{U/mg})$	$V_{\max}/K_m$
$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	0.44	161	366	0.53	36.6	69.1
$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$	2.68	21.9	8.17	2.78	22.1	7.95
$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH}_2$	-	0.0	0.0	3.26	22.8	6.99

(3) 本年度の成果のまとめ

①PUO にジスルフィド結合を導入することで熱安定性が 10℃向上した。

②PUO-A398C にアミノ酸置換すると FAD を共有結合できるが、共有結合によって熱安定性は向上しなかった。

③PUO-E328D にアミノ酸置換するとより長鎖のジメチルアミンに反応性を示すようになったが、pH 安定性などが低下した。

5. 今後の計画

ヒスタミンオキシダーゼの活性中心をポイントミューテーションにより改変して、基質特異性の改善を行って、より測定に適したものに改変する。PUO についてもランダム変異によるアミノ酸置換を行い、特性の改善を試みる。最終的に市場に安価に供給できる酵素産生系の確立を行う。

これらの酵素を用いて、魚の腐敗検出システムを構築する。

6. 研究成果の発表

- 1) *Arthrobacter* sp. KAIT-B-420 由来プトレッシンオキシダーゼのクローニングと測定への応用, 山村晃, 川上勇希, 上原なつみ, 岡田知慧, 松本邦男, 2013 年電気化学会秋季大会(東京)
- 2) 腐敗アミンオキシダーゼのスクリーニングと発現系の構築, 山村晃, 川上勇希, 小島悟, 岡田知慧, 松本邦男, 第 7 回バイオ関連シンポジウム(名古屋)
- 3) 部位突然変異によるプトレッシンオキシダーゼの酵素化学的特性の改変とその応用, 山村晃, 上原なつみ, 川上勇希, 岡田知慧, 松本邦男, 電気化学会第 81 回大会

食嗜好センシングに關与する食品成分分析とその生成機構に基づく制御について

—ショウガの色素性成分の構造と特性—

研究者名：次世代センシング研究所・第一研究室 飯島陽子（栄養生命科学科）

1. 研究の目的

食品のおいしさや嗜好性は、色や香り、味によって影響を受ける。本研究では、嗜好性の偏りが大きい植物性食材を対象に、色・香気・味に寄与する成分の構造決定、分析を行っている。また、品種や調理過程における成分変化について、メタボローム技術による解析を進めている。本年度は、ショウガの黄色色素成分についての研究を報告する。

ショウガ根茎は、黄白色を示し、すりおろしたり漬物として料理に彩りを添える。しかし、その清成分についての詳細は分かっていない。本研究では、ショウガの黄色色素に關与する成分の特定とショウガの種類や産地による特性について調べることを目的とした。

2. 研究の必要性及び従来の研究

ショウガは、日本において最もポピュラーな香辛野菜であり、特に回転ずし屋などでは、大量に酢漬けショウガが消費されている。食品加工されて消費される場合、ショウガの香りやその色調が重要視されているが、ショウガの黄色色素についての詳細は今までに全く分かっていなかった。また、品種による品質の差についてもこれまでに曖昧であったため、本研究において、多数の品種および産地の異なるショウガを収集し、黄色色素成分について調べることで、ショウガの品質評価に貢献すると考えた。

3. 期待される効果

本研究では、ショウガの色素成分に着目したが、ショウガのみならず、多くの植物食材では、色、香り、味が品質評価において重要視されており、その多くはどの成分が寄与しているのか詳細が分かっていないのが現状である。また、調理加工によって、変化する成分もあり、それぞれのファクターを考慮すると複雑である。よって、それらの寄与成分が明らかになれば、その成分をマーカーとして、品種改良、調理方法の考案が行えると考えている。

4. 研究の経過及び結果

産地や品種の異なる62種のショウガ根茎を入手し、黄色色素成分をメタノールにて抽出した。UPLCを用い、420nmにて黄色色素を検出した。また、比較のためウコンも入手し、同様に分析を行った。その結果、ショウガの黄色色素成分として主に3種の成分が検出された。そのうち、2種は、ウコンの色素成分同様、curcumin、demethoxycurcuminであることが

標準品との比較により同定された。もう1種については、ウコンには存在しないショウガ独特の黄色色素成分であった。そこで金時ショウガを用いて各種クロマトグラフィで分取精製を繰り返し、単離後、MSおよびNMRでこの成分の構造を確認した。その結果、この成分は6-dehydrogingerdioneであることが分かった。Curcumin、demethoxycurcumin、6-dehydrogingerdioneの平均含量は、ショウガ100gあたり、それぞれ2.2 mg、1.6 mg、20.0 mgであった。黄色の強い金時ショウガにおいて、curcumin、demethoxycurcuminが多く含まれる傾向にあったが、品種や産地によって組成は大きく異なっていた。また、金時ショウガの定量値と同濃度でこれらの3種を混合し、色素強度を420nmで比較したところ、ショウガ抽出液の約90%の強度を示し、これらの3成分がショウガの黄色に寄与することが示唆された。次に、同じ生育環境で育てた3種（ラクダ、谷中、オウミ）の種ショウガと新ショウガについて、各黄色成分量の違いと測色計におけるb値を測定した。いずれの品種においてもb値は新ショウガより種ショウガで高い値を示し、谷中、オウミでは、特に3成分のすべての含有量が新ショウガより種ショウガで多い傾向を示した。

本研究成果は、2014年8月に行われる食品科学工学会で発表する予定であり、また、*Food Science and Technology Research* 誌に2014年6月にアクセプトされた。

5. 今後の計画

今後は、特に食嗜好センシングに影響の与えられと考えられる香気成分に着目し、香辛野菜やゴボウなどの風味が独特な和野菜を中心に、香気寄与成分の同定、生成メカニズム、調理加工中の変化に着目し、研究を進める予定である。

6. 研究成果の発表（2013年度、他の研究課題も含む）

学会発表および招待講演

- (1) Characterizaion of the acyclic monoterpene biosynthesis responsible for pleasant aroma in fresh ginger rhizome. Yoko Iijima, Takao Koeduka, Hideyuki Suzuki, Kikue Kubota, 10th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology (2013.4) ポスター賞受賞
- (2) トマト果実の成熟に依存する配糖化酵素の機能解析 飯島陽子, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 青木考, 第31回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (2014.9)
- (3) 質量分析を用いた網羅的成分解析の食品加工への応用, 飯島陽子
第29回茶学術研究会講演会特別講演 (2014.3)

著書および論文

- (1) “野生種トマト—その多様性と利用性”, 飯島陽子, 生物工学会誌, 91(11), 662-665 (2014)
- (2) “メタボロミクスに基づく多成分解析の食品の質的評価に対する有用性”, 飯島陽子, 食品と開発, 48(11), 7-9 (2013)
- (3) Steroidal glycoalkaloid profiling and structures of glycoalkaloids in wild tomato fruit., Iijima Y., Watanabe B, Sasaki R, Takenaka M, Ono H, Sakurai N, Umemoto N, Suzuki H,

Shibata D, Aoki K., *Phytochemistry*, 145-157 (2013)

- (4) Traumatins- and dinortraumatins-containing galactolipids in Arabidopsis: their formation in tissue-disrupted leaves as counterparts of green leaf volatiles., Nakashima A, von Reuss SH, Tasaka H, Nomura M, Mochizuki S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Boland W, Takabayashi J, Matsui K., *J Biol Chem*. 288(36):26078-88 (2013)
- (5) Enhancement of production of eugenol and its glycosides in transgenic aspen plants via genetic engineering., Koeduka T, Suzuki S, Iijima Y, Ohnishi T, Suzuki H, Watanabe B, Shibata D, Umezawa T, Pichersky E, Hiratake J., *Biochem Biophys Res Commun.*, 436(1):73-8 (2013)
- (6) An application of a relational database system for high-throughput prediction of elemental compositions from accurate mass values., Sakurai N, Ara T, Kanaya S, Nakamura Y, Iijima Y, Enomoto M, Motegi T, Aoki K, Suzuki H, Shibata D., *Bioinformatics.*, 29(2):290-1 (2013)
- (7) “香辛料・ハーブとその香り～香気生成メカニズムとその蓄積”, 飯島陽子,
におい・かおり環境学会誌, 45(2),132-142 (2014)
- (8) Long-chain free fatty acid profiling analysis by liquid chromatography-mass spectrometry in mouse treated with peroxisome proliferator-activated receptor α agonist., Takahashi H, Suzuki H, Suda K, Yamazaki Y, Takino A, Kim YI, Goto T, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Takahashi N, Kawada T., *Biosci Biotechnol Biochem*. 77(11):2288-93 (2013).

「次世代センシングデバイスおよび応用システムの研究開発」

—センサユニットの開発と応用技術の検討—

研究者名： ホームエレクトロニクス開発学科 黄 啓新

1. 研究成果の要約

本研究では、安心・安全な暮らしができる未来の社会や便利な生活空間や環境にやさしいスマートハウスを実現するために、汎用的なセンサユニットの開発と応用技術の検討を行うことを目的とする。今年度は主に以下の成果を上げた。

- 1) ハードウェアとソフトウェアの二つ視点から汎用センサユニットの構築を検討した。
- 2) 室内環境をモニターするために市販された温湿度センサ、照度センサ、圧力センサと匂いセンサを用いて、コンパクトなセンサユニットを作製し、タブレット PC を用いてデータを集めることができた。また、熱中症やヒートショックを予防する応用も検討した。
- 3) アウトドア活動を支援するために、GPS センサ、温度センサや気圧センサ等からなるセンサユニットの製作と表示するためのユーザインターフェースの設計を行い、データのセンシングと表示ができた。

2. 研究経過および結果

2. 1 センサユニットの構築

センサユニットは Fig. 1 のように、いくつかのセンサと、センシングデータの一次処理するためのインターフェース回路と無線でデータを伝送する回路からなる。汎用性やコスト低減を考え、センシングデータの一次処理回路は Arduino MEGA 2560 R3 というデータ演算処理モジュールを使用した。Arduino は、AVR マイコン、入出力ポートを備えた基板で、Arduino 言語でプログラミングが

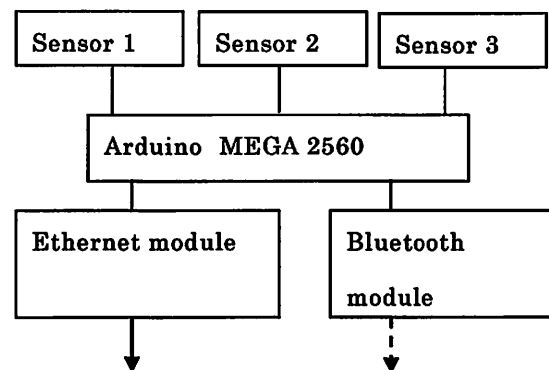


Fig. 1 Hardware block diagram of the sensor unit.

できる統合開発環境から構成されるシステムとなる。一方、無線通信モジュールに関して、現在標準的に搭載されている近距離通信に Bluetooth、長距離通信に Ethernet 用いることとした。前者は B to B のやり取りや省電力動作可能である反面、使用可能範囲が限られて、大容量のデータ通信が不向きである。一方後者は離れた場所で多くの情報のやり取りができ、安定的な電源が要求される。今回通信モジュールはそれぞれ Arduino

Ethernet Shield R3 と SparkFun WRL-09358 Bluetooth Mate をそれぞれ使用した。

2. 2 室内環境をモニタリングするためのセンサユニット

近年、高齢者たちは夏の熱中症と冬のヒートショックによる事故が増えている。これらの具体的な問題を解決するため、既存のものをうまく活用することと低コストでサービスを提供することが必要である。ここで、屋内用の小型化センサユニットを開発し、家庭にある既存の情報端末と接続し、リアルタイム的に室内環境の情報をセンシングするシステムを構築し、家電製品を効率よく制御できることを目指している。Table 1 に室内センサユニットを構成するセンサー一覧表を示す。Photo. 1 は回路基板上に作製したセンサユニットであった。サイズ 70mm×80mm×20mm の中に、温度センサ、湿度センサ、照度センサ、圧力センサや匂いセンサやインターフェース回路や通信モジュールが実装された。Fig. 2 はタブレット情報端末上に設計したユーザインターフェースで、各種のセンシング情報はデジタルでリアルタイム的に表示されるものと時系列でアナログ的に表示されたものがある。サンプリング時間はユーザ側がセッティングできる。センサユニットの動作時間と消費電力について、バッテリーを用いて駆動時間を計測した。測定は通信モジュールの Bluetooth と Ethernet を同時に起動し、データを送信し、二つのタブレット PC により受信するという条件で行われた。測定の結果、消費電力は約

Table 1. The sensors in the sensor module of indoor

Sensor	Model	Main spec.
Humidity	SparkFun SEN-09569 HHH-4030	0-100% RH, $\pm 3.5\%$
Temperature	Parallax MS5607	-40-85°C, 0.01°C
Pressure	Parallax MS5607	10-1200 mbar
Luminance	NJL7502	1-100000 lux
Odor	TGS2450	Odorous, over 1 ppm

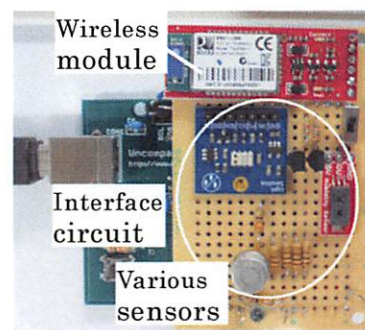


Photo 1. Photograph of the assembled sensor module

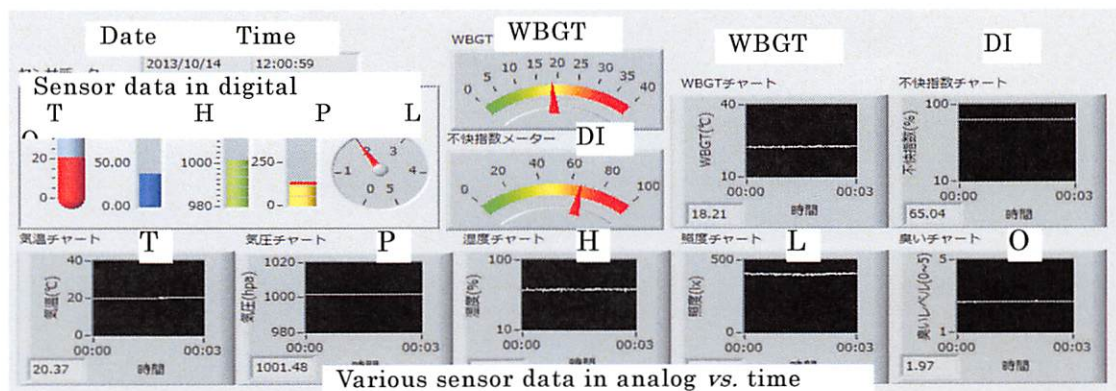


Fig. 2 Display screen of the user interface (T: temperature; H humidity; P: atmospheric pressure; L: Illuminance; O: odor)

0.14W であった。

また、センシングデータの応用例として、室内環境の温度と湿度のデータを利用し、室内の WBGT の時間変化グラフを作成した。その結果は Fig. 3 に示す。また、この結果はユーザインターフェースにも表示される。WBGT は、人体の熱収支に影響の大きい湿度・輻射熱・気温の3つを取り入れた指標で、熱中症の指標としてよく利用されている。他にも、不快指数などもセンシングデータより求められて、ユーザに提供することが可能である。もしある閾値を超えると、情報端末より警告音等を鳴らし、ユーザに安全な対策をとるように促す。将来的に、家電と接続し連動し、強制的に家電を ON することも考えられる。

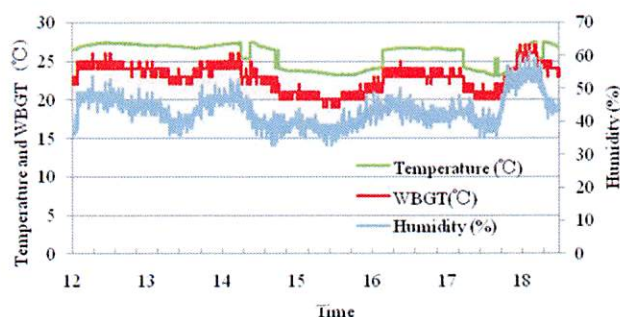


Fig. 3 Relationship between the WBGT, humidity, and temperature of a room

2. 3 アウトドア活動を支援するセンサユニット

近年、中高年の中では登山活動がブームになっているが、それに伴う事故なども多発している。それを防ぐ手段の一つとして、ナビゲータの活用である。専用の登山ナビゲータは高価で、専門性が強くて、拡張性もない。そのため、この研究では、ユーザが持っているタブレット端末を活用し、単独のセンサユニットを購入すれば、汎用的な山登り支援システムが実現できる。昨年動作検証するための実験を行った。今年、実際センサユニットを作製した。Table 2 に室内センサユニットを構成するセンサー一覧表を示す。Photo. 2 は回路基板上に作製したセンサユニットであった。サイズ 120mm×75mm×65mm の中に、GPS センサ、温度センサ、圧力センサ、磁気センサやインターフェース回路や通信モジュールが実装された。センサユニットの消費電力を測定し、約 0.23W で

Table 1. The sensors in the sensor unit of outdoor

Sensor	Model	Main spec.
GPS	GT-723F	Venus 6 correlators 5m CEP accuracy
Temperature	Parallax MS5607	-40–85°C, 0.01°C
Pressure	Parallax MS5607	10–1200 mbar
Azimuth	RDCM-802	Precision ±5° Resolution 3bit



Photo. 2 Photograph of the assembled sensor module

あった。Fig. 4はタブレット情報端末上に設計したユーザインターフェースで、各種のセンシング情報はデジタルでリアルタイム的に表示されるものと時系列でアナログ的に表示されたものがある。また、GPSによる位置情報はタブレット端末にある地図情報と連動し、今

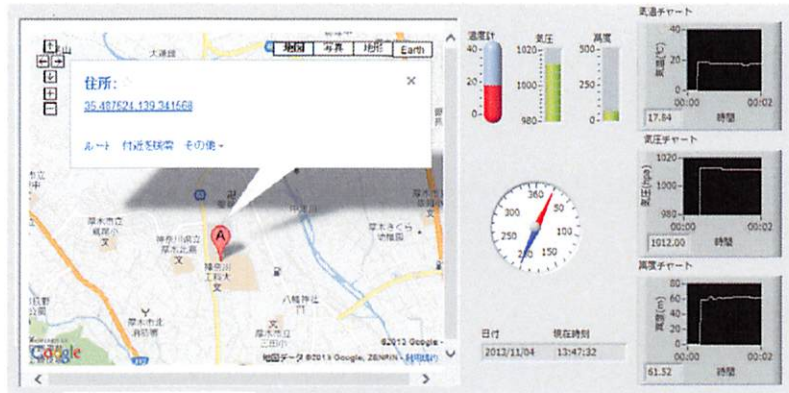


Fig. 4 Display screen of the user interface

の居場所は確認することができた。屋外用の製品なので、サイズや消費電力等の課題があり、今後さらなる改善が必要である。

3. 平成 26 年度の計画

平成 26 年度は研究計画の最終年度で、具体的に以下の三つの内容を検討する。

- 1) センサユニットの性能改善： まずセンサユニットのサイズを小さくし、現在の半分以下（40mm×40mm×20mm）に実現したい。次にセンサーモジュールの消費電力を低減する。
- 2) ユーザインターフェイスのリファイン： 現在汎用情報端末として、Window OS を使用している。守備範囲を拡大するために、Android OS に対応するタブレットやスマートフォンに使えるようなアプリケーションソフトを開発する。
- 3) 家電制御への実証実験： 上記の 1) と 2) を検討した結果に基づいて、HEMS センターに登録企業と連携し、屋内における空気質量や温湿度を改善するために、エアコン、空気清浄機とアロマテラピー用機器に ECHONET Lite コントローラを付けて、実験室における基礎実験を行う予定。

4. 論文・国際会議発表

- 1) 森、黄と三栖, ” 情報端末と接続しやすい汎用性高いセンサユニットの開発”, 第センサシンポジウム論文集 6 PM3-PSS-052 4 ページ、2013.11
- 2) Fumihide Mori, Keishin Koh, Takayuki Misu; “ Development of a sensor module for monitoring indoor environments”, Applied Mechanics and Material 475-476, pp455-459, 2013. (Tarans. Tech Publications, Switzerland)

次世代センシングデバイスおよび応用システムの研究開発

一 医用画像診断支援システムの高度化に関する研究 一

研究者名：電気電子情報工学科 武尾 英哉

1. 研究の目的

CT, MRI, デジタル X 線, 超音波診断機などに代表される医療診断機器の高性能化に伴い, 一回の撮影で得られる医用画像の毎数は大幅に増大した. 例えば, CT 装置では画像あたり 0.5~1mm のスライス精度まで向上し, 胸部診断の場合, 約 500~1000 枚に及ぶ画像データが収録される. しかしながら, こういった装置の高性能化とは逆に, 病変の見落としが心配される. 理由は, 情報として埋もれている小さな信号 (病変を表す情報) を大量の画像情報の中から見落としなく発見 (診断) することが難しくなっているからである. そこで, これら医師の画像診断を支援する コンピュータ支援診断(CAD: Computer Aided Diagnosis)の研究がされている. CAD とは, 医用画像をコンピュータを用いて解析し, 病変の疑いのある候補を抽出し表示することで, 医師の診断をサポートする機能であり, 第二の意見 (セカンドオピニオン) とも呼ばれる.

ところで, 人体における様々な病気を対象として考えている CAD において, 現在研究が着手されている領域はまだごく一部にすぎない. 一方, 最近の CT 装置の進化に伴い, 比較的低被爆線量で人体の全身 (頭~足のつま先まで) を容易に撮影できるようになった. また, CT 検診車なども登場し, 検診で CT が使われるようになってきている. このことから, 健常者も含めて全身 CT を撮影し, 全身のあらゆる病変を対象とした夢の CAD システムが実現できれば, より早期に病気を見つけることが可能と思われる.そこで本研究では, 人工知能による認識技術の高度化を進め, 全身 CAD の実現に向けた基礎研究の強化を図る.

2. 研究の必要性及び従来の研究

これまで国内外の研究機関では, X 線画像や CT 画像を用いて, 乳がん, 肺がん, 胃がん, 肝臓がんなど一部の部位を対象とした CAD が開発されてきたが, これらは人体の疾病 (病変) の一部にすぎない. そこで, 将来的には全身のあらゆる病変を対象とした CAD システムを開発するために, 本研究では, 以下の部位とモダリティを対象とした CAD の適応領域の拡大を目指す.

- (1) CT 画像による胸部疾患の診断支援技術の確立と更なる高精度化
- (2) 診断支援技術の眼科領域への適用拡大
- (3) 他部位への診断支援技術の適用拡大の可能性検討
- (4) CAD システムの FDA・薬事認可のための客観的評価仕組みの確立

そこで本年度は, 上記のうち, (1) と (2) 基礎技術の確立と高精度化を目標に研究を進めた. 本研究の進め方の特徴は, これまで乳がんを中心に 10 年間以上研究を進めて築いてきた CAD の基盤技術を, 広く他部位やマルチモダリティに展開するとともに, 臨床の現場と連携を図りながら実用化 (役に立つシステムの開発) を目指していく点にある.

3. 期待される効果

本研究は, 医療分野のある単一のモダリティにとどまらず, X 線撮影, CT, MRI, さらには細胞画像 (明視野もしくは顕微鏡画像) にまで至っている. また, 検診~診断, さらには治療や新薬研究に至るまでの分野にわたっている. このように, CAD の応用領域の拡大化を図っており, 医療・医学の発展に大きく寄与している.

なお、本研究を進める上で、市場サイドの声を反映するために、より一層、臨床サイド（医療機関）との連携を強めた。本学に加え、栃木県立がんセンター（黒木放射線科医）、国際医療福祉大学病院（縄野放射線科医）、（独）国立がん研究センター中央病院（永井臨床放射線技師）、高橋眼科クリニック（高橋眼科医）と共同研究および開発を進めた。

4. 研究の経過及び結果

本研究の特徴は、これまで乳がんを中心に 15 年間以上研究を進めて築いてきた CAD 技術を、広く他部位や他モダリティに展開するとともに、臨床の現場と連携を図りながら実用化（役に立つシステムの開発）を目指していく点にある。研究課題（1）は栃木県立がんセンター、（独）国立がん研究センター中央病院および国際医療福祉大学病院、研究課題（2）は高橋眼科クリニックと連携を図り、臨床データの収集および臨床評価も進めてきた。そして、その研究成果は CARS2013 で海外発表^{[1], [6]}するとともに、日本医用画像工学会(JAMIT)の論文誌にも掲載された^{[5], [8]}。現在、更なる高精度化を図っており、その研究成果を平成 26 年度中に海外を中心とする学会で発表する予定である（CARS2014 および JAMIT 論文誌へ投稿中）。

（1）胸部 CT 画像を用いた胸水領域と圧迫性無気肺領域の分離計測^{[1]–[5]}

胸水貯留は、心不全、肝硬変、肺炎、癌など様々な原因により発生する。その増加した胸水や気胸などの胸腔内の占拠性病変が、気管支を圧迫するとその末梢部分は無気肺となる。胸水、無気肺とも呼吸困難などを引き起こす可能性があり、無気肺は肺炎などを併発するため早期の治療が必要となる。従来の単純 X 線画像による診断では、隣接する胸水部と圧迫性無気肺領域の識別は非常に困難であった。本研究では、胸部の造影 CT 画像を用いて胸水領域と圧迫性無気肺領域の分離を行い、半自動処理にて個別に容積を計測する手法を提案する。定量化を行うことで病状の進行度や治療の経過を数値的に判断することが可能となる。肺空気層領域の抽出、肋骨情報からの肺輪郭検出、心臓領域の除去を行い無気肺領域と胸水領域のみを抽出し画像を精査して特定部位の体積を計測する。実患者のデータを用いて検証を行った結果、本手法での特定部位の定量測定が有効であることが示唆された。



図 1. 胸水領域

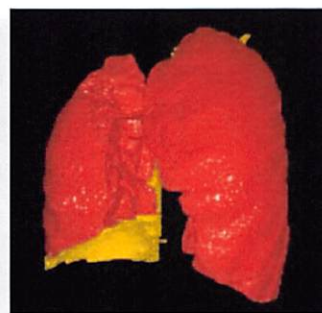


図 2. 胸水+空気層

（2）眼底画像における経時サブトラクション処理による網膜症の診断支援システムの開発^{[6]–[8]}

眼底画像を用いた診断は、糖尿病性網膜症などの眼疾患を早期に発見する手段として旧来から利用されている。しかし、所見の微妙な変化を客観的かつ正確に把握することや患者の視力との対応関係を正確に捉えることは難しい。そこで本研究では、眼底画像の経時的変化をサブトラクション処理を用いて、その違いを表現した差分画像と、経時的な変化の程度を定量的に算出した経時変化度の両者を提示し、医師の診断をサポートする手法を開発した。特に眼底撮影の場合は、額と顎を固定する為、同一撮影装置であれば複数の撮影画像間での幾何学的変化はほぼ線形変化に限定される。よって、高精度な画像位置合わせが容易にできる為、位置ずれアーチファクトの少ない差分画像が実現できる。本処理は任意の

なお、本研究を進める上で、市場サイドの声を反映するために、より一層、臨床サイド（医療機関）との連携を強めた。本学に加え、栃木県立がんセンター（黒木放射線科医）、国際医療福祉大学病院（縄野放射線科医）、（独）国立がん研究センター中央病院（永井臨床放射線技師）、高橋眼科クリニック（高橋眼科医）と共同研究および開発を進めた。

4. 研究の経過及び結果

本研究の特徴は、これまで乳がんを中心に15年間以上研究を進めて築いてきたCAD技術を、広く他部位や他モダリティに展開するとともに、臨床の現場と連携と図りながら実用化（役に立つシステムの開発）を目指していく点にある。研究課題（1）は栃木県立がんセンター、（独）国立がん研究センター中央病院および国際医療福祉大学病院、研究課題（2）は高橋眼科クリニックと連携を図り、臨床データの収集および臨床評価も進めてきた。そして、その研究成果はCARS2013で海外発表^{[1], [6]}するとともに、日本医用画像工学会(JAMIT)の論文誌にも掲載された^{[5], [8]}。現在、更なる高精度化を図っており、その研究成果を平成26年度中に海外を中心とする学会で発表する予定である（CARS2014およびJAMIT論文誌へ投稿中）。

（1）胸部CT画像を用いた胸水領域と圧迫性無気肺領域の分離計測^{[1]-[5]}

胸水貯留は、心不全、肝硬変、肺炎、癌など様々な原因により発生する。その増加した胸水や気胸などの胸腔内の占拠性病変が、気管支を圧迫するとその末梢部分は無気肺となる。胸水、無気肺とも呼吸困難などを引き起こす可能性があり、無気肺は肺炎などを併発するため早期の治療が必要となる。従来の単純X線画像による診断では、隣接する胸水部と圧迫性無気肺領域の識別は非常に困難であった。本研究では、胸部の造影CT画像を用いて胸水領域と圧迫性無気肺領域の分離を行い、半自動処理にて個別に容積を計測する手法を提案する。定量化を行うことで病状の進行度や治療の経過を数値的に判断することが可能となる。肺空気層領域の抽出、肋骨情報からの肺輪郭検出、心臓領域の除去を行い無気肺領域と胸水領域のみを抽出し画像を精査して特定部位の体積を計測する。実患者のデータを用いて検証を行った結果、本手法での特定部位の定量測定が有効であることが示唆された。

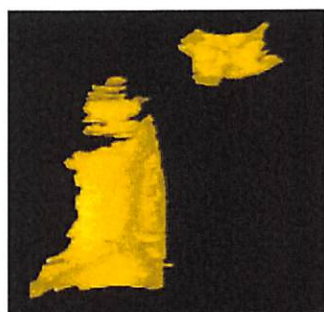


図1. 胸水領域



図2. 胸水+空気層

（2）眼底画像における経時サブトラクション処理による網膜症の診断支援システムの開発^{[6]-[8]}

眼底画像を用いた診断は、糖尿病性網膜症などの眼疾患を早期に発見する手段として旧来から利用されている。しかし、所見の微妙な変化を客観的かつ正確に把握することや患者の視力との対応関係を正確に捉えることは難しい。そこで本研究では、眼底画像の経時的変化をサブトラクション処理を用いて、その違いを表現した差分画像と、経時的な変化の程度を定量的に算出した経時変化度の両者を提示し、医師の診断をサポートする手法を開発した。特に眼底撮影の場合は、額と顎を固定する為、同一撮影装置であれば複数の撮影画像間での幾何学的変化はほぼ線形変化に限定される。よって、高精度な画像位置合わせが容易にできる為、位置ずれアーチファクトの少ない差分画像が実現できる。本処理は任意の

2 画像の差分画像と経時変化度を算出することが可能であるが、今回は初診時画像を基準として、1 症例 (12 枚の時系列の画像群) に適用した。その結果、それぞれの差分画像は各病変も強調されて表現されていることが確認できたとともに、経時変化度は各時点での患者の視力と高い相関を持つ (相関係数 0.912) との結果を得たが、今後この結論を一般化するために症例数を増やして本手法の有効性を検証する必要がある。



図 3. 初診時眼底画像



図 4. 経時変化画像

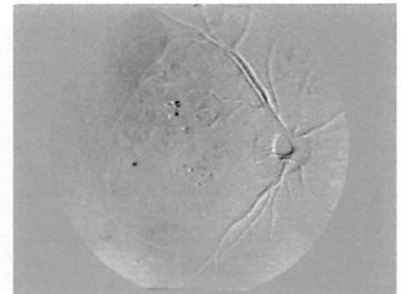


図 5. 差分画像

5. 今後の計画

今年度の研究成果で得た CAD 技術を応用して、来年度はより実用的なシステムまで開発を進め、臨床の現場で評価をいただけるまでレベルを向上させる。本研究の特長は、診断の支援となる付加情報も示すことで医師の診断性能の向上に役立てることである。また、研究課題 (3)、(4) にいても研究を進めていく。

6. 研究成果の発表

- [1] Measuring pleural fluid volume from CT image, Computer Assisted Radiology and Surgery 27rd International Congress and Exhibition, CARS2013, pp.S320-S321, 2013 June, Heidelberg, K. Abe, H. Takeo, Y. Dounomae, Y. Kuroki, Y. Nagai
- [2] 胸部 CT 画像を用いた胸水領域と圧迫性無気肺領域の分離計測, 第 32 回日本医用画像工学会大会 (JAMIT2013), OP3-2, Aug. 2013, 安倍和弥, 武尾英哉, 堂之前義文, 黒木嘉典, 永井優一
- [3] 胸部 CT 画像を用いた胸水領域と圧迫性無気肺領域の分離計測, 厚生労働省平成 25 年度第 1 回黒木小班会議, (独)国立がん研究センター中央病院, 2013 年 8 月 30 日, 安倍和弥, 武尾英哉
- [4] 胸部 CT 画像を用いた胸水・無気肺領域の分離計測の高度化, 厚生労働省平成 25 年度第 2 回黒木小班会議, (独)国立がん研究センター中央病院, 2014 年 1 月 24 日, 安倍和弥, 武尾英哉
- [5] 胸部 CT 画像を用いた胸水領域と圧迫性無気肺領域の分離計測, Medical Imaging Technology, Vol. 32, No. 1, pp. 32-39, 2014, 安倍和弥, 堂之前義文, 武尾英哉, 黒木嘉典, 永井優一
- [6] Development of an assisted diagnostic system for retinopathy that applies temporal subtraction to funduscopy images, Computer Assisted Radiology and Surgery 27rd International Congress and Exhibition, CARS2013, pp.S333-S334, 2013 June, Heidelberg, Y.Ban, Y.Dounomae, K. Abe, H. Takeo, Y. Takahashi, Y. Nagaii
- [7] 眼底画像における経時サブトラクション処理による網膜症の診断支援システムの開発, 第 32 回日本医用画像工学会大会 (JAMIT2013), OP3-1, Aug. 2013, 伴 幸巧, 安倍和弥, 武尾英哉, 堂之前義文, 高橋嘉晴, 永井優一
- [8] 眼底画像における経時サブトラクション処理による網膜症の診断支援システムの開発, Medical Imaging Technology, Vol. 31, No. 4, pp. 225-230, 2013, 伴 幸巧, 安倍和弥, 堂之前義文, 武尾英哉, 高橋嘉晴, 永井優一

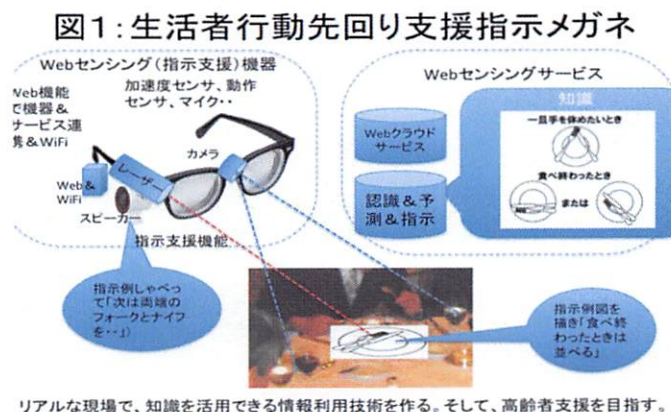
「次世代センシングデバイスおよび応用システムの研究開発」

—Web とセンシング融合による生活支援技術の研究—

研究者名： ホームエレクトロニクス開発学科 一色 正男

1. 研究成果の要約

Web センシング機器検討から開始して、システム検討をしたい。検討具体事例としては、「生活者行動先回り支援指示メガネ」図1を最終目標に検討していく。これは、高齢者生活支援のホーム IT であり、最新 Web と Web サービスの連携技術で実現させることを研究する。



「高次な Web ネットワーク生活環境時代」において、想定されるサービスを先取り研究することで、将来の課題解決に供すべき新技術を検討し提供する。本研究では、皆が検討すべきということを発信することと、実際のサービス可能性を具体的に検討してやることを目指す。また、同時に想定される高齢化社会と高齢者住宅をも想定した場合、「Web とセンシング融合によるより豊かな生活」を提供できる生活支援技術の研究をすることは大いに期待され価値があるものである。(web ビジネス状況図の図2省略)三年計画の中間年であり、計画中の[2]Web センシングサービスを中心に基本構造を検討し、試作設計を開始した。具体的には、下記の三つの成果を得た。

成果1:[2](5)試作による個別機器機能検証の実施 <ブラインド、照明など家電機器での実装検討>

成果2:[1](3)支援指示機能の選定と試作の実施 <ふわふわりモコンでの実装検討>

成果3:[2](4) Web センシングサービスの基本連携設計の実施。<HEMS 連携、基礎検討

2. 研究経過および結果

ホーム IT システムは、省エネ推進の一手段として、特に、スマートハウス標準化検討会(経済産業省主催)の HEMS タスクフォース座長などで、HEMS 関係企業と論議しているが、HEMS システムとして最近注目されだした。これは一部機能であり、ネットワーク化された機器が提供できる機能はもっと多くあり、生活者にとって重要な生活支援機能が注目されだすと想像される。本研究では、特にこの機器がネットワークされ

た将来生活シーンに着目し、より高度なサービスが提供する機能や価値を先取りし、生活環境の高度化構造とそのサービスを研究する。

その中で、生活者の高齢化が重要な要素と考えている。ますます60歳以上の人口が増える日本だからこそ、高齢者に価値を提供できるネットワーク生活環境利用技術の構築を目指すのである。高齢者になると、5感覚が衰える。これらの支援を最終目的としウェアラブル生活支援技術を考える。図3へweb連携のサービス構成を示す。

今回の研究では大きく2つの構成について、5つの技術領域を考える。

[1]Web センシング (支援指示) 機器

(1) 機器の Web 化対応技術の研究
(HTML5, Web Intents, Web Socket, Web Memory etc)

(2) センシング機器の Web 化の研究
(HEMS 連携, ECHONET, DLNA, HTML5)

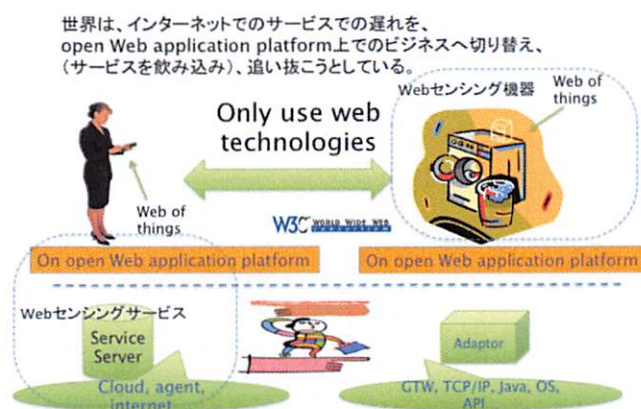
(3) Web および機器での支援指示機能の研究
(網膜ディスプレイ、直観的表示、機能アシスト etc)

[2]Web センシングサービス

(4) Web 上でのサービス構築技術の研究 (HEMS 連携, クラウド連携, MMI 構造)

(5) サービスの構造と内容研究 (勉強支援、高齢者支援、スマート家電、介護ロボット、見守り etc)

図3: 全てのサービスはWeb Application Platform上へ



<本年度の結果>

上記のうち、[2]を中心に25年度は基本構造を検討し、試作設計を開始し機能確認を実施する。本年度は、図3の中で、右側 Web センシング機器部分に相当する。図ではCE機器を代表例として示しているが、試作したブラインド、照明もその一部であり先行検討をした。携帯電話のセンサーを利用することで、全体として Web センシングサービスの検討となった。これらのアプローチが、新生活支援の可能性を示すことを試作にて示した。

成果1 : 2試作による個別機器機能検証の実施 <ブラインド、照明など家電機器での実装検討>

特に、勉強支援想定した、机上の照度センサー値を参照し目標照度へ向け ECHONET Lite 対応させたブラインドを試作し、制御機能検証を実施した。また、風速計のセンサー値を可視化することでセンサー値を直感的に理解できる環境の実装を実施した。関係

成果 2 : [1](3)支援指示機能の選定と試作の実施 <ふわふわりモコンでの実装検討>

iPad や andrid 端末を対象に、ブラウザベースのふわふわりモコンを実装し、支援指示機能を試作し、ユーザ評価試験を実施した。 関係論文等[5,7,12,15]

成果 3 : [2] (4)Web センシングサービスの基本連携設計の実施。<HEMS 連携、基礎検討

構成として、図 4 の仕組みへまとめた。また、HEMS 連携について、ECHONET Lite 対応化の推進と機器対応の促進について、支援研究を進めた。 関係論文等 [1,2,3,4,6,13,14,16,17,18,19]

3. 平成 26 年度の計画

26 年度は、サービスシステム全体での確認による、上記新サービスの可能性を示す。図 4 へ全体構造を示す。特に、最終年度では、Web センシング機器と Web センシングサービスの統合連携を目指す。

[2]Web センシングサービス

(4) Web 上でのサービス構築技術の研究 (HEMS 連携,クラウド連携、MMI 構造)

(5) サービスの構造と内容研究 (高齢者支援、スマート家電、介護ロボット、見守り etc)

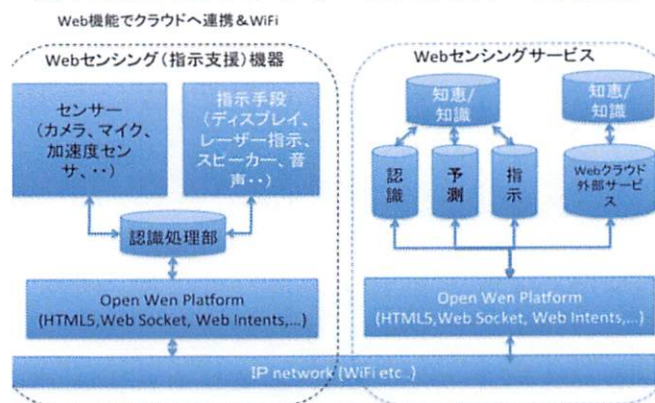
目標 1 : Web センシング機器からの情報をベースに、Web サービスとしての設計。実装し連携を目指す。

目標 2 : 本構造の拡張可能性検討と調査の実施。

特に、目標 1 では、Web サービス基盤の検討に基づき、Web サービス構造を検討する。図 4 で示すように、連携基盤は、Web Platform を活用することで、アプリケーション側で連携可能になるという特性を最大限生かす。(少なくとも、10 年後の未来生活を想定するならば、実用可能性の高い仮定を考える)。W3C (www.w3.org) を調査し、最新 Web の内容を反映させながら検討していく。3 年間で変化することも考えられるので、自由度を高く検討していくことも研究の価値である。実際、WebIntent は進まず、WebSocket ベースの手法が注目された。

図 4 では、簡単に構造としては、左側センシング機器から Web を通して、右側サービ

図4:Webセンシングサービスシステムの構造



スへ連携するように構造を示した。物理的場所については特定していない。Web はネットワーク上で連携しているため、物理的位置に依存しないので、機器連携先（本質的には Web 構造上等価であれば機器内部での良い）（クラウド上の）サービス（サーバ）にサービスを構築して認識、予測、指示を判断して返すものとした。研究では、この点の具体的構造を研究し、実装トライを行い、可能性について知見を得たい。

論文・国際会議発表

【学会誌印刷発表論文】

- 1, 杉村 博, 関家 一雄, 渡部 智樹, 一色 正男 ; 「Web サービスによる HEMS 機器相互接続テスト環境の開発」、電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌), Vol. 133, No.4, p.818-819 (2013). (2014.4.1)、 [R1]
2. 一色正男、笹川雄司「スマートハウスをオープンプラットフォームホームビジネスへ」、OHM,p.6-7,10月(2013)、
3. 一色正男、笹川雄司「スマートハウスの心臓部『ECHONETLite』その最新動向と国際展開に向けたポイント」、ENECO,p22-25,11月(2013)、
- 4, 一色正男「スマートハウスの最新動向・「ECHONET Lite」が築く未来」、ベース設計資料,No.159、p46-49,11月(2013)、

【査読付き国際学会発表論文】

- 5, Hiroshi Sugimura, Masao Issiki, Takeaki Mori and Kazunori Matsumoto ;
"Building Open Hems-Lifelog Over Social Networking Service with Sensor Data", 7th IADIS International Conference on Information Systems 2014 (IS2014). pp.378-380, Madrid, Spain, Feb (2014),
- 6, Hirotaka Nakajima, Masao Isshiki, Yoshiyasu Takefuji ; "WebSocket Proxy system for mobile devices", IEEE GCCE 2nd, October (2013).
- 7, Tomoki Watanabe, Rika Mochizuki, Toru Kobayashi, and Masao Isshiki, "HACCS : Home Appliance Control Concierge System", IEEE COMPSAC 2013, September (2013).

【学会等口頭発表論文】（一色講演関係は含まず）

- 8, 岡本健司, 横山裕平, 吳天, 三浦翔, 杉村 博, 一色正男「ECHONET Lite による電動ブラインドの研究 1（サービスプラットフォーム開発）」、照明学会 第 28 回光源物性とその応用研究会、3 月(2014).
- 9, 吳天, 篠崎元希, 樋口怜央, 横山裕平, 岡本健司, 一色正男, 三栖貴行「ECHONET Lite による電動ブラインドの研究 2（照度実験）」、照明学会 第 28 回光源物性とその応用研究会、3 月(2014).
- 10, 福代健太, 米田勇介, 一色正男, 三栖貴行「LED 光点と Kinect による風速可視化技術

の研究」、機械学会東海支部第 63 期講演論文集、229、3 月(2014)。

11, 岡本健司, 横山悠平, 三浦翔, 関家一雄, 呉天, 中島義人, 杉村博, 三栖貴行, 一色正男「ECHONET Lite サービスプラットフォームの提案と実現」、情報処理学会第 76 全国大会論文集、4x-8、pp3:407-408、3 月(2014)。

12, 阿部聡明, 池田雅人, 渡部智樹, 杉村博, 一色正男「家電の状態に応じたユーザーへの通知システム」情報処理学会第 76 全国大会論文集、5Y-1、pp3:513-514、3 月(2014)。

13, Masao Isshiki, Kazuo Sekiya and Hiroshi Sugimura: Smart-Home Business Will Be Grown by HEMS Certification Support Center of KAIT, Proceedings of KAIT International Symposium 2013, p.25, 厚木市, 神奈川県 (2013.8.27-29)

14, 植田 智明, 杉村 博, 松本 一教, 一色 正男: センサデータからの人間の行動推定, 第 27 回人工知能学会全国大会, 1C5-6, pp.1-4, 2013. (6.4) 富山市, 富山. (06 月 04 日(Tue) 18:40-20:40 C 会場(-国際会議場 202 号室)

15, 渡部智樹, 望月理香, 杉村博, 小林透, 一色正男; ”視聴映像の時間長を考慮した家電制御システム”, 情報処理学会 CDS 研究発表会, 2013/5. 【5/23 研究会発表】

【新聞記事】

16, 日刊工業新聞, 2013 年 10 月 1 日(火), 「スマートハウスにおける神奈川工科大学 HEMS 認証支援センターの取り組み」

17, 読売新聞, 2014 年 1 月 26 日(日), 「次世代のセキュリティを考える～スマートハウス時代の安心・安全」

18, 日本経済新聞, 2014 年 1 月 28 日(火), 「エネルギーの見える化で加速するスマートシティ」

「次世代センシングデバイスおよび応用システムの研究開発」

触媒金属/SiC ショットキーバリア接合ダイオードガスセンサの開発

研究者名： 電気電子情報工学科 工藤 嗣友

1. 研究成果の要約

近年、工場、車などから排出される C_xO_y 、 NO_x 、悪臭等のガス規制が高まる中、高度な半導体センサの開発が要求されている。中でも、高温環境において複数のガス検知、安定動作の信頼性のある半導体を使用する必要がある。そこで本研究では、上記要求を満たすために Si よりも物性値に優れ高温動作可能な材料である SiC に注目し、構造、プロセスともに容易なショットキーダイオード構造を採用したマルチ検知形構造の半導体ガスセンサの開発を目的としている。本構造は、ショットキーバリアダイオードのアノード側に複数の触媒金属を形成したマルチ構造となっており、ガス雰囲気中における電気的特性の違いにより混合ガスの種別の検知に大いに期待が持てる。これまで、簡易的なショットキーバリアダイオードのプロセスを行ってきたが、大きな問題点が生じた。

(1) 金属/4H-SiC の接合部の不安定化

- ・ 金属電極の剥離により安定的な電気的特性が得られない問題

熱処理温度、時間に問題が考えられる。

(2) 酸化膜形成の不安定化 (図 1、図 2 エリプソメータの測定より)

条件：電気炉温度 1100°C

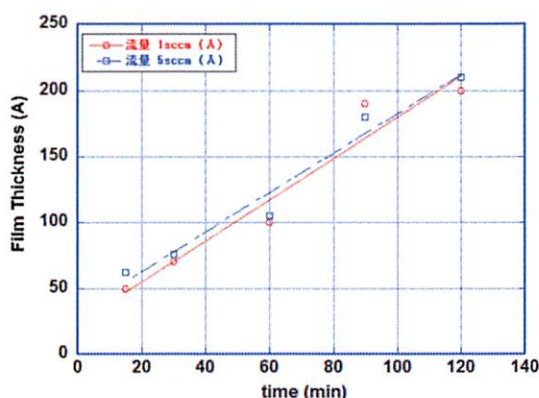


図 1 Dry 酸化膜厚

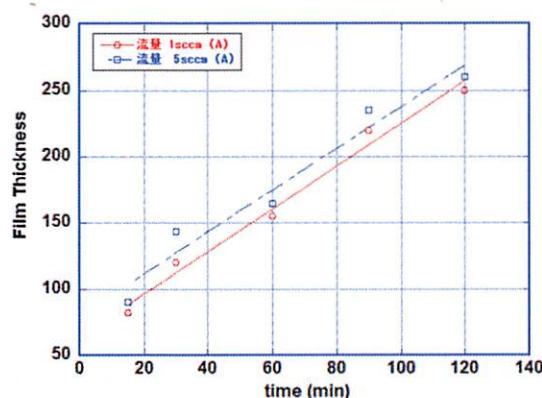


図 2 Wet 酸化膜厚

2. 研究経過および結果

本年度は、上記の 2 つの問題点の改善に向けて、初めに電気的特性を得ることを優先的に行った。

(1) 図 3 の簡易的なショットキーバリアダイオードの構造より、プロセスは基板 RCA 洗浄、HF 洗浄、シリサイド化の形成がかつ触媒金属として機能可能な Ni 金属を用いて

蒸着法により電極形成で完成となる。プロセス終了後、Ni 電極と半導体との界面安定化させるために熱処理をおこなった。ただし、次のプロセスの変更を行った。

変更点：熱処理温度 400℃から 550℃、熱処理時間 20 分から 40 分とし、熱処理中は N₂ 雰囲気中で行った。

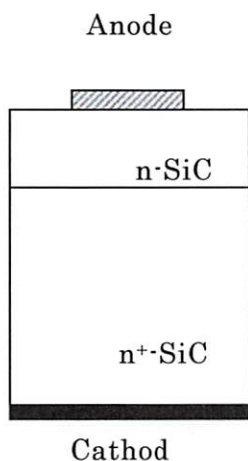


図 3 断面図

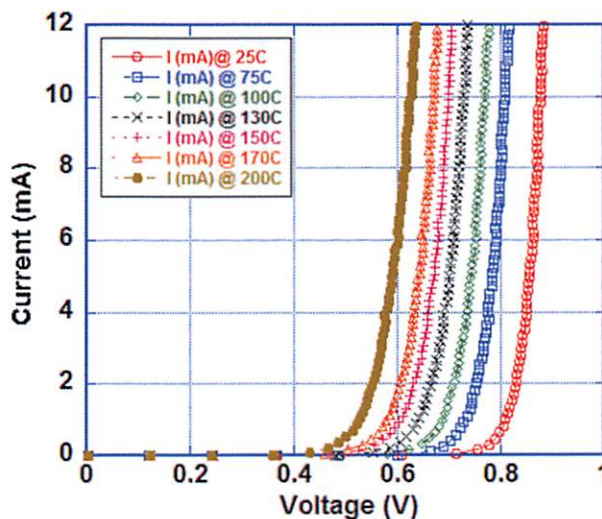


図 4 温度依存性による順方向特性

図 4 は、Ni/4H-SiC ショットキーバリアダイオードの温度依存性による順方向特生を示す。測定器の関係で 12(mA) までの電流しか流せないが、温度による順方向特生が得られることができた。逆方向特性に関しては、-12(V)における電流値を測定したところ温度依存性による大きなリーク電流が見られなかった。

(2) 酸化膜形成用電気炉の改良

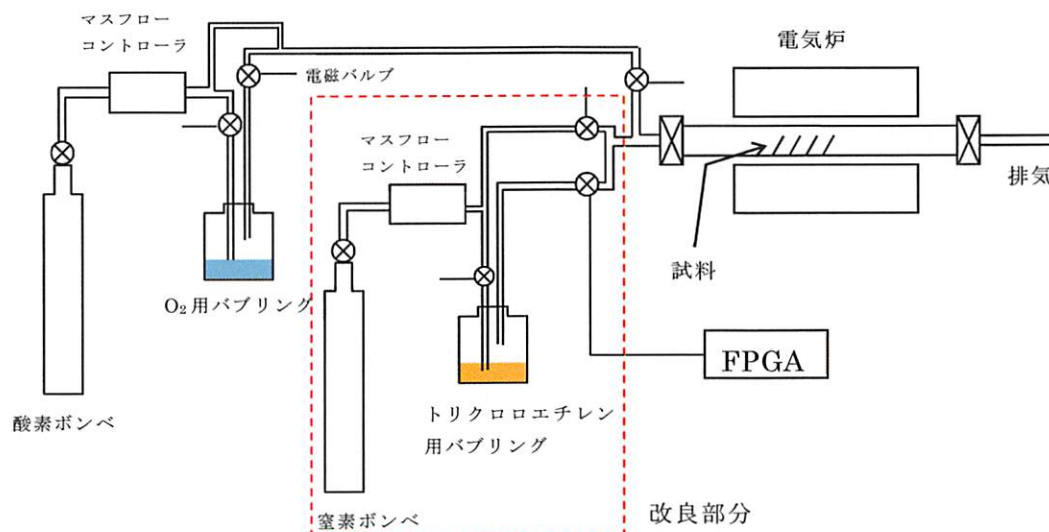


図 5 改良した酸化膜堆積用電気炉

半導体試作の初期プロセスにおいて、膜厚の厚いフィールド酸化膜の形成が非常に重要である。これは、デバイスの汚染防止や活性化領域以外のリーク電流防止に必要な酸化膜である。SiC 基板上に SiO₂ 膜を形成は、Si と比べて堆積レイトが遅く、かつ酸化中に炭素が表面に出てきて界面を荒くする原因にもなる。また、表面の汚染も良質な酸化膜形成の妨げとなり、昨年度製作した電気炉では解決できなかった。そこで、本年度は、O₂ 導入前に、N₂ パージを導入しなおかつ、デバイス表面のナトリウム汚染防止に有効な手段としてトリクロロエチレンに N₂ バブリングさせて電気炉に送る方法を採用した。さらに、図 6 に示すガスの導入タイミングチャートの改善を行いながら成膜したところ安定した膜厚が得られるようになった。図 7、図 8 は、電気炉の改良後の酸化膜形成実験を示す。Dry, Wet とともに安定した堆積レイトが得られることが出来た。

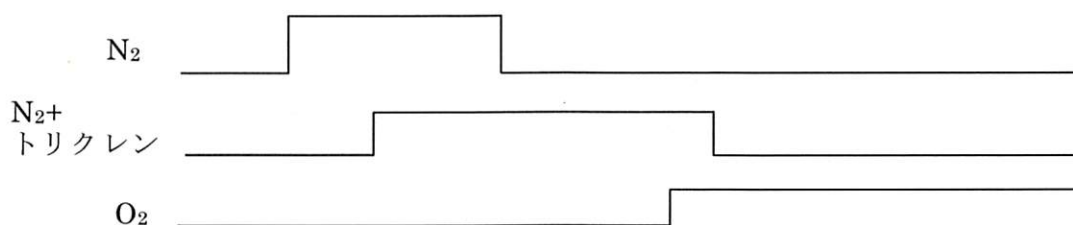


図 6 ガスのタイミングチャート

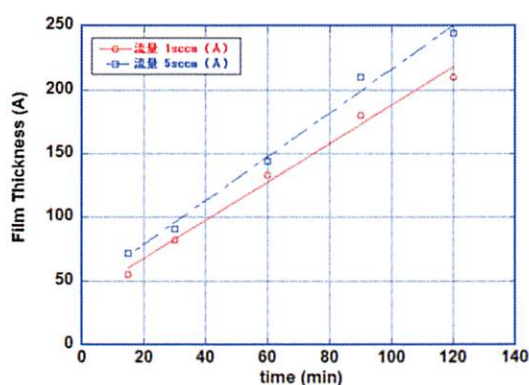


図 7 Dry 酸化膜厚

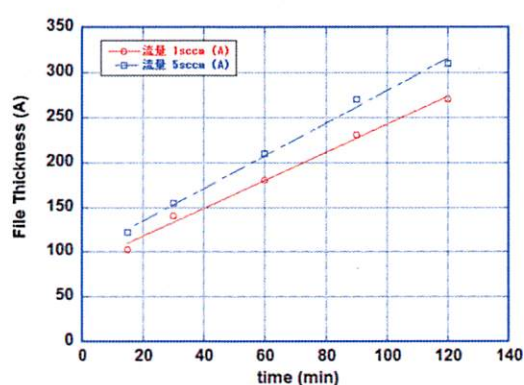


図 8 Wet 酸化膜厚

3. 平成 26 年度の計画

本年度は、特性改善に向けて 4H-SiC 構造の検討を行い、ガスセンサ構造に有効である。しかし、SiC を用いたプロセス技術にはまだ解決する部分があるため、以下の項目を今後の計画を進める予定である。

(1) 酸化膜質の電氣的評価と XPS による組成分析評価

昨年度、XPS による組成分析評価の予定だったが装置故障のため評価が出来なかったので、今年度中には分析評価を行いたいと思う。

(2) 3次元構造によるデバイスシミュレーションの動作解析

今年度は2次元でのシミュレーションで動作を検討した。今後としては3次元シミュレータを導入し奥行き構造を含む動作検証を行い、更なる高性能な構造を検討する。

(3) SiCプロセスの検討

プロトタイプ構造としてプレーナ型ショットキーバリアダイオードのプロセスを検討する。従来のSiプロセスの流用も可能であるが炭素が含まれるため炭素汚染を防ぐ対応を含むプロセス検討が必要である。異種金属触媒体電極を形成させるためのプロセスの検討も行う。また、熱処理によって金属とSiC基板の界面に形成されるシリサイドに関するプロセス検討も行う。

(4) マスクパターン設計

ショットキーバリアダイオードの試作にあたり、デバイスパターン、TEGパターン設計を行う。

論文・国際会議発表

SiCおよび関連ワイドギャップ半導体研究会にて発表予定している。