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8巻

2015

The Memoirs

of

Research Institute of Advanced Sensing System,
Kanagawa Institute of Technology
(1030 Shimoogino, Atugi-shi, Kanagawa, Japan)
Vol.8(2015)

目 次

	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		
	応用バイオか学科 菊地 幹夫 ・・・・・	6	j
	(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 ・・・・	1	2
	(4)アロステリック酵素を用いたエフェクターのフローインジェクション計測		
	応用化学科 佐藤 生男 ・・・・	1	6
	(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		
	―プトレッシンオキシダーゼとヒスタミンオキシダーゼのアミノ酸置換による		
	酵素化学的特性の改変―		
	応用バイオ科学科 山村 晃 ・・・・	2	1
	(6) 食嗜好制御を目的とした食品フレーバー成分のメタボローム技術に基づく食品		
	品質評価法の開発と応用		
	栄養生命科学科 飯島 陽子 ・・・	2	6
2.	第2研究室「高機能センシングデバイスの研究開発」		
	(1)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 ・・・・	3	2
	(2)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 ・・・・	3	5
	(3) 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電気的検討と		
	低損失デバイスの構造提案		
	雷気電子情報工学科 工藤 嗣友 ・・・・	3	9

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:水晶振動子(QCM)センサを用いたセンシングシステムにおいて、QCMセンサに目的物質に対して選択性を持たせることは、分離カラムなどが不要となり短時間に分析が可能となる。

本法のセンシング法を疎水性物質である女性ホルモン 17β -エストラジオール $(\beta$ -E2)を対象に分析手法を検討した。このホルモン物質は一般河川水域や公共水域に存在し、オスのメス化などを引き起こすことが報告されている物質である。そこで、この内分泌攪乱物質について多検体試料迅速に測定できるQCMセンシング法の開発を行った。

(2) 研究期間内 (平成26年度) に明らかにする事項:これまで実施してきた β -E2を鋳型分子とするナイロン6薄膜をデュアル型QCMにコーティングしたセンサーについて、 β -E2濃度と周波数応答の関係の再現性を調査し、会わせて、 β -E2、エストロン、エストリオール、プロゲステロン等との選択性について、再調査し、応用分析への具現化を行う。また、水溶性物質への試みとして、カテキンについて基礎分析を検討し、実用性の検討を加えた。

2. 研究の必要性及び従来の研究

(1)検出部としての鋳型分子薄膜被覆QCMセンサの有用性

通常、QCMセンサを用いた流れ分析においては、QCMの金電極表面に抗原抗体反応に基づく抗体分子を被覆し、流れ系に注入された抗原分子が抗体に取り込まれることで、QCMの周波数減少が生じ、その減少量より、吸着した抗原分子の量が推定できる。高選択性である反面、抗体被覆QCMの製造ロット間によって応答能が異なること、連続した分析を行うにはQCMを新規に取り替えるか、もしくは、別の抗体分子を注入し、抗原をQCMより引き抜くことなどが必要となり、同一のQCMセンサによる多検体迅速分析は難しいこととなる。

それに対して、本法で提案するセンシングは、QCM表面の化学処理(鋳型薄膜の被覆)によって、センサのコストを下げるだけで無く、同一センサによる連続分析が可能となり、利便性は格段に向上する。

(2)ヒトの性ホルモン物質 β-E2の計測法の必要性

ヒトの性ホルモン物質 β -E2は高エストロゲン活性を持ち、下水処理を経由して河川に放出されるが、ヒトより代謝された β -E2複合体は活性汚泥中で微生物分解を受け、その一部が再び β -E2となり、水域に流入していることが報告されている。そのため、魚類などの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事実がある。環境省 (SPEED98、ExTEND2005、ExTEND 2010) においても、それらの物質のモニタリングの必要性を警告しいている。

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、QCMセンサ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穴プレートセルに被覆できるなど、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となる。今回は、報告の後半に応用的展開として、食品分析として近年そのヒトへの効果が注目されているカテキンの分析法の試みについて報告する。

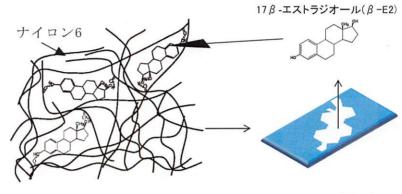
4. 研究の経過及び結果

今年度は、次の流れの計画に基づいて研究を進めた。

(1)E2鋳型薄膜の作製法

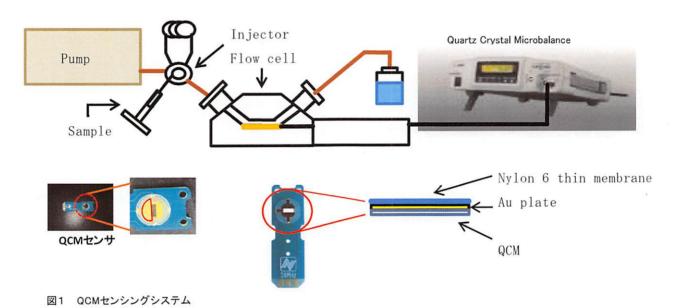
17β-E2を鋳型分子として、ホスト分子をナイロン6とした鋳型薄膜の形成の概念を右に示した。

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CONH 基と β -E2のOH基と水素結合を形成させる。これをQCMの金電極面に被覆した。



QCMセンサ表面

日本電波工業製デュアル式30MHz ATカットをQCMとして用いた。QCMセンサをフローセルに設置し、その後、MeOH水溶液を3mL/hでシリンジポンプで送液した。QCMの周波数減少量より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を示す。



(2) 鋳型分子

本実験で用いた鋳型分子を右に示した。

β-E2の分子構造の相違は、水酸基-OH基2個持ち、立体的な構造の差は他の性ホルモン分子(エストロン、エストリオール)と比べて非常に小さい。強いエストロゲン活性を示し、下水処理水にはこれらの一部が含まれ、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。

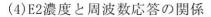
17 β -エストラジオール(β -E2)

鋳型薄膜QCMの調製は、ギ酸30m1にナイロン60.05g、 β -E2 0.00423g を溶解し、その $1\mu1$ 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、2ppm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 について示したものである。

QCMの2チャンネル(2ch)は、金電極表面に 何も被覆しない場合で、低濃度のため、ノ イズは見られるが大きな周波数の増減は見 られない。一方、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あり、 β-E2の吸着とともに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 ていることがわかる。移動相のMeOHの濃度 上げることで、β-E2の脱離速度が高めるこ とが可能である。



β-E2の応答する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。

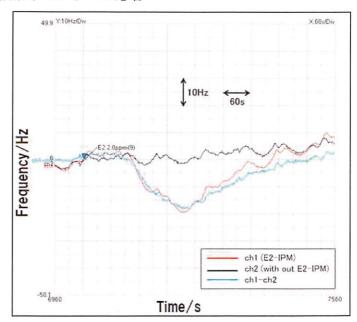


図2 2ppm β-E2の周波数応答

β-E2濃度と周波数減少量

E2 濃度/ ppm	Run1	Run2	Run3	Run4
2.0	17.0 Hz	17.0 Hz	20.0 Hz	18.0 Hz
2.5	23.0 Hz	24.0 Hz	24.0 Hz	23.0 Hz
4.0	32.0 Hz	31.0 Hz	32.0 Hz	32.0 Hz
5.0	41.0 Hz	42.0 Hz	40.0 Hz	42.0 Hz

2~5ppmのβ-E2を同条件で測定を行った。移動相組成は、5vo1% MeOHで、なお注入する試料も移 動相と同様なMeOH濃度とした。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(表1)。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。

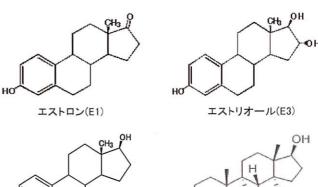
(5) ゲスト分子の応答能の比較

ゲスト分子として、エストロン(E1)、β-E2、エストリオール(E3)、17α-エストラジオ $-\nu(\alpha-E2)$ 、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、β-E2とE3は-OH基の置換数が異なり、またE1と は-0H基数と=0との差で分子構造に差ない。

さらに、 α -E2は β -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。

QCMセンサによる応答の差を表2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、β-E2分子の周波数減少量は



テストステロン

17α-エストラジオール(α-E2)

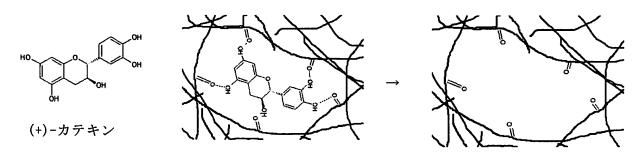
表2 ゲスト分子の応答能

	Run1		Run3	Run4
E2	31.0 Hz	33.0 Hz	34.0 Hz	30.0 Hz
E1	16.0 Hz	18.0 Hz	16.0 Hz	18.0 Hz
E3	20.2 Hz	20.0 Hz	19.0 Hz	18.0 Hz
α-Ε2	20.0 Hz	21.0 Hz	21.0 Hz	20.0 Hz
EE2	46.0 Hz	47.0 Hz	48.0 Hz	47.0 Hz
テストステロン	16.0 Hz	18.0 Hz	15.0 Hz	15.0 Hz

平均32.0Hz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 β -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。

(6)食品分析を目指した(+)-カテキン鋳型薄膜QCMセンサの試作

QCMセンサの金電極面に(+)-カテキンを高選択的に認識する分子鋳型薄膜を被覆したQCMセンサを作製した。このセンサを検出部として流れ分析システムに組み込み、(+)-カテキンの吸着に基づくQCMの周波数減少を測定して濃度を測定する試みを行った。ナイロン6薄膜の作成法は前述と同様である。



(+)-カテキン分子鋳型ナイロン6薄膜の作製とQCMの応答

(+)-カテキン分子鋳型ナイロン薄膜QCMセンサの作製法は次の通りである。

ギ酸30mLにナイロン6を0.05g、(+)-カテキン0.0035gを混合して溶解する。この溶液0.6μ1(金電極面積8.75 mm²)をシリンジを用いてQCMセンサの金電極面に滴下して塗布する。ナイロン6と(+)-カテキンの混合割合は自由に変えることができ、中でも上記の条件がより適切であった。塗布後、静置して乾燥することで(+)-カテキンを含むナイロン6薄膜が金電極面上に形成される。QCMセンサはATカットの市販のものをそのまま使えるが、デュアルタイプQCMセンサでは1チャンネル側に被覆する。QCMセンサの周波数はいずれのものも使用できる。中でもより周波数の高い30MHzのQCMセンサを用いることで分析種を高感度に検出ができる。

作製したQCMセンサをフローセルに装着し、移動相溶液には、10%メタノール水溶液を流速3 m1/hで 通液する。ナイロン6薄膜中の(+)-カテキンが脱着され、(+)-カテキンの分子形状の空隙を持ったナイロン6薄膜が得られる。その後、分析試料溶液200 μ 1を注入し、周波数の減少量(Hz)を測定する。あら

かじめ作成した検量線(分析物質の濃度または 量と周波数の減少量との関係を示したもの)を 用いて、分析種の濃度または量を算出する。検 出される周波数応答挙動は、QCM上の鋳型サイトに分析種が吸着するとともに周波数が低下 し、その後、移動相中に存在するメタノール より鋳型サイト中の分析種は脱離し、周波数 応答は初期状態に復帰する。多検体の場合は、 連続して同様な分析操作を行うことで測定で きる。QCMセンサは同一のものを装着したまま 繰り返し使うことができる。

図3は、(+)-カテキン15 mg/Lについて分析した際の結果である。(+)-カテキンの応答を調べたところ、(+)-カテキンに対して濃度に応じた

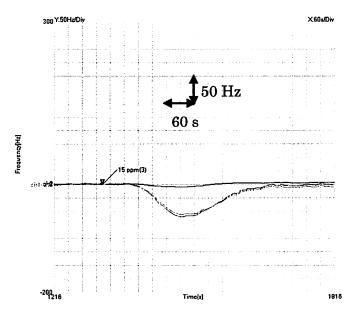


図3 15ppm (+)-カテキンの周波数応答

周波数減少が生じ、水溶性の高い物質にもセンサ材料として利用できることが明らかとなった。 現在、ナイロン6鋳型薄膜の製法とQCMセンサへの応用的展開を請求項の範囲とする特許申請を行う 予定である。

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、疎水性物質であるエストロゲン物質の計測法に利用できることがわかった。さらに今年度の新たな試みとして、水溶性物質の(+)-カテキンに対して検出できることがわかった。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センサ部のディスポーザブル型チップの製作
- (2) 多検体試料の連続及び迅速分析
- (3)食品の計測技術((+)-カテキン)の確立

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、評価された経緯がある。

- 4) は次年度特許申請の予定である。
- 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)「内分泌撹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)
- 4) 特許申請の予定:「分子形状の鋳型を持つ薄膜被覆水晶振動子センサによる分析技術」(2015)

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(群馬県)の渓流の水質調査から、一部の渓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いだし、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駒ヶ岳千畳敷カール(長野県)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。これら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。これらの渓流水の生 物試験結果と合わせると、これらの地点のいくつかでは水質の酸性化に伴い、生物相にすでに変 化がでている可能性が強いことを見いだした。

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渓流などが酸性化し、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のあ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。立山や白馬の積雪の調査では、山岳地の積雪にも酸性物質が含まれており、特に立山ではpHの平均値は5.0であるが、4.5程度まで下がる場合も度々あることが報告されている。乗鞍岳りの湖沼群の水質は、pHが5~6であり、イオン成分濃度やアルカリ度が極めて低いため酸性雨に対する感受性が極めて高いことがわかっている。pHの低下の原因としては鉱山、火山、腐植質の影響ではなく、酸性雨による可能性が最も高い。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²⁾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渓流などで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数年計画で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、酸性雨による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渓流で、水質の酸性化の現状と進行状況を明らかにする。
- ②谷川岳の渓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谷川岳での調査から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 生物影響が顕在化してからでは手遅れである。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顕在化する前の予兆として、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)の山地渓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渓流水があること、一部の渓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檜曽川(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は複数の調査地点を設けた。

(1) 水質調査

今年の調査でも、ほとんど同じpHの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、一ノ倉沢では電気伝導率 (EC) とアルカリ度が低く、pHが5付近のことがあり、酸性化している(表1)。

(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の渓流水では、例年と同様にオオミジンコに遊泳阻害・致死が見られた。したがって酸に感受性の高い水生生物種には、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、生物多様性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いだし、それは水質、特にpHと関係がある可能性を見いだした。今年の調査でも同様な特徴があることを確認した。

- 1) ケイ藻類の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、マチガ沢では非常に少なく、東黒沢では非常に多く、湯檜曽川では中位であった。季節による細胞数の変化は、本年度は顕著ではなかった。見いだされたケイ藻をpHに対する性質で分類すると、幽ノ沢では好酸性種の割合が多く、これはこの沢の水質が調査地点の中で最も酸性であることと一致した。
- 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、また東黒沢と湯檜曽川では非常に多く、マチガ沢の2地点ではその中間である。幽ノ沢と一ノ倉沢では、①酸に弱い水生昆虫として知られているカゲロウ目の個体数が少ない。②日本の酸性河川ではカワゲラ目、トビケラ目等が優占種であるが、特に酸性河川の優占種であるオナシカワゲラ、ハラジロオナシカワゲラ、ユビオナシカワゲラが多かった。これに対して、マチガ沢や東黒沢ではカゲロウ目が多くみられ、特にヒラタカゲロウやコカゲロウなどの酸に対して感受性が高い水生昆虫の個体数が多くなった。このように明らかに水生昆虫の種類が変化しており、これはpHの違いを反映していた。

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,8月と9月に調査をした。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ECは酸性雨による渓流水の酸性化が起きやすい先行指標になった。水質の酸性化が日本の複数の山岳地帯で起きている可能性があると菊地は昨年度報告したが、乗鞍岳の湖沼群の水質調査の報告¹⁾と、浅見ら³⁾が2014,2015年に学会で高山の湖沼ではpHとECが低い値を示すことを発表した内容は、菊地の推察を裏付けた。

(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、渓流水によってはオオミジンコに遊泳阻害・致死が見られ、これらの渓流の水質が有害である可能性がわかった。

(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り、少なくともケイ藻では地点間のpHの違いを反映していた。

- 1) ケイ藻類の細胞数を同一調査日で沢ごとに比較すると、長谷部新道や水源地湧出点で非常に少なく、日暮の滝では非常に多く、剣ヶ池流出点では中位であった。季節による細胞数の変化は、日暮の滝で顕著に見られた。見いだされたケイ藻をpHに対する性質で分類すると、剣ヶ池流出点では真酸性種の割合が他の地点とくらべて多く、これはこの沢の水質が調査地点の中で最も酸性であることと一致した。
- 2) 水生昆虫については、駒ヶ岳千畳敷の剣ヶ池と長谷部新道では、比較的多くの種が生息しており、フタオカゲロウ、マダラカゲロウ、カワトビケラなどが見られた。日暮の滝では、これらに加えヒラタカゲロウとコカゲロウなどが見られた。これらの地点で水生昆虫相の違いはややあるが、谷川岳の場合ほど顕著ではない。これは谷川岳ほど地点間のpHの差が大きくはないことによるのかもしれない。

5. 研究成果の発表

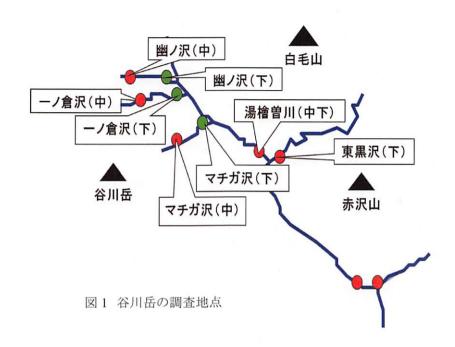
印刷物

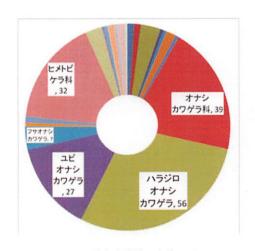
- 1) Watanabe, T., Fujimoto, R., Sawai, J., Kikuchi, M., Yahata, S., Satoh, S. (2014) Antibacterial Characteristics of Heated Scallop-Shell Nano-Particles. *Biocontrol Science*, 19, 93-97.
- 2) 菊地幹夫,小野寺浩樹,佐藤朱美,後藤健一朗,加藤佳珠恵,澤井淳 (2014) オオミジンコ胚への重金属イオン及び重金属ピリチオン錯体の毒性. 環境毒性学会誌,17,33-40.
- 3) Yasue, S., Sawai, J., Kikuchi, M., Nakakuki, T., Sano, K. and Kikuchi, T. (2014) Sporicidal characteristics of heated dolomite powder against *Bacillus subtilis* spores. *Biocontrol Science*, 19, 113-119.

6. 参考文献

- 1) 川上智規 (1993): 乗鞍岳湖沼群の水質に対する降雨の影響. 環境工学研究論文集, **30**, 73-80. 川上智規 (1994) 乗鞍岳湖沼群における酸の供給と消費機構. 環境工学研究論文集, **31**, 81-89. 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.
- 3) 浅見和希ほか (2015) 高山湖沼の水環境に関する研究-中部山岳地域を中心に-. 2015年度日本地理学会春季学術大会発表要旨集

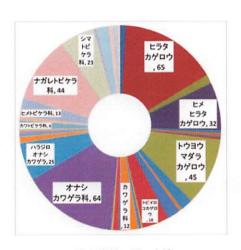
浅見和希ほか (2014) 中部地方の高山湖沼の水環境に関する研究. 陸水物理研究会報 - 第36 回研究発表会 (2014 能登大会) 講演要旨 -





pH がやや酸性の水域

幽ノ沢中流 pH 4.25~5.88, 一ノ倉沢中流 pH5.31~6.37



pH が中性に近い水域

東黒沢 pH 6.64~7.37, マチガ沢下流 pH 6.24~7.29

図2 谷川岳の渓流における pH と水生昆虫相の関係 (2012~2014)

表 1 谷川岳の渓流の水質 (2014年7~10月,一部欠測有り)

	pН	EC (mS/m)	水温 (℃)
幽ノ沢(中)	5.0~5.3	0.43~2.19	4.6~16.8
幽ノ沢(下)	5.2~5.8	0.69~2.15	6.4~14.7
一ノ倉沢(中)	5.6~6.3	0.48~2.72	4.8~11.1
一ノ倉沢(下)	(下) 6.2~6.5 0.94~2	0.94~2.35	8.1~12.8
マチガ沢 (中)	6.1~6.3	1.18~2.43	8.6~15.6
マチガ沢 (下)	6.4~6.9	1.69~2.56	8.1~13.7
東黒沢	6.6~6.7	4.19~4.89	7.9~16.9
湯檜曽川	6.2	2.15~2.43	9.0~15.7

表 2 駒ヶ岳千畳敷カール及びその下流の渓流の水質 (2014年8月及び9月)

	pН	EC (mS/m)	水温 (℃)
長谷部新道	6.4, 6.4	0.69, 0.65	6.1, 6.5
水源地湧出点	5.6, 5.5	1.09, 1.04	2.6, 2.6
剣ヶ池流出点	6.3, 5.8	1.14, 0.90	9.1, 7.5
日暮の滝	6.5, 7.1	1.82, 1.44	14.1, 12.3

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

1. 研究の目的

- ①フーリエ変換マイクロ波(FTMW)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FTMW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 FTMW 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 FTMW 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。

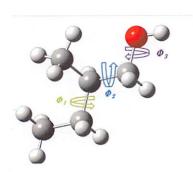
3. 期待される効果

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 2-メチル-1-ブタノールの FTMW スペクトル

ペンタノールの構造異性体である 2-メチル-1-ブタノー ル(2-Me-1-BuOH と略す)の回転スペクトルを FTMW 分光 計で研究した。2-Me-1-BuOHにはφ1軸回りに関して trans(t) 型と gauche(g,g')型が、同様に φ_2 軸回り、 φ_3 軸回りにもそ れぞれ t型、g型、g'型の安定な回転異性体が存在し(図1)、 27 個の安定な回転異性体の存在が予想される。市販の 2-Me-1-BuOH をステンレス製の液溜めに入れて 30℃に保 ち、背圧 2atm のアルゴンで真空チャンバー内に分子線と して噴射した。cam-B3LYP を用いて安定化エネルギーと Fig. 1 Molecular structure of 2-Me-1-BuOH 回転定数を求めた。最安定の TGt 型で $12\sim15$ GHz に b 型



O 枝遷移のシリーズを見出し、a 型遷移も 14~16GHz に J=4←3 を 18~21GHz に J=5←4 遷 移を帰属した。 測定された周波数を用いて回転定数を最小二乗法で決定した (表 1)。 回転異 性体 TGt 型を帰属したが、多数の未帰属線が残っているので今後検討をする。

Table 1 Obtained and calculated molecular parameters and number of transitions of the 2-Me-1-BuOH

Parameter	Obtained	Calculated
A/MHz	4706.1700 (8)	4715.2
B/MHz	2346.8108 (4)	2357.1
C/MHz	1707.5867 (4)	1712.8
N_a /- or μ_a /D	20	0.85
N_b /- or μ_b /D	39	1.04
N_c /- or μ_c /D	6	0.81

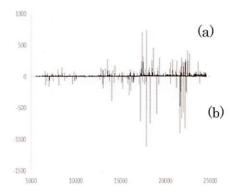


Fig.2 Observed spectra of the 2-Me-1-BuOH. (a) unassigned and (b) assigned spectra.

4.2 EO-ES 錯体

分子間力について包括的知見をえるため、 $C_{2\nu}$ など対称性の高い分子で構成される分子錯体をフーリエ変換マイクロ波分光 (FTMW) および量子化学計算により系統的に研究してきた。その際、酸素原子と硫黄原子が果たす役割の差に注目し、具体的にはエチレンオキシド (EO)

とエチレンスルフィド(ES)を取り上げた。Gaussian09を用いて分子軌道法を行っ

Fig. 3 Molecular structure of EO-ES and ES--EO

Table 2 Molecular parameters of the stable conformers in the EO-ES system

た。EO-ES ヘテロ二量体には 2 個の安定 構造がある(図 3)。回転定数、双極子モー メント、安定化エネルギーの計算値を表 2 にまとめた。EO と ES を等量混合し、ア ルゴンガスで約 0.8%に希釈した。背圧を 5 気圧とし $7\sim18$ GHz 領域を掃引した。 8GHz 領域で観測したスペクトルから EO と ES の単量体、Ar-EO と Ar-ES 錯体の遷 移を除き、 $J=3\leftarrow2$ 、a 型遷移を 3 本帰属し、

	Calculated		Obtained
parameter	EO-ES	ES-EO	EO-ES
ΔE /cm	0.0	251.1	
A / MHz	5259.2	6162.4	5220.98932 (87)
B/MHz	1447.4	1231.7	1400.075716 (85
C/MHz	1374.0	1131.5	1327.289377 (85
μ_a /D or N_a /-	1.28	2.30	57
μ_b /D or N_b /-	0.33	0.44	21
μ_c /D or N_c /-	0.00	0.00	

さらに a 型遷移と c 型遷移を測定・帰属した。最小二乗法により決定した分子定数を表 2 に示す。決定した回転定数を量子化学計算の結果と比べ、検出した EO-ES 錯体は最 安定構造である EO-ES であると結論した。同様に自然存在比における 34 S および 2 個 の 13 C 種の回転スペクトルを測定し、得られた分子構造を確認した。

4.3 DMS-DME 錯体

近接距離における分子間力の詳細を明らかにするため、対称性の高い分子を選び、それらの錯体をフーリエ変換マイクロ波(FTMW)分光法により系統的に研究してきた。地球大気など広い領域で重要な役割を果たしながら、その分子間錯体についてほとんど研究されてこなかったジメチルスルヒド(DMS)を取り上げ、ジメチルエーテル(DME)との錯体が図4のような面

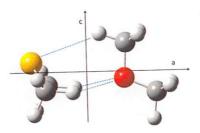


Fig. 4 Molecular structure of DMS-DME

対称配置をとることを回転スペクトルの観測から明らかにした。今回、錯体構造をより詳しく決定するため同位体種のスペクトルを観測すること、また一部の回転スペクトルに見られる分裂からメチル基の内部回転の詳細を明らかにすることを目的として、

スペクトルの観測解析を行った。図4の構造から、40 l³C 同位体は DMS で1種類、DME で2種類期待 され、実際 34S 種のおおよそ半分の強度をもつー 35 組の DMS l³C のスペクトルが、またさらに半分の強度の2種の DME の l³C スペクトルが観測され 30 た。

得られた DME free CH_3 基の V_3 の値は 918.35 (47) cm^{-1} となり、DME 単体の値 951.72(70) cm^{-1} より低いが、DME の 2 量体の値 785.4(52) cm^{-1} より大きい。一方、DMS の V_3 の値は 744.96 (53) cm^{-1} で、DMS 単体の値 752.57(84) cm^{-1} より小さく、Ar-DMS の 736.17 (32) cm^{-1} 、CO-DMS の 745.5(30) cm^{-1} とよく一致している。

DMS-DME、EO-ES 錯体および類似錯体の結合 エネルギー E_B と電荷移動による安定化エネルギーCT の計算値との相関を図 5 に示す。 E_B と CT

の間に極めてよい相関があることがわかる。 DME や DMS を含む錯体は赤線上にのり、CT の 値が E_B の約 2.5 倍である。一方、EO や ES を含 む錯体では青線にのり、CT が E_B の約 2 倍である。

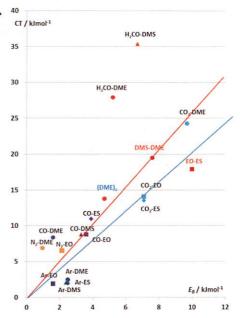


Fig. 5 Relationship between the bonding energy E_B and the calculated stabilized energy of the charge transfer CT of the DMS-DME, EO-ES, and related complexes.

この要因としては、イオン化ポテン

シャル $I_p(eV)$ を比較すると DME(10.04 eV)や DMS(8.72 eV)の I_p 値が EO(10.56 eV)や ES (9.04 eV)より小さいので、電子給与体になりやすく CT の値が大きくなると示唆される。一方 H_2 CO-DME や H_2 CO-DMS 錯体では H_2 CO が強い電子受容体なので、CT の値が E_B より 4 倍ほど大きいことが分かる。

5. 今後の計画

- ① アンモニアの検出方法を確立することは分析化学の立場からきわめて重要な課題の一つである。アンモニアの定量分析を行うとき、容器や配管などへの吸着・付着の課題が問題となる。測定対象とするアンモニア分子を容器などに収納するのではなく、直接試料棒に吸着・吸収させ、レーザー光を試料棒に照射し、アンモニア分子を直接気相中に放出させてその吸収強度を測定する方法を開発する。このためにレーザー蒸発法に用いる試料棒の開発や測定条件を検討する。さらに 13 C を含む化合物が 13 CHO や 13 CHO などに分解される量を FTMW 分光計でその同位体種の検出および定量を目指す。
- ② 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。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、シクロペンタノールなど)を対象として、回転スペクトル を測定・帰属することを目指す。さらに、草のにおいの原因物質であるシス-3-ヘキセナ ールを検出することを目指す。
- ③ 環境汚染物質での分子錯体、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 N₂-DME および CO₂-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

論文発表

 Yoshiyuki Kawashima, Yoshio Tatamitani, Yoshihiro Osamura, and Eizi Hirota, "Intermolecular Interactions between Formaldehyde and Dimethyl Ether and between Formaldehyde and Dimethyl Sulfide in the Complex, Investigated by Fourier Transform Microwave Spectroscopy and Ab Initio Calculations", J. Phys. Chem. A 2015, 119, 2132-2141

口頭発表

- 1) Yoshiyuki Kawashima, Yoshio Tatamitani, Yoshihiro Osamura, and Eizi Hirota, "Intermolecular Interactions between Formaldehyde and Dimethyl Ether and between Formaldehyde and Dimethyl Sulfide in the Complex, Investigated by Fourier Transform Microwave Spectroscopy and Ab Initio Calculations", 69th International Symposium on Molecular Spectroscopy (Champaign (Illinois) USA)
- 2) Yoshiyuki Kawashima, Ryusuke Katsuragi, Jun Utsugi, and Eizi Hirota, "Conformational Analysis of Whisky Lactone Using Fourier Transform Microwave Spectroscopy and Quantum Chemical Calculations", 23rd International Conference on High Resolution Molecular Spectroscopy, Bologna (Italy).
- 3) 川嶋良章・宇都木淳・葛城隆祐・廣田榮治 "フーリエ変換マイクロ波分光と量子化学計算によるウィスキーラクトンの構造解析(第2報)"、第8回分子科学討論会 1A03 広島大学
- 4) 間瀬貴之・川嶋良章・廣田榮治 "フーリエ変換マイクロ波分光と量子化学計算によるエチレンオキシドとエチレンスルヒド錯体の構造解析" 第8回分子科学討論会 2P020 広島大学

アロステリック酵素を用いたエフェクターのフローインジェクション計測

研究者名: 応用化学科 佐藤生男

1. 研究成果の要約

ディスク状の炭素繊維を化学修飾して酵素固定化用の担体に用いた. 前年度と異なるところは、クロロ金酸液を含浸させた炭素繊維を還元する際に、水素ガスの代わりに過酸化水素水を作用させて金属状の金に変換し、酵素の固定化を試みたことである. また塩化パラジウム液をこのディスク状の炭素繊維に一度、浸み込ませた後にパラジウム(II)イオンをパラホルムアルデヒドで還元し、次いで金酸と金属パラジウムとをイオン交換し、金属状態の金にする方法も検討した. 酵素触媒として、代表的なアロステリック酵素の一つであるグリコーゲンホスホリラーゼ bを用い、フローインジェション計測システムを用いて、エフェクター(アデノシンーリン酸、以後AMPと略称)の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に充填し(内径:約7.0 mm, 充填高さ:約15 mm)、本リアクタを識別素子とし、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構成した. 本法を用いることで2 μM (最低検出限界)以上の正リン酸を定量できることを再確認し、次いで2.0 mM以下の AMP を分光測光法的にモニターすることができた.

2. 研究概要

2.1 計測原理

アロステリック酵素は一般に、糖代謝系に存在し、特異な制御作用を発揮する。タンパク質分子にあって、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、本酵素の触媒活性が調節され、ひいては代謝系の制御がなされることはつとに知られている。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 も既知であり、この酵素のエフェクターであるAMPは、エフェクター結合部位に配位、結合することで、酵素触媒活性が制御される。一方、エレクトロニクスの基礎事分野では、電子デバイスのトランジスタが、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既知である。これらの関係に注目し、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試行した。

このことを実践するため、エフェクターとしてのAMP分子に着目し、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伸長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で活性の計測を行った。

グリコーゲンホスホリラーゼ b

グリコーゲン(n) + グルコース 1-リン酸 \longrightarrow グリコーゲン(n+1) + 正リン酸

この反応で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ることで発色、形成されるイオン会合体をモニタリングすることにより、ひいては上記の反応を分光測光法的に定量することで、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) 15個をアセトン中で超音波洗浄(15分間)し,脱脂,乾燥した.次いで,10 mM 硝酸液中に浸漬し(30分間,75℃に保温),吸引ろ過後,洗浄,分離して、110℃で乾燥した.
- (b) 金酸液の含浸: 10 mL の純水中にテトラクロロ金(Ⅲ)酸四水和物(0.33 g) を溶解し(80 mM 液),50 mL 容の三角フラスコに移し、上記の硝酸処理後、乾燥済の炭素繊維を保冷庫内(4℃)で、一晩(約 18 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、保冷庫内で乾燥した。
- (c) 過酸化水素水による還元: 200 mL 容の三角フラスコに 0.25 M 過酸化水素水 100 mL, さらに 金酸を含浸させた炭素繊維を加え, 30 分間, 室温で減圧下(アスピレーター)に置き, 75℃の恒 温槽に浸し, 6 時間保温し, 金属状態に還元することとした. 吸引ろ過して, 洗浄後に 4℃の保 冷庫内で一晩乾燥させた. なお, この過酸化水素水を作用させると, 直ちに気泡が発生すると共 に金属状の金属が生成し, 三角フラスコの底部に沈む現象が認められた.
- (d) パラジムと金酸とのイオン交換法による金属状金への還元: 過酸化水素水による金への還元とは別に、パラジウムイオンの金との置換による金属状の金が炭素繊維の表面で被覆されることを試みた. 300 mL 容の三角フラスコに飽和塩化パラジウム溶液(100 mL)を先ず加え、次いで硝酸処理済みの炭素繊維を入れ、恒温槽(60℃)中で2時間保温し、室温に冷めてから30分間減圧状態(アスピレータ)に置いた. 初めのうち、溶液の表面に浮かんでいた炭素ディスクが溶液を吸収して、すべて沈んだ後、恒温室(4℃)で約18時間以上、振盪(60 rpm;振れ幅 25 mm)させた.

パラホルムアルデヒド 0.180 g を三角フラスコに秤量し、純水 200 mL を少しずつ撹拌しながら加えて、恒温槽中 (60°C) で約 2 時間、溶解させた.このパラホルムアルデヒド溶液 200 mL をディスク状の炭素繊維が浸漬したパラジウム溶液中に、さらに恒温槽中 (60°C) で 5 分間毎に 10 mL ずつ添加し、4 時間反応させた.室温に戻した後、減圧吸引ろ過を行い、100 mL の純水で洗浄した.吸引ろ過操作で水滴が出なくなるまで乾燥させ、恒温室 (4°C) で風乾させた.

テトラクロロ金(III)酸四水和物 $(0.0693 \,\mathrm{g})$ を 50 mL 容の三角フラスコで秤量し、塩化ニッケル液 21 mL(Ni^{2+} として、5000 ppm に調製)を加え、溶解した。この液にディスク状の炭素繊維を添加し、アスピレーターで 30 分間減圧し、恒温室 (4° C) で約 1 日間振盪させ、金属パラジウムを金のイオン交換し、金属状の金に置換させることとした。その後、パラジウム液の処理と同様の操作でろ過と乾燥を行った。

- (e) アミノエタンチオール化: この過酸化水素水で還元処理あるいは別に金属状の金で置換,被覆したディスク状の炭素繊維と 20 mM 2-アミノエタンチオール液 (0.05M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 8.0, 100 mL) とを,予め室温で液中の気泡を可及的に減圧下 (アスプレーター)で除去し,再び4℃の保冷庫内で往復振盪 (18 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) し,4℃の保冷庫内で乾燥させた.
- (f) グルタルアルデヒド活性化: 0.25%グルタルアルデヒド溶液(100 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),次いで純木で洗浄し,秤量値が変化しなくなるまで室温で乾燥させた.
- (g) 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%の重さに相当する GPb 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(pH 7.0)10 元 中に溶解し、9.0 元 を固定化に適用した。50 時間、4℃の保冷庫内で振盪後、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: ほぼ 100%). このようにして本酵素を定量的に固定化することができた。なお、シッフの塩基の残存を考慮し、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に詰め、さらにアクリル製の恒温ホルダーに取り付け、計測システムに組み込んだ。

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行った. 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, 最適計測条件として, キャリヤーの組成が 50 μM 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ことを再確認した. 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た.

3. 結果

先ず、本酵素は過酸化水素水による炭素繊維の還元法でも、またパラジジウムコーティングした後に金属状の金に置換する方法でも定量的に固定化できた.次に、このシステムを用いて正リン酸を微少濃度 (2 μM) で測定できることを再確認した.固定化の活性の発現に対しは、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しても、酵素リアクタからの排出液と発色液とを混合しても、この混合液の発色が認め難かった。つまり、イオン会合体の生成に起因する応答が認められなかったことになる。 過酸化水素還元法による固定化物では全く、またイオンの置換法ではわずかにしか触媒活性の発現が観察されなかった。 酵素タンパク質自体の固定化は可能であったが、活性を発現する状態には未だ至っていないと思われる。

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、定量的な固定化には成功した. 酵素活性の十分にある炭素繊維を取得するためには、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が必定で、次年度にはパラジウムで予め被覆した炭素繊維を金酸液に含浸(振盪・攪拌)し、金属状の金に置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. この際、気泡を炭素繊維表面から予め、徹底的に除去しておく必要が有ると考える.

研究発表リスト

印刷物発表

- (1) Ikuo SATOH, and Yasushi KANZAKI: "Immobilization of Enzymes onto Carbon Fibers and its Application to Flow Determinations", *Proceedings of the 57th Chemical Sensors Symposium*, **29**, Supplement B, pp.124 126, 2014.
- (2) Ikuo SATOH, and Yasushi KANZAKI: "Investigation on Conditions of Immobilizing Enzymes onto Carbon Fibers and Their Application to Flow Sensors", "Proceedings of the 58th Chemical Sensors Symposium, 31, Supplement A, pp.97 99, 2015.

口頭発表

- (1) 佐藤生男,神崎愷:「酵素の修飾済炭素繊維への固定化とフロー計測への適用」,公益社団法人電気 化学会,化学センサ研究会 第57回講演会,2014年,9月28日,札幌.
- (2) 佐藤生男,神崎愷:「炭素繊維上への酵素の固定化条件の検討とセンサへの応用」,公益社団法人電 気化学会,化学センサ研究会,第58回講演会,2015年,3月17日,横浜.

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とヒスタミンオキシダーゼのアミノ酸置換による酵素化学的特性の改変-

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、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ン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、プトレッシンオキシダーゼを産生する Arthrobacter sp. KAIT-B-420、ヒスタミンオキシダーゼを産生する Arthrobacter crystallopoietes KAIT-B-007 を土壌から探索し、その酵素遺伝子の増幅に成功した。そして、この遺伝子を pCold ベクターに挿入した後、大腸菌に形質転換して高発現系の構築にも成功した。

本研究では、このプトレッシンオキシダーゼ遺伝子をポイントミューテーションおよびランダム ミューテーションによって酵素化学的特性の優れた酵素を取得することを目的とする。

また、ヒスタミンオキシダーゼ遺伝子は、Arthrobacter globiformis IFO12137 由来のヒスタミンオキシダーゼとのキメラタンパク質を作製することや、ポイントミューテーションによって酵素化学的特性の優れた酵素を取得することを目的とする。

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。

一方、ヒスタミンオキシダーゼは、本研究室で Arthrobacter crystallopoietes KAIT-B-007 から見いだされたのもが既存の酵素よりも熱安定性が高く、基質特異性も高かった。この熱安定性と基質特異性の原因となっている構造を解明することで、熱安定性を高くしたり、基質特異性を高くしたりするために必要なアミノ酸置換についての知見を得ることができる。また、より優れたセンサー素子の提供が可能となる。

- 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およびヒスタミンオキシダーゼなどの優れたセンシング素子の高発現系を構築し、提供することができる。

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 基質特異性の改変

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 1)。 (1)と同様な方法によって変異体を合成し、精製した。

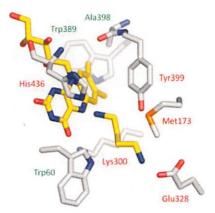


図 1 PUO の活性中心 黄: FAD およびプトレッシン

表1 PUO-wildの基質特異性

3705 P. S.
相対活性(%)
100
19
3
0
0
0
0
0
0
0
0

表2 PUO-E328Dの基質符異性

基質	相対活性(%)
Putrscine	100
Cadaverine	32
1,6-Diaminohexane	43
Benzylamine	0
4-Amino-1Butanol	0
Tyramine	0
1,3-Propanediamine	0
N-Butylamine	0
Ethylenediamine	0
L-Ornithine	0
2-Ethylethylenediamine	0

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(NH_2 -(CH_2)4- 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(NH_2 -(CH_2)5- NH_2)との反応性は変化せず、PUO-wild で反応が起こらなかった NH_2 -(CH_2)6- NH_2 に反応性を示す予想外の改善に留まった(表 1 \sim 3)。

表 3 PUO-wild と PUO-E328D の特性の比較

	PUO-wild		PUO-E328D			
基質	$K_{\rm m}({ m mM})$	$V_{\rm max}({\rm U/mg})$	$V_{\rm max}/K_{\rm m}$	K _m (mM)	$V_{\rm max}({\rm U/mg})$	$V_{\rm max}/K_{\rm m}$
NH ₂ -(CH ₂) ₄ -NH ₂	0.44	161	366	0.53	36.6	69.1
NH ₂ -(CH ₂) ₅ -NH ₂	2.68	21.9	8.17	2.78	22.1	7.95
NH ₂ -(CH ₂) ₆ -NH ₂	-	0.0	0.0	3.26	22.8	6.99

(2) プトレッシンオキシダーゼのランダムミューテーションによる改変

プトレッシンオキシダーゼ遺伝子に Mn^{2+} を添加して、dNTP 濃度を低下させて dGTP を多くして PCR を行うことで、複製の正確さを下げることで、ランダム変異を導入した。この PCR 産物を精製した後、pCold II ベクターに組み込み、コンピテントセル BL21 株に形質転換した。プラスミドを精製してその塩基配列を決定した。測定した 19 株全てで、遺伝子変異に伴うアミノ酸置換が起こっているものはなかった。次年度、変異率を上げてもう一度ランダムミューテーションを行う。

(3) ヒスタミンオキシダーゼキメラタンパク質の合成による酵素化学的特性の改変

ヒスタミンオキシダーゼは、Arthrobacter 属のほとんどの種が産生する酵素であり、遺伝子塩基配列が報告されているのは、Arthrobacter globiformis IFO12137 と本研究室で探索した Arthrobacter crystallopoietes KAIT-B-007 のみである。2 つの種が産生するヒスタミンオキシダーゼは、熱安定性に関しては、KAIT-B-007 由来の物が 10° C高い熱安定性を示し、ヒスタミンに対する基質特異性も高いことが明らかにされている。

そこで、これら2つのヒスタミンオキシダーゼのキメラタンパク質を作製して、酵素化学的特性がどの部分に依存しているかを明らかにすることを計画し、KAIT-B-007 由来の物を前半IFO12137 由来の物が後半のキメラ(007mae(図2))とその逆のキメラ(007ato)の二種類を作製した。実際には、pCold I-HODifoを作製した後、これらを鋳型としてPCR を行い、相同組換えによって、キメラタンパク質を発現するベクターを合成した。これを、コンピテントセルE.coli BL21に形質転換して、発現させた後、His-trapカラムで精製した。

精製酵素の熱安定性を評価した結果、007mae のキメラは熱安定性が維持されていたが、007ato のキメラは熱安定性が IFO12137 由来の物と同程度で良くなかった(図3)。その結果から、熱安定性は KAIT-B-007 由来の HOD の前半部分にあることが分かった。また、007mae は、ヒスタミンに対する反応性がほとんどなくチラミンとの反応性は見られ、KAIT-B-007 由来 HOD の後半にヒスタミンを認識する部分があることが明らかになった。今後、詳細な熱安定性を示すアミノ酸の置換と基質特異性を決めている部分の解析を行って



図 2 007mae キメラ

黄: KAIT-B-007 由来、青: IFO12137 由来

緑:銅イオン、ピンク: H437、H439、H598、Y389

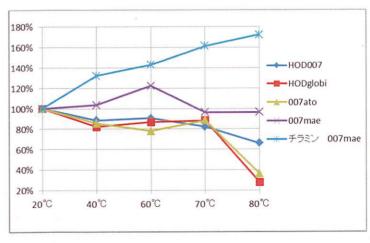


図3 HOD の熱安定性の比較(残存活性)

(4) ヒスタミンオキシダーゼのポイントミューテーションによる基質特異性の改変

Arthrobacter crystallopoietes KAIT-B-007 のヒスタミンオキシダーゼは、H437、H439、H598 の3つのヒスチジンのイミダゾール基によって配位した銅イオンを1つもつ銅酵素である。この銅イオンと酸素によって Y388 が酸化されトパキノンを形成することで、ヒスタミンを酸化することができる (図2)。この Y388 の隣の D389 をグルタミン酸に置換する(HOD-D389E)ことで、基質結合部位を小さくすることでヒスタミンの基質特異性を変化させることを試みた。

ポイントミューテーションは、pCold I-HOD007 を鋳型として、変異導入プライマーを用いて PrimeStar Max を用いて PCR を行うことで導入した。この PCR 産物を精製した後、コンピテントセル E.coli BL21 に形質転換した。形質転換大腸菌を培養後、プラスミドを精製して、DNA 塩基配列を確認して変異配列が導入されていることを確認した。この HOD-D389E を大腸菌中で大量発現して、10 μM CuSO4 水溶液を添加して酵素に銅イオンを配位させて、半日氷冷して酸化した。His-trap カラムで酵素を精製した。精製酵素に対して、アミノ酸脱炭酸生成物であるヒスタミン、チラミン、フェニルエチルアミンに対する反応性を検討した。HOD-wild と HOD-D389E の酵素共にチラミン、フェニルエチルアミンに対して、基質阻害があることが明らかになった(図4)。今後、チラミンやフェニルエチルアミンに対する反応性を改善していく必要がある。また、ヒスタミンに対しても基質阻害があるが、非常に高濃度で阻害が起こるため、実試料分析では問題にはならないと考えた。

HOD-wild と HOD-D389E を比較すると、Vmax に関してはヒスタミンの反応速度はあまり変化せず、チラミン、フェニルエチルアミンの反応速度がそれぞれ半分、3分の1に低下して良好な結果が得られた。一方、Kmの値に見られるように、チラミンとフェニルエチルアミンに対する親和性は変化せ

ず、ヒスタミンの親和性が半 分に低下していることがわ かる。以上のことから、今回 の変異によってチラミンと フェニルエチルアミンとの 反応性(Vmax/Km)を3分 の1に下げることはできた が、ヒスタミンとの反応性も 半分に下がってしまったた め、基質結合部位の別の部位 をアミノ酸置換すべきであ ることが分かった(表3)。

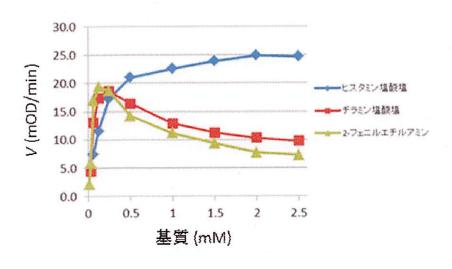


図4 HOD-E389D の基質と反応速度の関係

表 3	HOD-wild	と HOD-D389E	の特性の比較

		PUO-wild			PUO-D389E	
基質	$K_{\rm m}({ m mM})$ $V_{\rm max}({ m mU})$		g) $V_{\rm max}/K_{\rm m}$ $K_{\rm m}$ (r		$K_{\rm m}({\rm mM})$ $V_{\rm max}({\rm mU/mg})$	
ヒスタミン	0.17	0.24	1.45	0.30	0.22	0.74
チラミン	0.05	0.08	1.77	0.06	0.04	0.63
フェニルエチルアミン	0.23	0.17	0.74	0.22	0.05	0.23

(5) 本年度の成果のまとめ

- ①PUO-E328D にアミノ酸置換すると基質の炭素鎖が長いジアミンとの反応性が向上した。
- ②PUO のランダムミューテーションによるアミノ酸置換は達成できなかった。
- ③KAIT-B-007 の前半に熱安定性、後半に基質特異性に関する部位が存在することがわかった。
- ④HOD-D389E にアミノ酸置換すると、チラミンとフェニルエチルアミンの反応性が3分の1に低下し、ヒスタミンの反応性が半分に低下した。

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) アミノ酸置換プトレッシンオキシダーゼによるポリアミンの測定,山村晃,川上勇希,上原なつみ,松本邦男,第8回バイオ関連シンポジウム(岡山)
- 2) Arthrobacter sp.KAIT-B-420 が産生するプトレッシンオキシダーゼ遺伝子置換による基質特異性の変化および耐熱化の検討,山村晃,川上勇希,日本農芸化学会 2015 年大会(岡山)

食嗜好制御を目的とした食品フレーバー成分のメタボローム技術に基づく 食品品質評価法の開発と応用

研究者名:栄養生命科学科・准教授 飯島 陽子

1. 研究の目的

近年、健康に対する消費者の意識は高く、「予防医学」の概念が広がっている。「健康に生きる」ための食指導において、野菜果物などの植物性食品をできるだけ多くバランスよく摂取することが好ましいことは、当たり前のこととなっている。しかしながら、実際に多くの野菜を継続的に摂取することは難しく、その原因として野菜素材の風味に対する抵抗感、テクスチャー(食ざわり)が挙げられる。本研究では、香気が独特で一般に好き嫌いが顕著である野菜類(ここでは「香味野菜」と呼ぶこととする)に着目し、メタボローム技術によって"好き嫌い"に影響の大きい香気成分のスクリーニング、同定を行うことを目的とした。

2. 研究の必要性及び従来の研究

野菜の風味成分については、その着目度は大きく、調理法の工夫、食材の品種改良などが進んでいる。これまでの食品風味成分分析では、甘味成分ならグルコース、スクロース、旨味成分ならグルタミン酸・・など、既知の特定成分の分析データで判断されてきた。しかし、実際には食品は成分複雑系であり、さらに味成分間のみならず、味成分と香気成分間での相互作用があることが最近食品業界では注目されてきており、食品の成分複雑系を意識した分析法が求められる。申請者が提唱する「メタボローム技術」は、本来は生物における代謝変動をノンターゲットに俯瞰する解析方法であるが、食品のような成分複雑系を考慮した成分分析にも適しており、代謝で起こる成分間反応を、食品の調理・加工・保存中における成分間反応に置き換えて応用することができる。本研究では、多変量解析を基盤としたメタボローム技術による解析手法を考案し、本技術を応用し、野菜や香辛料のこれまでに不明であった新たな知見を得ることとした。

3. 期待される効果

本研究の特色は、①成分複雑系解析からキー化合物を見出すこと②食材の生産から食卓に上がるまでを意識した多成分成分比較解析を行うことである。解析手法を考案し、香辛料や野菜を取り上げ、その風味や品質に関わる成分を新たに見出し、その生成制御が何に起因するのかを明らかにすることとした。これらの成果は、キー化合物を見出し、生成メカニズムを調べることで、野菜の風味成分の量を消費者好みに制御することが可能となると期待できる。

4. 研究の経過及び結果

①サンショウの品種による香気組成の違い

サンショウはミカン科の Zanthoxylum 属に属し、アジアを中心に香辛料として利用されている。同族異種のものも多いが、遺伝的な分類は不明である。そのため、市場に出回る 8種の Zanthoxylum 属植物の香気プロファイルを比較し、種による特徴を調べることを目的とした(図 1)。液体窒素中で粉砕後、分析サンプルとし、各凍結葉サンプル 200mg をガラスチューブに測りとり、超純水 1ml および内部標準として methyl decanoate $(6.25 \, \mu g)$ 、スターラーバーを入れて密封した。 60° C、30 分間ドライヒーターで撹拌しながら、SPME 法にて香気成分を抽出した。SPME ファイバーは、DVD/Carboxen/PDMS の素材を用いた。抽出した香気成分は、GC-MS にて分析を行った。



図1. 本実験で用いた8種のサンショウ種

全サンプルデータを一括比較解析を行うため、解析手法の構築を行った。まず GC-MS 生データを MetAlign プログラム (Lommen, Anal. Chem., 81, 3079-86, 2009) によりピークデコンボリューション、ノイズ除去処理後、データ間でピークアライメントを行った。次に、AIOUTPUT プログラム (Tsugawa et al, BMC Bioinformatics, 12, 131, 2011) を香気成分解析用にアレンジし、標品リテンションインデックスおよび MS スペクトルの一致によって一括同定した。標品が入手できなかった成分については、Willy スペクトルライブラリにより、アノテーションを行った。その手法を図 2 に示す。

各サンショウから検出された香気成分組成をもとに、主成分分析および階層的クラスター解析により、サンプル間の類似性を調べた。解析は各検出成分の log10 値を用いた。主成分分析の結果、第一主成分 26.6%、第二主成分 20.7%でサンプルが分離された(図

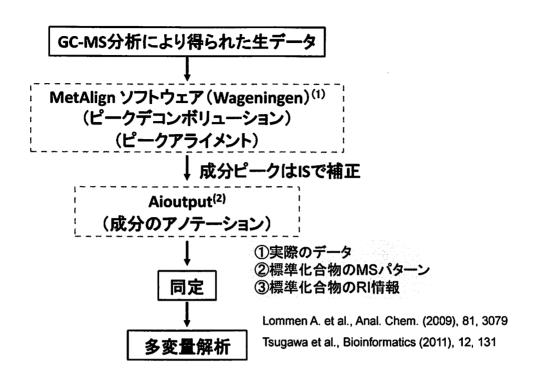


図2. 本研究で構築した GC-MS 生データの一括解析方法

3)。 Z.piperitum に属する種は、いずれも近いクラスターを形成し、カラスサンショウ、イヌサンショウ、フユサンショウとは離れていた。一方、イヌサンショウ、フユサンショウは近いクラスターを形成していた。ローディングプロットにより、寄与度の高い成分を精査すると、Z.piperitumではモノテルペン類の種類が多く、citronellal、citronellyl acetate などが、特徴的に検出された。これらの成分は、サンショウ様の特徴香気を有することが知られており(Jiang and Kubota, 2004)、これらの成分の存在がZ.piperitumの香辛料としての利用性に関与することが予想された。Citronellal はブドウサンショウ葉で一番多く存在したが、ブドウサンショウ変種では検出されなかった。ブドウサンショウ変種は、多数のブドウサンショウ生育する際に偶然見出されたものであるが、citronellal や geraniol など非環式テルペン類はブドウサンショウ同様に含まれていたことから、citronellal 生合成に関わる酵素遺伝子が欠落しているか、変異が起こっているものと推測された。

Z.piperitum 以外のサンショウ類は、モノテルペン類以外に 2-undecanone、2-tridecanone などのメチルケトン類が大きく検出された。イヌザンショウ、フユザンショウは、ブドウサンショウ、アサクラサンショウを生育する際に台木としてよく用いられる。実際、今回用いたブドウサンショウの台木(品種は不明)からも葉がついたため、分析したところ、これらのメチルケトン類が主要成分であった。これらのメチルケトン類は、ブルーチーズの主要香気成分として知られ、野生種トマトの一部のトライコームでも生成することが知られており、"臭い"においとして生成することが分かってい

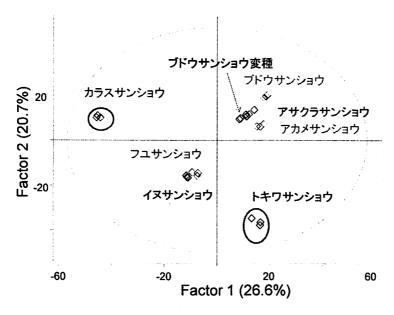


図3. 各種サンショウ揮発性成分の GC·MS プロファイルに基づく主成分分析

②メタボローム解析による新ショウガとひねショウガの風味の比較から見出した黄色色素 成分

ショウガは、日本では生の状態で料理に用いられることが多く、特に、未熟なショウガ 根茎である「新ショウガ」と成熟した古い根茎である「ひねショウガ」は、それぞれ違っ た方法で料理に用いられる。そこで本研究では、成分プロファイルの違いについてメタボ ローム解析に基づき検討した。金時ショウガ(愛知県産、小ショウガ種)と土佐一ショウ ガ(高知県産、大ショウガ種)について、同じ圃場で収穫した新ショウガとひねショウガ をサンプルとした。不揮発性成分を 75%メタノールで抽出したのち分析に供し、 ESI-positive モードおよび negative モードでイオン化を行った。LC-FTICR-MS による精密 質量レベルでピーク検出を行い、リニアイオントラップにより MS/MS フラグメントイオン を取得した。また、同時に PDA による検出も行った。各サンプルデータについて、精密質 量レベルおよび MS/MS パターンに従ってピークアライメントを行い、比較解析を行った。 成分の構造情報は過去の文献データ、MS データにより得た。すべてのデータ解析の結果、 500 以上の成分ピークが検出された。その中には、15 種の gingerol 関連化合物、25 種の diarylheptanoid が含まれていた。主要な辛味成分である 6-gingerol の含量は、新鮮重量 あたりでは新ショウガとひねショウガで大きな差は見られなかった。しかし、6-gingerdiol など gingerol 関連化合物において、新ショウガよりもひねショウガのほうが量が多い傾向 を示した。また、PDA の結果を合わせると、ひねショウガでは黄色色素として 2 種の成分が 増加していた。これらの物質を単離し、構造決定したところ、curcumin と 6-dehydrogingerdione であることが分かった (図4)。

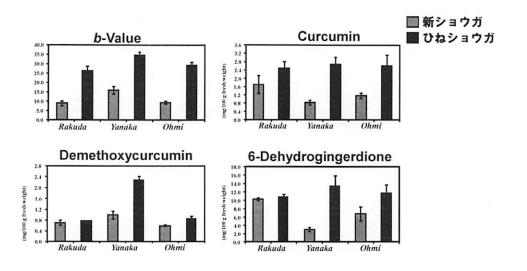


図4. 新ショウガとひねショウガにおける黄色強度と黄色色素成分の比較

5. 今後の計画

今後は、特にゴボウ、ピーマンなどで共通の不快な風味成分について、その生成機構を調べる予定である。また、近年、野菜の摂取しやすくするための加工品として野菜ジュースが挙げられる。生とジュース加工との風味の比較について詳細に調べる予定である。

6. 研究成果の発表

〈論文〉

- <u>Ulijima Y</u>, Koeduka T, Suzuki H, Kubota K, Biosynthesis of geranial, a potent aroma compound in ginger rhizome (Zingiber officinale): molecular cloning and characterization of geraniol dehydrogenase., *Plant Biotechnol*.31, 525–534 (2014)
- ②<u>Iijima Y</u> Recent advances in the application of metabolomics to studies of biogenic volatile organic compounds(BVOC) produced by plant., Metabolites, 4, 699-721 (2014)
- ③<u>Iijima Y</u>, Joh A., Pigment composition responsible for the pale yellow color of ginger (Zingiber officinale) rhizomes., Food Science and Technology Research, 20, 971-978 (2014)
- ④Miyashita T, Okamura T, <u>Iijima Y</u>, Suzuki H, Shibata D, Takaya Y, Tanaka H and Etoh H. (S)-3-Amino-1-ethylglutarimide from green tea (Camellia sinensis), 45,科学·技術研究, 3, 45-48 (2014)

〈著書〉

①<u>Iijima Y.</u>, Koeduka T., Suzuki H., Kubota K., Biotransformation of the acylic monoterpenoids responsible for the pleasant aroma in fresh ginger rhizome. Current Topics in Flavor Chemistry

- & Biology, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie 社, p328-332 (2014) 査読付き
- ②<u>飯島陽子</u>,"食品の香気成分複雑性に基づく解析技術と食品の質的評価への応用", バイオインダストリー, 31, 8, p9-14 (2014)
- ③<u>飯島陽子</u>, "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", におい・かおり環境学会誌、45、2、132-142 (2014)

<学会発表・講演>

- ①<u>lijima Y.</u>, Sakurai N., Suzuki H., Shibata D. Metabolomics Application for evaluation of effect of cooking on vegetables. Metabolomics 2014 (Tsuruoka Japan), 2014.6.25 (ポスター発表)
- ②石原拓巳,飯島陽子, 市場に出回る生鮮トマト果実のフレーバー成分の比較解析, 食品科学工学会第61回大会 (中村学園大学・福岡),2014.8.29
- ③飯島陽子,城彩,ショウガ根茎の黄色色素成分について,食品科学工学会第 61 回大会 (中村学園大学・福岡),2014.8.30
- ④小池理奈,飯島陽子, ゴボウの香気特性について, 食品科学工学会第 61 回大会 (中村学園大学・福岡), 2014.8.30
- ⑤飯島陽子,大場香織, サンショウ (Zanthoxylum) 属植物葉における揮発性成分組成の比較, 第 58 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (和歌山大学・和歌山), 2014.9.20

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 - 医用画像診断支援システムの高度化に関する研究 -

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, ディジタル 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 $0.5\sim1$ mm のスライス精度まで向上し、胸部診断の場合、約 $500\sim100$ 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きているからである。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、<u>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</u>.

- (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) 他部位への診断支援技術の適用拡大の可能性検討
- (3) CAD システム開発の効率化および FDA・薬事認可のための客観的評価仕組みの確立

本年度は、上記のうち、(1)、(2) および(3) の CAD システム開発の効率化に関して、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 20 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、臨床の現場と連携と図りながら実用化(役に立つシステムの運用の実現)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、医学・臨床(医療・治療)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.

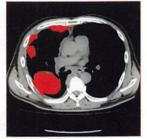
4. 研究の経過及び結果

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、研究課題(2)は(独)国立がん研究センター中央病院、(3)日本医用画像工学会 CAD グループ (医師と工学者の集まり)と連携を図り、臨床データの収集および臨床評価を進めてきた。そして、その研究成果は CARS2014 国際会議で発表 で発表 で表表 で表表に、日本医用画像工学会(JAMIT)論文誌にも掲載された 2. 現在、更なる高精度化を図っており、その研究成果を平成 27 年度中に海外を中心とする学会で発表する予定である(現在、CARS2015 国際会議および JAMIT 論文誌へ投稿中)。

(1) 胸部 CT 画像を用いた胸膜中皮腫の領域抽出[1]-[4]

胸膜中皮腫は胸膜にがん細胞が認められる病態であり、胸壁や肺の表面にも腫瘍が浸潤・転移する. 胸膜浸透による胸水貯留や、それに伴う呼吸困難を引き起こす要因となり、また縦隔胸膜より心膜に浸潤し腫瘍を形成すると拡張不全による心不全を引き起こすなど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、初期の中皮腫の発見は、中皮腫自体の初期症状の乏しさもあり困難であった. そこで本課題では、胸部 CT 画像を用いて胸膜中皮腫の領域を抽出し、個別に体積を計測する手法を開発した. 図1と図2にその抽出結果を示す. 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. 実患者のデータを用いて検証を行い、本手法での中皮腫領域の特定および定量計測による診断支援の可能性が示唆された.





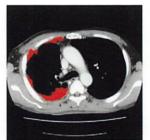




図1. 胸膜中皮腫の抽出手法(赤色の領域:胸膜中皮腫)

図2. 胸膜中皮腫の抽出結果

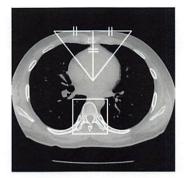
(2) 胸部 CT 画像を用いた骨格左右比較による肋骨原発性骨腫瘍の体積計測 [5]

骨格の左右対称性を用いて胸部 3 次元 CT 像から肋骨原発性骨腫瘍の鑑別,体積計測を行う手法を提案する. 健常例 17 症例の胸部 CT 像から肋骨の左右対称性について考察し,溶骨性腫瘍 4 症例,骨硬化性腫瘍 1 症例を用い,腫瘍の鑑別及び体積計測を行った. 健常例の肋骨の体積差は,左右で対称に位置する肋骨に対して 10%未満に抑えられ,有症例との明確な体積差を得ることができた. また,対象に位置する肋骨同士で差分をとることで,大幅な誤差なく骨腫瘍の体積を計測できることが示された.

なお、本研究の主要技術である肋骨抽出について説明する.肋骨領域の抽出には、断面 $70\text{mm} \times 70\text{mm}$ に体軸方向の長さを分類スライスに合わせて適応的に変化させた関心領域(VOI: Volume of Interest)を使用する(図3の B). ラベル付けされた領域ごとに走査させ、VOI 内部の画素数が最大になる領域を脊柱領域として除去することで、肋骨を抽出する(図5の C).



(A) 立体角を用いた骨格抽出



(B) 肋骨及び脊柱の ROI 図3. 肋骨の抽出



(C) 抽出結果

(3) 3次元腹部 CT 像への肝腫瘍の埋め込みによる CAD 開発の効率化 [6]-[7]

医療の現場では CT や MRI など撮影装置の高精細化により生成される医用画像の量が増大しており、 それを読影する医師の負担も急増している. そのため計算機により診断の補助を行う CAD 開発が行われ ているが、患者のプライバシーなどの問題から十分な量の症例サンプルを入手することができないため、 システムの有用性を示すことが難しい. そこで、人工的に症例サンプルを生成する技術を開発した.

本課題では、3次元腹部 CT 像において、ポアソンブレンディング技術を腫瘍の形状や細かい血管への影響を考慮して改良した画像合成法を開発した。この合成法を利用し、既存の症例画像から腫瘍を埋め込むことにより腫瘍の存在する CT 像を人工的に作成する。既存の腫瘍の大きさ、コントラスト、位置を変更することにより多量の人工症例画像を生成することができる。実際に作成した人工症例画像を医師に評価していただき、本手法が本物と遜色無い人工症例画像が作れることを確認した。

また、本技術を用いて参加した CAD コンテスト「TOで優勝したことも大きな成果である.

5. 今後の計画

本研究成果で得た CAD 技術を発展させて、今後も多部位展開(最終的には全身 CAD の開発を夢見ている) を進め、CAD システムの普及に貢献したい。また、ホームヘルスケア分野にも応用していきたい。

6. 研究成果の発表

- [1] Separation measurement of pleural fluid and compressive atelectasis regions from chest CT image, Computer Assisted Radiology and Surgery 28rd International Congress and Exhibition, CARS2014, pp. S359-S360, 2014 June, Fukuoka, K. Abe, <u>H. Takeo</u>, Y. Donomae, Y. Kuroki, Y. Nagai
- [2] 胸部 CT 画像を用いた胸膜中皮腫の領域抽出, Medical Imaging Technology, Vol. 32, No. 5, pp. 332-337, 2014, 安倍和弥, 堂之前義文, 武尾英哉, 黒木嘉典, 永井優一
- [3] 胸部 CT 画像を用いた胸膜中皮腫の領域抽出,第 33 回日本医用画像工学会大会 (JAMIT2014), 0P5-3, July. 2014, 安倍和弥, 堂之前義文, 武尾英哉, 黒木嘉典, 永井優一
- [4] 胸部 CT 画像を用いた心肺疾患に対する支援画像診断技術の開発, 信学技報, vol. 114, no. 482, MI2014-59, pp. 35-40, 2015 年 3 月, 安倍和弥, 武尾英哉, 黒木嘉典, 永井優一
- [5] 胸部 CT 画像を用いた骨格左右比較による肋骨原発性骨腫瘍の体積計測,信学技報,vol. 114, no. 482, M12014-60, pp. 41-44, 2015 年 3 月, 小林凉, 武尾英哉, 永井優一
- [6] 3 次元腹部 CT 像への肝腫瘍の埋め込み, 信学技報, vol. 114, no. 482, MI2014-62, pp. 49-54, 2015 年 3 月, 畠山拓也, <u>武尾英哉</u>, 高取祐介
- [7] JAMIT-CAD コンテスト (3 次元腹部 CT 像への肝腫瘍の埋め込み),第 33 回日本医用画像工学会大会 (JAMIT 2014), July. 2014, 畠山拓也, 武尾英哉

「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. 研究の目的

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。

Webセンシング(指示支援)機器 Webセンシングサービス 加速度センサ、動作 Veb機能 センサ、マイク・ 一日年を休めたいとき ナービス連 べ終わったとき 測&指示 指示支援機能

図1:生活者行動先回り支援指示メガネ

リアルな現場で、知識を活用できる情報利用技術を作る。そして、高齢者支援を目指す。

2. 研究の必要性と従来の研究

「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。

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~web連携のサービス構成を示す。

3. 期待される効果

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 てみることを目指す。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)

4. 研究経過および結果

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 (網膜ディスプレー、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)

三年計画の最終年であり、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: Web センサ技術利用のクラウド HEMS 開発環境の可能性を示した。

成果2: Web センサ技術利用の HEMS 開発プラットフォームの可能性を示した。

成果3:Web センサ技術利用のアンコンシャス情報利用技術の有効生と可能性を示した。

<本年度の結果>

26年度は、最終年度であり、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~全体構造を示す。

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実施した。

[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)

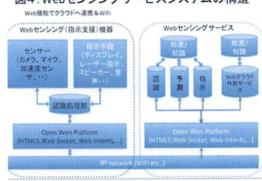
特に、Web サービス基盤の検討に基づき、Web サービス構造を検討した。図4で示すように、連携基盤は、Web Platform を活用することで、アプリケーション側で連携可能になるという特性を最大限生かす。(少なくとも、10年後の未来生活を想定するならば、実用可能性の高い仮定と考える)。3年間で変化することも考えられるので、自由度を高く検討していくことも研究の価値である。実際、WebIntent は進まず、WebSocket ベースの手法が注目されだした。

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 はネットワークの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。

図3:全てのサービスはWeb Application Platform上へ



図4:Webセンシングサービスシステムの構造



成果1:Web センサ技術利用のクラウド HEMS 開発環境の可能性を示した。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。実装し連携を目指し、WebSocket を利用したサービスを作成検討した。無料サービスサーバを利用した、サーバと宅内ゲートウェイを WebSocket で連結して、容易にサービス構築できるクラウド HEMS 開発環境を試作提供し、実サービスの実現ができることを示した。関係論文等[3,4,8,9,20]

成果2: Web センサ技術利用の HEMS 開発プラットフォームの可能性を示した。センサ利用の宅内サービスを簡便な Web インターフェースと連携動作記述ファイルにて動作できることを示した。特に、ス

マートメータの電力値をセンサ入力として利用し、HEMS 機器を連携制御することを示し有効性を確認した。また、センサ利用によるブラインドサービス、センサ利用技術教育についても示し、効果的であることを示せた。関係論文等[2,5,6,7,10,11,12,13,14,15,16,17]

成果3:Web センサ技術利用のアンコンシャス情報利用技術の有効生と可能性を示した。センサ情報をトリガーにした、Web ベースの機器連携サービスを試作し、アンコンシャス情報による HEMS サービスの有用性と可能性化を示した。関係論文等[1, 18, 19]

5. 今後の計画

本年度で完結し、今後は普及利用に向け別途向上していく。

6. 研究成果の発表

【学会誌印刷発表論文】

1, 渡部智樹(NTT, 神奈川工科大), 高嶋洋一(NTT), 杉村博, 一色正男(神奈川工科大), "Web サービスとマルチデバイスのフレキシブルな連携方式の実現",情報処理学会論文誌 コンシューマ・デバイス&システム, Vol. 5, No. 1, pp. 38-46, 2015, (査読あり)

【査読付き国際学会発表論文】

- 2, Hiroshi SUGIMURA, Kazuki UTSUMI, Masayuki KANEKO, Kazuki ARIMA, Masahiro SAKAMOTO, Yuki IMAIZUMI, Tomoki WATANABE and Masao ISSHIKI," Development of Immersive Display System of Web Service in Living Space", 2014 IEEE 3rd Global Conference on Consumer Electronics, pp. 49-50, MAKUHARI MESSE, TOKYO, JAPAN, Oct. 2014. (査読あり)
- 3, Kazuyuki ASHIMURA, Osamu NAKAMURA, Masao ISSHIKI, "Accessible TV Based on the W#C MMI Architecture", 2014 IEEE 3rd Global Conference on Consumer Electronics, pl, MAKUHARI MESSE, TOKYO, JAPAN, Oct. 2014.

【学会等口頭発表論文】 (一色講演関係は含まず)

- 4, 内海 和貴, 岡本 健司, 村上 隆史, 宇佐美 真, 杉村 博, 一色 正男 "クラウド型 HEMS サービス 基盤の研究", 第13回コンシューマ・デバイス&システム研究会 Vol. 2015-CDS-13, No. 1, pp 1-447, 2015
- 5,武内 浩平, 鈴木 洸斗, 金子 将之, 関家 一雄, 杉村 博, 益子 寛, 一色 正男 "汎用赤外線リモコンの ECHONET Lite 化と家電ゲームの開発",第 13 回コンシューマ・デバイス&システム研究会 Vol. 2015-CDS-13, No. 2, pp. 1-4, 2015.
- 6, 宮澤 重明, 石川 誠弥, 葉山 拓哉, 岡本 健司, 関家 一雄, 杉村 博, 奥山 武彦, 一色 正男 "新世代 HEMS サービスの開発 ~スマートメータのデータ活用~", 第 13 回コンシューマ・デバイス&システム研究会, Vol. 2015-CDS-13, No. 3, pp. 1-4, 2015.
- 7, 茂木 奈菜, 桑田 陽介, 有馬 一貴, 杉村 博, 関家 一雄, 梅田 哲士, 一色 正男, "電流波形解析による家電機器分離技術の HEMS 実用化支援", 第 13 回コンシューマ・デバイス&システム研究会, Vol. 2015-CDS-13, No. 4, pp. 1-4, 2015.
- 8, 杉村 博, 三栖 貴行, 山崎 洋一, 笹川 雄司, 藤田 裕之, 関家 一雄, 村上 隆史, 一色 正男 "HEMS 開発者教育用コンテンツの開発と教育の実施", IT を活用した教育シンポジウム 2014, Vol. 9, pp. 99-102 (2015).
- 9, 杉村 博, 三栖 貴行, 山崎 洋一, 笹川 雄司, 藤田 裕之, 関家 一雄, 村上 隆史, 一色 正男 "コンシューマデバイス開発者育成のための ECHONET Lite 教育コンテンツの開発",第 12 回コンシューマ・デバイス&システム研究会, Vol. 2015-CDS-12, No. 34, pp. 1-5 (2015).
- 10,横山悠平, 佐々木まどか, 川崎耀馬, 今泉優樹, 岡本健司, 一色正男, 杉村 博 "ECHONET Lite を用いた HEMS サービス開発環境の構築",第77回情報処理学会全国大会 4V-03,p2 ,March 2015, (口頭発表)
- 11,有馬一貴,金子将之,村上隆史,杉村博,一色正男"HEMS 継続利用のための節電支援ツールの開発",第77回情報処理学会全国大会 4V-04,p2,March 2015,(口頭発表)
- 12,金子将之,波多野匠,村上隆史,杉村博,一色正男 "快適な目覚めをサポートする家電製品連携システムの開発",第77回情報処理学会全国大会5V-03,p2,March 2015, (口頭発表)

- 13, 杉村博, 三栖貴行, 山崎洋一, 笹川雄司, 藤田裕之, 関家一雄, 村上隆史, 一色正男, "HFMS 開発者教育用コンテンツの開発と教育の実施" IT を採用した教育シンポジウム 2014 講演論
- " HEMS 開発者教育用コンテンツの開発と教育の実施", IT を活用した教育シンポジウム 2014, 講演論文集, pp99-102, Vol. 9, Mar 2015
- 14, 杉村博, 三栖貴行, 山崎洋一, 笹川雄司, 藤田裕之, 関家一雄, 村上隆史, 一色正男,
- " コンシューマデバイス開発者育成のための ECHONET Lite 教育コンテンツの開発", 第 12 回 CDS 研究会, Vol. 2015-CDS-12, No. 34, pp. 1-5, Jan 2015
- 15, 岡本健司, 今泉優樹, 斉藤隆児, 湯田和馬, 渡邊亮, 呉天, 横山悠平, 杉村博, 三栖貴行, 一色正男, 今吉秀幸(株式会社ニチベイ), "電動ブラインドによる光環境最適化システムの検討",第29回光源物性とその応用研究会, pp. 20-26, Dec 2014
- 16, 岡本健司, 横山悠平, 呉天, 杉村博, 三栖貴行, 一色正男, 今吉秀幸 "ECHOENT Lite による光環境最適化システムの提案", 照明学会, 光源・照明システム分科会主催公開研究会 pp , 0ct. 2014, 17, 岡本健司, 横山悠平, 斉藤隆児, 湯田和真, 渡邊亮, 呉天, 杉村博, 一色正男, 三栖貴行, "ECHONET Lite による電野ブラインド制御の検討"、 平成 26 年度照明学会会国大会、12-7、Sep
- "ECHONET Lite による電動ブラインド制御の検討", 平成 26 年度照明学会全国大会, 13-7, Sep 2014(ポスター発表).
- 18, 宇佐美真, 三浦喬平、一色正男, "Augmented Reality System to use 3-dimensional Marker for 360-degrees Graphic Rotations Seamlessly in Hand-Motions",情報処理学会 CDS 研究会,No11,p8, Aug 2014,
- 19, 渡部智樹, 高嶋洋一, 杉村博, 一色正男, "Web サービスとマルチデバイスのフレキシブルな連携方式の実現",情報処理学会研究報告"Vol. 2014-CDS-10, No. 14", pp. 1-7, Aug 2014, (ロ頭発表)
- 20, 内海和貴,金子将之,有馬一貴,坂本優大,今泉優樹,三浦翔,杉村博,一色正男, "LINC: 音声及びジェスチャー認識を用いた 住空間情報没入型表示システム",情報処理学会研究報告,Vol. 2014-CDS-10 No. 14, pl-4, May 2014,

付録抜粋論文:[1,4,6,10]を添付する。

以上

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電気的検討と 低損失デバイス構造提案

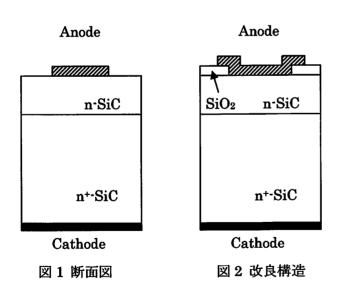
研究者名:所属学科 氏名 電気電子情報工学科 工藤 嗣友

1. 研究の目的

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、高温度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代表的なユニポーラデバイスとしてショットキーダイオード構造を採用したガス検知形構造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ガス検知に大いに期待が持てる。そこで本構造化への可能性を明らかにするために、以下の項目を中心に検討を行った。

- (1) 順方向、逆方向特性の電気的特性の検討
- (2) 低損失化に向けた新構造ダイオードの提案

2. 研究の必要性及び従来の研究



従来 Si 基板を用いたショットキー接合ダイオードセンサは、コスト面で非常に安く従来のプロセスで製作することが出来る。しかし、ショットキーバリアダイオード(以降 SBD)は、順方向電圧降下の低減化のために、センサ側に金属触媒体材料の仕事関数が小さな材料を選択すると、逆方向電流の増加を招き、かつ温度上昇により逆方向電流が増大し熱暴走する問題が有る。図 1 は、簡易型ショットキー接合 4H·SiC ダイオー

ドの断面図を示す。これらの構造は、プロセスが容易かつ逆回復特性時の低損失化が利点 である。

3. 期待される効果

執筆者は、これまで加熱した金属触媒材料を用いて接触分解反応の研究を行ってきた。各材料とも反応性ガス中における電気的特性が異なる特性を突き止め、これらの金属触媒体材料を用いた高温用半導体ガスセンサへの可能性を検討してきた。本研究では、高温用に適した半導体材料として SiC(Silicon Carbide)に注目し、中でも 4H-SiC は他の SiC 結晶と比較し物性値が優れているので採用した。

本研究では、SiC 基板上に金属触媒体材料を堆積させて簡易的な構造で特性評価を行ってきたが逆方向リーク電流が大きく改善する必要性があった。リーク電流の原因には金属を堆積した後の熱処理工程等の複数が考えられる。本研究では、熱処理温度以外の点で、Si系デバイスでも採用されてきたコンタクト面以外の部分にSiO2膜を形成させリーク電流の改善に貢献できた。しかし、酸化膜形成には高温で処理を行うので成膜時にSiCの表面より炭素が出てリーク電流の大きな問題となる。そこで、リーク電流改善に期待が持てる手法としてSiC表面の炭素の制御の処理に期待出来るパイロジェニック酸化を導入した。これは、通常水蒸気(酸素)に水素を混ぜた状態で電気炉に導入する手法で、この装置を有料レンタルし成膜実験を行った。

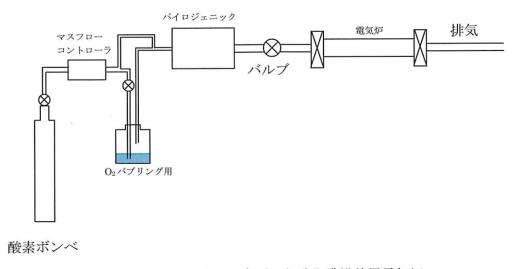


図3 変更した酸化膜堆積用電気炉

4. 研究の経過及び結果

4.1 酸化膜形成実験と逆方向リーク電流特性

本研究では、特性改善を目的としているため、始めに図3で示す酸化装置を用いて4H-SiC 基板での酸化膜形成実験を行った。図4は、酸素の流量を5,sccmと酸素と水素の割合を1:0.2とし電気炉温度1100℃で時間を30~150分の30分ごとにおける酸化膜の堆積結果を示す。最大150分まで行い膜厚測定には、段差測定装置を用いた。堆積結果を見ると、パイロジェニック法を導入するとわずかながら成膜速度が向上していることが確認できた。

さらに、ダイオードの逆方向リーク電流を確認したところ、パイロジェニック法を用いた 場合リーク電流が1桁改善出来たことが確認できた。

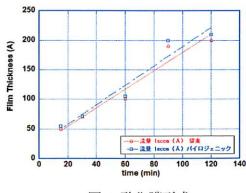


図 4 酸化膜形成

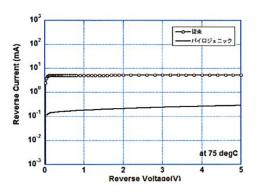


図5 逆方向リーク電流

4.2 新構造の検討

ユニポーラデバイスであるショットキーバリアダイオードは、低オン電圧、高速動作が可能である一方で、高温環境においてパフォーマンスが劣化する問題がある。そこで、本研究では、ショットキーバリアダイオードよりも低損失デバイスの構造を検討し、その構造を図6に示す。このデバイスは、MOS構造を有しユニポーラデバイスとバイポーラデバイスの中間の動作をすることを期待していることから高温時における逆方向リー

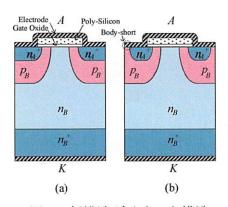


図6 新構造ダイオード構造

ク電流が抑えられことに期待が持てる。この構造は、MOS 構造を有しているがプロセスが簡易であるのが利点である。そこで、この構造の有効性を調べるために、材料を Si に戻し試作とデバイスシミュレータで電気的検討を行った。

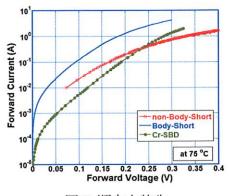


図 7 順方向特生

図7は、図6(a) non-Body-Short 構造と同図 (b)Body-Short 構造の順方向特性と比較用に Crショットキーの結果を示す。図6(a)と Crショットキーは、実際に試作し実測結果を示している。この場合の動作温度は75℃であり、3つのデバイスはほほ同じ活性領域を持つ。また、構造(b)のシミュレーション解析には、SILVACO社のデバイスシミュレータを用いた。この図からボディ短絡型のオン電圧が最も低く、非ボディ短絡

型に比べて、1Aのオン電圧値は約55%程度に低減できることがシミュレーション結果から得られた。

5. 今後の計画

図6の構造をSiで試作し、傾向が出てきたので、これをSiCに材料を変えた場合の電気的特性の検討を行う。ただし、Siとプロセス条件が異なるため以下の項目のプロセス検討を行う。

- ① 2 重拡散プロセスと拡散条件
- ② ゲート電極材料の検討(ポリシリコンゲートから金属材料への変更等)以上を考慮し、低損失型ガスセンサ素子の開発を進めていきたい。

6. 研究成果の発表

- (1) 2014 年 8 月 26 日 東京都足立区 東京電機大学 平成 26 年 電気学会産業応用部門 大会 "ボディ短絡型自己バイアスチャネルダイオードの逆回復特性シミュレーション" 山田、工藤、菅原
- (2) 2014 年 9 月 20 日 北海道札幌市 北海道大学 2014 年 第 75 回応用物理学会学術 講演会 "ボディ短絡型自己バイアスチャネルダイオードの逆回復特性のシミュレーション解析" 山田、工藤、菅原