

愛媛大学社会連携推進機構  
研究成 果 報 告 書

第4号  
(2010)

## 目 次

### 研究成果報告書第4号の発刊にあたって

愛媛大学社会連携推進機構長

林 和 男

### 研究成果報告

白血病に対する新規免疫遺伝子治療の開発と臨床応用 ----- 1

愛媛大学大学院医学系研究科教授  
タカラバイオ株式会社

安川 正貴  
峰野 純一

抗がん剤による副作用評価モデルの構築 ----- 4

愛媛大学大学院医学系研究科教授  
愛媛大学大学院医学系研究科准教授  
味の素株式会社医薬カンパニー医薬研究所  
輸液栄養透析研究所薬理研究室室長  
味の素株式会社医薬カンパニー医薬研究所  
輸液栄養透析研究所薬理研究室主任研究員

荒木 博陽  
末丸 克矢  
堂本 英樹  
梶原 賢太

医薬品化を目指した中和抗体の作製 ----- 7

愛媛大学大学院医学系研究科教授  
株式会社免疫生物研究所

東山 繁樹  
木下 憲明

液中プラズマを利用したCVD新技術に関する研究 ----- 8

愛媛大学大学院理工学研究科教授  
愛媛大学大学院理工学研究科准教授  
愛媛大学大学院理工学研究科准教授  
愛媛大学大学院理工学研究科助教  
株式会社豊田自動織機研究開発センター  
株式会社豊田自動織機研究開発センター  
株式会社豊田自動織機研究開発センター

野村 信福  
豊田 洋通  
山下 浩  
向笠 忍久  
下 傑久  
奥田 真也  
林 秀高

二光子吸収記録再生系のモデル化と信号処理方式の検討 ----- 13

愛媛大学社会連携推進機構特命教授  
愛媛大学大学院理工学研究科教授  
愛媛大学大学院理工学研究科講師  
愛媛大学大学院理工学研究科博士前期課程  
富士フィルム株式会社記録メディア研究所主任研究員  
富士フィルム株式会社記録メディア研究所研究員

大澤 壽  
岡本 好弘  
仲村 泰明  
沖中 一貴  
北原 淑行  
佐々木俊央

超高信頼性チップ製造のためのシグナルインティグリティ不良の  
モデル化およびその故障検査法 ----- 22

愛媛大学大学院理工学研究科教授  
愛媛大学大学院理工学研究科准教授  
株式会社半導体理工学研究センター研究推進室

高橋 寛  
樋上 喜信  
大西 洋一

P S灰造粒砂を用いたコンクリート二次製品の開発 ----- 26

愛媛大学大学院理工学研究科助教  
愛媛大学工学部等技術部機械・環境建設系技術班  
株式会社予州興業環境部主任  
株式会社予州興業専務取締役

木下 尚樹  
川口 隆曉  
松尾 晓  
三好 正忠

高性能光触媒瓦の開発 ----- 29

愛媛大学理工学研究科教授  
愛媛大学工学部技術職員  
愛媛県産業技術研究所窯業技術センター主任研究員  
菊間町窯業協同組合理事長  
菊間町窯業協同組合副理事長  
菊間町窯業協同組合青年部長

田中 寿郎  
岡野 聰  
菅 雅彦  
柚山 一文  
浜田 幹夫  
菊池 陽一郎

ZnO膜のダメージ評価方法の研究 ----- 31

愛媛大学大学院理工学研究科教授  
住友重機械工業株式会社技術本部技術開発センター

白方 祥  
酒見 俊之

パルス駆動による知覚輝度向上効果を用いた  
消費電力半減LED光源システムの実用化 ----- 38

愛媛大学大学院理工学研究科助教  
愛媛大学大学院理工学研究科教授  
Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie,  
University of Toulouse 3  
Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie,  
University of Toulouse 3

本村 英樹  
神野 雅文  
David Buso  
Georges Zissis

四国西部地域に分布する火山灰の研究 ----- 44

愛媛大学大学院理工学研究科教授  
株式会社四国総合研究所土木技術部  
株式会社四国総合研究所土木技術部

榎原 正幸  
池田 倫治  
辻 智大

生物検定法による絶縁油中PCBの簡易定量法 ----- 53

愛媛大学農学部環境先端技術センター副センター長  
京都電子工業株式会社  
株式会社シーズテック

本田 克久  
高木 陽子  
戸井田秀基

魚肉タンパク質摂取による抗肥満効果および筋肉増強効果 ----- 56

愛媛大学農学部准教授  
愛媛大学農学部特定研究員  
愛媛大学大学院農学研究科  
日本水産株式会社生活機能科学研究所研究員

岸田 太郎  
水重 貴文  
魚住 圭佑  
川端 二功

ケールの生理機能評価に関する研究 ----- 63

愛媛大学農学部准教授  
遠赤青汁株式会社  
遠赤青汁株式会社

菅原 卓也  
越智 賢二  
高岡 照海

DNAマーカーを用いたヒラメ形態異常の防除技術の開発 ----- 69

愛媛大学南予水産研究センター准教授  
有限会社まる阿水産生産部開発課

高木 基裕  
澤山英太郎

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系の高度化、高性能化 ----- 73

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター教授  
株式会社セルフリーサイエンス社長

戸澤 譲  
尾澤 哲

高圧下における中性子利用実験の技術開発 ----- 80

愛媛大学地球深部ダイナミクス研究センター教授  
愛媛大学地球深部ダイナミクス研究センター  
G-COE研究員  
独立行政法人日本原子力研究開発機構  
量子ビーム応用研究部門研究推進室室長代理  
独立行政法人日本原子力研究開発機構  
量子ビーム応用研究部門研究副主幹  
独立行政法人日本原子力研究開発機構  
中性子イメージング・分析研究グループ研究副主幹  
独立行政法人日本原子力研究開発機構  
中性子イメージング・分析研究グループ研究副主幹  
独立行政法人日本原子力研究開発機構  
J-PARCセンター研究員  
独立行政法人日本原子力研究開発機構  
量子ビーム応用研究部門研究員

井上 徹  
山田 明寛  
内海 渉  
服部 高典  
酒井 卓郎  
安田 良  
有馬 寛  
佐野亜沙美

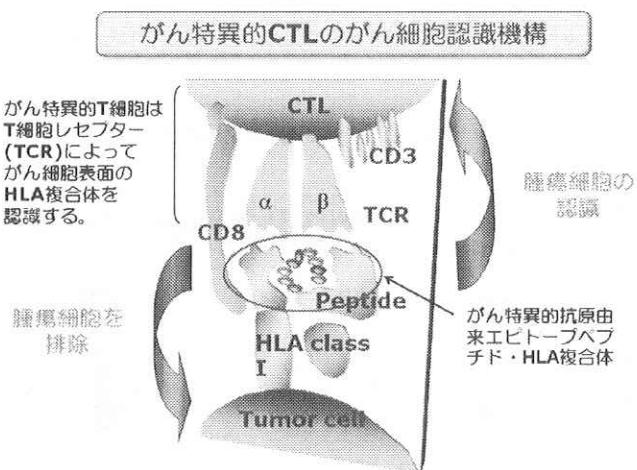
# 白血病に対する新規免疫遺伝子治療の開発と臨床応用

愛媛大学大学院医学系研究科教授 安川正貴  
タカラバイオ株式会社 峰野純一

## 背景

近年、化学療法の進歩や分子標的薬の開発などによって、悪性腫瘍（がん）の治療成績は着実に向 上しているものの、いまだ治癒に至る症例は限られている。動物モデルを用いた基礎的研究成果や同種造血幹細胞移植の臨床的観察から、がんを治癒に導くためには、免疫学的監視機構が重要である事が明らかになってきた。免疫監視機構は様々な免疫担当細胞の相互作用から形成されているが、その中心的役割を担っている細胞は、細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte; CTL）である。このような背景のもと、がん患者体内でがん特異的CTLを誘導する試みがなされている。CTLはT細胞レセプター（T-cell receptor; TCR）によって、がん細胞表面に発現しているHLAクラスI分子とがん細胞に選択的に発現しているタンパク質由来ペプチド（がんペプチド）との複合体を認識して、正常細胞と区別し、がん細胞のみを特異的に殺傷する能力を有している（図1）。

図1. がん特異的CTLのがん細胞認識機構

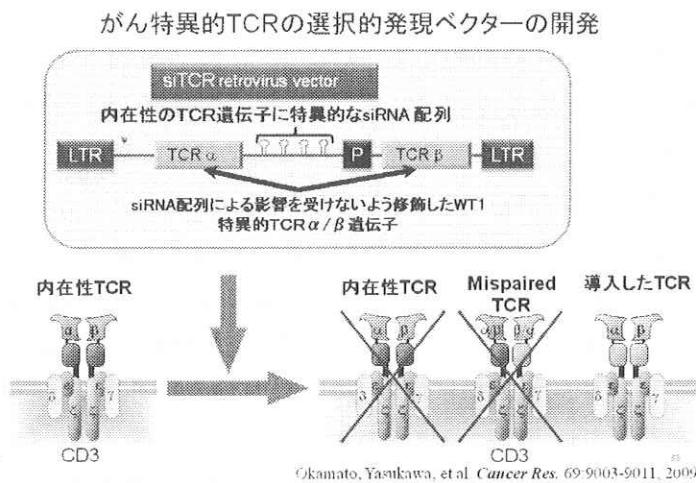


これまでに、CTLを誘導する目的で、がんペプチドやがんペプチドを添加した樹状細胞を接種する免疫療法が開発され、一部の症例で治療効果が得られているものの、その効果は限られており、新たな治療戦略が求められている。上記したように、CTLはTCRでがん細胞を認識するので、がん特異的TCRを遺伝子導入することによってがん特異的CTLが容易にかつ大量に作成できることが考えられる。このようなアイデアのもと、がん特異的TCR遺伝子導入による新規がん免疫療法の開発を行った。

## 方法と結果

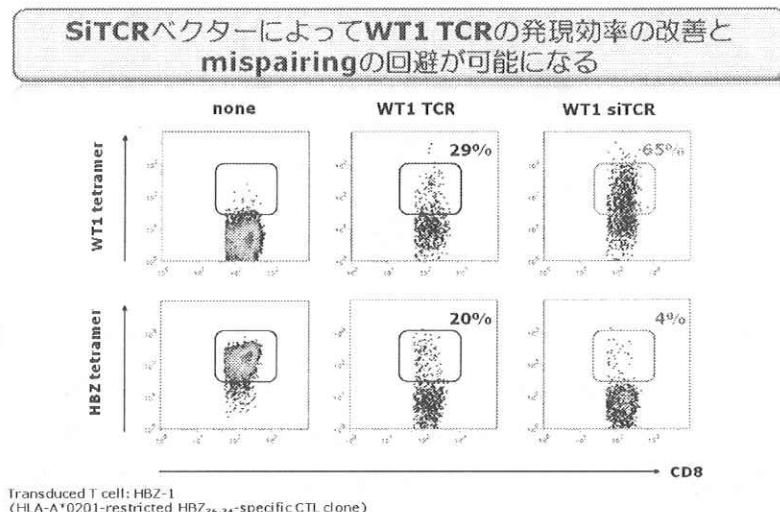
すでに我々が樹立している CTL クローン TAK-1 は、白血病細胞に強く発現している WT1 タンパク質由来ペプチド特異的で、日本人に最も頻度が高い HLA である HLA-A24 拘束性である。またこの CTL クローンの TCR は高い親和性を有している事が判明しているので、TAK-1 から TCR- $\alpha$  および TCR- $\beta$  遺伝子をクローニングした。さらに、これらの TCR 遺伝子発現レトロウイルスベクターを作成した。従来型のレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入すると、成熟 T 細胞が本来発現している TCR とミスペアリングが生じ、その発現効率低下や自己免疫反応性の獲得などが懸念される。そこで、内在性 TCR 発現を抑制する新規レトロウイルス発現ベクターを開発した（図 2）。

図 2. がん特異的 TCR の選択的発現ベクターの開発



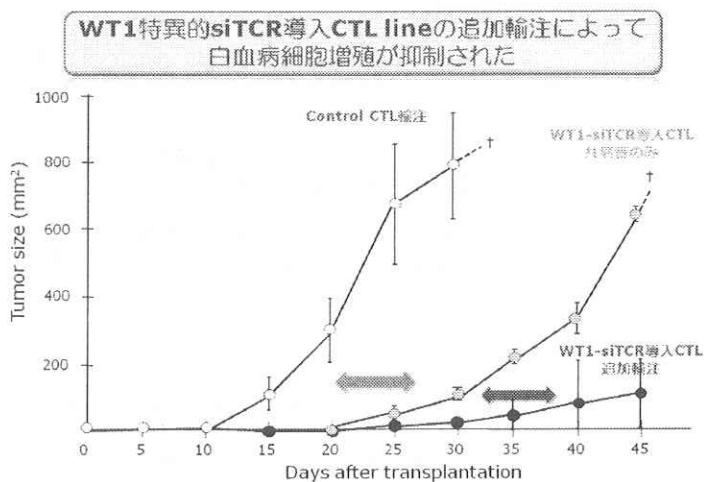
この新規発現ベクターを用いると、従来型ベクターに比べて発現効率が格段に向上去ることが明らかとなった。また、自己免疫などの危険が懸念されるミスペアリングも妨げられることが示された（図 3）。

図 3. 新規 TCR 発現ベクターによる発現効率の向上とミスペアリングの回避



ヒト化マウスの実験系を用いて、in vivo 抗白血病効果を検討したところ、WT1-TCR 遺伝子導入人工 CTL の移入によって、白血病細胞の増殖が著しく抑制される事が明らかとなった（図 4）。

図4. WT1-TCR 遺伝子導入 CTL 移入による in vivo 抗白血病効果



他方、正常の造血幹細胞への障害は全くないことが、in vitro 並びにヒト化マウスを用いた in vivo 実験系でも示された。

### 成果のまとめと将来の展望

本研究によって、従来不可能であった、効率性と安全性に富む、白血病に対する新規免疫遺伝子治療が可能となった。導入する TCR 遺伝子を変えることによって、様々ながんや AIDS などの難治性感染症にも広く応用可能である。これらの基礎研究、前臨床試験研究成果をもとに、現在第Ⅰ相臨床研究を開始すべく、学内審査ならびに厚労省審査を進めている。

# 抗がん剤による副作用評価モデルの構築

愛媛大学大学院医学系研究科教授

荒木博陽

愛媛大学大学院医学系研究科准教授

末丸克矢

味の素株式会社医薬カンパニー医薬研究所  
輸液栄養透析研究所薬理研究室室長

堂本英樹

味の素株式会社医薬カンパニー医薬研究所  
輸液栄養透析研究所薬理研究室主任研究員

梶原賢太

**要約：**ハムスターに抗癌剤（5-FU）を投与することによってがん化学療法剤投与による口内炎モデルを作成した。口内炎の潰瘍面積を指標として検討した結果、臨床現場で良く用いられているポラプレジンク・アルギン酸ナトリウム液で軽度ながら口内炎抑制作用が認められた。従って、本モデルを用いてがん化学療法の口内炎治療に対して有効な候補物質を探索できると考える。

**緒言：**がん治療においては新たな抗がん剤や放射線療法が組み込まれた新規プロトコールの開発が進められているが、薬の副作用に対する治療法の開発は、病気本来の治療法の開発に比べて遅れているのが現状である。口腔粘膜炎（口内炎）はがん化学療法を受ける患者の約30～40%、骨髄移植を受ける患者の80%、頭部または頸部の放射線治療を受ける患者の殆どに発症する。がん治療を受けている患者に口内炎が発症した場合には、患者に多大な自覚的苦痛をもたらすだけでなく、疼痛による食事摂取量の減少やコミュニケーション機能の低下が誘発され、患者のQOLを著しく低下させる因子となっている。しかし、現在、がん治療時の口内炎に対して有効な治療薬剤がなく、局所麻酔薬や鎮痛薬による対症療法が行なわれているのが現状であり、良質ながん療法を遂行するためには口内炎への副作用対策、すなわち口内炎の治療法の開発が必須となっている。

**方法：**5-FU（60 mg/Kg, ip）を2回（Day0およびDay2）投与した雄性シリアンハムスターにワイヤーブラシにより片側のチークポーチを2回ブラッシング（Day1およびDay2）することによってDay3に発症する口内炎モデルを作成した。口内炎評価は潰瘍面積の計測（図1）を行った。

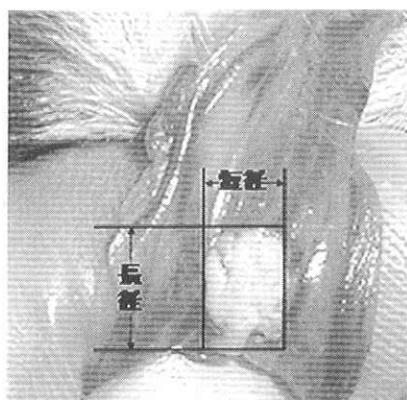


図1 口内炎面積の計測

口内炎治療薬としては、臨床現場で多く用いられているポラプレジンク・アルギン酸ナトリウム液 (PA-S) について検討した。実験では、これを口腔内用外用薬として応用する目的で、軟膏剤として調製した。軟膏を 1 日 1 回、口腔内の口内炎発生箇所に塗布した。なお、本研究は愛媛大学動物実験管理委員会の審査・承認を得て行った。

**結果：**5-FU (60mg/Kg i.p.) を 2 回投与したハムスターのチークポーチをプラッシングすることにより、その翌日(day3)に口内炎が発現した。その後、口内炎面積は経日に縮小し、約 2 週間以内に消失した。この改善過程に対する PA-S の影響を検討した。結果を図 2 に示す。二元配置分析の結果、PA-S 液塗布の要因に有意な差 [ $F_{(1,70)} = 5.301$ ,  $p < 0.05$ ] が認められた。しかし、塗布と投与日数の交互作用には有意な差はみられなかった。Student's *t*-test を用いた比較では、Day9, Day11 および Day13 において saline を塗布した対照群と比較して有意な差が認められた。しかし、Day3 から Day15 までの口内炎総面積 (AUC) に有意差はみられなかった。また、体重の変化にも影響はみられなかった。

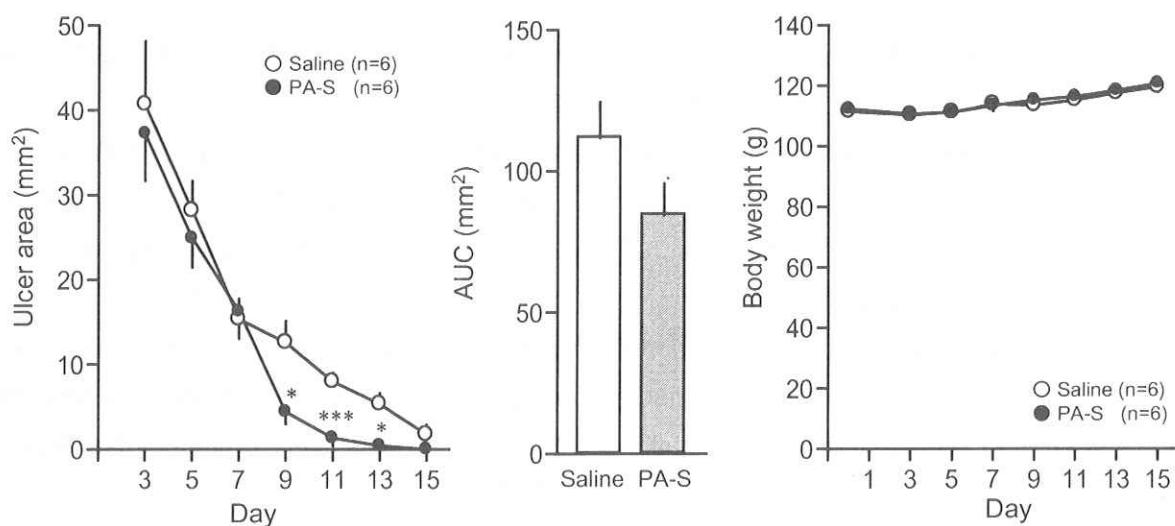


図 2. 5-FU 誘発口内炎に対するポラプレジンク・アルギン酸ナトリウム液の影響

縦軸は口内炎面積、Day3 から Day15 までの口内炎総面積 (AUC) および体重(g)の変化を示した (mean  $\pm$  SEM, n=6)。\*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (two-way ANOVA followed by Student's *t*-test)

**考察：**現在、がん化学療法による口内炎の予防及び治療または疼痛緩和には、氷片を用いた oral cryo-therapy、線維素溶解酵素含有アイスボールなどの他に、アズレンスルホン酸ナトリウム、PA-S あるいはステロイド軟膏などが使用されている。しかし、その治療効果やエビデンスも十分とは言い難い。本研究で 5-FU をハムスターに投与することによって口内炎が発症することを確認した。また、臨床的に用いられている PA-S の効果を確認できた。止血作用を有するアルギン酸ナトリウムや潰瘍治療薬であるポラプレジンクが、放射線治療時に発症する口内炎に対して有効性を示したことが報告されている<sup>1, 2)</sup>。また、両剤を混合調整した PA-S ががん化学療法時の口内炎に対して有効性を示したことが報告されている<sup>3)</sup>。本研究では、ハムスターの口内炎モデルにおいて PA-S の有効性が確認されたことから、本モデルはがん化学療法剤によって発症する副作用の口内炎に対する薬剤のスクリーニング法として用いることができると思われる。ただ、臨床現場でも様々な薬剤の有用性について

は疑問がある。実際今回の結果でも PS-A その治療効果は十分とは言い難く、今後より治療効果を向上した薬剤の開発が望まれる。

現在、keratinocyte growth factor<sup>4, 5)</sup>、interleukin-11<sup>6)</sup>ならびに transforming growth factor-β3<sup>7, 8)</sup>などを作用点とする新しい口内炎治療薬の開発研究が進んでいる。これらの基礎的研究においても、今回検討した 5-FU を投与したハムスターの口内炎モデルの応用が有用であると考えられる。

## 参考文献

- 1) Oshitani T, Okada K, Kushima T, Suematsu T, Obayashi K, Hirata Y, Takada Y, Ishida T, Yoshida M, Narabayashi I, et al. Clinical evaluation of sodium alginate on oral mucositis associated with radiotherapy. Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi. 1990; 25: 1129-1137.
- 2) Fujiwara F, Kamikonya N, Tuboi K, Irie M, Izumi M, Irie T, Fujisawa H, Muro C, Nakao N. Efficacy and safety of polaprezinc as a preventive drug for radiation-induced stomatitis Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi. 2002; 62: 144-150.
- 3) Katayama S, Ohshita J, Sugaya K, Hirano M, Momose Y, Yamamura S. New medicinal treatment for severe gingivostomatitis. Int J Mol Med. 1998; 2: 675-679.
- 4) Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, Gentile T, Weisdorf D, Kewalramani T, Shea T, Yanovich S, Hansen K, Noga S, McCarty J, LeMaistre CF, Sung EC, Blazar BR, Elhardt D, Chen MG, Emmanouilides C. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. N Engl J Med. 2004; 351: 2590-2598.
- 5) Freytes CO, Ratanatharathorn V, Taylor C, Abboud C, Chesson N, Restrepo A, Arango J, Odenheimer D. Phase I/II randomized trial evaluating the safety and clinical effects of repifermin administered to reduce mucositis in patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. Clin Cancer Res. 2004; 10: 8318-8324.
- 6) Sonis ST, Van Vugt AG, McDonald J, Dotoli E, Schwertschlag U, Szklut P, Keith J. Mitigating effects of interleukin 11 on consecutive courses of 5-fluorouracil-induced ulcerative mucositis in hamsters. Cytokine. 1997; 9: 605-612.
- 7) Sonis ST, Van Vugt AG, Brien JP, Muska AD, Bruskin AM, Rose A, Haley JD. Transforming growth factor-beta 3 mediated modulation of cell cycling and attenuation of 5-fluorouracil induced oral mucositis. Oral Oncol. 1997; 33: 47-54.
- 8) McCormack ES, Borzillo GV, Ambrosino C, Mak G, Hamblet L, Qu GY, Haley JD. Transforming growth factor-beta3 protection of epithelial cells from cycle-selective chemotherapy in vitro. Biochem Pharmacol. 1997; 53: 1149-1159.

# 医薬品化を目指した中和抗体の作製

愛媛大学大学院医学系研究科教授

東山繁樹

株式会社免疫生物研究所

木下憲明

近年、疾患を引き起こす原因分子を同定し、その分子を標的として治療を行う分子標的治療法が有効な治療手段となってきている。癌治療においては、細胞増殖制御の鍵分子である蛋白質リン酸化酵素を標的とした阻害剤の開発が進み、そのいくつかは既に有効な治療薬として使用されている。細胞膜表面に貫通する膜蛋白質で細胞内領域に蛋白質リン酸化酵素活性をもつ細胞増殖因子受容体は、多くの癌細胞でその発現量の増大、または恒常的活性化が認められ、癌治療の標的分子の候補となっている。細胞増殖因子受容体の阻害剤としては、特異性の点から中和抗体が有力な候補となる。昨今、ヒト化抗体開発等の技術の進歩と相まって、抗体医薬が注目されている。我々はこれまでに、細胞増殖因子受容体細胞外領域を免疫グロブリンFc領域に融合したリコンビナント蛋白質を产生し、これを抗原として用いることで、中和活性をもつ抗体産生の効率が飛躍的に高まるこことを明らかにしてきた。この技術を用いて、癌細胞および腫瘍血管細胞で治療標的分子として考えられる4種の細胞増殖因子受容体に対する中和活性をもつ抗体の作製を試み、3種の開発に成功した。

以下に、抗体名とその特性を示した。

## **Anti-Human PDGFR $\beta$ (22B1) Mouse IgG MoAb**

本モノクローナル抗体は、ウエスタン ブロッティング、免疫沈降試験により、PDGFR  $\beta$  を認識し、PDGFR  $\beta$  発現細胞に対する FACS 解析も可能ある。また、本抗体の添加によって、リガンド結合に依存的な PDGFR  $\beta$  のリン酸化が誘導されないことを確認し、中和抗体として使用できる。

## **Anti-Human c-Kit (12A8) Mouse IgG MoAb**

本モノクローナル抗体は、ウエスタン ブロッティング、免疫沈降試験により、c-Kit を認識し、c-Kit 発現細胞に対する FACS 解析も可能ある。また、本抗体の添加によって、リガンド結合に依存的な c-Kit のリン酸化が誘導されないことを確認し、中和抗体として使用できる。

## **Anti-Human KDR (23B31) Mouse IgG MoAb**

本モノクローナル抗体は、ウエスタン ブロッティング、免疫沈降試験により、KDR を認識し、KDR 発現細胞に対する FACS 解析も可能ある。また、本抗体の添加によって、リガンド結合に依存的な KDR のリン酸化が誘導されないことを確認し、中和抗体として使用できる。

# 液中プラズマを利用したCVD新技術に関する研究

愛媛大学大学院理工学研究科教授

野 村 信 福

愛媛大学大学院理工学研究科准教授

豊 田 洋 通

愛媛大学大学院理工学研究科准教授

山 下 浩

愛媛大学大学院理工学研究科助教

向 笠 忍

株式会社豊田自動織機研究開発センター

下 俊 久

株式会社豊田自動織機研究開発センター

奥 田 真 也

株式会社豊田自動織機研究開発センター

林 秀 高

## 1. はじめに

ダイヤモンドライクカーボン(DLC : Diamond-like Carbon)は、アモルファス炭素の中でも特に  $sp_3$  混成軌道結合した炭素を多く含む、不規則構造からなる準安定的な硬質アモルファス炭素である。DLCは高硬度、低摩擦係数、平滑性、ガスバリア性などの多くの優れた性質を有する高機能膜である。この各性質を利用して工具やペットボトルなどの様々な製品に利用されている。

一般的に DLC 膜の生成は低圧力下での気相プラズマ CVD 法を用いて行われるが、生成速度が遅いなどの問題がある。

一方、液中プラズマは液体中の気泡の中にプラズマを発生させる技術である。すでに、ダイヤモンド成膜やカーボンナノチューブの合成、有機溶媒からの燃料ガスの生成、水処置技術などに適用され、一定の成果をあげてきている<sup>1-3)</sup>。特に、液中プラズマ法を化学蒸着(CVD)技術として利用すれば、気相プラズマ CVD 法よりも原料密度の高い液体内で成膜を行うため、プラスチックなどの耐熱性の低い材料への高速成膜が期待できる。

液中プラズマ法による DLC の成膜実験では、1mm×43mm の放電面積を持つ電極を使って、40mm×50mm の領域に DLC 膜を成膜でき、成膜速度が  $1.5 \times 10^{-2} (\text{mm}^3/\text{s})$  であることが明らかにされた<sup>4)</sup>。しかし、高周波液中プラズマの異常放電による放電痕によって膜質が悪く、生成膜の硬度が低下するという問題が露呈していた<sup>4)</sup>。本研究ではこの基板への放電による損傷を軽減させる目的で、電極に工夫を施し、高周波液中プラズマによる DLC 膜の生成実験を実施したので報告する。

## 2. 高周波液中プラズマ実験

実験装置の概略図を図 1 に示す。実験装置は周波数 27.12MHz の高周波電源、整合器、反応容器、アスピレーターから構成されている。反応容器は内径 92mm、外径 100mm、高さ 95mm の石英ガラス容器を使用した。反応容器下部からタンゲステン電極を挿入し、その電極から 27.12MHz の高周波を反応容器内部に照射し、液中プラズマを発生させる。電極には  $\phi 3\text{mm}$  のタンゲステン丸棒を用いた。この電極先端部は半球状に加工されている。電極側面を石英ガラスで覆うことにより、溶液と電極との接触面積が少なくなり、高い電場を電極先端に集中させることができる。DLC を蒸着させる基板は p 型のシリコン(Si)基板を用いた。溶液には特級メタノール(メタノール純度 99.8%)を使用した。反応炉内部の圧力はアスピレーターとバルブを用いて調整し、所定の圧力条件で実験することができる。本実験では電極-基板間距離  $d$  を 1mm とし、反応炉内の圧力を変化させて成膜実験行った。各圧力条件下で、高周波の反射電力が可能な限り零になるように回路の整合をとり、電極先端でプラズマを発生させる。高周波の入力電力と反射電力の差は記録され、これを電気出力として記録した。本実験範囲での反射電力の最大値は 5W 以下であった。各実験にて生成された薄膜は走査型電子顕微鏡(SEM)、集束イオンビーム(FIB)装置、ラマン分光器にて評価を行った。

容器内圧力 20kPa、電極-基板間距離  $d=1.0\text{mm}$  の時に生成された薄膜の SEM 画像と FIB 画像を図 2、図 3 にそれぞれ示す。SEM、FIB 画像から薄膜表面は凸凹しており、膜中にボイド(膜中に発生する空孔)が確認された。また、FIB 画像から Si 基板と生成膜との界面(図 3 の黒線)が波うっており、高周波液中プラズマによって、Si 基板が損傷していることがわかる。

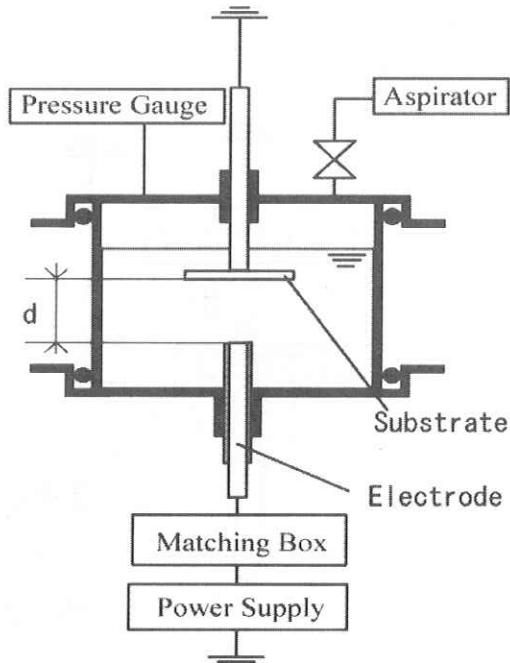


図 1 実験装置

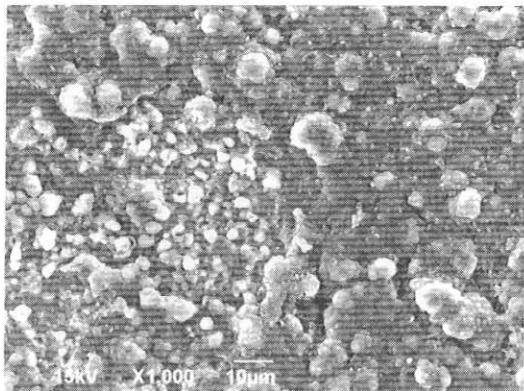


図 2 蒸着された DLC 膜の SEM 画像

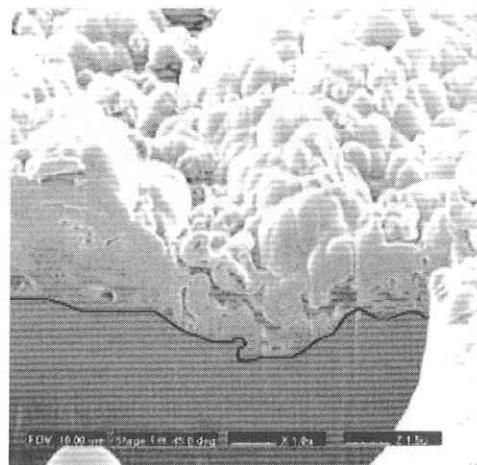


図 3 DLC 膜の FIB 画像

### 3. 補助電極を用いた薄膜生成実験

**金属キャップ型電極** 電子やイオンの基板への衝突を緩和させるために、電極先端に補助電極を設置し、成膜への効果を調べた。補助電極には、中心に穴が開いた銅製の金属キャップを作成し、電極の先端にこれを被せた。本実験で使用した電極の概略図を図 4 に示す。実験装置は電極の構成を除いては図 1 の高周波液中プラズマ実験と同じである。図中の  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  は電極-補助電極間距離、基板-補助電極間距離、補助電極中心の穴径とし、各パラメータを変化させ薄膜生成実験を行った。 $d_1=1.0\text{mm}$ ,  $d_2=1.0\text{mm}$ ,  $d_3=1.0\text{mm}$  で作成された薄膜の SEM 画像と FIB 画像を図 5 に示す。また、 $d_1=1.0\text{mm}$ ,  $d_2=1.0\text{mm}$ ,  $d_3=1.0$ , 1.5, 2.0 mm で作成された薄膜の FIB 画像を図 6 に示す。補助電極を被せると、従来の液中プラズマでの成膜時に確認されていた基板と薄膜界面の波うちが無くなり、基板の損傷が改善されることが確認された。また、金属キャップの穴径  $d_3$  が大きくなると基板がプラズマにさらされる領域が広がるため、生成される薄膜面積が広がるが、 $d_3=2.0\text{mm}$  の時に基板の損傷が発生する。これは  $d_3$  が大きくなると電極先端と補助電極の穴の縁との距離と電極と基板間の距離の差が少なくなるため、補助電極に回避していた放電が基板に移るためであると考えられる。

また、FIB 画像から生成された薄膜は粒子が集まって形成された膜の様であり、膜中には多数のボイドが確認された。

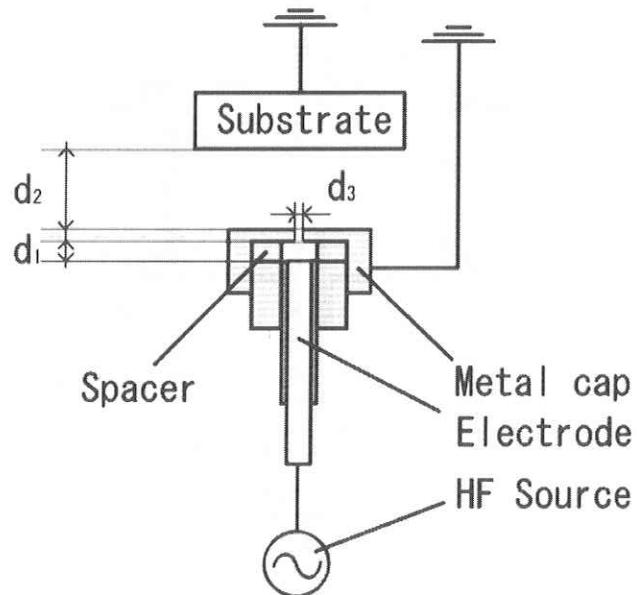


図4 電極前方に補助電極を設置（金属キャップ型電極）

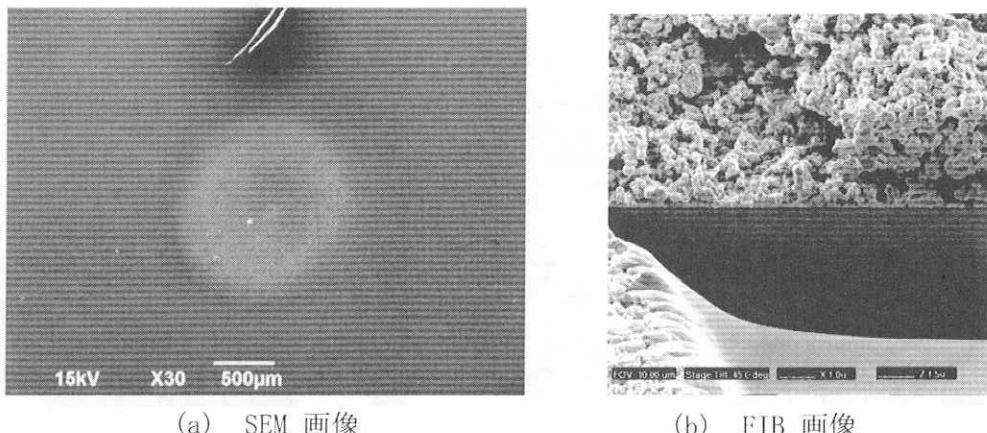


図5 補助電極設置によって得られた DLC 膜,  $d_1=1.0\text{mm}$ ,  $d_2=1.0\text{mm}$ ,  $d_3=1.0\text{m}$

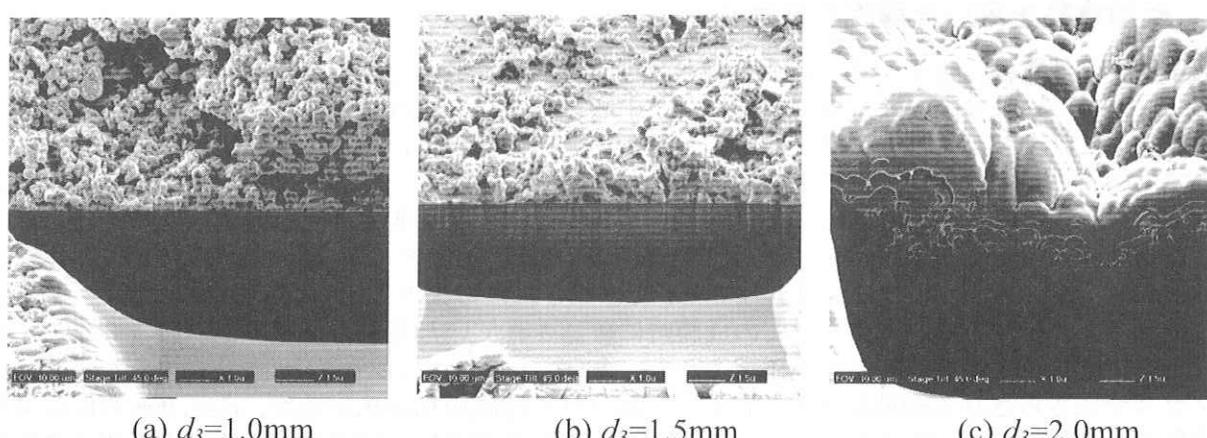


図6 DLC 膜の FIB 写真,  $d_1=1.0\text{mm}$ ,  $d_2=1.0\text{mm}$

**金属メッシュの設置** 金属キャップ型の補助電極では  $d_3$  の穴径によって成膜面積が制限されるので生成される薄膜の面積が狭くなる。そこで、図7に示すように、電極側ではなく、基板側に金属メッシュを設置し、これに補助電極として成膜実験を行った。図中の  $d_1$ ,  $d_2$  は電極-補助電極間距離、基板-補助電極間距離である。各距離とメッシュの種類を変更して成膜実験を行った。最も均質な膜が得られた  $d_1=1.0\text{mm}$ ,  $d_2=0\text{mm}$  の時の結果を図8(a)~(c)に示す。金属メッシュにはタングステンメッシュ(メッシュ線径  $\phi 0.03\text{mm}$ , 80mesh)を用いた。 $d_2=0\text{mm}$  なので、金属メッシュと基板は直接接触している。SEM 画像から、薄膜には複数のセグメント状の膜が生成されていることが分かる。また FIB 画像からは基板と薄膜の界面に波打ちはなく、金属キャップを補助電極に用いた場合と同様に基板の損傷を回避できるということがわかった。また、距離を変化させても金属キャップを用いた場合とは異なり、膜中にはボイドがほとんど確認できず、緻密な膜が生成されていた。 $d_2=0\text{mm}$  の距離を変化させた結果、 $d_2 \leq 1.0\text{mm}$  の時、生成膜にはボイドなどが存在したが、緻密な膜が得られた。また、 $d_2 > 1.0\text{mm}$  では、均質な膜が得られなかった。

メッシュのセグメントの大きさ、線径、材質などのメッシュの種類を変更した場合、生成された薄膜のセグメントの大きさに変化があり、メッシュの線径が太くなると綺麗なセグメント状の薄膜が生成されなかつた。これはメッシュの線径が太くなる事で、メッシュの線と基板との間に隙間が発生しやすくなり、その隙間に膜が生成されるためだと考えられる。セグメントの大きさなどの変化以外はメッシュの種類による大きな変化は見られなかつた。図8では DLC のラマンスペクトルも出ているため、金属メッシュを使用しても、DLC 膜の生成への影響は無いものと考えられる。

今回の実験で2種類の補助電極を用いて薄膜生成実験を行った結果、生成される薄膜の傾向に違いが見られた。金属キャップを用いた場合は、数  $\mu\text{m}$  程度の粒子状堆積膜が形成され、膜内に多数のボイドが見られる。一方、金属メッシュを用いた場合は緻密な膜が形成される傾向である。補助電極を用いて生成された薄膜が、粒子状堆積膜か、緻密な膜になるかの大きな要因は電極先端、補助電極、基板の各距離で決定される。

液中プラズマは電極先端からエネルギーが供給されており、電極先端から補助電極までは電極からのエネルギー供給があるため高エネルギーのプラズマであるが、補助電極を越えるとエネルギーの供給がほぼ無くなり、減衰した低エネルギーのプラズマになる。その結果、基板から離れたところで薄膜の成分が重合し始め、基板に付着するので、粒子の集まりのような薄膜が生成される。金属メッシュなどの緻密な膜が生成される場合は補助電極と基板の距離が直近であり、エネルギーの減衰が少なく、基板付近で原料の分解と蒸着が行われ、緻密な薄膜が形成されたと考えられる。

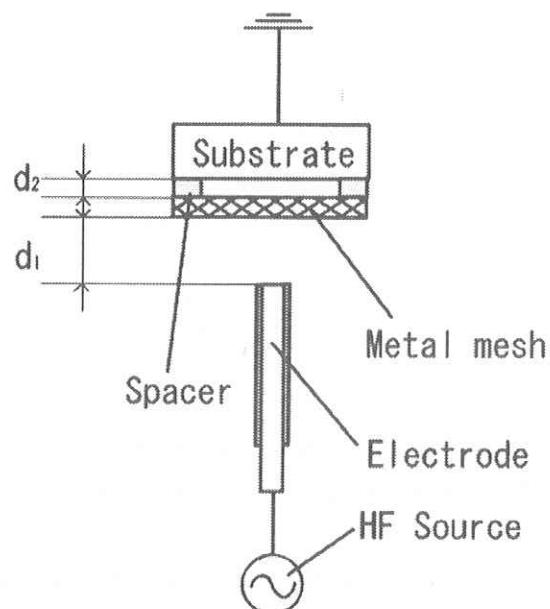
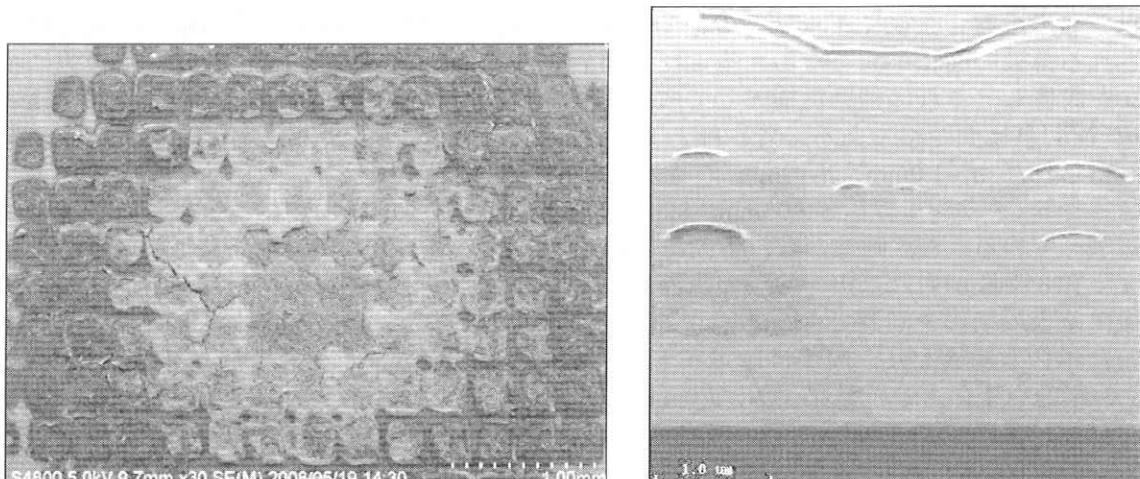
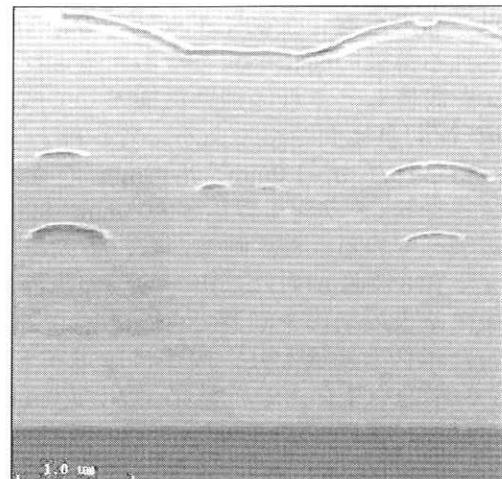


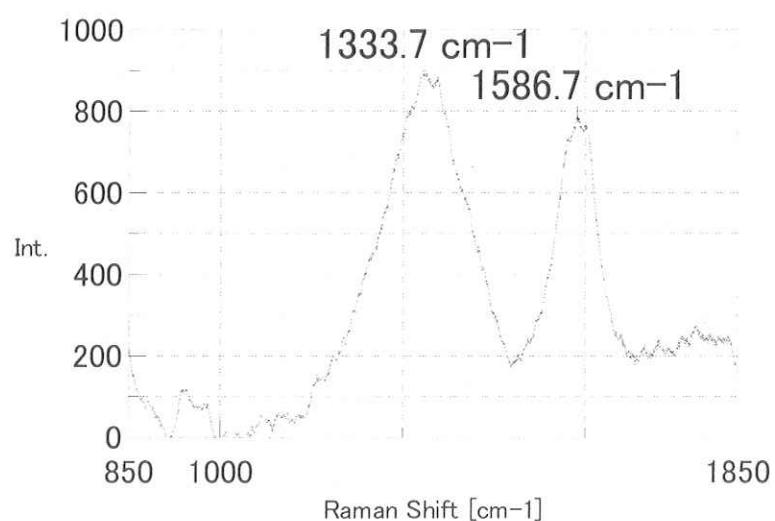
図7 基盤前方に金属メッシュを設置



(a) SEM 画像



(b) FIB 画像



(a) ラマン分光結果

図8 基盤前方にメッシュを設置することによって得られた DLC 膜,  $d_1=1.0\text{mm}$ ,  $d_2=0\text{mm}$

## 5. まとめ

本研究において、2種類の補助電極を作成し、高周波液中プラズマによる薄膜生成実験を行い、以下の結果を得た。

- ・補助電極を用いると基板の損傷を回避することが可能である。
- ・成膜時における電極、補助電極、基板の各距離は生成される薄膜に対して影響を与える。
- ・基板と補助電極の距離が近くなると緻密な膜が生成できる。

## 参考文献

- [1] H. Toyota, S. Nomura, S. Mukasa, Y. Takahashi, S. Okuda, Diamond Relat. Mater., **19** (2010) 418.
- [2] S. Nomura, H. Toyota, T. Maehara, S. Mukasa, H. Yamashita, and M. Kuramoto: Appl. Phys. Lett. **88** (2006) 211503-1.
- [3] S. Nomura, H. Toyota, S. Mukasa, H. Yamashita, T. Maehara, A. Kawashima, J. Appl. Phys., **106**, (2009) 073306.
- [4] 野村信福,他 6名, 愛媛大学社会連携推進機構研究成果報告, 第2号, (2008) 96.

# 二光子吸収記録再生系のモデル化と信号処理方式の検討

愛媛大学社会連携推進機構特命教授

大澤壽

愛媛大学大学院理工学研究科教授

岡本好弘

愛媛大学大学院理工学研究科講師

仲村泰明

愛媛大学大学院理工学研究科博士前期課程

沖中一貴

富士フイルム株式会社記録メディア研究所主任研究員

北原淑行

富士フイルム株式会社記録メディア研究所研究員

佐々木俊央

## 1. はじめに

光ディスクの高密度化、大容量化の要望に応えるために、ディスクの厚み方向への多層記録が可能な二光子吸収記録[1]が検討されている。二光子吸収記録により高密度化を実現するためには、二光子吸収記録に適した信号処理方式の開発が必要である。そこで、この検討に必要な記録再生系を孤立マーク再生波形によりモデル化し、記録再生系モデルを用いて、2値の記録データに対する再生波形、記録マークの拡大・縮小などによる媒体雑音について検討する。さらに、PRML(partial response maximum likelihood)方式の性能評価を行う。

## 2. 孤立マーク再生波形

本検討では、記録過程及び再生過程において同一のレーザを用いることとし、レーザの光強度分布  $I(x, y)$  を次式のガウス分布と仮定する。

$$I(x, y) = \exp \left[ -\frac{2(x^2 + y^2)}{(d/2)^2} \right] \quad (1)$$

ここで、 $x, y$  はビームの中心から、ダウントラック方向、クロストラック方向の位置をそれぞれ表す。また、ビーム直径  $d$  はレーザ波長  $\lambda$  と対物レンズの開口数 NA(numerical aperture) により  $0.82\lambda/NA$ [2] で与えられる。ここで、 $\lambda, NA$  を BD(Blu-ray Disc) と同一の  $\lambda = 405\text{nm}$ ,  $NA=0.85$  とすると  $d = 0.39\mu\text{m}$  となる。したがって、レーザビームプロファイルは図1のようになる。

記録過程では、記録レーザのレーザ光が記録媒体に照射され蛍光色素が媒体内に形成される。記録レーザ光強度が低い場合、媒体には蛍光色素が形成されない。そこで本検討では、次式で定義する記録感度曲線を導入する。

$$FD_C(PW_{rec}) = \begin{cases} 0, & 0 \leq PW_{rec} \leq 0.2 \\ 1.25PW_{rec} - 0.25, & 0.2 < PW_{rec} \leq 1 \end{cases} \quad (2)$$

ここで、 $PW_{rec}$  は最大強度で規格化した規格化光強度、 $FD_C(PW_{rec})$  は最大蛍光色素濃度で規格化した蛍光色素濃度とし、媒体上に形成される蛍光色素濃度分布をマークプロファイルと定義する。

図2に、式(2)の記録感度曲線を示す。図のように、本検討では規格化光強度  $PW_{rec}$  が 0.2 以下の場合は蛍光色素が形成されず、0.2を超えると  $PW_{rec}$  に比例して蛍光色素濃度が増加すると仮定している。図3に、再生過程における蛍光発光の条件を示す。但し、記録マークと励起レーザスポットを、それぞれ黒色円と白色円で示す。図の(a)の状態では、記録マークと励起レーザスポットが重なっていないため蛍光量は0となる。一方、図の(b)の状態では、記録マークと励起レーザスポットが重なっているため、式(2)に従って蛍光発光する。ここで、再生過程で発光する蛍光量を次式で定義する。

$$FD(t) = \iint_{overlap} f(x, y, t) \cdot g(x - \xi, y - \eta, t) d\xi d\eta \quad (3)$$

但し,  $FD(t)$ ,  $f(x, y, t)$ ,  $g(x - \xi, y - \eta, t)$  は時刻  $t$  における蛍光量, レーザビームプロファイル, マークプロファイルをそれぞれ表しており,  $\xi, \eta$  は位置に関する変数, 図 3 で示した記録マークと励起レーザスポットが重なる領域 *overlap* を定義すると, 任意の時刻  $t$  における蛍光量は記録マークと励起レーザスポットが重なる領域のたたみ込み積分で表すことができる. 従って, マークプロファイルの中心と励起ビームプロファイルの中心が重なるとき, 孤立マークからの蛍光量は最大となる. 蛍光は光検出器で電圧に変換される. 但し, 蛍光量から電圧への変換は線形と仮定する. 図 4 に, 孤立記録マークに対する二光子吸収記録再生系の応答である孤立マーク再生波形を示す. 但し, BD と同一のレーザを仮定しているため,  $d = 0.39\mu\text{m}$  となる. 図中の  $A$ ,  $PW_{50}$  は孤立マーク再生波形のピーク値, 孤立マーク再生波形の半値全幅をそれぞれ表している. ここで, 規格化線密度  $K$  を  $PW_{50}$  と  $T_b$  を用いて次式で定義する.

$$K = \frac{PW_{50}}{T_b} \quad (4)$$

但し,  $T_b$  はビット長  $L_b$  を時間表記したビット間隔を表している.  $L_b = d$  とすると,  $K = 0.72$  となる. また, 本検討で用いる孤立マーク再生波形は, 図のような正の電圧を持つ波形となる.

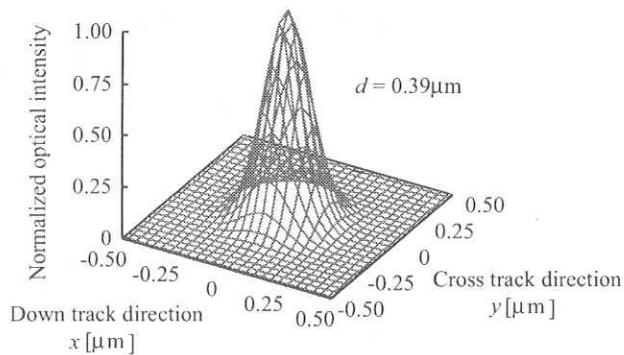


図 1 記録レーザビームプロファイル

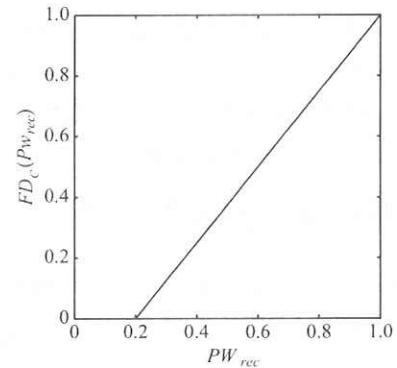


図 2 記録感度曲線

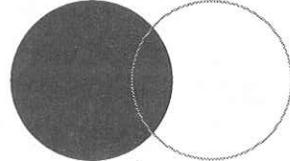
Fluorochrome

Exciting light



(a) 蛍光発光しない場合

Fluorochrome Exciting light



(b) 蛍光発光する場合

図 3 萤光発光の条件

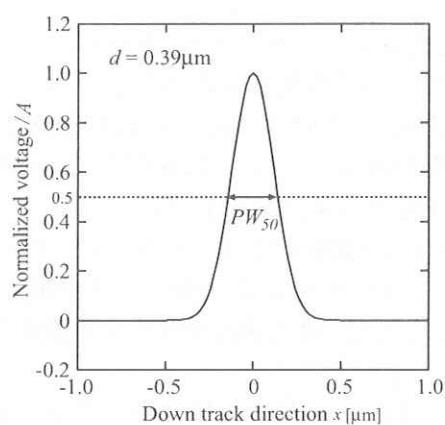


図 4 孤立マーク再生波形

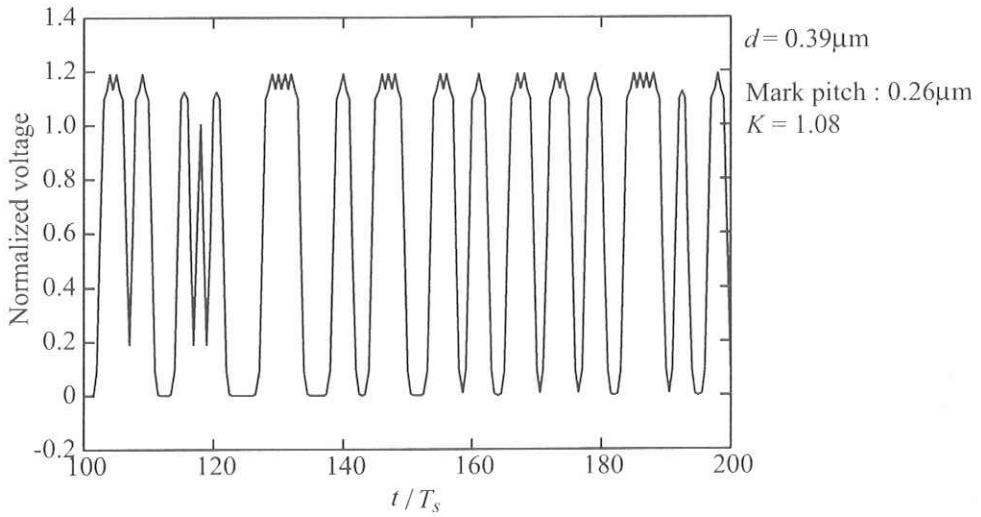


図 5 再生波形

### 3. 再生波形

二光子吸収記録再生波形に対して信号処理を行うためには、光信号ではなく電気信号が必要である。以下では、記録データに対して再生時に媒体から発光される蛍光を光検出器で電気信号に変換した再生波形を算出する。また、BD や DVD(digital versatile disc) で用いられている記録符号に近い(1,7)RLL(run-length-limited) 符号 [4] を用いることを前提としてシステムを考える。(1,7)RLL 符号は、符号化率が 0.667 となるため実際の記録では、マークピッチが  $0.26\mu\text{m}$ ,  $K = 1.08$  となる。ここで、再生波形を算出するにあたり、前提条件として重畠の理が成り立つものとする。

図 5 に、記録マークピッチが  $0.26\mu\text{m}$  とした場合の再生波形の例を示す。ここで、記録再生条件を  $K = 1.08$  としている。図より、孤立再生波形では最大規格化振幅が 1 であったにも関わらず、隣接するマークの影響を受けて 1 を超える再生振幅となっている。

### 4. 媒体雑音モデル

本検討では、記録レーザの照射時間のばらつきによる記録マーク径変動および、ビームの位置決め精度による記録マーク位置変動により生じる振幅変動を媒体雑音とする。図 6 に、記録マーク変動について示す。図中の実線、破線は基準のマーク、変動したマークをそれぞれ示している。図のようにマーク変動として、マーク径変動とマーク位置変動を考え、形状は円形から変化しないものと仮定している。また、マーク径変動は基準のマーク径で規格化した標準偏差  $\sigma_D$  のガウス分布に従い、マーク位置変動は、符号化率を考慮したシンボル間隔  $T_s$  で規格化した標準偏差  $\sigma_P$  のガウス分布に従い、変動すると仮定する。

図 7 に、記録マーク径変動の影響だけを受けた再生波形を示す。図の(a), (b) は、記録マーク径が、基準径より 0.95, 1.05 倍だけ変化した場合の孤立マーク再生波形とマーク径変動の影響を受けた雑音波形をそれぞれ示している。但し、記録再生条件を図 4 と同一としている。図中の破線、点線、実線は、基準となる孤立マーク波形、マーク径変動の影響を受けた孤立マーク波形、雑音波形を示している。図より、記録マーク径が大きくなれば孤立マーク再生波形の振幅が大となり、小さくなれば振幅が小となる。そのため、雑音波形は、正または負の単峰波形となることがわかる。また、図 8 に、特定の記録データに対する再生波形を示す。図中の点線、実線は再生波形、マーク径変動を含んだ再生波形を表している。但し、 $\sigma_D = 0.01$  としている。また、図 9 に、マーク径変動した再生波形から基準の再生波形を引いた雑音波形を示す。図より、記録マーク径変動による雑音は、図 7 で示した雑音波形の連なりであることがわ

かる。

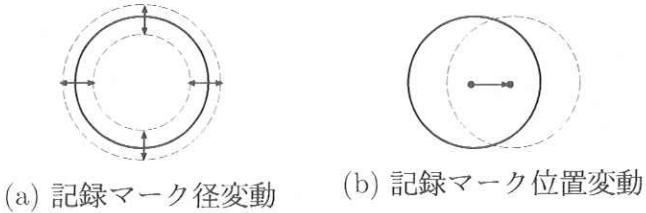


図 6 記録マーク変動の様子

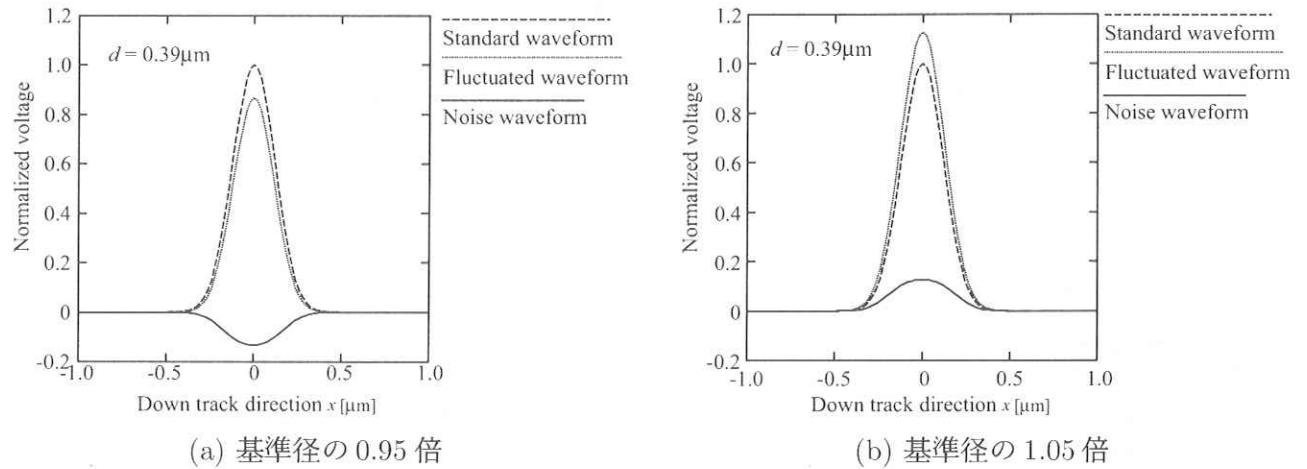


図 7 記録マーク径変動

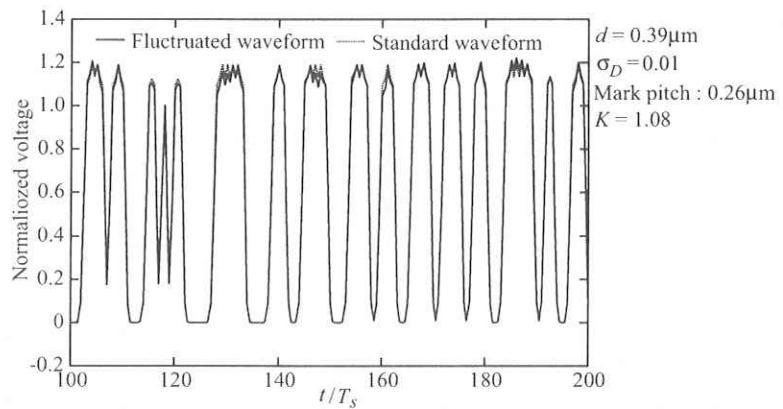


図 8 記録マーク径変動を考慮した再生波形

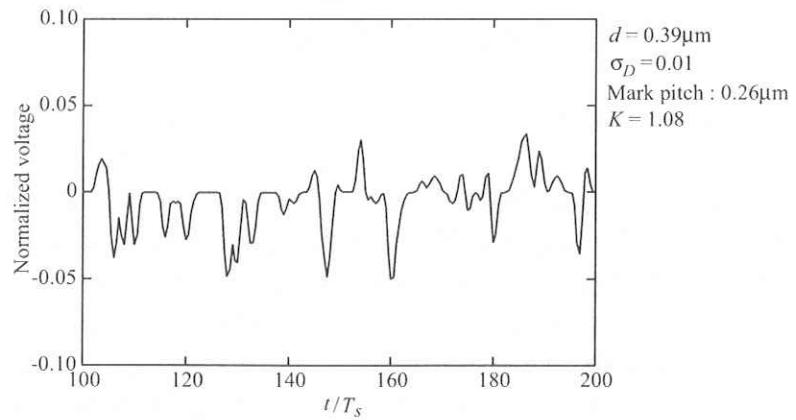


図 9 記録マーク径変動による雑音波形

図 10 に、記録マークが目標の記録位置より  $0.02\mu\text{m}$  だけ後方にずれた場合の孤立マーク再生波形と基準マーク波形とのずれである雑音波形を示す。但し、記録再生条件を図 4 と同一としている。図中の破線、点線、実線は基準の孤立マーク波形、マーク位置変動の影響を受けた孤立マーク波形、雑音波形を示している。図より、記録マーク位置が変動した場合の孤立マーク再生波形は、再生波形の形状はそのまままで位置がずれた波形となり、中心位置よりも前方ではマーク位置変動の影響を受けた波形の振幅が大であるため雑音波形は正となり、後方では小となるため、雑音波形はダイバ尔斯状となることがわかる。また、図 11 に、特定の記録データに対する再生波形を示す。図中の点線、実線は基準の再生波形、マーク位置変動を含んだ再生波形を表している。但し、 $\sigma_p = 0.01$  としている。また、図 12 に、雑音波形を示す。図より、記録マークの位置変動による雑音は、マーク径変動雑音の場合と同様に、図 10 の雑音波形の連なりであることがわかる。

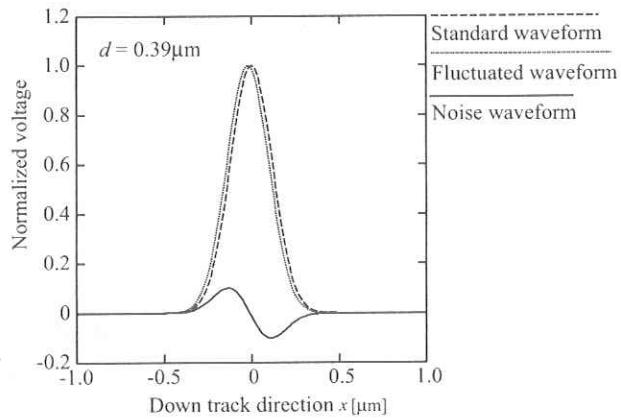


図 10 記録マーク位置が  $0.02\mu\text{m}$  ずれた場合

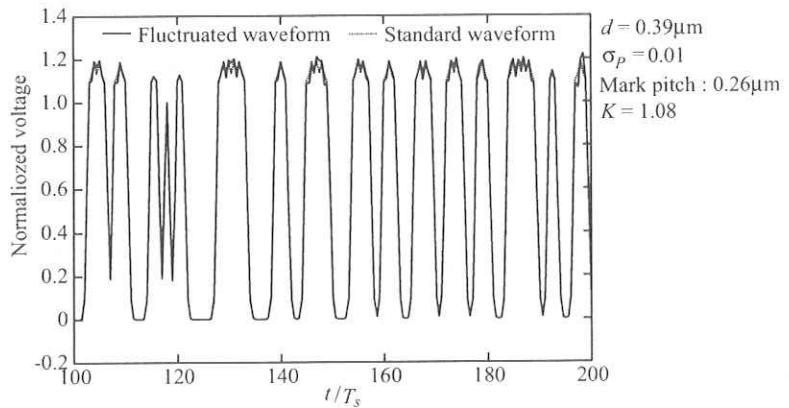


図 11 記録マーク位置変動を考慮した再生波形

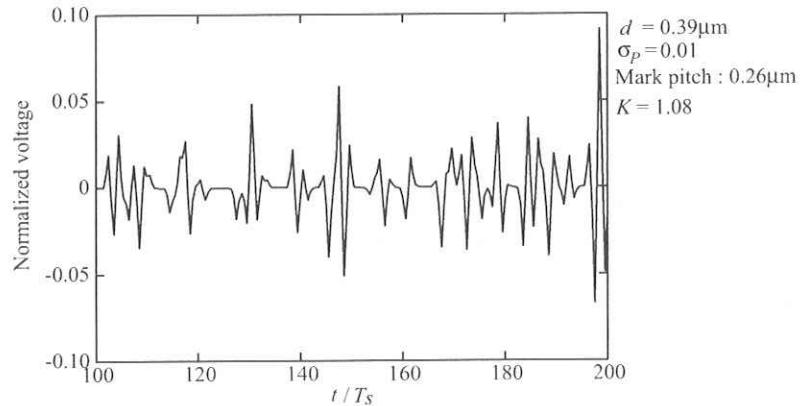


図 12 記録マーク位置変動による雑音波形

## 5. 性能評価

図13に、本検討で用いる記録再生系ブロック図を示す。入力データ系列は、(1, 7)RLL符号器により符号化され、1ビット遅延のプリコーダを介して記録系列となる。記録系列は、二光子吸収記録再生系に入力され、記録・再生が行われる。再生された蛍光は、光検出器により電気信号に変換されて再生波形となる。再生波形は、ビットレート  $f_b$  で規格化した規格化遮断周波数  $x_h$  のローパスフィルタとタップ数  $N_t$  のトランスポンダーフィルタで構成される等化器により、二光子吸収記録再生系入力から等化器出力までが所望のPR特性となるように波形等化される。等化された再生波形は、ビタビ復号器に入力され、(1,7)RLL符号の制約を考慮したビタビ復号[5]が行われ、更にプリコーダの逆特性を有するポストコーダを介して(1,7)RLL復号器で復号が行われた後、出力データ系列が出力される。そして入力データ系列と出力データ系列を比較することによりBER(bit error rate)を算出する。ここで、読み出し点におけるシステム雑音の実効値  $\sigma_S$  に対するSN比を次式で定義する。

$$\text{SNR}_S = 20 \log_{10} \left( \frac{A}{\sigma_S} \right) \quad [\text{dB}] \quad (5)$$

但し、システム雑音を考慮する帯域を  $f_b$  とし、媒体雑音は、記録系列に依存する非線形雑音のためSN比の定義に含めない。

表1に、シミュレーションの諸条件を示す。シミュレーション条件はBDの記録波長、NAを基準とし、記録マークピッチ、規格化線密度は(1,7)RLL符号の符号化率を考慮して検討している。図14に、読み出し点における記録マーク径変動  $\sigma_D$  または記録マーク位置変動  $\sigma_P$  と最大振幅の二乗で規格化した媒体雑音電力の関係を示す。ここで、媒体雑音はマーク径または位置変動を考慮した再生波形から基準の再生波形を引くことで求めている。図より、各変動に対する雑音は、径変動の方が位置変動に比べて大きいことがわかる。

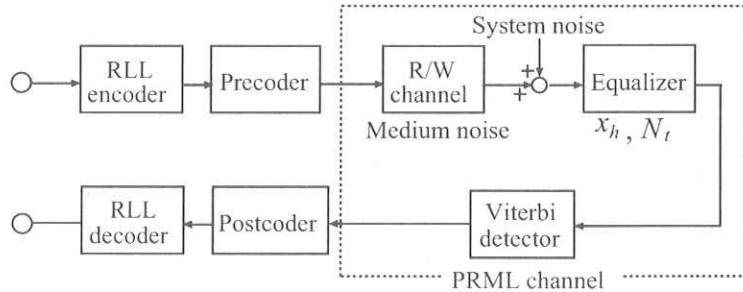


図13 記録再生系ブロック図

表1 諸条件

Recoding code	(1, 7)RLL
Wavelength of laser	$\lambda = 405\text{nm}$
Numerical aperture of objective lens	NA = 0.85
Diameter of laser beam	$d = 0.39\mu\text{m}$
Mark pitch	$0.39\mu\text{m}$
Normalized linear density	0.72
Normalized cut-off frequency of LPF	$x_h = 0.5$
Number of taps of transversal filter	$N_t = 15$

図 15 に、読み出し点において、記録マーク径変動を考慮した場合の最大振幅の二乗で規格化した雑音電力スペクトルを示す。但し、 $\sigma_P = 0.00$ ,  $\text{SNR}_S = 20\text{dB}$  とし、横軸は符号化率を考慮したシンボルビットレート  $f_s$  で規格化している。図中の点線、一点鎖線、実線は、 $\sigma_D = 0.01, 0.03, 0.05$  の場合をそれぞれ示している。図 16 に、記録マーク位置変動を考慮した読み出し点における規格化雑音電力スペクトルを示す。図 15 と同様に、 $\text{SNR}_S = 20\text{dB}$  としている。また、図中の点線、一点鎖線、実線は、 $\sigma_P = 0.01, 0.03, 0.05$  の場合をそれぞれ示している。両図より、読み出し点における、記録マーク径変動雑音は、低域に雑音成分が多く存在していることがわかる。また、記録マーク位置変動雑音は、図 16 のようなダイパルス状の形状であるため、直流分を含まないことがわかる。

図 17 に、記録マーク径変動を考慮した規格化識別点雑音電力スペクトルを示す。但し、 $\sigma_D = 0.03$ ,  $\sigma_P = 0.00$ ,  $\text{SNR}_S = 20\text{dB}$  としている。図中の実線、点線は、PR(1,2,1) 方式 [6], PR(1,2,2,1) 方式 [7] の最小二乗ユークリッド距離 [7] $d_{min}^2$  で規格化した識別点雑音電力スペクトルをそれぞれ示している。図 18 に、記録マーク位置変動を考慮した識別点雑音電力スペクトルを示す。但し、 $\sigma_D = 0.00$ ,  $\sigma_P = 0.03$ ,  $\text{SNR}_S = 20\text{dB}$  としている。線種は、図 17 と同一の PR 方式における雑音電力スペクトルを示している。両図より、識別点においては、記録マーク径変動雑音の方が 記録マーク位置変動雑音に比べて、ビタビ復号に悪影響を与えることが予想できる。また、PR(1,2,1)ML 方式の方が PR(1,2,2,1)ML 方式と比べて、良好な復号利得が得られることが予想できる。

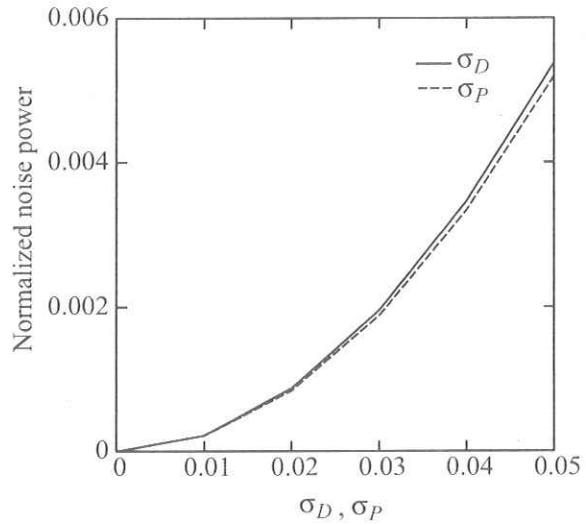


図 14 読み出し点における媒体雑音電力

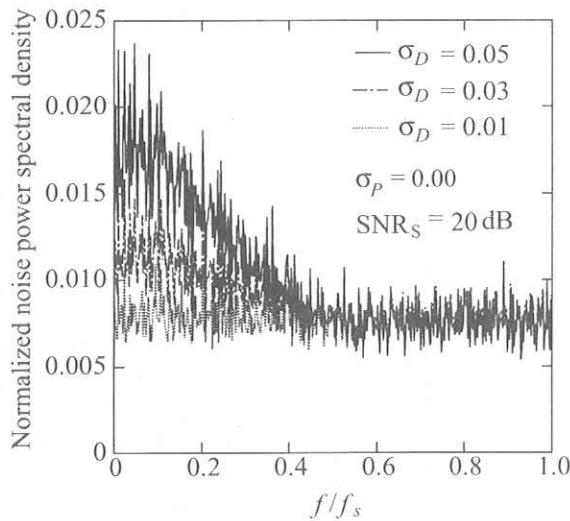


図 15 読み出し点における記録マーク径変動  
雑音電力スペクトル

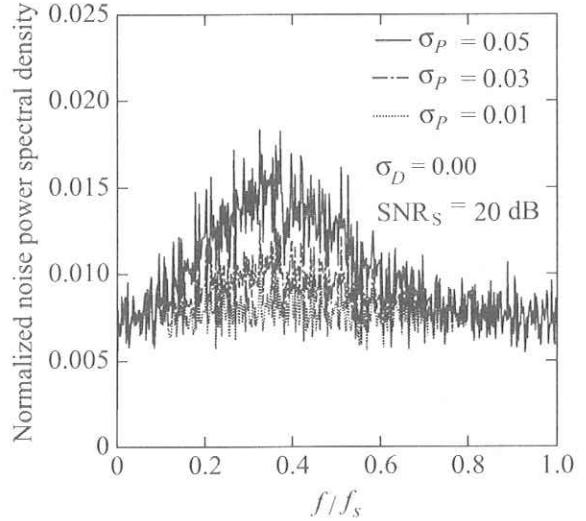


図 16 読み出し点における記録マーク位置変動  
雑音電力スペクトル

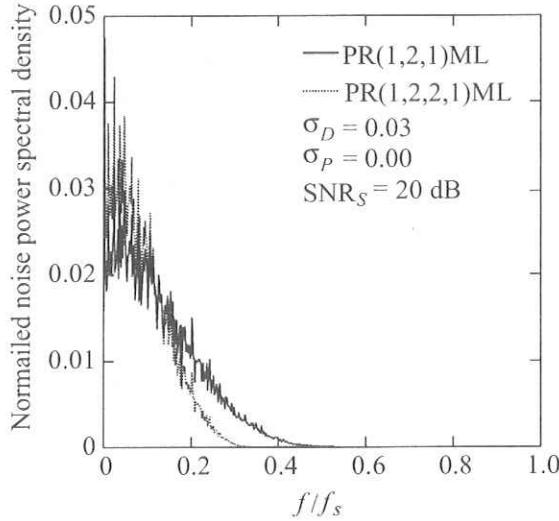


図 17 識別点における記録マーク径変動  
雑音電力スペクトル

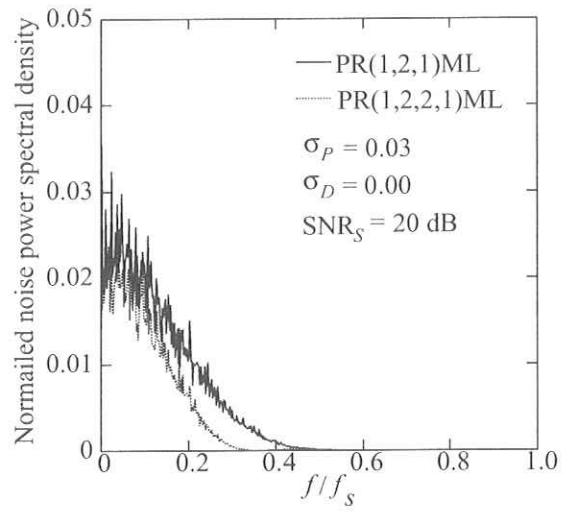


図 18 識別点における記録マーク位置変動  
雑音電力スペクトル

図19に、BER特性を示す。但し、媒体雑音は記録マーク径変動を考慮し、 $\sigma_D = 0.03$ としている。図中の○、□印はPR(1,2,1)ML方式、PR(1,2,2,1)ML方式のBER特性をそれぞれ示している。図より、 $\text{BER} = 10^{-4}$ を満足する $\text{SNR}_S$ は、PR(1,2,1)ML方式がPR(1,2,2,1)ML方式に比べて低いため、PR(1,2,1)ML方式は、PR(1,2,2,1)ML方式に比べて良好なBER特性であることがわかる。図20に、媒体雑音として記録マーク位置変動を考慮した場合のBER特性を示す。シミュレーション条件は、 $\sigma_P = 0.03$ とした以外は図19と同一とする。図より、PR(1,2,1)ML方式は21dBで誤りなく復号できているが、PR(1,2,2,1)ML方式では23dBの場合でも誤りがあるため、記録マークの位置変動がある場合においてもPR(1,2,1)ML方式が良好な特性を示すことがわかる。

図21に、記録マーク径変動 $\sigma_D$ とBER特性の関係を示す。但し、 $\sigma_P = 0$ としてシステム雑音は加えていない。図中の○、□印は、PR(1,2,1)ML方式、PR(1,2,2,1)ML方式のBER特性をそれぞれ示している。図より、PR(1,2,1)ML方式が $\sigma_D = 0.03$ 、PR(1,2,2,1)ML方式は $\sigma_D = 0.02$ より大きくなると誤り始めるため、PR(1,2,1)ML方式の方が良好なBER特性を示すことわかる。図22に、記録マーク位置変動 $\sigma_P$ とBER特性の関係を示す。但し、 $\sigma_D = 0$ としてシステム雑音は加えていない。図より、PR(1,2,1)ML方式の方が、PR(1,2,2,1)ML方式と比べて誤り始める $\sigma_P$ の値が大きいため、良好なBER特性を示していることがわかる。図21と22を比較した場合、記録マーク径変動の方が記録マーク位置変動に比べてBER特性に悪影響を与えることがわかる。

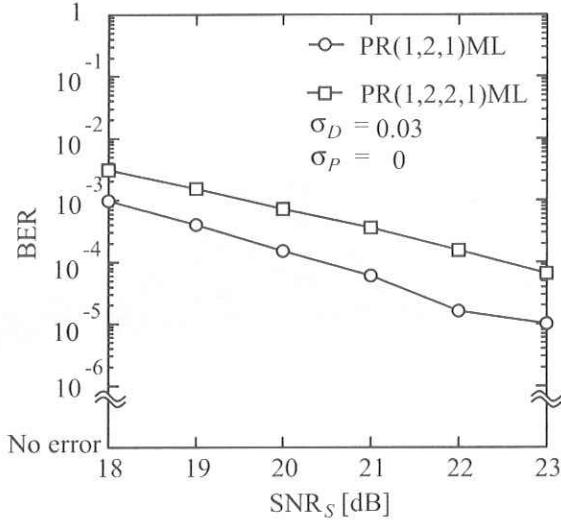


図 19 BER 特性(記録マーク径変動を考慮)

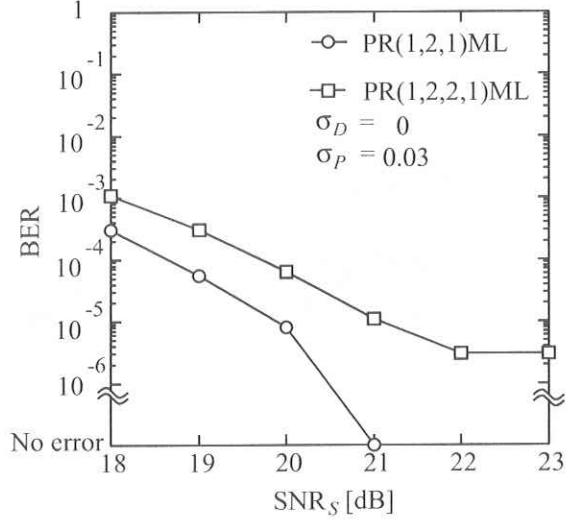


図 20 BER 特性(記録マーク位置変動を考慮)

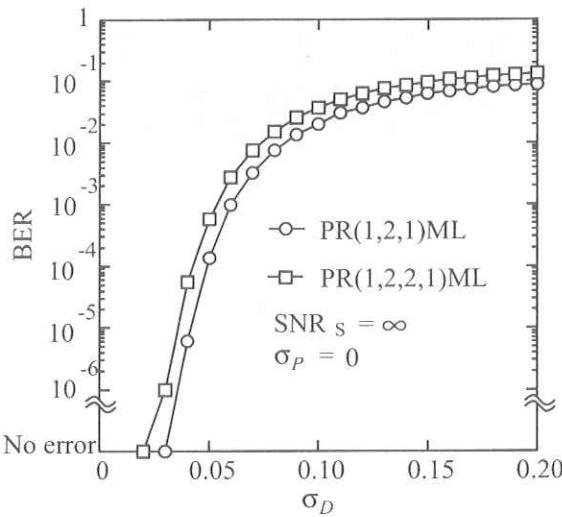


図 21 記録マーク径変動と BER の関係

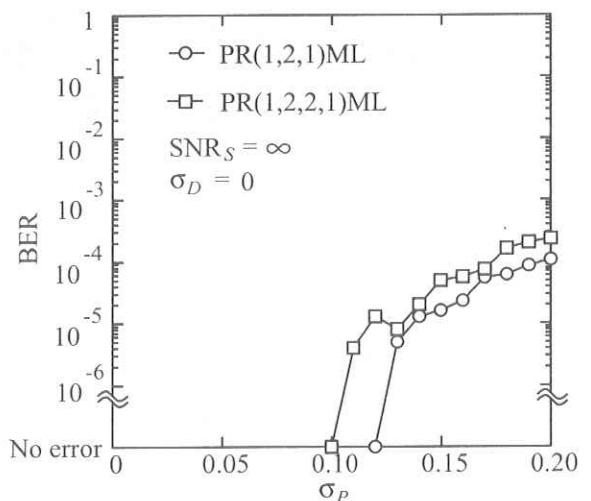


図 22 記録マーク位置変動と BER の関係

## 6. まとめ

本検討では、まず、孤立マーク再生波形について述べ、再生波形の算出、二光子吸収記録再生系での媒体雑音と雑音電力、雑音電力スペクトルを求めた。また、二光子吸収記録にPRML方式を適用し、BER特性による性能評価を行った。その結果、記録マーク径変動雑音のみを考慮した場合および記録マーク位置変動を考慮した場合、PR(1,2,1)ML方式がPR(1,2,2,1)ML方式に比べて良好なBER特性を示すことが明らかとなった。また、記録マーク径変動のみと記録位置変動のみを比較した場合、記録マーク径変動を考慮した場合の方がBER特性に悪影響を与えることが明らかとなった。今後は、実機との整合性と記録密度について検討を行うと共に、繰り返し復号を二光子吸収記録に適用して二光子吸収記録に適した信号処理方式の開発を行う。

## 参考文献

- [1] Haichuan Zhang, Edwin P. Walker, Wenyi Feng, Yi Zhang, Joannes M. Costa, Alexander S. Dvornikov, Sadik Esener, and Peter Rentzepis, "Multi-layer Optical Data Storage Based on Two-photon Recordable Fluorescent Disk Media," Eighteenth IEEE Symposium on Mass Storage Systems and Technologies, pp.225–236, San Diego, USA, April 2001.
- [2] 西尾 壽彦 MS TODAY, vol.10, no.2, pp.2–3, Feb. 2001.  
<http://www.m-system.co.jp/mstoday1/mst2001.pdf/mst0102.pdf>
- [3] 小川 博司, 田中伸一, “ブルーレイディスク読本,” オーム社, 東京, 2006.
- [4] P.H. Siegel, J.K. Wolf, “Modulation and Coding for Information Storage,” IEEE Commun. Mag., vol.29, no.12, pp.72–73, Dec. 1991.
- [5] 大沢 寿, 高田 昌和, 岡本 好弘, “光磁気記録におけるPRML方式の一検討,” 信学総大, no.C-469, 1995.
- [6] E. R. Kretzmer, “Generalization of a Technique for Binary Data Communication,” IEEE Trans. Commun. Technol., vol.COM-14, no.1, pp.67–68, Feb. 1966.
- [7] 大沢 寿, 岡本 好弘, 斎藤 秀俊, “高密度ディジタル磁気記録のための信号処理技術,” 信学論(C-II), vol.J81-C-II, no.4, pp.393–412, April 1998.

# 超高信頼性チップ製造のためのシグナルインティグリティ不良のモデル化およびその故障検査法

愛媛大学大学院理工学研究科教授

高 橋 寛

愛媛大学大学院理工学研究科准教授

樋 上 喜 信

株式会社半導体理工学研究センター研究推進室

大 西 洋 一

## 1. はじめに

大規模集積回路 (VLSI チップ) の高機能化および高速化に伴って、VLSI チップの使用の範囲も広範囲にわたるものとなっている。最近では、特に自動車分野での VLSI チップの活用が増大している。自動車分野においては、厳しい品質管理 (欠陥ゼロ・プロセス) が求められている。自動車分野での VLSI チップは、多層化構造が導入されている。多層化構造においては、配線やビアにおける欠陥 (断線や短絡) に対処することが重要となっている。特に、配線やビアにおいて、信号伝播遅延の増加および電圧の変動の影響が、信号の完全性 (シグナルインティグリティ) を低下させることによって VLSI チップの誤動作を引き起こしている。

本研究の目的は、1) コンピュータシミュレーション (電子回路シミュレーションおよび電磁界シミュレーション) を利用して半断線故障の振る舞いの解析を行うこと、および配線の半断線故障をモデル化すること、2) 物理的に半断線故障を作り込んだテストチップ (TEG) を設計・製作し、半断線故障モデルを検証すること、および3) 新しい半断線故障モデルに対するテスト・故障診断法に関する研究である。提案する新しい故障のモデルに基づくテスト・故障診断法は、次世代チップに対する最適なコストでのテスト・故障診断の技術に関する研究である。本研究は、今後ますます重要となる製品の品質確保と早期歩留まり確保を実現する技術の基礎となる。

## 2. 研究内容

以下の項目について研究を進めている。

計画 1 : 半断線故障モデルの提案: デバイスシミュレーションおよび電磁界シミュレーションの解析結果を利用して、配線およびビアの半断線故障をモデル化する。

計画 2 : 半断線故障検証用テストチップ (TEG) を設計・製作、および故障影響の測定: 物理的に半

断線故障を作り込んだ 65 ナノプロセスの TEG を設計・製作する。その計測結果に基づいて半断線故障の励起条件および故障の影響範囲とその強さ (遅延の増加) を明らかにし、故障モデルを検証する。

計画 3 : テストパラメータ (検査対象の遅延故障サイズ) の決定法の提案: 配線およびビアに半断線故障をもつ被検査回路の誤動作を検査するために、検査対象の遅延故障サイズを決定する手法を提案する。

計画 4 : 半断線故障モデルに基づくテスト生成法の提案: 半断線故障箇所に対する隣接信号線の影響を考慮した故障モデルに基づいて遅延故障テスト生成の高精度化法を開発する。

計画 5 : 半断線故障モデルに基づく故障診断法の提案: 半断線故障箇所に対する隣接信号線の影響を考慮した故障モデルに対して遅延故障診断ベースの半断線故障診断法を開発する。

## 3. 研究の進捗および成果

2009 年度の成果を以下に述べる。

計画 1 に関しては以下の成果を得ている。電磁界シミュレータを用いて近接配線が半断線に及ぼす遅延の影響について調べた。ここでは、信号線が物理的な傷や断裂をもつことによって生じる電気的な不具合を抵抗性オーブン故障と考える。図 1 に示すように、信号線の長さは 110 $\mu m$  とし、信号線の厚さは 300nm とする。その信号線の一部の厚さを 30 分の 1 に削った状態を半断線故障とする。なお、シミュレーションにおいては、90nm プロセスのパラメータを用いた。

半断線している両隣の配線の電圧が固定の場合 (Case 1-3), 半断線している配線の入力信号と同相 (Case4) あるいは逆相 (Case5) の場合について調べた。

図 2 に Case4 の結果を示す。図中の点線で示された波形は、故障信号線への入力の信号波形である。一方、図中の線で示された波形は、故障信号線からの出力の信号波形である。シミュレーション結果から、故障信号線の信号変化の極性と同相の信号変化が隣

接信号線に生じている場合は、故障箇所の遅延が軽減し、故障箇所で生じている付加遅延の影響をマスクすることが判明した。

図3にCase5の結果を示す。図中の点線で示された波形は、故障信号線への入力の信号波形である。一方、図中の線で示された波形は、故障信号線からの出力の信号波形である。故障信号線の信号変化の極性と異なる極性の信号変化が隣接信号線に生じている場合は、故障箇所において比較的大きな付加遅延が生じている。シミュレーション結果から、逆相の場合は故障箇所の遅延を増大させることが判明した。

表3は、各ケースに対する隣接配線による遅延時間の変化を示している。

表1: 隣接配線による遅延時間の変化

隣接信号	遅延時間
ケース1:両端がGND	110ps
ケース2:両端がVDD	123ps
ケース3:両端がGNDとVDD	112ps
ケース4:両端が同相	25ps
ケース5:両端が同相	301ps

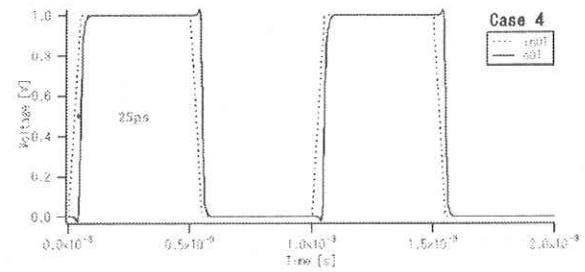


図2: ケース4の出力信号波形

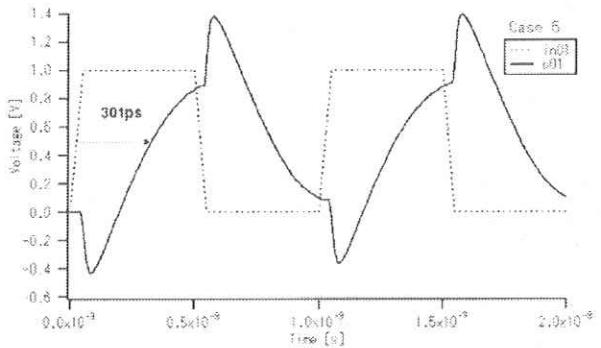


図3: ケース5の出力信号波形

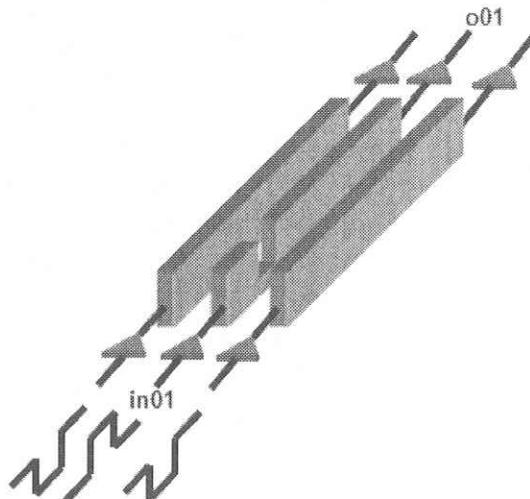


図1: 電磁界シミュレーションを行った隣接配線

計画2に関しては以下の成果を得ている。実チップでの半断線故障の振る舞いを調べるためにTEG-Aチップの設計をしている。TEG-Aチップは最新のCMOS 65nmプロセスを用いて設計される。

表2はTEG-Aチップの諸元を示している。配線構造としてはL9構造、L3構造、L3L3L3構造を用

意する。半断線の実現には、チップ設計時に作りこまれた電気的判断と、チップ作製後にFIB(集束イオノビーム)を用いて作りこまれる物理的半断線の2つの方法を用意している。故障の振る舞いについてはディレイラインの埋め込みとリピートサンプリング手法を用いて、適切な波形を精度良く観測できるように設計する。

表2: CMOS 65nm プロセスの諸元

CMOS Process	e-Shuttle 65nm Si Express
Die Size	2.5 x 2.5 mm sqr
VCORE	1.2V
VIO	3.3V
配線層数	12層
PKG	QFP 80pin

計画4に関しては以下の成果を得ている。図4に示すように、ローンチオンキャプチャ方式において、ドントケアをもつ遷移故障用テストパターンを利用した、拡張遅延故障モデルに基づく半断線故障検出テストパターンの生成法を提案した。また、ベンチ

マーク回路を用いた計算機実験において、提案手法の有効性を評価した。

まず、信号線  $V_j$  に対する遷移故障用テストパターン  $\langle t_n, t_{n+1} \rangle$  が、信号線  $V_j$  の抵抗性オープン故障を検出できない場合があることを述べる。ここで、信号線  $V_j$  の立ち上り遷移故障に対するテストパターン  $\langle t_n, t_{n+1} \rangle$  を考える。テストパターン  $\langle t_n, t_{n+1} \rangle$  は、信号線  $V_j$  に立ち上りの信号変化を生じさせる。いま、信号線  $V_j$  の隣接信号線における信号変化に着目する。多くの隣接信号線において、信号線  $V_j$  と同様に立ち上り信号変化が生じているならば、その影響によって信号線  $V_j$  における信号変化の遅延量を減少させる。したがって、このテストパターン  $\langle t_n, t_{n+1} \rangle$  は、半断線故障によって生じた付加遅延を減少させ、検出することができない。

提案手法では、拡張遅延故障モデルに基づいて半断線故障を励起させるために、隣接信号線に対して、目標信号線がもつ信号変化の極性と逆の信号変化を割り当てる試みを試みる。

提案する拡張遅延故障モデルに基づくテストパターン生成法は、2つのフェーズによって構成する。本研究では、テストパターン生成のための目標故障集合はすべてのゲートの出力とする。

フェーズ1(拡張遅延故障シミュレータによる判定)：フェーズ1では、拡張遅延故障シミュレータを利用する。拡張遅延故障シミュレータでは、与えられたテストパターンが、ゲート出力において拡張遅延故障モデルの条件を満足しているか否かを判定する。拡張遅延故障シミュレータは、テストパターンが目標のゲート出力に付加遅延を生じさせることができること、および故障の影響をフリップフロップに伝搬可能であることを判定する。

フェーズ2(ドントケアを利用したテストパターン生成)：与えられた遷移故障用テストパターン集合において、拡張遅延故障モデルに基づくテストパターンを求めることができなかったゲート出力を目標とする。目標とするゲート出力に対して拡張遅延故障モデルに基づくテストパターンを新たに生成するためには、拡張遅延故障モデルの故障励起条件を満足するように、隣接信号線に適切な信号変化を割り当てなければならない。フェーズ2では、目標とするゲート出力の遷移故障を検出できるテストパターン対のドントケアに着目する。フェーズ2では、拡張遅延故障に対するテストパターンの条件を満足するように、ドントケアをもつ外部入力の値を変更する。

図4において、故障信号線  $V_j$  がもつ半断線故障に対するテストパターンの例を示す。ここで、隣接信

号線は  $A_1, A_2$  および  $A_3$  とする。いま、故障信号線は立下り信号変化をもつとする。ここで、テストパターンによって、隣接信号線  $A_1, A_2$  および  $A_3$  が立上り信号変化をもつならば、故障信号線に拡張遅延故障モデルに基づいて遅延故障が励起する。この場合は、 $EX_{V_j}(A_1, A_2, A_3)$  の値は1となる。

本稿で提案した拡張遅延故障モデルに基づくテストパターン生成法をC言語で実装し、ベンチマーク回路に適用した評価実験結果を示す。評価実験においては、半断線故障によって、ゲート出力の検出可能な最小付加遅延が生じていると仮定する。また、各ゲート出力に対して、ランダムに5本の信号線を選択し、それらを隣接信号線とした。

表の回路の欄には回路名を示す。総数の欄には、半断線故障を仮定したゲート出力の総数を示す。遷移故障の欄のテスト数の項目では、与えられた遷移故障テスト集合のテストパターン数を示す。また、検出数の項目では、遷移故障の検出数を示す。半断線故障の欄の検出数の項目では、フェーズ1における結果として、与えられた遷移故障テスト集合のテストパターンによって検出できた半断線故障の数を示す。

本実験では、与えられた遷移故障テスト集合のテストパターンによって検出できなかった半断線故障に対して、提案手法のフェーズ2を適用した。その結果を半断線故障の欄の「生成数」、「改善」および「精度」の項目にそれぞれ示している。生成数の項目では、提案したテストパターン生成法によって新たに生成できたテストパターン数を示す。また、改善の項目では、提案手法を適用することによって新たに検出できた半断線故障数を示す。最後に、故障検出効率によって、検出可能な遷移故障をもつゲート出力数に対する半断線故障の検出数を示す。故障検出効率は次式で定義する。

故障検出効率 (%) = (提案手法によって生成されたテストパターンによって検出できた半断線故障数) ÷ (与えられた遷移故障テストパターンによって検出できた遷移故障数) × 100

ここで、故障検出効率が高ければ、より半断線故障に対して精度の高いテストパターン集合が得られることになる。

例えば、cs38417回路では、与えられたテストパターン集合によって20,171個の半断線故障が検出可能であった。提案手法を未検出な半断線故障に適用した結果、新たに119個の半断線故障が検出可能となった。cs38417回路では、提案手法によって生成されたテストパターンによって99.6%の故障検出効率を得る。

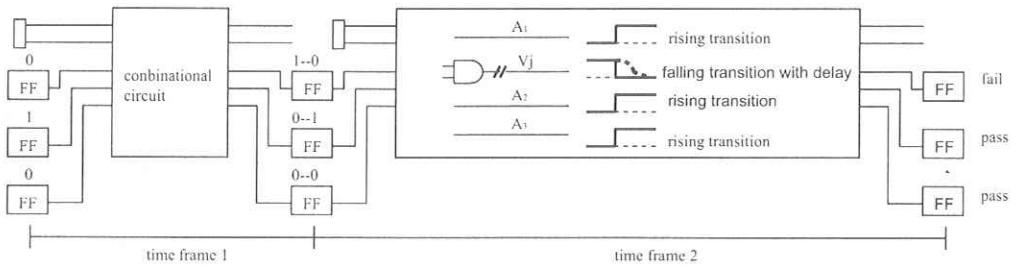


図 4: 半断線故障テスト生成法の概要

表 3: テストパターン生成実験結果

回路	総数	遷移故障		半断線故障			
		テスト数	検出数 (検出率)	フェーズ 1	フェーズ 2	改善	故障検出効率
cs1488	627	183	601(95.9)	531	7	8	89.7
cs1494	620	172	600(96.8)	503	14	14	86.2
cs9234	5347	783	4545(85.0)	4065	120	136	92.4
cs13207	7236	924	6650(91.9)	6162	163	178	95.3
cs15850	9102	870	7231(79.4)	6774	90	98	95.0
cs35932	14337	211	11509(80.3)	11338	68	70	99.1
cs38417	20649	1616	20375(98.7)	20171	118	119	99.6
cs38584	17668	2120	14379(81.4)	13194	301	324	94.0

実験結果から、与えられた遷移故障テストパターンでは検出できなかった半断線故障に対して、提案手法によって新たにテストパターンが検出できることを示した。

#### 4. まとめ

2009 年度は、電磁界シミュレーションによって、半断線故障の影響および隣接信号線における信号変化の影響などを解析した。また、半断線故障に対する拡張遅延故障モデルに基づくテスト生成法を提案した。

#### 主な関連発表

- 1) H. Takahashi, Y. Higami, Y. Takamatsu, K. Yamazaki, T. Tsutsumi, H. Yotsuyanagi, and M. Hashizume, “New Class of Tests for Open Faults with Considering Adjacent Lines,” Proceedings of IEEE Eighteenth Asian Test Symposium, pp.301-306, 2009.11
- 2) T. Tsutsumi, Y. Kariya, M. Hashizume, H. Yotsuyanagi, K. Yamazaki, Y. Higami, H. Takahashi, and Y. Takamatsu, “Preliminary Analysis of Interconnect Full Open Faults using TEG chips,” Pro-

ceedings of the 24th International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications, pp.679-682, 2009.7

- 3) 高橋, 梶上, 首藤, 高棟, 高松, 堤, 山崎, 四柳, 橋爪, “抵抗性オープン故障のモデル化とそのテスト生成について,” 信学技報, DC2009-68, 2010

# PS 灰造粒砂を用いたコンクリート二次製品の開発

愛媛大学大学院理工学研究科助教

木下尚樹

愛媛大学工学部等技術部機械・環境建設系技術班

川口 隆

株式会社予州興業環境部主任

松尾 晓

株式会社予州興業専務取締役

三好正忠

## 1. 研究背景および目的

平成 19 年度の検討結果より、PS 灰造粒骨材のコンクリート用骨材としての適用性を強度面から考慮すると、細骨材および粗骨材の骨材すべてを PS 灰造粒骨材使用することは、強度不足から使用可能な適用範囲が狭く、市場における需要も少ないものと考えられた<sup>1)</sup>。また、平成 20 年度は PS 灰造粒骨材の使用を細骨材に限定し、骨材として安価な PS 灰造粒骨材を用いることにより、より安価で軽量な型枠の開発について検討した。具体的には乾燥収縮ひずみ、対凍害性および通気性を検討した上で、混和材として繊維の有効性、型枠として際の内部コンクリートの養生性などを検討した<sup>2)</sup>。

PS 灰造粒骨材を用いたモルタルは一般的なモルタルと比較して、軽量、吸水性が高く、多孔質であることから、埋設型モルタル型枠として利用した場合、軽量化が図れ、弱材齡時の内部コンクリートに対する養生効果が期待され、耐久性の向上につながると考えられる。そこで平成 21 年度は、養生効果について検討することとした。

## 2. PS モルタル型枠の養生効果の検討

ここではまず PS モルタル型枠の配合を決定し、強度特性の把握した。つぎに決定した配合にて試作した型枠を用いて、実現場を想定して野外で実規模の供試体を作製し、養生中の温度計測による断熱効果を従来の型枠と比較、検討した。また、型枠内に打設されたコンクリートの気密性・水密性について実験を行い、従来の型枠と比較し、養生後の耐久性能を検討した。

型枠の配合は、モルタルフロー値の結果から、W/C=25%で PS 灰造粒砂の体積割合が 50%の配合とし、PET 繊維を使用した。また、曲げ強さは平板で 6.7 N/mm<sup>2</sup> であり、湿潤密度は 1.9 g/cm<sup>3</sup> と普通モルタルと比較して、約 0.4g/cm<sup>3</sup> 軽量化が図れた。

型枠の効果を検討するため、PS モルタル型枠、碎砂を用いた普通モルタル、合板の 3 種類の型枠を用いて、供試体を作製した。供試体となる型枠内に打設するコンクリートは、W/C=41%，W/C=63% の 2 種類用い、計 6 体の供試体を作製した。図 1 に供試体の概要を示している。型枠の寸法は、全て 600mm×600mm×18mm とし、供試体の寸法はマスコンクリートを想定し、500×500×500mm とした。型枠面以外は厚さ 50mm の断熱材により覆い、断熱状態を保った。

断熱効果の影響を検討するため、型枠表面、内部コンクリートの表面・中心部の 3 か所に熱電対を配置し、打設直後から温度を計測した。実験は夏期に野外で行い、外気温もあわせて計測した。

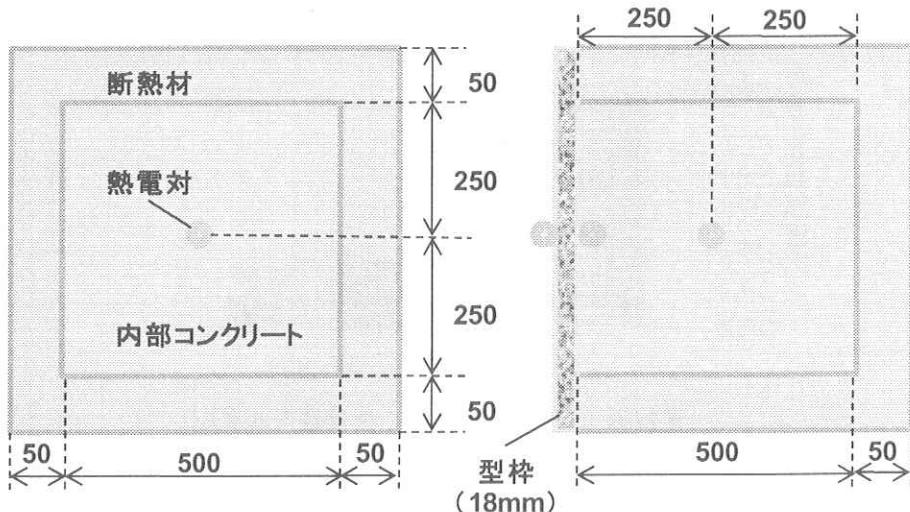


図1 養生効果の検討に使用した供試体の概要

また、合板は打設から3日後に脱型を行い、中心部の温度が一定になるまで測定を継続した。型枠の断熱性能による温度ひび割れ抑制効果については、温度ひび割れ指数によって比較した。その結果、PSモルタルは普通モルタルに近い値を得た。

つぎに、吸水性能による養生効果の検討するため、供試体を養生後、型枠に接する面からコアリングし、表面の密実性（水密性、気密性）について、透水試験、透気試験を行った。あわせて圧縮試験を行い強度特性も求めた。

各試験の結果を図2～図4に示す。強度特性、水密性、気密性（W/C=41%）については、型枠の違いによる大きな変化はみられなかった。しかし、気密性のW/C=63%の供試体では、モルタル型枠の透気係数が合板の2倍程度であった。原因として、本実験では型枠と内部コンクリートの接着を高めるため、型枠内部の面は整形を行っていない。このことから、型枠の凹凸によって表面の気泡やあばたが発生し、気密性に影響を与えたのではないかと考えられる。型枠の表面を平滑にすることで、気密性が改善されるのか、型枠の形状による透気係数の影響を今後さらに検討する必要があると考えられる。

以上の結果より、PSモルタルを型枠に用いることで、軽量化は図れるが、断熱性能による温度ひび割れ抑制効果や、吸水性能による養生効果は確認できず、普通モルタルと同程度の性能であるといえる。

### 3.まとめ

PS灰造粒砂を用いたモルタル型枠の養生効果によるコンクリートの耐久性能の検討から、軽量化は図れるが、断熱性能による温度ひび割れ抑制効果や、吸水性能による養生効果は確認できず、普通モルタルと同程度の性能であった。

本研究の課題として、吸水性能の効果による表層部における密実性の評価や、型枠の表面形状が透気係数に及ぼす影響についての検討が、今後さらに必要であると考えられる。また、本研究の耐久性能の検討は、型枠の断熱、吸水効果による養生効果による内部コンクリートの密実性への影響を検討したが、型枠と内部コンクリートをあわせて総合的に評価していくことが今後の課題である。

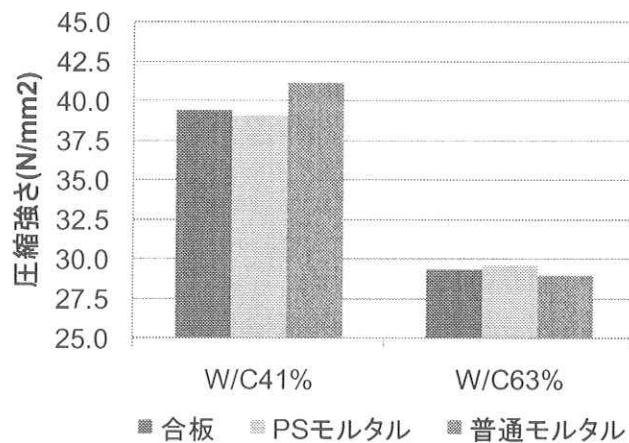


図2 圧縮強さの評価

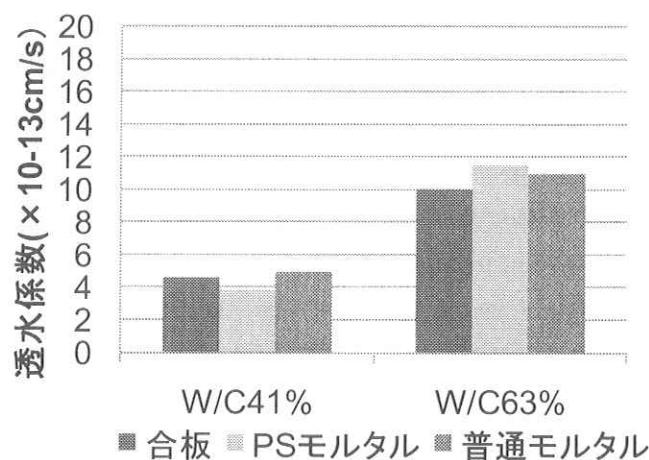


図3 透水性の評価

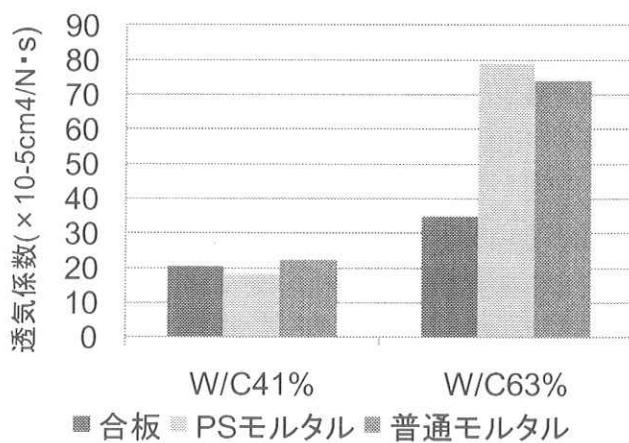


図4 透気性の評価

#### 参考文献

- 1) 木下尚樹, 川口隆, 松尾暁, 三好正忠 : PS 灰を活用した造粒物のコンクリート骨材への適用に関する基礎的研究, 愛媛大学社会連携推進機構研究成果報告書, 第2号, pp.34-48, 2009.3.
- 2) 木下尚樹, 川口隆, 松尾暁, 三好正忠 : PS 灰造粒砂のコンクリートへの適用性に関する基礎的研究, 愛媛大学社会連携推進機構研究成果報告書, 第3号, pp.21-28, 2010.3.

# 高性能光触媒瓦の開発

愛媛大学理工学研究科教授

田中寿郎

愛媛大学工学部技術職員

岡野聰

愛媛県産業技術研究所窯業技術センター主任研究員

菅雅彦

菊間町窯業協同組合理事長

柚山一文

菊間町窯業協同組合副理事長

浜田幹夫

菊間町窯業協同組合青年部長

菊池陽一郎

## 1. 背景と目的

近年、NOx や温室効果ガス (CO<sub>2</sub>) による環境問題が地球規模で深刻化し、エコ意識が社会的に急速に高まり、様々な商品に環境性能が要求されてきている。一方で、愛媛県の地場産業として挙げられる瓦の生産量は減少の一途を辿り、新たな高機能性を付加させることが強く求められている。本研究では、高性能な光触媒瓦の製造技術開発とその評価に関して研究を実施した。

## 2. 研究の実施と成果

### 2-1. エコ瓦基盤の試作

瓦原料土は、菊間瓦工業協同組合の配合土および淡路瓦土を用いた。菊間瓦工業協同組合の配合土は、讃岐土 60wt%+五味土 40wt%である。水分を約 20%に調整し、瓦用土練成形機にて平板状に押出成形後、所定の長さに切断し、フレクションプレスにて瓦タイルに成形した。また、ランプシェードの基盤は、瓦用土練成形機にて円筒及び角筒状に押出成形後、所定の長さに切断し、切り抜き加工によりランプシェードを作成した。焼成試験は、シャトル式いぶし窯で行った。昇温速度 70°C/時間、最高温度 1000~1040°C、保持時間 4 時間で、酸化雰囲気で焼成した。その後火を止め、冷却過程で 950°C になった段階で 40 分間、工業用プロパンガスで焼成処理した。

### 2-2. 光触媒コーティング技術の確立

コーティングの方法にはディップ法、塗布法、スプレー法などの種々の手法が考えられるが、瓦の製作現場での手間を考え、最も現実的であるスプレー法を用いた。また、今回用いたコーティング溶液はペルオキソチタン酸溶液であり、乾燥、熱処理することでアナターゼ型酸化チタンに析出することが分かっている。また、瓦は美しい光沢を有しており、光触媒コーティング処理がこの意匠性に影響を及ぼさないことも重要となる。そこで、瓦表面に 1~10 回噴霧を行い、乾燥条件を自然乾燥~400°C と変化させ、瓦の外観に与える影響についても検討を行った。

図 1 にスプレーコーティングの回数と明度 (L\*値) の関係を示す。コーティング回数が 2 回までは、色が黒ずみ、色むらも発生した。しかしコーティング回数が多くなるに光沢が改善し、10 回のコーティングでは、明度 (L\*値) は 50 以上となり、未処理のものとほぼ変わらない値となった。また、コーティング回数が 6 回の試験体について熱処理を行ったが、温度を上昇させるにつれ色合いが明るくなり、明度 (L\*値) が 55 程度になった。(図 2)

以上のことから、スプレーコーティングの回数および熱処理は、いぶし炭素の光沢に大きく影響し、コーティング回数を増やすことと熱処理を実施することで色むらがなく、明るい色となることがわかった。

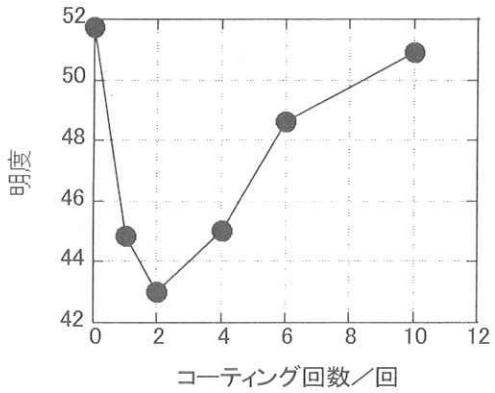


図1. スプレーコーティングした瓦タイルの明度

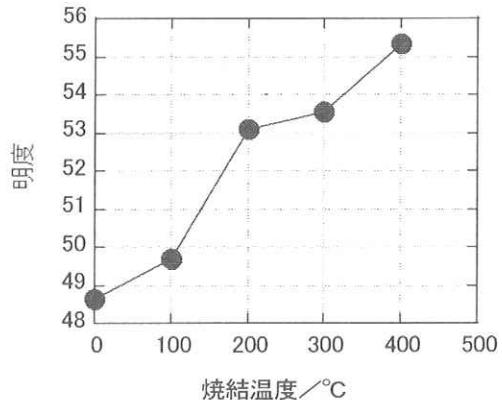


図2. 热処理後の瓦タイルの明度

### 2-3. 空気浄化性能の評価

試作した光触媒コーティング瓦基盤を用いて、バッチ式の空気浄化性能試験を行った。塗布量とアセトアルデヒド分解率の関係を検討する目的から、コーティングは、塗布量が明確となる刷毛塗りにより実施した。塗布量は、 $0.004\text{ml}/\text{cm}^2$  および  $0.04\text{ml}/\text{cm}^2$  の 2 種類で試験した。100°Cで乾燥させたのち 400°C 2h で焼成した。反応容器は 30L のプラスチック式の密閉容器を用い、容器内のアセトアルデヒド濃度を約 50ppm に調整後、2 時間静置し容器内の空気、温度、湿度を安定化させた。その後、UV ランプを点灯し分解処理した。照射光として UV ランプ( $\lambda_{\max}=365\text{nm}$ )を用いた。サンプルと UV ランプの距離は 10mm とした。容器内のアセトアルデヒドガスの濃度は、所定時間ごとに 100ml 採取し、検知管により測定した。

図3 に、試作瓦基盤による分解試験結果を示す。塗布量の違いにより分解率が異なった。 $0.004\text{ml}/\text{cm}^2$  の塗布量では、180 分の処理で約 50% の分解率であるのに対し、 $0.04\text{ml}/\text{cm}^2$  では約 95% の分解率であった。さらに、300 分の処理では、30L の反応容器中のアセトアルデヒドのほぼ全量が分解除去できることがわかった。

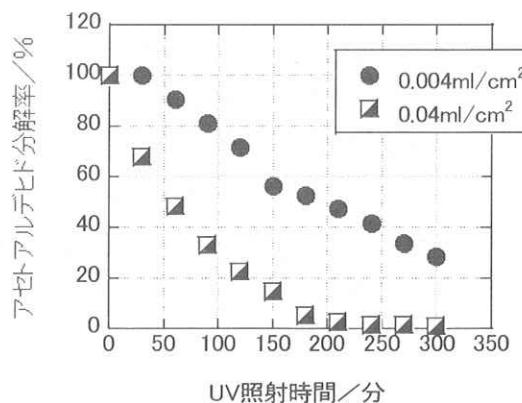


図3. 光触媒瓦タイルのアセトアルデヒド分解率

# ZnO 膜のダメージ評価方法の研究

愛媛大学大学院理工学研究科教授

白 方 祥

住友重機械工業株式会社技術本部技術開発センター

酒 見 俊 之

## 概要 :

愛媛大学と住友重機械はCIGS 太陽電池における ZnO 成膜における CBD バッファ層へのダメージの評価方法について共同研究を実施した。愛媛大学にて CIGS 太陽電池の CBD バッファ層を作製し、住友重機械にて ZnO 膜を成膜し、愛媛大学にて評価を行った。この結果、CBD バッファ層作製後と ZnO 成膜後における CIGS 光吸収層のフォトルミネッセンス (PL) 強度の変化を測定することで ZnO 成膜におけるダメージの大きさを評価できることがわかった。

## 1. はじめに

近年、地球環境問題を背景に太陽光発電システムの導入量が世界的に増加し、太陽電池の需要が急増している[1]。このような背景のもと、安価で高効率な太陽電池が求められており、化合物薄膜系太陽電池の Cu(In, Ga)Se<sub>2</sub> (CIGS) 太陽電池が注目を集めている。CIGS 太陽電池は光吸収層となる CIGS 層の上に溶液成長法 (CBD 法) によりバッファ層を作製し ZnO 膜と透明導電膜を積層する必要がある。ZnO 膜や透明電極膜の成膜時に下地へダメージを与えると、その影響を受け変換効率が低下する。そこで本報告では、スパッタとイオンプレーティングにて CBD バッファ層上に ZnO を成膜し、その影響を評価する方法を検討した。

## 2. 実験

### 2-1. 評価用基板

厚み 2.8mm のソーダライムガラス板上に膜厚 500nm の Mo 膜をスパッタにて成膜し、MBE 装置を用い CIGS 光吸収層を三段階法にて作製した。第一回サンプルでは光吸収層に CuInSe<sub>2</sub> 層を用い、第二回サンプルでは CIGS 層を用いた。これを幅約 1cm、長さ約 5cm の短冊状に 2 本切り出し、CBD 法にて膜厚約 50nm の CdS バッファ層を積層した。この基板に ZnO 膜、および透明導電性膜 (TCO 膜) として Al ドープ ZnO 膜 (AZO 膜) あるいは Ga ドープ ZnO 膜 (GZO 膜) を成膜した。

### 2-2. ZnO 成膜、透明電極成膜

第一回サンプルでは、RF-スパッタ法 (SP 法) を用いて ZnO 膜と AZO 膜を成膜したサンプル A と反応性プラズマ蒸着法 (RPD 法) を用いて ZnO 膜と GZO 膜を成膜したサンプル B を作製した。第二回サンプルでは、ZnO 膜のみ SP 装置 (サンプル A) と RPD 装置 (サンプル B) で成膜後、両サンプルに SP 装置を用いて AZO 膜を積層した。

### 2-3 太陽電池の作成

透明電極を成膜したサンプルに真空蒸着法にて Al の櫛型電極を作成し、スクライブし太陽電池を作製した。作成した太陽電池の一例を写真 1 に示す。

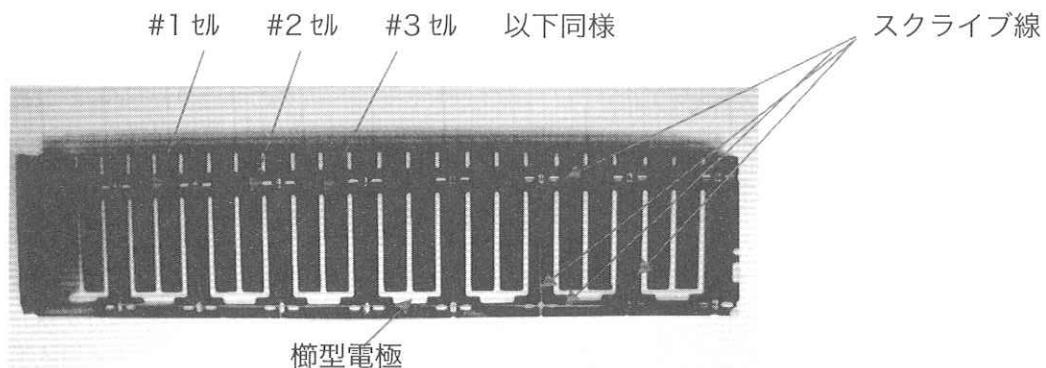


写真 1 試作した CIGS 太陽電池

### 2-4. 評価方法

CIGS 光吸收層の PL の測定では、室温で 632.8nm の He-Ne レーザーを励起光として用いた。サンプルは XY ステージ上に搭載し、PL 強度の面内分布のマッピングを行った。PL 強度の測定はプロセス毎に行い、太陽電池の特性との比較を行った。

### 3. 結果および考察

表 1、表 2 に第一回サンプルと第二回サンプルにおいて、最も変換効率の高かった太陽電池の PL 強度の推移と太陽電池特性を示す。PL 強度は、光吸收層 (CIS, CIGS) 作成、CBD-CdS バッファ層積層、ZnO 成膜、TCO 成膜の各々のプロセス終了後に測定した。なお、第二回サンプルではスクライブ後の PL 強度も測定した。また、表には CBD-CdS バッファ層積層後の PL 強度との比率も括弧内にて示した。

表 1 第一回サンプルの代表値（括弧内は CBD の PL 強度との相対値）

20100218 セル : A#3, B#3	PL 強度の推移				太陽電池の特性			
	CIS	CBD	ZnO	TCO	効率	Voc	Isc	FF
SP-ZnO, AZO (サンプル A)	730	100 (1.0)	180 (1.80)	120 (1.20)	4.95	0.39	29.5	0.43
RPD-ZnO, GZO (サンプル B)	840	40 (1.0)	65 (1.63)	30 (0.75)	3.14	0.34	18.1	0.52

表 2 第二回サンプルの代表値（括弧内は CBD の PL 強度との相対値）

20100825 セル : A#5, B#5	PL 強度の推移					太陽電池の特性			
	CIGS	CBD	ZnO	TCO	スクライブ	効率	Voc	Isc	FF
SP-ZnO (サンプル A)	624	935 (1.0)	840 (0.90)	222 (0.24)	297 (0.32)	7.83	0.65	16.7	0.72
RPD-ZnO (サンプル B)	577	1003 (1.0)	552 (0.55)	280 (0.28)	367 (0.37)	7.66	0.65	16.6	0.71

表1、表2より、TCO成膜後もしくはスクライプ後のPL強度と、太陽電池の変換効率には相関が見られることが分かる。室温でのPL強度は少数キャリアの寿命を反映する。太陽電池での少数キャリアの寿命は開放電圧( $V_{oc}$ )や形状因子(FF)と強い相関があるため、PL強度と変換効率とに相関が得られたと考えられる。また太陽電池の場合、開放状態と短絡状態では光生成キャリアの収集効率が異なるためPL強度が異なる。同様に開放状態でも、太陽電池内部の並列抵抗等によるリークによりPL強度が低下する。このようにPL強度は、太陽電池での、光生成キャリアの寿命低下をもたらすダメージや、リークの検出に有効と考えられる。プロセスごとのPL強度の変化より、太陽電池特性を低下させるプロセスの把握が可能である。

表1の第一回サンプルにおいて、CBDバッファ層作成後とZnO成膜後のPL強度の比率を比較すると、SP法では1.8倍に対しRPD法では1.6倍に留まっている。同様にTCO成膜後は、SP法の1.2倍に対しRPD法では0.75倍と低下している。このようにRPD法ではSP法よりもZnO成膜、および、TCO成膜におけるPL強度の低下が大きい。なお、参考まで、第一回サンプルのPL強度マッピング結果を参考図1Aおよび参考図1Bに示す。

次に、太陽電池の特性を比較する。図1に第一回サンプルの太陽電池の諸特性を示す。横軸は各サンプルにおける太陽電池の位置を表し、左側の#1～#4の太陽電池はMo/CIS/CdS/SP-ZnO/SP-AZOのプロセスにて作製したもの、右側の#1～#4の太陽電池はMo/CIS/CdS/RPD-ZnO/RPD-GZOのプロセスにて作製したものを意味する。なお、表1のPL強度比較は、各々のサンプルの#3太陽電池の位置のものである。

図1より、SP法にてZnO、AZOを成膜した太陽電池の方が、RPD法でZnO、GZOを成膜した太陽電池よりも変換効率が高い結果が得られた。なお、ZnO、AZOをSP法で成膜したものは $V_{oc}$ 、 $J_{sc}$ が高く、ZnO、GZOをRPD法で成膜したものはFFが高い傾向を示す。 $V_{oc}$ は成膜時のダメージ、 $J_{sc}$ は透明電極やZnO膜の透過率、FFは直列抵抗( $R_s$ )や並列抵抗( $r_{sh}$ )の影響を受けると考えられており、 $V_{oc}$ の差異からSP法の方がRPD法より低ダメージであったことが考えられる。この理由として、SP法の方が成膜時の圧力が一桁高いことが関係している可能性が考えられる。また $J_{sc}$ の差異の原因として、RPD-GZO成膜には3%Ga添加ZnOの蒸発材料を使用しているため、SP-AZO膜よりもキャリア密度が高く長波長領域の透過率が低くなっていたことが考えられる。また、RPD法のサンプルの方が $R_s$ は低く $r_{sh}$ は高い傾向を示しており、これがFFの差異に繋がったと考えられる。これはSP-ZnO膜とRPD-ZnO膜の抵抗等の違いも原因の一つと考えられる。

このように、第一回サンプルにおいて、RPD法で成膜したサンプルはSP法で成膜したサンプルよりPL強度の低下率が大きく成膜時のダメージが大きかったことが考えられるが、実際、太陽電池の特性において、RPD法で成膜したサンプルは $V_{oc}$ が低いことが認められた。

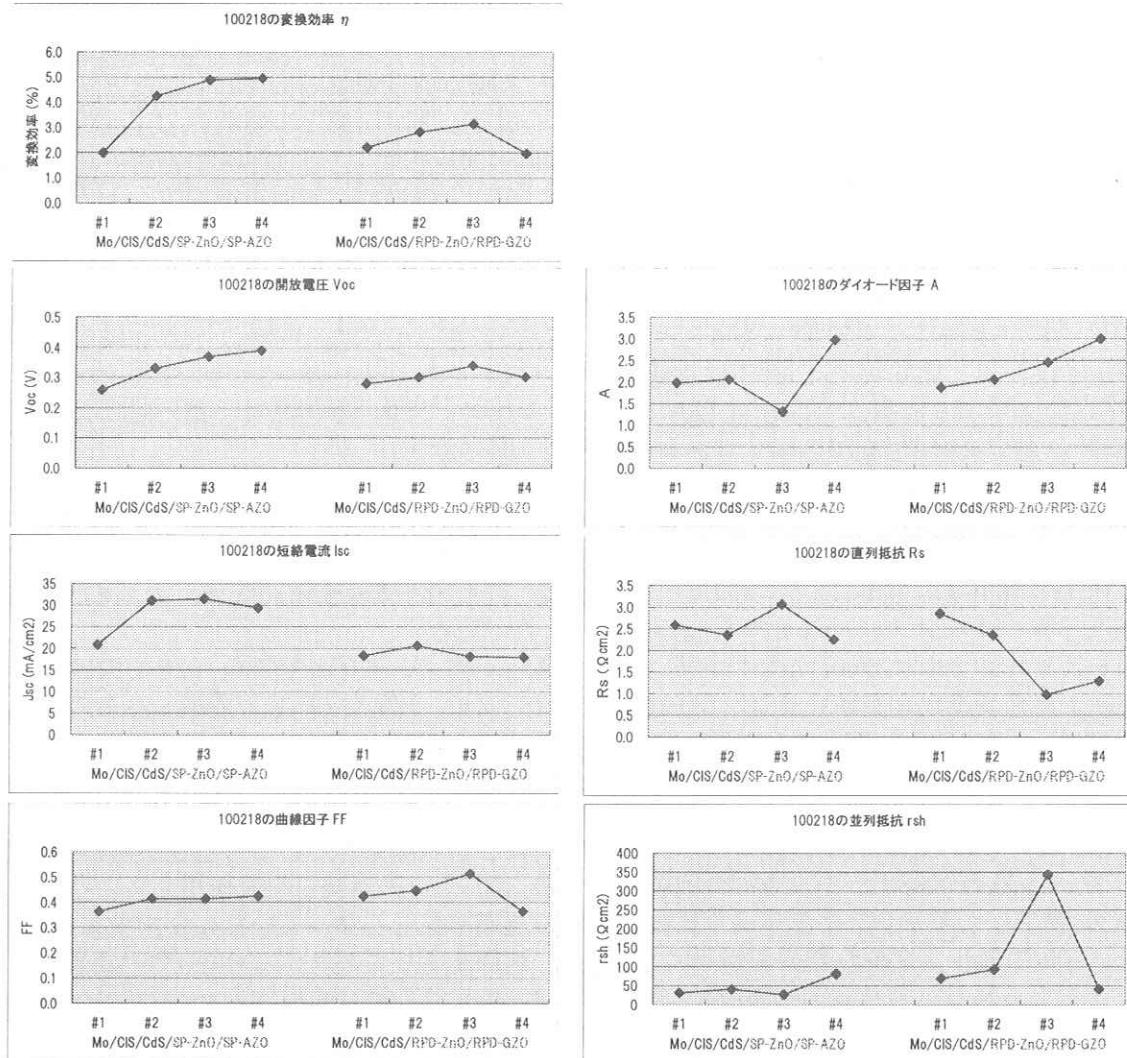
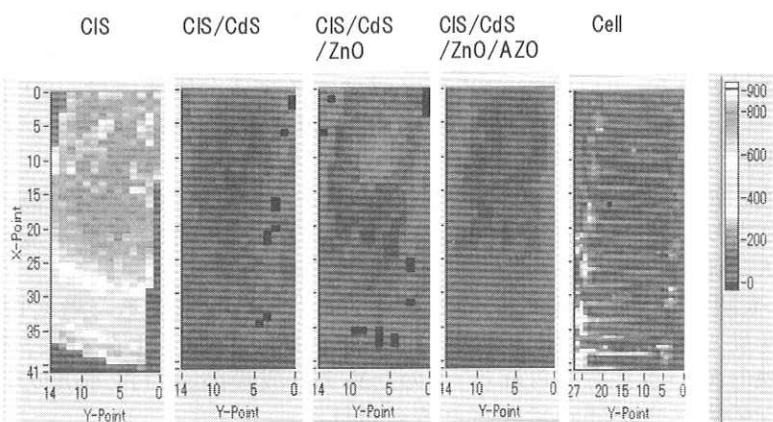
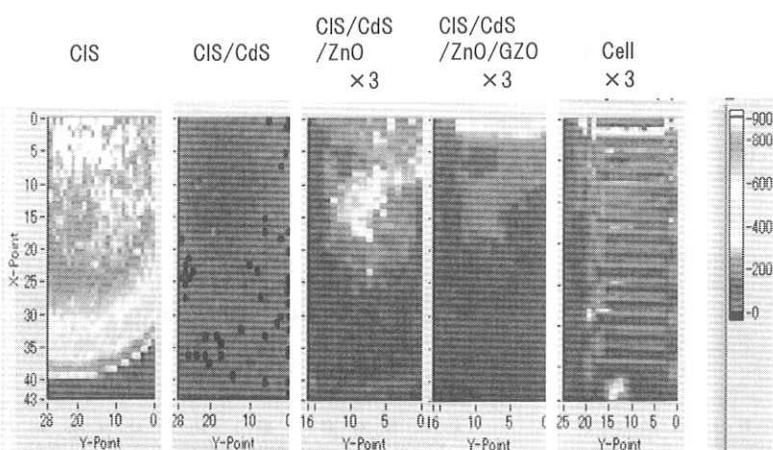


図 1 第一回サンプルの太陽電池の諸特性



参考図 1A 第一回サンプル (スパッタ : SP) のプロセス毎のPLマッピング



参考図 1B 第一回サンプル (PRD) のプロセス毎のPLマッピング  
(但し、CIS/CdS/ZnO, CIS/CdS/ZnO/GZO, Cell の3サンプルのPL強度は3倍の値を表示)

第二回サンプルでは ZnO 膜を SP 法、もしくは RPD 法で成膜した以外は、同プロセスとした。表 2 は第二回サンプルにおいて、#5 太陽電池の位置における PL 強度の推移を示す。CBD バッファ層作成後の PL 強度に対する ZnO 成膜後の PL 強度の比率を比較した結果、SP 法では 0.90 倍に対し RPD 法では 0.55 倍となっている。しかし、スクライブによる素子分離後では、SP 法が 0.32 倍、RPD 法が 0.37 倍となり、ほぼ同程度の結果が得られた。参考まで、第二回サンプルの PL 強度マッピング結果を参考図 2 A および参考図 2 B に示す。

図 2 に第二回サンプルの太陽電池特性を示す。なお、RPD 法のサンプルには #3 試料は傷の影響の為に異常値が現れた。図 2 より、SP 法で ZnO を成膜したサンプルと RPD 法で ZnO を成膜したサンプルでは、ほぼ同等の太陽電池特性が得られていることがわかる。

このように、太陽電池特性は太陽電池化した後の最終的なダメージ等を反映すると考えられ、途中の ZnO 成膜における影響を切り出すことは出来ない。しかしプロセス毎の PL 強度は、そのプロセスでのダメージのを反映していると考えられる。このため ZnO 成膜前後の PL 強度の比較より ZnO 成膜におけるダメージの大きさが評価できると考えられる。

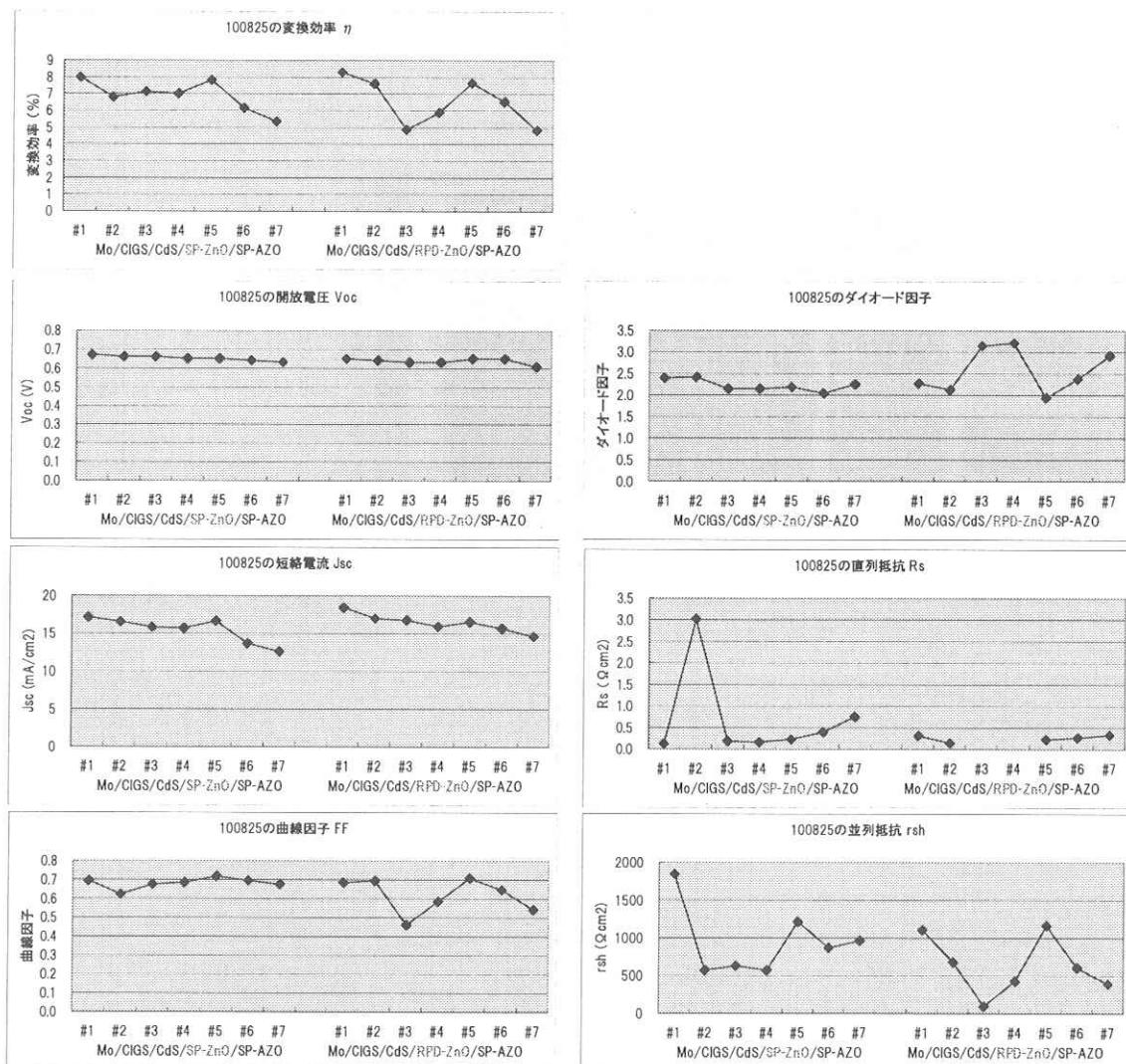
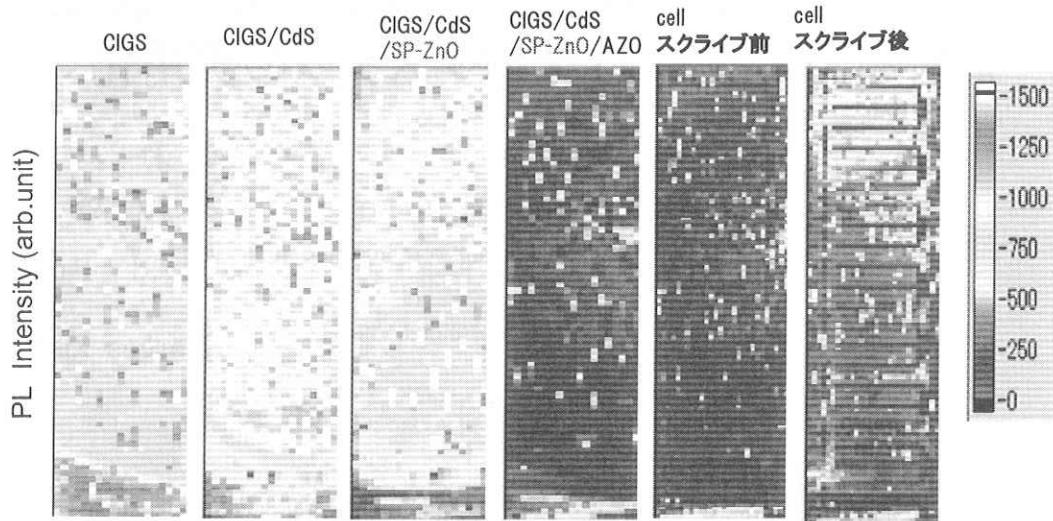
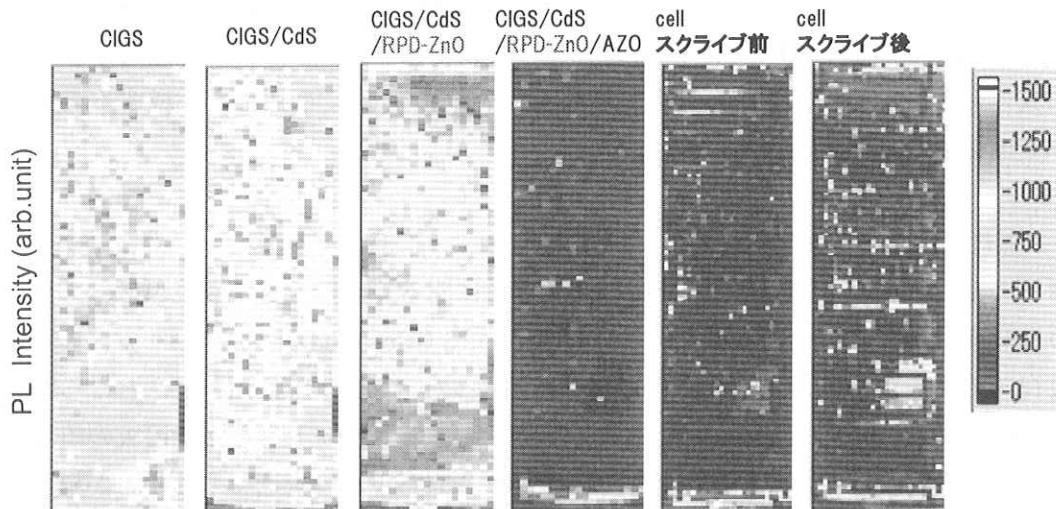


図 2 第二回サンプルの太陽電池の諸特性  
(RPD-ZnO サンプルの#3 セル付近に傷があり、この影響で異常値が発生している)



参考図 2A 第二回サンプル (スパッタ : SP) の PL 強度のマッピング



参考図 2B 第二回サンプル (RPD) の PL 強度のマッピング

## 5.まとめ

CIGS 光吸収層からのフォトルミネッセンス(PL)強度は太陽電池の特性と相関があることがわかった。PL測定は、太陽電池としての特性を評価できるのみならず、ZnO成膜前後のPL強度の測定より、ZnO成膜時のダメージの大きさの評価法の一つであることが明らかになった。

## 参考文献

- [1] 貝塚 泉：“世界における太陽光発電市場の現状と展望”，  
第3回 SEMI 太陽光発電技術シンポジウム，SEMICON Japan 2008

# パルス駆動による知覚輝度向上効果を用いた消費電力半減 LED 光源システムの実用化

愛媛大学大学院理工学研究科助教

本村英樹

愛媛大学大学院理工学研究科教授

神野雅文

Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie,  
University of Toulouse 3

David Buso

Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie,  
University of Toulouse 3

Georges Zissis

## 1. はじめに

次世代光源として期待されている LED は、従来の光源に無い高速応答性という特長がある。これをを利用して LED をパルス駆動すると、直流点灯時に比べて同じ光束（光の量）で 2 倍程度の明るさを人間が知覚するという効果を著者らは発見した。本共同研究は、知覚輝度向上のメカニズムの検証を通して、用途に応じた LED 点灯条件の最適化や高効率のパルス点灯回路の開発などを経て、LED の特性（長寿命・省電力）を活かしたまま、さらなる省電力(最大で半減)を達成する表示灯や照明のシステムを開発することを目的とする。

## 2. パルス点灯による知覚輝度向上

パルス状の発光について、観測者が実際の光量以上に明るく感じるという現象は、フラッシュランプのような単発の閃光については從来から知られていた (Broca-Sulzer 効果)。一方、繰り返しパルスについてはそのような効果は無いというのが定説であった (Talbot-Plateau 則)。ところが、Talbot らの実験は 50 年以上前になされたものであり、当時は電球とスリット付き回転円板の組み合わせで繰り返しパルス光を得ていたため、パルスの立ち上がりや立ち下がりを速くすることが難しく、理想的なパルスではなく、三角波に近い発光波形であったと思われる。

我々は、LED のように、明滅する光の立ち上がりと立ち下がりが数十マイクロ秒以下という高速応答性を持つ光源を用いた場合、「ちらつきを知覚する限界周波数以上の高繰り返しパルス光の強度については、人間はその時間平均強度をパルス光の強度として認識する」という Talbot-Plateau の法則から外れて、繰り返しパルスについてもパルス光による知覚輝度の向上が見られるのではないかという仮説を立て、実験的に検証した。

図 1 に知覚輝度向上効果の検証実験手順を示す。同じ仕様の LED について入力電力と全光束の関係を実測し、同じ特性を持つものを選び出す。これらを並べて暗室内に配置し、一方をパ

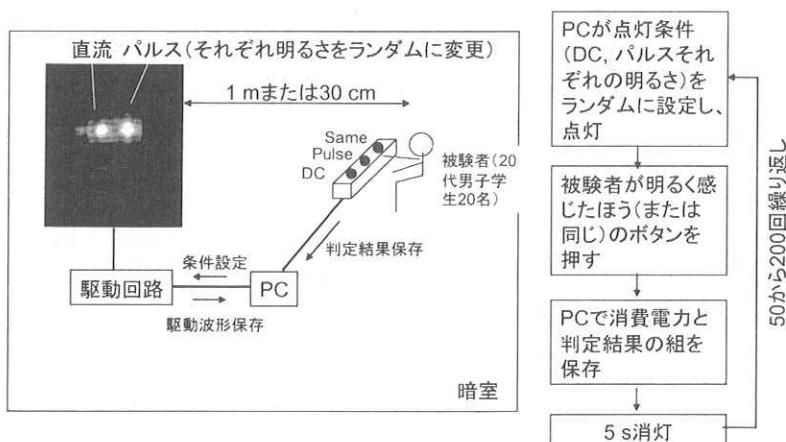


図 1: 知覚輝度向上効果の検証実験手順

ルス、他方を直流電流で駆動する。2つのLEDへの注入電力をコンピュータで制御し、それぞれランダムな値に設定する。被験者は直流点灯とパルス点灯のどちらが明るく感じるか、または同じ明るさに感じるかを判断し、コンピュータに接続されたジョイパッドのボタンを押すことで、それぞれのLEDへの注入電力と、被験者の判定結果の組が記録される。その後、5秒間消灯した後、同様の実験を50~200回繰り返す。実験は、LEDを直接見る場合と、照明として用いる場合の2通り行った。LEDおよび照明対象と、被験者との位置関係は図2および図3に示すとおりである。LEDは日亜化学、NSPB500S(青)、NSPG510S(緑)、NSPR510CS(赤)およびNSPW500DS(白)を用いた。

図4に青色LEDを用い、LEDを直視したときの実験結果の一例を示す。同一被験者の50回試行について、被験者の判断(直流のほうが明るい、同じ、パルスのほうが明るい、の3通り)ごとに直流駆動とパルス駆動の注入電力の組をプロットする

(図4左)。次に、あらかじめ測定した各LEDの注入電力と全光束の関係を用いて、同図の軸を全光束に変換する(図4右)。この図において、被験者の判断が「同じ」である点について、最小二乗法により原点を通る近似直線の傾きを求める。図4では傾きが0.54となっており、被験者に同じ明るさを感じさせるために必要な全光束の値は、直流点灯1に対してパルス点灯では0.54で済むということになる。ここで、知覚輝度向上率をこの傾きの逆数(この場合 $1/0.54=1.85$ )で定義する。なお、直流点灯とパルス点灯とで注入電力を同程度にすると、パルス点灯の場合には電力注入が極短い時間に集中するため(例えばデューティ比10%では直流点灯時の10倍の電力を全体の1/10の時間に集中して注入する)、発光効率が低下する。そのため、図4の左図と右図とで近似直線の傾きが異なる。

図5に点灯周波数による知覚輝度向上率の変化を示す。青色LEDを直視し、デューティ比を5%(左

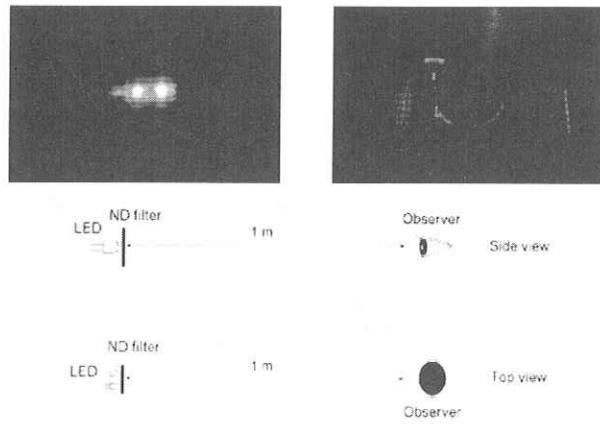


図2: 点灯時および消灯時の光源の様子と、光源と被験者的位置関係(LEDを直視した場合)

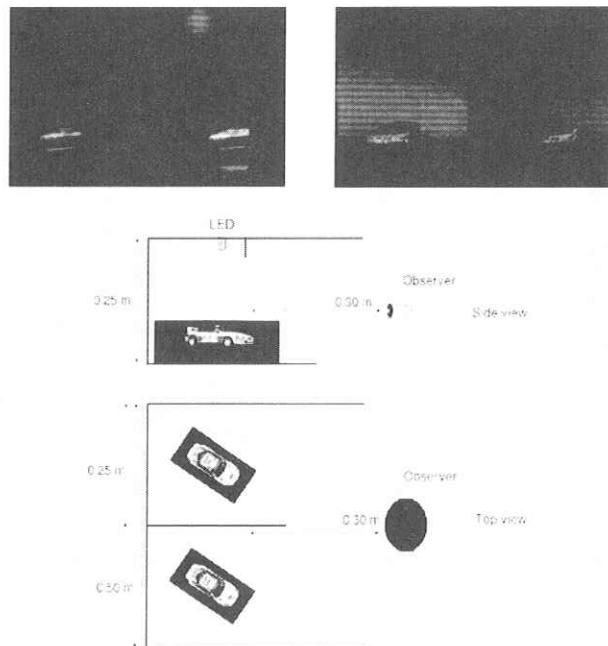


図3: 点灯時および消灯時の観測対象の様子と、光源と観測対象および被験者的位置関係(LEDを照明光源として使用した場合)

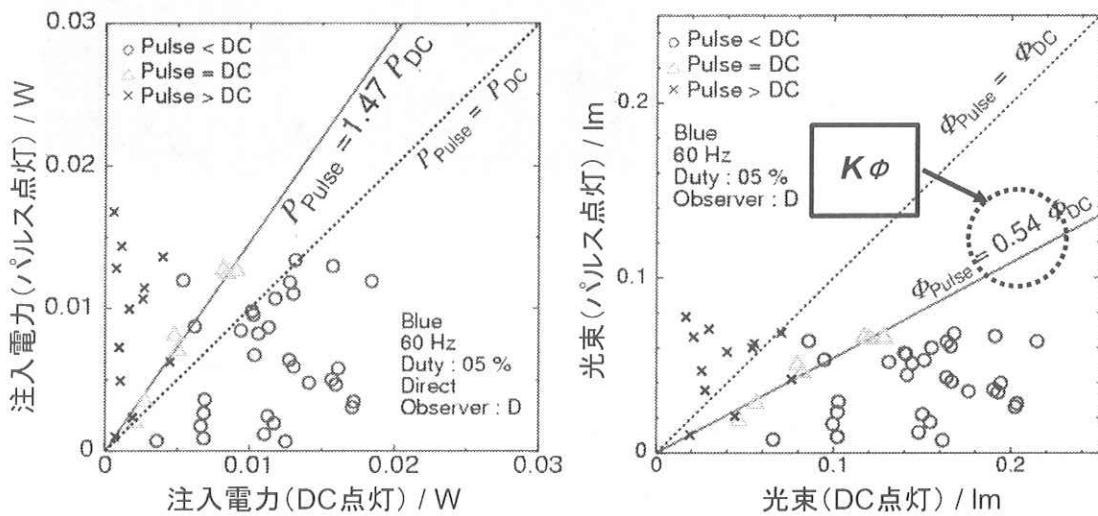


図 4: 実験結果の一例

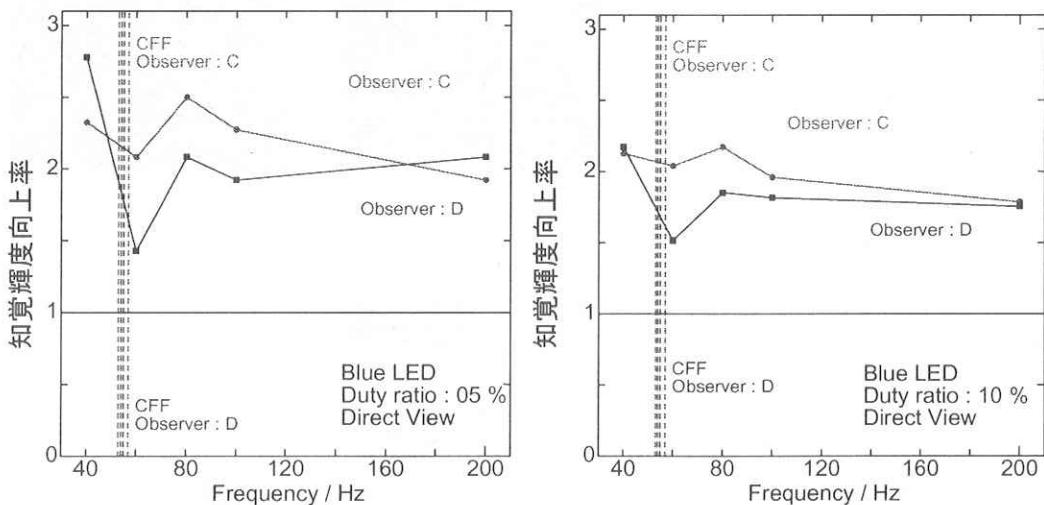


図 5: 点灯周波数による知覚輝度向上率の変化 (左: デューティ比 5%, 右: デューティ比 10%)

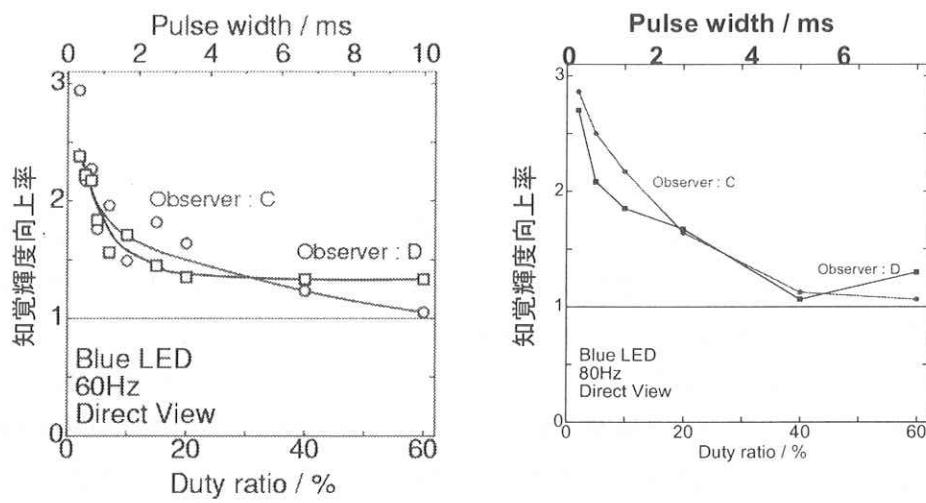


図 6: パルス幅 (デューティ比) による知覚輝度向上率の変化 (左: 点灯周波数 60 Hz, 右: 点灯周波数 80 Hz)

図) または 10% (右図) とした。図中の CFF と記した値は臨界融合周波数で、被験者がちらつきを感じる最大の点灯周波数である。この図より、ちらつきを知覚する限界周波数以上の高繰り返しパルス光の強度についても、LED を用いることで知覚輝度向上効果が得られることがわかった。また、他の発光色の LED についても、点灯周波数 60 Hz, デューティ比 5%において 1.5~2.0 程度の知覚輝度向上率が得られた。

図 6 にパルス幅 (デューティ比) による知覚輝度向上率の変化を示す。青色 LED を直視し、点灯周波数を 60 Hz (左図) または 80 Hz (右図) とした。パルス幅を 5 ms 以下にすることで知覚輝度向上効果が現れ、さらにパルス幅を短くすることで知覚輝度向上率が上昇することがわかった。

### 3. パルス点灯時の発光色変化が知覚輝度向上率に与える影響

前節で述べたように、直流点灯とパルス点灯とで注入電力を同程度にすると、パルス点灯の場合には電力注入が極短い時間に集中する。このとき、発光効率が低下するのと同時に、発光波長も変化する。したがって、前節の方法により求めた知覚輝度向上率 (1.5~2.0 程度) には、直流点灯とパルス点灯で発光色が異なることが被験者に与える心理的な効果を含んだ数値となっている。前節で求めた知覚輝度向上率から、発光色変化による心理的な効果の寄与を分離し、パルス点灯の寄与を求めるため、次に記すような解析を行った。

発光色の違いを定量化して評価するために、図 4 における各点について、直流点灯とパルス点灯の各 LED の CIELAB 色度空間での座標を求め、2 点間の距離 (色差)、

$$\Delta E = \sqrt{(L^*_{DC} - L^*_{pulse})^2 + (a^*_{DC} - a^*_{pulse})^2 + (b^*_{DC} - b^*_{pulse})^2} \quad (1)$$

により発光色シフト量を定量化し、知覚輝度向上率との関係を検証した。

図 7 に青色 LED を周波数 60 Hz, デューティ比 5%で点灯したときの実験結果について、上記の方法で色差と知覚輝度向上率との関係をプロットしたものを示す。LED を直視した場合 (左図) と LED を照明として用いた場合 (右図) のいずれの場合も、色差  $\Delta E$  が 0 に近づくにつれて知覚輝度向上率が減少しているが、LED を照明として用いた場合には、測定点を外挿すると、 $\Delta E=0$  で知覚輝度向上率が 1.3 程度となり、これがパルス化による知覚輝度向上率であるといえる。

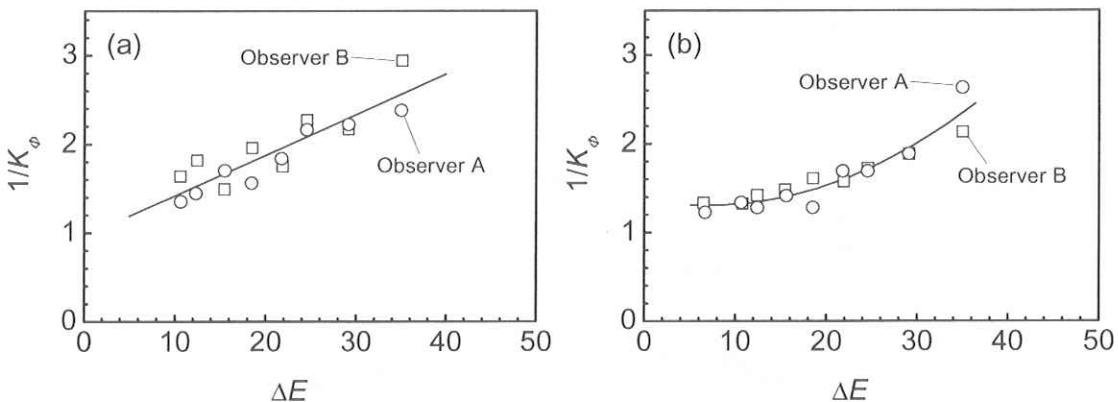


図 7: CIELAB 色度空間での色差と知覚輝度向上率との関係 (左: LED を直視した場合、右: LED を照明として用いた場合)

#### 4. 発光色が変化しない条件での知覚輝度向上効果の検証

前節では CIELAB 色度座標を用いて LED の発光色の違いを定量化し、直流点灯とパルス点灯で発光色が異なることが被験者に与える心理的な効果を分離することを試みた。ところが、被験者個々の心理的な効果を 1 つの尺度で定量化することは原理的に難しい面があるので、発光色が変化しない条件での知覚輝度向上効果を実験的に求め、多角的に検証する必要がある。そのため、次に記すような点灯方法で実験を行った。

注入電力と全光束の関係を実測し、特性の揃った 10 個の LED を 2 組用意する。これらをそれぞれ図 8 に示すような駆動波形で点灯する。図 8 左の波形では、10 個の LED が同期して同じタイミングでパルス点灯する。図 8 右の波形では、10 個の LED が順番に点灯していくものであり、デュー

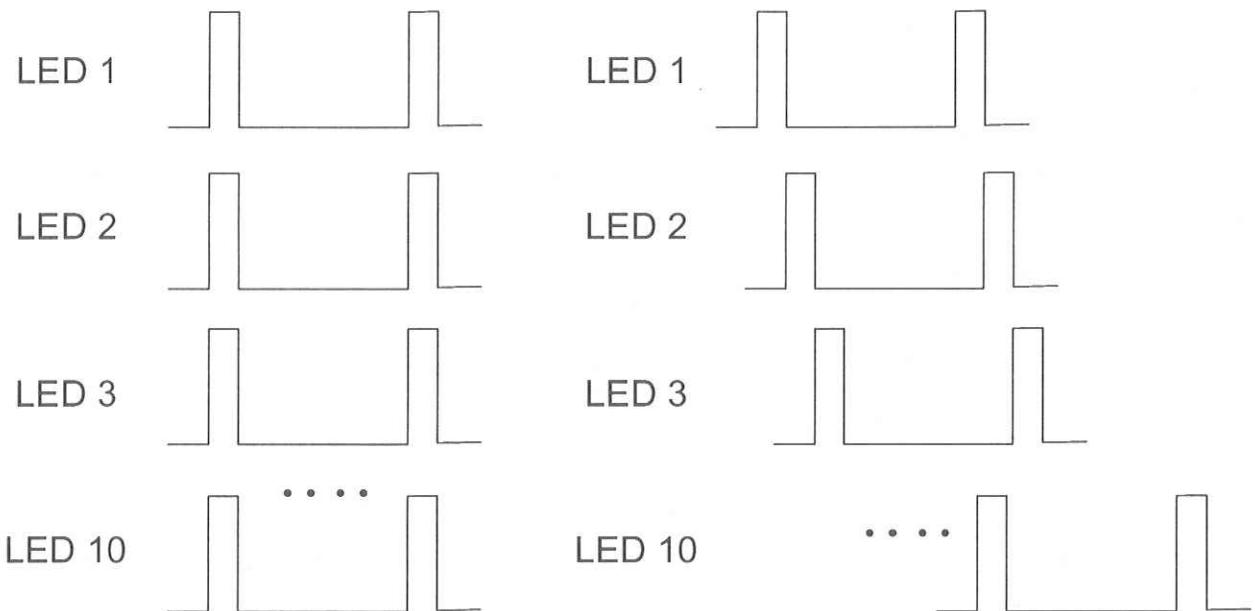


図 8: 発光色を揃えて実験するための LED の駆動波形の概略図（左: 同期点灯方式、右: 順次点灯（擬似直流）方式）

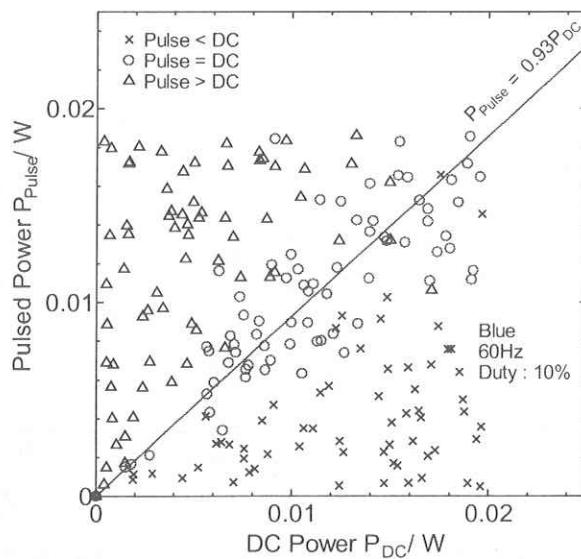


図 9: 同期点灯方式と順次点灯方式により点灯した LED の知覚輝度検証実験結果

ティ比を 10%にすることで、10 個の LED の発光波形の和が直流と同等になる。個々の LED は全く同じ周波数、パルス幅、振幅のパルスで点灯しているので、発光色や発光効率はすべての LED で同じになる。この 2 組の LED の点灯方式（同期点灯と順次点灯）について第 2 節と同様の被験者による知覚輝度判定実験を行うことにより、発光色を同じにし、パルス化の効果のみが現れるようにして知覚輝度向上率を求める実験を行った。

図 9 に、同期点灯方式と順次点灯方式の比較により、パルス化による LED の知覚輝度向上効果を検証した実験結果を示す。青色 LED を直視した場合であり、1人の被験者の判定結果を示している。同じ明るさに見える場合の注入電力測定点について、近時直線の傾きが 0.93 となっており、知覚輝度向上率が  $1/0.93=1.08$  と計算される。今後、複数の被験者により検証を行い、LED の発光色や、デューティ比等の点灯条件も変化して検証する必要がある。

## 5. まとめと今後の展望

LED のパルス点灯により、ちらつきを感じない程度の速い繰り返し周波数でも 1.5~2.0 度の知覚輝度向上効果が得られた。点灯条件としてはパルス幅を短くすることが必要であり、およそ 5 ms 以下で知覚輝度向上効果が現れた。ただし、これについてはパルス点灯による発光色の変化が与える心理的な効果を含んでいる。CIELAB 色度座標を用いた解析や、複数の LED の同期点灯と順次点灯の比較実験の結果から、純粋なパルス点灯の効果はこれより小さく、1~1.5 度と推測される。今後、被験者の数を増やし、LED の発光色や、デューティ比等の点灯条件も変化させて検証する必要がある。

# 四国西部地域に分布する火山灰の研究

愛媛大学大学院理工学研究科教授

榎 原 正 幸

株式会社四国総合研究所土木技術部

池 田 倫 治

株式会社四国総合研究所土木技術部

辻 智 大

## I. テフラにおける火山地質学的課題

### (1) テフラから復元するマグマ溜りの層状構造

島弧および大陸縁辺における大規模火山噴出物は、基底部から最上部に向かってより未分化な組成へと変化する事例が知られている (e.g., Druitt and Bacon, 1989; Schimincke et al., 1999). この組成的な変化は、噴火時点で酸性マグマ溜まりが組成的な層状構造を形成していたことを示唆している (e.g., Hildreth, 1981; Freeiz and Mahood, 1986; Brown et al., 1998).

### (2) 火山噴火のトリガー

火山は、一定の時間・空間の範囲で活動し、寿命がある。これは、これら火山が孤立した高温部分溶融体（マントルダイアピル）が上昇することによって生じたことを示している (Sakuyama, 1983).

地殻内部を上昇してきたマグマが、LNB（浮力中立点）付近で形成されたマグマ溜りからさらに上昇して噴火するには、更なる要因が必要であると考えられている。その要因として、以下のようなものが考えられている；

- ①新たなマグマのマグマ溜りへの注入,
- ②マグマの冷却・結晶化による水の過飽和,
- ③冷却・結晶化による分化した液の上昇,
- ④マグマ溜りの周囲の地殻の変形.

上記の火山噴火のトリガーは、一回の大規模火山噴火によって形成された降下火山灰を検討することで解明することができると考えられる。さらに、これらの研究によって、従来、明らかでなかった九州を給源とする広域テフラの主降灰域を特定することが可能になると考えられる。

## 2. 四国に分布する後期更新世以降の広域テフラの火山地質学的および記載岩石学的特徴

本研究では、更新世中期以降、四国西部周辺に堆積したと推定される、広域テフラおよび九州北部を給源とする中・小規模のテフラの火山地質学的および記載岩石学的特徴について纏める。

## II. 研究結果

### 1. 大分県竹田氏久住町の鬼界アカホヤ火山灰

今回、地質調査の対象とした地点は、大分県竹田市久住町の露頭である（図 3）。この地点の露頭において、詳細な地質柱状図を作成した。

#### （1）採取試料

分析試料は、大分県竹田市久住町の四ツ口の大露頭（図 3 右図）(Fig. 1: N33° 2' 18", E131° 21' 20") から採取した。この大露頭は、この地点に広がる丘陵部の一部を農業用土壤としての土壤採取によって削り取られて作られたものである。この地点の地質層序を図 2 左図に示す。この露頭は、下位から、九重第一降下軽石堆積物 (Kj-P1) が 2 m 以上、火山灰質褐色土壤（ローム層）が約 2.5 m、暗褐色土壤（腐植土）が約 80 cm、AT に富む褐色土壤（AT）が約 20 cm、火山灰質褐色土壤（ローム層）が約 1.3 m、黒色土壤（腐植土）が約 70 cm、鬼界アカホヤ火山灰 (K-Ah) が約 15 cm、10 cm 程度の黒色土壤（腐植土）を挟んで、段原降下スコリア (DS) が約 10 cm、黒色土壤（腐植土）が約 1.7 m によって構成される。

鬼界アカホヤ火山灰は帶褐色の降下火山灰濃集層からなる。火山灰層の上下の黒色土壤との境界は明瞭である（図 3 右図）。

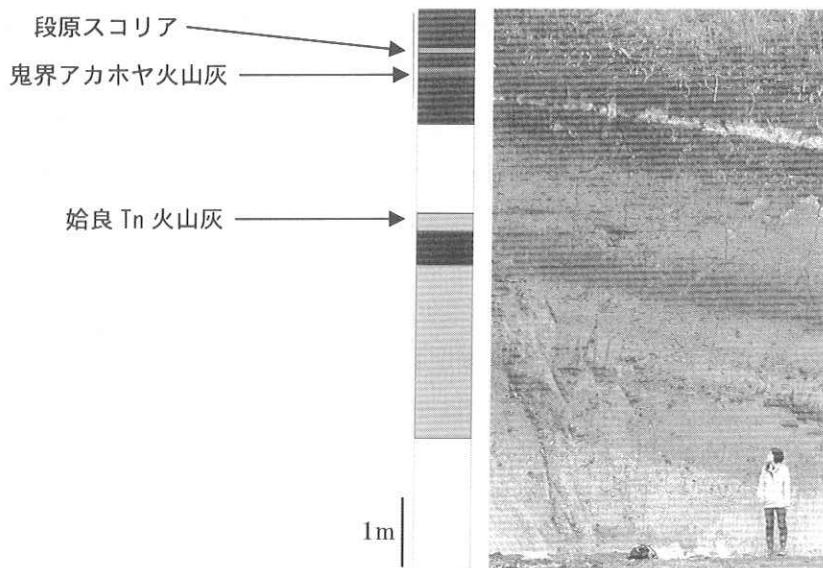


図 3. 大分県竹田市久住町における露頭写真および柱状図（榎原ほか、2008 を一部改変）。

#### （2）研究方法

##### a. 前処理

火山灰試料の前処理は以下の手順で行った。

- ① 試料をアルミホイルに包み、定温乾燥機（50°C に設定）で約 6 時間乾燥させる。
- ② 乾燥させた試料を約 4-5g 量りとる。
- ③ テトロン製 #250 メッシュ（粒径 0.063-0.125mm）を使い、鉱物が壊れないよう流水下で

粘土粒子を取り除く。

④その後、金属ふるい（粒径 0.25mm 以下, 0.25–0.5mm, 0.5–1.0mm）に試料を乗せ、ふるい分けする。

⑤金属ふるいにアルミホイルをかぶせ、定温乾燥機で約 6 時間乾燥させる。

⑥乾燥させた試料の中から、超音波洗浄で壊れやすい黒雲母を取る。

⑦黒雲母を取り除いた試料（粒径 0.25–1.0mm）を、超純水で超音波洗浄する。約 30 分に 1 回水を入れ替える。2, 3 回で大体きれいになる。水を捨てる際、斑晶を流さないよう、#250 メッシュを使用する。

⑧水の濁りがなくなったら、#250 メッシュにかけながら水を捨て、#150 メッシュ（粒径 0.125–0.25mm）を使い  $\phi$  0.063–0.125mm と  $\phi$  0.125mm～のものに分ける。

⑨⑧で分けたものをそれぞれ乳鉢に移し、定温乾燥機で約 6 時間乾燥させる。

⑩乾燥させた試料をふるいにかけ、粒径 4.0～, 2.0～4.0, 1.0～2.0, 0.5～1.0, 0.25～0.5, 0.125～0.25 mm, 0.063～0.125 mm にそろえる。

⑪双眼実体顕微鏡を用いて斑晶を分け、粒径ごとに構成粒子量比を出す。

#### b. 火山灰の記載方法

洗浄・乾燥した粒径 1/8 ~ 1/16mm の試料を四分法で約 200 粒子選出し、実体双眼顕微鏡および偏光顕微鏡で、斑晶鉱物およびガラスの量比を求めた。同定された重鉱物は、斜方輝石・单斜輝石不透明鉱物の 5 種類である。

各テフラの火山ガラスの形状は、吉川（1976）に基づき、1/8~1/16mm の粒度の火山ガラスを扁平型（II 型）、中間型（C 型）、多孔質型（T 型）、その他（O 型）に区分して記録した。

#### c. 屈折率測定

火山ガラスの屈折率測定には、浸液の温度を直接測定して屈折率を求める温度変化型測定装置“MAIOT”（古澤、1995）を使用した。測定精度は  $\pm 0.0001$  程度である。屈折率測定には、 $\phi$  0.125–0.063mm のガラスを使用した。測定個数は 30 個である。

#### d. EDS による斑晶および火山ガラスの主要成分分析

火山ガラスは非晶質であるため風化に対して脆弱である。そのため、地層中の火山ガラスは、地下水や降水によって変質する可能性が大きい（荒牧・原村、1966；Fisher and Schmincke, 1984；喜多ほか, 1999；岩崎・榎原, 2004）。例えば、風化作用によって、火山ガラス中の  $K_2O$  および  $Na_2O$  が周縁部や割れ目に沿って溶脱しやすい（岩崎・榎原, 2004）。従来、EDS 分析用火山ガラス薄片の作成方法は、スライドガラス上に火山ガラス片を載せ、不定方位でエポキシ樹脂で封入するという簡単な方法で行ってきた（たとえば、奥村, 1991；奥村, 1993；黒川, 1999）。しかしながら、これらの方では、樹脂に埋め込んだ

ガラス片の傾きによっては、変質部も含めて分析してしまうため、分析値が分散する可能性がある。また、X線発生領域の深さや水平方向への広がりのため、ガラス試料の薄い部分を測定すると、測定値にばらつきが生じる場合も考えられる。

そこで、本研究では、火山ガラスの未風化部に最も近いデータを出すために、分析用火山ガラス試料を岩崎・榎原（2004）および中村・榎原（2006）の方法に従って作成した。以下、本研究における実体鏡下でのガラス片の薄片試料作成方法を示す。

- ①あらかじめ、長軸径をそろえた火山ガラスを用意する。
- ②0.25 mm 以上の火山ガラスは、スライドガラスで作成した自作の試料台上の凹部に長軸をほぼ垂直に立てて定置する（岩崎・榎原、2004）。0.25 mm 以下のものは透過電子顕微鏡用の銅製シートメッシュで作成した試料ホルダーを使用する（中村・榎原、2006）。
- ③試料台上でエポキシ樹脂によって火山ガラス片を封入する。
- ④エポキシ樹脂で硬化後、ノギスを用いて火山ガラス片の長軸径がほぼ 1/2 になるまで 1 μm および 0.25 μm のダイヤモンドスラリーで試料を研磨する。
- ⑤カーボン蒸着する。

テフラ中の火山ガラスおよび斑晶鉱物の定量分析は、愛媛大学理学部生物地球圈科学科に設置している走査電子顕微鏡（JEOL JSM - 5400）に Oxford 社製 X 線検出器を装着した EDS を使用した。火山ガラスを分析する場合、測定条件は加速電圧 10 kV、電流値  $4.00 \times 10^{-10}$  A、測定時間 200 秒で、各鉱物の場合、加速電圧 15 kV、電流値  $4.00 \times 10^{-10}$  A、測定時間 100 秒である。ビームは、火山ガラスおよび斜長石では  $4 \times 4 \mu\text{m}$  の正方形に拡張し、他の鉱物では  $1 \mu\text{m}$  に絞って分析した。また、火山ガラスの分析では、風化による影響などを避けるため、火山ガラスの研磨面の中央部付近を分析した。

火山ガラスは各粒子ごとに 5 点分析し、その平均値を求め、分析値とした。測定対象元素は Si, Ti, Al, Fe, Mn, Mg, Ca, Na および K の 9 元素である。火山ガラスの分析に際しては、標準試料として、黒曜石（Astimex Scientific Limited 社製）および合成ガラス（NIST 620）を用いて、正確度および再現性をチェックした。また、以下の測定結果では、特に断らない限り、火山ガラスの分析値のトータル 100 wt. % として計算した値を用いた。

### （3）構成粒子の量比および火山ガラスの形態

構成粒子およびそれらの量比を図 4 にまとめた。久住町の鬼界アカホヤ火山灰は、構成粒子として火山ガラスを 95% 以上含むガラス質火山灰で、少量の斑晶鉱物として斜長石、单斜輝石、斜方輝石および不透明鉱物を含む。

火山ガラスの形態は、扁平型（Ha, Hb）が最も多い、次いで扁平（Ca, Cb）が卓越する。また、火山ガラスは褐色のものを含む。

### （4）火山ガラスの屈折率

火山ガラスの屈折率の値は、1.5018～1.5125 の範囲に分散している。分布の最頻値は、

1.5099～1.5119付近にある。

### (5) 火山ガラスの化学組成

火山ガラス・斑晶鉱物中ガラス包有物の主要元素組成およびトータル値を100wt.%に再計算した値を表2に示す。代表的な酸化物で100wt.%に再計算した値を以下に示す。

これらの火山ガラスおよび斑晶鉱物中ガラス包有物の主要元素組成に関して、ハーカー図を作成した(図5)。その結果、鬼界アカホヤ火山灰中の火山ガラス片は、流紋岩質およびデイサイト質のほぼ2つの組成領域に分けられる。さらに、デイサイト質組成のスコリア中に流紋岩質ガラスが含まれるもののが存在し、組成的には不連続であることも明らかになった。

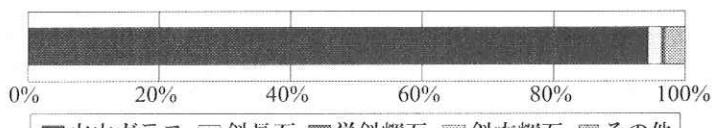


図4. 鬼界アカホヤ火山灰の構成粒子および量比。

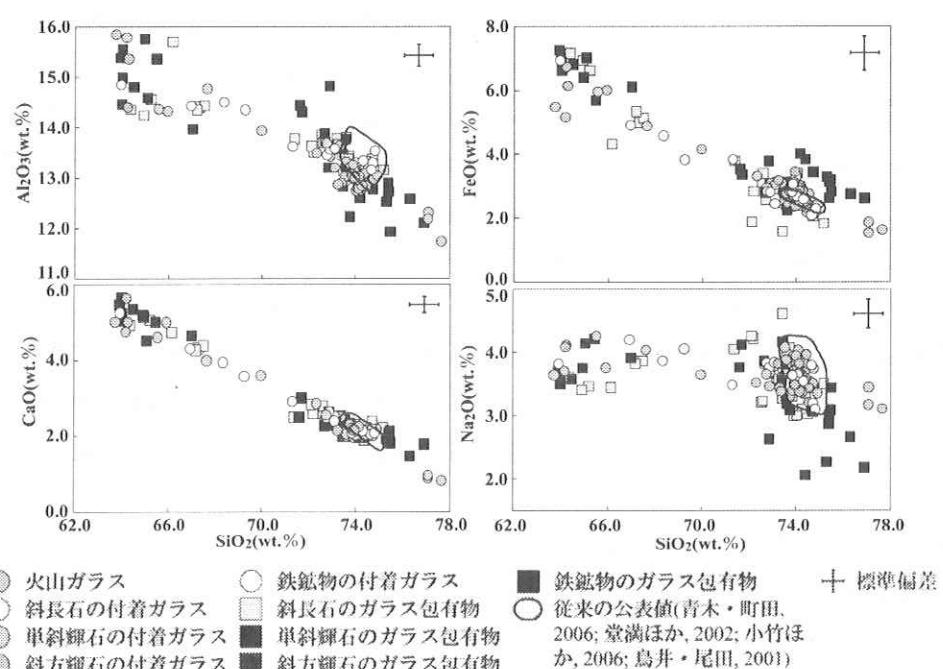


図5. 鬼界アカホヤ火山灰中の火山ガラスおよび斑晶の付着ガラスのハーカー図。

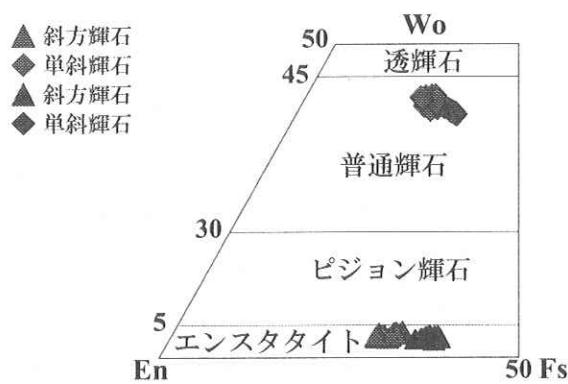


図 6. 単斜輝石および斜方輝石の化学組成.

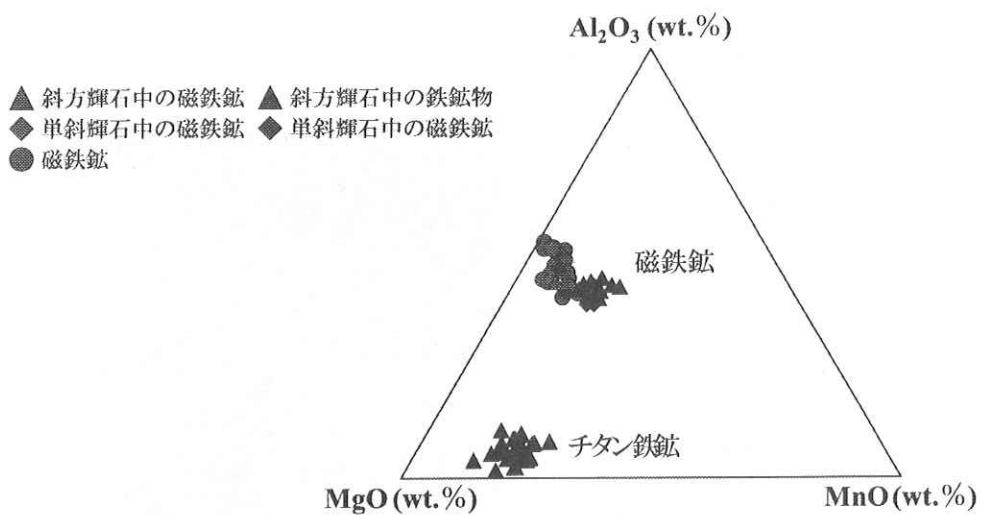


図 7. Fe-Ti 酸化物の微量元素ダイヤグラム.

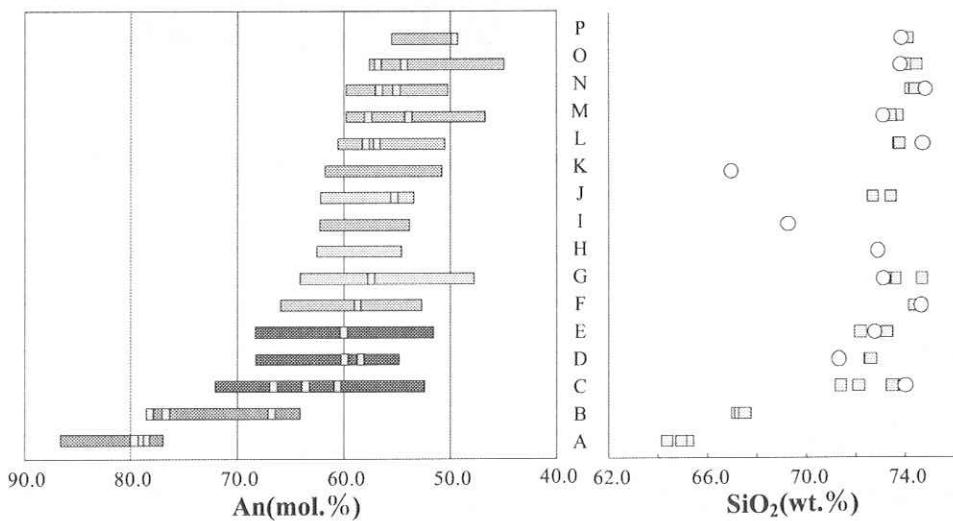


図 8. 斜長石の化学組成と付着ガラスおよびガラス包有物の化学組成の関係.

左図：斜長石の An 成分の範囲とガラス包有物と接する部分の An 量. 図では An 量が高い斜長石から順に配列している. 右図：A～P の斜長石における付着ガラスおよびガラス包有物

の  $\text{SiO}_2$  量. 斜長石の An 量が低くなるとともにガラスの  $\text{SiO}_2$  量が高くなる傾向を示す.

#### (6) 斑晶の化学組成

輝石は、Mg#に基づいて、2つのタイプに分けられる. すなわち、単斜輝石および斜方輝石とともに、 $\text{SiO}_2$  に富むガラス（流紋岩質）を伴う輝石が、相対的に  $\text{SiO}_2$  に乏しいガラス（デイサイト質）を伴うそれより Fe に富む傾向が認められる（図 6）.

Fe-Ti 鉱物に関しては、 $\text{SiO}_2$  に富むガラス（流紋岩質）を伴う磁鐵鉱が相対的に Mn に富み、かつ  $\text{SiO}_2$  に乏しいガラス（デイサイト質）にはチタン鉄鉱が伴われない（図 7）.

斜長石は、より An に富むものが、より  $\text{SiO}_2$  に富む包有ガラスもしくは付着ガラスを伴っている（図 8）.

## 2. 鹿児島県志布志市の大隈降下軽石堆積物

#### (1) 採取試料

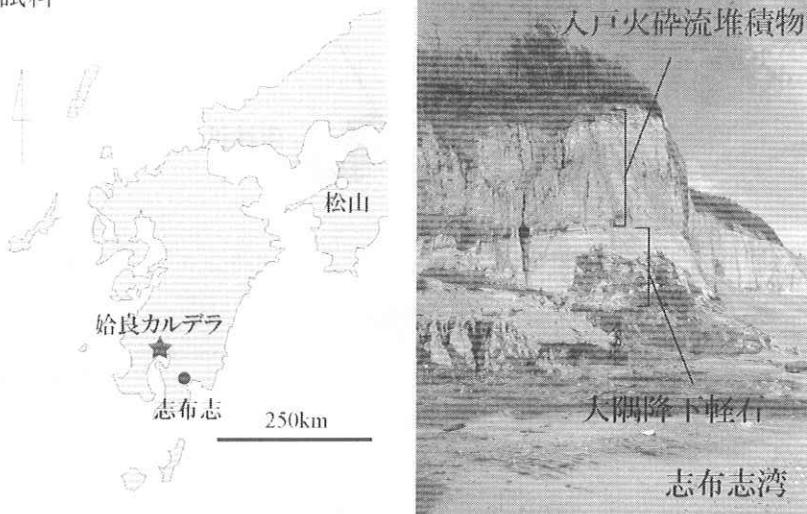


図 9. 試料採取地点および露頭写真.

分析試料は、大木・早坂（1973）によって記載された鹿児島県志布志市海岸沿いの大露頭において行われた（図 9）.

#### (2) 研究方法

研究方法の 1 と同様である.

#### (3) 構成粒子組成および量比

大隈降下軽石堆積物の基質は、ガラスを主体とするガラス質テフラで、軽鉱物として斜長石および石英を含む. 斑晶鉱物は斜長石、石英、単斜輝石、斜方輝石および鉄鉱物である. 火山ガラスの形態は、軽石型が最も多く、ついで少量の扁平型および塊状型が卓越する（図 10）. また、火山ガラスの色は無色である.

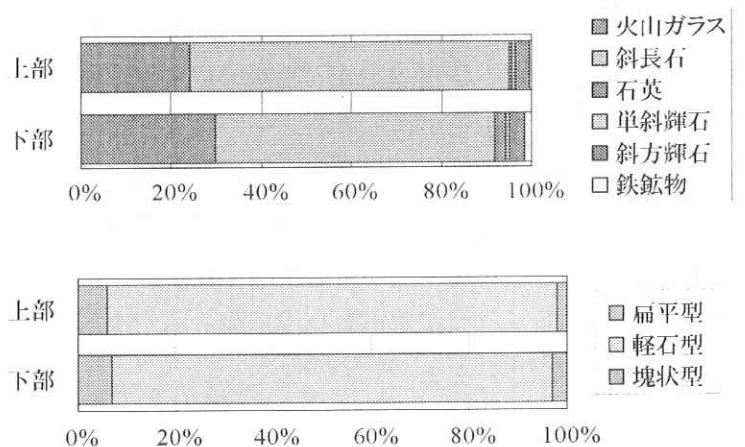
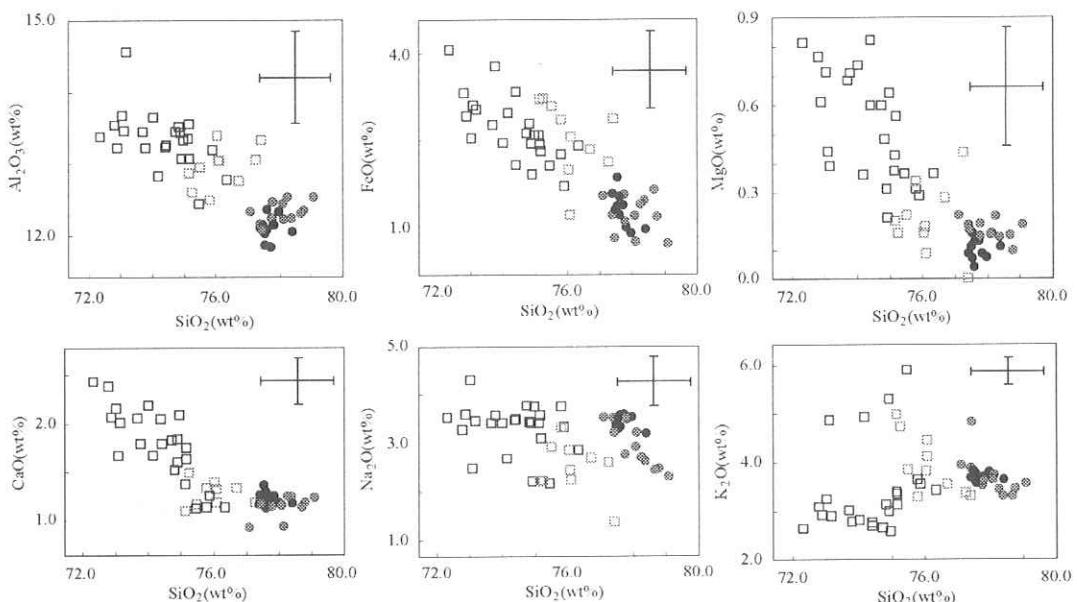


図 10. 大隈降下軽石堆積物の基質の構成粒子およびその量比とガラスの形態.

#### (4) 火山ガラスの化学組成



● 大隈降下軽石・上部 ● 大隈降下軽石・下部 □ 大隈降下軽石・cpx中のガラス包有物 □ 大隈降下軽石・cpx中のガラス包有物  
図 11. 大隈降下軽石堆積物中の火山ガラスおよび単斜輝石中のガラス包有物のハーカー図

火山ガラスの主要元素分析では、従来、知られていなかった化学組成の多様性が明らかになった。すなわち、大隈降下軽石堆積物中の火山ガラス片の化学組成は、上部が下部と比較して、SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO に乏しく、FeO, CaO, Na<sub>2</sub>O および K<sub>2</sub>O にやや富む傾向が認められる。また、単斜輝石中のガラス包有物は、火山ガラス片と比較して、著しく SiO<sub>2</sub> に乏しく、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, FeO, MgO および CaO に富む（図 11）。

### 3. 考察

本共同研究では、愛媛県西部から多数の地点で見出される鬼界アカホヤ火山灰および姶良 Tn 火山灰の標準データを得るため、大分県および鹿児島県の試料を採取し、岩石学的に検討した。その結果、多数の新しい知見が得られた。一つは鬼界アカホヤ火山灰のガラスの主要成分がバイモーダルであること、もう一つは姶良 Tn 火山灰と同時層である大隈降下軽石堆積物において、火山ガラス片の化学組成と单斜輝石中のガラス包有物のそれが著しく異なる点である。これらの事実は、両者を形成したマグマ溜りが従来知られていたより、より組成的に不均質であったことを示唆している。この不均質性は、各広域火山灰の主分布域を解明するために活用できる可能性がある。

# 生物検定法による絶縁油中 PCB の簡易定量法

愛媛大学農学部環境先端技術センター副センター長  
京都電子工業株式会社  
株式会社シーズテック

本田 克久  
高木 陽子  
戸井田 秀基

## 【はじめに】

650万台にも及ぶといわれている微量PCB汚染廃電気機器等は、PCB特別措置法により2016年7月までに保管事業者において処理が義務づけられた。2010年1月に環境省廃棄物・リサイクル対策部産業廃棄物課において簡易定量マニュアル<sup>1)</sup>が策定され、従来の厚生省告示192号別表第2と比較してより簡易な定量法が迅速分析・処理に寄与することとなる。

我々が開発してきた、唯一の生化学的方法を利用したフロー式イムノセンサー法<sup>2)</sup>は、検出下限値0.15mg/kg以下、正確さとしての真値と測定値の差が±20%以内、繰り返し測定の変動係数15%未満の性能を満たした測定技術でありJIS C 2320で規定されているすべての電気絶縁油種に対して適用可能であることが認められた。また、JIS K 0464「PCBの免疫測定方法通則」により分析の精度が定量法として規定されている。

一方、簡易定量マニュアルで規定されている前処理の回収率確認法は、PCB #169に特異的に反応し、測定対象のPCB(KC)には反応しない抗体を用いた同イムノセンサーによる測定法により確立できている。本報告では、PCB内部標準物質(PCB #169)を添加した絶縁油試料について正確性、再現性および前処理の回収率確認の実証データについて報告する。

## 【方法】

### 絶縁油試料

絶縁油試料は、JIS C 2320に規定の1種~7種の電気絶縁油およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DOP)の濃度既知のPCB含有絶縁油10試料を使用した(Table 1)。

### 前処理

前処理は、愛媛大学の技術を利用したPCB分析前処理装置(株式会社シーズテック社製)を使用した(Fig.1)。絶縁油試料約25mgと200ng/mLのPCB内部標準物質(PCB #169)40μLを精製カラム(硫酸シリカゲルと硝酸銀シリカゲルより構成された多層カラム)に添加した後、85°Cで60分間加熱保持した。冷却後、ヘキサン20mLを送液し、PCBを精製カラムに連結した濃縮カラム(アルミナカラム)に吸着させた。濃縮カラムを乾燥後、反転させ、加熱下0.2mLのDMSO(ジメチルスルホキシド)を回収し、これを測定試料とした。

Table 1 The oil samples

Sample	Oil	GC/MS mg/kg
No.1	JIS1	0.53
No.2	JIS1	0.72
No.3	JIS1	0.28
No.4	JIS2	0.51
No.5	JIS3	0.52
No.6	JIS4	0.56
No.7	JIS5	0.51
No.8	JIS6	0.50
No.9	JIS7	0.50
No.10	DOP	0.48

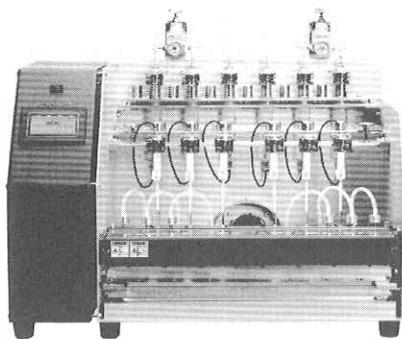


Fig.1 Preparation system for analysis of PCB

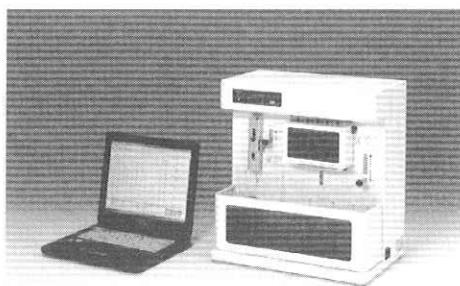


Fig.2 Flow Immunosensor DXS-610

### 測定

測定は、フロー式イムノセンサーDXS-610（京都電子工業社製）を用いた(Fig.2)。抗PCB抗体-①(絶縁油中PCB分析絶縁油中に含まれるKC混合物に特異的に反応し、PCB #169に反応しない抗体)、測定セル、バッファーは、同社製のPCB測定キットを用い、簡易定量マニュアル<sup>1)</sup>に従い測定を行った。換算係数選択のための測定は、抗PCB抗体-②(KC600に高い反応性を有する抗体)回収率確認の測定は、抗PCB抗体-③(絶縁油中に含まれるKCに反応しない抗体)を用い、簡易定量マニュアル<sup>1)</sup>に従い測定を行った。抗PCB抗体-③の特異性についての詳細は本学会口頭発表1A-05で報告する。

### 【結果と考察】

絶縁油試料10検体について試料ごとに3回前処理、測定を行ったPCB測定値の変動係数とPCB#169測定値の変動係数をFig.3、PCB測定値とGC/MS測定値の比をFig.4に示す。

全ての試料について分析における繰り返し性が15%未満、GC/MS測定値との比は20%未満であることが確認された。

次に、絶縁油試料10検体について各試料ごとに3回前処理、測定を行ったPCB内部標準物質の回収率結果をFig.5に示す。

全ての試料について回収率は85%～110%の範囲内で収束している。

### 【結論】

生化学的測定法におけるPCB測定値の信頼性は、内部標準物質(PCB #169)を添加し、回収率を確認することにより、85%～110%の範囲内であれば保証される。

### 【参考文献】

- 1) 「絶縁油中の微量PCBに関する簡易定量マニュアル(第1版)」、環境省公表,102-123, 2010
- 2) 高木陽子 他：第18回環境化学討論会要旨集, 504-505, 2009

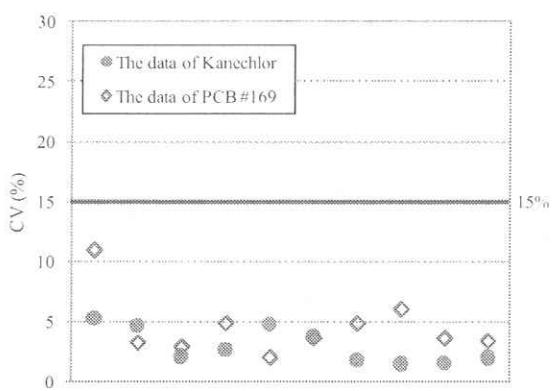


Fig.3 The reproducibility of the PCB determination method

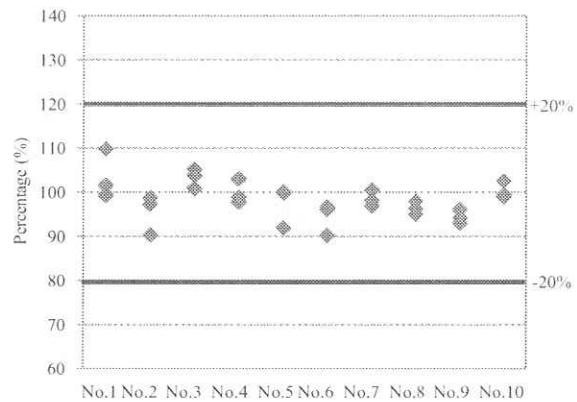


Fig.4 The comparison of Immunosensor value to GC/MS value

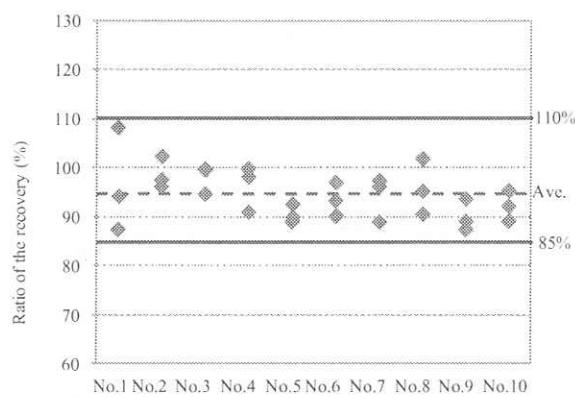


Fig.5 The ratio of the recovery for the internal standard material

# 魚肉タンパク質摂取による抗肥満効果および筋肉増強効果

愛媛大学農学部准教授

岸 田 太 郎

愛媛大学農学部特定研究員

水 重 貴 文

愛媛大学大学院農学研究科

魚 住 圭 佑

日本水産株式会社生活機能科学研究所研究員

川 端 二 功

肥満は生活習慣病をはじめとして、数多くの疾患の危険因子である。日本でも、食事の欧米化や運動不足などの生活習慣の偏りで、肥満が増加しており、特に男性ではいずれの年齢層でも増加している（厚生労働省「国民健康・栄養調査」平成19年）。肥満を予防・改善するには、食事、運動、薬による方法が挙げられる。その食事において植物性タンパク質の摂取に抗肥満効果があることはよく知られている（1）。しかし、動物性タンパク質が肥満に与える影響についての報告は少ない。

報告によると、高脂肪食摂取ラットにおいてスケトウダラのタンパク質を添加し与えた場合、他のタンパク質源（カゼイン、ツナ、鶏）を添加し与えた場合と比較して内臓脂肪の蓄積が抑えられた。この時、摂取エネルギーは変化しないにもかかわらず白色脂肪組織重量は有意に減少したことから、スケトウダラタンパク質（Alaska pollack protein : APP）摂取によるエネルギー消費の増大が示唆された（2）。現在、魚油の摂取における抗肥満効果は数多く報告されている（3）。しかし、魚肉タンパク質の摂取における抗肥満効果の報告は数少なく、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究ではこれについて代表的な白身魚のタンパク質であるAPPを用いて検討した。

## 実験方法

5週齢オスSD系ラットを室温 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 、12時間の明暗サイクル（明期3:00~15:00）に保ち、ステンレス製ゲージ内で個別飼育した。タンパク質源としてカゼインを用いた低脂肪（Cas-LF）飼料（#D12450B, Research diet, USA）を与えて5日間飼育し飼育環境に慣れさせた。その後、高脂肪飼料（#D12451, Research diet, USA）でタンパク質源をそれぞれ100%カゼイン、100%APP（Cas-HF、APP-HF）とした飼料をそれぞれ与える2群に分け（n=8）飼育した。餌および水は自由摂取させ、4週間飼育した。体重・摂食量は毎日測定し、解剖前3日間で糞を回収した。また、実験飼料に用いたタンパク質のアミノ酸組成と成分組成は表1に示した。

## 分析方法

屠体は粉碎後、Folchらの方法で総脂質量を測定した。すなわち、粉碎した屠体をクロロホルム：メタノール混液（2:1, v/v）でホモジネートした後、濾過し、0.37%塩化カリウム水溶液を加え、一晩放置した。その後、水層を除去し、クロロホルム：メタノール：水混和液（3:48:47, v/v/v）で数

回洗浄後、溶媒を除去し、残渣重量を脂質量とした。また屠体タンパク質量は、ケルダール法で、屠体水分量は、重量法で測定した。

血清の TG、コレステロールおよび HDL コレステロール濃度は、それぞれ酵素法に基づく市販のキット (TG-E テストワコー、コレステロール E テストワコー、HDL-コレステロール E-テストワコー：和光純薬) を用いて測定した。動脈硬化指数は  $\log(TG/HDL)$  の式で求めた (6)。

肝臓の総脂質は屠体と同様の方法で測定し、クロロホルム：メタノール：水混和液による洗浄前の抽出液を乾固、10% トリトン X 含有 2-プロパノールに再溶解し、血清と同様に肝臓総コレステロールおよび TG 濃度を測定した。

糞中胆汁酸量は Sheltawy、Losowsky らの方法に従って測定した。すなわち糞を凍結乾燥後に粉碎し、クロロホルム：メタノール = 1 : 1 溶液で 60°C で一晩抽出した。適量の抽出液を乾固後メタノールに再溶解し、NADP 存在下、37°C で  $3\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナで反応し、発生した NADPH を波長 340 nm で測定した。糞中総脂質量は屠体総脂質に準じ、ただし抽出は 3 回繰り返した。糞中タンパク質はケルダール法で測定した。

糞中難消化性タンパク質量はプロスキー法における酵素処理部分を簡略化した市販のキット (食物纖維測定キット: 和光純薬) を用いた。約 1g のサンプルを熱安定性アミラーゼ、グルコシダーゼ、プロテアーゼ酵素で人工的に消化し、非消化物中のタンパク質を体タンパク質測定と同じ方法で測定し、難消化タンパク質 (%) を求めた。

#### 統計処理

実験結果は各群の平均値  $\pm$  標準誤差で表した。各データの統計処理は Bonferroni の多重比較検定法および t-検定法を用いて行い、 $p < 0.05$  を有意とし、 $p < 0.12$  を傾向ありとした。

表 1 カゼインおよびタラタンパク質のアミノ酸組成、エネルギーおよび一般成分

		Casein	APP
Amino acid			
Taurine	(%)	0.00	0.57
Aspartic acid	(%)	6.41	9.18
Threonine	(%)	3.86	3.95
Serine	(%)	5.21	3.82
Glutamic acid	(%)	20.00	13.40
Glycine	(%)	1.70	3.94
Alanine	(%)	2.76	5.17
Valine	(%)	5.77	4.35
Cystine	(%)	0.32	1.06
Methionine	(%)	2.52	2.61
Isoleucine	(%)	4.53	3.91
Leucine	(%)	8.39	7.06
Tyrosine	(%)	5.02	3.19
Phenylalanine	(%)	4.57	3.46
Lysine	(%)	7.14	8.34
Histidine	(%)	2.69	2.28
Arginine	(%)	3.30	5.64
Tryptophan	(%)	1.12	0.97
Proline	(%)	9.64	2.91
Energy			
Protein	(kcal)	513	472
Non-digestive protein	(%)	85.6	87.5
Fat	(%)	17.7	33.6
Carbohydrate	(%)	1.0	< 0.1
Water	(%)	2.1	1.5
Ash	(%)	10.5	9.4
	(%)	0.8	1.5

## 結果

データは示さないが、飼料摂取量、飼料効率、終体重、体重増加量にはタンパク質の違いによる有意差はみられなかった。

主に赤筋（遅筋）であるヒラメ筋重量は群間では有意な差はなかった。赤筋と白筋（速筋）の混合筋である腓腹筋重量（g）は体重あたりの重量では APP-HF 群で増加傾向が見られた（図 1）。

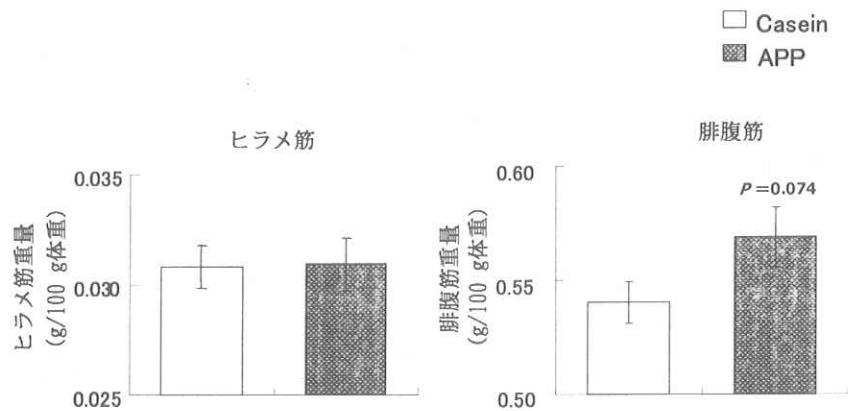


図 1 タラタンパク質が筋肉重量に及ぼす影響

値は平均値±標準誤差で示した (n=8)。有意差検定にはスチュードントの t 検定を用いた。APP の上に示した p 値は Casein との間の有意水準を示す。

副睾丸周囲脂肪組織重量は Cas-HF 群と比較して APP-HF で減少傾向が見られた。また、APP-HF 群は腸間膜脂肪組織重量でも、Cas-HF 群と比較して減少傾向が見られた (図 2)。データは示さないが腎臓重量、脾臓重量、腎周囲脂肪組織重量、肩甲骨間褐色脂肪組織重量、体脂肪、体タンパク質、体水分(%)は群間で有意な差はなかった。

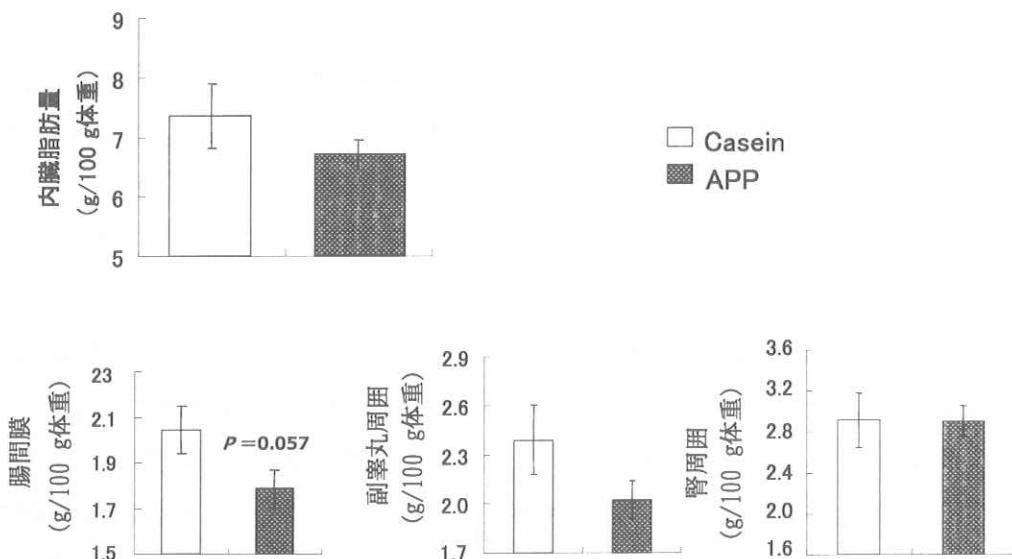


図 2 タラタンパク質が脂肪組織重量に及ぼす影響

値は平均値±標準誤差で示した (n=8)。有意差検定にはスチュードントの t 検定を用いた。APP の上に示した p 値は Casein との間の有意水準を示す。

データは示さないが血清総コレステロール、HDL・コレステロールおよびNon-HDLコレステロール濃度に有意な差はなかった。血清中性脂肪濃度は Cas-HF 群と比較して、APP-HF 群で有意に低下した（図 3）。肝臓重量は Cas-HF 群が  $15.3 \pm 0.6$  g であったのと比較して、APP-HF 群で  $13.5 \pm 0.5$  g と有意に減少した。肝臓中性脂肪濃度は Cas-HF 群と比較して APP-HF 群で減少する傾向が見られた（図 3）。肝臓総脂質および総コレステロール量にも同様の傾向が見られた。すなわち 肝臓総脂質量; Cas-HF 群、 $1.30 \pm 0.15$  g/肝臓、APP-HF 群、 $1.06 \pm 0.10$  g/肝臓；肝臓コレステロール量; Cas-HF 群、 $0.26 \pm 0.03$  mmol/肝臓、APP-HF 群、 $0.21 \pm 0.02$  mmol/肝臓。

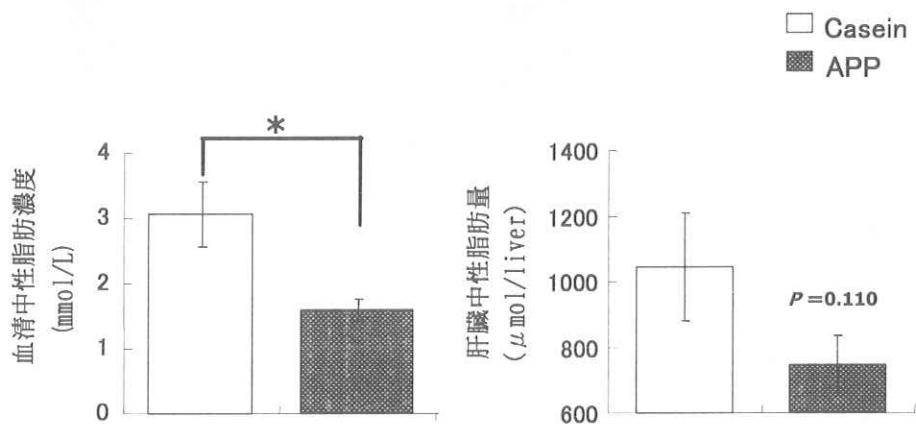


図 3 タラタンパク質が血中および肝臓の中性脂肪濃度に及ぼす影響

値は平均値土標準誤差で示した (n=8)。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

APP の上に示した p 値は Casein との間の有意水準を示す。

データは示さないが糞排泄量に有意差は見られなかった。糞中タンパク質排泄は Cas-HF 群が  $17.1 \pm 0.7\%$  であったのと比較して、APP-HF 群で  $20.1 \pm 1.0\%$  と有意に増加した。データは示さないが糞中総脂質および胆汁酸排泄には有意な差はなかった。

## 考察

既報と同様に、飼料摂取量には APP 摂取による影響はなかった。さらに、内臓脂肪全体では群間で有意な差はなかったものの、副睾丸周囲と腸間膜脂肪組織重量が Cas-HF 群と比較して、APP-HF 群で減少傾向があったことから（図 2）、APP による内臓脂肪蓄積の抑制効果について既報の再現性を確認できたと考えた。内臓脂肪蓄積抑制の機構として、エネルギー源、特に脂質の吸収阻害が考えられる。APP の難消化部が消化管で脂質を結合し、そのまま糞とともに排泄されているかもしれない。APP はカゼインと比較して、難消化タンパク質が多く（表 1）、実際糞中のタンパク質は APP 摂取により有意に増加した。しかし、糞中脂質排泄量は APP 摂取により変化することはなかった。APP 摂取による内臓脂肪蓄積抑制にエネルギー吸収は関与していないと考えられる。

非常に興味深いことに、APP 摂取により腓腹筋重量 (g/100 g of BW) がカゼイン摂取より増加す

る傾向が見られた。骨格筋は全身の約40%を占める筋肉である。通常、1日の総エネルギー消費量の70%が基礎代謝により消費され、この基礎代謝量に骨格筋の維持・増大は深く関与している。骨格筋量の増大が基礎代謝量を増加させ、エネルギー消費量が増加したことで内臓脂肪蓄積が抑制された可能性はある。さらに、APP摂取により血清中性脂肪濃度が有意に低下し、肝臓中性脂肪濃度も低下する傾向が見られた。骨格筋の増大により、中性脂肪の分解およびこれにより生じた脂肪酸の取り込みを促進したことが、血清・肝臓の中性脂肪濃度の低下として現れているとすれば一定の説得力はある。もう一つの大きなエネルギー消費の場である褐色脂肪組織に関してはAPP摂取による量的な変化は見られなかった。しかし、褐色脂肪組織のエネルギー消費がAPP摂取により変更している可能性は残される。今後質的な変動も調べる必要はある。

本実験で見られた骨格筋量の増大は遅筋と速筋の混合筋である腓腹筋で見られ、主に遅筋であるヒラメ筋では見られなかった。骨格筋の筋線維は大きく分けて遅筋線維と速筋線維の2種類があり、速筋は主にグルコースをエネルギー源とし、遅筋は遊離脂肪酸のみをエネルギー源とする。腓腹筋は遅筋も含んでおり、また速筋も必ずしも遊離脂肪酸をエネルギー源に出来ないわけではないが、速筋の増大が大きいとすると糖代謝の変更の関与も無視できないかもしれない。速筋の増大によりグルコース消費が促進され、血糖値の上昇が抑えられ、インスリン分泌が節約され、脂質の合成・蓄積が抑えられる可能性はある。

APPの摂取により筋肉量が増加した理由は今のところ全くわからない。報告によると、乳清タンパク質や大豆タンパク質の摂取は筋肉増大を引き起こし(4)、分枝鎖アミノ酸の1つであるロイシンの摂取が骨格筋量と関係していることが知られている(5)。これらと同様なことがAPPにより引き起こされている可能性はある。関連してタラをはじめ白身魚の筋肉に占める割合は速筋の方が圧倒的に多い。これを食餌させた場合に速筋が特異的の増加したことも興味深い。また、APP摂取により自発的運動が促進されている可能性も否定は出来ない。実際摂取タンパク質により自発運動が増加する例もわずかながら報告されている(6)

APP摂取により筋肉量の増加が見られ、エネルギー消費の増大により脂肪蓄積が抑制されていることが示唆された。実際にヒトが摂取しうる用量においても効果が発現すれば、非常に有用な効果であり、今後詳細な用量応答および作用機構を解明する必要がある。筋肉量増加の理由も現時点は全くわからない。今後これがAPP特有の効果であるか、あるいは魚肉全般、あるいは動物種を問わず筋肉組織全般の現象であるかも含めて明らかにする必要がある。

## 参考文献

- (1) Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T. Soy Protein Isolate and Its Hydrolysate Reduce Body Fat of Dietary Obese Rats and Genetically Obese Mice (Yellow KK). Nutrition 16:349–354, 2000

- (2) Oishi Y, Dohmoto N. Alaska Pollack Protein Prevents the Accumulation of visceral Fat in Rats Fed a High Fat Diet. *J Nutr Sci Vitaminol* ,55 ,156-161 ,2009
- (3) Aguilera AA, Díaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Ros RM. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 15, 350-357,2004.
- (4) Phillips SM, Symposium 2: Exercise and protein nutrition, The science of muscle hypertrophy: making dietary protein count, *Proc Nutr Soc* 70, 100–103, 2011
- (5) Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids* 37:609–616, 2009.
- (6) Sato T, Shinohara Y, Kaneko D, Nishimura I, Matsuyama A. Fermented soymilk increases voluntary wheel running activity and sexual behavior in male rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 35(6),749-754, 2010.

# ケールの生理機能評価に関する研究

愛媛大学農学部准教授 菅 原 卓 也

遠赤青汁株式会社 越 智 賢 二

遠赤青汁株式会社 高 岡 照 海

## 1. 緒 言

ケールはアブラナ科の植物で、ビタミン、ミネラル、食物繊維など多くの栄養素がバランスよく含まれているのが特徴である。また、さまざまな生理効果も報告されており、健康食品素材としての有効性は高く、青汁の素材として一般にも広く受け入れられている。

我々は、ケールの新たな生理機能の探索を目的として共同研究を開始した。手始めに、抗酸化活性、アレルギー抑制活性、脂肪蓄積抑制活性など、ケールの機能性のスクリーニングを行った。その結果、免疫促進活性がもっとも効果的であることが明らかとなり、免疫調節機能について詳細に検討を行った。

免疫とは、生体の恒常性を維持するために自己と非自己を識別し、非自己を排除するしくみである。免疫には様々なタンパク質が関与しており、その代表が抗体である。抗体は異物を特異的に認識して結合することで、その排除のための処理を活性化する。また、抗体以外にも様々な免疫タンパク質があり、様々な免疫細胞の活性化に関与している。

本研究では、抗体産生細胞であるヒト型ハイブリドーマ HB4C5 細胞やヒト末梢血リンパ球に及ぼす効果について検討を行った。また、生体内でのケール抽出物の免疫調節機能の検討のために実験動物としてマウスを用い、ケール抽出物の経口投与による有効性を評価した。さらに、ケール抽出物中の活性物質の精製と同定を試みた。

## 2. 方 法

### 2.1 ケール抽出物調製法

ケールの乾燥原葉 5 g を 50 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁したのち、遠心分離により不溶物を除去して抽出液を回収した。

### 2.2 免疫促進活性測定法

IgM を産生するヒト型ハイブリドーマ HB4C5 細胞、あるいは健常人より採取したヒト末梢血リンパ球 (hPBL) を、ケール抽出物を添加した無血清培地（インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、および亜セレン酸ナトリウムを添加した ERDF 培地 : ITES-ERDF 培地）中で培養し、一定時間培養後、培養上清中に分泌された抗体量、ある

いはサイトカイン量を酵素抗体（ELISA）法にて定量した。

## 2.3 遺伝子発現に及ぼす効果

ケール抽出物を作成させた後、細胞内の遺伝子発現に与える影響を定量的リアルタイム PCR により測定した。また、内部標準（基準）遺伝子として、GAPDH 遺伝子発現を指標に目的遺伝子の相対的な発現量の変化を測定した。

## 2.4 動物実験

8 週齢のメス BALB/c マウスに対し、体重 1 kg につきケール抽出物をタンパク質として 2 mg を毎日 1 回経口投与により 14 日間与え、15 日目にマウスを解剖し、腸管免疫組織である腸間膜リンパ節（MNL）とパイエル板（PP）を回収し、各免疫組織に存在するリンパ球の活性を評価した。なお、本動物実験は愛媛大学が定めた動物実験指針に則って行われた。

## 3. 結 果

### 3.1 HB4C5 細胞の抗体産生に及ぼすケール抽出物の効果

IgM を産生するヒト型ハイブリドーマ HB4C5 細胞の培養液にケール抽出物を様々な濃度で添加し、6 時間培養後に培養液に分泌された IgM 量を測定した。その結果、図 1 に示したようにケール抽出物は HB4C5 細胞の IgM 産生を約 400  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で約 5 倍促進することが明らかとなった。また、促進活性が 400  $\mu\text{g/mL}$  まで濃度依存的に高まつたことから、ケール粗抽出液中には HB4C5 細胞の IgM 産生を促進する何らかの免疫促進因子が含まれている可能性が示唆された。そこで、活性物質の性状を検討するため、ケール抽出液を加熱処理した後の残存活性を測定した。ケール抽出物を 100°C、30 分間熱処理した後に活性を測定したところ、加熱処理により促進活性が 20 倍上昇することが確認された。また、タンパク質を分解する酵素であるトリプシンでケール抽出物を処理した後に活性を検討した結果、トリプシン処理により活性が消失した。これらの結果から、ケール中に含まれる免疫促進物質は、加熱処理により免疫促進効果が上昇する性質のあるタンパク質であることが明らかとなった。

つぎに、活性物質の分子の大きさについて検証した。分子の大きさにより分画する限外濾過法を用いてケール抽出物を分画し、抽出物中の成分を分子の大きさで分けた後に活性を測定した。その結果、ケール抽出物中には分子の大きさが異なる複数の活性物質が存在することが推測され、それぞれ、分子量 50,000 以上の物質と、50,000 よりも小

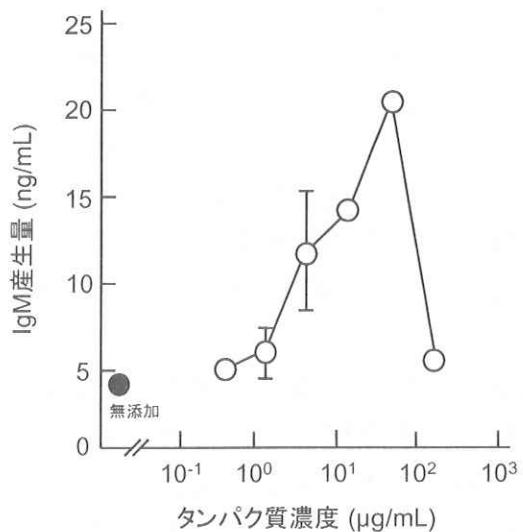


図 1 ケール抽出物の抗体産生促進効果

さい物質であることが推察された。

### 3.2 ヒト末梢血リンパ球に対する効果

ヒトから採血した末梢血中のリンパ球を回収し、ケール抽出物、あるいはケール抽出物分子量 50,000 以上の画分を添加した培地でヒト末梢血リンパ球 (hPBL) を 48 時間培養した後の培地中の免疫タンパク質の量を比較した。まず、hPBL の抗体 (IgM、IgG) 產生に及ぼす効果を検討したところ、分子量 50,000 以上の画分が IgM 產生を 2.0 倍、IgG 產生を 1.3 倍促進することが明らかとなった（表 1）。また、その他の免疫タンパク質（サイトカイン）產生に及ぼす効果を検討したところ、分子量 50,000 以上の画分が、体液性免疫応答を活性化するインターロイキン (IL)-4 や IL-5 の產生を促進した。また、分子量 50,000 以下の画分は、マクロファージや好中球などの貪食細胞が関与する自然免疫を活性化する腫瘍壞死因子 (TNF)- $\alpha$  產生を約 2 倍促進することが明らかとなった。

表 1 hPBL に対するケール抽出物の効果 (ng/mL)

免疫タンパク質	無添加	全抽出物	分子量5万以上
IgM	10.2±0.5	18.3±1.0	20.9±2.0
IgG	70.3±0.9	81.7±0.8	89.8±0.2
IL-4	2.3±0.2	2.7±0.1	2.1±0.3
IL-5	9.6±1.8	10.5±3.1	15.7±2.5
TNF- $\alpha$	35.6±0.1	73.4±1.0	35.1±3.1

### 3.3 作用機構の解明

ヒト型ハイブリドーマ HB4C5 細胞の抗体產生や hPBL の抗体やサイトカインの產生を促進したことから、その作用メカニズムの解明を試みた。HB4C5 細胞の抗体產生を指標として、まず抗体遺伝子の転写段階に及ぼすケール抽出物の影響をリアルタイム PCR 法にて評価した。

その結果、ケール抽出物により HB4C5 細胞の抗体產生は促進されているものの、抗体遺伝子の転写活性は促進されていないことが明らかとなった。そこで、ケール抽出物の作用点はどこなのかを明らかとするため、転写活性を阻害する薬剤であるアクチノマイシン D で HB4C5 細胞を処理した後に、ケール抽出物の促進効果を検討した。その結果、ケール抽出物は、アクチノマイシン D で転写が阻害された HB4C5 細胞の抗体產生を促進することが明らかとなった。この結果は、ケール抽出物の抗体產生促進効果が抗体タンパク質の生合成における転写段階以降のステップに作用していることを示している。具体的には、翻訳段階、あるいは分泌段階に作用しているのではないかと推察される。

### 3.4 ケール抽出物の経口摂取による免疫促進効果

8週齢メス BALB/c マウスに対して体重 1 kg につきタンパク量にして 2 mg のケール抽出物を 14 日間経口的に投与した。15 日目に腸管免疫組織である腸間膜リンパ節 (MLN) とパイエル板 (PP) を摘出し、各免疫組織に存在するリンパ球回収し、培地内で 2 日間培養後、培養液中の抗体量を測定することによりリンパ球の活性を評価した。

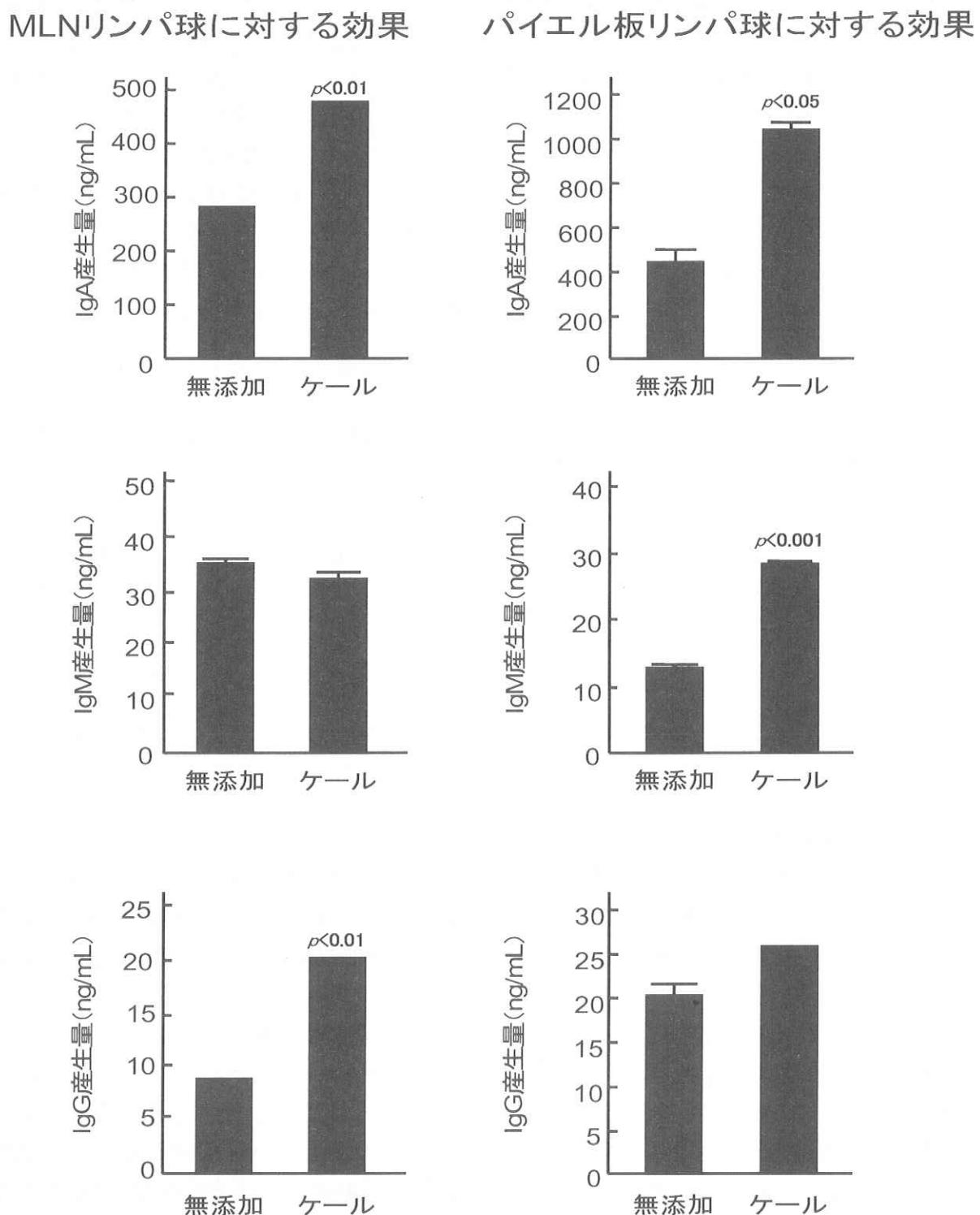


図 2 ケール抽出物の経口摂取が腸管リンパ球の活性に及ぼす影響

とパイエル板 (PP) を摘出し、各免疫組織に存在するリンパ球回収し、培地内で 2 日間培養後、培養液中の抗体量を測定することによりリンパ球の活性を評価した。

その結果、図2に示したように、MNLリンパ球のIgA産生とIgG産生がケール抽出物の経口摂取により有意に促進されていた。IgAは主に消化管の中で、消化管からの異物の侵入を防ぐ抗体である。一方、PPリンパ球の抗体産生も、ケール抽出物の摂取で有意な産生促進が認められた。以上のことから、ケール抽出物の経口摂取は腸管免疫系を刺激し、腸管免疫組織に存在するリンパ球の抗体産生能を活性化する作用があることが確認できた。

### 3.5 ケール抽出物の活性物質の同定

ケール抽出物中の活性物質を同定するため、液体クロマトグラフィーによる精製を試みた。陰イオン交換カラムを用いてケール抽出物を分画した。得られた画分のHB4C5細胞に対する抗体産生促進活性を測定し、活性が認められたF1～F4の画分の成分をSDS-PAGEゲル電気泳動法にて解析した。その結果、図3に示したように、分子量約53,000と18,100の2本のバンドが検出された。



図3 ケール抽出物中の活性物質の特定 (SDS-PAGE 解析)

活性物質と思われる分子量53,000のタンパク質を同定するために、液体クロマトグラフ質量分析法によるタンパク質の同定解析を行った。その結果、このタンパク質は光合成に関与する酵素の一つであるルビスコ（リブロース1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ）の大サブユニットタンパク質であると推定された。

そこで、実際にルビスコに抗体産生促進効果があるかどうかを検証するために、ホウレンソウ由来のルビスコを試薬購入し、その活性をケール抽出物

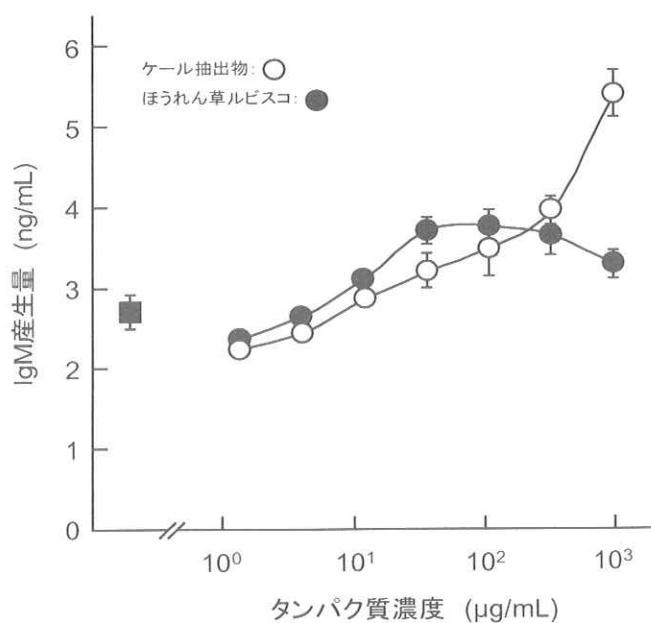


図4 ルビスコの抗体産生促進活性

と比較した。その結果、図 4 に示したように、ホウレンソウ由来ルビスコにも HB4C5 細胞の IgM 産生を促進する効果があることが確認され、ケール抽出物中の 53,000 の分子量を持つ活性物質はルビスコ大サブユニットタンパク質であることが確認できた。また、ケールルビスコはホウレンソウ由来ルビスコよりも活性が高いことが明らかとなった。

#### 4. 結 言

本共同研究プロジェクトにより、ケール中には免疫力を高める成分が含まれており、その活性物質の一つはルビスコであることが確認された。現在、もう一つの活性物質である 18,100 タンパク質の同定に取り組んでいる。

元来、ケールは健康食品素材として注目されているが、免疫力を高める効果があることはこれまで報告されていなかった。従って、その活性物質を特定した研究成果の有効性は高いと考えられ、この研究成果の応用により、ケールの免疫補助食品への応用が期待される。

# DNA マーカーを用いたヒラメ形態異常の防除技術の開発

愛媛大学南予水産研究センター准教授

高木 基 裕

有限会社まる阿水産生産部開発課

澤山 英太郎

## -ヒラメ体色黄化個体の解析-

【目的】ヒラメの種苗生産群には、通常とは異なる黄色味を帯びた個体がごく稀に確認されるが、通常個体とは色も模様も異なり、商品価値が低いことから、本変異個体を効率的に排除する必要がある。本研究では、通常個体と体色変異個体の体色を数値化して本異常個体の特徴を調べるとともに、マイクロサテライトマーカーを用いた同胞群解析によるグループ分けを行い、本異常が遺伝的なものかどうかを検討した。

【方法】2008年秋に同一親魚群から得られた受精卵を用い種苗生産を行った。77日齢に目視による選別を実施し、同一水槽から通常個体50個体と体色変異個体105個体を採取した。各個体の体表面をスキャナで取り込み、画像解析ソフトにより鰓を除く体表面のRGBカラーモデル各値および輝度を求めた。また、各個体からゲノムDNAを抽出し、4種類のマイクロサテライトマーカー座 (*Pol-1\**, *Pol-3\**, *Pol-4\**, *Pol-5\**) のDNA多型を検出した。得られた各個体のDNA多型情報を用いて KINGROUPにより同胞解析を行い、完全同胞と半同胞を再構築した。

【結果】ヒラメ体表のRGB各値を求めたところ(図1)、体色変異個体では通常個体と比較してRedとGreenで有意に高い値を示し、Blueでは有意に低い値を示した。輝度も体色変異個体では有意に高い値を示した。次にマイクロサテライトマーカー解析で得られた稚魚のアリル型から同胞群を再構築したところ(図2)、12個の完全同胞群と9個の半同胞群が形成された。体色変異個体の多くは2つの半同胞群に含まれたことから、本変異個体は特定の親魚の関与によることが示され、遺伝的要因の関与が推定された。本研究から、形態異常魚の親魚を特定することで、形態異常魚を効率的に排除できる可能性が示された。

## 【成果発表】

澤山英太郎・高木基裕(2010)ヒラメ体色異常個体の遡及的親子鑑定による発生要因の推定と効率的排除. 日本水産学会春季大会, 神奈川.

澤山英太郎・高木基裕(2010)ヒラメ体色変異個体の特徴と同胞関係の推定. 水産増殖 58, 345-350.

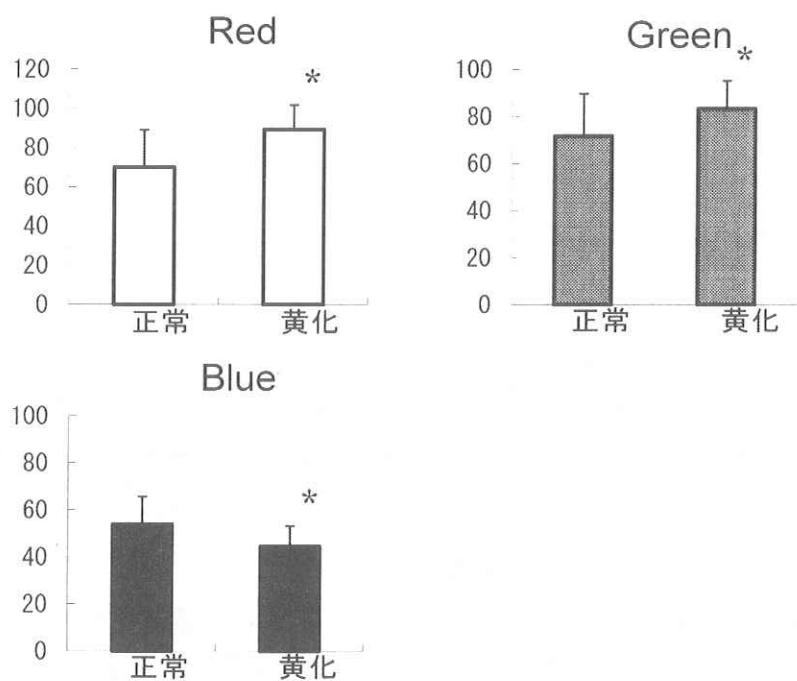


図1. 正常個体と体色変異個体の体表面RGBカラー モデルの平均値(*t*-検定,  $P<0.05$ )

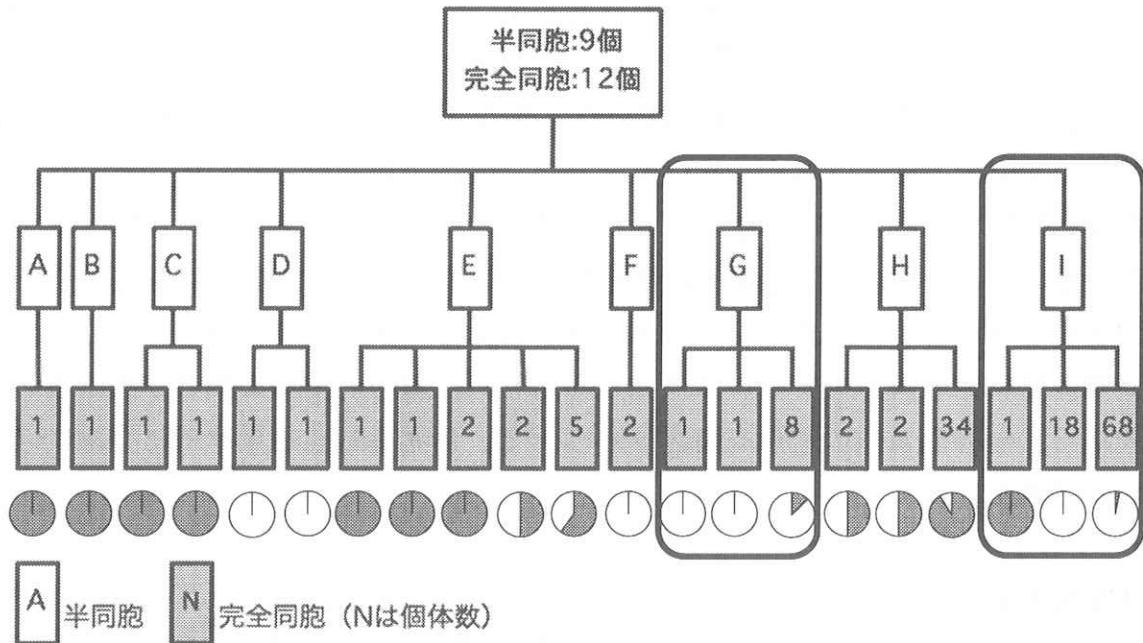


図2. 正常個体と体色変異個体の仮想家系構築結果。円グラフのグレーの部分は正常個体、白の部分は体色黄化個体を示している。また、体色黄化個体を多く産んでいる家系を黒枠で囲っている。

## -ヒラメ眼位異常個体の解析-

【目的】ヒラメの種苗生産群には一定の頻度で逆位個体が発生（図3）するが、ロットにより発生頻度が異なることが経験的に知られている。本研究では、正常個体と逆位個体についてDNA親子鑑定を行い、親魚間での逆位個体発生頻度を比較することで、種苗生産群に発生する逆位個体の発生要因を推定した。

【方法】2008年秋に、8個体のメス親魚と9個体のオス親魚の組合せから自然産卵により得られた受精卵を用いて種苗生産を行った。96日齢時に目視による選別を行い、正常個体52個体と逆位個体49個体を得て、4種類のマイクロサテライトマーカー座(*Pol-I*<sup>\*</sup>, *3*<sup>\*</sup>, *4*<sup>\*</sup>, *5*<sup>\*</sup>)のDNA多型を検出した。得られたマイクロサテライト情報から正常個体群と逆位個体群間のpairwise  $F_{ST}$ 値を求めた。また、DNA多型情報を用いて親子鑑定ソフトCERVUS3.0により両親の性別が分かっている場合の親子鑑定を実施して正常個体と逆位個体の親子関係を求め、親魚間における逆位個体発生率を比較した。

【結果】マイクロサテライト解析により得られたDNA多型情報から遺伝的多様性を調べたところ、ヘテロ接合体率（観察値、期待値、観察値/期待値）およびアリル頻度において、正常個体群と逆位個体群で違いは見られなかった。また、pairwise  $F_{ST}$ 値を求めたところ、両群間の値は0.009であり、集団間の異質性は確認されなかった。マイクロサテライトマーカー座の多型により、解析に用いた全ての個体の親子関係を特定することができた。親子鑑定の結果から（図4）、正常個体群では7個体のメス親魚と5個体のオス親魚からなる14個の完全同胞が、逆位個体では7個体のメス親魚と7個体のオス親魚からなる18個の完全同胞が確認された。正常個体と逆位個体の多くは同じ親魚から産まれていたが、1個体のメス親魚は他の親魚よりも逆位個体を高い割合で産んでいる傾向が見られた。以上の結果から、逆位個体の発生要因は後天的な影響が強いものの、一部のメス親魚は遺伝的もしくは他の母性要因により逆位個体を產生していることが示唆された。

### 【成果発表】

澤山英太郎・高木基裕（2010）DNA親子鑑定によるヒラメ逆位個体の発生要因の推定。水産増殖学会大会、佐賀。

澤山英太郎・高木基裕（2010）DNA親子鑑定技術を用いたヒラメ逆位個体の発生要因の推定。水産増殖 58, 441-446.

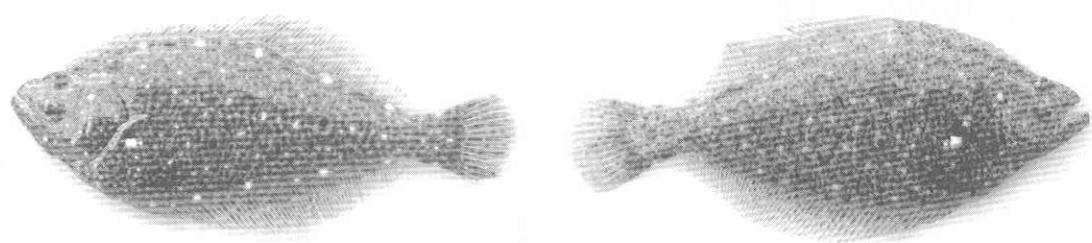


図3. 本研究に用いた正常個体（左）と逆位個体（右）

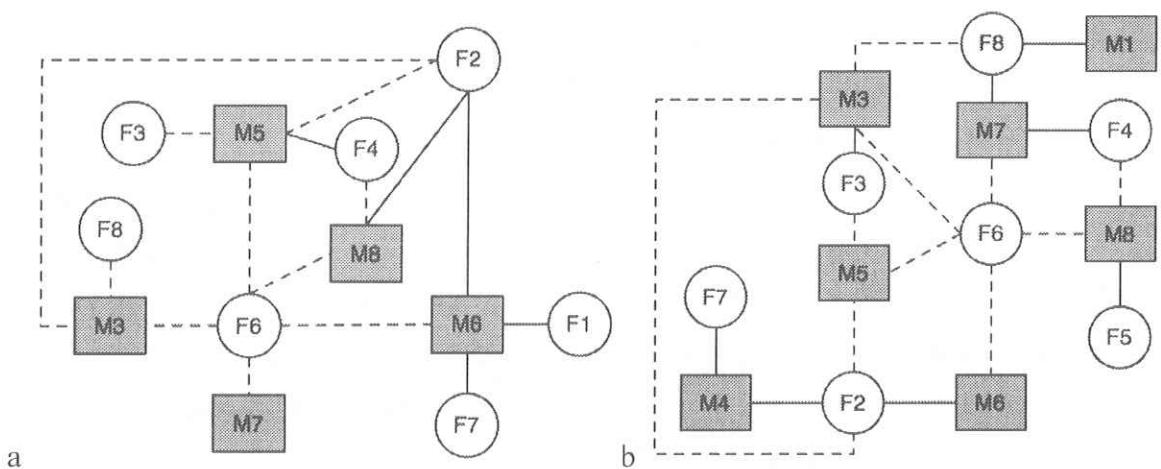


図4. 正常個体と逆位個体の生産に関与した親魚の組合せ。aは正常個体、bは逆位個体に関与した親魚の組合せを表し、Fはメス、Mはオス、破線は正常および逆位個体に共通した組合せを示している。

# コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系の高度化、高性能化

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター教授

戸澤

譲

株式会社セルフリーサイエンス社長

尾澤

哲

## 【はじめに】

コムギ胚芽抽出液を利用する無細胞タンパク質合成系は、高品質のタンパク質を試験管内で合成することを可能とした画期的なバイオ工学技術である。本共同研究は、無細胞タンパク質合成系においてこれまでに確認された技術的な問題の解決を図り、本技術のさらなる高度化および高性能化を進める目的で実施したものである。

タンパク質合成は、mRNA の塩基配列を基にアミノ酸をペプチド結合により連結してゆく反応である。ポリペプチ鎖は、さらに立体的な構造を形成することにより、機能を持つタンパク質が誕生する。立体構造の形成は、ポリペプチドを構成する個々のアミノ酸固有の性質に基づいて進行するため、異なる種類の配列を持つタンパク質が共存すると、タンパク質の結晶化効率は著しく低下してしまう。従って、構造と機能の研究に供するために無細胞合成されるタンパク質に求められる品質として、ポリペプチド鎖として均一なアミノ酸配列を有することが大前提となる。

無細胞生命科学工学研究センターの進化工学部門研究室では、これまでに無細胞系で合成されたタンパク質のアミノ末端（N 末端）のプロセシング機構と、コムギ胚芽抽出液内在性のメチオニルアミノペプチダーゼ活性の配列特異性と効率を解析してきた。得られた実験結果より、セルフリーサイエンス社の販売しているコムギ胚芽抽出液には十分なメチオニルアミノペプチダーゼ活性が内在し、コムギ胚芽無細系により合成されたタンパク質の N 末端を均一に保つ機構が備わっていることを示し、目的とするタンパク質の N 末端からタンパク質合成が予定通り開始されている場合においては、合成産物の N 末端の均質性が極めて高いことを確認してきた（参考文献 1）。

今まで様々な遺伝子がコードするタンパク質を合成してきたが、それらの中には、目的分子量を持つ産物とともに、目的産物よりやや大きい副産物を伴うケースが見受けられた。我々は、この不均一性を生む原因を解明し、使用するクローニングベクターの改良を通じて問題解決を図ることに成功したのでご紹介をさせていただく。

## 【不均一性発生のメカニズム】

タンパク質合成は、mRNA を鋳型としてその塩基配列に特異的なアミノ酸残基がペプチド結合により連結してゆくことで進行する。タンパク質合成反応の始まり、すなわち翻訳反応の開始は、無細胞タンパク質合成系では特殊な RNA 配列を利用することにより、効率化が図られている。この翻訳開始の効率化を制御する RNA 配列として、現在、複数の異なる配列が利用されているが、国内外の大学研究機関では、オメガ配列と呼ばれる植物ウイルス由来の配列を利用するケースが多い。オメガ配列を利用する翻訳鋳型 mRNA の構造は以下のようになる（図 1）。

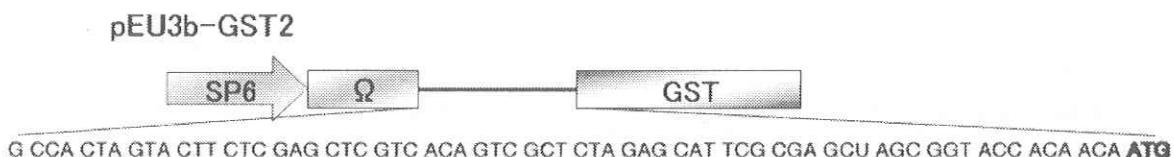


図 1. コムギ無細胞系で用いる mRNA 合成用プラスミド。SP6 とはバクテリオファージ SP6 由来の転写酵素が認識する転写プロモーターを示す。mRNA はオメガ（Ω）配列部分を含んだ形で下流の目的タンパク質コード領域（ここでは GST タンパク質を例示）とともに転写合成される。翻訳開始は AUG コドンで制御されるのが一般的であるため、従来の mRNA デザインにおいては、目的タンパク質コード領域の ATG（転写されると AUG）がオメガ配列を含めて最初に 5'側に出現するように設計する。

我々は、オメガ配列使用時に観察される目的産物以外の合成産物に着目し、まずその由来を確認する作業を進めた。予期せぬ副産物を生成する例として作成したテスト用タンパク質の合成パターンを以下に示す（図 2）。

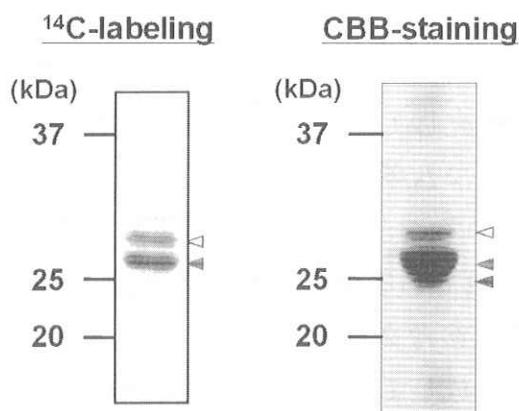


図 2. 合成タンパク質の電気泳動パターン。左は <sup>14</sup>C-ロイシン標識条件下で合成した翻訳反応液をオートラジオグラムにより画像解析を行ったもので、右はグルタチオンカラムにより精製したタンパク質を SDS-PAGE で泳動後に CBB 染色したパターンをそれぞれ示している。27kDa の位置の矢印（左では下側、右では真ん中）のタンパク質が GST タンパク質であり、これより大きな分子量のタンパク質が合成され、ともに精製されることが分かる。グルタチオンカラムに結合することから、この産物は GST を含むものであることが予想された。

この副産物を精製し、その N 末端のアミノ酸配列をペプチドシーケンサーにより解析したところ、このタンパク質は目的タンパク質の N 末端にさらに 31 個の余計なアミノ酸が伸長した産物であることが判明した。この余計なアミノ酸配列は、図 3 のように翻

訳効率制御配列として利用しているオメガ配列内部から始まるアミノ酸配列と一致した。さらに、従来、開始コドンとして考えられる RNA の AUG 配列からの翻訳開始ではなく、AUU という非 AUG コドンからの翻訳開始産物であることが確認された。

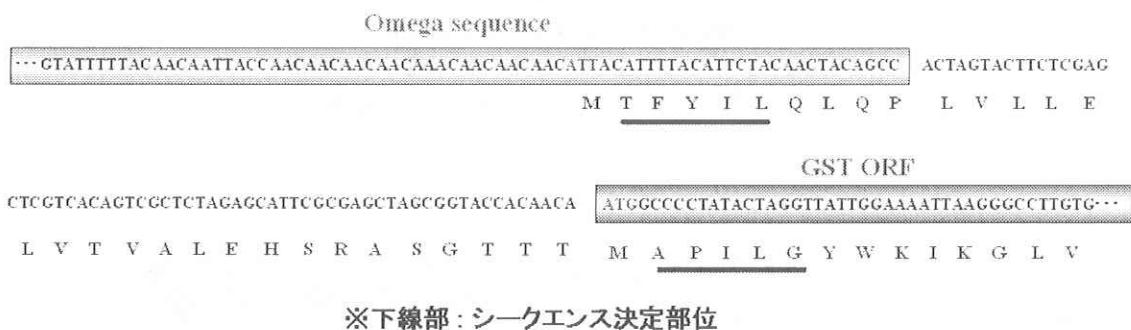


図 3. 目的タンパク質より大きな分子量を持つ副産物の正体。生成したタンパク質のアミノ酸配列を解析した結果、GST タンパク質コード領域上流のオメガ配列内部から翻訳開始されたペプチドを持つタンパク質であることが判明した。

### 【開始コドンとして認識されるコドンの調査】

無細胞系で利用するオメガ配列は、自然界に一般的に存在する mRNA が有する翻訳開始効率を遥かに凌ぐ強力な翻訳促進力を示す。このため、一般的に生物システムが好む AUG 開始コドン以外のコドンについても翻訳開始コドンとして認識してしまう確率が増す。この点については既に実験的事実として過去に論文が発表されている（参考文献 2）。我々は、無細胞系においてどのようなコドンが AUG と同様に翻訳開始コドンとして機能し得るかについて解析を行った。

その結果、次項の図 4 に示すように 7 種類のコドン (CUG, GUG, UUG, ACG, AUA, AUC, AUU) が開始コドンとして認識されることを確認できた。いずれも AUG の 1 塩基が他の塩基に置換されたものであり、ここには示していないが 2 塩基以上置換されたコドンは開始コドンとして認識されないことも確認している。

この実験により、AUG 以外の潜在的な開始コドン候補が選抜できたことから、我々は、オメガ配列から目的タンパク質コード領域に至る 5' 非翻訳領域における塩基デザインのコンセプトを大きく変更する必要性があると結論付けた。

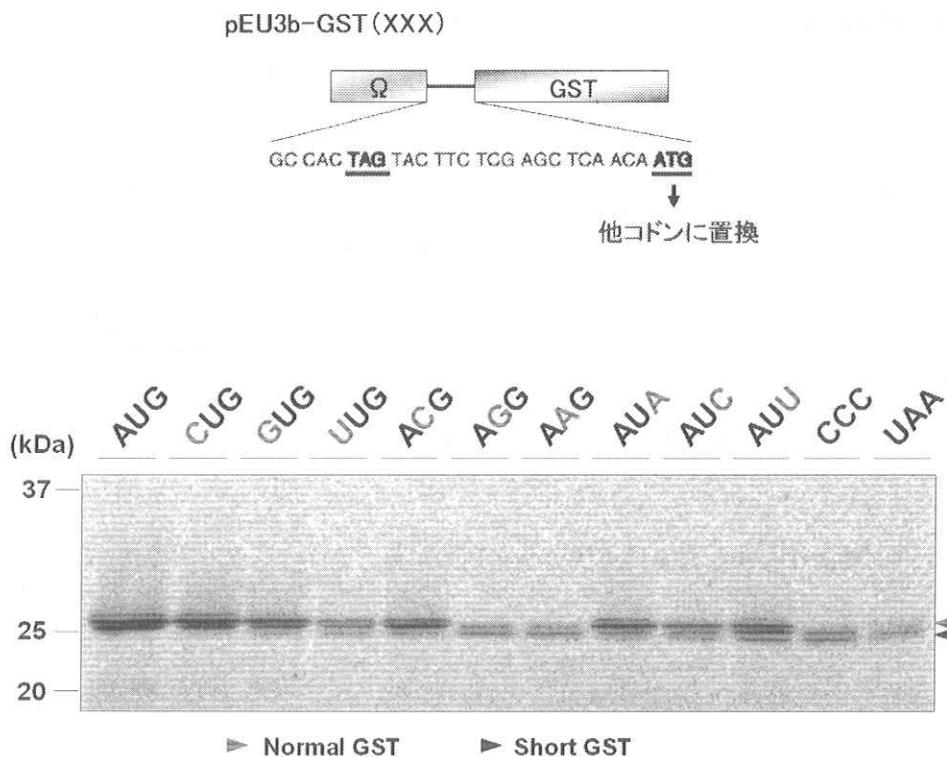


図4. 開始コドンとして認識可能な非AUGコドンの同定。上の図に示すように、テストタンパク質であるGSTの開始コドンAUGを他のコドンに置換した。下図はそれぞれの置換コドンの翻訳開始効率を比較したもの。<sup>14</sup>C-ロイシン標識条件下で合成した翻訳反応液をオートラジオグラムにより画像解析を行った。上側のシグナルが27kDaのGST由来するもので、その下側のシグナルは目的とする翻訳開始位置より下流から翻訳が開始されているものである。上側のシグナルを生成できるのは、7種類のコドン(CUG, GUG, UUG, ACG, AUA, AUC, AUU)であることが確認できた。

#### 【偽開始コドンからの翻訳産物を排除する仕組み作り】

上記で確認したように、潜在的に開始コドンとして認識され得る非AUGコドンは、実験の目的上、偽開始コドンとなる。これらは翻訳産物の均一性を常に脅かす可能性を秘めているため、偽開始コドン由来の翻訳産物を排除するための鋳型mRNAデザイン検討を進めた。検討の結果、図5に示すように、目的とするタンパク質アミノ酸配列に相当するRNA領域の上流にナンセンスコドンを配置することにより、副産物生成の回避が可能となることを確認できた。一度開始した翻訳反応を中断させてしまうと、下流のAUG開始コドンからの翻訳効率は低減する可能性も考えられたが、ナンセンスコドンの配置により、かえって目的タンパク質の収量は増加し、好ましい改善結果が得られた。

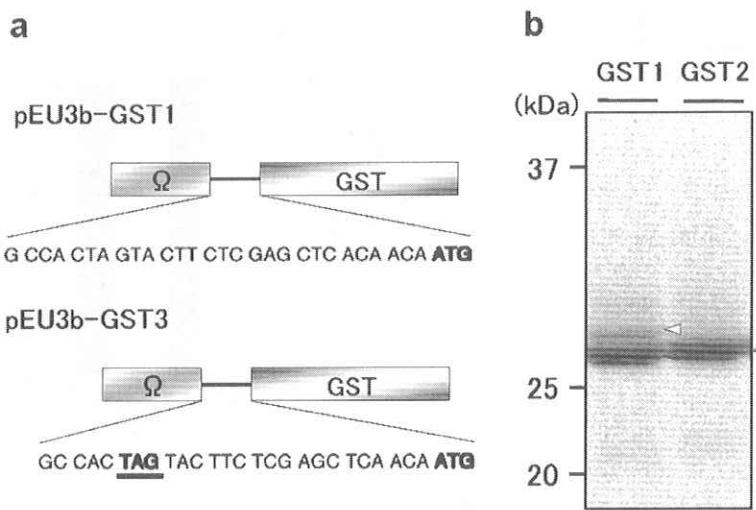
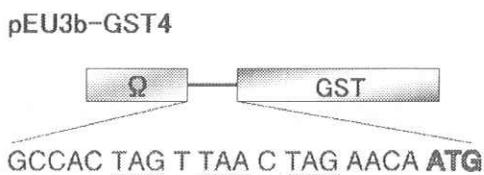


図 5. タンパク質コード領域上流へのナンセンスコドン導入の効果. a は GST タンパク質をコードする領域の上流の配列を示す。下側のベクターでは導入したナンセンスコドン UAG に相当する DNA 塩基配列 TAG を下線で示している。b は翻訳反応液をオートラジオグラムにより画像解析を行ったものであり、27kDa の翻訳産物の生成が確認できる。ナンセンスコドンが無い GST1 では、目的産物より大きい分子量のペプチドが確認できる。ナンセンスコドン導入により GST2 ではこの副産物が見られなくなる。

コドンは 3 塩基で規定されるので、mRNA の塩基配列は、3 通りのコドンの認識パターンがある。従って、目的とするタンパク質の読み枠以外の 2 つの読み枠に由来する翻訳産物が存在する可能性も高い。本改良系の高性能化を図るため、我々は異なる 3 つの読み枠全てに対応するナンセンスコドンを導入した mRNA 転写システムを構築し（図 6）、翻訳物の解析を行った。



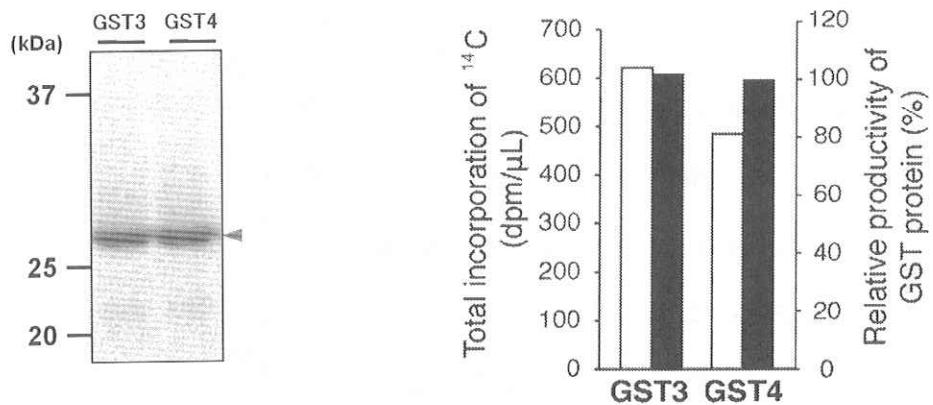


図 6. 3つの読み枠へのナンセンスコドン導入による効果。前頁下の図は GST のコード領域上流の 3つの読み枠それぞれへのナンセンスコドンの導入様式を示す。上左図は、<sup>14</sup>C-ロイシン標識条件下で合成した翻訳反応液をオートラジオグラムにより画像解析を行ったものであり、27kDa の翻訳産物の生成が確認できる。この図の結果を右図で数値化した。Total incorporation of <sup>14</sup>C とは、目的産物以外の短いペプチドも含め、ここで用いた mRNA を鋳型として生成したロイシンを含むペプチドの総量を測定したもの。

<sup>14</sup>C 標識アミノ酸の取り込み率は、mRNA を鋳型とするペプチド生成量に比例する。上図のように、3つの読み枠全てにナンセンスコドンを設置した系では、ペプチド生成量あたりの目的産物 (GST) 合成量が、ナンセンスコドンを 1 つにした場合より更に改善されていることが確認できた。

この改善システムを他のタンパク質に適用して解析を行った。次項図 7 に合成後に精製して得られたタンパク質の解析結果を示す。今回は、実際にタンパク質を精製し、SDS-PAGE および CBB 染色により最終的な収量比較を行った。その結果、可溶性タンパク質である GST のみならず、10 以上の膜貫通領域を有する PPase1 についても良好な合成効率と均質性の改善を確認することができた。

### 【まとめ】

他のタンパク質合成においても、本研究で示した mRNA デザイン改良法は汎用性が高いことに疑いの余地は無い。本研究の成果は、以下の論文（参考文献 3）として発表済みであるとともに、研究室のホームページにも共同研究者向け資料として公開し、国内外の無細胞系の利用者に対する情報発信も行っている。

# 第2回 農業生物工学研究会

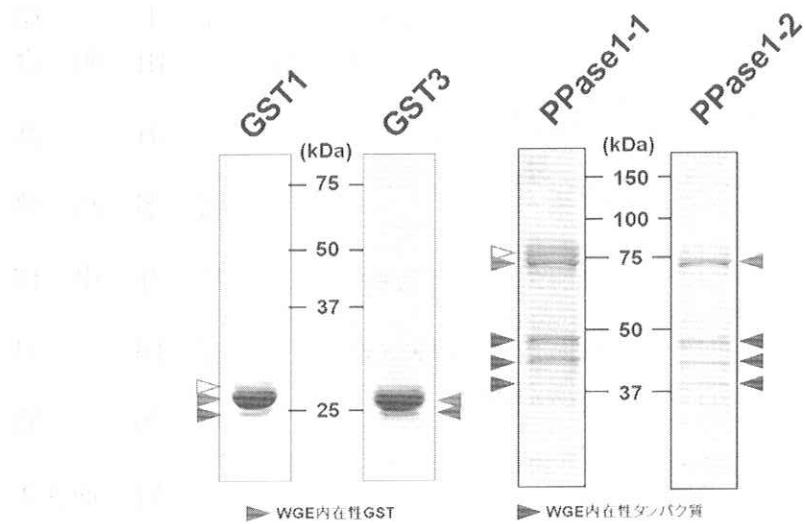


図7. ナンセンスコドンの導入による合成産物収量の変化. GST1 および PPase1-1 は、上流のナンセンスコドンが無い従来型の mRNA に由来する翻訳産物、GST3 および PPase1-2 は上流にナンセンスコドンを導入した mRNA に由来する翻訳産物であり、それぞれ His タグを利用した精製を行って SDS-PAGE と CBB 染色により画像解析を行った。目的とする GST は 27kDa、PPase1 は 75kDa である。尚、GST の下側の低分子量側の矢印は、コムギ胚芽自身の内在性 GST が共精製されたものであり、合成産物ではない。PPase1 の 50kDa 以下の低分子量側の 3 つの矢印もコムギ内在性のカラム結合タンパク質であることは確認済みである。

## 【参考文献】

1. Kanno T, Kitano M, Kato R, Ohmori A, Endo Y, and Tozawa Y. (2007) Sequence specificity and efficiency of protein N-terminal methionine elimination in wheat-embryo cell-free system. *Protein Expr. Purif.* **52**, 59-65.
2. Schmitz J, Prüfer D, Rohde W, Tacke E. (1996) Non-canonical translation mechanisms in plants: efficient in vitro and in planta initiation at AUU codons of the tobacco mosaic virus enhancer sequence, *Nucleic Acids Res.* **24**, 257-263.
3. Ohta T, Matsuoka H, Nomura Y, Tozawa Y. (2010) Control of translational initiation in the wheat-embryo cell-free protein expression system for producing homogenous products. *Protein Expr. Purif.* **73**, 15–22.

# 高圧下における中性子利用実験の技術開発

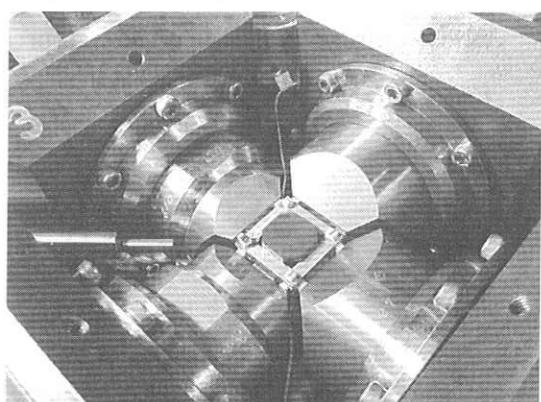
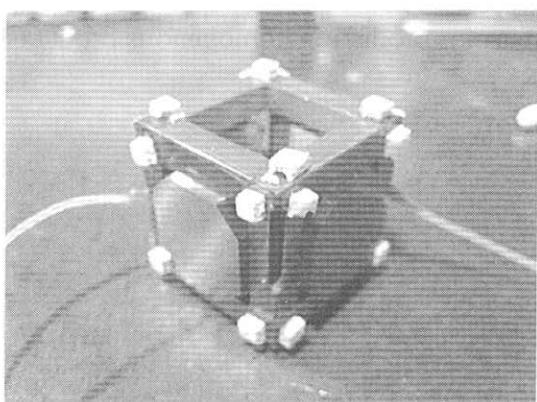
愛媛大学地球深部ダイナミクス研究センター教授	井 上 徹
愛媛大学地球深部ダイナミクス研究センター G-COE 研究員	山 田 明 寛
独立行政法人日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門研究推進室室長代理	内 海 渉
独立行政法人日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門研究副主幹	服 部 高 典
独立行政法人日本原子力研究開発機構 中性子イメージング・分析研究グループ研究副主幹	酒 井 卓 郎
独立行政法人日本原子力研究開発機構 中性子イメージング・分析研究グループ研究副主幹	安 田 良
独立行政法人日本原子力研究開発機構 J-PARC センター研究員	有 馬 寛
独立行政法人日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門研究員	佐 野 亜沙美

## [研究目的]

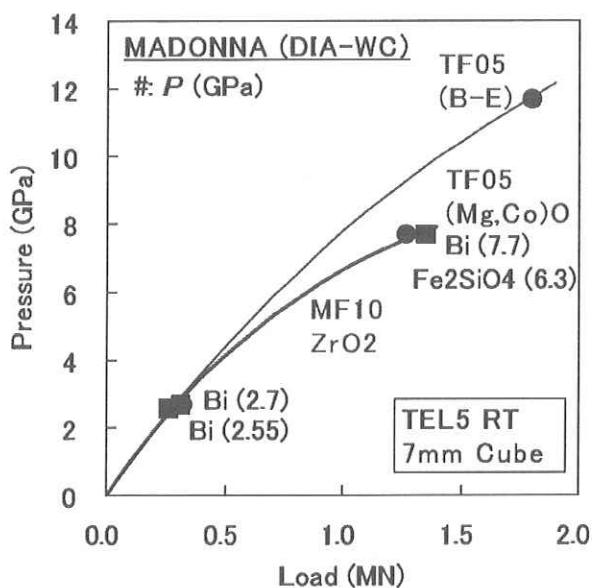
J-PARC に建設中の高温高圧中性子ビームライン PLANETにおいて、高温高圧下での中性子散乱実験、及び中性子イメージング実験を可能とするために必要な各種技術開発を行った。具体的には、高圧装置におけるアンビル、ガスケット、圧力媒体などの材質、形状などを中性子利用実験に最適化するとともに、高圧実験に必要な知見を蓄積した。さらに、中性子カメラの予備実験を行い、導入すべきカメラの検討を行った。尚、本研究は、新学術領域研究「高温高圧中性子実験で拓く地球の物質科学」の中の 1 つのプロジェクトとして遂行した。

## [研究内容]

1) 中性子実験に適用する 6-6 加圧システムの開発を行った。特に、中性子実験は試料、及びアンビル材の放射化が問題となり、簡便にアンビルが交換できるシステムを構築することが重要となる。このシステムは、今までの 1 段式のみのアンビルよりも第 2 段アンビルは小さなアンビルで済み、そのことは 1) 安価に導入できる、2) 各種材質の超硬合金をアンビル材として選択できる、3) アンビル破壊に伴う試料・アンビルの飛散を第 2 段アンビルのみをケースに包むことにより防ぐことができる、等のメリットを持っている。この技術開発は、今後高温高圧中性子実験を進めていく上で極めて重要な技術となると考える。

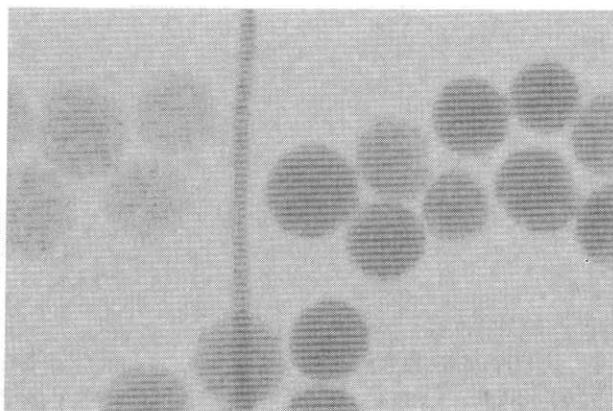


6-6 加圧システム



圧力校正曲線の一例。MF10 は Ni バインダーの WC アンビル、TF05 は Co バインダーの WC アンビルである。実験はトランケーション(TEL) 5 mm, 圧力媒体 7 mm のものを使用した。

2) J-PARC での中性子カメラ導入に向けてのテスト実験を、(株)東芝の協力の基、「匠」ビームラインで行った。実験には中性子カメラ（東芝中性子カラ—I.I.）を使用した。特に、流体相不混和現象のモデル物質として含水無水シリカゲルの像を観察したが、30 秒程度の露出で十分、その含水量の違いが観察できることが明らかとなった。またパルス中性子で時間ブランкиングをかけた撮影も行ったが、その結果も良好で、エネルギー分解した撮影も行えることが明らかとなった。



シリカゲル（左：ほぼ無水、右：含水）の中性子イメージング像。  
シリカゲルの直径は 2 mm 程度である。

## 参考文献

- [1] Nishiyama, N. et al., 2008. High Press. Res., **28**, 307-314.
- [2] Kawazoe, T. et al., 2010. High Press. Res., **30**, 167-174.

## 愛媛大学社会連携推進機構研究成果報告書第4号

発行 2011年3月  
発行者 愛媛大学社会連携推進機構  
〒790-8577 松山市文京町3番  
TEL (089) 927-8819  
FAX (089) 927-8820  
印刷 七キ株式会社