

愛媛大学社会連携推進機構
研究成 果 報 告 書

第 6 号
(2012)

社会連携推進機構研究成果報告書第6号の発行にあたって

愛媛大学社会連携推進機構長
矢田部 龍一

1991年のバブル崩壊以降、日本経済は長期に渡って停滞しています。この間に膨れ上がった国の借金は、実に1000兆円にもなっています。さらに、莫大な借金と少子高齢化で弱った国力に追い打ちをかけたのが、東日本大震災の発生です。千年に一度とも言われる未曾有の大地震は、福島第一原子力発電所での全電源喪失による水素爆発やメルトダウンという大事故まで引き起こしてしまいました。大震災発生後、2年が経過しましたが、被災地では、いまだに多くの人たちが過酷な避難生活を強いられています。

戦後、東洋の奇跡とまで言われるほどの発展を遂げた日本経済ですが、今日の日本は国内産業の空洞化もあって危機的状況におかれています。日本経済復興のためには産業界の国際競争力の強化が必須の課題です。そして、産業界の国際競争力強化のためには、何よりも大学に眠る宝の山である知的資源の活用が喫緊の課題になっています。

1970年代の米国は、泥沼化したベトナム戦争の後遺症などもあり、国際競争力を失い、国力が衰退していました。それを立て直すために導入されたのが1980年制定のバイ・ドール法です。バイ・ドール法は、政府資金による研究成果に対して大学や研究者が特許権を取得することを認めた法律です。この法律により研究開発の成果を広く活用できるようになりますことで産学連携が推進されるようになりました。また、中小企業の公的研究への参加の促進が図られるようになりました。これらの取り組みの成果もあり、1980年代には米国の国際競争力が再び復活しました。米国におけるバイ・ドール法導入の成功を受けて、日本でも1999年に産業活力再生特別措置法第30条として同様な法律が制定され、日本の産学連携が大きく進展し始めることになりました。

愛媛大学も、この法案の制定を受けて産学連携に本格的に取り組んできています。その結果、平成24年度を見ると、共同研究142件、受託研究136件、特許申請件数64件というような実績を上げています。愛媛大学の研究能力から見れば、まだまだ十分な実績とは言えないかも知れませんが、着実に成果は上がりつつあります。

今回、第6号の研究成果報告書を発行できる運びになりました。ご努力頂いた関係各位に心より感謝申し上げますとともに、本報告書が広く活用されることを願います。

愛媛大学には、本報告書に示した以外にも多くのシーズが眠っており、また、多くの有能な研究者が在籍しています。日本経済の復興のために、地域経済の復興のために、国立大学法人愛媛大学の知的資源の活用を切にお願いするとともに、今後とも皆様方のご指導、ご支援を賜りますよう宜しくお願ひ申し上げます。

目 次

研究成果報告書第6号の発刊にあたって

愛媛大学社会連携推進機構長

矢田部 龍一

研究成果報告

まちづくり人材育成・啓発事業 ----- 1

愛媛大学地域創成研究センターセンター長	寺谷 亮司
愛媛大学地域創成研究センター教授	和田 寿博
愛媛大学法文学部教授	宮崎 幹朗
松山市市民部市民参画まちづくり課主査	古田 真樹
松山市市民部市民参画まちづくり課主査	池下 明弘
松山市市民部市民参画まちづくり課主任	鍵山 直人
松山市市民部市民参画まちづくり課主事	余吾 雄一
松山市市民部市民参画まちづくり課主事	二宮 愛子

構造解析技術の向上による新機能性物質の探索と創出の加速 ----- 4

愛媛大学大学院理工学研究科教授	宇野 英満
愛媛大学総合科学研究支援センター准教授	谷 弘幸
愛媛大学総合科学研究支援センター准教授	倉本 誠
愛媛大学総合科学研究支援センター助教	森 重樹
宇都宮大学工学部助教	伊藤 智志
山口大学大学院医学研究科教授	上村 明男
九州大学大学院工学研究科教授	古田 弘幸
鳥取大学大学院工学研究科教授	伊藤 敏幸
静岡大学大学院理学研究科准教授	加藤 知香
高知大学理学部教授	北条 正司
香川大学大学院工学研究科教授	馮 旗
香川大学教育学部教授	高木由美子

イリジウム錯体-粘土複合膜を使ったセンシングデバイス ----- 7

愛媛大学大学院理工学研究科教授	佐藤 久子
独立行政法人物質・材料研究機構	田村 堅志

次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェアの研究開発 ----- 12

愛媛大学大学院理工学研究科助教 宮田 竜彦
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
分子科学研究所教授 平田 文男

放射線誘発口内炎モデルの作成と評価系の確立 ----- 16

愛媛大学医学部附属病院教授 荒木 博陽
愛媛大学医学部附属病院薬剤部 渡邊 真一
小野薬品工業株式会社水無瀬研究所創薬研究部
第三研究室第三グループグループヘッド 南 真志
小野薬品工業株式会社水無瀬研究所創薬研究部
第三研究室第三グループ 中西 美樹

搅乱手法を用いたプライバシー保護医療情報分析の実験評価 ----- 21

愛媛大学医学部附属病院准教授 木村 映善
NTT情報流通プラットフォーム研究所 千田 浩司
NTT情報流通プラットフォーム研究所 濱田 浩氣
NTT情報流通プラットフォーム研究所 五十嵐 大
NTT情報流通プラットフォーム研究所 富士 仁
NTT情報流通プラットフォーム研究所 高橋 克巳
愛媛大学医学部附属病院教授 石原 謙

多施設共同による頭頸部癌頸部リンパ節転移診断におけるOne Step Nucleic acid Amplification(OSNA)法応用の検討 ----- 30

愛媛大学大学院医学系研究科教授 浜川 裕之
シスメック株式会社ライフサイエンス事業推進本部
市場開発グループ係長 岩壁 賢治

肝臓USボリュームRVSによる治療効果判定の評価 ----- 31

愛媛大学医学部附属病院講師 廣岡 昌史
日立アロカメディカル株式会社 荒井 修

活性型EGFR認識抗体によるEGFR阻害薬感受性診断法の開発 ----- 32

愛媛大学プロテオ医学研究センター教授
富士レビオ株式会社
富士レビオ株式会社

東山 繁樹
伊勢 信之
暮石 勝利

車内映像の解析による運転中の危険動作の検出 ----- 35

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教授
愛媛大学大学院理工学研究科助教
株式会社NPシステム開発代表取締役
株式会社NPシステム開発開発本部長
株式会社NPシステム開発担当

木下 浩二
村上 研二
一色 正晴
塩梅 敏
大野 浩一
白木 陽

ケーブルの劣化メカニズムや劣化診断技術に関する研究 ----- 39

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
四国電力株式会社原子力保安研修所保修訓練グループ主任

藤井 雅治
井堀 春生
大江 秀紀

耐酸化・絶縁被覆を施した高飽和磁化磁性金属ナノ粒子の開発 ----- 44

愛媛大学大学院理工学研究科准教授
サムスン横浜研究所専任研究員
サムスン横浜研究所主席研究員

山室 佐益
及川 忠昭
寺尾 芳孝

エージェントオレンジ由来ダイオキシン汚染土壤の簡易迅速測定法
～フロー式イムノセンサー(KinExA)による分析法～ ----- 47

愛媛大学農学部附属環境先端技術センター長
愛媛大学農学部附属環境先端技術センター
京都電子工業株式会社
京都電子工業株式会社

本田 克久
上田 祐子
高木 陽子
立石 典生

機能性鉄資材による有機塩素化合物の分解処理技術の開発
－農薬、ディルドリンの分解とその要因－

49

愛媛大学農学部附属環境先端技術センター長
愛媛大学農学部附属環境先端技術センター
石原産業株式会社
石原産業株式会社

本田 克久
上田 祐子
平井 恭正
畠中 恒孝

リグノセルロース系バイオマスからの低環境負荷型バイオエタノール生産技術に関する研究～前処理技術開発を中心として～

66

愛媛大学上級研究員センター上級研究員
愛媛大学農学部准教授
愛媛大学農学部客員教授
独立行政法人産業技術総合研究所
バイオマス研究センター長
独立行政法人産業技術総合研究所
バイオマス研究センター招聘研究員
独立行政法人産業技術総合研究所バイオマス研究センター
エタノール・バイオ変換チーム長
独立行政法人産業技術総合研究所バイオマス研究センター
水熱・前処理チーム長

秀野 晃大
川嶋 文人
森田 昌敏
坂西 欣也
澤山 茂樹
矢野 伸一
遠藤 貴士

麦類におけるγアミノ酪酸（GABA）の高生産に関する研究

97

愛媛大学農学部教授
株式会社マエダ代表取締役社長

渡部 保夫
前田 耕作

DNAマークを用いたヒラメ形態異常の防除技術の開発

109

愛媛大学南予水産研究センター准教授
有限会社まる阿水產生産部開発課

高木 基裕
澤山英太郎

まちづくり人材育成・啓発事業

愛媛大学地域創成研究センターセンター長	寺 谷 亮 司
愛媛大学地域創成研究センター教授	和 田 寿 博
愛媛大学法文学部教授	宮 崎 幹 朗
松山市市民部市民参画まちづくり課主査	古 田 真 樹
松山市市民部市民参画まちづくり課主査	池 下 明 弘
松山市市民部市民参画まちづくり課主任	鍵 山 直 人
松山市市民部市民参画まちづくり課主事	余 吾 雄 一
松山市市民部市民参画まちづくり課主事	二 宮 愛 子

1 本研究の目的と成果

地域創成研究センターと松山市市民部市民参画まちづくり課が共同して、地域社会においてまちづくりの中心となる人材の育成と市民の啓発を目的に「地域づくり支援セミナー」を 10 回にわたり開催した。地域住民を主体とした地域づくりおよび地域活性化は重要な地域課題であり、地域づくりに関わる人材の育成と市民への啓発の必要性はいうまでもない。地域創成研究センターの地域貢献および松山市が進める住民主体の地域づくりの一環として、本共同研究事業は平成 16 年の地域創成研究センターの創設以来継続してきた。毎年 40 名程度の受講生を対象におこなってきたものであり、これまでの受講生総数は 300 名を超えており、これらの受講生の中から、松山市の各地域でまちづくり協議会の設立やその活動に積極的に関わる市民が輩出されている。

平成 24 年度の受講生数は 45 名であった。今年度の受講生の特徴として、町内会などで地域活動を継続している方や地域づくりに関心のある一般市民に加えて、愛媛大学および松山大学の大学生が多数参加していたことがあげられる。毎回のセミナー終了時に受講生に質問や感想を書いてもらつたが、受講生からの反応は良く、有意義なセミナーであったことがうかがえる。

また、町内会や団地自治会などを中心として、地域コミュニティづくりに取り組んでいる地域への聞き取り調査等をおこない、今後のセミナーの実施の際の参考とすることができた。

2 地域づくり支援セミナーの実施

10 回のセミナーの内容とスケジュールはおおむね以下のとおりであった。

第 1 回（平成 24 年 6 月 26 日、19:00～21:00） 「セミナーのガイダンス」

セミナーのスケジュール説明の後、セミナーで使用する手法（ワークショップ・グループワーク、KJ 法など）を説明し、「みんなが考える住みやすいまちとは？」というテーマでワークショップをおこなった。

第 2 回（平成 24 年 7 月 10 日、19:00～21:00） 「まちづくり活動の類型について」

まちづくり活動が、親交型から課題解決型・自治型へと変化していることについて説明した後、前回のワークショップのまとめをおこなった。

第3回（平成24年7月24日、19:00～21:00） 「住民主体の地域づくりの先進事例を学ぶ」

住民を主体とした地域づくりに取り組んでいる3つの地域の事例（新潟県上越市の地域協議会、京都府美山町の地域振興会、鹿児島県鹿屋市柳谷集落〈やねだん〉）を紹介し、「やねだん」についてのDVDを視聴した。

第4回（平成24年8月7日、19:00～21:00） 「松山市におけるまちづくり活動の実際」

白水台自治会及び堀江地区まちづくりコミュニティ会議の実際の活動について、活動している代表者の方に話をいただき、松山市における地域づくりの実際の活動についての関心を高めてもらった。その後、松山市のまちづくり協議会への支援制度や松山市地域におけるまちづくり条例について理解を深めた。

第5回（平成24年9月11日、19:00～21:00） 「まちづくりのプロセスについて」

「地域を知る」→「地域を考える」→「地域をつくる」というまちづくりの手順について説明し、そのための考え方の1つである「地元学」について、水俣の場合を例にして説明し、地元学の有用性について学んだ。

第6回（平成24年9月25日、19:00～21:00） 「湯布院のまちづくりに見る地域のあり方」

長年、湯布院観光協会事務局長の仕事をして、愛媛大学法文学部総合政策学科講師となった米田誠司氏の話を聞き、観光先進地である湯布院のまちづくりについて学んだ。

第7回（平成24年10月13日、9:00～16:00） 「まちあるき」（実地演習）

三津浜地区でグループに分かれてまちあるきをおこない、各グループのテーマ（歴史文化、安全安心のまちづくり、海との関わり、身近な生活環境）に合わせて地図づくりをおこない、その結果をグループごとに発表した。

第8回（平成24年10月23日、19:00～21:00） 「まちづくり計画づくに向けて」

福岡県宗像市日の里地区のまちづくり計画、松山市内の各地域（桑原地区、余土地区、五明地区など）のまちづくり協議会のまちづくり計画を紹介し、まちづくり計画の作成のために、まちづくりの方向性（理念・理想）や具体的な取り組みを実行していく組織のあり方を考えていく必要性があることを学んだ。

第9回（平成24年11月6日、19:00～21:00） 「ミニまちづくり計画の策定」

第7回のまちあるきで調べたことをもとにして、各グループに分かれてミニ街づくり計画づくりをおこなった。

第10回（平成24年11月23日、19:00～21:00） 「ミニまちづくり計画の発表と閉講式」

グループに分かれて前回のミニまちづくり計画を仕上げで、各グループごとに発表した。その後、閉講式をおこない、修了証などを受講生に渡した。

3 地域コミュニティづくり調査

以下のような項目についての調査をおこない、地域コミュニティづくりおよび地域コミュニティの活性化の方策について検討した

（1）岡山市の「電子町内会」制度に関する資料集め

岡山市が進めている地域コミュニティ活性化策の1つとしての「電子町内会」制度について、資料を請求し、都市地域における地域住民のコミュニケーションのあり方を検討した。

（2）東京都武蔵野市のコミュニティ条例に関する調査

東京都武蔵野市は、地域コミュニティとして、町内会等の地縁型コミュニティのほか、NPOやボランティア団体などの特定の目的を持った住民の組織・つながりも地域コミュニティの1つと位置づけ、これらの地域コミュニティへの支援を進めている。この制度についての調査をおこなった。

(3) 東京都立川市の地域コミュニティ支援制度

東京都立川市では、孤独死を出さない団地自治会活動が有名だが、市はこれらの町内会や自治会の住民活動を支援している。このような支援の仕組みについて調査をおこなった。

構造解析技術の向上による新機能性物質の探索と創出の加速

愛媛大学大学院理工学研究科教授	宇野英満
愛媛大学総合科学研究支援センター准教授	谷弘幸
愛媛大学総合科学研究支援センター准教授	倉本誠
愛媛大学総合科学研究支援センター助教	森重樹
宇都宮大学工学部助教	伊藤智志
山口大学大学院医学研究科教授	上村明男
九州大学大学院工学研究科教授	古田弘幸
鳥取大学大学院工学研究科教授	伊藤敏幸
静岡大学大学院理学研究科准教授	加藤知香
高知大学理学部教授	北条正司
香川大学大学院工学研究科教授	馮旗
香川大学教育学部教授	高木由美子

東日本大震災以来、日本の科学者には、その専門分野を問わず原子力エネルギーから再生可能エネルギーへの転換が大問題かつ緊急の課題として提示されている。このほかにも、がん治療法の開発、感染症の制圧など様々な難題がある。これらの難問題の解決に、化学の分野からは、新しい機能を持った物質の開発、既存物質の機能の発掘が重要な貢献をするであろう。また一方で、次代を担う優秀な若手研究者を育てることも間接的な問題解決の道であることは言うまでもない。これらの難題を解決するために、有機・無機新機能材料の開発を目指し、同じ高度に専門化された機器を用いて研究を推進する科学者で集まり、相互に研究協力や若手育成を主眼においていた幾つかのサブグループよりなる研究プロジェクトを立ち上げた。本共同研究プロジェクトは、一部サブグループを入れ替えた形の継続課題である。

これらサブグループの研究を遂行していく上では、高性能の分析機器による物質構造の解析と物性の評価は必要不可欠であり、それに必要な基本的な機器と技術の大部分をサブグループで既に有している。しかしながら、有期雇用研究者の増加や研究の一部を学生が担っている現状から、研究遂行に必要なすべての技術がサブグループ内にあるわけではない。逐次発生する研究遂行上の問題に対処するために、より高度な研究機器を使用した最新の解析技術を研究に携わる者自らが習得するか、他の専門家に解析を依頼するかの選択を迫られている。本申請のプロジェクトは、これら両方の推進方法を可能にし、サブグループの研究を加速する試みである。ネットワーク所属の機器を活用して、若手

研究者に対し最新の分析・解析技術を合宿形式で伝授する。この一方で研究者間の交流を促し、研究課題解決の機会と方法を与えるとともに、中核施設で受託解析を行い、個々の最先端研究を推進することを目的とした。

本共同研究プロジェクトは、「機器解析合宿」の開催と受託解析による最先端研究の加速を目指しており、中核となる組織は愛媛大学総合科学研究支援センター城北ステーションである。プロジェクト全体では、以下の3事業を実施した。

- ① 機器解析合宿： 単結晶X線構造解析合宿（夏休み期間3泊4日）とNMR構造解析合宿（夏休み期間3泊4日）をおこなった。単結晶構造解析合宿では、極微小結晶用単結晶構造解析装置と高輝度X線単結晶構造解析装置を用いて、反射の測定から解析プログラムを用いた結晶構造解析を行い、論文として公表できるレベルのデータに仕上げる技術を実習を通じて学んだ。NMR構造解析合宿では、核磁気共鳴測定システムを用い、個々に必要な情報に応じて種々の一次元あるいは二次元パルスシークエンスの測定法の活用方法を習得した。
- ② 受託解析： サブグループからの共同研究の依頼を受けて、ステーション所有の機器を用いた機器解析のサービスを行った。
- ③ 最先端研究： 以下のサブグループが個々に研究をおこなった。

宇野・伊藤（智）グループ： 「近赤外色素の開発」 ペリ環状分解反応を利用した共役系の拡張を行い、近赤外領域に強い吸収を持つ色素を合成し、その物性を検討した。

上村グループ： 「高選択的ラジカルドミノ反応の開発とそれを生理活性物質の新規合成法の開発」 ラジカル環化反応に基づく新規なドミノ反応を開発し、それを活用して複素環を有する生理活性物質の新規合成法の開発へと展開した。

古田グループ： 「新規π電子系化合物の創出とその電子構造の解明」 炭素一窒素混乱型大環状オリゴピロールを合成し、種々の金属との錯体化合物の電子状態を解明した。

伊藤（敏）・高木グループ： 「イオン液体を用いた新反応場の構築」 イオン性液体を反応場として用いた新規反応及び高選択的反応を開発した。

加藤グループ： 「機能性ポリ酸塩触媒の創製」 ポリオキソメタレートに異元素を組み込むことにより触媒機能点を作成し、新規触媒作用を有する物質を開発した。

北条グループ： 「希硝酸の酸化力を発現させる反応場と貴金属の溶解」 0.1～2.0M程度の希硝酸が酸化力を發揮する反応場を構築し、貴金属を溶解させると共に、その原因の解明をおこなった。

馮旗グループ： 「高性能色素増感太陽電池開発」、色素増感太陽電池用 TiO₂ ナノ材料および有機色素とのナノ複合体の合成と太陽電池特性評価を行なった。

機器解析合宿は、総合科学研究支援センター城北ステーションの技術職員および理学電機職員の協力を得て、森が単結晶 X 線構造解析、谷と倉本が NMR 構造解析を実施した。これらの合宿は、本プロジェクト参加のサブグループだけを対象にしたものではなく、全国の研究グループを対象にした。14名の参加があった。

受託解析は、愛媛大学総合科学研究支援センター城北ステーションの谷、倉本と森が担当し、機器利用料金にして 377,665 円分の利用があった。

このプロジェクトは大学連携設備ネットワークの事業として行なった。

イリジウム錯体-粘土複合膜を使ったセンシングデバイス

愛媛大学大学院理工学研究科教授

佐藤久子

独立行政法人物質・材料研究機構

田村堅志

1. 背景と目的

イリジウム(Ir)錯体は、近年りん光型発光材料として注目されている材料である。この中でも特に 3 倍のイリジウムイオン (Ir(III)) がフェニルピリジン誘導体とつくるシクロメタレート型錯体は可視光領域に強い発光を示し、それを利用した液晶ディスプレイ用 EL 素子材料などへの応用研究が盛んにおこなわれている。¹⁾ このようにイリジウム錯体の示す発光は長寿命の励起三重項からのりん光発光であるため、他の分子との相互作用の可能性がある。このため、同じ三重項状態にある酸素分子によって高効率の消光が観測されるという特質がある。これらのことから、発光性の金属錯体は酸素のプローブとして有望な材料といえる。我々は レアメタル材料であるイリジウム金属をなるべく少なく使用するために、ナノメーターオーダーの膜にする技術の開発をおこなってきた。まず、発光性の中性のイリジウム錯体を用いたラングミュア・プロジェクト (LB) 法により単分子膜を製造し、単分子膜でも十分高い発光性を示すことを明らかにした。²⁾ これは、発光性イリジウム錯体を用いた LB 膜の製造とその発光デバイスへの応用を示した初めての例である。一方、層状無機化合物である粘土鉱物は、層間に有機色素や金属錯体をイオン交換によって吸着することができる。そこで我々は、イリジウム錯体-粘土ハイブリッド LB 膜により堅固な膜の製造にとり組んでいる。³⁻⁹⁾ ここで用いる粘土 LB 法の技術は有機・無機ハイブリッド法による超薄膜製造法のひとつであり、その方法に改良を加えて、膜の製造方法の確立に努めてきた。本報告では膜強化のための検討として、粘土 LB 法を用いた陽イオン性で両親媒性のイリジウム錯体とモンモリロナイトとのハイブリッド LB 膜の酸素センサーへの応用を述べる。⁹⁾

2. 実験方法

粘土 LB 法とは図 1 に示すように、粘土の分散液の上に陽イオン性の単分子膜を形成し、剥離した粘土粒子が単分子層に静電気力により吸着することを利用した複合薄膜作製法である。粘土鉱物は図 2 に示すように 4 面体シートと 8 面体シートから構成された層状無機化合物であり、これらの層が負に帯電しているために、陽イオンを吸着することができる。このため、層間に有機色素や金属錯体をイオン交換によって吸着することができる。また粘土層の厚さは約 1 nm であり、水に分散されると剥離されて 1 nm にナノシート化される。このナノシートを粘土 LB 法の下相に分散させて LB 膜を製造する。LB 膜に粘土ナノシートを導入すると整層構造は安定化し、粘土に由来する諸性質を付加することができることが特徴である。

陽イオン性 Ir(III)錯体として、 $[Ir(dfppy)_2(dcbpy)]^+$ 、 $[Ir(ppy)_2(dcbpy)]^+$

(n=9, 18) (dc9bpy = 4,4'-dinonyl-2,2'-bipyridine, dc18bpy = 4,4'-dioctadecyl-2,2'-bipyridine, dfppyH=2-(4', 6'-difluorophenyl)bipyridine ; ppyH = 2-phenylbipyridine) (図3) を合成した。これらの錯体を用いて LB 法によりモンモリロナイト(クニピア P : クニミネ工業)とのハイブリッド LB 膜を製造した。水面上に浮遊する膜を親水性ガラス基板上に垂直法によって移行し LB 膜を製造した。アルキル鎖長、トラフ 温度、粘土量、表面圧を変化させてハイブリッド LB 膜製造の最適条件の検討を行った。ここで LB 膜の略称として $[\text{Ir}(\text{dfppy})_2(\text{dc9bpy})]^+$ 、 $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{dc9bpy})]^+$ と粘土ナノシート (モンモリロナイト) とハイブリッド化した膜を {DFPPY/clay}, {PPY/clay} と各々略記する。また、純水の上で製造した LB 膜を {DFPPY/water}, {PPY/water} と略記する。

図4の石英セル中で、真空中および、酸素分圧をかえて、LB 膜の発光測定をおこなった。

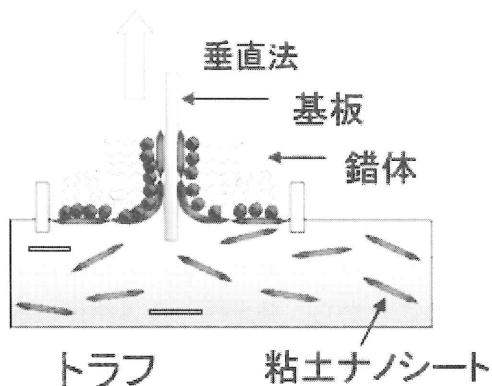


図1 粘土LB法：粘土の分散液の上に陽イオン性の単分子膜を形成し、剥離した粘土粒子が単分子層に静電気力により吸着することを利用した複合薄膜作製法。

図2 粘土鉱物の構造：4面体シートと8面体シートから構成された層状無機化合物であり、層間に有機色素や金属錯体をイオン交換によって吸着することができる。

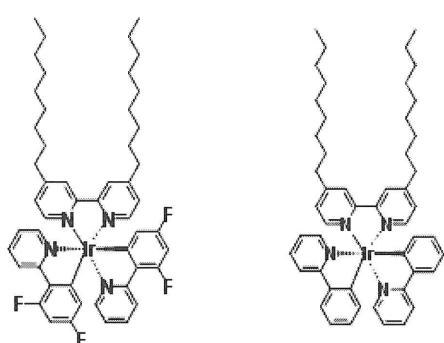


図3 用いたIr(III)錯体
(左) $[\text{Ir}(\text{dfppy})_2(\text{dc9bpy})]^+$
(右) $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{dc9bpy})]^+$

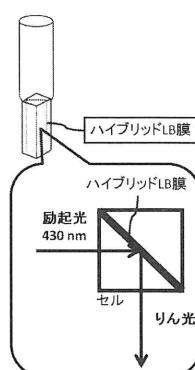


図4 LB膜の測定方法

3. 結果と考察

下相にモンモリロナイト分散液を用いると、図5に示すように π -A 曲線は下相が純水のときと比べて立ち上がり面積や崩壊圧に違いが見られた。このことにより、気液界面においてハイブリッド膜が形成されることがわかった。ハイブリッドLB膜の原子間力顕微鏡観察により、モンモリロナイト粒子に均一に Ir(III)錯体が吸着した薄膜の生成を確認した。原子間力顕微鏡でガラス基板上に移行したLB膜表面を観察したところ、膜厚約3 nmの均一な膜が形成されていることがわかった。このことから、錯体はアルキル鎖を垂直にして配向し、粘土ナノシートとのハイブリッド化LB膜が形成されたことを確認した。

これらのLB膜から発する発光スペクトルを励起波長430 nm、真空条件下で測定した。図6に示すように、真空中で2種類の{DFPPY/clay}と{PPY/clay}の発光のピーク波長はそれぞれ510 nm, 550 nmであった。次にハイブリッドLB膜を用いて、酸素による消光の酸素分圧依存性を調べた。酸素によって、図に示すような、酸素分圧に応じた顕著な消光を示した。しかも、図7に示すように、酸素の導入・排気の時間変化に対応して発光の迅速可逆な強度変化が起こることがわかった。特に{DFPPY/clay}において微量酸素分圧による敏感な応答性を示した。図8には、Stern-Volmerプロットでの解析結果を示した。これによると、酸素分圧が10 kPaに達するまでに大きく消光し、その後は飽和してゆくことがわかった。特に、 $[Ir(dfppy)_2(dC9bpy)]^+$ とのハイブリッド化({DFPPY/clay})によって感度が良いことがわかった。Stern-Volmerプロットで示されるこの非線形現象は酸素消光に異なる状態が存在することを示唆しており、(1)式のTwo-siteモデルで解析できることがわかった。ここで、 K_{sv1} 、 K_{sv2} は消光に関する感度をあらわし、 f_1 、 f_2 は2成分の割合を表す。 K_{svav} によって全体の感度を比較できる。その結果、オーバーオールの応答性で{DFPPY/clay}が2倍程度大きいことがわかった。

$$\frac{I_0}{I} = \left[\frac{f_1}{1 + K_{sv1} P_o} + \frac{f_2}{1 + K_{sv2} P_o} \right]^{-1} \quad (1)$$

$$f_1 + f_2 = 1$$

$$K_{svav} = f_1 \times K_{sv1} + f_2 \times K_{sv2}$$

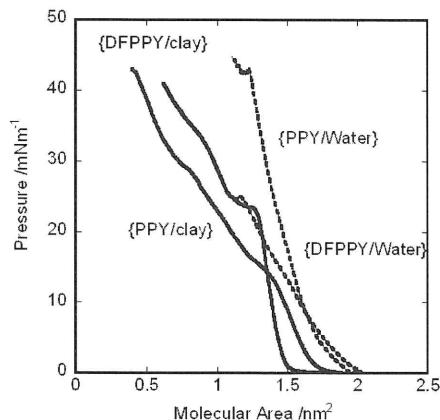
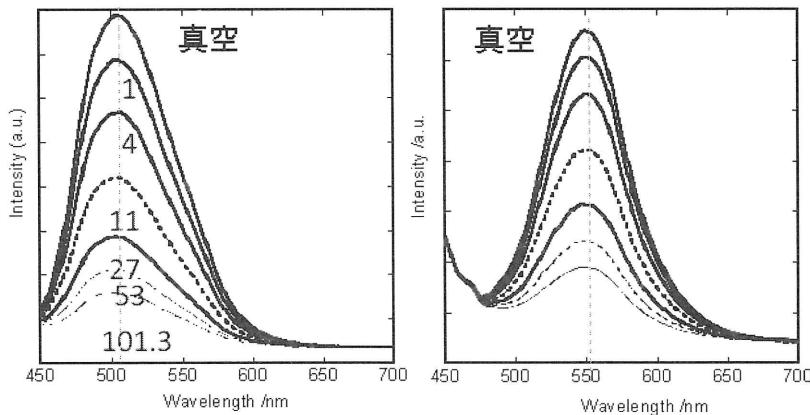


図5 Π -A曲線
純水の上の膜と比べて、粘土ハイブリッド化膜は密なパッキングであり、{DFPPY/clay}が最も密なパッキングをとっている。



{DFPPY/clay}

{PPY/clay}

図6 酸素分圧による発光特性

図中の数値は酸素分圧 (kPa) を表す

(2つのハイブリッドLB膜での同じ分圧の場合の発光を示す)

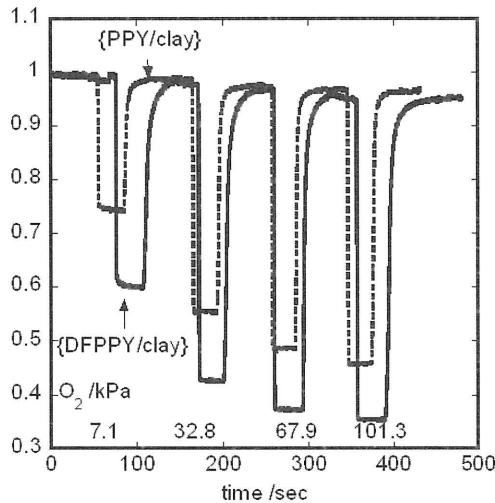


図7 酸素分圧に応じた迅速可逆応答性

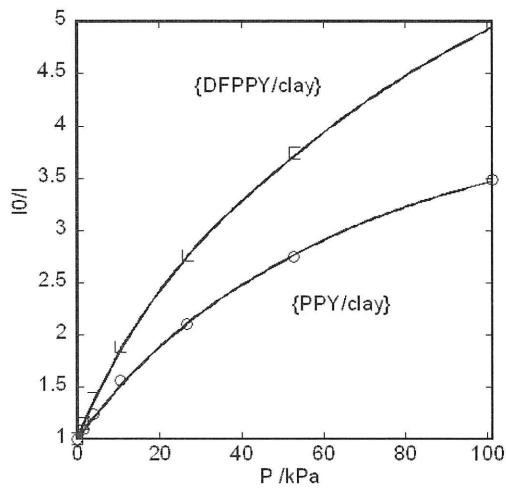


図8 酸素分圧による
Stern-Volmer プロット

4.まとめ

ここでは、イリジウム錯体と層状無機物質（粘土鉱物：モンモリロナイト）とのハイブリッド化LB膜による発光および酸素分子による消光に関する共同研究を報告した。この研究によって、単一膜でも十分高い発光性を示すことがわかった。用いた方法は湿式であるため、低エネルギーの製造方法である。さらに、粘土鉱物とのハイブリッド化であるため環境にやさしいことや、貴重なレアメタル物質イリジウム金属をLB膜にすることによって用いる錯体の量を少なくできることも大きな特徴である。また、拡散過程を含まない表面のみでの応答のため、短時間の迅速応答性や高感度化が実現

でき、酸素など気体センサーとして有望な材料となり得る。粘土鉱物とのハイブリッド化は、膜厚制御がナノメーターのオーダーで可能であり、均一かつ再現性の優れた薄膜デバイスの製造を実現できる可能性がある。今後、多種類の気体を単一膜で同時にセンシング可能となれば、新規な応用技術として、多方面への展開が期待できる。

5. 参考文献

- 1) M. S. Lowry and S. Bernhard, *Chem. Eur. J.*, **12**, 7970 (2006).
- 2) H. Sato, K. Tamura, M. Taniguchi and A. Yamagishi, *New J. Chem.*, **34**, 617 (2010).
- 3) H. Sato, K. Tamura, M. Taniguchi and A. Yamagishi, *Chem. Lett.*, **38**, 14 (2009).
- 4) H. Sato, K. Tamura, R. Aoki, M. Kato and A. Yamagishi, *Chem. Lett.*, **40**, 63 (2011).
- 5) H. Sato, K. Tamura, K. Ohara, S. Nagaoka and A. Yamagishi, *New J. Chem.*, **35**, 394 (2011).
- 6) H. Sato, K. Tamura and A. Yamagishi, “Application of Clay Mineral-Iridium(III) complexes Hybrid Langmuir-Blodgett Films for Photosensing” p 259-272 Chap 13 in Clay Minerals in Nature Ed. M. Valaskova and G. S. Martynkova, INECH (2012).
- 7) 佐藤久子、新機能材料の開発と応用展開 一粘土鉱物、ナノシート、メソ孔シリカと有機系層状材料を利用して一 シーエムシー出版 (2012年5月刊行) 第9章 錯体一層状無機ハイブリッドによる酸素センサー p105-111.
- 8) 佐藤久子, 田村堅志, 長岡伸一、月刊ケミカルエンジニアリング 57/5 47-52 (2012).
- 9) K. Morimoto, T. Nakae, K. Ohara, K. Tamura, S. Nagaoka and H. Sato, *New J. Chem.*, **36**, 2467 (2012)

次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェアの研究開発

愛媛大学大学院理工学研究科助教

宮 田 竜 彦

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

分子科学研究所教授

平 田 文 男

1. 研究背景

次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェアの研究開発の一環で、液体の統計力学理論のひとつである3次元RISM理論（以下、3D-RISM理論）と分子動力学シミュレーション（以下、MD法）を組み合わせた連成計算手法の開発を行なった。本連成計算手法をMD/3D-RISM法と呼ぶことにする。このような新しい連成計算手法の開発は、実際には、異なる手法同士を結び付けるための理論的な考察、アルゴリズムの提案、ソースコード執筆、既知の系への手法適用によるプログラム動作と結果の確認、未知の系への手法適用による新しいサイエンスの開拓、という流れで進むことが多い。本研究においてもこの流れにしたがった。

また、3D-RISM理論は水溶液中の巨大溶質分子（たとえばタンパク質分子など）の溶媒和を分布関数（溶媒の空間的な存在確率）として記述するための理論であり、3D-RISM理論単体での計算ではこれまでにも多くの成果がある[1-3]。また3D-RISM理論で求まる分布関数を用いると、自由エネルギー等の熱力学的な量も計算できる。ただし、3D-RISM理論で分布関数を計算するためには分子の内部自由度を固定する必要があり（分子の柔らかさを考慮できないということ）、タンパク質分子のような内部自由度の大きな対象を扱う上では制限もあった。本研究で開発したMD/3D-RISM法はこの弱点を克服し、分子の内部自由度はMD法できちんと扱いつつ、3D-RISM理論の枠組みも活かせるという連成計算手法である。

2. 研究目的

前節で述べた手法開発の一連の流れのうち、今回は「既知の系への手法適用によるプログラム動作と結果の確認」と「未知の系への手法適用による新しいサイエンスの開拓」の部分を行なった。現実的には後者はまだ研究途上であり、具体的な成果もこれから出版される予定であるため、本報告書では前者の「既知の系で得られた計算結果」に絞って報告する。

MD/3D-RISM法を使った自由エネルギー計算の応用例として、クラウンエーテル18C6が水中でカリウムイオンK⁺を結合するプロセスを選んだ。この系は1960年代にPedersenによってクラウンエーテルが発見された後、非常に多くの研究例があり、実験的には系の（少なくとも静的な）挙動はほとんど分かっていると考えられている。このような系の特徴は、新しい計算手法を確認するうえではうってつけである。18C6は環構造を持つ

ており、 K^+ イオンはこの環構造の中心にある空孔にトラップされることが知られている。

そこで、 K^+ が遠距離から徐々に 18C6 分子（の空孔）に近づくとき、系の自由エネルギーがどのように変化するかを MD/3D-RISM 法で計算した。また、環状の 18C6 分子は内部自由度があり、ある程度分子の形を変えることができる。 K^+ イオンとの相対的な距離によって、18C6 分子の形がどのように変わるものも興味の対象とした。

3. 結果と考察

ここでは反応座標として 18C6 と K^+ イオンの重心間距離 ξ を選んだ。すなわち、重心間距離 ξ という反応座標に沿って自由エネルギープロフィール（平均力ポテンシャルとも呼ばれ、PMF と書くこともある）を計算した。得られた自由エネルギープロフィール（PMF）を図 1 に示す。

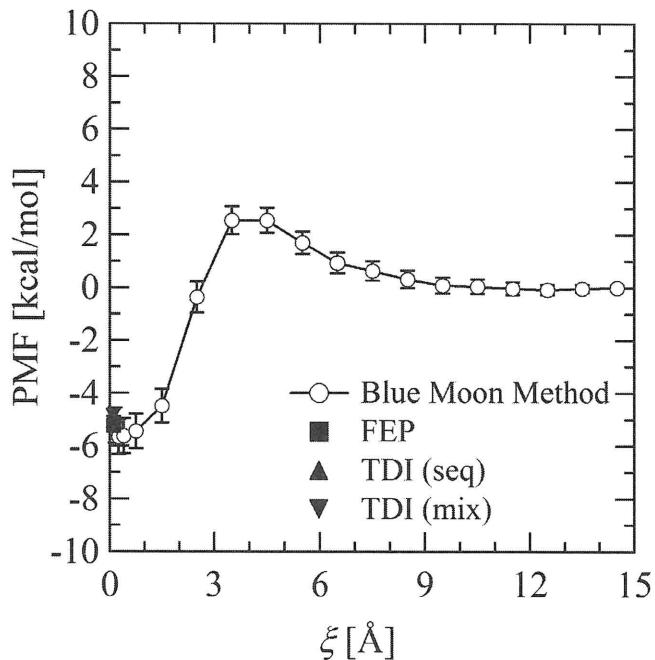


図 1 18C6 と K^+ イオンの重心間距離に沿った自由エネルギープロフィール

横軸 ξ は重心間距離であり、Blue Moon Method と書かれているデータが MD/3D-RISM 法で計算した自由エネルギープロフィールである。この自由エネルギープロフィールを描く際、自由エネルギーの基準点（ゼロ点）として $\xi = 14.5 \text{ \AA}$ の点を選んだ。FEP、TDI(seq)、TDI(mix)のデータ点も MD/3D-RISM 法で計算した結果であるが、これらは自由エネルギーの基準点を無限遠点としたときの結果である。 $\xi = 0 \text{ \AA}$ の近傍すべての結果が一致することから、 $\xi = 14.5 \text{ \AA}$ ではすでに 18C6 と K^+ イオンの間の有効相互作用は消失していると考えられる。また、18C6 が K^+ イオンを結合する前後で、自由エネルギーは約 5 kcal/mol 程度変化する。これに対応する実験値はおよそ 2.8 kcal/mol であるが、用いている力場の

精度が古典レベルである点などを考慮すれば、これはかなりよく一致していると言える。したがって本計算手法 MD/3D-RISM 法は、既知の系（クラウンエーテルの系）に対して実験的に知られた挙動を妥当な精度で再現すると結論づけられる。

また自由エネルギープロフィール（PMF）の特徴として、分子間距離が遠方から近づくに伴い、いったん極大値を経た後に PMF が大きく低下し、 K^+ イオンが 18C6 に認識されることが分かる。この極大値の出現理由を調べるために、18C6 周りや K^+ イオン周りの水和数、および、18C6 と K^+ イオンの直接相互作用のバランスが重心間距離に依存してどのように変化するかを、計算結果を基に解析した。その結果、PMF の極大値近傍では、 K^+ イオンが水とともに 18C6 とも十分相互作用できない状況になっていることが判明した。すなわち、 K^+ イオンが周囲と十分に相互作用できないというフラストレーションが PMF の極大となって見えていると解釈できる。

さらに、18C6 分子の形が重心間距離に応じてどのように変化するかを調べた。実際の解析方法としては、まず 18C6 の有する 6 個の酸素原子に注目した。18C6 分子の存在する空間中にある平面を考え、これらの 6 個の酸素原子の座標をこの平面に射影することで六角形を作る。この六角形の面積が最大となるように、18C6 分子の配向に対して平面の角度を調整する。こうして得られた六角形の面積の分布を図 2 に示す。

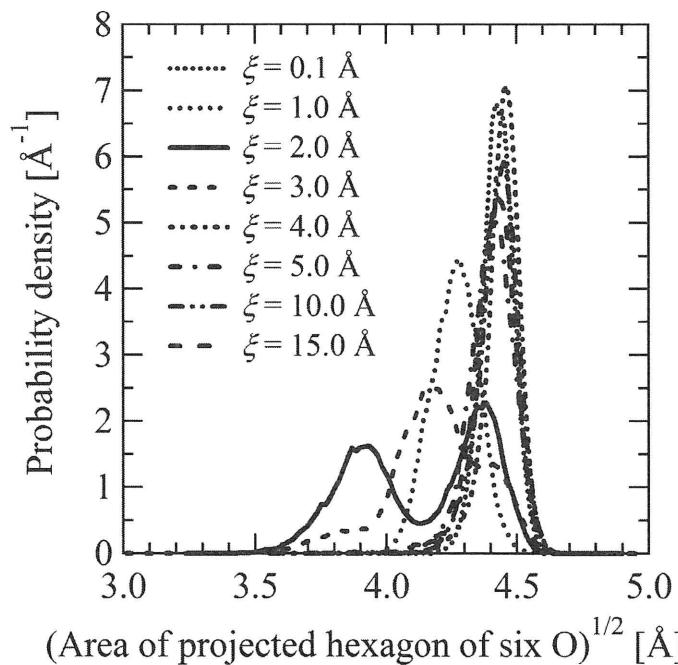


図 2 18C6 の 6 個の酸素原子の座標を平面に射影して作る六角形の面積の最大値の分布

図 2 の横軸は、六角形の面積の平方根である。本質的には面積のままでもなんら問題はないが、長さの次元にした方が考えやすいのではないかという理由から平方根をとってプロットした。重心間距離 $\xi = 0.1 \text{ \AA}$ のとき、 K^+ イオンは 18C6 の中心の空孔に完全に入

っており、 $18C_6$ の環構造は幾何学的に閉じることができない。つまり、図 2 で見えている $\xi = 0.1 \text{ \AA}$ のときの分布は、 $18C_6$ の形がきれいに開いた環構造をとっているときの分布である。 $18C_6$ の形は、 $\xi = 2 \text{ \AA}$ または 3 \AA のときを除き、開いた環構造をとっていることが分かる。一方、 $\xi = 2 \text{ \AA}$ または 3 \AA のときには、六角形の面積が狭くなる分布が見えていることから、これらの重心間距離のときには $18C_6$ の環構造が閉じられる場合があることを示す。このことは、 K^+ イオンとの相対的な距離に応じて $18C_6$ の形が有意に変化することを意味する。

4. まとめ

次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェアの研究開発の一環で、液体の統計力学理論のひとつである 3D-RISM 理論と MD シミュレーションを組み合わせた連成計算手法 MD/3D-RISM 法の開発を行なった[4]。既知の系としてクラウンエーテルを選び、 $18C_6$ と K^+ イオンの結合プロセスの自由エネルギー計算を MD/3D-RISM 法で行なった。その結果、本計算手法は実験的に知られていた挙動をよく再現することが分かった。また、計算結果の詳細な解析から、自由エネルギープロフィールで観察された極大値が K^+ イオンの周囲との相互作用のしにくさに起因すること、および、 $18C_6$ の形は K^+ イオンとの相対的な距離に応じて有意に変化することを明らかにした。なお、このクラウンエーテルに関する結果は論文として出版されている[5,6]。

参考文献

1. T. Imai, R. Hiraoka, A. Kovalenko, and F. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (2005) 15334.
2. N. Yoshida, S. Phongphanphanee, Y. Maruyama, T. Imai, and F. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006) 12042.
3. S. Phongphanphanee, N. Yoshida, and F. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (2008) 1540.
4. T. Miyata and F. Hirata, *J. Comput. Chem.*, **29** (2008) 871.
5. T. Miyata, Y. Ikuta, and F. Hirata, *J. Chem. Phys.*, **133** (2010) 044114.
6. T. Miyata, Y. Ikuta, and F. Hirata, *J. Chem. Phys.*, **134** (2011) 044127.

放射線誘発口内炎モデルの作成と評価系の確立

愛媛大学医学部附属病院教授

荒木博陽

愛媛大学医学部附属病院薬剤部

渡邊真一

小野薬品工業株式会社水無瀬研究所創薬研究部

南真志

第三研究室第三グループグループヘッド

小野薬品工業株式会社水無瀬研究所創薬研究部

中西美樹

第三研究室第三グループ

【背景および目的】

現在、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、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%、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^{1,2)}。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^{3,4)}、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。そのために、口内炎の動物モデルの開発が重要となる。抗がん剤を用いた口内炎モデルは確立されており⁵⁾、報告も数多くあるが、放射線誘発口内炎モデルに関する報告は少なく、作成方法の基礎的研究や評価方法には改良の余地が多く残されている。本研究ではハムスターのチークポーチに放射線を直接照射することにより、口内炎を惹起した。また、ハムスターモデルに対してケラチノサイト成長因子（Keratinocyte growth factor : KGF）であるPaliferminを用いて口内炎予防/治癒効果の確認を行い、本研究で用いる口内炎モデルの妥当性を検討した。

【方法】

1. 口内炎モデルの作成

実験には雄性シリアンハムスター6週齢を用い、チークポーチに放射線(20, 25, 30, 40, 50Gy)を単回照射することで作成した。放射線照射にはHITACHI MBR-1520R-3を使用した。

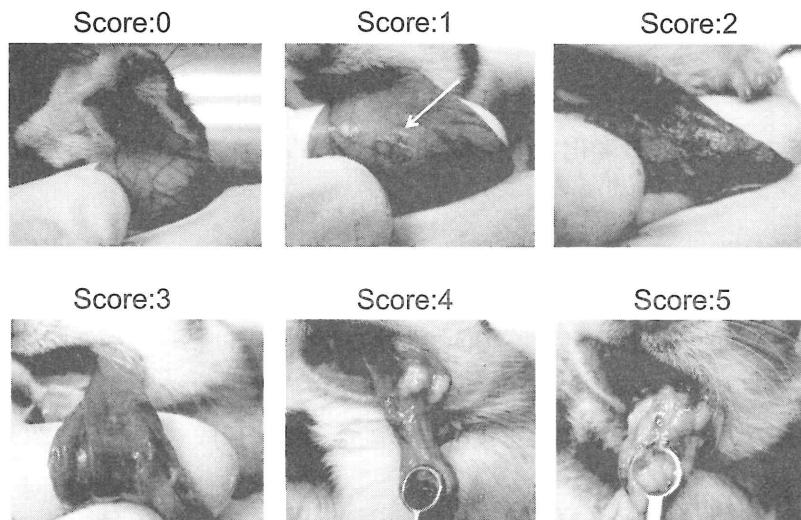
2. 口内炎の評価

上記条件にて作成した口内炎をスコアリング、H&E染色、炎症の指標である好中球ミエロペルオキシダーゼ（Myeloperoxidase : MPO）活性の測定により評価を行った。口内炎は、その程度を6段階(スコア0-5)に分類して肉眼的に評価した（図1）。

スコアリング

0. 正常

1. 紅斑や充血がみられ、軽度の表皮剥離がある。膿や潰瘍の形成はない。
2. 高度の紅斑や充血がみられ、中程度の表皮剥離がある。膿や潰瘍の形成はない。
3. 高度の紅斑や充血がみられ、表皮剥離から潰瘍形成。わずかに出血や膿が認められる場合もある。
4. 膿を伴う潰瘍がチークポーチの 50%未満に認められる。
5. 膿を伴う潰瘍がチークポーチの 50%以上に認められる。萎縮あるいは癒着するケースもある。



Macroscopic aspects of oral mucositis in hamsters with a single irradiation.

図 1 放射線誘発口内炎（ハムスター）のスコアリング（Grade 0～5）

3. 放射線誘発口内炎に対する Palifermin の作用と用量反応性

KGF である Palifermin(1, 5 mg/kg, s.c.) 投与の影響について検討した。照射線量は 25Gy とし、Palifermin (1, 5 mg/kg, s.c.) は放射線照射後 1, 2, 3 日目に投与した。

【結果】

1. 放射線照射量の違いによる口内炎の程度

ハムスターのチークポーチに放射線(20-50 Gy)を照射すると、8 日目より口内炎の発症が認められた。その後は、放射線照射量に依存して口内炎の程度を示すスコアが増加し、そのピークは 14 日目となった。なお、体重は各群間とも放射線を照射していない対照群と比較して差はみられなかった。20Gy 照射ではスコア 3 以上を記録した個体はなく、照射線量の増加によるスコアの増大は 40Gy でほぼ頭打ちとなった（図 2）。

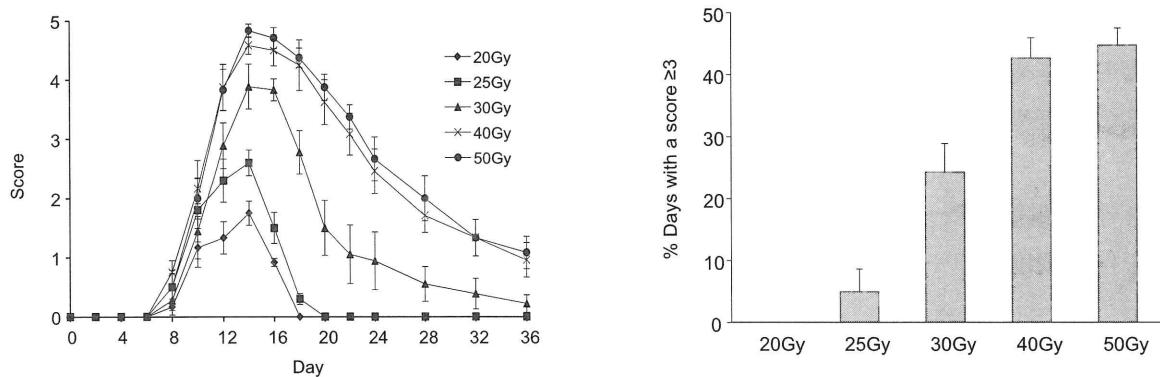
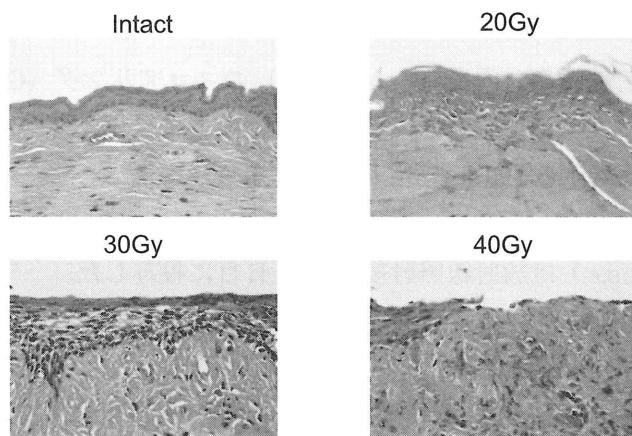


図 2 口内炎スコアの経日変化と全観察期間に占めるスコア ≥ 3 であった日数の割合

2. 組織学的変化に及ぼす放射線照射の影響

H&E 染色による組織学的所見によると、20Gy 照射による障害は粘膜上層に限定しており、炎症性細胞の浸潤等はほとんどみられなかった。30Gy となると炎症性細胞の浸潤が著明となり、明らかな炎症の増大が認められた。40Gy 照射では上皮細胞の脱落や潰瘍形成も明らかに認められ、線量に依存した口内炎の悪化を示した（図 3）。



Samples were removed and processed for H&E staining ($\times 400$ magnification) after the animal was killed on day 14.

図 3 口内炎の組織学的所見 (H&E 染色)

3. MPO 活性に及ぼす放射線照射の影響

MPO 活性は線量に依存した增加がみられたが、40Gy で頭打ちとなり、50Gy ではむしろ減少傾向を示した（図 4）。

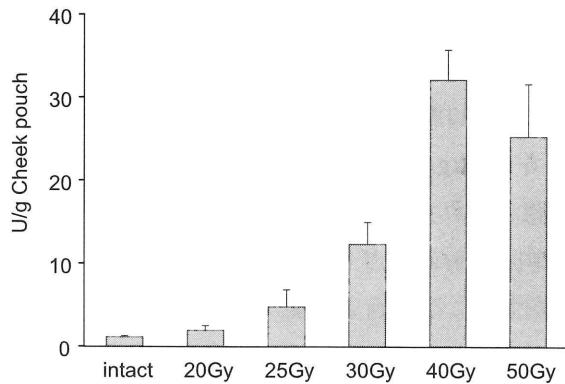


図4 口内炎誘発ハムスターのチークポーチにおけるMPO活性

4. 放射線誘発口内炎に対するPaliferminの作用

放射線 25Gy を照射したハムスターに対し、ヒト遺伝子組み換え KGF である Palifermin 5 mg/kg/day の投与は口内炎の抑制傾向を示し、累積スコアでは対照群と比較して有意($p<0.05$)な差が認められた。一方、Palifermin 1 mg/kg/day の投与は口内炎スコアの減少を示さなかった（図5）。

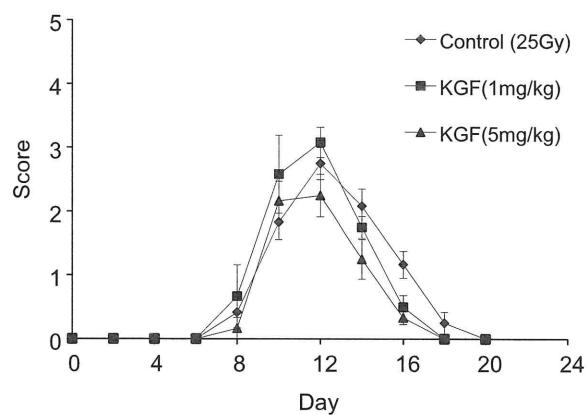


図5 放射線誘発口内炎(25Gy)に対するPaliferminの作用

【考察】

ハムスターのチークポーチに放射線(20-50 Gy)を照射すると、8日目より口内炎の発症が認められ、その後は、放射線照射量に依存して口内炎の程度を示すスコアが増加し、そのピークは14日目となった。H&E染色による組織学的所見あるいはMPO活性の結果から、20Gy照射による炎症性細胞の浸潤等はほとんどみられず、30Gy以上で明らかな炎症の増大が認められた。MPO活性において40Gy

で頭打ちとなり、50Gy ではむしろ減少傾向を示した原因是照射線量の増加による細胞死等が考えられ、薬効の評価を行う上では照射線量を 40Gy 以下にとどめることが望ましいと推察された。

薬物の効果の検討では、すでに口腔および腸管における粘膜の細胞増殖を促す作用が知られている KGF である Palifermin を 5 mg/kg/day 投与して、口内炎の累積スコアを対照群と比較したところ、有意な口内炎程度の軽減が認められた。

以上のことから、放射線単回照射により作成したハムスターの口内炎モデルは、スコアリングに加え、組織学的評価、MPO 活性による評価も可能であることが明らかとなった。また、Palifermin の投与によって、その有効性が確認されたことから、今後は Palifermin を陽性対照とした口内炎治療予防薬の評価が可能であることが示された。

【総括】

本研究により、ハムスターの口内炎評価モデルの作成が可能となった。今後諸種化合物の放射線誘発口内炎に対する効果および作用機序を解明する上で有用と考えられる。

参考文献

1. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol.* 1998;34:39–43.
2. Scully C, Sonis S, Diz PD. Oral mucositis. *Oral Dis.* 2006;12:229–41.
3. Yamamura K, Ohta S, Yano K, Yotsuyanagi T, Okamura T, Nabeshima T. Oral mucosal adhesive film containing local anesthetics: in vitro and clinical evaluation. *J Biomed Mater Res.* 1998;43:313–7.
4. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Mucositis study section of the multinational association for supportive care in cancer; International Society for Oral Oncology. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer.* 2004;100:2026–46.
5. Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69:437–43.

搅乱手法を用いたプライバシー保護医療情報分析の実験評価

愛媛大学医学部附属病院准教授	木 村 映 善
NTT情報流通プラットフォーム研究所	千 田 浩 司
NTT情報流通プラットフォーム研究所	濱 田 浩 気
NTT情報流通プラットフォーム研究所	五十嵐 大
NTT情報流通プラットフォーム研究所	富 士 仁
NTT情報流通プラットフォーム研究所	高 橋 克 巳
愛媛大学医学部附属病院教授	石 原 謙

1. はじめに

ICT(Information and Communication Technology)の発達に伴い、組織や個人が所有するデータの収集・管理・利用形態が多様化してきている。このような状況において、個人データをICTによって容易に収集・管理でき、安心・安全な利活用が可能となれば、社会や産業における新たな価値創造が期待できる。例えば医療健康分野では、EHR(Electronic Health Record)やPHR(Personal Health Record)といった個人の健康情報を収集・管理・利用する基盤の実用化の動きが見られる。

しかし個人データの利活用、特に二次利用においては、往々にしてセキュリティやプライバシーの問題が実用の大きな障壁となる。特にプライバシーについては、個人データ開示の基準が不明確という指摘がある¹⁾。そこで経済産業省委託事業「情報大航海プロジェクト」²⁾では、行動データや医療健康データといった個人データを利活用する実証実験と並行して、国内において先進的な事例と言える、個人データ開示基準に関するガイドラインを作成している¹⁾。本ガイドラインでは、集合匿名化と呼ばれるプライバシー保護技術が推進されている。集合匿名化は、識別情報を加工（削除、一般化等）し、ある個人データに対応する特定個人をk人未満に絞り込めないかどうかを匿名性の指標とするk-匿名性(k-Anonymity)³⁾、またはその派生指標に基づく技術の総称と捉えられる。k-匿名性は直感的に理解しやすく、現在最も代表的な匿名性の指標と言えよう。

k-匿名性に関する研究動向は、匿名性、データの有用性、および処理コストに関する研究に大別できる。データの有用性については、医療健康分野において

も実験報告等が見られる。 k -匿名性を満たすための処理は k -匿名化と呼ばれ、個人データの抽象度を上げる一般化（例：「年齢」を「年代」に一般化）が基本処理となる。これに対し、ある個人データに対応する特定個人を $1/k$ 以上の確率で推定できないようにする Pk -匿名化⁴⁾は、いくつかの個人データを確率的に別の値に置き換える処理が基本となり、 Pk -匿名化の匿名性指標である Pk -匿名性は、 k -匿名性と同等の匿名性を持つことが示されている⁴⁾。また、2章で詳述するが、 Pk -匿名化は k -匿名化と比べて以下の利点がある。1) データ加工に制限が無い（ k -匿名化は所望の匿名性を満たす加工が不可能な場合がある）2) 個人データの収集者に対しても集合匿名化の匿名性を確保できる一方、 Pk -匿名化は k -匿名化と異なり確率的に値を変更するため、 Pk -匿名化後のデータを用いて統計分析等を行う場合、その分析精度、すなわちデータの有用性が重要な指標となる。医療健康分野で Pk -匿名化の有用性を評価した先行研究は筆者らが知る限り無く、実際の医療情報に Pk -匿名化を適用し、 Pk -匿名化後のデータの有用性評価が本研究の目的である。

2. 方法

2.1 機微な情報を含むデータ

下記に、本研究で適用する Pk -匿名化手法を説明するためのサンプルデータを提示する（表1）。先頭行は各値の項目名を表し、識別子、準識別子、センシティブ属性、非センシティブ属性の何れかに分類される。ここで識別子はそれ単独で誰のデータか特定し得る情報、準識別子は他の準識別子と組み合わせることで誰のデータか特定し得る情報、センシティブ属性は識別子、準識別子以外の情報でプライバシーに係わる情報、そして非センシティブ属性はそれ以外の情報とする。集合匿名化は、個人データの識別子削除を前提として、準識別子を加工し誰のデータか特定困難にする。加工無しの準識別子が増える程個人特定のリスクが高まり、特定されるとセンシティブ属性の値が知られ得るため準識別子の加工が必要とされる。

表1 個人データの例

E-mail (識別子)	Age (準識別子)	Education (準識別子)	Zip Code (準識別子)	Annual Income (センシティブ属性)	Smoking (非センシティブ属性)
aaa@xx.com	24	Bachelor	53711	40k	Yes
bbb@xx.com	25	Bachelor	53712	50k	No
ccc@yy.com	30	Master	53713	50k	No
abc@xx.com	30	Master	53714	80k	No
abb@zz.com	32	Master	53715	50k	No
bcc@xx.com	32	Doctorate	53716	100k	Yes

2.2Pk-匿名化

Pk-匿名化は、識別子を削除した任意のレコードについて、誰のデータか $1/k$ 以上の確率で推定できないように準識別子の値を加工する手法である。準識別子の値の確率的な置き換えが基本であり、準識別子の加工前後のデータを比較し、任意のレコードについて対応するレコードを $1/k$ 以上の確率で推定できなくなる加工を Pk-匿名化と呼ぶ。表 2 に、表 1 の個人データを Pk-匿名化したイメージを与える。各データを確率的に置き換える手法として維持置換搅乱(Retention-Replacement Perturbation)が知られている⁵⁾。維持置換搅乱は、各項目について維持確率 p を設定し、確率 p でそのまま値を残し、確率 $1-p$ でランダムな値に置き換える。この処理を搅乱と呼ぶ。搅乱しない(非)センシティブ属性は $p=1$ とすれば良い。維持置換搅乱は、搅乱後のデータから、期待値最大化等により搅乱前のデータの統計量を推定できる特徴があり、データの有用性向上が期待できる。この推定処理を再構築と呼ぶ。更に搅乱処理はデータ毎に独立に行えるため、データ保持者は搅乱したデータを提出し、データ集約者/利用者(分析者)は集約したデータを再構築して利用すればデータ保持者以外の全ての者に対するプライバシー保護が可能となる。一方 Pk-匿名化は、誰のデータか $1/k$ 以上の確率で推定できないように維持確率 p を決定することを特徴とし、その後は単純に搅乱及び再構築を実行すれば良い。

表 2 Pk-匿名化のイメージ

Age (準識別子)	Education (準識別子)	Zip Code (準識別子)	Annual Income (センシティブ属性)	Smoking (非センシティブ属性)
24	Bachelor	53715	40k	Yes
34	Bachelor	53712	50k	No
30	Master	53712	50k	No
25	Bachelor	53714	80k	No
30	Master	53715	50k	No
32	Master	53714	100k	Yes

3. 実験評価

3.1 実験概要

愛媛大学医学部附属病院(以下、愛媛大病院)の患者データにPk-匿名化を適用し、クロス分析及び多変量解析を行った。患者データは分析に必要な項目のみ抽出し、患者データを許容範囲の限界まで一般化してPk-匿名化を適用し、分析結果の精度を評価した。

3.2 利用データ

愛媛大病院の患者データは、愛媛大病院が医療統計情報プラットフォーム研究会6)(CISA)に提出しているデータのうち、2007年1月から2011年3月分までのデータを利用した。CISAは研究会参加の大学附属病院からレセプト・DPCデータに基づいた独自形式の医療保険情報を収集・蓄積しており、日本では最大級規模の医療保険情報データベースを構築している。クロス分析では、患者データから性別、年齢、診療科、処方量、処方回数、医薬品コードを抽出し、ベンゾジアゼピン(BZD)系の処方履歴として180,320件の有効レコードを得た。患者数は10,563人となった。性別は男女の2通り、年齢は5年刻みの生年とし22通り、診療科は22通り、処方量は912通り(処方量114通り×単位種類数8通り)、処方日数(処方回数)は79通り、医薬品コードはBZD系32通り、そしてBZD系の作用型を5通り(超短期/短期/中期/長期/超長期)と、一部一般化を施した。これらのうち、性別、年齢、診療科は準識別子、その他はセンシティブ属性に設定した。準識別子については、これ以上の一般化は分析に支障をきたすと判断した。

3.3 分析内容

クロス分析については、以下に挙げるBZD系の処方傾向の分析事例7)をユースケースとして、愛媛大病院の患者データを用いた追従試験を行った。・国立13大学病院を対象に、2009年4月～2010年3月のBZD系処方情報(外来受診患者95,516名に対する601,067件)を収集した。

[結果1] 処方件数は男性よりも女性が多い

[結果2] ピークは精神科で35-39歳、一般診療科では65-69歳

[結果3] 全処方の57.6%が一般診療科での処方、34.5%が高齢者(65歳以上)に対する処方。高齢者に対する処方頻度は精神科より一般診療科の方が高い割合(19.7% vs. 45.4%)

[結果 4] 短時間作用型 BZD が高齢者に対する BZD 系薬剤処方の 68.9%を占め, その処方頻度も精神科より一般診療科の方が高かった (52.0% vs. 74.3%)

上記の結果 1~4 について, 愛媛大病院の患者データを Pk-匿名化して得た結果と比較する. 但し Pk-匿名化は搅乱後のデータ(搅乱データ), 及び更に再構築したデータ(再構築データ)の双方について比較し, 再構築の効果も合わせて評価する.

4 結果

4.1 k-匿名化の限界

愛媛大病院の患者データは一次加工処理として許容範囲の限界まで一般化されている. この一次加工データに k-匿名化を適用しても無駄であり, k-匿名性を満たすためには同一の準識別子の組の値が k 個未満のレコードを削除する等の対策が必要となる. 表 3 に実際 k 個未満となったレコード数を示す.

表 3 k 匿名性を満たさないレコード数

k	2	3	4	5	10	50	100
削除等の対策が必要となるレコード数	30	70	130	182	576	4,414	11,570

表 3 の結果から, k の値が大きいとき, 例えば k=100 とした場合は約 6. 4%が削除等の対象となり, 少なからず影響があることが判明した.

4.2 元データの結果

愛媛大病院の患者データ 180,320 件を用いた 3.1.2 副節の結果 1~4 の追従試験の結果を以下に示す(結果 I~IV は結果 1~4 に対応). 一般診療科の範囲が不明だったため診療科全体に置き換えて評価した.

[結果 I] 処方を受けた患者は男性が 5, 042 人(47.7%), 女性が 5,521 人(52.3%)

[結果 II] 精神科のピークは 1970-1974 年生まれ(51 人), 1975-1979 年生まれ(45 人), 全体では 1935-1939 年生まれ(1, 214 人), 1930-1934 年生まれ(1,184 人)

[結果 III] 生年が 1945 年以前の患者は 4, 702 人(44.5%)

[結果 IV] 生年が 1945 年以前の患者で短時間作用型 BZD 系薬剤処方は 51.3%

上記の結果について、結果 II のみ CISA のデータよりも愛媛大病院の方が全体的に高齢の方に分布している以外は、結果 1~4 とほぼ同等の結果となった。

4.3 搅乱データ及び再構築データの結果

次に、愛媛大病院の患者データを加工して搅乱データ及び再構築データを生成し、3.1.2 副節で紹介したクロス分析の追従試験を行った結果を示す。k の値を $k=2, 3, 4, 5, 10, 50, 100$ と動かし、搅乱データ及び再構築データを 100 組生成して評価した。特に結果 I は詳細に評価した。以下に示すグラフ及び表は、搅乱データ及び再構築データを用いて 3.1.2 副節で紹介したクロス分析の追従試験を行った際の分析精度を表す。

[結果 I] 男女の患者数を集計し、100 組の集計値の平均を用いた。結果 I は男女の二値であるため、以下では男性の集計値にのみ着目する。k をパラメータとした集計値の推移を図 1 に示す。

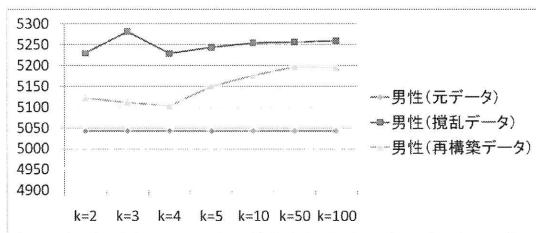


図 1 結果 I の集計値（男性のみ）

何れも搅乱データと比べ再構築データの方が本来の集計値に近いことが分かる。また各データの誤差、 $| \{加工データの集計値\} - \{\text{本来の集計値}\} | / \{\text{本来の集計値}\}$ は、搅乱データは 3.5~5%程度であるのに対し、再構築データは何れも 1~2%程度改善されている。次に元データを 10 倍に重複して上記同様の評価を行なった結果を図 2 に示す。元データを 10 倍にすることで精度は大幅に向上了し、誤差は搅乱データが 3.1~4.0%程度、再構築データが 0.7~3.3%程度となった。

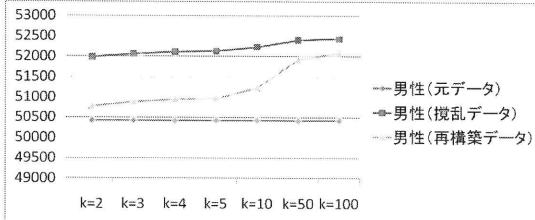


図 2 元データのサイズの 10 倍の時の結果 I の集計値 (男性のみ)

[結果 II] 精神科と全体のピークがどの程度一致するか確認した(表 4,5. 集計値は一致データの平均). 精神科はピークでも度数が 51 と小さく分析に足る精度は得られなかった. 全体ではピークの度数が 1, 214 と比較的大きく一致割合は両データ有意な傾向が見られる. 誤差は再構築による改善効果が大きい. 一致割合自体は決して高くないが, これは二番目以降のピークが僅差の場合に順位変動が起こり易いことが原因と考えられる. また度数が大きい程再構築による高精度推定が期待できるため, 度数が大きい集計値に着目する分析であれば高精度の結果が期待できる.

表 4 結果 II の評価結果 (精神科)

k	搅乱データ			再構築データ		
	一致割合	集計値	誤差	一致割合	集計値	誤差
2	8/100	33.4	34.6%	14/100	125.5	146.1%
3	8/100	33.9	33.6%	14/100	156.0	205.9%
4	1/100	30.0	41.2%	6/100	109.5	114.7%
5	9/100	31.6	38.1%	7/100	126.1	147.3%
10	3/100	32.7	35.9%	4/100	160.8	215.2%
50	2/100	33.0	35.3%	4/100	144.5	183.3%
100	2/100	30.0	41.2%	3/100	68.7	34.6%

表 5 結果 II の評価結果 (全体)

k	搅乱データ			再構築データ		
	一致割合	集計値	誤差	一致割合	集計値	誤差
2	43/100	675.7	44.3%	42/100	1249.6	2.9%
3	34/100	656.3	45.9%	33/100	1272.3	4.8%
4	55/100	644.3	46.9%	52/100	1277.8	5.3%
5	42/100	634.7	47.7%	43/100	1262.7	4.0%
10	46/100	614.4	49.4%	45/100	1291.5	6.4%
50	35/100	570.7	53.0%	33/100	1321.3	8.8%
100	25/100	562.4	53.7%	25/100	1390.4	14.5%

[結果 III] 生年が 1945 年以前の患者数が元データと比べ誤差 5%, 10%未満の割合を確認した(表 6).

表 6 結果IIIの評価結果

k	搅乱データ		再構築データ	
	5%未満	10%未満	5%未満	10%未満
2	0/100	0/100	86/100	98/100
3	0/100	0/100	68/100	98/100
4	0/100	0/100	70/100	96/100
5	0/100	0/100	73/100	97/100
10	0/100	0/100	59/100	90/100
50	0/100	0/100	42/100	70/100
100	0/100	0/100	30/100	66/100

搅乱データは精度の低下が著しいが、再構築データは一定の精度が得られている。特に $k \leq 10$ であれば 9 割以上は誤差 10%未満となっている。

[結果 IV] 生年が 1945 年以前の患者で短時間作用型 BZD 系薬剤処方の割合が、本来と比べ誤差が 1%, 3%, 5%, 7%未満となったものの割合を確認した。結果を表 7 に示す。結果 I~III と比べレコード数が 17 倍以上となったことから(注：結果 I~III では同一患者の重複レコードを削除していたため)，高精度の分析結果が得られた。特に誤差 3%未満を許容すれば、 $k=100$ としても十分な精度が得られることが確認された。

表 7 結果IVの評価結果

k	搅乱データ				再構築データ	
	1%未満	3%未満	5%未満	7%未満	1%未満	3%未満
2	0/100	0/100	0/100	100/100	95/100	100/100
3	0/100	0/100	0/100	94/100	93/100	100/100
4	0/100	0/100	0/100	53/100	85/100	100/100
5	0/100	0/100	0/100	14/100	82/100	100/100
10	0/100	0/100	0/100	0/100	72/100	100/100
50	0/100	0/100	0/100	0/100	40/100	100/100
100	0/100	0/100	0/100	0/100	23/100	100/100

5. まとめと今後の課題

Pk-匿名化と呼ばれるデータ搅乱手法を実際の医療情報に適用して一定のプライバシー保護を満たした個人データを生成し、限定的ながらも高精度のクロス分析結果が得られることを確認した。また、データの一般化によりプライバシーを守る k-匿名化の限界について実例を示し、Pk-匿名化の優位性を明らかにした。今後の課題は、より多量のデータを用いて Pk-匿名化の有用性評価を行うこと、多変量解析等への適用検討、そして k-匿名化の効果が期待できない状況における Pk-匿名化の有用性評価を行うことが挙げられる。

参考文献

- [1] パーソナル情報の利用ガイドライン（案）<利用の在り方に関する提言>.http://www.meti.go.jp/policy/it_policy/daikoukai/igvp/index/h22_report/sub/05.pdf.情報大航海プロジェクトパーソナル情報検討チーム, 2010.
- [2] 経済産業省：情報大航海プロジェクト.http://www.meti.go.jp/policy/it_policy/daikoukai/igvp/index/.
- [3] L.Sweeney.k-anonymity: A model for protecting privacy. International Journal of Uncertainty Fuzziness and Knowledge Based Systems, Vol.10, No.5, pp.557-570, 2002.
- [4] 五十嵐大, 千田浩司, 高橋克巳.k-匿名性の確率的指標への拡張とその適用例.情報処理学会コンピュータセキュリティシンポジウム 2009(CSS2009), pp.763-768, 2009.
- [5] R.Agrawal, R.Srikant, and D.Thomas. Privacy Preserving OLAP. SIGMOD, pp. 251-262, 2005.
- [6] CISA 医療統計情報プラットフォーム.http://www.cisa.jp/.
- [7] 大原信.ベンゾジアゼピン系薬剤の処方実態調査(第 2 報).シンポジウム「CISA Study: 医療統計情報の有効な活用事例」, 2011.

多施設共同による頭頸部癌頸部リンパ節転移診断におけるOne Step Nucleic acid Amplification (OSNA)法応用の検討

愛媛大学大学院医学系研究科教授

浜川 裕之

シスメック株式会社ライフサイエンス事業推進本部

市場開発グループ係長

岩壁 賢治

頭頸部扁平上皮癌において頸部リンパ節転移は重要な予後因子であり、転移の有無を正確に診断することは治療上必須である。センチネルリンパ節生検は、頸部リンパ節転移の有無および頸部郭清術の必要性を判断する上で有用な検査方法であると考えられる。しかしながら、リンパ節の一部のみを検査対象とする従来の病理組織検査では微小転移を含めた正確な転移診断には限界がある。そこで、本研究では頭頸部扁平上皮癌のリンパ節微小転移診断における One Step Nucleic acid Amplification (OSNA) 法の有用性について検討し、将来的に本法にてセンチネルリンパ節生検およびリンパ節転移診断を行うことを目指している。対象は、触診および画像検査にて明らかな転移所見が認められない短径が 12 mm 以下のリンパ節とし、山口大学、獨協医科大学、徳島大学、高知大学、宮崎大学の協力を得て、計 105 症例 322 個のリンパ節を集積し、解析した。まず、リンパ節を最大割面 2 mm 幅でスライスし、従来の病理組織検査にて転移診断を行った。つづいて、残り全てのリンパ節を OSNA 法を用いて診断し、病理組織検査結果と照合した。病理組織検査にて転移陽性と診断されたリンパ節は 44 個、このうち OSNA 法にて転移診断可能であったリンパ節は 33 個(感度:75.0%)であった。また、特異度は 96.8%、正診率は 93.8% であった。以上の結果は、OSNA 法が頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移診断に応用できる可能性を示唆しているが、改良すべき点として感度の向上が挙げられる。

肝臓USボリュームRVSによる治療効果判定の評価

愛媛大学医学部附属病院講師 廣岡 昌史
日立アロカメディカル株式会社 荒井 修

肝細胞癌に対するラジオ波焼灼療法(RFA)は広く普及し生命予後の改善に寄与している。しかし治療効果判定は、従来治療数日後に撮影する造影CTまたはMRIを待たなければならない。効果不十分であれば再度RFAを行い、その都度造影CTを施行する過程を繰り返すことになる。このため医療コスト増加や画像検査を再三行うことによる放射線被曝量の増加などが問題点として指摘されてきた。治療回数を一回で終了できるように、治療の現場で判定できる方法の開発が期待してきた。

著者らは以前焼灼術後に発生する高エコー領域が治療による壊死領域に一致することを実証した。治療前の超音波画像に描出された肝癌とこの高エコー領域を同一断面上で比較することによって新たな治療効果判定方法の開発を試みた。

磁場発生装置内で超音波検査を実施する。磁場発生内の超音波検査にて、画像構築された2D断面は数式化可能となる。治療後も磁場発生装置内で超音波検査を行うことで同じ2D断面を表示させることができた。これを用いて治療効果判定をした。実際の臨床に応用し、これまで効果判定に使用した造影CT検査の回数を大幅に減少させることに成功し、放射線被曝量低下にもつながった。治療回数も大幅に減少したため入院日数の短縮化にも成功した。

今回使用した肝臓USボリュームRVSシステムにより新たな肝癌治療効果システムを開発し、その有用性を確認した。今後転移性肝癌などへの応用も期待され、有効な効果判定方法になる可能性がある。

活性型EGFR認識抗体によるEGFR阻害薬感受性診断法の開発

愛媛大学プロテオ医学研究センター教授

東山繁樹

富士レビオ株式会社

伊勢信之

富士レビオ株式会社

暮石勝利

1. 緒言

従来癌の抗癌剤治療では、細胞障害性抗癌剤が標準的治療法として用いられてきたが、近年異なる作用機序の分子標的薬が開発されるようになった。分子標的薬は、癌細胞が有する異常活性化癌遺伝子への偏執的な増殖依存性を標的とし、それらの異常を有する癌に対して劇的な効果を発揮する。一方、その他の癌に対しては、無効であり副作用のみをもたらす。従って有効な分子標的薬治療を実現するには、個々の癌における異常な増殖依存性を的確に診断する方法の開発が必須であり、急務である。ゲフィチニブ、エルロチニブ等の上皮増殖因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬は、特に活性型 EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌患者に対して顕著な抗腫瘍効果をもたらすことが明らかとなってきた。ところで、このような EGFR 阻害薬感受性に関係する活性型 EGFR 遺伝子変異としては、これまでに EGFR のキナーゼドメインを構成するエクソン 21 の L858R、エクソン 19 の E746-A750del を始め 10 種類以上の変異が同定されている（図 1）。従って、これら全ての変異に従来の遺伝子診断方法を適用すれば当然高いコストを要し、医療経済的には問題となるものと考えられる。我々は、これらの変異を網羅的に検出することを可能とすべく、これらの変異が EGFR の活性型構造を誘導することに着目し、EGFR タンパク質の活性型構造を認識する抗体の開発を試みた。

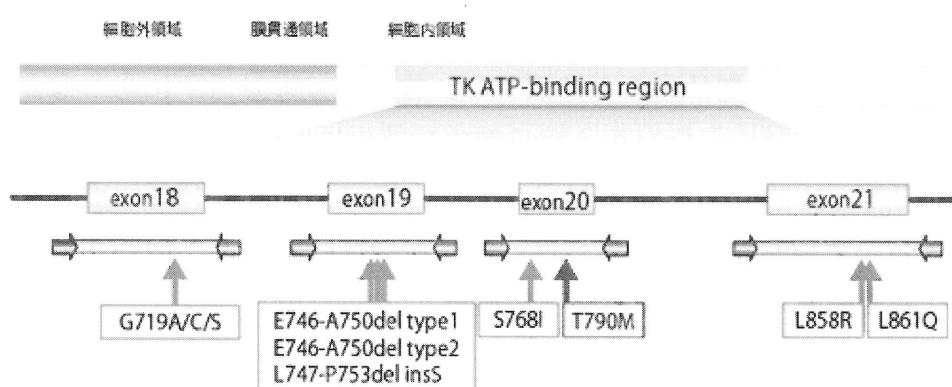


図 1 肺癌で同定された活性型変異 EGFR

2. EGFR の活性化構造を認識する抗体の開発

我々はキナーゼ活性を有するヒト EGFR 組換え体を昆虫細胞で発現させ、それを免疫原として抗 EGFR マウスモノクローナル抗体を樹立した。ヒト肺癌細胞株 A549 が発現する野生型 EGFR へのそれらの反応性を免疫沈降法で検討したところ、樹立した抗体クローンの内 3 種類のクローン (4-2, 25-1 及び 30-2) が、リガンド EGF による刺激依存的に EGFR と反応し、実際に活性型 EGFR 特異抗体の樹立に成功したことが示された。(図 2)。

3. 樹立抗体のエピトープ解析

大腸菌によって発現させた EGFR フラグメントとの反応性をウェスタンプロットにより解析することにより、活性化 EGFR 依存的に反応する 3 種の樹立抗体の反応エピトープを同定した。この結果からこれら抗体クローンの内、4-2 及び 25-1 は共通する配列を認識し、EGFR のキナーゼドメイン C 末端領域 (A.A.956-998) をエピトープとすることが明らかとなった。一方、30-2 はさらに下流の自己リン酸化ドメイン内の A.A.1023-1115 をエピトープとすることが判明した(図 3)。この内、4-2 及び 25-1 のエピトープは、既に報告されている結晶構造解析結果において活性化に伴い構造が大きく変化する部位であることが示され (Cancer Research 2004;64:6652-6659)、樹立抗体が EGFR の活性型構造を認識することを支持する結果となった。

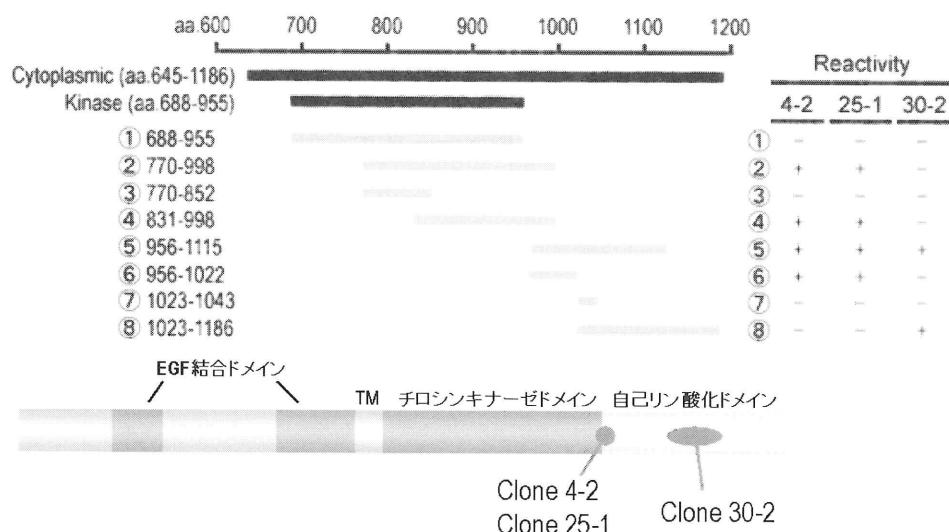


図 3 活性型 EGFR 特異抗体のエピトープ

4. 樹立抗体による活性型変異 EGFR の検出

PC-9、HCC4006、HCC827 等のヒト肺癌由来株化細胞株は活性型変異 EGFR (エクソン 19 欠損変異 EGFR) を発現し、ゲフィチニブ等の EGFR 阻害薬に強い感受性を示す。これらは A549、H460 等のヒト肺癌細胞株に発現する野生型の EGFR と異なり、EGF により刺激しなくとも自己リン酸化が見られ、活性化状態にあることがわかる (図 4 の B)。これらの細胞株を用い樹立抗体 4-2 の活性化変異 EGFR に対する反応性を評価したところ、A549 及び H460 が発現する野生型の EGFR に対しては EGF 刺激依存的な反応性を示すのとは対照的に、PC-9、HCC4006 及び HCC827 が発現するエクソン 19 欠損変異 EGFR に対しては EGF により刺激されなくとも反応することが示された (図 4 の A)。

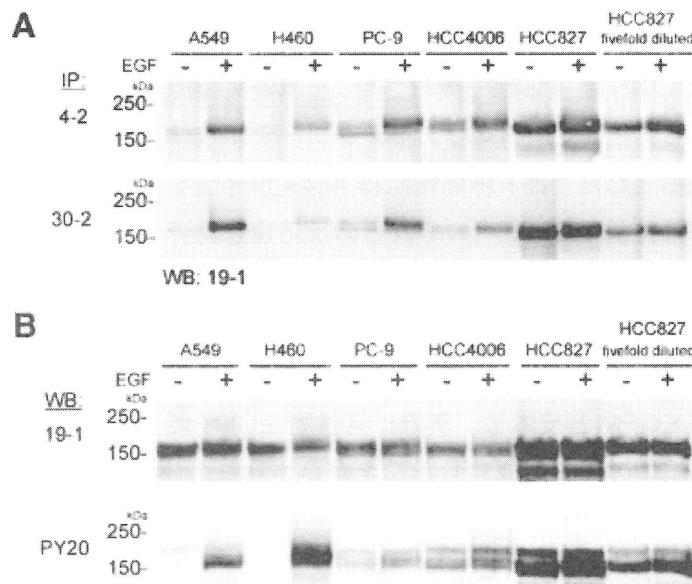


図 4 樹立した抗体の活性型変異 EGFR に対する反応性
本研究により EGFR の活性型構造を認識する画期的な抗体の樹立に成功した。これらの抗体は肺癌の EGFR 阻害薬感受性に関わる活性型変異 EGFR とも反応し、EGFR 阻害薬感受性癌を簡便に診断するための免疫測定診断薬の開発に応用可能であることが示され、今後の実用化が期待される成果を得ることが出来た。

5. 総括

本研究により EGFR の活性型構造を認識する画期的な抗体の樹立に成功した。これらの抗体は肺癌の EGFR 阻害薬感受性に関わる活性型変異 EGFR とも反応し、EGFR 阻害薬感受性癌を簡便に診断するための免疫測定診断薬の開発に応用可能であることが示され、今後の実用化が期待される成果を得ることが出来た。

車内映像の解析による運転中の危険動作の検出

愛媛大学大学院理工学研究科講師	木下 浩二
愛媛大学大学院理工学研究科教授	村上 研二
愛媛大学大学院理工学研究科助教	一色 正晴
株式会社NPシステム開発代表取締役	塩梅 敏
株式会社NPシステム開発開発本部長	大野 浩一
株式会社NPシステム開発担当	白木 陽

1 はじめに

運送業界やタクシー業界では、安全管理や顧客サービスの向上のために、加速度センサやGPSなどの各種センサに加えて、車内の状況を撮影できるカメラを備えたドライブレコーダーの設置が拡がりを見せており、近年では、大容量メモリカードの普及により、長時間（5時間ほど）の映像を記録することが可能になった。記録された膨大な映像から、急ブレーキや接触事故などの危険なイベントを検出することは、加速度センサの情報を用いることで容易に実現できる。しかし、ドライバが助手席やダッシュボードの荷物を触るなどの、定常走行時における潜在的な危険動作は、加速度センサなどから検出できない。そこで、映像からドライバの見かけの動きを推定して解析することで、このような危険な動作を検出するシステムを開発したので、それを報告する。

2 システムの構成

開発したシステムでは、ドライバの大きな動きを「危険な動作」と定義した。そして、ドライブレコーダに記録された映像に対して動きの解析を行うことで、加速度センサなどでは検出できない「危険な動作」を自動で検出する。システムの処理ステップの概要は

1. ドライバの顔を自動検出し、その結果から上半身領域を推定
2. 上半身領域において、見かけの動き（オプティカルフロー；以後、単にフローと呼ぶ）を推定
3. フローの分布状況から危険動作を検出

である。以下、各ステップについて説明する。

2.1 ドライバ領域の特定

ドライブレコーダに付属するカメラで撮影された車内映像には、ドライバの他、助手席に座る人や窓から見える車外の風景が写っている。これらは、ドライバの動きを解析するにあたって不要であるだけでなく、誤った解析結果を導くために、ドライバ領域のみを切り出したい。

車種やカメラを設置する位置によって、映像内におけるドライバの位置が異なるために、本システムでは、オープンソースのコンピュータビジョンライブラリであるOpenCVを利用して、ドライバの顔領域を検出し、その結果からドライバの上半身領域を推定した。ある画像系列に対して適用した結果を図1に示す。なお、プライバシー保護のために顔領域にはモザイク処理を施している。



図1 OpenCV を用いた顔検出の結果とドライバの上半身領域

2.2 見かけの動きの推定

見かけの動き（オプティカルフロー）とは、三次元の実世界における並進と回転の動きを、二次元の画像平面に投影した動きである。これは、画像上での輝度パターンの移動速度（動きの方向と大きさ）を表現するので、対象物の運動の状況を把握することができる。しかし、我々が観測できるのは、各画素における輝度値であるので、その情報からフローを推定しなければならない。フローの推定法は、

- 時間的に連続する二枚の画像間で対応する画素する方法
- 輝度値の空間ならびに時間的な変化から推定する方法

に大別される。前者は、一般に対応点を全探索するために処理時間がかかる傾向にあるので、我々が開発したシステムでは後者の方法を採用した。

いま、時刻 t における画素 (x, y) の輝度値を $I(x, y, t)$ とおく。画素 (x, y) における水平方向の動き $u(x, y)$ と垂直方向の動き $v(x, y)$ との間には、

$$I_x(x, y, t)u(x, y) + I_y(x, y, t)v(x, y) + I_t(x, y, t) = 0$$

なる関係が成り立つ。ここで、 I_x, I_y, I_t はそれぞれ、水平、垂直、時間軸方向の輝度の微分値（デジタル画像の場合は差分値）で、これらは画像から計算することができる。この方程式を解けば、フローを求めることが可能であるが、未知数が u, v の 2 つであるにも関わらず、方程式が 1 つであるために、本質的に解くことができない。これまでに、フローの大域的な滑らかさやフローの局所領域内の同一性を附加条件として、フローを推定する方法が提案された。これらの方法では、なるべく正確なフローを推定することに力点が置かれていた。しかし、ドライバの危険な動作を検出するには、大きな動きがあったか否かを判定すればよく、正確にフローを推定する必要はない。そこで、以下のように、水平方向と垂直方向で独立に動きを計算することで、未知数の数を減らして可解な問題へと変換する方法を採用した。

$$\begin{aligned} I_x(x, y, t)u(x, y) + I_t(x, y, t) &= 0 \\ I_y(x, y, t)v(x, y) + I_t(x, y, t) &= 0 \end{aligned}$$

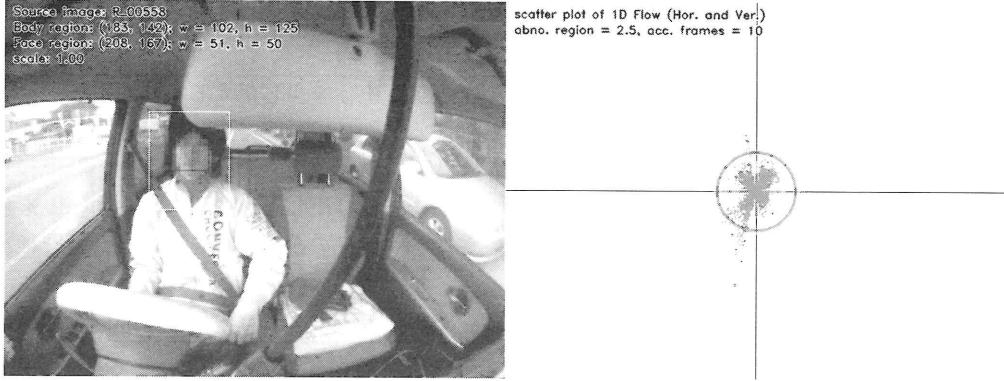


図 2 通常運転時のフローの分布

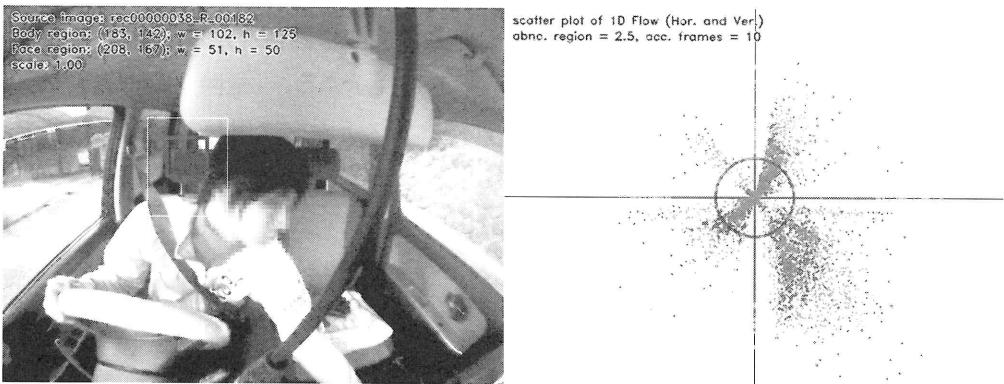


図 3 前かがみ時のフローの分布

このとき、水平方向のフロー $u(x, y)$ は

$$u(x, y) = \begin{cases} -I_t(x, y, t)/I_x(x, y, t), & |I_x(x, y, t)| > \theta_e \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}$$

と計算できる。ただし、平坦な領域ではフローを推定できないために、閾値 θ_e を設けて、差分値が大きなエッジ画素のみでフローを算出する。また、垂直方向のフローも同様に計算できる。

2.3 フローの分布情報を用いた危険行動の検出

過去 10 フレーム分のフローを累積した散布図を用いて、ドライバの運転の状況を把握し、危険な行動を検出する。図 2 に示すように、通常運転時ではドライバは大きく動くことがないので、フローは散布図の原点付近に多く分布する。一方、図 3 に示すように、例えば運転中に助手席の荷物を触るなどの危険な行動時では、フローは広い範囲に分布する。このような性質を利用した危険度を定義して、それを評価することでドライバの危険な行動を検出する。

3 システムの評価

本節では、株式会社 NP システム開発より提供頂いた映像データに対して、本システムを適用した結果を示す。用いたデータは、様々な時間帯および気候において撮影されたデータである。今回は、危険な行動か否かを 1 フレームごとに人出で確認し、その結果と比較することでシステムの性能確認を行つ

表 1 過検出ならびに未検出の状況

状況	危険フレーム	検出フレーム	備考
通常走行（朝、雨）	-	382 - 387	上体を少し揺する行為が検出
通常走行（朝、晴）	-	428 - 435	顔に手を当てて、顔を揺する行為が検出
通常走行（昼、晴）	-	152 - 154, 156	車体の大きな縦揺れが原因
脇見（昼、晴）	088 - 429	014 - 044, 445 - 446	座り直しと体を横に揺らす行為を検出
脇見（昼、曇）	206 - 219	検出されず	手元の書類に目を落とす行為を検出できず
脇見（夜）	314 - 450	検出されず	夜間の映像でエッジを抽出できず
振り返り（朝、晴）	278 - 398	164 - 175, 283 - 320	車体の大きな縦揺れが原因で過検出

た。脇見運転の映像が記録された 15 件のデータに対して本システムを適用すると、12 件の危険な行動を検出することができた。また、危険な行動を含まない通常走行時のデータ（8 件）に適用すると、5 件を危険な行動として検出した。なお、プライバシーの保護のために画像を示すことができないので、過検出ならびに未検出の状況を説明する結果の一部を、表 1 に提示する。「危険フレーム」は、目視で確認しながら検出した正解フレームで、「検出フレーム」は、本システムを適用して検出されたフレーム番号を示している。備考欄に、過検出もしくは未検出であったときのシーンの状況を記載した。

また、別途 5 時間分の映像が記録されたデータに対して実験を行った結果、データのデコードの時間と含めて検出に要した時間は約 30 分であった。なお、このデータは、十分な最適化を施さず、シングルスレッドで実行した結果である。

4 おわりに

本報告では、ドライブレコーダに記録された映像から見かけの動きを算出して、その分布を解析することで、定常走行時におけるドライバーの危険な行動を検出する方法について説明した。そして、実際の映像に対して評価実験を行った結果を報告した。

開発したシステムでは、映像データのみで危険な行動を検出したために、車体の大きな縦揺れが原因で過検出されたケースがいくつか見られた。このタイプの過検出は加速度センサを併用すると防ぐことが可能であると期待できる。したがって、ドライブレコーダの他のセンサ情報を積極的に活用することも取り組んでいきたい。また、運転中に、手元の書類に目を落としたり、携帯端末を操作したりといった、ドライバーが大きく動かないタイプの危険な行動の検出にも取り組まなければならない。

ケーブルの劣化メカニズムや劣化診断技術に関する研究

愛媛大学大学院理工学研究科教授

藤井 雅治

愛媛大学大学院理工学研究科准教授

井堀 春生

四国電力株式会社原子力保安研修所保修訓練グループ主任

大江 秀紀

1. はじめに

近年、発電所から撤去された絶縁ケーブルの中には特別環境下で使用していないにも関わらず、想定寿命の数分の1の期間しか使用できない可能性のものが見つかるなど、電力設備を中心とする電気機器の事故原因は絶縁関係が圧倒的であり、絶縁材料の保守・管理は非常に重要であり、絶縁材料の劣化診断技術の研究は古くから行われている。しかしながら、現在行われている劣化診断の手法は、電気的な試験をおこなったり、大掛かりな測定装置を用いたりする必要がある上に、診断の確度も現場を満足させるに至っておらず、より容易で確実な劣化診断技術が求められている。

劣化診断技術の発展のためには、劣化要因についての詳細な検討が不可欠である。そこで、ケーブルの電気トリーに着目した研究やマクスウェル応力の測定、さらには新たな劣化診断に関する検討を行うことで、発電所のケーブルに対する保全の高度化を目指した劣化診断技術などの最新知見を得て、保全方式の見直し検討等を行うことを目的として、本研究が計画された。本研究は3年計画であるが、本稿では2年間で明らかになったことを述べる。

2. 電気トリー現象の観察に関する実験

絶縁材料の電気的な劣化要因として電気伝導的な面から初期電子の働きやキャリアの振る舞いあるいはその環境依存性など多くのデータが蓄積されている。ケーブルの場合、電気トリー（以後トリーと称す）の研究が盛んにされてきた。しかし、その発生機構等はいまだ定説がない。本研究室では交流電界場でのトリーの観測で2次元的な試料を用意し、架橋度を変化させることによりトリーの発生と進展を制御できることを見出した。これから得られる知見を利用すればトリー発生を防止することや進展の抑制方法などが検討できると考えられる。また、架橋度を変化させることは固体と液体、あるいはゲル中それぞれでの絶縁破壊現象を観測するだけでなく媒体が連続的に固体から液体へと変化して行く場合何が主たる要因になっていくかを知ることにもなり、絶縁劣化防止に関して有用な知見を提供できることがわかつてきた。

2.1 絶縁物/ゲル中の電気トリーの進展現象

シリコーンゴム中で発生するトリーの発生は、電界集中によりそこに流れる込む電流のジュール熱によるシリコーンゴムの気化から始まることを前年度示した。これを防ぐことがトリー発生を防ぐためには1番重要であることが分った。即ち、電極形状(曲率半径)や材料の熱的特性が重要な要因となる。しかし、進展機構を実験考察するとき、トリー進展開始は十分に制御できない。進展機能そのものを観察するには進展場所を固定することと電極形状のばらつきを押さえることは非常に重要になってくる。そこで、トリー自身を電極として使用することを試みた。

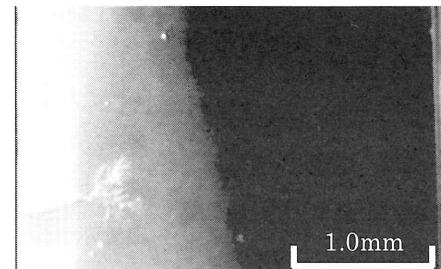
針電極近傍を混合比 1:1 の通常のシリコーンゴムで覆い、その外側に任意の混合比のシリコーンゴム／ゲルが来るようとした。この結果、その境界からトリーが考察しようとする架橋度のシリコーンゲル中に進展することになる。これは 1:1 中のトリーを針電極として用いることを意味する。これにより、電極の曲率半径(混合比 1:1 中でのトリーの管径がほぼ一定)を一様にすることとトリー発生の場所と方向を固定することができる。

図 1 に混合比 1:1 から 6:1 へとトリーが進展した様子を示す。視覚的に分かりやすくするために混合比 1:1 のものには着色剤を入れた。(a)(b) 従来のトリーが進展し、界面に達すると媒質の固さが異なるためトリー先端はバブル状になる。バブルの曲率半径はそれまでのものより大きくなるので進展が止まる。その間、他のトリーが進展する。図 1(c)では 5 カ所ほど達し、止まったため、さらに印加電圧を上げたもので、その中の 1 つが進展したものである。1 つが伸びると、その先端に電界集中が集まるため、この枝のみが成長を続ける。

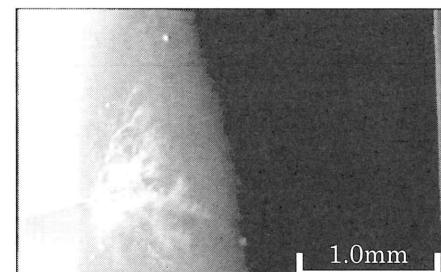
混合比 6:1 の中で成長したトリーはバブルが連続した形となっている。各バブルの間は細い直線状のトリーなので、パールに糸を通した形状に見えるので、以後、このトリーをパールチェーン型トリーと呼ぶ。

2.2 パールチェーン型トリーの進展モデル

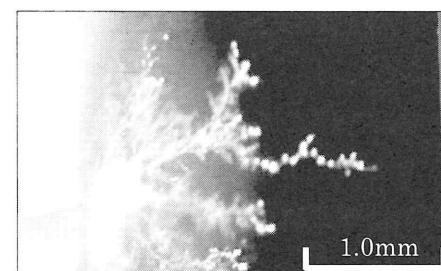
図 2 に典型的なパールチェーン型トリーを示す。バブル部分と直線部分からなっていることと枝分かれがバブル部分から起きていることが分る。前者についてはトリーが気化現象からなることと内部圧力と媒質であるシリコーンゴムの堅さあるいは流動性の動的均衡から形成されたとするにより説明可能である。後者に関してはまだ明確な説明は出来ないが、時間的推移をもう少し詳しく調べる必要がある。トリーの枝分かれ現象について多くの報告があるが、今回得られたパールチェーン型トリーから



(a) 1m20s · 2.25kV



(b) 2m26s · 3.75kV



(c) 4m48s · 6.0kV

図 1 混合比 1:1 から 6:1 への
トリーの進展

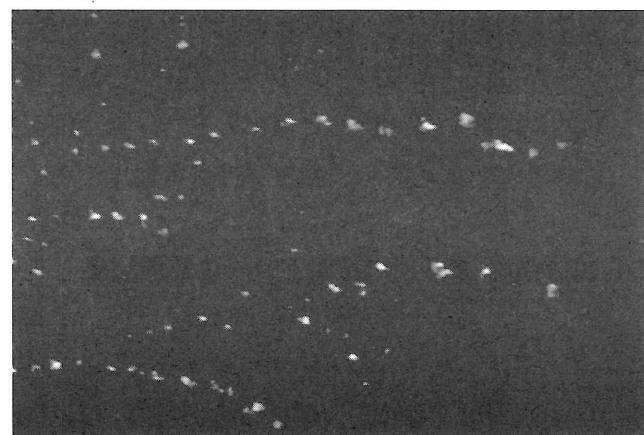


図 2 パールチェーン型トリー

新たな知見が得られると考えている。

3. マクスウェル応力の可視化に関する実験

絶縁材料の機械的な劣化要因としてマクスウェル応力がよく上げられるが、その詳細な働きについては充分調べられていない。交流電界下ではマクスウェル応力により電極側で絶縁物は収縮・伸延し劣化していく可能性があるとともに電極との衝突により損傷を受ける可能性がある。このマクスウェル応力が可視化されれば、劣化メカニズムの研究だけでなく劣化診断技術にも大いなる貢献になる。機械的なひずみや応力を可視化する方法は、ひずみ計や変位計などを用いて直接測定する方法のほかに、光学的な手法によるものも多く、光弾性法、モアレ法、ホログラフィ法、スペックル法、コースティックス法、さらにマッハツェンダー干渉計など種々の光干渉法があるが、これらを用いて、マクスウェル応力を観察した例はこれまでにほとんど報告されていない。我々は、マクスウェル応力の観察に際し、電圧を印加しながら測定・観察することを考慮し、非接触で測定が可能な光学的な手法が妥当であると考え、その手法について検討した。

3.1 光弾性による光学的位相差の測定

あらかじめ、試料全体の応力分布が得やすいマッハツェンダー干渉法を用いて応力の観察をおこなったが、試料を電気トリー観察と同様のシリコーンゴムを使用した場合、材料の均質性の観点から、干渉法での応力観察が困難であることが判明したため、以下に述べる光弾性法を用いて、応力と光強度変化の相関を調べた。

図3に測定に用いた光学系を示す。光学系は2種類用意した。試料としてシリコーンゴム($6.2 \times 3.2 \times 9\text{ mm}$)を使用した。軟化剤(A剤)と硬化剤(B剤)を3:1の割合で15分混合し、真空定温乾燥機を用いて脱気した後にアクリルの型に流し込み、再び真空定温乾燥機を用いて70°Cで8時間加熱して成形した。

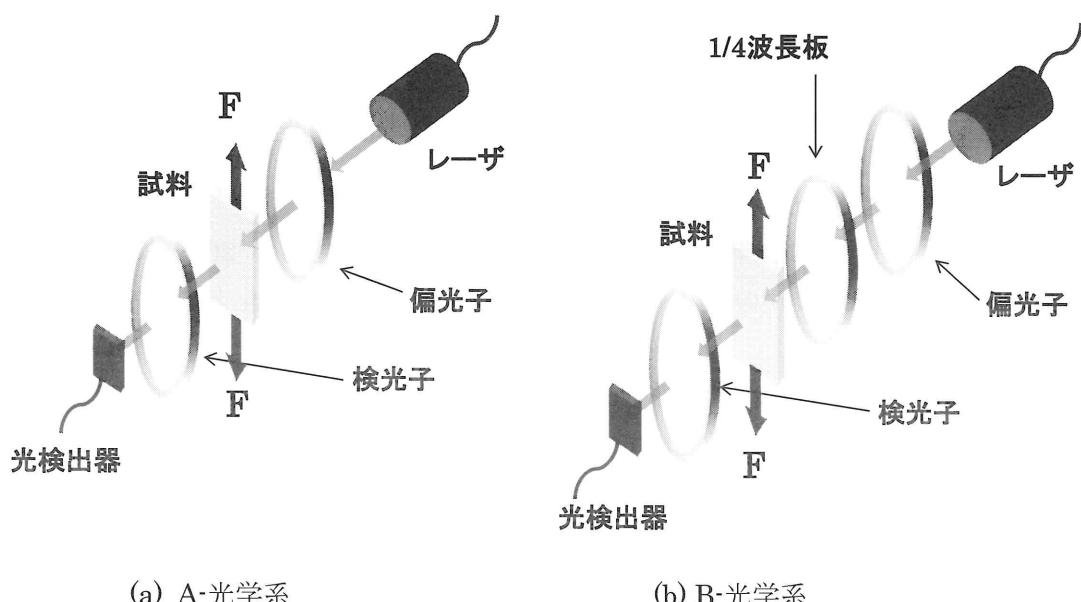


図3 光弾性法

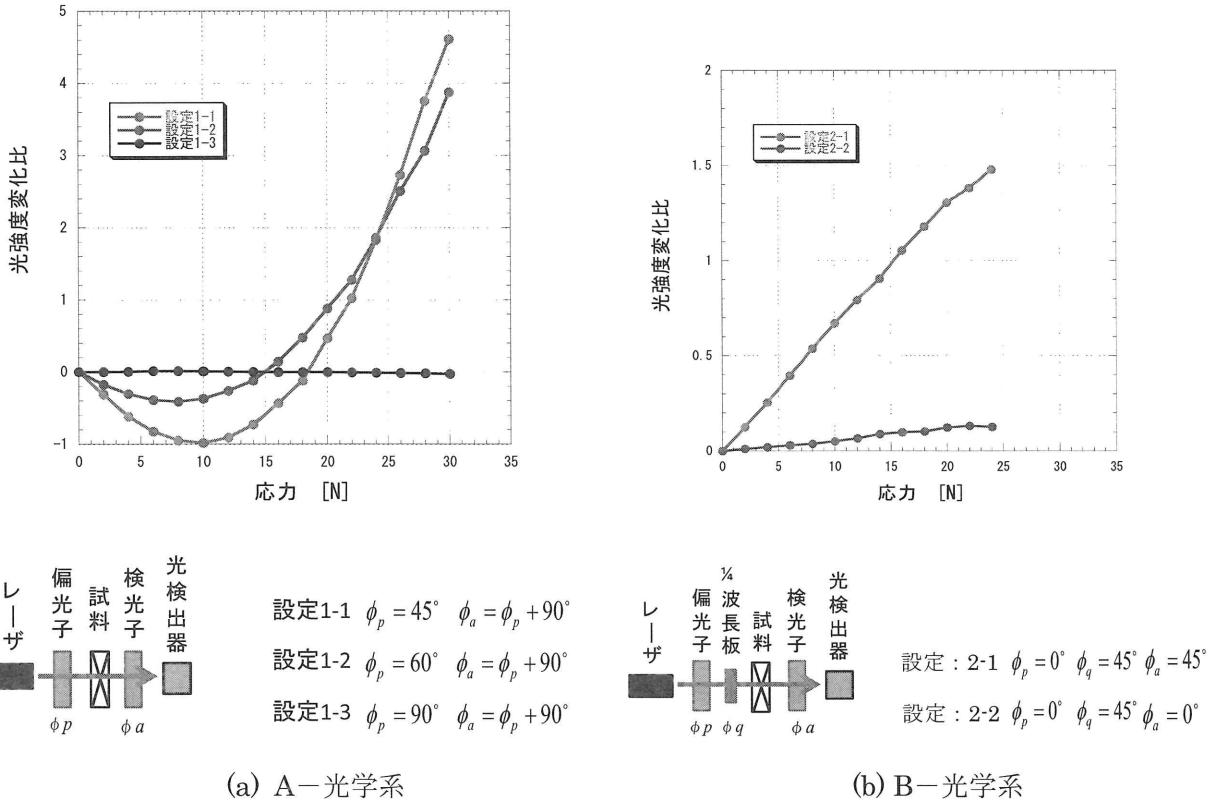


図4 光弾性法による応力と光強度変化の関係

両光学系において、引張り試験機を用いてシリコーンゴムに応力0(N)～25(N)を与えることで、試料を通過する光の偏光状態を変化させ、それに伴って変化する光強度変化を測定した。

結果を図4に示す。(a)はA-光学系で得られた結果である。光学軸の設定によって、異なる変化が得られているのがわかる。設定1-3でほとんど辺がないのは、応力の方向と入射光の直線偏光の軸が一致しているためである。理論的には

$$\Delta = A \sin^2 \frac{\gamma}{2} \sin^2 2\beta \quad \begin{matrix} \beta: \text{応力軸と透過軸の差} \\ \gamma: \text{位相差} \end{matrix}$$

で変化していると考えられ、この結果は妥当性のあるものであるが、応力が20(N)以下において、1つの光強度変化の値に対して、2つの応力値が対応している点で、光強度変化と応力の相関が得られていない。

図4(b)はB-光学系で得られた結果である。25(N)以下において、設定2-1の光学系では、応力に対して光強度変化の値との相関が良好に得られている。応力の方向と光学軸の設定によっては、変化が小さくなる可能性もあるが、逆に考えれば、応力の方向も測定できる可能性があると考えることができる。なおB光学系では、 ϕ_a の角度によって以下の式で推移すると考えられる。

$$\Delta(45) = \frac{1}{2} I_{in} \cos 2\beta \sin \gamma \quad \Delta(0) = \frac{1}{2} I_{in} \sin 2\beta \sin \gamma$$

4. 今後の予定

電気トリー進展のメカニズムでは、進展の早い電子などが起因するものと熱的な要因からなるものが一般的に考えられている。ケーブルなどで使われる一般的な絶縁物の場合、後者が主な要因と考えられている。この進展機構は高分子の架橋剤をパラメータにすることにより、容易に調べることが可能であると考えている。また、トリー内の気化現象などを考察することで、さらに、トリーの発生と進展についての考察を行う予定である。

光弾性による光学的手法を用いて応力を測定できることを確認したが、この手法によってマクスウェル応力を測定するためには、サンプルの形状に工夫を加えることが必要であると考え、現在、数種類のサンプル形状について検討をおこない、マクスウェル応力の測定を試みている。力学的な応力による測定結果との相関をみると、マクスウェル応力が固体絶縁体の劣化にどの程度影響しているか、何らかの知見を与えることができる予定である。

さらに、絶縁劣化診断の光学的手法の1つとして、新たに、蛍光あるいはラマン分光分析による方法を検討する。

耐酸化・絶縁被覆を施した高飽和磁化磁性金属ナノ粒子の開発

愛媛大学大学院理工学研究科准教授

山室 佐益

サムスン横浜研究所専任研究員

及川 忠昭

サムスン横浜研究所主席研究員

寺尾 芳孝

1. 研究の背景と目的

近年、携帯電話等による無線通信の高速化・省電力化・小型化の要請にともない、高周波数帯域に対応した受信アンテナの開発が望まれている。そのためには、磁性体（透磁率）と誘電体（誘電率）の性質を兼備した磁性誘電体を用いることが有効である。高い透磁率を示す磁性材料としては、強磁性遷移金属単体の中で最大の飽和磁化を示すFeおよびその合金で最大の飽和磁化を示すFe-Co合金が知られている。これらを微粒子化したもの表面に絶縁（誘電体）被覆をすることにより、高い透磁率と誘電率を両立する。また、金属ナノ粒子を実用化する際には、酸化による経時劣化が問題となる。特に、鉄は化学的に活性であることから酸化に弱く、磁気的に優れた金属鉄の状態を安定に保持するためには、粒子表面を耐酸化被膜で保護することが望ましい。以上の観点から、本研究では耐酸化性に優れ、且つ電気絶縁性も兼備した高飽和磁化を有する磁性Feナノ粒子の作製技術の開発を試みた。

2. 実施内容

2.1. 耐酸化および絶縁被膜形成の概略

粒子表面を耐酸化被膜で保護する際、実質的な金属相の充填率を確保するために、耐酸化被膜の厚さを極力薄くすることが肝要になる。本研究においては、基材粒子の材質がFeであることを鑑みて、耐酸化性ならびに耐食性に優れたステンレス合金添加元素の一つであるNiを粒子表面に薄く被覆し、基材粒子と部分的に合金化させることにより、耐酸化性を付与することを試みた。ただし、粒子表面のステンレス合金化のみでは絶縁性を確保することができないため、大気暴露により粒子の最表面のみを酸化させて、比抵抗の大きな表面酸化被膜に変換することを試みた。以上の表面被膜形成の概略を図1に示す。

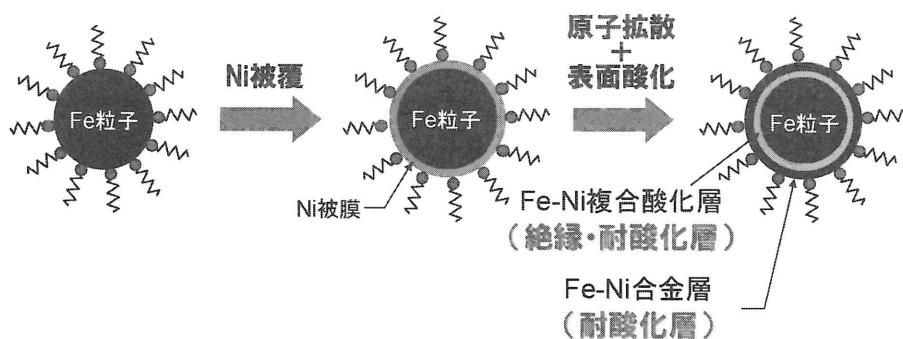


図1 Ni被覆Fe粒子反応プロセスの概略図

2.2. 耐酸化被膜で保護されたFeナノ粒子の合成結果

本実験で用いた反応プロセスでは、Feナノ粒子の形成からNi被覆まで、同じ反応器具・溶液内で一貫して行うことが可能である。基材粒子となるFeナノ粒子は、ヘキサデカン等の高沸点有機溶媒中で界面活性剤として微量のオレイルアミンの存在のもと、鉄ペンタカルボニル(Fe(CO)₅)を熱分解することにより作製した。Feナノ粒子作製後に反応溶液を一旦室温まで冷却し、Niアセチルアセトナート錯体とオレイルアミンを追加添加した後に、ゆっくりと昇温してNi被覆を施した。粒子形成が容易なNiを被覆するに際して特に重要な点は、Niアセチルアセトナート錯体を添加した後の温度管理である。Niアセチルアセトナート錯体から生成されるNiイオンは容易に還元されるため、Feナノ粒子の表面に付着するだけでなく、単独でNiナノ粒子を形成してしやすい。これに関しては、昇温速度を適切に調節することによりNiイオンを徐々に還元し、生成されたNi原子が優先的にナノ粒子表面のみに付着するよう反応条件を最適化することが重要である。反応温度、昇温速度、アルキルアミンの添加量について検討した結果、単独でNiナノ粒子を形成することなく、既存のFeナノ粒子の表面のみにNi原子を付着・被膜形成させる条件を抽出することができた。

図1に、Ni被覆前後におけるFeナノ粒子のTEM観察結果を示す。両試料ともに、TEM観察を行う際の試料移送時に大気暴露していることから、粒子表面は酸化されている。写真から、Ni被覆を行っていないFeナノ粒子の場合には、2nm程度の厚さのコントラストの薄い酸化被膜が明瞭に確認されるが、Ni被覆を施した場合には、酸化被膜の存在が不明瞭であるとともに、コントラストの黒い金属コア部分が良好に保持されている様子が確認される。FeとNiの原子番号が近いこと、また表面に形成された酸化被膜の存在により、TEM観察によるNi被膜の識別は困難である。

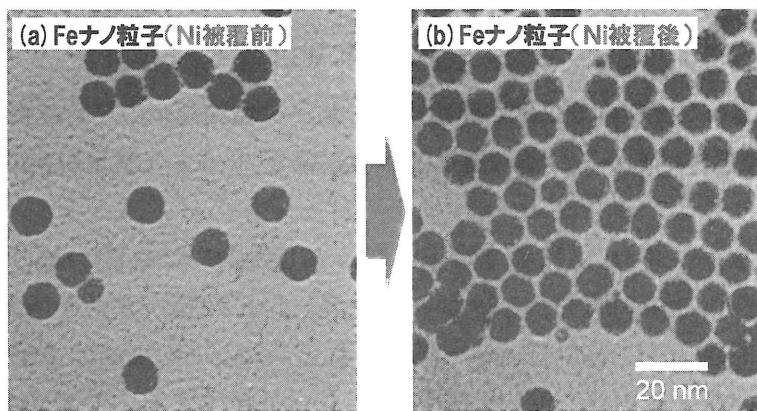


図1 大気暴露による粒子酸化についてのTEM観察結果

(a) Feナノ粒子、(b) Ni被覆Feナノ粒子

EDXによる組成分析の結果、Niの組成として16.7 at. %という値が得られた。Ni被覆したFeナノ粒子を作製する場合のFeとNiのモル比(10:2)をもとに組成比を計算すると、Niの組成は約17 at. %となることから、ほぼ100%の反応効率で投入されたNiがFeナノ粒子の被覆に供されていることになる。しかし、図1のTEM写真からは、Ni被覆の前後においてサイズに顕著な変化は見られていない。そこで、用いたFeと

Niのモル比（10：2）をもとに、直径が10 nmのFeナノ粒子に被覆したNi被膜の厚さを見積もったところ、約0.3 nmという値が得られた。この値は極めて小さく、酸化の際の体積膨張を考慮すると、Ni被覆によるサイズ変化はほとんど検出できることと対応している。

磁気特性は酸化の影響を強く受けることから、TEM観察では検出困難な微量な酸化の進行具合を定量的に評価することができる。そこで、生成粒子の耐酸化特性について調べるために、粒子を大気中でホットプレートを用いて加熱し、飽和磁化（印加磁場8 kOe、室温測定）の経時変化について調べた。なお、大気酸化時の加熱温度は50°Cとし、最長30時間にわたり加熱実験を行った。その結果、Ni被覆しないFeナノ粒子に比べ、Ni被覆したものは大きな飽和磁化を示し、Ni被覆による顕著な耐酸化性の向上が確認された。さらに、粒子のコアであるFe相と被覆したNi相との間での合金化を促進するために、Ni被覆を行った反応溶液中でさらに200°Cまで昇温したところ、大気酸化後の飽和磁化はさらに高い値を示し、耐酸化性がより向上しことを示唆している。

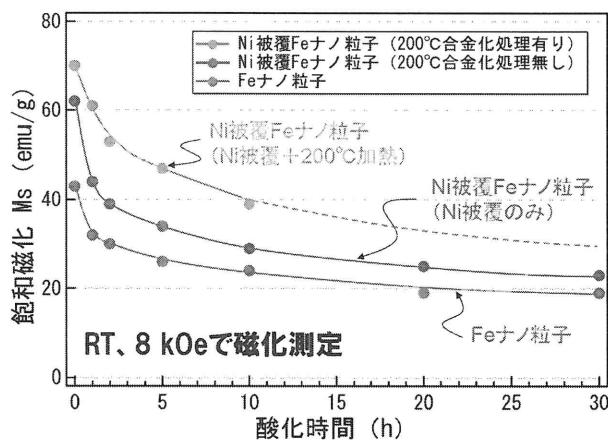


図3 大気中での加熱酸化による粒子の飽和磁化の経時変化
(ただし、加熱温度は50°C、飽和磁化は印加磁場8 kOe・室温測定のものである)

Ni被膜の厚さは0.3 nm程度と格子定数ほどしかないにもかかわらず、このような耐酸化特性を発現することが判明したことから、今後、Ni被膜の厚さを増大することにより、より耐酸化性を向上させることができると期待される。ただし、表面の2割の厚さ部分に粒子の総体積の半分が存在するため、例えば直径10 nmの粒子において表面1 nmが酸化されるとすると、残存するFeコアは半減してしまうことになる。したがって、Ni被覆された粒子の酸化をオングストロームレベルで制御することが要求されるが、これについては今後の課題である。

エージェントオレンジ由来ダイオキシン汚染土壤の簡易迅速測定法 ～フロー式イムノセンサー(KinExA)による分析法～

愛媛大学農学部附属環境先端技術センター長	本 田 克 久
愛媛大学農学部附属環境先端技術センター	上 田 祐 子
京都電子工業株式会社	高 木 陽 子
京都電子工業株式会社	立 石 典 生

【はじめに】

本件は、JICA/JSTによる「ベトナム及びインドシナ諸国におけるバイオマスエネルギーの開発による多益性気候変動緩和策の研究プロジェクト」の一環で、焼き畑や戦争中に散布された枯葉剤による土壤汚染などで広がった約900万haの荒廃地の有効利用化が進められている。それら荒廃地の有効利用を進めるためには、まず土壤測定法を開発し、植林地の汚染マップを作成するなどの土壤調査が必要となる。

土壤汚染の要因については特に、枯葉剤(エージェントオレンジ)の製造において副産物として生成され、その毒性が広く知られている2,3,7,8-TeCDD(D48)の汚染の有無が問題となっており¹⁾、これまでに分析調査結果が報告されている²⁾³⁾。汚染マップの作成には、広範囲にわたる土壤のスクリーニングが必要となるため、機器分析による煩雑、高額な分析を行うことは現実的でないことから、より迅速・簡易かつ安価なオンライン分析方法の開発が望まれている。

そこで我々は、生化学的手法を用いたエージェントオレンジ由来のダイオキシン汚染土壤分析システムの開発を目的として、試料の抽出法、前処理法、および測定系の構築を行ってきた。本報告では、特に、D48に特異性を有する抗体を用いたフロー式イムノセンサーによる測定系の構築、および生物検定法用の抽出・前処理法の妥当性について評価を行ったので報告する。

【実験方法】

開発した抽出・前処理法により調製された試料中に、測定を妨害する土壤由来のマトリクス等が含まれていないことを確認するため、ブランク試験、添加回収試験を行った。また、抽出、前処理、測定の繰返し再現性試験による精度および、機器分析との相関性を確認することによる真度の確認を実施した。

試薬

D48に特異的に反応する抗体(ハイブリドーマは(財)食品薬品安全センターより分与)、測定セル、バッファーは、京都電子工業(KEM)社製を用いた。前処理は、シーズテック社製のダイオキシン分析前処理装置(SZ-DXN-PT010)を使用し、測定装置は、フロー式イムノセンサーDXS-610(KEM社製)を用いた(Fig.1)。

D48標準溶液は、CIL社製のノナン溶液をジメチルスルホキシド(DMSO)転溶あるいはヘキサン転溶したものを用いた。添加回収試験用の試料は、ダイオキシン類不含土壤2試料(D48のHRGC/HRMS実測値；0.2pg/g以下)を用い、精度確認のための試料は、予めセライト(関東化学社製)に100ng/gとなるようにD48ヘキサン標準溶液を添加し均一化したものと土壤試料Aを混合し、1000pg/gとなるように調製したものを用いた(標準土壤試料)。真度確認に使用した試料は、D48が含まれている事が確認されている、日本において採取したダイオキシン汚染土壤(2~5000pg-TEQ/g)10試料を用いた。

方法

抽出は、土壤試料5gを採取し4%の0.1M H₂SO₄を含むアセトン溶液による超音波抽出法によりヘキサン粗抽出液を調製した。機器分析(HRGC/HRMS)との相関性の評価に使用した土壤10試料については、ト

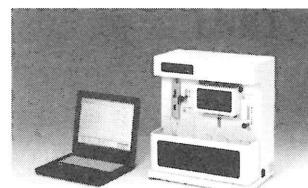


Fig.1 Flow Immunosensor DXS-610

ルエンによるソックスレー抽出ののち、ヘキサン転溶を行い試料とした。

前処理は、ヘキサン粗抽出液 1.25g 相当量を分取し、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 30 分間加熱保持した。冷却後、ヘキサン 40mL を送液し、D48 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、これを前処理済み試料とした。

測定は、前処理済み試料をバッファーと抗体溶液を順に添加し、攪拌させ測定試料とした。

【結果と考察】

1. ブランク試験・添加回収試験

土壤試料 A および B のブランク試験結果は、両検体ともに本測定法の定量下限値(100pg/g) 以下であった。また、添加回収試験は、前処理済試料 A、B 共に D48 を終濃度 40pg/mL、80pg/mL となるよう添加した試料を用いて評価した結果、試料 A=100%、試料 B=97% であったことから、本抽出・前処理で調製した土壤試料中には測定系に影響を及ぼすマトリクス成分などの混入はないものと判断された。

2. 抽出から測定までの再現性（精度確認）

Table1 には、標準土壤試料について、抽出から測定まで 3 回測定 (N=3) を行った結果を示した。N=3 の再現性は CV=4.6 であり、回収率は、約 80% であったことから、本分析法は、精度の高い分析システムであることが確認された。

Table 1 Validation of Analysis system for D48.

Sample	Conc. of sample pg/g	Times	Quantitative value pg/g	Average	CV
A	1000	1	790	778	4.6
		2	738		
		3	806		

3. 機器分析(HRGC/HRMS)との相関性（真度確認）

ベトナムのエージェントオレンジ由来汚染土壤の分析における、対象ダイオキシン異性体は D48 であるが、評価に使用した土壤 10 試料は、D48 以外のダイオキシン類をも含んでいることから、解析に使用した HRGC/HRMS 値には、異性体ごとの実測値(pg/g)に本抗体の交差反応率を乗じた値の総和を採用した。Fig.2 には、HRGC/HRMS 値と DXS-610 値の相関図を示したが、原点を通る、良好な直線性が得られ真度の高い測定法である事が確認された。換算係数は、3.35 であった。

【結論】

本分析システムは、土壤中の D48 を簡易に・迅速にモニタリング出来る測定法として十分に適用し得る事が確認できた。ベトナムにおける汚染土壤は、汚染由来を鑑みると、主として D48 濃度が高くその他ダイオキシン類異性体濃度が低いと想定されることから、本法のベトナムにおけるダイオキシン汚染マップ作成への貢献が期待される。今後は、ベトナムの汚染土壤を用いた評価を実施していく予定である。

【参考文献】

- 1) Young, A, L.The History, Use, Disposition and Environmental Fate of Agent Orange. Springer, New York, 2009
- 2) Mai Ta et al., Dioxin contamination in soils of Southern Vietnam. Chemosphere. 67(9),1802-1807,2007
- 3) Masao Kishida et al., Chemosphere. 78(2),127-133,2010

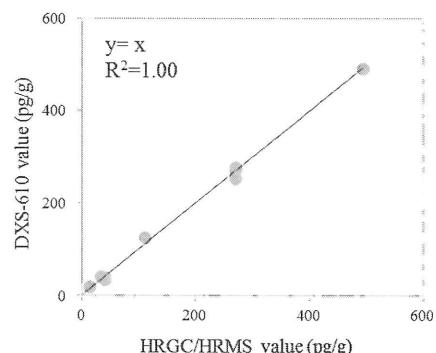


Fig.2 Correlation diagram
(HRGC/HRMS value vs. DXS-610 value)

機能性鉄資材による有機塩素化合物の分解処理技術の開発 —農薬、ディルドリンの分解とその要因—

愛媛大学農学部附属環境先端技術センターセンター長

本 田 克 久

愛媛大学農学部附属環境先端技術センター

上 田 祐 子

石原産業株式会社

平 井 恭 正

石原産業株式会社

畠 中 恒 孝

1. はじめに

ディルドリンは、アルドリン、エンドリン、イソドリンを含めた通称ドリン剤の1種であり、1960年代に英國から輸入され、日本において農業や衛生害虫駆除の分野で使用されてきた¹⁾。しかし、一方では、土壤から植物へ移行し、成長抑制を引き起こすことが報告され²⁾、また、環境中の残留性が高く、生物蓄積性や長期毒性が懸念されることから、2001年にストックホルム条約によって残留性有機汚染物質(POPs)に指定された。国内においても化審法や農薬取締法の規制により、1975年に農薬登録が失効して以来、販売及び使用が禁止され、その結果として、環境省が実施しているモニタリング調査によると、環境中のドリン類濃度は年々減少してきている。しかし、未だに微量の検出が確認され、特にディルドリンは、環境中でアルドリンが酸化し、ディルドリンに変化したまま残留するため、アルドリンやエンドリンと比較して、検出濃度と検出頻度がともに高い³⁾ことが知られている。また、植物では、キュウリ、ばれいしょ、にんじんなどの農作物においてディルドリンの高い吸収性が報告されており⁴⁻⁶⁾、日本においても過去にドリン剤を農薬として使用していた圃場で栽培したキュウリに基準値を超えるディルドリンの検出が報告されている^{7,8)}。このような基準値を超過した農作物の流通を防止する対策として、ディルドリン吸収の低い接木による吸収抑制技術⁹⁾や接木による抑制技術と土壤の活性炭処理を組み合わせた技術¹⁰⁾など、いくつかのレメディエーション技術が報告されている。しかし、これらのレメディエーション技術では、汚染土壤を短期間に、かつ長期にわたって修復することは難しく、しかも広範囲に汚染された圃場の全体を修復するには、膨大な時間と費用を要することとなる。

そこで、本研究は、短期間に広範囲の汚染土壤を修復することを目的として、鉄系資材を用いたディルドリンの分解除去技術の検討を行った。鉄は、比較的安価であり、土壤中において多量に存在するため、修復後の農作物の栽培に対する影響が軽微であると考えられ、また鉄系資材による脱塩素化技術は、フェントン反応^{11,12)}やゼロ価鉄等¹³⁻¹⁶⁾を用いた有機塩素化合物の分解技術が報告がされている。本論では、鉄系資材における水溶液中のディルドリン分解とそれに及ぼす要因についての知見を得るために、以下の6項目について検討を行った。

まず、鉄系資材を用いた有機塩素化合物の脱塩素化反応が、金属表面の電子の移動により行われていること^{14,15)}を考慮して、ここでは、2種類の鉄系資材の配合割合とディルドリン分解率の関係、並びに各配合割合の酸化還元電位とディルドリン分解率との関係を明らかにする(第1項目)と共に、分解メカニズムについて考察した(第2項目)。次に、適正な配合割合の鉄系資材を用いて、温度(第3項目)及びディルドリン濃度(第4項目)と反応速度の関係を求め、さらに反応溶液中のpH(第5項目)及びイオン成分(第6項目)のディルドリン分解に及ぼす影響について検討した。

2. 実験方法

2.1 鉄系資材の種類

鉄系資材には、酸化鉄(以下、MT-V0という)と金属鉄粉の2種類を用いた(石原産業(株)製)。MT-V0の主成分は、鉄(67%)と酸素(30%)であり、マグнетタイト構造を有している。Fig.1に

MT-V0 の X 線回折(XRD)の分析結果を示した。MT-V0 は、チタン製造の過程で副産物として得られる硫酸鉄を中和して生成する沈殿物をろ過後、100°C以下の低温で乾燥させたものであり、原料である硫酸鉄中に 2 倍の鉄が混在しているためマグнетライトの結晶生成が見られる。

2. 2 標準物質及び試薬類

- 以下の標準物質及び試薬類を用いて実験を行った。
- ・標準物質：アルドリン、ディルドリン、エンドリン(関東化学(株))
 - ・サロゲート物質： $^{13}\text{C}_{12}$ -アルドリン、 $^{13}\text{C}_{12}$ -ディルドリン(CIL, Inc.)
 - ・内標準物質：フルオランテン- d_{10} (関東化学(株))
 - ・アセトン、ヘキサン(和光一級(蒸留して使用)：和光純薬工業(株))
 - ・メタノール(試薬特級：和光純薬工業(株))
 - ・デカン(環境測定用：和光純薬工業(株))
 - ・塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム(試薬特級(450°C, 3 時間で加熱処理)：和光純薬工業(株))
 - ・塩酸、水酸化ナトリウム、硫酸、硝酸、硝酸ナトリウム、臭化ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム(試薬特級：和光純薬工業(株))
 - ・中性リン酸塩 pH 標準液(0.025mol/L KH_2PO_4 , 0.025mol/L Na_2HPO_4 ：東亜 DKK(株))
 - ・精製水：蒸留水
 - ・5% 塩化ナトリウム水：精製水に 5%となるよう塩化ナトリウムを加え、ヘキサン洗浄を行った。
 - ・ガラス纖維ろ紙：GA200 及び GA100(ADVANTEC)

2. 3 分析装置及び分析方法

- ・元素組成分析：SEM[JSM-5600LV](日本電子(株))/EDS[INCA Energy 250](オックスフォードインスツルメンツ(株))
- ・X 線回折：Mini Flex(Rigaku)
- ・酸化還元電極：ORP 複合電極 キャル・メモ[PST-5721C](東亜 DKK(株))
- ・pH 電極：pH 複合電極 キャル・メモ[GST-5721C](東亜 DKK(株))
- ・電機伝導率セル：浸漬形電気伝導率セルキャナル・メモ[CT-57101C](東亜 DKK(株))
- ・振とう機：マルチシェーカー[MMS-3011](EYELA)

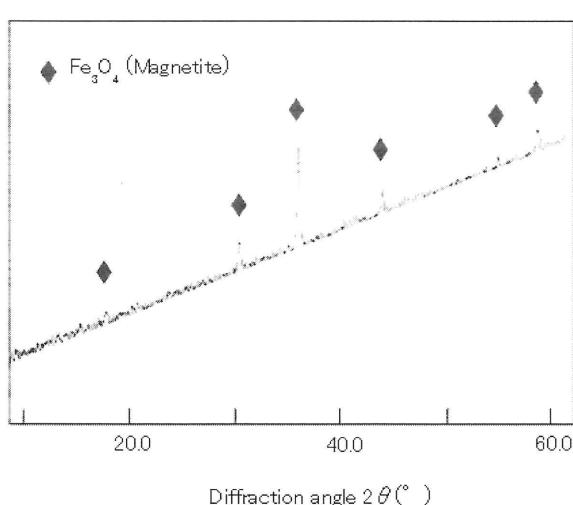


Fig. 1. XRD spectrum of MT-V0

・イオンクロマト測定：DIONEX ICS-1000 (DIONEX)

ドリン類の分析は、全て以下の方法で行った。水溶液中のドリン類と鉄系資材とを反応させた後、遠心分離(3500rpm, 5min)により、上澄液と残渣に分離した。上澄液は 100mL 分液ロートに移した後、サロゲート(0.5mg/L、メタノール溶液)50μL を添加した。既報¹⁷⁾より、精製水からヘキサンへのドリン類の抽出は、塩化ナトリウムを添加することにより、アルドリンの抽出効率が向上したことから、上澄液に塩化ナトリウム 1.5g を加え、ヘキサン 10mL にて振とう抽出(10min)を行った。しばらく静置した後、硫酸ナトリウムを用いてヘキサン層の脱水を行い、エバポレータと窒素濃縮を用いて 100μL まで濃縮後、内標準溶液(0.5mg/L、デカン溶液)を 50μL 添加し、測定試料とした。残渣は、サロゲート(0.5mg/L、メタノール溶液)50μL を添加し、ア

セトン 20mL を加え振とう抽出 (30min)を行った後, ガラス纖維ろ紙を用いて吸引ろ過し, 液をエバポレータにて約 1mL まで濃縮した。その後, あらかじめ 5% 塩化ナトリウム水 50mL を加えた 100mL 分液ロートに移し, アセトンを用いて洗いこみを行い, ヘキサン 10mL にて振とう抽出 (10min)を行った。しばらく静置した後, 硫酸ナトリウムを用いてヘキサン層の脱水を行い, エバポレータと窒素濃縮を用いて 100 μ L まで濃縮後, 内標準溶液 (0.5mg/L, デカン溶液)を 50 μ L 添加し, 測定試料とした。

2.4 測定対象物質及び測定条件

以下に測定対象物質と測定条件を示した。アルドリンは $^{13}\text{C}_{12}$ -アルドリン, ディルドリンとエンドリンは, $^{13}\text{C}_{12}$ -ディルドリンを用いて定量を行い, 各サロゲート物質と内標準物質の比率により回収率を算出した。

- ・測定対象物質: アルドリン, ディルドリン, エンドリン
 - ・測定機器: GC(Agilent7890A)/MS(Agilent5975C)
- 測定条件は, 既報¹⁷⁾に従った。

2.5 実験条件

2.5.1 2種類の鉄資材におけるディルドリン分解率と酸化還元電位(ORP)の関係

2種類の鉄系資材(MT-V0と金属鉄粉)を8通りの配合割合(1:0, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:0)(w/w)で混合し, 以下の実験を行った。精製水 30mL を加えた 50mL 容遠沈管にディルドリン標準溶液 (7mg/L, メタノール溶液) 50 μ L を添加し, よく混合した後, 各種混合鉄系資材 1g を添加し, 室温及び遮光下で横振とう[120rpm]にて最大 96 時間振とうを行った。試料は, 適時採取し, 分析に供した。実験は全て n=2~4 で行い, 結果は以下全ての実験において平均値で示した。酸化還元電位(以下, ORP という)の測定は, 精製水 30mL を加えた 50mL 容の遠沈管に各種配合割合の混合鉄を 1g 添加し, 軽く混合した後, ORP 電極を差しこみ, 室温及び遮光下で, 最大 46 時間横振とう[120rpm]を行い, 連続的に記録した。

2.5.2 ドリン類分解の作用機作

2種類の鉄系資材におけるドリン類分解の作用機作を検討するために, エンドリンを用いて実験を行った。精製水 30mL を加えた 50mL 容遠沈管にエンドリン標準溶液 (11.4mg/mL, アセトン溶液) 50 μ L を添加し, よく混合した。その後, 2.5.1 の実験で求めた適正な配合割合の混合鉄 (MT-V0: 金属鉄粉 = 2:1(w/w), 以下混合鉄という) 1g を添加し, 最大 48 時間横振とう[120rpm]を行った。試料を適時採取し, エンドリン分析及び上澄液の一部をイオンクロマト法により塩化物イオンを測定した。

2.5.3 ディルドリン分解速度と反応温度の関係

精製水 30mL を加えた 50mL 容遠沈管にディルドリン標準溶液 (7mg/L, メタノール溶液) 50 μ L を添加し, よく混合した。その後, 混合鉄 1g を添加し, 1 時間横振とう[120rpm]を行った後, 4°C, 25°C 及び 50°C の恒温槽中に静置し, 試料を適時採取して分析に供した。なお, 静置は遮光下で行い, 実験は全て n=2 で行った。

2.5.4 水溶液中のディルドリン濃度と分解率の関係

精製水 30mL を加えた 50mL 容遠沈管に各濃度に調整したディルドリン標準溶液 (0.7, 7, 70, 700mg/L, メタノール溶液) 50 μ L を添加し, よく混合した(各溶液中のディルドリン濃度: 0.0011, 0.011, 0.11, 1.1mg/L)。その後, 混合鉄 1g を添加し, 室温及び遮光下で横振とう[120rpm]にて最大 48 時間振とうを行い, 試料を適時採取して分析に供した。なお, 実験は全て n=2~4 で行った。

2.5.5 ディルドリン分解率とpHの関係

pH 1~13に調整した精製水(pH調整には、塩酸と水酸化ナトリウムを使用)30mLを加えた50mL容遠沈管にディルドリン標準溶液(7mg/L、メタノール溶液)50μLを添加し、よく混合した。その後、混合鉄1gを添加し、室温及び遮光下で横振とう[120rpm]にて最大48時間振とうを行い、試料を適時採取して分析に供した。また、強酸性側での混合鉄の影響を確認するため、硫酸と硝酸についても同様の実験を行った。全ての実験は、n=2で行った。なお、反応前後の溶液中の差異を観察するため、各pH溶液30mLに混合鉄1gを添加し、pHと電気伝導率、及びpH1と13におけるORPを測定した。

2.5.6 ディルドリン分解率と各種イオン濃度の関係

ハウス及び路地圃場やトウモロコシ圃場の土壤溶液中には、主にMg²⁺、Ca²⁺やNO₃⁻が検出され、その濃度は0.1~20mmol/L程度¹⁸⁾であることから、本実験では、各種イオン(カチオン:Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、アニオン:Cl⁻、Br⁻、SO₄²⁻、NO₃⁻、PO₄³⁻)溶液を精製水で低濃度(0.5mmol/L)と高濃度(50mmol/L)に調整し、各種イオン濃度とディルドリン分解率の関係を検討した。各種イオン水溶液30mLを加えた50mL容遠沈管にディルドリン標準溶液(7mg/L、メタノール溶液)50μLを添加し、よく混合した。その後、混合鉄1gを添加し、室温及び遮光下で横振とう[120rpm]を24時間行い、上澄液と残渣を分析に供した。実験は全てn=2~3で行った。さらに、反応前後の溶液中の差異を観察するため、精製水30mLに混合鉄1gを添加し、pH測定とイオンクロマト法による各種イオン濃度の測定(前述の9種イオン及びNO₂⁻-NとNH₄⁺-N)を行った。また、中性リン酸塩においては、ディルドリン分解率との関係を詳細にみるため、溶液中のリン酸濃度を変化させたもの(0.005, 0.05, 0.5, 1, 3, 5, 50mmol/L)についても、上と同様の実験を行った。

3.結果及び考察

3.1 2種類の鉄系資材におけるディルドリン分解率と酸化還元電位(ORP)の関係

2種類の鉄系資材(MT-V0と金属鉄粉)の配合割合を変化させて、水溶液中のORPとディルドリン分解率の関係を検討した。結果をFig.2に示す。なお、ディルドリン濃度は、上澄液と残渣のそれぞれを絶対量で算出し、合量を全ディルドリン量として示した。また、ORPは、比較電極(3.3mol/L塩化銀電極)を用いて測定を行ったため、単極電位差(206mV:25°C)を加算し水素基準電位(SHE)とした。

Fig.2(A)の結果より、MT-V0単独(配合比1:0)の場合は、分解が認められなかったが、他の配合割合では、ディルドリンの分解が見られた。しかしながら、分解速度は、配合割合によって大きく異なり、その分解速度の変化は、Fig.2(B)に示したORPの変化とほぼ同じ傾向を示した。つまり、配合割合(MT-V0:金属鉄粉)が1:1の時に分解速度は最も速く、配合割合がどちらか一方に偏るにつれて分解速度の低下がみられた。この点を詳しく見るために、46時間後の各配合割合のORPとディルドリン分解率の関係を図示してみると(Fig.3)、ORPが低いほどディルドリンの分解率が高く、特に-150mVよりも低いORP値で高いディルドリン分解率を示した。本結果は、これまで報告されているORPが約-500mV~-300mV¹³⁻¹⁶⁾において、金属による塩素系化合物の脱塩素化反応が進行することよく一致している。本実験の結果では、2種類の鉄系資材の配合割合が1:1の時にディルドリン分解速度が最大となることが明らかになったが、金属鉄粉を多く使用することは、赤水の発生や資材費用が高価となるため、実施が困難であると考えられたことから、以下の実験においては、配合割合2:1の混合鉄を用いて実験を行った。

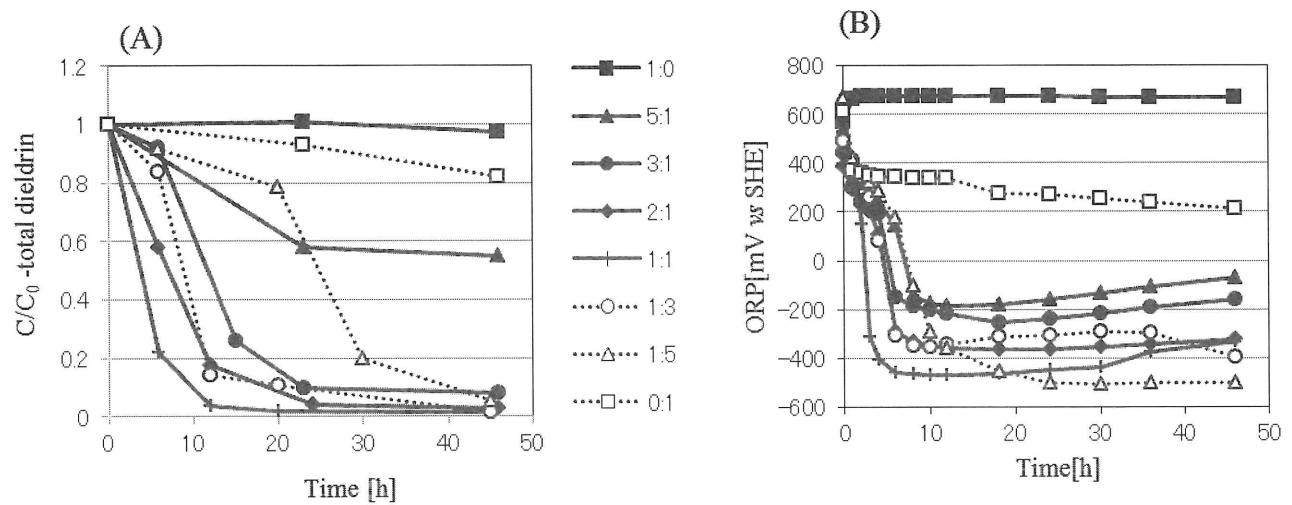


Fig. 2 (A). Ratio of the final (C) to the initial (C_0) amount of dieldrin, (B) Timely change of oxidation-reduction potential for each of iron-based materials (MT-V0: Fe=1:0~0:1)

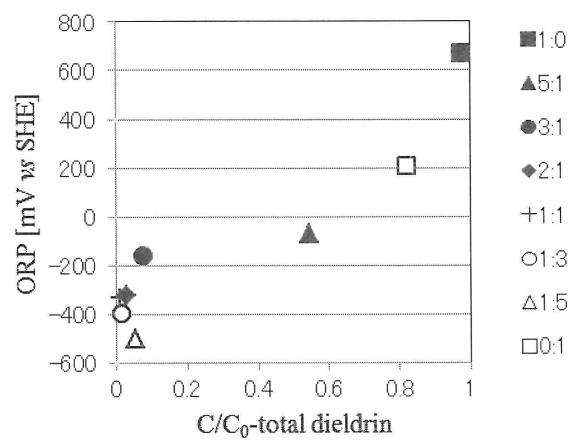
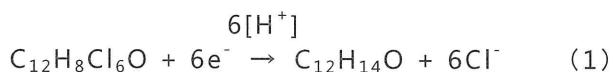


Fig. 3. Relationship between ORP and total-dieldrin degradation rate after 46h with addition of iron-based material

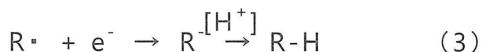
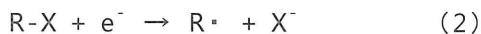
3. 2 ドリン類分解の作用機作

本研究で用いた混合鉄によるディルドリン分解反応の作用機作を明らかにするため、ディルドリンの異性体であるエンドリンを用いて検討を行った。これまでの報告では、有機塩素系農薬であるジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)¹³⁾や γ -ヘキサクロロシクロヘキサン(γ -HCH)¹⁹⁾などのゼロ価鉄による分解反応は、脱塩素化反応であるとされていることから、ドリン類も同様の反応が考えられるため、塩化物イオンの測定を行った。なお、エンドリンは、6個の塩素を含むため、脱塩素化反応は(1)式のように進行すると考えられる。



したがって、測定した塩化物イオン濃度を1/6とし、その結果をFig.4に示した。Fig.4より、エンドリン濃度の減少に伴って、塩化物イオン濃度が増加したことから、ドリン類と混合鉄との反応が脱塩素化反応であると言える。しかし、その物質収支は、反応が進行するに伴い低下した。これは、エンドリンの全塩素(6個)が同時に脱塩素化するのではなく、DDT¹³⁾や γ -HCH¹⁹⁾と同様に順次反応が進行し、反応過程において塩素を含んだ中間体を生成しているためと思われる。つまり、1ないし5個の塩素を含んだ構造を持つ化合物の塩素量が測定されていないため、物質収支としては時間の経過とともに低下したと思われる。

本実験で用いた2種類の鉄系資材によるディルドリン分解反応のメカニズムは電荷の異なる金属間の電子の授受により起こったと考えられる。通常、有機ハロゲン化合物(R-X)の炭化水素(R-H)への還元は、二段階の1電子移動によって進むと考えられている²⁰⁾。つまり、以下の(2), (3)式により反応が進行する。



なお、(3)式のラジカルの還元はあまり大きくない負の電位で起こることから、脱ハロゲン化反応においては、(2)式のラジカルの生成及びハロゲン化物イオンの脱離が律速となる。本実験においては、有機ハロゲン化合物のラジカルの生成に寄与する電子の供給は、



であると考えられるが、通常、酸洗浄等を行っていない金属鉄粉は表面酸化が進行し、 α -FeOOHや γ -Fe₂O₃などの酸化鉄に覆われているため、(4)式の反応は容易に進行しないと考えられる。本実験の結果においても、金属鉄粉のみ(0:1)の場合には、ディルドリン量及びORPの著しい減少がみられなかったことから(Fig.2)、本実験で用いた金属鉄粉は表面酸化が進行し、酸化鉄に覆われていると考えられる。しかし一方で、金属鉄粉にMT-V0を混合することにより、ディルドリン量及びORPの大変な低下がみられ、これには、MT-V0の構造が起因していると考えられる。XRDの結果より、MT-V0はマグネタイト構造を有することが明らか

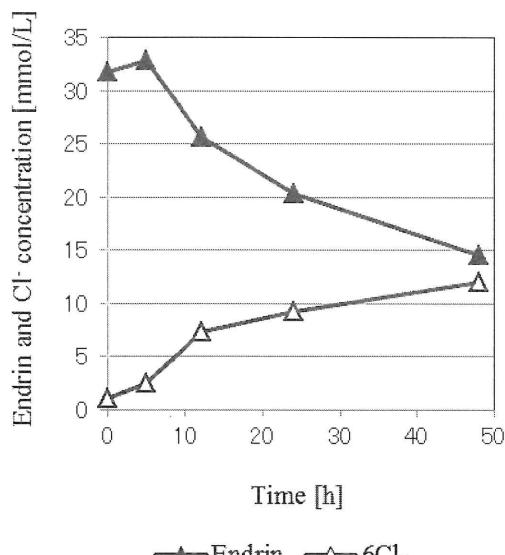
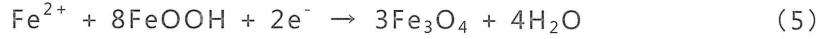


Fig. 4. Timely change of concentration of endrin and chloride with iron-based material

かとなっている(Fig.1)。マグネタイト(Fe_3O_4)は一般的に $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$ の形で存在し、溶液中に Fe^{2+} を溶出する。Chih-Chung ら¹⁴⁾は、未洗浄のゼロ価鉄に Fe^{2+} を添加すると、鉄表面を覆っている酸化鉄($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)と Fe^{2+} が反応し、マグネタイト構造を形成することで、内部に存在するゼロ価鉄の電子の放出が容易となり、酸化還元電位の低下に伴ってトリクロロエチレンの脱塩素化反応が進行するとしている。また黒田ら²¹⁾も、 Fe^{2+} や電子(e^-)の存在により



のような反応が進行することで、酸化鉄(ヘマタイト)からマグネタイトへの変化は十分可能であるとしている。本実験においては金属鉄粉とMT-V0を混合することにより、MT-V0より溶出した Fe^{2+} と金属鉄粉表面の酸化鉄が(5)式の反応を起こし、鉄粉表面の酸化鉄がマグネタイト構造を有することで、電子の授受が容易となり、ORPの低下及びディルドリンの分解反応が進行したものと考えられる。また、2種類の鉄系資材の配合割合の変化によるディルドリン分解速度の違いは、金属鉄粉が少ない(5:1や3:1)場合には反応部位が不足し、金属鉄粉とディルドリンとの衝突頻度の低下が起り、一方、MT-V0が少ない(1:5や1:3)場合には、金属鉄粉がMT-V0と接触する頻度が低下し、表面が酸化鉄で覆われた状態の金属鉄粉が多く残存したため、ディルドリン分解速度が低下したと考えられる。したがって、本実験で用いた2種類の鉄系資材におけるディルドリンの分解反応には、電子を放出するための金属鉄粉と金属鉄粉からの電子放出を容易にするMT-V0の二つが必須であると言える。

3.3 ディルドリン分解と反応速度の関係

金属資材を用いた塩素系化合物の脱塩素化反応は、通常、水溶液中の濃度変化から反応速度を算出していることが多く、その反応は擬一次反応であるとされている^{12,14,15,22,23)}。本実験における混合鉄を用いた上澄液と残渣中のディルドリン濃度の変化から反応速度を算出すると、上澄液(Fig.5(A))は、(7)式に一致し、これまでの報告と同様に擬一次反応を示した。

$$-\frac{d[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{t-\text{supernatant}}}{dt} = k_s[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{t-\text{supernatant}} \quad (6)$$

$$[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{t-\text{supernatant}} = [\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{0-\text{supernatant}} e^{-k_s t} \quad (7)$$

ここで、 $[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_t$ は時刻 $t[\text{h}]$ におけるディルドリン量、 k_s は上澄液におけるディルドリン減少の反応速度定数を示す。

一方、残渣中のディルドリン濃度の減少(Fig.5(B))は、(9)式と一致し、いずれの配合割合においても二次反応を示した。

$$-\frac{d[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{t-\text{residual}}}{dt} = k_r[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{t-\text{residual}}^2 \quad (8)$$

$$[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{t-\text{residual}} = \frac{[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{0-\text{residual}}}{1 + k_r t [\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}]_{0-\text{residual}}} \quad (9)$$

k_r は、残渣におけるディルドリン減少の反応速度定数を示す。

混合鉄での上澄液と残渣におけるディルドリン量の変化をFig.6に示した。Fig.6より、ディルドリン分解反応は、反応初期段階では、溶液中のディルドリンが上澄液から著しく減少しているのに対して、残渣においてはゆるやかに低下していることが分かる。これは、疎水性を有するディルドリンが、初期段階において混合鉄に速く吸着することによって、上澄液のディルドリンが急減し、一

方、混合鉄に吸着したディルドリンは、反応開始から3~8時間後のORPの低下(Fig.2 (B))とともに分解が進行したことを示している。つまり、混合鉄を用いた水溶液中ディルドリンの分解反応は、その大部分が早い段階で残渣(混合鉄)に吸着するため、主として二次反応であると言える。

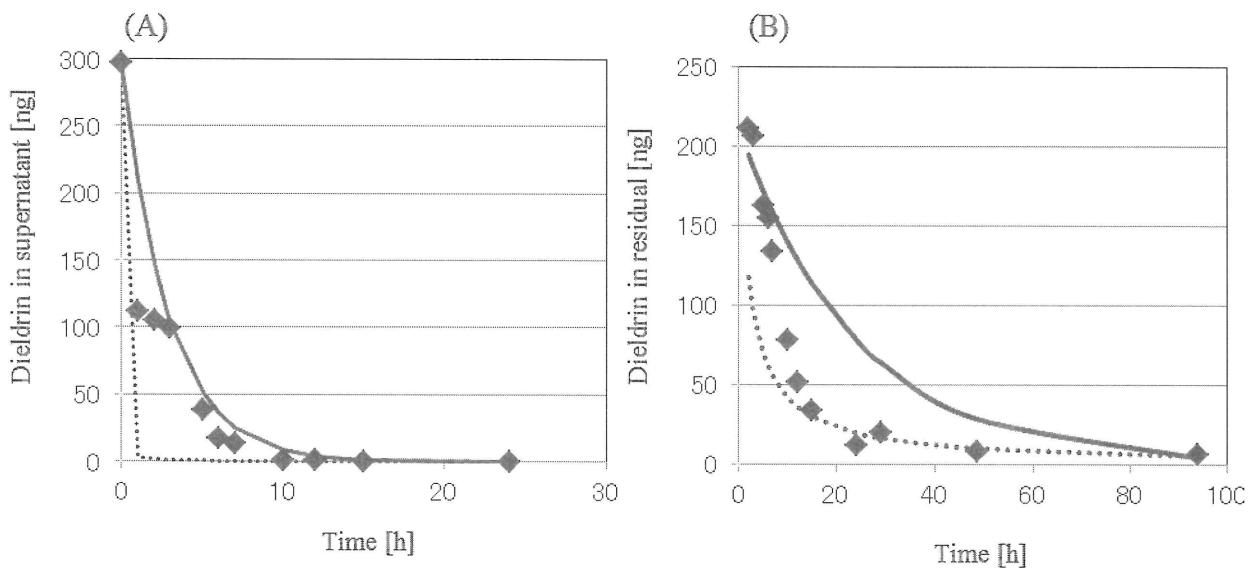


Fig. 5. Relationship between theoretical rate equation and measured value in dieldrin degradation. (A) Supernatant, (B) Residual

first*: Theoretical rate equation of first-order reaction

second**: Theoretical rate equation of second-order reaction

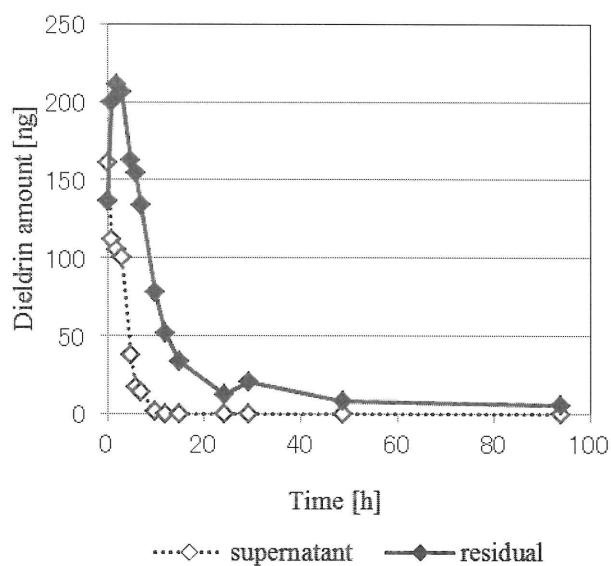


Fig. 6. Timely change of dieldrin amount in supernatant and residual

3.4 ディルドリン分解速度と反応温度の関係

通常、化学反応は温度の上昇に伴って反応速度が増加することが知られていることから、分解反応時の温度を4°C, 25°C及び50°Cと変化させて実験を行った。その結果をFig.7に示す。Fig.7より、(8)式から速度定数を求めたところ、4°C, 25°C及び50°Cにおいて、それぞれ0.00020, 0.00065及び0.0055 h⁻¹であった。その関係は、温度が上昇するに従って分解速度が上昇し、Arrheniusの式とよく一致した。本結果は、これまでに報告されている金属による脱塩素化反応^{13,19,22,23)}ともよく一致し、混合鉄を用いたディルドリン分解反応が温度依存性であることを示している。

3.5 水溶液中のディルドリン濃度と分解率の関係

各ディルドリン濃度(0.0011~1.1mg/L)における分解率の経時変化をFig.8に示す。各ディルドリン濃度における分解速度は、0.074~0.093 h⁻¹であり、いずれの濃度レベルにおいてもほぼ同じ分解速度を示し、本実験で行った比較的低濃度のディルドリンの濃度範囲においては、濃度依存性はないと言える。近年の環境水中のディルドリン濃度レベルは、日本におけるモニタリング調査³⁾では、31~750pg/L、またAmritaら²⁴⁾によると、インド国内のGomtia川(ガンジス河支川、サンプリング期間:2004年1月~2005年12月)では、検出限界未満~22.45ng/Lとなっており、本研究で用いた混合鉄は環境水中のディルドリン分解処理においても有効であると言える。

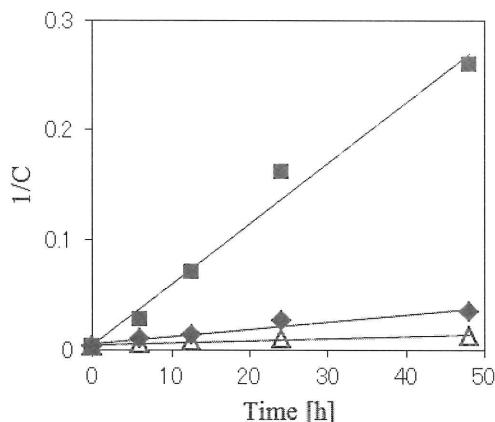


Fig.7. Effect of temperature on the degradation of dieldrin by iron-based material

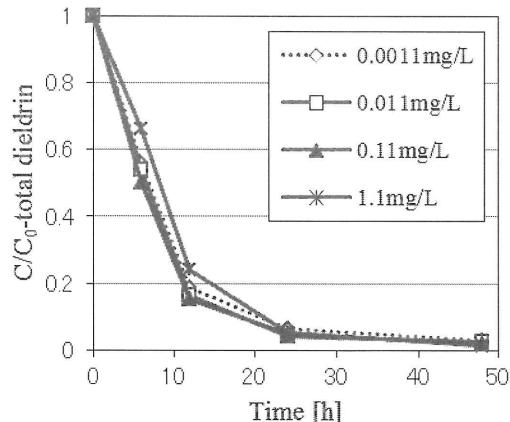


Fig. 8. Effect of dieldrin concentration on the degradation of dieldrin by iron-based material

3. 6 ディルドリン分解率と pH の関係

鉄は一般に、pH によって存在形態が変化することが知られていることから、pH 1~13において、混合鉄の添加と無添加によるディルドリン分解の検討を行った。まず、比較対照実験として、混合鉄を添加しない場合、いずれの pH においてもディルドリンの分解はみられなかった(Fig.9, ○印)が、混合鉄を添加した48時間後のディルドリン量は、初期 pH 3~9において、90%以上の分解率を示した(Fig.9, ●印)。しかし、強酸性(pH 1.00)及び強アルカリ性(pH 11.3 及び 12.9)では、ディルドリン分解がほとんど進行していないことが明らかであった。

まず、ディルドリン分解がみられた初期 pH 3~9における反応速度についてみると(Fig.10)，pH が低いほど分解速度が速い傾向を示した。これまでの報告によると、鉄を用いた脱塩素化反応は、弱酸性溶液中では、鉄の酸化により活性水素や電子が発生し、これらが脱塩素化反応を促進するとされている^{19,22,23)}。また、黒田ら²¹⁾は、プロトンと電子が多く存在する場合には、



の反応が進行するとしていることから、弱酸性溶液中では、MT-V0 から溶出する Fe^{2+} に加えて、鉄の酸化により活性水素や電子が多く存在することで、金属鉄粉表面において(10)式の反応が促進され、ディルドリン分解が進行したものと考えられる。

次に、強アルカリ性側で分解が進行しなかった原因としては、鉄の不動態化が考えられる。Jiann

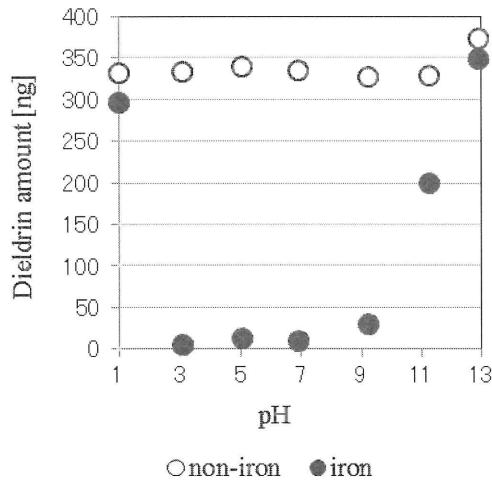


Fig. 9. Effect of pH on the degradation of dieldrin after 48 h with iron-based material

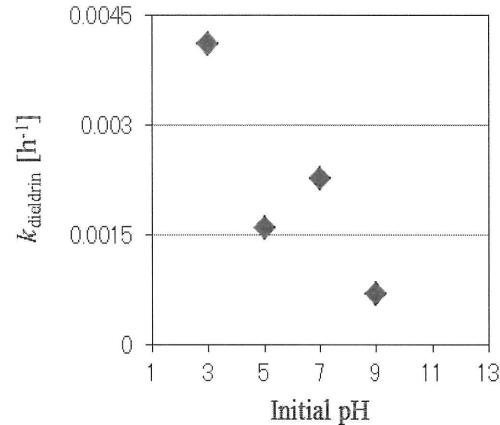


Fig. 10. Relationship between reduction rate constants (k_{dieldrin}) and pH

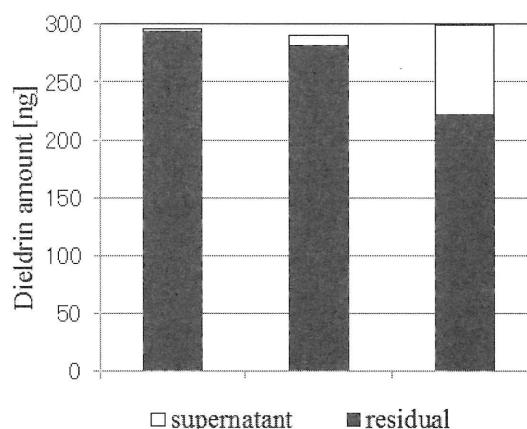
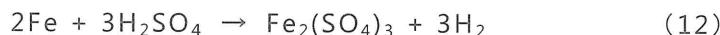


Fig. 11 Distribution of dieldrin in supernatant and residual after treatment with HCl , H_2SO_4 and HNO_3

ら²⁵⁾の報告によると、強アルカリ側では、 Fe(OH)_3 が鉄表面を覆うため鉄の不動態化が進行し、反応部位を減少させることから、反応速度が低下するとされており、本実験において、pH 11.3 及び 12.9 では、48 時間後に反応溶液が黄褐色を呈したことより、 Fe(OH)_3 が生成したものと考えられる。一方、強酸性側(pH 1.00)において、ディルドリンの分解反応が進行しない理由としては、酸性溶液中の鉄の酸化が関係していると考えられる。この現象を詳細に検討するため、pH 1 に調整した硫酸溶液と硝酸溶液を用いて塩酸溶液と同様の実験を行ったところ、いずれの酸性溶液においても塩酸溶液と同様にディルドリンの分解はみられなかつたが、上澄液と残渣との間のディルドリンの分配に違いが認められた(Fig.11)。

つまり、塩酸溶液と硫酸溶液中では、ディルドリンの大部分が残渣に吸着して存在しているのに対し、硝酸溶液中では約 25%が溶液中に存在した。これらの溶液中におけるディルドリン分配の差異は、各溶液中の鉄の存在形態の違いによるものと思われる。まず、塩酸溶液と硫酸溶液についてみると、溶液が黄褐色を示し、気泡の発生が観察されたことより、



の反応が進行し、鉄化合物を生成することで、溶液中ディルドリンの残渣への吸着が増加したと考えられる。一方、硝酸溶液についてみると、硝酸は鉄を不動態化させる作用があるため、不動態化された混合鉄へのディルドリンの吸着が抑制されたものと考えられる。

また、鉄の存在形態をさらに明らかとするため、各 pH 溶液中のディルドリン分解率と ORP 及び電気伝導率との関係についてみると(Table 1)、ディルドリン分解速度が比較的速かった初期 pH 3~9 の溶液においては、48 時間後には pH 5 付近の値に近づいていることが分かる。これは、Eh-pH ダイアグラム²⁶⁾によると、pH 5 付近では、ORP が -440~0mV となり、鉄は Fe^{2+} として存在することから、本研究において、ディルドリン分解が進行した系においては、(4)式及び(10)式の反応が進行したものと考えられる。また、初期 pH 1 の 3 種類の強酸性溶液において、48 時間後の電気伝導率に著しい低下がみられ(Table 5)，これは、(4)式及び(10)式によって生成された Fe^{2+} が酸性条件下でさらに酸化され、(11)式と(12)式のような反応によって、鉄化合物が生成したことによると思われる。一方、初期 pH 12.9 の溶液では、48 時間後の ORP が 162.4mVとなっていたことから、Eh-pH ダイアグラム²⁶⁾から推定すると、鉄は Fe(OH)_3 の形態で存在していると考えられる。いずれにしても、強酸性溶液及び強アルカリ性溶液においては、鉄の酸化、もしくは不動態化によりディルドリン分解が進行しないことから、混合鉄を用いて脱塩素化反応を行うには、pH 調整が重要な因子であると言える。

しかし、ほとんどの土壤は、植物生長に必要な養分の可給度を高めるため、中性ないし微酸性である²⁷⁾ことから、混合鉄の土壤への適応においては、pH の影響は軽微であると言える。さらに、土壤は、pH の変化を抑制する緩衝作用を有する²⁷⁾ため、混合鉄を施用することによる土壤 pH の変化はほとんど無視できると考える。

Table 1. Change of pH and electric conductivity(EC) under dieldrin degradation, reduction rate constants of total-dieldrin, and ratio(C/C_0)

Initial pH	pH at 48h	EC [mS/m]	EC at 48h [mS/m]	Reduction rate constants [h^{-1}]	C/C_0
1.00 ^a	1.21	10000	4800	—	0.95
1.07 ^b	1.58	9900	3700	—	1.0
1.00	3.39	5500	1400	—	1.1
3.08	4.71	31	15	0.0041	0.017
5.03	5.35	0.36	5.2	0.0016	0.042
6.89	5.28	0.16	5.2	0.0023	0.028
9.21	5.30	0.32	7.0	0.00069	0.098
11.3	6.94	11	11	—	0.62
12.9	12.5	920	890	—	1.1

a: Control with HNO_3

b: Control with H_2SO_4

3.7 ディルドリン分解率と各種イオン濃度の関係

これまでの報告から、キュウリによるディルドリンの吸収移行は、可給態ディルドリンの根からの取り込みとされている^{9,10)}。なお、土壤中におけるディルドリンの存在形態は、粘土有機物複合体に強く結合したものと、比較的水溶化されやすい形態(50%MeOH/水により抽出されるディルドリン²⁸⁾)があるとされており、ここでは、後者を可給態と表現した。

本項では、可給態ディルドリンが存在する土壤溶液中のイオン成分が、混合鉄を用いたディルドリン分解にどのように影響するかを明らかにするため、各種イオンの濃度(低濃度:約0.5mmol/L、高濃度:約50mmol/L)とディルドリン分解率との関係について検討を行った。その結果をFig.12に示す。Fig.12より、カチオンは、全てのイオンにおいて、低濃度及び高濃度ともにディルドリン分解率が90%以上を示し、ディルドリン分解には、カチオンはほとんど影響ないと考えられる。一方、アニオンにおいては、イオンの種類によって大きく異なり、Cl⁻とBr⁻、及びSO₄²⁻は、低濃度及び高濃度のいずれの水溶液においても90%以上のディルドリン分解率を示したのに対して、NO₃⁻とPO₄³⁻では、分解率が低く、特に高濃度の水溶液においては、ディルドリンがほとんど分解されなかった。そこで、各種イオン濃度の経時変化をみると(Table 2)、ほとんどのイオンが反応前後の濃度変化がみられなかつたのに対して、SO₄²⁻とNO₃⁻、及びPO₄³⁻では、24時間後のイオン濃度に大幅な減少がみられた。つまり、これらのアニオンの減少は、鉄と化合物を生成したことを意味し、ディルドリンの反応部位を減少させたと考えられる。しかしながら、SO₄²⁻溶液中では、ディルドリン分解率が90%以上を示した。これは、FeSO₄によるグリーンラスト GR(SO₄²⁻)-[Fe^{II}₄Fe^{III}₂(OH)₁₂]²⁺[SO₄²⁻·3H₂O]²⁻の生成が考えられる。グリーンラストは、強い還元力を有することから塩素系化合物の脱塩素化反応を引き起こすとされ、Tunlawitら²⁹⁾の報告によると、Fe⁰+FeSO₄やマグネタイト+FeSO₄などの系でメトラクロルの脱塩素化反応を明らかにしている。つまり、本実験において24時間反応後のSO₄²⁻濃度が低下したにも関わらずディルドリン分解率が90%以上を示したことは、FeSO₄によるグリーンラストがディルドリン分解を進行させたと考えられる。

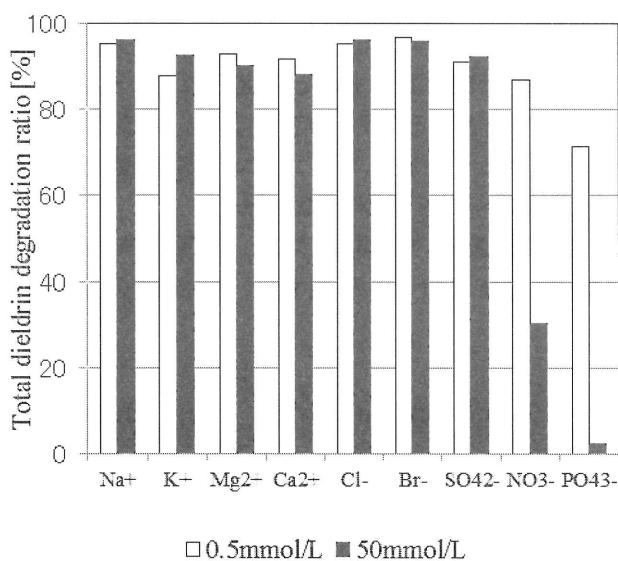


Fig. 12 Effect of ions on the degradation of dieldrin by iron-based material

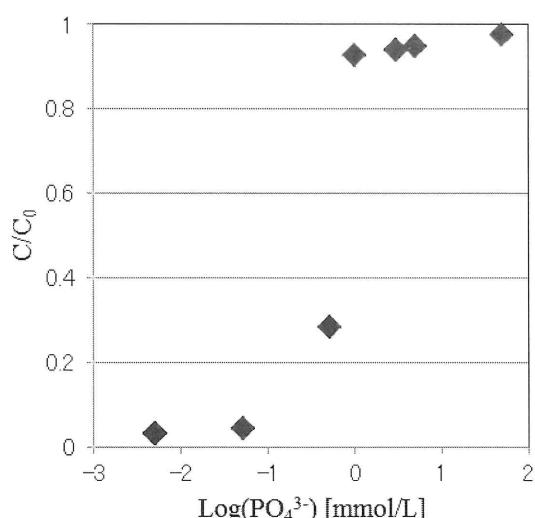


Fig. 13 Effect of PO₄³⁻ concentration on the degradation of dieldrin by iron-based material

一方、ディルドリン分解を阻害したNO₃⁻とPO₄³⁻に関する詳細を明らかにするため、まず、PO₄³⁻について、水溶液濃度を0.0044～51.1mmol/Lまで変化させ、ディルドリンの分解率とPO₄³⁻濃度の変化を調べた(Fig.13)。その結果、0.0481mmol/L以下のPO₄³⁻水溶液では、ディルドリンの95%以上が分解したが、1.05mmol/L以上の溶液ではディルドリン分解

率は低く、ディルドリンの分解が PO_4^{3-} 濃度に依存していることが分かる。また、溶液中の PO_4^{3-} 濃度の変化についてみると(Table 3)、ディルドリンの分解率が 95%以上を示した 0.0044 及び 0.0481mmol/L の PO_4^{3-} 溶液では、24 時間後には PO_4^{3-} が検出されず、 PO_4^{3-} の初期濃度が 1.05mmol/L 以上の溶液からは、約 1mmol/L 少ない PO_4^{3-} が検出された。つまり、溶液中の Fe は約 1.05mmol/L の PO_4^{3-} と反応し、化合物を生成したため、 PO_4^{3-} 濃度が 1.05mmol/L 未満の水溶液中では、 PO_4^{3-} に対して Fe が過剰に存在することでディルドリン分解が進行し、 PO_4^{3-} 濃度 1mmol/L 以上の溶液中では、ディルドリン分解に使用される Fe の全てがリン酸鉄となつたため、ディルドリン分解が進行しなかったと考えられる。

次に、 NO_3^- についてみると、 PO_4^{3-} 溶液中での反応と同様に、Fe と NO_3^- との化合物形成に加えて、Fe による NO_3^- の還元反応が考えられる。Hans ら³⁰⁾の報告によると、 Fe^{2+} や Fe^{3+} の水酸化沈殿物であるグリーンラストは強い還元能力を持ち、硝酸塩をアンモニウムへと還元している。本実験では(Table 4)、24 時間反応後の NO_3^- 濃度が低下したのに対して、 NO_2^- と NH_4^+ 濃度が増加し、溶液中の pH は、低濃度 NO_3^- 溶液中では 6.18 から 9.24、高濃度 NO_3^- 溶液中では 6.18 から 9.65 までそれぞれ上昇した。つまり、このことは、 NO_3^- 溶液中では、 NO_3^- の還元反応に混合鉄の一部が使用されたことによって、ディルドリンの分解が抑制されたものと考えられる。一般的な畠地のイオン組成として、 PO_4^{3-} は化合物を形成して難溶性となるため、リン酸溶出量は低いが、 NO_3^- は施用されたアンモニア態窒素や有機物の分解によって生成したアンモニア態窒素が酸化され、硝酸態として存在することが多い³¹⁾ことから、混合鉄への影響が懸念される。

以上の結果より、混合鉄を用いてディルドリン汚染土壌を修復する場合には、施用地域の気候や施用時期、及び土壌の化学的性質(pH、イオン組成及び濃度)に考慮して、混合鉄の施用量を決定する必要があると言える。

Table 2. Ion concentrations under low (Ca. 0.5mmol/L) and high (Ca. 50mmol/L) concentrations of ions

		Cation				Anion				
		Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	Br^-	SO_4^{2-}	NO_3^-	PO_4^{3-}
Low	0h	0.587	0.484	0.395	0.403	0.47 4	0.511	0.476	0.481	0.486
	24h after	0.589	0.509	0.383	0.540	0.46 6	0.466	0.004	0.002	n.d. *
High	0h	48. 9	50. 7	41. 5	44.6	45. 7	47. 7	47. 8	47. 9	51. 1
	24h after	47. 6	49. 0	42. 8	46.5	44. 8	47. 9	39. 1	45. 2	45. 4

n.d.*: Not detected. (< 0.001mmol/L)

Table 3. PO_4^{3-} concentration, and degradation rate of dieldrin by iron-based material

PO_4^{3-} -mmol/	0h	0.0044	0.0481	0.486	1.05	2.87	4.38	51.1
---------------------------	----	--------	--------	-------	------	------	------	------

L	24h after	n.d.*	n.d.*	n.d.*	0.185	1.64	3.27	45.4
C/C ₀ -total dieldrin		0.032	0.044	0.29	0.93	0.94	0.95	0.98

n.d.*: Not detected. (< 0.001mmol/L)

Table 4. Three types of nitrogen (mmol/L) and pH in NO_3^- solutions (Ca. 0.5mmol/l and Ca. 50mmol/L) at 0h and 24h after

		NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	pH
Low	0h	0.481	n.d.*	0.023	6.18
	24h after	0.002	n.d.*	0.685	9.24
High	0h	47.9	n.d.*	0.100	6.18
	24h after	45.2	0.375	1.917	9.65

n.d.*: Not detected. (< 0.002mmol/L)

要約

2種類の鉄系資材による水溶液中ディルドリン分解に及ぼす要因として、6項目（各配合割合における酸化還元電位とディルドリン分解の関係、ドリン類分解の作用機作、反応温度、水溶液中のディルドリン濃度、水溶液中のpH及びイオン成分）の検討を行った。その結果、酸化鉄(MT-V0)と金属鉄粉の配合割合が、1:1の時に分解速度が最も速く、水溶液中の酸化還元電位の低下に伴って分解が進行する脱塩素化反応であることが分かった。ディルドリンの分解反応は、温度依存性であり、ディルドリン濃度が0.0011~1.1mg/Lの範囲においては、濃度依存性はみられなかった。また、pH3-9の溶液中では、ディルドリン分解は進行したが、強酸性(pH 1.00)と強アルカリ性(pH 11.3及び12.9)の溶液中では鉄の状態変化により、ディルドリン分解は進行しなかった。溶液中のアニオン(NO_3^- 及び PO_4^{3-})は、鉄と化合物を形成することでディルドリン分解の反応部位を減少させ、さらに NO_3^- 溶液中では、鉄の一部が NO_3^- の還元反応に使用され、ディルドリン分解を抑制していることが明らかとなった。

文献

- 1) 環境省環境保健部環境安全課: POPs 対策検討会(第1回)議事次第・資料 (2005)
- 2) Lichtenstein, E. P., Millington, W. F. and Cowley, G. T.: Effect of various insecticides on growth and respiration of plants. *Agricultural and food chemistry*, 10, 251-256 (1962)
- 3) 環境省環境保健部環境安全課: 平成20年度版「化学物質と環境」 (2009)
- 4) 乙部裕一, 佐藤龍夫: 作物の有機塩素殺虫剤(ディルドリン)吸収特性, 北海道立農業試験場集報, 75, 21-24 (1998)
- 5) Suzuki, M., Yamato, Y. and Watanabe, T.: Multiple organochlorine pesticide residues in japan. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 10, 145-150 (1973)

- 6) Isabel, H., Paul, M., Rainer, S. and Gabriela, W.: Survey of organochlorine pesticides in horticultural soils and there grown Cucurbitaceae. *Chemosphere*, 73, 954-961 (2008)
- 7) 近藤治美, 天川映子, 佐藤寛, 安田和男, 大貫憲一, 秋葉美智子, 金谷和明: 多摩地域産きゅうりにおけるディルドリン検出に関する事例研究, *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.*, 54, 132-135 (2003)
- 8) Hashimoto, Y.: Dieldrin residue in the soil and cucumber from agricultural field in tokyo. *J. Pestic. Sci.*, 30, 397-402 (2005)
- 9) Otani, T. and Seike, N.: Rootstock control of fruit dieldrin concentration in grafted cucumber(*Cucumis sativus*). *J. Pestic. Sci.*, 32, 235-242 (2007)
- 10) Hashimoto, Y.: Reduction of dieldrin concentration in cucumber fruits using cucurbita rootstocks and activated carbon. *J. Pestic. Sci.*, 32, 229-234 (2007)
- 11) Erdal, K. and Oktay, E.: Degradation of aldrin in adsorbed system using advanced oxidation processes: comparison of the treatment methods. *Journal of Hazardous Materials*, 106B, 115-125 (2004)
- 12) Boussahel, R., Harik, D., Mammar, M. and Lamara-Mohamed, S.: Degradation of obsolete DDT by fenton oxidation with zero-valent iron. *Desalination*, 206, 369-372 (2007)
- 13) Sayles, G. D., You, G., Wang, M. and Kupferle, M. J.: DDT, DDD, and DDE dechlorination by zero-valent iron. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 3448-3454 (1997)
- 14) Chin-Chung, L., Dyi-Hwa, T. and Chun-Yuan, W.: Effect of ferrous ions on the reductive dechlorination of trichloroethylene by zero-valent iron. *Journal of Hazardous Materials*, B136, 706-713 (2006)
- 15) Shih, Y. H., Chen, Y. C., Chen, M. Y., Tai, Y. T. and Tso, C. P.: Dechlorination of hexachlorobenzene by using nanoscale Fe and nanoscale Pd/Fe bimetallic particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 332, 84-89 (2009)
- 16) Katsenovich, Y. P. and Miralles-Wilhem, F. R.: Evaluation of nanoscale zerovalent iron particles for trichloroethene degradation in clayey soils. *Science of the Total Environment*, 407, 4986-4993 (2009)
- 17) 上田祐子, 本田克久: ドリン系農薬の分析過程におけるいくつかの問題点とその検討, 環境化学, 20, 9-14 (2010)
- 18) 岡島秀夫: 土地利用と土壤溶液のイオン組成, p.85-128, 「土壤の吸着現象—基礎と応用ー」, 日本土壤肥料学会編, 株式会社 博友社, 東京 (2001)
- 19) Zhiyuan, W., Ping'an, P. and Weilin, H.: Dechlorination of γ -hexachlorocyclohexane by zero-valent metallic iron. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 992-997 (2009)
- 20) 湯川泰秀, 向山光昭: 「パイン有機化学」, [II], 1034-1035 (1993)
- 21) 黒田正和, 張欣, 山上利一: 赤錆(ヘマタイト)のマグネタイトへの変換における磁気の効果, 環境技術, 36, 64-71 (2007)
- 22) Jianjun, W., Xinhua, X., Yong, L. and Dahui, W.: Catalytic hydrodechlorination of 2,4-dichlorophenol over nanoscale Pd/Fe: Reaction pathway and some experimental parameter. *WATER RESEARCH*, 40, 348-354 (2006)
- 23) Xinhua, X., Hongyi, Z., Ping, H. and Dahui, W.: Catalytic dechlorination kinetics of p-dichlorobenzene over Pd/Fe catalysts. *Chemosphere*, 58, 1135-1140 (2005)
- 24) Amrita, M., Priyanka, O. and Kunwar, P. S.: Levels and distribution of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments of Gomti river(India)-a tributary of the Ganges river. *Environ Monit Assess*, 148, 421-435 (2009)

- 25) Jiann-L, C., Souhail, R. A., James, A. R. and Zhenbin, L.: Effect of pH dechlorination of trichloroethylene by zero-valent iron. *Journal of Hazardous Materials*, B83, 243-254 (2001)
- 26) 渡辺正, 中村誠一郎:「電子移動の化学-電気化学入門」, p.72 (1996)
- 27) 青峰重範:土壤の化学性, p.109-126, 「土壤学」, 株式会社 朝倉書店, 東京 (1971)
- 28) Sakai, M., Seike, N., Murano, H. and Otani, T.: Relationship between dieldrin uptake in cucumber and solvent-extractable residue in soil. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 11261-11266 (2009)
- 29) Tunlawit, S., Patrick, J. S., Steve, D. C. and Yul, R.: Greenrust and iron oxide formation influences metolachlor dechlorination during zerovalent iron treatment. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 5219-5227 (2003)
- 30) Hans, C. B. H., Susanne, G., Marianne, E. and Christian, B. K.: Kinetics of nitrate reduction by green rusts-effect of interlayer anion and Fe(II) :Fe(III) ratio. *Applied Clay Science*, 18, 81-91 (2001)
- 31) 奥田東, 五島善秋, 川口桂三郎, 小林章, 塚本洋太郎:「土壤肥料ハンドブック」, p.65-84, 株式会社 養賢堂, 東京 (1965)

リグノセルロース系バイオマスからの低環境負荷型バイオエタノール生産技術に関する研究 ～前処理技術開発を中心として～

愛媛大学上級研究員センター上級研究員	秀野晃大
愛媛大学農学部准教授	川嶋文人
愛媛大学農学部客員教授	森田昌敏
独立行政法人産業技術総合研究所	
バイオマス研究センターセンター長	坂西欣也
独立行政法人産業技術総合研究所	
バイオマス研究センター招聘研究員	澤山茂樹
独立行政法人産業技術総合研究所バイオマス研究センター	
エタノール・バイオ変換チーム長	矢野伸一
独立行政法人産業技術総合研究所バイオマス研究センター	
水熱・前処理チーム長	遠藤貴士

1. 緒言

地球温暖化防止に向けた二酸化炭素削減や循環型社会構築、環境産業の主導権確保という観点から石油代替となるバイオエタノールの生産が活発であった。しかし最近になって、シェールオイルの登場や穀物価格の上昇を理由にサトウキビやトウモロコシといった可食資源を利用したバイオエタノール生産が減産されている。そこで、第二世代バイオエタノールと呼ばれる、食糧や飼料と競合しない木質系バイオマスからのバイオエタノールの必要性が高まっている。「バイオマス・ニッポン総合戦略」によれば、日本における廃棄物に関わる木質系バイオマスの年間発生量は、建設発生木材、林地残材や未利用樹を合わせて年間約 2400 万 t になり、エタノールに換算すると約 540 万 kl に及ぶため、木質系バイオエタノール製造技術の開発が強く望まれる。

ヒノキ(*Chamaecyparis obtuse*)は高品質建築材として伝統的な日本家屋の建築で用いられてきた。世界最古の木造建築物である法隆寺でもヒノキが用いられており、耐腐朽性の高い材である。我が国の 2007 年におけるヒノキの年間生産量は、65,000 m³ であるが、その内約 70% が不良品として使用されずうち捨てられている (Ohtsuki et al., 2011)。ヒノキの特性の一つである耐腐朽性は、加水分解の困難さと同義であり、バイオエタノール生産の原料として問題となる。

リグノセルロースを主要構成成分とする木質系バイオマスからバイオエタノールを生産するには、前処理、糖化、発酵、蒸留精製工程が必要である。前処理および糖化処理後に得られる単糖類は、再生可能エネルギーだけでなく、バイオマテリアルの原料にもなるため、両処理はバイオリファイナリー社会構築の基盤技術である。特に前処理は重要な工程であり、本工程の成否により後段の糖化で用

いられる酵素量や、そこで得られる糖化率も大きく変わる。酵素コストは、以前として製品のエタノール生産コストに占める割合が大きい(Hamelinck et al., Biomass Bioenergy, 2005)ため、酵素使用量の削減化も極めて重要な課題である。

従来の前処理法の一つである濃硫酸法は、既に確立された技術であるが、糖の過分解、中和時に発生する石膏の処理、薬品耐性プラントの必要性、硫酸回収時の消費エネルギーが大きいことなどが問題になっていた (Sun and Cheng, Bioresour. Technol., 2002)。希硫酸法も、硫酸中和による石膏発生の問題や薬品耐性プラントの必要性は同様に存在する。カナダにある Iogen 社の爆碎法 (Tolan, Clean Technol. Environ. Policy, 2002)は、低濃度の硫酸を投入しており、基本的に上記と同様の問題を抱えている。アンモニア爆碎法 (Teymour et al., Bioresour. Technol., 2005)は、比較的糖化しやすい草本類の研究例が多いが、木材に対する効果は不明な点が多い。さらに、以上に挙げた手法では、下流工程に移行する際に pH 調整や、微生物の生育阻害物質を除く必要がでてくる。また、糖化酵素量を減らすための環境低負荷型前処理としては、ボールミル処理のようなエネルギー消費型前処理が必要であり、前処理コストが嵩むという問題を同様に抱えていた。

オルガノソルブ処理は、エネルギー消費量が少なく、高効率な酵素糖化を可能にする前処理技術の一つである (Zhao et al., 2009)。本処理は、木質バイオマスを各種有機溶媒に酸触媒等を用いて、ヘミセルロースおよびリグニンを抽出し、大部分のセルロースを残渣として回収する手法である。これまでに、強酸、高温のような過酷な条件を用いることで、酵素糖化の効率を高めてきたが、糖の過分解が問題となっていた (Teramoto et al., 2008)。グルコースやキシロースの過分解物であるフルフラールや 5-ヒドロキシメチルフルフラールは、酵母の生育阻害物となり、後段の発酵工程を阻害する。一方で、温和な条件では酵素糖化の効率が低下する為、新たなオルガノソルブ処理の開発が求められている。

本研究では、リグノセルロースからのバイオエタノール生産を目指し、低成本で高糖化率を可能にする環境低負荷型前処理の開発を目的とし、原料としてヒノキを用いて、(1) 混合溶媒によるアルコールオルガノソルブ処理および短時間ボールミル処理の組み合わせ、(2) 微量酸添加オルガノソルブ単独処理の検討を行った。

省エネルギー型前処理であるアルコールオルガノソルブ処理を中心に条件検討を行い、市販糖化酵素による加水分解試験を行った。各種セルラーゼ酵素製剤およびアクセサリー酵素を用意し、酵素活性及びたんぱく量を明らかにしたうえで、酵素の組み合わせを検討し、本研究で得られる前処理物の糖化に適した酵素カクテルの開発を行った。低成本な木質系バイオエタノール生産を目指す上で、糖化工程の改善も前処理と同様に重要である。本研究では、糖化酵素として Acremozyme (明治製菓株式会社) を中心に使っていった。本酵素は我が国で育種された *Acremozyme cellulolyticus* TN 株由来であり、従来の *Trichoderma reesei* 由来の市販酵素より、 β -glucosidase 比活性や耐熱性が高いことで知られている。そのため、50°C付近で長時間の糖化を行っても、セロビオースの蓄積が少なく効率良くセルロースを糖化できる。しかし、最近になり世界的な酵素メーカーが *T. reesei* の遺伝子工学的育種や培養法の開発を行い、従来よりも β -glucosidase 比活性が高い酵素の生産や、大幅な低成本化を実現している。そこで、今後の我が国における糖化酵素生産戦略を考える上でも、これらの会社が開発した酵素を用いて、オルガノソルブ処理物の糖化を行い、Acremozyme との比較を行った。最終的にはオルガノソルブ前処理物を原料として、耐熱性酵母を用いた同時糖化発酵試験によりエタノール生産を行い、前処理法および糖化酵素の評価とした。

(1) 混合溶媒によるアルコールオルガノソルブ処理および短時間ボールミル処理の組み合わせ

(1) 2. 材料および方法

(1) 2.1. ヒノキ

木質バイオマスとしてヒノキおが屑を用いた。おが屑を篩にかけ、 $125\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下のサイズのものをサンプルとして用いた。ヒノキおが屑の構成単糖は、グルコース (449 mg/g-material)、キシロース (44 mg/g-material)、マンノース (105 mg/g-material) であり、クラーソンリグニンの割合は乾燥重量換算で 31.9% であった。

(1) 2.2. 混合溶媒を用いたアルコールオルガノソルブ処理および短時間ボールミル処理

マントルヒーターを装着した SUS316 製高圧容器(内径 1 cm、長さ 25 cm、図 1)を用いて、各種溶媒におけるオルガノソルブ法の条件検討を行った。溶媒としては、エタノール(EtOH)、エチレングルコール(EG)、水(W)を単独または混合して用いた。容器内に各種溶媒 10 mL、溶媒/木粉の質量比が 5/1 となるよう木粉を添加し、マントルヒーターにより $110\text{--}230^\circ\text{C}$ 、30 分間加熱した。各種反応条件を表 1 に示す。反応終了後、100 mL エタノールで洗浄し、 50°C 、3 時間真空乾燥を行った後、乾燥サンプル約 0.6 g、ボール(直径 5 mm) 約 30 g、遊星型ボールミル粉碎機(P-6, フリッチュジャパン株式会社) を用いて、微粉碎処理(400 rpm , 10 min) を行った。前処理物は酵素糖化による加水分解を行った。

(1) 2.3. 市販酵素による糖化試験

アクレモニウムセルラーゼ(明治製菓株式会社) を用いて糖化試験を行った。基質 1 g に対し、酵素蛋白質量 0.4 g を用いて、酵素反応を行った(45°C , 72 h)。反応終了後、反応液の上清を適宜希釈し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による生成糖の分析を行った。Aminex HPX-87P カラム (BioRad Co.)を装着した HPLC (JASCO Co.)により分析した。カラムオーブンは 80°C に設定し、溶離液として超純度イオン交換水を用いて、流速 1 mL/min で測定した。

糖化率は、生成糖の収率として(1)式を用いて算出した。

$$\text{糖化率 } (\%) = \frac{a \cdot b}{c} \cdot 100 / d \quad (1)$$

$$b = e/f$$

a: 生成単糖量(mg); b: 水熱処理の固形分収率; c: 基質の乾燥重量 (g); d: 単位乾燥重量あたりのヒノキに含まれる単糖量(mg/g); e: 水熱処理および洗浄後の残渣の乾燥重量(g); f: 水熱処理前のヒノキの乾燥重量(g)

(1) 2.4. Severity 解析

Overend ら(1987)の手法に従い式(2)を用いて、反応温度および反応時間を包括的に評価できる severity parameter を算出することができる。

$$R_0 = t \exp[(T-100)/14.75] \quad (2)$$

h: 反応時間; T: 反応温度(°C);

さらに pH の影響も包括的に評価する為、式(3)で表わされる Chun ら(1990)や Teramoto ら(2008) の手法を用いて、修正 severity parameter 算出した。

$$R'_0 = [H^+] t \exp[(T-100)/14.75] \quad (3)$$

[H⁺]: 25°C で測定した pH (pH=-log[H⁺])から算出

(1) 2.5. 電界放出型電子顕微鏡(Field emission scanning electron microscopy: FE-SEM) 観察

白金イオンスパッター(E-1045; Hitachi High-Technologies Co.)を用いて、各種試料に白金蒸着をした後、FE-SEM (S-4800, Hitachi High-Technologies Co.)を用いて、印加電圧 1.4 kV で試料表面の形態観察を行った。

(1) 2.6 粒子サイズ測定

試料を適宜蒸留水に懸濁し、超音波洗浄機を用いて分散させた後、Partica LA-950 laser diffraction particle size distribution analyzer (HORIBA Co., Kyoto, Japan)に導入し、粒子サイズ分布を測定した。

(1) 2.7 構成单糖およびクラーソンリグニンの分析

各種試料の構成单糖およびクラーソンリグニンの分析を TAPPI Test Method T249 (Tappi 1992) に準じて行った。室温下で、約 0.5 g の試料をつぶしながら 72% 10 ml 硫酸と約 1 時間反応させ、硫酸濃度が 11.8%となるように蒸留水で希釈し、オートクレーブ反応(121°C, 10 min) を行った後、5 N の水酸化ナトリウムで pH5.0 に中和した。反応残渣を室温まで空冷後、100 mL の熱水で洗浄し、アスピレーターを用いてガラスフィルターで濾過し、105°Cで恒量になるまで乾燥したものを、クラーソンリグニンとして重量測定した。中和液を 10,000 rpm、5 分間遠心した後、上清に内部標準として 2-デオキシグルコースを添加し、0.45 um フィルターで濾過したものをイオン交換カラム CarboPac PA1 column およびパルスドアンメトリック検出器を装着した高速液体クロマトグラフィー(Dionex, Sunnyvale, CA, USA) により分析した。溶離液はイオン交換水を使用し、流速 1 mL/min で、室温下

で分析を行った。カラムを洗浄する為、0.3 N 水酸化ナトリウムおよび 0.1 N 水酸化カリウム、1.5 N 重炭酸ナトリウムを用いた。

(1) 3. 結果および考察

(1) 3.1 Severity parameter の違いが固形分収率および酵素加水分解に与える影響

混合溶媒によるオルガノソルブ処理およびオルガノソルブ処理と短時間ボールミル処理の組み合わせ後の固形分収率および酵素糖化試験の結果を図 2 に示す。横軸に Severity parameter、縦軸に固形分収率および酵素糖化後の糖化率を示している。EtOH および EG 供に、severity (R') が $\log 10^{-2}$ 以上になると固形分収率が減少し始めた。しかし、酵素糖化後の糖化率については、溶媒の違いによる影響が確認された。EG を基本溶媒として用いると、 $\log R'$ の値が 10^{-1} 以上になると、ボールミル処理無しでもグルコース収率が増加したが、EtOH では低い収率であった。EG については、木材の液化においてその溶解力の強さ故、いくつかの研究報告例 (Vanasse et al. 1988; Yamada and Ono 2001; Ahmed et al. 2002; Zhang et al. 2007) があるものの、酵素加水分解の為のオルガノソルブ処理で用いられた例は少ない。ボールミル処理無しのオルガノソルブ単独処理の内、W25/EG75/AA1 の混合溶媒が最も高い糖化率を得た。一方で、ボールミル処理を組み合わせることにより、EtOH および EG を用いたオルガノソルブ処理で severity 値が低くても、グルコース収率が大きく増加し、EtOH と EG で得られたグルコース収率の最大値に違いは無かった。EtOH および EG を用いたオルガノソルブ処理で酵素糖化の為に最適な severity 値はそれぞれ 10^{-2} (Glu, 55%; Xyl, 24%; Man, 34%) および 1 (Glu, 57%; Xyl, 14%; Man, 23%) であった。キシロースおよびマンノース収率については、severity 値がある閾値を超えると大きく減少した。そのような閾値は、EtOH で 10^{-2} 、EG で 10^{-1} であった。このような severity の閾値を超える反応条件では、固形分収率の減少も確認されており、キシロースやマンノースを構成糖とするヘミセルロースの溶出が起こった為と考えられる。ボールミル処理を組み合わせたオルガノソルブ処理では、severity 値が低くても、高い糖化率を達成しており、特に過酷な反応条件により溶出してしまったヘミセルロース由来のキシロースおよびマンノースを回収する上でも有効な手法であると示唆される。

(1) 3.2 酵素糖化の為のボールミル処理に対するオルガノソルブ処理の効果

ボールミル処理に対するアルコールオルガノソルブ処理の効果を図 3 に示す。ボールミル処理単独では、粉碎時間 20-30 分間で一定値に達した。一方で、オルガノソルブ処理 (W25/EtOH75/AA1, 140 °C, 30 min or W25/EG75/AA1, 170 °C, 30 min) を組み合わせることで、粉碎時間 10 分間で、粉碎時間 30 分間のボールミル単独処理よりも高い糖化率が得られた。ボールミル処理は水熱処理やオルガノソルブ処理に比べ、エネルギー消費量が大きく (Inoue et al., 2008)、バイオエタノール生産工程にかかる全消費エネルギーに占める割合も大きい (Yanagida et al., 2009) ことが知られている。オルガノソルブ処理を組み合わせることで、ボールミル処理の粉碎時間の大変な短縮が可能になった。Hideno ら (2009) は、ボールミル処理に代わり、消費エネルギーが少なく高糖化率を可能にする前処理として湿式ディスクミル処理 (wet disk milling: WDM) を提案している。オルガノソルブ処理と WDM を組み合わせることで、高糖化率を維持しながら、さらにエネルギー消費量を少なくできる可能性がある。

(1) 3.3 ヒノキ前処理物の糖化試験比較

これまでのヒノキ前処理物の糖化試験結果を図4に示す。EtOHをベース溶媒としたオルガノソルブ処理単独では、無処理ヒノキの糖化率とほとんど変わらず、EGに変えることで約2倍の糖化率を得た。10分間のボールミル処理では無処理ヒノキの約4倍の糖化率であった。しかし、アルコールオルガノソルブ処理とボールミル処理を組み合わせることで、大きく糖化率が増加した(W25/EtOH75/AA1_BM10→グルコース収率: 48.9%, キシロース収率: 13.8%, マンノース収率: 32.8%, W25/EG75/AA1_BM10→グルコース収率: 52.9%, キシロース収率: 18.1%, マンノース収率: 29.8%)。これらの値は、無処理ヒノキのグルコース収率の7-8倍、キシロース収率の9-11倍、マンノース収率の15-16倍であった。本結果から、オルガノソルブ処理と短時間ボールミル処理の協奏効果が示された。日本では、ヒノキは建築材としてよく用いられる針葉樹材であり、その廃材も大量に排出される。しかしながら、ヒノキは他の材に比べ腐朽耐性が強く難分解性である為、ヒノキの酵素糖化に関する研究報告例は限られている。その数少ない報告例の中で、Maekawaら(1996)は蒸煮爆碎処理(232°C, 28 kgf/cm², 4 min)によって20-40%の糖化率を得て、さらに過酸化アルカリ処理(2% H₂O₂, 2 N NaOH, room temperature, 18-24 h)を組み合わせることで50-60%の糖化率を得ている。本研究では、消費エネルギーの少ないアルコールオルガノソルブ処理と短時間ボールミル処理の組み合わせにより、同等の糖化率を達成しており、本手法の有効性を示すことができた。

(1) 3.4 ヒノキ前処理物に含まれる構成糖およびクラーソンリグニンの比較

無処理ヒノキや、EtOHおよびEGをベースとしたアルコールオルガノソルブ処理ヒノキの構成糖組成に違いはほとんど無かった。また、オルガノソルブ処理ヒノキの粒子サイズも無処理とほとんど変わらず(図6)、アルコールオルガノソルブ処理単独では、糖組成や粒子サイズ、糖化率にほとんど影響が無かった。しかし、クラーソンリグニンの割合は、オルガノソルブ処理ヒノキが無処理に比べわずかに減少し(図5)、酸可溶リグニンも同様の傾向を示した(data not shown)。

一方で、オルガノソルブ処理にボールミル処理を組み合わせることで、粒子サイズは非常に小さくなり、50%以上の粒子が100 μm未満となり(図6)、糖化率も大きく増加した(図3)。オルガノソルブ処理とボールミル処理の組み合わせは、同じ粉碎時間のボールミル処理単独の約2倍の糖化率を得ることができる(図3)。オルガノソルブ処理の効果は、セルロース表面上を覆う微量のリグニンの除去(図5)やヘミセルロースを軟化し、ボールミル処理の効果を高めることかもしれない。

酵素的酸温和分解リグニン(Enzymatic mild acidolysis lignin: EMAL)とは、リグニン-炭水化物間の結合を開裂して溶出されるリグニンである(Wu and Argyropoulos 2003; Guerra et al., 2006a and b)。Guerraら(2006a)は温和な酸分解工程を経ることで、より緩やかな粉碎条件でも、リグニン-炭水化物複合体からリグニンを取り出すことが可能であると報告している。同様に、本研究では、酢酸添加の比較的温和なオルガノソルブ処理によって、短時間のボールミル処理でも高収率で糖を得ている。EMALに関する文献や本研究の結果から、酢酸添加のオルガノソルブ処理と短時間ボールミル処理の組み合わせにより、ヒノキ中のリグニン-炭水化物間の結合が部分的に開裂し、酵素糖化性を高めたと示唆される。

(1) 3.5 ヒノキ前処理物表面の形態観察

各ヒノキ試料表面を FE-SEM を用いて観察した電子顕微鏡写真を図 7 に示す。無処理ヒノキ表面が滑らかであるのに対し、オルガノソルブ処理物表面にはいくらかの溝があった（図 7(b), (c)の黒矢印）。さらに、EG ベースのオルガノソルブ処理物表面にはナノスケールの小孔が確認された（white arrow in Fig. 7 (c)）。Teramoto ら (2007) は、EtOH 蒸煮ユーカリ材表面に、ナノスケールの小孔を多数確認しており、これらの小孔が酵素のアクセスibilityを高めたと考察している。本研究でも、ボールミル処理無しのオルガノソルブ処理では、EtOH ベースより EG ベースの糖化率が高く、ナノスケールの小孔が酵素糖化性向上に寄与すると示唆される。*Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼの主要酵素である cellobiohydrolase I (CBH I) の大きさは、4-18 nm と考えられており (Lee and Woodward, 2000; Igarashi et al., 2009)、本研究で用いた *Acremonium cellulolyticus* 由来のアクリモザイムも同様の酵素を含んでいる。先述のナノスケールの小孔は、セルラーゼの侵入を容易にし、前処理物内部のセルロースを糖化するのに役立っていると考えられる。

以上の結果から、アルコールオルガノソルブ処理と短時間ボールミル処理の組み合わせは、ヒノキ中のリグニン-炭水化物間の結合開裂や、ナノスケールの小孔および溝の形成という物理化学的な性質変化を引き起こすことで、酵素糖化性を高めていると考えられる。本研究は、バイオエタノール製造の原料として難分解性のヒノキを利用できる可能性を拓げるものである。

表 1 アルコールオルガノソルブ処理条件

Solvents	Temperature (°C)	Time (h)	Max. pressure (MPa)	Solid recovery (%)	Severity $R'0$
Raw JC	-	-	-	100	-
W100/AA1	170	0.5	1.1	83.6	8.51E-02
W75/EtOH25/AA1	170	0.5	1.0	84.1	5.13E-02
W50/EtOH50/AA1	170	0.5	1.1	89.0	1.74E-02
W25/EtOH75/AA1	110	0.5	0.6	97.5	1.03E-04
W25/EtOH75/AA1	140	0.5	0.8	98.0	7.88E-04
W25/EtOH75/AA1	170	0.5	1.3	94.0	6.03E-03
W25/EtOH75/AA1	200	0.5	2.5	86.9	4.61E-02
W25/EtOH75/AA1	230	0.5	4.4	69.9	3.52E-01
W75/EG25/AA1	170	0.5	0.5	88.0	9.33E-02
W50/EG50/AA1	170	0.5	0.7	82.5	7.94E-02
W25/EG75/AA1	110	0.5	0.4	98.3	1.21E-03
W25/EG75/AA1	140	0.5	0.4	95.6	9.26E-03
W25/EG75/AA1	170	0.5	0.7	85.5	7.08E-02
W25/EG75/AA1	200	0.5	0.8	75.0	5.41E-01
W25/EG75/AA1	230	0.5	1.1	65.8	4.14E+00

初期圧力は窒素ガスを用いて、0.2 MPaに設定した。各アルファベット表記を以下に示す。

無処理ヒノキ (125-500 μm): Raw JC; 蒸留水: W; エタノール: EtOH; エチレングリコール: EG

アルファベット横の数字は混合比率を示す。

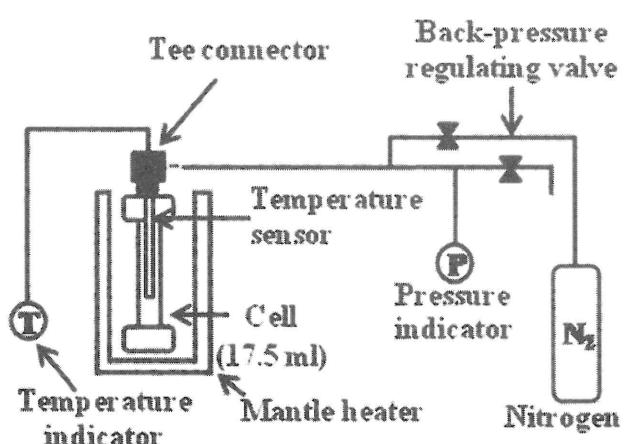


図 1 オルガノソルブ処理反応装置図

マントルヒーターを装着した内容量 17.5 mL の SUS316 製セル（内径: 1 cm; 長さ: 25 cm）を使用。

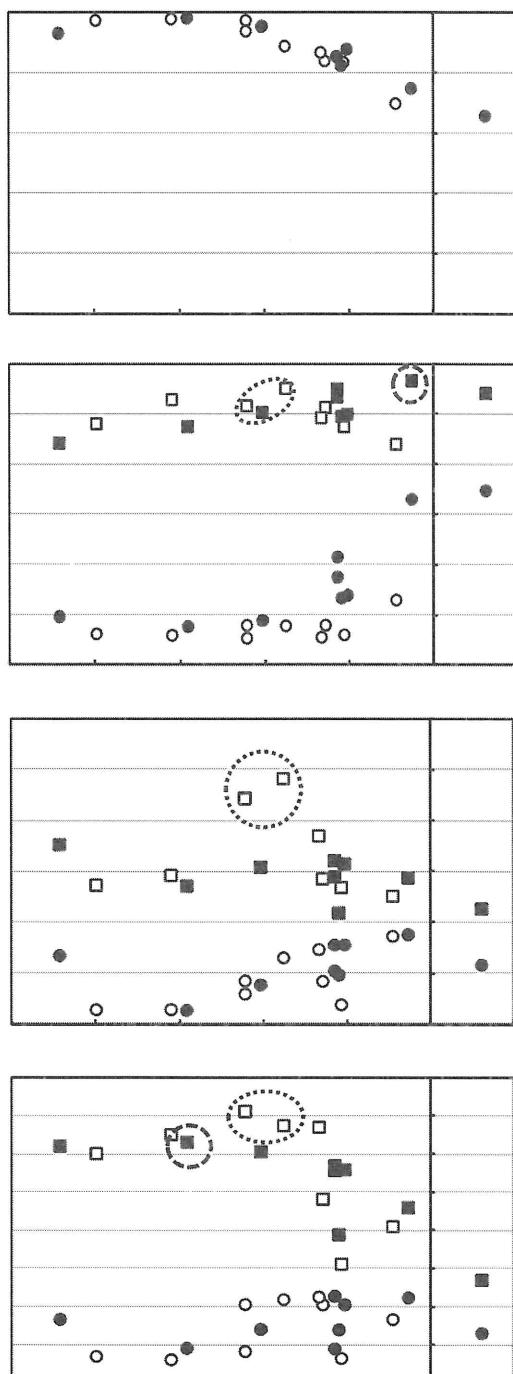


図 2 ヒノキ酵素糖化および固体分収率に対するアルコールオルガノソルブ処理の影響

○: W75/EtOH25/AA1; □: W75/EG25/AA1; ●: W75/EtOH25/AA1 のボールミル処理物(10 min);
■: W75/EG25/AA1 のボールミル処理物(10 min)

オルガノソルブ処理反応条件: 170°C, 30 min

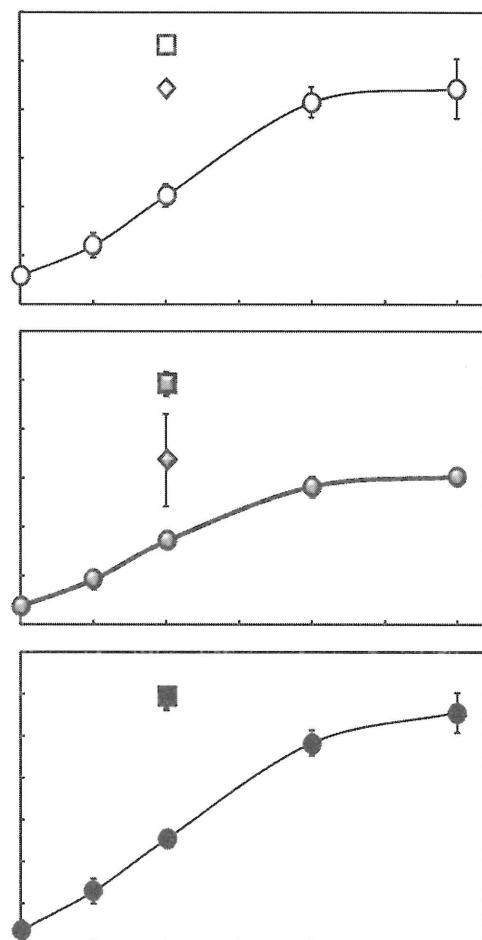


図3 ヒノキ酵素糖化におけるボールミル処理に対するアルコールオルガノソルブ処理の効果

○, ●, ■: ボールミル処理物のグルコース収率; キシロース収率; マンノース収率

□, ◻, ■: ボールミル処理前に W25/EtOH75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理 (140°C, 30 min) を組み合わせた処理物のグルコース収率; キシロース収率; マンノース収率

◇, ◆: ボールミル処理前に W25/EG75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理 (170°C, 30 min) を組み合わせた処理物のグルコース収率; キシロース収率; マンノース収率

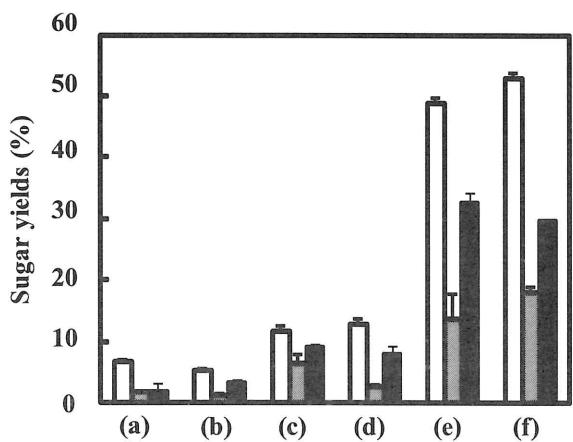


図4 各種ヒノキ試料の酵素糖化試験

□: グルコース收率; ■: キシロース收率; ▨: マンノース收率

(a)無処理ヒノキ; (b) W25/EtOH75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理物 (140°C, 30 min); (c) W25/EG75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理物 (170°C, 30 min); (d) ボールミル処理物(10 min); (e) (b)のボールミル処理物(10 min); (f) (c) のボールミル処理物(10 min)

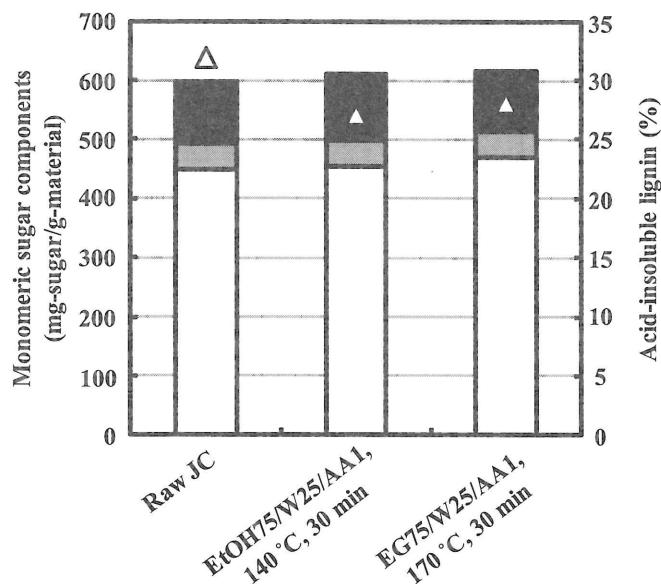


図5 各種ヒノキ試料の構成糖組成およびクラーソンリグニンの割合

□: グルコース; ■: キシロース; ▨: マンノース; △: クラーソンリグニン

(a)無処理ヒノキ; (b) W25/EtOH75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理物 (140°C, 30 min); (c) W25/EG75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理物 (170°C, 30 min)

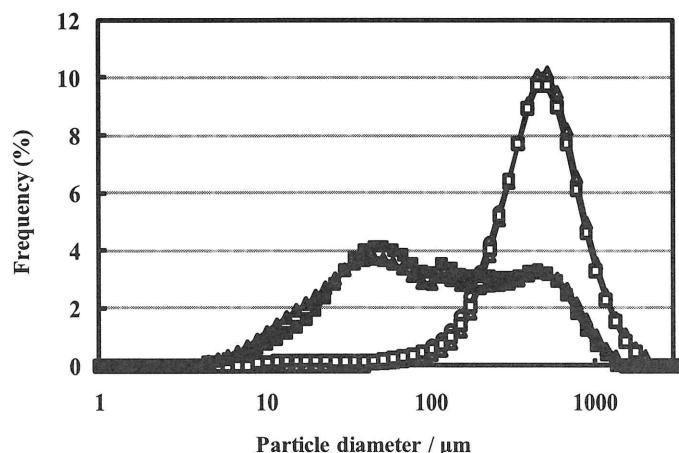


図 6 各種ヒノキ試料の粒子サイズ分布

○: 無処理ヒノキ; △: W25/EtOH75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理物 (140°C, 30 min);
 □: W25/EG75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理物 (170°C, 30 min); ▲: △のボールミル処理物(10 min); ■: □のボールミル処理物(10 min)

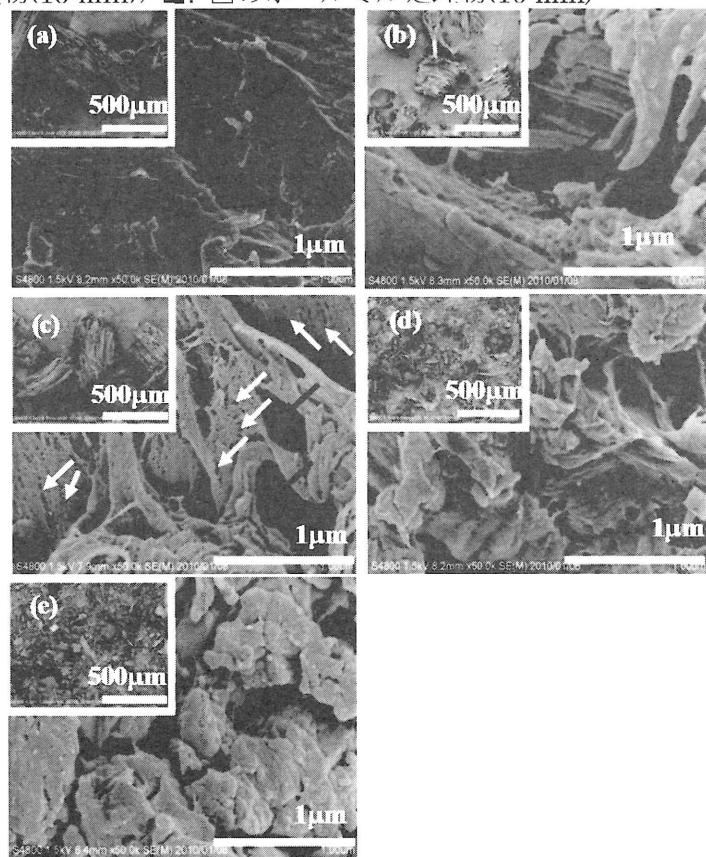


図 7 各種ヒノキ試料表面の電界放出型電子顕微鏡写真

(a)無処理ヒノキ; (b) W25/EtOH75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理物 (140°C, 30 min); (c) W25/EG75/AA1 混合溶媒によるオルガノソルブ処理物 (170°C, 30 min); (d) (b)のボールミル処理物 (10 min); (e) (c) のボールミル処理物(10 min)

(2) ヒノキ高効率酵素糖化の為の微量酸添加オルガノソルブ処理の検討

(2) 2. 材料および方法

(2) 2.1 ヒノキ

(1) 2.1 と同様の試料を用いた。

(2) 2.2 微量酸添加アルコールオルガノソルブ処理

約 15 g のヒノキサンプル及び各種反応溶媒 80 mL を入れたガラス内筒(100 cm³) を、TPR-1 型ポータブルリアクター(耐圧硝子工業株式会社) の金属容器に入れ、リアクター内部のヘッドスペースを窒素で置換し、温度コントローラーを用いて種々の温度(140~200°C)、時間(30~60 min) で反応を行った後、空冷した。反応溶媒はメタノール(MeOH)、エタノール(EtOH)、エチレングリコール(EG)、水(W)の混合溶媒をそれぞれ用いた。触媒としては、微量の酢酸(AA)、塩酸(HCl)、硫酸(H₂SO₄) を用いた。約 400 mL のエタノールを用いてサンプルの洗浄および吸引濾過を行い、残渣を回収し、55°C、20~21 時間の真空乾燥を行った後、重量を測定し、固体分収率を求めた。各反応条件および固体分収率を表 2 に示す。なお、反応溶媒および反応条件は、ガラス管を用いた予備実験により、それぞれ最適化されたものを使用した。一部のサンプルは微粉碎処理を行う為に、サンプル約 1.8 g、ボール(直径 5 mm) 約 90 g を用いて、400 rpm, 10 min でボールミル処理を行った。各処理物の構成糖組成およびクラーソンリグニン分析は、(1) 2.7 と同様に行った。

(2) 2.3 市販糖化酵素による加水分解試験

市販酵素 Acremozyme(明治製菓株式会社) 及び Accellerase1500 (Genencor 社) を用いて (1) 2.3 の方法と同様に前処理物の糖化試験を行った。酵素糖化の経時変化を測定する場合は、100 mL 容エレンマイヤーフラスコに基質 6 g 及び酵素蛋白質量 0.24 g となるように調製した酵素液(40 mg·protein/g·substrate) を 60 mL 入れ、45°C、72 時間、150 rpm の攪拌振とう反応を行った。反応液は遠心分離(20,000 g、10 min) の後、上清を適宜希釈し、(1) 2.3 と同様に HPLC による生成糖の分析を行った。Acremozyme および Accellerase1500 の各酵素比活性を表 3 に示す。

(2) 2.4 FE-SEM 観察

各種ヒノキ試料を四酸化オスミウムで処理した後、(1) 2.5 の方法と同様に観察した。

(2) 2.5 X 線結晶回折分析

約 100 mg の試料を、高圧ポンプを用いて錠剤状に成形した後、Rigaku RINT-TTR3 X-ray diffractometer (Rigaku Co., Tokyo, Japan)を用いて X 線結晶回折分析を行った。X 線源として、CuK α を用いて、50 kV、300 mA で照射し、スキャンレンジ 2-60°、スキャンスピード 2°/ min で測定した。得られた回折強度から、Segal ら(1959)の方法に従い、式(4)を用いて結晶化度 (Crystallinity index: CrI)を求めた。

$$\text{結晶化度(CrI \%)} = [(I_{002} - I_{\text{am}})/I_{002}] \times 100 \quad (4)$$

I_{002} : $2\theta = 22.5^\circ$; I_{am} : $2\theta = 18.7^\circ$

(2) 2.6 耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* による同時糖化発酵試験

同時糖化発酵試験では、オルガノソルブ処理物入りの滅菌済み液体培地 60 mL が入った 100 mL 容エルレンマイヤーフラスコに、耐熱性酵母 *K. marxianus* NBRC1777 株の前培養液を接種し、0.2 μm フィルター滅菌済みの酵素液(Accellerase1500, 40 mg·protein/g·substrate) を添加後、43°C、150 rpm の攪拌振とう培養を行い、各培養時間毎(3, 6, 12, 24, 48, and 72 h)に 500 μL ずつサンプリングした。培養液は遠心分離(20,000 g, 10 min) の後、上清を適宜希釀し、Aminex HPX-87H カラム (BioRad Co.)を装着した HPLC (JASCO Co.)によりエタノール濃度を分析した。カラムオーブンは 60°C に設定し、溶離液として 10 mM H₂SO₄を用いて、流速 1 mL/ min で測定した。

(2) 3. 結果および考察

(2) 3.1 微量酸添加アルコールオルガノソルブ処理物の主要組成

微量酸添加アルコールオルガノソルブ処理物の構成糖組成およびクラーソンリグニン割合を図8に示す。本実験では、ポータブルリアクターを用いて、(1)の系のスケールアップを行った為、(1)で用いた混合溶媒および酢酸と同じ組成(W25/EtOH75/AA1, 140°C, 30 min および W25/EG75/AA1, 170°C, 30 min)の結果も併せて示す。本実験結果においても、図5で示した試料の分析結果とほぼ同様の結果が得られ、スケールアップが問題無く行えたことを示した。一方で、酸を微量添加したオルガノソルブ処理物では、キシロースやマンノース等のヘミセルロース由来の構成糖が大きく減少(硫酸添加)または消失した(塩酸添加)。その分、セルロース由来の構成糖であるグルコースの割合が増加した。硫酸添加のオルガノソルブ処理物(EtOH50/W50/SA0.05)では、ヘミセルロース由来の構成糖とともにクラーソンリグニンも減少したが、MeOHベースの塩酸添加処理物(MeOH50/W50/HCl0.4)のクラーソンリグニンの割合は、生ヒノキとほぼ同じであった。しかし、EtOHベースの塩酸添加処理物(EtOH50/W50/HCl0.4)では、クラーソンリグニンの割合も減少しており、ヘミセルロースと共にリグニンの溶出も大きいことが明らかになった。

Lavarack ら(2002)の報告によれば、キシラン分解に関して、塩酸の触媒活性は硫酸のそれより低い。本実験結果においても、硫酸添加処理物においてマンノースの存在は確認されたものの、キシロースは確認できなかった。しかしながら、微量の塩酸添加(0.4%, equal to approximately 0.1 N)においては、ヘミセルロース由来のキシロースおよびマンノースが完全に消失し、相対的にセルロース由来のグルコースの割合が増加した。以上の結果を鑑みると、塩酸はマンノースを構成单糖とするヒノキのヘミセルロース分解活性が高いと考えられる。EtOH50/W50/SA0.05 および

EtOH50/W50/HCl0.4 のクラーソンリグニンの割合は、他の試料よりも少ないという結果から、リグニンの溶解性は溶媒にも影響を受けており、リグニンの溶解力は、 MeOH よりも EtOH の方が高いと考えられる。既報によれば、オルガノソルブ処理は、リグニン・炭水化物やリグニン間の化学結合を開裂および有機溶媒によるリグニンの溶解によって、リグノセルロースの脱リグニンを引き起こす (McDonough, 1993; Sarkanyen, 1990)。ヒノキを用いた本研究においても、同様の現象を確認した。

(2) 3.2 微量酸添加アルコールオルガノソルブ処理物の酵素糖化

微量の酸を添加したオルガノソルブ処理物の酵素糖化の結果を図 9 に示す。無処理ヒノキはほとんど糖化せず、低いグルコース濃度のままであった。72 時間後の糖化液の濃度では、 EtOH50/W50/HCl0.4 の結果が最も高く、40 g/L に達し、酢酸添加オルガノソルブ処理 (EtOH75/W25/AA1 および EG75/W25/AA1) とボールミル粉碎処理を組み合わせた二種の約 2 倍の濃度であった (図 9(a))。ボールミル処理を組み合わせた処理物は、糖化速度が早いものの、20~25 g/L で頭打ちとなった。しかしながら、固体分収率を考慮した糖収率では、 EtOH75/W25/AA1 および EG75/W25/AA1 の二種は、72 時間後に 40~45% にまで達した。一方で、 EtOH50/W50/HCl0.4 のグルコース収率は反応時間と伴に緩やかに増加し続け、72 時間で先述のボールミル処理物の収率に追いつき、その後約 60% まで達した。興味深い事に、 MeOH ベースの MeOH50/W50/HCl0.4 は緩やかに増加し続けるものの、最終的に 30% 未満の収率であり、溶媒による違いが顕著に示される結果となった。このような微量塩酸添加のオルガノソルブ処理における溶媒の影響を示した研究例はほとんど無く、重要な知見といえる。本研究は、木質バイオマスの酵素糖化を高める為のオルガノソルブ処理に用いる溶媒として、 EtOH をベースに微量塩酸を添加した混合溶媒が適している事を示した最初の例である。(1) 混合溶媒によるアルコールオルガノソルブ処理および短時間ボールミル処理の組み合わせの検討では、ボールミル処理時間を 1/2~1/3 まで短縮できたが、ボールミル処理はオルガノソルブ処理に比べ高消費エネルギー型処理である為、オルガノソルブ処理のみで高糖化率を得る本手法の意義は大きい。

(2) 3.3 市販酵素二種による糖化率の違い

本研究「(1) 混合溶媒によるアルコールオルガノソルブ処理および短時間ボールミル処理の組み合わせ」では、糖化酵素として Acremozyme(明治製菓株式会社)を中心を使ってきた。本酵素は我が国で育種された *A. cellulolyticus* TN 株由来であり、従来の *T. reesei* 由来の市販酵素より、 β -glucosidase 比活性や耐熱性が高いことで知られている。そのため、50°C付近で長時間の糖化を行っても、セロビオースの蓄積が少なく効率良くセルロースを糖化できる。しかし、最近になり世界的な酵素メーカーが *T. reesei* の遺伝子工学的育種や培養法の開発等を行い、従来よりも β -glucosidase 比活性が高い酵素の生産や、大幅な低コスト化を実現している。そこで、2009 年に Genencor 社が発売した Accellerase1500 を用いて、これまでの前処理物に対する糖化試験を行った結果を図 10 に示す。生ヒノキや、酢酸添加オルガノソルブ処理及びボールミル処理を組み合わせた処理物 ($\text{EtOH75/W25/AA1_B10}$ および EG75/W25/AA1_B10) に対しては Acremozyme に比べ Accellerase1500 の方が高いグルコース収率であったが、その差は小さかった。一方、微量の塩酸添加オルガノソルブ処理物 (MeOH50/W50/HCl0.4 および EtOH50/W50/HCl0.4) に対しては、Accellerase1500 を用いることで、Acremozyme よりも確実に高い糖化率が得られ、ボールミル処理と同等以上のグルコース収率が得られた。微量の酸を添加したオルガノソルブ処理物、特に EtOH50/W50/HCl0.4 に対しては Accellerase1500 が有効であることが示された。

EtOH50/W50/HCl0.4 は、セルロース主体の残渣であるため(図 8)、Acremozyme よりも β -glucosidase 比活性の高い Accellerase1500 (表 3) が適していると考えられる。

(2) 3.4 X 線結晶回折解析

各種ヒノキ試料の X 線回折強度スペクトラムを図 11 に示す。酢酸添加オルガノソルブ処理とボールミル粉碎処理を組み合わせた二種(EtOH75/W25/AA1_B10 および EG75/W25/AA1_B10)のピークは緩やかであった。一方で、無処理ヒノキおよび微量塩酸添加のオルガノソルブ処理物二種(MeOH50/W50/HCl0.4 および EtOH50/W50/HCl0.4)のピークはシャープであった。図には示していないが、ボールミル処理をしていない酢酸添加オルガノソルブ処理物二種(EtOH75/W25/AA1 および EG75/W25/AA1)のピークも、ほぼ無処理ヒノキと同様の形状であった。これら回折強度から算出された結晶化度(CrI %)を表 4 に示す。ピーク形状が緩やかであった EtOH75/W25/AA1_B10 および EG75/W25/AA1_B10 の結晶化度は無処理ヒノキの半分強の値しかなく、大幅な結晶化度の低下が示された。一般的にボールミル処理物については、結晶化度の低下と糖化性の向上に正の相関関係がある。しかし、セルロースの酵素糖化に関わる要素は複雑であり、結晶化度の影響だけで考察するのは適切でないという報告もある(Park et al., 2010)。実際、オルガノソルブ処理物全てにおいて無処理ヒノキよりもわずかに高い結晶化度の値を示した。Hideno ら(2009)は、稻わらの水熱処理物について、見かけの結晶化度が増加することを報告している。本研究から、水熱処理やオルガノソルブ処理等の溶媒中で加熱する処理は、酵素糖化性を高めるが、見かけの結晶化度も高めることができた。これは、オルガノソルブ処理や水熱処理によって、リグノセルロース表面のヘミセルロースやリグニンといった非結晶物が除去されることで、高結晶性セルロースが露出されることによって引き起こされると考えられる。以上の結果を踏まえると、EtOH50/W50/HCl0.4 等の高結晶性セルロースが露出した試料の糖化には、cellobiohydrolase 活性や β -glucosidase 活性が求められ、実際にこれらの条件を満たす酵素組成になっている Accellerase1500 が適していた。

(2) 3.5 ヒノキ前処理物表面の形態観察

微量塩酸オルガノソルブ処理物の FE-SEM 写真を図 12 に示す。(1) 3.5 でも示したように無処理ヒノキの表面は滑らかで、小孔や異物は見当たらない。一方で、微量塩酸オルガノソルブ処理物の表面には、いくつかの球体(100 nm~5 um)が確認できた(白矢印)。Selig らの報告(2007)によると、この球体はリグニンが変性して表面に溶出し、固化したものであり、リグニン球と呼ばれる。興味深い事に、MeOH50/W50/HCl0.4 試料表面のリグニン球は破損しているものが多いが、EtOH50/W50/HCl0.4 試料表面のリグニン球はほとんど壊れておらず、表面が滑らかであった。オルガノソルブ処理で用いる溶媒によって、リグニン球の強度や化学的性質が異なるのかもしれない。リグノセルロース表面上に存在するリグニン球は、酵素糖化に対して負の影響があると考えられている(Selig et al., 2007)。MeOH50/W50/HCl0.4 試料表面のリグニン球が破損して出来たと思われる細かい欠片が、表面を覆っており、EtOH50/W50/HCl0.4 試料に比べて糖化率が低い要因となっているかもしれない。Li らの報告(2012; SFBC abstract)では、このリグニン球は酵素のプロセッシングを強く阻害するものの、表面上の付着は強固でない為、酵素量を増やすか、糖化時間を長くすることによって、リグニン球が少しづつ剥離し、糖化率が増加するとしている。最近、Igarashi ら(2011)は、高速原子間力顕微鏡を用いて、*T. reesei* の cellobiohydrolase I (TrCel7A) 分子がセルロース表面を加水分解しながら移動する姿を動画で示している。その動画には、セルロース表面の”ささくれ”だった部位に TrCel7A 分子が、

交通渋滞のように次々と蓄積していき、さらに TrCel7A 分子数を増やしてやると、”ささくれ”が取れ、一気に TrCel7A 分子の移動が進む姿が映されていた。これらの報告と本研究結果から、MeOH50/W50/HCl0.4 試料表面上のリグニン球破損物は、セルラーゼ分子の交通渋滞を引き起こしていると推察される。一方で、MeOH50/W50/HCl0.4 試料表面をさらに高倍率で観察すると、ナノスケールの小孔が無数にあり、その小孔の奥にセルロースナノファイバーが確認できた(図 12 (e))。このナノスケールの小孔により、内部にまでセルラーゼ分子が到達でき、無処理ヒノキに比べ大幅な糖化率増加を示したと考えられる(図 9, 10)。一方、EtOH50/W50/HCl0.4 試料表面には、セルロースナノファイバーが露出している部位があった(図 12 (f))。この表面に露出したセルロースナノファイバーは、結晶化度の増加(表 4)を裏付けるものであると同時に、MeOH50/W50/HCl0.4 試料に比べ糖化率を高める(図 9, 10)要因の一つであると示唆される。本研究結果は、オルガノソルブ処理で用いる溶媒や微量の酸によって、試料表面のナノスケール構造が異なり、その違いによって酵素糖化が大きく影響されることを示すものである。

塩酸は、脱リグニンおよびヘミセルロース分解に関して優れた触媒である為、塩酸を用いた処理によってヘミセルロースおよびリグニンを溶出でき、さらに大部分のセルロースを処理残渣中に残すことができる(Zhao et al., 2009)。これまでの研究報告から、Li らは、脱ヘミセルロースおよび脱リグニンの割合と酵素糖化性の増加に綺麗な正の相関関係があると報告している(2012)。しかしながら、ボーリミル処理物はヘミセルロースおよびリグニンをほぼ完全に含んだ状態であるにも関わらず、高い糖化率を示す。従来の研究では、ボーリミル処理物の結晶化度の低下が、酵素糖化性の増加の要因として説明してきた。しかし、本研究結果において高い糖化率を示した微量塩酸添加オルガノソルブ処理物(MeOH50/W50/HCl0.4 および EtOH50/W50/HCl0.4)の結晶化度は高い(表 4)。さらに、本処理物は、リグニンを 26% も含んでおり(図 1)、これは約 70% のリグニンが残存した状態である。同様に、Huijgen ら(2012)は、リグニンが多く残存している基質でも、キシランの減少およびリグニンの変性によって、酵素糖化性が増加したと報告している。このパラドックスは、図 12 で示した FE-SEM の写真によって説明することができる。すなわち、微量塩酸添加のオルガノソルブ処理によって、リグニンの変性(リグニン球の形成)に続き、試料表面のナノスケール構造が大きく変化し、セルロースナノファイバーが露出することで、結晶化度と伴に酵素糖化性を大きく増加させたと考えられる。我々の研究結果は、リグノセルロースの酵素糖化において、約 4-18 nm のセルラーゼ分子がアタックできる基質表面のナノスケール構造を最も重要な因子として提案するものである。

(2) 3.6 耐熱性酵母 *K. marxianus* による同時糖化発酵試験

これまでの検討から得られたヒノキ前処理物が、糖化だけでなく、発酵も問題無く行える原料であることを示す為、耐熱性酵母 *K. marxianus* および Accellerase1500 を用いた同時糖化発酵試験を行った。予備実験により、グルコース(20g/L)を炭素源として *K. marxianus* NBRC1777 株を 45°C で培養すると 24 時間以内に全グルコースを消費し、理論収率に近い効率でエタノール発酵を行うことが可能であった。しかし、セルロース粉末を炭素源として同時糖化発酵を 45°C で行ったところ、48 時間以降、培養液中にグルコースが蓄積し始め、エタノール発酵が停止した為、ヒノキ前処理物を原料にした同時糖化発酵では、43°C、72 時間とした。ヒノキ前処理物を原料にした同時糖化発酵の生成エタノール濃度の経時変化を図 13 に示す。無処理ヒノキをネガティブコントロールとして用いた。最も糖化率が高く、生成糖濃度も高かった EtOH50/W50/HCl0.4 試料を用いた培養で、最も高濃度のエタノールを生成し(22.1 g/L)、糖化および発酵も問題無く行える原料であることを示した。エタノール生成速度で比較すると、酵素糖化の同様、酢酸添加オルガノソルブ処理(EtOH75/W25/AA1 およ

び EG75/W25/AA1)とポールミル粉碎処理を組み合わせた二種が他の試料よりも短時間(24 時間)で定常値に達した。一方、EtOH50/W50/HCl0.4 試料では緩やかにエタノールを生成し続け、その濃度は 48 時間でポールミル処理試料を上回った。以上の結果は、図 9 に示した酵素糖化の傾向と類似しており、同時糖化発酵のエタノール生成効率は原料の糖化率に大きく依存していることを示唆している。さらに糖化率は、前処理に大きく依存している為、前処理法の開発は最終産物のエタノール生成に大きな影響を与える。本研究で開発した微量塩酸添加のオルガノソルブ処理法は、木質系バイオマスからの第二世代バイオエタノール生産に有効であり、特に難分解性のヒノキを利用する可能性を拓げるものである。

表2 オルガノソルブ処理条件および固形分収率 (Solid recovery)

Solvents	Acids (%)	Time (min)	Temp. (°C)	Max pressure (Mpa)	Solid recovery (%)
EtOH75/W25/AA1	1	30	140	0.9	97.00
EG75/W25/AA1	1	30	170	0.5	91.45
EtOH50/W50/SA0.05	0.05	60	200	2.4~2.5	65.02
MeOH50/W50/HCl0.4	0.4	45	170	1.5	51.61
EtOH50/W50/HCl0.4	0.4	45	170	1.5	47.73

AA:酢酸; SA: 硫酸; HCl: 塩酸; EtOH: エタノール; EG: エチレングリコール; MeOH: メタノール
略字横の数字は、混合比率を示す。

表3 Acremozyme および Accellerase1500 に含まれる各酵素の比活性

	Cellulase (FPU/mg)	CMCase (IU/mg)	β-glucosidase (CBU/mg)	Xylanase (IU/mg)	β-xylosidase (IU/mg)
Acremozyme	0.57	7.15	1.74	61.49	9.29
Accellerase 1500	0.57	9.16	2.98	20.26	29.89

表4 各ヒノキ試料の結晶化度

Sample	CrI (%)
Raw JC	60.2
EtOH75/W25/AA1	65.1
EG75/W25/AA1	69.5
EtOH75/W25/AA1_B10	33.3
EG75/W25/AA1_B10	34.1
MeOH50/W50/HCl0.4	78.5
EtOH50/W50/HCl0.4	80.9

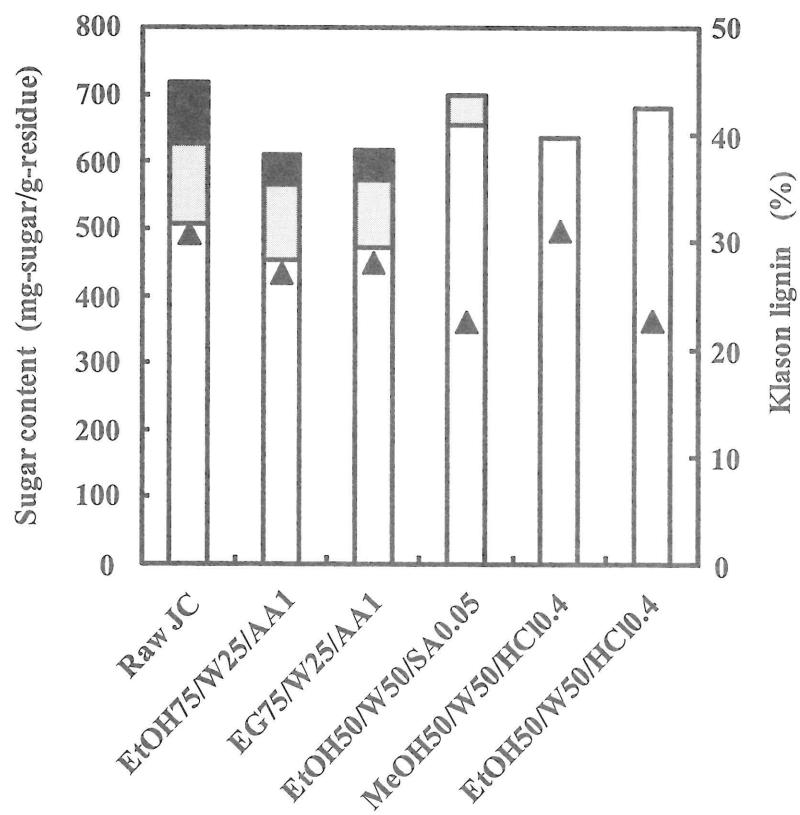


図8 各ヒノキ試料の構成単糖組成およびクラーソンリグニンの割合

□: グルコース; ■: キシロース; ▨: マンノース; ▲: クラーソンリグニン

各試料の表記は表 2 参照。

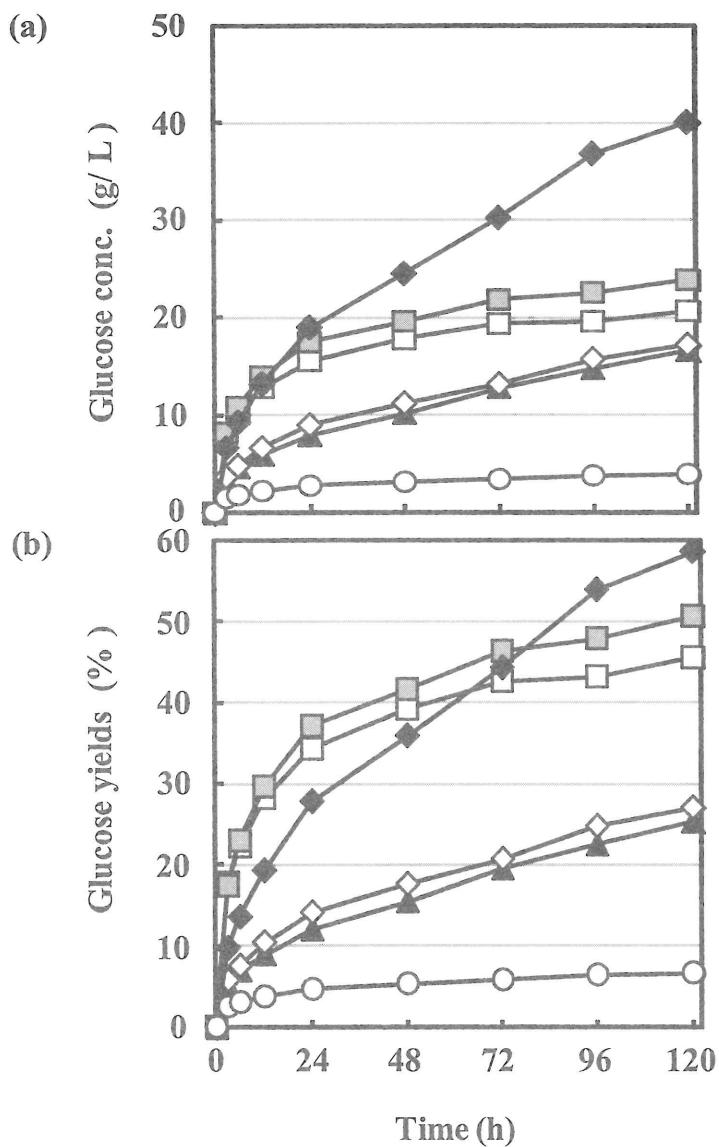


図9 Acremozymeによる各ヒノキ試料の酵素糖化試験

(a) グルコース濃度の経時変化、(b) 固形分収率を考慮したグルコース収率の経時変化

○: 無処理ヒノキ; ▲: EtOH50/W50/SA0.05; ◇: MeOH50/W50/HCl0.4; □: EtOH75/W25/AA1_B10; ■: EG75/W25/AA1_B10; ◆: EtOH50/W50/HCl0.4

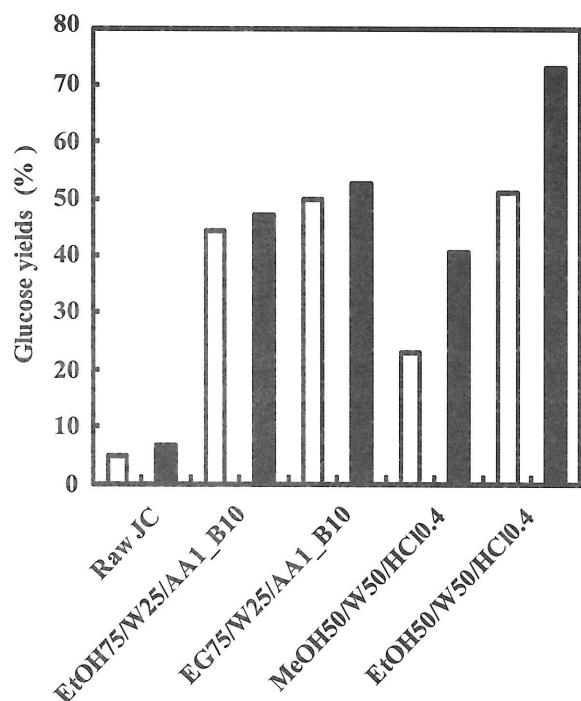


図 10 Acremozyme および Accellerase1500 の各ヒノキ試料の酵素糖化試験の比較

□:Acremozyme; ■: Accellerase1500

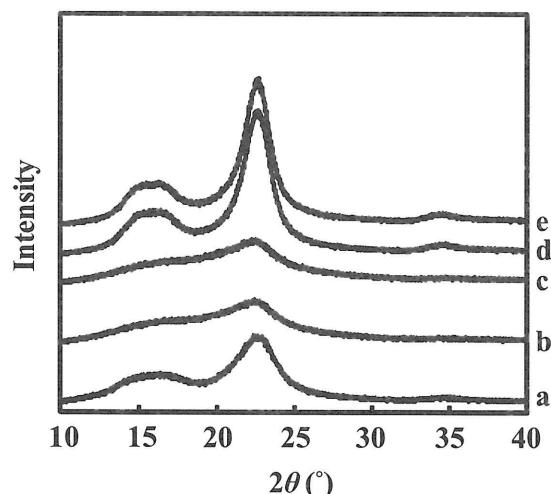


図 11 各ヒノキ試料の X 線結晶回折強度スペクトラム

a: 無処理ヒノキ; b: EtOH75/W25/AA1_B10; c: EG75/W25/AA1_B10; d: MeOH50/W50/HCl0.4; e: EtOH50/W50/HCl0.4

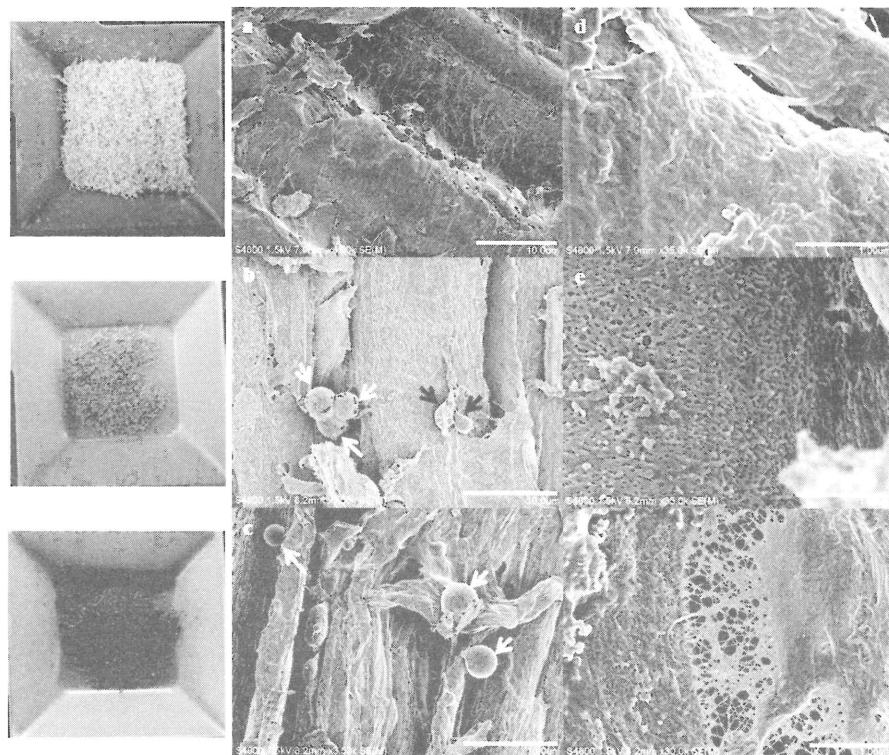


図 12 微量塩酸オルガノソルブ処理ヒノキの概観およびFE-SEM写真

(a) 無処理ヒノキ ($\times 3,000$), (b) MeOH50/W50/HCl0.4 ($\times 3,000$), (c) EtOH50/W50/HCl0.4 ($\times 3,000$),
 (d) 無処理ヒノキ ($\times 30,000$), (e) MeOH50/W50/HCl0.4($\times 30,000$) and (f)
 EtOH50/W50/HCl0.4($\times 30,000$).

(a)-(c)のスケールバー: 10 μm ; (d)-(f)のスケールバー: 1 μm

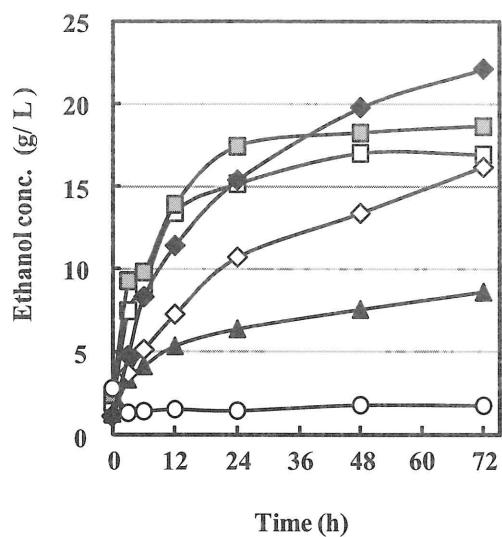


図 13 耐熱性酵母を用いた同時糖化発酵の生成エタノール濃度 (g/L)の経時変化

○: 無処理ヒノキ; ▲: EtOH50/W50/SA0.05; ◇: MeOH50/W50/HCl0.4; □: EtOH75/W25/AA1_B10; ■: EG75/W25/AA1_B10; ◆: EtOH50/W50/HCl0.4

4. 結論

木質バイオマスとしてヒノキを用いて、エタノール、エチレングリコール、水の混合溶媒を用いて種々の条件にて処理し、それらをセルラーゼにより糖化することにより、前処理の反応条件について検討を行った。その結果溶媒組成が W25/EtOH75/A1 では、140°C、W25/EG75/A1 では 170°C の反応条件において前処理を行い、さらに短時間のボールミル処理を行うことにより、高い単糖収率が得られることが判明した。しかしながら、ボールミル処理はオルガノソルブ処理に比べ高消費エネルギー型処理であり、オルガノソルブ処理のみで高糖化率を得る処理法の開発が必要である。そこで、微量の酸を添加したオルガノソルブ処理の検討および酵素の至適化を行った結果、微量の塩酸を添加した EtOH50/W50/HCl0.4 の溶媒を用いた処理物に対し、Accellerase1500 を用いて酵素糖化することで、酢酸添加オルガノソルブ処理にボールミル粉碎処理を組み合わせと同等以上のグルコース収率を達成した。さらに、X 線結晶回折解析および FE-SEM による表面形態観察によって、本処理物の物性を明らかにし、リグノセルロースの酵素糖化に重要な因子として、リグニンの変性および表面のナノスケール構造変化を提案した。本研究で提案したこれらの因子は、従来の研究で報告されてきた結晶化度や脱リグニン度の矛盾を解消するものであり、意義深い学術的知見であると同時に、リグノセルロースの利用に大きく貢献するものである。最終的に微量塩酸添加オルガノソルブ処理ヒノキを原料として、耐熱性酵母を用いた同時糖化発酵により、高効率なエタノール生成に成功し、これまで利用されてこなかったヒノキからの第二世代バイオエタノール生産の可能性を拓げる研究結果となつた。

5. 謝辞

本研究は、(1) 平成 21~24 年度科学技術振興調整費「若手研究者の自立的研究環境整備促進」プログラム、(2) 平成 22 年度環境省循環型社会形成推進科学研究費補助金、(3) 平成 22 年度松籟科学技術振興財団研究助成金、(4) 平成 22~24 年度科学研究費補助金（若手 B, 22780292）の支援で行われた。酵素については、明治製菓株式会社、ジェネンコア協和株式会社、ノボザイム・ジャパン株式会社、新日本化学株式会社、阪急バイオインダストリー株式会社、産業技術総合研究所 井上宏之研究員、愛媛大学 渡辺誠也准教授に供与して頂いた。ここに記して謝意を表する。

6. 参考文献

1. Ahmed, S., Capart, R., 2002. Liquefaction of wood in two successive steps: solvolysis in ethylene-glycol and catalytic hydrotherm. *Appl. Energy* 72, 631-644.
2. Alvira, P., Pejóa, E.T., Ballesterosa, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851-4861.
3. Angles, M.N., Ferrando, F., Farriol, X., Salvado, J., 2001. Suitability of steam exploded residual softwood for the production of binderless panels. Effect of the pre-treatment severity and lignin addition. *Biomass Bioener.* 21, 211-224.
4. Ballesteros, I., Oliva, J.M., Navarro, A.A., Gonzalez, A., Carrasco, J., Ballesteros, M., 2000. Effect of Chip Size on Steam Explosion Pretreatment of Softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86, 97-110.
5. Donohoe, B.S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2008. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 913-925.
6. Endo, T., 2009. Bioethanol production from woods with the aid of nanotechnology. *Synthesiology* 2, 310-320.
7. Esteghlalian, A., Hashimoto, A.G., Fenske, J.J., Penner, M.H., 1997. Modeling and optimization of the dilute sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresour. Technol.* 59, 129-136.
8. Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C., Murali, N., 2006. Biorefineries: Current status, challenges, and future direction. *Energy Fuels* 20, 1727-1737.
9. Hägerdala, B.H., Galbea, M., Grauslunda, M.F.G., Lidéna, G., Zacchia, G., 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnolog.* 24, 549-556.
10. Hallac, B.B., Sannigrahi, P., Pu, Y., Ray, M., Murphy, R.J., Ragauskas, A.J., 2010. Effect of ethanol organosolv pretreatment on enzymatic hydrolysis of *Buddleja davidii* stem biomass. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 1467-1472.
11. Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2008. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10-18.
12. Hideno, A., Aoyagi, H., Ogbonna, J.C., Tanaka, H., 2007. Utilization of Spent Sawdust Matrix after Cultivation of *Grifola frondosa* as Substrate for Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Food Sci. Technol. Res.* 13, 111-117.

13. Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T., Inoue, S., Endo, T., Sawayama, S., 2009. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresour. Technol.* 100, 2706-2711.
14. Holtzapple, M., Lundein, J.E., Sturgis, R., Lewis, J.E., Dale, B.E., 1992. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34-35, 5-21.
15. Igarashi, K., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttila, M., Samejima, M., 2009. High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase 1 on crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 25, 36186-36190.
16. Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttila, M., Ando, T., Samejima, M., 2011. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science* 333, 1279-1282.
17. Inoue, H., Yano, S., Endo, T., Sasaki, T., Sawayama, S., 2008. Combining hot compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus. *Biotechnol. Biofuel.* 1, 2.
18. Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T., 2003. Bioorganosolve pretreatment for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *J. Biotechnol.* 103, 273-280.
19. Lavarack, B.P., Griffin, G.J., Rodman, D., 2002. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass Bioener.* 23, 367-380.
20. Lee, I., Evans, B., Woodward, J., 2000. The mechanism of cellulase action on cotton fibers: evidence from atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 82, 213-221.
21. Maekawa, E., 1996. On an available pretreatment for the enzymatic saccharification of lignocellulosic materials. *Wood Sci. Technol.* 30, 133-139.
22. McDonough, T.J., 1993. The chemistry of organosolv delignification. *Tappi. J.* 76, 186–193.
23. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673-686.
24. Ohtsuki, T., Noda, S., Ui, S., 2011. Improvement of bioconversion suitability of Japanese cypress wood by combination of UV radiation, ozonization and decay treatment with white-rot and brown-rot fungi. *Canadian J. Pure Appl. Sci.* 5, 1333-1343.
25. Okuda, N., Ninomiya, K., Takao, M., Katakura, Y., Shioya, S., 2007. Microaeration enhances productivity of ethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 350-357.

26. Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X., Saddler, J., 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 473-481.
27. Papatheofanousa, M.G., Billaa, E., Koullasa, D.P., Montiesb, B., Koukios, E.G., 1995. Two-stage acid-catalyzed fractionation of lignocellulosic biomass in aqueous ethanol systems at low temperatures. *Bioresour. Technol.* 54, 305-310.
28. Park, J., Shiroma, R., Al-Haq, M.I., Zhang, Y., Ike, M., Arai-Sanoh, Y., Ida, A., Kondo, M., Tokuyasu, K., 2010. A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw - Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. *Bioresour. Technol.* 101, 6805-6811.
29. Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K., 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol. Biofuels* 3, 10.
30. Sarkanen, K.V., 1990. Chemistry of solvent pulping. *Tappi. J.* 73, 215–219.
31. Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text. Res. J.* 29, 786–794.
32. Selig, M.J., Viamajala, S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Prog.* 23, 1333-1339.
33. Sun, F., Chen, H., 2008. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. *Bioresour. Technol.* 99, 6156-6161.
34. Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.
35. Tappi Press (1992) *Tappi Test Methods*, Method T249 cm-85, Atlanta, GA
36. Teramoto, Y., Hwan, S.L., Endo, T., 2008. Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. *Bioresour. Technol.* 99, 8856-8863.
37. Teramoto, Y., Tanaka, N., Lee, S.H., Endo, T., 2007. Pretreatment of Eucalyptus wood chips for enzymatic saccharification using combined sulfuric acid-free ethanol cooking and ball milling. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 75-85.
38. Vanasse, C., Lemonnier, J.P., Eugene, D., Chornet, E., 1988. Pretreatment of wood flour slurries prior to liquefaction. *Can. J. Chem. Eng.* 66, 107-111.
39. Yamada, T., Ono, H., 2001. Characterization of the products resulting from ethylene glycol liquefaction of cellulose. *J. Jap. Wood Resear. Soc.* 47, 458-464.

40. Yanagida, T., Fujimoto, S., Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Sawayama S., 2009. Energy and economic evaluation for ethanol production of non sulfuric acid pretreatment method from rice straw. *J. Jpn. Soc. Energy Resour.* 30, 8–14.
41. Yu, G., Yano. S., Inoue, H., Inoue, S., Endo, T., Sawayama, S., 2010. Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 539-551.
42. Zhang, T., Zhou, Y., Liu, D., Petrus, L., 2007. Qualtative analysis of products formed during the acid catalyzed liquefaction of bagasse in ethylene glycol. *Bioresour. Technol.* 98, 1454-1459.
43. Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 815-827.

7. 本共同研究の主な業績

【原著論文（査読制）】

1. Akihiro Hideno, Hiroyuki Inoue, Kenichirou Tsukahara, Xu Fang, Takashi Endo, Shigeki Sawayama (2011) Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source, *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 162-168. IF: 2.367
2. Ayato Kawashima, Akihiro Hideno, Hidetaka Morita, Masayoshi Fukuoka, Katsuhisa Honda and Masayoshi Morita (2011) Dioxin-like polychlorinated biphenyl adsorbent obtained from enzymatic saccharification residue of lignocelluloses, *Bioresource Technology*, vol. 102, 4682-4687. IF: 4.980
3. Akihiro Hideno, Hiroyuki Inoue, Takashi Yanagida, Kenichiro Tsukahara, Takashi Endo and Shigeki Sawayama (2012) Combination of hot compressed water treatment and wet disk milling for high sugar recovery yield in enzymatic hydrolysis of rice straw, *Bioresource Technology*, vol. 104, 743-748. IF: 4.980
4. Akihiro Hideno, Ayato Kawashima, Masayoshi Fukuoka, Takashi Endo, Katsuhisa Honda, Masatoshi Morita (2013) Effect of alcohol organosolv treatment combined with short-time ball milling on the enzymatic hydrolysis of Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*), *Wood Science and Technology*, vol. 47: 381-393. IF: 1.727
5. Akihiro Hideno, Ayato Kawashima, Takashi Endo, Katsuhisa Honda, Masatoshi Morita (2013) Ethanol-based organosolv treatment with trace hydrochloric acid improves the enzymatic digestibility of Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) by exposing nanofibers on the surface, *Bioresource Technology*, vol.132: 64-70. IF: 4.980
6. Akihiro Hideno, Hiroyuki Inoue, Tatsuya Fujii, Shinichi Yano, Kenichiro Tsukahara, Katsuji Murakami, Harunobu Yunokawa, Shigeki Sawayama, High-coverage gene expression profiling analysis of the cellulase-producing fungus *Acremonium cellulolyticus* cultured using different carbon sources, *Appl. Microbial. Biotechnol.*, in press. (DOI : 10.1007/s00253-013-4689-0) IF: 3.613

【学術発表】

- 秀野晃大, 川嶋文人, 福岡正義, 森田英嵩, 本田克久, 森田昌敏: リグノセルロースからのバイオエタノール製造における環境低負荷型前処理条件の検討. 第5回バイオマス科学会議 発表論文集: 76-77, 2010 (東京).
- 福岡正義, 秀野晃大, 川嶋文人, 大枝剛士, 森田英嵩, 本田克久, 森田昌敏: 木質系バイオエタノール製造のための水熱前処理法及び酵素糖化法の開発. 2010年度日本農芸化学大会講演要旨集: 258, 2010 (東京).
- Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Yano, S., Fang, X., Endo, T., Sawayama, S.: Saccharolytic enzymes production from disk milling rice straw by *Acremonium cellulolyticus*. 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Abstract: 125, 2010 (USA).
- Inoue, H., Fujii, T., Hideno, A., Fang, X., Yano, S. and Sawayama, S.: Identification of the main components of cellulases and xylanases by *Acremonium cellulolyticus* grown on different carbon sources. 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Abstract: 86, 2010 (USA).
- Morita, M., Nishiyama, T., Fukuoka, M., Hideno, A., Kawashima, A., Morita, H., Kawano M. and Honda, K.: Investigation on ethanol production from woody biomass. Part2 Engineering and a system for Zero-emission, Symposium for Environmental Chemistry, 2010 (Korea).
- Nishiyama, T., Fukuoka, M., Hideno, A., Kawashima, A., Morita, H., Kawano, M., Honda, K. and Morita, M.: Investigation on ethanol production from woody biomass. Part1 Organosolvolysis for saccharification of woody material, Symposium for Environmental Chemistry, 2010 (Korea).
- 川嶋文人, 森田英嵩, 福岡正義, 秀野晃大, 本田克久, 森田昌敏: 酵素糖化リグニン残渣の還元分解による低分子化. 第6回バイオマス科学会議発表論文集: 108-109, 2011(大阪).
- 秀野晃大, 川嶋文人, 本田克久, 森田昌敏: リグノセルロースを原料にしたエタノール製造のためのAlkaline peroxide前処理法の検討. 第6回バイオマス科学会議, 発表論文集: 96-97, 2011 (大阪).
- Hideno, A., Kawashima, A., Honda, K. and Morita, M.: Investigation of alkaline peroxide treatment for enzymatic hydrolysis of Japanese cypress. 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Abstract 121, 2011 (USA).
- 秀野晃大: セルロース系バイオエタノール生産技術の開発: 前処理および糖化技術を中心として. 第20回植物バイオテクシンポジウム 植物バイオマス活用技術の新展開~異分野若手研究者からの提案~, 2011 (京都). *招待講演
- 秀野晃大, 西山達也, 川嶋文人, 本田克久, 森田昌敏: 木質系バイオエタノール製造の為の前処理法を中心とした要素技術開発. 第20回日本エネルギー学会大会講演要旨集: 154-155, 2011 (大阪).
- 秀野晃大, 川嶋文人, 森田昌敏, 本田克久, 遠藤貴士: リグノセルロース系バイオマスの高効率酵素糖化の為の前処理法の検討. 第7回バイオマス科学会議発表論文集: 102-103, 2012 (盛岡).
- 秀野晃大, 川嶋文人, 遠藤貴士, 本田克久, 森田昌敏: ヒノキ高効率酵素糖化の為のアルコールオルガノソルブ処理法の検討. 2012年度日本農芸化学大会講演プログラム集: 34-35, 2012 (京都).

14. Hideno, A., Inoue, H., Fujii, T., Yano, S. and Sawayama, S.: Analysis of gene expression in *Acremonium cellulolyticus* using High-coverage gene expression profiling (HiCEP) method. 34th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Abstract 145, 2012 (USA).
15. 森田昌敏, 川嶋文人, 秀野晃大: サツマイモを原料としたバイオエタノール生産の為の要素技術開発. 第1回環境放射能除染研究発表会講演要旨集 P. 148, 2012 (福島).
16. 秀野晃大, 川嶋文人, 森田昌敏: 木質系バイオエタノール生産の為の要素技術開発. 第1回環境放射能除染研究発表会講演要旨集 P. 41, 2012 (福島)

8. 追記

本報告書の「(1) 混合溶媒によるアルコールオルガノソルブ処理および短時間ボールミル処理の組み合わせ」および「(2) 微量酸添加オルガノソルブ単独処理の検討」は、それぞれ”Hideno et al., *Wood Science and Technology*, vol. 47: 381-393 (2013)” および”Hideno et al., *Bioresource Technology*, vol.132: 64-70 (2013)” の内容を中心にまとめたものである。

2013年2月 執筆者: 秀野晃大

麦類におけるγアミノ酪酸(GABA)の高生産に関する研究

愛媛大学農学部教授

渡 部 保 夫

株式会社マエダ代表取締役社長

前 田 耕 作

【はじめに】

γアミノ酪酸 (GABA, ギャバ) は、多様な機能性を示すアミノ酸である。脳内では興奮抑制性の神経伝達物質であり、その前駆体であるグルタミン酸は興奮性の神経伝達物質である。脳内でのこの機能の他に、経口摂取した場合、抹消神経や内蔵器官に作用した結果として血圧上昇抑制や成長ホルモン分泌促進、腎機能障害改善、精神安定化、リラックスなどの効果を示すことが例証されている。さらに、医薬品（ガンマオロン錠）として1日3グラムもの高濃度で投与されてもおり、安全性は非常に高い。これらの効能からGABAは特定保健用食品の機能成分として、「血圧が高めの方に」効果があるとする表示が、消費者庁から認められている商品もある。筆者の一人が経営している食品加工会社（株）マエダでは、大豆や小豆、麦類、米（餅米）を加工した商品を販売しているが、経営戦略としてGABAの機能性に注目した。特に、大豆を材料としてGABAを高生産する技術を開発し、「ギャバきなこ」を製品とすることを計画した。上述した通り、GABAの前駆体は旨味調味料のグルタミン酸であることから、生大豆をグルタミン酸溶液に浸漬し保温すること（グルタミン酸浸漬法と呼ぶ）でGABAを生産した。

GABAは生物に広く存在しているグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD酵素）の作用で合成されるので、生大豆でGABAを製造するためには、植物のGAD酵素の特性を精査し、最適なグルタミン酸浸漬法の条件を確立する必要がある。詳細は省略するが、GAD酵素の最適な反応条件を設定できたことに加えて、グルタミン酸浸漬の前に生大豆を70°C程度で加熱処理することが有効であることを明らかにし、比較的高濃度のGABAを含む生大豆を製造できた。

そこで、このグルタミン酸浸漬法を他の食材に応用することを考えた。本共同研究では、麦類、雑穀類を材料として、特に、はだか麦の一種、もち麦においてGABAが高生産できることを発見し、既に商品として販売していること、加えて、GABAもち麦粒、粉、エキスを用いて新しい商品開発を試みたので報告する。

【材料および方法】

はだか麦、もち麦、ヒエ、アワ、アマランサス、キビ、黒玄米、赤玄米は、株）マエダが使用している材料を用いた。グルタミン酸、ピリドキサールリン酸（PLP）などビタミンB6類は和光純薬製の特級試薬を用いた。

グルタミン酸浸漬法におけるグルタミン酸溶液は、0.5% グルタミン酸（無塩）水溶液（pH 4から5）であり、必要に応じて1mmol/L以下のビタミンB6類、ピリドキシン（PN）、PLP

を添加した。サンプル（50g）をグルタミン酸溶液（100mL）に浸漬し、室温（25°C）で所定の時間保温した後、水切りカゴを用いて水切りした。さらに、室温で一晩（15時間）保温した。この保温処理中にサンプル中に含まれているGAD酵素によりグルタミン酸からGABAが生成される。グルタミン酸浸漬処理されたサンプルは、65°Cで3時間オーブンを用いて乾燥した。

もち麦ヌカを用いたGABAエキスの製造は次のように行った。ヌカ25～35gをグルタミン酸溶液（0.5%, pH 4.5）と混合し、室温（25°C）で一晩（約15時間）保温した。懸濁液を1,000×gで10分間遠心分離し、上澄みを得た。殺菌のために120°Cでオートクレーブ処理した。

サンプル中に含まれるグルタミン酸とGABA含量は次のように測定した。乾燥サンプル10gをラボミキサーで粉体化後、30mLの2%(w/v)スルホサリチル酸溶液を加えて、高速振とう機を用いて10分間激しく攪拌し、サンプル中のアミノ酸を抽出した（同時に除タンパクを行った）。遠心分離（1,000×g, 10分間）し、上澄みを回収して、アミノ酸分析の試料とした。クエン酸緩衝液（pH 2.2, 和光純薬社製）を用いて10倍希釈した後、アミノ酸分析装置（SHIMADZU社製）を用いて、グルタミン酸とGABA量を測定した。エキスの場合は、等量の4%スルホサリチル酸を加え、アミノ酸抽出・除タンパクを行い、アミノ酸分析のサンプルとした。

【実験結果および考察】

1. 各種麦類や雑穀類を用いたGABA生産

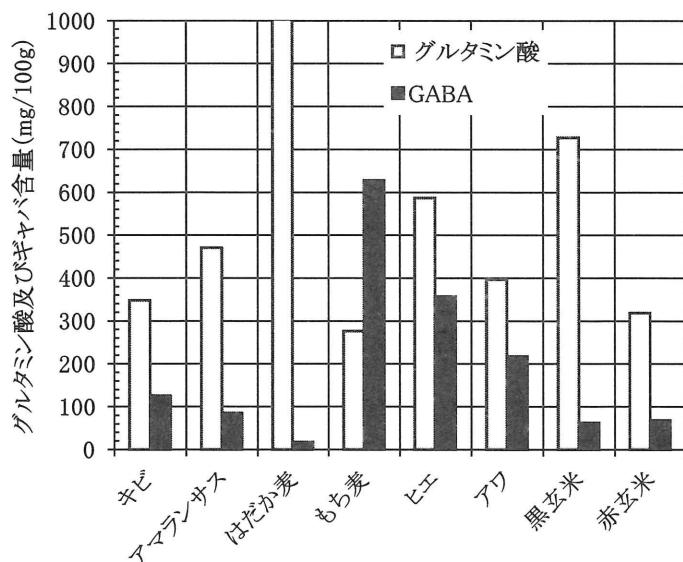


図1 各種麦類や雑穀類を用いたGABA生産

麦類や雑穀類として、キビ、アマランサス、はだか麦、もち麦、ヒエ、アワ、黒玄米、赤玄米を材料として、申請者らが確立したグルタミン酸浸漬法を用いてGABAを製造した

結果を図1に示した。グルタミン酸からGABAの変化を触媒するGAD酵素には補因子としてPLPを必要とするため、この実験では1mmol/LのPLPを加えた。これら材料の中で、もち麦、ヒエ、アワが、高いGABA生産性を示した。特に、もち麦でのGABA生産性は特に高いことが分かった。

2. GABA生産性に対するビタミンB6類添加の効果

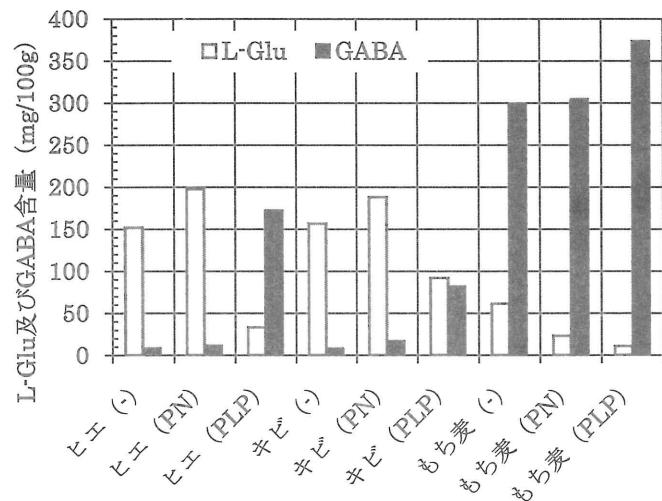
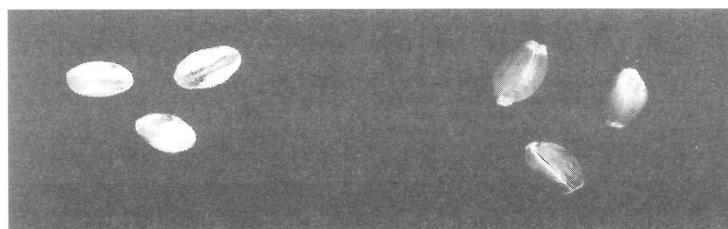


図2 ヒエ、キビ、もち麦でのGABA生産に対するビタミンB6添加の効果 (-: 補因子無添加, PN: ピリドキシン(ビタミンB6), PLP: ピリドキサルリン酸)

PLPはGAD酵素の補因子ではあるが、現在、我が国では食品添加物として認可されていない。一方、ビタミンB6(PN:ピリドキシン)は食品添加物であることから、PLPの効果をPNに置き換えるか、あるいは不要であるかについて、1.の実験で効果が認められた材料を用いて検討した。結果を図2に示した。最も生産性の高かったもち麦では、PLPの効果があったが、無添加でもほぼ同程度の生産性を持つことが分かった。一方、ヒエとキビでは、PLPが存在する場合のみGABA生産を確認した。これらのことから、もち麦を用いてGABAを生産すれば、食品衛生法に抵触することなく、さらに余分な添加物を必要としないことで経済的にも有効な技術であることが分かった。

3. もち麦を用いたGABA生産性に対する精麦(精白)の効果

1.及び2.の実験で用いた材料は、㈱マエダ所有のモノであるが、もち麦は玄麦の表皮を剥いだ精麦(精白)粒であった。なお、ヒエとキビも精白サンプルであった。精白もち麦と玄麦の写真を図3に示した。



もち麦(左:精麦、右:玄麦)

図3 精白もち麦粒と玄麦

そこで、もち麦での GABA 生産性が精白の効果であると考えられたので、いろいろな精白度で精白した精白もち麦粒を用いて、GABA 生産を検討した。結果を図4に示した。

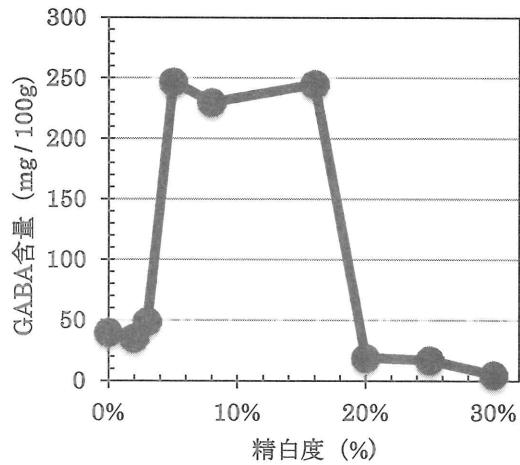


図4 もち麦での GABA 生産性に対する精白度の効果

精白していない玄麦（0%）ではほとんど GABA を生産せず、5%から 16%の間で精白したもち麦で高い GABA 生産性を確認した。精白度が低過ぎる場合はグルタミン酸が内部に浸透しないため、精白度が高過ぎる場合は表皮の酵素が剥ぎ落とされるために GABA 生産性が悪くなると推察された。

別に、もち麦と同じ大麦類に属する大麦とはだか麦について、もち麦と同程度に精白した精白粒を用いて同様にグルタミン酸浸漬法による GABA を生産したが、生産性は低かつた。また、小麦は、その粒が大変硬いために精白粒は作られず、粉体にまで加工される。従って、麦類では、精白もち麦粒を用いれば大変効率よく GABA を生産できると結論した。

4. 精白もち麦粒を用いた GABA 生産に対する基質グルタミン酸濃度の効果

GABA 製造において、基質グルタミン酸濃度が低く抑えられれば、経済的に好ましいと言える。そこで、精白もち麦粒のグルタミン酸浸漬法におけるグルタミン酸濃度について検討した。結果を図5に示した。

1%グルタミン酸濃度で最適の GABA 生産性を認めたが、その半分、0.5%でも 1%の条件と遜色ない生産量であった。基質グルタミン酸量が少なければ経済的であるので、産業レベルでの生産では 0.5%が好ましいことが分かった。

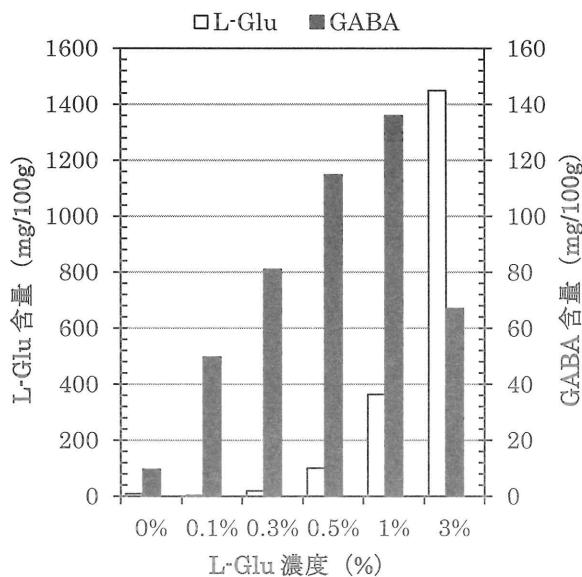


図5 精白もち麦粒を用いた
GABA生産に対する基質グル
タミン酸濃度の効果

5. 精白もち麦粒を用いたGABA生産にたいするグルタミン酸溶液浸漬の処理時間の効果

これまで精白もち麦をグルタミン酸溶液に室温(25°C)で一晩、約15時間浸漬した後、水切りを行い、さらに室温でそのまま一晩保温し、その間に酵素によりグルタミン酸からGABAに変換する条件で処理していた。この処理時間が短縮できれば、より効率的なGABA生産が達成できる。そこで、粒にグルタミン酸を浸透させる処理であるグルタミン酸浸漬時間について検討した。

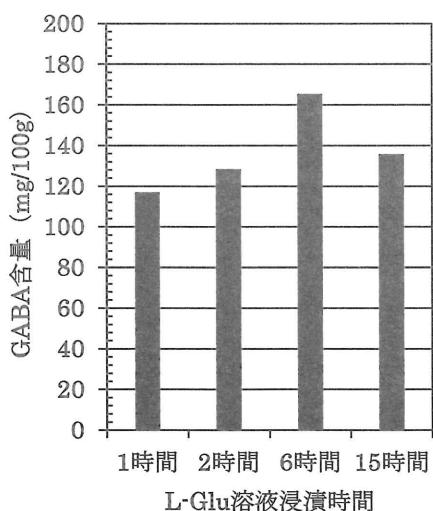


図6 精白もち麦粒を用いたGABA
生産に対するグルタミン酸溶液浸漬
時間の効果

得られた結果を図6に示した。処理時間6時間まではGABA生産量は増加したが、一晩(15時間)の処理では逆に低下した。従って、処理時間6時間で十分と考えられ、次の水切り後の保温(一晩)と合わせても、1日の操作でGABA製造工程を完了できることが分

かつた。

6. 精白もち麦粒を用いた GABA 生産に対するグルタミン酸溶液 pH の効果

これまでの実験は、植物の GAD の最適 pH は 4 から 5 であること、大豆での GABA 生産について確立した条件を参考にしたが、ここで、精白もち麦粒での GABA 生産性に対する pH の効果を検討した。得られた結果を図 7 に示した。

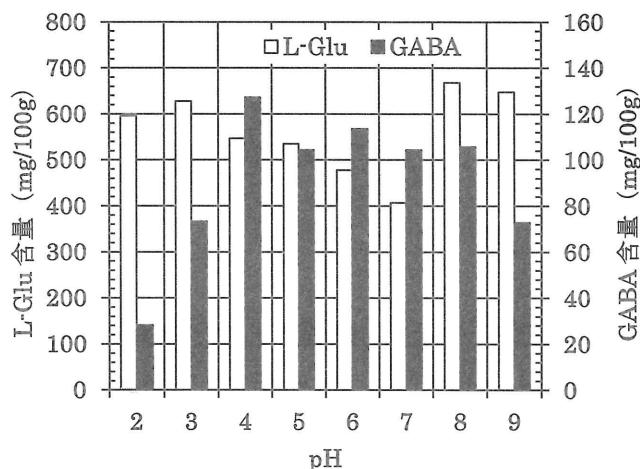


図 7 精白もち麦粒を用いた
GABA 生産に対する pH の
効果

GABA 生産の最適 pH は 4 であったが、それより高い pH 8 までは効果的な GABA 生産が確認できた。

以上、精白もち麦粒を用いた GABA 生産工程を次のように決定した。精白もち麦サンプル (50g) を 0.5% グルタミン酸溶液 (pH 4, 100mL) に浸漬し、室温 (25°C) で 6 時間保温した後、水切りカゴを用いて水切りし、さらに、室温で一晩 (15 時間) 保温した。比較的低温での熱風乾燥法により乾燥して、ギャバもち麦粒を製造した。(株)マエダでは、現在、100g 当たり 200 から 300mg GABA を含む製品を安定して製造できている。

7. もち麦ヌカを用いた GABA 生産

もち麦では、精白することで GAD 酵素が活性化し、グルタミン酸から GABA への変換効率が高くなった。一方で、精白することによりもち麦からヌカが生じる。さらに、穀類のタンパク質は表皮に多く存在すると言われているので、ヌカにも多くの GAD 酵素が含まれていると推察された。そこで、精白処理の残渣である「もち麦ヌカ」を用いた GABA 生産性について検討した。ヌカをグルタミン酸溶液と混合し、室温で一晩 (15 時間) 保温した。反応液を遠心分離し、上澄みを得た。結果は省略するが、もち麦ヌカを用いた場合、高い GABA 生産を確認し、GABA エキスを製造できることが分かった。最適条件は次の通りであった。PLP 不要、グルタミン酸溶液 : 1% (0.5% でも同程度) pH 4.5、混合比率 : ヌ

カ 35g + グルタミン酸溶液 100mL, 搅拌必要なし, 加熱 (殺菌) 処理: 120°C 1 時間でも減少一割。㈱マエダでは、これらの条件で製造したギャバエキス (液体) は、100mL 当たり 200mg から 300mg の GABA を含有していた。

8. もち麦, 大麦, はだか麦ヌカ, 小麦フスマの GABA 生産と PLP との関連性

もち麦ヌカでは、補因子 PLP の添加無しでも GABA を高生産できた。もち麦ははだか麦の変種であり、同じ六条大麦類である。はだか麦ヌカを同様にグルタミン酸溶液で処理した場合、もち麦ヌカよりも効率よく GABA が生産できることが分かった (表 1)。他方、二条大麦ヌカや小麦フスマを用いた場合は GABA の生産性は低かった。しかしながら、

表 1 麦ヌカおよび小麦フスマを用いた GABA 生産に対する PLP 添加の効果

品種	GABA 量 (mg/mL)		比率*
	PLP 濃度: 0 mmol/L	PLP 濃度: 1 mmol/L	
もち麦ヌカ	1.30	2.44	0.53
裸麦ヌカ	2.75	3.40	0.81
大麦ヌカ	0.78	3.44	0.23
小麦フスマ	0.89	2.46	0.36

* 比率は、(PLP を添加しない条件で生成された GABA 量 ÷ 1 mmol/L の濃度の PLP を添加した条件で生成された GABA 量) を示している。それぞれの麦ヌカ (あるいはフスマ) 25g を 100mL の 1% (w/v) グルタミン酸溶液 (pH 4.5) に懸濁して、25°C で 6 時間反応した。遠心分離後、得られた上澄みに含まれる GABA 量 (mg/mL) を示した。

二条大麦ヌカや小麦フスマを用いた場合でも、PLP を加えてグルタミン酸と反応させると、他のもち麦ヌカやはだか麦ヌカと同程度の GABA 生産性を確認した (表 1)。これらのことから、これらの麦類には GABA の生産に関する GAD 酵素は同程度存在しているモノと考えられ、もち麦やはだか麦ヌカで GABA 生産性が高いのは補因子の PLP 含量が高いためであると推察した。3.の実験で、精白はだか麦粒での GABA 生産性が低かったことを述べた。この結果は、はだか麦では GABA 生産に関する GAD 酵素が精白処理により粒から離脱しやすいことを暗示している。

9. 「GABA もち麦粉」と「もち麦 GABA エキス」を用いた GABA 強化食パンの製造

上述したように、㈱マエダでは、高濃度の GABA を含む GABA もち麦粉と GABA エキスを製造しているので、それらを用いて「GABA 強化食パン」を製造し、製造工程での GABA

の消長を測定した。食パンの製造はホームベーカリー（㈱パナソニック）を用いて行い、レシピは次の通りであった。ミックス粉（理研農産化工株式会社サクサクトーストミックス）280 g（GABA もち麦粉 30 g と 60g で一部置き換えた）、無塩バター10 g、ドライイースト 4.2 g、水 200 ml。同装置取扱説明書に従い、早焼きコース（製造時間約 2 時間）で食パンを製造した。パンの中心部と表面部（加熱変色している部分）とに分け、それぞれを凍結乾燥、粉碎後、グルタミン酸量および GABA 量を測定した。

作製した食パンの形状を図 8 に示した。もち麦粉にはグルテンが含まれていないため、GABA もち麦粉を 60g 加えた場合は、形状がいびつであった。食感は、もち麦粉に由来するモチモチ感があり、30g 加えた場合は、大変好評であった。

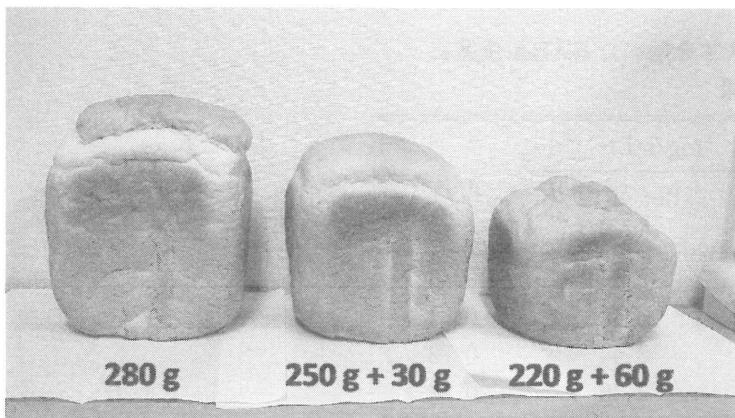


図 8 もち麦粉を添加して作製した食パン

（左：コントロール（小麦 280g），中央：GABA もち麦粉 30g，右：GABA もち麦粉 60g）

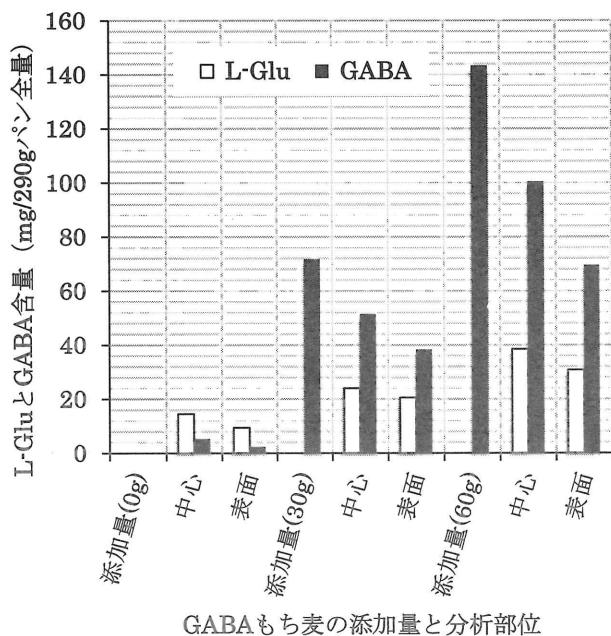


図9 GABA もち麦粉を用いた食パン製造前後のGABAの消長

図9に発酵・焼き上げ後のGABAの消長を示した。2時間と短時間製造メニューで行つたが、作製後中心部では添加量の約70%にGABA量が減少した。表面は焼き上げのためかGABA量は半減した。パン製造には酵母が使用されており、酵母はGABAを資化するためGABAが減少したと考えられる。しかしながら、パン製造後に添加したGABAがすべて消失してしまうわけではないので、この減少率を考慮して、GABA強化パンを製造する場合は多めにGABA素材を添加することで目的の含量のGABAを含む製品が製造できると結論できた。

図10にGABAエキスを用いて製造したGABA強化パンを示した。レシピは、上述したGABAもち麦粉を用いた場合の水200mLの一部(20mL)をGABAエキスに置き換えた。製品の形状はコントロールと大差なく、膨張性も同程度であった。GABAもち麦粉を用いて食パンを製造する場合も、不足するグルテンを添加すれば、コントロールと変わらない形状のモノが製造できるが、その分余分な素材が必要となり、GABA強化パンを製造する場合はGABAもち麦エキスを使用して製造する方が経済的と考えられた。



図10 GABAエキスを添加して製造した食パン
(左:コントロール, 右:エキス入り)

10. GABA もち麦エキスを用いたヨーグルトの製造

プラスチック容器を用いて牛乳 250mL と市販の粉末種菌 0.5g (株)食品流通システム社製「ヨーグルト種菌」を使用) を混合し、ラップで密封して 45°Cで 7 時間保温した (コントロール)。

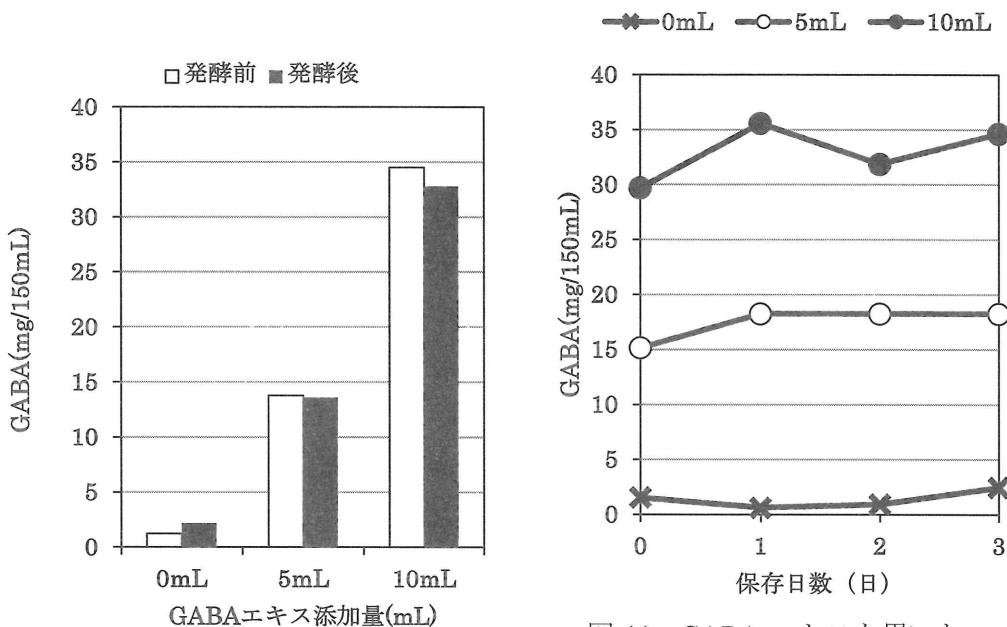


図 11 GABA エキスを用いたヨーグルト製造前後の GABA 量の変化

GABA ヨーグルトは牛乳の一部を GABA エキスに置換して全量を 250mL とし、上記と同様の方法で発酵し作製した。図 11 に発酵前後のヨーグルトに含まれる GABA 量を測定した結果を示した。ヨーグルトは乳酸菌による発酵食品であるが、発酵前後で GABA の減少はほとんどなく、乳酸菌は GABA を資化しないことが分かった。さらに、製造した GABA ヨーグルトを冷蔵庫で保存して、保存期間中の GABA の消長を調べた (図 12)。GABA 含量の減少は観察されず、牛乳に含まれるグルタミン酸から乳酸菌による GABA 生産が起こるようで、GABA 含量の増加も観察された。

以上、ヨーグルト製造における GABA の消長からは、GABA エキスを用いて GABA 強化ヨーグルトを製造できることを示したが、実際に食した場合、麦類独特の麦臭さがあり、プレーンヨーグルトには不向きであることも分かった。しかし、フルーツ等を添加したフルーツヨーグルトとすれば、問題なく商品化できると結論した。

【まとめ】

GABA もち麦粒については、(株)マエダで販売中の「ギャバごはんの素」や「ギャバきな粉」に既に利用されている(図13)。それを粉体化したGABA もち麦粉は、パンやクッキーなどの菓子類の製造に利用できると考える。ただ、ギャバもち麦粉を利用してパンを製造する場合は、もち麦がグルテンを含んでいないので、充分に膨張したパンを製造するためには別途グルテンを添加する必要がある。GABA もち麦エキス(GABA はだか麦エキス)は、ヨーグルトを含めていろいろなGABA 強化商品の開発に活用できるであろう。また別に、同エキスを煮詰めてより高濃度に濃縮し、錠剤あるいはカプセル化によるGABA サプリメントの開発も可能であると考えている。



図13 (株)マエダで販売している
GABA を含む商品

愛媛県は日本一のはだか麦の産地である。はだか麦粉を利用した製パン技術も最近確立され、(株)マエダから「ふわふわパンの素」として販売を開始したところである。はだか麦粉の活用の延長線上で、GABA もち麦粉の利用を進展させたいと考えている。平成24年度愛媛大学地域連携プロジェクトとして、現在、はだか麦粉、GABA もち麦粉、GABA エキスを資源とした地域連携推進活動を進めてもいる。

最後に、GABA のもつ有用な生体調節機能や効能を広く一般市民に知っていただき、またGABA を安心して摂取していただきたい。この活動が消費者の健康維持・増進に少しでも貢献できれば幸甚と考えている。

【研究成果】

1. 前田耕作、渡部保夫：特願2010-39461, ギャバを含有するギャバもち麦の製造方法およびその製品.
2. 渡部保夫、鳥居枝里子、大野一仁、前田耕作：もち麦粒を用いた γ -アミノ酪酸の高生産技術、日本食品科学工学会誌、58(4), 182-185 (2011).
3. 渡部保夫、鳥居枝里子、渡辺誠也、前田耕作：六条大麦ヌカを用いた γ -アミノ酪酸の高生産の要因、日本食品科学工学会誌、59(6), 291-294 (2012).
4. 渡部保夫: もち麦を用いた γ -アミノ酪酸の高生産技術(その1), New Food Industry, 54(6), 27-34 (2012).

5. 渡部保夫: もち麦を用いた γ アミノ酪酸の高生産技術(その 2), New Food Industry, 54(7), 38-44 (2012).
6. 渡部保夫: 地域產品の利用拡大に貢献する保健機能性の付与と地域連携, 月刊愛媛ジャーナル, 103 号, 80-83 (2012).

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

-養殖ヒラメ親魚の系統解析-

【目的】ヒラメの育種を進めるうえで、養殖家系の遺伝的多様性および類縁関係を把握することは重要である。本研究では、まる阿水産が保有するヒラメ親魚集団を対象として、マイクロサテライト DNA マーカーによる家系解析をおこなった。

【方法】ヒラメの養殖用種苗生産に用いられている親魚 8 家系 (A~H) について、4 つのマイクロサテライト DNA マーカーを用いて解析を行った。各マーカーのアリル数、ヘテロ接合体率、ハーディ・ワインバーグ平衡を求めるとともに、遺伝距離から UPGMA デンドログラムを作製して各家系の類縁関係を調査した。

【結果】解析に用いた群の多くで、アリル数の減少、ヘテロおよびホモ接合体過剰、ハーディ・ワインバーグ平衡からの逸脱が確認され、家系の遺伝的多様性が失われていた。また、解析に用いた 8 家系は 2 つのクレード (クレード 1 : A~E, クレード 2 : F~H) に分けられ、2 つの遺伝的に異なった養殖ヒラメ集団が存在した。

【成果発表】

澤山英太郎・高木基裕 (2011) マイクロサテライト DNA マーカーを用いた養殖ヒラメの家系解析. 第 10 回日本水産増殖学会大会, 三重.

澤山英太郎・高木基裕 (2012) マイクロサテライト DNA マーカーを用いた養殖ヒラメ親魚群の遺伝的評価. 水産育種 41, 69-74.

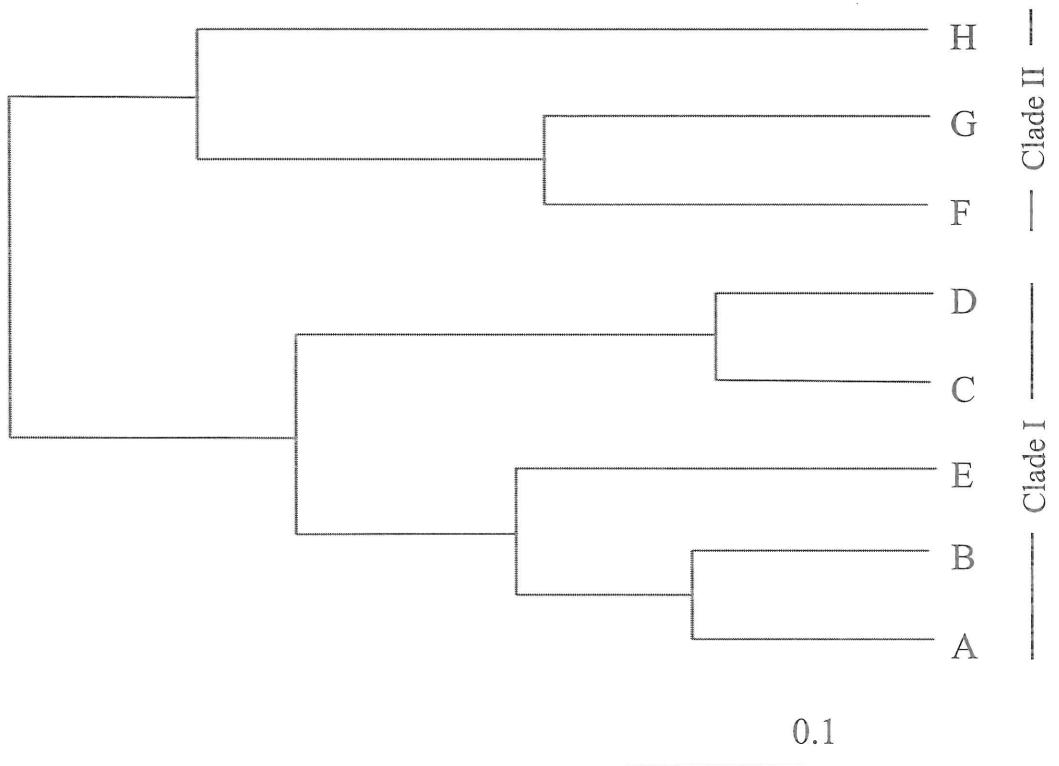


図 1. マイクロサテライトマークー4 座のアリル頻度より求めたヒラメ親魚 8 集団の UPGMA デンドログラム。各アルファベットは各親魚集団を表している。

-有眼側白化個体の出現家系解析-

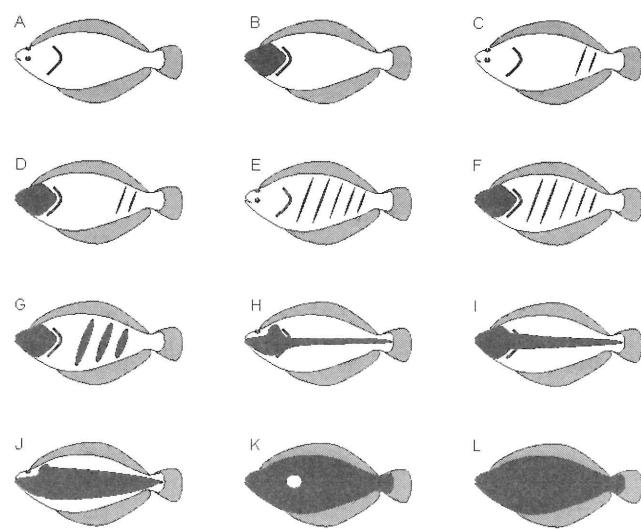
【目的】ヒラメの種苗生産において、有眼側に色素胞が形成されない白化個体が生じることは広く知られているが、遺伝的な発生要因について調べた研究は少ない。本研究では、商業規模でのヒラメ種苗生産において発生した白化個体について、マイクロサテライト DNA による親子鑑定を行い、遺伝要因の関与を調査した。

【方法】解析に用いた種苗は 2010 年春による阿水産で販売用に生産されたものを用いた。8 個体のメス親魚と 9 個体のオス親魚からなる組合せから同一日に得られた受精卵を 50kL 水槽へ導入して飼育した。60 日齢に選別を行い、正常個体 72 個体と、白化個体 72 個体を得た。白化個体の白化強度の判定については田畠（1991）に従った。また、マイクロサテライト DNA マーカー (*Pol-I*^{*}, *3*^{*}, *4*^{*}, *5*^{*}, *Po56*^{*}) を用いて親子鑑定を行い、親魚間での白化個体出現頻度を正常個体と比較した。

【結果】本生産ロットにおける白化個体出現頻度は 2.0% であった。白化強度を判定したところ、白化強度が高いとされるカテゴリー A～F に含まれる個体が全体の 95.9% を占めた。親子鑑定の結果から、正常個体と白化個体の出現家系には大きな違いが認められなかつた。しかし、半同胞間における白化強度の違いを比較したところ、一部の親魚において特定の白化強度に偏る傾向が見られた。また、アリル数やアリル頻度については正常個体と白化個体でほぼ同程度であったが、遺伝的異質性検定については有意な差が認められた。以上の結果から、ヒラメの人工種苗生産で見られた白化個体に特定の家系の関与は認められなかつたが、白化強度は遺伝的に支配されている可能性が示唆された。

【成果発表】

澤山英太郎・高木基裕（2012）ヒラメ人工種苗で見られた有眼側白化個体の出現家系解析. 日本水産学会秋季大会, 山口.



田畠(1991)を一部改変

図2. 本研究におけるヒラメ白化強度の判定基準。Lが正常個体。

表1. メス親魚と仔の白化強度 (%)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
♀1	4.2	41.7	8.3	25.0		12.5	4.2		4.2
♀2									
♀3	5.3	31.6		26.3		31.6	5.3		
♀4		40.0		40.0		20.0			
♀5		20.0		40.0		40.0			
♀6									
♀7	20.0	20.0	20.0	20.0		20.0			
♀8	25.0	25.0		25.0		25.0			

表2. オス親魚と仔の白化強度 (%)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
♂1	12.5	37.5	12.5	20.8		16.7			
♂2									
♂3		21.1		52.6		21.1	5.3		
♂4									
♂5									
♂6	4.3	34.8		21.7		30.4	4.3		4.3
♂7		66.7		16.7		16.7			
♂8									
♂9									

愛媛大学社会連携推進機構研究成果報告書第6号

発行者 2013年3月
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 セキ株式会社