

平成 27 年度研究費助成 研究成果報告書集

研究成果報告書 目次

- 新規破骨細胞制御因子 DCL-1/CD302 の機能解明および CCN2 による制御機構の解明
岡山大学 大学院 医歯薬学総合研究科 助教 青山 絵理子 1
- メカニカルストレスを利用した心筋細胞のストレス応答能獲得のしくみ
岡山大学 大学院 医歯薬学総合研究科 助教 片野坂 友紀 3
- B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染増殖を制御する分子機構の解明
岡山大学 大学院 医歯薬学総合研究科 助教 團迫 浩方 7
- 限られた帯域で複数動画を同時配信できるインターネット放送システムの構築
岡山大学 大学院 自然科学研究科 准教授 後藤 佑介 9
- 交流大電流通電を可能とする单相高温超電導変圧器を用いた小型・軽量電源の開発
岡山大学 大学院 自然科学研究科 准教授 七戸 希 15
- 脱水素ケイ素化およびリン化反応を利用した新規求核分子触媒の創製
岡山大学 大学院 自然科学研究科 助教 村井 征史 19
- 江戸期の巨石樋門・倉水門の撤去に関わる 3D レーザースキャナによる記録保存および文献調査
岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 准教授 樋口 輝久 23
- 河川堤防の安全な維持管理のための総合的照査方法の確立
岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 金 秉洙 25
- 植物バイオマスからの骨成分合成
岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 准教授 永禮 英明 35
- トンネル覆工・空隙・地山の相互作用とロックボルトの効果
岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 講師 柴田 俊文 39
- 旭川感潮域のケレップ水流域における塩水流動の現地観測および数値解析
岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 赤穂 良輔 43
- 難培養性乳酸菌を用いた乳牛用プロバイオティクス飼料の開発
岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 准教授 西野 直樹 49
- テンナンショウ属を用いた植物の性転換機構の解明
岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 宮崎 祐子 53
- 腫瘍抗原糖鎖をカップリングさせた機能性糖鎖ポリマーの抗腫瘍抗体産生への応用
岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 教授 木村 吉伸 59
- 植物の生殖細胞における DNA メチル化動態に関する研究
岡山大学 資源植物科学研究所 助教 池田 陽子 62
- オオムギ発芽時耐塩性 QTL の同質遺伝子系統作出と生活環横断的な塩ストレス応答機構の解明
岡山大学 資源植物科学研究所 助教 最相 大輔 67
- 繰り返される CSR を巡る問題を発端として一競争戦略を公正概念の視点から考察
岡山大学 大学院 社会文化科学研究科 教授 北 真収 70
- 「食品素材や化粧品素材」としての「高機能化ポリフェノール誘導体」の
環境に優しい「次世代型酵素的合成システム」の開発
岡山県立大学 保健福祉学部 准教授 中島 伸佳 76

■ 人体近傍生気象現象の把握と温熱環境評価モデルの構築 岡山県立大学 情報工学部 助教 島崎 康弘 78
■ 超音波ニードルパンチ処理を施したCF/PA6複合材料の衝撃特性の評価 岡山県立大学 情報工学部 助教 小武内 清貴 83
■ ステートマシン図を用いたWebアプリケーションの自動テスト環境の開発 岡山県立大学 情報工学部 助教 横川 智教 87
■ 実感を伴う水害用デジタル避難ガイドの開発(2) 岡山県立大学 デザイン学部 講師 齋藤 美絵子 93
■ わが国との比較的視点で捉える台湾における歴史的町並み(老街)保存事業の分析研究 岡山県立大学 デザイン学部 准教授 西川 博美 99
■ 建築家ジェフリー・バワの建築言語に関する研究 岡山県立大学 デザイン学部 教授 岩本 弘光104
■ 現代作家の陶磁器デザインと技法の集積 岡山県立大学 デザイン学部 教授 久保田 厚子110
■ 微量の水を用いた高分子/疎水性イオン液体の相挙動の制御と機構解明 岡山理科大学 理学部 講師 大坂 昇116
■ 高効率な発光を目指した有機蛍光材料の開発 岡山理科大学 理学部 講師 岩永 哲夫120
■ 簡易なUAVを用いた斜面形状取得と斜面変状評価手法の開発 岡山理科大学 生物地球学部 准教授 佐藤 丈晴125
■ 未利用バイオマス細胞壁分解における放線菌フェルラ酸エステラーゼの有用性評価 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所 流動研究員 裏地 美杉130
■ 青枯病菌エフェクターの宿主植物因子による活性化機構の解明 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所 流動研究員 向原 隆文134
■ 死細胞から放出される組織リモデリング増悪化因子の分子機能を病態制御 就実大学 薬学部 教授 森 秀治140
■ 小児精神疾患治療を指向した経鼻薬物送達法の可能性を探る薬物動態学的研究 就実大学 薬学部 准教授 井上 大輔144
■ 鳥類アデノ随伴ウイルス(AAAV)ベクターの開発 就実大学 薬学部 准教授 工藤 季之148
■ 高脂肪食摂取による肥満の形成はGas6阻害により抑制できるか? 倉敷芸術科学大学 生命科学部 講師 椎葉 大輔153
■ 色素増感太陽電池を指向した含ケイ素化合物の合成 倉敷芸術科学大学 生命科学部 教授 仲 章伸157
■ 効力に「はずれ」が生じない新規インフルエンザワクチン製造株の開発 川崎医科大学 微生物学教室 助教 内藤 忠相162
■ HTLV-1由来のHBZ蛋白を標的とした新規HTLV-1関連疾患の発症予防・治療法に関する研究 川崎医科大学 微生物学教室 助教 塩浜 康雄164
■ 非同期式直列演算器に基づいた超低消費電力デジタル補聴器の開発 川崎医療福祉大学 講師 近藤 真史167

海外渡航報告書 目次

■ 岡山大学 工学部	助教 矢納 陽	……………173
■ 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科	准教授 吉田 圭介	……………175
■ 岡山大学 理学部	助教 菅 倫寛	……………177
■ 岡山大学 資源植物科学研究所	准教授 谷 明生	……………178
■ 岡山理科大学 理学部	教授 汪 達紘	……………179
■ 津山工業高等専門学校 電子制御工学科	准教授 細谷 和範	……………180

新規破骨細胞制御因子 DCL-1/CD302 の機能解明および CCN2 による制御機構の解明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

青山絵理子

(概要)

骨、軟骨組織の増殖、分化に関与することが知られている CCN 2 は他の様々な因子と結合してそれらの機能を制御することにより多機能性を発揮するものと考えられている。そこでその結合因子のスクリーニングから見いだされた CD302 は膜タンパク質の一種であり、マクロファージなどでの発現が知られている。今回我々が注目した破骨細胞はマクロファージ系の前駆細胞から分化するにも関わらず、CD 302 の発現や機能は全く報告されていなかった。そこで我々は破骨細胞分化におけるこの因子の役割に注目し、CD302 が成熟破骨細胞において発現していることを見いだした。さらに破骨細胞の分化過程において si RNA を用いて CD302 の発現を抑制したところ、TRAP 陽性の成熟破骨細胞数が減少し、アクチンリングが断片化する様子が見られた。同時に、骨吸収能も低下していた。また、免疫沈降法により CD302 はアクチンおよび CCN 2 のそれぞれと結合することも示された。これらの結果から、CD302、CCN 2 およびアクチンの三者が協働してアクチンリングを形成している可能性が考えられる。

(本文)

1. 破骨細胞分化の過程におけるDCL-1発現の確認

マウス骨髄由来の破骨細胞前駆細胞を用いた破骨細胞誘導系においてウエスタンブロッティング法で DCL-1 のタンパク質量を測定した。その結果、分化の初期からある程度存在しており、分化に伴ってやや上昇することを確認した。さらに同時期の細胞から RNA を回収して mRNA レベルでも DCL-1 の発現が分化の後半にかけて上昇していることが分かった (Figure 1 (A))。

2. DCL-1とCCN2およびアクチンとの結合

DCL-1とCCN2の結合を確認するためDCL-1を発現している成熟破骨細胞の溶解物を用いて免疫沈降法およびウエスタンブロッティング法を行った。その結果、DCL-1はCCN2と結合する可能性が高いことが分かった。また、DCL-1はアクチンとも強く結合することを同様の実験系を用いた解析から明らかにした (Figure 1 (B))。

3. 成熟破骨細胞におけるDCL-1の機能解明

マウス骨髄由来細胞から誘導した成熟破骨細胞を

アクチンおよび抗 DCL-1 抗体で染色し、両者がアクチンリング上で共局在していることを確認した (Figure 2)。また、siRNA によって DCL-1 の発現を抑制したところ TRAP 陽性かつ多核でアクチンリングを形成する成熟破骨細胞の生成が減少した (Figure 3)。また、DCL-1 の siRNA で処理した成熟破骨細胞形成期の細胞をタイムラプス撮影し、その過程を詳細に観察した。その結果、DCL-1 の発現を抑制された破骨細胞誘導系では成熟破骨細胞に特徴的に見られるアクチンリングの形成および維持が阻害されていることが分かった (Data not shown)。さらに、DCL-1 の発現抑制は破骨細胞による骨吸収能も阻害することが明らかになった (Figure 4)。これらの結果から CD302 は RANKL により誘導される破骨細胞において発現しており、アクチンリングに分布していることや、その発現を阻害するとアクチンリングの異常が生じることから破骨細胞のアクチンリングの形成と維持に CD302 が関与していると考えられる。今回、我々は CD302 が CCN2 およびアクチンと結合する可能性を示したが、我々は以前に CCN2 もアクチンと結合することを報告している¹⁾。

従ってCCN2はCD302と共にアクチンリング形成に関与している可能性がある。

参考文献1) Yosimichi et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299: 755-776 (2002)

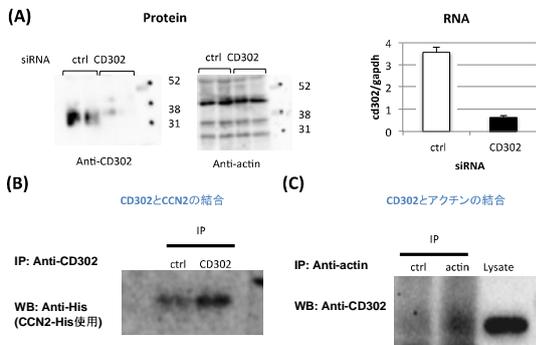


Figure 1. CD302の破骨細胞における発現とCCN2およびアクチンとの結合 (A) マウス骨髄由来の破骨細胞前駆細胞をM-CSF (100 ng/ml) とRANKL (50 ng/ml) で刺激し、3日後にCD302の siRNAを添加し、さらにその1日後に回収した細胞由来タンパク質およびRNAをウエスタンブロッティング法およびreal time PCR法で解析した。(B) マウス骨髄中の前駆細胞から誘導した破骨細胞のタンパク質溶解物にrecombinant CCN2-Hisを混和し、抗CD302抗体で免疫沈降させたものを抗CCN2抗体でウエスタンブロッティング解析した。(C) マウス骨髄中の前駆細胞から誘導した破骨細胞のタンパク質溶解物を抗アクチン抗体で免疫沈降させたものを抗CD302抗体でウエスタンブロッティング解析した。

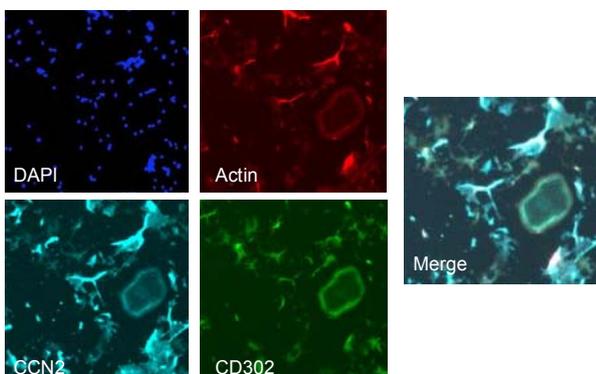


Figure 2. 成熟破骨細胞におけるCD302とactinの局在 M-CSF (100 ng/ml) と RANKL (50 ng/ml) で刺激したマウス骨髄由来の破骨細胞前駆細胞を抗CD302抗体、抗 CCN2抗体、Phalloidin-Alexa488およびDAPIで染色した。

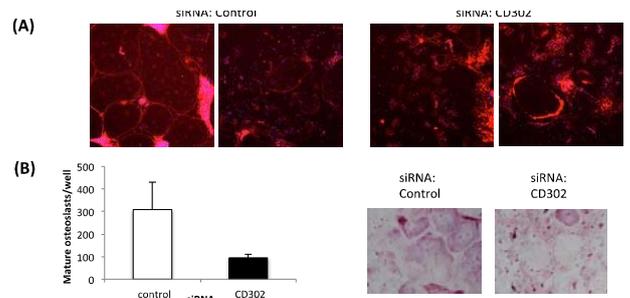


Figure 3. CD302 発現の抑制によるアクチンリング TRAP 陽性多核細胞の減少 (A) マウス骨髄由来の破骨細胞前駆細胞をM-CSF (100 ng/ml) と RANKL (50 ng/ml) で刺激後、4日後に siRNA を添加し、さらに1日間培養した後の細胞のアクチンと核を免疫染色した。(B) (A)と同様の条件で培養した細胞をTRAP 染色し、TRAP 陽性 の成熟破骨細胞数を計数した。

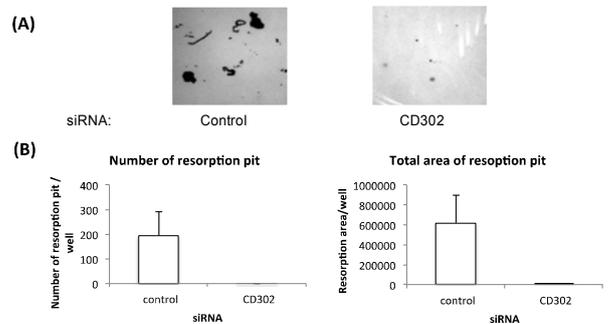


Figure 4. CD302発現の抑制による骨吸収能の抑制 マウス骨髄由来の破骨細胞前駆細胞をリン酸カルシウムコートした培養プレート上に播種し、M-CSF (10 ng/ml) と RANKL (100 ng/ml) で刺激後、2日後にsiRNAを添加し、さらに2日間培養した後にcalceinで染色した。リン酸カルシウム吸収面積と吸収窩の数を測定した。

メカニカルストレスを利用した心筋細胞のストレス応答能獲得のしくみ

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科

片野坂友紀

心筋細胞は、生後ただちに分裂能を失った終末分化細胞であり、一生に渡って、体の成長や運動、妊娠や高血圧などの血行動態（メカニカルストレス）の変化に応じて形や機能を変化させながら、心臓ポンプ機能を一定に保つことが知られている。しかしながら、心筋細胞がメカニカルストレスを感知する機構は、これまで不明であった。これまでの研究において、我々は、心筋細胞の介在板に発現するメカノセンサーTRPV2が、心臓の生理機能の維持に欠かせない重要な分子であることを報告している (Katanosaka et al., 2014, *Nature Communications*)。しかしながら、心筋細胞がメカニカルストレスの変化に応じながら形や機能を維持する仕組みは未だ明らかになっていない。

本研究では、心筋細胞がメカニカルストレスの変化に応じながら形や機能を維持する仕組みを明らかにすることを目的として、TRPV2 ノックアウト (KO) マウスの肥大応答を解析した。この結果、メカノセンサーTRPV2 は、心筋細胞の生理的肥大およびメカニカルストレスによって引き起こされる病的肥大に欠かせない分子であることが明らかとなった。

【背景】

心臓は、血行動態の変化に応じて、形や機能を変化させながら、ポンプ機能を一定に保とうとする大変ユニークな特徴を持った臓器である。心筋細胞は、生後速やかに分裂能を失うため、その後の成長や運動、あるいは高血圧などによる血行動態の変化に対して、一つ一つの細胞の大きさや形を変えて適応することとなる。このしくみが破綻すると、心臓のポンプ機能は低下し、心不全が発症する。心不全に至る疾患は多様であるが、多くの場合で、血行動態ストレス応答として心肥大が先行する。肥大応答の原因は、細胞内 Ca^{2+} の持続的な上昇であることが明らかになったが、その Ca^{2+} シグナルが、細胞内のどこで生じるか、どの分子によって伝達されるかについては、未だ不明である。

我々は、正常心において介在板に局在する心筋メカノセンサーの候補分子 TRPV2 を発見し(1, 2)、この分子が心臓の形や機能の維持に必須であることを、ノックアウト(KO)マウスの作製・解析から明らかにしたところである(3)。興味深いことに、TRPV2 が欠損した心筋では、適応シグナルを生み出す IGF-1 受容体/PI3K/Akt 経路が顕著に減弱していたため、このような細胞では適応的な肥大応答を引き起こすことができないのではないかと考えられた。そこで、本研究では、TRPV2KO

マウスを用いて、メカニカルストレスに起因する肥大応答能を解析した。また、TRPV2KO マウスから単離した新生仔心筋細胞を用いて、心筋細胞の肥大応答能や拍動心筋細胞への成熟過程を、形態および生理レベルで解析した。

【方法】

① 動物

実験に使用するマウスは、岡山大学自然生命科学研究所研究支援センター・動物資源部門鹿田施設において、12 時間の明暗サイクル、温度制御下にて飼育した。すべての実験は、10 週令の♂マウス（体重：22–24 グラム）を使った。これらのマウスは、遺伝的特徴を実験者に対して不明にして、かつランダムに取り扱った。動物実験は、岡山大学動物実験委員会に承認を受けて、ガイドラインに従って行った。

② 大動脈結紮モデルの作製

左室に圧負荷を施すために、マウスの大動脈を結紮した。100 mg/kg ketamine と 5 mg/kg xylazine で麻酔した後、大動脈に27Gの注射針をあて、7-0のナイロン糸で結紮した。

③ 新生仔培養心筋細胞の単離

生後1日の新生仔マウスをエーテル麻酔後、断頭し、心臓を摘出した。左室を細かく刻み、0.2%トリプシン溶液中で、攪拌しながら37度で酵素処理を行い、上澄みを回収した。回収した上澄みは、10%FCS含有のDMEM培地を加えトリプシン活性を止め、遠心分離(1000回転)にかけた。沈殿を10%FCS含有のDMEM培地にて培養した。

④ 組織学的解析

心臓を摘出後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。PBSで洗浄後、パラフィンに包埋し、切片を作製した。切片はHE染色およびマッソントリクロール染色した。新生仔培養細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、PBSで洗浄し、0.1%Triton溶液に浸漬し、透過処理をおこなった。0.3%BSAでブロッキングした。1次抗体に45分間浸漬後、30分PBSで洗浄し、2次抗体(Alexa-labeled抗ウサギ抗体、あるいは抗マウス抗体)を30分間浸漬した。PBSで洗浄した後、ファロイジン染色およびDAPI染色をおこなった。オリンパス社製のLV1000を用いて、観察した。

⑤ 細胞内Ca²⁺イメージング

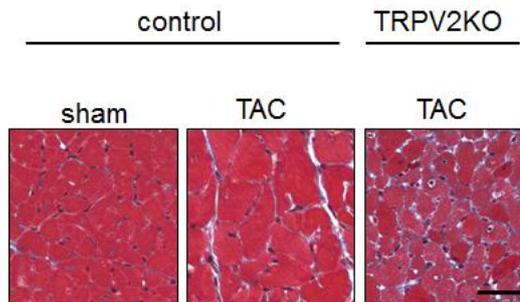
新生仔培養心筋細胞に、2μM Fura-2を37度で30分ロードした。ロード後、細胞は、標準Tyrode溶液に浸し、顕微鏡下で白金電極を用いて電気刺激を与え、電気刺激によって引き起こされる細胞内Ca²⁺濃度の変化を記録した。

【結果】

大動脈結紮に対するTRPV2KOマウス心臓の応答

正常心では、大動脈を結紮後、約1週間で、ひとつひとつの細胞が大きくなることによって心臓が肉厚になるという典型的な肥大応答をひきおこした(図1中央)。このような組織内には、マッソントリクロール染色に陽性となる繊維化像はみられなかった。一方で、TRPV2KOマウスでは、個々の細胞が大きくなるような肥大応答はみられなかった(図1右)。このことから、メカニカルストレスによって引

き起こされる適応的な肥大応答には、TRPV2が必須であることが明らかとなった。



(図1) 大動脈結紮による圧負荷応答
左室横断切片のマッソントリクロール染色像
左：正常心(圧負荷なし)の左室横断切片
中央：圧負荷後の正常心の左室横断切片
右：圧負荷後のTRPV2KOマウス心臓の左室横断切片(スケール：50μm)

心筋細胞の肥大応答を支えるシグナルの活性化状況を調べるために、細胞内のサバイバル経路を担うAktシグナルのリン酸化状況を調べた。この結果、正常心を利用した大動脈結紮モデルでは、Aktシグナルが亢進しているものの、TRPV2KOマウスを利用した大動脈結紮モデルでは、Aktシグナルの活性化が見られなかった。このことは、TRPV2を介したメカニカルシグナルが、心筋細胞の肥大応答を支えていることを示している。また、一方で、細胞死を促すシグナルの一つであるCaMKIIシグナルは、正常心を利用した大動脈結紮モデルでは、亢進していなかったが、TRPV2KOマウスを利用した大動脈結紮モデルでは、亢進していることが明らかとなった。これらの結果は、TRPV2KOマウスでは、圧負荷による肥大応答を示さないだけでなく、圧負荷によって、心不全の発症や重篤化においてみられるような、筋細胞が壊死するシグナルが亢進してしまうこととなることを示している。心臓がメカニカルストレスを利用して恒常性を維持する機構には、TRPV2を介したシグナルが重要な役割を示しているらしいと考えられた。

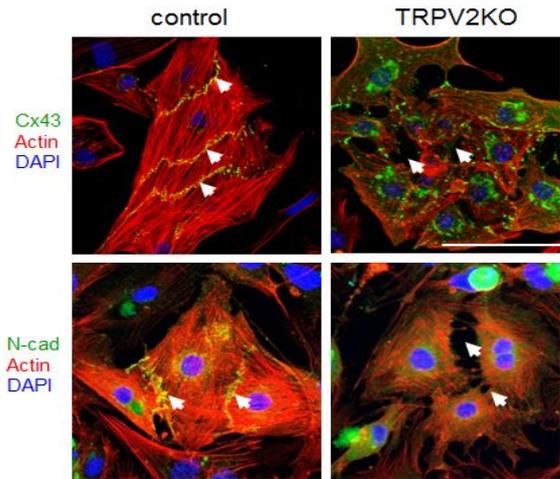
我々は、これまでの研究において、大動脈結紮に

よる圧負荷によって、負荷の経過時間に応じて、TRPV2 発現が上昇してくるという実験的事実を得ている。このこともまた、心臓に備わったメカニカルストレスに応じて筋細胞の形態や機能を変容するメカニズムにおいて、TRPV2 が大きな役割を持つことを示唆している。

新生仔 TRPV2KO マウス心臓から単離した培養心筋細胞

新生仔マウスから単離した心筋細胞の培養実験系では、介在板の形成過程や筋繊維の再構成の様子を観察することができる。図2は、培養3日後のコントロールおよび TRPV2KO 細胞の細胞形態・介在板因子の局在・細胞骨格の様子を示している。コントロール群では、発達したサルコメアが観察される。また、介在板因子であるコネクシン43やN-カドヘリンが細胞同士の接着部位である介在板に局在している。さらに、これらの細胞群は、周囲の細胞と同調拍動していた。しかしながら、TRPV2KO 細胞群では、隣り合う細胞間に隙間があいており、介在板が形成されていなかった。また、本来介在板に局在するはずのコネクシン43やN-カドヘリンが細胞内に凝集していた。さらにこれらの細胞では、同調拍動がみられなかった。これらの結果は、心筋細胞が同調拍動を獲得した細胞へと分化するために、TRPV2 を介したメカニカルシグナルが必要であることを示している。

心筋細胞は、収縮機能を向上させる方向へと分化するため、収縮機能に必要なサルコメアの充実と、これらを効率的に動かす細胞内Ca²⁺ハンドリングの充実が基礎となる。心筋細胞の成熟過程を、機能的に評価するために、我々は、Fura-2を用いたCa²⁺イメージングによって、心筋細胞生理機能を評価した。この結果、TRPV2KO 細胞では、筋細胞の興奮収縮連関を担うCa²⁺輸送体分子の発現が著しく低く、一定の時間が経過しても筋小胞体のCa²⁺含量が著しく低いことも明らかにしている。このことは、形態的にも、機能的にも筋細胞の成熟・分化において、TRPV2 が必須であることを示している。



(図2) 新生仔培養細胞の細胞形態および介在板局在分子・細胞骨格の様子

上段：コネクシン43(緑)、アクチン(赤)、核(青)の三重染色。下段：N-カドヘリン(緑)、アクチン(赤)、核(青)の三重染色。左；コントロール細胞、右；TRPV2KO細胞、スケールバー、100 μ m。

【考察】

本研究では、心筋細胞がメカニカルストレスの変化に応じながら形や機能を維持する仕組みを明らかにすることを目的として、TRPV2 ノックアウト (KO) マウスの肥大応答を解析した。この結果、メカノセンサーTRPV2は、心筋細胞の生理的肥大およびメカニカルストレスによって引き起こされる病的肥大に欠かせない分子であることが明らかとなった。さらに、生理的な肥大応答のひとつである筋成熟過程において、TRPV2は、必須の分子であることが示唆された。今後TRPV2を介したメカノトランスダクションの詳細を解析することによって、心臓がメカニカルストレスをうまく利用しながら形や機能を維持していく仕組みが明らかになっていくだろう。

本研究成果は、メカノセンサーを介した心不全発症メカニズムの解明に繋がると考えられる。現行の血管拡張薬や体液調節因子阻害による降圧薬に加えて、本研究の成果としてメカノセンサーをターゲットとした心不全治療法を提案できれば、不全治療に新たな選択肢を供給することとなり、QOLを改善して国民を悩ま

す病気の克服に役立つことから、保健医療への貢献は計り知れない。

【謝辞】

最後になりましたが、本研究を支援いただきましたウエスコ学術振興財団に深く感謝いたします。

【参考・引用文献】

- (1) Yuko Iwata, Yuki Katanosaka, Yuji Arai, Kazuo Komamura, Kunio Miyatake, Munekazu Shigekawa. A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. **J. Cell Biol.** **2003**, **161:957-967**. Yuko Iwata and Yuki Katanosaka contributed equally to this work.
- (2) Katuhiko Muraki, Yuko Iwata, Yuki Katanosaka, Tomohiro Ito, Susumu Ohya, Munekazu Shigekawa, Yuji Imaizumi. The vanilloid receptor homolog GRC is a novel component of stretch-sensitive nonselective cation channel in vascular smooth muscle cells. **Cir. Res.** **2003**, **93: 829-838**
- (3) Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Satoshi M, Naruse K. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. **Nature Communications**, **2014**, **10.1038/ncomms4932**

B型肝炎ウイルス (HBV) の感染増殖を制御する分子機構の解明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

團迫 浩方

B型肝炎ウイルス (HBV) は、ウイルスゲノムとして不完全二本鎖 DNA を持つ DNA ウイルスである。HBV の持続感染は慢性肝炎を引き起こし、さらには肝硬変や肝がんなどの肝疾患を発症するとされている。肝硬変や肝がんの段階での治療は非常に難しいと考えられており、HBV の持続感染を抑制し、慢性肝炎を沈静化させることが肝硬変や肝がんを予防するためには重要である。現在、HBV の持続感染を抑制するために、インターフェロン (IFN) あるいは核酸アナログ製剤が用いられているが、著効率の低さや耐性ウイルスの出現など問題が多い。そのため、HBV の感染増殖機構を明らかにし、治療の標的となりうる新規宿主因子を同定することが重要である。2013年に、単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスなどの DNA ウイルスの感染を認識する宿主因子として、cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) が同定された。本研究では、cGAS に着目し、HBV の持続感染に対する cGAS の制御機構を解明することを試みた。内在性 cGAS をノックダウンさせたヒト肝がん細胞株 Li23 細胞は、人工 HBV 二本鎖 DNA に対する自然免疫応答が消失した。一方、cGAS を恒常的に発現させた HepG2/NTCP-myc 細胞に HBV を感染させたところ、自然免疫応答を示した。これらの結果は cGAS が HBV の二本鎖 DNA を介して、HBV 感染を認識していることを示唆している。このように、cGAS は HBV の感染増殖を制御する宿主因子の一つであるものと考えられる。

1. はじめに

我が国の B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染者数はおよそ 150 万人であり、その約 10～15% が慢性肝炎から肝硬変、肝がんなどの肝疾患を発症するとされている。現在、HBV の治療にはインターフェロン (IFN) あるいは核酸アナログ製剤が主に用いられている。しかし、HBV 感染者の宿主ゲノム内に HBV ゲノムの一部が組込まれることもあり、これらの薬剤による HBV の完全排除は期待できない。とはいえ、HBV の持続的な感染増殖を抑制し、肝炎を沈静化させることが肝硬変や肝がんへの進行を予防するためには最も重要なことである。しかし、IFN はその著効率が 30% 程度と低いこと、一方の核酸アナログ製剤は耐性株の出現や投薬治療の中断が肝炎の急性増悪を引き起こすこと等、非常に問題が多い。

HBV は DNA ウイルスに属し、複製中間体として二本鎖 DNA を産生することが知られている。2013年に、cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) が単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルス (いずれも DNA ウイルスに属する) 由来の二本鎖 DNA を介してウイ

ルス感染を認識することが報告された。しかし、cGAS は同じ DNA ウイルスに属する HBV 由来の二本鎖 DNA も認識することができるかどうかは明らかではない。本研究では cGAS に着目し、HBV の感染増殖に対する cGAS の制御機構を解明することを目的とした。

2. 方法と結果

(1) ヒト肝細胞株での cGAS 発現の確認

現在までに、肝細胞における cGAS に関する情報はほとんどない。最初に、HBV 感染受容性を示す肝がん細胞株 HepG2 細胞、その他の肝がん細胞株 (HuH-7 細胞や Li23 細胞) 及びヒト不死化肝細胞株 (PH5CH8 細胞や NKNT-3 細胞) の cGAS 遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR 法により測定した。興味深いことに、調べたヒト肝細胞株の中で cGAS 遺伝子の発現が確認されたのは、Li23 細胞及び NKNT-3 細胞のみであった。また、cGAS のタンパク質レベルをウエスタンブロット法により確認したところ、cGAS の遺伝子発現の結果と同じであった。

(2) cGAS による HBV DNA 認識の検討

次に、内在性 cGAS を発現している Li23 細胞を用いて、cGAS が HBV DNA を認識できるか検討した。人工的に HBV の二本鎖 DNA を作成し、Li23 細胞に導入したところ、自然免疫応答があることを示す ISG56 (IFN による誘導される遺伝子群の一つ) の発現誘導が確認された。一方、cGAS をノックダウンした Li23 細胞では、人工 HBV 二本鎖 DNA の導入による ISG56 の発現誘導は確認されなかった。これらの結果から、cGAS は HBV DNA を認識する可能性が示唆された。

(3) HBV 感染受容性に対する cGAS の影響

次に、HBV 感染受容性に対する cGAS の影響を検討した。HBV に感染受容性を示す HepG2/NTCP-myc 細胞 (HBV 受容体である宿主因子 NTCP を恒常的に発現させている HepG2 細胞) は内在性 cGAS を発現していないため、cGAS 遺伝子をレトロウイルスにより導入した。また、陰性コントロールとして、酵素活性を欠失している cGAS 変異体を恒常的に発現する HepG2/NTCP-myc 細胞も同様に準備した。これらの細胞に HBV を感染させたところ、恒常的に cGAS を発現する HepG2/NTCP-myc 細胞でのみ ISG56 が発現誘導された。これらの結果から、cGAS は HBV 感染を認識していることが示唆された。

3. 考察

本研究により、HBV は同じ DNA ウイルスに属する単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスと同様に、cGAS により認識されていることが示唆された。cGAS は HBV の二本鎖 DNA を認識後、下流の自然免疫系 (IFN 産生系) を活性化しているものと考えられる。

また、cGAS の発現量は由来の異なるヒト肝細胞間で異なっている結果が得られたことから、個人間でも異なっている可能性がある。最近、cGAS 遺伝子の転写調節領域がメチル化されていることにより、遺伝子発現が調節されていることが報告された (1)。この研究成果はヒト大腸がん細胞で得られたものであるが、肝細胞でも同じことが起こっている可能性

がある。すなわち、cGAS の発現量の違いが HBV の持続感染を決定づけているかもしれない。この cGAS の発現を人工的に調節できれば、HBV 感染時の体内の自然免疫応答を高めることも可能であり、HBV の排除も可能であると考えられる。今後の課題として、cGAS 発現を高めるような薬剤を探索することが必要である。

4. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご助成いただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に深謝致します。

5. 参考文献

(1) Xia T, Konno H, Ahn J, Barber GN. Deregulation of STING signaling in colorectal carcinoma constrains DNA damage responses and correlates with tumorigenesis. *Cell Rep.* 14, 282-297 (2016)

限られた帯域で複数動画を同時配信できるインターネット放送システムの構築

岡山大学大学院自然科学研究科

後藤 佑介

インターネットによる映像視聴方法の多様化にともない、複数動画を同時に視聴する環境への注目が高まっている。本研究課題では、複数動画の同時配信において、実際のネットワーク環境で想定される課題に対処したインターネット放送システムを構築し、有用性を評価した。本システムでは、(1) 配信時の伝送遅延、(2) 帯域の揺らぎによるパケット欠損の影響、(3) 複数の仮想チャンネル上で配信する動画の分割比率の決定方法、および(4) 複数動画の同時配信を実現する独自の映像配信プロトコルの4点を考慮した。次に、データ受信時の待ち時間を短縮する放送スケジューリングのアルゴリズムを構築し、スケジューリング手法を導入可能な分割放送型配信システムを実現し、ネットワークシミュレータを用いた評価実験を行った。評価では、システム上で複数動画に対応したスケジューリング手法を導入し、実際のネットワーク環境における待ち時間短縮効果の有用性を検証した。

1. はじめに

インターネットによる映像視聴方法の多様化にともない、複数動画を同時に視聴する環境への注目が高まっている。動画データの配信方式として、Video on Demand (以下、VoD) と放送型配信の二つがある。VoD では、サーバはクライアントの受信要求に応じて帯域幅を確保して動画を配信する。このため、同じ時間帯に動画を要求するクライアント数の増加にともない、サーバが使用する帯域幅は比例して増加する。一方、放送型配信では、サーバは一定の帯域幅で複数のクライアントに同じ動画データを繰り返し配信するが、クライアントは要求した動画データが配信されるまで待つ必要がある。この待ち時間を短縮するため、一続きの動画データを複数の部分に分割して複数の通信路で配信する分割放送型配信が提案されてきた。また、分割放送型配信において、データ受信時に発生する待ち時間を短縮するスケジューリング手法が数多く提案されており、我々はスケジューリング手法を導入可能な分割放送型配信システムを実現してきた。

これまでの研究で、複数動画を同時に視聴する場合を考慮したスケジューリング手法は提案されているが、実際のネットワーク環境を考慮したシステム上での評価は行っていなかった。本研究課題では、インターネットを介して複数動画を同期配信する分

割放送型配信システムを実現し、スケジューリング手法を用いた評価を行う。

2. 放送型配信

放送型配信は、多くのクライアントが同じ動画データを受信する場合に用いられる配信方式である。即時性の高いスポーツ番組やコンサート映像のストリーミング配信、および特定の番組を一つのチャンネルで繰り返し配信するCS デジタル放送といったサービスでの利用を想定している。サーバは一定の帯域幅で同じ動画データを繰り返し配信し、クライアントは所望の契機で動画データを受信して再生する。サーバは、マルチキャストやブロードキャストといった通信方式を用いてクライアントに放送型で配信することで、VoD に比べてサーバの処理負荷や使用する帯域幅の増加を抑制できる。一方で、クライアントは、動画データの受信を要求してから再生が開始されるまでの間に待ち時間が発生する。

放送型配信において待ち時間が発生する様子を図1に示す。チャンネルの帯域幅を3.0 Mbps、動画データの再生レートを1.5 Mbps、再生時間を1分とする。図1の場合、クライアントが動画データの受信を開始する契機は動画データの先頭であり、クライアントは動画データの先頭部分を受信すると再生を開始できる。クライアントが動画データを受信するとき

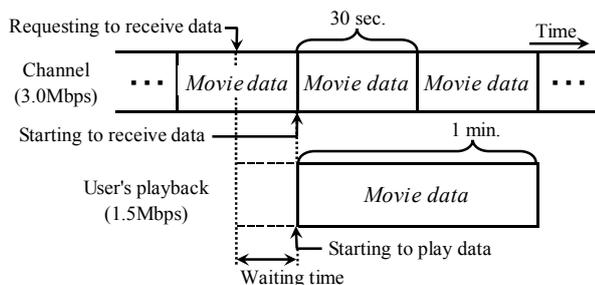


図 1：放送型配信における待ち時間発生の様子

の待ち時間は、サーバが動画データの先頭部分を配信した直後にクライアントが受信を要求した場合に最長となり、動画データ一周期分の $(60 \times 1.5) / 3.0 = 30$ 秒かかる。一方、サーバが動画データの先頭部分を配信する直前にクライアントが受信を要求した場合に待ち時間は最短となり、0 秒となる。以上より、図 1 の平均待ち時間は $(30 + 0) / 2 = 15$ 秒となる。

3. 複数動画の分割放送型配信

3.1 分割放送型配信の仕組み

分割放送型配信は、動画データを複数の部分（以下、セグメント）に分割して、最初のセグメントを頻繁に配信することで待ち時間を短縮する配信方式である。例えば、図 1 で用いた動画データを二つのセグメント S_1, S_2 に等分割し、1.5 Mbps の二つのチャンネル C_1, C_2 を用いて C_1 で S_1 、 C_2 で S_2 を繰り返し配信する場合、クライアントは受信した S_1, S_2 を途切れなく順番に再生できる。このとき、クライアントの待ち時間は S_1 の先頭が配信されるまでの時間であり、最長で $(60 \times 0.5 \times 1.5) / 1.5 = 30$ 秒、最短で 0 秒となり、平均の待ち時間は $(30 + 0) / 2 = 15$ 秒となる。

分割放送型配信では、最初のセグメントのデータサイズを小さくすることで再生開始までの待ち時間をより短縮できるが、動画データの再生中にセグメント間で途切れが発生する。この場合、再生中に途切れが発生しないようにするため、途切れ時間分だけ再生開始を遅らせる必要があり、全体の待ち時間は長大化する。そこで、動画データの再生中に途切れが発生しないようにした上で受信時の待ち時間を短縮するため、動画データの配信条件に応じてセグ

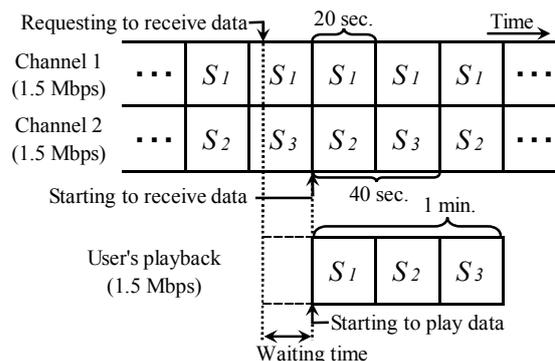


図 2：分割放送型配信における配信スケジュール例 (FB 法)

メントの分割比率を決定するスケジューリング手法が提案されてきた。

図 2 に、既存のスケジューリング手法である Fast Data Broadcasting and Receiving Scheme (以下、FB 法) [1] による配信スケジュール例を示す。FB 法は、サーバが使用できる帯域幅を k 個のチャンネルに分け、動画データを $2^k - 1$ 個のセグメントに等分割した上で、 i 番目のチャンネル C_i に連続した 2^{i-1} 個のセグメントを配置する手法である。チャンネルの帯域幅、動画データの再生レート、および再生時間は図 1 と同じとする。

図 2 の場合、サーバは使用できる帯域幅を 1.5 Mbps の二つのチャンネル C_1, C_2 に分割した上で、一続きの動画データを三つのセグメント S_1, S_2, S_3 に分割して、 C_1 で S_1 、 C_2 で S_2, S_3 を繰り返し配信する。FB 法では、動画データを $2^k - 1$ 個のセグメントに等分割するため、 S_1, S_2, S_3 の分割比率は等しく、セグメントの再生時間は 20 秒となる。このとき、待ち時間は S_1 の先頭が配信されるまでの時間となり、最長で $(20 \times 1.5) / 1.5 = 20$ 秒、最短で 0 秒となり、平均待ち時間は $(20 + 0) / 2 = 10$ 秒となる。データを分割しない場合、およびデータを二つに等分割する場合の平均待ち時間はどちらも 15 秒であり、スケジューリング手法を用いて分割することで、待ち時間を約 33.3% 短縮できる。以上より、分割放送型配信において、セグメントの分割比率を決定するスケジューリング手法の導入は重要である。

3.2 複数動画の同期配信の必要性

現在、サーバが複数動画をまとめて配信してクライアントが同時に視聴する環境は一般的になっている。例えば、通信カラオケの店舗で、ユーザの要望に応じて部屋の映像を撮影し、テレビ画面上に表示するサービスが挙げられる。複数のカラオケ部屋でそれぞれ撮影された複数の映像を各部屋のテレビ画面上で同時に表示することで、ユーザは仮想的に一つのカラオケ部屋で他の部屋のユーザとカラオケを楽しむことができる。

サーバが周期ごとに複数動画を放送型でまとめて配信する場合、一度に配信するデータサイズは大きくなり、再生開始までの待ち時間は長大化する。このため、待ち時間を短縮するスケジューリング手法の利用は、複数動画の同期配信において重要である。

3.3 複数動画の同期配信を考慮したスケジューリング手法

これまでの分割放送型配信では、サーバはスケジューリング手法を用いて配信することで、クライアントの動画再生までの待ち時間を効率的に短縮していた。スケジューリング手法では、サーバが使用できる帯域幅、動画の再生単位、およびクライアントの受信能力といった配信条件をもとに、各セグメントをどのタイムスロットでどのチャンネルから配信するかを決定する。一方で、分割放送型で複数動画を同期配信する場合、一度に配信するすべての動画データについて待ち時間を短縮する必要があり、スケジューリングは複雑になる。

複数動画の同期配信を考慮した既存のスケジューリング手法である Basic multiple-video broadcasting scheme (以下, MV-B 法) [2] は、複数動画の分割放送型配信において待ち時間を短縮するスケジューリング手法である。動画数が m のとき、 m 番目の動画の第 n セグメントは $S(m, n)$ と表す。また、 j 番目のタイムスロット T_j までに i 番目の動画の第 n セグメント $S(i, n)$ を放送しなければならない条件があり、この条件をスケジューリング条件とする。例えば、セグメント $S(i, n)$ は T_j までに最低一つのチャンネルにスケジューリングする必要が

Time slot	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7	T_8	T_9	T_{10}	...
Channel 1	S(1,1)										
Channel 2	S(2,1)										
Channel 3	S(3,1)										
Channel 4	S(4,1)										
Channel 5	S(5,1)										
Channel 6	S(1,2)	S(2,2)									
Channel 7	S(3,2)	S(4,2)									
Channel 8	S(5,2)	idle									
Channel 9	S(1,3)	S(2,3)	S(3,3)	S(1,3)	S(2,3)	S(3,3)	S(1,3)	S(2,3)	S(3,3)	S(1,3)	
Channel 10	S(4,3)	S(5,3)	idle	S(4,3)	S(5,3)	idle	S(4,3)	S(5,3)	idle	S(4,3)	
Channel 11	S(1,4)	S(2,4)	S(3,4)	S(4,4)	S(1,4)	S(2,4)	S(3,4)	S(4,4)	S(1,4)	S(2,4)	
Channel 12	S(5,4)	idle	idle	idle	S(5,4)	idle	idle	idle	S(5,4)	idle	
Channel 13	S(1,5)	S(2,5)	S(3,5)	S(4,5)	S(5,5)	S(1,5)	S(2,5)	S(3,5)	S(4,5)	S(5,5)	
Channel 14	S(1,6)	S(2,6)	S(3,6)	S(4,6)	S(5,6)	idle	S(1,6)	S(2,6)	S(3,6)	S(4,6)	
Channel 15	S(1,7)	S(2,7)	S(3,7)	S(4,7)	S(5,7)	idle	idle	S(1,7)	S(2,7)	S(3,7)	

図 3: 複数動画の配信スケジュール例 (MV-B 法)

ある。スケジューリング手順にもとづき、MV-B 法でスケジューリングすると、セグメントがチャンネルにスケジューリングされない時間帯(以下, アイドル時間)が発生する。動画数を 5、チャンネル数を 15 とした場合の配信スケジュール例を図 3 に示す。"idle" と表示されたタイムスロットがアイドル時間であり、チャンネル 8, 10, 12, 14, および 15 でアイドル時間が発生する。

また, Multiple-video broadcasting scheme with repairing (以下, MV-R 法) [2] は, MV-B 法で発生するアイドル時間に他のセグメントを配信することで, MV-B 法より待ち時間を短縮する手法である。

4. 分割放送型配信システム *TeleCaS*

4.1 概要

これまでに提案されてきたスケジューリング手法の多くは、計算機上でのシミュレーション環境を想定している。このため、システムの処理負荷やパケット損失による動画再生への影響を想定しておらず、実際のネットワーク環境でスケジューリング手法を用いる場合に発生する影響を考慮していない。我々の研究グループでは、実際のネットワーク環境でスケジューリング手法を評価可能な分割放送型配信システム Telecommunication and BroadCasting System (*TeleCaS*) [3] を提案してきた。しかし, *TeleCaS* は、複数動画の同期配信や同時再生に対応しておらず, MV-B 法や MV-R 法を適用できない。そこで, *TeleCaS* において, 複数動画の同期配信および同時再生を実現する。課題として, セグメントの配信契機を考慮した同期配信方式の実現, および複数動画の同時再生方式の実現という二つの課題がある。

4.2 セグメントの配信契機を考慮した同期配信方式

分割放送型配信で提案されているスケジューリング手法は、各チャンネルで周期的にセグメントを配信する。各セグメントの配信契機を同期できない場合、再生中に途切れ時間が発生する。例えば、遅延揺らぎの影響でセグメントの配信を同期できない場合、再生中に途切れ時間が発生する。

この課題に対処するため、我々の研究グループでこれまでに提案した配信契機の同期方法を用いて、複数動画の同期配信を実現する。この方法では、各セグメントの配信契機を同期させることで、途切れ時間を短縮できる。また、複数の動画配信では動画データを配信するチャンネル数が増加するため、単一の動画配信と比べて配信開始時刻のずれによる影響は大きくなる。そこで、複数の動画配信において、複数動画を分割した各セグメントを単一動画のセグメントとして処理する。これにより、複数の動画配信におけるセグメントの処理は単一の動画配信と同様の処理となり、複数の動画配信におけるセグメントの配信契機の同期を実現できる。

4.3 複数動画の同時再生方式

TeleCaS で複数動画の同時再生に対応するため、配信する複数動画の判別方法の提案、および複数動画の逐次再生方式の実現という二つの課題がある。

4.3.1 複数動画の判別方式の提案

複数動画の配信において、サーバは一つのチャンネルで複数の動画のセグメントを配信するようにスケジューリングすることで、各動画の配信契機を同期できる。クライアントは、複数動画を同時に視聴するため、複数のチャンネルから同時に受信したセグメントを各動画に復元する必要がある。これまでの **TeleCaS** のデータフォーマットは、配信開始部、およびセグメントを等分割した部分（以下、サブセグメント）をセグメントに復元する情報（以下、情報部）の二つで構成されていた。しかし、各セグメントがどの動画のどの部分かを示す情報はデータフォーマットに含まれていなかった。このため、クライアントは動画ごとに異なる再生プレイヤーに動画データ

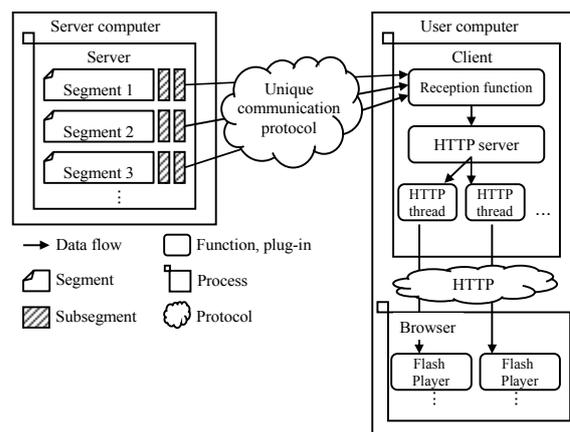


図 4：複数動画の分割放送型配信の構成

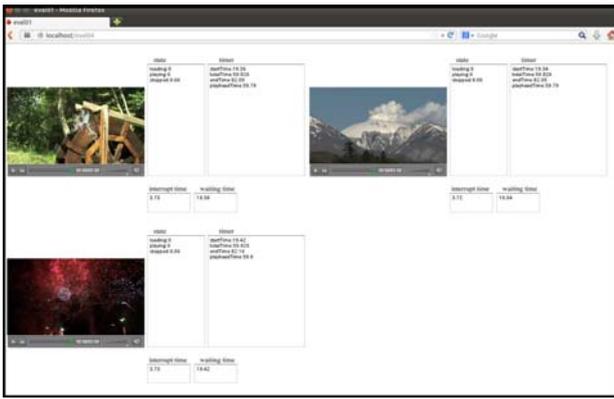
を送信できず、複数の動画を同時に再生できない。

実現方式では、配信開始部を拡張して動画数および動画識別子を追加することで、課題を解決した。クライアントは、動画識別子を用いることで、各セグメントがどの動画に対応するかを識別できる。

4.3.2 複数動画の逐次再生方式の実現

従来の **TeleCaS** では、複数の再生プレイヤーを同時に読み込むことができず、複数動画を同時に逐次再生できない問題がある。このため、受信した複数動画を同時に再生できず、複数の動画配信に対応したスケジューリング手法を **TeleCaS** に適用できない。

この課題に対処するため、ブラウザと通信を行う処理部をスレッド化する。**TeleCaS** における複数動画の分割放送型配信の構成を図4に示す。サーバは、分割放送型配信の通信プロトコルを使用して、サブセグメント単位でクライアントに動画データを送信する。クライアントは、ブラウザの読み込みから再生プレイヤーに動画データを転送するまでの部分をスレッド化した上で、並列処理する。これにより、ブラウザに埋め込まれた複数の再生プレイヤーを同時に読み込むことができ、クライアントは複数の再生プレイヤーと同時に通信できる。また、配信開始部の動画識別子をもとに各動画で先頭のサブセグメントを受信すると、クライアントは分割配信の通信プロトコルを逐次再生の通信プロトコルであるHTTPに変換して、対応する再生プレイヤーにサブセグメントを送信することで、複数動画を同時に逐次再生できる。

図 5: *TeleCaS* のスクリーンショット

4.4 実装

TeleCaS で複数動画の同期配信および同時再生に対応するように実装した。*TeleCaS* は、チャンネル数、帯域幅、およびセグメントの配信順序が異なるスケジューリング手法を導入できる。*TeleCaS* における再生画面のスクリーンショットを図 5 に示す。図 5 は、3 種類の動画データを同時に再生している様子を示す。動画再生は、Adobe Flash Player を用いた。

5. 評価

5.1 評価環境

TeleCaS の評価環境を図 6 に示す。実際のネットワーク環境を想定して、*TeleCaS* を導入した計算機を複数台用いてネットワークを構成した。サーバ計算機とクライアント計算機は Gigabit Ethernet で接続した。サーバ計算機とクライアント計算機の間は、帯域制御機能をもつ Dummynet を利用できる計算機を経由することで、ネットワークの帯域幅を制御する。本研究では、Dummynet により帯域幅を制御した上で、単位時間あたりに受信するデータ量を帯域幅として算出する。また、マルチキャスト通信を用いることで、放送型による動画配信を実現した。

5.2 *TeleCaS* を用いた評価

実際のネットワーク環境でスケジューリング手法の有用性を確認するため、FB 法、MV-B 法、および MV-R 法の 3 種類のスケジューリング手法を用いて、*TeleCaS* 上で待ち時間および途切れ時間の評価を行う。計算機シミュレーションで算出される待ち時間の値を理想値とし、*TeleCaS* による配信で算出され

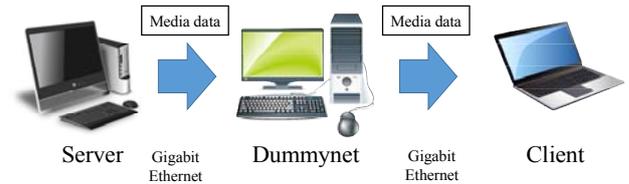


図 6: 評価環境の構成

る待ち時間と途切れ時間の値を測定値とする。各スケジューリング手法における待ち時間の理想値は、第 1 セグメントの受信時間の半分とした。理想値の算出で必要となる第 1 セグメントのデータサイズは、スケジューリング手法にもとづき、評価に用いる各動画データを分割した第 1 セグメントのデータサイズの平均値とした。

クライアントが一続きの動画データを再生終了まで途切れなく再生するため、再生中に発生する途切れ時間の分だけ動画の再生開始を遅らせる必要がある。そこで、待ち時間の測定値(以下、実待ち時間)は、*TeleCaS* で測定する待ち時間と途切れ時間の合計値とした。また、*TeleCaS* で測定する待ち時間と途切れ時間はクライアント計算機 3 台の平均値とし、クライアントが動画データの受信をサーバに要求した時刻から測定を開始する。また、評価では、逐次再生方式を用いることで、第 1 セグメントのうち先頭部分となるサブセグメントを受信すると再生を開始できる。

5.3 待ち時間に関する評価

複数動画の配信において、3 種類のスケジューリング手法を導入し、実際のネットワーク環境における実待ち時間の短縮効果を確認する。動画のデータサイズを変化させた場合に発生する待ち時間の変化を図 7 に示す。横軸は動画のデータサイズ、縦軸はクライアント計算機で各動画の実待ち時間を同一条件で 10 回求めた平均値とした。また、再生時間が異なる動画データを使用して、動画のデータサイズを変化させた。動画のデータサイズ以外の配信条件について、チャンネルの帯域幅は 1.5 Mbps、動画の再生レートは 1.5 Mbps、ブラウザ内の再生プレイヤー数は 5 個、チャンネル数は 15、および動画数は 5 種類とする。

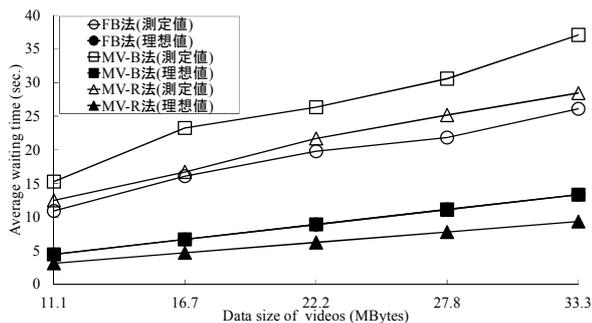


図 7: セグメントのデータサイズと平均待ち時間

まず、理想値について説明する。図 7 より、FB 法と MV-B 法における平均待ち時間の理想値はどちらも等しい。15 個のチャンネルで 5 種類の動画データを配信する場合、FB 法と MV-R 法の動画分割数は 7 で同じであり、第 1 セグメントの大きさは等しいため、第 1 セグメントを受信する時間の半分である平均待ち時間の理想値は一致する。一方で、MV-R 法の動画分割数は 10 であり、第 1 セグメントの大きさは他の二つの手法より小さくなるため、MV-R 法における平均待ち時間の理想値は他の手法より短くなる。

次に、測定値の評価結果について説明する。図 7 より、すべてのスケジューリング手法について、測定値は理想値に比べて長大化する。例えば、動画データサイズが 22.2 Mbytes における FB 法の理想値と測定値について考える。FB 法の理想値は、動画データサイズが 22.2 Mbytes の第 1 セグメント (約 3.18 Mbytes) を受信する時間の半分であり、約 8.9 秒となる。一方、FB 法の測定値は、待ち時間が約 8.8 秒、途切れ時間が約 11.0 秒であり、実待ち時間は合計で約 19.8 秒となる。この時間差は、シミュレーション環境では考慮していない動画再生中の途切れ時間の影響によるものである。

また、動画データサイズが 22.2 MBytes の場合、MV-R 法の測定値は、待ち時間が約 6.2 秒、途切れ時間が約 15.5 秒であり、実待ち時間は合計で約 21.7 秒となるため、FB 法より長い。一方、理想値では、MV-R 法の待ち時間は FB 法より短い。測定値では、動画再生中に発生する途切れ時間の影響により、スケジューリングが FB 法に比べて複雑である MV-R 法の実待ち時間は大きく長大化する。

6. おわりに

本研究では、分割放送型配信システム *TeleCaS* において複数動画の同期配信を実現するため、セグメントの配信契機を考慮した同期配信方式、および複数動画の同時再生方式を提案した。また、これらの対処を *TeleCaS* で実装して評価を行い、実待ち時間の短縮効果を評価した。評価では、*TeleCaS* 上で複数動画に対応したスケジューリング手法を導入して、待ち時間の短縮効果を確認した。

今後の予定として、動画再生中に発生する途切れ時間を短縮する方法の検討、およびパケット損失を考慮したスケジューリング手法の導入がある。

【参考文献】

- [1] Juhn, L. and Tseng, L.: Fast Data Broadcasting and Receiving Scheme for Popular Video Service, IEEE Trans. on Broadcasting, Vol. 44, No. 1, pp. 100-105 (1998).
- [2] Chen, Y. and Huang, K.: Multiple Videos Broadcasting Scheme for Near Video-on-Demand Services, Proc. IEEE Int. Conf. on SITIS' 08, pp. 52-58 (2008).
- [3] 木村明寛, 後藤佑介, 谷口秀夫: 動画データを分割配信するシステムの実現と評価, 電子情報通信学会論文誌 B, Vol. J96-B, No. 10, pp. 1217-1225 (2013).

交流大電流通電を可能とする単相高温超電導変圧器を用いた 小型・軽量電源の開発

岡山大学 大学院自然科学研究科 産業創成工学専攻

七戸 希

高温超電導線は市販のものでも液体窒素温度 77K・自己磁場下で 1mm^2 の断面積に 200A 以上の電流を電気抵抗ゼロで流すことができ、同線を用いた小型・高効率の電力機器の実現が期待されている。その機器開発のためには高温超電導線の通電特性を設計段階で十分把握しておく必要があり、その通電特性を把握するための試験には 1mm^2 の断面積を持つ高温超電導線において 200A を超える通電が可能な大電流電源が必要となる。しかしながら、市販の特に交流電源では、一般に体積および重量が非常に大きく、設置場所の制約や設置後の移動の困難さなど利用性においてデメリットが大きい。よって、大学研究室等では導入が難しく、このことがひいては高温超電導電力機器の開発の妨げとなる。そこで、著者らは単相高温超電導変圧器を用いた小型・軽量かつ高効率の交流大電流電源の開発を行った。同変圧器の一次側に低電流電源を接続し、二次側にて 500A の電流を出力できる構成の電源であり、高温超電導変圧器を用いることで体積と重量を削減することができる。開発した電源の体積と重量は 0.02m^3 と 16kg であり、それらは市販電源の約 1/12 となった。

1. まえがき

低炭素社会の実現に貢献できる機器として、さらにはスマートグリッドの主要構成機器として高温超電導電力機器の実用化が期待されている^[1]。その機器開発のためには同機器に用いられる高温超電導線の通電特性を設計段階で十分把握しておく必要がある。同線は市販のものでも液体窒素温度・自己磁場下で $200\text{A}/\text{mm}^2$ 以上の臨界電流密度を持っている^[2]ため、 1mm^2 の断面積を持つ高温超電導線において通電特性を把握するためには 200A を超える通電が可能な大電流電源が必要である。今後の高温超電導線の特性向上や 1mm^2 以上の断面積を持つ場合を考慮すると、500A 程度の通電が可能な電源が望まれる。ところが、市販の特に交流電源は、体積および重量が非常に大きく、設置場所の制約や移動の困難さなど利用性においてデメリットが大きく、小スペースしか持つことができない大学等の研究室では導入が難しい。このことは、ひいては超電導機器開発に関する基礎・応用研究の進捗に対して大きな妨げとなる。そこで、本研究にて、交流大電流通電を可能とする単相高温超電導変圧器を用いた小型・軽量電源を開発した。本電源は、同変圧器の一次側に小型の低電

流電源を接続し、二次側にて最大 500A を通電可能な電源であり、高温超電導変圧器を用いることで体積と重量を削減することができる。なお、高温超電導変圧器を用いると冷却の必要性が生じるが、電源の用途が高温超電導線の通電特性の測定であるため、同線に冷却が必要であることから、並行して冷却すればよく、使用環境に適合した電源である。開発した電源の体積と重量は 0.02m^3 と 16kg であり、市販電源の約 1/12 となった。

以下に電源の構成と通電試験の結果について述べる。

2. 電源の設計

図 1 に電源の構成を示す。単相高温超電導変圧器の一次巻線よりも二次巻線の巻数を小さくすることで、一次側に接続した低電流電源の電流を二次側にて増加させ、二次側で大電流を得る構成である。低電流電源としては、高温超電導線の通電特性把握のためには周波数可変型であることが必要である^[4]ため、インバータを接続することを想定している。変圧器の諸元を表 1 に示す。一次側定格値を 100V/30A とし、二次側で 6V/500A を出力するものである。一

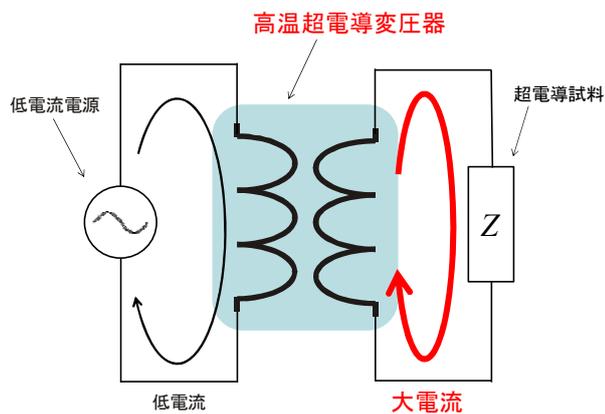


図1 電源構成

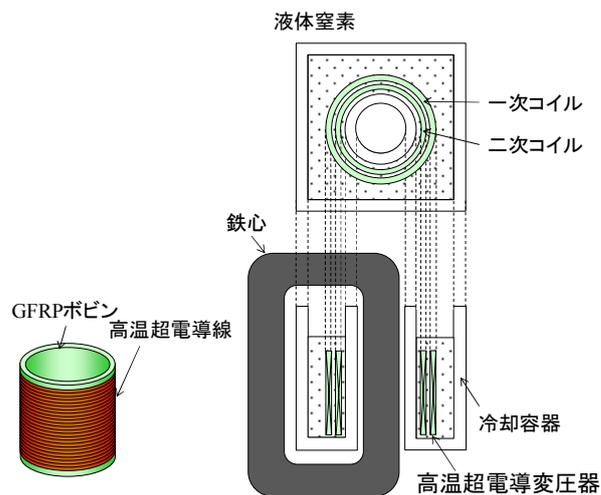


図2 高温超電導変圧器の構成

表1 高温超電導変圧器の諸元

	一次コイル	二次コイル
内径	100 mm	83 mm
外径	110 mm	89 mm
高さ	100 mm	100 mm
巻数	83	5
容量	100V/30A	6V/500A

次側定格値は、大学研究室等で容易に得ることができる電圧と電流値とし、これらの値を基準として、二次側に500Aが得られるようにした。

図2に高温超電導変圧器の構成を示す。同図左のように GFRP ボビンに高温超電導線をソレノイド状に巻くことで一次コイルと二次コイルを作製した。表1のように二次コイルの直径を一次コイルよりも小さくし、図2右のように同軸に組み合わせた。このように作製することで、もれ磁場の低減をするとともに巻線への印加磁場も低減している。後者により、高温超電導線で生じる交流損失^[3]の低減と、臨界電流の低下の抑制をすることができる。巻線に用いた高温超電導線は住友電気工業の DI-BSCCO (Bi2223 線) であり、一次巻線には Type S を 1 本、二次巻線には Type H を 5 本 1 束のケーブルにしてそれぞれ用いた。どちらもテープ形状の線であり、Type S は幅 2.4mm、厚さ 0.19mm、臨界電流 73A (77K、自己磁場)、Type H は幅 4.3mm、厚さ 0.23mm、臨界電流 190A (77K、自己磁場) である。一次巻線と二次巻線の臨界電流はともに定格電流の 2 倍程度となっており、安全のために余裕を持たせた設計とした。これ

らのコイルの中心に、図2右のように鉄心を通してある。鉄損低減のため、方向性電磁鋼板のカットコアを用いている。

冷却容器には、図2右のように、巻線のみが冷却される構造の発泡スチロール容器を用いた。強度と断熱性を考慮し、発泡倍率 30 倍のものを使用し、厚さはすべての箇所でも 10mm である。同容器に液体窒素を入れることで巻線を冷却する。このとき鉄心は室温のままになるため、鉄心ごと冷却する場合と比較して、冷却効率が高くなり、鉄損を低減することができる。

図3に作製した変圧器の写真を示す。一次側に接続する低電流電源（インバータを想定）を含めた電

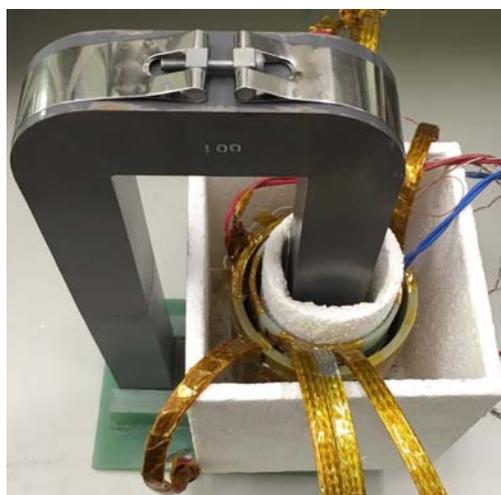


図3 高温超電導変圧器の写真

源全体の総体積と総重量は 0.02m^3 と 16kg であり、市販電源の約 $1/12$ となった。

なお、本電源に用いられる高温超電導変圧器のように、高温超電導線を用いた電力機器には、通電中の電気抵抗の発生による焼損事故を防止するために保護システムを取り付けることが必須である。これについては著者に多くの開発実績^[5]があり、これらを本変圧器に適用できるように改良することで安全性の確保も実現している（研究成果^[6]）。

3. 通電試験

作製した高温超電導変圧器を用いて、目標の 500A の通電が行えるかを検証するための通電試験を行った。試験では、図1の低電流電源としてスライダックを、二次側には超電導試料を想定して $10\text{m}\Omega$ の抵抗器を接続して通電を行った。試験結果を図4に示す。同図(a)はスライダックにより印加した一次電圧、

同図(b)は変圧器二次側に発生した出力電圧である。一次電圧のピーク値は 83V 、二次電圧は 5V となっており、表1の巻数比どおりの電圧になっていることがわかる。同図(c)は一次側通電電流、同図(d)は $10\text{m}\Omega$ の抵抗器に流れる出力電流である。一次側電流のピーク値 30A に対して二次側電流のピーク値は 500A となっており、巻数比どおりの電流が流れていることと目標値の 500A 通電を達成できたことがわかる。どちらの電流波形にもひずみが無く、交流電源として活用できることが見込まれる。

4. まとめ

本研究にて、高温超電導変圧器を用いた小型・軽量の交流大電流電源の開発を行った。一次巻線よりも二次巻線の巻数を小さくし、一次側に低電流を通電して二次側で大電流を出力する構成の電源であり、ソレノイド形状の一次および二次コイルを Bi2223

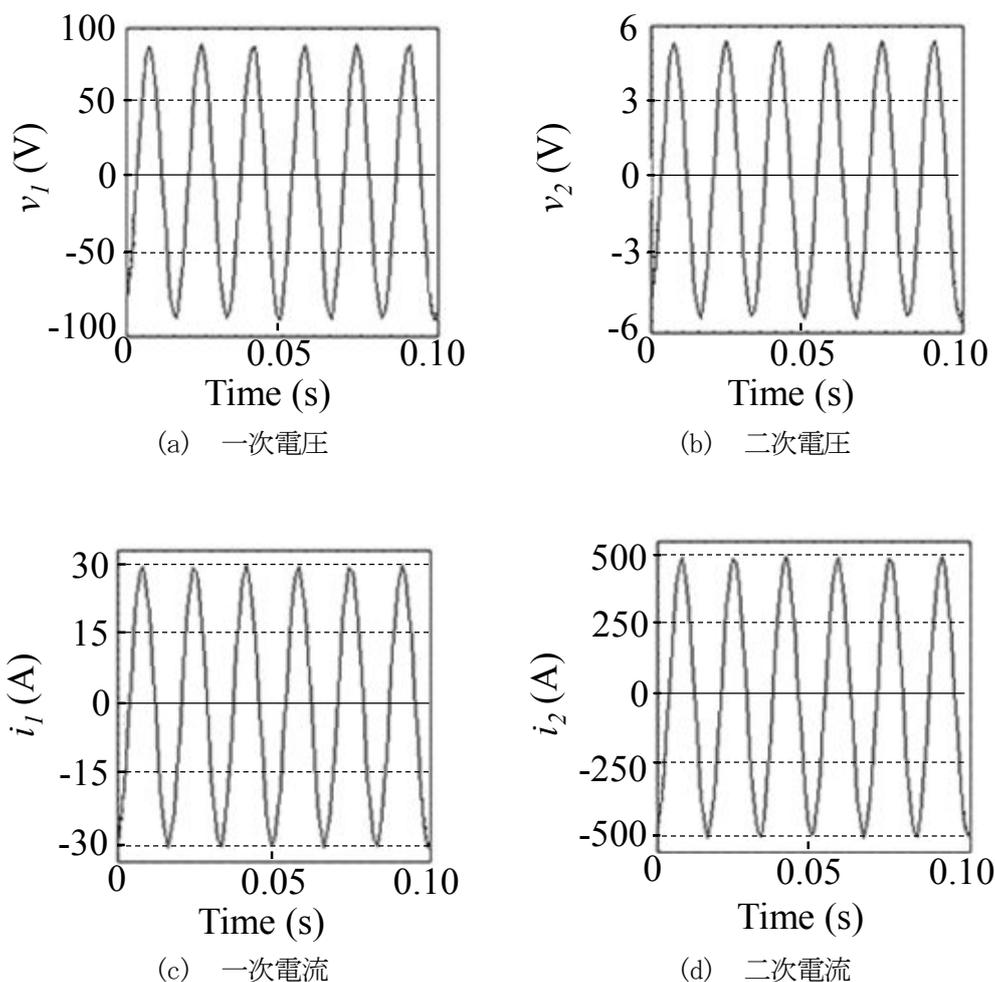


図4 通電試験結果

高温超電導線にて作製して同軸に組み合わせ、鉄心を通すことで変圧器を構成し、液体窒素にて両コイルのみが冷却され、鉄心は室温に保持される構造の冷却容器を作製した。一次側定格値を100V/30A、二次側定格値を6V/500Aとして作製し、通電試験を行ったところ、二次側にひずみの無い電流を最大500Aまで通電することができ、設計どおりの通電を達成できた。また、開発した電源の体積と重量は0.02m³と16kgとなり、ともに市販電源の約1/12にすることができた。

また、本研究に関する研究として、現在、以下を進めている。

- ・一次コイルのみ銅コイルとしたハイブリッド変圧器の検討
- ・アモルファス鉄心の使用
- ・高温超電導線としてYBCO線の使用
- ・電源を周波数可変にすることを目的としたインバータの使用と通電特性解析

以上の検討により、さらなる小型・軽量化、高効率化を行い、実用性の高い電源を開発していく。

研究成果

- [1] 門脇 良, 七戸 希, 有効電力法を用いたハイブリッド単相 YBCO 高温超電導変圧器の常電導転移保護システム, 第 17 回 IEEE Hiroshima Student Symposium, No. A-29, 2015. 11. 21-22, 岡山大学
- [2] 田中 雄飛, 岸 紀行, 七戸 希, 単相 Bi2223 高温超電導変圧器のインバータ通電における電流ひずみ抑制, 第 17 回 IEEE Hiroshima Student Symposium, No. A-30, 2015. 11. 21-22, 岡山大学
- [3] 小野 孝晃, 小出 哲之, 七戸 希, 単相 Bi2223 高温超電導変圧器を用いた小型交流大電流電源の開発, 第 17 回 IEEE Hiroshima Student Symposium, No. A-31, 2015. 11. 21-22, 岡山大学
- [4] 田中 慎一, 中村 慎吾, 七戸 希, ハイブリッド単相 Bi2223 高温超電導変圧器を用いた小型交流大電流電源の開発, 第 17 回 IEEE Hiroshima

Student Symposium, No. B-28, 2015. 11. 21-22, 岡山大学

- [5] 岸 紀行, 七戸 希, 単相 Bi2223 高温超電導変圧器のインバータ通電における損失特性, 平成 27 年度 (第 66 回) 電気・情報関連学会中国支部連合大会, No. 3-1, 2015. 10. 17, 山口大学
- [6] 小出 哲之, 七戸 希, 有効電力法を用いた単相 Bi2223 高温超電導変圧器の常電導転移保護システム, 平成 27 年度 (第 66 回) 電気・情報関連学会中国支部連合大会, No. 3-1, 2015. 10. 17, 山口大学
- [7] 中村 慎吾, 七戸 希, 有効電力法を用いたハイブリッド単相 Bi2223 高温超電導変圧器の常電導転移保護システム, 平成 27 年度 (第 66 回) 電気・情報関連学会中国支部連合大会, No. 15-9, 2015. 10. 17, 山口大学

参考文献

- [1] 電気学会, 超電導電力機器とシステムの高性能・多機能化, 電気学会技術報告, 第 1290 号 (2013)
- [2] Tomohiro Kagiya, et al., Recent R&D progress on DI-BSCCO wires with high critical current properties, Physics Procedia, Vol. 27, pp. 256-259 (2012)
- [3] 仁田旦三, 超電導エネルギー工学, オーム社, pp. 36-45 (2006)
- [4] K. Wakasugi, S. Murase, F. Naito, S. Shimamoto, Effects of frequencies and temperatures on self-field loss for Ag/Bi-2223 tapes, Physica C, Vols. 357-360, pp. 1209-1212 (2001)
- [5] For example, N. Nanato, Y. Kobayashi, Quench Detection and Protection for High Temperature Superconducting Transformers by Using the Active Power Method, Physics Procedia, Vol. 58, pp. 264-267 (2014)

脱水素ケイ素化およびリン化反応を利用した新規求核分子触媒の創製

岡山大学大学院 自然科学研究科

村井 征史

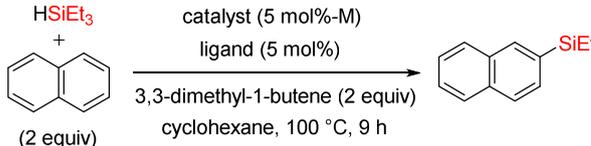
脱水素を伴う炭素-水素結合の触媒的な官能基化は、原子効率や環境調和性の観点から有用である。しかし、ヘテロ原子を含む配位性補助基を持たない芳香環の官能基化法は限られており、これまでに報告されている手法では、高温や大過剰の芳香族化合物を用いることが必須であった。これに対し、本研究では、イリジウム錯体を用いることで、芳香族化合物の炭素-水素結合のケイ素化反応が、触媒的に効率よく進行することを見出した。本反応により、水素を副生するだけで、酸化的ハロゲン化や玉尾酸化、檜山クロスカップリング反応により、ハロゲンやヒドロキシ基、アリール基を始めとした多様な官能基へと容易に変換可能なシリル基を、芳香環に一段階で導入できた。詳細な検討により、反応は電子不足かつ縮環数の多い芳香環ほど、円滑に進行し、位置選択性は立体障害によってコントロールされることが分かった。すなわち、今回のケイ素化に基づく官能基化は、臭素化に代表される従来法とは完全に異なる反応性を示し、求核触媒を含む新規分子の開発に、非常に有用であることが明らかとなった。

研究申請の段階において、本申請者は、遷移金属触媒存在下、ヒドロシランをアズレンに作用させることで、脱水素を伴うアズレンの炭素-水素結合のケイ素化反応が起こることを見出ししていた。ここで導入されるシリル基は、酸化的ハロゲン化や玉尾酸化反応、檜山クロスカップリング反応により、ハロゲンやヒドロキシ基、アリール基を始めとした、多様な官能基へと容易に変換可能である。この知見を基に、本申請課題「脱水素官能基化を利用した求核分子触媒の開発」への第一歩として、まず、様々な芳香族化合物に適用可能な、汎用性の広い脱水素ケイ素化反応の確立を目指すことにした。

触媒量のイリジウム錯体 $[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{cod})]_2$ と配位子 3,4,7,8-テトラメチル-1,10-フェナントレン **tmphen** 存在下、ナフタレンにトリエチルシランを作用させ、 100°C で9時間反応させると、2-シリルナフタレンが収率70%で得られた (Table 1, entry 1)。この時、ナフタレン環の1位の炭素-水素結合のケイ素化による1-シリルナフタレンは全く副生しなかった。本反応では、反応の進行に伴い水素が副生するが、その効率的な捕捉のために3,3-ジメチル-1-ブテンの添加が必須であった。また、円滑な反応の進行のため

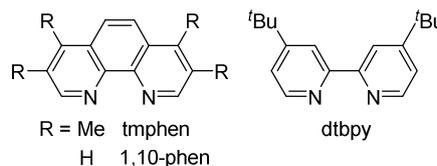
には二座窒素配位子の使用が効果的であることや、イリジウムと同じ9族の対応するロジウム錯体 $[\text{Rh}(\text{OMe})(\text{cod})]_2$ を用いた場合、反応がほとんど進行しないことが分かった (entries 3-6)。

Table 1. Optimization of reaction conditions



entry	catalyst / ligand	Yield
1	$[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{cod})]_2$ / tmphen	71 (70)
2	$[\text{IrCl}(\text{cod})]_2$ / tmphen	53
3	$[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{cod})]_2$ / dtbpy	48
4	$[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{cod})]_2$ / 1,10-phen	42
5	$\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$	1
6	$[\text{RhCl}(\text{cod})]_2$ / tmphen	1

Yields are determined by ^1H NMR. The value in parentheses is isolated yield.



$[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{cod})]_2$ 触媒と **tmphen** 配位子存在下、様々な芳香族化合物のケイ素化を検討した (Table 2)。そ

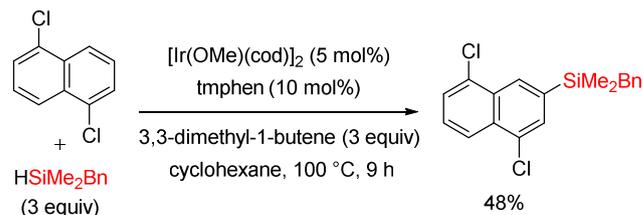
の結果、電子求引性および供与性の置換基を有する種々のナフタレン誘導体がトリエチルシランと反応し、対応する β -シリルナフタレンを与えることが分かった (entries 1-3)。なお、電子不足な芳香族化合物のケイ素化は非常に速く進行し、ジシリルナフタレン誘導体の副生もわずかに確認された (entries 1 and 3)。本反応はヘテロ原子を含むイミド誘導体やアントラセン、フェナントレン、ピレンに対しても円滑に進行し、それぞれ対応する芳香族シランを中程度の収率で与えた (entries 4-7)。芳香環の電子的な性質に依らず、いずれの場合にもケイ素化は立体障害の最も小さい位置で選択的に起こった。さらに本反応には、檜山クロスカップリングに利用可能なベンジルジメチルシランも適用できた (Scheme 1)。

Table 2. Iridium-catalyzed dehydrogenative silylation of polycyclic aromatic compounds

entry	Product
1 ^b	
2 ^a	R = 4-MeOC ₆ H ₄ : 72%
3 ^{a,b}	R = 4-CF ₃ C ₆ H ₄ : 72% R = 4-CF ₃ C ₆ H ₄ : 7%
4 ^a	
5 ^a	64%
6 ^a	31% 31%
7 ^a	54%

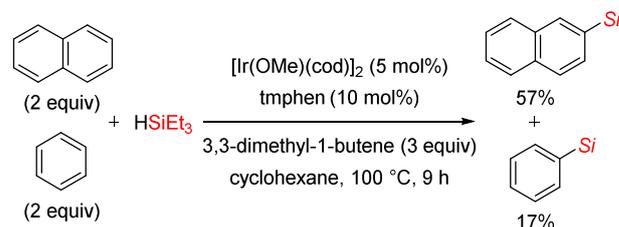
^a Dioxane was used as a solvent. ^b For 4 h.

Scheme 1. Iridium-catalyzed dehydrogenative silylation with benzyldimethylsilane



興味深いことに、イリジウム触媒を用いる本反応条件下では、ベンゼンが共存していてもナフタレンが選択的にケイ素化された (Scheme 2)。現段階ではこの反応性の序列は、芳香族化合物とイリジウム活性種の相互作用の強さに依存すると考えている。すなわち、芳香族共鳴安定化エネルギーはベンゼン環の縮環に伴って低下するため、ナフタレンの二重結合の結合次数は、ベンゼンよりも高くなる。これによりイリジウム中心はベンゼンよりもナフタレンにより強く π -配位し、選択的なケイ素化を起こしたと考えられる。

Scheme 2. Selective dehydrogenative silylation of naphthalene in the presence of benzene (Si = SiEt₃)



以上の知見を踏まえ、反応の推定機構を Figure 1 に示した。まず、tmphen が配位した [Ir(OMe)(cod)]₂ 錯体にヒドロシランが酸化的付加した後、還元的脱離を経てイリジウムヒドリド種が生成する。ここにヒドロシランが酸化的付加し、水素捕捉剤へ挿入、還元的脱離を順にすることで、イリジウムシリル種 **A** へと変換される。これが芳香環に π -配位し、**B** に示すように環上で固定される結果、ケイ素化が効率よく進行したのだと考えられる。

一方、イリジウム触媒を用いる本反応条件下で、芳香族化合物にビスピナコラートジボロンを作用させると、炭素-水素結合の直接ホウ素化反応が進行することが分かった。この反応性を利用し、イリジウム触媒存在下、ピレンにヒドロシランとジボロンを連続的に作用させたところ、ピレンの長軸方向に

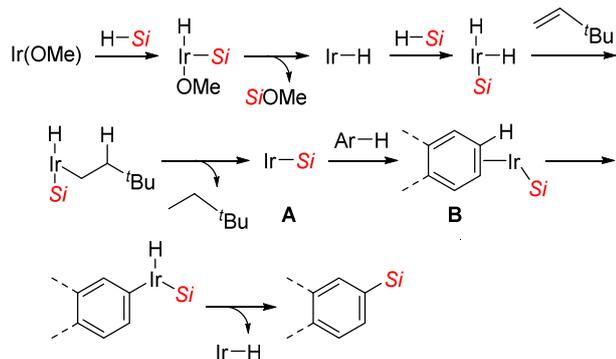
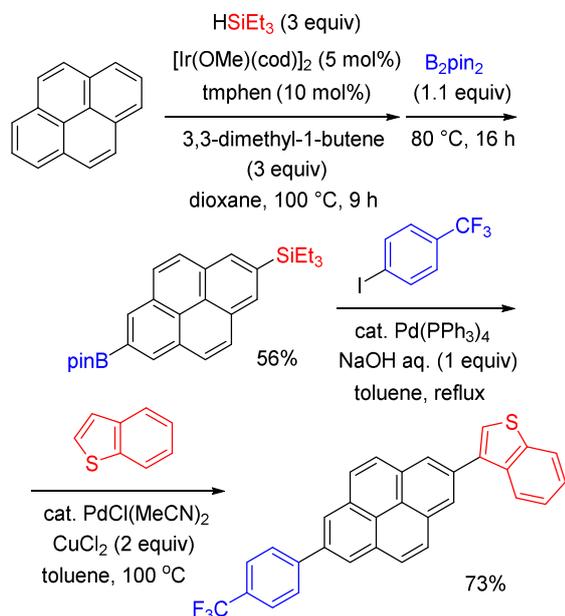


Figure 1. Plausible reaction mechanism (tmphen ligand is omitted for clarity, and Si indicates SiR₃)

位置選択的にシリル基とボリル基を一段階で導入することができた(Scheme 3)。これらの官能基は、パラジウム触媒を用いる鈴木・宮浦クロスカップリング反応と、炭素-水素結合の直接アリール化反応により、それぞれ選択的に変換でき、ドナー部位とアクセプター部位を有する二官能性ピレンを短段階で合成することもできた。

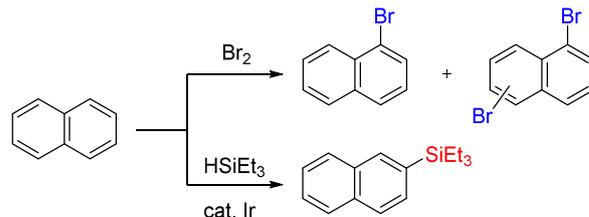
Scheme 3. One-pot, site-selective silylborylation of pyrene and its synthetic application to donor-acceptor substituted pyrene



以上、本研究では、様々な芳香族化合物に適用可能な、脱水素を伴う炭素-水素結合のケイ素化反応を確立した。通常の芳香環の官能基化は臭素化に代表されるように、芳香環の電子的要因に反応性や位置選択性が支配され、電子豊富な化合物にしか適用できない (Figure 2)。一方、今回のイリジウム触媒を用いる手法は、立体障害が最も小さくな

る位置で官能基化が選択的に起こり、化合物を見分けて選択的に官能基化をすることもできた。本反応はこのような特異な位置および化学選択性の発現に加え、ヘテロ原子の配位を要さずに芳香族の炭素-水素結合の官能基化を進行させた非常に珍しい例である。今後、本研究で得られた知見を応用し、新規求核分子触媒の創製に取り組む予定である。

Conventional Method: **Electronic Control** (Site-Selectivity and Reactivity (only with Electron-Rich Aromatics))



This Work: **Steric** (Site-Selectivity) and **Electronic** (Chemoselectivity) Control

Figure 2. Challenge in the functionalization of polycyclic aromatic compounds

発表論文 (査読付き論文)

- (1) "Palladium-Catalyzed Direct Arylation of Azulene Based on the Regioselective C-H Bonds Activation" Murai, M.*; Yanagawa, M.; Nakamura, M.; Takai, K.* *Asian Journal of Organic Chemistry* **2016**, Accepted.
- (2) "Synthesis of Sila[n]helicenes via Dehydrogenative Silylation of C-H Bonds under Rhodium Catalysis" Murai, M.*; Okada, R.; Nishiyama, A.; Takai, K. *Under review*.
- (3) "Rhodium-Catalyzed Synthesis of Chiral Spiro-9-silabifluorenes via Dehydrogenative Silylation: Mechanistic Insights into the Construction of Tetraorganosilicon Stereocenters" Murai, M.*, Takeuchi, Y.; Yamauchi, K.; Kuninobu, Y.; Takai, K.* *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22*, 6048-6058 (Selected as a *Hot Paper*).
- (4) "Molybdenum-Catalyzed Stereospecific Deoxygenation of Epoxides to Alkenes" Asako, S.; Sakae, T.; Murai, M.; Takai, K.* *Under review*.
- (5) "Short Synthesis of [5]- and [7]Phenacenes with Silyl Groups at the Axis Positions" Roy, D.; Maekawa, H.;

- Murai, M.*, Takai, K.* *Chemistry –An Asian Journal*, **2015**, *10*, 2518-2524.
- (6) “Rhodium-Catalyzed Synthesis of Benzosilolometallobenes via the Dehydrogenative Silylation of C(sp²)-H Bonds” Murai, M.*, Matsumoto, K.; Takeuchi, Y.; Takai, K.* *Organic Letters*, **2015**, *17*, 3102-3105.
- (7) “Rhenium-Catalyzed Efficient Stereospecific Deoxygenation of Unactivated Aliphatic Epoxides to Alkenes” Nakagiri, T.; Murai, M.*, Takai, K.* *Organic Letters*, **2015**, *17*, 3346-3349.
- (8) “Acceleration Effects of Phosphine Ligands on the Rhodium-Catalyzed Dehydrogenative Silylation and Germylation of Unactivated C(sp³)-H Bonds” Murai, M.*, Takeshima, H.; Kuninobu, Y.; Takai, K.* *Journal of Organic Chemistry*, **2015**, *80*, 5407-5414 (Selected as a *Featured Article* and *ACS Editor’s Choice*).
- (9) “Iridium-Catalyzed Dehydrogenative Silylation of Azulenes Based on the Regioselective C-H Bonds Activation” Murai, M.*, Takami, K.; Takeshima, H.; Takai, K.* *Organic Letters*, **2015**, *17*, 1798-1801.
- (10) “Rhenium-Catalyzed Dehydrogenative Borylation of Primary and Secondary C(sp³)-H Bonds Adjacent to a Nitrogen Atom” Murai, M.*, Omura, T.; Kuninobu, Y.; Takai, K.* *Chemical Communications*, **2015**, *51*, 4583-4586.
- (11) “Palladium-Catalyzed Synthesis of 3-Acyl-2-aminobenzofurans via Three-Component Coupling Reactions of 2-(Cyanomethyl)phenols with Aryl Halides and CO” Murai, M.*, Okamoto, K.; Miki, K.; Ohe, K.* *Tetrahedron* **2015**, *71*, 4432-4437.
- (12) “Transition Metal-Catalyzed Facile Access to 3,11-Dialkylfulminenes for Transistor Application” Murai, M.*, Maekawa, H.; Hamao, S.; Kubozono, Y.; Roy, D.; Takai, K.* *Organic Letters*, **2015**, *17*, 708-711.
- (13) “Rhenium-Catalyzed anti-Markovnikov Addition Reaction of Methanetricarboxylates to Unactivated Terminal Acetylenes” Hori, S.; Murai, M.*, Takai, K.* *Journal of American Chemical Society*, **2015**, *137*, 1452-1457.
- (14) “Isolation and Structural Characterization of *gem*-Biszinciomethane Complexes Stabilized with Nitrogen Ligands” Nishida, Y.; Hosokawa, N.; Murai, M.*, Takai, K.* *Journal of American Chemical Society*, **2015**, *137*, 114-117.
- (15) “Iridium-Catalyzed Intermolecular Dehydrogenative Silylation of Polycyclic Aromatic Compounds without Directing Group” Murai, M.*, Takami, K.; Takai, K.* *Chemistry -A European Journal*, **2015**, *21*, 4566-4570.

江戸期の巨石樋門・倉水門の撤去に関わる3Dレーザースキャナによる記録保存および文献調査 【経過報告】

岡山大学大学院環境生命科学研究科

樋口輝久

倉敷市亀山と帯高の間を流れる2級河川・六間川に位置する倉水門は、潮除け水門として宝永4(1707)年に築造されたもので、全幅10m(2連)、花崗岩の石梁を大胆に使用した典型的な岡山式の石造樋門であると同時に、岡山県内に現存する最古の巨石樋門でもあり、非常に貴重な土木遺産である。その倉水門が、岡山県の河川改修事業によって撤去されることになったが、地域住民による保存活動が行われたため、撤去はされるものの、解体された石材を保管し、倉敷市によって近くの公園で一部復元されることになった。そこで本研究では、貴重な土木遺産を3Dレーザースキャナ計測によって記録保存を行い、解体後の復元のために活用するとともに、関係する古文書を収集、分析する。当初、平成26年度に予定されていた撤去作業が、工事の遅れによって平成27年度に延期されたが、さらに延期されたため、3Dレーザースキャナ計測が実施できず、平成28年度に持ち越すこととなった。

1. 研究の目的

倉水門の撤去に対して、地域住民が岡山県と倉敷市に保存の要望書を提出したにもかかわらず、河川拡幅のため現位置での保存は不可能との判断で、移設についても予算的に不可能との結果であった。その後、倉敷市との協議によって、撤去される樋門の石材の一部を付近の公園でモニュメントとして再利用し、残りは市の所有地に保管しておくことでまとまった。石材を丁寧に取り外し、保存しておくことによって、将来、倉水門を復元する道筋が残された。しかしながら、倉水門は文化財に指定されておらず、岡山県および倉敷市の教育委員会は記録保存の予算すら確保できないため、代表研究者が将来の倉水門復元に向けた記録保存をしようとするものである。今、計測をして記録を残しておかなければ、二度と復元できなくなるばかりか、300年以上にわたって干拓地の生命線として機能し、地域で親しまれてきた倉水門の存在そのものが忘れ去られてしまう。また、歴史的構造物にとって、撤去は最悪の結果であるが、江戸期の石造樋門が稀少となった今日、その撤去作業によって当時の築造技術、とりわけ基礎構造が明らかとなる貴重な機会でもあり、本研究の果たす学術的役割は高い。

2. 研究の内容と進捗状況

本研究では、記録保存のための実測調査と、関係する古文書等の文献調査を実施する予定であった。

実測調査は、倉水門が撤去作業される際、上部構造(水面より上)について、固定レーザースキャナによる3D計測を行い、河川を締切り、水抜きをした後に、水面より下の部分と基礎構造を計測する予定であったが、撤去作業が当初の平成27年2~3月から平成27年12月~平成28年(本年)2月に延期され、その後、さらにそれも延期された。

ところが、年度が明けた本年4月に、5月16日から出水期の6月15日までに撤去されることが示された。事業主体である岡山県に対しては、将来の復元のために実測調査を行う時間の確保と丁寧な石材の撤去を、再三にわたって申し入れていたにもかかわらず、1ヶ月という短い工期では、いずれも十分な成果を得るのが厳しい状況となった。

なお、解体の際は、将来の復元に備え、城郭石垣の解体復元の手順と同様に石材に番号を付して記録する予定であったが、とてもそのような時間的な余裕はなくなってしまった。さらに、再利用する一部の石材以外は、重機によって強制的に撤去する旨も示された。当然のことながら、水門本体の解体撤去

後、土中の基礎部分を段階的に掘削し、当時の基礎構造、築造技術を確認しながら計測することは不可能となった。

3. 今後の予定

水門の撤去作業が始まる直前（5月中旬）に、施工者と日程調整をしながら、上部構造（水面より上）の3Dレーザースキャナ計測を実施する。また、水面下の橋台、橋脚については、締切後、重機で石積が撤去される前に、工事の進捗状況を確認しながら、右岸側（5月下旬）、左岸側（6月上旬）を順次計測する。

残念ながら、いつの日かの完全復元は不可能となったが、新たな土地を生み出し、300年以上にわたって地域のシンボルとして存在した倉水門の記録と合わせ、歴史的建造物の保存にむけた将来への教訓として今回の事業主の一連の対応を、計測結果がまとまり次第、報告したい。



下流側橋梁部より



上流側の梁と樋柱



左岸上流側より



六間川の上流より



昭和20年の改修記念碑

河川堤防の安全な維持管理のための総合的照査方法の確立

岡山大学大学院 環境生命科学研究科

金 秉洙

本研究では、河川堤防の地盤材料であるまさ土のみで細粒分含有率(F_c) 10%, 25%, 40%, 50%を調整し、細粒分含有率による不飽和土力学特性及び浸透特性を定量的に評価した。まず、一定含水比圧縮試験結果により、細粒分含有率(F_c)が増加するほど、初期飽和度(S_{i0})が減少するほど、土のせん断強度が増加することが確認できた。この結果により、 $F_c=25\%$ 以上になれば、降雨時の水位上昇に対して河川堤防が高い飽和状態($S_r=70\%$ 以上)でも効率的かつ安全に堤防の維持管理が期待されると考えられる。また、一定含水比圧縮試験の試験結果(p_{net} , q)の關係にSSMにより求めたサクシオン応力(p_s)を有効拘束応力として適用し、その關係を評価した。そして、理論式と実験結果から導いた見かけの粘着力(Δc)の比較により、細粒分含有率によるせん断強度の結果を評価した。これらの結果により、河川堤防の地盤材料において細粒分含有率の重要性が明らかになったと考えられる。

有率の提案を目指す。

1. はじめに

本研究では、まず試料となる高梁川堤防から採取したまさ土について物性試験を行ない、土の物性を把握する。その後、試料の細粒分含有率を減少させながら締め固め試験を行い、各細粒分含有率における締め固め曲線を導き、各締め固め度の結果が堤防設計の基準を満足しているかを評価する。次に変水位透水試験を行い、各細粒分含有率における保水性試験を行い、水分特性曲線を求めた。続いて、力学的特性に関しては、飽和状態での圧密非排水三軸圧縮試験(CU)を行い、細粒分含有率による粘着力と内部摩擦角を把握する。また、不飽和状態での一定含水比圧縮試験を行い、細粒分含有率による土の不飽和せん断強度の増減について調べ、土のせん断強度と関連するサクシオンと細粒分含有率の關係を明らかにする。最後に、SSM (Suction stress - SWRC Method : Kim et al. 2010)を適用により、細粒分含有率による各供試体のサクシオン応力(p_s)を求め、有効拘束圧力として適用する。これらの結果により、細粒分含有率による不飽和土せん断強度の変化と飽和状態の破壊線との關係を評価し提体材料の細粒分

2. 理論的背景

2.1 サクシオン(Suction, s)

土塊の間隙空間が完全に水で満たされていない不飽和土には、メニスカス水が土粒子間に生じることで飽和土の場合と異なり、間隙水圧(u_w)だけではなく、間隙空気圧(u_a)が作用する。マトリックサクシオン, s (以後、サクシオンと呼ぶ) は、これら間隙空気圧と間隙水圧の差として定義される。よってサクシオンは、 $s=u_a-u_w$ で表される。

2.2 不飽和せん断強度に対するサクシオンの影響

水のメニスカスが生じて、土にサクシオンが作用すると、土粒子間に吸い込む力が生じる。この粒子間力は、土粒子間の滑りに対する抵抗を増加させ、その結果、不飽和土のせん断強度を増加させる。一般的に、不飽和土せん断強度式は、Bishop and Blight (1963)の提案式を始め、飽和土せん断強度の理論を拡張して提案されてきた。

$$\tau = c + \sigma \tan \phi + \Delta c \quad (1)$$

ここで、 c ：飽和粘着力， σ ：鉛直全応力， ϕ ：内部摩擦角， Δc ：見かけの粘着力である。

不飽和土では，飽和土せん断強度式($\tau = c + \sigma \tan \phi$)に見かけの粘着力(Δc)が加わることで，全体としてせん断応力が大きくなる。また，代表的には，Fredlund et al. (1978)，軽部ら(1996)および Vanapalli et al. (1996)は，見かけの粘着力に対して，次式を提案した。

$$\Delta c = \left(\frac{S_r - S_{r0}}{1 - S_{r0}} \cdot s \right) \times \tan \phi \quad (2)$$

ここで， S_r ：現在の飽和度， S_{r0} ：残留状態の飽和度， s ：サクシオンである。

2.3 土中水の分布の影響およびサクシオン応力

平衡状態における土中の水分量とサクシオンの関係は，水分特性曲線として知られている。乾燥過程と湿潤過程での水分特性曲線の差は，ヒステリシスと呼ばれている。よって，同じサクシオンでも，乾燥過程と湿潤過程では，異なる土中水の状態が存在する。土中水の状態が異なれば，その結果として間隙水の分布状態が変わる。

メニスカス水により生じるサクシオンは内部粒子間力を増加させて，それによって土骨格の剛性を増加させる。一方，バルク水により生じるサクシオンは土骨格の剛性を増加させて，同時に負の間隙水圧と同じ作用によって土骨格を圧縮して体積を減少させる。このような影響は負の間隙水圧の影響と同じものである。

軽部ら(1996)は，メニスカス水の影響で生じる応力成分をメニスカス応力(p_m)，バルク水の影響で生じる応力成分をバルク応力(p_b)で名付けた。また，二つの応力成分の和が次式のようにサクシオン応力(p_s)を構成するとした。また，彼らはサクシオン応力として，次式を提案した。

$$p_s = \frac{S_r - S_{r0}}{1 - S_{r0}} \cdot s \quad (3)$$

表-1 物性試験結果

項目	物理値
土粒子の密度 (ρ_s)	2.58 (g/cm ³)
液性限界(w_L)	N.P
塑性限界(w_P)	24.6 (%)
最大乾燥密度(ρ_{dmax})	1.88 (g/cm ³)

表-2 まさ土の粒度特性

項目	通過率
礫分 (75~2mm)	2.8 (%)
砂分 (2~0.075mm)	78.8 (%)
細粒分 (0.075mm以下)	18.4 (%)
細粒分含有率(F_c)	18.4 (%)
平均粒径(D_{50})	0.38 (mm)

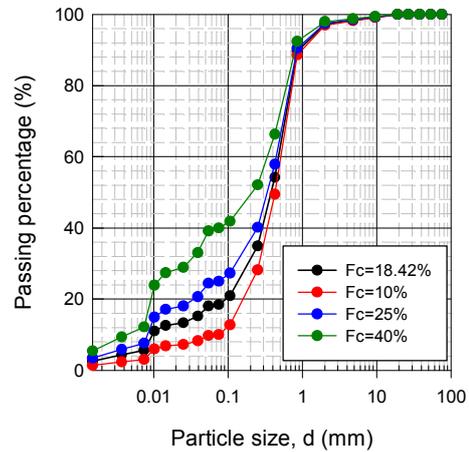


図-1 細粒分含有率によるまさ土の粒度分布曲線

軽部ら(1996)は，締固めたカオリン試料に対する三軸試験の結果を解析した。その結果，せん断過程中的試料の最大体積圧縮状態で同じ拘束圧力 ($p_{net} + p_s$) に対して，せん断応力が一定の関係を示すことが分かった。加藤ら(2001)は，締固めたシルト試料に対してサクシオンと体積変化を測定しながら一軸圧縮試験を行った。その結果から，拘束応力に対する一軸圧縮強度の関係がユニークになることを示した。このようなサクシオン応力は Bishop の有効応力式の χ により次式のように表されると考えられる。

$$p_s = \chi \cdot s \quad (4)$$

3. 試料および物理特性

本研究では、高梁川堤防から採取したまさ土の物理特性の把握のために、土粒子密度試験、液性・塑性試験、締固め試験、粒度試験の4つの試験を行った。これらの結果は、表-1と表-2、図-1と図-2に示す。また、締固め試験(A-a法)においては各細粒分含有率(F_c)による締固め特性を把握し、後述する圧密非排水三軸圧縮試験(CU)や一定含水比圧縮試験(CWCC)での各細粒分含有率(F_c)において、締固め度(D_c)が90%以上を満足していることが確認できる。圧密非排水三軸圧縮試験(CU)により求められたモール・クーロンの破壊基準からの粘着力(c)と内部摩擦角(ϕ)は、表-3に示している。

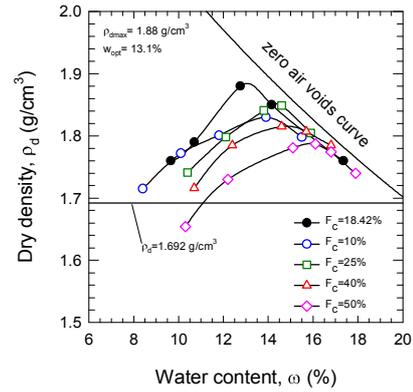


図-2 細粒分含有率による締固め曲線

表-3 c と ϕ の関係

F_c (%)	c (kPa)	ϕ (°)
10	-	-
25	10.0	23.4
40	5.0	23.2
50	16.0	16.2

4. 保水性試験

保水性試験は、セル内の供試体に空気圧（正圧）を負荷し、供試体から排水される水分量を記録する試験である。本研究では、加圧法を採用し、サクシヨンと飽和度の関係である水分特性曲線(soil-water content(retention) curve: SWCC or SWRC)を求め、細粒分含有率(F_c) 10%, 25%, 40%, 50%による水分特性曲線の変化を把握することが目的である。

供試体は、一定含水比圧縮試験に用いる試料と同じまさ土を用いて静的締固め法によって作製した。供試体サイズは、直径 60 mm であり、試験時間を短縮するために供試体高さを 10 mm とした。細粒分含有率による各供試体の初期条件は、乾燥密度(1.692 g/cm³, ρ_{dmax} の 90%), 初期飽和度, 約 80%である。

試験手順としては、まず供試体を飽和させ、試験を行った。本研究での保水性試験では、所定の鉛直応力を与えず、セル圧を段階的に増加させて排水過程を行った。供試体に与えるセル圧としての空気圧は、段階的に 2→5→10→20→50→100→200→400 kPa まで加えられた。各空気圧での排水量が一定に収束すると、次の段階に移った。

細粒分含有率(F_c) 10%, 25%, 40%, 50%において保水性試験を行った。サクシヨン(s) と飽和度 (S_r) の関係を示す水分特性曲線を図-3 にまとめている。水分特性曲線は、含水量による吸水力の変化を現わ

す曲線として不飽和地盤の固有特性を現わしており、地盤の強度と挙動特性を決める非常に重要な基本物性である。これらの水分特性曲線をフィッティングするために、以下の Fredlund and Xing (1994)の提案式を用いた。

$$\theta = C(\psi) \left[\frac{\theta_s}{\ln[e + (\psi/a)^n]} \right]^m \quad (5)$$

ここに、 θ : 体積含水率, ψ : 全サクシヨン(kPa), θ_s : 飽和体積含水率, e : ネイピア数(2.71828), $C(\psi)$: 修正関数である。

$$C(\psi) = \left[1 - \frac{\ln(1 + \psi/\Psi_r)}{\ln(1 + 10^6/\Psi_r)} \right] \quad (6)$$

ここに、 Ψ_r :残留体積含水率に対応するサクシヨン, a : フィッティング変数(空気侵入値と密接な関係を持つ), n : フィッティング変数(水分特性曲線の勾配), m : フィッティング変数(残留含水率と密接な関係を持つ)である。

本研究に用いた試料では、浸透サクシヨン

(Osmotic suction)の影響がほとんどないと考え、式(5)でのトータルサクション(ψ)は、空気圧によるサクション(Matric suction)と等しいと仮定した。表-3は、まさ土試料の試験結果に対して式(5)を適用して得られたフィッティング変数を示している。図-3では、細粒分含有率による水分特性曲線をそれぞれ示しており、それらフィッティングパラメーターは、表-4にまとめた。図により、飽和度が減少と共にサクションの値が増加していること分かる。つまり、供試体から排水量が発生するほど、飽和度が減少し、サクションの増加と繋がる。また、細粒分含有率(F_c)が高いほど、同じ飽和度の条件でサクションの値が大きくなること分かる。

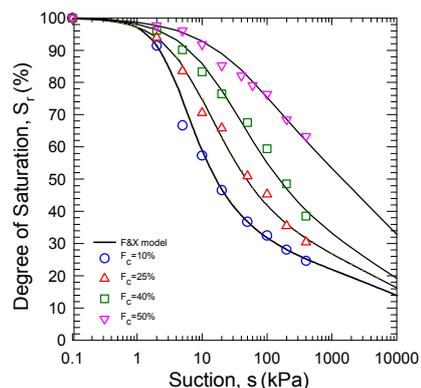


図-3 細粒分含有率による水分特性曲線

表-4 フィッティングパラメーター

F_c (%)	Fitting parameters		
	a	n	m
10	3.20	1.72	0.64
25	6.00	1.19	0.70
40	14.20	0.98	0.73
50	29.50	0.78	0.54

5. 一定含水比圧縮試験

一定含水比圧縮試験とは、供試体を飽和させずに、含水比を一定に保った状態で周りから有効拘束圧力をかけず、鉛直荷重のみを載荷し圧縮を行う試験のことである。そしてその際に、センサーによって一軸圧縮強度を測定し、圧縮によって排水した吸排水量を二重管ビュレットで測定し、そこから体積ひずみを計測し、一軸圧縮強度と体積ひずみの関係を求める。大まかな実験の流れとしては、ふるい分け、試料準備、供試体の作製、供試体の設置、そしてせん断の順に実験を行う。

5.1 試験装置

図-4は、一定含水比圧縮試験の実験装置を示している。この実験装置は、ペロフラムタイプの三軸セルであるペダスタルには、ポーラストーンの代わりにセラミックディスク (AEV=500kPa) を装着している。実験中はセラミックディスクに通じた水管路端部に取り付けたセルに通じる排水経路の先にビュレットを接続して、ビュレット内の水位の変動を差圧計により読み取り、セルからの吸排水量を測定した。吸排水量を測定することによって、体積ひずみを計測した。セル上部には、軸変位計が取り付けられており、せん断中の供試体の軸変位量を測定した。荷重計はセル内部に装着されているため、せん

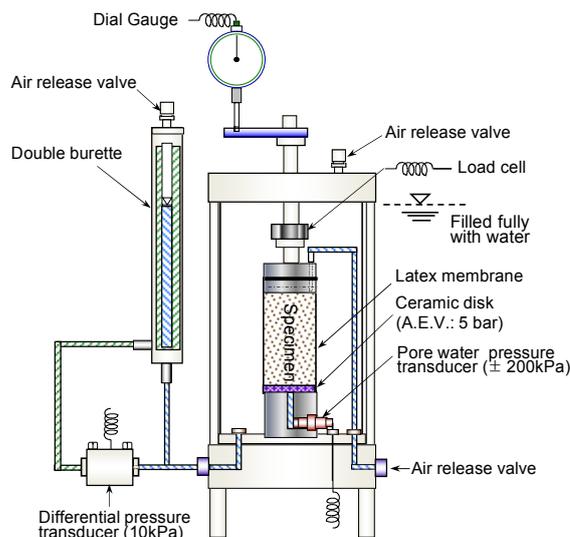


図-4 一定含水比圧縮試験装置の概念図

断時のピストン貫入に伴う摩擦力を考慮する必要のない構造になっている。

5.2 試験方法

本研究で用いる細粒分含有率(F_c) 10%, 25%, 40%, 50%の一定含水比試験の供試体の製作のため、2mmふるいの下に0.075mmふるいを重ね、試料をふるい分けした。また、0.075mmふるいのものを水洗いし、

乾燥させ、2~0.075mm と 0.075mm 以下の 2 種類の試料を用意した。この 2 種類の試料を目標の細粒分含有率(F_c)に混合し、目標の飽和度(S_r)になるように水を加え、十分に混ぜ合わせる。規定の質量を測った試料を 3 等分し、5cm × 10cm モールドに詰め、静的三層締め固めを行い、その後ジャッキを用いて、直径 5 cm、高さ 10 cm 供試体を取り出した。各供試体の初期状態は、表-5 にまとめている。

作製した供試体をポーラスメタルの上に乗せ、メンブレンを被せゴムリングを用いて固定させた。その後、セルを組み立て供試体がすべて水に浸かるようにセル水を入れた。より正確な実験を行うために、セル水注入後、セル内の空気を完全に排除した。荷重計、二重管ビュレットをセットし、鉛直荷重、排水量を測定する準備を行った。せん断過程では、有効拘束圧力を掛けず、不飽和かつ含水比一定の状態、排水条件で 0.1%/min のせん断速度でせん断を行った。その際、鉛直荷重、鉛直変位、排水量を測定した。

5.3 試験結果

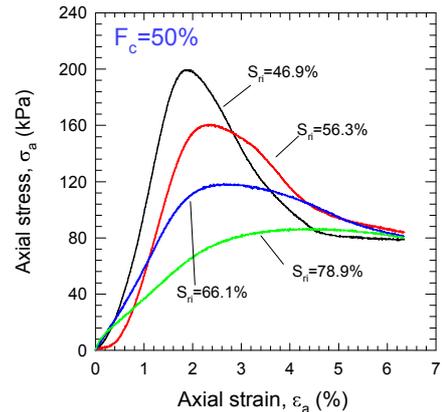
細粒分含有率(F_c) 10%、25%、40%、50%の結果が求められ、代表的に $F_c=50\%$ においてそれぞれ初期飽和度(S_{ri}) 50%~80%に対する試験結果を示す。図-5(a)は、軸ひずみ(ϵ_a)と一軸圧縮強度(q_u)の関係の結果を示している。細粒分含有率(F_c)に関わらず、初期飽和度(S_{ri})が小さくなるほど一軸圧縮強度(q_u)が大きくなることが確認された。また、特に初期飽和度(S_{ri}) 50%、60%では、細粒分含有率が大きくなるほど急激に一軸増加し、早い段階で一軸圧縮強度がピーク値になることが観察された。

また、細粒分含有率(F_c) 50%においてそれぞれ初期飽和度(S_{ri}) 50%~80%に対する軸ひずみ(ϵ_a)と体積ひずみ(ϵ_v)の関係を図-5(b)に示している。図により、軸ひずみ(ϵ_a)が大きくなる程、体積ひずみ(ϵ_v)が大きくなり、膨張していることが確認された。初期飽和度(S_{ri})が高い時に体積の膨張が少ないのは、細粒分の増加によりダイランシーが減少したことが原因だと考えられ、初期飽和度(S_{ri})が低くなるに従って体積の膨張が大きいのは細粒分の増加によるダイレ

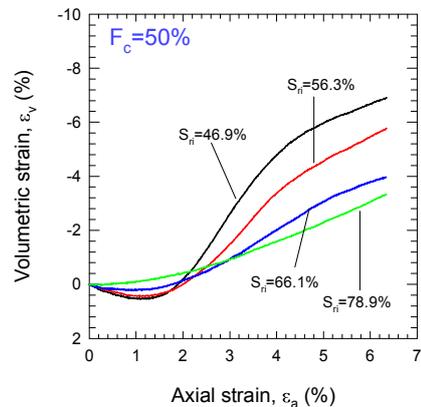
表-5 各供試体の初期状態

F_c (%)	ρ_{di} (g/cm ³)	S_{ri} (%)	S_{rf} (%)	p_{sf} (kPa)
10	1.699	49.73	47.52	9.50
	1.696	60.85	53.35	7.36
	1.706	68.14	63.30	5.13
	1.704	78.57	73.06	3.87
25	1.699	50.18	48.14	27.20
	1.695	61.21	52.43	21.08
	1.692	71.83	66.47	10.83
40	1.670	78.05	75.71	7.12
	1.707	48.60	46.89	96.59
	1.701	65.10	63.60	34.22
50	1.692	72.09	69.00	25.25
	1.679	82.35	76.56	16.69
	1.702	46.89	47.03	—
50	1.701	56.27	55.65	103.51
	1.708	66.12	64.92	90.52
	1.694	78.85	74.33	55.20

Note: ρ_{di} : 初期乾燥密度, S_{ri} : 初期飽和度, S_{rf} : 破壊時の飽和度, p_{sf} : 破壊時のサクシヨン応力



(a) 軸ひずみ(ϵ_a)と体積ひずみ(ϵ_v)の関係



(b) 軸ひずみ(ϵ_a)と体積ひずみ(ϵ_v)の関係

図-5 一定含水比圧縮試験結果 ($F_c=50\%$)

タンシーの減少よりも、サクシヨンによるダイレタ

ンシーの増加が大きくなったためであると考えられる。

6. 細粒分含有率がせん断強度に及ぼす影響

6.1 細粒分含有率によるせん断強度の比較

図-6 は、初期飽和度(S_{ri})と最大一軸圧縮強度($q_{u\max}$)の関係を示している。その結果 $S_{ri}=50\sim 80\%$ の範囲では、初期飽和度(S_{ri})が減少するほど最大一軸圧縮強度が増加することが確認された。そして、 $F_c=10\%$ と 25% の間には、わずかのせん断強度差が見られたが、 $F_c=25\%$ と 50% の間には、大きなせん断強度差が発生している。これは、細粒分含有率 $F_c=10\%$ では、サククションによるせん断強度の増分が小さいと判断されるからである。細粒分含有率 $F_c=50\%$ の場合は、サククションによる大きな強度の増分があると考えられる。このことから、細粒分含有率 $F_c=10\%\sim 50\%$ の範囲では、細粒分含有率(F_c)が高くなるほど、サククションの影響が大きくなり、せん断強度が増加すると考えられる。

6.2 堤防材料としての細粒分含有率(F_c)の提案

図-6 のように初期飽和度(S_{ri})= 70% 、 80% の範囲で見ると、 $F_c=10\%$ と 25% ではほとんどせん断強度の差が発生していないが、 $F_c=25\%$ と 50% では、大きなせん断強度の差が発生している。このことから、 $F_c=25\%$ 以上になれば、細粒分含有率(F_c)の影響により大きなせん断強度の増分が期待できると考えられる。国土技術研究センターの河川土工マニュアル(2009)の規定や、一定含水比圧縮試験(CWCC)の結果から、現場で堤防の地盤材料を考える上で、地盤材料が細粒分含有率 $F_c=25\%$ 以上 50% 以下になれば、降雨時の水位上昇に対して河川堤防が高い飽和状態でも効率的かつ安全に堤防の維持管理が期待されると考えられる。

6.3 Suction stress-SWRC Method (SSM)について

Suction stress - Soil water retention curve Method (以下、SSM ; Kim et al., 2010)とは、図-7 のように不飽

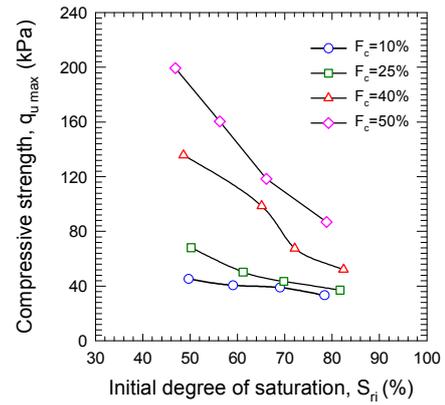


図-6 細粒分含有率による初期飽和度と最大一軸圧縮強度の関係

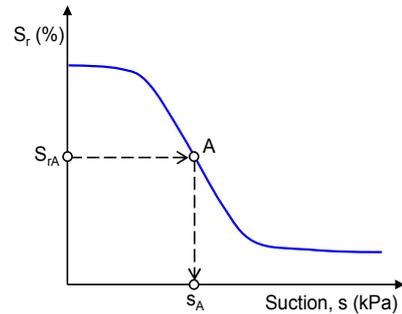


図-7 SSM でのサククションの求め方 (Kim et al. 2010).

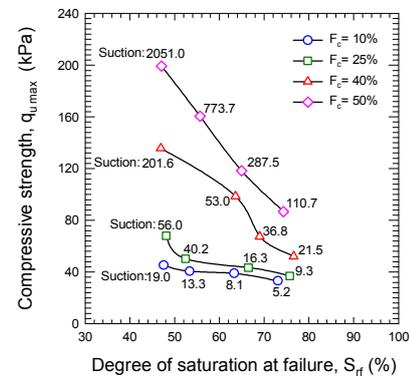


図-8 一軸圧縮強度と SSM によるサククションの比較

和土の強度試験においてサククションがせん断応力と体積変化に及ぼす影響について水分特性曲線に基づいてせん断面におけるサククションを求め、飽和度とともにサククション応力を決定することで、不飽和土のせん断強度を推定するものである。

せん断強度の差がサククションの影響によるものであるのかを確認するために、水分特性曲線から各細粒分含有率(F_c)において、破壊時における各飽和度(S_{rf})のサククションの値を読み取った。図-8 は、この求めたサククションの値を破壊時における各飽和度

(S_{r0})と最大一軸圧縮強度の関係のグラフに適用した図である。この図により、最大一軸圧縮強度の値とサクシジョンの値が対応していることが確認できる。SSMにより、求めたサクシジョン応力の式は、以下のようになる。ここで、 s^* は、SSMにより水分特性曲線から求めたサクシジョンである。

$$p_s = \frac{S_r - S_{r0}}{1 - S_{r0}} \cdot s^* \quad (7)$$

7 不飽和土せん断強度に対するサクシジョン応力の適用

不飽和土のせん断強度は、サクシジョンによる影響が大きいことは一般的に知られている。本章では、一定含水比圧縮試験におけるサクシジョンによるせん断強度の増分を明らかにするため、細粒分含有率(F_c)による各供試体のサクシジョン応力(p_s)を、有効拘束圧力として適用し、細粒分含有率による不飽和土せん断強度の変化と飽和状態の破壊線との関係性を評価する。また、式(2)から算定した見かけの粘着力(Δc_1)と飽和破壊線及び不飽和破壊線に基づいて求めた見かけの粘着力(Δc_2)の値を比較する。

7.1 一定含水比圧縮試験での p , q の関係

一定含水比圧縮試験の場合、せん断中に拘束圧を掛けない側方応力がゼロとなる。したがって、三軸圧縮試験では軸差応力は、最大主応力(σ_1)と最小主応力(σ_2 , σ_3)の差であるが、一定含水比圧縮試験では最大主応力(σ_1)のみとなる。そして、平均有効主応力は、全有効主応力の平均であるが、一定含水比圧縮試験では、 $\sigma_2 = \sigma_3 = 0$ となる。以下に、一定含水比圧縮試験の軸差応力(q)と平均基底応力(p_{net})の式を示す。

$$q = \sigma_1 \quad (8)$$

$$p_{net} = \frac{1}{3} \sigma_1 - u_a \quad (9)$$

7.2 残留飽和度(S_{r0})の算定

一般的に、図-3で示しているように、水分特性曲

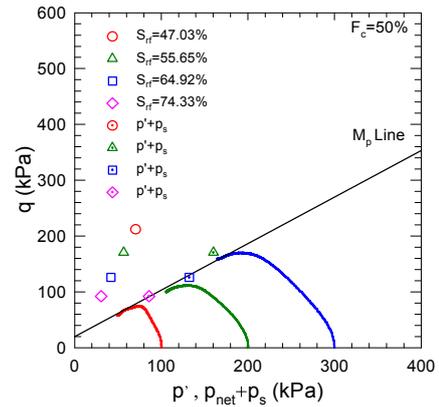


図-9 サクシジョン応力の適用 ($F_c=50\%$)

線から残留飽和度(S_{r0})を求めている。しかし、シルトや粘土質の試料の場合、確実に決めるのが難しくなる。よって、本研究では、農業工学分野での萎れ点 (wilting point, 1500 kPa, 約 4.2 pF) に着目した。萎れ点の 1500kPa というサクシジョンの値は、植物が水分を引き上げる限界値として知られている (Meyer and Gee, 1999)。蒸発産量は、萎れ点と地盤の能力の差と等しい。さらに、Gardner (1960)と Hillel (1971)の研究によると、萎れ点、1500kPa よりサクシジョンが大きくなると、メニスカス水が形成されにくいということが判明された。よって、本研究では、水分特性曲線において、1500kPa のサクシジョンを基準に対する飽和度を残留飽和度(S_{r0})に定めた。

7.3 サクシジョン応力の適用及び考察

不飽和土と飽和土の関係を明らかにするため、不飽和土を対象に行った一定含水比圧縮試験の試験結果(p_{net} , q)の関係に SSMにより求めたサクシジョン応力(p_s)を適用し、図-9で示しているように、三軸圧縮試験の試験結果(p' , q)と比較をおこなった。その結果、($p_{net} + p_s$, q)の関係により、破壊時での応力点が飽和状態の三軸圧縮試験の試験結果から求めた M_p line とほぼ一致することが分かった。これは、サクシジョンにより増加したせん断応力の増分と、有効拘束応力としてのサクシジョン応力の影響が一致していることを意味する。よって、本研究で行った細粒分含有率によって一定含水比圧縮試験から異なる結果が得られているが、サクシジョン応力の適用により、それぞれのサクシジョンとせん断強度の関係が解明で

きると考えられる。

7. 4 見かけの粘着力(Δc_1 , Δc_2)の比較

Vanapalli ら(1996)の式(2)から求めた見かけの粘着力(Δc_1): 一定含水比圧縮試験での各細粒分含有率(F_c)における破壊時の飽和度(S_{rf})と, 図-3 の水分特性曲線から求めたサクシオン(s), 残留飽和度(S_{r0})の値から Vanapalli ら(1996)の式(2)を用いて見かけの粘着力(Δc_1)を求めた。

一方, 一定含水比圧縮試験(CWCC)から求めた見かけの粘着力(Δc_2): 見かけの粘着力(Δc_2)は, 図-10 に示している通り, 圧密非排水三軸圧縮試験(CU)から求めた飽和破壊線の粘着力(c)と, 一定含水比圧縮試験から求めた不飽和破壊線の粘着力(c)を比較し導く。その際, 各供試体の不飽和破壊線は, 一定含水比圧縮試験から得たモールの応力円に飽和破壊線の傾きを適用し求めた。

式 (6), (7)で求めた見かけの粘着力(Δc)を表-3 に示している。細粒分含有率 $F_c=10\%$ における一定含水比圧縮試験(CWCC)から算定した見かけの粘着力(Δc_2)は, 細粒分含有率 $F_c=10\%$ における圧密非排水三軸圧縮試験(CU)を今後行い, 求める予定である。また, 二つの方法によって導いた細粒分含有率(F_c)の見かけの粘着力(Δc)の差を図-11 に示している。表-6 に示す通り, 細粒分含有率(F_c)=25%では, 見かけの粘着力(Δc)の差は小さい。それに対して, 細粒分含有率(F_c)=40%, 50%の場合, 破壊時の飽和度(S_{rf})が高い場合は見かけの粘着力(Δc)の差は小さいが, 破壊時の飽和度(S_{rf})が低くなるにしたがって, 差が大きくなった。その原因として, 破壊時の飽和度(S_{rf})が低い時 Vanapalli らの式から推定した見かけの粘着力(Δc_1)が小さくなったことが挙げられる。

Vanapalli らの式から推定する際, 水分特性曲線からサクシオンを読み取り用いた。その際, ポーラスメタルの上限値が 500 kPa であり, 飽和度が低い状態でのサクシオンは 500 kPa を超えており, 読み取りに誤差があるのではないかと考えられる。また, 細粒分含有率(F_c)=40%の場合, 基準となる圧密非排水三軸圧縮試験(CU)から求めた飽和破壊線の粘着力が予想より低い値となった。これにより, 一定含

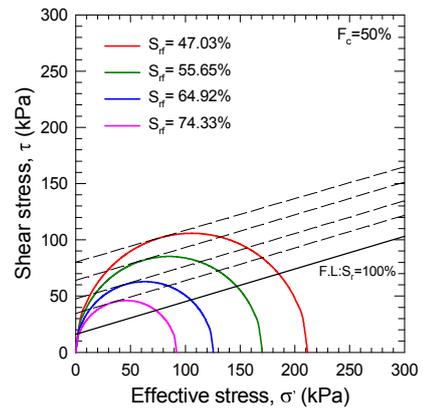


図-10 一定含水比圧縮試験(CWCC)からの見かけの粘着力(Δc_2)

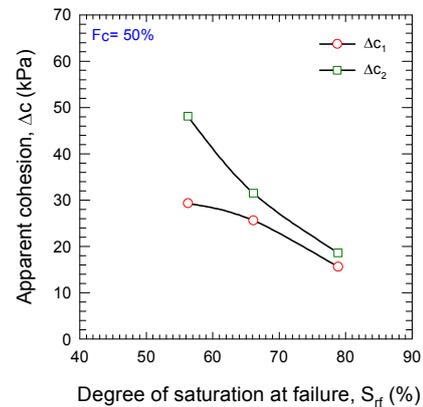


図-11 見かけの粘着力(Δc)の比較

表-6 見かけの粘着力の比較

F_c (%)	S_{rf} (%)	Δc_1	Δc_2
10	47.52	4.0	—
	53.35	3.4	—
	63.30	2.7	—
	73.06	2.1	—
25	48.14	7.3	12.4
	52.43	6.2	6.5
	66.47	3.7	4.3
	75.71	2.6	2.3
40	46.89	19.2	39.8
	63.60	10.2	27.6
	69.00	8.2	17.4
	76.56	5.8	12.3
50	47.03	—	—
	55.65	29.3	48.1
	64.92	25.6	31.5
	74.33	15.6	18.6

水比圧縮試験(CWCC)から算定した見かけの粘着力(Δc_2)が大きくなり, 二つの方法によって導いた見かけの粘着力(Δc)の差が大きくなったことも, 要因の一つとして挙げられる。このように, 二つの方法によって導いた見かけの粘着力(Δc)に差がある部分

もあるが、破壊時の飽和度(S_{rf})が低くなるにつれて見かけの粘着力(Δc)が大きくなる傾向が全体を通して見られる。

8. 結論

本論文では高梁川堤防のまさ土のみで調整した細粒分含有率(F_c) 10%, 25%, 40%, 50%についての物性試験、圧密非排水三軸圧縮試験(CU)、一定含水比圧縮試験を行い、結果からサクシオンによる不飽和土せん断強度の増分の関係を明らかにした。また、細粒分含有率がせん断強度に及ぼす影響について不飽和土力学理論に基づいて行い、得られた結論を以下に示す。

- (1) 一定含水比圧縮試験の結果により、軸ひずみ(ϵ_a)と一軸圧縮強度(q_u)の関係では、細粒分含有率(F_c)に関わらず、初期飽和度(S_{ri})が小さくなるほど一軸圧縮強度(q_u)が大きくなることが確認された。一方、軸ひずみ(ϵ_a)と体積ひずみ(ϵ_v)の関係では、細粒分含有率(F_c)に関わらず、軸ひずみが大きくなる程、体積ひずみが大きくなり、膨張していることが確認された。
- (2) 初期飽和度(S_{ri})と最大一軸圧縮強度($q_{u\max}$)の関係の結果により、初期飽和度(S_{ri}) 70%, 80%の範囲で見ると、 $F_c=10\%$ と $F_c=25\%$ ではほとんどせん断強度の差が発生していないが、 $F_c=25\%$ と $F_c=40\%$ では、大きなせん断強度の差が発生した。このことから、 $F_c=25\%$ 以上になれば、細粒分含有率(F_c)の影響により大きなせん断強度の増分が期待できると考えられる。したがって、現場で堤防の地盤材料を考える上で、地盤材料が細粒分含有率、 $F_c=25\%$ 以上 50%以下になれば、降雨時の水位上昇に対して河川堤防が高い飽和状態でも効率的かつ安全に堤防の維持管理が期待されると考えられる。
- (3) 細粒分含有率(F_c) 25%, 40%, 50%において、不飽和土と飽和土の関係を明らかにするため、不飽和土を対象に行った一定含水比圧縮試験の試験結果(p_{net} , q)の関係にSSMにより求めた

有効拘束応力成分としてサクシオン応力(p_s)を適用し、三軸圧縮試験の試験結果(p' , q)と比較をおこなった。その結果、残留状態応力点が飽和土を対象として行った三軸圧縮試験の試験結果から求めた M_p line とほぼ一致することが分かった。これは、サクシオンにより増加したせん断応力の増分と、有効拘束応力としてのサクシオン応力の影響が一致していることを意味する。よって、本研究で行った細粒分含有率によって一定含水比圧縮試験から異なる結果が得られているが、サクシオン応力の適用により、それぞれのサクシオンとせん断強度の関係が解明できると考えられる。

- (4) 最後に、理論式と試験結果によって導いた見かけの粘着力(Δc)には差のある部分もあるが、破壊時の飽和度(S_{rf})が低くなるにつれて見かけの粘着力(Δc)が大きくなる傾向がある。また、破壊時の飽和度(S_{rf})を固定し見かけの粘着力(Δc)を比較すると、細粒分含有率(F_c)が高くなるにしたがって、二つの方法で導いた見かけの粘着力(Δc)はどちらも大きくなっている。よって、細粒分含有率(F_c)の増加と共に見かけの粘着力(Δc)が大きくなり、せん断強度の増加に繋がるということが明らかになった。

参考文献

- 1) 加藤正司, 吉村優治, 河井克之, 寸田 亘: 不飽和土の一軸圧縮試験時の強度特性に及ぼすサクシオンの影響, 土木学会論文集, No.687/III-56, pp.201-218, 2001.
- 2) 軽部大蔵, 加藤正司, 浜田耕一, 本田道識: 不飽和土の間隙水の状態と土塊の力学的挙動の関係について, 土木学会論文集, No.535, pp.83-92, 1996.
- 3) 財団法人国土技術研究センター: 河川土工マニュアル, pp. 59-79, pp. 62-66, 2009.
- 4) Bishop, A.W. and Blight, G.E.: Some aspects of effective stress in saturated and partly saturated soils, Geotechnique, Vol.13, No.3, pp. 177-197, 1963.

- 5) Fredlund, D.G., Morgenstern, N.R. and Widger, R.A.: The shear strength of unsaturated soils. Canadian Geotechnical Journal, Vol.15, No.3, pp.313-321, 1978.
- 6) Fredlund, D.G. and Xing, A.: Equations for the Soil - Water Characteristic Curve. Canadian Geotechnical journal, Vol. 31, No. 4, pp. 521-532, 1994.
- 7) Gardner, W.R.: Dynamic aspects of water availability to plants. Soil Science 89, 63-73, 1960.
- 8) Hillel, D.: Soil and water. Academic Press, New York, 1971.
- 9) Kim, B.S., Shibuya, S., Park, S.W., and Kato, S. Application of suction stress for estimating unsaturated shear strength of soils using direct shear testing under low confining pressure. Canadian Geotechnical Journal. Vol. 47, No. 9, pp. 955-970, 2010.
- 10) Meyer, P.D., and Gee, G.W.: Flux-based estimation of field capacity. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, ASCE 125(7), 595-599, 1999.
- 11) Vanapalli,S.K., Fredlund, D.G., Pufahl, M.D. & Clifton, A.W.: Model for prediction of shear strength with respect to soil suction. Canadian Geotechnical Journal, Vol.33, No.3 pp. 379-392, 1996.

植物バイオマスからの骨成分合成

岡山大学大学院環境生命科学研究科

永禮 英明

環境浄化とリン資源量減少とを背景に、土壌浄化用に栽培した植物からリンを抽出・回収する方法について検討した。本研究では、回収物の付加価値を高めるため、回収物を骨の主成分であるヒドロキシアパタイトに近づけることを目的に実施した。本研究で使用したバイオマス（飼料用デントコーン）に含まれるリンの67～76%が1時間以内に溶液中に抽出された。抽出液にカルシウムを添加しリン酸カルシウム沈殿を生成させた。このとき、添加するカルシウム量を変化させることで、溶液中に含まれるリンの沈殿率、ならびに生成した沈殿中のカルシウム／リン比が変化した。添加するカルシウム量を溶液中リン量の1.3倍（モル比）としたとき、リン沈殿率は59～76%に低下したが、固形物中カルシウム／リン比としてヒドロキシアパタイトでの比1.67に近い値が得られた。また、この固形物を600℃、30分間灰化したところ、ヒドロキシアパタイトの生成が確認された。

1. はじめに

リンは全ての生物に必須な元素であり、肥料の主成分でもある。しかし、人口が増加し、より多くの食料と肥料とが必要とされている一方、将来的にはリン鉱石量減少に伴い肥料供給量が減少し、食料価格が高騰すると予想されている[1]。そのため、様々なルートでリンを回収・再利用するための技術が必要とされている。

筆者らはこれまでに下水や植物バイオマスからリンを回収するための技術を開発し、それぞれ70%、80%の回収率を達成している[2-5]。しかし、問題は回収したリンの再利用価格である。将来の資源量減少が予測されているにもかかわらず、リン鉱石の輸入価格は低い。そのため回収したリンの価格もこれに影響され、処理に要する費用を回収することができない。

そこで、本研究では、回収したリンの一部を肥料より価値の高い物質に変換し、全体として処理費用を回収するという視点から、植物バイオマス（トウモロコシ）からリンを回収し、骨の成分であるヒドロキシアパタイトに加工する方法について検討した。日本では高齢化が進展し、骨に関する疾患が増加すると見込まれている。ヒドロキシアパタイトを含む人工骨の需要も増加することから、これへの適用を想定している。

筆者らの過去の研究から、乾燥バイオマスを水に浸漬することで速やかにリンが液中に溶出すること、また抽出液にカルシウムイオンを添加することでリンを含む沈殿を得られることが分かっている。ただし、過去の研究ではリンの回収率を最大化することを目的としており、回収した固形物には多量のカルシウムが含まれていた。本研究では、回収率よりも回収固形物中を骨の成分であるヒドロキシアパタイトに近づけることを目的とする。

2. 研究方法

実験は、(1) バイオマスからのリン抽出、(2) 抽出液からのリン回収、(3) 回収物の乾燥という手順で進めた。

2.1 使用したバイオマス

農地浄化用に、2012年2月から3月に高知大学で栽培された飼料用デントコーンを乾燥させたものを使用した。栽培期間が50日であるため結実しておらず、葉と茎のみから構成されていた。

2.2 バイオマスからのリン抽出

イオン交換水1Lあたりに乾燥したバイオマス20gを入れた。1時間、室温で浸漬したのち、10分間ザルで水を切り、得られた液をメンブレンフィルターでろ過し、これを抽出液とした。

2.3 抽出液からのリン回収

抽出液に 1 mol/L NaOH を添加して pH を調整したのち、1 mol/L の CaCl_2 溶液（以下、Ca 溶液とする）としてカルシウムを添加し、沈殿を生成させた。pH は 7.0~10 の範囲で、Ca 溶液添加率は抽出液 1 L あたり 40~80 mL の範囲で条件を設定した。静置したのち上澄み水の一部を採取し、0.45 μm シリンジフィルターでろ過し、分析用試料とした。

2.4 回収固形物の乾燥

沈殿物を遠心分離（3,500 rpm×10 min）し上澄み液を除去した。ここにアセトンを加え、さらに遠心分離をすることで沈殿を洗浄した。洗浄は 3 回行った。その後、沈殿をドラフト内で 24 時間乾燥させ、さらに 60°C で 24 時間乾燥させた。乾燥物の一部を採取し 1 mol/L 硝酸で溶かしたものを分析用試料とした。

2.5 分析方法

抽出液、沈殿生成後の上澄み水について水質分析を行った。また、回収固形物を硝酸で溶解したのちについても水質分析を行い、固形物中成分の分析を行った。基本的に、金属成分ならびにリンは ICP-AES（SII Vista-Pro）で、イオン類はイオンクロマトグラフ（島津製作所 LC-10A）で測定した。

回収した固形物に含まれる結晶を確認するため、X 線回折分析を実施した。使用した装置は Rigaku Rint Ultima III で、X 線源は Cu K α （40 kV/30 mA、波長 154.18 pm）、角度 5~60°の範囲を 0.02°刻み、2°/min の速さでスキャン測定した。

また、固形物を走査型電子顕微鏡（JEOL JIB-4500）で観察した。

3. 結果・考察

3.1 バイオマスからのリン抽出

抽出に供したバイオマスと抽出液とを図 1 に示す。乾燥したバイオマスを 1 時間イオン交換水に浸漬するだけで、茶褐色の抽出液が得られた。

抽出液のリン濃度を測定した結果、バイオマスに含まれていたリンの 67~76% のリンが抽出液中に溶出していることが確認された。



図 1 使用したバイオマス（上）と抽出液（下）

3.2 抽出液からのリン回収

抽出液中リンのうち沈殿に取り込まれた率を沈殿率と定義した。沈殿率を図 2 に示す。沈殿率は pH による影響を強く受け、pH 7 では 67~72%にとどまるが、pH 8.5 以上だと 90~94%に達した。ただし、これは沈殿生成時のカルシウム／リン比を 10 mol/mol 以上とカルシウムを過剰に添加した場合での結果である。この比が 2 mol/mol を下回った場合、pH 9 においても沈殿率は pH 7 の場合と同程度の 59~76%となった。

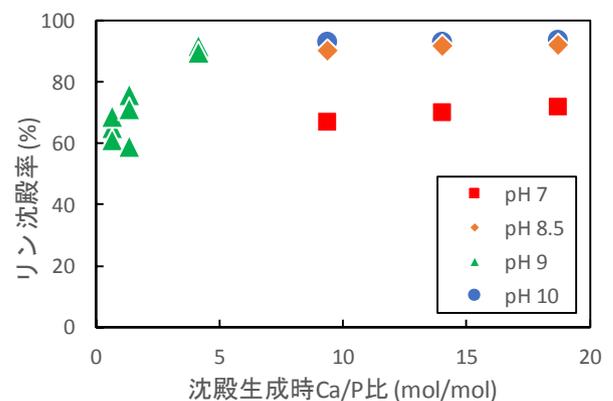


図 2 抽出液からのリン沈殿率

3.3 回収固形物の性状

図 3 に回収した固形物中のカルシウム／リン比を示す。骨成分であるヒドロキシアパタイトにおける比は 1.67 mol/mol である。これに比べ、沈殿生成時にカルシウムを過剰に添加した場合、いずれの pH でも固形物中カルシウム／リン比は 1.9 mol/mol 以上となり、ヒドロキシアパタイトに比較してカルシウムが過剰であった。しかし、カルシウム添加量を抑制していくに従い固形物中での比も低下し、添加時カルシウム／リン比を 1.3 mol/mol 程度にすることで、固形物中での比を 1.5~1.6 mol/mol と、ヒドロキシアパタイトのそれに近づけることができた。

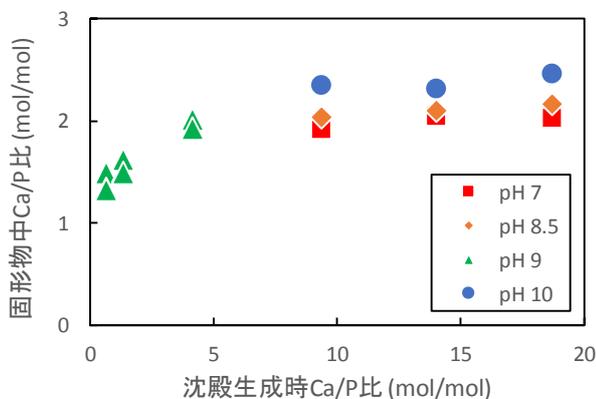


図 3 回収固形物中カルシウム／リン比

3.3 灰化によるヒドロキシアパタイト結晶の生成

得られた固形物について、X 線回折分析を実施し、ヒドロキシアパタイトの結晶の有無を確認した。本分析では、ある結晶構造が含まれるとそれに固有の角度でピークが現れる。

沈殿物を 105°C で乾燥して得られた固形物の場合、明確なピークは現れ検出されなかった(図 4 上図を参照)。そこで、この固形物をさらに 600°C で 30 分間灰化し、再度分析を行った。なお、灰化によって重量の 31~39% が減少した。この減少は沈殿に含まれていた有機物を表している。リン酸カルシウムの沈殿が生成する際、バイオマスから溶出した有機物を取り込みながら沈殿していることを示している。

灰化した試料について X 線分析を実施した結果、乾燥したのみの場合と違い、複数のピークが検出された。ただし、ピークの位置は沈殿生成時のカルシウム／リン比によって異なっていた。カルシウム／リン比が 1.3 mol/mol のとき、ヒドロキシアパタイト

に固有の 3 つのピーク ($2\theta = 31.8, 32.2, 32.9^\circ$) が検出され、ヒドロキシアパタイトの存在が確認された(図 4 下図を参照)。

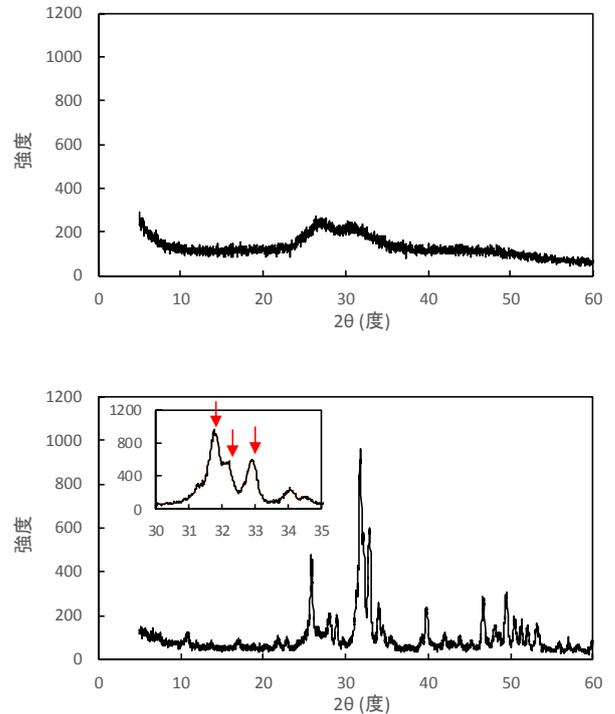


図 4 X 線回折分析の結果
(沈殿生成時 Ca/P=1.3 mol/mol,
上：灰化前，下：600°C 30 分間灰化後)

灰化後の固形物を電子顕微鏡で観察した。灰化後の固形物、および電子顕微鏡での結果の一例を図 6 に示す。ヒドロキシアパタイトは含まれているはずであるが、明確な結晶構造は確認できなかった。図 4 の結果から示唆されるように、複数の物質が混在していると考えられた。



図 5 灰化後の固形物
(沈殿生成時 Ca/P=1.3 mol/mol)

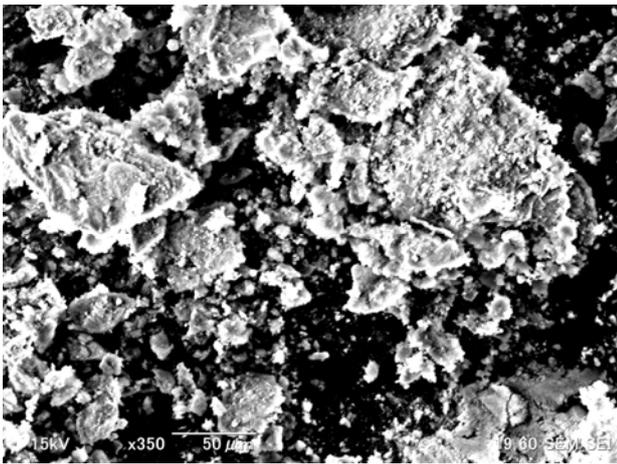


図 6 灰化後固形物の電子顕微鏡写真
(沈殿生成時 Ca/P=1.3 mol/mol)

4. 結論

本研究では、植物バイオマス（トウモロコシ）からリンを回収し、骨の成分であるヒドロキシアパタイトに加工する方法について検討した。

トウモロコシから、最大約 70%の効率でリンを固形物として回収することができた。ただし、回収率は抽出液へのカルシウム添加率によって変化し、カルシウム／リン比が高いほど回収率は高く、固形物中のカルシウム／リン比も高い。

カルシウム添加率を抑え、カルシウム／リン比を 1.3 mol/mol として得た沈殿を 600℃で 30 分間灰化することにより、ヒドロキシアパタイトを含み、カルシウム／リン比もヒドロキシアパタイトとほぼ同じ固形物を得ることができた。

謝辞

本研究は清水康友君の協力を得て実施しました。X 線回折分析では岡山大学・河村雄行教授のご協力を得ました。電子顕微鏡は岡山大学ナノ構造解析・分析ユニットに設置の機器を使用しました。

参考文献

- [1] D. Cordell, J.-O. Drangert, and S. White, "The story of phosphorus: Global food security and food for thought," *Global Environmental Change*, vol. 19, pp. 292-305, 2009.
- [2] 永禮英明, 津野洋, W. Saktaywin, and 早山恒成, "オゾンによる汚泥減容化とリン回収を導入し

た高度下水処理プロセスでのリン回収方法の検討," *環境工学研究論文集*, vol. 46, pp. 469-475, 2009.

- [3] W. Saktaywin, H. Tsuno, H. Nagare, T. Soyama, and J. Weerapakkaroon, "Advanced sewage treatment process with excess sludge reduction and phosphorus recovery," *Water Res*, vol. 39, pp. 902-10, Mar 2005.
- [4] H. Nagare, T. Fujiwara, T. Inoue, S. Akao, K. Inoue, M. Maeda, *et al.*, "Nutrient recovery from biomass cultivated as catch crop for removing accumulated fertilizer in farm soil," *Water Sci Technol*, vol. 66, pp. 1110-6, 2012.
- [5] 永禮英明, 井上司, 藤原拓, 赤尾聡史, 前田守弘, and 山根信三, "トウモロコシからのリン抽出法の検討," *環境工学研究論文集* vol. 47, pp. 459-464, 2010.

トンネル覆工・空隙・地山の相互作用とロックボルトの効果

岡山大学大学院 環境生命科学研究科

柴田俊文

農業用水路トンネルは、大正・昭和時代に施工されたものが数多くあり、老朽化による劣化や機能低下の問題が指摘されている。そのため、補修工事費用も膨大になることが予想され、より経済的な補修（補強）方法の確立が望まれる。近年、農業用水路トンネルで見られる極小断面でのロックボルトによる補強技術が新たに開発され、施工事例も報告されてきている。これらのトンネルは、鉄道・道路トンネルとは断面寸法が相違するため、ロックボルトの最適な本数・長さや間隔が異なることが予想される。また、在来工法で施工されたトンネルに補強工法としてロックボルトを施工する場合、NATM工法で用いる場合とは地山とロックボルトの相互挙動が相異なることが考えられる。本論文では、地山とロックボルトの挙動の把握、裏込注入工法との併用効果の検討を目的として載荷実験を行う。

1. はじめに^{1,2)}

日本の農業用排水路は約 400,000km におよび、そのうち農業用水路トンネル（図-1）は 2,000km 以上に達する。これらの水路トンネルは用排水路の上流に位置することが多く、受益が非常に大きい反面、老朽化によりその機能を失うと経済的な損失も甚大なものとなる。そのため、正確な機能診断と適切な維持補修により長寿命化をはかることが、喫緊の課題となっている。

ロックボルト工法による補修（補強）は、作業時間が短いため通水時に容易に適用でき、安価でピンポイントの補強が可能である。そのため、長期的な使用を条件に最適な設計条件を明らかにすれば、低コストで補強ができるため、その効果は非常に大きなものとなる。その一方で、農業用水路トンネルは断面積 3m² 未満の極小断面が多く、従来は広い作業領域が必要なロックボルト工法による補強は実施されてこなかった。しかし、狭隘な場所で作業可能なロックボルト工法の新技術が数年前に開発され、極小断面のトンネルの補強に用いられるようになってきている³⁾。だが、その際の配置や寸法の決定は断面スケールが大きい道路・鉄道トンネルの基準を参考になされているため、ロックボルトの設定条件^{4,5)}が適切になっていない可能性がある。さらに、NATM工法の施工に用いるロックボルトを矢板工法の補強に使用するため、トンネルの構造の違いが補強効果



図-1 農業用水路トンネル

に影響を及ぼす可能性も否定できない。そのため、補強に用いるロックボルトの最適な施工条件を把握するには、地山とトンネル覆工の相互作用を明白にし、荷重と地山挙動との相関関係を明らかにする必要がある。

本論文では、地山とロックボルトの挙動の把握を目的として実験を行う。また、矢板工法で見られる地山と覆工の間の空隙を考慮して、裏込注入工法との併用効果の検討を行う。具体的には、矩形形状に作製したモルタルを、斜面をつけて二分割し、ロックボルトを模擬した鉄棒をモルタル中に設置して載荷実験を実施する。

2. 供試体の作製

図-2 に示すように、横×奥行き×高さが 100mm×100mm×200mm のモルタルを用いて載荷実験を行う。

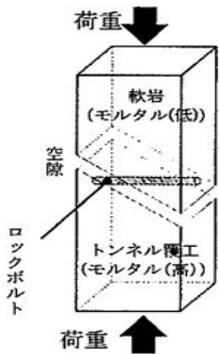


図-2 载荷実験



図-3 供試体



図-4 供試体作製に用いた型枠



図-5 全自動圧縮試験機

ここで地山および覆工を想定し、目標強度 5N/mm^2 程度の低強度モルタルと、目標強度 20N/mm^2 程度の高強度モルタルを使用する。それぞれのモルタルの配合は、低強度が早強ポルトランドセメント、砂、水が 800g , $2,400\text{g}$, 800g 、高強度のものが $1,400\text{g}$, $2,040\text{g}$, 630g を用い、目標強度より w/c はそれぞれ 100% , 45% となるよう設定した^{6,7)}。裏込注入工法およびロックボルト工法はグラウトの注入と直径 5mm の鉄棒の挿入により模擬する。ここで、グラウトは $1\sim 2\text{N/mm}^2$ 程度の強度が確保できればよいため、定着用グラウト材の水分量を増やし、流動性を高め施工しやすいように調整した。具体的には、充填用グラウトの配合は、水/グラウトの重量比を 0.184 、鉄棒定着用では 0.276 として使用した。また不連続面を作製するため、供試体作製時にプラスチック製のスペーサーを型枠中央に配置し、その際に傾斜を設けて供試体を二分し、角度は 30° , 45° とした。図-3 に、分割した供試体を、図-4 に供試体作製に用いた型枠を示す。

3. 実験概要

作製した供試体に鉄棒を挿入して鉛直方向に載荷して実験を行う。挿入した鉄棒の定着は、グラウトの注入によって行われ、鉄棒は不連続面の角度にかかわらず、左右両端まで設置する。実験は、モルタル間の空隙・鉄棒の角度・2種のモルタルの組み合わせをそれぞれ変化させて実施し、測定したデータから作成した応力-ひずみ曲線を比較する。なお載荷は、全自動圧縮試験機 (HI-ACTIS-2000 ; 図-5) を用いて行っている。ここで、ロックボルト配置前の



(a) 不連続面に対し
垂直に配置



(b) 不連続面に対し
傾斜をつけて配置

図-6 鉄棒を配置した供試体

裏込注入の効果を検討するため、図-2, 3 に示す供試体の空隙にグラウトを充填したものにより比較を行う。鉄棒は、不連続面に対して垂直に配置する供試体と傾斜を設けて配置する供試体の合計二ケースを想定した。図-6 に鉄棒を配置した供試体を示す。(a)が不連続面に対して垂直、(b)が不連続面に対して傾斜を設けるケースで、鉄棒の位置を直線で表示している。なお、(b)の場合は、鉄棒は荷重載荷方向に垂直 (上下面に対して水平) に配置しているため、不連続面に対しては、傾斜を有する形で位置していることとなる。ここで、不連続面に対して垂直に鉄棒を配置するパターンは、円形のトンネル断面にロックボルトを配置した場合を想定しており、角度をつけて配置するパターンは、地山が有する不連続面をロックボルトが貫入する場合と幌形や馬蹄形トンネルのスプリングライン下部にロックボルトが配置されることを仮定している。

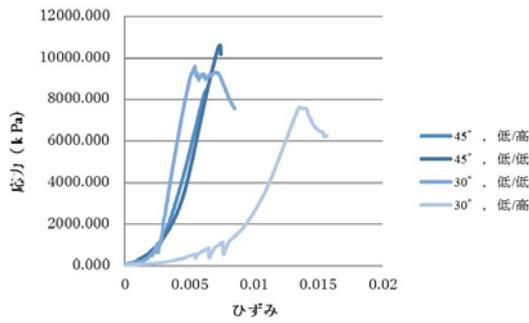


図-7 不連続面の角度の影響

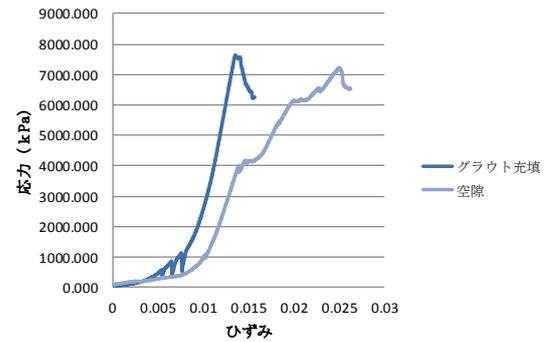


図-8 補強工法の併用の効果

4. 実験結果

図-7に鉄棒を不連続面に傾斜配置し、角度を変化させた際の結果を示す。ここで、供試体の上部に高強度モルタル、下部に低強度モルタルを組み合わせたケースと、両方も低強度モルタルを用いたケースについて実験を実施した。なお、不連続面はグラウトを注入せず、二つのモルタルが接している状態になっている。最大応力で比較すると、モルタルの組み合わせが同じ場合、不連続面の角度は30°より45°の方が高い値を示した。モルタル強度の組み合わせで考察すると、低強度モルタル同士の方が高強度モルタルと組み合わせた場合より高い最大応力が得られた。これは、変位制御による実験のため、高強度モルタルに対してより大きな応力が作用し、全体の強度が下がったことが考えられる。

図-8にグラウトのみを用いた場合と鉄棒とグラウトの両方を用いた場合とで実験を行った結果を示す。ここで、不連続面の角度は30°とする。最大応力に大きな差異は確認できなかったが、同一応力においてはグラウトを充填した供試体の方が小さいひずみの値を示している。このことから併用による補強の効果が確認できる。

図-9に上下に高強度モルタルを配置し、垂直に鉄棒を挿入した実験の結果を示す。ここで、図中凡例の「密着」とは、グラウトを充填させず上下のモルタルが接した状態を示す。グラウトで充填した方が角度に関わらず、高い最大応力と圧縮強度が得られた。グラウトを充填した場合はモルタル同士が連続している状態であるのに対し、密着した条件では僅かに隙間が空いて不連続になっており、両者の相対

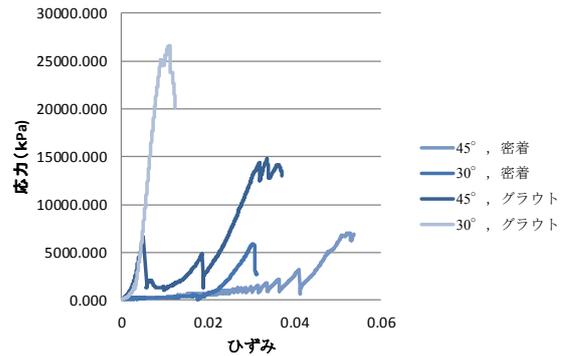


図-9 鉄棒の垂直配置時の結果

変位が大きくなっている。そのため、鉄棒に直接載荷されたことにより、モルタルの応力の上昇が遅れたものと考えられる。

5. まとめ

本論文では、ロックボルト工法と裏込注入工法との併用の効果を検討し、トンネル覆工と地山の境界部における角度の影響について載荷実験を実施して、その結果を比較した。ロックボルトは鉄棒で表し、トンネル覆工および地山は高強度と低強度のモルタルにより模擬して実験を実施した。供試体載荷実験を通して、補強箇所のトンネル覆工と地山の角度および地山強度の影響、ロックボルト工法と裏込注入工法の併用効果を示すことができた。

参考文献

- 1) 森 充広, 浅野 勇, 渡嘉敷 勝, 西原正彦, トンネルの構造的安全性に関する研究動向～変状事例に基づく考察～, 農工研技法, 214, pp.31-76, 2013.
- 2) 森 充広, 森 丈久, 渡嘉敷 勝, 中矢哲郎, 藤原

- 鉄朗, 齋藤 豊, 通水状態での農業用水路トンネル調査・点検技術の開発, 農業農村工学会論文集, Vo.278, pp.9-17, 2012.
- 3) 山地宏志, 中野陽一, 清水則一, ロックボルトによる極小断面水路トンネル補修の設計と施工法, 「建設施工と建設機械シンポジウム」論文集, pp.23-28, 2009.
 - 4) 吉田秀典, 宇田圭一, 平川芳明, 森 聡, 不連続面の寸法とロックボルト導入効果に関する一考察, 応用力学論文集, Vol.8, pp.443-450, 2005.
 - 5) 公益財団法人鉄道総合技術研究所, 変状トンネル対策工設計マニュアル, 1998.
 - 6) 伊藤正憲, 早川健司, 瀬野康弘, 鈴木祥三, トンネル覆工背面空洞充填用軽量モルタルの基本物性, 土木学会第 56 回年次学術講演会講演概要集, pp.322-323, 2001.
 - 7) 野城一栄, 小島芳之, 宮林秀次, 西藤 潤, 朝倉俊弘, 竹村次朗, 地質不良区間における新設山岳トンネル用地震対策工の適用性, 土木学会論文集 C, Vol.65, No.4, pp.1062-1080, 2009.

旭川感潮域のケレップ水制域における塩分流動の現地観測および数値解析

岡山大学大学院環境生命科学研究科

赤穂 良輔

概要

感潮河川である旭川下流域には、ケレップ水制群が設置されており、多様な生物の生息・生育・繁殖環境となっている。水制域の良好な環境状態を維持するためには、水制周辺の流況を調査するとともに、長期的な塩水流動特性を把握する必要がある。本研究では、旭川ケレップ水制域における塩水流動の長期シミュレーションモデルの構築への第一段階として、平水時の塩水流動特性の把握を目的とし、旭川本流における塩分の鉛直分布の定点観測および準三次元塩水流動解析モデルの開発を行った。観測結果より、ケレップ水制域では上層の塩分は潮汐によって流動する一方、下層の塩分は定常であることが明らかになった。さらに、得られた観測データを元に塩分の鉛直分布を仮定し、塩水流動解析を実施したところ、従来の平面二次元モデルでは表現できなかった下層での塩分定常化の再現に成功した。ケレップ水制域では、水平渦により低水路と浅瀬での水の交換が発生するが、上層の低塩分水が交換するため、ケレップ水制間の浅瀬では低塩分状態で安定している可能性が示唆された。

1. 序論

感潮河川における水制域は、水草類が繁茂し、魚介類や鳥類の生息場所となるため、環境保全の観点から非常に重要である。感潮河川では、平常時に底層に塩水が侵入し汽水状態が形成されるとともに、潮汐による非定常運動が存在し、水域の物質輸送や水質分布および生活環境の基盤を形成している。したがって、水制域の良好な環境状態を維持するためには、水制周辺の流況を調べるとともに、感潮河川における長期的な塩水流動の特性を把握する必要がある。本研究では、感潮河川である旭川のケレップ水制域を対象とし、現地観測および数値シミュレーションを用いて、潮汐による水制域への塩水流入の特性について検討する。

塩分流動は基本的に三次元の現象だが、運動の空間スケールを大局的にみると、密度成層に伴う傾圧の効果と比較して、潮汐変動に伴う順圧の効果が支配的である。また、水制は潮汐に伴い水面からの露呈と水没を繰り返すため、順圧による流動について流速の鉛直分布を考慮する必要がある。ただし、旭川感潮域における塩水流動の長期シミュレーションを三次元計算モデルで実施するのは、計算コストの面から困難である。そこで本研究では、現地観測により旭川本流にお

ける塩分の鉛直分布を計測し、平水時の潮汐による塩水流動の特性を把握した後に、二次元モデルと同程度の計算負荷で、流動場の三次元性を考慮できる新たな準三次元モデルの構築を行う。

2. 研究フィールド

図-1 に本研究で対象とする旭川下流域の概要を示す。岡山県の中央を流れる旭川は、河口から約 12km の岡山市三野において百間川と分派し、瀬戸内海に繋がる児島湾に注いでいる。市街地から河口に向かって舟運のための水深確保対策として、河口からの距離

図-1 旭川下流域の概要図¹⁾



写真-1 ケレップ水制

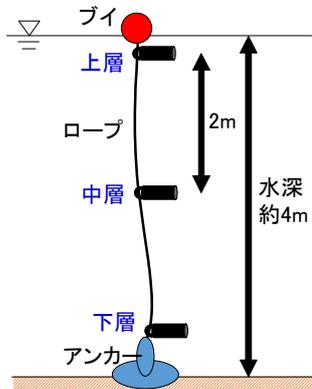


図-2 塩分計測器の設置方法の概念図

2.2km から 6.6km の区間の左岸側にケレップ水制群が設置されている。ケレップ水制は写真-1 のような T 型構造の玉石積みの石水制で計 19 基が現存している。ケレップ水制周辺には干潟とヨシ原が広がっており、多様な生物の生息・生育・繁殖環境となっている²⁾。

3. 現地観測

3.1 観測装置の概要および設置方法

図-2 に示すような塩分観測装置を旭川河道内に設置し、塩分の定点観測を実施した。塩分測定器には、HOBO 電気伝導率ロガーCO-U24-002C を使用し、水面付近、河床付近、中層（水面より 2m）の 3 点の電気伝導率を一時間おきに測定するように設定した。計測された電気伝導率より塩分を換算し、各水深における塩分の時間変化を推定する。

図-3 に設置位置を示す。本観測では、ケレップ水制群の上流に位置する桜橋(河口からの距離 6.73km)より 20m 程度下流側に設置した。設置位置の平均水深は約 4m で、橋脚の後流の影響はほぼない位置にした。測定器は約 1 ヶ月ごとに回収し、データ収集後に再設置を行う。

3.2 観測結果

図-4 に宇野の潮位観測データおよび三野(旭川)の水位観測データ、図-6 に塩分の 2016 年 1 月 15 日から 3 月 3 日における観測結果を示す。河口から 6.73km 地

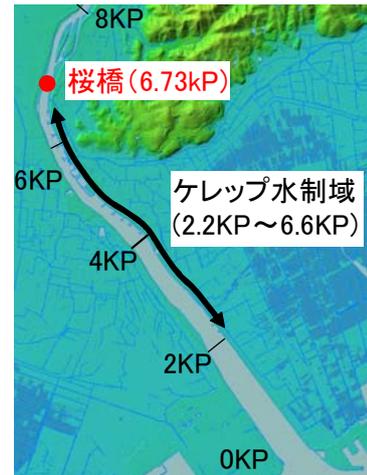


図-3 観測装置の設置位置¹⁾

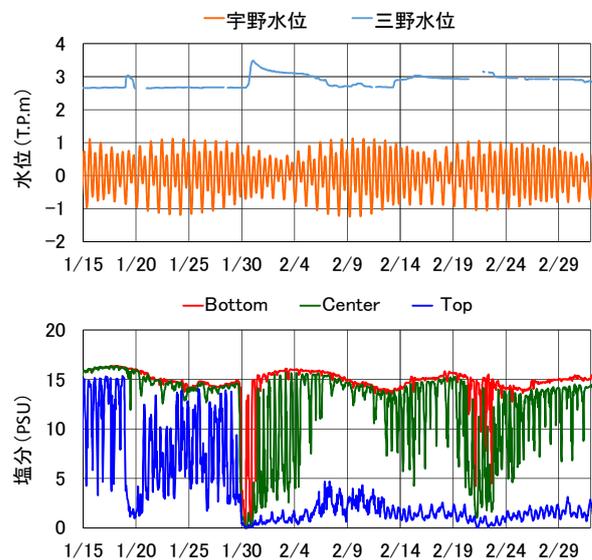


図-4 水位および塩分の時間変化

いることが明らかである。

河床付近（赤線）では、小規模な出水があった 1 月 29 日および 2/20 以外では約 15PSU と海水の約半分程度に希釈された塩水が侵入している。また、変動幅は小さいものの大潮・小潮に相関が確認でき、小潮時にやや高くなっている。一方、海面付近（青線）および中層（緑線）における塩分は、満潮・干潮との相関が高いことが確認できる。

また、1 月 29 日に発生した $100 \text{ m}^3/\text{s}$ 程度の出水後、河床付近では約 2 日、中層付近では約 8 日で出水前と同程度の塩分に回復していることが確認できる。一方、水面付近は出水後には淡水となり、観測期間内では回復に至らなかった。三野の水位観測データより 1 月 29 日の出水前は 1 か月半ほど大きな出水がなく、

塩水くさびが上流側へ侵入していたと考えられる。本観測期間内では、2月20日に約60 m³/sの出水が発生しており、塩水くさびが再度下流側へ流出し、回復しなかったと推測できる。

本観測より、出水の少ない冬季における旭川下流域の塩水くさびの挙動は、潮位が支配的であることが示された。また、観測位置より下流側のケレップ水制域では海水の約半分程度の塩水が存在していると考えられる。

4. 数値解析

4.1 計算モデル

塩水流動を生じさせる圧力勾配は性質上“順圧(barotropic)”と“傾圧(baroclinic)”に分けられる。順圧とは水位差による全層的な圧力勾配であり、これによる運動は浅水流方程式で記述できる。一方、傾圧は密度の鉛直分布の差異による断面内の圧力勾配である。

前章で示した観測データによれば、ケレップ水制域の流量は、上流水位がほぼ一定であることから、河口水位(潮位)に概ね支配されている。このことから傾圧に比べて順圧による流動が大きいものと考えられる。また、ケレップ水制は潮汐に伴い水面からの露呈と水没を繰り返すため、順圧による流動について流速の鉛直分布を考慮する必要がある。

そこで本研究では、浅水流方程式と同等のフレームで三次元性が考慮できる準三次元モデルを用いて順圧的な流動を求めた後に、傾圧的流動による“分散の効果”を加える塩分流動モデルを導入した。以下、各モデルの概要を示す。

(1) 準三次元モデル³⁾

準三次元モデルの基礎方程式は、静水圧近似および平面流速場の水深方向の流速を異なる鉛直分布モードを持った多成分連成で表現し、水深方向に積分することで導出され、比較的低い計算負荷で合理的に三次元性を考慮した流況を再現することが出来る。本研究

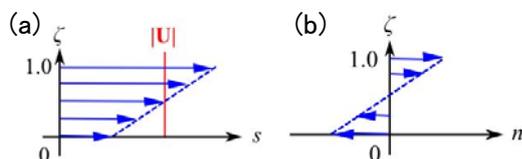


図-5 準三次元モデルによる流速分布の概念図：

(a) 主流方向, (b) 二次流方向

では、水深方向流速分布を以下の線形モードと仮定し、水深方向にGalerkin積分することで導出される最もシンプルかつ実用的な準三次元モデルを採用した。

$$u_i(x, y, z) = U_i(x, y) + u'_i(x, y) \cdot f_i(\zeta) \quad (1)$$

ここで、 $x_i=(x, y)$ は水平方向のデカルト座標、 z は鉛直方向の座標、 $u_i=(u, v)$ は x_i 方向の流速、 $U_i=(U, V)$ 、 $u'_i=(u', v')$ はそれぞれ x_i 方向流速の水深平均成分および水深平均成分からの偏差成分を表している。また h を水深、 z_b を河床高とした場合、 $\zeta=(z-z_b)/h$ は無次元水深を表し、流速分布関数を $f_i(\zeta)=\zeta-1/2$ より与えた。流速分布関数より主流および二次流は図-5の様に表現することができる。

(2) 塩分流動モデル⁴⁾

本研究では、塩分の鉛直分布を線形と仮定することにより、傾圧の効果を簡略に考慮できる二次元塩分流動モデルを用いた。塩分の鉛直分布の概念図を図-6(a)に示す。ここで、横軸は海水の塩分 S_0 に対する相対塩分 $\sigma=S/S_0$ で定義される相対塩分の鉛直平均値 $\bar{\sigma}=\bar{S}/S_0$ (\bar{S} :塩分の鉛直平均値)であり、左側が淡水($\bar{\sigma}=0$)、右側が海水($\bar{\sigma}=1$)である。また縦軸は水面からの深さ z 、水深 h としたとき、 $\zeta=z/h$ で定義される相対水深である。淡水と海水の場合には塩分は鉛直方向に一様となる。一方、中間密度の場合は下層の塩分が上層に比較して大きくなる。

本研究では、 $\bar{\sigma}$ および上層と下層の相対塩分偏差 $\Delta\sigma=\Delta S/S_0$ を用いて、次式のように相対塩分の鉛直分布を仮定した。

$$\sigma(\zeta) = \bar{\sigma} + \Delta\sigma(\zeta - 1/2) \quad (2)$$

また、 $\Delta\sigma$ と $\bar{\sigma}$ の関係の関係を式(2)のように放物線で近似する(図-6(b))。

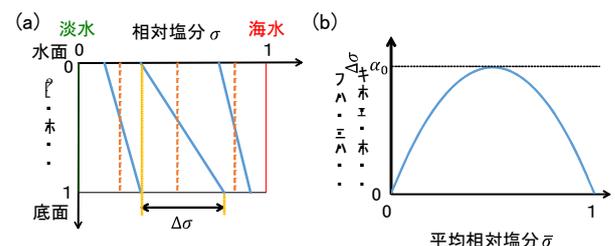


図-6 塩分の鉛直分布の概念図：(a) 相対塩分の鉛直分布, (b)

水面と底面の相対塩分偏差の仮定

$$\Delta\sigma = 4\alpha_0\bar{\sigma}(1-\bar{\sigma}) \quad (3)$$

ここで、 α_0 は 0~1 の範囲の値をとる偏差係数であり、値が小さいほど水面と底面の塩分偏差が小さい、すなわち混合が強い状態を表す。

塩分の輸送方程式は次式で書かれる。

$$\partial_t(h\bar{S}) + \partial_x(M\bar{S} + F_x) + \partial_y(N\bar{S} + F_y) = 0 \quad (4)$$

ここで $M\bar{S}$ と $N\bar{S}$ がそれぞれ x, y 方向の順圧による塩分フラックスであり、準三次元モデルの結果を用いる。また、 F_x, F_y は傾圧による塩分の付加的フラックスであり、塩分の鉛直分布を式で近似した場合、それぞれ次式より求められる。

$$F_x = \pm \frac{\alpha_0 \bar{S} (S_0 - \bar{S})}{6S_0} h^2 \sqrt{\frac{g\varepsilon_0}{2\phi S_0}} \left| \partial_x \bar{S} \right| \quad (5)$$

$$F_y = \pm \frac{\alpha_0 \bar{S} (S_0 - \bar{S})}{6S_0} h^2 \sqrt{\frac{g\varepsilon_0}{2\phi S_0}} \left| \partial_y \bar{S} \right| \quad (6)$$

4.2 離散化手法^{3),4)}

本研究では、三角形格子における有限体積法を用いて基礎方程式の離散化を行った。Godunov 系統の計算手法を採用しており、特性線に沿って波動方程式を分解し、波の風上方向を考慮した定式化を行うことで、安定かつ高精度に移流計算を行うことができる。また GPGPU を用いた高速並列計算プログラムを作成し、計算時間の短縮化を図った。

5. 再現計算

5.1 計算条件

図-7 に計算領域および地盤高を示す。下流端を児島湾の湾口、上流端を旭川の河口より 10 km とし、図-8 のように三角形非構造格子で分割した。また、ケレップ水制は三角形の辺に沿うように配置させ、越流量を本間の越竜公式より与えた。本研究では、平水時の塩水挙動の特徴の再現を目的とし、計算期間は、出水前の 1 月 23 日 8:00 から 20:00 までの 12 時間とした。境界条件として、上流端には北方水位・流量観測所の流量を与え、下流端には宇野潮位観測所の水位を与えた。ただし、上記期間の北方における水位データは未公開であったので、三野水位観測所の水位データより北方水位観測所での水位を推定し、同観測所の H-Q 式

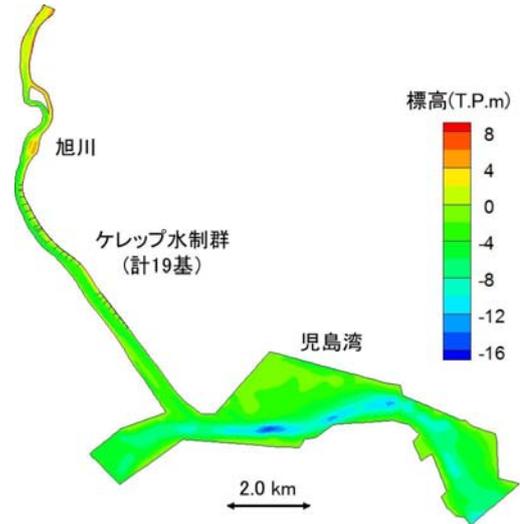


図-7 計算領域および標高

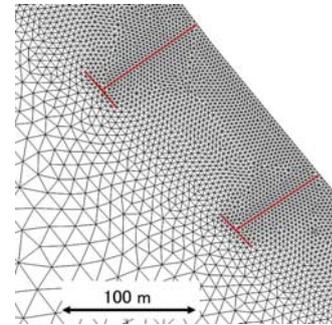


図-8 ケレップ水制周辺の計算格子

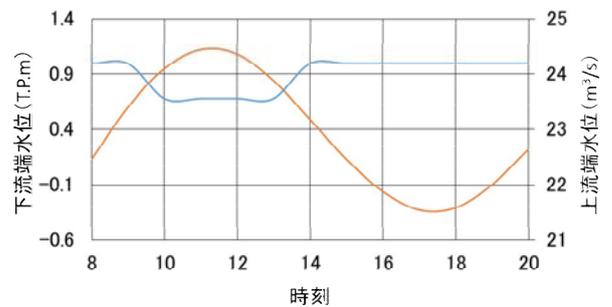


図-9 境界条件

条件には、1 月 23 日 8:00 における水位および流量を境界条件とした 5 時間の助走計算後の結果を与えた。また、塩分については、文献より児島湾での塩分は冬季では海水の約半分程度に希釈されているという文献⁵⁾の結果および、塩水は新鶴見橋（河口から 9.55 km）まで到達しているという知見に基づき、河口から 9.5 km より下流側で 18 PSU という初期条件のもと、上記の助走計算を行い、得られた結果を塩分の初期値として与えた。

5.2 観測結果を用いた偏差係数の設定

式(5), (6)に示すように、傾圧による塩分の付加的フ

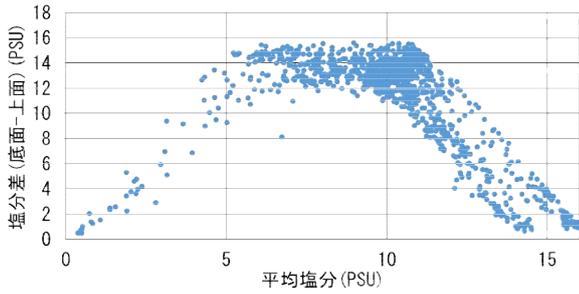


図-10 上層と下層の平均塩分と塩分差の関係
 ラックスは、混合の強弱を表すパラメータ α_0 を含んでいる。本研究では、第3章で示した桜橋での上層と下層の塩分(図-4)を用いて以下の様に α_0 を求めた。上層と下層の平均塩分と塩分差の関係を整理すると図-10に示すようになる。塩分が 8 PSU でピークをとり 0 PSU および 16 PSU の両端でゼロとなる。そこで、本研究では、上記の2つの条件が成り立つように $\alpha_0=2/3$ と設定した。

6. 結果と考察

6.1 縦断的な塩分流動

図-11 および図-12 は、満潮時および干潮時における塩分の縦断分布を示す。ただし、塩分の鉛直分布は、滞筋における平均塩分を用いて式より算出した。また、(a)は本モデル、(b)は分散の効果を入れない場合 ($\alpha_0=0$)の結果を示している。(a)の結果では、干潮時・満潮時ともに河口から約 2 km より上流側で二層化する特徴が表れている。また、塩水くさびの先端は、干潮時には河口から約 9.5km、満潮時には 9.8km に位置しており、(b)と比較し移動量が少ない。これは干潮時において、傾圧の影響(上流側への移流)と順圧の影響(下流側への移流)がバランスしていることを示している。以上のように、旭川における冬季の塩水くさびの特徴を概ね捉えられていることから、本解析モデルは良好に塩分の挙動を再現できていると考えられる。

6.2 ケレップ水制域周辺の流況

図-13 に塩水遡上時におけるケレップ水制域周辺の水深平均流速ベクトルおよび塩分の分布図を示す。また、図-14, 15 に図-13 内の赤線で示した横断面内の塩分の鉛直分布を示す。ベクトル図より、ケレップ水制によって水平渦が生じており、低水路と浅瀬の間で水の交換が生じていることが分かる。塩分の鉛直分布

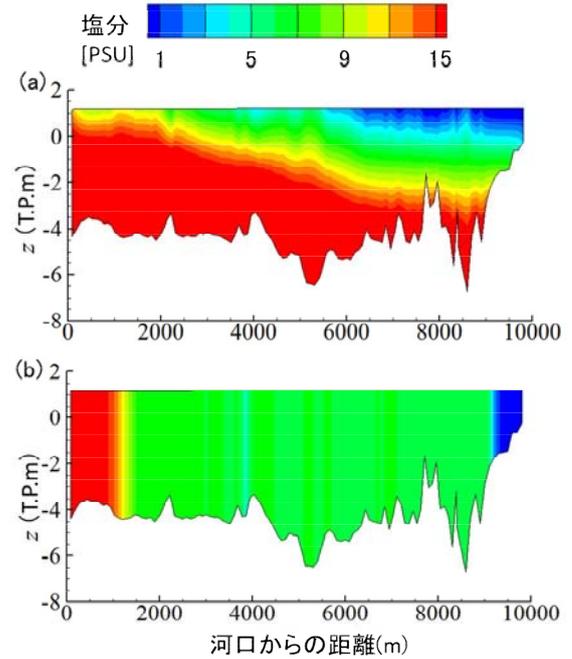


図-11 満潮時における塩分の縦断分布：(a)分散あり、(b)分散なし

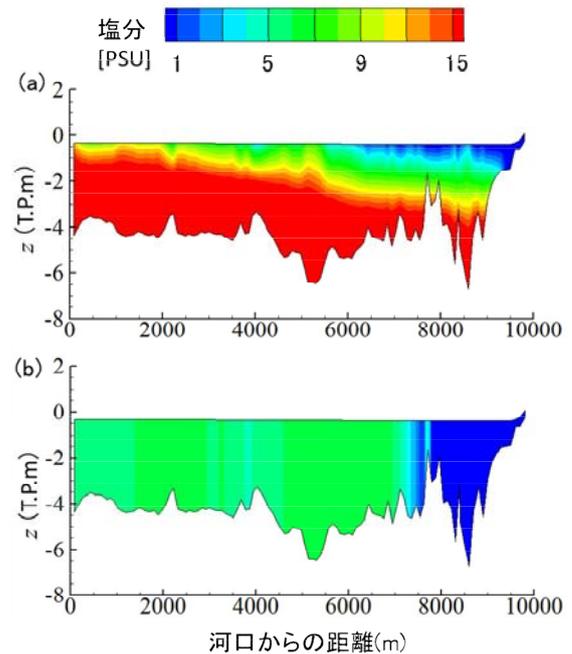


図-12 干潮時における塩分の縦断分布：(a)分散あり、(b)分散なし

なる一方で、浅瀬では塩分が低くなっている。これは、上層の低塩分の水が主に浅瀬へ流入しているためであり、丸々らによる観測結果⁹⁾の傾向とよく一致している。分散の効果을考慮しない従来のモデルでは、低水路と浅瀬で塩分差が生じず、やや高い塩分の水が侵

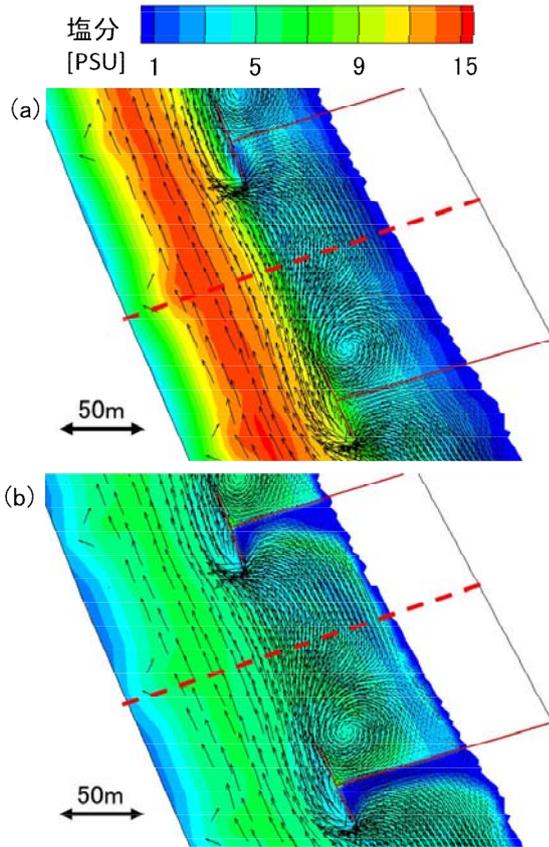


図-13 塩水遡上時における水深平均流速ベクトルおよび塩分分布：(a)分散あり，(b)分散なし

について観測を実施していないが、今後詳細な塩分の挙動を計測し、より詳細な制度検証を行う予定である。

7. 結論

本研究では、旭川下流域のケレップ水制域における平水時の塩分流動特性について、現地観測および数値解析より検討を行った。本研究の結論を以下に示す。

(1)ケレップ水制域上流の桜橋において、塩分の鉛直分布の定点観測を行った。上層・中層の塩分は潮汐により流動する一方、下層では出水時を除き高塩分となることが明らかとなった。

(2)流速および塩分の鉛直分布を線形仮定した塩分流動解析モデルを構築し、平水時における塩分流動の再現計算を行った。下層における高塩分水の停滞・など従来の解析モデルと大きく異なる結果が得られた。今後モデルの再現性を検証するために、ケレップ水制域での塩分計測を実施する予定である。

参考文献

1)国土地理院地図の電子地形図（色別標高図）

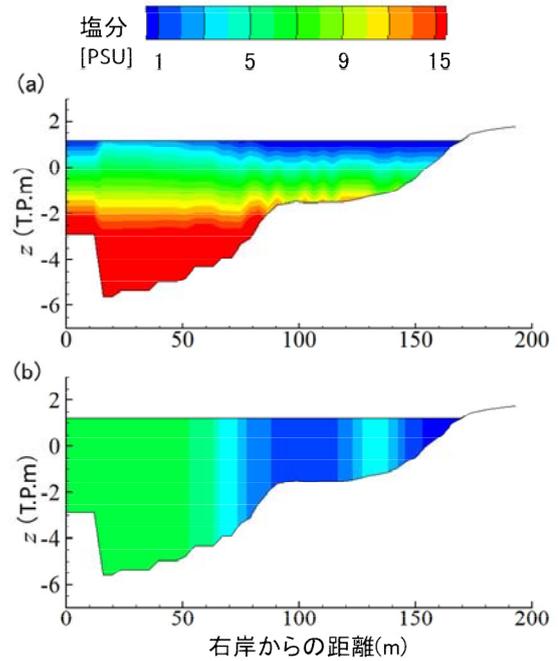


図-14 満潮時における塩分の横断分布：(a)分散あり，(b)分散なし

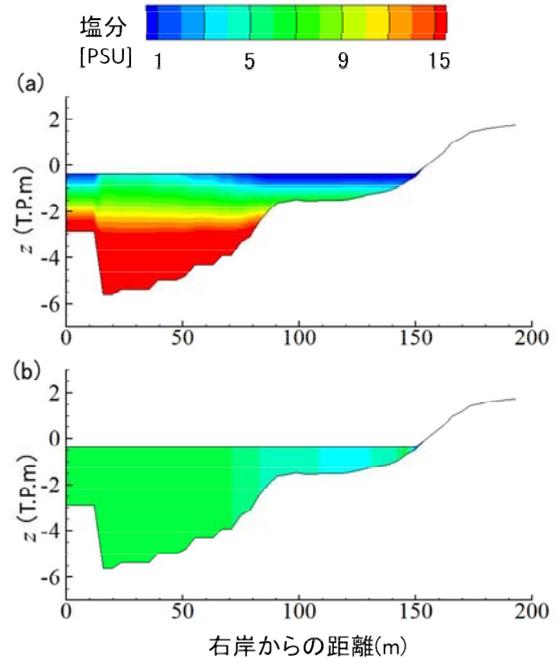


図-15 干潮時における塩分の横断分布：(a)分散あり，(b)分散なし

2)旭川水系河川整備計画，国土交通省中国地方整備局，平成25年3月

3) 石川忠晴，赤穂良輔，新井奈々絵，田潤，土木学会論文集B1(水工学)，Vol.72，No.4，I_331-I_336，2016。

4) 赤穂良輔，石川忠晴，安河内美咲，鶴田泰士，土木学会論文集B1(水工学)，Vol. 70，No. 4，pp. I_877-I_882，2014。

5) 大久保賢治，汽水域研究会，Vol.20，pp.31-33，2013。

6) 長縄真吾，池田満之，藤岡賢哉，川島明昌，陸水雑，Vol.58，pp.261-276，1997。

難培養性乳酸菌を用いた乳牛用プロバイオティクス飼料の開発

岡山大学大学院環境生命科学研究科

西野直樹

発酵飼料から分離した *Lactobacillus acetotolerans* 及び *Lactobacillus pontis* を用い、乳房炎起因菌 (*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Streptococcus uberis*) 及び飼料の好気的変敗に関わる細菌ならびに真菌 (*Bacillus subtilis*、*Aspergillus fumigatus*、*Candida krusei*、*Pichia anomala*、*Saccharomyces cerevisiae*) に対する抗菌活性を測定した。また、トウモロコシ発酵飼料 (WCS) に単独及び混合添加する調製試験も行い、好気的変敗の抑制効果を検証した。腸内生残性はトウモロコシ WCS を生産、給与する酪農家 6 件の実態調査で評価し、乳牛計 30 頭の糞便フローラを調べて *L. acetotolerans* と *L. pontis* の有無を調べた。*L. acetotolerans* は *S. aureus*、*E. coli*、*A. fumigatus* 及び *B. subtilis* に、*L. pontis* は *S. aureus*、*E. coli*、*S. uberis* 及び *A. fumigatus* に抗菌活性を示したが、培養上清を中和するといずれの効果も消失した。トウモロコシ WCS に対する *L. acetotolerans* の変敗抑制効果は単独添加でも確認されたが、*L. pontis* と混合添加すると抑制作用は顕著に高まった。腸内生残性の評価でも、*L. acetotolerans* は非常に優れた乳酸菌種であると判断された。ただし、発酵飼料中に 10^6 cfu/g レベルで存在しても糞便には 10^4 cfu/g レベルでしか検出されず、牛腸内で優勢菌種となることは難しいと考えられた。

1. 目的

発酵貯蔵は自給飼料の主要な貯蔵形態であり、牧草、飼料作物、食品副産物など多種多様な飼料素材が、ロールペール、バンカー、トランスバッグなど様々なサイロに密封・貯蔵されている。発酵飼料生産者の約 5 割は乳酸菌製剤を使用しており、効果が大きい新製品への期待及びその普及性は非常に高い。当初の乳酸菌製剤は、貯蔵中の栄養素損失と有害微生物の生育を抑える目的で開発され、関係者の精力的な取り組みにより、技術的に見ればそれらの目標はほぼ達成された。一方、皮肉なことに、開封後の腐敗や長期貯蔵時のカビ発生は、関連技術が進展した現代の方が解決困難な課題となった。空気存在下で乳酸を代謝する細菌、酵母及びカビは多く、乳酸優勢のいわゆる良質発酵飼料は開封後かえって腐敗が進みやすい。当初の添加剤開発では、乳酸生成をいかに促進するかがキーポイントとされたが、近年は同時に酵母やカビを抑えるというマルチ機能が求められている。*Lactobacillus buchneri* という 1 菌種が腐敗防止機能をもつ乳酸菌製剤として普及しているが、多量の酢酸を生成する菌種であり、関係者の誰もがさらなる改良及び機能強化を求めている。

我々は、発酵飼料の貯蔵特性と細菌フローラを調

べ、それらを品質制御に応用する研究を継続的に行ってきた。実規模サイロの実態調査も続けており、発酵飼料乳酸菌の腸内生残性を評価する研究も行っている。それらの取組みの中で、これまで発酵飼料から分離されることがない *Lactobacillus acetotolerans* や *Lactobacillus pontis* が、乳牛腸内で生残しうるプロバイオティクス候補となることを示してきた。これらの乳酸菌を分離することにも成功しており、有用乳酸菌を発酵飼料調製過程で増菌し、動物の疾病予防及び健康増進につなげるという、次世代型添加剤の開発に向けた研究の準備が整った。

本研究では、上記 2 菌種を中心に、1) 乳房炎起因菌及び飼料の好気的変敗に関わる細菌・真菌に対する抗菌作用、2) 実態調査に基づく *L. acetotolerans* と *L. pontis* の腸内生残性解析を行った。

2. 方法

2.1. 乳房炎及び好気的変敗に関わる細菌及び真菌に対する抗菌活性

L. acetotolerans と *L. pontis* の純粋培養物を用い、代表的な乳房炎起因菌 (*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Streptococcus uberis*) 及び好気的変敗関連菌 (*Aspergillus fumigatus*、*Bacillus subtilis*、

Candida krusei、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia anomala* 及び *Candida krusei*) に対する抗菌作用をソフトアガー重層法及びアガーウェル拡散法で調査した。アガーウェル拡散法は培養上清を用いて行ったが、pH を 7.0 に調整した上清と無調整の 2 種類について調査した。

2.2. 発酵飼料の好気的変敗抑制効果

L. acetotolerans と *L. pontis* の好気的変敗抑制効果は、トウモロコシ発酵飼料 (WCS) を材料としてパウチサイロで評価した。MRS 培地で *L. acetotolerans* と *L. pontis* を培養し、滅菌生理食塩水で洗浄した乳酸菌を 10^5 cfu/g レベルで添加して、2 ヶ月間室温で保存した。開封後、発酵生成物を HPLC で測定するとともに、細菌フローラを変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) 及びリアルタイム PCR (qPCR) で調べた。好気的変敗の有無は一部の発酵飼料を 7 日間空気にさらして評価し、7 日後の細菌フローラを解析して、変敗抑制効果を検証した。

2.3. 乳牛腸内における *L. acetotolerans* と *L. pontis* の生残性評価

トウモロコシ WCS を生産及び給与している酪農家計 6 件を訪問し、発酵飼料と糞便 (直腸糞) を採取した。いずれもバンカーサイロでトウモロコシ WCS を生産しており、給与飼料全体に占める発酵飼料の割合 (DM 当り) は 20~40%であった。発酵飼料は代表的サンプルを、糞便は乳牛 5 頭から採取した。

細菌フローラの解析は、DGGE と qPCR で行った。市販キット (DNeasy Blood & Tissue Kit 及び QIAamp DNA Stool Mini Kit) を用いて細菌 DNA を精製し、16S rRNA 遺伝子の V3 領域を対象とするユニバーサルプライマーを用いた DGGE 及び nested-PCR を応用した *Lactobacillus* 特異的 DGGE を行った。主要な DNA バンドを切り出して TA クローニングを行い、DNA の塩基配列を測定して BLAST による菌種同定を行った。

qPCR は全細菌と *L. acetotolerans* を対象として行

い、全細菌数の推定には *E. coli* の 16S RNA 遺伝子を含むプラスミドを、*L. acetotolerans* の推定には *L. acetotolerans* の 16S RNA 遺伝子を含むプラスミドを用いた。*L. pontis* の qPCR も試みたが、*L. pontis* だけを検出するプライマーの設計ができておらず、本報告にはデータを示していない。

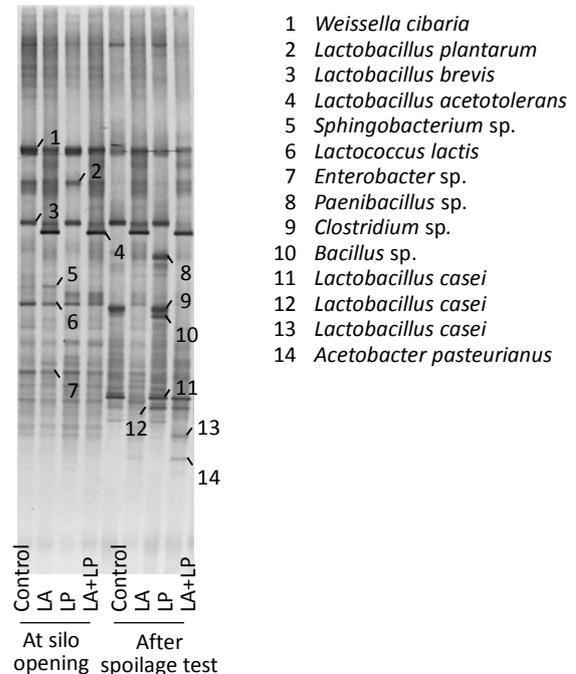


図 1. *L. acetotolerans* (LA)及び *L. pontis* (LP)を添加したトウモロコシ WCS の細菌フローラ。2 ヶ月間嫌氣的に貯蔵して開封し (at silo opening)、7 日間空気に曝して変敗させた (after spoilage test)。

3. 結果と考察

3.1. 及び好気的変敗に関わる細菌及び真菌に対する抗菌活性

L. acetotolerans は *S. aureus*、*E. coli*、*A. fumigatus* 及び *B. subtilis* に、*L. pontis* は *S. aureus*、*E. coli*、*S. uberis* 及び *A. fumigatus* に抗菌活性を示した。乳房炎起因菌及び好気的変敗関連菌のいずれにも有効という結果であるが、培養上清を中和するといずれの効果も消失した。そのため、抗菌活性の主体は発酵過程で生じた乳酸及び酢酸によるものと推察され、真菌の抑制にも非解離型有機酸の抗菌力が作用していると考えられた。発酵飼料は pH 4.0 前後を示すことが多く、*L. acetotolerans* と *L. pontis* の抗菌活性がそのまま期待できるが、牛腸内は pH 6.0~7.0 に保たれており、糞便とともに排菌された場合でも敷料を含めた環境

は pH 7.0–8.0 と酸性条件にはならない。環境性の乳房炎起因菌を抑えるには中性域でも抗菌活性を示すことが望ましく、産業の場で疾病予防効果を発揮することは難しいと判断された。一方、真菌の生育を乳酸で抑えることは容易ではなく、*A. fumigatus* に対する抗菌活性は乳酸及び酢酸以外の代謝物が関与していると考えられる。そこで、抗真菌作用をもつフェニル乳酸の生成能を調べたところ、*L. acetotolerans* にその能力が確認された。定量的な評価を *L. pontis* とともに進めており、抗菌活性の機序解明は今後も継続したい。

3.2. 発酵飼料の好気的変敗抑制効果

トウモロコシ WCS への添加効果は、*L. acetotolerans* 単独でも認められたが、*L. acetotolerans* と *L. pontis* を混合添加すると (Figure 1 の LA+LP)、好気的変敗に伴う発熱が開封後 1 週間全く観察されなくなった。*L. pontis* の単独添加は全く効果がなく、開封後 2 日以内に発酵飼料は発熱して変敗した。細菌フローラを調べたところ、*L. acetotolerans* 及び *L. pontis* の添加に関わらず、*Weissella cibaria*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus brevis*、*Lactococcus lactis* といった多様な乳酸菌が確認された。*L. acetotolerans* はこれらと共存する形で検出されたが、*L. pontis* は変敗抑制効果を示した *L. acetotolerans* との混合添加でもその DNA を確認することはできなかった。好気的変敗を起こした無添加及び *L. pontis* 添加発酵飼料では *Bacillus* sp. 及び *Paenibacillus* sp. が検出されたが、*L. acetotolerans* を添加した発酵飼料ではそれらが見られず、抗菌活性の情報が反映された結果となった。

3.3. 乳牛腸内における *L. acetotolerans* と *L. pontis* の生残性評価

訪問した酪農家ではトウモロコシ WCS を全て添加剤なし調製していた。発酵飼料には *L. acetotolerans*、*L. pontis*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus vini*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus amylolyticus* が検出されたが、いずれのサンプルにも *L. acetotolerans* は安定して検出された。Farm 1、2、4 及び 6 の発酵飼料には *L. pontis*

も検出され、*L. vini* とともに検出頻度の高い乳酸菌と判断された。これらの結果は *L. acetotolerans* と *L. pontis* がトウモロコシ WCS 中で生育・生残しやすいことを示しているが、3.2 で記載した添加実験の結果では、貯蔵 2 ヶ月後に *L. pontis* を確認できていない。DGGE では 1 つのバンドに複数の細菌 DNA が重なって存在することがあり、添加実験でも *L. pontis* は生残しているのかもしれない。

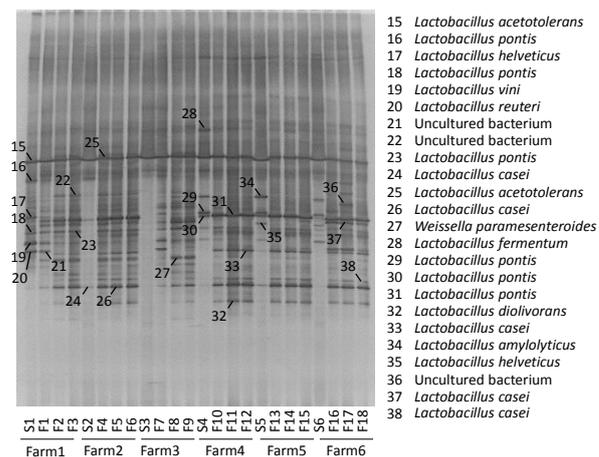


図 2. トウモロコシ WCS とそれを給与した乳牛糞便の細菌フローラ。バンカーサイロでトウモロコシ WCS を調製・利用する 6 件の酪農家を訪問し、発酵飼料と乳牛糞便を採取して細菌フローラを調査した。*Lactobacillus* 特異的プライマーを用いた nested PCR で DGGE を行った。S は給与されていた発酵飼料を、F は乳牛糞便のサンプルを示す。

発酵飼料には認められないのに糞便中に確認された乳酸菌は *Weissella paramesenteroides* 及び *Lactobacillus diolivorans* であるが、*L. casei* と *L. reuteri* についても発酵飼料に存在するしないに関わらず糞便中に検出される事例が多かった。*L. amylolyticus*、*L. fermentum*、*L. helveticus* は糞便中にまったく確認できず、牛腸内で消失したと判断された。これらに対し、*L. acetotolerans* の DNA は全ての糞便サンプルに明確に検出され、飼料由来の乳酸菌の中では最も生残する可能性が高いと考えられた。

qPCR で定量的な解析を行ったところ、発酵飼料中の *L. acetotolerans* は 10^5 cfu/g レベルで全細菌数の 100 分の 1 程度であった。一方、糞便中の *L. acetotolerans* は 10^4 cfu/g レベルで全細菌数の 10,000 分の 1 程度に過ぎず、*Bacteroides* spp. や *Clostridium* spp. が優勢の牛腸内で健康増進効果を期待すること

は容易ではないと考えられた。

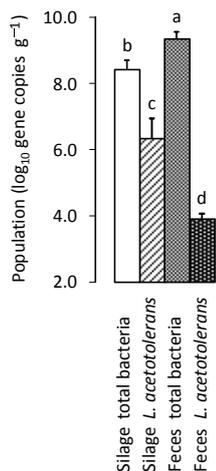


図 3. トウモロコシ WCS とそれを給与した乳牛糞便の全細菌数と *L. acetotolerans* の菌数。発酵飼料は 6 サンプルの平均値±標準偏差を、糞便は乳牛 30 頭から採取したサンプルの平均値±標準偏差を示す。異なるアルファベットを付した平均値の間には有意差 ($P<0.05$) がある。

L. acetotolerans を添加したトウモロコシ WCS の給与試験は現在実施中であるが、発酵飼料中の割合を高めても糞便で検出される *L. acetotolerans* のレベルを 10^6 cfu/g 以上にすることは難しい。動物の疾病予防及び健康増進につなげる次世代の添加剤としては能力が残念ながら不十分である。しかし、実際に飼育される乳牛で生残性が示唆される有望な候補であることは間違いなく、今後も選抜を続ける予定である。

テンナンショウ属を用いた植物の性転換機構の解明

岡山大学大学院環境生命科学研究科

宮崎祐子

テンナンショウ属はサトイモ科に属する雌雄異株の多年生植物で、年によって個体の性表現が可塑的に変化する。テンナンショウ属の性転換には個体サイズが関係していると言われており、サイズが大きいと雌に、小さいと雄になる傾向がある。しかしながら性決定の生理的および分子メカニズムは未だ明らかにされていない。本研究ではカントウマムシグサを用いて花成制御および性決定に関与する遺伝子群、すなわちオス特異的およびメス特異的な遺伝子群を明らかにするため、雄花および雌花の網羅的遺伝子発現解析を行った。また、性決定に関与する栄養分を明らかにするため、球茎内の非構造体炭水化物量および窒素量を測定した。網羅的遺伝子発現解析の結果、オス特異的およびメス特異的な遺伝子群が明らかとなった。球茎の養分量については、6月の値に対する10月の球茎の養分含有率を算出したところ、可溶性糖類のみにおいて有意にオスおよびメスで減少していた。このことから、無性から有性への性表現型の転換に関して可溶性糖類が関与している可能性が考えられた。今後、性決定に関与する遺伝子の発現量と可溶性糖類の関連について明らかにする必要がある。

はじめに

テンナンショウ属の植物は、地下に球茎を持つサトイモ科の多年草で、落葉樹林の林床やその周辺に生息する。日本はテンナンショウ属がもっとも多様化している地域のひとつで、60の分類群(51種9亜種)が分布している(邑田 2011)。これらの植物は個体サイズに依存して可逆的に性表現を変化させることが知られており、個体サイズが比較的小さいときは葉のみを展開し有性繁殖を行わず(無性)、個体サイズが大きくなると雄花をつけ(オス)、さらに大きくなると種によって雌花(メス)または両性花をつけることが分かっている(Kinoshita 1986, 1987)。草本植物の個体サイズは一般的に光や土壌栄養塩などの環境要因に影響を受けることが考えられるが、それらの環境要因は容易に変化しやすい。近年では例えばシカによる食害や森林の都市近郊化などにより、林床に生育するテンナンショウ属の生育環境は変化してきている。

一方、雌雄異株植物にとって、雌雄の各個体がそれぞれの遺伝子を次世代に残し、種が存続していくためには、雌雄個体間で確実に交配する必要がある。そのためには、個体群内の雌雄の比が非常に重要である。しかしながら、前述のような生育環境の変化

により、個体サイズの変化を介した雌雄の性比に偏りが生じ、交配様式が変化した結果、遺伝的多様性が低下する、あるいは個体群が維持できなくなる恐れがある。テンナンショウ属には希少種や絶滅危惧種が含まれるため、それらの種の保全の観点からも、テンナンショウ属の性がどのようにして決定するのかを明らかにすることは非常に重要である。

性表現型の決定は地下に存在する球茎上で、開花の前年に行われる。テンナンショウ属は春に地上に葉と花を同時に出し、夏から秋に地上部が枯れる。その間、球茎の上では、翌年の葉や花になる芽が成長する。この芽の形態の季節変化を、ユキモチソウ(*Arisaema sikokianum*)において調べた Fukai (2004) は、4月および5月には発達する芽は無性であり、6月および7月に花序の原基が観察され、10月から12月には雌雄が形態的に識別可能になると示している。このことから、無性と有性(オスおよびメス)が分かれる花芽形成は5月から6月に、雌雄の決定は10月までに行われていると予測できる。

性表現は個体サイズに依存することが分かっているが、両者の間に見られる傾向は相関関係を検出するにとどまっており、光合成同化産物の獲得量など

が関連しているのではないかという示唆もある（濱尾ら 2004）が、そのメカニズムに言及するものではなく、性の決定機構は未だ明らかにされていない。さらに個体内の光合成同化産物量や窒素量など、個体の栄養状態の指標となるような因子が性決定に関与すると仮定しても、個体の性が決定付けられるのは雌雄が形態的に判別可能となる時期より前であり、それがいつなのかを正確に知ることは手段がなく、未だ不明なため、光合成同化産物量や窒素量などの因子がいつ作用しているのかは未解明のままである。

繁殖器官の誘導にどのような個体内養分が影響し得るのかという疑問に対し、他の植物種では、繁殖器官への投資が完了した後に最も減少した個体内養分が最も重要であるとみなしている（Ichie et al. 2005, Ichie & Nakagawa 2013）。この考え方を適用すれば、テンナンショウ属においては、無性よりも繁殖器官を産出するオスやメスのほうが、さらにオスよりも果実を産出するメスのほうが、より個体内養分を消費すると考えられるため、繁殖期間後に最も減少した養分の不足が、それぞれの性表現型を分ける要因の一つであると考えられることができる。

そこで本研究では性が形態的に判別不可能な時期に雌雄を判別する材料として花成制御遺伝子に着目し、花成および性決定を制御する遺伝子群を網羅的遺伝子発現により特定することとした。さらに、個体内の光合成同化産物量および窒素量を測定してそれらの関係を解析することで性転換の要因を解明し、性転換を行う植物の生活史の理解および保全への基礎情報とすることをねらいとした。

材料と方法

■対象種と調査地

対象種はカントウマムシグサ (*Arisaema serratum*) とした。調査およびサンプリングは岡山県岡山市龍ノ口山国有林（北緯 34° 42'、東経 133° 58'）内の登山道沿いに行った。本種は日本の本州、四国、九州、韓国の済州島に分布する（邑田 2011）。おもに有性生殖を行い、地下茎が分球し子芋が形成されることはほとんどないとされている（Kinoshita 1987）。

2015年4月から5月にかけて、小葉が4枚以上の個体に個別番号を付与し、性別を記録した。個別番号を付与した全ての個体に対し、5月8日に地際偽茎直径を2方向で記録し、平均値を偽茎直径とした。偽茎直径は、個体サイズ（球茎重量、葉面積など）を代表することが報告されており（Kinoshita 1986）、球茎の掘り取りを行う際に採取月ごとに偽茎直径に偏りがないよう調整するために用いた。

個体の掘り取りを毎月1回、2015年6月22日、7月21日、8月19日、9月18日、10月26日に行った。それぞれの月で無性5-6個体、オス5-7個体、メス2-3個体ずつ、地上部、球茎を含む個体全体を採取した。

■網羅的遺伝子発現解析

オス花序およびメス花序をそれぞれ3個体から2015年4月27日に採取した。採取した花序はそれぞれCTAB法（Chang et al. 1993）でRNA抽出を行い、DNase処理（TURBO DNA-free DNase, Ambion）を行ったのち、カラム精製（RNeasy Mini Kit, Qiagen）を行った。その後クオリティチェック（2100 バイオアナライザ, Agilent Technologies）を行った後、網羅的遺伝子発現解析に供試した。

網羅的遺伝子発現解析（RNA-seq）は次世代シーケンサー（HiSeq 2500, Illumina）を用いて行った。得られたデータはクオリティコントロールを行った後、de novo アセンブリをTrinity（Grabherr et al. 2011）を用いて行った。得られたコンティグに対し、Blastx を用いてアノテーションを行った。その後、コンティグに対しマッピングされたリードを用いて edgeR（Robinson et al. 2010）により発現解析を行い、雄花と雌花の間で発現に差のある塩基配列を抽出した。

■非構造体炭水化物量の測定

凍結乾燥させた球茎を QIAGEN Tissue Lyser II（QIAGEN, Hilden, Germany）の Grinding Jar Steel 2×25ml を用いて粉碎した。1.5ml チューブの重量を電子天秤で測定した。1.5ml チューブに入れた粉碎済み球茎 3.0-4.0mg の電気オープン 70°C で乾燥させ、重量を測定した。前もって測定した 1.5ml チューブの重量を引き、乾燥後の重量を計算した。1.5ml

チューブに入った乾燥済み球茎に 80%エタノール 500 μ l を注ぎ、攪拌した後 10000rpm で 10 分間高速遠心分離器にかけ、上澄みを回収した。エタノールを注ぎ、上澄みを回収するまでの作業を 3 回繰り返した。回収した上澄みをヒートブロック 90-100°C でエタノールが飛ぶまで熱した後、チューブに 1.0ml の超純水を加え、攪拌した。これを可溶性糖類抽出分画とした。

可溶性糖類抽出分画 500 μ l を試験管に取り、5%フェノール溶液 500 μ l を加えてよく攪拌した。ここに、濃硫酸 2.5ml を、液面に直接あたるように注入した。よく攪拌した後、45°C の恒温槽中に 30 分置き、取り出した後、よく攪拌した。シッパーユニット（シッパー160, SHIMADZU, Kyoto, Japan）付きの分光光度計（UVMINI-1240, SHIMADZU, Kyoto, Japan）を用いて、490nm で吸光度を測定した。このシッパーユニットのうち、しごきポンプ用塩ビ系チューブは濃硫酸によって劣化するため、測定後取り替えた。0, 0.03125, 0.0325, 0.125, 0.25 mg/ml のグルコース溶液を測定した検量線から、濃度を計算し、可溶性糖含有率とそれに球茎乾燥重量を掛けた可溶性糖含有量を計算した。この検量線上に乗らなかったものは、倍に薄めてから測定した。

可溶性糖類を抽出した残滓のエタノールを飛ばした後、チューブに 0.2mol/L の水酸化カリウム溶液を加え、攪拌した。チューブをヒートブロック 100°C に 30 分置いた。取り出したチューブを冷却した後、1mol/L CH₃COOH を 200 μ l 加えて溶液を中和した。Amyloglucosidase 溶液を 500 μ l 加えて攪拌、チューブを 55°C の恒温槽に 1 時間置き、取り出した後 100°C のヒートブロックに 1 分間置いた。冷却後 10000rpm の高速遠心分離器 15 分かけ、得られた上澄みを別のチューブに回収、これをデンプン抽出分画とした。

デンプン抽出分画の定量はグルコース C II-テスト（WAKO, Osaka, Japan）を用いた。デンプン抽出分画 20 μ l を試験管に入れ、発色溶液 3.0ml を注ぎ、よく攪拌した。これを、分光光度計を用いて 505nm で吸光度を測定した。0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mg/ml のグルコース溶液を使って検量線を描い

た。デンプンをグルコースに変化させて測定しているため、デンプンの含有量を計算する際に、得られた溶液中のグルコース量を 0.9 倍し、デンプン量として算出した。

■全窒素量の測定

非構造体炭水化物量の測定に用いたものと同様の粉碎した球茎サンプルを 3.5-4.0mg 秤量して錫箔に包んだ。連続フロー型同位体比質量分析計 (Delta V advantage, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) で全窒素量を測定した。

■球茎内の養分量の季節変化

6 月から 9 月および 10 月の間の養分含有率の変化を性表現型ごとに比べるために、季節変化率を計算した。

$$\Delta N = \frac{N_i}{N_j}$$

ここで、 ΔN をある養分の季節変化率、 N_i を 9 月または 10 月のある養分の含有率、 N_j をある養分の 6 月の平均値とする。季節変化を可溶性糖類、デンプン、窒素含有率で計テンナンショウ属の性表現型の決定に個体内養分が関与しているという仮説の下、テンナンショウ属の性表現型の決定に個体内養分が関与しているという仮説の下、算し、無性、オス、メスで比較した。

■解析方法

月ごとの偽茎直径の差について、一元配置分散分析を行い、有意差がないことを確認した。偽茎直径と葉面積、地上部乾燥重量、球茎乾燥重量の関係に関し、葉面積、地上部乾燥重量、球茎乾燥重量を自然対数変換した上で、単回帰分析を行った。地上部乾燥重量、球茎乾燥重量、養分含有率の季節変化について、一元配置分散分析を行った。ある当年の性表現型について、翌年の性表現型の違いによって差があるかどうかについては、 t 検定を行った。以上の解析はすべて R version 3.2.0 (<https://www.r-project.org/>) を使用した。

結果

■偽茎直径と性表現

調査を行った全個体について、性表現型ごとの偽茎直径の頻度分布を示した(図1)。無性、オス、メスの順に偽茎直径が大きくなっているが、明瞭な移行サイズがあるわけではなく、無性とオス、オスとメスにはある程度の移行幅が存在することがわかった(図1)。

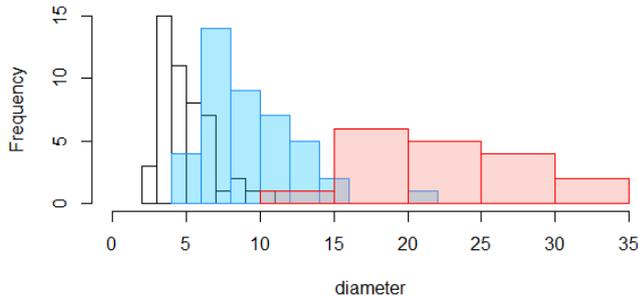


図1. 性表現別の偽茎直径の頻度分布.

横軸は偽茎直径、縦軸は頻度。白抜きの黒線は無性、青はオス、赤はメスを示す。

■網羅的遺伝子発現解析

雌花および雄花それぞれから、他種で報告されている雄花および雌花に特異的な遺伝子と相同性のある遺伝子がそれぞれ特定され、塩基配列が得られた。

(*詳細については論文化のため、詳細情報を非掲載といたします。)

■地上部乾燥重量、球茎乾燥重量と偽茎直径との関係

偽茎直径と対数変換した地上部乾燥重量の関係は、無性 ($P < 0.001$)、オス ($P < 0.001$)、メス ($P < 0.001$) で有意な正の相関がみられた。偽茎直径と対数変換した球茎乾燥重量との関係は、無性 ($P < 0.01$)、オス ($P < 0.01$)、メス ($P < 0.001$) で有意な正の相関がみられた。

■地上部乾燥重量、球茎乾燥重量、メスの花序乾燥重量の季節変化

掘り取った個体のうち、地上部を採取できたものは、無性では8月2個体、9月3個体、10月0個体、オスでは8月3個体、9月0個体、10月2個体と、8月以降に減少した。地上部乾燥重量の季節変化を見ると、無性、オス、メスで有意な季節変化はみられなかった ($P > 0.05$)。

球茎乾燥重量の季節変化を見ると、無性、オス、メスで季節変化はみられなかった(図2, $P > 0.05$)。

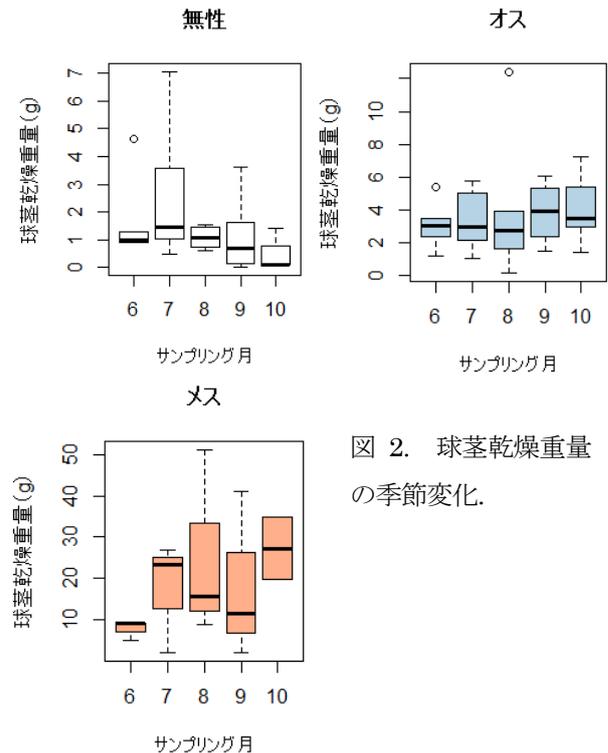


図2. 球茎乾燥重量の季節変化.

メスの花序乾燥重量は、サンプル数が少ないため統計解析を行わなかったが、6月から9月にかけて増加している傾向が見られた。

■個体内養分量の季節変化

可溶性糖含有率について、無性では有意な季節変化がみられた ($P < 0.05$)。月ごとの平均値は6月から9月まで減少し、10月には増加した。オス、メスでは有意な季節変化はなかった。

デンプン含有率では、無性で有意な季節変化がみられた ($P < 0.01$)。また、6月から9月までは減少傾向を示していた。オス、メスでは有意な季節変化はみられなかった。

窒素含有率については、無性 ($P < 0.001$)、オス ($P < 0.001$)、メス ($P < 0.01$) で有意な季節変化がみられた。

■球茎内の養分量の季節変化

養分含有率の季節変化の変化率は、可溶性糖類では、10月の値に有意な性表現型間の差があり(図3, $P < 0.05$)、無性で大きく、オス、メスで小さい傾向を示した。デンプン含有率では、9月 ($P < 0.05$)、10月 ($P < 0.01$) の値に有意に性差がみられ、無性で小さく、オス、メスで大きい傾向を示した。

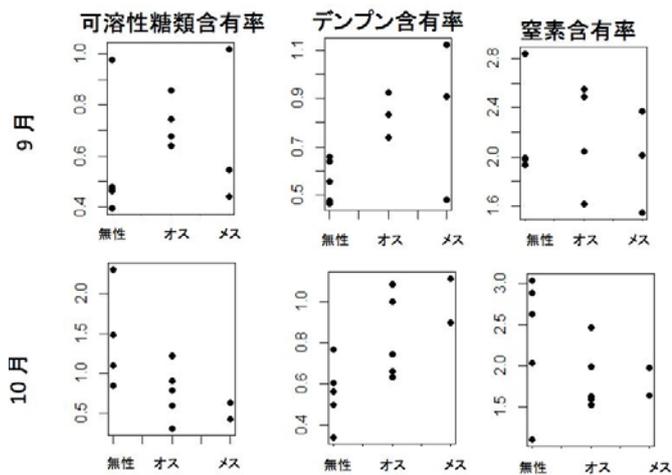


図3. 球茎内の6月の養分量に対する9月および10月の養分量の変化率。

■翌年の性表現型

9月および10月の芽では、翌年の性表現型を形態的な観察から判別することができた。

9月および10月に採取した無性11個体のうち、5個体が翌年オスになることがわかった。当年無性のうち、雄花序をつけた5個体は、すべて球茎乾燥重量が1g以上だった。翌年オス個体と翌年無性の個体において、球茎乾燥重量に有意差はなかった ($P > 0.05$)。翌年オス個体と無性の個体において、可溶性糖類含有率、デンプン含有率、窒素含有率の差はみられなかった。

当年オス9個体のうち、1個体が雌花序をつけており、ほかはすべて雄花序をつけていた。統計解析は行わなかったが、翌年メス個体と翌年オス個体で、球茎乾燥重量、養分含有率に差はみられなかった。

当年メス5個体のうち、2個体は雄花序をつけており、他の個体は雌花序をつけていた。翌年オス個体と翌年メス個体では、球茎乾燥重量や養分含有率に差はみられなかった ($P < 0.05$)。

考察

■性表現型別の季節変化

性表現型によって、地上部や球茎乾燥重量、養分量の季節変化には違いが見られた。無性は、球茎乾燥重量が減少傾向で、球茎のデンプン量が減少していた。これは、個体の維持や翌年の葉や花への投資のために、炭水化物が使われていたことを示してい

る。可溶性糖類の含有率は6月から9月まで減少し、10月に増加した。地上部のサンプル数が10月には0個体だったことから分かるように、この時期には地上部がほとんど消失しており、球茎は休眠状態だったと考えられる。そのため、冬の気温低下の対策として、可溶性糖類を生産していた可能性がある。窒素量の増加は、劣化する地上部からの転流が考えられる。

オスは、地上部乾燥重量、球茎乾燥重量、可溶性糖類量、デンプン量で季節変化は認められなかった。オスは無性よりも個体サイズが大きいということもあり、無性より養分等の蓄積量が多く、蓄積量に対する消費量が小さいため、無性ほどの変化は見られない。窒素量は増加しているが、無性の増加と比較すると増加の割合は小さい。この要因もまた、劣化していく地上部からの転流が考えられる。

メスは、地上部乾燥重量、球茎乾燥重量、可溶性糖類量、デンプン量で季節変化はみられなかった。メスは、無性やオスと違い、果実への投資などコストが大きいはずだが、それを含めても相対的には球茎養分に影響が出ないほど蓄積量が大きいと考えられる。窒素量は増加しているが、無性やオスに比べると増加の割合は小さい。これには、メスでは果実を成熟させるために地上部を維持しなければならないことが関係していると考えられる。

■繁殖器官への資源分配

10月の可溶性糖類含有率で有意に性表現型ごとに差があり、無性よりもオス、メスで小さくなっていった。つまり、無性よりも、オスやメスで繁殖期間中の消費量が大きかった養分であり、オスやメスの繁殖に対して、可溶性糖類が重要な養分である可能性がある。したがって、性表現型の転換に関し、可溶性糖類が関与している可能性が考えられる。

■翌年の性表現型と養分量の関係

9月と10月に採取した球茎上の芽から、実際に性表現型が変化することが確認できた。また、繁殖の終わった9月と10月に、翌年の性表現型による養分の違いはないことが示された。

結論

当年の性表現型（無性、オス、メス）によって、養分の季節変化に違いがあることがわかった。無性ではデンプンや可溶性糖類は減少し、オスやメスでは変化しなかった。個体サイズに対する相対的な消費量が違いの要因であることが考えられた。窒素に関しては、無性、オス、メスで増加していた。劣化する地上部からの転流が要因と考えられ、地上部の季節変化が球茎内の窒素量に影響する可能性が示唆された。

養分量の季節変化から、繁殖期間中にオスやメスで最も減少していたのは、可溶性糖類であることが示された。可溶性糖類が繁殖期間中に最もオスやメスで消費される養分であり、オスやメスに性表現型を決定する際にも影響する可能性が示唆された。

今後、網羅的遺伝子発現の結果明らかとなった性決定に関与すると考えられる遺伝子の発現量と可溶性糖類の関連について明らかにすることで、養分量が性決定に与える影響について明らかにすることが可能であると考えられた。

引用文献

Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113- 116.

Fukai S (2004) Floral initiation and development of the sex-changing plant *Arisaema sikokianum* (Araceae). *International Journal of Plant Sciences*, 165: 739-744.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29: 644-652.

濱尾章二、成田佳紀、加藤英介、野崎貴史、佐野智彦 (2004) 性転換するマムシグサにおけるサイズと花序への投資量の関係. *日本植物園協会誌*, 38: 113-118.

Ichie T, Kenta T, Nakagawa M, Sato K, Nakashizuka T. (2005) Resource allocation to reproductive organs during masting in the tropical emergent

tree, *Dipterocarpus tempehes*. *Journal of Tropical Ecology*, 21:237-241.

Ichie T, Nakagawa M (2013) Dynamics of mineral nutrient storage for mast reproduction in the tropical emergent tree *Dryobalanops aromatica*. *Ecological Research*, 28: 151-158.

Kinoshita E (1986) Size-sex relationship and sexual dimorphism in Japanese *Arisaema* (Araceae). *Ecological Research*, 1:157-171

Kinoshita E (1987) Sex change and population dynamics in *Arisaema* (Araceae) I. *Arisaema serratum* (Thunb.) Schott. *Plant Species Biology*, 2: 15-28.

邑田仁(2011) 原色植物分類図鑑 日本のテンナンショウ, 北隆館, 東京.

R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma Oxf Engl.*: 26:139-40.

腫瘍抗原糖鎖をカップリングさせた機能性糖鎖ポリマーの抗腫瘍抗体産生への応用

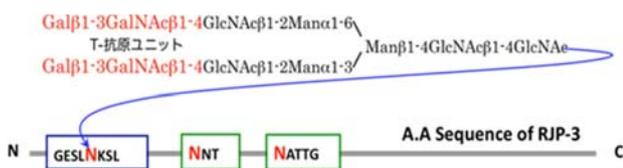
岡山大学大学院 環境生命科学研究科 生物機能化学講座

木村 吉伸

(概要)

本研究は、ローヤルゼリー中に我々が見出した腫瘍抗原含有糖鎖を利用した抗腫瘍抗体の作成や腫瘍免疫療法への応用利用を目的としている。平成27年度は、ポリグルタミン酸とローヤルゼリータンパク質由来の糖鎖を用いた人工糖鎖ポリマーの調製と応用利用を目指した。その結果、多価数の糖鎖(糖ペプチド)をカップリングさせた腫瘍抗原糖鎖含有の人工糖鎖ポリマーの合成方法を確立するとともに、腫瘍抗原糖鎖の精製法に改良を加えて、逆相クロマトを用いた多量調製法を開発した。また、T抗原の酵素合成に利用できる新規・1-3Gal転移酵素の遺伝子同定と発現系構築に成功した。

申請者らは、T細胞増殖促進活性を持つローヤルゼリータンパク質(RJGP)に結合する糖鎖の構造と機能解析を行う過程で、腫瘍抗原の一つであるT抗原(Galβ1-3GalNAc)を有する新しいタイプの抗原性糖鎖がローヤルゼリー中に存在することを世界に先駆けて発見している(Kimura, Y., Ushijima, T., Maeda, M., et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2583-2587 (2006), Kimura, Y., Nagai, H., Miyamoto, M., Kimura, M., and Yonekura, M. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2148-2150 (2010))。



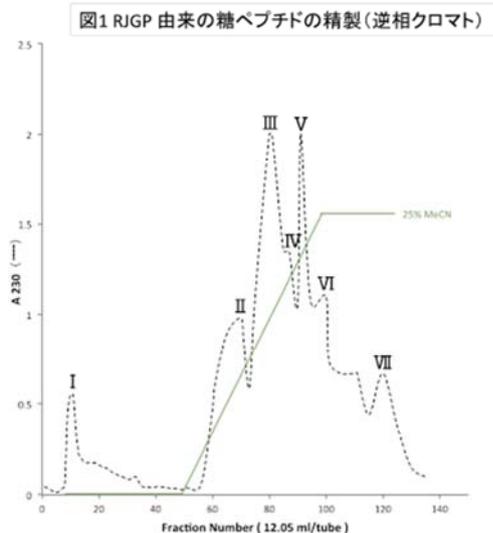
1. RJGPからのT-抗原含有糖ペプチドの調製と人工糖鎖ポリマー合成

本課題では、ローヤルゼリー糖タンパク質由来のT-抗原含有糖鎖を利用して、人工糖鎖ポリマーを調製することにより、抗腫瘍抗体の作成や腫瘍免疫療法への応用利用を目指した。

平成26年度迄に、ローヤルゼリー糖タンパク質(RJGP3)のヒドラジン分解物から、レクチンアフィニティークロマト、順相HPLCを用いることで、T-抗原含有糖鎖を比較的多量(5mg程度)に調製する方法を確立していた(Maeda, M., Tanaka, T., Kimura,

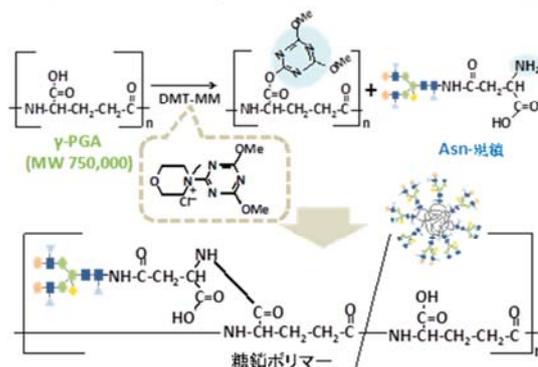
M., and Kimura, Y. (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 276-278)。しかしながら、人工糖鎖ポリマーを作成し、抗T抗原抗体作成等に利用するためには、ポリマーへのカップリング効率を考慮すると、50mg以上のT-抗原含有糖ペプチドが必要であることが判明し、既報の糖鎖調製方法に改良を加える必要が生じた。そこで、平成27年度にはT-抗原含有糖ペプチドの調製法の再検討を行った。粗ローヤルゼリー凍結乾燥物(50g, 茨城大学農学部米倉政実教授より譲渡を受けた)を透析後、3%ギ酸中でペプシン(300mg)消化した(37℃, 72時間)。反応終了後、アンモニア水で中和した後、減圧濃縮を行った。得られた酵素消化物を脱塩水(5L)に対して透析し、糖ペプチドを透析外液に回収した。透析外液を減圧濃縮した後、Sephadex G-25 column(4.0 x 85 cm)で糖ペプチドを部分精製した。得られた糖ペプチドを濃縮乾固した後、蒸留水(23ml)に溶解し、Wako gel 100C18(Φ3 x 20 cm)に供し、疎水クロマトにより糖ペプチドの精製を行った。吸着した糖ペプチドは、アセトニトリル濃度を0%から25%まで直線的に上昇させることで溶出させた。その結果、糖鎖構造及びペプチド構造の違いにより、図1に示すように数種類の糖ペプチドが分離された。それぞれの糖ペプチド画分について糖鎖構造解析を行ったところ、画分IIに、T-抗原含有の複合型糖鎖を含む糖ペプチドが特異的に回収されていることが明らかになった。

一方、画分 III には Man₉GlcNAc₂ 構造からなるハイマンノース型糖ペプチドが溶出していた。そこで、この2つの糖ペプチド画分を、人工糖鎖ポリマー合成に使用した。



次いで、ペプシン消化で得られた T-抗原含有糖ペプチド及びハイマンノース型 (Man₉GlcNAc₂) 糖ペプチドから Asn-糖鎖への誘導を行った。上で得られた糖ペプチドをアクチナーゼ消化後、ゲルろ過と Shodex NH₂-P 樹脂を用いた親水性クロマトを組み合わせる方法 (Maeda, M., Takeda, N., Kimura, M., and Kimura, Y., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1269-1274 (2013)) により, Asn-糖ペプチドを精製した。人工糖鎖ポリマーの合成に当たっては、ポリマー骨格として生物分解性ポリマーである好塩古細菌由来 L 体γポリグルタミン酸(L-γPGA, 平均分子量 75 万, TOYOBO 社製)を用いた。糖鎖ポリマーの合成は、L-γPGA と Asn-糖鎖を脱塩水に溶解後、縮合剤である 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride *n*-Hydrate(DMT-MM)を添加し、室温で 4 時間攪拌した。反応終了後、ゲルろ過と逆相 HPLC を組み合わせることで合成糖鎖ポリマーを精製した。L-γPGA に対する Asn-糖鎖の結合率は、アミノ酸組成分析により得られた L-γPGA 由来グルタミン酸(Glu)と Asn-糖鎖由来アスパラギン酸(Asp)のモル比から算出した。糖鎖構造は、糖鎖ポリマーをヒドラジン分解後、遊離糖鎖を *N*-アセチル化、ピリジルアミノ化し、HPLC 及び質量分析によ

図2 人工糖鎖ポリマー合成: γ-PGA と糖ペプチドのカップリング反応



り確認した。その結果、T-抗原糖鎖含有糖ペプチド (画分 II) は、T-抗原糖鎖を含まない複合型糖鎖が混在していることが分かったため、今後、T-抗原糖鎖のみを含む糖ペプチドの調製方法の確立が必要である。しかしながら、混在する糖鎖は哺乳動物にも存在する構造であるため、これらの糖鎖に対する抗体は生じない可能性もあるため、平成 28 年度以降は、この糖鎖ポリマーを用いた抗体作成に着手する予定である。一方、画分 III から調製した人工糖鎖ポリマーについては、Man₉GlcNAc₂ がほぼ均一構造として結合していることが分かった。RP-HPLC により

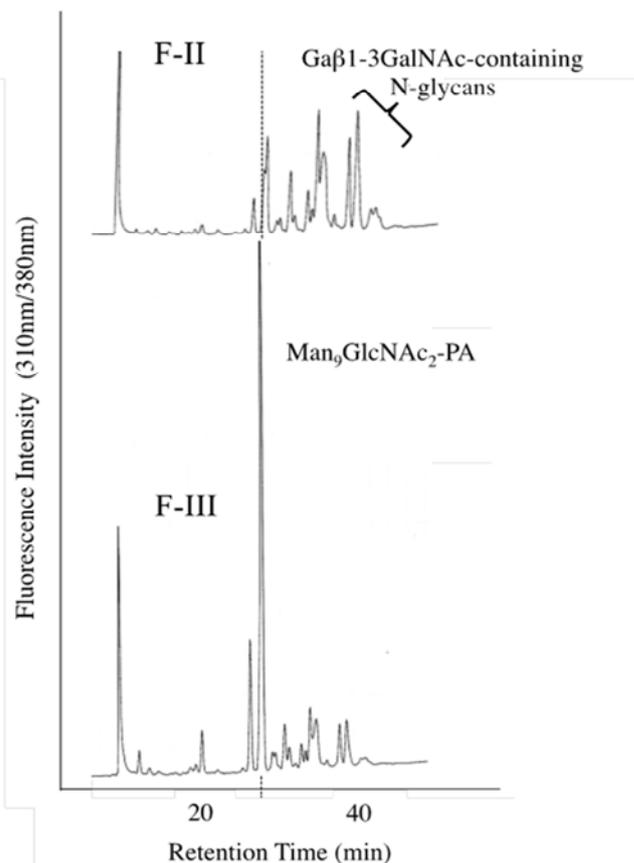
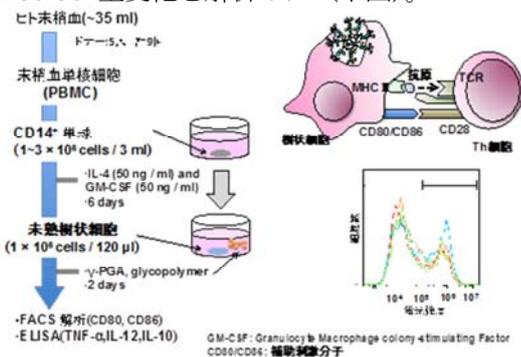


図3 人工糖鎖ポリマーに結合させたN-グリカンの構造

精製した人工糖鎖ポリマーのアミノ酸分析の結果から、L-γPGA 1 分子当たり 350 分子程度の Man₉GlcNAc₂ 糖鎖 (糖ペプチド) が結合していることが明らかになった。

2. RJGP 由来の糖ペプチド (Man₉GlcNAc₂-Asn) 含有糖鎖ポリマーの免疫活性

T-抗原含有糖ペプチドをカップリングさせた人工糖鎖ポリマーについては抗体作成に使用するため、平成 27 年度は、幾つかの免疫細胞 (樹状細胞やマクロファージ等) 表面に発現が確認されているレクチン様レセプターに注目し、ハイマンノース型糖鎖をコンジュゲートさせた人工糖鎖ポリマーの免疫活性を調べた。L-γPGA、ハイマンノース型糖鎖をカップリングさせた L-γPGA (0.5~100μg/mL) でヒト未熟樹状細胞 (iDC) を刺激後、iDC 上に発現される CD80/86 量変化を解析した (下図)。



糖鎖ポリマー刺激によるヒト樹状細胞上の CD80/86 発現とサイトカイン分泌解析

その結果、L-γPGA 及び動物細胞で定常的に発現されている複合型糖鎖 (NeuNAc₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂) をカップリングさせた L-γPGA は、iDC 上の CD80/86 の発現量に影響を与えないのに対して、ハイマンノース型糖鎖をカップリングさせた L-γPGA は、CD80/86 の発現量を顕著に抑制することが分かった。この結果は、異なる構造のハイマンノース型糖鎖 (Man₈GlcNAc₂) をカップリングさせた人工糖鎖ポリマーによる刺激と同様であった。この事実は、ハイマンノース型糖鎖-γPGA が免疫抑制剤として利用可能であることを示唆している。平成 28 年度以降は、RJGP 由来のハイマンノース型糖ペプチドをカップリングさせた糖鎖ポリマーを用いて、iDC 表面の CD80/86 の発現量抑制機構の解析と免疫抑制活性の応用利用についての展開を図る予定である。

ハイマンノース型糖鎖-γPGA を用いた抗糖鎖抗体作成は今後の検討課題であるが、多価数の糖鎖がカップリングしているポリマーであるため、抗糖鎖抗体の作成は可能であると思われる。これまでに、HIV コートタンパク質に結合するハイマンノース型糖鎖に対するモノクローナル抗体が作成され、抗 HIV 抗体への利用が期待されている (Astronomo, R.D., Lee, H.K., Scanlan, C.N., Pantophlet, R., *et al. J. Virol.*, **82**, 6359-6368 (2008))。従って、今回作成した Man₉GlcNAc₂-Asn を多価カップリングさせた糖鎖ポリマーは、新たな抗 HIV 抗体作成への利用が期待される。

3. T-抗原含有 N-グリカンの酵素合成を目指した昆虫特異的な β 1-3 ガラクトース転移酵素 (β1-3GalT) の発現系構築

天然の RJGP には T-抗原含有 N-グリカンの存在量が少ないため、酵素合成法を利用した T-抗原含有糖鎖の調製方法の確立に着手した。β1-3GalT 遺伝子 (ミツバチ, ショウジョウバエ) 同定は既に完了しており (Yamamoto-Hino M, Yoshida H, Ichimiya T, *et al. Genes Cells.* **20**, 521-42 (2015), Ichimiya T, Maeda M, Sakamura S, *et al. Glycoconj J.* **32**, 141-51 (2015)), 昆虫細胞を用いた遺伝子発現系構築を行った。その結果、2 種のミツバチ β1-3GalT の発現系構築に成功し、T-抗原含有糖鎖の酵素合成法の端緒を開くことができたと考えている (図 4)。

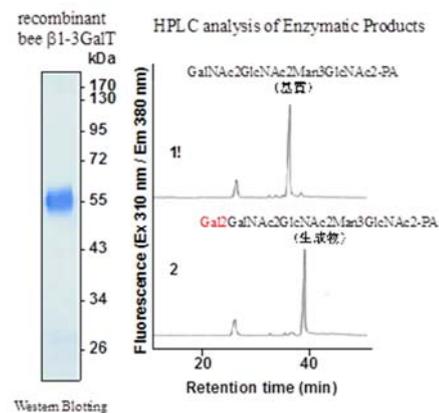


図 4 組換えミツバチβ1-3 GalT の酵素活性測定

謝辞

最後になりましたが、本研究課題の推進にご協力頂きましたウェスコ学術振興財団に感謝申し上げます。

植物の生殖細胞における DNA メチル化動態に関する研究

(所 属) 岡山大学 資源植物科学研究所

(氏 名) 池田 陽子

(概要)

植物では、動物と異なり、DNA メチル化が世代ごとにリセットされず、親の DNA メチル化状態が子に引き継がれる現象が知られており、生殖細胞系列では、受精後胚乳を形成する中央細胞のみで能動的 DNA 脱メチル化が起こると考えられている。しかしながら植物の雌側の生殖細胞や、受精後の初期発生における DNA メチル化の動態については細胞が植物体内部の限定されたわずかな細胞で起こるため、解析が難しく、未だ不明な点が多い。植物の生殖過程における DNA メチル化動態を解析するために、本年度は、シロイヌナズナ DNA 脱メチル化酵素遺伝子の蛍光マーカーラインを作成し、DNA 脱メチル化酵素の発現解析を行った。また、植物の生殖過程における DNA メチル化と進化過程について考察するため、陸上植物の基部に位置する種の 1 つであるゼニゴケを用い、DNA メチル化酵素及び脱メチル化酵素変異体の作成を行った。

(研究の背景及び目的)

DNA 塩基配列だけでなく、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな情報も、遺伝子の発現制御に重要であることが知られている。動物では、初期発生過程で DNA メチル化情報はいったん消去され、新たに書き込まれるため、世代ごとのリセットを受ける。一方で、植物では、受精後胚乳となる中央細胞で DNA 脱メチル化が起こる一方、卵および精細胞、胚系列での DNA 脱メチル化は報告されていない。また、植物では、DNA メチル化酵素の欠損などにより低メチル化状態が引き起こされると、交配により背景を野生型に戻しても DNA メチル化が復帰しない現象が知られている。このことから、植物では、動物とは異なり、DNA メチル化の世代ごとのリセットが行われず、環境ストレスなどの何らかの要因により、低メチル化が引き起こされると、その情報が次世代に伝わりうることを示唆している。しかしながら、植物の生殖細胞、及び発生初期過程における DNA メチル化の維持機構に関しては、生殖細胞が植物体内部の限定されたわずかな細胞で起こるため、解析が難しく、未だ不明な点が多い。特に、植物の雌側の生殖細胞や、受精後の初期発生における DNA メチル化の動態については組織単離の問題があり、依然として不明な点が多い。この問題にアプローチするため、H26 年度において、ウエスコ学術

振興財団の助成を頂き、シロイヌナズナ生殖細胞の単離法の確立及び DNA 脱メチル化酵素の機能解析を行った。本年は、これをさらに発展させ、(1) シロイヌナズナ DNA 脱メチル化酵素遺伝子の蛍光マーカーラインの観察により、DNA 脱メチル化酵素の生殖過程における挙動を明らかにすること (2) 陸上植物の基部に位置する種の 1 つであるゼニゴケを用い、DNA メチル化に関わる遺伝子を同定し、これらの変異体を作成して表現型を解析することにより、生殖過程及び初期発生過程における機能を明らかにし、植物進化と DNA メチル化の果たした役割について考察できると考え、これらに焦点を絞って研究を行った。

(研究材料)

・シロイヌナズナ

シロイヌナズナは植物で最初に全ゲノムが解読されたモデル植物である。実験室系統が確立されており、遺伝学、分子生物学の材料として利用されている。生殖細胞や生殖の分子メカニズムに関し、植物で最も情報が蓄積しているため、本研究でも研究材料に用いた。野生型として実験室系統 Col-0 を使用した。

・ゼニゴケ

ゼニゴケは苔類のモデル植物として近年リソース

が確立された。全ゲノムが解読され、形質転換も可能である。生活環の殆どをハプロイドで過ごす。雄雌異体であり、精子による有性生殖及び無性芽による無性生殖の2つの様式で増殖を行う。野生型として京都で採取された Tak-1 系統を用いた。

(研究方法)

1-1 シロイヌナズナ脱メチル化酵素の生殖細胞における発現解析

シロイヌナズナゲノムには既知の DNA 脱メチル化酵素をコードする遺伝子が4つ存在する。中央細胞での発現及び機能が報告されている *DEMETER (DME)* 以外は、生殖過程における機能は不明であったため、H26年度において、*REPRESSOR OF SILENCING1 (ROS1)*, *DEMETER LIKE2 (DML2)*, *DEMETER LIKE3 (DML3)* の各遺伝子のプロモーターとコード領域(それぞれ長さ約8kb)からストップコドンを除いた配列に GFP 遺伝子をつなぎ、GFP 融合タンパク質を発現させるベクターを作製した。この T-DNA ベクターコンストラクトをシロイヌナズナに導入して形質転換体を得た。形質転換第1世代目のトランスジーンをヘテロで持つ植物を観察した所、*ROS1* の根端における発現が確認できたが、*DML2*、*DML3* の蛍光は観察されなかった。H27年度は、確実に観察するためにトランスジーンをホモで持つ個体をそれぞれ複数の独立ラインで確立し、それらの個体の生殖細胞における蛍光を顕微鏡で観察した。

2-1 ゼニゴケ DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素遺伝子の単離と発現データの探索

京都大 河内研究室で構築された、ゼニゴケの転写産物のデータベース (EST データベース) に対して、シロイヌナズナの DNA メチル化酵素関連酵素の相同性検索を行った。タンパク質のアミノ酸配列に対して cDNA 配列をアミノ酸に翻訳したデータベース検索 (tblastn) を行った。得られたゼニゴケの相同遺伝子について、葉状体、雌生殖器官、雄生殖器官における発現データを検索し (文献 1)、生殖器官で発現し

ているか調べた。

2-2 ゼニゴケ DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素遺伝子変異体の作出

相同性検索により同定した DNA メチル化関連遺伝子の生殖過程における機能を解析するため、DNA メチル化酵素遺伝子のオルゾログ *MpMET1*、DNA 脱メチル化酵素遺伝子のオルゾログ *MpROS1A*, *MpROS1B* の変異体を作成した。ゼニゴケでは CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集が高効率で可能である事が最近報告されている (文献 2)。そこで、この方法を用いてそれぞれの遺伝子につき植物間での保存性の高いアミノ酸をコードしている領域をそれぞれ2つターゲット (guideRNA) に選び、CRISPR/Cas9 用ベクター (文献 2) にクローニングし、アグロバクテリウムを用いてゼニゴケ胞子を形質転換した。得られた形質転換体のターゲット領域付近の塩基配列を解析し、変異体を選抜して、表現型解析を行った。

(結果)

1-1 シロイヌナズナ脱メチル化酵素の生殖細胞における発現解析

ROS1、*DML2*、*DML3* のプロモーターで各遺伝子の末端に GFP を融合させたタンパク質を発現するトランスジーンをホモで持つ形質転換第3世代の種子を選抜し、解析に用いた。なお、*ROS1*、*DML2*、*DML3* はいずれも核局在シグナルを有するので、発現した場合は核で蛍光が検出されると予想できる。まず、各マーカーの花粉における蛍光を観察した所、いずれのマーカーラインにおいても、図 1A のような像が観察され、花粉では顕著な蛍光は観察されなかった。また、雌側の受精前の胚珠及び受精後間もない胚珠においても、GFP 蛍光は検出されなかった (図 1B)。その後、発達初期の種子 (early heart stage, 受精後約3日) から胚を取り出し、観察した所、*ROS1* のマーカーラインは根端の再外層の数細胞の核で蛍光が見られた (図 1D)。さらに発達が進むと (late heart stage, 受精後約3.5日)、根端における蛍光

を示す細胞は増加し、子葉の再外層やメリステム付近においても強い核の蛍光が検出できた(図 1E)。DML2、DML3 については、いずれのタイミングにおいても蛍光は検出できなかった。

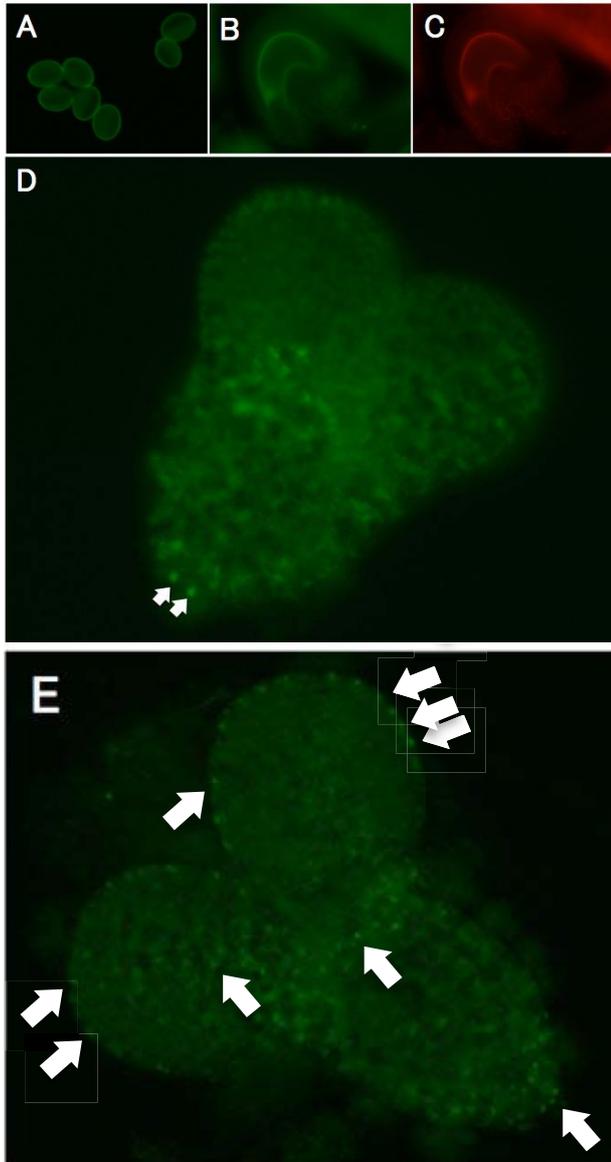


図1 ROS1のマーカラインの蛍光観察像 (A) 受粉前の成熟花粉のGFP蛍光観察像、自家蛍光のみが検出された。(B) 受粉前の胚珠のGFP蛍光観察像、自家蛍光のみが検出された。(C) Bのプラスチド自家蛍光の検出。Bと像が一致する。(D) 受精後初期胚(early heart stage)のGFP蛍光観察像。白い矢印が核におけるGFP蛍光。(E) 受精後初期胚(late heart stage)のGFP蛍光観察像。白い矢印が核におけるGFP蛍光。

2-1 ゼニゴケ DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素遺伝子の単離

ゼニゴケゲノム上にシロイヌナズナの DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素の相同遺伝子が存在するか、

BLAST 検索を行った結果、CG メチル化に関わる維持メチル化酵素 MET1 のオルソログ (MpMET1) を同定した。CHG メチル化に関わる植物特有の DNA メチル化酵素 CMT、及び de novo メチル化酵素 DRM のオルソログについてはそれぞれ 2 つを同定した。また、DNA 脱メチル化酵素 ROS1 フェミリーのオルソログもゲノム上に 2 つ存在していた (MpROS1A, MpROS1B)。次に、文献 1 に公開されている器官別の遺伝子発現データを参照し、上記遺伝子の発現を調べた所、MpMET1 は孢子体及び生殖器官で恒常的に発現していた。CMT, DRM, ROS1 のオルソログについては、いずれも片方の遺伝子は恒常的に発現しており、もう 1 セットの遺伝子は雌生殖器官特異的に発現していた。

2-2 ゼニゴケ DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素遺伝子変異体の作出

CRISPR/Cas9 システムにより、MpMET1, MpROS1A, MpROS1B の変異体を作成した。ゼニゴケの孢子体にターゲット配列を組み込んだ CRISPR/Cas9 ベクターを形質転換し、抗生物質耐性を指標に形質転換体の選抜を行った。得られた形質転換体から DNA を抽出し、ターゲット領域に変異が導入されているかをシーケンスにより調べた。MpMET1 の場合、図 2 B に示す T1, T2 の領域をターゲットとしており、T1 領域をターゲットとした変異体は得られなかったが、T2

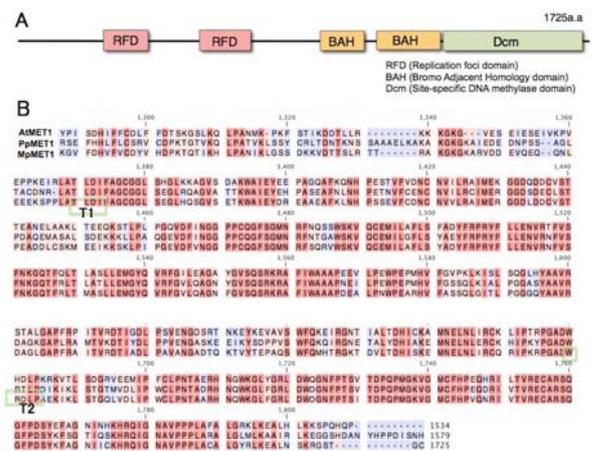


図2 MpMET1のゲノム編集のターゲット領域 (A) MpMET1タンパク質のドメイン構造 (B) MpMET1のC末端側のDcmドメインのアミノ酸のアライメントと、ゲノム編集のターゲット領域 (T1, T2)。At:シロイヌナズナ。Pp:ヒメツリガネゴケ。Mp:ゼニゴケ。

領域に対する変異体が複数かつ雄雌それぞれの個体が得られた (図 3A)。これらの *Mpmet1* 変異体はいずれも個体の成長が遅く、個体サイズが小さく、仮根の数が増加し、無性芽様の器官を多数形成する表現型を示した (図 3B)。

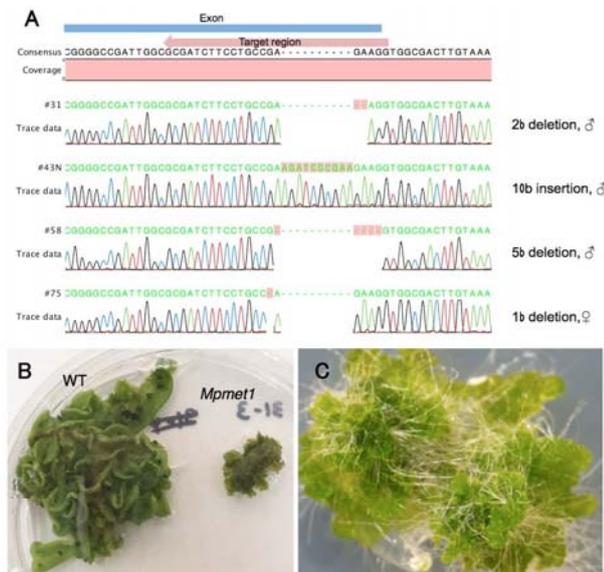


図3 *Mpmet1*変異体
(A) ゲノム編集によって得られた*Mpmet1*変異体の塩基配列解析結果. 3つの塩基欠失変異体と1つの挿入変異体を得られた.
(B) WT及び *Mpmet1*変異体 #31の写真.
(C) *Mpmet1*変異体 #31の拡大写真.

さらに、*MpROS1A*、*MpROS1B* の変異体も複数得られている。現在の所、野生型と異なる表現型は見られない。

(考察と今後の展望)

1-1 シロイヌナズナ脱メチル化酵素の生殖細胞における発現解析

シロイヌナズナ *ROS1*、*DML2* 及び *DML3* 遺伝子の GFP マーカーラインの観察から、受精前の生殖細胞ではいずれも明らかな発現は観察されなかった。一方、受精後に関しては *ROS1* が発生の早い段階、かつ分裂の盛んな根端付近で優先的に発現していた。このことから、動物では生殖細胞で DNA 脱メチル化酵素の働きによって能動的脱メチル化が起こるのに対し、シロイヌナズナの生殖過程では DNA 脱メチル化酵素の発現が抑制され、脱メチル化が起こらないよう制御されていると考えられる。一方、受精後胚発生初期過程で脱メチル化酵素の発現が活性化される機構

が存在している事が明らかになった。

2-1 ゼニゴケ DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素遺伝子の単離と発現データの探索

シロイヌナズナの DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素遺伝子のオルソログがゼニゴケでも見つかり、かつ良く似た構造が保存されていたことから、植物特有の DNA メチル化・脱メチル化酵素はゼニゴケが分化する以前の、植物の進化過程の早い段階で獲得されたと考察できる。ゼニゴケで複数コピー同定された CMT, DRM, ROS1 オルソログのうちそれぞれ1つは雌側の生殖器官でのみ高い発現を示した。系統樹解析を行った所 (data not shown)、これらはいずれもゼニゴケが分化した後の過程で遺伝子重複が起こり、その後、雌の生殖器官での特異的な発現様式を獲得した事が示唆された。このことから、ゼニゴケにとって有性生殖過程で DNA メチル化を制御することは何らかのメリットがあったのではないかと考えられる。これについては今後の DNA メチル化関連酵素の機能解析により明らかにできると期待している。

2-2 ゼニゴケ DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素遺伝子変異体の作出

今回、*Mpmet1* 変異体が複数得られ、CRISPR/Cas9 システムがゼニゴケにおいて効率よく働くことが明らかになった。*MpMET1* の T1 領域については変異体を得られなかったが、この領域は植物で共通して高度に保存されている領域であり、*MpMET1* の機能が完全に失われると、致死となるのではないかと考えられた。*Mpmet1* 変異体の表現型から、*MpMET1* はゼニゴケの成長及び正常な形態形成に重要な役割を果たしている事が示唆された。無性芽を多数形成する表現型は、他の植物の *met1* 変異体では見られない、ゼニゴケ特有の表現型である。ゼニゴケは無性芽による無性生殖によりクローンを増やす能力を有しているため、今回のような表現型が見られたのではないかと考えられる。DNA メチル化は無性生殖過程を制御する機能も担っている事が示唆された。

(謝辞)

本研究を行うにあたり、ウエスコ学術振興財団の
学術研究助成の支援を頂き、深く感謝致します。

(本研究助成による研究結果に関する学会発表)

日本植物生理学会第57回年会(岩手大、2016年3月
18-20日)ゼニゴケにおけるDNAメチル化の機能解析.
池田陽子, 他4名

(参考文献)

(文献1)

Plant Cell Physiol. 2016; 57(2):325-38.
Transcriptional Framework of Male Gametogenesis in
the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. Higo A, Niwa
M, Yamato KT, Yamada L, Sawada H, Sakamoto T, Kurata
T, Shirakawa M, Endo M, Shigenobu S, Yamaguchi K,
Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T, Araki T.

(文献2)

Plant Cell Physiol. 2014; 55(3):475-81.
CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the
liverwort *Marchantia polymorpha* L. Sugano
SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada
T, Hara-Nishimura I, Kohchi T.

オオムギ発芽時耐塩性 QTL の同質遺伝子系統作出と生活環横断的な塩ストレス応答機構の解明

岡山大学資源植物科学研究所

最相 大輔

(概要)

塩害は作土中の過剰な塩類による作物の生育阻害を引き起こす。地球規模の気象変動は、塩類集積土壌をはじめとした耕地の劣化を拡大させている。世界規模の人口拡大に伴い益々の食糧増産が求められる中、塩類集積土壌での作物の生産性拡大は育種的にも喫緊の課題である。我々はこれまでに岡山大学が保有するオオムギ遺伝資源を材料に、発芽時耐塩性の種内変異の網羅的調査と量的形質遺伝子座(QTL)マッピングに取り組み、東アジア在来系統に特徴的な耐塩性 QTL(3H および 7H 染色体)を同定している。本研究では、醸造用品種「はるな二条」の遺伝背景に、東アジア在来系統の耐塩性 QTL 領域のみが組換わった同質遺伝子系統(Near Isogenic Line; NIL)の作出に取り組んだ。「はるな二条」を花粉親に 3 回の戻し交雑個体(n=325)を 3 世代自殖させた NILs 集団(B3F3 世代)を育成した。QTL マッピングに用いた連鎖地図を基に平均 5cM 間隔で SNP マーカーを選定し、Amplicon-seq による一斉ジェノタイプ用のプライマー対 (206 loci) を設計した。さらに、生活環横断的な塩ストレスに対する応答機構を遺伝学的、生理学的に解析するために、非破壊系で効率よく塩ストレス応答を評価するための評価系構築にも取り組んだ。

(研究の背景および目的)

地球規模の気象変動は、塩類集積土壌をはじめとした耕地の劣化を世界的に拡大させている。塩害とは、土壌中の過剰な塩類が引き起こす作物の生育阻害である。2011 年には世界総人口が 70 億人を超え、将来的に 100 億人を超えるとも予想される中、耕地の劣化が進めば世界的な食糧難はさらに深刻になると予想されることから、塩類集積土壌でも生育する耐塩性作物の開発は喫緊の課題となっている。

植物の耐塩性は多くの遺伝子が関わる複雑な形質であると共に、生育ステージ毎に異なる制御を受けていると考えられている(Yamaguchi and Blumwald 2005)。塩類ストレスに対する感受性は、発芽時が特に敏感であることから、発芽時の NaCl に対する生理的、遺伝的応答機構を明らかにすることは重要な課題である。

オオムギは、コムギ、イネ、トウモロコシに次ぐ 4 番目の生産高を誇る重要な穀物の一つであるが、オオムギはイネ科作物の中で塩害に強いとされている (馬 2010)。オオムギは耐塩性に関する幅

広い種内変異を有しており、発芽時耐塩性については東アジアに耐性系統が分布する事が明らかとなっている(Mano et al. 1996)。醸造品種「はるな二条」と日本の在来系統「早木曾 2 号」の交雑に由来する組換え自殖系統集団 (F8 世代)110 系統を用いた量的形質遺伝子座(QTL)マッピングにより、東アジア在来系統に特徴的な耐塩性 QTL(3H および 7H 染色体)を同定している (最相ら 2014, 伊藤ら 2015)。耐塩性作物開発のためには、オオムギで見出された発芽時耐塩性の原因となる遺伝子を明らかにすると共に、分子生理的に耐塩性機構の全貌が解明する事が必要となる。

本研究では、発芽時耐塩性の応答機構を遺伝学的、生理学的に解析する上で有効な研究材料となる、耐塩性 QTL 領域の同質遺伝子系統(Near Isogenic Line; NIL)の育成に取り組んだ。また、非破壊系で効率よく塩ストレス応答を評価するための評価系構築にも取り組んだ。

(材料および方法)

2014-2015 シーズンの栽培実験は、岡山大学資源植物科学研究所（倉敷市）の実験圃場にて行った。

「はるな二条」(OUJ247；二条性)と「早木曾2号」(OUJ064；六条性)のF1に対して、「はるな二条」を花粉親に3回の戻し交雑したB3F1個体(n=65)の自殖種子から、各5個体を3世代自殖させたB3F3世代(n=325)を実験に使用した。各系統5粒ずつを慣行法に従って栽培した。各系統について圃場出穂日および芒穂型を調査した。

NILの選抜に用いる genomic DNA は、B3F1 個体およびその後代個体の葉身から抽出した。QTL 領域の導入とゲノム背景の均一性の評価には、RNA-seq によって取得した一塩基多型(single nucleotide polymorphisms; SNPs)を利用した (Takahagi et al. under revision) . EnsemblPlants (http://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Index) から公開されているオオムギのリファレンス・ゲノム配列を鋳型にして、各 SNP を含む領域 150~200bp を増幅するプライマー対を Primer3 により設計した。これらの中から連鎖地図構築に用いた 653 SNPs を抽出した後に、約 5cM 間隔でゲノムを網羅する SNP マーカーを選抜した。一方、QTL 領域の選抜のために、各 QTL に対してゲノム中の対象領域を挟む 2 組の Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) マーカーは GENETYX ver13.0.3 により設計した。

(結果および考察)

1. はるな二条／早木曾2号 B3F3 集団の栽培

B3F3 種子が採集できた 319 系統について圃場秋播栽培した結果、319 系統全てについて圃場出穂日データを取得した。2014-2015 シーズンの倉敷市での慣行栽培条件下では、「はるな二条」「早木曾2号」の出穂迄日数は、それぞれ 134.5 ± 2.7 , 143.8 ± 0.8 日 (mean \pm SD, n=6)であった。B3F3 集団全体の平均は 137.8 ± 1.6 日であり、集団全体が戻し交雑親である「はるな二条」に近い出穂性を示したことから、3 回の戻し交雑によるはるな二条への NIL 化が集団全体で進んでいることが示唆された。両親系統間では、二条性 vs.六条性の異なる芒穂型をしめすが、B3F3 集団 319 系統の内、6 系統(1.9%)のみが六条性

であった。オオムギの条性形質は *Vrs1* 遺伝子座がコードする転写因子 *HvHox1* 遺伝子に支配されるメンデル形質である事が知られていることから (Komatsuda et al. 2007), 本 B3F3 集団では、3 回の戻し交雑によって任意の一遺伝子座の集団内頻度が *Vrs1* 座と同程度にまで減少していることが示唆された。

2. ゲノムワイド SNP マーカーの選抜

「はるな二条」および「早木曾2号」を材料にした RNA-seq により、オオムギのリファレンス・ゲノム (Morex) に対してそれぞれ約 4 万、6 万の SNPs を検出している (Takahagi et al. under revision). NIL を選抜する過程では、標的領域以外のゲノム領域を戻し交雑親由来のゲノムで置換されていること (ゲノム背景の均一性) を確認する必要がある。これを実現する方法として、NGS を利用した Amplicon-seq が有効である事から、そのための実験環境の構築に取り組んだ。RNA-seq により得られた SNPs をゲノムリファレンス・ゲノム上に位置付け、両親間で多型的なサイトを対象に SNP を含む 150~200bp を特異的に増幅するプライマー対を Primer3 により設計した。設計出来た 2,445 loci について、QTL 解析に用いた連鎖地図と相互に参照して約 5cM 間隔でゲノムを網羅する SNP マーカーを選抜した。その結果、206 SNP loci を設定することに成功した。現在、これらのプライマーからランダムに PCR 実験を実施し、増幅の成否についてプライマーの品質確認を進めている。

3. 耐塩性 QTL 連鎖マーカーの開発

2. で設計した 206 プライマー・セットを用いた Amplicon-seq により、任意のゲノム領域が供与親 (「早木曾2号」) 型に置き換わった「はるな二条」NILs 集団が構築できると期待される。この中から耐塩性 QTL NILs を選抜するために必須となる QTL 連鎖マーカーの構築にも取り組んだ。伊藤ら(2015)で検出した 2 つの QTL 領域を挟む SNP マーカーを探索したところ、3H 染色体の QTL (122.6–134.1 cM) および 7H 染色体の QTL (67.4–73.5 cM) を挟む SNP

マーカーを見出した。現在、これらの CAPS マーカー化を進めている。

(今後の展望)

2015-2016 シーズンには、はるな二条／早木曾2号 B3F4 集団を育成してゲノムのホモ化を進めている。現在、2. で構築された 206 SNP loci セットを使った Amplicon-seq による一斉解読により、各々の NIL が持つ供与親ゲノムの一斉同定を現在進めている。その中から 3. で開発している CAPS マーカー解析を実施することで、本研究の目的である耐塩性 QTL の NIL が同定され、オオムギで見出された発芽時耐塩性の原因遺伝子探索が大いに進展することが期待される。現在、SPAD 値を指標にした非破壊系による耐塩性試験の実験系構築にも着手している。非破壊系による耐塩性試験は、生育ステージを追って塩ストレスに対する各系統の応答性を経時的に観察できることから、分子生理的に耐塩性機構の全容解明が期待される。

(謝辞)

本研究は公益財団法人ウエスコ学術振興財団の支援のもと実施されました。多大な支援に対し心より感謝致します。ゲノムワイド SNP マーカーの開発は、理化学研究所環境資源科学研究センターの持田恵一博士、高萩航太郎氏の支援の下実施されました。非破壊系による耐塩性試験の開発は、岡山大学資源植物科学研究所・且原真木博士との共同研究で行いました。これらの方々に深く感謝申し上げます。

(参考文献)

1. Yamaguchi, T. and Blumwald, E. (2005) Developing salt-tolerance crop plants: challenges and opportunities. **Trends in Plant Science** 10: 615 - 620.
2. 馬 建鋒 (2010) 不良土壌に対する植物の応答. 間藤 徹 (編) 植物栄養学 第 2 版 文英堂出版 pp.199-233.
3. Mano, Y., Nakazumi, H. and Takeda, K. (1996) Varietal variation in and effects of

some major genes on salt tolerance at the germination stage in barley. **Breeding Science** 46 : 227 - 223.

4. 伊藤大樹, 最相大輔, 本庄三恵, 八杉公基, 永野惇, 高萩航太郎, 持田恵一, 佐藤和広 オオムギ発芽時耐塩性の QTL 解析 日本育種学会第 127 回講演会, 平成 27 年 3 月 21・22 日 玉川大学
5. 最相大輔・堀江智明・木下俊則・馬 建鋒 ～水 土壌 作物～ 環境ストレス突破の分子生理基盤と育種との融合 **育種学研究** 17: 71-76 (2015)
6. Komatsuda T, Pourkheirandish M, He CF, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, et al. 2007. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104(4): 1424-1429.

専門サービスのオンライン取引による参入戦略—公正論の視角から—

岡山大学大学院社会文化科学研究科 教授

北 真収

本稿では、知識・情報格差が存在する専門サービス、その中でも無形資産を対象とする情報に作用するサービスに限定して、スタートアップ企業の市場参入の論点に新たにオンライン取引や公正論の視角を加えて考察を行ってきた。

先行研究を踏まえて、スタートアップ企業の市場参入の仮説を導出し、事例調査を行ってそれらの妥当性について検討を行った。その結果、以下の点を確認することができた。

1つは、専門サービスはシンプルで明解なサービス内容や、判断を手助けする情報の提供など公正要素を十分に含んだものであること、サービス提供者は顧客との間に信頼性、中立性、尊重性の側面から公正な関係を築くこと、この両者が相互に作用すれば顧客満足を高める。2つ目は、顧客満足は市場を切り開く鍵である。公正感もその鍵に影響を及ぼす重要な要因である。

1. はじめに

本稿は、スタートアップ企業のオンライン取引による専門サービス市場への参入戦略に関して、公正論の視点から考察する。

サービスとは、顧客と従業員の間、物的資源ないし財との間、サービスの提供者のシステムとの間の相互作用において、生じる無形の性質の活動あるいは一連の活動である。それは顧客の問題の解決として提供される (Grönroos, 1990)。本稿でいう専門サービスは、Lovelock (1983) に倣って無形資産を対象とする情報に作用するサービスをいう。幅広い分野の専門家が、知識を駆使して情報処理、情報提供を行うサービスを指している。

オンライン取引は、インターネット上で顧客が提供者と相互作用しながら、商品・サービスの注文・購入から決済までを行う方法である。果たして専門サービスはオンライン取引に適合するのだろうか、理論的な検討が必要である。また、市場参入を企てるのは既存企業ではなく新たに設立された独立系のスタートアップ企業とする。市場のライフサイクルの位置によって参入の方法は異なるが、オンライン取引という新たな方法による市場再構築の可能性の追求という意味を含めて、成熟した専門サービス市場を想定する。

専門サービスの提供や評価には、専門的知識や技

能が必要とされる。そのため、当該サービス提供者と顧客との間には知識・情報格差が存在する。このような市場への参入戦略を検討する場合は、一般的なサービスにおいて築かれた概念や理論を使いながらも新たな視点を加えて考察する必要がある。そこで、本稿では公正概念を適用することによって顧客の視点に立った参入のあり方、方法について議論を深め、それらを明らかにすることを目的とする。

2. 仮説の提示

競争戦略上、市場参入においては市場を限定した集中戦略が選択されやすい。集中戦略ではコスト集中や差異化集中が提唱されている (Porter, 1980)。しかし、これは基本形にすぎないし、実務上抽象的でもある。製品・サービスの特性やそのライフサイクル、企業属性なども考慮されなければならない。実際、成熟した市場を細分化した上で、特定の顧客層だけのニーズに絞ったとしても、スタートアップ企業などが新規参入する場合は、特に顧客の知覚リスクが大きな課題となる。

公正感とは信頼の一部の要素を構成する。また、顧客満足とは正の相関があるという先行研究に基づけば、参入における知覚リスクへの対処に公正概念を適用し、信頼を築きながら顧客満足を高める方法が提起される。

オンライン取引は、顧客の参加の観点から見れば手続き的公正が当てはまり、割安な価格である点は分配的公正に当たる。しかしながら、オンライン取引、専門サービス、スタートアップのサービス提供者にはそれぞれ高い知覚リスクが存在する。参入に当たっては、標的とする顧客層を定めてシンプルで明解なサービス内容や評価情報、詳細情報など顧客の判断を手助けする情報の提供、信頼性・中立性・尊重性の側面からみた企業と顧客間の関係作りが考慮されて、相互に作用する必要がある。つまり情報の公正や手続き的公正の要素が十分に含まれ作用し合うことを意味する。

そこで、専門サービスのオンライン取引による参入戦略として、以下のような仮説を提示する。

【仮説1】

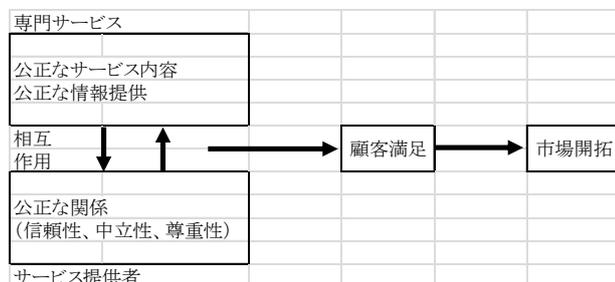
専門サービスはシンプルで明解なサービス内容や、判断を手助けする情報の提供など公正要素を十分に含んだものであること、サービス提供者は顧客との間に信頼性、中立性、尊重性の側面から公正な関係を築くこと、この両者が相互に作用すれば顧客満足度を高める。

顧客満足は売上の伸びに影響を与えるという先行研究に基づくと、次の仮説が示される。

【仮説2】

顧客満足は市場を切り開く鍵である。公正感もその鍵に影響を及ぼす重要な要因である。

図1 スタートアップ企業の市場参入



3. 事例調査

オンライン取引、専門サービス、スタートアップという本稿の主旨に照らして、ライフネット生命を事例として取り上げる。事例調査は、主に事業が起

ち上がり市場を開拓していく段階にフォーカスして事実関係を記述している。

<ライフネット生命の事例>

会社概要

ライフネット生命保険株式会社は、保険販売にインターネットを用いる点が特徴である。日本国内では戦後初、74年ぶりに国内外の保険会社を親会社としないで設立された独立系生命保険会社である。

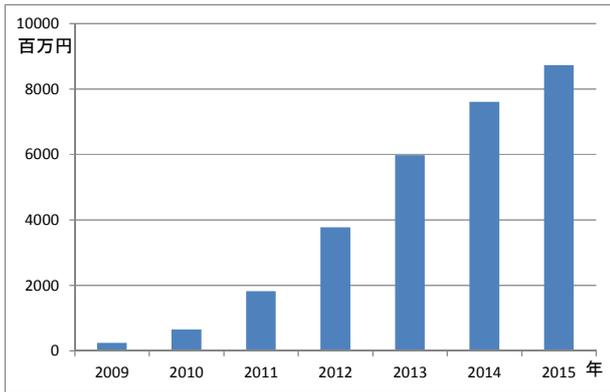
東京都千代田区に本社を置き、資本金 105 億 40 万円、経常収益 87 億円、保有契約件数約 21 万 5 千件 (2015 年 3 月期決算数値)、従業員数約 90 名。

2006 年、大手生命保険会社に長年勤務してきた出口治明氏 (現会長兼 CEO) は岩瀬大輔氏 (現社長兼 COO) と準備会社を設立する。生命保険業免許を取得して 2008 年 5 月に営業を開始した。保険料半額、保険金の不払いゼロ、商品の比較情報の提供を掲げ、「正直に、わかりやすく、安くて、便利に。」をモットーにする。インターネットを活用して生命保険サービスを提供する会社として、同時期に、SBI アクサ生命 (現アクサダイレクト生命) も誕生しており、ライフネット生命は 2 番目になる。

2012 年に東京証券取引所マザーズ上場。開業間もない 2010 年にはオリコン顧客満足度ランキング「医療保険部門」総合第 1 位に輝いた。最近でも、2014 年と 2015 年の 2 年連続でオリコン顧客満足度ランキング「生命保険部門」総合第 1 位、2015 年に J.D. パワー アジア・パシフィックによる生命保険契約の顧客満足度がソニー生命と並んで第 1 位を獲得した。

保険の契約件数は、2009 年 8 月には保有契約件数 1 万件に達し、その後も 2010 年 12 月に 5 万件、2011 年 12 月に 10 万件、2014 年 2 月に 20 万件を突破し着実に成長を遂げている。¹

図2 経常収益の推移



出所：ライフネット生命各年3月期決算資料をもとに作成

4. 考察

仮説1は、「専門サービスはシンプルで明解なサービス内容や、判断を手助けする情報の提供など公正要素を十分に含んだものであること、サービス提供者は顧客との間に信頼性、中立性、尊重性の側面から公正な関係を築くこと、この両者が相互に作用すれば顧客満足を高める。」

まず、サービス提供システムがオンライン取引というセルフ・サービスである。これは顧客自身が高不満の原因を作り出す面もあると言われるが、ウェブサイトはヘルプデスク協会が主催するサポートポータル格付けにおいて、4年連続(2012年～2015年)で最高ランクを受賞、また、情報の分かりやすさ賞(UCDA アワード)を受賞するなど操作や利用がしやすい。そうした環境の中では、顧客の参加意識が高まりやすいところから、手続き的公正を実行している。

分かりやすいという方針のもとで、専門サービスとしての生命保険が主契約のみの単品型で設計されている。保険初心者の多い子育て層にとって特約のない、貯蓄性のない、掛け捨て保険であるため、その内容や説明が分かりやすい。保険料が比較的簡単に見積もれる。この点はオリコン顧客満足度ランキングにおいて保険プランの分かりやすさが評価されている。業界の商慣習にとられないで約款や保険料表を公表している。分かりやすいこと、透明なこと、こうした点は情報的公正に当たる。

また、生命保険の本業は給付金を迅速、確実に支

払うことにあるという考え方に立って、支払いを5営業日以内に行うことを公表してきた。そのために、支払事由を死亡、入院、手術の3点に絞っている。迅速という点は手続き的公正に当たる。公表という点は情報的公正に当たる。

保険外交員による対面販売方式に代わるセルフ・サービス方式のオンライン取引、商品の数・保険金支払い事由の数・特約なし・解約返戻金なし・配当なしなど選択肢を絞り込んだ設計によって管理費用も削減でき割安な保険料を実現した。たとえば、かぞくへの保険では、働き盛りの20歳～40歳で、開業当時に業界で最低水準の保険料を設定した。保険料はオリコン顧客満足度ランキングにおいても高く評価されている。開業後の契約者アンケートによれば、見直し契約者の保険料は、毎月約7,000円の節約で見直し前のほぼ半額になった。保障は保険外交員を持つ先発大手とほぼ同じだが、保険料は先発大手のほぼ半額を実現した。割安な保険料は、分配的公正に当てはまる。

開業6か月後、業界のタブーを破って手数料に当たる付加保険料を開示し保険料の価格構造を公開した。先発他社と比較しても十分低い付加保険料率である。付加保険料はサービスに応じて定められるべきものなのでこれまで開示はタブーとされてきたのだが、なぜ割安にできるのかを広く知らしめることになった。比較情報がほとんどなかった状況の中で、顧客が生命保険を検討するの1つの判断材料を提供した。こうした透明性は情報的公正に当たる。

ライフネット生命の保険のコンセプトには、オンライン取引という顧客参加型、つまり手続き的公正感を高めやすい枠組みの下で、分かりやすさ、簡単、透明、納得、迅速、割安など複数の公正要素が組み合わせられている。つまり、情報的公正、分配的公正など分厚い層の公正が形成されている。これを整理したものは表1に示している。

表1 保険のコンセプト

項目	特徴	公正	根拠
オンライン取引	顧客参加	手続きの公正	
ウェブサイト	分かりやすい	情報の公正	格付け最高ランク、UCDAアワード
単品型保険	分かりやすい	情報の公正	特約なし、貯蓄性なし
見積もり	簡単作成	情報の公正	顧客満足度第1位
約款、保険料表の開示	透明性	情報の公正	業界慣習を破る
他社比較情報	納得できる	情報の公正	
給付金支払	迅速	手続きの公正	
給付金支払の公表	透明性	情報の公正	
保険料	割安	分配的公正	顧客満足度第1位
付加保険料の開示	透明性	情報の公正	業界慣習を破る

スタートアップ企業が専門サービス、それもオンライン取引を用いて手掛けようとするならば、標的顧客である子育て層に対して会社としてのより一層の信頼性を築く必要がある。顧客がサービス提供者の手続きの公正を判断する関係性モデルの中では提供者の信頼性、中立性や尊重性が重要である (Lind & Tyler, 1988)。まず、信頼性から見ていこう。

相互扶助という生命保険の原点に戻り、「真っ正直に経営する」「わかりやすいものをつくる」などの経営方針をマニフェストで顧客に約束している。前述の付加保険料の開示、約款の開示など業界の悪しき商慣習にとらわれない行動をとる一方で、オンライン取引だからこそ、なりすまし防止上本人確認を厳格化し、また、契約時の健康状態はできるだけ詳しく聴くなど、原理原則に忠実な会社としての姿勢を強く打ち出している。

経営方針の約束やその行動は、保険業界に深く精通した創業者だからこそ、業界をよくしたいという強い思いの表れであり、それが子育て層の共感を得ている。

オンラインビジネスに相応しく社長ブログを配信するなど経営陣がツイッターやフェイスブックで積極的に情報を発信している。たとえば、経営陣が日本アドバイザーズ協会主催の「web 人賞」を受賞した。ソーシャルネットワーク・サービス (SNS) などのオンライン・コミュニティは、インターネットを介して参加者が共通の関心や問題意識を持って自発的に集まり、比較的対等な立場で日常の役割を脱して自律的に相互作用をする場であり、そこには何らかの共同性が存在すると定義されるが (宮田, 2005)、ライフネット生命の経営陣は共通性や共同性でのつながりを強く意識している。

オンラインだけでなく、会社を知ってもらうにはリアルを組み合わせることが重要だという認識の下、経営陣はセミナーや講演会を活用し、講師を引き受けている。加えて、経営陣2人で40冊もの著書を精力的に執筆している。

外部による評価に関しては、すでに商品の関係は言及した通りだが、会社としては、開業後間もなくして、働きがいのある会社ランキング (Great Place to Work® Institute Japan が実施)、ビジネスモデルのデザインのグッドデザイン賞受賞 (日本デザイン振興会主催)、スティービーアワードの国際ビジネス賞などで高い評価を得ている。2014年のオリコン顧客満足度ランキングでは、「会社の信頼性」項目が第2位の評価を受けるまでに高まった。

外部評価に加えて、SNS や著書、講演を通じて経営陣が絶えず情報を発信していることは、顧客との信頼形成に少なからず好影響を与えている。

次に中立性について見ていこう。ウェブサイトでは、公的な保障制度の仕組みや、生命保険のよくある誤解など、顧客が生命保険を理解し、納得できる情報を提供している。生命保険販売のためのみに機能するものではなく、生命保険がわかるウェブサイトである。

顧客の声の継続的な開示にとどまらず、他の顧客の要望への賛同や、ライフネット生命の対応内容に対する忌憚のない評価を顧客に求めている点も我田引水でなく偏っていない。ウェブサイトから見えてくる中立的な部分などが子育て層に好意的な影響を与えている可能性がある。

最後に尊重性を見てみよう。コンタクトセンターは、先発大手と比べて受付時間を長くしている。ヘルプデスク協会が主催する問合せ窓口格付けにおいて、4年連続 (2012年～2015年) で最高ランクを受賞している通り、オペレーターは一件一件の問合せに信頼のおける誠実な対応をしている。また、公的扶助や年金を含めて問い合わせに丁寧に答えている。

コンタクトセンターを基点に集められた意見・要望、苦情等の「お客様の声」は、全社員が共有し、業務の改善に役立っている。開業当初から、四半期

ごとに、お客様の声の例と対応状況を公表している点も尊重や配慮の表れである。

ライフネット生命は、2008年5月開業時に社長ブログを配信、同年11月に付加保険料を開示、2009年にはコンタクトセンターを自前の運営に切り替えるなど、開業後、一気に顧客との距離感を縮める手を打った。これらが、子育て層に信頼性、中立性、尊重性の側面から見た公正感を生んだと考えられる。

専門サービスであるライフネット生命の保険のコンセプトには、手続き的公正という枠組みの下で、複数の公正要素を組み合わせた分厚い層の公正が形成されている。一方、顧客がサービス提供者の手続き的公正を判断する中で、提供者の信頼性、中立性や尊重性を重要視するが、同社は公正な関係を築きつつある。これを整理したものは表2に示している。

専門サービスのコンセプトに形成された公正、サービス提供者に求められる手続き的公正、この2つの公正を経営陣が社長ブログなどのウェブサイトと講演などのリアルを組み合わせた情報発信を通じ相互に作用させることによって、市場や顧客の関心を集めてより一層大きな公正感を生み出したと考えられる。

開業後すぐに雑誌の企画の「プロが入りたい保険」で第1位に選ばれ、また、開業後2年余りで顧客満足度総合第1位を獲得している。仮説の提示の節でも述べた通り、公正感と満足度は正の相関があることから、顧客の知覚する公正感が高い顧客満足度へつながった可能性がある。よって、仮説1は妥当であると判断される。

表2 顧客との関係づくり

項目	特徴	公正	根拠
маниフェスト	顧客に約束	信頼性	
社長ブログ	顧客と対等に相互作用	信頼性	web人賞
講演	リアルなつながり	信頼性	
外部評価	会社の組織、能力	信頼性	グッドデザイン賞
ウェブサイト	保険が理解できる	中立性	格付け最高ランク、UCDAアワード
他社比較情報	乗り換えのリスクを負う	中立性	業界慣習を破る
顧客の評価	対応内容の評価を求める	中立性	
オペレーター	誠実、丁寧	尊重性	格付け最高ランク
顧客の声	対応状況を公表	尊重性	

仮説2は、「顧客満足は市場を切り開く鍵である。公正感もその鍵に影響を及ぼす重要な要因である。」

ライフネット生命は、開業後わずか数年で外部機関によって高い顧客満足度の評価を得たが、この評価を支えるのは、実際に加入した20代、30代の子育て層である。開業後の契約者アンケートによると、契約者の8割が20代、30代である。また、6割が新規加入および追加加入で、新たな市場の開拓につながっている。一方、契約件数は、「開業5年以内に保有契約件数15万件以上」という開業当初の経営目標を半年早く達成した。サービスが標的にした顧客層に満足されることが、需要となり市場を開拓していることがうかがえる。公正感が顧客満足に影響を与えている仮説1を踏まえると、公正感も市場の開拓を担っていることが推察される。よって、仮説2は妥当である。

5. 結論

1つは、専門サービスはシンプルで明解なサービス内容や、判断を手助けする情報の提供など公正要素を十分に含んだものであること、サービス提供者は顧客との間に信頼性、中立性、尊重性の側面から公正な関係を築くこと、この両者が相互に作用すれば顧客満足度を高める。2つ目は、顧客満足は市場を切り開く鍵である。公正感もその鍵に影響を及ぼす重要な要因である。

本稿では、スタートアップ企業の参入戦略に注目した。そして、専門サービスやその提供者と顧客の間の知覚リスク、社会的な不確実性を低減する手掛かりを公正理論に求める中で、参入のあり方と公正の関係を先発大手と対比させたコンテキストとともに明らかにしたことが1つの学術的貢献である。

注

¹ 記述は次の文献を参考にした。出口治明(2009)『直球勝負の会社』ダイヤモンド社、ライフネット生命ホームページ(<http://www.lifenet-seimei.co.jp/>)、「ライフネット生命保険社長出口治明(1)(2)」『PRESIDENT Online』2013年6月27日、28日(<http://president.jp/articles/-/9764>)、「社長インタビュー第1回～第4回」『bizoccean(ビズオーシャン)』(<http://www.bizoccean.jp/column/president/president45/>)、ドリームゲートスペシャルインタビューMY BEST LIFE 挑戦する生き方第79回ライフネット生命保険株式会社 岩瀬大輔(http://case.dreamgate.gr.jp/mbl_t/id=776)

参考文献

- Grönroos, C. (1990). *Service management and marketing: managing the moments of truth in service competition*. Jossey-Bass.
- Lind, E. A., & Tyler, T. R. (1988). *The social psychology of procedural justice*. Plenum Press.
- Lovelock, C. H. (1983). Classifying Services to Gain Strategic Marketing Insights. *Journal of Marketing*, 47 (summer), 9-20.
- 宮田加久子 (2005) 『きずなをつなぐメディア：ネット時代の社会関係資本』 NTT 出版.
- Porter, M. E. (1980). *Competitive Strategy*. The Free Press.

「食品素材や化粧品素材」としての「高機能化ポリフェノール誘導體」の環境に優しい「次世代型酵素的合成システム」の開発

岡山県立大学 保健福祉学部 栄養学科

中島 伸佳

1. はじめに

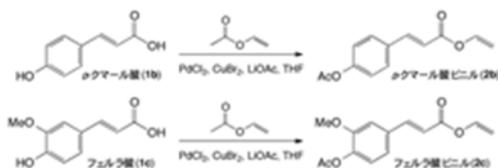
花の色の多彩さや美しさを担う天然植物色素はフラボノイドを基本骨格（アグリコン）とした配糖体構造を有し、さらに糖の特定の水酸基が位置特異的にアシル化を受けている場合が多く、このような化学構造的な修飾が植物色素の安定性や生理機能に深く関与しているといわれている。

天然植物色素は、それ自体が持つ抗酸化性などの生理機能から健康食品などとして注目される一方、それらの中には美白効果などを有する化合物も存在しており、化粧品素材や食品添加物などとしての利用や研究も試みられている。

そこで、本研究では、まず美白効果があるとされている植物性成分のひとつであるアルブチンに各種の芳香族酸を導入したアシル化アルブチンを酵素的に合成（リパーゼのエステル交換反応を利用）し、高機能で新規な食品素材や化粧品素材などを開発することを目的とした。

2. アシルドナーの合成

リパーゼ触媒によるトランスアシル化には、通常、芳香族酸ビニルがアシルドナーとして必要である。しかし、桂皮酸ビニル(3a)以外は市販されていないので以下のように化学的に合成した。

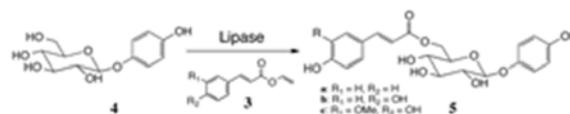


次に、フェノール性水酸基のアセチル基を脱保護するために、EtOH存在下でのリパーゼによる位置選択的な脱保護を行った。

Table 1. Enzymatic Regioselective Alcolysis of 2b, 2c in EtOH

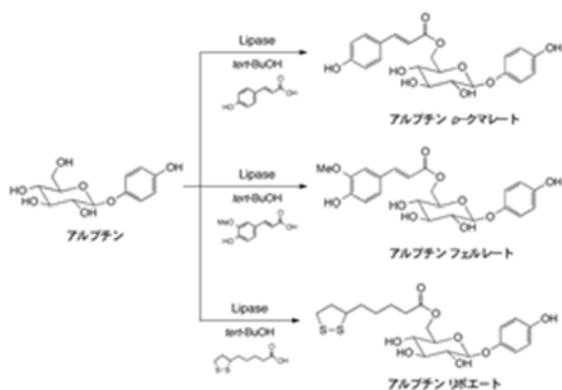
Lipase	2b		2c	
	3b (%)	1b (%)	3c (%)	1c (%)
Amano-A	55	11	43	21
Amano-AY	46	14	50	15
Amano-F	43	9	39	22
Amano-M	32	15	41	18
Amano-PS	85	0	78	0
CAL-B	64	6	67	5

3. アシル化アルブチンの酵素合成



さらに、9種類のリパーゼを用いてアルブチンへの桂皮酸エステル化に関するスクリーニングを行った。その結果、酵素としてはCAL-B (Chirazyme L-2)が、溶媒は脱水していないアセトニトリルが最適で、2日後に最大変換率(90%)を示した。同様に、アシルドナーとして *p*-クマール酸ビニル(3b)とフェルラ酸ビニル(3c)を用いた場合も、2日後に最大変換率(5b: 85%, 5c: 70%)を示した。

次に、ビニルエステルを経由しない直接的な酵素的アシル化も検討した。その結果、脱水した *t*-ブタノール中で *p*-クマール酸、フェルラ酸、 α -リポ酸をアシルドナーとした場合に、それぞれのアシル化生成物を確認できた。アシル化の変換率については、アシルドナーとして α -リポ酸を用いた場合が最も高く(>90%)、次いで *p*-クマール酸(65%)、フェルラ酸(50%)の順であった。



アルブチンシナレート (桂皮酸エステル), アルブチン *p*-クマレート, アルブチンフェルレート, アルブチン α -リボ酸エステルについては抗酸化性を維持したままで, 耐光性や耐熱性などの安定性が向上することが確認できた。

4. アシル化植物色素の酵素合成

最後に, 下記の Fig. に示すように, 変換率は, さほど高くはなかったが (単離収量: 20%程度), 生体触媒 (リパーゼ) として CAL-B を, 溶媒として脱水していないアセトンを用いて, 50°C で, 1 週間に渡り, *p*-クマール酸ビニル (3b) をアシルドナーとして, 花卉などの植物性組織の色彩を担う天然植物色素そのものであるイソケルシトリンとクリサンテミンのそれぞれのアシル化を行った。

この場合においても, それぞれのアグリコンが有する抗酸化性をほぼ維持したままで, 安定化などの高機能化が達成できた。

しかしながら, フラボノイド類のような天然植物色素など比較的, 高分子のアシルアクセプターのリパーゼによる酵素的・芳香族酸エステル化は, アシルドナーとして芳香族酸ビニルの利用が必要であった。



Fig. Reaction scheme for lipase-catalyzed regioselective transesterification to synthesize isochlorogenic p-coumarate and chrysin p-coumarate

人体近傍生気象現象の把握と温熱環境評価モデルの構築

岡山県立大学 情報工学部

島崎 康弘

人間生活を取り巻く温熱環境は悪化しており、暑熱障害の増加にみられるように今や温熱環境は健康や安全に関わる問題として広く認識されている。安全・快適な温熱環境を考える際に、その空間の現状や改善効果を定量的に表現する環境定量化ツールとして、温熱環境指標の構築に取り組んだ。人体温熱環境そのものの把握や人体生理反応を理解するうえで、人体への熱入力となる人体受熱量は重要であることから、皮膚 - 衣服 - 環境の系から構成される着衣伝熱モデルを構築し、実験的にその検証を行い、良い精度で予測できることを示した。また、局所的な熱負荷への応答を理解するために被験者実験により、熱負荷、温冷感、快適感の関係性を探る試みを行い、局所的な熱刺激は局所温冷感に寄与し、さらに全身温冷感へとつながることが明らかになった。さらに、冷刺激と温冷刺激の感受レベルの違いや環境ごとに全身部位での感受性の違いを示した。本知見に加え環境の非一様性を表現し、人体の動的な状況把握を進めることでユニバーサルな屋外温熱環境指標の再構築が期待できる。

1. はじめに

気候変動や都市ヒートアイランドの影響を受けて夏季の屋外温熱環境は悪化しており、その対応に迫られている。温熱環境を改善するためには、現状を把握し改善効果を客観的に示しうる温熱環境指標が必要である。このような背景から、これまでもさまざまな温熱環境指標の研究がされてきた。温熱環境決定には、環境側の温熱要素である気温、湿度、気流（風速）、放射の4要素と、人体側の温熱要素である着衣量と代謝量の2要素が深く関わっており[1]、PMV[2]やSET*[3]といった国際指標がある。

言うまでもなく人体温熱状態予測においてこれらの要素をできるだけ多く含有する必要があるが、これまでの評価法は人体側情報の欠如が指摘されている。従って、厳しい屋外環境に広く適用できる温熱環境指標が確立されているとは言えず、モデル検証に足る被験者の生理量データも不足している。そこで、本研究では、環境熱負荷の様々な実空間にて活動時の人体温熱生理情報および心理反応を実測し、温熱環境が人体に与える影響を分析し、さらに、温熱暑熱環境適応策検討に有効となる温熱環境の定量化ツールの提案を行う。

筆者らは上述六要素全てを含有した「人体熱負荷量」指標をこれまでに提案した[4]、[5]。人体熱負

荷量は、人体を中心とした熱の授受を、代謝量、着衣という人的要素および正味ふく射量、顕熱損失、潜熱損失という環境要素から算出した物理量である。この指標をともに、実空間に特有の熱環境や人体の非一様性および非定常性、および人間活動を考慮することで、人体熱負荷指標を様々な環境下でも適用できるユニバーサルな屋外温熱環境指標として再構築することを最終的な目標とする。

2. 方法

2.1 局所熱負荷量の算出

人体温熱環境そのものの把握や人体生理反応を理解するうえで、人体への熱入力となる人体受熱量は重要となる。一方で、その値は実環境においては人体部位でも異なり、また、とりわけ屋外環境における着衣の影響はこれまで考慮されていない。そこで、特定の着衣部位を想定した局所熱負荷把握モデルを検討した。

皮膚 - 衣服 - 環境の系から構成される着衣伝熱モデルを図1に示す。この系における熱移動式は定常かつ1次元的として捉えると以下の式(1)のように書ける。

$$\frac{d^2T}{dy^2} + \dot{q} = 0 \quad (1)$$

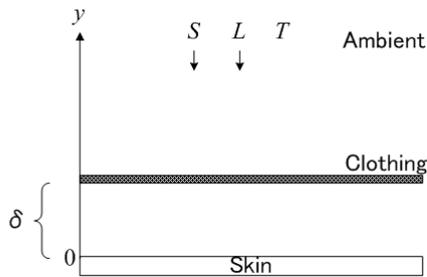


図1 1次元皮膚 - 衣服 - 環境系伝熱モデル

ここで、 T は温度、 y は鉛直座標の変位、 \dot{q} は発熱量である。 \dot{q} はふく射伝熱による衣服表面での熱移動を示し $y=\delta$ でのみ生じる。この系において衣服素材は多孔質材料として扱うため、日射は衣服素材で吸収されるほか、透過し、さらには皮膚表面で反射した日射が更に衣服素材で吸収される。これらの日射受熱は以下の式(2)のように書ける。

$$q_{S,clo} = S\alpha_{clo} + S\tau_{clo}r_{skin}\alpha_{clo} \quad (2)$$

ここで、 S は全天日射量、 α_{clo} は衣服素材の日射吸収率、 τ_{clo} は衣服素材の日射透過率、 r_{skin} は皮膚の日射反射率である。他方、大気よりくる長波放射は衣服素材で吸収される。同様に、皮膚表面より放射される長波放射も衣服素材で吸収される。同時、温度に応じて衣服素材より、大気および皮膚へ長波放射が起り、最終的な衣服素材における長波による受熱は以下の式(3)のように書ける。

$$q_{L,clo} = \varepsilon_{clo}(L - \sigma T_{clo}^4) + \varepsilon_{clo}\sigma(\varepsilon_{skin}T_{skin}^4 - T_{clo}^4) \quad (3)$$

ここで、 L は大気放射量、 σ は Stefan-Boltzman 定数、 ε は放射率、 T は温度を表し、添え字 clo および $skin$ はそれぞれ衣服素材、皮膚における値を示している。従って、総合的な衣服素材でのふく射伝熱量は以下の式(4)のように書ける。

$$\dot{q} = \frac{q_{S,clo} + q_{L,clo}}{l} \quad (y = \delta) \quad (4)$$

ここで、 l は衣服素材の厚さである。

これにより求められる人体への伝熱量に基づき、人体熱負荷計算へ適用が可能となる。

本モデルの検証として、素材の温度測定実験を行った。日射あり環境下で行う実験は、大阪府立産業

技術総合研究所の人工気象室内、それ以外の実験は岡山県工業技術センターの恒温恒湿槽内(PSL-4S)にて行った。なお、大阪府立産業技術総合研究所の人工気候室内には模擬太陽光源があり、67個のメタルハライドランプが平面上に並べられている。模擬太陽照射面の面積は、2.0 m²で、その真下で実験を行った。解析対象(測定系)の構成要素について説明する。模擬皮膚は、温度を一定に保つためにペルチェ素子で構成され、PID制御を実装したクールプレート(AS ONE SCP-85)を使用した。衣服内空気層と素材について、均一な衣服内空気層を設けるために木製スペーサー(縦100 mm、横100 mm、高さ δ mm)を用い、その上面に日射特性の異なる綿100%の素材(黒、白、赤、黄)をたるみなく張りつけた。また、本スペーサーは外部との断熱的役割をもつ。素材の日射特性の違いが衣服内空気層と素材の温度場形成に与える影響を明らかにするために、日射特性の異なる素材を用いた。その中でも値に差が見られる黒、赤、着、白の4色を選定した。衣服内空気層厚さ δ は5.0、10.0、15.0 mmの3種類である。実際の着衣空隙厚さの違いによって生じる自然対流の影響を考慮するために、この3種類を選択した。

ふく射環境下の全天日射量(短波放射量)、大気からの赤外放射量(長波放射量)、白金測温抵抗体は、地面から1.5 mに設置した長短波放射計(EKO MR-60)を用いて測定した。なお、模擬太陽照射面の中心点を予め計測し、中心点の垂線上に長短波放射計と解析対象を設置した。風速は、”日射あり”環境下では超音波風速計(Young CYG-81000)、“日射なし”環境下では熱線式風速計(Kanomax Model6531)を用いて測定した。気温と相対湿度はそれぞれサーミスタ(T&D TR-73U)、高分子湿度センサ(T&D TR-73U)で測定した。なお、模擬皮膚表面、衣服内空気層(4点)、素材表面の温度は被覆の無いT型熱電対で測定した。気象要素はNEDO日射量データベースを基に、岡山市の快晴日を参考にした。

2. 2 局所熱負荷に対する応答

実環境で起こる局所的な熱負荷への応答を理解するための実験を行った。ペルチェ素子およびPIDコ

ントローラにより温度制御可能な熱刺激プレートをもちいて人体主要七部位(前額, 腹部, 右上腕, 右手甲, 右大腿, 右下腿, 右足甲)へ熱刺激を与えた. これらの部位は, 温熱生理として重要である平均皮膚温の算出に用いられるものであり, 全身への寄与が大きい箇所である. 刺激面積は5×5 cmとした[6]. 実験は, 30分間で, 開始10分後から10分間, 局所熱刺激を与えた. 代謝の影響を小さくするために食後二時間以上空け, 異なる実験を連続で行う際は前の実験の影響がないように十分な時間を空けた.

測定項目は, 表面皮膚温度・舌下温 (J型熱電対), 熱流束値 (CAPTEC製 HF30型), 心拍数 (POLAR製 RS800CX, アメアスポーツジャパン製 SUUNTO t3d, バイタルモニター 8726-GB), 室温・湿度及び大気圧 (T&D TR-73U), 全身・局所の温冷および快適感である. 心理申告である温冷感, 快適感 はASHRAE (American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers)の基準に従い, 温冷感を-3の「寒い」から+3の「暑い」に, 快適感を-2の「不快」から+2の「快適」のスケールに変換して測定した. 申告表は, 線形尺度を用いて2分毎に被験者自身が現在感じた温冷感・快適感に当たるポイントに縦線を記入してもらった.

暑熱環境・中立環境・寒冷環境の各条件下で実験を実施した. 暑熱実験(気温35℃)および寒冷実験(気温5℃)は, 大阪府立産業技術総合研究所の人工気象室で行った. また, 中立実験(気温20℃)は岡山県立大学内に簡易的な人工気候室を作成し, 行った. 実験人数は, のべ226人であり, 健康な大学生・大学院生であった. 被験者の身長は平均1.68m, 体重は平均58.8kg, 年齢は平均21.2歳であった. また, 着衣量を統一するため, 同一の上下長袖のコンプレッションウェアにて行い, この時のclo値は0.33であった.

熱刺激温度は皮膚上では45℃または15℃であり, 衣服上では50℃および10℃であった. これは, それぞれの環境下での各部位の平均皮膚温から, コンプレッションウェア上(腹部・上腕・大腿・下腿)から熱刺激を与える場合を±15℃になるように設定し, 肌上(前額・手甲・足甲)から直接熱刺激を与

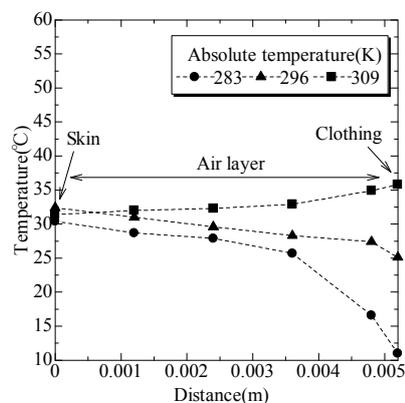
える場合を±10℃になるように設定した. なお, この熱刺激の設定温度は, 熱流束値ができるだけ各部位で一定になることも考慮した.

3. 結果

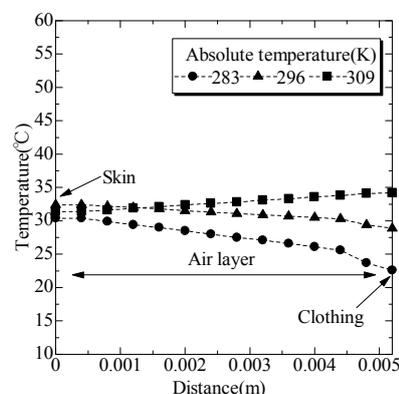
3.1 着衣を介した局所熱負荷モデル検証

測定系の温度分布について, 紙面の都合上実験値とモデル解析結果のいくつかを整理して示す. なお, 実験値のデータは, 3回の測定における定常状態とみなした時刻から5分間の測定値を平均化処理した結果である.

図2に示すのは, 日射なし条件の黒色衣服の様々な環境における温度分布である. 気温10℃(283K)と23℃(296K)では皮膚から素材にかけて温度は下降し, 36℃(309K)では, 皮膚から素材にかけて温度は上昇する. この温度変化傾向は, どの空気層厚さの数値解析結果でも概ねよく再現出来ていると言える. 日射がないため, 衣服素材の色の違いによる温度分布への影響はみられなかった.



(a) 実験値



(b) モデル計算値

図2 日射なし条件における温度分布 ($\delta=5$ mm)

図3に示すのは、日射条件での白色衣服と黒色衣服の様々な環境下における温度分布である。実験値、数値解析結果ともに測定点における温度は、どれも黒色の方が白色に比べて高くなった。日射特性の中でも日射吸収率の占める割合が高いことから、特に日射吸収率の影響が大きいと考えられる。また同一黒色衣服に関して、“日射なし”と“日射あり”の測定系における温度分布に着目すると、各測定点の温度は、どの空気層厚さにおいても“日射なし”より“日射あり”の方が高かった。

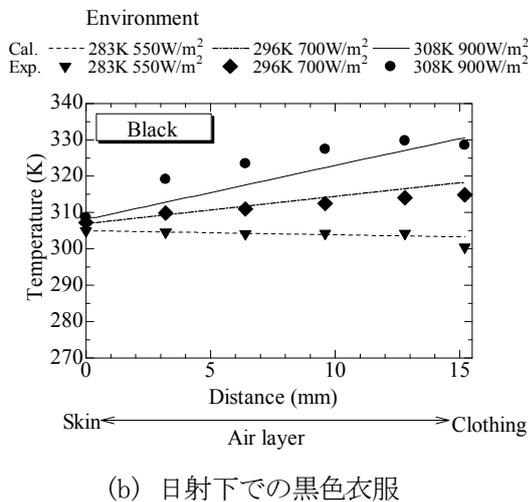
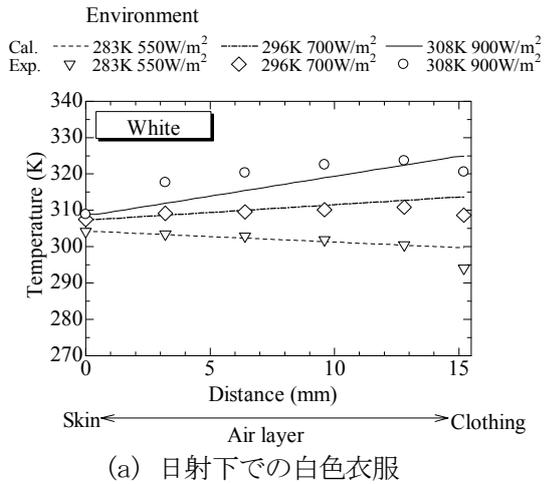


図3 色違い衣服の温度分布 ($\delta=15$ mm)

その他の条件を含め、実験値と数値解析結果を比較すると、どの色、空気層厚さ、気象条件においても温度変化傾向は概ね定性的に一致しており、素材の日射特性を考慮したモデルの有用性を示すことが出来たと言える。

これにより、屋外環境における部位毎に異なる着

衣人体受熱量が予測できるようになった。

3. 2 局所熱負荷量と心理申告

局所熱負荷量と局所温冷感の関係について、大腿刺激の例を図4に示す。温・冷刺激、環境に関わらずおおむね両者には線形の関係があることが分かる。さらに、図5には、局所温冷感と全身温冷感の関係について、腹部刺激の例を示す。気温により局所温冷感の全身への寄与にやや違いが生じ、気温毎に整理すると、両者には線形の関係が強く表れる。結果的に、局所的な熱刺激は局所温冷感に寄与し、さらに全身温冷感へとつながるといえる。

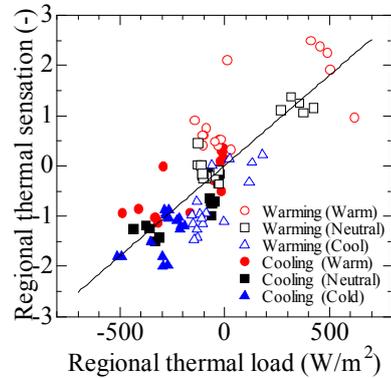


図4 局所熱負荷量と局所温冷感の関係

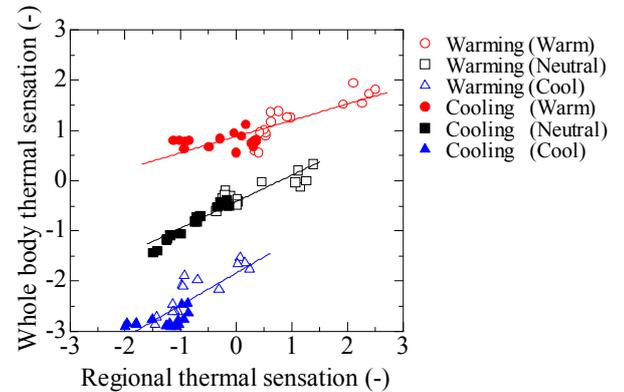


図5 局所温冷感と全身温冷感の関係

ここで、図4において、局所熱負荷と局所温冷感の間にある相関直線の傾きに注目すると、単位熱負荷量あたりの温冷感変動、つまり温冷感の感度を示すこととなる。図4同様に他の部位でも、局所熱負荷量と局所温冷感の間には相関関係がみられたため、この温冷感の感度について考えることは、人体への影響把握や温熱対応策へ有効であると考えられる。

そこで、各部位の感受性を比較したものが図6である。一概に結果をまとめることは容易ではないが、冷刺激と温冷刺激の感受レベルの違いや環境ごとに全身部位での感受性の違いを観察できる。本結果は局所的な温熱環境に対する全身感受反応のデータベースとして使用できる可能性がある。

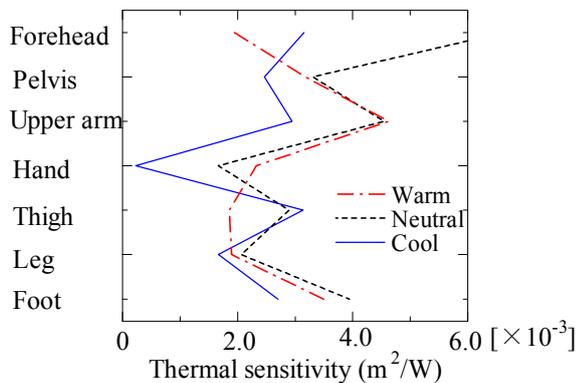


図6 温熱感受性の部位差

4. まとめと今後の展望

本研究は、悪化する温熱環境改善に向けて現状把握や改善の定量的評価に必要な温熱環境指標構築に向けて、これまで欠如していた局所的な温熱効果の検討を行ったものである。まず、人体近傍生気象現象の把握として、屋外で想定される局所的な日射受熱を再現できる着衣人体モデルを構築し、実験的にその検証を行った。次に、温熱環境評価モデルの構築として、上述のような局所熱負荷に対しての生理反応を心理申告によって求め、部位および環境毎に整理した。

人体熱負荷量を用いてユニバーサルな屋外温熱環境指標として再構築するためには、さらに環境の非一様性を表現し、人体の動的な状況把握を進めることが求められる。

5. 謝辞

本研究は、公益財団法人ウエスコ学術振興財団の支援を頂いた。ここに記して感謝の意を表す。

6. 参考文献

- [1] 例えば、宇田川光弘ほか、建築環境工学，朝倉書店，2009.
- [2] P. O. Fanger, Thermal comfort, Danish Technical Press, 1970.
- [3] A. P. Gagge et al., A standard predictive index of human response to the thermal environment, ASHRAE Trans. Vol. 93, pp. 709-731, 1987.
- [4] 島崎康弘ほか、人体熱負荷量に基づく温熱快適性指標の提案，日本冷凍空調学会論文集，Vol. 26, No. 1, pp. 113-120, 2009.
- [5] Yasuhiro Shimazaki et al., Application of human thermal load into unsteady condition for improvement of outdoor thermal comfort, Building and Environment, Vol. 46, Issue 8, pp. 1716-1724, 2011.
- [6] 島崎康弘ほか、接触熱刺激による局所冷却が温冷感に与える影響，Thermal Science and Engineering, Vol. 20, No. 40, pp. 61-67, 2012.

超音波ニードルパンチ処理を施した CF/PA6 複合材料の衝撃特性の評価

岡山県立大学 情報工学部

小武内 清貴

本研究の目的は、CF/PA6 からなる炭素繊維強化熱可塑複合材料の衝撃負荷に伴う変形および内部損傷に及ぼす超音波ニードルパンチ処理の影響を明らかにすることである。PAN 系平織炭素繊維布と PA6 シートから作製したプリプレグを積層し、 $[0-90^\circ]_{14}$ の積層構成を有する積層板を作製した。これに対し、刺突間隔 2 mm の条件にて超音波ニードルパンチ処理を施し、試験片を作製した。作製した試験片に対し、落錘衝撃試験機を用いて面外方向に衝撃負荷を与え、積層板の面外変形量および内部に生じた層間剥離の長さを評価した。その結果、試験片の面外方向の最大変形量および変形部位の投影面積に及ぼす超音波ニードルパンチ処理の影響は少なかった。一方、試験片内部の損傷状態は、超音波ニードルパンチ処理の有無によって差異が見られた。超音波ニードルパンチ処理を施していない試験片では、内部に複数の層間剥離が観察され、またその長さも長かったのに対し、超音波ニードルパンチ処理を施した試験片内部の層間剥離部位の数は少なく、その長さも短かった。以上より、超音波ニードルパンチ処理は衝撃負荷に伴う層間剥離の抑制に有効であることが分かった。

1. 緒 言

炭素繊維を強化繊維、熱可塑性樹脂を母材とする炭素繊維熱可塑複合材料(CFRTP)は軽量、高強度を有し、従来の熱硬化性樹脂を母材とする炭素繊維強化複合材料(CFRP)に比べ、使用後の炭素繊維の再資源化も容易なため、比較的製品寿命の短い輸送機器等への応用が期待されている^[1]。

輸送機器は、その製品寿命の間に破損、特に衝撃による破損を生じる可能性が高く、衝撃後の特性(例えば CAI 強度)は、複合材料構造部材にとって重要な指標の一つである。一般に高強度を有する織物強化複合材料は、衝撃によって層間剥離を生じることが知られ^[2]、本課題で対象とする CFRTP においても例外ではない。層間剥離の抑制には、層間特性の向上が有効である。CFRP においては、母材樹脂の高じん化^[3]や繊維と樹脂の界面の高強度化^[4]等が試みられてきた。また、三次元織物^[5]やスティッチング^[6]等、厚み方向に強化した強化材を用いる方法や、Z-pinning^[7]等、微小なピンを板厚方向に挿入する方法等も模索されている。しかし、CFRTP では母材樹脂の粘度が高く、これらの方法をそのまま CFRTP に応用することは難しい。申請者はこれまでに、特殊な形状の針に超音波加振を行い、CFRTP に刺突す

る、超音波ニードルパンチ処理を施すことにより、CFRTP 面外方向に母材樹脂流れを誘起し、静的な面内特性及び層間特性が向上することを見いだした。また、本手法は対象材の加熱が不要、小型・安価な装置で実施可能など、その応用範囲は広い。

そこで本研究では、PAN 系炭素繊維を強化材、PA6 を母材とする CF/PA6 複合材料に対し、超音波ニードルパンチ処理を施し、その衝撃特性を、落錘型衝撃試験機を用いて定量的に評価した。具体的には、落錘衝撃後の試験片の変形量、および試験片内部に生じた層間剥離長さを定量的に評価した。

2. 材料および実験方法

2.1 供試材

強化材に 3K 平織炭素繊維布 (TORAY 製 CO6343)、母材に PA6 樹脂ペレット (TORAY 製 CM1017) を用いた。試験片作製にあたっては、樹脂ペレットをヒートプレスにて厚さ 0.1 mm のシート状に成形したものを用いた。

2.2 試験片作製方法

試験片作製に先立ち、本研究では CF/PA6 プリプレグを作製した。150 mm 角に切り出した平織炭素繊維布を、同じく 150 mm 角の PA6 シート 2 枚にて挟み、240 °C、2.5 MPa、3 min の条件にてヒート

プレスを行い、CF/PA6 プリプレグを作製した。作製したプリプレグを積層構成 $[0-90]_{14}$ にて積層し、テフロンシート製のバッグに入れ密閉した。バッグ内の空気を真空ポンプにて吸引しつつ、 $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 2.5 MPa 、 4 min の条件にてヒートプレスを行い、厚さ約 3.5 mm の CF/PA6 複合材料を作製した。作製した CF/PA6 複合材料の繊維体積含有率は約 50% 程度であった。作製した CF/PA6 複合材料板から繊維 0° 方向を長手方向として $45\times 45\text{ mm}^2$ の矩形形状にダイヤモンドカッタを用いて切り出し、試験片とした。

2.3 超音波ニードルパンチ処理

図1に本研究にて使用した超音波ニードルパンチ装置を示す。本装置は制御 PC によって駆動される XYZ テーブルと超音波ウェルダ(超音波工業製, UPW228)および直径 1 mm の半球状先端を有するニードルホーンから構成される。ニードルホーンを周波数 28 kHz の超音波にて加振し、刺突速度 0.5 mm/s の条件にて、試験片表面から厚み方向に 3.0 mm の深さまで刺突し、 1 sec 保持した後、同速度にて引き抜いた。本研究では、単位面積当たりのニードル刺突回数(以下, NP 密度)が $15/\text{cm}^2$ となるよう、図2に示すように 2 mm 間隔にてニードル刺突を行った。

2.4 衝撃試験

図3に本研究にて使用した落錘型衝撃試験機を示す。本装置は先端に半径 8 mm の半球状の圧子を有するストライカを、所定の位置から自由落下させることにより、試験機下部に固定された試験片に所定の衝撃エネルギーを与えることが可能である。本研究では試験片の単位厚さ当りの衝撃エネルギー G を 1.5 、 3.0 、 4.5 J/mm の3条件にて実験を行った。

2.5 試験片観察

衝撃を与えた試験片の面外方向の変形量を、非接触式3次元測定器(Keyence製, KS-1100)を用いて測定した。試験片中央部の $40\times 40\text{ mm}^2$ の矩形領域を $100\mu\text{m}$ 毎に測定した。また試験片内部の損傷状態を評価するため、圧子の落下点付近にて試験片を切断し、断面を研磨後、デジタルマイクロスコープ(Keyence製, VHX-100)にて観察した。

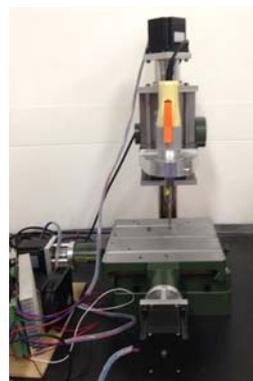


Fig.1 Ultrasonic needle punching apparatus.

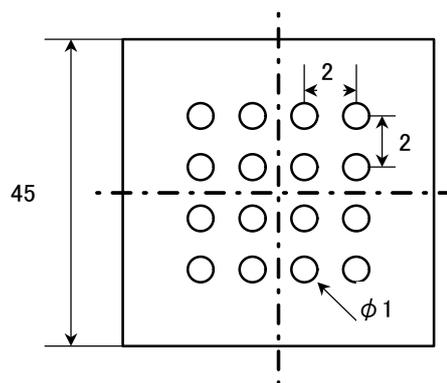


Fig.2 Configuration of needle punched specimen.

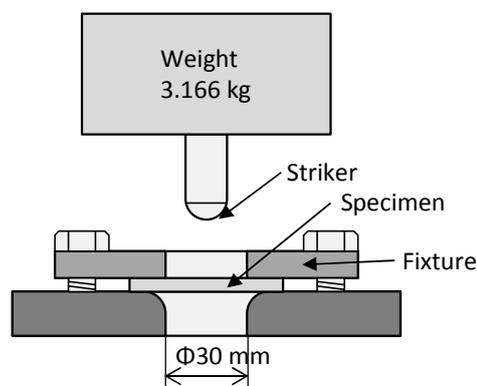


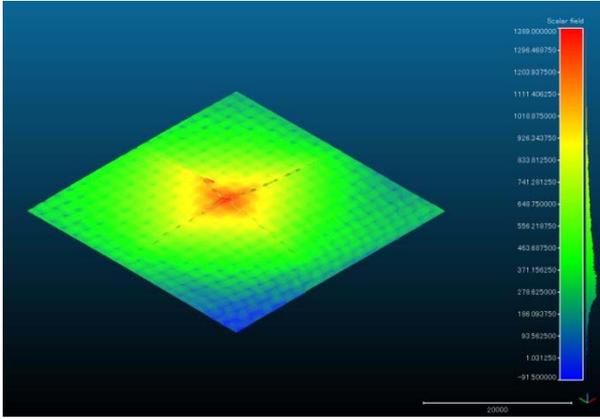
Fig.3 Schematic illustration of impact tester.

3. 結果および考察

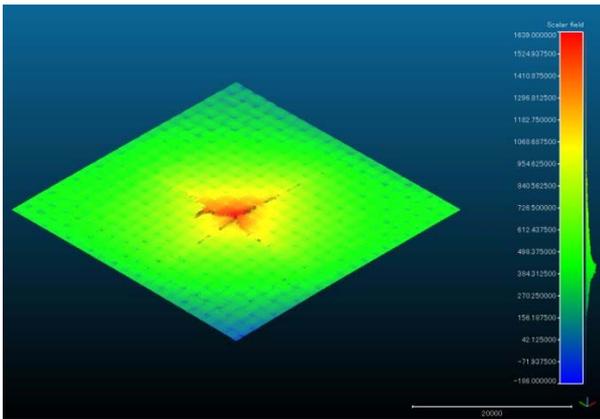
3.1 衝撃試験後の試験片変形量

図4に 4.5 J/mm の衝撃を与えた試験片の変形形態を示す。なお、比較のため超音波ニードルパンチ処理を施していない試験片の結果も併せて示す。図より、超音波ニードルパンチ処理の有無による圧子周辺の変形状態の差異は見られなかった。試験片の変形状態を定量的に比較するため、試験片の面外方向への最大変位と、面外方向の変形が生じた部位の投影面積をそれぞれ評価した。なお、本研究では面外

方向への変形が生じた部位とは、面外方向に 0.175 mm 以上の変位が生じた部位と定義した。図 5 および 6 に試験片の最大面外変位および面外変形部の投影面積を示す。図より、試験片の変形状態に及ぼす超音波ニードルパンチ処理の影響は小さいことがわかった。



(a) Without needle punching.



(b) With needle punching.

Fig.4 Surface morphology of specimen after impact test (4.5 J/mm).

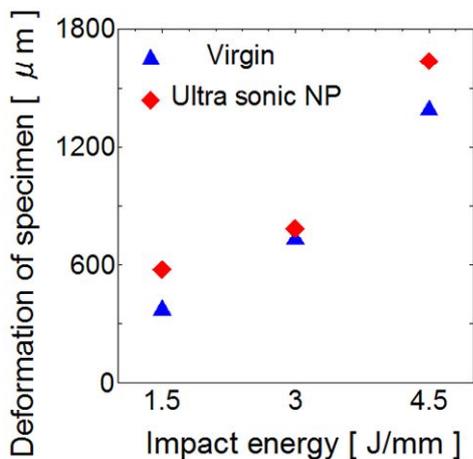


Fig.5 Out-plane deformation of specimen after impact test.

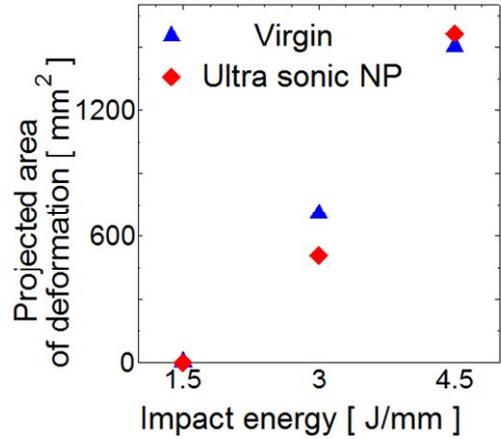
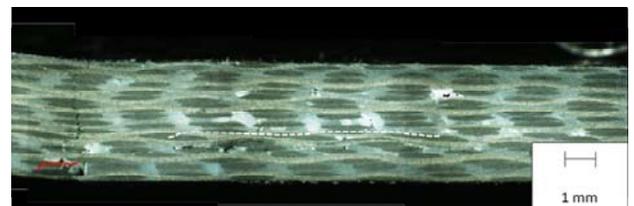


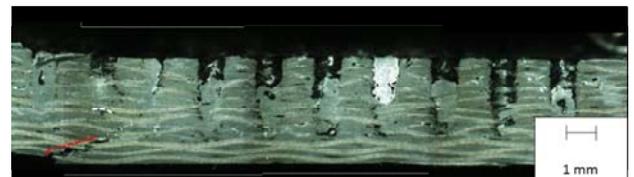
Fig.6 Projected area of out-plane deformation of specimen after impact test.

3.2 試験片内部損傷状態

図 7 に 4.5 J/mm の衝撃を与えた試験片の断面を示す。図中破線にて層間剥離を示す。図より、超音波ニードルパンチ処理を施した試験片では、試験後の層間剥離部位の減少が見て取れた。また、それぞれの試験片で観察された層間剥離部位の長さの最大値を測定した結果を図 8 に示す。図より、超音波ニードルパンチ処理を施した試験片では、衝撃によって生じた層間剥離部位の長さが減少していることが分かった。これは、層間剥離が進展する際、超音波ニードルパンチ処理を施した部位が抵抗となり、進展を妨げたものと考えられる。以上のことより、CF/PA6 複合材料への超音波ニードルパンチ処理は、衝撃に伴う内部層間剥離の抑制に有効であるといえる。



(a) Without needle punching.



(b) With needle punching.

Fig.7 Cross section of specimen after impact test (4.5 J/mm).

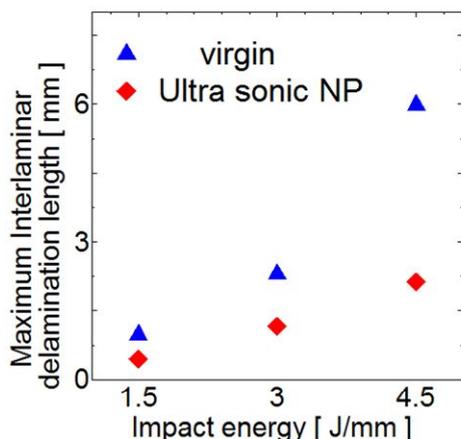


Fig.6 Maximum interlaminar delamination length of specimen.

3. 結 言

CF/PA6 からなる複合材料に対し、超音波ニードルパンチ処理を施し、衝撃負荷を与え、その損傷状態を評価した。その結果、超音波ニードルパンチ処理は衝撃負荷に伴う層間剥離の抑制に有効であることが分かった。

参考文献

- [1] Jun TAKAHASHI: “Polymer Based Composite Materials for Lightning Automobile”, Automotive technology, Vol. 59, No. 11(2005), pp.17-23.
- [2] Akira TODOROKI, Hideo KOBAYASHI and Jong Gi LEE: “Micromechanism and Delamination Resistance of CF/PEEK”, Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, Vol.60, No.573 (1994), pp.1272-1279.
- [3] J. K. Kim, C. Baillie, J. Poh and Y.W.Mai, Fracture Toughness of CFRP with Modified Epoxy resinMatrices, Composites Science and Technology, Vol.43 (1992), pp.283-297.
- [4] Masaki Hojo, Satoshi Matsuda, Motosugu Tanaka, Shojiro Ochiai and Atsushi Murakami, “Mode I Delamination Fatigue Properties of Interlayer-Toughened CF/Epoxy Laminates”, Composites Science and Technology, Vol.66, No.5, pp.665-675 (2006).
- [5] Ming Ji, Haruo Ishikawa, Meiji Anahara and Yoshiharu Yasui, “The Estimation of Fracture Resistance of Orthogonal Three-Dimensional Fiber-Reinforced Composite by DCB

Testing”, JSME Part A, Vol.62, No.596, pp.897-901 (1996).

- [6] Yutaka Iwahori, Takashi Ishikawa, Youichi Hayashi and Nobuyuki Watanabe “Study of Interlaminar Fracture Toughness Improvement on Stitched CFRP Laminates”, Journal of the Japan Society for Composites Materials, Vol.26, No.3, pp.90-100 (2000).
- [7] Ivana K. Partridge and Denis D.R. Cartie “Delamination Resistant Laminates by Z-Fiber pinning: Part I Manufacture and Fracture Performance”, Composites Part A, Vol.36, No.1, pp.55-64 (2005).

ステートマシン図を用いた Web アプリケーションの自動テスト環境の開発

岡山県立大学 情報工学部 情報システム工学科

横川 智教

本研究では、Web アプリケーションの自動テスト環境の構築を目的とした、ナビゲーション構造のモデル化手法を開発した。モデル化には、UML のステートマシン図を用いている。ステートマシン図によるモデル化を行うことで、既存の自動検証およびテスト生成のための技術を応用することが可能となる。本手法では、Web ナビゲーションのページ移動と認証管理、そしてユーザによる操作をそれぞれ個別のステートマシン図によって表し、メッセージにより相互通信を行うことでユーザ層さや認証状況に依存したナビゲーションの振る舞いをモデル化することが可能である。本稿では、オンラインショッピングサイトの画面遷移仕様書を例題として、提案する枠組みに基づいてステートマシン図によりモデル化を行った結果を示している。そして、モデル解析ツール SAL を用いて、Web ナビゲーションの振る舞い検証およびテストの自動生成を行った。その結果として、設計の誤りを正しく検出することができ、さらに所望の条件に対するテストケースを自動生成することができた。

1. 背景

近年のソーシャルネットワーキングサービスの普及を始めとして、オンラインショッピングや Web バンキングなど、多くのサービスが Web アプリケーションとして実現されている。Web アプリケーションは、Web ブラウザを通してユーザがビジネスロジックを実現するための枠組みであり、Web コンテンツ、ユーザインタフェース、そして Web ナビゲーションの 3 つによって実現される。中でも Web ページ間の移動を制御するための枠組みである Web ナビゲーションの設計は、その構造の複雑さから開発に要するコストに対して大きな影響を与えている。Web アプリケーションの開発コストの多くは検証とテストによって占められているため、その自動化により開発コストを削減するための試みが数多く報告されている。ソフトウェア開発を自動化するための技術の 1 つとして、モデル駆動開発^[1]と呼ばれるアプローチが広く知られており、適用事例も報告されている。モデル駆動開発は、ソフトウェアの要求および設計を実行可能な形式でモデル化することにより、モデル上でのシミュレーションおよび検証、そしてテストの自動生成を可能とする技術である。

Web ナビゲーションの設計には画面遷移図が広く用いられているが、モデル駆動開発を適用するため

には、対象となるシステムを実行可能な形式でモデル化する必要がある。画面遷移図による設計をそのまま利用することは困難である。UML^[2]のステートマシン図は、実行可能なモデルであり、モデル駆動開発にも広く活用されている。

本研究では、Web ナビゲーション構造をステートマシン図によってモデル化することで、検証およびテスト生成の自動化を実現する。ステートマシン図によるモデル化を行うことで、モデル検査^[3]による検証^[4]やテストの自動生成^[5]のように、既存の様々なモデルベースの技術を応用して検証やテスト生成を行うことが可能である。本手法では、動的な Web ナビゲーションの振る舞いを表現するため、Web ナビゲーションを構成する要素であるページ移動、認証管理、そしてユーザ操作に加えて、ナビゲーションの制御に用いられるユーザの認証状況とフォーム部品の値とその変化を表現可能なモデルを提案している。本稿では、得られたモデルを用いて、遷移システムの統合解析環境 SAL (Symbolic Analysis Laboratory)^[6]による検証およびテスト生成を行った結果についても示している。

2. Web ナビゲーション

2.1 概要

Web アプリケーションは、Web コンテンツ、ユーザ

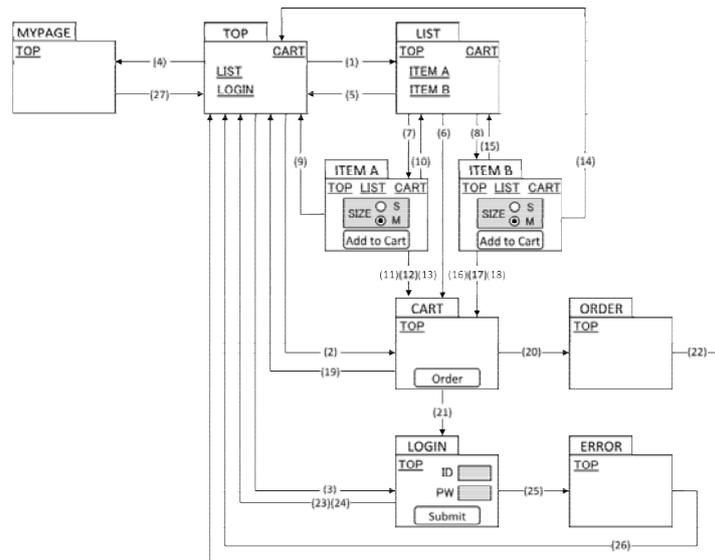


図1 exAppの画面遷移図

インタフェース，そしてWebナビゲーションの3つによって構成される。WebコンテンツはWebを通してユーザへと供給される文書や画像・音楽などのマルチメディアを指し，Webナビゲーションは，Webページ間のページ移動を制御するための枠組みのことを指す。ユーザインタフェースは，ユーザがWebブラウザを通してアプリケーションに要求を送り，コンテンツの提供を受けるための枠組みである。

Webナビゲーションに関しては，従来はハイパーリンクに代表されるような静的なナビゲーションが主流として用いられてきたが，近年のWeb技術の発展に伴って，スクリプトによって制御される動的なナビゲーションの利用が一般的となっている。静的ナビゲーションではユーザの操作に対して必ず同じページ移動が行われるが，動的ナビゲーションでは同じ操作であっても，他の要因に従って異なるページ移動が行われる。ナビゲーションに影響を与える要因には様々なものが考えられるが，本研究では，ユーザの認証状況およびWebページ上のフォーム部品に入力された値に依存するものとする。

2.2 例題アプリケーション

ここでは，簡単なオンラインショッピングサイトを実現するWebアプリケーションexAppを例題として，提案法によりナビゲーション構造をモデル化した結果について示す。アプリケーションの動作の概要としては，まず商品リストへと遷移し，希望の商品を選択する。そして，商品のサイズを選択してカ

ートへと追加する。最後にオーダーボタンを押し，注文を完了する。ここで，ユーザ認証(ログイン)を完了していないければ，注文を行うことはできない。

exAppの画面遷移図を図1に示す。このアプリケーションは，トップページ(TOP)，商品リストページ(LIST)，商品Aのページ(ITEM A)，商品Bのページ(ITEM B)，カート表示ページ(CART)，オーダー完了ページ(ORDER)，ログインページ(LOGIN)，エラーページ(ERROR)，そして個人ページ(MYPAGE)の9つから構成される。ページ間のナビゲーションを表1に示す。例として，(1)のナビゲーションは，トップページにおいてリンクLISTがクリックされると，商品リストページへと移動することを示している。

exAppにおいて想定するユーザ操作を表2に示す。exAppにおけるユーザ操作は，ハイパーリンクのクリック，ラジオボタンのチェック，ボタンの押下，そしてテキストボックスへの入力の4種類であり，ページ毎に可能な操作が異なる。

また，商品A，Bのページおよびログインページはフォーム部品をもつ。フォーム部品とは，ラジオボタンやテキストボックスなど，Webサーバに対してユーザやクライアントがデータを送信するための機能である。各ページがもつフォーム部品およびその型と定義域を表3に示す。商品AおよびBのページはラジオボタンSIZEをもち，取り得る値はSとMの2通りである。ログインページは2つのテキストボックスIDおよびPWをもつ。HTMLで実装されたテ

表1 exApp のナビゲーション

No.	遷移元	遷移先	操作	条件	認証
1	TOP	LIST	LIST をクリック		
2	TOP	CART	CART をクリック		
3	TOP	LOGIN	LOGIN をクリック	ログオフ状態	
4	TOP	MYPAGE	LOGIN をクリック	ログオン状態	
5	LIST	TOP	TOP をクリック		
6	LIST	CART	CART をクリック		
7	LIST	ITEM A	ITEM A をクリック		
8	LIST	ITEM B	ITEM B をクリック		
9	ITEM A	TOP	TOP をクリック		
10	ITEM A	LIST	LIST をクリック		
11	ITEM A	CART	CART をクリック		
12	ITEM A	CART	Add to Cart を押す	A SIZE が S	
13	ITEM A	CART	Add to Cart を押す	A SIZE が M	
14	ITEM B	TOP	TOP をクリック		
15	ITEM B	LIST	LIST をクリック		
16	ITEM B	CART	CART をクリック		
17	ITEM B	CART	Add to Cart を押す	B SIZE が S	
18	ITEM B	CART	Add to Cart を押す	B SIZE が M	
19	CART	TOP	TOP をクリック		
20	CART	ORDER	Order を押す	ログオン状態	
21	CART	LOGIN	Order を押す	ログオフ状態	
22	ORDER	TOP	TOP をクリック		
23	LOGIN	TOP	TOP をクリック		
24	LOGIN	TOP	Submit を押す	ID と PW が正しい	ログオン
25	LOGIN	ERROR	Submit を押す	ID か PW が誤り	
26	ERROR	TOP	TOP をクリック		
27	MYPAGE	TOP	TOP をクリック		

表2 exApp のユーザ操作

No.	操作	ページ
1	TOP をクリック	LIST, ITEM A, ITEM B, CART, ORDER, LOGIN, ERROR, MYPAGE
2	LIST をクリック	TOP, ITEM A, ITEM B
3	ITEM A をクリック	LIST
4	ITEM B をクリック	LIST
5	CART をクリック	TOP, LIST, ITEM A, ITEM B
6	LOGIN をクリック	TOP
7	S をチェック	ITEM A, ITEM B
8	M をチェック	ITEM A, ITEM B
9	Submit を押す	LOGIN
10	Order を押す	CART
11	Add to Cart を押す	ITEM A, ITEM B
12	正しい ID を入力	LOGIN
13	正しい PW を入力	LOGIN
14	誤った ID を入力	LOGIN
15	誤った PW を入力	LOGIN

表3 exApp のフォーム部品

No.	ページ	名前	型	定義域
1	ITEM A	A SIZE	ラジオボタン	S, M
2	ITEM B	B SIZE	ラジオボタン	S, M
3	LOGIN	ID	テキスト	正, 誤
4	LOGIN	PW	テキスト	正, 誤

キストボックスでは自由入力が可能であるが、画面遷移図を記述する際には定義域を抽象化して明示的に与えることが一般的である。exApp では、ID および PW の定義域を、正常値(valid)と異常値(invalid)の2通りに抽象化して与えている。

ナビゲーション(12)(13), (17)(18), そして(24)(25)は、フォーム部品に入力された値に依存するナビゲーションである。(12)(13)では、ボタン Add to Cart を押下するという操作に対して、ラジオボタンの値に依存してその後の処理が異なる。も

し S がチェック済みであれば、商品 A(S) がカートへと追加され、M がチェック済みであれば、商品 A(M) がカートへと追加される。(17)(18)も同様である。(24)および(25)では、正しい ID・PASS が入力されているか否かによって処理および遷移先が変化する。一方、(20)(21)は認証状況に依存するナビゲーションである。ボタン Submit を押下するという操作に対して、ユーザがログイン状態であればオーダー完了ページへと移動するが、非ログイン状態であればログインページへと遷移する。

3. ステートマシン図を用いたモデル化

ステートマシン図を用いて動的な Web ナビゲーションをモデル化するためには、Web ナビゲーションを構成する要素であるページ移動、認証管理とユーザ操作の振る舞いに加え、ナビゲーションの制御に用いられるユーザの認証状況とフォーム部品の値を表現する必要がある。

本手法では、ページ移動、認証管理、そしてユーザ操作をそれぞれ個別にステートマシン図としてモデル化する。ページ移動のステートマシン図では、状態が Web ページを表し、遷移がページ間の移動を表す。認証管理のステートマシン図では、状態がユーザの認証状況を表し、遷移が認証状況の変化を表す。そして、ユーザ操作のステートマシン図では、状態はユーザの状況を表し、遷移はユーザによる操作の実行を表す。提案するモデルでは、ユーザ操作をメッセージとして表す。その上で、ユーザ操作を表すメッセージをユーザ操作のステートマシン図からアクションとして送信し、ページ移動のステートマシン図でイベントとして受信することで、ユーザ操作に伴う Web ページ間の移動を表現する。ユーザの認証状況は、前述の通り認証管理のステートマシン図において表す。フォーム部品の値はフォームが所属する Web ページ内のみにおいて有効であるため、ページ移動のステートマシン図において、Web ページに対応する状態のサブ状態として表す。

得られるステートマシン図の一般形を図 2 に示す。図 2 (a) に示すように、ページ移動のステートマシン図では Web ページの一つ一つを状態で表し、それらを遷移で接続することでページ間の移動を表す。Web ページがフォーム部品をもつ場合、図 2 (b) に示すように状態をフォーム部品ごとに領域へと区切り、領域内のサブ状態としてその値を表す。ユーザ操作のステートマシン図は、図 2 (c) に示すように、ユーザの状況を表す一つの状態と、操作の実行を表す自身への遷移で構成される。また、認証管理のステートマシン図は、図 2 (d) に示すように、ユーザの認証状況を表す 2 つの状態と、その変化を表す遷移で構成される。

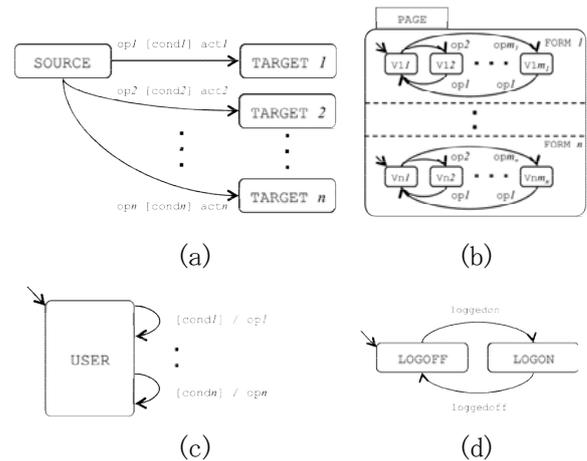


図 2 得られるステートマシン図の一般形

4. 適用実験

4.1 モデル化されたステートマシン図

提案法により exApp をステートマシン図によりモデル化した。図 3 に得られたステートマシン図を示す。図 3 (a) は、ページ移動を表すステートマシン図である。図 1 のトップページ(TOP)、商品リストページ(LIST)、商品 A のページ(ITEM A)、商品 B のページ(ITEM B)、カート表示ページ(CART)、オーダー完了ページ(ORDER)、ログインページ(LOGIN)、エラーページ(ERROR)、そして個人ページ(MYPAGE)の 9 つのページは、それぞれ状態 TOP, LIST, ITEM_A, ITEM_B, CART, ORDER, LOGIN, ERROR, そして MYPAGE としてモデル化される。

表 1 に示された 27 種のナビゲーションは、それぞれ状態間の遷移としてモデル化されている。ナビゲーションを引き起こすユーザ操作をイベント、ナビゲーションを行う条件をガード条件、そしてナビゲーションに伴って実行される処理をアクションとしてモデル化を行う。また、ユーザ操作に伴うフォーム部品の値の変化も同様にユーザ操作をイベントとするサブ状態間の遷移としてモデル化している。

表 2 に示された 15 種のユーザ操作は、メッセージとしてモデル化される。リンク TOP, LIST, ITEM A, ITEM B, CART, そして LOGIN のクリックは、メッセージ click_TOP, click_LIST, click_ITEM_A, click_ITEM_B, click_CART, そして click_LOGIN としてモデル化される。ラジオボタン S および M のチェックはメッセージ check_S および check_M として

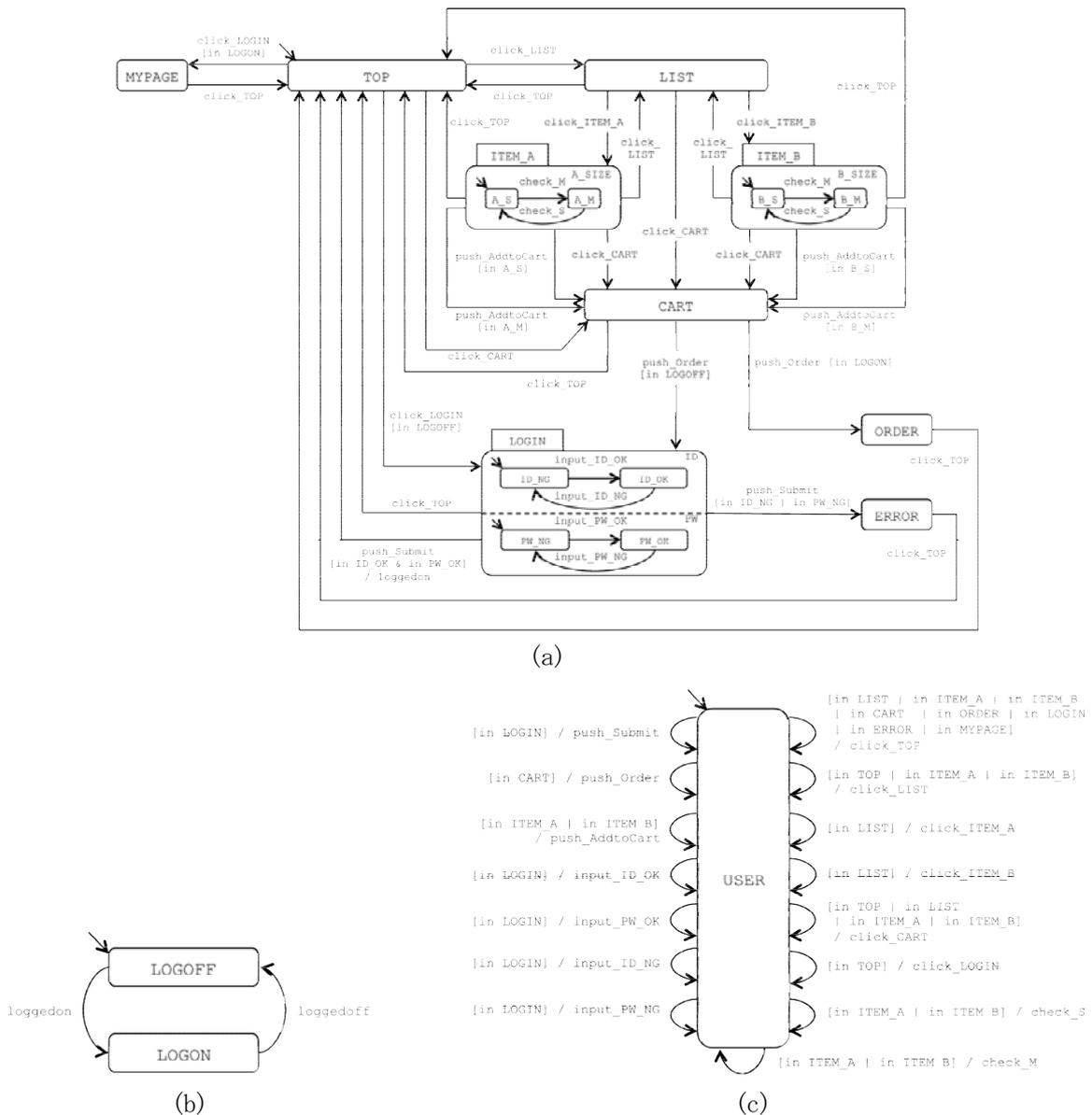


図3 exApp をモデル化したステートマシン図

モデル化される。ボタン Submit, Order, そして Add to Cart の押下はメッセージ push_Submit, push_Order, そして push_AddtoCart としてモデル化される。テキストボックスへの正しい ID および PW の入力はメッセージ input_ID_OK および input_PW_OK として、誤った ID および PW の入力はメッセージ input_ID_NG および input_PW_NG としてそれぞれモデル化される。

図3 (b)は、認証管理を表すステートマシン図である。認証済みであることを表す状態 LOGON と未認証であることを表す状態 LOGOFF をもつステートマシン図によってモデル化される。

図3 (c)は、ユーザ操作を表すステートマシン図である。表3に示した15種のユーザ操作がそれぞれ1

つの遷移によってモデル化されている。

4.2 動作検証およびテストパターン生成

Web ナビゲーションをステートマシン図によってモデル化する大きな利点の1つは、これまでに開発されたステートマシン図を対象とした自動検証手法やテスト生成手法を利用することで、動作検証やテストパターンの生成が可能となることである。

まず、SAL の検証ツール sal-smc を用いて Web ナビゲーションの動作検証を行った。まず、「未認証状態のときはオーダー完了ページには到達できない」ことについて検証を行った。sal-smc による検証の結果、この特性は満たされていることが証明された。次に、「TOP から ORDER へと到達できるか」などといった各ページ間の到達可能性についても検証を行っ

た. sal-smc による検証の結果, 「MYPAGE から LOGIN へ」「MYPAGE から ERROR へ」については到達不可能という結果が出力された. この誤りの原因は, 例題アプリケーションには認証解除を行うためのナビゲーションが含まれていないことである. そのため, 認証済みとなった後は未認証状態に戻ることができず, 未認証状態でのみ遷移が可能となるログインページやエラーページには到達することができない.

次に, SAL のテスト生成ツール sal-atg を用いて, テストパターンの生成を行った. sal-atg では, SAL プログラムに追加された補助変数に対して, 指定された補助変数の値を全て真とするような入力値の組み合わせをテストパターンとして生成する. したがって, 例題アプリケーションの各ナビゲーションに対して二値変数を定義し, ナビゲーションが実行されたときにその変数が真となるよう解析対象システムを記述することで, 全てのナビゲーションが実行されるようなテストパターンを生成できる. sal-atg による処理の結果, 長さ 52 のテストケースが 1 つ生成された. テストケースの一部を図 4 に示す. テストケースの変数はユーザ操作を表したイベントに対応している. したがって, このテストケースは LOGIN のクリック, TOP のクリック, …というユーザ操作

を順番に実行することを表している. このテストケースを実行することで, 表 1 の 27 のナビゲーションを全て実行することが可能である.

5. おわりに

本研究では, Web アプリケーションの自動テスト環境の構築を目的とした, UML のステートマシン図によるナビゲーション構造のモデル化手法を開発した. 本手法では, Web ナビゲーションのページ移動と認証管理, そしてユーザによる操作をそれぞれ個別のステートマシン図で表し, メッセージによる相互通信を行うことでユーザ操作や認証状況に依存したナビゲーションの振る舞いをモデル化できる. 適用例として, オンラインショッピングサイトを提案法によるモデル化を行い, 得られたモデルに対して解析ツール SAL を用いて検証およびテスト生成を行った結果について示した. また, 本研究の成果を学術論文へとまとめ, 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌) に投稿し, 掲載されている^[7].

参考文献

- [1] S. Mellor *et al.*: MDA Distilled, Principles of Model Driven Architecture, Addison-Wesley Professional (2004)
- [2] J. Rumbaugh, I. Jacobson and G. Booch: Unified Modeling Language Reference Manual, The Pearson Higher Education (2004)
- [3] E. M. Clarke, O. Grumberg and D. Peled: Model Checking, MIT press (1999)
- [4] W. Chan *et al.*: Model Checking Large Software Specifications, IEEE Trans. Softw. Eng., Vol. 24, No. 7, pp. 498-520 (1998)
- [5] G. Hamon, L. D. Moura and J. Rushby: Generating Efficient Test Sets with a Model Checker, Proc. of SEFM 2004, pp. 261-270 (2004)
- [6] S. Bensalem *et al.*: An overview of SAL, Proc. of LFM 2000, pp. 187-196 (2000)
- [7] 横川智教, 佐藤洋一郎, 有本和民: 検証およびテスト生成の自動化を考えたステートマシン図による Web ナビゲーションのモデル化, 電気学会論文誌 C, Vol. 136, No. 3, pp. 423-433 (2016)

```
1 tests generated: total length 52
All test goals discharged.
=====
Path
=====
Step 0:
--- Input Variables (assignments) ---
click_TOP = false
click_LIST = false
click_ITEM_A = false
click_ITEM_B = false
click_CART = false
click_LOGIN = true
check_S = false
check_M = false
push_Submit = false
push_Order = false
push_AddtoCart = false
input_ID_OK = false
input_PW_OK = false
input_ID_NG = false
input_PW_NG = false
-----
Step 1:
--- Input Variables (assignments) ---
click_TOP = true
click_LIST = false
-----
:
Step 2:
:
-----
```

図 4 得られたテストケースの一部

実感を伴う水害用デジタル避難ガイドの開発（2）

岡山県立大学デザイン学部

齋藤 美絵子

AR 技術を活用したモバイル防災アプリの現状において、AR の役割や機能が明確にされていないという問題がある。本研究では、文献および事例調査により洪水における防災教育に有用な AR アプリの課題とその解決策について検討し、被験者実験により検証した。その結果、AR を用いたシミュレーション画像とそれに紐づく情報を同一画面に表示することで内容理解に効果があること、シミュレーション画像の表現によって内容理解や防災意識の向上に僅かな差が生じることが分かった。

1、はじめに

バーチャルリアリティ技術の一つである Augmented Reality（以下 AR という）は、1990 年には命名され^{*1} 実現されていた技術ではあるが、その特殊性のため一般社会の日常生活と直接関係することが少なかった。しかし、2000 年以降、スマートフォンの高性能化とその普及に比例するように一般社会への普及が加速した。ユーザに特別な設備や能力を求めることなく使用することができる「モバイル AR」が実現したことで人々の関心は急速に高まりつつある。

そのような中、相次ぐ自然災害に対する国民一人ひとりの自助力と防災意識を向上するべく、防災のためのスマートフォンアプリが多数開発され無料で公開されている。近年では特に、AR の利点といわれる「直感的なわかりやすさ」に注目し、AR 技術を用いた防災アプリが開発され始めている。現在、日本で公開されている「防災」に関する iPhone アプリは 300 個に迫り、そのうちの 1 割程度に AR 技術が活用されている。

しかし、現時点では防災アプリにおける AR 活用はまだ開発途上といえ、その役割や効果について整理されていないことから、必ずしも効果的な表現形態

になっていないという問題がある。

本研究では、平常時に使用することを前提とした、災害対策や個人の自助力向上に有用な防災 AR アプリについて必要な要素を明らかにすることが目的である。なお、災害の種類は洪水とする。

以下本稿では、2 章で既存の防災 AR アプリの問題点について述べ、3 章では仮説として防災 AR アプリに必要な要素を挙げる。4 章では、被験者実験について説明し、その解析を 5 章、結論を 6 章で述べる。

2、現状の防災 AR アプリとその問題点

現在、iPhone 用に無料で公開されている防災 AR アプリ 23 個を対象に、誰が何のためにそのアプリを提供しているのか、どのような AR 技術と表現が使われているのかを中心に、以下 7 項目について調査した。

- ① 防災 AR アプリの目的
- ② AR 機能とその見せ方
- ③ AR の形式（ロケーションベース型、マーカ型、マーカレス型の別）
- ④ AR 機能の利用条件
- ⑤ シミュレーション画像の有無（災害想定画像が重畳されるかどうか）

⑥ ナビゲーション機能の有無(エアタグによる情報提示を含む)

⑦ AR アプリの管理者や発行元

2-1、防災 AR アプリの特徴

調査した防災 AR アプリの主な特徴をまとめると次の3点となる。

まず1つめは、平常時の利用を想定しているものが主流だということである。リアルタイムに気象情報と連動するアプリや一部機能は存在するが、緊急時に実用性をもったものは株式会社島津ビジネスシステムズが開発した『アメミル』のみであった。なお、このアプリは月額の有料会員に登録すると1時間先の雨量予測を見ることができ、無料会員は得られる情報が限られる。現状では、緊急時に実用性をもつ AR アプリが無料で公開されていないことがわかった。

2つめの特徴は、ロケーションベース AR (当該地でのみ機能する、GPS など位置情報を利用したもの) である。その大きな理由は、防災 AR アプリのほとんどが自治体の発行するハザードマップの応用展開であるからだと考えられる。任意の地点で「この場所は洪水時にどのくらいの浸水があるのか」という情報を表示する機能であることから、GPS との連動は必然といえる。

3つめの特徴は、シミュレーション機能とナビゲーション機能の両方を備えていながら、それぞれの役割が曖昧なことである。まず、シミュレーション機能として浸水を想定した画像がどのアプリも類似しており、水色透過画像をカメラファインダに重畳したもので、水害のリアリティは低い(図1)。そして、ナビゲーション機能とうたっているものも、エアタグを用いた避難場所表示のみで具体的な誘導指示や誘導機能はない(図2)。

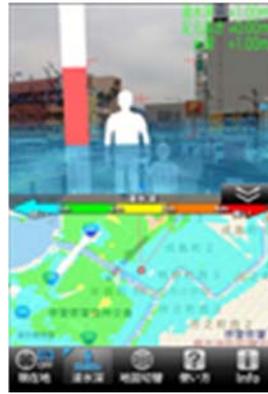


図1 浸水の表現



図2 避難所の表示

2-2、現状の問題点

これらの特徴から、現状の AR 災害アプリの主な問題点は以下の2つと考えられる。

まず1つめは、現状の多くのアプリが予想浸水深の情報や避難所の場所や方向など、データを AR によって可視化しているところで留まっており、避難時の行動に関する指示をはじめとする災害知識を得るためのコンテンツは AR 機能とは異なるページや階層で解説されていることである(図3)。この構造により、別々のページやメニューで得た情報および知識を紐付けて理解することは受け手に委ねられ、多くのユーザにとって具体的な知識の習得やその後の行動に結びつけにくいことが問題といえる。



図3 メニュー画面とノウハウ集の画面

2つめの問題として、シミュレーションであるにも関わらず、リアリティが必ずしも高くない画像表

現のみが用いられていることである。多くのシミュレーション機能は氾濫水を表すのに実際とは異なる水色の透過画像を用いている。これは浸水時に水中がどうなっているかを分かりやすく示すためであると考えられる。しかしながら、実際の水は濁った泥色であり、水中の危険箇所などが避難者からは分からない難しい状況になることが透過画像では伝わらない。これら異なった表現法の防災教育への有効性が明らかになっておらず、表現として不適切な可能性がある。

3、防災 AR アプリに必要な要素

平時に防災教育目的で使用することを前提とした防災 AR アプリの改善に向け、前章であげた問題に対する解決策を提案する。

第一の問題に対しては、AR を用いて表示するシミュレーション画像とそれに紐づく災害知識を関連づけて表示する構成にすることで解決を図る。さらに、「現実の景色」→「AR による氾濫シミュレーション画像」→「文字によるインストラクション」と段階的に同一画面上に表示する構成とすることで、AR の利点といわれる「直感的なわかりやすさ」に「理解の確実性」を付加することができる考える。

第二の問題に対しては、シミュレーション画像として現状の多くの防災 AR アプリで表示される水色透過画像の効果および実際の氾濫時に近い泥水画像の効果を明らかにすることで解決を図る。「ドアが開けられなくなる水位は地面から 30cm」といった知識情報と、「浸水後の避難時は水中が見えないため脱げない紐靴を選ぶこと」といったシミュレーション情報では同じ画像を用いて説明することが適切とは考えにくいことから、「知識情報」は浸水時に水中がどうなっているかを視覚的に分かりやすく示す水色透過画像が効果的であり、「シミュレーション情報」はリアリティのある泥水の画像を提示することとする。

4、実験

解決策 1 と 2 の効果を検証することができる実験用コンテンツを作成し、それぞれの効果を評価する。

まず、具体的なインストラクションの有無についてその効果を検証する。AR 画面にインストラクションを付加するものとししないものとは内容理解の効果が異なるのか、別々の被験者群にそれぞれの実験用教材を閲覧させ、実験後に実施するテストの得点により評価を行う。

次に、解決策 2 については、AR で重畳するリアリティ (CG 表現) の違いが①内容理解および②意識向上に与える効果を明らかにする。ここで、①の内容理解については、位置や深さに関する「知識情報」と、状況把握のための「シミュレーション情報」とを大きく 2 つに分け、それぞれに対して水色画像と泥水画像では理解に差が出るのか、また、情報と画像の効果的な組み合わせがあるのかについて、実験後に実施するテストの得点により評価を行う。また、②の意識向上については実験前後に実施したアンケートの比較や自由記述の感想から分析する。

4-1、実験材料

国土交通省の「ハザードマップ作成の手引き」に記載されている住民へ周知されるべき情報から解説が望まれる項目を選出して『洪水対策のための実験用教材』を制作した。形態は AR アプリを模したウェブサイトで、内容は以下の 6 項目とした。なお、前半の 3 項目が「知識情報」、後半の 3 項目が「シミュレーション情報」と分類する。

(1) 大人にとって歩行が難しくなる水位の目安は 50cm であること。

(2) 大人にとってドアが開けられなくなる水位の目安は 30cm であること。

(3) 用水路付近で冠水時に避難できる水位の目安は 10cm であること。

(4) 避難時の履物は脱げにくい紐靴を選ぶこと。

(5) 避難時の服装は水を通す素材を選ぶこと。

(6) 浸水後の避難時には足下を確認する長い棒を持っておくこと。

実験用教材はA～Cの3種類を用意した。

A：現実の景色に水色の透過画像を重畳して見せる。既存の防災ARアプリに最も多い表現（図4）。

B：Aの重畳画面に文字によるインストラクションを付加して見せる（図5）。

C：Bと同じ構成で、重畳するCGを水色透過画像ではなく泥水不透過画像を用いて見せる（図6）。



図4 実験用教材A



図5 実験用教材B



図6 実験用教材C



図7 項目タイトル

インストラクションの有無による効果を検証する際はAとBを比較、リアリティの効果を検証する際はBとCを比較するよう、検証する要素以外は統一して作成した。

また、実験用教材A～Cすべての冒頭に目次を設けると共に各項目にタイトル画面を設け、どの群の被

験者でも表示内容について事前に心構えや想像ができるようにした。特に実験用教材Aにはインストラクションが無い場合、何について考えるためのAR画像なのかを知らせる役割となる（図7）。

さらに、ARを模したCG画像が重畳される前の通常の風景写真を事前に表示するようにした。つまり、実験材料は、[項目タイトル] → [通常の風景画像] → [ARを模したCG画像] → [インストラクション（BとCのみ）] という流れで閲覧させる。

4-2、被験者

18～24歳の大学生78名が参加した。これは、平成27年度に岡山県が実施した「県民満足度調査結果（防災対策編）」より、災害に対する備えを実施しているかという質問に「特に対策をしていない」と回答した年代は20歳代が4割程度（37.0%）と高くなっており、被験者の災害対策能力にばらつきが出にくいと考えたためである。

4-3、実験手続き

課題1（学習課題）：被験者をA～Cの3群に分け、それぞれに対応する実験用教材A～Cを1回通り閲覧させた。閲覧時間に制限はないが閲覧回数は1回に限った。これはARが「直感的な理解」を助けるツールとして期待されていることと、閲覧回数による理解のばらつきを避けるためである。

課題2（計算課題）：課題1を終えた被験者は即座に300から3ずつ引いた答えを次々と計算する作業を1分間行った。これにより、単なる暗記であるか内容を理解し知識習得に至っているかを区別する。

課題3（再生課題）：課題2を終えた被験者は、その内容を理解し記憶しているかどうかを確認するためのテストに取り組んだ。また、実験用教材に対する主観的な評価に関するアンケートに回答した。

以上、この実験手続きについては、認知心理学の先行研究^{*2}を参考にした。

5、実験結果

5-1、インストラクションの有無による効果

まず、被験者 A 群と B 群の正答率を比較する。A 群は、6 項目の正答率は平均で 27%であったことから、インストラクションなしで具体的な知識を得ることは困難であることがわかる。しかし、項目 4 の「避難時の履物はどんな種類を選ぶべきか？」という問いに正解することができた被験者が 17 名 (65%) と 6 割を超えている点については、「脱げにくさ」を根拠に正解した人が 7 名 (27%)、怪我の恐れを考慮して回答した人は 4 名 (15%) であったことから、インストラクション無しの水色透過画像でも水中で履物が脱げる恐れを想像することができることが読み取れる。

B 群の正答率は、6 項目の平均で 87%であった。しかも、A 群では項目によって正解にばらつきが見られたが、B 群では項目による正解のばらつきは見られなかった。これにより、AR 画像とインストラクションを併用することで、項目を問わず内容理解に効果があるといえる。

次に、主観評価として「今回の画像を見ることは水害対策を理解することに役立ちましたか？」という質問に「かなり役立った／やや役立った／あまり役立たなかった／全く役立たなかった」までの 4 段階で評価させたところ、A 群は、「かなり役立った／やや役立った」とポジティブに回答した人が合計で 21 名 (80%)、「あまり役立たなかった」とネガティブに回答した人が 4 名 (15%) であったのに対し、B 群はポジティブな回答が 26 名全員 (100%) から得られた。

さらに、自身が閲覧した実験用教材について「気に入った点」と「気に入らなかった点」について複数回答可として自由記述させたところ、A 群から「画像だけでは何を読み取れば良いのかわからない」という主旨の記述が 12 名 (46%) からあった。これに対し、B 群からは「何を読み取ればよいのかわから

ない」という主旨の記述は無かった。さらに、「段階的な情報提示が理解を助けた」という主旨の記述が B 群と C 群合計 8 名 (30%) からあったこと、実験用教材 6 項目の閲覧時間が A は平均 1 分 57 秒、B は 2 分 24 秒、C は 2 分 05 秒であったことから、B と C は文字を読まなければならなかったにも関わらず長い時間を要せず正解したという結果から、「直感的なわかりやすさ」に「理解の確実性」を付加できたといえる。

5-2、リアリティの効果

AR を用いたシミュレーション画像のリアリティについて効果を調べるため、被験者 B 群の正答率と C 群の正答率を比較する。被験者 B 群の 6 項目の正答率は平均で 87%であったのに対し、被験者 C 群の 6 項目の正答率は平均で 89%と差は見られなかった。さらに、前半 3 項目は知識情報、後半 3 項目はシミュレーション情報に関する質問であるので、我々の仮説によれば、前半は水色透過画像、後半は泥水画像の効果がそれぞれ高いことが予測されるが、実験結果を見ると、前半である項目 1 と 3 についても泥水画像の C 群の正答率が平均 94%と B 群よりも高く、後半である項目 4 については C 群よりも B 群の方が僅か 1 名ではあるが正解者が多かった。よって、テストの正答率からは立証できなかった。しかし、項目 2 の正答率について注目したい。項目 2 は「浸水時、大人の手でドアが開けられなくなる水位は何センチ以上か？」という問いで、泥水画像を用いた C 群で正解できた被験者は 15 名 (57%) であった。正答率に加えて、主観評価を得るための自由記述においても、「浸水時の画像が重なった部分が全くわからなくなる」「もう少し透明にしてほしい」といった、泥水が不透明であることを気に入らないと記述した人が 4 名 (15%) おり、不透明であることが深さの目安や印象を妨げてしまう恐れがあると判断できる。なお、前半 3 項目のうち項目 2 のみ不正解

が突出しているのは、項目1と3には被験者にとって水位の目安として利用できる大人と子どものシルエットを表示したが項目2には表示しなかったため、水位や深さに関する手がかりがなかったことが影響していると推察できる。なお、項目2に人のシルエットを表示しなかったのは写真の構図がクローズアップであったためである（図8）。



図8 浸水画像の透明・不透明の違い

また、水色の透過画像を用いた実験用教材 A・B の被験者による主観評価では、「水にリアリティがない」といった主旨の記述が合計で6名（23%）いたが、C群にはリアリティがないという記述は見られず、「水の濁り具合が実際に近い」「水の表現が良い」といった記述や「実際の状況がイメージしやすかった」という主旨の記述が10名（38%）からあった。これらの結果から、水位や深さについての目安を伴って理解したい情報は透過画像の方がユーザにとって負担が少なく、水害をイメージしやすいのは泥水画像であるといえる。

さらに、主観評価の項目で、「今回と同じような形態（閲覧したもの）で他の内容について機会があれば見てみてもよいと思いますか?」、「今後、水害やそれ以外の災害に対する対策について知ろうと思えますか?」という質問に「とてもそう思う/ややそう思う/あまり思わない/全く思わない」の4段階で評価させたところ、「とてもそう思う/ややそう思

う」と回答をした人がB群に比べてC群の方が多かった。それぞれ微増ではあるが、事前アンケートで「水害対策で知っていること・実際に行っていること」を記入させた結果、B群の被験者は17名（65%）が記入をし、C群の被験者は15名（57%）が記入しており、災害対策についての意識向上においては、B群は17名（65%）から24名（92%）へ増え、C群は15名（57%）から25名（96%）へ増えたことになる。この結果から、ユーザの防災意識向上においては、リアリティのあるAR画像の方が効果的であるといえる。

6、結論

実験により、AR画像とそれに紐づく情報を同一画面へ表示することで内容理解に効果があることがわかった。シミュレーション画像のリアリティによって内容理解を助ける情報の種類が異なるという仮説においては、大きな差はみられなかったが、このようなAR画像による比較実験を行った例は見当たらないため、この実験は有意義であったと考えている。また、水害をイメージしやすく、今後の災害対策にたいする姿勢や意識の向上に効果があるのはリアリティのある画像であるといえる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり（財）ウエスコ学術振興財団から研究経費を助成していただきました。ここに記して感謝いたします。

参考資料

- *1 蔵田武志, 清川清, 大隈隆史 (2015) 『AR (拡張現実) 技術の基礎・発展・実践』科学情報出版.
- *2 林聖将, 石井健太郎, 開一夫 (2014) 『防災マニュアルの内容理解を促進する挿絵の条件』2014年度日本認知科学会第31回大会.

わが国との比較的視点で捉える台湾における歴史的町並み（老街）保存事業の分析研究

岡山県立大学 デザイン学部

西川 博美

台湾では「老街」と呼ばれ親しまれる日本統治時代に主に市区改正事業により形成された歴史的町並みを保存する事業が盛んである。それは地方都市の町並みにおいても盛んに町並み保存事業が実施され、「社区营造」と呼ばれるボトムアップのまちづくり政策が取られて、住民による主体的なまちづくり事業が強く反映されてきた。一方、わが国における町並み保存事業は、倉敷市の美観地区にも代表されるように、重要伝統建造物群保存地区といった保存政度で推進されてきた。台湾の町並みの最大の特徴は、店屋の立面にほどこされた濃密な装飾で、町並みの保存事業ではこれを修復することに注力されている。その立面装飾は、町並みの形成の経緯や年代により違いがあることがわかった。町並みの成立が、市区改正事業によるものではなく住民の主体的な建設であったものにも、立面に濃密な装飾を有していることがわかった。また一方で、1935年の台湾中部での大地震後に市区改正事業により建設された町並みでは、装飾が排除されていくが、それには建物の材料や構造の変化だけではなく、目指すべき町並みのイメージにも変化があったことを明らかにした。

1. はじめに

日本統治時代の台湾では、亭仔脚と呼ばれる軒下歩道を設置した店屋が連続する町並みが全島にわたり建設されている。それは、日本統治時代の建築制度である1900年に公布された「台湾家屋建築規則」によって軒下歩道の設置が義務づけられ普及したとされる。申請者はこれまで、実際の町並みの建設は、1910年以降、各地の市・街・庄で実施された市区改正計画の事業により実現していった状況を明らかにしてきた。その町並みは、建築制度と市区改正事業（都市計画事業）により計画的に建設されてきたものと考えられる。

現在の台湾で、その町並みが「老街」と呼ばれ、さまざまな保存事業が講じられて、観光資源にもなっている。申請者は、これまでその台湾の町並みの保存事業が、「社区营造」と呼ばれるボトムアップのまちづくり政策が取られて、また、住民による主体的なまちづくり事業が強く反映されてきたことを明らかにしてきた。また、町並みの保存事業では、その濃密とも言える独特な立面のデザインを保存修復することに注力されていることがわかった。

その立面のデザインは建設当時の建築規則においても、市区改正事業計画においても、立面装飾を必須のものとしての規定はなかった。ではなぜ、こうした特徴ある立面デザインが、当時、波及したのか。

そのことを明らかにするために、申請者は平成27年度期間中に2つの着眼点から研究を行った。まず一つ目は、とりわけ現在に観光地として栄えている老街の町並みが、市区改正事業の中での建設ではなく、自主的に亭仔脚の町並みを形成していった地域にもあることに着目し、その町並みの成立の経緯を整理して示すこととした。二つ目は、老街としてガイドブック等で紹介されながらも、観光地としては有名ではなく、店屋の改装が景観を優先する方法ではなく自由に行われているものが、1935年以降に建設された町並みに多くあることに着目した。台湾では繰り返し震災の被害を受けているが、それらの市区改正事業が、震災復興の過程で実施されているケースが多ことに着目し、町並みの形成において、この震災への対応にどのような影響があったのかを検証した。

2. 市区改正計画によらない町並みの形成について

台湾総督府の市区改正計画ではなく実施された町並み形成の事業の例を見てみると、現在も老街（歴史的町並み）と呼ばれ観光地になっているものに3つの町並みが存在する。それは、三峡老街（新北市）、新化老街（台南市）、湖口老街（新竹市）の例である。

三峡老街では、1915年に廳長に着任した達脇良太郎が、道幅の狭さ、建物の高さが不一致であること、

排水溝などの下水整備が整っていないことを見て、台湾総督府の市区改正計画とは別に、1916年に街区の建設・整備を実施し、街道沿いに亭仔脚をともなう店屋が連なる町並みが建設された。またその後も、鎮公所、農会や郵便局や学校といった公共施設も建設していった。ここでの町並みが、市区改正計画によるものでないことは、その道路が緩やかに湾曲していることからわかる。市区改正計画では、街区の整備にともない新たな道路を建設するのが一般的で、その場合はほとんどが直線的な道路となる。また、道幅は市区改正事業の場合は車の往来が可能な8m程度には拡幅されるが、ここでは4mに満たない道幅のままである。これは総督府によるトップダウンにより道路用地として寄付あるいは買収を行う方法ではなく、廳長が道路沿いの地主1軒1軒に掛け合い町並みを整備した事業であった。

結果的に、この道幅が広すぎず緩やかに湾曲した道沿いに、赤煉瓦造で1層建ての店屋が連なる町並みの風景が、現在観光客を集める要素になっているのである。



三峡老街の町並み

次に新化老街では、1920年に街の中央を南北に貫く道が倍の幅員に拡築され、沿道に亭仔脚を持った洋風立面の店屋が自主的に建てられていく。1921年に林茂己という商店主が、3階建ての店屋を建設したことが契機となり、その後、この建物の美観が評判となり、これを模範建築として、次々と洋風意匠を持った店屋が建てられた。この建設事業が市区改正計画によるものではなかったため、総督府から農会を通じて店屋一軒あたり2000円の無利息融資が実施された。なぜ新化街では市区改正計画が策定されなかったのか。1923年8月11日の台湾日日新報

では、市区改正は「従来幾回も試みられてきたが着手されなかった」とされる。市区改正の策定は台湾総督府によるが、実際の事業実施は街や庄が担うことになるが、財政事情が弱体な街や庄では、計画が策定されても事業実施が後送りにされることが一般的だったとされるが、新化街では、市区改正計画が策定されずにいたために、総督府からの直接の無利息融資の支援が受けられ、町並みが実現したということが言えそうである。現在も新化の町並みが修復・保存され、地域住民が日常的に利用する商店として存続し続けている要因は、この町並みの成立が総督府によるものではなく、住民等の自助努力によるものであり、現在にも、そのまちづくり的精神が受け継がれていることによるのではないかと判断できる。



現在の新化老街の町並み 1921年林茂己の商店

そして、上述と同様の自主的な町並みの建設ではあるが、近隣都市の市区改正の影響によるものと判断できるのが、湖口街のケースである。湖口街は現在の新竹県に位置した扇状地の端にある台地である。清の時代に台北から新竹まで鉄道が施設され、湖口に駅が設けられたことにより、街区が形成された。三峡街と同じく1916年に地元の行政により街区の改変が行われ、町屋の建設が進んでいった。ただし、ここでは市区改正事業と同様の整然とした街区形成が見て取れる。ここでは、清の時代から日本統治時代の1918年頃にかけて4段階に街区が形成されていたという。第一段階と第二段階で街の北東部の街区が形成されている。この部分は既存の街路を拡張したものと考えられる。それを基盤として、1916年から1918年にかけて、西方向へ新たに道路が建設され、統一された店屋の街区が形成される。この整然とした街区と街路の整備は、1913年に隣接する新竹街で市区改正事業が決定・実施されており、その影響を

うけたものであると判断できる。現在、湖口老街はその統一的なデザインの店屋が連続して並ぶ風景が評価され、駅や市街地から離れた立地にもかかわらず、観光客を集めているが、ここにも住民らの自助努力による町並みの形成の意思が現在にも引き継がれていると考えられる。



湖口老街の町並み

市区改正計画によらないで亭仔脚の型式を基盤とする町並みが形成された例は、数は限られるものの上記の例だけにとどまらなると考えられる。しかし、現在も「老街」として親しまれるものの例としては、この3例を挙げることができる。

3例においては、街区の整備や道路の建設・整備において、その整備の程度に差があることが認められるが、それは市区改正計画のような統一的な計画標準が存在しなかったためであると理解できる。一方で3例とも、濃密な洋風立面のデザインを有していることが共通している。このことは、台北市に実現した亭仔脚の町並みデザインが、制度や事業計画という枠組みを超えても広く波及していく要素であったことを示す事実であると言える。

この3例は、現在にもその町並みの保存事業が活発であり、建設当時においても、現在においてもまちづくりの要素が大きいことが伺えるのである。

3. 地震災害復興による町並みの形成

日本統治期に、台湾では繰り返し震災の被害を受け、これらの震災の復興の過程で市区改正事業が実施されているケースが多い。この地震を契機とした市区改正事業からの町並みの形成において、この震災被害によりどのような影響があったのかを検証した。とりわけ、特徴ある亭仔脚（軒下歩道）の町並

み景観が、震災復興の中で、どのような影響を受け、どのように変化していったかを考察した。

震災が市区改正事業に最も大きな影響を与えたと考えられるのが、1935年の4月21日に発生した新竹から台中にかけての大震災(台湾中部震災)では、死者が3294名、被災民26万人にのぼった。建築物の被害も甚大であり、全壊家屋は17,835戸とされる。そのため、台湾総督府は、いち早く4月29日に、復興のために震災復興委員会を設置する。そして、その復興計画の中で、被災地において戸数500戸以上で、危険家屋が5割を超え、かつ市区改正事業施行の経済的能力を有する19の街・庄に対して、積極的に市区改正計画を策定し、実施した。さらにその費用について国庫および新竹州費からそれぞれ1/3の補助を与えることを通達した。被災地が広範にわたったこともあり、大がかりな市区改正計画の促進と誘導が計られた。

台湾における市区改正計画が、1937年に公布される「台湾都市計画令」に向けて1931年ごろから、街・区全体に一貫した計画性が求められるようになり、それにともない店屋は構造を煉瓦造から鉄筋コンクリート造に改めながら建設されていく。台湾中部震災を契機とした市区改正計画の促進政策濃密な洋風立面のデザインを有していることは、こうした市区改正事業の変化をさらに促進するものであった。

この震災を契機として計画された市区改正計画は、街区の修復ではなく、ほとんど新設に近いものであった。多くの家屋が倒壊被害を受けた状況もあり、市区改正計画の中核となる街路の整備において、従来とは異なる街路網が整備された。

それにともない、新設や大幅に改築される街路沿いにおいては、被災家屋だけでなくすべての店屋が改築された。例えば、新聞報道によれば台中州の豊原街では、震災後1年経過した段階で、震災で大破した家屋1,259戸のうち復旧したのは222戸しかなかったが、それは市区改正事業の実施のためだと説明されている。つまり、市区改正事業として街路の改築が進む中で、まずは被害の有無にかかわらず店屋を除却、あるいは道路に面する部分の一部を除却する作業が進められていた。



豊原街の被害の様子



豊原街市区改正計画図

こうして、震災後の街・庄では、ほぼ新設に近いような形で、新しい町並みが登場した。では、その町並みは、かつてのものとのどのような違いがあるものとなったのか。町並みの最も大きな特徴となる亭仔脚（軒下歩道）の型式は、そのまま踏襲されるが、その材料や構造については震災時の状況が脆弱なものであると分析され、改善が求められていた。

『台湾建築会誌』に報告された分析によれば、店屋建築の被害は特に甚大なものであったとされ、その理由について、①亭仔脚部分の独立柱が脆弱なものであること、②母屋の壁と亭仔脚の壁（扶壁）が構造的に一体化されていないこと、③その亭仔脚の扶壁が過重でありほとんどが倒壊していることなどが指摘された。そこで、台湾総督府は、この状態を法令を使って改良しようとした。

建築物の材料および構造を規定する法律として「台湾家屋建築規則」が1900年に公布されていたが、これは台北城内の地域を対象に施行が始まった。その法律を、この震災を契機にして、市区改正計画の策定を指示した地方の庄・街にも施行することとした。具体的には、同規則の施行細則にある地方長官が同規則の施行地域を規定できる制度を使って、州知事が州令として同規則の施行と施工地域を、7

月1日に示した。これにより、亭仔脚はこの規則にしたがって新設された。同規則の規定にしたがい、亭仔脚の材料・構造は、震災で壊滅的な被害となった土角は禁止されるのはもちろん、煉瓦造は平屋のものに限られ、2階建て以上のは鉄筋コンクリート造にすることが義務づけられることとなった。

こうした材料・構造の規制により、煉瓦造が主流であったそれまでの亭仔脚をともなう町並みは、鉄筋コンクリートの風貌へと変わっていった。



1935年 市区改正後の鹿港の町並み

かつて、地理学者の富田芳郎は、1940年代に台湾全島で亭仔脚の町並みの調査を行い、「明治型」「大正型」「昭和型」という3類型を提示した。1925年からの昭和期に入ると、町並みの姿は大きく変容する。富田の観察によれば、「大正型」では煉瓦造のものが大半で赤い色を呈した町並みであったのに対し、「昭和型」では、コンクリート造のものとなり、グレー色の町並みとなった。これは、「台湾家屋建築規則」の施工地が震災を契機に広げられ、その規制を受けて変化したものだったと理解できる。「大正型」では独立した扶壁が設けられ、そこに細密な装飾が施されていたのだが、「昭和型」ではそうした扶壁が設けられず、装飾も細密なものがほとんど見られなくなるとされた。

亭仔脚の町並みは、現在「老街」と称され台湾では観光地化されたり保存運動が取り込まれたりする例が多くなったが、その景観的に最も重要な要素は、立面にほどこされた装飾である。擬洋風とも指摘されるその独自の装飾は、確かに台湾の町並みの特徴を示すものだが、それが鉄筋コンクリート造に変化することで姿を消していった。しかし、材料・構造の変化だけで装飾が消失していくことになったのか。

そこには、装飾を排することを目的とした運動が

あった。震災からの復興事業については、上記のように市区改正計画策定の指示や、「台湾家屋建築規則」の施行などの施策が取られたが、もう一つ重要な施策が、国庫や州などによる低利資金の融通による財政的な援助であった。これは総額で613万円という金額が、大蔵省により7月31日に決定されるが、その後この低利資金の申し込みが殺到したようすが新聞でも報じられている。

こうした政府による援助を受ける形で、被災民による自力更正運動がさまざまな形で呼びかけられるようになる。その運動の中で、装飾を排することが指摘されるようになったのである。台湾総督府は、被災民の「精神的指導」を行い、「国民的教化」を図ることで「復興精神」を強化するために、新竹、台中の両州知事に対して、5月17日付けで「震災地住民の自力更正運動ニ関スル件」という依命通達を発した。そこには、指導方法としてさまざまな事項が挙げられているが、その中で、住宅の改善として、「台湾家屋建築規則」により規制されている土角を排すること等とともに、「前面屋上の装飾を廃すること」とされている。つまり、亭仔脚の立面に装飾をほどこすことは、震災復興の復興精神の中で否定されたのである。それは制度として規制されたのではなく、精神運動の中で好ましくないものとされた。

この通達の後、新聞報道でも復興精神の重要性についての報道が目立つようになり、「災いを一転して明朗な自力更正」という見出しで復興していく新たな店屋等について紹介した記事では、「従来のような暗鬱な気分は全くけし飛んで了ひ極めて明朗な家屋となったことは誠に喜ばしい」と指摘されている。ここからうかがえるのは、煉瓦造で濃密な装飾がついたファサードは暗鬱なものとして評価されるようになっていった状況である。

このように、震災の復興における自力更正運動の中で、暗鬱なものから明朗なものへという、目指すべきデザインイメージの変化を受け、それまでの町並みに特徴的であった装飾が省かれていくことになったのである。

4. まとめ

日本統治時代の台湾では、亭仔脚と呼ばれる軒下歩道を設置した店屋が連続する町並みが形成され、それが現在、老街として親しまれ町並みの観光地となっている。その町並み景観の最大の特徴は亭仔脚の立面にほどこされた独特な装飾であるが、その装飾は、地域によって、あるいは町並みが建設された時期によって変化が伺える。

日本統治時代に台湾総督府による市区改正事業が74箇所で行われている。しかし、現在に老街として観光地になっているものには、その市区改正事業が実施されずに町並みが形成されてきたものもある。それらの事例を検証してみると、町並みの形成の段階においても、現在の町並み保存事業においても、まちづくりの性格が濃いことがわかった。

また、日本統治時代の台湾では、度重なる地震災害に見舞われた。その災害復興の中で実施された市区改正事業の中で、店屋は、構造を煉瓦造から鉄筋コンクリート造に改めながら建設され、装飾が排除されていった。しかし、材料・構造の変化だけで装飾が消失していったわけではなく、装飾を排することを目的とした運動があった。煉瓦造で濃密な装飾は暗鬱なものとして、鉄筋コンクリート造で装飾を省いたものが明朗なものとして評価され、それまでの町並みに特徴的であった装飾が省かれていった。

このようにして町並みの建設の経緯・時代により装飾の変化が見受けられた要因が明らかになった。

尚、2章の市区改正計画によらない町並みの形成については、2015年度日本建築学会大会[関東]にて、「台湾における市区改正計画によらない軒下歩道（亭仔脚）の町並み形成について」（西川博美、日本建築学会大会[関東]学術講演梗概集、pp. 59-60、2015年9月）で口頭発表を行った。また、3章の地震災害復興による町並みの形成については、東アジア建築文化国際会議 EAAC2015 光州にて、「The Earthquake Disaster Reconstruction and the Walk-Way under Eaves During Japanese Colonial Period in Taiwan」、(Hiromi NISHIKAWA、『EAAC 2015 GWANGJU』 East Asian Architecture Cultural International Conference 2015 (韓国)、査読有、p. 857-860、2015年11月)に掲載と口頭発表を実施し、研究の成果を発表した。

建築家ジェフリー・バワの建築言語に関する研究

岡山県立大学デザイン学部

岩本 弘光

(概要)

本研究は現代建築の発展に大きな足跡を記した、スリランカ人建築家ジェフリー・バワ (Geoffrey Bawa : 以下、バワという。) の建築作品に関する建築言語と空間構成原理に関する研究を行い、モンスーン気候、稲作、仏教文化など、スリランカと建築の成立基盤を共有する我が国の建築意匠、建築計画の発展に寄与することを目的とする。本研究の研究成果は当初の計画通り、「解説 ジェフリー・バワの建築」として平成 28 年 1 月 10 日付で彰国社より刊行された。刊行図書の仕様は B5 版、338 頁、カラー印刷、現地写真、原設計図を掲載。

(本文)

成果物の刊行図書抜粋をもって本文とする。

まえがき 003

1章

スリランカと建築家ジェフリー・バワ 009

- 01. スリランカの風土 010
- 02. スリランカの歴史と建築 016
- 03. バワはどのようにしてバワになったか 042
- エッセイ1 ウルリックへのインタビュー 050

2章

バワ建築を理解するための10の視点 055

- 01. スリランカ的なるもの 056
- 02. アニミズム 060
- 03. バワの建築思想 063
- 04. 場の解説 066
- 05. シンハラ建築とモダニズム建築の接点 069
- 06. 隠れた秩序 072
- 07. 形のない形 075
- 08. 境界の喪失 077
- 09. 建築語法 079
- 10. 美の源泉 082
- エッセイ2 イスマスとの出会い 084

3章

吹きわたる風 バワ作品25題 087

- 01 光のラビリンス No.11 088
- 02 南スリランカの散居 ドクター・シルバ邸 100
- 03 軽やかなスクリーン ビショップズ・カレッジ 104
- 04 市中の山居 イナ邸 108
- 05 沈黙なる饒舌 チャペル・フォー・グッドシエフアード・コンベント 116
- 06 愛され続けるバワデザイン ギャラリー・カフェ 124
- 07 巨岩の原始小屋 ボロンタラワ・エステート・バンガロー 130
- 08 インド洋に君臨するランドマーク ベントータ・ビーチ・ホテル 140
- 09 追い出されたリビング セレンディブ・ホテル 148
- 10 石柱の木造建築 マドゥライ・クラブ 152
- 11 ハイエンド・リゾートの原形 バトゥジンパール No.5、No.11 160
- 12 ケララの落胤 シーマ・マラカ 170
- 13 穿たれた壁 クラブ・ヴィッラ 174
- 14 記憶の庭園 No.87 178
- 15 谷間の協奏曲 インスティテュート・フォー・インテグラル・エデュケーション 184
- 16 水へのオマージュ トリトン・ホテル 190
- 17 国家のデザイン：シンハラ的なるもの 新国会議事堂 198
- 18 丘陵のシンフォニー ルフス大学 202
- 19 インド洋に浮かぶヴィッラ・ロトンダ コースト・ハウス 210
- 20 風景のプロセニアム カンダラマ・ホテル 214
- 21 海辺の中庭 ライトハウス・ホテル 226
- 22 水に浮かぶ回廊 ブルーウォーター・ホテル 234
- 23 形のないカタチ 赤い崖の家 244
- 24 バワの遺言 ラスト・ハウス 252
- 25 夢の庭園 ルスガンガ 260

エッセイ3 “4姉妹”は誰が設計したか 270

原図集 272

巻末資料 バワ年表、作品案内地図、文献リスト、索引 325

あとがき 336

目次

あとがき

一冊の本を上梓するのに長い時間がかかってしまった。バワ建築に初めて触れたのは「カンダラマ・ホテル」だったが、素っ気ないフレームにすぎない小学校のような建物が、何故に静謐な空間を生むのかとの素朴な疑問に、どうしても答えが見出せず、はたと考え込んでしまった。さながら、謎を歌って解けぬものを食い殺すギリシア神話「オイディプス王」のスフィンクスにバワが重なり、そこから謎解きの長い旅路が始まったというのが、理由にならない理由だ。

バワが設計したホテルに投宿しながら、曖昧な所在地名だけを頼りに何とか探して当て無理を頼んで見せてもらった名作や、スリランカ全島に残された古代仏跡などの建築遺産を訪ね歩いて、足跡を記した点が次第に集まって真っ白だったスリランカの地図がいつしか黒塗りの面となり、島の空気感が肌に馴染み始めたころ、少しずつバワの全体像が見えてきた。あてのない予感を頼りに北部の古都を巡っていると、そこにはバワ作品と同じ「匂ひ」のする清涼な空気感が溢れていて、今更ながらに彼がスリランカの嫡子であることに思い至った。すると、立ちこめていた霧の迷いが晴れたように急に目の前が開け、島の風土とバワ作品の揺るぎない関係、そして彼の作品の本質が垣間見えたような気がした。結局のところ、筆者の建築観はモダニズムから一步も外に出ておらず、視野狭窄におちいつていたのである。

困ったのは、バワ作品を形容するに相応しい言葉を探し当てることで、そこに思い至ればそれは即ち、バワ作品の本質を知ることと同義であり、「謎かけゲーム」が終わるのはわかっていた。結論として、筆者はバワ作品の中にある種の「アニミズム」を見たのである。「ある種の」と枕詞を付けねばならないのは、少なからず宗教的ニュアンスを帯びた「アニミズム」という言葉が、成立宗教以前の素朴な自然への畏れや敬いであるにせよ、抹香臭さとは無縁であったバワの作風にとって揺るぎない形容であるという確信がない故である。不幸にして筆者は彼の建築に相応しい他の言葉や概念を知らないのである。しかし、大きく深呼吸して胸いっぱい息を吸い込むように、バワは島の風土と自然を丸呑みしてそれを建築に表現してみたが、これを「アニミズム」と呼ばずして他にどのような形容があるのであろうか。硬直した建築理論に背を向け、相反するモダニズムとスリランカ伝統の建築言語を巧みに使い合わせたバワの建築作法は、ヴァナキュラーで土着的な環境に寄り添い、島固有の材料と技術に耳を傾けて構築しようとする精神構造に根差している。これは島の多神教的な秩序がバックグラウンドとなった、農耕的な調和を重んじるものであり、そうした多様性を重んじる寛容な精神が、近代と伝統、西洋技術と土着文化の相克を超えて、それらを融合することに成功したといってもいいのである。

当初、バワ作品を「解説」するに当たって、正道に導いてくれる建築理論の「杖」を探してみたが、バワ作品の本質を一突きにできるものは見当たらなかった。例えば、バワの建築手法は、B.ルドフスキーが『建築家なしの建築』で近代建築を批判した姿勢に通底しており、あたかもそれに呼応するかのような彼の作品には、今更ながらに驚きを禁じ得ないが、バワはそれを意識してデザインしていたわけではない。次いで、K.フランプトンが著した高名な批評では、「批判的地域主義」に相当する建築の定義を、「反・中心主義に対する合意」、「敷地に建てられた構造物によって規定される領域を強調する建築。“場所即形態”」と規定しており、それらはそのままバワ建築の在り様に符合するが、これについてもグローバルに同時発生した大きな現代建築の流れを彼が意識していたとは思えない。また、今世紀の地球環境問題を背景にした、建築のサステナビリティに回答する先駆例と読み解くことも可能であるが、彼の時代にはこの概念が成熟しておらず、こうした硬直した議論はむしろバワ作品を矮小化し、彼が愛した建築の悦びからひどく乖離するものであろう。つまり、バワが建築理論を否定したように、彼の作品もまたその外側に位置していたのであり、バワ作品の「解説」には権威づけられた建築理論ではなく、建築が拠ってたつ「場」と建築空間の本質を媒介する別の「何物」かが必要であった。恐らく、それが筆者の見た「アニミズム」の正体だったのである。

一方、これまでバワ作品は「トロピカル建築(熱帯建築)」と称されてきたが、そうした定義の出自と独り歩きが、バワ作品の理解を妨げミスリードしているのではないか、との疑念が終始頭から離れなかったことから、この問題について若干触れておきたい。まずは、「トロピカル」という言語の概念が英語と非英語圏の日本語では大きく異なっている点である。日本における外来語「トロピカル」の一般的な理解は、太陽が輝き透き通った水面に葉陰が風に揺れる、どこまでも開放的でポジティブな南国のイメージであろうが、英語の「トロピカル」は日本のそれとは大きく異なった概念である。D.ロブソンによれば、英語の「トロピカル」は少し前まで「植民地」と同義であり、少なからず蔑称のニュアンスがあったというのである(『Beyond Bawa』)。これは19世紀までにヨーロッパ人が植民地化した、インド、スリランカ、ミャンマー、インドネシアなど南アジア、東南アジア諸国はことごとく「熱帯」、つまり気候区分でいうところの「トロピカルゾーン」に属していたため、南アジア、東南アジア植民地域と熱帯気候が重なった状態を集約し、支配者たる植民本国側の眼差しと記憶を引きずった言語としての「トロピカル」だったのである。実際、彼らは「熱帯建築」を正しくは「植民地熱帯建築(Colonial tropical architecture)」とも呼び慣わしていたようである。また「トロピカル」には別の側面もある。熱帯地域の病気療養に対処するため、「熱帯医学(Tropical

Medicine)」の研究が建築に先んじて発達しており、これに引きずられるかたちで、1953年にはロンドン大学で「トロピカル建築」に関する講演会が開催されおり、翌年の1954年には「熱帯建築学」がA.A.スクールで開講されている。なお、バワはこの時ちょうどA.A.スクールに在籍しているが、この講座の受講登録をしていない。こうして、イギリスのアカデミズムは、植民本国が直面した切実なテーマとして「トロピカル」の諸問題を正面に据えて、「トロピカル建築」という呼称が定着したようである。がしかし、地勢学と気候学からひねり出した「トロピカル」概念は、総論としての熱帯建築をくくることはできようが、バワ作品の意味を捉えることはできず、むしろ乖離を広げ本質を見誤ると言わざるを得ないのである。

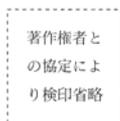
話が迂遠するが、興味深いことに南アジア、東南アジアを中心にして瞬く間に伝搬したハイエンド・リゾート・ホテルは、疑いなくバワ作品を淵源としている。何故だろうか。人は誰もが自然と呼応して自らの生を確かめ、自然への憧憬と自然を希求する本能を生来持つてこの世に生まれてきた。これがバワ作品の「アニミズム」であり、彼はこの人間の古層に蓄積した「野性の記憶」を揺り起こし、島の美学を沈殿させ、美しく清廉なモダニズムの衣を建築に着せて、人々を魅了した。そこには建築理論や数字に置き換えがたい、人間の本能に根差した悪魔的な悦びが秘かに横たわっているのであり、それがバワ建築の魅力の源泉となっているのであろう。このような人間の本能に洋の東西や貴賤はなく、その意味において、バワ作品は普遍性すら帯び始めるといってもいいのである。こうしてみると、インド洋に浮かぶ小さな島の風土や自然がバワにゆくりと語りかけ、彼はその声を静かに掬い上げて見事に建築や庭園の形に置き換えた、と思えてならないのである。

謝辞を述べたい。イスメスには多くの知恵を授けてもらい幾度となく励ましていただいた。ハバラナの夜に多謝である。ウルリックに会えたのは天啓であり、実直な証言を聞けたばかりでなく貴重な竣工当時の写真や図面を提供して下さり感謝に絶えない。また、写真提供を快諾して下さったスリランカ民主社会主義共和国政府と写真家のドミニク、ならびに図面提供を受けたバワ財団に謝辞を述べる。最後に、誰よりも本書の刊行を喜んでくれたであろう亡き父と、愛情豊かに筆者を育ててくれた母、そして、一人授かった愛娘と半生を超える歳月を共に過ごしてきた最愛の妻にこの本を捧げたい。末筆となったが、彰国社編集部の鷹村暢子さんには感謝あるのみである。温かい眼差しと示唆に富んだ意見が最後まで支えとなった。心から御礼申し上げたい。

2015年6月20日

(本書は、公益法人ウエスコ学術振興財団の一部旅費助成による研究成果である)

解説 ジェフリー・バワの建築 スリランカの「アニミズム・モダン」
2016年1月10日 第1版発行



著者 岩本弘光
発行者 下出雅徳
発行所 株式会社 彰国社



自然科学書協会会員
工学書協会会員

162-0067 東京都新宿区富久町8-21
電話 03-3359-3231 (大代表)
振替口座 00160-2-173401

Printed in Japan

© 岩本弘光 2016年

印刷：社光舎印刷 製本：中尾製本

ISBN 978-4-395-32041-7

<http://www.shokokusha.co.jp>

本書の内容の一部あるいは全部を、無断で複写（コピー）、複製、および磁気または光記録媒体等への入力を禁止します。許諾については小社あてご照会ください。

現代作家の陶磁器デザインと技法の集積

岡山県立大学デザイン学部

久保田厚子

本研究の目的は現代日本陶芸の正当な評価を広く国内外に発信することで、芸術文化の振興に寄与することです。国内陶磁器産業の空洞化が進む我が国において吃緊に整備すべきは、陶芸家が協働しその成果を発表する場です。その場として、公益財団法人からの助成によって焼成技術者を雇用し、大学外の研究者と共同で大学の壁を越えたガス炉還元焰焼成を実現しました。平成27年度内に9回の還元焰焼成を実施したことで、陶磁器研究が進むと共に、合わせて学生の作品も焼成したので、卒業制作や授業において教育上の大きな効果も得られました。平成27年度は公益財団法人ウエスコ学術振興財団と、公益財団法人野村財団に採択され、東京藝術大学と岡山県立大学の共同研究として実施しました。本学の大型ガス炉2基を中心に陶芸家が協働した1年間の研究成果を、著作権と引用についてピュアレビューを行った後、ウェブサイト「現代日本陶芸のデザインと技法2016」に、3月31日にアップロードしました (<http://cdatoma.tumblr.com/>)。本研究計画は4年間継続し、最終の平成30年度に瀬戸内市立美術館で作品展を行います。

1. 研究の目的

現代日本陶芸の正当な評価を広く国内外に発信することで芸術文化の振興に寄与する本研究は、地方の公立大学の設備が広く文化に貢献できるものです。

2. 研究の特色

学外から助成をうけて焼成技術者を雇用することで、共同研究者と共に定期的なガス炉還元焰焼成を実現しました。9回に及ぶ還元焰焼成で、陶磁器研究が著しく進むと共に、同時に学生作品を焼成したので、卒業制作や授業に対して教育上の効果がありました。

平成27年度は公益財団法人ウエスコ学術振興財団と公益財団法人野村財団の助成を受け、東京藝術大学と岡山県立大学の共同研究として実施しました。

3. 研究方法

岡山県立大学の大型ガス炉2基を中心に陶芸家が協働した1年間の成果を、創造力と作品性を向上させる場としてのウェブサイト「現代日本陶芸のデザインと技法2016」(<http://cdatoma.tumblr.com/>)に2016年3月31日、論文形式で11本をアップロードしました。本研究は4年間継続し、最終の平成30年度に瀬戸内市立美術館で作品展を行い、列品解説と研究会を開催します。

4. 研究の効果

ウェブサイト「現代日本陶芸のデザインと技法

2016」は、岡山県立大学造形デザイン学科新入生オリエンテーションの資料として紹介した他、陶芸授業の教材としても活用されています。炉内容積1.0 m³と0.5 m³のガス炉に作品焼成を集約することは、低炭素社会化にも貢献しています。

5. 平成27年度焼成実績

平成27年度の岡山県立大学ガス炉焼成日程

2015年5月18日～19日、6月15日～16日、7月27日～27日、10月26日～27日、11月19日～20日、12月16日～17日、2016年1月14日～15日、2月22日～23日、3月28日～29日、計9回。

岡山県立大学の森下工業製シャトル式ガス炉は、高温焼成に耐える高断熱の密閉式で、ガスバーナーに特許を持つ最高水準の焼成炉です。毎回の本焼成の一週間前に電気炉で素焼を実施し、ガス炉還元焰焼成と同時に電気炉で酸化焰焼成も実施しました。

予め共同研究者とセラミックデザイン関係学生に焼成スケジュールを配信し、窯詰め前日までに作品を岡山県立大学アトリエに集め、施釉を完成させました(図1)。窯炉焼成担当者、本学セラミックデザイン関係教員、本学在学学生、学外の共同研究者で窯詰めを行いました(図2～図3)。

炉扉を密閉後に点火し、約30時間で還元焰焼成し、5日間徐冷してから窯出しました(図4～図5)。



図1 窯詰め前の素焼施釉作品 (2015年12月7日)



図2 台車式0.5 m³ガス炉窯(2015年12月7日)



図3 1 m³ガス炉窯 (2015年6月21日)



図4 0.5 m³ガス窯出し (2015年11月7日)



図5 0.5 m³ガス窯出し (2015年6月21日)

6. 作品撮影

論文に用いる為の作品を写真撮影しました。

日時/2016年1月23日(土) 13:00~23:00

場所/岡山県立大学 3212 演習室

撮影者/斎城卓

撮影方法/4×5 ポジフィルムビューカメラ

撮影参加者/8名

撮影点数/14点

7. 論文ピアレビュー

2016年2月1日から3月31日まで、共同研究メンバーは、インターネット上の論文執筆サイトにアクセス権を得て論文を執筆し、メンバー内に公開してピアレビューを行いました。ピアレビューは著作権と引用について行い、論文内容は各自の責任としました。

8. ウェブサイトアップロード

ウェブサイト「現代日本陶芸のデザインと技法 2016」を2016年3月31日 23:55 にアップロードしました(図6)。

<http://cdatoma.tumblr.com/>

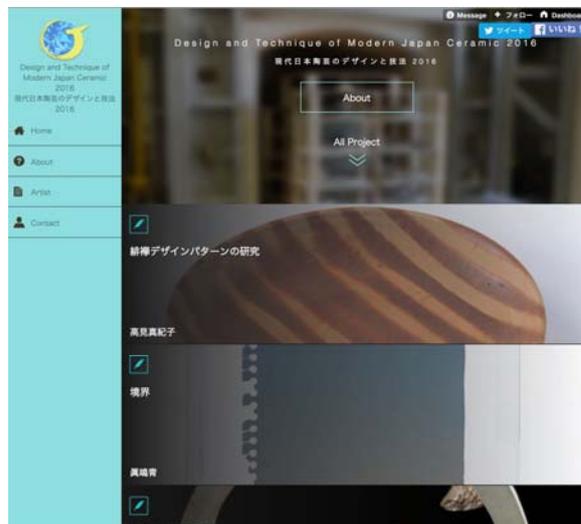


図6 <http://cdatoma.tumblr.com/>

9. ウェブサイト掲載の論文

1) 久保田厚子 (研究代表者)

「ハイブリッド青白磁技法1」

具象的な植物デザインの技法 (図 7) と、抽象的な幾何学パターンの技法 (図 8) を複合させ、固い磁器を柔らかい筆の細密な描画で立体的に彫り出す技法を考案しました (図 9、図 10)。



図 7 植物デザイン



図 8 幾何学パターン



図 9 ハイブリッド青白磁技法1の大皿作品

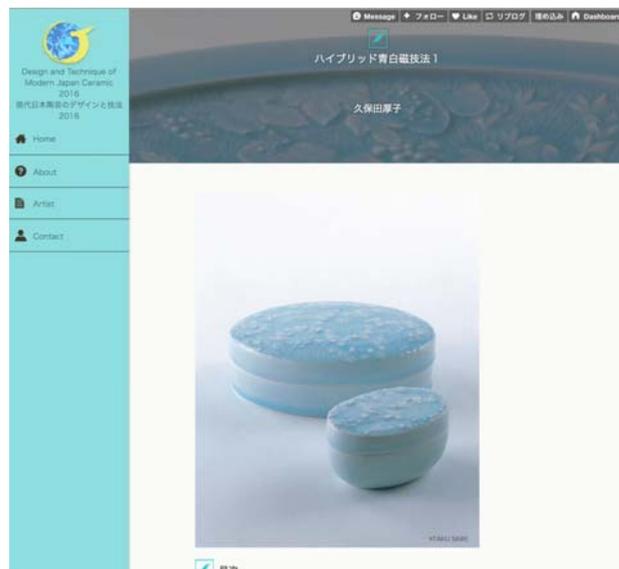


図 10 ハイブリッド青白磁技法1のウェブサイト

2) 難波敬恵

「塩化コバルトを利用した色の濃淡の立体的変化」

塩化コバルトを筆に水溶液で含ませて塗布し、器面と内部の色の濃淡の変化を効果的に利用した作品を制作しました (図 11)。



図 11 $\phi 210 \times 160$ mm

3) 木村知子

「染付に対応するスケッチの考察」

スケッチと磁器作品を並べて表現の可能性を改めて考えました (図 12)。



図12 苧環角蓋物

4) 眞嶋青「境界」

2種類の異なる質感の粘土をグラデーションで繋げた作品です。陶磁器の粘土には様々な色や質感があり、混ぜ合わせることで別の表情を作り出すことができます。紐作りのように層を重ねて形を作る粘土の特性を使って、磁器から陶器に変容していく紙のように薄い作品を制作しました(図13)。



図13 境界

5) 井戸川豊 陶磁器における装飾技法に研究

銀泥彩磁(図14)は本焼の後に染色に使われる友禅染用の筆で銀を器の全面に打ち付けるようにして塗り、焼成温度のわずかな差で銀一色ではなく、黄や白が入り混じったような発色をするのが特徴です。



図14 銀彩磁とうもろこし文鉢

6) 梶原香織 「テーブルウェアにおけるパターンデザインの展開」

染付けとラスターカラーの対比を主体として研究を進めました(図15)。



図15 白磁春草文皿

7) 今田拓士

「マット釉と焼成温度の関係について」

かたち、色、質感、時間等の制約がある陶芸でしか成し得ない作品に繋がる重要な要素を、マット釉と強還元焼成で追求しました。(図16)。



図16 隔壁の陶

8) 三浦義広

「小型マケットによる立体イメージの保存法」

本研究の目的は、イメージした立体のフォルムを、陶土を用いて瞬時に小型マケットにする方法を明らかにすることです(図17)。



図17 作品 猿

9) 栗原慶

「造形遊びの要素を取り入れた青白磁制作」

高さを抑え広がりのある形状は表裏で世界観を変えるのではなく水を写し取った表現を試みた為です。裏側にも表面に準じた波紋様を施しています。この作品で強調したいのは、波紋の表現自体に造形遊びの要素を取り入れたことです(図18)。



図18

10) 西村芳弘 「詩の形」

今を生きる人間として私なりの咀嚼(解釈・理解)で現代の陶俑を作ろうと考えました。今後の課題として、ガラスや金属など異素材を組み合わせ、深い表現になるか試みたい(図19)。



図19

11) 高見真紀子

「緋襷デザインパターンの研究」

着目した特徴は、緋襷の藁灰で覆われた部分のみが赤く発色する点です。緋襷の赤と地肌の白のコントラストを使用してパターンデザインを持った備前焼制作を試みました（図 20）。



図 20

10. ウェブサイトの反響

インターネット配信には著作権侵害や引用文マナーについて徹底的に留意する必要がある反面、世界と直結し距離を飛び越えた反響があります。3月31日にウェブサイト公開直後のメールの一部を報告します。

- ① 4月1日／…熱意に感動、やきものの技法についてアップロードしたものを拝見しました。モデルとする自然を徹底的にデッサンするその姿勢に感動しました。ここまでやるのか？と。…いろいろお話を聞かせてください(出版関係者、在東京)。
- ② 4月1日／ご活躍お喜び申し上げます。アップロード驚きました凄い内容ですね。それにこのホームページの出来栄も内容と共に凄い感性を感じさせてくれます。これからも引き引き続き進展を拝見させていただきます。大変楽しみです。ありがとうございました(地域創世関係者、在岡山市)。
- ③ 4月1日／…技法、段階を細かく写真入りで説明してくださっているの、素人にもとてもよくわかります。9月の講演会のお手伝いをしたときにわかったつもりになっていましたが、この研究を見て、さらに深く理解す

ることができました。…こうしてさまざまな陶芸の技法がわかりやすく説明されて、とても意義のあるプロジェクトだと思います。これが英訳されるとさらによいですよね。…これからのご活躍も楽しみにしております！（ミシガン大学附属美術館長、在ミシガン州）。

④ 4月6日／とても発信力があるメディアで、素晴らしいですね。みなさん、製作の技法や手順のみならず、表現の狙いやコンセプトを文章化しているのにも、感嘆します。県立大の出身者は、こうしたホームページへの参加のなかで、在学時にはまだできなかったような高いレベルで、自身の考えを表明できている(特に文章で)と思います。…私も頑張らなくては行けないと、励まされました(元岡山県立大学准教授、在神戸市)。

11. ウェブサイトのアクセス数

ウェブサイトのアクセス数は、カウンターの不調のため4月6日からカウントを開始し、4月6日～9日までの3日間は以下の状況でした。

セッション 19、ユーザー5、ページビュー92、ページセッション 4.84、平均セッション時間 00:05:58、直帰率 36.84%、新規セッション率 26.32%、New Visitor73.7%、Returning Visitor26.3%

12 まとめ

一昨年までに研究代表者が延 350 人の陶芸家から作品の主題・素材・技法について聴き取り調査を行った結果、陶芸家は新しい様々な技法を試みている事が判りました。反面、日本の陶磁器産業は昭和 40 年代をピークとして生産量は下落に転じ、製陶会社の廃業や工場の国外移転が続き、人財である技術者まで国外に流出しました。現在では 8 割のメーカーが廃業したと言われ、原材料で入手できないものが少なくありません。企業の研究開発の減少によって陶磁器実験の場は少なく、美術系大学の陶磁専攻コースが縮小や廃止になっています。さらに陶芸家は口伝で伝承するため、陶芸は文化として継承されずに作家の没後は失われる事すらあります。その中で、本共同研究は独創的な試みです。前例がない為にウェブサイト制作は手探りの状態で式から構築しました。アップロードした結果、芸術文化振興はもとより、1年間の研究成果がウェブサイトに配信された手応えは、研究者の作品性の向上と発信力を得る効果としても大変大きいものでした。

微量の水を用いた高分子/疎水性イオン液体の相挙動の制御と機構解明

岡山理科大学 理学部 化学科

大坂 昇

疎水性イオン液体への高分子の溶解に関する基礎的研究として、微量の水を添加した際の相分離温度の制御、及びその機構解明を行った。高分子として poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPA)、疎水性イオン液体として (1-alkyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide) ($[C_n\text{mim}][\text{TFSA}]$) を用いた系では上限臨界共溶温度 (UCST) 型の相分離が起きるが、1 wt%程度の水の添加で約 30 °C も相分離温度が上昇することが見出された。一方、高分子として polypropylene glycol (PPG) を用いた系では下限臨界共溶温度 (LCST) 型の相分離が起きるが、この系に 1 wt%程度の水を添加することでも相分離温度が約 20 °C も上昇することが見出された。UCST 型、LCST 型のどちらの系においても疎水性イオン液体単独の系 (約 2 wt%) よりも多量の水 (10 wt%) を溶解させること、及び FT-IR 測定の結果から、水分子が選択的に高分子に水和することで相分離温度を上昇させていることが示唆された。また、LCST 型の系で見出された微量の水の添加による相分離温度の上昇は、高分子の溶解性の向上を意味する。このため、本研究の結果は相分離温度の連続的な制御だけでなく、従来疎水性イオン液体への溶解が困難であった高分子やたんぱく質を溶解させるための新規手法として期待できる。

1. はじめに

イオン液体は 100°C 以下で液体となる塩の総称であり、高い熱安定性や優れた導電性などの特徴をもつことから新規な機能性溶媒として電気化学デバイス用電解液や新規反応溶媒、各種材料などへの様々な応用展開が可能であり、ここ 10 年程で研究報告数が急増している。しかし、各々の用途に向けた適切なイオン液体を新規にデザインすることは容易ではない。そのため、イオン液体同士、またはイオン液体と通常の液体との混合により、溶媒の機能・物性を連続的に変化させる試みが行われている。

国内では大野らが、親水性イオン液体と水とを混合して水和イオン液体を実現し、タンパク質の溶解や耐熱性、経時安定性が水溶液中に比べて格段に向上することを明らかにしている [1, 2]。また、合成高分子を用いた研究では、Nayak らが親水性イオン液体と水とを混合して PNIPA の溶解性を調べ、十分な量の水 (50 vol%) の添加で、PNIPA の UCST が 30°C 程低下することを報告している [3]。

上記のように、親水性イオン液体においては、水との混合溶媒としての研究が活発化しているが、疎水性イオン液体においては研究例がない。そこで本研究課題では、高分子と疎水性イオン液体 (1-alkyl

-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide)

($[C_n\text{mim}][\text{TFSA}]$) との系に微量の水を添加し、その相分離温度の変化を明らかにすることを試みた。特に、上限臨界共溶温度 (UCST) 型の相分離、及び下限臨界共溶温度 (LCST) 型の相分離を示す系それぞれに対して微量の水の添加を行った。

2. 試料と実験操作

UCST 系として poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPA) / $[C_n\text{mim}][\text{TFSA}]$ を、LCST 系として polypropylene glycol (PPG) / $[C_n\text{mim}][\text{TFSA}]$ を用いた。PNIPA は AIBN を開始剤として tert-ブチルアルコール中でラジカル重合して合成した。MALDI 測定を行った結果、 $M_w = 4.0 \times 10^3$ g/mol であった。PPG は Aldrich 製で、 $M_w = 3.4 \times 10^3$ /mol、 $M_w/M_n = 1.01$ のものを用いた。 $[C_n\text{mim}][\text{TFSA}]$ は Merk 製で、純度 99.0% のものを用いた。それぞれの試料は、溶液を作成後、グローブボックス内にて 90 °C で 1 日真空乾燥し、さらにその後 115 °C で 1 日真空乾燥した後に測定に用いた。乾燥後の水の添加などの操作はグローブボックス内にて窒素雰囲気下にて行った。

透過率測定は、紫外可視分光光度計を用いて波長 630 nm、1 °C/min の条件で行った。示差走査熱量

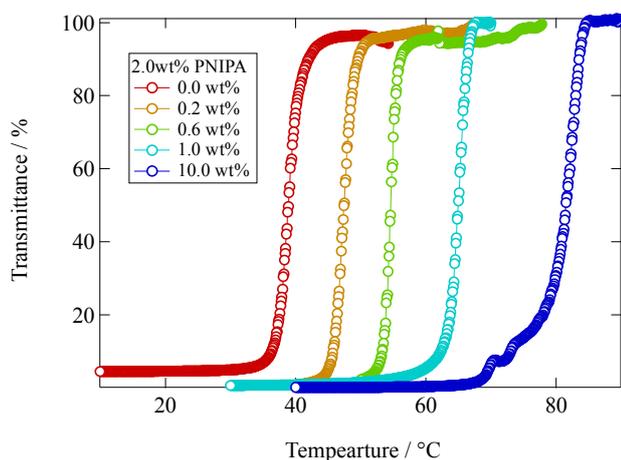


Figure 1 水添加量に依存したPNIPA/[C₂mim][TFSA] (2.0 wt%) 溶液の温度-透過率曲線

測定 (DSC) は、1 °C/min で温度を制御して測定を行った。フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) 測定は、加熱透過セルを用いて種々の温度にて行った。

3. 結果と考察

UCST 系へ及ぼす水の効果

UCST 型の相分離を示す PNIPA/[C₂mim][TFSA] に水を添加した際の温度-透過率曲線を Figure 1 に示す。水が添加されていない系では、PNIPA/[C₂mim][TFSA] の透過率は 40 °C 近傍で大きく減少した。この透過率が減少し始める温度を相分離温度 (T_{PS}) と決定した。一方、1.0 wt% の微量の水を添加した系では T_{PS} は 30 °C 近く上昇した。また、PNIPA/[C₂mim][TFSA] は 10 wt% もの水を溶解させ、 T_{PS} は 80 °C 近傍まで上昇した。

Figure 2 に温度-透過率曲線から決定した、添加した水の量に依存した T_{PS} の変化を示す。水を添加し

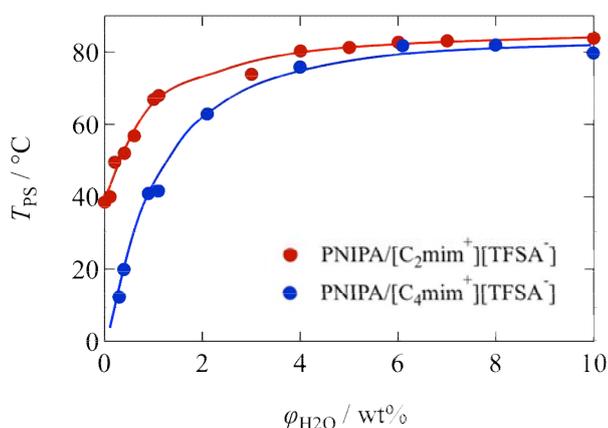


Figure 2 水添加量に依存したPNIPA/[C_nmim][TFSA] (2.0 wt%) 溶液の相分離温度の変化

た際に、約 3 wt% までの微量な範囲では T_{PS} は大きく上昇し、その後 T_{PS} の変化はほとんど無い。また、[C₂mim][TFSA] 単独では約 2 wt% までの水しか溶解しないが、PNIPA/[C₂mim][TFSA] では 10 wt% 以上の多量の水を溶解させることが明らかにされた。また、疎水性イオン液体に[C₄mim][TFSA]を用いた場合にも水に対する同様の傾向が見られた。しかし、添加した水に対する T_{PS} の上昇の程度は [C₂mim][TFSA]を用いた場合よりも大きかったが、多量の水を添加した際には約 80 °C と同程度の T_{PS} を示した。

溶媒和構造を調べるために FT-IR 測定を行った結果を Figure 3 に示す。1650 cm⁻¹ 近傍に、PNIPA の C=O 基が [C₂mim][TFSA] のカチオンの C₂-H 基との間の水素結合により生じる吸収ピークが観測されている

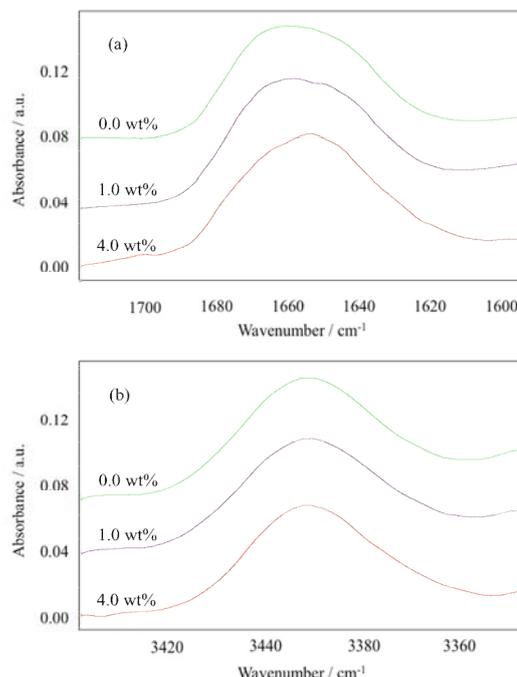


Figure 3 添加した水に依存した PNIPA/[C₂mim][TFSA] (2.0 wt%) 溶液の FT-IR スペクトル

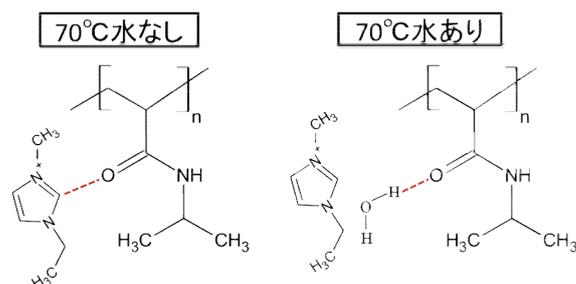


Figure 4 水なし (左)、及び水あり (右) における溶液中の PNIPA の溶媒和構造のイメージ図

[4]。しかし、水を添加すると 1620 cm^{-1} に PNIPA の C=O 基が水の O-H 基との水素結合により生じる吸収ピークが観測された。一方、PNIPA の N-H 基と $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ のアニオンとの間に生じる吸収ピーク (3387 cm^{-1}) に変化は見られなかった。

以上より、PNIPA/ $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ に水が添加された際の溶媒和構造として Figure 4 の予備的なモデルが考えられる。水は PNIPA のアミド基の C=O 基に選択的に水和し、 $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ のカチオンの C=O 基との水素結合を妨げると考えられる。また、水和した水分子は周囲の $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ と上手く水素結合することができずエネルギー的に不利な状態となる。このために、水を添加することで UCST 系の T_{PS} が上昇したと考えられる。一方、疎水性イオン液体に $[\text{C}_4\text{mim}][\text{TFSA}]$ を用いた系では、カチオンのアルキル側鎖が伸びることで、カチオンの C₂-H 基と PNIPA の C=O 基との水素結合の形成が抑制されており、水分子が PNIPA に容易に水和して T_{PS} が大きく増加したと考えられる。詳細な分光スペクトルの解析や溶媒和構造モデルの精密化は今後行っていく予定である。

LCST 系へ及ぼす水の効果

LCST 型の相分離を示す PPG/ $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ に水を添加した際の温度-透過率曲線を Figure 5 に示す。水が添加されていない系では、PPG/ $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ の透過率は $30\text{ }^\circ\text{C}$ 近傍で大きく減少した。この透過率が減少し始める温度を T_{PS} と決定した。一方、 $1.0\text{ vol}\%$ の微量の水を添加した系では T_{PS} は $15\text{ }^\circ\text{C}$ 近く

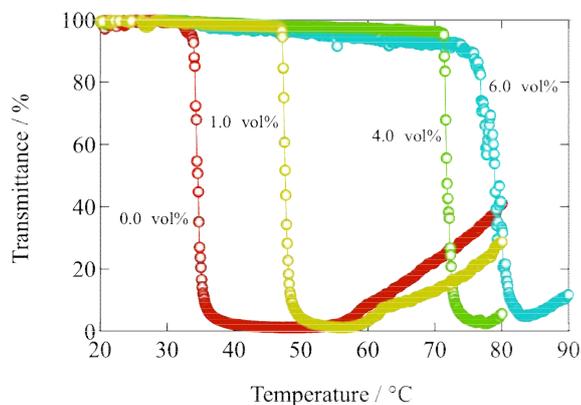


Figure 5 昇温により得られた PPG/ $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ (20vol%) 溶液の温度-透過率曲線

上昇した。また、PPG/ $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ は $6\text{ vol}\%$ もの水を溶解させ、 T_{PS} は $80\text{ }^\circ\text{C}$ 近傍まで上昇した。一方、添加した水が多量の $5.0\text{ vol}\%$ 近傍では Figure 6 に示すように降温時に透過率が減少したため、UCST 型の相分離も起こすことが示された。以上の結果より得られた PPG/ $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ の水に依存した相分離

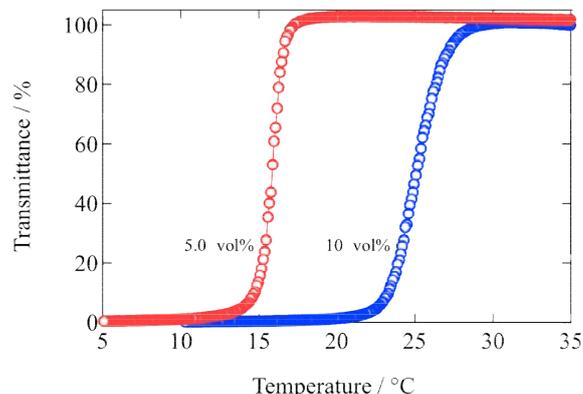


Figure 6 降温により得られた PPG/ $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ (20vol%) 溶液の温度-透過率曲線

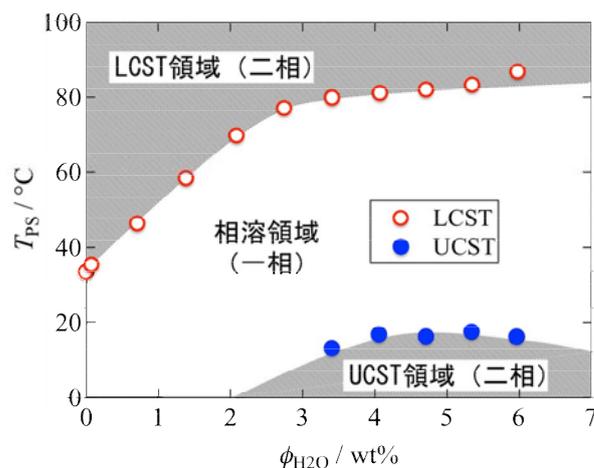


Figure 7 水添加量に依存した PPG/ $[\text{C}_n\text{mim}][\text{TFSA}]$ (20 vol%) 溶液の相分離温度の変化

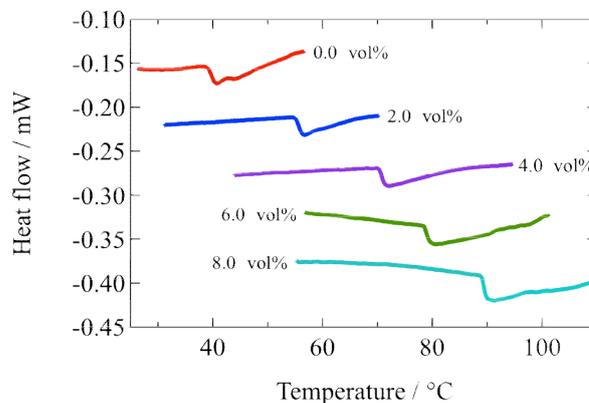


Figure 8 水添加量に依存した PPG/ $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TFSA}]$ (20vol%) 溶液の DSC 曲線

温度の変化を Figure 7 に示す。水添加量が 2 vol% 以下では 0 °C 以上の相溶領域が拡大していることが分かる。この結果は、微量の水を添加することで LCST 型の相分離挙動を示す高分子やたんぱく質などの系の溶解性を向上できることを示しており、従来溶解が困難であった物質の新規な溶解法になることが示された。

この特異な T_{PS} の変化を理解するために、まず、DSC 測定を行った。Figure 8 に見られるように、水の添加量が増加するにつれ吸熱エンタルピーが 0.58 J/g から 3.3 J/g へと増加した。この結果は LCST による脱溶媒和量の増加を意味しており、水が選択的に PPG に溶媒和したことを示唆している。さらに、Figure 9 に FT-IR 測定を行った結果を示す。3125 cm^{-1} 付近の吸収ピークが水の添加により高周波数側にシフトしていることが分かる。この吸収ピークは C_4 , C_5 の C-H の伸縮振動を示すピークであることから [5]、PPG の C-O-C と相互作用しているカチオンの割合が減少したことを示している。以上より、PPG/[C_2mim][TFSA] に水和する水分子の溶媒和構造は Figure 10 のように図示できる。水分子が PPG と

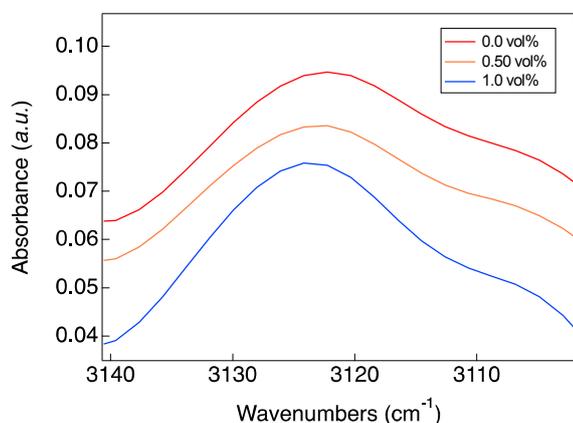


Figure 9 添加した水に依存した PPG/[C_2mim][TFSA] (20vol%) 溶液の FT-IR スペクトル

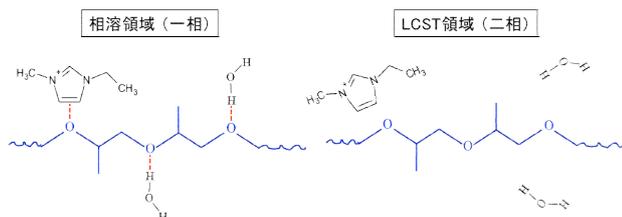


Figure 10 相溶領域 (左)、及び LCST 領域 (右) における溶液中の PPG の溶媒和構造のイメージ図

水素結合して強く相互作用することで LCST が大きく上昇したものと考えられる。

4. まとめ

疎水性イオン液体と高分子からなる溶液に水を添加し、その際の相分離温度の変化を UCST 系、および LCST 系において調べた。興味深いことにどちらの系においても微量の水の添加で相分離温度が大きく上昇することが明らかにされた。また、DSC 測定や FT-IR 測定を行った結果、水分子が PNIPA に選択的に水和することで相分離温度を上昇していることが明らかにされた。特に LCST 系においては微量の水による相分離温度の上昇は相溶領域が上昇することを意味しており、疎水性イオン液体に溶解が困難と思われていた高分子やたんぱく質を溶解させる新規手法として今後詳細にその基礎的知見を深める必要があると考えられる。

5. 参考文献

- [1] Fujita, K., Ohno, H., *Biopolymers*, **93**, 1093 (2010).
- [2] Fujita, K., Ohno, H., *Chem. Commun.*, **48**, 5751 (2012).
- [3] Nayak, P. K., et. al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 1806 (2013).
- [4] Wang, Z., Wu, P., *J. Phys. Chem. B*, **115**, 10604, (2011).
- [5] Dhumal, N. R., et. al., *J. Phys. Chem. A*, **118**, 2547, (2014).

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なご支援を頂いた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に心より感謝を申し上げます。

高効率な発光を目指した有機蛍光材料の開発

岡山理科大学 理学部 化学科

岩永 哲夫

光や熱に安定であることが知られている芳香族ビスイミド類を基本ユニットに用いて、高効率な発光を目指した有機蛍光材料の開発を進めている。今年度も昨年度に引き続き、アントラセンビスイミド (ABI) ユニットの基盤とした有機蛍光材料の開発を行った。ABI ユニットのイミド部位と芳香族部位に置換基を簡単に導入でき、分子の電子状態を簡単にチューニングできる。今回は、9-エチニル ABI ユニットの1,8-アントリルスパーサーを介して、菌頭カップリングにより効率的に導入した。得られた化合物の分光学的性質を明らかにするために、吸収スペクトルと蛍光スペクトルをクロロホルム中で測定した。吸収スペクトルにおいて、2つの9-エチニル ABI ユニットの1,8-アントリルスパーサーで連結した化合物は、長波長側に幅広い吸収帯が観測された。DFT 計算の結果に基づき、この吸収はABI ユニットの1,8-アントリルスパーサーとの分子内電荷移動相互作用と帰属できた。またABI ユニットの対面した位置に電子供与性置換基である9-エチニルアントラセンをもつ化合物においても、長波長側に電荷移動相互作用に伴う幅広い吸収が確認された。

1. はじめに

現在、有望な有機蛍光性材料の基本ユニットとしてアントラセンやペンタセンなどのアセン系芳香族化合物などが使われている。アセン系芳香族化合物は電子豊富な化合物として知られており、置換基の種類を変えることで色調をチューニングすることができる。同じ骨格をもった複数の誘導体を組み合わせることで RGB を達成しようとする研究も進められている。ところがアセン系芳香族化合物は光や空気中の酸素などに不安定な側面をもち、多くの誘導体において取り扱いを注意しなければならない問題点を抱えている。

本研究では、そのようなアセン系芳香族化合物が持つ問題点を解決できるような蛍光性色素の開発を目指す。基盤ユニットとして利用するアントラセンビスイミド (ABI) は、アセン骨格を有しているにもかかわらず、イミド基を導入することで光や熱への安定性が高い。また様々な位置に置換基を簡単に導入でき、分子の電子状態を簡単にチューニングできる。具体的な手法としては、イミド基の *N* 位や芳香族アセン部位に芳香族ドナーユニットを導入することで、電子的特性が異なる誘導体を合成することを計画した。^[1] またイミドの *N*-位に自己集積能を

持つ長鎖アルキルを複数導入することで分子間の相互作用を強めたり、逆に嵩高い置換基を導入することで分子間の相互作用を抑制するなど、分子間の相互作用をたくみに操作して、新たな蛍光プロセスを持った蛍光材料の開発を目指している(Chart 1)。

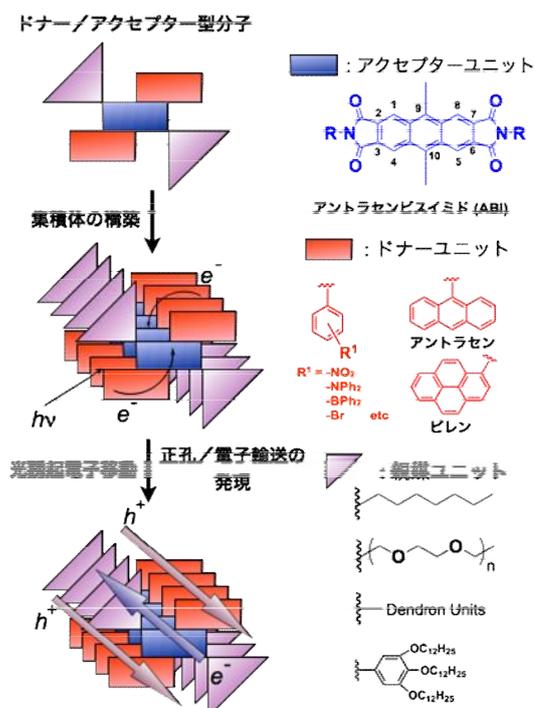


Chart 1. (左) 蛍光性芳香族ビスイミドの集積と電子移動プロセス。(右) アクセプター・ドナー・親媒ユニットの候補。

規則的にユニットを配置する手法が確立できれば、光誘起電子移動を妨げない集積体を構築することが可能となる。今回、アリールスペーサーで連結することで、複数のABIユニットを規則的に配置することを計画した。またABIユニットにドナーユニットを空間的に近づける分子も設計したので、それら分子の合成と性質について、以下に報告する (Figure 1)。

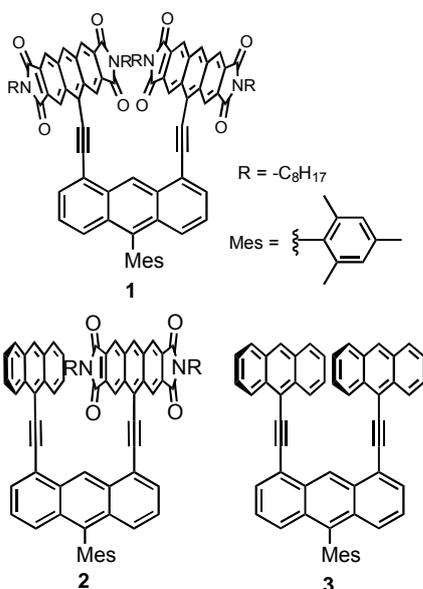


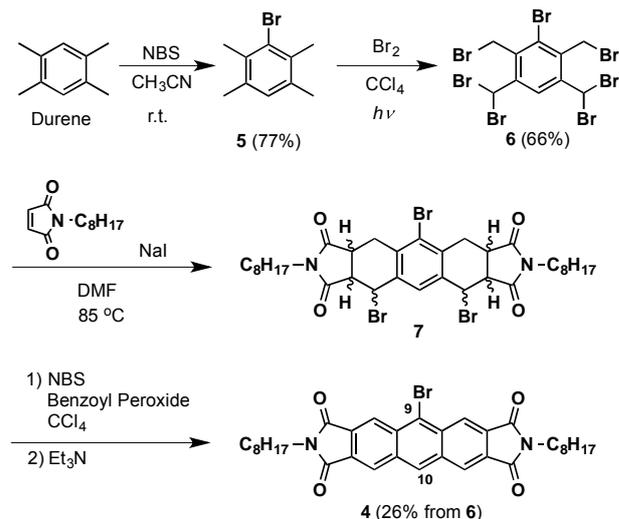
Figure 1. 蛍光性アントラセンビスイミドの分子設計

2. 結果と考察

今年度は、昨年度開発した蛍光特性をもつ9-エチニルアントラセンビスイミド (ABI) 骨格を用いて、これを複数有する分子の合成と電荷移動相互作用の空間的な相互作用を観察するために新しいドナー/アクセプター型分子の開発を行った。^[2] 芳香族ビスイミド骨格を持つ分子は、溶解度が悪いことが知られているが、イミド基のN位にオクチル基を導入することで溶解度の向上を図った。アリールスペーサーとして1,8-アントリレン骨格を、芳香族ドナーにはアントラセンを利用した。合成した分子の分光学的性質や電子構造について考察するために、電子スペクトルの測定やDFT計算を行った。

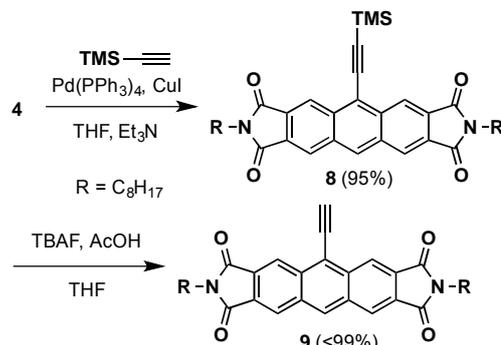
ABI誘導体1と2を合成するために、対応する9-ブロモABI4を原料に用いた。9-ブロモABI4は、当研究室で開発した方法を用いて合成した。^[3]

Dureneを出発原料として、アセトニトリル中でN-ブロモコハク酸イミド (NBS) と反応させることでモノブロモDurene5を得た。続けて、5に臭素をラジカル付加させることで、ヘプタブロモ体6を得た。ヘプタブロモ体6にオクチルマレイミドをDiels-Alder反応させて付加環化体7を得たあとに、NBSとトリエチルアミンで処理することで、9-ブロモABI4を得ることができた (Scheme 1)。



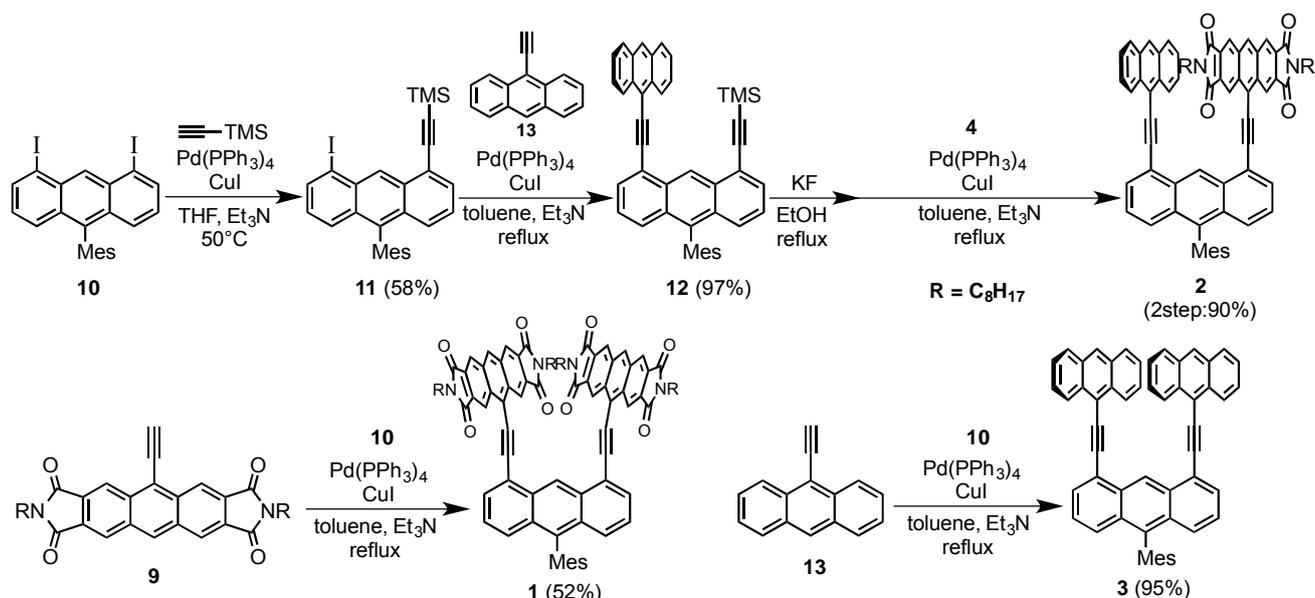
Scheme 1. 9-ブロモABI4の合成

化合物4に対して、トリメチルシリルアセチレンをSonogashiraカップリングにより導入し、TBAFを用いて脱保護することで、9-エチニルABI9を効率よく得ることができた (Scheme 2)。



Scheme 2. 9-エチニルABI9の合成

得られた9-エチニルABI9と1,8-ジヨードアントラセン10を混合し、Pd(PPh₃)₄とCuIを触媒として加えて、トリエチルアミン-トルエン中で反応させた



Scheme 3. 化合物 1・2 と対照化合物 3 の合成

ところ、化合物 **1** を収率 52%で得ることができた (Scheme 3). 一方、非対称にアントラセンユニットと ABI ユニットの配置した化合物 **2** の合成は、次の経路で行った. 化合物 **10** を出発原料として、Sonogashira カップリングによりモノエチニル化し、続けて 9-エチニルアントラセン **13** を導入した. その後、フッ化カリウムを用いて脱シリル化し、化合物 **4** と再度 Sonogashira カップリングすることで化合物 **2** を中程度の収率で得ることができた. また対照化合物 **3** についても 1,8-ジヨードアントラセン **10** と 9-エチニルアントラセン **13** から同様に合成した. 合成した化合物 **1**~**3** は、 ^1H NMR と ^{13}C NMR スペクトルおよび FAB マススペクトルにより同定した.

化合物 **1**~**3** の分光学的性質を明らかにするために、吸収スペクトルと蛍光スペクトルをクロロホルム中で測定した (Figure 2&3). Table 1 には電子スペクトルのデータをまとめて記載している.

2つの ABI ユニットの持つ化合物 **1** は、長波長側になだらかな幅広い吸収を有していた. この吸収について DFT 計算の結果から考察するために分子軌道を確認したところ、HOMO がスペーサーの 1,8-アントリル部位に、LUMO が ABI ユニットの局在化していることが明らかになった (Figure 4). このことから、この幅広い吸収はアントラセンスペーサーから ABI ユニットへ結合を介した分子内電荷移動によるものと示唆された. 一方、化合物 **2** も長波長側に同様に幅広い吸収帯が観察された. これも DFT 計

算の結果から分子軌道を確認したところ、HOMO が 9-エチニルアントラセンユニットに、LUMO が 9-エチニル ABI ユニットに局在化していることがわかった. この結果から長波長側の幅広い吸収は、化合物 **1** と異なり空間を介した分子内電荷移動相互作用による吸収であると示唆された. 化合物 **1** と **2** の長波長側の吸光係数 (ϵ) はほぼ同程度の値を示し、同じ系統のユニット同士の分子内電荷移動吸収であることが支持される結果となった. また2つの 9-エチニルアントラセンユニットを有する化合物 **3** は、ABI ユニットを含む化合物 **1** と **2** に比べて、短波長側に最大吸収波長が観測され、吸光係数が増大していることがわかった. これはアントラセン骨格の数に起因して吸光係数が増大したものと考えられる.

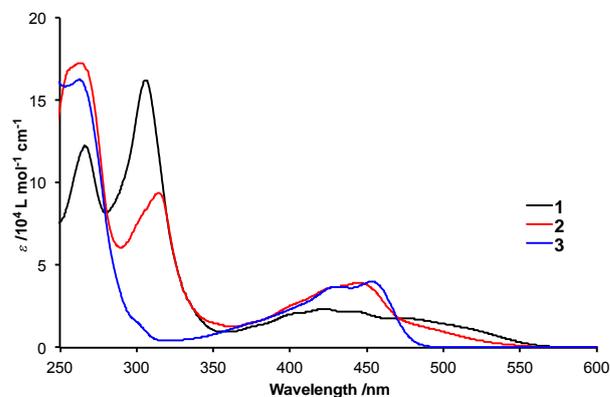


Figure 2. アントラセンビスイミド誘導体の吸収スペクトル (クロロホルム中)

また HOMO-LUMO のバンドギャップについて、DFT 計算の結果と比較するために、実際に測定した吸収スペクトルから HOMO-LUMO ギャップを算出したが再現性が悪かった。このため、より精度が高い計算レベル (M06/6-31G(d)レベルなど) で検討する必要がある。

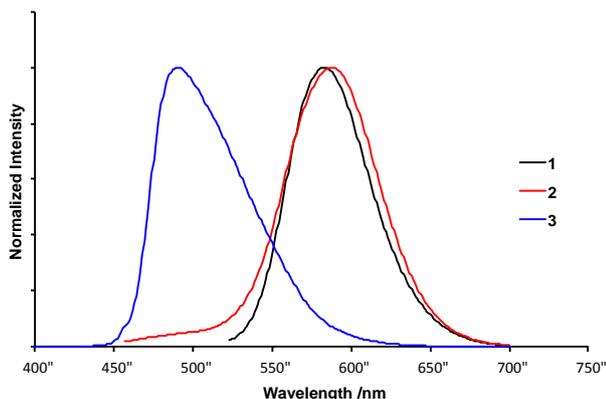


Figure 3. アントラセンビスイミド誘導体の蛍光スペクトル (クロロホルム中)

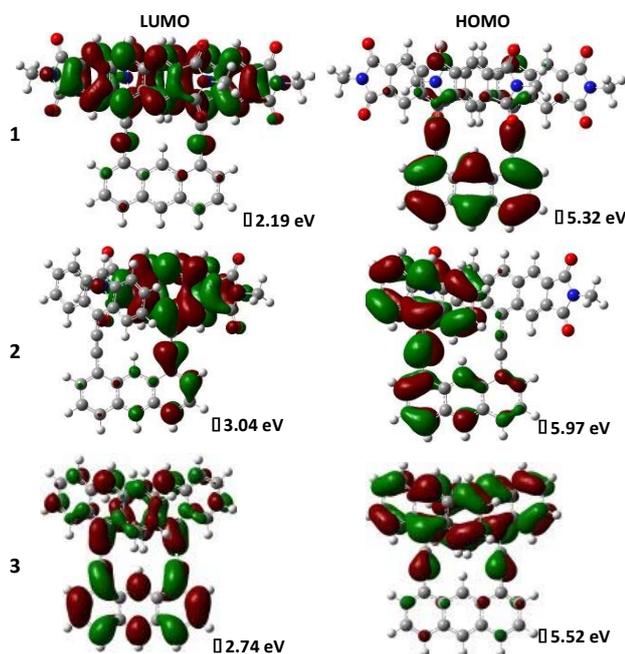


Figure 4. 化合物 1~3 の分子軌道

蛍光スペクトルをクロロホルム中で測定したところ、化合物 **1** と **2** とともに発光ピークはシャープに観測され、その波長は 583 と 588 nm であった (Figure 3 & Table 1)。一方、蛍光量子収率はいずれも 3 割程度となった。これまで合成した ABI 誘導体と比べて、著しく蛍光量子収率が低下している。これは対応す

る同種なユニット同士が分子内電荷移動相互作用を示すことによると推測される。今後、これまで合成した ABI 誘導体も含めて、構造と電子的性質の相関をさらに検討していく必要がある。

3. まとめ

本研究の最終目標は、広い π 平面を有するアクセプターユニットに超分子相互作用を発現する置換基を導入して、高効率な発光機能をもつ有機機能性材料の開発を行うことである。今年度の研究期間中には、1,8-アントリレンスパーサーを基盤とした新しいアントラセンビスイミド誘導体の合成方法を確立し、その電子的性質を明らかにした。今後は、基本骨格のイミド位に複数の長鎖アルキルをもつ置換基を導入し、集合状態での光特性を調べていく予定である。本研究で達成される芳香族ビスイミドユニットを基盤とした蛍光材料の効率的な開発を通して、従来にない分子構造と基本物性・性能を提示することで学際的分野のみならず、地域の素材メーカーや薬品メーカーを活性化し、科学技術社会の発展に貢献をしていきたいと考えている。

4. 謝辞

本研究は、平成 27 年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団の学術研究費助成事業の助成を受けて実施したものである。また本研究の遂行にあたり、東京工業大学大学院理工学研究科・豊田真司教授、岡山理科大学理学部化学科・山田晴夫教授、若松寛准教授に有益な助言を頂いた。ここに記して感謝申し上げます。

5. 参考文献

- [1] a) Jiang, W.; Ye, L.; Li, X.; Xiao, C.; Tang, F.; Zhao, W.; Hou, J.; Wang, Z. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1024. b) Li, C.; Wonneberger, H. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 613. c) Yue, W.; Lv, A.; Gao, J.; Jiang, W.; Hao, L.; Li, C.; Li, Y.; Polander, L. E.; Barlow, S.; Hu, W.; Di Motta, S.; Negri, F.; Marder, S. R.; Wang, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5770. d) Gsänger, M.; Oh, J. H.; Könnemann, M.; Höffken, H. W.; Krause, A.-M.; Bao, Z.; Würthner,

Table 1. 化合物 **1**~**3** と **8** の分光学的データと HOMO・LUMO レベル

Compounds	λ_{\max} /nm (ϵ)	λ_{em} /nm (Φ_{F}) ^b	HOMO /eV ^c	LUMO /eV ^c
1	520 (11000) ^a	583 (0.27)	-5.32	-2.19
2	490 (12000) ^a	588 (0.28)	-5.97	-3.04
3	453 (40100)	490 (0.22)	-5.52	-2.74
8	434 (17200)	442 (0.46)	—	—

a) A shoulder band. b) Absolute quantum yields determined by a calibrated integrating sphere system in chloroform. c) Calculated at M06/3-21G theory level for the *N*-Me compounds.

F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 740. e) Chopin, S.; Chaignon, F.; Blart, E.; Odobel, F. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4139.

[2] a) Morris, J. L.; Becker, C. L.; Fronczek, F. R.; Daly, W. H.; McLaughlin, M. L. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6484.

b) Ilhan, F.; Tyson, D. S.; Meador, M. A. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 2978. c) Wang, Z.; Kim, C.; Facchetti, A.; Marks, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13362. d) Usta, H.; Kim, C.; Wang, Z.; Lu, S.; Huang, H.; Facchetti, A.; Marks, T. J. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 4459.

[3] T. Iwanaga, R. Tanaka, S. Toyota, *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 105.

6. 研究成果

(1) T. Iwanaga, M. Ogawa, S. Toyota, 16th International Symposium on Novel Aromatic Compounds (ISNA-16), Poster, PSA-125 (2015.7.5-10, Madrid, Spain).

(2) 山本由樹, 岩永哲夫, 豊田真司, 2015年日本化学会中四国支部大会, ポスター, 15P48 (2015.11.14-15, 岡山大学, 岡山市).

(3) T. Iwanaga, M. Ogawa, T. Yamauchi, S. Toyota, *J. Org. Chem.* in press.

簡易な UAV を用いた斜面形状取得と斜面変状評価手法の開発

岡山理科大学 生物地球学部 生物地球学科

佐藤丈晴

本稿は、迅速に崩壊地形の定量的評価を行うため、簡易な UAV を用いて空中写真測量を行い、測量結果を短時間で算出する方法について述べたものである。一般に空中写真測量は航空機、ヘリコプター、UAV を用いて実施されるものであるが、規模が大きいため一般的な小さな被災箇所の測量には適していない。また、コストの側面からは、UAV を採用するにしても機体だけで大きなコストが必要なため、中小企業での導入は難しい。

そこで、本稿は、コストを抑えた簡易な UAV を用いて、写真測量の可能性について検討した事例を報告する。UAV とカメラが一体化した誰でも容易に扱える UAV でも写真測量が行えることを明らかにした。得られた画像から SfM 技術を用いて 3 次元高密度点群データを取得し、3 次元モデルの構築を行った。これらの作業工程が 1 時間弱で完了することから、現地で撮影した写真を移動中に処理し、業務打合せ等説明に用いることも可能である。また、3 次元高密度点群データを出力することで、3 次元データを取り扱える汎用のソフトで地形解析を実施することも可能である。

1. はじめに

近年、河川、砂防、港湾を中心として航空レ 25
一ザ測量¹⁾が実施されており、面的に詳細な地形データの取得が行われている。このような測
5 量データは、災害発生前の微地形抽出²⁾、土砂量の計測³⁾等に用いられており、古いデータ程
その重要性が高まっている。 30

しかしながら、そのデータを得るための航空
測量は、実施規模が大きく、測量に要する計画、
10 準備の段階から、測量の実施及びデータ取得後の解析作業に膨大なコスト、労力、時間を必要
とし、迅速性に欠ける課題がある。業務におい 35
て、ある一定の工期内に納品するという実施形態であれば、好適な条件であるが、災害発生時
15 にすぐに測量するという場面では適用が難しい。また平成 26 年広島災害のような大規模災害は
まれであり、通常はある一つの斜面が崩壊して 40
その迅速な対応を行わなければならないという機会が多い。従来は、災害発生直後に指定され
20 た業者が、測量調査を実施し、迅速に縦横断面図や現地写真などを提示する災害対応を行って
いる。このように単発的な災害対応は迅速性が最 45
も重要である。

この需要に対して好適な手法の一つとして、
UAV (unmanned aerial vehicles) を用いた写真
測量が挙げられる。近年小型の UAV の進歩によ
って低空の空撮や高画質の写真撮影が可能とな
り、多くの災害現場で活躍している⁴⁾。また、
SfM⁵⁾ (Structure from motion) 技術によって
30 画像データから 3 次元の DSM (Digital surface
model) を得ることができるようになった。これ
らの技術は、現地の立ち入りが困難な斜面にお
いて、崩壊規模や状況を知るうえで有用である。
また事前準備を必要とせず、現地に到着直後か
ら測量を実施できる利点がある。デメリットと
しては、高度な専門技術を要する技術者でしか
取り扱えない。UAV 本体のみの価格が 100 万円
以上するものが一般的であり、地方の建設コン
サルタント会社や測量会社では導入が難しいと
いう課題があった。

本稿では、簡易な UAV を用いて現地で写真測
量を実施し、短時間で 3 次元地形データの取得
から被災箇所の縦横断面図の作成まで実施できる
方法について紹介する。

5



図-1 今回採用した UAV

10

2. 機材およびソフトウェア

50

簡易な小型 UAV として DJI 社の Phantom3 を用いた。サイズは対角線 350mm、重さ 1.2 kg であり、山中をリュックで背負って持ち運び可能である。本機器はクアッドコプターの一つでカメラが初期から搭載されている。カメラの性能を 15 考慮すると、市販のデジカメがより多種多様の機能を装備しているのが、UAV への取り付け、シャッターの自動化、ペイロード 20 (積載重量) を考える等、誰でも挑戦できるという視点でデメリットが目立つことからカメラ 60 と UAV が一体となっている本製品を採用した。

続いて、Sfm ソフトウェアは Agisoft の Photoscan を採用した。複数枚の画像を用いて、三次元の点群データを計算する。このソフトは複数枚の写真から 3 次元データを簡単に構築で 65 きるソフトである。Sfm はコンピュータビジョンの分野において開発され、動画や静止画からカメラ撮影位置を推定し、三次元形状を復元する要素技術の 1 つである^{5),6)}。本稿では、Sfm の三次元形状復元技術を崩壊地の地形の定量的評価に適用した。 30

3. 検討方法

35

以下に 3 次元データ取得方法について記載する。本検討で対象としたのは、平成 24 年 7 月に 75 発生した九州北部豪雨災害で被災した熊本県阿蘇市における崩壊箇所であり、崩壊規模は長さ 50m、幅 30m、深さ 10m 程度である。

40

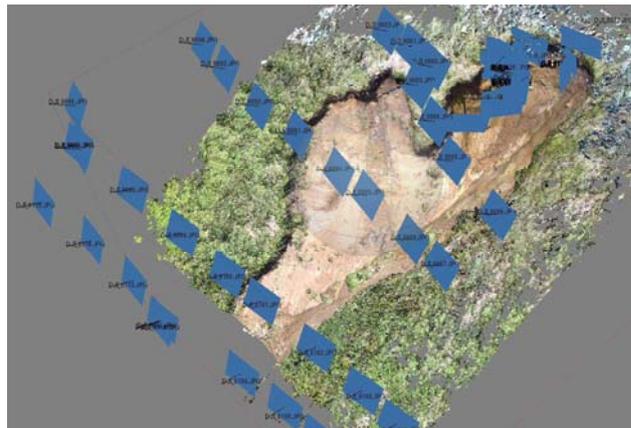


図-2 写真撮影位置 (図中青色で表示) と高密度の点群データ

1) 小型 UAV による現地状況の写真撮影

対象箇所において小型 UAV による空撮を行った。できるだけ斜面に垂直となるように、カメラの角度を設定しつつ、57 枚の写真撮影した。(図-2、巻末写真-1)。崩壊地の冠頭部はオーバーハング状の形状を示していたので、冠頭部にかなり接近して真横の方向から撮影を行った(巻末写真-2 及び 3)。このように調査者が近づくことのできない方向からも写真撮影できる場所に小型 UAV を用いるメリットがある。使用した小型 UAV は GPS による位置情報も取得でき、画像データに撮影位置の GPS データが保存されている。

2) 写真撮影位置の特定

Agisoft の Photoscan を採用し、解析に用いる画像データの写真撮影位置を特定する(図-2)。また、このデータから三次元高密度の点群データを生成する(図-2)。いずれもコマンドを指定するのみで、自動的に計算が実施される。多少の解析条件の調整はあるものの、最初はデフォルトで実施し、その後必要に応じて条件設定し、再解析を行う。

3) 三次元データの作成

点群データからポリゴンデータを計算し、三次元データの作成を行う。これは高密度



図-3 3次元モデルの作成

点群データから3次元の三角形 (TIN) データを作成するものである (図-3)。

4) 必要な点群データを抽出し、地形解析を実施
 必要な高密度の点群データが得られれば、
 データ抽出して地形解析を実施する (図-4)。

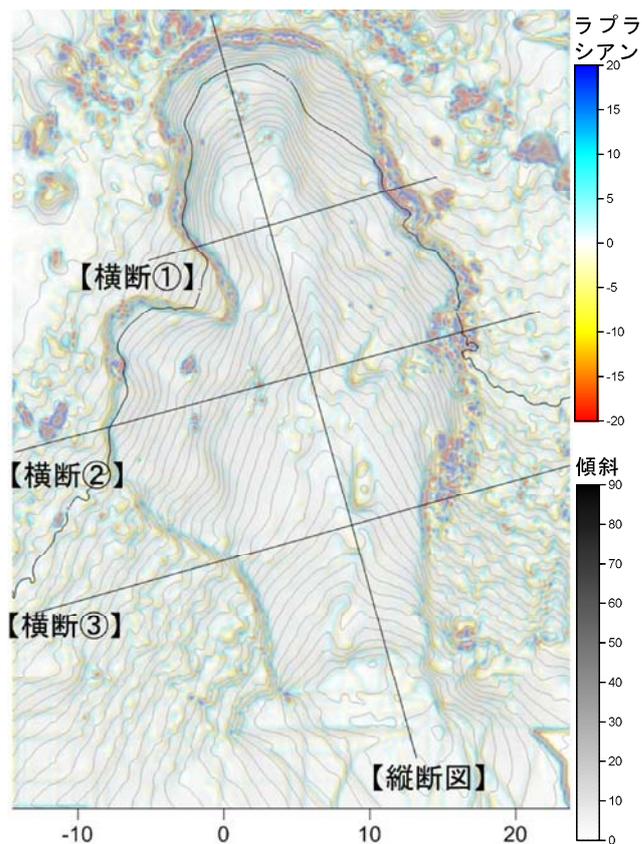


図-4 崩壊箇所の傾斜ラプラシアン図

4. 地形解析

この手法で得られる3次元データは、ほぼ航空レーザ測量データと同じである。異なる点は、利点では解像度が大幅に向上していることである。図-3ではデフォルトモードで約300万点のデータを抽出している。収集データはカメラの解像度に依存するものであるが、一般的に数cm単位で取得できる点とオーバーハング箇所について斜め下から見上げながら撮影することが可能である。欠点は写真測量であるため草本を透過してデータを取得することができないこと。また、得られた座標値が小型 UAV に積載された GPS によるものであるため、誤差が数m単位で発生することである。もちろん測量範囲内に基準点を数点設置すれば、この課題は解決される。この誤差は地球上の位置とのずれという問題であり、測量範囲内の形状や距離について誤差が出るものではない。測量範囲内の既知点があれば平行移動することで正しい位置を特定できる。

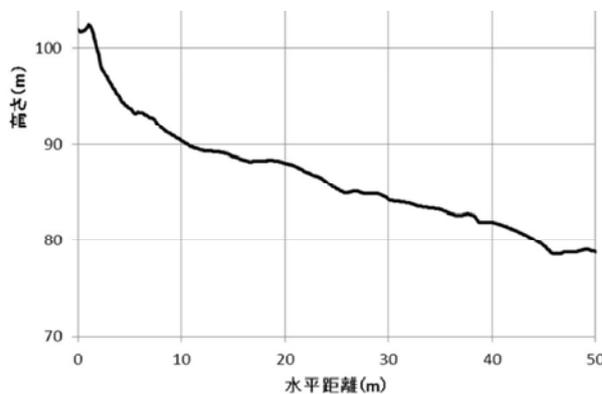


図-5(a) 崩壊箇所の縦断面図

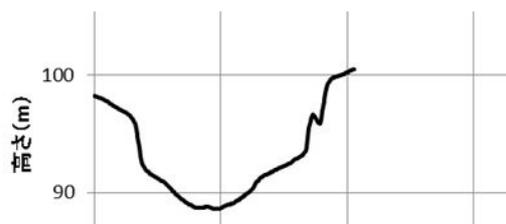
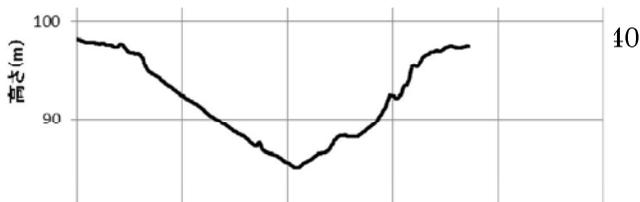
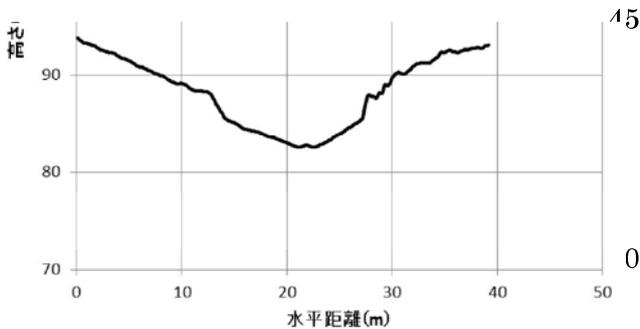


図-5(b) 崩壊箇所の横断面図 (図-4 横断①)



5 図-5(c) 崩壊箇所の横断図(図-4横断②)



10 図-5(d) 崩壊箇所の横断図(図-4横断③)

15 図-4に図-3地点の崩壊箇所について、傾斜ラプラシアン図を作成した。300万点のデータから10cmDEM(約36万個)を計算した。傾斜量を陰影で、斜面の凹凸を色で表現した。凹箇所を青系統、凸箇所を赤系統の色を配色した。この崩壊地について作成した縦横断図を図-5に示した。これらの縦横断図は10cm単位でデータを取得しており、一般に実施される公共測量と比較して大幅にピッチが細かくなっている。一般的に写真測量と公共測量の誤差はほとんどないことは先行研究⁷⁾で確認されている。

5. 解析時間

30 本章では、3次元データ取得時間について整理する。まず現地での撮影時間(検討方法1))については、UAVを離陸してから10分足らずで撮影は完了した。撮影方法として、UAVを少し動かしては撮影し、また数m平行移動させるといって極めて原始的な方法である。図-2では57枚(解析には36枚使用)の空撮を行った。1秒ごとのインターバル撮影を行っている事例⁵⁾もあるが、写真の選定と解析時間を考慮すると、必要と思われる位置で撮影することで、最小化が図れる(取りこぼしのリス

クを生じるが)。今回用いたPhantom3は15分経過すれば、一度帰還し、バッテリー交換が必要になるくらいの機体であると考えてよい。もちろんバッテリーを交換し、再び撮影を続けることは問題ない。

撮影後からはパソコンの中の作業となるため、パソコンのスペックについて簡単に説明する。本検討では、富士通のノートパソコンLIFEBOOK AH77/Jを用いた。すべての写真の位置決定(検討方法2))は、画像データに撮影時のGPSデータが記録されているため、36枚を1分程度で終わることが可能である。これは、GPSデータからおおよその位置を与え、複数枚の写真の位置取りから若干変更する程度で完了するためである。

続いて、高密度点群データの生成(検討方法2))は、36枚の写真の解析で45分程度の時間が必要となる。この作業に最も時間を要するため目的に応じた写真の枚数の最適化を図ることで作業効率を大幅に向上させることが可能となる。ちなみに、別箇所でも16枚の画像から高密度点群データの作成を試みたときは14分必要であった。

最後に3次元データの作成(検討方法3))は10分を要した。ただしこの作業は、高密度点群データを用いて、地形解析(検討方法4))を実施するのであれば、特に必要はない。高密度点群データを算定した直後にエクスポートすることで点群データを取得することができる。検討方法3)は点群データから3次元モデルを作成し、3次元形状を表示することを目的として実施するものである。

以上より、3次元モデルを構築する(検討方法3)まで実施する)ためには、36枚の画像であれば1時間弱必要となる。現地で撮影後移動中にノートパソコンに働いてもらうことで、自治体での説明に用いることは可能である。現地初動調査で写真撮影し、報告時にはすでに現地の簡易測量を実施し、3次元モデル

を作成して現地状況を説明することができれば、災害対応における大幅な時間短縮に資することとなる。

5 6. まとめと課題

本稿では、簡易な UAV と Sfm 技術を用いた 3 次元データの抽出について、災害対応における迅速対応の適用可能性について検討を行った。課題として、崩壊面積と必要最小限の画像数の関係、及びその撮影方法について検討し、より短時間で高精度な 3 次元点群データを 50 を得る条件を検討する。

謝辞

15 本研究は、公益財団法人ウエスコ学術振興財団の学術研究費助成事業において研究助成を 55 頂き実施しているものである。ここに記して感謝申し上げます。

20 参考文献

- 1) 日本測量調査技術協会：航空レーザ測量による災害対策事例集，2013
- 2) 神原規也，佐藤丈晴：マスマーブメント地形解析にあたってのラプシアン図表現手法，砂防学会誌，Vol. 67, No. 1, pp. 41-47, 2014
- 3) 秋山浩一，高橋大地，松本直樹，丹羽諭，内田太郎，蒲原潤一：レーザープロファイラによる差分データを用いた土石流による浸食堆積状況の把握，平成 27 年度砂防学会研究発表会概要集，p. A-114～A-115, 2015
- 4) 坂上雅之，金井啓通，清水幹輝，堀大一郎：UAV を活用した奈良県深層崩壊箇所の土砂移動観測，平成 27 年度砂防学会研究発表会概要集，p. A-266～A-267, 2015
- 5) 内山庄一郎・井上 公・鈴木比奈子：Sfm を 75 用いた三次元モデルの生成と災害調査への活用可能性に関する研究，防災科学技術研究所研究報告，第 81 号，2014

6) 満上育久 (2011)：私の研究開発ツール Bundler: Structure from Motion for Unordered Image Collections. 映像情報メディア学会誌，53, 479-482.

7) 河原能久：UAV を利用した河川の物理環境のモニタリング —航空レーザ測量と空中写真測量—，航空レーザーセミナー2015 広島，2015



巻末写真-1 崩壊地の状況



巻末写真-2 崩壊地冠頭部の状況



巻末写真-3 崩壊地冠頭部の状況

未利用バイオマス細胞壁分解における放線菌フェルラ酸エステラーゼの有用性評価

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

裏地美杉

放線菌由来フェルラ酸エステラーゼ (FAE, R18 および R43) は、米糠、トウモロコシおよびコムギふすまなどの未利用バイオマスからの FA 抽出に効果を示す酵素である。今回それらを用いた細胞壁分解への有用性を評価するため、脱脂米糠、トウモロコシ穂軸、サトウキビバガスを材料とし、FAE と放線菌由来糖加水分解酵素処理による生成糖類を分析した。その結果、脱脂米糠およびサトウキビバガスからは六炭糖から構成される 3-6 糖のオリゴ糖が生成されており、FAE の添加によってそれらの生成量が増加した。トウモロコシ穂軸からは、五炭糖で構成される 2 糖の生成が FAE の添加によって著しく増加した。また、サトウキビバガスではフェルラ酸の抽出にも、FAE と糖加水分解酵素の共処理が最も効果があり、共処理による相乗効果が見られた。これらの結果より、FAE によって細胞壁からフェルラ酸などの桂皮酸が取り除かれることで、細胞壁の分解が促進されており、さらに糖加水分解酵素と FAE が協動的に働くことで、フェルラ酸およびバイオ燃料用糖などのバイオマテリアル生産が促進されると考えられた。

フェルラ酸エステラーゼ (FAE) は、フェルラ酸やバイオ燃料用糖などのバイオマテリアル生産において、重要な役割を持つ鍵酵素である。FAE によって植物細胞壁から遊離するフェルラ酸は、主にイネ科植物細胞壁成分ヘミセルロースに存在し(図 1)、酸化活性および紫外線吸収作用を有する多機能物質である。食品や化粧品の添加物として利用されている他、近年では、アルツハイマー性認知症に抑制効果を示すことが明らかにされ(1)、フェルラ酸を用いた機能性食品の開発が期待されている。フェルラ酸の生産方法としては、FAE などの微生物酵素を用いて植物バイオマスからフェルラ酸を抽出する方法が研究されている(2, 3)。また一方でフェルラ酸は、ヘミセルロースで二量体(ジフェルラ酸)となって糖質ポリマー間の架橋を形成し、植物細胞壁の構造維持に重要な働きをしている。そのため、バイオエタノール生産の原料となる植物バイオマスの細胞壁分解にも、FAE によるフェルラ酸、ジフェルラ酸および桂皮酸類などリグニンの除去が有効であることが報告された(4)。

上記のように、FAE はバイオマスを用いたバイ

オマテリアル生産において、非常に有効な酵素であり、高機能 FAE の探索とその利用に注目されている。FAE は、麴カビ由来のものが古くから数多く研究されているが(5)、放線菌由来の FAE (R18 および R43) は既存の FAE 遺伝子とは相同性を示

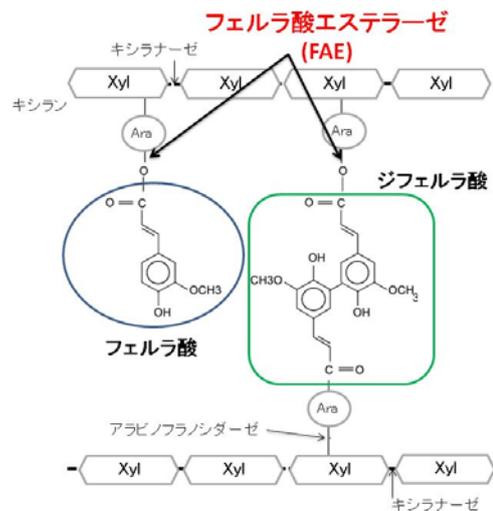


図1 イネ科植物細胞壁ヘミセルロース中のフェルラ酸 (矢印は各酵素による切断部位を示す)

フェルラ酸エステラーゼ(FAE): アラビノフラノシドに結合した、フェルラ酸を分離する酵素

キシラナーゼ: キシランをキシロース(Xyl)に分解する酵素

アラビノフラノシダーゼ: キシランに結合したアラビノフラノシド(Ara)を分離する酵素

さなかつた。また、放線菌 FAE は、共にイネ科未利用バイオマスからフェルラ酸を抽出する能力を有していた (6)。放線菌 FAE は、エステラーゼモチーフを保持するものの、アミノ酸配列でも既存 FAE と相同性を示さず、新たな活性メカニズムを持つことが予想されている。また、これまでの解析によって、放線菌 FAE は、既存の FAE の中で最も基質認識が広い FAE に分類された。そこで今回の申請研究において、フェルラ酸生産以外のバイオマス利用における放線菌 FAE の特性を明らかにするため、バイオマス細胞壁成分の分解への有用性を評価した。

実験方法

実験試料

実験試料にはイネ科バイオマスとして、脱脂米ぬか、トウモロコシ穂軸、サトウキビバガスを粉碎し、使用した。放線菌酵素は、R18 と R43 の二種類のフェルラ酸エステラーゼ (R18 および R43)、キシラナーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼを用いた。

酵素反応

10 mg の粉碎バイオマスに、400 μ l の 0.1M トリスマレイン酸バッファー (pH 7.0) を添加し、99 度で 5 分加熱後冷却した。バイオマスサンプルに 20 mg の FAE、5mg キシラナーゼおよび α -L-アラビノフラノシダーゼの各酵素粉末を添加、総量 800 μ l とし、反応液は 50 度で 24 時間振とうした。反応後、遠心分離して上清を回収し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析を行った。

桂皮酸類の分析と定量

桂皮酸類の分析は C18 カラム (Symmetry C18 3.5 μ m 2.1 \times 50 mm, Waters) を用いた。HPLC 条件として、カラム温度 40°C、0.1%ギ酸水溶液と 0.1%ギ酸含有アセトニトリルによるグラジエントで有機溶媒比を 10%から 60%までを流速 0.3 ml/min、322 nm の UV 吸収で分析した。HPLC 分析には LCMS-2020 (Shimadzu) を使用した。

オリゴ糖類の分析

オリゴ糖類の分析にはアミドカラム (X Bridge Amide 3.5 μ m 2.1 \times 50 mm, Waters) を用いた。LC-MS 条件として、カラム温度 40°C、0.2% トリエチルアミン含有 80%アセトニトリルと 0.2% トリエチルアミン含有 30%アセトニトリルによるグラジエントで有機溶媒比を 0%から 60%までを流速 0.5 ml/min、190 nm の UV 吸収で分析し、さらにネガティブモードにて MS 分析を行った。質量分析には LCMS-2020 (Shimadzu) を使用した。

結果と考察

バイオマスからのオリゴ糖類の生成への FAE の効果

R18 もしくは R43 の放線菌 FAE、および放線菌キシロースと放線菌 α -L-アラビノフラノシダーゼの糖加水分解酵素の 3 酵素共処理による脱脂米糠、トウモロコシ穂軸、サトウキビバガスからの生成糖類を解析した。使用したキシラナーゼは、セルラーゼ活性を併せ持っており、生成糖として、セルロースの主成分であるグルコース、およびヘミセルロースの主成分であるキシロース等の、六炭糖と五炭糖の両方が検出されることが予想された。脱脂米糠およびサトウキビバガスを材料としたとき、FAE の処理によって六炭糖から組成される 3 糖から 6 糖のオリゴ糖生成量が増加していた (図 2)。また、脱脂米糠では五炭糖の生成がほとんど見られないのに比較すると、サトウキビバガスでは、糖加水分解酵素の処理により、五炭糖で構成される 2 糖の生成量が増加していたが、その増加に FAE の効果は見られなかった。一方、トウモロコシ穂軸を材料とした場合、FAE の処理によって、六炭糖で構成されるオリゴ糖の増加はわずかであったが、五炭糖で構成される 2 糖の生産量が明らかに増加していた。以上の結果から、脱脂米糠およびサトウキビバガスにおいて、放線菌 FAE の添加によって、セルロースの分解がヘミセルロースの分解よりも促進されたと考えられる。またトウモロコシ穂軸では、放線菌 FAE の添

加によってヘミセルロースの分解が促進され、キシロビオースと考えられる分子量282の五炭糖からなる2糖を生成した。イネ科植物細胞壁内では、セルロースはヘミセルロースの倍以上含まれており(7)、さらに細胞壁構造はイネ科植物種間に

において多様な構造をとっている(8)。今回材料として用いた、脱脂米糠およびサトウキビバガスは、使用したキシラナーゼの基質としてヘミセルロースよりもセルロースが多く、そのためにセルロース由来オリゴ糖の生成が促進されたと考え

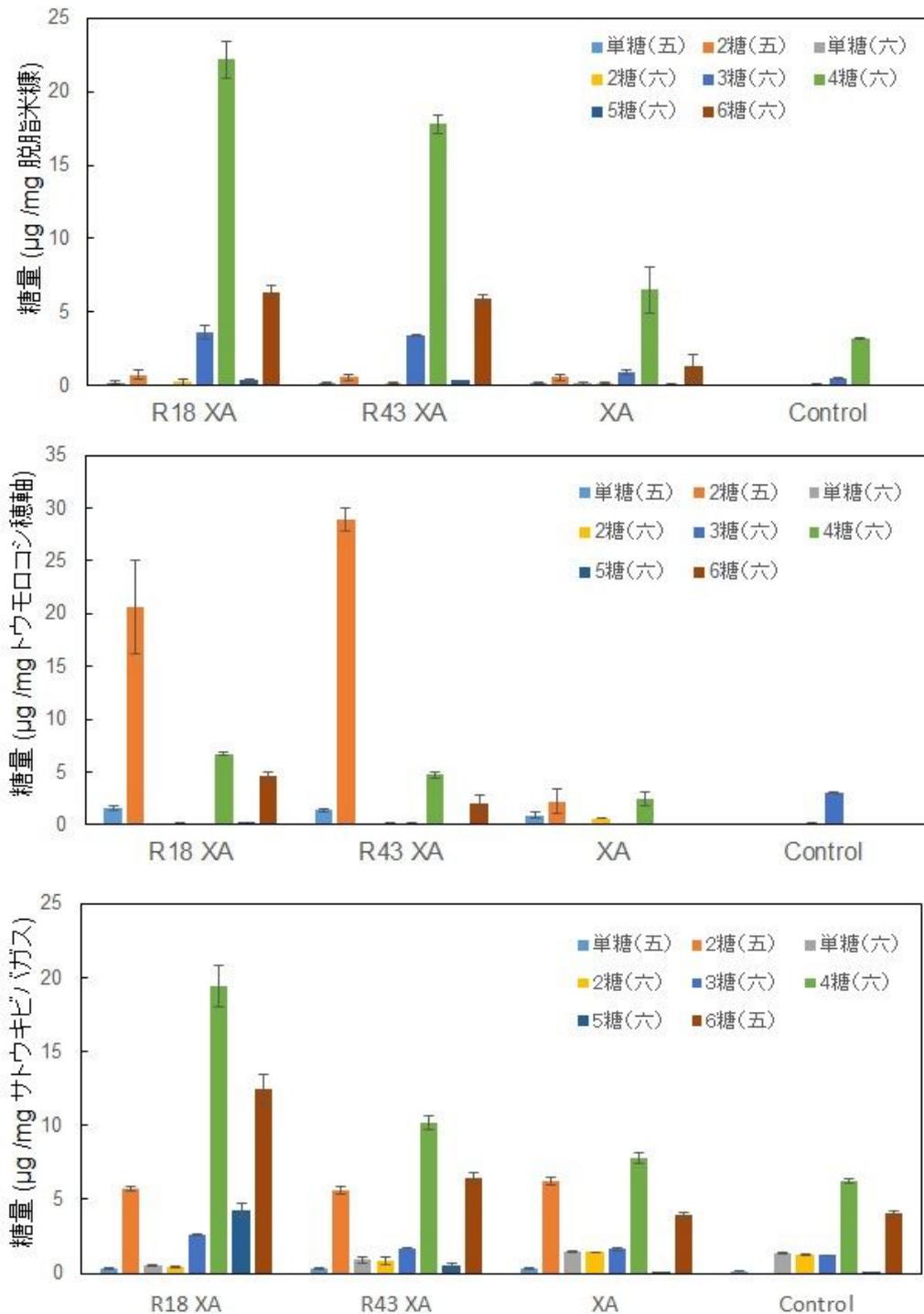


図2 バイオマスからの糖生成における放線菌FAEの効果

R18、R43、放線菌FAE; X、放線菌キシラナーゼ; A、放線菌 α -L-アラビノフラノダーゼ; Control、酵素未処理

られる。また、ヘミセルロースのみならず、セルロースの分解にも放線菌FAEが寄与できることが明らかになった。

サトウキビバガスにおける桂皮酸類の遊離

これまで脱脂米糠、トウモロコシふすま、小麦ふすまについて、FAEおよび糖加水分解酵素（キシラーゼおよびアラビノフラノシダーゼ）によるフェルラ酸の遊離を確認している（6）。そのなかでも、脱脂米糠を材料とした場合に、FAEと糖加水分解酵素の共処理が、フェルラ酸の遊離に相乗効果を示すという結果を得ている。サトウキビバガスは、FAEと糖加水分解酵素による共処理において、オリゴ糖の生成パターンが脱脂米糠のものと類似していた。サトウキビバガスの酵素処理上清中の遊離フェルラ酸を定量した結果、フェルラ酸の遊離は、酵素未処理のコントロールではほとんど見られず、糖加水分解酵素のみの処理でわずかに見られた（図3）。また、R18もしくはR43と糖加水分解酵素を共処理した場合、遊離するフェルラ酸量が10倍以上増加することが明らかとなった。このことは、放線菌FAEのいずれもが、サトウキビバガス細胞壁からのフェルラ酸抽出に効果を持つことを示しており、また脱脂米糠への効果と同様に、その働きは糖加水分解酵素との相乗効果によって得られたと考えられる（図3）。また、桂皮酸類で、フェルラ酸とともにイ

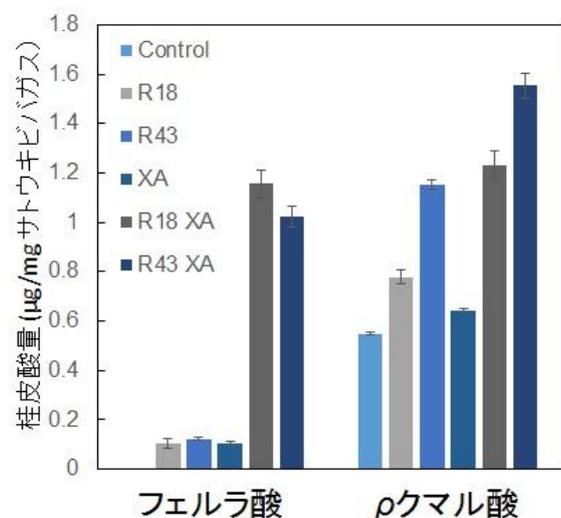


図3 サトウキビバガスからの桂皮酸類生成量

ネ科植物細胞壁に多く含まれる *p*クマル酸も、フェルラ酸と同様に遊離されており、FAEの共処理によって生成する *p*クマル酸量は未処理および糖加水分解酵素処理の2～3倍程度であることが分かった。これまでに、放線菌FAEは桂皮酸エステル類のなかでもフェルラ酸に最も高い基質特異性を示す酵素であるという解析結果を得ているが（6）、バイオマスからの遊離においては、糖加水分解酵素と協調的に働くことでその能力を発揮できたと考えられる。

これらの結果をまとめると、放線菌FAEは植物種間の多様な細胞壁構造に対応し、糖加水分解酵素の働きを補助し細胞壁分解を促進させる酵素であるといえる。さらに、今回の解析で見出したバイオマス由来オリゴ糖は、バイオ燃料用糖として供給できるだけでなく、生理活性をもつ機能性オリゴ糖である可能性がある。今後はこれらのオリゴ糖の機能性評価を行い、放線菌酵素を用いたバイオマス利用への付加価値を示していきたい。

参考文献

1. Sultana R *et al.*, 2005, *J Neurochem* 92:749-758
2. Uraji *et al.*, 2013 *Appl Biochem Biotechnol* 171:977-987,
3. Huang *et al.*, 2011 *Bioresource technology* 102: 8117-8122
4. Agger *et al.*, 2010 *J Agric Food Chem* 58: 6141-6148
5. Koseki *et al.*, 2009 *Appl Microbiol Biotechnol* 84:803-810
6. Uraji *et al.*, 2014 *PLoS One* 9:e104584
7. 農研機構
<http://www.naro.affrc.go.jp/project/result/s/laboratory/nics/2010/nics10-22.html>
8. Yokoyama and Nishitani, *BSJ-Review* 5: 46(2014)

青枯病菌エフェクターの宿主植物因子による活性化機構の解明

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

向原隆文

(概要) ナス科植物青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は多数のエフェクタータンパク質を宿主細胞内に注入して感染を成立させる。青枯病菌エフェクターを酵母で発現させたところ、酵母の増殖を著しく阻害するエフェクター (RipAY) が見いだされた。RipAY はグルタチオン (GSH) を分解する γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼと相同性を有しており、酵母で発現させると細胞内の GSH プールを枯渇させるほど強い GSH 分解活性を示した。GSH は植物の自然免疫系で重要な働きをしており、RipAY を発現させた植物では GSH プールの枯渇に伴い病害抵抗反応の著しい抑制が観察された。興味深いことに RipAY は病原菌内では不活性化型として発現するが、植物の細胞質型チオレドキシンによって活性化型となり、強力な GSH 分解活性を発揮した。GSH は病原菌の生育やストレス耐性においても重要であり、宿主チオレドキシンを介した GSH 分解活性の厳密な制御は病原菌自身の GSH を守るための安全装置と考えられる。本研究から、RipAY は宿主 GSH のみを選択的に分解することで病害抵抗反応を抑制するという新奇作用機序を持つ病原因子であることが明らかとなった。

はじめに

青枯病は植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされるナス科作物の最重要病害である。青枯病菌の宿主範囲は非常に広く、ナス科を中心に 50 科 200 種以上の植物を加害する (Hayward, 1991)。本菌は植物の根や傷口から植物体内に侵入すると維管束内で増殖しながら全身に広がり、最終的には植物全体を枯死させる (Genin and Denny, 2012)。

植物は病原菌の感染から身を守るために二つの主要な防御系を発達させている (Jones and Dangl, 2006)。一つは pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (PTI) と呼ばれ、様々な病原体が共通に持つ細胞成分 (分子パターン) を受容体を介して認識・起動される防御系である (Boller and Felix, 2009)。PTI が誘導された細胞では、MAP キナーゼやカルシウム依存性プロテインキナーゼの活性化、活性酸素種 (ROS) の生成、防御関連遺伝子の発現、ホルモンやファイトアレキシンの合成、カロース蓄積等の病害抵抗反応が連続的に誘導され、病原菌の封じ込めを担う。一方、病原菌は宿主の PTI を乗り越えて感染を成立させるため、PTI を抑制する病原因子 (エフェクター) を発達させた。植物はエフェクターによる PTI 抑制に対抗するために病害

抵抗性 (R) タンパク質を発達させた。R タンパク質は細胞内でエフェクターを感知し、effector-triggered immunity (ETI) と呼ばれる防御系を起動する (Maekawa *et al.*, 2011)。ETI によって誘導される病害抵抗反応は PTI と比較して非常に強く、しばしばプログラム細胞死を伴うほど激烈である。

グラム陰性植物病原細菌の多くは Hrp タイプ III 分泌系と呼ばれる特殊なタンパク質分泌系を用いて植物にエフェクターを注入する (Alfano and Collmer, 1997)。今日までに植物免疫系を阻害するエフェクターが複数同定されている。これらエフェクターの標的宿主因子のほとんどはパターン認識受容体やシグナル伝達に関わるタンパク質、植物ホルモンの生産に関わるタンパク質等、病害抵抗反応の上流や下流で働く植物タンパク質である (Dou and Zhou, 2012; Macho and Zipfel, 2015)。一方、タンパク質以外の宿主細胞成分を標的とするエフェクターもわずかながら報告されている (Macho, 2015)。

青枯病菌の Hrp タイプ III 分泌系は宿主植物に対する病原性に必須である (Boucher *et al.*, 1987; Mukaiharu *et al.*, 2004)。このことから、本菌がエフェクターを利用して植物免疫系を抑制し、感染を成立させていることは明白である。筆者らは、日本産

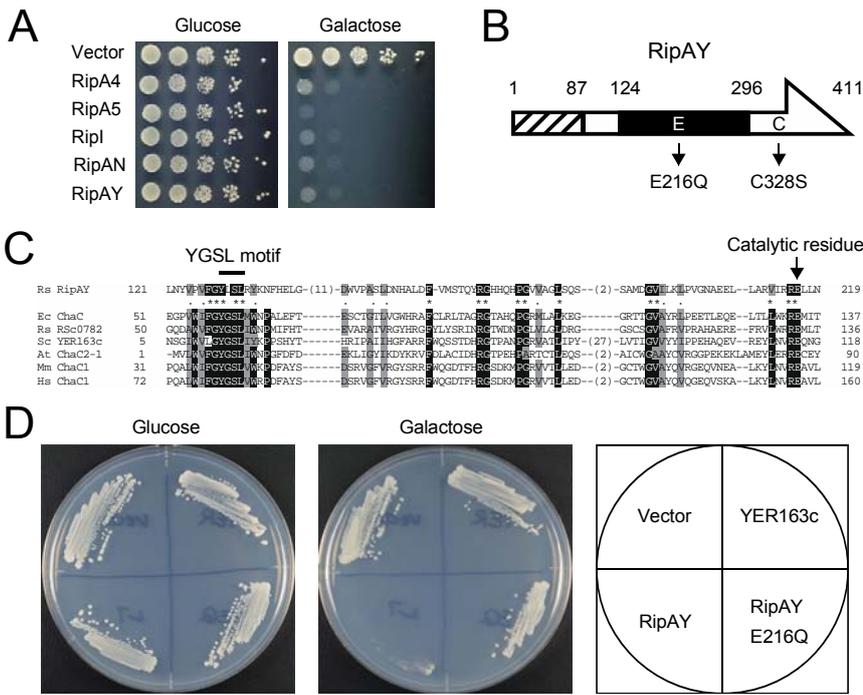


図 1. 酵母の増殖を阻害する青枯病菌エフェクター

(A) エフェクター発現抑制培地 (Glc) 及び誘導培地 (Gal) での酵母の増殖。(B) RipAY エフェクターのタンパク質構造。斜線はタイプ III 分泌シグナル。(C) 様々な生物種由来の γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (γ -GCT) と RipAY のアミノ酸配列の比較。特徴的な YGSL モチーフと触媒残基のグルタミン酸を矢印で示す。(D) RipAY, RipAY E216Q 及び YER163c を発現する酵母の増殖。

青枯病菌 RS1000 株の全エフェクターレパートリーの解明に成功し、青枯病菌が植物病原細菌の中では最も多い約 70 種類のエフェクターを持つことを報告している (Mukaihara *et al.*, 2010)。現在、青枯病菌のエフェクターは Rip (*Ralstonia injected protein*) と呼ばれているが、Rip エフェクターのタンパク質機能はほとんどが未解明であり、病原因子としての役割も不明である。

酵母は病原菌エフェクターの宿主 (真核) 細胞内での機能を知るための良いモデル生物と考えられる。本研究では、青枯病菌エフェクターを酵母で発現させて表現型解析を行い、これまでに知られていない興味深いエフェクター活性とその活性化に関わる宿主植物因子を明らかにしたので報告する。

結果と考察

1. 酵母の増殖を阻害する青枯病菌エフェクターの同定

RS1000 株の約 70 種類のエフェクター遺伝子を酵母発現ベクターに組み込んで酵母に形質転換し、*GAL1* プロモーターの制御下で誘導発現させた。エフェクター発現酵母の表現型解析から、酵母の増殖を著しく阻害する 5 つのエフェクター (RipA4,

RipA5, RipI, RipAN と RipAY) が見いだされた (図 1A)。この中で筆者らはグルタチオン (GSH) 分解酵素である γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (γ -GCT) と相同性を有する RipAY エフェクターに着目した (図 1B)。RipAY の中央領域には全体的な相同性は低いものの γ -GCT 活性に重要な YGSL モチーフと活性中心であるグルタミン酸 (E) 残基がよく保存されていた (図 1C)。RipAY の 216 番目のグルタミン酸をグルタミンに置換した変異タンパク質 RipAY E216Q は酵母で発現させると増殖阻害活性が完全に消失することから、RipAY の 216 番目のグルタミン酸はエフェクター機能に重要なアミノ酸残基であることが示された (図 1D)。一方、酵母由来の γ -GCT (YER163c) を酵母で発現させても増殖阻害は全く観察されなかった。

2. RipAY は酵母細胞内の GSH プールを枯渇させる
酵母の γ -GCT である YER163c は酵母で発現させても増殖阻害効果を示さなかったが、RipAY の 216 番目のグルタミン酸が酵母の増殖阻害に重要なことは、RipAY が γ -GCT として機能する可能性を示唆する。そこで、RipAY の発現を誘導した酵母の細胞内 GSH 量を経時的に測定した。その結果、RipAY

を発現誘導すると速やかに細胞内の GSH 量が減少しはじめ、誘導後 6 時間でコントロールの 1%以下にまで GSH 量が低下することが明らかとなった(図 2)。一方、 γ -GCT 活性に重要と考えられるグルタミン酸を変異させた RipAY E216Q を発現させた酵母では細胞内 GSH の減少は全く観察されなかった。YER163c を発現させた酵母では GSH 量は緩やかに減少するもののコントロールの 50–60%まで低下するのみであった。この結果から、RipAY は γ -GCT として機能すること、その活性は既知 γ -GCT と比較してかなり強力であることが考えられた。酵母の GSH 欠損株は GSH 非存在下で増殖が停止することが知られており、RipAY 発現酵母で観察される増殖阻害は GSH 枯渇に起因すると推察される。

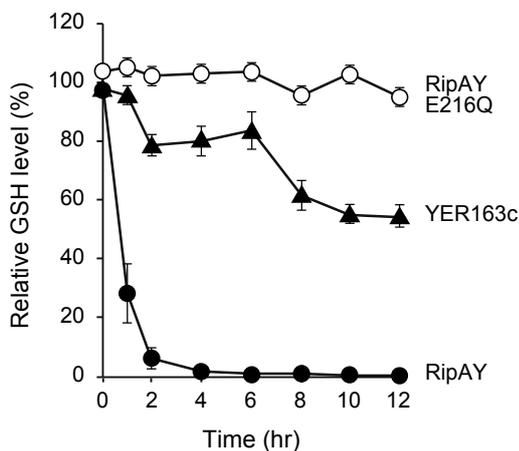


図 2. エフェクター発現酵母の細胞内 GSH 量の変化
RipAY (●), RipAY E216Q (○) 及び YER163c (▲) を発現する酵母の増殖を 2 時間毎に測定している。GSH の相対量は同時に培養したベクターコントロールを 100% として比較算出した。

3. RipAY は植物細胞内の GSH プールを枯渇させ、植物の PTI を介した病害抵抗反応を抑制する

RipAY の植物細胞に対する効果を確認するため、ベンサミアナタバコでアグロインフェクション法により RipAY を一過的に発現させた。RipAY を発現させた本葉ではアグロインフェクション後 48 時間では細胞死等の可視的な変化は観察されなかった(図 3A)。この時の植物細胞内 GSH 量を測定したところ、

RipAY 発現葉では GSH 量がベクターコントロールの 5%以下にまで減少していた(図 3B)。一方、RipAY E216Q の発現葉では GSH 量の減少は観察されなかった。この結果は、RipAY が植物細胞内でも γ -GCT を分解し、GSH 合成系が正常な場合でも GSH を枯渇させられるほど強い分解活性を持っていることを示している。

RipAY が植物細胞のどこで働くかを明らかにするために GFP との融合タンパク質を作成し、植物細胞内での局在性を調べたところ、RipAY-GFP 及び RipAY E216Q-GFP は細胞質にのみ局在していた。この結果から、RipAY が機能する場所は植物の細胞質であると考えられた(図 3C)。

GSH は植物の病害抵抗反応において多数の重要な役割を果たしており、GSH の合成量が低下したシロイヌナズナの *pad2-1* 変異体では PTI の抑制や親和性の病原菌に対する感受性の増大が報告されている

(Glazebrook and Ausubel, 1994)。RipAY が植物の PTI 反応を抑制するかどうかを調べるために、ベンサミアタバコの本葉をフラジェリンタンパク質の N 末端側 22 アミノ酸断片 (*flg22*) で処理した。*flg22* は植物に PTI を誘導するエリシターとして広く利用される代表的な病原菌由来の分子パターン (PAMP) である。ベクターコントロールの本葉では *flg22* 処理後、数分から活性酸素種 (ROS) の生成を示すシグナルが検出され、処理後 20 分でピークを迎える(図 3D)。しかしながら、RipAY を発現させた本葉では ROS 生成がコントロールと比較して著しく抑制された。一方、RipAY E216Q の発現葉では ROS 生成の抑制は全く観察されなかった。さらに、*flg22* 処理で誘導されることが知られている病害抵抗性関連遺伝子の発現を調べたところ、RipAY 発現葉では調べた全ての PTI マーカー遺伝子の発現誘導が著しく抑制されていた(図 3E)。RipAY E216Q 発現葉では PTI マーカー遺伝子の発現抑制は全く観察されなかった。

以上の結果から、青枯病菌の RipAY は植物細胞内の GSH プールを枯渇させることで病害抵抗反応を抑制するという新奇作用機序を持つ病原因子であることが明らかとなった。

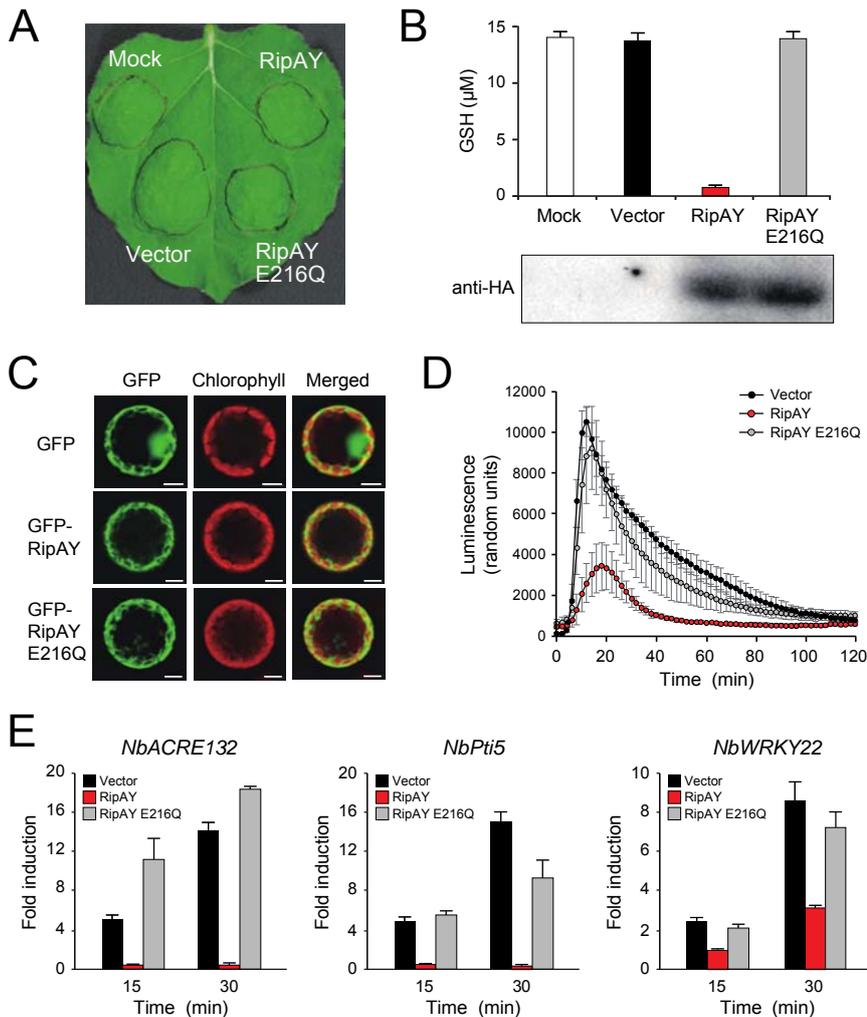


図 3. アグロインフィルトレーションにより RipAY を発現させたベンサミアナ本葉の表現型

(A) アグロインフィルトレーションにより RipAY 及び RipAY E216Q を発現させたベンサミアナタバコ本葉。Mock はバッファーのみ。接種後 48 時間で撮影。(B) エフェクター発現葉の GSH 量。接種葉におけるエフェクターの発現。HA 標識されたエフェクターをウエスタンブロットで検出している。(C) GFP および GFP 融合エフェクターの植物細胞内の局在性。(D) flg22 処理葉における ROS 生成。ベクターコントロール及びエフェクターを発現させたリーフディスクを 100 μM の flg22 で処理し、処理後 120 分までの ROS 生成を発光モニターした。(E) flg22 処理葉における各 PTI マーカー遺伝子の発現。

4. RipAY の GSH 分解活性は未知の真核細胞因子により活性化される

RipAY の GSH 分解活性を *in vitro* で詳細に調べるため、RipAY, RipAY E216Q 及び YER163c タンパク質を大腸菌で発現させ、組換えタンパク質を得た。酵母のγ-GCTである YER163c を *in vitro* で GSH と反応させると GSH が減少した(図 4)。しかしながら、RipAY では様々な条件でも GSH の減少は観察されなかった。いくつかの病原菌エフェクターでは酵素活性が真核細胞因子で活性化されることが知られている。そこで RipAY の反応液中に酵母及び植物の粗抽出液を加えたところ、GSH 分解活性が認められた。一方、RipAY E216Q ではいずれの場合も GSH 分解は観察されなかった。*Pseudomonas syringae* の AvrRpt2 エフェクターでは酵母や植物由来のシクロフィリンでプロテアーゼ活性が活性化されることが

報告されている (Coaker *et al.*, 2005)。しかしながら、シクロフィリンを全て欠損した酵母変異株の粗抽出液を加えても RipAY の GSH 分解活性は活性化された。この結果から、RipAY の活性化には未知の真核細胞因子が関与することが示された。

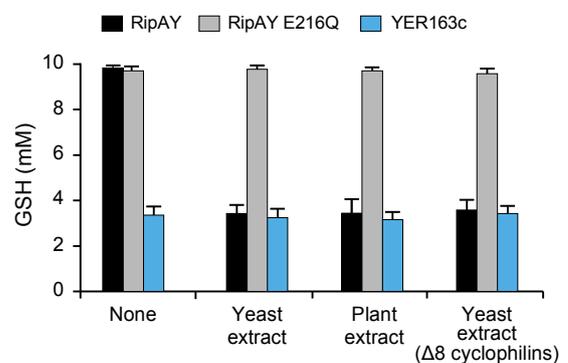


図 4. RipAY の GSH 分解活性は未知の真核細胞因子により活性化される

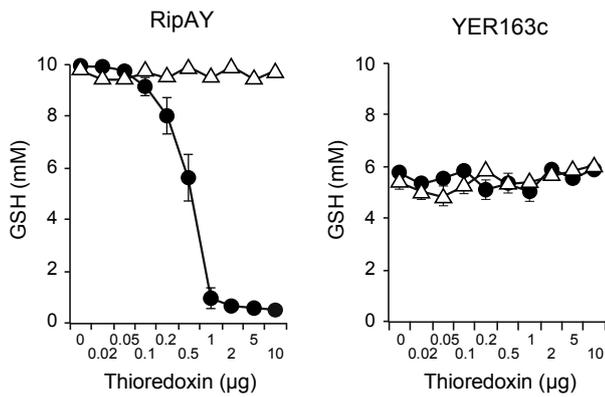


図5. RipAY 及び YER163c の GSH 分解活性に対する精製チオレドキシンの効果
酵母チオレドキシソ TRX2 (●) 及び大腸菌チオレドキシソ TrxA (△) を反応液に添加し、GSH 量を測定した。

5. RipAY を活性化する真核細胞タンパク質の同定

RipAY の GSH 分解活性を活性化する真核細胞因子を同定するため、試料の調整が容易な酵母の粗抽出液を限外ろ過フィルターで分画したところ、活性化因子の分子量は 10–100 kDa と推定された。フィルター分画液をゲル濾過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーで分画し、RipAY の活性化と相関するタンパク質の部分配列を質量分析で決定したところ、酵母チオレドキシソ TRX2 であった。

(以上、データ示さず)。TRX2 による RipAY の活性化を証明するために精製 TRX2 を用いて検証実験を行ったところ、TRX2 の量に応じて RipAY の GSH 分解活性は増大した (図 5)。一方、酵母の γ -GCT である YER163c の GSH 分解活性は TRX2 の添加によって全く変化しなかった。完全に活性化された RipAY は YER163c よりも 30–40 倍高い GSH 分解活性を示し、RipAY が非常に強力な GSH 分解酵素であることが明らかとなった。

チオレドキシソはほとんどの生物に共通に存在するタンパク質であるが、RipAY は大腸菌の粗抽出液では活性化されない (図 4)。RipAY は大腸菌の精製チオレドキシソでも活性化されなかった (図 5)。RipAY は青枯病菌由来のチオレドキシソでも活性化されない (図 6A) ことから、病原菌細胞内では不活性化型で発現・維持されると考えられる。

6. RipAY は植物の細胞質型チオレドキシソによってジスルフィド還元活性非依存的に活性化される

青枯病菌のエフェクターは Hrp から植物細胞内に注入され、そこで病原因子としての機能を発揮するため、RipAY は植物細胞内のチオレドキシソにより活性化されると考えられる。植物ではチオレドキシソの機能分化が進んでおり、アラビドプシスでは少なくとも 20 のチオレドキシソが存在し、7 つのタイプ (*f, m, x, y, z, o* 及び *h*) に分類されている (Meyer *et al.*, 2002)。RipAY は植物細胞内では細胞質に局在するため、細胞質型のチオレドキシソ *h* の効果を調べたところ、細胞質に多量に存在するチオレドキシソ *h1* から *h5* で活性化されることが明らかとなった (図 6A)。一方、葉緑体にのみ存在するチオレドキシソ *m1, f1, x, y1* 及び *z* では全く活性化されなかった (図 6B)。エフェクターの酵素活性が自身が働く場所にのみ局在する宿主因子で活性化されるよう上手くチューニングされているのは大変興味深い。

チオレドキシソはジスルフィド還元活性を介してタンパク質の活性を制御することが知られている。しかし、RipAY の活性化に本活性は必要でなかった (データ示さず)。このことはジスルフィド還元活性を有する原核型チオレドキシソが RipAY を活性化しない事実と良く一致し、チオレドキシソによる未知のタンパク質活性化機構の存在が強く示唆される。

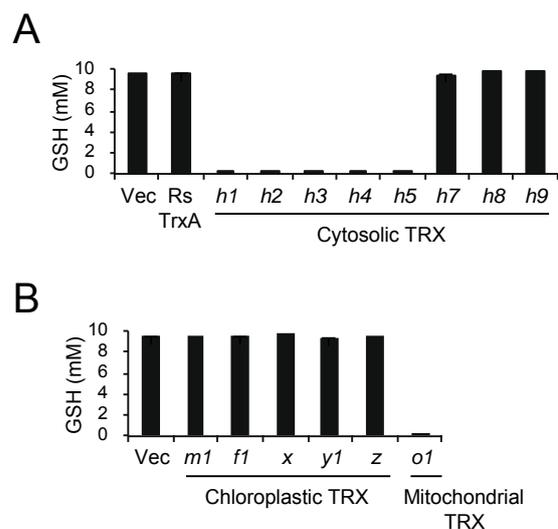


図 6. 植物チオレドキシソによる RipAY の活性化

6. GSH は青枯病菌の生育に必須である

青枯病菌の細胞内で RipAY が不活性化型で発現することは、病原菌にとって GSH が重要なことを示唆する。細菌では GSH は二段階で合成され、各段階で働く酵素は *gshA* 及び *gshB* 遺伝子にコードされている。青枯病菌の *gshAB* 変異株 (RS1701 株) では GSH を合成できなくなっていた。興味深いことに、RS1701 株では H₂O₂ やメチルグリオキサールに対する耐性が大きく低下しており、GSH が病原菌の酸化ストレス応答や解毒経路で重要な働きをしていることが明らかとなった(ここまでデータ示さず)。また、RS1701 株は GSH を含まない最少培地中では完全に生育が停止することから、病原菌の生育に GSH が必須であることも示された (図 7)。以上の結果から、RipAY の活性は病原菌内の GSH を分解から守るために厳密に制御されていると考えられる。

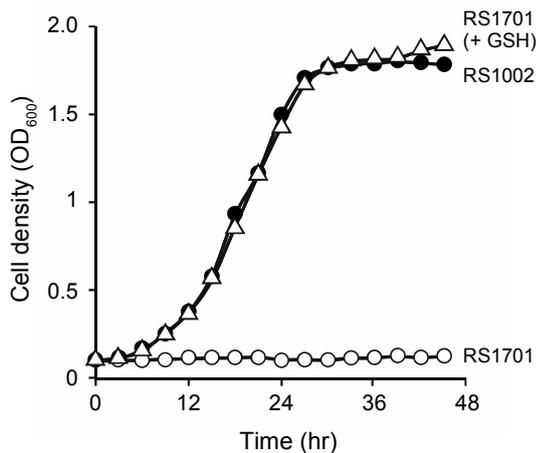


図 7. GSH 合成変異株 RS1701 の最少培地における増殖

おわりに

本研究から、青枯病菌の RipAY エフェクターが植物チオレドキシンで活性化される強力な GSH 分解酵素であり、植物の GSH プールを枯渇させて病害抵抗応答を抑制するという新奇な作用機序を持つ病原因子であることが明らかとなった (図 8 に作用モデルを示す)。植物チオレドキシンに依存した RipAY の活性化機構は、病原菌自身にとっても重要な GSH を RipAY による分解から守る安全装置として発達したと考えられる。

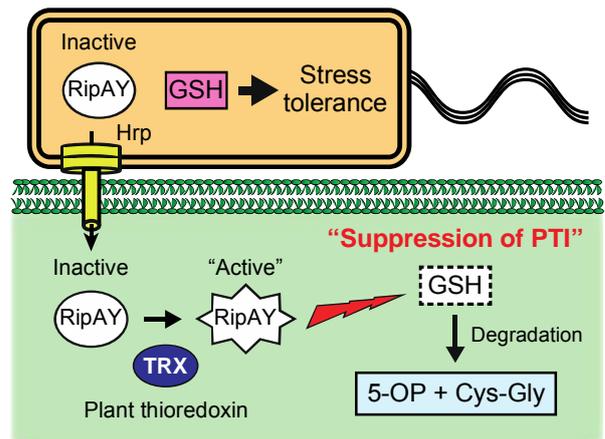


図 8. 植物と青枯病菌の相互作用における RipAY の役割

謝辞

本研究は岡山県農林水産総合センター生物科学研究所の畑中唯史専門研究員、小田賢司専門研究員、中野真人流動研究員との共同研究によるものです。

研究を支援していただいたウエスコ学術振興財団に感謝致します。

引用文献

Alfano and Collmer (1997) *J. Bacteriol.* **179**: 5655-5662.
 Boller and Felix (2009) *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379-406.
 Boucher *et al.* (1987) *J. Bacteriol.* **169**: 5626-5633.
 Coaker *et al.* (2005) *Science* **308**: 548-550.
 Dou and Zhou (2012) *Cell Host Microbe* **12**: 484-495.
 Genin and Denny (2012) *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**:67-89.
 Glazebrook and Ausubel (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 8955-8959.
 Hayward AC (1991) *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**: 65-87.
 Jones and Dangl (2006) *Nature* **444**: 323-329.
 Macho AP (2016) *New Phytol.* **210**: 51-57.
 Macho and Zipfel (2015) *Mol. Cell* **54**:2 63-272.
 Maekawa *et al.* (2011) *Nat. Immunol.* **12**: 817-826.
 Meyer *et al.* (2002) *Methods Enzymol.* **347**: 394-402.
 Mukaihara *et al.* (2004) *Mol. Microbiol.* **54**: 863-875.
 Mukaihara *et al.* (2010) *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 251-262.

死細胞から放出される組織リモデリング増悪化因子の分子機能と病態制御

就実大学 薬学部

森 秀治, 豊村隆男, 渡邊政博

近年、細胞死に伴って死細胞から免疫・炎症系を刺激する因子が放出され、これが「組織リモデリング」病態形成にとっての共通基盤となっている事が明らかとなりつつある。組織リモデリング病態は、脳血管障害や糖尿病などの様々な難治性疾患の増悪化に関与し、これら疾患の重度後遺症に伴う医療負担は極めて甚大であるにもかかわらず、未だ有効な根治的治療の方策は確立していないのが現状である。我々は、組織リモデリング病巣局所に出現して免疫炎症反応を過剰亢進し、病態増悪化を引き起こす因子 (Damps) を見出した。しかしながら、現時点で、その病態生理学的意義に関しては不明な点が多いのが現状である。本研究では Damps の病態局所での存在様式を明らかにするために Damps 関連因子を結合させた不溶性担体を作成し、これを Damps 結合因子探索のための特異プローブとして適用した。生体組織から Damps 対して高親和性を示す結合因子の単離を試みた結果、数種の結合因子候補を検出することに成功した。このことは Damps が他因子と共に機能的複合体を形成し得ることを意味するものであり、組織リモデリング病態制御のための新たな治療標的の可能性を示唆するものと考えられた。

1. はじめに

細胞死・炎症・創傷治癒などの生体の再生機構は、多種多様の生理活性因子群によって引き起こされる極めて精巧な生命維持活動であり、その破綻は連鎖的な組織リモデリング病態 (病的な組織構造と機能障害) を引き起こし、重篤な難治性疾患 (動脈硬化や線維化など) を招いてしまう。従って、組織リモデリングに関わる因子を見出し、その制御機構を解明する事は、疾患の未然防止や新規治療法を開発して行く上で極めて重要な課題と考えられる。

我々は、単球 / マクロファージの免疫制御機構に関わっている活性因子研究の過程で、偶然にも脳梗塞発症時の過剰な生体応答に伴って梗塞巣局所に出現する病態増悪化因子 (Damps) の存在を見出し、これが病巣の拡大・増悪化に大きく関与している事を発見した。

驚くべき事に、この増悪化因子 (Damps) は、細胞死に伴って細胞内から細胞外へと局在変化を起こし、細胞外で周囲の免疫細胞や内皮細胞を刺激してサイトカイン様活性 (すなわち遊走活性亢進、細胞接着因子発現亢進、炎症性サイトカインや活性酸素の産生亢進など) を発揮することが明らかとなり、特に

Damps による過剰刺激は典型的なサイトカイン血症の惹起を示唆するものであった。加えて、Damps に対する単クローン抗体を採取して梗塞病態に対する治療効果を検討した所、抗体投与は梗塞病巣に高い結合指向性を有し、神経細胞死や運動麻痺などの症状を著しく抑える事も明らかとなった (FASEB J (2007))。また、抗体による梗塞治療効果は、既知のいかなる市販治療薬 (ラジカルスカベンジャー等) よりも優れ、発症後に投与しても有効性を発揮する驚くべきものであった。これらの知見は、Damps シグナルの遮断が脳梗塞をはじめとする多くの組織リモデリング病態の治療や予防に直結する事を示唆するものであり、投与方法や開発コストの面で、抗体以外の活性分子 (いわゆる Damps に対する低分子遮断薬) を創成していくことが極めて重要であることを裏付けるものであった。

また、Damps の病態局所での存在様式は、現時点で全く不明であり、生体内での Damps 相互作用因子の解明は、Damps が担う病態生理学的意義の解明と共に、新規制御薬開発においても有益な情報を提供してくれるものと考えられた。

このような背景の下、本研究では Damps 関連因子

結合担体を Damps 結合因子探索のための特異プローブとして適用し、生体組織から Damps 関連因子に高親和性を示す結合因子の単離を試みた。

2. 方法

A) Damps 関連因子をリガンドとした不溶性担体の作製

- 1) 不溶性担体 (EAH セファロース 4B, 5 mL gel bed) をファルコン管に取る。
- 2) 担体に、20 % EtOH 液 (30 mL) を加え、転倒混和する。
- 3) 遠心 (2,500 rpm, 5 分, 室温) する。
- 4) クリーンベンチ内で、無菌的に上清を取り除き、滅菌済のリン酸緩衝液 (20 mL) で3回洗浄・平衡化する。
- 5) D-glyceraldehyde (0.18 g) を、リン酸緩衝液 (pH7.4) 20 mL に溶解する。
- 6) 濾過滅菌後に、上記の無菌担体と混合する。
- 7) 37°Cで、10日間、ゆっくりと転倒混和させる。
- 8) 反応後の担体を純水で洗浄する。
- 9) PBS で洗浄後に、PBS に懸濁し、4°Cで保存する。

B) Damps 化担体を用いた生体内 Damps 結合因子の単離

- 1) ブタ肺臓 (約 100 g) を 3~4 個の断片に小分けする。
- 2) 小分けした肺臓 (100 g) に、タンパク質分解酵素阻害剤入り冷 PBS (200 mL) を加え、ホモジナイズする。
- 3) 遠心 (9,000×g, 10分, 4°C) し、上清 (可溶性画分) を回収する。
- 4) 上清に Damps 化担体を加え、4°Cで一晩振とうする。
- 5) グラスフィルターを用いて、Damps 化担体を回収する。
- 6) Damps 化担体をカラムに詰め、冷 PBS で洗浄する。
- 7) 0.5 M NaCl 入り冷 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.5)、及び 1.0 M NaCl 入り冷 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を用いて、結合因子を段階的に溶出する。
- 8) 溶出した結合因子を SDS-PAGE にかき、銀染色に

より結合因子のバンド確認を行う。

3. 結果と考察

0.5 M NaCl 入り冷 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を用いて溶出した画分の fr. 1~10 の SDS-PAGE パターンを図 1 に示す。

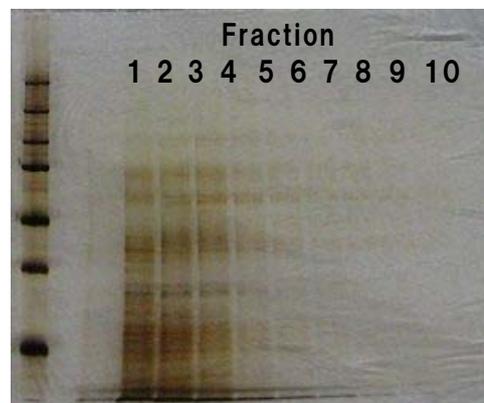


図 1 Damps 化担体を用いた肺臓由来 Damps 関連因子結合画分の電気泳動パターン

Damps 化担体、およびコントロールとしての担体のみを用いて同実験を行った比較検討から得られた泳動パターンを図 2 に示す。

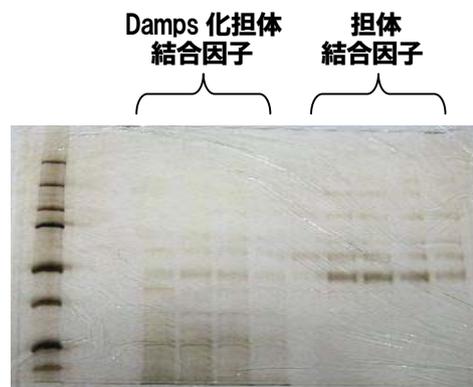


図 2 Damps 化担体結合因子と担体結合因子の泳動パターンの比較検討

両者を比較し、Damps 化担体で調製した溶出試料の低分子量画分のみ、複数個の特異的バンドを確認することができた (図 3)。

今回の研究から、Damps 関連因子と複合体を形成し得る複数種の生体内結合因子が存在することが確

認められた。

今後は、Damps とその受容体から構成される *in vitro* 結合アッセイにおいて、これらの複数種の因子が結合に如何なる影響を及ぼすのかについて検討を進めると共に、Damps が持つ免疫・炎症刺激作用に対する効果についても、RAW 細胞や THP-1 細胞などの免疫担当細胞を用いてサイトカイン産生能や NF- κ B 活性化能などを検証していく必要性があり、今後の研究が大いに期待できるものと思われた。



図3 Damps 化担体に特異的な結合画分 (低分子量画分)の発見

4. おわりに

本研究を通じて、Damps 分子が生体内で機能的複合体を形成し得る事を見出すことに成功した。この知見は、将来的に Damps シグナルの抑制に働くペプチド配列の同定や新たな低分子型分子標的薬の創成にもつながっていくものと考えられ、今後の研究展開が大いに期待されるものである。

5. 謝辞

本研究を実施するに際して、ご助成いただきました公益財団法人ウエスコ学術振興財団の皆様にご心より感謝申し上げます。

6. 参考文献

1) Okuma Y, et al : Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction. *Neuropharmacology*, 85 18-26 (2014)

2) 森 秀治 他 : 生活習慣病の増悪化因子「HMGB1, AGEs-RAGE 系」に対する創薬プラットフォーム構築. *日本薬理学雑誌*, 143 14-17 (2014)

3) 大熊祐 他 : 外傷性脳傷害に対する抗 HMGB1 抗体治療. *岡山医学会雑誌*, 125 97-102 (2014)

4) Takahashi HK, et al : Role of cell-cell interactions in high mobility group box 1 cytokine activity in human peripheral blood mononuclear cells and mouse splenocytes. *Eur J Pharmacol*, 701 (1-3) 194-202 (2013)

5) Takahashi HK, et al : Histamine inhibits high mobility group box 1-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *Eur J Pharmacol*, 718 (1-3) 305-313 (2013)

6) Takahashi HK et al : Role of cell-cell interactions in high mobility group box 1 cytokine activity in human peripheral blood mononuclear cells and mouse splenocytes. *Eur J Pharmacol* 701: 194-202 (2013)

7) Shichida T et al : Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nature Med* 18: 911-917 (2012)

8) Okuma Y, et al : Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Annal Neurol* 72: 373-384 (2012)

9) Zhang J, et al : Anti-HMGB1 monoclonal antibody protects blood-brain barrier from ischemia-induced disruption. *Stroke* 42: 1420-1428 (2011)

10) Kanellakis P, et al : High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 313-319 (2011)

11) Terada C, et al : Gene expression and localization of high-mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama*

- 65: 369-377 (2011)
- 12) Mori S, et al : Ciprofloxacin inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *Brit J Pharmacol* 61: 229-240 (2010)
- 13) Takahashi HK, et al : Prostaglandin E2 inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression on monocytes, cytokine production and lymphocyte proliferation during human mixed lymphocyte reaction. *J Pharmacol Exp Ther* 334: 964-972 (2010)
- 14) Zhang J, et al : Histamine inhibits adhesion molecule expression in human monocytes, induced by advanced glycation end products during the mixed lymphocyte reaction. *Brit J Pharmacol* 160: 1378-1386 (2010)
- 15) Takahashi HK, et al : Effect of nicotine on advanced glycation end products- induced immune response in human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 332: 1013-1021 (2010)
- 16) Ohashi K, et al : Advanced glycation end products enhance monocyte activation during human mixed lymphocyte reaction. *Clin Immunol* 134: 345-353 (2010)
- 17) Takahashi HK, et al : β 2-adrenoceptor stimulation inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pharmacol* 627: 313-317 (2010)
- 18) Wake H, et al : Histidine- rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin- induced angiogenesis in matrigel plug assay. *Eur J Pharmacol* 623: 89-95 (2009)
- 19) Takahashi HK, et al : Prostaglandins E2 inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression, cytokine production and lymphocyte proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 656-670 (2009)
- 20) Liu R, et al : Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S100A12 to receptor for advanced glycation endproducts: heparin's effect on binding. *Acta Medica Okayama* 63: 203-211 (2009)
- 21) Wake H, et al : High mobility group box 1 complexed with heparin induced angiogenesis in a matrigel plug assay. *Acta Medica Okayama* 63: 249-262 (2009)
- 22) Wake H, et al : Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 330: 826-833 (2009)

小児精神疾患治療を指向した経鼻薬物送達法の可能性を探る薬物動態学的研究

就実大学 薬学部 薬物動態学研究室

井上 大輔

本研究では、有効な小児精神疾患治療法の確立を最終目的とし、直接的に脳内へ薬物送達可能な経鼻経路を利用した薬物送達法の可能性を探るべく、薬物の中枢移行に関する薬物動態学研究を試みた。まず基礎的情報を得るために、caffeine をモデル薬物として静脈内投与後の体内動態を解析した。本検討で、麻酔処置により caffeine の体内動態が変動する可能性が示されたため、麻酔状態のラットにおける caffeine の体内動態及び脳移行性の変化を併せて評価した。ラットに静脈内投与後、caffeine は速やかに脳組織に移行し、制限を受けず広く脳内に分布することが示された。また、麻酔処置により caffeine の血中からの消失が遅くなることが明らかとなり、caffeine の血中消失の遅延が脳内動態を変動させる結果となった。血中濃度および脳組織中濃度の速度論的解析により、caffeine の血中濃度の影響を除外した薬物動態学的パラメーターを利用することで、麻酔による体内動態の影響を除外でき、正確な脳移行量の解析が可能であることが示された。今後、薬物動態学的解析を利用して、経鼻投与による薬物脳移行の有効性評価を行い、経鼻薬物送達法の確立に繋げたい。

現代社会において、精神神経疾患の患者数は急激に増加しており、国際的な臨床試験数は、「がん」に次いで2番目に多く¹⁾、中枢神経疾患領域の医薬品開発が活発であることが伺える。小児においては、注意欠如多動性障害（ADHD）や自閉症・アスペルガー、うつ病、パニック障害、適応障害など、数多くの精神疾患が社会問題化しており、小児精神疾患は急増の一途を辿っている。これら多くの精神疾患では有効な治療薬はいまだ少なく、小児ではさらに開発が困難を極める。うつ病や不安障害、統合失調症、認知症など、様々な疾患が存在しており、病態メカニズムの解明や新しい創薬研究・開発が急速に進められている現在において、有効な薬理効果を示す薬物見出されても、一般的な注射剤や経口製剤では、全身性の副作用が問題となることも多い。中枢神経疾患の薬物療法では、脳組織や神経組織内へと薬物を送達する必要があるが、全身循環血と脳組織を隔てるバリアである血液脳関門（BBB）の存在により、薬物を含む物質の移行は極めて厳格に制限される²⁾。従って、治療効果が得られる有効濃度域に達する程の高い脳内薬物濃度を維持するためには、高用量の薬物投与が必要となり、その結果として、全身性の副作用が発現するか、副作用回避のため十分量を投与できず、治療薬として成立しないケース

が多々ある¹⁾。即ち、有効な中枢神経疾患の薬物治療戦略としては、薬物の全身移行を抑え、脳へ選択的移行が可能な、効率的な脳内送達法の構築が重要なアプローチとなる。

加えて、小児の場合は、ほとんどの医薬品で詳細な薬物動態が未知で、小児に対する有効性や安全性さえ不明な薬物も数多い。最近になり、日本においても小児製剤の詳細な研究開発に向けた取り組みが始まり、小児製剤の薬物動態学研究が大きく注目され始めたところである。

薬物の低い脳内送達率を克服するための有用な手段として、近年、「経鼻経路」が注目され、脳組織への薬物送達法として経鼻投与が利用される研究が多くなされている³⁾。においを感知する嗅神経が脳内から鼻腔上部へと伸びており、鼻腔内投与された薬物はこの嗅神経領域（Olfactory region）を介して脳内へ直接的に移行することが知られている⁴⁾。（図1）この「鼻腔-脳経路」を利用することで、全身循環血を介さず、脳への直接的な薬物移行が可能となるため、最大のバリアである BBB を回避でき、かつ脳組織へ選択的な薬物送達が可能となる。従って、「鼻腔-脳経路」を利用した薬物送達法は、全身性副作用の著しい軽減と、高い脳内薬物移行を可能とし、中枢神経疾患治療薬の有望な送達法となり得る。実

際、経鼻投与経路を利用した動物及びヒトでの検討が報告され、注射剤や経口投与に比べ、投与薬物の脳移行性および治療効果が高いことが認められた研究も多い³⁾。さらに、近年の経鼻投与デバイスの発展により、簡便に一定量を鼻腔内噴霧できるようになり、小児に対して保護者などの他者が容易に投与可能な点からも、経鼻製剤は小児精神疾患治療薬として優れた可能性を有しており、経鼻製剤化は小児に対する有能な治療戦略となり得るものと考えられる。そこで我々は、有効な小児精神疾患治療薬の開発を最終目標として、BBB を回避でき、直接的に脳内へ薬物送達可能な「経鼻経路」を利用した薬物送達法の可能性を探るべく、精神疾患治療薬の経鼻投与後の薬物動態学研究を試みることにした。

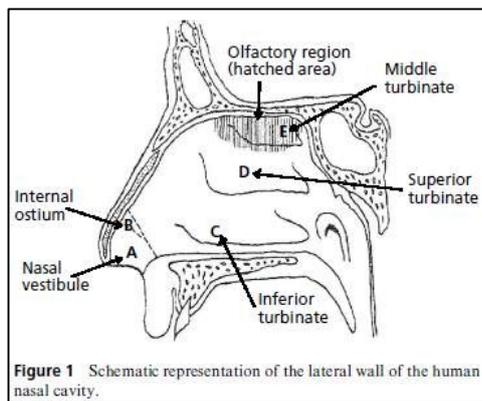


図1 鼻腔の構造 (Illum L.⁵⁾ より)

方法

Caffeine の脳内動態の評価

本検討では、まず初期的検討として、薬物の脳移行性を正確に評価可能なシステムを確立するため、体内動態及び脳移行性を評価するためにモデル薬物として caffeine を選択し、caffeine をラットに静脈内投与後の薬物動態に関する基礎的情報を得ることを試みた。Urethane (1.2 g/kg, i. p.) により麻酔を施したラットの左大腿静脈より caffeine 溶液 (0.4 mg/kg) を静脈内投与し、一定時間経過後 (5, 15, 30, 60, 120 min) に、脳脊髄液 (CSF) を採取し、氷冷 PBS を経心的灌流することで脱血した後、脳組織を採取した。脳組織は、海馬 (HI)、嗅球 (OB)、大脳、小脳に分割した。本検討では CSF 及び HI、OB 中の caffeine 濃度を LC/MS/MS を使用して定量し、

脳組織中 caffeine 濃度の時間推移を測定した。

麻酔による体内動態の影響

Urethane 麻酔を施すことで、caffeine の血中動態が変動することが示唆されたため、麻酔による caffeine の体内動態に及ぼす影響を、覚醒状態のラットと比較検討することで評価した。覚醒群では、diethylether の吸入による一時的な麻酔下のラットに、薬物投与用カニューレを左大腿静脈に挿入し、その後、覚醒させたラットに caffeine 溶液をカニューレより静脈内投与し、上記の麻酔下ラット群と同様に、CSF、HI、OB 中の caffeine 濃度推移を測定した。

血中濃度推移の評価

Caffeine の血漿中濃度推移を得るために、urethane 麻酔下あるいは覚醒状態のラットに caffeine 溶液を静脈内投与後、右大腿動脈に挿入した採血用カニューレより経時的に血液を採取し、血漿中 caffeine 濃度の時間推移を測定した。

結果と考察

図2に、脳組織 CSF、HI、OB 中の caffeine 濃度推移を示した。いずれの組織においても投与初期 (5分) より caffeine の移行が認められ、caffeine は組織移行性が極めて高いことが確認された。また最高血中濃度到達時間 (T_{max}) は CSF で 5-15 分、OB では 5 分と caffeine の移行が早い結果が得られた。これは、OB は脳表面に存在しており CSF と接する位置に存在すること、さらに OB は体積の小さい部位であるために、caffeine 濃度の速やかな増大が得られたと考えられた。HI では T_{max} が 60 分と移行が緩やかであり、移行量も OB と比較して低く、HI は脳深部に位置することがこれらの相違の一因と考えられた (表1)。

血漿中 caffeine 濃度推移を麻酔群及び覚醒群で比較した結果、麻酔群では caffeine の消失が緩やかになることが示された (図3)。従って、麻酔薬の影響により血液からの caffeine 消失が変動する可能性が示唆された。脳組織では、CSF において麻酔

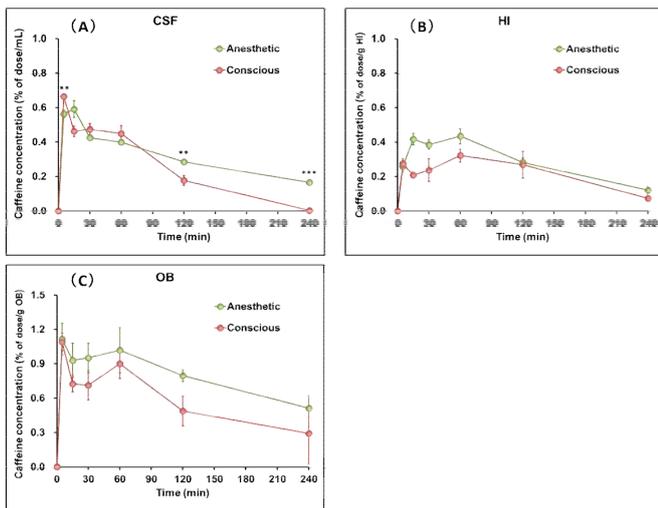


図2 脳組織中のcaffeine濃度推移
 静脈内投与後の各組織中caffeine濃度の経時的変化。(A)脳脊髄液(CSF)、(B)海馬(HI)、(C)嗅球(OB)。データは平均値±標準偏差(n=3-9)で示し、両群間の統計学的有意差を*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001で表記。

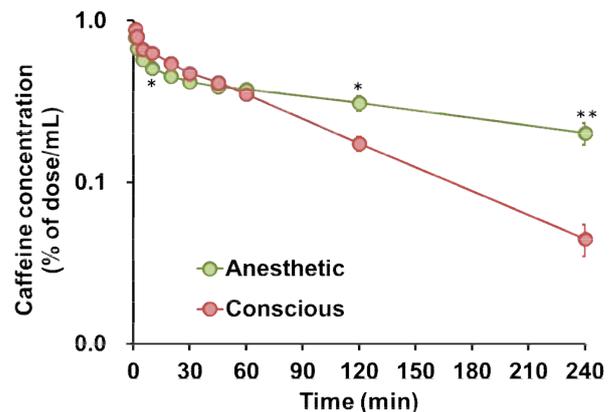


図3 血漿中のcaffeine濃度推移
 静脈内投与後の血漿中caffeine濃度の経時的変化。データは平均値±標準偏差(n=3-4)で示し、両群間の統計学的有意差を*p<0.05, **p<0.01で表記。

群で有意に高いcaffeine濃度が120分以降も維持されており、血中濃度推移の影響を強く受けた可能性が考えられた(図2)。一方、HIでは、覚醒群と比較して麻酔群の最高血中濃度(C_{max})が高く、麻酔によりcaffeineの移行量が増大した結果、血中濃度時間曲線下面積(AUC)が高くなったと考えられた(図2-c, 表1)。さらに、OBでは、麻酔群のAUCが覚醒群と比較して1.4倍大きく、麻酔群でより高いcaffeineの移行が観察された(図2-d)。上記の通り、麻酔の影響によりcaffeineの血中動態

が変動することが示されたため(図2-a)、麻酔群と覚醒群の血中濃度推移の相違の影響を除去するために、各組織中濃度のAUCと血漿中濃度のAUCとの比($AUC_{tissue/plasma}$)を算出した(表2)。両群の $AUC_{tissue/plasma}$ を比較した結果、脳組織のCSF及びHI、OBでは覚醒時のAUC比に対する麻酔時のAUC比($AUC_{anesthetic}/AUC_{conscious}$)がそれぞれ0.98及び0.97、1.06となった。いずれの脳組織においても1付近の値を示しており、本パラメーターを算出することで、血中濃度推移の変動を除外した脳組織内への薬物移

表1 Caffeineの薬物動態学的パラメーター

		AUC ₀₋₂₄₀		AUC ratio (Anesthetic/Conscious)	C _{max} (% of dose/mL)	T _{max} (min)
		(% of dose min/mL)	(% of dose min/g tissue)			
Plasma	Anesthetic	78.1		1.32	-	-
	Conscious	59.0			-	-
CSF	Anesthetic	74.8		1.29	0.59	15
	Conscious	57.9			0.66	5
HI	Anesthetic		68.0	1.28	0.43	60
	Conscious		53.1		0.32	60
OB	Anesthetic		189.8	1.40	1.11	5
	Conscious		135.3		1.09	5

血漿中(Plasma)、脳脊髄液(CSF)、海馬(HI)、嗅球(OB)における各種パラメーター。0-240分における組織中濃度-時間曲線下面積(AUC₀₋₂₄₀)、覚醒群に対する麻酔群のAUC比(AUC ratio)、最高血中濃度(C_{max})、最高血中濃度到達時間(T_{max})。

表2 AUC比

		AUC ratio	
		(A) AUC _{tissue/plasma}	(B) AUC ratio _{anesthetic} / AUC ratio _{conscious}
Plasma	Anesthetic	1	1
	Conscious	1	
CSF	Anesthetic	0.96	0.98
	Conscious	0.98	
HI	Anesthetic	0.87	0.97
	Conscious	0.90	
OB	Anesthetic	2.43	1.06
	Conscious	2.29	

(A)血漿に対する組織中AUCの比、(B)覚醒群に対する麻酔群の(A)の比

行を評価可能であることが示された。

さらに本検討で血中濃度推移の影響を除外した解析を行った結果、caffeine の脳移行は、麻酔の影響を受けない結果となった。従って、麻酔により caffeine の血中消失が遅延したことにより脳組織中 caffeine 濃度は上昇したが、血中濃度推移の変動を受けたのみで、麻酔処置が薬物の脳移行性自体に影響しないことを示唆している。これは、caffeine は BBB による制限を受けることなく脳組織に移行可能であり、極めて高い膜透過性及び高い組織分布能を有することに起因すると考えられた。

結論

本検討では、薬物の脳移行性を薬物動態学的に解析するための基礎的情報を得るために、caffeine をモデル薬物として、静脈内投与後の体内動態を評価した。その結果、caffeine では、高い膜透過性と組織分布能により静脈内投与後、速やかに組織移行することが明らかとなった。Caffeine の脳組織への移行は、CSF や脳表面に存在する OB では速やかな移行が観察されたが、脳深部にある HI では移行が緩やかであり、caffeine のような高い組織分布能がある薬物であっても、組織移行性に脳内部位差が存在することが示された。さらに、麻酔処置により血流が低下することで血中からの caffeine 消失が遅延する結果が得られたが、AUC 比を指標とした動態学的パラメーターを算出することで、脳組織移行性に対する血中動態の影響を除外できることが明らかとなった。本検討で使用した caffeine では、麻酔時には血流低下による脳移行量の変化がみられるが、脳組織への薬物移行能自体には影響を与えていないことが示された。

今後は、caffeine のような組織分布能が極めて高い薬物に加えて、様々な物理化学的性質を有する薬物を追加検討し、麻酔や睡眠時などの生理状態の差異が及ぼす脳移行性への影響を検討する必要があると思われた。

本研究結果から、薬物動態学的パラメーターを利用することで、正確な脳移行性を評価できる可能性が

示されたため、本結果を基に、今後は経鼻投与後の薬物動態学的研究を進め、中枢神経疾患治療を目的とした有用な経鼻薬物送達法の構築を目指したい。

参考文献

- 1) 日本における医薬品開発の現状と展望 精神神経疾患領域の臨床開発を中心に. 中林哲夫、玉浦明美、近野健一、ファルマシア、vol. 47, No. 9 (2011).
- 2) *In vivo* methods to study uptake of nanoparticles into the brain. van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Hennink WE, Storm G, Schiffelers RM, Mastrobattista E. *Pharm. Res.*, 28 (3), 456-471 (2011).
- 3) Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. Chapman CD, Frey WH 2nd, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, Schiöth HB, Benedict C., *Pharm. Res.*, 30 (10), 2475-2484, (2013).
- 4) Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. Mistry A, Stolnik S, Illum L. *Int. J. Pharm.*, 379 (1), 146-157, (2009).
- 5) Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? Illum L., *J. Pharm. Pharmacol.*, 56 (1), 3-17, (2004)

鳥類アデノ随伴ウイルス (AAAV) ベクターの開発

就実大学 薬学部 薬学科

工藤 季之

鳥類、特にニワトリは、哺乳類とならぶ研究における重要なモデル動物である。しかしながら、哺乳類と異なり遺伝子改変技術は未だに確立されておらず、研究の障害となっている。アデノ随伴ウイルス (AAV) は、遺伝子導入効率が極めて高いウイルスベクターの中にあって、とりわけ安全性の高さが評価されている。一方、従来の遺伝子組換え技術とは異なるゲノム編集技術の開発が、近年急速に進展している。この技術は、従来の幹細胞を利用した遺伝子改変技術 (ノックアウト法など) を凌駕するものになりつつある。そこで本研究では、これらの技術を組み合わせることで、これまで鳥類では不可能と考えられていた個体レベルでの遺伝子改変技術の確立を目指した。2003年に Bossis と Chiorini により構築された鳥類アデノ随伴ウイルス (AAAV) ベクター pA3V-GFP をもとに欠損型ベクターを作製し、これに 2015年に Ran らが報告したゲノム編集用の遺伝子発現ユニットを導入することで、新規な AAAV ベクターを構築した。これらについて、hSaCas9 遺伝子の発現およびウイルス産生能を確認した。

1. はじめに

ニワトリは発生学研究における優れたモデル動物でありながら、研究手法上、いくつかの欠点がある。1 つは、簡便に遺伝子を導入する方法が、未だに確立されていない点である。哺乳類では、マイクロインジェクション法が確立されてから久しく、高い効率でトランスジェニックマウスを作製することが可能である。もう 1 つは、簡便に遺伝子を破壊する方法が確立されていない点である。哺乳類では、胚幹 (ES) 細胞を利用したノックアウトマウスの作製手法が確立されており、すでに研究における必須実験とみなされている。本研究では、これらの欠点を解消するため、CRISPR/Cas9 系が機能する鳥類アデノ随伴ウイルス (AAAV) ベクターの確立を試みた。アデノ随伴ウイルスベクターでは、導入された遺伝子がゲノムに組み込まれる確率は必ずしも高くない。しかしながら、CRISPR/Cas9 法を利用した相同組換えによる遺伝子導入が極めて有効であることが示されている。これにより、単に遺伝子を導入だけでなく、狙った場所に組込むことが可能になる。また、CRISPR/Cas9 法はもともと遺伝子破壊に有効な方法として開発されているため、遺伝子を破壊する点でも、効果的に機能することが期待できる。

2. 材料と方法

(1) 細胞の培養

ヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK293 は、ダルベッコによる改変培地 (DMEM, Sigma) に非働化したウシ胎児血清 (FBS, Hyclone) 10%および抗生物質 (最終濃度: 50 units/mL ペニシリン、50 μ g/mL ストレプトマイシン、Nacalai Tesque) を添加したもので培養した。また、培養にはブタ腱由来タイプ I コラーゲンでコートされたプラスチックディッシュ (Asahi Glass) を使用した。

(2) 鳥類アデノ随伴ウイルス (AAAV) ベクターの構築

鳥類アデノ随伴ウイルス (AAAV) ベクター pA3V-GFP、カプシド発現ベクター pCA3V-RC、およびヘルパーベクター pSR449B は、Chiorini 博士 (NIH) より譲渡いただいた^{1,2)}。ゲノム編集用ベクター pX602 は Addgene 社から入手した³⁾。

欠損型鳥類アデノ随伴ウイルス (AAAV) ベクター pA3V-GFPd4 および pA3V-GFPd5 は、pA3V-GFP をもとに作製した⁴⁾。ゲノム編集用鳥類アデノ随伴ウイルスベクターは、以下の方法により構築した。hSaCas9 遺伝子および gRNA 発現ユニットは、ゲノム編集用ベクター pX602 を制限酵素 AgeI (Nippongene) および NotI (NEB) により切断して得られた約 4.5 kb の DNA

断片を使用した。pA3V-GFPd4 および pA3V-GFPd5 は、制限酵素 BsmI (NEB) および NotI (NEB) で切断して NotI-SphI-XbaI-SpeI-BsmI リンカーを導入することで、SV40 ポリ A シグナル配列を除いた。これらを制限酵素 AgeI (Nippongene) および NotI (NEB) により切断し、前記の DNA 断片を導入することで、pA3Vd4-hSaCas9 および pA3Vd5-hSaCas9 を作製した。さらに、これらを制限酵素 BssHII (TOYOBO) で切断することで、ゲノム編集用 AAV 配列を含む DNA 断片を切り出した。これを、ゲノム編集用ベクター pX602 を制限酵素 BssHII (TOYOBO) で切断して得られたベクター DNA の導入することで、制限酵素 BsaI の認識配列を 1 ヶ所取り除いた pA3Vd41-hSaCas9、pA3Vd42-hSaCas9、pA3Vd51-hSaCas9 および pA3Vd52-hSaCas9 を作製した。

塩基配列の確認には、シーケンシングキット (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) を使用し、3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により解析を行った。

(3) 細胞への遺伝子導入

HEK293 細胞は、遺伝子導入の前日に植え継ぎ、遺伝子導入時にプレート表面を 70%程度おおうように調整した。遺伝子の導入には、遺伝子導入試薬 (HilyMax, Dojindo) を使用した。6 well プレートの場合、1 well あたり使用するプラスミド DNA は 4 μ g、HilyMax は 12 μ L とした。培養液に試薬で処理した DNA を添加した後、そのまま約 48 時間培養し、遺伝子の発現を検討した。

プラスミド DNA は、プラスミド DNA 精製キット (NucleoBond Xtra Midi, Macherey-Nagel) を使用して調製した。

(4) 免疫ブロッティング

細胞を細胞溶解液 (CellLytic-M, Sigma) で処理して得られた試料は、5 分の 1 量の 6 \times サンプリングバッファーと混合した。これを 100 $^{\circ}$ C 2 分間熱処理した後、各試料 15 μ L を SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (Mini-PROTEAN TGX Any kD 15 wells, Bio-Rad) に供した。泳動後は、タンパク質を PVDF メンブレン (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad) に転写した。ブロッ

キングには PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO) を、一次抗体および二次抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) を使用した。一次抗体は、抗 HA 抗体 (Sigma) を 1,000 倍希釈で、二次抗体は、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) を 10,000 倍希釈で使用した。検出には、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を使用し、ルミノ・イメージアナライザー LAS-1000 Plus (Fuji Film) により解析を行った。

(5) 遺伝子組換えウイルスの調製

HEK293 細胞は、遺伝子導入の前日に植え継ぎ、遺伝子導入時にディッシュ表面を 70%程度おおうように調整した。遺伝子の導入には、遺伝子導入試薬 (PEI_{max}, Polysciences, 1 mg/mL, pH7.0) を使用した。10cm ディッシュの場合、使用するプラスミド DNA (ウイルスベクター、カプシド発現ベクター、ヘルパーベクター) は 30 μ g、PEI_{max} は 30 μ L とした。培養液に試薬で処理した DNA を添加した後、そのまま約 72 時間培養を続け、遺伝子組換えウイルスの調製を行った。培養液約 10 mL に、0.5M EDTA を 125 μ L 加えることで、細胞をディッシュ底面からはがして回収した。ウイルス調製は、ウイルス抽出試薬 (AAVpro Extraction Solution, Takara Bio) を使用し、プロトコルに従って行った。ウイルス液は、使用時まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

(6) 遺伝子組換えウイルスの定量

遺伝子組換えウイルスの定量は、リアルタイム PCR 法により行った。ウイルス DNA の調製は、ウイルス定量キット (AAVpro Titration Kit ver 2.0, Takara Bio) を使用し、プロトコルに従って行った。PCR は、CMV プライマー (CMV_F; 5' -CATGGTGATG CGGTTTTGG-3'、CMV_R; 5' -CAATGGGGTGGAGACTTGGG-3') を用い、SYBR Premix *ExTaq* II (Takara Bio) を使用し、プロトコルに従って行った。反応及び解析には、Sequence Detection System PRISM 7000 (Applied Biosystems) を使用した。定量は、pA3V-GFP を鋳型として検量線を作成し、ウイルスゲノム (vg) の絶対量を算出した。

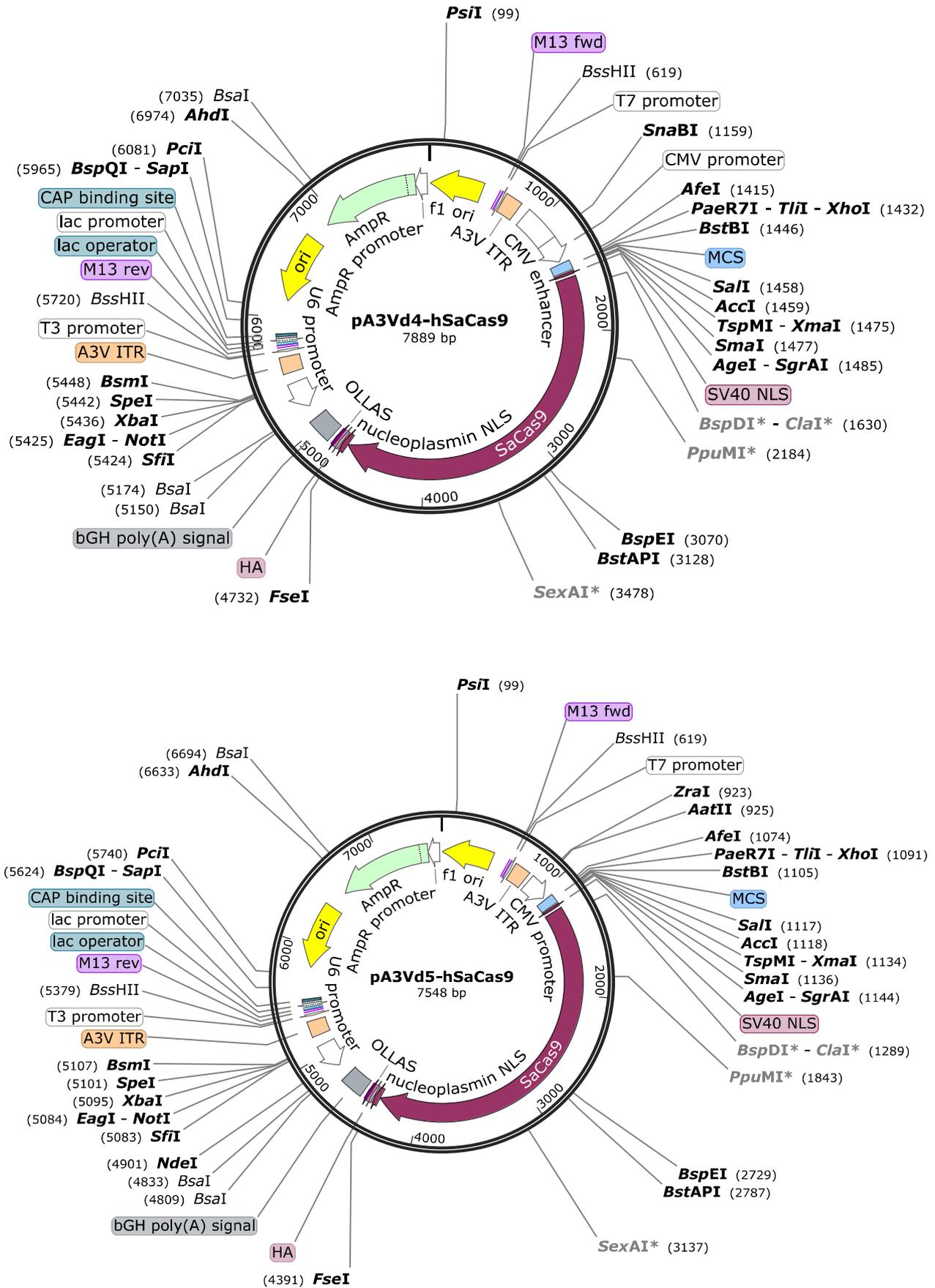


図1 pA3Vd4-hSaCas9 および pA3Vd5-hSaCas9 の制限酵素地図

3. 結果

(1) ゲノム編集用 AAV ベクターの構築

欠損型 AAV ベクター pA3V-GFPd4 および pA3V-GFPd5 は、ゲノム編集用の hSaCas9 遺伝子および gRNA 発現ユニットを導入するために、pA3V-GFP から不要な配列を取り除いたものである。pA3V-GFPd5 については、pA3V-GFPd4 から CMV エンハンサー配列も取り除くことで、プロモーター配列の最小化を行っている。さらに、これらのベクターにある SV40 ポリ A シグナル配列を除いて、複数の制限酵素認識部位を挿入することで、遺伝子の構築を容易にした。これらのベクターから、GFP 遺伝子を除いて、ゲノム編集用の遺伝子を導入した pA3Vd4-hSaCas9 および pA3Vd5-hSaCas9 を作製した (図 1)。これらについては、HEK293 細胞に導入し、hSaCas9 タンパク質の一過性の発現を免疫ブロッティングで確認した (図 2)。

しかしながら、これらのベクターは本来、gRNA の配列を導入するための 2ヶ所の BsaI 認識配列の他に、アンピシリン耐性遺伝子上に 1ヶ所の BsaI 認識配列があるため、このままの状態では使用できない。そこで、アンピシリン耐性遺伝子上に BsaI 認識配列を含まないゲノム編集用ベクター pX602 とプラスミドベクターのバックボーンを置換することとした。この際に、制限酵素 BssHII 認識部位を利用したため、挿入配列のバックボーンに対する方向性が異なる 2種類のベクターが構築されることとなり、それぞれ pA3Vd41-hSaCas9 および pA3Vd42-hSaCas9、pA3Vd51-hSaCas9 および pA3Vd52-hSaCas9 とした。これらについても、HEK293 細胞に導入し、hSaCas9 タンパク質の一過性の発現を免疫ブロッティングで確認した (図 2)。

(2) 遺伝子組換えウイルスの産生

hSaCas9 タンパク質の一過性の発現が確認できた 6つのゲノム編集用 AAV ベクターについて、遺伝子組換えウイルスの産生能を検討した。アデノ随伴ウイルスは、そのゲノムサイズが約 4.7 kb であるため、ITR 配列を除いて、置換可能な DNA 断片のサイズは、約 4.5 kb がその上限となる。このサイズを超えると、ウイルスの産生能及び感染効率が著しく低下する。

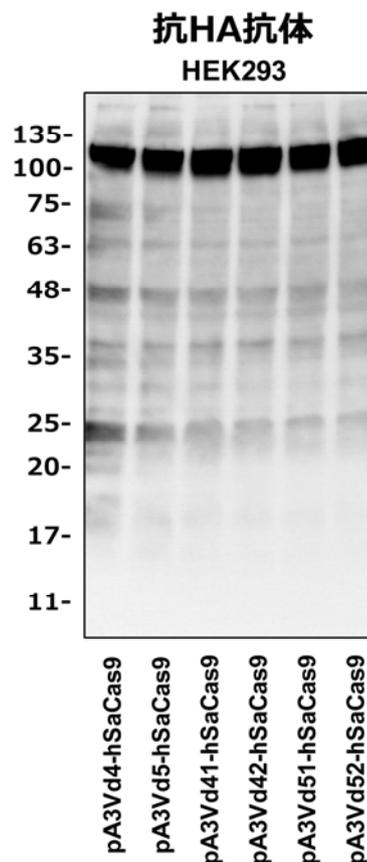


図 2 抗 HA 抗体による免疫ブロッティング

pA3Vd4-hSaCas9、pA3Vd41-hSaCas9 および pA3Vd42-hSaCas9 は、ITR を含むサイズが約 5.0 kb であり、この上限を超えている (図 1)。一方、pA3Vd5-hSaCas9、pA3Vd51-hSaCas9 および pA3Vd52-hSaCas9 は、ITR を含むサイズが約 4.7 kb であり、上限内に収まっている (図 1)。実際に、これらのウイルス産生能を確認したところ、これらの元となった pA3V-GFPd4 (ITR を含むサイズが約 2.0 kb) および pA3V-GFPd5 (ITR を含むサイズが約 1.6 kb) と比較し、pA3Vd5 系で 6 割程度、pA3Vd4 系でさらにその 6 割程度のウイルス産生が確認された (表 1)。

4. 考察

pA3Vd4 系および pA3Vd5 系のゲノム編集用 AAV ベクターでは、いずれも hSaCas9 タンパク質の発現が確認されており、遺伝子の構造には問題はないと考えられる。また、その発現量も大きな差は認められなかった (図 2)。pA3Vd4 系および pA3Vd5 系はプロモーター配列が異なっており、エンハンサー配列を

含まない pA3Vd5 系で、hSaCas9 タンパク質の発現低

下が懸念されたが、そのような傾向は認められなかった。また、同じプロモーター配列を使用した鳥類細胞でのプロモーター活性の検討でも、これらの配列間で、レポーター遺伝子発現に大きな違いは認められなかった⁵⁾。

ウイルス産生能に

関しては、サイズがより大きな pA3Vd4 系が pA3Vd5 系に較べて劣るという予想通りの結果になった (表 1)。元のベクターである pA3V-GFPd4 および pA3V-GFPd5 との比較でウイルス産生能が低下したのは、そのサイズの違いによるだけでなく、使用した DNA のモル数の違いによるところも大きいと考えられる。DNA を導入するにあたっては、DNA の使用量を一定に保っているため、ベクターのサイズが大きくなると、相対的に使用するモル数が少なくなる。この違いがウイルス産生量に少なからず影響を与えていると推測される。pA3Vd4 系と pA3Vd5 系の比較では、そのサイズの違いは 5%程度であり、モル数への影響はほとんどないと考えられる。そのため、ウイルス産生能の差は、サイズが上限を超えるか超えないかに依存すると推測される。

これらの結果より、ゲノム編集用 AAV ベクターとしては、pA3Vd5 系がより優れていると考えられる。今後は、これらのベクターに gRNA 配列を挿入し、ゲノム編集活性を比較することで、最終的に最も優れたベクター系の選別を行う予定である。

謝辞

本研究にあたり、公益財団法人ウエスコ学術振興財団による研究助成を賜りましたことを、深く感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたりご協力頂きました近藤麻衣氏に、心から感謝いたします。

表 1 ベクターのサイズとウイルス産生量

Vector	Size(bp)	*10 ⁷ Vg/μL	*10 ⁷ Vg/μL	*10 ⁷ Vg/μL	*10 ⁷ Vg/μL
pA3V-GFPd4	4,861	14.1	14.7	1.40	ND
pA3V-GFPd5	4,520	12.7	12.1	3.23	ND
pA3Vd4-hSaCas9	7,889	5.0	5.4	0.50	ND
pA3Vd5-hSaCas9	7,548	8.0	9.2	0.90	ND
pA3Vd41-hSaCas9	7,730	ND	ND	ND	0.61
pA3Vd42-hSaCas9	7,730	ND	ND	ND	0.50
pA3Vd51-hSaCas9	7,389	ND	ND	ND	1.32
pA3Vd52-hSaCas9	7,389	ND	ND	ND	1.20

ND はデータなしを示す。ウイルスの産生量は vg (virus genome) のコピー数として、各 1 バッチでのデータを示している。遺伝子導入効率やウイルス DNA の調製法の違いにより、バッチ毎のウイルス産生量 (定量値) が大きく異なる。

引用文献

- 1) Bossis I, Chiorini JA. Cloning of an avian adeno-associated virus (AAAV) and generation of recombinant AAV particles. *J Virol.* 2003 Jun;77(12):6799-6810.
- 2) Smith RH, Afione SA, Kotin RM. Transposase-mediated construction of an integrated adeno-associated virus type 5 helper plasmid. *Biotechniques.* 2002 Jul;33(1):204-211.
- 3) Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 2015 Apr 9;520(7546):186-191.
- 4) 工藤季之「鳥類アデノ随伴ウイルス (AAAV) ベクターによる鳥類のゲノム編集」2016 年、公益財団法人両備櫻園記念財団、生物学に関する試験研究論叢 (第三十一集)、印刷中
- 5) 工藤季之「鳥類細胞における一過性遺伝子発現のためのプロモーターの比較」2016 年、岡山実験動物研究会報第 32 号、印刷中

高脂肪食摂取による肥満の形成は Gas6 阻害により抑制できるか？

倉敷芸術科学大学 生命科学部 健康科学科

椎葉 大輔

[概要]

本研究では、「高脂肪食摂取による肥満形成にはGrowth-arrest specific gene 6 (Gas6)が関与する」との仮説のもと、高脂肪食摂取マウスに対するAxl-Fc投与による脂肪組織肥大抑制効果について、体重の変化から検討した。その結果、Axl-Fcを投与したマウスでは、対照物質であるIgG-Fcを投与したマウスに比べ、体重が低値を示す傾向が観察された。この結果は、Gas6の働きを阻害することにより、脂肪組織の肥大を抑制する可能性を示唆するものであった。

[緒言]

近年、経済発展による飽食化や便利な生活活動がもたらす身体運動不足などによる生活習慣病

(life-style related diseases)が増加した。肥満症は、生活習慣病の初期に観察され、その後の糖尿病、脂質異常症、高血圧症、動脈硬化症などの発症に大きく影響する。また、世界の肥満人口が先進国を中心とした増加傾向であることが社会的な問題となっており、我が国も例外ではない。肥満症自身は、脂肪組織の肥大を除いて強い自覚症状はないものの、糖尿病や高血圧症等への進展を考えれば、患者自身のQOLのみならず、医療費を含む社会保障の観点から鑑みても、早急に対処すべき課題である。

肥満の原因は、主に過食、運動不足であることが知られている。食事においては、特に脂質の過剰摂取が問題とされている。これは、脂質から得た摂取エネルギーが生活活動に必要な消費エネルギーを上回ることによって、余剰エネルギーが脂肪組織に蓄積されるからである。実験動物を用いた研究では、脂質エネルギー比の高いエサほど肥満を発症することが報告されている。これにより、同量のエネルギーを摂取しても、脂質を過剰摂取することで肥満になりやすいことが示されている。また、高脂肪食摂取による肥満では、脂肪組織において、炎症反応が観察される。これらの炎症応答にはTNF- α やMCP-1などの炎症性因子が関与していることが知られている。これらの応答は、インスリン抵抗性や、その結果引き起こされる糖尿病の発症に深く関与し

ていることが知られている。この炎症性因子は、脂肪組織に浸潤した免疫細胞のみならず、肥大した脂肪細胞からも産生されることが知られている。このことは逆説的に、脂肪細胞（組織）の肥大を抑制することが出来れば、これら炎症応答亢進を抑制し、重度生活習慣病への進展を阻害できる可能性を示唆している。

脂肪組織の肥大は、構成する脂肪細胞自身の肥大と脂肪細胞数の増加によりなされる。脂肪細胞の増殖は脂肪組織幹細胞や脂肪前駆細胞を中心とした細胞集団からなされていると考えられるが、その制御機構は明らかではない。Gas6 (Growth arrest-specific gene 6) は、分泌型のタンパク質であり、1977年、Schneiderらによって、NIH3T3細胞の増殖停止時に特異的に発現される遺伝子 (growth arrest-specific gene) の一つとして発見された。先行研究では、Gas6が標的細胞膜上のGas6受容体群 (Tyro3, Axl, Merの3種類で構成、TAM受容体群) に作用して、細胞死を抑制する効果を示すことが報告されている。申請者は平成26年度ウエスコ学術振興財団助成での成果として、高脂肪食を摂取させたマウスの脂肪組織におけるGas6遺伝子発現が、脂肪組織において亢進する傾向を観察した。さらに、脂肪細胞株であるNIH-3T3-L1細胞を用いた検討において、分化が進むことによりGas6産生が亢進すること、Gas6阻害剤であるAxl-Fcを培養液中に添加することにより、死細胞割合が増加することを明らかにした。このことから、Gas6の働きを生体内で阻害す

ることにより、脂肪組織の肥大を抑制できる可能性が考えられた。

そこで、本研究では、マウス高脂肪食摂取性肥満モデルマウスを用いて、Axl-Fcによる生体内Gas6阻害による脂肪組織肥大抑制効果について、体重変化から検討を行った。

[方法]

動物実験プロトコール

雄性6週齢のC57BL/6Jマウスを同一ケージで13週間高脂肪飼料を摂取させ、高脂肪食性肥満マウスを作成した。即ち、マウス7匹を13日間、予備飼育をした。予備飼育後、マウスに13週間高脂肪飼料を摂取させた。摂取飼料はカロリー当り60%の脂肪含有する高脂肪飼料(5.2kcal/g)とした。飼料摂取および給水は、自由摂取とした。

阻害剤投与は、以下のプロトコールで行った。予備飼育期間中に、マウスをGas6阻害剤であるAxl-Fcを投与する群(Axl-Fc群:n=4)および対照物質であるIgG-Fcを投与する群(IgG-Fc群:n=3)の2群に分け、マーキングを行った。その後、高脂肪飼料負荷開始時に、Axl-FcおよびIgG-Fcを投与した。Axl-FcおよびIgG-Fcの投与手法は、徐放性ゼラチンハイドロゲルに封入し、腹腔内へ投与する方法を用いた。徐放性ゼラチンハイドロゲルは、生体内でゼラチンが分解される際に封入されている物質が拡散することが知られており、長期間の阻害剤投与などに用いられる徐放担体である。投与量は1匹あたりAxl-Fc/IgG-Fc 5 μ gとし、2週間に1回投与した。Axl-Fc/IgG-Fc投与は第6週目までの計3回行った。体重は毎週行った。13週間飼育した後に、EDTA採血および安楽死処置ののち、組織を採取した。血液サンプルは遠心分離ののち、血漿を回収して分析まで凍結保存した。採取した組織は液体窒素で直ちに凍結させた後、分析まで-80°Cで保存した。

統計処理

実験結果は平均値±標準値偏差で示した。体重の比較は二元配置分散分析ののち、多重比較検定としてBonferroni testを行った。曲線下面積は各マウ

ス毎に算出した後、それぞれの群をt testにて分析した。有意水準は5%とした。

なお本研究は、倉敷芸術科学大学動物委員会の審査・承認を経て実施された。

[結果および考察]

すべてのマウスにおいて、高脂肪食摂取により摂取期間に依存して、体重の増加が観察された。このことは、先行研究および平成26年度成果と同様の結果を示しており、本研究が適切に実施されていることを示すものであった。

Gas6阻害剤投与の影響について、Axl-Fc投与マウスにおいて、対照群であるIgG-Fc投与群と比較して、体重が低値を示す傾向が観察された(図1A)。一方でこの差は統計学的に有意な水準ではなかった。さらに、この体重変動について曲線下面積(AUC)について検討した(図1B)。AUCは、ある物質の曲線の積分値を示すものであり、薬剤の血中濃度の評価等で用いられる。その結果、体重実測値と同様、低値を示す傾向が観察された(図1B)。

本研究において、Axl-Fcによる体重増加抑制効果が統計学的な有意差が観察される程には見られなかった理由については、以下の2点が考えられた。1つめとして、高脂肪食負荷の第5週目において観察された、一過性の体重減少が関係している可能性がある。本研究で用いた60%脂肪含有高脂肪飼料は、飼料自体の酸化の影響から長期間交換をしない場合、摂食量が低下することが知られている。本研究では週2回の割合で飼料の交換を行っていたが、古い飼料の残存など、何らかの影響で一時的に摂食量が低下し、体重減少が引き起こされ、それまでに観察されていた差がつぶれてしまった可能性が考えられた。実際に、体重低下が起こる前週(第4週)までの体重変動の解析を行ったところ、実測値体重およびAUCともAxl-Fc投与群がIgG-Fc投与群に比べ、統計学的に有意に低値を示した(p<0.05, 図記載なし)。

2つめとして、Axl-Fc投与量の不足が考えられた。本研究においては、Axl-FcおよびIgG-Fcともゼラチンハイドロゲルとともに腹腔内投与し徐放させて

いる。一方で、腹腔に投与（徐放）された水溶性物質は、腹膜より吸収され全身循環系に乗ることが知られている。このことから、局所投与に比べ、全身に物質が拡散することから、十分量を投与しない場合、生体内濃度が低くその効果が十分に観察されない可能性が考えられた。さらに高脂肪食摂取マウスにおいては、著しく体重増加することから、通常成体マウスよりも、より多量の投与が必要となる可能性も考えられた。

上記2点については、飼料交換頻度や交換方法、Axl-Fc 投与量および経路等を再検討する必要性など、本研究における解決すべき課題を示すものであるものの、その一方では肥満に対する Gas6 の治療標的としての有効性を示す極めて興味深いデータであると考えられた。

以上、本研究により生体内で Gas6 の働きを阻害することにより、脂肪組織の肥大を抑制できる可能性が示唆された。現在、本研究で採取した血液および組織の分析を進めるとともに、本研究結果を受けて Gas6 阻害剤の投与量増加や脂肪組織局所への投与など検討も進めており、今後さらに詳細で明確な Gas6 の影響について報告できるものと、鋭意研究を進めている。

[謝辞]

本研究を遂行するにあたり、助成課題として採択いただいた、(財)ウエスコ学術振興財団 山地弘理事長をはじめ、選考委員の先生方および関係各位に心より深謝する。

[参考文献]

Takahashi M, Ikemoto S, Ezaki O: Effect of fat /carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. J Nutr Sci Vitaminol 45: 583-593,1999

下田 純一, 濱本 高義. 2001, Gas6 Deficient Mice. 血栓止血誌, 12: 514-521.

Higashiura K, Ura N, Ohata J, Togashi N, Takagi

S, Saitoh S, Murakami H, Takagawa Y, Shimamoto K. Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. Clin Endocrinol (Oxf). 2004; 61: 753-9.

Hotamisligil, G. S.: Inflammation and metabolic disorders. Nature, 444, 860-867 (2006)

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A : Inflammation : the link between insulin resistance, obesity and diabetes. Trends Immunol 2004, 25 : 4-7.

Schenk, S., Saberi, M. & Olefsky, J. M.: Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. J. Clin. Invest., 118, 2992-3002 (2008)

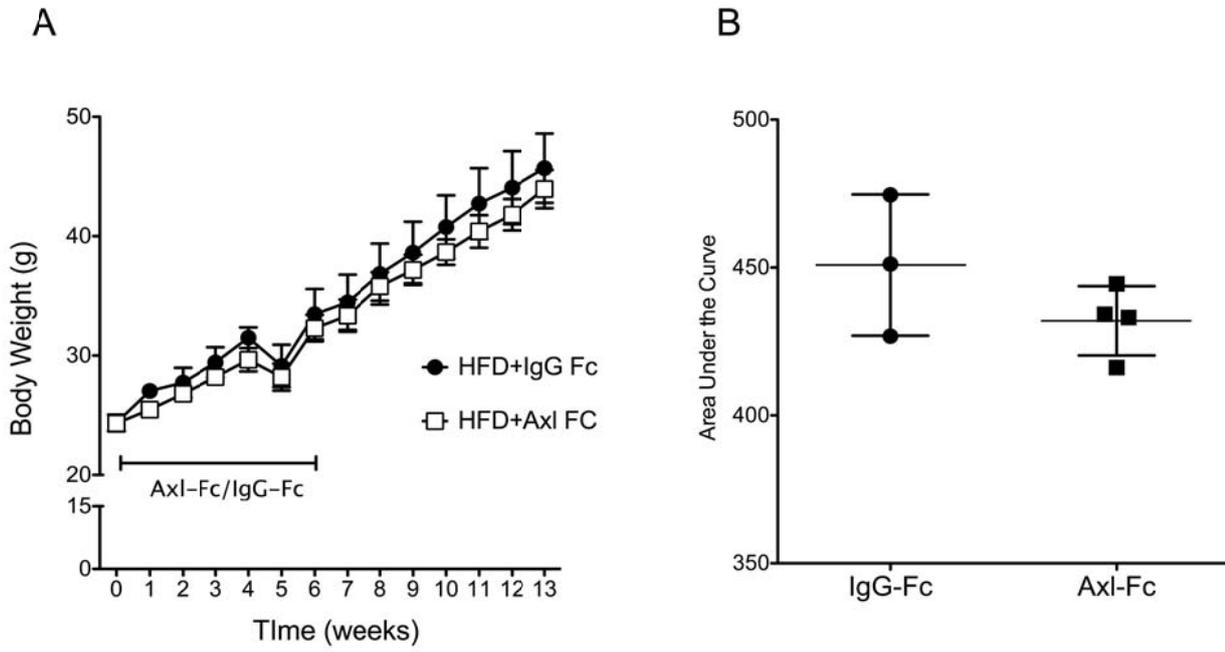


図1 Axl-Fc投与が高脂肪食摂取マウスの体重増加に及ぼす影響

色素増感太陽電池を指向した含ケイ素化合物の合成

倉敷芸術科学大学 生命科学部 生命科学科

仲 章伸

本研究ではジシラニル置換されたドナー-アクセプター型化合物の合成法を開発し、合成した化合物の色素増感太陽電池への応用、評価実験を行うことを目的とした。まず、チエニル基上のヘキシル基の位置が違う2種類の化合物の合成を行い、紫外可視吸収スペクトルおよび蛍光発光スペクトルの測定を行った。その結果、分子内のベンゾチアジアゾール部とヘキシル基を持つチオフェン部との平面性の違いが、紫外可視吸収スペクトルに大きく影響を与えることを明らかにした。また、これらの化合物を用いて色素増感太陽電池のセルを組み立て、光電変換効率の算出も行った。

1、はじめに

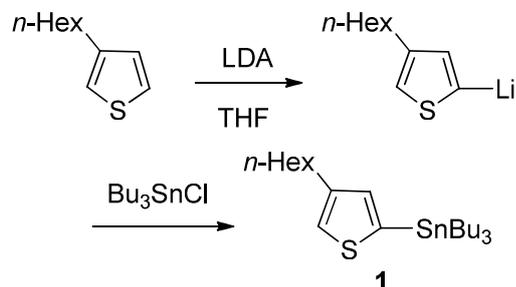
近年、エネルギーの不足、地球温暖化、炭素資源の枯渇の問題は、人類の未来に深く影を落としてきている。その中で、化石燃料に依存しないエネルギーとして、太陽光を有効利用するシステムの開発が急務になっている。その高まりの中で、旧来の太陽電池に対し、低コストで耐久性の高い色素増感太陽電池ならびに有機薄膜太陽電池の開発が注目されてきている。特に、色素増感太陽電池は、材料が安価であること、製造プロセスが簡単であることから、発電コストを大幅に下げることができるとされている。しかし、実用化には、耐久性や光電変換効率の向上など、様々な課題が残されている。そこで本研究は、地球上に無尽蔵に存在する元素であり、環境への負荷が少ないケイ素を利用することにより、新規な色素増感太陽電池の作成を行った。当研究室でのケイ素-ケイ素結合を有する化合物に関する基礎研究により、紫外線を当てるとケイ素-ケイ素結合がラジカル的に解裂することが明らかにされている。本研究は、ケイ素-ケイ素結合を有している化合物を

合成ターゲットとしており、その反応を利用すれば、色素増感太陽電池の酸化チタンナノ粒子電極に色素を化学的に接着させることができ、非常に安定で耐久性の高いものを作ることが出来ると考えた。また、ケイ素の特徴を生かし、うまく分子をデザインすることが出来れば、これまでにない光電変換を実現することができるようになるのではないかと考えた。地球上に豊富に存在する原子であり、環境にやさしいケイ素の性質を明らかにし、これまで以上に使用することが出来るようになれば、資源の有効利用という観点からだけでなく、持続可能な科学技術の発展の実現に対してもたいへん有意義なことであると考えられる。

2、結果と考察

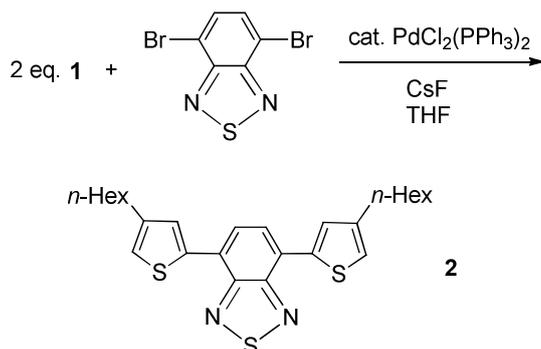
まず、窒素気流下で 3-ヘキシルチオフェンを THF 溶液中で LDA(リチウムジイソプロピルアミド)を反応させリチオ化したのち、トリブチルチンクロライドを反応させ、化合物(1)を得た(Scheme 1)。

Scheme 1



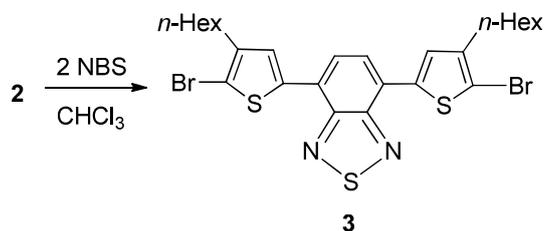
THF 溶液中で化合物(1)と 4,7-ジブロモベンゾ-1,2,5-チアジアゾールをパラジウム触媒存在下で Stille カップリング反応を行い、化合物(2)を得た (Scheme 2)。

Scheme 2



化合物(2)を THF 溶液中で NBS (N-ブロモスクシンイミド)と反応させ、化合物(3)を得た (Scheme 3)。

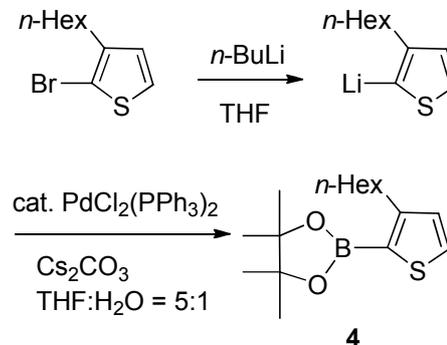
Scheme 3



また、ヘキシル基の位置が違う同様の化合物の合成を次のように行った。3-ヘキシル-5-ブロモチオフェンを THF 溶液中で *n*-ブチルリチウムを反応させリチオ化したのち、2-イソプロポキシ-4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロランを

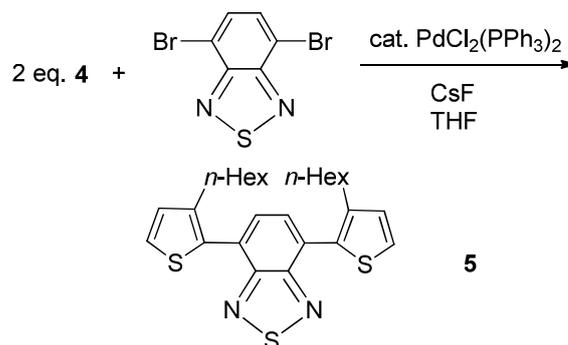
反応させ、化合物(4)を得た (Scheme 4)。

Scheme 4



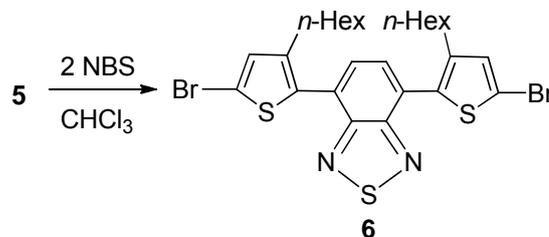
THF 溶液中で化合物(4)と 4,7-ジブロモベンゾ-1,2,5-チアジアゾールをパラジウム触媒存在下で鈴木-宮浦カップリング反応を行い、化合物(5)を得た (Scheme 5)。

Scheme 5



また、化合物(5)を THF 溶液中で NBS (N-ブロモスクシンイミド) と反応させ、化合物(6)を得た (Scheme 6)。

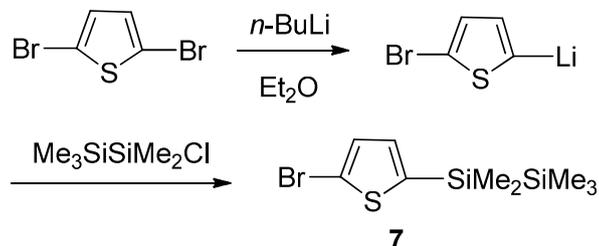
Scheme 6



2,5-ジブロモチオフェンをジエチルエーテル溶液中で *n*-ブチルリチウムを反応させリチオ化したの

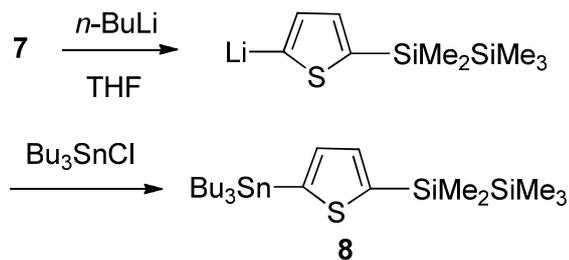
ち、ペンタメチルクロロジシランを反応させ、化合物(7)を得た(Scheme 7)。

Scheme 7



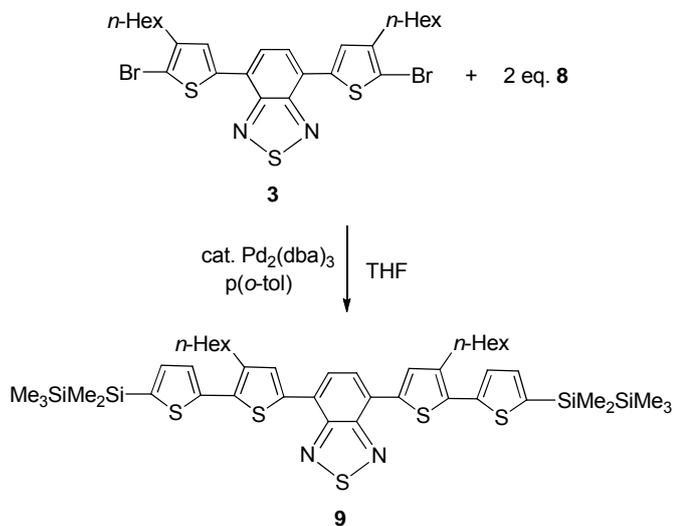
2,5-ジブromoチオフェンをジエチルエーテル溶液中で *n*-ブチルリチウムを反応させリチオ化したのち、トリブチルチンクロライドを反応させ、化合物(8)を得た(Scheme 8)。

Scheme 8



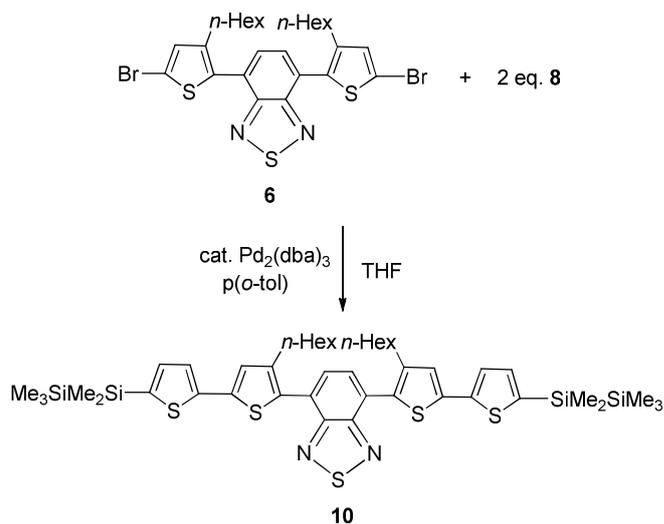
窒素気流下、THF 溶液中で化合物(3)と化合物(8)をパラジウム触媒存在下でStilleカップリング反応を行い、化合物(9)を得た(Scheme 9)。

Scheme 9



窒素気流下、THF 溶液中で化合物(6)と化合物(8)をパラジウム触媒存在下でStilleカップリング反応を行い、化合物(10)を得た(Scheme 10)。

Scheme 10

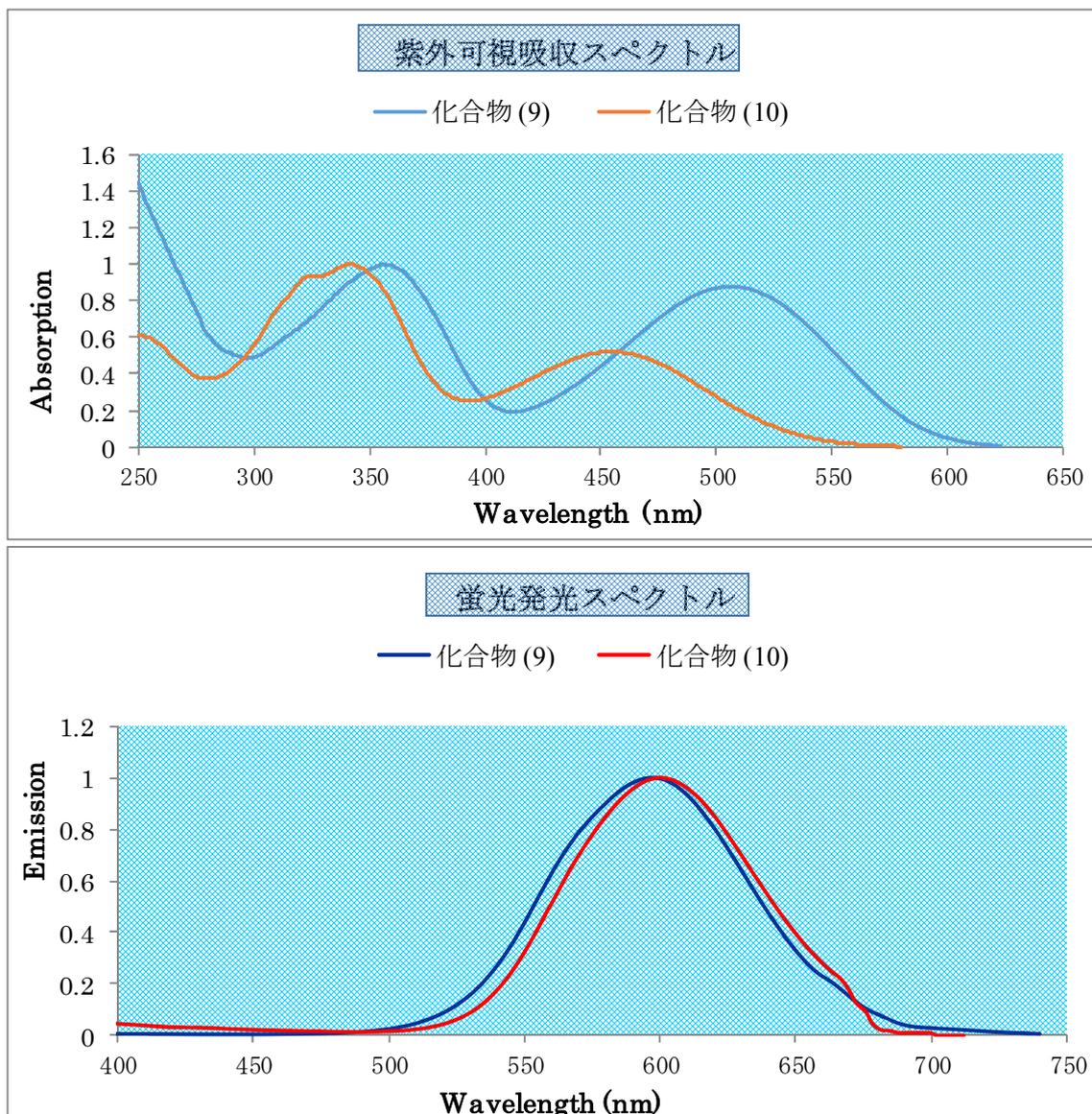


次に化合物(9)、(10)の紫外可視吸収スペクトル及び蛍光発光スペクトルを測定した。結果は下記のようになった。スペクトル溶媒は全て1,4-ジオキサンを用いた。

化合物(9)、(10)のヘキシル基の位置の違いが分子内のベンゾチアゾール部とヘキシル基を持つチオフェン部との平面性の違いに影響を与えたものと考えられる。立体障害の少ない化合物(9)は分子の平面性が高まり化合物(10)と比べ共役が拡張され、紫外可視吸収スペクトルの極大吸収がレッドシフトしたと考えられる(Table 1)。

Table 1

	化合物 (9)	化合物 (10)
紫外可視吸収 スペクトル	355,503 nm	343,456 nm
蛍光発光スペ クトル	598 nm	600 nm



化合物(9)、(10)を色素として用いた色素増感太陽電池を製作し評価実験を行った。太陽電池はそれぞれ2種類、用意した。一つは光反応を行うもの、もう一つは光反応と比較するために光を当てずに暗浸漬させたものを製作した。

・色素増感太陽電池セルの製作

1) : FTO (フッ素ドーパ酸化スズ)の付着した面へ、ドクターブレード法を用いてチタニアペーストを塗った。その後、チタニアペーストを塗った電極を500℃で焼成し、チタニアコーティングのFTO電極を

作成した。

2) : 化合物(9)、(10)を11.9 mg を量りとり、蒸留したクロロホルム6ml 加え2g/Lになるよう調製した。

3) : 調製した色素溶液を光反応させた電極と反応させないものの2つを3 ml ずつスクリー管瓶にアルゴン置換して用意した。

4) I : 光反応させる電極は色素溶液に浸したのちTiO₂の光吸収がある400nm以下の光をカットした光源を用いて40分間、光反応を行なった。反応後、クロロホルムで洗浄し色素の吸着を確認した。その後、

Table 2

	化合物 (9)		化合物 (10)	
	光反応	暗浸漬	光反応	暗浸漬
光電変換効率 (PCE)	0.26%	0.38%	0.20%	0.27%
解放電圧 (J_{sc})	1.06 mAcm ⁻²	1.61 mAcm ⁻²	1.49mAcm ⁻²	1.65mAcm ⁻²
短絡電流 (V_{oc})	368 mV	384 mV	255mV	291mV
フィルファクター (FF)	0.68	0.62	0.55	0.57

光が当たらないようにアルミホイルで覆って室温でデシケーター中、真空乾燥させた。

II：暗浸漬させる電極は色素溶液に浸した後、光が当たらないよう直ちにアルミホイルで完全に覆い、24時間室温で浸漬させた。浸漬後、クロロホルムで洗浄し色素の吸着を確認した。

5)：TiO₂に吸着した色素面を5 mm×5 mmの大きさにカットした。

6)：Pt電極が付いたガラスにパラフィルムで作ったスペーサーを貼り付け、そこへ電解液を入れ、上から色素の付いたFTO電極を気泡が入らないよう注意しながら挟んでセルを製作した。

7)：製作したそれぞれの色素増感太陽電池の性能評価を行った。結果は上記のようになった。(Table 2)

これらのことを踏まえ化合物(9)、(10)を光反応させた電池と暗浸漬させた電池の光電変換効率の差を生んだ原因の一つとして色素溶液のチタニアコーティングのFTO電極への反応時間の違いが考えられる。チタニアコーティングのFTO電極と色素が触れる時間が増えれば吸着量が増え、反応時間に比例した光電変換効率の差が生まれたと考えている。

今後は、さらに長波長領域に吸収極大を持つ化合

物をデザインし、合成したいと考えている。

謝辞

本研究は、ウエスコ学術振興財団の助成により実施されたものである。ここに謝意を表します。

参考文献

[1] R. West, A title, in: Z. Rappoport, Y. Apeloig (Eds.), The Chemistry of Organic Silicon Compounds, vol. 3, Wiley, New York, 2001 (chapter 9).

[2] D.Y. Son, A title, in: Z. Rappoport, Y. Apeloig (Eds.), The Chemistry of Organic Silicon Compounds, vol. 3, Wiley, New York, 2001 (chapter 13).

効力に「はずれ」が生じない新規インフルエンザワクチン製造株の開発

川崎医科大学・微生物学教室

内藤 忠相

世界中で脅威をふるうインフルエンザは、水禽類を自然宿主とする人獣共通感染症であるため、天然痘ウイルスのように撲滅できないと考えられている。最も理想的なインフルエンザ対策は、感染および重症化を未然に予防するワクチン接種であるが、現行のHA ワクチンは万能ではない。その理由の一つとして、ワクチン製造時における抗原性変異の影響が挙げられる。

本研究の目的は、毎年のインフルエンザワクチンの効力に「はずれ」が生じない選定を可能にする「遺伝的安定性に優れた母体ウイルス株の開発」である。変異が入りにくいワクチン母体株が開発できれば、ウイルス増幅時における抗原性変異を考慮せずに済み、最大限の効果が期待できるワクチン株を効率よく選択できる。具体的には、ウイルスゲノム複製時において「忠実性が向上した改良型ポリメラーゼ」を単離して、変異導入効率を低下させたワクチン母体株の開発を行った。その結果、ウイルスポリメラーゼのPB1 サブユニットを改変することによってウイルス増幅時における変異導入効率を低下させることに成功し、鶏卵を用いてウイルス継代を繰り返してもHA タンパク質に変異が入りにくいワクチン製造株を作製することができた。

インフルエンザウイルスのゲノムは、8本に分節化された一本鎖マイナス鎖RNAである。ウイルスゲノムからの転写および複製反応はウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼによって行われ、ウイルスmRNAからタンパク質が翻訳されてウイルス増殖が進行する。ウイルスポリメラーゼは、PB2、PB1 およびPAの3つのサブユニットから構成されており、分節化ゲノムの1番から3番のそれぞれにコードされている。PB1 サブユニットにはポリメラーゼモチーフが備わっており、RNA伸長反応を触媒するポリメラーゼ酵素の本体として機能している。

インフルエンザウイルスを含むウイルスRNAポリメラーゼの性質として、ウイルスゲノム複製の際に誤った塩基を取り込む効率がDNAポリメラーゼと比較して非常に高い。DNAポリメラーゼは、 10^{10} 塩基内に数塩基の割合でエラーが起こるのに対して、インフルエンザウイルスでは約1万塩基に1つの割合でエラーが導入されると考えられている。ゲノム複製過程におけるRNAウイルスのこのような高い変異導入効率はウイルスゲノムの多様性を生み出し、薬剤耐性能の獲得や宿主免疫機構からの回避、および宿主特異性の拡大戦略に寄与している。

一方で、インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの高い変異導入効率は、ワクチン製造時において抗原性変異の問題を引き起こす。ワクチン株作製には、高増殖性のワクチン製造株が使用される。毎春に次年度シーズンのウイルス流行予測が行われ、選定された流行ウイルスの抗原となるHAおよびNAと呼ばれるウイルスタンパク質をワクチン製造株に組込む事でワクチン種株が作製され、発育鶏卵で種株を増幅し製品化されている。

具体的には逆遺伝学的手法を用いて、現行のワクチン製造株である高増殖性A型インフルエンザウイルスPR8株(A/Puerto Rico/8/1934 H1N1型)に、次年度に流行予測されたウイルス株のHAとNA遺伝子を組込むことでワクチン株を作製するが、株によっては鶏卵内増殖に馴化し、HAやNAタンパク質の抗原部位に変異が導入される場合がある。そのようなウイルスは、抗原性および増殖性が優良でもワクチン候補株からは除外される。よって、ワクチン株には、製造時に変異が入らず抗原性が変わらないことが求められる。

そこで本研究では、ウイルスゲノム複製時において「忠実性が向上した改良型ポリメラーゼ」を単離

して、ウイルス増殖時において変異導入率を低下させたワクチン製造株を開発する。ワクチン製造株の変異導入効率を低下させることができれば、抗原性変異の影響を考慮せずに済み、ワクチン開発および製造の迅速化に大いに貢献することが期待できる。

申請者は、近年報告されたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの結晶構造解析等の研究成果を基盤情報として、現行のワクチン製造株である高増殖性 PR8 ウイルスの高忠実化誘導を試みた (図 1)。具体的には、PB1 タンパク質の 43 番目のアミノ酸であるバリン残基 (Val) をイソロイシン (Ile) に置換した改変ウイルス (PB1-V43I ウイルス) を作製した。そして、発育鶏卵を用いて PB1 野生型ウイルスと PB1-V43I ウイルスを増幅させて変異導入効率の比較検討を行った。増幅後のウイルス粒子からウイルスゲノムを抽出し、次世代シーケンサーを用いてエラー頻度を算出した結果、PB1-V43I ウイルスの変異導入効率は、非置換型の元株と比較して半分に低下していた。すなわち、PB1-V43I ウイルスは変異の入りにくい性質を獲得し、ワクチン製造の迅速化に資する新規高忠実性ワクチン製造株と考えられた。

さらに、PB1-V43I ウイルスを母体として、2009 年のパンデミック株である A(H1N1)pdm09 の HA と NA 遺伝子を組込んだワクチン候補株を作製し性状解析を行った。その結果、PR8 元株を用いて作製したワクチン株では増殖馴化変異と共に HA の抗原部位に

アミノ酸置換が導入され抗原性変異が起きたが、PB1-V43I ワクチン株では増殖馴化変異のみが導入され抗原性は保たれていた。

一方でウイルスの一般的な性質として、ポリメラーゼの忠実性を向上させるとウイルスの増殖能力は低下する。その理由は、ゲノム複製時において塩基を取り込む際の正確性が向上することで、RNA 鎖伸長の速度が低下する事に起因する。そのため、高忠実性ポリメラーゼをワクチン製造株に応用するには、ウイルスの高増殖性能を維持することが必要である。PB1-V43I 置換を施したワクチン候補株の増殖能力は元株と同程度であることを確認しており、現在は高忠実性ワクチン製造株としてパンデミックワクチン開発への実用化を検討中である。

近年 H7N9、H6N1、H9N2 および H10N8 などの亜型に属するトリインフルエンザウイルスがヒトへ直接感染する事例が次々と報告されており、今後そのようなウイルスがヒト-ヒト感染に関わる変異を獲得することでパンデミックを引き起こす可能性が懸念されている。しかしながら、現状ではそのような新型ウイルスの出現を事前に予測することはほぼ不可能であり、パンデミックウイルスワクチンの製造は「流行後」に開始せざるを得ない。従って、パンデミックワクチン株の作製を効率良く行うことは極めて重要であり、高忠実性ワクチン製造株を応用することでワクチン開発の迅速化が期待できる。

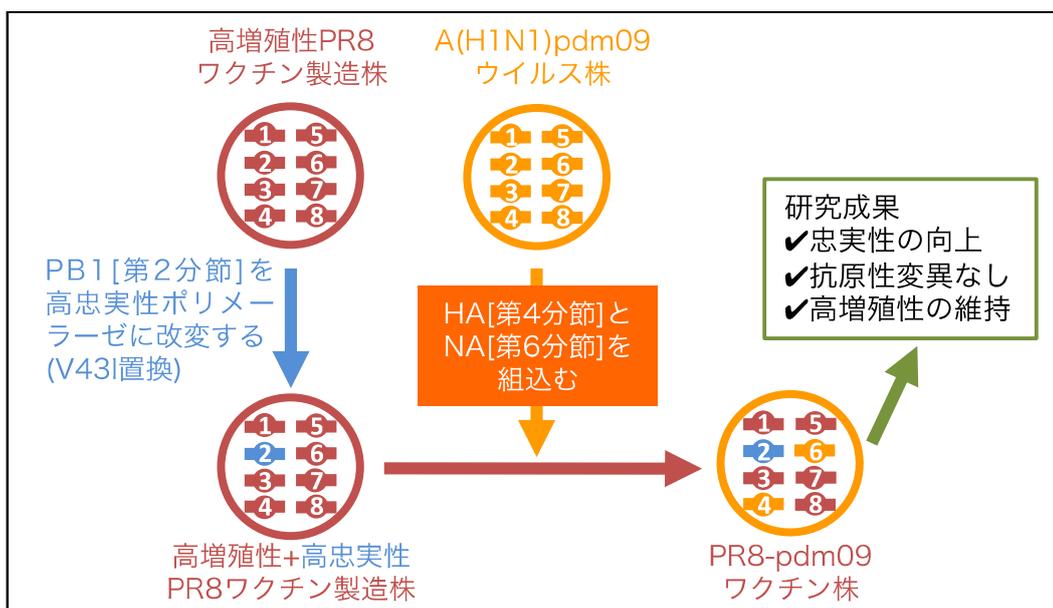


図 1 高忠実性ワクチン株の作製方法と性状解析の結果

HHTLV-1 由来の HBZ 蛋白を標的とした新規 HTLV-1 関連疾患の発症予防・治療法に関する研究

川崎医科大学 微生物学教室

塩浜 康雄

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T cell leukemia virus type 1: HTLV-1) のマイナス鎖にコードされる HBZ は、HTLV-1 感染症における発がん・慢性炎症形成双方の原因遺伝子であるが、従来は優れた抗体が存在しなかったため、生体内での発現量が極めて低い HBZ 蛋白の発現と病態との関連は不明であった。本研究では、新規に取得した抗 HBZ 単クローン抗体を用いて、患者生体内の HBZ 蛋白質発現量および抗 HBZ 抗体価を評価した。ATL 患者、HAM 患者、無症候性キャリアー (AC) の末梢血単核球 (PBMC) 中の HBZ 蛋白量及び血漿中の抗 HBZ 抗体価を測定し、HBZ mRNA 発現量との関連を解析した。急性型 ATL (n=5) の 3 検体で HBZ 蛋白の発現が検出可能であったが、HAM (n=10) および AC (n=4) の検体では検出できなかった。血漿中 HBZ 抗体は一部の検体でのみ陽性であった (ATL 16.7%, HAM 10.8%, AC 10.4%)。PBMC 中 HBZ mRNA 発現量と HBZ 蛋白発現量、血漿中の抗 HBZ 抗体価との間に有意な相関は認められなかった。HBZ 蛋白質の生体内における免疫原性は極めて低く、mRNA 発現量との相関がないことが明らかになった。HBZ 蛋白発現が急性型 ATL 発症に関与する可能性については、さらなる検討が必要である。

1. 緒言

HTLV-1 (Human T cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は、日本人によって発見され、世界で初めてヒト疾患との関連が示されたレトロウイルスである。HTLV-1 の主な感染経路は、母子感染 (垂直感染)、性感染 (水平感染) および輸血 (現在はスクリーニングにより消滅) の 3 つであり、HTLV-1 感染者の約 5% に成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia: ATL)、0.25~4% に HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) および HTLV-1 ぶどう膜炎 (HTLV-1 uveitis: HU) などの疾患を引き起こす。我が国は先進国における唯一の HTLV-1 浸淫国であり、その感染者数は国内に約 108 万人と推定され、今後も持続した ATL や HAM の新規発症例の増加が予測されていることから、HTLV-1 の感染予防法、関連疾患の発症予防法・治療法の確立は重要な課題である。また、全世界における HTLV-1 感染者は、カリブ海諸国やアフリカ等の途上国を中心に約 2,000 万人以上にものぼることが推定されており、HTLV-1 に関する研究成果は、国際的にも高い貢献が可能であると期待される。これまでの研究によって、HTLV-1 関連疾患

の発症や病態形成には、HTLV-1 由来の転写制御因子である Tax や HTLV-1 basic leucine zipper (HBZ) が重要な働きをしていることが明らかとなっている。HBZ は、その遺伝子発現が ATL 細胞の増殖に関与すること、HBZ を CD4 陽性 T リンパ球に強発現するトランスジェニックマウスが、制御性 T 細胞 (Treg) を増加させてその機能を抑制すると共に、エフェクター T 細胞の機能をも阻害することで発がんや炎症形成の双方に関与することなどから、ATL のみならず、HAM、HU 等の慢性炎症性疾患の病態形成にも必須の遺伝子とされている。また、HAM/TSP 患者末梢血単核球 (PBMC) における HBZ mRNA 発現量が、HTLV-1 プロウイルス量、疾患重症度、および髄液中炎症マーカー濃度と正の相関を示すことが報告されている。一方、HBZ 蛋白質については、生体内での発現がきわめて微量であり、HBZ 蛋白質と病態との関連は明らかにされていない。本研究では、HBZ 蛋白質の病因的意義を明らかにするために、独自の ELISA システムを用いて患者生体内の HBZ 蛋白質発現量および抗 HBZ 抗体価について評価を行った。

2. 材料と方法

(1) 細胞溶解液の調整

HTLV-1 感染細胞を PBS で 3 回洗浄し、 1×10^8 cells/mL の濃度になるようにプロテアーゼ阻害剤 (Thermo Fisher Scientific) を含む RIPA バッファー (Thermo Fisher Scientific) を加えて十分に懸濁し、バイオラプター (コスモバイオ) の推奨プロトコールに従ってソニケーション処理を行った。14,000×g、4℃の条件で15分間遠心操作を行い、上清を回収して細胞溶解液として使用した。

(2) HBZ 蛋白質検出・定量サンドイッチ ELISA

PBS で $5 \mu\text{g/mL}$ 濃度に希釈したラット由来の抗 HBZ モノクローナル抗体を、Nunc イムノプレート マキシソープ平底 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) の各ウェルへ $50 \mu\text{L}$ 加えて、室温で1時間、または4℃で一晩インキュベーションして固相化した。次に、PBS-T (0.05 % Tween-20 を含む PBS) で各ウェルを3回洗浄した後、5 % スキムミルク/PBS-T を $200 \mu\text{L}$ 加えて、室温で30分間ブロッキングを行った。さらに PBS-T で各ウェルを3回洗浄し、0.1 % BSA/PBS-T で4倍に希釈した細胞溶解液を $50 \mu\text{L}$ 加えて、室温で1時間反応させた。再び、各ウェルを PBS-T で3回洗浄し、HRP を標識したマウス由来の抗 HBZ モノクローナルを $50 \mu\text{L}$ 加えて室温で1時間反応させた。この時の抗体希釈液には、検出増感試薬 (TaKaRa 社: Western BLoT Immuno Booster solution1) を使用した。各ウェルを PBS-T で5回洗浄した後、TMB 溶液 (KPL) を $100 \mu\text{L}$ 加えて、室温で遮光しながら5分間の発色反応を行った。各ウェルへ1Nの H_2SO_4 を $50 \mu\text{L}$ 加えて酵素反応を停止した後、吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて450 nm、参考波長として620 nmの吸光度を測定した。検量線を、HBZ 蛋白質をスタンダードに用いて作製し、得られた吸光度より、各細胞溶解液中の HBZ 蛋白質濃度を計算した。HBZ 蛋白質検出・定量サンドイッチ ELISA の模式図を図1に示す。

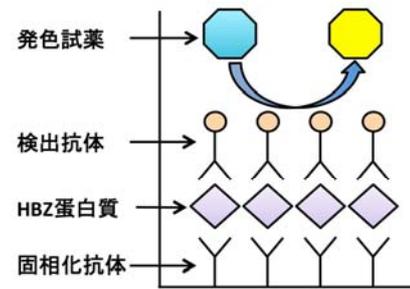


図1. HBZ蛋白質検出・定量サンドイッチELISAの模式図

(3) ヒト血漿中抗HBZ抗体価測定 ELISA

PBS で $1 \mu\text{g/mL}$ 濃度に希釈した組換え HBZ 蛋白質を、Nunc イムノプレート マキシソープ平底 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) の各ウェルへ $50 \mu\text{L}$ 加えて、室温で1時間、または4℃で一晩インキュベーションして固相化した。次に、PBS-T (0.05 % Tween-20 を含む PBS) で各ウェルを3回洗浄した後、1 % スキムミルク/PBS-T を $200 \mu\text{L}$ 加えて、室温で1時間ブロッキングを行った。さらに PBS-T で各ウェルを3回洗浄し、100倍に希釈したヒト血漿を $50 \mu\text{L}$ 加えて、室温で1時間反応させた。再び、各ウェルを PBS-T で3回洗浄し、2次抗体として HRP 標識抗ヒト抗体を $50 \mu\text{L}$ 加えて室温で1時間反応させた。ヒト血漿および2次抗体の希釈液には1 % スキムミルク/PBS-Tを使用した。各ウェルを PBS-T で5回洗浄した後、TMB 溶液 (KPL) を $50 \mu\text{L}$ 加えて、室温で遮光しながら5分間の発色反応を行った。各ウェルへ1Nの H_2SO_4 を $50 \mu\text{L}$ 加えて酵素反応を停止した後、吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて450 nm、参考波長として620 nmの吸光度を測定した。血漿中 HBZ 抗体価測定 ELISA の模式図を図2に示す。

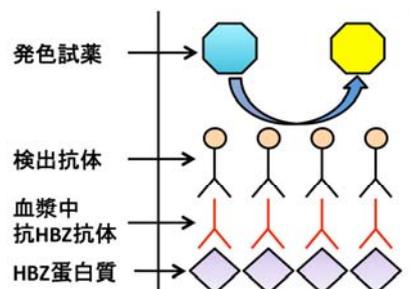


図2.ヒト血漿中抗HBZ抗体価測定ELISAの模式図

3. 結果

(1) HBZ 蛋白質サンドイッチ ELISA を用いた HTLV-1 関連疾患患者由来 PBMC における HBZ 蛋白質発現解析

HBZ 蛋白質検出・定量サンドイッチ ELISA を用いて、HTLV-1 関連疾患患者由来 PBMC における HBZ 蛋白質発現の解析を行った結果、ATL 患者由来 PBMC の 3 検体 (n=5) に HBZ 蛋白質発現が認められた。一方、HAM (n=10) およびキャリア (n=4) 由来検体には HBZ 蛋白質の発現は認められなかった。

(2) ヒト血漿中抗 HBZ 抗体価測定 ELISA を用いた HTLV-1 関連疾患患者由来ヒト血漿中抗 HBZ 抗体価の測定

ヒト血漿中抗 HBZ 抗体価測定 ELISA を用いて、HTLV-1 関連疾患患者由来ヒト血漿中における抗 HBZ 抗体を測定した結果、ATL 由来血漿では 7 検体 (n=42)、HAM/TSP 患者由来血漿では 13 検体 (n=120)、キャリア由来血漿では 5 検体 (n=48) の血漿中に抗 HBZ 抗体が検出された (陽性率は ATL 16.7%, HAM 10.8%, AC 10.4%)。

4. 考察

今回の HBZ 蛋白質サンドイッチ ELISA を用いた HTLV-1 関連疾患患者由来 PBMC における HBZ 蛋白質発現の解析により、HBZ 蛋白質発現の ATL 病態への関与が示唆された。HTLV-1 プロウイルスのマイナス鎖にコードされる HBZ は、遺伝子のプロモーター領域における欠損やメチル化は認められず、全ての ATL 症例においてその発現が認められ、HAM/TSP 患者の PBMC における HBZ mRNA の発現量が HTLV-1 プロウイルス量および病態マーカー濃度と相関を示すことが報告されている。今後、HBZ mRNA 発現量と合わせて HBZ 蛋白質の生体内での発現を評価することにより、HBZ 蛋白質発現が HTLV-1 関連疾患における発症・病態・予後予測の新規バイオマーカーとなる可能性がある。また、ヒト血漿中抗 HBZ 抗体価測定 ELISA を用いた HTLV-1 関連疾患患者由来ヒト血漿中抗 HBZ 抗体価の測定により、生体内における HBZ 蛋白質の

低い免疫原性が明らかとなった。これまでに HTLV-1 感染者の生体内には、HBZ を標的とする細胞傷害性 T 細胞や抗体産生細胞が存在し、同種造血幹細胞移植を受けた患者において HBZ 反応性の CD4⁺ T 細胞が誘導されるとの報告もあることから、HBZ 蛋白質を治療標的とした免疫療法により、HTLV-1 関連疾患を効果的に予防または治療できる可能性もある。今後、HBZ 抗体保有者と非保有者の違いについて解析し、当研究室で独自に作製した抗 HBZ モノクローナル抗体や HTLV-1 感染ヒト化マウスモデル系により免疫療法の効果を検討することで、HTLV-1 関連疾患の新規発症予防法・治療法の開発を目指したい。

5. 謝辞

本研究は、平成 27 年度ウエスコ学術振興財団学術助成事業の助成を受けて実施しました。ここに感謝申し上げます。

6. 参考文献

1. Yasuo Shiohama, Tadasuke Naito, Toshio Matsuzaki, Reiko Tanaka, Takeaki Tomoyose, Hiroshi Takashima, Takuya Fukushima, Yuetsu Tanaka and Mineki Saito : Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status . *Retrovirology*. 2016 Apr 27;13:29.

非同期式直列演算器に基づいた超低消費電力デジタル補聴器の開発

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床工学科

近藤 真史

近年、高性能な信号処理回路 (DSP) を搭載したデジタル補聴器が普及しているが、その電池寿命は数日程度に留まっているのが現状である。この問題に対して報告者は、単一の全加算器のみを用いて逐次的に演算を行う直列乗算器を前提として、リングオシレータに基づいた動的な制御を導入することによる小面積かつ低消費電力な乗算器を提案している。しかし、この乗算器は正数演算のみを対象としているため、フィルタ回路等への応用・実装が困難である。そこで本研究では、既提案の直列乗算器を拡張し、負数演算機能を備えた直列積和演算器の構成法を提案する。まず、積和演算器を構成する加算器と乗算器におけるビット単位の処理過程に着目し、ビットごとの加算を乗算処理に統合・隠蔽 (ビットシリアル化) することにより効率的かつ簡便に直列積和演算器を構成する。次に、2 の補数に基づいた負数乗算アルゴリズムが定数加算に帰着できる点を利用し、これをビットシリアル化と同様に乗算処理へ統合することにより、負数乗算に対応した積和演算を実現する。そして、以上に基づいた積和演算器を設計し、シミュレーションを通じて所望の動作を確認するとともに、FPGA を対象とした性能評価を以ってその有効性を示す。

1. まえがき

近年、高齢化社会の進展に伴って、デジタル信号処理回路 (Digital Signal Processor : DSP) を搭載したデジタル補聴器 (以下、単に補聴器という) が広く普及しているが、その電池寿命は数日程度に留まっているのが現状である^[1]。これに対する最も単純な解決法の一つとして電池の大容量化が挙げられるが、補聴器はその装着形態から搭載可能な電池容量に物理的な限界がある^[2]。一方、DSP 周辺に配置されているアンプ等のアナログ回路に対する低電圧化^[3]も検討されているが、低電圧環境下ではノイズ干渉が顕著となるためそれにも限界がある。したがって、補聴器における電池寿命の改善するためには、DSP のアーキテクチャの観点から低消費電力化を図ることに望みが残されている。

補聴器用 DSP は、汎用 DSP と同様に信号処理を効率的に展開するための積和演算器を内蔵している。ここで、人間の可聴域が 20Hz~20kHz 程度と特に低速な信号を扱う点に着目し、一對の全加算器 (FA) とフリップフロップのみを用いて逐次的に演算を行う直列演算器の応用が検討されつつある。特に、文献[4]の直列乗算器は、リングオシレータを用いて演算時のみ動的にクロックを生成・制御することで、小面積かつ低消費電力な乗算器を実現している。しかし、あくまでも乗算器の構成法に留まっており、これを積和演算器に応

用した際の回路構成やその性能については明らかになっていない。さらに、この直列乗算器は正数演算のみを対象としており、負数係数との乗算が含まれるフィルタ回路には対応できないという問題がある。

そこで本研究では、負数演算に対応した小面積かつ低消費電力な直列積和演算器を提案する。まず、積和演算におけるビット単位の処理過程に着目し、ビットごとの加算を乗算処理に統合・隠蔽 (ビットシリアル処理) することにより演算時間の短縮化を図る。ここで、2 の補数に基づいた乗算アルゴリズムは定数加算に帰着できるため、これをビットシリアル処理と同様に乗算処理へ統合することで負数演算に対応した直列積和演算器を構成する。以上の直列積和演算器を設計し、タイミングシミュレーションを通じてその動作を確認するとともに、既存の積和演算器との性能比較を通じてその有効性を示す。

2. 補聴器用 DSP の低消費電力化

デジタルフィルタによる雑音抑制処理など、補聴器における様々な聴覚支援機能は DSP により実現され、この種のデジタル信号処理の多くは、積和演算 ($w = w' + a \times b$, w : 現在の演算結果, w' : 直前の演算結果, a , b : 入力) に帰着される。このため、DSP では 1 クロック (CLK) で積和演算を完了するために専用の積和演算器を内蔵している。特にこれを構成する乗算器は、

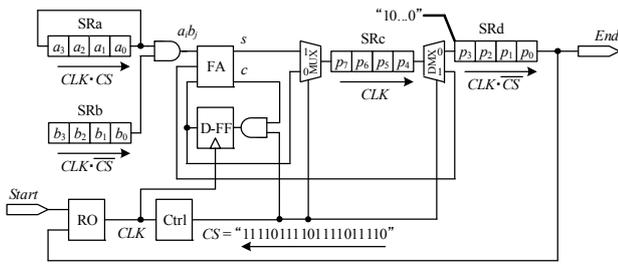
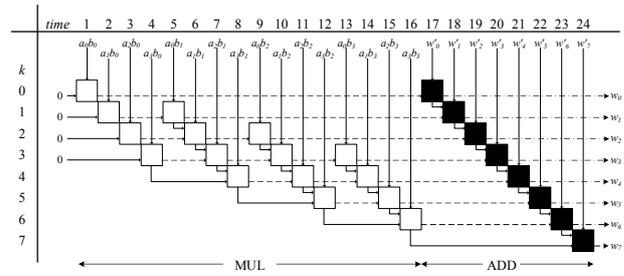


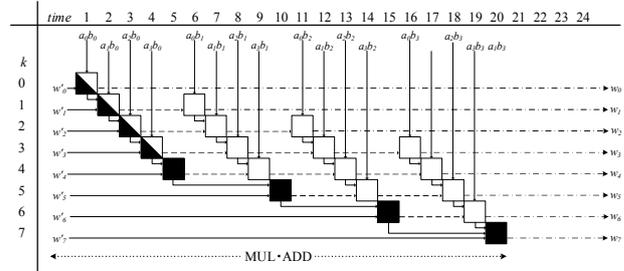
図 1 直列乗算器の構成

加算器に比して回路面積および動作速度に係るコストが大きい場合、積和演算器の性能、すなわち DSP の性能は乗算器のそれに強く依存する。

乗算器は、被乗数 a_i ($0 \leq i < n$) と乗数 b_j ($0 \leq j < n$) を入力として積 p_k ($0 \leq k < 2n$) を求める回路であり、その動作は部分積 $a_i \cdot b_j$ (\cdot は論理積を表す) を網羅的に足し合わせるにより実現される。通常この種の乗算器は、高速化を指向して部分積の足し合わせを並列的に行う形態 (以下、並列乗算器) を採るが、それに伴って回路面積が $O(n^2)$ で拡大し、静的な消費電力も同様に増大することとなる。これに対して報告者は、単一の FA とシフトレジスタ (SR) を用いて逐次的に部分積を足し合わせる直列乗算器に着目し、これにリングオシレータに基づいた動的なクロック生成・制御手法を導入することにより小面積かつ低消費電力な乗算器の構成法を提案している^[4]。これに基づいた直列乗算器の構成を図 1 に示す。図中のリングオシレータ (RO) は、演算の開始を表す *Start* がアサートされてから演算完了を表す *End* がアサートされるまでの期間だけ、FA の遅延に対応したクロックを生成する。制御回路 (Ctrl) は *CLK* に同期してレジスタへの制御信号 (*CS*) を生成し、*CS*'=1'ならば $a_0 \sim a_3 \cdot b_j$ に関する部分積の足し合わせ結果が SRc へ、*CS*'=0'ならばその時点で乗算結果が確定している SRc の最下位ビットの値が SRd へそれぞれ格納される。これを n 回繰り返すことにより、SRc および SRd にそれぞれ乗算結果の上位ビットおよび下位ビットが格納されることとなる。また、乗算完了のタイミングについては、上述の演算過程において SRd が n 回シフトされる点に着目し、予め SRd を信号列 "10...0" で初期化した上で、最下位ビットに '1' が出力されたタイミングを利用することで制御の簡略化を図っている。



(a)乗算と加算を独立処理する場合



(b)ビットシリアル処理の場合

図 2 演算過程

3. リングオシレータを用いた直列積和演算器

3.1. 設計方針

上述した直列乗算器における FA は、部分積に対する n ビット加算器として機能しているため、単一の FA のみを用いて加算を行う、いわゆる直列加算器も同様の枠組みで制御できる。したがって、これらリングオシレータに基づいた直列乗算器と加算器を用いることにより、補聴器用 DSP に適した小面積な積和演算器 (独立型) を構成することができる。 $n=4$ における独立型の処理過程を図 2(a)に示す。ここで□および■は、積和演算の乗算 (MUL) および加算 (ADD) におけるビット単位の加算処理 (以下、FA 処理という) を表す。図 2(a)より独立型では、部分積 $a_i \cdot b_j$ の FA 処理を $n2$ 回繰り返すことにより乗算が完了し、さらにその結果と w' を入力とする $2n$ 回の FA 処理を経て積和演算は完了することとなる。

ここで、図 2(a)の下位ビット ($k=0,1,\dots,n/2-1$) における最初の FA 処理に着目すると、無効な零加算が行われていることが分かる。さらに零加算であるため次段の FA 処理に対する桁上げが生じることもない。したがってこの零加算に係る FA 処理は完全に冗長ではあるものの、直列乗算器において SR の共通制御を実現する上で構造的に生じることとなる。一方、図 2(a)の各ビットにおける w' の加算のタイミングは、乗算前後に関わらず最終的な積和演算器結果に影響しない。そこで本研究はこれらの事実に着目し、ビット単位で積和演

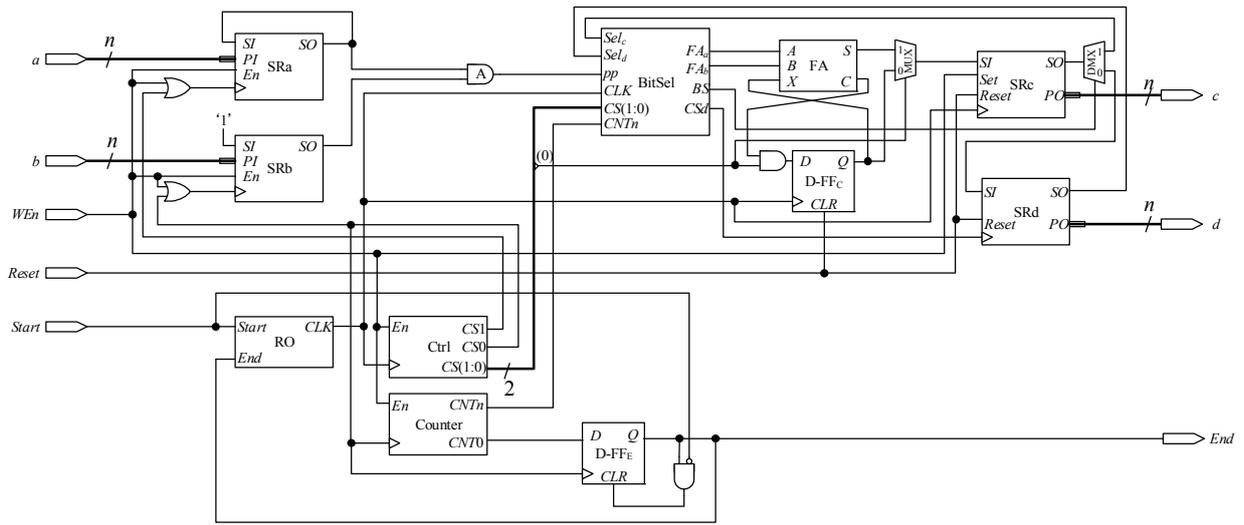


図 3 ビットシリアル型積和演算器の構成

算における乗算と加算の順序を入れ替えた上で、演算結果の下位ビットに対する加算を上述の冗長な FA 処理に統合・隠蔽することで、より効率的な演算を可能とした積和演算器 (ビットシリアル型) を提案する. ビットシリアル型の処理過程を図 2(b)に示す. 図 2(b)より、部分積当たりの FA 処理が 1 回分増加するものの、積和演算全体では w の加算に係る FA 処理回数が $n/2$ に削減されるため、演算時間の短縮効果とそれに伴う動的な消費電力の低減効果を期待できる.

3.2. 回路構成

図 3 より、提案するビットシリアル型は、 w に対する FA 処理のタイミングと部分積当たりの FA 処理回数が増加する点に注意すれば、既存の直列乗算器と同様の制御で実現できる. そこで本研究では、文献[4]の回路構成を踏襲してビットシリアル型を構成する方針を採る. これに基づいたビットシリアル型の構成を図 3 に示し、各構成要素の機能と意味を以下に記す. また、ビットシリアル化に伴って追加された構成要素には*を付して区別している.

SRa, SRb: 被乗数 a および乗数 b を格納するシフトレジスタ.

SRc, SRd: 演算結果の上位ビット c および下位ビット d を格納するシフトレジスタ.

ここで、各レジスタの PI および PO は並列の入出力、 SI および SO は直列の入出力を表し、 En のアサートにより PI の値を保持する.

FA: FA 処理に利用される全加算器.

D-FF_c: FA 処理で生じた桁上げを保持する非同期クリ

ア (CLR) 付のフリップフロップ.

D-FF_e: 演算の完了を表す信号 End を保持するためのフリップフロップ.

RO: 演算期間中のみ擬似的なクロック (CLK) を生成するリングオシレータ.

Ctrl: RO からの CLK に同期して、各レジスタのシフトタイミングを制御するコントローラ. 上述したようにビットシリアル型の制御は文献[4]のそれと同様であるため、リングカウンタを用いて制御信号 CS を生成する (図 2 参照). $CS1$ および $CS0$ はそれぞれ SRa および SRd のシフトタイミングを指示する信号であり、図 1 より $CS1 = CLK \cdot \overline{CS}$, $CS0 = CLK \cdot CS$ である. また、ビットシリアル化に伴って、それぞれの部分積の算出過程で 1 段分の FA 処理が追加されるため、Ctrl を構成するリングカウンタは 1 ビット拡張されて $n+2$ ビットとなる点に注意する.

***Count**: ビットシリアル型ではその演算過程で SRd の値を頻繁に更新するため、2.で述べたように SRd の初期化とシフトを利用して演算完了のタイミングを検出することができない. したがって本研究では、 SRb のシフト回数を数えるためのリングカウンタを別途設けることで演算の完了を検出する.

***BitSel**: SRc および SRd に格納されている w を選択的に FA へ入力するための回路であり、その回路構成を図 4 に示す. pp は SRa および SRb によって生成された部分積、 Sel_c および Sel_d はそれぞれ SRc および SRd の最下位ビットの値である. $BitSel$ はこれら 3 つの信号から内 2 つを選択して FA への入力 FA_a および FA_b として

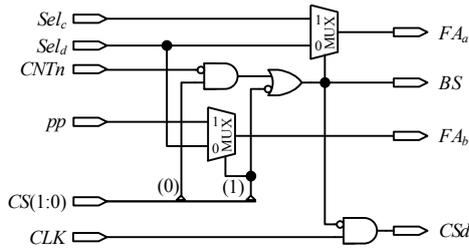


図 4 ビットシリアル化回路

出力する。これらの選択に係る制御は、現在の演算状況、すなわち Ctrl の CS (1:0) と Count の値 CNT (1:0) に基づいて処理される。また、これに伴って SRd のシフトタイミングと出力先が文献[4]のそれと異なるため、BitSel 内においてシフトタイミングを指示する信号 CSd と出力先を選択する信号 BS を別途生成している。

3.3. 動作手順

SRa および SRb に対するデータの格納から演算の完了に至るまでの動作手順は以下の通りである。

手順 1. データの格納と初期化：演算に先立って WEn がアサートされると、*a* および *b* がそれぞれ SRa および SRb に格納される。

手順 2. クロックの生成：初期化が完了して WEn がネゲートされた後、演算の開始を表す Start がアサートされると RO により CLK が生成される。

手順 3. 制御信号の生成：Ctrl は、CLK の立下りエッジに同期して CS を、立上りエッジに同期して CSa と CSb をそれぞれ生成する。またこれに伴って BitSel が CS に基づいて CSd を生成する。

手順 4. 積和演算処理：SRa (0) および SRb (0) から出力された a_i と b_j は、論理ゲート A と BitSel を経て FA に入力され、その演算結果は SRc ($n-1$) にシフトされる。なお、ここで加算される残りの 2 つの信号は、D-FF_C に格納されている直前の部分積の FA 処理で生じた桁上げ、SRc に格納されている途中結果である。この手順を n 回繰り返すと、 b_j に関する部分積が全て SRc に、桁上げは D-FF_C に格納される。ただし、演算開始時、すなわち $n=0$ の際には、BitSel により SRd に格納されている w の下位ビットが選択され、例外的にそれらとの FA 処理が行われる点に注意する。

手順 5. 確定した演算結果の格納：BS='0' として MUX と DMX が切り替ることにより SRc と SRd が接続され、演算結果が確定している SRc の最下位ビットの値が

		a_3	a_2	a_1	a_0		
	\times	b_3	b_2	b_1	b_0		
	1	$\overline{a_3b_0}$	a_2b_0	a_1b_0	a_0b_0		
	0	$\overline{a_3b_1}$	a_2b_1	a_1b_1	a_0b_1		
0	$\overline{a_3b_2}$	a_2b_2	a_1b_2	a_0b_2			
1	a_3b_3	$\overline{a_2b_3}$	$\overline{a_1b_3}$	$\overline{a_0b_3}$			
	p_7	p_6	p_5	p_4	p_3	p_2	p_1
							p_0

図 5 負数乗算アルゴリズム

DMX を介して、SRd ($n-1$) にシフトされる。

手順 6. 演算終了：手順 4~5 を n 回繰り返すと、SRc と SRd に確定した演算結果が全て格納される。それに伴って、Count から出力される CNT (0) が、D-FF_E に格納され、演算の完了を表す End としてアサートされる。そして、End を受けた RO は CLK の生成を停止し、それに伴って各構成要素も動作を停止する。最終的な演算結果 w は $c \& d$ (& は結合演算子) として得られる。

4. 負数演算機能の拡張

4.1. 負数乗算アルゴリズム

文献[4]の直列乗算器は正数演算を前提としているため、これを直接用いた独立型やビットシリアル型は負数を含む積和演算には対応していない。しかし、デジタルフィルタなどの実際の信号処理においては係数の多くには負数が含まれるため、これらの積和演算器の実用化を図る上では負数演算への対応が不可欠となる。この種の負数演算に係るアルゴリズムは、対象とするデータ形式が実数型か整数型かに依って大きく異なるが、高精度な信号処理を伴わない補聴器用 DSP では整数型データが一般的に用いられている。そこで本研究では、整数型データを前提として、ビットシリアル型積和演算器の負数拡張を検討する。

整数型データの加算処理においては、加数を 2 の補数とすることで容易に負数演算を行うことができる。しかし、乗算処理では、部分積をビットごとにシフトしながら繰り返し加算を行う形態であるため、単に乗数を 2 の補数とするだけでは負数演算を行うことはできない。したがって、この種の 2 の補数による乗算処理は、一般的に部分積の加算過程において適宜 2 の補数に変換する手法が採られている^[6]。2 の補数による乗算処理アルゴリズム ($n=4$) を図 5 に示し、各手順の説明を以下に記す。図 5 より、部分積の加算過程に着目すると、規則的な定数加算とビット反転により 2 の補数

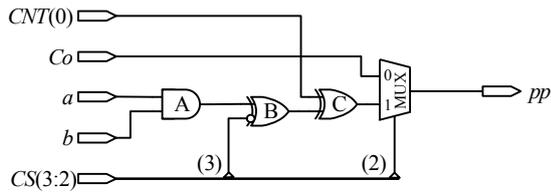


図 6 負数演算回路

に基づいた乗算処理を実現できることが分かる。特にこの定数加算は、3.1と同様に部分積の算出過程におけるFA処理の1ビット拡張とみなすことができる。そこで本研究では、ビットシリアル型の部分積算出過程に係るFA処理をさらに1ビット拡張し、それによって上述の定数加算を処理するとともに適宜その入力を反転することにより、負数演算に対応した積和演算器を直接的に実現する方針を採る。

4.2. 制御回路の拡張

ビットシリアル型における負数拡張に伴って、部分積の算出時にさらに1回分のFA処理を追加する必要があるが、3.2で述べたように単にFA処理の追加であれば、回路構成の変更はシフトレジスタのタイミング制御に係る箇所に限定できる。以下、負数拡張に伴う図3の変更点についてのみ述べる。

コントローラの拡張：ビットシリアル化の際にCtrlを構成するリングカウンタは既に $(n+2)$ ビットに拡張されているが、定数加算に係るFA処理を追加するため $(n+3)$ ビットのリングカウンタとして構成する。また、後述する負数変換回路においてCS(3:2)の信号を利用するため、リングカウンタの下位4ビットがCS(3:0)として出力される点に注意する。

定数メモリによるCountの置換：定数加算に必要なデータ列は、最上位および最下位ビットのみが1である n ビット信号列"100...01"であり、部分積の算出が完了したタイミングで順にこれらの定数 Co を出力する必要がある。ここで、ビットシリアル型では演算の完了までに必要なSRbのシフト回数を数えるためのCountを別途設けている。そこで本研究では、Countを上述のビット列を保持する n ビットのリングカウンタに置換した上で、その下位2ビットが"11"となったタイミングとして演算の完了を検出する。

負数演算回路の追加：負数演算を行うためには、BitSelに入力される部分積 pp を、適宜定数(Co)やビット反

転に置き換える必要がある。そこで、図3において単に部分積 pp を生成していた論理ゲートAに代えて、上述の負数拡張に伴う制御を担う負数演算回路を配置する。負数演算回路の構成を図6に示す。これにより追加された論理ゲートBおよびCはそれぞれ a_{n-1} および b_{n-1} における部分積のビット反転を担い($a_{n-1} \cdot b_{n-1}$ は除く)、MUXによりこれと定数 Co が選択されて pp として出力される。

5. 設計と評価

5.1. シミュレーションによる動作確認

負数演算に対応したビットシリアル積和演算器(TC-MAC)をXilinx ISE 14.6により設計し、同社製FPGA Spartan3E XC3C250Eを対象としたタイミングシミュレーションを通じてその動作確認を行った。なお、設計時におけるROの遅延については、配置配線制約を施したインバータチェーンとして試行錯誤的にその値を定め、ROには7段のインバータ遅延を設けている。被乗数 $a="0101"$ (5)、乗数 $b="1010"$ (-6)、前積和演算結果 $w="00111100"$ (60)を入力した場合におけるシミュレーション結果を図7に示す。シミュレーション波形上の各信号名とその意味は、演算結果 c & d を dm と表記している点を除いて図3と同様である。図7より、Startのアサートに伴ってCLKが生成され、それに基づいてCS1、CS0およびCSdがそれぞれ出力されていることを確認できる。特にCSdに着目すると、 w の下位ビットの加算を先行して処理するためのパルスが生成されていることが分かる。その後、積和演算が完了すると、Endのアサートされるとともに、CLKとそれに関連する制御信号が停止している。このときの演算結果 dm の値は"00011110"(30)であり、所望の演算が行われていることを確認できる。

5.2. 消費電力と回路面積の解析

Xilinx XPower Analyzerを用いてFPGA実装時における消費電力の解析を行った。評価対象は上述の負数に対応したビットシリアル積和演算器(TS-MAC)の他、ビットシリアル型積和演算器(BS-MAC)、Booth型乗算器に基づいた並列積和演算器(Booth-MAC)の3種に対しても同様に設計・解析を行った。また、この種の演算器の消費電力はデータ依存性が強いが、被乗数 $a="0101...01"$ 、乗数 $b="1010...10"$ 、 $w="00...0011...11"$ とし

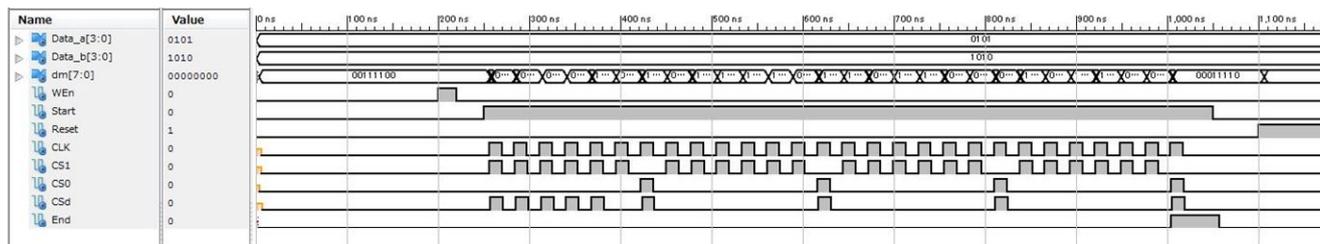


図 7 シミュレーション結果

てデータ内における'0'と'1'の割合を同数に設定している。各積和演算器の積和演算一回当たりにおける消費電力と所要面積の解析結果を表 1 に示す。ここで、LUT は FPGA 上で組み合わせ回路を構成する素子であり、FF は LUT と併せて順序回路を構成する D-FF である。表 1 より、 n の増加に伴って並列演算器である Booth-MAC の消費電力が急激に増大している。これは 2. で述べたように並列演算器は $O(n^2)$ で所要面積が拡大し、それに伴って静的消費電力が増大した結果と考えられる。これに対して直列演算器である他 2 種の消費電力は信号遷移回数に依る動的消費電力に依存するため、その消費電力は n に対して線形的な増加傾向を示している。一方、所要面積については、Booth-MAC の LUT 数は n に対して劇的に増加しており、上述した静的消費電力の増加要因を裏付ける結果となっている。特に BS-MAC および TC-MAC は同程度の資源量となっており、負数演算機能の導入に伴うオーバーヘッドが極力抑えられていることは特筆すべき点と考えられる。

6. あとがき

本研究では、リングオシレータに基づいた直列乗算器^[4]を積和演算器に拡張した上で、負数演算機能を備えたビットシリアル型直列積和演算器の構成法を提案した。本構成では、2 の補数表現をビット単位で加算処理に導入・隠蔽することにより、既存の回路構成の大部分を変更することなく簡便に負数演算機能を実現している。そして、タイミングシミュレーションにより所望の動作を確認するとともに、消費電力および所要面積の解析を通じてその有効性を確認した。今後の課題としては、本構成に基づいたデジタルフィルタを設計・実装し、より実用性を指向した評価を実施することが挙げられる。

表 1 評価結果

Structure	n [bit]	Power [mW]	LUT	FF
Booth-MAC	4	0.2	73	16
	8	2.28	228	32
	16	12.94	728	64
BS_MAC	4	0.72	27	30
	8	1.28	35	54
	16	1.62	51	102
TC_MAC	4	0.6	31	33
	8	1.19	39	57
	16	1.7	53	105

参考文献

- [1] 成沢良幸, "デジタル補聴器を解剖する," CQ 出版, インタフェース, Vol.6, pp.109-119 (June 2008)
- [2] J. DiCristina, "Introduction to Hearing Aids and Important Design Considerations," Maxim integrated (May 2010)
- [3] S. Kim, et al, "An Energy-Efficient Analog Front-End Circuit for a Sub-1-V Digital Hearing Aid Chip," IEEE J. Solid-State Circuits, Vol.41, No.4, pp.876-882 (Apr. 2006)
- [4] 近藤真史, 他, "デジタル補聴器用 DSP を対象とした非同期式直列乗算器の一構成法," 信学技報 CAS, Vol.114, No.312, pp.11-16 (Nov. 2014)
- [5] 鈴木昌治, "ディジタル数値演算回路の実用設計," CQ 出版, Design Wave Advance (Nov. 2006)

平成27年度 海外渡航報告書

岡山大学工学部

矢納 陽

1. はじめに

このたび、国際会議にて研究発表する機会を本助成事業により与えていただきました。ありがとうございます。大変貴重な経験をすることが出来ました。以下では、国際会議への参加発表に対する報告を記します。

2. 国際会議の概要

国際会議名：10th Asian Control Conference 2015 (ASCC 2015)

開催場所、期間： コタキナバル(マレーシア)、2015年5月31日～6月3日

主催団体： Asian Control Association, Universiti Teknologi Malaysia(Malaysia)

本国際会議は1994年に東京都立科学技術大学(現 首都大学東京)にて初開催された。その後ソウル(1997年)、上海(2000年)、シンガポール(2002年)、メルボルン(2004年)、バリ(2006年)、香港(2009年)、台湾(2011年)、イスタンブール(2013年)での開催を経て、今回の会議に至った。なお、次回2017年はオーストラリアで開催される予定である。今回の会議に対する投稿論文数は868件で50以上の国と地域から投稿されており、採択された論文数は630件で、採択率は73%である。また、口頭発表セッション数が95、ポスター発表セッション数が5で、各口頭発表セッションでは5件ほどの研究発表が行われた。国別ではマレーシア、日本、中国、韓国、オーストラリア、アメリカ、インド、シンガポール、インドネシアなどからの発表があった。



ASCC2015 開催会場

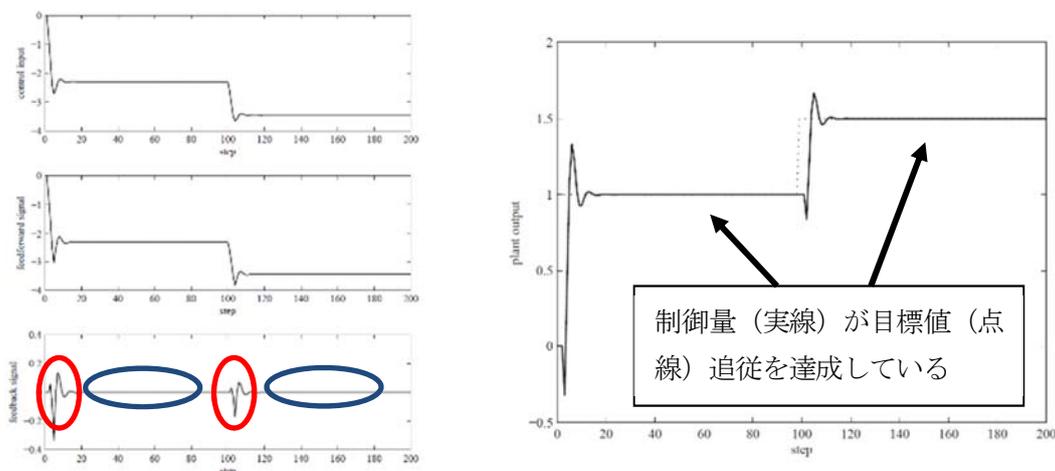


初日の基調講演の様子

3. 研究発表の内容

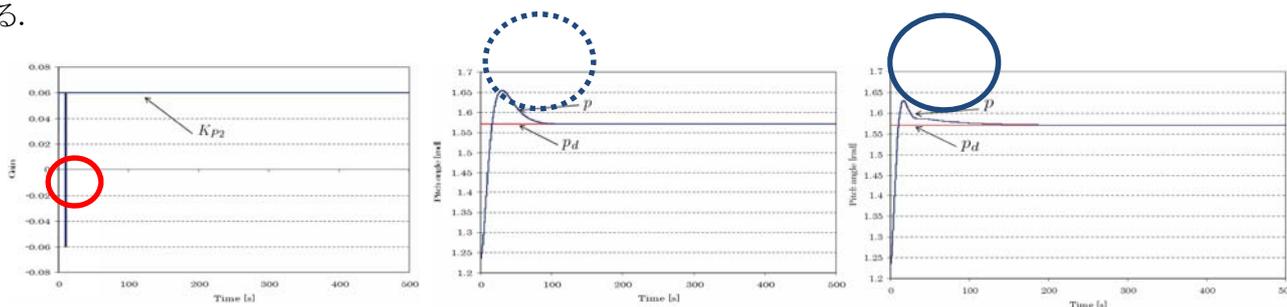
1件目の研究発表「A Design Method of On-demand Type Feedback Controller Using Coprime Factorization (既約分解を用いたオンデマンド型フィードバックコントローラ的设计法)」は、会議2日目に Practical Adaptive and Learning Controller Design というセッションの中で行った。この研究では、一般化最小分散制御則を既約分解によって拡張し、制御目的(目標値追従)を達成するという要求に応じてフィードバック信号が現れる制御則を提案した。この手法は制御対象が安定ならば事故等により運転中にフィードバック信号が切断されて0になった

としても出力値が発散せず、制御系がその安全性を保つという特徴を有する。質疑では外乱を想定した場合の応答や多入力多出力系への適用について質問を受けたが、本研究は基礎段階のものであるため、それらについては今後の課題として検討すると答えた。



目標値追従を達成するという要求に応じてフィードバック信号が現れ（赤丸）、目標値追従を達成するとフィードバック信号が0になる（青丸）。

会議 3 日目に 2 件目の研究発表「Switching PID Control for an Underactuated Flying Object through Model-based Prediction (モデルに基づく予測による劣駆動型飛翔体に対する切り換え型 PID 制御)」を行った。発表したセッションは Biomimetic Intelligence and Control for Robots and Machines である。この研究では、出力変数の数よりも入力変数の数が少なく、しかも出力変数が互いに干渉するという非線形性の強い制御対象に対し、制御対象のモデルを利用してその出力値が目標値に対して将来どのように変化するか仮想的に計算（予測）し、その結果に応じて PID 制御ゲインを適応的に切り換えるという手順を繰り返す制御則を提案した。劣駆動型飛翔体に対する制御系設計法の提案はこれまでもなされているが、制御対象のモデルに基づく出力値の仮想的な計算と PID 制御ゲインの適応的な切り換えを制御ステップ毎に繰り返す手法は提案されていなかった。質疑では PID 制御ゲインの切り換えルールについて質問を受け、制御誤差の予測値を利用してゲインの符号や大きさを調整する方法を説明した。今後はロール角の制御や目標値への収束時間を早めるような手法を検討する。



ゲインを適応的に切り換えることによって（赤丸）、従来法（点線の青丸）と比較してピッチ角のオーバーシュートを低減させた（青丸）

4. おわりに

本助成事業のおかげで国際会議にて研究発表することができました。ありがとうございます。重ねてお礼申し上げます。自分の研究発表だけでなく、他の研究の聴講を通して多くの研究に触れることができ、大変良い刺激になりました。今後も研究領域を掘り下げるだけでなく、多分野との融合を図り、地域の発展に寄与できる研究を推進したいと思います。ありがとうございました。

平成27年度 海外渡航報告書

岡山大学大学院 環境生命科学研究科

吉田圭介

講演題目：

NUMERICAL PREDICTION OF HYDRODYNAMIC FORCE ACTING ON A NATURAL STONE IN OPENCHANNEL FLOWS

(和訳：開水路流れにおいて自然石に作用する流体力の数値予測)

講演内容の概要：

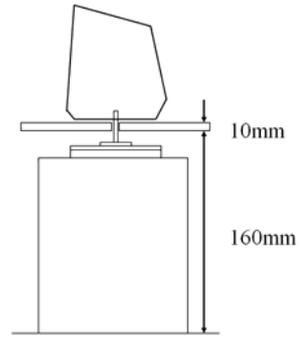
近年、河川のインフラ整備では構造物の堅牢さに加えて自然環境への調和が要求されており、現地で調達した石や木などの自然素材を用いた構造物が河道に設置される場合がある。こうした構造物は川の流れに多様性をもたせて河川景観を創造したり、水生生物の生息環境を保全するといった効果がある。一方、従前のコンクリート構造物とは異なり、自然石を用いた工法では材料の要素は必ずしも画一的ではなく、洪水時の治水機能を検討することは一般に困難である。現在、実務では技術者の経験や模型実験などに基づいて構造物の安全度を照査するのが通例であるが、労力や費用が多くかかる上、射流などの急変流場では計測そのものが困難であるため、設計の信頼性は必ずしも十分ではない。

そこで、本研究では近年、確立されつつある高精度な数値解析技術を利用して、自然石に作用する流体力を評価することとした。本研究では特に、抗力や揚力等の経験的な係数を用いずに高精度に流体力を計算する手法を提示しており、河川実務の課題を大きく克服する可能性を示唆している。

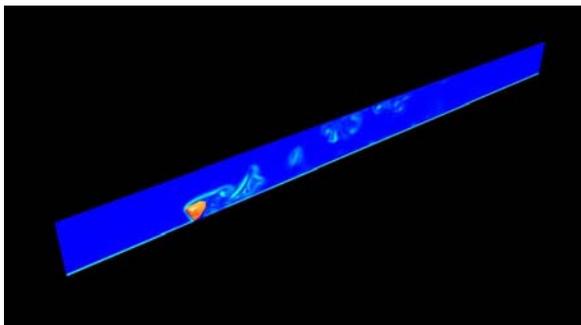
(研究発表 PPT スライドより研究内容の抜粋)



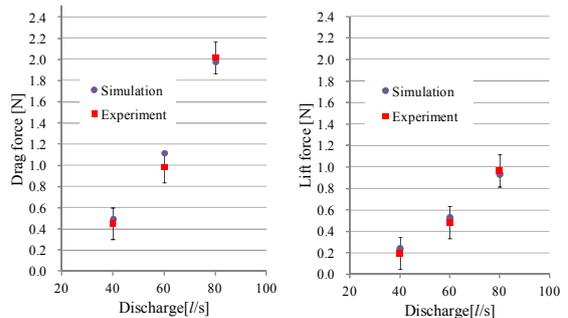
自然石を用いた河川構造物



実験水路、模型石および分力計

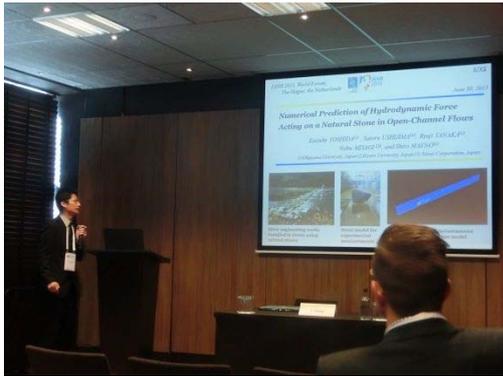


数値計算による模型石周辺の流体挙動の再現



抗力と揚力(実験と解析の比較)

(発表時の様子)



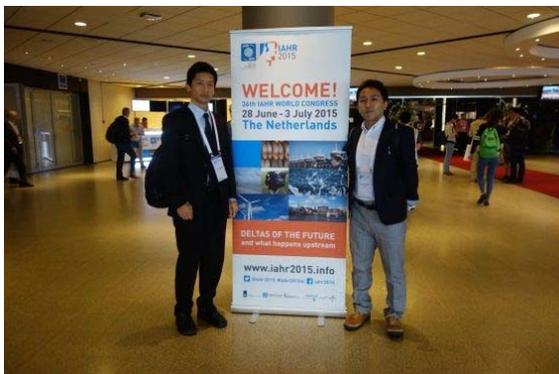
研究発表する申請者



司会者からの質問に回答する申請者

(大会情報)

- ・参加会議名：第36回 国際水理学会 全世界会議 (36th IAHR WORLD CONGRESS)
- ・主催団体名：国際水理学会 (IAHR)
- ・開催期間：2015年6月29日 ～ 2015年7月3日
- ・開催地：オランダ, ハーグ
- ・会場：World Forum
- ・会議での役割：口頭発表
- ・参加者数：約1380名 (大会本部の情報)
- ・論文発表件数：約1800件 (大会本部の情報)



申請者(左)と共に同行した社会人 Dr の学生



休憩時間にフロアで親交を深める参加者たち

(渡航情報)

- ・渡航先：オランダ, ハーグ
- ・渡航日程：
2015年6月28日 岡山→関西空港→アムステルダム→ハーグ ※オランダ航空 KLM 利用
2015年6月29日～7月3日 学会参加
2015年7月4日 (7月5日) ハーグ→アムステルダム→関西空港→岡山 ※機内泊, 含む

平成 27 年度 海外渡航報告書

岡山大学異分野基礎科学研究所

菅 倫寛

2015年6月28日から7月3日の日程でアメリカの Bentley University にて行われた Photosynthesis の分野のゴードン会議 (Gordon Research Conference) に参加した。ゴードン会議は90年近く歴史のある権威ある国際会議で、生物・化学・物理などの領域に分かれた会議が数年おきに開催される。ゴードン会議では自由な討論を通して研究者が最先端の情報交換や交流することを目的としており、この会議に参加できることは研究者にとって大変名誉あることである。私は“Radiation damage free structure of photosystem II in the S1 state at 1.95Å resolution” というタイトルでポスター発表を行った。

詳細は控えるが、岡山大学の沈建仁教授の研究グループは2011年に光合成光化学系IIの結晶構造を高い解像度で決定し、その研究内容は世界的に高く評価されている¹。しかし、この結晶構造については立体構造を決定するために使用した強力なX線によって損傷を受けた、壊れたものであると考える研究者も少なくなかった。そこで我々は新技術であるX線自由電子レーザーを用いて結晶構造解析を行い、放射線損傷を受けていない、結晶構造を決定した²。この“無損傷”の構造に基づいて、光化学系IIの反応機構についての詳細な議論が可能となった。今回我々が決定した結晶構造は、人工光合成を可能とする人工触媒のモデルテンプレートともなり得るといえる。

ゴードン会議において私はX線自由電子レーザーを用いて決定した無損傷の構造に関する内容を報告した。当日の発表は最初こそ緊張したが、話を進めるうちに研究者同士で盛り上がり、気が付いたら議論が深夜に及んでいることも少なくなかった。私の発表内容についておおいに盛り上がり、最後に固い握手をしたとき、ふと相手の名札に目をやると、祖父・実父がノーベル賞受賞者である Siegbahn 博士だったときには思わず息を呑んでしまったほどである。

ウエスコ学術振興財団の助成により、本会議に参加することが可能となり、多くの世界的に著名な研究者と情報交換することができた。最先端の情報を入手するとともに、国際的な共同研究に向けて研究打ち合わせもおこなった。この場をお借りして深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1 Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R. & Kamiya, N. *Nature* **473**, 55-60, (2011).
- 2 Suga, M. *et al. Nature* **517**, 99-102, (2015).

平成 27 年度 海外渡航報告書

岡山大学資源植物科学研究所

谷 明生

2015 年 7 月 19-23 日にスイスのアスコナで開かれた 10th International Symposium on Phyllosphere Microbiology に参加し発表を行ったので以下報告いたします。

植物の表面、特に葉の表面 (Phyllosphere) には様々な微生物が生息し、植物と相互作用している。あるものは病原性細菌であり、またあるものは共生細菌である。本学会では多くの発表が病原性細菌よりも共生細菌に焦点を当てており、その由来、構造、生態、機能、植物への働きかけ、代謝などに関する発表が多い。学会はこれらの研究成果を元にサステイナブルな農業の実現を目指している。参加者は 70 人、口頭発表は計 36 件、ポスターは 23 件であった。参加者はスイス、ドイツ、フランス、オーストリアが多く、イギリス、アメリカ、カナダ等、日本からは 2 名であった。ほとんどが大学・研究機関に属しているが、農業において微生物製剤などを扱う会社からも参加者があった。国際学会としては参加人数は多くないが、それだけ狭く深い研究領域に絞って研究発表・討議が行われた。

口頭発表ではこれまで本学術領域を牽引してきた Dr. Steven E. Lindow (UC. Berkeley)、Dr. Julia E. Vorholt (ETH Zurich) などの長年にわたるこれまでの知見に加え、最新の解析・分析技術に基づいた新しい知見について聴講できた。微生物だけでなく植物の研究者も参加しており、植物と微生物の間でやりとりされる化合物についてや、昆虫も含めた三者の相互作用などもあり、多角的なアイデアを得ることが出来た。

自身の発表としては、直前に Chair の Dr. Vorholt からポスター発表 (“Pyrroloquinoline quinone opens plant stomata.”) だけでなく口頭発表の追加の要請があり、” Production of ergothioneine in *Methylobacterium* species.” を追加した。前者に関しては病原性細菌と植物における、気孔を巡る攻防の分子メカニズムを研究していた Dr. Shen Yang He と深い議論を行い、一流科学雑誌に投稿するために足りないデータなどの指摘を頂いた。同じくスイスに滞在中に共同研究を行わせていただいた Dr. Vorholt とも近況報告と論文化のための細かい打ち合わせを行った。後者は植物葉圏で主要な細菌である *Methylobacterium* 属細菌における新しいアミノ酸の蓄積に関する新しい知見を紹介し、それが葉圏での生存に重要であることを示した。

学会は少ない参加人数、静かな環境、フレンドリーな空気が提供されており、新しい人脈の形成と旧交を温める良い機会であった。

以上

平成 27 年度 海外渡航報告書

岡山理科大学・理学部

汪 達紘

公益財団法人ウエスコ学術振興財団の海外渡航に関する助成をいただき、2015年8月29日～9月4日の間にオーストラリアのブリスベンにおいて開催された「The 9th International Conference on Dietary Assessment Methods (ICDAM9)」に出席し、「A comparative study of dietary assessment between the camera phone-based assessment method and the conventional method」を題した研究結果を発表した(図1、図2)。なお、申請者の渡航日程・概要を表1に示した。

ICDAM9には68カ国から437名の研究者が出席された。3日間にわたって延べ27テーマのシンポジウムセッション、および184演題のポスター発表が行われ、疫学における食事摂取評価方法論のみならず、疾病予防のための身体活動・運動療法、統計方法論など多岐にわたる話題であった。会期中に、各国の演者の最新の研究成果も聞き、参加者との討論・情報交換により今後の研究に役立つ知見を得ることができた。

また、会議前日に、共同研究者の小柏道子先生とブリスベン・クイーンズランド大学の敷地にあるNational Research Centre for Environmental Toxicologyを訪問し(図3)、Dr. Cheng Peng、Dr. Wasantha Wickramasinghe、Dr. Chris Paxmanらスタッフ(センター責任者のJack C. Ng教授のご都合により留守)と交流を行い、オーストラリアにおける重金属による環境汚染の歴史・現状、および発展途上国の研究者との共同研究の現状について説明していただいた。また、申請者の研究内容についても説明させていただき、討論を行った。

最後に、渡航費助成を賜った公益財団法人ウエスコ学術振興財団および関係者各位には、心より感謝申し上げます。

表1. 渡航日程および概要

日程	概要
2015年8月28～30日	移動：岡山⇒関西国際空港⇒香港国際空港 ⇒ブリスベン
2015年8月31日	National Research Centre for Environmental Toxicologyを訪問
2015年9月1～3日	The 9th International Conference on Dietary Assessment Methods (ICDAM9), Brisbaneにて出席・発表
2015年9月4日	移動：ブリスベン⇒香港国際空港⇒関西国際空港 ⇒岡山



図1. ICDAM9 2015の会場

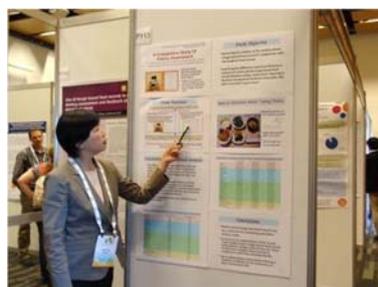


図2. ポスター発表



図3. National Research Centre for Environmental Toxicology 訪問

平成27年度 海外渡航報告書

津山工業高等専門学校

細谷 和範

このたび、公益財団法人ウエスコ学術振興財団海外渡航助成からのご支援を頂き、韓国のソウル市で2015年7月26日から7月31日の一週間にわたって開催された ASME-JSME-KSME Joint Fluids Engineering Conference 2015 (AJK2015-FED)に参加させていただきました。ここに渡航の報告をさせていただきます。

この会議はアメリカ機械学会、日本機械学会、韓国機械学会による流体力学に関する合同会議で、34ものテクニカルトラックから成る大変規模の大きい会議でした。おりしも MERS コロナウイルスの拡大が心配された時期でしたが、会議開催日には沈静化し、通常通り会議が開催され、490件もの講演がなされました。講演は全て英語による口頭発表で、各セッションとも闊達な議論がなされていました。発表者は韓国からの参加者が最も多く、次いで日本、アメリカ、中国と続き、フランスやイランなど、国際色の豊かな会議となっており、多数のレベルの高い研究成果の発表と有意義な議論がそこらかしこで行われていました。また Invited Speaker による高い研究レベルの講演により、議論はより一層闊達になりました。

報告者が発表したセッションは“Forum on Fluid Measurements and Instrumentation”で、放射性元素を含むスラリーの管理や、音響ドップラー効果を利用した局所流れの計測など、計測が困難な流れを対象にした研究を発表する Forum で、報告者は“Flow visualization of pipe flows obtained by MR imaginary”と題した発表を行いました。この研究は流体機械内部の見えない流れを非侵襲性の医療用診断装置の一つである MRI を用いて調べるもので、簡単な教科書レベルの流れ場の観察から実用性を視野に入れた水車タービンの流れの観察を試みた内容を発表しました。このセッションでは発表内容がバラエティーに富んでいたため、深い議論は難しいかと思いましたが、チェアマンの先生が MRI の専門家であったため、非常に鋭いコメントを頂きました。また併せて MRI で様々な流体実験を行う内容について非常に面白いと好意的な意見も頂きました。

今回の会議では発表した計測のセッション以外にも風車や水車など自然エネルギーの回収に関するセッションでも様々な議論ができ、今後の研究活動の活力源となる多くの知見と人との出会いがありました。このような貴重な機会を与えてくださった公益財団法人ウエスコ学術振興財団には大変感謝致しますとともに、より一層、研究活動に邁進する所存です。



写真一1 会場の様子



写真一2 登壇前の報告者（受付前にて）