

# SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL OF KANAGAWA UNIVERSITY

# KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

# Vol.30 2019

神奈川大学総合理学研究所

*Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University*

# Science Journal of Kanagawa University

Vol. 30

## 目 次

### 原 著

Formation of SiC Nanocrystals Aligned at the SiO<sub>2</sub>/Si Interface Aiming at Sample Preparation  
for Scanning Tunneling Luminescence Spectroscopy

Yasushi Hoshino、Yu Soga、Jyoji Nakata ..... 1

電極式調理の発明からパン粉へ続く歴史および再現実験

青木 孝 ..... 9

公立図書館蔵書貸出データの統計的分析－平塚市図書館を例として－

加藤憲一 ..... 17

二層二重スリットでの量子干渉思考実験

行方幸希、木村 敬 ..... 25

論述式試験に関する諸問題と採点支援システムの研究動向

後藤智範、永松礼夫 ..... 33

拡張ビオローゲンの還元で生じるラジカルに関する ESR 分光研究

中川優香、鈴木健太郎、菅原 正、平野弘樹、高橋広奈、河合明雄 ..... 39

紫外線照射下におけるケージドオレイン酸油滴封入ベシクルの巨視的運動

鈴木健太郎、村山栄貴、中山直之、菅原 正、山口和夫 ..... 43

二型性葉緑体の微細構造に注目した C<sub>4</sub> 植物トウモロコシとその類縁種の系統学的研究

鈴木季直、福田千春、河田直美、永井 慎、岡島 崇 ..... 47

輪形動物ヒルガタワムシの運動における纖毛冠の役割の研究

指旗和也、市川麗子、茂木和枝、豊泉龍児 ..... 55

クルマエビ眼柄甲殻類雌性ホルモンの精製と生物活性の測定

安保裕子、渡部聰美、甲高彩華、大平 剛 ..... 63

消化後固定法によるシロイヌナズナの減数分裂期染色体の調製

安積良隆、笹本浜子 ..... 67

ナマズ目オトシンクルスをモデルとした硬骨魚類黒色素胞の収縮調節機構の研究

深沢優子、橋本真莉菜、上谷雄介、天野桃香、茂木和枝、小笠原 強、豊泉龍児 ..... 73

神奈川県下で採集された原生動物ミドリゾウリムシの培養系の確立に関する研究

永見英子、橋 友理香、小谷 享、細谷浩史 ..... 85

腊葉標本 DNA の MIG-seq 法による利用可能性・解析手法の検討

岩崎貴也、小玉あすか、松尾 歩、陶山佳久、大西 亘、尾関雅章、中濱直之、山本 薫 ..... 89

相模湾河口域における長期環境変動モニタリング6　流入河川水及び底質の元素分析 岩崎俊志、岡崎太一、武井尊也、鈴木祥弘、金澤謙一、西本右子	97
---	----

## 教育論文

物理学実験1における光の回折・干渉実験の実践例と応用 星野 靖	103
反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学(6) 加部義夫	111
2018年度神奈川大学総合理学研究所事業報告	119
Science Journal of Kanagawa University 投稿規定	125
Author Index	129
編集後記	130

■ Full Length Paper ■ By a grant from Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

## Formation of SiC Nanocrystals Aligned at the SiO<sub>2</sub>/Si Interface Aiming at Sample Preparation for Scanning Tunneling Luminescence Spectroscopy

Yasushi Hoshino<sup>1,3,4</sup>, Yu Soga<sup>2</sup> and Jyoji Nakata<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Field of Physics, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: yhoshino@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** We investigated the synthesis of SiC nanocrystals (NCs) of several nanometers on a crystalline Si(001) surface, aiming at sample preparation for scanning tunneling luminescence using a novel conductive transparency probe. Two methods for C implantation and CO diffusion to SiO<sub>2</sub>/Si(001) samples were adopted for the formation of nanocrystalline SiC aligned on the Si(001) surface. The characterization of NCs: crystalline structure, shape, size and areal density, were analyzed by reflection high-energy electron diffraction, scanning probe microscopy and Rutherford backscattering spectroscopy. The C implantation method could not form sufficient NCs on the surface since the diffusion of C to the interface was not adequately promoted by thermal annealing. On the other hand, almost an ideal structure of SiC NCs of ~10 nm on the Si(001) surface was realized by CO annealing under 0.2 bar at 1100 °C for 0.5 h. The size of NCs primarily depends on the annealing time: the annealing conditions should be optimized for further decrement of the NC size.

**Keywords:** nanocrystal, scanning tunneling microscope, electroluminescence, silicon carbide, resonant elastic Rutherford backscattering

### Introduction

Nanocrystals (NCs) exhibit novel characteristics especially in the optical and electronic properties derived from a quantum size effect. The characterization of luminescence from individual NCs particularly attracts our interests to understand the properties of nanomaterials. However, the experimental method to detect electronic and optical features from an identical NC at the same time has been limited. Murashita *et al.* designed and developed a new spectroscopy using scanning probe microscope for the simultaneous measurements of luminescence as well as electronic states of a certain NC<sup>1,2)</sup>. The scanning tunneling luminescence (STL) spectroscopy makes it possible to collect both photons and electrons emitted from an individual NC by injecting tunnel elec-

trons or lights through a conductive and transparent (CT) probe with a small curvature.

In this study, we aim to synthesize nanometer-scale SiC crystals exposed on the surface of a crystalline Si substrate as a standard sample to evaluate the electroluminescence in the STL spectroscopy. The STL spectroscopy is an only method to detect local luminescence emitted from a NC when the electrons excited by injection of tunneling-electron from the tip to the sample recombine with holes. This method, which has special features of small tunneling-electron beam diameter and variable injection energy, can inject and pull out tunneling-electrons by applying bias voltage to the probe.

We prepared in this study SiC NCs on the crystal-

line Si substrate as the standard sample emitting light from the nanometer area. Since SiC is indirect transition type semiconductor, its light emission probability is extremely low in the bulk structures. Three-dimensional carrier confinement by forming SiC NCs with several nm, however, makes the light emission probability increase. This is because the band structure and the dipole selection rule are significantly relaxed, resulting in the increase of the recombination probability between electrons and holes. Since the emission wavelength of semiconductor NCs varies with size, it is important to evaluate both size and optical property at the atomic level and at the same point of sample. It is required that SiC nanocrystals within 10 nm in diameter are exposed on the surface and are not too dense in order to individually measure the luminescence from a single NC through the CT probe.

## Materials and Methods

We prepared samples with two kinds of methods of C ion implantation and CO thermal diffusion to synthesize SiC NCs at SiO<sub>2</sub>/Si interface. These processes are schematically shown in Fig. 1.

In the former process, we first performed 25 keV C<sup>+</sup> ion implantation with a fluence of  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  at RT in a thin SiO<sub>2</sub> layer with 150 nm thick synthesized by dry thermal oxidation of Si(001) substrates at 1000°C for 3 h under atmospheric pressure. The incident energy of 25 keV was chosen to be implanted in the SiO<sub>2</sub> layer in the very vicinity of the interface. The C-implanted samples were then annealed at 1000 and 1100°C for 1 h in Ar ambience to enhance the diffusion of the C atoms to the interface. The depth profile of the implanted C, before and after eliminating the capped SiO<sub>2</sub> layer, was analyzed by resonant elastic Rutherford backscattering (RBS) of <sup>12</sup>C(p, p)<sup>12</sup>C at 1.737 MeV using a 1-MV tandem-type Pelletron accelerator <sup>3)</sup>.

In the latter process, the same SiO<sub>2</sub>/Si(001) samples were thermally annealed in CO ambience at 1100°C for 0.5, 1 and 2 h under a pressure of 0.2 bar. In the previous works, SiC NCs are known to be synthesized at the SiO<sub>2</sub>/Si interface because of CO diffusion through the SiO<sub>2</sub> network and chemical reaction with the interfacial Si. Since the nucleation density of SiC nanocrystals depends on the CO pressure, we controlled the CO pressure to be 0.2 bar so

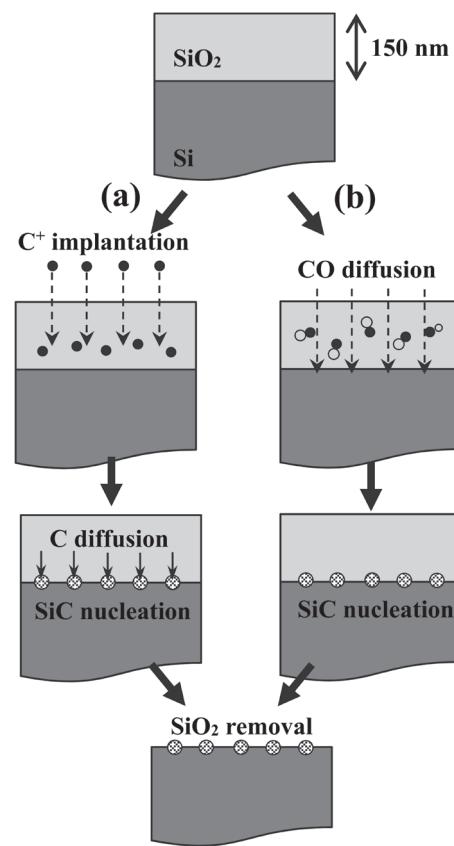


Fig. 1. Formation processes of SiC NCs in SiO<sub>2</sub>/Si samples by C ion implantation (a) and CO thermal diffusion methods (b).

that the density of nanocrystals did not become too large <sup>4,8)</sup>. Surface morphology was observed by atomic force microscopy (AFM) and scanning tunneling microscope (STM) after removing the SiO<sub>2</sub> layer by HF treatment.

## Results

### Calibration of incident energy and scattering cross section for <sup>12</sup>C(p, p)<sup>12</sup>C resonance

The detection sensitivity of low atomic number ( $Z$ ) elements existing in high  $Z$  materials is quite poor in the conventional RBS analysis due to low scattering cross section. However, the cross section is resonantly enhanced when the summation of incident energy in the center of mass system and nuclear energy generated by the formation of compound nucleus corresponds to the excited energy levels of the compound nucleus. The energy conservation rule is written by

$$\frac{M_2}{M_1 + M_2} E_0 + Q = E_{ex}, \quad (1)$$

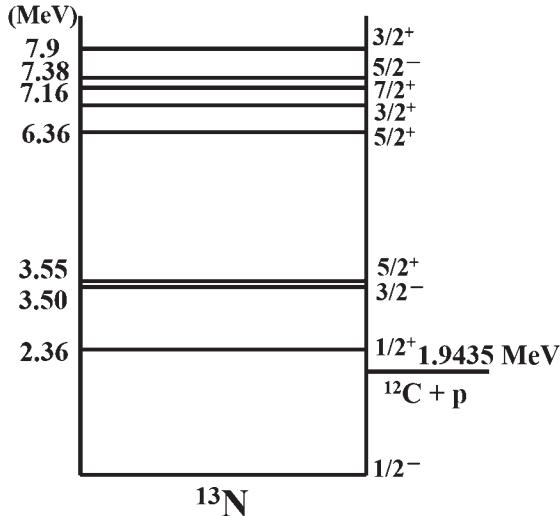
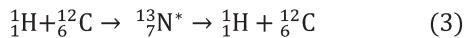


Fig. 2. Energy levels of <sup>13</sup>N atomic nucleus<sup>3)</sup>.

where  $M_1$  and  $M_2$  are the mass of projectile and target atoms, respectively.  $E_0$  is the incident energy of projectile in the laboratory system (L-system).  $E_{ex}$  is the energy levels of exited states for compound nucleus.  $Q$  is the energy generated by mass defect in the nuclear compound reaction; defined by

$$Q = \Delta m \cdot c^2 = ((M_1 + M_2) - M_3)c^2. \quad (2)$$

In the present resonance of <sup>12</sup>C(p, p)<sup>12</sup>C, the nuclear reaction equation is given by



and the  $Q$  value is estimated to be 1.9435 MeV.

Fig. 2 shows the energy levels of <sup>13</sup>N atomic nucleus<sup>3)</sup>. We can find that the first to third exited states with the nuclear spins and parities of  $J = 1/2+, 3/2-,$  and  $5/2+$  at  $E_{ex} = 2.365, 3.502,$  and  $3.547$  MeV, respectively. It is well known that the last state of  $J = 5/2+$  at  $3.547$  MeV shows significantly narrow resonance of 50 keV at 1.737 MeV in the L-system.

We first calibrated the terminal voltage of accelerator measured by a generating voltmeter (GVM) using the narrow resonance of <sup>12</sup>C(p, p)<sup>12</sup>C at 1.737 MeV. Figure 3 shows the RBS spectra observed for a graphite substrate at a scattering angle of 160° as a function of terminal voltage monitored by GVM from 0.850 to 0.950 MV. In accordance with kinematic relations in the elastic collision at the surface, the proton energy scattered from the carbon atoms existing on the top surface at a scattering angle of 160° is calculated to be 1.290 MeV for the incident proton beam with the resonant energy of 1.737 MeV. As can be shown in Fig. 2, the surface resonance is clearly observed at the GVM voltage of 0.92 MV,

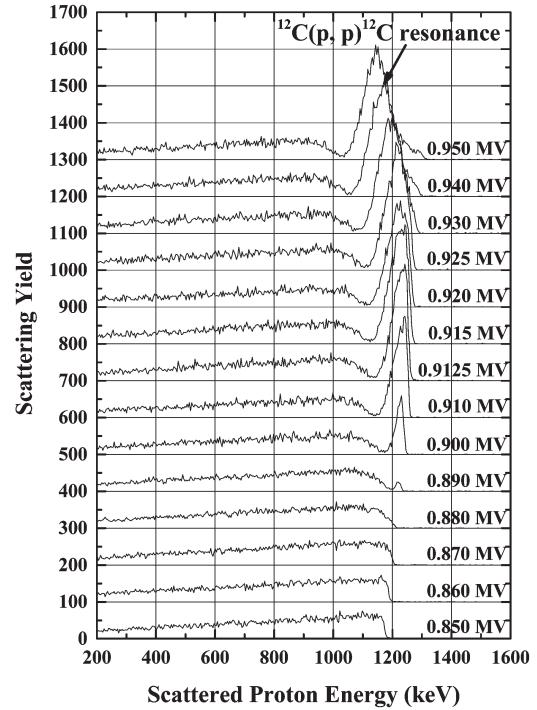


Fig. 3. RBS spectra observed for graphite at various acceleration voltages monitored by GVM.

suggesting that the proton ions accelerated by that voltage was found to correspond to the resonance energy of 1.737 MeV.

Next, we calibrated the resonant differential cross section at 1.737 MeV by a shallowly C-implanted sample in a Si substrate with an areal density of  $4.0 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ . Fig. 4 shows RBS spectrum obtained by <sup>12</sup>C(p, p)<sup>12</sup>C resonance at 1.737 MeV. It is well known that Si has also broad resonance around 1.7 MeV. A small sharp peak is clearly observed around the energy of 1240 keV, which corresponds to the signal of the <sup>12</sup>C(p, p)<sup>12</sup>C resonance. From the scattering yield, the differential scattering cross section for the resonance at a scattering angle of 160° was estimated to be  $8 \times 10^{-25} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$ , which was 50 times higher than that for the ordinary Rutherford scattering. It is suggested that the number of <sup>12</sup>C atoms with an order of  $10^{15} \text{ cm}^{-2}$  can be sensitively detected.

### Formation of SiC NCs at SiO<sub>2</sub>/Si interface by C implantation

In this section, we show the results of SiC NCs formed by C ion implantation in SiO<sub>2</sub>/Si followed by annealing<sup>9)</sup>. Fig. 5 shows resonant RBS spectra observed for the samples as-implanted (a) and

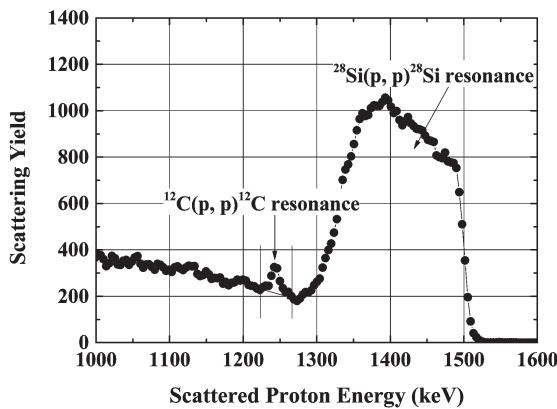


Fig. 4. RBS spectra at the resonance observed for shallowly C-implanted Si (001) substrate with  $4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ .

post-annealed at  $1000^\circ\text{C}$  (b). According to the scattering yield from  $^{12}\text{C}$  atoms observed in Fig. 5(a), the areal density of  $^{12}\text{C}$  was estimated to be  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ , which is found to be the same as the C fluence. In a RBS spectrum, the energy of scattered projectiles is strongly related to the depth in which the scattering centers are located. The scattered proton energy arrowed in Fig. 5(a) indicates that the implanted C atoms were distributed in the  $\text{SiO}_2$  layer around the depth of 50 nm measured from the surface. On the other hand, three small peaks were separately observed after annealing at  $1000^\circ\text{C}$  as shown in Fig. 5(b). The peaks located at higher (2) and lower (4) energies correspond to the C atoms diffused to surface and interface, respectively. The intermediate peak (3) is attributed to the C atoms in  $\text{SiO}_2$  layer. This fact shows that half of implanted C atoms was segregated to the surface and the interface by post-annealing at  $1000^\circ\text{C}$ .

After eliminating the capped  $\text{SiO}_2$  layer by dipping the sample in diluted HF solution, the signal from C was entirely disappeared as shown in Fig. 6. It shows that the postannealing at  $1000^\circ\text{C}$  enhances the C diffusion to the surface and the interface; however, the sufficient C atoms could not be fixed at the sites by this method.

#### Formation of SiC NCs at $\text{SiO}_2/\text{Si}$ interface by direct CO annealing

We then investigated the formation of SiC NCs by direct annealing of  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  specimen in CO gas ambience. Fig. 7 shows surface protrusion image and cross-sectional shapes of one of NCs for the samples with different annealing time after removing the

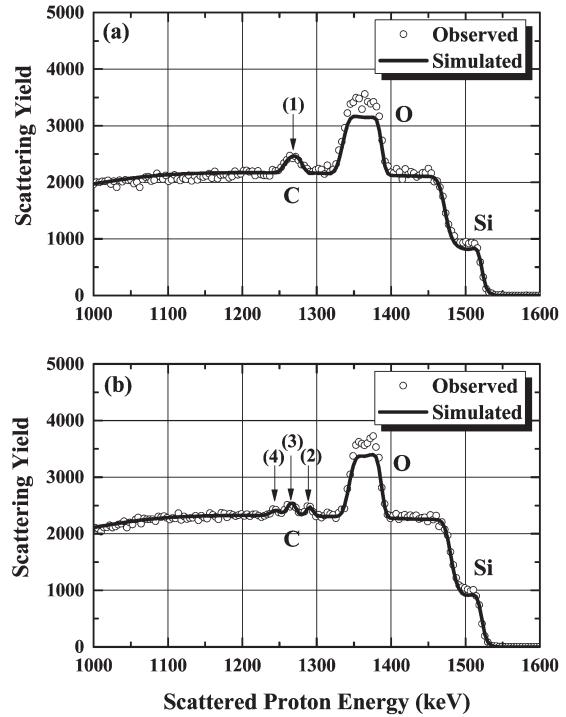


Fig. 5. Resonant RBS spectra observed for the samples as-implanted (a) and post-annealed at  $1000^\circ\text{C}$  (b).

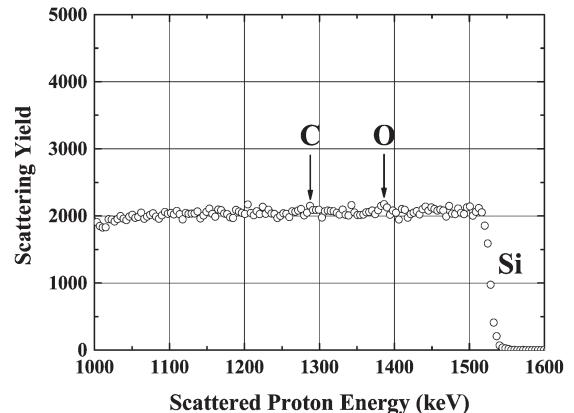


Fig. 6. RBS spectra after eliminating the capped  $\text{SiO}_2$  layer entirely.

$\text{SiO}_2$  layer by HF treatment observed by AFM. It is clearly found that epitaxially oriented NCs were formed on the  $\text{Si}(001)$  surface. The nucleation density of NCs is found to be about  $1.0 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  regardless of annealing time. This density is sufficiently low necessary for the optical measurement of the individual NCs by STL spectroscopy. The diameter of NCs observed for the samples annealed for 0.5, 1 and 2 h was estimated to be 10, 15 and 30 nm, respectively. It is found that the cluster size strongly depends on the annealing time. It should be noted that the quantum size effect becomes remarkable

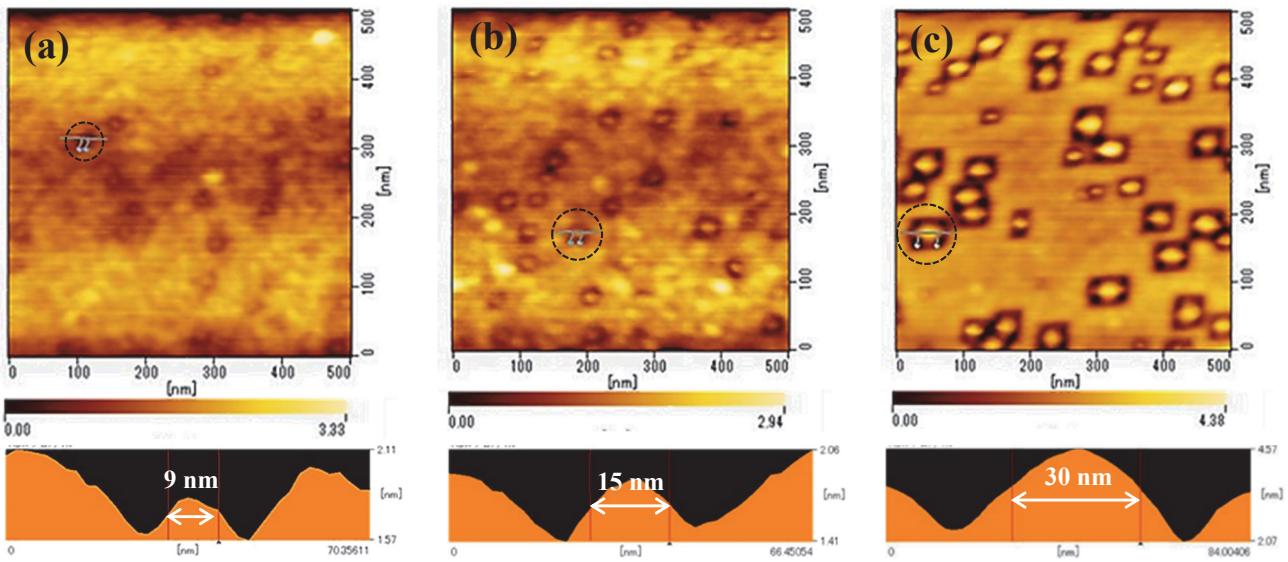


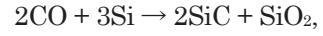
Fig. 7. AFM images and cross-sectional shapes of NC for the samples with different annealing times of 0.5 (a), 1 (b) and 2 h (c).

when the size of NCs is 10 nm or less, so that the semiconductor NCs are likely to emit luminescence. The annealing period of 0.5 h or less should be therefore suitable for the synthesis of NCs for the measurement of STL spectroscopy.

Fig. 8 shows a typical RHEED pattern observed for the samples on which the NCs were formed. The electron beam with an energy of 20 keV was incident along the [1̄10]-axis. The streak patterns indicated by yellow arrows are attributed to the diffraction from the Si(001) surface. In addition, one can see bright spot-like patterns, whose configuration was independent of the azimuth direction of incident electron beam. It is suggested that the observed pattern is therefore derived to be the diffraction laterally transmitted through 3-dimensional fine structure. The symmetry and distance of the diffraction spots indicated that the NCs are crystal-

line 3C-SiC.

As can be clearly seen in Fig. 7, the NCs of each sample have characteristic shape surrounded by squared pits. These pits are caused by forming SiO<sub>x</sub> compound in accordance with the following reaction at the SiO<sub>2</sub>/Si interface:



after CO diffuses in SiO<sub>2</sub> without dissociating and dissociates. The pits are thus formed after removing thermal oxide and SiO<sub>x</sub> with HF<sup>10)</sup>.

Fig. 9 shows the surface protrusion obtained by STM observation. In order to emerge NCs on the surface for STM measurements, we performed wet chemical preparations by alternately dipping in HNO<sub>3</sub> and HF solution several times. In the STM images, we can clearly see SiC NCs with a characteristic cross shape, whose size strongly depends on the annealing time. The NCs were found to be coalesced each other with increasing annealing time.

## Discussion

We performed the synthesis of SiC NCs on a crystalline Si(001) surface with two kinds of procedures of C implantation and CO thermal diffusion into SiO<sub>2</sub>/Si interface. In the former process, we could not form sufficient SiC NCs at the SiO<sub>2</sub>/Si(001) interface since the diffusion of C to the interface was not enough promoted by thermal annealing at 1000°C. We also tried higher temperature annealing of 1100°C; however the superficial SiO<sub>2</sub> layer was damaged by the annealing process; eventually

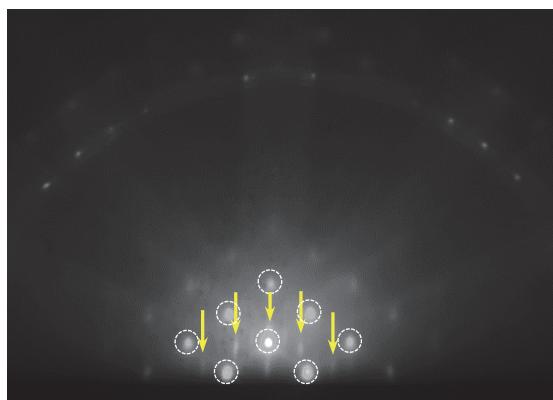


Fig. 8. RHEED pattern for the NC-formed Si(001) surface.

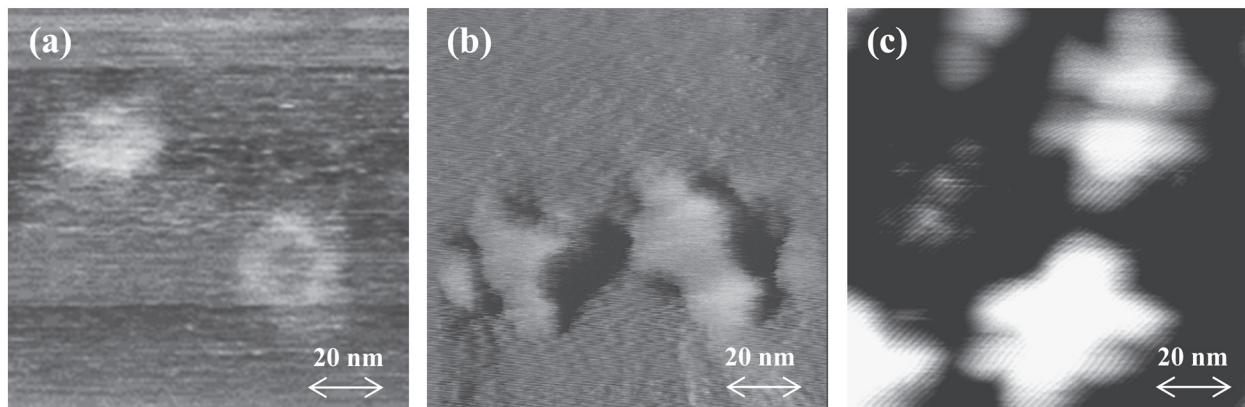


Fig. 9. Surface protrusion images observed by STM for CO diffused samples at 1100°C for 0.5 (a), 1.0 (b), and 2.0 h (c).

some cracks were formed on the sample. The annealing time should be considered carefully.

In the latter process of CO diffusion, we succeeded in the synthesis of SiC NCs within the size of about 10 nm by short annealing of 0.5 h. The sizes of the SiC NCs became bigger by annealing for longer period ( $> 0.5$  h), though the number of the NCs was almost constant ( $1 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ ). It is suggested that NCs grow randomly on the  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  interface at the early stage of CO diffusion ( $< 0.5$  h). After a critical time, the nucleation takes place beside already formed NCs. Consequently, the annealing time should be shorter ( $< 0.5$  h) to form small NCs with several nanometers. However, there have been also some discussions that the critical time is existed for beginning the formation of NCs in the previous studies<sup>11)</sup>. The detailed formation process of NCs should be considered on pressure, temperature, and time in CO annealing process. The optimization of such parameters in annealing is therefore a quite important issue to make SiC NCs with a quantum size.

In summary, we investigated the synthesis of SiC NCs within 10 nm on a crystalline Si(001) surface by C implantation and CO diffusion processes aiming at the sample preparation for tunneling luminescence spectroscopy. By annealing the  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  sample in 0.2 bar CO ambience at 1000°C for 0.5 h, NCs in about 10 nm size were formed at the interface. RHEED pattern showed that the NCs consist of cubic silicon carbide structure. Parameters in annealing such as pressure, temperature, and time should be optimized for further decrement of the NC size for the suitable sample of STL measurements by CT probe.

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Mr. Y. Saito and Dr. T. Murashita for his great supports and valuable comments in this study. This research was partly supported by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University (RIIS201801).

## References

- 1) Murashita T (1997) Novel conductive transparent tip for low-temperature tunneling-electron luminescence microscopy using tip collection. *J. Vac. Sci. Technol. B* **15**: 32-37.
- 2) Omi H, Sychugov I, Kobayashi Y and Murashita T (2009) New microscope combines optical and electrical excitation into a single scanning tunneling microscope unit for simultaneous characterization of near-field luminescence for individual nanostructures. *Kenbikyo* **44**: 174-178.
- 3) Ajzenberg-Selove F (1991) Energy Levels of Light Nuclei A = 13-15. *Nuclear Physics A* **523**: 1-196.
- 4) Cavellin CD, Trimaille I, Ganem JJ, D'Angelo M, Vickridge I, Pongrácz A and Battistig G (2009) An  $^{18}\text{O}$  study of the interaction between carbon monoxide and dry thermal  $\text{SiO}_2$  at 1100°C. *J. Appl. Phys.* **105**: 033501/1-7.
- 5) Pongrácz A, Hoshino Y, D'Angelo M, Cavellin CD, Ganem JJ, Trimaille I, Battistig G, Josepovits KV, and Vickridge I (2009) Isotopic tracing study of the growth of silicon carbide nano-crystals at the  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  interface by CO annealing. *J. Appl. Phys.* **106**: 024302/1-5.
- 6) Deokar, G, D'Angelo M and Deville Cavellin C (2011) Synthesis of 3C-SiC Nanocrystals at the  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  Interface by  $\text{CO}_2$  Thermal Treatment. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**: 1-5.
- 7) Pécz B, Makkai Zs, Pongrácz A, Bársóny I, Deák P and Battistig G (2007) Formation of epitaxial SiC nanocrystals. *Surf. Sci.* **601**: 2671-2674.
- 8) Pongrácz A, Battistig G, Dücső Cs, Josepovits KV and Deák P (2007) Structural and electronic properties of  $\text{Si}/\text{SiO}_2$  MOS structures with aligned 3C-SiC nanocrystals in the oxide. *Mater. Sci. Eng. C* **27**:

- 1444-1447.
- 9) Voelskow M, Panknin D, Polychroniadis EK, Ferro G, Godinnion P, Mestres N, Skorupa W, Monteil Y and Stoemenos J (2004) Epitaxial SiC formation at the SiO<sub>2</sub>/Si interface by C<sup>+</sup> implantation into SiO<sub>2</sub> and subsequent annealing. *Mater. Sci. Forum* **483-485**: 233-236.
  - 10) Zhang L, Chen LQ and Du Q (2007) Morphology of critical nuclei in solid-state phase transformations. *Phys. Rev. Lett.* **98**: 265703/1-4.
  - 11) Sugimoto T (2007) Underlying mechanisms in size control of uniform nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **309**: 106-118.



■原 著■

## 電極式調理の発明からパン粉へ続く歴史および再現実験

青木 孝<sup>1,2</sup>

Historical Background of the Invention of Electrode Rice Cooker/Bread Machine and a Reproduction Experiment

Takashi Aoki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: u17aok@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Breadcrumbs made from "Denki-Pan" (breads baked using an electrode bread machine invented by Shozo Akutsu) are still on the market. We conducted an experiment to reproduce Denki-Pan, and compared stainless steel and titanium as electrode plate materials. The experiment revealed that the existing technology to cook rice with electrodes ("Denki-Rice") had been applied to Denki-Pan. Thus, Shozo Akutsu had put a two-purpose device into practical use. Electrodes to cook Denki-Rice are placed either parallel or at the bottom of a cooker. We investigated historical factors that influenced the process of materializing this idea.

**Keywords:** Denki-Pan, Denki-Rice, panko, titanium, gelatinization, starch, granule

### 序論

2枚の極板を木枠に挟んで、その中に極板に接するようにパン生地を入れ、極板間に100 Vの交流電源をかけるだけの電気パン焼き器は、第二次世界大戦後、物資が少なかった時代に、家庭で自作されかなり広く用いられた<sup>1)</sup>。この時、渡辺由美子氏の調査によれば<sup>2)</sup>、パン生地としては、1946年当時、農林省食糧研究所の川口武豊氏による小麦粉にふくらし粉を入れた練り状のものや、1947年当時、阿久津正蔵氏によるイースト菌で発酵させた練り状のものが紹介されている。神奈川大学理学部では物理学学生実験の1つとして、ふくらし粉と食塩と砂糖を入れた液状のパン生地を、幅6 cm 平行に離した2枚のステンレス極板（長さ18 cm、高さ10 cm）を木枠に挟んだ自作パン焼き器に入れ100 Vで通電し、29年前から性能評価を課題とさせる（図1）。その結果、余熱も必要なオーブン等による周りから加熱する焙焼式に比べ、電極式は、パン生地自体がジュール熱で発熱するため、熱効率が70%程度と良く、焼き上がると蒸発により自動的に電流が切れるという優れた性質を持つことが分かった。その後偶然2016年夏に、戦後の1947年頃に家庭用として市販された電極式炊飯器「たからおはち」の実物が大阪市立博物館に所蔵・展示され、その再現実験を2013年

に長谷川能三学芸員が行っていることを知った。この再現論文<sup>3)</sup>において、「たからおはち」の2枚の極板の構成には、電解質の少ない水道水で炊飯するための工夫が施されているので、本学のようなパン焼き器では炊飯できないと結論されていた。そこで、疑問に思い2017年春に、本学のパン焼き器でも炊飯できることを実験により実証した<sup>4)</sup>。

さらに調べると、現在でも電極式パンを作ってパン粉に加工していることが分かった。驚きと共に、全国パン粉工業協同組合連合会事務局に問い合わせ、その会員会社等の御協力により、電極式調理の歴史および食品衛生法と絡む実務上重要な極板の材質選定の経緯について教えていただいた。全く知らない事ばかりだった。

さらにまた、2018年3月、TV朝日の「超イッテンモノ」という番組で、三好日出一氏が所蔵する、



図1. 本学パン焼き器により焼いたパン粉用パン。

戦後、平塚市の旧火薬廠（現横浜ゴム）の地下倉庫にあった電極式炊飯器が旧陸軍のものとして紹介された（図2）。この三好日出一氏の電極式炊飯器は、長谷川能三学芸員の再現論文<sup>3)</sup>の中に記載のある「たからおはち」の実用新案359047「電気炊飯器（B）」（1646年3月12日出願）の元になっている、第二次世界大戦前の日高周蔵氏の1934年1月16日出願の特許116015「電気に依る飯炊法」に使われる同心円形の極板（例示の1つ）のものと同一だった。「たからおはち」は、この日高周蔵氏の特許の、お櫃の底に配置した極板形を櫛の歯形に改良したものである。2018年10月に、三好日出一氏に電極式炊飯器を見せて頂いた所、取扱説明書に、専売特許「厚生式電気炊飯器（五合炊用）」と題して、「昭和9年頃から陸軍において飯水の中に直接電流を通じて熱を発生させ、飯炊をする事について研究し、表題の特許が成立しました。しかし、陸軍で使用するものは兵器としての応用に主眼があつて、そのままでは家庭用にならない事はもちろんですが、ここに財団法人国民栄養協会の研究によって家庭用電気炊飯器の完成を見た次第であります。」と記してあった。国民栄養協会は、1946年1月に厚生省内に厚生大臣を会長として発足する。東京薬科大学生命科学部の内田隆講師の調査（以降の「食生活」の記事すべて）によれば、当協会発行の月刊誌「食生活」1946年4月号に「炊飯器いよいよ発売」の広告があり、この時期に発売されたことが分かる。三好日出一氏の取扱説明書の製造元は名古屋市同仁産業株<sup>4)</sup>で、この広告の製造元は東京都品川区田野井製作所なので、全国的に製造されていたことになる。



図2. (左) 厚生式炊飯器（三好日出一氏所蔵）、(右) お櫃の底の同心円形極板（1946年4月発売）。

また、「食生活」1946年10月号<sup>5)</sup>には、国民栄養協会事業部の記事で、「かつて元陸軍糧秣本廠がもっていた特許の使用権を当協会が譲り受け作つたのだが、近頃、2, 3類似品が出ている様である。」と書かれ、同号には、阿久津正蔵氏のパンについての寄稿もある。その後、旧火薬廠は1947年1月に残務整理完了につき消滅し、進駐軍が接収した後、1955年に横浜ゴムに払い下げられる。この厚生式炊飯器は、三好日出一氏の友人が1970年頃、横浜ゴムから地下倉庫の処分を依頼された時に、新品の厚

生式炊飯器を100個ほど見つけ、その一つを個人的に保管し、後に三好氏に譲ったものである。渡辺由美子氏が調査した1947年7月出版の「家庭の電化」<sup>6)</sup>には、当時市販されていた電極式炊飯器の極板形が2例紹介されており、そのうち一つが厚生式である。この本の中で、書物で電極式炊飯器を紹介するのは最初であると述べ、使用した自身のありがたみを伝え、最近の電熱界における傑作であると書く。飯炊きの電化は、待望されていたのである。これらから、この厚生式炊飯器に前後に追従して、お櫃の底に配置した極板形を変えた「たからおはち」等の炊飯器が広く市販されていたことが分かる。

さらにまた、お櫃の底に極板を配置し、飯水の中に直接電流を通じる日高周蔵氏の特許（厚生式炊飯器）に先立ち、釜を2重にして、外釜の底に電極板を配置し、外釜で水を沸騰させ熱源とし、その100°C蒸気で間接的に内釜で炊飯する「自動電気鍋」の特許81658が1928年に、荒木吉次郎氏から出願されている<sup>7)</sup>。内釜の飯水に直接電流を通じるのではなく、外釜の極板と別け、外釜に入れた水が蒸発すれば通電が切れる。翌1929年3月の改良特許83460の外釜の極板形は、縦に対向形から、厚生式と同様の同心円形に変更されている。同10月の再改良特許86342は、「万能レンジ」として市販された（公立はこだて未来大学デジタル資料館 po000941ポスターより）。このお櫃の底に極板を置く形式は、かまどの発想から自然で受け入れ易かったと考える。電極式炊飯器は完成した技術ではあったが、電流調整が難しく感電等の問題があった。電極式で水道水の湯を沸かすには小電流過ぎる。一般的な実用に耐える外熱式の炊飯器は、荒木吉次郎氏の電極式の熱源をヒーターに変えたものである。2重釜にして、外釜に沸騰したら20分で蒸発する分量の水を入れ（100°Cで20分が炊飯の決め手）、外釜を鋳込みヒーターで熱し、間接的に炊飯をする「東芝自動式電気炊飯器ER-4」が1955年に市販される。外釜の水が蒸発すると温度が上がり、バイメタルのサーモスタットで電源が切れる。現在に近い1重釜で、鋳込みヒーターの上に直接に釜を置き、鍋底のセンサーが130°Cで切れる炊飯器は、翌1956年松下電器が市販し、1988年にはIHジャー炊飯器を発明する。

一方、国民栄養協会は、「食生活」1946年10月号の中で、「厚生式電極式製パン器（新発売）」の広告をしており、炊飯器同様、電極式パン焼き器も市販したことが分かる。内田隆講師（東京薬科大学）の調査によれば、第二次世界大戦後早い同時期に、少年工作として既にパン焼き器の設計が紹介された<sup>8)</sup>。

翌年1947年には渡辺由美子氏の調査によれば、

東京女子経済専門学校（現在は新渡戸文化短期大学）の沼畠金四郎教授により、極板間隔 6 cm 程度における、食塩量に対する水温と電流値の時間変化についての解析が行われていた<sup>9)</sup>。この論文では、全国パン粉工業協同組合連合会等に教えて頂き感動した電極式パン粉に至る経緯と、極板の材質による評価も含めた、そのパン粉用の電極式パンを再現する実験をしたので報告する。全国パン粉工業協同組合連合会の資料<sup>10)</sup>によれば、この電極式パン焼き装置の技術が、陸軍の阿久津正蔵氏の発明<sup>11)</sup>で、まず電極式炊飯があり、次いでパン焼きとなり、現在も電極式パン粉として残っていることをご存じだろうか。教えて頂いたその歴史を簡単に紹介する。

阿久津正蔵氏は、陸軍の「飯が炊け、パンが焼ける給養車を戦車団の装備として速やかに完成せよ。金はいくらかかってもよろしい。」という命令を受け電極式炊飯器を開発し、それをトラックに実装した 94 式炊事自動車を 1934 年に試作する。翌 1935 年（昭和 10 年）に、日本陸軍糧秣廠報告<sup>12)</sup>に見られるように、阿久津正蔵氏によって電極式製パン法および装置単体の創案・発明がなされた<sup>13)</sup>。さらに 1936 年出願の実用新案 247954 「パン焼きに転用し得る炊飯用電極」の改良により、炊事自動車の煮炊装置にパン焼きを組み込み、そして 1937 年に、同じ装置で炊飯もパンも焼ける電極式（電源装置を含む）の 97 式炊事自動車と命名されて完成し実用化され技術が結実する。仕様は 1 時間に千食である。したがって、電極式調理は、炊飯が先でパン焼きが後となる。1939 年のノモンハン事件では、日ソ国境線において 97 式炊事自動車が出動した。阿久津正蔵氏の遺稿<sup>11)</sup>によれば、「戦車用の炊飯とパン焼きを兼ねた装備の単位は、外周を絶縁体で囲んだ木製の箱に電極板 5 枚を装着したものであって、電極板間に飯は米と水を入れ、パンは生地を入れて通電する。電圧は 115 V、電流は 100 A、周波数は 50 Hz といった定格のもの。」であった。木製の箱の 1 単位は、長さ 60 cm、横 30 cm、深さ 20 cm である<sup>14)</sup>。横 30 cm を、電極板 5 枚で仕切るので、電圧 115 V、極板間隔は 7.5 cm 程度になる。大妻女子大学の上杉宰世准教授によれば、軍隊式栄養パンが、イースト菌で発酵させた練り状のパン生地として知られる<sup>15)</sup>。第二次世界大戦になり、前述の「たからおはち」等の家庭用の電極式炊飯器が市販される。長谷川能三学芸員によれば「たからおはち」の取扱説明書には、製造元の富士計器株式会社の所在地が「東京都蒲田区」となっており、1943 年の施行から蒲田区の廃止が 1947 年であるので、その市販年を 1947 年頃と推定する（極板の実用新案 359047 は 1946 年出願）。

陸軍の炊事自動車の炊飯もパンも焼ける電極式調理の仕様は、1934 年 6 月 8 日出願の実用新案 235674 「電気炊飯装置」や同じく 1935 年 1 月 16 日出願の特許 118764 「電気煮炊装置」に見るよう、極板を立てて対向に設置したもので<sup>14)</sup>、その技術を家庭の炊飯用に転用したものが、お櫃の底に極板をはわせて設置した仕様だったことが、厚生式炊飯器の取扱説明書には書いてある。実際には、極板を底に配置し下方からジュール熱を加えるより、立てて対向させ飯水自体に両側から均一にジュール熱を加える方が、全体的に加熱が出来るので、うまい飯が炊ける<sup>4)</sup>。阿久津正蔵氏の遺稿<sup>11)</sup>には、「国民栄養協会の厚生式炊飯器は、私が個人として実用新案をとったものである。権利について、陸軍糧秣本廠について問い合わせたら、川島四郎博士が「阿久津君（在独駐在員）はどうせ帰ってこないだろうから、使ってもよろしい」という返事をもらったので売り出しました。申し訳ないことをしました。といって協会から、権利金を払ってくださいました。」とある。しかし、炊飯器単独について陸軍および阿久津正蔵氏は、特許を出願しておらず、日高周蔵氏の特許 116015 にも権利者として現れない。したがって厚生式炊飯器の元になる日高周蔵氏（発明者）の特許と、阿久津正蔵氏との権利関係は遺稿にはあるが確認できない。日高周蔵氏の特許に続き同年 1934 年に、陸軍が立てた対向極板の「電気炊飯装置」の実用新案 235674（阿久津正蔵氏発明）を出願する一方、追って同年、阿久津正蔵氏個人でも、日高周蔵タイプのお櫃の底の極板形状を畝状に変更した「電気炊飯箱」の実用新案 227334 を出願する。その後、陸軍は炊事自動車のために、日高周蔵氏の特許の翌年 1935 年に、用途を煮炊に広げた特許 118764 「電気煮炊装置」と同年、特許 116473 「炊事車」を出願する。続き同年、阿久津正蔵氏個人でも、被煮炊物中に電極を挿入する特許 126395 「電気煮炊方法」を出願する<sup>12)</sup>。

また、パン焼き器については、陸軍および阿久津正蔵氏から特許は出ていない。1943 年の阿久津正蔵著書「パン科学」の中で、1935 年に陸軍で発明した電気パン焼き装置を紹介している。電流を通しパンを焼き上げるという着想はすでに米国において創意されていたが、我々は、それを完全なる実用装置として、電源設備も含めた電気炊事自動車を完成させた、換言すれば、電気パン焼装置の創案と称する方が良いかもしれない、と述べている。この著書には、主にパンを焼く仕事について科学的に記してあり、国民パン食の普及に努めるためには意義深いと、陸軍糧秣本廠長が序を書いている。一方の電極式製パン

ン法も、戦後同時期、炊飯器と同様に家庭用に技術が転用される。さらに、その電極式パンが、業務用のパン粉になる。戦後 1949 年には、当初配給制であった小麦粉を電極式パン焼き機を用いてパンにして販売するも、殆ど売れず返品され、このパンを天日干しして販売したところ、売り先が確保できることから、それ以来パン粉を製造するメーカーも出現する。1951 年からは、麦類の統制が解除され、小麦粉が自由に売買でき家庭配給パンの必要がなくなり、パン粉販売へ転向するメーカーも出る。1958 年に入り、これまでのパン粉の少量生産から、名古屋市の株式会社ミカワ電機製作所等の指導により、製造設備の大型化、近代化が普及していく。現在も電気パン焼き機の製造販売を行っており、工場としては、初めて名古屋で電極式パンおよびパン粉が製造された。現在、パン粉は、パン生地の発酵までは共通の工程で、練り状のパン生地を焼く時に、所望するパン粉の性質によって、オーブンで実際に焼く焙焼式と通電による電極式に分かれ、できたパンを碎いて製造する。電極式パン粉は焼くわけではないので、白い、焙焼式に比べ少し硬めのパン粉になり、粒状は良く見た目も良い。白い焙焼式のパン粉は、焼き色を漂白した。電極式は、焙焼式に比べパン窯の余熱の必要もなく経済的なうえ、設備が小さくでき、新規参入し易かつたので戦後、関西で広まる。一方関東は焙焼式だった。1960 年からは、多量のパン粉の輸出が始まり、特に米国においては、多くの反響を呼び、その後同国に、電極式生産方式も輸出されることになる。1965 年には、ロサンゼルスに工場が設置され、電極式パン粉は米国において冷凍食品向けに広く採用される。日本では 1962 年から、時間が経過しても食感が落ちなかつたので、冷凍エビフライの衣に白い電極式パン粉が初めて香川県のメーカーで使われ評判になった。冷凍技術の進化により、スーパーなどで冷凍食品が増えるにつれ、関西の電極式が関東にも広がっていく。さらによくまた、電極式パン焼き器では、極板の素材が通電により電蝕し、生地に溶けだしてしまうので重要であり<sup>15)</sup>、食品衛生法の食品、添加物等の規格で規定されている。当初は、鉄と定められていたが、鉄は塩によりすぐ錆が発生し、パン粉の品質に問題が多かった。1967 年には、素材として違法な極板（亜鉛引き鉄板等）を使った業者が、県衛生局の立ち入り検査を受け、販売停止の厳しい取り締まりを受けた。そのため、全国パン粉工業協同組合連合会の陳情により、新極板として「鉄およびアルミニウム」が 1970 年に食品衛生法の一部改正のうえ、使用許可になった。この改正により、電極式が再び脚光を浴びた。それでも腐食するので、全国パン粉

工業協同組合連合会の技術委員だった清水康夫氏らの努力で、腐食が極めて少ない純チタンを極板として 1988 年に認めさせ、食品衛生法の一部改正のうえ、使用許可を得て現在に至る。その清水康夫氏が次のように書く<sup>10)</sup>。

- (1) パン粉は元来西洋でフランスパンなどを削って衣として鉄板の上のフライ料理の原料であり、日本で発展を遂げた食品素材であるが、日本式パン粉の生産技術は著しく優れており、とくに通電式製パン法は日本独特のものである。
- (2) 軍事用に研究された電気パンが戦後の食糧難のときに、家庭用のパン焼き器として利用され、これが更にパン粉用のパン焼成法に発展したのは興味深い。

このような、阿久津正蔵氏が発明した電極式パン焼き技術が、純チタンを使った新極板の開発努力と認可によって、現在も電極式パン粉として残っている事実が、知られていないことが残念でならない。EU でも認知されて、2012 年にオックスフォード英語辞典に「PANKO」が英単語として採用された。1990 年に、ミカワ電機製作所が英国に、電極式パン・パン粉機械を出品したことでも知名度を上げた。商売として初めてパン粉を売り出したのは、1907 年（明治 40 年）の東京京橋八丁堀で、丸山寅吉氏による。それまでは、西洋料理のコックが食パンからパン粉を作り、コロッケ、エビフライに使っていたが、企業化したいという発想だった。食パンを碎いて作るパン粉をソフトパン粉と言い、それ以外のパンから作るパン粉は普通パン粉と言う。この時、丸山寅吉氏は、焙焼式の食パン以外のパンを焼く方法を工夫して、ソフトパン粉に近づけるように製品化した。この方法が、現在も使用されているパン粉碎機の原型となる。その後、世紀を越え、パン粉は日本式洋食の食品素材として大発展した<sup>16)</sup>。

## 方法

### 電極式パン粉用パンの再現実験と手順

電極式パン粉用パンの再現実験を次のように行った。パン生地は、日清カメリヤ小麦粉（強力粉）150 g、SAF ドライイースト 4.5 g、塩 1.5 g、無塩バター 5.0 g、砂糖 2.5 g を水 100 g で練り<sup>10)</sup>、20 分間 60°C で 1 次発酵させる。その後、ガス抜きし 3 等分して丸めて成型し本学パン焼き器に入れ、26 分間 63°C で、ケースごと 2 次発酵させる。イースト発酵により膨らみ、パン生地がステンレス極板に接触する。

100 V 通電後、図 3 の上図に電力の時間変化を、下図に横軸を同じ時間経過とした温度の時間変化を示す。10 分経過後に電流は 0.3 A まで下がり、14 分

までは通電シフタをして蒸らした。実際に焼けたパンは、図1となり、熱効率は63%である。電流値の時間変化は、従来の学生実験の液状のパン生地（ふくらし粉、塩、砂糖）同様に小麦デンプンの糊化の進行に従い、二つのピークをもつことを確認した。糊化の開始温度で第1の電流ピーク、糊化の終了温度で最少となり、デンプン内の水分が放出され電流が上昇し、析出開始により第2の電流ピークが現れる。一方、家庭用電気オーブンによる焙焼式の再現実験の場合には、1次発酵後、ガス抜きして5等分し丸めて成型し市販のアルミケースに入れ、生地の2次発酵までは電極式と同じ過程で、その後、オーブンを10分間で190°Cまで予熱し、同190°Cで2次発酵させた生地を19分間焼く。両者を再現実験して、同じ配合のイースト発酵させた生地を電極式で焼いたパンと、電気オーブンで焼いたパンを比較すると図4となる。電極式は左で白いパンとなる。右は焼き色がついた焙焼式パンである。実例として現

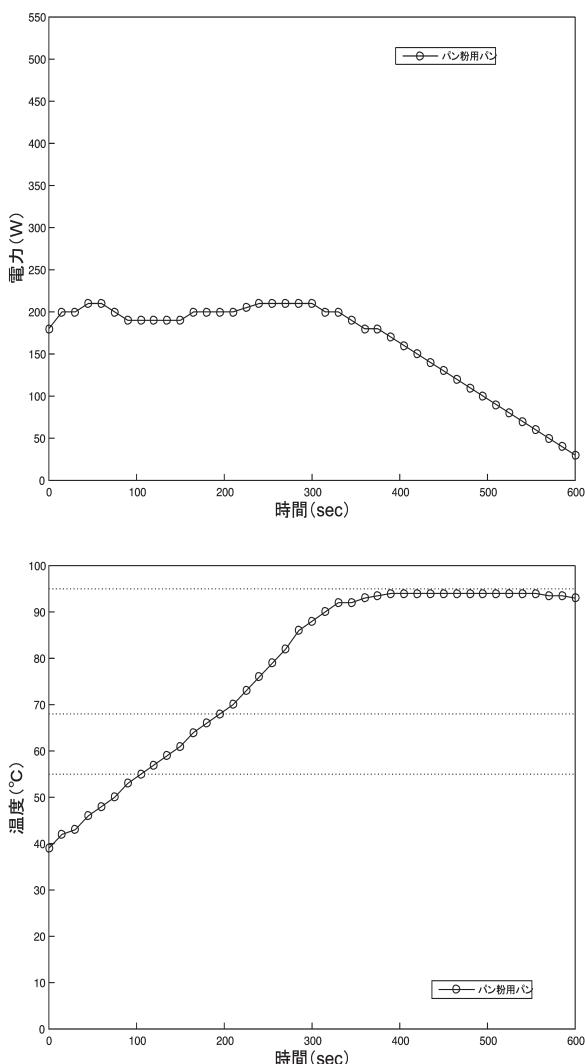


図3. (上)パン粉用パン(水100g, 塩1.5g, イースト4.5g, 砂糖2.5g, 無塩バター5g)の電力値. (下)水温の時間変化.

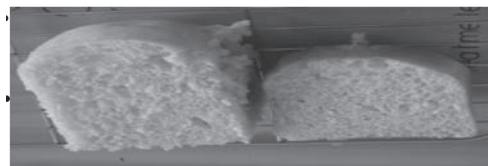


図4. 再現実験したイースト発酵のパン粉用パン（左：電極式：3等分、右：焙焼式：5等分）。



図5. (上) 工場業務用の電極式パン焼きケース（純チタン板）. (下) 焼いた電極式パン粉用パン。

在でも、工場において業務用または市販用の電極式パン粉用のパンは、図5上下図のように、50cm×50cm四方程度の純チタン極板を、木型ケースの代わりに、絶縁体としてのポリプロピレンケースに極板間隔を12cm程度に配置して、200V交流電源で焼かれている。このとき、ポリプロピレンは木のようにパンに混入する恐れはなくなったが、その反面、吸水性がないので工夫しているという。

### パン粉用模擬練りパンと液状特性の把握

ドライイーストにより発酵させた練り生地による電極式パン粉用のパンを、薄力粉に入る水の量を減らし練り状生地とし、ふくらし粉で発泡を代用することで模擬パンとして作りたいと考えた。練らないで蒸しパンになる液状の基本配合（小麦粉150g、塩0.4g、ふくらし粉6g、砂糖25g、水190g）から、水の量を減らし、捏ねて練り状にした生地の電流特性を調べる。薄力粉は、従来の日清フラワー粉より粉のキメが細かい日清ヴァイオレット粉を使い、水の量が減る分、小麦量は150gから225gに増やす。このヴァイオレット粉を捏ねて練り状にし、グルテンを出して模擬パンとする。まず従来の液状基本パンにおける電流特性の予備実験の結果、小麦粉のキメ細かさと特に捏ね量の増加は、電流増加を起こすことが分かった。熱効率は70%程度で変わらない。

この結果をふまえ、ふくらし粉を使った練り状の生地のパン粉用パンの模擬パンを作り、電流特性を見た。ヴァイオレット薄力粉225gに、ふくらし粉

9 g、塩 1.8 g、砂糖 4 g、ショートニング 7.5 g、水 150 g を入れ基本配合とし、捏ねて練り状にしてグルテンを出しパン生地を作る。塩を基本の 1.8 g (図 6 の青○印)とした場合と塩を 2.0 g (赤×印)とした場合、さらに塩の 1.8 g は変えず水の量を 170 g に増やした (緑＊印) 場合の電流特性の比較を図 6 に示す。3 者とも塩が多く、電流が大きいので 50 秒でデンプンの糊化開始の第 1 ピークとなる。直後に電流は減少し、最少 (糊化終了) になった後、第 2 ピークは現れず、電流は平坦となり、析出 (95 °C) により電流は下がっていく。電流增加の違いにより、下がる時刻は異なる。その時、塩を入れない、ふくらし粉のみの液状生地 (小麦粉 150 g、ふくらし粉 6 g、砂糖 25 g、水 190 g) の電流特性 (図 6 の黒・印の点線) が、電流の最少後は、ふくらし粉の発泡のために電流増加が阻害され、電流

が平坦になり第 2 ピークが現れなかったように<sup>4)</sup>、塩が入っていても水が少ない練り状生地においても、同様の発泡が効いて、第 2 ピークが現れないことが分かった。

ドライイーストで発酵させた練り生地の電極式パンの電流特性が、理屈通り二つのピークをもつ (図 3) のは、発泡の仕方が違うことの表れである。練らない液状生地の蒸しパンとは違い、グルテンがふくらし粉から発生する炭酸ガスを風船のように溜め込むために、パン生地が膨らんでもっちりとした食感になる。基本の塩 1.8 g、水 150 g の模擬練りパン (青○印) は、10 分で電流は 0.8 A まで下がり、13 分まで通電して蒸らす。このとき熱効率は 59 % となり、ドライイースト発酵の電極式パンと同様に少し熱効率は落ちる。

この基本配合から水だけを 20 g 増やし 170 g にすると (緑＊印)、塩分量は約 0.1% 薄くなるがイオンがより溶け出すので、第 1 ピークの電流値は 1.2 倍になり、熱効率は 62% に上がる。一方、基本配合から塩分量だけを 0.2 g (塩分量約 0.1%) 増やし 2.0 g にした時 (赤×印) の、第 1 ピーク電流の増加よりも、水分量を 20 g 増やした方が、練り生地 :  $\frac{\text{水分量}}{\text{小麦量}} = 0.67$ においては電流特性に敏感である。液状生地 :  $\frac{\text{水分量}}{\text{小麦量}} = 1.27$ においては、塩 0.2 g の微增量でも敏感であった<sup>4)</sup>。

## 結果と討論

### チタン極板による電流特性の比較検討

全国パン粉工業協同組合連合会が、1988 年に新極板と認めさせた純チタン板とステンレス板との比較を行った。純チタンには、純度によってチタン 1 種 (99.8 % 以上) とチタン 2 種 (99.4 % 以上) 等に分かれる。不純物としては、N, C, H, Fe, O 原子が入る。組合連合会の認可はチタン 1 種で受けている。本論文では、チタン 1 種と 2 種とステンレスの 3 種類で比較する。チタンは電気伝導率が低いので、ステンレス板厚 0.6 mm より薄くして、清水康夫氏の論文<sup>10)</sup>と同様に 0.5 mm とした。まず、従来のヴァイオレット薄力粉による液状生地の基本パンで、3 種類の極板による電流特性を比較した。図 7 によれば、ステンレス、チタン 1, 2 種とも水温上昇はほぼ同じで、二つの山のピーク位置 (時刻) も同じであり、極板による特性差は小さい。この時、チタン 1 種とステンレスの電流値はほぼ等しいが、特にチタン 2 種ではステンレスに比べ、第 1 ピークの電流値が 1.1 倍になる。熱効率はステンレスの 70 % と同様に変わらない。また、チタン 1, 2 種の極板に接するパンの側面において、極板が焼け変色した所や、パチパチと放電する

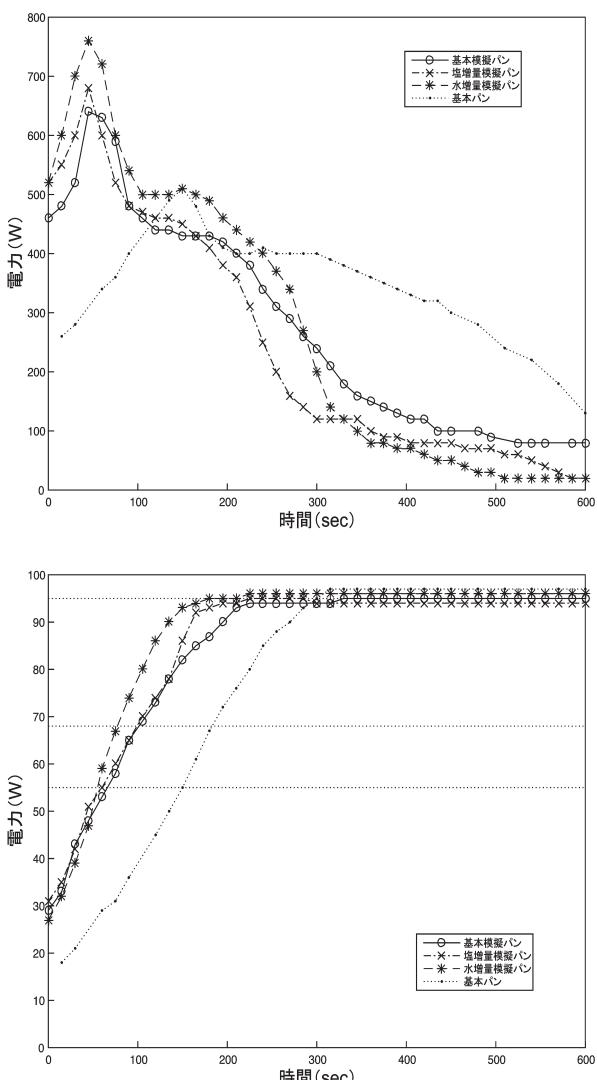


図 6. (上) ステンレス極板のパン粉用模擬練りパンの基本配合 (○印: 水 150 g) と塩増量 2.0 g (×印: 水 150 g) と水増量 (\*印: 水 170 g, 塩同じ) および塩なし液状パン (・印: 小麦粉 150 g, 水 190 g, ふくらし粉 6 g) の電力値. (下) 水温の時間変化.

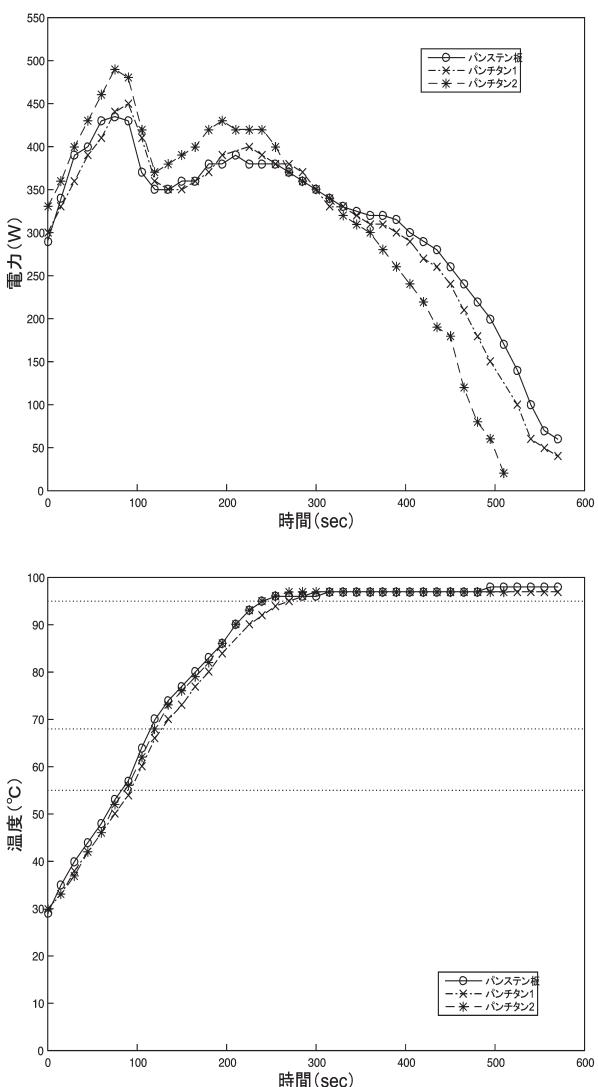


図7. (上) チタン1種(×印), 2種(\*印)とステンレス板(○印)による液状パン(ヴァイオレット小麦粉150g, 水190g, 塩0.4g, ふくらし粉6g, 砂糖25g)の電力値. (下) 水温の時間変化.

ときに黄色い斑点が現れた。神奈川大学理学部化学科の西本右子教授に、この部分の蛍光X線分析による成分分析をお願いした所、主にCa(カルシウム)で、黒点ではTi(チタン)も検出した。このCaは、アイコクベーキングパウダーの第1リン酸カルシウム:重量比10%から析出したもので、小麦粉のフラボノイドとアルカリの反応で黄色に変色したものと考えられ、金属による害はない。

次に、ドライイーストで発酵させた電極式パン粉用のパンで、3種類の極板による電流特性の比較を行った。実験の結果、ステンレス板とチタン1, 2種の極板の違いは、わずかだった。水温の上昇が析出温度まで、3種類で異なるが、おだやかに7分かけて進むので、その差が大きく出ない。結果的に、ドライイーストで発酵させた生地では、小麦量に対する

水分量(水分量/小麦量=0.67)は、模擬練りパンと同じであるが、デンプンの糊化の開始(第1ピーク)と終了(電流最少)および析出(第2ピーク)温度帯が、5°C程度低い方にずれていることが分かった。練つたうえに発酵させると、デンプンの性質が変わることの表れである。熱効率も3種類とも65%程度で変わらない。さらに、模擬練りパンのステンレス、チタン1, 2極板の電流特性の比較を行った。模擬練りパンでは、イースト発酵パン同様に、通電により起こる水温上昇の変化が3種類の極板で少し違うので、二つの電流ピーク位置がずれ、高電流のために第2ピークまでの時間も2分と短く、ステンレスとチタン極板で特性差が目立つ。模擬練りパンのチタン極板では特に水温上昇が早く、電流の第1ピーク(糊化開始温度)が早くきて、電流値もステンレスの1.1倍と高い。さらに、析出が始まる95°Cに、チタン極板は早く達するために、第2ピーク(上昇なく平坦な電流から落ちる所)も2分頃から早く始まり、ステンレス板よりも早くしかも急に電流低下が起こる。このためチタン極板では生焼けになり易く、第2ピークまでの時間を延ばすために、水を20g増やし模擬練りパンの場合だけ、チタン極板用の生地配合に変える必要がある。熱効率は、3種類の極板で60%程度と同じであるが、水を20g増やすと5%向上する。最後に、炊飯において、3種類の極板による電流の特性比較を行った結果、各極板による電流特性はほぼ変わらず、熱効率も70%程度で同じだった。

## まとめ

電極式パン粉用のイースト発酵パン(強力小麦粉)の再現実験を行い、このパンの電流特性も糊化の進行と析出に伴い、二つ山になることを確認した。糊化の開始と終了の温度帯は、5°C程度低い方にずれる。熱伝導率は基本液状パンの70%より5%程度下がる。また、発酵させる代わりに、ふくらし粉を使い、薄力小麦粉に対する水分割合を少なくし、練り状にして電極式パン粉用のパンを模擬的に再現した。熱伝導率は、発酵パンより5%程度下がる。模擬練りパンは、ふくらし粉の発泡の効果で、本来の電流増加が平坦になり、そのまま析出が起るので電流の第2ピークが現れず、一つ山になる。同じ発泡でも、発酵とふくらし粉では影響が違う。

電極式パン粉用パンのために国から認可を得た純チタン1, 2種極板(厚さ0.5mm)と従来のステンレス極板(厚さ0.6mm)の電流特性を比較した。その結果、特に模擬練りパンでは、ステンレス板に比べチタン板では極めて温度上昇が早く、そのため析

出による電流低下が早く起きる。熱効率は変わらない。炊飯を含む他の生地では極板による差は小さい。またチタン板において、パン生地のふくらし粉に由来するパン側面に付着する黄色い斑点は、蛍光X線分析によりカルシウムと分かり無害と確認した<sup>17)</sup>。

1946年4月に国民栄養協会が市販したお櫃の底に極板を配置した厚生式炊飯器は、実物の発見（三好日出一氏所蔵）により、1934年日高周蔵氏の特許11615「電気に依る飯炊法」を使って製造されたことを確認した。他の発見例はない。この取扱説明書には、立てて対向した極板による陸軍の電極式技術の家庭用への転用を考え、厚生式炊飯器の元特許を成立させたと書いてあるが、陸軍と日高周蔵氏の特許において、権利および開発過程について関係性は確認できない。従って、国民栄養協会が陸軍の特許使用権を譲り受けて厚生式炊飯器を作ったと述べるが、その事実関係性は不明である。厚生式炊飯器を前後して「たからおはち」等の類似品が市販された。一方、阿久津正蔵氏は陸軍の命令によって電極式炊飯技術の上に、1935年電極式パン焼き装置単体を発明し、それを組み込み1937年に炊飯もパン焼きもできる電源設備も含めた97式炊事自動車を完成し実用化した。この電極式パン焼き装置（法）は、日本独自技術で第二次大戦後、家庭で自作され、業務用の装置からは電極式パン粉が作られ、現在も市販され続けている。PANKOは英語になった。日高周蔵氏の素性も阿久津正蔵氏との関係も不明である。

## 謝辞

全国パン粉工業協同組合連合会の丸山憲夫専務理事、有限会社小谷食品の小谷一夫社長、クラウン・フーズ株式会社の楠本知己常務取締役、株式会社ミカワ電機製作所の近藤悟右社長、および有限会社酒井食品加工所の酒井均社長、株式会社トライパン粉の中神毅品質管理開発課主任には、貴重なご指導とご意見を頂いた。また、三重大学教育学部の松岡守教授には、貴重なご指導とご指摘を頂き、それがこのすべての報告のきっかけとなった<sup>17-19)</sup>。大阪市立科学館の長谷川能三学芸員には資料の確認をお願いした。神奈川大学理学部化学科の西本右子教授には付着物の分析をお願いした。昭和のくらし博物館の小泉和子館長、小林こずえ学芸員や渡辺由美子氏、太田洋子氏、尾村七恵氏には、2017年「パンと昭和」の企画展と、国指定重要文化財熊谷家住宅において実験の機会を頂いた。小泉和子館長には、模擬練りパ

ンから実際にパン粉の再現までして頂いた。和光大学の岩城正夫名誉教授には、実験を見て助言を頂いた上に発火実験をして頂いた<sup>20)</sup>。東京薬科大学の内田隆講師とは、実験を見てその後多くの重要な情報を教えて頂き議論した<sup>21)</sup>。ケース改良は株式会社三矢製作所の小原美千代氏にお願いした。三好日出一氏には Wikipedia の海瀬氏と同伴して、貴重なお話を伺った。ここに感謝いたします。

## 文献

- 1) 小泉和子 (2017) パンと昭和. 河出書房新社, 東京.
- 2) 渡辺由美子 (2016) 代用食の自家製パン. 昭和のくらし博物館企画展「パンと昭和」展関連トーク「戦中戦後のパンのおはなし」資料.
- 3) 長谷川能三 (2013) 電極式炊飯器とその再現. 大阪市立科学館研究報告 23: 25-30.
- 4) 青木 孝 (2018) 電極式パン焼き器を使った炊飯実験の特性理解. 神奈川大学理学誌 29: 5-12.
- 5) 国民栄養協会事業部 (1946) 製粉機と電気炊飯器. 食生活 (10): 40-43.
- 6) 関 重廣 (1947) 家庭の電化. 彰考書院, 東京.
- 7) 橋本小百合, 庵 雅美 (1947) 発明に見る日本の生活文化史. 生活道具シリーズ炊飯器2. ネオテクノロジー, 東京.
- 8) 小林喜通 (1946) 家庭用電気パン焼き器の設計. 少年工作 (創刊号) 1: 14-16.
- 9) 沼畠金四郎 (1947) 電極式製パンに就て. 家庭科学 8: 36-40.
- 10) 清水康夫 (1987) 通電式製パン法とチタン通電極板について (チタンの科学と生物学的安全性について). パン品質向上に関する資料7. 全国パン粉工業協同組合連合会編・出版, 東京. pp.2-18.
- 11) 阿久津正蔵 (1988) 電極式電流炊飯とパン焼きの発明 (遺稿) 食品と科学 1988(5): 112-113.
- 12) 阿久津正蔵 (1943) パン科学. 生活社, 東京.
- 13) 清水康夫 (1988) 通電式製パン法とチタン通電極板について. 食品と科学 1988(5): 114-117.
- 14) 川島四郎 (1974) 炊飯の科学. 光生館, 東京.
- 15) 森山繁隆, 熊沢 恒, 石原利克 (1960) 電極式パン焼き器によるパン中の金属について. 衛生化学論文抄録 8: 56-57.
- 16) 全国パン粉工業協同組合連合会編 (1977) パン粉百年史.
- 17) 松岡 守, 青木 孝 (2017) 「電気パン」実験における食品としての安全性の再評価. 日本産業技術教育学会東海支部第35回研究発表会論文.
- 18) 松岡 守, 青木 孝 (2019) 「電気パン」の由来調査と食品としての安全性の再評価. 日本産業技術教育学会誌. 投稿中.
- 19) 松岡 守, 岩瀬仁志, 手嶋由和他 (2001) 「電気パン」実験に対する電気的特性の実験的評価と食品としての安全性. 日本産業技術教育学会誌 43: 161-168.
- 20) 岩城正夫 (2005) セルフメイドの世界. 群羊社, 東京.
- 21) 内田 隆 (2018) 「電気パン」実験の教材的意義の考察. 東京薬科大学学術リポジトリ 2018: 41-48.

■原 著■

## 公立図書館蔵書貸出データの統計的分析 —平塚市図書館を例として—

加藤憲一<sup>1,2</sup>

A Statistical Analysis of Public Library Book Lending Data  
— The Case of the Hiratsuka City Library —

Ken'ichi Katou<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: kkatou@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** This paper discusses the statistical characteristics of the numbers of library book loans using data from a public library. It aims to clarify the relationship between the moment of distribution of the numbers of book loans and tail probability from statistical perspectives, focusing on the number of years since each book was published.

**Keywords:** operations research, statistical analysis, library loans and ageing

### 序論

平塚市の市立図書館（以下、平塚市図書館）の蔵書貸出データを用いて、蔵書の新しさと貸出回数に関する統計的性質について考察する。蔵書の出版年からの経過年数を蔵書の新しさを表す指標とし、これを経年数と呼ぶ。平塚市図書館の一般図書を対象とし、2012年から2016年までの5年間の年間貸出回数分布と経年数の関係を、モーメントおよび裾確率の観点から調査する。あわせて、連続する2年間の貸出回数を比較することで、貸出回数が持つ不規則性の要因について議論する。また、貸出回数分布の期待値を経年数のべき関数で表すモデルを提案し、回帰分析を通して図書分類ごとの特徴を抽出する。

### 方法

#### 蔵書貸出データ

はじめに平塚市図書館の概要と、本論文で用いた蔵書貸出データについて説明する。平塚市図書館は中央館と移動図書館、北館、西館、および南館から構成される。2016年度図書館年報<sup>1)</sup>による所蔵冊数は一般図書、児童図書、参考図書の合計808,396冊であり、個人登録者数は101,933人に対して年間の個人貸出冊数はのべ1,327,075冊（視聴覚資料を除く）の規模である。本論文で分析の対象とする2011年度以降2016年度以前の利用規則では個人貸出の貸

出期間は最大2週間であり、各館ごとに上限10点の貸出が可能であった。なお、2017年度に個人貸出の同時貸出可能点数は全館あわせて上限15点に変更されている。蔵書貸出データは貸出データと蔵書リストの2種類のデータから構成される。貸出データは蔵書についてID、タイトル、著者、出版社、出版年、価格、ページ数、大きさ、請求番号等に加え、館外への年間貸出回数が1月から12月までを1年間とする暦年単位で、2012年から2016年までの5年分が記録されている。以後この5年間を集計期間と呼ぶ。平塚市図書館では同じ図書、すなわちタイトル、著者、出版社、出版年等が同一の蔵書を複数館にまたがって、あるいは一館で複数冊所蔵することもある。このとき貸出データには同じ図書の貸出回数の合計値のみが記録される。以下では貸出データに記録された同じ図書をひとまとめとした単位を資料と呼び図書と区別する。分析は全て資料単位で行う。蔵書リストは2017年1月時点の蔵書を図書単位で記録したデータである。大きく一般図書と児童図書に分類され、日本十進分類法（以下、NDC）による分類番号、図書ID、タイトル、著者、出版社、出版年等が記録されている。

貸出データは集計期間の5年間において貸出回数を1回以上持つ資料のみが記録され、貸出が記録さ

れなかった資料の情報を欠いている。貸出の有無によるない総資料点数を推定するために、蔵書リストを資料単位に再構成し、2017年1月時点での全資料のリストを作成した。このリストを用いて各年で貸出が記録されていない資料点数を推定した。ただし蔵書リストは2017年1月以前の購入や廃棄の情報を欠いている。そこで出版年が貸出の集計年以前の資料についてはその年において所蔵されていると仮定した。例えば、蔵書リストに記録された2015年出版の資料が貸出データに存在しない場合には、2014年以前は所蔵していないものとみなし、2015年以後の貸出は0回とする。出版年が2017年の資料は分析の対象から除外する。また蔵書リストに記録されていないが貸出データに記録されている資料についても、2017年1月より前の時点で廃棄がなされたものとみなして除外した。

本論文では対象を一般図書に限定する。児童図書、視聴覚資料、雑誌や他の資料は除外した。以上の前処理を行った結果、総資料点数383,576点に対する集計期間総計で4,067,743回の貸出を分析の対象とする。

## 結果と討論

### 回転率と貸出率

はじめに貸出の状況をNDCの類別に貸出率と回転率でみる。ここである資料群に対し、集計期間の貸出回数を資料点数で除算したものを回転率と呼ぶ。これは資料1点の貸出回数の期待値に相当する。また集計期間中に1回以上貸出が記録された資料の割合を貸出率と呼ぶ。NDC第*i*類(*i*=0,1,⋯,9)に分類される資料群をNDC*i*と表記する。NDCの類分けはNDC0(総記)、NDC1(哲学)、NDC2(歴史)、NDC3(社会科学)、NDC4(自然科学)、NDC5(技術・工学)、NDC6(産業)、NDC7(芸術・美術)、NDC8(言語)、NDC9(文学)となる。類によらず全ての資料をまとめた資料群を全資料と表記する。回転率と貸出率を表1に示す。先に述べたとおり資料点数は蔵書リストからの推定値であるため、これを分母とする回転率、貸出率も誤差があることに注意する。表中の貸出点数\*(C)は5年間に1回以上貸出が記録された資料点数を意味する。表1に見る平塚市図書館の資料点数の類別構成比は、池内ら<sup>2</sup>の集計による全国公立図書館の類別蔵書構成比の平均値と大きな違いはなく、公立図書館として標準的な蔵書構成比を持つものと考えられる。回転率や貸出率に顕著な特徴を持つ類がある。NDC5、NDC9の回転率は他の類に比べ顕著に大きい。またNDC0の回転率、貸出率は小さい。NDC9の資料は全資料

表1. 回転率と貸出率(2012-2016年)

資料群	資料点数(A)	貸出回数(B)	貸出点数*(C)	回転率(B/C)	貸出率(C/A)
NDC 0	11,702	28,223	4,882	2.412	0.417
NDC 1	18,316	174,855	12,314	9.547	0.672
NDC 2	41,359	350,948	24,971	8.485	0.604
NDC 3	56,882	350,668	31,260	6.165	0.550
NDC 4	30,121	254,594	19,503	8.452	0.647
NDC 5	31,814	551,917	22,817	17.348	0.717
NDC 6	15,733	127,248	9,716	8.088	0.618
NDC 7	40,097	340,729	26,569	8.498	0.663
NDC 8	7,582	63,878	5,067	8.425	0.668
NDC 9	129,970	1,824,683	88,269	14.039	0.679
全資料	383,576	4,067,743	245,368	10.605	0.640

に対し点数で3割強、貸出回数で4割強を占めるため、全資料の指標に与える影響が大きい類である。

### 暦年およびNDC類と貸出回数分布の関係

予備考察として暦年での貸出回数分布の相違の有無について検討する。単年での貸出回数の総数は2012年の約85万回から2016年の約78万回と減少している。図1に全資料の暦年ごとの貸出回数の度数分布をプロットしたグラフを示す。横軸に貸出回数、縦軸に度数(資料点数)の対数をとった。貸出回数がおよそ30回以上の範囲で度数が年を追うごとにやや減少する傾向もあるが、分布の形状は暦年による顕著な違いはないものと判断した。以下では1年を単位とする貸出回数を分析するが、特に断らない限り暦年別には議論せず5年分をまとめる。すなわち、1点の資料で最大5個の年間貸出回数の標本値を同一の資料群に属する5個の貸出回数の標本値として扱う。図1から、貸出回数がおよそ10回以上では、回数の増加に対して度数は幾何級数的に減少することがわかる。この性質は経年数を導入した上であらためて分析する。資料単位の集計であるため、年間の貸出回数が50回を超える資料も無視できない割合で存在することに注意する。

類別に貸出回数分布を観察する。各類の資料点数にばらつきがあるため、類ごとに度数を資料点数で除算した確率分布で比較する。確率分布をプロット

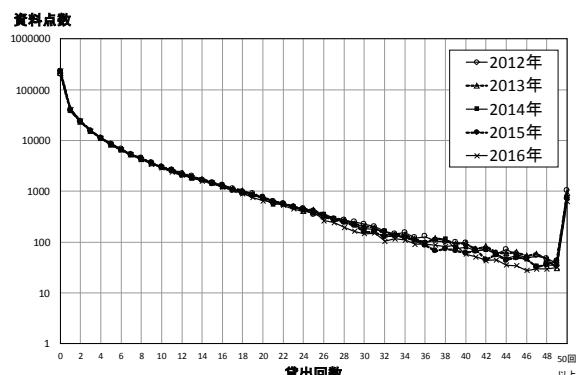


図1. 貸出回数分布の暦年別比較(全資料).

したグラフを図2に示す。図1で観察された全資料の度数分布の性質は、各類でも同様に観察できる。一方、類により分布に差異があることも読みとれる。例えば、グラフの傾き、すなわち幾何級数的な減少の早さはNDC5、NDC9では他の類に比べやや緩やかな傾向が観察される。ここでは類により異なることのみ指摘し、踏み込んだ検討はしない。

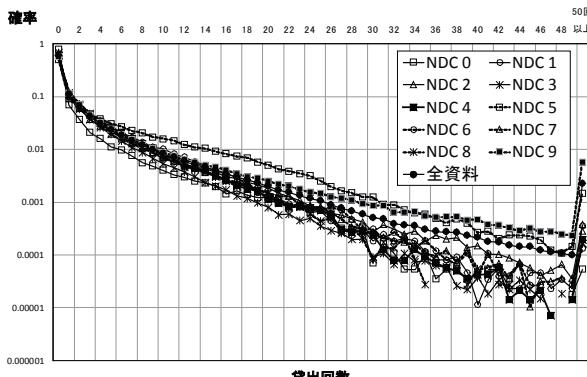


図2. 貸出回数分布のNDC類別比較。

### 蔵書の新しさと貸出回数の関係

蔵書の新しさと貸出回数の関係について考える。一般に図書館の蔵書は、時間経過につれて貸出の頻度が減少していくオブソレッセンスと呼ばれる性質を持つことが既存の研究で指摘されている。例えば星野ら<sup>3)</sup>は、東京大学総合図書館の蔵書を対象として出版年別に資料群を分割したとき、出版年別の蔵書回転率は出版年を遡るにつれ減少する性質を持つことを指摘している。松井ら<sup>4)</sup>は、奈良大学図書館の蔵書を対象に同様の調査分析を行っている。これらの研究では、オブソレッセンスを個別の資料の経年変化ではなく、ある同一期間において出版年で区分された資料群間に観察される貸出回数の統計的な性質ととらえている。また、オブソレッセンスを前提として蔵書の貸出の数理モデルの提案も行われている。Burrell<sup>5)</sup>は、個々の蔵書における貸出の生起を、所蔵期間の指數関数で減少する強度関数を持つ非定常ポアソン過程とするモデルを提案している。また、岸田<sup>6,7)</sup>は、Burrellのモデルを踏まえ、強度関数の時間的な振る舞いに関して微分方程式を用いた演繹的な説明を試みている。これらの研究ではオブソレッセンスを、蔵書の貸出回数にランダムネスを持たせつつ、時間経過とともに期待値の意味で減少していく性質としてとらえている。

本論文では資料の新しさを表す指標として出版年からの経過年数を用いる。ある資料に対し集計年と出版年の差を経年数と呼ぶ。例えば2010年に出版された資料の2016年における経年数は6となる。

類別および全資料の資料群に対して、2016年の資料経年数の累積分布をプロットしたグラフを図3に示す。図3から、経年数の分布は類により異なることがわかる。NDC5以外の類では、50%の資料は経年数12年以下から18年以下となる、また20%以上の資料が経年数23年以上であり経年数の大きい資料の存在も無視できない。NDC0、NDC2は他の類に比べ経年数の大きい資料の割合がやや大きい。NDC5は50%以上の資料の経年数が10年以下であり、比較的新しい資料で構成されている。

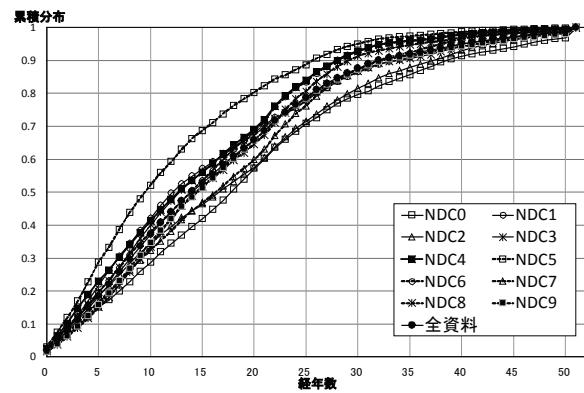


図3. 資料経年数の累積分布(2016年)。

経年数に応じた貸出回数を把握するため、以下に述べる方法で経年数別の貸出回数分布を集計する。分析の対象となる資料群を $I$ とする。 $I$ に含まれる1点の資料 $i \in I$ の $t$ (=2012, ..., 2016)年における貸出回数を $n_{i,t}$ とする。この資料の出版年を $b_i$ とするとき、経年数と貸出回数を組とする標本値 $(t - b_i, n_{i,t})$ を得る。これを資料群でまとめることで経年数が付与された貸出回数の標本値の集合

$N = \{(t - b_i, n_{i,t}); t - b_i \geq 0, t = 2012, \dots, 2016, i \in I\}$ を得る。これを経年数で分割して経年数が $y$ 年である資料の貸出回数の標本値の集合

$$N_y = \{(t, n) \in N; t = y\}, y = 0, 1, \dots$$

を得る。 $N_y$ の貸出回数の確率分布を

$$p_y(k) = \#\{(y, n) \in N_y; n = k\} / \#N_y, k = 0, 1, \dots$$

で定義する。ここで $\#S$ は集合 $S$ の要素の個数を表す。これを資料群 $I$ に対する経年数 $y$ 年の貸出回数分布と呼ぶ。

経年数別の貸出回数分布を集計し、経年数との関係を調査する。ここでは期待値(平均値)、変動係数と分布の裾に注目する。類別と全資料のあわせて11の資料群に対し、経年数 $y = 1, 5, 10, 20$ 年に対する貸出回数分布の期待値、変動係数および貸出回数が1, 5, 10回以上である標本数を表2に示す。なお資料1点につき最大で5年分の貸出回数が標本値として集計されるため、経年数 $y$ 年の標本数 $\#N_y$ の $y$ に関する

表 2. 経年数別貸出回数分布のモーメント等

資料群	経年数	標本数	期待値	変動係数	1回	5回	10回
NDC 0	1	1,486	7.320	1.058	1,265	769	443
	5	1,535	3.033	1.591	894	341	148
	10	1,509	0.838	3.356	381	63	25
	20	1,604	0.102	7.567	87	5	1
NDC 1	1	3,598	8.347	0.905	3,338	2,292	1,271
	5	3,866	3.803	1.217	2,980	1,181	369
	10	3,020	1.053	2.551	992	173	51
	20	1,807	0.493	3.401	389	35	8
NDC 2	1	6,703	10.083	0.995	6,064	4,197	2,759
	5	6,560	3.305	1.360	4,504	1,653	590
	10	5,342	1.529	1.954	2,302	552	141
	20	5,750	0.393	3.508	1,106	62	12
NDC 3	1	9,983	6.548	1.066	8,702	4,992	2,478
	5	11,474	2.461	1.502	7,282	1,994	544
	10	9,974	0.667	2.908	2,384	363	85
	20	5,839	0.163	4.860	526	22	6
NDC 4	1	6,219	7.467	0.959	5,697	3,610	1,796
	5	5,664	3.292	1.303	4,088	1,459	423
	10	4,776	1.175	2.208	1,730	350	81
	20	4,593	0.353	3.894	751	53	17
NDC 5	1	8,205	11.769	0.830	7,760	6,084	4,282
	5	8,011	6.099	1.275	6,306	3,470	1,810
	10	5,803	2.132	1.921	2,673	907	318
	20	2,810	0.250	5.244	292	26	8
NDC 6	1	2,734	6.991	1.026	2,448	1,456	712
	5	2,930	3.280	1.509	1,951	683	263
	10	2,539	1.263	2.815	852	184	69
	20	2,476	0.387	3.928	412	43	13
NDC 7	1	5,929	7.565	1.027	4,260	3,342	1,728
	5	6,241	3.582	1.435	4,420	1,580	628
	10	5,983	1.761	2.212	2,664	684	236
	20	6,660	0.641	3.003	1,734	166	56
NDC 8	1	1,021	6.814	1.044	889	525	263
	5	1,365	3.508	1.286	975	372	136
	10	1,452	1.753	1.894	632	190	58
	20	1,246	0.554	2.169	346	23	2
NDC 9	1	16,197	14.809	1.418	14,828	10,530	7,150
	5	19,771	6.494	1.729	15,342	7,680	4,064
	10	20,744	3.259	1.972	12,201	4,326	1,892
	20	18,761	0.651	3.504	4,461	600	155
全資料	1	62,075	10.111	1.311	56,363	37,797	22,882
	5	67,417	4.478	1.706	48,742	20,413	8,975
	10	61,142	1.981	2.332	26,811	7,792	2,956
	20	51,546	0.480	3.740	10,104	1,035	278

る合計は資料群の資料点数より多いことに注意する。横軸に経年数を 0 年から 30 年までとり、縦軸に期待値をプロットしたグラフを図 4 に、変動係数をプロットしたグラフを図 5 に示す。また、経年数  $y$  年に対し、1 回以上貸出された標本値の割合  $\sum_{k \geq 1} p_y(k)$  を 1 回以上の裾確率と呼ぶ。横軸に経年数、縦軸に 1 回以上の裾確率をプロットしたグラフを図 6 に示す。5 回以上、10 回以上の貸出に対しても同様に裾確率を計算した。プロットしたグラフをそれぞれ図 7、図 8 に示す。

経年数別の貸出回数分布は、資料群の標本をさらに経年数別に細分するため、標本数の減少に注意を払う必要がある。図 5 から、変動係数のグラフは、経年数が大きい範囲で不安定な振る舞いをすることがわかる。類によるが、おおよそ経年数が 20 年を超える範囲では、経年数に対する関数的な性質は不明

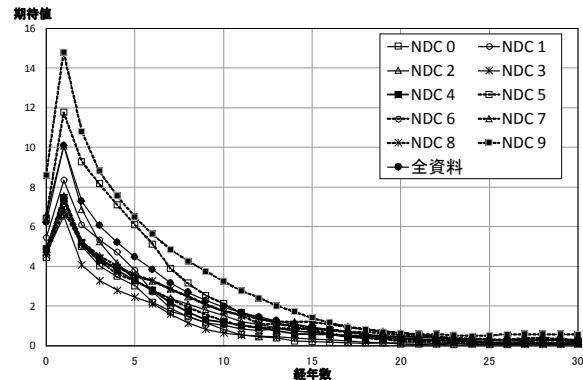


図 4. 経年数に対する期待値.

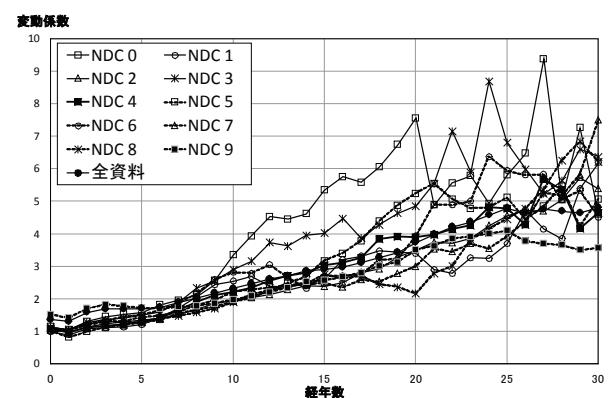


図 5. 経年数に対する変動係数.

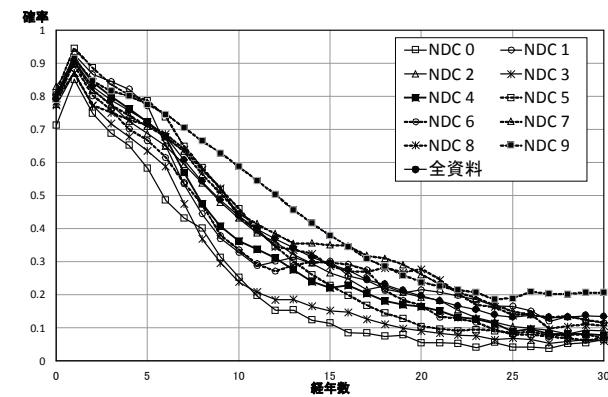


図 6. 経年数に対する 1 回以上の裾確率.

瞭となる。また経年数が 0 年の資料は提供期間が資料個々で異なると考えられるため、期待値等を議論することは意味をなさないだろう。表 2 に示した標本数も考慮し、経年数 1 年以上 20 年程度の範囲ではモーメント等の振る舞いを統計的な性質としてとらえることができると判断した。

図 4 より、貸出回数分布の期待値は、経年数に対し単調に減少する性質が確認できる。すなわち、期待値の意味でオブソレッセンスが確認できる。また図 5 から、変動係数は、経年数に対して線形的に増加する性質が確認できる。図 6 にみる 1 回以上の裾

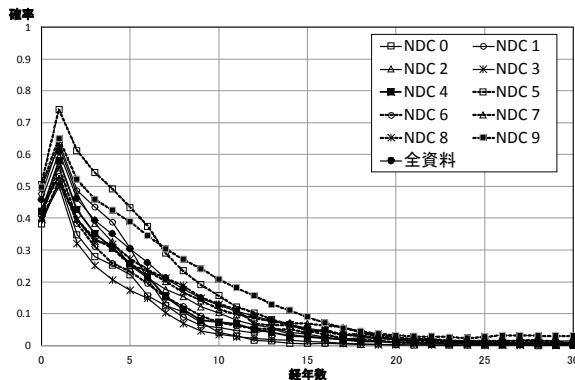


図7. 経年数に対する5回以上の裾確率.

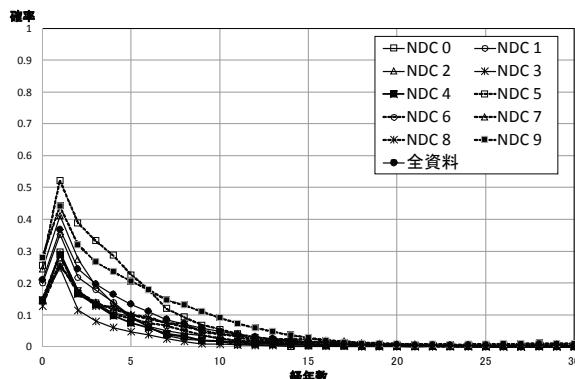


図8. 経年数に対する10回以上の裾確率.

確率は、経年数が増加するにつれ裾確率は減少しつつ正の値に漸近する。経年数20年の資料においても、NDC 0以外の類では10%から30%弱の割合で年間に1回以上の貸出を持つ。図7、図8に見る5回以上、10回以上の裾確率は、NDC 5、NDC 9では他の類に比べ大きい値を持つ。

経年数別貸出回数分布の形状を観察する。横軸に貸出回数を0回以上50回以下とし、NDC 9の経年数 $y=1, 5, 10, 20$ 年および経年数によらない全体の貸出回数分布を対数軸でプロットしたグラフを図9に示す。全資料に対する同様のグラフを図10に示す。

NDC 9、全資料に共通して経年数によらず貸出回数分布は貸出回数に対して単調に減少することが確認できる。ここで分布の減少率 $p_y(k+1)/p_y(k)$ に注目する。減少率は経年数 $y$ が小さいときは貸出回数 $k$ とは関係なくほぼ一定の値をとる。一方、経年数が大きいとき、減少率は貸出回数の増加につれて緩やかに増加し、一定の値に収束する性質が観察できる。従って、貸出回数分布は、貸出回数を増加させるとべき関数に漸近する。ただし、貸出回数が小さい範囲での減少率の変化も顕著な性質であり、貸出回数分布は一定の減少率を持つ確率分布、幾何分布に適合するとは言えないだろう。このことを簡単に検証

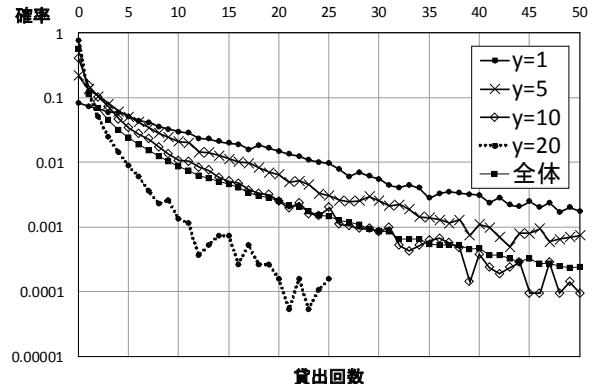


図9. 経年数別の貸出回数分布 (NDC 9).

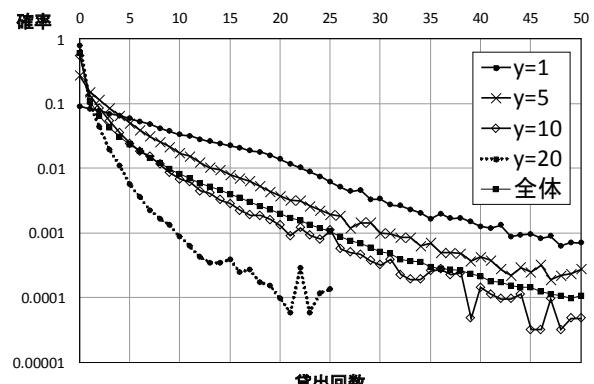


図10. 経年数別の貸出回数分布 (全資料).

する。定数 $p \in (0, 1)$ に対し確率変数 $X$ が確率分布 $p(k) = (1-p)p^k, K=0, 1, \dots$ を持つとき、パラメータ $p$ の幾何分布に従うと呼ぶ。このとき期待値は $E[X] = p/(1-p)$  変動係数は $CV[X] = 1/\sqrt{p}$ となるから、期待値と変動係数の間には等式 $CV[X] = \sqrt{1+1/E[X]}$ が成り立つ。この式をモデル式と呼ぶ。NDC 9および全資料に対して、経年数が1年以上20年以下の範囲で貸出回数分布の期待値と変動係数をそれぞれ横軸と縦軸にプロットしたグラフを図11に示す。NDC 9、全資料とも、貸出回数分布の期待値に対する変動係数の値は、幾何分布のモ

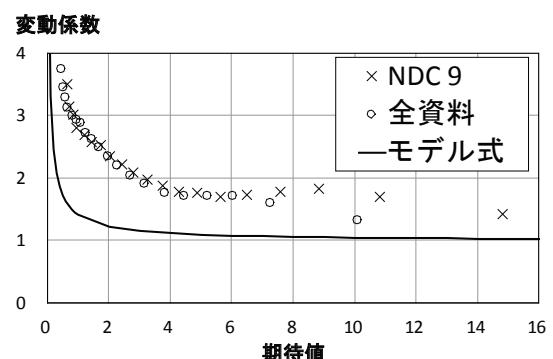


図11. 期待値と変動係数の散布図.

表3. 2015年の貸出回数に対する2016年の貸出回数分布（NDC 9）

2015年の 貸出回数	2016年の貸出回数											資料点数
	0	1	2	3	4-5	6-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51回以上	
0	82.1%	9.0%	3.7%	1.6%	1.4%	1.2%	0.8%	0.2%	0.1%	0.0%	0.1%	76,825
1	52.8%	21.5%	11.8%	5.8%	5.2%	2.2%	0.5%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	14,655
2	36.3%	22.5%	15.3%	9.7%	9.7%	5.5%	0.7%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	8,792
3	24.2%	20.9%	16.9%	12.0%	14.5%	9.9%	1.2%	0.3%	0.1%	0.0%	0.0%	5,587
4-5	14.5%	15.1%	15.5%	13.9%	20.0%	17.0%	3.4%	0.5%	0.1%	0.0%	0.1%	7,007
6-10	5.1%	7.1%	8.8%	10.3%	20.9%	34.0%	12.4%	1.0%	0.1%	0.1%	0.2%	8,106
11-20	1.0%	1.2%	2.3%	2.5%	8.1%	33.0%	43.6%	6.3%	1.2%	0.3%	0.4%	5,563
21-30	0.3%	0.4%	0.6%	0.3%	1.9%	8.8%	46.0%	33.4%	6.3%	0.8%	1.1%	1,797
31-40	0%	0%	0%	0%	0.6%	2.5%	21.4%	42.7%	25.0%	3.9%	3.9%	668
41-50	0%	0%	0%	0%	0.3%	0.3%	8.5%	25.7%	36.5%	17.5%	11.1%	342
51回以上	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1.1%	7.2%	17.8%	19.4%	54.5%	628
資料点数	76,810	14,906	8,792	5,513	7,084	8,239	5,455	1,692	663	280	536	129,970

デル式による値に比べて常に大きい。この観察からも、貸出回数分布は幾何分布とは異なる性質を持つと考えられる。

### 個別の資料における貸出回数の不規則性

ここまで資料群を経年数で細分したときの貸出回数の統計的な性質について分析してきた。図書館の運営にあたっては、経年数で区分された資料群の統計的な性質を把握するだけでは必ずしも有益とは言えない。貸出は、当然のことながら、個々の資料が持つ情報、価値に応じて生じるものである。ここでは、同一資料の連続する2年間での貸出回数を観察する。NDC 9 の 2015 年と 2016 年の貸出回数に注目する。この分析に限り、出版年が 2016 年の資料は 2015 年の貸出回数を 0 回として集計する。対象となる資料 129,970 点の 2 年間の貸出回数の標本相関係数は 0.823 とかなり大きい。この性質をより詳細にみるために、各年の貸出回数を 11 個の区分

{0,1,2,3,4-5,6-10,11-20,21-30,31-40,41-50,51-} に分割してクロス集計を行った。2015 年の各区分に対する 2016 年の貸出回数の分布を表 3 に示す。各行の分布は表の対角成分より左側に偏る性質を持つ。すなわち 2015 年に比べ 2016 年の貸出回数は減少する傾向が読みとれる。これは経年数別貸出回数分布で観察された資料群単位のオブソレッセンスと異なる、個別資料単位でのオブソレッセンスの存在を示唆すると考えられる。一方で、前年より貸出回数が多くなる資料もある程度存在する。例えば、2015 年の貸出が 1 回以上 5 回以下の資料は 36,041 点あるが、その中で 2016 年に 11 回以上貸出が記録された資料は 572 点存在する。このような連続する年における貸出回数の不規則な振る舞いは、蔵書の補充や廃棄の計画策定、あるいは開架・書庫への配置の決

定等、図書館の諸々の実務において扱いにくい性質となるだろう。資料個別の貸出の不規則性が図書館運営へ与える影響の評価は、オペレーションズ・リサーチの観点から興味深い問題である。この問題に取り組むためには、貸出事象の確率モデルによる記述等のさらなる検討が必要である。

貸出回数が大きい資料に注目し、個別の貸出回数の振る舞いを調査する。NDC 9 の単年貸出回数上位 10 点の資料を抽出し、2012 年から 2016 年の 5 年間の貸出回数の推移を表 4 に示す。あわせて、経年数が大きい資料に限定して同様の抽出を行う。ここでは出版年が 1996 年以前の資料から上位 10 点を抽出した結果を表 5 に示す。表中の網掛けは該当する資料が最大の貸出回数を記録した年を示している。NDC 9 では 2016 年における経年数が 20 年以上（出版年が 1996 年以前）の資料で 2012 年から 2016 年までの 5 年間で単年での貸出回数が 10 回以上ある資料は 964 点存在する。そのなかで経年数が 30 年以上の資料は 343 点ある。表 4、表 5 に抽出された資料は概ね 5 年間にわたり一定程度以上の貸出が生じている。しかし貸出回数の年ごとのばらつきは大きい。例えば、資料 T20 は最大値を記録した翌年の 2015 年には貸出回数が極端に減少する。また、資料 T15 の 2016 年では前年に比べ 2 倍以上に増加するなど、前年の貸出回数からは予期し難い振る舞いも確認できる。表 4 で抽出された経年数が小さい資料では経年による貸出回数の減少が明瞭に観察できるが、必ずしも最大値を経年数が最も小さい 2012 年ではとらない。これらを総合すると、資料個別の貸出回数の時系列的な振る舞いは、オブソレッセンスだけでは説明できない。一方で、単純なランダムネスだけで解釈することも難しい。急激な貸出の変動には外的要因が疑われるが、個別に検証が必要であ

表4. 貸出回数上位10点(NDC 9)

		貸出回数						
タイトル	著者	出版年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	5年間合計
T1	A1	2011	239	313	186	111	87	936
T2	A1	2008	308	240	145	97	88	878
T3	A2	2009	289	238	174	95	93	889
T4	A2	2010	280	216	135	68	48	747
T5	A3	2010	186	279	166	108	64	803
T6	A1	2011	226	264	273	257	174	1194
T7	A1	2010	270	263	224	153	116	1026
T8	A2	2009	263	217	130	85	70	765
T9	A4	2011	167	228	229	251	167	1042
T10	A1	2012	103	185	217	244	187	936

表5. 貸出回数上位10点(NDC 9, 1996年以前出版)

		貸出回数						
タイトル	著者	出版年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	5年間合計
T11	A1	1990	84	78	78	93	89	422
T12	A1	1993	51	87	60	80	67	345
T13	A1	1994	73	75	69	65	56	338
T14	A1	1993	53	56	50	73	54	286
T15	A5	1986	17	26	20	26	67	156
T16	A1	1995	23	20	25	40	66	174
T17	A1	1996	62	63	48	36	37	246
T18	A1	1989	48	44	62	53	51	258
T19	A1	1996	61	47	33	17	10	168
T20	A6	1986	51	57	61	7	3	179

る。また貸出の生起には類の持つ特性も考慮しなければならない。表4、表5で抽出された20点の資料のうち16点は2名の著者によるものであり、著者に紐付けされた資料の貸出が想定される。これはNDC 9に顕著な現象であり、著者の影響は他の類では明瞭には観察されない。一例として、NDC 9に次いで資料点数の多いNDC 3に対し、単年貸出回数上位の資料を同様に抽出した結果を表6、表7に示す。重複して抽出された資料T' 5を含め、20点の資料の著者は全て異なる。

資料個々の貸出回数は、オブソレッセンスだけではなく、ランダムネスや外的な要因からも大きな影響を受けると考えられる。このことはオブソレッセンスを個別の資料の運用に直接活用するには注意が必要なことを意味する。例えば前年の利用実績に基づいて資料の廃棄や追加補充を行うことは必ずしも有効とは言えない可能性がある。詳細な議論のために適切な数理モデルを構築して検討する必要があり、これは今後の課題である。

### べき関数モデルによる期待値の回帰分析

図4では、貸出回数分布の期待値は、経年数に対して幾何級数的に減少するようにみえる。そこで経年数y年に対する貸出回数の期待値 $f(y)$ のべき関数モデル

$$f(y) = A \rho^y, y = 1, 2, \dots, 20$$

表6. 貸出回数上位10点(NDC 3)

		貸出回数						
タイトル	著者	出版年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	5年間合計
T'1	A'1	2012	57	111	135	109	69	481
T'2	A'2	2015	—	—	—	44	99	143
T'3	A'3	2011	93	39	28	6	4	170
T'4	A'4	2015	—	—	—	19	82	101
T'5	A'5	1980	44	57	40	77	56	274
T'6	A'6	2009	77	76	56	36	35	280
T'7	A'7	2012	9	74	28	12	8	131
T'8	A'8	2000	73	60	60	52	61	306
T'9	A'9	2010	70	22	30	17	11	150
T'10	A'10	2013	—	20	69	46	22	157

表7. 貸出回数上位11点(NDC 3, 1996年以前出版)

		貸出回数						
タイトル	著者	出版年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	5年間合計
T'5	A'5	1980	44	57	40	77	56	274
T'11	A'11	1991	40	57	35	62	41	235
T'12	A'12	1986	26	9	0	0	1	36
T'13	A'13	1984	8	21	6	20	25	80
T'14	A'14	1995	0	1	21	24	2	48
T'15	A'15	1994	3	1	20	23	22	69
T'16	A'16	1985	0	3	22	23	7	55
T'17	A'17	1993	0	2	0	6	23	31
T'18	A'19	1982	10	7	5	19	8	49
T'19	A'18	1992	19	2	4	3	0	28
T'20	A'20	1996	19	5	0	0	1	25

による回帰分析を行う。ここで $A, \rho$ は正の定数とする。両辺の対数をとることで回帰直線により定数項を推定する。経年数1年以上20年以下の20個を標本とした。推定結果を表8に、べき関数モデルによる推定曲線のグラフを図12に示す。表中の $E^a$ は $10^a$ を表す。各類において、決定係数は概ね高い値を示し、期待値の変化はべき関数モデルでよく説明できることがわかる。定数項 $A$ は経年数0年、すなわち出版年における仮想的な年間貸出回数と解釈できる。出版直後の資料は、類により6回から15回程度の貸出が期待でき、特にNDC 5とNDC 9では顕著に大きい。また、NDC 5の減少率 $\rho$ はNDC 0を除く類の中で最小であり、オブソレッセンスの効果が強く表れる資料群であることがわかる。

ここでは経年数と期待値の関係について、モデル式による適合を試みた。変動係数や裾確率へのモデル式、あるいは貸出回数分布に対する理論分布の適合については今後の課題である。

### おわりに

本論文では公立図書館の蔵書貸出データを用いて、蔵書の貸出回数と経年数の関係について調査した。経年数により貸出回数が期待値の意味で減少するオブソレッセンスを確認することができた。また減少の程度はNDCによる類ごとに異なることもわかつた。一方で資料単位での貸出回数の振る舞いはかな

表8. べき関数モデルの推定結果

資料群	$A$ :定数項		$\rho$ :減少率		決定係数
	係数	p値	係数	p値	
NDC 0	8.25	1.60E-16	0.797	1.84E-18	0.987
NDC 1	6.79	7.40E-12	0.859	1.83E-11	0.923
NDC 2	8.35	5.65E-18	0.849	2.22E-17	0.983
NDC 3	8.35	5.50E-15	0.828	6.70E-17	0.981
NDC 4	6.92	1.90E-17	0.851	1.92E-17	0.983
NDC 5	15.67	1.42E-26	0.816	1.31E-25	0.998
NDC 6	6.31	7.49E-16	0.869	3.89E-15	0.970
NDC 7	6.55	9.59E-19	0.889	1.45E-16	0.979
NDC 8	6.74	9.41E-20	0.877	3.15E-18	0.986
NDC 9	15.25	1.94E-26	0.853	1.20E-23	0.997
全資料	9.84	5.34E-25	0.856	2.11E-23	0.996

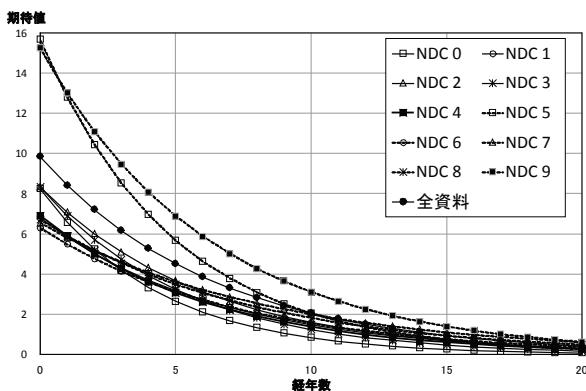


図 12. べき関数モデルによる推定曲線。

り不規則な振る舞いを含んでおり、経年数で一律に説明することは難しいことがわかった。

## 謝辞

貴重なデータを提供していただき、また問い合わせに快く対応していただいた平塚市図書館職員の皆様のご協力に深くお礼申し上げる。

## 文献

- 1) 平塚市中央図書館 (2017) 図書館年報『らぼーる 2016』.
- 2) 池内 淳, 中川恵理子 (2009) 公立図書館の蔵書構成比と貸出規則に関する実態調査. 三田図書館 2009 年度情報学会研究大会発表論文集. pp.29-32.
- 3) 星野雅英, 渡邉真由美, 風巻利夫, 原香寿子 (2008) 東京大学総合図書館における入館・貸出統計データ分析の試み. 大学図書館研究 82: 1-11.
- 4) 松井 朗, 磯野 肇 (2006) 「蔵書回転率」と「蔵書貸出率」を指標とする貸出データの分析調査. 奈良大学紀要 34: 177-190.
- 5) Burrell QL (1985) A note on ageing in a library circulation model. *J. Doc.* 41-2: 100-115.
- 6) 岸田和明 (1989) 図書の貸出頻度を記述する負の二項分布モデルの演繹的導出とその一般化. *Libr. Inform. Sci.* 27: 55-68.
- 7) 岸田和明 (1994) 利用統計を用いた蔵書評価の手法. 情報の科学と技術 44-6: 300-305.

■原 著■

## 二層二重スリットでの量子干渉思考実験

行方幸希<sup>1</sup> 木村 敬<sup>1,2</sup>

Theory of Bilayer Double-Slit Experiment for Quantum Coherence

Saki Namekata<sup>1</sup> and Takashi Kimura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Physics and Mathematics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka city, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: tkimura@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Herein, we used an ideal measurement to extend a single-layer double-slit gedanken experiment to a bilayer type, with the assumption that an ideal detector is used in the place of every slit; this detector detects a passing quantum with a certain probability. Similar to the single-layer case, we found that when the detector at the slit in front of the film always detects a passing quantum, the interference fringe caused by the quantum coherence on the film disappears. Moreover, a detector at the slit that is not from the film causes the replacement of the maximum interference fringe with the minimum, when the experimental parameters fulfill a certain conditions.

**Keywords:** quantum mechanics, quantum coherence, ideal measurement, bilayer double-slit experiment

### 序論

量子力学の観測問題の例題として、最も著名ものの一つが二重スリットを通過する量子力学に従うミクロの粒子（量子）の干渉である。図1のよう、左側の粒子源から放出される量子が2つあるスリットを経て右側のフィルムに衝突するという実験を考えよう。

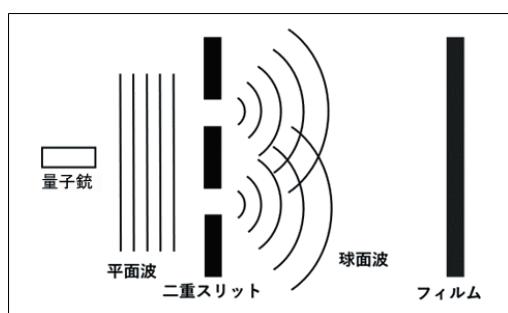


図1. 電子の二重スリット実験の模式図。左端の電子銃から放たれた電子は二重スリットを通過した後、球面波として伝搬し、右端のフィルム上に痕跡を残す。

量子は光子、電子、原子などミクロなスケールのものならどのようなものでもよいが、互いに影響を与えないように1個ずつ、十分時間をおいて粒子源から放射されるとする。量子が最終的にフィルムに

到達したとき、フィルム上には量子の痕跡の点が残るでしょう。量子が粒子源からフィルムに至るまでの途中で、「量子は粒子である以上、上のスリットか下のスリットをいずれか一方を通る」というのが常識的な考え方だ。ところがこの実験を繰り返していくと、フィルム上には量子の痕跡の点の集合として徐々に縞模様が現れる。そしてその縞模様は、波としての光の干渉を表すYoungの実験と同じ縞模様で、その間隔もYoungの実験の場合と全く同様に、「上下2つのフィルムを通った」古典的な2つの波の干渉の問題として計算されたものと一致する。これは量子が粒子性と波動性の両方の性質を合わせ持つことの現れである。この量子の粒子と波の二重性は、理論的な予言に留まらず、光子<sup>1)</sup>、電子<sup>2)</sup>、原子<sup>3)</sup>において実験で確認された。

図2は、日立基礎研究所で行われた有名な1電子干渉実験<sup>2)</sup>でのフィルム上の電子の痕跡である。左上、右上、左下、右下の順に $10, 2 \times 10^2, 6 \times 10^3, 1.4 \times 10^4$ と電子数が増えるに従い、徐々に干渉縞が現れて来る。一方、浜松フォトニクスによる光子干渉の実験<sup>1)</sup>による電子と同様の結果は、Youngの実験の干渉縞とは「一光子の実験をマクロな数の光子に

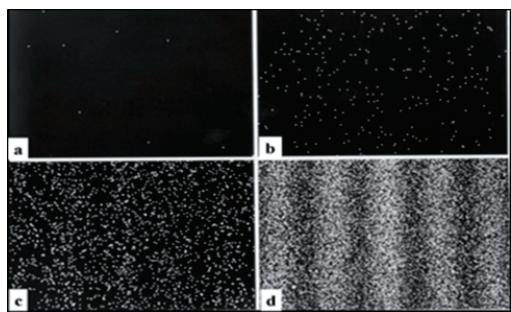


図2. 外村ら<sup>2)</sup>による電子の二重スリット実験の結果。白点はフィルム上の痕跡点である。白点の個数は左上、右上、左下、右下の順に  $10, 2 \times 10^2, 6 \times 10^3, 1.4 \times 10^4$  である。(図は、日立研究開発グループホームページ <http://www.hitachi.co.jp/rd/portal/highlight/auantum/doubleslit/index.html> より許可を得て転載。)

対して同時に集計したもの」であったことを意味している。その後、同様な干渉縞が  $C_{60}$  分子<sup>4)</sup> のような大分子、更には分子量が1万を超える巨大分子<sup>5)</sup>に至るまで観測されており、どの程度のスケールまで量子力学による予想が成り立つか興味を持たれている。

さて、スリットを1つだけにしたらどうなるだろうか。この場合、量子力学が教えるところであり実験でも確認されていることだが、もはや干渉縞は生じない。この事実を元に二重スリットの実験に話を戻すと、二重スリットの場合は、量子は「自分自身と干渉した」ということになる。即ち1個の量子が、「上下2つのスリットを両方とも通った」のである。我々の日常的な感覚からは非常識に思えるが、そのように理解する他はない<sup>6,7)</sup>。

それでは二重スリットがある場合、量子は常に両方のスリットを通るのだろうか？ 答えはNoである。もし、両方のスリットの場所に量子の検知器を置けるとしよう。その検知器は量子を吸収せず、近くを量子が通ったことだけを検知する理想的な非破壊測定装置であるとする。このとき、仮に上のスリットに設置された検知器が反応したとすると、量子が上のスリットを通り、下のスリットは通っていないことが確定する。従って、もう波は上のスリットを通る一つしかなく干渉縞は生じない。観測によって、下のスリットを通る波が消滅するのである。なお、「通過スリットの特定による干渉縞の消失は位置測定の反作用によって粒子の運動量が乱されることで説明出来る」という、射影演算子に頼らない立場<sup>8)</sup>においても、「粒子の通過スリットを確認すれば干渉縞が消える」という結論自体は変わらない。

このような二重スリットの干渉及びその経路観測による消滅を最も簡潔に式の上で記述するのが、次章で詳しく説明する理想測定の理論による先行研究<sup>9)</sup>

である。本稿ではこの先行研究をもとに、二重スリットを二層にした系の干渉問題についての我々の試論を紹介する。我々の計算結果は、フィルム直前の二重スリット上での測定が干渉の有無を決めるという自然な予想を確認するとともに、一層目の二重スリットでの経路観測によって、フィルム上での量子密度の極大、極小が入れ替わるという興味深い結果が示すものになっている。将来的に先行研究の実験が実現されれば、二層に拡張することも可能であると予想され、量子力学の観測問題において、一つの検討の舞台となる可能性もある。

本稿では、以下のような構成を探る。「方法」の「理想測定の理論」において、上述の理想的な非破壊測定装置（以下これを「検出器」と呼ぶ。）を含む系の二重スリットの干渉問題の定式化に関する先行研究<sup>9)</sup>を紹介する。「二層二重スリットの理論」では、二重スリットを二層にする我々の拡張理論を説明する。「結果と討論」では、「二層二重スリットの理論」で解説された理論式に基づいて、具体的な計算結果をグラフで表し、それらの物理的解釈を説明する。

## 方法

### 理想測定の理論

図3のように量子の二重スリット実験において、上（下）のスリットに検出器  $D_+$  ( $D_-$ ) を設置する。なお、簡単のため本稿では実験系が平面上にあるとし、スリットを実際の系での立体上の線ではなく平面上の点のように扱うことにする。

まず、量子の波動関数を

$$|\psi\rangle = |\psi_+\rangle + |\psi_-\rangle \quad (1)$$

と表す。ここで  $|\psi_+\rangle$  ( $|\psi_-\rangle$ ) は、上（下）のスリットを通る量子の波動関数である。ここで、上下のスリットには同位相の量子波が入射するとしている。

量子が  $D_+$  ( $D_-$ ) を通過すると、量子検出の結果として検出器の状態が  $|D_\pm\rangle$  から  $|D'_\pm\rangle$  に変化するでしょう。量子と検出器両方を合わせた系全体の状態は、

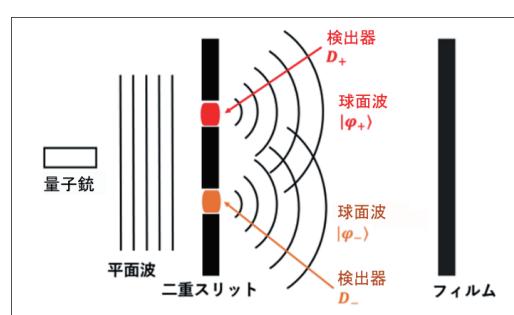


図3. 量子検出器を設置した量子の二重スリット実験の仮想図。上下のスリットにそれぞれ検出器  $D_+$  と  $D_-$  が設置されている。

スリット通過前の

$$|\Psi\rangle = (\psi_+ + \psi_-) \otimes |D_+ D_-\rangle \quad (2)$$

から、通過後には

$$|\Psi'\rangle = |\psi_+\rangle \otimes |D'_+ D_-\rangle + |\psi_-\rangle \otimes |D_+ D'_-\rangle \quad (3)$$

と変化することになる。なおこの時点では、系全体の初期状態を量子の状態と検出器の状態の直積で表せるという暗黙の仮定を行っている。(この仮定は「シュレーディンガーの猫」のパラドックスが議論される際にも、しばしば暗黙のうちになされている。) 系全体の密度行列は

$$\rho_s = |\Psi'\rangle\langle\Psi'| \quad (4)$$

である。ここで、検出器の取り得る状態について対角和 (trace) をとることで、量子系の密度行列を抜き出すことが出来る。

$$\begin{aligned} \rho &\equiv \text{Tr}_D \rho_s \\ &= \langle D'_+ D_- | \rho_s | D'_+ D_- \rangle + \langle D_+ D'_- | \rho_s | D_+ D'_- \rangle \\ &= |\psi_+\rangle\langle\psi_+| + |\psi_-\rangle\langle\psi_-|. \end{aligned} \quad (5)$$

上または下の検出器が反応したときの量子系の密度行列がそれぞれ  $\langle D'_+ D_- | \rho_s | D'_+ D_- \rangle$  と  $\langle D_+ D'_- | \rho_s | D_+ D'_- \rangle$  と与えられ、その和が検出器の反応の統計平均としての量子系のみの密度行列を与えるのである。この操作によって、量子状態は密度行列が单一の波動関数で表される純粋状態 (式(1)) から混合状態 5 へと移った。検出器の状態についての対角和をとる作用が通ったスリットを、(その上下のいずれかは別として) 確定させる射影演算子の演算と等価なためである。フィルム上の座標  $x$  (図 4) での波動関数はそれぞれのスリットから球面波として伝わり、

$$\langle x | \psi_{\pm} \rangle \propto \frac{\exp[ikL_{\pm}(x)]}{L_{\pm}(x)} \quad (6)$$

と与えられる。ここで  $k = 2\pi/\lambda$  ( $\lambda$  は de Broglie 波長)

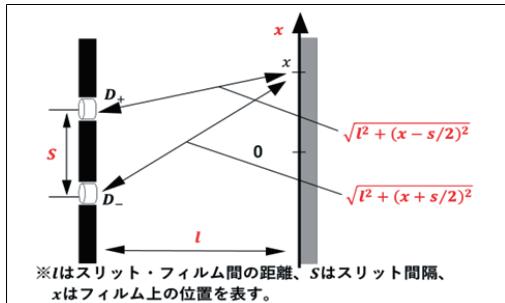


図 4. 二重スリットの配置図。 $l$  はスリットとフィルムの間の距離、 $s$  はスリット間の距離、 $x$  はフィルム上の座標を表している。

は量子の波数であり、 $L_{\pm}(x) \equiv \sqrt{l^2 + (x \mp s/2)^2}$  は上 (-) 下 (+) のスリットからフィルム上の座標  $x$  までの距離を表す。これらより、フィルム上の量子密度

$$\langle x | \rho | x \rangle \propto \frac{1}{L_+^2(x)} + \frac{1}{L_-^2(x)} \quad (7)$$

が得られる。予想されたように、検出器のおかげで干渉縞を与える振動項は現れない。

それでは、干渉縞を復活させるにはどうすればよいであろうか。そのために、スリットを量子が通ったときの検出器の検出確率を導入しよう。検出器を置いて量子を検出しなければ、検出器がない場合と同じになるという仕組みである。具体的には、全系の波動関数を

$$\begin{aligned} |\Psi\rangle &= |\psi_+\rangle \otimes (\alpha'_1 |D'_+ D_-\rangle + \alpha_1 |D_+ D_-\rangle) \\ &\quad + |\psi_-\rangle \otimes (\alpha'_2 |D_+ D'_-\rangle + \alpha_2 |D_+ D_-\rangle) \end{aligned} \quad (8)$$

とすれば、上 (下) 側の検出器の検出確率が  $|\alpha'_1|^2$  ( $|\alpha'_2|^2$ ) 検出しない確率が  $|\alpha_1|^2 = 1 - |\alpha'_1|^2$  ( $|\alpha_2|^2 = 1 - |\alpha'_2|^2$ ) と与えらえることになる。なお、一般性を失わずに  $\alpha_1$  や  $\alpha_2$  は正の実数にとれるので今後そのようにする。

式(5)と同様の密度行列の計算を実行すると、

$$\begin{aligned} \rho &= \text{Tr}_D \rho_s \\ &= \langle D'_+ D_- | \rho_s | D'_+ D_- \rangle + \langle D_+ D'_- | \rho_s | D_+ D'_- \rangle \\ &\quad + \langle D_+ D_- | \rho_s | D_+ D_- \rangle \\ &= |\psi_+\rangle\langle\psi_+| + |\psi_-\rangle\langle\psi_-| \\ &\quad + \alpha_1 \alpha_2 (\psi_+)\langle\psi_-| + |\psi_-\rangle\langle\psi_+| \end{aligned} \quad (9)$$

となる。なお、検出器の状態についての対角和をとる際、両方の検出器とも量子を検出しない状態  $|D_+ D_-\rangle$  が加わっている。また式(9)には  $\alpha_1 \alpha_2$  を比例係数に伴って、 $|\psi_+\rangle$  と  $|\psi_-\rangle$  という上下の経路の波動関数の積が現れており、その結果、フィルム上の量子密度には

$$\begin{aligned} \langle x | \rho | x \rangle &\propto \frac{1}{L_+^2(x)} + \frac{1}{L_-^2(x)} \\ &\quad + \alpha_1 \alpha_2 \frac{\cos k[L_+(x) - L_-(x)]}{L_+(x)L_-(x)} \end{aligned} \quad (10)$$

と、干渉縞を与える振動項 (右辺最終項) が現れる (図 5)。振動項の比例係数  $\alpha_1 \alpha_2$  の存在は  $\alpha_1 = 0$  または  $\alpha_2 = 0$  即ち  $\alpha'_1 = 1$  または  $\alpha'_2 = 1$  (従って、上下いずれか一方の検出器の検出確率が 1) ならば、量子の通ったスリットが確定し、干渉縞が消えるという

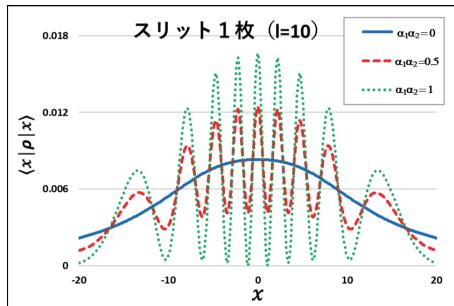


図5. 検出器を設置した二重スリットでのスリット上の量子密度。検出率に関係するパラメーターとしては $\alpha_1\alpha_2=0, 0.5, 1$ をとっている。また、二重スリット・フィルム間の距離 $l=10$ 、スリット間隔 $s=9$ 、波長 $=s/5$ (即ち、波数 $k=2\pi/\lambda=10\pi/s$ )としている。なお、本図は正確には式(10)の右辺を表したもので、量子密度の規格化は行っていない。

ことを表している。ここで、 $\alpha'_1 = 1$ かつ $\alpha'_2 = 1$ である(従って、両方の検出器とも検出確率が1)である必要はないことに注意しよう。一方の検出確率1の検出器が検出しなければ、量子は他方の検出器の置かれたスリットを通ったことが決まるからである。言い換えれば、干渉縞が現れるための必要十分条件は、上下両方のスリットの検出確率がともに1未満( $\alpha_1\alpha_2 < 1$ )であることである。なお、スクリーン上で量子波が強め合う明線の条件は、 $k(L_+(x) - L_-(x)) = 2m\pi$ であり、実験では多くの場合 $l \gg s, x$ なので $x \approx m\lambda l/s$ となる。

また、干渉縞は検出器が検出しないことによって弱められ、その大きさは $\alpha_1\alpha_2$ で決められる。そのため $\alpha_1\alpha_2$ は、先行研究では「純粹度」<sup>9)</sup>と呼ばれている。なお、関連する量として、干渉縞の振幅の最大(小)値 $I_{max}$ ( $I_{min}$ )から定義される

$$\text{visibility} = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \quad \text{もよく用いられている。}$$

## 二層二重スリットの理論

本章では前章で紹介した先行研究に基づき、図6のように二重スリットを二層にした系についての我々の理論を紹介する。なお、二重スリットを二層にした場合、右側の二重スリット上で、スリット以外の壁の部分に量子の大部分は衝突する。我々が問題とするのは、右側の二重スリットを通って最終的にフィルム上に達する一部の量子のみなので、実際に実験をする場合には、二重スリット1枚のみの場合よりも非常に多くの量子を必要とする。

図6では、前章で述べた一層目の(左側の)二重スリットに設置された検出器 $D_+$ と $D_-$ と同様に、二層目の(右側の)二重のスリットにも検出器 $\Delta_+$ と $\Delta_-$ がそれぞれ設置されている。それぞれの検出率を $|\beta'_1|^2$ 、 $|\beta'_2|^2$ とするが、簡単のため $\beta'i$ 及び

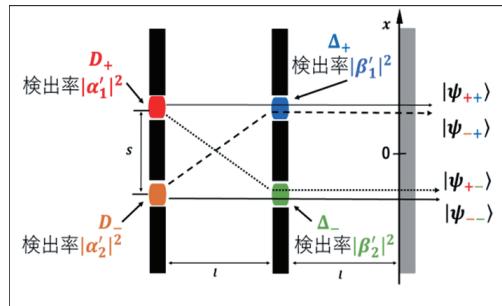


図6. 層二重スリットの模式図。2枚の二重スリットを並べている。いずれの二重スリットにも上下のスリットに量子検出器が設置されている。省略されている量子銃からフィルムに至るまでの量子の経路(上下のスリットの通り方)は $2 \times 2 = 4$ 通り存在する。2枚の二重スリットは同じスリット間距離 $s$ を持ち、2枚の二重スリット間の距離と右側の二重スリットとフィルム間の距離はともに1である。

$\beta'_i$  ( $i = 1, 2$ ) を今後  $\beta'^2_i + \beta^2_i$  を満たす正の実数とする( $\beta'^2_i$  は量子を検出しない確率)。図6で表される量子の各経路に沿ったフィルム上の波動関数は

$$\begin{aligned} \langle x | \psi_{++} \rangle &\propto \frac{\exp(ikl)}{l} \cdot \frac{\exp[ikL_+(x)]}{L_+(x)} \\ \langle x | \psi_{+-} \rangle &\propto \frac{\exp(ik\sqrt{l^2+s^2})}{\sqrt{l^2+s^2}} \cdot \frac{\exp[ikL_-(x)]}{L_-(x)} \\ \langle x | \psi_{-+} \rangle &\propto \frac{\exp(ik\sqrt{l^2+s^2})}{\sqrt{l^2+s^2}} \cdot \frac{\exp[ikL_+(x)]}{L_+(x)} \\ \langle x | \psi_{--} \rangle &\propto \frac{\exp(ikl)}{l} \cdot \frac{\exp[ikL_-(x)]}{L_-(x)} \end{aligned} \quad (11)$$

であり、量子全体のフィルム上の波動関数はこれらの和 $\psi = \psi_{++} + \psi_{+-} + \psi_{-+} + \psi_{--}$ である。

量子と検出器の合成系の波動関数は

$$\begin{aligned} |\Psi\rangle &= \psi_{++} \otimes (\alpha'_1 |D'_+ D_- \rangle + \alpha_1 |D_+ D_- \rangle) \\ &\quad \otimes (\beta'_1 |\Delta'_+ \Delta_- \rangle + \beta_1 |\Delta_+ \Delta_- \rangle) \\ &+ \psi_{+-} \otimes (\alpha'_1 |D'_+ D_- \rangle + \alpha_1 |D_+ D_- \rangle) \\ &\quad \otimes (\beta'_2 |\Delta'_+ \Delta_- \rangle + \beta_2 |\Delta_+ \Delta_- \rangle) \\ &+ \psi_{-+} \otimes (\alpha'_2 |D_+ D'_- \rangle + \alpha_2 |D_+ D_- \rangle) \\ &\quad \otimes (\beta'_1 |\Delta'_+ \Delta_- \rangle + \beta_1 |\Delta_+ \Delta_- \rangle) \\ &+ \psi_{--} \otimes (\alpha'_2 |D_+ D'_- \rangle + \alpha_2 |D_+ D_- \rangle) \\ &\quad \otimes (\beta'_2 |\Delta'_+ \Delta_- \rangle + \beta_2 |\Delta_+ \Delta_- \rangle) \end{aligned} \quad (12)$$

である。前章と同様に装置の状態について対角和を取ることで、量子の密度行列が

$$\begin{aligned} \rho_e &= \text{Tr}_D \text{Tr}_\Delta |\Psi\rangle \langle \Psi| \\ &= |\psi_{++}\rangle \langle \psi_{++}| + |\psi_{+-}\rangle \langle \psi_{+-}| \\ &\quad + |\psi_{-+}\rangle \langle \psi_{-+}| + |\psi_{--}\rangle \langle \psi_{--}| \\ &\quad + \alpha_1\alpha_2 (|\psi_{++}\rangle \langle \psi_{-+}| + |\psi_{-+}\rangle \langle \psi_{++}|) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& + |\psi_{+-}\rangle\langle\psi_{--}| + |\psi_{--}\rangle\langle\psi_{+-}| \\
& + \beta_1\beta_2(|\psi_{++}\rangle\langle\psi_{+-}| + |\psi_{+-}\rangle\langle\psi_{++}| \\
& + |\psi_{-+}\rangle\langle\psi_{--}| + |\psi_{--}\rangle\langle\psi_{-+}|) \\
& + \alpha_1\alpha_2\beta_1\beta_2(|\psi_{++}\rangle\langle\psi_{--}| + |\psi_{+-}\rangle\langle\psi_{-+}| \\
& + |\psi_{-+}\rangle\langle\psi_{+-}| + |\psi_{--}\rangle\langle\psi_{++}|). \quad (13)
\end{aligned}$$

と、得られる。これにより、フィルム上の量子密度は、そのフィルム上での規格化を行うと、

$$\begin{aligned}
\langle x|\rho|x\rangle &= \frac{\langle x|\rho_e|x\rangle}{Z}, \quad Z = \int_{-\infty}^{\infty} \langle x|\rho_e|x\rangle dx, \\
\langle x|\rho_e|x\rangle &= \left( \frac{1}{l^2} + \frac{1}{l^2+s^2} + 2\alpha_1\alpha_2 \frac{\cos[k(\sqrt{l^2+s^2}-l)]}{l\sqrt{l^2+s^2}} \right) \\
&\times \left( \frac{1}{L_+^2(x)} + \frac{1}{L_-^2(x)} \right) \\
&+ 2\beta_1\beta_2 \left\{ \alpha_1\alpha_2 \left( \frac{1}{l^2} + \frac{1}{l^2+s^2} \right) \right. \\
&\left. + 2 \frac{\cos k(\sqrt{l^2+s^2}-l)}{l\sqrt{l^2+s^2}} \right\} \frac{\cos k(L_+(x)-L_-(x))}{L_+(x)L_-(x)} \quad (14)
\end{aligned}$$

と与えられる。(なお、実際の実験では設定によって量子がフィルム上に到達する確率は異なるはずなので、この規格化は理論における便宜上、整理上のものでしかない。) 式(14)は積  $\alpha_1\alpha_2$  や  $\beta_1\beta_2$  の関数として与えられ、二重スリットが1枚のみの場合の自然な拡張になっている。その一方で、両者の積  $\alpha_1\alpha_2\beta_1\beta_2$  に依存する新たな項も現れている。

## 結果と討論

本章では前節で得られた式(14)に基づいて、いくつかのパラメーター別の結果とそれらについての物理的考察を述べる。

### 右側のスリットで量子を確率1で検出する場合 ( $\beta_1\beta_2=0$ の場合)

この場合は、右側の二重スリットの上下どちらのスリットを通ったかが決まる。その後は量子波が干渉する余地がないため、先行研究<sup>9)</sup>で検出器の検出確率が1の場合に帰着し、干渉縞は  $\alpha_1\alpha_2$  によらず消失する(図7)。このことは、式(14)の  $\langle x|\rho_e|x\rangle$  が

$$\begin{aligned}
\langle x|\rho_e|x\rangle &= \left( \frac{1}{l^2} + \frac{1}{l^2+s^2} + 2\alpha_1\alpha_2 \frac{\cos[k(\sqrt{l^2+s^2}-l)]}{l\sqrt{l^2+s^2}} \right) \\
&\times \left( \frac{1}{L_+^2} + \frac{1}{L_-^2} \right) \quad (15)
\end{aligned}$$

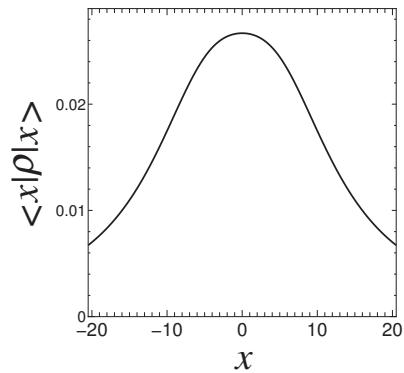


図7. 2枚目の二重スリットの上下いずれかのスリットで量子が必ず検出される場合 ( $\beta_1\beta_2=0$  の場合) のフィルム上の量子密度。この場合、結果は  $\alpha_1\alpha_2$  には依存しない(本文参照)。二重スリットと2枚目のフィルム間の距離(=2枚の二重スリット間の距離)  $l=10$ 、スリット間隔  $s=9$ 、波長  $\lambda=s/5$  (波数  $k=2\pi/\lambda=10\pi/s$ ) を採っている。

となることからもわかる。なお、式(15)は  $\alpha_1\alpha_2$  に依存する項と  $x$  に依存する項との積で書かれているため、規格化を行った後の  $\langle x|\rho|x\rangle$  はもはや  $\alpha_1\alpha_2$  には依存しない。よって式(15)と式(7)は、規格化まで考慮すれば完全に一致する。

### 右側のスリットで量子を全く検出しない場合 ( $\beta_1\beta_2=1$ の場合)

この場合には、他のパラメーターによらず必ず干渉縞が生じる。仮に量子が通った左側のスリットの上下が確定しても右側の二重スリットの上下どちらを量子が通ったかが確定せず、右側の二重スリットとフィルムの間では2つの進路の異なる波が存在するからである。なお、ここまで説明だけからは左側の二重スリットの検出器の役割が小さいように思えるかもしれないが、以下の小節で示すように左側の二重スリットの検出器も一定の条件下で重要な役割を果たす。

### $\alpha_1\alpha_2=1$ の場合

$\alpha_1\alpha_2=\beta_1\beta_2=1$  の場合は、全ての検出器がない場合に対応する。図8は  $\beta_1\beta_2=0$ 、 $\alpha_1\alpha_2=1$  の場合の量子密度の結果を示している。ここで  $s$  について、後述する図9の  $\alpha_1\alpha_2=0$  のときとの比較のため、図9と同じ3つのスリット間隔  $s$  の数値を採用している。結果は、古典的なヤングの実験を二層二重スリットで行った場合と同様である。即ち、量子密度はフィルム上の原点  $x=0$  で強め合って最大値をとり、原点を対称とした干渉縞が形成する。

### $\alpha_1\alpha_2=0$ の場合

ところが、 $\alpha_1\alpha_2=0$  の場合は話が変わって来る。このとき、左側の二重スリット上で量子の経路は

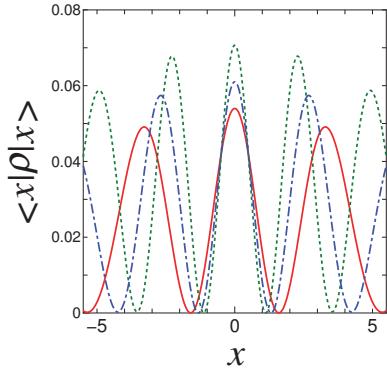


図8. 両方の二重スリットとも量子を検出しない場合 ( $\alpha_1 \alpha_2 = \beta_1 \beta_2 = 1$  の場合) のフィルム上の量子密度.  $\lambda = 1$  (波数  $k = 2\pi / \lambda = 2\pi$ ),  $l = 10$  とし,  $s = s_{\text{reverse}} \approx 3.20$  (実線: 赤),  $s = s_{\text{same}} \approx 4.58$  (破線: 緑)  $s = (s_{\text{same}} + s_{\text{reverse}})/2 \approx 3.89$  (一点破線: 青) の 3 つの  $s$  のときの結果を示している.

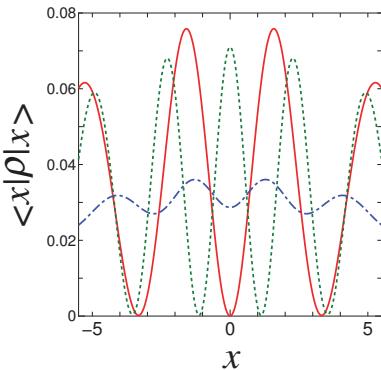


図9. 右側の二重スリット上では量子を検出しないが、左側の二重スリット上では必ず量子を検出する場合 ( $\alpha_1 \alpha_2 = 0$ かつ $\beta_1 \beta_2 = 1$  の場合) のフィルム上の量子密度.  $\lambda = 1$  (波数  $k = 2\pi / \lambda = 2\pi$ ),  $l = 10$  とし,  $s = s_{\text{reverse}} \approx 3.20$  (実線: 赤),  $s = s_{\text{same}} \approx 4.58$  (破線: 緑)  $s = (s_{\text{same}} + s_{\text{reverse}})/2 \approx 3.89$  (一点破線: 青) の 3 つの  $s$  のときの結果を示している.  $s = s_{\text{reverse}}$  (実線) のときと異なり,  $s = s_{\text{same}}$  (破線) のときは原点で量子密度が極小になっていることが分かる.

確定している。量子が仮に上のスリットを通ったとすると、その量子が右側の二重スリットの上のスリットを通過する場合と、下のスリット通過する場合で、経路長はそれぞれ  $\sqrt{l^2 + s^2}$  となる。まず経路差  $\sqrt{l^2 + s^2} - l$  が波長  $\lambda$  の整数  $m$  倍、即ち

$$s = \sqrt{m^2 \lambda^2 + 2m\lambda l} \quad (m = 0, 1, 2, \dots) \quad (16)$$

のときは、右側の二重スリットにおける上下のスリット上での波は同位相で、それらがフィルムの原点に来たときはお互いに強め合い、原点で最大をとる干渉縞が形成され、 $\alpha_1 \alpha_2 = 1$  のときと同様となる。

しかし、 $\sqrt{l^2 + s^2} - l$  が波長  $\lambda$  の半整数  $(m + 1/2)$  倍になるとき、即ち

$$s = \sqrt{\left(\frac{2m+1}{2}\lambda\right)^2 + (2m+1)\lambda l} \quad (m = 0, 1, 2, \dots) \quad (17)$$

のときは右側の二重スリットにおける上下のスリット上での波が逆位相となるため、フィルムの原点で波は弱め合い、量子密度は極小をとる。なお、実験系では多くの場合  $l \gg \lambda$  なので  $s_{\text{same}} \approx \sqrt{2m\lambda l}$ ,  $s_{\text{reverse}} \approx \sqrt{(2m+1)\lambda l}$  と条件式が近似できる。

上記を図9により確認しよう。右側の上下のスリットで同位相になる場合（経路差が 1 波長 :  $s = s_{\text{same}} \equiv \sqrt{\lambda^2 + 2\lambda l}$ ）と逆位相になる場合（経路差が半波長 :  $s = s_{\text{reverse}} \equiv \sqrt{\lambda^2/4 + \lambda l}$ ）で、確かに原点での極大、極小が入れ替わることが分かる。参考のため両者の平均  $s = (s_{\text{same}} + s_{\text{reverse}})/2$  のときの結果も加えてある。このように  $s$  によって、原点での極大と極小が徐々に入れ替わる。この極大と極小の入れ替わりは、二重スリット 1 枚だけでは生じず、2 枚の二重スリットを考えることで初めて生じるものである。

なお、前小節の図8に戻ると、右側の二重スリットのスリットの上下での位相差の効果が部分的ながらすでに現れており、 $s = s_{\text{same}}$  (破線)、 $s = (s_{\text{same}} + s_{\text{reverse}})/2$  (一点破線)、 $s = s_{\text{reverse}}$  (実線) という順に、原点での密度の大きさが減少していることが分かる。

### 一般の $\alpha_1 \alpha_2$ の場合

前小節で量子密度が原点で極小になった場合 ( $s = s_{\text{reverse}} = \sqrt{\lambda^2/4 + \lambda l}$ ) を考え、 $\alpha_1 \alpha_2$  を 0 から 1 まで増加させていくと、原点での振る舞いが極小

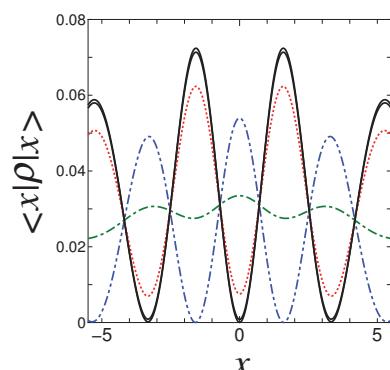


図10. 右側の二重スリット上で量子を検出しない場合に ( $\beta_1 \beta_2 = 1$  の場合). 左側の二重スリット上での量子の検出率を変えた場合の量子密度.  $\lambda = 1$  (波数  $k = 2\pi / \lambda = 2\pi$ ),  $l = 10$ ,  $s = s_{\text{reverse}} = \sqrt{\lambda^2/4 + \lambda l} \approx 3.20$  を採っている。原点での密度が低いグラフから高いグラフへの順に  $\alpha_1 \alpha_2 = 0, 0.9$  (いずれも実線: 黒), 0.99 (点線: 赤), 0.999 (一点破線: 緑), 1 (二点破線: 青) のときの結果を表している。

から極大へと移り変わることが確かめられるはずである。しかし、 $\alpha_1 \alpha_2 \leq 0.9$  程度まではほとんど変化が見られず、 $\alpha_1 \alpha_2 = 1$  近傍で驚くほど急に変化する。図 10 では  $\alpha_1 \alpha_2 = 0, 0.9, 0.99, 0.999, 1$  のときを示しているが、このうち  $\alpha_1 \alpha_2 = 0$  と  $\alpha_1 \alpha_2 = 0.9$  のグラフはほとんど重なってしまっている。これは左側の二重スリットで量子を検出する場合、フィルム上の原点で弱め合いが起き得る条件下では、左側の二重スリット上での検出確率がかなり低くなるまでその弱め合いが確認できることを示している。

### 「純粹度」について

二重スリット 1 枚のみの場合、干渉縞の強弱の強さを決める「純粹度」は  $\alpha_1 \alpha_2$  で定義されている。一方で既に見たように、二層二重スリットの場合は、フィルムの前にある右側の二重スリットの検出率に関するパラメータ  $\beta_1 \beta_2$  がゼロでないときのみ干渉縞が現れる。従って、純粹度に相当するパラメーターは  $\beta_1 \beta_2$  になるべきであろうと期待される。

実際に、前節で紹介した左側の二重スリットからの波が右側の二重スリットの上下スリットの位置で同位相になる場合、即ち  $s = s_{\text{same}}$  の場合には、上記の予想が当てはまる。図 11 は  $\alpha_1 \alpha_2 = 0.5$  を固定し、 $\beta_1 \beta_2$  を変えた結果を示しているが、干渉縞の振幅が  $\beta_1 \beta_2$  の増加に伴って滑らかに大きくなる様子が見られる。一方、逆に  $\beta_1 \beta_2 = 0.5$  を固定し、 $\alpha_1 \alpha_2$  を変化させても、ほとんどグラフの変化が見られない。図 12 では実際には  $\alpha_1 \alpha_2$  を 0 から 1 まで 0.2 刻みで変化させた計 6 つのグラフが書かれているが、線幅の範囲内にその変化は収まっている。このように、 $s = s_{\text{same}}$  の場合には二重スリットの 1 枚の場合の純粹度に相当するはたらきを  $\beta_1 \beta_2$  がし、逆に  $\alpha_1 \alpha_2$  はそのはたらきをしないことが分かる。

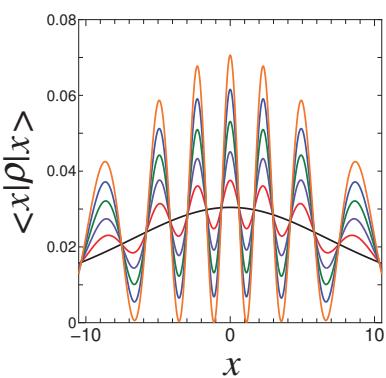


図 11.  $\alpha_1 \alpha_2 = 0.5$  を固定し、 $\lambda = 1$  (波数  $k = 2 \pi / \lambda = 2 \pi$ )、 $l = 10$ 、 $s = s_{\text{same}} = \sqrt{\lambda^2 + 2\lambda l} \approx 4.58$  を採った場合の  $\beta_1 \beta_2$  依存性を示したもの。原点での量子密度の小さいものから順に  $\beta_1 \beta_2 = 0$  (黒)、0.2 (赤)、0.4 (紫)、0.6 (緑)、0.8 (青)、1.0 (オレンジ) のグラフである (全て実線)。

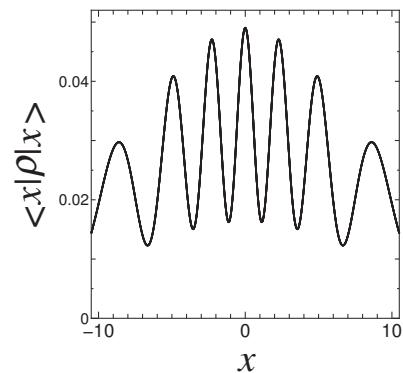


図 12.  $\beta_1 \beta_2 = 0.5$  を固定し、 $\lambda = 1$  (波数  $k = 2 \pi / \lambda = 2 \pi$ )、 $l = 10$ 、 $s = s_{\text{same}} = \sqrt{\lambda^2 + 2\lambda l} \approx 4.58$  を採った場合の、 $\alpha_1 \alpha_2$  依存性を示したもの。実際には  $\alpha_1 \alpha_2 = 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0$  をプロットしているが、全てのグラフが線幅の範囲内に収まっている。

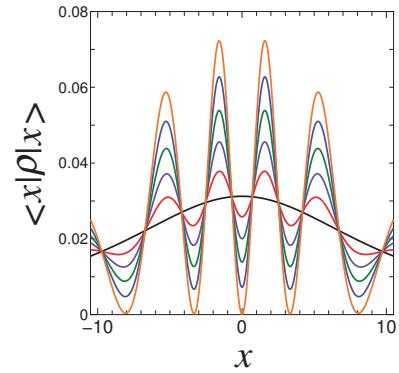


図 13.  $\alpha_1 \alpha_2 = 0.5$  を固定し、 $\lambda = 1$  (波数  $k = 2 \pi / \lambda = 2 \pi$ )、 $l = 10$ 、 $s = s_{\text{reverse}} \approx 3.20$  を採った場合の、 $\beta_1 \beta_2$  依存性を示したもの。原点での量子密度の小さいものから順に  $\beta_1 \beta_2 = 0$  (黒)、0.2 (赤)、0.4 (紫)、0.6 (緑)、0.8 (青)、1.0 (オレンジ) のグラフである (全て実線)。

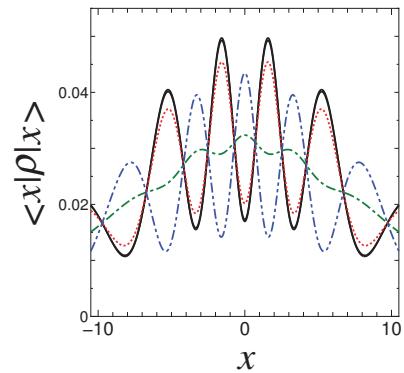


図 14.  $\beta_1 \beta_2 = 0.5$  を固定し、 $\lambda = 1$  (波数  $k = 2 \pi / \lambda = 2 \pi$ )、 $l = 10$ 、 $s = s_{\text{reverse}} = \sqrt{\lambda^2 / 4 + \lambda l} \approx 3.20$  を採った場合の  $\alpha_1 \alpha_2$  依存性を示したもの。原点での密度が低いグラフから高いグラフへの順に  $\alpha_1 \alpha_2 = 0, 0.9$  (いずれも実線: 黒)、0.99 (点線: 赤)、0.999 (一点破線: 緑)、1 (二点破線: 青) のときの結果を表している。

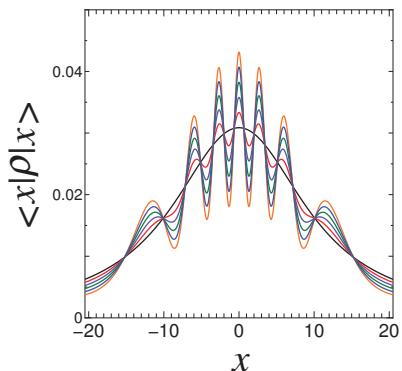


図 15.  $\alpha_1 \alpha_2 = 0.5$  を固定し,  $\lambda = 1$  (波数  $k = 2\pi/\lambda = 2\pi$ ),  $l = 10$ ,  $s = (s_{\text{same}} + s_{\text{reverse}})/2 \approx 3.89$  を採った場合の,  $\beta_1 \beta_2$  依存性を示したもの。原点での量子密度の小さいものから順に  $\beta_1 \beta_2 = 0$  (黒), 0.2 (赤), 0.4 (紫), 0.6 (緑), 0.8 (青), 1.0 (オレンジ) のグラフである (全て実線)。

一方で、前節で紹介した左側の二重スリットからの波が右側の二重スリットの上下スリットの位置で逆位相になる場合、即ち  $s = s_{\text{reverse}}$  のときは前小節の中で述べたように状況はやや複雑になる。まず  $\alpha_1 \alpha_2$  を固定して、 $\beta_1 \beta_2$  を変化させてみると、 $s = s_{\text{same}}$  のときと同様に  $\beta_1 \beta_2$  とともに振幅が大きくなる(図 13)。他方、 $\beta_1 \beta_2 = 0.5$  を固定して、 $\alpha_1 \alpha_2$  を変化させると、前小節で  $\beta_1 \beta_2 = 1$  を調べた場合と同様、 $\alpha_1 \alpha_2$  が 1 に近づくとき急激に干渉縞の極小と極大が入れ替わる(図 14)。その意味では、 $\alpha_1 \alpha_2$  も  $\beta_1 \beta_2$  の値によっては振幅を変える能力をもっているといえる。 $\beta_1 \beta_2 = 0$  のとき、即ち確率 1 で右側の二重スリットが量子を検出する場合には 4.1 節で既に述べたように、干渉縞がスリット間隔  $s$  や  $\alpha_1 \alpha_2$  によらずそもそも存在しなくなるので、 $\alpha_1 \alpha_2$  が振幅を大きく変えるのは、 $\beta_1 \beta_2$  がある程度の大きさをもつときに限られるといえる。

また、中間的な  $s = (s_{\text{same}} + s_{\text{reverse}})/2$  のときは  $\beta_1 \beta_2$ ,  $\alpha_1 \alpha_2$  ともに振動の振幅を大きくする働きを示すことが、それぞれ図 15 と図 16 から見て取れる。

以上のことから、 $\beta_1 \beta_2$  は諸条件によらず常に振動の振幅を大きくするが、 $\alpha_1 \alpha_2$  も条件によって同様の働きをすることが分かる。従って、本研究の二層二重スリットの場合、 $\beta_1 \beta_2$  のみで純粹度が決まるわけではなく、 $\alpha_1 \alpha_2$  も役割をもつ場合があり、純粹度を定義するとしてもより複雑な定義にする必要があるだろう。

## まとめ

今回我々は、二重スリットの量子干渉についての先行研究<sup>9)</sup>を拡張して二重スリットを二層にし、全てのスリット上に量子の通過を検出する検出器を設置

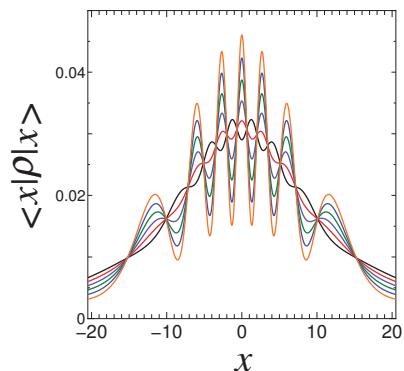


図 16.  $\beta_1 \beta_2 = 0.5$  を固定し,  $\lambda = 1$  (波数  $k = 2\pi/\lambda = 2\pi$ ),  $l = 10$ ,  $s = (s_{\text{same}} + s_{\text{reverse}})/2 \approx 3.89$  を採った場合の,  $\alpha_1 \alpha_2$  依存性を示したもの。原点での量子密度の小さいものから順に  $\alpha_1 \alpha_2 = 0$  (黒), 0.2 (赤), 0.4 (紫), 0.6 (緑), 0.8 (青), 1.0 (オレンジ) のグラフである (全て実線)。

した系の量子干渉について理論解析を行った。その結果、フィルム直前の右側の二重スリット上での測定が干渉の有無を決めるという自然な予想を確認するとともに、二層になることによる量子波の干渉条件の変化と量子の経路の観測とを複合する効果によって、フィルム上の干渉縞の極大、極小が入れ替わるという興味深い結果を得た。

## 文献

- 1) Tsuchiya Y, Inuzuka E, Kurono T and Hosoda M (1986) Photon-counting image and its application. *Adv. Electron. El. Phys.* **64A**: 21-31.
- 2) Tonomura A, Endo J, Matsuda T, Kawasaki T and Ezawa H (1989) Demonstration of single-electron buildup of an interference pattern. *Am. J. Phys.* **57**: 117.
- 3) Carnal O and Mlynek J (1991) Young's double-slit experiment with atoms: A simple atom interferometer. *Phys. Rev. Lett.* **66**: 2689-2692.
- 4) Arndt M, Nairz O, Vos-Andreae J, Keller G, vander Zouw G and Zeilinger A (1999) Wave-particle duality of C60 molecules. *Nature* **401**: 680-682.
- 5) Eibenberger S, Gerlich S, Arndt M, Mayor M and Tüxen J (2013) Matter-wave interference of particles selected from a molecular library with masses exceeding 10,000 amu. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**: 14696-14700.
- 6) 朝永振一郎 (1976) 光子の裁判. 講談社, 東京.
- 7) 細谷暁夫 (2014) 「光子の裁判」再び: 波乃光子は本当に無罪か. 別冊日経サイエンス 2014. 日経サイエンス社, 東京. pp42-51.
- 8) M. Jammer (1974) *The Philosophy of Quantum Mechanics*. Wiley New York.
- 9) 小出功史 (1992) 量子力学における観測問題の現状. 物性研究 **58**: 418-442.

■原 著 ■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 論述式試験に関する諸問題と採点支援システムの研究動向

後藤智範<sup>1,2</sup> 永松礼夫<sup>1</sup>

Studies on Essay-type Examination and Automated Essay Scoring System

Tomonori Gotoh<sup>1,2</sup> and Leo Nagamatsu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Information Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: gotout01@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** It is expected that description type examinations (DTEs) are able to evaluate abilities for logical inference and analytical thinking. DTEs have already been introduced in some faculties and departments for entrance examinations for universities. As a part of "the national common test for university entrance qualification", large-scale DTEs are planned for subjects of Japanese language and mathematics. The scoring process for DTEs differs from that for mark sheet-type examinations, requiring human support for scoring. In the field of pedagogy, some empirical studies on DTEs have been reported and many problems have been pointed out. In the U.S.A., to score DTE, some ESSs (Essay scoring Systems) have been in operation for over 20 years. In this paper on DTEs, we reviewed problems and solutions highlighted by recent study results based on the theory of education. Also, based on summarized trends of ESS studies in the U.S.A. and Japan, from the viewpoint of problems with DTEs, we discussed features and properties required for better ESSs.

**Keywords:** automatic essay scoring, exam, essay-type examination, machine learning, domain knowledge

### 序論

現在の形式での大学入試センター試験は本年度（2020年1月）の実施を最後に廃止され、2020年度からは新形式の「大学入学共通テスト」が実施される。「大学入学共通テスト」では論述式問題が導入される予定であり<sup>1)</sup>、2017年秋には試行調査が行われ、国語、数学で実施された<sup>2,3)</sup>。

論述式試験問題は大学入試における試験問題の形態の1つとして特に国立大学では、既に10年以上前から学部、学科単位では個別に導入されており、採用されている科目等についての調査研究がある<sup>4)</sup>。学部、学科単位での実施は、それぞれ試験問題が異なっており、1つの問題に対する受験者数は多くても $10^3$ 程度と想定される。「大学入学共通テスト」において、国語、数学で実施されれば前者では $10^5$ となり、学部・学科個別での実施とは比べると様々な影響を与えると想定される。

論述式問題は、マークシート方式に代表される選

択式問題などと比較すると、主な相違点として以下が挙げられる。

- (1) 答案に対する正解／不正解が明確に区分困難
  - (2) 機械的な採点が事実上利用できず、人手による採点が必要
- (1)については、教育学、特に教育測定分野での研究があり、様々な観点から問題が指摘されている。(2)については、前述したように問題数×受験者数に応じた採点者を揃える必要があり、これを支援するための教育工学、自然言語処理、機械学習を応用した研究がされつつある。

本研究は、論述式問題について試験形態としての位置づけ・特徴を明確にし、(1)については教育学、心理学、特に教育測定論の研究動向を概観し、(2)については、教育工学、自然言語処理、機械学習の最近の研究動向における主な論点について解説する。さらに、両者の観点からの問題点と解決の方向につ

いて論ずるものである。

## 方法

### 出題形式による試験問題の分類

現在、様々な試験問題形式が採用されている。試験問題の形式全般については、宮本の研究<sup>4)</sup>、論述式問題の特徴については大野木<sup>5)</sup>があり、本節では、これらの研究に基づいて、多面的な観点から分類を試みる。

#### (1) 正解の解答形式の分類

- (a) 客観的試験問題、(b) 主観的試験問題

##### (a) 客観的試験問題

正解が問題作成時に決定され、答案に対して採点者による正誤判断が生じない問題である。客観的問題は、正解の提示の有無により下記の形式がある。

###### (a) 選択式、(b) ○×式、(c) 記入式

(a) はマークシート方式に代表される試験で、受験者は提示されている解答群から正解を選択するという形式で、正解は解答群中に含まれる。(b) はあるテーマについて、複数の説明文が提示され、その内容に対する正誤を判断する問題である。(a)、(b) 共に正解あるいは不正解は提示されるのに対し、(c) は受験者自身が正解と想定される語句(文を構成しない)・数値・記号などを記入する問題であり、穴埋め式と呼ばれる形式もこれに属する。

##### (b) 主観的試験問題

客観的な正解が無く、したがって答案と正解との照合による機械だけによる採点は事実上できない。個々の答案に対して採点者による評価が必要とされ、答案に対する解釈、評価の観点など、採点者により採点結果が異なり得るという懸案が生じる。後述する論述式出題形式はこれに属する。

### 論述式出題形式の分類

論述式出題形式は、解答の記述量および解答への課題・テーマに提示の仕方からさらに分類される。

#### (1) 記述量

記述量について語数または字数の制限があり、その量(長さ)により2つに分類される。

##### (a) 小論文(essay)、(b) 短答式

(a) は英文では200語、日本語文では400字程度の制限が課された文章で記述する問題である。国公立大学の学部／学科で採用されている「論述式」とは呼ばれる問題形式がこれに相当し、通常正解(文)は無いと考えられている。一方、(b) は數十字から長くても200字程度での記述量で、「記述式」とも呼ばれる出題形式である。通常、採点に先立って正解文もしくは模範文が用意される。

両者の本質的な相違は字数というよりも文の数であり、前者は数文以上から構成され、後者は多くても2文程度である。この相違は、後述する論述式出題形式の解答に対する評価(採点)基準に密接に関わる。

#### (2) 課題の提示形式

通常、論述式出題形式では、記述すべき内容に密接に関連する課題が示される。課題の提示形式により、以下に挙げる3種類のカテゴリーがある。

- ・課題小論文、・素材小論文、・データ小論文

「小論文」と記されているが(1)の分類での(a)だけでなく短答式も含まれる。(a)は複数の文(全体で数百字前後の長さ)からなる課題文(prompt, 素材文とも呼ばれる)が、設問に先立って提示される形式である。(b)は課題文を提示せずに、長くても1文あるいは短い語句でテーマ(記述するための素材)が指定される形式である。(c)は文章だけではなく、図や表が提示され、これらに記載されるデータの内容に基づいて論述する形式である。

上述の分類によれば、2017年秋に行われた試行テストの国語の論述式問題2)は、課題小論文であり、その設問の一部が短答式として分類される。

### 論述式出題形式の評価能力

論述式問題により受験者のどのような能力が評価(得点の大小による)できるかという問題である。客観式問題では評価できないあるいは困難であるが、論述式問題が評価可能な能力として以下が挙げられている。

- (a) 表現力、(b) 構成力、
- (c) 読解力、(d) 独創性、
- (e) 知識

(a)、(b) および(d) は受験者が記述した文章に対する評価であり、前節で挙げた他の問題形式では評価不可能な能力であることは自明であろう。(c) は他の問題形式であっても、説明文が(c) が必要とされる長さ(語数、字数)を満たしていれば、当該能力を測定することは可能である。一方、論述式であっても前節で挙げた素材小論文形式では、複数の文から構成される課題文が無いため、(c) を評価することはできない。

上記の評価能力と関連するが、以下に挙げる側面も評価対象として考慮される<sup>6)</sup>。

- ・分析的思考、・批判的思考、
- ・問題発見能力、・問題解決能力

### 論述式出題形式の諸問題

論述式出題形式は、他の試験形式と比較して、教育

測定論上の問題が提起されている。具体的には、以下の3項目がある<sup>7,8)</sup>。

(a) 妥当性、(b) 信頼性、(c) バイアス

以下では、(a)、(b)について採り挙げる。

(a) 妥当性

当該試験問題に対する個々の受験者の採点結果、得点は、出題者の意図した能力の測定という観点から正しく反映しているものかどうか、という問題である。教育測定論では、妥当性をさらに以下の5項目に分類している<sup>8)</sup>。

(1) 内容的妥当性、(2) 基準連関妥当性、

(3) 因子的妥当性、(4) 交差妥当性、

(5) 結果妥当性

以下では、(1)～(3)についてその内容について採り挙げる。

(1) は客観的試験問題では、教科目標を構成する項目に対する設問内容が妥当であるか、言い換えれば不備や偏向が有無という観点から判断可能である。一方、論述式問題の場合には、能力測定の対象が特に前節で挙げた分析的思考など測定対象が抽象的であるため妥当であるかどうか検証が困難である。

(2) は当該試験問題と外部の試験問題の関連について得点データを比較する、具体的には確率統計学的分析をすることで判断される妥当性である。

(3) は、得点データに対し因子分析を適用し、因子すなわち背後にある能力を明らかにすることで判断される妥当性である。

(2) および(3) の観点から、論述式試験問題と他の形式・科目と比較とについて最近の研究としては荒井らの調査研究がある<sup>9)</sup>。この研究では、2つの小論文と大学入試センター試験の8科目を同一被検者(213名)に対して実施し得点データに対して、因子分析を含む統計解析をし、以下の結果を得た。

- ・ 小論文課題と他科目との相関は低く 0.3 度程
  - ・ 因子として小論文、文系／理系科目の 3 因子
- 上記結果により、小論文試験は、他の科目とは異なる能力を測定しており、試験として有用であるという結論を得ている<sup>9)</sup>。

一方、小論文の得点(素点)と分散調整した得点の両者の平均の相違を明らかにするために数値シミュレーションを用いた、阿久津らの研究がある<sup>10)</sup>。結果として素点を用いることにより、得点順位が変わる受験者が非常に多い(90%)ことを明らかにし、小論文試験問題を、大学入学試験に導入することに否定的な見解を示している。

(b) 信頼性

客観的試験／主観的試験問題に対する信頼性につい

ては、教育測定論において、統計学的な指標があるが、前節で述べた各種客観式試験、論述式試験(=主観的試験)において、信頼性についての統計学的指標のためのパラメータが異なる。

客観的試験：受験者数、設問数

論述式試験：受験者数、設問数、採点者数

論述式試験の場合、採点者に関する2つ問題が信頼性を低下させる大きな要因となることが報告されている<sup>9,10)</sup>。この問題は、(a)採点者内相関、(b)採点者間相関という2つの指標で評価される。(b)は答案に対し複数採点者で得点が異なる度合いを示す指標で、(a)は同一採点者の採点結果の一貫性を示す指標である。これら2つの指標に与える要因として、採点者および設問の仕方に関してそれぞれ以下の要因が指摘されている<sup>6,11)</sup>。

採点者：評価の観点、答案に対する解釈

設問：答案記述の字数制限、知識

上記要因は、説明文、設問文と密接に関連し、個々の試験問題個別であるため、詳細には論及されていない。一方、これら2つの指標の値を高める、言い換えれば信頼性を高めるための全般的な方策として以下が提案されている。

(a) 採点者数と(b) 設問数の増加、

(c) 採点のカテゴリー化(例：5段階、7段階)

これらの方策について、一般化可能性理論に基づく宇佐美らの実証的研究は以下の結果を得ている。

・ 採点者数は4名以上では効果が低下する。

・ (a)よりも(b)の方が効果が大きい、

・ (a)に対する(b)の最適な数値

・ 5段階が適切；(離散値による情報損失を抑制)

上記は、試験終了後の実施すべき信頼性向上のための方策であるが、試験開始前の方策として以下が提案されている。

(a) 採点基準の事前作成

(b) 採点基準に関する事前協議

前者は、答案の評価に対する採点者共通の制約を設定するものである。阿久津らの的研究では、採点基準の有無により採点間の相違について有意な差があったと報告している<sup>6)</sup>。

小論文(essay)を試験に課している米国の全国学力調査(NAEP: National Assessment of Educational Progress)では、(b)を実施している。国内において(b)の有無による採点者間相関の実証的研究では、相反する結果が報告されている<sup>10)</sup>。

### 論述式試験支援システム

序論で記した論述試験を支援するシステムの研究は、

米国では Essay Scoring System (ESS) なる名称で、1960 年代から行われている<sup>12)</sup>。米国で開発された ESS の対象とする論述式試験は、前章の分類における小論文 (essay) であり、短答式ではない。すなわち、指定されたテーマを主題とする複数の文から構成されるパラグラフとも捉えられる。

## ESS の構造

ESS は主に 3 つのモジュールから構成される。

(1) 自然言語解析、(2) 特徴解析、(3) 評価予測

(1) で、論述式問題を構成する素材文、設問文、および小論文 (解答) に対し、品詞辞書、統語規則データを用いて形態素解析、構文解析、パラグラフ解析を行い、構成単語、句、文、文間のつながりを同定する。(2) では、(1) の結果に基づき、以下に挙げる特徴を同定する。

語の意味、語の使用、構文構造 (文体)

文間のつながり (段落構造)

この段階で、綴りの誤り、語の使用傾向、文体などが明らかになる。(3) では、(2) の結果をもとにシステムに設定された評価基準に基づき対象小論文の得点を予測する。個々のシステムにより、評価基準、

および得点予測の手法が異なる。(3)において、小論文に使用された用語の妥当性を評価するために、素材文の内容に応じて、百科事典、専門書などから用語 (とその出現頻度データ等) が収集される。得点予測は、(2) において特徴が多変量であることから、(3) では評価手法として心理学で用いられる重回帰分析を使用するシステムが多い。また、(3) の処理においては、人間の採点者との相関を高めるために、過去の大量の採点データが用いられる<sup>12)</sup>。

## 米国の状況

米国では、1990 年代にいわゆるビジネススクール入学試験 GMAT で、小論文が課されており、この採点に初期の実用的な ESS の 1 つである "e-rater" (Electronic Essay Rater) が採点支援ツールとして用いられた。1990 年代に開発された米国の個々の ESS の特性、特に評価手法について詳細な説明が石岡のレビューに解説されている<sup>12)</sup>。

表 1 に米国における現在の主要な ESS とその特徴を掲載する<sup>13)</sup>。表 1 に示されるように、ESS で採用している評価手法の多くは、1990 年代に開発されたシステムで用いられている確率・統計学的手法であ

表 1. 米国で現在運用されている ESS(13) の表 1 で末尾の JESS を削除)

評価システム	開発	評価基準	評価手法	特記事項
AutoScore	American Institutes for Research (AIR)	意味概念／段落間の意味的つながり／語の多様性／文法エラー	統計的手法	採点基準は論題依存
LightSIDE	カーネギーメロン大学	内容／文体／構造／態	教師あり機械学習	オープンソース
Bookette	CTB/McGraw-Hill	構造／文法／意味／技巧	ニューラルネット	90 の特微量
E-raterT	ETS	構造／組織化／内容	重回帰モデル	12 の評価指標
Lexile Writing Analyzer	MetaMetrics	語彙使用の多様性／繰り返し使われる語彙の出現度合／文章としての流畅性の抑制	統計的手法	学年 (grade), ジャンル, 論題, 句読法 (punctuation) によらない
PEG	Measurement Inc.	構造／組織化／形式／技巧／独創性	重回帰モデル	意味理解に着手
IEA	Pearson Education	内容／文体／技巧	潜在的意味解析 (LSI)	論理構成／語の出現順を評価しない
CRASE	Pacific Metrics	アイデア／文章の流畅性／組織化／態／語彙選択／慣習／プレゼンテーションのうまさ	機械学習+統計(ベイズアプローチ)	Java 言語で実装
IntelliMetric	Vantage Learning	一貫性／内容／構成／文章の複雑さ／アメリカ英語への適応	ルール発見	論題ごとに大量のデータが必要

ることがわかる。IEA が採用している LSI（潜在意味索引、Latent Semantic Indexing）は情報検索の古典的検索モデルの 1 つであるベクトルモデルの発展形である。また今世紀に入り開発されたシステムでは機械学習、ニューラルネットが用いられている。

## 日本の状況

米国の ESS と同じく小論文を対象として評価をするシステムとして 2002 年に石岡、亀田によって開発された JESS がその嚆矢として挙げられる<sup>14)</sup>。JESS は採点基準、評価手法共に e-rater に準拠して開発されている。

JESS の開発以後、小規模の ESS の研究開発がされていった。これらの研究は、以下のような運用状況での運用を想定している。

- (a) 少人数の受験者（高校、塾の教室規模）<sup>15)</sup>
- (b) 問題出題者、採点者の支援<sup>16-18)</sup>
- (b) を主眼とした、三重大学のグループの一連の研究は、e-Learning システムの機能の拡張を意図したものである。具体的には、講義の過程において、web 上で教員（出題者かつ採点者）が短答式試験を課し学生が解答し、リアルタイムで解答・模範解答を表示するという利用を想定し開発されている<sup>17)</sup>。このため、問題の提示、素材文、模範文中のキーワード、などについての表示インターフェースに主眼がおかれていている<sup>17)</sup>。さらに、当該システムを実際の講義で使用し、システムとしての短答式試験の評価もされている<sup>18)</sup>。

一方、序論でふれた「大学入学共通テスト」で論述式試験が導入される予定との報告を受けて、米国の ESS の日本語版の開発を指向した研究・開発が現在されつつある。但し、米国版とは異なり、評価対象は小論文ではなく、短答式問題である。

上述の小規模の ESS ではなく、大量の試験結果を対象とした ESS のプロトタイプが石田、亀田らによって開発された<sup>19)</sup>。このシステムは、予測手法として機械学習アルゴリズムの一種のランダムフォレストを用い、理科／社会の 8 間の短答式問題について評価実験を行っている。

寺田らの研究<sup>20)</sup>では、複数の機械学習アルゴリズム、SVM (Support Vector Machine)、CNN (Convolutional Neural Network) 等を評価手法として用い、7 間の短答式問題（解答の平均文字数：約 32 字）に対して実験した結果、87 ~ 98% という高い精度を得ているが、評価は正誤の 2 値である。

上述の 2 つの研究での評価は、それぞれ個別の試験問題に対してであり、また採点法も異なっている。岡山大学の研究グループは、以下の 2 項目について

データ収集を目指して研究している<sup>21-23)</sup>。

- (a) 共通のシステム試験条件
- (b) 汎用的な用語データと重みの計算手法

(a) はシステムの評価で使用される問題、模範解答、答案データはシステム個別で、同一の問題に対してではない。他の研究者が利用できる共通の問題・模範解答・答案データの構築を目指したものである。(b) は、論述式試験が今後多くの科目で導入されると仮定した場合、網羅的な分野の用語データがあることが望ましい。Wikipedia をコーパスとして利用し、問題の分野に応じた計算手法を提案している。

## 討論

前章で述べたように、米国では小論文、日本では今後短答式である。論述式試験形式の諸問題で引用した実証的研究で対象とされた出題形式も小論文であり、短答式形式に対する教育測定論分野での研究が期待される。

## 教育測定論的アプローチの限界

前章の論述式出題形式の諸問題で取り上げた問題、特に信頼性の問題および、信頼性向上のための方策は、短答式に対しても適用可能であるが、試験問題作成後に対するものである。

論述式試験問題は、以下の 3 種類の文から構成される。

- (1) 課題文、(2) 設問文、(3) 模範文

(2) は解答文についての記述内容を指示するが、指示の仕方によって、解答文の内容は変更しうる。この側面からの研究としては安永らの研究<sup>24)</sup>があるのみであり、言語表現の観点からの上記の 3 つの関係についての研究が必要とされる。

## 評価基準の問題

小論文は複数の文から構成されるため、構造的な特性、個々の文の妥当性などの観点からの評価が必須で複数の基準から評価される。表 1 に挙げる評価基準はこのことを示している。一方、事実上 1 文だけからなる短答式問題は、これらの評価基準のほとんどが適用できない。短答式問題の主要な評価基準は、以下とされる。

### 正解文（模範文）と解答文の意味的同義性

短答式問題に対し、上記基準に基づく多くの実証的な研究が必要される。

## 謝辞

本研究は研究課題 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成に対する「記述式解答の自動採点

に向けた日本語文解析手法と採点方式の研究」(RIIS 201802) を受けて行った。記して感謝する。

## 文献

- 1) 大学入試センター (2017) 大学入学共通テスト実施に向けた検討状況。  
[[http://www.dnc.ac.jp/daigakunyugakukibousya-gakuryokuhyoka\\_test/progress.html](http://www.dnc.ac.jp/daigakunyugakukibousya-gakuryokuhyoka_test/progress.html)].
- 2) 大学入試センター (2017) 大学入学共通テスト・平成 29 年度試行調査・問題、正解表、解答用紙等。  
[[http://www.dnc.ac.jp/daigakunyugakukibousya-gakuryokuhyoka\\_test/pre-test\\_h29\\_01.html](http://www.dnc.ac.jp/daigakunyugakukibousya-gakuryokuhyoka_test/pre-test_h29_01.html)].
- 3) 平成 29 年度試行調査。大学入試センター (2017) [[https://www.dnc.ac.jp/sp/daigakunyugakukibousya-gakuryokuhyoka\\_test/pre-test\\_h29.html](https://www.dnc.ac.jp/sp/daigakunyugakukibousya-gakuryokuhyoka_test/pre-test_h29.html)].
- 4) 宮本友弘、倉元直樹 (2017) 国立大学における個別学力試験の解答形式の分類。日本テスト学会誌 **13**: 69-84.
- 5) 大野木裕明 (1994) テストの心理学。ナカニシヤ出版.
- 6) 阿久津洋巳、菊池 梢、鈴木安澄、鈴木 光、渡邊愛枝 (2006) 論述式テストの研究(1)－採点者間の一一致度－。岩手大学教育学部付属教育実施総合センター研究紀要 **5**: 115-122.
- 7) 宇佐美慧 (2012) 論述式テストを通した評価と選抜の信頼性に関する諸要因の影響力についての定量的比較検討。日本教育工学会論文誌 **36**: 451-464.
- 8) 宇佐美慧 (2012) 論述式テストの運用における測定論的問題とその対処。日本テスト学会誌 **9**: 145-164.
- 9) 荒井清佳、石岡恒憲、宮埜壽夫 (2013) 大学入学者選抜における小論文試験と教科・科目試験との関連について。日本テスト学会誌 **9**: 27-36.
- 10) 阿久津洋巳 (2017) 論述式テストの研究(2): 小論文採点の集計法。岩手大学教育学部付属教育実施総合センター研究紀要 **16**: 61-70.
- 11) 平井洋子、渡邊 洋 (1994) 小論文評点のカテゴリ化に関する測定論的考察。計量行動学 **21**: 21-31.
- 12) 石岡恒憲 (2016) 記述式テストにおける自動採点システムの最新動向。行動計量学 **31**: 67-87.
- 13) 石岡恒憲 (2016) コンピュータ上で実施する記述式試験—エッセイタイプ、短答式、マルチメディア利用について—。電子情報通信学会誌 **99**: 1005-1011.
- 14) 石岡恒憲、亀田雅之 (2002) コンピュータによる日本語小論文の自動採点システム、電子情報通信学会技術研究報告 No.TL2002-40: 43-48.
- 15) 篠田有史、中山弘隆、松本茂樹 (2007) 文の構造を利用した記述式問題の自動採点。コンピュータ&エデュケーション **22**: 41-44.
- 16) 高瀬治彦、川中普晴、鶴岡信治、森田直樹 (2013) 記述式小テストの解答群の分析手法—解答群からのキーワード自動抽出—。コンピュータ&エデュケーション **22**: 46-49.
- 17) 大庭知也 (2014) 記述式小テスト支援システム - キーワードの用いられ方の可視化。PC Conference: 54-57
- 18) 大庭知也 (2015) 多人数クラスにおける記述式小テストを支援するシステム—学生の理解状況をすばやく把握するためのインターフェイスー。コンピュータ&エデュケーション **39**: 86-91.
- 19) 石岡恒憲、亀田雅之、劉東 岳 (2016) 人工知能を利用した短答式記述採点支援システムの開発。電子情報通信学会技術研究報告。NLC, 言語理解とコミュニケーション. pp.87-92.
- 20) 寺田凜太郎、久保顕大、柴田知秀、黒橋禎夫、大久保智哉 (2016) ニューラルネットワークを用いた記述式問題の自動採点。第 22 回言語処理学会年次大会発表論文集. pp. 370-373.
- 21) 泉仁宏太、竹内孔一、大野雅幸、田口雅弘、稻田佳彦、飯塚誠也、阿保達彦、上田 均 (2017) 小論文採点支援のための関連文書取得法の考察。電子情報通信学会技術研究報告。NLC, 言語理解とコミュニケーション. pp.47-51.
- 22) 竹内孔一、大野雅幸、泉仁宏太、田口雅弘、稻田佳彦、飯塚誠也、阿保達彦、上田 均 (2017) 小論文の自動採点に向けたオープンな基本データの構築および現段階での自動採点手法の評価。言語処理学会第 23 回年次大会発表論文集. pp.839-842.
- 23) 大野雅幸 (2018) 小論文自動採点データ構築と理解力および妥当性評価手法の構築。言語処理学会第 24 回発表論文集. pp.368-371.
- 24) 安永和央、石井秀宗 (2011) 国語読解テストにおける設問文中の単語の難しさが能力評価に及ぼす影響—具体例を回答させる設問の検討。名古屋大学大学院教育発達科学研究科紀要 (心理発達科学). **58**: 105-112.

■原 著 ■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 拡張ビオローゲンの還元で生じるラジカルに関する ESR 分光研究

中川優香<sup>1</sup> 鈴木健太郎<sup>1, 2</sup> 菅原 正<sup>1, 2</sup> 平野弘樹<sup>1</sup> 高橋広奈<sup>2, 3</sup> 河合明雄<sup>1, 2, 4</sup>

Electron Spin Resonance Spectroscopy on Expanded Viologen  
Based Free Radicals Created by a Reduction Reaction

Yuka Nakagawa<sup>1</sup>, Kentaro Suzuki<sup>1, 2</sup>, Tadashi Sugawara<sup>1, 2</sup>,  
Hiroki Hirano<sup>1</sup>, Hirona Takahashi<sup>2, 3</sup> and Akio Kawai<sup>1, 2, 4</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University of Science, Kita-ku, Okayama City, Okayama 700-0005, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: akawai@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Electronic state properties of one-electron reduced expanded viologen compounds were investigated to develop organic molecular wires with high electro-conductivity, which are useful for constructing nano-scale electronic devices. To identify better materials than the well-studied dimethyl viologen, a prototype molecular wire component, expanded viologen compounds with internal phenyl or biphenyl groups were newly focused on. To understand the electrochemical stability of the expanded viologens, their one-electron reduced species, which are cation radicals of the expanded viologens, were studied by ESR spectroscopy and quantum chemical calculation. The optimized one-electron-reduced cation radical shows a nearly planar structure of a benzene and two pyridine rings. Calculated hyperfine coupling constants indicate that  $\pi$ -electrons are expanded over the three rings. Zn-reduced expanded phenyl viologen solution shows a green color and its absorption spectrum gives a clear electronic band appearing in the visible wavelength region. This visible absorption band was attributed to the electronic transition of the singly occupied electron in the free radical of the one-electron-reduced expanded phenyl viologen. This assignment was confirmed by ESR measurements of the solution yielding a partially broadened spectrum. The hyperfine structure of the spectrum was examined on the basis of quantum chemical calculation results.

**Keywords:** expanded viologen, one-electron reduction, free radical, ESR, molecular wire

### 序論

電子受容性化合物として知られビオローゲンは、電気伝導システムをナノサイズで構築することを目指したナノテクノロジーで用いる電導物質として期待されている。とくに、金ナノ粒子間の電気伝導を担う有機分子ワイヤーとしての利用に興味がもたれ、ビオローゲン型ネットワークの還元によりネットワークのコンダクタンスが増大することが見出されている<sup>1-3)</sup>。このような分子ワイヤーでは、電気伝導の際に分子中に電子が流れるため、過渡的に 1 電子

還元ラジカルが生じることになる。このラジカルの反応性が高いと、化学的に安定なワイヤーを構築しにくい。ビオローゲンは、電子受容しやすい点が優れているが、生じるラジカルが不安定であることが問題となっている。

一方、ビオローゲンに芳香環を導入して  $\pi$  共役が拡張したビオローゲン（拡張ビオローゲン）は、1 電子還元ラジカルが安定になる可能性があり、分子ワイヤーに用いる代替物質として期待されている。

本共同研究では、いくつかの拡張ビオローゲンについて合成を行い、拡張ビオローゲンから生じる1電子還元ラジカルについて、吸収スペクトルやESRスペクトル測定、および量子化学計算による電子状態の評価を行った。その解析結果に基づいて、電子状態の理解やラジカル安定性に関する議論を行った。これらの成果をもとに、優れた電子受容能をもち、かつ安定なラジカルを生じる拡張ビオローゲンの開発を目指す。

## 材料と方法

### 拡張ビオローゲンの合成

ビオローゲンは、4,4'-ビピリジン骨格を持つため、各ピリジニウム環に由来した二段階の酸化還元反応が起こる化合物である。ビオローゲンの一電子還元体であるラジカルカチオン体は、電界還元などの方法により得ることが一般的であるが、ビオローゲンに関しては、ジカチオン体とキノジイミン体を混合させ、ラジカルカチオン体を得るComproportionation反応（均化反応）も知られている<sup>4)</sup>。これは以下の図1に示したスキームで表される反応である。



図1. 均化反応によるラジカル2分子生成。

この反応をビオローゲンに対して用いる場合、ひとつ問題点がある。この反応では、ビオローゲンの二電子還元体であるキノジイミン体を用いるが、この合成は容易ではない。一方で、ビオローゲン骨格内部に芳香環を導入し、ビオローゲン骨格内部のπ共役を拡張した化合物の場合は、ビオローゲン骨格が安定化することで、キノジイミン体の生成が容易になると考えた。そこで本研究では、安定なキノジイミン体を生じる拡張ビオローゲンを見出すため、4,4'-ビピリジル骨格の2つのピリジル間にベンゼン環やビフェニル環を導入した内部拡張フェニルビオローゲン化合物を合成した。以下にその詳細を述べる。

はじめに1,4-ジ(4-ピリジル)ベンゼンとプロモアルカンをDMF中で反応させ、ビオローゲンの臭化物塩を合成した。アルキル基としては、n-メチル、n-プロピルおよびn-オクチルを用いた。これらに対し、対イオンをヘキサフルオロリン酸塩に交換し、有機溶媒への溶解度を向上させた。反応スキームを以下の図2に記す。

同様の合成は、ベンゼン環の代わりにビフェニル環を用いた場合についても行った。これにより、合わせて6種類の内部拡張フェニルビオローゲン化合物を合成した。

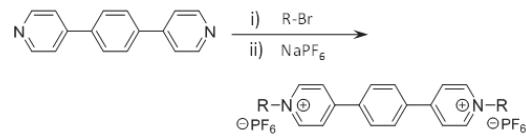


図2. 内部拡張フェニルビオローゲンの合成スキーム。

## 結果と討論

### 拡張ビオローゲンからのラジカル生成

ベンゼン環あるいはビフェニル環を導入した内部拡張フェニルビオローゲンが得られたので、これらを還元することでラジカル生成を試みた。本研究では、Znを用いた比較的簡便な還元法により、溶液中でラジカル生成を行った。反応機構の詳細は明らかではないが、N-オクチルの場合について、以下に想定した反応スキーム（図3）を記す。

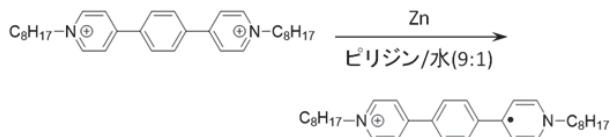


図3. 亜鉛による拡張フェニルビオローゲンの1電子還元とラジカル生成。

この還元法では内部拡張フェニルビオローゲンの溶解度が比較的高いピリジン/水(9:1)の混合溶媒を用いた。このN-オクチル内部拡張フェニルビオローゲン（図3参照）の溶液にAr雰囲気下で亜鉛を加えたところ、溶液が無色から紫色へ変化した。この溶液の紫外可視吸収スペクトルを図4に示す。

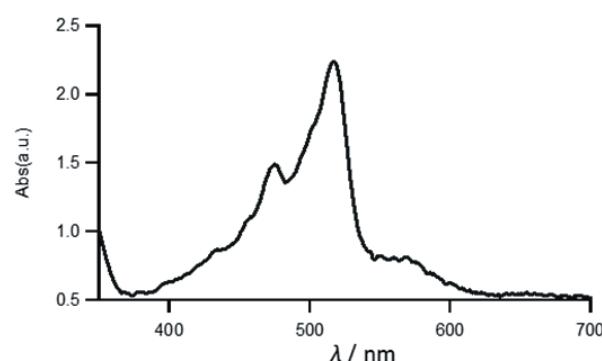


図4. ピリジン/水(9:1)混合溶媒中のN-オクチル内部拡張フェニルビオローゲンに対する亜鉛添加で得られた溶液の吸収スペクトル。

反応前のN-オクチル内部拡張フェニルビオローゲンは、紫外線波長領域から高エネルギー側にしか光吸収がない。従って、この緑色を示す化学種は1電子還元を受けたラジカルすなわち、N-オクチル内部拡張フェニルビオローゲンカチオンラジカルである可能性が高い。この溶液の緑色呈色は、Ar置換し

た溶液中であれば一日以上消えないため、安定なラジカルであることが示唆される。

この反応では、亜鉛を加えて数時間後に、亜鉛表面に青色結晶が析出した。この生成物はキノジイミン体と考えられ、1電子還元されたラジカルは、*N*-オクチル内部拡張フェニルビオローゲンおよびそのキノジイミン体との均化反応（図1）で起こることが示唆される。詳細については、青色結晶の分析が必要である。

### 拡張ビオローゲンラジカルの電子状態

内部拡張フェニルビオローゲンカチオンラジカルの電子状態に関する知見を得るために、最も単純な分子として*N*-メチル内部拡張フェニルビオローゲンについて密度汎関数法による量子化学計算を行なった。図5は、計算ソフト Gaussian 2016 を用い B3LYP/631Gd の理論レベルで構造最適化計算を行なった結果で、*N*-メチル内部拡張フェニルビオローゲンカチオンラジカルの構造を示す。この計算結果によれば、2つのピリジン環と1つのベンゼン環は、ほぼ同一平面上にあるが、わずかに 10.5° 程度互いにねじれた構造をとっていることが分かった。一方、ラジカル前駆体である*N*-メチル内部拡張フェニルビオローゲンについても、同様の量子化学計算を行なった。これによれば、3つの環は同一平面上にある構造が最適化構造で、ラジカル前駆体では  $\pi$  共役性が若干高いことが示唆される。

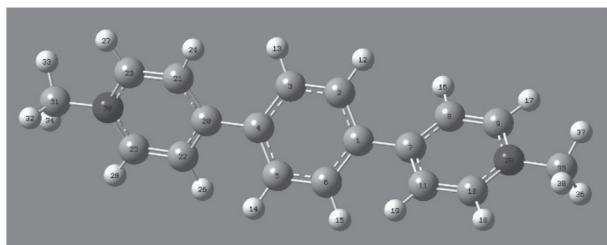


図5. 量子化学計算 (B3LYP/631Gd 理論レベル) で得られた*N*-オクチル内部拡張フェニルビオローゲンカチオンラジカルの最適化構造。

本研究では、Zn による還元でラジカルが生じることを示すため、生成物の ESR 計測を行う。そのため、量子化学計算で得られた最適化構造のラジカルが示す超微細構造定数を、表1にまとめた。

表1をみると、3つの環のプロトンが示す超微細構造定数は、-0.62、-0.89、-1.75 Gauss と、-1 Gauss 程度であることがわかる。McConnell の式によれば、ベンゼン環やピリジン環の水素の超微細構造定数は、各水素の結合している炭素原子が示すスピニ密度に比例する。従って、3つの環の超微細構

表1. 量子化学計算で得られた*N*-メチル拡張フェニルビオローゲンの超微細構造定数

原子数、原子	超微細構造定数 / Gauss
Phenyl 4、H	-0.89
Pyridine 4、H 4、H 2、N	-0.62
	-1.75
	2.80
Methyl 2、H 4、H	5.88
	1.54

造定数が -1 Gauss 程度と同じような値であったことから、ラジカルにおける不対電子は、3つの芳香環に広がっていると解釈できる。このような  $\pi$  電子が非局在化した電子状態を持つことから、内部拡張フェニルビオローゲンカチオンラジカルは化学的な安定性が高いと期待できる。実際、亜鉛による還元反応で生じた緑色を呈する生成物は1日以上の長い寿命を示したため、量子化学計算で示された非局在化した電子状態の描像と合致する。

### 拡張ビオローゲンラジカルの ESR 分光

最後に、亜鉛による還元で得られた生成物の溶液に対し、ESR 測定を行った。この実験では、生じるであろうラジカルの ESR スペクトルがなるべく単純になるように、*N*-アルキル置換基をメチルとした*N*-メチル内部拡張フェニルビオローゲンを試料とした。この分子を Ar 霧囲気下でピリジン / 水 (9:1) の混合溶媒に溶解させ、ESR 計測用の試料管内で Zn を添加することでラジカル生成させた。試料管は密閉した状態とし、酸素の混入を防いだ。この条件下では、ラジカルは1日以上の寿命があり、室温で通常の ESR 測定が可能であった。

図6に、観測された ESR スペクトル、および量子化学計算からシミュレーションした*N*-メチル内部拡張フェニルビオローゲンカチオンラジカルの ESR スペクトルを示した。後者では、スペクトル形状を実測に近づけるため、線幅を 0.22 Gauss としている。観測されたスペクトルは超微細構造線が明瞭には分離しておらず、全体的にブロードニングを起こしている。量子化学計算で得られた超微細構造定数によれば、ESR スペクトルはおよそ 30 Gauss に渡って現れることになるが、実測では 20 Gauss 程度にしか広がっていない。この原因として、ラジカル分子の動的な過程が関わっていると考えられる。1つは、未反応の内部拡張フェニルビオローゲンがラジカル

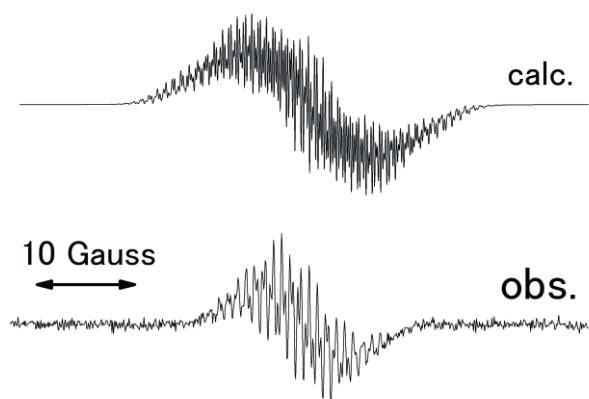


図 6. N-メチル内部拡張フェニルビオローゲンカチオンラジカルの ESR スペクトル。(上) 量子化学計算で得た最適化構造が示す超微細構造定数に基づくシミュレーション、(下) ピリジン / 水 (9:1) 混合溶媒中の 298 K における実測スペクトル。

との間で以下の図 7 のスキームで表される電子移動反応を起こすことに起因する。このような現象では、不対電子の感じる核スピン状態が電子移動速度と同じ速度で変化し、超微細構造が不明瞭になるスペクトル先鋭化が起こる可能性がある<sup>5)</sup>。しかしながら、この機構では実測のような超微細構造が部分的に残ることを説明できない。もう 1 つの可能性は、3 つの芳香環の間のねじれ振動で、いくつかの超微細構造線が線幅交代とよばれるブロードニングを起こすことである<sup>6)</sup>。量子化学計算で得られた 3 つの環のねじれ角はおよそ 10° であり、室温の熱運動でねじれ角のことなる配座異性体の間を相互変換することが十分考えられる。実測のスペクトルには、これら 2 つの動的な過程に依存したスペクトル形状のひずみが現れているものと推察される。これらの動的過程の影響は、試料濃度および観測温度を下げることで回避できると考えられ、今後の詳細な研究により、超微細構造定数の決定が可能と考えている。



図 7. 内部拡張フェニルビオローゲン間の不対電子移動過程。

## おわりに

今回の研究では、N-メチル内部拡張フェニルビオローゲンの 1 電子還元でカチオンラジカルが生じることを、可視部の吸収スペクトルや ESR 信号から実証し、さらにはカチオンラジカルの寿命が脱酸素条件下の室温溶液中で 1 日以上あることを示した。このことは、N-メチル内部拡張フェニルビオローゲンの 1 電子還元ラジカルが化学的に安定であることを示唆する。本研究の目的は内部拡張フェニルビオローゲンを分子ワイヤーとして用いる際に必要な電子状態や安定性に関する知見を得ることであった。その観点からすると、電気伝導過程で生じる可能性のあるカチオンラジカルが比較的安定であることは、内部拡張フェニルビオローゲンの新しい分子ワイヤ素材としての可能性が高いことを示したと考えている。

## 謝辞

本研究は、2018 年度総合理学研究所の共同研究助成 (RIIS201803) によって行なわれた。

## 文献

- 1) Taniguchi M, Tsutsui M, Mogi R, Sugawara T, Yoshizawa T and Kawai T (2011) Giant single-molecule conductance response to frontier molecular orbital phase differences. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 11426-11428.
- 2) Sugawara T, Minamoto M, Matsushita MM, Nickels P and Komiyama S (2008) Cotunneling current affected by spin-polarized wire molecules in networked gold nanoparticles. *Phys. Rev. B* **77**: 235316-235323.
- 3) Nickels P, Matsushita MM, Minamoto M, Komiyama S and Sugawara T (2008) Controlling co-tunneling currents in nanoparticle networks using spin-polarized wire molecules. *Small* **4**: 471-475.
- 4) Monk PMS (1998) *The Viologens*. John Wiley & Sons, Chichester.
- 5) Grampp G, Kattnig D and Mladenova D (2006) ESR-spectroscopy in ionic liquids: Dynamic linebroadening effects caused by electron exchange reactions within the methylviologene redox couple. *Spectrochimica Acta Part A* **63**: 821-825.
- 6) Atherton NM (1993) *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood Limited, Chichester.

■原 著 ■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 紫外線照射下におけるケージドオレイン酸油滴封入ベシクルの 巨視的運動

鈴木健太郎<sup>1,2</sup> 村山栄貴<sup>1</sup> 中山直之<sup>1</sup> 菅原 正<sup>1</sup> 山口和夫<sup>1</sup>

Macroscopic Motion of Giant Vesicle Containing Oil-Droplets Composed  
of Caged Oleic Acid Under UV Irradiation

Kentaro Suzuki<sup>1,2</sup>, Hiroki Murayama<sup>1</sup>, Naoyuki Nakayama<sup>1</sup>,  
Tadashi Sugawara<sup>1</sup> and Kazuo Yamaguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzukken@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** For constructing a self-propelled giant vesicle (GV) containing a driving source inside, a phospholipid GV encapsulating oil-droplets composed of caged oleic acid, 2-nitrobenzyl oleate (NBO), was prepared by centrifugal precipitation. Encapsulation of several numbers of the NBO droplets in a unilamellar GV was confirmed under phase-contrast and fluorescence microscopy. Major dynamics of the GVs containing NBO droplets under UV irradiation were a self-propelled motion (76%,  $N = 84$ ), and the migration direction was independent of the position of the UV light source, unlike in the free NBO droplet. The appearance of the photo-triggered rupture of the GV containing a large number of NBO droplets suggested that the origin of the motion was anisotropic modulation of the surface tension of the vesicular membrane caused by dissolving the photo-generated oleic acid from the NBO droplet.

**Keywords:** self-propelled motion, giant vesicle, caged compound, oil-droplet

### 序論

「動き」は、生命現象を特徴付ける重要なダイナミクスである<sup>1)</sup>。たとえば、ボルボックスやミドリムシのような光合成を行う水生微生物は、日差しの強い環境に自ら移動することで、生育に有利な状況を自ら作り出す<sup>2)</sup>。また、植物にもみられる小胞輸送では、単純拡散では実現困難な能動的物質輸送を細胞内で実現する<sup>3)</sup>。そこで生物を参考に、自ら動きを示す人工の分子システムを実現することができれば、生命現象を支える物理現象の理解が深まるだけでなく、従来の物質科学にはない新しい方法論に基づく物質輸送システムの構築につながり興味深い。

そのような観点から我々は、化学反応を起こす分子からなる油滴が自らつくり出す「動き」に関する研究を進めてきた<sup>4-6)</sup>。例えば、オレイン酸無水物を主成分とする油滴では、油滴表面で起こる加水分解反応により生じたオレイン酸が、油滴表面に表面張力勾配を作り出し、これが方向性ある運動を引き起

す<sup>5)</sup>。また、紫外線照射下でのみ化学反応を行うケージドオレイン酸（図1a）を油滴構成分子として利用することで、紫外線照射による動きの開始/停止の制御だけでなく、その運動方向も制御できることが確認された（走光性ダイナミクス）<sup>6)</sup>（図1b）。

生物が作り出す動きは、一般に分子モーターのような運動器官が作り出しており<sup>3)</sup>、言い換えれば、運動器官がその身体全体を動かし、さらには、他者を動かすこともできる。それに対して既存の自走性油滴系では、油滴全体が動きを作り出し、さらにその動きは自分自身を動かすことのみに使われる<sup>7)</sup>。もし、生物と同じように、駆動源が動きを作り出す自己駆動系が実現されれば、幅広く動きを利用可能な新しい分子システムの実現へと繋がる。

そこで本研究では、光照射下の分解反応によってオレイン酸を生じるケージドオレイン酸からなる油滴を、駆動性のない標準的なリン脂質からなるジャ

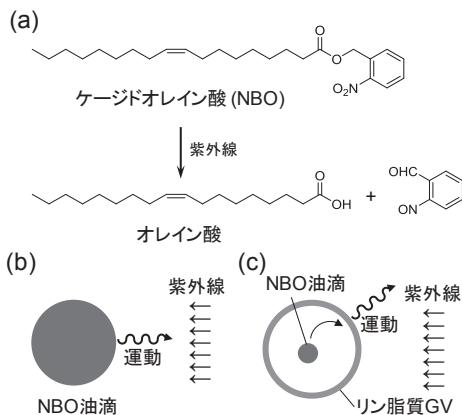


図1. (a) 紫外線照射下でオレイン酸を生ずるケージドオレイン酸 NBO. (b) NBO 油滴の紫外線照射下での走光性. (c) 封入した NBO 油滴によるベシクルの駆動.

イアントベシクルの内水相に封入し、内封油滴を駆動源する自己駆動ベシクルの実現を目指した(図1c)。先に示したように、ケージドオレイン酸油滴単独では、照射された紫外線の方向に自走する走光性ダイナミクスを示す<sup>⑥</sup>が、それと同時に、光分解生成物であるオレイン酸が油滴周辺に溶出する。このオレイン酸が、油滴を封入しているジャイアントベシクルの膜状態を変調することで、ベシクル全体の動きが生み出される可能性がある。

## 材料と方法

### 試薬

ベシクル内部に封入する光応答性油滴の構成分子であるケージドオレイン酸 NBO (オレイン酸 2-ニトロベンジル) は、すでに報告した方法<sup>⑥</sup>により合成したものを用いた。蛍光染色用のクロロフィルは、緑色植物抽出物 (C0870, 東京化成株式会社) より、クロロホルム抽出したものを用いた。その他の試薬おおび溶媒は市販のものをそのまま利用した。

### 遠心沈降法による油滴封入ベシクルの調製

ケージドオレイン酸油滴が封入されたジャイアントベシクルの調製は、すでに報告している遠心沈降法<sup>⑧</sup>を利用した二重ベシクル (内部に小ベシクルが封入されたジャイアントベシクル) 調製法<sup>⑨</sup>を参考に行った。オレイン酸 (2 wt%) と抽出クロロフィル (1 wt%) を含む油状の NBO 1  $\mu$ L を、1 mL のホウ酸塩 pH 標準液 (JIS 規格, pH 9.2) に加え、緩やかに震盪することで、粒径数  $\mu$ m から数 10  $\mu$ m の NBO 油滴を含む、o/w エマルションを調製した。この o/w エマルション 100  $\mu$ L を、4:1:1 のモル比の 1-パルミトイール-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC), 1-パルミトイール-2-オレオイル-sn-グリセロ

-3-ホスホグリセロール Na 塩 (POPG)、およびコレステロールを完全に溶解させた流動パラフィン (総濃度 1 mM) 1 mL に加え震盪することで、NBO 油滴封入水滴を流動パラフィン中に分散させた o/w/o エマルションを調製した。この o/w/o エマルション 300  $\mu$ L を、容量 1.5 mL のエッペンドルフチューブ中に入れたホウ酸塩 pH 標準液 (600  $\mu$ L) 上に浮かべ、マイクロ遠心機 (1-16, sigma) を用いて約 20,000 g の遠心加速度を 15 分間印加し、下層の緩衝液中に、油滴封入ジャイアントベシクルを形成させた。

### 油滴封入ベシクルへの紫外線照射とその観察

油滴封入ジャイアントベシクルの紫外線照射下におけるダイナミクスの観察は、すでに報告している論文の観察システム<sup>⑩</sup>を用いた。調製した油滴封入ベシクル分散液を、内容量 26  $\mu$ L のチャンバーに封入した。これを、倒立型位相差顕微鏡 (IX70, オリンパス) のステージ上に置き、試料側方から LED 型単色 UV 光源 (OminiCure LS405S, U-VIX) を用いて、波長  $365 \pm 5$  nm の単色紫外線 (油滴位置での照度 30 mW cm<sup>-2</sup>) を照射した場合の挙動を、顕微鏡に搭載された CCD カメラユニット (AdvanCam LP2, Advision) を用いて撮影し、動画および静止画としてコンピュータ上に記録した。得られた画像データの解析は、主に Power Point(Microsoft) 上で行った。

## 結果と討論

### NBO油滴封入ジャイアントベシクルの調製

位相差顕微鏡観察により、粒径数  $\mu$ m の油滴が複数個封入された、粒径数 10  $\mu$ m のジャイアントベシクルが形成されたことが確認された(図2 a, c)。遠心沈降法で形成されたジャイアントベシクルは、その原理上、ユニラメラベシクル (一層の脂質二分子膜からなるベシクル) ができやすいことが知られている<sup>⑩</sup>。観察されたベシクル膜に関するコントラストが小さいことは、今回形成されたベシクルが、ユニラメラベシクルかそれに近い薄い膜からなる膜構造を持つことを示唆する。一方で、内水相に封入された油滴は、ベシクル調製時に用いる流動パラフィン由来のものである可能性も考えられ、位相差顕微鏡による観察だけからでは、目的通り NBO 油滴が封入されているかを判断できない。そこで、NBO 油滴を調整する際、NBO の光分解反応に適した波長 365 nm 付近の紫外線に対する吸光係数が小さいクロロフィルで染色することで、NBO 油滴とそれ以外の油滴とを区別できるようにした(図2 b, d)。蛍光顕微鏡により観察を行ったところ、ベシクルに封入された油滴は、蛍光性のものとそうでないものとが

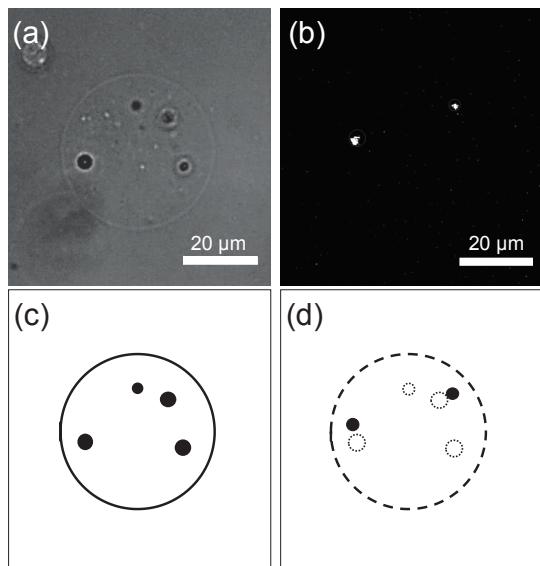


図 2. (上段) NBO 油滴封入ジャイアントベシクルの位相差顕微鏡像(a)および、油滴を染色した蛍光色素に基づく蛍光顕微鏡像(b). (下段) 各顕微鏡像における観察物を示す模式図(c)(d). なお、図 d 中の破線で示された円形は、位相差顕微鏡で観察されたベシクルおよび油滴の位置を示す. 位相差顕微鏡と蛍光顕微鏡での観察の間にはタイムラグがあるため、ブラウン運動の影響により、同一油滴であっても両測定間に若干の位置のずれが生じる.

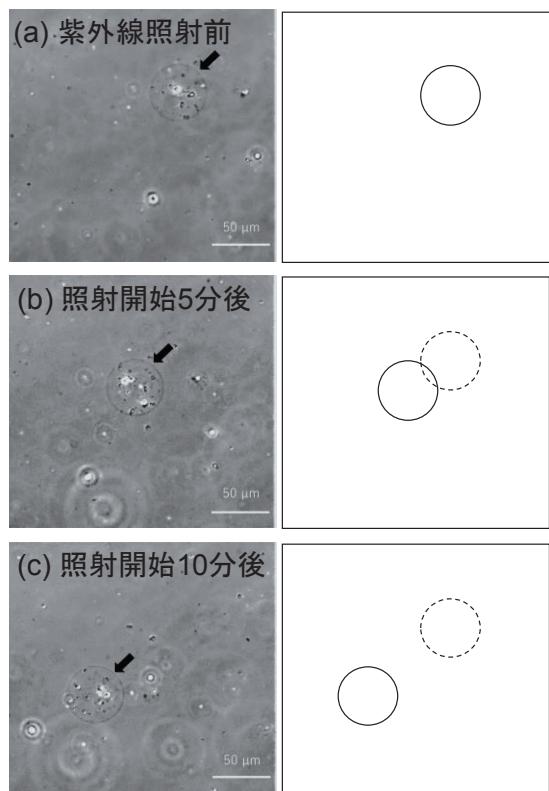


図 3. 紫外線照射下における、NBO 油滴封入ジャイアントベシクルの位相差顕微鏡像(左)、および、その画像中のベシクル位置を示した図(右). (a) 紫外線照射前、(b) 紫外線照射 5 分後、(c) 紫外線照射 10 分後. 図 b および c の右図中に示される破線で示される円形は、初期のベシクル位置を示す. なお紫外線は、紙面右上方向より照射した.

混在することが明らかとなり、これらのうち前者は NBO 油滴であり、後者は流動パラフィン油滴であると考えられる。従って、本方法により、目的とする NBO 油滴が封入されたジャイアントベシクルが形成されたことが確認された。

### NBO 油滴封入ジャイアントベシクルの紫外線照射下のダイナミクス

蛍光顕微鏡観察により、NBO 油滴の封入が確認されたジャイアントベシクルに対し、観測視野側方からの紫外線照射を行った際の巨視的な変化を、位相差顕微鏡により観察した(図 3)。観測した 84 個の NBO 油滴封入ジャイアントベシクルのうち、64 個(76%) については、10 分程度の紫外線照射に対して、初期位置からの移動が確認された。なお、アイシュタイン・ストークスの関係式より、数  $10 \mu\text{m}$  以上の大きさのベシクルに対するブラウン運動はベシクル全体を動かすほど大きくないと見積もられることから、この光照射下にみられる動きは、ブラウン運動とは区別され、内部に封入された油滴による影響であると考えられる。実際に、NBO 油滴を含まないベシクルに紫外線照射しても、運動性はみられない。ベシクルの移動速度は、サンプルごとのばらつきが見られるものの、概ね数  $\mu\text{m min}^{-1}$  程度であった。ベシクルの運動には直線性がみられるが、その方向は試料によって完全にランダムであり、この点は、紫外線に対する走光性がみられる単独の NBO 油滴場合とは異なる。

### NBO 油滴から生成されたオレイン酸のベシクル膜への影響

光反応によって、ベシクル内部で油滴より生成したオレイン酸が、ベシクル膜へと与える影響を確認するために、通常の約 10 倍量の NBO 油滴が封入されたジャイアントベシクルを別途調製し、このベシクルに、他と同様の紫外線(波長 365 nm, 照度  $30 \text{ mW cm}^{-2}$ ) を 10 分間照射したところ、ベシクルが崩壊するダイナミクスが観察された。崩壊時間に幅はあるものの、十分量の油滴が封入されたベシクルで、このダイナミクスは再現性よく観察された。

オレイン酸 / オレイン酸ナトリウムは数 mM の臨界ミセル濃度 (cmc) を有することから<sup>10)</sup>、光照射により NBO 油滴上に生じたオレイン酸の一部は、単分散分子あるいはミセルのかたちでベシクル内水相に溶出できるものと考えられる。弱塩基条件で洗剤としても利用されるオレイン酸は、リン脂質からなる脂質二分子膜に不安定化をもたらすことはよく知られており、この崩壊は、内水相を介したオレイ

ン酸によるものと解釈される。

光分解反応で生成したオレイン酸がベシクル膜へと与える影響を考慮して、比較的少数のNBO油滴が封入した際にジャイアントベシクルが見せる駆動の発現機構を、以下のように推測した。光分解反応により生じたオレイン酸は、内水相を介して脂質二分子膜の内膜（インナーリーフレット）に達すると、膜内で分子が反転するフリップフロップ機構<sup>11)</sup>によって、内膜から外膜（アウターリーフレット）へとオレイン酸が移動する。一般的なリン脂質の場合、フリップフロップの速度は数日の時定数を持つことが知られているが<sup>12)</sup>、オレイン酸の場合は、酸解離平衡により界面活性のあるオレートの状態と疎水性のオレイン酸状態をとることができるので、速やかなフリップフロップが可能であると考えられる。外膜に達したオレイン酸は、ベシクル外側の表面張力を低下させるが、このとき、ベシクル中の油滴の位置の中心からの偏りなどにより、表面のオレイン酸濃度に不均一性が生じれば、他の自己駆動系同様にマランゴニ効果<sup>5, 6, 13)</sup>による駆動が生じうると考えられる。

## 結論

本研究において、光照射下で化学反応を行うことができる油滴を駆動源として用いることで、動きを持たないジャイアントベシクルを駆動させる新しい自己駆動系の構築が実現しうることを示した。その駆動の原因は、光反応により生成したオレイン酸が、ベシクル内水相を介してベシクル膜に達し、これによって生じた表面張力の偏りに関連付けられる。今後は、ダイナミクス中での、ベシクル内外の水の動きや分子移動などを明確にする実験を行い、より詳細な機構の解明を目指すとともに、本系を利用して物質輸送系の構築を行いたい。

## 謝辞

本研究は、JSPS科研費JP16K05759および、研究課題「内部での化学反応を利用して動くベシクルの構築」に対する2018年度神奈川大学総合理学研究所

共同研究助成の助成金(RIIS201804)を受けて行われた。

## 文献

- 1) Hanczyc MM (2014) Metabolism and motility in prebiotic structures. *Philos. Trans. R. Soc. London B*, **366**: 2885-2893.
- 2) Carlile MJ (1975) *Primitive Sensory and Communication Systems, The Taxes and Tropisms of Micro-Organism and Cells*. Academic Press, London.
- 3) Soh S, Bytrcka M, Landere-Grzybowska K and Grzybowski BA (2010) Reaction-diffusion system in intercellular molecular transport and control. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**: 4170-4198.
- 4) Suzuki K, Toyota T, Takakura K and Sugawara T (2009) Sparkling morphological changes and spontaneous movements of self-assemblies in water induced by chemical reactions. *Chem. Lett.* **38**: 1010-1015.
- 5) Hanczyc MM, Toyota T, Ikegami T, Packard N and Sugawara T (2007) Fatty acid chemistry at the oil-water interface: Self-propelled oil droplets. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 9386-9391.
- 6) Suzuki K and Sugawara T (2016) Phototaxis of oil droplets comprising a caged fatty acid tightly linked to internal convection. *ChemPhysChem* **17**: 2300-2003.
- 7) Ryazantsev YS, Velarde MG, Rubio RG, Guzmán E, Ortega F and López P (2017) Thermo- and solute-capillary: Passive and active drops. *Adv. Colloid Interf. Sci.* **247**: 52-80.
- 8) Pautot S, Frisken BJ and Weitz DA (2003) Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir* **19**: 2870-2879.
- 9) Suzuki K, Machida K, Yamaguchi K and Sugawara T (2018) Photo-triggered recognition between host and guest compounds in a giant vesicle encapsulating photo-pierceable vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **210**: 70-75
- 10) Heß K (1942) Die röntgenographische und viskosimetrische Untersuchung von Seifenlösungen. *Fette Seifen Anstr.* **49**: 81-88.
- 11) Israelachvili JN (2011) *Intermolecular and Surface Forces, Third edition*. Academic Press, Amsterdam.
- 12) McConnell MH and Kornberg RD (1971) Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochem.* **10**: 1111-1120.
- 13) Kitahata H, Yoshinaga N, Nagai KH, Sumino Y (2013) Dynamics of Droplets. In: *Pattern Formations and Oscillatory Phenomena*. Kinoshita S, ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 85-118.

■原 著■

## 二型性葉緑体の微細構造に注目した C<sub>4</sub> 植物トウモロコシと その類縁種の系統学的研究

鈴木季直<sup>1, 2, 3</sup> 福田千春<sup>1</sup> 河田直美<sup>1</sup> 永井 慎<sup>1</sup> 岡島 崇<sup>1</sup>

A Phylogenetic Study on the Relationship between C<sub>4</sub> Plant Maize  
and Its Wild Relatives with Special Reference to  
Fine Structures of Dimorphic Chloroplasts

Suechika Suzuki<sup>1, 2, 3</sup>, Chiharu Fukuda<sup>1</sup>, Naomi Kawada<sup>1</sup>,  
Makoto Nagai<sup>1</sup> and Tskashi Okajima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** To provide information on the phylogenetic relationship between maize and its wild relatives, fine structures of dimorphic chloroplasts in those plant leaves were observed by electron microscopy. Examined plants were a cultivated maize, two kinds of annual teosinte, *Zea luxurians* (Ames 21876 and PI441931), two kinds of perennial teosinte, *Zea diploperennis* and *Zea perennis*, a tripsacum, *Tripsacum dactyloides*, and Job's tears, *Coix lacryma-jobi*. Bundle sheath chloroplasts of all plants were agranal, although the rudimentary grana piled up with a few thylakoids were frequently found in cultivated maize and annual teosinte, *Z. luxurians*. They always contained a large number of starch grains. Cell walls of bundle sheath cells were well constructed with a suberized lamella in all plants, and thickness of cell walls was the largest in tripsacum. In mesophyll chloroplasts of all plants examined, no difference was found in the internal membrane system. However, the starch content of mesophyll chloroplasts was conspicuously different among the plants examined. In cultivated maize and annual teosinte, mesophyll chloroplasts had uncommonly a few small starch grains, whereas those of perennial teosinte, *Z. perennis*, and tripsacum contained relatively numerous large starch grains. These results indicate that the starch content of mesophyll chloroplasts is a valid index to estimate the phylogenetic relationships among maize and its wild relatives, and that annual teosinte is closely related to cultivated maize. Structural features of dimorphic chloroplasts of Job's tears closely resemble those of tripsacum, suggesting a phylogenetic relationship.

**Keywords:** C<sub>4</sub> plants, maize, phylogenetic relationship, dimorphic chloroplasts, starch grains

### 序論

サトウキビやトウモロコシなど、光合成におけるC<sub>4</sub>経路の脱炭酸酵素がNADP-リノゴ酸酵素(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-malic enzyme)である典型的なNADP-ME型のC<sub>4</sub>植物の葉では、維管束鞘細胞とその周囲の葉肉細胞は形態的に異なる二種の葉緑体(二型性葉緑体)

を含むことが知られている<sup>1, 2)</sup>。維管束鞘細胞の葉緑体は発達したグラナを欠き多量の大きなデンプン粒を持つに対して、葉肉細胞の葉緑体は良く発達したグラナを持つがデンプン粒は殆どないか、あっても小さく、量もわずかである。さらに、発生過程における明瞭な維管束鞘葉緑体内的グラナの退化も



Fig.1. Plants examined by electron microscopy. A. Cultivated maize. B. *Tripsacum* grown in experimental field of Kanagawa University. C. Annual teosinte *Zea luxurians* (Ames21876) grown from the seed in a greenhouse. D. Job's tears *Coix lacryma-jobi* grown wild.

含めて二型性葉緑体の構造分化は、C<sub>4</sub>植物の機能分化や系統分化と相關している可能性が示されており<sup>3-5)</sup>、二型性葉緑体の微細構造を比較することで植物間の類縁関係を考察することができると考えられる。この観点から、本研究では、典型的なC<sub>4</sub>植物である栽培種トウモロコシ、その祖先野生種とされるテオシント4種（1年生2種、多年生2種）、野生類縁種のトリップサクム、およびトリップサクムに近縁と思われるジュズダマ<sup>6)</sup>の葉緑葉細胞と二型性葉緑体の微細構造を観察して比較検討した。

## 材料と方法

実験材料としたトウモロコシとその類縁種は、市販の栽培種トウモロコシ *Zea mays* L.、2種の一年生テオシント *Zea luxurians* (Durieu and Asherson) Bird (Ames21876, PI441933)、2種の多年生テオシント *Zea diploperennis* Iltis, Doebley and Guzman (PI441931) と *Zea perennis* (Hitchcock) Reeves and Mangelsdorf (Ames21869)、トリップサクム *Tripsacum dactyloides* L. である（図1A-C）。トリップサクムに近い日本の植物とされるジュズダマ *Coix lacryma-jobi* L. も参照植物として観察した（図1D）。テオシントの種子とトリップサクムの株は京都大学農学部の植物生殖質研究施設から提供されたものを用いた。シャーレの底に敷いた脱脂綿に水を含ませてその上に種子を播き、20°Cの培養器中に置いた。発芽後鉢に植えかえ、25°Cの温室内で育てた。約2ヶ月後の第二葉または第三葉の先端部から葉片を採集した（図1C）。株分けされたトリップサクムを神奈川大学湘南平塚キャンパス内の実験圃場に植え、

成長した植物（図1B）の葉緑葉を採集した。参照植物のジュズダマは神奈川大学湘南平塚キャンパス近隣の川端に自生しており（図1D）、この葉緑葉を採集した。

葉緑葉から1×3 mm<sup>2</sup>の小片を細切りし、0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.2）で希釈した6%グルタルアルデヒド液に浸漬し、4°Cで24時間前固定した。同磷酸緩衝液と蒸留水で洗浄した後、蒸留水で希釈した2%四酸化オスミウム液により4°Cで24時間後固定した。その後、試料をアセトン系列で脱水し、Epoxy樹脂に包埋して熱重合させた。ウルトラミクロトーム（Reichert Ultracut-N）で樹脂包埋試料から厚さおよそ70 nmの超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡（JEOL JEM2000EX）で観察した。

葉緑体、特に葉肉細胞葉緑体のデンプン量の違いを定量的に比較するために、細胞や細胞内構造容積の変化を評価できるモンタージュ法<sup>7-10)</sup>を適用した。撮影された葉肉細胞葉緑体の電子顕微鏡写真（デンプン含有率計測対象写真）を対象にし、葉緑体の断面積およびその中に含まれるデンプン粒の断面積を画像処理ソフトImage Jで測定し、葉緑体断面積当たりのデンプン粒断面積の割合（%）を求め、植物間での差異を比較検討した。

## 結果

トウモロコシの葉緑葉には既に良く知られているような典型的な二型性葉緑体が観察され、葉肉細胞の葉緑体は、C<sub>3</sub>植物と同様に、グラナとインターフラグメントラコイドからなる内膜系を含んでおり（Fig. 2A）、

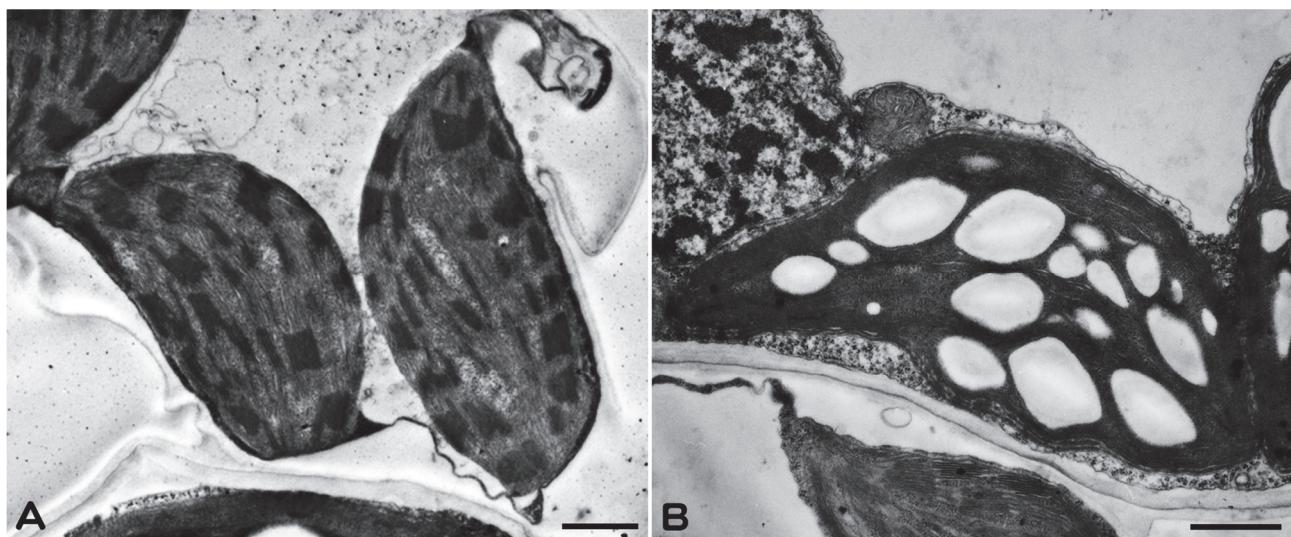


Fig.2. Dimorphic chloroplasts in the green leaves of maize. A. Chloroplasts of mesophyll cells, containing well developed grana and no starch grain. B. Chloroplasts of bundle sheath cells, showing agranal structures and a numerous number of large starch grains. Scale bars, 1 μm.

一方、維管束を取り囲む維管束鞘細胞の葉緑体は  $C_3$  植物の葉緑体より大きく、その内膜系においてはグラナを欠いていた (Fig. 2B)。一般的に二型性葉緑体は内膜系におけるグラナの有無により特徴づけられているが、典型的な  $C_4$  植物では葉緑体に含まれるデンプン粒の有無または多少によっても区別されている。本観察でも、実際に、維管束鞘細胞葉緑体には多数の大きなデンプン粒が含まれていたが、葉肉細胞葉緑体には全く含まれていないか、あっても小さく、数も数個以内であった。デンプン含有率計測対象写真内で観察された全葉肉細胞葉緑体 124 個中、少量ながらもデンプン粒が含まれていたものは 9 個、およそ 7.3% であった。

トウモロコシの祖先野生種とされる 4 種のテオシントの緑葉に含まれる二型性葉緑体の微細構造を観察した (Fig. 3)。一年生テオシントは *Z. luxurians* (Ames21876) および *Z. luxurians* (PI441933) の 2 種を観察した。Fig.3A と Fig.3B は、それぞれ、*Z. luxurians* (Ames21876) の典型的な葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体を示している。維管束鞘細胞葉緑体は大きなレンズ型で、グラナを欠く内膜系を持つ特徴はトウモロコシのそれと同じであり、また、多数の大きなデンプン粒を含んでいた。一方、葉肉細胞に含まれる葉緑体の内膜系は非常に良く発達した多数のグラナとインターラナチラコイドからなり、トウモロコシのそれと特徴は一致した。Fig.3A の葉緑体のようにストロマ内に全くデンプン粒を示さないか、観察されても、それらは、トウモロコシの葉肉細胞葉緑体と同様に、極めて小さく数も僅かであった。同じ一年生テオシントの *Z. luxurians*

(PI441933) の二型性葉緑体もこれらと同じ微細構造特徴を示した。*Z. luxurians* (Ames21876) では、デンプン含有率計測対象写真で観察された全葉肉細胞葉緑体 99 個中、デンプン粒が含まれていたものは 19 個、およそ 19.2% であり、この率はトウモロコシより高かった。

多年生テオシントは二倍体の *Z. diploperennis* (PI441931) と四倍体の *Z. perennis* (Ames21869) の 2 種を観察した。Fig.3C と Fig.3D は、それぞれ、*Z. diploperennis* の典型的な葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体を示している。維管束鞘細胞葉緑体は、トウモロコシのそれと同様に、内膜系は並走する単一のチラコイドからなり、グラナを欠いていた。チラコイド間のストロマには多数の大きなデンプン粒が含まれていた。一方、葉肉細胞葉緑体がグラナとインターラナチラコイドからなる内膜系を含むことはトウモロコシのそれと同様であったが、ストロマ内には、少数ながらも、かなりの頻度でデンプン粒が観察された。デンプン含有率計測対象写真で観察された全葉肉細胞葉緑体 71 個中、デンプン粒が含まれていたものは 33 個、およそ 46.5% であり、トウモロコシや一年生のテオシントよりも高頻度で葉緑体がデンプン粒を含むことが示唆された。

Fig.3E と Fig.3F は、それぞれ、四倍体テオシント *Z. perennis* の典型的な葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体を示している。前者がグラナを含み、後者はそれを欠くという内膜系の特徴はトウモロコシおよび他のテオシントと同じであった。維管束細胞葉緑体のストロマに多量のデンプンが含まれていることも同じであったが、トウモロコシや一年生テオシント

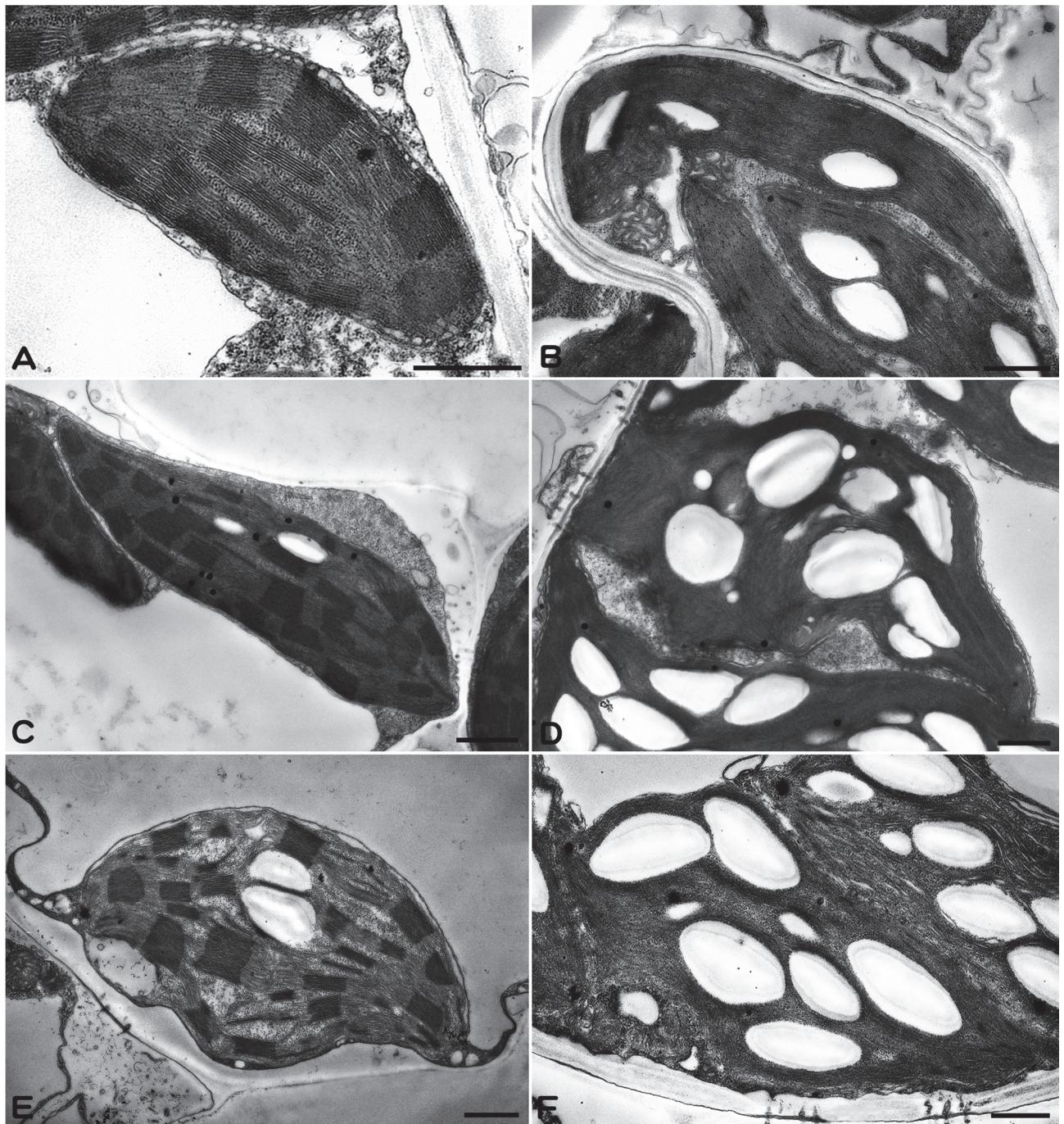


Fig.3. Dimorphic chloroplasts in the green leaves of various teosintes. A and B. Chloroplasts of mesophyll cells (A) and bundle sheath cells (B) in an annual teosinte *Z. luxurians* (Ames21876). C and D. Chloroplasts of mesophyll cells (C) and bundle sheath cells (D) in a perennial diploid teosinte *Z. diploperennis*. E and F. Chloroplasts of mesophyll cells (E) and bundle sheath cells (F) in a perennial tetraploid teosinte *Z. perennis*. Note starch grains found in mesophyll cell chloroplasts. Scale bars, 1  $\mu$ m.

トとは異なり、葉肉細胞葉緑体にはかなりデンプン粒が出現する傾向があった。それは *Z. diploperennis* と同様であったが、出現頻度はそれより低く、デンプン含有率計測対象写真で観察された全葉肉細胞葉緑体 127 個中、デンプン粒が含まれていたものは 41 個、およそ 32.3% であった。

トウモロコシ類縁の野生種と思われるトリップサクムの緑葉に含まれる二型性葉緑体の微細構造を観察

した (Fig.4A, B)。トリップサクムも  $C_4$  経路をもつ植物であり<sup>5)</sup>、維管束鞘細胞内の葉緑体は、グラナを欠いた内膜系とチラコイド間に多量の大きなデンプン粒を含んでおり、トウモロコシやテオシントと同じ特徴を示した (Fig.4A)。一方、葉肉細胞の葉緑体は、内膜系ではトウモロコシやテオシントと違いは認められなかったが、ストロマ内に含まれるデンプン粒の状況は顕著に異なっていた (Fig.4B)。葉肉細胞の

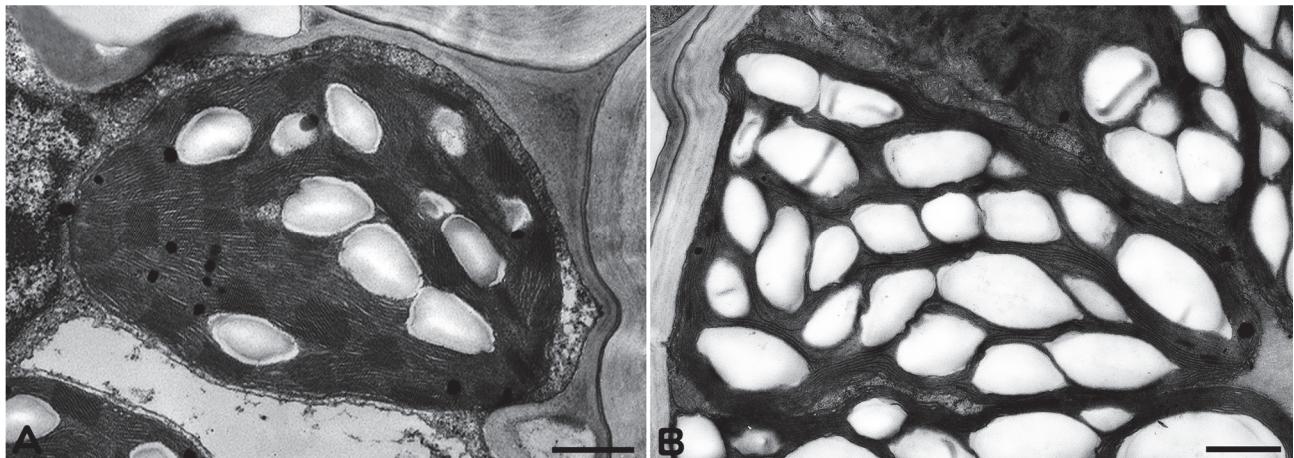


Fig.4. Dimorphic chloroplasts in the green leaves of *tripsacum*. A. Chloroplasts of mesophyll cells, containing well developed grana and a numerous number of relatively large starch grains. B. Chloroplasts of bundle sheath cells, showing agranal structures and a numerous number of large starch grains. Scale bars, 1 μm.

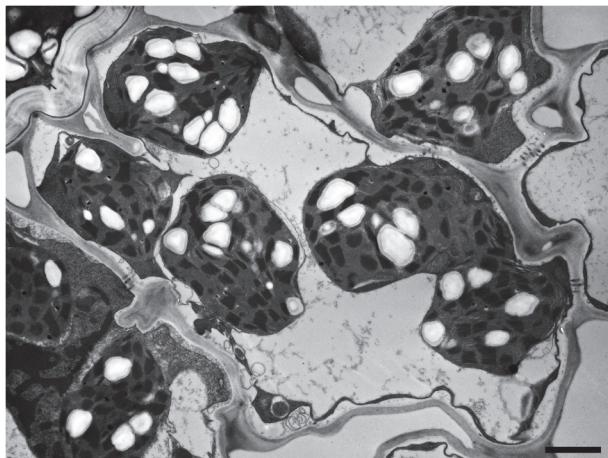


Fig.5. Mesophyll cells of *tripsacum* leaves, showing all chloroplasts contain a numerous number of relatively large starch grains. Scale bar, 1 μm.

葉緑体内にはかなり大きなデンプン粒が多数含まれており、そのデンプン粒に関する微細構造的所見は NADP-ME 型以外の C<sub>4</sub> 植物<sup>11)</sup> や典型的な C<sub>3</sub> 植物の

葉肉細胞内に見られる葉緑体に似ていた。デンプン含有率計測対象写真で観察されたトリップサクムの全葉肉細胞葉緑体 106 個中、デンプン粒が含まれていたものは 86 個、およそ 81.1% であり、トウモロコシや一年生のテオシントよりも高頻度で葉緑体にデンプン粒が含まれることが示唆された。これを反映し、時には、葉肉細胞内に含まれる全ての葉緑体に多数の大きなデンプン粒が含まれていた (Fig.5)。

トリップサクムに近縁と思われるジュズダマの緑葉に含まれる二型性葉緑体の微細構造を観察した (Fig.6A, B)。維管束鞘細胞の葉緑体はグラナを欠いた内膜系を持ち、多数の大きなデンプン粒を含み、観察された他のすべての植物のそれとよく似ていた (Fig.6A)。葉肉細胞のグラナを持つ葉緑体は、トリップサクムの葉肉細胞葉緑体とよく似ており多数の大きなデンプン粒を含んでいた (Fig.6B)。デンプン含有率計測対象写真で観察されたジュズダマの全葉肉細胞葉緑体 77 個中、デンプン粒が含まれていたもの

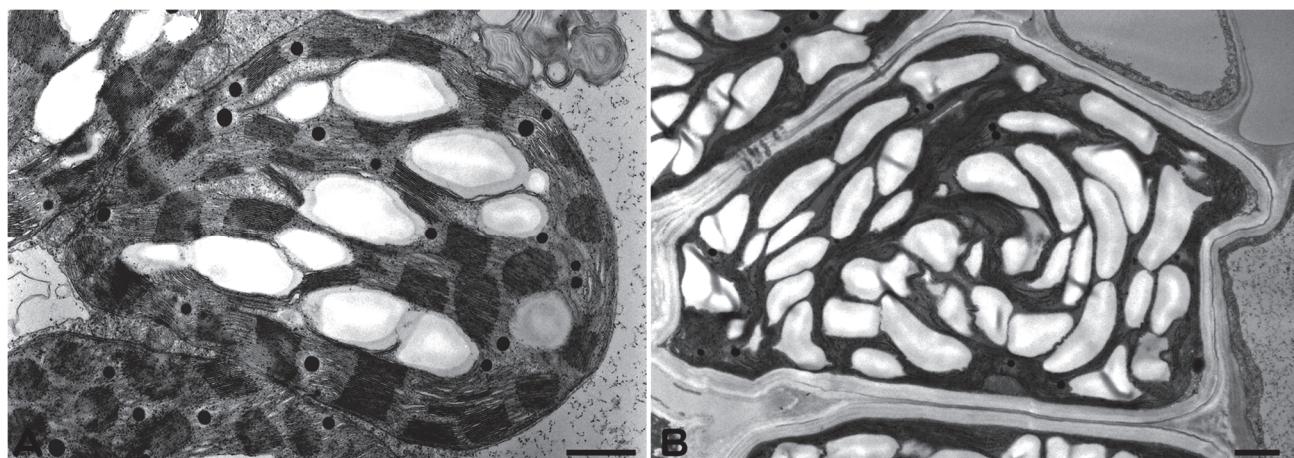


Fig.6. Dimorphic chloroplasts in the green leaves of *Job's tears*. A. Chloroplasts of mesophyll cells, containing well developed grana and a numerous number of relatively large starch grains. B. Chloroplasts of bundle sheath cells, showing agranal structures and a numerous number of large starch grains. Scale bars, 1 μm.

は69個、およそ89.6%で、殆どの葉緑体がデンプン粒を含むことを示した。

葉肉細胞葉緑体内のデンプン量の違いを定量的に比較するために、撮影された電子顕微鏡像を無作為に抽出し、デジタル画像に変換し、葉緑体および葉緑体内デンプン粒の断面積を測定した。いずれの植物でも、観察された葉肉細胞（各植物、n=20）には3～4個の葉緑体が含まれており、葉緑体が細胞に占める割合は25～30%でほぼ同じ値を示した。一方、澱粉粒が葉緑体に占める割合（%）は植物毎に異なっていた。Fig.7はその結果をまとめたものである。以下、平均値とその標準偏差（n=60）で表すと、トウモロコシは $0.08 \pm 0.26\%$ で最も低く、次いで一年生テオシントが $0.25 \pm 0.58\%$ 、四倍体の多年生テオシントが $1.54 \pm 2.48\%$ 、二倍体の多年生テオシントが $1.68 \pm 2.95\%$ と順次高くなり、トリップサクムは $7.29 \pm 5.75\%$ で最も高かった。なお、ジュズダマは $6.27 \pm 5.67\%$ でトリップサクムに近い割合を示した。

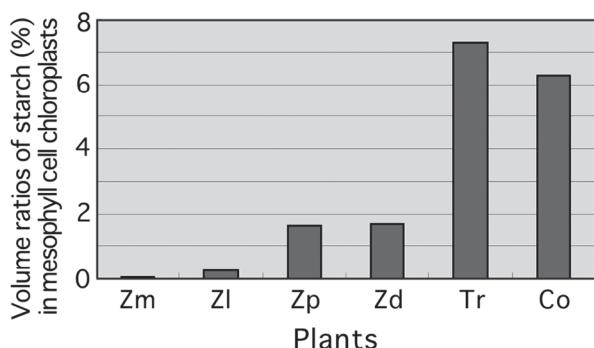


Fig.7. Fractional volume (%) of starch grains to the whole mesophyll chloroplast, from the digital image analysis of electron micrographs. Zm: *Z. mays*, Zl : *Z. luxurians*, Zp : *Z. perennis*, Zd: *Z. diploperennis*, Tr: *T. dactyloides*, Co : *C. lacryma-jobi*.

## 討論

典型的なNADP-ME型C<sub>4</sub>植物の綠葉に見られる葉緑体の構造分化が機能分化や系統分化と相關している可能性に基づき、栽培種トウモロコシとその類縁種の二型性葉緑体の微細構造を観察して比較検討した。その結果、葉緑体の内膜系では種間の違いは認められなかつたが、葉肉細胞葉緑体のデンプン粒出現状況に顕著な違いが生じていることが認められた。デンプン粒が各葉肉細胞葉緑体に占める割合はトウモロコシで最も低く、次いで、一年生テオシント、多年生テオシント、トリップサクムの順に高くなっていた。

従来、トウモロコシの起源については多くの研究がなされており、テオシントがトウモロコシの直接の先祖であるとするテオシント説<sup>12,13)</sup>や絶滅した野

生種とテオシントやトリップサクムとの交雑により進化したとする三部説<sup>14)</sup>など諸説あったが、アイソザイムや葉緑体DNAの系統解析<sup>15,16)</sup>から、近年ではトウモロコシに最も近い系統は一群のテオシントであると考えられており、トウモロコシの起源にトリップサクムが関与する可能性も否定されているようである<sup>17)</sup>。本研究でなされた葉肉細胞葉緑体のデンプン粒出現の比較において、トウモロコシは一年生テオシントと最も良く似ており、トリップサクムやジュズダマとは顕著に異なっていたことはトウモロコシの起源に関する前述の解釈とよく一致する。また、葉肉細胞葉緑体におけるデンプン粒の出現状況はトウモロコシの類縁について考察する上での有効な指標となると考えられる。

トウモロコシの葉肉細胞葉緑体に全くデンプン粒が見られないということはない。葉の成長過程や温度条件によってはかなり明確なデンプンの蓄積が生じ、デンプン粒が出現する<sup>4,18,19)</sup>。また、デンプンの合成酵素と分解酵素は共に葉肉細胞にも存在しているが、合成酵素活性は、維管束鞘細胞で著しく高く<sup>19,20)</sup>分解酵素の活性は葉肉細胞で高いことが知られている<sup>20)</sup>。おそらく、両細胞におけるこれらの酵素の活性化の違いもまたトウモロコシとその類縁種との相関を示す指標となりうると思われる所以、活性に関する細胞化学的研究が今後の課題として興味深い。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、研究材料のトリップサクムの株とテオシントの種子をご提供下さいました京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻 栽培植物起源学分野の河原太八博士に感謝致します。また、河原太八博士をご紹介下さいました神奈川大学工学部の大塚一郎博士に謝意を表します。

## 文献

- 1) Laetsch WM (1971) Chloroplast structural relationships in leaves of C<sub>4</sub> plants. In: *Photo-synthesis and Photorespiration*. Hatch MD, Osmond GB and Slatyer RO, eds., Wiley-Interscience, New York. pp. 323-349.
- 2) Kanai R and Edwards GE. (1999) The biochemistry of C<sub>4</sub> photosynthesis. In: *C<sub>4</sub> Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 49-87.
- 3) Laetsch WM and Price I (1969) Development of dimorphic chloroplast of sugar cane. *Amer. J. Bot.* **56**: 77-87.
- 4) Suzuki S and Ueda R (1974) Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids in C<sub>4</sub>-plants. I. The relationship between development of plastids and leaf cell differentiation during germination in

- Zea mays* L.. *Sci Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku* **15**: 237-354.
- 5) Dengler NG and Nelson T (1999) Leaf structure and development in C<sub>4</sub> plants. In: *C<sub>4</sub> Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 133-172.
  - 6) Sage RF, Li M and Monson RK (1999) The taxonomic distribution of C<sub>4</sub> photosynthesis. In: *C<sub>4</sub> Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 551-584.
  - 7) Peachey LD (1965) The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25**: 209-231.
  - 8) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastructural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. *J. Electron Microsc.* **52**: 337-347.
  - 9) Aoki Y, Marumo S, Nishikata H, Kozuka M, Fukada M, Koura N, Hayatsu M and Suzuki S (2015) Ultrastructural changes and intracellular ion movements in tertiary pulvinous cells during the seismonastic response of *Mimosa pudica* L.. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 53-69.
  - 10) Ito S, Ono M, Hirose Y, Watanabe N, Utagawa C, Maeda N, Marumo S, Shimozono N, Shiozawa T, Ito S, Hayatsu M and Suzuki S (2018) Structural changes and intra- and extra-cellular ion movements in motor cells during leaf closure of insectivorous Venus flytrap. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 55-63.
  - 11) Kashiwagi M, Yoshida K, Sakai M, Hamamoto C and Suzuki S (1939) Morphogenesis of chloroplasts during the illumination in etiolated cotyledons of a C<sub>4</sub> plant *Amaranthus*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **19**: 57-65.
  - 12) Beadle GW (1939) Teosinte and the origin of maize. *J. Heredity* **30**: 245-247.
  - 13) Iltis HH (1939) From teosinte to maize: The catastrophic sexual transmutation. *Science* **222**: 886-894.
  - 14) Mangelsdorf PC and Reeves RG (1938) The origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **24**: 303-312.
  - 15) Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez GJ and Doebley J (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6080-6084.
  - 16) Matsuoka Y (2005) Origin matters: Lessons from the search for the wild ancestor of maize. *Science* **305**: 383-390.
  - 17) 福永健二 (2009) トウモロコシの起源 一テオシント説と栽培化に関わる遺伝子一. *国立民俗学博物館調査報告書* **84**: 137-151.
  - 18) Hilliard JH and West SH (1970) Starch accumulation associated with growth reduction at low temperatures in a tropical plant. *Science* **168**: 494-496.
  - 19) Downton WJS and Hawker JS (1973) Enzymes of starch ad sucrose metabolism in *Zea mays* leaves. *Phytochemistry* **12**: 1551-1556.
  - 20) Spilatro SR and Preiss J (1987) Regulation of starch synthesis in the bundle sheath and mesophyll of *Zea mays* L. Intercellular compartmentation of enzymes of starch metabolism and the properties of the ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **83**: 621-627.



■原 著■

## 輪形動物ヒルガタワムシの運動における纖毛冠の役割の研究

指簾和也<sup>1</sup> 市川麗子<sup>1,3</sup> 茂木和枝<sup>2</sup> 豊泉龍児<sup>1,2</sup>

Bdelloid Rotifer: A Study on the Role of Ciliary Corona in Locomotion

Kazuya Sashihata<sup>1</sup>, Reico Ichikawa<sup>1,3</sup>, Kazue Mogi<sup>2</sup> and Ryuji Toyoizumi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: reico.bio@gmail.com

**Abstract:** Rotifers (species belonging to the phylum Rotifera) have numerous motile cilia on their surface, and they use these cilia for locomotion and feeding. Especially, the corona, the most-anterior paired apparatus, has ciliary bands with densely packed long cilia. From zoological aspects, microscopic rotifers are intriguing organisms. *Philodina* sp. (class Bdelloidea, order Bdelloida) is well-known for its cryptobiosis, and this rotifer species has a potential to become a model organism for ciliary movement, because we can easily resuscitate *Philodina* by immersing it in artificial fresh water. The corona of the rotifer has two important ciliary bands, preoral ciliary one and postoral ciliary one, both of which are essential for swimming and feeding. However, mechanisms for the metachrony (metachronal wave), the coordinated ciliary movement of its corona, have not yet to be unveiled. In this report, ciliary beating of rotifer *Philodina* sp. was observed with a high-speed camera after treating it with the chemical agent, to investigate the role and mechanism of metachrony in the paired corona of the *Philodina* sp. By treating *Philodina* with Sodium Orthovanadate (V) (an inhibitor of dynein ATPase), trajectories of its swimming changed markedly compared with the control group; *Philodina* changed its swimming direction more frequently to form tiny circular trajectories. By treating *Philodina* with NiCl<sub>2</sub> (an inhibitor of dynein ATPase), metachrony was disrupted and ciliary movement was mostly arrested. Neurotransmitters are known to be involved in the control of ciliary beating in several invertebrate species. Therefore, we next examined the effects of octopamine, norepinephrine (noradrenaline), and serotonin on the ciliary beating and locomotive behaviors of the *Philodina* sp. After the administration of octopamine or norepinephrine, confusion of metachrony and resultant disorder of the "collective V-shaped waveform" of metachrony were markedly induced. As the results, trajectories of swimming significantly increased the ratio of topical spiral circle lines. At higher dose of serotonin, the cilia movement of the preoral ciliary band was weakened or stopped, and frequent changes between ciliary locomotion and muscular creeping behavior were induced. The administration of nepicastat, an inhibitor of the biosynthesis of octopamine or norepinephrine, elicited retraction and closure of the paired corona into the body, and often caused the failure of creeping movement. These above changes may have been the reflection of the neurotransmitter-dependent control of metachronal ciliary movement of *Philodina* sp. of the bdelloid rotifer. In this report, we challenge to investigate the complex and fascinating ciliary metachrony of the *Philodina* rotifer. We hope that our efforts will promote studies on ciliary metachronal wave using the rotifer.

**Keywords:** Rotifera, rotifer, Bdelloidea, locomotion, ciliary beat, metachronal wave, norepinephrine, octopamine, serotonin

## 序論

輪形動物門 (Phylum Rotifera) のワムシ類は三胚葉性の左右相称動物である。約 3000 種が知られ、単生殖巣綱 (Class Monogononta)、ヒルガタワムシ綱 (Class Bdelloidea)、ウミヒルガタワムシ綱 (Class Seisonidea) の 3 綱に大きく分類される。体長は最大約 3 mm であるが、大部分は 500  $\mu\text{m}$  以下と小さく、その体は頭部、胴部、足部に分けられる。匍匐性の種では外見上胴部、足部に体節に似た構造が見られるが、体節構造はない。この偽の体節を望遠鏡のように折りたたむことで伸縮や収納を行う<sup>1)</sup>。

ワムシ類は、1000 個ほどの細胞で構成され、一生を通して核の数が一定であり、胚の時期以降には細胞の分裂は起こらないため、一般に寿命は短く、その一生は環境によって 20 日から 30 日とされる。多くの組織が多核体 (syncytium) で、表皮は細胞内クチクラを持ち、これを肥厚させて被甲を形成する種（例えば被甲によく発達したトゲをもつツボワムシ *Brachionus calyciflorus* など）もいる。

輪形動物の生活は纖毛冠と深い関わりを持っている。ほとんどの纖毛冠では液流を生むための運動性纖毛が 2 つの帶状に密集して生えており、前部纖毛帶は後方への纖毛打 (ciliary beat) を行い、後部纖毛帶は前方への纖毛打を行う<sup>2,3)</sup>。本研究で実験動物として用いたヒルガタワムシ (*Philodina sp.*) もまた、体の前端に纖毛 (cilia) が密集した 2 つの纖毛帶からなる纖毛冠（輪毛器 corona）を持ち、回転するように見える纖毛運動 (ciliary movement) によって移動のための運動と摂食を行う（図 1）。一時的に纖毛冠を被甲に収納することができ、開いた纖毛冠を用い

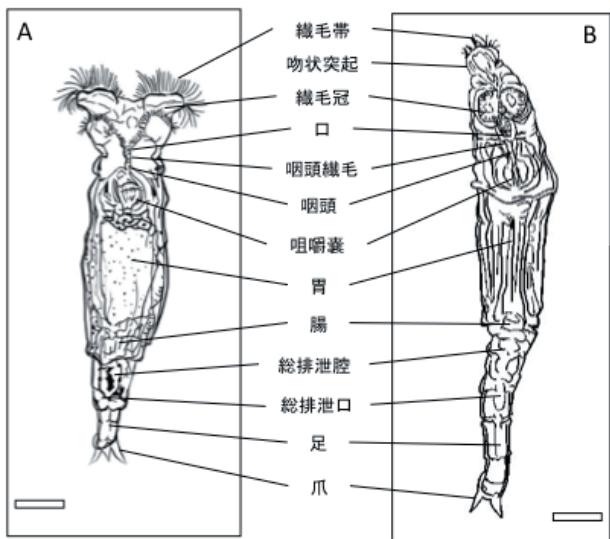


図 1. ヒルガタワムシ (*Philodina sp.*) の体制。 (A) ヒルガタワムシの摂食時の腹面図。 (B) ヒルガタワムシのシャクトリムシ様の匍匐行動時の腹面図。 Bars, 50  $\mu\text{m}$ .

る遊泳と、纖毛冠を収納した頭部でシャクトリムシ様に這う移動の両方を行って生活する。多くのワムシ類の纖毛冠では運動性纖毛が 2 つの帶状に密集して生えており、先述のように口前纖毛帶は後方への纖毛打を行い、口後纖毛帶は前方への纖毛打を行う<sup>4)</sup>。

ワムシは、多様な体制、神経系の働き、広域に分布する同目の生態についての理学的研究が盛んな上に、水産業や廃水処理においても注目を集めている。しかし、それらの研究と比べるとヒルガタワムシの纖毛を用いる移動や摂食行動に着目した研究は少ない。筆者らはヒルガタワムシが固着性と遊泳性のどちらの状態であっても纖毛冠の纖毛を用いることに注目し、ヒルガタワムシが纖毛運動の制御機構に関する研究においてモデル生物となりうると考えた。ワムシ類の纖毛に関する先行研究では、纖毛帶の配置が明らかにされている<sup>3)</sup>。纖毛打の制御についての研究では、ヒルガタワムシと同様に纖毛帶を持つウニ幼生の纖毛運動において、神経伝達物質が纖毛運動の方向性と周期安定性（纖毛打は安定度の高い周期運動を行うと考えられている）に関与することが報告されている<sup>4)</sup>。ムラサキイガイの鰓纖毛は神経支配があることが明らかになっている<sup>5)</sup>。ゾウリムシにおいては、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度上昇が纖毛打逆転を生ずることや鞭毛の波形の調節をしていることが知られている<sup>6)</sup>。カタコウレイボヤの精子鞭毛やウニ胚の纖毛運動ではダイニンと結合する  $\text{Ca}^{2+}$  結合性タンパク質カラクシンが鞭毛打波形の調節を行っている<sup>7)</sup>。また、ヒルガタワムシが有する神経系の研究では、ヒルガタワムシ目に属する *Macrotrachela quadricornifera* において serotonin 作動性神経系が纖毛冠から足部に渡って広く存在し、纖毛冠に沿った serotonin の局在が報告されており、纖毛運動が serotonin 作動性神経に何かしらの制御を受けている可能性が示唆されている<sup>8)</sup>。他にもワムシ類の *Brachionus plicatilis* において、足腺、縦筋帶および纖毛冠、感覚毛帶、中枢神経節においてカテコールアミンと多数のアドレナリン受容体が確認されている<sup>9)</sup>。一般にヒトやマウスなどの哺乳類では、Octopamine と Norepinephrine はどちらもアドレナリン  $\alpha$  1 受容体に結合することで受容細胞の細胞内カルシウム濃度を上昇させ得ることが知られている<sup>10)</sup>。

一方で、ヒルガタワムシの纖毛運動の詳細な制御機構についてはほとんど解明されておらず、神経伝達物質がヒルガタワムシの纖毛運動による移動や摂食行動に与える影響に注目した研究もない。そこで我々は、纖毛運動阻害剤の投与、および神経伝達物質の投与によって、ヒルガタワムシの纖毛運動や行

動にどのような変化がもたらされるのかを、主にハイスピードカメラを用いた行動観察によって調査した。そして、得られた結果をもとに、ワムシの運動様式における纖毛運動、特に纖毛冠のそれへの神経伝達物質の役割について考察した。

## 材料と方法

本研究では、ヒルガタワムシ (*Philodina sp.*) を使用した。休眠させたヒルガタワムシを紙片に吸着した『ひかりヒルガタワムシ』(キヨーリンフード工業株式会社) を、10% Steinberg 氏液 (人工淡水) に 1-2 日間浸漬して、26 度の恒温器内で蘇生させて、実験に使用した。蘇生時の飼育水中には餌として研究室で培養したクロレラを与えた。実験に用いる際は、多穴プレートへの投入時に 10% Steinberg 氏液を用いてワムシを洗浄した。

### 纖毛運動阻害剤への浸漬

① ATPase の阻害剤であるオルトバナジン (V) 酸ナトリウム ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 分子量 183.91) と、② 纖毛運動に阻害効果を引き起こす塩化ニッケル (II) ( $\text{NiCl}_2$ ; 分子量 129.60) を用いて、どちらも 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM に 10% Steinberg 氏液で希釈して浸漬に用いた。浸漬 24 時間後に纖毛冠と遊泳行動の観察と撮影を行った。纖毛冠の纖毛運動の観察は Olympus 社の倒立顕微鏡 IX71 と、Phtron 社のハイスピードカメラ Fastcam Mini AX50 を用いて撮影し、低倍速で観察した。遊泳行動の観察は Olympus 社の実体顕微鏡 SZX16 と同社顕微鏡用カメラ DP22 を用いた。撮影した動画は、windows PC アプリのペイントを使用してマニュアルで軌跡をトラッキングした。

### 神経伝達物質の投与

①アドレナリン  $\alpha$  受容体等に結合する Octopamine Hydrochloride ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$ ; 分子量 189.64)、②アドレナリン受容体全般に結合する Norepinephrine Bitartrate ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 分子量 337.28)、③ヒルガタワムシの纖毛冠の纖毛運動に関与すると予想される Serotonin Hydrochloride ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ ; 分子量 212.70) を使用した。濃度はそれぞれ 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM に 10% Steinberg 氏液で希釈して浸漬に用いた。浸漬 1 時間後と 24 時間後に纖毛冠と遊泳行動の観察と撮影を行った。観察および撮影は纖毛運動阻害剤の項と同様に行った。

### 神経伝達物質の生合成阻害剤への浸漬

Dopamine  $\beta$ -hydroxilase の阻害剤であり、Octopamine, Norepinephrine の生合成を阻害する Nepicastat Hydrochloride ( $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{S} \cdot \text{HCl} \cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$ ; 分子量 336.31) を使用し、0.05 mM, 0.1 mM に 10% Steinberg 氏液で希釈し、浸漬に用いた。浸漬 1 時間後に纖毛冠と行動の観察を行った。

## 結果

### 纖毛冠の纖毛運動に対する阻害剤の影響

纖毛の屈曲運動に関与するダイニンの ATPase 活性を阻害する薬品としてオルトバナジン酸ナトリウム  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、塩化ニッケル (II)  $\text{NiCl}_2$  を用いてヒルガタワムシの纖毛運動、特に纖毛冠の纖毛運動の阻害と、これらの薬剤による纖毛を用いた移動、摂食行動への影響を調べた。

無処理群では、露出した纖毛冠付近に腹面方向からの纖毛流が生じており、口部へ向かう流れと纖毛冠の外側から体の後方への流れが生じていた (図

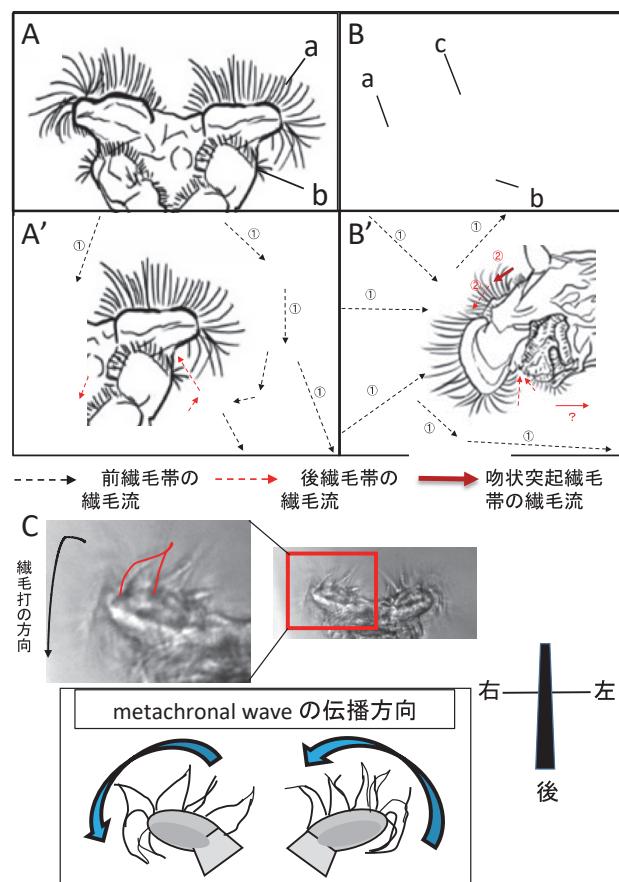


図 2. ヒルガタワムシの纖毛冠付近の纖毛流. (A, A') 腹面方向から見た纖毛冠付近の纖毛流形成を示した図. (B, B') 左側面方向から見た纖毛冠付近の纖毛流形成を示した図. (C) 纖毛冠の顕微鏡下での観察において、棘状の構造が纖毛冠上を滑るように metachronal wave を形成する. a, 口前纖毛帯; b, 口後纖毛帯; c, 吻状突起纖毛帯.

2A, A')。また左側面方向から見た場合、纖毛冠の背腹に後方へ向かう纖毛流があり、体から遠ざけるように流れていた(図 2B, B')。口部付近では、口後纖毛帯が口へ向かう小さな纖毛流を形成していた。また、吻状突起上の纖毛も口部方向へ纖毛流を形成するように見えた。口後纖毛帯のほとんどは後方から前方に向かう纖毛流を形成するが、最も腹側の後方に生える纖毛は後方への纖毛流を形成していた。露出した纖毛冠では、開かれた円盤状をした2つの纖毛冠上に口前纖毛が密に生え揃い、纖毛運動によるmetachronal wave が生じていた(図 2C)。この纖毛運動をハイスピードカメラで観察したところ、規則的な纖毛の運動による纖毛の位置的な重なりが棘状の波形を形成していた(図 2C)。

無処理群の遊泳行動としては、容器の外縁に沿うように泳ぎ、その軌跡は大きな円を描いた(図 3A)。また、壁面や底面との接触によって伸縮などの固着性の運動へ切り替わる様子が見られたが、遊泳中に伸縮行動を行うものはそれほど多くはいなかった。

$\text{Na}_3\text{VO}_4$  処理群では、纖毛運動に影響を与えないものの、遊泳軌跡を変化させた(図 3B)。正常な遊泳を行っていたヒルガタワムシを、0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM に希釈した  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  に投入し、24 時間後の口前纖毛の纖毛運動を観察した。その結果、すべての濃度において口前纖毛の纖毛運動に影響は生じなかった。しかしながら、遊泳軌跡においては  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  処理群では何度も方向転換をし、旋回するような遊泳軌跡であった。遊泳中の伸縮行動も頻発し、移動範囲が狭まるという対照群とは異なる様子が見られた。

$\text{NiCl}_2$  処理群では完全停止ではないものの、多くの纖毛が運動を停止する傾向があり、遊泳行動は阻害された(図 3C)。0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM の  $\text{NiCl}_2$  が纖毛運動および遊泳行動に与える影響を調べたところ、濃度依存的に口前纖毛の metachrony を乱す、あるいは纖毛運動を停止させる影響が生じた。纖毛運動の停止が生じた個体では摂食行動時にも纖毛流は形成されず、停止した纖毛は纖毛冠から垂れ下がるように有効打方向に屈曲して停止していた。この纖毛はヒルガタワムシ自身の伸縮運動による液流を受けても、一定の形状を維持した。遊泳軌道の観察では、遊泳軌道は描かれず、殆どの個体において纖毛冠を開かず伸縮運動を繰り返す行動が見られ、樽状の休眠状態へ移行する個体も多かった。

### 神経伝達物質投与による纖毛冠への影響

神経伝達物質は、対応する神経系とそれに連なる筋組織を支配する。それぞれの神経伝達物質を投与し

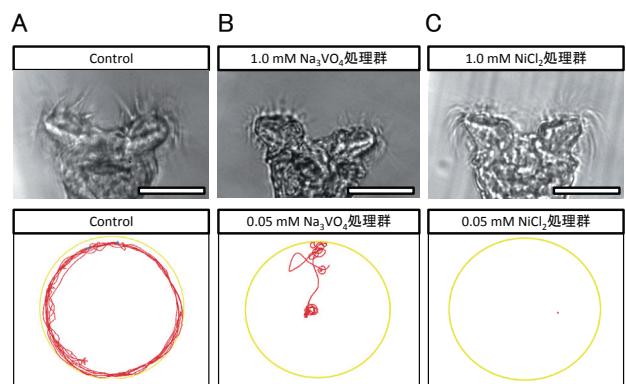


図 3. 繊毛運動阻害剤に 24 時間浸漬したヒルガタワムシの metachrony と遊泳軌道。上段は無処理正常個体および纖毛運動阻害剤への浸漬個体における摂食時の纖毛冠の拡大図を示す。下段は遊泳軌道を追跡した図を示す。録画個体数は各 n=6. Bars, 50 μm.

た場合のヒルガタワムシの固着性の運動、摂食に与える影響を調査した。

Octopamine 処理群では metachrony の乱れ、もしくは波形が変化することで遊泳軌道の変化が生じた(図 4 右上)。metachrony の乱れは最低濃度の 0.1 mM から生じ始め、本実験での最高濃度である 10 mM ではほぼすべての個体で乱れが生じた。纖毛運動への影響が生じた個体の纖毛冠付近の纖毛流には大局的な変化は見られず、前方から後方へ纖毛流を発生させていた。遊泳軌道の解析では長い距離の遊泳と常にカーブを描き、局所的な旋回を示すような複雑な軌道を描いた。このような遊泳が見られた個体では容器の壁面および底面への接触によても固着性の行動へは移行せず、衝突を繰り返すような遊泳を行っていた。metachrony や遊泳軌道に影響が見られた個体では、しばしば腹部方向への痙攣に似た屈曲が起こり、そのうちの少数個体では腹側へ屈曲したまま遊泳や伸縮を行う様子が見られた。

Norepinephrine 処理群では metachrony が乱れ、局所的な旋回遊泳が誘発された(図 4 左下)。Norepinephrine 投与の影響は全体的に Octopamine 投与の場合と類似していた。Norepinephrine によって、口前纖毛の metachrony は濃度依存的に乱れが生じた。また、濃度依存的に休眠状へ移行する個体数も増加した。しかし、Octopamine と比べると Norepinephrine 処理の効果は弱かった。遊泳軌道の解析ではほとんどの個体において Octopamine 同様の旋回行動を繰り返し、固着性の行動へ移ることはなかった。しかし、Octopamine よりもその旋回半径は狭く、より強い腹部側への屈曲が体に見られた。特に Norepinephrine の影響が大きかった個体では、体が球状、輪状となるほど強い屈曲を示し、纖毛冠が屈曲したヒルガタワムシ自身と接触するなどして

纖毛冠の状態を観察することはできなかった。

Serotonin 处理群では纖毛運動が微弱化した（図 4 右下）。また遊泳中の伸縮が誘発され、濃度依存的な metachrony の乱れが生じた。その多くでは、口前 細毛の纖毛運動が微弱化し、一部では纖毛運動がほぼ停止している個体も見られた。口前 細毛の纖毛運動がほぼ停止した個体では、 $\text{NiCl}_2$  处理群で観察された影響と同様に、有効打方向に屈曲して停止する 細毛が観察され、纖毛冠は一定の形状を維持していた。遊泳軌跡の解析では、Serotonin 处理によって遊泳と固着性の匍匐運動を高い頻度で切り替える様子が見られ、その軌跡は遊泳性のしなやかな線と匍匐性の細かな蛇行が見られる線とが混在して描かれた（図 4 右下）。小さな点のように見える軌跡の集中は、遊泳からの匍匐への切替えと匍匐運動によるものである。また、Serotonin がヒルガタワムシの体に与えた影響としては、纖毛冠のある頭部と胸部の間にある節の収縮と足の伸長、吻状突起の収縮、そして頭部の腹側への屈曲が高頻度で観察された。

### 神経伝達物質の生合成阻害による影響

神経伝達物質の過剰投与はヒルガタワムシの固着頻度と纖毛冠の露出頻度に影響を及ぼし、遊泳軌跡の局在化をもたらすことが示された。では、内在性の神経伝達物質の減少は、ヒルガタワムシの纖毛

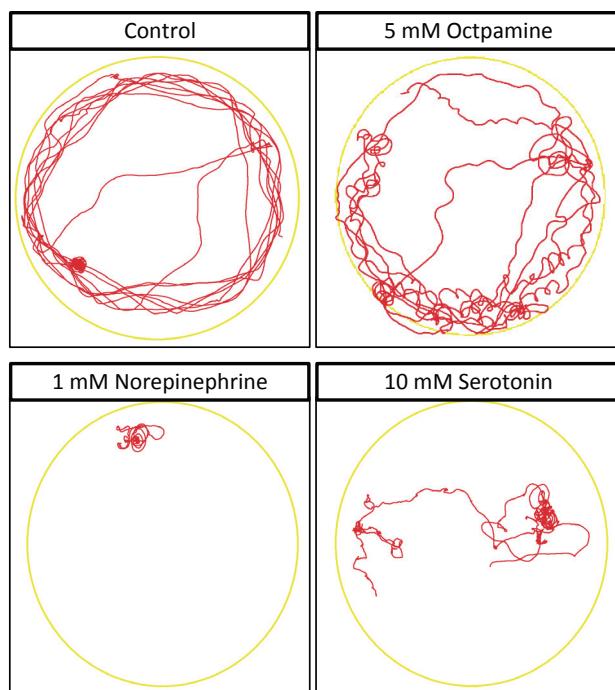


図 4. 対照群ならびに神経伝達物質投与群における遊泳軌跡の変化。神経伝達物質投与群の遊泳軌跡は対照群のそれと較べて大きな変化が観察される場合が多くた。Control, n=30; 5 mM Octopamine, n=12; 1 mM Norepinephrine, n=20; 10 mM Serotonin, n=10.

運動や行動に、どのような影響をもたらすであろうか。そのような問題意識から、次に神経伝達物質 Norepinephrine, Octopamine の生合成経路を遮断する薬剤 Nepicastat を用いてヒルガタワムシの行動にどのような変化を与えるかを観察した。

Nepicastat 处理群では、伸長状態と収縮状態間の形態変化に影響が生じ、匍匐運動における基質への粘着力が低下した。また、纖毛冠を撮影したすべての個体で収縮、または伸長した状態で纖毛冠を露出しなかったため、口前 細毛を観察できなかった。遊泳軌跡の解析においても、遊泳およびシャクトリムシ様の匍匐運動による移動は大半の個体で観察されなかつた。しかし、一部の個体では匍匐運動が観察された（図 5）。無処理対照群の匍匐運動では、胸部の高い伸縮性を利用して足先で基質に粘着し、頭部を移動先に延ばした後に足を収縮させて引き入れることで移動を行うが、Nepicastat 处理群では足の粘着力の低下のためか、移動時に足先を基質上で滑らせる様子が観察された。

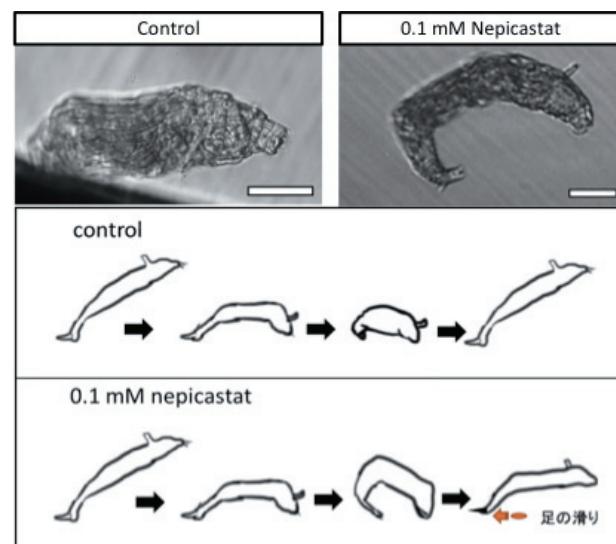


図 5. Nepicastat がヒルガタワムシの行動に与える影響。対照群では通常のシャクトリムシ様の匍匐運動パターンを示したが、0.1 mM Nepicastat 投与群の個体がシャクトリムシ様の運動パターンを行う際には、基質に足を固定して頭部を前方に伸ば時に足が基質上を滑る様子が観察された (n=12)。Bars, 50 μm.

### 討論

先行研究においてワムシ類はその多様な生態や体構造、咀嚼器の形状によって多くの種が同定され、分類されてきた。その中でもヒルガタワムシは生殖様式の特殊性が意識され、生殖様式、分布、遺伝子の水平伝播、生態、行動、体制に関する研究がなされている。ヒルガタワムシにおいてその特徴的な纖毛冠における纖毛の配置や、神経系の分布、筋肉や内

臓の配置が徐々に明らかになっている中で、本研究ではワムシ類の命名の由来でもある車輪のように見える繊毛冠の metachronal wave を制御する機構と樽状、収縮状態、伸長状態へと体を変化させる機構について新たな知見をもたらすことを目的として実験研究を行った。

$\text{NiCl}_2$  处理群および Serotonin 处理群では口前繊毛帯の繊毛運動の停止が生じた。繊毛運動が停止した個体では、摂食行動時に起こす繊毛冠の周囲の繊毛流形成機能が失われ、口前繊毛は繊毛冠の縁から後方へしなった状態で停止していた。停止した口前繊毛は、外部の水流やヒルガタワムシの伸縮運動があつてもその形状に大きな変化は起こらず、微小な湾曲があつても即座に変化前の形状に戻る様子が観察された。この様子からヒルガタワムシの口前繊毛はある程度の剛性と弾性を持っていると考えられる。恐らくこの弾性は有効打に利用されるものとして推測され、この繊毛を回復打によって持ち上げ、有効打の行う際に繊毛の構造的な反発力を利用していると推測される。

Octopamine, Norepinephrine, Serotonin 处理群の全てにおいて、metachronal wave の波形の乱れが生じた。神経伝達物質の過剰投与はヒルガタワムシの固着頻度や繊毛冠の露出頻度を変化させ、遊泳軌跡の局在化をもたらすこと、metachrony の維持には神経伝達物質が関与することが示唆された。アドレナリン  $\alpha$  1 受容体は、ヒトやマウスにおいて受容細胞の細胞内カルシウム濃度を上昇させることが知られている<sup>9)</sup>。また、Octopamine や Norepinephrine はどちらもアドレナリン  $\alpha$  受容体に結合する。Doran らの実験により、カタツムリの繊毛細胞において Serotonin は繊毛運動の周期性 ciliary beating frequency (CBF) と細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることができると報告されている<sup>11)</sup>。Serotonin の 10 mM 投与群で見られた繊毛運動の停止は、二本の中心小管がカルシウム濃度依存的にダイニンの滑り頻度と速度を抑制することと関係していると予想している<sup>12)</sup>。これらの先行研究から、本研究における Serotonin 处理による繊毛打の抑制は、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により繊毛運動に抑制的な作用が加えられたことが原因であると考えている。また、ヒルガタワムシの繊毛冠における metachrony の制御には、神経刺激によるカルシウムイオンの濃度変化が関与している可能性が考えられる。本研究の今後の展望としては、カルシウムイメージングを行い、ヒルガタワムシ体内のカルシウムイオンの局在を調べ、繊毛運動とカルシウムイオンの相関について明らかにしたい。培養細胞の研究でよく用いら

れているカルシウムイオン指示薬である Fluo-8 によるイメージングを試みたが、細胞内への充分な浸透ができていなかったようなので、プロトコルを改善することを今後の展望として挙げたい。

ヒルガタワムシは固着性と遊泳性を切り替える生活をしており、固着性の行動である摂食行動ではヒルガタワムシの物理的な位置の固定や薬剤による運動性の阻害を行うことなく繊毛運動を観察することができる。この繊毛運動は metachronal wave を持つておらず、それはあたかも棘のような波形を作り出している。そのため薬剤処理による繊毛への効果を、観察しやすい棘状の波形が保持されているかどうかで判断ができるポテンシャルを秘めていると考えられる。しかし、この繊毛冠の繊毛運動はしばしば伸縮やシャクトリムシ様の匍匐運動によって体内に隠されてしまうため、撮影できる時間にムラができる、平準化されたデータの取得は難しい。それでも本研究はヒルガタワムシの metachronal wave の形成について初めて研究したものである。今後の繊毛運動研究にヒルガタワムシが優れた研究材料として役立つことを期待する。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、助言いただきました日野晶也教授ならびに大平剛教授に深謝いたします。また、神奈川大学総合理学研究所所長ならびに所員各位に深謝いたします。

## 文献

- 1) 朝比奈英三 (1950) ヒルガタワムシの一種 *Philodina roseola* の生態観察. A Culture Note of a Bdelloid Rotatoria *Philodina roseola* Ehrenberg. 陸水学雑誌 14: 181-188.
- 2) Koste W and Shiel R (1986) Rotifera from Australian Inland waters. I. Bdelloidea (Rotifera : Diganonta). *Mar. Freshw. Res.* 37: 765-792.
- 3) Melone G and Ricci C (1995) Rotatory apparatus in Bdelloids. *Hydrobiologia* 313: 91-98.
- 4) Strathmann RR, Jahn LT and Fonseca CRJ (1972) Suspension feeding by marine invertebrate larvae: clearance of particles by ciliated bands of a rotifer, pluteus, and trochophore. *Biol. Bulle.* 142: 505-519.
- 5) Aiello E, Hager E, Akiwumi C and Stefano GB (1986) An opioid mechanism modulates central and not peripheral dopaminergic control of ciliary activity in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Cell Mol. Neurobiol.* 6: 17-30.
- 6) Mogami Y and Takahashi K (1983) Calcium and microtubule sliding in ciliary axonemes isolated from *Paramecium caudatum*. *J. Cell Sci.* 61: 107-121.
- 7) Mizuno K, Shiba K, Okai M, Takahashi Y, Shi-taka Y, Oiwa K, Tanokura M and Inaba K (2012) Calaxin drives sperm chemotaxis by  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A. **109**: 20497-20502.
- 8) Leasi F, Pennati R and Ricci C (2009) First description of the serotonergic nervous system in a bdelloid rotifer: *Macrotrachela quadricornifera* Milne 1886 (Philodinidae). *Zool. Anz.* **248**: 47-55.
  - 9) Keshmirian J and Nogradi T (1989) Rotifer neuropharmacology IV. Involvement of aminergic neurotransmitters in the abnormal sessile behavior of *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Aschelminthes). *Hydrobiologia* **174**: 213-216.
  - 10) 濱川富朗, 福田英臣 他 (1991) 神經伝達物質 藥物作用 と疾患. 廣川書店. 高崎
  - 11) Doran SA, Koss R, Tran CH, Christopher KJ, Gallin WJ and Goldberg JI (2004) Effect of serotonin on ciliary beating and intracellular calcium concentration in identified populations of embryonic ciliary cells. *J. Exp. Biol.* **207**: 1415-1429.
  - 12) Bannai H, Yoshimura M, Takahashi K and Shingyoji C (2000) Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *J. Cell Sci.* **113**: 831-839.



■原 著■

## クルマエビ眼柄甲殻類雌性ホルモンの精製と生物活性の測定

安保裕子<sup>1</sup> 渡部聰美<sup>1</sup> 甲高彩華<sup>1</sup> 大平 剛<sup>1,2</sup>

Purification of Crustacean Female Sex Hormone from the Eyestalk of the Kuruma Prawn *Marsupenaeus japonicus* and Its Biological Activity

Yuko Anbo<sup>1</sup>, Satomi Watabe<sup>1</sup>, Sayaka Kotaka<sup>1</sup> and Tsuyoshi Ohira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: ohirat-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Recently, crustacean female sex hormone (CFSH) has been purified from the female eyestalk of the crab *Callinectes sapidus*. Gene knockdown of *C. sapidus* CFSH by RNA interference was shown to inhibit the appearance of female reproductive characteristics. This result suggests that CFSH controls female secondary sex characteristics. Recently, we cloned cDNA encoding the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* CFSH (Maj-CFSH). In order to examine the biological function of Maj-CFSH, we purified native Maj-CFSH and assessed its biological function. In our previous study, native Maj-CFSH was localized in the sinus gland located in the eyestalk of *M. japonicus*. Therefore, sinus glands were dissected under a stereo microscope and an extract was subsequently prepared. The sinus gland extract was subjected to reverse-phase HPLC. All peak fractions were collected and subjected to western blot analysis using anti-Maj-CFSH antibody. As a result, immunopositive band was detected only in a single peak fraction. This peak fraction was subjected to N-terminal amino acid sequence analysis and then 10 N-terminal amino acid residues were determined. This N-terminal sequence was identical to that of the mature Maj-CFSH. These results indicate that we have successfully purified native Maj-CFSH. The effect of the purified native Maj-CFSH on vitellogenin (VG) gene expression was examined using an ex vivo ovarian incubation system. Maj-CFSH had an inhibitory effect on VG gene expression, whereas the negative control (medium only) did not. Maj-SGP-VII, which is one of six vitellogenesis-inhibiting hormones (VIH) in *M. japonicus*, also had a clear inhibitory effect on VG gene expression levels in this incubation system. These results suggest that Maj-CFSH exhibits vitellogenesis-inhibiting activity in *M. japonicus*.

**Keywords:** kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, crustacean female sex hormone (CFSH), vitellogenesis-inhibiting hormones (VIH)

### 序論

通常、甲殻類の複眼は頭部から突出しており、その複眼を支えている柄の部分を眼柄と呼ぶ。この眼柄を切除すると、雌の卵黄形成が早まることがから、眼柄内には成熟を抑制的に制御する因子が存在すると推定されていた。また、眼柄の基部にはX器官と呼ばれる神経分泌細胞群と、そこからのびる軸索の末端で形成される神経血液器官（サイナス腺）が存在すること、およびX器官で合成された神経ペプチドがサイナス腺に貯蔵された後、血リンパ中に放出さ

れることが判明した。そして1991年に、アメリカンロブスターのサイナス腺から成熟を抑制する作用を持つ神経ペプチドが単離され、卵黄形成抑制ホルモン（vitellogenesis-inhibiting hormones, VIH）と名付けられた<sup>1)</sup>。その後、日本の水産重要種であるクルマエビのサイナス腺には、少なくとも6種類のVIHが存在することが報告され、多様なVIHにより成熟が抑制されていることが示唆された<sup>2)</sup>。その後、シバエビやクマエビなどクルマエビ科のエビ類

から次々と VIH が単離・同定されている<sup>3)</sup>。

2014 年、アオガニのサイナス腺から甲殻類雌性ホルモン (crustacean female sex hormone, CFSH) が単離された<sup>4)</sup>。アオガニの CFSH は雌のサイナス腺にのみ存在し、遺伝子発現も雌特異的であった。RNA 干渉によるアオガニ CFSH の遺伝子サイレンシングを行うと、雌性生殖孔や抱卵剛毛のような交尾と抱卵に必要な雌性外部形態の形成を抑制した。このことから、CFSH は甲殻類の雌の二次性徴を制御していると考えられている。クルマエビにおいても、眼柄から CFSH (クルマエビ眼柄 CFSH) をコードする cDNA がクローニングされている<sup>5)</sup>。しかし、クルマエビ眼柄 CFSH は雌雄の眼柄で遺伝子発現しており、アオガニのような雌雄特異性は観察されなかつた。そのため、クルマエビ眼柄 CFSH は雌性ホルモンではなく、別の機能を有すると考えられた。そこで本研究では、クルマエビ眼柄 CFSH をサイナス腺から精製・単離し、その生物活性を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 実験動物

2016 年から 2017 年にかけて、沖縄県久米島町と徳島県鳴門市の養殖業者から購入した雌雄のクルマエビ (15 g ~ 25 g) をサイナス腺の摘出に使用した。2018 年 1 月に徳島県鳴門市の養殖業者から購入した未成熟な雌クルマエビ (平均体重約 25 g) を卵黄形成抑制活性の測定に用いた。

### クルマエビ眼柄 CFSH の精製

クルマエビのサイナス腺を実体顕微鏡下でピンセットとマイクロ剪刀を用いて外科的に摘出した。摘出したサイナス腺を 2 M 酢酸溶液が入っている 1.5 ml チューブに移し、氷上に置いた。チューブ 1 本あたり 100 個のサイナス腺を入れ、ホモジナイザーペッスルを用いてホモジナイズし、13,500 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清のみを別のチューブに移し、元のチューブに残った沈殿に再び 2 M 酢酸溶液を入れ、同じ操作を行った。2 回分の上清を合わせたものをサイナス腺粗抽出物とした。次に、遠心エバポレータ (佐久間製作所, 東京) を用いてサイナス腺抽出物を濃縮した後、0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) を加えて 1 ml となるように調製し、逆相 HPLC (NANOSPACE SI-1, 資生堂, 東京) に供した。カラムは Senshu Pak PEGASIL C4 SP100 カラム (4.6 × 100 mm, センシュー科学, 東京) を用いて、20% MeCN/0.05% TFA から 60% MeCN/0.05% TFA までの 40 分間のリニアグラジェントで分画した。流速は

1 ml/ 分、検出は 225 nm の波長で行い、溶出パターンを見ながらマニュアルで全てのピーク産物を分取した。

### 抗クルマエビ眼柄 CFSH 抗体を用いたウエスタンプロット解析

10 サイナス腺に相当するピーク産物に 2 × Laemmli sample buffer (250 mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.02% bromophenol blue) を等量加え、100°C で 5 分間熱処理をしたサンプルを 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。ゲルと同じ大きさに切った PVDF 膜 (アトー, 東京) を 99.5% メタノールに数秒浸した後、Blotting buffer B (25 mM Tris-base, 5% メタノール) に 30 分以上浸した。ゲルと同じ大きさに切った濾紙 2 枚を Blotting buffer A (0.3 M Tris-base, 5% メタノール) に、4 枚を Blotting buffer B に 30 分以上浸した。電気泳動後、アクリルアミドゲルを Blotting buffer B に浸した。セミドライ式ブロッティング装置上に Blotting buffer A に浸した濾紙 2 枚、Blotting buffer B に浸した濾紙 1 枚、PVDF 膜、泳動後のアクリルアミドゲル、Blotting buffer B に浸した濾紙 3 枚を順番に重ね、ゲル面積 (cm<sup>2</sup>) の 2 倍の電流 (mA) を 40 分間流した。蛋白質が転写された PVDF 膜を 0.05% tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS; Tris buffered saline (pH7.5); 20 mM Tris-HCl, 150 mM sodium chloride) 中で 5 分間ずつ 2 回振盪した後、ブロッキング溶液 (0.5% スキムミルク, 0.05% tween-20 を含む TBS) 中で 30 分間振盪した。そこに抗クルマエビ眼柄 CFSH 抗体<sup>6)</sup> を 1/2,000 倍量入れ、37°C で一晩振盪した。PVDF 膜を 0.05% tween-20 を含む TBS で 5 回洗浄した後、0.05% tween-20 を含む TBS に PVDF 膜を浸し、HRP 標識された抗ウサギ IgG ヤギ IgG 抗体 (funakoshi, 東京) を 1/2,000 倍量加えて 37°C で 1 時間振盪した。PVDF 膜を 0.05% tween-20 を含む TBS で 10 回、TBS で 5 回洗浄した後、検出液 (0.009% 4-Chloro-1-naphthol と 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む TBS) を用いてシグナルを検出した。

### N 末端アミノ酸配列

N 末端アミノ酸配列は、ABI Procise 491 HT Procise® Protein Sequencer (Applied Biosystems, USA) を用いて解析した。

### 卵黄形成抑制活性の測定

卵巣の培養は Tsutsui らの方法に従って行った<sup>7)</sup>。逆相 HPLC で精製したクルマエビ眼柄 CFSH を 1 サ

イナス腺相当量ずつ培養液に添加し、クルマエビの卵巣片を培養した。ネガティブコントロールは培養液のみで、ポジティブコントロールはクルマエビの組換え Pej-SGP-VII（クルマエビの 6 種類の VIH のうちの 1 つ）<sup>8)</sup>を 10 ng ずつ培養液に添加して卵巣片を培養した。

## 定量 PCR

培養したクルマエビの卵巣片の全 RNA は Ribozol (AMRESCO, Ireland) を用いて抽出した。定量を行うために 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマー (Maj-Vg qPCR-F と Maj-Vg qPCR-R と TaqMan プローブを設計し、合成を外注した (表 1)。逆転写反応および PCR 反応は PLATINUM Quantitative RT-PCR Thermoscript One-Step System (Invitrogen) を用いて、2 X Thermoscript reaction mix を 7.5 μL, Thermoscript Plus/Taq mix を 0.25 μL, ROX reference dye を 0.25 μL, 50 mM Magnesium Sulfate を 0.65 μL、プライマー Maj-Vg qPCR-F と Maj-Vg qPCR-R (10 μM) をそれぞれ 0.2 μL, 10 μM TaqMan プローブを 0.2 μL, SDW を 10.75 μL, 40 ng/μL の卵巣 total RNA 溶液を 5 μL を含む 25 μL の溶液を使用した。反応は 60°C で 15 分間、95°C で 5 分間保温の後、95°C で 15 秒間、61°C で 50 秒間のサイクルを 38 回繰り返した。サーマルサイクリングと蛍光シグナルのリアルタイム測定には 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いた。Vg 遺伝子を適度に発現しているクルマエビの卵巣から抽出した total RNA を連続希釈したものと標準物質として、それらから得られる蛍光シグナルの測定値をもとに標準曲線を描画した。

表 1. 定量 PCR で使用したプライマーと TaqMan プローブ

Primer	Sequence (5'-3')
Maj-Vg qPCR-F	AACATCGCCCAAATCCTCTCT
Maj-Vg qPCR-R	GGCACTCAAAGCCCACAAAA
TaqMan probe	(6-FAM) CCTGGCAATTGCAGACCGGCA (TAMRA)

## 結果

### クルマエビサイナス腺ペプチドの精製

クルマエビのサイナス腺抽出物 (150 個相当量) を逆相 HPLC で分画した結果、多数のピークが観察された (図 1)。回収したピーク産物の全てを、抗クルマエビ眼柄 CFSH 抗体を用いたウエスタンプロットに供した。その結果、溶出時間 19 分の P1 で免疫陽性のバンドが観察された (図 2)。この P1 を N 末端アミノ酸配列解析に供し、10 残基のアミノ酸配列を解析した (決定したアミノ酸配列 : HLDDFIPGLL)。その配列は、成熟クルマエビ眼柄

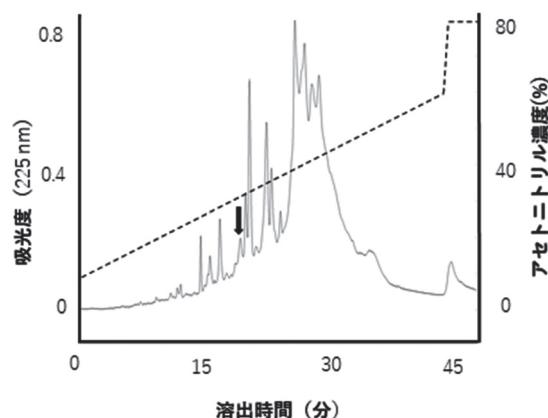


図 1. 逆相 HPLC を用いたクルマエビのサイナス腺抽出物 (150 個相当量) の分離。矢印は P1 を示し、点線はアセトニトリル濃度を示す。

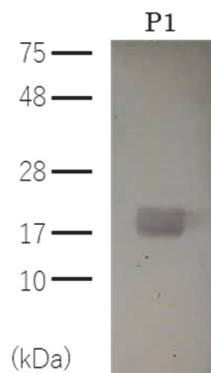


図 2. 抗クルマエビ眼柄 CFSH 抗体を用いたウエスタンプロット解析。

CFSH のアミノ酸配列と完全に一致していた<sup>5)</sup>。これらの結果より、P1 はクルマエビ眼柄 CFSH であると考えられた。

### 卵黄形成抑制活性の測定

クルマエビ眼柄 CFSH の卵黄形成抑制活性を測定した。クルマエビ眼柄 CFSH を 1 サイナス腺相当量ずつ培地に添加してクルマエビの卵巣片を培養したところ、Vg mRNA 量は  $55.8 \pm 5.7\%$  に減少した (図 3)。この値はコントロール群の  $108.8 \pm 37\%$  と比べて低かったが、統計的に有意ではなかった。ポジティブコントロールのクルマエビ VIH も Vg 遺伝子の発現を抑制したが ( $50.0 \pm 10.7\%$ )、これの統計的に有意ではなかった。本来、クルマエビ VIH は有意に Vg mRNA の発現を抑制することが知られていることから<sup>9)</sup>、今回の結果は卵巣培養に問題があった可能性がある。クルマエビ眼柄 CFSH の Vg 遺伝子発現の抑制率は、クルマエビ VIH と同程度であったことから (図 3)、クルマエビ眼柄 CFSH は卵巣における Vg 遺伝子の発現を抑制する活性をもつと考えられた。

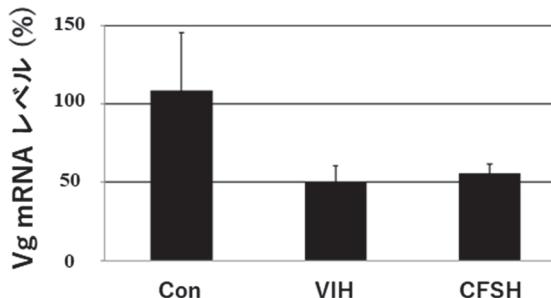


図3. 卵黄形成抑制活性の測定. Conは培地のみ, VIHはPej-SGP-VIを培地に添加, CFSHは1サイナス腺相当量を培地に添加して卵巣を培養した結果を示す. エラーバーは標準誤差を示す.

## 討論

クルマエビのサイナス腺から、眼柄CFSHを精製・単離した。天然CFSHを精製したのはアオガニCFSHに続いて本研究が2例目である<sup>4)</sup>。サイナス腺からCFSHを精製することができるようになったことで、CFSHの機能解析が格段に進むと思われる。例えば、本研究では精製したクルマエビ眼柄CFSHを、クルマエビの卵巣培養系に添加してみた。もし、クルマエビ眼柄CFSHが雌性ホルモンであればVg遺伝子の発現を促進するのではと予想したが、予想外にもクルマエビ眼柄CFSHはVg mRNAの発現を抑制した。CFSHに卵黄形成抑制活性があることを明らかにしたのは本研究が初めての例である。序論でも述べたが、クルマエビ眼柄CFSHは雌雄の両方で遺伝子発現していることから、雌性ホルモンではないと考えられてきた<sup>5)</sup>。本研究により、クルマエビ眼柄CFSHが成熟を制御している可能性を示すことができた。今後は、クルマエビ眼柄CFSHが、雄においても精子形成を抑制しているかを調べる必要がある。

クルマエビ眼柄CFSHを精製・単離できるようになつたが、精製できるホルモン量は既知のサイナス腺ホルモンよりも少ない<sup>2)</sup>。例えば、本研究で使用したクルマエビのVIH(Pej-SGP-VII)は、300サイナス腺相当量の抽出物から、測定波長225 nmの時の吸光度が0.5以上の高さのピーク産物が得られている。今後、クルマエビ眼柄CFSHの投与実験などを通して生物活性を調べていくことになるが、天然クルマエビ眼柄CFSHを用いるのには限界がある。なぜなら、天然クルマエビ眼柄CFSHを用いて投与実験を行うためには、数千尾のクルマエビが必要となるからである。このように、天然ホルモンの精製

には、コストもかかるうえに、時間も必要である。将来的に、この問題を解決するためには、クルマエビ眼柄CFSHの組換え体の作製法の確立が必要である。クルマエビ眼柄CFSHはN結合型糖鎖の付加配列を有することから、天然CFSHには糖鎖が付加されていると推測されている<sup>6)</sup>。そのため、組換え体の作製には哺乳類細胞や昆虫細胞を宿主に用いる発現系や、酵母発現系などを用いる必要があると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、三重大学生物資源学部の筒井直昭准教授には有益なご助言をしていただきました。ここに謝意を表します。

## 文献

- 1) Soyez D, Le Caer JP, Noel PY and Rossier J (1991) Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides* **20**: 25-32.
- 2) Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* **6**: 49-90.
- 3) 福島 翠 (2010) クルマエビ類における成熟制御因子の探索. 修士論文, 日本大学.
- 4) Zmora N and Chung JS (2014) A novel hormone is required for the development of reproductive phenotypes in adult female crabs. *Endocrinol.* **155**: 230-239.
- 5) Kotaka S and Ohira T (2018) cDNA cloning and in situ localization of a crustacean female sex hormone in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Fish. Sci.* **84**: 53-60.
- 6) 甲高彩華 (2018) クルマエビの甲殻類雌性ホルモン様分子の探索および生理機能の解明. 博士論文, 神奈川大学.
- 7) Tsutsui N, Katayama H, Ohira T, Nagasawa H, Wilder MN and Aida K (2005) The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **144**: 232-239.
- 8) Nagai C, Asazuma H, Nagata S, Ohira T and Nagasawa H (2009) A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, using the bacterial expression system. *Peptides* **30**: 507-517.
- 9) Tsutsui N, Nagakura A, Nagai C, Ohira T and Nagasawa (2013) The ex vivo effects of eyestalk peptides on ovarian vitellogenin gene expression in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Fish. Sci.* **79**: 33-38.

■原 著 ■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 消化後固定法によるシロイヌナズナの減数分裂期染色体の調製

安積良隆<sup>1, 2, 3</sup> 笹本浜子<sup>2</sup>

Preparation of Meiotic Chromosomes of *Arabidopsis thaliana*  
by Digest-and-Fix Method

Yoshitaka Azumi<sup>1, 2, 3</sup> and Hamako Sasamoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Meiosis is an essential process for the production of gametes, and it consists of one round of chromosome replication and two rounds of mitosis. During meiosis, the chromosome number must be accurately halved, or subsequent generations produced by fertilization of gametes with irregular numbers of chromosomes will become aneuploids, which are lethal in most cases. This accuracy is guaranteed by homologous chromosome synapsis and even segregation. Therefore, synapsis and the following segregation are prerequisites for the production of normal gametes and the next generation. The molecular mechanism of chromosome control during meiosis of plants remains unclear. Unknown components such as ncRNA may be involved. In order to elucidate components of this mechanism, a new method of intact chromosome preparation is necessary. We explored the Digest-and-Fix method, which consists of two steps. First, digestion of pollen mother cells with cell wall-digesting enzymes while keeping their plasma membrane intact, and second, simultaneous fixing and spreading of chromosomes with Farmer's solution onto slide glasses.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, meiosis, pollen mother cell, chromosome, cell wall

### 序論

体細胞分裂では1回の染色体複製の後、1度だけ有糸分裂が起こり、母細胞と娘細胞の染色体数は等しいが、減数分裂では1回の染色体複製の後、連続して2回の有糸分裂が起こるため、染色体数が半減する。植物ではこの分裂により、染色体数 $2n$ の胞子体から染色体数 $n$ の配偶体世代が作り出され、この中で精細胞と卵細胞といった配偶子が形成される。これらの雌雄の配偶子の受精によって、前世代と同じ $2n$ の染色体をもつ次世代が生み出されるわけであるが、正常な染色体数の次世代が生み出されるためには、減数分裂時に正確に1組の染色体を有するように染色体数が半減されなければならない。このしくみは世代を通じて染色体数を維持する上で非常に重要である。

植物を材料とする減数分裂の研究でも、染色体の

構造観察は古くから行われてきた。1890年ごろ、E. A. Strasburger や J. L. Guignard らは、ユリ科の植物で減数分裂時に相同染色体が対合・分離し、染色体数が半減する様子を光学顕微鏡を用いて観察した。この染色体の挙動が、後に遺伝子と呼ばれるメンデルの要素の挙動と一致することから、遺伝子は染色体上に存在するとする染色体説が提唱された。電子顕微鏡が開発され、詳細な染色体の構造解析が進み、動物、真菌類、植物で減数分裂期には相同染色体間にシナプトネマ複合体と呼ばれる構造が形成されることも明らかとなつた<sup>1-3</sup>。

1980年ごろ、シロイヌナズナがモデル植物に採用されて、シロイヌナズナでも減数分裂期染色体の観察が盛んに行われるようになった。Ross らは固定した花粉母細胞の細胞壁をサイトヘリカーゼなどを用

いて消化し、物理的障壁が除去され自由となった染色体をスライドガラスに平面的に薄く貼り付けた後に DAPI で染色するという減数分裂期染色体の観察法を開発した<sup>4)</sup>。この方法は簡便で、染色体をスライドガラス表面に広く薄く貼り付けるので、染色全体を光学顕微鏡でも高精細に観察することができる。シロイヌナズナで減数分裂期相同組み換えに異常が生じるものやシナプトネマ複合体が形成されないものなどの減数分裂変異体が数多く単離され、この方法で染色体が解析された<sup>5-9)</sup>。変異体の原因遺伝子が同定され、減数分裂時に特異的に発現し、減数分裂に不可欠な遺伝子の解析も進められている。ゲノムプロジェクトの完了や変異体などの遺伝的資源の蓄積、転写産物や遺伝子産物の網羅的な解析<sup>10)</sup>などがあって、減数分裂に必要な遺伝子の解析は今も進められている。

近年、タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) が様々な生理現象に関与していることが明らかになり、その重要性が増してきている。酵母菌では減数分裂期の相同染色体の対合に ncRNA が必要であることが示されている<sup>11)</sup>。また、植物でも phasiRNA と呼ばれる植物特有の ncRNA が減数分裂に必要である可能性が示されている<sup>12, 13)</sup>。様々な要素の関連が示唆されてきているが、依然として減数分裂期の染色体やシナプトネマ構造などの構成因子がすべて明らかになっているわけではない。

これまでの観察法では花粉母細胞を固定したのち、細胞壁消化酵素を用いて細胞壁を取り除き、染色体をスライドガラスなどに付着させて観察するものであるが、消化酵素を働かせている間に、消化酵素に混入している様々な酵素が細胞内に侵入し、タンパク質や RNA が分解され、染色体の構成要素が失われる可能性がある。未知の構成要素の局在を検出するための方法として我々は固定しないで生きた花粉母細胞の細胞壁を取り除いて、固定と同時に染色体をスライドガラス上に平面的に付着させ、染色体構成要素を高精細に解析する方法の開発を試みた。

## 材料と方法

### シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Landsberg erecta) は培養土に播種し、神奈川大学湘南ひらつかキャンパスの植物育成棟内で栽培した。24°C、14 時間明期 10 時間暗期の光周期の蛍光灯下、1 週間に 1 度、ハイポネックスを肥料として与えた。

### 細胞壁の酵素処理

実体顕微鏡下でシロイヌナズナの花序から、1 mm

以下の蕾を取り出し、萼片をできるだけ切除した。萼を除いた蕾を、ホールスライドガラスに用意した 100 μL の各種濃度の細胞壁消化酵素を含む溶液に沈めた。消化酵素はセルラーゼ RS (ヤクルト)、マセロザイム R10 (ヤクルト)、ペクトリニアーゼ (協和化成)、ヘミセルラーゼ (シグマ H-2125)、ドリセラーゼ 20 (協和発酵工業) を使用した。密閉できるプラスチックの箱の中にスライドガラスを並べ、所定の時間室温 (20°C 前後) に置き、消化を行った。

### 染色体標本の作製と顕微鏡観察

消化後の花粉母細胞の様子を観察する場合は、所定の時間が経過した時点で一部の蕾をスライドガラスに移し、針で薬を破壊した後、カバーガラスを被せ、顕微鏡観察を行った。

染色体標本を作製する場合は、消化し終えた蕾をスライドガラス上の 3 μL の 60% 酢酸溶液に移し、薬を潰して花粉母細胞をスライドガラス上に拡散させた。5 μL の 60% 酢酸溶液を追加して、45°C のホットプレート上に 1 分間置いた。ファーマー液 (エタノール : 酢酸、3 : 1) を滴下することで、染色体を固定した。風乾後、1.5 μg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (VECTOR) で染色して、蛍光顕微鏡 (オリンパス BX61) で観察し、デジタルカメラ (オリンパス DP80) で記録した。

## 結果

減数分裂期染色体の微細構造・構成成分をできるだけ保持した減数分裂期染色体試料を準備する方法として消化後固定法の開発に挑んだ。従来の方法とは違い、細胞膜を破壊しないで細胞壁を消化し、半プロトプラスト化した細胞を調製し、それを固定すると同時にスライドガラスに貼り付ける方法を試すこととした。

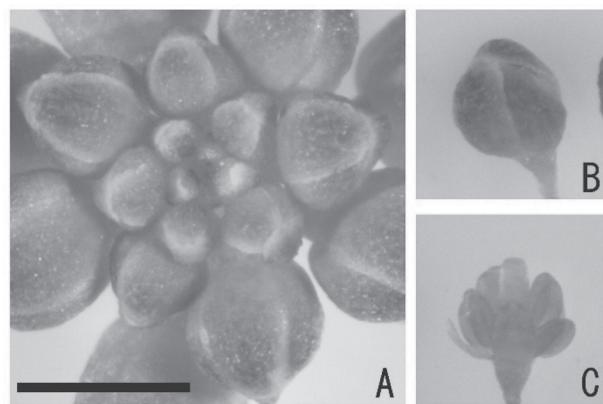


図 1. シロイヌナズナの蕾。A. 健康なシロイヌナズナの花序。B. 花序から蕾を取り出した状態。C. 取り出した蕾から萼を取り除いたもの。スケールバー、1 mm。

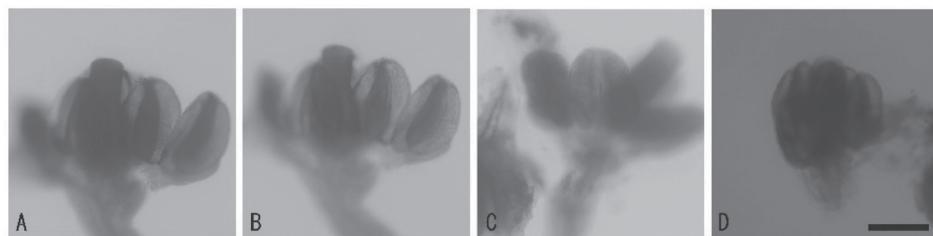


図 2. 酵素処理を行った薔。A. 消化前の薔，B. 0.5 h 処理した薔のもの，C. 4 h 処理した薔のもの，D. 14 h 処理した薔のもの。スケールバー，0.2 mm.

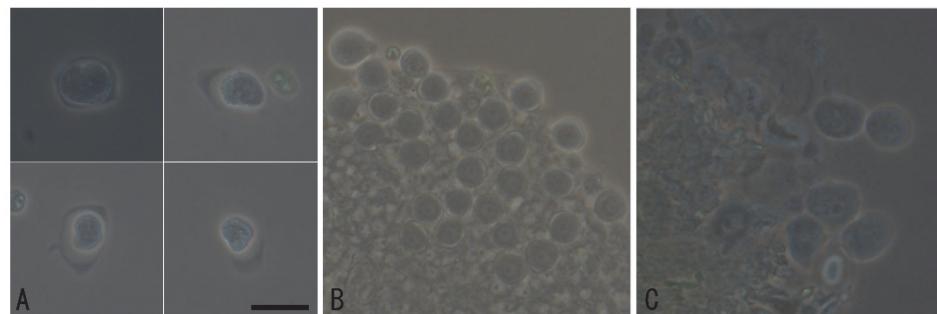


図 3. 消化した薔の花粉母細胞。A. 0.5 h 処理した薔のもの。B. 4 h 処理した薔のもの。C. 14 h 処理した薔のもの。スケールバー，20 μm.

図 1A のようなシロイヌナズナの花序を集め、花粉母細胞が減数分裂を行っていると予想される大きさの薔を選抜した。薔が残っていると消化酵素が薔中に侵入しにくいと考え、先端の鋭利な針を用いて、薔から萼を除くことにした（図 1C）。薔が露出した状態の薔を酵素液に沈めた。使用する酵素としては 2017 年の安積と笛本の研究結果<sup>14)</sup>を踏まえ、セルラーゼ RS、ヘミセルラーゼ、ペクトリニアーゼを用いた。

ゼ RS、ヘミセルラーゼ、ペクトリニアーゼを使用することにし、濃度と処理時間を変えて消化を行った。高濃度短時間処理（0.5 h 処理；4% セルラーゼ RS、4% ヘミセルラーゼ、2% ペクトリニアーゼ、1 M ソルビトール、0.5 時間）、中濃度処理（4 h 処理；1% セルラーゼ RS、1% ヘミセルラーゼ、0.5% ペクトリニアーゼ、1 M ソルビトール、4 時間）、低濃度長時間処理（14 h 処理；0.4% セルラーゼ RS、0.4% ヘミセルラーゼ、0.2% ペクトリニアーゼ、1 M ソルビトール、14 時間）など条件で花粉母細胞の細胞壁を消化した。図 2 に

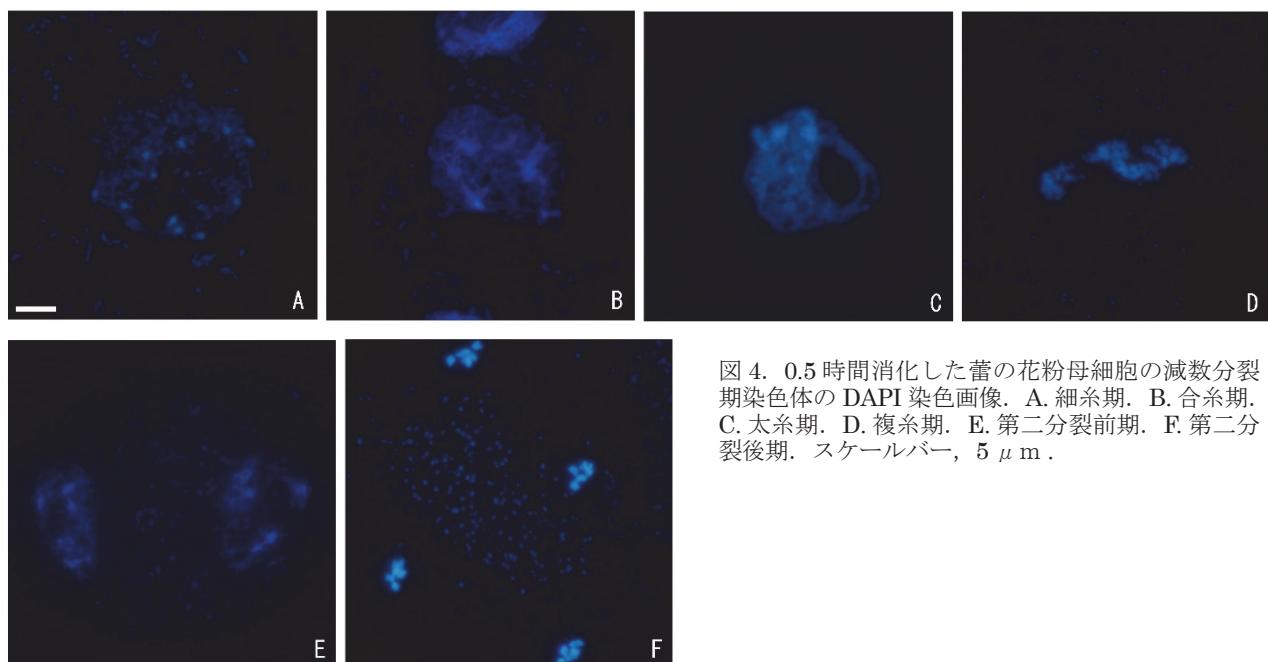


図 4. 0.5 時間消化した薔の花粉母細胞の減数分裂期染色体の DAPI 染色画像。A. 細糸期。B. 合糸期。C. 太糸期。D. 複糸期。E. 第二分裂前期。F. 第二分裂後期。スケールバー，5 μm.

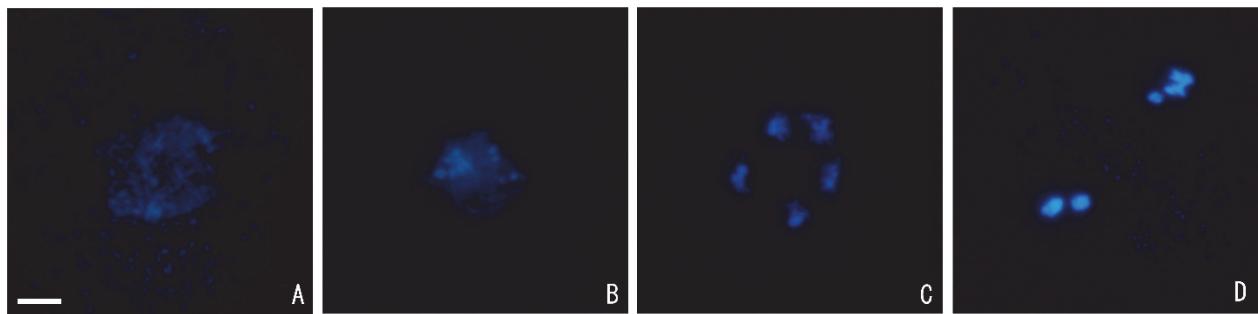


図 5. 4 時間消化した薔薇の花粉母細胞の減数分裂期染色体の DAPI 染色画像. A. 細糸期. B. 合糸期. C. 移動期. D. 第二分裂中期. スケールバー, 5  $\mu$ m.

示すように、上記の 0.5 h、4h、14h 処理後のどの薔薇も処理前の形状を保っていた。植物の地上部の表皮細胞の外側にはクチクラ層が形成されるので、薔薇の表面もクチクラ層に覆われていると考えられ、これらの酵素ではクチクラは消化されなかつたと考えられる。そのため薔薇の外見は維持されたものと思われる。

これらの処理後、薔薇をスライドガラス上でつぶして細胞を顕微鏡で観察したところ、図 3 のように様々な程度に細胞壁が消化された花粉母細胞が観察された。酵素処理によって、全ての花粉母細胞が壊れてしまうことが、最悪の結果であるが、どの処理においても、壊れてしまった花粉母細胞もあつ

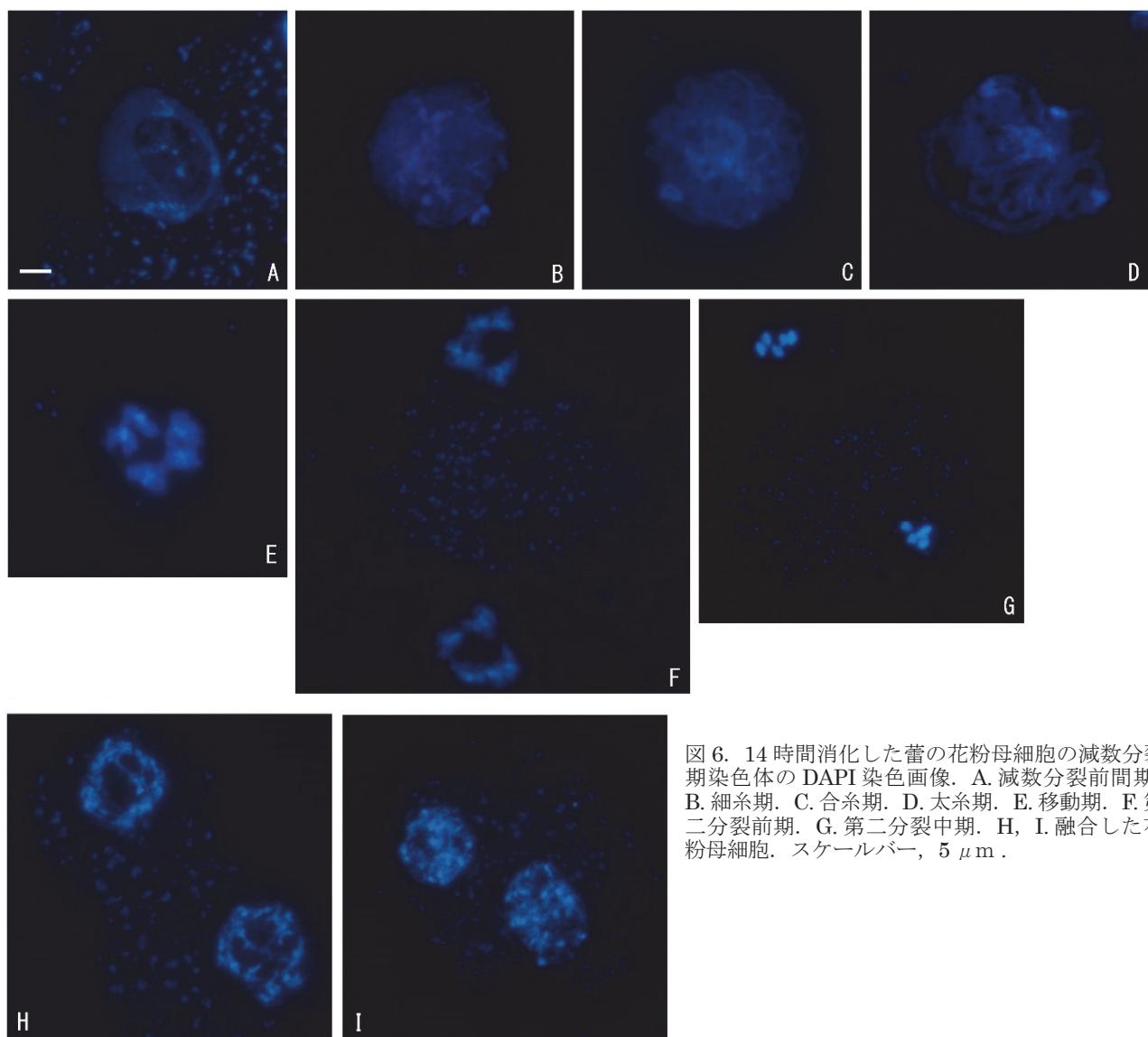


図 6. 14 時間消化した薔薇の花粉母細胞の減数分裂期染色体の DAPI 染色画像. A. 減数分裂前間期. B. 細糸期. C. 合糸期. D. 太糸期. E. 移動期. F. 第二分裂前期. G. 第二分裂中期. H, I. 融合した花粉母細胞. スケールバー, 5  $\mu$ m.

たかも知れないが、壊れていない花粉母細胞が多数見られたので、これらの条件で消化を行い、染色体を観察することにした。

消化後の薬をスライドガラス上で破壊し、花粉母細胞をスライドガラスに貼り付け、DAPI 染色して、染色体の観察を行った。0.5 h、4 h、14 h 处理のどの処理においても、減数第一分裂から第二分裂の様々なステージの染色体が鮮明に観察された。このことから、3つのすべての処理において適度に細胞壁が消化された花粉母細胞が存在したことがわかる(図4、5、6)。0.5 h 処理では、一枚のスライドガラスに比較的多数の細胞が観察されたが、14 h 処理のスライドガラスでは観察された細胞の数は比較的小少であった。すべての処理において1枚のスライドガラスに幅広いステージの花粉母細胞が観察された。また、どの処理でも鮮明な減数分裂期染色体を観察することができたが、染色体は凝縮の程度が低く、弛緩しているような印象であった。14 h 処理のものでは、融合しているように思われる細胞が散見された(図6 H、I)。長時間処理すると細胞膜が露出した細胞同士の融合が起こるものと思われる。

## 討論

減数分裂期染色体の構造・要素を知るため、できるだけ生細胞中の状態を維持した染色体を調製する方法の開発を試みた。細胞膜を壊さずに細胞壁を消化して、プロトプラストに近い状態にして、固定と同時に染色体をスライドガラスに貼り付ける方法の開発を行った。セルラーゼ RS、ヘミセルラーゼ、ペクトリアーゼを使用することで花粉母細胞の細胞壁を十分消化することができ、減数分裂期染色体を観察できることができ明らかになった。観察された染色体は、固定してから消化する Ross らの方法で観察されたものと比べると、やや弛緩している印象があった。対応している相同染色体も少し距離があるようだ。先に固定する方法では、通常、ファーマー液で1晩固定するのに対し、本研究の方法では固定は数分程度で終わる。固定時間の差が染色体像に現れたのかも知れない。長時間の固定は過度の凝縮を引き起こすのかも知れないし、短時間の固定は不十分であるかも知れない。短時間の固定と長時間の固定とどちらがより良く生細胞での状態を反映しているかは、さらなる検討を要する。

観察される細胞の数は、スライド毎に違いはあったが、固定してから細胞壁を消化する方法と比べると少ない印象であった。これは、スライドガラスに付着する細胞は細胞壁を除かれたもので、消化後固定法では薬ごとに薬に侵入する酵素の量に違いがあ

り、その量によって、多くがプロトプラスト化する薬もあればそうでない薬もあり、貼りつく花粉母細胞の数にばらつきができると考えられる。酵素はクチクラ層を通過できないため、気孔や何らかの原因でできた傷口などから侵入すると考えられるが、侵入口の多寡によって違いが生じると推察される。

固定を先に行う方法では、比較的同じステージの花粉母細胞が1つのスライドガラスに観察されたが、本研究の消化後固定法では1枚のスライドガラス上に、つまり1つの薬由来の試料に多くのステージの花粉母細胞が観察された。これは消化中もステージが進行するが、消化処理によって様々なステージで進行が停止したためではないかと考えられる。さらに、長時間の消化を行うと、細胞融合が起こったのではないかと思われる多核の細胞も見られた。

これらのこと総合すると、短時間高濃度で処理した方が生細胞の状態に近く、ステージが揃った試料を得やすいと考えられる。観察される細胞の数は固定を先に行う方法と比べると少ないかも知れないが必要な数の細胞は十分観察することができた。本研究では固定にファーマー液を使用した。パラフォルムアルデヒドなどを用いた固定を行えば、観察したいターゲットによっては、より良い結果が得られる可能性がある。RNAの分解の程度を調べる必要があるが、DNAやRNAを主たる観察対象とする場合は本研究に使用した方法は非常に適していると考えられる。

## 謝辞

本論文の一部は、2018年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS201806)を受けて行われた。記して感謝する。

## 文献

- 1) Moses MJ (1958) The relation between the axial complex of meiotic prophase chromosomes and chromosome pairing in a salamander (*Plethodon cinereus*). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**: 633-638.
- 2) Zickler D (1973) Fine structure of chromosome pairing in ten Ascomycetes: meiotic and premeiotic (mitotic) synaptonemal complexes. *Chromosoma* **40**: 401-416.
- 3) Albini SM, Jones GH and Wallace BM (1984) A method for preparing two-dimensional surface-spreads of synaptonemal complexes from plant meiocytes for light and electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **152**: 280-285.
- 4) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
- 5) Grelon M, Vezon D, Gendrot G and Pelletier G (2001) AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic

- recombination in plants. *EMBO J.* **20**: 589-600.
- 6) Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y and Ma H (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J.* **21**: 3081-3095.
  - 7) Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K and Sugimoto-Shirasu K (2006) *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* **48**: 206-216.
  - 8) Bai X, Peirson BN, Dong F, Xue C and Makaroff CA (1999) Isolation and characterization of SYN1, a RAD21-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant cell* **11**: 417-430.
  - 9) Higgins JD, Sanchez-Moran E, Armstrong SJ, Jones GH and Franklin FC (2005) The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev.* **19**: 2488-2500.
  - 10) Zhang B, Xu M, Bian S, Hou L, Tang D, Li Y, Gu M, Cheng Z and Yu H (2015) Global Identification of Genes Specific for Rice Meiosis. *PLoS One* **10**: e0137399.
  - 11) Ding DQ1, Okamasa K, Yamane M, Tsutsumi C, Haraguchi T, Yamamoto M and Hiraoka Y (2012) Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science* **336**: 732-736.
  - 12) Komiya R1, Ohyanagi H, Niihama M, Watanabe T, Nakano M, Kurata N and Nonomura K. (2014) Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J.* **78**: 385-397.
  - 13) Xia R, Chen C, Pokhrel S, Ma W, Huang K, Patel P, Wang F, Xu J, Liu Z, Li J and Meyers BC (2019) 24 nt reproductive phasiRNAs are broadly present in angiosperms. *Nat. Commun.* **10**: 627.
  - 14) 安積良隆, 笹本浜子 (2017) 高等植物の花粉母細胞のプロトプラスト化と染色体観察に関する研究. *神奈川大学理学誌* **28**: 85-92.

■原 著 ■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## ナマズ目オトシンクルスをモデルとした硬骨魚類黒色素胞の 収縮調節機構の研究

深沢優子<sup>1,3†</sup> 橋本真莉菜<sup>1†</sup> 上谷雄介<sup>1</sup> 天野桃香<sup>1</sup> 茂木和枝<sup>2</sup>  
小笠原 強<sup>1,2</sup> 豊泉龍児<sup>1,2</sup>

Study on the Mechanisms for Melanophore Contraction in *Otocinclus*

Yuko Fukasawa<sup>1,3,†</sup>, Marina Hashimoto<sup>1,†</sup>, Yusuke Uetani<sup>1</sup>, Momoka Amano<sup>1</sup>,  
Kazue Mogi<sup>2</sup>, Tsuyoshi Ogasawara<sup>1,2</sup> and Ryuji Toyoizumi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: yuko7778kngwu@gmail.com

† Both authors contributed equally to this work.

**Abstract:** *Otocinclus* is a very popular catfish, belonging to the order Siluriformes, family Loricariidae. *Otocinclus* has a very flat dorsal surface and the melanophores in the dorsal dermal skin are distributed in a proper density that allows us to recognize and quantitatively assess the morphology of individual ones; thus, we think that *Otocinclus* catfish is appropriate for the study of neurogenic regulation of melanophore aggregation/dispersion phenomena. Using a pharmacological approach including the hypodermic microinjection of neurotransmitters and related agonists/antagonists and the immersion of whole individuals into reagent solution, we investigated the mechanisms regulating melanophore activities. Our results are helpful to understand the adrenergic control of catfish melanophore activities. Therefore, we believe that *Otocinclus* is a good teleost model for the pigment cell research.

**Keywords:** catfish, melanophore, aggregation, adrenaline, muscarine, innervation

### 序論

魚類において皮膚の色、模様の発現やその変化は、保護色、配偶行動、威嚇、同種間コミュニケーションなど様々な局面で重要な生き残り戦略となっている。魚類は動物界のなかでも色素胞（色素細胞）の種類に富んでおり、しかも魚類の色素胞は運動性を有するものが圧倒的に多い。特に黒色素胞（melanophore）の運動性はよく研究されている<sup>1,2)</sup>。

下等脊椎動物の色素細胞は5ないし6種類に分類され、黒色素胞はその一つである<sup>3,4)</sup>。黒色素胞がメラノソームと呼ばれる黒色ないし褐色に着色した細胞質顆粒を凝集／拡散させることで体表面の色調が変化する。硬骨魚における黒色素胞に対する神経支配は著しく、その多くはアドレナリン作動性の交感神経に单一支配されているとされる<sup>4-8)</sup>。交感神経

節後ニューロンの末端部から黒色素胞表面に放出されるアドレナリン性神経伝達物質は norepinephrine (NE, 別名 noradrenaline) を主体とし、NE によって黒色素胞が凝集することが知られている<sup>9)</sup>。

一般に、硬骨魚類の黒色素胞は、凝集を誘起するα受容体（α1、α2）と、拡散を誘起するβ受容体（β1、β2）を持つ<sup>10-14)</sup>。そのα1受容体にはα1A、α1B、α1Dの3つのサブタイプが、α2受容体には、adrB1, adrB2a, adrB2b, adrB3a, adrB3bの5種類のサブタイプがある<sup>15)</sup>。一方、交感神経節後ニューロンの末端から NE と共に、副伝達物質として ATP も放出され、ATP が脱リン酸化されて色素細胞のadenosine受容体に作用し、NE の作用とは逆の色素顆粒拡散を生じる機構も存在する<sup>16)</sup>。交感神経に

よる单一支配であるにもかかわらず、ATPによる相反的な作用により、背地順応など環境適応に要求される迅速な体色変化が可能となっている<sup>9</sup>。一方で、ナマズ目の黒色素胞は NE の  $\beta$  受容体とともに、 $\alpha$  受容体の代替としてムスカリンをリガンドとする acetylcholine 受容体 (Muscarine 受容体) を発現し、ムスカリンも黒色素胞メラノソームの収縮拡散を制御している<sup>17, 18</sup>。

ナマズ目の一魚種である南米原産の *Otocinclus sp.* は、小型観賞魚として広く流通している。本研究では、その平坦な背面に、黒色素胞が比較的均一かつ離散的に分布することから、個々の黒色素胞の収縮の度合いを明瞭に観察できる魚種として着目している。本研究は、*O. vestitus* をアドレナリン作動性 agonist/antagonist に浸漬する形で黒色素胞に対する作用を調査した (実験 I、II、III)。しかしながら、この方法では agonist/antagonist が心拍や血圧に作用し、副次的な作用としての黒色素胞の収縮 / 拡散を観察している懸念があった。そこで、次に、*O. vestitus* の極めて平らな背面皮下に薬剤を極微量注射することで (実験IV)、黒色素胞の近傍に NE などの様々な神経伝達物質や受容体の阻害剤を投与し、ナマズ目の黒色素胞の収縮機構の一端を解明することを目的とした。

## 材料と方法

ナマズ目ロリカリア科に属する *Otocinclus vestitus* の成魚を飼育水槽から無作為に選び実験に使用した。

### 実験 I

#### 実験方法

各濃度の薬剤を直径 35 mm の培養皿に注ぎ、対照群では人工淡水 (10 % Steinberg 氏液) のみを満たした。個体毎に培養皿に投入し、30, 60 分後にオリンパス実体顕微鏡 (SZX16) で撮影を行った。撮影直前には各個体を 0.4% 2-Phenoxyethanol/10% Steinberg 氏液で麻酔した。撮影倍率は 12.5 倍、32 倍、63 倍とし、*O. vestitus* の成魚の背面頭部側においての黒色素胞の観察を行い、識別基準 (図 1、図 2) を設けて、黒色素胞の変化を判定表に記した。実験終了から 24 時間後の生存率を調査した。

#### 使用薬剤

$\alpha$ ,  $\beta$  受容体の双方に結合する NE bitartrate、 $\alpha$ 1 受容体作動薬である Phenylephrine、 $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 2A 受容体作動薬である Oxymetazoline · HCl、 $\alpha$ 2 受容体作動薬である Tizanidine · HCl、 $\beta$ 2 受容体作動薬である Terbutaline · HCl を使用した。pH は 7.3-7.5

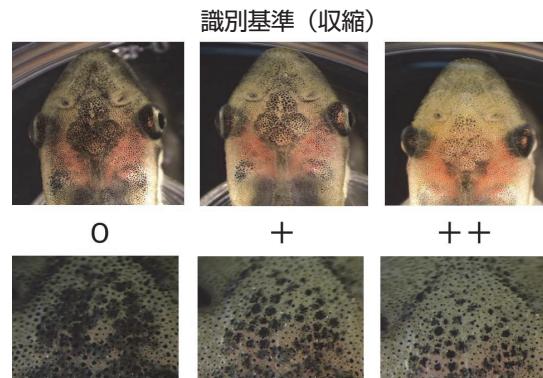


図 1. 黒色素胞の収縮の場合の識別基準を示した写真.

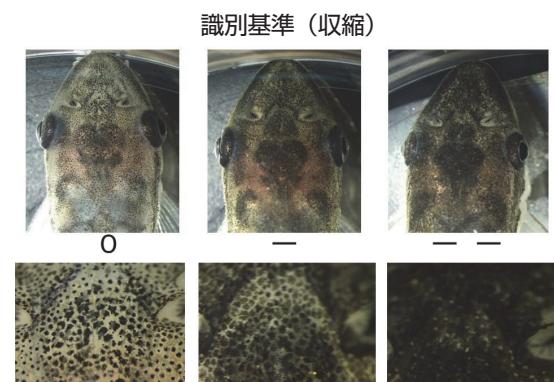


図 2. 黒色素胞の拡散の場合の識別基準を示した写真.

に調整した。

### 実験 II

#### 実験方法

0.1% MS222-10% Steinberg 氏液で予め麻酔した個体を、薬剤を含む人工淡水に投入し、キーエンス社製デジタルマイクロスコープを用いて、麻酔直後を 0 分とし、10 分毎に 60 分後まで 25/50/150 倍の倍率で観察、撮影し (露光時間は 1.5 秒に固定)、頭部背側の黒色素胞の経時変化を記録した。

#### 使用薬剤

薬剤は NE bitartrate、 $\alpha$ 1 受容体阻害剤の Prazosin、 $\alpha$ 2 受容体阻害剤の Yohimbine と Rauwolscine、 $\beta$ 1 受容体阻害剤の Atenolol を使用した。5 mM NE-10% Steinberg 氏液に最終濃度 0.001/0.1 mM Prazosin, 0.1 mM Yohimbine, 1 mM Rauwolscine, 25 mM Atenolol を溶解した処理液 (pH 7.2-7.5) を調製した。なお、5/10 mM NE, 0.1 mM Yohimbine, 1 mM Rauwolscine の単独処理実験も行った。

### 実験 III

#### 使用薬剤

薬品を人工淡水である 10% Steinberg 氏液に溶かして pH 7.3-7.6 に調整した。使用した薬品と濃度

は以下のとおりである。アドレナリン $\alpha$  /  $\beta$ 受容体の作動薬である 10 mM Norepinephrine bitartrate monohydrate, アドレナリン $\alpha$ 1 /  $\alpha$ 2受容体の作動薬である 0.5 mM Oxymetazoline, dopamine から norepinephrine を合成する酵素である dopamine  $\beta$ -hydroxylase を阻害する 0.1 mM Nepicastat hydrochloride, ムスカリノ型コリン受容体を阻害する 1.0 mM Atropine。撮影時には 0.1% 2-phenoxyethanol-10% Steinberg 氏液に *O. vestitus* を浸漬し全身麻酔をかけた。

## 実験方法

ナマズ目ロリカリア科 *Otocinclus vestitus* の成魚(体長約 3 cm)を飼育水槽から無作為に選びだして実験に用いた。各々作成した試薬を 35mm 径のペトリ皿に注いだ。次いで、*O. vestitus* をペトリ皿内に浸漬し黒色素胞の変化を追った。浸漬直後を 0 分とし、0, 30, 60 分の時に Olympus 社の実体顕微鏡 SZX16 を用いて撮影倍率 63 倍で静止画を撮影した。撮影領域は黒色素胞の重なりが少なく、平面で観察のしやすいことから左鼻孔の尾側かつ左目の上側とした(図 3)。

## 定量化

撮影した写真の中から 4 つの黒色素胞を選び、フ



図 3. 撮影領域を表した図。撮影は赤枠で囲んだ領域を撮影した。

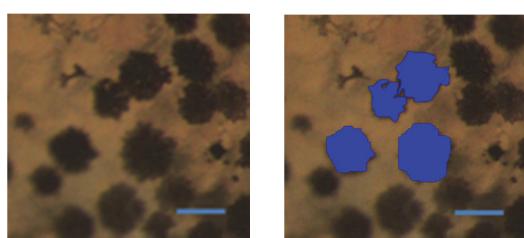


図 4. 定量化前と後の写真。定量化する際に右写真のように黒とは異なる色で塗りつぶした。この黒色素胞 4 細胞分の青色のピクセル数をデータ表現に用いた。Bars, 100  $\mu$ m.

リーウエアの GIMP (GNU Image Manipulation Program) を用いてその 4 細胞の面積の定量化をおこなった。撮影した写真の上に透明なレイヤーを追加し、そのレイヤー上に 4 つの黒色素胞の部分を青色で塗りつぶした(図 4)。その後、ヒストグラムを用いて、そのピクセル数を、あらかじめ対物ミクロメーターで同様の方法で求めておいた 100  $\mu$ m<sup>2</sup>当たりのピクセル数で割り、黒色素胞 4 細胞分の面積のデータとした。そして、そのデータを用いてグラフを作成した。

## 検定

正規性の検定と関連 2 群検定を行い、浸漬 0 分後と 60 分後を比べて有意差が生じているか調べた。またグラフから黒色素胞が凝集しているか、あるいは拡散しているのかを判定した。

## 実験IV

### 実験生物

ナマズ目ロリカリア科に属する *O. vestitus* 成魚を飼育水槽から無作為に選び注射実験に使用した。実験後は、別の飼育水槽に実験日ごとに分けて飼育した。実験後から 2 週間以上飼育した個体を再び別の薬剤溶液の注射実験に用いた。

### 使用薬剤

神経伝物質等を 10% Steinberg 氏液に溶解し、pH 7.2-7.5 になるよう調整した。調査した薬品と注射液の濃度は以下の通り；adrenaline 受容体伝達物質である 0.1 mM Norepinephrine bitartrate,  $\alpha$ -adrenaline 受容体阻害剤の 0.1 mM Yohimbine HCl, Muscarine 受容体の伝達物質の一つである 0.1 mM Muscarine iodide, dopamine 受容体の伝達物質 10 mM Dopamine-HCl, GABA 受容体伝達物質である 10 mM 4-aminobutyric acid (GABA), serotonin 受容体の伝達物質である 10 mM Serotonin-creatinine sulfate monohydrate。微量注射と黒色素胞の撮影に際しては、0.1% 2-phenoxyethanol-10% Steinberg 氏液で全身麻酔をかけた。

### 注射方法と撮影方法

注射は、Drummond 社の微量注射器 NANOJECT を用いて、*O. vestitus* に対し正面から背面の皮下(図 5 赤丸)に 1 個体あたり 128.8 nl (32.2 nl × 4 回)注射した。注射直前、10 分後、30 分後、60 分後に黒色素胞を撮影し、変化を追った。

撮影領域は、黒色素胞が凝集・拡散のどちらの反応が起こっても、黒色素胞が重なることなく、1 細

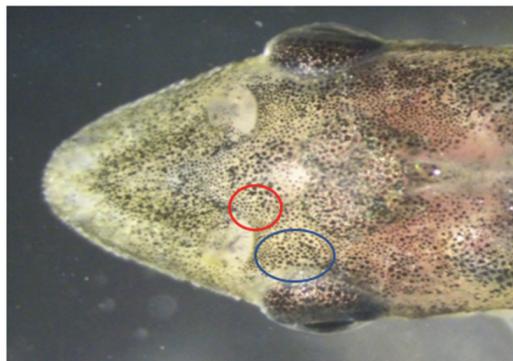


図 5. 撮影領域と注射領域を表した図。撮影は青丸で囲んだ領域を撮影した。注射は写真の左側から右側の方向に向かって、赤丸で囲んだ領域に注射をした。

胞が観察しやすい鼻孔の後ろ側かつ眼の上部の領域（図 5 青丸）と定め、Olympus 社の実体顕微鏡 SZX16 を用いて 63 倍の倍率で撮影した。

### 定量化

実験Ⅲと同様の方法で定量化を行った。

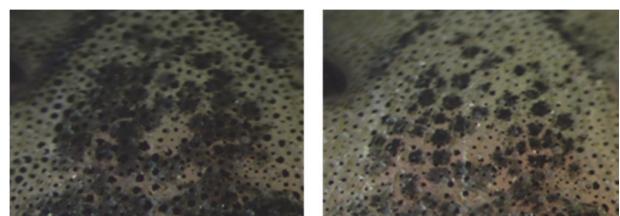
### 検定

正規性の検定、関連 2 群の検定、次いで多重比較の検定 (false discovery rate; FDR 法) を行い、微量注射の前後で細胞面積に有意差が生じるかを調べた。

## 結果

### 実験 I

NE 処理では、処理開始後すぐに黒色素胞が収縮はじめ、30 分後には明白な収縮が生じた。30-60 分後には、1.0 mM 処理群 ( $n=15$ ) よりも 10 mM 処理群 ( $n=15$ ) の方が強く収縮し、後者では黒色素胞の大きさが処理前の 2 分の 1 程度の大きさになつた（図 6）。60 分後には一部の黒色素胞が少し弛緩した個体も生じた。生存率は 100% だった。Phenylephrine 処理では 1.0 mM 処理群 ( $n=18$ )、10 mM 処理群 ( $n=22$ ) 共に黒色素胞の収縮は全く生じなかつた（表 1）。生存率は 100% だった。1.0-10 mM Oxymetazoline 処理では、処理開始から 30 分後には黒色素胞が拡散し始め、10 mM 処理群 ( $n=8$ ) は 60 分後には背面全体が黒色素胞に覆われ黒色素胞間の境界が不明になる程、黒色素胞が極度に拡がつた（図 7）。また 10 mM 処理群の個体は 30 分を過ぎると明らかに動かなくなり実験終了から 24 時間後の生存率は 25% に下がつた（1.0 mM 処理群の生存率は 95% ( $n=22$ )）。1.0-5.0 mM Tizanidine 処理では、Oxymetazoline 処理と同様に、黒色素胞が拡散した（生存率は 1.0 mM 処理群 ( $n=23$ )、5.0 mM 処理群 ( $n=2$ ) ともに 100%；図 8）。Terbutaline 処理では、



control	0	+	++
Time 0	16 (100)	0	0
30	16 (100)	0	0
60	16 (100)	0	0

1.0 mM	0	+	++
Time 0	15 (100)	0	0
30	2 (13)	13 (87)	0
60	0	11 (73)	4 (27)

10 mM	0	+	++
Time 0	15 (100)	0	0
30	1 (6.7)	9 (60)	5 (33)
60	0	3 (20)	12 (80)

図 6. Norepinephrine (NE) 浸漬実験の結果。10 mM NE で浸漬処理開始後 0 分（左上）から 60 分（右上）の間に、黒色素胞群ははっきりと収縮した。

表 1. Phenylephrine 浸漬実験の結果

control	0	+	++
Time 0	20 (100)	0	0
30	20 (100)	0	0
60	20 (100)	0	0

1.0 mM	0	+	++
Time 0	18 (100)	0	0
30	18 (100)	0	0
60	18 (100)	0	0

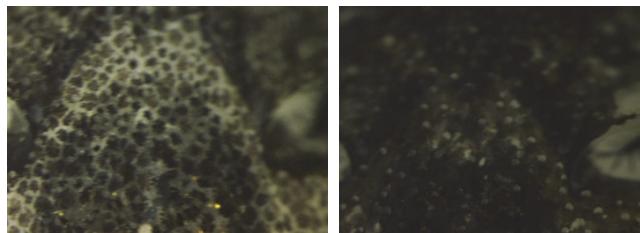
10 mM	0	+	++
Time 0	22 (100)	0	0
30	22 (100)	0	0
60	22 (100)	0	0

室温: 19 - 23°C, 湿度: 18 - 62%

NE 処理程強くないが、黒色素胞に収縮がみられた。10 mM 処理群 ( $n=22$ ) においては、30 分後には過半数の個体で収縮が認められ、30 分後に収縮した個体は 60 分後にも持続的に収縮していた（表 2）。

### 実験 II

5 または 10 mM NE 単独処理により、10 分後には黒色素胞が凝集し、60 分後まで凝集し続けた（5 mM,  $n=14/15$ ; 10 mM,  $n=15/15$ ; 図 9）。一方、NE と  $\alpha_2$  受容体阻害剤の Yohimbine または Rauwolscine を競合させたところ、いずれの阻害剤の場合にも NE による黒色素胞の凝集の抑制が観察され、一部



Control	0	-	--
Time0	23 (100)	0 (0)	0 (0)
30	23 (100)	0	0
60	23 (100)	0	0

1.0 mM	0	-	--
Time0	20 (100)	0 (0)	0 (0)
30	8 (40)	11 (55)	1 (5.0)
60	0	11 (55)	9 (45)

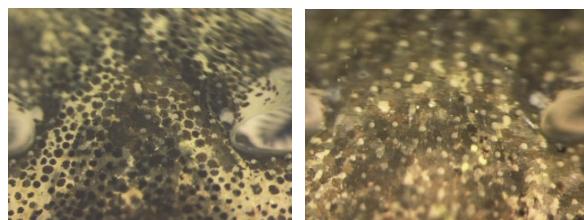
10 mM	0	-	--
Time0	8 (100)	0 (0)	0 (0)
30	1 (13)	7 (88)	0
60	0	1 (13)	7 (88)

図 7. Oxymetazoline hydrochloride 浸漬実験の結果. 処理開始 60 分後に黒色素胞は拡散した.

の個体ではむしろ拡散した。5 mM NE と 0.1 mM Yohimbine を競合させたところ、15 個体中 2 個体は黒色素胞が吻側の一部の領域でのみ凝集した（10 分後から 60 分後まで持続；以下 10-60 分後と表記）。他の 7 個体は黒色素胞が拡散し、残りの 6 個体は凝集も拡散も認められなかった（10-60 分後；図 10）。また、0.1 mM Yohimbine 単独処理により、黒色素胞が拡散した（n=14/15；10-60 分後）。5 mM NE と 1mM Rauwolscine を競合させた場合には、黒色素胞が凝集した個体は 15 個体中皆無であり、7 個体で黒色素胞が拡散し、残り 8 個体は変化がなかった（10-60 分後；図 11）。また、1 mM Rauwolscine 単独処理により、黒色素胞が拡散した（n=14/15；10-60 分後）。

一方、 $\alpha_1$ 受容体阻害剤の Prazosin または  $\beta_1$ 受容体阻害剤の Atenolol を NE と競合させても NE による黒色素胞の凝集を抑制することはなかった。5 mM NE と 0.001 mM Prazosin を競合させた場合には、10 個体の全てで黒色素胞が凝集し（10-60 分後）、5 mM NE と 0.1 mM Prazosin を競合させると、15 個体中 12 個体で黒色素胞が凝集した（10-60 分後；図 12）。5 mM NE と 25 mM Atenolol を競合させると、15 個体の全てで黒色素胞が凝集した（10-60 分後；図 13）。

対照群として、0.1% MS222 – 10% Steinberg 氏液で同様の実験を行ったが、変化は見られなかった。



Control	0	-	--
Time0	23 (100)	0	0
30	23 (100)	0	0
60	23 (100)	0	0

1.0 mM	0	-	--
Time0	23 (100)	0	0
30	6 (26)	16 (70)	1 (4.3)
60	1 (4.3)	18 (73)	4 (17)

5.0 mM	0	-	--
Time0	2 (100)	0	0
30	0	0	2 (100)
60	0	0	2 (100)

室温: 20 – 24°C, 湿度: 23 – 33%

図 8. Tizanidine hydrochloride 浸漬実験の結果. 処理開始 30 分後（左上 1.0 mM；右上 5.0 mM）の結果.

表 2. Terbutaline Sulfate 浸漬実験の結果

Control	0	+	++
Time0	22 (100)	0	0
30	22 (100)	0	0
60	22 (100)	0	0

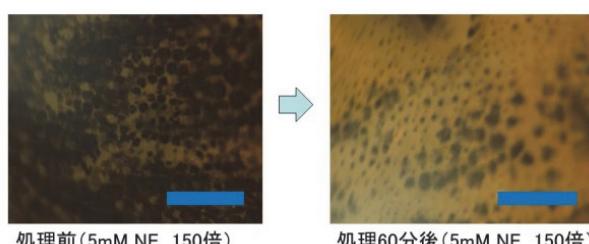
  

1.0 mM	0	+	++
Time0	22 (100)	0	0
30	15 (68)	7 (32)	0
60	8 (36)	14 (64)	0

10 mM	0	+	++
Time0	22 (100)	0	0
30	10 (45)	12 (55)	0
60	4 (18)	14 (64)	4 (18)

室温: 19 – 23°C, 湿度: 50 – 62%



NE	例数	凝集	拡散	変化なし
5mM	15	14 (93%)	0 (0%)	1 (7%)
10mM	15	15 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

図 9. 5 mM NE への浸漬実験の結果（実験 II の対照群）. Bars, 500 μm.

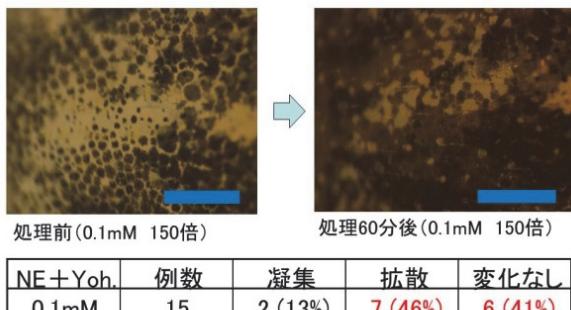


図 10. 5 mM NE, 0.1mM Yohimbine の共投与実験の結果.  
Bars, 500 μm.

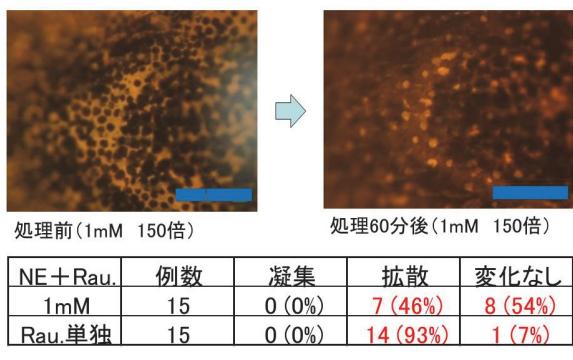


図 11. 5mM NE, 1mM Rauwolscine の共投与実験の結果.  
Bars, 500 μm.

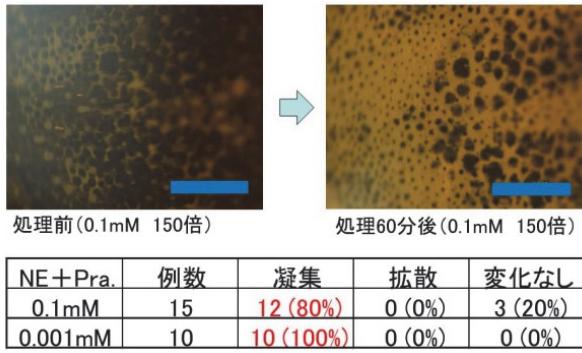


図 12. 5 mM NE, 0.1 mM または 0.001 mM Prazosin の共投与実験の結果. Bars, 500 μm.

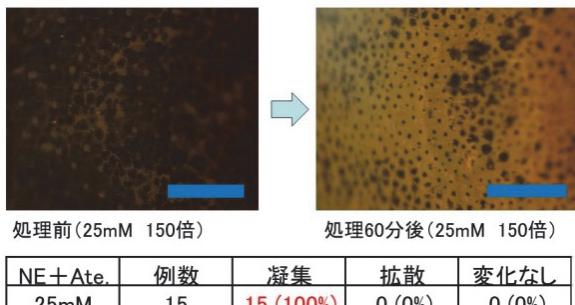


図 13. 5 mM NE, 25 mM Atenolol の共投与実験結果.  
Bars, 500 μm.

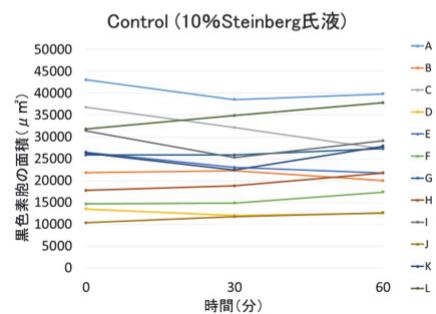
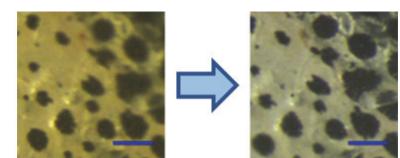


図 14. 無処理群 (10% Steinberg 氏液) の浸漬実験結果 (実験 III の対照群). 浸漬直後 0 分(左上)と浸漬 60 分後(右上)の写真と定量化したグラフ(下)である. 写真では変化がなく、グラフでもあまり大きな変化は見られない. Bars, 100 μm.

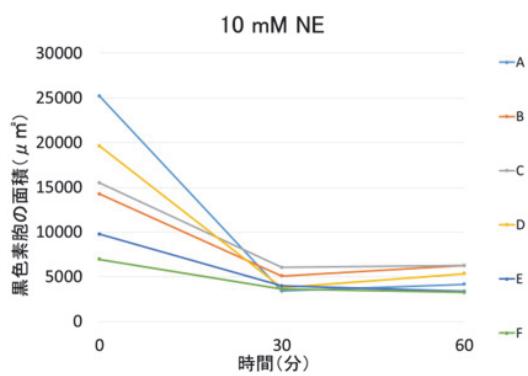
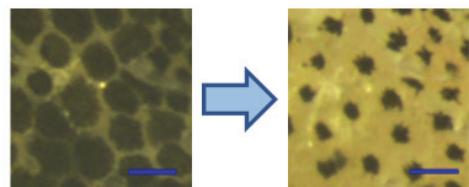


図 15. Norepinephrine (NE) の浸漬実験結果. 浸漬直後 0 分(左上)と浸漬 60 分後(右上)の写真を比べると、黒色素胞の面積が減少していることがわかる. 定量化した結果のグラフ(下)からも同様の結果が読み取れる. Bars, 100 μm.

### 実験III -a

溶媒の 10% Steinberg 氏液のみに浸漬した対照実験では、あまり大きな変化はみられなかった ( $n = 12$ ,  $P > 0.1$ , 図 14)。Norepinephrine (NE) に浸漬した結果、30 分後には黒色素胞が凝集した ( $n = 6$ ,  $P < 0.01$ , 図 15)。Oxymetazoline への浸漬では、60 分かけて次第に黒色素胞が拡散した ( $n=15$ ,  $P < 0.01$ , 図 16)。Nepicastat への浸漬では、黒色素胞が凝集する個体と拡散する個体の双方が生じ

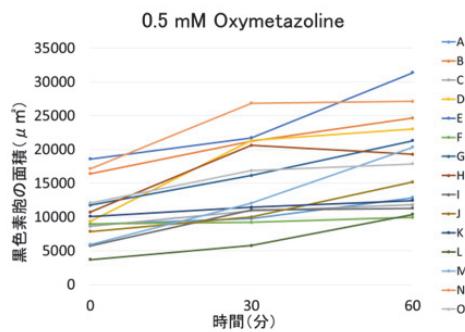
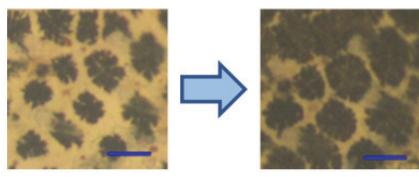


図 16. Oxytetracycline 浸漬実験結果。浸漬直後 0 分（左上）と浸漬 60 分後（右上）の写真を比べると、黒色素胞の面積が増加していることがわかる。この結果を定量化したところ、グラフからも増加傾向にあることが分かる。Bars, 100  $\mu\text{m}$ .

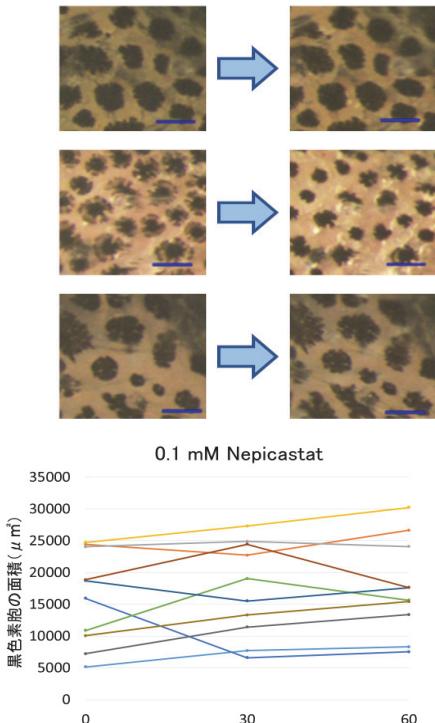
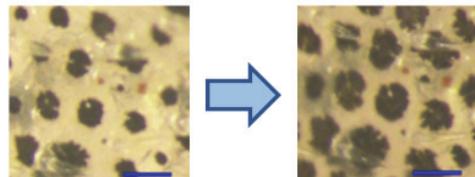


図 17. Nepicastat の浸漬実験結果。浸漬直後 0 分（左上）と浸漬 60 分後（右上）をみると、黒色素胞の面積が変化していない個体、増加した個体、減少した個体がいて、個体ごとにまちがちな反応が見られた。黒色素胞の面積を定量化したところ、個体によって様々な変化を示し、統一した変化は得られなかつたことがグラフ（下）からも読み取れる。Bars, 100  $\mu\text{m}$ .

た（ $n=10$ ,  $P > 0.1$ , 図 17）。実験後翌日までに死亡した個体は Oxytetracycline 处理した 15 個体中 2 個体と Nepicastat 处理した 10 個体中 3 個体で、10%

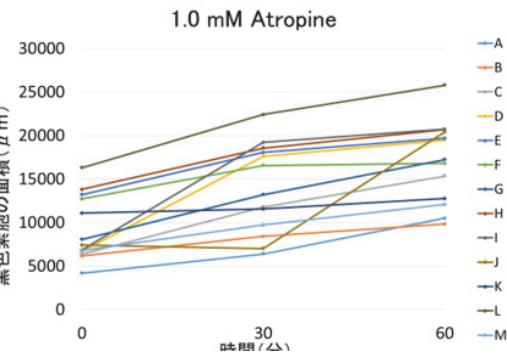


図 18. Atropine 浸漬実験結果。浸漬直後 0 分（左上）と浸漬 60 分後（右上）の写真を比べると、黒色素胞の面積が増加していることがわかる。この結果を定量化したグラフからも増加傾向にあることが分かる。Bars, 100  $\mu\text{m}$ .

Steinberg 氏液処理した個体と Norepinephrine 処理した個体と Atropine 処理した個体はすべて翌日まで生存していた。

### 実験III -b

Atropine への浸漬では、黒色素胞は 60 分かけて次第に黒色素胞が拡散した（ $n = 13$ ,  $P < 0.01$ , 図 18）。

### 実験IV -a

溶媒の 10% Steinberg 氏液のみを注射した対照実験では、あまり大きな変化はみられなかった（ $n = 15$ ,  $P > 0.1$ , 図 19）。

Norepinephrine (NE) を注射した結果、10 分後には黒色素胞が凝集した（ $n = 15$ ,  $P < 0.01$ , 図 20）。Yohimbine 注射では、30 分かけて次第に黒色素胞が拡散した（ $n = 15$ ,  $P < 0.01$ , 図 21）。

### 実験IV -b

Muscarine 注射では、黒色素胞は 10 分後には拡散した（ $n = 15$ ,  $P < 0.01$ , 図 22）。また、Dopamine 注射では、10 分後には凝集反応を示した（ $n = 15$ ,  $P < 0.01$ , 図 23）。Serotonin 注射では、黒色素胞が凝集する個体と拡散する個体の双方が生じた（ $n = 15$ ,  $P > 0.1$ , 図 24）。GABA 注射では、大きな変化は見られなかった（ $n = 15$ ,  $P > 0.1$ , 図 25）。注射後に死亡した個体は、実験 3 時間後に死亡した 1 個体のみで、他の個体は実験後数日経っても生存していた。

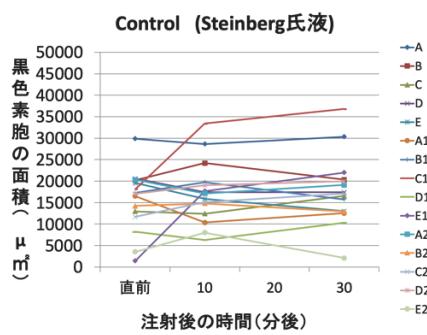
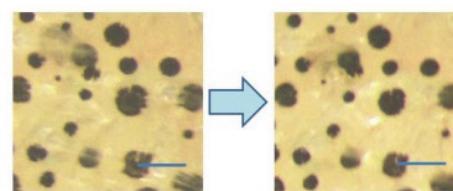


図 19. 対照群 (10% Steinberg 氏液) の注射実験の結果. 注射前 (左上) と注射 30 分後 (右上) の写真と, 定量化したグラフ (下) である. 写真では変化がなく, グラフでもあまり大きな変化は見られない. Bars, 100 μm.

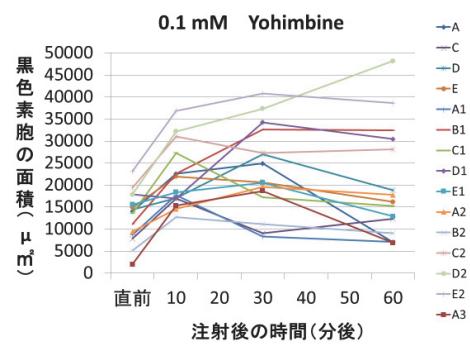
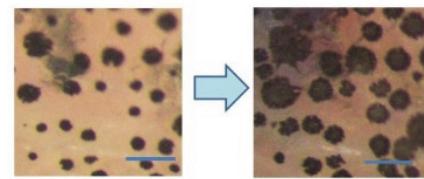


図 21. Yohimbine 注射実験の結果. 0.1 mM 注射の注射前 (左上) と注射 10 分後 (右上) の写真を比べると, 黒色素胞の面積が増加していることがわかる. この結果を定量化すると, グラフからも黒色素胞の面積が増加傾向にあり, やがて概ね元の大きさに戻ることが分かる. Bars, 100 μm.

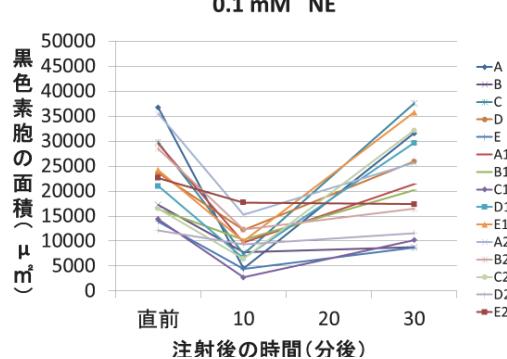
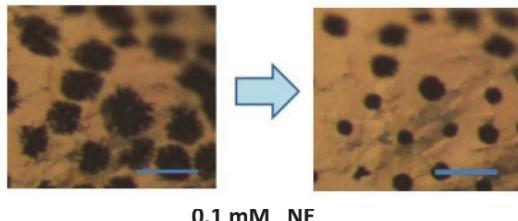


図 20. Norepinephrine (NE) の注射実験の結果. 0.1 mM NE 注射の注射前 (左上) と注射 10 分後 (右上) の写真を比べると, 黒色素胞の面積は減少していることがわかる. 定量化した結果のグラフ (下) からもわかる. 一旦収縮した黒色素胞はやがて概ね元の大きさに戻った. Bars, 100 μm.

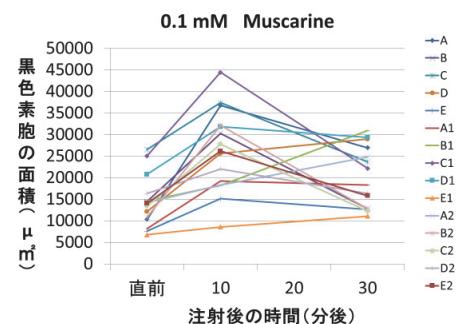
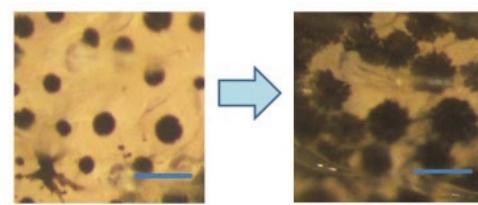


図 22. Muscarine の注射実験の結果. 0.1 mM Muscarine 注射の注射前 (左上) と注射 10 分後 (右上) の写真を比べると, 黒色素胞の面積が増加していることがわかる. この結果を定量化すると, グラフでも増加傾向にあることがわかる. Bars, 100 μm.

## 討論

実験 I、実験 II、実験 III-a、実験 IV-a より、オトシンクルスの黒色素胞は、多くの硬骨魚類と同じく NE 依存性経路の刺激で凝集した（図 6、図 9、図 15、図 20）。哺乳類の  $\alpha 2$  受容体は神経系のシナプス前膜に存在し Norepinephrine の放出を抑制する負の feedback 経路で働くことが知られているが、本研究の Yohimbine 関連の結果からは、ナマズ目魚種で

も  $\alpha 2$  受容体がシナプス前膜に局在し、同様のメカニズムを担うかについては、今後の慎重な検討が必要である（図 10、図 21）。Terbutaline 处理で黒色素胞が収縮したことから、*O. vestitus* の  $\beta 2$  受容体が黒色素胞の収縮に関与することが示唆された（表 2）。また、NE に  $\alpha 1$  受容体阻害剤の Prazosin、 $\beta 1$  受容体阻害剤の Atenolol を競合させても黒色素胞の凝集は阻害されず（図 12、図 13）、一方、 $\alpha$

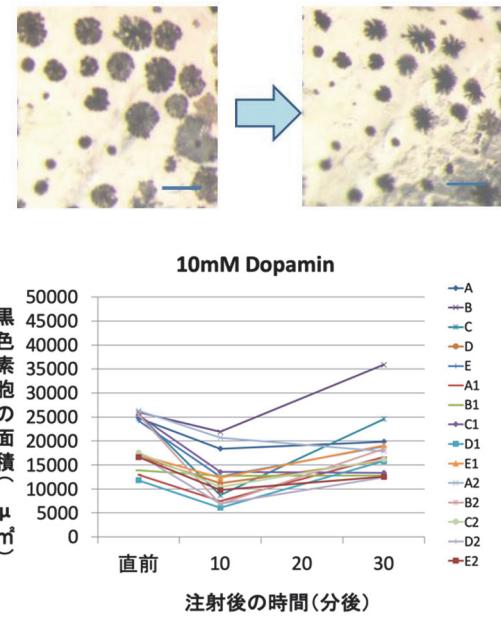


図 23. Dopamine 注射実験の結果. 10 mM Dopamine 注射の注射前（左上）と注射 10 分後（右上）の写真を見比べると、黒色素胞の面積が減少している。定量化したデータのグラフからも、面積の減少が読み取れる。Bars, 100 μm.

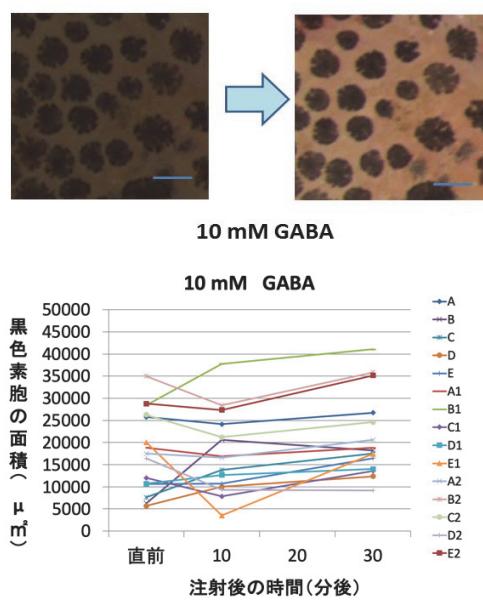


図 25. GABA の注射実験の結果. 10 mM GABA 注射の注射前（左上）と注射 10 分後（右上）をみると、黒色素胞の面積は変化していない。この個体以外においても、黒色素胞の面積は、GABA の注射によって、増加・減少どちらの反応も見られた。定量化したところ、個体によって様々な変化を示し、統一的な傾向性はなかったことがグラフ（下）からもわかる。Bars, 100 μm.

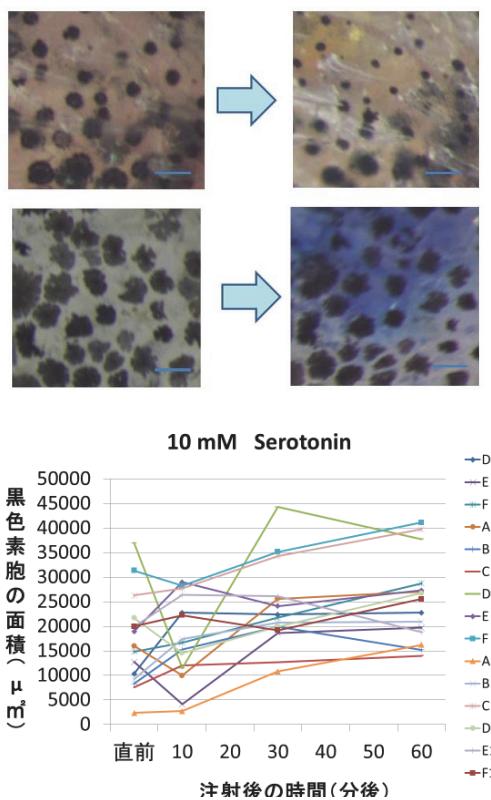


図 24. Serotonin の注射実験の結果. 写真（10 mM 注射）のように、黒色素胞の面積が減少した個体もいれば、変化しない個体もいた。グラフでも、黒色素胞の収縮の有無について一定の傾向性は生じていない。Bars, 100 μm.

2 受容体阻害剤である Yohimbine, Rauwolscine を競合させると黒色素胞の凝集が阻害された（図 10、図

11）。従って、オトシンクルスにおける黒色素胞の凝集 / 拡散には、黒色素胞の  $\alpha 2$  受容体を介した情報伝達系（細胞内 cAMP の減少）が働いていると考えられる。 $\alpha 2$  受容体は主に神経細胞のシナプス前膜に分布し、伝達物質遊離に対して抑制的に作用し、そこに  $\alpha 2$  受容体阻害剤を投与し負のフィードバック制御を抑制すると伝達物質遊離は増加する。本研究において、NE と  $\alpha 2$  受容体阻害剤との共投与、更には  $\alpha 2$  受容体阻害剤の単独投与でも黒色素胞が拡散した個体すら生じた結果については、やや予想外であった。*Otocinclus* 黒色素胞の  $\alpha / \beta$  受容体に対する NE 結合の親和性の問題とともに、今後の研究を待ちたい。

NE の微量注射によって、注射領域近傍の黒色素胞は 10 分程度のタイムスケールで鋭敏に反応し、凝集した。一方で、注射した NE 液の皮下での拡散に起因すると思われるが、注射 30 分後には NE の凝集効果は薄れ、黒色素胞は元の大きさに回復した（図 20）。一方、NE 浸漬実験による黒色素胞の凝集は 30 分後には最も凝集していた（図 15）。皮下への NE の浸透に時間がかかったためであろう。そして、少なくとも続く 30 分間凝集効果が持続したのは、浸漬によって大量の NE を投与したことによると思われる。浸漬実験は、未知の全身性の効果が黒色素胞の収縮 / 拡散に関する結果の解釈の妨げになる懸念があるので、注射実験を中心にして、なおかつ

浸漬実験を補完的に用いるのが妥当な手法と云えるかもしれない。本研究の実施範囲内においては、同一の薬剤は、黒色素胞の収縮 / 拡散に関して、タイムコースは異なれど、注射実験でも浸漬実験でも同様の効果をもたらした。そのような結果からは、ストレス反応等を介した浸漬実験の解釈の誤りからは今回も逃れていると読み取れる。

実験IV-bより、黒色素胞における acetylcholine 受容体 (Muscarine 受容体) の存在も強く示唆されたが (図 22)、実験III-bの副交感神経遮断薬である Atropin の浸漬実験の結果は解釈が難しい (図 18)。また、Dopamine 投与で著しい黒色素胞の収縮が誘起されたことから、黒色素胞において Dopamine 受容体の発現が期待される (図 23)。しかし他方で、この収縮は、Dopamine が NE の前駆体であることに起因する可能性も考えられる。Nepicastat による浸漬実験では、統一的な反応が見られなかったことから dopamine  $\beta$ -hydroxylase は黒色素胞の収縮に直接関与しないのかも知れない (図 17)。

また Serotonin, GABA の注射では黒色素胞の面積に著しい変化がみられなかつたことから、黒色素胞の収縮 / 拡散にはこれらの伝達物質は直接関与しないと予想される (図 24、図 25)。

今後の課題としては、*O. vestitus* の  $\alpha$ 2 受容体やムスカリ型受容体をクローニングしてその黒色素胞における発現と局在を実証し、今回の実験で使用した薬剤とは異なる agonist/antagonist を注射し、これらの機能をより明確にする必要がある。また今回は平面での観察であったが、黒色素胞の収縮を 3 次元的に評価する系を構築する必要がある。

本研究の実施によって、本邦でも入手し易いナマズ目の小型魚類であるオトシンクルスが黒色素胞の収縮の研究に有用なモデル魚種となることが示されたと筆者らは考えている。

## 謝辞

実験IVの検定については、神奈川大学（現 明治学院大学教養教育センター）の安部淳博士にご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。本研究は神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201809) を受けて実施されました。総合理学研究所所長並びに所員各位に御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Ikeda K, Semenova I, Zhapparova O and Rodionov V (2010) Melanophores for microtubule dynamics and motility assays. *Methods Cell Biol.* **97**: 401-14.
- 2) Ligon RA and McCartney KL (2016) Biochemical regulation of pigment motility in vertebrate chromatophores: a review of physiological color change mechanisms. *Curr. Zool.* **62**: 237-252.
- 3) 大島 範子 (2003) 硬骨魚類における色素胞とその運動制御の仕組み 比較生理生化学 **20**: 131-139.
- 4) Salim S and Ali SA (2011) Vertebrate melanophores as potential model for drug discovery and development: a review. *Cell Mol. Biol. Lett.* **16**: 162-200.
- 5) Miyashita Y, Kumazawa T and Fujii R (1984) Receptor mechanisms in fish chromatophores--VI. Adenosine receptors mediate pigment dispersion in guppy and catfish melanophores. *Comp. Biochem. Physiol. C* **77**: 205-10.
- 6) Andersson RG, Karlsson JO and Grundström N (1984) Adrenergic nerves and the alpha 2-adrenoceptor system regulating melanosome aggregation within fish melanophores. *Acta. Physiol. Scand.* **121**: 173-9.
- 7) Morishita F, Katayama H and Yamada K (1985) Subtypes of beta adrenergic receptors mediating pigment dispersion in chromatophores of the medaka, *Oryzias latipes*. *Comp. Biochem. Physiol. C* **81**: 279-85.
- 8) Burton D and Vokey JE (2000) Alpha(1)- and alpha(2)-adrenoceptor mediation in melanosome aggregation in cryptic patterning of *Pleuronectes americanus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **125**: 359-65.
- 9) Yasuoka A, Abe K, Arai S and Emori Y (1996) Molecular cloning and functional expression of the alpha1A-adrenoceptor of Medaka fish, *Oryzias latipes*. *Eur. J. Biochem.* **235**: 501-7.
- 10) Ruuskanen JO, Laurila J, Xhaard H, Rantanen VV et al. (2005) Conserved structural, pharmacological and functional properties among the three human and five zebrafish alpha 2-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **144**: 165-77.
- 11) Ruuskanen JO, Peitsaro N, Kaslin JV, Panula P and Scheinin M (2005) Expression and function of alpha-adrenoceptors in zebrafish: drug effects, mRNA and receptor distributions. *J. Neurochem.* **94**: 1559-69.
- 12) Ruuskanen JO, Xhaard H, Marjamäki A, Salaneck E et al. (2004) Identification of duplicated fourth alpha2-adrenergic receptor subtype by cloning and mapping of five receptor genes in zebrafish. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 14-28.
- 13) Xu J and Xie FK (2011)  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors of zebrafish in melanosome movement: a comparative study between embryo and adult melanophores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **405**: 250-5.
- 14) Wang Z1, Nishimura Y, Shimada Y, Umemoto N, Hirano M, Zang L, Oka T, Sakamoto C, Kuroyanagi J and Tanaka T (2009) Zebrafish beta-adrenergic receptor mRNA expression and control of pigmentation. *Gene* **446**: 18-27.
- 15) Kumazawa T, Oshima N, Fujii R and Miyashita Y (1984) Release of ATP from adrenergic nerves controlling pigment aggregation in tilapia melanophores. *Comp. Biochem. Physiol. C* **78**: 1-4.
- 16) Ovais M (1994) Control of melanosome movements in isolated skin melanophores of a catfish *Clarias batrachus* (Linn.). *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **38**: 185-8.

- 17) Hayashi H and Fujii R (1994) Pharmacological profiles of the subtypes of muscarinic cholinoreceptors that mediate aggregation of pigment in the melanophores of two species of catfish. *Pigment Cell Res.* **7**: 175-83.
- 18) Parker GH1, Rosenblueth A (1941) The Electric Stimulation of the Concentrating (Adrenergic) and the Dispersing (Cholinergic) Nerve-Fibres of the Melanophores in the Catfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **27**: 198-204.
- 19) Kasukawa H, Oshima N and Fujii R (1986) A comparative survey of the type of sympathetic neuro-melanophore transmission in catfishes. *Comp. Biochem. Physiol. C*. **85**: 115-20.
- 20) Fujii R, Miyashita Y and Fujii Y (1982) Muscarinic cholinoreceptors mediate neurally evoked pigment aggregation in glass catfish melanophores. *J. Neural. Transm.* **54**: 29-39.



■原 著 ■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 神奈川県下で採集された原生動物ミドリゾウリムシの 培養系の確立に関する研究

氷見英子<sup>1,2</sup> 橋 友理香<sup>3,4</sup> 小谷 享<sup>4</sup> 細谷浩史<sup>4,5</sup>

Studies on Establishment of Culture System of Green Paramecium,  
*Paramecium bursaria*, Isolated in Kanagawa Prefecture

Eiko Himi<sup>1,2</sup>, Yurika Hashi<sup>3,4</sup>, Susumu Kotani<sup>4</sup> and Hiroshi Hosoya<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki City, Okayama 700-8536, Japan

<sup>2</sup> Present Address: School of Agriculture, Kibi Tokyo International University, Minamiawaji City, Hyogo 656-0400, Japan

<sup>3</sup> Yamano College of Aesthetics, Hachioji City, Tokyo 192-0396, Japan

<sup>4</sup> Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>5</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: ft160257sv@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** A green paramecium, *Paramecium bursaria*, having several hundred symbiotic algae in its cytoplasm, is widely distributed in freshwater habitats of the world. The symbiotic relationship between *P. bursaria* and symbiotic algae is an excellent model for studying symbiosis between eukaryotic cells. Algae-free *P. bursaria* lines have been produced to clarify the symbiotic relationship between *P. bursaria* and symbiotic algae. In addition, multiple strains of symbiotic algae have been isolated from *P. bursaria*. It has also been revealed that these cloned algae could proliferate in algae-free *P. bursaria* leading to green *P. bursaria*. However, it is still unknown whether algae are the only symbiont with *P. bursaria*. In this study, bacterial flora analysis of the *P. bursaria* medium was performed to investigate the relationship between *P. bursaria* and bacteria. Moreover, a strain of *P. bursaria*, which can be cultures without of bacteria as food, was established. The results obtained will be discussed in this report.

**Keywords:** green paramecium, bacteria, culture medium, symbiosis, protistology

### 序論

代表的な原生生物の一種である纖毛虫ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、体内に緑藻クロレラに類似の共生藻が数百個共生している。大きさは 100 μm 程度であり、肉眼でも緑色に見える点で他の原生生物と容易に区別できる。

ミドリゾウリムシは、世界各地に普遍的に生息している。野外では共生藻が体内に共生していない「白いミドリゾウリムシ」が生息している、という報告もある<sup>1)</sup>。良く知られているゾウリムシとミドリゾウリムシは、共生藻の有無を除けば互いに類似の形態を持ち、同じ纖毛虫に分類されている。しかし、両者を交配させる事、さらにはゾウリムシに共生藻を共生させる事なども不可能である。

なぜ（ゾウリムシではなく）ミドリゾウリムシ体内に共生藻が共生できるのだろうか。

共生藻とミドリゾウリムシ両者の共生メカニズムを明らかにするために、白いミドリゾウリムシを研究室内で人工的に作成する方法が複数報告されている<sup>2)</sup>。また、ミドリゾウリムシから単離された共生藻クローン株も複数確立されている<sup>3)</sup>。これらの単離共生藻株は、前出の白いミドリゾウリムシに補食させると、補食された一部の共生藻がミドリゾウリムシ体内に移動し、結果的に「緑色の」ミドリゾウリムシを再生/復元させる事も可能である<sup>4,5)</sup>。単離共生藻株は、藻類培養の培地内で、ミドリゾウリムシに共生していない状態で長期間培養が可能である。

残念な事に、これらの単離共生藻株をゾウリムシに補食させても共生藻は食胞からゾウリムシ体内に移動せず、上述の様に「緑色のゾウリムシ」を創製する事は不可能である。共生藻に対するミドリゾウリムシとゾウリムシのこのような反応の差は、どのような理由で生ずるのだろうか。この理由を明らかにする事が、「共生藻のミドリゾウリムシへの共生メカニズムの解明」に直結する事は間違いない。このために、まだ未解明のミドリゾウリムシゲノムの解析は急務である。

共生藻に関しては、分子生物学的な解析が進んでいる。一方、ミドリゾウリムシ体内の共生藻の種類を始め、世界各地に生息するミドリゾウリムシ体内の共生藻の状況が同一か否か、など、細胞生物学的な解析に関しては多くの事項が未解明のままである。

ゾウリムシは、まわりのバクテリアやカビ、さらには（自由生活性の）藻類などを補食して生存が可能である。一方ミドリゾウリムシは、太陽光の利用できる日中は、体内の共生藻が産生する光合成産物を利用して生存が可能である。また、日中でもバクテリアやカビなどを補食している可能性は高い。さらに、太陽光が利用できない環境（夜間など）では、ゾウリムシと同様ミドリゾウリムシは確実にバクテリアやカビ、さらには藻類などを補食しているものと推測されている。

共生藻をミドリゾウリムシに補食させると、一部の共生藻は消化を免れミドリゾウリムシ体内で共生を開始することは既に述べた。消化を免れ、共生を開始できるものは共生藻だけであろうか。ミドリゾウリムシに補食されたバクテリアやその他の微生物の行く末は？ 実際、藻類が共生できないのにも関わらず、核内にバクテリアが共生（論文では“infection”とも表記）しているゾウリムシの仲間が存在する、という報文がある<sup>6)</sup>。ミドリゾウリムシにおいても、体内でバクテリアと酵母菌（のinfection）を確認したという報文が存在する<sup>7)</sup>。

ゾウリムシやミドリゾウリムシを培養する際には、通常、様々な種類のバクテリアをエサとして投与している。バクテリアや酵母菌の共生を報告したこれらの報文<sup>6,7)</sup>でも、培養に際しバクテリアがエサとして投与されている。この場合、投与されたバクテリアが補食後体内に取り込まれ、「共生」に至らぬ手前の状況でゾウリムシやミドリゾウリムシの体内で観察されている可能性は無いのだろうか。本来なら、「無菌」の状態のゾウリムシやミドリゾウリムシを準備し、エサとしてバクテリアの投与は行わないですむ培養条件が必須である。そのもとで、あらためてバクテリアを加えその行方を追う必要がある。本研

究では、ミドリゾウリムシの培養条件の確立を目的として、エサの投与を行わず長期に渡り維持可能なミドリゾウリムシ株の確立を行った。

## 材料と方法

### ミドリゾウリムシ

湘南ひらつかキャンパス内各所の湿地や池でミドリゾウリムシの探索を行い、得られたミドリゾウリムシについて、複数のクローン化株が既に確立されている<sup>8)</sup>。具体的には、ミドリゾウリムシ個体を培養池水から単離し、洗浄後レタス培地で増殖させ、クローン化ミドリゾウリムシ株を作製した。これらのミドリゾウリムシ株を本研究で使用した。

### エサを投与しないミドリゾウリムシの培養

ミドリゾウリムシの培養では、レタス培地を使用した。レタス培地の作製は以下の通りである。レタスの葉を洗浄後、沸騰水中で1-2分茹でたのち、濾紙上に広げ乾熱滅菌器で乾燥させた。乾燥したレタス葉1gに対して2Lの割合でイオン交換水(DW)を加え、100°Cで5分間抽出を行った。その後、抽出液の冷却を待ってろ過を行いレタス葉を取り除いた。得られたレタス培地を広口メジャーブンに分注してオートクレーブ(120°C、20分)を行い、室温で保存した。クローン化ミドリゾウリムシはレタス培地中で外部からバクテリアなどのエサを与えず、インキュベーター(BiOTRON, 日本医科機械製作所)内で23°C、光照射下(12時間明、12時間暗)長期間培養を行った。

## 結果

### ミドリゾウリムシの継代

ミドリゾウリムシを一匹単離しクローン化する作業は2017年までに実施されている<sup>8)</sup>。得られた複数のクローン化株について、2017年以後現在に至る迄、培養時にバクテリアなどのエサを外部から投与する事は行っていない。具体的には、6穴プレートの各ウェルに3mLのレタス培地を投入、それぞれのウェルに1匹ずつ、培地中で保存されているクローン化ミドリゾウリムシを投与後、培養を開始し増殖の様子を観察した(2017年)。ミドリゾウリムシは、投入前に、保存されている200mLコルベン中から取り出されレタス培地を用いて洗浄を行った。培養開始後二週間で20-30細胞/ウェル程度(密度では7-10細胞/mL程度)に増殖した株を選別し、洗浄は行わず同様な作業をさらに一度繰り返した。培養開始後三週間で100-200細胞/ウェル程度(密度では30-70細胞/mL程度)に増殖した株を100mLの

培養系（200 mL コルベン）に投入、増殖を観察した。培養開始後 40–60 日程度で 1000–1400 細胞 /mL の密度に増殖し、その状態（増殖の定常期）でインキュベーター内で長期間（1 年程度）保存した。この間、エサのバクテリアは投与していない。同様な作業は 2018 年も実施、さらに 2019 年も既に実施済みである。

ミドリゾウリムシの培養に、通常バクテリアなどのエサを用いることは既に述べた。実際、本研究グループでも、野外からミドリゾウリムシを単離した後しばらくは、レタス培地にエサを投入して培養を行っていた（2017 年以前）。本研究グループを含む、各所で実施されているこのような培養法では、研究者毎に加えるエサ（各種バクテリア以外に、ミドリゾウリムシ以外の小型の原生生物などを与えて培養している研究グループもある）の種類が異なり、ミドリゾウリムシ培養条件の均一化（均一化とは、どの研究グループでも全く同様のミドリゾウリムシ培養条件を用いて実験を行う、の意味）がはかれないという難点がある。共生藻に関しては、例えば日本国内、あるいは海外で採集されるミドリゾウリムシについて、どの個体でも同じ種類の共生藻が共生しているのか、さらには一個体内部の共生藻（400 個程度）が同種か否かなど、基本的な事項について不明である事はすでに述べた。共生藻に関する均一化の問題を解決するため、共生藻除去した白いミドリゾウリムシを作製し<sup>2)</sup>、そこにクローン化した共生藻を再共生させ「内部の共生藻の種類が全部均一のミドリゾウリムシ」を作製、「モデルミドリゾウリムシ」を作製する試みも魅力的である<sup>4,5)</sup>。しかし、培養中にミドリゾウリムシから共生藻が出入りしているという観察もあり、いくら均一の共生藻を共生させた新規ミドリゾウリムシであっても、長期間の培養中「共生藻の質」を常に保証することは難しい。ミドリゾウリムシおよび共生藻に関わるこのような「実験材料としての質の保証」、言い換えると「ミドリゾウリムシを実験材料としてモデル化する」事に関して容易に想定される問題を解決する作業は急務である。

### 培地中のバクテリア

ミドリゾウリムシを野外から単離した直後は、ミドリゾウリムシは体内にエサとして複数のバクテリアやその他の微生物（酵母菌や原生生物）を取り込んでいるはずである。これらの微生物は、ミドリゾウリムシを一匹単離し、無菌のレタス培地で洗浄を繰り返しても除去されない事は明白である。それだけでなく、除去されなかつたバクテリアや微生物が培

地中で増殖し、培養液中でこれらが検出されるはずである。本研究では、野外から単離直後のミドリゾウリムシの培養液について、エサ投与下で培養開始後一定の期間ごとに採取し、バクテリア培養用の寒天培地（BTB 寒天培地、ニッスイ）に塗布後、形成されたバクテリアコロニーの同定を 16SrDNA の配列を明らかにすることにより実施した。この実験により、培養開始直後（投与されたエサのバクテリアが優位）からどのような種類のバクテリアが培地中で増殖していくか、経時的な観察を行った。その結果、培養開始後 2 日では、投与されたバクテリア（理研 JCM14683）が優位であったが、5 日目から他種のバクテリアが増殖し始めて、12 日では JCM14683 は検出されず、Proteobacteria に属する *Variovorax* や、Bacteroidetes に属する *Chryseobacterium* などのバクテリアが優位に増殖していた。これらのバクテリアは、エサ投与を実施した複数のミドリゾウリムシ培養系で同様に検出されており、ミドリゾウリムシの培養環境下での常在菌である可能性が高いものと考えられた。

### 討論

本研究で使用されたミドリゾウリムシは無菌化されておらず、正確な意味でのクローン（純粋な单一細胞由来の細胞集団）ではない。ゾウリムシやミドリゾウリムシを無菌化したと言う報文も過去にあるが、無菌化ゾウリムシでは、その後体内にバクテリアが共生している事が明らかにされた。バクテリアの共生がゾウリムシやミドリゾウリムシの生存には必要である可能性が高い。

本研究により、長期間外部からバクテリアを投与せずレタス培地中で維持できるミドリゾウリムシ株が確立された。外部からのエサの投与が無い状態で、当該株がこれからどれくらいの期間維持できるか、今後も継続的な確認作業が必須である。今回は、バクテリア投与開始後短期間での培養液中におけるバクテリア組成の変化を確認した。今後、長期間バクテリア投与をせず維持されたミドリゾウリムシ培養液においても、バクテリアの組成がどのように変化しているか、網羅的に解析する必要がある。

### 謝辞

本研究は 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成金（RIIS201808）を受けて行った。本研究の遂行には、神奈川大学の日野晶也教授（理学部）、北島正治氏（理学部）、井上和仁教授（理学部）を始め、卒論生各位（小貫まどか、島村拓伸、中澤隼、根岸一樹、諸橋礼大）の協力を得た。ここに感謝の意を表する。

## 文献

- 1) Tonooka Y and Watanabe T (2002) A natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. *Europ. J. Protistol.* **38**: 55-58
- 2) Hosoya H, Kimura K, Matsuda S, Kitaura M, Takahashi T and Kosaka T (1995) Symbiotic algae-free strain of the green paramecium *Paramecium bursaria* produced by herbicide paraquat. *Zool. Sci.* **12**: 807-810
- 3) Nishihara N, Horiike S, Takahashi T, Kosaka T, Shigenaka Y and Hosoya H (1998) Cloning and characterization of symbiotic algae from the green paramecium *Paramecium bursaria*. *Protoplasma* **203**: 91-99
- 4) 細谷浩史 (2000) 太陽エネルギーで生きる動物. *科学* **70**: 636-641.
- 5) 細谷浩史 (2013) 原生動物ミドリゾウリムシの謎にせまる. *じっきょう理科資料* **73**: 1-6.
- 6) Preer LB (1969) Alpha, an infectious macronuclear symbiont of *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.* **16**: 570-578.
- 7) Gortz HD (1982) Infections of *Paramecium bursaria* with bacteria and yeasts. *J. Cell Science.* **58**: 445-453
- 8) Hosoya H, Hamao K, Kato K, Dohra H and Kotani S (2017) Studies of green paramecium, *Parameicum bursaria*, isolated in Kanagawa Prefecture. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 79-83

■原 著 ■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 腊葉標本 DNA の MIG-seq 法による利用可能性・解析手法の検討

岩崎貴也<sup>1, 2, 8</sup> 小玉あすか<sup>2</sup> 松尾 歩<sup>3</sup> 陶山佳久<sup>3</sup>  
大西 哲<sup>4</sup> 尾関雅章<sup>5</sup> 中濱直之<sup>6</sup> 山本 薫<sup>7</sup>

Examination of Possibilities and Methods for MIG-seq Analysis Using  
Plant Herbarium Specimen-Derived DNA

Takaya Iwasaki<sup>1, 2, 8</sup>, Asuka Kodama<sup>2</sup>, Ayumi Matsuo<sup>3</sup>, Yoshihisa Suyama<sup>3</sup>,  
Wataru Ohnishi<sup>4</sup>, Masaaki Ozeki<sup>5</sup>, Naoyuki Nakahama<sup>6</sup>  
and Kaoru Yamamoto<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Kawatabi Field Science Center, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Osaki City, Miyagi 989-6711, Japan

<sup>4</sup> Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, Odawara City, Kanagawa 250-0031, Japan

<sup>5</sup> Nagano Nature Conservation Research Institute, Nagano City, Nagano 381-0075, Japan

<sup>6</sup> Institute of Natural and Environmental Sciences, University of Hyogo, Sanda City, Hyogo 669-1546, Japan

<sup>7</sup> Yokosuka City Museum, Yokosuka City, Kanagawa 238-0016, Japan

<sup>8</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: iwasaki-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Herbarium specimens hold their DNA information at the time of collection from fields. This DNA information provides us with the opportunity to directly compare the past and present. However, it is difficult to analyze specimen DNA in the usual way because the DNA has been fragmented due to the effects of ultraviolet light and chemical fumigation. Therefore, in this study, we examined possibilities and methods of MIG-seq analysis using specimens of six plant species. As the results, several thousand or more loci were sequenced on average in all species, indicating that MIG-seq analysis is also useful for plant specimen-derived DNA. The number of loci and number of sequence reads obtained by the next-generation sequencer were significantly positively correlated, and the number of loci continues to increase without convergence even if the number of leads exceeds 300,000. Although the number of loci after correction of the number of reads decreased in old specimen samples of three species, a relatively large number of loci could be obtained in many samples in the case of specimens prepared around 1980. Also a sufficient number of loci were also sequenced in some samples of older specimens. Therefore, as long as the specimen condition is good, MIG-seq analysis should be useful even for a fairly old sample. Moreover, when the sequence data from multiple independent library constructions were integrated, the number of loci continued to rise even when the number of reads exceeded about 800,000. In conclusion, the most effective way to perform MIG-seq analysis for plant specimen-derived DNA would be to carry out multiple independent library preparations and obtain as many reads as possible.

**Keywords:** Plant herbarium specimen, DNA, MIG-seq, next generation sequencer, stacks

## 序論

植物研究者が野外の植物を調べる際には、プロアマを問わず、腊（さく）葉標本（=押し葉標本）を作成し、博物館や大学の標本庫に収蔵して保存することが一般的である。腊葉標本は、植物分類学的研究の基礎になるだけでなく、地域の植物相研究や保全を行う上でも重要な情報源となる<sup>1)</sup>。特に数十年前などの過去に作製された標本は、生きていた時の植物の形態や分布といった情報はもちろんとして、当時のDNA情報をもタイムカプセルとしてその中に保存している可能性があり、過去と現在の遺伝的情報比較を可能とする貴重な材料である。このような過去の博物館標本を活用した研究分野は、近年、博物館（Museum）+オミクス（Omics）の造語であるミュゼオミクス（Museomics）として注目されるようになってきている<sup>2)</sup>。トキ<sup>3)</sup>やコヒヨウモンモドキ<sup>4)</sup>など、これまで動物標本を用いた研究例の方が多かったが、植物でも標本DNAを解析することで、実は絶滅種が移入種であったことを明らかにした例などがある<sup>5)</sup>。

標本のDNAを解析する際に立ちはだかる最大の問題は、DNA分子の断片化である。多くの場合、腊葉標本のDNAは、標本作成時の熱乾燥や、保存時の紫外線や薬品燻蒸の影響などによって、断片化が進んでいる<sup>6)</sup>。これは古い標本ほど顕著であり、腊葉標本の場合、骨由来DNAの分解速度の約6倍である $1.66 \times 10^{-4}$  nucleotide per yearという速度で断片化が進むと推定されている<sup>7)</sup>。断片化が進んだDNAでは数百bp程度の領域のPCR增幅さえ困難になることが多く、このような場合、通常のサンガーフィルムによるDNA塩基配列解読をするためには、短い領域を増幅するプライマーを設計し直すなどの工夫が必要となる<sup>5,8)</sup>。短い断片の塩基配列を大量に解読できる次世代シーケンサーを活用し、断片化した標本DNAのゲノム全体を解析するという試みもされているが<sup>9)</sup>、これには多額の解析費用が必要であり、様々な非モデル生物の多サンプルで行うのは難しい。また、特定の制限酵素部位に挟まれた領域だけを選択的に解析するRAD-seq法<sup>10)</sup>では、断片化・劣化が進んだDNAで制限酵素反応がうまくいかず、結果が安定しないことがあった。

そこで本研究では、近年に開発され、普及が進んでいるMIG-seq法<sup>11)</sup>による解析に着目した。この手法では、単純な塩基配列が複数回繰り返されたSSR（simple sequence repeats）領域の配列をプライマーとして最初にPCRを行う。これによって、ゲノム中に多数存在するSSR配列に挟まれたISSR（inter-simple sequence repeats）領域を増幅し、次

世代シーケンサーによって配列を決定する。DNAの断片化や劣化の影響を比較的受けにくいPCRを最初に行うため、最初に制限酵素処理が必要なRAD-seq法よりも安定した結果が得られることが期待できる。実際に、30年前に作製されたアザミ属植物の腊葉標本でも、状態さえよければ、MIG-seq解析に用いることが可能であることが報告されている<sup>12)</sup>。ただし、アザミ属植物以外での腊葉標本への適用例はまだほとんどなく、MIG-seq法が腊葉標本のDNAに対してどれくらい有効なのはまだ分かっていないことが多い。本研究では、6種の植物の腊葉標本を用い、どんな植物種の腊葉標本でも同じ様に解析可能なのか、どれくらい前に作製された標本まで解析が可能なのか、効率良く解析を行うためにはどのような工夫が有効かなどを明らかにすることを目的として、研究を行った。

## 材料と方法

### 腊葉標本からの葉片採取とDNA抽出

対象として、被子植物からブナ *Fagus crenata* Blume (ブナ科)、ヨツバヒヨドリ *Eupatorium glehnii* F.Schmidt ex Trautv. (キク科)、マツムシソウ *Scabiosa japonica* Miq. (マツムシソウ科)、ゼンティカ *Hemerocallis dumortieri* C.Morren var. *esculenta* (Koidz.) Kitam. ex M.Matsuoka et M.Hotta (ユリ科)、シダ植物からヒカゲノカズラ *Lycopodium clavatum* L. (ヒカゲノカズラ科)、マツバラン *Psilotum nudum* (L.) P.Beauv. (マツバラン科) の合計6種を選んだ。それぞれの種について、神奈川県立生命の星・地球博物館（標本室コードはKPM）、長野県環境保全研究所（NAC）、横須賀市自然・人文博物館（YCM）に収蔵されている腊葉標本合計198点から、それぞれ5mm×5mm程度の葉片を採取した。内訳としては、ブナ標本67点（KPM収蔵、1962-2016年作製）、ヨツバヒヨドリ標本10点（NAC収蔵、1981-2010年作製）、マツムシソウ標本6点（NAC収蔵、1978-2010年作製）、ゼンティカ標本6点（NAC収蔵、1981-2009年作製）、ヒカゲノカズラ標本43点（KPM収蔵、1949-2015年作製）、マツバラン標本66点（そのうち、KPM収蔵36点、1958-2017年作製。YCM収蔵30点、1951-2017年作製）である（表1）。

採取した葉片はステンレスビーズを用いて破碎し、Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega) を用いて、規定のプロトコルに従い、ゲノムDNAを抽出した。マツバランについては、抽出後のDNAを分注後、DNAが受けた損傷を修復できるとされるNEBNext FFPE DNA Repair Mix (NEB) によ

表 1. 本研究で使用した臘葉標本のリスト

ブナ	KPM-NA0026816, KPM-NA0026818, KPM-NA0027786, KPM-NA0027787, KPM-NA0027789, KPM-NA0061922, KPM-NA0106146, KPM-NA0107783, KPM-NA0112972, KPM-NA0114551, KPM-NA0115413, KPM-NA0131361, KPM-NA0152656, KPM-NA0154294, KPM-NA0158722, KPM-NA0166125, KPM-NA0180700, KPM-NA0184345, KPM-NA0184346, KPM-NA0202858, KPM-NA0206990, KPM-NA0207172, KPM-NA0213578, KPM-NA0280238, KPM-NA0282452, KPM-NA0287791, KPM-NA0288518, KPM-NA0289692, KPM-NA0289752, KPM-NA0296271, KPM-NA0296787, KPM-NA0297322, KPM-NA0297388, KPM-NA0298518, KPM-NA1032358, KPM-NA1032359, KPM-NA1032360, KPM-NA1032361, KPM-NA1032362, KPM-NA1032363, KPM-NA1032364, KPM-NA1032365, KPM-NA1032366, KPM-NA1032367, KPM-NA1032368, KPM-NA1032369, KPM-NA1032370, KPM-NA1032371, KPM-NA1032372, KPM-NA1032373, KPM-NA1032374, KPM-NA1032375, KPM-NA1032376, KPM-NA1032377, KPM-NA1032378, KPM-NA1032379, KPM-NA1032380, KPM-NA1032381, KPM-NA1032382, KPM-NA1032383, KPM-NA1032384, KPM-NA1032385, KPM-NA1032386, KPM-NA1100214, KPM-NA1103157, KPM-NA1105852, KPM-NA1108494
ヨツバヒヨドリ	NAC-126381, NAC-143933, NAC-144206, NAC-144305, NAC-145516, NAC-146035, NAC-155039, NAC-167198, NAC-167435, NAC-167439
マツムシソウ	NAC-97293, NAC-97294, NAC-144680, NAC-159205, NAC-167028, NAC-167477
ゼンティカ	NAC-144761, NAC-144762, NAC-157762, NAC-158082, NAC-167450, NAC-167451
ヒカゲノカズラ	KPM-NA0005073, KPM-NA0029558, KPM-NA0075482, KPM-NA0075483, KPM-NA0075484, KPM-NA0075485, KPM-NA0075486, KPM-NA0075487, KPM-NA0075488, KPM-NA0101554, KPM-NA0103258, KPM-NA0106207, KPM-NA0106582, KPM-NA0108236, KPM-NA0109334, KPM-NA0111443, KPM-NA0117483, KPM-NA0119118, KPM-NA0119694, KPM-NA0125017, KPM-NA0126750, KPM-NA0127262, KPM-NA0134692, KPM-NA0154865, KPM-NA0154872, KPM-NA0158533, KPM-NA0175866, KPM-NA0280502, KPM-NA0292885, KPM-NA1050003, KPM-NA1050004, KPM-NA1050005, KPM-NA1050006, KPM-NA1050007, KPM-NA1100277, KPM-NA1100531, KPM-NA1101279, KPM-NA1102599, KPM-NA1102784-1, KPM-NA1102784-2, KPM-NA1102784-3, KPM-NA1103018, KPM-NA1107929
マツバラン	KPM-NA0005666 (2), KPM-NA0005667, KPM-NA0005668, KPM-NA0119422, KPM-NA0124184 (3), KPM-NA0131941, KPM-NA0132388 (4), KPM-NA0132389, KPM-NA0133611 (2), KPM-NA0137727, KPM-NA0143539, KPM-NA0143545, KPM-NA0148330 (3), KPM-NA0168792 (2), KPM-NA0176451 (2), KPM-NA0184210, KPM-NA0283355 (2), KPM-NA0285369, KPM-NA0294659, KPM-NA0297301 (3), KPM-NA0301811, KPM-NA1103376, YCM-V-554, YCM-V-2356 (2), YCM-V-2955 (4), YCM-V-2958, YCM-V-2959 (3), YCM-V-19469 (4), YCM-V-19470, YCM-V-19471, YCM-V-19472, YCM-V-32674, YCM-V-34659, YCM-V-44368, YCM-V-44664, YCM-V-44727, YCM-V-62883, YCM-V-63206, YCM-V-66750 (2), YCM-V-67582 (2), YCM-V-68506

標本番号末尾の括弧内数字は同じ標本台紙上から採取したサンプルの点数を示す。

る修復処理 (DNA 8  $\mu$ l に、NEBNext FFPE DNA Repair Mix 0.3  $\mu$ l と NEB FFPE DNA Repair Buffer 0.9  $\mu$ l を加え、20° C で 20 分インキュベート) を行った。処理後の DNA の精製は行わず、未処理の DNA とは別にして、そのままその後の実験に用いた。

### MIG-seq 解析

各サンプルから抽出した DNA を用い、Suyama and Matsuki<sup>11)</sup> の方法に従って、MIG-seq 解析のためのライプラリを作成した。最初の 1st PCR の条件は Suyama and Matsuki<sup>11)</sup> のものと基本的に同じだが、アニーリング温度は 38° C に、サイクル数は 30 に変

更した。ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンティカのサンプルについては、独立した 1st PCR を 3 回行い、それぞれを混ぜずにそのまま 2nd PCR 以降の操作を行った。1st PCR 後には、Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter Life Sciences) を用いて、PCR 産物の濃度の標準化と短い断片の除去を行った。2nd PCR 以降の操作は、Suyama and Matsuki<sup>11)</sup> と同じ方法で行った。作製したライプラリは、MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle) (illumina) を用い、MiSeq (illumina) の 80bp Paired-end のラン合計 2 回で塩基配列データを得た。

## データ解析

得られた配列データについてまず、Suyama and Matsuki<sup>11)</sup>の方法に従ってフィルタリング処理を行った。最初に FASTX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) を用いてデータのクオリティでフィルタリングを行った（パラメータは Phred quality score 33、q=30、p=40）。更に、TagDust<sup>12)</sup>を用い、FDR 0.01 の基準で、アダプター配列が含まれる配列を除去した。

フィルタリング後の配列データは種ごとに整理し、Stacks v. 1.48<sup>13)</sup>の ustacks の機能を用い、同一遺伝子座と思われる配列をまとめた（パラメータはデフォルト条件である m=3、M=2、N=4）。このまとめた配列数は MIG-seq 解析で得ることのできた遺伝子座数に相当し、各サンプルでどの程度のゲノムワイドな ISSR 領域を增幅・塩基配列決定することができたかの指標となる。

まず各種について、得られた塩基配列のリード数と最終的に検出できた遺伝子座数との間に相関があるかどうかをピアソンの積率相関係数を用いて調べた。次に、リード数の多寡の影響を緩和するために 10 万リード当たりの数に標準化した遺伝子座数と、標本作製年の間の相関関係を調べた。マツバランについては、FFPE Repair 処理を行った DNA と未処理の DNA それぞれで得られた遺伝子座数を比較し、標本由来 DNA における FFPE Repair 処理の効果を調べた。その際には、対応のある t 検定によって、有意な遺伝子座数の増加があるかを調べた。最後に、ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ニッコウキスグについても同じ DNA に対して 1st PCR 以降の実験を独立に行った 3 回分のデータをまとめた際に、マツバランについては FFPR Repair 未処理と処理済み DNA それぞれのデータをまとめて解析した際に、遺伝子座数がどう変わるかを調べた。その際、総リード数と遺伝子座数の相関関係をピアソンの積率相関係数を用いて調べた。統計処理や作図については、全て R v. 3.2.5<sup>14)</sup> を用い、有意水準は 5% とした。

## 結果

### リード数と遺伝子座数の関係

198 点の腊葉標本から抽出した DNA を元に、重複も含めて合計 308 サンプルの MIG-seq 解析用ライブラリを作成し、MiSeq で塩基配列を決定した。フィルタリングの結果、2 ラン分の合計で 49,110,296 リード、約 3.9 Gbp のデータを得ることができた。1 サンプル当たりの平均は、159,449 リードであった。

各標本につき 1 サンプル分のデータを取り出して ustacks 解析を行った結果、ブナでは 187 ~ 8,834 (平

均 2,334)、ヨツバヒヨドリでは 4,291 ~ 11,686 (平均 9,255)、マツムシソウでは 5,943 ~ 70,724 (平均 8,607)、ゼンティカでは 6,252 ~ 14,726 (平均 10,755)、ヒカゲノカズラでは 550 ~ 14,401 (平均 2,394)、マツバランでは 443 ~ 13,703 (平均 4,398) の遺伝子座が得られた。サンプル数の少ないゼンティカを除いた他 5 種では、リード数と遺伝子座数の間に有意な正の相関が検出された（全て p < 0.01）（図 1）。相関係数 r は、ブナで 0.950、ヨツバヒヨドリで 0.872、マツムシソウで 0.973、ヒカゲノカズラで 0.973、マツバランで 0.962 であった。どの種でも、本研究で得られたリード数の範囲では、遺伝子座数が収束するような様子はみられず、単調増加していた。

### 標本作製年と遺伝子座数の関係

各標本につき 1 サンプル分のデータを取り出し、標本作製年と、10 万リード当たりの値に補正した遺伝子座数との関係を調べた結果、ブナ、ヒカゲノカズラ、マツバランの 3 種でのみ、有意な正の相関が検出された（全て p < 0.001）（図 2）。相関係数 r は、ブナで 0.518、ヒカゲノカズラで 0.645、マツバランで 0.806 であった。一方、ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンティカでは 1980 年前後に作製された標本由来の DNA でも、2010 年前後に作製された標本由来の DNA とほぼ同程度の遺伝子座数が得られており、標本作製年の効果は顕著にはみられなかった。ブナやヒカゲノカズラでも、1980 年頃に作製された標本であれば、一部で近年に作製された標本とそれほど変わらない数の遺伝子座数が得られた。マツバランの場合は 1980 年前後の標本がほとんど無かつたために影響が推定しづらいが、より古い 1960 年頃の標本で、10 万リード当たり数千レベルの遺伝子座数が得られたサンプルも複数みられた。

### FFPE Repair 処理の効果

66 点のマツバラン標本から抽出した DNA について、FFPE Repair 未処理の DNA と処理済み DNA を使って実験を行った結果を比較した。リード数では、未処理が平均 118,306、処理済みが平均 144,988 であり、対応のある t 検定でも有意な差が検出された（p < 0.001）。しかし、遺伝子座数では、未処理が平均 4,398、処理済みが平均 4,541 であり、わずかに増加はしたものので、有意な差はみられなかった。また、各サンプルについて未処理と処理済み DNA で得られた遺伝子座数の差分を調べた結果、一部のサンプルでは遺伝子座数が大きく増加しているものの、逆に減少したサンプルもあり、一貫した傾向はみられなかつ

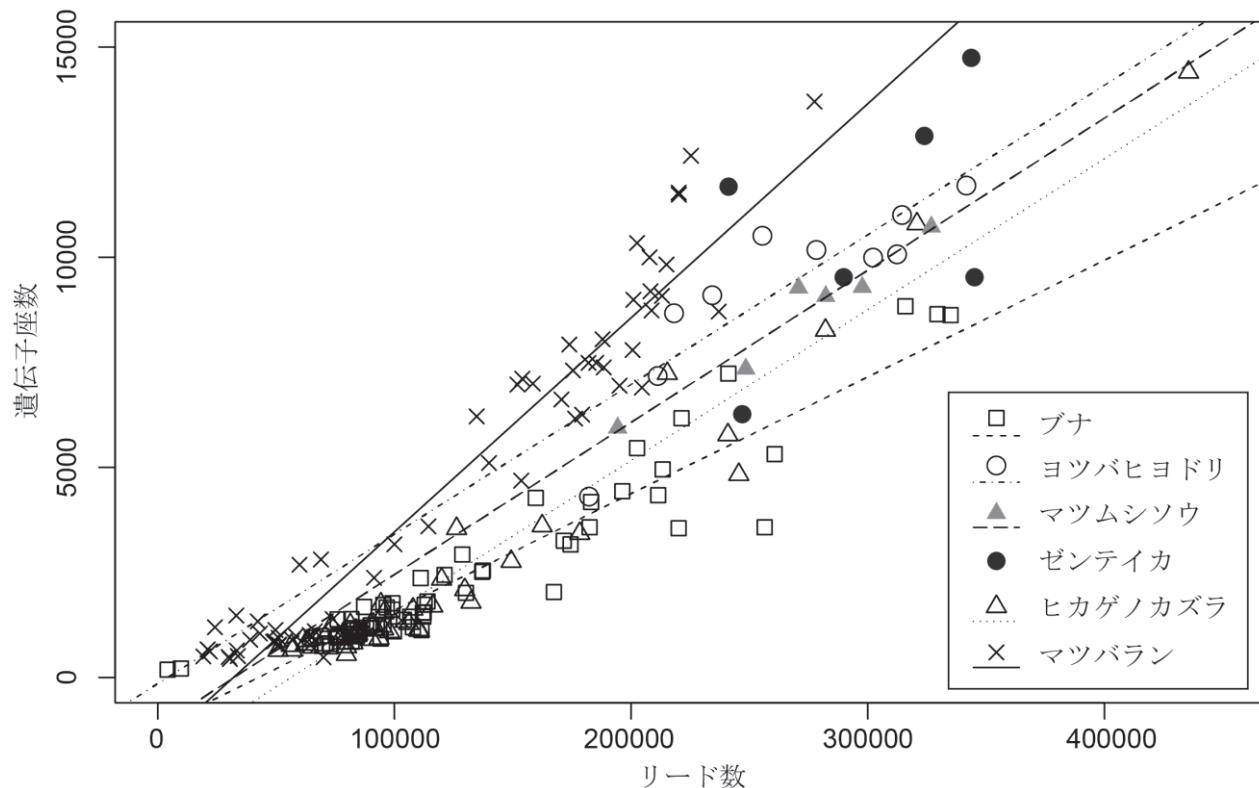


図 1. リード数と遺伝子座数の関係。有意な相関関係がみられた 5 種のみで近似直線を示している。

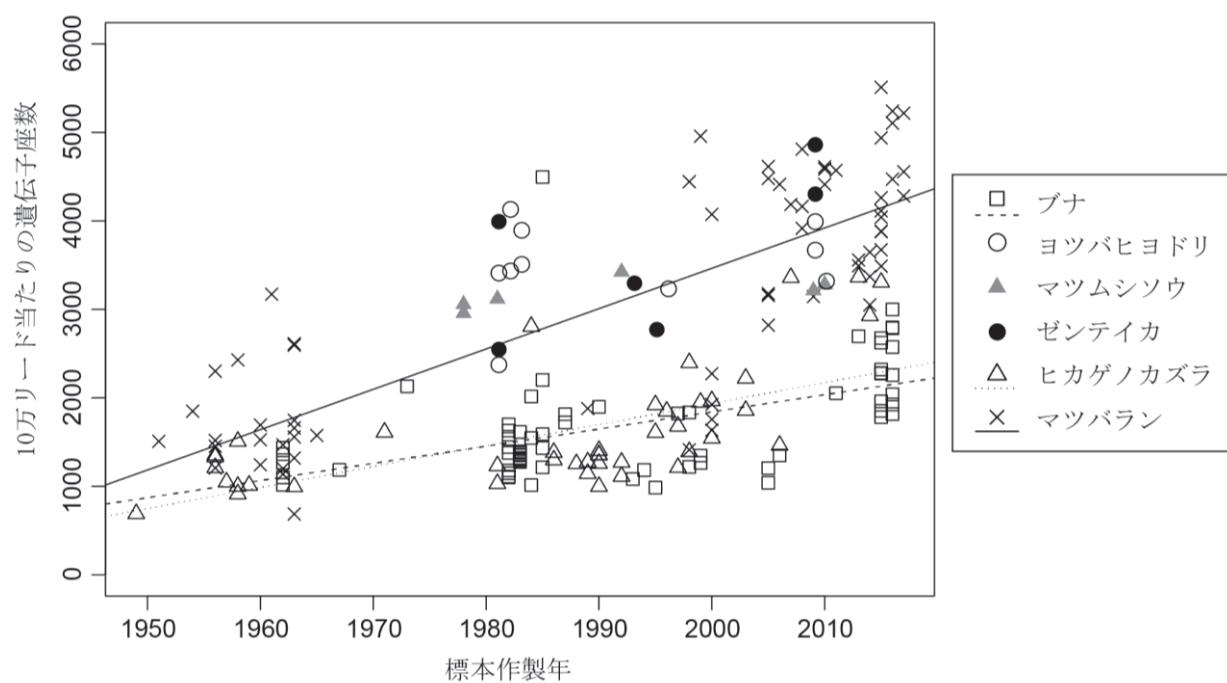


図 2. 標本作製年と 10 万リード当たりに補正した遺伝子座数の関係。有意な相関関係がみられた 3 種のみで近似直線を示している。

た（図 3）。また、ごく小数の遺伝子座しか得られていないかった標本作製年の古いサンプル（図 3 中のサンプル番号が若いもの）については、FFPE Repair の処理の有無で遺伝子座数にほとんど差がみられなかった。

#### 独立した複数回のライブラリ作成による効果

複数の独立して行った MIG-seq 解析で得られたデータをまとめてリード数を増やした結果、ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンティカ、マツバランの全ての種について、リード数の増加に伴う有意な遺伝

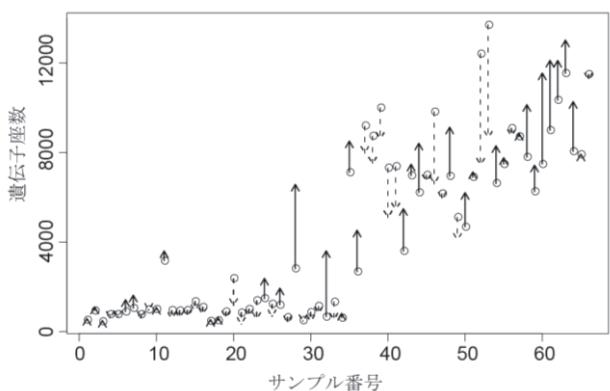


図3. マツバランにおけるFFPE Repair処理前と後での遺伝子座数の変化。サンプル番号は左から右の順で、標本作製年が古いものから新しいものが並んでいる。FFPE Repair処理によって遺伝子座数が増加した場合は実線の矢印で、減少した場合は破線の矢印で示している。

子座数の増加がみられた（全て  $p < 0.001$ ）（図4）。相関係数  $r$  は、ヨツバヒヨドリで 0.940、マツムシソウで 0.987、ゼンティカで 0.789、マツバランで 0.965 であった。どの種でも、リード数の増加に伴って遺伝子座数が収束するような様子はみられず、単調増加していた。また、マツバランは 1×から 2×にデータを増やす際に、FFPE Repair の処理をしたDNA由来のデータを加えているが、特に相関関係から外れるような様子はみられず、リード数の増加に

伴って、遺伝子座数が単調増加した。

## 討論

### MIG-seq 解析の汎用性

本研究で得られた結果から、MIG-seq 法による腊葉標本由来の DNA の解析は、多くの種でも広く有効であることが明らかとなった。ただし、種による違いはみられ、ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンティカ、マツバランの 4 種では、ブナとヒカゲノカズラに比べて明らかに多い遺伝子座数が得られた。この原因は不明であるが、ゲノムサイズの違いやゲノム構成の違いによって ISSR 領域が含まれる数が異なること、腊葉標本作製時の乾燥のし易さが種によって異なることなどが、可能性として考えられる。

### 標本作製年の影響

本研究で得られた標本作製年と遺伝子座数の関係（図2）から、少なくとも 1980 年頃以降に作成された腊葉標本であれば、多くの種で十分に MIG-seq 解析が可能であることが示唆された。中でも、NAC に収蔵されているヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンティカの腊葉標本では、標本作製年が古くなつても遺伝子座数の有意な減少が検出されず、得られた遺伝子座数そのものも多かつた。標本庫で殺虫のため

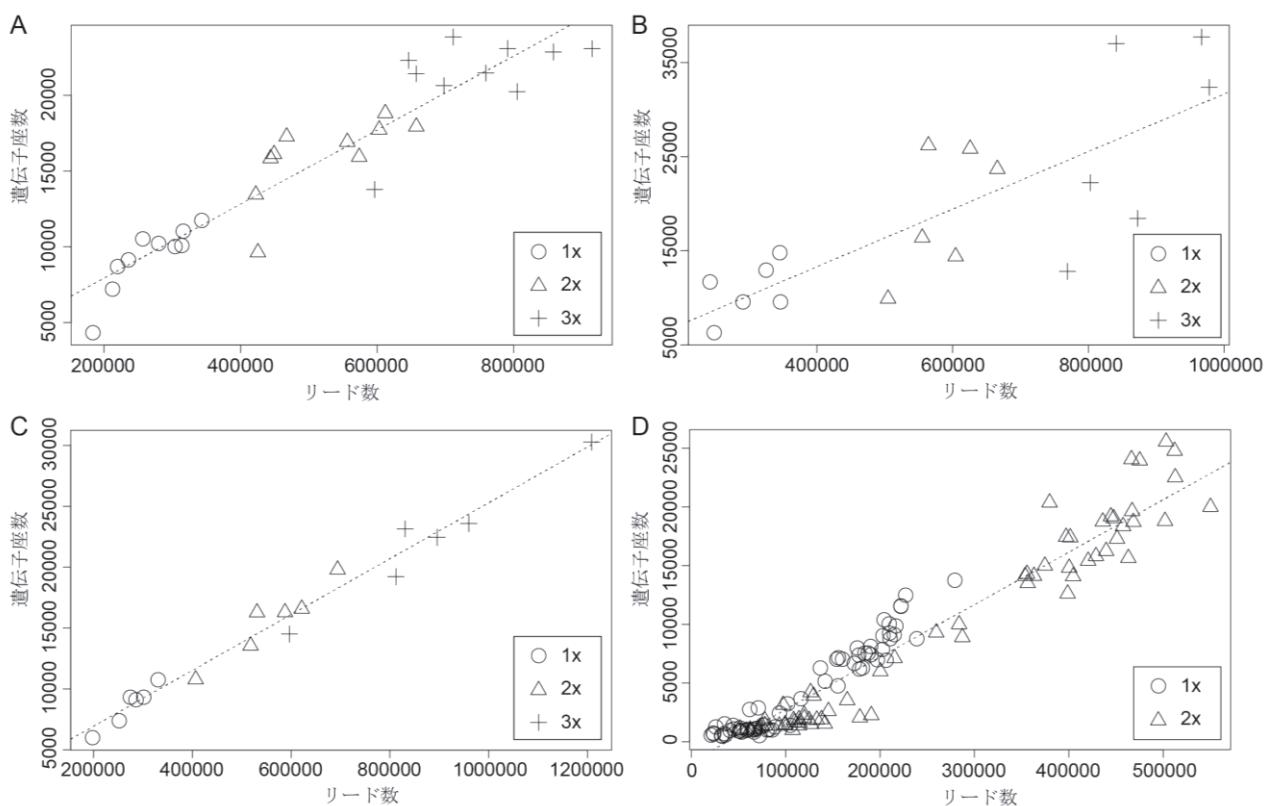


図4. 独立した複数回のライブラリ作製が遺伝子座数增加に及ぼす効果。A. ヨツバヒヨドリ, B. マツムシソウ, C. ゼンティカ, D. マツバラン。

に行われるヨウ化メチル剤や臭化メチル・酸化エチレン混合剤などによる燻蒸は、腊葉標本の DNA を少なからず分解することが知られている<sup>6)</sup>。しかし、NAC では薬剤による燻蒸がこれまでほとんど行われておらず、それによって DNA の分解が最小限に抑えられてきた可能性がある。NAC のような、ほとんど燻蒸をしていない標本庫の腊葉標本を用いれば、かなり古い年代に作製された標本の DNA でも解析が可能になるかもしれない。本研究では、1980 年頃以前に作製された古い NAC の標本は用いていないため、薬品燻蒸をしていない標本庫でどれぐらい古い標本の DNA までが断片化されずに残っているかの限界は分からなかった。しかし、燻蒸をしている KPM や YCM の古い標本でも、1980 年前後なら一部のサンプルで十分な遺伝子座数が得られていたこと、マツバランの 1960 年頃に作製された標本でも一部では比較的多くの遺伝子座数が得られていたことなどを合わせて考えると、かなり古い年代に作製された標本でも状態さえ良ければ、十分に MIG-seq 解析に利用可能であると思われる。ただし、同じリード数当たりの遺伝子座数は多くの場合で古い標本ほど減少しており、DNA の断片化や劣化によって MIG-seq 解析用ライプラリの作製効率は落ちていると思われる。目的次第ではあるが、古い時代に作製された標本 DNA をどうしても解析に用いたい場合には、後述のリード数を増やす工夫を積極的に活用するべきであると思われる。

### 腊葉標本の DNA を用いた MIG-seq 解析において求められる工夫

種によって多少の違いはあるものの、リード数を増やすほど、得られる遺伝子座数は比例して増加した(図 1)。複数回の独立したライプラリ作製で得られたデータを統合した場合でも、リード数と遺伝子座数の相関関係は同様に維持されており(図 4)、本研究で得られたリード数の範囲を超えて、更に遺伝子座数は増えることが予想される。このことは、MIG-seq のライプラリ作製の際に増幅される ISSR 領域の数がかなり多く、数十万リードレベルではそれらの塩基配列を解読しきれていないことを示唆している。独立した PCR の効果そのものについては検証できなかつたが、30 サイクルと次世代シーケンサーのライプラリ作製では多めのサイクル数の PCR を行っていることも考えると、冗長性を高めるためにも複数のライプラリ作製を平行して行い、後でデータを統合する本研究の手法が有用だと思われる。

一方、FFPE Repair 処理については、遺伝子座数に対する有意な効果が検出されなかつた(図 3、図

4D)。この処理によって遺伝子座数が増加しているサンプルが比較的多かつたが、減少しているものも一部みられた。リード数は有意に増加していたことから一定の効果はあると思われるが、少なくとも本研究では劇的に遺伝子座数を増加させるほどの効果までは確認できなかつた。昆虫標本のミトコンドリア DNA と核リボソーム DNA の塩基配列解読を行つた研究では、FFPE Repair 処理によるライプラリ作製とシークエンス結果の改善が確認されており<sup>15)</sup>、サンプルの状態や解析手法によって効果が異なる可能性も考えられる。この処理の効果については更なる検証が必要であろう。

ここで注意しておきたい点として、FFPE Repair は、DNA 分子のニックやギャップ、酸化、3' 末端ブロックなどのダメージを修復するだけでなく、シトシンの脱アミノ化(ウラシル化)についても修復が可能であることが挙げられる。FFPE Repair をしていない古 DNA では、シトシンの脱アミノ化によって変化したウラシルがアデニンと対応してしまい、PCR 増幅の際に元々はシトシンであった塩基がチミンに置換されてしまう現象が知られている<sup>16)</sup>。この脱アミノ化自体はランダムに起こるため、脱アミノ化してしまったシトシンを含む DNA 断片が PCR で偶然多く増幅されない限り、この問題は見えてこない。しかし、正確なジェノタイピングを行うためには注意すべき問題であり、この点で FFPE Repair 処理は効果が大きいと思われる。また、本研究で行つてゐる独立した複数回のライプラリ作製は、この問題が発生する確率を下げるこどもできる。

以上の結果をまとめると、腊葉標本の DNA を効率良く MIG-seq を解析に用いるためには、複数の平行したライプラリ作製を行い、後でデータを統合してリード数を増やす手法が最も有効であると思われる。今回は最大 3 回分のデータ(最大で 90 万～120 万リード)をまとめて解析に用いたが、リード数の増加で遺伝子座数はまだ増加することが予想されるため、4 回あるいは 5 回以上のライプラリ作製も効果が有るだろう。特に、古い、あるいは劣化した標本の DNA はライプラリ作製効率が悪いため、多めの重複ライプラリ作製を行つてリード数を増やすことが有効な手段の一つになると思われる。

### 謝辞

本研究は 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS201807)と科研費(18K06394)、2017 年度神奈川大学共同研究奨励助成金(課題名:丹沢山塊における大気汚染物質の沈着と環境影響)、(独)環境再生保全機構の環境研究総合推進費

(4-1605) の支援を受けて行わされました。ここに深く謝意を表します。腊葉標本からの葉片採取の際には、長野県環境保全研究所の柳澤衿哉氏、神奈川大学の鮎澤勘太氏、志村映実氏にサポートをして頂きました。また、DNA 実験では、神奈川大学の泉進教授、佐藤栞氏、櫻澤健太氏にサポートをして頂きました。これらの方々にも心より感謝申し上げます。

## 文献

- 1) 黒沢高秀, 志賀隆 (2016) 植物さく葉標本室をつくろう. *分類* **16**: 17-30.
- 2) 伊藤元己 (2017) ミュゼオミクス—博物館とバイオイシフォマティクスのクロスロード. *生物の科学 遺伝* **71**: 438-441.
- 3) Feng S, Fang Q, Barnett R, Li C, Han S, Kuhlwilm M, Zhou L, Pan H, Deng Y, Chen G, Gamauf A, Woog F, Prys-Jones R, Marques-Bonet T, Gilbert M-T-P and Zhang G (2019) The genomic footprints of the fall and recovery of the crested ibis. *Curr. Biol.* **29**: 340-349. e347.
- 4) Nakahama N, Uchida K, Ushimaru A and Isagi Y (2018) Historical changes in grassland area determined the demography of semi-natural grassland butterflies in Japan. *Heredity* **121**: 155-168.
- 5) 兼子伸吾, 首藤光太郎, 黒沢高秀 (2013) 古い植物標本を用いた絶滅個体群の系統解析方法の開発: 磐梯朝日地域の「絶滅種」イワキアブラガヤの標本を用いた系統解析. *共生のシステム* **13**: 95-99.
- 6) 小菅桂子, 秋山弘之, 田口信洋 (2004) 生物系収蔵資料に含まれるDNAに及ぼすヨウ化メチル燻蒸剤の影響. *分類* **4**: 17-28.
- 7) Weiß C-L, Schuenemann V-J, Devos J, Shirsekar G, Reiter E, Gould B-A, Stinchcombe J-R, Krause J and Burbano H-A (2016) Temporal patterns of damage and decay kinetics of DNA retrieved from plant herbarium specimens. *R. Soc. Open Sci.* **3**: 160239.
- 8) Nakahama N and Isagi Y (2017) Availability of short microsatellite markers from butterfly museums and private specimens. *Entomol. Sci.* **20**: 3-6.
- 9) 久保田涉誠, 伊藤元己, 森長真一 (2017) 100 年前の標本を使用した全ゲノム解析—進化を直接観察する. *生物の科学 遺伝*. **71**: 448-453.
- 10) Rowe H-C, Renaud S and Guggisberg A (2011) RAD in the realm of next-generation sequencing technologies. *Mol. Ecol.* **20**: 3499-3502.
- 11) Suyama Y and Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Sci. Rep.* **5**: 16963.
- 12) Lassmann T, Hayashizaki Y, and Daub C-O (2009) TagDust—a program to eliminate artifacts from next generation sequencing data. *Bioinformatics* **25**: 2839-2840.
- 13) Catchen J-M, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, and Postlethwait J-H (2011) Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3 (Bethesda)* **1**: 171-182.
- 14) R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [URL <https://www.R-project.org/>].
- 15) Sproul J-S and Maddison D-R (2017) Sequencing historical specimens: successful preparation of small specimens with low amounts of degraded DNA. *Mol. Ecol. Resour.* **17**: 1183-1201.
- 16) Brotherton P, Endicott P, Sanchez J-J, Beaumont M, Barnett R, Austin J and Cooper A (2007) Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Res.* **35**: 5717-5728.

■原 著 ■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 相模湾河口域における長期環境変動モニタリング 6 流入河川水及び底質の元素分析

岩崎俊志<sup>2</sup> 岡崎太一<sup>2</sup> 武井尊也<sup>1,2</sup> 鈴木祥弘<sup>1,3</sup> 金澤謙一<sup>1,3</sup> 西本右子<sup>1,2,4</sup>

Long Term Environmental Change Monitoring in Sagami Bay Estuary 6  
— Element Concentration of Influent River Water and Bottom Sediment —

Shunji Iwasaki<sup>2</sup>, Taichi Okazaki<sup>2</sup>, Takaya Takei<sup>1,2</sup>, Yoshihiro Suzuki<sup>1,3</sup>,  
Ken'ichi Kanazawa<sup>1,3</sup> and Yuko Nishimoto<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: y24moto@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** The element concentrations of two rivers flowing into Sagami Bay were compared. In Hayakawa, which is a river flowing in a hot spring area, certain element concentrations in the river water were high in the upstream and middle basins. It was considered to be the effect of the hot spring. The sediments of the river upstream of the Kaname river were found to contain a large amount of organic components. As in the previous year, in the Kaname river, the concentration of all detected elements in the river water tended to increase as it went downstream.

**Keywords:** river water, elemental analysis, bottom sediment

### 序論

著者らが継続して測定を行っている相模湾の平塚市周辺の海域で採取した海水及び相模湾への流入河川である金目川の河川水を使用した結果を報告した<sup>1)</sup>。相模湾河口域の海水では、冬期に流入した河川水の影響で、表層に塩濃度の低下が観測されている<sup>2,3)</sup>。またこれまで継続して測定してきた相模湾流入河川である相模川及び金目川（花水川）の河川水を同日にサンプリングし、両河川水の分析結果の差異を検討した。その結果上流から下流にいくに従って各元素濃度が増加する傾向は共通するが全体的に金目川の方が元素濃度が高いことがわかった<sup>4)</sup>。今年度は相模湾流入河川である早川を測定対象に加え、金目川と同時期にサンプリングし、結果を比較した。同時にサンプリングした底質の結果についても報告する。

### 材料と方法

#### 河川水及び底質試料の採取

河川水の試料は、金目川（上流：秦野市内、国道246号線との交差地点付近、中流：平塚市内土屋橋付近、下流：平塚市内花水橋付近）及び早川（上流：箱根町強羅、宮城野駐在所近く、中流（須雲川）：箱根町湯本、箱根湯本駅近く、下流：小田原市早川、早川橋下）で採取した。

#### 河川水の分析

採水した試料を、No.5A (ADVANTEC) と No.5C (ADVANTEC) のろ紙でろ過後、孔径 0.45 μm のシリジフィルター (Minisart RC15, Sartorius) でろ過した。

測定には ICP-AES(日立ハイテクサイエンス SPS3500) を使用し、キャリヤーガス : 0.35 L/min、

プラズマガス:14.0 L/min、補助ガス:0.40 L/min (いずれも Ar)、吸い込み量:1.70~1.90 mL/min の条件で測定した。

### 底質の分析

採取した試料を、風乾、ふるい分けし粒径 150~250  $\mu\text{m}$  を測定試料とした。110°Cまでの乾燥減量、及び 610°Cまでの強熱減量を測定した。試料 1.00 mg を純水、1 mol/L 硝酸、1 mol/L 塩酸で溶出試験を行い、溶液をろ紙 (5A, 5C)、シリシジフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) の順にろ過を行った。ろ過後の残渣を蛍光 X 線分析装置 (Rigaku, ZSX Priums II) で定性分析を行い、ろ液を ICP-AES で定量分析を行った。

## 結果と討論

### 採取した河川水及び底質の基本特性

表 1 に河川水の水温, pH, 導電率、底質の乾燥減量、強熱減量を示した。10月の金目川中流の河川水の pH が低いが、5日連続して測定している全てで 5.7

~ 6.1 であった。これまでの測定値の中で pH7 以下の値は初めてであった。また金目川上流の底質の強熱減量が最大であり、有機物が多く含まれることがわかった。

### 底質の測定結果

底質試料を乾燥後蛍光 X 線分析による定性分析を行った。両河川共に検出された元素は、Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti, Mn, P, Sr, Zn, Cu であった。天候の安定した 10 月 15 日から 19 日に 5 日間連続、金目川中流でサンプリングした底質の純水、1 mol/L HCl 及び 1 mol/L HNO<sub>3</sub>への溶出試験を実施した。測定結果を表 2 に示した。連続して純水抽出では 0.4% 程度の Na, K が 0.1% 程度の Si, Ca の溶出が、さらに 0.05% 程度の Fe, P の溶出が観測された。HCl 及び HNO<sub>3</sub>では 3~4% の Al, Si, Ca, Fe, 1.5~2.5% の Mg, P, 0.5% 程度の Na, K の溶出が観測された。

表 1. 河川の水質と底質の基本物性

Date	River	Sampling point	Bottom segment		River water		
			Loss on drying (%)	Loss on ignition (%)	Temperature (°C)	pH	Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
2018 8/27	Hayakawa	upper	1.09	3.26	21.9	8.11	278
		middle	1.44	2.33	25.2	8.23	301
		lower	2.38	2.30	24.9	8.60	333
	Kaname	upper	4.60	6.06	22.0	8.00	240
		middle	1.08	2.48	26.0	8.10	300
		lower	0.85	2.07	26.1	7.55	342
2018 10/17	Hayakawa	upper	1.11	2.25	15.1	8.19	273
		middle	1.14	1.12	14.0	8.00	290
		lower	1.76	1.66	15.0	8.31	328
	Kaname	upper	4.15	5.09	15.0	8.28	281
		middle	1.11	1.84	18.0	5.75	240
		lower	1.98	2.62	13.1	8.21	322
2018 12/3	Hayakawa	upper	0.98	2.24	14.1	8.30	326
		middle	1.05	1.86	14.9	8.05	293
		lower	1.32	2.16	14.1	8.21	276
	Kaname	upper	3.73	8.06	13.5	9.33	236
		middle	1.78	4.33	15.0	8.28	281
		lower	1.50	2.93	13.1	8.21	322

表2. 金目川中流の底質の水及び1 mol/L HCl, HNO<sub>3</sub>への溶出量の5日間連続サンプリング試料の平均値と%RSD  
(n=5)

	Elution test mg/L (%RSD)	1M HCl	1 M HNO <sub>3</sub>
	Pure water		
Na	0.43 (30%)	0.48 (18%)	0.46 (7%)
Mg	-	1.7 (8%)	1.41 (22%)
Al	-	3.47 (15%)	3.55 (16%)
Si	0.09 (15%)	3.44(12%)	3.24 (14%)
P	0.06 (188%)	2.46 (11%)	1.83 (24%)
K	0.39 (3%)	0.43 (2%)	0.44 (4%)
Ca	0.12 (57%)	3.10 (11%)	3.45 (15%)
Fe	0.04 (4%)	3.98 (15%)	2.96 (19%)

- : Not detected

表3. 相模湾流入河川である早川及び金目川採取試料の定量結果

(mg/L)

Date	River	Sampling point	Ca	Na	Si	Mg	K	Sr	B	Fe	Mn
2018 8/27	Hayakawa	upper	28.56	27.79	44.61	17.89	5.30	0.11	0.12	-	-
		middle	18.28	42.18	43.37	9.05	5.15	0.22	0.22	-	-
		lower	18.19	34.29	41.31	9.47	4.89	0.18	0.18	-	-
	Kaname	upper	21.07	18.11	26.44	13.99	2.58	0.06	0.02	-	-
		middle	23.91	29.85	25.13	13.62	6.15	0.08	0.02	-	-
		lower	24.37	31.67	24.57	15.54	7.13	0.09	0.03	-	-
2018 10/17	Hayakawa	upper	37.60	50.12	41.21	6.52	7.06	0.08	0.10	0.05	-
		middle	32.52	54.58	39.01	5.72	7.26	0.05	0.23	0.08	-
		lower	54.19	36.41	43.54	9.01	6.91	0.06	0.21	0.07	-
	Kaname	upper	37.75	20.46	24.21	7.46	3.31	0.04	0.07	-	-
		middle	47.06	38.10	26.39	8.20	9.73	0.06	0.02	-	-
		lower	53.07	44.11	27.99	8.94	4.59	0.07	0.02	-	-
2018 12/3	Hayakawa	upper	42.14	16.82	23.50	10.77	4.19	0.07	0.12	0.05	-
		middle	26.21	29.65	20.82	5.39	4.99	0.06	0.34	0.05	-
		lower	26.99	34.69	21.44	7.05	5.63	0.08	0.27	0.10	-
	Kaname	upper	29.12	9.58	13.57	7.67	2.77	0.04	0.02	-	-
		middle	33.00	17.23	13.79	8.09	8.09	0.05	0.03	-	-
		lower	39.17	24.03	14.28	9.52	9.52	0.06	0.03	-	-

- : 定量下限以下

### 河川水の測定結果

表3に早川及び金目川で同日に採水した測定結果を示した。金目川では上流から下流にいくに従って各元素濃度が増加する傾向は例年と同様であった。一

方早川では上流の Ca, Mg 濃度が高く、中流の B, Na 濃度が高い傾向であった。2016年、2017年も同様の傾向であったことから、強羅温泉（上流）、箱根湯本温泉（中流）の影響と考えられた。

表 4-1. 底質溶出試験結果 (8/27 サンプリング試料)

(mg/L)

Date	River	point	Eluent	Si	Al	Fe	Ca	Na	K	Mg	P
2018 8/27	Haya kawa	upper	H <sub>2</sub> O	0.07	-	0.04	0.82	0.37	0.39	0.03	-
			1M HCl	0.92	1.56	1.58	1.26	0.36	0.39	0.23	0.94
			1M HNO <sub>3</sub>	1.06	1.63	2.13	0.84	0.35	0.39	0.37	1.08
		middle	H <sub>2</sub> O	0.08	-	0.04	0.26	0.35	0.38	0.03	-
			1M HCl	1.42	2.37	1.92	2.04	0.43	0.43	0.44	1.02
			1M HNO <sub>3</sub>	1.65	2.54	2.60	3.20	0.41	0.43	0.63	1.57
		lower	H <sub>2</sub> O	0.08	-	0.04	0.72	0.34	0.38	0.05	0.22
			1M HCl	1.64	2.83	2.21	1.98	0.40	0.41	0.48	1.45
			1M HNO <sub>3</sub>	1.64	2.83	2.21	1.98	0.40	0.41	0.48	1.45
2018 8/27	Kana me	upper	H <sub>2</sub> O	0.13	0.01	0.05	0.02	0.37	0.40	0.01	0.03
			1M HCl	9.47	11.6	11.9	6.59	0.52	0.51	5.05	0.30
			1M HNO <sub>3</sub>	8.57	10.6	8.13	7.00	0.52	0.50	4.03	0.24
		middle	H <sub>2</sub> O	0.07	0.01	0.05	0.01	0.38	0.40	0.00	0.03
			1M HCl	4.32	4.25	5.79	2.66	0.46	0.46	3.25	0.32
			1M HNO <sub>3</sub>	3.39	3.69	3.46	3.21	0.49	0.45	1.66	0.27
		lower	H <sub>2</sub> O	0.05	0.00	0.05	0.00	0.36	0.40	-	0.03
			1M HCl	3.20	2.97	4.82	2.30	0.42	0.45	1.88	0.30
			1M HNO <sub>3</sub>	3.36	3.29	4.60	2.36	0.47	0.47	1.99	0.29

表 4-2. 底質溶出試験結果 (10/17 サンプリング試料)

(mg/L)

Date	River	point	Eluent	Si	Al	Fe	Ca	Na	K	Mg	P
2018 10/ 17	Haya kawa	upper	H <sub>2</sub> O	0.03	-	0.02	0.62	0.39	0.40	0.00	0.03
			1M HCl	1.33	1.95	2.32	1.73	0.42	0.42	0.41	0.15
			1M HNO <sub>3</sub>	1.28	2.01	1.81	2.22	0.47	0.43	0.33	0.13
		middle	H <sub>2</sub> O	0.04	-	0.03	0.62	0.40	0.41	-	0.03
			1M HCl	1.44	2.02	2.26	2.00	0.51	0.46	0.57	0.18
			1M HNO <sub>3</sub>	1.44	2.07	1.99	2.83	0.44	0.42	0.50	0.18
		lower	H <sub>2</sub> O	0.06	-	0.03	0.86	0.41	0.41	-	0.03
			1M HCl	1.77	2.87	2.38	2.02	0.50	0.44	0.45	0.22
			1M HNO <sub>3</sub>	1.62	2.66	1.74	2.54	0.46	0.43	0.32	0.19
2018 10/ 17	Kana me	upper	H <sub>2</sub> O	0.14	0.01	0.04	0.42	0.48	0.41	-	0.05
			1M HCl	7.75	9.56	9.41	6.32	0.55	0.48	3.89	0.30
			1M HNO <sub>3</sub>	7.27	8.32	5.77	7.11	0.53	0.48	2.49	0.25
		middle	H <sub>2</sub> O	0.08	-	0.05	-	0.34	0.38	-	0.26
			1M HCl	3.22	3.12	3.54	2.88	0.45	0.43	1.51	2.16
			1M HNO <sub>3</sub>	3.00	3.07	2.37	3.08	0.41	0.42	1.01	1.23
		lower	H <sub>2</sub> O	0.08	-	0.04	0.82	0.48	0.41	-	0.05
			1M HCl	4.78	5.37	7.42	4.06	0.55	0.50	2.52	0.36
			1M HNO <sub>3</sub>	4.51	4.67	5.11	5.15	0.53	0.48	1.65	0.35

表 4-3. 底質溶出試験結果 (12/3 サンプリング試料)

Date	River	point	Eluent	Si	Al	Fe	Ca	Na	K	Mg	P	(mg/L)
2018 12/3	Haya kawa	upper	H <sub>2</sub> O	0.06	-	0.02	0.20	0.41	0.42	-	0.04	
			1M HCl	1.77	2.47	2.60	1.57	0.43	0.44	0.53	0.19	
			1M HNO <sub>3</sub>	1.75	2.40	2.26	1.92	0.41	0.42	0.51	0.16	
		middle	H <sub>2</sub> O	0.06	-	0.02	0.38	0.39	0.41	-	0.05	
			1M HCl	1.67	2.51	2.53	2.42	0.44	0.45	0.52	0.20	
			1M HNO <sub>3</sub>	1.52	2.43	1.91	1.97	0.44	0.43	0.39	0.19	
		lower	H <sub>2</sub> O	0.08	0.01	0.03	0.42	0.39	0.41	-	0.05	
			1M HCl	2.32	3.35	2.92	2.00	0.47	0.46	0.55	0.24	
			1M HNO <sub>3</sub>	2.01	2.99	2.06	2.20	0.44	0.45	0.37	0.23	
	Kana me	upper	H <sub>2</sub> O	0.12	0.00	0.03	0.34	0.39	0.41	-	0.05	
			1M HCl	7.86	8.89	8.89	6.56	0.51	0.49	3.57	0.35	
			1M HNO <sub>3</sub>	7.00	8.07	5.59	6.35	0.52	0.50	2.38	0.29	
		middle	H <sub>2</sub> O	0.08	0.01	0.03	-	0.39	0.41	-	0.07	
			1M HCl	4.61	4.89	5.46	5.20	0.53	0.49	2.27	0.44	
			1M HNO <sub>3</sub>	4.08	4.53	3.51	4.30	0.50	0.48	1.48	0.38	
		lower	H <sub>2</sub> O	0.07	0.01	0.03	0.32	0.41	0.41	-	0.06	
			1M HCl	4.19	4.00	5.57	3.69	0.51	0.49	1.75	0.42	
			1M HNO <sub>3</sub>	4.12	4.10	4.67	3.66	0.56	0.49	1.61	0.39	

### 底質溶出試験と河川水測定結果の関係

表 4-1～表 4-3 に早川及び金目川の河川底質の溶出試験の結果を示した。早川の酸溶出量は上流から下流に行くに従って増加する傾向がみられ、河川水で観測された上流の Ca, Mg が高濃度である傾向とは一致しない。いずれも B の溶出は確認されなかつた。金目川では上流の酸溶出量は多く、やはり河川水中の元素濃度とは相関がみられない。例年の測定結果と比較すると、10月サンプリングの金目川の河川水濃度が高い傾向にあったが、原因究明には至らなかつた。結果は示さなかつたが、例年同様相模川の測定も実施しており、相模川の河川水濃度に例年との大きな違いはみられない<sup>4)</sup>ことを確認した。

### 謝辞

本研究は、平成 30 年度神奈川大学総合理学研究所共

同研究助成 (RIIS201805) を受けて行った。ここに謝意を表します。

### 文献

- 1) 平賀義路, 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2011) 相模川河口域の植物プランクトンの分布への淡水流入の影響. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **23**: 59-66.
- 2) 野木大輔, 平賀義路, 金澤謙一, 西本右子, 武井尊也, 鈴木祥弘 (2015) 相模川河口域プランクトン生物量の周年変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 91-96.
- 3) 武井尊也, 鈴木祥弘, 金澤謙一, 西本右子 (2016) 相模川河口域海水及び流入河川水の元素濃度. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **27**: 81-84.
- 4) 荒井 健, 島川涼太, 武井尊也, 鈴木祥弘, 金澤謙一, 西本右子 (2017) 相模川河口域における長期環境モニタリング 4－流入河川水の元素濃縮. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 109-112.



■教育論文■

## 物理学実験 1 における光の回折・干渉実験の実践例と応用

星野 靖<sup>1, 2, 3</sup>

Practical Examples and Applications for Diffraction and Interference of Lights  
in Experimental Physics 1

Yasushi Hoshino<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: yhoshino@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** I introduce some experimental topics regarding diffraction and interference of light penetrating a single and double slit. The physics of diffraction and interference can be explained by the superposition of waves in direct space with a slight phase difference, which is an important concept in the field of not only applied physics but also condensed matter physics and cosmology. In the Faculty of Science, Kanagawa University, subjects on wave physics are systematically taught to first-year to third-year students in the class of experimental physics. I show some examples of Fraunhofer diffraction of light by a single and double slit, covered in the Experimental Physics 1, and finally expand to Fresnel diffraction as an advanced subject.

**Keywords:** diffraction, interference, wave packet, fraunhofer diffraction, fresnel diffraction, coherence

### 序論

物理学の歴史の中で、光は波か粒子かという議論は、中世ヨーロッパを中心に活発に行われた。17世紀後半、C. Huygens は光の伝搬、反射・屈折現象などを波動的性質により幾何学的に説明し、「Treatise in light」を著した。一方、同時代に I. Newton は、著書「Philosophiae Naturalis Principia Mathematica (PRINCIPIA)」および「A Treatise of the Reflexions, Refractions, Inflexions and Colours of Light (OPTIKS)」の中で、光の持つ様々な物理的性質を粒子的側面から説明した。それから 100 年もの間、ヨーロッパを中心に光に関する様々な実験が行われたが、当時は粒子説が有力であったようである。しかし 19 世紀初頭の T. Young による二重スリットを用いた光の干渉実験により、光が波動的性質を持つことが確認され、A.-J. Fresnel や G. Kirchhoff による理論的な説明がなされると波動説が優勢となつた。1865 年には、J. Maxwell により光が電磁波の一種であることが一般的に示され、「A dynamical theory of the electromagnetic field」と題された論文

の中で Maxwell 方程式として美しくまとめられた。ところが 19 世紀後半から 20 世紀初頭、光電効果や Compton 効果に代表される光の粒子性に起因する物理的現象が相次いで発見された。当時、量子論の勃興とともに、光の持つ本質に関して様々な検証実験がなされた。1905 年、A. Einstein が光量子仮説に基づく光電効果の説明により光の粒子性が確かめられ、ノーベル物理学賞を受賞したことは有名である。ところがその直後には M. Laue により、X 線が結晶により回折を起こすこと（波動性）が発見され、結晶構造解析への応用の端緒となった。

このように、当時数百年にわたり様々な実験が行われ、光が粒子性と波動性いずれの性質も兼ね備えた二面的存在であることが明らかとなり、現在では「量子」と考えるに至っている。更にそれまで粒子として考えられていた電子も波動的性質と粒子的性質を合わせ持つことが 1920 年代に発見され、この二面性はすべての物質にとって普遍的な性質であることがわかっている。そしてこれらの波動的・粒子的

性質は、今日様々な研究・開発分野において広く応用されていることは周知のことであろう。このような背景の中、光や物質の波動性や粒子性に関して理解を深めることは、実験物理分野のみならず物性理論、ひいては物理教育の観点からも非常に有意義と考える。

神奈川大学理学部の物理学学生実験においては、光の波動性に関する様々な実験テーマが用意され、学生が実験として系統的に学修できるよう工夫されている。まず1年次の基礎物理学実験法では、「Newton Ring」を用いた光の干渉実験を行い、光の波動性について理解を深めると同時に、計測と誤差について考えるテーマが扱われる。2年次の物理学実験1では、波長の異なる半導体レーザ（赤・緑・青）から発せられたコヒーレント単色光を用いた「Youngの回折・干渉実験」を行い、スクリーン上に現れた縞間隔と二重スリット間隔との関係を調べる。スリットとスクリーンとの幾何学的配置により干渉縞の現れ方は単純な関係で記述でき、実験結果と理論予測を比較することにより、光の波動的性質を深く理解できるテーマである。3年次の物理学実験2では、光の波動的性質として重要な「偏光と複屈折」と「X線回折による結晶構造解析」を行う2つの実践的な

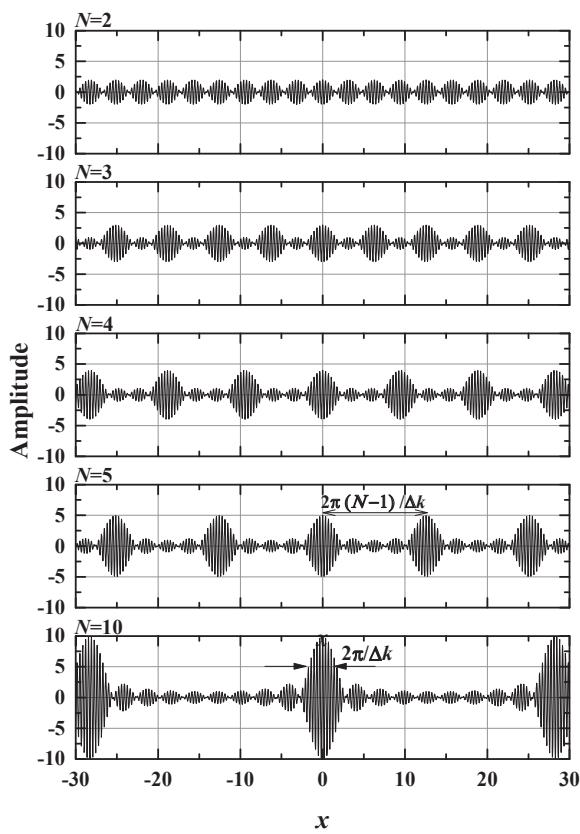


図1. 波数 $[k_1, k_2] = [17, 19]$  ( $\Delta k = 2$ ) のバンド幅を持つ $N$ 個の波の重ね合わせと波束の形成。

テーマを設定している。ここで扱う平面波の回折・干渉の原理は非常に単純であり、スリットや原子による回折で少し位相（光路差）の異なる波同士の重ね合わせによりすべて説明できる。これら一連の実験は、物理を学ぶ学生には教育的かつ実学的テーマであると考える。

まず波の回折干渉について、基礎的な考え方について触れよう。上記のように波の干渉による強度分布は、次式に示すようにわずかに位相の異なる複数の波同士の重ね合わせにより生じる。

$$\Psi(x) = \sum_{n=1}^N \cos((k_1 + (n-1)\delta k)x) \\ \propto \frac{\sin\left(\frac{N\delta k \cdot x}{2}\right)}{\sin\frac{\delta k \cdot x}{2}} \quad (1)$$

$$\delta k \equiv \frac{\Delta k}{N-1} = \frac{k_2 - k_1}{N-1} \quad (2)$$

例として、 $[k_1, k_2]=[17, 19]$  の間で $N-1$ 分割した $N$ 個の正弦波を重ね合わせた計算結果を図1に示す。例えば $N=2$ の場合、合成波は2つの正弦波の和、

$$\Psi = \cos(k_1 x) + \cos(k_2 x) \\ = 2 \cos\left(\frac{k_1 - k_2}{2}x\right) \cos\left(\frac{k_1 + k_2}{2}x\right) \quad (3)$$

となり、いわゆる $2\pi/(k_1 - k_2)$  間隔の「うなり」が観測される。さらに $N$ 個の正弦波の重ね合わせによって、波の局在化が起こり $2\pi(N-1)/(k_1 - k_2)$  間隔で波束が形成されることが分かる。これは数学で言えば、次式(4)で示すように散乱体形状 $g(x, y)$ （ここではスリットや結晶構造）をFourier変換したものであり、物理的に表現すればスリット $g(x, y)$ による波の回折・干渉現象そのものである。

$$\Psi(X, Y) = \iint_{-\infty}^{\infty} g(x, y) \exp[-ikr] dx dy \quad (4)$$

$$r = \sqrt{(X-x)^2 + (Y-y)^2 + L} \quad (5)$$

つまり、スリット通過後の経路長 $r$ の差（位相差）が異なる複数の波の重ね合わせにより、距離 $L$ に置かれたスクリーン上の点 $(X, Y, L)$ で波の干渉像 $|\Psi(X, Y)|^2$ が現れることが直感的に理解できる。

本稿では、主に物理学実験1で行っている单・複スリットによる可視レーザ光の回折・干渉実験の実践例についてやや発展的内容も含めて述べるが、難しい回折積分などの概念は使わず、初等的な大学数学のみで理解できるよう配慮した。

### Fraunhofer 回折の理論

まず、入射波を平面波として扱うことができ、スリットとスクリーンまでの距離が十分長い場合の回折・

干渉理論を扱う。このような条件設定を Fraunhofer 近似という。

### 単スリットによる回折の理論

図2にスリット開口幅  $a$  の単スリットを用いた光の回折実験における各光学機器の幾何学的配置図を示す。ここで、スリットとスクリーンまでの距離を  $L$  とし、スリット中心を原点とした  $x-z$  座標系を考える。単純化のため、 $y$  平面上での議論とすると、スクリーン上の観測座標点  $Q$  は、 $Q(X, 0, L)$  と表される。まず入射平面波は、Huygensの原理より、スリット開口部の各微小領域から球面波を発生すると考える。そこで、スリット開口幅  $a$  を  $N$  等分し、微小区間  $\Delta x (= a/N)$  に分割する。スリット上の任意の点  $P(x_n, 0, 0)$  と、スクリーン上の点  $Q(X, 0, L)$  の距離  $r_n$  は、次のように書ける。

$$r_n = \sqrt{L^2 + (X - x_n)^2} \quad (6)$$

これを Taylor 展開し、 $x_n$  の 2 次の項を微小量として無視した Fraunhofer 近似を適用すると、

$$r_n \approx \left( L + \frac{X^2}{2L} \right) - \frac{Xx_n}{L} \quad (7)$$

と表される。したがって、点  $r$  において点  $r_n$  から発せられる素源波の振幅  $\Psi_n(r)$  は波数  $k$  とすると、一般的に球面波

$$\Psi_n(r) = \frac{\exp[-ikr_n]}{r} \quad (8)$$

と書ける。十分遠方では、平面波として近似できるので、単スリットを透過した波のスクリーン上における振幅は、

$$\begin{aligned} \Psi(X) &\approx \lim_{N \rightarrow \infty} \sum_n \exp \left[ -ik \left( \left( L + \frac{X^2}{2L} \right) - \frac{X}{L} \cdot n \frac{a}{N} \right) \right] \\ &= \exp \left[ -ik \left( L + \frac{X^2}{2L} \right) \right] \cdot \int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} \exp \left[ \frac{ikX}{L} x \right] dx \\ &= \exp \left[ -ik \left( L + \frac{X^2}{2L} \right) \right] \cdot a \frac{\sin \left( \frac{kXa}{2L} \right)}{\frac{kXa}{2L}} \end{aligned} \quad (9)$$

となる。したがって、スクリーン上の点  $Q(X, 0, L)$  における回折強度は、

$$|\Psi(X)|^2 \propto a^2 \left[ \frac{\sin \left( \frac{kXa}{2L} \right)}{\frac{kXa}{2L}} \right]^2 \quad (10)$$

と書ける。図3に、強度分布を示す。これが単スリットによる回折干渉像であり、sinc 関数とも呼ばれる。

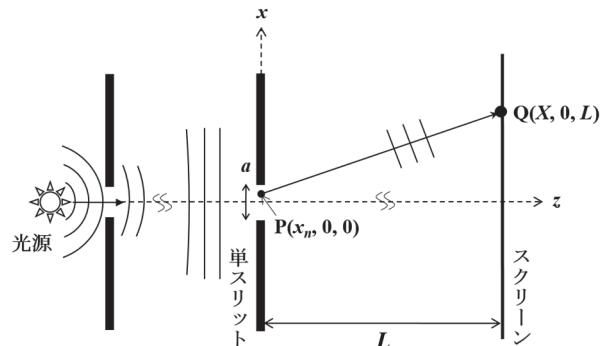


図2. 開口幅  $a$  の単スリットでの光の回折実験における各光学機器の幾何学的配置図。

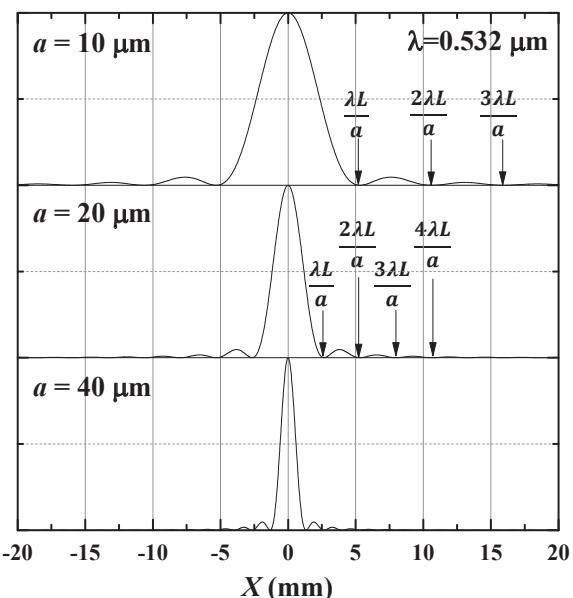


図3. 単スリットでの回折・干渉実験における回折強度分布の計算値。ここで、 $L = 1\text{ m}$ ,  $\lambda = 0.532\text{ }\mu\text{m}$  とし、スリット開口幅を (a)  $a = 10\text{ }\mu\text{m}$ , (b)  $20\text{ }\mu\text{m}$ , (c)  $40\text{ }\mu\text{m}$  とした。

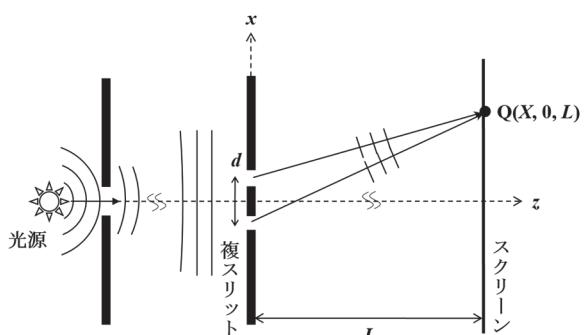


図4. スリット間隔  $d$ , 開口幅  $a$  の複スリットでの光の回折実験における各光学機器の幾何学的配置図。

### 複スリットによる回折の理論

次に、いわゆる Young の実験に代表される複スリットによる回折を取り扱う。図4に開口幅  $a$ 、スリット間隔  $d$  の複スリットの幾何学的配置を示す。複ス

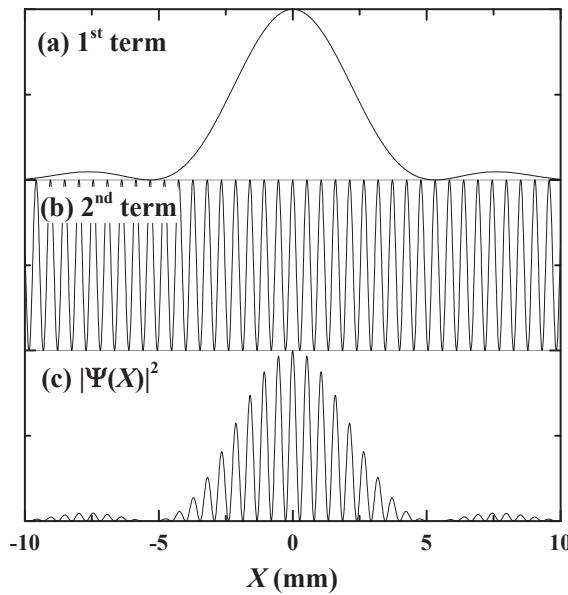


図5. 複スリットでの回折・干渉実験における回折強度分布の計算値. 式(12)における第一項(a), 第2項(b)とそれらの積(回折強度)(c). ここで,  $L = 1\text{ m}$ ,  $a = 10\text{ }\mu\text{m}$ ,  $d = 100\text{ }\mu\text{m}$ ,  $\lambda = 0.532\text{ }\mu\text{m}$ とした.

リット通過後の波の振幅と回折強度は、2つの単スリットからの回折波の合成として、以下の式により見積られる。

$$\begin{aligned} \Psi(X) &\propto \int_{-\frac{d}{2}-\frac{a}{2}}^{-\frac{d}{2}+\frac{a}{2}} \exp\left[\frac{ikX}{L}x\right] dx + \int_{\frac{d}{2}-\frac{a}{2}}^{\frac{d}{2}+\frac{a}{2}} \exp\left[\frac{ikX}{L}x\right] dx \\ &= 4a \frac{\sin\left(\frac{kXa}{2L}\right)}{\frac{kXa}{2L}} \cdot \cos\left(\frac{kXd}{2L}\right) \quad (11) \end{aligned}$$

$$|\Psi(X)|^2 \propto \left[ \frac{\sin\left(\frac{kXa}{2L}\right)}{\frac{kXa}{2L}} \right]^2 \cdot \cos^2\left(\frac{kXd}{2L}\right) \quad (12)$$

回折強度を表す式(12)における第一項と第二項、それらの積を図5示す。複スリットでは、第一項の単スリットによる回折強度に対し、2つのスリットによる干渉結果が掛け算された形になることが分かる。したがって、明線は第二項の位相項より、

$$\frac{kXd}{2L} = n\pi \quad (13)$$

の条件が成立する場所点Qに現れる。これが有名なBraggの回折条件である。

### 多重スリットによる回折の理論

最後に多重スリットによる回折強度分布について触れたい。複スリットの理論をN個の開口に拡張すると、最終的に振幅と回折強度分布は、

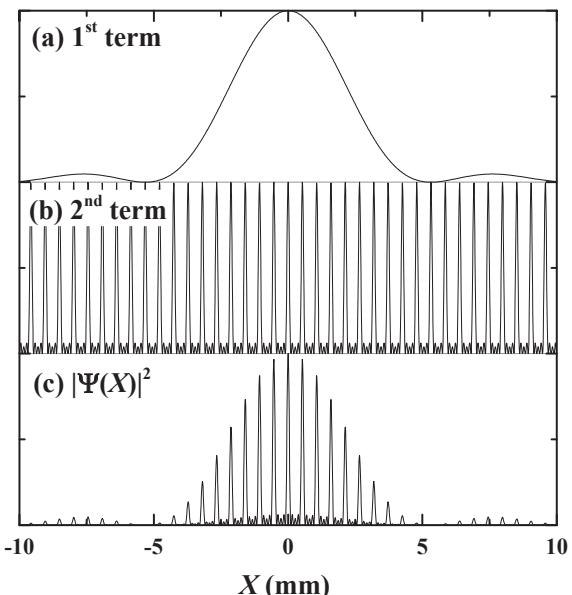


図6. 多重スリットでの回折・干渉実験における強度分布の計算値. 式(15)における第一項(a), 第2項(b)とそれらの積(回折強度)(c). ここで,  $L = 1\text{ m}$ ,  $a = 10\text{ }\mu\text{m}$ ,  $d = 100\text{ }\mu\text{m}$ ,  $\lambda = 0.532\text{ }\mu\text{m}$ とした.

$$\Psi(X) \propto \sum_{j=-\frac{N-1}{2}}^{\frac{N-1}{2}} \left[ \int_{j\frac{d}{2}-\frac{a}{2}}^{j\frac{d}{2}+\frac{a}{2}} \exp\left[\frac{ikX}{L}x\right] dx \right] \quad (14)$$

$$|\Psi(X)|^2 \propto \left[ \frac{\sin\left(\frac{kXa}{2L}\right)}{\frac{kXa}{2L}} \right]^2 \cdot \left[ \frac{\sin\left(N\frac{kXd}{2L}\right)}{\sin\left(\frac{kXd}{2L}\right)} \right]^2 \quad (15)$$

と書けることが分かる。例えば  $N = 5$  の場合で強度分布をグラフにすると、図6のようになる。 $N$ を十分に大きく取った場合が、いわゆる回折格子による回折パターンであるが、複スリットの場合 ( $N = 2$ ) に比べ  $N$  の増加による波束の空間的局在化で回折スポットがシャープになっていることが視覚的に理解できる。式(15)における第二項は Laue 関数と呼ばれ、X線や電子線回折による結晶構造解析においてよく出てくるものであり、結晶の周期構造(スリット間隔)を反映した重要な項である。

### 物理学実験1での光の回折干渉実験例

#### 複スリットによる回折干渉実験 (Youngの実験)

物理学実験で用いる各種スリットは、マイクロスリットカッターを用い、意図的に感光させたガラス製写真乾板上に自作した。図7に実際に開口幅  $a = 20\text{ }\mu\text{m}$  スリット間隔  $d = 100\text{ }\mu\text{m}$  で作製したスリットを光学顕微鏡で観察した一例を示す。なお、ガラス乾板上に作製したスリットは、湿気に弱いため保管には注意が必要である。

図8に赤( $\lambda = 0.635 \mu\text{m}$ )、緑( $\lambda = 0.532 \mu\text{m}$ )、青( $\lambda = 0.450 \mu\text{m}$ )のレーザを用い、 $L = 1 \text{ m}$ の距離で観察した仕様の不明な3つの複スリットからの回折パターンを示す。以下の回折パターンはすべてスマートフォンのカメラで撮影したものである。図5に示す回折強度分布の例と比較すると、特徴がよく一致していることが確認できる。

続いて、隣接明線間隔(明線10個の平均より算出)を求め、横軸に波長、縦軸に明線間隔をプロットしたものを図9に示す。これより、明線の間隔と波長は比例関係になっていることが分かる。ここで式(12)

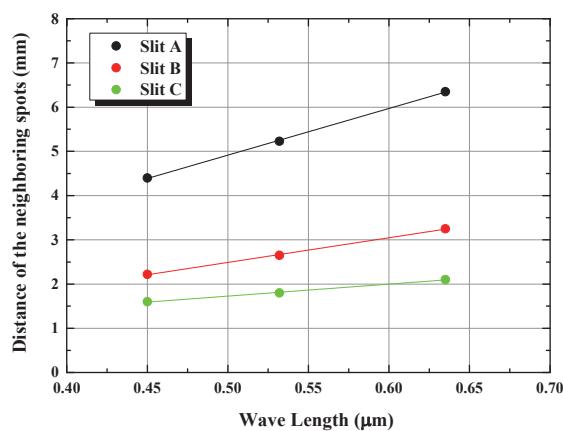


図7.  $a = 20 \mu\text{m}$ ,  $d = 100 \mu\text{m}$  で自作したスリットの写真の一例。

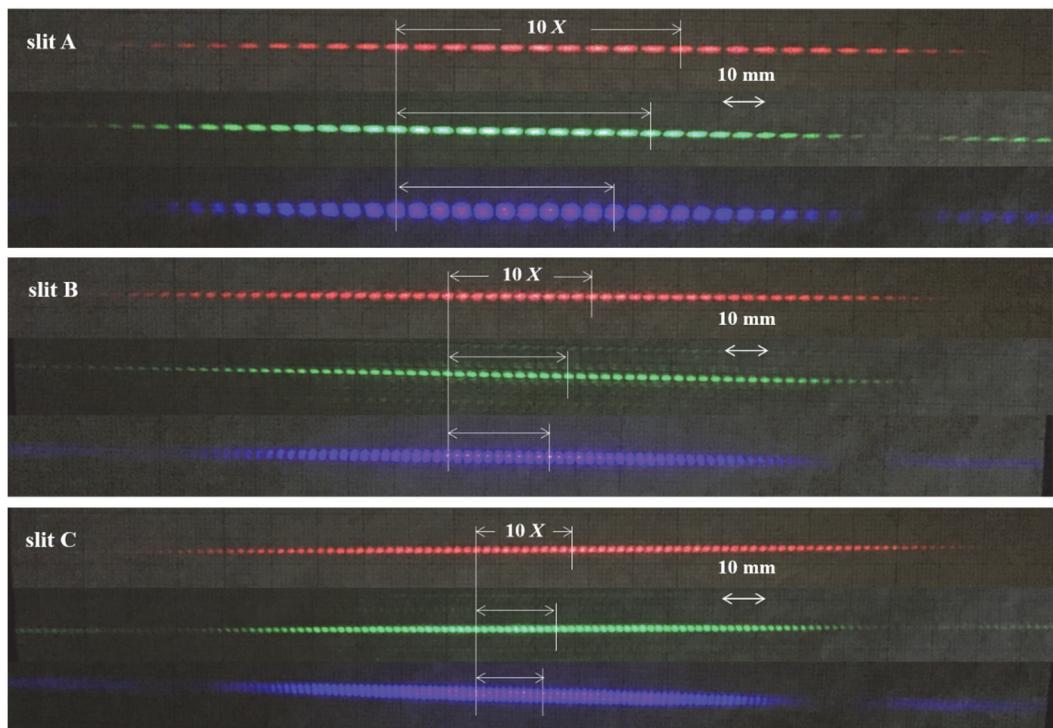


図8. 赤( $\lambda = 0.635 \mu\text{m}$ )、緑( $\lambda = 0.532 \mu\text{m}$ )、青( $\lambda = 0.450 \mu\text{m}$ )のレーザを用い、 $L = 1 \text{ m}$ の距離で観察した複スリットからの回折パターン。なお回折パターンは、10 mm 方眼紙に投影し写真撮影した。

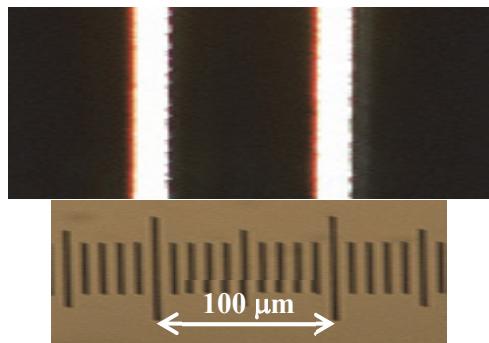


図9. 実験より求めた隣接明線の間隔と波長の関係。

の第二項より、

$$X = \frac{nL}{d} \cdot \lambda \quad (16)$$

の関係が成り立つとき、2つのスリットを通過した波の位相が同じくなり、スクリーン上の点Q( $X, 0, L$ )の位置に明線が現れる。これが Bragg の回折条件であるが、実験結果と式(12)から導かれる理論値を比較検討することは教育的である。ここで理論上明線間隔と波長の関係は、次式(17)のように表される。

$$X = \frac{L}{d} \cdot \lambda \quad (17)$$

最小二乗法により求めたグラフの傾きから、各スリットの間隔  $d$  を見積もると、表1のようになった。

表 1. 回折スポット間隔から見積もったスリット間隔

	傾き	$R^2$ 係数	スリット間隔 ( $\mu\text{m}$ )
Slit A	10555	0.9996	95
Slit B	5578.4	0.9991	180
Slit C	2711.5	0.9976	370

### 单スリットを用いた回折・干渉実験

図 10 に、波長  $0.532 \mu\text{m}$  のレーザ光を用い、スクリーンから距離  $L = 1 \text{ m}$  に設置した開口幅  $20, 40 \mu\text{m}$  の单スリットからの回折パターンを示す。図 3 に示した sinc 関数と比較すると特徴が良く一致していることが確認できる。

本節の最後に、单スリットによる回折の一例として、毛髪の太さの解析を行ってみる。細線による回折は、開口单スリットとはポジネガ反転の関係にあるが、式(10)で示す開口单スリット同じ回折強度式が成り立つ。これを、Babinet の原理という。図 11 に太さが未知の毛髪からの回折パターンを示す。図 3 に示すように、暗線の間隔  $\bar{X}$  は、

$$\bar{X} = \frac{\lambda L}{a} \quad (18)$$

であるから、実験より毛髪の太さ  $a = 70 \mu\text{m}$  と求まる。

### Fresnel 回折への発展

これまで光源とスリットおよびスクリーンの距離がそれぞれ十分に大きく、入射波と回折波を平面波として扱える場合について回折・干渉効果を考えてきた。最後に波の回折干渉に関する発展的な話題として、Fresnel 回折について触れよう。ただ物理学実験 1 では Fresnel 回折の範囲までは扱わないが、波の回折干渉実験の発展的なテーマとしては教育的なので、最後に簡単に紹介したいと思う。

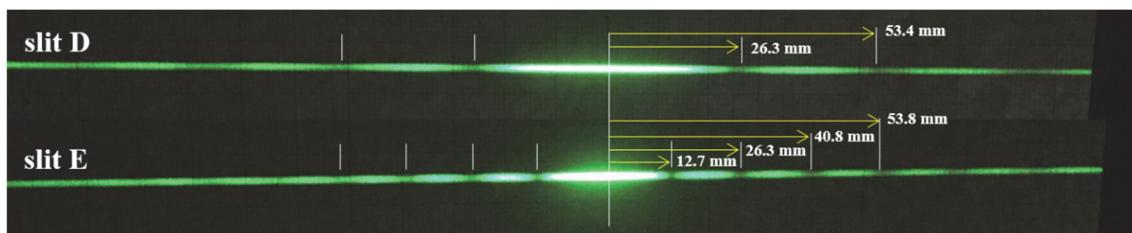


図 10. 緑色 ( $\lambda = 0.532 \mu\text{m}$ ) レーザを用い,  $L = 1 \text{ m}$  の距離で観察した, 開口幅  $a = 20$  (Slit D),  $40 \mu\text{m}$  (Slit E) の单スリットからの回折パターン.



図 11. 髪の毛からの回折像.

### 单スリットによる Fresnel 回折理論

これまでの Fraunhofer 回折では、光源からスリットとスリットからスクリーンの間隔がそれぞれ十分に大きく、入射波と回折波を平面波として扱った。いずれかの距離が十分に短い場合は、波を一般的な球面波 (スリットでは円筒波) として扱う必要がある。図 12 に Fresnel 回折実験における各光学機器の幾何学的配置と座標系を示す。ほとんどの教科書では、平面波が入射する場合が記述されているが、本稿では入射波が球面波 (円筒波) とし、一般的な形式で記述する。これまでも説明したように、図 12 のスクリーン上の座標  $X$  に到達する回折波は、スリット上の各微少領域からの素源波の重ね合わせとして表される。これまでと同様に、回折波の出発点に依存した光路差が生じ、その結果スリット上で干渉が起こるはずである。スリット間隔を  $a$ 、スリット間とスクリーン - スリット間の距離をそれぞれ  $L_1, L_2$  とすると、スリット上の任意の座標  $P(s, 0, L)$  からの回折波がスクリーン上の点  $Q(X, 0, L)$  に達する場合の光路差  $\Delta$  は、Taylor 展開の 2 次まで取ると、

$$\begin{aligned} \Delta &\cong \sqrt{\left(\frac{L_1}{\cos \beta}\right)^2 + s^2} + \sqrt{\left(\frac{L_2}{\cos \beta}\right)^2 + s^2} \\ &= \frac{s^2 \cos \beta (L_1 + L_2)}{2L_1 L_2} + (\text{h. o.}) \end{aligned} \quad (19)$$

と書ける。ここで Fraunhofer 近似において無視した 2 次の項 ( $s^2$ ) が Fresnel 回折では意味を持ってくる。したがって、点  $Q(X, 0, L)$  での振幅は、

$$\Psi(X) = \int_{s_1}^{s_2} \exp[-ik\Delta] ds \quad (20)$$

となる。ここで積分は、スリット内側領域に渡って行うので、今回は図 12 より積分範囲は、

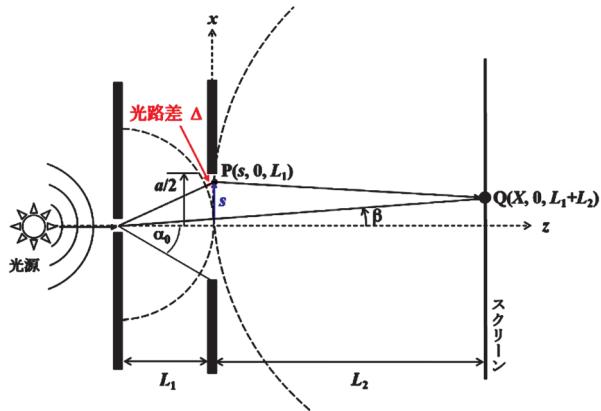


図 12. 開口幅  $a$  の単スリットでの Fresnel 回折実験における幾何学的配置図。

$$\begin{aligned} s_1 &= (-\alpha_0 - \beta)L_1 \\ s_2 &= (\alpha_0 + \beta)L_1 \end{aligned} \quad (21)$$

とすればよい。ここで、 $\alpha_0$  は第 1 スリットから見た第 2 スリットの広がり角、 $\beta$  は第一スリットから点  $Q$  を結ぶ線分と  $z$  軸のなす角であり、それぞれ

$$\alpha_0 = \sin^{-1}\left(\frac{a}{2L_1}\right) \quad (22)$$

$$\beta = \tan^{-1}\left(\frac{X}{L_1 + L_2}\right) \quad (23)$$

となる。ここで  $a$  は  $L$  に比べ十分小さいとした。

$$\xi \equiv s \sqrt{\frac{2s \cos \beta (L_1 + L_2)}{L_1 L_2 \lambda}} \quad (24)$$

と置くと回折強度は、

$$\begin{aligned} |\Psi(X)|^2 &\propto \left\{ \int_{\xi_1}^{\xi_2} \cos\left(\frac{\pi}{2}\xi^2\right) d\xi \right\}^2 \\ &+ \left\{ \int_{\xi_1}^{\xi_2} \sin\left(\frac{\pi}{2}\xi^2\right) d\xi \right\}^2 \end{aligned} \quad (25)$$

と書ける。結局、回折強度はこの積分の値で決まることが分かる。ここで、右辺に出てくる積分

$$C(x) = \int_0^x \cos\left(\frac{\pi}{2}\xi^2\right) d\xi \quad (26)$$

$$S(x) = \int_0^x \sin\left(\frac{\pi}{2}\xi^2\right) d\xi \quad (27)$$

を Fresnel 積分という。被積分関数は関数形からも推測できるが、 $\xi$  の増加とともに激しく振動する。一方、Fresnel 積分値は共に  $1/2$  に収束することが知られている。図 13 にこれらのグラフを示す。また  $C(x)$  と  $S(x)$  それぞれ  $x$  軸と  $y$  軸の値として描くといわゆる Cornu Spiral が得られ、回折強度がこの曲線上の 2 点を結ぶ距離として幾何学的に導かれるこ

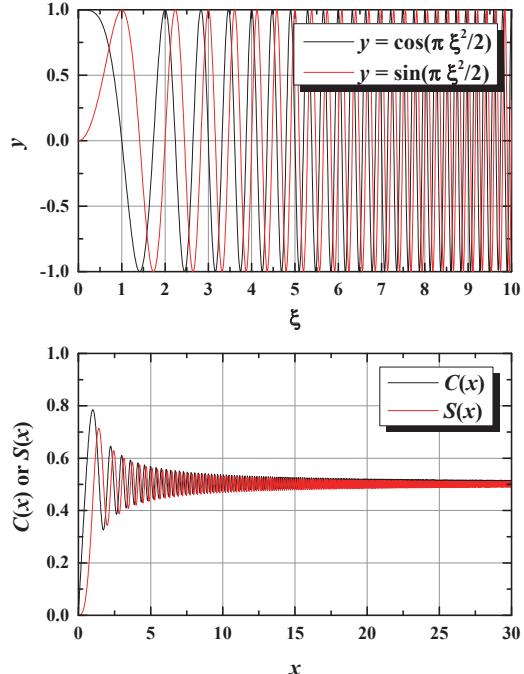


図 13. 式 (26) と (27) で示される Fresnel 積分の被積分関数と Fresnel 積分値。

とから、Fresnel 回折の解析によく用いられる。またこの Fresnel 積分は、数学の分野でも興味深い関数の一つであるが、ここでは物理学実験の話題に戻そう。

実験と比較するに当たり、具体的に  $\lambda = 0.532 \mu\text{m}$ 、 $a = 1.31 \text{ mm}$ 、 $L_2 = 1 \text{ m}$  として、数値積分によりスクリーン上  $Q(X, 0, L_1 + L_2)$  における回折強度を計算してみよう。図 14 に、 $L_1$  をパラメータとして計算した Fresnel 回折強度の結果を示す。図 14 と図 3 を比べると Fresnel 回折条件では Fraunhofer 回折とはかなり異なった回折パターンが得られることが分かる。

### 单スリットによる Fresnel 回折条件における実験

最後に、Fresnel 条件で観察した実際の回折パターンを図 15 に示す。実験条件は、図 14 に示したシミュレーションのものと同じとした。図 14 と図 15 を比較すると、強度分布が良く再現できていることが分かる。Fraunhofer 回折条件とは異なり、図 14、図 15 の (c)(e) に見られるように、同位相になる中心部でも光学系の幾何学的配置によっては弱めあう条件となる場合が出てくることが確認できる。

高等学校や大学での物理学実験では、Fraunhofer 回折までを扱うことが多いが、発展的なテーマとして Fresnel 回折の理論と実験の一例を示した。Fresnel 回折の理論は、解析的に解くことが難しいため、実験においては敬遠しがちであるが、計算機

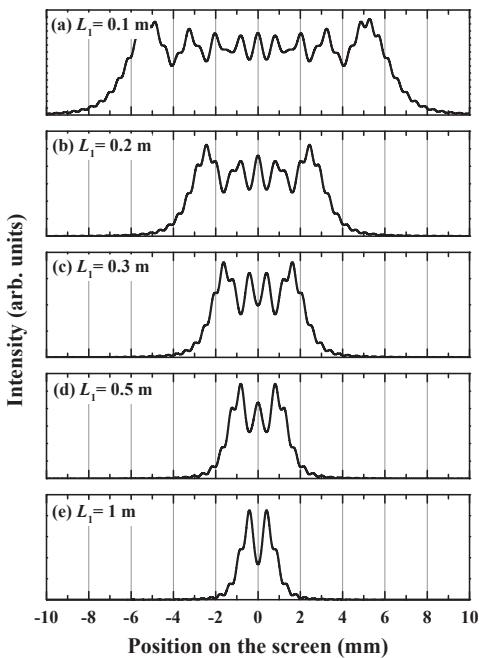


図 14. スリット幅  $a = 1.31 \text{ mm}$  の単スリットを用い、 $L_2 = 1 \text{ m}$  に固定し、 $L_1 = 0.1$ (a), 0.2(b), 0.3(c), 0.5(d), 1.0 m (e) の各条件で数値積分より計算した Fresnel 回折強度。波長は  $\lambda = 0.532 \mu\text{m}$  とした。

による数値計算も含め、回折・干渉に関する実験の集大成として扱うことは、教育的な価値も大いにある。また Fresnel 回折の例は、研究分野のみならず身近なところでも以外に多く、それらの応用や重要性についても触れることも必要であると同時に、波の干渉に関して興味を持つてもらうきっかけになる題材であると感じる。

## おわりに

これまで物理学実験 1 で行っている光の回折・干渉実験に関するテーマの概要とその発展的内容について述べた。波の重ね合わせによる局在化や変調、共鳴などの干渉効果は、応用物理における実験にとどまらず量子物性物理から宇宙物理にわたる様々な物理分野で現れる現象である。我々に身近なところでは、スリットを結晶原子に置き換え、X線や電子線を入射することにより、結晶からの回折パターンも同

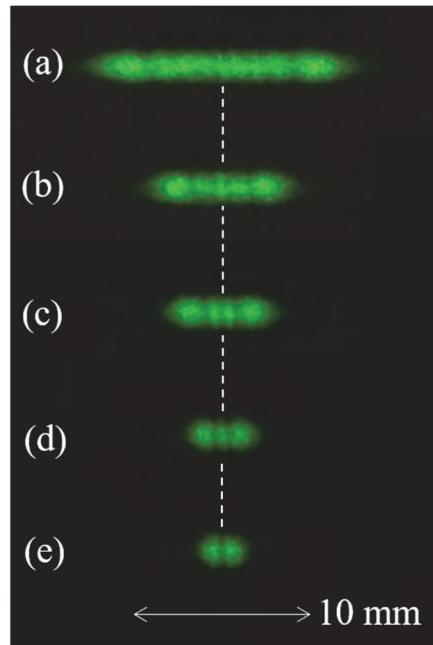


図 15. スリット幅  $a = 1.31 \text{ mm}$  の単スリットを用い  $L_2 = 1 \text{ m}$  とし、 $L_1 = 0.1$ (a), 0.2(b), 0.3(c), 0.5(d), 1.0 m (e) の各条件で、波長  $\lambda = 0.532 \mu\text{m}$  のレーザを用いて観察した Fresnel 回折パターン。

様に得ることができる。この回折パターンを解析することにより、結晶の対称性(スリット形状)や原子間隔(スリット間隔)に関する情報を得ることができ、X線(電子線)構造解析として広く利用されている。特にX線回折に関するテーマは物理学実験 2 で扱うが、波の回折・干渉に関する基礎理論は、本稿で述べたものを基礎に展開される。ここでは、大学 2 年生レベルで直感的に現象が理解できるよう、初等的な数学のみを用い、実空間での正弦波の重ね合わせとして、回折干渉効果を記述した。周期的に並ぶ散乱体の Fourier 変換が回折像(Fourier 空間像)であり、逆変換が実空間像になることが理解できると、さらに応用範囲が広がり得ると考える。

## 謝辞

光の回折・干渉実験装置の設計、作製においてサポートを頂いた斎藤保直先生に感謝いたします。

■教育論文■

## 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学(6)

加部義夫<sup>1,2</sup>

Organometallic Chemistry Based on Reaction Types  
and Anecdote of Discoveries (6)

Yoshio Kabe<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City Kanagawa 259-1293, Japan,

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: kabe@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Organic compounds containing carbon-metal bonds are called organometallic compounds. Such compounds have been known and studied since the 19th century and have been widely applied to influence synthetic transformation in modern organic chemistry. Many educational benefits could result from the use of reaction types and discovery episodes for undergraduates and graduate classes in organic and organometallic chemistry. Wilke, the successor of Ziegler and director of Max-Planck-Institute für Kohlenforschung, took over research on the Ni-effect, which brought about the discovery of the Ziegler-Natta catalyst. He discovered the  $TiCl_4/AlEt_2Cl$  catalyzed oligomerization reaction of butadiene to yield cyclododecatriene (CDT) without a olymer. Furthermore, the olefin and  $\pi$ -allyl Ni-complexes were isolated and found to act as important intermediates for oligomerization. Around the same time, the Wacker method was applied to industrial reactions in which water was added to ethylene ligand of the Pd(II) complex to give acetaldehyde. Tsuji discovered a similar type of reaction : nucleophile addition to the  $\pi$ -allyl ligand of the  $\pi$ -allyl Pd (II) complex, which was developed to Pd(0) catalyzed allylation (Tsuji -Trost reaction). On the other hand the heterogeneous Ni catalyst has been applied to the industrial hydrogenation reaction since its discovery by Sabatier. When Wilkinson modified Rh(III) (*Pyridine*)<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> as one of the homogeneous hydrogenation catalysts with Ph<sub>3</sub>P instead of pyridine as a ligand, he serendipitously discovered the very active and coordinatively unsaturated Rh(I)(Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>Cl complex (Wilkinson catalyst). Knowles and the Monsanto company applied these phosphine Rh(I) catalysts to the asymmetric synthesis of amino acid derivatives such as L-doapa. After that, Kagen and Noyori improved phosphine ligands such as DIPHOS and BIANP, which resulted in high optical yield syntheses of amino acids from 83 to 100% enantiomer excess (ee), respectively.

**Keywords:** olefin complex,  $\pi$ -allyl complex, allylation, phosphine complex, hydrogenation

### はじめに

遷移金属の化学は、1930年～1960年にかけてドイツで開発された以下の工業的プロセスとしての均一触媒反応にその起源があることをこれまでに見てきた<sup>1,2)</sup>。

- 1) オキソ反応、Reppe 反応に代表されるカルボニル化反応（1930-1940年）
- 2) Ziegler-Natta 触媒重合（1950年代）

### 3)Wacker 法（1956年）

今回は最後の Wacker 法をきっかけにはじめてパラジウム触媒を用いた有機合成反応が開発されたこと、さらに工業的に重要な不均一水素化触媒反応を均一系触媒反応に展開する過程で、ロジウムやルテニウム触媒を用いた不斉水素化反応が開発されたことについて解説する。

## 遷移金属オレフィン錯体と $\pi$ アリル錯体

第二次世界大戦後、石炭から石油にエネルギー転換を支えた触媒反応が Ziegler – Natta 法によるエチレンの重合と、もうひとつがドイツの Wacker 社により企業化され、エチレンを塩化パラジウム Pd(II) Cl<sub>2</sub> で酸化しアセトアルデヒドを製造する方法である（図 1(1)）<sup>3-8</sup>。もともと 1827 年 Zeise 塩 ( $\text{CH}_2 = \text{CH}_2$ ) PtCl<sub>2</sub> を水で処理することでアセトアルデヒドを生成することが知られていた。1894 年 Phillips 社も PdCl<sub>2</sub> 酢酸溶液にエチレンを通すと Pd(0) 黒が沈殿しアセトアルデヒドに酸化されることを見出した。これらはいずれも量論反応であるが、Pd(0) を Cu(II) Cl<sub>2</sub> で再酸化する方法を見出し Wacker 社が 1950 年に企業化したものである。オレフィン塩化パラジウム錯体では、パラジウムによる電子逆供与は比較的弱く、オレフィンの $\pi$ 電子が金属の方に分極し炭素が電子不足の状態になっている。そこで求核試薬による反応が可能となる。 $\text{OH}^-$  が攻撃することによりオレフィン上に付加が起き、その後 $\beta$  水素脱離によりエタノールそして互変異性シアセトアルデヒドが生成する<sup>6</sup>。OH<sup>-</sup> の代わりに Moiseev が OAc<sup>-</sup> との反応で酢酸ビニルの合成を見出し工業的合成法となつた（図 1(2)）。求核試薬がオレフィンの水素と置換しているわけだが、普通の有機反応では起こらない反応である。これが可能であるのは置換される H が Pd(II) から Pd(0) の反応に基づく酸化作用によって除かれるからである。Pd(0) は Cu(II) を仲介して酸素で再酸化しリサイクルされる。同じ頃、Wilke は Ziegler の後継者として Max-Plank 研究所で所長に就任した。彼は Ziegler の研究グループに所属して以来、Ni 効果の研究を続けてきた。エチレンの 2 量化に有効な Ti(OR)<sub>4</sub>/Et<sub>3</sub>Al 触媒系をブタジエンの重合に適用するとポリ-1, 2-ブタジエンを生成した。

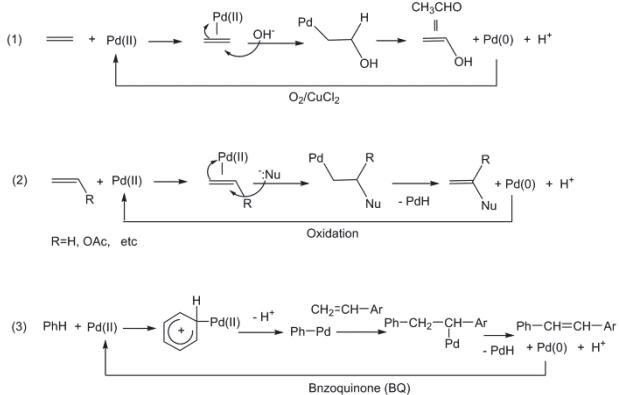
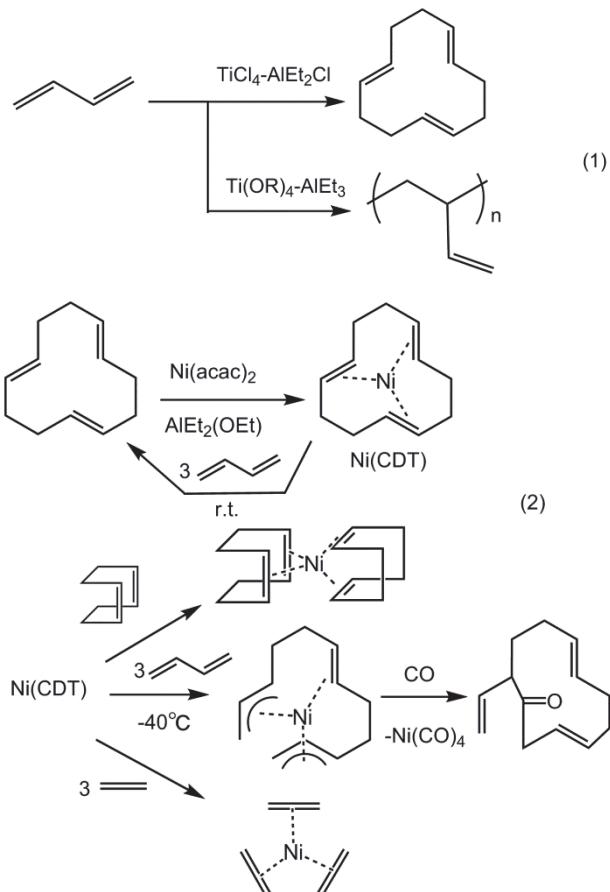


図 1. Pd(II) の反応. (1) Wacker 法. (2) Moiseev 法と He gedus の反応. (3) 藤原反応.

そこで触媒をさらに、 $\text{TiCl}_4/\text{AlEt}_2\text{Cl}$  にかえたところ、重合は進まず、ブタジエンの三量体、シクロドデカトリエン (CDT) が生成した（式 1）。Wilke はこの CDT を用いて Ni 錯体化学を展開した<sup>9, 10</sup>。CDT 存在下、Ni(acac)<sub>2</sub> を  $\text{AlEt}_2(\text{OEt})$  で還元したところ、Ni(CDT) 錯体を単離することに成功した（式 2）。この錯体はブタジエンの三量化を触媒して CDT を与えたことから、Wilke のブタジエンが Ni のまわりに配位してオリゴマー化が進行するという予想を裏付けた。さらにこの錯体はシクロオクタジエンやエチレンと配位子交換により対応する Ni(0) 値の錯体を与えた。これらはすべて“裸のニッケル”錯体と呼ばれた。条件をかえることで、Ni(COT) 錯体の前駆体である開環した C12 単位の配位子とする錯体も単離することに成功した。この錯体は末端に 2 つの $\pi$ -アリル構造を有し、その構造は別途合成したビス $\pi$ -アリル Ni 錯体と比較して決定されて（式 3）。ブタジエンの 2 量化についても同様なビス $\pi$ -アリル Ni 錯体を確認しその後の $\pi$ -アリル部位の反応は添加される配位子に依存した（図 2(1)）（式 3）。

1962 年辺は東レ基礎研究所で Ziegler-Natta 法のエチレン、プロピレンの重合触媒によるブタジエンの環化 2 量化による COD、COT の製造など東レで行われていた工業的な触媒合成法を目の当たりにし



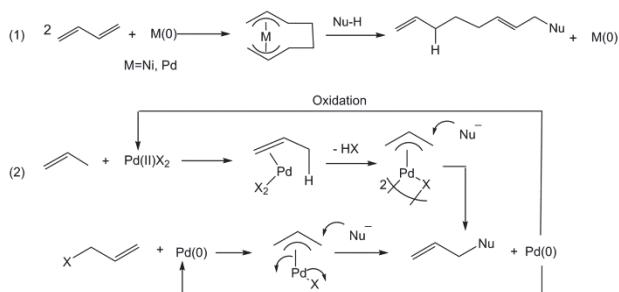


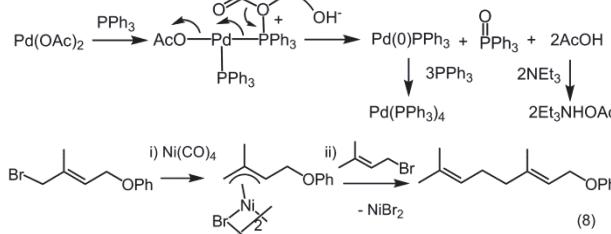
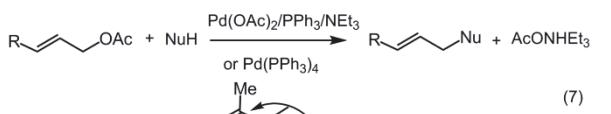
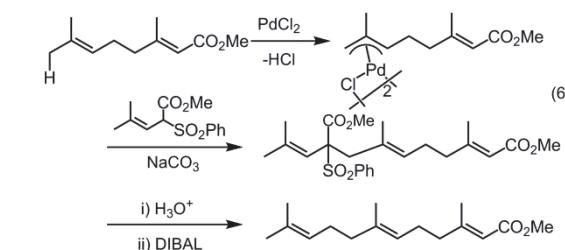
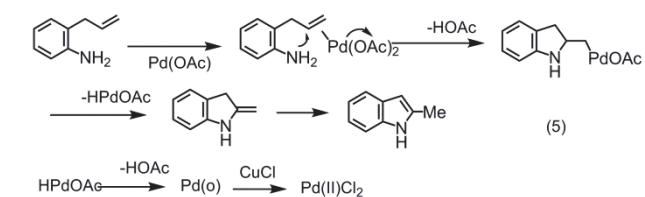
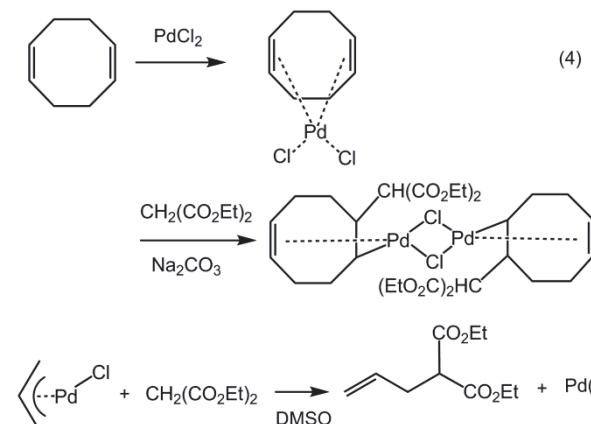
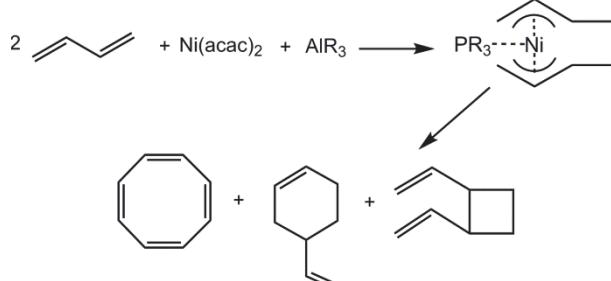
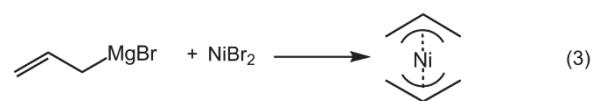
図2. Pd(0)の反応. (1) ブタジエンのテロメリゼーション. (2)  $\pi$ -アリル錯体の反応 (辻-Trost反応).

てた。特にPd触媒Wacker法に魅了され、Pd触媒を用いてるC-C結合生成反応の研究を開始した(式4)<sup>11-13)</sup>。

辻は当時Fischerの弟子のHafnerにより合成された $\pi$ -アリルPd錯体をマロン酸エステルと塩基で存在下で反応させてC-C結合形成反応にはじめて成功した(式4、図2(2)、上段の式)。その他のPd(II)の反応としては、Hegedusらが種々の求核剤のオレフィンへの付加反応を研究して(図1(2))(式5)<sup>14)</sup>。この際Pd(II)が反応活性種なので、O<sub>2</sub>、Cu(OAc)<sub>2</sub>で反応で生成するPd(0)を再酸化している。藤原らもPd(II)を用いる反応として酢酸パラジウム触媒でベンゼンがスチレンに置換する反応を報告している(式6、図1(3))<sup>15)</sup>。

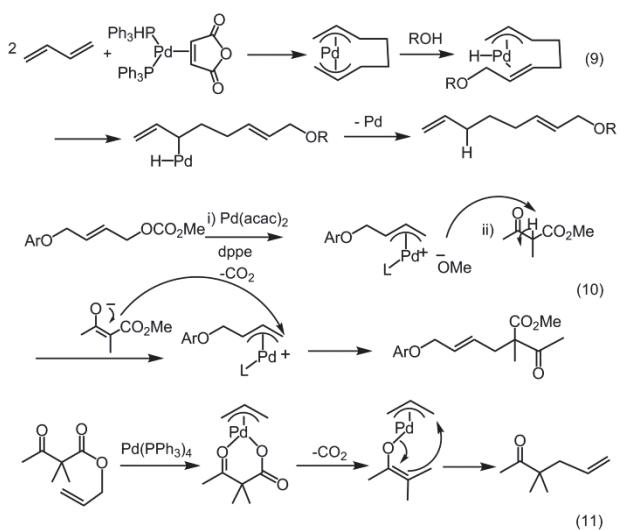
この反応はPd(II)によるベンゼンの求電子置換反応でPhPdが生成し、その後はHeck反応と同じ反応機構で進行している。この場合もPd(0)をベンゼンキノン(BQ)で再酸化して反応を進行させている。辻の $\pi$ -アリルPd錯体のアルキル化反応もTrostらによりPd(II)の反応が当初ゲラニオールなどの天然物の合成に応用されていた(式6)<sup>12, 16)</sup>。しかしこの反応は量論のPd触媒が必要であり、触媒量で進行する反応が求められていた。東レの畠、三宅らにより酢酸アリルをPd(OAc)<sub>2</sub>/PPh<sub>3</sub>、NEt<sub>3</sub>を用いて、Pd(0)価を系中で発生させるか、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(0価)触媒を用いる反応が報告されると(式7、図2(2)下段)<sup>17, 18)</sup>、アリル化反応はPd(0)の反応に置き換えられていった。この場合、Pd(OAc)<sub>2</sub>は系中のPPh<sub>3</sub>とEt<sub>3</sub>NでPd(0)に還元される。さらに系中にオレフィン(Wacker反応)やアルコール(ケトン酸化)などがあると、Pd(II)からPd(0)が発生している。

Ni(0)もPd(0)と同様、アリルハロゲン化物とNi(CO)<sub>4</sub>やNi(COD)を用いて $\pi$ -アリルPd錯体を生成するが、 $\pi$ -アリルPd錯体とは異なり、求核剤とではなく求電子剤と反応することが知られている。求電子剤として反応するためNi(II)が副生し



Ni(0)に還元リサイクルできないので量論反応となる（式8）<sup>19-22)</sup>。

ブタジエンの2量化反応もWilkeのNi化学でみたようにNi(0)ではビスπ-アリル錯体を経由して環状生成物を与えるのに対して（式3），求核剤が1,4-付加したテロマーを与えることが萩原、Shell社のSmutnyらにより独立に報告された（式9）<sup>23, 24)</sup>。Pd(0)の反応が開発されると辻らはアリル炭酸エステルを用いた中性条件下でのアリル化反応を発展させた（式10, 11）<sup>11, 12)</sup>。



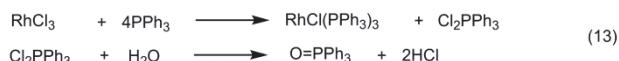
## 遷移金属ホスフィン錯体と均一水素化反応

カルボニル錯体のところで登場した英國のMondが1890年代にNi金属とCOから偶然に猛毒のNi(CO)<sub>4</sub>が生成することを発見した<sup>25)</sup>。この発見に刺激されたフランスのSabatierはNi金属とH<sub>2</sub>やエチレンやアセチレンの相互作用を研究した。Ni金属存在下、アセチレンとH<sub>2</sub>を反応させると、大半は炭になってしまったが、一部エチレンが生成することを確認し、Ni金属による不均一系水素化触媒反応を発見する<sup>26)</sup>。当時、不飽和有機化合物の水素化反応は、香料などのアルコールの製造に広く応用され、GrignardとともにSabatierは第1回のノーベル化学賞を受賞した。

Sabatierのこの水素化反応の発見以来、不均一系の水素化触媒が使われてきたが、1938年、Calvin（後に、光合成、CO<sub>2</sub>固定化回路の発見で1961年ノーベル化学賞を受賞）により、はじめて均一系水素化反応が報告された。すなわち酢酸銅存在下、ベンゼキノンのキノリン溶液の100°Cでの水素による還元反応である。この水素化の最初の段階はCu(II)のCu(I)への還元であり、引き続きCu(I)とH<sub>2</sub>の反応

によりCuHが生成し、明らかにこのものが還元剤となる<sup>27)</sup>。

均一相水素化の触媒系で最も広範に研究されているの、一つはペンタシアノコバルタート(II)アニオン溶液である。ペンタシアノコバルタート(II)アニオン溶液はシアニド(CN<sup>-</sup>)の溶液をCo(II)塩に加えることで調整でき、この溶液をH<sub>2</sub>、NaBH<sub>4</sub>もしくはヒドラジンと反応させるとヒドリドペンタシアノコバルタート(II)アニオンの還元剤が生成する。この還元剤と多くの不飽和ケトン、アルデヒド、カルボン酸などの共役系の不飽和二重結合を還元する（式12）<sup>27)</sup>。

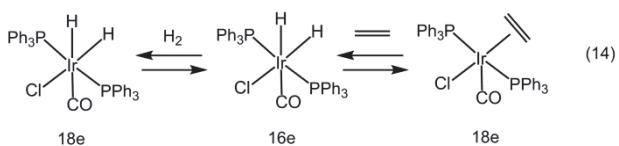


初期のペンタシアノコバルタート(II)アニオンを用いる均一系水素化反応の研究には井口をはじめとする日本人研究者が大きく寄与している。井口は配位説を提唱したWernerのところに留学し、帰国した日本人の錯体化学の第一人者の柴田雄二の学生で、梶田龍太郎も同じ研究室である。

その後、均一系水素化の研究で、Wilkinsonは井口のRh(III)アミン錯体がキノンを水素化する研究や、HerpernらのRu(II)塩酸水溶液がフマル酸を水素化する研究を参考にRh(III)Py<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>錯体を合成し1-ヘキセンを常圧で水素化することを見出した<sup>28, 29)</sup>。

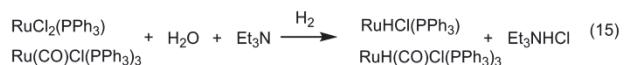
水素によりRh(III)がRh(0)に還元されず安定化し、さらに有機溶媒に可溶化させようとRh(III)にピリジンにかえてPh<sub>3</sub>Pを配位子として添加した。すでにWilkinsonらはHerpernらのRu系にPh<sub>3</sub>Pを添加することで、(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>RuCl<sub>2</sub>と(Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>RuCl<sub>2</sub>が生成し、これらが水素化触媒になることを見出している<sup>27)</sup>。同様な実験を井口らのRh(III)系に適用したところ(Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>Rh(III)Cl<sub>3</sub>ではなく、(Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>Rh(I)Clが単離され常圧で例がないほどすみやかにオレフィン、アセチレン類が水素化されることを見出した。Rh(III)は系中で過剰のトリフェニルホスフィンにより還元されてRh(I)になっていた。溶媒のエタノールをアセトンにかえても反応が進行することからエタノールが還元剤ではない（式13）<sup>30, 31)</sup>。このWilkinson錯体の合成については、1960年代、Wilkinsonだけでなく、BenettやICIのCoffeyらによってほぼ同時に報告されているが、水素化反応の研究はWilkinsonらの研究の寄与が大きい<sup>32)</sup>。

この当時、無機錯体の理論化学はPaulingの混成軌道理論から、配位子場理論（分子軌道理論）<sup>33-37)</sup>に発展し安定な錯体は中心金属のd電子数+配位子



からの電子対の総数が 18 電子になることで閉殻構造をとり安定になると理解されるようになった<sup>36, 37)</sup>。これは典型元素（金属）の 8 電子則に対応する。とくに Vaska らにより合成された Ir 錯体（Vaska 錯体）は水素やエチレンと可逆的に付加することが実験から確かめられた（式 14）<sup>38, 39)</sup>。すると Vaska 錯体は Ir(I) で  $d^8ML_4$  になるので総電子数が 16 電子と配位不飽和となり、酸化付加<sup>40, 42)</sup>によりジヒドリドエチレン Ir(III) 錯体を生成し、エチレンを配位させると、安定な 18 電子錯体を形成できることになる。その逆の還元的脱離により配位により配位不飽和 Ir(I) 錯体を再生できる。ただしこの当時、還元的脱離という言葉はまだなかった。この酸化付加、配位不飽和の概念を Wilkinson 錯体に適用すると同じく錯体自身が 16 電子配位不飽和 Rh(I) 錯体で、これから  $\text{Ph}_3\text{P}$  が脱離するとさらに配位不飽和 Rh 錯体が中間体として生成し、これに水素が酸化付加する。続いてオレフィンが配位、挿入、還元脱離して、16 電子配位不飽和 Rh(I) 錯体が再生するので<sup>42)</sup>、反応が触媒的に進行する（図 3(2)、ジヒドリド機構）。一般に種々の金属配位不飽和錯体が、他にも炭素-ハロゲン結合などの多くの共有結合に酸化付加し、酸化状態が変化し還元状態にもどることができる。途中結合の組み換え（メタセシス）が起きると新し結合が形成されるので、有機合成における遷移金属の有用性の理由がここにある。このときホスフィン錯体はホスフィン配位子が低原子価金属に電子を供与し安定化したり、金属から電子を受け取り脱離して配位不飽和種を発生させたり、触媒反応進行中に起る中心金属の酸化数の変化をうまく中和することができる配位子であることから、この後、触媒反応には不可欠なものとなった。

一方 Wilkinson 錯体  $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$  は CO と反応して定量的に、 $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCOCl}$  を生成するが、この錯体は水素化の触媒にはならず、カルボニル化/脱カルボニル触媒となることが、Wilkinson や辻らにより見出されている<sup>30, 31)</sup>。さらに  $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RuCl}_2$  やその CO と反応して生成する  $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Ru}(\text{CO})\text{Cl}_2$  は、HCl 補足剤存在下、 $\text{H}_2$  で処理するとモノヒドリド錯体を生成する（式 15 図 3(1)）。この  $\text{RuHCl}(\text{PPh}_3)_3$



や  $\text{Ru}(\text{CO})\text{Cl}(\text{PPh}_3)_3$  は、モノヒドリド機構にオレフィン類を水素化することができる（図 3(1) モノヒドリド機構）<sup>43)</sup>。Vaska 錯体について、酸化付加や水素化反応のモデルとして研究されたが高い触媒活性は示さなかった<sup>41)</sup>。しかし後年 Crabtree らにより Ir カチオン錯体  $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{PCy}_3)\text{Py}]PF_6$  が開発され、実用的な水素化触媒となつた<sup>44)</sup>。

Wilkinson らが水素化触媒を報告して、しばらくして 1972 年、米国 Monsanto 社の Knowles らはホスフィン配位子に Horner らの不斉なリン配位子を使うことで、不斉水素化反応を試みた。しかし光学純度過剩率 (ee%) は 28% と低かった。 $\alpha$ -アニシル基の導入 (PAMP) やフェニル基をシクロヘキシリ基に還元した配位子 (CAMP) で 88%ee まで達成できた（式 16）<sup>45, 46)</sup>。基質はアミノ酸の不斉合成目的にフェニルアラニンのデヒドロアミノ酸誘導体を検討した。この基質は二重結合とアセトアミド基が金属中心に配位できるので触媒反応には適した化合物である。一方、1971 年フランスの Kagan らは酒石酸から誘導でき、合成が簡便なビスホスフィン配位子 (DIPOS) を合成し同じ反応を検討したところ、リン上に不斉がなくても 83%ee の不斉収率を得ることができた。これを知った Knowles らは自分たちの PAMP 配位子をエチレンで架橋したビスホスフィン配位子を合成して検討したところ、95%ee の値を達成した。1974 年、Monsanto 社はこの不斉触媒反応をパーキンソン病の治療薬である L-DOAPA の

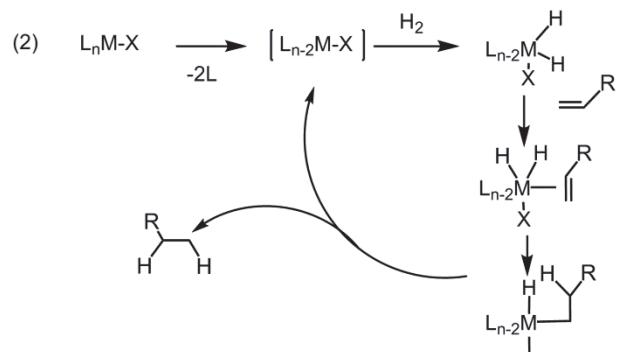
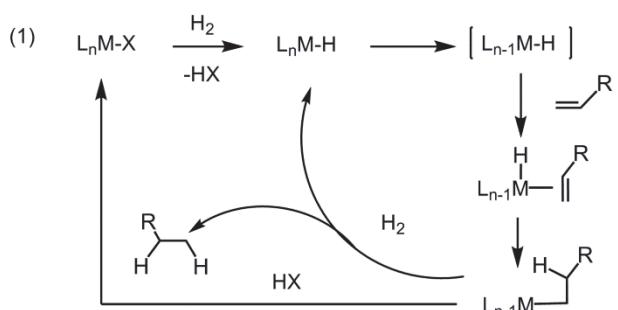
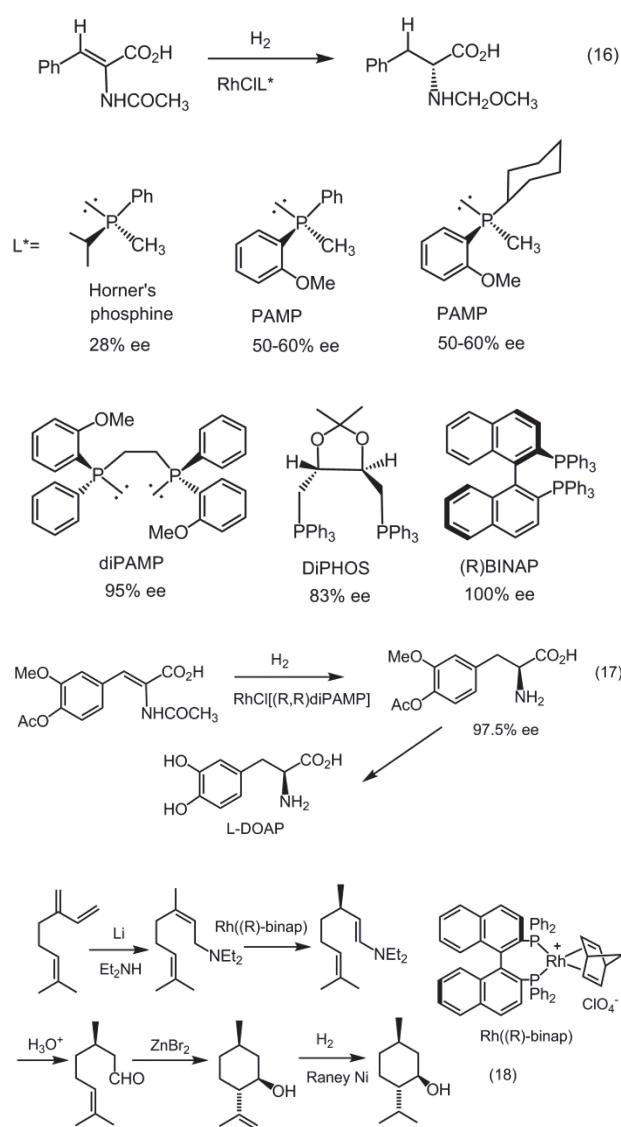


図 3. 均一水素化反応. (1) モノヒドリド機構. (2) ジヒドリド機構.

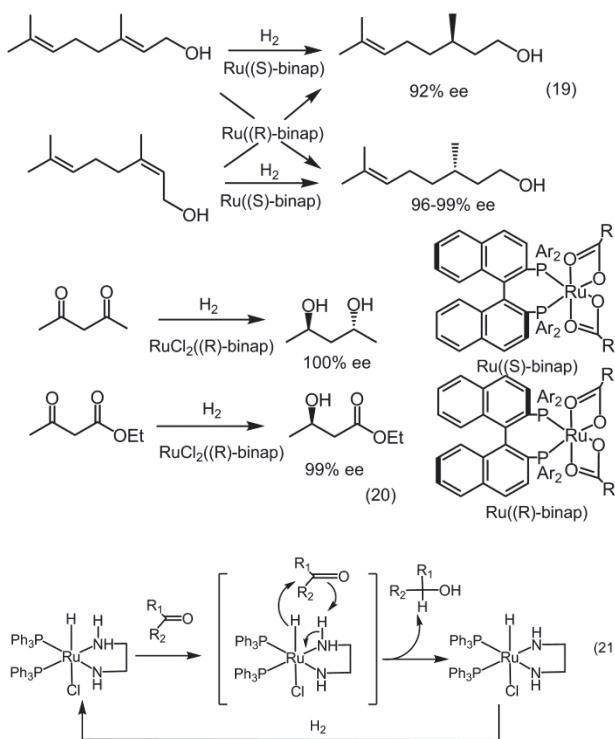
製造に応用して企業化した(式17)。野依らがこの不斉水素化触媒の開発競争に加わったのは1974年ごろのことである<sup>47, 48)</sup>。野依らが導入したビナフチル不斉配位子は、もともとCramがクラウンエーテルに組み込んだアミノ酸分割できることで注目されていた配位子である。当初はLiAlH<sub>4</sub>をビナフチルで修飾し量論のカルボニル還元反応を検討していたが、ビナフチル骨格をもつジホスフィン(BINAP)を合成するのに6年もの年数をかけて両鏡像異性体の合成に成功した(式16)。このBINAP触媒を用いてフェニルアラニンのデヒドロアミノ酸の合成はほぼ完全な不斉合成(100%ee)を達成した(式16)。同じRh-BINAP触媒はゲラニルアミンの不斉異性化の優れて触媒であることが、明らかになり高砂香料により(-)-メントールの製造に企業化された(式18)<sup>49)</sup>。Rh錯体は金属に配位性のアセトアミド基が置換したオレフィオンについてのみ高い不斉収率



で水素化を実現する。そこで野依らはRu-BINAP触媒の開発に移行した。その結果Ru-BINAP触媒では種々の官能基のあるオレフィンには高い不斉収率で水素が進行し、オレフィン以外にもカルボニル基が不斉触媒還元が実現した(式19、式20)<sup>50)</sup>。Ru-BINAPの水素化反応のメカニズムはモノヒドリド機構で進行し、とくにβ-ケトエステルではオレフィンではなくケトンの不斉還元が実現した。2001年、キラル触媒による不斉水素化の研究に対してMonsantのKnowlesと野依、さらに不斉酸化反応のSharplessがノーベル化学賞を受賞するが、<sup>51, 52)</sup>この年にも野依らはRuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)にエチレンジアミンとKOHを加えるとカルボニル基を触媒的に不斉水素化できることを報告している。この反応は工業的にも広く使われている。量論的なLiAlH<sub>4</sub>やNaBH<sub>4</sub>還元反応に替わる反応である。その反応機構は以下のようないくつかの触媒サイクルが想定されている(式21)<sup>53)</sup>。

## おわりに

Pd(II)を触媒に用いたWacker法は、アセトアルデヒド(酸化して酢酸)の工業的製造法である。辻らは通常の有機反応には見られないこのPd(II)触媒によるオレフィンの求核置換反応に魅せられて、Pd(II)を用いたアリル化反応やさらにカルボニル化反応(本稿では割愛したが引用文献を参照)を開発する。一方、Vaska錯体などの研究から遷移金属錯体の構造(18電子則、配位不飽和)や基本反応(酸化付加反



応) が理解されてきた。その結果パラジウム触媒反応では Pd(II) ではなく Pd(0) が触媒活性種として、Wilkinson 触媒による均一水素化反応では Rh (III) ではなく Rh(I) が触媒活性種であることが理解されるようになった。そして BINAPなどの配位子を有する Rh や Ru 不斉水素化金属触媒では、(一) メントールのようなキラルな化合物の工業的製造法にも応用されるまでに発展することになった。

## 文献

- 1) 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学(4). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 107-111.
- 2) 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学(5). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 113-119.
- 3) 辻二郎 (1978) 有機金属化学ノート(1). *化学* **33**: 531.
- 4) 辻二郎 (1978) 有機金属化学ノート(2). *化学* **33**: 617.
- 5) 辻二郎 (1978) 有機金属化学ノート(3). *化学* **33**: 709.
- 6) 辻二郎 (1991) 有機合成を変えた遷移金属ーその基本的理解と活用ー. 化学同人, 東京.
- 7) Jira R (2009) Acetaldehyde form ethylen-A retrospective in the discovery of wacker process. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**: 9034-9037.
- 8) Keith JA and Henry PM (2009) The mechanism of the wacker reaction: A talk of two hydroxypalladations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**: 9038-9049.
- 9) 山本明夫 (1978) <対談>錯体触媒とともにー G. Wilk 教授に聞くー. 現代化学 **1978**: 43-52.
- 10) Wilk G. (1963) Cyclic oligomerization of butadiene and transition metal  $\pi$ -complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2**: 105-115.
- 11) Tsuji J (2015) Dawn of organopalladium chemistry in the early 1960s and retrospective overview of the research on palladium-catalyzed reactions. *Tetrahedron* **71**: 6330-6348.
- 12) 辻二郎 (1999)  $\pi$ -アリルパラジウムの化学の誕生と発展. 有機合成化学協会誌 **57**: 1036-1050.
- 13) Tsuji J (1969) Carbon-Carbon formation via palladium complexes. *Acc. Chem. Res.* **2**: 144-152.
- 14) Hegedus LS (1984) Palladium-assisted reactions of monoolefins. *Tetrahedron* **40**: 2415-2434.
- 15) Jia C, Kitamura T and Fujiwara Y (2001) Functionalization of arenes and alkanes via C-H bond activation. *Acc. Chem. Res.* **34**: 633-639.
- 16) Trost BM (1980) New rules of selectivity: Allylic alkylations catalyzed by palladium. *Acc. Chem. Res.* **13**: 385-393.
- 17) Takahashi K, Miyaki A and Hata G (1971) Palladium-catalyzed exchange of allylic groups of ether and esters with active hydrogen compounds II. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **45**: 230-236.
- 18) Atkins KA, Walker W and Manyik RM (1970) Palladium catalyzed transfer of allylic group. *Tetrahedron Lett.* **1970**: 3821-3824.
- 19) 辻二郎 (1975) 遷移金属を用いる有機合成 最近の進歩(1). *化学の領域* **29**: 50-58.
- 20) 辻二郎 (1975) 遷移金属を用いる有機合成 最近の進歩(2). *化学の領域* **29**: 131-139.
- 21) 辻二郎 (1975) 遷移金属を用いる有機合成 最近の進歩(3). *化学の領域* **29**: 199-207.
- 22) Baker R (1980) Carbon-carbon bond forming reactions of allyl complexes of nickel, palladium and iron. *Chem. & Ind.* **18**: 816-823.
- 23) Takahshi S, Shibano T and Hagihara N (1967) The dimerization of buatdiene by palaldium complex catalysts. *Tetrahedron Lett.* **1964**: 2451-2453.
- 24) Smuty EJ (1967) Oligomelization and dimerization of butadiene under homogeneous catalysis. Reaction with nucleophililes and the synthesis of 1,3,4-octatriene. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 6773-6794.
- 25) Abel E (1990) Ludwig Mond-father of metal carbonyls- and some much more. *J. Organometallic Chem.* **383**: 1-20.
- 26) Herrmann WA (1990) 100 years of metal carbonyls: a serendipitous chemical discovery of major scientific and industrial impact. *J. Organometallic Chem.* **383**: 21-44.
- 27) Bird CW [櫻井英樹, 細身 彰, 吉良満夫 訳] (1971) 遷移金属を用いる有機合成. 廣川書店. 東京.
- 28) Osborn JA, Jardine FH, Young JF and Wilkinson G (1966) The preparation of properties of tris(triphenylphosphine) halogeno-rodhium (I) and some reactions thereof including catalytic homogeneous hydrogenation of olefines and acetylene and their derivatives. *J. Chem. Soc.* **1966**: 1711-1732.
- 29) Young JF, Osborn JA, Jardie FH and Wilkinson G (1965) Hydride intermediates in homogeneous hydrogenations of olefins and acetylenes using rhodium catalysis. *Chem. Commun.* **1965**: 131-132.
- 30) 辻二郎 (1972) 有機合成化学に新分野をひらく Wilkinson 錯体(1). *化学* **27** 292-299.
- 31) 辻二郎 (1972) 有機合成化学に新分野をひらく Wilkinson 錯体(2). *化学* **27**: 292-299.
- 32) 上村栄 (1998) エボミーから学ぶ化学の基礎 ウィキソソニ錯体(Wilkinson's catalyst). *化学* **53**: 44-45.
- 33) Ballhausen CJ (1979) Quantum mechanics and chemical bonding in inorganic complexes. I Static concepts of bonding; dynamic concepts of valency. *J. Chem. Educ.* **56**: 215-218.
- 34) Ballhausen CJ (1979) Quantum mechanics and chemical bonding in inorganic complexes. II Valency and inorganic metal complexes. *J. Chem. Educ.* **56**: 294-297.
- 35) Ballhausen CJ (1979) Quantum mechanics and chemical bonding in inorganic complexes. III Spread of the idea. *J. Chem. Educ.* **56**: 357-361.
- 36) Mitchell PR and Darisch RU (1969) The eighteen electron rule. *J. Chem. Educ.* **46**: 811-814.
- 37) Albright TA, Burdett JK and Whangbo MH (1985) *Orbital Interaction in Chemistry*. John Wiley & Sons. New York.
- 38) Vaska L and Rhode RE (1965) Homegeneous catalytic hydrogenation of ethylene and acetylene with four-coordinated iridium and rhodium complexes. Reversible catalyst-substrate adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **87**: 4970-4971.
- 39) Vaska L (1968) Reversible activation of covalent molecules by transition metal complexes. The role of covalent molecules. *Acc. Chem. Res.* **1**: 335-344.
- 40) Collman JP (1968) Pattern of organometallics reactions relevant to homegeneous catalysis. *Acc.*

- Chem. Res.* **1**: 136-143.
- 41) Halpern J (1970) Oxidative reactions of transition metal complexes *Acc. Chem. Res.* **3**: 386-392.
  - 42) Heck RF (1969) Addition reactions of transition metal complex. *Acc. Chem. Res.* **2**: 10-16.
  - 43) Cotton AF and Wilkinson G (1980) *Advanced Inorganic Chemistry. A comprehensive Text.* 4<sup>th</sup> Edition. John Wiley & Sons. New York.
  - 44) Hartwig JF [小宮山三四郎, 橋田宗隆, 岩澤伸治訳] (2015) ハートヴィッグ有機遷移金属化学(上)(下). 東京化学同人. 東京. pp.537-613.
  - 45) Knowles WS (1983) Asymmetric hydrogenation. *Acc. Chem. Res.* **16**: 106-112.
  - 46) 辻 二郎 (2008) 有機合成のための遷移金属触媒反応. 有機合成化学協会編. 東京化学同人. 東京. pp.113-132.
  - 47) 野依良治, 高谷秀正 (1988) 超不斉触媒 BINAP 錯体完全不斉合成に挑む. *化学* **43**: 146-153.
  - 48) 現代化学編集グループ (2001) 2001年ノーベル化学賞野依良治教授. *現代化学* **2001(12)**: 24-28.
  - 49) 谷 一英 (1987) 第四世代の不斉合成. *化学* **42**: 268-274.
  - 50) 高谷秀正 (1991) 超不斉配位子. *化学* **46**: 171-174.
  - 51) Knowles WS (2002) Asymmetric hydrogenations (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**: 1998-2007.
  - 52) Noyori R (2002) Asymmetric Catalysis: Science and opportunities (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**: 2008-2022.
  - 53) Noyori R and Ohkuma T (2001) Asymmetric catalysis by architecture and functional molecular engineering: Practical chemo- and stereoselective hydrogenation of ketones. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 40-73.

## 2018年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告

### 1 人事

#### (1) 所長・運営委員

所長：	化学科 教授	川本達也
運営委員：	数理・物理学科 教授	本間正明
	数理・物理学科 教授	水野智久
	情報科学科 教授	木下佳樹
	情報科学科 教授	張 善俊
	化学科 教授	辻 勇人
	化学科 教授	西本右子
	生物科学科 教授	小笠原強
	生物科学科 教授	小谷 享

#### (2) 編集委員

委員長：	化学科 教授	川本達也
編集委員：	数理・物理学科 教授	長 宗雄
	数理・物理学科 教授	長澤倫康
	情報科学科 教授	桑原恒夫
	情報科学科 教授	張 善俊
	化学科 教授	加部義夫
	化学科 教授	堀 久男
	生物科学科 准教授	安積良隆
	生物科学科 教授	井上和仁

#### (3) 産官学委員

委員長：	数理・物理学科 教授	水野智久
運営委員：	数理・物理学科 准教授	加藤憲一
	数理・物理学科 教授	長 宗雄
	情報科学科 教授	桑原恒夫
	情報科学科 教授	張 善俊
	化学科 教授	辻 勇人
	化学科 教授	堀 久男
	生物科学科 教授	井上和仁
	生物科学科 教授	大平 剛

#### (4) 教育研究委員

委員長：	生物科学科 教授	小笠原強
運営委員：	数理・物理学科 教授	木村 敬
	数理・物理学科 教授	長澤倫康
	化学科 教授	西本右子

#### (5) 顧問・特別所員・客員教授・客員研究員

顧 問：	藤原鎮男、 門屋 卓
特別所員：	上村大輔、 紀 一誠

鈴木季直、	野宮健司
羽鳥尹承	
客員研究員：	安部 淳、 阿部孝宏
	市川貴美子、 内田英伸
	王 国柱、 大石不二夫
	河合 忍、 川上義輝
	岸 康人、 金 善正
	魏 紹蓉、 河野 優
	齋藤礼弥、 櫻井英博
	笛本浜子、 佐藤 剛
	高橋広奈、 田中輝彦
	田仲二朗、 辻本和雄
	堤 一統、 豊泉和枝
	豊田賢治、 永島賢治
	永島咲子、 橋 友理香
	付 哲斌、 村下 達
	山崎淳也、 八柳祐一
	若山典央

### 2 セミナー・シンポジウム・講演会

#### (1) 第48回湘南ハイテクセミナー

##### —機器分析入門—

種々の機器分析法の基礎を幅広く講義します。企業や公立機関の新人クラスの分析担当者、あるいは開発部門で分析にも興味を持たれているような方を対象にします。

##### 演題・講師：

###### 1)「赤外分光」

高柳正夫(東京農工大学大学院 連合農学研究科)

###### 2)「質量分析」

明石知子(横浜市立大学大学院 生命医科学研究科)

###### 3)「工業材料の実分析と総合的な解析」

米森重明(米森技術士事務所・元旭硝子)

###### 4)「環境分析」

西本右子(神奈川大学理学部化学科)

###### 5)「NMR分光」

天野 力(神奈川大学理学部化学科)

###### 6)「液体クロマトグラフィー」

渋川雅美(埼玉大学大学院理工学研究科)

日時：2018年6月7日(木)・8日(金)  
 10時～16時40分  
 会場：KUポートスクエア  
 (みなとみらいクイーンズタワー14階)  
 主催：神奈川大学総合理学研究所  
 後援：日本分析化学会関東支部

- (2) 第49回湘南ハイテクセミナー  
 －研究・開発と分析技術－  
 種々の機器分析法の基礎と応用を幅広く講義します。特に、優れた分析技術が研究・開発に対し、いかに重要な寄与をなし得るかという視点を重視します。企業や公立機関の分析担当者、あるいは開発部門で分析にも興味を持たれているような方を対象にします。

演題・講師：  
 1)「研究・開発と超微量分析」  
 高橋純一(日本大学文理学部非常勤講師・元アジレントテクノロジー社シニアスタッフ)  
 2)「研究・開発と表面分析」  
 田沼繁夫(国立研究開発法人物質・材料研究機構)  
 3)「研究・開発と材料分析」  
 志智雄之(公益社団法人日本分析化学会)  
 4)「研究・開発とNMR分光」  
 嶋田一夫(東京大学大学院薬学系研究科)  
 5)「研究・開発と赤外分光」  
 由井宏治(東京理科大学理学部第一部化学科)  
 6)「研究・開発と環境分析」  
 田中 敦(国立研究開発法人国立環境研究所)

日時：2018年12月6日(木)・7日(金)  
 10時～16時40分  
 会場：KUポートスクエア  
 (みなとみらいクイーンズタワー14階)  
 主催：神奈川大学総合理学研究所  
 後援：日本分析化学会関東支部

- (3) 第29回神奈川大学平塚シンポジウム  
 「元素の多様性と物質科学」

日時：2019年3月9日(土)  
 10時00分～17時00分  
 会場：神奈川大学湘南ひらつかキャンパス  
 (11号館サーカムホール)  
 主催：神奈川大学理学部化学科  
 神奈川大学総合理学研究所

共催：日本化学会

- 演題・発表者：  
 1)「フッ素が付与する分子性結晶の特異な分子認識特性」  
 堀 顕子 准教授(芝浦工業大学工学部)  
 2)「3座ピンサー型鉄およびニッケル錯体の合成と触媒反応」  
 山口佳隆 教授(横浜国立大学大学院工学研究院)  
 3)「キャパシタ用高耐久性炭素ナノ細孔体電極の開発と実用化」  
 白石壮志 教授(群馬大学大学院理工学府)  
 4)「5つの金属イオンが織り成す革新機能」  
 正岡重行 准教授(分子科学研究所)  
 5)「結合生成・解離を利用して発光スイッチングする金属錯体」  
 吉村 崇 教授(大阪大学放射線科学基盤機構)  
 6)「錯体配位子法による多核配位化合物群の自在構築」  
 今野 巧 教授(大阪大学大学院理学研究科)

- (4) 講演会  
 演題：「正しい情報活用で研究のレベルアップを！」  
 講演者：上野京子氏  
 (化学情報協会情報事業部)  
 日 時：2018年4月4日(水)  
 15時20分～16時20分  
 会 場：神奈川大学湘南ひらつかキャンパス  
 (6号館306室)  
 主 催：神奈川大学大学院理学研究科  
 神奈川大学総合理学研究所

報 告：  
 演者として化学情報協会情報事業部の上野京子氏をお迎えし、講演会を開催した。演題は「正しい情報活用で研究のレベルアップを！」であり、研究を進める上で情報の必要性、及び正しい情報の集め方について解説し、次にその情報源の見極めと得られた情報の評価の方法を解説された。さらに、研究倫理と著作権についても簡単に触れた。また2015年9月の国連サミットで採択されたSDGs「Sustainable Development Goals (持続可能な開発目標)」についても、紹介があった。  
 大学院生を中心に20名以上の参加者があり、特に大學生にとって有意義な講演内容であった。

(報告者 山口和夫 2018. 4. 11)

(5) 講演会

演題：「シュタルク分光によるイオン液体の電子構造とルブレンの光化学反応の研究」

講演者：飯森俊文 准教授

(室蘭工業大学)

日 時：2018年5月25日(金)

15時00分～17時00分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス  
(11号館第2会議室)

主催：神奈川大学理学部化学科  
神奈川大学総合理学研究所

報告：

今回の講師を務めた飯森俊文准教授は、化学物質の重要な性質の一つである電気双極子モーメントについて、物質に電場を印加して光吸収や発光スペクトルを測定するシュタルク分光法を用いて研究している。本講演の前半では、この分光法を近年注目されているイオン液体中のイオン分子に適用し、イオン液体とくにイオンゲルと呼ばれる特殊なイオン液体中におけるイオン種の配向に関する情報について紹介した。イオンゲル中のイオンの電気双極子モーメントの詳細な計測データをもとに、イオンの配向と電気伝導度の関係について解説した。また、講演後半では、有機半導体としての活用が期待されるルブレン分子の光学的性質に関する研究を紹介した。ルブレンの光特性に関して重要な電気双極子モーメントについて、正確に測定した結果を示し、ルブレンの電界トランジスタとしての使用に関する解説を行なった。

(報告者 河合明雄 2018. 5. 30)

(6) 講演会

演題：「Reversible Photoreduction and Energy Transfer of Perylene Diimide Dyes」

講演者：Wade Sisk 博士

(Morgan State University, Baltimore,  
U.S.A.)

日 時：2018年6月25日(月)

11時00分～12時20分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス  
(11号館第2会議室)

主 催：神奈川大学理学部化学科  
神奈川大学総合理学研究所

報告：

講師のSisk博士は、有機固体レーザー発振に

利用できる化学システムの開発をめざし、ポリマー中に有機色素を分散させた系での光励起と緩和過程について、分光学的手法による観測とその結果の理論的解釈を行なっている。今回の講演では、ポリマー中にペリレン系色素をドープした物質を対象とし、その発光強度のレーザー照射時間依存性実験の結果を示した。これをもとに、ポリマー中における活性酸素による色素の退色に関する光化学反応機構について解説した。とくに、溶存酸素の濃度と色素の寿命の関係に関して最新の実験結果を紹介し、この関係を合理的に説明する新しい機構について述べた。これをもとに、既存の物質開発方針が常に正しいわけではないことについて、自身の研究成果および近年の他研究者の成果を交えた解説を行なった。

また本講演では、神奈川大の学部生が主たる聴衆であったため、いくつかの配慮を頂いた。専門知識の初歩的な解説に時間を割いていただき、また英語による説明を聞き易くするために講演スライド内容に文章を多めに盛り込む工夫をいただいた。

(報告者 河合明雄 2018. 6. 29)

(7) 講演会

演題：「Design, Synthesis and Functionalization of Imidazoheterocycles」

講演者：Prof.Alakananda Hajr

(Visva-Bharati University, India)

日 時：2018年7月19日(火)

16時00分～17時30分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス  
(6号館209室)

主 催：神奈川大学理学部化学科

神奈川大学総合理学研究所

報告：

講演者らが開発した多置換imidazo[1,2-al]pyridineの合成研究についての学術講演が行われた。銅や鉄などの遷移金属、亜鉛やインジウムなどの典型金属などを触媒とした様々な反応によって、多様な置換様式をもったライブラリの形成について1時間程度の講演が行われた。講演後の質疑応答セッションでは、教員からの質問やコメントに加えて大学院生からも的確な質問が出るなど、30分程度の時間を使って非常に活発な討論がなされた。

(報告者 辻勇人 2018. 7. 26)

## (8) 講演会

演題：「Frechet derivative and analytic functional calculus」

講演者：Dragan Djordjevic 教授  
(セルビア・Nis大学)

日時：2018年7月26日(木)

10時00分～12時00分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス  
(14号館101室)

主催：神奈川大学理学部数理・物理学科  
神奈川大学総合理学研究所

報告：

今回の講演では複素Banach algebra  $A$  上の Frechet 微分とその応用である analytic functional calculus について講義されました。それは  $A$  の元  $a$  とそのスペクトル  $\sigma(a)$  上で正則な関数の微分が Cauchy の積分公式により展開されることを講義されました。ここでは Frechet derivative と Gateaux derivative との関係を示しつつ、板書により丁寧に講義されました。

(報告者 長宗雄 2018.8.6)

## (9) 講演会

演題：「質量分析を用いた構造生物学－質量の情報から生体高分子の機能に迫る」

講演者：明石知子 准教授  
(横浜市立大学大学院生命医科学研究所)

日時：2018年8月7日(火)

15時30分～16時50分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス  
(6号館207室)

主催：神奈川大学大学院理学研究科  
神奈川大学総合理学研究所

報告：

化学科の力石助教および川本が世話人となり、上記講演会を6号館207号室で開催しました。生体高分子を研究のターゲットとして、NMR や X 線結晶解析からは得られない情報を質量分析の様々なテクニックを駆使して獲得することで、生体高分子の本質に迫る研究成果は新鮮であり、質量分析のもつ高い能力と可能性も示され、大変刺激的なものでした。また、質量分析の各装置の特徴を研究成果と合わせて紹介いただき、高度な内容を学生にもわかりやすくご説明いただきました。講演会には化学科の教職員や学生だけではなく、生物科学科の研究者も

出席され、講演後、活発な討論がなされました。

(報告者 川本達也 2018.8.10)

## (10) 講演会

演題：「Rapid Synthesis of  $n$ -Extended Azacorannulenes」

講演者：Prof. Shingo Ito  
(Nanyang Technological University,  
Singapore)

日時：2018年12月3日(火)

14時30分～16時00分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス  
(6号館305室)

主催：神奈川大学理学部化学科  
神奈川大学総合理学研究所

報告：

窒素原子を含むボウル型多環芳香族分子である  $n$  拡張アザコラニュレンについての学術講演が行われた。独自開発の反応により迅速合成とそれらの構造的特徴および物性について1時間程度の講演が行われた。講演後の質疑応答セッションでは、教員からの質問やコメントに加えて大学院生からも質問があった。特にスピノ多重度について菅原特任教授や鈴木特任准教授を交えた熱心な議論を含めて、30分程度の時間を使って非常に活発な討論がなされた。

(報告者 辻勇人 2018.12.13)

## (11) 平塚祭 特別参加企画

テーマ：「神大理学部の産官学連携へのアプローチ」公募に参加した理学部の研究をスターで紹介

日時：2018年10月27日(土)、28日(日)

10時00分～16時00分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス  
(6号館226室)

主催：神奈川大学総合理学研究所

## 3 産官学 活動実績

## (1) 展示会

「BIO tech 2018」

日時：2018年6月27日(水)～29日(金)

会場：東京ビッグサイト

出展者：光機能性材料研究所

中西淳 プロジェクト研究員

テーマ：「細胞動的パターンングのための光応答足場材料」

主 催：リードエグジビションジャパン㈱

(2)展示会

「イノベーションジャパン2018」

日 時：2018年8月30日(木)～8月31日(金)

会 場：東京ビッグサイト

出展者：神奈川大学理学部化学科

山口和夫 教授

テーマ：「光応答性ホスホン酸単分子膜を用いた  
金属ナノ粒子インクの選択的塗布技術の  
開発」

主 催：国立研究開発法人科学技術振興機構

国立研究開発法人新エネルギー・産業技術  
総合開発機構

(3)展示会

「JASIS 2018 ~アジア最大級の分析・科学機器  
展~」

日 時：2018年9月5日(水)～7日(金)

会 場：幕張メッセ

出展者：神奈川大学理学部化学科

西本右子 教授

テーマ：「分析技術で環境とエネルギー問題に挑  
戦」

主 催：一般財団法人日本分析機器工業会

一般財団法人日本科学機器協会

(4)展示会

「Jflex2019」

日 時：2019年1月30日(水)～2月1日(金)

会 場：東京ビッグサイト

出展者：神奈川大学理学部化学科

山口和夫 教授

テーマ：「光分解性保護基を巧みに利用した新た  
な材料の創製」

主 催：株式会社加工技術研究会

株式会社JTBコミュニケーションデザイン

(5)特 許

[日本出願]

1)「新規抗腫瘍剤」

上村大輔、秋山優子、河田有紀、犬塚俊康、  
丸 範人、藤崎 稔

2)「データ構造、情報検索装置、データベースの更  
新方法、データベースの更新装置、データベー  
ス更新用プログラム」

桑原恒夫



# Science Journal of Kanagawa University

## 投稿規定

### 1 編集方針

Science Journal of Kanagawa University は、神奈川大学総合理学研究所の事業および研究の成果を公表する科学誌であり、事業報告、公募研究の成果報告論文、数学、物理学、情報科学、化学、生物学その他理学全般にわたる所員による一般研究論文、所員が所外の研究者と行なった共同研究に関する論文等を掲載する。投稿者は原則として神奈川大学総合理学研究所所員であるが、編集委員会の承認により所員以外の投稿論文も掲載する。論文の共著者については特に規定しない。本誌名称の略記は *Sci. J. Kanagawa Univ.* とし、和名は神奈川大学理学誌である。

### 2 掲載論文の種類

研究論文は、総説 (Review) と原著 (Full-Length Paper/ Note)、および報告書 (Report) とする。原著には短報 (Note) を含み、報告書 (Report) は原著に準ずる。

上記論文の他に、テクニカルノート (Technical Note)、教育論文 (Educational Paper) および研究交流報告 (Report of Research Communication) を掲載する。

掲載する論文は和文および英文である。

### 3 原稿の体裁 (総説および原著)

総説および原著論文 (短報を含む) の原稿は、下記要領に従って、そのまま印刷できるように仕上げる。なお、テクニカルノート、報告書、教育論文および研究交流報告についてはそれぞれ以下の 4、5、6、7 に示す。

#### (1) 頁数

短報は、刷り上がり 4 頁以内とするが、それ以外の論文には特に頁制限はない。但し、編集委員会により論文が冗長と判断された場合には頁数は限定される。また、12 頁を超える場合には、超過分に係わる経費は著者の負担とする。

#### (2) 原稿用紙サイズ

A 4 版の用紙を用いる。本文および図表の占める範囲 (紙面) は縦横 245 × 170 mm とす

る。この場合、余白は、上辺 30 mm、下辺 20 mm、左辺 20 mm、右辺 20 mm である。

#### (3) 段組み

研究課題名、著者名、研究課題名 (英語)、著者名 (英語)、所属 (英語)、Abstract (英文)、Keywords (英語) は 1 段組みとする。但し、所属、Abstract、Keywords は紙面内で更に左右およそ 10 mm ずつの余白を置く。

研究課題名、著者名、研究課題名 (英語)、著者名 (英語) は中央揃え、所属 (英語)、Abstract (英文)、Keywords (英語) は左右両端揃えとする。

序論、材料と方法 (または方法)、結果、討論 (または結果と討論)、謝辞、文献は 2 段組み、左右両端揃えとする。

#### (4) 使用文字 (フォントの種類)

基本的に、和文は M S 明朝、英文は Century とする。但し、μ などのギリシャ文字や数学記号などを部分的に異なる字体にすることは差し支えない。

図の説明文および表もこれに準ずるが、図中の文字や記号については特に限定しない。文字サイズは下記の各項目で指示する。

#### (5) 論文構成

研究課題名、著者名、研究課題名 (英語)、著者名 (英語)、所属 (英語)、Abstract (英文)、Keywords (英語)、序論、材料と方法 (または方法)、結果、討論 (または結果と討論)、謝辞、文献 (英語または日本語) の順とする。図と表は本文中の適切な位置に挿入する。

#### (6) 論文種の表示

第 1 頁、第 1 行目に左揃えで、前後に ■ 記号を付して論文種を記入する。

例えは、■ 総 説 ■、■ 原 著 ■、■ 原著 (短報) ■、■ 報告書 ■ など、

英 文 で は、■ Review ■、■ Full-Length Paper ■、■ Note ■、■ Report ■ など。

最終的には編集委員が判断して論文種を決定する。

文字は、M S ゴシックで 11P (ポイント) とし、太字にはしない。

次の研究課題名まで1行あける。

(7) 研究課題名、著者名、所属

本文が和文の場合、研究課題名（日本語）は太字（Bold）で14P（ポイント）、著者名（日本語）は太字で12Pとする。著者と著者の間は1文字分のスペースをあける。

続く、研究課題名（英語）は13P、著者名（英語）は12P、所属（英語）は9Pとし、これらは太字にしない。

本文が英文の場合、研究課題名は太字で14P、著者名は太字で12P、所属（英語）は太字にせず9Pとする。

それぞれの間は1行あけを原則とするが、著者名（英語）と所属（英語）の間は行間をあけない。

著者の所属が複数の場合には、各著者名末尾および対応する所属の先頭に上つき数字（1、2、3、など）を付し区別する。

本文が英文の場合、研究課題および所属は前置詞、冠詞、接続詞を除き各語の最初の文字を大文字で記述し、著者名はフルネームで名姓の順に記述する。最終著者の前は“and”を置く。

次のAbstractまでは1行あける。

(8) Abstract

要旨は原則的に英文とする。語数は250語程度が適切であるが、特に制限しない。

見出し（Abstract：）からは1文字あけて要旨本文を書く。

文字サイズは、見出し（Abstract：）は太字で11P、要旨本文は10Pとする。

(9) Keywords

要旨に続けて、行間をあけず、Keywords：の見出しを置き、1字あけて、5語程度（英語）のKeywordsを付す。

文字は10Pを用い、見出し（Keywords：）はイタリックで太字とする。

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とする。

序論、材料と方法（または方法）、結果、討論（または結果と討論）、謝辞、文献の各項目の見出しあは左揃えとする。

各項目間は1行分のスペースをあける。

文字サイズは、各項目の見出しあは太字で12P、本文は10Pとする。

各項目の第1段落の出だしは左寄せではじ

め、第2段落から出だしを1文字（英文では2文字）あける。

必要なら、各項目内で小見出しを設ける。小見出しあは太字で10.5Pとする。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

(11) 文献

文献の項目見出しあは左揃えとする。

文献は本文に引用した順に番号を付し、記載する。

番号は片括弧（閉じ括弧のみ）表示とする。本文中では、片括弧つき番号を“上つき文字”とし、該当する部分に必ず記入する。

文字サイズは、項目の見出しあは太字で12P、各文献は9Pとする。

文献が日英混合の場合、和文の文献のアルファベットと数字には、Centuryのフォントを用いる。

以下は記入例である。著書、分担著書、原著、学位論文、学会発表などにより表記法が異なるので、それぞれの記入例を参照して正確に記載する。

- 1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* **10** Suppl: 89-109.
- 2) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- 3) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.
- 4) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol.I*. Anghileri LJ and Tuf-fet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 5) Owada M (2011) Phylogeny and adaptation of endolithic bivalves in the Mytilidae. *D.Sc. thesis, Kanagawa University*, Japan.
- 6) Taiz L and Zeigen E [西谷一彦、島津研一郎監訳] (2003) ティツザイガー植物生理学第3版. 培風館, 東京.
- 7) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料

- の元素分析法. *微生物* 5: 34-44.
- 8) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) 生命へのアプローチ. 弘学出版, 東京.
  - 9) 鈴木季直 (1992) 凍結技法, 第6章. よくわかる電子顕微鏡技術. 平野 寛, 宮澤七郎監修, 朝倉書店, 東京. pp. 137-148.
  - 10) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. 神奈川大学総合理学研究所年報 2003. pp.41-80.
- ※ インターネット情報を文献として引用する場合は、著者(年)論文タイトルなどの末尾に [ ] 付きで、[doi:-----]、[www:-----]、[http://www:-----] のように記述する。なお、閉じ括弧のあとには必ずピリオドをつける。

#### (12) 表

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

表の上部には必ず番号(表1.、Table 1.など)とタイトルを付し、本文との整合を期す。

表のタイトルは、表の幅にあわせて両端揃えとする。タイトルの末尾にピリオドはつけない。

表のスタイルについては特に定めないが、用いる文字や数字のサイズは本文のそれを超えないように配慮する。

なお、本文への挿入の他に各表の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する。

#### (13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

図には必ず番号(図1.、Fig.1.など)を付し、本文との整合を期し、図の下部に番号と説明文を加える。図が細分化されている場合には、A、B、C…(図1A.、Fig.1A.など)をつけて区別する。

図のタイトルの末尾にはピリオドを置く。

図のタイトルと説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

図のタイトルと説明文に限り、和文でもピリオド(.)とカンマ(,)を用いる(和文の句読点は用いない)。

図の番号および説明文の文字サイズは9Pとする。

図はできるだけ分かりやすいものとし、図中の文字や記号は高さ3~5mm程度にする。

写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

なお、本文への挿入の他に各図の抜粋も作成

し、電子媒体として原稿に添付する。これらの図は、あまり圧縮せず、電子密度300dpi程度の原図とする。

#### (14) 単位

SI unitを用いる。和文であっても、原則的に、数値および単位には半角文字を用い、%および°Cを除き、数値と単位の間は必ず半角分スペースをあける。

#### (15) 作製見本

希望者には作製見本(デジタルファイル)を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

## 4 原稿の体裁(報告書)

これに該当するものは、神奈川大学および総合理学研究所より研究費助成を受けた研究の報告書である。

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

個別の助成研究の報告書は原著と同等に扱うので3の規定に準じて原稿を作製する。

多人数による共同研究のうち、

(1) 各研究者が全員原著と同等の論文(短報の場合も含めて)を投稿出来る場合は、それらを原著として扱い、原稿は3の規定に準じて作製する。

(2) 各研究者が要約を作製し、代表者がそれらを一つの報告書としてまとめる場合は、編集委員会の指示に従ってこれを作製する。この場合も、文書のレイアウト、フォントの種類とサイズなどの基本的な原稿作製基準は3の規定と同じである。

報告書のうち、著者が希望し編集委員会が採択したもの、あるいは編集委員会が選択し著者の同意が得られたものは原著または短報として掲載する。

## 5 原稿の体裁(テクニカルノート)

これに該当するものは、研究技術および研究装置の紹介記事である。

研究論文(原著および報告書)の規定に準じて原稿を作製する。

## 6 原稿の体裁（教育論文）

これに該当するものは、自然科学分野の教育研究や教育技法に関する論文、および完成度が高く簡潔に纏められた実習テキストなどである。

研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

## 7 原稿の体裁（研究交流報告）

これに該当するものは、研究交流を目的とした他大学・研究所訪問記、海外研究留学報告、国内外開催の国際学会参加報告などである。

本誌、18巻掲載の該当論文を参照し、英文要旨を省略できることを除いて、研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

## 8 投稿と略題名（Running Title）提出

明瞭に印刷された図を含むオリジナルの印刷された原稿1部とそれがファイルされているデジタル記録媒体（FD、MO、CDなど）を編集委員会（神奈川大学総合理学研究所）に提出する。

論文の課題名が長い場合には、和文で25字、英文で50字以内の略題名（Running Title）が必要である。略題名は原稿に加えず、別紙に記入して提出する。

## 9 投稿論文の審査

適時、レフリーによる校閲を行ない、採否や再投稿請求は編集委員会で決定する。

総説、および編集委員会が認める特殊な報告書の場合を除き、既に発表されている論文の版権を侵害するような原稿は採用されない。

## 10 原稿の校正

掲載決定原稿は、ゲラ刷りの段階で著者の校正を依頼する。校正は最低限の修正に留める。

## 11 投稿料

原則として投稿は無料であるが、カラー印刷を含むものについての著者経費負担の有無および負担額は編集委員会で決定する。投稿原稿の体裁が規定にあわず、編集段階で修正に経費が生じた場合は著者が実費を負担するものとする。

また、いずれの範疇であっても、論文が12頁を超える場合には、超過分に係る経費は著者がその実費を負担するものとする。

## 12 別刷

掲載された総説および原著（短報を含む）は別刷り50部が著者に無料贈呈される。50部を超えて希望された別刷部数については実費を徴する。

## 13 版権等

掲載論文の内容についての責任は著者が負うものとする。その著作権は著者に属するが、著作権のうち、複製権および公衆送信権については神奈川大学図書館に許諾を与えるものとする。論文内に使用した他者の著作物（図版や写真など）の転載許可は著者の責任において投稿前に行う。

出版権は神奈川大学総合理学研究所に属するが、総合理学研究所は頒布の便を図るために、神奈川大学学術機関リポジトリを通じて「Science Journal of Kanagawa University」を公開するものとする。

## Author Index

### A

- Amano, Momoka 天野桃香 ..... 73  
 Anbo, Yuko 安保裕子 ..... 63  
 Aoki, Takashi 青木 孝 ..... 9  
 Azumi, Yoshitaka 安積良隆 ..... 67

### F

- Fukasawa, Yuko 深沢優子 ..... 73  
 Fukuda, Chiharu 福田千春 ..... 47

### G

- Gotoh, Tomonori 後藤智範 ..... 33

### H

- Hashi, Yurika 橋 友理香 ..... 85  
 Hashimoto, Marina 橋本真莉菜 ..... 73  
 Himi, Eiko 氷見英子 ..... 85  
 Hirano, Hiroki 平野弘樹 ..... 39  
 Hoshino, Yasushi 星野 靖 ..... 1, 103  
 Hosoya, Hiroshi 細谷浩史 ..... 85

### I

- Ichikawa, Reico 市川麗子 ..... 55  
 Iwasaki, Shunji 岩崎俊志 ..... 97  
 Iwasaki, Takaya 岩崎貴也 ..... 89

### K

- Kabe, Yoshio 加部義夫 ..... 111  
 Kanazawa, Ken'ichi 金澤謙一 ..... 97  
 Katou, Ken'ichi 加藤憲一 ..... 17  
 Kawada, Naomi 河田直美 ..... 47  
 Kawai, Akio 河合明雄 ..... 39  
 Kimura, Takashi 木村 敬 ..... 25  
 Kodama, Asuka 小玉あすか ..... 89  
 Kotaka, Sayaka 甲高彩華 ..... 63  
 Kotani, Susumu 小谷 享 ..... 85

### M

- Matsuo, Ayumi 松尾 歩 ..... 89  
 Mogi, Kazue 茂木和枝 ..... 55, 73  
 Murayama, Hiroki 村山栄貴 ..... 43

### N

- Nagai, Makoto 永井 慎 ..... 47  
 Nagamatsu, Leo 永松礼夫 ..... 33  
 Nakagawa, Yuka 中川優香 ..... 39  
 Nakahama, Naoyuki 中濱直之 ..... 89  
 Nakata, Jyoji ..... 1  
 Nakayama, Naoyuki 中山直之 ..... 43  
 Namekata, Saki 行方幸希 ..... 25  
 Nishimoto, Yuko 西本右子 ..... 97

### O

- Ogasawara, Tsuyoshi 小笠原 強 ..... 73  
 Ohira, Tsuyoshi 大平 剛 ..... 63  
 Ohnishi, Wataru 大西 亘 ..... 89  
 Okajima, Takashi 岡島 崇 ..... 47  
 Okazaki, Taichi 岡崎太一 ..... 97  
 Ozeki, Masaaki 尾関雅章 ..... 89

### S

- Sasamoto, Hamako 笹本浜子 ..... 67  
 Sashihata, Kazuya 指旗和也 ..... 55  
 Soga, Yu ..... 1  
 Sugawara, Tadashi 菅原 正 ..... 39, 43  
 Suyama, Yoshihisa 陶山佳久 ..... 89  
 Suzuki, Kentaro 鈴木健太郎 ..... 39, 43  
 Suzuki, Suechika 鈴木季直 ..... 47  
 Suzuki, Yoshihiro 鈴木祥弘 ..... 97

### T

- Takahashi, Hirona 高橋広奈 ..... 39  
 Takei, Takaya 武井尊也 ..... 97  
 Toyoizumi, Ryuuji 豊泉龍児 ..... 55, 73

### U

- Uetani, Yusuke 上谷雄介 ..... 73

### W

- Watabe, Satomi 渡部聰美 ..... 63

### Y

- Yamaguchi, Kazuo 山口和夫 ..... 43  
 Yamamoto, Kaoru 山本 薫 ..... 89

**編集後記**

Science Journal of Kanagawa University 第30巻を無事発行できましたことを編集委員一同お喜び申し上げます。本巻では、原著論文15件、教育論文2件が掲載されています。投稿者の皆様に厚く御礼申し上げます。

さて、本巻編集中に30年ぶりの改元を迎える時代は平成から令和に移りました。理学部が設置された湘南ひらつかキャンパスはまさに平成元年に開設され、平成の時代と共に歩んでまいりました。30年の月日はサイエンスにも大きな変化をもたらし、AI、ゲノム、宇宙、素材等々様々な分野で、平成の最初には思いも寄らなかった飛躍的な進歩を遂げています。

次の令和の時代にも神奈川大学理学部は常に新たな研究への挑戦と、社会に貢献する人材の育成を目指し、理学部・大学院理学研究科・総合理学研究所一体となって前進していくよう所員一同頑張っていく所存です。

最後に本巻の発行に際し、総合理学研究所長の川本達也先生、編集委員会顧問の鈴木季直名誉教授、研究所事務の竹内百里香さん、並びに編集委員の皆様に感謝申し上げます。

[ 神奈川大学総合理学研究所、  
理学部数理・物理学科 川東 健 ]

神奈川大学理学誌編集委員会	
委員長	
川本達也	化学科
委 員	
安積良隆	生物科学科
阿部吉弘	数理・物理学科
井上和仁	生物科学科
加部義夫	化学科
川東 健	数理・物理学科
桑原恒夫	情報科学科
張 善俊	情報科学科
堀 久男	化学科
顧 問	
鈴木季直	神奈川大学名誉教授

Science Journal of Kanagawa University	
Editor-in-Chief	
Tatsuya Kawamoto	Department of Chemistry
Editors	
Yoshitaka Azumi	Department of Biological Sciences
Yoshihiro Abe	Department of Mathematics and Physics
Kazuhiro Inoue	Department of Biological Sciences
Yoshio Kabe	Department of Chemistry
Ken Kawahigashi	Department of Mathematics and Physics
Tsuneo Kuwabara	Department of Information Sciences
Shanjun Zhang	Department of Information Sciences
Hisao Hori	Department of Chemistry
Adviser	
Suechika Suzuki	Emeritus Professor of Kanagawa University

**Science Journal of Kanagawa University Vol. 30  
(Sci. J. Kanagawa Univ.)**

発行日	2019年6月30日
編集者	Science Journal of Kanagawa University 編集委員会
発行者	神奈川大学総合理学研究所
発行所	〒259-1293 平塚市土屋 2946
	Tel. 0463-59-4111 (内 2500)
	Fax. 0463-58-9684
印刷所	光和アドバンス株式会社

神奈川大学総合理学研究所

*Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University*