ISSN 1880-0483

SGIENCE JOURNAL **KANAGAWA UNIVERSITY** SCIENCE JOURNAL KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol.252014

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. 25



原 著

Distibution of a Neural Cell-Specific Isoform of Microtubule-Associated Protein 4 in Growth Cones	
Kazuyuki Matsuchima, Hiroyuki Nakagawa and Susumu Kotani	1
高次元一様等方宇宙の生成確率 長澤倫康、阿部優花	7
カーボンナノチューブの真空一貫プロセスによる形成法と RHEED / STM による Co ナノ粒子 評価の研究 中田穣治、山下友実、斎藤保直、星野 靖	15
二次元シリコン半導体基板の物性研究 水野智久、青木 孝、鮫島俊之	23
 部分情報抽出に基づく Web サービス関数の自動生成法 韓 浩 	31
ファイル共有サービスの形式アシュランスケース-事例研究- 木下佳樹、武山 誠、平井 誠、湯浅能史	39
組込みシステムデモンストレーションの効果に関するアシュランスケース事例 森口草介、中原早生、木下佳樹	51
希ガス結晶構造と遮蔽 L-J ポテンシャル 天野 力	57
ロタキサンを用いた一方向移動分子モーターの開発 木原伸浩、西山淳也、牧田佳真	63
チタン (IV) 三置換 Dawson 型ポリ酸塩単量体とそれを用いた NH ₄ ⁺ イオン内包テトラポッド型 四量体の合成 松木悠介、星野貴弘、増田佳奈、松井敬祐、力石紀子、松永 論、野宮健司	69
アフリカツメガエル尾芽胚の陰影反応における胚性付着器官セメント腺の役割について 藤村桃子、茂木和枝、原田由美子、鶴岡慎哉、村上柳太郎、豊泉龍児	73
筋節長に注目したイワガニの鋏脚筋および歩脚筋の微細構造解析 田島昌和、宮崎真一、田中貴裕、早津 学、鈴木季直	79
相模湾平塚沖の貝類相:2012年と2013年の調査結果 大和田正人、小林由弥、大久保至、金澤謙一	87

西表島マングローブ植物4種の生育域と葉の内部形態との相関 早津 学、笹本浜子、鈴木季直	91
神奈川県下で流通する中国産輸入ユムシの分子系統学的研究 風間 真、玉井健太、西川輝昭、森山利紗、日野晶也	99
好冷性珪藻類 Thalassiosira Nordenskioeldii からの全ゲノム遺伝子の抽出 鈴木祥弘、金澤謙一、森本貴之、米澤直樹、中山 堯	107
相模川河口域海況の日変化 栗飯原海人、平賀義道、鈴木祥弘	111
ウミホタル類の環境耐性の解明と至適飼育環境の構築研究 若山典央、金澤謙一	117

研究交流

第九回神奈川大学 - 国立台湾大学学術交流 木原伸浩 ····································
2013 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告
Science Journal of Kanagawa University 投稿規定
Author Index 143
編集後記

■ Full-length Paper ■

Distribution of a Neural Cell-Specific Isoform of Microtubule-Associated Protein 4 in Growth Cones

Kazuyuki Matsushima^{1,3,4} Hiroyuki Nakagawa² and Susumu Kotani¹

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

² Division of Biology, Faculty of Science, Fukuoka University, Fukuoka 814-0180, Japan

³ Central Institute of Saravio Cosmetics Ltd., Tsurumi 1356-6, Beppu, Ooita 874-0840, Japan.

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: kazuyuki_matsushima@yahoo.co.jp

Abstract: At least five isoforms of microtubule-associated protein 4 (MAP4) are derived from a single gene by alternative mRNA splicing. We previously reported the predominant localization of a neural cell-specific isoform of MAP4 (MAP4-SP) over the ubiquitously expressed isoform (MAP4-LP) in neuronal growth cones. In the present study, we closely examined the distribution of MAP4 isoforms tagged with fluorophores in neuroblastoma cells. When the two isoforms were co-expressed in living cells, both MAPs showed filamentous distributions, indicating their co-localization with microtubules. Computer-aided image analysis revealed that MAP4-SP was the predominant species in neurites, neurite branching regions, and growth cones. Irruption of MAP4 fluorescence was occasionally observed in growth cones, through the transition zone up to the actin-rich region. A blind test suggested that more MAP4-SP is localized in the transition zone, as compared to MAP4-LP. We concluded that MAP4-SP is distributed in specialized subcellular compartments that are enriched with dynamic microtubules. The differential localization of the isoform should underlie its unique function in neural cells. *Keywords*: microtubule, microtubule-associated protein 4 (MAP4), growth cone, neural MAP4

Introduction

Microtubules are highly dynamic cytoskeletal polymers that undergo continual assembly and disassembly within cells. The organization and dynamics of microtubules depend on interactions with numerous microtubuleassociated proteins (MAPs)*. MAP4 is a major non-neural MAP involved in the organization and stabilization of microtubules during various cellular activities¹⁾. Multiple isoforms of MAP4 are generated by alternative splicing in mammalian tissues^{2–4)}.

We previously identified a unique MAP4 isoform (MAP4-SP) lacking a large portion of the Pro-rich region, and found that its distribution is restricted to neural ectodermderived cells and tissues⁴⁾ (Fig. 1). We compared the activities of MAP4-SP and MAP4-LP, the conventional full-length isoform. The results revealed that the microtubule-binding affinity of MAP4-SP is slightly lower than that of MAP4-LP⁴⁾, and microtubules decorated with MAP4-SP are more sensitive to depolymerization stimuli than those bound with MAP4-LP⁵⁾. In addition, the turnover of MAP4-SP between the microtubule-bound and -unbound states occurs at a rate 2-4 times faster than that of MAP4-LP in living cells⁵⁾. These results suggested that the principal role of MAP4-SP is to modulate the dynamic instability required for rapid microtubule organization in developing neurons.

Fluorophore-tagged MAP4-SP was detected in the distal area of developing neurites, where actin filaments are abundant⁶⁾. Immunostaining of cortical neurons revealed the patchy staining pattern of MAP4 in the cell bodies and processes⁷⁾. These results suggested that MAP4-SP interacts with other structures than microtubules in

^{*}Abbreviations: MAP(s), microtubule-associated protein(s); Prorich, proline-rich; MAP4-SP, a neural cell-specific isoform of MAP4; MAP4-LP, a ubiquitously expressed isoform of MAP4; EGFP, EYFP, and ECFP, enhanced green, yellow, and cyan fluorescent proteins, respectively.

these areas, with the most promising candidate being filamentous actin. Based on a working hypothesis that MAP4-SP acts as a mediator between microtubules and actin filaments at a particular region in neurons, we tested the interaction between purified MAP4 and reconstituted actin filaments, and proved that MAP4 actually binds to actin filaments in vitro⁸. However, the role of MAP4-SP in living neural cells has remained elusive.

To address this issue, we observed in this study the subcellular localizations of MAP4-SP and -LP tagged with fluorophores in NG108-15 cells. The localizations of the two isoforms in developing growth cones were compared in detail. The possible co-localization with actin filaments was also examined.

Materials and Methods

NG108-15 cells were maintained as described previously^{5,6)}. For cell observations, NG108-15 cells were cultured on cover slips coated with 0.01% poly-Llysine and 12.5 µg/ml laminine. Cells were transiently transfected with expression plasmids, pEYFP-MAP4-SP, pECFP-MAP4-LP, pEGFP-MAP4-SP and pEGFP-MAP4-LP, for MAP4 visualization⁶⁾. Transfections were performed 24-48 h prior to the image acquisition, using the SuperFect transfection reagent (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan), according to the standard protocol.

Live imaging of transfected cells was reported previously ⁶⁾. All images were analyzed by the ImageJ software (NIH, USA). The images of EYFP-MAP4-SP and ECFP-MAP4-LP were merged into a single picture, after fluorescence intensity calibration. Fluorescence imaging of growth cones containing rhodamine-phalloidin-labeled actin filaments and EGFP-coupled MAP4 isoforms was performed as described previously⁵⁾.

The blind test to assess the distribution pattern of MAP4 in growth cones was performed as follows: we prepared 213 images in total (124 images for SP and 89 for LP) showing the distributions of actin filaments and MAP4 isoforms in growth cones. All images were randomly presented to a tester, who was uninformed about the experimental details. The tester judged whether or not the green fluorescence in each image was fully distributed in the transition zone. The results of the tester's judgments were processed to determine the dependence of the distribution pattern on the MAP4 species.

Results

When expression plasmids for the two MAP4 isoforms



Fig.1. Schematic structures of MAP4 isoforms. MAP4-LP (upper) and SP (lower) are shown. The amino acid residues are numbered. The nomenclatures of the domains and subdomains are according to our previous reports^{3,4)}.

were transfected into NG108-15 cells, both MAPs showed filamentous distributions, indicating their co-localization with microtubules (Fig. 2B and 2C). The staining patterns appeared to be uniform throughout the cell, and selective binding to a certain subset of microtubules was hardly detected for both MAPs. However, the merged image (Fig. 2D) clearly showed the color gradation ranging from red to green (in this figure, MAP4-SP fluorescence is red, and MAP4-LP fluorescence is green), indicating the different distributions of the two MAPs. To assess their localizations more accurately, the fluorescence intensity of every pixel was computationally analyzed, to determine which of the two was dominant at the site. MAP4-LP was dominant in most of the cytoplasm of the cell body, while MAP4-SP was the predominant species in neurites, neurite branching regions, and growth cones (Fig. 2E).

Next, we inspected the localization of MAP4 isoforms in growth cones (Fig. 3). For this purpose, actin filaments were stained with rhodamine-phalloidin, to visualize the lamellipodia and leading edges of the cell. Since microtubules are considered to be restricted to the proximal region of growth cones, the MAP4-derived fluorescence should also be observed in that region, in agreement with our results (Fig. 3A shows a couple of examples). However, the irruption of MAP4 fluorescence, through the transition zone up to the actin-rich region, was sometimes observed in addition to the fluorescence in the proximal region (Fig. 3A, upper panels). Based on the extent of the irruption, the staining patterns of the transition zone were roughly divided into two groups: one with the fully distributed pattern, in which the entire transition zone was stained with MAP4 fluorescence (Fig. 3A, upper panels), and the other with the opposite (not fully distributed) pattern, in which the MAP4 fluorescence was hardly detected in the transition zone (Fig. 3B, lower panels). To determine whether the different staining



Fig.2. Live cell observation of an NG108-15 cell expressing MAP4 isoforms. NG108-15 cells were cotransfected with two MAP4 constructs and observed by fluorescence microscopy. A, a phase-contrast microscopic image of the cell. B and C, fluorescence micrographs depicting the distributions of EYFP-MAP4-SP (B) and ECFP-MAP4-LP (C). D, merged image of B and C. EYFP fluorescence is colored red, while ECFP is green. E, the data in B and C were processed to show the dominant MAP species in each spot in the cell. The fluorescence intensities of each pixel at the same spot in B and C were compared, and the spot is colored red when the intensity of EYFP was higher. Otherwise, the spot is colored white. The bars indicate $10 \mu m$.

patterns resulted from the differences in the MAP4 species, we performed a blind test, as described in the materials and methods section. A strong correlation between the distribution pattern and the MAP4 species was evident (Fig. 3B): among growth cones expressing EGFP-MAP4-SP, approximately 60% were classified into the fully distributed pattern, while the percentage dropped to 37% for those expressing EGFP-MAP4-LP. These results indicated that MAP4-SP localizes more readily than MAP4-LP to the transition zone.

Discussion

MAP4 undergoes regulated alternative splicing, resulting in the production of at least five isoforms²⁻⁴. We previously focused on the difference



Fig.3. Localization of MAP4 isoforms in the transition zone of a growth cone. A. typical images showing two types of MAP4 distributions in the transition zone. Cells were double-stained with rhodamine-phalloidinlabeled actin and EGFP-coupled MAP4 isoforms. In the merged panels, actin fluorescence is colored red, while MAP4 fluorescence is green. Upper panels, a growth cone with fully distributed EGFP fluorescence in the transition zone. Lower panels, a growth cone without fully distributed EGFP fluorescence. Bars indicate 10 μ m. B. circle graphs showing the frequencies of each distribution type in growth cones expressing MAP4 isoforms. The population was 124 for MAP4-SP and 89 for MAP4-LP.

between two isoforms, a neural cell-specific isoform with a deletion in the Pro-rich region (MAP4-SP) and a full-length isoform (MAP4-LP). We reported the relatively low microtubule-stabilizing activity of MAP4-SP both in vitro and in vivo^{4,5)}. Although no difference in their localizations was detectable in hepatoma cells⁵⁾, we often observed the intrusion of MAP4-SP decorated microtubules into the growth cones of NG108-15 cells. In the neuronal cells, the MAP4-LP decorated microtubules were contrastingly restricted to the proximal regions^{6,9)}. The distinctive localization of MAP4-SP is quite likely to be related to the function of the neuralspecific isoform⁴⁾.

In this study, we transfected NG108-15 cells with the expression plasmids for fluorophoreconjugated MAP4-SP and MAP4-LP, and examined their intracellular distributions. The subcellular localizations of the two isoforms largely overlapped, but a distinctive tendency was also observed for MAP4-SP: it was predominantly localized in neurites, neurite branching regions, and growth cones (Fig. 2). A careful examination revealed an enrichment of MAP4-SP in the transition zone of the growth cone, as compared to MAP4-LP (Fig. 3). This greatly supported our previous observation that MAP4-SP was detected in the transition zone, where MAP4-LP was hardly observed⁹⁾. These results suggested that MAP4-SP is concentrated in a neural cell-specific domain, where it performs its distinct functions.

How do the MAP4 isoforms become differentially localized? The localization of MAP4 isoforms can be regulated by the difference in their affinities to microtubules. Since MAP4-SP is easily detached from microtubules^{4,5)}, this isoform may be preferentially displaced to newly polymerized microtubules in the transition zones. We previously reported that microtubules decorated with the microtubule-binding domain fragment of MAP4-SP do not form bundles and maintain constant spacing between them, while the MAP4-LP fragment-bound microtubules form tight bundles without spaces⁴). We also previously discussed the possibility of a conformational difference between MAP4-SP and LP on microtubules. Based on these ideas, we proposed that MAP4 adopts at least two conformations upon binding to microtubules: one is a compact conformation, and the other is a loosely packed, bulky conformation (manuscript in preparation). Since the conformation of MAP4 could directly influence its affinity to microtubules, MAP4 in the compact conformation may bind to microtubules tightly and efficiently stabilize them, while in the bulky conformation, MAP4 may bind weakly to microtubules and exhibit poor stabilizing activity. The bulky conformation may originally be a folding intermediate, which is eventually transformed into the compact form on microtubules, but MAP4-SP cannot undergo this transformation because of the deletion in the Pro-rich region. This scheme is illustrated in Fig. 4.

It is also possible that MAP4-binding proteins serve as regulators of MAP4 localization. Septins, an evolutionarily conserved family of GTPases, bind to MAP4 in the Pro-rich region to prevent the MAP from binding to microtubules¹⁰. We reported previously that septin2, a septin monomer



Fig.4. Schematic illustration of the activity-based regulation of MAP4 isoform localization. A. MAP4-LP transforms from a bulky conformation to a compact form on microtubules. MAP4-LP in the compact conformation binds to microtubules tightly, remains there for a long time, and efficiently stabilizes them. Consequently, MAP4-LP can be the dominant species in preexisting microtubules. Few MAP4-LP molecules bind to newly polymerized microtubules, because of their binding to preexisting ones in the compact conformation. B. MAP4-SP cannot undergo the transformation to the compact form, because of the deletion in the Prorich region. Since MAP4 in the bulky conformation binds to microtubules only weakly, it is easily released from preexisting microtubules, and migrates to other sites where newly polymerized, dynamic microtubules are abundant. Septins facilitate the migration, since they efficiently inhibit MAP4 binding to preexisting microtubules.

protein, inhibited the microtubule-binding activity of MAP4-SP more efficiently than that of MAP4-LP in vitro⁶). Septins may prevent MAP4-SP from binding to preexisting microtubules, resulting in the displacement of the isoform to the septin-free regions, where it can bind to newly polymerized microtubules. Dynamic microtubules decorated with MAP4-SP may migrate into the regions that normally lack stable microtubules, such as the growth cone periphery, and modulate actinmicrotubule interactions there. Further time-lapse imaging analyses of the dynamics of MAP4-bound microtubules will help to clarify the specific function of MAP4-SP in the growth cones.

Acknowledgement

We would like to thank Professor Shanjun Zhang (Department of Information Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University) for his advice regarding computer-aided image analysis. This work was supported by a Grant-in-Aid for the High-Tech Research Center Project, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. Thanks are also due to Dr. Brenda Yoshinaga (SKYBAY Scientific Editing) for reading the manuscript.

References

- 1) Tokuraku K, Katsuki M and Kotani S (2002) Structural and functional analyses of microtubule-associated protein 4. *Rec. Res. Devel. Biochem.* **3**: 315-333.
- West RR, Tenbarge KM and Olmsted JB (1991) A model for microtubule-associated protein 4 structure. Domains defined by comparisons of human, mouse, and bovine sequences. J. Biol. Chem. 266: 21886-21896.
- 3) Tokuraku K, Matsushima K, Matui T, Nakagawa H, Katsuki M, Majima R and Kotani S (2003) The number of repeat sequences in microtubule-associated protein 4 affects the microtubule surface properties. J. Biol. Chem. 278: 29609-29618.
- 4) Matsushima K, Aosaki M, Tokuraku K, Hasan MR,

Nakagawa H and Kotani S (2005) Identification of a neural cell specific variant of microtubule-associated protein 4. *Cell Struct. Funct.* **29**:111-124.

- 5) Hasan MR, Jin M, Matsushima K, Miyamoto S, Kotani S and Nakagawa H (2006) Differences in the regulation of microtubule stability by the pro-rich region variants of microtubule-associated protein 4. *FEBS Lett.* 580: 3505-3510.
- 6) Hasan MR, Matsushima K, Yue JM, Nakagawa H, Miyamoto S and Kotani S (2006) Functional analyses of a neural cell specific variant of microtubuleassociated protein 4. *Sci. J. Kanagawa Univ.* 17:3-11.
- 7) Nomiya K, Takahashi S. Noguchi R. Nemoto S, Tokuraku K, Okuyama S, Matsushima K, Ikezu T and Kotani S (2010) Distinct neuronal localization of microtubule-associated protein 4 in the mammalian brain. *Neurosci. Lett.* 484:143-147.
- Matsushima K, Tokuraku K, Hasan MR and Kotani S (2012) Microtubule-associated protein 4 binds to actin filaments and modulates their properties. J. Biochem. 151:99-108.
- 9) Nakagawa H, Matsushima K, Iwasaki M, Shimohigashi M, Tokuraku K and Kotani S (2013) Deletion in the pro-rich region of microtubule-associated protein 4 influences its distribution in neural growth cone. *Fukuoka Univ. Sci. Rep.* **43**:67-72.
- 10) Kremer BE, Haystead T and Macara IG (2005) Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol. Biol. Cell* **10**: 4648-4659.

■原 著■

高次元一様等方宇宙の生成確率

長澤倫康^{1,3,4,5} 阿部優花²

Creation Probability of Homogeneous and Isotropic Higher-Dimensional Universe

Michiyasu Nagasawa^{1,3,4,5} and Yuka Abe²

- ² Department of Information Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ³ Department of Information Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. E-mail: nagasawa@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Creation from nothing as proposed by Vilenkin is one possible scenario in quantum cosmology. In this paper, based upon this model, the probability of quantum tunneling of the (d+1)-dimensional universe when $d \geq 3$ is calculated. The existence of the wave functional of the universe is postulated and it is assumed that the solution of the Wheeler–DeWitt equation should describe cosmic evolution in the region where the quantum effect of gravitation would be dominant. The equation can then be derived once the Hamiltonian is obtained. Similarly to the Vilenkin's model, a spatially homogeneous and isotropic metric is employed. However, the number of spatial dimensions is not limited to three. For simplicity, only the closed version of the universe is used so that the volume of the whole space is finite. In such cases, the evolution of the universe can be parameterized by a single dynamical parameter called the scale factor which depicts the size of the universe. Hence the wave functional of the universe becomes a function that depends on the scale factor. The potential that the universe obeys has a barrier between the state where the scale factor equals zero and that where the scale factor has a finite amplitude. Using the WKB approximation, the creation possibility of the universe is calculated by analogy with a tunneling process in quantum mechanics. The size of the created universe is determined by the cosmological constant, that is, the vacuum energy density. In addition to the preceding claim that the larger the vacuum energy becomes, the smaller the creation probability is, the result in this paper show that the higher the spatial dimension, the steeper the decrease of the creation probability of a larger universe, although the tunneling probability of the Planck size universe does not exhibit a monotonous tendency in accordance with the spatial dimension.

Keywords: creation probability of universe, quantum cosmology, extra dimension

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

序論

宇宙がどのようにして誕生し、我々の住む宇宙が何 故このような姿をしているのかを明らかにするこ とは、宇宙論における根源的で興味深い課題であ る。しかしながら、これまでのところ時空を量子的 に扱える重力の量子論は確立されておらず、既存 の物理学から推測される時空の量子的性質に基づ いて、計算が可能な範囲の議論がなされているに すぎない¹⁻⁴⁾。本論文では、その中でも Vilenkin による無からの宇宙創生モデル⁵⁾に着目し、この モデルを一般の高次元時空に適用した場合の宇宙 生成の確率を導き出す。

一般相対性理論においては、時空の計量と物質 の分布の関係が、アインシュタイン方程式によっ て表現される。そこで、変分原理によりアインシュ タイン方程式が導かれる作用に対応するラグラン ジアンからハミルトニアン H を求め、正準量子 化を適用すれば、量子力学におけるシュレーディ ンガー方程式に相当する、宇宙の波動汎関数 Ψ が 従うべきホイーラー・ドウィット方程式

$$\hat{H}\Psi = 0 \tag{1}$$

が導出できる⁶⁾。これは、量子力学における場合 と異なり、波動汎関数の時間発展ではなく、Ψに対 するハミルトニアン拘束条件を示す方程式である。

Vilenkin のモデルでは、正の宇宙定数 Λ を持つ 閉じた一様等方宇宙を採用する。その結果 Ψ は、 宇宙の計量の全時空における配位に依存する汎関 数ではなく、大きさを表すスケールファクターaのみに依存する関数となる。ここで、aを正準変 数とみなして、a = 0から有限のaへの時間進化 を表す経路を、あたかも量子力学におけるトンネ ル過程であるかのようにみなす。すると、トンネ ル効果の透過確率を大きさゼロの状態から有限の 大きさを持った宇宙が生まれる確率Tと同一視で きて、

$$T \sim \exp\left(-\frac{3\pi c^3}{\hbar G\Lambda}\right)$$
 (2)

なる表式が得られ、大きな宇宙定数を持った宇宙 の方が生まれやすいことがわかる。ここで、cは 真空中の光速、Gは重力定数、 $\hbar = h/2\pi$ 、hはプ ランク定数である。

式(??)は、時間1次元、空間3次元の4次元 宇宙に対する計算結果であるが、量子重力理論の 有望な候補である超弦理論によれば、時空は10 次元、あるいは 11 次元であることが要求される ⁷⁻¹⁰⁾。我々が宇宙を4次元時空と観測している事 実と整合させるため、3次元を超える余分な空間 次元は実験に矛盾しないほど小さくコンパクト化 されているとみなしたり、重力以外の相互作用は 余次元に伝わらないとするブレインワールド仮説 が提唱されているが、時空の量子効果が無視でき ない誕生直後の宇宙は、すべての空間次元が同等 な高次元の一様等方時空であったとする方が自然 であろう。そこで、次節以降、一般の (*d*+1)次 元時空の場合の、トンネル効果に基づく宇宙誕生 確率の表式を導き出す。

方法

時間1次元、空間*d*次元の一様等方時空の計量は、 時空の座標を

$$x^{0} = ct, x^{1} = \chi, x^{2} = \theta_{1}, \dots, x^{d} = \theta_{d-1}$$
 (3)

とおき、

$$ds^{2} = g_{\mu\nu}dx^{\mu}dx^{\nu} = -c^{2}dt^{2} + a^{2}(t)\left(d\chi^{2} + S_{K}^{2}(\chi)d\Omega_{d-1}^{2}\right)$$
(4)

と表せる。*a*(*t*) はスケールファクター、宇宙の空 間曲率の符号 *K* に応じて

$$S_{K} = \begin{cases} \sin \chi & ; \quad K = 1 \\ \chi & ; \quad K = 0 \\ \sinh \chi & ; \quad K = -1 \end{cases}$$
(5)

であり、

$$d\Omega_{d-1}^{2} = \sum_{k=1}^{d-1} \sin^{2} \theta_{1} \cdots \sin^{2} \theta_{k-1} d\theta_{k}^{2}$$
(6)
$$= d\theta_{1}^{2} + \sin^{2} \theta_{1} d\theta_{2}^{2} + \cdots$$

$$+ \sin^{2} \theta_{1} \sin^{2} \theta_{2} \cdots \sin^{2} \theta_{d-2} d\theta_{d-1}^{2}$$

は (*d* – 1) 次元球面部分に対応する微小世界間隔 の 2 乗である。

以下 K = 1 として、閉じた宇宙についてのクリ ストッフェル記号、リッチテンソル、スカラー曲 率を計算する。まず、計量の対角成分を $A_k \equiv g_{kk}$ とおくと、

$$A_0 = -1 \tag{7}$$

であり、 $k \ge 1$ に対しては、

$$\alpha_0(x^0) = a(t), \ \alpha_1(x^1) = S_K = \sin \chi \ , \ (8)$$
$$\alpha_2(x^2) = \sin \theta_1, \dots, \alpha_{d-1}(x^{d-1}) = \sin \theta_{d-2} \ (9)$$

と定めれば、

$$A_k = \left\{ \alpha_0(x^0)\alpha_1(x^1) \times \dots \times \alpha_{k-1}(x^{k-1}) \right\}_{(10)}^2$$

と、 A_k は x^0 から x^{k-1} までの座標にしか依存し ないことが確認できる。従って、クリストッフェ と記せば、ゼロにならない n < k の場合には、 ル記号

$$\Gamma^{\mu}_{\nu\lambda} = \frac{1}{2} g^{\mu n} \left(\frac{\partial g_{n\nu}}{\partial x^{\lambda}} + \frac{\partial g_{n\lambda}}{\partial x^{\nu}} - \frac{\partial g_{\nu\lambda}}{\partial x^{n}} \right)$$
(11)

のうちゼロでないものは、同一の添字に関しても 和をとらないことにして表記すれば、

$$\Gamma^{\nu}_{\mu\mu} = -\frac{1}{2}g^{\nu\nu}\frac{\partial g_{\mu\mu}}{\partial x^{\nu}} = -\frac{\frac{\partial A_{\mu}}{\partial x^{\nu}}}{2A_{\nu}} \quad ; \quad \nu < \mu \quad (12)$$

と書ける
$$\frac{d(d+1)}{2}$$
 個の成分と
 $\Gamma^{\mu}_{\nu\mu} = \Gamma^{\mu}_{\mu\nu} = \frac{1}{2}g^{\mu\mu}\frac{\partial g_{\mu\mu}}{\partial x^{\nu}} = \frac{\partial A_{\mu}}{\partial A_{\mu}} ; \quad \nu < \mu$
(13)

と書ける d(d+1) 個の成分だけである。ここでは、

$$g^{00} = \frac{1}{A_0}, g^{11} = \frac{1}{A_1}, \dots, g^{dd} = \frac{1}{A_d}$$
 (14)

を使っている。こうして、リッチテンソル

$$R_{\mu\nu} = \frac{\partial \Gamma^{i}_{\mu\nu}}{\partial x^{i}} - \frac{\partial \Gamma^{i}_{\mu i}}{\partial x^{\nu}} + \Gamma^{n}_{\mu\nu}\Gamma^{i}_{ni} - \Gamma^{n}_{\mu i}\Gamma^{i}_{n\nu} \quad (15)$$

の対角成分は、式(12)と同様に同一の添字に関し ても和をとらない約束のもと、

$$R_{\lambda\lambda} = \sum_{i=0}^{\lambda-1} \frac{\partial \Gamma_{\lambda\lambda}^{i}}{\partial x^{i}} - \sum_{i=\lambda+1}^{d} \frac{\partial \Gamma_{\lambda i}^{i}}{\partial x^{\lambda}} + \sum_{n=0}^{\lambda-1} \sum_{i=n+1}^{d} \Gamma_{\lambda\lambda}^{n} \Gamma_{ni}^{i}$$
$$- 2\sum_{i=0}^{\lambda-1} \Gamma_{\lambda i}^{\lambda} \Gamma_{\lambda\lambda}^{i} - \sum_{i=\lambda+1}^{d} \left(\Gamma_{\lambda i}^{i}\right)^{2}$$
(16)

$$= -\sum_{i=0}^{\lambda-1} \frac{\partial^2 A_{\lambda}}{\partial x^i \partial x^i} \frac{1}{2A_i} \\ -\sum_{i=\lambda+1}^d \left(\frac{\frac{\partial^2 A_i}{\partial x^\lambda \partial x^\lambda}}{2A_i} - \frac{\left(\frac{\partial A_i}{\partial x^\lambda}\right)^2}{2A_i^2} \right)$$

$$-\sum_{n=0}^{\lambda-1} \frac{\frac{\partial A_{\lambda}}{\partial x^{n}}}{2A_{n}} \left(\sum_{i=n+1}^{d} \frac{\frac{\partial A_{i}}{\partial x^{n}}}{2A_{i}} - \frac{\frac{\partial A_{\lambda}}{\partial x^{n}}}{A_{\lambda}} \right) - \sum_{i=\lambda+1}^{d} \left(\frac{\frac{\partial A_{i}}{\partial x^{\lambda}}}{2A_{i}} \right)^{2}$$
(17)

と書き表せる。さて、 $\alpha_k(x^k)$ の x^k による微分を

$$\alpha'_k \equiv \frac{\partial \alpha_k}{\partial x^k} \quad , \quad \alpha''_k \equiv \frac{\partial^2 \alpha_k}{\partial x^k \partial x^k}$$
(18)

$$\frac{\partial A_k}{\partial x^n} = 2A_k \frac{\alpha'_n}{\alpha_n} \quad , \tag{19}$$

$$\frac{\partial^2 A_k}{\partial x^n \partial x^n} = 2A_k \frac{\alpha_n''}{\alpha_n} + 2A_k \left(\frac{\alpha_n'}{\alpha_n}\right)^2 \tag{20}$$

となる。これらを式(17)に代入して、

$$R_{\lambda\lambda} = -\sum_{i=0}^{\lambda-1} \frac{A_{\lambda}}{A_i} \left\{ \frac{\alpha_i''}{\alpha_i} + \left(\frac{\alpha_i'}{\alpha_i}\right)^2 \right\}$$
$$-\sum_{i=\lambda+1}^d \left\{ \frac{\alpha_\lambda''}{\alpha_\lambda} - \left(\frac{\alpha_\lambda'}{\alpha_\lambda}\right)^2 \right\}$$
$$-\sum_{n=0}^{\lambda-1} \frac{A_{\lambda}}{A_n} \frac{\alpha_n'}{\alpha_n} \left(\sum_{i=n+1}^d \frac{\alpha_n'}{\alpha_n} - 2\frac{\alpha_n'}{\alpha_n}\right)$$
$$-\sum_{i=\lambda+1}^d \left(\frac{\alpha_\lambda'}{\alpha_\lambda}\right)^2 \qquad (21)$$
$$= -\sum_{i=0}^{\lambda-1} \frac{A_{\lambda}}{A_i} \left\{ \frac{\alpha_i''}{\alpha_i} + (d-i-1) \left(\frac{\alpha_i'}{\alpha_i}\right)^2 \right\}$$
$$- (d-\lambda) \frac{\alpha_\lambda''}{\alpha_\lambda} \qquad (22)$$

が得られる。 $\alpha_0 = a(t)$ であるから、a(t)の時間 微分を

$$\dot{a} \equiv \frac{da}{dt}$$
 , $\ddot{a} \equiv \frac{d^2a}{dt^2}$ (23)

と表すことにより、 $\lambda = 0$ のときは

$$R_{00} = -d\frac{\ddot{a}}{c^2 a} \tag{24}$$

が導かれる。一方 $\lambda \ge 1$ の場合は、

$$R_{\lambda\lambda} = C_{\lambda} - \frac{A_{\lambda}}{A_0} \left\{ \frac{\alpha_0''}{\alpha_0} + (d-1) \left(\frac{\alpha_0'}{\alpha_0} \right)^2 \right\}$$
$$= C_{\lambda} + A_{\lambda} \left\{ \frac{\ddot{a}}{c^2 a} + (d-1) \left(\frac{\dot{a}}{c a} \right)^2 \right\} \quad (25)$$

と求まる。ただし、

$$C_{\lambda} \equiv -\sum_{i=1}^{\lambda-1} \frac{A_{\lambda}}{A_{i}} \left\{ \frac{\alpha_{i}''}{\alpha_{i}} + (d-i-1) \left(\frac{\alpha_{i}'}{\alpha_{i}} \right)^{2} \right\}$$

$$- (d-\lambda) \frac{\alpha_{\lambda}''}{\alpha_{\lambda}}$$
(26)

である。ここで $k \ge 1$ に対して成り立つ

$$\alpha_k'' = -\alpha_k \quad , \quad \alpha_k'^2 = 1 - \alpha_k^2 \tag{27}$$

を利用して、

$$C_{\lambda} = -\sum_{i=1}^{\lambda-1} \frac{A_{\lambda}}{A_i} \left\{ -1 + (d-i-1)\left(\frac{1}{\alpha_i^2} - 1\right) \right\} + (d-\lambda)$$
(28)
$$= (d-\lambda) - \sum_{i=1}^{\lambda-1} \frac{A_{\lambda}}{A_i} \left\{ \frac{d-i-1}{\alpha_i^2} - (d-i) \right\}$$

$$=(d-\lambda) - \sum_{j=2}^{\lambda} \alpha_j^2 \times \cdots \times \alpha_{\lambda-1}^2 (d-j)$$
$$+ \alpha_1^2 \times \cdots \times \alpha_{\lambda-1}^2 (d-1)$$
$$+ \sum_{i=2}^{\lambda-1} \alpha_i^2 \times \cdots \times \alpha_{\lambda-1}^2 (d-i)$$
$$=(d-1)\alpha_1^2 \times \cdots \times \alpha_{\lambda-1}^2 = (d-1)\frac{A_{\lambda}}{\alpha_0^2}$$
(29)

と計算でき、式 (25) に代入して、

$$R_{kk} = A_k \left\{ \frac{\ddot{a}}{c^2 a} + (d-1) \left(\frac{\dot{a}}{ca}\right)^2 + \frac{d-1}{a^2} \right\}$$
(30)

が $k \ge 1$ の場合の表式となる。こうして、式(24) の結果と合わせて、スカラー曲率は

$$R = \sum_{i=0}^{d} g^{ii} R_{ii}$$
$$= 2d\frac{\ddot{a}}{c^2 a} + d(d-1) \left\{ \left(\frac{\dot{a}}{ca}\right)^2 + \frac{1}{a^2} \right\} \quad (31)$$

であることが導出できる。

ちなみに、開いた宇宙の場合は $\alpha_1 = \sinh \chi$ であり、式 (27)の関係のうちk = 1のときのみ

$$\alpha_1'' = \alpha_1$$
 , $\alpha_1'^2 = 1 + \alpha_1^2$ (32)

と置き換えねばならない。その結果、スカラー曲 率は

$$R = 2d\frac{\ddot{a}}{c^2a} + d(d-1)\left\{\left(\frac{\dot{a}}{ca}\right)^2 - \frac{1}{a^2}\right\} \quad (33)$$

となる。また、平坦な宇宙では $\alpha_1 = \chi$ となって、

$$\alpha_1'' = 0$$
 , $\alpha_1'^2 = 1$ (34)

を適用すべきであり、

$$R = 2d\frac{\ddot{a}}{c^2a} + d(d-1)\left(\frac{\dot{a}}{ca}\right)^2 \qquad (35)$$

である。以上をまとめると、(*d*+1) 次元一様等方 宇宙のスカラー曲率は

$$R = 2d\frac{\ddot{a}}{c^2a} + d(d-1)\left\{\left(\frac{\dot{a}}{ca}\right)^2 + \frac{K}{a^2}\right\} \quad (36)$$

と表わせることがわかった。

続いて、式 (31) で得られたスカラー曲率を使っ て、閉じた (d+1) 次元一様等方宇宙の生成確率 を求める。(d+1) 次元時空の進化が従うラグラン ジアン密度 \mathcal{L}_d は、(d+1) 次元の重力定数を G_d 、 宇宙定数を Λ_d とおいて、

$$\mathcal{L}_d = \frac{c^4}{16\pi G_d} (-2\Lambda_d + R_d) \tag{37}$$

となる。閉じた d 次元一様等方空間の体積を V_d とおくと、

$$V_d = \int_0^{\pi} d\chi \int_0^{\pi} d\theta_1 \int_0^{\pi} d\theta_2 \cdots \int_0^{\pi} d\theta_{d-2}$$
$$\times \int_0^{2\pi} d\theta_{d-1} \ a^d \sin^{d-1} \chi \sin^{d-2} \theta_1 \sin^{d-3} \theta_2 \times$$
$$\cdots \times \sin \theta_{d-2} = \frac{2\pi^{\frac{d+1}{2}}}{\Gamma\left(\frac{d+1}{2}\right)} a^d$$
(38)

である。 $\Gamma(x)$ はガンマ関数である。ラグランジア ン $L_d = \mathcal{L}_d V_d$ を時間積分した作用を不変に保っ たまま、部分積分を利用してスケールファクター の2階微分を消去すると、表面項が無視できれば、 式 (37) の R_d に式 (31) のスカラー曲率を代入し たものは、

$$\mathcal{L}_d = -\frac{d(d-1)c^4}{16\pi G_d} \left\{ \left(\frac{\dot{a}}{ac}\right)^2 + \frac{2\Lambda_d}{d(d-1)} - \frac{1}{a^2} \right\}$$
(39)

と変形できる。宇宙定数から長さの次元を持った 量 l_d を

$$l_d \equiv \left\{ \frac{2\Lambda_d}{d(d-1)} \right\}^{-\frac{1}{2}} \tag{40}$$

と定義すると、式 (39) は

$$\mathcal{L}_{d} = -\frac{d(d-1)c^{4}}{16\pi G_{d}} \left\{ \left(\frac{\dot{a}}{ac}\right)^{2} + \frac{1}{l_{d}^{2}} - \frac{1}{a^{2}} \right\}$$
(41)

とも表せる。こうして、ラグランジアン
$$L_d = -\frac{c^4 d(d-1)\pi^{\frac{d-1}{2}}}{8G_d\Gamma\left(\frac{d+1}{2}\right)} \left\{ \left(\frac{\dot{a}}{ac}\right)^2 + \frac{1}{l_d^2} - \frac{1}{a^2} \right\} a^d$$
(42)

からスケールファクター a に共役な運動量

$$p_d \equiv \frac{\partial L_d}{\partial \dot{a}} = -\frac{c^2 d(d-1)\pi^{\frac{d-1}{2}}}{4G_d \Gamma\left(\frac{d+1}{2}\right)} \dot{a} a^{d-2} \qquad (43)$$

が、続いてハミルトニアン H_d が

$$H_{d} \equiv p_{d}\dot{a} - L_{d} = -\frac{c^{4}d(d-1)\pi^{\frac{d-1}{2}}}{8G_{d}\Gamma\left(\frac{d+1}{2}\right)} \\ \times \left\{ \left(\frac{\dot{a}}{ac}\right)^{2} - \frac{1}{l_{d}^{2}} + \frac{1}{a^{2}} \right\} a^{d} \qquad (44)$$

と求まる。ハミルトニアンを

$$H_d = -\frac{4G_d\Gamma\left(\frac{d+1}{2}\right)}{c^2 d(d-1)\pi^{\frac{d-1}{2}}a^{d-2}} \left\{\frac{p_d^2}{2} + U_d(a)\right\}$$
(45)

と書き直すことにより宇宙のポテンシャルエネル ギー $U_d(a)$ を定義すると、

$$U_d(a) = \frac{c^6 d^2 (d-1)^2 \pi^{d-1}}{32 G_d^2 \Gamma \left(\frac{d+1}{2}\right)^2} \left(\frac{1}{a^2} - \frac{1}{l_d^2}\right) a^{2d-2}$$
(46)

が得られる。

 $U_d(a) = 0$ を満たす a は

$$a = 0 \quad , \quad l_d \tag{47}$$

であるから、 $p_d = 0$ の宇宙がa = 0の状態から $a = l_d$ の状態へと遷移する過程を、 $U_d(a) > 0$ なるポテンシャルの障壁をすり抜ける量子力学的トンネル効果とみなし、WKB 近似を適用すれば、 大きさ $a = l_d$ の宇宙が生成する確率 T_d として、

$$T_{d} \equiv \exp\left(-\frac{2}{\hbar} \int_{0}^{l_{d}} \sqrt{2U_{d}(a)} da\right)$$

= $\exp\left\{-\frac{c^{3}d(d-1)(d-3)!! \pi^{\frac{d-1}{2}}}{2\hbar G_{d} d!! \Gamma\left(\frac{d+1}{2}\right)} (l_{d})^{d-1}\right\}$ (48)

を定義することができる。なお、 G_3 が通常の重 力定数Gに一致し、 $\Gamma(2) = 1$ であることに注意 すれば、

$$T_3 = \exp\left\{-\frac{c^3\pi}{\hbar G_3\Gamma(2)} \left(l_3\right)^2\right\}$$
(49)

が式 (2) の T に一致することが、式 (40) を用いて 確かめられる。

 T_d の表式 (48) から、一般の (d+1) 次元時空に おいても、大きな宇宙ほど生成されにくいことが 確認できる。長さとして意味を持つ最小のスケー ルとして一般次元でのプランク長 L_d を

$$L_d \equiv \left(\frac{G_d\hbar}{c^3}\right)^{\frac{1}{d-1}} \tag{50}$$

と定義すると、式(48)は

$$T_{d} = \exp\left\{-\frac{d(d-1)(d-3)!! \pi^{\frac{d-1}{2}}}{2d!! \Gamma\left(\frac{d+1}{2}\right)} \left(\frac{l_{d}}{L_{d}}\right)^{d-1}\right\}$$
(51)

と書き表せる。

結果

式(51)を使って、具体的に宇宙生成確率の空間次 元数に対する依存性を見てみる。



図 1: $l_d = L_d$ の場合の T_d . 横軸は時空の次元数(d+1), 縦軸が宇宙生成の確率である.

小さい宇宙のほうが生成確率が高いのだから、 最も生まれやすい可能な限り小さな宇宙として、 l_d がプランク長に等しい場合、すなわちプランク スケールの宇宙定数を持つ宇宙の T_d を求める。 $l_d = L_d$ とした場合の T_d を $d = 3 \sim 11$ に対して 示したのが図1である。図1からは、4次元、また は5次元時空が最大の生成確率を持ち、8次元で 極小値をとることはわかるが、空間次元数dに対 する T_d の明白な傾向は読み取れない。より大き な宇宙の生まれにくさを調べるため、 $l_d = 1.5L_d$ として $d = 3 \sim 11$ に対する T_d を図2に描画し た。図2からは、空間次元数が大きくなると共に



図 2: $l_d = 1.5L_d$ の場合の T_d . 図1同様, 横軸は時空の次元数 (d+1), 縦軸が宇宙生成の確率であるが, 縦軸は対数表示を採用している.

宇宙生成確率が減少することがよりはっきりと見て取れる。

式 (51) から実は、 $l_d = L_d$ の場合、宇宙生成の 確率は d = 7 で最小になることがわかる。実際、 T_d の指数の肩の部分の d 依存性を、 $l_d = L_d$ の場 合に

$$\frac{\ln T_{d+1}}{\ln T_d} = \begin{cases} \frac{2(d-2)!!}{(d-1)!!} & ; \quad d : \widehat{\sigma} \\ \\ \\ \\ \frac{\pi(d-2)!!}{(d-1)!!} & ; \quad d : \mathcal{B} \\ \end{cases}$$
(52)

と明示すればわかる通り、dが十分大きくなると T_d は1に近づいていく。 T_d の最小値は8次元時 空における

$$T_7 = \exp\left(-\frac{4}{15}\pi^3\right) \tag{53}$$

であり、 $d \ge 12$ すなわち 13 次元以上の時空では、 生成確率が4次元時空の場合を上回ることになる。

討論

一般相対性理論に基づき、量子力学におけるトン ネル効果の透過率と同様にして、高次元一様等方 宇宙の生成確率を求め、宇宙生成率の空間次元数 に対する依存性をあらわに定式化することがで きた。

その結果、より大きな宇宙定数を持つ小さな宇 宙ほど生成確率が高くなり、特にプランク長の宇 宙については、時空が8次元の場合が最も生まれ にくく、空間次元数が大きくなるにつれて、宇宙 生成の確率は1に漸近することも示せた。8次元 時空で最小確率が実現する物理的意味は不明であ り、超弦理論から望まれる10次元や11次元の宇 宙が特別に生成されやすいわけでもなく、具体的 数値についてはより詳しい解析が必要である。特 に、プランク長よりも大きな宇宙を対象とすると、 より高次元になるほど生成確率が急速に減少する。 逆に言えば、生成時の大きさがプランク長より少 しでも小さい場合、高次元の宇宙ほど誕生しやす くなることになる。宇宙が生成されるときの条件 を細かく定め、好まれる時空次元があり得るかを 調べることが、今後の課題であろう。

本論文では、正の宇宙定数を持った宇宙がプラ ンク長程度の大きさで生まれるシナリオを扱った。 誕生後の宇宙は、宇宙定数が真空のエネルギーの 役割を果たすことにより、インフレーションを経 てマクロな大きさに到達すると考えられる。しか し、観測によれば、もし現在の宇宙に宇宙定数が 存在するとすれば、

$$l_3 \sim 10^{61} L_3 = 10^{61} \sqrt{\frac{G\hbar}{c^3}}$$
 (54)

程度に相当し、真空のエネルギー密度に換算する とプランクスケールより 120 桁以上も小さいこと が判明している¹¹⁾。生成時の宇宙定数との莫大 な差異は、重要な未解決問題である。

宇宙がどのように誕生したかは早晩解き明かさ れる問題ではなく、例えば物理定数が一定ではな いとする可能性に基づく計算¹²⁾など、幅広い見 地から取り組む柔軟な姿勢が必要であろう。天文 観測や素粒子理論の進歩と共に、今後の発展が期 待される。

文献

- 1) 佐藤勝彦 (1996) 相対性理論. 岩波書店, 東京.
- 2) 佐藤勝彦, 二間瀬敏史 [編] (2008) 宇宙論 I 宇宙 のはじまり. 日本評論社, 東京.
- Bojowald M (2011) Quantum Cosmology : A Fundamental Theory of the Universe (Lecture Notes in Physics 835). Springer, Berlin.
- 吉田伸夫 (2013) 明解量子宇宙論入門. 講談社, 東京.
- Vilenkin A (1982) Creation of universes from nothing. *Phys. Lett.* B117:25-28.
- DeWitt BS (1967) Quantum theory of gravity.
 I. The canonical theory. *Phys. Rev.* 160:1113 -1148.

- Green MB, Schwarz JH (1984) Anomaly cancellation in supersymmetric D=10 gauge theory and superstring theory. *Phys. Lett.* B149: 117-122.
- 8) Witten E (1995) String theory dynamics in various dimensions. *Nucl. Phys.* B443:85-126.
- 9) ジョセフ・ポルチンスキー (2012) ストリング理論 第1巻, 第2巻. 丸善, 東京.
- 10) 太田信義 (2012) *超弦理論・ブレイン・M理論*. 丸善, 東京.
- Planck Collaboration (2014) Planck 2013 results. I. Overview of products and scientific results. To be published in Astron. Astrophys. arXiv:1303.5062 [astro-ph.CO].
- 12) 横山愛,長澤倫康 (2010) 光速変化モデルにおける宇宙生成の確率と真空のエネルギー. 神奈川大 学理学誌 21:17-22.

■原 著■ 2013年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

カーボンナノチューブの真空一貫プロセスによる形成法と RHEED / STM による Co ナノ粒子評価の研究

中田穣治^{1,2} 山下友実¹ 斎藤保直¹ 星野 靖¹

Growth of Carbon Nanotubes using Total Vacuum Processes and Characterization of Co Nano-particles by RHEED/STM

Jyoji Nakata^{1, 2}, Tomozane Yamashita¹, Yasunao Saito¹ and Yasushi Hoshino¹

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

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: jyojin@info.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We have investigated total vacuum processes for fabricating carbon nanotubes (CNTs) without exposure to air to avoid oxidation of catalytic metal species. Various metal nano-particles have been used as catalytic species for CNT growth. However, oxidation of metal atoms is thought to be inappropriate for CNT growth. Pure metal nano-particles without oxygen atoms are thought to be suitable for catalytic growth of CNTs. Thus, oxidation of these metal nano-particles before growing CNTs should be avoided. Total vacuum processes for the formation of metal nano-particles and successive growth of CNTs are the most appropriate. We have developed an apparatus for formation of metal nano-particles on the HOPG (Highly Oriented Pyrolytic Graphite) substrate by metal evaporation from a heated vessel, and for CNT growth using a CAS (Cracking Atom Source), utilizing a STM (Scanning Tunneling Microscope) high-vacuum chamber. Furthermore, a RHEED (Reflection High Energy Electron Diffraction) instrument is incorporated into this chamber, enabling observation of the crystal orientations of crystalline metal nano-particles on the substrate and of the HOPG substrate itself. We have improved the metal evaporating methods from filament heating to a vessel heating process. This change improves the uniformity of the two-dimensional distributions of metal nano-particles on the surface of the substrate. We have ascertained the uniformities and the crystalline orientation of Co nano-particles on the HOPG substrate, and ascertained the orientation of the HOPG substrate itself, by observing RHEED patterns and STM images. Furthermore, we have discussed the possibility of improving the controllability of sizes and sizedispersions for metal nano-particles by introducing point defects on the surface of the HOPG substrate via ion beam irradiation, such as Ar ions. This is because point defects might become traps of migrating metal atoms, before the metal atoms gather together and grow to nano-particles. Thus, these metal nano-particles become well-defined nucleationsites for CNT growth. If the surface of the HOPG substrate is completely flat, the evaporated metal atoms migrate on the surface of the substrate in random directions, and nucleate nano-particles by accidental collisions between these metal atoms. Therefore, restricted point defects on the surface of the substrate might enhance the controllability of sizes and size-dispersions of well-defined metal nano-particles.

Keywords: CNT, catalysis, metal nano-particles, total vacuum processes, RHEED, STM, CAS, CVD, Ar ion guns, filament evaporation, vessel evaporation, HOPG substrate

序論

当研究室では、これまでカーボンナノチューブ (Carbon nanotube: CNT)の形成制御について研究 を行ってきた。CNT は、日本人によって発見され た新素材であり1)、鉄の数百倍という機械的強度の みならず、電気伝導率や熱伝導率等電気特性や熱 特性に優れた性質を持っている。カイラリティー (Chirality, CRT) と呼ばれるグラフェンシートの巻 き方により金属になったり半導体になったりする性 質があり、またチューブの直径がナノサイズである ため、LSI などの縦型配線材料として利用したり、 FET 電子素子のチャネルに利用したりその用途は広 い^{2,3}。何れにしても直径がナノサイズであるとい う最大の特徴、利点を活かした形で電子素子の微細 化に応用される可能性がある。そのため CNT は 21 世紀の新しい省エネルギーデバイスとして期待され ている。

CNT の直径あるいは CRT を制御することにより、 金属にしたり、半導体としてのバンドギャップを変 えることができる。即ち、CRT 制御によって CNT の最大の特徴ともいえる金属体・半導体の作り分け も可能となる⁴⁻⁶⁾。しかし、日本はもちろん世界各 国で CNT に関する研究が盛んに行なわれているが、 CRT まで成長制御された CNT 形成法は未だ誰も実 現できていない。

当初我々は、単結晶基板上に堆積した絶縁膜試料 の界面に金属イオンをホットイオン注入してナノ粒 子金属と下地単結晶基板とのエピタキシャル成長に よる結晶方位の揃ったナノ粒子形成を試みた⁷⁻¹⁰。

CNT は通常 Fe, Co, Ni のような触媒としての金 属ナノサイズの微結晶粒子を形成し、その後に、 CVD(Chemical Vapor Deposition) 法により触媒微粒 子を核に CNT を成長させる。昨年度の報告におい て CRT の制御に関して、従来の研究方向では困難性 が伴うことを指摘し、大きく研究の方向を変えるこ とを提案した¹¹⁾。今までの研究の基本的なスタンス としては大きさと結晶方位の揃った金属ナノ粒子を 形成して、そこに、ナノ粒子が液相化しないような 低温 CVD 法で CNT を成長させようという方法であ った。これらの条件の内、ナノ粒子直径制御が極め て困難であることが明らかになった。即ち、CRT制 御のためには原子の直径程度の大きさのナノ粒子の 制御が必要である。この問題に関しては未解決であ る。大きさ(直径)のばらつきが少ない金属ナノ微 粒子成長技術に関しては MeV 級イオン照射を利用 した提案があり¹²⁾、それらも将来の課題として検討 してゆきたい。

結晶方位が揃ったナノ粒子をある一定方向に形成

することに関してはそれなりの実験結果が出てきて いる。今回の報告の中でもそれに一部触れたいと思 う。

別な困難性として次のことが挙げられる。すなわ ち、同一の CRT を持った CNT を成長させるために は CVD 成長中温度をある一定以下に低減化しなけ ればならないということである。即ち、均一な結晶 方位の揃った種触媒微結晶金属ナノ粒子を形成でき たとしても、その後の CVD 法による CNT 成長過程 において、高温状態になり CNT 成長の核となると 金属ナノ粒子が液相化して、元の結晶方位の情報が 失われてしまうのである。要は金属ナノ粒子を固相 状態のまま、CNT を固相成長させなければ種結晶の 方位を反映した CRT の CNT は成長しないからであ る。この CVD プロセスの温度低減化は緊急の課題 である。このために必要となる技術として MeV 級 イオンビーム照射を利用して、ビーム照射しながら 同時に炭化水素系ガスを試料チャンバーに流すこと により、低温で CNT を成長させる試みを検討しよ うとしている。これについてはまた、別途詳細にそ の原理や方法を解説することにする。

その他の問題点として現状では金属ナノ粒子を核 に CNT を CVD 法で成長させる際には一旦空気中 に試料を取り出して別の CVD チャンバーに移動し なければならないということがある。この時に金属 微粒子が自然酸化されることが必定であり、酸化物 としての金属ナノ粒子がその後の CNT 成長プロセ スの妨げになることも指摘されている。従って、金 属ナノ微結晶粒子形成から、CNT 成長まで一貫し て真空中で行えるような真空一貫プロセスが重要と なる。そこで我々はSTM(走査型トンネル電子顕微 鏡、Scanning Tunneling Microscope) 測定チャンバ ーの中に金属微粒子蒸着源、さらに CVD 法に代わ る CAS(Cracking Atom Source) と呼ばれる C 原子線 を照射できる装置を同一 STM チャンバーの中に組 み込み、金属ナノ粒子の形成から CNT の成長まで を同一の STM 真空チャンバーの中で処理できるよ うな真空一貫プロセス装置を開発した。

更に、金属ナノ微結晶粒子の形成を RHEED(反射 高速電子線回折、Reflection High Energy Electron Diffraction)と呼ばれる固体表面の結晶性を評価する 分析装置を組み込み、STM 観察も同一チャンバー内 で行えるようにした。即ち、ナノ金属微粒子の形成、 CNT の成長、そしてそれら両方を RHEED と STM で分析、観察する装置を一つの真空チャンバーの中 に組み込んだ総合的な真空一貫プロセス分析装置を 開発した。この論文においてはこの真空一貫プロセ ス分析装置の概要とそれを使用して得た幾つかの実



図 1. CNT 成長・分析用真空一貫プロセス装置の全体像.

験結果を紹介する。

図1に真空一貫プロセス分析装置の全体像を示す。 図中のイオン銃は後に述べる基板にArイオンを照 射してダメージを与える装置である。このイオン銃 により導入された欠陥を核にして微粒子蒸着源から 飛ばした金属原子線が大きさの揃った種結晶触媒金 属微粒子を形成することを期待して取りつけた。

これまでの研究から、CNT 成長に必要となる触媒 微結晶粒子のサイズ、結晶の方位、CNT の単層・多 層制御が CRT 制御に大きく関わっているとされて いる。当研究室の今までの研究において、「フィラ メント式蒸着源」を使用して、高配向グラファイト (Highly Oriented Pyrolytic Graphite: HOPG) 基板 上に触媒微結晶粒子として Co を蒸着してきた。Co が蒸着した HOPG 表面を RHEED および STM を 用いて評価した結果、1-5 nm 程度の Co 微粒子が HOPG 基板上に (0001) 配向し、エピタキシャル成 長(基板の結晶方位と同一方位で微結晶粒子が結晶 成長していること)していることが分った。しかし、 観察する基板の場所により Co 微粒子の付き方にム ラが大きく、蒸着レートにも再現性がなかった。そ こで、図1の微粒子蒸着源としてムラなく均一に蒸 着できると期待される「るつぼ式蒸着源」に変更して、 HOPG 基板上での Co 微粒子の成長過程の研究を行 った。

フィラメント式蒸着源の実験結果

当研究室における従来の研究においては、図1に示 された微粒子蒸着源として、図2に示すような内部 構造を持つフィラメント式蒸着源を用いて HOPG 基 板上に Co 微粒子を形成していた。フィラメントは タングステンでできており、そこに蒸着金属である



図 2. フィラメント式蒸着源の写真.



図 3. フィラメント式蒸着源による Co 微粒子の RHEED 像. 蒸着時間 70 秒 (a), 140 秒 (b), 210 秒 (c).

Coの線が巻き付けられている。直流定電流電源装置 を用いてフィラメントへ電流を流すと、発生するジ ュール熱によってフィラメントの温度が上昇する。 そして、Co線が加熱されて蒸発した Co原子線は基 板に照射される。このようにして HOPG 上に形成し た Co金属微粒子を RHEED および STM を用いて 観察した。

RHEED による観察

図3に示す RHEED 像から蒸着量が増加すると ともに、HOPG のパターン(青三角で示す)よりも Co のパターン(赤三角で示す)が強く出ていること が分る。このことから、HOPG 基板上に(0001) 配 向した(下地の HOPG 基板に対してエピタキシャル 成長した) Co 微粒子が成長したことが確認できた。

STM による観察

図4に示すSTM 像から蒸着量の増加に伴って、Co 微粒子のサイズも大きくなっており、微粒子密度、 原子密度も増加していることが分った。しかし、図 5の画像に示したように HOPG 基板の測定箇所によ り大きなムラが見られた。この原因として我々は、 蒸着源である Co 金属がタングステンフィラメント に Co 線として巻き付けた構造のため、Co 線の疎密 が影響して蒸着にムラが出たと考えた。ムラなく均 ーに蒸着できると期待される「るつぼ式の蒸着源」(図 6,7)に変更して、フィラメント式と同様の実験を行 った。

図6にるつぼ式蒸着源の模式図を示す。るつぼ式 蒸着源はアルミナでできており、その外周はタング ステン製の線で巻かれている。このタングステン線 に電流を流すことにより、るつぼを温めて中の固体 Co金属を溶かし、Co原子線として HOPG 基板上に 飛ばした。

るつぼ式蒸着源の実験結果

先ず、HOPG 基板に対して、テープで表面の何層 かを剥離し、平坦な清浄表面を露出させた。その表 面に対して、Coを表1の条件で蒸着して RHEED、 STM により表面観察を行った。

RHEED による観察

図 8 に清浄 HOPG 及び表 1 の条件で Co 蒸着した HOPG の RHEED 像を示す。写真では見にくいが、 図 8 から蒸着時間を増やすにつれて Co の RHEED パターンが強くなっている。このことから、HOPG 上に Co が (0001) 配向していることが確認できた。



図 4. フィラメント式蒸着源による Co 微粒子の STM 像. 蒸着時間 70 秒 (a), 140 秒 (b), 210 秒 (c).



図 5. フィラメント式蒸着源による Co 微粒子の STM 像. 中央付近 (a) と周 辺部 (b). 基板の測定箇所によりムラ (微結晶粒子の直径に大きなばらつき) が見られた STM 像 (同一試料、同一条件のもとで成長).



図 6. るつぼ式蒸着源の写真.



図 7. るつぼ式蒸着源の断面図と平面図.

STM による観察

表1の条件でCo蒸着したHOPGのSTM像を図 9(a)と(b)に示す。また、表2にこれらのSTM像か ら算出したCo金属ナノ微結晶粒子のサイズ平均値 と微粒子密度を示す。

図 9(a) と (b) から微粒子のサイズにややばらつき があることがわかる。しかし、図 5 のような局所的 な大きなばらつきや、ムラは見られなかった。微粒 子密度は画像上の微粒子の総数をスキャンサイズの 二乗で割ることで求めた。表 2 から、蒸着時間の増 加に伴って、サイズ平均値が 2 倍近く大きくなって いることがわかる。清浄 HOPG 表面のような平坦面 において、微粒子の成長となる核は存在しない。そ のため基板表面上を容易に移動できる Co が凝集し、 微粒子の肥大化につながったと考えられる。微粒子 自身が大きくなることにより、蒸着時間が6倍にな っているにも関わらず、微粒子密度、すなわち単位 面積当たりの微粒子数は約25%程度しか増加してい ないという事実を裏付けている。

今後の予定

欠陥導入による Co 微粒子密度制御の可能性

正常なグラファイト表面においては Co が結晶化す るための成長核が存在しないため、基板表面を自 由に Co 原子が移動し、たまたま衝突して合体した 原子が微結晶ナノ粒子を形成する。それが下地の

表 1. るつぼ式蒸着源による Co 蒸着条件

蒸着時間 (sec)	電流 (A)	電力 (W)	蒸着時真空度 (Torr)
5	22	99 910	$1.0 imes10^{\cdot8}$
30		219	$2.1 imes10^{-8}$



図 8. 清浄表面 (a), るつぼ式蒸着源による Co 微粒子の 5 秒蒸着した (b), 30 秒蒸着した (c) の RHEED 像



図 9. るつぼ式蒸着源による Co 微粒子の 5 秒蒸着した (a), 30 秒蒸着した (b) の STM 像

表 2. Co 微粒子のサイズ平均値と微粒子密度

蒸着時間 (sec)	サイズ平均値 (nm)	微粒子密度 (個 /cm ²)
5	2.2	$2.01 imes10^{11}$
30	3.9	$2.58 imes10^{11}$

HOPG 基板に対してエピタキシャル成長しているの であるが、各微粒子の直径と直径のバラツキを制御 するには不十分である。そこで、これら微粒子の大 きさとそのバラツキを制御する方法が必要になる。 過去の文献 13) によると以下のような方法が提案さ れている。

Graphite 表面に点欠陥を導入すると蒸着した Co が欠陥にトラップされて微粒子の凝集・肥大化が起 きにくくなる。過去に報告された文献 13) によると、 HOPG 基板表面に Fe を 2 ML(2 mono-layer, 2 原子 層) 蒸着させ、STM 観測を行って、個々の Fe 微粒 子のサイズを測定しグラフ化した結果が掲載されて いる。これを図 10 に示す。

この図から、平均: 5.9 nm、標準偏差: 2.1 nm の Fe 微粒子が成長していることがわかる。かなり、大 きさにばらつきがあることが分る。次に、HOPG 基 板表面に Ar イオン照射を行い表面に欠陥を導入し、 同様に Fe 微粒子を 2 ML 蒸着させた。STM 観測を 行って、個々の Fe 微粒子のサイズを測定してグラ フ化した結果を図 11 に示す。

今後上記に示したように HOPG 基板上に図1に 示した Ar イオン銃により Ar イオンを低エネルギー で照射し、表面に欠陥を導入することにより、Co原 子がその欠陥にトラップされ、Co 微結晶粒子の大 きさやバラツキを制御できないかどうか検討してい く。Ar イオンのエネルギーとドース量を最適化して HOPG 基板の結晶性を失わない程度に照射してやる ことを検討する。過度にダメージを加えると HOPG 基板の結晶性が破壊され Co 微粒子が HOPG 基板に 対してエピタキシャル成長しなくなる可能性がある。



図 10. HOPG 基板上に Fe を 2 原子層蒸着させた時の STM 観察像 (a), Fe 微粒子の横方向大きさの ヒストグラム (b)、縦方向の高さのヒストグラム (c).



図 11. HOPG 基板上に Ar イオン照射を行った後に Fe を 2 原子層蒸着させた時の STM 観察像 (a), Fe 微粒子の横方向大きさのヒストグラム (b)、縦方向の高さのヒストグラム (c).

基板表面の加熱による Co 微粒子の構造変化

一般に、表面を加熱することにより、表面マイグレ ーションが活発になり、微粒子が互いに凝集し肥 大化していく。単層 CNT 成長において、金属ナノ 微粒子の肥大化は致命的である。そのため、清浄 HOPG および欠陥導入 HOPG において、各温度で 加熱後、どのように Co 微粒子の凝集が見られるか 基礎的な検討が必要である。前節で提案した欠陥導 入 HOPG では、欠陥に Co がトラップされると思わ れるので、高温においても Co 微粒子の凝集が抑制 されることが期待される。そして、CNT 成長におい て必要となる炭化水素ガス(CH4や C2H4 ガスなど) を Co 蒸着 HOPG に曝露し、どのように吸着するの かSTM で観察する。また、ガス導入時の基板加熱 時に Co 微粒子の構造にどのような変化が起こるの かを観察する。最終的な目標は CVD 法を用いたカ イラリティ制御された単層 CNT の成長である。

まとめ

高度に制御された CNT 成長のために、超高真空用 STM 装置を改造して種結晶金属ナノ粒子の生成から CNT 成長までを、試料を空気中に暴露することなく、 すべて真空中で行えるようにするための真空一貫プ ロセス装置を開発した。これにより金属ナノ粒子の 酸化を防いで CNT を成長させることができるよう になった。さらに形成した金属ナノ粒子とともにそ の後に成長させた CNT をそのまま真空を破ること なく RHEED と STM で観察可能とした。

当初、結晶金属ナノ微粒子形成のために金属原子 線を飛ばす蒸着源として、タングステンフィラメ ントに Co線を巻きつけた構造にして Co原子線を HOPG 基板上に飛ばしていた。しかし制御性がなく、 試料基板上での場所の相違によるムラが大きかった。

本研究において蒸着源をフィラメント式からるつ ぼ式に変更したことで、以前見られた場所の相違に よるムラはなくなった。また、清浄 HOPG 基板に蒸 着した Co 微粒子は (0001) 配向し、1-5 nm 程度のサ イズであることが RHEED 観察と STM 観察で確認 できた。蒸着量の増加に伴ってサイズが大きくなる ことも分かった。

今後の研究の方向としては、HOPG 基板上に Ar イオン照射等により基板表面に点欠陥的なダメージ を導入し、金属原子線を選択的に欠陥にトラップさ せ、金属ナノ微粒子の大きさと、直径を制御すると ともに、基板に対して結晶方位の揃った金属ナノ粒 子が形成できる最適条件を検討していく。

文献

- Iijima S and Ichihashi T (1993) Single-shell carbon anotubes of 1-nm diameter. *Nature* 363 : 603-605.
- Jorio A, Dresselhaus G and Dresselhaus MS. (2008) Carbon Nanotubes : Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Saito R, Dresselhaus G and Dresselhaus MS. (1998) *Physical Properties of Carbon Nanotubes*. Inperial College Press, London.
- Baughman RH, Zakhidov AA and de Heer WA (2002) Carbon nanotubes - the route toward applications. *Science* 297 : 787-792.
- 5) Schnorr JM and Swager TM (2011) Emerging applications of carbon nanotubes. *Chem. Mater.* **23** : 646-657.
- 6) Cao Q, Kim HS, Pimparkar N, Kulkarni JP, Wang CJ, Shim M, Roy K, Alam MA and Rogers JA (2008) Medium-scale carbon nanotube thin-film integrated circuits on flexible plastic substrates. *Nature* 454 : 495-500.
- Hoshino Y, Arima H, Yokoyama A, Saito Y and Nakata J (2011) Characterization of hot-implanted Fe near the SiO₂/Si interface. *Jpn. J. Appl. Phys.* 50: 035601/1-5.
- Hoshino Y, Arima H, Saito Y and Nakata J (2012) Growth of single-walled carbon nanotubes from hot-implantation-formed catalytic Fe nanoparticles assisted by microwave plasma. *Appl. Surf. Sci.* 258 : 2982- 2988.
- Hoshino Y, Arima H, Yokoyama A, Saito Y and Nakata J (2012) Carbon nanotube growth from catalytic nano-clusters formed by hot-ion-implantation into the SiO₂/Si interface. *Nucl. Instrum. & Methods.* B282:125-129.
- Hoshino Y, Arima H, Yokoyama A, Saito Y and Nakata J (2013) Analysis of depth redistribution of implanted Fe near SiO2/Si interface Nucl. Instrum. & Methods : in press.
- 中田穣治、谷地田剛介、刈部真里、斎藤保直、星野靖 (2013) 高温イオン注入形成触媒微粒子からの CNT 成長-問題点の総括と今後の展望-. Sci. J. Kanagawa Univ. 24:87-99.
- 12) Rizza G, Cheverry H, Gacoin T, Lamasson A and Henry S (2007) Ion beam irradiation of embedded nanoparticles:Toward an in situ control of size and spatial distribution. J. Appl. Phys. 101:014321/1-5.
- 13) Kholmanov N, Gavioli L, Fanetti M, Casella M, Cepek C, Mattevi C and Sancrotti M, (2007) Effect of substrate surface defects on the morphology of Fe film deposited on graphite. *Surf. Sci.* 601:188.

■原 著■ 2013年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

二次元シリコン半導体基板の物性研究

水野智久1 青木 孝1 鮫島俊之2

Physical Properties of Two-Dimensional Si Layers

Tomohisa Mizuno^{1,3}, Takashi Aoki¹ and Toshiyuki Sameshima²

- ¹ Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan.
- ² Department of Electrical and Electronic Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture/Technology, Tokyo 184-8588, Japan.
- ³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: mizuno@info.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We experimentally studied both the Si crystal direction and the impurity dopant density dependence of quantum confinement effects (phonon confinement effects (PCE) and band structure modulation (BSM)) in a two-dimensional (2D) Si layer. By polarization Raman spectroscopy, in the asymmetrical broadening region of Raman spectra owing to the PCEs in the 2D Si layer, we demonstrated that the incident laser polarization direction dependence of the Raman intensity deviates from the Raman selection rule. However, a photoluminescence (PL) method shows that the bandgap E_G expansion is isotropic in the 2D Si layer. In contrast, the E_G narrowing effects of n⁺ 2D-Si are much smaller than those of conventional 3D n⁺-Si, which is characteristic of 2D-Si. However, Raman spectroscopy shows that the PCEs are completely independent of the phosphorous dopant density of n⁺ 2D-Si. Consequently, it is very important to reconstruct future MOS devices composed of 2D-Si layers, considering the above 2D-Si characteristics of PCE and BSM.

Keywords: 2D-Si, phonon confinement, uncertainty principle, Raman spectroscopy, band structure modulation, photoluminescence, polarization, crystal direction, impurity dopant, CMOS, SOI, SOQ

序論

2 次元 Si (2D-Si) 構造は、極微細 SOI (silicon-oninsulator)、FinFET¹⁾ などの CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor) 素子、及び Si 光素子²⁾ に広く応用されている。CMOS における短チャネル 効果抑制や、光素子における光ルミネッセンス (PL) を増大するには、2D-Si 層厚 *Ts* を薄膜化し続ける必 要がある。また、高速 CMOS 素子実現には、(110) 面 CMOS や歪み Si 構造などの研究も進められてい る¹⁾。

2D-Si 層においては、電子の量子力学的閉じ込め 効果により、電子移動度劣化の議論がされている³⁾。 更に、2D-Si を含めた低次元 Si においては、バンド 構造が変調され、バンドギャップの増大も報告され ている⁴⁾。

一方、低次元 Si 構造(Si ナノワイヤー、Si ドッ

トなど)においては、量子的な閉じ込め効果による 第一次近似以外のフォノンも活性化される⁵⁾。その 結果、半導体素子におけるキャリアのフォノン散乱 確率が増え、キャリア速度の劣化も予想されている⁵⁾。

以上のように、2D-Siを含めた低次元 Si 研究は、 微細素子実現のための実用的な目的のみならず、種々 の量子的閉じ込め効果の実証という物性研究にとっ ても非常に重要である⁶⁻⁸⁾。

本稿では、2D-Si におけるフォノン閉じ込め効果 (phonon confinement effects: PCE) とバンド構造の 変調効果の結晶方位依存性、及び不純物原子の影響 の詳細を検討したので報告する^{9,10)}。また、PCE は UV ラマン分光法を用い、バンド構造の変調効果は PL 評価を用いた。

材料と方法

フォノン閉じ込め効果

一般的に、3D-Si においては、格子振動はフックの 法則に従って解析される¹¹⁾。その結果、光学フォノ ン波数 ω (光学フォノンエネルギー E_P に対応)の波 数ベクトル \vec{q} 依存性(分散曲線)を求めることがで きる。Siのフォノンの波数はラマン分光により求め ることができるが、Si ラマンピークの波数 520cm⁻¹ は、第1次近似的には 3D-Si における第一ブリュア ン領域での中心 Γ 点、即ち $\vec{q}\approx0$ での光学フォノン波 数に等しいことがわかっている¹¹⁾。

一方、低次元 Si 構造においては、Heisenberg の 不確定性原理により、 \vec{q} には不確定性 Δq が生じる ⁵⁾。2D-Si では、 $\Delta q \approx 1/T_s$ 程度になる。その結果、 $\vec{q}\approx 0$ 以外での Δq の範囲の波数ベクトルにおいて、 520cm⁻¹より低いラマン波数のフォノンも活性化さ れる。これを、フォノン閉じ込め効果と言う¹⁾。こ のように、微細構造での不確定性原理のような量子 効果現象を、ラマン分光ならば室温で観測可能とな る。

バンド変調効果

電子が微細な半導体中に閉じ込められると、量子的 閉じ込め効果により、半導体のエネルギーバンド構 造が変調する¹⁾。

例えば、PL評価から、(100)Siにおいては、(110) Siと異なり、間接遷移方型から直接遷移型に変調す ることがわかっている⁷⁰。

また、無限大の井戸型ポテンシャルに電子が閉じ 込められた場合、次式のように Si の禁制帯幅 E_G は、 T_s の薄膜化により増大することがわかっていってい る¹¹⁾。

$$E_G(T_S) = \frac{2h^2}{T_S^2} (m_L^{-1} + m_{HH}^{-1}) \,. \tag{1}$$

ここで、hはプランク定数、 m_{ℓ} (=0.98 m_{0})及び m_{HH} (=0.48 m_{0})は、それぞれ電子及び重い正孔の有効 質量である (m_{0} は電子質量)。

2D-Siの形成法

SOI 素子においては、 $T_s=L_{EFF}/3$ (L_{EFF} は素子のチャ ネル長)に従って薄膜化する設計だけで短チャネル 効果を抑制でき、その結果、SOI 素子は将来素子と しても非常に有望と言われている¹⁾。しかし、 T_s の 薄膜化を続けると、Si 格子定数程度まで薄膜化が進 み、SOI は 2D-Si 構造となり、現在の 3D-Si とは物 性が異なってくる³⁾⁻¹⁰⁾。従って、将来素子の特性を 予測するには、本研究のような 2D-Si 構造の物性を 解明する必要がある。 (100) 真性 2D-Si (2D i-Si) は、 膜厚 55nm の (100)SOQ (silicon-on-quartz) 基板を酸化法による薄 膜化工程により作製した⁹⁾。また、 $n^+(4 \times 10^{20}$ cm⁻³)) 及び $p(2 \times 10^{19}$ cm⁻³)2D-Si は、それぞれ膜厚 55nm 及び 10nm の (100)SOI 基板への不純物イオン注入 し、その後の酸化法による薄膜化工程により作製し た¹⁰⁾。 T_s 値は酸化時間により制御し、反射率スペク トル法により求めた⁶⁾。全ての構造は、2D-Si 層断 面の TEM 像より、均一且つ良好な結晶性を確認で きた。

フォノン特性は主に波長 325nm 又は 442nm のレ ーザー光を用いたラマン分光により評価した。また、 バンド構造は、エネルギー 2.33eV の励起レーザーを 用いた PL 法により解析した。

結果および討論

量子的閉じ込め効果の異方性®

フォノン量子的閉じ込め効果の結晶方位依存性

最初に、SOQにおけるフォノン閉じ込め効果(PCE) について議論する。

図 1(a) は、 T_s =1nm におけるラマンスペクトルで ある。PCE によるスペクトルの低波数側への非対称 性が見られる。PCE によるスペクトル幅増大効果を 解析するために、ラマンピーク強度の 1/10 になる 520cm⁻¹より低波数側及び高波数側のスペクトル幅 W_L 及び W_H を導入する。図 1(b)、(c) は W_L 及び W_H の原子層数 N_L 依存性である。ここで、dを原子間隔 とすると((100) 面では d=0.136nm) N_L = T_s/d +1 で与 えられる ⁷⁾。SOQ のラマン結果は SOI 構造のラマン 結果に一致しており、しかも励起レーザー波長に依 存しないこともわかる。

ここで、442nm 励起レーザーを使用したラマン偏 光測定におけるラマン散乱模式図を図 2 に示す。 $\vec{k_{I}}$ 及び $\vec{E_{I}}$ は入射レーザーベクトル及び偏光ベクトル である。 $\vec{k_{s}}$ 及び $\vec{E_{s}}$ は散乱光レーザーベクトル及び 偏光ベクトルである。 $\vec{E_{I}}$ と [011] 軸となす角を、 ϕ 、 $\vec{E_{I}}$ と $\vec{E_{s}}$ とのなす角を θ とする。すると、ラマン 選択則により、ラマン強度 I_{R} は次式で表される¹²⁾。

$$I_R \propto \sum_J \left| \overrightarrow{E_I} \mathbf{R}_J \overrightarrow{E_S} \right|^2, \quad (2)$$

ここで R」はラマンテンソルであり、次式で表される¹²⁾。

$$R_{x} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & d \\ 0 & d & 0 \end{pmatrix}, \quad R_{y} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & d \\ 0 & 0 & 0 \\ d & 0 & 0 \\ R_{z} = \begin{pmatrix} 0 & d & 0 \\ d & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad (3)$$



図 1. (a)442nm ラマン分光スペクトル結果 ($T_s=1$ nm). W_L ,及び W_H はそれぞれの低波数及び高波数側の幅. (b) W_L の N_L 依存性. (c) W_H の N_L 依存性. \bigoplus , \blacksquare はそれぞ れ 442nm 及び 325nm の SOQ データ, \blacktriangle は 325nm の SOI データである.



図 2. (100) 面 Si での偏光ラマン散乱の模式図. $\vec{k_l}$ 及び $\vec{E_l}$ は入射レーザーベクトル及び偏光ベクトルである. $\vec{k_s}$ 及び $\vec{E_s}$ は散乱光ベクトル及び偏光ベクトルである. $\vec{E_l}$ と Si 結晶方位の [011] となす角を ϕ , $\vec{E_l}$ と $\vec{E_s}$ とのなす角を θ とする.



図 3. 偏光ラマンスペクトル結果. $T_s=1$ nm. (a) $\phi = 0^{\circ}$ における θ 依存性. (b) $\theta = 0^{\circ}$ における ϕ 依存性.



図 4. ラマン強度の ϕ 依存性. ●及び■は θ =0°及び 90°の結果. 破線及び点線は理論結果(式(4)). (a) T_s =55nmにおける波数520cm⁻¹強度. (b) T_s =1nmに おける波数520cm⁻¹強度. (c) T_s =1nmにおける波数 480cm⁻¹強度.

ここで、dは F2g 対称における成分である。 (100)Si の場合、式 (2) は簡単に次式になる。 $I_R \propto \cos^2(2\phi + \theta)$ 。 (4) 本研究においては、式(4) のラマン選択則の



図 5. 偏光 PL スペクトル結果. $\phi = 0^{\circ}$ における θ 依存性. *Ts*=0.8nm.



図 6. 偏光 PL 結果の φ 依存性. *Ts*=0.8nm. ●及び■は θ =0°及び 90°の結果. (a)*E*_{PH}. (b)*I*_{PL}. 右縦軸は PL 偏光度.

2D-Siにおける成立の可否、特に PCE 領域の *I*_Rの 選択則の可否が重要な目的である。

図 3(a)、(b)は、膜厚 1nm の 2D-Si のラマン偏光

スペクトルのそれぞれ θ 及び ϕ 依存性である。ラマ ン強度は強い偏光を示し、 θ 及び ϕ の増加とともに、 I_R は、特に 520 cm⁻¹の強度は急激に減少することが わかる。一方、PCE 領域での I_R の低下は抑制されて いる。

これらの I_R の ϕ 依存性をまとめると図 4 のように なる。図 4(a)(b) に示すように、Si 膜厚が 56nm 及 び 1nm の一次ラマン散乱である波数 520 cm⁻¹ の I_R は、式(4)の理論値に完全に一致することがわかり、 2D-Si においてもラマン選択則は成立することがわ かった。一方、図 4(c) より、PCE 領域の波数 480 cm ⁻¹ での I_R は、理論値とは大きくずれているのがわか る。従って、PCE 領域のラマン光は、選択則には従 わないことが明らかになった。

PL 光の偏光特性

この節では、PL 光の偏光特性と、 E_G の 2D-Si にお ける変調特性について議論する。

PL 光の偏光特性の模式は、図 2 の $\vec{k_s}$ 及び $\vec{E_s}$ が PL 光のベクトル及びその偏光ベクトルを表している以外は、ラマン偏光と同様である。

図5は偏光 PL スペクトルン結果である。励起レ ーザーの偏光方向に平行の PL 光強度 *I*_{PL} のほうが垂 直方向の *I*_{PL} より大きく、PL 光は偏光していること がわかる。しかし、PL のピークエネルギー *E*_{PH} は偏 光によらず一定である。

図 6(a) は、*E_{PH}*の励起レーザーの偏光方向 φ 依存



図7.3D-Siにおけるエネルギーバンド模式図.HH及び LHはそれぞれ重い正孔,軽い正孔バンドを示す. に点 はブリュアン帯域の中心,L点は(111)方向の帯域端,X 点は(100)方向の帯域端を表す. E_1 及び E_2 はL点及び X点での光子の価電子帯から伝導帯への直接遷移間のエ ネルギー差を表す.

性である。 E_{PH} は ϕ によらず一定である。しかも、 PL 偏光角度にも依存していないことがわかる。

一方、図 6(b) は I_{PL} の励起レーザーの偏光方向 ϕ 依存性である。 I_{PL} も ϕ に依存しなく等方的である。 しかし、 $\theta = 0^{\circ}$ の I_{PL} は常に 90°より大きい、即 ち、実線に示すように、PL 光の偏光度 α は平均的に 約 0.07 程度である。ここで、

$$\alpha = \frac{I_0 - I_{90}}{I_0 + I_{90}} \quad (4)$$

 I_{b} 及び I_{90} はそれぞれ $\theta = 0^{\circ}$ 及び 90° の I_{PL} である⁹。 以上の PL 偏光度の結果から、PL 光は Si 結晶方 向依存する光学的に何らかの異方性、即ち、励起光 の吸収率、または、PL 発光効率の異方性に起因して いると思われる。一方、PL 偏光特性からは、 E_{G} の 異方性はないことが判明した。

反射率の変調効果:「点以外のバンド変調

PL 光により、 E_{G} の変調効果、即ち、 Γ 点でのバンド構造変調を観測できた。この節では、 Γ 点以外のバンド変調の議論を行う。

図7は、3D-Siにおけるバンド構造の模式図であ る。間接遷移型のSiにおいても、各点のバンドギャ ップより大きなエネルギーのUV光を照射すると、 直接遷移が可能となる。例えば、L点((111)方向の 帯域端)、及びX点((100)方向の帯域端)において は、価電子帯(重い正孔バンド)から伝導帯への直 接遷移が可能で、3D-Siの吸収率及び透過率スペク トルには、Ei及びE2のエネルギーにピークが生じる。 その結果、Ei及びE2の値から、それぞれのバンド ギャップを求めることができる。

図 8(a) は UV 領域での反射率スペクトルの T_s 依存性を示す。 $T_s \ge 1.9$ nm では、 E_I 及び E_2 のピーク が明白であり、しかも、その値が T_s とともに変動し ているのがわかる。図 8(b) は、 E_I 及び E_2 の T_s 依存 性を示す。 T_s の減少とともに、 E_I は増大し、 E_2 は 減少していることが判明した。従って、PL 法による 「点での E_G 変調のみならず、反射率分光により、 T_s < 10nm の 2D-Si では L 点及び X 点でのバンドエネ ルギー構造の変調も確認できた。

不純物原子の量子的閉じ込め効果への影響 10)

MOSFET には必ず pn 接合が必須である。従って、 不純物添加の 2D-Si 特性への影響の詳細を研究する 必要がある。

n⁺/p⁺2D-Si 作製には、それぞれ P⁺ 及び B⁺ イオン 注入による不純物添加と酸化法による Si 薄膜化が必 要である。しかし、Si 酸化時の P 及び B の酸化膜と Si との偏析係数が、それぞれ 10 及び 0.1 と大きく



図 8. (a) 反射率スペクトルの *Ts* 依存性. (b) *E*₁ 及び *E*₂ エネルギーの *Ts* 依存性.



図 9. 不純物濃度の T_s 依存性. 挿入図は、ボロン及びリンイオン注入後の Si 酸化による, Si 薄膜化製法を示す. 初期 T_s は、P⁺ 及び B⁺ 用に対してそれぞれ 55nm 及び 10nm である. また, P⁺ 及び B⁺ ドーズ量は, それぞれ 4 × 10¹³ cm⁻² 及び 3 × 10¹⁵ cm⁻² である.

違うため¹⁰⁾、Si薄膜化にともないSi中のPは増大し、 Bは減少する。

図 9 はプロセスシミュレータによる Si 中の P 及 び B 濃度の Ts 依存性である。予想通り、Ts の薄膜



図 10. ドープトSiのPLスペクトル. $T_s=0.5$ nm.



図 11. PL ピークエネルギーの T_s 依存性. \bullet , \blacksquare は、そ れぞれ n^+ , 及び p^- の結果. なお、▲は真性 Si の結果.



図 12. 禁制帯幅尖鋭化効果の不純物濃度依存性. ●, ■は、 それぞれ n⁺,及び p⁻の結果. 実線は 3D-Si における結 果¹¹⁾.



図 13. (a)*W*_L の *N*_L 依存性. (b) ラマンピーク波数低下の *N*_L 依存性. ●, ■は、それぞれ n⁺, 及び p⁻の結果. なお, ▲は真性 Si の結果.

化とともに、急激に P 濃度は増大し、B 濃度は減少 する。従って、1 × 10²⁰ cm⁻³ 以上の高濃度の n⁺2D-Si は形成は容易であり、 $T_s = 0.5$ nm において 1 × 10²⁰ cm⁻³ 及び 4 × 10²⁰ cm⁻³ 試料作製に成功した。し かし、p⁺2D-Si は高濃度化は困難のため今回は p⁻層(約 1 × 10¹⁹ cm⁻³)を実現した。

まず最初に、PL法による E_{G} 特性の議論を行う。 図 10 はPLスペクトルの不純物濃度依存性である。 ドープト 2D-Si においても PL 光は観察することに 成功した。しかし、PL 強度は高濃度の n^{+} において 劣化している。しかも、 E_{PH} は不純物添加されると、 多少、低下しているのがわかる。

また、図 11 は *Epu の Ts* 依存性である。真性 Si も 不純物添加 Si も *Epu* は、*Ts* の減少とともに、急激に 増大する。特に、真性 Si においては、次式で実験結 果を表すことができた。

 $E_{PH} = 1.85 - 0.25T_S. \quad (5)$

しかし、同じTsでは、不純物添加SiにおいてはEPH

が低下しているのがわかる。これは、3D-Si における不純物添加による *Ea*の尖鋭化現象と思われる¹¹⁾。

ここで、 E_G の尖鋭化 $\delta EG \ge \delta EG \equiv E_{PHI} - E_{PHD}$ で 定義する。 E_{PHI} 及び E_{PHD} は、それぞれ真性 Si 及び 不純物添加 Si の E_{PHI} である。

 δE_G の不純物濃度依存性を図 12 に示す。実線で 示した 3D-Si における δE_G (=18.7 $ln(N/7 \times 10^{17})$ 、 ここで N は不純物濃度)¹¹⁾ と比較して、2D-Si にお ける δE_G は数分の一に低下している。現在、この物 理機構は不明であるが、この 2D-Si 固有の特性を考 慮して新たな pn 接合構造を設計する必要がある。

次に、不純物原子による PCE への影響について議論する。図 13(a) は、真性 Si 及び不純物添加 Si における W_L の N_L 依存性である。不純物添加しても、 W_L の N_L 依存性は変わらないことがわかる。また、図 13(b) は、ラマンピーク波数の 520 cm⁻¹ からの低波数への変位 $\Delta \omega$ の N_L 依存性である。 $\Delta \omega$ 特性にも不純物添加の影響は無いことが判明した。以上の結果より、不純物原子による PCE への影響はないことが明確になった。従って、 1×10^{21} cm⁻³ 以下の不純物原子では、格子振動に影響を与えることは無いと言える。

まとめ

将来の微細素子用構造として有望な 2D-Si 構造にお ける量子閉じ込め効果の結晶方位依存性、及びその 不純物原子の影響の実験的研究を行った。

UV ラマン分光の偏光特性を測定することによっ て、2D-Si においても第一次近似ラマン光強度はラ マン選択則により説明できることが判明した。しか し、フォノン閉じ込め効果領域のラマン光強度は、 ラマン選択則からずれることが初めて実証された。

また、偏光 PL 法による E_G 値及び PL 強度は、結 晶方位によらず一定であることがわかった。しかし、 PL 強度は偏光していることも判明した。

一方、PL 法によって、不純物添加 2D-Si での E_g 尖鋭化効果は、3D-Si より小さいことがわかった。 しかし、フォノン閉じ込め効果への不純物原子の影 響はないことが判明した.

将来の CMOS 構築には、以上の結果を考慮した素 子設計、特に新 pn 接合構造が今後益々、重要となる。

謝辞

イオン注入に関して、理学部の中田穣治教授及び 星野靖特別助教に感謝いたします。本研究の一部 は、総合理学研究所共同研究助成金、及び科研費 (24560422)の援助を受けた。

文献

- Nazarov A, Colinge JP, Balestra F, Raskin JP, Gamiz F and Lysenko V. S. (2011) Semiconductor-On-Insulator Materials for Nanoelectronics Applications. Springer, Berlin.
- 2) Saito S, Sakuma N, Suwa Y, Arimoto H, Hisamoto D, Uchiyama H, Yamamoto J, Sakamizu T, Mine T, Kimura S, Sugawara T, Aoki M and Onai T (2008) Observation of optical gain in ultra-thin silicon resonant cavity light-emitting diode. In: *IEDM Tech. Dig.* Paper 19.5: pp.1-4.
- Uchida K, Koga J and Takagi S (2007) Experimental study on electron mobility in ultrathin-body silicon-on-insulator metal-oxide-semiconductor fieldeffect transistors. J. Appl. Phys. 102: 074510/1-8.
- Agrawal BK and Agrawal S (2000) First-principles study of one-dimensional quantum-confined Hpassivated ultrathin Si films. *Appl. Phys. Lett.* 77: 3039-3041.
- 5) Kumar V (2008) Nanosilicon. Elsevier, Amsterdam
- Mizuno T, Tobe K, Maruyama Y and Sameshima T (2012) Experimental study of silicon monolayers for future extremely thin silicon-on-insulator devices: phonon/band structures modulation due to quantum confinement effects. *Jpn. J. Appl. Phys.* 51: BC03 / 1-8.
- 7) Mizuno T, Aoki T, Nagata Y, Nakahara Y and Sameshima T (2013) Experimental study on sur-

face-orientation/strain dependence of phonon confinement effects and band structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **52** : 04CC13 / 1-8.

- 水野智久、青木 孝、鮫島俊之 (2013) 低次元シ リコン半導体構造の研究. 神奈川大学理学誌 24:17-24.
- 9) Mizuno T, Nagata Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Crystal direction dependence of quantum confinement effects of two-dimensional Si layers fabricated on silicon-on-quartz substrates: modulation of phonon spectra and energy-band structures. Jpn. J. Appl. Phys. 53: 04EC08 / 1-6.
- 10) Mizuno T, Nagata Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Crystal direction dependence of quantum confinement effects of two-dimensional Si layers fabricated on silicon-on-quartz substrates: modulation of phonon spectra and energy-band structures. Jpn. J. Appl. Phys. 53: 04EC08 / 1-6.
- 11) Sze SM and Ng KK (2006) *Physics of Semiconductor Devices*. Wiley, New York.
- 12) Mizoguchi K and Nakashima S (1989) Determination of crystallographic orientations in silicon films by Raman microprobe polarization measurements. J. Appl. Phys. 65: 2585-2590.

■原 著■

部分情報抽出に基づく Web サービス関数の自動生成法

肁 浩^{1,2}

Automatic Generation Methods of Web Service Functions Using Partial Information Extraction

Hao Han^{1,2}

¹ Department of Information Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: han@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: With the development of the Internet, Web service functions, such as search engine service functions and Map service functions, become more important and convenient for the integration of various services on the Web. Currently, however, most existing Web sites do not provide Web service functions. In this paper, a partial information extraction technology based method is proposed to automatically construct Web service functions from general Web applications quickly and easily. The experiment shows that this approach is applicable to various kinds of Web sites such as the BBC country profiles site and CNN news search site. *Keywords*: Web application, Web service function, information extraction

序論

今日では、Web上の情報サイトや検索サイトがWeb サービス関数を提供している場合、利用者はこれら の関数を利用する比較的簡単なプログラムを作成す ることで、さまざまなサービスを統合して活用する ことができる。しかし、現時点では多くのWebサイ トがWebサービス関数を提供していない。Webサ ービス関数を提供していないWebサイトの情報を他 のサービスと統合したい場合、必要な部分情報を獲 得するWebサービス関数を独自に作成する必要があ る。

例えば、BBC Country Profiles¹⁾から、ある国・ 地域の人口、面積、首都等の基本情報を獲得したい 場合、その国・地域の Web ページを取得し、目的の 部分情報の位置を特定して抽出し、その結果を返す Web サービス関数を作成する。また、CNN.com²⁾か ら、あるキーワードを含むニュース記事のタイトル や URL を獲得したい場合、CNN.com のニュース検 索を利用し、検索結果ページから目的の情報を抽出 し、その結果を返す Web サービス関数を作成する。 しかし、これらの Web サービス関数を作成するため には、プログラミンングや HTML 等の知識が必要で あり、さらに、人手による開発は多くの時間と労力 がかかる。

本論文は、Web サービス関数を持たない情報サイ トや検索サイトに対して、部分情報抽出技術に基づ くWeb サービス関数の生成法を提案する。この提案 手法により、利用者はプログラミングなしに個人的 なサービス統合に必要となるWeb サービス関数を自 動的に生成することができる。

本論文の以降の構成は次の通りである。「現状の問題点」では現状の問題点と関連研究について述べる。 「構造判定と部分情報抽出」では部分情報抽出技術で 必要となるページ構造の判定法と部分情報の抽出法 について述べる。「Web サービス生成法」では Web サービス生成法として、静的 Web サービス法と動的 Web サービス法について述べる。「討論」では本手 法を評価し、「結論」では結論を述べる。

方法と結果 現状の問題点 基本概念

Web サービスとは、HTTP などのインターネット関連技術を利用し、ソフトウェアの機能をネットワークを介して利用可能にするための技術であ

り、SOAP (Simple Object Access Protocol) と呼ば れるプロトコルや、REST (Representational State Transfer) と呼ばれるアーキテクチャスタイルを用い てメッセージの送受信を行う。複数の Web サービス を組み合わせることによってアプリケーションやサ ービスを構築するマッシュアップに用いられる。

HTML (HyperText Markup Language) は、Web ページの論理構造や見かけを記述する言語であ り、現在、多くのWebページで利用されている。 HTML の情報を考慮することで、外部プログラムに よってWebページ中の情報を解析できるが、XML (Extensible Markup Language)とは仕様が異なるた め、XML 文書を対象とした解析技術をそのまま利 用することができない。一方、XHTML (Extensible HTML) は、HTML を XML に準拠した仕様になる ように改良したものであり、XML 関連技術を容易に 適用することができる。Java 等の多くのプログラミ ング言語では、HTML 文書を XHTML 文書に変換 するためのライブラリが提供されており、これによ り、HTML 文書でも XML 関連技術を適用すること が可能となっている。

XPathは、XMLに準拠した文書の特定の部分を 指定するための言語構文であり、以下のような形式 で表現する。

BODY:0/FORM:1/TABLE:2

これは、ノード <body> の 2 番目の子ノードである
<form> の 3 番目の子ノードである を表す。

関連研究

従来の部分情報抽出や Web サービス生成は、人手に よる HTML 文書の分析やプログラミングを必要とし たり、対象とする Web ページやデータの種類が限ら れていたりする。

Web Service Gateway³は、Webページから特定 の情報を抽出して返すWebサービス関数を提供す るためのラッパー・システムである。これは複数の HTML 構造解析用プラグインを持ち、ユーザはその 中から目的のページの解析に最適なプラグインを選 択する。しかし、どのプラグインが最適であるかを 判断するためには、各プラグインの内容を知ってい る必要がある。自分でプラグインを作成することも できるが、その場合には高度な知識を必要とする。

GridXSLT⁴⁾は、グリッドコンピューティング環 境における大規模な並列処理のためのXSLT言語で あり、このXSLT文書を利用してWebサービスを生 成する。しかし、この手法は、人手によるプログラ ミングと配置ファイルの記述が必要である。H2W⁵⁾ も同様である。

Pollock⁶⁰は、Webページのフォーム送信機能を分析し、動的なWebサービスを生成する。この手法は、 XWrapを使ってラッパーを生成し、Webサイトの 関連情報を使ってWSDLファイルを生成する。しか し、人手によるHTML文書(フォーム送信機能)の 分析が必要である。

HTML2RSSⁿは、時系列情報を記述するWebペ ージ中の日付表現とタイトルを抽出し、RSSを自 動的に生成する。しかし、この手法が対象とする Webページは、ブログ、BBS、チャット、メーリ ングリストのように、類似した構造が連続して出現 するページに限られている。Query-interface-based extraction⁸⁾も同様である。

これらの従来手法に対し、我々の手法は、人手に よるプログラミングを必要とせず、また、一般的な Webページの中のテキスト、画像、リンクなどの様々 なデータを抽出対象とする。

構造判定と部分情報抽出

提案手法は、大きく分けて、ページ構造解析と部分 情報抽出の2つの部分から構成される。

ページ構造の判定法

「現状の問題点」で述べたように、HTML 文書の内 容を直接解析することは容易ではない。そこで、我々 は、Java のライブラリである HTMLParser ⁹⁾ を利 用して HTML 文書を XHTML 文書に変換し、木構 造として扱う。例えば、<h1>タグのように開始タグ と終了タグを対で使用するタグがある場合、そのタ グに相当するノードは、間にはさまれた XHTML 文 字列が表す1つ、ないし複数の構造木の根ノードの 親ノードとなる。HTML 文書では、開始タグと終了 タグの対で使用されるべきタグの一方が欠落してい たり、2組のタグが交差していたりすることがある が、HTMLParser は、適当な位置にタグを追加した りすることで、どのような HTML 文書であっても必 ず XHTML 文書に変換する。
 タグのように終 了タグを持たず単独で使用するタグの場合は、その タグに相当するノード1つのみで構成される構造木 となる。また、XHTML タグを含まない文字列の場 合も、テキストノード1つのみの構造木となる。

ページ構造の判定はこの構造木を利用して行うが、 ページ内には注釈やメタデータ等のクライアント側 では表示されない情報や、JavaScriptやJavaアプ レット等のクライアント側で実行されるプログラム を含む部分の情報が存在する。クライアント側で表 示されなければユーザはそれを視認できないため、 クライアント側で表示されない情報は、部分情報抽 出の対象から除外する。また、クライアント側で実 行されるプログラムを含む部分は、実行結果に影響 を与える部分が複数箇所に点在している可能性があ り、抽出は困難であるため、これも対象から除外する。

部分情報抽出の対象外の情報は、ページ構造の判 定を行う前に構造木から除去する。その処理は以下 の手順で行う。

- 1. 以下に示す抽出対象外の部分を削除する。
 - クライアント側で実行されるプログラム (例:<script>、<applet>)
 - 注釈 (例:<comment>、<meta>)
 - ・ 隠し項目 (例:<input type="hidden">)
 - クライアントイメージマップ(例:<map>、<area>)
 - ・ 改行 (

 //>)
- 以下に示すノード以外の葉ノードを削除する。
 - ・ テキストノード (#text)
 - 画像、オブジェクトノード(、
 <object>)
- 3. 新たに削除可能なノードが出現する限り、2 を繰り返す。

ページ構造の類似性の判定は、その構造木が持つ 葉ノードの数をN個とした場合、√N個程度の部分 木に分割し、全体木の根ノードから各部分木の根ノ ードへ至るXPathの集合を用いて行う。この集合を レイアウトパターンと呼ぶ。2つのページのレイア ウトパターンが類似しているとき、その2つのペー ジの構造は同じであると判断する(レイアウトパタ ーンの類似性については、次の「部分情報の抽出法」 で述べる)。

レイアウトパターンを上述のように決定する理由 について述べる。対象となるページの構造木が深さ mの完全なn分木であると仮定する。このとき、葉 ノードの数は n^m 個であり、 $\sqrt{n^m} = n^{\frac{n}{2}}$ は、深さ $\frac{n}{2}$ の位 置にある中間ノードの数に相当する。根ノードから この $n^{\frac{n}{2}}$ 個のノードへ至る XPath の集合をページ構 造の判定に利用するということは、すなわち、全体 木の上半分の構造を、そのページの構造を特徴づけ る部分とみなすということである。我々は、全体木 の上半分の構造が、ページ構造の類似性の判定に適 していると考えている。

レイアウトパターンは以下の手順で取得する。

- 全体木の葉ノード数の平方根を Nmax とする。
- 2. 全体木の根ノードを指す XPath のみからな る集合 L を用意。

- Lから、自分より下にある葉ノード数が最大のノード(複数ある場合は先頭に最も近いノード)を指す XPath p を取り出す(L = L)
 b)とする)。
- *p*が指すノードの子ノードを指す XPath の集合を L'とする。
- IL|+|L'|≤Nmax ならば、L=L ∪ L'とし、 3に戻る。
- 6. L U 砂をレイアウトパターンとする。

例えば、BBC Country Profiles の Japan のページ(葉ノード数 344 個)に対して上述の手法を適用 すると、図1のような15 個の XPath の集合が得ら れる。Japan のページのレイアウトの概略は図2の とおりであり、破線で囲まれた部分が、レイアウト パターンの各 XPath に対応する部分を示す。

レイアウトパターンには 15 個の XPath があるが、

<pattern></pattern>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:0/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:1/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:2/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:4/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:5/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:6/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:7/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:8/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/IMG:9/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:3/TABLE:0/TR:0/TD:0/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:3/TABLE:0/TR:0/TD:1/TABLE:0/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:3/TABLE:0/TR:0/TD:1/TABLE:1/TR:0/</p>
<p>BODY:0/DIV:0/DIV:3/TABLE:0/TR:0/TD:1/TABLE:1/TR:2/</p>
$<\!\!P\!\!>\!\!BODY\!:\!0/\!DIV\!:\!0/\!DIV\!:\!3/TABLE\!:\!0/TR\!:\!0/TD\!:\!1/TABLE\!:\!1/TR\!:\!1/TD\!:\!1/\!<\!\!/P\!\!>$
$<\!\!P\!\!>\!\!BODY\!:\!0/DIV\!:\!0/DIV\!:\!3/TABLE\!:\!0/TR\!:\!0/TD\!:\!1/TABLE\!:\!1/TR\!:\!1/TD\!:\!0/\!<\!\!/P\!\!>$



図 1. BBC Country Profiles のレイアウトパターン.

図2. BBC Country Profiles のレイアウトと分割結果.
図2で破線に囲まれた部分は13個しかない。残り の2つのうちの1つは、スタイルシートの設定によ り非表示となっており、スタイルシートに対応して いないブラウザでのみ表示される部分である。もう 1つは ノードであるが、width 属性と height 属性のどちらの値も0であり、src 属性で指定されて いるファイルも通常の画像ファイルではなく、ブラ ウザ上ではどの部分に対応しているかが分からなか った. Japan のページの構造木の深さは最大で19、 平均で11であるのに対し、獲得したレイアウトパタ ーン中の XPath の深さは最大で9、平均で5であっ た。これより、確かに全体木の上半分程度の構造が レイアウトパターンとして獲得できていることが分 かる。

部分情報の抽出法

抽出部分の指定は、レイアウトパターンごとに、ブ ラウザ上に表示されたページを見ながら、マウスで クリックすることにより行う。すると、全体木の根 ノードからクリックされた位置に相当するノードへ 至る XPath が得られる。その後、選択した部分のデ ータ名とデータ型を入力し、現在表示中のページの レイアウトパターンのための抽出パターンとして保 存する。データ型には単一テキスト、連続テキスト、 単一オブジェクト、連続オブジェクト、単一リンク、 連続リンクの6種類がある。「単一」の場合、選択し た部分だけを抽出対象とするが、「連続」の場合は、 選択した部分だけでなく、その周辺部分も抽出対象 とする。これは、複数段落にまたがる長文を抽出対 象としたい場合等に使う。抽出方法は後述する。

部分情報の抽出手法の説明の前に、XPathの類似 性とレイアウトパターンの類似性を定義する。2つ のXPath $P_1 \ge P_2$ があるとき、 P_1 中のすべてのノー ドの名前、ID 属性の値、親子関係が P_2 中のすべて のノードと完全に一致し、各ノードの兄弟関係の順 位の誤差が±1以内であるならば、 $P_1 \ge P_2$ は類似し ていると呼ぶ。例えば、 P_1 が以下のような XPath で あったとする (o_n は兄弟関係の順番、idn は ID 属性 の値を表す)。

BODY:0:id/t1:o1:id1/t2:o2:id2

このとき、P²が以下のような XPath ならば、P¹と 類似している。

BODY:0:id/t₁:o'_1:id_1/t_2:o'_2:id_2

$o_n - 1 \le o'_n \le o_n + 1 \ (n \in \{1, 2\})$

レイアウトパターンの類似性は次のように定義する。 2 つのレイアウトパターン *L*₁ と *L*₂ があるとき、*L*₁ 中の各 XPath について、それと類似した XPath が *L*₂ 中に存在するならば、*L*₁ は *L*₂ に類似していると 呼ぶ(レイアウトパターンの類似性は非対称である)。

各ノードの兄弟関係の順位の誤差を許容すること により、広告の有無等、ページ間の微妙な違いを吸 収することができる。もし誤差を許容しないと、少 し違うだけでもレイアウトパターンが異なると判断 され、ユーザの作業(抽出したい部分情報の位置の 指定)の増大を招く。一方、たとえ位置が少し変化 したとしても、タグ名や ID 属性値は変化しない。 タグ名や ID 属性値の違いを許容しないのはそのた めである。

部分情報の抽出は以下の手順で行う。

- 1. 対象ページのレイアウトパターン L1 を取得
- 2. L₁ が類似しているレイアウトパターン L2 に 対応する抽出パターンを用意
- 3. 抽出パターンを利用して部分情報を抽出

目的の部分情報の抽出は、XPathの類似性を利用 して行う。データ型が単一テキスト、単一オブジェ クト、単一リンクである場合、その抽出パターンの XPath について、その先頭のノードから順に比較し ,抽出対象のノードを特定する。その際、兄弟関係の 順番は、完全一致、-1、+1の優先順位で同一のタグ 名と ID 属性値を持つノードを探索する。部分情報 抽出の段階においても、XPathの各ノードの兄弟関 係の順位の誤差を許容することにより、微妙な変化 を吸収できる。

データ型が連続テキスト、連続オブジェクト、連 続リンクである場合、抽出対象のノードを特定した 後、さらにその周辺のノードを以下の手順で探索す る。

- 1. 特定したノードの親ノードをNとする。
- 特定したノードの XPath について、Nから上の部分は兄弟関係の順番も含めて完全に一致し、下の部分は兄弟関係の順番以外が一致するノードを探索。
- 自分自身を含めて2つ以上のノードが見つかったら、それらを連続ノードとする。自分自身以外に見つからず、Nが全体木の根ノードならば、連続ノードは存在しないと判断。それ以外の場合は、Nの親ノードを新しいNとして、2に戻る。

例として、BBC Country Profiles から国名、地図、 基本情報、首脳の写真を抽出する場合と、CNN.com のニュース検索結果ページからニュースタイトル、 ニュース記事 URL を抽出する場合を挙げる。

BBC Country Profiles からの情報抽出は以下のようになる。

 BBC Country Profiles から適当な国・地域ペ ージを1つ選び、以下の部分を選択してデー タ名とデータ型を入力。

- 国名 (CountryName、単一テキスト)
- 地図(CountryMap、単一オブジェクト)
- 基本情報(Facts、連続テキスト)
- ・ 首脳写真 (LeaderPicture、単一オブジェク
 ト)
- 各部分の XPath とデータ型を利用し、部分情報を抽出。抽出結果は XML で記述(図3)。

```
<result>
<item>
<item>
<ink>Page URL</ink>
<CountryName>Country name</CountryName>
<CountryMap>URI of the country's map</CountryMap>
<Facts>
Pasic information 1
Pasic information 2
Basic information 3
</re>
</re>
</re>
</re>
</re>
</re>
</re>
</re>
```

図 3. BBC Country Profiles からの抽出結果.

CNN News のニュース検索結果ページからの情報 抽出は以下のようになる。

- CNN News のニュース検索結果ページから、 以下の部分を選択してデータ名とデータ型を 入力。
 - ニュースタイトル (NewsTitle、連続テキスト)
 - ニュース記事 URL (NewsLink、連続リンク)
- 各部分の XPath とデータ型を利用し、部分情報を抽出。抽出結果は XML で記述(図4)。

result>
<item></item>
<newstitle></newstitle>
Title 1
Title 2
<newslink></newslink>
News page URL 1
News page URL 2
/result>

図 4. CNN 検索結果ページからの抽出結果.

Web サービス生成法

Web ページには大きく分けて2種類がある。1つは、 リンクをたどったりドロップダウンリストから項目 を選択したりすることで得られ、ユーザのリクエス トによってページの内容やURLが変化しない静的 ページ、もう1つは、ユーザがテキストフィールド 等に必要事項を入力しサブミットボタンを押すこと で得られ、入力した内容によってページの内容が変 化する動的ページである。本節では、静的ページと 動的ページそれぞれについて、部分情報抽出に基づ く Web サービスの自動生成法を述べる。

静的 Web サービス法

静的ページからの部分情報抽出に基づく Web サービ スは、あらかじめ対象となる全てのページから必要 な部分情報を抽出してデータベースに保存しておき、 そのデータベースに対して問い合わせを行うことで 実現する。生成手順は以下のとおりである。

- 1. 抽出対象の静的ページ集合を取得。
- 適当なページを取り出し、部分情報の抽出パ ターンを作成(図 5(1)、(2))。
- 抽出パターンを利用して静的ページ集合から 部分情報を収集し、データベースに保存(図 5(3))。
- Web サービスに対する入力を SQL 文に変換 してデータベースに送り、結果を XML でユ ーザに返すように、Web サービスのインター フェースを設定(図 5(4)、(5)、(6))。



図 5. 静的 Web ページを対象とした Web サービス生成.

生成した Web サービスはデータベースに保存され た情報を利用するため、抽出元のページの内容が更 新されると、データベースの内容との間で不整合が 生じる。抽出元の情報との整合性を保つため、Web サービスを生成する際には、抽出対象の情報の特性 に応じてデータベースの更新間隔を設定する。

例として、BBC Country Profiles が提供する各国・ 地域の情報を利用し、国・地域名を入力として与え るとその国・地域の基本情報を返す Web サービスを 挙げる。BBC Country Profiles のトップページには 国・地域名を列挙したドロップダウンリストがあり、 ユーザが目的の国・地域名を選択することによって その国・地域の情報を閲覧できる。Web サービス作 成者は、以下の手順で Web サービスを生成する。

- ドロップダウンリストを解析し、国・地域名 とその国・地域の情報が掲載されている Web ページの URL を収集。
- 収集した Web ページから適当なページを選択し、前節で述べた手順に従って抽出したい情報(例えば正式名称、首都名、人口、首脳の写真、国旗画像等)に対応する抽出パターンを作成。
- 3. 作成した抽出パターンを利用して全てのペー ジから必要な部分情報を抽出し、データベー スに保存。
- 国・地域名を入力として受け取ってそれを SQL 文に変換してデータベースに送り、結果 を XML で返すように、Web サービスのイン ターフェースを設定。
- Web サービスが出力する結果の例を図6に示す。

<item>

```
k>http://news.bbc.co.uk/1/hi/world/asia-pacific/country_profiles/1258586.stm
```

pan_map203.gif</CountryMap

<Facts>

Full name: Japan

Population: 127.9 million (via UN) Capital: Tokyo

Area: 377,864 sq km (145,894 sq miles)

```
Major language: Japanese
```

Major religions: Shintoism, Buddhism

- Life expectancy: 79 years (men), 86 years (women)
(UN)
- Monetary unit: yen

```
GNI per capita: US $37,670 (World Bank)
Internet domain: .jp
```

```
International dialling code: +81
```

```
</Facts>
```

```
</item>
```

図 6. 地域の基本情報を返す Web サービスの出力結果例.

動的 Web サービス法

動的ページからの部分情報抽出に基づく Web サービ スは、実行されるたびに入力された情報を Web アプ リケーションに送信し、受信した結果ページから目 的の部分情報を抽出する。生成手順は以下のとおり である。

人手により適当な入力をWebアプリケーションに与え、結果ページを取得(図7(1))。

- 2. 部分情報の抽出パターンを作成 (図 7(2))。
- Web サービスに対する入力を対象となる Web ア プリケーションへのリクエストデータに変換し て送信し、結果ページから抽出した情報を XML でユーザに返すように、Web サービスのインタ ーフェースを設定(図 7(3)、(4)、(5)、(6))。



図 7. 動的 Web ページを対象とした Web サービス生成.

Web アプリケーションへのリクエストデータの送 信のエミュレートには、HtmlUnit¹⁰を利用する。

例として、CNN.com が提供するニュース検索機 能を利用し、キーワードを入力として与えると該当 するニュース記事のタイトルや記事ページへのリン クを返す Web サービスを挙げる。Web サービス作 成者は、以下の手順で Web サービスを生成する。

- 人手により適当なキーワード(例えば、 "Tokyo"等)でニュース検索を行い、検索結 果ページを取得
- 前節で述べた手順に従って、検索結果ページ 中のニュースタイトル、記事ページへのリン クに対応する抽出パターンを作成

```
<result>
</result>
```

図 8. CNN ニュース検索 Web サービスの出力結果例.

- キーワードを入力とし、作成した抽出パター ンによって検索結果ページから目的の部分情 報を抽出して XML で返すように、Web サー ビスのインターフェースを設定
- Web サービスが出力する結果の例を図8に示す。

討論

部分情報抽出手法の評価を行うため、US版 Yahoo のトップページに表示されているニュース記事リン ク先のページ、CNN.comのトップページの"Latest News"に表示されているニュース記事リンク先の ページ、BBC Country Profilesの各国・地域の情報 ページを収集した。Yahoo と CNN.com はニュース タイトルと記事本文、関連写真を、BBC Country Profiles は国・地域名、地図、基本情報、首脳の写 真を抽出対象とした。

レイアウトパターンの獲得に使用したページ数 と、それにより類似ページと判断されたページ数を 表1に示す。いずれの場合も、1つのレイアウトパ ターンで大半のページに対応できる。Yahoo News、 CNN.com の場合、2ページが1つ目のレイアウト パターンでは類似ページと判断されなかった。BBC Country Profiles の場合は37ページが残ったが、さ らに2つのページからレイアウトパターンを獲得す ることにより、全てのページが3つのレイアウトパ ターンのいずれかに対応すると判断された。

それぞれのページからの各部分情報の抽出結果を 表2に示す。Yahoo と CNN.com のニュース記事本 文は、すべてのページから正しく抽出できた。ニュ ースタイトルは、Yahoo のページからはすべて正し く抽出できたが、CNN.com では、メインタイトル

表1. レイアウトパターン数と対応ページ数

+ 1 1	스러~	パターン数			
94 1		1	2	3	
Yahoo	76	74	75	76	
CNN.com	31	29	30	31	
BBC Country Profiles	267	230	259	267	

表2. 各部分情報の抽出結果

地図

基本情報

首脳の写真

		Yal	100	CNN.com			
		成功	失敗	成功	失敗		
1	タイトル	76	0	30	1		
	本文	76	0	31	0		
	写真	64	12	25	6		
	BBC Country Profile						
成功					失敗		
玉	·地域名		267		0		

255

239

244

12

38

23

ではなく、その直前にあるサブタイトルを抽出した ページが1つあった。抽出箇所の指定に使用したペ ージにはサブタイトルがなく、そのメインタイトル の位置と同じであったことが原因である。写真は、 Yahooの12ページ、CNN.comの6ページについ て、目的とは異なるものを抽出した。BBC Country Profilesでは、国・地域名はすべて抽出できたが、 地図は12ページ、基本情報は28ページ、首脳の写 真は23ページについて、目的とは異なるものを抽出 した。目的の情報がそのページに存在しなかったり、 異なる位置にあったりしたことが原因である。

本実験では、各サイトにつき3ページずつについて抽出箇所を指定するだけで、残りの全てのペ ージから情報を抽出できた。その際、我々の手法では、ユーザの手動操作によるHTML構造の解析や XPathの記述の必要はなく、その知識を持たないユ ーザでも容易に使用できる。

結論

本論文では、Web ページからの部分情報の抽出手法 と、それを利用した Web サービス関数の自動生成法 を提案した。我々の手法の特徴は以下のとおりであ る。

- 適用対象を一部のWebページやデータに限 定せず、一般的なWebページのテキストや リンク、画像等のあらゆるデータを抽出可能 である。
- ユーザが行うべき操作は、GUIによる抽出 箇所の指定のみである。レイアウトパターン の獲得、指定箇所を特定する部分情報パス (XPath)の生成、部分情報の抽出はすべて自 動で行われるため、ユーザはプログラミング やHTMLの知識を必要としない。
- レイアウトパターンと部分情報パスの類似性 を利用することにより、1つのレイアウトパ ターンや抽出パターンで対応可能なページの 範囲が広がる。これにより、ユーザの作業量 を減らすことができる。
- 我々の Web サービス関数の生成手法は、静 的 Web ページだけでなく、Web アプリケー ションが動的に生成する Web ページにも適 用可能である。

我々の手法は、JavaScript等のクライアント側で 実行されるプログラムが出力する動的データを扱え ない。今後、動的データの抽出も可能となるように、 本手法を拡張したい。

謝辞

東京工業大学徳田研究室のご協力を心より感謝申し 上げます。

文献

- BBC Country Profiles. http://news.bbc.co.uk/2/ hi/country_profiles/default.stm
- 2) CNN. http://www.cnn.com.
- 3) Huy HP, Kawamura T and Hasegawa T (2005) How to make Web sites talk together-Web service solution. In: *The Proceedings of the 14th International Conference on World Wide Web*. pp.850–855.
- Kelly PM, Coddington PD and Wendelborn AL (2006) A simplified approach to Web service development. In: *The Proceedings of the 2006 Australasian Workshops on Grid Computing and Eresearch*. pp.79–88.

- Tatsubori M and Takashi K (2006) Decomposition and abstraction of Web applications for Web service extraction and composition. In: *The Proceedings of the 2006 International Conference on Web Services.* pp.859–868.
- 6) Lu YH, Hong Y, Varia J and Lee D (2005) Pollock: Automatic generation of virtual Web services from Web sites. In: *The Proceedings of the 2005 ACM* symposium on Applied Computing. pp.1650–1655.
- Nanno T and Okumura M (2006) HTML2RSS: Automatic generation of RSS feed based on structure analysis of HTML document. In: *The Proceedings* of the 15th International Conference on World Wide Web. pp.1075–1076.
- Han H (2014) Extracting news from server side databases by query interfaces. Comp. Info. Syst. 54(2): pp.57-65.
- 9) HtmlParser. http://htmlparser.sourceforge.net/
- 10) HtmlUnit http://htmlparser.sourceforge.net/

■原 著∎

ファイル共有サービスの形式アシュランスケース -事例研究-

木下佳樹 1.2 武山 誠1 平井 誠1 湯浅能史1

A Formal Assurance Case for a File Sharing Service \sim Case Study \sim

Yoshiki Kinoshita^{1, 2}, Makoto Takeyama¹, Makoto Hirai¹ and Yoshifumi Yuasa¹

¹ Department of Information Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University Hiratsuka City, Kanagawa 219-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: yoshiki@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Assurance cases have been developed and maintained for many systems based on confidence of the stakeholders. The stakeholders have various fields, special knowledge, preconditions and vocabularies. This makes the confidence unclear and unstable. We propose a formal assurance case to clarify the context. In this paper, we attempt to picture a sample formal assurance case. We made the definition of the life cycle of a file sharing service. It consists of not only the system but also the process for developing, operating, maintaining, achieving accountabilities and making agreements. We also tried to describe the formal assurance case using the Agda system, which is used for checking consistency of definition and logic.

Keywords: assurance case, dependability, security, maintainability, reliability, validation

序論

システムおよびその開発・運用体制が、複雑で大規 模化した現代において、さまざまな環境の変化やシ ステムへの要求の変化に対応し、想定外および想定 内の障害に対応して、安全で安心なサービス継続が 求められている。そのためには、システムやサービ スに関係する関係者すべてが、なぜ、何に対して、 だれが、いつ、どこで、どのように、対応するのか、 予め議論し、合意し、準備しておくことが、重要で ある。その前提として、共通の言葉を使い、誤解や 勝手な解釈がはいらないよう、明確に定義しておか なければならない。我々は、こうした活動のツール として、形式アシュランスケースを提案し、その実 証実験として、ファイル共有サービスにおける形式 アシュランスケースの記述を行った。本稿では、形 式アシュランスケースと記述実験の概要を説明し、 形式アシュランスケースを用いることにより、環境 の変化に起因するアシュランスケースの不整合の検 出が容易になることを示す。

最初に、形式アシュランスケースとその構築方法 の概要を説明する。

次に、アシュランスケースを記述することにより、 開発・運用を一体として、変化対応と障害対応を推 進する DEOS プロセスを紹介し、標準的なプロセス

および実施組織構成との対応関係を明確にし、形式 アシュランスケース記述の前提となる一般的な用語 と前提知識の定義を与える。

そして、本記述実験の概要を説明し、その全体の ライフサイクルを構成する各プロセスの内容、成果 物および実施者と、それらの相互の関係を明確にし、 本記述実験で必要とする、より具体的な用語や前提 知識を体系化したオントロジーを定義する。

その後、定義されたオントロジーを用いて、本実 験の対象としたファイル共有サービスのシステムお よびプロセスが適切に構成されていることを確信す るための、システムおよびプロセスについての議論 を示す。

最後に、数学の証明記述とその支援に用いられる Agda 言語を用いた、ファイル共有サービスについて の形式アシュランスケースの実例を説明し、その効 果を示す。

結果と討論 形式アシュランスケースと構築方法 形式アシュランスケースの概念

複雑で大規模なシステムを上位レベルの概念から下 位レベルまで詳細に論じるアシュランスケースは、

それ自体、多くの分担者によって作成され更新され る複雑で大規模な文書である。この文書の整合性を 検査し確保する技術は、アシュランスケースに基づ いて適切さを達成するうえで本質的に重要な課題と なる。人間が注意深く読んでチェックする、いわゆ るレビューだけではアシュランスケースの整合性検 査は難しい。

整合性検査は、アシュランスケースの作成だけで なく保守においても鍵となる。システムや環境や要 求などの変化に応じてアシュランスケースを部分的 に変更する際には、全体の整合性が失われないよう にしなければならない。本節では、機械的に整合性 を検査できるアシュランスケースの記述方式、形式 アシュランスケース¹⁾について説明し、それに基づ いたアシュランスケース整合性検査ツール D-Case in Agda^{9), 10)} を紹介する。

GSN^{5), 6)}、CAE³⁾、Toulmin モデル¹²⁾等は、アシ ュランス議論の構造を議論の構成要素の種別(ゴー ルノード、ストラテジノード等)と要素間の関係で 定式化する。

しかし、議論の整合性は議論要素の種別だけでは 検査できない。要素の内容に立ち入り、内容記述の 土台となる用語や前提知識を体系化したオントロジ ーを明確にして整合性検査の基準とする必要がある。 このオントロジーは、システムや環境を構成する物 には何があるか、要求や制約、仮定として考慮する 性質や関係はどんな事柄か、それらの成否を知る方 法は何か、を示してアシュランス議論の枠組みを定 めるものである。このオントロジーの対象には、ゴ ールを記述するのに必要な概念、概念の間の関係や 仮定、システムや環境などの議論の対象物、議論の 中で使うことにした推論原理、等が含まれる。

GSN、CAE 等は、オントロジーの定義を議論の構

成要素として明確に定式化していない。オントロジ ーの一部は自然言語によって文書のあちらこちらで 説明され、また一部は暗黙裡に読者に了解されるも のとされる。このため、議論の整合性は全てレビュ ーによって人間が総合的に判断するしかない。レビ ュアーによって整合性の判断基準が異なってもその 相違を検出することも難しい。機械的な整合性検査 には、基準となるオントロジーの明確な定式化が不 可欠である。

形式アシュランスケースは、「理論部分」と「議論 部分」の二つからなる。理論部分は、オントロジー を一定の形式論理体系における形式理論として明示 する。議論部分は、この形式理論における形式証明 としてアシュランス議論を与える。整合性検査は、 議論部分がこの形式理論における形式証明として文 法的に正しいか否かの機械的検査に帰着される。

理論部分は、アシュランスケースの書き手の頭 の中にあるオントロジーを議論から参照する際の インターフェースを、読み手と機械に対して具体 的に与えるものといえる(図1)。また、理論部分 は、数理モデルとしての解釈を通じて妥当性確認の 対象となる。書き手の頭の中のオントロジーの妥当 性を直接確認することはできない。さらに、記述と してデータ化された理論部分は、妥当性を維持する ための操作の対象となる。新事実が判明してそれ までのオントロジーに矛盾が生じた場合に、truth maintenance アルゴリズムを通じて概念語彙を細 分化して矛盾を解消したり、あるいは現実自体の 変化に対応して語彙・公理を追加・削除する belief revision を実施したりするなどが考えられる。従来 の形式手法では、理論をひとつ枠組みとして固定し、 その中での検証を主眼とすることが多かったが、理 論部分をデータとして持つ形式アシュランスケース



図 1. アシュランスケースとオントロジー. a. 自然言語ベースのアシュランケースにおけるオントロジー. b. 形式 アシュランケースにおけるオントロジー.

は、枠組みが変化することを想定した定式化といえ る。

D-Case in Agda は、「命題は型、証明はプログラム」 という構成的型理論の考えにもとづくプログラミン グ言語 Agda を用いて形式アシュランスケースの記 述と検査を実現するツールである。理論部分は型や 関数を定義するライブラリとして、議論部分はそれ を用いたプログラム(つまり証明)として記述され、 整合性検査はプログラムの型検査に帰着される。数 理論理学で通常考えられる形式論理体系の記述では、 実用的に書き下せる形式理論・形式証明は小規模な ものに限られるが、プログラミング言語の機能を用 いることで、より実際的な規模と複雑さでの記述が 可能となる。

形式アシュランスケースの構築方法

以下のような手順で、形式アシュランスケースを構 築することができる。

- 語彙の抽出。当該システムおよびプロセスを 記述するための語彙を決定し、アシュランス ケースではもっぱらこの語彙を用いる。語彙 の決定には、その意味も含まれるので、前提 条件や環境も語彙の決定により決まってしま う。
- 証憑の収集。アシュランスケースに用いる証 憑を集める。
- 3) トップレベルクレームを決定する。
- 1)で決定した語彙を用い、2)の証憑に基づいて3)を示すための議論部分の記述を試みる。
- 5) 4)の過程で十分な議論が展開できなかったり、証憑の不足が認められた場合には、語彙や証憑の集まりを再検討し、3)に戻る。環境やニーズの変化によるシステム変更が行われた時も語彙や証憑を再検討して3)に戻る。

本稿は、上記手順に沿って、形式アシュランスケ ースの一記述実験の過程を説明する。次節では、本 実験に必要な語彙の一部である DEOS プロセスにつ いて説明する。

DEOS プロセス

Open Systems Dependability

大規模化・複雑化する現代のシステムでは、動作環 境や提供するサービスへの要求をどこまで把握して 管理すべきか、その境界は曖昧であり、開発時にシ ステムの正確な仕様を定めることはますます困難に なってきている。また、仮にこれを定めても、環境 や要求は頻繁に変化し、それに対応するためサービ スやシステムの変更を余儀なくされることも多い。 現代的なシステムの、このような特徴に注目する立 場を開放系の立場 (*Open Systems viewpoint*) と呼ぶ。 開放系の立場で着目する問題は、以下の二点である。

- 曖昧性:システムの境界に対する認識、稼働 条件や環境条件についての想定、サービス要 件を述べる語彙の理解などに、関係者間で齟 齬があり、これによりトラブルが起きる。
- 変化:サービスへの要求(ユーザや出資者の期待、従うべき法令など)や環境(ネットワーク、物理的/社会的環境など)が変化したり、システムが経年劣化したりして、適合性が損われる。

文献¹¹⁾では、これらの問題を乗り越えてシステム を長く安定的に運用するために必要な能力のことを *Open Systems Dependability (OSD)*と呼び、その実 現のためにシステムが辿るべきライフサイクルとし て DEOS プロセスを提唱している。本実験の一つの 目的は、DEOS プロセスに沿った運用・開発を我々 自身が実際に行うことで、このプロセスの定義を明 確にし、また各所で成果物として作成される文書、 特にアシュランケースの有り方を探究することであ る。本節では、DEOS プロセスとアシュランスケー スについて、本稿で必要な範囲で概説する。これら についての詳細は¹¹⁾を参照されたい。

DEOS 二重サイクル

DEOS プロセスでは、システムが OSD を維持しつ つ永続的にサービスを提供し続けるために、DEOS 二重サイクル(図2)と呼ばれるシステムライフサイ クルの一形式を提案している。なお、文献¹¹⁾では、 電子化を前提とした数々の拡張をアシュランスケー スに対して行い、これを D-Case と呼んでいる。本 稿の範囲内ではこれらの差異は特に問題とはならな いため、以下、一般的な呼称である"アシュランス ケース"を用いる。

DEOS 二重サイクルでは、システムの運用状態が 正常な範囲 (*In-Operation Range*)から逸脱して、サ ービスに障害が生じた(または生じそうな)時、そ こから復旧に至る方法を2種類のサイクルとして定 めている。

ひとつは、リスク分析などにより事前に想定した 障害に対するものである。このような障害から復旧 する方法は、予め定めて関係者で合意しておくべ きもので、障害対応サイクル (the failure response cycle) と呼ばれている。対応策を手順書に記載する などして運用者に周知し、発生時はそれに従うこと で、迅速な対応が可能となる。勿論、システムには、 そのために必要な機能を備えておく。



図 2. DEOS 二重サイクル (文献 ¹¹⁾ から和訳引用).

もうひとつは、事前に想定しなかった障害に対す るものである。事前に想定しなかった障害は、シス テム運用の前提とする環境条件の検討やリスク分析 が、十分になされない場合に生じるのはもちろんで あるが、十分な検討をしてもなお想定できないよう な障害もある。また、(想定できなかった事情により) 運用時にリスク分析のときとは環境が異なってしま うために生じる障害もある。変化対応サイクル(the change accommodation cycle)では、現状の正しい環 境条件のもとで、障害対応策を含む運用方式やシス テムの要件を、関係者で議論して定義し直し、合意 してシステムを再開発する。

また、障害ではないが、出資者やユーザなどの事 情により、サービスに対する要求が変化することも ある。この場合も、サービスやシステムの要件を再 定義しなくてはならないが、想定外障害への対応と 同様、変化対応サイクルよって対処する。

プロセスの実施者と説明責任

OSD の実現には、関係者達の適切な説明責任遂行が 不可欠である。文献¹¹⁾では、サービスの総責任者で ある事業者を主に、その説明責任を論じている。し かし、システムライフサイクルでは他にも多くの者 が関わっており、彼ら全てがそれぞれの役割(*role*) に則した説明責任を果してはじめて、事業者はその 時々のサービスの状態の全容を把握でき、以って自 身の説明責任も果すことができる。本実験では、こ れら事業者以外の関係者についても、その説明責任 の範囲を明確にする。本実験では、関係者の役割と して以下の四つを想定する。

- 上位利害関係者 (superior stakeholders) 出資者 や利用者などサービスの提供を事業者に委託 する者、また事故があったときの被害などを 受ける者達。それぞれの立場から、サービス に対して要求を持っており、それに変化が生 じた時には事業者に伝える。
- 事業者 (service provider) システムライフサイ クルの実施者であり、サービス全般について、 上位利害関係者への説明責任を負う。システ ムの運用を運用者に、開発および改変を開発 者に、それぞれ業務委託している。
- 運用者 (operator) システムを運用して、ユー ザに日常サービスを提供する者。事業者から、 通常運用と障害対応サイクルの実施を受託し ており、予め定義された要件に従ってこれら を行う。日々の運用状況や、発生した障害(想 定内のもの,想定外のもの)について、説明 責任を負う。
- 開発者(developer)システムやその要素の構築(改変に伴う再構築も含む。以下同様。)を行う者。変化対応サイクルにおいて、事業者から開発プロセスの実施を受託しており、事

業者や運用者と合意した要件に従って、シス テムを構築する。開発プロセスの実施状況や、 構築されたシステムに関して、説明責任を負 う。

業務が個人ではなく組織により行われる場合、組 織の管理責任者が説明責任を負うことになる。また、 受託した業務の一部を、組織内で、または外部組織 に再委託することもある。この場合でも、最終的な 説明責任は元の業務を受託した組織の管理責任者に ある。この者は再委託先に定めた説明責任が、自身 のそれを果すに十分であるよう配慮しなくてはなら ない。このような、委託・再委託の連鎖における説 明責任の定め方については、文献 2) で詳細に論じた。

DEOS プロセスとアシュランスケース

DEOS プロセスでは、業務委託の際などに関係者間 で行った議論をアシュランスケースとして記述する。 これにより、単に業務や成果物の要件定義だけでは なく、その要件で委託者の要求が十分満されること (合目的性)や、受託者側が与えられたリソース下で その要件を満すせること(実現可能性)など、要件 定義の根拠まで、後に追跡可能な形で残すことがで きる。

本実験では、整合性検査などの機械処理を念頭に おいて、形式アシュランスケースを用いる。前節で も述べたように、形式アシュランスケースは、議論 自体の記述を行う部位(通常「アシュランスケース」 と呼ばれているもの)に加えて、議論の土台となる オントロジーを明示化した「理論部分」と呼ばれる 部位を持つ。議論に参加する関係者は、ここに宣言 /定義された語彙や提示された前提条件が、自らの 認識と照らして齟齬がないことを、各人の責任にお いて確信した上で、アシュランスケースに合意する。 これにより、なんらかの事情で議論の前提に、破れ' が生じ、想定外の障害が起きたとき、関係者の協力 を得やすくなり、迅速な対応が可能になる。

アシュランスケースで記述する議論のことをアシ ュランス議論 (assurance arguments) という。これ には、大きく分けて2つの種類がある。

- プロダクト議論 (product-based arguments) プロセスの成果物が、要求される特定の性質を満していることを、証憑(環境の観測データや関連文書の記述、システムのテスト結果等)に基いて議論する。
- プロセス議論 (process-based arguments) プロ セスが目的に則して適切であることを、実際 に行われた活動やタスクの定義や特性に基い て議論する。

それぞれのアシュランスケースをプロダクトケース、 およびプロセスケースと呼ぶ。

文献 1) では、プロダクト議論が依って立つ証憑の 出自を明かにして、その作成過程の妥当性を保証す るプロセス議論を行えば、全体としてのアシュラン ス議論をより確実にできることを説いている。本実 験では、この考えを更に推し進め、プロダクト議論 のオントロジーへの関係者の合意形成についてもプ ロセス議論を行うことにした。具体的には、語彙や 前提条件、要件定義などについて、関係者に十分な 批判的検討を促すような活動を、プロセスに明示的 に組み込み、それらの効果を示すプロセスケースを 作成する。

形式アシュランスケースにおいては、証憑も関係 者間の合意も、共にアシュランスケースの理論部分 の妥当性を支えるものであり、これはその意味で1) の方法論の自然な拡張であるといえる。

本事例で用いる語彙

ファイル共有サービス KFS

本実験で対象とするのは、ある研究プロジェクトの ために、筆者らの研究室で運用しているファイル共 有サービスである。これを KFS という固有の名称で 呼ぶ。以下に概要を述べる。

目的:大学の研究チーム内での情報共有と、対外 発信と共同研究のための外部との情報共有。

期間:2012年7月より初期開発を開始。サービス 運用期間は同11月より、研究プロジェクトが終了す る2014年3月まで。

規模:固定ユーザは、チームメンバ5名前後。他に、 外部との共同研究の為に、最大5名程度の一時ユー ザを想定する。

予算:総額 400 万円程度。ハードウェア/ソフト ウェア代、外注先(X社)に支払う開発費・運用人 件費など。(X社には、開発・運用に関連した一部の 社内情報の提供や、アシュランスケース作成補助作 業なども依頼したが、これらは純粋に研究目的のも のであり、サービス提供に伴う業務でないため、そ の費用はここに含めない。)

これらはサービスやシステムの要件を定めるのに、 考慮すべき条件の一部を成している。 運用と開発の対象である、システム」は、次の4つの 要素から構成される。

- ファイルサーバ (KFS-FS)
- データバックアップ用コンピュータ(KFS-BC)
- 利用者手順書(KFS-UM)
- 管理運用手順書(KFS-AM)

ファイルサーバは、民間の VPS プロバイダが提 供する仮想マシン上に構築されたものである。一方、 データバックアップ用コンピュータは実マシンであ り、事業者の勤務先である研究室に設置されている。

前節で述べた、システムライフサイクルにおける

4つの役割を果す者達を以下に示した。

- 上位利害関係者: A の研究室, 神奈川大学, プロジェクト基金団体 Y
- 事業者組織:研究員 B*,研究員 C, 教授 A
- 開発者組織:技術者 D*(X 社),技術者 E(X 社))
- 運用者組織:研究員 B*,技術者 E(X 社)

肩に*印を付けた者が組織の管理責任者である。

ライフサイクルプロセスの詳細

DEOS 二重サイクルは、合意形成・開発・説明責任 遂行・運用(正常運用,障害対応)の4つのプロセ スから成っている。文献11)では、これらに詳細な 定義を与えているわけではない。そこで、本実験では、 システムライフサイクルプロセスの枠組みに関する 日本工業規格(JIS)X0170を参考にした。4つのプ ロセス とJISX0170のテクニカルプロセスとの対 応は、表1のようになっている。

表1. DEOS プロセスと JIS X 0170 テクニカルプロセス

DEOS プロセス	JIS X0170 テクニカルプロセス				
合意形成	利害関係者要求事項定義、要求事項分析				
開発	方式設計、実装、結合、検証				
説明責任遂行	移行、妥当性確認				
通常運用、障害対応	運用、保守				

本副節では、各プロセスの開始条件と定義(目的, 成果物,活動)、およびプロセス実施者の負う説明責 任について述べる。

合意形成プロセス:事業者が、システムの動作環 境や運用環境の不備、上位利害関係者の要求との不 一致などを認識した時、自身の判断で開始する。また、 初期開発時にまず行われるのもこのプロセスである。 合意形成プロセスの目的は、サービスとシステムに ついて、現状の環境や要求を正しく反映した要件を 確定することである。プロセスが成功すると、成果 として利害関係者要件書とシステム要件書が更新さ れる。これらは以下の条件を満している。

A) サービスが利害関係者要件書を満すならば、自身の要求が満されることに、上位利害関係者達

が合意している。

- B) システムがシステム要件書を満すならば、利害 関係者要件書を満すサービスを提供できること に、事業者と運用者が合意している。
- C) システム要件書を満すように、システムを構築 することができることに、事業者と開発者が合 意している。

条件 B), C)の保証のため、事業者と運用者/開発 者でプロダクトケースを作成する。サービスやシス テムの要件定義、およびプロダクト議論のオントロ ジーは、十分に検討した上で合意されなくてはなら ない。我々の実験では、これを実現するため、非機 能要件の分類に基く要求抽出やトレードオフ分析な どの活動を行った。これらの活動の妥当性について は、プロセスケースを作成して保証する。

第2.2節で触れたように、DEOS プロセスでは、 正常時の運用要件に加えて、想定する障害群とそれ らへの典型的な対応策についても、予め上位利害関 係者と合意しておくことを定めている。障害対応サ イクルに指定されている対策(図2参照)の要件が 抜け漏れなく抽出されるよう、本実験では下記項目 からなるフォームを定め、システム運用に関するプ ロダクト議論は、それを埋める形で行った。

- 想定する障害(原因,被害)のリスト
- リストの各障害について:
 - ▶ 予防措置策(原因の発生を防ぐための活動)
 - ▶ 未然廻避策(原因が発生しても被害に至らないようにする活動)
 - ▶ 迅速対応策(被害軽減のレベルと、それを 実現するための活動)

それぞれの活動について、原因/被害の発生の検知、 検知した場合の対処、および、事業者と運用者の説 明責任遂行などのタスクを定める。

事業者は、合意形成プロセスの実施に関して説明 責任を負っている。プロセス開始時には、契機とな った環境の変化や原因を上位利害関係者に告げる。 また、プロセス実施中は、サービスの要件の実現性 に関して、運用者・開発者の意見を伝え、合意形成 の調停役を勤める。

開発プロセス:合意形成プロセスが成功し、事業 者から開発業務を受託した時、開発者はこのプロセ スを開始する。

開発プロセスの目的は、システム要件書を満すよ うにシステムを構築することである。プロセスが成 功すると、成果としてシステムが構築され、更に検 証報告書が作成される。これらは以下の条件を満し ている。

A) システム要件書の各項目をシステムが満すこと

の証拠を、検証報告書が与えている。

開発者は、開発プロセスの実施に関して、委託元 である事業者への説明責任を負っている。検証報告 書は、その遂行のために作成されるものであり、事 業者が納得できるものでなくてはならない。

開発プロセスでどのような活動を行うかは、通常 は開発者の裁量にまかせ、委託した事業者は成果物 である検証報告書のみで要件充足を確認することが 多い。しかし今回は DEOS プロセスによる開発を行 う '実験'であるため、これに沿った活動を行うよう、 また、それぞれの担当者と開発責任者との間の合意 形成と説明責任遂行に関る文書(アシュランスケー スを含む)を提出するよう、開発者である X 社に依 頼した。これについては、次副節において改めて述 べることにする。

説明責任遂行プロセス:開発プロセスが成功して、 システム要件書の全ての項目が成り立つことを、事 業者が確信した時、このプロセスが開始される。

プロセス開始時点で、事業者は利害関係者要件書 を満すサービスが提供できることも確信できている。 これは合意形成プロセスの終了条件 B)によるもの である。その確信を上位利害関係者に伝えることが、 このプロセスの目的である。終了後には以下が成り 立っている。

A) 提供されるサービスが、利害関係者要件書を満 すことを、上位利害関係者達が確信している。

各種文書のレビューや、実際の運用環境における テスト運用などの活動によりこれを実現する。

上記条件 A) が成り立てば、合意形成プロセスの終 了条件 A) と併せて、上位利害関係者らは自らの要求 を満すサービスが提供されることを確信しているは ずである。即ち、新システムによるサービス提供に 移行する準備が整ったことになる。

運用プロセス:説明責任遂行プロセスが成功した ら、事業者は新しいシステムによるサービス移行/ 再開を指示し、運用者は運用プロセスを開始する。

運用プロセスには、定められた終了があるわけで はない。ただし、事業者が必要と判断した時に、運 用者に指示して停止させることはある。プロセスの 実施中は、以下の何れかの状態が成り立っている。

- A) サービスが、利害関係者要件書で定めた正常な 運用状態の範囲内にある、または
- B) 利害関係者要件書で想定された障害が起きているが、決められた通りの障害対応が成功している、または
- C) 決められた障害対応が失敗したか、想定されていない障害が起きて、その情報が事業者に報告されている。

正常運用時および障害発生時に行う諸活動、およ びそれらの妥当性は、運用ケースにより与えられて いる。これは、合意形成プロセスにおいて条件 B)を 担保するために作成したプロダクトケースのことで ある。ここでは、それがプロセスケースとして機能 している。

運用者は、運用プロセスの実施に関して、委託元 である事業者への説明責任を負っている。上記 C) に おける事業者への報告は、それに該当する。報告さ れる情報には、単なる失敗の事実だけでなく、失敗 の原因となった環境条件の、破れ'の指摘も含まれる。 原因の究明は運用ケースに基いて行われる。形式ア シュランスケースを用いていることで、この活動は 機械支援が可能となり、迅速かつ的確に行うことが できる。

開発プロセスの詳細

開発プロセスでは、設計・実装・検証の3つの活動 を行う。開発者は、対応するプロセスをそれぞれの 担当者に委託することで開発プロセスを進める。本 実験においては、これらは開発組織である X 社内で の業務委託として行った。

設計プロセス:開発者は、システム要件書に合意 して開発業務を受託すると、設計担当者に指示して まずこのプロセスを実施する。

設計プロセスの目的は、システムがシステム要件 書を満すために、システム要素が持つべき機能を考 え、それぞれの要件と全体の結合方式を定めること である。設計プロセスが成功すると方式設計書が作 成される。これは以下の条件を満している。

A) 各システム要素が方式設計書中のその要素に関する項目を満すならば、それらを結合したシステムがシステム要件書を満すことに、開発者と設計担当者が合意している。

条件 A) を保証するため、開発者と設計担当者でプ ロダクトケースを作成する。方式設計の決定や、プ ロダクト議論のオントロジーへの合意は、十分に検 討された上で成されなければならない。このため X 社はトレードオフ分析や社内レビューなどの活動を 行った。これらの活動の妥当性は、プロセスケース で保証する。

実装プロセス:開発者は、設計プロセスが終了し てその成果物を得たら、実装担当者にこのプロセス の開始を指示する。

実装プロセスの目的は、方式設計書に従ったシス テム要素の実装を行うことである。実装プロセスが 成功すると、成果として各システム要素は実装され、 単体試験結果報告書を含む実装作業報告書が作成さ れる。これらは以下の条件を満す。

A) 各システム要素が、方式設計書中のその要素に 関する項目を満すことの証憑を、単体試験結果 報告書が与えている。

実装担当者は開発者に対して、実装プロセスの説 明責任を負っている。条件 A) はその遂行のための ものである。実装作業報告書には、この他に実装や 試験の手順などが記され、開発者に提出される。本 実験では、実装機材についての前提を確認するため、 まず事前検証を行った。これは、不測の事態による 実装作業の手戻りリスクをさけるための方策である。 その後、方式設計書の要件毎に、実装・単体試験等 の活動を行った。これらの活動の妥当性はプロセス ケースで保証する。

検証プロセス:実装プロセスが成功して、全ての システム要素が実装されると、開発者はこのプロセ スを開始する。

設計プロセスの終了条件 A) により、開発者はこの 時点で、システムがシステム要件書を満すことを確 信できているはずである。しかし、これは開発組織 内で合意されたオントロジーに基く確信であり、そ のままで事業者への説明責任を果せるかという点に 不安が残る。事業者を説得できる客観的な方法で、 システム要件を確認する統合検証を行うことが、検 証プロセスの目的である。このプロセスに成功する と、要素がシステムとして統合され、また成果物と して検証戦略定義書と検証結果報告書が作成される。 これらは以下を満している。

- A) 検証戦略定義書に基く検証に全て合格すれば、 システムがシステム要件書を満すことを、事業 者と開発者が合意している。
- B) システムが検証戦略定義書に基く検証に全て合格したことの証憑が、検証結果報告書により与えられている。

条件 A) を保証するため、事業者と開発者でプロダ クトケースを作成する。検証戦略の決定や、プロダ クト議論のオントロジーへの合意は、十分な検討の 上で行われなくてはならない。戦略の網羅性を高め るため、システム要素の組み合わせごとに使用シナ リオを作成するなどの活動を行った。これらの活動 の妥当性は、プロセスケースにより保証する。

検証戦略定義書と検証結果報告書を併せた文書が、 検証報告書であり、これが開発プロセスの成果物と なる。開発プロセスの終了条件が満されることは、 上記の条件 A) と B) から分る。

以上、本節では、次節以降で用いる KFS のシステ ムおよびプロセスに関して具現化した用語や前提条 件や満たすべき性質を表現するオントロジーを定め、 また、議論に必要な証憑となる文書を特定した。

KFS のアシュランス議論

本節では、定めたオントロジーおよび特定された証 憑に基づいて、KFS のシステムおよびプロセスが妥 当であるというトップクレームを確信するための議 論を説明する。トップクレームを DEOS プロセスに 沿って分解し、分解された各プロセスが妥当である というサブクレームについて、さらに議論を深めて いく。Agda 言語を用いて、トップクレームと、その 分解は、以下のように記述できる。

module KFS.TopLevelArgument where open import KFS.Argument.ChangeAccommodation open import KFS.Argument.FailureResponse open import KFS.Argument.NormalOperation open import KFS.Context.DEOSProcess

open import KFS.Utilities open 変化対応議論 open 議論ゴール記述

open 通常運用議論 open 障害対応議論

main-case =

Context[ディペンダブルの説明 / KFS はディペンダブル ∋ 通常運用・障害対応・変 化対応の適切さの議論

- ・通常運用ケース
- ・障害対応サイクルケース
- ・変化対応ケース] where

open import KFS.Context.SpecifiedRequirements open import KFS.Context.DesignSpecification open import KFS.Context.SpecifiedReqTest open import KFS.Evidence.TestResults

以上のように、open import によって、他のファ イル中に記述されたモジュールを参照して、議論を 展開できる。以下の副節で各モジュールを説明する。

変化対応議論

変化対応は妥当であるというサブクレームを、 DEOSプロセスに沿って、議論展開する。

module 変化対応議論 where

module 変化対応 = KFS.Context. DEOSProcess. ChangeAccommodation. 議論ゴール記述

変化対応ケース:変化対応.適切 変化対応ケース=

let open 変化対応 in Context [適切の説明 / 適切 ∋ 変化対応サイクルの構成要素ごとの議論 (合意形成方法適切 ∋ 合意形成方法の妥当性と確実な履行の議論 ·(合意形成方法妥当 ∋ 要求仕様合意と要件定義合意の方法の妥当性の議論 · (要件→要求 ∋ U < " 議事録 " >) ·(要求→ニーズ ∋ U < " 議事録 " >)) ·(合意形成方法履行 ∋ U < "要求分析書">)) · (開発方法適切∋ 開発方法の妥当性と確実な履行の議論 ·(開発方法妥当 ∋ 設計、実装、検証方法の妥当性の議論 ·(設計方法妥当 ∋ U < "設計計画">) ·(実装方法妥当 ∋ U < "実装計画 ">) ·(検証方法妥当 ∋ U < " 検証計画 " >)) ·(開発方法履行 ∋ U < " レビュー記録 " >)) (変化対応説明責任遂行方法適切 ∋ 変化対応説明責任遂行方法の妥当性と確実な履行 の議論 · (変化対応説明責任遂行方法妥当 ∋ U < "開発完了および運用移行規程">) ・(変化対応説明責任遂行方法履行 ∋ U < "開発完了および運用移行議事録 ">)) 1 通常運用議論 通常運用は妥当であるというサブクレームを、要件

通常運用は妥当であるというサブクレームを、要件
 定義に基づいて、システムや運用の体制が設計・実
 装されていることを、証憑を下に議論展開する。
 module 通常運用議論 where
 module 通常運用 = 議論ゴール記述
 open 要件から要求の議論
 open 設計仕様から要件の議論

```
通常運用ケース:通常運用.適切
通常運用ケース =
let open 通常運用 in
Context[適切の説明 /
適切 ∋ 要件定義、設計、実装の段階ごとの議論
・要件→要求ケース
・設計→要件ケース
・実装テストの証憑.通常運用関連.テスト結果
```

障害対応議論

障害対応は妥当であるというサブクレームを、要件

定義およびリスク分析に基づいて、システムとプロ セスが設計・実装されていることを議論展開する。

module 障害対応議論 where module 障害対応ゴール記述 = KFS. Context. DEOSProcess.FailureResponse. 議論ゴール記述 open 要件から要求の議論 open 設計仕様から要件の議論 open リスク対処議論

障害対応サイクルケース:障害対応ゴール記述,適切 障害対応サイクルケース= let open 障害対応ゴール記述 in Context [適切の説明 / 適切 ∋ 障害対応サイクルの構成要素ごとの議論 (let open 障害対応プロセス) open 要件から要求の議論.障害対応プロセス open 設計仕様から要件の議論.障害対応プロセス open 要件テストの議論. 障害対応プロセス open 実装テストの証憑. 障害対応プロセス in Context[プロセス適切の説明/ プロセス適切 ∋ 適切性の議論 (要求を満たす ∋) 要件達成を中間段階とする議論 ・要件→要求ケース ・(要件達成 ∋ 検証とテストで二重チェック) ·(要件達成検証 ∋) 要件定義、設計の段階ごとの議論 ・設計→要件ケース ・設計仕様テスト結果) ・要件テストケース)) ・リスク対処ケース

D1

Agda 言語を用いた形式化の技法と効果 ファイル構成

本副節では、複数の関係者が長期間にわたって、変 化しつづける環境や要求に追従し、実際の組織やシ ステムとアシュランスケースとの整合性および関係 者の合意状態の維持を図りやすくするために、プロ グラミング手法における構成管理の考え方を、アシ ュランスケースの構築・保守の活動に導入した、ア シュランスケース全体のファイル構成方法について 記述する。

複数の関係者で、共通の語彙を用いることを強制 している状況では、ある関係者が語彙を追加・変更・ 削除する場合には、その原因となった事象、対応方針、 影響範囲、今後の予定などを関係者と協議あるいは 説明し、了承を得て、語彙の更新を実施する必要が ある。もし、影響する関係者の範囲を見誤り、了承 を得ないまま更新した場合でも、アシュランスケー ス全体の整合性検査を実施することにより、不適切 な状態にあることを検出できるようにしておくこと が望まれる。

上記を考慮し、最上位フォルダ KFS 下に、共通に 用いる語彙を格納するフォルダ Context、共通に用 いる証憑を格納するフォルダ Evidence、それらに基 づいた議論展開を格納するフォルダ Argument を用 意する。議論を展開するファイルでは、上記語彙や 証憑のフォルダに格納されたファイルのうちの、必 要な語彙や証憑を記述したファイルを参照する。こ うすることにより、共通する語彙や証憑を追加・変更・ 削除した場合には、それを参照するすべての議論展 開に影響し、アシュランスケース全体の整合性検査 を実施することにより、更新内容に適切に対応でき ていない議論展開お分では、不適切な状態にあるこ とを検出可能となる。

パラメータ化

本副節では、以下の2つの目的で用いたパラメータ 化の考え方と、そのいくつかの例を記述する。目的 のひとつは、複数の関係者での語彙の共通化と、そ の語彙が示す対象の網羅性および整合性の自動検証 である。もうひとつの目的は、アシュランスケース における議論展開のパターン化、および、そのパタ ーンに基づくアシュランスケースのテンプレート部 品の抽出と再利用である。¹³⁾

ひとつの例は、利害関係者要件書項目、システム 要件書項目、設計項目、検証項目、利用手順書項目、 運用手順書項目、障害対応項目などの各ドキュメン トの各項目に、項目 ID を付与し、これらの項目 ID を各ドキュメントごとにまとめて、各ドキュメント ごとの一つのパラメータで取り扱うものである。こ のようにすることによって、利害関係者要件書項目 パラメータをもちいて記述された議論展開が、すべ ての利害関係者要件書項目について網羅されている のかを明確にすることができ、自動検証することが 容易になる。また、利害関係者要件書作成の活動が 適切であったことを議論展開するアシュランスケー スと、システム要件項目全体が利害関係者要件項目 全体を満足させることを議論展開するアシュランス ケースで、同じ利害関係者要件項目パラメータを用 いることによって、2つのアシュランスケースの整 合性が明確化でき、自動検証が容易になる。さらに、 こうした議論展開のパターンが明確化でき、設計項 目、検証項目、各手順書項目、障害対応項目などの 議論展開に再利用することが容易になる。

もうひとつの例は、障害対応における予防措置、 未然回避、軽減措置という3つの対応手段をまとめ て、1つのパラメータで取り扱うものである。この ようにすることによって、各障害対応項目ごとに、 3つの対応手段が網羅されているかを明確にするこ とができ、自動検証することが容易になる。ある障 害対応項目において、予防措置のみで十分に対応可 能である場合には、関係者合意の下で、未然回避お よび軽減措置を準備しないこととしてよいが、上記 のようにパラメータ化しておくことにより、こうし た合意を含めて、3つの対応手段が網羅されている ことを強制することができる。

システム環境変化に起因する不整合発生の例

リスク対策強化に伴う形式アシュランスケースの更 新がなされないことによる不整合発生と、その検出 および修正のシナリオを示す。

ある時点で、全体の整合性のとれたアシュランス ケースが完成していた。その後、リスク検討担当者 が、想定すべき障害を一つ新たに発見し、追加した。 具体的には、利害関係者要件項目"s18:部外者がフ ァイルの情報を改ざんしたり盗んだりできない"に 対して、新しい想定障害項目 failure18-6:"退職者に よるアクセス"を追加した。

このリスク検討担当者は、当該ファイル KFS/ Context/RiskTreatment.agda を型検査し修正すべ き関連語彙を特定できた。まず、場合分けのための 語彙「想定障害のある要求毎」等に修正を加える。 続いて、リスク検討担当者は、当該ファイル KFS/ Context/RiskTreatment.agda が再び型検査に通るよ うになったことを確認できたので、帰宅してしまう。 必要となった対策議論担当者への連絡を忘れてしま った。そのため、整合性が破たんしてしまった。

翌日、プロジェクトのデイリービルドの一部と して、アシュランスケースのトップレベルファイ ル KFS/TopLevelArgument.agda の型検査が行わ れ、昨夜変更したファイルとは別のファイルで型エ ラーが見つかる。エラーは、すべての想定障害に対 する対策を記述する部分において新想定障害項目 failure18-6 への対策の記述が欠けているというもの である。ビルドシステムはこのファイルを担当する 対策議論担当者にエラーをメールで通知した。

以上が、語彙定義の変更で生じる議論の不整合を 型検査で発見できる例である。

対策議論担当者が出勤し、ビルドシステムからの エラー通知を見て、担当するファイルを修正。別フ アイル

KFS/Argument/RiskTreatment/RiskCasesKido.agda が型検査に通るようになることを確認。対策議論担 当者は、つづけて、トップレベルファイルを再検査 して、昨夜の変更および直上の変更に影響を受ける 他の個所を特定した。もう一つ別のファイル

 $\label{eq:KFS} KFS/Argument/FailureResponse/RiskTreatment. agda$

が型エラーを生じているのを発見し、修正。再度、 トップレベルファイルを再々検査して、これ以上影 響箇所がなく全体の整合性が回復したことを確認し た。

なお、実験において発生した障害例としては、パ スワードファイル設定方法の運用手順書記載誤りに よるパスワード変更ができなくなる障害、時刻合わ せのための標準時刻サーバへのネットワークアクセ ス制限変更による時刻設定障害、不正アクセス防止 強化のためのアクセス可能 IP アドレス制限変更によ るアクセス障害などがある。これらに対して、アシ ュランスケースに記述した手順に沿って、障害対応 および説明責任遂行を実施し、再発防止として、ア シュランスケースの見直しを実施した。

結論

我々は、DEOS プロセスに基づいた形式アシュラン スケースの具体的な構築例を示した。また、システ ムの環境変化に起因する不整合発生の例をいくつか 示した。これらの不整合は、形式アシュランスケー スについては、容易に検出可能であるが、従来の非 形式的なアシュランスケースでは、システムやサー ビスが大規模化するにつれ、検出が困難になると思 われる。

謝辞

本研究は、JST CREST 研究領域 DEOS 受託研究「利 用者指向ディペンダビリティの研究」の一環である。 また、本実験に協力いただいた関係各位に感謝する。

文献

- Habli I and Kelly T (2006) Process and product certification arguments – Getting the balance right. In Workshop on innovative techniques for certification of embedded systems. In : Proceedings of 12th IEEE Real-Time and Embedded Technology and Applications Symposium. San Jose, California, USA.
- 2) Hirai M, Yuasa M and Kinoshita Y(2000) A chain of accountabilities in open systems based on assured entrustments. *The 24th pp. IEEE International Symposium on Software Reliability Engineering.* Pasadena, California, USA.
- Bishop P and Bloomfield R (1998) A Methodology for Safety Case Development. In : Industrial Perspectives of Safety-Critical Systems: Proceedings of the Sixth Safety-critical Systems Symposium. Birmingham. pp.1-10.
- Hall JG, Mannering D and Rapanotti L (2007) Arguing safety with problem oriented software engineering. In : Proceedings of High Assurance Systems Engineering Symposium. HASE'07. 10th IEEE. pp. 23-32.
- 5) GSN Working Group (2011) GSN Community Standard. Version 1.
- 6) Kelly TP and Weaver RA (2004) The goal structuring notation – a safety argument notation. In : Proceedings of the Dependable Systems and Networks 2004 Workshop on Assrance Cases. Florence, Italy. pp.1-9.
- 7) Kinoshita Y and Takeyama M(2013) Assurance case as a proof in a theory: towards formulation of rebuttals. In : Assuring the Safety of Systems -Proceedings of the Twenty-first Safety-critical Systems Symposium. Bristol, UK. Dale C, Anderson T, eds., SCSC. pp. 205-230.
- Matsuno Y, Takamura H and Ishikawa Y (2010) A dependability case editor with pattern library. In : Proceedings of the Ninth IEEE International Symposium on High-Assurance Systems Engineering (HASE'05). pp. 170-171.
- 9) Takeyama M (2011) D-Case in Agda verification tool (D-Case/Agda). http://wiki.portal.chalmers.se/agda/pmwiki. php?n=D-Case-Agda.D-Case-Agda.
- Takeyama M, Kido H and Kinoshita Y (2012) Using a proof assistant to construct assurance cases. In : Fast Abstract in Proceedings of Dependable Systems and Networks (DSN) 2012. pp.1-2.
- 11) Tokoro M (ed.) (2012) Open Systems Dependability
 Dependability Engineering for Ever-Changing Systems. CRC Press (ISBN 978-1466577510), New.York, USA.
- 12) Toulmin SE (1958) The Uses of Argument. Cambridge University Press, Updated edition published in 2003 by the same publisher (ISBN 978-0-521-53483-3). Cambridge, UK.
- 13) 木藤浩之,平井 誠,湯浅能史(2012) 事例研究:高 信頼なファイルサーバのためのアシュランスケース に基づく開発.第10回ディペンダブルシステムワー クショツプ(DSW2012).神戸.pp.1-11.

■原 著■

組込みシステムデモンストレーションの効果に関する アシュランスケース事例

森口草介1 中原早生1 木下佳樹2

A Case Study of a Formal Assurance Case for Demonstration of Embedded Systems

Sosuke Moriguchi¹, Hayao Nakahara¹ and Yoshiki Kinoshita²

¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Information Sciences, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: chiguri@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A case study of assurance case construction is presented. A formal assurance case for an embedded system life cycle is constructed. We also develop a framework for assurance case construction. The structure of argument and ontology definition is prescribed by our assurance case construction framework, which is based on the waterfall model of system development. The formal assurance case enables verification of consistency and integrity of the assurance case, and we indeed found some inconsistency arised as a result of a system update. *Keywords*: assurance case, dependability, embedded system, maintainability

序論

アシュランスケースとは、(広義の)システムが一定 の性質を満たすという主張を客観的な証拠(証憑) をもとに説明する議論を記した文書である。システ ムの利害関係者間の合意を得るために用いられる。 対象の規模に比例して議論も複雑となるため、アシ ュランスケースは一般には非常に大きなものとなり うる。大規模アシュランスケースの理解を促進する ため、GSN^{1,2)}や CAE³⁾、D-Case⁴⁾ などの記法が導 入され、一定の効果が得られている。しかし、これ らの記法だけでは、この議論が整合しているか、証 拠の参照が正しいか、などの検査を行うことは難し い。

アシュランスケースを形式言語で記述し、議論 の整合性や証拠への参照の正しさの検査を機械的 に行うことを可能にしたものを第三著者らが導入 し、形式アシュランスケースと呼んだ⁵⁰。D-Case in Agda^{6,7)}はD-Case に関する形式アシュランスケース 記述を支援するツールである。D-Case in Agda では 形式化や議論の記述により確認可能な整合性の粒度 を変えることによって、定義時に挙げた項目を全て 列挙しているか(要素の網羅性)、議論の構築が適切 に行われているか、証拠の参照が適切か(型による 整合性確認)、などの整合性検査を自動的に行うこと ができる。これにより、形式アシュランスケースは 通常のアシュランスケースと比べ信頼性が高い。特 に、アシュランスケースを変更した時に不整合が生 じることが多いが、自動的な整合性検査により、そ のような不整合を容易に検出することができる。

形式アシュランスケースにより、アシュランスケ ースの整合性検査の可能性が大きく広がった。しか し、現状では形式アシュランスケース記述方法論が 確立しておらず、システムライフサイクルにおいて どのように形式化が行うことで効果的な結果が得ら れるかも十分には確かめられていない。

本研究は、システムライフサイクルを対象とする アシュランスケースを対象とする。システムライフ サイクルには、ニーズの取得、要求の決定、方式設 計や詳細設計、実装などのプロセス(システムライ フサイクルプロセス)が同定されており 8)、各プロ セスに特有の語彙が導入されている。しかしシステ ムのアシュランスケースは、システム全体に関する ものであり、そこでは各プロセスの間の関係、例えば、 ニーズを仕様が適切に捉えているか、実装が仕様を 満足しているか、などの議論を行うことが必要であ る。システムライフサイクルを対象とするアシュラ ンスケースは、以上のような議論のために必要な語 彙を設定した上で記される。

具体的なシステムライフサイクルに関するオン トロジーを決定するには、当該システムに関する 基本的な知識が必要である。また、そのオントロジ ーに基づくアシュランスケースを記述するには、仕 様書や検証報告書などのシステム文書を正確に理 解する必要がある。このような領域知識 (domain knowledge)をアシュランスケースの読者や記述者が 十分に持っていない場合もある。アシュランスケー スはシステムの専門家だけではなく、利用者をはじ め、システムの利害関係者一般を対象とするものだ からである。また、アシュランスケースの読者や記 述者が基本的な領域知識をもっていても、開発者が とる固有の開発過程やツールなどの知識までもつと は限らない。本研究では、開発対象の領域知識を補 うため、アシュランスケース記述者は、システム開 発と週に一度程度の打合せを行って領域知識を得た。 アシュランスケースに用いるオントロジーを、開発 資料を基に作成した。

企業における組み込みシステムのデモンストレー ションシステムの開発資料を基に、形式アシュラン スケースの記述を行い、アシュランスケース記述方 法論展開に資する観察を得たので、本論文では、記 述実験に用いた形式化の方法について報告する。形 式アシュランスケースの全体の骨組みを決める、い わゆるフレームワークを設定し、それに基づいて形 式アシュランスケースを D-Case in Agda を用いて記 述した。D-Case in Agda の整合性検査がおおむね、 有効に機能していることを観察した。

本論文の構成は以下の通りである。まず、アシュ ランスケースを記述した対象の開発プロセスと、ア シュランスケース記述のために変更した部分につい て説明する。続けてアシュランスケースにおける議 論の大枠と、形式化の方法を規定するフレームワー クについて述べる。その後、この形式化フレームワ ークについて、形式アシュランスケースによる整合 性検査が有効に働くことについて述べ、最後にまと める。

結果と討論

記述実験

本研究におけるアシュランスケースの対象は、自動 走行自動車のデモンストレーションを模型自動車に よって行うシステムの開発プロセスである。実験に 関わったのはA社とB社(ともに仮称)の二社(以 下開発側)と著者ら(以下神奈川大グループ)であり、 開発は開発側が、アシュランスケース記述は主に神 奈川大グループが行った。開発の期間中は、週に一 度程度のミーティングを開発側と神奈川大グループ で行い、その時点での文書に関する説明、疑問点の 解消などを行った。

開発するシステムはA社による展示会でのデモン ストレーション用のシステムである。開発は主とし てA社が行うが、上流工程をB社が担当した。

我々が設定したシステムライフサイクルは以下の プロセスからなるものである。

- 1. A社の持つニーズの獲得。
- B社によるユースケース作成、およびシナリ オテストの作成。
- 開発側によるユースケースへの合意。また、 ユースケースを元に要求事項を記述し、ニー ズの再分析および結果への合意。
- 4. B社による方式設計の記述、および結合テス トの作成。
- 5. A 社による詳細設計の記述、および単体テス トの作成。
- 6. A社による実装、および単体テストの実行。
- 7. 結合テストの実行。
- 8. シナリオテストの実行。

これは、いわゆる V 字モデルに従ったウォーター フォール型開発の典型的な流れである。開発はニー ズの獲得、ユースケースの記述、方式設計、詳細設計、 実装の各段階に分けて進められ、それぞれにおいて 段階的な詳細化、具体化が行われる。また、各段階 ではシステムが記述を満足するかを確認するテスト ケースが作成され、実装の完成後にはそのテストケ ースを用いたテストが行われる。

アシュランスケース記述

上記の開発プロセスに関するアシュランスケースの 記述を行った。このシステムの目的は、システムが デモンストレーションを適切に行うことである。ア シュランスケースの記述は、この目的が達成される ことの確認である。そのために、プロセス毎にアシ ュランスケースを記述することとした。それだけで はなく、各プロセスのアシュランスケースと、前後 のプロセスのアシュランスケースの間の関係を確認 するアシュランスケースも記述することとした。プ ロセス毎のアシュランスケースとプロセス間の関係 を確認するアシュランスケースをすべてまとめて、 デモンストレーションが適切であることのアシュラ ンスケースとする。



図 1. デモンストレーションが可能という目的の達成を要 求事項の達成とする議論.

デモンストレーションが可能であるという目的の 達成は、要求事項を満たすことに相当する。これを GSNによって表すと、図1のようになる。

次に、システムが要求事項を満たすとは、機能要 求と非機能要求のどちらも達成することである(図 2)。このうち、非機能要求の達成はテストによって 確かめられる。機能要求の達成は、シナリオテスト に加えて、詳細化した方式設計が満たされることか ら導かれる。後者の導出は、詳細化関係に関する議



図2.要求事項を機能要求と非機能要求に分ける議論.

論と、方式設計が満たされていることを示す議論の 二つからなる。

機能要求において用いたテストと詳細化関係によ る導出は、方式設計においても同様に用いられる。 方式設計を詳細化した段階は詳細設計であるので、 詳細設計を満たしていることを利用して議論する。 最後に詳細設計は実装したシステムに対するテスト によって確かめられる。

以上の議論全体を図にしたものが図3である。こ



図 3. 今回作成したアシュランスケースの議論上部.



図 4. 形式アシュランスケースに用いる項目の記述。線は 右のオントロジーの公理により左側の項目の意味を付け ていることを表す.



図 5. フレームワークにおけるオントロジー.

れらの議論は開発対象の詳細であるため、ここでは 概要のみ説明する。テスト結果を証憑とするにあた っては、テスト内容が対象としている文書の項目を 網羅しているか、それらすべてに想定通りのテスト 結果が出ているか、の二つの議論を行う。詳細化関 係の議論については、模型自動車が各段階における 項目を満たすかについて、形式化を元にした詳細化 における対応関係によって行う。これは次節にて説 明する。

形式化フレームワーク

形式アシュランスケースにおけるオントロジーの定 義には、用語が満たすべき性質を公理として明示す ることが求められる(図4)。例えば車体やモーター、 障害物を認識するセンサーなどの特性についての公 理を明示する必要がある。これらの公理は、領域知 識や技術文書を表現するものなので、公理の明示に あたっては、これらの詳細な理解が必要である。

今回の記述実験では、詳細設計の語彙を用いてオ ントロジーを構築した(図5)。詳細設計以外の段階 に関するアシュランスケースも、全て詳細設計の語 彙によって記述された。

さらにある段階が前の段階の詳細化になっている 場合、その詳細化関係を記した。(図 6)。"詳細化の 結果が正しいならば元の結果も正しい"という議論 を行った。

以上の方針を形式化の「フレームワーク」として 捉える。フレームワークにおいて規定されているも のは以下の通りである。



図 6. フレームワークにおける語彙の解釈。矢印は依存関係を表す.

- V字モデルに対し、各段階における記述と、 次の開発段階における記述に対する依存関係 を作成する。
- 各段階においてテストを準備し、その段階での文書の全項目が確認されるかを確かめ、実装後にテストを行う。
- 議論では詳細化関係にある段階間の議論、およびテストにより確認する。
- 詳細設計(最も粒度の細かい記述)における 項目をオントロジーとして利用する。

本研究では、このフレームワークに基づいてアシュ ランスケースを記述した。

分析

仕様を記述するだけでソフトウェア設計の向上が得 られるのと同様に、アシュランスケースの記述だけ で、要求事項やシステムのオントロジーの向上が得 られる場合がある。また、形式アシュランスケース の整合性検査には、そのアシュランスケースが参照 する文書間の整合性検査も含まれる。さらに、形式 アシュランスケースの整合性検査によって、変更時 に影響を受け、整合性のなくなった箇所を検出する ことができる。

本章では、アシュランスケース記述による開発プ ロセスオントロジーの向上、参照文書間の整合性検 査、および変更時の影響検出について、本研究でみ られた例について紹介する。

議論作成時の不適切な開発プロセス設定の指摘

B 社が作成した当初のユースケースをもとにアシ ュランスケースを記述しようとしたところ、以下の ような問題点を観察した。

- 目的の"デモンストレーションが可能である"という主張の内容が、必ずしも明確ではない。
- ニーズの各ライフサイクルプロセスへのマッピングが不明確である。

今回 B 社が当初に作成したユースケースは機能要求 に偏っており、非機能要求が殆ど含まれていなかっ た。そのため、B 社が当初作成したユースケースを 考えるだけではニーズを満たさないシステムになっ てしまい、それでは"デモンストレーションが可能 である"という主張が達成されないように思われた。 一方、B社の意見では、それでも"デモンストレー ションが可能である"ということになる。このこと は"デモンストレーションが可能である"の意味が 関係者によって異なり、この主張の内容が明確では ないことを意味する。

また、ニーズの各ライフサイクルプロセスへのマ ッピングが明確でないという問題がある。これは B 社の当初ユースケースに現れなかった非機能要求に おいて顕著である。例えば、ニーズの中には"走行 中に発生する音が騒がしくない"という項目が存在 する。しかし、そもそも"騒がしくない"とはどの 程度の音量なのか、高音および低音はどのようにす るのか、について、関係者以外が決定することはで きない。

以上の点から、大きく"デモンストレーションが 可能である"の達成条件およびニーズに対応する要 求事項の記述を明確に行うことを追加して B 社がユ ースケースを改訂することとなった。

これは、論理的間違いの指摘ではないが、オントロジーをより明確にして向上させた例である。

議論作成時の不整合の発見

各開発段階では、その段階で決定した項目や項目間 の関係性について文書で残すこととした。一方、各 開発段階間での時間的な変化や、詳細化による問題 の発見もあり、たびたび上位のニーズや要求事項、 方式設計における項目の変更、すりあわせが行われ る。しかし、これらのすりあわせの結果起こった変 更が、必ずしも文書に反映されるとは限らない。今 回の開発では、ニーズに関する変更は行われなかっ たが、要求事項や方式設計の段階で、実現性の問題 からいくつかの変更がなされた。

影響が大きかった変更の例に、模型自動車が走行 する領域の外側の壁に関する特別扱いをやめたこと がある。模型自動車が走行する領域は、全体を壁に 囲まれ、その外に出ないようにしている。当初はこ の壁を別途検出し、衝突しないように走行する予定 だったが、変更後は障害物として扱うようにした。 この変更は、壁に衝突しないというニーズには直接 影響しないが、要求事項以下では壁の扱いを明確に 記述していたため、それ以降の各フェーズにおいて 文書の記述を変更する必要があった。特に、方式設 計では車体の持つ機能として壁の検知を明記してい たため、そこから機能が削除されるはずだった。し かし、実際には開発は進行していたにもかかわらず、 この項目は削除されず、最終的に形式アシュランス ケースを記述した神奈川大グループの指摘により削 除された。

この問題は、特に開発時に資料が見直されないということに起因する。実際にこの変更が行われたとき、既に開発の段階はA社による詳細設計の段階であり、詳細設計における資料では対応する修正が行われていた。一方、方式設計についてはB社が担当であったことと、既に一通りの記述が終わっていたことなどから、修正が見落とされたと考えられる。

人間が整合性を確かめた文書であっても、それぞ れを独立して記述している限りその整合性は十分で ないことが多い。今回のフレームワークでは、複数 の文書間の依存関係を明記するため、ある段階での 文書が変更されると、他の文書との整合性がとれな くなり、アシュランスケースの記述において発見さ れる。また、形式アシュランスケースとして記述す ることにより、文書内の対応関係に抜けや漏れがな いかを検査、確認できる。このため、本フレームワ ークを用いることでも、文書の整合性が向上する。

変更による不整合の発見

前節で述べた整合性は、アシュランスケース記述時 に検出される文書の整合性だった。本節では記述後 の文書の変更における不整合発生とその検出の例に ついて述べる。対象は、記述全体の大きな変更では なく、各項目の追加や削除である。

議論の対象は詳細化関係にある記述同士なので、 ここでは方式設計を中心に、要求項目と詳細設計へ の影響を考える。要求項目、方式設計、詳細設計の 依存性の関係は、既に見たとおり図6のように表現 できる。

方式設計に項目の追加を行うと、その解釈を記述 する必要がある。影響として検出される部分はこの 解釈が存在しないことであり、このときアシュラン スケース記述者は詳細設計の項目から解釈を作成す る(図7)。この場合、詳細設計に変更が波及するに もかかわらず修正されておらず、項目中に関連する 項目が存在しなければ、記述者はその不足に気づく



図7. 方式設計における項目の追加(中央右). 詳細設計の項目を用いて関連性を記述しなければならない.



図 8. 方式設定における項目の削除(灰色). 関連していた依存性(点線)の記述を修正しなければならない.

ことができる。一方、追加時に要求項目への影響は 特にない。これは、方式設計に対する変更が行われ た場合に、必ずしも要求やニーズが変更されないこ とから説明できる。なお変更されるべきだった場合 には、方式設計の変更から検出することはできない。

項目の削除では、存在していた解釈が削除される が、詳細設計に影響は現れない(図8)。これは詳細 設計において削除する項目があるとは限らないため である。他方、要求項目に関しては、その解釈に削 除した項目が現れた場合にその箇所が定義できない ことで影響が検出される。

以上から、追加は詳細化した先への影響が検出さ れ、削除では詳細化の元への影響が検出される。こ の検出は、変更に対して全体の整合性を取る意味で 非常に重要な方向での検出であり、十分に機能して いると考えられる。

結論

本論文では、企業における組み込みソフトウェア開 発プロセスの適切さに関する形式アシュランスケー ス記述の事例を報告した。この記述実験の過程で、 各開発段階における文書に対する整合性や一貫性を 確かめることができ、また、設計変更に伴う不整合 発生を検出することができた。

謝辞

本研究は、JST CREST 研究領域 DEOS 受託研究「利 用者指向ディペンダビリティの研究」の一環である。 また、本実験に協力いただいた関係各位に感謝する。

文献

- Kelly TP and Weaver RA (2004) The goal structuring notation – a safety argument Notation. In: Proceedings of the Dependable Systems and Networks 2004 Workshop on Assrance Cases. Florence.
- 2) GSN Working Group (2011) GSN Community Standard. Version 1.
- Bishop P and Bloomfield R (1998) A methodology for safety case development. Industrial perspectives of safety-critical systems. In: Proceedings of the Sixth Safety-critical Systems Symposium. Birmingham. pp. 194-203.
- Tokoro M, Ed.(2012) Open Systems Dependability. CRC Press, Florida.
- 5) Kinoshita Y and Takeyama M (2013) Assurance case as a proof in a theory: towards formulation of rebuttals. In: Assuring the Safety of Systems - Proceedings of the Twenty-first Safety-critical Systems Symposium. Bristol. pp. 205–230.
- Takeyama M, Kido H and Kinoshita Y (2012) Using a proof assistant to construct assurance cases. In: Fast Abstract in Proceedings of Dependable Systems and Networks (DSN) 2012. pp.1-2.
- 7) D-Case in Agda, verification Tool (D-Case/Agda). http://wiki.portal.chalmers.se/agda/pmwiki. php?n=D-Case-Agda.D-Case-Agda
- 8) ISO/IEC 15288 Systems and software engineering - System life cycle processes

■原 著■

希ガス結晶構造と遮蔽 L-J ポテンシャル

天野 力^{1,2}

Crystal Structure of Rare-Gas and Shielded Lennard-Jones Potential

Chikara Amano^{1,2}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: amano@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The inter-atomic force in crystals or clusters is shielded by nearby atoms to work within a short range. Using the shielded Lennard-Jones (L-J) potential, the author succeeded in explaining the crossover of structures of rare-gas clusters from the icosahedral to the cubic closest packing, which was inferred from electron diffraction experiments. He expected that the same potential may be a key idea to dissolve the discrepancy between theory and experiment for rare-gas crystal structures, experiments prefer the ccp structure while theories prefer the hcp. Unexpectedly, the potential could not resolve the discrepancy. On the contrary, the long range L-J potentials made the ccp more stable than the hcp. Within short range potentials another type with a cut-off term made the ccp more stable, if an appropriate cut-off distance is employed. These results indicate the difference in nature of two structures

Keywords: crystal structure, cohesive energy, rare-gas, shielded Lennard-Jones potential, ccp and hcp

序論

結晶の最密充填構造モデルとして立方最密充填 (ccp) と六方最密充填(hcp)とがあることは良く知られて いる。2種の構造は充填率と配位数は等しいが、エ ネルギーにごくわずかの差がある。ヘリウムを除く 希ガスの結晶構造として実験はもっぱら ccp 構造を 与える¹⁾。この結果を原子間ポテンシャル、特にレ ナード - ジョーンズ (Lennard-Jones、以下 L-J と略 記) ポテンシャルで解釈しようとすると問題が生じ る。木原は引力項として r⁻⁶、斥力項として r⁻⁷-r⁻¹²の 形の L-J ポテンシャルを用いて結晶凝集エネルギー を計算したところ、hcp の方がエネルギーが低いす なわち安定であるという実験と異なる結果を得た2。 次に彼は斥力項として指数関数を用いる Born-Mayer ポテンシャルを用いて、谷幅の広いポテンシ ャルは ccp 構造を安定にするという結果を得た。結 晶やクラスター中の原子間力は近接原子による遮蔽 のため近距離力となっている、すなわちポテンシャ ルの谷幅は狭くなっていると考えるのが自然であろ う。筆者は遮蔽効果を取り入れた L-J ポテンシャル を用いる計算により、実験により予想された希ガス

クラスターの正 20 面体から ccp への構造転移が起 きる原子数が再現されることを示した³⁾。 すなわ ち谷幅の狭い遮蔽 L-J ポテンシャルがクラスターの 原子間ポテンシャルとして適切であることが示され た。この結果を踏まえて筆者は結晶構造においても 遮蔽 L-J ポテンシャルは hcp と比べて ccp 構造を安 定にするであろうと予想した。遮蔽ポテンシャルと しては短距離型の引力項を持つ L-J ポテンシャルと Stillinger により提案された ccp 構造を安定にする切 断項を持つ L-J ポテンシャル^{4.5)} の2種を検討した。 希ガス結晶が hcp より ccp 構造を好むという実験結 果は理論的に十分には説明されていない⁶⁾。

方法

遮蔽 L-J ポテンシャル

L-J ポテンシャルの一般式は式(1)で表される。ここで *R*>*S* の場合には第1項が斥力、第2項が引力を表す。大きな*R*、例えば *R*>12、を持つものは遮蔽ポテンシャルすなわち近距離力で谷幅が狭いものを表し、小さな*R*(*R*<12)を持つものは遠距離力で谷幅の広

いポテンシャルを表す。

実際の計算では換算単位 $\epsilon = U(r)/U_0$, $\rho = r/r_0$ を用いる。いくつかの例を Fig. 1 に示す。

$$U(r) = \frac{U_0}{R-S} \left\{ S\left(\frac{r_0}{r}\right)^R - R\left(\frac{r_0}{r}\right)^S \right\}.$$
 (1)

以下の計算は木原に従った。格子点の初期座標は ccp 構造では式(2)と(3)で、hcp 構造では式(4)と (5)で与えられる。ここで a は最近接原子間距離であ る。

中心原子からの距離が等しい原子は同じ殻に属す るものとして、順に第1殻、第2殻、第3殻、...の

$$x = \frac{La}{\sqrt{2}}, y = \frac{Ma}{\sqrt{2}}, z = \frac{Na}{\sqrt{2}};$$

$$L, M, N = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots \qquad (2)$$

$$|L| + |M| + |N| = 0, 2, 4, 6, \dots \qquad (3)$$

$$x = \frac{La}{2}, y = \left[\frac{1}{3}\left\{\frac{1 - (-1)^{N}}{2}\right\} + M\right]\frac{\sqrt{3}a}{2}, z = \frac{N\sqrt{2}a}{\sqrt{3}};$$

L, M, N = 0, ±1, ±2, ±3, ... (4)

$$L + M - N = 2p; p = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$$
 (5)

原子と呼ぶ。各々の殻に属する原子数は ccp の場合 は 12, 6, 24, 12, 24, …、hcp の場合は 12, 6, 2, 18, 12, 6, 12, …となる。

ポテンシャルエネルギーの項 λr^{T} (*T*は式(1)の *R*または*S*を表す)に関する1原子あたりの結合エ ネルギーは ccp の場合は式(6)で与えられる。

$$\frac{1}{2}\frac{\lambda}{a^T}C_T = \frac{1}{2}\frac{\lambda}{a^T}\sum_{i=1}^{\infty}n_i\left(\frac{a}{r_i}\right)^T.$$
 (6)

ここで C_r は ccp 構造のポテンシャルエネルギー定数と呼ばれる量であり、 r_i は中心原子とi 番目の殻に属する原子との距離を示す。一方項 λr^{T} に関する1原子あたりの結合エネルギーは hcp の場合は式(7)で与えられる。

$$\frac{1}{2}\frac{\lambda}{a^{T}}H_{T} = \frac{1}{2}\frac{\lambda}{a^{T}}\sum_{i=1}^{\infty}n_{i}\left(\frac{a}{r_{i}}\right)^{T}.$$
 (7)

ここで H_T は hcp 構造のポテンシャルエネルギー 定数と呼ばれる。



Fig. 1. L-J potentials for R = 5, 8, 12, 28 and S = 4, 6, 12.

実際の計算ではポテンシャルエネルギー定数 Cr を 厳密に計算できる第1項と積分近似で計算する第2 項に分ける:

$$C_T = \sum_{i=1}^{\infty} n_i \left(\frac{a}{r_i}\right)^T = \sum_{i=1}^{\theta} n_i \left(\frac{a}{r_i}\right)^T + \sum_{i=\theta+1}^{\infty} n_i \left(\frac{a}{r_i}\right)^T.$$
 (8)

ここで θ はある殻数を表す。第2項を積分で近似 したポテンシャルエネルギー定数を C_r 'と表す。

$$C_{T}' = \sum_{i=1}^{\theta} n_{i} \left(\frac{a}{r_{i}}\right)^{T} + \frac{4\sqrt{2}\pi}{(T-3)A_{g}^{T-3}};$$
$$A_{g} = \left\{\frac{3}{4\sqrt{2}} \left(1 + \sum_{i=1}^{g} n_{i}\right)\right\}^{\frac{1}{3}}.$$
(9)

ポテンシャルエネルギー定数を用いて凝集エネル ギー(1原子あたりのポテンシャルエネルギー)は ccpでは式(10)、hcpでは(11)で与えられる:

$$E_{ccp}(a) = \frac{1}{2} \frac{U_0}{R-S} \left\{ S\left(\frac{r_0}{a}\right)^R C_R - R\left(\frac{r_0}{a}\right)^S C_S \right\}, \quad (10)$$
$$E_{hcp}(a) = \frac{1}{2} \frac{U_0}{R-S} \left\{ S\left(\frac{r_0}{a}\right)^R H_R - R\left(\frac{r_0}{a}\right)^S H_S \right\}. \quad (11)$$

それらのエネルギーを格子定数 a に関して最小化 した凝集エネルギーは式 (12) と (13) で表される:

$$E_{ccp} = -\frac{1}{2} \left(\frac{C_s^{R}}{C_R^{S}} \right)^{\frac{1}{R-S}} U_0, \quad (12)$$
$$E_{hcp} = -\frac{1}{2} \left(\frac{H_s^{R}}{H_R^{S}} \right)^{\frac{1}{R-S}} U_0. \quad (13)$$

これらの式中の *C_s*, *C_R*, *H_s*, *H_R* の代わりに近似値 *C_s*', *C_R*', *H_s*', *H_R*'を用いる。

切断 L-J ポテンシャル

切断 L-J ポテンシャルとして Stillinger ^{4,5)} により提 案された次式を用いる:

$$V(r) = U_0 A\left\{ \left(\frac{r_0}{r}\right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r}\right)^{S} \right\} \exp\left\{\frac{1}{\left(\frac{r}{r_0}\right) - \left(\frac{r_{cut}}{r_0}\right)}\right\}.$$
 (14)

ここで切断距離を決める reat/roの値は ccp では殻 数 6 以上、hcp では殻数 8 以上離れた原子間力がほ ぼゼロになるように決められる。その値は 2.465 付 近にあり、この時中心原子とゼロでない相互作用を 持つ原子の総数は ccp では 78、hcp では 68 である。 この差により ccp 構造の凝集エネルギーが低くなる ことが期待される。しかし、式 (14)の関数は r>reat でゼロでない不都合な振る舞いをするので、実際に は切断関数により r>reat の部分が強制的にゼロとした ポテンシャルが用いられる。A の値はポテンシャル の最小値が -Uo になるようにする規格化因子である。 凝集エネルギーは最近接原子間距離 a の関数である ため、凝集エネルギーを最小にする a の値とその時 の凝集エネルギーを数値計算により求めた。

結果

ポテンシャルエネルギー定数の近似値 Cr', Hr'の値と 殻数 Nを Table 1 に示す。 C_{T} , H_{T} の値は殻数 Nの増 加に対する小数点以下7桁の範囲の停留値であり、 Nはその時の殻数の最小値である。ccp構造のCT' の値には Lennard-Jones 等7)のゼータ関数法によ る計算値があり、それらは小数点以下5桁または6 桁の範囲でこの表の値と一致している。Hep 構造の *H*_T'の値は T=6,8 に関してのみ Kane 等⁸⁾ による値 が報告されていて、それらは小数点以下4桁の範囲 でこの表の値と一致している。T=6-18に関して木原 の Cr, Hr'の値はこの表の値と小数点以下5桁まで一 致している。T=4, 5, 20, 24, 28 に関する Hr'の値は 全く新しい。L-Jポテンシャル(R=7-28; S=4-14)に 関する凝集エネルギーの値を Table 2 に示す。この うち R>12 かつ S>6 は遮蔽ポテンシャルである。遮 蔽ポテンシャルを含む表2の全てのポテンシャルで、 予想に反して hcp の方がエネルギーが 0.002-0.01% 低いという結果である。反対に谷幅の広いポテンシ ャル (R=5-8 かつ S=4,5) では ccp の方がエネルギ ーが 0.002-0.006%低い (Table 3)。

Table 4 に Stillinger 型の切断 L-J ポテンシャル を用いた計算の結果として、ポテンシャルの極小値 を与える原子間距離 r_{min}/r_0 、凝集エネルギーの最小 値を与える最近接原子間距離 r_{nb}/r_0 、凝集エネルギ ー E およびその差 δE が与えられている。切断パラ メータ $r_{cut}/r_0=2.46$, R=12, S=4-8、および $r_{cut}/r_0=2.60$, R=12, S=6 に関して ccp 構造の方が hcp 構造よりも 低い凝集エネルギーを与える。

Table 1. Potential terms C_T and H_T

77	сср		hcp		
1	$C\vec{T}$	N	H_{T}	N	
4	25.3383046	76	25.3390825	76	
5	16.9675187	34	16.9684365	34	
6	14.4539212	18	14.4548974	18	
7	13.3593878	14	13.3603469	12	
8	12.8019373	10	12.8028219	10	
9	12.4925468	$\overline{7}$	12.4933218	8	
10	12.3112457	6	12.3118963	6	
12	12.1318802	5	12.1322938	4	
14	12.0592283	4	12.0592283	4	
16	12.0273549	4	12.0274794	4	
18	12.0129983	4	12.0130600	4	
20	12.0062800	4	12.0063092	4	
24	12.0015108	4	12.0015166	4	
28	12.0003713	4	12.0003723	4	

討論

遮蔽 L-J ポテンシャル

遮蔽 L-J ポテンシャルは ccp 構造を安定化しないと いう結果は木原の谷幅の狭いポテンシャルは ccp 構 造を安定化しないという結果と一致している。R=5-8, S=4-6 で表される長距離力 L-J ポテンシャルが ccp 構造を安定化するという結果は木原により予見され たが、本論文で明確に示された。その計算は多数の 設数を取り入れる多量の計算を必要とするため、計 算されなかったのであろう。その代わりに木原は指 数関数の斥力項を持つ Born-Mayer ポテンシャルで 谷幅を決めるパラメータσが 8.5< σ <8.675 の範囲 にある広い谷幅を持つ長距離力ポテンシャルが ccp 構造を安定化することを示した。しかし輸送実験結 果の解析によるとσの値はクリプトンに関して 13.5 が提案されている⁸⁾。谷幅の広い遠距離力ポテンシ ャルは ccp 構造を安定化し、谷幅の狭い近距離力ポ テンシャルはhcp構造を安定化するという結果は2 つの構造の特徴を表している。

Table 2. Cohesive Energy for the L-J potentials of $R{=}7{-}28,$ $S{=}4{-}10$

R	S	ccp	hcp	δE
$\overline{7}$	5	-15.4229621	-15.4231138	0.0001517
	6	-11.5917883	-11.5922754	0.0004871
8	5	-13.5672786	-13.5676731	0.0003945
	6	-10.4012527	-10.4019065	0.0006538
9	4	-22.3073926	-22.3075183	0.0001257
	5	-12.4393455	-12.4398948	0.0005493
	6	-9.6744232	-9.6751831	0.0007599
10	4	-20.4989332	-20.4992599	0.0003267
	5	-11.6924273	-11.6930743	0.0006470
	6	-9.1935070	-9.1943306	0.0008236
	8	-7.4841156	-7.4851193	0.0010037
12	4	-18.3093226	-18.3098537	0.0005311
	6	-8.6102003	-8.6110699	0.0008696
	8	-7.1275597	-7.1285513	0.0009916
	10	-6.6243220	-6.6252932	0.0009712
14	4	-17.0503845	-17.0509836	0.0005991
	6	-8.2786914	-8.2795482	0.0008568
	8	-6.9321075	-6.933044	0.0009365
	10	-6.4826040	-6.4834853	0.0008813
	12	-6.2892778	-6.2900389	0.0007611
16	10	-6.3996830	-6.4004744	0.0007914
	12	-6.2254692	-6.2261247	0.0006555
	14	-6.1413970	-6.1419148	0.0005178
20	10	-6.3119788	-6.3126306	0.0006518
	12	-6.1613742	-6.1618769	0.0005027
	14	-6.091444	-6.0918075	0.0003635
24	10	-6.2686835	-6.2692493	0.0005658
	12	-6.1318329	-6.132248	0.0004151
	14	-6.0699641	-6.0702456	0.0002815
28	10	-6.2437102	-6.2442231	0.0005129
	12	-6.1157284	-6.1160929	0.0003645
	14	-6.0589494	-6.0591865	0.0002371

Stillinger は切断型 L-J ポテンシャルを用いて凝集 エネルギーを求め、それが ccp 構造を安定化するこ とを示した。我々の計算も表4に示されるようにそ のポテンシャルは切断パラメータと R, S のある範囲 で ccp 構造を安定にするものであることを支持した。 しかしそのポテンシャルは2つの構造の近接原子数 の違いから得られた特殊なものであり、実際のポテ ンシャルを表しているかどうかが問題となろう。

ゼロ点振動と3体相互作用

Jansen 等はゼロ点振動の効果を木原の L-J(S,6) ポテ ンシャルによる凝集エネルギーに加えても hep のエ ネルギーの方が低いという結果は変らないと報告し

Table 3. Cohesive Energy for the L-J potentials of R =5-8, S =4, 5

R	S	$E_{ m ccp}$	$E_{ m hcp}$	δ
5	4	-63.0063645	-63.0024041	-0.0039604
6	4	-38.9342037	-38.9325306	-0.0016731
6	5	-18.9126162	-18.9123677	-0.0002485
$\overline{7}$	4	-29.7441949	-29.7434785	-0.0007164
8	4	-25.0754892	-25.0752962	-0.0001930

た¹⁰。Schirilitzki はゼロ点エネルギーと自由エネル ギーの非調和項を取り入れた計算により ccp の方が エネルギーが低くなると報告した¹¹⁾。近年、ゼロ点 振動の効果のみでも ccp のエネルギーが hcp よりも 低くなるという計算結果が得られた¹²⁾。ccp のエネ ルギーを下げる効果のあるのは調和振動モードの結 合であり、非調和振動ではないという詳細な結果も 提出された¹³⁾。

Jansen は最近接原子間の3体短距離交換相互作 用が ccp 構造のエネルギーを hcp よりも低くすると いう結果を得た¹⁴⁾。一方 Swenberg は3体相互作用 は ccp の安定化に寄与しないという結果を報告した ¹⁵⁾。Neb 等は長距離3体相互作用が ccp 構造のエネ ルギーを hcp よりも低くすると報告した¹⁶⁾。Dotelli 等は3体短距離交換相互作用は ccp の安定化を与え ると報告した¹⁷⁾。3体短距離相互作用は ccp のエネ ルギーを hcp に相対的に低下させるが、3体長距離 相互作用は逆に増加させる。その和は ccp 構造のエ ネルギーの低下を与えるが、hcp よりも低いエネル ギーを与える程ではないという結果が得られた¹⁰⁾。 Hermann 等は完全基底系を用いた MP2 計算により ゼロ点振動を含まなければ hcp が ccp よりも安定な 構造であるという結果を得た¹⁸⁾。

以上の考察から実験で得られた ccp 構造の安定化 を与える要因として Stillinger の切断 L-J ポテンシ ャルまたはゼロ点振動、あるいはその両者が有望で ある。量子論ではゼロ点振動を考慮したものが真の ポテンシャルエネルギーを与える。遮蔽 L-J ポテン シャルにゼロ点振動の補正を加えたものが ccp 構造 を安定化するかどうかは今後の課題であろう。

結論

木原により示された σ 値の小さい谷幅の広い Born-Mayer ポテンシャル以外に、谷幅の広い遠距離 L-J ポテンシャル (R=5-8, S=4,5) は hcp 構造よりも ccp 構造を安定にする。一般に谷幅の広いポテンシャル は ccp 構造を安定化すると言えるだろう。原子間力 の遮蔽という自然な予想に反して、谷幅の狭い遮蔽 L-J ポテンシャルは ccp 構造の安定化を与えない。 しかし遮蔽ポテンシャルのうち、切断項を持つ短距 離 L-J ポテンシャルは切断距離を適切に選ぶことに より ccp 構造を安定化する。これらの結果は2種の 最密充填構造の違いを表している。

2体の遮蔽 L-J ポテンシャルという考えは予想さ

れた結果を与えないが、結晶内では原子間力が遮蔽さ れているという考えは妥当であると思われる。今後は 遮蔽 L-J ポテンシャルのエネルギーにゼロ点振動の補 正を加えたものが ccp 構造を安定化するかどうかを調 べる必要があろう。

Table 4. Cohesive Energy for the cut L-J potentials of R = 12, S = 4-10

r /m	rent/m S		$A r_{min}/r_0$	сср		hcp		8 E
1 cut/10	D	Л	$I \min I 0$	E	$r_{ m nb}$	E	$r_{ m nb}$	012
2.46	4	5.54190	1.13338	-15.1566	1.09843	-15.1471	1.09765	-0.0095
	5	6.78600	1.12239	-14.3042	1.09875	-14.2972	1.09837	-0.0090
	6	8.42658	1.11360	-13.7194	1.09715	-13.7155	1.09698	-0.0039
	$\overline{7}$	10.7059	1.10635	-13.3110	1.09459	-13.3093	1.09450	-0.0017
	8	14.1070	1.10024	-13.0210	1.09160	-13.0207	1.09154	-0.0003
	9	19.7553	1.09499	-12.8119	1.08800	-12.8125	1.08800	0.0006
	10	31.0262	1.09042	-12.6594	1.08540	-12.6604	1.08538	0.0010
2.60	4	5.15718	1.13562	-15.9821	1.09683	-16.0175	1.09618	0.0354
	5	6.32139	1.12417	-14.8391	1.09792	-14.8564	1.09756	0.0173
	6	7.85668	1.11507	-14.0749	1.09684	-14.0644	1.09684	-0.0105
	$\overline{7}$	9.98909	1.10760	-13.5539	1.09459	-13.5595	1.09449	0.0056

文献

- 1) Klein ML and Venables JA (1976) *Rare Gas Solid*. Academic Press, London.
- Kihara T and Koba S (1952) Crystal structures and intermolecular forces of rare gases. J. Phys. Soc. Japan 7: 348-354.
- Amano C, Mikami Y and Mochizuki S (2011) Shielded Lennard-Jones potentials and the crossover of structures of rare gas clusters. *Sci. J. Kanagawa Univ.* 22: 1-7.
- Stillinger FH and Stillinger DK (1990) Computational study of transition dynamics in 55-atom clusters. J. Chem. Phys. 93: 6013-6024.
- Laviolette RA and Stillinger FH (1985) Multidimensinal geometric aspects of the solid-liquid transition in simple substances. J. Chem. Phys. 83: 4079-4085.
- 6) Van de Waal BW (1996) No evidence for size-dependent icosahedral → fcc structural transition in raregas clusters. Phys. Rev. Lett. 76: 1083-1086.
- Lennard-Jones JE and Ingram AE (1925) On the calculation of certain crystalpotential constants, and on the cubic crystal of least potential energy. *Proc. Roy. Soc.* A107: 636-653.
- Kane BG and Goeppert-Mayer M (1940) Lattice summations for hexagonal close-packed crystals. J. Chem. Phys. 8: 642.
- Mason EA (1960) Redetermination of the intermolecular potential for krypton. J. Chem. Phys. 32: 1832-1836.
- 10) Jansen L and Dawson JM (1954) Intermolecular

forces and crystal structures of rare gases. J. Chem. Phys. 22: 1619-20.

- Schirlitzki HJ (1971) Influence of anharmonicities to the lattice structure of rare-gas crystals. Z. Phys. 246: 363-368.
- 12) Rosciszewski K, Paulus B, Fulde P and Stoll H (2000) Ab initio coupled-cluster calculations for the fcc and hcp structures of rare-gas solids. *Phys. Rev.* B62: 5482-5488.
- 13) Peter S, Nicola G, Robert PK, Ralf T and Gloria EM (2006) Extension of the Lennard-Jones potential: Theoretical investigation into rare-gas clusters and crystal lattices of He, Ne, Ar, and Kr using many-body interaction expansion. *Phys. Rev. B* 73: 064112/1-19.
- 14) Jansen, L (1964) Stability of crystals of rare gas atoms and alkali halides in terms of three-body interactions. I. Rare-gas crystals. *Phys. Rev.* 135: 1292-1306.
- 15) Swenberg CE (1967) Three-body exchange forces in rare-gas crystals. Phys. Lett. A 24: 163-164.
- 16) Neb DK, Singh RK and Sanyal SP (1986) On the stability of crystal structures of rare gas solids. *Physica Status Solidi B* 134: K97-K100.
- 17) Dotelli G and Jansen L (1996) On the crystal structure problem for heavy rare-gas solids: A three-atom exchange perturbation analysis. *Physica A* 234: 151-166.
- 18) Herman A and Peter S (2009) Complete basis set limit second-order Moller-Plesset calculations for the fcc lattices of neon, argon, krypton and zenon. J. Chem. Phys. 131: 244508/1-7.

■報告書■ 2013 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ロタキサンを用いた一方向移動分子モーターの開発

木原伸浩^{1,3} 西山淳也¹ 牧田佳真²

Construction of One-Directional Linear Molecular Motor Using Rotaxane Platform

Nobuhiro Kihara^{1,3}, Junya Nishiyama¹ and Yoshimasa Makita²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Chemistry, Osaka Dental University, Kuzuhahanazono, Osaka 573-1121, Japan

 $^{\scriptscriptstyle 3}$ To whom correspondence should be addressed. E-mail: kihara@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A rotaxane was prepared from dibenzo-24-crown-8 (DB24C8) and a secondary ammonium salt bearing a bulky 3,5-dimethylphenyl group and a protected secondary amino group separated by a tert-butyl group. The first active transport was carried out by acylation of the "left" ammonium moiety. The DB24C8 wheel moved onto the ammonium group produced by the deprotection of the "right" amino group. The second active transport was carried out by the re-acylation of the "right" ammonium group. The DB24C8 wheel further moved "right-side" over the terminal tert-butyl group. A secondary ammonium salt bearing a cyclopentyl terminal group furnished pseudorotaxane rapidly by mixing with DB24C8. The rapid acylation of the psudorotaxane resulted in active transport of the DB24C8 wheel. The cyclopentyl group acted as a small and bulky terminal group. Isopropyl and sec-butyl groups were too small to realize active transport and a sec-pentyl group was too bulky to form a pseudorotaxane. One methylene chain was necessary between the cyclopentyl group and the ammonium moiety to achieve effective active transport.

Keywords: rotaxane, active transport, rapid acylation of ammonium group, cyclopentyl terminal group

序論

生体系での物質や小器官の移動は能動輸送で行なわれている。生体系の能動輸送はATPによるリン酸化で極めて効率良く駆動されている。

ロタキサンは軸コンポーネントと輪コンポーネン トからなる超分子である。ロタキサンでは軸コンポ ーネントから輪コンポーネントが解離しないため、 人工的な能動輸送を研究するのに最適の系である。 これまで、二重結合の光異性化反応を利用して様々 な能動輸送系が開発されてきた¹⁻⁴⁾。しかし、光異性 化は定量的に起こらないため、光定常状態に達する とそれ以上の輸送は起こらなくなる。そのため、光 反応で定量的な能動輸送は困難である。光エネルギ ーを駆動力とする能動輸送系は、ATPをエネルギー 源とする生体の能動輸送系とは全く異なる原理で駆 動されているだけでなく、エネルギー効率において も生体の能動輸送系と比べられるものではない。

ー方我々はこれまで、リン酸化に相当する反応 であるアシル化で駆動される定量的な能動輸送を 実現してきた⁵⁰。この能動輸送系は図1に示すよう に速度論的に駆動されており、dibenzo・24-crown-8 (DB24C8)を輪コンポーネントとして持つ二級アン モニウム塩型のロタキサン2-H⁺から始める。2-H⁺は アンモニウム塩の近傍に末端置換基R₁としてシクロ ヘキシル基または tert-ブチル基を持つ。2-H⁺を塩 基で中和すると、遷移状態に相当するロタキサン2* が生成する。2* は熱力学的に不安定で、速度定数k₁ で1とDB24C8 に解離することで安定化する。しか し、DB24C8 はR¹との立体反発を避けるように軸 の中央へ移動し、過渡的なロタキサン2を形成する こともできる。2* から2への変換速度定数をk₂とす ると、DB24C8の内孔はシクロヘキシル基やtert ブ チル基よりもわずかに大きいだけなので^{6,7)}、 $k_1 < k_2$ と なっている。過渡的なロタキサン2は熱力学的には 不安定で、DB24C8 は R^1 を乗り越えて、速度定数 k_3 で1 + DB24C8 に崩壊して行く。ここで、 k_3 よ りも高速に(DB24C8 が R^1 を乗り越える前に)2の アミノ基を速度定数 k_4 でアシル化すれば、DB24C8 は軸コンポーネントの中央から戻れなくなり、2の 過渡的な構造が固定される。このようにして得られ るロタキサン3は4 + DB24C8 よりも熱力学的に不 安定であり、輪コンポーネントである DB24C8 は能 動輸送されている。 R^1 が十分に嵩高いシクロヘキシ ル基や tert-ブチル基であると k_3 は小さく、アシル 化を高速に行なえば $k_3 < k_4$ となり、定量的な能動輸 送が実現される。

末端置換基として tert-ブチル基は特別である。2 ではDB24C8がtert-ブチル基を乗り越えて軸コン ポーネントの外に出て行くことはできるが、これは 分子内反応だからであり、DB24C8 が嵩高い tert-ブチル基を乗り越えて、軸コンポーネントの外から アンモニウム塩部位にたどり着くことはできない")。 このことを利用すると、末端置換基 R²に tert-ブチ ル基を用い、その外側に第二のアンモニウム塩を置 けば、連続した能動輸送が実現できると期待できる。 生体内の能動輸送系では、軸コンポーネントに相当 するレールはポリマー状の繰り返し構造をもってい る。能動輸送系を区切るセパレーターとして tert-ブ チル基を用いることで連続した能動輸送が実現でき れば、生体内の能動輸送系に類似した、長距離に渡 る繰り返し構造の上を一方向に移動して行くような 能動輸送系を構築することができる。そこで、本研 究では、その基本系として2段階の能動輸送系の構 築を行なった。

一方、R¹として tert-ブチル基を用いると軸コン ポーネントの外から R¹を乗り越えて DB24C8 がア ンモニウム塩部位にたどり着くことはできない (k_f ~ 0) が、R¹としてシクロヘキシル基を用いた場合、 DB24C8 は R¹を乗り越えてアンモニウム塩部位に たどり着くことができる。そのため、R¹としてシク ロヘキシル基を用いれば、1-H⁺と DB24C8 の混合物 から、能動輸送された状態 3 へと直接持ち上げるこ とができる。しかし、その速度定数 k_fは非常に小さく、 1-H⁺と DB24C8 の混合物から 2-H⁺ が生成する反応 が平衡に達するまでには 100 日以上の時間がかかる 6 。R¹をシクロヘキシル基よりも小さくすると k_f は 大きくなるが、同時に k₁ と k₃ も大きくなり、能動 輸送が起こる条件 (k₁ < k₂ および k₃ < k₄)を満たさ なくなってしまうおそれがある。もし k_f が十分大き い R¹でも能動輸送ができるならば、解離状態 1-H⁺ + DB24C8 から、能動輸送状態 3 へと直接速やかに 持ち上げることができ、実験的に意味のある時間内 で能動輸送が実現できる。そこで、本研究では、シ クロヘキシル基よりも小さな置換基を R¹に用いるこ とで、高速な 2-H⁺の生成と定量的な 3 への変換の両 方を満足する「都合の良い置換基」の探索を検討した。



図1. アシル化を駆動力とする能動輸送系の速度論.

結果と考察

二段階能動輸送

トリブチルホスフィンを触媒とするアシル化法を利 用し⁸⁾、出発ロタキサンとして5を合成した。5の アンモニウム塩部位を中和しながらアシル化すると、 定量的に6が得られた。2つの窒素上を選択的に保 護-脱保護するために、R¹と R²には異なる保護基を 用いている。ここで、5では左側の末端置換基が非 常に嵩高く、DB24C8が左側に動くことはできない。 また、右側には2つのメチル基を持つ嵩高い C。と N 上の R¹ があるため、DB24C8 は軸から抜けること はできない。次に6の保護基R¹を脱保護した。6a (R¹ = Cbz) の場合は軸上のベンジルエステルの加水 素分解も併発するため7aの収率は約30%に過ぎな かったが、 $6b \cap R^1$ (Troc) は定量的に脱保護され、 89%の収率で7bが得られた。7bは、対アニオンを PF₆-とすると、R¹が消失して発生するアンモニウム 塩部位との相互作用のため、DB24C8が2つのメチ ル基を持つCaを乗り越えて右側のアンモニウム塩 上に収まった。

7bのアンモニウム塩部位を高速にTroc化すると、



図2. 保護–脱保護による二段階能動輸送.

C_aの嵩高さに基づく能動輸送が起こり、収率 88% で 8b が得られた。8b は徐々に DB24C8 を放出して 定量的に 9b を与えた。この時、DB24C8 は 8b の右 末端の tert-ブチル基を乗り越えて軸コンポーネント の外側に移動して行っている。すなわち、5 から 9b の過程で、DB24C8 は左から右に一方向に移動して いる。

高速能動輸送

シクロヘキシル基を末端に有する擬ロタキサン10で は、大過剰のEt₃Nと1当量のDMAP存在下、大過 剰のBoc₂Oでアシル化すれば79%の効率でDB24C8 を能動輸送できる。そこで、末端置換基を少し小さ いシクロペンチル基とした12で同様に能動輸送を 検討することにした。まずDB24C8がシクロペンチ ル基を乗り越えて行く速度を見積もるために、12に 対応するアンモニウム塩とDB24C8を混合したとこ ろ、速やかに12が生成し、1.5時間ほどで平衡に達 した。同様の条件で10の生成が平衡に達するまでに は100日以上かかるので、DB24C8にとって、シク ロペンチル基が立体障害として働きにくいことが分 かる。

12の生成が平衡に達した後、10で能動輸送でき た条件でアシル化を行なった。しかし、この条件で は能動輸送生成物である13は全く得られなかった。 この結果は、シクロペンチル基のような小さい末端 置換基を用いたため $k_1 > k_2$ になってしまったから であるとも考えられるが、アシル化条件が悪いため に k₃ > k₄ であったからであるとも考えられる。もし 前者であれば、末端置換基としてシクロペンチル基 を用いると能動輸送は不可能になるが、後者であれ ば、アシル化速度(k₃)を速くすればよいものと考 えられる。そこで、Boc₂Oよりも反応性の高いアシ ル化剤を用いて能動輸送を検討した。その結果、炭 酸誘導体である TrocCl を用いると 5%の、芳香族カ ルボン酸誘導体である BzCl を用いると 78%の効率 で、それぞれ能動輸送生成物13が得られた。また、 BzCl をアシル化剤として用いた時には、触媒として DMAPを用いなくとも 63%の効率で能動輸送する ことができた。DMAP を用いると系が複雑になるこ とから、以後の検討では DMAP を用いないことにし た。以上のように13が収率よく得られることから、 末端置換基をシクロペンチル基としてもk1 < k2 とい う条件が満たされ、擬ロタキサンを速やかに生成し ながらでも効率的に能動輸送できることが分かった。

そこで、様々な末端置換基を持つアンモニウム塩 を用いて能動輸送を検討した。12と同じくシクロペ ンチル基を持つ14では、60%の効率で能動輸送す



図 3. シクロペンチル基を末端置換基とするロタキサンでの高速能動輸送.

ることができた。また、14の場合は、溶媒をトルエ ンとし、用いる DB24C8 の量を 1.5 当量まで減らす と、95%とほぼ定量的な能動輸送が可能であること が分かった。一方、末端置換基をイソプロピル基と した 15 や sec- ブチル基とした 16 では能動輸送効率 はそれぞれ 8%、10%であった。これらの置換基は シクロペンチル基よりも小さく、k1 < k2 の条件が十 分に満たされていないものと考えられる。そこで末 端置換基を sec- ペンチル基としたところ、DB24C8 は sec- ペンチル基を乗り越えることができず、17 が 生成しなくなった。

さらに、シクロペンチル基とアンモニウム塩との



図 4. 様々な末端置換基を持つロタキサン.

間のメチレン鎖の長さの効果について検討した。メ チレン鎖を長くした 18 では能動輸送効率は 59%で あった。同じ条件で 12 は 95%の能動輸送効率を示 したことから、メチレン鎖を長くすることでシクロ ペンチル基が DB24C8 から見て動力学的に嵩高い置 換基として働きにくくなったものと考えられる。一 方、メチレン鎖を持たない 19 では、DB24C8 から見 てシクロペンチル基は非常に嵩高く感じられるはず であるにも関わらず、能動輸送効率はわずか 2%で あった。このことから、効率的な能動輸送には、末 端置換基の大きさだけでなく、その位置関係も極め て重要であることがわかった。

最後に、14を用いて、BzCl以外のアシル化剤で 能動輸送を検討した。酸クロリドと同様に求電子性 の高いイソシアナートを用いると43%の効率で能動 輸送された。脂肪族酸クロリドは反応条件下で分解 するため、AcClを用いると能動輸送は起こらなかっ た。酸無水物として Bz₂O や Ac₂O を用いると能動輸 送は起こらなかったが、反応性の高い TFAA の場合 は 88%の効率で能動輸送された。以上のことから、 効率的に能動輸送を行なうためには、k₃の大きな、



図 5. 求電子性の高いアシル化剤による能動輸送.

求電子性の高いアシル化剤を用いることが必須であ ることが明らかとなった。

謝辞

本研究は、「ロタキサンを用いた一方向移動分子モー ターの開発」の課題名で2013年度神奈川大学総合 理学研究所共同研究助成を受けて行ないました。所 長ならびに所員各位のご支援に深謝いたします。

文献

- 1) Kay ER, Leigh DA and Zerbetto F (2007) Synthetic molecular motor and mechanical machines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**:72-191.
- 2) Barrell MJ, Campa AG, Delius M, Geertsema EM and Leigh DA (2011) Light-driven transport of a molecular walker in either direction along a molecular track. Angew. Chem. Int. Ed. 50:285-290.
- Baroncini M, Silvi S, Venturi M and Credi A (2012) Photoactivated directionally controlled transit of a non-symmetric molecular axle through a macrocycle. Angew. Chem. Int. Ed. 51:4223-4226.
- Browne WR and Feringa BL (2011) Chiroptical molecular switches. In: Molecular Switches, Second, Completely Revised and Enlarged Edition, Vol. 1. Feringa BL and Browne WR, eds., Wiley-VCH, Weinheim. Chap. 5. pp.121-179.
- 5) Makita Y, Kihara N and Takata T (2008) Quantitative active transport in [2]rotaxane using a oneshot acylation reaction toward the linear molecular motor. J. Org. Chem. **73**:9245-9250.
- Ashton PR, Baxter I, Fyfe MCT, Raymo FM, Spencer N and Stoddart JF (1998) Rotaxane or pseudorotaxane? That is the question! J. Am. Chem. Soc. 120:2297-2307.
- 7) Tachibana Y, Kihara N, Furusho Y and Takata

T (2004) Is the tert-butyl group bulky enough to end-cap a pseudorotaxane with a 24-crown-8-ether wheel? *Org. Lett.* **6**:4507-4509.

8) Tachibana Y, Kawasaki H, Kihara N and Takata T (2006) Sequential O- and N-acylation protocol for high-yield preparation and modification of rotaxanes: synthesis, functionalization, structure, and intercomponent interaction of rotaxanes. J. Org. Chem. **71**:5093-5104.

■原 著■ 2013年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

チタン (IV) 三置換 Dawson 型ポリ酸塩単量体とそれを用いた NH4⁺ イオン内包テトラポッド型四量体の合成

松木悠介¹ 星野貴弘¹ 増田佳奈¹ 松井敬祐¹ 力石紀子¹ 松永 論^{1,2} 野宮健司¹

Syntheses of Monomeric Tri-Titanium(IV)-Substituted Dawson Polyoxometalate (POM) and Non-Bridging Tetrameric POM Encapsulating Ammonium Cation

Yusuke Matsuki¹, Takahiro Hoshino¹, Kana Masuda¹, Keisuke Matsui¹ Noriko Chikaraishi Kasuga¹, Satoshi Matsunaga^{1, 2} and Kenji Nomiya¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: matsunaga@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The monomeric tri-Ti(IV)-substituted Dawson polyoxometalate (POM), Na₁₂[P₂W₁₅Ti₃O₆₂] • NaCl • 6H₂O, was synthesized by basic hydrolysis of the bridging Dawson tetramer with an encapsulated chloride ion, Na₁₉H₂[{P₂W₁₅Ti₃O₅₉(OH)₃}₄{ μ_{3} -Ti(H₂O)₃}₄Cl] • 124H₂O, at pH 9.0 and unequivocally characterized by complete elemental analysis, thermogravimetric and differential thermal analysis (TG/DTA), FTIR spectroscopy and solution ³¹P NMR spectroscopy. The monomeric tri-Ti(IV)-substituted Dawson POM could not be derived from either a direct reaction of the trilacunary Dawson species, [P₂W₁₅O₅₆]¹², with Ti source or the non-bridging Dawson tetramer, [{P₂W₁₅Ti₃O_{57.5}(OH)₃}₄Cl]²⁵. It could be prepared for the first time by hydrolysis of the bridging Dawson tetramer with an encapsulated Cl- ion. In this work, the non-bridging Dawson tetramer with an encapsulated ammonium cation was synthesized by using the monomeric tri-Ti(IV)-substituted Dawson POM. This fact indicates that the monomeric tri-Ti(IV)-substituted Dawson POM can be used as a precursor for the synthesis of novel oligomeric POMs and organometallic-supported POMs.

Keywords: polyoxometalate, titanium, monomer, NH4+-encapsulating tetramer

序論

分子性の酸化物クラスターであるポリ酸塩 (polyoxometalate: POM)は、強酸性、耐酸性、豊富 な酸化還元特性などの極めて多彩な性質を有してい るため、触媒、表面化学、材料科学、医薬など様々 な観点から広く研究がなされている¹⁾。POM 骨格 を構成する金属は、主にタングステン(VI)やモリブ デン(VI)が用いられているが、これらの金属を位置 選択的に欠損させた欠損型 POM を合成することが 可能である。欠損型 POM は、飽和型 POM に比べ て欠損部位が高い表面塩基性度を有しているため、 異種金属イオンを欠損部位に取り込んだ金属置換型 POM の合成に利用することができる。通常のタン グステン(VI)やモリブデン(VI)などの構成金属を異 種金属で置換することで表面電荷密度を制御するこ とができ、さらなる機能拡張部位として期待できる。 これまでにタングステン(VI)三原子を、バナジウ ム(V)やニオブ(V)で置換した三置換Dawson型 POM単量体(図1上)が合成され、その表面に有 機金属種を担持できることが報告されている²⁾。こ れはVI価のタングステン酸をV価の異種金属イオン で置換しているためPOM上の表面負電荷密度が大 きくなり、カチオン性有機金属種との相互作用が 向上したためと考えることができる。一方で、チ タン(IV)のイオン半径(0.75 Å)はタングステン


図 1. バナジウム (V) およびニオブ (V) 三置換 Dawson 型 POM 単量体(上)と二種類のチタン (IV) 三置換 Dawson 型 POM 四量体(下). 中心空間にカプセル化されている Cl イオンは省略している. 赤はバナジウムもしくはニオ ブ,青と水色はチタンを表している.

(VI)のイオン半径(0.74 Å)とほぼ等しく、欠損部 位にチタン(IV)が導入されたチタン置換 POMの 合成が可能である³⁾。チタンはIV価であるため、上 記のバナジウム (V) やニオブ (V) に比べてさらなる 表面負電荷密度の増大が予想される。これまでに当 研究室では、Dawson型 POM 三欠損種から導かれ るチタン(IV) 三置換体の合成を行ってきたが、チ タン(IV) 置換 POM は分子間の Ti-O-Ti 結合を形成 しやすく、単量体ではなく Ti-O-Ti 結合により縮合 したテトラポッド型四量体として単離された(図 1下)^{4,5)}。また、チタン (IV) 三置換 Dawson 型四 量体は、反応条件に応じて二種類の四量体、つま り [{P₂W₁₅Ti₃O_{57.5}(OH)₃}₄Cl]²⁵ (架橋なし四量体)⁴と [{P₂W₁₅Ti₃O₅₉(OH)₃}₄{µ₃-Ti(H₂O)₃}₄Cl]²¹ (架橋あり四 量体) を形成することを明らかにした。これら二種 類のチタン (IV) 三置換 Dawson 型四量体は、中心空 間に様々なイオン (Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻等) をカプセル 化することができる 6,7)。

我々は、これまで四量体としてのみ合成され たチタン(IV) 三置換 Dawson型 POMの単量体 Na₁₂[P₂W₁₅Ti₃O₆₂]・NaCl・6H₂Oの合成に成功した。 さらにチタン(IV) 三置換 Dawson型 POM 単量体を 前駆体に用いて、中心空間に NH₄⁺ カチオンをカプ セル化した架橋なし四量体を合成したので報告する。

材料と方法

材料

エタノール、ジエチルエーテル(和光純薬工業(株)) は、購入したものをそのまま用いた。CLカプセル 化架橋あり四量体 $Na_{19}H_2[{P_2W_{15}Ti_3O_{59}(OH)_3}_4{\mu_3}-Ti(H_2O)_3}_4Cl]・124H_2Oは既報⁵⁾に従い合成した。$

合成法

チタン(IV) 三置換 Dawson型 POM 単量体 Na₁₂[P₂W₁₅Ti₃O₆₂]・28H₂O Cl⁻カプセル化架 橋あり四量体 Na₁₉H₂[{P₂W₁₅Ti₃O₅₉(OH) $_{3}^{4}$ { μ_{3} -Ti(H₂O) $_{3}^{4}$ Cl]・124H₂O (4.8 g, 0.253 mmol)を純水 20 mL に溶解し、1 M NaOH 水溶液を用いて pH 9.0 に 調整した。この溶液に NaCl (8.0 g, 0.137 mmol)を 加え一時間撹拌した。析出した白色粉末をメンブラ ンフィルター (JG 0.2 μ m)を使って濾取し、エタノ ール 30 mL で 3 回、ジエチルエーテル 50 mL で 3 回洗浄し、減圧乾燥を 2 時間行い、白色粉末として チタン (IV) 三置換 Dawson型 POM 単量体を収率 41.7% (2.0 g スケール)で得た。

NH4⁺ カチオンをカプセル化した架橋なし四量体

Na₁₂[P₂W₁₅Ti₃O₆₂]・NaCl・ $6H_2O$ (0.50 g, 0.11 mmol) を純水 12 mL に溶解し、そこへ NH₄Cl (0.06 g, 1.12 mmol)を加えた。0.1 M 塩酸を用いて pH 8.4 に調整 した後、80°C で 30 分間撹拌した。この溶液をロー タリーエバポレーターを用いて白色粉末が析出する まで濃縮を行った。純水 1 mL を加え、35°Cで析出 した粉末を溶かし、室温までゆっくりと冷却した。 析出した無色針状結晶をメンブランフィルター (JG 0.2 μ m) で濾取し、エタノール 10 mL で 3 回、ジエ チルエーテル 50 mL で 3 回洗浄し、減圧乾燥を 3 時 間行うことで、NH₄⁺ カチオンをカプセル化した架橋 なし四量体を白色粉末として収率 14.3% (0.067 g ス ケール) で得た。

結果と討論

合成と同定

チタン (IV) 三置換 Dawson型 POM 単量体は、 Dawson型三欠損種とチタン (IV) から直接合成す ることはできず、速やかな自己縮合で Ti-O-Ti 結合 を形成し四量体になってしまう^{4),5)}。しかし、既に 我々が報告している架橋あり四量体 [$P_2W_{15}Ti_3O_{59}$ (OH) $_{3}^{4}$ { μ_{3} -Ti(H₂O) $_{3}^{4}$ Cl]²¹ を NaOH 水溶液で加水分 解することにより、単量体 [$P_2W_{15}Ti_3O_{62}$]¹² を合成 することができた (図 2)。架橋あり四量体を溶解 した溶液を NaOH 水溶液で pH 9.0 まで塩基性にす ると、塩基加水分解により単量体が生成した。これ



図2. チタン(IV) 三置換 Dawson 型 POM 単量体の合成ルートと、それを用いた NH4⁺ カプセル化架橋なし四量体の合成.

表 1. チタン(IV)三置換 Dawson 型 POM 単量体の元素分析結果	
---	--

	Н	Cl	Na	0	Р	Ti	W	Total (%)
calcd.	0.28	0.81	6.80	24.74	1.41	3.27	62.71	100
found	0.27	0.84	5.85	23.9	1.40	4.09	61.90	98.24

calcd. for $Na_{12}[P_2W_{15}Ti_3O_{62}] \cdot NaCl \cdot 6H_2O$ (MW: 4397.56) Mikroanalytisches Labor Pascher (Remagen, Germany).

は Dawson 型 POM の cap 部分 1 カ所をチタン (IV) で置換した POM やチタン(IV) 一置換および二置 換 Keggin POM に一般的に見られる現象であり、溶 液を酸性にすると多量体構造が、塩基性にすると単 量体構造が生成する3。しかし、架橋なし四量体か らは pH を高くしても単量体への加水分解は起こら ず、架橋あり四量体からのみ単量体構造を単離する ことができた。FTIR の結果から、架橋あり及び架 橋なし四量体に特徴的な分子間 Ti-O-Ti に基づく振 動バンド (690-650 cm⁻¹) が観測されなかったことか ら、単量体構造であることが確認できた。全元素 分析の結果(表1)から、組成を塩化ナトリウム1 分子を含む Na₁₂[P₂W₁₅Ti₃O₆₂]・NaCl・6H₂O と決定 し、found の合計値も 98.24 % と純度良く合成する ことができた。 D_2O 中での ³¹P NMR 測定では、 $\delta =$ -4.94, -14.61 ppm に一対の二本線ピークが観測され た(図 3a)。低磁場側のピークはチタン(IV)で置換 されたサイトに近いP原子に由来し、高磁場側のピ ークはタングステン (VI) で cap されたサイトに近い P 原子に由来すると考えられ、単量体が選択的に得 られたことが明らかとなった。前駆体である架橋あ り四量体の化学シフトは -7.04, -13.77 ppm であるこ とから(図 3d)⁵、単量体構造への変換に伴うピー クのシフトが明確に観測されている。

チタン (IV) 三置換 Dawson 型 POM 単量体は、前 述の通りバナジウム(V) 三置換体やニオブ(V) 三置 換体に比べ高い負電荷密度を有していることから、 これを利用したカチオン性有機金属種の担持や自己 縮合による多量化などのさらなる分子修飾が期待さ れる。そこで、過剰のNH4⁺カチオン存在下、チタ ン (IV) 三置換 Dawson 型 POM 単量体を 0.1 M 塩酸 添加により縮合させることで、NH4⁺をカプセル化 した架橋なし四量体の合成に成功した(図2)。架橋 なし四量体は、分子内 Ti-O-Ti 結合を形成する稜共 有酸素原子へのH⁺付加の有無により、中心空間の 電荷を制御できることが明らかとなっている。例え ば、酸性下では分子内 Ti-O-Ti 結合の酸素原子に H⁺ が計 12 個付加しているため、TiO6 八面体 12 個で形 成される中心空間はカチオン性の高い状態になって おり、Cl-アニオンを内包する。一方、H⁺が分子内



図 3. D_2O 中での ³¹P NMR スペクトル. (a) 今回合成し たチタン (IV) 三置換 Dawson POM 単量体, (b) NH₄⁺を 内包した架橋なし四量体, (c) Cl⁻を内包した架橋なし四量 体, (d) 前駆体として用いた Cl⁻を内包した架橋あり四量 体.

Ti-O-Ti 結合の酸素原子に付加していない場合、中心 空間はアニオン性の高い状態になり、NH4⁺カチオン が中心空間に取り込まれる。本合成法では、pH を 8.4 に調整するため、稜共有酸素はH+付加が起こら ずカチオンである NH4⁺ イオンを内包していた。³¹P NMR からは、CI カプセル化架橋なし四量体の化学 シフト($\delta = -7.6, -14.0$ ppm, 図 $3c)^{4}$ とは異なるピー ク(δ = -7.21, -14.2 ppm, 図 3b)を示し、これは従 来の方法で合成した NH4⁺ カプセル化架橋なし四量 体のピーク(δ = -7.15, -14.23 ppm)⁷⁾ と良く一致し た。NH4⁺カプセル化架橋なし四量体は、これまでに (1) チタン(IV) 三置換ペルオキソ種 Na₉[P₂W₁₅(TiO₂)₃ O₅₆(OH)₃]・14H₂Oを固体状態で 200℃にて加熱し、 これに NH₄Cl を加える方法と、(2) Cl カプセル化架 橋なし四量体の12個のH⁺をアンモニア水で中和す る方法の2種類で合成が可能であったが7)、本方法 は単量体を原料として NH4⁺存在下で四量体へと縮 合する新しい方法である。

まとめ

チタン (IV) 置換 POM は分子間の Ti-O-Ti 結合を形成しやすく、これまでは単量体ではなく Ti-O-Ti 結合 により縮合したテトラポッド型四量体として単離されてきた。本研究では、チタン (IV) 三置換 Dawson 型 POM 架橋あり四量体 $[{P_2W_{15}Ti_3O_{59}(OH)_3}_4 {\mu_3-Ti(H_2O)_3}_4Cl]^{21}$ を塩基加水分解することにより、単量体 Na₁₂ $[P_2W_{15}Ti_3O_{62}]$ ·NaCl·6H₂O の合成に初めて成功した。さらにチタン (IV) 三置換 Dawson 型 POM 単量体を前駆体に用いて、中心空間にNH₄⁺カ チオンをカプセル化した架橋なし四量体を合成する 新たな方法を見出すことができた。今回合成に成功 したチタン (IV) 三置換 Dawson 型 POM 単量体は、 これまで報告されてきたバナジウム (V) およびニオ ブ (V) 三置換体 Dawson 型 POM 単量体に比べて高 い負電荷密度を有しているため、今後はカチオン性 有機金属種を担持した新たな機能性 POM の合成を 行う予定である。

謝辞

本研究は、2013年度総合理学研究所共同研究の研究 助成を受けて行いました。厚く御礼申し上げます。

文献

- Hill CL, Ed. (1998) Polyoxometalates. Chem. Rev. 98: 1-390.
- 2) Pohl M, Lyon DK, Mizuno N, Nomiya K and Finke RG (1995) Polyoxoanion-supported catalyst precursors. Synthesis and characterization of the iridium(I) and rhodium(I) precatalysts [(n-C₄H₉)₄N]₅Na₃[(1,5-COD)M•P₂W₁₅Nb₃O₆₂] (M = Ir, Rh). *Inorg. Chem.* 34: 1413-1429.
- Nomiya K, Sakai Y and Matsunaga S (2011) Chemistry of group IV metal ion-containing polyoxometalates. *Eur. J. Inorg. Chem.*: 179-196.
- 4) Sakai Y, Yoza K, Kato CN and Nomiya K (2003) A first example of polyoxotungstate-based giant molecule. Synthesis and molecular structure of a tetrapod-shaped Ti–O–Ti bridged anhydride form of Dawson tri-titanium(IV)-substituted polyoxotungstate. *Dalton Trans.* **32**: 3581-3586.
- 5) Sakai Y, Yoza K, Kato CN and Nomiya K (2003) Tetrameric, trititanium(IV)-substituted polyoxotungstates with an α-Dawson substructure as soluble metal-oxide analogues: molecular structure of the giant ''tetrapod'' [(α -1,2,3-P₂W₁₅Ti₃O₆₂)₄{µ₃-Ti(OH)₃}₄Cl]⁴⁵. Chem. Eur. J. **9**: 4077-4083.
- 6) Sakai Y, Yoshida S, Hasegawa T, Murakami H and Nomiya K (2007) Tetrameric, tri-titanium(IV)-substituted polyoxometalates with an α -Dawson substructure as soluble metal oxide analogues. Synthesis and molecular structure of three giant ''tetrapods'' encapsulating different anions (Br⁻, I⁻, and NO₃). Bull. Chem. Soc. Jpn. 80: 1965–1974.
- 7) Sakai Y, Ohta S, Shintoyo Y, Yoshida S, Taguchi Y, Matsuki Y, Matsunaga S and Nomiya K (2011) Encapsulation of anion/cation in the central cavity of tetrameric polyoxometalate, composed of four trititanium(IV)-substituted α -Dawson subunits, initiated by protonation/deprotonation of the bridging oxygen atoms on the intramolecular surface. *Inorg. Chem.* **50**: 6575-6583.

■原 著■

アフリカツメガエル尾芽胚の陰影反応における 胚性付着器官セメント腺の役割について

藤村桃子1 茂木和枝2 原田由美子3 鶴岡慎哉1 村上柳太郎34 豊泉龍児125

A Prospective Role of the Cement Gland for Dim Light-Induced Swimming Behavior in *Xenopus* Tailbud-Stage Embryos

Momoko Fujimura¹, Kazue Mogi², Yumiko Harada³, Shinya Tsuruoka¹ Ryutaro Murakami^{3,4} and Ryuji Toyoizumi^{1,2,5}

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

- ² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ³ Department of Environmental Science and Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Yamaguchi University, Yamaguchi City, Yamaguchi 753-8512, Japan.

⁴ Department of Applied Molecular Bioscience, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University, Yamaguchi City, Yamaguchi 753-8512, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. E-mail: toyo-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Some aquatic animals, especially in their embryonic, larval and/or juvenile stages, show quick escape behavior when the environmental light dims suddenly. This behavioral response is called the shadow response, or, in some cases, dim light response, and can be reproduced in laboratory conditions. Several pioneering researchers revealed that Xenopus laevis embryos show this shadow response temporarily at the tail-bud stage (phylotypic late-somite stage just before larval stages). The cement gland is an adhesive, mucous-secreting embryonic organ that characterizes this Xenopus tailbud stage embryo. Aquatic Xenopus embryos often hang onto circumferential substrata, water grasses and even each-other's bodies. In a previous study, Jamieson and Roberts (2000) reported that adhesion to a substratum supresses the shadow response of the embryo. As a next step in analyzing the possible involvement of the cement gland in the embryonic shadow response behavior, we tested the response of late tailbud stage embryos whose primordium of the cement gland is dissected at the earlier stage. Semi-quantitative analysis under reciprocal dim light stimuli by turning off the white LED light in a hand-made shading box was performed, and the incidence of the shadow response decreased gradually in both cement gland-dissected embryos and control siblings. In detail, the incidence of the first response to the light dimming was about the same in both the experimental and control groups, but the incidence fell rapidly in cement gland-dissected groups. Taken together, we propose the possibility that the *Xenopus* embryonic cement gland might be involved in the fine-tuning of the sensitivity of the shadow response to the reciprocal dimming light stimuli. Habituation of the shadow response will decrease the risky continuous swimming behavior to flickering light such as the play of sunlight through tree branches. Absence of this tranquilizing mechanism may disadvantage tailbud embryos against predators, even if the first shadow response is rather advantageous to the embryos to escape from the predator. Keywords: Xenopus laevis, cement gland, dissection, shadow response, dim light response, escape behavior, habituation, repetitive stimulation

序論

水生動物の幼生などは捕食者から身を守るために陰 影反応 (shadow response, shadow reaction) を起こ す。陰影反応とは、ある一定の照度下において突然 照度が極端に低下した時に見られる行動である。突 然の減光に対し、カラシン目の洞窟魚 (Astyanax mexicanus) では上方への遊泳行動を示す¹⁻⁷⁾。モノ アラガイ(Lymnaea)では軟体部を殻の内に引っ込 める回避行動を示し^{8,9)}、カミクラゲ (Spirocodon saltatrix)では傘の収縮運動を示すことが報告されて いる¹⁰⁻¹²⁾。アフリカツメガエル (Xenopus laevis)の 尾芽胚では遊泳行動を示す。遊泳を開始した尾芽胚 はらせんを描いて上方へ泳ぎだし、水面や試験管の 側面などに頭部にあるセメント腺を使って付着する ことで遊泳行動を停止する。ツメガエル尾芽胚の陰 影反応は、松果体に依存する反応であることが古く から知られている 13,14)。

セメント腺 (cement gland) とは、アフリカツメ ガエルにおいて尾芽胚期から初期幼生期までの一定 の発生段階(st. 28-50)に形成される胚性付着器官で ある^{15,16)}。セメント腺からは粘液が分泌される。こ の粘液で水面や葉の裏に付着することによって、遊 泳と捕食が可能になるまでの期間、エネルギー消 費を抑えて捕食者に捉えられにくくする補助的な 役割を果たしていると考えられている。他にも洞 窟魚 Astyanax mexicanus やスズキ目のティラピア (Tilapia)の幼生にも類似した付着器官があることが 報告されている 16,17)。このように、アフリカツメガ エルにおけるセメント腺の発生期間と陰影反応が観 察される期間は重なっていることが知られている。 Jamieson と Roberts (2000) による先行研究は、セ メント腺での基質面への付着が陰影反応によって誘 起される遊泳行動を抑制し、なおかつ既にセメント 腺によって付着している尾芽胚は、環境光の減光に 対して陰影反応を示し難くなることを報告している 18)。陰影反応に限らず、ツメガエル尾芽胚/幼生の 遊泳行動の停止には三叉神経からセメント腺への投 射が関与していることが知られている^{19,20)}。セメン ト腺からの求心性ニューロンがセメント腺の基質面 への付着を三叉神経に伝え、遊泳行動が停止する。

では、セメント腺が最初から無かった場合には、 陰影反応自体は生じ易くなるのであろうか?付着に よる遊泳の停止が起こらなくなると、游泳距離は伸 びるのであろうか?本研究ではそのような問題意識 をもとに、セメント腺を切除した尾芽胚を用いて陰 影反応の観察を行い、陰影反応に対するセメント腺 の役割の調査を行った。録画可能な実験装置を自作 し、尾芽胚の陰影反応の反応率(=反応個体数/実 験個体数)や遊泳距離に関わるデータを収集し、定量的な解析を行った。また、装置の点灯・消灯の サイクルを8回繰り返すことで、陰影反応に慣れ (habituation)が生じるのかについても、無処理胚と セメント腺切除胚の双方で調査を行った。

材料と方法

アフリカツメガエル胚については、ID をつけて個 別飼育している野生型の雌雄成体に生殖腺刺激ホル モン(雌 300 unit, 雄 250 unit)を皮下注射し、24 $^{\circ}$ の室温での自然交配により胚を得た。受精卵はチ オグリコール酸溶液 (pH 8.6)でゼリー層を除去し て人工淡水 (10% Steinberg 氏液)中で実験に用い る発生段階になるまで飼育した。発生段階の同定は Nieuwkoop & Faber (1994)の発生段階表(復刻版) に従った^{15,21)}。

セメント腺の切除

st. 23・24 になったところでコリオン除去を行い、イ ンセクトピン(志賀昆虫普及社製)を紙ヤスリで研 磨して作成したナイフで、色素沈着により明確にな ったセメント腺を切除した(図1)。セメント腺を切 除した尾芽胚はペニシリン・ストレプトマイシンを 最終濃度100 μg/mlになるよう10% Steinberg 氏液 (人工淡水)で調製した溶液に浸し、st. 33・34 になる



図1. 初期尾芽胚期におけるセメント腺原基の切除. A.アフリカツメガエル後期尾芽胚の側面図. B.尾芽胚頭 部の拡大図.矢頭はセメント腺を示す. C.虫ピンを磨い て自作した微小ナイフで切除した. D.セメント腺を切除 する前の初期尾芽胚. E.セメント線を切除した直後の胚. F.腹側面から見た無処理群の後期尾芽胚. G.腹側面から 見た切除処理群の後期尾芽胚.

まで飼育した。切除の割合が 6-9 割のものを選別し て実験に用い、その後3日間の生存を確認して処分 した。切除率が6割以上の尾芽胚では、基質や水面 への付着は認められなかった。一方、実験に用いな かったセメント腺切除率が5割以下の尾芽胚では、 基質への付着が観察された。

対照群として、同じ遺伝的背景をもつ無処理の同 腹尾芽胚を腰高シャーレ内で st. 34-35 になるまで飼 育し、無作為に取り出して実験に用いた。なお、同 じ発生段階の同腹胚を対照実験に供するために、同 バッチの無処理群とセメント腺切除群は独立に温度 設定した別々のインキュベーターで発生速度を調節 し、別日に実験を行った。

観察方法

各個体を均一な条件下となるよう、培養試験管(外 径: 25 mm、高さ: 120 mm) に 10% Steinberg 氏液 を水深8cmまで満たし、各試験管に尾芽胚を1個 体ずつ投入し、LED ライト(白)を取り付けたシリ コン栓で栓をした。LED ライト以外の光を尾芽胚が 受けないようにカラーボードで暗箱を作成し、赤外 線カメラ (DIGITAL COWBOY 製, DC-NCR13U) を 暗箱内に設置することで、暗黒下での実験を可能に した(図2)。試験管6本を暗箱内に並べて蓋を閉じ、 明順応 1.5 min 以上、暗順応 1.5 min のサイクルで 実験を行った。暗箱を閉じた状態で、LED 点灯時の 試験管底部の照度は1518 ± 25 Lux であり、消灯時 の照度は0±0Lux であった。赤外線カメラによる 撮影を消灯前後に行い、暗箱外のPCで録画/保存 の操作を行った。試験管6本分の6個体を1グルー プとし、1グループにつき8回の試行を行った(図 3)。1回の実験に8グループ(48個体)の尾芽胚を 用いた。試験管6本を並べる暗箱内のラックは、赤 外線カメラからの距離がなるべく均等になるように 配置を工夫し、予備実験により、試験管の位置によ る陰影反応の差異がないことを確認した。実験時に



図2. 陰影反応の実験装置の作製. A. セットアップの全景. 暗箱内に設置した赤外線動画カメラで,尾芽胚の行動を 録画して解析した. 録画時には暗箱側面の蓋(手前側)は 閉じた. B. 尾芽胚の相互作用を排するために,平底試験 管1本につき1個体を入れ,白色 LED を個別に照射した.



図3.本研究における、試行1回あたりの明暗のタイムコース.ON,OFFはLEDライトの点灯・消灯を示し、緑枠の開閉は暗箱の蓋の開閉を示す.右回りで時間が経過する.ライトを点灯(ON)し、暗箱の蓋を開け(開)、試験管を6本並べ、試験管の壁面に付着した尾芽胚を振り落とす.次いで、暗箱の蓋を閉じ(閉)、明順応を1.5分行う(オレンジ実線).消灯(OFF)の10秒前から消灯後30秒まで赤外線カメラで動画を撮影する(赤●).(カメラによる静止画の撮影も行う).消灯(OFF)と同時に暗順応を1.5分行い(黒実線)、再びライトを点灯(ON)して暗箱の蓋を開ける(開).ここまでの操作を1回分の試行とし、1グループ(6個体)につき8回の試行を行った.

測定した水温は23-26.2℃であったが、1 例を除きほ とんどの測定例で23-25℃の範囲内であった。

採点基準

撮影した動画データを元に1個体ずつにスコアを付けた。陰影反応は消灯直後に上方へ向かって遊泳する反応であるので、消灯後10秒以内にどこまで遊泳したかで採点を行った。

反応率のスコアのつけ方

陰影反応の反応率のスコアとしては、実験群と無処 理群の各回の試行において、消灯直後に少しでも運 動した個体数(距離の移動が伴わなくても、からだ をくねらすように動かした場合も含む)を実験個体 数で割り算し、百分率で表現した。

遊泳距離のスコアのつけ方

遊泳距離のスコアとして、消灯後10秒以内に試験 管の底面から4 cm(入れた人工淡水の深さの半分) 以上泳いだ個体を2点とした。4 cm 未満の範囲で泳 いだ個体と底面で屈曲運動をした個体を1点とした。 一方、全く反応を示さなかった、または消灯前にセ メント腺で付着してしまった個体を0点とした。

結果

実験は互いに異なる雌雄の組み合わせの4バッチ分、 同腹胚を無処理群とセメント腺切除群に分けて実施 した。両群それぞれ192個体ずつ、図3のタイムコ ースで陰影反応実験を行ない、試行回数における両 群のスコアをまとめた(表1,図4)。両群の反応率 と平均点の解析及び比較はMann-Whitney検定を用 いて行った。

横軸に試行回数をとった陰影反応の反応率のグラフ(図4A)を作成し、陰影反応の開始について比較を行った。大局的には、連続した消灯刺激に対し、両群とも試行を重ねると陰影反応を示しにくくなった(各群それぞれにおいて、1回目と8回目の比較でP<0.01)。セメント腺切除群の58%(n=111/192)の胚が5割以上の頻度で陰影反応を示した。一方、対照群の73%(n=140/192)の胚が5割以上の頻度で 陰影反応を示した。

1回目の試行においては、2群間で反応率に有意 差は見られなかった(P>0.01)。ところが、2-4回目 の試行まで無処理群の陰影反応の反応率はほぼ一定 に保たれたが、セメント腺切除群は無処理群より も急激に反応率が低下し、両群に有意差が生じた (P<0.05)。5回目以降の試行では無処理群の反応率も 低下したために8回目の試行では両群の反応率はほ ぼ重なった。

次に横軸に試行回数をとった陰影反応の遊泳距離 の平均点のグラフ(図4B)を、図4Aと同一のデ ータセットについて作成し、陰影反応の遊泳距離に ついての解析を行った。こちらについても、両群と も回を重ねるごとに、概ねスコアは低下していった (各群それぞれにおいて、1回目の試行と8回目の試 行との間で P<0.01)。無処理群では5回目の試行ま ではほぼ一定に保たれた後に低下した(1回目と5 回目で P>0.05、1回目と8回目で P<0.01)。セメン ト腺切除群では、試行を重ねる毎にほぼ一様に低下 した(1回目と8回目の間で P<0.01)。1回目の試 行において両群を比較したところ、セメント腺除去 群は無処理群よりも遊泳距離が長かった(P<0.005)。

セメント腺を切除した尾芽胚は、実験後3日間の 生存を確認した後に処分した。

討論

陰影反応の反応率のグラフにおいて、セメント腺切除群と同腹無処理群の1回目の試行の間で反応率に 有意差が生じなかったことから、セメント腺切除は 陰影反応の生じやすさに影響しないことが示唆され た。しかしながら、セメント腺切除群の2-7回目の 試行においては反応率の低下が顕著であったことか ら、消灯刺激を反復した場合には、セメント腺切除 胚は無処理胚よりも慣れが早期に生じることが示唆 された。本研究により、セメント腺が慣れの抑制に も関与する可能性が示されたといえる。

また遊泳距離のグラフにおいて、セメント腺切除 群の1回目の試行における遊泳距離が、同腹無処理 群より長かったという結果を踏まえると、セメント 腺切除によって陰影反応による遊泳の停止が起こり にくくなっていることが伺える。いずれにせよ、消

表1. 無処理胚とセメント腺切除胚の実験結果

無処理胚(n=192)の実験結果				セメント腺切除胚(n=192)の実験結果							
試行 回数	2点の 個体数	1点の 個体数	合計点	平均点	反応率	試行 回数	2点の 個体数	1点の 個体数	合計点	平均点	反応率
1	67	72	206	1.07	72%	1	111	39	261	1.36	78%
2	77	64	218	1.14	73%	2	96	24	216	1.13	62%
3	64	76	204	1.06	73%	3	93	21	207	1.08	59%
4	64	73	201	1.05	71%	4	71	28	170	0.89	52%
5	77	57	211	1.10	70%	5	68	35	171	0.89	54%
6	71	57	199	1.04	67%	6	60	26	146	0.76	45%
7	53	65	171	0.89	61%	7	60	31	151	0.79	47%
8	44	50	138	0.72	49%	8	59	33	151	0.79	48%



図4.実験結果の集計表(表1)にもとずく反応率(A)ならびに消灯直後の遊泳距離のスコア(B). Aのグラフにおいては、2群の試行回数毎の陰影反応の反応率の比較を行った. 反応率 = <u>満灯直後に運動した個体</u>と定義した. Bのグラフにおいては、2群の試行回数毎の遊泳距離の比較を行った. 試験 管の底面から4 cm以上泳いだ個体を2点、4 cm 未満の 範囲で泳いだ/底面で屈曲運動を示した個体を1点として、各試行における遊泳距離のスコアの平均値を算出した.

灯反応の試行を重ねるにつれて両群の遊泳距離は低 下することからも、両群とも慣れが生じることが示 唆された。消灯刺激の反復が、刺激に対する尾芽胚 の慣れではなく、遊泳による疲労を生んでおり、そ のために遊泳距離が落ちているとの解釈も否定でき ない。しかしながら、反応率のスコアは、消灯刺激 に対して、少しでも動いている場合を含めて定義し ているので、反応率の推移の方からは、グラフが右 肩下がりに減少しているのは、慣れによるものと解 釈するのが現段階では妥当であると考えている。

今後の展望としては、試行回数8回目で2群間に おける反応率、遊泳距離のスコアの双方がほぼ一致 したことから、8回目以降の両数値がどのような推 移を示すかが興味深いところである。試行回数及び 例数を増やしての実験が期待される。予備実験とし て、消灯刺激のサイクルを、明順応2分以上、暗順 応2分とした場合にも、試行を重ねるにつれ、反応 率のスコアは下がっていった。慣れによりものでは なく、胚の遊泳に伴う疲労による遊泳距離のスコア の減少の可能性を払拭するために、明順応3分、暗 順応3分での実験を予定している。また、電気刺激 等で、尾芽胚に対して本実験と同等の距離を強制的 に垂直方向に遊泳させ、そのスコアをとることで、 尾芽胚の遊泳行動が疲労に対してどの程度抵抗性が あるのかについても検討したい。

本実験ではセメント腺除去を外科的に行ったが、 切除の具合にばらつきがでてしまった。今後はアン チセンス核酸による翻訳阻害技術によってセメント 腺を低形成とした尾芽胚を用いて本研究と同様な枠 組みの実験を実施したい。アフリカツメガエルのセ メント腺では agr1/2, xhas3, xmlk2, tbx20, otx2 な どの様々な遺伝子が特異的に発現することが相次い で報告されている²²⁻²⁹⁾。4 細胞期胚の背側 2 割球に、 モルフォリノ骨格をもつ人工核酸で出来た相補鎖を 微量注射することにより、これらの遺伝子がコード するタンパク質のセメント腺での発現をノックダウ ンし、セメント腺を作れなくなった尾芽胚を用いて 陰影反応実験を試みる予定である。

カラシン目洞窟魚 (Astyanax mexicanus) には、頭 部後方に一過的にセメント腺の相同器官(その形態 と幼魚における形成位置から Sylvie Rétaux らのグ ループは casquette と命名)が形成され、基質面に 付着可能となる。この洞窟魚のセメント腺の形成の 分子機構が近年解明され、意外にもツメガエル胚の それと相同な分子機構、すなわ bmp4 と pitx1/2 が 関与する分子機構によってセメント腺が形成される ことが報告されている^{16,30)}。序論で触れたように、 カラシン目洞窟魚の陰影反応については、洞窟魚の 研究で著名な Jeffery らによって詳しい研究がなさ れている。陰影反応が繰り返し誘起される状況下に おいて、カラシン目洞窟魚のセメント腺がツメガエ ル胚のセメント腺と同様の役割を果たすのかについ て興味を抱いている。

謝辞

本研究は、2010年度神奈川大学総合理学研究所共 同研究助成を受けて行った洞窟魚の陰影反応の研究 (文献7)が端緒となり、山口大学の原田由美子先生、 村上柳太郎教授との共同研究として発展させたもの であります。所長ならびに所員各位の御支援に深謝 いたします。

文献

- Jeffery WR (2001) Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev. Biol.* 231:1-12.
- Jeffery WR, Strickler AG and Yamamoto Y (2003) To see or not to see: Evolution of eye degeneration in Mexican blind cavefish. *Comp. Int. Biol.* 43:531-541.
- Phillips L (2008) Blind larvae sense light. J. Exp. Biol. 211:i-ii.
- Yoshizawa M and Jeffery MR (2008) Shadow response in the blind cavefish *Astyanax* reveals conservation of a functional pineal eye. *J. Exp. Biol.* 211:292-299.
- 5) Jeffery WR (2008) Emerging model systems in evo-devo: cavefish and microevolution of development. *Evol. Dev.* **10**:265-272.
- 6) Jeffery WR (2009) Regressive evolution in Astyanax cavefish. Annu. Rev. Genet, 43:25-47.
- 小林 剛,豊泉龍児,小笠原強,日野晶也,齋藤雄 介,茂木和枝(2011)カラシン目洞窟魚 Astyanax mexicanusの陰影反応と光受容系の観察. Sci. J. Kanagawa Univ. 22:37-42.
- 8) Sunada H, Sakaguchi T, Horikoshi T, Lukowiak K and Sakakibara M (2010) The shadow-induced withdrawal response, dermal photoreceptors, and their input to the higher-order interneuron RPeD11 in the pond snail Lymnaea stagnalis. J. Exp. Biol. 213(Pt 20):3409-3415.
- Sunada H, Lukowiak K and Sakakibara M (2012) Repetitive noxious stimulus altered the shadowinduced withdrawal behavior in Lymnaea. Acta Biol. Hung. 63 Suppl 2:179-189.
- Kikuchi K (1947) Shadow reaction and vertical distribution in the sea by Spirocodon saltatrix. Dobutsugaku Zasshi: 144-146.
- Arkett SA (1985) The shadow response of a. hydromedusan (polyorchis penicillatus): behavioral mechanisms controlling diel and ontogenic vertical migration. *Biol. Bull.* 169:297-312.
- 12) Arkett SA and Spencer AN (1986) Neuronal mechanisms of a hydromedusan shadow reflex. J. Comp. Physiol. A 159:201-213.
- 13) Roberts A (1978) Pineal eye and behavior in Xeno-

pus tadpoles. Nature 273:774-775.

- 14) Foster RG and Roberts A (1982) The pineal eye in Xenopus laevis embryos and larvae: A photoreceptor with a direct excitatory effect on behaviour. J. Comp. Physiol. 145:413–419.
- 15) Nieuwkoop PD and Faber J (1994) Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis. Garland Science, New York.
- Rétaux S and Pottin K (2011) A question of homology for chordate adhesive organs. *Commun. Integr. Biol.* 2011 4: 75-77.
- Peters HM (1965) Uber larvale *Haftorgane* bei Tilapia (Cichlidae, Teleostei) und ihre Rückbildung in der Evolution. Zool. J. Physiol. 71:287–300.
- Jamieson D and Roberts A (2000) Responses of young *Xenopus laevis* tadpoles to light dimming: Possible roles for the pienal eye. *J. Exp. Biol.* 203:1857-1867.
- Boothby KM and Roberts A (1992) The stopping response of *Xenopus laevis* embryos: pharmacology and intracellular physiology of rhythmic spinal neurones and hindbrain neurones. *J. Exp Biol.* 169:65-186.
- Boothby KM and Roberts A (1992) The stopping response of *Xenopus laevis* embryos: behaviour, development and physiology. J. Comp. Physiol A. 170:171-180.
- 21) Hausen P and Riebesell M (1991) The Early Development of Xenopus laevis: An Atlas of the Histology. Springer-Verlag, New York / Heidelberg.
- 22) Hemmati-Brivanlou A, Frank D, Bolce ME, Brown BD, Sive HL and Harland RM (1990) Localization of specific mRNAs in *Xenopus* embryos by wholemount *in situ* hybridization. *Development* **110**: 325-330.

- 23) Aberger F, Weidinger G, Grunz H and Richter K (1998) Anterior specification of embryonic ectoderm: The role of the *Xenopus* cement glandspecific gene *XAG-2*. *Mech. Dev.* **72**:115-130.
- 24) Brown DD, Binder O, Pagratis M, Parr BA and Conlon FL (2003) Developmental expression of the *Xenopus laevis* Tbx20 orthologue. *Dev. Genes Evol.* 212:604-607.
- 25) Poitras L, Bisson N, Islam N and Moss T (2003) A tissue restricted role for the *Xenopus* Jun N-terminal kinase kinase kinase MLK2 in cement gland and pronephric tubule differentiation. *Dev. Biol.* 254:200-214.
- 26) Vigetti D, Viola M, Gornati R, Ori M, Nardi I, Passi A, De Luca G and Bernardini G (2003) Molecular cloning, genomic organization and developmental expression of the *Xenopus laevis* hyaluronan synthase 3. *Matrix Biol.* 22:511-517.
- 27) Nardini M, Ori M, Vigetti D, Gornati R, Nardi I and Perris R (2004) Regulated gene expression of hyaluronan synthases during *Xenopus laevis* development. *Gene Expr. Patterns* 4 :303-308.
- 28) Michiue T, Danno H, Tanibe M, Ikuzawa M and Asashima M (2007) *Xenopus* galectin-VIa shows highly specific expression in cement glands and is regulated by canonical Wnt signaling. *Gene Expr. Patterns* 7:852-857.
- 29) Mancini P, Castelli M and Vignali R (2013) Identification and evolution of molecular domains involved in differentiating the cement gland-promoting activity of Otx proteins in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **130**:628-639.
- 30) Pottin K, Hyacinthe C and Rétaux S (2010) Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish Astyanax mexicanus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107:17256-17261.

■原 著■

筋節長に注目したイワガニの鋏脚筋および歩脚筋の微細構造解析

田島昌和^{1,3} 宮崎真一² 田中貴裕² 早津 学^{2,3} 鈴木季直^{1,2,3,4}

Ultrastructural Analysis of Cheliped and Walking Leg Muscles with Special Reference to the Sarcomere Length in Striped Rock Crabs

Masakazu Tajima¹, Shin'ichi Miyazaki², Takahiro Tanaka², Manabu Hayatsu^{2,3} and Suechika Suzuki^{1,2,3,4}

¹ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

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

³ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail:suechika-bio@ kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To examine the variation of sarcomere length and A-band length in muscles of various segments (merus, carpus, and propodus) in cheliped (CP) and walking leg (WL) of striped rock crabs, electron microscope observations were carried out. The sarcomere length and A-band length in 15 kinds of segment muscles examined were $4.49 \sim 9.57 \,\mu m$ and $3.63 \sim 6.52$, respectively, and extremely longer than those in vertebrate skeletal muscles. They were classified into four groups by their dimensions. In sarcomere length, the four groups were $4.0 \sim 5.0$ µm (muscles of the 1st WL merus and carpus, 3rd WL carpus and propodus, and 4th carpus), 5.0~6.0 µm (muscles of the 1st WL carpus, 2nd WL merus and carpus, and 4th merus), 6.0~7.0 µm (muscles of the CP carpus, 2nd WL propodus, 3rd WL merus, and 4th WL propodus) and $7.0 \sim 10.0 \ \mu m$ (muscles of the CP merus and propodus). In A-band length, the four groups were 3.0~4.0 µm (muscles of the 1st WL merus, 2nd WL merus, 3rd WL carpus and propodus, and 4th WL merus and carpus), 4.0~5.0 µm (muscles of the 1st WL carpus and propodus, 2nd WL carpus and propodus, 3rd WL merus, and 4th WL propodus), 5.0 µm (muscle of CP carpus) and 6.0~7.0 µm (muscles of the CP merus and propodus). A histogram showing the frequency distribution of the A-band length revealed three remarkable peaks at 3.1 μ m, 3.9 μ m and 4.8 μ m, and a minor peak at 6.3 μ m, and indicated a certain periodicity of 0.8 μ m between peaks. These results suggest that the thick filament length in leg muscles of striped rock crabs may be regulated to become a multiple of 0.8 µm as an unit length by some factors.

Keywords: muscle ultrastructure, sarcomere length, A-band length, cheliped, walking leg, striped rock crab

序論

骨格筋は軸方向に沿って併走する多数の筋線維で構 成されており、各々の筋線維内には無数の筋原線維 が併走している。筋原線維は縦方向に連結する多数 の筋節の集合体であり、筋節は骨格筋が力を発生す るための基本的な構造単位となっている。

両端をZ帯とする単一筋節内には、ミオシン分子 を主体とする太いフィラメントと、G-アクチンが重 合した F-アクチン、トロポミオシンおよびトロポニ ンなどで構成される細いフィラメントが走行してお り、それらは、A 帯内で共存し、互いに隣接し、併 走している。滑り説^{1,2)}によれば、骨格筋の短縮は、 これら二種の筋フィラメント間の滑りによって引き 起こされる。また、筋の力発生機構は、クロスブリ ッジ説^{3,4)}により説明されており、トロポニンへの Ca²⁺ 結合から始まる ATP 加水分解を伴うミオシン 分子頭部(S1)とアクチン分子間の結合と解離の繰 り返し(クロスブリッジサイクル)の間に生ずるミ オシン分子頭部の角度変化により力が発生すると考 えられている。

アクチンとミオシンの結合と解離が効率よく、確 実に行われるために、骨格筋では、それぞれのフィ ラメント自体に、それらを構成する主要蛋白質分子 の縦方向への規則的ならせん周期配列がある。また、 隣り合って走行する二種のフィラメントは横断面に おいて交互に配列し、かつ、それぞれが六角格子を 成すように配列している。このような規則的な分子 およびフィラメントの配列を示す構造の特徴は、一 般的な骨格筋の筋節で見られる二種のフィラメント の長さをも規定しているように思われる。実際に、 脊椎動物骨格筋の一般的な筋節長は筋種や動物種に よる違いは殆どなく、2.2 ~ 2.3 µm であり、太いフ ィラメントの長さを表すA帯長はおよそ1.6 µm で あり、細いフィラメントの長さを表す半筋節内の Z 帯から H 帯の端までの長さはおよそ 1.1 um とほぼ 常に一定の長さを示す 5-7)。

In vitro では、単離されたアクチンあるいはミオシ ンは、低イオン強度の KCl 溶液中ではかなり無制限 に重合し、数 µm を遥かに超える長さや異常に幅広 い太さの人工的フィラメントを形成する⁸⁾。しかし、 前述したように *in vivo* では、2.2 ~ 2.3 µm の標準 的な長さをもつ脊椎動物骨格筋の筋節を構成する太 いフィラメントと細いフィラメントの長さは極めて 正確に、それぞれ 1.6 µm と 1.1 µm (半筋節長) に 限定されそれ以上には伸長しない。このことは、筋 節が構築される時に、それぞれのフィラメント主要 構成蛋白質のモノマーからポリマーへの重合度が厳 密に制御されていることを示している。フィラメン トの長さを規定する要素として、細いフィラメント については、例えばβ·アクチニン⁹⁾のように、各 種のフィラメント端キャップ蛋白質が知られている。 一方、太いフィラメントではキャップ蛋白質は明ら かにされていないが、筋節内でこれを束ねる働きを 持つ C 蛋白質¹⁰⁾ があり、フィラメント上に一定間 隔で局在し、フィラメントの全長決定に関与してい る可能性がある。また、1980年代に明らかにされた コネクチンフィラメント 11,12) とネブリンフィラメン ト 11) は、それぞれ太いフィラメントと細いフィラメ ントの全長にわたって並走しながらフィラメント表 面に結合し、それによってフィラメントの長さを規 定している可能性が考えられている。このように、 骨格筋の筋節構築において二種のフィラメントの長 さを決める可能性のある要素が知られている。しか し、何故その長さなのかという課題について、その 長さになることの必然性や合理的な説明は何ら得ら れていない。

筋節長および二種の筋フィラメントが何故その長 さに規定されているのかを合理的に説明するための 一つの試みとしては、自然界に見られる例外的な筋 節長の筋について微細構造解析を行い、標準的な筋 節長の筋と比較検討することが有効であるように思 われる。筋節長が著しく短いものとしてはヒドロク ラゲの横紋筋が知られており、その長さは 1.2 um で ある¹³⁾。一方、カニ、ザリガニ、ロブスターなどの 甲殻類や、カブトガニでは、4~10 µm と著しく長い 筋節をもつ筋がしばしば報告されている14-19)。この 点に注目し、2007~2009年に、甲殻類のイワガニ Pachygrapsus crassipes Randallの鋏脚筋と歩脚筋 について電子顕微鏡による微細構造観察を行ったと ころ^{20,21)}、脚筋の筋節は脊椎動物骨格筋のそれより 長く、また、長さも脚ごとに異なることが示唆された。 本研究では、イワガニ全脚筋の電子顕微鏡観察を行 い、筋節長およびA帯長を測定して比較し、筋節長 を規定する二種フィラメントの基本的単位長につい て考察した。

材料と方法

材料

甲長と甲幅がそれぞれ約 3.0 cm と約 3.3 cm のイワ ガニ Pachygrapsus crassipes Randall の成体(図 1A)を実験材料とし、神奈川県中郡大磯町大磯の大 磯港と真鶴の岩礁帯で採取したものを材料とした。 イワガニの脚について、本論文では最も上部の脚を 鋏脚(図 1B)、それから下部の脚を順にそれぞれ第 1、第2、第3、第4歩脚(図 1C)とした。全ての 脚は4節に分節されており、いずれの脚の場合でも、 胴部に近い側から順に、それぞれ長節、腕節、前節、 指節と呼ばれている(図 1B, C)。各脚の先端部とな



図1. イワガニ. A. 個体. 左右対をなす脚は,最上部が 鋏脚,その下部は上から順次第1,第2,第3,第4歩脚. 鋏脚と各歩脚はいずれも胴部から先端部へと順次,長節、 腕節、前節、指節の4節で構成されている. B. 鋏脚. C. 第1歩脚.

る指節の外骨格を切開し、内殻部を実体顕微鏡で観 察したところ、筋線維束は殆ど含まれていなかった ため、本研究では、各脚を構成する4節のうち、指 節を除き、その他の前節と腕節および長節の筋を観 察対象とした。

微細構造観察

氷冷麻酔したイワガニから鋏脚および第1~4歩脚 を解剖鋏で摘出し、カニ生理塩類溶液 (crab saline: 470 mM NaCl, 8 mM KCl, 20 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 5 mM HEPES-Tris, pH 7.2) を満たした底部 にシリコンラバーを敷いたシャーレ内で脚の外骨格 の上面を除去し、殻部でピン止めした。脚が屈曲し ている状態で、脚筋を pH 7.2 の 0.1 M カコジル酸緩 衝液で希釈した 2.5% グルタルアルデヒド (GA) 液 で2時間、室温で前固定した。次に、DW で希釈し た2%の四酸化オスミウム(OsO4)で2時間、室温 で後固定した。その後、エタノール系列(50%、70 %、90%、100%) で各10分と、プロピレンオキシ ド(PO)を用いて 20 分間ずつ 2 回脱水した。エポ キシ樹脂とPOを1:1の比率で混合した溶液に試 料を浸し、4℃で24時間静置した。次に、液を新規 に調合したエポキシ樹脂と置換し、4℃で24時間静 置し、樹脂を試料内に浸潤させた。樹脂浸潤後、脚 筋を柄付き針で数本の筋線維束に分け、更に剃刀を 用いて短く細切した。細切試料を包埋板の平らな部 分に載せ、上から少量の樹脂を滴下(SS 式ドロップ 法²²⁾)し、40℃と60℃で各24時間熱重合した。SS 式ドロップ法により試料を樹脂に包埋して重合する と、試料の筋線維束は極小椀型樹脂ブロックの平ら な底面に水平に包埋されるので、底面の向きに注意 してこのブロックを台木とする別の樹脂ブロック先 端に同じ包埋樹脂を用いて接着した。実体顕微鏡下 で剃刀を用いてこれらの樹脂ブロックをトリミング し、切断面が筋線維長軸に対して正確に平行または 直角になるよう設定してダイヤモンドナイフ装着の ウルトラミクロトーム (Reichert Ultracut-N) で厚 さ約70 nmの超薄切片を作製した。超薄切片は、カ ーボン蒸着で膜補強したコロジオン支持膜を張った Cu-150 メッシュに載物し、酢酸ウランとクエン酸 鉛で二重に電子染色し、透過型電子顕微鏡(JEOL JEM2000EX, JEOL JEM1230) で観察した。フィ ルムに撮影された全ての電子顕微鏡像はスキャナー を用いてデジタル化した。

電子顕微鏡の倍率補正ために、実験日毎に使用した全倍率で倍率補正用標準スケールのグレーティングレプリカ(1格子間隔、0.463 µm)を撮影した。 各倍率のグレーティングレプリカデジタル画像の格 子間隔を画像解析ソフトウェアの ImageJ (National Institutes of Health, USA) で測定し、単位長あたり のピクセル数を較正値として決定し、各倍率を補正 した。補正倍率をもとに、ImageJ により各筋節の 筋節長およびA帯長を測定した。バリエーションの ある筋節長およびA帯長の中から、筋節長を決定す る要素となりうる単位長の存在を示唆できるような 規則性があるか否かを検討するために、いくつかの 区間(0.1 µm、0.05 µm)を任意に設定し、A帯長 に関する度数分布を調べ、ヒストグラムを解析した。

結果

観察対象としたイワガニ全脚全節の脚筋で太いフィ ラメントを主体とするA帯と細いフィラメントを機 械的に支持するZ帯、A帯とZ帯の間のI帯は明瞭 に観察された。しかし、多くの節で明瞭なM帯は観 察されなかった。隣接して並走する筋原線維間の間 隙には多数の筋小胞体(SR)が局在していた。これ らのSRは切片像では小胞状になっており、その多 くは楕円形を示し、大きさは様々であった。

図2は鋏脚の長節筋、腕節筋、前節筋の縦断切片 像を示している。各筋の筋節でZ帯はかなり明瞭で あり、やや蛇行していたが、筋節両端のZ帯同士は ほぼ平行に走行していた。長節筋(図2A)の筋節長



図 2. イワガニ鋏脚各節筋の縦断切片像. A. 長節筋. B. 腕節筋. C. 前節筋. スケール:1 µm.



図 3. イワガニ第1歩脚各節筋の縦断切片像. A. 長節筋. B. 腕節筋. C. 前節筋. スケール:1 µm.

は約 9.57 µm であり、A 帯とI 帯の長さはそれぞれ 約 6.11 µm と約 3.67 µm であった。A 帯の中央部に は不明瞭ながら M 帯も観察された。腕節筋(図 2B) では、筋節長は約 6.28 µm であり、A 帯とI 帯の長 さはそれぞれ約 5.18 µm と約 0.90 µm であった。A 帯中央部に M 帯は観察されなかった。前節筋(図 2C)の筋節長は約 7.27 µm であった。A 帯とI 帯の 長さはそれぞれ約 6.52 µm と約 0.82 µm であり、A 帯中央部に M 帯は観察されなかった。

図3は第1歩脚の長節筋、腕節筋、前節筋の縦断 切片像を示している。各筋の筋節で筋節両端のZ帯 同士はほぼ平行に走行していた。長節筋(図3A)の 筋節長は約4.49 μ m であり、A帯とI帯の長さはそ れぞれ約3.63 μ m と約0.73 μ m であった。A帯の中 央部には不明瞭ながらM帯が確認された。腕節筋 (図3B)の筋節長は約4.83 μ m であり、A帯とI帯 の長さはそれぞれ約4.31 μ m と約2.69 μ m であった。 A帯中央部にM帯は確認されなかった。前節筋(図 3C)の筋節長は約5.68 μ m であった。A帯とI帯の 長さはそれぞれ約4.19 μ m と約1.84 μ m であり、A 帯中央部には比較的明瞭なM帯が確認された。

図4は第2歩脚の長節筋、腕節筋、前節筋の縦断 切片像を示している。各筋の筋節で両端のZ帯はほ ぼ平行に走行していた。長節筋(図4A)の筋節長は



図 4. イワガニ第2歩脚各節筋の縦断切片像. A. 長節筋. B. 腕節筋. C. 前節筋. スケール:1μm.

約 5.10 μ m であり、A 帯とI 帯の長さはそれぞれ約 3.81 μ m と約 1.65 μ m であった。A 帯中央部には不 明瞭ながら M 帯が確認された。腕節筋(図 4B)の 筋節長は約 5.37 μ m であり、A 帯とI 帯の長さはそ れぞれ約 4.52 μ m と約 1.00 μ m であった。この筋で も、A 帯中央部に不明瞭な M 帯が観察された。前節 筋(図 4C)の筋節長は約 6.51 μ m であり、A 帯と I 帯の長さはそれぞれ約 4.29 μ m と約 2.59 μ m であっ た。この筋では A 帯中央部に M 帯は観察されなか った。

図 5 は第 3 歩脚の長節筋、腕節筋、前節筋の縦断 切片像を示している。各筋の筋節で Z 帯は明瞭な直 線状であり、筋節両端の Z 帯同士の平行走行は極め て明確であった。長節筋 (図 5A)の筋節長は約 6.29 μ m であり、A 帯と I 帯の長さはそれぞれ約 4.41 μ m と約 1.97 μ m であった。A 帯中央部に M 帯は確認さ れなかった。腕節筋 (図 5B)の筋節長は約 4.71 μ m であり、A 帯と I 帯はそれぞれ約 3.77 μ m と約 0.93 μ m であった。A 帯中央部に不明瞭ながら M 帯が観 察された。前節筋 (図 5C)の筋節長は約 4.81 μ m であった。A 帯と I 帯の長さはそれぞれ約 3.77 μ m と約 1.55 μ m であり、A 帯中央部には不明瞭ながら M 帯が観察された。

図6は第4歩脚の長節筋、腕節筋、前節筋の縦断



図 5. イワガニ第3歩脚各節筋の縦断切片像.A. 長節筋.B. 腕節筋.C. 前節筋.スケール:1μm.

切片像を示している。各筋の筋節でZ帯は直線状で あり、筋節両端のZ帯同士はほぼ平行に走行してい た。長節筋(図 6A)の筋節長は約 5.44 μ m であり、 A帯とI帯の長さはそれぞれ約 3.90 μ m と約 1.29 μ m であった。A帯中央部にはM帯がかなり明瞭に 観察された。腕節筋(図 6B)の筋節長は約 4.71 μ m であった。A帯とI帯の長さはそれぞれ約 3.80 μ m と約 1.07 μ m であり、A帯中央部にはM帯が観察さ れた。前節筋(図 6C)の筋節長は約 6.44 μ m であり、 A帯とI帯の長さはそれぞれ約 4.44 μ m と約 1.63 μ m であった。A帯中央部にM帯は観察されなかっ た。

表1は観察された全てのイワガニ脚筋の縦断切片 像をデジタル化し、画像解析ソフトを用いてそれぞ れの筋の筋節について筋節長およびA帯長を測定し た結果を示している。筋節長で筋を分類するとおよ そ4群になることが示された。第1群は筋節長が 4.0~5.0 µmとなる筋であり、それらは、第1歩脚 長節筋、第1歩脚腕節筋、第3歩脚腕節筋、第3歩 脚前節筋および第4歩脚腕節筋であった。第2群は 筋節長が5.0~6.0 µmとなる筋であり、それらは、 第1歩脚前節筋、第2歩脚長節筋、第2歩脚腕節筋 および第4歩脚長節筋であった。第3群は筋節長が 6.0~7.0 µmとなる筋であり、それらは、 数脚腕節筋、



図6.イワガニ第4歩脚各節筋の縦断切片像.A.長節筋.B. 腕節筋.C.前節筋.スケール:1 µm.

表 1. イワガニ鋏脚および歩脚筋の各筋節の筋節長および A帯長

脚	節筋	筋節長 (μm)	A 帯長 (µm)	例数
	長節筋	9.57 ± 0.46	6.11 ± 0.32	35
鋏脚	腕節筋	6.28 ± 0.75	5.18 ± 0.25	30
	前節筋	7.27 ± 0.38	6.52 ± 0.47	50
空 1	長節筋	4.49 ± 0.24	$\frac{3.63}{2} \pm 0.40$	62
- 年期	腕節筋	4.83 ± 0.74	4.31 ± 0.37	28
- JANAP	前節筋	5.68 ± 0.50	$\textbf{4.19} \pm 0.65$	54
空の	長節筋	5.10 ± 0.36	$\frac{3.81}{2} \pm 0.53$	70
<i>兎∠</i> 上町	腕節筋	5.37 ± 0.33	4.52 ± 0.29	67
小叫	前節筋	6.51 ± 0.42	4.29 ± 0.36	94
盛り	長節筋	6.29 ± 0.47	4.41 ± 0.14	37
第5 	腕節筋	4.71 ± 0.47	$\frac{3.77}{2} \pm 0.30$	45
歩脚	前節筋	$\frac{4.81}{2} \pm 0.61$	$\frac{3.77}{2} \pm 0.28$	100
笛 /	長節筋	5.44 ± 0.36	3.90 ± 0.28	60
坊 4 	腕節筋	4.71 ± 0.33	3.80 ± 0.19	100
190 JUN	前節筋	6.44 ± 1.30	4.44 ± 0.65	100

値は平均値±標準偏差.筋節長およびA帯長の平均値の 下線部の色は、それぞれ長さによって4群に分類したと きに属する群を示している.下線部の黄色は第1群、 ▲ 色は第2群,録●は第3群,数●は第4群. 第2歩脚前節筋、第3歩脚長節筋および第4歩脚前 節筋であった。第4群は筋節長が7.0~10.0 μm と なる筋であり、それらは、鋏脚長節筋と鋏脚前節筋 であった。

筋節長は筋の伸長あるいは短縮によって長さが変 化するので、筋節長の違いをより正確に把握するた めにはそれらのA帯長を測定して比較することも重 要である。表1の右コラムはA帯長を測定した結果 を示している。A帯長での分類も、同じようにこれ らの筋は4群に分けうることが示された。第1群は A 帯長が 3.0 ~ 4.0 μm となる筋であり、それらは、 第1歩脚長節筋、第2歩脚長節筋、第3歩脚腕節筋、 第3歩脚前節筋、第4歩脚長節筋および第4歩脚腕 節筋であった。第2群はA帯長が4.0~5.0 µmと なる筋であり、それらは、第1歩脚腕節筋、第1歩 脚前節筋、第2歩脚腕節筋、第2歩脚前節筋、第3 歩脚長節筋および第4歩脚前節筋であった。第3群 はA帯長が約5.0 µmとなる筋であり、それは、鋏 脚腕節筋のみであった。第4群はA帯長が6.0~ 7.0 um となる筋であり、それらは、鋏脚長節筋と鋏 脚前節筋であった。A帯長による分類群は筋節長に よる分類群と必ずしも一致しなかった。

異なる筋節長の間の相関について検討するために、 イワガニの鋏脚筋および歩脚筋の全節から得られた A帯長について、区間を0.1 μmとする度数分布図 を作成した(図7)。図では三つの顕著なピークが認 められ、それらのピーク値はA帯長で3.1 μm、3.9 μm、4.8 μm(矢印)であった。A帯長5.0 μm以上 の範囲についてはピークが不明瞭であったので、区 間をより小さい0.05 μmとする度数分布図を作成し て検討した(図8)。その結果、A帯長5.0 μm以上 の範囲には不明瞭ながらおよそ6.3 μmをピーク値と する新たなピークが認められた。一方、A帯長5.0 μm以下の範囲には図7と同様に、同じピーク値を 持つ顕著な三つのピークが存在し、これらのピーク 間の間隔は概ね等しく、およそ0.8 μmであった。

討論

筋節長あるいはA帯長にもとづいて全ての節を分類 したところ、それぞれが4つの群に分類された(表 1)。鋏脚の長節筋の筋節は全脚全節の中で最も長く、 それを反映してA帯長も長く、A帯長分類群の第4 群に属していた。それは、これまでに報告されてい るメナガガザミの眼胚挙筋のA帯長5.9 µm¹⁴に近 かった。鋏脚腕節筋の筋節長は約6.28 µmで第3群 に属し、A帯長も約5.18 µmで第3群に属していた。 鋏脚筋の筋節長およびA帯長はいずれの節でもかな り長かった。歩脚筋のA帯長は第2群と第1群と



図 7. イワガニ鉄脚および歩脚筋のA帯長に関する度数 分布図.横軸はA帯長.区間は0.1 µm.縦軸は例数.総例 数は931.イワガニ個体数は5.ピーク値(矢印)は左から 3.1 µm, 3.9 µm および 4.8 µm.



図8. イワガニ鋏脚および歩脚筋のA帯長に関する度数 分布図. 横軸はA帯長. 区間は0.05 µm. 縦軸は例数. 総 例数は931. イワガニ個体数は5. ピーク値(矢印)は左か ら3.1 µm, 3.9 µm および4.8 µm. ピーク間周期(上辺の 両矢印)は0.8 µm. この間隔による倍数値を縦の破線で 示している. 右側の領域のうち,5.5 µm にはピークはな いが,6.3 µm にはマイナーピークが見られる.

に分類され、第2群では例えば第1歩脚の腕節筋の ように、筋節長は約4.83 µm で、A帯長では約4.31 µm であった。第2群のA帯長は、カブトガニの尾 節挙筋のうちの一部の節で報告されているA帯長 4.4 µm²³⁾ に近かった。第1群に属する第1歩脚の長 節筋は、最も短い筋節長を反映して、A帯長も最も 短かった。第1群のA帯長は、これまでに報告され ているロブスターの腰部伸筋のA帯長3.7 µm¹⁷⁾ に 近かった。筋節長による分類とA帯長による分類は 必ずしも一致しなかった。これは、筋節長が筋伸長 や短縮により長さ変化を生ずるためである。伸長に より長さ変化が生じないと考えられるA帯長での比 較は、筋節長の違いの妥当性を考察する上で有効で あった。

図8で示した度数分布図から、異なるA帯長が何 らかの規則性に基づいて生じている可能性について 検討した。度数分布図では、顕著な三つのピークが 認められた。それらのピークの値は3.10 µm、3.90 µmと4.75 µmであった。それぞれのピーク間の間 隔はおよそ0.8 µmであり、ピークが周期的に現れ

ることを示した。脊椎動物骨格筋のA帯長は一般的 に 1.6 µm であり、これは今回検出できたと思われ るピーク出現周期 0.8 µm の2倍の長さに相当する。 0.8 µm を、筋が筋節を構築する際の太いフィラメン トの構成基本単位長と仮定すると、図8の最初のピ ークである 3.1 µm は基本単位長の約4倍、第2の ピークは約5倍、第3のピークは約6倍の長さに相 当する。自然界で、これまでに知られている最も短 い筋節をもつ筋は、ヒドロクラゲの下傘筋で、その A 帯長は 0.8 µm であると考えられている¹³⁾ これら のことから、一般的に横紋筋が筋節を構築する場合 にA帯長を規定するための基本単位長として 0.8 µm が適用されていると仮定することは妥当に思われる。 このことは、図8で不明瞭ながら認められた長い領 域のピークが約6.4 µm であり、それが基本単位長の 8倍に相当するという事実によっても裏付けられる。 この長いA帯長を示す節は鋏脚前節筋の節であった。

結論として、イワガニの脚筋の太いフィラメント の長さは未知のファクターによって約 0.8 µm を基本 単位長としてその倍数になるように制御されている と思われる。これは、多様な筋節長を示すイワガニ の脚筋のみに限られたことではなく、横紋筋全般に 適用されうる基本原理と考えられる。筋節長、A帯長、 あるいは太いフィラメント長を増大することの意味 は、なお不明であるが、結果的に太いフィラメント と細いフィラメントの overlap region が長くなる (図 9) ことから、この現象がクロスブリッジ形成の確率 を高めるという点で、これらの節の収縮力に利点を 与えている可能性がある。この問題は、何故 A 帯長 がある一定の単位長で構築されるのかという筋の筋 節構築に関わる本質的な疑問とともに、今後明らか にされるべき課題である。

文献

- Huxley AF (1957) Muscle structure and theories of contraction. Prog. Biophys. Biophys. Chem. 7:255-318.
- Huxley HE (1957) The double array of filaments in cross-striated muscle. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3: 631-648.
- Huxley AF and Simons RM (1971) Mechanical properties of the cross-bridges of frog striated muscle. J. Physiol. 218 Suppl: 59-60.
- Huxley AF (1974) Muscular contraction. J. Physiol. 243: 1-43.
- Page SG and Huxley HE (1963) Filament lengths in striated muscle. J. Cell Biol. 19: 369-390.
- Page SG (1968) Fine structure of tortoise skeletal muscle. J. Physiol. 197: 709-715.
- 7) 鈴木季直 (2002) 筋. 生物学データ大百科事典. 石原 勝敏,金井龍二,河野重行,能村哲郎編,朝倉出版, 東京. pp. 1462-1503.



図 9. A 帯長の比較. ヒドロクラゲと脊椎動物およびイワ ガニの横紋筋の筋節またはA 帯長の比較から,筋節を構 築する際の太いフィラメントの長さを規定するユニット として構築基本単位長という概念を仮定することができ, その長さは 0.8 μ m である. ヒドロクラゲではA 帯長は約 0.8 μ m で基本単位長とほぼ等しく,脊椎動物のA 帯長は約 約1.6 μ m で約2倍, イワガニの第1群ではA 帯長が約3.10 μ m で約4倍,第2群ではA 帯長が約3.90 μ m で約5倍, 第3群ではA 帯長が約4.75 μ m で約6倍,第4群ではA 帯長が約6.40 μ m で約8倍となっている.

- Suzuki S, Chaen S, Akimoto T, Yamamoto N, Oishi N and Sugi H (1998) Fine structures of synthetic myofilaments observed by the low angle rotary shadowing method. *Electron Microsc.* 33 Suppl: 210.
- Maruyama K and Sakai H (1981) Cell beta- actinin, an accelerator of actin polymerization, isolated from rat kidney cytosol. J. Biochem. 89: 1337-1340.
- Squire JM, Morris EP and Nneji G (1990) The three-dimensional structure of the nemaline rod Z-band. J. Cell Biol. 111: 2961-2978.
- 11) Wang K and Somerville LL (1988) Sarcomere matrix of striated muscle: in vivo phosphorylation of titin and nebulin in mouse diaphragm muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*,**262**: 118-129.
- 12) Kimura S, Matsuura T, Ohtsuka S, Nakauchi Y, Matsuno A and Maruyama K (1992) Characterization and localization of alpha- connectin (titin 1): an elastic protein isolated from rabbit skeletal muscle. J. Muscle Res. Cell Motil. 13: 39-47.
- Keough EM and Summers RG (1976) An ultrastructural investigation of the striated subumbrellar musculature of the anthomedusan, *Pennaria tiarella. J. Morph.* 149: 507-525.
- 14) Hoyle G and McNeill PA (1968) Correlated physiological and ultrastructural studies on specialized muscles. Ib. Ultrastructure of white and pink fibers of the levator of the eyestalk of *Podophthalmus vigil (Weber). J. Exp. Zool.* **167**: 487-521.
- Franzini-Armstrong C (1970) Natural variability in the length of thin and thick filaments in single fibres from a crab, *Portunus* depurator. J. Cell Sci. 6: 559-592.
- 16) Zachar J and Zacharova D (1966) Potassium con-

tractures in single muscle fibres of the crayfish. J. Physiol. **186**: 596-618

- 17) Jahromi SS & Atwood HL (1969) Correlation of structure, speed of contraction, and total tension in fast and slow abdominal muscle fibers of the lobster (Homarus americanus). J. Exp. Zool. 171: 25-38.
- Dewey MM, Levine RJC and Colflesh DE (1973) Structure of *Limulus* striated muscle. The contractile apparatus at various sarcomere lengths. *J. Cell Biol.* 58: 574-593.
- Dewey MM, Walcott B, Colflesh DE, Terry H and Levine RJC (1977) Changes in thick filament length in *Limulus* striated muscle. J. Cell Bio. 75: 366-380.
- 20) 宮崎真一(2008) イワガニの鋏脚筋と歩脚筋の微細

構造観察.2007年度神奈川大学理学部生物科学科卒業論文.

- 21) 田中貴裕 (2009) イワガニ鋏脚筋及び歩脚筋の筋節 長とA帯長に関する微細構造学的研究. 2008 年度神 奈川大学理学部生物科学科卒業論文.
- 22) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastrucural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. J. Ekectron Microsc. 52: 337-347.
- 23) Dewey MM, Colflesh DE, Brink P, Fan S, Gaylinn B & Gural N (1982) Structual, functional, and chemical changes in the contractile apparatus of Limulus striated muscle as a function of sarcomere shortening and tension development. Soc. Gen. Physiol. Ser. 37: 53-72.

■原 著■

相模湾平塚沖の貝類相:2012 年と 2013 年の調査結果

大和田正人^{1,4} 小林由弥² 大久保至³ 金沢謙一¹

Molluscan Fauna in Sagami Bay off Hiratsuka: Results of the Investigation by Dredging in 2012 and 2013

Masato Owada^{1,4}, Yuya Kobayashi², Itaru Okubo² and Ken'ichi Kanazawa¹

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

² Animal Care Company Limited, 5-18-14 Shinjuku Ward, Tokyo 160-0022, Japan

³ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

 $^4\,$ To whom correspondence should be addressed. E-mail: owada-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Mollusca and bottom sediments were simultaneously collected by dredging Sagami Bay off Hiratsuka on 9 July 2012, 11 September 2012, 21 November 2012 and 9 September 2013. The collected specimens were 785 individuals composed of 44 species: 19 species of gastropods, 1 species of scaphopod and 24 species of bivalves. Almost all were warm-water species. Two tropical species (*Modiolus flavidus* and *Fulvia australis*) were found, however; they were juvenile and probably abortive migrations. At depths of 5 to 20 m the bottom sediment was coarse- to fine-grained sand sometimes containing pebbles. The substrate around 30 m deep was fine- to very fine-grained sand containing granules or mud depending on the location, and around 40 m deep it was very fine-grained sand with mud. Because 15 species had been collected more than two times in previous investigations and many adult individuals were included, they must be reproducing off Hiratsuka. On the basis of the kinds of bottom sediments where the 15 species were collected, it suggests that a stenotopic species (*Solidicorbula erythrodon*) and an eurytopic species (*Glossaulax didyma*, *Tomopleura nivea* and *Brevimyurella japonica*) are related with the substratum.

Keywords: Molluscan fauna, bottom sediment, dredge, Hiratsuka, Sagami Bay

序論

相模湾に生息する貝類については、東部の三浦半島 周辺、西部の伊豆半島周辺を中心にドレッジを用い た調査が数多く行われており、代表的な報告として は、Horikoshi¹⁾、黒田ほか²⁾、奥谷³⁾などが知られ ている。中央部については、大和田ほか⁴⁻⁶⁾の平塚 沖に生息する貝類の調査、佐藤ほか⁷⁾の藤沢市地先 のダンベイキサゴの調査などが知られているが、東 部や西部に比べるとまだ報告が少ない。また、貝類 の分布が底質に強く影響されることは従来から知ら れているが、実際に貝類と海底堆積物を同時に採集 して解析した例は少なく、正確に理解されていると は言いがたい。本研究はこれまでに行われてきた大 和田ほか⁴⁻⁶⁾の継続調査であり、今回とこれまでの 結果を比較することによって、平塚沖の貝類相の現 況、さらに貝類の分布と底質の関係について考察す る。

材料と方法

2012 年 7 月 9 日、2012 年 9 月 11 日、2012 年 11 月 21 日、2013 年 9 月 9 日にドレッジを用いた調 査が行われた(特別採捕許可番号:第 24-50 号、第 25-37 号)。漁船を借り上げ、神奈川県平塚市の平塚 新港から直線距離で約 2000 m 以内の海域でドレッ ジを曳き、底生生物と海底堆積物を採集した(Fig. 1、Table 1)。底生生物の採集に用いたドレッジは間 口 50 × 15 cm、袋部のメッシュサイズ 20 mm の簡



Fig. 1. Sampling localities. This investigation was carried out in the area enclosed by broken line.

易ドレッジ(離合社、5121-B)、海底堆積物の採集 に用いたドレッジは直径 17 cm、長さ 42 cm の小型 円筒形ドレッジ(離合社、5113)である。簡易ドレ ッジの後部に小型円筒形ドレッジを連結し、底生生 物と海底堆積物を同時に採集した。採集した底生生 物を実験室に持ち帰って種ごとに選別し、100% エ タノールで固定した。貝類については奥谷^{8,9}に基 づいて種を同定し、そこに記載されている分布域を 記録した。海底堆積物については目視で種類と粒度 を調べた。

結果海底堆

海底堆積物

水深 5 ~ 20 m 付近の底質は粗粒~細粒砂からなる 砂底であったが、中礫が含まれる地点もあった。水 深 30 m 付近の底質は細粒~極細粒砂からなる砂底 であったが、細礫や泥が含まれる地点もあった。水 深 40 m 付近の底質は泥を含む極細粒砂からなる泥 質砂底であった(Table 1)。

貝類

2012年7月の調査では腹足綱5種、二枚貝綱15種 の合計20種65個体、2012年9月の調査では腹足 綱10種、掘足綱1種、二枚貝綱16種の合計27種 142個体、2012年11月の調査では腹足綱10種、 掘足綱1種、二枚貝綱10種の合計21種84個体、 2013年9月の調査では腹足綱9種、掘足綱1種、二 枚貝綱12種の合計22種494個体が採集された。全 体としては腹足綱19種、掘足綱1種、二枚貝綱24 種の合計44種785個体が採集された(Table 2)。

未同定の3種を除く41種の地理的な分布をTable 3にまとめたところ、北海道から九州地方に広く分 布する種が1種(バカガイ)、房総〜紀伊半島を中心 に分布する種が38種見られた。さらに、紀伊半島を 分布の北限とする南方系種が2種(サザナミマクラ、 ボタンガイ)見られたが、それらは全て幼貝であった。

Table 1. Depths and bottom sediments on the positions where a dredge was dropped and lifted.

sampling date	station	position	depth (m)	bottom sediment
July, 2012	st.1	35°18'06"N, 139°22'03"E—35°18'02"N, 139°21'40"E	40-41	very fine-grained sand with mud
	st.2	35°18'08"N, 139°21'45"E—35°18'08"N, 139°21'54"E	30-31	very fine-grained sand
	st.4	35°18'14"N, 139°22'03"E—35°18'15"N, 139°21'49"E	23-20	fine-grained sand
	st.5	35°18'36"N, 139°21'17"E—35°18'36"N, 139°21'34"E	11-10	fine-grained sand
	st.6	35°18'24"N, 139°21'21"E—35°18'23"N, 139°21'35"E	15 - 15	fine-grained sand
	st.7	35°18'45"N, 139°21'24"E—35°18'43"N, 139°21'42"E	6—7	medium-grained sand
	st.8	35°18'47"N, 139°21'46"E—35°18'51"N, 139°21'28"E	44	medium-grained sand
September, 2012	st.1	35°18'03"N, 139°21'56"E—35°18'07"N, 139°22'15"E	40-41	very fine-grained sand with mud
	st.2	35°18'10"N, 139°22'09"E—35°18'06"N, 139°21'47"E	30-32	very fine-grained sand
	st.3	35°18'09"N, 139°21'58"E—35°18'12"N, 139°22'09"E	28-27	fine-grained sand
	st.4	35°18'15"N, 139°22'06"E—35°18'16"N, 139°21'45"E	21-19	fine-grained sand
	st.5	35°18'22"N, 139°21'41"E—35°18'22"N, 139°21'57"E	15-15	fine-grained sand
	st.6	<u>35°18'34"N, 139°21'41"E—35°18'33"N, 139°21'55"E</u>	109	medium- to fine-grained sand
	st.7	35°18'38"N, 139°21'51"E—35°18'42"N, 139°21'35"E	77	fine-grained sand
	st.8	35°18'50"N, 139°21'25"E—35°18'48"N, 139°21'45"E	44	fine-grained sand
November, 2012	st.1	35°18'07"N, 139°22'08"E—35°18'03"N, 139°21'53"E	40-40	very fine-grained sand with mud
	st.3	35°18'11"N, 139°22'09"E—35°18'07"N, 139°21'50"E	30-31	very fine-grained sand
	st.4	35°18'07"N, 139°21'50"E—35°18'09"N, 139°22'10"E	32-35	fine-grained sand with granules
	st.5	35°18'16"N, 139°22'11"E—35°18'16"N, 139°21'53"E	20-20	fine-grained sand
	st.6	35°18'21"N, 139°22'07"E—35°18'23"N, 139°21'46"E	15 - 14	coarse ⁻ to medium-grained sand
	st.7	35°18'29"N, 139°22'06"E—35°18'32"N, 139°21'47"E	11-11	fine-grained sand with pebbles
	st.8	35°18'35"N, 139°22'03"E—35°18'43"N, 139°21'42"E	7—7	medium-grained sand
	st.9	35°18'47"N, 139°21'46"E—35°18'51"N, 139°21'26"E	44	fine-grained sand
September, 2013	st.1	35°18'02"N, 139°21'54"E—35°18'06"N, 139°22'13"E	43-42	very fine-grained sand with mud
	st.2	35°18'05"N, 139°22'08"E—35°18'03"N, 139°21'41"E	4040	very fine-grained sand with mud
	st.3	35°18'07"N, 139°21'45"E—35°18'10"N, 139°22'14"E	31—33	very fine-grained sand
	st.4	35°18'15"N, 139°22'13"E—35°18'15"N, 139°21'46"E	21-20	fine-grained sand
	st.5	35°18'22"N, 139°22'11"E—35°18'21"N, 139°21'50"E	15 - 15	fine-grained sand
	st.6	35°18'27"N, 139°22'11"E—35°18'27"N, 139°21'51"E	11 - 12	fine-grained sand
	st.7	35°18'44"N, 139°21'45"E—35°18'47"N, 139°21'25"E	65	medium-grained sand with pebbles

class	scientific name	Japanese name	July, 2012 24 1 24 9 24 1 24 5 24 6 24 7 24 8	September, 2012 or 1 or 9 or 9 or 4 or 5 or 6 or 7 or 6	November, 2012 of 1 of 2 of A of 5 of A of 0 of 0	September, 2013	total of individuals
Gaetronoda	Ilmhonium wicenteum	ブキキノング	0190 1190 0190 0190 Fine 7190 Tine	UNE LIE DUE DUE FUE FUE DUE ZUE TUE	26 DIE LIE DIE DIE THE THE DIE THE	130 010 010 110 100 100 010 710 100 100 10	148
asurupuna	Glossanlay didyma	ッメタガイ	1	2 - -	67	4 20	10
	Mammilla so.	Mammilla 001種	4	4	1	*	
	Eunaticina papilla	ネコガイ	1				-
	Sinum planulatum	ツツミガイ		1		1 1	co.
	Natica buriasensis	カスミコダマ				1 2 1	4
	Natica sp.	Naticaの1種		1			1
	Zeuxis castus	ハナムシロ			3	1 1 1	9
	Zeuxis sp.	Zeuxisの1種			1		1
	Fusinus perplexus	ナガニシ		1	1	1	~
	Olivella japonica	ホタルガイ	1				1
	Olivella fulgulata	ムシボタル			1	1	2
	Inquisitor vulpionis	ミガキモミジボラ		1			1
	Tomopleura nivea	マキモノシャジク		1	1 2		4
	Lophiotoma leucotropis	クダマキガイ		1 4			5
	Paradrillia consimilis	ヒメシャジク			3		ço
	Dimidacus amanda	コニクタケ				1	1
	Brevimyurella japonica	ヒメトクサ	1 2 3 1	1 3	2	1 1 1	16
	Philine vitrea	ウスキセワタ		2	1		~
Scaphopoda	Laevidentalium coruscum	セトモノツノガイ		1	4 1 2	1	6
Bivalvia	Petrasma pusilla	キヌタレガイ	1	1			2
	Nucula paulula	マメクルミ			1		-
	Jupiteria confusa	ゲンロクソデガイ	2	2	1 2 1 2	1	11
	Portlandia japonica	ベッコウキララガイ	4	4		1	6
	Glycymeris imperialis	ミタマキガイ	1	4 3	1 3 2	1 1	16
	Modiolus flavidus	サザナミマクラ		1			1
	Musculista perfragilis	ノジホトトギス				1 1	2
	Fulvia australis	ボタンガイ		1			1
	Mactra chinensis	バカガイ				1	-
	Mactra crossei	ヒメバカガイ	1	11	8 2	1	23
	Raetellops pulchellus	チョノハナガイ	1	1			2
	Chion semigranosa	フジノハナ			1		1
	Nitidotellina hokkaidoensis	サクラガイ	1	1	1 1 1	1	9
	Azorinus cf. abbreviatus	cf. ズングリアゲマキ	1		1		2
	Solen cf. gordonis	cf. アカマテガイ		1			1
	Siliqua pulchella	ミゾガイ	1			1	2
	Placamen tiara	ハナガイ	3	1	1 1 1	2 1	10
	Veremolpa micra	ヒメカノコアサリ		1	2	1 1 1 436	442
	Pitar japonicus	ウスハマグリ		1			1
	Gomphina melanegis	コタマガイ	1				1
	Callista chinensis	インセマリスレ	2 1	2	1 2	1 3 1	13
	Cyclosunetta menstrualis	ワスレガイ	1	1			2
	Maretrix lamarckii	チョウセンハマグリ	1				1
	Solidicorbula erythrodon	クチベニガイ	3 2	1 1 3		1	11

Table 2. List of the mollusca collected in this investigation

Table 3. Distributions of the mollusca collected in this investigation

distribution areas	number of
distribution areas	species
Hokkaido to Kyushu	1
southern Hokkaido and southward	2
southern Hokkaido to Kyushu	5
Tohoku and southward	3
Tohoku to Kii Peninsula	2
Kashima sea and southward	1
Kashima sea to Kyushu	1
Boso Peninsula and southward	6
Boso Peninsula to Okinawa	6
Boso Peninsula to Kyushu	9
Sagami Bay and southward	3
Kii Peninsula and southward	2
total of species	41

討論

平塚沖の貝類の現況

サザナミマクラとボタンガイは南方系種であり、採 集された個体が幼貝であることから、平塚沖では無 効分散である可能性が高い。今回の調査で採集され た44種からこの2種と未同定の3種を除いて大和 田ほか⁴⁻⁶⁾の結果に照らし合わせると、共通して採 集された種が9種、2回以上採集された種が16種、 初めて採集された種が14種あることが分かった。共 通して採集された9種(ツメタガイ、マキモノシャ ジク、クダマキガイ、ヒメトクサ、ミタマキガイ、 ハナガイ、ヒメカノコアサリ、マツヤマワスレ、ク チベニガイ)については、複数個体の成貝が毎回採 集されていることから、平塚沖で再生産を行ってい ると見られる。2回以上採集された16種のうち6種 (ダンベイキサゴ、ムシボタル、ゲンロクソデガイ、 バカガイ、ウスハマグリ、ワスレガイ)についても、 これまでに採集された回数が比較的多く、複数個体 の成貝が採集されていることから、同様に再生産を 行っている可能性が高い。残りの10種と今回初めて 採集された14種については、今後の調査結果と比較 しなければ明確なことは言えない。

貝類の分布と底質の関係

平塚沖で再生産していると見られる 15 種が採集され た底質をまとめると、ダンベイキサゴ、ムシボタル、 バカガイ、ワスレガイでは中粒〜細粒砂、クチベニ ガイでは細粒砂、クダマキガイ、ゲンロクソデガイ、 ミタマキガイ、ハナガイ、ヒメカノコアサリ、ウス ハマグリ、マツヤマワスレでは細粒〜泥を含む極細 粒砂であった。ツメタガイ、マキモノシャジク、ヒ メトクサが採集された底質は中粒〜泥を含む極細粒 砂であり、上述の種に比べてかなり広い範囲であっ た。以上のことから、平塚沖の貝類には、クチベニ ガイのように狭い範囲の底質に生息する種とツメタ ガイ、マキモノシャジク、ヒメトクサのように比較 的広い範囲の底質に生息する種がいると言える。

謝辞

ドレッジによる底生生物と海底堆積物の採集につい ては、平塚漁業組合の小久保誠氏と伏黒哲司氏、神 奈川大学の齋藤礼弥博士と池尾奈々氏にご協力を頂 いた。底生生物の選別、リストの作成については、 神奈川大学において 2012 年度、2013 年度に博物館 実習 I を履修した学生諸氏にご協力を頂いた。これ らの方々に心より感謝を申し上げる。

文献

- Horikoshi M (1957) Note on the molluscan fauna of Sagami Bay and its adjacent waters. *Sci. Rep. Yokohama National Univ.*, *Section II.* 6: 37-64.
- 黒田德米,波部忠重,大山 桂(1971) 相模湾産貝類. 生物学御研究所編,丸善,東京.
- 奥谷喬司(2006)2002~2004年に相模湾の陸棚・ 斜面および漸深海帯から採集された原鰓類および異 靱帯類(二枚貝綱). 国立科学博物館専報 40:295-306.
- 4) 大和田正人,吉田奈央,佐藤武宏,金沢謙一(2007) 海産無脊椎動物の相互作用と形態・適応の進化、および、人間活動がこれらに与える影響―相模湾平 塚沖浅海の貝類と海底環境―. Sci. J. Kanagawa Univ. 18: 77-80.
- 5) 大和田正人, 金沢謙一 (2011) 相模湾平塚沖の貝類相: 2010 年夏の調査結果. Sci. J. Kanagawa Univ. 22: 79-82.
- 6) 大和田正人,小林由弥,大久保至,金沢謙一(2012) 相模湾平塚沖の貝類相:2011年9月と10月の調査 結果. Sci. J. Kanagawa Univ. 23:71-74.
- 佐藤武宏,利波之徳、山本章太郎(2009)藤沢市地 先の相模湾におけるダンベイキサゴの分布と成長に ついて. Bull. Kanagawa prefect. Mus. (Nat. Sci.). 38: 95-106.
- 8) 奥谷喬司(1986)*決定版生物大図鑑貝類*.世界文化社, 東京.
- 9) 奥谷喬司(2000) 日本近海産貝類図鑑. 東海大学出版, 東京.

■原 著■ 2013年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

西表島マングローブ植物4種の生育域と葉の内部形態との相関

早津 学 1.2.4 笹本浜子 2.3 鈴木季直 1.2

Correlation Between the Habitat and the Leaf Anatomy in Four Mangrove Plants Growing in Iriomote Island

Manabu Hayatsu^{1,2,4}, Hamako Sasamoto^{2,3} and Suechika Suzuki^{1,2}

- ¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ³ Yokohama National University, Yokohama City, Kanagawa 240-8501, Japan
- ⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: hayatsu-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To examine the correlation between the habitat and the leaf anatomy in various mangrove plants, by using light and electron microscopes, we observed cross-sectional views of leaves in Rhizophora stylosa, Kandelia obovata, and Bruguiera gymnorrhiza which distribute successively from the sea to the land in the intertidal zone of Iriomote island. Leaves of all these mangrove plants are constructed with a multiseriate epidermis on both upper and lower sides. The multiseriate epidermis was most conspicuous in Avicennia marina living in the region nearest to the sea, and the number of epidermal cell layers decreased gradually in other plants as there habitat became further from the sea. Although the leaf blade thickness was largest in Avicennia marina, the development of palisade and spongy tissues was poorest and those cells were smallest. Conversely, the intercellular space was widest and the cell size of palisade and spongy tissues was largest in Bruguiera gymnorrhiza living in the region farthest from the sea. Furthermore, only in Avicennia marina, salt glands were frequently observed in the upper epidermis and numerous trichomes covered the lower surface of the leaf blade. These results suggested that there is a strong correlation between habitat and leaf anatomy. The multiseriate epidermis formation may be enhanced by increasing the influence of seawater. Specialized cells of multiseriate epidermis may contribute to the regulation of salt tolerance by accumulating or extruding the excess salt ions derived from seawater.

Keywords: mangrove plants, leaf anatomy, multiseriate epidermis, salt tolerance, Iriomote island

序論

マングローブとは、熱帯や亜熱帯の沿岸、入江、河 口部などの潮間帯に生育する樹木の総称である。マ ングローブ植物は高い塩濃度の環境でも生育する耐 塩性の機能を備える塩生植物であり、世界に100種 程、存在しており^{1,2}、マングローブ林は複数種の マングローブ植物によって構成されている。マング ローブ植物は、潮の満ち引き(干満の差)や海水塩 濃度などの環境条件の違いで領域毎に異なる種の 群落を形成している。この分布は一般的に帯状分布 (Zonation)と呼ばれており、様々なマングローブ植物で林が構成されているため、その種と環境条件を特定するための研究が行われている^{3,4)}。一般の陸上植物を高塩濃度環境で生育させると、細胞内外の浸透圧調節⁵⁾や細胞壁の細胞間接着で機能するペクチンの合成に支障をきたし、生育不良となることが知られている。マングローブ植物は海水の影響を受ける環境に適応して生育することから高濃度の塩に対する特別な生理機構とそれに伴う構造を持つこと

が示唆される。これまでにマングローブ植物間の組 織レベルの構造を比較する観察研究も進められてい る。その結果、多くのマングローブ植物が特殊な外 部形態や機能を有し、高い耐塩性を持つ種では塩類 腺などの他の植物にはあまり見られない構造を持つ ことが知られている⁶⁾。しかし、潮間帯内の各マン グローブ植物の生育域とそれらの植物の葉の内部構 造との相関に注目した研究はあまり行われていない。 本研究では、西表島のマングローブ植物のうち潮間 帯内での生育域を異にするヒルギダマシ Avicennia marina、ヤエヤマヒルギ Rhizophora stylosa、メ ヒルギ Kandelia obovata、オヒルギ Bruguiera gymnorrhiza を対象に、葉の組織を光学顕微鏡と透 過型電子顕微鏡で観察し、潮間帯内生育領域と葉の 構造との関連について検討をした。

材料と方法 ^{材料}

図1は西表島沿岸部のマングローブ植物の生育域を 模式的に示している。最も海側で海水の影響を常に 受ける領域にはヒルギダマシAvicennia marina、陸 側に近く比較的海水の影響が少ない領域にはオヒ ルギ Bruguiera gymnorrhiza、それらの中間の領域 に、ヤエヤマヒルギ Rhizophora stylosa とメヒルギ Kandelia obovata が生育している。これら4種のマ ングローブ植物の葉を西表島沿岸部で採取し、水分 を保つために純水で湿らせた紙に包み、チャック付 きの袋に入れて大学まで運搬した。

顕微鏡観察のための試料調製

葉先から3 cm 内側の主脈付近の葉身部を試料とし た。葉の組織の構成や色を知るため、維管束の横断 面を含む切片を徒手切片法で作製し、染色せずに光 学顕微鏡 (Olympus BH-2) で観察した。さらに、 光学顕微鏡での詳細な組織観察と電子顕微鏡での微 細構造観察のため、葉を小片にした後、0.1 M 燐酸 緩衝液で希釈した 6% Glutaraldehyde (以下 GA) 液が入っている試料瓶に入れ、4℃で24時間前固定 し、さらに純水で希釈した2% Osmium tetroxide (以下 OsO4) 液に置換し、4℃で 24 時間後固定した。 固定試料は、アセトン系列で脱水した後、Epon 樹脂 (Quetol 812) に包埋し、40℃で24 時間、60℃で24 時間熱重合させ、試料ブロックを作製した。さらに、 試料ブロックからウルトラミクロトーム(Reichert Ultracut-N) で厚さ 0.9 µm の切片を作製し、カバー ガラスに載せ、1% toluidine blue で加温染色した後、 光学顕微鏡で観察した。また、同様に厚さ70 nm の切片を作製し、カーボン蒸着で補強したコロジオ ン膜を張った Cu-150 メッシュに載せ、酢酸ウラン とクエン酸鉛で電子染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1230) で観察した。

結果

葉の外部形態観察と光学顕微鏡による組織観察

葉は4種とも、楕円形の濃い緑色をしており、一般 的な陸上植物と比べると肉厚で、表面には光沢があ った。しかし、ヒルギダマシの葉の裏側は光沢がな く、やや白く、ざらざらしていた。また、ヤエヤマ ヒルギの葉では、葉先部に尖った突起があった。図 2は、各種マングローブ植物の葉の横断切片の光学 顕微鏡像である。上段は徒手切片法で作製した切片 の像であり、下段は6% GA と 2% OsO4 で化学固定し、 樹脂包埋した葉の切片像である。図2のAとEがヒ ルギダマシ、BとFがヤエヤマヒルギ、CとGがメ ヒルギ、DとHがオヒルギのそれぞれの切片像であ る。いずれの植物でも葉の表面には厚いクチクラ層 が観察され、さらに最外層の上面表皮細胞と柵状組 織との間に前表皮由来と考えられる多数の細胞層が 存在し、これらによって多層表皮系が構成されてい た。また、ヒルギダマシの上面の多層表皮系では塩 類腺と思われる陥入が観察され、下面側の表皮細胞 層の外側には trichome と思われる上下に細長い細胞 が観察された(図2A)。この細胞は、無色で表皮を 覆うように密に並んでいた。柵状組織と海綿状組織 はともに濃い緑色をしていた。ヤエヤマヒルギでは 下面側の表皮にも多層表皮系と類似した細胞層が観 察された(図2B)。このような細胞層はメヒルギや オヒルギでも観察された。また、濃緑色の柵状組織 の細胞は配列が不規則であり、一部に多層表皮系の 細胞が食い込んでいるように見えるところも観察さ れた。海綿状組織はヒルギダマシと比較すると色が 薄い傾向があった。メヒルギは、下面側の多層表皮 系直下に濃い緑色の細胞で構成される複数の細胞層 が観察された(図2C)。柵状組織は濃い緑色の細胞 が規則正しく配列されていた。海綿状組織ではヤエ ヤマヒルギと同様、色の薄い細胞が多く観察された。 オヒルギにも、下面側の多層表皮系直下に複数の細 胞層が存在し、柵状組織と海綿状組織の細胞はヤエ ヤマヒルギやメヒルギに類似していた(図 2D)。

化学固定して樹脂包埋した葉の切片を作製し、光 学顕微鏡で観察した。ヒルギダマシは上面側の多層 表皮系が7~8層の細胞層からなり、それらの細胞 は液胞が著しく発達していた(図2E)。柵状組織と 海綿状組織の細胞は表皮系の細胞と比べると小さい が、同様に液胞は良く発達しており、細胞間隙は少 なく、細胞同士は密着していた。また、下面側の表



図 1. 西表島沿岸部のマングローブ林の帯状分布 (Zonation). 海側から陸側に向かい, ヒルギダマシ, ヤエヤマヒルギ, メ ヒルギ, オヒルギが生育している.



図 2. 西表島マングローブ植物 4 種の葉の徒手切片 (上段)と樹脂包埋切片 (下段)の光学顕微鏡像. 切片像はそれぞれヒ ルギダマシ Avicennia marina (A, E), ヤエヤマヒルギ Rhizophora stylosa (B, F), メヒルギ Kandelia obovata (C, G), オヒ ルギ Bruguiera gymnorrhiza (D, H) である. Bar: 0.1 mm.



図 3. マングローブ植物 4 種の葉の上面側表皮付近の細胞層の透過型電子顕微鏡像. ヒルギダマシ (A), ヤエヤマヒルギ (B), メヒルギ (C), オヒルギ (D)の葉は表面が厚いクチクラに覆われ, 液胞が非常に発達していた.オヒルギのみ液胞が高電子密 度の物質で満たされていた.Bar: 10 µm.



図 4. 多層表皮系細胞の透過型電子顕微鏡像.A. ヒルギダマシ葉の多層表皮系3層目の細胞.B. ヤエヤマヒルギ葉の多層表 皮系2層目の細胞.C.メヒルギ葉の多層表皮系3層目の細胞.D,E. オヒルギの多層表皮系2層目の細胞.ヒルギダマシの 細胞の液胞では何も観察されず,オヒルギでは、高電子密度の構造は様々な形状で液胞内に観察された.Bar:10 μm.

皮外側には徒手切片で観察された trichome も観察さ れた。ヤエヤマヒルギでは多層表皮系が上面側で5 ~6層、下面側で2層観察された(図2F)。上面側 の表皮系の細胞は大きく、液胞が良く発達しており、 一部の細胞は液胞が薄く染色されており、中に様々 な形状と大きさの顆粒が観察された。柵状組織の細 胞は他の3種の植物の葉と比較すると濃く染色され ており、細胞同士は密着していた。一方、海綿状組 織の細胞も液胞は良く発達しており、細胞間隙は広 かった。柵状組織と海綿状組織のごく一部の細胞で は、液胞内に黒い顆粒が観察された。メヒルギでは 多層表皮系が上面側で3~4層、下面側で3層観察 された(図2G)。それらの細胞のうち、上面側3層 目の細胞は大きく、発達した液胞は黒い物質で満た されていた。一部の表皮系細胞では液胞内に顆粒が 観察された。柵状組織は上下に細長くて液胞が良く 発達した細胞で構成されており、上面側のみならず、 わずかながら下面側にも観察された。海綿状組織の 細胞は液胞が良く発達していた。細胞間隙は広く、 ヤエヤマヒルギで観察された液胞内の顆粒はメヒル ギの多層表皮系の3層目以外に、柵状組織と海綿状 組織の一部の細胞の液胞内にも観察された。このよ うな細胞は維管束の周りに多く観察された。オヒル ギでは多層表皮系が上面側で2層、下面側で2層の 細胞層で構成されていた(図2H)。上面側の表皮系 1層目のほぼ全ての細胞では発達した液胞が黒い物 質で満たされており、2層目と下面側の表皮系2層

目の殆どの細胞も同様の液胞を含んでいた。柵状組 織と海綿状組織の細胞では液胞が良く発達しており、 液胞内にはしばしば黒い物質が含まれていた。また、 この両組織内の細胞間隙は4種の中で最も広かった。

透過型電子顕微鏡による微細構造観察

図3はマングローブ植物4種の葉の上面側表皮付近 の細胞層の透過型電子顕微鏡像である。4種とも葉 の表面は厚いクチクラで覆われており、その下に多 層の表皮細胞が観察された。ヒルギダマシでは多層 表皮系最外層の細胞は長径およそ 15 μm であり(図 3A)、下層細胞は大きいものでは長径およそ 60 µm (図 4A) であった。液胞が非常に良く発達しており、 細胞内小器官は少なかった。ヤエヤマヒルギでは多 層表皮系最外層の細胞は長径およそ15 um であり (図 3B)、下層細胞では長径およそ 35 µm であった (図 4B)。液胞がかなり良く発達しており、しばしば 高電子密度の顆粒を液胞に含んでいた。メヒルギで は多層表皮系の1層目と2層目の細胞は長径およそ 30 µm で、液胞が良く発達しており、しばしばその 中に顆粒を含んでいた(図 3C)。さらに下層の細胞 は長径およそ 40 µm であり、発達した液胞内は高電 子密度の物質でほぼ満たされていた(図4C)。オヒ ルギでは多層表皮系の最外層の細胞は長径およそ25 µm であり、発達した液胞内は高電子密度の物質で 満たされていた(図 3D)。それよりさらに下層の細 胞は長径およそ 40 µm で、同様に液胞が良く発達し



図 5. 柵状組織細胞(上段)と海綿状組織細胞(下段)の透過型電子顕微鏡像.A, E. ヒルギダマシ.B, F. ヤエヤマヒルギヤ.C, G. メヒルギ.D, H. オヒルギ.Bar:10 µm(上段), 5 µm(下段)



図 6. ヒルギダマシ葉の上面表皮に観察された塩類腺 (A) と下面表皮外側に観察された trichome (B)の透過型電子 顕微鏡像.Bar:10 µm (A),5 µm (B).

ていたが、液胞内に観察される高電子密度の顆粒の 形状は様々であった(図4D、E)。柵状組織と海綿 状組織の細胞は、4種とも良く発達した液胞と核や 葉緑体などの細胞内小器官を含んでいた。ヒルギダ マシの柵状組織の細胞は長径およそ 55 um であり、 核や葉緑体などの細胞内小器官が細胞の上部と下部 に局在している傾向が見られた(図 5A)。葉緑体内 にはデンプン粒が観察された。海綿状組織の細胞は 直径およそ25 μm であり、葉緑体内にデンプン粒は ほとんど観察されなかった(図5E)。ヤエヤマヒル ギの柵状組織の細胞は長径 40 ~ 60 μm であり、核 や大きなデンプン粒を含む葉緑体と比較的未発達な 液胞が観察された(図5B)。葉緑体は数が多く、液 胞内には高電子密度の顆粒も観察された。海綿状組 織の細胞は直径およそ 28 µm であり、デンプン粒を 含む葉緑体が観察された(図5F)。メヒルギの柵状 組織は長径およそ 70 µm で上下に細長く、発達した 液胞内に高電子密度顆粒が含まれており、葉緑体内 にはデンプン粒が観察された(図5C)。海綿状組織 の細胞は直径およそ 30 µm であり、デンプン粒を含 む葉緑体、高電子密度顆粒を含む液胞が観察された (図 5G)。オヒルギの柵状組織細胞は長径およそ 40 µm であり、デンプン粒を含む葉緑体と高電子密度 顆粒を含む液胞が観察された(図 5D)。これらの細 胞の中には液胞が高電子密度顆粒で満たされている 細胞も観察された。海綿状組織の細胞は直径およそ 28 µm であり、デンプン粒を含む葉緑体と高電子密 度顆粒を含む液胞が観察された(図5H)。

ヒルギダマシの葉の切片の光学顕微鏡観察で認め られた塩類腺(図 6A)と trichome (図 6B) につい て電子顕微鏡による微細構造観察を行った。塩類腺 を構成する細胞は上面側の多層表皮系内に存在し、 幅およそ 20 µm、クチクラから縦におよそ 60 µm 陥 入したその基部に観察された。その表面側はクチク ラ層で覆われており、3層の細胞層で構成されてい た。最外層では縦に15 um 程の核や比較的小さな液 胞を含むいくつかの細胞が横に並んでおり(図 6A)、 2 層目には未発達な液胞を含む長径 20 µm の円盤状 の細胞が単一で存在し、3層目には直径10 µmの比 較的小さないくつかの細胞が横並びに配列していた (図 6A)。ヒルギダマシの葉の下面側の表皮細胞外側 に見られる trichome は、細胞壁が厚く、著しく発達 した液胞を含む2つの細胞で構成されていた。下面 側の表皮細胞に繋がる細胞は、直径およそ10 µmの 比較的小さな細胞であった。さらにその細胞に繋が る 2 つ目の細胞は長径 25 ~ 30 µm の長方形の細胞 であった(図 6B)。どちらの細胞も細胞内に細胞質 基質は殆ど観察されず、内部は液胞のみが占めてい た。先端の細胞の下側細胞壁は一部が変形し、下向 きに2つの突起を形成しており、さらにそれら突起 は互いに向き合うように内側に湾曲していた。

討論

一般的に殆どの高等植物では表皮は一層の細胞層か らなる。しかし、観察したマングローブ植物4種には、 表皮下で多層の細胞層が観察された。これらの細胞 層の細胞は液胞が良く発達して典型的な表皮細胞と 類似していることから、組織学的に表皮系と考えら れ、これらの植物の葉の表皮は多層表皮系を構成し ていると考えられる。このような多層表皮系は他の マングローブ植物でも観察されており、細胞の液胞 は体内に取り込んだ余分な塩類の蓄積場所として機 能し、それによって葉組織全体の浸透圧調節に寄与 していると考えられる。ヒルギダマシでは、その余 分な塩類は観察された塩類腺から排出すると考えら れる⁶⁾。そのような特殊な構造を持たないマングロ ーブ植物は塩類蓄積量が限界に達すると葉を落とし、 植物体内の塩分調節を行ったり、根からの塩の吸収 を抑えたりすると考えられている"。今回得られた 結果は、海水の影響を強く受ける領域に生育する植 物では、多層表皮系の発達がより顕著で、層が厚く なっており、一方、海水の影響を受けにくくなる陸 側の領域で生育する植物では、上面側の表皮下層が 薄くなる傾向が示され、この考えを強く支持した。 潮間帯におけるマングローブ植物の生育域とそれら の植物の組織分化には強い相関があると考えられる。

ヒルギダマシを除くマングローブ植物にはそれぞ れの組織の細胞内に高電子密度の顆粒が観察された。 マングローブ植物はポリフェノールやタンニンが豊 富であると考えられており^{8,9}、これらの高電子密 度の顆粒がポリフェノールやタンニンである可能性 が考えられる。また、この高電子密度の顆粒はオジ ギソウの葉枕運動細胞の液胞内で報告されているタ ンニン液胞¹⁰⁾に類似しており、ダイズの根の根冠に 存在するコルメラ細胞の液胞内にも類似した顆粒の 存在が報告されている¹¹⁾。オジギソウの葉の振動傾 性反応に伴う葉の閉合運動とダイズの根の重力屈性 で液胞内の顆粒が生理学的機能に関与する細胞内イ オンの遊離、吸着することで生理学的機能の制御を 行っていると考えられている。高電子密度の顆粒が 全く観察されなかったヒルギダマシは、多層表皮系 の細胞への余分な塩類の蓄積および塩類腺からの排 出で体内の塩分調節を行っている種であるのに対し、 特殊な器官を持たないその他のマングローブ植物は、 過剰な、または成長に不必要なイオンを高電子密度 の顆粒に吸着することで多層表皮系の数をそれほど 増やすことなく、植物体内の浸透圧調節を可能とし ていると考えられる。しかし、これら顆粒または物 質がタンニンであるか否かについてはまだ不明であ り、解析は今後の課題である。また、生育域との相 関については、高電子密度の顆粒が観察されたマン グローブ植物3種の結果を比較すると、海水の影響 を受けにくくなるに従って、顆粒は増加している傾 向が見られた。前述したように、マングローブ植物 は体内の浸透圧調節機構として、塩類の排出と蓄積 や根からの塩の吸収抑制が知られており⁷、これら を組み合わせて体内の塩濃度を調節していると考え られている。従って、より海水の影響の少ない生育 域のマングローブ植物では多層表皮系の細胞層の数 を増やすことよりも、高電子密度の顆粒に蓄積する

ことで十分な浸透圧調節を行っている可能性がある。

謝辞

本研究は、2013年度の神奈川大学総合理学研究所共 同研究の助成金を受けて行われました。ここに謝意 を表します。

文献

- Spalding MD, Kainuma M and Collins L (2010) World Atlas of mangroves. Earthscan Publications Ltd., UK.
- 2) Tomlinson PB (1986) *The botany of mangroves*. Cambridge University Press, New York.
- Macnae W (1968) A general account of the fauna and flora of mangrove swamps and forests in the Indo-West Pacific region. Adv. Mar. Biol. 6:73-270.
- Watson JG (1928) Mangrove forests of the Malay Peninsula. *Malayan Forest Rec.* 6: 1-275.
- Tuteja N (2007) Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol.* 428:419-38.
- 6) Drennan PM, Berjak P, Lawton JR and Pammenter NW (1987) Ultrastructure of the salt glands of the mangrove, Avicennia marina (Forssk.) Vierh., as indicated by the use of selective membrane staining. *Planta* 172:176-183.
- 7) 加藤 茂, 矢口行雄, 杉 二郎 (1986) 各種マングロ ーブ葉のイオン組成. 日本海水学会誌 40:9-16.
- Kathiresan K and Ravi V (1990) Seasonal changes in tannin content of mangrove leaves. *The Indian Forester* 116:390-392.
- Ravi AV and Kathiresan K (1990) Seasonal variation in gallotannin from mangroves. Indian J. Mar. Sci. 19:224-225.
- 10) Fleurat-Lessard P, Frangne N, Maeshima M, Ratajczak R, Bonnemain JL and Martinoia E (1997) Increased expression of vacuolar aquaporin and H+-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica L. Plant Physiol.* 114:827-834.
- Hayatsu M, Ono M, Hamamoto C and Suzuki S (2012) Cytochemical and electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intracellular calcium in columella cells of soybean roots under simulated microgravity. J. Electron Microsc. 61:57-69.

■原 著■ 2013年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

神奈川県下で流通する中国産輸入ユムシの分子系統学的研究

風間 真 1.5.6 玉井健太 2 西川輝昭 3 森山利紗 4 日野晶也 1.4

Monophyletic Possibility in Japanese and Chinese Groups of Echiuran Worm, *Urechis unicinctus*

Makoto Kazama^{1,5,6}, Kenta Tamai², Teruaki Nishikawa³, Risa Moriyama⁴ and Akiya Hino^{1,4}

- ¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ² Shimonoseki Marine Science Museum "KAIKYOKAN", Shimonoseki City, Yamaguchi, 750-0036, Japan
- ³ Department of Biology, Faculty of Science, Toho University, Funabashi City, Chiba, 274-8510, Japan
- ⁴ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ⁵ Present Address, Tokai University, Departmet of Infectious Diseases, School of Medicine, Isehara City, Kanagawa 259-1193, Japan
- $^6~$ To whom correspondence should be addressed. E-mail: kzm_makoto@yahoo.co.jp

Abstract: Echiuran worms are a small group of marine animals having an elongated proboscis and non-segmented body. They are classified into the two orders, Echiuroinea and Xenopneusta. Xenopneusta includes only one genus Urechis with four species. Among them, U. unicinctus lives in intertidal or subtidal sandy bottoms of Japan and its vicinity. The Japanese population once favored a density high enough for fish bait. In recent years, the density has decreased due largely to human impacts, such as habitat destruction. Therefore, the major sales of this species for anglers' fish bait now depend on imported live worms from China and Korea. This might cause genetic pollution or contamination of the Japanese population. In this study we conducted a marketing survey of ten shops selling live worms in the Shonan and Seisho areas of Kanagawa Prefecture to understand the present situation concerning imported worms. Some worms imported from China were used for sequencing the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. Japanese worms were collected in Yamaguchi and Fukuoka Prefectures for the same purpose. All the obtained sequences were analyzed phylogenetically, using NJ and ME methods. The results showed that the Japanese and Chinese worms may comprise a panmictic population, with quite similar genetic identities. Thus, we have concluded that the possibility of genetic contamination can be ruled out in so far as the COI gene is used as a genetic marker.

Keywords: *Urechis*, COI, genetic pollution, echiuran worm, phylogenetic tree, genetic distance

序論

ユムシ Urechis unicinctus は日本近海及び韓国、中 国などの近隣国沿岸に分布する海産無脊椎動物の一 種である。日本においては、古くは平安時代より記 載のある動物種であり¹⁾、今日も釣り用の生き餌と して身近な動物である¹⁻³⁾。通常、ユムシは干潟や浅 海砂泥域に U 字の巣穴を形成して生息し、この巣穴 には甲殻類をはじめとする多くの生物が共生する⁴。 干潟をはじめとした浅海域は生物多様性が高い環境 として知られているが、ユムシの生活様式もまたこ れに寄与していると考えられる。

しかし近年の沿岸工事等の影響で、日本国内では ユムシの生息域がきわめて限定的となりつつある。 神奈川県内ではかつて三浦半島でも容易に採集でき たようであるが、今日では採集可能な地域は見つか らない(横浜市立大学元教授田澤栄五郎博士私信)。 環境省自然環境局における「第7回自然環境保全基 礎調査 浅海域生態系調査(干潟調査)」においても、 東京湾、三浦半島・相模湾における記録はない^{5,6)}。 同干潟調査ではユムシの生息地域、北海道紋別市お よび福岡県北九州市で記録されるに留まっている³⁾。 一方で釣餌業者の輸入するユムシが、生餌として国 内を流通している。Saitoらの報告²⁾によると、西 日本地区では、中国産及び韓国産のユムシが釣餌と して販売されており、また「ユムシ」とは異なる名 称で販売されている場合もある。販売は周年的であ るため、輸入個体が国内で繁殖できる可能性も否め ない。

今日の釣りは、世代や性別に制限のないレジャー として普及しており、また経験の有無にかかわらず、 生き餌による釣りは手軽に成果を期待できる。しか し輸入された生き餌を購入し、その余った釣り餌を 遺棄する事に問題が生じうる。近年、在来性の国産 個体群に対してこれら釣り餌が遺伝的撹乱などの悪 影響を及ぼす可能性について議論されている⁷⁰。ユ ムシについては、輸入個体と在来個体の間に明確な 差や影響は知られていないが、今後、在来個体群内 に遺伝的攪乱を招く可能性も危惧される。

本研究では、神奈川県内湘南〜西湘地区の釣具店 にてユムシ販売の店頭調査と聞き取り調査を行い、 一部については実際にユムシを購入した。購入した ユムシを材料に、異なる名称で販売されているユム シの遺伝的差異、異なる地域で流通しているユムシ の遺伝的差異、さらには購入したユムシと日本国内 で採集したユムシの遺伝的差異について検討を試み た。また購入したユムシと日本国内で採集したユム シについて分子系統樹を作成し、ユムシ個体の地域 差や生餌市場を流通するユムシの系統を推定した。

材料と方法

ユムシの入手及び市場調査

2009年より断続的に行ってきた神奈川県神奈川県内 湘南一西湘地区の釣具店におけるユムシの調査に加 え、本研究では同地域における10店舗での聞き込 み調査(2012年2月より2013年11月)を実施し、 販売の有無、産地、商品名を記録した。このうち中 国産の販売を確認できた店舗の一部では実際にユム シを購入し、この個体を形態観察するとともにDNA を抽出した。また2013年2月に山口県内の生き餌 卸業者1店からも聞き込み調査を行った。購入した 中国産ユムシと神奈川県で購入したユムシを比較す るために、それぞれDNA抽出に供した。

日本産ユムシ Urechis unicinctus の採集は、瀬戸 内海沿岸(福岡県吉富干潟、山口県千鳥浜)の2地 点で行った。福岡県では、福岡県水産海洋技術セン ター豊前海研究所の協力を得て、継続的に採集を試 み、本研究では3個体を DNA 抽出に供した。また 山口県産ユムシは2011 年から2014 年にかけて2, 3月に採集を試み、本研究では5個体を用いた。さ らには岡山大学理学部付属牛窓臨海実験所前の浜で 2007 年7月に採集したゴゴシマユムシ Ikedosoma gogoshimense の固定標本2個体からも DNA 抽出し、 以下の塩基配列決定と解析に用いた。

塩基配列の決定

本研究では、神奈川県内の3店舗にて購入した中 国産ユムシ15個体、山口県内の生き餌卸業者から 購入した中国産ユムシ3個体、瀬戸内海沿岸の2 地点にて採集したユムシ8個体、ゴゴシマユムシ *Ikedosoma gogoshimense*2個体を材料とした。

各個体の体壁筋肉層をおよそ 20 ~ 100 mg 切除し、 この筋肉層を液体窒素中で粉砕した。粉砕した組織 片よりフェノール法、もしくは DNeasy Tissue Kit (QIAGEN 社) によって total DNA を抽出した。こ れを元に Kazama ら⁸⁾の反応条件に従い、PCR 法 で COI (*Cytochrome oxidase subunit I*) 遺伝子の単 離・増幅を行った。PCR 産物は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems 社) を用いたダイデオキシ法に供し、BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems 社)による精製を経て、DNA オートシーケンサー(AB 3130 Genetic Analyzer、Applied Biosystems 社)による精製を経て、DNA オートシーケンサー(AB 3130 Genetic Analyzer、Applied Biosystems 社)による 本)による る精製を没定した。PCR 法並びにダイデオ キシ法では、表1に記した 3 組の組み合わせ、計6 種類のプライマーを使用した。決定した塩基配列は

表1.プライマーの設計と組み合わせ

Sense	Antisense
5'-ACNAAYCAYAARGAYATYGG-3'	5'-RAARTGYTGNGGRAARAANGT-3'
5'-AAAACCACAAAGACATTGG-3'	5'-AAGTGTTGGGGGGAAGAATG-3'
5'-GTGCGATGATTATACTCAAC-3'	5'-GCGGAGAAAGCTTCTCATAG-3'

日本DNAデータバンクDDBJへ登録した(Accession No. *AB932561 - AB932588*)。

遺伝的距離及び分子系統解析

COI 遺伝子は分子系統学的な指標として広く用いら れており、ユムシ属 Urechis 属についてもデータベ ース上に2件の登録がある。ひとつ(Accession No. EF656365)は中国北京のマーケットで販売されて いた U. unicinctus1 個体より得られた配列であり⁹、 もうひとつ(Accession No. AY619711)は米国カリ フォルニア州で採集された同属別種 U. caupo に由来 する¹⁰。

本研究では、この2つの塩基配列に加え、上述した28個体より得た配列を解析の対象とした。解析では、MEGA411)を用いて、アライメントの後に EF656365配列と比較し、点変異を生じている部位、 及びその数を得た。またこの情報に基づき、一塩 基多型の種類と各個体の遺伝的距離を求めた。さら に Neighbor-Joining (NJ)法と Minimum Evolution (ME)法による分子系統樹を作成した。外群にゴゴ シマユムシ Ikedosoma gogoshimenseの配列を用い、 それぞれの分子系統樹において演算を100回繰り返 し、ブートストラップ率を算出した。

結果

神奈川県湘南~西湘地区における生餌ユムシの流通

2012年2月より2013年11月の間に、本研究では 神奈川県湘南〜西湘地区にて、生餌を取り扱う釣具 店10店舗を調査した(表2)。この内、9店舗でユ ムシを販売していた。これら取扱店の全てユムシは 常備品ではなく、仕入れ状況は各店舗によって異な っていた。一方で、通年的に予約と取り置きが可能 であったため、実質的には通年販売に等しい状態で 購入可能であった。

店頭では、ほとんどの場合「ユムシ」という商品 名で取り扱っていたが、「スーパーコウジ」という 商品名で販売する店舗も1店のみあった。この「ス ーパーコウジ」は、吻の形状や生殖輸管の配置と 数(2対4本)などの形態的特徴はユムシ Urechis unicinctus であった。またホシムシ類などの混在も 見られなかった。

産地に関する聞き取り調査では、3店舗で「輸入 品」と返答を得て、このうち1店舗で「中国産」、2 店舗で「おそらく中国産」とあった。またいずれの 場合も詳細な産地までは特定できず、一方で日本産 や中国以外からの輸入個体を扱う店舗も見つからな かった。そこで本報告では、以降、購入個体を「中 国産ユムシ」として扱う。本研究で塩基配列を決定し、

表2. 湘南〜西湘地区10店舗におけるユムシ取扱い状況

店舗	取扱い	輸入元	商品名
A*	販売	おそらく中国産	ユムシ
B*	販売	おそらく中国産	ユムシ
С	販売	-	ユムシ
D*	販売	中国産	スーパーコウジ
Е	販売	-	ユムシ
\mathbf{F}	非売	-	-
G	販売	-	ユムシ
Н	販売	-	ユムシ
Ι	販売	-	ユムシ
J	販売	-	ユムシ

店舗名はA-Jと表記し、*印は本研究でユムシを購入した 店舗を示す.輸入元は聞き取り調査の結果に、商品名は 実際に店頭での表示に基づき記した.

表 3. 試料の産地と個体数

産地	個体数	産地記号
U. unicinctus		
山口県千鳥浜*	5	JA
福岡県吉富干潟*	3	$_{ m JB}$
中国 (輸入)	18	A-J
I. gogoshimense		
岡山県牛窓*	2	IG

釣り用の生餌として販売されていた個体は,聞き取り調 査の結果より,全て中国産とした.

*印は実際に最終した場所を示す.産地記号は表2及び図 1と一致する.

比較する対象とした個体の各産地と個体数などを表 3にまとめた。

COI 配列に見られる個体差

本研究では、26 個体の U. unicinctus について COI 塩基配列の一部領域(817 塩基)を決定し、これに 同種の既決登録配列(EF656365)を加えて、計 27 個体を比較した。

COI部分配列の817塩基中、Urechis全27個体で 751塩基が共通に保存されていた。しかしながら点 変異がほぼ全ての個体に見られ、遺伝子型は23通 りとなった。817塩基の全てが完全一致した場合は 2通りが確認され、この2通りの遺伝子型はそれぞ れ3個体に見られた。一方は、神奈川県内の小売店 A、B、並びに山口県卸業者より購入した各1個体で あり、もう一方は神奈川県内の小売店Aにて購入し た2個体と山口県で採集した1個体であった。他の 21個体では、1箇所もしくは複数個所に点変異が見られた。

817 塩基中の 66 箇所で確認された点変異のうち 29 箇所は、それぞれ 1 個体のみで見られる変異であ った。複数個体で確認できた 37 箇所の点変異を表 4 にまとめた。

日本産個体(福岡県及び山口県)のみに確認でき た変異は、表4に示した759番目のT→Cが唯一 であり、この変異は2個体で見られた。一方、日本 産個体で見られず、中国産のみで確認できた変異は 10箇所(128,356,521,539,560,620,659,713,764, 806番目)にあった。しかし、日本産8個体の全て に共通する変異は皆無であり、中国産19個体の全て に共通する変異もまた皆無であった。そのため、地 域固有の指標となる変異や配列は、今回対象とした 配列、個体では確認されなかった。

なお塩基の欠損は、*I. gogoshimense と U. caupo* を含めても、本研究で検証した COI 領域内では確認 されなかった。さらに上述した全ての点変異におい ても、アミノ酸配列に影響を与えない変異が大半を 占め、アミノ酸配列変換後に見られる変異は、単一 個体でのみ見られる変異を含めても、271 残基中 8 残基にとどまった。

塩基番号	240	273	279	309	348	366
EF656365	Т (19)	C (24)	A (24)	T (25)	T (16)	G (25)
変異塩基	C (8)	T (3)	G (3)	C (2)	C (10) / G (1)	A (2)
塩基番号	423	424	450	459	534	585
EF656365	C (25)	C (11)	T (24)	C (11)	T (25)	C (24)
変異塩基	T (2)	T (16)	C (3)	T (16)	A (2)	T (3)
塩基番号	594	657	663	666	678	708
EF656365	T (25)	C (23)	T (21)	T (24)	G (24)	C (11)
変異塩基	C (2)	T (4)	C (1) / G (5)	C (3)	A (3)	T (16)
塩基番号	711	738	759	774	777	798
EF656365	T (24)	G (25)	T (25)	C (24)	A (25)	G (2)
変異塩基	C (3)	A (2)	C (2)	T (3)	G (2)	A (25)
塩基番号	825	828	838	855	858	897
EF656365	T (24)	A (24)	T (25)	G (3)	T (25)	G (25)
変異塩基	C (3)	G (2) / T (1)	C (2)	A (24)	C (2)	A (2)
塩基番号	952	981	990	1003	1038	1044
EF656365	A (25)	C (24)	G (24)	T (23)	C (24)	G (23)
変異塩基	G (2)	T (3)	A (3)	C (4)	T (3)	A (4)
塩基番号	1047					
EF656365	G (7)					
変異塩基	A (20)					

表4. 変異の見られた塩基と部位

本研究では、27個体の U. unicinctus について COI 遺伝子の点変異が 66箇所に散在することを確認した. このうち複数個体で確認できた 37箇所の変異について、EF656365と比較した場合の塩基とその部位を示す. 塩基記号の後ろに示す括弧内の数値は同変異をもつ個体数を示す.

個体間の遺伝的距離

上述の塩基配列より、各 Urechis unicinctus 個体と 同属別種 U. caupo との遺伝的距離を推定した。日本 産 8 個体との遺伝的距離の平均は 0.027 substitution / site、中国産 19 個体とは 0.021 substitution / site と同程度であった。外群 I. gogoshimense 2 個体との 遺伝的距離もまた、日本産 8 個体からは平均 0.441 substitution / site、中国産 19 個体からは 0.444 substitution / site と同程度であった。すなわち日 本産と中国産の U. unicinctus は、U. caupo 及び I. gogoshimense とは同程度の遺伝的距離にあると言え る。なお、I. gogoshimense と U. caupo との遺伝的 距離は、0.426 substitution / site であった。

さらに U. unicinctus 種内について遺伝的距離の推 定を試みた。全 27 個体の各個体間で推定される遺 伝的距離は、平均 0.014 substitution / site であった。 これに対して、日本国内で採集した 8 個体間に見ら れる遺伝的距離の平均値は 0.015 substitution / site、 中国産 19 個体間では 0.014 substitution / site であ った。また日本産 8 個体と中国産 19 個体の間にお ける遺伝的距離も平均 0.014 substitution / site であ った。すなわち、日本産 8 個体と中国産 19 個体は U. caupo 及び I. gogoshimense から同程度の遺伝的 距離に位置し、かつ日本産ユムシと中国産ユムシの 遺伝的多様度は同程度であると考えられる。

分子系統解析

上述の COI 塩基配列に基づき、分子系統樹を作成 した(図1)。I. gogoshimense を外群とした場合、 Urechis 属は1個体を除き、単一のクラスタを形成 した(図1A及び1B)。クラスタから外れたタクソ ンはU. caupo であり、U. unicinctus の全27個体は 同一クラスタに包含された。このU. unicinctus のク ラスタは、ブートストラップ率99%以上を示した。

この U. unicinctus のクラスタ内を詳しく見直す と、2つのサブクラスタに分かれていた(図1C,D)。 一方の姉妹クラスタは3個体から成り、他方は残り

24 個体から構成されていた。以上のトポロジーは NJ法、ME法のいずれにおいても共通に確認できた。 前者の姉妹クラスタを構成する3個体は日本産1個 体と異なる店舗で購入した中国産2個体であり、も う一方のクラスタにも、日本産8個体と中国産16個 体が混在し、ここに文献9から引用した EF656365 配列も含まれていた。「ユムシ」と「スーパーコウジ」 と異なる名称で販売されていたユムシは、それぞれ が両クラスタに散在していた。

24 個体から成る後者の姉妹クラスタ内にもまた、 複数のクラスタを確認できたが、80%以上のブート ストラップ率を示したクラスタは、配列が完全一致 した3個体で構成される場合に限られた。この3個 体には日本産と中国産の両方が含まれ、両者の間に 明瞭な系統的差異は見られなかった。

討論

日本では古来よりユムシを「牛」などと呼んで食用 や釣り餌にしてきた^{1,5)}。現在では、生き餌として「ス ーパーコウジ」、「コウジ」、「マメコウジ」、「ユムシ」 という呼称で、日本各地で販売されている²⁾。

本研究でも、神奈川県内において「スーパーコウ ジ」と「ユムシ」が販売されていたことを確認できた。 Saito らの報告²⁾ では、西日本で釣り餌として流通 するユムシが主に中国産と韓国産であることが指摘 されているが、神奈川県内を流通するユムシについ ても、同様に中国産が主であることが聞き込み調査 より明らかとなった。しかしながら、販売時の名称 は産地に由来するものではないらしい。山口県内の 生き餌卸業者によると、これら異なる呼称の個体は 主に体長や体壁の肥厚などによる。個体の成長など によって商品価値も変わり、商品名も異なるようで ある。また同卸業者によると、中国産ユムシは主に 中国南部で採集されているとのことだった。

本研究で確認できた「スーパーコウジ」と「ユムシ」 は、いずれも分子系統学的にも U. unicincutus の系 統に属するため、生物学上の同一系統の同一種であ ると解釈することに無理はない。さらに「スーパー コウジ」と「ユムシ」を含めた中国産ユムシと、日 本産ユムシでは、中国産ユムシ各個体間の遺伝的距離、 の助じてれもほど等 距離であった。中国産ユムシと日本産ユムシとに同 一多型が見られたことも勘案し、両個体群は同一系 統に属すると思われる。そのため、現段階では、中 国産ユムシの遺伝的多様性が 攪乱される可能性は低い。

むしろ、中国産ユムシと日本産ユムシは遺伝的な 交流が存在する個体群という可能性も考えられる。 結論付けるには尚早であるが、この場合、例えば幼 生期の個体が自由遊泳によって移動する可能性など が挙げられる。筆者らのこれまでの研究¹⁴⁾と過去の 知見^{12,13,15)}から、*Urechis*属では約1ヵ月から3ヵ 月の遊泳期間が存在しうる。この期間が個体間の交 流を可能にし、次世代を残しているとも考えられる。

一方、本研究結果を遺伝的攪乱が生じた結果と解 釈することも不可能ではない。この可能性について は、より大規模な集団的解析を待たずに判断するこ とはできない。しかしながら、いずれにしても本研



図 1. COI 塩基配列に基づいた分子系統樹.本研究で決定した COI 塩基配列の一部領域(817 塩基)及び EF656365(中国産 U. unicinctus), AY619711(北米産 U. caupo,青い囲み)に基づいて,分子系統樹を作成した.AはNJ法,BはME 法による系統樹を示す.AとBそれぞれに示した赤い囲み範囲の拡大図がCとDに対応する.図中の数値はブートスト ラップ率(%)を意味する.AおよびBでは80%以上,CおよびDでは60%以上の場合のみを記してある.スケールバー は塩基置換率(substitution / site)を示す.各タクソンのA~Dは表2に示した購入店舗に対応し,a~fは個体識別記号 を意味する.日本国内で採集した個体はJAとJB,またSは山口県内の生き餌卸業者から購入した個体を示す.IGは I. gogoshimenseを示す.

究で対象とした日本産ユムシと中国産ユムシが、遺 伝的によく似た個体群であることに違いない。

ところで、2012年2月から2013年11月の期間 に購入したユムシから配偶子を得る事はなかったが、 2012年以前の断続的な調査では、受精可能な配偶子 を有する個体も確認している。そのため、交配実験 から各個体群間における生殖的隔離の程度を検討す る事も可能であると考えられる。中国産ユムシの発 生様式に関する報告¹²⁾、日本産ユムシ^{13,14)}ならびに 同属別種 U. caupoの発生様式¹⁵⁾に著しい差異はな い。一方で、餌や温度などの異なる飼育条件に依存 して、発生速度や生存率に違いが生じると考えられ る。そのため、交配実験から各地域の個体群につい て受精における適温の違いなどを検討することが可 能と思われる。

本研究では、釣り餌として流通している「ユムシ」 と「スーパーコウジ」が遺伝的に同一の系統に属す ることを明らかとした。また神奈川県内に流通する 中国産ユムシと日本産ユムシ(瀬戸内海産)もまた 遺伝的に同一の系統であることを明らかとした。ユ ムシは釣り用の生き餌として日本各地を流通してい るが、少なくとも現在の瀬戸内海産個体群と輸入ユ ムシの間に差異は見られなかった。釣り餌ユムシの 流通規模を踏まえると、東北地方を含む東日本のよ り広範囲な地域を対象とした検討も今後は必要とな るであろう。

謝辞

本研究では、日本産ユムシの入手について福岡県海 洋技術センター豊前海研究所、岡山大学理学部附属 臨海実験所のご助力賜りました。ここに深謝の意を 表します。本研究は神奈川大学総合理学研究所共同 研究助成によって実施致しました。ここに謝意を表 します。

文献

- 西川輝昭 (1995) ユムシ・イムシのルーツを訪ねて 一動物和名の一考察. 海洋と生物 17: 512-517.
- 2) Saito H, Niwa N, Kawai K and Imabayashi H (2011) Current state of aquatic animals sold as sport fishing bait in Western Japan. *Bulletin of*

the Hiroshima University Museum 3:45-57.

- 3) 西川輝昭(2007) ユムシ動物門.第7回自然環境保 全基礎調査 浅海域生態系調査(干潟調査)業務報告 書.環境省自然環境局 生物多様性センター.pp.178-182.
- Itani G, Izichi M and Ueda H (2005) Crab species collected from the burrows of *Uechis unicinctus* in Hiuchi-Nada, the central Seto Inland Sea, Japan. *Cancer* 14: 1–4.
- 5) 風呂田利夫 (2007) 三浦半島・相模湾. 第7 回自 然環境保全基礎調査 浅海域生態系調査 (干潟調査) 業務報告書.環境省自然環境局 生物多様性センター . pp.50-51.
- 風呂田利夫(2007)東京湾.第7回自然環境保全基
 礎調査 浅海域生態系調査(干潟調査)業務報告書. 環境省自然環境局 生物多様性センター.pp.39-47.
- 岩崎敬二 (2009):海の外来生物 Q & A. 海の外来 生物.日本プランクトン・日本ベントス学会編,東 海大学出版会.pp.3-18.
- Kazama M, Endo M, Akiu N and Hino A (2013) Cold-shock-induced polyspermy and low-temperature tolerance in Janaese sea urchin eggs. J. Exp. Marine Biol. and Ecol. 443:178-187.
- 9) Wu Z, Shena X, Suna M, Rena J, Wange V, Huangd Y and Liua B (2009) Phylogenetic analyses of complete mitochondrial genome of *Urechis unicinctus* (Echiura) support that echiurans are derived annelids. *Molecular Phylogen. Evol.* 52: 558-562.
- Boore JL (2004) Complete mitochondrial genome sequence of *Urechis caupo*, a representative of the phylum Echiura. *BMC Genomics*. 5:p.67.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:p.1596-1599.
- 12) Qinghao K, Jiasheng Z and Zaimin J (2002) Studies on the seed production of Urechis unicinctus.
 I. Influence of water temperture on embryonic development and larval rearing. J. Ocean Univ. Qingdao. 32: 273-278.
- Sakiyama F (1958) Rearing experiments of Urechis larvae. Nat. Sci. Rep. Ochanomizu Univ. 9:47-56.
- 14) 風間 真,田澤栄五郎,竹村佐智子,日野晶也 (2001) ユムシ (Urechis unicinctus)の人工受精、発 生および長期飼育について.神奈川大学総合理学研 究所年報 2001. pp.35-44.
- 15) Newby WW (1940) *The Embryology of the Echiuroid worm Urechis caupo.* The American Philosophical Society, Independence Square, Philadelphia.
■原 著■ 2013 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

好冷性珪藻類 Thalassiosira Nordenskioeldii からの 全ゲノム遺伝子の抽出

鈴木祥弘^{1,2,3} 金沢謙一¹ 森本貴之² 米澤直樹² 中山 堯²

Extraction of Total Genome DNA from a Psychrophilic Diatom Species, *Thalassiosira Nordenskioeldii*

Yoshihiro Suzuki^{1,2,3}, Ken'ichi Kanazawa¹, Takayuki Morimoto², Naoki Yonezawa² and Takashi Nakayama²

¹ Department of Biologaical Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Information Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail:r201170216pp@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Preparation of total genome DNA is essential for genomic analysis by next generation DNA sequencers. However the DNA of a psychrophilic diatom species *Thallasiosilla nordansioeldii* is hard to prepare becoming shredded during preparations with various methods. The silicified cell wall of the species could have physical and chemical interactions with large DNA molecules. A gentle preparation method with benzoyl chloride was adopted and a good amount of total DNA could be extracted, although it contained short fragments of DNA. *Keywords*: diatoms, genome, next generation sequencer, psychrophilic, *Thallasiosilla nordansioeldii*

序論

次世代シークエンサーによってゲノム解読にかかる 時間とコストは低下した。しかし、天然の生物種で 新規にゲノムを解読することは依然として容易では ない。交配で純系を作出できない種では、遺伝子構 成がヘテロであることも解読を難しくしている。さ らに、天然の生物種では実験生物で確立されている 生理・生化学的手法がそのままでは適用できず、培 養や DNA 精製が難しいものも存在する。こうした 生物群の1つに珪藻類がある。 珪藻類は海洋の主要 な一次生産者であるがゲノム解読は進んでおらず、 2014年4月現在で、ゲノムが解読された種は中心 目と羽状目でそれぞれ1種に過ぎない¹⁾²⁾。本研究で は、ゲノム解読の対象として冬季オホーツク海のプ ランクトン藻類群集から単離した低温棲珪藻種に着 目した。本種のゲノム DNA は精製の際に容易に切 断されてしまい、次世代シークエンサーの解析に必 要な高分子の DNA を大量に得ることが困難であっ た。このため、本研究では、細胞破砕、蛋白質の変性、 DNAの共雑物からの精製の3段階について精製中の DNA 分子の劣化を検討した。これにより、珪藻類培 養株から次世代シークエンサーを用いたゲノム解析 に必要な高分子 DNA を精製する方法の確立を目指 した。

材料と方法 低温棲藻類の単離と培養

2012年3月、北海道サロマ湖においてプランクト ン藻類の単離を行った。潮汐により結氷の無かっ た第二湖口付近の海面から表層水をバケツで採水 し、プランクトンネットで200倍に濃縮してプラン クトン藻類試料とした。プランクトン藻類試料を濾 過海水で希釈した後、氷冷した時計皿に微細藻類試 料を移し、水温を0℃に保ちながら双眼実体顕微鏡 で検鏡した。細胞内に明瞭な葉緑体が認められ、コ ロニー当たりの細胞数が多く盛んに増殖していると 推定できる個体を選び、先を細くしたパスツール ピペットで1個体ずつ取り出した。これをf10 培 地(Guillard) 各1 mLの入った24 ウェルプレート

(Apogent Discoveries) に移して、50 μ mol photons m⁻² s⁻¹の青色蛍光灯(カリビアンブルー:スドー)の 下、0℃で5~6日培養した。プレートで増殖した 微細藻類を 10 mL の f/10 培地の入った試験管に移 し、同じ条件で培養を続けて培養株とした。培養株 のうち試料中で優占していた珪藻種 Thalassiosira nordenskioeldii Cleve を実験に用いた。まず、単離 株を f/2 培地 (Guillard) 100 mL に移植し、同じ条 件で培養を続けた。細胞数が十分に増加した後、培 養細胞を含む培地 50 mL を f/2 培地 (Guillard) 1500 mL に移植した。細胞数が十分に増加し増殖が停止 する前に、光学顕微鏡で細胞の状態を確認して細胞 を集めた。細胞は0℃、2000gで10分間遠心分離 してペレットとして回収した。ペレットは等量の培 地で懸濁した後、200 µ L ずつ分注した。分注後、0 ℃、 2000 gで3分間遠心分離してペレット試料を得た。 必要に応じて試料を液体窒素で凍結させ、・81℃で保 存した。

ゲノム DNA の調整

試料から全 DNA を抽出した。精製には 3 つの方法 を用いた。いずれの方法も 1. 細胞の破砕、2. 蛋白質 の変性、3.DNA の精製の 3 つに分けられる過程が含 まれていた(図 1)。フェノール・クロロホルム法³⁾ では 200℃で 24 時間乾熱滅菌した乳鉢で藻類の細胞 を破砕した。破砕処理中に細胞が融解しないように 乳鉢と乳棒は液体窒素で冷却し低温を保った。SDS を含む緩衝液中で蛋白質分解酵素(protainaseK)と RNaseA を用いて蛋白質と RNA を分解し、さらに、

中性フェノールで試料を処理して蛋白質を変性させ た。変性した蛋白質を遠心処理で除いた後、水相 のDNAを100%エタノールで沈殿させた。これを 70%エタノールで洗浄後、緩衝液に溶解して DNA を精製した。DNA吸着カラム法には、DNeasy (Qiagen CO.,LTD)を用いた⁴⁾。この方法でも乳鉢 を用いて細胞を破砕した。その後、蛋白質変性剤 と RNaseA を含む抽出緩衝液で RNA と蛋白質を分 解・変性し、その多くを遠心処理により沈殿させた。 DNA と伴に水溶液中に残った共雑物は、DNA 吸着 カラムを通過させ、DNA のみをカラムに残した。カ ラムを洗浄緩衝液で洗浄して、僅かに残った共雑物 を除いた後、溶出緩衝液を用いて DNA を溶出して 精製した。塩化ベンジル法では、物理的な細胞破砕は 行わない⁵⁾。塩化ベンジルを含む細胞破壊緩衝液に より細胞膜、細胞壁、核膜などが破壊される。抽出 緩衝液には RNaseA や界面活性剤が含まれており、 DNA が水層に効率よく抽出される。夾雑物を沈殿と して分離して精製された DNA は、さらにエタノー ル沈殿法により洗浄される。

精製されたゲノム DNA の定量と質の検証

精製されたゲノム DNA の濃度と共雑物の過多の検 証は、分光光度計を用いて、波長 200-350nm の範囲 で吸収スペクトルを測定し検討した。A260/A280 の 値を蛋白質の混入の指標として求めた。また、A260 から濃度を求めた³⁾。DNA は 1%アガロースを含む TAE 緩衝液中で電気泳動し、精製操作による DNA の切断の有無を検討した。



図 1. ゲノム DNA 精製に用いた方法の概略.

結果と考察

フェノールにより変性させて蛋白質を沈殿させ取り 除く方法は、さまざまな生物試料からの DNA 精製 に用いられる。本研究でも中性フェノールにより蛋 白質の変性させ、その後、残留するフェノールを取 り除くためにクロロホルムを用いるフェノール・ク ロロホルム法を適用した。本種の培養細胞は粘液質 であった。破砕後の細胞にフェノールを作用させて 蛋白質を凝集させ遠心分離すると、同時に粘液が沈 殿した。この際に分離した水相からエタノール沈澱 法で DNA の精製を試みたが、ほとんど沈澱は生じ なかった。僅かに生じた沈澱を溶解して測定した吸 光スペクトルには、DNA の吸収スペクトルも、蛋白 質の吸収スペクトルも認められなかった(図2A)。 蛋白質の分離の際に生じた沈澱に、多くの DNA が 含まれていたものと考えられる。DNA 吸着カラムを 用いた方法でも、細胞を破砕し、蛋白質などを変性 して沈殿させる。この方法でも同様に粘液質が沈殿 したが、上澄の水相にはDNAが存在した。水相を カラムで処理すると一定量の DNA を得ることが出 来た(図2B)。この方法でも乳鉢を用いて細胞を破 砕するが、乳鉢に一定量の試料が残ってしまうため、 小量の試料を処理する際には損失の割合が大きい。 このため、乳鉢を用いずに直接抽出の処理から始め る方法を試みた。乳鉢を用いた方法では、100mg 藻 体あたり 5.6 µgの DNA が得られたのに対し、乳 鉢を用いない方法では、100mg 藻体あたり 8.7 µ gのDNAを得ることが出来た(図2C、表1)。本 研究で用いたカラムでは、乳鉢を用いた細胞破砕が DNAの収率を上げているわけではなかった。また、 カラムを用いて精製された DNA 試料の吸収スペク トルのA260/A280はいずれも1.8であり、夾雑物の 混入が僅かであることを示していた(表1)。乳鉢を 用いずに細胞の破砕を行う方法に塩化ベンジル法が ある。この方法で抽出された DNA を含む水溶液か ら、夾雑物が変性剤などにより除かれる。残った水 溶液中の DNA はエタノール沈澱法により回収した。 この方法では、カラム法と比較して20倍近い量の DNAを同じ量の藻体から得ることが出来た(図 2D、

表 1. 各 DNA 溶液の吸光度特性

表 1)。DNA 試料の吸収スペクトルの A260/A280 は 2.0 であり、夾雑物の混入が僅かであることを示して いた(表1)。高濃度のDNA が含まれるため、DNA を回収するエタノール沈澱の際に DNA の沈澱が目 視できた。このような高濃度の DNA 溶液からエタ ノールで DNA を沈殿させる際に、DNA をガラス棒 で巻き取ることで、高分子の DNA を得る方法があ る。本研究でもこの方法を試みた。得られた DNA は1/9 に減少したが、DNA 試料の吸収スペクトルの A260/A280は2.0であり、夾雑物の混入が僅かであ ることを示していた(表 1)。得られた DNA に蛋白 質などの夾雑物が含まれていないことと同様に、精 製の途中で DNA が断片化していないことも、試料 を次世代シーケンサに供する際に重要である。精製 された DNA 試料を電気泳動したところ、いずれの 試料も断片化した成分を多く含んでいることが明ら かになった(図3)。どの処理でも処理の RNaseA を 用いて RNA の分解を行っていることから、断片は DNA であると考えられる。乳鉢を用いた細胞破砕 の有無にかかわらず、同様に断片化した断片が同様 に含まれること、カラムを用いない塩化ベンジル法



図 2. 精製された全DNA試料の吸光度. 生重量 100 mg の藻体から精製された DNA を TA 緩衝液 200 μ 1に溶出 した. 純水で 80 倍に希釈して測定した. A. 細胞を乳鉢 で破砕後,フェノール・クロロホルム法で精製. B. 細胞 を乳鉢で破砕後に DNA 吸着カラム法で精製. C. DNA 吸 着カラム法で精製. D. 塩化ベンジル法で精製後,エタノー ル沈澱. E. 塩化ベンジル法で精製後,エタノール沈澱の 際に高分子 DNA をガラス棒で巻き取った.

	フェノール・ クロロホルム	破砕後 カラム精製	破砕せずに カラム精製	塩化ベンゾイル エタノール沈澱	塩化ベンゾイル ガラス棒
A 260	N.D.	0.009	0.014	0.213	0.023
A 280	N.D.	0.005	0.008	0.105	0.011
A 260/ A 280	-	1.8	1.8	2.0	2.0
DNA 推定量 (μ gDNA)	0	5.6	8.7	133	14.4



図 3. 精製試料の電気泳動. 1% アガロースで各 2.0 µ 1の 試料を電気泳動し, SYBR Green で染色. 分子量マーカー は 0.5K bp のラダーで下から 500, 1000, 1500, 2000 bp を 示す.

でも断片化していることから、これらの物理的操作 が断片化の原因であるとは考えにくい。これらの試 料に共通する要因は、藻類それ自体である。珪酸ガ ラス質の細胞壁は、DNA断片化の原因候補の一つ としてあげることが出来る。藻類それ自体が原因で あるならば、これを回避することは難しい。しかし ながら、電気泳動像の最も上部に認められるように これらの試料にも多くの断片化されていない多くの DNA が含まれている。また、収率は悪く不十分で はあるが、ガラス棒を用いた精製では断片化された DNA を減らすことが出来ている(図3)。分子量に よる選別の方法には、ゲル濾過法などがある。また、 アガロース電気泳動のバンドから DNA を回収する 方法も開発されている。本研究で、*Thallasiosilla nordansioeldii* 細胞から、効率よく DNA を精製で きることが明らかになった塩化ベンジル法で大量の DNA を準備できれば、これらのいずれかの方法で断 片化していない純粋なゲノム DNA を調整できるこ とが本研究の結果は示している。

謝辞

本研究は神奈川大学理学部総合理学研究所共同研究 助成により行われた。毎週行われた共同研究会合の 準備にご協力いただいた神奈川大学理学部生物科学 科集団生物第4研究室の大学院生の皆さんには、深 くお礼申し上げる。

文献

- 1) Chris Bowler *et al.* (2008) The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**:239-244.
- Armbrust EV et al. (2004) The genome of the diatom Thalassiosira pseudonana: Ecology, evolution, and metabolism. Science 306 :79-86.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- 4) Qiagen DNeasy CO.,LTD (2000) Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit Handbook. http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/ qiagen/1015107hbdny_0800ww.pdf
- Nippon Gene Co., Ltd (2012) Isoplant Manual 8th edition. http://nippongene.com/pdf/manual_english/_ISOPLANT2_ver3_111102.pdf

■原 著■ 2013 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模川河口域海況の日変化

栗飯原海人1 平賀義道2 鈴木祥弘1.2.3

Diel Changes of Several Environmental Factors in the Estuary of the Sagami River

Kaito Kuriiihara¹, Yoshimichi Hiraga² and Yoshihiro Suzuki^{1,2,3}

- ¹ Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ² Department of Biological Science, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ³ To whom correspondence should be addressed. E-mail:r201170216pp@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Stratifications of sea water-body, distributions of the phytoplankton biomass and several environmental factors were estimated during the spring tide and the neap tide in April 2014 at the estuary of Sagami River. Measurements were carried out four times a day and diel changes of the water-body were estimated. During spring tides, low salinity water from the river was extended, narrowed and mixed with seawater at the surface layer and particle matters might be made. During the neap tide, stratification by low salinity and warm water was fixed. The temperature and dissolved oxygen concentration were increased at the surface during the day. Instead of these diel changes, the factors changed more widely in 7 days. Massive growth of phytoplankton was clearly detected at the beginning of stratification of the water body.

Keywords: phytoplankton, biomass, stratification, the spring tide, the Sagami River

序論

相模湾は日本海溝から延びる相模トラフが湾内に続 き、湾内には水深1000mに達するトラフとその斜 面の海丘と海底谷により、特徴的な海底地形が形成 されている。これにくわえて、湾沖合には黒潮が流 れ、様々な河川から淡水が流入しており、湾内には 複雑な環境が形成されている。平塚市周辺の海域も 例外ではない、周辺の隆起海岸段丘地形にくわえて、 平塚海底谷と呼ばれる特異な海底地形や相模川から の淡水の流入、潮汐により、環境は複雑に変動して いる」。この海域で、河川流量の変化2)と対応付け た特定の季節について、成層構造と植物プランクト ンの対応が調べられてきた³⁾。こうした研究で広い 海域を詳細に測定する場合、特定地点での測定は1 回限りとなり、この測定結果を測定期間の代表値と して用いることが多い。潮汐などの日変動の影響を 小さくするため、小潮などの時期を選んで測定が行 われたが3)5)、日変動自体を検討した例は少なかった。 本研究では、潮汐変動の顕著な春季の大潮の期間を

選び、この海域の成層構造と植物プランクトン分布 や環境要因の日変動を調査した。この結果を直後の 小潮の時期に測定された結果と比較することで、各 調査地点での一回の測定を代表値として用いて解析 した海況が実態を表すものかどうかを検討した。

材料と方法

環境要因と植物プランクトン生物量の測定

調査船より、直読式総合水質計(AAQ126, JFEア ドバンテック株式会社)を垂下して、観測海域の各 地点で電気伝導度、温度、圧力に加えて、光量子流 量密度(光強度)、濁度とクロロフィル蛍光強度を 測定した。電気伝導度、温度、圧力は、測定器付属 のソフトウェアにより塩濃度(‰)、温度(℃)、水深 (m)に換算した。海水密度の指標(σ)は、塩濃度と 温度、圧力から算出した海水密度(kg/m³)より1000 を引いて求めた。同時に採水した海水中のクロロフ ィル濃度を求め⁶、機器の蛍光強度をこの値で較正 してクロロフィル濃度(µg/L)に換算した。溶存酸素 濃度は測定器付属のソフトウェアにより絶対値(mg/ L)で求めた。光強度は表層の強度に対する相対光強 度(%)に換算した。これらの環境指標は水深と対応 付け、各測定地点で鉛直分布を求めた。測定期間中 に連続して時刻と緯度、経度を全地球測位システム (GPS)端末(FG-530,EMPEX社.日本)を用いて記 録し、測定を行った時刻から観測点を算出した。測 定点の平面上の位置より河口からの距離を求め、各 測定値の鉛直分布を入力することでソフトウェア (Gsharp, dlp 社,日本)により海洋断面上の各要因の 推定値の分布を図表化した。

観測期間と観測地点 相模川河口から沖合に向かっ て南北方向に 2.5 km の範囲の海域 (図 1) で観測を 行った。潮位変動の影響を考慮するため、潮位の変 動の大きい大潮にあたる 2014 年 4 月 1 日と潮位の 変動の小さい小潮にあたる 2014 年 4 月 8 日に観測 を行った。観測地点は相模川河口より南北方向に 13 点で、沖合 2500 m 付近まで観測を行い、成層構造 と各要因の鉛直方向の分布を求めた。

結果

春季海況の日間変化

河口から沖合 2500 m までの南北方向について海面 から水深 45 m までの範囲で、温度、塩濃度、濁度、 光強度、溶存酸素濃度とクロロフィルa濃度を測定 した。さらに、推定された海水密度から求めた成層 構造と各環境要因との関係を検討した。相模川河口 付近の水深は東西方向で異なり、河口より500mの 範囲の様々な地点で5m以下の水深となる3)。この ため、調査船が侵入できる最浅の水深まで近づき、 その地点から測定を始めた。河口から離れるに従っ て水深は増し、沖合 1500 m 以上で水深は 50 m を超 え、2500 m付近で水深は100 m以上となった。こ の範囲の海況を2014年4月1日と4月8日の9: 00から15:00の時間帯に、河口と沖合の間を各 2往復移動して測定を行った。これにより、河口か ら沖合にかけて 45m 以浅の水深について示された 海洋断面における各環境要因の推定値の分布を求め た。まず、各測定日の全てのデータを用いて日平均 の海況を求め、比較した(図 2a-1, f-1, g-1)。大潮で あった4月1日の海況は時間とともに大きく変化し たため、全データを用いて推定された各パラメータ の分布は鉛直方向に大きく変化した。この傾向は変 化の大きかった温度、相対光強度、溶存酸素濃度で 顕著であった(図2)。4月1日の温度は表層で15.5 ℃で、僅かではあるが水深とともに低下し水深 45 m

付近で15.0℃となった。(図2a-1)。4月8日は表層 に比較的高い温度(15.6℃)の層が認められた。さら に、20 m 以深にも高い温度(15.8℃)の水塊が沖合 から伸張していた。このため、表層と水深 20mの 間に低温(15.2℃)の水塊が挟み込まれるように分布 していた(図 2a-2)。両日を比較すると、温度の分布 は7日間で著しく変化していることが分かった。4 月1日の塩分濃度は表層から水深15m以浅に濃度 が低い層が認められた。また、この層以深では34.6 ‰でほぼ一定の塩濃度であった(図2b-1)。これに 対し4月8日は水深5m以浅に32‰以下の塩濃度が 低い層が認められた。水深 5m から 25m の間に濃度 勾配があり、塩濃度は次第に高くなった。30m 以深 45m までは 34.6‰で一定であった。 塩濃度の高い水 塊は河口から離れるほど浅い水深まで張り出してお り、河口から 1000m 付近で 35m 以深であったもの が、2500mでは20m以深となった(図2b-2)。温 度と塩分濃度、水深に伴う圧力で決定される海水密 度の指標である σ の分布は、海域の成層の状態を表 す。4月1日のσは水深5m以浅で24.5と低く、そ れ以深で25.7 と一定になり、さらに40m以深で26 となった。表層を除く各深度の密度勾配は緩やかで、 鉛直混合が容易に生ずることが推察された。4月8 日のσも表層で24.5、40m以深で26となったが、 表層から深層にかけて徐々に密度が高くなってい た。各層で一定の密度勾配が形成されており、40m までの層で成層が形成されつつあることが推察され た。4月1日の濁度は河口から沖合1500mの表層か ら海底まで、特に河口付近の海底で高い値が認めら れた。4月8日にも濁度は河口から沖合1500mの表 層から海底まで、特に河口付近の海底で比較的高い



図1. 観測海域.a. 相模湾全景. 図中の四角形は図bの 位置を示す.b. 調査海域. 図中の南北2.5 kmの直線に沿っ て観測を行った.0.2 km ごとに13 点の観測点を設けた.

値0が認められたが、その分布は水深 20m 以浅で 沖合 2500m まで広がっていた。クロロフィル a 濃 度の分布は、両測定日で大きく異なっていた。4月1 日には測定した全層で 1000 μg Chla/L であった のに対し、4月8日には表層でやや低いものの水深 5mから20mの間の層で1600 µg Chla/Lに達す る高いクロロフィル濃度の分布が認められた。この 層は河口でやや厚く沖合で薄くなるが、全海域でほ ぼ一定であり、河口付近では海底に達していた。濁 度を上昇させる粒子やクロロフィル a で示される植 物プランクトンなどの影響で、海中の光強度は4月 1日と4月8日で大きく異なっていた。河口から沖 合 1500m までに懸濁粒子の分布が限定されており、 藻類密度も低いことが予想された4月1日の海中光 強度は、河口付近で急速に、沖合で緩やかに低下し た。このため10%の光強度が認められる水深は河口 で 10m であったのに対し、沖合 2500m で 15m とな った。一方、懸濁粒子や、藻類密度が高い水塊が河 口から沖合まで認められた4月8日の海中光強度は、 沖合で僅かに減衰が緩やかになるものの、河口付近 から沖合まで同じように減衰した。このため、10% の光強度が認められる水深は河口でも沖合 2500 m でも10mとなった。溶存酸素濃度の分布は海域の 成層と藻類の分布に対応して、両日で大きく異なっ ていた。密度勾配が小さく鉛直混合が容易に生じる と推察される4月1日の溶存酸素濃度は、海底付近 で大きく変化したため、各時点での測定結果と異な り、鉛直方向に大きく変化する分布が得られた。一方、 成層により鉛直混合が生じ難く、表層付近から水深 20mにかけて藻類密度の高い4月8日には、表層か ら水深 25 m で 8.0 mg/L と高い溶存酸素濃度が測定 され、それ以深で徐々に値が低下し、水深45mで は7.6となった。高い溶存酸素濃度の分布は高い藻 類密度と対応していた。このため、河口付近の海底 でも高い溶存酸素濃度が維持されていた。

海況の日変化

上に述べたように、河口付近沿岸の海況は7日の短 期間で劇的に変化した。これらの変化を時間的にも 空間的にも十分な頻度で測定することは正確な測定 のために重要である。GPSを利用し200m毎に正確 な測定点を設定し、6時間以内に4回の測定を実施 した。しかし、沿岸域では潮汐によって、一日の間 に海況が大きく変化した。短時間で変化する海況の 測定を長い時間をかけて測定し、その結果をまとめ て表すことは困難である。測定が正確なものであっ ても、全てのデータを統合することで、一日の特定 の時間のそれぞれの海況を示すことができないばか



図2. 相模川河口の環境要因とクロロフィル a 濃度の鉛直 分布. 図下部の白色部分は海底, 図上部の黒四角(■)は 観測地点を示している.上より温度,塩濃度,密度,濁度, クロロフィル a 濃度,相対光強度と溶存酸素濃度を表し, 左は4月1日大潮の際の測定結果,右は4月8日小潮際の 測定結果を示す.

りか、海況の全体像を捉え難くした。本研究では、1 年のうちで最も潮汐の影響が顕著な春季の大潮の期 間を選び、90分ごとに同じ測定を行っている。この 変化を測定時間ごとに分けて解析し、一日の変化を 求めた(図3h,図4h)。また、同時期の小潮の時期を 選び同様の測定を行って比較した。大潮の測定では

20

0

(h) $\frac{1}{4}$

6 8

14 16 18 20 22 24

¹⁰(時)



上より温度 (a), 塩濃度 (b), 密度 (c), 濁度 (d), クロロフィル a 濃度 (e), 相対光強度 (f) と溶存酸素濃度 (g) を表し, 左から 9:15-11:30(I), 11:30-13:20 (II), 13:20-14:14 (III), 14:14-15:14 (IV) の測定結果を示 す. 各図下部の白色部分は海底, 図上部の黒四角 (■) は観測地点 を示している. それぞれの期間の潮位 (h) は図中 I からIVで示した.



(h)

2 4

6

8

¹⁰(時)

14 16 18 20 22 24

0-

ò

(小潮). 上より温度 (a), 塩濃度 (b), 密度 (c), 濁度 (d), クロロ フィル a 濃度 (e), 相対光強度 (f) と溶存酸素濃度 (g) を表し, 左から 9:00-10:00 (I), 10:00-11:10 (II), 11:10-12:00 (III), 12:00-13:00(IV) の測定結果を示す. 図下部の白色部分は海底, 図上 部の黒四角 (■) は観測地点を示している. それぞれの期間の 潮位 (h) は図中 I からIVで示した.

各環境要素の分布は一日の間に大きく変化した(図 3)。引き潮の時期(I期)に沖合 2000 m まで伸長し ていた低塩濃度の水塊は(図 3b-I)、満ち潮に転じ たⅡ期、Ⅲ期に河口へと押し戻されると同時に混合 し、海水より僅かに低濃度の水塊を形成した(図3b-Ⅱ~IV)。沖合 1000m までの範囲で生じた濁度の高 い水塊 (図 3d-Ⅱ~IV) はこの混合と対応していた。 濁度の変化とともに相対光強度も変化した。濁度の 高い水塊を透過すると光は減衰するため、水塊の広 がりとともに河口付近で光が強く減衰した(図3-f)。 また、 I 期に認められた沖合 2000m 付近の濁度の高 い水塊(図 3d-I)は、河口域の水塊が引き潮とともに 移動したと考えることができる。I期に認められた 河口付近の低溶存酸素水塊(図 3g-I)は、満ち潮に 転じると認められなくなった(図 3g-Ⅱ~Ⅳ)。表層 に外海からの海水が押し寄せるⅡ~IV期に(図3h)、 海底付近の海水は海底に沿って深層へと移動するこ とが予測できる。

大潮の時期の測定と異なり、潮汐による変化のほ とんどない小潮の時期の測定では(図4h)、全体の傾 向はデータを統合して作成した図2・2とほぼ等しか った(図4)。しかし、小潮の測定でもいくつかの要 因に分布の変化が生じた。正午前後のⅢ期とⅣ期に 表層数メートルの温度が上昇し、高温の水塊が生じ た(図4a)。また、溶存酸素濃度がⅢ期とⅣ期で上昇 し、高い酸素濃度の水塊が深い水深まで進捗してい た(図4g)。これらの変化は潮汐ではなく日照と日照 に伴う藻類の光合成によるものと推察される。

少なくとも本研究で測定を行った海域では、潮汐や 日照により、環境要因は一日のうちでも変動するこ とが明らかになった。特に潮汐の影響は顕著であり、 大潮の際に一日の測定結果を統合して示された図か らは、海況を検討することは難しいことが示された。 一方、海況を短時間で測定できれば、この時期の海 況の日変化を捉えることが可能であった。さらに、 短時間で測定された海況を異なる日に測定された同 様の測定結果と比較すると、日内の変化に比較して、 日間の変化は大きく、明瞭に異なることが明らかに なった。本研究の結果は、季節変動などの日間変化 を測定する場合には、潮汐や日照などによる日内変 化の影響を考慮する必要があるが、一日のうちの特 定の時間帯に測定された結果であっても、大きく変 動する日間変化を検討する際には、有効であること が明らかになった。

铅櫥

本研究では野外調査に、神奈川県平塚市漁業協同組 合の伏黒哲司氏と栄宝丸船長の上谷きよし氏にご協 力頂いた。厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 日本海洋学会編 (1985) *日本全国沿岸海洋誌*.東海大 学出版会,東京.
- 2) 国土交通省 水文水質データベース (*http://www1. river.go.jpl*)
- 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.
- 児玉壮史,鈴木祥弘 (2010) 相模川河口域の海況と 植物プランクトンの分布. Sci. J. Kanagawa Univ. 21: 65-69.
- 5) Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measure Ments (1994UNESCO)
- 6) Lalli CM and Parsons TR (1995) *Biological Oceanography : An Introduction (Open University Oceanography Series).* Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.

■原 著■ 2013年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ウミホタル類の環境耐性の解明と至適飼育環境の構築研究

若山典央 1.3 金沢謙一 1.2

Culture Methods for Sea-Fireflies

Norio Wakayama^{1,3} and Ken'ichi Kanazawa^{1,2}

- ¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ² Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
- ³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: wa@umiho.net

Abstract: The culture conditions for sea-fireflies were investigated in this study. When using a larger tank, dispersion of individuals to floor sediment causes insufficient feeding for each individual. In contrast, small capacity tanks demonstrate water pollution. A culture tank with isolation chambers was divised. The isolation chambers prevent individual dispersion, and enable each individual to feed. Tolerance to water pollution under culturing conditions was tested. Sea-fireflies show high tolerance to ammonia and nitrite. It is suggested that the rapidly decreasing number of individuals in culture tanks was caused by loss of oxygen. The survival rate of juveniles increased in the presence of antibiotics. An influence of antibiotics on hatching and copulation was also suggested.

Keywords: Myodocopa, Ostracoda, culture method

序論

ウミホタル Vargula hilgendorfii の発光は酵素の概 念を学ぶ際に都合がよく、また発光が興味を惹きや すいことから教育の場でも活用されている。しかし 実験生物として確立されている生物ではないため飼 育による維持が容易ではなく、利用のためには頻繁 な採集が必要となる。発光生物として耳目を集めや すいため、ホビーとして飼育を試みる事例が web 上 でもみられ、容易に飼育できる、繁殖、成長すると いう記述が散見される。しかし、ウミホタルにおい て雌による貯精が示唆されており^{2,3)}、交尾せずに複 数回にわたり放仔する4)事から同一の雌個体から数 ヶ月にわたり新たな幼体が出現しているとしても水 槽内で繁殖を行っているという根拠にはならない。 また記述からは大量斃死、死骸と脱皮殻の誤認、や がては個体数を減じ個体の補充を必要とするといっ た状況を読み取る事ができ、長期飼育を称する場合 でも水槽内で漠然と生存個体が確認できているとい う程度の飼育状態である事が多いとみられる。成書、 文献におけるウミホタルの飼育技術への言及は少な く、エアレーションを備えた水槽で飼育可能である1)

とされるが、それだけでは難しい(阿部 私信)と もされるなど混乱がみられる。

従来の飼育方法は二種に大別される。主に底面濾 過を備えた水槽飼育とインキュベータに格納したシ ャーレ、プラ容器等による個別飼育である。ウミホ タルの水槽飼育においては底面濾過が用いられる事 が多い。これはウミホタルは昼間に砂に潜るため砂 を敷いて飼育する事が望ましく、また剥き出しの取 水口から個体を吸い込まないためである。取水口に スポンジ等のカバーを取り付ける事で吸い込みを軽 減する事もできるが、時間と共にスポンジに吸着さ れる個体が増えてしまうため、取水部の流速が抑え られる底面濾過が利用される事が多い。 しかし、 底面濾過では底砂そのものがフィルタとなるため、 ウミホタルの様に砂に潜る小形生物を飼育する場合 は濾過部のメンテナンスが困難であり、またウミホ タルが好む細粒砂を使用するためには底砂を厚くす る必要があるため砂中で還元細菌によって硫化水素 が発生して生体に害を及ぼす事がある。水槽飼育は 水質管理や給餌を一括して行う事が可能であり、多

くの個体を収容可能である。しかしウミホタルは成 体でも体長 2.9-3.2mm 程度と小形である。そのため 水槽内に多数の個体を収容している場合、各個体の 正確な状況や個体数の増減を目視で正確に判断する 事は困難である。大型の槽内に敷かれた底砂全体に 個体が分散した場合は特に個体の管理、追跡が難し くなる。また、ウミホタルは餌の臭いにより活性化 されて摂餌を行う⁵⁾が、飼育容器が大型であり底砂 面積が広いほどに給餌にムラが生じる。このため大 型水槽では給餌サイクルを短く、あるいは多量の餌 を与える必要が生じるが、これが水質の悪化を招く 原因となる。以上の問題点を整理すると、ウミホタ ルの飼育で必要な条件は次の3点にまとめられる。

(1) 小形生物を吸引しない濾過装置を備える

(2)管理しやすい小形容器に少数の個体を収容する(3)少量の餌の臭いにより装置全体のウミホタルが 活性化する規模の底砂面積に抑える。

これらの内、(2),(3)は飼育容器の小型化により 実現可能だが、一般的に水槽飼育において、水量の 多さは水質の安定に寄与する。ウミホタル類の環 境耐性についての研究は少なく、介形虫全体で見 ても Cyprideis torosa の硫化水素耐性⁶⁾、ウミホタ ルの低温、低塩分耐性"程度にとどまっており未 解明の部分が多いが、ウミホタルおよびこれを含む Cypridinidae が生息する場所は細粒砂でかつ泥やデ トリタスの蓄積がなく、通水の良い環境に限られる。 Euphilomedidae、Cylindroleberididae とは異なり Cypridinidae は底質から硫化水素臭がする場所では みられないため、ウミホタルはきれいな海に生息す ると俗に言われている。ウミホタルがどの程度水質 の悪化に影響されるかは定かではないが、飼育下で 水質の安定性が低い場合には個体に悪影響を及ぼす 可能性がある。これらの条件からウミホタルの飼育 は個体管理のため小形容器で行う事が望ましい反面、 同時に装置内の水量を多くとり水質の安定性を高め る必要性があるといえる。

一方、インキュベータを用いた個別飼育では全く 状況が異なる。一般にウミホタルが個別飼育の対象 となる事は少ない。ウミホタルが主に用いられてき た発光物質に関する研究では個体識別が必要ない為 である。しかし、ウミホタルを含むミオドコーパ類 は未記載種が多く、その生態や成育過程の研究も多 くはなく未知の点が多い。生息深度が大きいものや、 遠洋で浮遊生活を営むと思しきもの等、わずかな個 体数あるいは幼体しか採集されないものも多い。採 集しやすい沿岸域でみられるものの中にも、特定の 季節に幼体のみ得られるもののもある。こういった安 定した採集の難しい生物の実態を捉え、さらなる科 学的理解につなげていくためには、高い確実性で成 育させられる飼育方法が必要となる。そこで行われ るのが温度、照明が管理されたインキュベータ内に 少数の個体を精密に管理する個別飼育であるが、こ れもまた十分に確立されているとは言いがたい。多 くの生物において抗生剤の使用により成長率や生存 率が向上する事が広く知られている。これまでミオ ドコーパ類の飼育には用いられていないが、これを 使用する事でこれまで維持や成育の難しかったミオ ドコーパについても取り扱う事が可能になるのでは ないかと思われる。

以上の状況を踏まえ、本研究ではウミホタルを含 むミオドコーパ類の飼育技術を高めるべく、管理し やすく、かつ安定した飼育環境を実現する飼育装置 の構築と抗生剤を用いた飼育の検証を主軸として飼 育方法の模索を行った。

材料と方法

実験に用いたウミホタルは静岡県下田市および千 葉県館山市にてベイトトラップを用いて採集した。 Vargula sp. の幼体については千葉県館山市でドレッ ジ採集されたものを使用した。

チャンバ式飼育装置での飼育

本研究で作成した飼育装置は、個別飼育における個 体管理の容易性と水槽飼育における水質管理、これ ら二つの飼育方法の利点を併せ持つ事を目指し、隔 離飼育チャンバを備えた水槽を構築した。チャンバ として 300 mL 又は 500 mL 容量の塩化ビニール製 プラスチックボトルを用いた。通水不足による酸欠 を防止するため、小型ポンプを用いて与圧した飼育 水をチャンバ内に送り込み、目開き1mmのナイロ ンメッシュを取り付けた 50 mm 径の排水口から排 出する事で飼育水の滞留を防止した。プラスチック ボトルの蓋部分を加工し、給水用のシリコーンチュ ーブ(外径6mm、内径4mm)と排水口(ø50mm) を取り付けた。給水部のシリコーンチューブを斜め に配置する事で個別容器の内周を巡る流れを作り出 した。飼育チャンバの構造は図1Cに示すとおりで ある。小形ポンプは 50 mL 遠沈管を加工した分配器 に接続し、複数の飼育チャンバに同時に送水できる 構造とした。分水部のシリコーンチューブを外径8 mm、内径6mmのものとする事で飼育チャンバ給 水部のシリコーンチューブと容易に脱着可能な構造 とした。飼育チャンバ内には厚さ 5-10 mm 程度にな る様、細粒砂を敷き詰め、チャンバ内の水流強度は 底砂を乱さない程度に調整した。

飼育チャンバおよび給水装置をオーバーフロー管



図1. チャンバ式飼育装置の概念図. A. 装置全体図. クーラー co, ポンプ pu1 主水槽 ta1, 下部サンプからなるオーバー フローシステムにポンプ pu2 と配管を介してウミホタル飼育槽 ta2 が接続されている. B. ウミホタル飼育槽 ta2 内の構 造. 小形ポンプ pu3 で加圧した飼育水を分配器 di を経由してチャンバに送る. 水圧は調整バルブ va によって制御される. チャンバ内の水は個体流失防止のためのメッシュを備えた排水口から排水される. C. チャンバの構造図. 蓋 ca とパッ キン ga に設けた貫通孔部分にメッシュ me を挟みこむ. 蓋部を貫通する様取り付けられるシリコンチューブ tu を通じて 飼育水が送り込まれる. 各図の矢印は飼育水の移動方向を示す.

を備えた遮光水槽(図1内ta2. 450×250×280 mm)内に設置し、飼育水は濾過層を兼ねたサンプ、 温度コントローラ、プロテインスキマーを備えた大 型水槽(図1内ta1ヒトデ類、ヤドカリ類を飼育。 900×450×450 mm)のサンプからポンプで取水し、 オーバーフロー排水をサンプに戻す所謂リフジウム 構造として水質の安定性を確保した。飼育槽の全容 は図 1A および B、図 2 のとおり。チャンバ内個体 への給餌は3日に一度の頻度で行った。個体の流失 を防止するため、給水チューブを取り外してチャン バへの給水を止め、チャンバを傾けて排水口から飼 育水を捨てて水位を減らした後に蓋を外し、裏面に 個体が付着していないか確認して給餌作業を行った。 冷凍保存したアジあるいはイワシの身を解凍し、数 mm 角程度にしたものをチャンバ内に投入し、蓋を 戻し給水を復帰させた上で 30 ~ 60 min 程度経過し た後に余剰の餌を取り除いた。餌を取り除く際にも、 上記と同様の手順で作業を行い、個体の流失を防止 した。以上の条件で維持された8つのチャンバにそ れぞれ 20 個体のウミホタル成体を入れ、11 ~翌4 月までの半年間飼育を行った後に個体数をカウント、 生存率を求めた。

ウミホタルのアンモニア、亜硝酸耐性の検証

水槽立ち上げ当初に飼育水中に蓄積しやすく、毒性 が強いとされるアンモニアおよび亜硝酸に対する耐



図2. 運用中のチャンバ式飼育槽内の状況. ポンプ pu3 で加圧された飼育水が各チャンバに送り込まれる. 右奥の縦管がオーバーフロー機構.

性をみた。塩化アンモニウム又は亜硝酸ナトリウム を濾過滅菌海水に加え、種々の濃度に調整した実験 海水 50 mL 中に1個体のウミホタル(成体♀)を入 れ、18°C で24時間インキュベートした後に生死判 定を行った。生死判定は遊泳の可否、心臓の拍動、 麻痺状態でない付属肢の動作の3点を基準とし、い ずれか一点でも確認された場合は生存個体とみなし た。それぞれの濃度条件で20個体を使用した。

インキュベータ代替装置と抗生剤を用いた飼育

インキュベータに代え、民生用の安価な冷温庫を

用いての飼育を試みた。本来は飲料等の保温を行 うための装置であり、ペルチェ素子を用いて冷却あ るいは加熱を行っている。冷温庫(図3. VS-404 VERSOS)の扉部分は二重の透明 PS 樹脂であった ため、ここに発泡スチロール板を内蔵させる加工を 行う事で温度安定性を高める事を目指した。庫内温 度は 18℃とし、温度ロガー(サーモクロン G タイプ、 KN ラボラトリーズ)で記録して温度制御の精度を 検証した。この冷温庫を用い、下に示す実験を行った。

Vargula sp. の成育

特に死亡率が高く飼育しにくい Vargula sp. の成育 を試みた。用いた個体は全てA-4からA-3の幼体で 計20個体。飼育に用いた海水は濾過滅菌の後にペ ニシリンGカリウム塩を69.9mg/Lとなる様加え、 冷蔵保存したものを飼育水温に調整してから使用し た。滅菌した複数のプラスチック容器に1個体あた り10mL以上の飼育水容量で個体を収容し、給餌、 換水は3日に一度の頻度で行った。餌として人工飼 料 (テトラマリン テトラ社)のほか、アジの身を 用い、飼育容器中に餌を投入し、30-60 min 程度経 過した後にピペットを用いて個体を新たな容器に移 した。control として、抗生剤を加えない非滅菌海水 によって5個体の飼育を行った。実験は約半年にわ たって行い、成体になった個体は♀3個体について は♀のみを入れた容器で飼育し、他の個体(♀9個体、 ♂2個体)については雌雄同じ容器で飼育した。



図 3. 市販の冷温庫での飼育状況.小規模に生体を維持する場合に有用.

抗生剤がウミホタルの発生におよぼす影響の検討: ペニシリンGが胚発生に与える影響をみるため、 FSW 中に入れた4個体の Vargula hilgendorfii 雌個 体の産卵を待ち、産卵を終えた直後に胚を背甲から 取り出して2グループに分け、8-10個の胚をそれぞ れ9mLの濾過滅菌海水または69.9mg/Lペニシリ ンGカリウム塩含有濾過滅菌海水中で発生を進行さ せた。24時間に一度以上の頻度で容器を揺り動かし、 胚の容器への付着を防止した。換水は3日に一度行 った。

結果と討論

チャンバ式飼育槽

運用テスト期間中、飼育装置に機能上の問題は生じ なかった。実験期間中に塩濃度が40%に達した事も あったが大量斃死は生じず、生残性(図4)は平均 63.8% であった。各チャンバ内で生じた死骸は全て 確認され、個体の管理や状態の確認に問題は生じな かった。実験チャンバと同様に維持されていた予備 チャンバでは幼体の脱皮殻も確認されたが、先行研 究で報告されている成体の脱皮^{1),2)}は観察されなか った。新たに放仔された幼体については、全て失わ れた。初齢幼体は体長 0.88 mm 程度と小さく、目開 き1mmのナイロンメッシュを通る事のできるサイ ズであったため流失したと考えられる。排水部に目 開き1mmのナイロンメッシュを用いたのは、珪藻 や有機物の付着により排水性が落ちる事を恐れたた めであるが、実験期間中に顕著な汚れの付着は見ら れなかったことから、より小さな目開きのメッシュ でも問題が生じる事はない可能性が高い。より目開 きの小さいメッシュを用いる事で齢の低い幼体につ いても飼育可能になると思われる。

以上の様に、チャンバに限られた個体を収容する事



図 4. チャンバ式飼育装置の各チャンバでの生残率. チャンバ No. 1-4 は 500 mL 容器, 5-8 は 300 mL 容器..

で、精密に管理しながら飼育する事が可能となる事 が示された。今後、これを基本として改良を重ねる 事で飼育、成育を伴う研究の一助となるだろう。また、 今回は給餌やメンテナンスを重視して専用の飼育槽 を設けたリフジウム形式をとったが、簡略化し単独 の水槽として稼働させる事や既存の水槽内にチャン バを設置する事も可能である事から、小形生物の飼 育に広く応用可能であると考えられる。

ウミホタルの水質耐性

飼育におけるウミホタルの斃死原因が水槽飼育の開 始時に問題となりやすいアンモニア、亜硝酸にある のではないかという推測の元に、市販のアクアリウ ム用検出試薬(テトラテストアンモニア試薬および 試験紙亜硝酸塩)で基準とされるアンモニア 0.25 mg/L (塩化アンモニウム換算 0.74 mg/L)、亜硝酸 2.5 mg/L(亜硝酸ナトリウム換算 3.75 mg/L)を大 きく超える値で実験を行った。24時間後の生存率 は図 5A および B に示すとおりであり、塩化アンモ ニウムで1,000 mg/mL、亜硝酸ナトリウムで3,000 mg/Lを超えなければ生存率の極端な減少は見られな い(より低い値についても実験を行ったが、生存率 の減少が全く見られなかった事から、結果は記して いない)。どちらも前記した水槽飼育での基準と比較 して極めて大きい値であり、適切な濾過が行われて いる通常の飼育状況でこれらの値に到達するとは考 えがたい。この結果からはウミホタルの水槽飼育に おいて、少なくとも24時間以内の水質悪化により生 存できなくなるとは考えにくい。クルマエビやガザ ミの幼生のアンモニア、亜硝酸耐性 7) と比較しても かなり強靭であると判断される。ウミホタルがきれ いな砂の海岸だけでなく比較的多様な環境に生息す るという報告⁹⁾もあり、野外での調査結果もウミホ タルの強靭さを示している。この結果から、ウミホ タルは一般的なマリンアクアリウムを構築した上で チャンバー式飼育装置実験において示した様な給餌 安定性の確保や個体流失の防止などの対策を加える 事で容易に飼育可能な生物であると考えられる。

では、なぜウミホタルを飼育する事が難しいとさ れるのであろうか? Web上の記述や飼育体験者の 言からは飼育開始直後に大量斃死が生じ、その後は 少しずつ減っていくケースが多いと判断される。こ の場合にまず考えられるのが採集後に水槽構築を開 始した、あるいは過密状態で飼育した等の要因によ り水槽の濾過機能を超えてアンモニア、亜硝酸が蓄 積するというケースだが、ウミホタルのアンモニア、 亜硝酸耐性については前記した通り十分に高く短時 間の内に大量斃死に至るとは考えがたい。次に考え

られるのが採集直後、多大なストレスが生じると推 測される飼育環境への移行において、輸送時のスト レスや水槽への投入時の水合わせの不足によって生 じる斃死である。適切な輸送方法が採られ、水合わ せが行われていればこの時点での斃死は生じにくい が、不適切な方法(輸送時に使用した海水での飼育 開始や水合わせなしでの水槽投入)を採った場合に は少なくない数の個体が死に至ると考えられる。加 えて前述した通りウミホタルは小さく、慣れた飼育 者でなければ肉眼で水槽内の個体の生死を見分ける 事が難しい。そのため斃死個体を都度水槽から除い ていない飼育者も多いとみられる。飼育開始当初に 生じた斃死個体を放置する事で細菌増殖や、それに 伴う酸素消費の増大が生じる。後述するが、本研究 において抗生剤の添加により死亡率が劇的に低下し ている点から、ウミホタルが細菌感染症あるいは細 菌増殖による酸素濃度低下によってその健康を損な っている可能性が示唆される。現時点ではどちらが 原因となっているかを定める事はできないが、いず れにせよ斃死した個体が生存個体に悪影響を及ぼす 事は明らかである。またベイトトラップでの採集時 にはほとんどの個体が満腹状態まで餌を摂取してい



図 5. ウミホタルの水質耐性実験の結果. A. 塩化アンモ ニウム添加海水中でのウミホタルの生存率. B. 亜硫酸ナ トリウム添加海水中でのウミホタルの生存率. コントロー ル(濃度 0) と各濃度条件を Fisher の exact test によっ て検定した結果をグラフ中に示す.

るとみられ、これが水槽内で同時的に排泄される事 で生じるアンモニア濃度上昇や細菌増殖も同様に影 響を及ぼすと思われる。

上記した様にアンモニア、亜硝酸濃度の増加によ って死に至らないとしても個体の酸素消費に加え、 アンモニアから亜硝酸塩、硝酸塩が生じる際の酸素 消費、さらに細菌増殖による酸素消費などの要因が 複合的に働いて酸素欠乏状態になる可能性がある。

ウミホタルの生息状況と底層環境との関係におけるモデル解析で溶存酸素量が主要な説明変数の一つとして挙げられており¹⁰、ウミホタルが飼育下で溶存酸素が減少する高水温に弱い事も合わせ、酸素欠乏が大量斃死のトリガーとなっている可能性があるだろう。いずれにせよ、今回示された条件からは一般的なマリンアクアリウムで飼育する場合に大きな問題が生じるとは考えがたく、ウミホタルの飼育が難しいとされるのは飼育者の飼育知識及び技術の不足による面が大きいと推測される。

冷温庫と抗生剤を用いた飼育

3台の冷温庫を運用し、実験期間中に1台が故障し たものの、結露水によるファンの故障であったため 部品交換により性能が回復された。ペルチェ素子の 冷却、加熱性能はそれほど高くはないため特に空気 に比べて比熱の大きい海水の温度の上昇、下降には 時間を要した。しかし温度安定後のぶれは設定温度 +0.5 ~ 1.5℃以内に収まっており、表示温度とのず れはあるものの、安定性は良好であった。今回使用 した冷温庫は研究用として販売されている冷却可能 な小形インキュベータの 1/10 以下の価格でありなが ら飼育に十分な性能を示しており、費用対効果は圧 倒的である。構造が単純な事から、初等の電子工作 知識さえあれば容易に修理あるいは改造する事も可 能である。12 V 電源で動作する事から車載も可能で あり、野外での採集行でも便利に使用する事が可能 であった。

Vargula sp. の成育

水質変化に弱く、個体維持が難しい V. sp を抗生剤 存在下で飼育する事で、70%程度の成功率でA-3 以 下の幼体から成体まで成長させる事ができた。得ら れた成体は♀12、♂2と性比に大きな偏りがみられ た。control については全ての個体が実験期間中に死 亡しており、抗生剤の効果は非常に大きいとみられ る。飼育中に失われた個体の多くは脱皮時に死亡、 あるいは他の個体に捕食されていた。脱皮する個体 には脱皮の2-3 日前から背甲の白濁と軟化がみられ、 脱皮後の背甲の硬化に数日を要した事から脱皮前後 には刺激を避け、特に複数個体を一つの容器で飼育 している場合には共食いに注意する必要がある。成 育した個体は野生個体と形態的に異なる点は確認さ れなかったが、主に人工飼料を与えて成育した個体 では消化器官表面の朱色色素が薄かった(図 6)。現 時点では抗生剤の影響か、餌の影響なのかは判断で きないが、餌から得られるカロテノイド色素が自然 条件下と飼育下で大きく異なっているため色彩が薄 くなっている可能性が考えられる。また、長期にわ たり飼育した個体では、個体の活性が低く餌や刺激 に対する応答が弱い様見受けられた。

生殖への影響

成体になった Vargula sp. の雌雄を同所で飼育した 場合と分けて飼育した場合の両方で雌個体が卵形成、 抱卵を繰り返し行う様子が確認された。しかしいず れの場合でも胚発生の進行は見られず、卵は数日の うちに膨潤して破裂した。これにより、V. sp. につ いては成長させた雌雄個体から幼体を得る事ができ なかった。この胚の挙動は V. hilgendorfii における 無精卵の挙動⁴⁾と同様であり、交尾が正常に行われ ていない可能性が高い。生物発光ミオドコーパは海 中で求愛ディスプレイを行う¹¹⁾事が知られており、 V. sp. もこれと同様であると考えられる。小形の飼 育容器内では求愛ディスプレイを行う事ができず、 交尾に至っていない可能性がある。また、抗生剤の 影響により生殖になんらかの影響が生じている可能 性も否定できない。いずれにせよ、今回の条件に近 い小規模容器での飼育下での繁殖には条件の検討が 必要である。



図 6. 実験室内で成長させた Vargula sp. の色彩. 左に示 す野生個体と比べ,右に示す室内で成育させた個体では消 化管(矢印)の色素が薄い. スケールバーは1mm.

胚発生への影響

V. hilgendorfii 胚の発生の推移は先の報告⁴⁾と同様 であり、controlと抗生剤存在下で差異は見られなか った。ペニシリンG存在下で発生させた胚は発生中 に死亡したものはなく、発生そのものは孵化段階ま で至り付属肢の運動も観察されるものの、すべての 個体が孵化しないまま死亡した。control 胚では2割 程度が発生途中で死亡したが、孵化段階に達したも のは全数が孵化した。ペニシリンGが孵化シークエ ンスに何らかの影響を及ぼしていると考えられるが、 同様にペニシリンG存在下で飼育していた雌個体に おいて正常に放仔がみられた事から、ペニシリンG の影響は雌の保育によって打ち消される可能性があ る。胚は雌の背甲内で第7肢によって常に接触刺激 を受けており、これが孵化の助けとなっている可能 性が考えられる。

感染症

長期飼育した個体において全身に綿状の物体が付着、 増殖する事があった(図7)。同様のものは採集した 野生個体でも時折見受けられる。これが生じた個体 ではやがて付属肢の動作が困難になり、背甲表面ま でが綿状の物体で覆われた。飼育水の交換や個体の 移動時に用いるピペットや容器を使い回す事で他の 個体にも同様の症状が拡大した。軽度の個体につい ては抗真菌剤(ミコナゾール硝酸塩100 μg/mL)の 存在下で飼育する事で症状が解消した。ペニシリン Gおよびストレプトマイシンの存在下でも増殖する 事と合わせ、真菌の一種ではないかと思われる。

以上の様に、安価な冷温庫の使用によりミオドコ ーパ個体の維持、飼育が可能であり、また抗生剤の 使用によりこれまで飼育下での成育が困難であった 種についても生存率を大幅に高める事ができる事が 明らかになった。発生や生殖への影響が懸念される ものの、幼体を成長させて成体を得られる可能性が 示された事は今後、研究を進める上で大きなメリッ トとなるだろう。

他のミオドコーパ個体維持メソッド

今回の研究により得られた結果ではないが、ミオド コーパ類の取り扱いに有用と思われる情報を以下に 記す。多くは経験則であり、定量的な実験によるも のではないが実際にミオドコーパ類を取り扱う際に 参考になると思われる。

採集

ベイトトラップ内に餌を剥き出しのまま入れるとミ オドコーパ個体がこれを摂取してしまい、その後の



図 7. 綿状の物体が付着した V. hilgendorfii 個体. 背甲の 透明性が失われ, 付属肢の動作も制限されている. スケー ルバーは 1 mm.

輸送や初期飼育段階に一斉に排泄し、水質の悪化を 招く。餌をメッシュ製の袋や濾紙で包み込む事でこ れを軽減できる。市販の「お茶パック」を用いるの が利便が良い。

移動

採集後の持ち帰りなど、長距離移動が必要になる事 が多い。特に生エサを用いたベイトトラップを用い た採集後は、ミオドコーパを含む海水が汚れている 事が多い。細菌増殖、温度上昇によって短時間の内 に水質が悪化する事があるため、採集終了後にネッ トを通して洗浄し、新鮮な海水に移す事が有効であ る。また、時期によってはヤコウチュウ等、表層 海水中のプランクトンが多い。これも酸欠の原因と なるため、採集後に持ち帰るための海水は事前に簡 易的にでも濾過する事が望ましい。洗浄後、数百個 体程度に分けて 10 L 程度の蓋つきバケツに入れて輸 送する。バケツを満水にする事は避け、上部に空間 を設けておく事で数時間程度の輸送には十分耐える。 ウミホタルを含む Cypridinidae には酸欠に弱いとみ られるものが多いが、上記した対策をとっておけば エアレーションは必ずしも必要ない。エアレーショ ンを行う場合は個体を潰さない様、小形軽量なエア ストーンを選ぶかエアストーンをバケツ内で固定し ておく必要がある。移動時に何より注意すべきなの は水温である。ミオドコーパ類は高水温に弱いもの が多く、また水温上昇による溶存酸素の低下と合わ せて酸欠による斃死が生じやすくなる。特に夏期に は注意が必要で、バケツ上に氷を乗せ全体をブルー シートで包むなどして冷却する工夫が必要である。 宅急便等で送る場合には個体数を抑えて密閉容器に 入れ、断熱剤等で覆う事で冷えない様に対策した上 で冷蔵クール便を用いるのが有効である。

水合わせ

採集後、飼育環境に移すなど異なる水質の飼育水に 移す場合に水質を段階的に変化させる、いわゆる「水 合わせ」を行う事により死亡率が低下する。死亡率 の低下はウミホタルや V. sp. 等、発光種で顕著であ る。

給餌

給餌の際は暗条件にした方が個体の活性が高まる。 給餌と給餌の間は2-3日に抑える事が望ましい。特 に小形容器での複数個体飼育では給餌感覚が延びる と共食いが発生しやすくなる。

飼育時の照明

ウミホタルは負の走光性を示す事が知られているが、 採集後、不安定な照明条件下で飼育している場合に はこの走光性は容易に失われる。照明にサイクルを 設け、遮光性の高い底砂を用いて飼育する事で比較 的長く維持可能となるが、走光性に関する実験は採 集後短期間のうちに済ませる事が望ましい。

海水掛け流しでの飼育

これまで試行した中で最も成績の良かった飼育方法 は分水装置とオーバーフロー槽を用いた濾過海水の 掛け流しである。飼育槽のオーバーフロー排水部に ナイロンメッシュを張るなどして個体流失を防止す る必要があるが、メンテナンスフリーで長期間に 渡って維持可能な理想環境である。事実上、濾過海 水がふんだんに使用できる臨海施設に限られる方法 ではあるが生存率は抜群であり給餌による水質悪化 も気にかける必要がない。デトリタス食者である Euphilemedes 属などは、濾過海水に含まれる有機物 粒子を餌としているのか、無給餌状態でもよく成長 する。注意すべき点として、海水の濾過状況によっ ては汲み上げた海水に浮遊性ミオドコーパや捕食生 物が混じっている場合がある点、そして臨海施設の 海水流しは排水経路が海に直結している場合がある ため、異なる地域で採集したミオドコーパを飼育す

る際には撹乱防止のために排水に個体が混じらない 様、十分な対策をとる必要がある点が挙げられる。

謝辞

本研究は2013年度神奈川大学総合理学研究所共同 研究助成を受けて行った。お茶の水女子大学湾岸生 物教育研究センターの清本正人准教授にはミオドコ ーパのサンプル収集にご協力頂いた。ご厚情に深謝 致します。

文献

- 阿部勝己 (1994) 海蛍の光[~]地球生物学にむけて.
 筑摩書房,東京.
- 岡田彌一郎,加藤光次郎 (1949) 海螢の生活史. 科学 16: 64-66.
- Cohen AC (1983) Rearing and postembryonic development of the myodocopid ostracode Skogsbergia lerneri from coral reefs of Belize and the Bahamas. J. Crustacean Biol. 3: 235-256.
- Wakayama N (2007) Embryonic development clarifies polyphyly in ostracod crustaceans. J. Zool. 273: 406-413.
- Vannier J, Abe K and Ikuta K (1998) Feeding in myodocopid ostracods: functional morphology and laboratory observations from videos. *Marine Biol.* 132: 391-408.
- 6) Jahn A, Gamenick I and Theede H (1996) Physiological adaptations of *Cyprideis torosa* (Crustacea, Ostracoda)to hydrogen sulphide. *Marine Ecol. Progress Series* 142: 215-223.
- 中村中六 (1954) ウミホタル Cypridina hilgendorfii G.W.Müller の生態に関する研究. 水産学の概 観. 日本水産学会編. pp.108-127.
- 8) 馬渡健二,平山和次(1975)水産生物幼生の無機態窒素に対する抵抗力の成長にともなう変化.長崎大学 水産学部研究報告 39:1-6.
- 9) 逸見泰久,伊津野麗,岡本直子,川田和博 (2002) ウミホタルの分布と行動. 日本ベントス学会誌 57: 21-27.
- 10) 大平和弘,上甫木昭春(2011)大阪湾東岸域における ウミホタルの生息に適した底層環境と影響する周辺 特性. ランドスケープ研究 74: 491-496.
- Morin JG (1986) Fireflies of the sea Luminescent signaling in marine ostracode crustaceans. *FLORIDA ENTOMOLKOGIST* 69: 105-121.

■研究交流報告■

第九回神奈川大学-国立台湾大学学術交流

木原伸浩1,2

Report of the 9th International Exchange Program between Kanagawa University and National Taiwan University

Nobuhiro Kihara^{1,2}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

 $^{\rm 2}$ $\,$ To whom correspondence should be addressed. E-mail: kihara@kanagawa-u.ac.jp $\,$

はじめに

神奈川大学化学科と国立台湾大学化学科(化学系) は毎年交互に教員と学生を派遣しながら国際会議を 開催する国際学術交流を続けている¹⁻⁷⁾。2013年度 には、2014年3月16日(木)から16日(日)に かけて、神奈川大学において第九回学術交流国際会 議を中心とする学術交流行事が行なわれた。本稿は その記録である。

学術交流

第九回学術交流の位置づけ

国立台湾大学化学科(化学系)と神奈川大学理学部 化学科は2005年3月に学術交流協定を結び、以来、 毎年度、交互に訪問団を組織し、訪問先で国際会議 を開催する学術交流を続けてきた。2008年度に行 われた第四回学術交流からは大学院生も参加するよ うになった³⁾。派遣大学院生の数を表1にまとめる。 開催地が台湾の時は神奈川大学からの派遣数、開催 地が日本の時は国立台湾大学からの受入数である。 毎年少しずつ規模を拡大してきており、学生の交流 を含めた学術交流として成熟してきた感がある。

国立台湾大学との国際交流は、それに参加した学 生にとって忘れえぬ思い出となる。単に国際会議に 参加するだけではなく、異国の学生と個人的な交流 ができる貴重な機会である。学生にどれだけ主体的

表1. 派遣大学院生数

年度	開催地	大学院生数
2008	台湾	6
2009	日本	9
2010	台湾	12
2011	日本	8
2012	台湾	12
2013	日本	12

に交流させるかが重要である。

これまで国立台湾大学の学生を本学に迎えるにあ たっては、本学大学院生でWelcome 委員会を組織 し、湘南ひらつかキャンパス内で生活を共にするこ とを行なってきた。昨年度の国際交流において、国 立台湾大学でも同様の学生組織が作られ、本学から 派遣された大学院生と非常に密な交流が行なわれ た。そこで、第九回の学術交流で国立台湾大学の一 行を迎えるにあたっては、本学大学院生でWelcome 委員会を組織することはこれまでと同様であるが、 Welcome 委員会のメンバーには、単にキャンパス内 だけでなく、国際交流の最初から最後までつきあっ てもらうこととした。

Welcome 委員会

Welcome 委員会は、昨年度の国際交流で台湾に派遣 された学生を中心に組織した。委員長には D2 の西 山君になってもらうこととし、様々な準備を依頼し た。以下に Welcome 委員会のメンバーを挙げるが、 Welcome 委員会は完全に固定した組織ではないた め、このリストは不完全であることをお断りしてお く。

白取 愛	化学専攻博士後期課程3年
西山淳也	化学専攻博士後期課程2年
小西 翼	化学専攻博士後期課程1年
田中陽子	化学専攻博士前期課程2年
小嶋慎也	化学専攻博士前期課程2年
齋藤佑典	化学専攻博士前期課程2年
上田優一朗	化学専攻博士前期課程1年
岩崎 亮	化学専攻博士前期課程1年
坂西綱太	生物科学専攻博士後期課程3年

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

齋藤礼	」弥	生物科学専攻博士後期課程	3	年
橋友理	香	生物科学専攻博士後期課程	2	年
佐藤	岡山	生物科学専攻博士前期課程	2	年
夏見	彩	生物科学専攻博士前期課程	1	年

3月13日(木)

チャーターバスで Welcome 委員メンバーが木原と共 に湘南ひらつかキャンパスを出発した頃には雨が降 り始めていた。天気予報では、夕方から夜にかけて 嵐になるとのことであった。あいにくの天気の中を、 教員4名と学生12名からなる国立台湾大学の一行 は13:30に羽田に到着した。以下にそのリストを示 す。学生はいずれも、参加した教員の研究室の学生 である。神奈川大学における派遣学生選抜の方法と は大きく異なっている。なお、所属の系は日本では 学科に相当する単位である。

化学系教授 劉如熹(Liu, Ru-Shi)

生物科学技術系教授 黃慶璨 (Huang, Ching-Tsan) 化学系副教授 詹益慈 (Chan, Yi-Tsu)

分子細胞生物学研究所副教授 黃筱鈞 (Huang, Hisao-Chun)

生物科学技術系大学院生 黄玉嬌 (Huang, Yu-Chiao)

化学系大学院生陳致融(Chen, Chih-Jung)化学系大学院生陳玠瑋(Chen, Chieh-Wei)化学系大学院生蔡宜庭(Tsai, Yi-Ting)化学系大学院生梁顏鵬(Liang, Yen-Peng)化学系大学院生傅軍豪(Fu, Jun-Hao)化学系大学院生杜宗翰(Tu, Tsung-Han)

生物科学技術系大学院生 黃彥鈞 (Huang, Yan-Jiun)

分子細胞生物学研究所大学院生 陳境峰 (Chen, Ching-Feng)

分子細胞生物学研究所大学院生 楊蕙如(Yang, Hui-Ju)

生物科学技術系大学院生 江瑩育(Jiang, Ying-Yu) 分子細胞生物学研究所大学院生 楊晴棻 (Yang, Ching-Fen)

このうち、黄副教授と黄玉嬌さん、楊蕙如さん、 楊晴棻さんが女性である。黄副教授は所用があり、 先に到着していた。

国立台湾大学の一行をバスに乗せて、まずは鎌倉 に向かった。Welcome 委員会のメンバーが国立台湾 大学の学生と十分に話をするためには最初が肝心で ある。バスでは、Welcome 委員会のメンバーをばら ばらに座らせ、国立台湾大学の学生とできるだけ隣 同士となるようにした。これによって、特に親しい 友人を作ることが目的である。この試みは大変うま くいった。

最初は、鎌倉で大仏(高徳院)と鶴岡八幡宮を訪 れる予定であった。しかし、羽田を出るのに予定外 に時間がかかったのと、風雨がかなり強まってきた ことから、大仏を訪れるのは中止にし、鶴岡八幡宮 だけを訪れることとした。鶴岡八幡宮では1時間半 ほどの時間があったが、日本での最初のお土産とし て、小町通りで傘を買う人が多く、前途多難であった。



図1. 雨の鶴岡八幡宮にて

風雨が強まる中、鶴岡八幡宮を出発し、箱根保養 所に向かった。保養所に到着した頃には風雨は非常 に強く、しかも、大型バスは保養所の前の細い坂道 に入ることができないため、横殴りの雨の中をスー ツケースを持ち上げながら坂を登って保養所にたど り着いた。

貸し切りにした保養所では雨で冷えた体を温泉で 暖めていただき、舟盛りを皆で楽しんだ。また、女 子学生は保養所に用意されているゆかたを楽しんだ。 その後は、ロビーで夜遅くまで懇親の時が続いた。

3月14日(金)

翌朝、雨は上がっていたものの雲が厚く、スカイラ インから富士山を見るのはあきらめ、直接元箱根に 向かった。海賊船で芦ノ湖を渡り、ロープウエイで 大涌谷に向かった。噴煙孔から上がる白煙と熱泉で 作られる黒卵を堪能した。集合時刻の少し前から雪 が降り始めた。台湾の一行には雪が始めての学生も 多く、寒さに震えた。

大涌谷からは小田原に向かい、小田原城を見学し た。日本の民族衣装の貸し出しがあり、コスプレを 楽しむメンバーもいた。天守閣に上って小田原の町 を一望した後、湘南ひらつかキャンパスに向かった。



図2. 海賊船にて.



図4.小田原城天守閣前(コスプレをしているのは黃副教 授と江瑩育君).



図3. 大涌谷にて.

湘南ひらつかキャンパスに到着するとすぐに学生 を国際交流研修施設に案内し、設備について説明し た後、第三食堂 Luna で歓迎会を開催した。化学科 を中心に多数の教員が参加し、来日を歓迎すると共 に、国際交流のあり方について意見を交換した。

終宴後、教員はグランドホテル神奈中秦野に宿泊 していただき、学生は国際交流研修施設に戻った。 Welcome 委員会のメンバーは、国際交流研修施設で たこ焼きを一緒に作るなどして、国立台湾大学の学 生と歓迎会の続きを行なった。

3月15日(土)

学術交流の3日目は、メインイベントの学術交流国 際会議である。ポスターボードは昨日の歓迎会の前 に設置してあるので、朝からポスターを貼る学生の 姿がみられた。

国際会議のプログラムを後掲(図11)する。日野 理学部長の挨拶の後、神奈川大学から4件(理学部 化学科2、理学部生物科学科1、工学部物質生命化学 科1)、国立台湾大学からは4件の招待講演があり、



図5. 歓迎会にて.

神奈川大学から26件(理学研究科化学専攻21、理 学研究科生物科学専攻5)、国立台湾大学から12件 のポスター発表があった。また、ポスターを発表し た学生のうち神奈川大学から2名(化学専攻、生物 科学専攻各1)と国立台湾大学から2名は講演のみ のショートスピーチも行なった。招待講演はいずれ も聞き応えのある内容で、会場からは多くの質問が 寄せられた。ポスター発表は軽食をつまみながらの 気楽な雰囲気で行なわれた。ポスター発表には1時 間半の時間を用意したがあっという間で、午後の講 演が始まってもポスターの前から去り難い多くの参 加者があった。最後に山口理学研究科委員長の挨拶 で第9回の学術交流国際会議は終了した。

発表者と山口理学研究科委員長および加部化学科 主任は秦野で情報交換会を行ない、学術交流国際会 議の成功を祝うと共に、今後の国際交流の進め方に ついて話し合いをおこなった。一方、学生は国際交 流研修施設ですき焼きパーティーを行ない、やはり、 学術交流国際会議での発表の成功を祝った。さらに その後は、ゲームなどをしてながら話し込み、遅く



図6. 学術交流国際会議における質疑応答.



図8. 関帝廟にて.



図7. ポスター発表の様子.

まで交流を行なった。

3月16日(日)

国際交流の前半とは打って変わり、最終日はきれい に晴れて、暖かい日であった。Welcome 委員会のメ ンバーと一緒にまず中華街に行き、関帝廟などを見 学した。中国文化を外から見る経験は興味深いよう であった。

みなとみらい港に移り、屋形船で横浜港クルーズ と美しい和食弁当を堪能した。最後に、キリンビー ルの生麦工場を見学した。原料から発酵過程まで英 語と日本語の二本立てで説明していただいた。見学 の最後は試飲会で、美味しいビールの注ぎ方を教わ った。

国立台湾大学一行のうち黄筱鈞副教授と学生2名 は日本国内の旅行をさらに続けるとのことであった が、残りのメンバーは羽田を17:55に発って帰国し た。Welcome委員会のメンバーは4日間共に過ごし た学生といつまでも別れを惜しんだ。



図9. 横浜港クルーズの屋形船にて.



図 10. キリンビール生麦工場見学.

おわりに

神奈川大学と国立台湾大学との国際交流は、回を重 ねてきて、学生の交流を中心とする行事として定着 してきた。大学院生の中では国立台湾大学との国際 交流があることが当然と受け止められ、興味のある 学生にとっては強いモチベーションとなってきてい



る。交流の進め方も改善されてきており、今回の国 際交流でひとつの形として定まったようである。

その一方で課題も残っている。特に学術交流国際 会議に運営上の問題もあるが、最大の問題は、国際 交流が長期の学生の交互派遣に発展して行かないこ とである。神奈川大学の化学科と国立台湾大学の化 学科との間の学科間学術交流協定から出発した関係 は、毎年の国際交流の実績を受け 2011 年4月には 大学間の学術交流協定に発展した。それ以来、全学 の新しい学術交流協定に基づいて交換留学が実施さ れてきたが、そのほとんどは語学系の学生の交換で あって、神奈川大学の理学部あるいは理学研究科の 学生が交流協定を利用して国立台湾大学に学びにあ るいは研究に行った例はない。密ではあるが数日間 の交流だけではなく、長期滞在する実質的な研究交 流へと発展させて行ってほしい。しかも、それを上 からのアレンジではなく、学生からの希望で実現し てほしい。そのためにも、本学術交流が理学研究科 の中の日常的な行事として行なわれ、国立台湾大学 との交流をより自然なものとしていく必要があると 考える。

謝辞

第9回神奈川大学-国立台湾大学国際交流は理学研究科 特別予算で行なった。年度末の時間の限られた中で全 ての事務を滞りなく進めて下さった渡辺郁子さんと大 舘愛さん、および、開催に尽力して下さった多くの関 係者の方々に深謝します。

文献

- 杉谷嘉則(2007)「国立台湾大学」訪問の記. 神奈川 大学理学誌 18: 103-105.
- 竹内重夫(2007)台湾大学における第2回化学科合同シンポジウムに参加して.神奈川大学理学誌18:107.
- 木原伸浩(2009)第四回神奈川大学-国立台湾大学学 術交流国際会議. 神奈川大学理学誌 20:93-103.
- 本原伸浩(2010)第五回神奈川大学-国立台湾大学学 術交流の記. 神奈川大学理学誌 21:77-88.
- 5) 松原世明(2011)第六回神奈川大学-国立台湾大学学 術交流の記. 神奈川大学理学誌 22: 95-107.
- 6) 木原伸浩(2012)第七回神奈川大学-国立台湾大学学 術交流. 神奈川大学理学誌 23: 89-98.
- 7) 木原伸浩(2013)第八回神奈川大学-国立台湾大学学 術交流. 神奈川大学理学誌 24: 135-139.

2013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:	生物科学科	教授	鈴木李直
運営委	員:	数理·物理学科	教授	水野智久
		数理·物理学科	准教授	堀口正之
		情報科学科	教授	張 善俊
		情報科学科	准教授	田中 賢
		化学科	教授	木原伸浩
		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	准教授	安積良隆

.

(2) 編集委員

委 員 長:	生物科学科	教授	鈴木季直
編集委員 :	数理·物理学科	教授	長澤倫康
	数理·物理学科	准教授	堀口正之
	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	天野 力
	化学科	教授	加部義夫
	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	受	加藤	憲一
				数理·	·物理	学科	准教护	受	堀口	正之
				情報種	斗学科		教授		桑原	恒夫
				情報種	斗学科		教授		張	善俊
				化学和	斗		教授		堀	久男
				化学和	斗		教授		山口	和夫
				生物種	斗学科		教授		鈴木	季直

(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:	化学科	教授	山口和夫

(5) 顧問·特別所員·客員研究員

- 顧 問: 藤原鎭男、門屋 卓、武内義尚
 特別所員: 大石不二夫、杉谷嘉則
 羽鳥尹承、松本正勝、森 和亮
- 客員教授: 大場信義、久慈俊郎、笹本浜子 箸本春樹
- 客員研究員: 市川貴美子、風間 真

河合 忍、岸 康人、角浜憲明 北島正治、小林照幸、甲高彩華 斎藤保直、坂本峻彦、佐藤繭子 鈴木健太郎、谷村昌俊 辻本和雄、津田弘久、堤 一統 豊泉和枝、鳥飼章子、中川清子 永島咲子、中野陽子、牧野博昭 八柳裕一、若山典央

2 セミナー・シンポジウム・講演会

(1)第38回湘南ハイテクセミナー 一機器分析入門-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:

- 「赤外分光」
 高柳正夫(東京農工大学大学院 共生科学 技術研究院 環境資源物質科学部門)
- 2)「NMR分光」
 天野 力(神奈川大学理学部化学科)
 3)「環境分析」
 - 西本右子(神奈川大学理学部化学科)
- 4)「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)
- 5)「分析総論」 杉谷嘉則(神奈川大学理学部化学科)
- 6)「有機・高分子材料分析」 松尾大輔(株式会社日東分析センター)
- 日時:2013年6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
- (2)第39回湘南ハイテクセミナー ー研究開発と分析技術ー 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」 原口紘炁(社団法人国際環境研究協会)
- 2)「研究・開発と環境分析」 田尾博明(独立行政法人産業技術総合研究所)
- 3)「研究・開発と材料分析」
 志智雄之(株式会社 日産アーク)
- 4)「研究・開発と赤外分光」 由井宏治(東京理科大学理学部化学科)
- 5)「研究・開発とNMR」 嶋田一夫(東京大学大学院薬学系研究科)
- 6)「研究・開発とX線を利用した分析」 田沼繁夫(独立行政法人物質・材料研究機構)
- 日時:2013年12月5日(木)・6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24回神奈川大学平塚シンポジウム
 - 日時:2014年3月8日(土) 10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 (11号館サーカムホール)
 - 主催:神奈川大学理学部 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)「一方向移動系の設計と運転」 木原伸浩 教授(神奈川大学)
 - 2)「1分子接合の分子科学」 谷口正輝 教授(大阪大学)
 - 3)「ナノカーボン分子の科学 有限長カーボン ナノチューブ分子ベアリング」
 磯部寛之 教授(東北大学)
 - 4)「金属錯体で創る多彩な機能性液体」 持田智行 教授(神戸大学)
 - 5)「固液界面がもたらす新しい分子機能」 - 蓄電機能と光電流変換」
 - 阿波賀邦夫 教授(名古屋大学)

- 6)「人は分子に触れることができるのか?界面科学から分子科学へのマクロなアプローチ」
- 有賀克彦 主任研究員(物質・材料研究機構) 7)「機能性ソフトマテリアルの設計 分子から巨視スケールに至る構造制御は可能 か?」 相田卓三 教授(東京大学)
- (4) 講演会
 - 演題:「ナノメートルサイズのポリ酸の化学」
 - 講演者:尾関智二 教授 (東京工業大学大学院教授)
 - 日 時:2013年8月2日(金) 16時30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228室)
 - 主 催:神奈川大学理学研究科 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228号室で開催した。分 子の対称性と結晶の対称性についての基礎的 な解説にはじまり、ナノメートルサイズの混 合原子価ポリオキソメタレートを中心とした 最新の研究成果について、利用施設の解説の 含めて詳細にご紹介いただいた。 (報告者 川本達也 2013.8.8)
- (5)講演会
 - 演 題:「分光器革命-分光器は化学をどのように 変えたか」
 - 講演者:竹内敬人 教授 (神奈川大学名誉教授)
 - 日時:2013年8月30日(金) 16時50分~17時50分
 - 会場:神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス (6号館228室)
 - 主 催:神奈川大学理学研究科 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228号室で開催した。 紫外、可視スペクトル、赤外スペクトル、核磁気共鳴、さらにはX線結晶解析の発見・発展の経緯を豊富な資料に基づき、詳しく解説していただいた。化学の発展に際してそれら

分光器および分光学の果たした役割の大きさ を改めて知る機会になった。 (報告者 川本達也 2013.9.4)

(6)講演会

- 演題:「Fixed point theory and its applications to optimal control problem of positive solutions for differential equations」
- 講演者:張 玲玲 教授 (中国・太原理工大学)
- 日 時:2013年11月5日(火) 9時00分~10時00分
- 会場:神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス (13号館103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:

中国・太原理工大学教授の 張 玲玲 氏は制御 理論に現れる微分方程式の不動点について研 究を進めていて,多くの研究成果をあげてお られ、今回の講演では,最適制御理論で利用 される微分方程式の不動点定理について、さ らに一般的に拡張した 第2階 impulsive differential equation のコーシー問題の最近の研 究成果について講演頂きました。 (報告者 長 宗雄 2013.11.11)

- (7) 講演会
 - 演題:「Outer inverses with prescribed range and nullspace」
 - 講演者:Gabriel Kantun-Montiel 教授 (Linda Vista University, Mexico)
 - 日 時:2013年11月5日(火) 10時00分~11時00分
 - 会 場:神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス (13号館103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:

メキシコ・Linda Vista大学教授のGabriel Kantun-Montiel 氏は作用素論の若手の成長 著しい研究者であります。今回の講演では代 数的に展開されていた一般逆元についての理 論を、作用素の値域と核空間に注目したこと による逆作用素を、作用素論的に拡張し、バ ナッハ空間を直和分解することにより、作用 素の分解定理を利用することで、新しいスペ クトル理論などの最近の研究成果について講 演頂きました。 (報告者 長 宗雄 2013.11.11)

(8) 講演会

- 演 題:「Generalized inverses of operators on Hilbert C*-modules」
- 講演者: Dragon Djordjevie 教授 (University of Nis, Serbia)
- 日 時:2013年11月5日(火) 11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 (13号館103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:

セルビア・Nis大学教授のDragon Djordjevic 氏は作用素論の世界的リーダーの一人であり, 専門誌・Functional Analysis, Approximation and Computationを主催しています。今回の 講演では, ヒルベルト空間とバナッハ空間の 中間に位置する Hilbert C*-modulesの空間に ついての基本的性質と、部分空間の性質およ び内積もどきを導入し、一般の内積空間(ヒル ベルト空間)との相違、さらにそこでの要素の 一般逆作用素についての最近の研究成果につ いて講演頂きました。 (報告者 長 宗雄 2013.11.11)

- (9) 講演会
 - 演題:「Recent results Hilbert space operators」
 - 講演者: Lee Mi Ryeong 教授 (Catholic University of Daegu)
 - 日 時:2014年2月11日(火) 9時30分~10時30分
 - 会 場:神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス (13号館103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:

韓国・大邸広域市にある Catholic University of Daegu大学教授のLee Mi Ryeong は作用 素のスペクトル理論で大きな成果を上げてお られます。作用素のスペクトル理論について は、1990年ころから、著しい発展を遂げました。初めに、1990年ころからの研究について 纏められておられ、これまでの研究状況を大 変上手に解説くださいました。その後、E(n)hyponormal 作用素についての研究成果を講 演頂きました。

(報告者 長 宗雄 2014.2.12)

- (10)講演会
 - 演題:「On flatness of weighted shifts operator」
 - 講演者:Li Chunji (李 春吉)教授 (Northeastern University (中国・東北 大学))
 - 日 時:2014年2月11日(火) 10時30分~11時30分
 - 会 場:神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス (13号館103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:

中国・東北大学教授のLi Chunji はモーメン ト問題について大きな成果を上げておられま す。weighted shifts operator のflatness につ いては 1966年に Stampfli により subnormal 作用素は flatであることが示されました。そ の後目立った進展がありませんでしたが 1990 年頃から Curto や Putiner などにより新た な研究が始まりました。2014年の現在まで 作用素がflat であるのかどうかについて多く の成果がなされています。東北大学教授のLi Chunji 氏も多くの貢献をされていますので、 weighted shifts 作用素についての彼の研究成 果を中心に講演頂きました。 (報告者 長 宗雄 2014.2.12)

- (11)講演会
 - 演 題:「金属内包ヘミクリプトファンの性質」 講演者:牧田佳真 助教(大阪歯科大学)
 - 日 時:2014年2月28日(金) 15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 (13号館105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:

ヘミクリプトファンの持つ限られた大きさの 内孔内部に触媒作用を持つ金属錯体を構築し、 その触媒活性を検討した。触媒性錯体が、そ の作用部位に限られた大きさの空間を持つこ とで触媒作用が制御され、錯体単独では現わ れない高い活性が見られた。また、ヘミクリ プトファンの不斉を利用する不斉合成も検討 した。 (報告者 木原伸浩 2013.3.22)

- (12)講演会
 - 演題:「Molecular Design of Chiral Polymeric Organocatalysts and Their Applications in Asymmetric Catalysis」
 - 講演者: Md. Masud Parves, Postdoctoral Fellow (神奈川大学)
 - 日 時:2014年2月28日(金) 16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 (13号館105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:
 シンコニジニウム塩を主鎖に組み込んだポリマーを相間移動触媒として用いて、不斉反応を行なった。グリシン誘導体の不斉アルキル化反応においては、対応する低分子化合物を上回る不斉収率を実現し、また、触媒の再利用も可能であった。
 (報告者木原伸浩 2013.3.22)
- (13)講演会
 - 演題:「Marine biological research off western coast of Australia and in the Yellow Sea off China」
 - 講演者: Dr. John Keesing (CSIRO:オーストラリア連邦科学産業 研究機構)
 - 日 時:2014年3月7日(金) 14時30分~15時30分
 - 会 場:神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス (6号館205室)
 - 主 催:神奈川大学理学部生物科学科 神奈川大学総合理学研究所
 - 報告:
 - Dr. John Keesing氏はオーストラリア連邦科

学産業研究機構海洋大気研究部門の上席主任 研究員で、汚染、漁業、養殖、生息場所の改 変、気候変動などの環境ストレスに対する海 洋生物の応答について主に研究しています。 今回の講演では、まず、オーストラリア西海 岸の大陸棚における大規模な生物環境調査に 基づいて解析された海中の炭素循環、窒素循 環に関する研究が紹介されました。風浪等に よる海底攪乱によって巻き上げられた堆積物 中の窒素と炭素が供給源として最も重要であ り、海底表面で濾過食を行う海綿動物がこれ までに見積もられていたよりもはるかに窒素 循環に貢献している事が示されました。次に、 中国沖の黄海に2008年以降夏に大発生する緑 藻の発生メカニズムに関する研究が紹介され ました。衛星写真の解析と現地調査から、こ の緑藻大発生の発端が海苔の養殖地帯にあり、 海苔の養殖網に付着した緑藻であることが示 されました。海苔の生育を助けるために除去 され、捨てられた緑藻が海流に乗って流れる 間に、発育を続け、大規模な集団になってい くという興味深い研究成果でした。

講演は英語により行われましたが、演者が スライドにテキストを多く入れ、かなりゆっ くりと話したことから、比較的分かり良かっ たのではないかと思われます。但し、生態 学系の英語の専門用語とオーストラリア英語 独特の発音については聞きとるのが少し難し かったかもしれません。春休み中と言うこと もあって、参加人数は21名でした。 (報告者 金沢謙一 2014.3.13)

(14)講演会

演	題:	Hypercyclicity for the elements of the
		commutant of an operator

- 講演者: Manuel Gonzalez 教授 (スペイン・カンタブリア大学)
- 日 時:2014年3月19日(水) 11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 (13号館105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:

スペイン・カンタブリア大学教授のManuel Gonzalez 氏は数学の最も評価の高い Springer社から著書: Three-space problems in Banach space theory を出版しています。作用素 論の重要な研究テーマである不変部分空間の 存在定理に関係する cyclic vector についての 研究で、特に重要な作用素としてhypercyclic 作用素があります。今回の講演では、この問 題について、unilateral weighted backward shift 作用のcommutantや、Cesaro 作用素の 性質など、具体的な作用素を紹介しながら講 演頂きました。

(報告者 長 宗雄 2014.3.28)

- (15)講演会
 - 演 題:「An unified approach to Weyl type theorems」
 - 講演者: Pieto Aiena 教授 (イタリア・パレルモ大学)
 - 日 時:2014年3月19日(水) 13時00分~14時00分
 - 会場:神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス (13号館105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:

イタリア・パレルモ大学のPietro Aiena 教授 は作用素論研究では不可欠となっている図書: Fredholm and local spectral theory, with applications to multipliers を著しています。作 用素 T が Wevl の定理を満たすとは、そのス ペクトルから Weyl スペクトルを除いたもの は, finite multiplicity である孤立な固有値と なっているときを言います。H. Weyl はヒル ベルト空間上の Hermite 作用素はこの性質を 持つことを示しました。これはその後多くの 研究者によってもっと一般的な作用素に拡張 されて来ています。現在、この方面での研究 で最先端に位置しているのが Pietro Aiena 教 授です。今回の講演では彼の最近の研究につ いて講演頂きました。 (報告者 長 宗雄 2014.3.28)

(16) 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」

- 日 時:2013年10月27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 2013]

- 日 時:2013年5月8日(水)~10日(金)
- 会 場:東京ビッグサイト
- 出展者:光機能性材料研究所 客員研究員 中西 淳 神奈川大学理学部化学科 教授 山口和夫 テーマ:「近紫外光に応答する機能性バイオ材料」
- 主 催:リードエグジビションジャパン(株)
- (2)展示会
 - 「教育ITソリューションEXPO2013」
 - 日 時:2013年5月15日(水)~17日(金)
 - 会 場:東京ビッグサイト
 - 出展者:神奈川大学理学部情報科学科 教授 張善俊
 - テーマ:「「仮想セル」表示新機能を実現した電子 黒板」(中国の俊益電子(株))として出展
 - 主 催:エースリー(株)
- (3)展示会
 - 「イノベーションジャパン2013」
 - 日 時:2013年8月29日(木)~8月30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 教授山口和夫
 - テーマ:「光応答性高分子材料創製のための2-ニ トロベンジル基で連結されたカップリン グ剤の開発」
 - 出展者:神奈川大学理学部情報科学科 教授 木下佳樹
 - テーマ:「利用者指向ディペンダビリティの研究」
 - 主 催:科学技術振興機構 新エネルギー・産業技術総合開発機構
- (4)展示会
- 「湘南ひらつかテクノフェア2013」
 - 日 時:2013年10月10日(木)~12日(土)
 - 会 場:ひらつかアリーナ
 - 出展者:神奈川大学理学部化学科
 - 教授 川本達也
 - テーマ:「太陽光活用を基盤とするグリーン/ラ イフイノベーション創出技術研究拠点の形

成」

- 出展者:神奈川大学理学部生物科学科 教授 小笠原強
- テーマ:「メダカ・キンギョ・ウナギなどは海水 で生存するか-魚類の浸透圧調整-」
- 主 催:平塚商工会議所
- (5) 展示会
 - 「第20回ディスプレイ国際ワークショップ」
 - 日 時:2013年12月4日(水)~6日(金)
 - 会 場:札幌コンベンションセンター
 - 出展者:神奈川大学理学部情報科学科 教授 張 善俊
 - テーマ:「大容量表示・記録を可能にする"仮想セ ル"電子黒板」
 - 主 催:IDW展示委員会
- (6) 展示会
 - 「テクニカルショウ・ヨコハマ2014」
 - 日 時:2014年2月5日(水)~7日(金)
 - 会 場:パシフィコ横浜
 - 出展者:神奈川大学理学部化学科 教授 西本右子
 - テーマ:「"環境に優しい"から一歩進めて"環境を 育てる"ための分析技術」
 - 主 催:財団法人神奈川産業振興センター 社団法人横浜市工業会連合会 神奈川県、横浜市
 - (7)展示会
 - FC EXPO 2014
 - 日 時: 2014年2月26日(水)~2月28日(金)
 - 会 場:東京ビッグサイト
 - 出展者:光合成水素生産研究所 客員研究員 桜井 英博
 - テーマ:「シアノバクテリア・紅色光合成細菌に よる大規模光合成水素生産研究開発」
 - 主 催:リードエグジビションジャパン(株)
 - (8)特 許(日本出願)
 - 1)「語句学習用プログラム」 桑原恒夫
 - フルオロフェニル基を有する化合物、パターン形成用基板、光分解性カップリング剤、パターン形成」
 山口和夫、伊藤倫子
 - 3)「ニトロベンジルカルバメート型化合物、パター ン形成用基板、光分解性カップリング剤、パ

ターン形成」

山口和夫、川上 雄介

- 4)「かご型シルセスキオキサン誘導体」山口和夫、加部義夫、力石紀子
- 5)「N-スルフォニルインドール誘導体及びその用途」
 上村大輔、阿部孝宏、川添嘉徳、渡部多恵子、鈴木佑太郎、山田薫
 6)「公知のN-スルフォニルインドール誘導体の用
- 6)「公知のN-スルフォニルイントール誘導体の用途」 上村大輔、阿部孝宏、川添嘉徳、渡部多恵子、 鈴木佑太郎、山田 薫

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。

なお、本誌名称の略記は <u>Sci. J. Kanagawa</u> 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)、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、報告書、テクニカルノート、 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 × 170mm 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10mm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、結果、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MS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)、<u>序論、材料と方法、結果</u>、 <u>討論、謝辞、文献</u>(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。

例えば、■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、MS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、<u>5語程度(英語)</u> 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。

<u>序論、材料と方法、結果、討論、謝辞、文</u> <u>献</u>の各項目の見出しは左揃えとする。

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。 小見出しは太字で10P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<u>記入例</u>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、<u>それぞれの記入例を参照して正確に</u> 記載する。

- Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. J. Cell Biol. 10 Suppl: 89-109.
- 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 eduis*. *Sci. J. Kanagawa. Univ.* 16: 9-17.
- Squire J (1981) The Structural Basis of Muscular Contraction. Plenum Press, New York.
- 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 Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- Owada M (2011) Phylogeny and adaptation of endolithic bivalves in the Mytilidae. *D.Sc. thesis, Kanagawa University.* Japan.
- 6) 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.
- 佐藤賢一,鈴木季直 (1998) 生命へのアプ ローチ. 弘学出版,東京.

- 8) 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.
- 9) 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.
- (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。

<u>表の上部には必ず番号(表 1.、Table 1. な</u> <u>ど)とタイトル</u>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。

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。

(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、<u>本文との整合を期し、図の下部に番号と</u> <u>説明文</u>を加える。図が細分化されている場 合には、<u>A、B、C… (図1A.、Fig.1A. など)</u> をつけて区別する。

図の説明文は、図の幅にあわせて両端揃え とする。

図の説明文に限り、和文でもピリオド(.) とカンマ(,)を用いる(<u>和文の句読点は用い</u> <u>ない</u>)。

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、<u>図</u> <u>中の文字や記号は高さ3~5 mm 程度にする</u>。 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。

(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、<u>%お</u> よび℃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<u>略題名 (Running Title)</u> 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、<u>和文で25字、</u> 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、<u>論文が12頁</u> 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<u>総説および原著(短報を含む</u>)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、出版権は神奈川大学総合理学研究所に属する。

Author Index

Α

Abe, Yuka	阿部優花 7
Amano, Chikara	天野 力 57
Aoki, Takashi	青木 孝 23
F	
Fujimura, Momoko	藤村桃子
н	
Harada, Umiko	原田由美子 73
Hayatsu, Manabu	早津 学 79,91
Han, Hao	韓 浩 31
Hino, Akiya	日野晶也 99
Hiraga, Yoshimichi	平賀義道 111
Hirai, Makoto	平井 誠 39
Hoshino, Takahiko	星野貴弘 69
Hoshino, Yasushi	星野 靖 15
К	
Kanazawa, Ken'ichi	金沢謙一87,107,117
Kasuga, Noriko Chikaraishi	力石紀子 69
Kazama, Makoto	風間 真 99
Kihara, Nobuhiro	木原伸浩63,125
Kinoshita, Yoshiki	木下佳樹 39,51
Kobayashi, Yuya	小林由弥 87
Kotani, Susumu	
Kuriiihara, Kaito	栗飯原海人 111
Μ	
Makita, Yoshimasa	牧田佳真 63
Masuda, Kana	增田佳奈 69
Matsushima, Kazuyuki	
Matsui, Keisuke	松井敬祐 69
Matsuki, Yusuke	松木悠介 69
Matsunaga, Satoshi	松永 諭 69
Miyazaki, Shin'ich	宮崎真一 79
Mizuno, Tomohisa	水野智久
Mogi, Kazue	茂木和枝 73
Moriguchi, Sosuke	森口草介 51

Morimoto, Takayuki	森本貴之 107
Moriyama, Risa	森山利紗 99
Murakami, Ryutaro	村上柳太郎 73
Ν	
Nagasawa, Michiyasu	長澤倫康 7
Nakagawa, Hiroyuki	
Nakahara, Hayao	中原早生 51
Nakata, Jyoji	中田穰治 15
Nakayama, Takashi	中山 堯 107
Nishikawa, Teruaki	西川輝昭 99
Nishiyama, Junya	西山淳也 63
Nomiya, Kenji	野宮健司 69
0	
Okubo, Itaru	大久保至 87
Owada, Masato	大和田正人 87
S	
Saito, Yasunao	斎藤保直 15
Sameshima, Toshiyuki	鮫島俊之
Sasamoto, Hamako	笹本浜子 91
Suzuki, Suechika	鈴木季直 79,91
Suzuki, Yoshihiro	鈴木祥弘 107, 111
т	
Tajima, Masakazu	田島昌和 79
Takeyama, Makoto	武山 誠 39
Tamai, Kenta	玉井健太
Tanaka, Takahiro	田中貴裕 79
Toyoizumi, Ryuji	豊泉龍児 73
Tsuruoka, Shinya	鶴岡慎哉 73
W	
Wakayama, Norio	若山典央 117
Υ	
Yamashita, Tomozane	山下友実 15
Yonezawa, Naoki	米澤直樹 107
Yuasa, Yoshifumi	湯浅能史 39



本誌の発行で Science Journal of Kanagawa University (神奈川大学理学誌) も第25巻を数える事 になりました。

今年度は、原著 18本、研究交流 1本が掲載され ております。今年の原著 18本の内訳を見ますと、総 合理学研究所研究助成を受けた研究課題に関する論 文とそれ以外の論文がそれぞれ 9本ずつあります。 総合理学研究所研究助成を受けた研究課題の論文投 稿は当然として、それ以外で 9本の原著論文が投稿 されたことを喜ばしく存じています。その結果本誌 の総ページ数は、昨年に引き続きおよそ 150 頁とな りました。これは所員の方々の活発な研究と投稿が 行われたことの表れであり、投稿して下さった方々 に編集委員一同感謝申し上げます。

また学科別の投稿数では、原著で数理・物理学科 3件、情報科学科3件、化学科3件、生物科学科8件、 生物科学科と情報科学科との共著1件となっていま す。生物科学科が飛び抜けて多いですが、他の全て の学科からもまんべんなく投稿されております。な お研究交流は化学科からの投稿ですが、これは理学 部全体の行事についての内容が投稿されたものです。

紙媒体としての本誌の発行部数は例年 200 部程度 であり、その配布先のほとんどが理学部内を中心と した神奈川大学内です。しかし本誌は電子媒体とし て神奈川大学総合理学研究所および図書館のホーム ページ上で全文を世界中に公開しております。その 意味で、本誌は本学部の研究成果を広く世の中に知 らしめる重要な役割を担っており、その影響力は大 変大きいと考えられます。所員の皆様にはそのよう な事もお考え合わせの上、今後とも活発な投稿をお 願い申し上げます。

> [神奈川大学総合理学研究所、 理学部情報科学科 桑原恒夫]

神奈川大学理学誌編集委員会 Science Journal of Kanagawa University		nagawa University	
委員長		Editor-in-Chief	
鈴木季直	生物科学科	Suechika Suzuki	Department of Biological Sciences
委員		Editors	
安積良隆	生物科学科	Yoshitaka Azumi	Department of Biological Sciences
天野 力	化学科	Chikara Amano	Department of Chemistry
井上和仁	生物科学科	Kazuhito Inoue	Department of Biological Sciences
加部義夫	化学科	Yoshio Kabe	Department of Chemistry
桑原恒夫	情報科学科	Tsuneo Kuwabara	Department of Information Sciences
張 善俊	情報科学科	Shanjun Zhang	Department of Information Sciences
長澤倫康	数理・物理学科	Michiyasu Nagasawa	Department of Mathematics and Physics
堀口正之	数理・物理学科	Masayuki Horiguchi	Department of Mathematics and Physics

Science Journal of Kanagawa University Vol. 25 (Sci. J. Kanagawa Univ.)

発行日	2014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