

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol.29 2018

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

目 次

原 著

A System for Latin Documents Analysis and Translation Antoine Bossard and Keiichi Kaneko	1
電極式パン焼き器を使った炊飯実験の特性理解 青木 孝	5
ナノ構造シリコンカーバイドの基盤研究 水野智久、青木 孝、前田辰郎、入沢寿史	13
<i>n</i> -型ダイヤモンド半導体へのオーミック電極構造形成法の研究(1) 中田穰治、新井 健、佐藤秀人、関 裕平、内藤隆平、星野 靖	19
形式アシュランスケースのモジュール化事例 ー SDBS の帰属および帰属決定プロセスについてのアシュランスケースの研究ー 渡邊 宏、木下佳樹、武山 誠	33
記述式設問に対する自動採点モデルの試案 永松礼夫、後藤智範	39
Open-Dawson 型ポリオキソメタレートの構造異性体 野宮健司、井上雄介、三原航平、宮前枝里子、新井裕喜、力石紀子、松永 諭	47
立体構造が制御されたオリゴシランの実験的・理論的研究 辻 勇人、金澤悠紀、江原雅博	51
ハエトリソウ捕虫葉の閉合に伴う構造変化と運動細胞内外のイオン動態 伊藤 栞、小野真菜美、広瀬裕子、渡邊信彦、歌川ちひろ、前田奈美、丸茂 幸、 下園奈津美、塩澤拓実、伊藤晋之介、早津 学、鈴木季直	55
金目川水系におけるダビドサナエ属 2 種の棲息地分化とその要因 太田祥作、金沢謙一	65
相模湾平塚沖の貝類相：2016 年と 2017 年の調査結果 大和田正人、齋藤礼弥、緒方大地、清野裕暉、加瀬友喜、金沢謙一	73
サルエビ卵黄形成抑制ホルモンの精製および構造決定 花塚真史、梶 圭祐、吉田幸宏、筒井直昭、大平 剛	77
ゼブラフィッシュ血管内皮細胞の初期分化 藤田深里、磯貝純夫	83

相模川河口域天然藻類群集の群集構造の推定への次世代シーケンサーの試験的適用 鈴木祥弘、渡辺瑛士朗、金沢謙一、西本右子	89
---	----

短 報

極低温 ESR による金属タンパク質及び金属錯体の機能解析 — 光合成細菌 <i>Heliobacillus mobilis</i> のフェレドキシンの性質 — 羽田野敦史、北島正治、瀬尾悌介、片岡祐介、川本達也、櫻井英博、井上和仁	93
--	----

報告書

医学用語の統合によるカルテの潜在意味解析の研究 韓 浩、中山 堯	97
---	----

教育論文

数理・物理学科における物理学実験での放射線教育の実践例 星野 靖	101
反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (4) 加部義夫	107
反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (5) 加部義夫	113

研究交流報告

第 13 回神奈川大学—国立台湾大学学術交流 木原伸浩	121
--------------------------------------	-----

2017 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告	127
-------------------------------	-----

Science Journal of Kanagawa University 投稿規定	132
---	-----

Author Index	136
--------------------	-----

編集後記	138
------------	-----

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

A System for Latin Document Analysis and Translation

Antoine Bossard^{1, 3} and Keiichi Kaneko²

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

² Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei City, Tokyo 184-8588, Japan

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

Abstract: A long time before English, Latin was the international language of the occidental world. Since Latin is at the root of numerous languages, knowledge of it is of marked benefit when learning foreign languages. Especially because of complex grammar, Latin classes in secondary education remain unpopular. In this research note, we summarise our proposal of a system for automatic Latin document analysis and grammar-aware translation support. In addition to such natural language processing aspects, the proposed system features a very accessible user interface that makes the system suitable for pedagogical purposes.

Keywords: language, system, educational, grammar, inflection, declension, conjugation

Introduction

Even if partly concealed, Latin is ubiquitous within occidental cultures, and more precisely, occidental languages. For instance, the etymology of numerous French and English words has Latin roots. Words such as “audio” (from *audire* “to listen”), “fluctuation” (from *fluctuare* “to float”) and “domestic” (from *domus* “house”) are some examples.

Yet, Latin has a complex grammar, involving for instance cases (declensions), genders and extensive conjugation (moods, tenses and the numerous corresponding inflections). There are two major consequences to this fact:

1. The knowledge of Latin is difficult to acquire, and as such, the number of Latin students has been steadily decreasing, for instance with France almost shutting down Latin classes ¹.
2. The support of Latin by information technologies is minimal, if not inexistent. For instance, translation engines such as Google Translate and Microsoft Translator do not include Latin in the list of their supported languages. Existing online Latin dictionaries are almost exclusively word-based dictionaries without inflection support ². Exceptionally, the Olivetti electronic dictionary ³ does provide inflection support but remains word-based.

The above two issues are indeed not completely unrelated. It is reasonable to assume that a better technology support with respect to Latin would definitely not harm its popularity, quite the contrary. Hence, the aim of this research project is to provide a system realising the automatic analysis of Latin documents, *in fine* providing translation support and more generally pedagogical support.

Method: System Overview

In this section, we give a brief overview of the proposed system. The system is described in more detail in our paper ⁴. We have built it mostly by using the functional language Racket and its development environment and libraries ⁵.

First, our system relies on a database of Latin words. This database has been assembled from the list of the 1,000 most frequent Latin words as given by C. Francese ⁶. Importantly, our database has been automatically generated, with each entry being fully expanded: noun forms are not abbreviated, and verbs are given with their full five forms (or four for verbs without supine). For instance, the original verb entry “voco, -are” is expanded to the full 5-form “voco, vocas, vocare, vocavi, vocatum”. Each database entry includes grammatical information

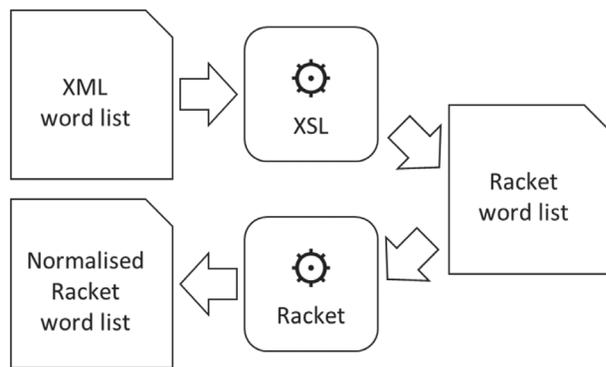


Fig. 1. Database creation process: from the original XML word list to the normalised Racket database.

such as gender, as well as English semantical information. The database creation process is detailed in Fig.1: the original XML database (word list) is transformed into a Racket word list with an XSL stylesheet, the obtained Racket word list being then normalised (entry expansion as explained above) by a Racket routine. In addition, a secondary database is used to match irregular inflections with the corresponding primary database entry.

The supported grammar features are listed below.

- Conjugation: indicative, subjunctive, infinitive, imperative, participle, gerund moods, present, future, imperfect, perfect, pluperfect, future perfect tenses, and the active and passive voices.
- Lexical categories: nouns, verbs, adjectives (including comparatives and superlatives), pronouns, prepositions, adverbs and conjunctions.

Most notably, the adjective declension system is the most difficult given the numerous patterns. In fact, one adjective usually induces $6 \text{ cases} \times 3 \text{ genders} \times 2 \text{ numbers} = 36 \text{ forms}$.

The system input consists in a Latin sentence (or simple words), its grammatical analysis being the output. The input text is pre-processed by a parser to distinguish words, removing punctuation symbols, white space, and normalising capitalization.

Last but not least, the proposed system features a user-friendly online interface, which relies on the server component bundled with the software. For that, we have used the suitable Racket libraries such as web-server/servlet⁵⁾. The system is thus very easy to deploy as it includes a web-server component, and to use as a regular web browser suffices. An illustration of the system interface with a sample output is given in Fig.2. In this figure, the input Latin sentence is *Domus patris nostri*. ‘Our father’

Back

Results of the analysis

Input sentence: "Domus patris nostri."

- **domus**

Lexical Category	Matches	Translation
noun feminine	nominative singular, vocative singular, genitive singular, nominative plural, vocative plural, accusative plural.	house, home
- **patris**

Lexical Category	Matches	Translation
noun masculine	genitive singular,	father, ancestor
- **nostri**

Lexical Category	Matches	Translation
pronoun	, plural masculine genitive	we
pronoun	, singular masculine genitive, singular neuter genitive, plural masculine nominative, plural masculine vocative	our

Fig. 2. Illustrating the online system user interface.

s house.” The three words are successfully matched by the system, which provides lexical categories (e.g., “feminine noun” for “domus”), match details (e.g., “singular genitive” for “patris”) and English translation information (e.g., “we” and “our” for “nostri”).

Experimental Results

We have realised with the proposed system the automatic analysis of the first twenty parts of Cicero's “*Laelius de amicitia*”, this corpus consisting of 2,008 words. In total, 64% of the corpus (i.e., 64% of the words) were successfully analysed by the system, that is, successfully matching these Latin words with our database, and thus being able to provide grammatical information supporting text comprehension and translation elements as well. An excerpt of the obtained results is given in Table 1, focusing on the three grammatical categories: noun, verb and adjective. In total, 724 words were not matched by the analysis, thus providing no information, for instance, to the student.

The results for the noun grammatical category are further detailed in Fig. 3. Precisely, for each grammatical case, the number of noun occurrences are

Table 1. Excerpt of the experimentation results

Word type	Occurrences
Noun	
masculine	77
feminine	97
neuter	43
<i>Total (noun)</i>	215
Verb	261
Adjective	185

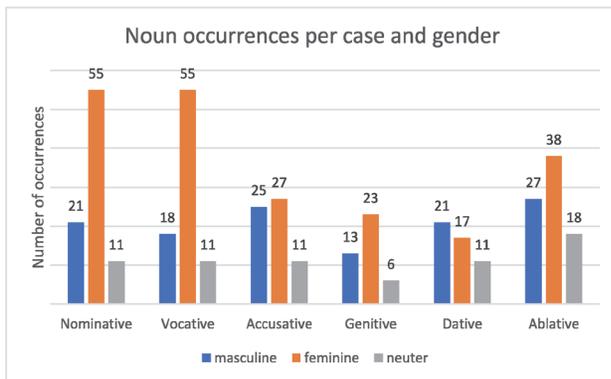


Fig. 3. Detail of the noun occurrences, genders being distinguished for each case.

given for the three genders: masculine, feminine and neuter.

Discussion

Out of the 724 unmatched words, many are duplicates. Precisely, a total of 477 distinct words remained unmatched by the system. In addition, it should be noted that several matched words belonged to more than one grammatical category. For instance, the word “vitas” can be analysed both as a noun (from *vita*, *vitae* “life”) or a verb (from *vito*, *vitas*, *vitare* “to avoid”). Also, out of the 215 detected nouns, two occurrences of “viri” were found; this noun being matched as both a masculine and feminine noun, it explains that the sum of the three gender totals gives 217 instead of 215. This behaviour can also be seen in Fig. 3. Finally, the analysis also exposed a rather uniform repartition of the various grammatical categories (noun, adjective, pronoun, etc.), with respect to the matched words, obviously.

Compared to the Latin analysis system of William Whitaker⁷ which weighs 1.2MB (and with no user interface) against a few kilobytes (90KB) in our case, the obtained results are significantly positive. In other words, our system was able to provide sup-

porting information for 64% of the Latin words of the analysed text at a fraction of the complexity of a previous system.

Regarding future works, the authors plan the following developments:

1. Expansion of the supported grammatical categories, with for instance additional conjunctions and prepositions;
2. Detection of the grammatical case of the word that directly follows a particular preposition in order to provide even more helpful translation information;
3. Experimentation with a class of Latin students so as to quantitatively evaluate the pedagogical impact of the proposed system.

Acknowledgements

This research has been partly supported by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University (RIIS201706).

References

- 1) Vaudano M (2015) Le latin et le grec vont-ils vraiment disparaître du collège ? *Le Monde*, April 2015.
- 2) Ultralingua (2017) *Online Dictionary*. Ultralingua Inc., Minneapolis, MN, USA. Retrieved from [http://www.ultralingua.com/onlinedictionary/].
- 3) Olivetti E and Olivetti F (2003) *Dizionario Latino Olivetti*. Olivetti Media Communication, Candaba, Philippines.
- 4) Bossard A (2018) A grammar aware system for Latin document analysis and learning support. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Teaching, Education, and Learning*, Naha, Japan. pp. 22-36.
- 5) Flatt M (2012) Creating languages in racket. *Communications of the ACM*. **55**: 48-56.
- 6) Francese C (2014) *Latin Core Vocabulary*. Dickinson College Commentaries. Retrieved from [http://dcc.dickinson.edu/latin-vocabulary-list].
- 7) Whitaker W (2010) *Words*. University of Notre Dame, IN, USA. Retrieved from [http://archives.nd.edu/cgi-bin/words.exe].

■原 著■

電極式パン焼き器を使った炊飯実験の特性理解

青木 孝^{1,2}

Experimental Evaluation of the Electrical Characteristics of Denki-Pan

Takashi Aoki^{1,2}

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: u17aok@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We experimentally studied the electrical characteristics of Denki-Pan. It was noted that the electrical characteristics were caused by the difference between pan and rice.

Keywords: Denki-Pan, gelatinization, starch granule

序論

今日、電気エネルギーを熱エネルギーに変えて利用するための色々な器具が市販されている。この極板型パン焼き器は、第二次世界大戦後、物資が少なかった時代に、家庭で自作されかなり広く用いられた¹⁾。神奈川大学理学部では、このパン焼き器について、熱効率など実際はどのような性能であったのか調べる実験を、28年前から学生実験に取り入れ、パン焼き器を製作して行ってきた。その結果、箱に電極を2枚入れただけの簡単な物ながら、オーブンのようにパン生地を外から熱を加えるのではなく、パン生地内で発熱するため熱損失が少ないこと、焼き上がるとマイコンも無しに自動的に電流が切れることなどの優れた性質を持っていることが分かった。



図1. パン焼き器実験の構成。

学生実験では、幅6 cm平行に離れた2枚のステンレス極板(長さ18 cm、高さ10 cm、厚さ1 mm)を木枠に挟んだパン焼き器に、パン生地を入れ、2枚のステンレス極板端子間に直に100ボルトの交流商用電源をかける。パン焼き器の木枠ケースの外寸は、幅8 cm、長さ21.5 cm、高さ11 cmである。内寸は、6 cm × 18.2 cm × 10 cmとなる。焼き上がったパンが取り出せるように、木枠ケースの底板は分

離でき、パッキンで水漏れを防ぐ(図1)。

また、大阪市立科学館の研究報告²⁾によれば、1940年頃、電極式パン焼き器と同様の電極式炊飯器「たからおはち」が市販されており、同科学館ではそれを所蔵・展示し、2013年同論文では長谷川能三学芸員が再現実験をしている。その結果、水道水によりピークで200 Wの消費電力に相当する電流が流れ、30分程度で炊飯できたとしている。その特記の中で、2枚の極板の形状と配置が製品として重要であると推論し、電極式パン焼き器では、水道水のために電流がほとんど流れず炊飯はできないと結論している。そこで、自前の電極式パン焼き器で、本当に炊飯は無理なのか検討してみた。

さらに、極板への電気分解のために、極板の素材、パン等の素材が含む添加物から有害金属が析出しないように注意を与えている。同様の指摘は、1999年に三重大学教育学部が行った「電気パン」の電気的特性と安全性の実験的評価の研究³⁾で論じられている。本学では、パン素材として市販のホットケーキミックスを使わず、日清フラワー薄力小麦粉、食塩、上白糖、アイコクベーキングパウダー(重曹を中和するため添加物を各メーカーで工夫している)を混ぜて使うが、この配合では金属等が析出したことがない。ただし、この配合に、M社の牛乳を混ぜたところ析出が起こった。

本論文では、まず、既存のパン焼き実験において、さらに詳しい解析を行った上で、同パン焼き器を使った炊飯実験の解析と評価を行った。その結果、小麦粉デンプンと米デンプンの、吸水による膨張が加熱

によって起こる糊化温度帯の違いにより、特徴的な電流特性が現れることを理解したので報告する。

方法

パン焼き実験の評価手順

パン生地は、小麦粉 150 g に、ふくらし粉 6 g、食塩 0.4 g、味付けのための砂糖 30 g を加え、それらを 190 g の水で手早く練り合わせたもので、すぐにパン焼き器に流し込む。電源をかけると、ピークで 470 W の電力を使い、9 分程度でパンは焼き上がる。

通電時、東京電力の 50 ヘルツ交流電源であれば、極板の正 (+) と負 (-) は、1 秒間に 100 回入れ替わる。パン生地の中では、食塩などの電解質が水の中で電離して、正と負のイオンになっている。そのため、交流をかけると、引き付けられる方向が交互に入れ替わるので、イオンは行ったり来たりしながら、電流を流すことになる。これが繰り返されるために、イオンはパン生地の中で振動し、その運動に相当するエネルギーを受け取り、さらにイオンが周囲の水分子、デンプンの分子等と衝突することにより、熱エネルギーに変わり、パン生地の温度を上げ、その熱は水が蒸発することに使われる。水が減少していくと、イオンに解けだした食塩が析出し、電流のキャリヤが減少するので、電流が切れる（ほとんど流れなくなる）という便利な特徴を発現する。

熱効率を考えるに当たり、電流が切れるまでに加えた全電気エネルギー（ジュール）は、時間と共に変わる電流値を測定していくことで計算できる。1 アンペアの電流が 1 ボルトの電圧の所を流れた時の電力を 1 ワットといい、1 ワットの電力が 1 秒間にした電気エネルギーを 1 ジュールと定義する。例えば、電流の測定間隔の 15 秒間に、電流値が 1 アンペアから 3 アンペアに変化した場合に加えた電気エネルギーは、100 ボルトの交流電圧として台形の面積を計算すればよいので、3000 ジュールとなる。

パンが焼き上がるまでの間、図 2 のように 15 秒おきに、電流値を測定し、その台形の面積を合算していけば、加えた全電気エネルギーが計算できる。実務上は、電力ではなく、電流値の時間変化のグラフにおける台形の面積を合算し、一定値として交流

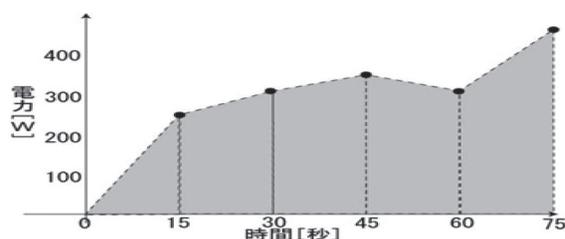


図 2. 加えた電気エネルギーの計算モデル。

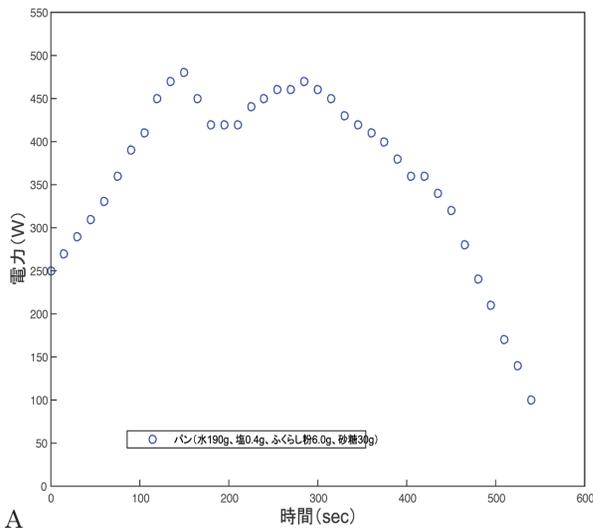
電圧値 100 ボルトを掛け合わせれば同じ事になる。したがって、パンが焼き上がるまでの時間の電流値の総和（台形の合算）が 1994 アンペア・秒ならば、全電気エネルギーは 199400 ジュールとなる。

一方、元々のパン生地の重さから、焼き上がった時のパンの重さを指し引いた差が、蒸発した水の量であると考え、この水を加熱し、蒸発に必要な、パンを焼くのに使った熱エネルギーも計算できる。1 g の水を 1°C 上げるのに比熱 1 カロリーを使い、1 g の 100°C の湯水を蒸発（気化）させるのに、気化熱 539 カロリーを必要とする。この時、蒸発した水の量を 31 g とすると、元々の水 190 g を 15°C から 100°C まで上げるのに 16150 カロリー使い、さらに 31 g の水を蒸発させるのに 16705 カロリー必要であるので、パンを焼くために使った全熱エネルギーは合わせて 32855 カロリーと分かる。1 カロリーは 4.2 ジュールと換算できるので、この全熱エネルギーは 137991 ジュールとなる。かくして、この蒸発に使ったパンを焼くための熱エネルギーを、加えた全電気エネルギーで割り算 ($\frac{137991}{199400} \times 100 = 69$) することによって、電気エネルギーを熱エネルギーに変換した時の熱効率が求められ、69% 程度になる。かなり熱損失が少ない優れた器具であることが分かる。

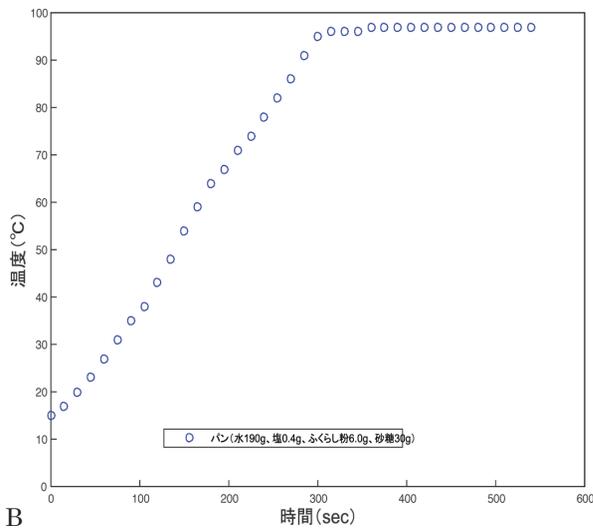
パン焼き実験結果の既存評価

この電流値の時間変化と、パン生地中の温度（主に水温）の時間変化との関連を観察することによって、より複雑な現象を理解することができる。実験結果として、図 3 の上図が、電力（ワット：W）の時間変化で、下図が温度（°C）の時間変化を示す。横軸が、各図共通に秒（sec）で時間を表わすので、各時刻に対応する電力（電圧 100 ボルトで割り算すれば電流値アンペアと同じ）と、パン生地の温度の推移が分かる。図 3 から、小麦デンプンは 2 分後、55°C になると、加熱によりデンプン粒子が水分を吸い始め糊化が始まる。このデンプン粒子の吸水膨張の開始によりイオンの振動が阻害され、この時一度、電流が下がり 1 度目のピークを持つことが分かる。その後、加熱に伴いデンプン粒子の膨張が限界となり糊化が終了する。この時の終了温度が 68°C⁴⁾ で、デンプン粒子の粘度が最大となり糊状に半固形化するため、ふくらし粉による発泡も落ち着き、イオンが振動し易くなり再び電流が増加に転じる。そのため、糊化終了温度で、電流は最小となる。

パン生地の温度が、5 分後、100°C に達する頃には、蒸発が始まり食塩の析出も顕著になり、イオン数の減少に伴い電流は急激に減少していくため 2 度目のピークを持つ。したがって、電流値の時間変化は、



A



B

図3. 基本パン(水 190 g, 塩 0.4 g, ふくらし粉 6 g, 砂糖 30 g)の電力値 (A), 水温の時間変化 (B).

二つのピーク（山が二つ）を持つ推移を示す。この事は、意外にも学生実験してみても分かったことである。パン焼き器は、適度の味がするように食塩を加えると、適度の電流が流れるように作られていたわけである。熱効率は 69% となる。

米デンプンの場合には、糊化の温度帯が小麦デンプンとは違う⁵⁾ (表 1)。ふくらし粉の主成分である重曹（炭酸水素ナトリウム）も弱い電解質である。塩に比べ混ぜる量が多い。解けたイオンは、3 分後、パン生地素材の温度が約 65°C に達すると、急激に反応が起こり、重曹は炭酸ナトリウムと二酸化炭素（気体）と水に分解する。この二酸化炭素が泡となり放出されることで、パンは膨らむ。この気泡が、糊化により小麦粉デンプンが半固化した際につぶれるのを防ぐ。ふくらし粉の熱分解のピークは、各メーカーで変えている（表 2）。アイコクベーキングパウ

ダーは、重量比で 1/4 が重曹であるが、その重層の発泡分解のピーク温度帯を広げている。

学生実験では、水を 150 g、ふくらし粉 5 g として、塩を 0.4 g (図 4 の×印) と 0.7 g (*印) に変えて、電流特性と熱効率の違いを見させる。前述の基本パン配合 (○印) との電流特性の比較は、図 4 となる。この時、熱効率は表 3 となる。

表 1. 小麦粉デンプンと米デンプンの糊化温度帯と析出開始温度

	糊化開始	糊化終了	析出開始
小麦粉	55°C	68°C	95°C
米	60°C	93°C	95°C

表 2. アイコクベーキングパウダー（ふくらし粉）と重曹の熱分解温度帯

	分解開始	分解ピーク	分解終了
ふくらし粉	60°C	93 ~ 96°C	96°C
重曹	60°C	85 ~ 94°C	94°C

表 3. 基本パンと学生実験パン 1, 2 (ふくらし粉 5 g, 砂糖 30 g) の熱効率

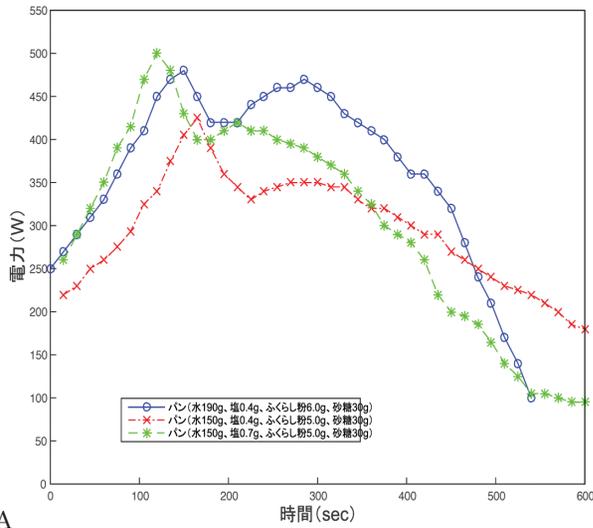
	塩	水	ふくらし粉	熱効率	完成
基本	0.4 g	190 g	6 g	69%	9 分
実験 1	0.4 g	150 g	5 g	61%	10 分
実験 2	0.7 g	150 g	5 g	71%	9 分

塩の量が多くなれば電流が上がり温度上昇が速く、小麦粉デンプンの糊化開始温度 55°C へ達する時間が早くなり、その結果第 1 ピークが早く起こる。その場合、電流値も大きくなるので、パンは早く焼き上がり、熱効率も上がることが分かっている。また、学生実験と違い、本論文では簡易電流測定器を用い、温度も測定場所によって多少異なる上、棒温度計による簡易測定を行ったので、図 4 において厳密には二つの結果を比較できない。

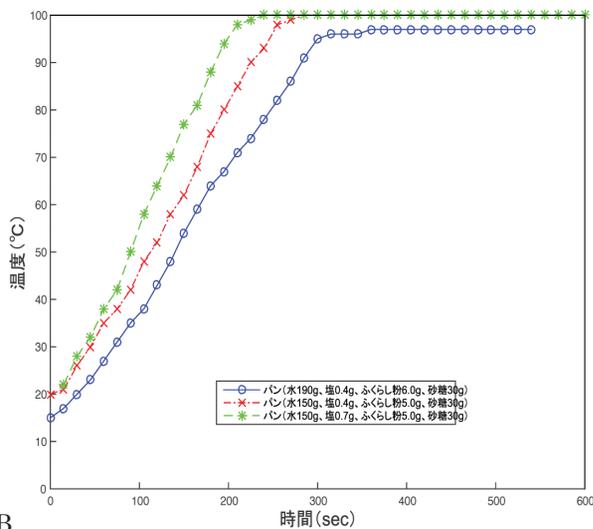
結果と討論

パン焼き実験の詳細検討

基本のパン配合において、塩とふくらし粉の個別の効果を見るために、基本配合から、塩を抜いたふくらし粉のみの生地 (図 5 の×印)、ふくらし粉を抜いた塩のみの生地 (*印) でパン焼き実験を行った。図 5 によれば、糊化開始に起こる基本パン (○印) の 1 度目の電流ピークは、ふくらし粉のみ (×印) の第 1 電流ピークと全く重なるので、ふくらし粉の電解質によって起こっていることが明確に分かる。



A



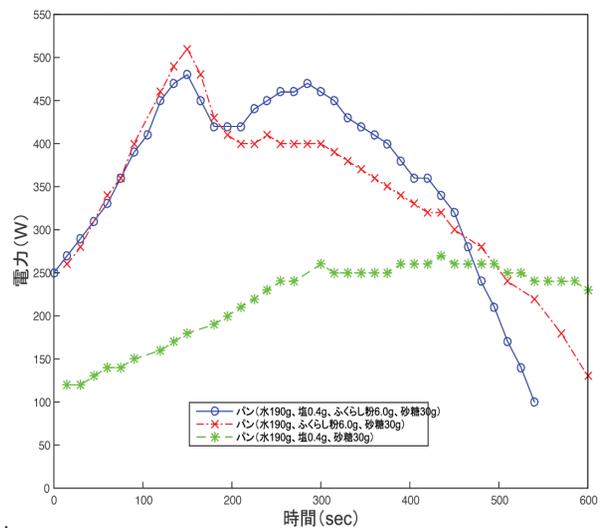
B

図4. 基本パン(○印)と学生実験1(×印:塩0.4g)と、学生実験2(*印:塩0.7g)(ふくらし粉5g,砂糖30gは共通)の電力値(A),水温の時間変化(B).

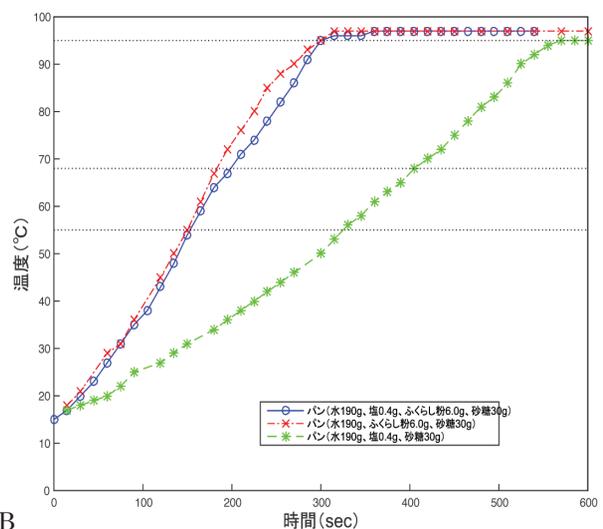
しかし、ふくらし粉のみ(×印)の場合には、糊化終了時の電流最少を経た後に、電流値が平坦のまま増加に転じず、95°Cの析出により電流値が下降するため、2度目のピークが現れない。

一方、塩のみ(*印)の場合には、電流値が小さく火力が弱いので温度上昇が遅いが、糊化の開始温度で第1電流ピークは現れ、95°Cになった時点で析出が始まり第2電流ピークも現れる。火力が弱いので2山の電流ピークが明確に出てこない。結論としては、ふくらし粉のみでは電流ピークが1山であるが、塩のみでは2山の電流ピークが現れ、基本パンの2つ目のピークは、塩によって発現していることが理解できる。

そこで次に、ふくらし粉のみの場合に電流ピークが1山となる理由を探り明確にするためと、塩のみ



A

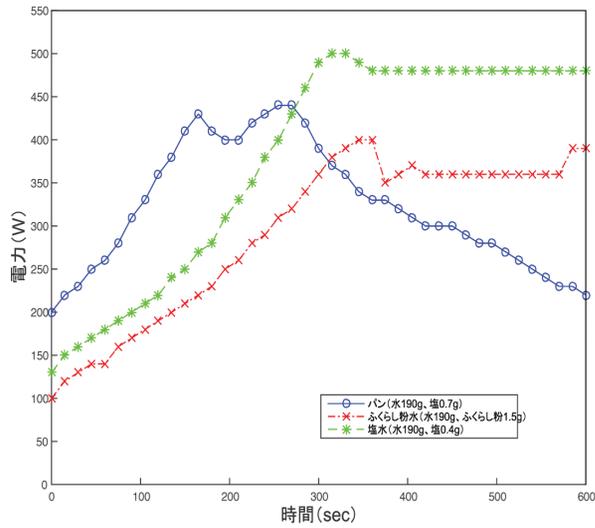


B

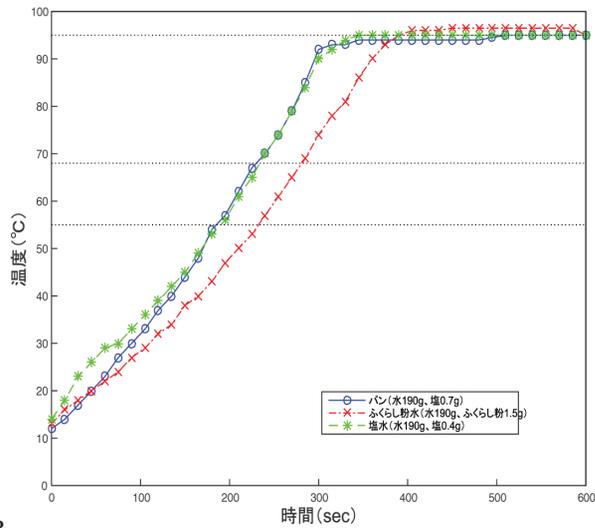
図5. 基本パン(○印)と基本配合から塩抜き(×印:ふくらし粉6g)と、ふくらし粉抜き(*印:塩0.4g)したパンの電力値(A),水温の時間変化(B)

の場合の2山ピークを火力を強めて確認するために、塩を0.7gに増やした塩水パン(図6の○印)と、単に、塩水(*印)と、ふくらし粉を溶かしたふくらし粉水(×印)に通電した時の電流変化を見た(図6)。

図6によれば、塩0.7gに増量した塩水パン(○印:砂糖なし)は火力が増え、予想通り、小麦粉の糊化開始と終了、析出の温度変化にしたがい、電流は2山ピークを取った。ピーク電流は440W程度である。また塩水(*印)に通電した場合には、単純に電流増加し、95°Cで沸騰により電流は平坦になる。一方、ふくらし粉水(×印)に通電した場合には、60°Cを越えて熱分解して発泡しだすが、65°C程度から電流は単純増加から鈍り始め平坦になる。熱分解後も同様な電解質であることが分かる。さらにイコクベーキングパウダーの場合には発泡のピークが



A



B

図6. 増量塩水パン (○印: 水 190 g, 塩 0.7 g) と、ふくらし粉水 (×印: 水 190 g に、ふくらし粉 1.5 g を溶かす) と塩水 (*印: 水 190 g に、塩 0.4 g を溶かす) の電力値 (A)、水温の時間変化 (B).

93°C~96°Cであり、図6の×印のようにこの間、発泡のために電流が0.5 A(電力では50 W)程度下がる。この発泡による電流の停滞が、図5のふくらし粉のみ(×印)のパンにおいて、1山ピーク後の糊化終了による最少から電流が平坦になり、電流が増加して行かず、95°Cの析出開始により電流が下がるだけで1山しか現れない理由であることが分かった。ふくらし粉の代わりに、重曹のみを使ってパンを焼いても、同様な電流の1山ピークの現象が現れる。ただし、発泡のピーク開始温度が、アイコクベーキングパウダーに比べ、8°Cほど低いので(表2)、早く電流上昇が平坦になり、糊化終了による電流値最少の後にくる電流値の平坦状態がより長く続く。重曹を単体で使った場合には、熱分解後に出来る炭酸ナトリウムが苦くアルカリ性を示し、小麦が変色しパ

ンが黄色くなる。熱効率と同程度である。

パン焼き器を使った炊飯実験と評価

米 150 g を洗い水切りする。洗米によって 14 g の水を吸う。この米を、水 230 g に対して、塩 0.4 g (基本パンと同じ) を入れたものに 30 分間浸しておき、その後、パン焼きケースに移し電源を入れ、通常の炊飯の手順にしたがう。電流変化は図8となり、図7のように米は炊ける。この時、6 cm 間隔の対向極板には、電気分解によるステンレス極板の変色、金属の析出はなかった。

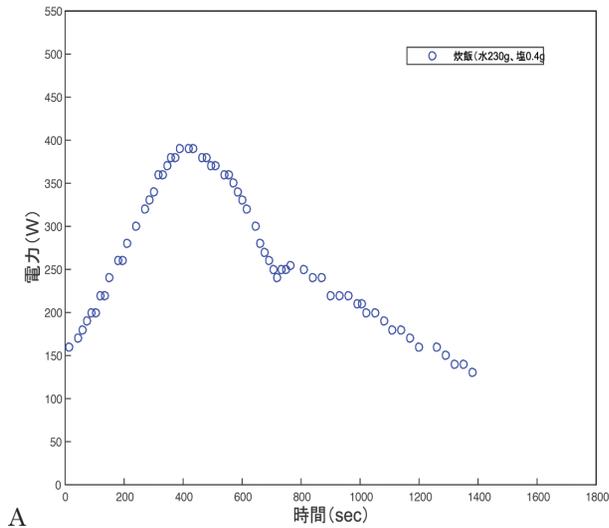


図7. 基本炊飯の炊き上がり.

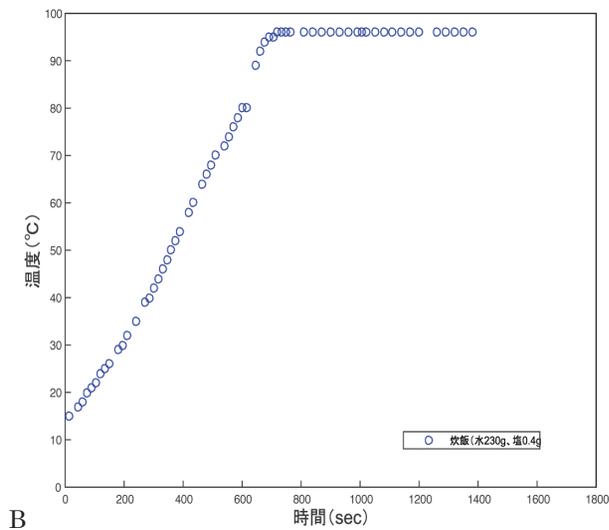
表2に示したように、米デンプンの糊化温度帯は小麦と違い60°C~93°Cなので、第1の電流ピークが糊化開始の60°Cで起こり、糊化終了93°Cで最小電流、95°Cで塩が析出を開始して2度目の電流ピークとなる。糊化終了温度と析出開始温度が近く短いため第2の電流ピークは小さい。予測通りの2山の電流ピークとなる。糊化終了温度に達した時にフタをして、23分で電流値が100 W程度まで下がった後、電源を切り5分蒸らした。

塩水だけによるパン(図6の○印)と、塩水だけによる炊飯(図8の○印)は、糊化の開始で1度目の電流値ピーク、糊化の終了で電流値最少、その後増加し、95°Cの蒸発による塩の析出開始により2度目の電流値ピークを取る。この電流特性は、両者で全く変わらないことを実験により確認した。デンプンの種類による糊化開始と終了の温度帯が違うだけである。熱効率も71%でパンと同程度であった。

次に、基本炊飯と同じ塩0.4 gで、水の量を230 gから200 gに減らし、塩濃度を上げたもの(図9の*印:炊飯後米が固くなる)と、塩の代わりに電解質のふくらし粉1.0 gを入れた場合(×印)の比較を行った。塩分濃度が上がれば、基本の炊飯配合の特性(図9の○印)よりも電流が上がり、速い温度上昇のために早く炊ける(20分)。一方、塩水による炊飯では2山の電流ピークが見られるが、ふくらし粉1.0 gのみで炊いた図9の×印では、電流値が小さく火力が弱いために、糊化開始温度で第1電流ピークが170 W程度にしか上がらない。水道水で行った大阪市立科学館の「たからおはち」の再現実験と同



A



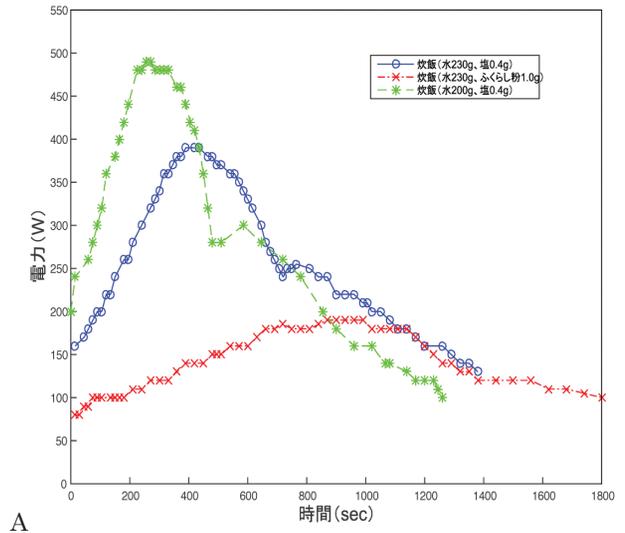
B

図8. 基本炊飯（水 230 g, 塩 0.4 g）の電力値 (A), 水温の時間変化 (B).

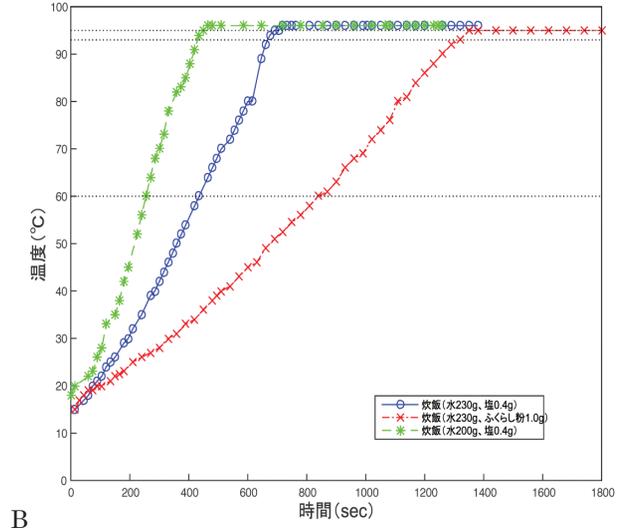
程度の電流特性である。糊化終了温度で電流値が最少になり、以後はふくらし粉のみパンの場合と同様に平坦な電流値となり、95°Cの析出開始から電流が下がり出す1山の電流特性を示す。炊き上がりも「たからおはち」の再現実験と同様に27分かかる。熱効率は、調理時間が長いにもかかわらず70%程度であった(表4)。

表4. 塩水パンと炊飯実験の熱効率

	塩	水	ふくらし粉	熱効率	完成
基本炊飯	0.4 g	230 g	0 g	71%	23分
ふくらし粉炊飯	0 g	230 g	1 g	74%	27分
塩水パン	0.7 g	190 g	0 g	71%	15分



A



B

図9. 基本炊飯（○印：水 230 g, 塩 0.4 g）と、ふくらし粉による炊飯（×印：水 230 g, ふくらし粉 1 g）と基本炊飯の水分量減変化による炊飯（*印：水 200 g, 塩 0.4 g）の電力値 (A), 下水温の時間変化 (B).

水道水による炊飯実験と評価

本学の極板間隔 6 cm のパン焼き器を使って、水道水で炊飯実験を行ったところ、6 W に相当する電流しか流れなかった、水 190 g に塩 0.4 g を入れた塩水では、同じ 6 cm 間隔の極板で 20 倍の 120 W 流れる。またこの時、極板間隔を 1 cm にすると、水道水でも塩水でも、6 cm 間隔に比べ 5 倍電流が流れることを実験で確認した。14°C 程度で水道水（×印）と塩水（○印：水 190 g, 塩 0.4 g）、ふくらし粉水（*印：水 190 g, ふくらし粉 1.5 g）、小麦水（+印：水 190 g, 小麦粉 150 g）において、極板間隔を 1 cm から 6 cm まで変えて電流値（W 換算）を測定すると、図10のように、極板間隔が狭くなるにつれて指数関数的に電流値が増大することが分かった。水道水でも、

極板間隔が 1 cm ならば、30 W 流れるので、炊飯出来ることが分かった。一方、小麦水は極板間隔が 6 cm でも 60 W も電流が流れるので、水道水のみでもパンが焼けることが分かった。「たからおはち」の再現実験では、元本と同じように、2 枚の極板を同形の櫛の歯型の形状に切り、それをパン焼き器のように対向ではなく、底板の平面上に、2 枚のそれぞれの極板の櫛の歯が互い違いに噛むように取り付けられ、2 枚の極板間隔は 1 cm 程度になっている。これは、パン焼き器の対向極板の間隔を 1 cm にした時と同等である。対向する長さが、互い違いに噛んだ「たからおはち」の方が長くなるので、パン焼き器では 30 W であるが、「たからおはち」では水道水でもほぼ 2 倍の 70 W の初期電流が流れることになる。そこで、パン焼き器でも 2 枚の極板を折り曲げて加工して、図 11 のような試作器を作った。ちょうど底板の中央で、1 cm 離れて極板が向き合う。

この試作器を使って水道水で炊飯を行うと図 12 の○印の電流特性で炊飯できる。水道水では、電流ピークで 120 W に相当する電流しか流れず火力が弱い。「たからおはち」の半分の電流である。また、火力が弱いため、塩水炊飯のような糊化に伴う 2 山の電流ピークがはっきり現れず、析出開始の時の第 2 の

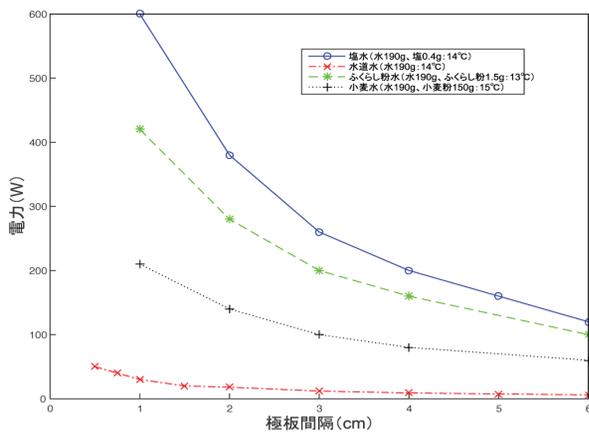


図 10. 14°Cにおける塩水 (○印：水 190 g, 塩 0.4 g) と水道水 (×印) と、ふくらし粉水 (*印：水 190 g, ふくらし粉 1.5 g) と小麦粉 (+印：水 190 g, 小麦粉 150 g) の極板間隔による電流変化 (電力換算)。



図 11. 極板間隔 1 cm のパン焼き試作器。

電流ピークが、1つの1山電流ピークとして見えるに留まる。57分かかって炊飯できる。

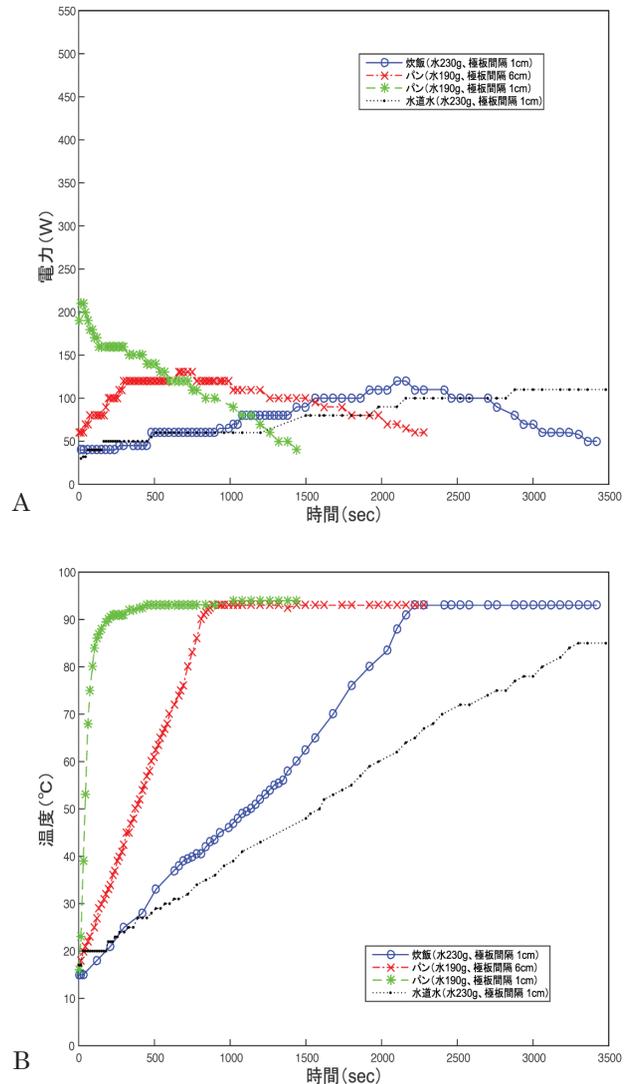


図 12. 水道水による炊飯 (○印：水 230 g, 米 150 g, 極板間隔 1 cm) とパン (×印：水 190 g, 小麦粉 150 g, 極板間隔 6 cm) と、パン (*印：水 190 g, 小麦粉 150 g, 極板間隔 1 cm) と水道水 (・印：極板間隔 1 cm) の電力値 (A), 水温の時間変化 (B)。

米を入れずに水道水のみに通電していくと、図 12 の・印 (点線) となり、米が入った水よりも電流は流れず、沸騰するまで単純増加する。一方、極板間隔 6 cm で小麦水パンを焼いた図 12 の×印も状況は水道水炊飯 (○印) と同じであり、電流が少なく火力が弱いため、析出開始の第 2 の電流ピークの 1 山の電流ピークしか分からない。40 分で焼けるが、糊化の進行による電流ピーク特性が火力が弱いため明確に現れない。この小麦水パンを、極板間隔が 1 cm のパン焼き試作器で焼くと (*印)、初期電流が電力で 200 W 近くあり、30 秒ですぐに糊化開始の第 1 の電流ピークが現れた後、すぐに析出開始温

度となり糊化が不十分のまま余熱でパンが焼けていくので 24 分かかる。水道水では、調理時間がかなり長く、熱効率も少し下がる (表 5)。

表 5. 水道水によるパンと炊飯実験の熱効率

	極板間隔	水	熱効率	完成
水道水炊飯	1 cm	230 g	57%	57 分
水道水パン	6 cm	190 g	67%	40 分

まとめ

(1) 基本配合のパン素材から、塩抜きと、ふくらし粉抜きにしたパン焼き実験の比較によって、ふくらし粉のみの場合 (重曹も同様) には糊化終了後、発泡のために電流が定常 (平坦) になり、2 度目の電流ピークが現れず、基本配合の場合の 2 度目の電流ピークは塩によって発現していることが分かった。その現象は、ふくらし粉を入れた炊飯でも同様である。そして塩の 2 山の電流ピークは、デンプンの糊化の進行と析出によって起こることを確認した。同様の結論があることが分かった⁷⁾。糊化の開始温度で第 1 の電流ピーク、糊化の終了温度で最少となり、デンプン内にため込んだ水分が放出され通電性が上がり電流が上昇する。その後、析出開始により第 2 の電流ピークが現れる。糊化の進行温度帯はデンプンの種類により違うので、パン (小麦粉) と炊飯で電流値グラフの形は変わるが、電流ピークができる原理は同じである。その時、パンも炊飯も熱効率は同様に 70% 程度である。電流ピークが 150 W 以下と小さい場合には、第 2 の電流ピークだけが目立ち 1 山のように見える。

(2) 塩を微量加えれば、6 cm の極板間隔のパン焼き器でも炊飯は可能である。ふくらし粉でも同様に炊飯は可能である。脱穀が難しく粉食に適する小麦粉の場合は、塩水のみでは糊化により半固形化したパンがゴムのようで、食味のためにはふくらし粉による気泡が必須となる。しかし、米の場合は粒食であり潰れないので、塩のみでもふっくら炊き上がる。

(3) 水道水で炊飯するには、極板間隔を 1 cm 程度にしないと十分な通電が起こらない (6 cm の 5 倍流れる)。パン焼き試作器のように、極板を折り曲げ底板に置いて極板間隔を近づければ、パン焼き器でも「たからおはち」のように水道水で炊飯が可能であるこ

とを実証した。水道水で炊飯するには、極板の形状の工夫が必須である。それでも火力は弱く、炊けるけれども炊飯には難がある。パンは水道水でも焼ける。

(4) 微視的には、ステンレス極板でも、パン粉を作るためのパン中に、金属が検出されるという 1960 年の報告がある⁸⁾。現在でも、電極式パン粉は市販製法の 1 つとなっており、1988 年に全国パン粉工業協同組合連合会の尽力で、安全性と食品、添加物等の規格基準が改訂され、極板に念願のチタン使用が許可された。

謝辞

パン焼き器は、改良を重ねて、ケーエム工房の溝口潔氏に作って頂いた。昭和のくらし博物館の小泉和子館長および小林こずえ学芸員には、貴重なご意見を頂いた。また、三重大学教育学部の松岡守教授ならびに群馬県立藤岡中央高校の岡田直之教諭には、貴重なご指摘を頂いた。ケース底板のパッキンについては、スケーター(株)営業部の奥田歩氏にお手数をおかけした。ケースの補充は、(株)三矢製作所の小原美千代氏にお願いした。なお、本学のパン焼き学生実験は、寺本俊彦教授が発案し、宮澤弘成教授が始めた。宮澤教授には、2017 年 5 月 13 日に、なつかしいご意見を頂いた。ここに感謝いたします。

文献

- 1) 小泉和子 (2017) パンと昭和. 河出書房新社, 東京.
- 2) 長谷川能三 (2013) 電極式炊飯器とその再現. 大阪国立科学館研究報告 23: 25-30.
- 3) 松岡 守, 岩瀬仁志, 手嶋由和, 早川ひとみ, 脇田圭造, 尾本保明, 川口博之, 平山雄一, 松村和俊, 宮間 敬, 川口元一 (2001) 「電気パン」の電気的特性と安全性の実験的評価. 日本産業技術教育学会誌 43: 161-168.
- 4) 長尾慶子, 藤井彩香 (2005) デンプン粒~水系の糊化にともなう状態変化の微視的および巨視的観察. 日本調理科学学会誌 38: 45-50.
- 5) 三浦芳助 (2003) 熱分析によるデンプンの糊化・老化特性の解析. 広島女学院大学論集 53: 79-87.
- 6) 坪井好人 (1954) 電極式炊飯器の考察と実験. 山口大学教育学部研究論叢, 理科・職業・家庭 4: 67-72.
- 7) 岡田直之 (2009) 電気パンの電流値変化. 物理教育 57: 85-90.
- 8) 森山繁隆, 熊沢 恒, 石原利克 (1960) 電極式パン焼き器によるパン中の金属について. 衛生化学論文抄録 8: 56-57.

■原 著■ 2017年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ナノ構造シリコンカーバイドの基盤研究

水野智久^{1,3} 青木 孝¹ 前田辰郎² 入沢寿史²

Experimental Study on SiC Nano-Dots

Tomohisa Mizuno^{1,3}, Takashi Aoki¹, Tatsuro Maeda² and Toshifumi Irisawa²

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

² Nanoelectronics Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba City, Ibaraki 305-8568, Japan

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

Abstract: We experimentally studied the optimization of the hot-C⁺-ion implantation process for forming nano-SiC (silicon carbide) regions in a (100) Si-on-insulator substrate at various hot-C⁺-ion implantation temperatures and C⁺ ion doses to improve photoluminescence (PL) intensity for future Si-based photonic devices. We successfully optimized the process by hot-C⁺-ion implantation at a temperature of about 700°C and a C⁺ ion dose of approximately 4×10^{16} cm⁻² to realize a high intensity of PL emitted from an approximately 1.5-nm-thick C atom segregation layer near the surface-oxide/Si interface. Moreover, atom probe tomography showed that implanted C atoms cluster in the Si layer and near the oxide/Si interface; thus, the C content locally condenses even in the C atom segregation layer, which leads to SiC formation. Corrector-spherical aberration transmission electron microscopy also showed that both 4H-SiC and 3C-SiC nanoareas near both the surface-oxide/Si and buried-oxide/Si interfaces partially grow into the oxide layer, and the observed PL photons are mainly emitted from the surface SiC nano areas.

Keywords: 3C-SiC, hexagonal-SiC, photoluminescence, Si-based photonics, quantum dot, uncertainty principle, carbon-ion implantation, SOI

序論

2次元 Si (2D-Si) 構造は、極微細 SOI (silicon-on-insulator)、FinFET¹⁾ などの CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor) 素子、及び Si 光素子¹⁾ に広く応用されている。SOI 素子においては、Si 膜厚 $d_s=L_{EFF}/3$ (L_{EFF} は素子のチャネル長) に従って薄膜化する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、 d_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、2D-Si 構造の物性を解明する必要がある。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²⁾。

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、電子の量子力学的閉じ込め効果によりバンド構造が変調され、バンドギャップ E_G 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⁾。これがフォノン閉じ込め効果である。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。我々は 2D-Si における量子閉じ込め効果を Raman 分光及び PL 法により、大

きなフォノン閉じ込め効果及び E_G 増大効果を実験的に実証してきた⁶⁻¹⁴⁾。

しかし、可視域から近紫外までの PL 発光を目指すには、更なる E_G の増大が必須である。そこで、SOI 構造及びバルク Si への C ホットイオン注入法を用いて SiC ドットを作製し、その大きな PL 発光を実証してきた¹⁵⁻¹⁸⁾。

本報告においては、発光体である SOI 基板上的 SiC ドット形成機構とその PL 特性の詳細について報告する¹⁹⁾。更に、PL 特性のホット $^{12}\text{C}^+$ イオン注入温度 T 依存性を明らかにした。

材料と方法

SiC ドット形成法

表面酸化膜 (SOX) 付き (約 100 nm) (100)SOI 基板へのホット $^{12}\text{C}^+$ イオン注入法により、SiC ドット形成を行った¹⁹⁾。今回は、Si 膜厚を 20 nm と 8 nm の二種類の SOI 基板を用いた。PL 強度の T 依存性を明確にするために、 $500 \leq T \leq 1000^\circ\text{C}$ の条件で、また C ドーズ量 D_c は $4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ で行った。

フォノン評価用 UV-Raman 分光、及びバンド構造評価用の PL 特性は波長 325 nm レーザー光を用いた。レーザービーム径は 1 μm 、レーザーパワーは約 1 mW である。

結果と討論

SiC ドット構造

最初に、三次元の C 原子分布の評価をアトムプローブ (atom probe tomography (APT)) で行った¹⁹⁾。

図 1 は、C 原子の深さ方向の分布の結果である。酸化膜界面に幅約 1.5 nm の非常に狭い C 偏析層が形成され、C 濃度は最大約 30 原子%にも達する。

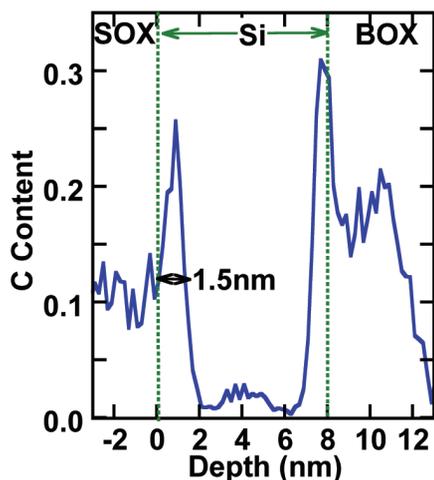


図 1. APT による C 原子の深さ分布. $T=800^\circ\text{C}$, $D_c=4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $d_s=8 \text{ nm}$.

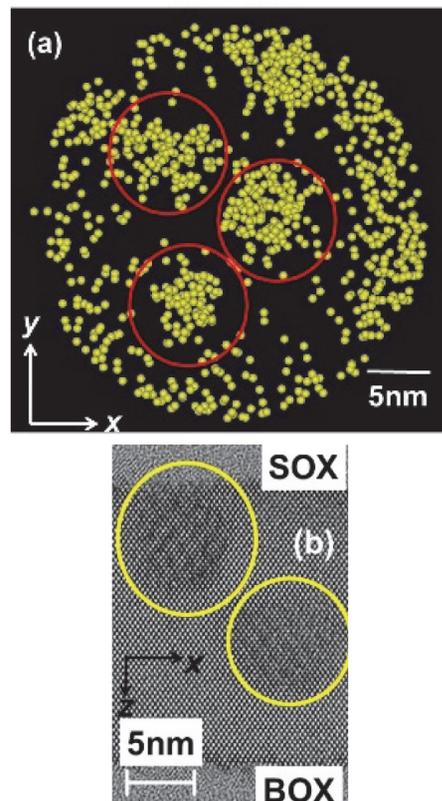


図 2. (a) APT による Si 中の C 原子分布 (各点は数個の C 原子に対応). $T=800^\circ\text{C}$, $D_c=4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $d_s=8 \text{ nm}$. (b) SOI 断面の CsTEM 写真. $T=900^\circ\text{C}$, $D_c=4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $d_s=20 \text{ nm}$.

更に、図 2(a) に、その C 偏析層を除いた Si 中の C 原子の二次元分布を示す。明らかに、C 原子は大きさが約 5 nm でクラスター化しているのがわかる。それは、図 2(b) の CsTEM (corrector-spherical aberration transmission electron microscopy) 観察でも確認できた。これらの結果より、C 原子は、自己整合的に局所的に高濃度化することがわかった。

また、図 3(a) に示すように、C 原子がクラスター化している局所領域に、O 原子 (表面酸化膜中の O 原子起因と思われる) もクラスター化しているのを確認できた。この物理機構は不明である。更に、図 3(b) に C 原子からの C 及び O 原子濃度 Y の相関長 R 依存性を示す。両データとも次式の C 原子からの距離 R の動径分布関数 (破線) で表されるのがわかる。C 原子の周りに O 原子が集合しているのがわかる。

$$Y(R) = Y_1 + Y_2 \exp\left(-\frac{R}{R_0}\right), \quad (1)$$

ここで、 Y_1 と Y_2 は適合値、 R_0 は相関長で原子クラスターの大きさの目安である。C 及び O 原子の R_0 は数 nm であることがわかり、図 2 の結果と一致する。

一方、C 偏析領域での C 濃度の二次元分布を図 4(a) に示す。C 偏析領域においても、C 原子はクラ

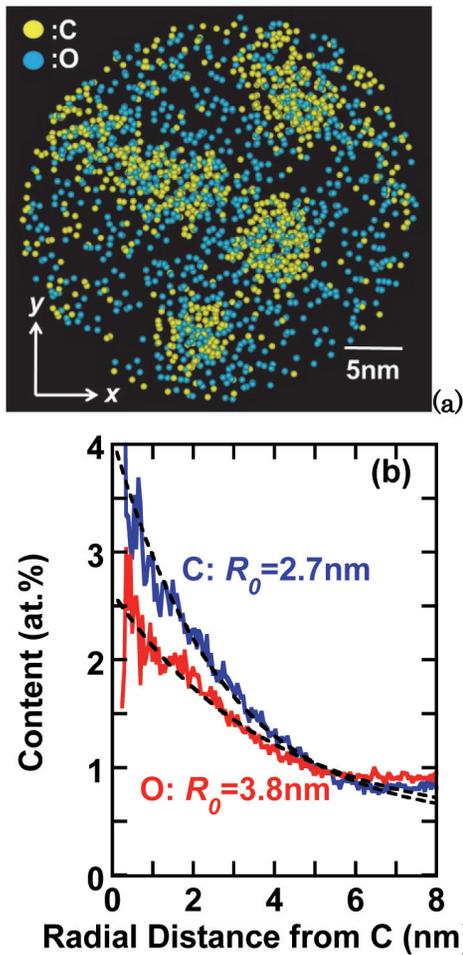


図3. (a) APTによるSi中のC及びO原子分布. $T=800^\circ\text{C}$, $D_c=4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $d_s=8 \text{ nm}$. (b) C及びO原子のC原子からの相関長依存性. 破線は、式(1)による計算結果.

スター化し局所的に高濃度化しているのがわかる。更に、図3(b)同様に、図4(b)はC偏析領域でのC濃度のC原子からの相関長依存性である。C偏析領域においても、式(1)の動径分布関数でC濃度を説明することができるが、図3のSi中とは違い、C偏析領域での R_0 はSi中の数分の一しかなくCクラスター径は1 nm程度の極微細であることがわかる。このC濃度の局所的高濃度化により、酸化膜界面でのSiCナノドット形成が起こると考えられる。

また、図5に表面酸化膜(SOX)界面での断面CSTEM (corrector-spherical aberration transmission electron microscopy: 球面収差補正TEM) 写真、及び電子線回折(ED)パターンを示す。SiCの多くのポリタイプの中から、大きさが2 nm程度の3C-SiC(立方晶)及びH-SiC(六方晶)ドットが確認された。

以上の結果から、Cイオン注入されたSOI基板は、図6に示す模式図のように、酸化膜へ成長したこれらのSiCドットは、所謂、量子ドットのため、ドット内に量子的に閉じ込められた電子の不確定原理による

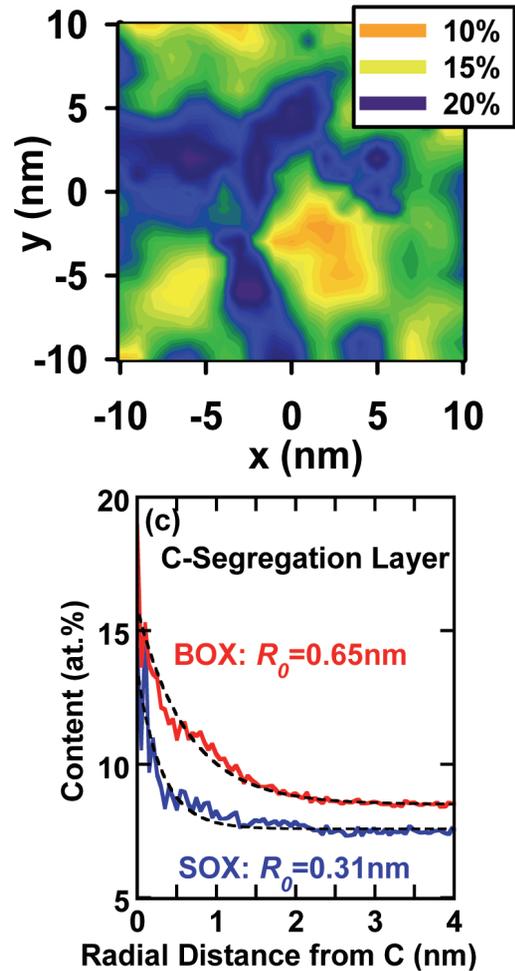


図4. (a) APTによる表面C偏析領域でのC原子濃度の等高線図. $T=800^\circ\text{C}$, $D_c=4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $d_s=8 \text{ nm}$. (b) 表面(SOX)及び裏面(BOX)C偏析領域でのC原子濃度の相関長依存性.

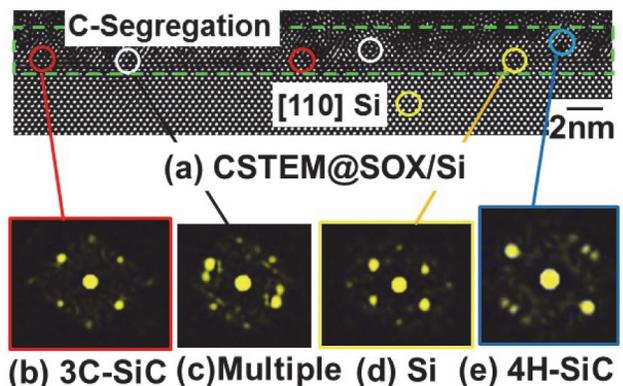


図5. 表面C偏析領域の(a)CSTEM写真、及び(b)-(e)電子線回折パターン. $T=900^\circ\text{C}$, $D_c=4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $d_s=8 \text{ nm}$.

電子波数の選択則の緩和が起こり、間接遷移型のSiCにおいてもPL発光効率の増大が期待できる^{19,20}。

PL発光特性

この節において、PL発光の T 依存性を明らかにする。

図7に示すように、PL発光スペクトルは大きな T

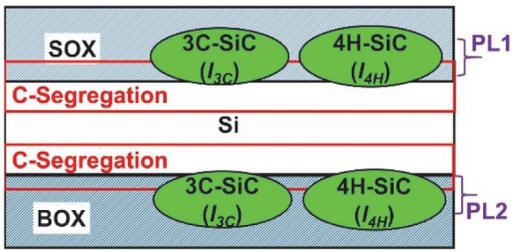


図6. 酸化膜界面のC偏析領域にSiCドットを有するSOI構造模式図.

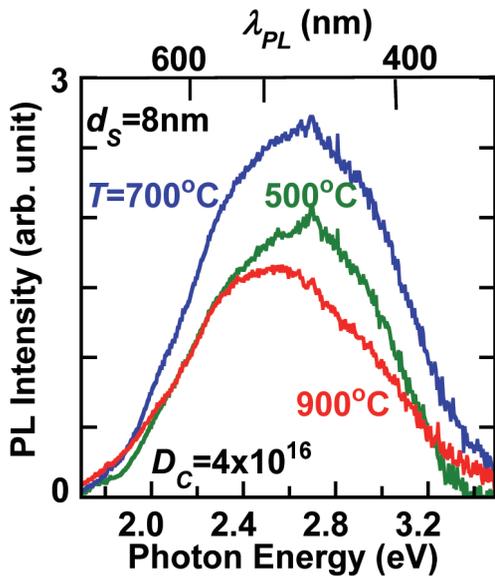


図7. PLスペクトルの T 依存性. $D_C = 4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $d_s = 8 \text{ nm}$.

依存性を示している。特に、PL強度増大には、最適な T が存在している。ここで、PL強度ピーク値の T 依存性を図8(a)に示す。PL強度増大には、 T が700-800°Cに最適な温度があることがわかる。一方、 $T=1000^\circ\text{C}$ では、大きなPL強度の劣化が見られる。そこで、イオン注入されたSi層の結晶性を議論する。図8(b)はSiのRamanピークのFWHMの T 依存性である。 T の上昇とともにFWHMは改善しており、 $T=1000^\circ\text{C}$ においても結晶性劣化は見られない。

ここで $T=1000^\circ\text{C}$ における大きなPL強度劣化機構を明確にするために、Cイオン注入後にポスト N_2 アニール(温度 $T_N=1000^\circ\text{C}$)を行い、PL強度の N_2 アニール時間 t_N 依存性を明らかにする。図9(a)に示すようにPLスペクトルは大きく N_2 アニール時間に依存している。更に、PL強度のピーク値の N_2 アニール時間 t_N 依存性を図9(b)に示す。 N_2 アニール時間30分以内では、PL強度 I_{PL} は急激に増大する。即ち、次式の増大関数で表される。

$$I_{PL}(t_N) = I_1 + I_2 \left[1 - \exp\left(-\frac{t_N}{t_F}\right) \right], \quad (2)$$

ここで、 I_1 と I_2 は適合値、 t_F は緩和時間である。

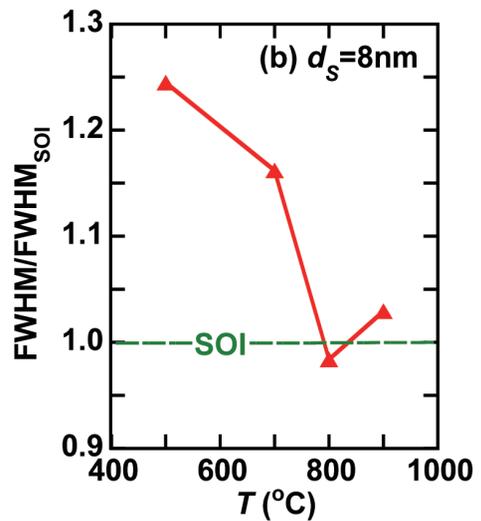
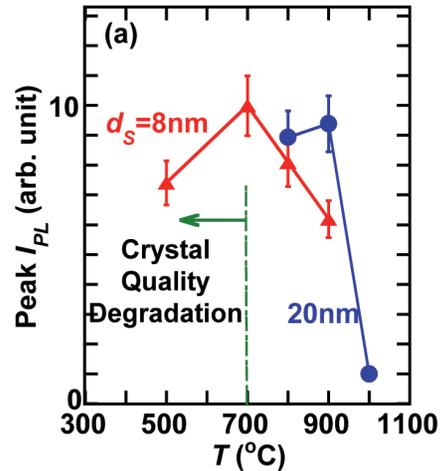


図8. (a)PLピーク強度、及び(b)FWHMの T 依存性. $D_C = 4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $d_s = 8 \text{ nm}$.

しかし、30分以上では、 N_2 アニール時間とともにPL強度は徐々に劣化し、次式の減少関数で表される。

$$I_{PL}(t_N) = I_3 + I_4 \exp\left(-\frac{t_N}{t_D}\right), \quad (3)$$

ここで、 I_3 と I_4 は適合値、 t_D は緩和時間である。 t_F 及び t_D は約4及び127分で、 t_F のほうが断然短いのがわかる。

一方、図9(c)に示すように、SiのRamanピークシフト $\Delta\omega$ 及びFWHMは N_2 アニール時間に依存していない。よって、図9(b)の結果は、Si結晶性には無関係であることがわかる。

一方、PLピークエネルギーから求めた3C-SiC及び4H-SiCドットの E_G の t_N 依存性を図10に示す。明らかに、 E_G は t_N とともに増大している。ドット内の電子閉じ込め効果により $E_G \propto R^2$ であるため²⁰⁾、図10の結果はSiCドット径は t_N とともに縮小していると考えられる。よって、ドット内の電子波数の選択則の緩和効果が増大し、PL発光効率は増大すると思われる。

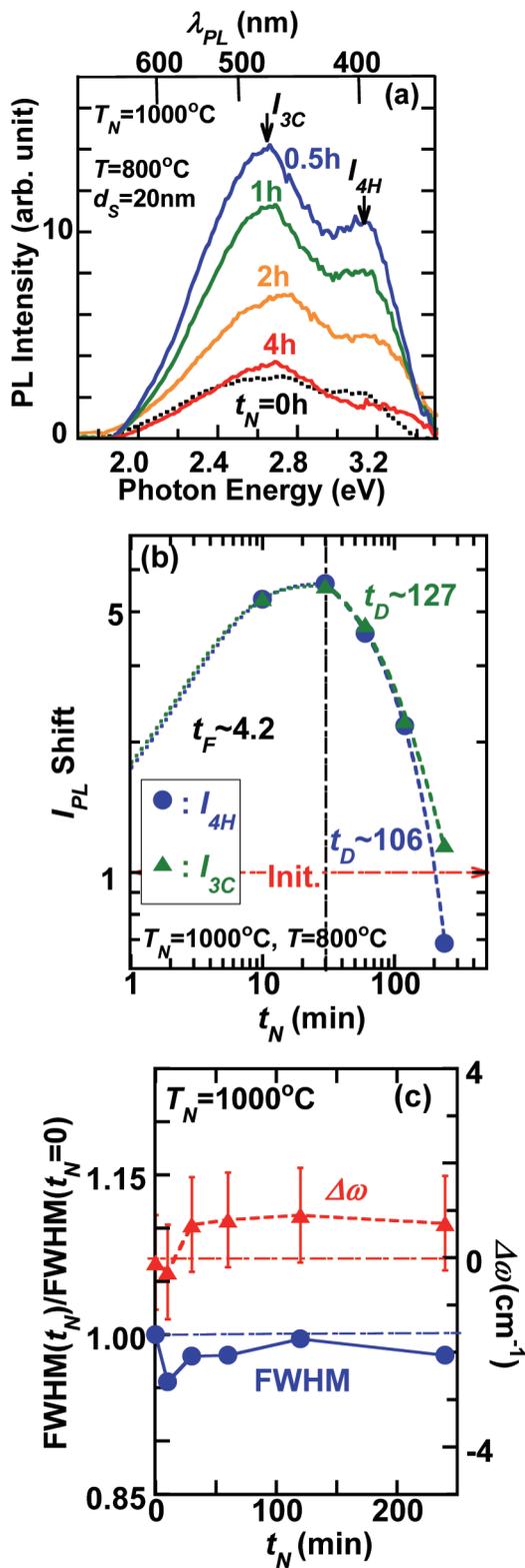


図9. (a)PLスペクトル, (b)PLピーク強度, 及び(c)FWHM及び $\Delta\omega$ の t_N 依存性. $T=800^\circ\text{C}$, $D_C=4 \times 10^{16}\text{cm}^{-2}$, $d_S=20\text{nm}$, $T_N=1000^\circ\text{C}$. (a)での矢印は3C-SiC及び4H-SiCの E_G を示す²⁰⁾.

ここで、SiCドットからのPL強度は次のように考えられる。

$$I_{PL}(t_N) = S(t_N)N(t_N)I_0(t_N), \quad (4)$$

S , N , I_0 はドットの面積、密度、及びPL強度である。

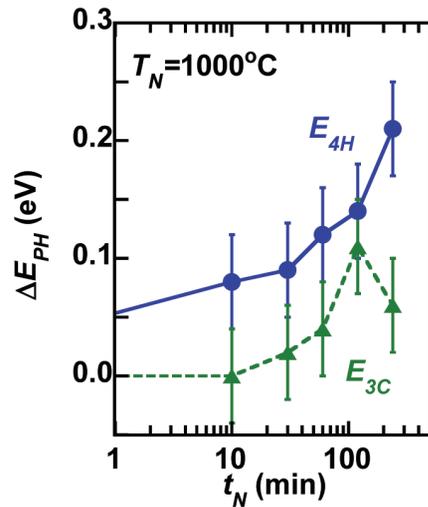


図10. PLピークエネルギー(3C-SiC:丸, 及び4H-SiC:三角)の t_N 依存性. $T=800^\circ\text{C}$, $D_C=4 \times 10^{16}\text{cm}^{-2}$, $d_S=20\text{nm}$, $T_N=1000^\circ\text{C}$.

図9(b)結果は、次のように考えられる。 $t_N \leq 30$ 分でのPL強度増大は、図10の結果からドット径収縮による式(4)でのドット当たりのPL強度増大に起因していると思われる。一方、 $t_N > 30$ 分でのPL強度減少は、大きなSiCドット径収縮による式(4)での S の減少によると思われる。

結論

Si系発光素子研究の一環として、(100)SOI基板へのCホットイオン注入法により作製したSiCドット構造解析とPL発光機構についての研究を行った。

APT分析により、Si中にイオン注入されたC原子のクラスター化を確認し、C原子が局所的に高濃度化しているのを明確にした。また、CSTEMによって、SiCポリタイプの立方晶及び六方晶構造SiCドット形成を確認し、特にSi表層から酸化膜領域への2nm程度の粒径のSiC量子ドットを実証できた。

その結果、強いPL発光(近紫外から可視域)が実現でき、PL強度増大のCイオン注入温度の最適条件を見い出せた。従って、このSiCドット技術は将来のSi系発光素子にとって有望であることがわかった。

謝辞

本研究の一部は、科研費(17K06359)及び神奈川県総合学術研究所共同研究助成金(RIIS201701)の援助を受けた。

文献

- 1) 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. *IEDM Tech. Dig.*, Paper 19.5., pp.1-4
- 2) Nazarov A, Colinge JP, Balestra F, Raskin JP, Gamiz F and Lysenko VS (2011) *Semiconductor-On-Insulator Materials for Nanoelectronics Applications*. Springer, Berlin.
 - 3) Uchida K, Koga J and Takagi S (2007) Experimental study on electron mobility in ultrathin-body silicon-on-insulator metal-oxide-semiconductor field-effect transistors. *J. Appl. Phys.* **102** (074510): 1-8.
 - 4) Agrawal BK and Agrawal S (2000) First-principles study of one-dimensional quantum-confined H-passivated ultrathin Si films. *Appl. Phys. Lett.* **77**: 3039-3041.
 - 5) Kumar V (2008) *Nanosilicon*. Elsevier, Amsterdam.
 - 6) 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** (02BC03):1-8.
 - 7) Mizuno T, Aoki T, Nagata Y, Nakahara Y and Sameshima T (2013) Experimental study on surface-orientation/strain dependence of phonon confinement effects and band structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **52** (04CC13):1-8.
 - 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) 水野智久、青木 孝、鮫島俊之 (2014) 二次元シリコン半導体基板の物性研究. *神奈川大学理学誌* **25**:23-30.
 - 10) 水野智久、前田辰郎、多田哲也、青木 孝 (2015) 二次元半導体デバイスの研究. *神奈川大学理学誌* **26**:33-39.
 - 11) 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.
 - 12) Mizuno T, Nakahara Y, Nagata Y, Suzuki Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Quantum confinement effects in doped two-dimensional Si layers: novel device design for two-dimensional pn-junction structures. *Jpn. J. Appl. Phys.* **53** (04EC09):1-7.
 - 13) Mizuno T, Nagamine Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T and Sameshima T (2015) Impurity doping effects on impurity band structure modulation in two dimensional n+ and p+ Si layers for future CMOS. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54** (04DC05):1-6.
 - 14) Mizuno T, Suzuki Y, Nagamine Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T and Maeda T (2015) Surface-oxide stress induced band-structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54** (04DC02):1-6.
 - 15) Mizuno T, Nagamine Y, Omata Y, Suzuki Y, Urayama W, Aoki T and Sameshima T (2016) C-atom-induced bandgap modulation in two-dimensional (100) silicon carbon alloys. *Jpn. J. Appl. Phys.* **55** (04EB02):1-8.
 - 16) 水野智久、前田辰郎、青木 孝、鮫島俊之 (2016) 可視域シリコン発光素子の開発. *神奈川大学理学誌* **27**:15-21.
 - 17) Mizuno T, Omata Y, Nagamine Y, Aoki T and Sameshima T (2017) Material structure of two-/three-dimensional Si-C layers fabricated by hot-C+ion implantation into Si-on-insulator substrate, *Jpn. J. Appl. Phys.* **56** (04CB03):1-8.
 - 18) Mizuno T, Nakada S, Yamamoto M, Irie S, Omata Y, Aoki T and Sameshima T (2017) SiC Nano-Dots in Bulk-Si Substrate Fabricated by Hot-C+Ion Implantation Technique. In: *Ext. Abstr. Solid State Devices and Materials*. pp.597-598.
 - 19) Mizuno T, Omata Y, Kanazawa R, Iguchi Y, Nakada S, Aoki T and Sasaki T (2018) Nano-SiC region formation in (100)Si-on-insulator substrate: Optimization of hot-C+ion implantation process to improve photoluminescence intensity. *Jpn. J. Appl. Phys.* **57** (04FB03):1-9.
 - 20) J. Fan and P. K. Chu (2014) *Silicon Carbide Nanostructure*. Springer, Cham.

■原 著■ 2017年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

n-型ダイヤモンド半導体へのオーミック電極構造形成法の研究(1)

中田穰治^{1,4} 新井 健² 佐藤秀人³ 関 裕平¹ 内藤隆平¹ 星野 靖¹

Research for Ohmic Electrode Formation of *n*-type Diamond Semiconductors

Jyoji Nakata^{1,4}, Ken Arai², Hideto Satou³, Yuhei Seki¹, Ryuhei Naitou¹
and Yasushi Hoshino¹

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

² Department of Electrical and Electronic Engineering, School of Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama City, Kanagawa 226-8503, Japan

³ Branch of Nagoya, Out-Sourcing Technology, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: nakatj01@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We have investigated the ohmic electrode structures necessary for the minute evaluation of electric properties of diamond semiconductors. Firstly, we constructed two-types of electrode for triple-layers made of Au/Pt/Ti metals. The Ti layer, which directly contacts the diamond substrate, was formed by two methods. One was Ti evaporation, and the other was Ti ion implantation that induces a graphite-like carbon (GLC) layer in the substrate simultaneously. We compared the electrical properties of these two-types of electrode using the Van der Pauw method. A good ohmic property was confirmed in the Au/Pt/GLC layer (Ti implantation) electrode at temperatures from 300 to 800°C, where the GLC layer was formed by Ti ion implantation with a total fluence of $1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ at room temperature. Secondly, we aimed to simplify the electrode structures by forming a low-resistance GLC layer using Ar ion implantation (GLC (Ar implantation) electrode), instead of Ti irradiation. We also formed a single-layer electrode using Au evaporation. We compared the electric properties of these two-types of electrode by the Van der Pauw method. The ohmic contact properties were evaluated by I-V measurements at temperatures from 300 to 800°C. As a result, a good ohmic property for the *n*-type Ib diamond substrate with the Au/Pt/GLC (Ar irradiation) electrode structure was obtained at temperatures from 300 to 800°C. However, a good ohmic property was not observed at temperatures higher than 600°C in cases of conventional Au/Pt/Ti (evaporation) and the Au single-layer electrode without the GLC layer. The GLC layer was therefore found to be necessary to obtain the fine ohmic property for the *n*-type Ib diamond. Finally, we measured ohmic properties of the Au/Pt/GLC (Ar implantation) electrode structure with a wide range of measuring voltages of around $\pm 100 \text{ V}$. We succeeded in obtaining good ohmic contact with the diamond Ib substrate over a comparatively wide temperature range of 300-600°C.

Keywords: *n*-type diamond substrate, ohmic contact, graphite layer, TiC compound, triple-layer electrode, ion implantation, metal evaporation

序論

本研究室では、ダイヤモンド半導体の研究をおこなっている。半導体とは、電気伝導性の良い金属などの導体と電気抵抗率の大きい絶縁体の中間の抵抗率を持つ物質である。基本的に絶縁体と構造は同じで

あるが、熱や光といったエネルギーに対して影響を受けやすい性質を持つ。結晶中では、電子のとりエネルギーはバンド（帯）状の準位を作る。この領域をバンド構造と呼ぶ。各種半導体についての説明を

以下の表 1 にまとめる。

半導体は、エネルギーを与えることによって価電子帯から電子がバンドギャップ（禁止帯）を越え伝導帯に励起されることにより電気が流れるようになる。このことから、バンドギャップが狭いほど電気が流れやすいことがわかる。導体ではバンドギャップが存在しないため容易に伝導帯に電子が励起することができ、絶縁体ではバンドギャップが広いため価電子帯から伝導帯に電子を励起することができない。

また、半導体には n 型と p 型が存在し、これは伝導現象を支配するキャリアによって分類することが可能である。

表 1. 各種半導体の性能評価

Diamond	4H-SiC	GaAs	GaN	Si
バンドギャップ[eV]				
5.5	3.26	1.42	3.42	1.12
電子移動度[cm ² /Vs]				
2200	1000	8500	900	1400
正孔移動度[cm ² /Vs]				
1600	115	400	150	600
絶縁破壊電界[MV/cm]				
10	2.8	0.4	3	0.3
飽和ドリフト速度[×10 ⁷ cm/s]				
2.5	2.2	1.0	2.4	1.0
熱伝導率[W/cm・K]				
20	4.9	0.46	1.3	1.5

バンドギャップが広いほど、半導体として動作させるためのエネルギーもまた多く必要となる。そのため、ダイヤモンド半導体は高温下などの過酷な環境下でも動作が可能となる。絶縁破壊電界とは絶縁性が破壊され導通状態となる電界である。絶縁破壊電界が大きければ、導体間を隔離している絶縁体が高電圧に耐えることができるようになる。熱伝導率とは熱伝導の起こりやすさであり、これが大きければ半導体は放熱しやすく熱膨張などが起こりにくくなる。ドリフト速度は半導体内での電子や正孔のキャリアの平均速度であり、その最大値を飽和ドリフト速度呼ぶ。この値が大きければデバイスの高速化が可能となる。移動度は半導体内での電子や正孔などのキャリアの移動のしやすさであるため、この値が大きければ電流が流れやすくなる。これらのことから、ダイヤモンドはシリコンと比較して物性として優れた点が多く存在する。

このようにダイヤモンドは優れた物性をもっているが、同時に課題も存在する。課題の 1 つにオーミック電極の作製がある。オーミック電極とはオーム

の法則 ($V=RI$) が成り立つ電極である。ダイヤモンド半導体の電気的特性評価やデバイスの作製にはオーミック電極の形成が必要不可欠である。

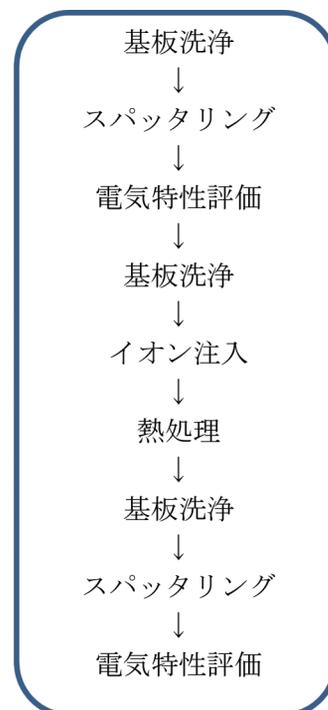
これまで本研究室ではダイヤモンド Ib 基板に対して Au/Pt/Ti の 3 層電極を用いて電気特性の評価を行っていた。しかし 3 層電極は 600°C から 800°C までの高温領域ではオーミック特性が得られていなかった。そこで本研究室では高温領域でもオーミック特性を得るために電極部に Ar を注入して GLC (Graphite Like Carbon) 層を導入した Au/Pt/Ti/GLC の 4 層電極が作製された。Ib 基板の 4 層電極では 300°C から 800°C までの幅広い温度でオーミック特性を得られた^{1,2)}。

本研究では幅広い温度でオーミック接触が得られた 4 層電極構造の簡略化を目指した。まず Ar を注入する代わりに Ti を注入することで電極構造の簡略化を図った。その後オーミック接触に Ti が必要なのかを調べるために、Ti を注入する代わりに Ar を注入することで Ti を含まない電極を作製し、オーミック特性の比較及び検討を行った。

材料と方法

本研究における総合的な実験手順を表 2 に示す。また本研究の実験で共通であるものについてここで説明する。

表 2. 実験手順



洗浄

必要に応じて基板に対して化学洗浄および超音波洗

浄を行った。化学洗浄の条件等を以下の表3にまとめる。王水洗浄、酸洗浄、アルカリ洗浄は表3に従って、その後純水を用いて超音波洗浄を行った。

表3. 化学洗浄の条件等

洗浄薬品	薬品配合比率	温度	時間
王水	硝酸：塩酸 1：3	200℃	30分
酸	硝酸：塩酸 1：3	200℃	30分
アルカリ	過酸化水素水：アンモニア水： 純粋 1：1：5	80℃	20分

(王水洗浄は電極を剥がすときのみ)

電気特性評価

作製した基板に対して Resitest8300 ホール効果測定装置を用いて室温から 800℃の範囲で I-V 特性、シート抵抗の測定と *pn* 判定を行った。図1に基板を上から見た図を示す。電極は基板に対し、図2のような多層構造でつけた。各電極の各2点間(1-2間、2-3間、3-4間、4-1間、1-3間、2-4間)に電圧をかけ、電流値を測定した。

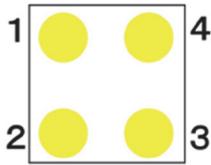


図1. 電極配置図。

使用基板

本研究では、試料として高温高压合成ダイヤモンド Ib 基板を使用した。表4にダイヤモンド基板の分類を示す。ダイヤモンド基板は窒素の有無で I と II、無色か有色かで a と b に分類されている。本研究で使用したダイヤモンド Ib 基板は基板中に窒素を 100 ppm 以上含んでおり、その色は黄色である。

表4. ダイヤモンド基板の分類

	色の有無	窒素含有量
I a 基板	無し	100(ppm) 以上
I b 基板	有り	100(ppm) 以上
II a 基板	無し	0.1(ppm) 以下
II b 基板	有り	0.1(ppm) 以下

※ 1(ppm)=0.0001(%)。

Ti 蒸着 3 層電極と Ti 注入による 3 層電極

従来本研究室では 3 層電極において Ti はスパッタリングにて蒸着されてきた。本研究では Ti を蒸着させ

る代わりにイオン注入することで結晶欠陥を導入してグラファイト層 (GLC 層) 形成も同時に行うようにした。

形成した電極構造

図2に Ti 蒸着 3 層電極 Au/Pt/Ti (300/50/50 nm) と Ti イオン注入 3 層電極 Au/Pt/TiC&GLC (300/50/≈100 nm) の構造を示す。

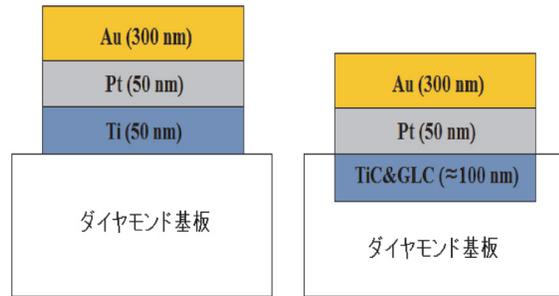


図2. 電極構造の比較。(Ti 蒸着 3 層電極 (左), Ti イオン注入 3 層電極 (右))。

左の蒸着 Ti においてはダイヤモンド基板に密着した Ti 層が熱処理を経て、下地のダイヤモンド基板を構成する C 原子と TiC の化合物を形成し、それが半導体ダイヤモンド基板とオーミック接触を形成することが知られている。従って、最初から蒸着ではなく、ダイヤモンド基板に Ti イオン注入により導入すれば、C 原子との化合物を形成すると同時に基板ダイヤモンド単結晶を破壊して、グラファイトを形成できると考えられる。このグラファイトは金属的な性質を持っており、極めて電気伝導度が高いので、半導体との接触面においてオーミック特性を得るのに好都合であると考えられる。

Ti 蒸着 3 層電極は洗浄後の Ib 基板上に Ti, Pt, Au を順にそれぞれ 50, 50, 300 nm の厚さでスパッタリング法で蒸着して作製した。Au は電極に Au ワイヤをボンディングしやすくするために蒸着した。Pt は Ti と Au の合金化や Ti の酸化を防ぐ役目をしている。

Ti 注入 3 層電極は Ti 蒸着 3 層電極を作製した基板を洗浄した後、同一基板上に作製した。加速エネルギー及び Dose 量は TRIM シミュレーションにより求めた。図3に加速エネルギー 200 keV で Ti 注入した場合のイオン注入によりダイヤモンド基板中に形成される空孔密度の TRIM コードによるシミュレーション結果を示す。

本研究室ではドナーやアクセプタを 100 nm 付近に注入することを想定している。そのため欠陥導入深さがドナー・アクセプタ注入層に届くように 100 nm 以上であることが求められている。シミュレー

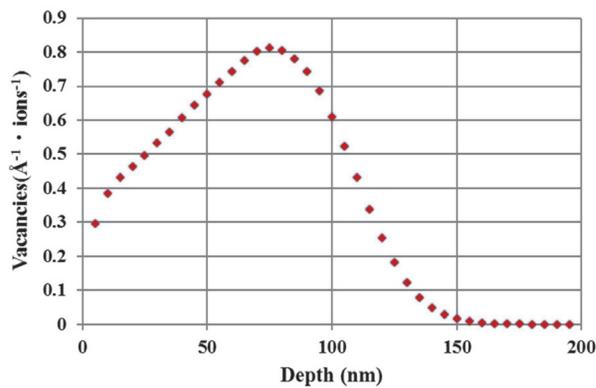


図 3. 加速エネルギー 200 keV で Ti 注入した場合の空孔密度の TRIM によるシミュレーション結果.

シミュレーションの結果 200 keV で欠陥導入深さが十分 100 nm を越えることがわかったため、加速エネルギーは 200 keV とした。注入温度は RT(室温)とした。Dose 量は 5.93×10^{15} ion/cm² である。Dose 量は基板表面のダイヤモンド結晶構造を全て破壊する程度になるように設定した。Ti 注入後 Ar 雰囲気中で 800°C 1 時間の熱処理を行なった。熱処理をすることで欠陥導入層が GLC 層となる。熱処理後基板を洗浄して Pt, Au を順にそれぞれ 50, 300 nm の厚さでスパッタリング法で蒸着した。

次に、さらに新しい電極構造としてオーミック特性を持つとともに、電極形成プロセスを簡略化することを目的に次節で説明する構造を持った電極構造を考案した。

Au 単層電極と Ar 注入 GLC 層 3 層電極

Ti がオーミック特性に与える影響を排除するために Ti を含まない電極を作製した。また Ti を除くことに伴い、Ti と Au の合金化や Ti の酸化を防ぐ役目をしている Pt を除いた。

形成した電極構造

図 4 に Au 単層電極 Au (300 nm) と Ar 注入 GLC 層電極 Au/Pt/GLC (300/50/≈100 nm) の構造を示す。Au 単層電極は洗浄後の基板の上に Au を 300 nm の厚さでスパッタリング法で蒸着して作製した。

Ar 注入 GLC 層電極は Au 単層電極を作製した基板を洗浄後、同一基板の上に作製した。Ar 注入 GLC 層電極では Au のみのスパッタではボンディングがうまくいかなかったため、Pt を含む電極構造とした。加速エネルギー及び Dose 量は TRIM シミュレーションにより求めた。図 5 に加速エネルギー 190, 200 keV で Ar 注入した場合の空孔密度の TRIM のシミュレーション結果を示す。

当初シミュレーションの結果 200 keV で欠陥導入

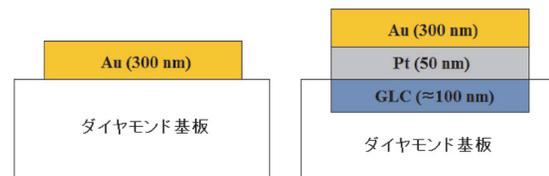


図 4. 電極構造の比較. Au 単層電極 (左), Ar 注入 GLC 層電極 (右).

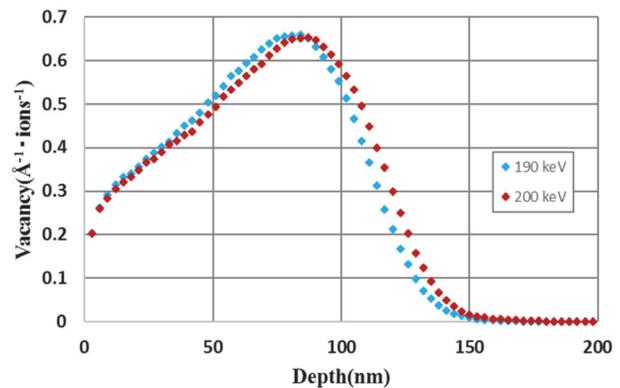


図 5. 加速エネルギー 190, 200 keV で Ar 注入した場合の空孔密度の TRIM によるシミュレーション結果.

深さが十分 100 nm を越えることがわかったため、加速エネルギーは 200 keV とする予定だった。しかし 200 keV では放電することがあり安定しなかったため 190 keV とした。図 5 より 190 keV でも欠陥導入深さが 100 nm を十分越えることが分かったため 190 keV でも問題ない。注入温度は RT とした。Dose 量は 1.00×10^{16} ion/cm² である。Dose 量は基板表面のダイヤモンド結晶構造を全て破壊する程度になるように求めた。Ar 注入後 Ar 雰囲気中で 800 °C 1 時間の熱処理を行なった。熱処理で欠陥導入層が GLC 層となる。熱処理後基板を洗浄して Pt, Au を順にそれぞれ 50, 300 nm の厚さをスパッタリング法で蒸着した。

結果

材料と方法で述べた Ti 蒸着 3 層電極と Ti イオン注入 3 層電極に関する実験結果と、Au 単層電極と Ar イオン注入 GLC 層を含む 3 層電極の構造に関して、それぞれを比較しながら各種電気特性 (I-V 特性、シート抵抗、pn 判定) の実験結果を述べる。

Ti 蒸着 3 層電極と Ti イオン注入 3 層電極

I-V 特性

Ti 蒸着 3 層電極と Ti 注入 3 層電極について 300 – 800°C の各温度での I-V 特性のグラフを図 6 に示す。測定時の基板の向きが 90 度ずれていたため左のグラフの 1 – 2, 2 – 3, 3 – 4, 4 – 1 はそれぞれ右のグラ

フの 2-3, 3-4, 4-1, 1-2 に対応している。

300-800°C の範囲で Ti 注入 3 層電極において、電圧数 V 程度の範囲でオーミック接触が得られた。Ti 注入 3 層電極は Ti 蒸着 3 層電極に比べオーミック接触が改善し、各温度で抵抗が小さくなった。

シート抵抗

Ti 蒸着電極と Ti 注入電極を用いて測定した Ib 基板のシート抵抗について図 7 に示す。

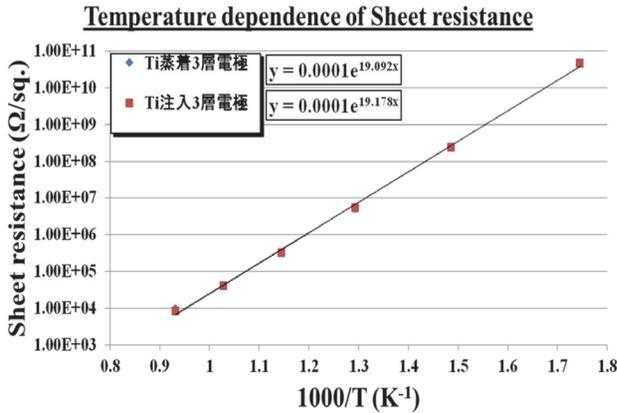


図 7. 未注入ダイヤモンド Ib 基板のシート抵抗の測定絶対温度依存性. Ti 蒸着 3 層電極 (◆), Ti イオン注入 3 層電極 (■).

図 7 より各温度において、Ti 蒸着 3 層電極と Ti 注入 3 層電極でシート抵抗に殆ど変化がないことが分かる。また図 7 より活性化エネルギーを求めると Ti 蒸着 3 層電極と Ti 注入 3 層電極の両方で 1.65 eV 程度となった。これは窒素の不純物準位 1.4-1.7 eV に近い値である。

pn 判定

Ti 蒸着 3 層電極と Ti 注入 3 層電極を用いて測定した Ib 基板の pn 判定について表 5 に示す。

表 5 より 300°C から 800 °C において、Ti 蒸着電極と Ti 注入電極で同じく n 型を示しており変化がないことが分かる。総じて蒸着 Ti とイオン注入 Ti とで形成する 3 層構造電極においては pn 判定に関してもほとんど同じ結果であることが分かった。そこで新しい電極構造としてオーミック特性を持つとともに、電極形成プロセスを簡略化することを目的に考案した電極構造で各種電気特性を測定した結果を次に示す。

Au 単層電極と Ar 注入 GLC 層を含む 3 層電極 I-V 特性

Au 単層電極と Ar 注入 GLC 層を含む 3 層電極について 300-800°C の各測定温度での I-V 特性のグラ

表 5. pn 判定.

°C	Ti 蒸着 3 層電極	Ti 注入 3 層電極
RT	?	?
100	?	?
200	P?	?
300	N	N
400	N	N
500	N	N
600	N	N
700	N	N
800	N	N

フを図 8 に示す。

300°C の温度では両試料とも ± 20 V 程度の温度範囲で良好なオーミック特性が得られている。また、400-600°C においては両試料とも良好なオーミック特性を保っているが、その電圧範囲は ± (1V-2 V) 程度の極めて狭い領域に限られてくる。さらに、700-800°C の範囲でも Ar 注入 GLC 層電極において、非常に狭い電圧 ± 1 V 程度の範囲でオーミック特性が得られたが Au 単層電極ではその狭い電圧範囲内でもオーミック特性が崩れてくるのが分かる。総じていえば ± (1V-2 V) の狭い電圧範囲に限れば Au 単層電極でもかなり良好なオーミック特性を得ることが分かった。

シート抵抗

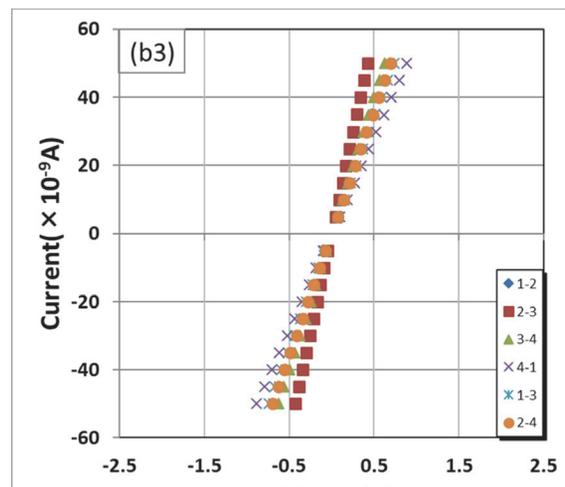
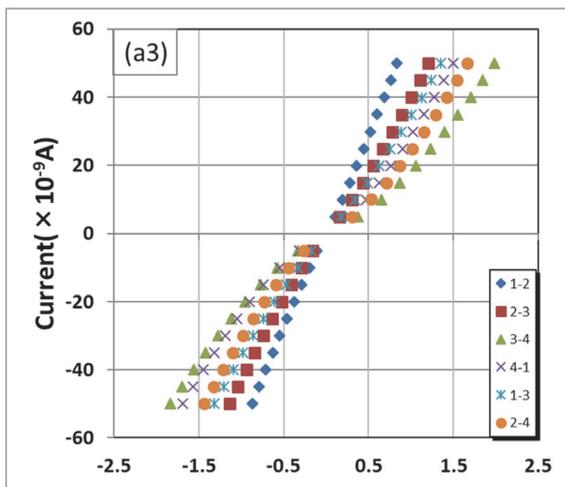
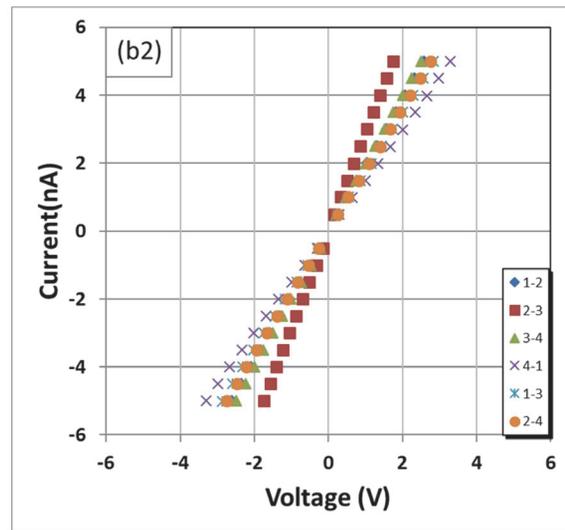
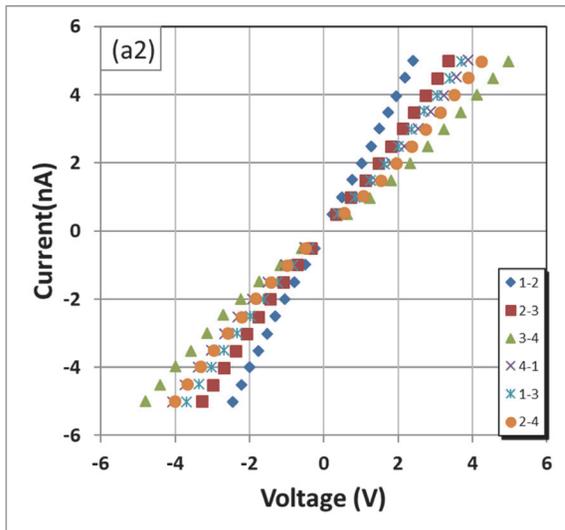
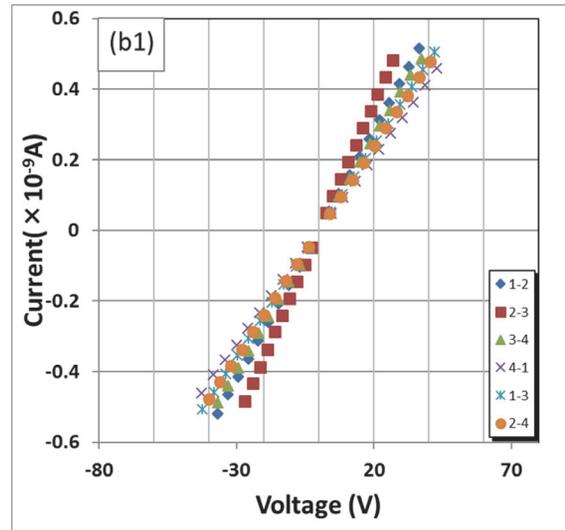
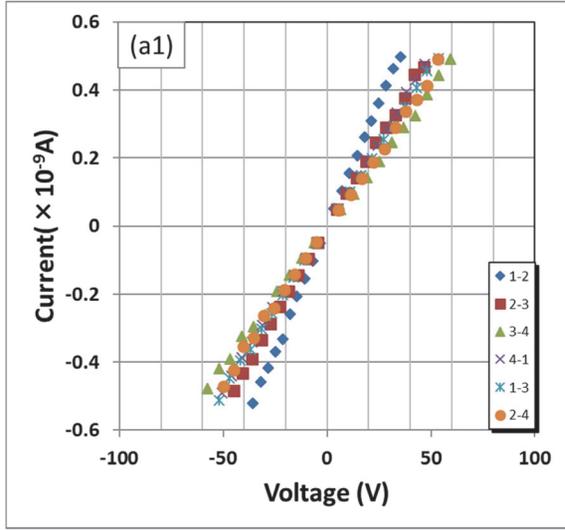
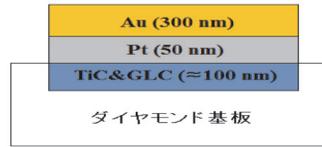
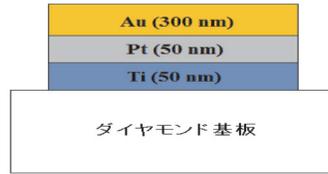
Au 単層電極と Ar 注入 GLC 層層を含む 3 層電極を用いて測定した Ib 基板のシート抵抗について図 9 に示す。

図 9 より各温度において、Au 単層電極と Ar 注入 GLC 層電極でシート抵抗に大きな変化がないことがわかる。また図 9 より活性化エネルギーを求めると Au 単層電極では 1.50 eV、Ar 注入 GLC 層電極では 1.46 eV 程度となった。

pn 判定

Au 単層電極と Ar 注入 GLC 層電極を用いて測定した Ib 基板の pn 判定について表 6 に示す。

表中の ? は測定ノイズが大きくホール効果測定における交流磁場の位相とホール起電力の位相差が 0° または 180° から 90° 以上離れている場合に表示される。また、N? は 60° ~90° 離れている場合表示される。この表 6 より Au 単層電極においては 700°C を除いて 300-800°C において、Ar 注入 GLC 層を含む 3 層電極構造と同じく n 型を示しており両方で殆んど



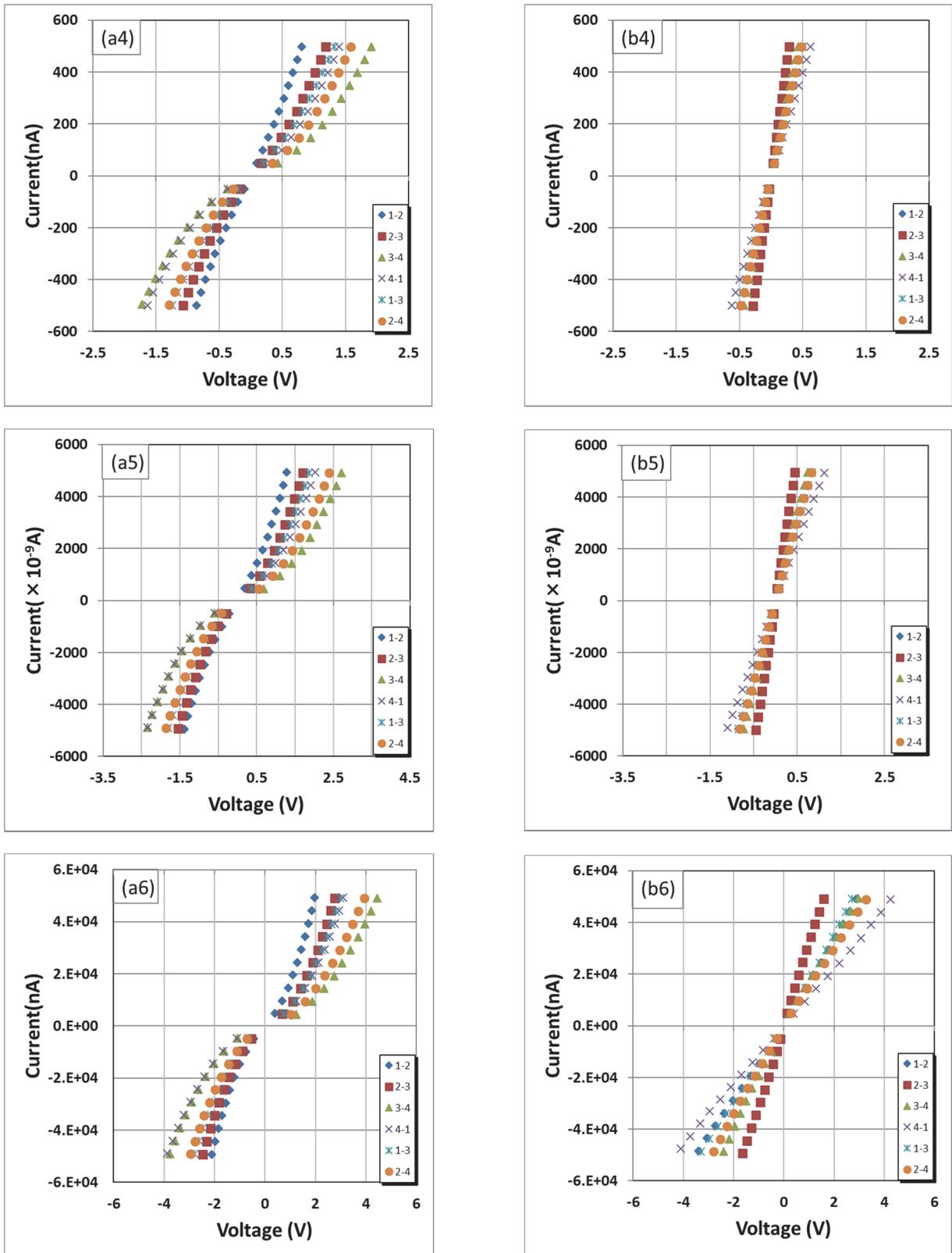
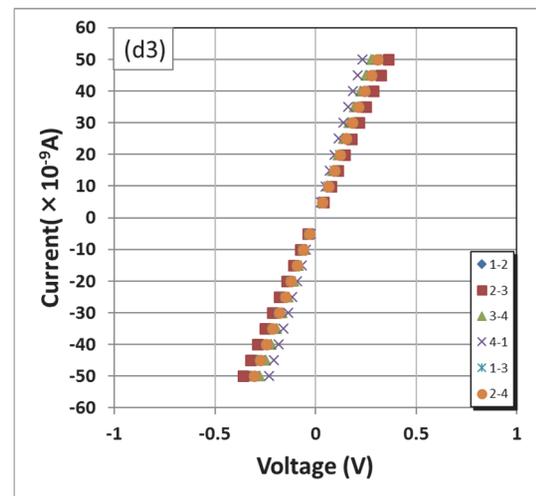
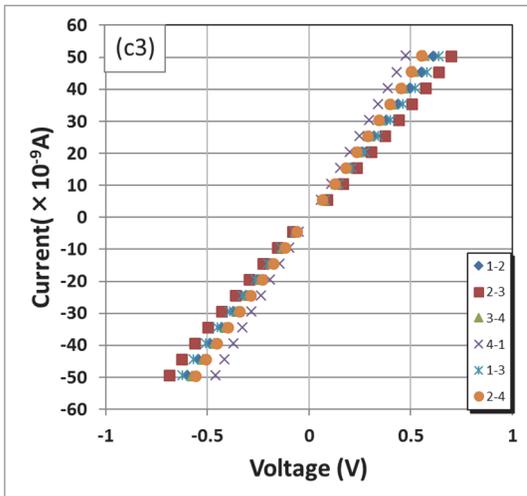
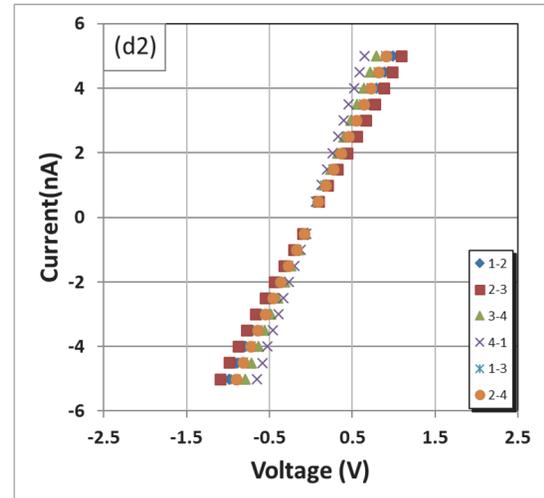
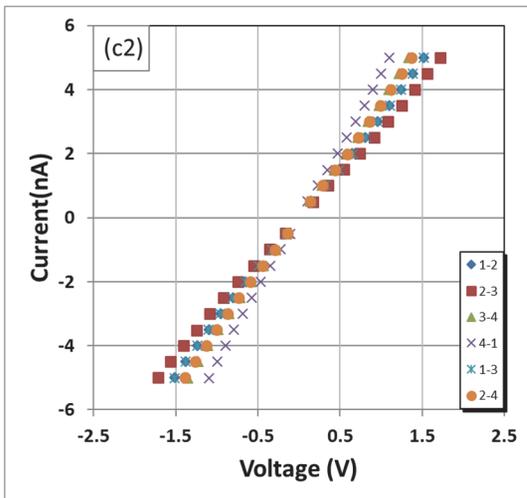
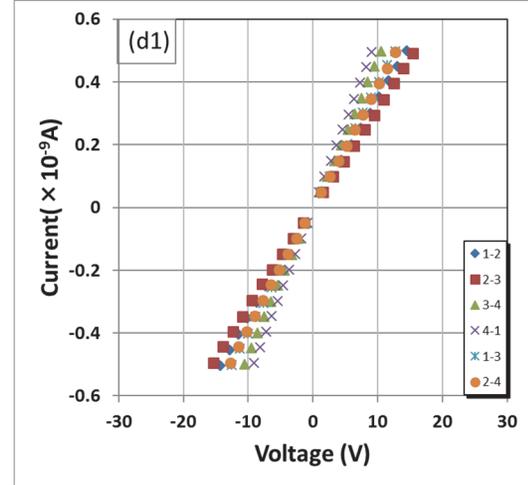
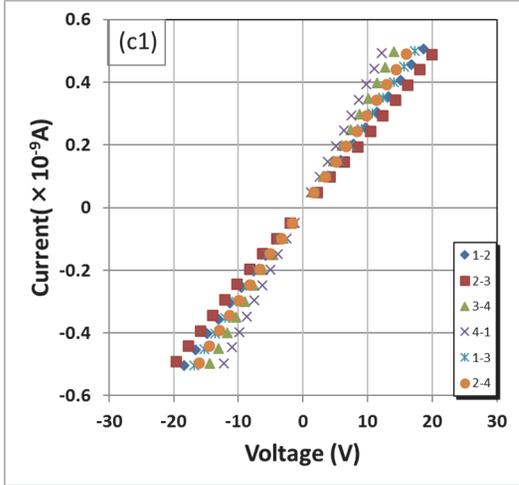
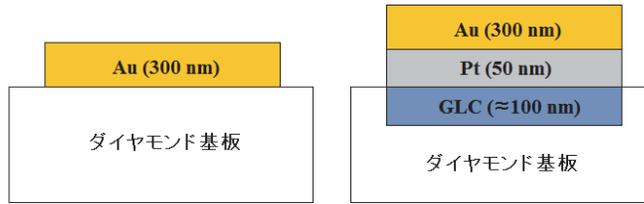


図 6. 未注入ダイヤモンド Ib 基板の I-V 特性. Ti 蒸着 3 層電極構造 (a) と Ti イオン注入 3 層電極構造 (b). 1-6 は測定温度 300-800°C で 100°C 間隔に相当. 測定点の色分けは図 1 における電極番号間の I-V 測定に相当する.



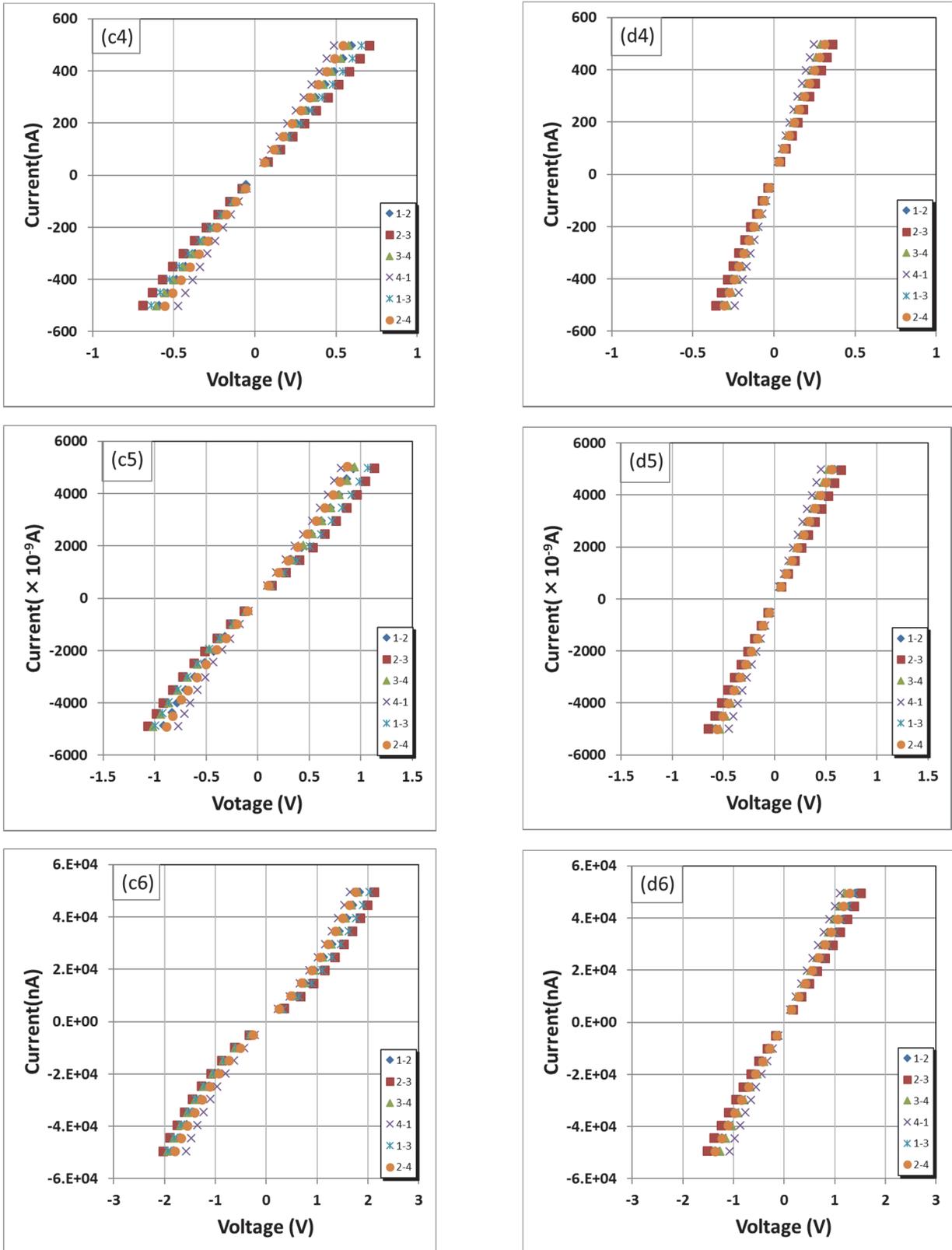


図8. 未注入ダイヤモンドIb基板のI-V特性. Au単層電極構造(c)とAr注入GLC層層を含む3層電極構造(d). 1-6は測定温度300-800°Cで100°C間隔に相当. 測定点の色分けは図1における電極番号間のI-V測定に相当する.

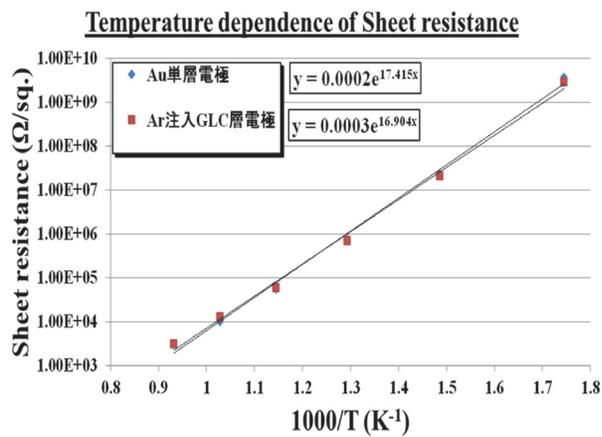


図 9. 未注入ダイヤモンド Ib 基板のシート抵抗の測定絶対温度依存性. Au 単層電極(◆), Ar イオン注入 3 層電極(■).

表 6. pn 判定

°C	Ti 蒸着 3 層電極	Ti 注入 3 層電極
RT	?	N?
100	?	?
200	N?	?
300	N	N
400	N	N
500	N	N
600	N	N
700	?	N
800	N	N

差がないことが分かる。Au 単層電極の 700°C ではノイズが大きく、pn 判定できなかった。また、GLC 層を含む電極においては 100°C という低温以外では n 型または、n? を示している。しかし、総じて Au 単層電極構造よりも Ar イオン注入 GLC 層を含む 3 層電極構造の方が良好なオーミック特性を有していると言える。

Ar 注入 GLC 層を含む 3 層電極のオーミック特性が得られる電圧範囲

結果の章において測定した Au 単層電極と Ar 注入 GLC 層を含む 3 層電極の比較において、さらにオーミック特性を得ることができる測定電圧範囲を調べた。そのために I-V 特性測定のための電圧範囲を広範囲に変えて測定した。電圧 ± 数 V の範囲と約 ± 100 V の範囲について 300-800°C の各測定温度での I-V 特性のグラフを図 10 に示す。左側の図は測定温度範囲が狭い場合の結果であり、右側の図は広い場合の結果である。

その結果、Ar イオン注入形成 GLC 層を含む 3 層

電極において 300-500°C 程度まで、良好なオーミック特性が ± 100 V 近くの広範囲な測定電圧まで得られた。しかし、700°C、800°C の高温になると著しく線形性が保たれなくなる。そして、800°C に於いては本来、ダイヤモンド半導体と金属との接触によるショットキーバリアードダイオードなのであるが、まるでツェナーダイオードのような振舞いを行っている。しかし、総じていえば、± 100 V というような広範囲な電圧において実際のダイヤモンドデバイスを動作させることはなく、実用的には ± 数十 V で充分であろう。従って、その電圧範囲で動作させる限り 300-800°C の高温下で良好なオーミック特性が実現できる Ar イオン注入形成 GLC 層を含む 3 層電極構造が今のところ最も有望であると思われる。今後まとめのところに詳述したが、GLC 層がオーミック特性に大きく関わっていることが分かったので、GLC の元となる結晶欠陥の量つまり Ar の Dose 量を変えてオーミック特性がどのように変化するかを確認する必要がある。また、Ar 注入 GLC 層電極でボンディングのために Pt を蒸着したが、ここで Pt 部分を他の安価な金属で代替できる可能性がある。あるいは Au の蒸着量を増やすことにより Pt の蒸着をしないで済む可能性もある。

図 10 から言える結論的なことは測定電圧 ± 数 V の範囲では Ar イオン注入 GLC 層を含む 3 層電極構造において 800 °C まで良好なオーミック接触が得られた。± 数十 V の範囲では 300° - 600°C の測定温度範囲で比較的良好なオーミック特性が確認できたが、700 °C、800 °C においては大きくオーミック特性から崩れることが分かった。

討論

I-V 特性より Ti 注入 3 層電極は電圧 ± 数 V の範囲で 300-800°C の測定温度範囲においてオーミック特性が得られた。Ti 注入 3 層電極は Ti 蒸着 3 層電極に比べオーミック特性が改善し、抵抗が小さくなった。しかし、pn 判定に関しては両者ともほぼ同じ結果が得られ、Ti 注入による基板の電気特性は Ti 蒸着と比較して変化は見られなかった。

現状では Ti 注入 3 層電極は Ti 蒸着 3 層電極作製の基板を洗浄し同一基板上に作製している。そのため Ti 注入 3 層電極の電気特性評価に対して、Ti 蒸着 3 層電極作成時のスパッタ蒸着による残留 Ti の影響が考えられた。この点について当研究室博士課程の関裕平が、洗浄後の Ti の残留はダイヤモンド密度に対して数百 ppm 程度であることを示した³⁾。そのため本研究では洗浄後の残留 Ti の電気特性に与える影響は無視している。

次にイオン注入による Ti の電気特性評価に与える影響を考える。Ti 蒸着 3 層電極ではダイヤモンド基板に Ti をスパッタリング法で蒸着しており、界面に TiC が形成されている。この TiC がダイヤモンド半導体との界面でオーミック特性を顕現していると考えられている。そのためもし、洗浄工程を経ても Ti が残留していれば Ti がオーミック特性という電気特性に影響を及ぼすと考えられる。

一方、Ti イオン注入 3 層電極では Ti はダイヤモンド基板表面から注入エネルギーにより 100 nm 深さ付近まで進入している。また Ti 注入量は 5.93×10^{15} ion/cm² である。これに対してダイヤモンド結晶の原子密度 1.76×10^{23} atoms/cm³ を用いて、基板表面付近 100 nm のダイヤモンド結晶の原子面密度を求めると 1.76×10^{18} atoms/cm² となる。Ti 注入量は上記で求めたダイヤモンド結晶の原子面密度と比較しておよそ 10^3 程度である。そのため Ti 或いは TiC がオーミック特性を引き起こした可能性は小さいと判断した。即ち、Ti、TiC の影響が小さいと思われるにも関わらず、オーミック特性を得られたことになる。結論として Ti、TiC 以外の要因によってオーミック特性を得られたと考えた。オーミック特性を顕現する原因を特定するため Ti の影響を完全に排除する必要がある。

オーミック特性を得るのに Ti が必要かどうかを調べるために Ti を含まない電極構造を作製した。結果の章における (b) の実験結果で述べたように Ti を全く含まない Ar 注入で GLC 層電極を作製し、オーミック特性を測定して Au 単層電極と比較した。この場合は、電圧 ± (1 V-2 V) 程度の範囲でなおかつ 300-800°C の測定温度範囲でオーミック特性が実現できた。さらに、測定電圧が非常に狭い ± (1 V-2 V) 程度の範囲ではあるが、300-800°C の測定温度の範囲では Au 単層電極という非常に単純な構造でもそれなりのオーミック特性が得られていることが分かる。即ち、オーミック特性を得るのに Au 単層であれ、Ar イオン注入 GLC 層であれ、Ti は全く必要でないことが分かった。

しかし、Ar イオン注入 GLC 層を含む電極構造では図 10 から明らかなように 600-800°C の高温測定温度範囲において、電圧 ± (30 V-100 V) の広い範囲で見るとオーミック特性が大きく崩れてくる。

結論的には基板表面のダイヤモンド結晶を破壊し熱処理することで導入した GLC 層がオーミック特性に大きく関係していると考えられる。

次に、Ar 注入 GLC 層電極がオーミックである電圧範囲を調べる。図 10 では 800°C の測定温度において大きく崩れた I-V 特性であったが、± 5 V の狭

い範囲に限れば、図 11 に示すように 800°C における電圧 ± 5 V の範囲では良好なオーミック特性を顕現していることが確認できた。

ダイヤモンド半導体においては、何故かキャリア濃度が増加する高温になればなるほどオーミック特性が得にくくなる。何故高温測定においてオーミック特性が崩れていくのかその詳細な機構は分からない。いずれにしろ、キャリアの多い高温領域で、オーミック特性が悪くなることが経験的にも今回の実験においても確認された。むしろ逆にキャリア濃度が非常に少ない 300°C のような低温領域の方が良好なオーミック特性を広い範囲な測定電圧において顕現している。

まとめると、本測定では 300-800°C という広範囲な温度領域では、Au 単層電極でも Ar 注入 GLC 層を含む 3 層電極でも ± (1 V-2V) の狭い測定電圧範囲で良好なオーミック特性が得られた。また、Ar 注入 GLC 層を含む 3 層電極構造においては 300-800°C の広範囲温度領域で、電圧 ± 5 V 程度の範囲までは良好なオーミック特性が得られることが確認できた。

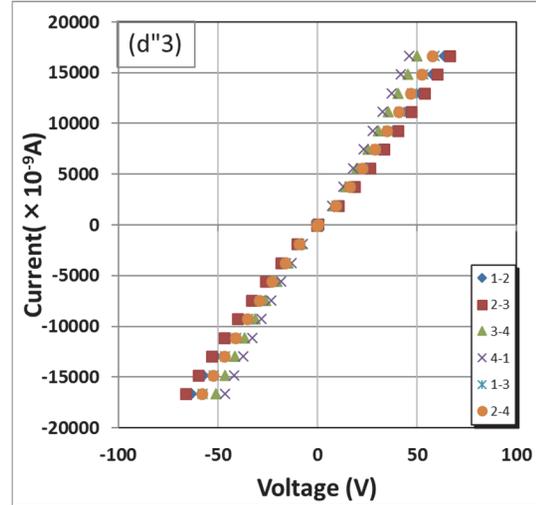
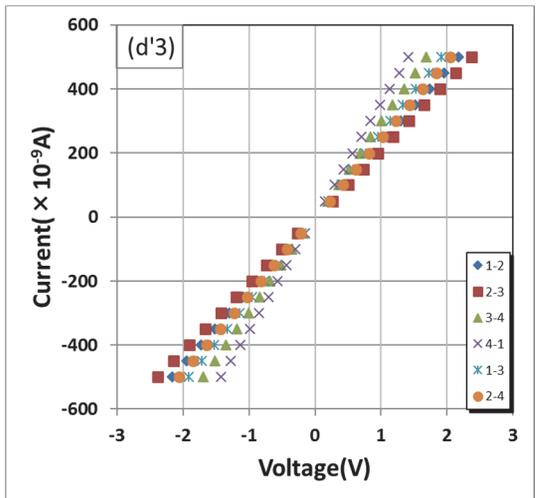
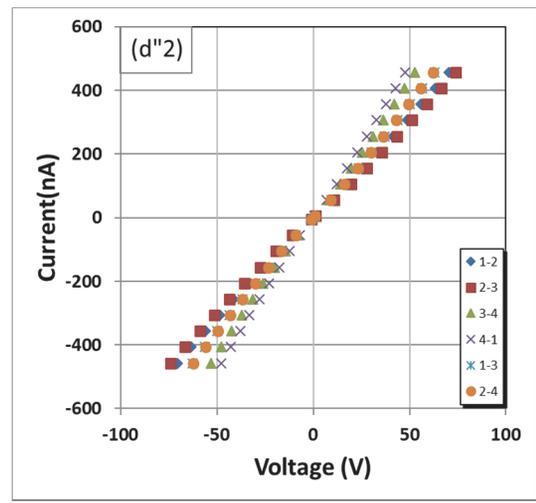
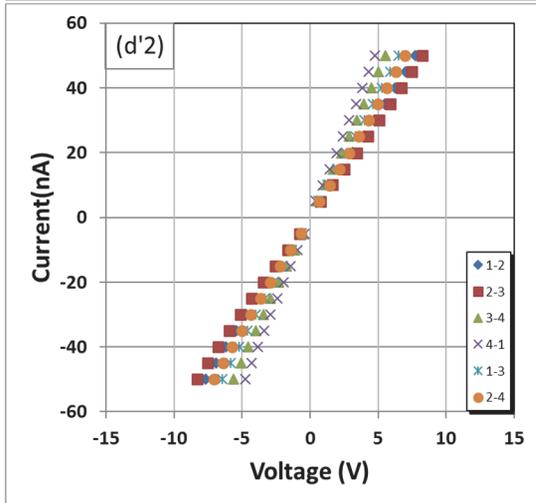
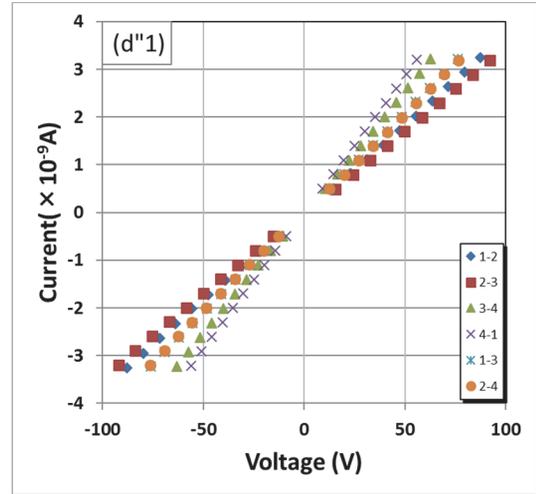
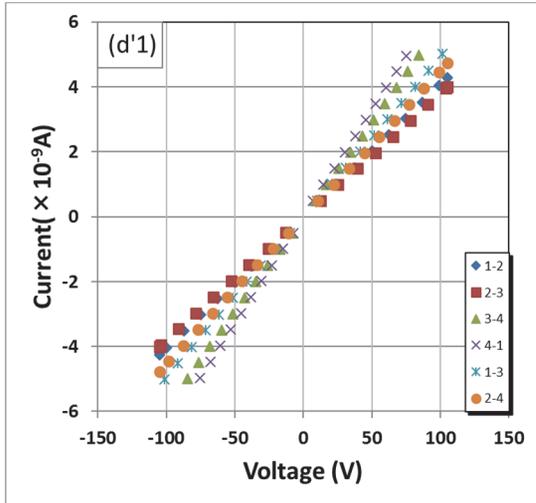
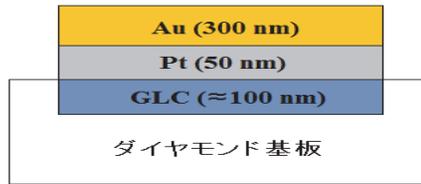
結論的には電圧 ± 5 V 程度の範囲では測定温度 300-800°C の範囲で良好なオーミック特性を得るのに Ti を全く含まない Ar 注入 GLC 層を含む 3 層電極構造で十分であることが確認できた。

まとめと今後の予定

300-800°C において、電圧 ± 5 V 以内の範囲でオーミック接触を得るには Ti は必要なく、Ar 注入のみで十分であることが分かった。また Ar 注入 GLC 層 3 層電極と Ti 注入 3 層電極で、測定電圧範囲内でオーミック特性に大きな差が無かったことから、オーミック特性に大きく寄与しているのは注入元素そのものではなく、イオン注入によりダイヤモンド基板に導入された GLC 層であることが分かった。

本研究の測定電圧 ± 5 V の範囲内ではどの Ti 注入電極構造と Ar 注入電極構造でもオーミック特性に大きな差が見られなかったが、± 100 V 程度の高電圧の範囲で比較したときには Ti イオン注入電極と Ar イオン注入電極でオーミック特性に差が出る可能性がある。そのために Ti 注入電極の高電圧範囲での I-V 特性を測定し、本研究で測定した Ar 注入電極の広い高電圧範囲での I-V 特性測定結果と比較すべきである。

また GLC 層がオーミック特性に大きく関わっていることが分かったため、GLC の元となる結晶欠陥の量つまり Dose 量を変えてオーミック特性がどのように変化するかも確認する必要がある。



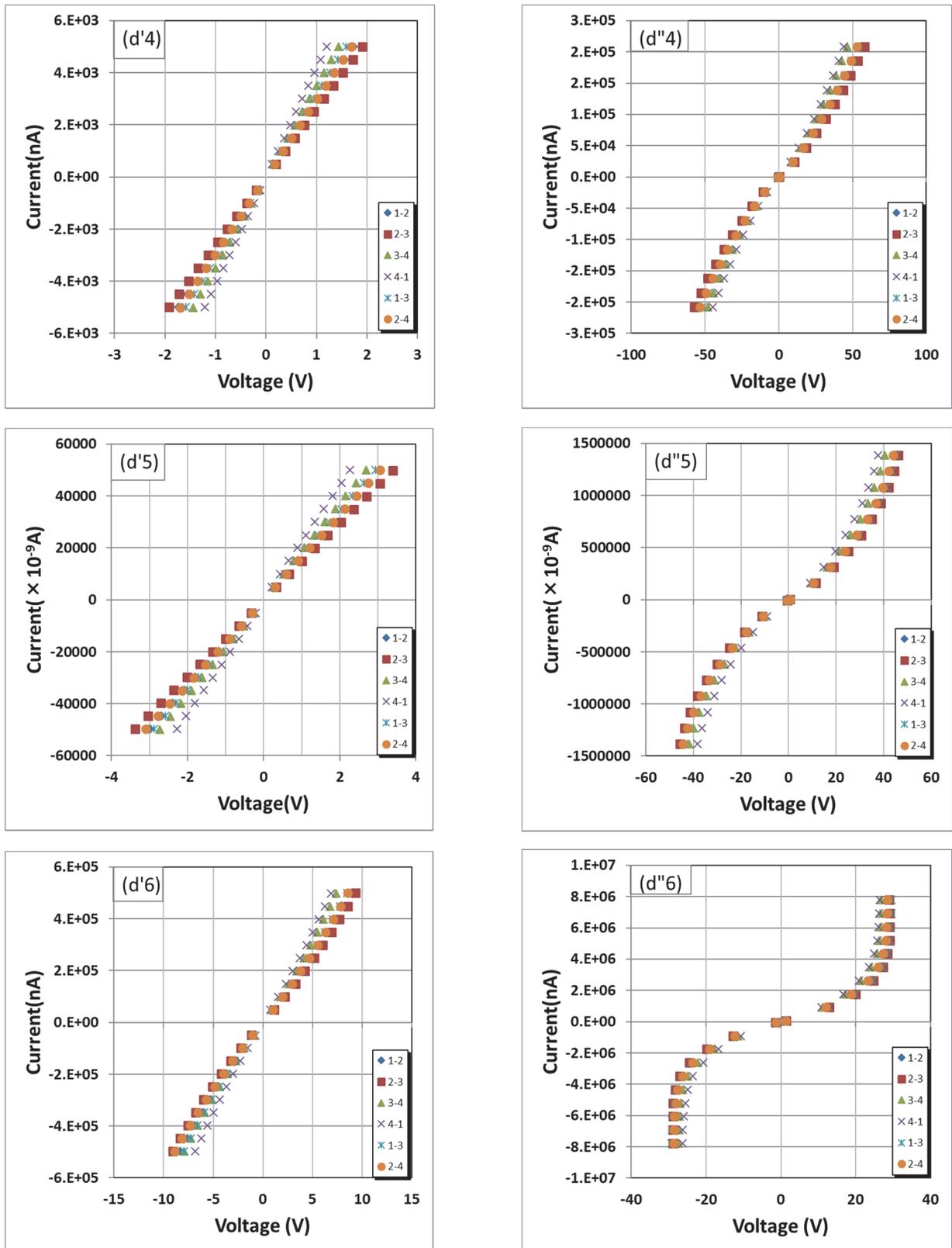


図 10. 未注入ダイヤモンド Ib 基板の I-V 特性. Ar 注入 GLC 層層を含む 3 層電極の狭い測定電圧範囲 (d') と広い測定電圧範囲 (d''). 1-6 は測定温度 300-800°C で 100°C 間隔に相当. 測定点の色分けは図 1 における電極番号間の I-V 測定に相当する.

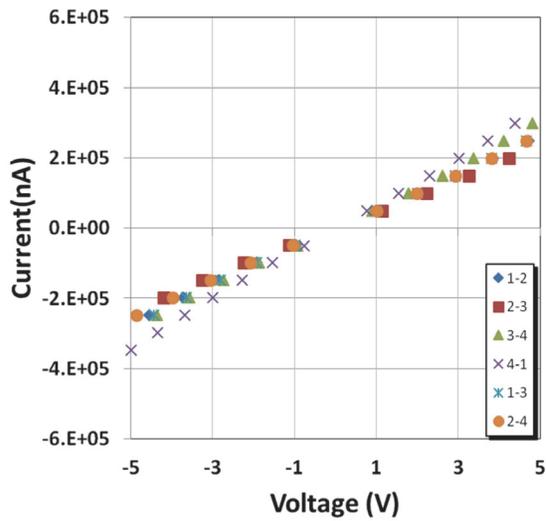


図 11. 800°C での Ar 注入電極の I-V 特性.

さらに Ar 注入 GLC 層電極でボンディングのために Pt を蒸着したが、ここで Pt 部分を他の安価な金属で代替できる可能性がある。あるいは Au の蒸着量を増やすことにより Pt の蒸着をしないで済む可能

性もある。今後検討すべき課題である。

謝辞

本研究は 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201702) を受けて行った。記して感謝する。

文献

- 1) 関 裕平, 星野 靖, 斎藤保直, 中田穰治 (2015) ダイヤモンド半導体のオーミック電極形成と, 高品質ダイヤモンドへの高温 B イオン注入による p 型ダイヤモンド半導体形成の研究. 神奈川大学院理学研究科情報科学専攻修士論文.
- 2) 中島定夫 (1993) 酸素イオン注入法により形成した埋め込み酸化膜を有する半導体基板の研究. *D.Tec. thesis, University of Toyohashi Institute of Technology and Science*. Japan.
- 3) Seki Y, Hoshino Y and Nakata J (2016) Investigation for acid cleaning effect on multi-metal-electrodes used for ohmic electronic property measurements of n-type diamond substrate. 第 17 回「イオンビームによる表面・界面解析」特別研究会予稿集. p. 9.

■原 著■ 2017年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

形式アシュランスケースのモジュール化事例 － SDBS の帰属および帰属決定プロセスについての アシュランスケースの研究 －

渡邊 宏^{1,4} 木下佳樹^{2,3} 武山 誠^{2,3}

A Case Study of Modular Design for Formal Assurance Case

Hiroshi Watanabe^{1,4}, Yoshiki Kinoshita^{2,3} and Makoto Takeyama^{2,3}

¹ Research Institute for Materials and Chemical Measurement, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba City, Ibaraki 305-8565, Japan.

² Department of Information Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan.

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

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: hiroshi-watanabe@aist.go.jp

Abstract: We present a case study of modular design for formal assurance case in Agda. The formal assurance case to be decomposed in our study claims the quality and reliability of data, and it was developed in previous work. In this study, we present the following: some requirements for modularization which is obtained from the analysis of both the code and domain of our case; decomposition criteria obtained from the analysis of the requirements. Moreover we give a concrete example of module decomposition of the case based on the criteria.

Keywords: formal assurance case, modular design, Agda, decomposition criteria

序論

モジュール化は、ソフトウェア工学における基本的な設計概念で、システム全体を管理しやすいサイズの小さな部品に分解して構成しようとするものである^{1,2)}。複雑化、大規模化するシステムを複数人で効率良く開発するため、システムの全体的な理解を促進するため、また、再利用性を高めるために用いられる。

アシュランスケースは安全性、セキュリティ、総合信頼性などについての、システムのアシュランス(システムへの信頼)の議論を明文化したものである。さらにこれを計算機で処理しやすいように形式言語で表現したものは形式アシュランスケースと呼ばれる。特にプログラムの形で形式アシュランスケースを記すことができることが知られている³⁾。モジュール化は、プログラムを対象として議論されることから始まったが、大規模、複雑なシステムでは、そのアシュランスの議論も大規模化、複雑化する傾向があり、アシュランスケースを対象とするモジュール化が課題となっている^{3,4)}。

本論文では、アシュランスケースをモジュール化するための一般論構築へ向け、具体的事例を題材にモジュール化に取り組み、アシュランスケースをモジュール化する基準を模索する。

我々は帰属評価結果の妥当性を主張する形式アシュランスケースの構築を試み、報告した⁵⁾。この形式アシュランスケースにはモジュール化がほとんどなされていない。本論文では、この形式アシュランスケースと同等な、しかしうまくモジュール化された形式アシュランスケースの構築を試み、次の観点からモジュール化を考察して、検討の結果を報告する。

- 題材およびその領域の必要事項を見極める、
- 題材の記述言語が提供するモジュールシステムを活用する。

最初の観点については、例えば次を考える必要がある。報告⁵⁾の形式アシュランスケースには、測定、評価されたデータの品質、信頼性を主張する議論が記述されている。アシュランス議論はデータを引用

して進められる。この領域では、データを別のデータへ取り換え同じアシュランス議論をする可能性、データを再利用して別の品質、信頼性に関するアシュランス議論をする可能性がある。モジュール化はこのような発展可能性に柔軟に対応できることが求められる。

また、報告⁵⁾で与えた形式アシュランスケースは Agda 言語によって、データ型やデータ型の値の定義の集まりとして記述されている。Agda 言語はモジュール化を支援する言語機構 (module, import など) を提供している。モジュールシステムを使い、形式アシュランスケースの中の型や値の定義をいかに、分類、分割して管理するかが課題である。

本論文の寄与は次の通りである：

- 題形式アシュランスケースのモジュール化の検討内容および基準を得た。また、形式アシュランスケースをモジュール化した具体例を得た。
- データの品質、信頼性を議論するアシュランスケースのモジュール化の具体例を与えた。
- アシュランスケースのモジュール化の一般論構築へ向けた具体的検討材料を与えた。

材料と方法

モジュール化と分解基準

ソフトウェアのモジュール化は、あらかじめ、運用時の保守、改修を容易にするため、将来の発展可能性を向上させるために行われる。

ソフトウェアエンジニアリングの教科書²⁾には、モジュール化で期待される効果として次があげられている：

- 全体を単純な部品に分解できること。
- 逆に単純な部品を組合わせて全体を構成できること。
- 各部品は単純で簡単に理解できること。さらに、個々の部品を理解すれば、全体のシステムを理解できること。
- 変更、修正にも柔軟に対応できること。一部分を修正しても、それがいくつかの部分的な部品たちの修正に留まり、大がかりな全体の修正にまでつながらないこと。

実際にモジュールを設計するには分解基準が参考になる。プログラムに対しては、すでに、さまざまな分解基準が提案されている。例えば、Parnas は文献¹⁾で例題システムを用いて主要手順、情報隠蔽の二つの分解基準を説明および提案している。しかし、アシュランスケースに対しては、モジュール化のための分解機構⁴⁾はあるが、具体的な基準はまだ検討の余地がある。

Agda のモジュールシステム

Agda 言語⁶⁾が提供するモジュールについて必要な部分を簡単に紹介する。

モジュール宣言

Agda のプログラムは型および関数などの定義からなる。Agda ではこれらをモジュールと呼ばれる部品に分割して管理する。例えば以下は、自然数を表す型の宣言 Nat と One が Nat 型の値 S O である事の宣言の二つからなるモジュール M0 の宣言である。

```
module M0 where
  data Nat : Set where
    O : Nat
    S : Nat → Nat
  One : Nat
  One = S O
```

モジュール内で定義された名前の参照

モジュールの中で定義された名前をモジュール名で修飾することによって、モジュールの外から参照することができる。例えば上記のモジュール M0 の外から One を参照するには

```
M0.One
```

とする。

パラメータ付きモジュール

モジュールには型や値のパラメータをつけることができる。例えば以下は型 T とその値 t をパラメータとして受け取り、f が T 型の値を全て t に写す関数である事の宣言を持つ付きモジュール M1 の宣言である。

```
module M1 (T : Set) (t : T) where
  f : T → T
  f x = t
```

モジュール M1 の外で M1.f を参照すると、これは T と t を仮引数とする関数を指す。従って例えば

```
M1.f (M0.Nat) (M0.O)
```

は型 M0.Nat → M0.Nat を持つ関数であり

```
M1.f (M0.Nat) (M0.O) (M0.S M0.O)
```

の値は M0.O である。

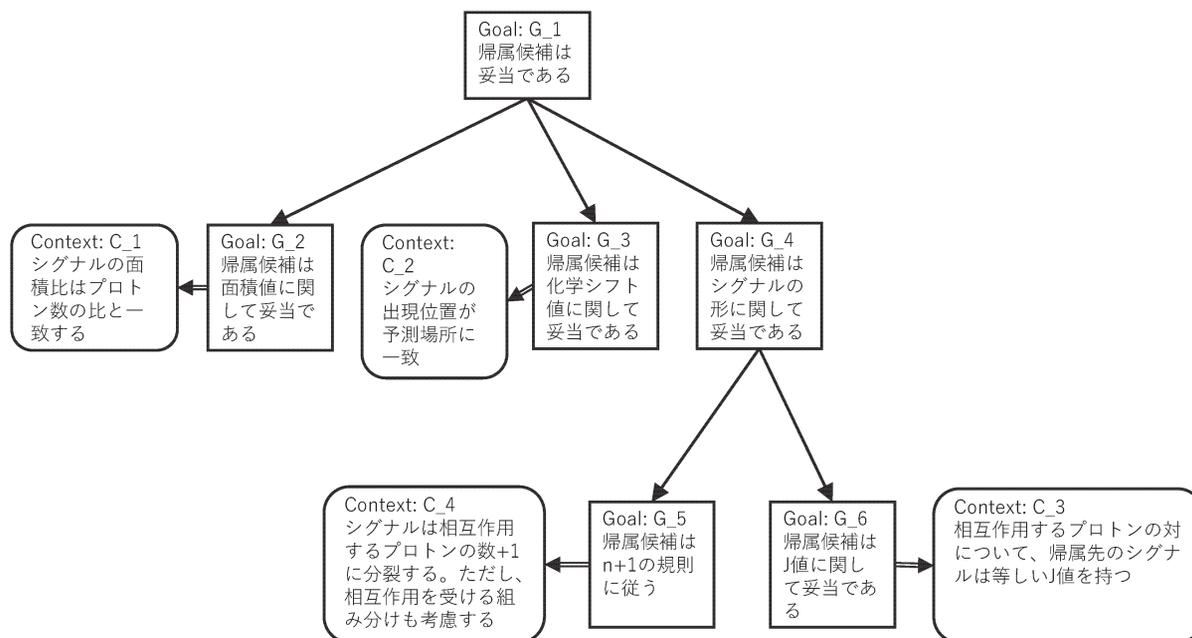


図 1. 題材の形式アシュランスケースの議論 (概略). 題材の形式アシュランスケースは, メタノールの 1H NMR スペクトルの帰属評価結果の妥当性を主張するアシュランスケースを形式化したものである. 測定サンプルの化合物の解析結果と測定データの解析結果の間の関係として与えられる帰属候補がそれぞれの解析結果に対して妥当であることを議論する. 詳細は報告⁵⁾を参照されたい.

モジュールを開く (open)

前節最後の式では Nat , S , O は全て M0 での定義を用いている。そこで、いちいち M0 で修飾するかわりに

open M0

としてモジュール M0 を「開く」と、その後では、 M0 で定義された名前を M0 で修飾することなく

$\text{M1.f}(\text{Nat}) (\text{O}) (\text{S O})$

などとして用いることができる。

形式アシュランスケース作成実験

データおよびプロセスの信頼性、品質を適切に伝えるための明文化する方法として、我々は形式アシュランスケースの適用可能性を検討している。

具体的には、産業技術総合研究所の有機化合物のスペクトルデータベース (SDBS)⁷⁾ が公開する「NMR スペクトルの帰属評価結果」を題材に、その妥当性を主張する議論をアシュランスケースおよび形式アシュランスケースで記述する実験を行ってきた^{5,8)}。

これまで、 ^1H NMR スペクトルの帰属評価結果データを題材に、GSN (Goal Structuring Notation) の記法で記述したアシュランスケース事例を得た⁸⁾。

さらに、そこで観察された課題を解決するため、

得られたアシュランスケースの形式化を行った。その結果、これまで次の二種類の形式アシュランスケース事例を得ている。

1. スペクトルデータの解析結果の妥当性を主張する議論。
 2. 帰属評価結果の妥当性を主張する議論。
- 両者のアシュランス議論は全く異なるが、引用するデータの部分など文脈に共通部分がある。このうち 2 について形式化のようすを報告した⁵⁾。

本論文では、これまで報告してきた 2 の形式アシュランスケースを題材にモジュール化を検討する。ただし、モジュール化の検討を進める上で、2 と共通する文脈を持つ 1 の形式アシュランスケースのことも考慮する必要がある。以下では、1 のような 2 と文脈を共有するが異なる議論を記述したアシュランスケースのこと指して、2 に関連するアシュランスケースと呼ぶ。

帰属評価結果の妥当性を主張する形式アシュランスケース⁵⁾

題材の形式アシュランスケースを紹介する。この形式アシュランスケースには図 1 の議論が記述されている。また、Agda のプログラムコードの全体構成は次のとおりである。(報告⁵⁾から引用)

1. 基本的な定義。
コード全体にわたり使用する基礎的な型および関数を準備した。例えば、真偽値型、自然数型、浮

動小数点型からリスト型、ベクトル型とそれらに付随する関数など。

2. 文脈の定義

アシュランスケースの文脈をまとめて表現した。

(ア) 解析結果データ、帰属候補

メタノールについての議論で用いる測定データ、解析結果データを導入した。

(イ) 専門家判断機構

専門家判断の案件を格納するための準備。

(ウ) 検査関数

ゴールの要件が成り立つことを判断するため、データの検査関数を実装した。

3. ゴール

アシュランスケースのゴールおよびサブゴールを準備した。

4. 証拠

専門家判断の事実と事由を導入する。

5. ストラテジー

6. アシュランスケースの議論

トップゴールの型の値を証明する。議論の木構造全体を表現する。

結果

検討内容

既存の形式アシュランスケースのプログラムコード、データの品質、信頼性の主張を明文化する領域の必要事項を解析した結果、以下の検討すべきモジュール化の要件を得た。

1. ゴールとストラテジー、ゴールと検査関数はそれぞれ結びつきが強く、分離しにくい。

(ア) ゴールとストラテジーはコード上分離できない場合がある。レコード型を用いてゴールの型を定義する場合、ストラテジーはメンバーで表現される。

(イ) ゴール（の構成子）と検査関数の定義を同時に修正しなければならない可能性がある。

2. データを導入する部分は二つに分かれる：個別のデータを格納するためのデータ型を定義する部分；データ型の値を実際に宣言してデータを導入する部分。

3. プログラム中の個々の定義は、個別の測定データに依存するものと全く依存しないものに分けられる。

4. データを取り換え、同じアシュランス議論をする必要がある。例えば、メタノールのスペクトルの帰属評価結果の妥当性の議論に換えて、エタノールのスペクトルの帰属評価結果について議論する。

5. 同じデータを使い、関連するアシュランス議論をする必要がある。例えば、メタノールの帰属評価結果でなく、同じメタノールのスペクトルデータの解析結果の妥当性を主張する議論をする。

6. 証拠の値はデータとゴールの両方に依存する。これは、値が、特定のデータがあるゴールを満足することを専門家が判断した事実に対応するため。以上の要件を検討して次の基準を得た。

モジュール化の基準

我々がとったモジュール化の基準は、形式アシュランスケースを図2の五つのモジュールに分解するものである。

各モジュールの内容と役割りは次のとおりである。

共通語彙モジュール

帰属評価結果の妥当性を主張するアシュランスケースおよび、関連するアシュランスケースに共通する文脈はここにまとめる。

個別のデータを格納する型はここで定義する。

ゴールおよびストラテジーモジュール

帰属評価結果の妥当性を主張するアシュランスケースの議論で使うゴール、ストラテジー、検査関数を定義する。

個別データを格納するために導入する型および引用する個別データの値をパラメータに指定できるパラメータ付きモジュールとして実現する。

結果的に、ゴール、ストラテジーとゴールが成り

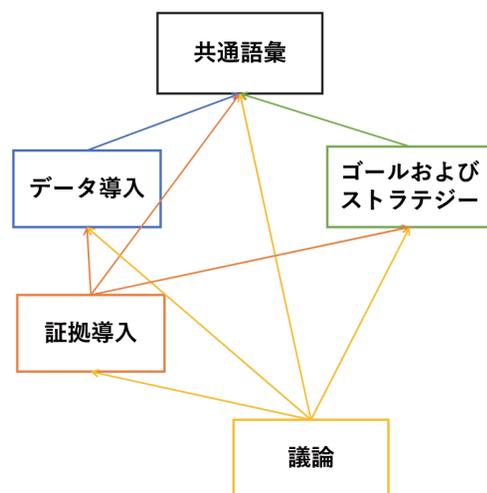


図2. モジュール分解とモジュール間の依存関係. 形式アシュランスケースを分解する五つのモジュールとモジュール間の依存関係を矢印で示したもの. 例えば、議論モジュールから共通語彙モジュールへの矢印は、議論モジュールの中で共通語彙モジュールを開くことを意味する。

立つ要件がここへ集約される。

関連するアシュランスケースのゴールおよびストラテジーは帰属評価結果の妥当性のゴールおよびストラテジーとは別のモジュールにまとめる。

データ導入モジュール

共通語彙モジュールに定義された個別のデータを格納する型の値をここで定義して測定データ、解析結果データなどを導入する。

証拠導入モジュール

専門家判断結果型の値を定義して証拠を仮定として導入する。導入する証拠が無い場合はモジュールを置かなくても良い。

このモジュールは、データ導入モジュールとゴールおよびストラテジーモジュールを開いて定義を利用する。

ゴールおよびストラテジーモジュールを開くさい、実際のデータをパラメータに指定する。

議論モジュール

議論の木を構築する。

ここでは上記すべてのモジュール開き、定義を利用する。

基準の説明

我々は、データに依存する部分と依存しない部分を分けて区別した。ここでデータに依存しない部分とは、共通語彙モジュール、ゴールおよびストラテジーモジュールである。依存しないのはそれ以外のモジュールである。

データに依存する部分はひとまとめにせず、データ導入モジュール、証拠導入モジュール、議論モジュールの三つに分離した。分離した理由は、議論と独立にデータ導入モジュールを設けてデータを再利用できるようにするためである。

データに依存しない部分である、共通語彙モジュールとゴールおよびストラテジーモジュールも同様にひとまとめにしないことにした。これは関連するアシュランスケースがあることを考慮したためである。

モジュール化の具体例

以下に、前節で述べたモジュール化の基準に従ってモジュール分解した結果を紹介する。ここで、五つのモジュールはそれぞれ別々のファイルに分解した。

共通語彙モジュールは次の項目から構成される。項目 2 以降が測定データおよび解析結果などを格納

するために準備する型定義である。

1. 基本的な型の準備
 - 1.1 量化記号、直和、maybe 型
 - 1.2 真偽値型
 - 1.3 自然数型
 - 1.4 記述説明データ型
 - 1.5 浮動小数点数型
 - 1.6 リスト型とベクトル型
 - 1.7 検査関数のひな形
2. ピークとシグナル
 - 2.1 ピーク
 - 2.2 シングレット
 - 2.3 マルチプレット
 - 2.4 シグナル
 - 2.5 シグナルの集まり
3. 測定化合物の解析結果型
4. 帰属候補型

ゴールおよびストラテジーモジュールは次の項目から構成される。最初に検査関数を定義して、次にそれらを利用してゴールおよびストラテジーを定義した。

1. 検査関数の定義
 - 1.1 専門家判断事実 - 型
 - 1.2 面積積分値の比較
 - 1.3 化学シフト値の比較
 - 1.4 結合定数の検査
2. ゴールおよびストラテジーの定義
 - 2.1 面積値について妥当
 - 2.2 化学シフト値について妥当
 - 2.3 N+1 の規則に従う
 - 2.4 結合定数について妥当
 - 2.5 シグナルの形状について妥当
 - 2.6 帰属候補は妥当

ゴールおよびストラテジーモジュールは次のプログラムコードのとおり、パラメータ付きモジュールとして宣言した。

```
open import 共通語彙
module ゴールおよびストラテジー (X : Set)
(DX : Peak-type X)
(signal-data : Signal-Data X DX)
(sample-data : Sample-Type)
(candidate
:Candidate-of-Assignment-Between
```

sample-data and signal-data) where

専門家判断事実の（構成子を持たない）型を共通語彙モジュールではなくこのモジュールの中で定義した理由は、専門家判断事実の値を導入できる場所をできるだけ制限するためである。ここで定義すれば、証拠の値はこのモジュールより上流に位置するモジュール、例えばデータ導入モジュールの中などでは定義できない。

データ導入モジュールは次の構成で与えた。

1. ピークデータ
2. シグナルデータ
3. 測定化合物の解析結果データ
4. 帰属候補データ

証拠導入モジュールおよび議論モジュールは単純なので構成を示すのは省略する。議論モジュールでは次のプログラムコードのように他の四つのモジュールを開いて、アシュランス議論を与える木を構成した。

```
open import 共通語彙
module 議論 where
  open import データ導入
  open import ゴールおよびストラテジー
Peak-n peak-d signal-d sample-d assign
open import 証拠導入
```

ここで、特にゴールとストラテジーモジュールは具体的なパラメータを指定していることに注意されたい。パラメータとして指定しているのはデータ導入モジュールで定義した値たちである。

討論

形式アシュランスケースの既存研究の実例を題材にモジュール化に取り組んだ。得られた検討内容および基準を報告した。さらに、実際にモジュール化した事例を報告した。

モジュール化の基準で述べたように、データ導入モジュールおよび証拠導入モジュールが独立してい

るのが我々のモジュール化の特徴である。そのため、データと証拠の部分を取り換えること、データを取り換えず別アシュランス議論を構築するなど、モジュール化を進める前と比べアシュランスケースが容易に再利用できるようになった。

本論文で報告したモジュール化の基準をもとに、一般的なアシュランスケースのモジュール分解基準へ発展させるのは今後の課題である。

謝辞

本研究は、研究課題「システムライフサイクルとそのアシュランス議論の Agda による定式化」に対する 2017 年度神奈川大学総合理学研究所の共同研究助成 (RIIS201703) を受けた。

文献

- 1) Parnas DL (1972) On the criteria to be used in decomposing systems into modules. *Commun. ACM* 15. 12: 1053-1058. [DOI=<http://dx.doi.org/10.1145/361598.361623>].
- 2) Ghezzi C, Jazayeri M and Mandrioli D (2002) *Fundamentals of Software Engineering (2nd ed.)*. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, NJ, USA.
- 3) 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 and Anderson T, eds., CreateSpace Independent Publishing Platform, Bristol. pp. 205-230.
- 4) The Assurance Case Working Group (ACWG) (2018) *Goal Structuring Notation Community Standard. Version 2*. SCSC - The Safety-Critical System Club, UK. [<https://scsc.uk/r141B:1>].
- 5) 渡邊 宏, 木下佳樹, 武山 誠, 奥野康二 (2017) 形式アシュランスケース事例: メタノール ¹H NMR 帰属評価結果の妥当性 — SDBS の帰属および帰属決定プロセスについてのアシュランスケースの研究 —. *Sci. J. Kanagawa Univ.* 28: 37-45.
- 6) The Agda Team, Agda Documentation. [<http://agda.readthedocs.org/>].
- 7) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 有機化合物のスペクトルデータベース (SDBS). [<https://sdb.db.aist.go.jp>].
- 8) 渡邊 宏, 木下佳樹, 武山 誠, 奥野康二 (2016) SDBS の帰属および帰属決定プロセスについてのアシュランスケースの研究. *Sci. J. Kanagawa Univ.* 27: 29-38. [<http://hdl.handle.net/10487/14213>].

■原 著■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

記述式設問に対する自動採点モデルの試案

永松礼夫^{1,2} 後藤智範¹

Proposal of Model for Automated Marking Techniques for Description Type of Examination

Leo Nagamatsu^{1,2} and Tomonori Gotoh¹

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: lnag@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: After AY2020, the new "national center test for university admissions" will start. Description-type questions that are not included in the current national center test are newly introduced. The marking process for description type problems -- evaluating scores for each answer script -- is modeled as the semantic similarity of answer sentences to the correct answer sentences. It can be handled within a framework of natural language analysis. In this paper, based on natural language analysis, we proposed a basic model and a prototype method for automated marking. We also discussed some problems regarding the actual implementation of this method.

Keywords: automatic exam marking, description type of examination, Japanese morpheme analysis, thesauri, knowledge base, dependency analysis, domain knowledge

序論

現在の形式での大学入試センター試験は 2019 年度 (2020 年 1 月) の実施を最後に廃止され、2020 年度からは新形式の「大学入学共通テスト」の実施に移行され、これに伴って記述式問題が導入される予定であり¹⁾、2017 年秋には試行調査が行われた²⁾。一方、神奈川県では県立高校の入学試験で、2016 年度から記述式問題が導入されている³⁾。

記述式問題の採点は、マークシート方式とは異なり機械的採点は困難と認識され、上記の試験では、人手による採点を実施されている。人手による採点は、マークシート方式・コンピュータによる採点と比較し以下に挙げる問題がある。

(1) 採点時間 (2) コスト

(1) については、センター試験、予備校の試験などは、特定期間内に受験者の得点を公表する必要があり、受験者数によっては多数の採点者を必要とされる。また、採点者の負担が大きくなる問題も発生しうる。結果的に人件費・コストが増加する(2)。したがって記述式設問に対してもコンピュータによる採点が期待される。

本研究は、正解文の長が 40 ~ 100 字に限定した

記述式問題について自動採点を意図したモデルおよび手法を提案し、その問題点を検討する。

設問の種類とその特徴

設問形式の種類

試験問題において設問・問いの形式としては、以下の代表的な 3 種類が挙げられる。

(1) 選択式、(2) 記入式 (穴埋め式)、(3) 記述式

(1) 選択式

問題文に続いて与えられた選択肢の中から解答を選ぶ方式である。大学入試センター試験の大半の設問では選択肢の数とした五つ程度をこの方式が採用されている。受験者の解答パターンは出題者の想定したものに限られ、パターン数は有限個なので採点の自動化は容易である。

(2) 記入式 (穴埋め式)

文章の一部が空欄になった設問について、それを埋める語 (または値) を答える方式である。正解とされた単語の一致を見るだけなので (表記のゆれを除けば) 容易に自動採点できる。類似形式として複数の単語からなる句や数式を答えさせるものもある。

(3) 記述式

文あるいは文章を答えさせるものである。想定する文字数が少ないもの（文の数が1または2程度で、100文字程度までのもの）と長いもの（文の数が多く、想定文字数も多い）がある。採点を容易にするため文字数制限を課すことが多い。また、設問で何を問うかの方向性として以下の3項目が挙げられる。

(a) 知識、(b) 思考力、(c) 表現力

(a) 知識を問う：複数の単語（教科書にあるようなキーワード）の関係性を記述した文を書かせて、事実関係の連関を理解しているかを問うような使い方。例えば「黒船の来航を契機に幕府は開港を決めた」のような文を想定する。採点の自動化の立場からは必要なキーワードが含まれていて適切に関係づけられているかを判定すれば可能と思われる。

(b) 思考力を問う：受験者に推論の過程を示したような解答を要求するもの。採点のためには複数の文の接続として論理が整合して述べられているかの判定が必要となる。

(c) 表現力の評価：文科省／大学入試センターによる「表現力」の位置づけは、「知識・技能」と対比する「思考力・判断力・表現力」の一部とされ、単体での定義は明確ではない。「思考力・判断力・表現力を問う条件付記述式問題について」⁴⁾の「表現力」の項目では「目的に応じた文章の構成や展開を工夫し、論拠に基づいて自分の考えを文章にまとめる」とされている。試験問題の立場からは、解答文を作りあげる力であり国語科の採点項目であるが、他教科では「内容が適切に表現されている」ことを採点で考慮するのみでよいと考えられる。

記述式設問において、字数制限だけでは正解と同じ、もしくは類似の意味の文が多数発生し、正解／不正解の判別を困難にする。これを軽減する手段として、解答文に含まれるべき単語や句を指定、または設問文中に記載し、それらの並べ替えで文章を作成させる設問形態もある。「情報を SNS に発信」という例では、制限がなければ、「発信」の言い換えとして、「投稿」、「送信」、「アップロード」などとした答案があり得るが、使える単語群に「投稿」のみを設定すれば解答例を少なくできる。

設問形式の特徴

設問形式の種類で挙げた3種類の設問形式毎の比較表を表1に示し、比較項目について以下に説明する。解答パターン数：正答・誤答を含めて提出される答案が何通りあるかを示す。

正解の数：正答とされる答案が何通りあるかを示す。

正解判定：正解か／否かを判定する際に行う処理内

容である。

採点の公平性：人間の複数の採点者の間で評点に差が出る可能性があるかを示す。

自動化：機械的採点が可能かを示す。

部分点：採点結果が正解・不正解の二値でなく、数段階の部分点に分けた点数付与にできるかを示す。

表 1. 設問形式の特徴

	選択	記入	記述
解答パターン数	1	少数	多
正解の数	1	1+ α	多い*
正解／不正解の判定	一意	一意+言換え	複数条件で判定
採点の公平性の担保	可	可	ゆらぎ大
自動化	可	可	難
部分店の可能性	no	no	あり

* 正解と意味的に等価な言換えが多数発生する。

記述式設問では、人間（採点者）の関与が必要となる。例えば、試行調査の国語・記述式の「正答の条件」⁵⁾では、『○○○○』ということが書かれている」といった項目が複数設定され、それらを満たしているかで判定する方式である。客観的にこの判断を行うのは困難なので、公正性を保つには一つの答案に複数の採点者がつくことが望ましい。

方法
類似度に基づく評価

設問形式の特徴で述べたように、一般的には記述式設問に対する解答は、1つ以上の文で表現されるが、問題を単純化するために正解文および解答文について以下の2つの条件を満たす記述式設問を想定する。

(a) 文字数：40～100字、(b) 文数：1

文は構成単語、およびこれらの構文構造で規定される特定の意味を有する。一方、特定の意味を表現する文は唯一ではない。ある特定の文を構成する個々の単語について、同義語が存在しない文を想定することは現実的でないからである。このため他の形式の設問と異なり、記述式設問において、解答の評価を正解と完全に一致するか否かとすることは不適切である。記述式設問の解答の評価は以下のように定義することが妥当と考えられる。

$$\text{正解文に対する解答文の類似度} = [0, 1] \cdot \cdot (1)$$

解答文が正解文と意味的に完全に一致していれば1、そうでなければ類似の程度に応じて0までの値となる。左記の定義に従えば、ある記述式設問の配点を p とし、解答文の実際の評点を p' とすると、(1)式からは次式のように定義することができる。

$$0 \leq p' \leq p \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot (2)$$

以下では、個々の得点 p' を何に基づいて、どのような方法で決定するかについて述べる。

採点モデル

考え方

一般に、記述式設問の正解文には当該問題において「重要な概念を表す語・句」を複数含んでいる。この「重要な概念を表す語・句」は、問題作成者が解答文に含まれてほしいと期待する語・句であり、ここでは、「評価対象表現」とよぶことにする。一般に、記述式設問では正解文中に含まれる、言い換えれば、正解文を構成する評価対象表現の数は、指定された字数の長さに応じて増加すると言える。例えば、指定された文字数が20字前後の場合は、正解文中の語数が数語となるので、評価対象表現は単語となる場合が多く、また50字以上では、動詞を含む句となる場合もありうる。

記述式設問の構成要素を以下のように定義する。

Sr : 正解文、 Sa : 解答文

e : 評価対象表現、 e' : 対応表現、 w : 語

k : 正解文中の評価対象表現の数

h : 解答文中の対応表現の数

正解文は w, e の並び、解答文は w, e' の並びとして以下のように表せる。

$Sr: w e_1 w \cdots w e_2 w \cdots w e_i w \cdots w e_k w$

$Sa: w \cdots e'_1 w \cdots e'_2 w \cdots e'_i w \cdots e'_h w$

$1 \leq i \leq k, 1 \leq j \leq h, h \leq k$

上式において、 i, j はそれぞれ出現順序を表すもので、例えば e_2 と e'_2 が対応しているわけではない。というのは、日本語文では、ヲ格、ニ格、副詞句などは、語順は任意であるからである。

設問形式の特徴で述べたように、記述式設問に対する解答に対しては部分点を与えることが一般的である。上記の考え方に従えば、部分点付与の基準、具体的には解答文中のどの表現に対して部分点をどのくらい付与するかは、概ね次の観点からとなる。

- (a) 正解文中の特定の評価対象表現に対応する解答文に含まれる表現の個数
- (b) 特定の評価対象表現に対応する解答文中の表現の意味的な類似の度合い

採点計算モデル

通常記述式設問では正解文中の個々の評価対象表現はそれぞれ部分点が設定される。これと解答文中の対応する表現の部分点を以下のように表す。

se : 評価対象表現(e)の部分点

se' : 対応表現(e')の部分点

正解文に対する解答文の類似度は、解答文中の対応表現の部分点の総和(s_a)として次式で定義することができる。

$$\sum_{j=1}^h se'_j = s_a \leq p \quad \cdots \cdots \cdots (3)$$

採点手法

解答文の評点は、(3)に示されるように部分点(se'_j)の総和となる。したがって、部分点(se'_j)をどのような方法で決定するかが問題となる。以下の段階を経て決定する。

- (1) 正解文中の評価対象表現の設定
- (2) 解答文に対する形態素一構文解析
- (3) 評価対象表現と対応表現の探索・照合

以下の説明文を読み、設問に答えなさい(10点)。

説明文

2017年5月に、改正個人情報保護法が施行された。この改正では個人情報とされるものの範囲が大きく拡大されている。第二条では、氏名・生年月日等の項目に加え、識別符号等の項目が追加された。

1) その情報に含まれる氏名、生年月日その他の記述などによって、特定の個人を識別できるもの(他の情報と容易に照合でき、それにより特定の個人を識別できるものを含む)

2) 個人識別符号が含まれるもの(特定の個人の身体的特徴を変換した文字、番号、記号などや、カードや書類で個人に割り当てられた文字、番号、記号などで、特定の個人を識別できるものを含む)

二番目の項目で、新たに「個人識別符号」が定義されている。具体的には、指紋データや顔認証データ、虹彩、声紋、DNAのような個人の身体的特徴を変換した文字、番号、記号などや、パスポート番号や運転免許証番号、住民票コード、基礎年金番号、保険証番号のような個人に割り当てられた文字、番号、記号なども個人情報に該当することとなった。

他にも、マイナンバー、各種カード番号、端末ID、アカウントIDなども該当すると考えられ、これらは慎重に扱うべき情報とされ、本人の承諾なく公開することなどには問題がある。

設問

「財布を拾ったので、持ち主を探すため、財布の中に入っていたクレジットカードの番号と拾った状況をSNSで公開して情報提供を求めた」ことが問題となる理由を60文字以内で書きなさい。

図1. 記述式設問の実例。

(4) 得点計算

上記の過程について、図 3.1 に示す高校教科「情報」分野の記述式設問を具体例として以下で上記の処理手続きを説明する。

評価対象表現の設定

正解文を構成する個々の語句に対し、評価対象表現を決定し、それぞれについて部分点を設定する。図 1 に示す記述式設問の正解例を以下に挙げる。

正解文 [44 字]:

クレジットカード番号は個人情報に相当し、
所有者の許可なくそれを公開しているので
問題である。

下線が引かれた語句を評価対象表現とする。この正解文には 4 か所あり、 $p=10$ とし、それぞれの部分点 (se_i) を以下に示す。

- e_1 クレジットカード番号 3 (se_1)
- e_2 個人情報 2 (se_2)
- e_3 所有者の許可なく 3 (se_3)
- e_4 公開している 2 (se_4)

形態素－構文解析

正解文の評価対象表現のうち、 e_1 、 e_2 においては例えば以下に挙げる同義表現がある。

- 同義表現 (e_1): クレジットカードの番号
- 同義表現 (e_2): 個人の情報、個人に関わる情報
プライバシー情報

上の例は、いずれも単語、複合語およびこれらから構成される名詞句である。一方、 e_3 、 e_4 では、前者は動詞（「許可」、動詞としてのサ変名詞）を含み、後者は動詞そのものであるため、同義の様々な活用形態の表現がありうる。したがって、次の (3) 評価対象表現と対応表現の照合の精度を高めるために、正解文、解答文の両者の構成単語と構文構造を明確にする必要があり、以下の解析を行う。

(1) 形態素解析 → (2) 係り受け -- 表層格解析

形態素解析

図 2 に正解文に対する形態素解析の結果（分かち書きされた文）および係り受け解析－表層格解析の結果を示す。

形態素解析では名詞性要素に対しチャンキングを行い、さらに、元の単語とチャンキングによって得られた複合語の対応情報を保持する必要がある。例えば、上記の例では以下となる
「クレジットカード」「番号」→「クレジットカード番号」「個人」「情報」-「個人情報」

この操作により、例えば解答文に「クレジットカ

ードの番号」という句が含まれていても、 e_1 に対応する表現と同定することができる。

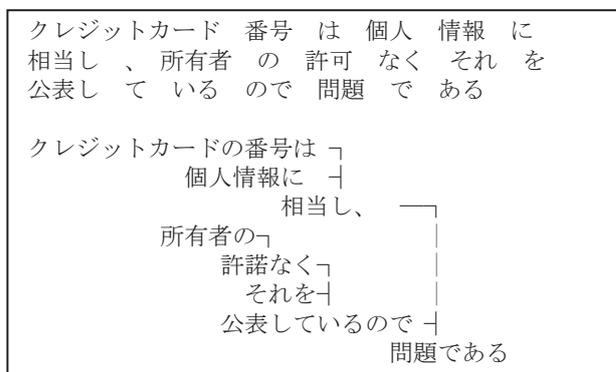


図 2. 正解文の解析結果の実例。

係り受け -- 表層格解析

図 2 の係り受け - 表各解析結果において、図中の「-」の前方の語が係り元、下方の語が係り先、イタリック体は述部、ゴチック体は連用修飾する助詞、アンダーラインは名詞性要素を示している（以下の解析結果の実例も同様の表記）。

表層格解析の結果として、述語とその格要素、および副詞句が決定され、各格要素内の語（句）- 名詞性要素が決定する。具体的には、以下のとおりである。

- 動詞：相当する
- 格要素 八：クレジットカード番号
- 二：個人情報

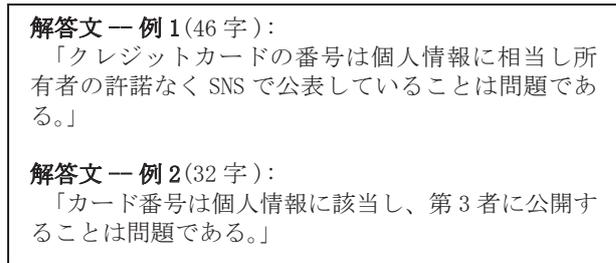


図 3. 解答文の実例。

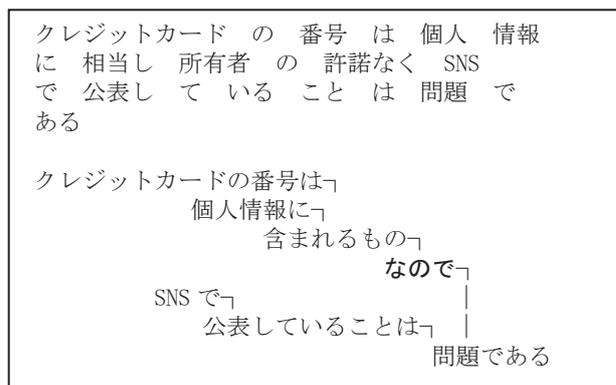


図 4. 解答文 -- 例 1 の解析結果の実例。

解答文の例として、図 3.3 に解答文 - 例 1、解答文 - 例 2 を挙げる。上記解析は、解答文に対しても同様の処理を実施する。

図 4 に、解答文 - 例 1 の形態素解析、係り受け - 表層格解析の結果を示す。

評価対象表現と対応表現の照合

この処理では、正解文および解答文に対する自然言語解析の結果に基づき、それらを照合することで、前者の評価対象表現 (e) に対し、対応表現 (e') 探索し照合する過程である。

解答文には「クレジットカードの番号」という表現があるが、(1) における処理単語 - 複合語の対応から、正解文の「クレジットカード番号」の同義表現であると認定される。また、解答文中には語として、言い換えれば終端記号として「許可」、「公開」は無いが、それぞれの同義語である「許諾」、「公表」が用いられている。以上から、正解文および解答文 - 例 1 について、評価対象表現 (e_i) とその対応表現 (e') は以下のようになる。

評価対象表現 (e)	対応表現 (e')[解答文-例 1]
1 クレジットカード番号	クレジットカードの番号
2 個人情報	個人情報
3 所有者の許可なく	所有者の許諾なく
4 公開している	公表している

図 2 の解答文 - 例 2 では、評価対象表現 (e_i) とその対応表現 (e') は以下のようになる。

評価対象表現 (e)	対応表現 (e')[解答文-例 2]
1 クレジットカード番号	カード番号
2 個人情報	個人情報
3 所有者の許可なく	
4 公開している	公開する

得点計算

この処理では、前項で説明した (3) の結果に基づき、次の 2 つの段階を経て得点計算をする。

(a) 部分点の算出：個々対応表現 (se' j) の評価

(b) 部分点の総和

解答文 - 例 1 では、4 つの評価対象表現に対し同数の対応表現があり、いずれも同義表現であるため、上記の (a) 段階では、全ての対応表現について事前に設定された s_i 部分点が付与される。

$$s_i = se'_j \quad (1 \leq i, j \leq 4 = h)$$

したがって、(b) は以下となる。

$$\sum_{j=1}^4 se'_j = 3 + 2 + 3 + 2 = 10 = p$$

解答文 - 例 2 では、(a) において「カード番号」が「ク

レジットカード番号」と同義とはみなされず、se' 1 = 2 と仮定すれば、se' 3 = 0 であるので、(b) は以下となる。

$$\sum_{j=1}^4 se'_j = 2 + 2 + 0 + 2 = 6$$

採点手法の性能評価

自動採点手法の性能評価は、これを実装した自動採点プログラムが出力した得点と、人間の採点とがどの程度乖離しているか、乖離の度合いということになる。ある 1 つの記述式設問に対して、n 人の受験者 (解答数 = n) について、採点者の得点を sh、自動採点プログラムの得点を sc としたとき、全受験者間について両者間での相違の平均を d とすると、d は以下の式で与えられる。

$$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |sh_i - sc_i| = d \cdot \dots \cdot (4)$$

上式において、d が 0 に近づくほど人間の採点との一致度合いが高くなる。試験という公正性を最重要課題とする状況では、そうする必要はある。

討論

採点計算モデルの拡張

設問形式の種類で述べたように記述式設問では、受験者の能力の評価項目として (a) 知識、(b) 思考力、(c) 表現力を挙げている。当該設問の属する科目、また作成者の意図によってはこれらの評価項目の比重は異なってくる。例えば図 1 の設問の解答文 - 例 3 として、以下を仮定する。

「クレジットカード番号はこじんじょうほうに相当し、しょゆうしゃのきよかなく公開しているので問題である。」

採点手法で述べた採点方法では、解答文 - 例 3 の得点 p = 10 となる。表現力を考慮した場合、p = 10 は不適当であろう。したがって、採点計算モデルとして (3) 式を拡張し以下の式 (5) を導入する。

$$\sum_{j=1}^h se'_j + C = s_a \leq p \quad \dots \dots (5)$$

上式で C は 評価対象表現以外の採点上考慮すべき項目の値で、試験個別に設定する値である。

同義表現の問題

採点手法の性能評価の (4) で d が大きくなる要因として、同義表現の問題が挙げられる。これは次の 2 項目が挙げられる。

(a) 個々の評価対象表現 (se_i) の同義表現の数

(b) 正解文に含まれる評価対象表現の数 (k)

(a) については、1つの評価対象表現 (se_i) について、語、句レベルで様々な同義表現が用いられる。同義表現の個数は、それぞれの評価対象表現によって異なる。同義表現の個数が多いほど、採点手法で述べた (3) の処理、すなわち解答文中の対応表現を同定することが困難となり、採点者が認識した対応表現の数 h よりも小さくなる。

(b) は指定された文字数と関連する問題である。文字数が長いほど構成単語数が多くなり、評価対象表現数 (k) が増加する。 k が増加すると、(a) の問題が累積し、(4) で d の増加をもたらす。上記問題の軽減手段としては、次の2つが考えられる。

(1) 文字数以外の制約、(2) 同義表現の収集

解答文に対する制約

長さ以外の制約条件として以下が挙げられる。

(a) 文の構成要素 (b) 文の構文

(a) としては、表 2.1 の記述式設問の説明で述べたように、解答文中に使用すべき語・句を、具体的に例示することである。(b) としては、以下の制約が挙げられる。

- ・ 文の構文の規定 (例: 「・・・の理由を述べよ」)
- ・ 文頭または、文末表現の規定

同義表現の収集

同義表現の収集のアプローチとして次の2つが挙げられる。

(1) 当該問題に限定 (2) 当該科目全般

(1) は、個別の記述式設問毎に評価対象表現 (se_i) の同義表現を収集するというものである。したがって、試験毎に毎回収集する必要がある。(2) は、記述式設問の科目について、学ぶべき概念を中心に、同義語を収集するというアプローチである。科目についてある種のシソーラスを構築すると考えてよい。シソーラスに含まれる用語が網羅的であれば、採点者の有する知識に近づき、採点計算モデルの拡張で述べた問題の減少をもたらす。また、記述式設問作成で (1) の作業の支援としても有用である。

同義語の収集方法

特定科目の教科書/参考書で説明される用語、および一般的な用語についての同義語を収集する方法としては以下が挙げられる。

(1) 既存の言語資源の利用

(2) 当該科目のコーパスに対する自然言語解析

(1) としては、電子媒体の辞書 (EDR 電子辞書等)、

類語辞典 (分類語彙表等)、シソーラス (JST 科学技術用語シソーラス等) が利用できる。

(1) では、語 (単語、複合語) 形態のいわゆる同義語は収集可能であるが、句レベル、言い換えれば<名詞 (句)、動詞> の対としての同義表現を得ることは困難である。(2) として、当該科目について電子媒体の教科書・参考書を対象に、形態素一構文解析で述べた手法を適用する必要がある。この作業としては、自然言語研究で使用されているオープンソースの形態素解析エンジン MeCab⁶⁾、日本語係り受け解析器 CaboCha⁷⁾ 等の解析ツールが利用できる。

自動採点システムの運用

はじめにで挙げた記述式設問では、採点に際し複数名による採点が行われている。採点手法の性能評価で説明した (4) 式において、 sh を採点者 A による得点 sA 、 sc を採点者 B による得点 sB に置き換えれば、 d は両採点者間の相違を示すことを意味する。採点者間の相違について、例えば $d < 0.1$ とならないと、当該問題に対して公正性の問題が生じ、採点が無効となる可能性が生ずる。記述式設問に対し自動採点システムを導入するためには、上記の条件を満たしていることを前提とすることが妥当と考えられる。

終わりに

今後の課題として以下が挙げられる。

(a) 正解文の別解・多義表現の研究

(b) 本モデルに基づく実証研究

(a) については、記述式設問の設問形式上の最大の問題は、別解・多義表現が多数出現し、採点者間に差異が生じることである。自然言語解析の観点からの実証的な研究が必要である。

(b) については、本稿はモデル提示に留まったが、具体的な問題・設問を作成し、数十名程度の学生に対して実施し当モデルによる実証実験が求められる。

謝辞

本研究は 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「短い記述式解答の自動採点に向けた日本語文解析手法の検討」(RIIS201705) を受けて行った。記して感謝する。

文献

- 1) 大学入試センター (2017) 大学入学共通テスト実施に向けた検討状況. [http://www.dnc.ac.jp/daigaku-nyugakukibousyagakuryokuhyoka_test/progress.html].
- 2) 大学入試センター (2017) 大学入学共通テスト・平成 29 年度試行調査・問題、正解表、解答用紙等.

- [http://www.dnc.ac.jp/daigakunyugakukibousyagakuryokuhyoka_test/pre-test_h29_01.html].
- 3) 神奈川県教育委員会 (2016) 県立高等学校入学者選抜調査改善委員会中間とりまとめ検討資料. [<http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/826441.pdf>].
 - 4) 文部科学省 (2015) 思考力・判断力・表現力を問う条件付記述式問題について (たたき台). 高大接続システム改革会議 (第9回) 配付資料, 別紙 2-2, 2015年12月22日. [http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/chousa/shougai/033/shiryo/_icsFiles/afieldfile/2015/12/22/1365554_04_1.pdf].
 - 5) 大学入試センター (2017) 大学入学共通テスト・平成29年度試行調査: 国語・正答例および正答の条件. [http://www.dnc.ac.jp/albums/abm.php?f=abm00011249.pdf&n=01_%E5%9B%BD%E8%AA%9E.pdf].
 - 6) Kudo T (2006) MeCab: Yet Another Part-of-Speech and Morphological Analyzer. [<http://taku910.github.io/mecab/>].
 - 7) Kudo T (2005) CaboCha/ 南瓜: Yet Another Japanese Dependency Structure Analyzer. [<http://taku910.github.io/cabochoa/>].

■原 著■ 2017年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

Open-Dawson 型ポリオキシメタレートの構造異性体

野宮健司^{1,2,3} 井上雄介¹ 三原航平¹ 宮前枝里子¹ 新井裕喜¹
力石紀子^{1,2} 松永 諭^{1,2}

Geometrical Isomer of Open-Dawson Polyoxometalate

Kenji Nomiya^{1,2,3}, Yusuke Inoue¹, Kohei Mihara¹, Eriko Miyamae¹, Yuki Arai¹,
Noriko Chikaraishi Kasuga^{1,2} and Satoshi Matsunaga^{1,2}

¹ Department of Chemistry, 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 To whom correspondence should be addressed. E-mail: nomiyk01@jindai.jp

Abstract: By the reaction of β -Keggin-type polyoxometalate (POM), $[A-\beta\text{-SiW}_9\text{O}_{34}]^{10-}$ with Fe^{3+} at pH 3, the β, β -isomer of open-Dawson POM containing the tetra-iron(III) cluster $[\{\text{Fe}_4(\text{OH})_2(\text{OH})_6\}(\beta, \beta\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})]^{9-}$ ($\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$) was successfully synthesized as potassium salt and the molecular structure was determined. It was unequivocally characterized by complete elemental analysis, thermogravimetric and differential thermal analysis (TG/DTA), FTIR and UV-vis absorption spectroscopy, cyclic voltammetry, and X-ray crystallography. X-ray crystallography revealed that the $\{\text{Fe}_4(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})_5\}^{7+}$ cluster ion was embedded in the open pocket moiety of the β, β -type open-Dawson POM $[\beta, \beta\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66}]^{16-}$ formed by the fusion of two tri-lacunary β -Keggin POMs, $[A-\beta\text{-SiW}_9\text{O}_{34}]^{10-}$, via two W-O-W bonds. The β, β -open-Dawson POM corresponds to an opened structure of the usual γ -Dawson POM. $\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$ is the first example of the geometrical isomer of the previously reported α, α -open-Dawson POM containing the tetra-iron(III) cluster $[\{\text{Fe}_4(\text{OH})_6\}(\alpha, \alpha\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})]^{10-}$ ($\alpha, \alpha\text{-Fe}_4\text{-open}$).

Keywords: polyoxometalate; open-Dawson structure; iron; geometrical isomer

序論

分子性の酸化物クラスターであるポリオキシメタレートは、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⁾。様々な構造のポリオキシメタレートが知られているが、近年 open-Dawson 型ポリオキシメタレートが新しいタイプとして注目されている²⁾。古くからよく知られる Dawson 型ポリ酸塩は、2つの Keggin 型ポリオキシメタレート三欠損種が6本の W-O-W 結合により縮合した構造を有している(図1左)。しかし、負電荷の大きいゲストアニオン XO_4^- ($\text{X} = \text{Si}, \text{Ge}$) を内包する Keggin 型三欠損種は、静電反発により通常の Dawson 型構造にはなりづらく、電荷反発を避けるように2本の W-O-W 結合のみで連結した open-Dawson 型ポリオキシメタレート

を形成する(図1右)。つまり、open-Dawson 型ポリオキシメタレートは、従来の Dawson 型ポリ酸塩が中央で口を開いた様な構造を有している。その開口部には、様々な金属イオンを最大6個まで導入することが可能であり、これまでに様々な金属イオンを導入した open-Dawson 型ポリオキシメタレートが報告されている²⁻⁴⁾。特に、多核金属中心による共同的な触媒反応や基底高スピンを有する単分子磁石などのプラットフォームとして期待でき、実際に5個の Ni イオンを開口部含む open-Dawson 型が水の酸化分解触媒として効果的に機能することが報告されている³⁾。

一方で Dawson 型ポリオキシメタレートには6種類の幾何異性体($\alpha, \beta, \gamma, \alpha^*, \beta^*, \gamma^*$)が存在する。open-Dawson 型ポリオキシメタレートにおいても通

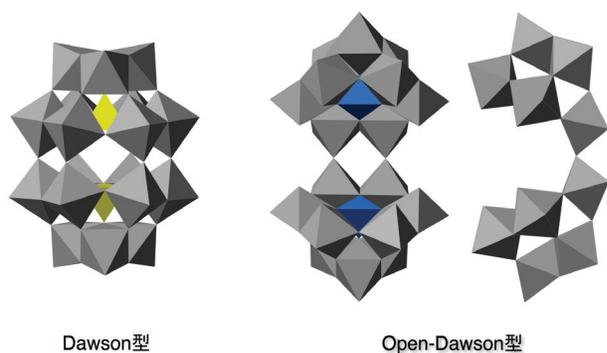


図1. 通常の Dawson 型ポリオキシメタレートと open-Dawson 型ポリオキシメタレートの構造.

常の Dawson 型と同様に、 α, α -型 (図2左)、 α, β -型 (図2中)、 β, β -型 (図2右) などの構造異性体が考えられるが、 α -Dawson 型の開いた構造に相当する α, α -open-Dawson 型ポリオキシメタレートのみが報告されている。これまで確認されている open-Dawson 型ポリオキシメタレートの異性体が合成できれば、異性体間での比較が可能となり、open-Dawson 型ポリオキシメタレートの化学にとって有用な知見を与えられられる。

今回我々は、文献⁴⁾で報告されている Fe^{3+} の4核クラスターイオンを開口部に導入した α, α -open-Dawson 型ポリオキシメタレートの異性体に相当する β, β -型 open-Dawson 型ポリオキシメタレート、 $[\{\text{Fe}_4(\text{OH}_2)(\text{OH})_5\}(\beta, \beta\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})]^{9-}$ ⁵⁾ ($\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$) をカリウム塩として合成に成功し、構造を明らかにしたので報告する。

材料と方法

材料

塩化鉄(III)六水和物、塩酸、水酸化カリウム、塩化カリウム (和光純薬) は、精製せずに購入したものをそのまま用いた。 β -Keggin 型ポリオキシメタレート三欠損種ナトリウム塩は既報⁶⁾に従い合成した。

合成法

$\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$ のカリウム塩 $\text{K}_9[\{\text{Fe}_4(\text{OH}_2)(\text{OH})_5\}(\beta, \beta\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ の合成

β -Keggin 型ポリオキシメタレート三欠損種 Na^+ 塩 $\text{Na}_9\text{H}[\text{A}-\beta\text{-SiW}_9\text{O}_{34}] \cdot 23\text{H}_2\text{O}$ (1.00g, 0.351 mmol) を純水 50 mL に懸濁させた。1.0 M HCl_{aq} を用いて pH 3.0 に調整し、飽和 KCl 水溶液を 1.0 mL 加えた。この溶液に $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.190 g, 0.703 mmol) を加えた。この段階での pH は 1.57 であった。その溶液を 1.0 M KOH_{aq} を用いて pH を 3.0 に調整し 80°C で 30 分間攪拌した。再度 1.0 M KOH_{aq} を用いて pH を 3.0 に調整し、室温で 1 週間静置することにより、

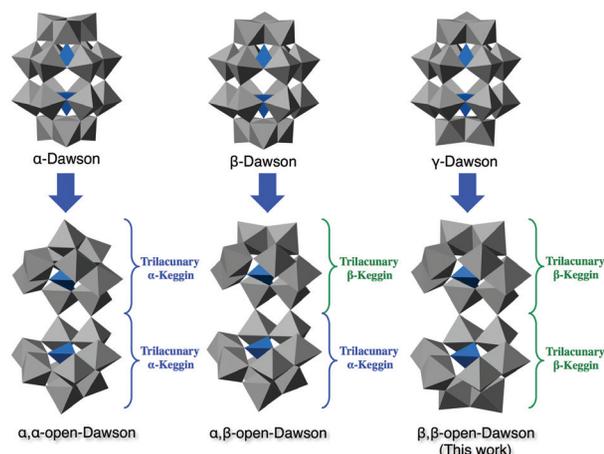


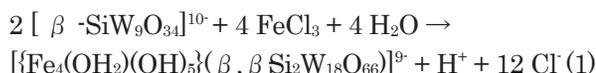
図2. Dawson 型ポリオキシメタレートとその開いた構造に相当する open-Dawson 型ポリオキシメタレートの構造.

黄色板状結晶が析出した。析出した結晶をメンブランフィルター (JG 0.2 μm) を使ってろ取り、減圧乾燥を 2 時間行うことで $\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$ のカリウム塩 0.211 g (0.0390 mmol) を得た。(収率 22.2%)

結果と討論

合成と同定

$\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$ カリウム塩 $\text{K}_9[\{\text{Fe}_4(\text{OH}_2)(\text{OH})_5\}(\beta, \beta\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ は別途合成した β -Keggin 型ポリオキシメタレート三欠損種 Na^+ 塩 $\text{Na}_9\text{H}[\text{A}-\beta\text{-SiW}_9\text{O}_{34}] \cdot 23\text{H}_2\text{O}$ と $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ をモル比 1:2 で反応させ、pH 3.0 に調整したのち 80°C で 30 分間攪拌させることで結晶として得た。収率は 22.2% であった。 $\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$ の反応式を以下に示す。



異性体である $\text{K}_2\text{Na}_8[\{\text{Fe}_4(\text{OH})_6\}(\alpha, \alpha\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})] \cdot 44\text{H}_2\text{O}$ ($\alpha, \alpha\text{-Fe}_4\text{-open}$) は前駆体に K^+ イオンを有する open-Dawson 型ポリオキシメタレート $\text{K}_{13}[\{\text{K}(\text{H}_2\text{O})_3\}_2\{\text{K}(\text{H}_2\text{O})_2\}(\alpha, \alpha\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})] \cdot 19\text{H}_2\text{O}$ (K-open) を用いている⁴⁾。一方で、 $\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$ は β -Keggin 型ポリオキシメタレート三欠損種 Na^+ 塩 $\text{Na}_9\text{H}[\text{A}-\beta\text{-SiW}_9\text{O}_{34}] \cdot 23\text{H}_2\text{O}$ を前駆体とすることで得られた。 $\alpha, \alpha\text{-Fe}_4\text{-open}$ 、 $\beta, \beta\text{-Fe}_4\text{-open}$ 共に、反応溶液の pH を 3.0 とすることで得られた。 $\alpha, \alpha\text{-open-Dawson}$ 型ポリオキシメタレートの形成には過剰量の K^+ イオンが必要であり、合成において K^+ イオンに重要な役割があることが示唆されている。今回合成した $\beta, \beta\text{-open-Dawson}$ 型ポリオキシメタレートも過剰量の K^+ イオンが必要であったことから、 $\beta, \beta\text{-open-Dawson}$ 型ポリオキシメタレー

トの形成においても K^+ イオンに重要な役割があることが示唆された。全元素分析の結果、測定値の合計が、99.74 % となり、純度よく合成できていることが明らかとなった。測定値は結晶水 4 つを含む組成 $K_9[\{Fe_4(OH_2)(OH)\}_3(\beta, \beta -Si_2W_{18}O_{66})] \cdot 4H_2O$ と一致した。測定前の $10^{-3} \cdot 10^{-4}$ Torr の一昼夜吸引乾燥により、4.23 % の重量減が観測され、結晶水 13 個分に相当する (計算値; 4.33 %)。これらの結果から、 $\beta, \beta -Fe_4\text{-open}$ カリウム塩の組成は $K_9[\{Fe_4(OH_2)(OH)\}_3(\beta, \beta -Si_2W_{18}O_{66})] \cdot 17H_2O$ と決定した。

結晶構造

$\beta, \beta -Fe_4\text{-open}$ カリウム塩の単結晶 X 線構造解析の結果を図 3 (a), (b) に示す。2 つの β -Keggin 型ポリオキシメタレート三欠損種が 2 本の W-O-W を介して連結した骨格を形成しており、その開口部に Fe^{3+} 4 核クラスター $\{Fe_4(OH_2)(OH)\}_3^{7+}$ が導入された構造 $[\{Fe_4(OH_2)(OH)\}_3(\beta, \beta -Si_2W_{18}O_{66})]^{9-}$ であった。この構造は、 α, α -型の上下の cap 部分 $\{M_3O_{13}\}$ ユニット 2 つが 60° 回転した異性体構造であり、通常の γ -Dawson 型が口を開けた構造に相当する。 $\beta, \beta -Fe_4\text{-open}$ カリウム塩は α, α -open-Dawson 型ポリオキシメタレートの異性体として初めての例である。開口部に導入されている 4 つの Fe^{3+} イオンは長方形型に配列していた。隣接している Fe^{3+} イオンは稜共有型 (O67, O68, O69, O70) および頂点共有酸素原子 (O71, O72) で連結されていた。BVS 計算⁷⁾の結果、 Fe^{3+} イオンを架橋する 4 つ酸素原子 (O67, O69, O71, O72) は OH^- であることが示唆された (BVS 値; O67, 1.106; O69, 1.157; O71, 1.170; O72, 1.255)。一方、開口部内側の 2 つの稜共有酸素原子 (O68, O70) の BVS 値は他の 4 つと比較してわずかに下がっていた (BVS 値; O68, 0.796; O70, 0.660)。

このことから、1 つのプロトンが 2 つの稜共有酸素原子 (O68, O70) 上に存在していると考えられ、開口部内の Fe^{3+} 4 核クラスターは $\{Fe_4(OH_2)(OH)\}_3^{7+}$ であると考えられる。

Open-Dawson 型ポリオキシメタレートは、開口部の開き具合を開口角として定義することができ、導入された金属クラスターに依存して開口角が変化することが知られている⁸⁾。 $\beta, \beta -Fe_4\text{-open}$ の開口角は 58.736° であった。異性体である $\alpha, \alpha -Fe_4\text{-open}$ は 58.147° であり、開口部内の構造に明確な差は確認されなかった。

ポリオキシメタレートの酸素原子と対カチオンの K^+ との間に多くの相互作用が存在していた。特に open-Dawson 型ポリオキシメタレートのチョウツガイ部分に相当する $\{WO_6\}$ の酸素原子 (O15 O16

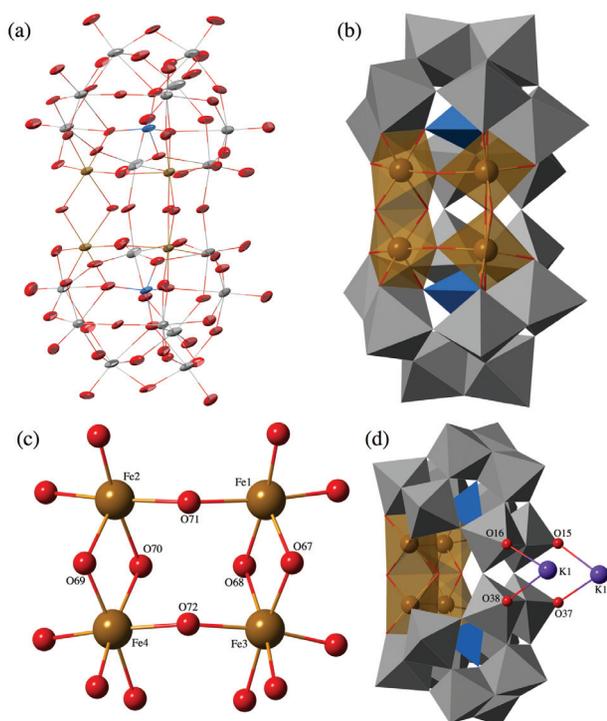


図 3. $\beta, \beta -Fe_4\text{-open}$ のアニオン部位の構造 (a,b) と開口部内の Fe クラスター部分構造 (c), ポリオキシメタレートと K イオンとの相互作用 (d)。灰色、水色、茶色の多面体はそれぞれ $\{WO_6\}$, $\{SiO_4\}$, $\{FeO_6\}$ を示している。

O37 O38) と K イオン (K1) の相互作用 (図 3 (d)) は既報の open-Dawson 型ポリオキシメタレートでも観測されている。これらの相互作用は既報の α, α -open-Dawson 型ポリオキシメタレートと同様に β, β -open-Dawson 型ポリオキシメタレートにおいても構造を安定化させる重要な要因であると考えられる。

吸収スペクトル

純水中で測定した吸収スペクトルを図 4 に示す。0 から Fe^{3+} への電荷移動が 450 nm 付近 ($\epsilon = 98 M^{-1} cm^{-1}$) に観測され、 $\alpha, \alpha -Fe_4\text{-open}$ と類似したスペクトルであった。

電気化学

0.5 M KOAc/HOAc 緩衝液 (pH = 4.8) 中に 0.5 mM となるように $\beta, \beta -Fe_4\text{-open}$ を加え、スキャン速度 25 mV/s で測定を行った。得られたサイクリックボルタモグラムを図 5 に示す。基準電極は銀-塩化銀電極を用いた。 W^{6+} に関連する特徴的な還元波が -0.665, -0.794, -0.939 V に観測された。Hill らは類似の酸化還元過程を Zn を含有した open-Dawson 型ポリオキシメタレートの測定でも報告しており、 W^{6+} に関する第二還元波は二電子過程であると報告している⁹⁾。同一の測定条件で異性体である $\alpha, \alpha -Fe_4\text{-open}$

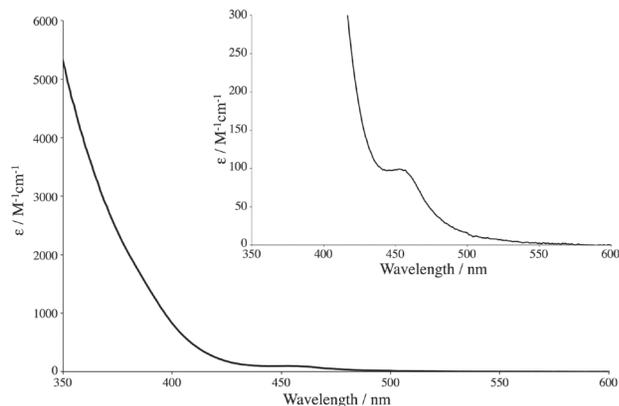


図4. 純水中で得られた β, β - Fe_4 -open カリウム塩のUV/Vis スペクトル。

open の測定を行うと β, β - Fe_4 -open と類似したサイクリックボルタモグラムが得られた。しかし、 W^{6+} に基づく α, α - Fe_4 -open の還元過程は、わずかにシフトして観測された(-0.704, -0.866, -0.936 V)。一方で、-0.212, 0.380 Vに観測された酸化還元過程はZnを導入したopen-Dawson型ポリオキシメタレートでは観測していないため Fe^{3+} の酸化還元波であると考えられる。 W^{6+} の第二還元波(-0.794 V)と Fe^{3+} の還元波(-0.212 V)の面積比は約1:2となっていた。すなわち2:4電子の反応であり、4つの Fe^{3+} が同時に反応していると考えられる。

まとめと展望

我々は、鉄(III)の4核クラスターを導入した β, β -open-Dawson型ポリオキシメタレート $\text{K}_9\{[\text{Fe}_4(\text{OH})_2(\text{OH})_5(\beta, \beta\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})]\cdot 17\text{H}_2\text{O}$ (β, β - Fe_4 -open カリウム塩)の合成、構造解析に成功した。

β, β - Fe_4 -open は β -Keggin型ポリオキシメタレート三欠損種 Na^+ 塩 $\text{Na}_9\text{H}[\text{A}-\beta\text{-SiW}_9\text{O}_{34}]\cdot 23\text{H}_2\text{O}$ と $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を反応させることで得られた。 β, β - Fe_4 -open は α, α -open-Dawson型ポリオキシメタレートの異性体として初めての成功例である。現在は、さらなる異性体として β -Dawson型の開いた構造に相当する α, β -open-Dawson型ポリオキシメタレートの合成に向けて研究を進めているところである。

謝辞

本研究は、研究課題「Open-Dawson型ポリオキシメタレートの構造異性体の探索」に対する2017年

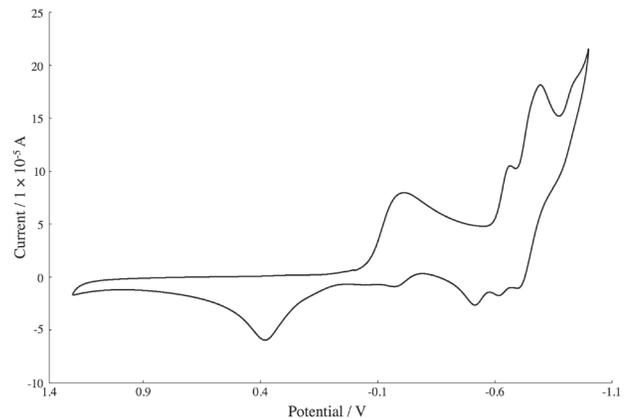


図5. 0.5 M KOAc/HOAc 緩衝液(pH = 4.8)中で得られた β, β - Fe_4 -open カリウム塩のサイクリックボルタモグラム。

度総合理学研究所共同研究の研究助成(RIIS201707)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.
- Laronze N, Marrot J and Hervé G (2003) Synthesis, molecular structure and chemical properties of a new tungstosilicate with an open Wells-Dawson structure, α - $[\text{Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66}]^{16-}$. *Chem. Commun.*: 2360-2361.
- Zhu G, Glass EN, Zhao C, Lv H, Vickers JW, Geletii YV, Musaev DG, Song J and Hill CL (2012) A nickel containing polyoxometalate water oxidation catalyst. *Dalton Trans.* **41**: 13043-13049.
- Leclerc-Laronze N, Marrot J and Hervé G (2006) Dinuclear vanadium and tetranuclear iron complexes obtained with the open Wells-Dawson $[\text{Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66}]^{16-}$ tungstosilicate. *C. R. Chimie* **9**: 1467-1471.
- Matsunaga S, Miyamae E, Inoue Y and Nomiya K (2016) β, β -Isomer of open-Wells-Dawson polyoxometalate containing a tetra-iron(III) hydroxide cluster: $[\{\text{Fe}_4(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})_5(\beta, \beta\text{-Si}_2\text{W}_{18}\text{O}_{66})\}]^{9-}$. *Inorganics*. **4**: 15.
- Tézé A and Hervé G (1990) α -, β -, and γ -Dodecatungstosilicic acids: isomers and related lacunary compounds. *Inorg. Synth.* **27**: 85-96.
- Brown ID and Altermatt D (1985) Bond-valence parameters obtained from a systematic analysis of the Inorganic Crystal Structure Database. *Acta Crystallogr.* **B41**: 244-247.
- Matsunaga S, Inoue Y, Otaki T, Osada H and Nomiya K (2016) Aluminum- and gallium-containing open-Dawson polyoxometalates. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **642**: 539-545.
- Zhu G, Geletii YV, Zhao C, Musaev DG, Song J and Hill CL (2012) A dodecanuclear Zn cluster sandwiched by polyoxometalate ligands. *Dalton Trans.* **41**: 9908-9913.

■原 著■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

立体構造が制御されたオリゴシランの実験的・理論的研究

辻 勇人^{1,3} 金澤悠紀² 江原雅博²

Experimental and Theoretical Studies
on Conformationally Controlled Oligosilanes

Hayato Tsuji^{1,3}, Yuki Kanazawa² and Masahiro Ehara²

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

² Institute for Molecular Science and Research Center for Computational Science, Okazaki City, Aichi 444-8585, Japan

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

Abstract: Theoretical calculations have been performed on the pentasilane compound that is conformationally constrained into all anti conformations. Optimized geometry in the photoexcited state suggests that the $\sigma\sigma^*$ character is the lowest excited state in terms of the extended terminal Si-Si bonds. Meanwhile, the bond and dihedral angles are barely changed, because of the rigidity of the trisilane unit. These phenomena effectively explain the experimental data of the photophysical properties of the all anti-pentasilane compound.

Keywords: oligosilanes, conformation, photophysical properties, excited state

序論

ケイ素原子が鎖状に連結した化合物はポリシランと呼ばれ、ケイ素鎖内での σ 電子の非局在化現象 (σ 共役) に由来するユニークな光物性や電子物性を示すことが知られている。これまで様々な研究が精力的になされており、近年では半導体シリコンの一次元類縁体として分子エレクトロニクス等への応用が期待されている^{1,2)}。ポリシランの電子状態は、ケイ素主鎖の長さや立体構造に大きく依存することがこれまでの研究で知られている^{3,4)}。したがって、所望する機能の発現には立体構造の精密制御が必要である。最初にこの辺の背景を説明する。

まず、基底状態のケイ素鎖長と立体配座の影響の解明に関しては、筆者ら独自の環骨格を利用した立体配座制御法が有効であった。すなわち、この方法によりジシランからヘキサシランまでのオリゴシラン化合物の分子構造制御を行い、紫外吸収スペクトル、磁気円二色性スペクトル、光電子分光などの計測と理論計算を併せることで、ケイ素鎖長や立体配座と光物性の相関を明らかにしてきた⁵⁻¹⁴⁾。この一連の研究において着目したのは、 $\sigma\sigma^*$ 遷移と $\sigma\pi^*$ 遷移の交差忌避である。すなわち、ポリシランやオリゴシランのフロンティア軌道を記述するには、ケ

イ素主鎖中の Si-Si 結合が寄与する σ および σ^* 軌道に加えて、主鎖のケイ素原子と側鎖の炭素原子の Si-C σ^* 軌道の集合により形成される π 型の対称性を持つ分子軌道 (π^* 軌道) を考える必要がある。鎖長が短いオリゴシランや特定の立体配座を含んだ構造ではこの影響が顕著であり、例えばケイ素が 2 個 (Si-Si 結合が 1 個) のジシランの紫外吸収スペクトルにおいては、禁制遷移である $\sigma\pi^*$ 遷移が最もエネルギーが低い励起状態を与え、波長領域 210 nm 付近に ϵ 数千程度の吸収帯として観測され、ついで 200 nm よりも短波長側に許容遷移である $\sigma\sigma^*$ 遷移が ϵ 数万の強い吸収帯として観測される。ケイ素が 4 個のテトラシランでは、Si-Si-Si-Si 鎖内の中央の Si-Si 結合周りの回転によって、ケイ素鎖に関する立体配座異性体を生じる。Si-Si-Si-Si 二面角 ω が 0° 付近 (syn 配座) では、 $\sigma\pi^*$ 遷移の方がエネルギー的に低いのにに対し、 $\omega = 180^\circ$ 付近 (anti 配座) ではエネルギー関係が逆転し、 $\sigma\sigma^*$ 遷移が最もエネルギー的に低くなる。そして、これら $\sigma\sigma^*$ と $\sigma\pi^*$ 遷移は対称性が同じであるために、中間程度の ω をもつ領域において交差忌避を示す。ケイ素の数が 5 個 (ペンタシラン) 以上では、ケイ素鎖が伸張

した構造では $\sigma\sigma^*$ が最低励起状態となるが、有効共役長（すなわちケイ素主鎖の立体配座）次第では、 $\sigma\pi^*$ 遷移の寄与が顕著であり、スペクトルの解釈は多少複雑になるが、各種測定や理論計算を組み合わせることで理解ができるようになった。

以上のように、基底状態の分子構造が与える影響の解明については、理論的・実験的双方から大きな進展が見られた。一方で、発光スペクトルの分子構造依存性については、励起状態の構造を考慮する必要があり、未だ解決途上である。実験的に観測されているペルメチルオリゴシラン $\text{Me}(\text{SiMe}_2)_n\text{Me}$ のフォトルミネッセンスを例にとりて説明する。ケイ素の数 n が 2, 3 のジシラン、トリシランは蛍光を示さないのに対し、 $n=4$ のテトラシランでは極低温下で、Stokes シフトが大きい幅広い弱い蛍光帯を示す。このような鎖長依存性の理解としては、ジシラン、トリシランでは最低励起状態が禁制の $\sigma\pi^*$ 遷移に由来するのに対し、テトラシラン以上では $\sigma\sigma^*$ 遷移由来の励起状態となるために、発光を与える遷移にも許容性が出てくると考えられる。さらに鎖長が長くなると発光帯は顕著になり、概ねヘプタシラン($n=7$)を境として、それ以上ケイ素鎖が長いものでは、Stokes シフトが小さく発光帯がシャープになることが観測されている。このような発光挙動の変化に関しては、鎖長が短い($n=4-6$)ものでは励起状態での構造変化が大きいのに対し、鎖長が長くなると σ 電子の非局在化効果により構造変化が小さいことが、励起状態の構造最適化計算から示唆されている。このような励起状態での挙動、特に基底状態の立体構造制御が励起状態の構造に与える影響を詳細に検証するために本研究では、立体構造が強固に固定されたオリゴシラン分子をモデルとして用い、実験・理論を融合した検討を行うこととした。

材料と方法

本研究のモデルとしては、図1に示した all anti-ペンタシラン分子（以下 aa-Si_5 と略す）を選んだ。この aa-Si_5 は、 σ 共役の拡張に理想的な all anti 配座の構築を目指して、以前に筆者らが独自に開発したものである。2本のテトラメチレン鎖をもつ双環トリシランユニットによって、ケイ素鎖が強固に all anti に固定されているため、対応する n -ドデカメチルペンタシラン $\text{Me}(\text{SiMe}_2)_5\text{Me}$ に比べてシャープな紫外吸収帯が長波長側に現れる⁹⁾。さらに興味深いことに、 $\text{Me}(\text{SiMe}_2)_5\text{Me}$ の発光帯は短鎖オリゴシラン特有の大きな Stokes シフトをもったブロードなものであるのに対し、 aa-Si_5 の発光帯は、長鎖のオリゴシランのようにシャープである¹⁵⁾。まずは

このようなスペクトルの相違が、励起状態でのどのような構造変化に起因するのかを、励起状態の構造最適化計算によって検証することとした。基底状態の構造最適化計算には、B3LYP/6-311G*、励起状態には PBE0/6-311G* レベルを用いた。なお、 $\text{Me}(\text{SiMe}_2)_5\text{Me}$ については、ケイ素主鎖についての配座異性体が多数存在するため、現在継続して検討を行っており、本稿では最適計算によって得られた aa-Si_5 の構造のみ示すこととする。

結果

図1に、基底状態ならびに励起状態での構造最適化計算の結果得られた結合長と結合角を記した。励起状態での Si-Si 結合長は末端 (Si1-Si2) 244 pm、中央 (Si2-Si3) 239 pm であった。基底状態がともに 238 pm であるのに比べると、特に末端では 2.5% もの結合長の伸張が見られた。一方で、結合角については、Si1-Si2-Si3 114.4°、Si2-Si3-Si4 104.1° と、基底状態の 112.8-113.5°、104.2° から大きな変化が見られなかった。また、二面角も基底状態の 177.0° から励起状態で 174.6° と、all anti 配座が保たれたままであった。

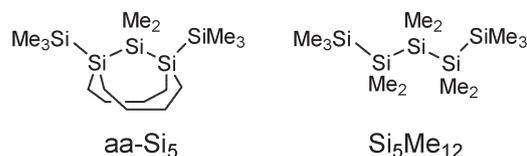


図1. 双環トリシランユニットを用いた all anti ペンタシラン (aa-Si_5) と n -ドデカメチルペンタシラン $\text{Me}(\text{SiMe}_2)_5\text{Me}$ の分子構造。

討論

計算によって得られた励起状態の構造に関して注目すべき点は、Si-Si 結合の伸張である。これは、励起状態が $\sigma\sigma^*$ 遷移の性質を有することを支持している。すなわち、Si-Si 結合性軌道 (σ 軌道) から Si-Si 反結合性軌道 (σ^* 軌道) に電子が移ることによって、Si-Si 結合次数が減少したために結合長が伸張したことを意味する。また、中央の Si-Si 結合に比べて末端の伸張が顕著である、双環トリシランユニットの効果によるものであると考えられる。すなわち、このユニットが強固であるために、大きな構造変化には大きなエネルギーが必要となるのに対し、ユニット外の末端 Si-Si 結合は比較的容易に構造変化を受けたと考えられる。また、励起状態でも all anti 配座が保たれていることから、基底状態と同様に有効共役長が長い (σ 電子が非局在化した) 状態が保たれるため、長鎖のオリゴシランと同様の挙動を示すものと考察できる。今後、この安定構造か

ら基底状態への遷移の計算、すなわち、発光スペクトルの詳細なシミュレーションを行い、励起エネルギーや振動子強度の結果から、今回得られた励起状態構造の妥当性（計算レベルの妥当性）の検証や、 $\text{Me}(\text{SiMe}_2)_5\text{Me}$ の励起状態における分子構造変化との比較によって、オリゴシランの励起状態に関するより深い知見を得るための検討を行う。さらに系統的な研究を行うために、テトラシランやヘキサシラン等の鎖長が異なるものや、それぞれにおいて基底状態での立体配座が異なる化合物を出発点としたときの構造変化等についても詳細な検証が必要であり、引き続き検討する予定である。

謝辞

本研究の一部は、研究課題「立体構造が制御された有機ケイ素化合物の研究」に対する 2017 年度総合化学研究所共同研究助成 (RIIS201708) のサポートにより行われた。ここに感謝申し上げる。

文献

- 1) Su TA, Li H, Klausen RS, Kim NT, Neupane M, Leighton JL, Steigerwald ML, Venkataraman L and Nuckolls C (2017) Silane and germane molecular electronics. *Acc. Chem. Res.* **50**: 1088-1095.
- 2) Sasaki M, Shibano Y, Tsuji H, Araki Y, Tamao K and Ito O (2007) Oligosilane chain-length dependence of electron transfer of zinc porphyrin-oligosilane-fullerene molecules. *J. Phys. Chem. A*. **111**: 2973-2979.
- 3) Miller RD and Michl J (1989) Polysilane high polymers. *Chem. Rev.* **89**: 1359-1410.
- 4) Tsuji H, Michl J and Tamao K (2003) Recent experimental and theoretical aspects of the conformational dependence of UV absorption of short chain peralkylated oligosilanes. *J. Organomet. Chem.* **685**: 9-14.
- 5) Kanazawa Y, Tsuji H, Ehara M, Fukuda R, Casher DL, Tamao K, Nakatsuji H and Michl J (2016) Electronic transitions in conformationally controlled peralkylated hexasilanes. *ChemPhysChem*. **17**: 3010-3022.
- 6) Tsuji H, Fogarty HA, Ehara M, Fukuda R, Casher D, Tamao K, Nakatsuji H and Michl J (2014) Electronic transitions in conformationally controlled tetrasilanes with a wide range of SiSiSiSi dihedral angles. *Chem. Eur. J.* **20**: 9431-9441.
- 7) Fukazawa A, Tsuji H and Tamao K (2006) All-anti-octasilane: conformation control of silicon chains using the robust bicyclic trisilane as the building block. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 6800-6801.
- 8) Tsuji H, Fukazawa A, Yamaguchi S, Toshimitsu A and Tamao K (2004) All-anti pentasilane: conformation control of oligosilanes based on bis(tetramethylene)-tethered trisilane unit *Organometallics* **23**: 3375-3377.
- 9) Mallesha H, Tsuji H and Tamao K (2004) UV Absorption and mass spectra of n-alkylsilyl end-capped anti, cisoid-alternating oligosilanes up to docosasilane (Si₂₂). *Organometallics* **23**: 1639-1642.
- 10) Seki S, Okamoto K, Matsui Y, Tagawa S, Tsuji H, Toshimitsu A and Tamao K (2003) Transient absorption spectroscopy of radical ions of rigid anti- and syn-tetrasilane. *Chem. Phys. Lett.* **380**: 141-145.
- 11) Tsuji H, Terada M, Toshimitsu A and Tamao K (2003) $\sigma\sigma^*$ transition in anti,cisoid alternating oligosilanes: clear-cut evidence for suppression of conjugation effect by a cisoid turn. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 7486-7487.
- 12) Fogarty HA, Tsuji H, David DE, Ottosson CH, Ehara M, Nakatsuji H, Tamao K and Michl M (2002) Peralkylated tetrasilanes: conformational dependence of the photoelectron spectrum. *J. Phys. Chem. A* **106**: 2369-2373.
- 13) Tsuji H, Toshimitsu A, Tamao K and Michl J (2001) UV, MCD, and LD spectra of a conformationally constrained ortho-tetrasilane: support for the avoided crossing model of conformational effects on excited states. *J. Phys. Chem. A*. **105**: 10246-10248.
- 14) Tamao K, Tsuji H, Terada M, Asahara M, Yamaguchi S and Toshimitsu A (2000) Conformation control of oligosilanes based on configurationally constrained bicyclic disilane units. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 3287-3290.

■原 著■

ハエトリソウ捕虫葉の閉合に伴う構造変化と運動細胞内外のイオン動態

伊藤 葉¹ 小野真菜美¹ 広瀬裕子² 渡邊信彦² 歌川ちひろ² 前田奈美² 丸茂 幸²
下園奈津美² 塩澤拓実² 伊藤晋之介² 早津 学^{2,3} 鈴木季直^{1,2,4,5}

Structural Changes and Intra- and Extracellular Ion Movements in
Motor Cells during Leaf Closure of Insectivorous Venus Flytrap

Shiori Ito¹, Manami Ono¹, Yuko Hirose², Nobuhiko Watanabe², Chihiro Utagawa²,
Nami Maeda², Sachi Marumo², Natsumi Shimozono², Takumi Shiozawa², Shinnosuke Ito²,
Manabu Hayatsu^{1,3} and Suechika Suzuki^{1,2,4,5}

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 Present Address: Division of Microscopic Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata City, Niigata 951-8150, Japan

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

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

Abstract: To examine the regulatory mechanism of leaf closure in the insectivorous plant Venus flytrap, light and electron microscope studies on the distribution of motor cells, the ultrastructure of those cells, and the intra- and extracellular movement of various ions during leaf closure were performed in a specified region near the midrib at the middle of the blade. Light microscope observation revealed that one or two well-arrayed hypodermal cell layers were present beneath the epidermis. In hypodermal and epidermal cells, during leaf closure, the cell volume measured by the montage method decreased significantly on the adaxial side and increased significantly on the abaxial side, indicating their major contribution as motor cells to leaf closure. Electron microscope observation showed that motor cells of hypodermal and epidermal cell layers contained electron-dense materials located along the inner surface of tonoplasts. On the adaxial side, electron-dense materials found as flattened sheets changed shape to numerous small globules during leaf closure. An inverse change in electron-dense materials in the structure was found on the abaxial side. Since the structural change of electron-dense materials is correlated with the volume change of motor cells during leaf closure, they may play a significant role turgor variation in those cells. Quantitative X-ray microanalysis of cryosections showed that, during leaf closure, the concentration of K decreased significantly in the vacuolar electron-dense material, vacuolar lumen, and cell walls on the adaxial side, while it increased on the abaxial side. In the blade region near the midrib, K ions released from the vacuolar electron-dense material in the adaxial cells may cause the movement of water to the abaxial region, and eventually turgor movement by the swelling of abaxial motor cells. The reciprocal Ca movement between adaxial and abaxial motor cells during leaf closure indicates the possible role of Ca ions in regulating the turgor pressure.

Keywords: seismonastic leaf closure, Venus flytrap, cell volume change, vacuolar electron-dense material, ion movement, quantitative X-ray microanalysis

序論

北米原産の食虫植物ハエトリソウ *Dionaea muscipula* Ellis は、昆虫を捕獲するために捕虫葉を閉じる。この運動は、葉の中肋（主脈領域）を回転中心とする左右裂片の閉合運動であり、駆動力は中肋近傍の葉肉細胞で生ずる膨圧と考えられている。左右裂片それぞれの向軸面中央部には3本の棘状感覚毛が分布しており、これらの感覚毛に昆虫などが接触することが刺激となり、感覚毛基部にある感覚細胞で受容器電位が生じ、続いて発生する活動電位が葉身内を伝播し、主脈近傍に達してこの領域の細胞群が活性化され、膨圧運動が誘起されて機械的な葉裂片の閉合が引き起こされると考えられている¹⁻⁴⁾。このように、従来の研究により、捕虫葉閉合における刺激応答の生理学的機序の概要は示されているが、閉合に関わる運動細胞の形態変化やイオン動態についての知見は少ない。

ハエトリソウにおける刺激受容と興奮伝達およびそれに続く膨圧運動による運動細胞活性化の様式はオジギソウの振動傾性反応の機序⁵⁻⁹⁾に類似している。オジギソウの刺激応答である葉柄屈曲や小葉閉合を引き起こす葉枕細胞の膨圧変化はKイオンの移動を伴う水の流出入によって成され^{5, 9)}、その流動にはCaイオンが制御因子として関与している可能性が示されている^{9, 11)}。その類似性から、ハエトリソウの捕虫葉閉合でも、膨圧変化を駆動力とする運動細胞ではオジギソウと同様のイオン動態や運動調節機構が機能している可能性が高い。本研究では、この点を明らかにするために、光学顕微鏡を用い、膨圧変化に伴う運動細胞の形態変化および容積変化の解析を行ない、オジギソウで示されているCa動態へのタンニン関与^{9, 11, 12)}を検討するために硫酸鉄による細胞化学を試みた。また、電子顕微鏡を用い、膨圧変化に伴う運動細胞の微細構造変化の観察を行ない、凍結切片・元素分析法¹³⁻¹⁷⁾により、捕虫葉閉合に伴う運動細胞における各種イオンの動的分布変化を解析した。

材料と方法

材料

市販のハエトリソウ *Dionaea muscipula* Ellis を購入し、24°Cの温室で栽培し、葉身の長さが約2 cmの捕虫葉を研究材料として使用した。捕虫葉は、摘出や解剖などの物理的的刺激や化学固定剤などの薬物刺激によって容易に閉じてしまうので、鉢植えのままのハエトリソウを密閉ガラス容器(24.5 × 11.5 × 25.0 cm³)内に静置し、ジエチルルエーテルでガス麻酔(1.5~2.0時間)することにより開いている状態

(開状態)を誘導した。一方、閉じている状態(閉状態)も、感覚毛を針で2回刺激して閉じさせた後に同条件のガス麻酔を施すことで誘導した。麻酔後、葉身を先端、中央、基部の3領域に分割し、先端部と基部は除外し、中央部のみを残した。捕虫葉の閉合は、葉の中肋付近の細胞の膨圧運動により引き起こされていると考えられる⁴⁾ので、葉身中央部から中肋部分は取り除き、その切断縁から葉縁方向へ2~3 mm巾となる帯状の葉片を摘出し、この中肋側中央部(駆動部)を研究対象試料とした。

顕微鏡観察試料の作製

通常の光学顕微鏡および電子顕微鏡観察のため、葉片を0.1 Mのリン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した6%グルタルアルデヒド液に浸し、4°Cで24時間前固定した。次に、同リン酸緩衝液と蒸留水で洗浄した後、2%四酸化オスミウム液に浸し、室温で3時間後固定した。固定試料はアセトン系列で脱水し、Epoxy樹脂への置換処理を施し、樹脂に包埋して熱重合させた。

ウルトラマイクローム(Reichert Ultracut N)で包埋樹脂ブロックから光学顕微鏡観察用の切片(厚さ~0.9 μm)を薄切し、トルイジンブルーで加温染色し、光学顕微鏡(OLYMPUS BH-2)で観察し、組織像をCCDカメラ(Pixera 600DL-CU)で撮影した。同様に、厚さ~70 nmの超薄切片を作製し、カーボン蒸着で補強したコロジオン支持膜を張ったCu-150のメッシュに載物し、酢酸ウランとクエン酸鉛でそれぞれ10分間ずつ染色し、透過型電子顕微鏡(JEOL JEM 2000EX, JEM1230 TEM)で観察した。

モニタージュ法による細胞容積の測定

捕虫葉の閉合に最も寄与する細胞群を特定するために、閉合に伴う膨圧変化を検出すべく、細胞容積変化を評価できるモニタージュ法^{9, 18-20)}を適用した。捕虫葉中肋側中央部(駆動部)に分布する全細胞の断面積を画像処理ソフトImage Jで測定し、開状態と閉状態の測定値間に有意の差があるか否かについてt検定を行った。

タンニン細胞化学

本研究の初期に、ハエトリソウの捕虫葉細胞の通常顕微鏡観察で、中肋側中央部の細胞内にはオジギソウの葉枕細胞に見られる液胞内タンニン粒^{9, 21)}と類似の高電子密度構造が観察された。この構造がタンニン粒であれば細胞の膨圧変化に関与している可能性があるため、同定のため、硫酸鉄(FeSO₄)細胞化学²²⁾を試みた。徒手切片法で作製した切片を

2%FeSO₄ 液で 2 時間染色し、光学顕微鏡 (OLYMPUS BH-2) で観察し、CCD カメラ (Pixera 600DL-CU) で撮影した。

含水量測定

後述の X 線マイクロアナリシスの元素定量では元素濃度を乾燥重量 (mmol/kg dry wt.) で表すが、この値を生体組織内での濃度に換算するには組織 (または細胞) の含水量の知見が必要となる¹³⁻¹⁶⁾。ハエトリソウ捕虫葉から中肋側中央部葉片を切り出し、電子天秤 (SHIMADZU AUW220) で生重量を測定した後、アセトン系列で脱水して再び試料の重量を測定し、試料塊としての含水量 (または含水率) を計算した。

急速加圧凍結と凍結超薄切片の作製

定量的 X 線マイクロアナリシスのため急速加圧凍結法により試料を凍結した。捕虫葉から摘出した葉片 (中肋側中央部) を細切し、直径 2.5 mm、高さ 1.0 mm の円盤状凍結用キャリアの試料装填孔内に向きを考慮して装填し、高圧凍結装置 (Leica EM-PACT) で加圧凍結した。凍結試料はアルミ製専用コンテナに収納して液体窒素中で保存した。

クライオチャンバー内を -145°C、ガラスナイフを -140°C、試料回転移動軸を -140°C に冷却したクライオミクロトーム (Leica Ultra UCT/EM FCS) に凍結試料を装填し、厚さ約 200 nm の凍結超薄切片を作製した。アイラッシュスティックで切片をすくい取り、クライオチャンバー内でカーボン支持膜を張った Ni-200 メッシュに載物し、もう一枚のメッシュを支持膜が向かい合うように重ね合わせて圧迫した後、専用の冷却コンテナに収納した。次に、凍結乾燥装置 (VFD-300S) に冷却コンテナを装填し、高真空条件下で -110°C 以下から 30°C まで約 10 時間かけて徐々に温度を上げて凍結乾燥させた。乾燥後切片を乾燥器内に保存した。

定量的 X 線マイクロアナリシス

エネルギー分散型 X 線検出器 (JEOL EX-14033 JTP) を装着した透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM 1230 TEM) の試料汚染防止コールドトラップを液体窒素で冷却し、凍結乾燥切片を装填したクライオトランスファーホルダー (Gatan model 626DH) を鏡筒内に挿入してから液体窒素で -130°C に冷却した。分析時の観察倍率を 15,000 倍、加速電圧 80 kV、試料ホルダーの傾斜角度を水平位から 15° に設定し、ビームスポットサイズを 4 に設定した。電子ビームを直径およそ 0.1 μm になるように集束させ、分析対

象領域に 200 秒間照射し、発生した X 線を検出器で検出した。

X 線スペクトルの各ピーク値に基づいて、元素の定性を行った²³⁾。X 線スペクトル解析ソフト (NORAN System SIX) を用い、定量測定の理論^{13-15, 23)} に従い、特性 X 線の X 線強度 (Px) と連続 X 線由来のバックグランド (4.5~5.5 keV) の X 線強度 (Bx) の強度比 (P/B 比) を求めた。これに、用いた分析電子顕微鏡における各元素のウェイトファクター (Wx)^{9, 16, 17)} を積算して各元素の濃度 (mmol/kg dry wt.) を算出した。

結果

捕虫葉の組織観察

捕虫葉の閉合に寄与する膨圧変化の大きい運動細胞の分布を組織学的に検討するために、樹脂包埋試料由来の切片 (厚さ約 0.9 μm) を光学顕微鏡で観察した。Fig.1 は、葉の表面に垂直な断面を示し、上部は向軸側、下部は背軸側である。向軸側表面には表皮のさらに外側に高頻度で分泌腺が局在しており、それらの形状は多細胞からなる楕円体であった。

向軸側も背軸側も共に表皮付近の細胞群は細胞壁も細胞質もトルイジンブルーで強く染色されていた。表皮直下の細胞は、向軸側でも背軸側でも、表皮細胞よりやや大きく、しかし、その形状は良く似ており、その細胞群は、水平方向に密に隣接して配列し、表皮第二層とも看做しうる細胞層を構成していた。背

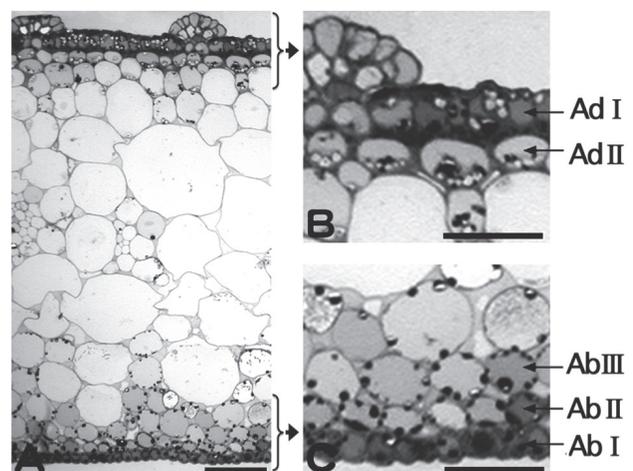


Fig.1. Light microscope images of a Venus flytrap leaf, cut transversely near the midrib at leaf opening state. A. Low magnification view, showing adaxial side in upper part and abaxial side in lower part. B. Enlarged view of adaxial side, showing epidermal (Ad I) and hypodermal (Ad II) cell layers. C. Enlarged view of abaxial side, showing epidermal (Ab I) and hypodermal (Ab II, Ab III) cell layers. Note secretory glands localized on the surface of adaxial epidermis. Scale bar, 200 μm (A) and 100 μm (B, C).

軸側では、さらにこの細胞層の下にそれより大きな細胞が配列して第三の層をなしていた。Fig.1 に示すように、これらの表皮細胞および表皮直下の細胞層の名称を、それぞれ、向軸側 I 層 (表皮細胞層; Ad I)、向軸側 II 層 (Ad II)、背軸側 I 層 (表皮細胞層; Ab I)、背軸側 II 層 (Ab II)、背軸側 III 層 (Ab III) とした。

捕虫葉細胞の断面積測定

葉の閉合が細胞の膨圧変化により誘起されるとすれば、葉の内奥部にある細胞間隙の多い葉肉細胞群より、層をなすように整然と配列している細胞群の方がより大きく関与すると考えられる。そこで、前述した、表皮および表皮下の 5 層を構成する細胞の容積変化を検出すべく、それらの細胞断面積をモンタージュ法^{9, 18-20)}を用いて測定した。測定値は各層ごとに、縦軸を例数 (細胞数)、横軸を階級幅 200 μm^2 とした細胞断面積で表した度数分布グラフにまとめたが、いずれのグラフもおおむね正規分布を示した。

表 1 は細胞層ごとの細胞断面積の平均値と標準偏差、ならびに捕虫葉の開閉両状態間の測定値についての t 検定結果を示している。向軸側 I 層 (表皮細胞) の細胞群では、閉状態の細胞断面積は開状態のそれより有意に小さく、閉合前の 84% であった。向軸側 II 層の細胞は、開状態では I 層の細胞より基本的に大きい、閉合に伴い有意に小さくなり、細胞断面積は開状態のその 71% であった。向軸側 I 層の細胞群より縮小率は大きく、閉合時にこれらの細胞の膨圧はより大きく減少することが示唆された。

背軸側 I 層 (表皮細胞) の細胞は向軸側 I 層の細胞より常に小さく、細胞断面積でおよそ半分程度の大きさであった。捕虫葉の閉合に伴い、細胞断面積はやや増加しており、開状態のおよそ 116% の値を示した。しかし、その変化は検定による有意の差としては認められなかった。背軸側 II 層の細胞も I 層と同様に小さかったが、細胞断面積は開状態のおよそ 117% の大きさとなり、両者の細胞の大きさは辛うじて有意の差があるものと認められた。背軸側 III 層の細胞は、背軸側 I 層や II 層の細胞よりかなり大

きかったが、向軸側の細胞よりは小さかった。しかし、閉状態の細胞断面積は開状態の 116% を示し、有意に増加しており、閉合に伴い、これらの細胞群の細胞の膨圧が増大している可能性が示された。

捕虫葉運動細胞の微細構造観察

捕虫葉の閉合に伴う中肋側中央部の表皮および表皮直下の細胞層を構成する細胞の構造変化を検出するために開および閉状態の組織について電子顕微鏡観察を行った (Fig. 2)。

向軸側表皮細胞外表面の細胞壁の厚さは 5~8 μm で、さらにその外表面は厚さ約 0.5 μm のクチクラ層で覆われていた。また、表面には、クチクラ層に密着して長径 65~75 μm 、短径 30~35 μm の楕円体状の分泌腺が観察された (Fig. 2B)。I 層の表皮細胞内では、色素体は殆ど見られず、あっても未発達の色素体であった。しかし、II 層の表皮下細胞では大きなデンプン粒を含む葉緑体が見られた (Fig. 2A)。I、II 層の細胞はいずれも液胞が良く発達しており、細胞の中央は殆ど液胞で占められていた。液胞内には高電子密度の構造が含まれており、それは、開状態では液胞膜の内表面に沿って広がる薄い帯状を呈し (Fig. 3A)、一方、閉状態では液胞膜内表面に沿って分布する多数の顆粒であった (Fig. 3B)。

背軸側表皮細胞外表面の細胞壁の厚さは 2~3 μm 程と向軸側のそれよりも薄かった (Figs. 2C, D)。更に、その表面を覆うクチクラ層も細胞壁の約 1/2 の厚さであった。向軸側では I 層の表皮細胞内に殆ど色素体は見られなかったが、背軸側では表皮細胞でも内膜系の発達した葉緑体が観察された。II 層と III 層の細胞では、向軸側と同様に、デンプン粒を含む葉緑体が含まれていた (Figs. 2C, 2D, 3C)。向軸側と同様に、液胞内に高電子密度構造が観察され、形状も開と閉の状態では異なっていたが、その違いは向軸側とは全く逆の鏡像的相関を示し、開状態で顆粒状、閉状態で帯状であった (Figs. 3C, 3D)。

Table 1. Cross-sectional areas of epidermal and hypodermal cells in leaf central regions near the midrib at opening and closing states of Venus flytrap leaves

Cell layers	Opening state (μm^2)	Closing state (μm^2)	Level of significance
Adaxial I	1,675.5 \pm 685.6 (n = 93)	1,413.2 \pm 641.1 (n = 94)	< 0.01
Adaxial II	2,048.5 \pm 1,307.9 (n = 104)	1,455.8 \pm 797.5 (n = 102)	< 0.01
Abaxial III	1,217.0 \pm 718.3 (n = 96)	1,409.3 \pm 666.2 (n = 92)	< 0.05
Abaxial II	748.7 \pm 386.6 (n = 99)	874.3 \pm 388.4 (n = 101)	< 0.05
Abaxial I	806.5 \pm 447.6 (n = 91)	935.3 \pm 678.7 (n = 90)	> 0.05

Values are mean \pm SD.

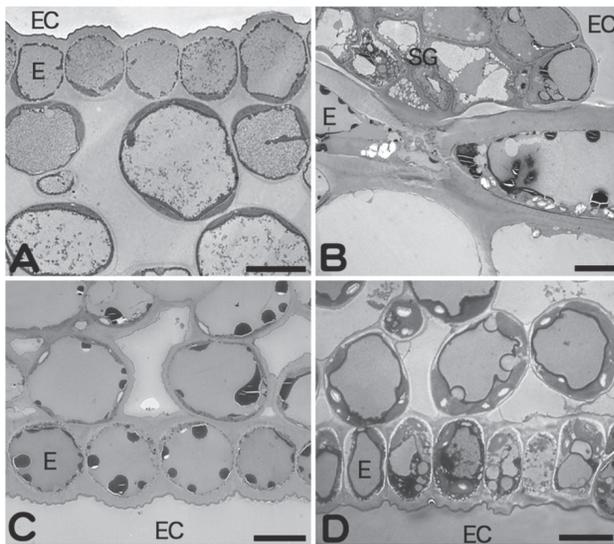


Fig.2. Electron microscope images of Venus flytrap leaves, showing epidermal and hypodermal cell layers. A and B. Cross-sectional view of adaxial side in leaf opening state (A) and closing state (B). C and D. Cross-sectional view of abaxial side in leaf opening state (C) and leaf closing state (D). EC: extracellular space, E: epidermis, SG: secretory gland. Scale bars, 10 μ m (A-D).

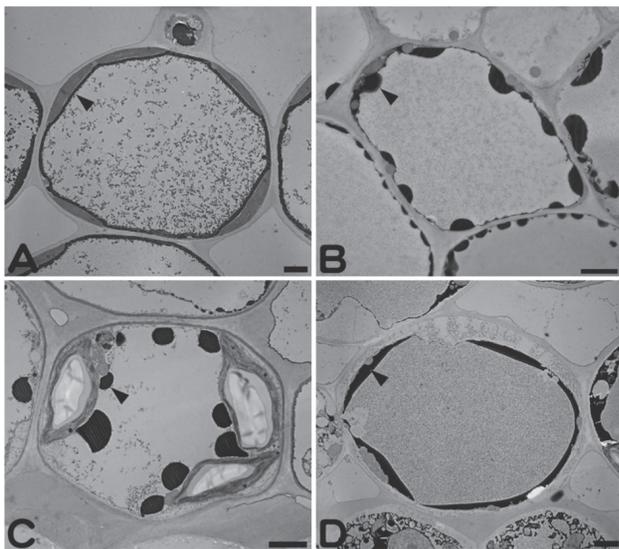


Fig.3. Electron microscope images of hypodermal cells in Venus flytrap leaves. A and B. Cells of adaxial side (Ad II) in leaf opening state (A) and closing state (B). C and D. Cells of abaxial side (Ab II) in leaf opening state (C) and leaf closing state (D). Note the inverse structural change of vacuolar electron-dense materials (arrow heads) localizing along the inner surface of tonoplast between adaxial and abaxial sides in addition to the leaf opening and closing states. Scale bars, 2 μ m (A-D).

光学顕微鏡によるタンニンの細胞化学

Fig.4 は、閉状態のハエトリソウ捕虫葉の中肋付近から徒手切片法により切削した横断切片の FeSO_4 処理前後の光学顕微鏡写真である。 FeSO_4 処理前 (Fig. 4A) に比べ、 FeSO_4 溶液で 2 時間処理した切片 (Fig.

4B) では、組織全域の細胞が黒褐色に強染色され、いずれの細胞にも多くのタンニンが含まれていることが確認された。これにより、電子顕微鏡で観察された液胞内の高電子密度構造がオジギソウで見られるタンニン粒と類似の成分で構成されている可能性が示された。

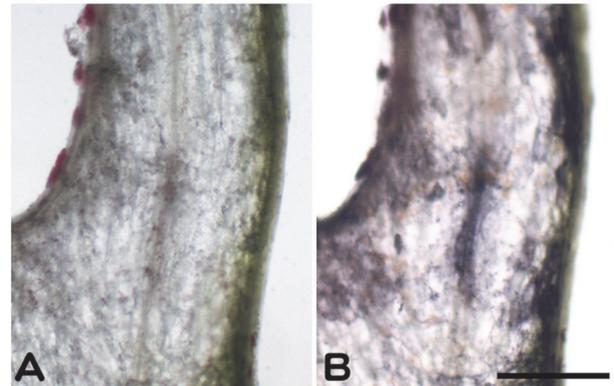


Fig. 4. Light microscope images of transverse sections, cut manually from living Venus flytrap leaves at leaf closing state, showing a part of leaves near the midrib. Left and right indicate adaxial and abaxial sides, respectively. A. Cross-sectional view before cytochemical FeSO_4 staining. B. Cross-sectional view after 2 hr from cytochemical FeSO_4 staining, showing structures well stained with FeSO_4 in epidermal and hypodermal cells. Scale bar, 0.5 mm.

含水量

乾燥重量で示される元素濃度を生体内の溶液濃度に換算するために必要となる組織の含水量を測定した。脱水前の質量が 0.0131g であった組織の脱水後の重量は 0.0035g であった。これは生重量の約 26% であり、ハエトリソウ捕虫葉の含水量 (率) は約 74% であった。

凍結切片の元素分析

Fig. 5 は、開状態と閉状態にある捕虫葉の中肋側中央部葉片を加圧凍結し、凍結葉片の向軸側および背軸側からそれぞれ薄切された凍結超薄切片の電子顕微鏡像を示している。水を多量に含む液胞の一部でアイスダメージの痕跡が認められるが、細胞壁や細胞質基質の領域は物質構成が滑らかであり凍結は良好であった。開状態捕虫葉の向軸側細胞では液胞内に分散した高電子密度構造が見られた。閉状態では、向軸側細胞内に高電子密度の大きな粒状構造が複数観察されたが、樹脂包埋切片像との比較より、これらは葉緑体に含まれるデンプン粒と思われた。開状態捕虫葉の背軸側細胞では液胞膜に沿って高電子密度構造が見られた (Fig. 5A)。閉状態では、背軸側

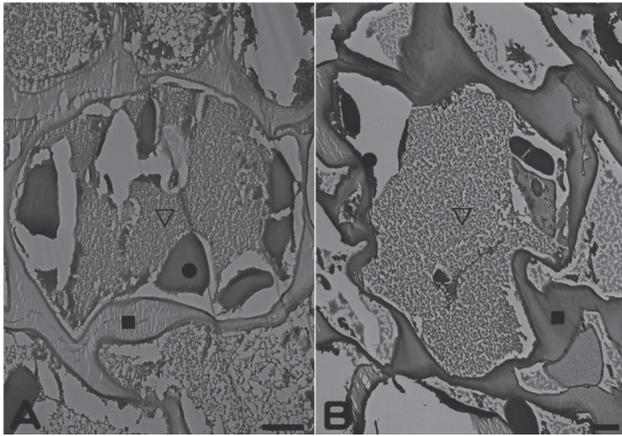


Fig. 5. Cryosection images of Venus flytrap leaves, showing abaxial hypodermal cells (Ab II) in leaf opening state (A) and leaf closing state (B). X-ray microanalyses are performed at points of the electron-dense material (●), the vacuole lumen (▽) and the cell wall (■). Scale bars, 2 μm (A, B).

細胞の液胞内に高電子密度構造が、また、細胞質基質領域にはデンプン粒が見られた (Fig. 5B)。

ハエトリソウ捕虫葉の閉合に伴う、運動細胞と考えられる表皮および表皮下細胞内の各種イオン動態を調べるために、これらの凍結超薄切片を対象に、液胞内高電子密度構造、液胞、および細胞壁の X 線マイクロアナリシスを行った (Fig. 5 内標識 ●, ▽, ■)。Fig. 6 は、X 線マイクロアナリシスの一例で、開状態捕虫葉向軸側細胞内の高電子密度構造分析で得られた X 線スペクトルを 0.90 keV から 4.20 keV のエネルギー範囲で示したものである。低エネルギー領域から順に、Na-K α 線 (1,041 eV)、Mg-K α 線 (1,253 eV) Si-K α 線 (1,739 eV)、P-K α 線 (2,013 eV)、Cl-K α 線 (2,621 eV)、K-K α 線 (3,312 eV)、Ca-K α 線 (3,690 eV) のスペクトルピークが示されている。Si は、電子顕微鏡の真空排気系で必ず使用される物質の構成元素であり、装置からの混入を無視できず試料由来の元素としては特定できないため解析対象外とした。Ni も凍結切片を載物しているメッシュの素材であるため解析対象外とした。P は生体膜、核酸、蛋白質などに由来するものと考えられるが、運動細胞における膨圧変化の要因となる場合や、それによって引き起こされる濃度変化などがあるとは思われないので解析対象から除外した。Mg は分析で全く検出されないケースが多かったので解析対象から除外した。

捕虫葉の閉合に伴い、向軸側では、Na と Cl のピークパターンの変化は殆どなかった。しかし、K と Ca のピークは明らかな逆相関の変化が認められ、測定した三カ所とも閉合時に、K のピークは小さく、相対的に Ca のピークは大きかった。この K と Ca

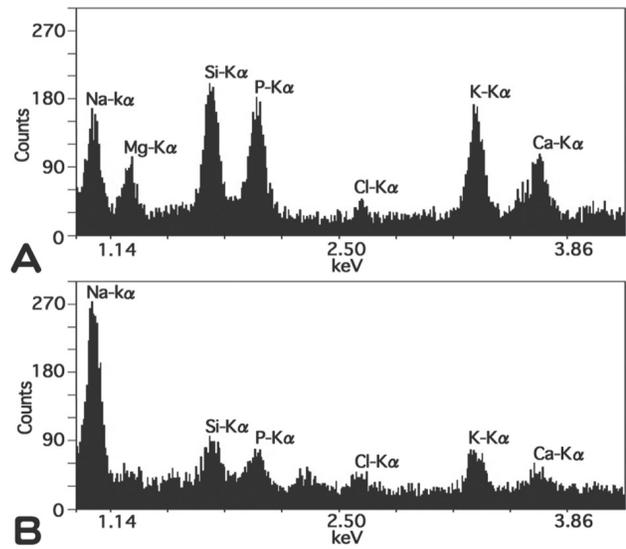


Fig. 6. Examples of X-ray spectra obtained from the vacuolar electron-dense material found in the adaxial motor cells of Venus flytrap, at the leaf opening state (A) and the leaf closing state (B). Labels indicate spectral peaks of respective element-line emission. The ordinate gives the number of X-ray events, and the abscissa shows the X-ray energy in keV (range 0.90~4.20 keV).

のピーク高の相対的な変化はおおむね濃度変化 (表 2) に反映されていた。しかし、実際に、閉合に伴い Ca 濃度が増加したのは液胞のみであった。なお、Na は閉合に伴って液胞内高電子密度構造と液胞で増大していたが細胞壁では殆ど変化していなかった。また、Cl はいずれの分析部位でも閉合時に殆ど濃度は変化していなかった。

捕虫葉の閉合に伴い、背軸側では、向軸側と同様に、Na と Cl のスペクトルパターンは殆ど変化しておらず、濃度も殆ど変化していなかった (表 2)。一方、K と Ca が逆相関となるピークパターン変化を示すことは向軸側と同様であったが、それぞれのピーク高の変化は向軸側とは逆になっており、閉合に伴い、K のピークは大きく、相対的に Ca のピークは小さくなった。この結果は明瞭に濃度の変化として示され、閉合に伴い、いずれの切片においても K 濃度は増加し、逆に、Ca 濃度は閉合前の濃度よりおよそ 1/2 に減少していた (表 2)。

討論

捕虫葉閉合運動細胞の容積変化

捕虫葉の閉合に関わる駆動部と思われる葉の領域 (中肋側中央部) で細胞層をなす細胞の断面積を捕虫葉の開状態と閉状態で測定した結果、閉合時に大きな容積変化を示したのは、向軸側 II 層の細胞群で、閉合時には元の大きさの 71 % まで小さくなっていた。

Table 2. Concentrations of various elements in the electron-dense structure in vacuole, the vacuole and the cell wall of epidermal and hypodermal cells in leaf central regions near the midrib at opening and closing states of Venus flytrap leaves

Insectivorous leaves	Element	Concentration (mmol/kg dry wt.)					
		Electron-dense structure		Vacuole		Cell wall	
		Open (13)	Close (12)	Open (13)	Close (12)	Open (12)	Close (12)
Adaxial cell	Ca	43.0	21.8	9.7	18.8	68.7	26.5
	K	118.2	52.1	35.0	20.2	177.5	26.3
	Cl	22.3	21.2	9.7	8.5	18.3	11.6
	Na	84.2	268.3	17.1	89.0	102.8	120.5
Abaxial cell	Ca	21.0	11.1	7.8	4.3	28.3	13.0
	K	25.3	43.7	12.4	15.3	22.9	47.4
	Cl	15.4	29.9	9.0	10.5	20.4	19.9
	Na	62.4	49.6	25.3	21.2	83.2	88.6

Values are mean of examples. Numbers of X-ray microanalyses are indicated in parenthesis.

一方、背軸側では、細胞断面積の変化率は小さいながらも、いずれの層の細胞も大きくなっていった。細胞断面積の変化は容積変化を反映しており^{9, 18-20}、捕虫葉の閉合を引き起こすに細胞（運動細胞）の膨圧増加は細胞容積増大と相関する^{24, 25}ので、捕虫葉中肋付近で、向軸側の主に表皮下細胞群が膨圧減少し、逆に、背軸側の主に表皮下細胞群が膨圧増大することが中肋を支点とする左右裂片の内側への屈曲を引き起こし、閉合が達成されると考えられる。このような、表裏（又は上下）双方の細胞の膨潤と縮小によって生ずる屈曲は、オジギソウの主葉枕⁶⁻⁹や小葉枕⁹で知られている。捕虫葉中肋側中央部の細胞層を形成する細胞は捕虫葉閉合の運動細胞であり、閉合時には主に向軸側Ⅱ層などの細胞内から水が流出して膨圧が低下し、流出した水は背軸側に移動し、Ⅱ層やⅢ層などの細胞内に流入して膨圧を増大させて捕虫葉を閉じさせると考えられる。

液胞内高電子密度構造の成分と機能

捕虫葉閉合に関わる運動細胞の液胞内には、オジギソウの運動細胞で観察されているタンニン液胞^{10, 11}や液胞内タンニン粒とよく似た高電子密度構造が見られた。この構造は液胞膜内表面に局在し、向軸側運動細胞では、開状態で薄い帯状で、閉状態では顆粒状であった。この形状の違いは背軸側では逆となり、開状態では顆粒状で、閉状態では薄い帯状であった（Fig. 3）。この構造の形状の違いは、捕虫葉閉合に伴う向軸側と背軸側の運動細胞の逆相関的な容積変化とよく対応しており、運動細胞の膨圧変化に大きく関わっていると考えられる。この考えは、オジギソウ主葉枕の膨圧減少時に大きな一つの塊であ

るタンニン液胞が数珠状の多数の小塊になる現象¹¹や小葉枕でも液胞内タンニン粒が膨圧減少時に小さくなる現象⁹が観察されていることによっても支持される。

FeSO₄によるタンニン細胞化学で運動細胞を含む組織全体が強く染色されたことから、捕虫葉の組織と細胞には多くのタンニンが含まれていると考えられる。運動細胞内での挙動はオジギソウの葉枕細胞内の挙動と類似しているため、液胞内高電子密度構造はタンニンで構成されている可能性が高い。類似の液胞内の顆粒がCaやKなどのイオンと結合し、液胞への水の出入りと相関し、あるいはそれを調節している可能性がオジギソウの小葉枕⁹やダイズの根のコルメラ細胞¹⁶で示されており、液胞内高電子密度構造は、液胞への水の出入りに重要な役割を果たしていることが示唆された。

捕虫葉閉合に伴う運動細胞内イオン動態

運動細胞が膨圧運動を引き起こす過程では、細胞内外への水の移動調節にKイオンやCaイオンなどが大きく関わっていることがオジギソウの振動傾性反応機構の研究で明らかにされている^{9-11, 26-28}。凍結切片の元素分析結果は、捕虫葉閉合時に、K濃度は、捕虫葉の向軸側では高電子密度構造、液胞内、細胞壁のいずれにおいても減少し、背軸側ではそれらのいずれにおいても増加することを示した。Fig. 7はこの結果に基づき運動細胞内のKイオン動態を説明する概念図である。運動細胞ではKイオン移動と水移動は連動している。捕虫葉閉合時には、背軸側の運動細胞は膨潤しており、液胞内の高電子密度構造のK濃度も増大していたが、これは細胞壁から細胞質

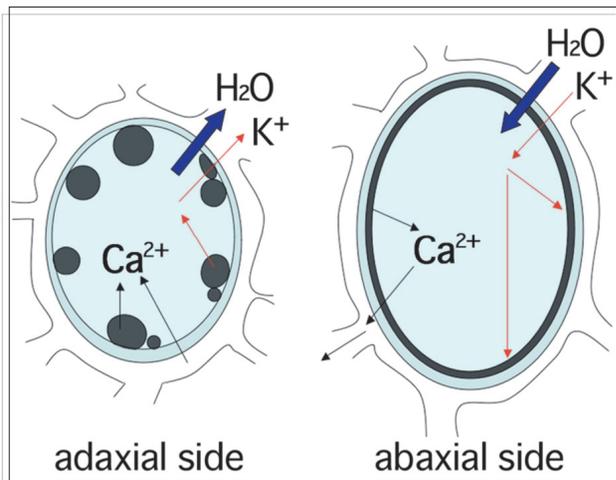


Fig. 7. Diagram showing the ion movement and water in the motor cells of Venus flytrap leaf at the leaf closure. As a result of movement, shrinkage is caused in adaxial cells and swelling is caused in abaxial cells. Dark granules and flattened sheets along the inner surface of tonoplast indicate electron-dense materials.

基質を経て液胞内へと流入した K イオンが液胞内で高電子密度構造に結合することを示していると考えられる。逆に、向軸側では運動細胞は縮小し、液胞内高電子密度構造の K 濃度は減少しており、K イオンがこの構造から遊離し、液胞内から細胞質基質を経て細胞外へと流出することを反映していると考えられる。恐らく、この時、水と K イオンはアポプラストを経由して背軸側へと向かうものと思われる。

Fig.7 には閉合時の運動細胞における Ca イオン動態も示している。Ca は、向軸側では高電子密度構造と細胞壁で減少し、液胞内では増加していた。液胞内の増加は、閉合に伴う高電子密度構造と細胞壁からの流入を示唆している。一方、背軸側では、Ca は高電子密度構造、液胞内、細胞壁のいずれにおいても減少していた。オジギソウでは、K イオンチャネルの開口に Ca イオンがトリガーとして関与している可能性が報告されており^{26,28)}、元素分析の結果もこれを支持し、K イオンと Ca イオンの連動移動が報告されている⁹⁾が、ハエトリソウでは、各測定部位で、K 濃度と Ca 濃度の増減は一致せず、むしろ背軸側では全く逆相関を示しているのと同じような機構を説明することは出来ない。K イオンと水の出入りに Ca イオンがどのように関与しているかは今後の課題である。

Cl イオンは電荷のバランスをとるように陽イオンと共に移動する可能性があることがオジギソウの主要葉枕の研究で指摘されている^{6, 10, 27)}が、ハエトリソウでは向軸側でも背軸側でも殆ど濃度の変化は見られず、膨圧運動に直接関与していないと考えられる。

一方、Na 濃度は、いずれの測定部位でも、閉合に伴い、向軸側では顕著に増加し、背軸側では減少していたが、この濃度変化の検討は今後の課題として残された。

文献

- 1) Haberlandt G (1906) *Sinnesorgane im Pflanzenreich zur Perzeption Mechanischer Reize, 2. Auflage*. Engelmann, Leipzig.
- 2) Jacobson SL (1965) Receptor response in Venus' s fly-trap. *J Gen Physiol.* **49**: 117-29.
- 3) Burdon-Sanderson J (1873) Note the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula* Ellis. *Proc. Royal Soc. Lond.* **21**: 495-496.
- 4) Fagerberg WR and Allaian D (1991) A quantitative study of tissue dynamics in Venus's flytrap *Dionaea muscipula* Ellis. *Am. J. Bot.* **78**: 645-657.
- 5) Abe T and Oda K (1976) Resting and action potentials of excitable cells in the main pulvinus of *Mimosa pudica*. *Plant Cell Physiol.* **17**: 1343-1346.
- 6) Abe T (1981) Chloride ion efflux during an action potential in the main pulvinus of *Mimosa pudica*. *Bot. Mag. Tokyo* **94**: 379-383.
- 7) Allen RD (1969) Mechanism of the seismonastic reaction in *Mimosa pudica*. *Plant Physiol.* **44**: 1101- 1107.
- 8) Tamiya T, Miyazaki T, Ishikawa H, Iriguchi N, Maki T, Matsumoto JJ and Tsuchiya T (1988) Movement of water in conjunction with plant movement visualized by NMR imaging. *J. Biochem.* **104**: 5-8.
- 9) Aoki Y, Marumo S, Nishikata H, Kozuka M, Fukada M, Koura N, Hayatsu M and Suzuki S (2015) Ultrastructural changes and intracellular ion movements in tertiary pulvinous cells during the seismonastic response of *Mimosa pudica* L. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 53-69.
- 10) Fleurat-Lessard P, Frangne N, Maeshima M, Ratajezak 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.
- 11) Toriyama H and Jaffe MJ (1972) Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **49**: 72-81.
- 12) Fleurat-Lessard P (1988) Structural and ultrastructural features of cortical cells in motor organs of sensitive plants. *Biol. Rev.* **63**: 1-22.
- 13) Shuman H, Somlyo AV and Somlyo AP (1976) Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: Methods and validity. *Ultramicroscopy* **1**: 317-339.
- 14) Suzuki S, Hino N and Sugi H (2004) Intracellular calcium translocations during the contraction-relaxation cycle in scorpionfish swimbladder muscle. *J. Exp. Biol.* **207**: 1093-1099.
- 15) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*.

- Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- 16) 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.
 - 17) Hayatsu M (2015) Studies on intra- and extracellular calcium translocation during the gravitropic response of plant roots. *D.Sc. thesis, Kanagawa University, Japan.*
 - 18) Peachey LD (1965) The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25**: 209-231.
 - 19) Devine CE, Somlyo AV and Somlyo AP (1972) Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell Biol.* **52**: 690-718.
 - 20) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastructural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. *J. Electron Microsc.* **52**: 337-347.
 - 21) Visnovitz T, Világi I, Varró P and Kristóf Z (2007) Mechanoreceptor cells on the tertiary pulvini of *Mimosa pudica* L. *Plant Signal. Behav.* **2**: 462-466.
 - 22) Ruzin SE (1999) *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, New York.
 - 23) Hall TA (1971) The microprobe assay of chemical elements. In: Oster G (ed.), *Physical Techniques in Biological research*. Oster G, ed., Academic Press, New York. pp.157-275.
 - 24) Brown WH (1916) The mechanism of movement and the duration of the effect of stimulation in the leaves of *Dionaea muscipula*. *Amer. J. Bot.* **3**: 68-90.
 - 25) Fagerberg WR and Allaian D (1991) A quantitative study of tissue dynamics in Venus's flytrap *Dionaea muscipula* Ellis. *Amer. J. Bot.* **78**: 647-657.
 - 26) Satter RL and Galston AW (1981) Mechanisms of control of leaf movement. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**: 83-110.
 - 27) Moran N (1990) The role of ion channels in osmotic volume changes in *Samanea* motor cells analyzed by patch-clamp methods. In: *The Pulvinus: Motor Organ for Leaf Movement*. Satter RL, Gorton and Vogelmann T, eds., The American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA. pp.101-129.
 - 28) Cote G (1995) Signal transduction and leaf movement. *Plant Physiol.* **109**: 722-734.

■原 著■

金目川水系におけるダビドサナエ属 2 種の 棲息地分化とその要因

太田祥作^{1,2} 金沢謙一²

Habitat Differentiation and Its Factors in Two Dragonfly Species
of the Genus *Davidius* in the Kaname River System

Shosaku Ohta^{1,2} and Ken'ichi Kanazawa²

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

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: sho39ota@gmail.com

Abstract: In the Kaname River system, habitat differentiation between two odonate species, *Davidius fujiama* and *D. nanus*, can be observed. In adults, *D. fujiama* lives in forested areas along the upper stream, and *D. nanus* lives in open areas along the lower stream. The adults mate and oviposit along the watercourses of their respective habitats. The difference of oviposition may result in naiad habitat differentiation, which is, however, not so distinct and their respective habitats overlap in the boundary area. The naiad habitat extends downstream from the oviposition area in each species. The naiads may be transported by strong water flow sometimes caused by storms.

Keywords: odonata, gomphidae, davidius, differentiation, river

序論

トンボ目サナエトンボ科ダビドサナエ属のクロサナエ *Davidius fujiama* とダビドサナエ *Davidius nanus* は、共に河川に棲息し、2年1化性である¹⁾。クロサナエは、ダビドサナエと比較して、より上流側に偏って分布することが従来指摘されており、クロサナエが河川の源流域を含む上流域に、ダビドサナエは上流から中流域にかけて分布することが報告されている¹⁾。しかし、これら2種の棲息地の違いが生じる要因を扱った研究例は過去にない。本研究では、金目川水系における2種の幼虫と成虫の分布および棲息環境を調査して、2種の棲息地の違いが生じた要因を究明することを目的とした。

方法

調査地点は、秦野市から平塚市にかけて流れる2級河川金目川の水源から下流域にかけての本流12地点と支流1地点の計13地点を設定した(図1)。地点⑤が支流河川に位置する。本研究では、河原の有無、水深、流速などに基づいて地点①~⑥を上流域、⑦~⑫を中流域、⑬を下流域と区分した。2種の生育状況に合わせて、2015年11月~2016年3月に

2015年度幼虫調査(地点⑥を除く②~⑬、全9回)、2016年4~5月に羽化殻調査(地点①~⑫、全10回)、同年5~7月に成虫調査(地点①~⑦、全25回)、同年9月~2017年1月に16年度幼虫調査(全地点月1回、全19回)を実施した。成虫調査に関しては、クロサナエの金目川での観察例が少なかつたため、相模原市緑区青野ヶ原の道志川支流で追加調査を実施した。幼虫採集では網目3mmの玉網を使用し、成虫調査では双眼鏡を用いて観察を行った。16年度幼虫調査では、採集された幼虫を4齢期(F-0、F-1、F-2、F-3以下:0は終齢幼虫、数値が増えるごとに若い齢期を表す)に識別²⁾して個体数を数え、その変動を調べた。尚、2種の幼虫の区別は雄の終齢幼虫の一形質によってのみ可能とされており^{1,3)}、雌や他の齢期の幼虫については一括して *Davidius sp.* として扱った。2016年8月~2017年2月には地点①~⑫に水温計を設置し、長期的な水温の変化を調べた。また、幼虫の高水温耐性を調べるため、地点④と⑥で採集したF-2以下の若齢幼虫42個体を水温25℃及び29℃の条件下で3日間ずつ飼育する実験を行った。

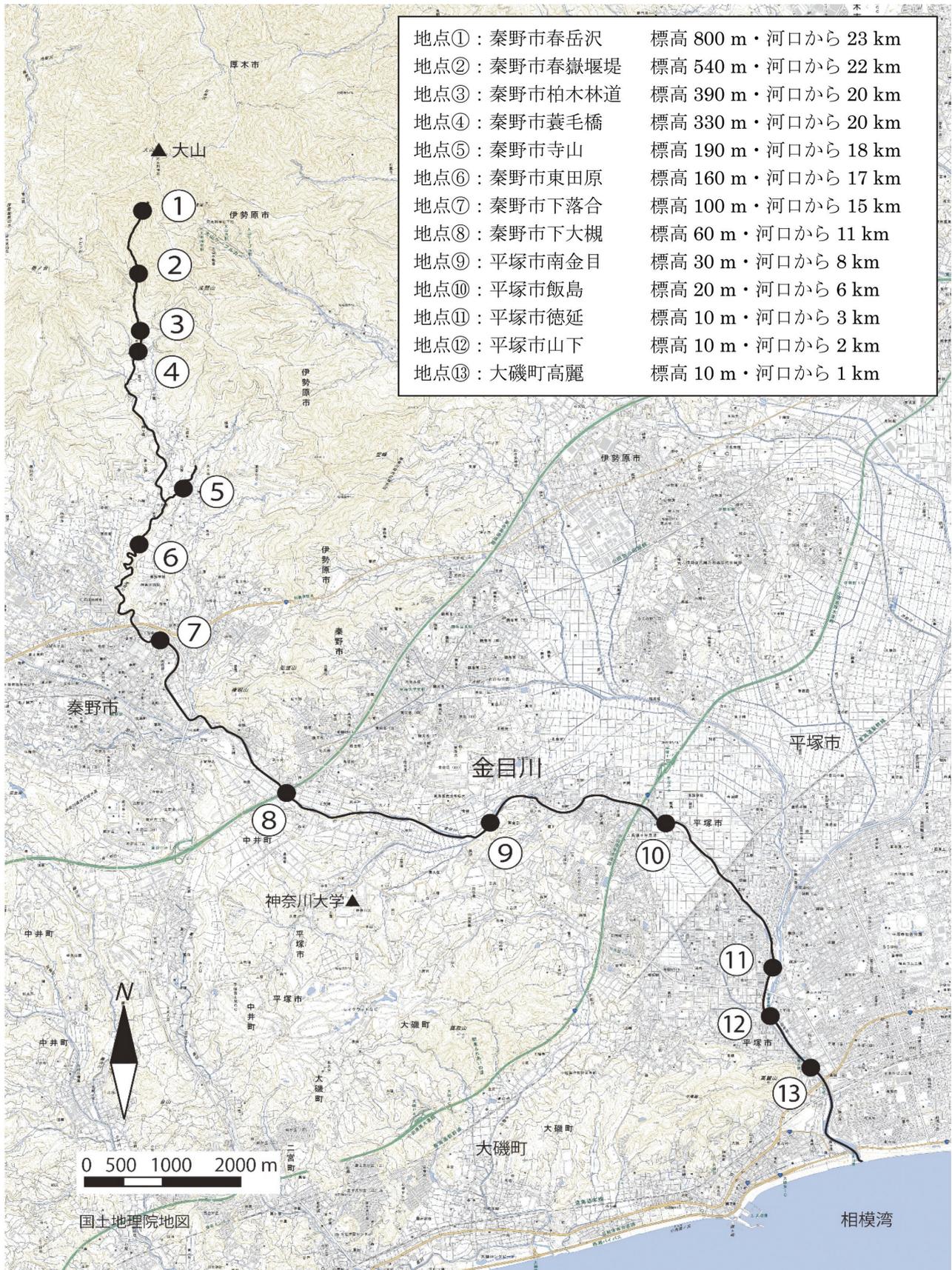


図 1. 調査地点.

表 1. 採集された幼虫の個体数 (2015 年度)

齢期	地点										
	②	③	④	⑤	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬
F-0	0	1	4	0	3	3	0	7	2	4	0
F-1	0	0	0	2	0	3	4	1	1	0	0
F-2以下	7	10	20	1	7	1	4	2	0	0	0
計	7	11	24	3	10	7	8	10	3	4	0

表 2. 採集された幼虫の個体数 (2016 年度)

齢期	地点												
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬
F-0	0	7	15	40	1	11	16	6	8	3	1	2	0
F-1	0	8	22	22	1	98	50	19	31	17	0	1	0
F-2	1	2	4	5	2	109	49	8	13	8	0	0	0
F-3以下	1	52	52	117	2	73	24	1	2	0	1	3	0
計	2	69	93	184	6	291	139	34	54	28	2	6	0

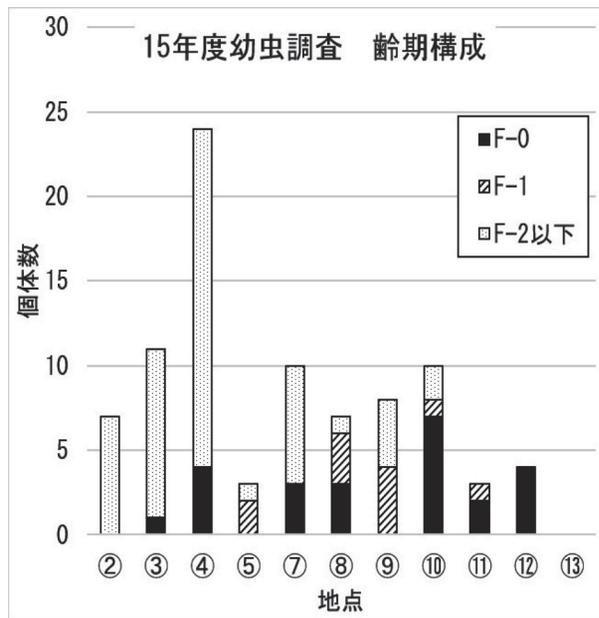


図 2. 幼虫の齢期構成 (2015 年度).

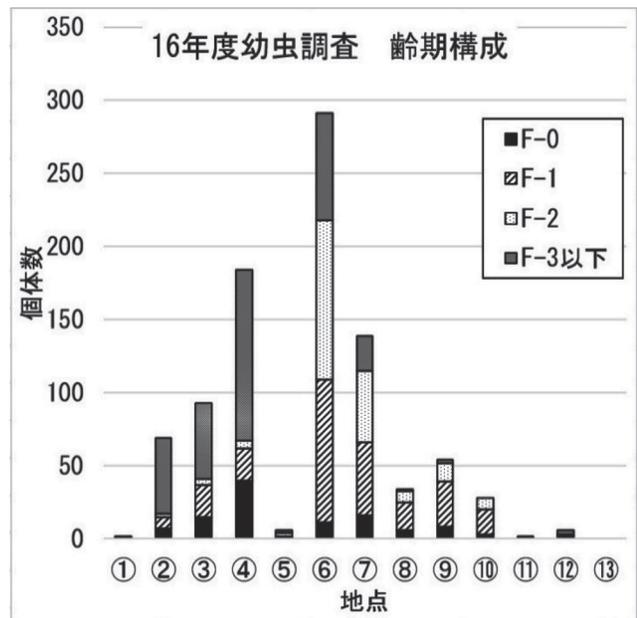


図 3. 幼虫の齢期構成. 2016 年度二次～五次調査までの集計結果.

結果 幼虫調査

調査を行った 13 地点のうち、幼虫が採集されたのは地点⑬を除く 12 地点であった。齢期の構成は、2015 年度、2016 年度共に、上流側の地点ほど若齢幼虫の割合が高く、下流側の地点ほど老齢幼虫の割合が高かった (表 1、2、図 2、3)。

2016 年度一次～五次調査における幼虫の齢期構成の変遷を見ると、各地点とも F-2 から F-0 への成長に伴うと考えられる個体数の遷移が読み取れる (図 4)。

16 年度の調査で地点ごとの個体数を比較すると、地点④⑥⑦に明瞭なピークが認められ、そこから離

れるに従い個体数は少なくなっていた。特に、地点⑩より下流と、支流の地点⑤では僅少であった。

幼虫は、河川の蛇行部内側など流れが緩い浅瀬に形成される砂底から採集された (図 5)。地点①～④、⑨では小規模な砂底が浅瀬に複数点在し、地点⑥⑦⑧⑩⑫では比較的大規模な砂底が浅瀬に広がり、地点⑤⑪⑬は砂泥底であった。各地点の状況は調査の度に異なり、夏季には台風等による出水、それによる流路の移動、冬季には水量の減少等の環境変化があった。こうした環境変化は、砂底の縮小や消失、干出をもたらしていた。

種同定が可能な雄の終齢幼虫の分布は表 3 の通り

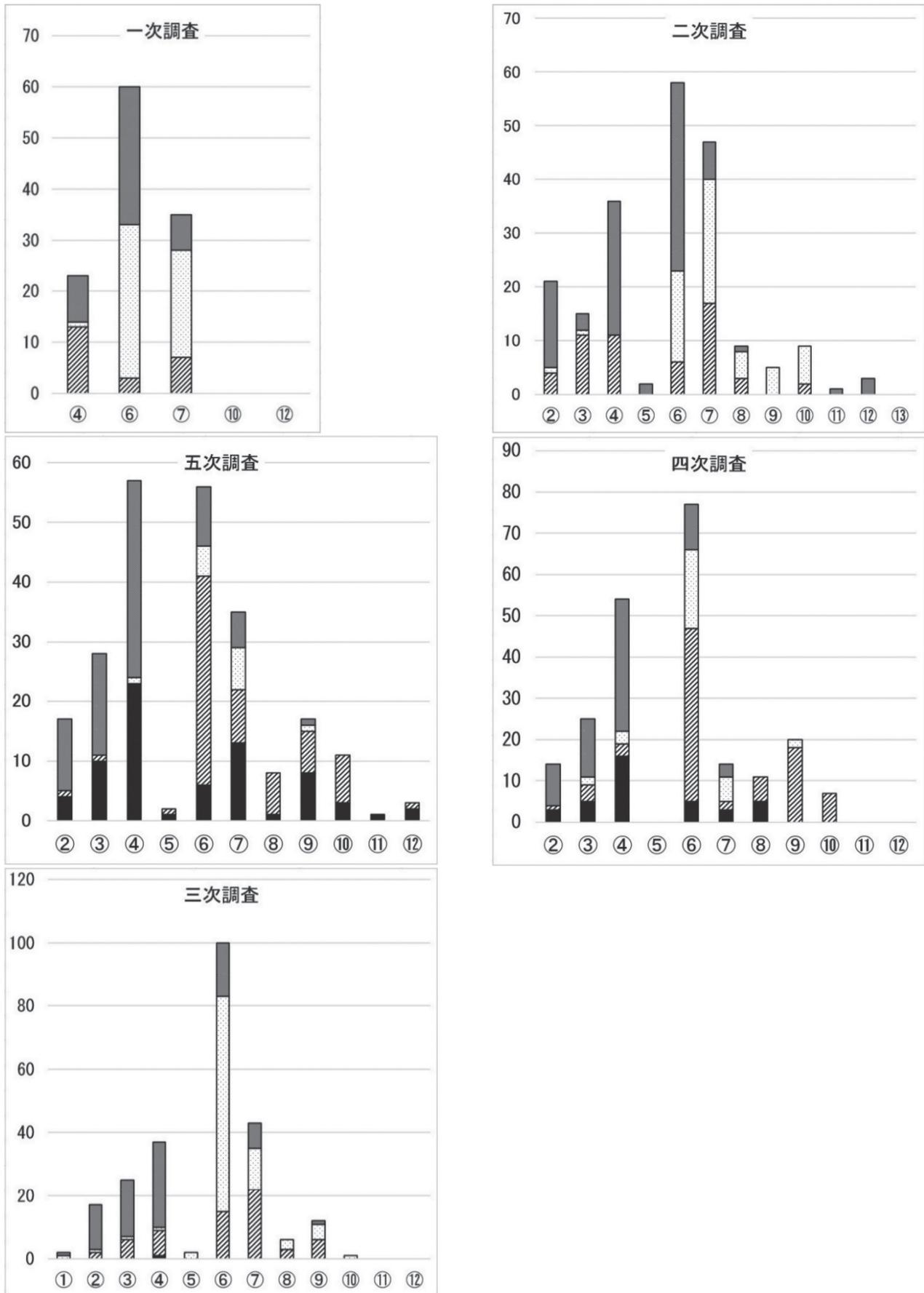


図4. 16年度幼虫調査における地点別の齢期構成比, 個体数比較. グラフ縦軸は個体数, 横軸は地点. 一次調査は9~10月, 二次調査は10月, 三次調査は11月, 四次調査は12月, 五次調査は1月に実施.



図 5. 幼虫の棲息する砂底環境 (地点④).

であった。クロサナエでは上流域 (地点④)、ダビドサナエでは上～中流域 (地点⑥⑦) に分布のピークが存在した。しかし、クロサナエの分布のピークが局所的であるのに対し、ダビドサナエのピークは不明瞭であった。地点⑥～⑨にかけては 2 種の分布の重複が認められた。

羽化殻調査

クロサナエでは地点④、ダビドサナエでは地点⑥⑦で羽化殻が最も多く見付き、終齢幼虫の個体数のピークと一致した (表 3)。地点⑦では 2 種の羽化殻が採集された。2 種共に、羽化殻は、川岸の水面から概ね 30 cm の高さにある草本や石に付着していた。また、幼虫が多く棲息する砂底に近接した岸辺から

表 3. 2 種の終齢幼虫と羽化殻の分布状況

流域	地点	クロサナエ		ダビドサナエ	
		幼虫	殻	幼虫	殻
上流	①				
	②	3			
	③	7			
	④	25	7		
	⑤				
	⑥	5		12	16
中流	⑦	1	1	8	6
	⑧	1		7	
	⑨	1		3	
	⑩			8	1
	⑪			2	
	⑫			1	2
下流	⑬				

数値は個体数。幼虫は終齢幼虫、殻は羽化殻。

表 4. 羽化殻調査の集計結果

クロサナエ 採集日	地点	
	④	⑦
2016/4/25	4	1
2016/5/1	3	
計	7	1

ダビドサナエ 採集日	地点			
	⑥	⑦	⑩	⑫
2016/4/15				1
2016/4/19			1	1
2016/4/20	6	2		
2016/4/25	7	2		
2016/5/1	3	2		
計	16	6	1	2

ダビドサナエ属総合 (2種及び未同定個体を含む)										
Davidius spp.	地点									
採集日	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑩	⑫	
2017/4/15										2
2017/4/19								1	1	
2017/4/20					11	6				
2017/4/25			7		13	7				
2017/5/1			8	1	14	8				
2017/5/3							1			
2017/5/8	1	1	1	1		1				
2017/5/21			1							
計	1	1	17	2	38	22	1	1	3	

数値は羽化殻個数。

多く見つかった。下流側の地点ほど羽化期が早く、上流側ほど遅くなる傾向にあった (表 4)。

成虫調査

2 種の成虫の分布は完全に分かれており、クロサナエは地点①～②にかけての水源地を含む最上流域、ダビドサナエは地点③～⑥にかけての上流域で観察された。成虫の棲息環境を比較すると、クロサナエは森林が発達し閉鎖的な水源地周辺に棲息するのにに対し、ダビドサナエは樹林が少なく開放的な上流域に棲息するという違いが見られた (図 6)。この傾向は金目川だけでなく道志川支流でも同様であり、クロサナエが湧水のある水源地周辺に複数個体見られたのに対し、ダビドサナエはより下流側の草地で 1 個体見られた。金目川流域では、クロサナエの棲息地は地点①～②にかけての約 1 km、ダビドサナエは地点③～⑥にかけての約 3 km の範囲であった。標高では、クロサナエが約 800 ～ 540 m、ダビドサナ



図 6. 2 種の繁殖地の景観. 左: 地点①クロサナエ繁殖地. 右: ダビドサナエ繁殖地.

エが約 390 ~ 160 m の範囲に分布していた。水平分布ではダビドサナエの方がより広く、垂直分布ではクロサナエの方がより広がった。クロサナエを観察した道志川支流の調査地点は標高約 380 m であった。

産卵

産卵行動は 2 種とも同様であった。日陰となる湿潤な岸边に、雌が単独で飛来し、地上 50 cm 未満の低空をホバリング飛翔しつつ、空中から卵を産み落としていた。産卵場所の岸边には砂利や礫、コケや落葉が存在していたが、そこに一貫性はないように見受けられた。2 種の産卵場所の条件に違いは見いだせないが、産卵が観察されたのはクロサナエでは地点①、ダビドサナエでは地点④であり、同所的な産卵は観察されなかった。

縄張り行動と交尾

地点④で観察されたダビドサナエ雄では、流れの中央から水際における行動と、流れからやや離れた護岸上を中心とした陸域における行動で違いが認められた。水際では、特定の場所（石や草本上といった 1 箇所）に執着してそこに留まり続けることが多く、接近してくる同種、異種（アサヒナカワトンボ *Mnais pruinosa*⁴⁾ とシオヤトンボ *Orthetrum japonicum japonicum*）に対して排斥行動をとり、一旦離れても再度そこへ戻ってくる行動が観察された。一方、陸域の個体では、排斥行動は 1 例観察されたのみで、執着性を示す行動は観察されなかった。

雌の場合、水際には産卵行動が観察されただけで、産卵を終えるとそこから離れ、他は陸域での行動に終始しており、排斥行動も一切観察されなかった。

ダビドサナエの雄における水際の一定範囲を占有するという縄張り行動は、地点④から⑥までの複数

地点で観察された。

道志川支流のクロサナエ雄でも、ダビドサナエ雄と同様の同種、異種（カワトンボ属の 1 種 *Mnais sp.* とヒメクロサナエ *Lanthus fujiacus*）に対する排斥行動や、特定箇所への執着といった縄張り行動が観察された。一方、金目川のクロサナエ雄では、水際や樹上に飛来、静止しても数分以内に移動し、同じ場所に再度出現することはない等、明瞭な占有行動や排斥行動は観察されなかった。つまり、金目川のダビドサナエと道志川のクロサナエは明瞭な縄張りを持つ一方、金目川のクロサナエは明瞭な縄張りを持たなかった。金目川のダビドサナエと道志川のクロサナエでは多くの場合 1 地点当たり同時に複数の雄個体が観察されたのに対し、金目川のクロサナエでは 1 地点当たり 1 個体のみが観察されるに止まった。

ダビドサナエでは交尾に関わる行動、タンデム（交尾態の前段階：雄が尾部付属器により雌の頭部を掴んだ状態）が 2 例、交尾態（雌雄の交尾器が結合した状態）が 9 例観察された。タンデムの形成場所は水際で、雄が雌を捕捉し、地上へ降下してタンデムを形成した。飛び立った後、空中で交尾態を形成し、水際を離れて陸域へ向かった。9 例の交尾態は全て陸域で観察された。これにはタンデム形成後陸域へ飛び去った交尾態のペア 2 例と、陸域に静止して交尾中だったペア 7 例が含まれる。陸域では、雄が静止していた雌を捕捉し頭部を把握しようとしたが、雌は抵抗してこれを振り切ると即座に飛び去る様子が観察された。

水温調査

金目川の水温を調査した結果を表 5 に示す。概ね上流から下流へ下るに伴い水温は上昇し、下流ほど最高水温と最低水温の差が大きかった。クロサナエの終齢幼虫が最も多く生息していた地点④では、最高 - 最低水温が、夏季 19 - 15°C、秋季 16 - 11°C、冬季 14 - 4°C であった。一方、ダビドサナエの終齢幼虫が多く生息していた地点⑥~⑩では、最高 - 最低水温が、夏季 21 - 17°C（地点⑥のみ）、秋季 25 - 12°C、冬季 20 - 6°C であった。

高水温飼育実験

水温 25°C で地点⑥の 1 個体、水温 29°C で地点④の 1 個体が死亡した。その死因はどちらも脱皮不全によるものであった。他の 40 個体は実験を通して生存しており、形態や行動面に異常は認められなかった。

表 5. 金目川における 2016 年 9 月～2017 年 2 月までの水温変化

地点	2016年9月		2016年10月 ～11月		2016年11月 ～2017年2月	
	最低	最高	最低	最高	最低	最高
①			10°C	12°C	8°C	12°C
②	14°C	18°C	12°C	13°C	5°C	14°C
③	14°C	17°C	10°C	15°C	5°C	13°C
④	15°C	19°C	11°C	16°C	4°C	14°C
⑤	18°C	22°C	13°C	19°C	4°C	16°C
⑥	17°C	21°C	12°C	18°C	6°C	16°C
⑦			15°C	19°C	9°C	17°C
⑧			15°C	22°C	8°C	19°C
⑨			14°C	25°C	9°C	20°C
⑩			17°C	23°C	8°C	19°C
⑪			14°C	25°C	6°C	20°C
⑫	21°C	29°C	13°C	23°C	6°C	19°C

討論 棲息地の分化

金目川におけるクロサナエとダビドサナエの分布を表 6 に示す。野外調査の結果から、2 種間で棲息地の分化が生じていることが強く支持され、成虫では分布の重複は認められなかった。

終齢幼虫では分布の重複が見られたものの、2 種の分布のピークは明らかに異なっており、羽化殻のピークもそれと一致していた。しかし、2 種の幼虫は地点⑥～⑨では同所的に採集されており、2 種が同一の環境条件下で生育可能であることを示唆している。

水温調査の結果、それぞれの幼虫の棲息地で水温に大きな差はなかったが、ダビドサナエの方がより高水温に晒されていることが分かった。つまり、クロサナエの方が高水温耐性は低い可能性が暗示されたが、高水温飼育実験はこれを否定している。高水温が 2 種の棲息地分化の要因であるとは考え難い。

成虫の繁殖地を比較すると、クロサナエが河川上流域の森林が発達した水源地周辺を繁殖地として選ぶのに対し、ダビドサナエはそれよりやや下流域の樹林が少なく比較的開けた環境を繁殖地として選ぶという明瞭な相違があった。このことから、成虫の産卵場所の違いが、2 種の幼虫の分布域を上流側と下流側に規定していると推察される。即ち、クロサナエとダビドサナエの棲息地の分化は、成虫の繁殖産卵場所の違いが主因であると考えられる。

幼虫の生息場所

成虫の繁殖産卵場所と幼虫の棲息地がずれていることから、幼虫が金目川を流下していることはほぼ間違いない(表 6)。幼虫の棲息地である砂底は岸近くの浅瀬に形成されるが、出水や濁水に伴う消失や干出、再形成が頻繁に起こる不安定な場所である。そのため流量の増加時などに幼虫の流下が発生すると考えられる。幼虫の棲息個体数は砂底の安定性に依存していると考えられる。すなわち、砂底が安定して存在している地点が、幼虫の分布のピークとなっていると考えられる。また、下流側の地点ほど老齢幼虫の比率が高いのは、齢数を重ね、成育期間が長いほど流下に見舞われる機会が多いためと推察される。

幼虫の成長と羽化

一次調査から五次調査の幼虫の齢期構成の変遷を見ると、調査時期が春季に近づくほど、終齢幼虫 F-0 の割合が増え、これに伴い F-1、F-2 幼虫の比率が低下している。これは、幼虫 2 年目の 4 月から 5 月にかけて成虫へと羽化する生活史を反映していると考えられる。

羽化殻調査の結果では、下流側の地点ほど羽化期が早く、それに対して上流側の地点ほど羽化期が遅くなる傾向にあった。これには水温が影響している可能性がある。つまり、水温が羽化の誘発要因であり、水温の高い下流側ほど早く羽化期を迎えると推察される。しかし、春季の水温調査は実施されなかったため、この仮説は憶測の域を出ない。

表 6. 金目川水系における 2 種の分布状況

流域	地点	クロサナエ			ダビドサナエ		
		幼虫	殻	成虫	幼虫	殻	成虫
上流	①			3			
	②	3		3			
	③	7					3
	④	25	7				79
	⑤						2
	⑥	5				12	16
中流	⑦	1	1		8	6	
	⑧	1			7		
	⑨	1			3		
	⑩				8	1	
	⑪				2		
	⑫				1	2	
下流	⑬						

数値は個体数。幼虫は終齢幼虫、殻は羽化殻。

成虫雄の繁殖行動

金目川のダビドサナエ及び道志川のクロサナエの雄が明瞭な縄張り行動を示したのに対し、金目川のクロサナエの雄にはそれが見られなかった。この背景には、雄の個体密度が影響していると考えられる。雄の個体密度が高い場所では、他の雄を排除して産卵適地を縄張りとして確保することが雌を獲得する上で有利であり、個体密度が低い場所では争いなしに自動的に産卵適地を確保できるので、縄張り行動が見られないと推察される。雄の縄張り行動はそのほとんどが水際で観察されており、雌は交尾相手を求めて水際に飛来し、産卵適地に縄張りを確保している雄を好むと考えられる。一方、陸域など産卵不適地にいる雄は好まないのかもしれない。実際に雌が雄を受け入れてタンデムおよび交尾態が形成された場所は、観察された限り全て水際であった。交尾個体は縄張りを離れた陸域で観察されたが、これは交尾中に縄張り占有している他の雄からの妨害を避ける目的があると考えられる。

成虫の遡上産卵行動

羽化した地点や幼虫が多く棲息する地点に産卵するのであれば、産卵のための移動は僅かであり、移動コストを抑えられるように思われる。しかし、実際は終齢幼虫や羽化殻の分布地点よりかなり上流まで遡り産卵を行う。クロサナエの場合、幼虫の分布のピークでは繁殖活動は一切行われず、最上流域まで遡り、繁殖活動を行う(表7)。ダビドサナエでは幼虫の分布のピークでも繁殖活動を行う個体がいるが、これは少数であり大部分は更に上流で繁殖活動を行う(表7)。成虫が上流へ遡上して産卵する習性には、幼虫の捕食回避戦略が関与している可能性がある。金目川は上流域の下部から下流へ向かって魚類の種数が増大する。例えば、砂底に棲息する肉食性のヒガシマドジョウは、ダビドサナエの分布のピークである地点⑥が分布の最上流地点であり、そこから⑫までの上～中流域で確認されている。このドジョウは幼虫の天敵となっている可能性がある。こうし

た天敵による捕食を回避するためには、天敵が棲息しない流域で産卵することが有効であろう。成虫が遡上して産卵する行動には、捕食回避による幼虫の生存率上昇という適応的意義があると推察される。

今後の展望

本研究には未だ多くの課題が残されている。棲息地分化の要因として、幼虫の生育条件は可能性が低いことが示されたものの、主因と考えられる成虫の繁殖環境の条件を明確に評価・定量化するには至らなかった。また、金目川ではクロサナエの成虫は稀少であり、ダビドサナエと比較した行動生態学的解析ができなかった。羽化を誘発すると考えられる水温上昇を確かめるには、春季の水温調査が必須である。幼虫の受動的流下を立証するためには大規模出水の前後で採集調査を行う必要がある。今後、本研究で示唆された事柄を土台に2種の分布状況を一河川や一水系のみならず、全国の複数の河川において調査し、それらを比較研究することで、クロサナエとダビドサナエの棲息地分化の要因が明らかになると期待される。

謝辞

神奈川県立生命の星・地球博物館 主任学芸員 荻部治紀氏には、道志川支流のクロサナエ調査におけるご指導はもとより、本研究全般についてのご助言を賜りました。諏訪部昌氏をはじめとする神奈川県トンボ調査・保全ネットワークの皆様には、調査用品や情報のご提供を賜りました。これらの方々に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) 木尾園暁, 川島逸郎, 二橋 亮 (2012) *ネイチャーガイド 日本のトンボ*. 文一総合出版, 東京.
- 2) Corbet PS [椿 宜高, 生方秀紀, 上田哲行, 東 和敬 監訳] (1999) *トンボ博物学 行動と生態の多様性*. 海游社, 東京.
- 3) 石田昇三, 石田勝義, 小島圭三, 杉村光俊 (1988) *日本産トンボ幼虫・成虫検索図説*. 東海大学出版会, 東京.
- 4) 荻部治紀, 守屋博文, 林 文男 (2010) 神奈川県を中心としたカワトンボ属の分布. *神奈川県立博物館研究報告 (自然科学)* 39: 25-34.

■原 著■

相模湾平塚沖の貝類相：2016年と2017年の調査結果

大和田正人^{2,4} 齋藤礼弥^{1,2} 緒方大地³ 清野裕暉³ 加瀬友喜^{1,2} 金沢謙一^{1,2,3}

Molluscan Fauna in Sagami Bay off Hiratsuka:
Results of the Investigation by Dredging in 2016 and 2017

Masato Owada^{2,4}, Masaya Saito^{1,2}, Daichi Ogata³, Yuki Kiyono³, Tomoki Kase^{1,2}
and Ken'ichi Kanazawa^{1,2,3}

¹ Research Institute for Integrated 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 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: Molluscs and bottom sediments were collected by dredging in Sagami Bay off Hiratsuka in September 2016 and 2017. A total of 488 live specimens were collected, belonging to 36 species: 15 gastropods, 2 scaphopods, and 19 bivalves. Nine of them (*Umbonium costatum*, *Phalium flammiferum*, *Orinella pulchella*, *Musculus cupreus*, *Pteria breviaalata*, *Kellia japonica*, *Moerella jedoensis*, *Solen strictus*, and *Pitar noguchii*) were the first record in the investigation that started in 2010. All collected species except *Modiolus flavidus*, which is a tropical species, were warm-water species. The bottom sediment at around a depth of 5-10 m was medium to very fine grained sand containing 3.4-4.1% mud, and that at around a depth of 20-30 m was fine to very fine grained sand containing 7.0-9.1% mud. Around a depth of 40 m, the bottom sediment was fine to very fine grained sand containing 13.0% mud.

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でドレッジを使用し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⁾、Okutani and Matsukuma³⁾、Okutani⁴⁾などが知られる。中央部については、大和田ほか⁵⁻⁹⁾の平塚沖に生息する貝類の調査、佐藤ほか^{10, 11)}の藤沢市地先および大磯の調査などが知られるが、東部や西部に比べると報告が少ない。また、貝類の分布が底質に大きく影響されることは従来から知られるが、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い。著者らは神奈川県平塚沖で貝類と海底堆積物を同時に採集し、年ごとの貝類相の変化及び底質と種組成の関係を2010年から継続的に調査している。今回は2016年と2017年に行った調査の結果について報告する。

材料と方法

2016年9月1日(特別採捕許可番号:第27-48)と2017年9月13日(特別採捕許可番号:第28-52)に調査を行った。漁船を借り、神奈川県平塚市の平塚新港から直線で約1500m以内の海域で貝桁網あるいはドレッジを使用して貝類と海底堆積物を採集した(Table 1, Fig. 1)。2016年の調査では、間口70×30cm、袋部のメッシュサイズ20mmの貝桁網を使用して貝類を採集した。2017年の調査では、間口50×15cm、袋部のメッシュサイズ20mmのドレッジ(離合社、5121-B)を使用して貝類を採集し、直径17cm、長さ42cmの小型円筒形ドレッジ(離合社、5113)を使用して堆積物を採集した。簡易ドレッジの後部に小型円筒形ドレッジを取り付けて貝類と堆積物を同時に採集した。採集した貝類は実験室に持ち帰って種ごとにまとめ、100%エタノール

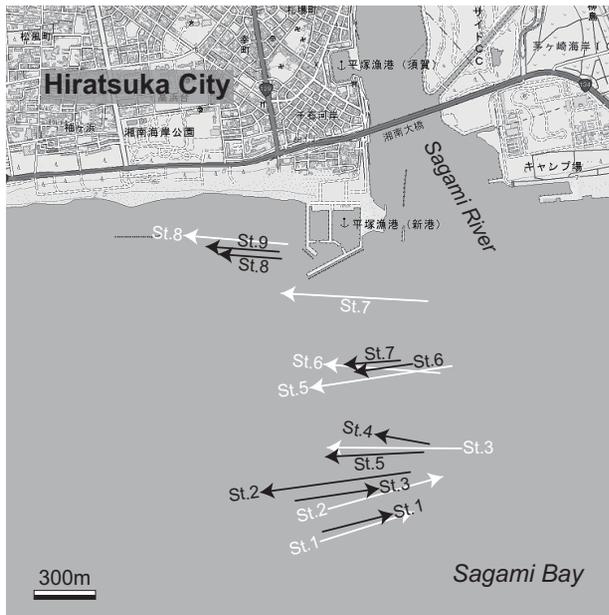


Fig. 1. Sampling localities. Arrows show the positions and directions of dredging. The white arrows indicate the investigation in September 2016, and the black arrows indicate that in September 2017.

Table 1. Depths and positions where a dredge was dropped or lifted

sampling date	station	position	depth (m)
September, 2016	St. 1	35°18'00.4"N, 139°21'51.7"E-35°18'05.2"N, 139°22'09.8"E	45.0-45.1
	St. 2	35°18'05.5"N, 139°21'53.3"E-35°18'10.4"N, 139°22'15.3"E	34.6-31.2
	St. 3	35°18'14.9"N, 139°22'19.0"E-35°18'15.0"N, 139°21'53.1"E	20.5-19.6
	St. 5	35°18'27.7"N, 139°22'17.1"E-35°18'24.3"N, 139°21'49.6"E	10.7-13.2
	St. 6	35°18'27.2"N, 139°22'14.7"E-35°18'27.3"N, 139°21'52.3"E	10.7-11.7
	St. 7	35°18'37.8"N, 139°22'12.6"E-35°18'39.0"N, 139°21'44.4"E	5.2-7.3
	St. 8	35°18'46.8"N, 139°21'45.5"E-35°18'48.1"N, 139°21'25.5"E	3.4-3.3
	September, 2017	St. 1	35°18'02.4"N, 139°21'52.6"E-35°18'05.1"N, 139°22'06.3"E
St. 2		35°18'11.4"N, 139°22'09.3"E-35°18'08.2"N, 139°21'40.8"E	27.8-29.1
St. 3		35°18'06.9"N, 139°21'47.6"E-35°18'08.8"N, 139°22'03.6"E	30.9-32.5
St. 4		35°18'15.7"N, 139°22'13.2"E-35°18'17.4"N, 139°22'02.4"E	20.1-17.3
St. 5		35°18'14.3"N, 139°22'12.0"E-35°18'13.9"N, 139°21'53.1"E	21.9-21.0
St. 6		35°18'28.2"N, 139°22'09.8"E-35°18'27.0"N, 139°21'58.5"E	10.7-12.0
St. 7		35°18'28.3"N, 139°22'07.4"E-35°18'27.7"N, 139°21'56.7"E	10.7-11.9
St. 8		35°18'44.6"N, 139°21'44.7"E-35°18'45.2"N, 139°21'32.9"E	5.0-6.0
St. 9		35°18'45.4"N, 139°21'44.5"E-35°18'46.0"N, 139°21'30.2"E	5.2-5.0

で固定した。種の同定は奥谷^{12, 13)}及び黒田ほか²⁾に基づいて行い、共に記載されている分布域を記録した。堆積物については乾燥重量を計測し、目合い2 mm、1 mm、0.5 mm、0.25 mm、0.125 mm、0.063 mmの連続篩を使用して粒径ごとに篩い分けを行い、各粒径に篩い出された堆積物の重量を精密天秤で計測した。

結果 貝類

2016年の調査では腹足綱10種、二枚貝綱10種の合計20種340個体、2017年の調査では腹足綱10種、掘足綱2種、二枚貝綱13種の合計25種148個体の生貝が採集された (Table 2)。調査全体では腹足綱15種、掘足綱2種、二枚貝綱19種の合計36種488個体の生貝が採集された。このうちの9種 (キサゴ、カズラガイ、クチキレガイ、タマエガイ、ウグイス

ガイ、ドブシジミモドキ、モモノハナガイ、マテガイ、シロウスハマグリ) は、2010年から継続している調査では初めて採集された。ウグイスガイはヤギ類に足糸で付着しており、タマエガイはエボヤの体内から見つかった。採集された貝類の分布域を Table 3にまとめた。紀伊半島以南に分布するサザナミマクラを除く35種が房総半島以南に分布する暖流系種であった。

海底堆積物

2017年の調査で採集した海底堆積物の粒度分布を Fig. 2に示した。水深5 m付近 (St.8とSt.9)の堆積物は中粒砂～極細粒砂で構成され、含泥率は3.4～3.7%であった。水深10 m付近 (St.6とSt.7)の堆積物は中粒砂～細粒砂で構成され、含泥率は3.6～4.1%であった。水深20 m付近 (St.4とSt.5)の堆積物は細粒砂～極細粒砂で構成され、含泥率は7.0～7.2%であった。水深30 m付近 (St.2とSt.3)の堆積物は細粒砂～極細粒砂で構成され、含泥率は7.6～9.1%であった。水深40 m付近 (St.1)の堆積物は細粒砂～極細粒砂で構成され、含泥率は13.0%であった。

討論

水深5～10 m付近の堆積物は中粒砂～極細粒砂の幅広い粒度で構成されるが、シルトをほぼ含まない。したがって、水流によって表層の堆積物が流動し易い環境と見られる。ここでは、キサゴ、ダンベイキサゴ、ツメタガイ、ホタルガイ、ヒメバカガイなどの埋在性で運動能力の高い貝類が数多く採集された。水流のある環境は、これらの貝類にとって都合が良いのであろう。一方、ヒメカノコアサリのように殻長8 mm以下で体サイズが小さく、砂泥底を好む貝類も採集された。これらの貝類は盆地のような場所に溜まった粒度の小さな堆積物に生息するのであろう。水深20～30 m付近の堆積物は細粒砂～極細粒砂で構成され、シルトを少し含む。したがって、水深5～10 mと比較して水流が弱い環境と見られる。ここでは、ミタマキガイ、サザナミマクラ、ヒメカノコアサリ、マツヤマワスレなどの貝類が採集された。これらの貝類は、サザナミマクラを除き、これまでの調査⁵⁻⁹⁾で繰り返し採集されている。したがって、相模湾中央部を特徴づける貝類と言える。水深40 m付近の堆積物は水深30 mと同様に細粒砂～極細粒砂で構成されるが、シルトを比較的多く含む。したがって、水流が弱く、表層の堆積物はあまり流動しない環境と見られる。ここでは、ハナムシロ、ウスキシワタ、ウスハマグリなどの貝類が採集され

Table 2. List of the species collected in the investigations in September 2016 and 2017

class	scientific name	Japanese name	September, 2016								September, 2017									total
			St.1	St.2	St.3	St.5	St.6	St.7	St.8	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	St.6	St.7	St.8	St.9		
Gastropoda	<i>Umbonium costatum</i>	キサゴ							1	8									9	
	<i>Umbonium giganteum</i>	ダンベイキサゴ	2			1				30						5	2		40	
	<i>Glossaulax didyma</i>	ツメタガイ				1	1			6					1	1			10	
	<i>Natica buriasensis</i>	カスミコダマ										1							1	
	<i>Phalium flammiferum</i>	カズラガイ			1														1	
	<i>Niotha variegata</i>	アラレガイ			2														2	
	<i>Zeuxis castus</i>	ハナムシロ		1								1							2	
	<i>Fusinus perplexus</i>	ナガニシ				1									1				2	
	<i>Olivella japonica</i>	ホタルガイ																6	6	
	<i>Olivella fulgulata</i>	ムシボタル							1										1	
	<i>Paradrillia consimilis</i>	ヒメシャジク										1							1	
	<i>Brevimyurella japonica</i>	ヒメトクサ											1						1	
	<i>Orinella pulchella</i>	クチキレガイ											1					1	2	
	<i>Philine argentata</i>	キセワタガイ			1														1	
	<i>Philine vitrea</i>	ウスキセワタ			1							4							5	
	Scaphopoda	<i>Episiphon subrectum</i>	ロウソクツノガイ															2		2
		<i>Laevidentarium coruscum</i>	セトモノツノガイ															1		1
	Bivalvia	<i>Jupiteria confusa</i>	ゲンロクソツデガイ															1		1
		<i>Glycymeris imperialis</i>	ミタマキガイ		3									1						4
<i>Modiolus flavidus</i>		サザナミマクラ										1	2						3	
<i>Musculus cupreus</i>		タマユガイ						1											1	
<i>Musculista senhousia</i>		ホトトギスガイ							1										1	
<i>Pteria brevilata</i>		ウグイスガイ											1						1	
<i>Kellia japonica</i>		ドブシジミモドキ												1					1	
<i>Maetra chinensis</i>		バカガイ								3									3	
<i>Maetra crossei</i>		ヒメバカガイ							4	19								1	24	
<i>Chion semigranosa</i>		フジノハナガイ							1										1	
<i>Moerella jodoensis</i>		モモノハナガイ												1					1	
<i>Solen strictus</i>		マテガイ			1														1	
<i>Siliqua pulchella</i>		ミンガイ																1	1	
<i>Placamen tiara</i>		ハナガイ																1	1	
<i>Veremolpa micra</i>		ヒメカノコアサリ				240							1	6	4	40	52	1	344	
<i>Pitar japonicus</i>		ウスハマグリ											1						1	
<i>Pitar noguchii</i>		シロウスハマグリ												1					1	
<i>Callista chinensis</i>		マツヤマワスレ		1	2	1			3				2						9	
<i>Solidicorbula erythron</i>		クチベニガイ						1	1										2	

Table 3. Distributions of the species collected in the investigation

distribution areas	number of species
Hokkaido to Kyushu	2
southern Hokkaido and southward	1
southern Hokkaido to Kyushu	8
Honshu to Okinawa	1
Tohoku and southward	2
Tohoku to Kii Peninsula	2
Kashima sea to Kyushu	1
Boso Peninsula and southward	10
Boso Peninsula to Kyushu	5
Boso Peninsula to Okinawa	1
Sagami Bay to Kyushu	1
Sagami Bay and southward	1
Kii Peninsula and southward	1
total species	36

た。水深 40 m 付近は今回調査した他の水深と比べて安定した環境と見られるが、採集された貝類は 4 種 8 個体と少ない。このような傾向はこれまでの調査⁵⁻⁹⁾でも同様に見られる。平塚沖では、水深 40 m 以深でシルトを比較的多く含む堆積物に生息する貝類が少ないのであろう。

分布の中心が紀伊半島以南であるサザナミマクラは 2010 年、2012 年の調査^{6,8)}でも採集されたが、いずれも殻長 15 mm 以下の幼貝であったため、無効分散とされた。しかし、今回の調査では殻長 20 mm 以上の成貝が 2 個体採集されたことから平塚沖で繁

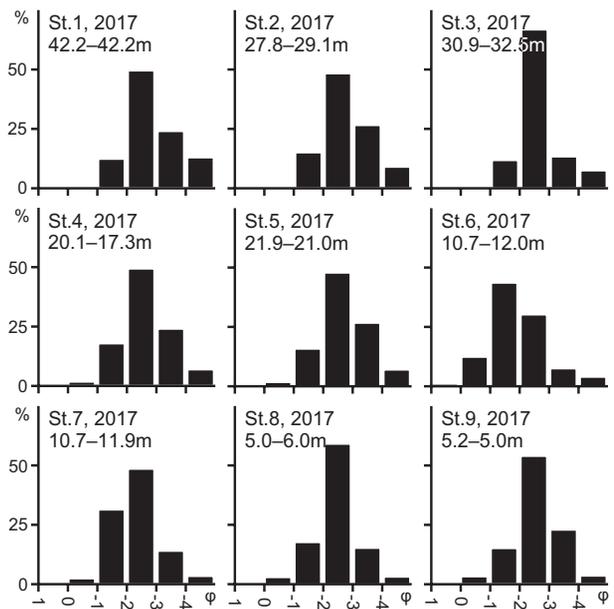


Fig. 2. Grain size distribution and depth on each locality. Grain size was shown in phi scale.

殖していると考えられる。サザナミマクラは相模湾東部のドレッジ調査²⁾でも採集されており、最近になって平塚沖に定着したと見られる。

キサゴは 2016 年の調査でダンベイキサゴと共に初めて採集された。採集された水深は約 3 m であり、比較的浅い。奥谷^{12,13)}は、キサゴとダンベイキサゴの垂直分布をそれぞれ潮間帯～水深 10 m 及び水深 5～30 m としており、キサゴの生息地の方が浅いとした。一方、佐藤ほか¹⁰⁾は、藤沢市地先のキサゴと

ダンベイキサゴの垂直分布をそれぞれ水深 8 m 以深及び水深 1 ~ 5 m としており、キサゴの生息地の方が深いとした。平塚沖では、水深 3 m よりも浅いところにはキサゴが生息し、深いところにはダンベイキサゴが生息するが、水深 3 m 付近では両種が共に生息すると見られる。

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、神奈川県農政部水産課の諸氏、神奈川大学の池谷幸子氏と戸田紗綾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 2016 年度、2017 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ます。

文献

- 1) 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.
- 2) 黒田徳米, 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.
- 3) Okutani T and Matsukuma A (1982) Some interesting mollusks dredged from the shelf around the southern coast of the Izu Peninsula, Honshu, with description of two new species. *Mem. Natn. Sci. Mus., Tokyo* **15**: 163-183.
- 4) Okutani T (2006) Protobranchia and Anomalodesmata (Mollusca: Bivalvia) collected in shelf, slope and bathyal zones in Sagami Bay, 2002-2004. *Mem. Natn. Sci. Mus., Tokyo* **40**: 295-306.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 大和田正人, 小林由弥, 大久保至, 金沢謙一 (2014) 相模湾平塚沖の貝類相: 2012 年と 2013 年の調査結果. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **25**: 87-90.
- 9) 大和田正人, 齋藤礼弥, 小林 剛, 吉田汐里, 金沢謙一 (2016) 相模湾平塚沖の貝類相: 2014 年と 2015 年の調査結果. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **27**: 59-62.
- 10) 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 Pref. Mus. (Nat. Sci.)*. **38**: 95-106.
- 11) 佐藤武宏, 渡邊芳明, 小玉大介 (2013) 相模湾大磯地域におけるチョウセンハマグリの生息を制限する要因. *Bull. Kanagawa Pref. Mus. (Nat. Sci.)*. **42**: 97-106.
- 12) 奥谷喬司 (1986) 決定版生物大図鑑貝類. 世界文化社, 東京.
- 13) 奥谷喬司 (2000) 日本近海産貝類図鑑. 第 1 版. 東海大学出版, 東京.

■原 著■ 2017年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

サルエビ卵黄形成抑制ホルモンの精製および構造決定

花塚真史¹ 梶 圭祐¹ 吉田幸宏¹ 筒井直昭² 大平 剛^{1,3}

Purification and Characterization of Crustacean Hyperglycemic Hormone-Family Peptides with Vitellogenesis-Inhibiting Activity from the Southern Rough Shrimp *Trachysalambria curvirostris*

Masafumi Hanazuka¹, Keisuke Kaji¹, Yukihiro Yoshida¹, Naoaki Tsutsui²
and Tsuyoshi Ohira^{1,3}

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

² Ushimado Marine Institute, Faculty of Science, Okayama University, Setouchi City, Okayama 701-4303, Japan

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

Abstract: Vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) in Crustacea belongs to the crustacean hyperglycemic hormone (CHH)-family. In order to characterize multiple VIH molecules in the southern rough shrimp *Trachysalambria curvirostris*, two CHH-family peptides were purified by reversed-phase HPLC and identified by N-terminal amino acid sequencing. The vitellogenesis-inhibiting activities of the CHH-family peptides were examined using ex vivo incubation of ovarian fragments of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. The two CHH-family peptides reduced vitellogenin mRNA levels in the ovarian fragments. The two CHH-family peptides did not show any hyperglycemic activity based on an *in vivo* injection assay. From these results, the two CHH-family peptides were designated as Trc-VIH-I and -II, respectively. Two cDNAs encoding Trc-VIH-I and -II precursors were cloned by RT-PCR coupled with 5'- and 3'-RACE. The mature Trc-VIH-I and -II were found to consist of 72 amino acid residues containing six conserved cysteine residues and possess an amidated C-terminus, respectively. The mature Trc-VIH-I and -II exhibited the highest sequence similarity with a CHH-family peptide showing vitellogenesis-inhibiting activity in a penaeid shrimp species, *Litopenaeus vannamei* VIH (Liv-SGP-G), by tBLASTn analysis. The mature Trc-VIH-I and -II shared amino acid identities of 63.0 and 74.3% with Liv-SGP-G, respectively. These results indicate that Trc-VIH-I and -II regulate vitellogenesis in *T. curvirostris*.

Keywords: crustacea, crustacean hyperglycemic hormone-family peptide, vitellogenesis-inhibiting hormone, sinus gland, southern rough shrimp, *Trachysalambria curvirostris*

序論

甲殻類の複眼を支える部分を眼柄と呼ぶ。組織形態学的研究から、眼柄の基部にはX器官と呼ばれる神経分泌細胞群と、そこから伸びる軸索の末端で形成される神経血液器官であるサイナス腺が存在することが示された¹⁾。眼柄由来の神経ペプチドはX器官で合成された後、サイナス腺に貯蔵され血液中に放出されることが明らかとなったため、これらはサイナス腺ホルモンと呼ばれるようになった。

た。これまでに、血糖上昇ホルモン (Crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、卵黄形成抑制ホルモン (Vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH)、脱皮抑制ホルモン (Molt-inhibiting hormone, MIH)、大顎器官抑制ホルモン (Mandibular organ-inhibiting hormone, MOIH)、色素拡散ホルモン (Pigment dispersing hormone, PDH)、赤色素凝集ホルモン (Red pigment-concentrating hormone,

RPCH) がサイナス腺ホルモンとして同定されている²⁾。CHH、VIH、MIH、MOIH の 4 種類は互いに類似したアミノ酸配列を持つため、CHH 族ペプチドとよばれる 1 つのペプチドファミリーを形成している³⁾。CHH 族ペプチドは 6 個のシステイン残基が完全に保存されており、それらは 3 対のジスルフィド結合を形成している。

甲殻類の卵成熟は VIH による抑制的な調節を受けている。1987 年、*in vivo* の生物検定において卵成熟の進行を抑制する活性を指標として、アメリカンロブスター (*Homarus americanus*) のサイナス腺から VIH が精製、単離され⁴⁾、その後、1991 年に一次構造が決定された⁵⁾。1995~1999 年にかけて、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) から 7 種類の CHH 族ペプチド (Maj-SGP-I~VII) が単離・構造決定された⁶⁻⁸⁾。これら 7 種類の CHH 族ペプチドのうち Maj-SGP-IV を除く 6 種類は CHH 活性および VIH 活性を有することから、これら 6 種類の CHH 族ペプチドのどれかが成熟を制御していると考えられている。

VIH は、種苗生産や養殖への応用が期待されることから多くの人々に関心を持たれてきた。しかし、現在までに同定された VIH は数例しかなく、研究は進んでいない。これまでに、VIH の研究が行われてきたエビ類は、アメリカンロブスターやクルマエビのような高い商業的価値を持つ種である。甲殻類の成熟制御機構を解明するためには、新たな種の甲殻類を使って VIH の研究を進める必要がある。本研究で実験対象としたサルエビ (*Trachysalambria curvirostris*) は養殖対象種ではないが、東海地方から西日本にかけて広く漁獲されている。そのため、活きた状態で購入することが可能である。また、短期間であれば飼育をすることもできる。これらの理由から、サルエビは新たな実験動物として有望と考えられる。そこで本研究では、サルエビの VIH を精製・単離し、それらの構造を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

実験動物

2016 年 7 月、2017 年 7 月に岡山県瀬戸内市で漁獲されたサルエビ (平均体重 15 g) と、2017 年 5 月に愛知県西尾市で漁獲されたサルエビ (平均体重 5 g) を実験で用いた。

サルエビ CHH 族ペプチドの精製

サルエビのサイナス腺を実体顕微鏡下でピンセットとマイクロ剪刀を用いて外科的に摘出した。サイナ

ス腺抽出物は Yang らの方法に従って調製した⁹⁾。次に、抽出物を Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters) に通して、10% アセトニトリル (MeCN) /0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) で洗浄した後、60% MeCN/0.05% TFA でサルエビの CHH 族ペプチドを含む画分を溶出した。遠心濃縮機を用いて MeCN を蒸発させた後、逆相 HPLC に供した。カラムは Shodex Asahipak ODP-50 4E (4.6 x 250 mm, 昭和電工) を用い、20% MeCN/0.05% TFA から 60% MeCN/0.05% TFA までの 40 分間のリニアグラジェントで分画した。流速は 1 ml/分、検出は 225 nm の波長で行い、溶出パターンを見ながらマニュアルでピーク産物を分取した。

質量分析および N 末端アミノ酸配列

逆相 HPLC で精製したピーク産物を減圧濃縮した後、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Time-of-Flight (TOF) 型質量分析機 (AXIMA®-CFR, 島津製作所) を用いて各ピーク産物の質量を測定した。また、アミノ酸配列自動分析機 (model 491HT protein sequencer, Applied Biosystems) で各ピーク産物の N 末端アミノ酸配列を分析した。

血糖上昇活性の測定

2017 年 7 月に岡山県瀬戸内市で漁獲されたサルエビを血糖上昇活性の測定に用いた。*in vivo* の投与実験は Yang らの方法に従って行った⁹⁾。精製した 2 種類のサルエビ VIH (Trc-VIH-I と Trc-VIH-II) を 1 µg ずつ注射した。ネガティブコントロールはクルマエビ生理食塩水のみを注射した。

卵黄形成抑制活性の測定

2017 年 10 月に徳島県鳴門市の養殖業者から購入した未成熟な雌クルマエビ (平均体重 25 g) を卵黄形成抑制活性の測定に用いた。卵巣の培養は Tsutsui らの方法に従って行った¹⁰⁾。精製した Trc-VIH-I と Trc-VIH-II を 1 µg ずつ培養液に添加し、クルマエビの卵巣片を培養した。ネガティブコントロールは培養液のみで卵巣片を培養した。

RT-PCR

サルエビ眼柄の全 RNA は Ribozol (AMRESCO) を用いて抽出した。サルエビ眼柄の first strand cDNA は ReverTra Ace® (TOYOBO) を用いて合成し、RT-PCR と 3' RACE の鋳型 cDNA として使用した。図 1 のピーク 17 (Trc-VIH-I) とピーク 19 (Trc-VIH-II) の N 末端アミノ酸配列解析の結果を基に、縮重オリ

ゴヌクレオチドプライマー (Trc-VIH-I は VIH-I-F と VIH-I-R、Trc-VIH-II は VIH-II-F と VIH-II-R) を設計し、合成を外注した (表 1)。PCR には Gotaq Green Master Mix (Promega) を 10 μ L と、鋳型 cDNA 溶液を 0.5 μ L、超純水を 7.5 μ L、100 μ M のプライマー F と R (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-F と VIH-I-R、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-F と VIH-II-R) をそれぞれ 1.0 μ L ずつを含む合計 20 μ L の溶液を使用した。反応は 94°C で 3 秒間保温の後、94°C で 30 秒間、53°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間のサイクル 35 回繰り返し、最後に 72°C で 3 分間の伸長反応を行った。

3'RACE

RT-PCR で増幅した Trc-VIH-I および Trc-VIH-II をコードする cDNA 断片の塩基配列を基に 3 種類ずつのフォワードプライマー (Trc-VIH-I は VIH-I-3F、VIH-I-3NF、VIH-I-3NNF、Trc-VIH-II は VIH-II-3F、VIH-II-3NF、VIH-II-3NNF) を設計し、合成を外注した (表 1)。また 3 種類のリバースプライマー (RTG、RTGN、RTG-NN) を使用した (表 1)。1 段階目の PCR ではプライマー 3F (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-3F、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-3F) と RTG を使用して、PCR 反応は 94°C で 3 分間保温の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C で 3 分間の伸長反応を行った。次に 1 回目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを鋳型として、プライマー 3NF (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-3NF、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-3NF) と RTGN を使用して 1 段階目と同様の条件で 2 段階目の PCR を行った。さらに 2 回目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを鋳型として、プライマー 3NNF (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-3NNF、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-3NNF) と RTGNN を使用して 1 段階目と同様の条件で 3 段階目の PCR を行った。

5'RACE

鋳型として用いるサルエビ眼柄の first-strand DNA の合成を SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。次に RT-PCR と 3' RACE で増幅した Trc-VIH-I および Trc-VIH-II をコードする cDNA 断片の塩基配列を基に 4 種類のリバースプライマー (Trc-VIH-I は VIH-I-5R と VIH-I-5NR、Trc-VIH-II は VIH-II-5R と VIH-II-5NR) を設計し、合成を外注した (表 1)。また、SMART RACE cDNA Amplification Kit に添付されている 2 種類のフォワードプライマー (UPM、NUP) を使

用した。PCR には TaKaRa LA PCR kit (TaKaRa) を用いて、10x LA PCR Buffer を 2 μ L、2.5 mM dNTP を 2 μ L、5' RACE 用の鋳型 cDNA 溶液を 0.5 μ L、LA taq HS ver. を 0.1 μ L、超純水を 13.4 μ L フォワードプライマーとリバースプライマー (10 μ M) をそれぞれ 1 μ L を含む合計 20 μ L の溶液を使用した。1 回目の PCR ではプライマー 5R (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-5R、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-5R) と UPM を使用して、反応は 94°C で 3 分間保温の後、94°C で 30 秒間、72°C で 3 分間のサイクルを 5 回繰り返し、94°C で 30 秒間、70°C で 30 秒間、72°C で 3 分間のサイクルを 5 回繰り返し、94°C で 30 秒間、68°C で 30 秒間、72°C で 3 分間のサイクルを 27 回繰り返し、最後に 72°C で 5 分間の伸長反応を行った。次に 1 回目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを鋳型とし、プライマー 5NR (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-5NR、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-5NR) と NUP を用いて、1 段階目と同様の条件で 2 段階目の PCR 反応を行った。

表 1. Trc-VIH-I と Trc-VIH-II の cDNA クローニングに使用したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')
RTG	AACTGGAAGAATTCGCGGCCG
RTGN	TGGAAGAATTCGCGGCCGAG
RTGNN	AAGAATTCGCGGCCGAGGAA
VIH-I-F	TTCGACACNTCTGYACNGG
VIH-I-R	TAYTCCATRCAYTGDATAA
VIH-II-F	ACTTCTTGYACNGGNGTNTT
VIH-II-R	ATGCACTGDATRAANACNGG
VIH-I-3F	GTCTGCGGAGGACTGCTACAA
VIH-I-3NF	GAGGACTGCTACAATGCTTT
VIH-II-3F	GTCTGCGGAGGACTGCTACAA
VIH-II-3NF	TGCGAGGACTGCTACAATGT
VIH-II-3NNF	GAGGACTGCTACAATGCTTT
VIH-I-5R	CGCAGACGCGGTTGAGACGCCGAGGA
VIH-I-5NR	CCCGACCAGTTGACAGTGGGCGCGGTA
VIH-II-5R	GTTCAGTCCCACGTCCAGGTGGTGGG
VIH-II-5NR	CGAGGAGTTCACGTCCCACGTCCAGGTG

塩基配列の決定

PCR 産物は pGEM®-T Easy ベクター (Promega) にサブクローニングした。挿入したインサート DNA の塩基配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った後、DNA シークエンサー ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

結果

サルエビ CHH 族ペプチドの精製

サルエビのサイナス腺抽出物 (186 個相当量) を逆相 HPLC で分画した結果、多数のピークが観察され

た (図 1)。これらのピーク産物のマスペクトルを MALDI-TOF MS を用いて測定した結果、ピーク 17 に m/z 8402.91 (M+H)⁺ のイオンピークが (図 1)、ピーク 19 に m/z 8443.65 (M+H)⁺ のイオンピークが観察された。これまでの研究から、VIH を含む CHH 族ペプチドはサイナス腺中の主要なペプチドであることと、分子量は 8,000~9,500 であることが明らかとなっている。これらの条件を満たしているピーク 17 と 19 は、サルエビの CHH 族ペプチドである可能性が高いと考え、N 末端アミノ酸配列解析に供した。

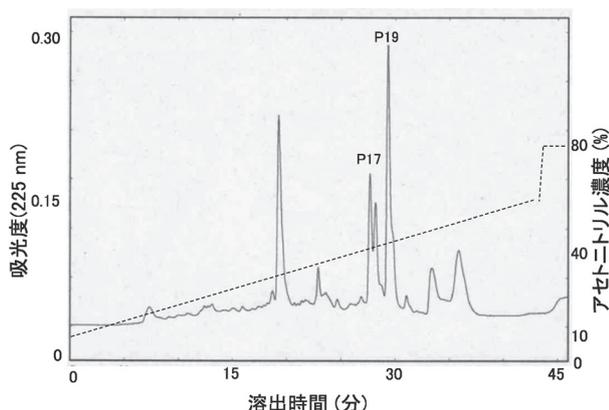


図 1. 逆相 HPLC を用いたサルエビのサイナス腺抽出物 (186 個相当量) の分離. 点線はアセトニトリル濃度を示す。

サルエビ CHH 族ペプチドの N 末端アミノ酸配列解析

ピーク 17 と 19 の N 末端アミノ酸配列を解析した結果、いずれも十脚類の CHH 族ペプチドと類似したアミノ酸配列を有していた (図 2)。

	10	20	30	40
P17	SLFDP?CTGV	FNRGLLGRLN	RVCDDCYNVF	REPHV?TECR
P19	SLFDTSCTGV	FNRDLLGRLN	RVCEDCYNVF	REPKVATFCR
	50	60		
P17	SNCFLNPSFI	Q		
P19	SNCYLNPVFI	QCMEYLLPEE		

図 2. サルエビ CHH 族ペプチドの N 末端アミノ酸配列. ? は同定できなかったアミノ酸を示す。

サルエビ CHH 族ペプチドの生物活性の測定

まず、ピーク 17 と 19 の血糖上昇活性を測定した。ピーク 17 と 19 をサルエビ 1 尾あたり 1 μ g ずつ投与した。その結果、血糖値はそれぞれ 18 ± 5.7 、 9 ± 5.8 μ g/ml ずつ減少した。この結果より、ピーク 17 と 19 はサルエビの血糖上昇ホルモンではないと考えられた。

次いで、ピーク 17 と 19 の卵黄形成抑制活性を測定した。ピーク 17 と 19 を 1 μ g ずつ培地に添加したところ、Vg mRNA 量は $63 \pm 15\%$ および $51 \pm 8\%$

に減少した (図 3)。これらの値はコントロール群と比べて有意ではなかったが、ピーク 17 と 19 に Vg 遺伝子の発現を抑制する傾向が観察された。これらの結果より、本研究ではピーク 17 と 19 をサルエビの卵黄形成抑制ホルモン I と II (Trc-VIH-I と Trc-VIH-II) と名付けた。

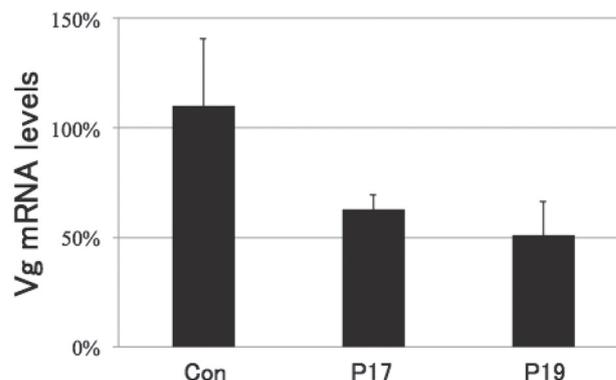


図 3. サルエビ CHH 族ペプチドの卵黄形成抑制活性. エラーバーは標準誤差を示す. Con は培地のみで卵巣を培養したコントロール群を示す。

Trc-VIH-II をコードする cDNA のクローニング

Trc-VIH-I と Trc-VIH-II をコードする cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した (図 4 と 5)。Trc-VIH-I の cDNA は 648 bp からなり、330 bp の Open reading frame (ORF) を持ち、110 アミノ酸残基からなる Trc-VIH-I の前駆体をコードしていた (図 4)。Trc-VIH-I の前駆体は N 末端側から順に、19 アミノ酸残基からなるシグナルペプチド、15 残基からなる CHH precursor-related peptide (CPRP) と呼ばれる機能不明のペプチド、2 残基の塩基性アミノ酸残基 (Lys-Arg) からなるプロセシングシグナル、72 アミノ酸残基からなる Trc-VIH-I、および 2 アミノ酸残基 (Gly-Lys) からなるアミド化シグナルにより構成されていた (図 4)。

Trc-VIH-II の cDNA は 646 bp からなり、351 bp の ORF を持ち、117 アミノ酸残基からなる Trc-VIH-II の前駆体をコードしていた (図 5)。Trc-VIH-II の前駆体は N 末端側から順に、26 アミノ酸残基からなるシグナルペプチド、15 残基からなる CPRP、2 残基の塩基性アミノ酸残基 (Arg-Arg) からなるプロセシングシグナル、72 アミノ酸残基からなる Trc-VIH-II、および 2 アミノ酸残基 (Gly-Lys) からなるアミド化シグナルにより構成されていた (図 5)。

成熟型の Trc-VIH-I および Trc-VIH-II は C 末端がアミド化された、3 対のジスルフィド結合を含む 72 アミノ酸残基からなると推定された (図 6)。成熟 Trc-VIH-I および Trc-VIH-II はバナメイの VIH

```

1 ACGCGGGGAGCAACCGGGTCTTCGCCTCCAGAGTCGACTTCACTTTGCTCCAGCGTT
61 TTCAGTATGATCGCCTTTCGGCTGGTGAAGTACCCCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGG
  M I A F R L V Q V T L L V L V S S E
121 GCGCTCTCCTCCCGCTGCCCTCCCTCGGGGAGCACCACCTGGCCAGAGGCTCTCTC
  A L S S P A A S P R G E H H L L A [K R] S L
181 TTCGACCCCTCTCGACGGGCGCTTCAACCGGGGGCTCTCGGGCGTCTCAACCGCGTC
  F--D--P--S--C--T--G--V--F--N--R--G--H--L--G--R--L--N--R--V
241 TGCGACGACTGCTACAATGTCTTCAGGGAGCCTCATGTGCTACTGAGTGCAGGAACAAC
  C--D--D--C--Y--N--V--F--R--E--P--H--V--A--T--E--C--R--N--N
301 TGCTTCTGAACCCGCTCTTCAATCAATGCCTGGAGTACATCATTCGCGAGGACCTTCA
  C--F--L--N--P--S--F--I--Q--C--H--E--Y--I--I--P--E--D--L--H
361 GAGGAATACCGCGCCACGTCGCAACTGGTCGGGAAGTAGACAACCTCAGCGGAAAGAAA
  E--E--Y--R--A--H--V--Q--L--V [G K] *
421 CTCAGAAAGGAAAAACACAGATTTTTTTTTCTGATATTCTGTGATATTTTTCTTTGAA
481 TCCTACCTTTGATTTGATTTTTCAGGCAATGGTTTGGCATTGCTGATATGAAATGATGG
594 AAATAATAAAGGATATGTGAATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図 4. Trc-VIH-I 前駆体をコードする cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列. 太字はシグナルペプチドを, 下線は CPRP を, 白のボックスはプロセシングシグナルを, 点線の下線は Trc-VIH-I を, グレーのボックスはアミド化シグナルを示す.

```

1 ACGCGGGGAGCAACCGGGTCTTCGCCTCCAGAGTCGACTTCACTTTGCTCCAGCGTT
61 GCGATGATCAGTCCCAGATCGTGTTCGGCCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
  M I S P Q I V F V A L V V L L A A S S S
121 TGGCTCGCACCGTGGACGGCTCTCTTCCCGCGGGCTCCCGAGGGGCGACACCGCC
  V P R T V D C L S S P A A S P R G D H R
181 CTCTGAGGGCGCTCCCTCTTCGACAGCTTCGACGGGGTCTTCAATCGGACCTCTCTC
  L V [R R] S L F D T S C T G V F N R P H L
241 GGGAGGCTCAACCGCGTCTCGCAGGACTGCTACAATGTCTTCAGGGAGCCCAAGTCCGC
  G R L N B V C E D C Y N V F R E P K V A
301 ACTGAGTGCAGGAGCACTGCTACCTGAACCCGCTTTCATCCAGTGCATGGAGTACCTG
  T E C R S N C Y L N P V F I G C M E Y I
361 TCGCCAGAGGAGCTCCAGGAGTTCAGTCCCGCTCCAGGTTGGGAAGGAAAGTACGACT
  L P E E L H E E F Q S H V Q V V [G K] *
421 CGGGGACGGATCAGCAGACGACGATTTGGGGAACGGAACTTTTGGAACTTTGGGTC
481 TTGAGGCATTTTGTCTGAATATTTACGTCGCTGTGTTGCTCTTTTGTTCATCAGTAGTG
541 AAGGAAATCTGCTTTACAATTTATACAAAATTCAGACAGTCTTCCAGGAATAATGCATA
601 GAGCGGTAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

```

図 5. Trc-VIH-II 前駆体をコードする cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列. 太字はシグナルペプチドを, 下線は CPRP を, 白のボックスはプロセシングシグナルを, 点線の下線は Trc-VIH-II を, グレーのボックスはアミド化シグナルを示す.

```

Trc-VIH-I : SLFDLSCTGVFNRLLELRINRVGDDCYNVFRBHVATECR : 40
Trc-VIH-II : SLFDLSCTGVFNRLLELRINRVGDDCYNVFRBHVATECR : 40
Liv-SGP-G : ANFDLSCTGVYDRELLERLSRLGDDCYNVFRBHVATECR : 40
Maj-SGP-VI : AAFDLSCTGVYDRELLERLSRLGDDCYNVFRBHVATECR : 40
Maj-SGP-II : SLFDLSCTGVYDRELLERLSRLGDDCYNVFRBHVATECR : 40

Trc-VIH-I : NNCFLNPSFIQCLEYIIPEDLHEVRAHVQLV : 72
Trc-VIH-II : SNCYINPVFIQCMEYLLPEELHBEVQSHVQV : 72
Liv-SGP-G : SNCYINPVFIQCMEYLLPEELHBEVQSHVQV : 72
Maj-SGP-VI : SNCYINPVFIQCMEYLLPEELHBEVQSHVQV : 72
Maj-SGP-II : RNCYINPVFIQCMEYLLPEELHBEVQSHVQV : 72

```

図 6. Trc-VIH-I および Trc-VIH-II と既知 VIH のアミノ酸配列のアライメント. Liv-SGP-G はバナメイ VIH を (Accession no. AB744717), Maj-SGP-VII はクルマエビ CHH/VIH を (Accession no. O15982), Mej-SGP-II はシバエビ VIH を示す (Accession no. AB622205). 3 種類以上の分子で保存されているアミノ酸残基を黒のボックスで示した.

(Liv-SGP-G) と 63.0% と 74.3%、クルマエビの CHH/VIH (Maj-SGP-VII) と 59.3% と 72.9%、シバエビの VIH (Mej-SGP-II) と 58.6% と 66.7% の相同性を示した (図 6)。

討論

サルエビから 2 種類の CHH 族ペプチド (Trc-VIH-I と Trc-VIH-II) を精製・単離し、その構造を明らかにした。Trc-VIH-I と Trc-VIH-II はいずれもシステイン 6 残基が保存されており、既知の CHH 族ペ

チドの特徴を有していた。Trc-VIH-I と Trc-VIH-II は既知の CHH と似た配列を有していたことから、最初は Trc-VIH-I と Trc-VIH-II はサルエビの CHH ではないかと考えた。しかし、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II をサルエビに注射しても血糖上昇活性は観察されなかった。本論文では結果を示さないが、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II をクルマエビとヨシエビに注射しても血糖上昇活性は観察されなかった。これらの結果から、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II はサルエビの CHH ではないと考えた。

クルマエビでは、Pej-SGP-IV を除く 6 種類の CHH 族ペプチドに血糖上昇活性に加えて、卵黄形成抑制活性が観察されている²⁾。そこで、クルマエビの卵巣培養系を用いて Trc-VIH-I と Trc-VIH-II の卵黄形成抑制活性を測定してみた。その結果、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II には有意に Vg mRNA の発現を抑制する活性は観察されなかったが、抑制する傾向は観察された。このため、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II の卵黄形成抑制活性は非常に弱いと考えられた。これは、サルエビではなくクルマエビの卵巣培養系を使用したことが原因かもしれない。将来的に、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II の生物活性を明らかにするために、サルエビの卵巣培養系を確立して調べる必要がある。

謝辞

本研究は 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201711) を受けて行われたものです。ここに謝意を表します。

文献

- Hanström B (1937) Inkretorische organe und Hormonfunktionen bei den Wirbellosen. *Ergebn. boil.* 14: 143-224.
- Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* 6: 49-90.
- Webster SG, Keller R and Dirksen H (2012) The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175: 217-233.
- Soyez D, Van Deijnen JE and Martin M (1987) Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Zool.* 244: 479-484.
- Soyez D, Le Caer JP, Noel PY and Rossier J (1991) Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides* 20: 25-32.
- Yang WJ, Aida K, Terauchi A, Sonobe H and Nagasawa H (1996) Amino acid sequence of a peptide

- with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Peptides* **17**: 197-202.
- 7) Yang WJ, Aida K and Nagasawa H (1997) Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides* **18**: 479-485.
- 8) Nagasawa H, Yang WJ, Aida K and Sonobe H (1999) Chemical and biological characterization of neuropeptides in the sinus glands of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. In: *Peptide Science-Present and Future*. Shimonishi Y. ed., Kluwer Academic Publishers, Great Britain. pp.453-454.
- 9) Yang WJ, Aida K and Nagasawa H (1995) Amino acid sequences of a hyperglycaemic hormone and its related peptides from the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* **135**: 205-212.
- 10) Tsutsui N, Katayama H, Ohira T, Nagasawa H, Wilder MN and Aida K (2005) The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **144**: 232-239.

■原 著■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ゼブラフィッシュ血管内皮細胞の初期分化

藤田深里^{1,3} 磯貝純夫²

Early Differentiation of Vascular Endothelial Cells During Zebrafish Development

Misato Fujita^{1,3} and Sumio Isogai²

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

² Department of Anatomy, School of Medicine, Iwate Medical University, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan

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

Abstract: Early differentiation of vascular endothelial cells is indispensable for the proper patterning and lumen formation of blood vessels. The vascular network forms in a reproducible and evolutionarily conserved manner, and their molecular mechanisms of formation have been markedly focused on. However, the differentiation process of vascular progenitors, angioblasts, remains unclear. Here, we report several tools to detect and analyze undifferentiated vascular endothelial cells in zebrafish embryos, including the vascular-specific transgenic lines, inhibitor treatments, and 3D reconstruction technique of electron microscopic serial images.

Keywords: zebrafish, vascular endothelial cell, angioblast, differentiation, serial section scanning electron microscopy

序論

生物の細胞は、一つの受精卵から卵割を経て数を増やし、さらなる細胞分裂と分化を経てさまざまな役割を担う形態と機能を獲得する。血管は血液を全身へ巡らせる器官であり、血液は酸素と栄養などを運搬し、二酸化炭素と老廃物などを処理する。管腔の内側を一層の血管内皮細胞が裏打ちし、外側は管の太さに応じて血管平滑筋細胞やペリサイトといった壁細胞が補強をしている。したがって、血管内皮細胞という細胞は、動脈・静脈および毛細血管のすべての種類の血管において内腔に存在する細胞である。またその形態は個々の細胞が薄く広がって接着している一層の扁平上皮構造を取っている。太い血管では多数の細胞により管腔をなしているが、細い血管では一細胞単独で管腔構造を取ることもある。血管内皮細胞は血液と組織との境界に位置し、選択的物質透過、血液凝固の阻止、逆に血栓性作用、また血管壁緊張調節、虚血応答による血管新生などさまざまな機能を担う多機能で動的な細胞であるが、細胞内小器官が少ないことが特徴として挙げられる^{1,2)}。未分化な血管内皮細胞、すなわち血管芽細胞がどの

ような分化を経て多機能で瘦せた細胞に変化するのか、詳細な形態変化観察や遺伝子メカニズム解析はまだ進んでいない。

小型の真骨魚類であるゼブラフィッシュは、受精後 6 時間にて原腸陥入、10 時間にて体節形成を開始する。その後、26 時間頃には血流を開始する³⁾。このように発生が早く、また卵生で卵膜も胚も透明なため顕微鏡下で生きたまま発生を観察するのに非常に適している⁴⁾。また、トランスジェニック技術を利用して血管内皮細胞に特異的に蛍光タンパク質を発現させる系統がいくつか作製されており、細胞の挙動を時空間的に観察することが可能である⁵⁾。未分化な血管芽細胞やさらに未分化な血管血球芽細胞に発現する遺伝子もいくつか解明されており、そのプロモーターを用いたトランスジェニック系統が作製されているため、血管内皮細胞の初期の分化を解析するモデル生物としても期待が持てる。

共焦点レーザー顕微鏡を含め一般的な光学顕微鏡はその分解能が 0.2 μm 程度である。原理的には光の波長の約半分までの分解能があるとされる。超解像

顕微鏡の技術開発が飛躍的に進んでいるがまだ身近ではない。毛細血管の内皮細胞は核の存在部位で2~3 μm 、辺縁部では0.1~0.2 μm あるいはそれ以下と非常に薄いため²⁾、光学顕微鏡で内皮細胞の形態やその中の細胞小器官を観察するのは難しい場合が多い。トランスジェニック技術により発現させた蛍光タンパク質も、細胞質分布タイプ・局所局在タイプおよび特定のタンパク質との融合タイプのいずれも光学顕微鏡上の漏れこみなどが無視できない。そのため、電子顕微鏡による解析も重要である。

近年、走査電子顕微鏡 (SEM: Scanning electron microscope) を用いて樹脂包埋試料の連続断面観察をする方法 (Array tomography 法) が組織解析技術を飛躍的に進展させた。集束イオンビームを用いたブロック面観察法 (FIB: Focused Ion Beam/SEM) や、マイクロトームを鏡体内に組み込んだ切削ブロック面観察法 (SBF: Serial Block-Face/SEM) の他に、超薄連続切片をガラス板に載せ、撮影した SEM 像を 3D 再構築する技法も報告されている^{6,7)}。細胞内外の超微細構造を電子顕微鏡レベルで立体情報として得られるこれらの技術は画期的である。一方で、Array tomography 法の特徴である同一標本での電顕観察と蛍光観察を可能にするためには、超微形態と抗原露出の相反する条件を満たす固定法を検討する必要がある。そこで本研究では、血管内皮細胞の最も初期の分化過程を遺伝子メカニズムの側面と形態変化の側面から明らかにすることを目的として、分子シグナルの阻害実験と電子顕微鏡解析の条件検討を行った。

材料と方法

ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 胚は、雌雄分けて飼育した成魚を交配用タンク (Tecniplast) に仕掛けて自然産卵により得た。野生型の系統として、EK、RW、TAB を用いた。発生段階は Kimmel et al., 1995 に従った³⁾。血管内皮細胞に蛍光タンパク質を発現する系統として、*Tg (fli1a:EGFP)*⁴⁾ を用いた⁵⁾。受精後 24 時間以降で観察する場合は 1-phenyl-2-thiourea (PTU, nacalai) を用いて黒色素形成を抑制し、麻酔はトリカイン (SIGMA, A5040) を使用した⁸⁾。

阻害剤実験

VEGFR 阻害剤 (SU5416, abcam) と PI3K 阻害剤 (LY294002, Calbiochem) をそれぞれ DMSO に溶解して 30 mM ストック溶液を調整した。ピンセットで卵膜を除去した胚を 10 μM VEGFR 阻害剤また

は 30 μM PI3K 阻害剤に浸して発生させた。24-well プレートの 1-well に 5 匹ずつで阻害剤処理を行った。

顕微鏡観察

麻酔した胚を、7% メチルセルロースを用いてディプレッションスライドガラスにマウントし、蛍光実体顕微鏡 (Olympus, SZX16) を用いて観察および画像取得を行った。詳細な蛍光画像解析には、胚は 1% 低融点アガロースゲルを用いてガラスベース ディッシュ (IWAKI, 3970-035) にマウントし、倒立型共焦点顕微鏡 (Zeiss, LSM700) を用いた。

連続切片 SEM 法の反射電子像による 3D 再構築

各発生段階の胚を 2% Paraformaldehyde (PFA)・1.25% Glutaraldehyde (GA) / 0.05 M リン酸緩衝液 (PB: Phosphate Buffer) 混合液で前固定し、1% 四酸化オスミウムで後固定した。固定後脱水し、エポキシ樹脂 (TAAB, エボン 812) に包埋した。ウルトラマイクロトームとダイヤモンドナイフ (DiATOME, histo jumbo 8.0 mm) で厚さ 200 nm の連続切片を切削し、基板 (導電処理済みスライドガラス) に回収した。光顕用として、1% トルイジンブルー染色を行った。トルイジンブルー染色標本をバーチャルスライドスキャナ (浜松ホトニクス, NanoZoomer) に取り込み、閲覧ソフトウェア (浜松ホトニクス, NDP view2) にて観察した。走査電子顕微鏡用として、1% 酢酸ウラン水溶液 (30 分) と硝酸鉛 (5 分) での電子染色を行った。セミインレンズ方式の超高分解能電界放出形 SEM (日立, SU8010) を用い対象細胞の反射電子 (BSE: Back Scattered Electron) 像を加速電圧 1.5 kV で連続撮影した。BSE 像を白黒反転することで透過電子顕微鏡 (TEM) の透過像と同様のコントラスト情報を取得した。Fiji ImageJ のソフトウェアを用いて、連続切片画像のアラインメントを施した。目的とする構造体を Adobe Photoshop を使用してライソソームや小胞体、ミトコンドリアなど目的の領域を選択した。3D Slicer ソフトウェアを用いてサーフェスレンダリング法にて 3D 再構築した。

免疫電子顕微鏡法

各発生段階の *Tg (fli1a:EGFP)*⁴⁾ 胚を 4% PFA・0.05% GA / 0.1 M PB 混合液で前固定し、抗 GFP 抗体 (sc-9996, Santacruz; G1544, SIGMA) を用いて抗体反応を行った。発色前に 1% GA により再固定し、DAB 発色後 1% 四酸化オスミウムによる後固定を行い、脱水後エポキシ樹脂 (エボン 812, TAAB) に包埋した。ウルトラマイクロトーム (ULTRACUT-UCT、

Leica) で厚さ約 1 μm の切片により光学顕微鏡で位置を確認した。ダイヤモンドナイフに替えて 60-90 nm の超薄切をグリッドに回収した。DAB 染色により抗原陽性細胞ではオスミウムブラックが形成され透過電子顕微鏡で黒く染まって見えるため、電子染色は硝酸鉛染色のみの単独染色を行い反応部位以外のコントラストはほとんど施さなかった。透過電子顕微鏡 TEM (H-7650、日立) を用いて撮影した。

結果

頭部血管芽細胞の出現時期

頭部の血管芽細胞になる予定の細胞は、ETS ファミリーの転写因子の一つ *etsrp* の mRNA 発現によって 5 体節期 (受精後 11.5 時間) に認められる^{9,10}。ゼブラフィッシュの血管内皮細胞に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統は複数作製されているが、ETS ファミリーの転写因子の一つ *fli1a* のプロモーターを用いた *Tg(fli1a:EGFP)^{fl}* が、発現開始が早く、また発現量も多い⁵。蛍光実体顕微鏡で観察した場合、14 体節期 (受精後 16 時間) にはすでに数細胞からなるクラスターが認められた (Fig. 1A,D)。血管芽細胞のクラスターは、吻側は前脳と眼柄の間 (Fig. 1 矢頭)、尾側は前脳の側面 (Fig. 1 矢印) に分かれて、左右に対をなしていた。より早い 12 体節期 (受精後 15 時間) は蛍光実体顕微鏡では観察と撮影が難しいが、共焦点顕微鏡では認められた。18 体節期 (受精後 18 時間、Fig. 1B,E)、22 体節期 (受精後 20 時間 Fig. 1C,F) と発生が進むにつれてそれぞれのクラスターの細胞数が増加して、特に尾側は管腔形成が進んだ (Fig. 1D-F)。管腔が認められると、血管内皮細胞への分化が完了してい

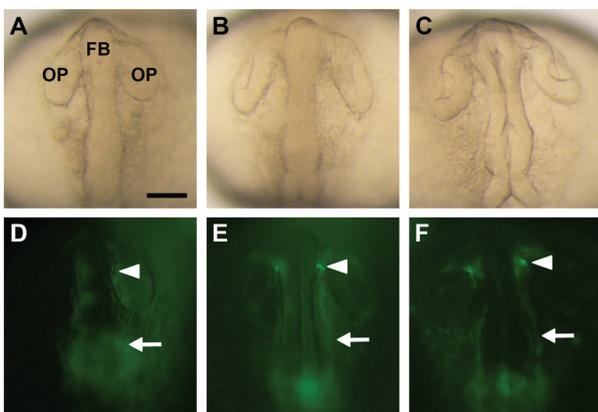


Fig. 1. Angioblasts of the developing zebrafish head. A-C. Transmitted light images of zebrafish at 14-(A), 18-(B), and 22-(C) somite stages. D-F. Fluorescent images of A-C. Arrows and arrowheads indicate anterior and posterior angioblast cluster, respectively, between optic lobe and forebrain. Dorsal views. Rostral is to the top. FB: forebrain, OP: optic lobe. Scale bar: 50 μm .

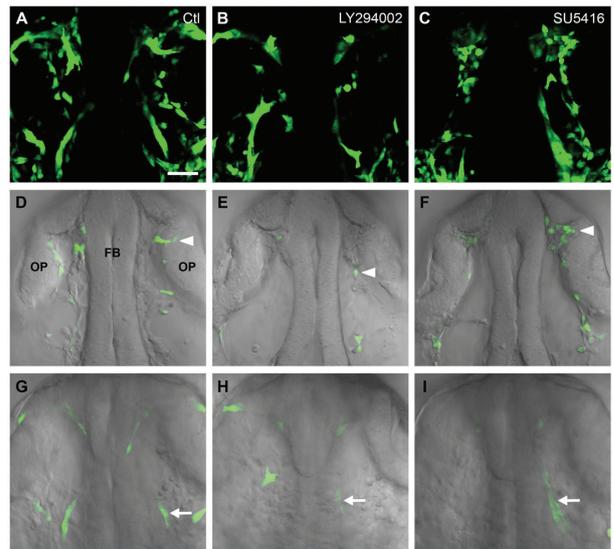


Fig. 2. Angioblast morphology in inhibitor treated embryos. A-I. Confocal images of the anterior head of 18 somite stage *Tg(fli1a:EGFP)^{fl}* embryos treated with either control DMSO carrier (A,D,G), the PI3K inhibitor LY294002 (B,E,H), or the VEGFR inhibitor SU5416 (C,F,I). 3D reconstructed images (A-C). Selected dorsal planes show rostral GFP-positive clusters (D-F, arrowheads) and selected ventral planes show caudal GFP-positive clusters (G-I, arrows). Dorsal views. Rostral is to the top. FB: forebrain, OP: optic lobe. Scale bar: 50 μm .

ることは確実である。ゼブラフィッシュ胚の血流開始は 30 体節期 (受精後 24 時間) 以降であるが 22 体節期にはこのようにすでに一部の血管は管腔形成が進んでいた。*Tg(fli1a:EGFP)^{fl}* を用いた場合、遅くとも 12 体節期には蛍光観察ができること、また極めて短期間に細胞分化が進み管腔形成が進行することがわかった。

阻害剤による頭部血管発生への影響

血管内皮細胞増殖因子 VEGF ファミリーはその受容体 VEGFR ファミリーを介して脈管形成および血管新生に主要な役割を担っている。VEGF シグナルの刺激によってホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) が活性化され、その下流の Akt などの細胞内シグナル伝達が活性化される。ゼブラフィッシュの血管発生においても、VEGF シグナルと PI3K シグナルは重要な役割を担っている^{11,12}。これらのシグナリングが頭部血管芽細胞の分化と脈管形成にどのように関与するか調べるため、VEGFR 阻害剤 (SU5416) および PI3K 阻害剤 (LY294002) を用いた。10 体節期に阻害剤処理を開始し、18 体節期に血管内皮細胞の観察を行った (Fig. 2)。胚全体の発生の明視野観察ではコントロール胚と差がなかった。共焦点顕微鏡観察では、コントロール胚では吻側および尾側両方のクラスター由来と思われる位置

に管腔が形成されているのを認めた (Fig. 2A,D 矢頭,G 矢印)。PI3K 阻害剤処理胚では吻側のクラスターの管腔形成が抑制された (Fig. 2B,D 矢頭,G 矢印)。VEGFR 阻害剤処理胚においても吻側のクラスターの管腔形成が抑制されていたが、さらに丸みを帯びた細胞が多く存在していた (Fig. 2C,F 矢頭,I 矢印)。血管芽細胞が未分化なまま増殖していることが示唆される。この分化異常は LY294002 に比べて SU5416 処理の方がより強く影響が出ていた。これらの結果から、頭部の血管芽細胞の最も初期の分化において VEGF シグナルと PI3K シグナルは関与しており、さらに、VEGF シグナルの下流に PI3K 以外のシグナルも併せて作用している可能性が示唆された。

連続切片 SEM 法の反射電子像による 3D 再構築

マウスなどの Array tomography 法に用いられる一般的な前固定液は、4% PFA・2.5% GA/0.1 M PB 混合液である¹³⁾。ゼブラフィッシュ成魚の組織から単離された初代培養細胞を用いた Array tomography 法では、前固定液として 4% PFA・4% GA/0.1 M PIPES 混合液が用いられている¹⁴⁾。しかし、ゼブラフィッシュ体節形成期のホールマウント胚では、細胞の形態および細胞内の微細構造が膨化や収縮などの影響を受けずに観察できる固定具合ではなかったため、適切な固定法を得るために条件検討を行った。緩衝液として、PB の他にカコジル酸およびリン酸緩衝生理食塩水を試験したが大きな差異は認めなかったため PB を採用した。続いて、PB の濃度について検討した。PB はマウスなどのほ乳類では通常 0.1 M で使用されるが、魚類胚では経験的に 0.01 M まで濃度を下げることがある。動物種や発生段階によって体液の浸透圧や組織の緻密さが異なるためである。ゼブラフィッシュ初期胚での至適濃度を調べるため、0.01、0.05、0.10 M の 3 種類の PB を用いて固定液を調整し比較をしたところ、明確な差異は認めなかった。また、固定試薬は混合せずに PB のみを初期胚の発生用培地として、卵膜を除去したゼブラフィッシュ胚を発生させたところ、0.10 M PB においてやや軽度の発生異常が見られた。これらの結果から、PB は 0.05 M を用いることとした。組織の密度が低くタンパク質が少ない初期胚では、4% PFA および 2.5% GA はともに強かったため、固定に影響が出ない濃度まで下げ、それぞれ 2% および 1.25% とした。また、固定は氷上にて 4 時間以上ゆるやかに振盪し、固定液のまま 4°C 保存した。固定標本の配送は冷蔵便を利用した。オルガネラの固定状況や細胞の形態を見ながらこのように固定液の条件検討をし、体節

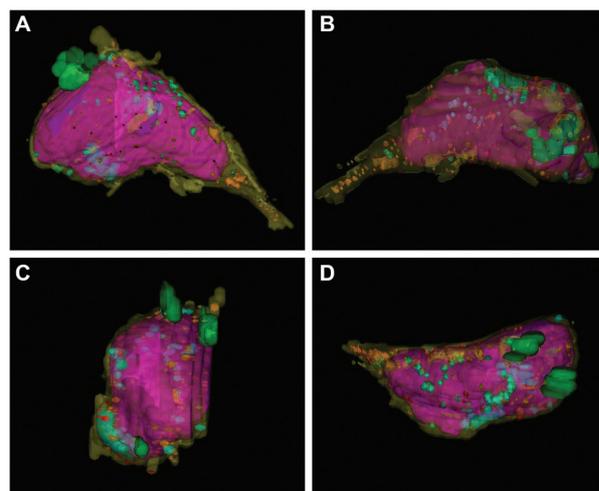


Fig. 3. 3D reconstruction of an endothelial cell in angulus venosus. A-D. Various angle views. 5 days post fertilization. Purple: nucleus, yellow: cytoplasm, green: lysosome, light blue: mitochondria, brown: ER, red: desmosome.

形成期から孵化仔魚までのゼブラフィッシュ胚では、3D 再構築法用として、2% PFA・1.25% GA/0.05 M PB 混合液で前固定することとした。

受精後 5 日のゼブラフィッシュ孵化仔魚の静脈角の内皮細胞の 3D 再構築画像を示す (Fig. 3)。赤紫で示した核が細胞の体積の大多数を占め、細胞質 (黄色) は少なかった。ライソソーム (緑) や小胞体 (茶色)、ミトコンドリア (水色) などの細胞小器官も少なかった。成熟分化した内皮細胞が細胞小器官に乏しいという知見^{1,2)}と一致する。このように、内皮細胞の内部微細構造について形態的なアーティファクトなしに観察できることが確認でき、ゼブラフィッシュに最も適した固定条件を得ることができた。今後、この固定条件を用いて初期の未分化な内皮細胞の継時変化を観察および解析していく。

免疫電子顕微鏡法

血管トランスジェニック *Tg(fli1a:EGFP)^{yl}* の観察から、初期胚の血管芽細胞の位置は推定できるが、管腔を形成していないため、蛍光識別できない切片上では判断が難しい。電子顕微鏡により観察する細胞が実際に血管芽細胞かどうかを特定するためには、免疫電顕用切片で蛍光を検出するか血管内皮細胞に発現するタンパク質の抗体を用いて染色するなどの必要がある。前述の 3D 再構築に用いた前固定液は、GA 濃度は 1.25% と低い、それでも EGFP の免疫染色において十分な染色が得られなかった。グルタルアルデヒドのタンパク質架橋作用が EGFP 抗原へ影響していると考えられる。そこで改めて条件検討し、免疫電顕用の固定として細胞の形態と微細構造を維持しつつ抗原も保持する濃度として GA 0.05%

と得た。一方で PFA の濃度を 4% に上げることで固定の強さを補った。したがって、体節形成期から 8 日目までの孵化仔魚に関しては、免疫電顕用として、4%PFA・0.05% GA/0.1 MPB 混合液で前固定することとした。前固定後、Array tomography 法と包埋前染色法（酵素抗体法）で比較した。前者は受精後 8 日以降の孵化仔魚には用いることができたが体節形成期の胚では形態も蛍光反応も十分な結果を得られなかったのに対し、後者は 12 体節期などの初期胚においても電子密度の高い沈殿として陽性シグナル（オスミウムブラック）を得ることができた。ただし、1 次抗体の反応には 7 日間の浸透を要した。

18 体節期のゼブラフィッシュ頭部切片の DAB 染色では、眼柄の内側、および、脳からやや離れた側方の眼柄の尾側の位置に抗 GFP 抗体で染色される細胞を複数認めた（Fig. 4A、矢頭）。これらの細胞局在位置は共焦点顕微鏡像と一致する（Fig. 2D,G 参照）。またその電子顕微鏡像においても陽性と判断できる十分な染色を得ることができた（Fig. 4B,C）。12 体節期および 18 体節期の血管芽細胞は、細胞質が多く丸みを帯び、典型的な未分化な細胞の形態を取っていることが確認できた。

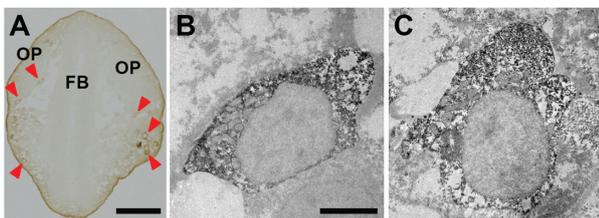


Fig. 4. Immunohistochemical staining and immunoelectron microscopy of zebrafish angioblast at the earliest stages. A. DAB staining of horizontal section of 18-somite stage *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* embryo. Anterior is to the top. B, C. Anti-GFP staining by immunoelectron microscopy of *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* embryo at 12-somite stage (B) and 18-somite stage (C). FB: forebrain, OP: optic lobe. Scale bars: 100 μ m in A, 4 μ m in B.

討論

血管内皮細胞に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック魚として本研究では *fli1a* プロモーターの *y1* 系統を用いた⁵⁾。 *fli1a* 遺伝子は血管内皮細胞以外にも、一部の血球・リンパ管内皮細胞・神経堤細胞・間充織細胞・マクロファージなどに発現することが報告されており、識別の難しい部位もあるためより適したトランスジェニック系統が必要である。血管内皮細胞への特異性が高いものとして *kdrl* プロモーターの系統も作製されているが^{15,16)}、発現開始が遅いことと動脈に比べて静脈での発現が弱いことが血管芽細胞の分化の解析には難点である。 *cdh5* (*VE-*

cadherin) は動静脈の差は無いが、発現開始は *fli1a* よりは遅い¹⁷⁾。より早くに発現を開始する遺伝子として *etv2* が挙げられ¹⁸⁾、血管芽細胞の分化の解析に有用かどうか検討する必要がある。同じ遺伝子のプロモーターを用いても、コンストラクトの性能や挿入されたゲノム環境により発現レベルも変化するため、allele 番号が異なる系統についても考慮する必要がある。

VEGFR 阻害剤および PI3K 阻害剤は、10 体節期から 18 体節期までの 4 時間作用させた。頭部の初期の血管芽細胞の分化に対して作用させるためにこの時期を選択したが、吻側の血管と尾側の血管で異なる結果を得た。この結果は、選択した時期が吻側の血管芽細胞クラスターの分化にとって最も重要な時期であった可能性を示唆する。また、VEGF-VEGFR シグナルは動脈化に関与することが知られているため、部位により応答が異なった可能性も考えられる。阻害剤を作用させた後に通常の胚用培地に戻して発生させることにより、個々の血管の分化に重要なタイミングを検索することが可能であると考えられる。VEGFR シグナルの阻害および PI3K シグナルの阻害において認められた丸みを帯びた血管芽細胞については、実際に未分化な状態が維持されているのか、または別の影響を生じているのか今後の検討が必要と考えられる。

電子顕微鏡解析では、標本の固定が極めて重要である。マウスで一般的に用いられている固定法がゼブラフィッシュ胚、孵化仔魚および成魚に適していなかったことから、さまざまな条件検討が必要であった。高い恒常性の保たれた羊水の中で発生する有羊膜類とは異なり、魚類など無羊膜類は卵膜を介して直接外界に触れていることから、一部の外的因子に対して浸透をあまり許さない表皮構造になっている可能性が考えられる。一方で、PFA および GA はともにタンパク質の固定に作用するため、タンパク質がまだ少なく脂肪組織の多い胚では、それぞれ濃度を上げて固定効果はあまり向上しないことが示唆された。不飽和脂肪酸が多いことも影響しているのではないかと考えられる。結果的に連続切片 SEM 法では PFA および GA は濃度を下げたものを採用することとなったが、同じゼブラフィッシュでも文献に見られる成魚の条件とも異なることから、発生段階や細胞の特性に合わせて固定条件を検討する必要があることがわかった。

Array tomography 法は、反射電子像による 3D 再構築も免疫電子顕微鏡像による 3D 再構築もいずれも可能であると謳われている。しかし、免疫電顕染色法において GA は除外したい成分であるが GA を

使用しないとゼブラフィッシュ胚の固定は不十分となり組織が崩れた。免疫組織染色用に改めて条件を検討しより良好なプロトコルを得ることができ、未分化な血管芽細胞の判別について確証を得ることができた。

ゼブラフィッシュ胚を用いて血管内皮細胞の初期分化を解析するにあたり、有用なトランスジェニック系統について検討および観察を行った。血管芽細胞の初期分化に関与する遺伝子の一端を明らかにした。血管芽細胞の形態変化を電子顕微鏡レベルで立体的に解析するための条件を検討した。今後さまざまな分化段階での形態学的特徴とその変化に関する遺伝子メカニズムを明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は2017年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS201712)を受けて行われました。電子顕微鏡解析は岩手医科大学生命科学研究技術支援センターにご協力いただきました。ご厚情に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) Fawcett DW and Jensch RP (2002) *Concise Histology*. CRC Press, Florida.
- 2) 渡辺陽之輔, 小川和朗, 永野俊雄, 鈴木昭男, 清寺真 (1996) 人体組織学 (脈管、血液・リンパ系). 朝倉書店, 東京.
- 3) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253-310.
- 4) Fujita M (2017) Model organisms for research on vascular development: zebrafish and medaka. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 389-392.
- 5) Lawson ND and Weinstein BM (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **248**: 307-318.
- 6) Wacker I and Schroeder RR (2013) Array tomography. *J Microsc.* **252**: 93-99.
- 7) 甲賀大輔 (2015) 連続切片 SEM 法. *Scientific Instrument News.* **58**: 5008-5014.
- 8) Westerfield M (2000) *The Zebrafish Book: A Guide for Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Oregon.
- 9) Sumanas S and Lin S (2006) Ets1-related protein is a key regulator of vasculogenesis in zebrafish. *PLoS Biol.* **4**: 60-69.
- 10) Pham VN, Lawson ND, Mugford JW, Dye L, Castranova D, Lo B and Weinstein BM (2007) Combinatorial function of ETS transcription factors in the developing vasculature. *Dev. Biol.* **303**: 772-783.
- 11) Zheng H, Fu G, Dai T and Huang H (2007) Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1a/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **50**: 274-280.
- 12) Fujita M, Cha YR, Pham VN, Sakurai A, Roman BL, Gutkind JS and Weinstein BM (2011) Assembly and patterning of the vascular network of the vertebrate hindbrain. *Development* **138**: 1705-1715.
- 13) 佐野 豊 (1981) 組織学研究法 (理論と術式). 南山堂, 東京.
- 14) Wacker I, Chockley P, Bartels C, Spomer W, Hofmann A, Gengenbach U, Singh S, Thaler M, Grabher C and Schröder RR (2015) Array tomography: characterizing FAC-sorted populations of zebrafish immune cells by their 3D ultrastructure. *J. Microsc.* **259**: 105-113.
- 15) Jin SW, Beis D, Mitchell T, Chen JN and Stainier DY (2005) Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development* **132**: 5199-5209.
- 16) Liu J, Fraser SD, Faloon PW, Rollins EL, Vom Berg J, Starovic-Subota O, Laliberte AL, Chen JN, Serluca FC and Childs SJ (2007) A bPix-Pak2a signaling pathway regulates cerebral vascular stability in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 13990-13995.
- 17) Lenard A, Ellertsdottir E, Herwig L, Krudewig A, Sauter L, Belting HG and Affolter M (2013) In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Dev. Cell.* **25**: 492-506.
- 18) Veldman MB and Lin S (2012) Etsrp/Etv2 is directly regulated by Foxc1a/b in the zebrafish angioblast. *Circ. Res.* **110**: 220-229.

■原 著■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模川河口域天然藻類群集の群集構造の推定への 次世代シーケンサーの試験的適用

鈴木祥弘^{1,3} 渡辺瑛士朗¹ 金沢謙一¹ 西本右子²

Trial Application of Next-Generation DNA Sequencer for the Estimation
of Structures of Natural Algal Communities
in the Estuary of the Sagami River

Yoshihiro Suzuki^{1,3}, Eishiro Watanabe¹, Ken'ichi Kanazawa¹
and Yuko Nishimoto²

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

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

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzuki03@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: In the winter of 2017, algal communities in the Sagami Bay were analyzed. In the mouth of the estuary of the Sagami River, algal communities different from those in offshore-water bodies were found. The structures of the 2 different communities in the mouth and offshore water-bodies were also analyzed by Amplicon analysis with NGS. DNA samples required for the analysis were obtained by extraction and purification from cells collected by the filtration of seawater. Although a sufficient number of OTU could be determined, they showed completely different phylogenetic relationships from the results of microscopic observations. The index region of *psbA* in this study was not suitable for DNA barcoding.

Keywords: amplicon analysis, community structure, diatoms, DNA barcoding, nextgeneration sequencing

序論

自然環境中で生物は周囲の環境の影響を受けながら生活している。生物の集まりである個体群は環境に対応して消長を繰り返している。環境への対応は生物種ごとに異なり、生態系を構成する種数や各種個体群の個体数（個体群密度）、すなわち生物群集の構造は生態系ごとに大きく異なる。生物群集の構造を明らかにすることは、生態系の環境とそこに生活する生物の関係を考える上で重要である¹⁾。我々は相模川河口域生態系の長期変動を検討するため、棲息環境と対応付けて植物プランクトン群集構造の解析を行ってきた²⁻⁴⁾。群集構造の解析に必要な植物プランクトン各種の同定と計数は、光学顕微鏡を用いた形態観察によって行う。しかし、形態観察による藻類種の同定には熟練が必要であり、十分な形態観察を実施しても、種同定が難しい種も少なくない。労力を必要とする形態観察による同定と計数は、群集

構造の解析を質的にも量的に制限してきた。

近年、形態観察に加えて各種の持つ DNA 塩基配列を指標として、藻類種の同定が行われるようになった。生物種や生態型で差異が認められる適切な DNA 領域について塩基配列を決定して比較することで、形態観察によることなく種同定が可能である⁵⁾。塩基配列をバーコードに見立てた DNA バーコード計画では、分類群ごとに適切な DNA 領域を指定し、効率的に塩基配列情報を蓄積することを目指している。生物種と塩基配列を対応付けた情報がデータベースとして十分に蓄積されれば、対象とする個体の塩基配列をデータベースに照合することで、個体の種同定が可能になる⁶⁾。さらに、百万分子を超える DNA 塩基配列を決定（シーケンシング）する次世代シーケンシング技術（NGS）をこの種同定に適用することが可能である。NGS を生物群集に適用するメタ

ゲノム解析と DNA バーコードを用いれば、一度の解析で生物群集全体の種同定が可能になる。非常に多数の塩基配列を一度に確認する方法では、顕微鏡観察では見つけにくい出現頻度の低い種の検出も可能になると考えられる。試料に含まれていた DNA 量に比例してアンプリコン (PCR で増幅された DNA 断片) が増幅されると仮定できれば、NGS で決定された配列の割合から、生物群集に含まれていた種ごとの DNA 量、さらに生物量が推定できる。DNA バーコードとメタゲノム解析を活用することで、群集構造の解析を質的・量的に改善できる可能性が高い⁶⁾。

本研究では、相模川河口域生態系の植物プランクトン群集にメタゲノム解析を適用した。DNA バーコード領域として、全ての光合成生物が持つ *psbA* (光化学系 II 反応中心 D1 蛋白質コード遺伝子) を用い、植物プランクトンの群集構造の解析がメタゲノム解析により可能である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

2017 年 12 月に相模川河口から沖合に向かって南北方向に 5.0 km の範囲で観測を行った。調査船舷側より、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、クロロフィル蛍光強度を測定した。電気伝導度と圧力は、測定器付属のソフトウェアにより塩濃度 (‰) と水深 (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 m^{-3}) より 1000 を引いて求めた。全地球測位システム (GPS) 端末 (FG-530, EMPEX 社) を用いて、測定期間中の時刻と緯度・経度を記録し、測定時刻から観測地点を算出した。観測点の河口からの距離を求め、各測定値の鉛直分布を入力し、海洋断面上の各要因の分布をコンターマップとして図表化した (Gsharp, dlp 社)。

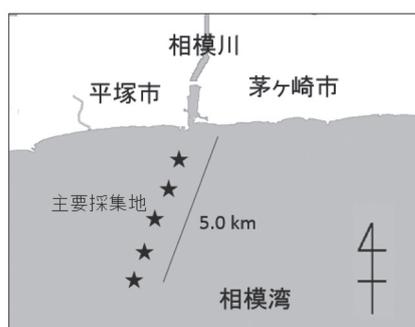


図 1. 観測海域と観測地点. 図中の 5,000m の直線に沿って観測を行った。

植物プランクトン群集構造

バンドーン採水器 (離合社) を用い、表層と水深 20m の海水 10 l を採水した。海水試料は沈降係数板 (Combined Plate Chamber, Hydro-Bios, Germany) を用いて濃縮し、光学顕微鏡 (IX70, オリンパス) で種同定と細胞密度測定を行った。

全 DNA の調整

採水した試料をプラスチックボトルに移し、暗所で保冷しながら実験室に輸送した。試料 50ml を減圧濾過し、フィルター (Isopore GTTP02500, ミリポア) 上に集められたプランクトンを冷凍庫内で凍結し (-80°C) 保存した。抽出の操作を行うため冷凍庫より取り出したフィルター上の試料は、室温で融解後直ぐに、抽出緩衝液で洗い落とし、マイクロチューブ中でペッセルを用いて破碎した。破碎液から DNA 吸着カラム法 (DNeasy, Qiagen) で全 DNA を抽出した。精製された全 DNA の濃度と共雑物の過多は、試料の吸収スペクトルで検討した。全精製試料 200 μ l のうち各 2.0 μ l を鋳型とし、光合成生物 *psbA* 領域に対するプライマー (F:TNCAYTTCTAYCCNVTHHTGGGA, R:RNCATGTGGAATGGGTGCAT) を用いて PCR を行った。95°C で 5 分、その後、94°C × 20 秒、55°C × 30 秒、72°C × 2 分の一連の反応を 35 回繰り返す、最後に 72°C × 7 分で伸長反応を終了、その後 4°C で保存した。得られた PCR 産物をアンプリコン読解に供した。

NGS によるアンプリコン読解

DNA 溶液の濃度測定を行い (Synergy H1 (Bio Tek), QuantiFluor dsDNA System (Promega))、アンプリコンの濃度を調整した。得られたアンプリコンに対し 2step tailed PCR 法でライブラリーを作製した。作製したライブラリーは断片長、副生成物の有無など品質確認を行った。次世代シーケンサー (NextSeq, Illumina) を用いて 2x300 bp の条件でシーケンシングを実施した。

読解データの解析

マージ後の断片長 290 塩基、リードの断片長 230 塩基、最低オーバーラップ長 10 塩基とし、クオリティーフィルタリングを通った配列をマージした。解析ソフト (Usearch drive5) で OTU (operational taxonomic unit) を求めた。得られた代表配列を BLAST 検索し、最も類似性の高い生物種を推定した。また、出現頻度の高い 15 の OUT について、解析ソフトを用いて (CLC Sequence Viewer, QIAGEN

Bioinformatics) を用いて系統関係を解析した。

結果と討論

海況

観測実施日 (2017.12.18) の塩濃度は河口付近の表層でわずかに低く 33.2‰であったが、河口の水深 3.0 m 以深やその他の地点では 34.2‰であった (図 2a)。16.5℃の最低水温も河口付近で認められた。沖合 1000m の地点でも、16.7℃以下のやや低い温度が表層で認められたが、沖合 2000m 地点では表層で 16.8℃、5m 以深で 17.0℃となり、さらに沖合では 17.0℃で表層から水深 45m まで一定となった (図 2b)。河口付近でのわずかに低い塩濃度と水温は、相模川からの淡水流入の影響であると考えられる。しかしながら、その影響は限定的で、影響を受けやすい表層でも沖合 2500m 以近に限られていた。密度の指標 σ は調査海域全体でほぼ均一であり、塩分成分を示す低密度の水塊は表層 1m 足らず、沖合 2000m 足らずに限定されていることが明らかであった (図 2c)。これ以外の部分の密度は 25.0-25.1 でほぼ一定

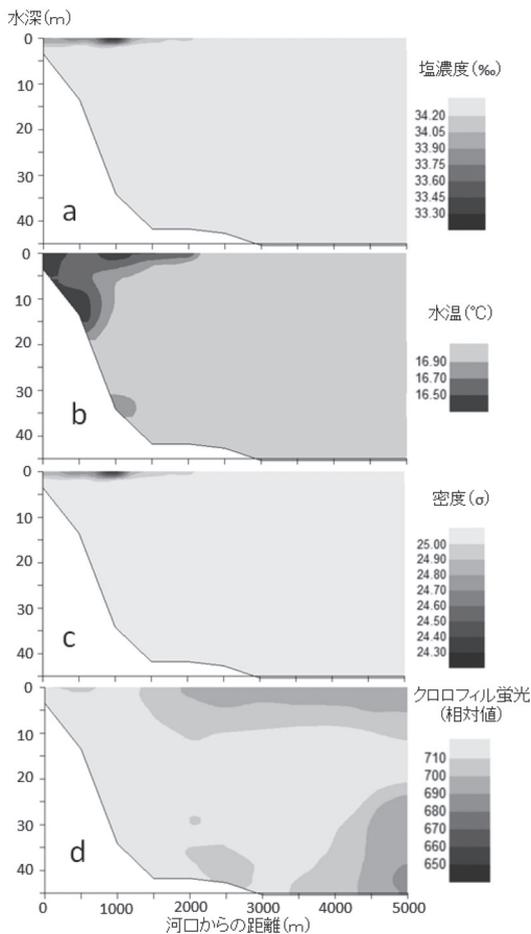


図 2. 観測海域の海況とクロロフィル a 蛍光シグナル。河口から沖合 5000m までの塩濃度 (a)、水温 (b)、密度 (c)、クロロフィル a 蛍光シグナル (d) を表す。

であった。この結果は、少なくとも水深 45m までの範囲で表層水の冷却に伴う鉛直混合が盛んに生じていることを示していた。この時期の深い鉛直混合は植物プランクトンの増殖を低く抑えていたと考えられる。また、相模川からの淡水の流入がわずかであることも植物プランクトンの増殖を低く抑えていたと考えられる。クロロフィル蛍光シグナルは沿岸域で 720 相対値とわずかに高かったが、測定海域全体でほぼ一定の値を示した (図 2d)。

植物プランクトン群集の種組成

海況に違いが認められた河口と沖合 5000m 地点で水深 1m 層と水深 10m 層から試料を採取した。海水試料中の藻類を 40-400 倍の倍率で顕微鏡観察したところ、主として珪藻類から成る植物プランクトン群集が観察された。藻類の細胞密度は河口の 1m 層と 10m 層の試料でそれぞれ 11800 と 9300 細胞 l^{-1} 、沖合の 1m 層と 10m 層の試料でそれぞれ 5500 と 5300 細胞 l^{-1} であった (図 3)。クロロフィル蛍光強度の差は 5% 足らずであるにも関わらず (図 2d)、細胞密度に大きな差が生じたことは、種組成の違いと対応していた。相模川からの淡水流入の影響を受ける河口では羽状目珪藻の *Navicula* spp. が優占し 1m 層と 10m 層でそれぞれ 68.4% と 29.6% を占めていた。さらに、河口では羽状目の様々な珪藻類が 1m 層と 10m 層でそれぞれ 11.7% と 16.2% を占め、*Navicula* spp. と合わせて、羽状目珪藻類が卓越する生物群集を形成していた。これに対して沖合

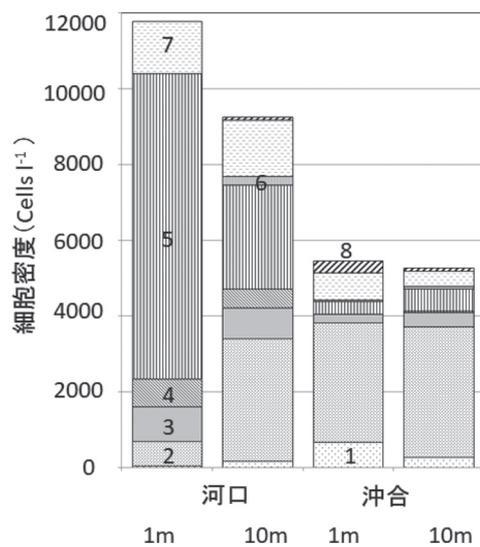


図 3. 河口と沖合 5000m 地点の表層と水深 5m 層の植物プランクトンの種組成。1: *Chaetoceros* spp. 2: *Skeletonema costatum*. 3: *Coscinodiscus* sp. 4: *Odontella* sp. 5: *Navicula* spp. 6: *Nitzschia* spp. 7: pinnate diatoms 8: centric diatoms の細胞密度 (細胞 l^{-1}) を示す。

では *Skeletonema costatum* が優占し 1m 層と 10m 層でそれぞれ 57.5% と 67.4% を占めていた。中心目珪藻類の *Chaetoceros* spp.、*Coscinodiscus* sp.、*Odontella* sp. も高い頻度で認められ、沖合では中心目珪藻類が卓越する生物群集を形成していた。観察された羽状目珪藻は概して小型であったことが、2 倍近い細胞密度にもかかわらずほぼ同一のクロロフィル蛍光強度しか示さなかった原因と考えられる。

アンプリコン解析

種組成に明瞭な差異が認められた河口と沖合の藻類群集の全 DNA 試料を用いて *psbA* 領域を対象にアンプリコン解析を行った。その結果それぞれの試料について 6100-113000 の raw reads を得ることができた。解析プログラムを用いて結合すると、4 試料で合わせて 1000 以上の OUT が算出された。しかし、算出された OUT のほとんどが数回の出現頻度であり、PCR の際の複製ミスや計算上のノイズであると考えられた。出現頻度が 0.5% 以上の OTS は河口 1m 層と 10m 層、沖合 1m 層と 10m 層の試料でそれぞれ 19、23、21、21 配列に過ぎなかった。これらの OTS を BLAST 検索したところ、珪藻の *S. costatum* と一致するものがあり、プラシノ藻類の *Ostreococcus* sp.、緑藻類 *Bathycoccus prasinos*、*Pyramimonas* sp と高い相同性を示すものが認められた。これ以外の OUT の配列は未培養で未知の生物の配列との関係しか求めることができなかった。これらの結果は少なくとも *psbA* 領域はバーコード DNA としてこの海域の藻類群集に適用可能なほどの十分な情報の蓄積がないことを示していた。また、試料を顕微鏡観察して求めた種の中には、解析結果から示唆されたプラシノ藻類や緑藻類は認められなかった。それにも関わらず高い頻度で増幅されたアンプリコンがこれらの種と高い相同性を示したのは、用いた *psbA* 領域の配列が系統関係と対応しにくいこと示唆していた。実際にこれらの配列を用いて最尤法で系統樹を作成すると系統樹は大きく 3 群に枝分れた (図 4)。この結果は顕微鏡観察された珪藻類の中心目と羽状目の 2 群と *psbA* 領域の塩基配列から求めた系統が対応しないことを示していた。

検索された *S. costatum* について、群集内の細胞の相対密度 (%) と検出された配列の相対出現頻度 (%) を比較すると、細胞密度が 5.6 から 65.4% まで大きく変動するのに対して、配列の頻度は 17.3 から 8.9% しか変動せず、さらに、細胞密度が高い値を示す沖合 10m 層で最も低い配列の頻度を示していた。

結論

本実験の方法でフィルターろ過した海水試料から解析に必要な十分量のゲノム DNA が得られることが明らかになった。また、NextSeq 次世代シーケンサー 1 回の解析で、藻類群集の種組成・群集構造解析に必要な十分量のアンプリコンを得られることが明らかになった。本研究で用いた DNA 領域 (*psbA*) は、塩基配列が系統関係を反映しないこと、珪藻類に関するデータの蓄積が不十分であることが明らかになった。これらの結果は、解析する DNA 領域を適切なものに変えることで、本研究のプロトコルが藻類群集の解析に適用できる可能性を示唆していた。

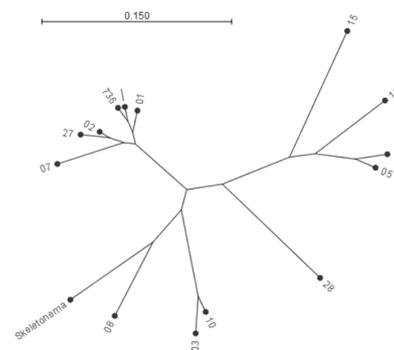


図 4. アンプリコン解析で求められた OUT 配列の系統関係。OUT 配列の DNA 塩基配列を用いて最尤法により求めた。図中横棒は遺伝距離を数字は OUT の番号を示す。BLAST 検索により種名が明らかになった *Skeletonema costatum* については図中でも属名を記す。

謝辞

相模湾プランクトン群集への NGS 活用の準備研究として実施した本研究は、神奈川県理学部総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201710) により行われた。研究にご理解とご支援頂いた神奈川県理学部総合研究所の所員の皆さんに深くお礼申し上げる

文献

- 1) 木元新作, 武田博清 (1989) *群集生態学入門*. 共立出版, 東京.
- 2) 児玉 壮, 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.
- 3) 平賀義路, 児玉 壮, 鈴木祥弘 (2012) 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.
- 4) 平賀義路, 鈴木祥弘 (2013) 相模川河口域の植物プランクトンの分布の季節変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **24**: 55-62.
- 5) 山田 真 (2013) 珪藻 *Skeletonema* 属の最近の分類と生理生態特性 (総説). *日本プランクトン学会報* **60**: 18-28.
- 6) Lopez I and Erickson DL (2016) *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. Humana Press, New York.

■短 報■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

極低温 ESR による金属タンパク質及び金属錯体の機能解析 —光合成細菌 *Heliobacillus mobilis* のフェレドキシンの性質—

羽田野敦史¹ 北島正治¹ 瀬尾悌介² 片岡祐介³ 川本達也^{4,5}
櫻井英博^{1,5} 井上和仁^{1,5,6}

Analysis of Metal Proteins and Metal Complexes by Cryogenic ESR
-Characterization of Ferredoxins from the Photosynthetic
Bacterium *Heliobacillus mobilis*-

Atsushi Hatano¹, Masaharu Kitashima¹, Daisuke Seo², Yusuke Kataoka³,
Tatsuya Kawamoto^{4,5}, Hidehiro Sakurai^{1,5} and Kazuhito Inoue^{1,5,6}

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

² Division of Material Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kanazawa City, Ishikawa 920-1192, Japan

³ Institute of Environmental Systems Science, Shimane University, Matsue City, Shimane 690-8504, Japan

⁴ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁵ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁶ To whom correspondence should be addressed. E-mail: inoue-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Two ferredoxins, FdA and FdB, were purified from the photosynthetic bacterium *Heliobacillus mobilis*. Their absorption spectra were typical of the 2[4Fe-4S] cluster with absorption peaks at 385 and 280 nm and with a shoulder at 305 nm. Fd-B was sensitive to oxygen, and its A385 values decreased by about 50% in 2 hours at 4°C under aerobic conditions. In contrast, A385 of Fd-A remained unchanged for up to 24 h under the same conditions. Cryogenic ESR measurements indicated that Fd-A had ESR signals around $g = 2.05$, 1.94 and Fd-B around $g = 2.05$, 1.92. Both ferredoxins were fully reduced by dithionite at pH 8.0.

Keywords: iron-sulfur center, ferredoxin, ESR, metalloprotein

序論

フェレドキシン (Fd) は鉄原子と硫黄原子から構成される鉄硫黄クラスター (Fe-S) を補因子として持つ可溶性の鉄硫黄タンパク質の一つで、Fe-S には、2 個の鉄原子と 2 個の硫黄原子からなる 2Fe-2S 型、3 個の鉄原子と 4 個の硫黄原子からなる 3Fe-4S 型、4 個の鉄原子と 4 個の硫黄原子からなる 4Fe-4S 型が存在する¹⁾。Fd は原核生物から高等生物まで広く存在し、様々な代謝系で電子伝達成分として重要な働きをしている¹⁾。光合成細菌ヘリオバクテリアはグラム陽性菌に属する絶対嫌気性の細菌で、主要な光合成色素としてバクテリオクロフィル (BChl) *g* を持つ。BChl*g* はテトラピロールの A 環の C の 3

位にビニル基を持つ点で BChl*a* よりも、むしろ植物のクロロフィル (Chl) *a* に化学的構造が似ている²⁾。また B 環の C の 8 位のエチリデン基が、酸素存在下で光異性化され Chl*a* と同じエチル基に変換される²⁾。ヘリオバクテリアの光化学反応中心は光化学系 I や緑色硫黄細菌と同様の鉄硫黄型であり、可溶性蛋白質である Fd を光還元することができる³⁾。還元型 Fd は Fd-NAD(P)⁺ 還元酵素 (FNR) を介して、電子を NAD(P)⁺ に渡し NAD(P)H を生成する。このような特徴を持つヘリオバクテリアは、酸素発生型の光合成を行うシアノバクテリアや葉緑体の光合成系の進化を考える上で、大変興味深い研究対象であ

る^{4,5)}。本研究はタイの水田土壌から単離されたヘリオバクテリアである *Heliobacillus mobilis*⁶⁾ から Fd を単離し、その性質を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

細菌株と培養条件

H. mobilis (ATCC No. 43427) は American Type Culture Collection より入手した。培養は PYE 培地を用いた。寒天培地はアクリル製の嫌気ジャー (BBL GasPak Anaerobic Systems, Becton Dickinson) 内に置き、ジャー内部に微量に含まれる酸素を嫌気ガスパック (アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学) を用いて除去した。密栓した培養瓶や嫌気ジャーは白熱灯の光 ($90 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を当てながら 40°C で培養した。

フェレドキシンの抽出と精製

定常期に達した培養液に酸化防止剤として 0.5 M ジチオナイト溶液を $500 \mu\text{l}$ 加え $8,000 \times \text{g}$ で 10 分間遠心し、菌体を沈殿として得た。これを圧力範囲 $1,000 \sim 1,400 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ でフレンチプレスセル (Aminco) 破壊後、 $20,000 \times \text{g}$ で 20 分、次いで、 $160,000 \times \text{g}$ で 1 時間の遠心を行い可溶性画分を得た。硫酸アンモニウムを 40% 飽和となるように可溶性画分に加え、攪拌しながら 4°C で 2 時間置いた。これを $20,000 \times \text{g}$ 、20 分間遠心し、上清に、さらに硫酸アンモニウムを加え 80% 飽和とした。 4°C で一晩置いた後、これを $20,000 \times \text{g}$ で 20 分間遠心し沈殿を得た。沈殿を少量の 50 mM Tris-HCl (pH7.8) に懸濁し、同じ緩衝液で透析を行い、硫酸アンモニウムを除き、これを Fd 粗抽出物とした。Fd の培養、単離、精製の操作は内部を窒素置換した嫌気ボックス内で行い、試料を外部に持ち出すときは気密性の高い容器に移した。また用いる緩衝液などの溶液はすべて脱気後窒素置換し、精製に用いたカラム類は窒素置換した嫌気ボックス内に 3 日間置いて精製に用いた。最初に、Fd 粗抽出物を DEAE セルロースカラムにかけ、 200 mM NaCl 、さらに 500 mM の NaCl を含む DEAE 緩衝液で溶出させ Fd を含む画分を集め、限外ろ過 (ウルトラフリー 4, Amicon) で濃縮後、Sephadex G-50 カラムにかけ、ゲルろ過緩衝液で展開した。Fd を含む画分を集め濃縮後、 2 M の硫酸アンモニウムを含む 50 mM Tris-HCl (pH7.8) で平衡化した疎水性クロマトグラフィー用カラム Phenyl Superose 10/10 (ファルマシア) に Fd を吸着後、 $2 \sim 0 \text{ M}$ の硫酸アンモニウムの直線的な濃度勾配を持つ 50 mM Tris-HCl (pH7.8) により溶出した。溶

出した画分を限外ろ過により脱塩後、 50 mM Tris (pH7.8) で平衡化した陰イオン交換カラム Mono Q 10/10 (ファルマシア) に吸着させ、 $0 \sim 1 \text{ M}$ の NaCl の直線的な濃度勾配を持つ 50 mM Tris-HCl (pH7.8) により溶出し、最終的な精製標品とした。

吸収スペクトルと ESR スペクトルの測定

吸収スペクトルは分光光度計 (UV 2500 PC, SHIMADZU) を用い、ESR スペクトルは液体ヘリウム温度可変装置 (LES-LTR5X, JEOL) を装着した ESR スペクトルメーター (JES-RE2X, JEOL) を用いた。

結果と討論

細胞破砕液に 40% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、沈殿を除去後、さらに 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて得られた沈殿を少量の 50 mM Tris-HCl (pH7.8) に懸濁し、これを透析して脱塩し可溶化させたところ、緑がかった濃褐色の試料が得られた (Fd 粗抽出物)。Fd 粗抽出物を DEAE カラムにかけ 200 mM の NaCl を含む DEAE 緩衝液で溶出させたところ、まず暗緑色の画分が溶出し、さらに NaCl 濃度を 500 mM にすると濃赤色の画分が溶出した。この画分を Sephadex G-50 カラムでゲルろ過したところ、ごく薄い茶色の画分と濃茶色の画分が分離した。このうち濃茶色の画分を集めて Phenyl Superose 10/10 にかけ、 $2 \sim 0 \text{ M}$ の硫酸アンモニウムの直線的な濃度勾配を持つ 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) で溶出したところ、硫酸アンモニウム濃度が 0.7 M と 0.6 M のときに、波長 380 nm に吸収を持つ画分がそれぞれ溶出された (図 1)。この 2 つの画分をそれぞれ Mono Q 10/10 に吸着後、

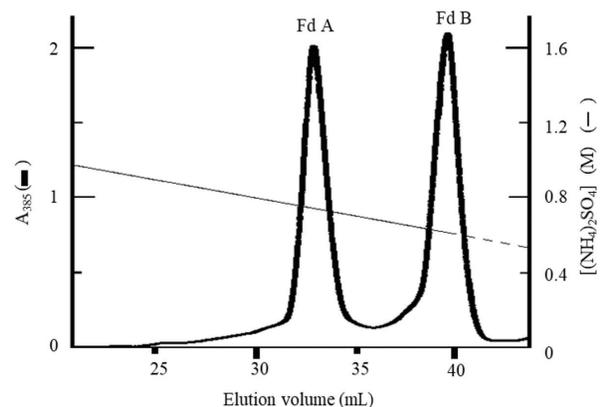


図 1. 疎水性クロマトグラフィーからの溶出パターン。疎水性クロマトグラフィー (Phenyl Superose 10 / 10, ファルマシア) に吸着後、 $2 \sim 0 \text{ M}$ の硫酸アンモニウム濃度の直線的な濃度勾配をかけた 50 mM Tris-HCl (pH7.8) で溶出した。

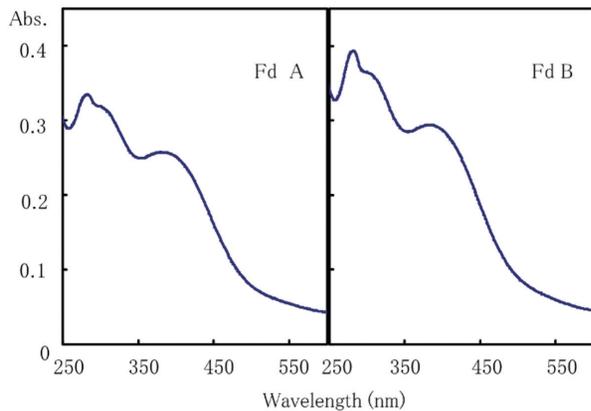


図2. 精製された Fd の吸収スペクトル.

0 ~ 1 M の NaCl の濃度勾配を持つ 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) で溶出し、濃茶色の画分を得た。図2にこれらの画分の吸収スペクトルを示す。どちらのスペクトルも 385 nm と 280 nm に吸収極大を、300 nm に肩を持つ 4Fe-4S 型の Fd に典型的な吸収スペクトル¹⁾を示した。硫酸アンモニウム濃度 0.7 M で溶出した Fd を Fd-A、0.6 M で溶出した Fd を Fd-B とそれぞれ命名した。SDS-PAGE にかけたところ、FdA も FdB も約 15 kDa 付近にバンドが検出された。

Fd の精製過程では全操作にわたり嫌気条件を保つように留意した。これは嫌気性の細菌からの Fd には酸素感受性を持つものが報告されており、ヘリオバクテリアの Fd も酸素感受性を持つ可能性が考えられたためである。Fd の酸素感受性を調べるために、精製した Fd 試料の緩衝液を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、300 mM NaCl に交換後、4°C に保ち、空気を通気したものと、嫌氣的に保ったものについて分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定した。8.3 μM の FdA に空気を通気後、4°C で 24 時間置いたが、嫌気条件に保った FdA と吸収スペクトルに差は見られなかった。一方、9.7 μM の FdB を同様に空気を通気後、4°C に置いて吸収スペクトルを測定したところ、空気通気後 2 時間で波長 385 nm における吸収が半減し、20 時間で約 1/4 に減少した (表 1)。この結果から FdA は酸素感受性ではないが、FdB は酸素感受性であると結論される。酸素感受性を持つ Fd では、空気下で 4Fe-4S クラスタが酸化され、3Fe-4S クラスタに変化し、電子伝達活性が失わ

表 1. 精製フェレドキシンの酸素感受性

	反応時間	
	0 h	2 h
Fd-A	0.25	0.25
Fd-B	0.30	0.15

れ、385 nm の吸収も減少する事が報告されている⁷⁾。FdB の場合も空気下で 4Fe-4S クラスタが破壊され 3Fe-4S クラスタに変化したものと推定される。

ESR 試料管中で Fd を 4°C で 50 mM Tris-HCl (pH7.8) でインキュベート後、液体窒素中で凍らせ ESR 測定を行った。この条件では EPR スペクトルに顕著なシグナルは見られなかった。次に、ジチオナイトを 5 mM 含む条件下で ESR シグナルを測定したところ、FdA の ESR スペクトルは $g = 2.04, 1.94$ 付近に 2 つのシグナルを示し、FdB では $g = 1.94 \sim 1.92$ 付近に 1 つのシグナルを示し (図 3)、FdA、FdB 共に pH7.8 の条件下においてジチオナイトで還元されることがわかった。この測定条件では、酸化還元電位は $-400 \sim -500$ mV に達する⁸⁾ので、両 Fd ともに、この範囲の酸化還元電位を持つと考えられる。この値は、これらの Fd が鉄硫黄型光化学反応中心から電子を受容し NADP⁺ へ電子を伝達するという仮定と矛盾しない。

シアノバクテリアや葉緑体の光化学系 I では、反応中心色素 P700 から光エネルギーによって励起された電子が末端の電子受容体である F_A/F_B へと伝達される。Fd が F_A/F_B 結合蛋白質である PsaC に接すると、F_A/F_B から電子が Fd の Fe-S に伝達され、Fd は FNR の存在化で NADP⁺ を還元し NADPH を生

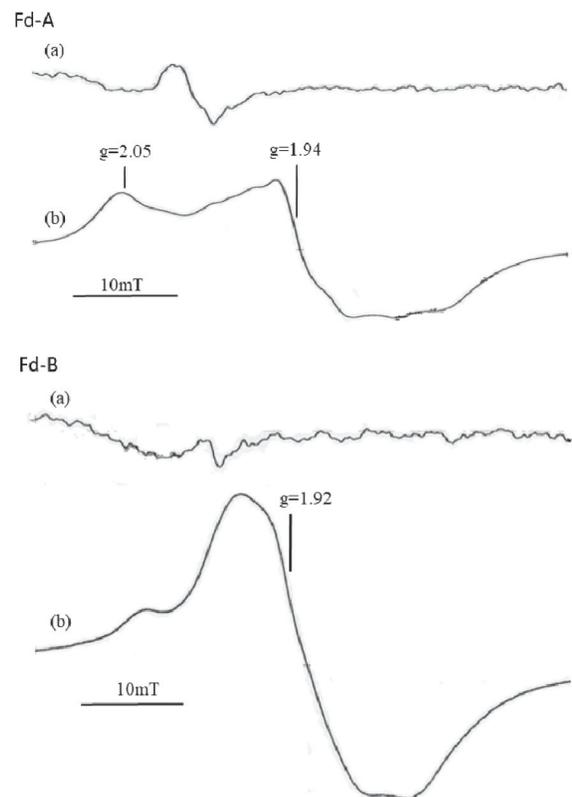


図3. 精製フェレドキシンの ESR スペクトル. (a) 酸化状態, (b) ジチオナイト 5 mM による還元状態.

成する。同じ鉄硫黄型反応中心をもつ緑色硫黄細菌では反応中心色素 P840 から光エネルギーによって励起された電子が F_M/F_B 蛋白質である PscB へと伝達され、Fd が還元される。ヘリオバクテリアの光化学系反応中心は未だ精製が進んでおらず、光化学系 I の PsaC や緑色硫黄細菌の PscB のような光化学反応中心複合体を構成する鉄硫黄ペプチドが存在するのかどうか明確ではない。界面活性剤を用いて光化学系 I の PsaC を複合体から分離することが可能であるが、分離された PsaC の Fe-S は高い酸素感受性を持つ⁹⁾。このことから今回単離された Fd のうち酸素感受性を持つ FdB と、光化学系 I の PsaC に関連性があるのかもしれない。

謝辞

本研究は 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201709) を受けて行った。

文献

- 1) Matsubara H and Saeki K (1992) Structural and functional diversity of ferredoxins and related proteins, In: *Advanced in Inorganic Chemistry*, Cammack R, eds., Academic press, California. pp. 223-280.
- 2) Gest H (1994) Discovery of the heliobacteria, *Photosynth. Res.* **41**: 17-21.
- 3) Sakurai H, Kusumoto K and Inoue K (1996) Function of the reaction center of green sulfur bacteria. *Photochem Photobiol.* **64**: 5-13.
- 4) Xiong J, Inoue K and Bauer C (1998) Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14851-14856.
- 5) Xiong J, Fischer W, Inoue K, Nakahara M and Bauer C (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science* **289**: 1724-1730.
- 6) Beer-Romero P and Gest H (1987) *Heliobacillus mobilis*, a peritrichously agellated anoxyphototroph containing bacteriochlorophyll *g*. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**: 109-114.
- 7) Tilley GJ, Camba R, Burgess BK and Armstrong FA (2001) Influence of electrochemical properties in determining the sensitivity of [4Fe-4S] clusters in proteins to oxidative damage. *Biochem J.* **360**: 717-726.
- 8) Inoue K, Fujii T, Yokoyama E, Matsuura K, Hiyama T and Sakurai H (1989) The photoinhibition site of photosystem I in isolated chloroplast under extremely reducing conditions. *Plant Cell Physiol.* **30**: 65-71.
- 9) Golbeck J (1999) A comparative analysis of the spin state distribution of *in vitro* and *in vivo* mutants of PsaC. *Photosynth. Res.* **61**: 107-144.

■報告書■ 2017年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

医学用語の統合によるカルテの潜在意味解析の研究

韓 浩^{1,3,4} 中山 堯^{2,3}

Semantic Analysis of EHR Based on Medical Terminology

Hao Han^{1,3,4} and Takashi Nakayama^{2,3}

¹ Department of Healthcare Information Management, The University of Tokyo, Bunkyo-ward, Tokyo 113-8655, Japan

² Department of Information Science, 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: han@hcc.h.u-tokyo.ac.jp

Abstract: This research establishes and promotes a project that aims to collect and arrange medical term dictionaries to facilitate NLP in clinical settings.

Keywords: EHR, medical term

序論

診療記録テキスト検索システムの利用者（医療従事者、医学研究者等）は1つのデータに対して様々な検索意図を有するため、利用者の満足度を高めるためには多様な検索意図と診療情報の意味関係を反映させて検索結果を解釈し、それを利用者に分かりやすい形で出力する必要がある。このために、本研究では、①潜在的な検索意図の分析、②検索意図と情報の意味関係を反映した出力方法、及び①の結果から②を生成するための③検索モデルとアルゴリズムの3つの課題を、相互に密接に連携する要素として位置づけた上で、それぞれの課題の解を与えることにより、一貫性のあるシステムを構築可能とすることを目的とする。2017年度は検索処理について実現に必要なデータを明らかにし、情報の意味関係の認識のため医学統合辞書検索の構築を行った。

研究背景

SS-MIX2¹⁾ 拡張ストレージ文書検索エンジンを代表とする現在の診療記録テキスト検索システムは、利用者の多様化する情報要求に十分に答えられていないと言えない。その要因として以下のような問題がある。

利用者が入力する問合せ（クエリ）は情報要求を的確に表現していない場合が多く、特に入力されたキーワードが少ない（1-3個）場合はクエリが曖昧

あるいは不十分になることが多い。これには、多義語のように検索対象自体に複数の解釈が可能である場合や、検索対象が様々な側面を有する場合（例えば、肺癌ではレントゲンの所見、治療計画、喫煙歴等）などがある。ところが、従来の診療記録テキスト検索エンジンでは、キーワードを含む文書（診療記録テキストなど）を、クエリと文書との類似性（relevance）のスコアに基づいてランキングするため、検索結果の上位が特定の解釈や側面に関する文書で占められるという状況が避けられない。この結果、少数派の多様な情報要求にはほとんど答えられないという問題が生ずることになる。

具体的には、検索意図マイニングにより、多義性のあるクエリ「○○」の潜在的な検索意図として「○○××」が得られたとしても、目的の文書には必ずしも「××」（及びそれに類似のキーワード）が含まれているとは限らないため、このような文書は「○○××」に対する検索結果として得ることはできない。これは再現率を低下させる問題の一つである。例えば、クエリ

「胸部 レントゲン」

の検索意図が

「胸部レントゲン検査結果を調べる」

が得られたとしても、現存の診療記録テキスト検索エンジンでは

「Xp 上アレセンサが効いている」
 のような検索結果が得られない。それは、検索システムに「レントゲン」と「Xp」（Xp はレントゲンの略語）あるいは「アレセンサ」と「胸部」の意味関係（アレセンサは肺癌を治療する薬物である）を認識する機能が実装されていないことが原因となっている。

逆に、検索結果になる文書に対して、検索キーワード「〇〇 ××」が含まれていてもそれが検索意図を反映していない場合もある。これは適合率を低下させる問題の一つである。例えば、クエリ

「妊娠 高血圧」

に対しては、次のような検索結果が得られる可能性がある：

「本人：不妊治療 父：胃癌 母：高血圧 姉：妊娠中」
 「妊娠中の高血圧特になし」

しかし、これらはいずれも実際の検索意図

「妊娠 高血圧症患者を調べる」

に合わない可能性がある。

上記のような問題点は、従来の手法が主として文書に表現された字面の情報を対象として研究されてきたことを示唆している。すなわち、利用者の検索意図と診療情報の意味関係を考慮することなく、文書の分類結果に基づいて情報の意味を判断するという分析の客観性を欠いているという根本的問題がある。

具体的には、これまでの国内外の研究は、検索対象になる文書のクラスタ解析に基づく利用者の閲覧行動の分類分析を中心として行われている。この手法は一部の検索エンジンでも重複・類似文書を除外する技術等として実用化されている。また、検索意図マイニングや類似の研究も従来から鋭意進められており、主に検索ログやクリックスルーログの分析に基づく技術としてクエリ補完やクエリサジェストの機能が実用化されている。一方、検索結果を分類あるいはクラスタリング（＝文書内容による組織化）して出力する研究も診療記録検索エンジンの出現後比較的早い時期から行われてきており、実用化されたものもある。しかし、このように個別の課題設定においては研究や実用化が進んでいるものの、これらは単独では上述した問題への十分な解とはならない。検索意図の一連の変化の理解と検索満足度の分析を行わず、主観的な判断に依存していることを避けられない。

計画

利用者の理解しやすさと利便性を考慮して、検索結果の表示出力において取り扱うべき検索意図を確定

する。ここでは、検索意図と検索満足度に人手で付与している属性を参考として、潜在的な検索意図を抽出して列挙する方法を研究する。その際、検索意図に関連がありそうな文書に着目することにより高精度化を図る。そのために、列挙した潜在的な検索意図に対して、種別と確率を付与する方法を検討する。種別については以前の研究²⁾に付与された検索意図種別を学習データとし、機械学習を利用して付与することを想定している。確率については各種の情報資源中における検索との共起頻度等に基づく推定手法を開発し、被験者実験により評価を行う予定である。

多義性等のあるクエリに対して、多面性を有する対象文書に対する情報の意味関係と利用者の検索「コンテキスト」などの扱いについて検討を行う。そして、既存の医学用語リソース等を利用して、さらに所属研究機関に開発された医療知識基盤としての臨床医学オントロジーを導入して、自然言語処理の方法に基づいて診療記録の意味関係を分析することにより情報の概念・属性と繋がり関係等を取得する。

実装

医学用語の総合検索サービスを提供するため以下の医学辞書を整理・統合して Web サービス API を開発している。

- Comejisyo
- ICD-10
- LiLak
- UMLS
- 標準病名マスター
- 医薬同義 T 辞書
- 医薬品 HOT コードマスター
- JAPIC 薬剤データベース
- 臨床検査マスター

開発環境として以下のものを利用している：

- Server Version: Apache Tomcat 8.5.30
- JVM Version: 1.8.0_60
- Jersey³⁾ Version: 2.25.1

開発済みの API の例をいくつか以下に示す。

API1：単語があれば、単語のコンセプト ID と存在先を返す関数 `term2attributes`

例：「イスポール」の属性を調べる場合：

```
http://localhost:8080/meddic/term2attributes
?term=イスポール
```

```
#term：パラメータ名、イスポール：パラメータ値
```

検索結果は、以下のような JSON のフォーマットとして返す。これによって「イスポール」は医薬同

義辞書の default 表 (コンセプト ID:D00002) に含まれていることが分かる。

```
{
  "term": " イスポール ",
  "id_attributes": [
    {
      "医薬同義 .default": {
        "concept_id": "D00002"
      }
    }
  ]
}
```

API2：単語コンセプト ID で指定された辞書から単語の属性を返す関数 conceptID2attributes

例：医薬同義辞書からコンセプト ID(D00002) の対応する単語の属性を調べる

```
http://localhost:8080/meddic/conceptID2attributes?composite_resource_name= 医 薬 同 義 .default& concept_id=D00002
# composite_resource_name : 辞書名、concept_id : コンセプト ID
```

結果は、以下のような JSON のフォーマットとして返す。これによって医薬同義辞書の中における (ID:D00002) の単語に関連する属性 (上位関係、カテゴリ、同義語リスト等) が分かる。

```
{
  "composite_resource_name": " 医薬同義 .default",
  "concept_id": "D00002",
  "composite_standard_codes": [],
  "parents": [],
  "children": [],
  "categories": [
    " 医薬品名 "
  ],
  "lead_term": 1,
```

```
"synonym_set": [
  "12% 総合アミノ酸製剤 ",
  " イスポール ",
  " ストリゾール ",
  "12% MIXED AMINO ACID PREPARATION",
  "ISPOL",
  "NUTRISOL"
],
"inferred_categories": [
  " 医薬品名 "
],
"others": []
}
```

今後の予定

開発された医療知識基盤としての臨床医学オントロジーを導入して、自然言語処理の方法に基づいて診療記録の意味関係を分析することにより情報の概念・属性と繋がり関係等を取得する。実験を行って基本的な有効性の確認を行うとともに、Wikipedia 等により収集したデータも考慮して意味情報の追加導入を行う。また、開発した手法を効率的に実行するために並列処理を導入して実装する。

謝辞

本研究は、研究課題「検索クリエ分析によるカルテの潜在意味解析の研究」に対する 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究の研究助成 (RIIS201704) を受けて行いました。厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) SS-MIX2. [http://www.ss-mix.org/cons/ssmix2_about.html].
- 2) 韓 浩, 郭 俊霞, 中山 堯 (2015) Q&A コミュニティに注目したブラウジング行動に基づく検索満足度の予測分析. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 41-45.
- 3) Jersey. [<http://jersey.github.io/>].

■教育論文■

数理・物理学科における物理学実験での放射線教育の実践例

星野 靖^{1,2}

Experimental Physics to Examine Radiation
in Department of Mathematics and Physics in Kanagawa University

Yasushi Hoshino^{1,2}

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: yhoshino@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The fundamental properties of radiation such as alpha, beta, and gamma radiation are systematically learned in the class of experimental physics prepared for students majoring in physics every year. I think that the learning of accurate knowledge and correct handling of radiation is ethically meaningful for students, especially those studying physics. This paper briefly introduces education programs for radiation physics in classes of experimental physics: experimental method in basic physics, experiments in physics I, and experiments in physics II

Keywords: experiments in physics, radioactivity, radioisotopes, energy spectrum

はじめに

自然科学の学問領域において、物理学が対象とする時間的・空間的・エネルギー的スケールは他の分野に比べて極めて広い。特に高エネルギー領域を対象とする種々の研究テーマは、まさに物理学の醍醐味を味わえる代表的な研究対象となっている。高エネルギーの粒子や電磁波は、素粒子や原子核の反応（壊変や融合など）を起源としたものが多く、自然の根源を理解する上でこれまで非常に重要な学術的役割を果たしてきた。今日では、加速器により人工的に高エネルギー粒子や電磁波を生み出すことができるようになり、それらは様々な物質の改質や物性・構造解析などに応用され、現代の科学技術を支える重要なツールにもなっている。

ところで、このような不安定核の遷移により発生した高エネルギーの粒子や電磁波のことを「放射線」と呼び、歴史的に見れば発見されて100年余りとなるが、今の社会情勢などから「原子核(力)」や「放射線」という言葉自体はあまり好意的には使わない傾向になってきた。しかしながら、物理学や材料科学あるいは生命科学・医学などの分野においては、安全を第一に確保した上で放射線を利用するという事は避けて通れない。特に物理実験系の研究室では卒業研究や大学院での研究の場において、実際に

高エネルギーの粒子や電磁波を用いた研究が日常的に行われている。

このような背景の中で特に物理学を専攻する者にとっては、放射線に関する正しい科学的知識を身につけ、安全にそれらを取り扱うことができる人材を育てることは教育倫理上意義深いものと考えられる。実際に数理・物理学科 物理コースにおいては、1年次から毎年実験科目（基礎物理学実験法(1年次)、物理学実験 I (2年次) と物理学実験 II (3年次)）の中で放射線に関するテーマを設け、系統的に理解を深めることができるような教育プログラムが組まれている。また講義においても、4年次に原子核・素粒子物理学という科目が用意され、より深く学修できる体系となっている。本稿では、実験分野における放射線物理に関する教育の取り組みについて簡単に紹介したい。

基礎物理学実験法

この科目は1年生後学期に配当され、2年次から始まる物理学実験やその後の卒業研究などにおいて実験・実習を安全に行うためのスキル、取得したデータを統計的に処理するノウハウ、各種計測機器の基本的な取り扱い方、数値シミュレーションなどを実

験・演習・講義を交えて学修する内容となっている。本稿に関連するものとしては、各種放射線の発生起源と種類・特徴やそれらの安全な取り扱い方について、実験を通して学んでいくテーマが挙げられる。実際これらは高等学校の物理の教科書の範疇でもあるが、高校における授業時間の制約や大学入試の出題範囲などの状況からあまり詳しく学んできていないのが本学学生の現状である。

まず放射線について割りと身近な存在であることを実感してもらうために、ガイガカウンタを用いて私たちの生活している環境における放射線量（自然放射線）を計測することから始める。カウンタ表示によると、おおよそ1~2 マイクロシーベルト毎時というガンマ線量が計測され、計数される毎にピーピーといった大きな音が発せられる。この生活環境において、カウンタブルな量として自然に放射線が飛び交っていることに最初は驚く学生もいる。ただこれが現実であるが、科学者にとってはこの程度に放射線カウンタがピーピー鳴るのは特に驚くほどのことでもない自然な現象である。

次に、代表的な放射線として知られている”アルファ線”、”ベータ線”、”ガンマ線”についてそれぞれの特徴を遮蔽効果という点から簡単な計測実験によ

りまず実感してもらう。具体的には、放射線源と検出器の間に厚さの異なるさまざまな材質の遮蔽物を挿入した時の線量率の変化を計測し、その材料の種類や厚さによる遮蔽効果（透過率）の違いを考察する。さらに、それぞれの放射線の実体が何であるかということ踏まえ、観測された現象を定性的に説明することを試みる。

最後に、霧箱を用いて実際に放射線が飛び交っている様子を目で観察し、その特徴を体感する。各地の科学博物館にはたいてい大型の霧箱が設置されており、毎年数人の学生は博物館などで観察した経験があるようである。長い物理学の歴史の中で見れば、これまで霧箱や泡箱、原子核乾板などいわゆる放射線の飛跡を直接記録する手法はさまざまなシーンで活躍してきた実験ツールでもある。

図1に、実際に霧箱を用いて観察した放射線の軌跡を、デジタルカメラを用いて露光時間1秒程度で撮影したものを示す。中央には磁石を設置した。矢印で示すように、放射線の通ったところに、細い筋状の白い雲が観測される。放射線の種類やエネルギーによっては、図1(b)に示すように偏向するものも稀に観測される。放射線の種類に応じた軌跡の形状(太さ・長さ)、偏向の角度や方向などについて考えるのも、1年生にとっては教育的かもしれない。

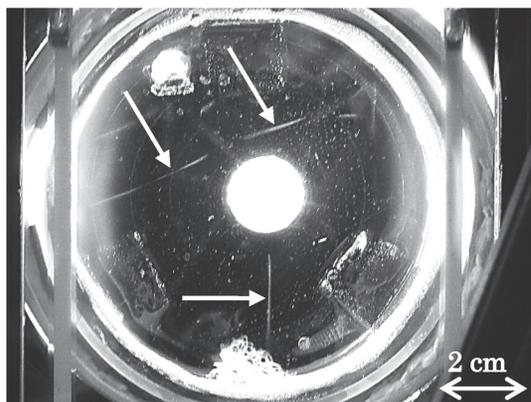


図1. 高温拡散霧箱を用いて観察した放射線の飛跡。中央の白い円形物は1000 G程度の磁石である。

物理学実験 I

次に2年次に配当される物理学実験 I では、ガイガカウンタを用いて ^{137}Cs から放射されるベータ線とガンマ線を種々の膜厚のアルミ箔を通して計数率測定する。アルミ箔の面密度(厚さ)に対して単位時間当たりの検出カウント数を対数プロットすることにより、アルミニウムによるベータ線とガンマ線の吸収率の違いについて定量的に議論する。放射性同位元素の壊変は、確率統計的に言えばポアソン過程に従う良い例として知られているが、この実験においても平均値や分散といった量についても触れながら統計的現象に関する理解を深める。最後に、空気層や検出器雲母窓の面密度、検出立体角などを適当に仮定することにより、真の放射能の決定を行う。1年次に比べやや発展的な内容になっている。

物理学実験 II

これまでの実験では主に放射線の計数に着目して行ってきたが、物理学実験 II では更に放射線(アルファ、ベータ、ガンマ線)のエネルギー分析を行うことでエネルギースペクトルを取得し、それらを解析することを主題とする。良く知られているように、放射線のエネルギーは、発生する原子核種固有であ

るので、エネルギー分析によってその起源を知ることができる。

まず導入として、学生が放射線の持つエネルギーについて考えるきっかけとなるよう、一つの思考実験クイズを出してみる。図2に示すように、質量天秤の左側の皿に陽子○と中性子●を1個ずつ乗せ、右側には陽子1個と中性子1個から構成される重水素原子核を1個乗せる。この天秤は一体どちらに傾くか？あるいは傾かないか？ということを探ねる(あくまでも思考実験として)。すると素直な多くの学生はどちらにも傾かないと答える。

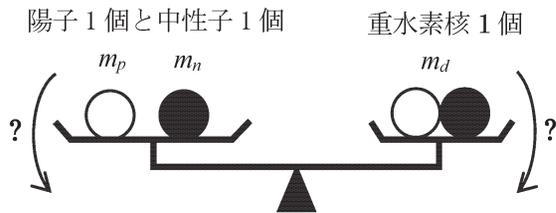


図2. 左側の皿に陽子○と中性子●を1個ずつ乗せ、右側に重水素原子核を1個乗せた質量天秤の模式図。

しかし、質量天秤は左側に傾く。ここで、陽子、中性子、重水素核それぞれの質量を m_p 、 m_n 、 m_d とすれば、つまり

$$m_p + m_n > m_d$$

という関係になっていることが分かる。実際これらの質量は、次の表1のような値として知られている。

表1. 核子の質量

陽子 (m_p)	$1.6726... \times 10^{-27}$ (kg)
中性子 (m_n)	$1.6749... \times 10^{-27}$ (kg)
重水素核 (m_d)	$3.3427... \times 10^{-27}$ (kg)

つまり構成核子をばらばらにおいた方が質量が大きいという結果になる。一方、原子番号の大きなウラン原子核1個とこれを構成する核子をばらばらに置いた天秤では、逆にウラン原子核1個の方に天秤は傾くであろう。

では次に、エネルギーを測定できる天秤なるものを頭の中に用意しよう。物理的には反応前後での全エネルギーは保存するので、例えば陽子1つと中性子1つが融合し重水素を形成したときでも、エネルギー天秤は傾かないはずである。したがって、これらの核子の反応に対して、次のようなエネルギー保存の関係が成り立ち、

$$m_p c^2 + m_n c^2 = m_d c^2 + Q$$

陽子と中性子の融合において Q なるエネルギーが余剰となり何かの形で放出されることが分かる。ここで、 Q 値はおおよそ MeV のオーダーである。もちろん化学反応にでも熱の放出や吸収によってエネルギーの散逸が起こるが、高々 eV 程度であろう。

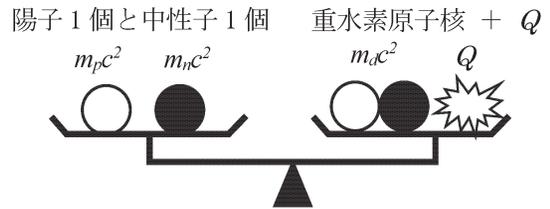


図3. 左側の皿に陽子○と中性子●を1個ずつ乗せ、右側に重水素原子核を1個乗せたエネルギー天秤の模式図。

これは核反応における Q 値と呼ばれ、まさにエネルギー発生之源となるものであり、原子力の素である。このエネルギーを受け取って放出された粒子や電磁波がアルファ、ベータ、ガンマ線に代表される放射線である。

次節に示すアルファ線のエネルギースペクトル測定実験において、質量欠損から計算される Q 値と放出される放射線のエネルギーを比較することで、これらが確かに対応していることが定量的にも容易に確かめられ、学生自身も腑に落ちることとなる。

^{226}Ra からのアルファ線エネルギースペクトル解析

自然放射線の代表的な壊変過程であるウラン系列において形成される ^{226}Ra は、その崩壊過程において主に以下に示す5種類のアルファ線を放出する。核反応の Q 値も併せて示す。

- ① $^{226}\text{Ra} \rightarrow ^{222}\text{Rn} + ^4\text{He}$ $Q = 4870.63 \text{ keV}$
- ② $^{222}\text{Rn} \rightarrow ^{218}\text{Po} + ^4\text{He}$ $Q = 5590.30 \text{ keV}$
- ③ $^{218}\text{Po} \rightarrow ^{214}\text{Pb} + ^4\text{He}$ $Q = 6114.63 \text{ keV}$
- ...
- ④ $^{214}\text{Po} \rightarrow ^{210}\text{Pb} + ^4\text{He}$ $Q = 7833.46 \text{ keV}$
- ...
- ⑤ $^{210}\text{Po} \rightarrow ^{206}\text{Pb} + ^4\text{He}$ $Q = 5407.46 \text{ keV}$

図4に ^{226}Ra から放出されるアルファ線のエネルギースペクトルを示す。なお反応式②と⑤の Q 値は、分解能に比べて値が近いので、スペクトル上では分離されていない。アルファ線のエネルギーがほぼ Q 値と一致していることが分かる。(実際には、運動量保存の関係からアルファ線の運動エネルギーは Q 値よりも若干小さくなることも確かめられる)。

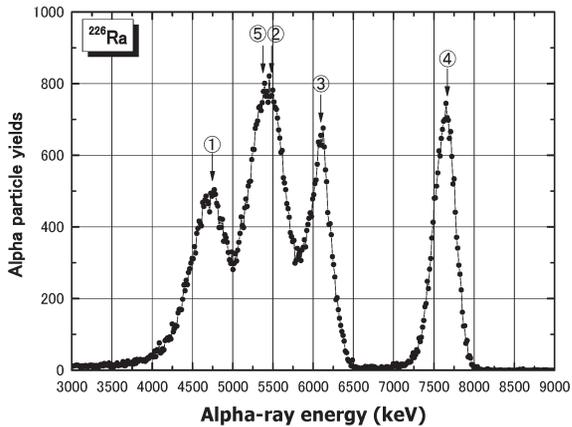


図4. ²²⁶Raからのアルファ線スペクトル.

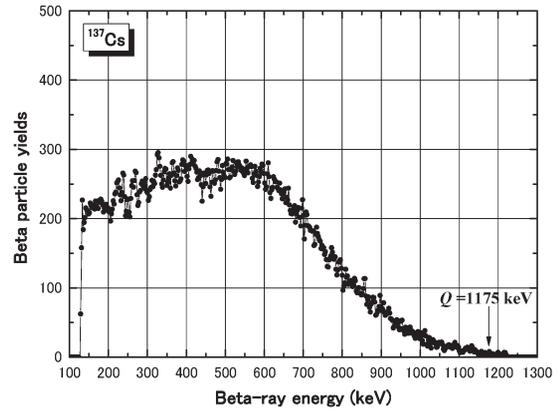


図6. ¹³⁷Csからのベータ線スペクトル.

¹³⁷Csからのベータ線エネルギースペクトル解析

¹³⁷Csは、図5に示すようなβ⁻崩壊によって安定な¹³⁷Baに遷移する。この核反応におけるQ値は1175.63 keVである。したがって、上に示したアルファ崩壊の考え方を適用すれば、放出されるベータ線のエネルギーはQ値1175.63 keV程度となり、エネルギースペクトルにもQ値付近にピークが観測される筈である。

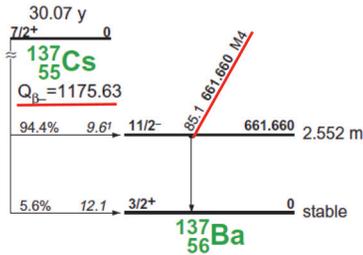
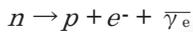


図5. ¹³⁷Csのβ⁻崩壊遷移図.

図6に¹³⁷Csからのベータ線スペクトルを示す。なお、ガンマ線由来のバックグラウンドは引いてある。図からわかるように得られるスペクトルはアルファ線スペクトルとは異なり、連続スペクトルとなる。ここで、β⁻崩壊の反応式は、一般的に次のようになることが分かっている。



つまりβ⁻崩壊では、ベータ線のほかに反電子ニュートリノが放出される。よって、アルファ崩壊とは異なり、3体の粒子が関わる反応となることから、ベータ線のエネルギーは定まらなくなり、連続スペクトルとなることが理解できる。

自然放射線（ガンマ線）のエネルギースペクトル測定と発生源の同定

この課題では、ガンマ線に代表される自然放射線のエネルギースペクトル測定をNaIシンチレーション検出器と高純度Ge半導体検出器を用いて行い、自然放射線の起源を同定する。またガンマ線と物質との相互作用として(1)光電効果、(2)コンプトン効果、(3)電子・陽電子対生成などがあるが、実際に測定スペクトルを解析しながら、それぞれの特徴について理解を深める。

図7に高純度Ge半導体検出器を用いて得られたエネルギースペクトルの一例を示す。ピークのエネルギーから放射性核種を決定し、(1)⁴⁰K系列、(2)ウラン系列、(3)トリウム系列、あるいは(4)人工放射線のどれに属するか調べる。図7に示したスペクトルで観測されたピークとその起源を表2に示す。

身近な材料や食物に含まれる放射線（ガンマ線）の検出と核種同定

最後に、身近な食品である食塩から放出される放射線（ガンマ線）を2種類の製法の異なる食塩に対し

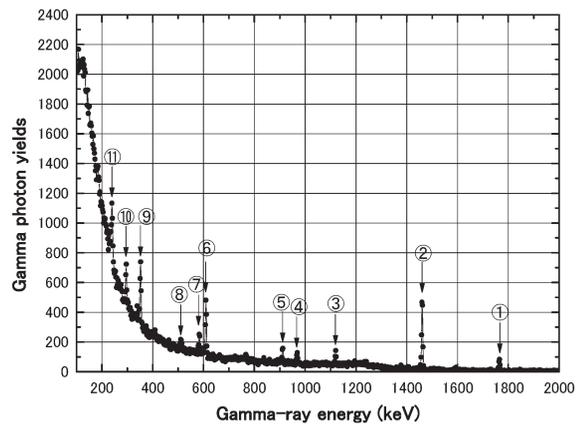


図7. Ge半導体検出器によって測定した自然由来のガンマ線スペクトルとその起源.

表 2. 自然放射線の典型的な起源と系列

Energy (keV)	起源	崩壊系列
① 1764.50	$^{214}\text{Bi} \rightarrow ^{214}\text{Po}$	ウラン
② 1460.86	$^{40}\text{K} \rightarrow ^{40}\text{Ca}$	カリウム
③ 1120.29	$^{214}\text{Bi} \rightarrow ^{214}\text{Po}$	ウラン
④ 968.77	$^{228}\text{Ac} \rightarrow ^{228}\text{Th}$	トリウム
⑤ 911.21	$^{228}\text{Ac} \rightarrow ^{228}\text{Th}$	トリウム
⑥ 609.32	$^{214}\text{Bi} \rightarrow ^{214}\text{Po}$	ウラン
⑦ 583.19	$^{208}\text{Tl} \rightarrow ^{208}\text{Pb}$	トリウム
⑧ 510.77 511.0	$^{208}\text{Tl} \rightarrow ^{208}\text{Pb}$ $e^- e^+$ 対消滅	——
⑨ 351.92	$^{214}\text{Pb} \rightarrow ^{214}\text{Bi}$	ウラン
⑩ 295.21	$^{214}\text{Pb} \rightarrow ^{214}\text{Bi}$	ウラン
⑪ 238.63	$^{212}\text{Pb} \rightarrow ^{212}\text{Bi}$	トリウム

て測定し、放射能の違いについて考える。まず1つ目のサンプルとして通常の食塩を用意する。2つ目として、いわゆる減塩処理をした食塩を用意する。学生にとっては、非常に身近な食品であるため、その違いに興味は湧いているようである。成分表示によると、減塩食塩は約50%のNaをKに置き換えた構成になっており、通常食塩に比べてKの含有量は約1000倍である。よく知られているように自然界に存在するK同位体で質量数40のKは放射性であり、図8に示すように崩壊する。したがって、Kを多く含む食品からは、必然的に ^{40}K が放出するベータ線やガンマ線が多く検出される筈である。蛇足であるが、地球の大気成分にArが1%ほど含まれるのは、 ^{40}K の電子捕獲EC壊変により日々生成されていることに因る。

図9に通常食塩(a)と減塩食塩(b)からのガンマ線スペクトルを示す。なお通常食塩にはほとんどKが含まれていないため、通常食塩に見られるKのピークは自然放射線由来のものであると考えてよい。両者を比較すると、減塩食塩からは ^{40}K 由来のガンマ線がより多く検出されていることが分かり、学生自身も一瞬驚くが、その合理的な理由に”なるほど”と納得しているようである。

ところで、Kは動植物が生きていくうえで不可欠

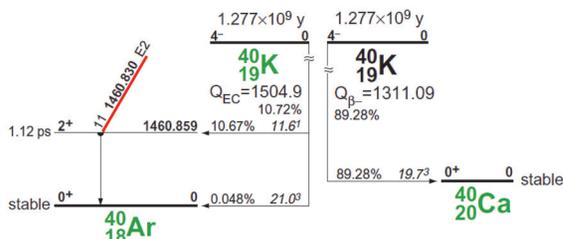


図 8. 原子核のエネルギー準位と ^{40}K の崩壊遷移図.

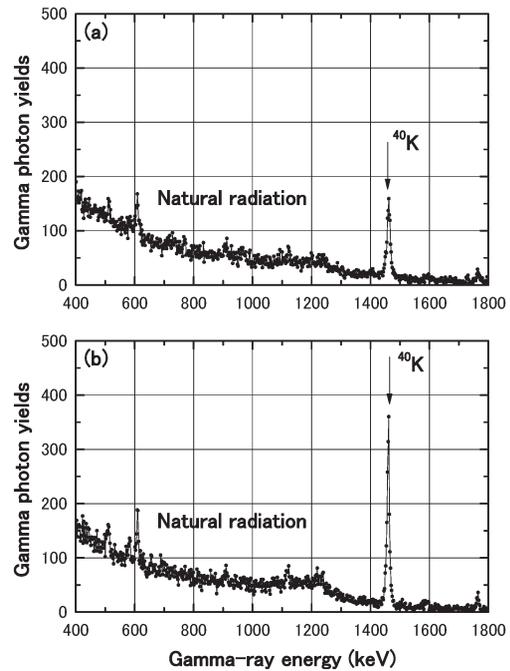


図 9. 通常食塩 (a) と減塩食塩 (b) からのガンマ線エネルギースペクトル.

なミネラル分である。厚生労働省によると、毎日2g程度のKを摂取するのがよいとされている。当然、人間の体内の組織の中にも多くのKが含まれている。その量は、おおよそ100g (2.5 mol) とされている。自然含有比で ^{40}K の割合は0.012%であるから、私たちの身体の中のKのうち0.0003 mol (1.8×10^{20} 個) は放射性 ^{40}K ということになる。 ^{40}K の半減期は約13億年であるので、1秒間に人間は、

$$\begin{aligned}
 -\frac{dN(t)}{dt} &= \frac{\ln 2}{T} N(t) \\
 &= \frac{\ln 2}{(13 \times 10^8) \times (365 \times 24 \times 3600)} \times 1.8 \times 10^{20} \\
 &\approx 3000 \text{ Bq}
 \end{aligned}$$

の放射線（ベータ線と1.46 MeVのガンマ線）を周囲に放出していることになる。

これまでの説明で通常食塩に比べ放射能の高い減塩食塩を取ることをためらう人もいるかもしれない。しかし、例えば毎日10gの減塩食塩を取ったときの ^{40}K の摂取量を実際に計算してみるとよい。そもそも体内のミネラル量はほぼ一定に保たれているので、摂取したKが体内に蓄積されることはないのだが…。それ以上に、循環器系にとって塩分控えめの医学的効果は大きいということであろう。

他の例も見てみよう。例えば、普通の牛乳1000ml中に含まれるカリウムは成分表に約1.5gと記載されている。この中の0.012%、つまり0.18mg (2.7

× 10^{18} 個) は放射性 K となる。簡単な計算により、市販されている牛乳 1000 ml の放射能は、必然的に約 45 Bq となることが分かる。また、有機物を構成する炭素の極々一部は放射性炭素 14 (^{14}C) であり、ベータ線を放出する。そのような意味で放射線は、意外と身近なものであることが理解できよう。

結び

数理・物理学科実験分野における放射線物理に関する教育の取り組みについて簡単に紹介した。3年間

にわたる実験プログラムでは、放射線に関する正しい理解を深めることができるよう年次ごとに適切なテーマを段階的に配置し、効果的に学修できるよう構成されている。学修内容も、なるべく身近な話題や関心事をテーマに織り込みつつ、客観的解析と科学的解釈が身に付くよう工夫している。特に毎回の実験が、「単なる計測・集計作業」で終わらないよう、なるべく学生にとっての驚きと発見そして興味と探究へと繋がるような有意義な内容を是非とも提供したい。

■教育論文■

反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (4)

加部義夫^{1,2}

Organometallic Chemistry Based on Reaction Types and Anecdotes of Discoveries (4)

Yoshio Kabe^{1,2}

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

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

Abstract: Organic compounds containing carbon-metal bonds are called organometallic compounds. Such compounds have been known and studied since the 19 century and have been widely used for synthetic transformation in modern organic chemistry. Their many educational benefits could result in the use of reaction types and discoveries in undergraduate and graduate classes in organic and organometallic chemistry. As the latter half of this approach, this report deals with transition metals. Mond was a chemist and entrepreneur with an alkali soda business. To improve the synthesis of alkali soda, i.e., the solvey method, he discovered binary gaseous metal carbonyls $\text{Ni}(\text{CO})_4$, with the same toxicity as KCN. The metal carbonyls were applied to industrial reactions such as the hydroformylation (Oxo or Roelen syntheses) of olefins using $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ and Reppe synthesis of acrylic acid using $\text{Ni}(\text{CO})_4$ and acetylene. In the chemistry of metal carbonyls, Reppe found that Ni-catalyzed acetylene oligomerization to yield benzene and cyclotetraene (COT). First, metal carbene complexes were synthesized by Fischer as derivatives of metal carbonyls. Wilkinson tried to isolate alkyl transition metal intermediates for Ziegler-Natta polymerization but, did not succeed because of the β -H elimination reaction. Therefore, he identified Pauson's incorrect structure of biscyclopentadienyliron. He collaborated with Woodward to report the first sandwich structure of ferrocene (Cp_2Fe). Fischer also independently identified the same structure. This discovery of ferrocene (Cp_2Fe) expanded metallocene chemistry.

Keywords: transition metal compounds, metal carbonyls, metallocene, ferrocene

はじめに

今回から遷移金属の化学に入るが、前回までの典型金属（元素）の化学では元素ごとにその反応のタイプと発見のエピソードをみてきた。遷移金属の化学では、元素ごとではなく、遷移金属錯体の種類について、年代にそってその発見のエピソードを見てゆき、それと並行して反応のタイプごとにその化学を紹介する。1900年の初頭に Gignard 試薬が発見され、典型金属の化学が大きく発展したことを前回までにみてきたが、これに比べて少し遅れて、遷移金属の化学は、1930年～1960年にかけてドイツで開発された以下の3つの工業的プロセスとしての均一触媒反応にその起源がある¹⁻¹⁰。

(1) オキシ反応、Reppe 反応に代表されるカルボニル化反応 (1930-1940 年)

(2) Ziegler-Natta 触媒重合 (1950 年代)

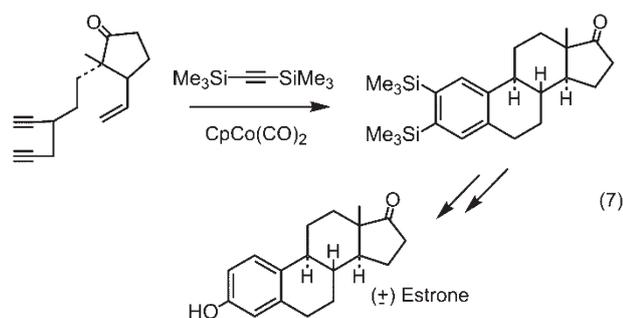
(3) Wacker 法 (1956 年)

今回はカルボニル化反応に関連して、遷移金属カルボニル錯体の化学と Ziegler-Natta 触媒重合の発見につながるフェロン Cp_2Fe の発見について解説する。

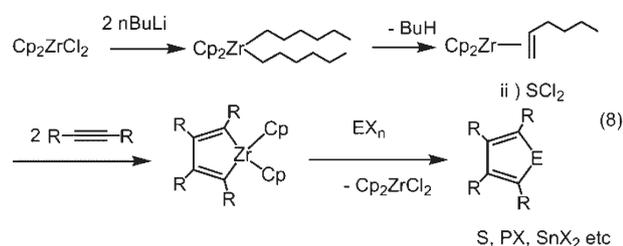
遷移金属カルボニル錯体

遷移金属化学の最も古い化学の一つは金属カルボニル錯体の化学である。1868年 Shuzenberger により $\text{Pt}(\text{CO})_2\text{Cl}_2$ が発見される。1890年代に入り、Mond

成への応用について、その後の代表的な反応を上げると、1970年、若松(味の素)はアルデヒドと酸アミド、COが金属カルボニル触媒を用いて、N-アシル α -アミノ酸の一段階合成反応を見出した(式4)^{23,24}。一方園田-村井らはアルデヒドとヒドロシランとCOから α -シロキシアルデヒドの合成を開発した(式5)^{23,25}。いずれもオキソ法と同じ $\text{HCo}(\text{CO})_4$ を触媒とするカルボニル化反応である。Fischerカルベンをそのまま有機合成に応用したのが、Dotz反応である(式6)²⁶。Reppeが $\text{Ni}(\text{CO})_4$ との反応で見出したアセチレンのオリゴメリゼーションは多様な金属と配位子を有する金属錯体で進行し、現在の有機合成になくはないものになっている。その有名な例としてVollhardtの $\text{CpCo}(\text{CO})_2$ 触媒によるステロイド合成である。ステロイド合成法として知られる亀谷法のベンゾシクロブテンをCo触媒のアセチレン三量化で構築している(式7)²⁷。もう一



つは、DupontのFaganが前周期ジルコノセンシクロペンタジエン錯体を根岸-高橋法により発生するオレフィン錯体と量論でアセチレンを二量化し得てその SCl_2 とのトランスメタル化でチオール合成である(式8)^{28,29}。このとき用いる典型元素としては、S以外にいろいろの典型金属(元素)の利用が可能で、5員環ヘテロールの一般的合成法である。

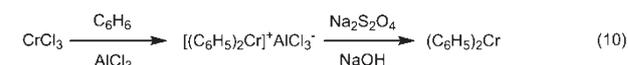
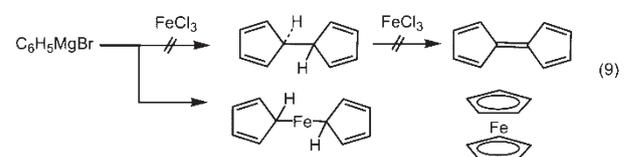


遷移金属メタロセン錯体

1951年にPausonらによりNature誌に発表になった一つの論文が遷移金属メタロセン錯体のはじめのフェロセン Cp_2Fe 発見のきっかけとなり、さらに遷移金属アルキル錯体の発展につながった³⁰。Pausonらはフルバレンというナフタレンの骨格

異性体芳香族化合物を合成しようとしてシクロペンタジエニル Grignard 試薬を Karashらがフェニル Grignard 試薬からビフェニルを合成したのと同じく塩化第二鉄と反応させたところ、フルバレンは合成されずにビスシクロペンタジエニル鉄が合成できたと報告した(式9)。このビスシクロペンタジエニル鉄の構造に疑問を持った三人の研究者がいた。一人はHarvard大の若き助手のWilkinsonと二人目は同じくHarvard大の合成の神様、Woodward、三人目はドイツのHiberの弟子のFischerであった。

Wilkinsonは長年遷移金属アルキル錯体の合成を検討してきたが、 α および β 水素脱離をとめない容易に分解するために不安定であることを熟知していた³¹。そのためにPausonの σ -アルキル錯体はありえないことにすぐに気がついた。そこへWoodwardの学生(Rosenblum)がRu金属塩が研究室にないかと訪ねてきた。WilkinsonはWoodwardもPausonの構造に疑問をもち同族のRuで同じ反応を検討しようとしていることがわかり、その後Woodwardと共同で研究を開始した³⁰。WilkinsonとWoodwardはX線結晶構造解析の結果はなかったが、単一のIRのCH吸収とダイポールモーメントがゼロの値であることから、さらにはシクロペンタジエニル環の



CHがアセチル化されるほど芳香族安定化していることからサンドイッチ構造のフェロセン構造を提案した。一方FischerもPausonの錯体を合成しオートクレーブ中で200気圧150°CとCOと反応させても反応しないほど安定であり、予備的なX線結晶構造解析で伸長した構造ではなく対称中心をもつ構造であること、さらには $\text{Cp}_2\text{Co}(\text{III})$ の同族体の合成と理論的検討から同じく二重コーン型構造を提案した。フェロセン発見60周年にFischerの弟子のWernerが書いた総説³²にはそれまでのフェロセン発見に関する研究者の論文がすべて網羅されている。当初三人の提案した構造は他の研究者に受け入れられなかったがX線結晶学者によりその完全な構造が明らかにされ、理論化学者Onsagerによりその安定性がMOから結論された。その後メタロセンと総称される多くの Cp_2M 、 Cp_2MX_2 と Cp_2MX_3 タイプの遷移金属錯体が合成された³³。シクロペンタジエニル以外の

メタロセンとしては、1955年、当時の Onsager が Hein のポリベンゼンクロム錯体がベンゼンを配位子とするサンドイッチ錯体であることを示唆し、それについて Zeiss が彼の学生の Tsutui らとその可能性を実験的に示した。そして Fischer と Hafner らにより別途にピシクロベンゼンクロムが合成単離されることによって非シクロペンタジエニル系の芳香族メタロセンが報告されるようになった(式10)^{34,35}。1973年 Woodward が異議申し立てる中、ノーベル賞委員会は Wilkinson と Fischer に遷移金属サンドイッチ錯体に関するノーベル賞を授与した³⁶。

おわりに

今回から後半の遷移金属の化学に入り、遷移金属錯体の種類として、遷移金属カルボニル錯体とメタロセン錯体の発見とその展開について紹介した。遷移金属カルボニル錯体については、オキソ法や、Reppé 法などの工業触媒反応と関連して解説した。遷移金属メタロセン錯体の発見のきっかけになった遷移金属アルキル錯体については次回で取り上げることにする。

文献

- 辻 二郎 (1973) 遷移金属錯体の反応—有機合成の立場から—. *現代化学* No.5: 10-19.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート(1). *化学* **33**: 531.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート(2). *化学* **33**: 617.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート(3). *化学* **33**: 709.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート(4). *化学* **33**: 789.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート(5). *化学* **33**: 875.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート(完). *化学* **33**: 965.
- 辻 二郎 (1991) 有機合成を変えた遷移金属—その基本的理解と活用—. *化学同人*, 東京.
- Fable J and Bahrman H (1984) Homogeneous catalyst-industrial applications. *J. Chem. Educ.* **61**: 961-967.
- 萩原信衛 (1995) 有機金属化学の黎明期. *有機合成化学協会誌* **53**: 645-649.
- Mond L, Langer C and Quincke F (1990) Action of carbon monoxide on Nickel. *J. Organometallic Chem.* **383**: 1-6.
- Mond L (1990) The history of my process of Ni extraction. *J. Organometallic Chem.* **383**: 7-10.
- Abel E (1990) Ludwig Mond—father of metal carbonyls and some much more. *J. Organometallic Chem.* **383**: 11-20.
- Herrmann WA (1990) 100 years of metal carbonyls: a serendipitous chemical discovery of major scientific and industrial impact. *J. Organometallic Chem.*, **383**: 21-44.
- Cornils B, Herrmann WA and Rasch M (1994) Otto Roelen, pioneer in industrial homogeneous catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**: 2144-2163.
- Hummel HG (1984) Walter Reppe 1892-1969. *Chem. Ber.* **117**: I-XXI.
- Carothers WH (1931) Polymerization. *Chem. Rev.* **8**: 353-426.
- Fischer EO (1976) On the way to carbene and carbyne Complexes. *Advances in Organometallic Chem.* **14**: 1-32.
- Cotton FA and Walton RA (1982) Multiple Bonds Between Metal Atoms. John Wiley & Sons Inc, New York.
- Heck RF (1969) Addition reaction of transition metal compounds. *Acc. Chem. Res.* **2**: 10-16.
- Thompson DT (1984) Platinum group metal catalyst in industrial organic synthetic chemistry in Britain 1984 (April): 333-336.
- 辻 二郎 (1999) 社会の土台を作る基礎化学製品 9 酢酸の製造法はどう変わってきたか. *化学と教育* **47**: 252-255.
- Colquhoun HM (1982) Cobalt-catalyzed carbonylation and cyclization of organic compounds. *Chem & Ind* **1982**(Oct): 747-751.
- 若松八郎 (1989) 若松反応 α アミノ酸の大規模合成に有用、特集にもみる日本の化学. *化学* **44**: 448.
- 園田 昇, 村井真二 (1986) カルボニル化とその応用、錯体化学の進歩. *化学増刊* **109**: 109-121.
- Dotsz KH (1984) Carbene complexes in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23**: 587-608.
- Vollhardt KPC (1977) Transition metal-catalyzed acetylene cyclizations in organic synthesis. *Acc. Chem. Res.* **10**: 1-8.
- Fagan PJ and Nugent WA (1988) Synthesis of main group heterocycles by metallacycle transfer from zirconium. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 2310-2312.
- Fagan PJ, Nugent WA and Calabrese JC (1994) Metallacycle transfer from zirconium to main group elements: versatile synthesis of heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 1880-1889.
- Wilkinson G (1975) The iron sandwich a recollection of the first four months. *J. Organometallic Chem.* **100**: 273-278.
- Wilkinson G (1974) The long search for stable transition metal alkyls. *Science* **185**: 109-112.
- Werner H (2012) At least 60 years of ferrocene: the discovery and rediscovery of sandwich complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**: 6052-6058.
- Pauson PL (1977) Aromatic transition metal complexes—the first 25 years—. *Pure & Appl. Chem.* **49**: 839-855.
- Seyferth D (2002) Bis(benzene)chromium 1. Franz Hein at the University of Leipzig and Harold Zeiss and Minoru Tsusui at Yale. *Organometallics* **21**: 1520-1530.
- Seyferth D (2002) Bis(benzene)chromium 2. Its discovery by E. O. Fischer and W. Hafner and subsequent work by research groups of E. O. Fischer, H. H. Zeiss, F. Hein, C. Elscherbroich and others. *Organometallics* **21**: 2800-2820.
- Seyferth D and Davison A (1973) The 1973 Nobel Prize for chemistry. *Science* **182**: 699-701.

■教育論文■

反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (5)

加部義夫^{1,2}

Organometallic Chemistry Based on Reaction Types and Anecdotes of Discoveries (5)

Yoshio Kabe^{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: kabe@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Organic compounds containing carbon-metal bonds are called organometallic compounds. Such compounds have been known and studied since the 19 century and have been widely used for synthetic transformation in modern organic chemistry. Their many educational benefits could result in the use of reaction types and discoveries in undergraduate and graduate classes in organic and organometallic chemistry. The repeating growth reaction of alkylaluminum with ethylene was discovered by Ziegler. An anomalous result was obtained on one occasion. Instead of converting ethylene into a mixture of ethylene oligomer, its dimer, i.e., 1-butene, was almost the only product. The promoter for this unexpected reaction was eventually found to be a trace of nickel salts, which was accidentally mixed into the reaction due to the use of an uncleaned metal autoclave after a hydrogenation experiment (Nickel effect). Since nickel salt could have such a marked influence on the course of ethylene with alkylaluminium, curiosity was aroused about the influence of transition metal salts. Ziegler and his group finally found that salt of Ti markedly accelerated the growth reaction, leading to the deposition of polyethylene. Natta found sterically controlled polypropylene with $R_3Al/TiCl_3$ instead of $R_3Al/TiCl_4$. Furthermore, he also found the polymerization of cyclic olefins with $R_3Al/MoCl_6$ or WCl_6 , but he misunderstood the reaction mechanism. Subsequent chemists disclosed the correct reaction mechanism : olefin metathesis of a carbene intermediate. A similar mechanism is applied as a Ziegler-Natta polymerization alternative to the insertion mechanism of transition alkylmetals. This Ziegler-Natta catalysts ($R_3Al-TiCl_3/TiCl_4$) open the reaction types of transmetalation between typical elements/metals and transition metals, which develops into a modern Ni- and Pd-catalyzed cross-coupling reaction. The Ziegler-Natta catalyst reaction of butadiene and acetylene produced rubber as well as conduction polymer.

Keywords: transition metal compounds, metal alkyls, polymerization, metathesis

はじめに

前回、遷移金属の化学に入り冒頭で、遷移金属の化学は、1930年－1960年にかけてドイツで開発された以下の3つの工業的プロセスとしての均一触媒反応にその起源があることを紹介した。

- (1) オキソ反応、Reppé 反応に代表されるカルボニル化反応 (1930-1940年)
- (2) Ziegler-Natta 触媒重合 (1950年代)
- (3) Wacker 法 (1956年)

今回は遷移金属アルキル錯体の化学と Ziegler-Natta 触媒の発見、さらに π 結合 (オレフィン) メタセシス反応について解説する。

遷移金属アルキル錯体

遷移金属アルキル錯体は β 位さらに α 位に水素があると脱離反応を容易に起こし安定に単離できない。そのため少なくとも β 水素に水素がなければ安

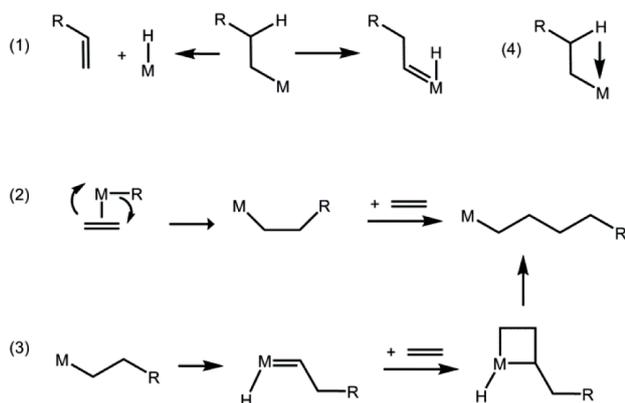
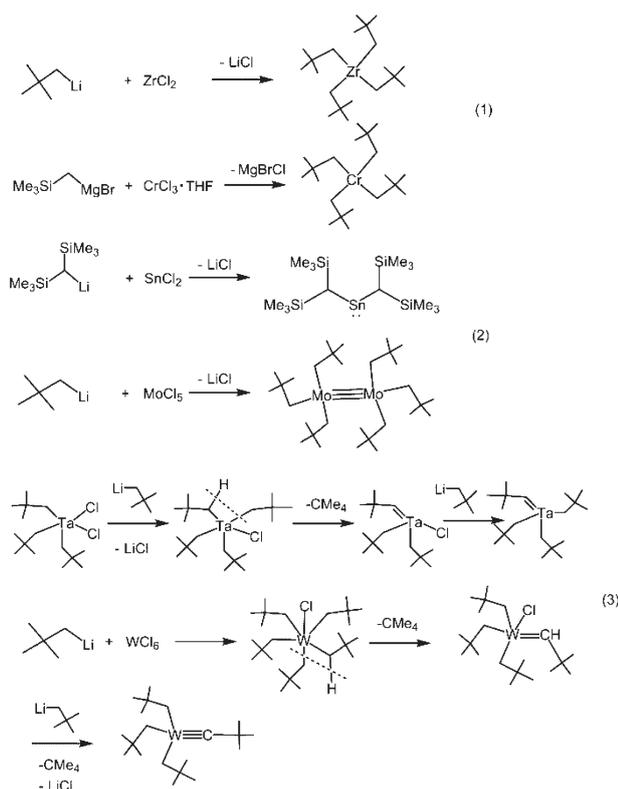


図 1. 遷移金属アルキル錯体の反応. (1) β 水素脱離 (左) と α 水素脱離 (右). (2) オレフィン重合の Cosse 機構. (3) オレフィン重合のメタセシス機構. (4) Agostic 相互作用.

定に単離できる (図 1 (1)). 遷移金属アルキル錯体はこの原理に基づいて、メタロセン発見後、大きく三つに発展した。一つは Lappert らによりネオペンチル基 ($t\text{BuCH}_2$) やトリメチルシリルメチル基 (Me_3SiCH_2) を有するアルキル錯体を β 水素を有していないため安定に合成できることが示され、ホモレプティック (homoleptic) 遷移金属アルキル錯体として多くの錯体が合成された (式 1)¹⁾。そして二つ目には典型金属元素でも遷移金属でも、これらの嵩高いアルキル基のために、たとえば 14 族 2 価種¹⁾ 金属-金属多重結合化合物の低配位化合物^{2,3)} が合成単離されてきた (式 2)。



により新しい遷移金属アルキルカルベン、カルビン錯体の合成が可能になった (式 3)⁴⁾。Schrock 型カルベン錯体の生成機構は見ると、 σ 結合メタセシスに分類できる反応を経由していることがわかる (式 3 中の破線)。すなわち Ta などの前周期の d 電子のない金属において、金属-炭素 σ 結合と炭素-水素 σ 結合の組み換えが起き、ネオペンタンが副生している。このタイプの反応については、この連載の最後の方で解説する。

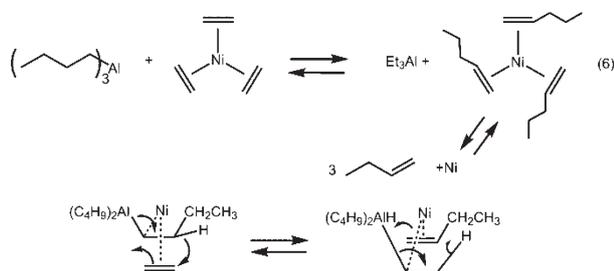
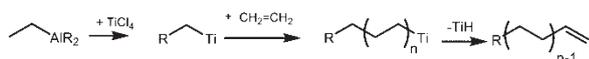
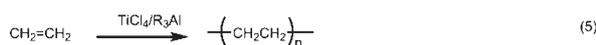
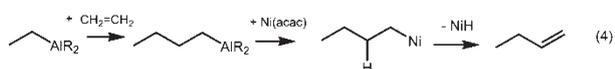
オレフィン重合 (1)

1954 年アルキルリチウムを合成しヒドロ (カルボ) アルミニウム化反応を発見した Ziegler がまたもや世紀の発見をする。Ziegler-Natta (低圧エチレン重合) 法を見出したことである。第一次世界大戦で敗戦国となったドイツは石炭を工業原料として CO とアセチレンから合成石油や合成ゴムを製造した。そして第二次世界大戦中とその戦後にかけて、石炭から石油へのエネルギー転換がはじまった。戦勝国アメリカは石油を国内で生産するばかりでなく中東の油田を開発し、世界に石油を供給してきた。石油ははじめ灯油として利用されたが、アメリカで自動車大量生産されるに及んでガソリンとしての需要が伸び低沸点留分のガソリンを得るために、石油の熱分解や改質が検討された。そのときに生成する分解ガス (エチレン、プロピレン) などの用途開発が求められていた。一方両大戦間、ドイツの Staudinger は「今まで正体不明であった一連の物質に特有のコロイド性、弾性 (ゴム)、繊維性 (セルロース) はすべて巨大分子が原因である (高分子説)」と提唱した⁵⁾。これに対してドイツのそうそうたる化学者たちは猛反対した。一方高分子の有用性を早くから認識していた化学工業は高分子説を支持した⁶⁻⁹⁾。1935 年イギリス ICI 社は Al のところで述べた¹⁰⁾、高圧法ポリエチレン製造に成功し、ドイツの IG 社 (戦時中、Hochest、Bayer、BASF が統合) がポリスチレン、ポリ塩化ビニルの製造、アメリカ Dupont 社の Carothers がナイロン 66 を発明し、高分子化学を確立させた¹¹⁻¹⁷⁾。

1927 年、当時まだ高分子説が提唱されて間もないころ、アメリカの Dupont 社の研究陣が天然ゴム、綿、セルロースの高分子の構造式が書かれた黒板を背景に撮った写真が残っており、いかに早くから化学工業で高分子を注目していたかがわかる¹⁸⁾。

戦中、Ziegler は「私は石炭のことは何も知らないし、石炭の研究をしたいと思わない」といって第三代 Kaiser Wilhelm 研究所の所長の就任要請を断った。しかし余人に変えがたく、好きなことは何をやっ

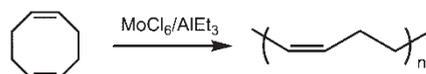
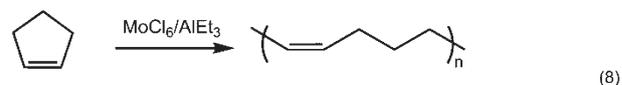
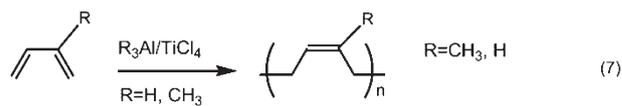
てもよいという条件で 45 歳で所長に就任し、エチレンに対するアルカリ金属の付加反応の研究を続けた¹⁹⁾。Ziegler のこのオレフィンへの金属付加の研究は、石炭から石油へのエネルギー転換とタイミングが一致した。すでに Al の研究で見出されたアルキルアルミニウムを用いるオリゴメリゼーションの反応¹¹⁾を実験していた助手の Holzkamp がオリゴマーがまったく得られず、1-ブテンが生成すると報告した。直ちにその原因が追求された (式 4)¹⁹⁻²⁸⁾。彼が実験に用いたオートクレーブはその前、接触還元に使われていた。そのため接触還元を用いた Ni 触媒が微量混入していたのである。実際に Ni 金属塩を添加すると 1-ブテンが生成した。Ni としては Raney Ni などの還元された Ni でも NiCl₂ のような塩でもよい。後者は AlEt₃ によって還元され、結局 Ni 金属そのものを用いるのと同じであった。



これはその後“ニッケル効果”と呼ばれることになる。Ziegler は Ni と同様な作用を示す金属あるいはその化合物が他にもあるのではないかと周期表にのっているすべて遷移金属を添加する実験を助手の Brecl に徹底的に行わせた。Co、Pt、Fe、Cu、Ag、Au と片っ端から試していったが、たいした効果はなかった。ところが周期表の左の方へ行って Zr のアセチルアセテートを使ってみたら、まったく別の結果が得られた。オートクレーブを開けてみたらポリエチレンの白色固体が一杯つまっていたのである。1953 年 10 月 26 日のことである。その後さらに添加する遷移金属化合物を変えて実験を続け、最もよく効くのが、Ti 化合物であり、常温常圧でもエチレンが重合することがわかった (式 5)。Ni 効果について Ziegler の弟子の Wilke が、ニッケルエチレン錯体 (裸のニッケル) とトリブチルアルミニウムの反応で 1-ブテン

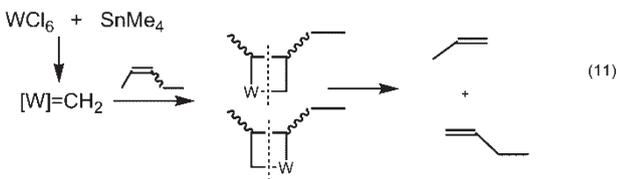
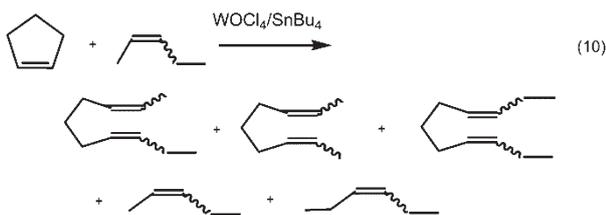
が生成する反応を見出し、ニッケル効果を明らかにするモデル反応とした (式 6)。その反応のメカニズムは Ni 金属の配位子まわりにて 1 段階で起きる電子環状反応と考えられた (式 6)^{29, 30)}。これに対して Eisch (Gilman の弟子で、Wilke のポストドク) は通常の β 水素脱離で NiH 中間体が関与する多段階の反応を提案している (式 4)³¹⁾。この二つの機構には細かい点には違いがあるものの、どちらも典型金属 (Al) と遷移金属 (Ni) の間で起きるトランスメタル化反応である。このタイプの反応は後年、Ni および Pd-クロスカップリング反応へと展開される。Ziegler が触媒を発見後、イタリアのモンチカッチーニ社の顧問をしていた Natta は、会社が Ziegler の研究所とライセンス契約をしているので、Ziegler の発見をいち早く入手し、翌年 3 月に R₃Al/TiCl₄ でうまく重合しないプロピレンを R₃Al/TiCl₃ で立体規則的に重合することを見出した。Ziegler と Natta はこの新しい触媒の発見に対して 1963 年ノーベル化学賞が授与された。

Ziegler-Natta 触媒は、ICI 社の高圧法に較べて、容易であるために世界各地の企業で実施された。こうした研究のブームの中で、アメリカの Goodrich 社の研究所は Ziegler-Natta 触媒を使ってエチレンと他のモノマーの共重合の研究を行った。その結果イソプレンを共重合モノマーとして用いたときに、たまたまゴム状物質が得られその分子構造が天然ゴムと同一のシス-1,4-結合を 98% もつポリイソプレンであることを発見し、天然ゴムに近い合成ゴムの製造に成功したとして 1954 年 12 月に公表した。翌年にイギリスの Goodyear 社も独立に Ziegler-Natta 触媒によるシス-1,4-ポリイソプレンの重合に成功した。またブタジエンからは Ziegler-Natta 触媒ではブタジエンのシス-1,4-結合重合は 50-60% しかならず、トランス-1,4-結合が生成し易いが、世界各地で触媒の改良が検討され、シス-1,4-ポリブタジエンの製造法も確立され、合成ゴム工業が石油化学工業の一翼として発展した (式 7)³²⁾。



π 結合メタセス反応 (1)

Ziegler のエチレン低圧重合触媒の発見は、プロピレンの立体規則性重合以外にもうひとつの波及効果として、シクロブテンやシクロペンテンなどの環状オレフィンの重合の研究がある。Natta がシクロペンテンを Ziegler 触媒では重合しないのを、 $\text{Et}_3\text{Al}/\text{MoCl}_6, \text{WCl}_6$ 触媒で反応させると重合することを見出した (式 8) ^{24, 33}。しかし不思議なことに、生成したポリマーには二重結合が残っていることに気がついた。Natta らは環状オレフィンのひずみのためにアリル位で切れて重合すると説明した (式 8)。ここで Goodyear tire & rubber 社の Calderon は上記の触媒では歪のないシクロオクタジエンも重合することから、Natta の説明はおかしいと考えた。そこで彼はひずみの全くない鎖状の 2-ペンテンを $\text{WCl}_6/\text{AlEt}_2\text{Cl}$ 触媒で反応させたところ、今日で言うところ



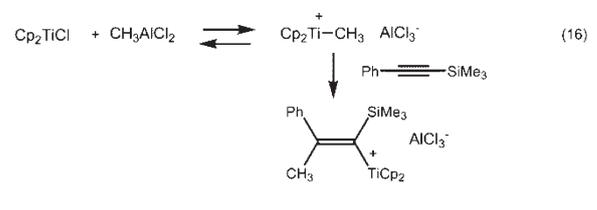
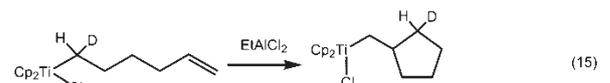
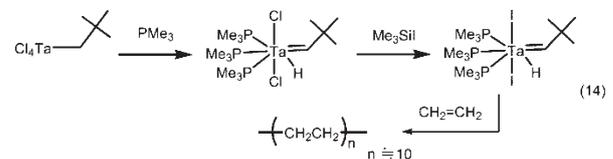
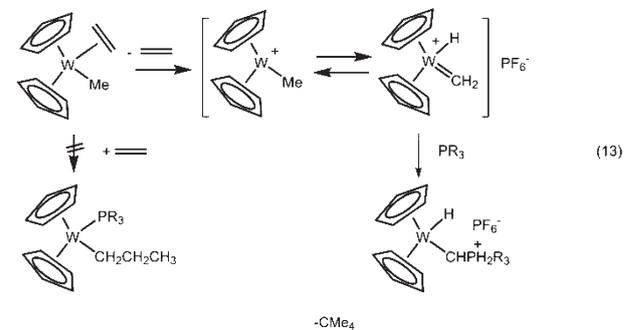
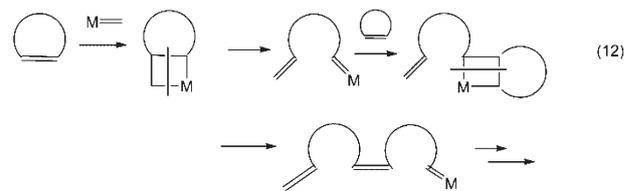
のメタセシス反応を発見し、オレフィンメタセシスと命名した (式 9) ³⁴。一方 Chauvin はシクロペンテンと 2-ペンテン (1:1) を $\text{WOCl}_4/\text{SnBu}_4$ または AlEt_3 触媒で反応させるとすべてのメタセシス生成物を確認した (式 10) ³⁵。さらに触媒を $\text{WCl}_6/\text{SnMe}_4$ にかえて内部オレフィンである 2-ペンテンと反応させると、末端オレフィンが生成することから明らかに $\text{W}=\text{CH}_2$ カルベンとメタラシクロブタン中間体からなるカルベン機構を提唱した (式 11)。以上の Calderon と Chauvin の研究からシクロペンテンおよびシクロオクタジエンの重合は開環メタセシス重合 (ROMP) であると理解できる (式 12)。

Ziegler-Natta 触媒重合の反応機構として、アルキルチタン中間体へつぎつぎとオレフィンが挿入する Cosse メカニズムが提唱されてきているが ³⁶、決め手になる証拠が不足しているために、1980 年代に数

多くの議論がなされた (図 1 (2) Cosse 機構)。

たとえばイギリスの Green らはタングステノセンメチルエチレン錯体にホスフィン加えると、エチレンは $\text{W}-\text{CH}_3$ への挿入が起こらず、ヒドリドカルベン中間体を経由して付加体を生成することを見出した。中間体のヒドリドカルベン $\text{W}-\text{CH}_3$ の α 水素脱離で生成し、この中間体をオレフィン重合反応に拡張してメタセシス機構を提唱した (図 1 (3) メタセシス機構) ^{37, 38}。

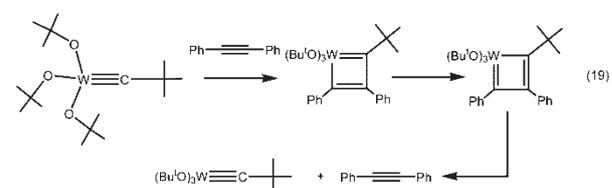
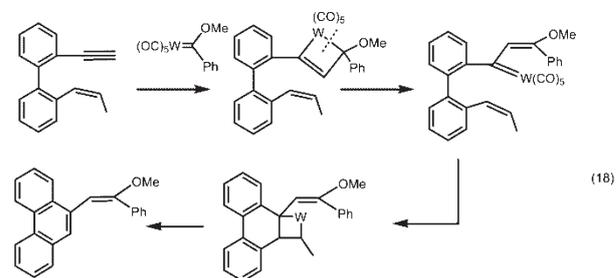
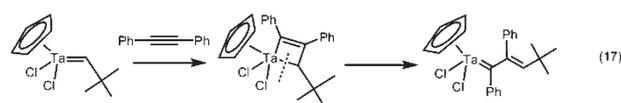
Ta のカルベン錯体を合成した Dupont 社の Schrock は MIT に移り、Ta カルベン錯体とオレフィンの反応を研究した。そうした中、Schrock も還元条件下で $\text{Ta}-\text{CH}_2\text{tBu}$ 錯体に PMe_3 を作用することで、ヒドリドカルベン錯体を単離し、この錯体がエチレンをオリゴマー化するすることを見出し Green の提唱したメタセシス機構に実験的根拠を与えた (式



14、メタセシス機構)^{37, 39)}。一方 $\text{Cp}_2\text{TiRCl-AlRCl}_2$ 系の触媒が分子内オレフィンや分子内アセチレンと反応してカルボメタル化生成物を与えることが、Grubbs や Eisch らにより報告された (式 15、16)³⁷⁾。

特に Grubbs は Ti-CDH 錯体の分子内カルボメタル化の同位体効果 (式 15) や $\text{Cp}_2\text{TiEtCl-EtAlCl}_2$ への C_2H_4 および、 C_2D_4 の重合成長速度への同位体効果が $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} \approx 1.0$ であることからメタセシス機構を否定した。その後 Green らは Brookhardt らと分子内の C-H 結合の水素が金属と至近距離にある agostic Ti 錯体を単離し、3つ目の重合機構としてこの agostic 錯体によりエチレン挿入が加速される機構を提唱した (図 1 (4))⁴⁰⁾。現在までのところ Ziegler-Natta 触媒により $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ は異なっており、後に登場する Kaminsky 触媒や希土類メタロセン触媒は $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} \approx 1.3$ と大きく、3番目の機構を支持する結果となっている⁴¹⁾。

アセチレン類も Ziegler 型触媒で重合する。白川らにより $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Bu})_4/\text{Et}_3\text{Al}$ 触媒でアセチレンを直接ポリアセチレンフィルムにする方法が発見され⁴²⁾、置換アセチレンについても、 WCl_6 、 $\text{MoCl}_6/\text{Ph}_4\text{Sn}$ などの触媒で重合することが増田らにより報告されている⁴³⁾。アセチレンの重合はアセチレンガスを Ziegler 触媒に通気することで合成されるが、その生成する不溶性のポリアセチレンの取り扱いに世界中の研究者が困難をかかえていた。白川の学生があるとき間違っ、Ziegler 触媒の量を通常の千倍も高い濃度で調整し、そこへアセチレンガスを通気したところ、触媒溶液の表面から重合が開始され、ポリアセチレンフィルムが生成した。そのフィルムの IR 透過電顕写真により、シス異性体は低温でトランス体より多く生成し、フィブリル状の高分子であることが明らかにされた。その後白川らは McDiarmid と Heager らと共同研究し、ポリアセチレンの Br_2 と I_2 ドープではじめて導電性ポリマーを合成することに成功した^{44, 45)}。この導電性ポリマーの合成をした白



川、MacDiarmid、Heager らに 2000 年のノーベル化学賞が授与された。

このアセチレン重合に対しても、オレフィン重合と同様に挿入機構と Katz らによりメタセシス機構の 2つが提案されている (図 2 (1) (2))⁴⁶⁾。メタセシス機構にはカルベン錯体にアセチレンが付加後、一度メタラシクロブテン中間体が生成し、その開裂でカルベン錯体を再生する。現在ではエンインメタセシスと呼ばれる反応である。当時 Schrock らは Ta カルベン錯体、Katz らはエンイン基質として W カルベン錯体の反応をモデル反応として確かめている (式 17、18)^{39, 46)}。さらに Katz らは白川らの $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Bu})_4/\text{Et}_3\text{Al}$ 触媒を用いて $\text{H}^{13}\text{C}^{13}\text{CH}$ と $\text{H}^{12}\text{C}^{12}\text{CH}$ (4:96) を共重合させたポリマーの固体 NMR を測定した。 ^{13}C - ^{13}C カップリングによるサテライトピークが C-C 結合長を 1.37 Å と仮定して計算で求めたスペクトルと一致することから、ポリアセチレンは挿入機構で生成した構造と一致することを示した。さらに Ph 置換アセチレンについては触媒が $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Bu})_4/\text{Et}_3\text{Al}$ のときは 91% (1.36 Å)、9% (1.48 Å) で $\text{MoCl}_6/\text{Ph}_4\text{Sn}$ のときは 88.7% (1.48 Å) で 12% (1.36 Å) で触媒により挿入機構とメタセシス機構の両方で進むことが明らかにされた (図 2 (1)(2)) (図中の * 印)⁴⁶⁾。当時、均一触媒を用いるアルキンメタセシスの研究は少なく Schrock は以前合成した W のカルバイン錯体を用いたアセチレンの低分子のアルキンメタセシスを報告した (式 19)^{39, 47)}。その反応の中間体のメタラシクロブタンジエンも単離しアルキンメタセシス触媒になることを確かめている。

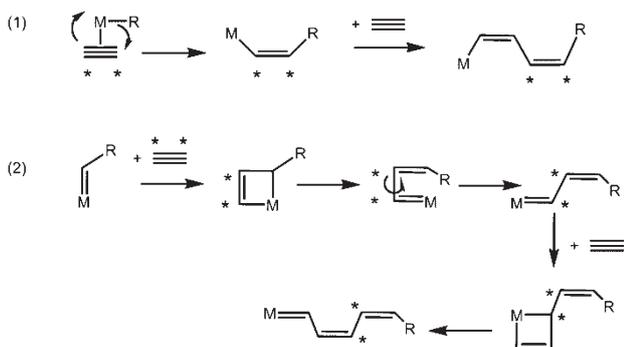


図 2. アセチレン重合の (1) 挿入機構と (2) メタセシス機構。* 印は ^{13}C ラベル炭素。

おわりに

前回から後半の遷移金属の化学に入り、 β 水素がない遷移金属アルキル錯体は安定に単離できることを示した。Ziegler-Natta 触媒はアルキルアルミニウムのエチレンへの付加によるオリゴマー生成反応について、Ni の添加効果 (Ni 効果) の原因を追究することで見出された。反応は Ti とアルキルアルミニウムのトランスメタル化反応で生成する遷移金属アルキル錯体が中間体である。このタイプのトランスメタル化反応は後年、Ni- および Pd- 触媒クロスカップリング反応に発展する。環状オレフィンの Ziegler-Natta 重合を反応機構についての疑問からメタセシス反応が見出され、ブタジエンとアセチレンの Ziegler-Natta 重合は合成ゴムと伝導性ポリマーの発見に繋がった。

文献

- Davidson PJ, Lappert MF and Pearce R (1974) Stable homoleptic metal alkyls. *Acc. Chem. Res.* **7**: 209-217.
- Cotton FA and Chisholm MH (1982) Bonds between metal atoms. A new mode of transition metal chemistry. *Chem. & Eng. News* **1982** (June): 40-54.
- Cotton FA (1983) Multiple metal-metal bonds. *J. Chem. Educ.* **60**: 713-720.
- Schrock RR (1983) Catalysis by transition metals: metal-carbon and triple bonds. *Science* **219**: 13-18.
- スタウディングー H [小林義朗訳] (1966) —研究回顧— 高分子化学への道—. 岩波書店, 東京.
- 高松秀樹 (1985) 高分子開発物語 (上). *化学* **40**: 87-92.
- 高松秀樹 (1985) 高分子開発物語 (中). *化学* **40**: 165-170.
- 高松秀樹 (1985) 高分子開発物語 (下). *化学* **40**: 254-259.
- 高松秀樹 (1992) 創造は天才だけのものか—模倣は創造への第一歩—. 化学同人, 東京.
- 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (2). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 267-270.
- 田中 穆 (1992) H. Staudinger の研究とドイツ高分子化学工業の誕生. *化学史研究* **19**: 172-187.
- 田中 穆 (1992) H. Staudinger の研究とドイツ高分子化学工業の誕生. *化学史研究* **19**: 247-261.
- 田中 穆 (1993) H. Staudinger の研究とドイツ高分子化学工業の誕生. *化学史研究* **20**: 243-258.
- 田中 穆 (1995) H. Staudinger の研究とドイツ高分子化学工業の誕生. *化学史研究* **23**: 1-14.
- 田中 穆 (1995) H. Staudinger の研究とドイツ高分子化学工業の誕生. *化学史研究* **23**: 147-166.
- Morawetz H (1985) *Polymers. The Origins and Growth of a Science*. John Wiley & Sons, New York.
- Carothers WH (1931) *Polymerization Chem. Rev.* **8**: 353-426.
- 三枝武夫 (1999) 研究開発物語 コア・コンピタンス 自社技術はこうして生まれた. *化学* **54**: 46-51.
- 大塚齊之助 (1959) オレフィン類の重合—Ziegler らの研究—. *化学の領域* **13**: 137-145.
- 熊田 誠 (1990) セレンディピティー. *化学* **48**: 844-849.
- Roberts RM [安藤喬志 訳] (1993) *Serendipity セレンディピティー—思いがけない発見・発明のドラマ—. 化学同人, 東京.*
- Ziegler K (1968) A forty Year' s stroll through the realms of organometallic chemistry. *Advances in Organometallic Chem.* **6**: 1-17.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート (4). *化学* **33**: 789.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート (5). *化学* **33**: 875.
- Eisch JJ (1983) Karl Ziegler Master advocate for the unity of pure and applied research. *J. Chem. Educ.* **60**: 1009-1014.
- Eisch JJ (2012) Fifty years of Ziegler-Natta polymerization: from serendipity to science. A personal account. *Organometallics* **31**: 4917-4932.
- 山本明夫 (1989) チーグラール触媒の発見. *化学* **44**: 14-15.
- 山本明夫 (1993) チーグラールとナッタ 二人の巨人, 栄光と葛藤. *高分子* **42**: 14-15.
- Fischer K, Jonas K, Misbach P, Stabba R and Wilk G. (1973) The "Nickel effect". *Angew Chem. Int. Ed.* **12**: 943-953.
- Wilk G (1984) Structure and reactivity of some transition metal complexes. *Pure & Appl. Chem.* **56**: 1635-1644.
- Eisch JJ, Ma X, Sigh M and Wilke G (1997) Aluminium-nickel intermediates in the Ziegler Nickel Effect: mechanistic support from catalyzed hydroalumination and carboalumination. *J. Organometallic Chem.* **527**: 301-304.
- 佐伯康治 (1992) 合成ゴムの技術とその工業. *化学史研究* **19**: 267-281.
- Natta G, Dall' asta G and Mazzanti G (1964) Stereospecific homopolymerization of cyclopentene. *Angew. Chem. Int. Ed.* **3**: 723-729.
- Calderon N, Chen HY and Scott KW (1967) Olefin metathesis-A novel reaction for skeleton transforamtion of unsaturated hydrocarbons. *Teteraghedron Lett.* **1967**(34) 3327-3229.
- Chauvin Y (2006) Olefin metathesis: the early days (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 3741-3747.
- Cossee P. (1960) On the reaction mechanism of ethylene polymerization with heterogeneous Ziegler-Natta catalysts. 1960(17) *Tetrahedron Lett.* **17**: 12-16.
- 磯辺 清 (1986) カルベンおよびカルバインを含む触媒反応 錯体触媒化学の進歩. *化学の増刊* **109**: 135-144.
- 伊藤健児 (1985) グリーン (M. L. H. Green) 遷移金属による C-H 活性化 オルガノメタリックス - 発展がめざましい有機合成の新分野. *化学増刊* **105**: 87-94.
- Schrock RR (1983) Catalysis by transition metals: metal-carbon double and triple bonds. *Science* **219**: 13-18.
- Brookhardt M and Green MLH (1983) **219**:13-18. Carbon-hydrogen-trasition metal bonds *J. Organometallic Chem.* **250**: 395-408.
- Grubbs RH and Coates GW (1996) α -Agostic interaction and olefin insertion in metallocene polymerization catalysts. *Acc. Chem. Res.* **29**: 85-93.
- Sirakawa H (2001) The discovery of polyacetylene film: the dawning of an era of conducting polymers (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 2574-2580.
- Matsuda T and Higashimura T (1984) Synthesis of high polymers from substituted acetylenes: exploitation of molybdenum- and tungsten-based catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **17**: 51-56.
- MacDiarmid AG (2001) "Syntjetic metals" : A novel role

- for organic polymers (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 2581-2590.
- 45) Heager AJ (2001) Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 2591-2611.
- 46) Kats TJ (2005) Olefin metatheses and related reactions initiated by carbene derivatives of metals in lower oxidation state. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**: 3010-3019.
- 47) Schrock RR (1986) High-oxidation-state molybdenum and tungsten alkylidene complexes. *Acc. Chem. Res.* **19**: 342-348.

■研究交流報告■

第13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 13th International Exchange Program
between Kanagawa University and National Taiwan University

Nobuhiro Kihara^{1,2,3}

¹ Department of Chemistry, 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 To whom correspondence should be addressed. E-mail: kihara@kanagawa-u.ac.jp

はじめに

神奈川大学大学院理学研究科（化学領域・生物科学領域）と国立台湾大学化学系生化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¹⁻¹¹⁾。2017年度は、2018年3月15日(木)から18日(日)にかけて、第13回学術交流行事が神奈川大学において行なわれた。

学術交流

第13回学術交流の背景

国立台湾大学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年度の第四回学術交流からは大学院生も参加するようになり³⁾、現在ではむしろ大学院生の交流が中心である。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。12～15名の派遣が定着している。

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
2014	台湾	15
2015	日本	13
2016	台湾	14
2017	日本	12

国立台湾大学との国際交流では、国際交流学術会議が中心行事であるが、その前後の行事や宿泊施設での交流会で、本学の学生が台湾の学生と個人的に交流する経験を持つことが重要である。神奈川大学で学術交流を行なう回には、神奈川大学大学院生によるWelcome委員会を組織し、学生同士の交流はWelcome委員会によって行われる。今回のWelcome委員会の委員長は化学領域D1の猪狩拓真君である。理学研究科から、猪狩君の声掛けにより集まった多くの学生がWelcome委員会のメンバーとして何らかの国際交流に参加し、また、国際会議に参加して国際会議の成功に寄与した。

大学院レベルでの緊密な学術交流を背景に、国立台湾大学化学系と神奈川大学理学部化学科は2012年度から学部3,4年生を対象とした国際共同授業(神奈川大学での名称は「化学国際交流」)を開始した。「化学国際交流」は2012年度に神奈川大学で開講した後、毎年度台湾と日本で交互に開講している。学部の際に「化学国際交流」を受講して国立台湾大学に知り合いのいる大学院生がWelcome委員会に参加している。彼らは交流において中心的な役割を果たし、また継続して国立台湾大学と関わる者として、交流の質の向上に大きく貢献している。

化学科同士の交流で始まった国立台湾大学との関係は、その実績を元に2011年度からは全学レベルに拡大された⁶⁾。猪狩君はこの制度を利用して、2015年10月から1年間、国立台湾大学化学系の詹研究室で研究をしてきた。また、大学院特別予算により、2017年8月には、化学領域の3人の大学院生が、やはり詹研究室で1ヶ月間研究をしてきた。このよう

に、国立台湾大学との関係は重層的になってきている。

第13回の学術交流はこのような背景の下で開催された。

3月15日(木)

Welcome 委員 12名（国立台湾大学からの学生と人数を合わせている）と木原は、国立台湾大学の一行を羽田でお迎えした。国立台湾大学の一行のうち、教員は以下の4名である。

羅 禮強 教授（化学系副主任）

廖 尉斯 副教授（化学系）

周 宏農 教授（生化院）

何 佳安 教授（生化院）

何教授は2年前にも学術交流に参加されている。

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 委員の数は国立台湾大学の学生の数と合わせてあるので、各メンバーをバスの2人掛けのシートに1人ずつ座らせ、国立台湾大学の学生とそれぞれ隣同士となるようにした。鎌倉つくまでに自己紹介などをし、仲良くなってもらった。

鎌倉では1時間半ほどの自由時間の間に、鶴岡八幡宮境内（図1）や小町通りを散策した。バスで隣同士となったペアで行動するようにし、学生が買い物などの手伝いをするようにした。

海岸通りを通過して箱根保養所に移動した。到着後すぐに夕食となった。美しく盛りつけられた夕食に歓声が上がリ、夕食後は温泉も楽しんだ。女性は浴衣も楽しんだ。ロビーでは夜遅くまで懇親の時間が続いた。



図1. 鶴岡八幡宮にて。

3月16日(金)

朝の9時にバスで出発した。昨日と同じ座席に座ったのでだいぶ打ち解けたようである。

湯本まで降り、神奈川県立生命の星・地球博物館を訪れた。地球の歴史、生命の歴史、神奈川の自然について学ぶことができる博物館である。1時間半の自由時間の間にゆっくりと回ることができた。解説には簡単な英語しかないので、ペアとなる学生に説明して貰いたかったが、なかなか難しいようである。

バスに再び乗車して5分もかからずにかまぼこ博物館に着いた。かまぼこ博物館は鈴廣本店に併設されている体験型の博物館である。日本の代表的な食品である「かまぼこ」と「ちくわ」を実際に作る体験を行なった（図2）。日本人と台湾人ができるだけ交互になるようにして、説明がわかるようにしたが、どれだけ通じたのだろうか。



図2. かまぼこ博物館にて「ちくわ」作り。

まずはかまぼこである。すでにすり身は用意されているので、すり身をへらでこねて空気を取り除いてから、同じへらを使って板の上に乗せていく「だけ」である。職人さんは事も無げにやっていたが、こちらには非常に難しい。しかし、皆なんとかか形にすることができた。ただし、こね具合や乗せ具合で味や歯触りが違って来るらしい。職人さんが乗せたものと我々が乗せたものではどのように違うのだろうか？

板に乗せたかまぼこを蒸し器に入れ、次はちくわである。すり身を平らにしてから、へらで竹の棒に巻き付けていく。しかし、竹の棒の表面がすべるのですり身が巻き付いてくれない！ 悪戦苦闘しながら何とか巻き付ける者、諦めて手で巻き付ける者、涼しい顔をしてさっと巻き付ける者、様々であった。

昼食をとり、かまぼこを物色していると、ちくわ

が焼きあがり、かまぼこが蒸し上がった。それぞれ自分が作ったものを受け取ってから小田原城に向かった。

まだ梅の残る小田原城を散策してから神奈川大学に向かった。到着して一休みした後、Lunaにて歓迎会を行った。箱根には行けなかった Welcome 委員会のメンバーはここからの参加となる。教員の参加が少なかったが、学部学生も含めて多くの学生が歓迎会に参加した。旧交を温める学生がいれば、初めての国際交流に気後れする学生を手助けする学生もいて、国際交流の継続の効果を感じた。

歓迎会の後は、学生たちは国際交流研修施設で Welcome 委員会メンバーと歓迎会の続きを行なった。国立台湾大学の教員はグランドホテル神奈中平塚に宿泊した。短い時間ではあったが、夜の平塚の町でショッピングを楽しんでいた。

3月17日(土)

サーカムホールには、箱根に行かなかった Welcome 委員が前日のうちにポスターボードを設置しており、学术交流国際会議の準備はすでに整っていた。

国際会議のプログラムとポスターを後掲する。Opening remarks では、木原が神奈川大学の紹介と本国際交流の歴史について述べた。



図3. 学术交流国際会議.

国際交流学術会議では、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4件（化学系2、生化系2）の招待講演があった（図3）。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。また、ポスター発表の学生のうち、神奈川大学から2名（化学領域、生物科学領域各1）と国立台湾大学から2名（化学系、生化系各1）のショートスピーチも行なわれた。ショートスピーチ

は講演のみで、質問はポスタープレゼンテーションで受付ける形である。

昼の時間にポスタープレゼンテーションが行われた（図4）。神奈川大学大学院理学専攻から35件（化学領域28、生物科学領域7）、国立台湾大学から12件（化学系6、生化系6）のポスター発表があった。ポスタープレゼンテーション会場には軽食を用意し、つまんで食べながらの気楽な雰囲気でのディスカッションが行なわれた。ポスター発表の時間は2時間あったが、瞬く間に終わってしまい、午後の講演が始まってもポスターの前でのディスカッションが終わらない参加者が多数見られた。



図4. ポスター発表の様子.

Closing remarks は西本化学科主任からいただいた。閉会后、発表者をご招待し、平塚で情報交換会を行なった。来年度から本国際交流を担当する辻教授、生物科学科から金澤教授も参加した。今後の国際交流の進め方について、特に、新しい大学院生参加プログラム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パーティーを行なった。多くの学生が集まり、夜遅くまで交流を行なった。

3月18日(日)

国際交流の最終日にふさわしい穏やかな日であった。この日の催しには Welcome 委員会からは12名が参加する予定であったが、昨夜のパーティーで盛り上がったため、予定外の参加者が2人ほどいた。

学生を載せたバスは湘南ひらつかキャンパスを出発し、平塚で教員をピックアップした後、横浜の三菱みなとみらい館に向かった。三菱みなとみらい館では先端科学技術について、体験を交えた見学を行なった。早めに見学を終えたグループはショッピングモールに繰り出していた。

中華街に移動し、昼食をとった。横浜中華街は世界最大級の中華街であり、日曜日で人出も多く、台湾の一行も興味深そうであった。



図 5. 中華街を散策する廖副教授.

昼食後は中華街を散策した(図 5)。台湾から見れば海外の中華街であり、日本人にとっても台湾人にとっても異文化体験であったようである。

横浜を後にし、羽田空港に向かった。国立台湾大学一行のうち廖副教授は翌週の日本化学会春季年会に招待されているために、また、何人かの学生は日本国内の旅行をさらに続けるために、それぞれ残るということであった。国際線ターミナルの 5 階の特設会場で写真会を行い(図 6)、別れを惜しんでから湘南ひらつかキャンパスへの帰途についた。到着後、国際交流研修施設の片づけを行ってから解散した。



図 6. 羽田空港にて.

さいごに

教員間の交流から始まった神奈川大学と国立台湾大学との国際交流は、大学院生の交流、学部間共同授業、研究交流と発展してきた。その成果を踏まえ、

今回来日された 4 人の先生方に、短期の研究交流の受入は可能かとお伺いしたところ、どなたも喜んで受入れるとのことであった。順調に進めば、2018 年の夏休みには、化学領域だけではなく生物科学領域からも大学院生の研究派遣が可能となるであろう。

国立台湾大学との国際交流は、理学部と理学研究科にとって、特別な行事ではなく、日常となってきた。どの大学でもグローバル化の掛け声は高いが、等身大の活動が行われることはまれである。本学と国立台湾大学との国際交流のように、自然な形で行われる交流は非常に貴重である。手を伸ばせばいつでもそこにある国際交流により、本学の学生の「外国」に対する壁が限りなく低くなっていくことを期待している。

国立台湾大学との国際交流で培われた国際的な雰囲気とノウハウは、理学部と理学研究科に多くの変革をもたらしつつある。2017 年にはタイのランシッド大学との研究交流が始まった。また、学部でも大学院でも英語で行われる授業が運営されるようになり、大学院では英語だけで修了できるようになった。いずれも手探りではあるが、後戻りするような性格のものではない。

国立台湾大学との国際交流は、2016 年度までは特別予算で行なってきたが、2017 年度の今回の交流からは経常予算の中で行うこととなった。それに伴い、様々な手続きは庶務課、教務課、国際課で行っていただけるようになった。年度末の忙しい時期であるにも関わらず、煩雑な手続きをしてくださった事務の方に篤く感謝をいたします。

文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 木原伸浩 (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.
- 8) 木原伸浩 (2014) 第九回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* 25:125-130.
- 9) 加部義夫 (2015) 第十回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* 26: 97-105.
- 10) 木原伸浩 (2016) 第 11 回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* 27: 101-108.
- 11) 木原伸浩 (2017) 第 12 回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* 28: 115-120.

研究交流報告：付録



13th International Symposium on the Kanagawa University - National Taiwan University Exchange Program

INVITED LECTURES

Akio Kawai (KU, Chemistry)

How Large Are Voids in Ionic Liquids?

Wei-Ssu Liao (NTU, Chemistry)

Bioanalytical Chemistry with Chemical Lift Off Lithography

Satoshi Ishikawa (KU, Material and Life Chemistry)

Synthesis of Microporous Crystalline Mo-V-Oxide for Selective Oxidation

Lee-Chiang Lo (NTU, Chemistry)

Development of Chemical Probes Exploiting Quinone Methide Chemistry for Biochemical Applications

Kentaro Suzuki (KU, Chemistry)

Self-Propelled Oil Droplet of Caged Fatty Acid toward UV Light Source

Hong-Nong Chou (NTU, Fisheries Science)

From the Nature Revelation of Red Tides to the Inspirations of Social Entrepreneurship

Emiko Maruta (KU, Biological Sciences)

Vegetation and Climate in Eastern Asia

Ja-an Annie Ho (NTU, Biochemical Science and Technology)

Biodegradable Nanodrug System for Cancer Therapy

SHORT SPEECHES

Toru Amakasu (KU, Chemistry)

Supramolecular Syntheses by Alkene Metathesis Reaction of Polyalkenyl Compounds as Dynamic Covalent Chemistry

Chong-You Chen (NTU, Chemistry)

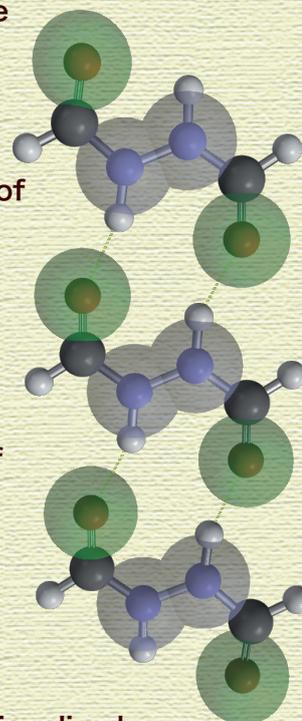
Self Standing Aptamers by an Artificial Defect-Rich Matrix

Masafumi Hanazuka (KU, Biological Sciences)

Purification and Characterization of Vitellogenesis-Inhibiting Hormone (VIH) From Southern Rough Shrimp *Trachysalambria curvirostris*

Yi-Te Chou (NTU, Biochemical Science and Technology)

Targeting Triple-negative Breast Cancer with Aptamer-functionalized Nanoformulations: A Synergistic Combined Treatment Using Photodynamic Therapy and Bioreductive Therapy



Kanagawa University, SHC, Circum Hall
17 March 2018 9:20 – 17:30
Poster Session 12:10 –14:10 at Foyer



Program

- 9:20 Opening Remarks
- 9:30 **How Large Are Voids in Ionic Liquids?:** Akio Kawai (KU, Chemistry)
- 10:05 **Bioanalytical Chemistry with Chemical Lift-Off Lithography:** Wei-Ssu Liao (NTU, Chemistry)
- 10:40 Coffee Break
- 10:55 **Synthesis of Microporous Crystalline Mo-V-Oxide for Selective Oxidation:** Satoshi Ishikawa (KU, Material and Life Chemistry)
- 11:30 **Supramolecular Syntheses by Alkene Metathesis Reaction of Polyalkenyl Compounds as Dynamic Covalent Chemistry:** Toru Amakasu (KU, Chemistry)
- 11:40 **Self-Standing Aptamers by an Artificial Defect-Rich Matrix:** Chong-You Chen (NTU, Chemistry)
- 11:50 **Purification and Characterization of Vitellogenesis-Inhibiting Hormone (VIH) From Southern Rough Shrimp *Trachysalambria curvirostris*:** Masafumi Hanazuka (KU, Biological Sciences)
- 12:00 **Targeting Triple-negative Breast Cancer with Aptamer-functionalized Nanoformulations: A Synergistic Combined Treatment Using Photodynamic Therapy and Bioreductive Therapy:** Yi-Te Chou (NTU, Biochemical Science and Technology)
- 12:10 Poster Session/Lunch
- 14:10 **Development of Chemical Probes Exploiting Quinone Methide Chemistry for Biochemical Applications:** Lee-Chiang Lo (NTU, Chemistry)
- 14:45 **Self-Propelled Oil Droplet of Caged Fatty Acid toward UV Light Source:** Kentaro Suzuki (KU, Chemistry)
- 15:20 Coffee Break
- 15:35 **From the Nature Revelation of Red Tides to the Inspirations of Social Entrepreneurship:** Hong-Nong Chou (NTU, Fisheries Science)
- 16:10 **Vegetation and Climate in Eastern Asia:** Emiko Maruta (KU, Biological Sciences)
- 16:45 **Biodegradable Nanodrug System for Cancer Therapy:** Ja-an Annie Ho (NTU, Biochemical Science and Technology)
- 17:20 Closing Remarks

2017年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告

1 人事

(1) 所長・運営委員

所長	化学科	教授	川本達也
運営委員	数理・物理学科	教授	阿部吉弘
	数理・物理学科	教授	水野智久
	情報科学科	教授	木下佳樹
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	辻 勇人
	化学科	教授	西本右子
	生物科学科	教授	小笠原強
	生物科学科	教授	金沢謙一

(2) 編集委員

委員長	化学科	教授	川本達也
編集委員	数理・物理学科	教授	長 宗雄
	数理・物理学科	教授	長澤倫康
	情報科学科	教授	桑原恒夫
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	加部義夫
	化学科	教授	堀 久男
	生物科学科	准教授	安積良隆
	生物科学科	教授	井上和仁
顧問	神奈川大学名誉教授		鈴木季直

(3) 産官学委員

委員長	数理・物理学科	教授	水野智久
運営委員	数理・物理学科	准教授	加藤憲一
	数理・物理学科	教授	長 宗雄
	情報科学科	教授	桑原恒夫
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	辻 勇人
	化学科	教授	堀 久男
	生物科学科	教授	井上和仁
	生物科学科	准教授	大平 剛

(4) 教育研究委員

委員長	生物科学科	教授	小笠原強
運営委員	数理・物理学科	教授	木村 敬
	数理・物理学科	教授	長澤倫康
	化学科	教授	西本右子

(5) 顧問・特別所員・客員教授・客員研究員

顧問：藤原鎮男、門屋 卓

特別所員：上村大輔、紀 一誠
鈴木季直、羽鳥尹承
松本正勝

客員教授：笹本浜子、細谷浩史
客員研究員：安部 淳、阿部孝宏
市川貴美子、大石不二夫
河合 忍、韓 浩
岸 康人、河野 優
齋藤礼弥、坂本峻彦、
佐藤 剛、谷村昌俊
田仲二郎、辻本和雄、
堤 一統、豊泉和枝、
永島咲子、橋 友理香
八柳祐一、若山典央

2 セミナー・シンポジウム・講演会

(1) 第46回湘南ハイテクセミナー

ー機器分析入門ー

種々の機器分析法の基礎を幅広く講義します。企業や公立機関の新人クラスの分析担当者、あるいは開発部門で分析にも興味を持たれているような方を対象にします。

演題・講師：

- 1) 「赤外分光」
高柳正夫(東京農工大学大学院 連合農学研究科)
- 2) 「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) 「液体クロマトグラフィー」
渋川雅美(埼玉大学大学院理工学研究科)
- 6) 「有機・高分子材料の組成・総合分析」
米森重明(米森技術士事務所・元旭硝子)

日時：2017年6月1日(木)・2日(金)

10時～16時40分

会場：KUポータスクエア

(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47回湘南ハイテクセミナー

—研究・開発と分析技術—

種々の機器分析法の基礎と応用を幅広く講義します。特に、優れた分析技術が研究・開発に対し、いかに重要な寄与をなし得るかという視点を重視します。企業や公立機関の分析担当者、あるいは開発部門で分析にも興味を持たれているような方を対象にします。

演題・講師：

- 1) 「研究・開発とNMR分光」
嶋田一夫(東京大学大学院薬学系研究科)
- 2) 「研究・開発と超微量分析」
高橋純一(日本大学文理学部非常勤講師・元アジレントテクノロジー社シニアスタッフ)
- 5) 「研究・開発と材料分析」
志智雄之(慶應義塾大学非常勤講師・元株式会社日産アーク)
- 6) 「研究・開発と赤外分光」
伴野元洋(東京理科大学理学部化学科講師)
- 7) 「研究・開発と表面分析」
田沼繁夫(国立研究開発法人物質・材料研究機構)
- 8) 「研究・開発と環境分析」
田中 敦(国立研究開発法人国立環境研究所)

日時：2017年12月7日(木)・8日(金)

10時～16時40分

会場：KU ポートスクエア

(みなとみらいクイーンズタワー 14階)

主催：神奈川大学総合理学研究所

後援：日本分析化学会関東支部

(3) 第27回神奈川大学平塚シンポジウム

「化学のための最先端光科学」

日時：2018年3月10日(土)

10時00分～17時00分

会場：神奈川大学湘南ひらつかキャンパス

(11号館サーカムホール)

主催：神奈川大学理学部化学科

神奈川大学総合理学研究所

共催：日本化学会

演題・発表者：

- 1) 「化学反応を追跡するための分光実験」
岩田耕一 教授(学習院大学理学部)
- 2) 「非線形振動分光を用いた液体/液体界面の直接計測と分子科学」
大内幸雄 教授(東京工業大学物質理工学院)
- 3) 「高発光効率・高安定性炭化水素分子の開発と有機レーザーへの応用」
辻 勇人 教授(神奈川大学理学部)
- 4) 「プラズモニク/ノンプラズモニク光ピンセットの開発」
坪井泰之 教授(大阪市立大大学院理学研究科)
- 5) 「光で成長する結晶」
奥津哲夫 教授(群馬大学大学院理工学府)
- 6) 「光を用いた新しい時間分解計測法とタンパク質反応への応用」
寺嶋正秀 教授(京都大学大学院理学研究科)

(4) 講演会

演 題：「Non-conventional applications of nitroxyl radicals: electron and proton transfer and water diffusion」

講演者：Lev Weiner 博士

(Weizmann Institute, Rehovot, Israel)

日 時：2017年5月29日(月)

15時00分～17時00分

会 場：神奈川大学湘南ひらつかキャンパス
(11号館第1会議室)

主 催：神奈川大学理学部化学科

神奈川大学総合理学研究所

報 告：

講師のWeiner博士は、安定な有機ラジカルとして古くから知られるニトロキシルラジカルについて、その酸化還元反応やプロトン移動反応を磁気共鳴法などを使って研究しており、この分野での世界的なリーダーである。ニトロキシルは、酸化剤や心臓病の治療薬として役だっているが、生体中の活性酸素に対する分子環境プローブにも使用することができる。今回の講演会では、聴衆の多数をしめた学部学生に配慮し、まず初めにニトロキシルラジカルのESR計測法に関する初歩的な解説を行った。続いてその最先端の応用研究として、(1) ガーリック中のアリシンなどジスルフィド結合をもつ様々な生理活性物質の定量的検出法の開発、(2) タンパク質1分子中での電子移動反応速度に関してタンパク質内位置依存の計測結果とその意義、について解説された。

いずれのテーマでも、ニトロキシラジカルの生体内化学計測への応用が極めて高度に進歩していることを熱弁された。

(報告者 河合明雄 2017.6.2)

(5) 講演会

演題：「ポリオキシメタレートの溶液化学」

講演者：尾関智二 教授

(日本大学文理学部)

日時：2017年8月29日(火)

16時00分～17時10分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(6号館207室)

主催：神奈川大学大学院理学研究科

神奈川大学総合理学研究所

報告：

化学科の力石助教および川本が世話人となり、上記講演会を6号館207号室で開催しました。ポリオキシメタレートに関する基礎的な解説から始まり、デカバナジン酸における水素結合を介した二量体と単量体の生成における使用溶媒との関連性についての詳細な解析結果が報告されました。そして、その解析結果から逆に溶媒の新たな性質を見出す試みが紹介されました。地道な研究とその結果に対する細やかな解釈は、院生など若い研究者に大きな刺激を与えるものでした。

(報告者 川本達也 2017.8.30)

(6) 講演会

演題：「Toeplitz and Hankel operators induced by measures」

講演者：Jaehui Park 助教

(韓国・ソウル大学)

日時：2017年10月26日(木)

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105室)

主催：神奈川大学理学部数理・物理学科

共催：神奈川大学総合理学研究所

報告：

ソウル大学のPark氏は測度によって導入されたToeplitz and Hankel作用素について解説し、その後、測度 μ に対してcompatibleであるとの性質を導入し、 μ がcompatibleである必要十分条件を求めたいと述べられた。さらに ϕ によって導入されたtruncated Toeplitz作用素 A_ϕ が有界となる条件は何か？との問題につ

いても、現在の進捗状況について述べられた。

(報告者 長 宗雄 2017.11.6)

(7) 講演会

演題：「Conjugation in model spaces and asymmetric truncated Toeplitz operators」

講演者：Marek Ptak 教授

(ポーランド・University of Agriculture in Krakow)

日時：2017年10月26日(木)

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：

ポーランド・University of Agriculture in Krakow 大学教授Marek Ptak氏は今回の講演で、model space 上での conjugation について解説され、 $B(H)$ の元 A と $B(H)$ の subalgebra W の距離 $d(A, W)$ が conjugation によって特徴付けできることを、基本的なことから解説した。さらに、 C -symmetric 作用素の集合は 2-reflexive であることを示されました。

(報告者 長 宗雄 2017.11.6)

(8) 講演会

演題：「Truncated Toeplitz operators can be characterized by conjugations」

講演者：Kamila Klis-Garlicka 教授

(ポーランド・University of Agriculture in Krakow)

日時：2017年10月26日(木)

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：

H^2 を Hardy 空間とする。 θ が inner function であるとき model space K_θ 上の作用素 A が有界な truncated Toeplitz である必要十分条件が θ で割り切れる inner function α に対して $A\alpha$ が C -symmetric であるのかが問題として提示されていた。この問題に対する最近の研究成果について講演された。

(報告者 長 宗雄 2017.11.6)

(9) 講演会

演 題：「リビングアニオン重合を用いた機能性高分子の精密合成」

講演者：石曾根 隆 教授
(東京工業大学)

日 時：2017年11月10日(金)
15時10分～16時40分

会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
(6号館204室)

主 催：神奈川県立理学部理学研究科
神奈川県立総合理化学研究所

報 告：

スチレン誘導体、メタクリル酸エステル類、エキソメチレンモノマー類のリビングアニオン重合による機能性高分子の精密合成に関して解説した。さらに一次構造の明確な機能性高分子として、水溶性・温度応答性高分子や高いガラス転移温度を示す高分子、両親媒性ブロック共重合体などの合成例を紹介した。

(報告者 山口和夫 2017.11.16)

(10) 講演会

演 題：「Multi-Stimuli-Responsive Pentiptycene Derivatives for Multicolor Fluorescence Imaging and Differential Sensing」

講演者：Jye-Shane Yang 教授
(国立台湾大学)

日 時：2017年12月5日(火)
15時10分～16時40分

会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
(6号館208室)

主 催：神奈川県立理学部化学科
神奈川県立総合理化学研究所

報 告：

物質の添加や機械的な刺激、溶媒蒸気等の外部刺激に応答して、発光色が変わるペンチプチセン誘導体に関するYang教授らの研究内容についての学術講演が行われた。単一の物質に対して添加する物質を変化させることで、青から赤までの広い範囲で発光波長を変化させることができ、これを用いた記録-消去の方法、次なるチャレンジ等について1時間程度の講演が行われた。講演後の時間を利用した質疑応答セッションでは、大学院生と教員からの質問が相次ぎ、30分程度の時間を使って非常に活発な討論がなされた。

(報告者 辻 勇人 2017.12.13)

(11) 平塚祭 特別参加企画

テーマ：「神奈川県立理学部の産官学連携へのアプローチ」公募に参加した理学部の研究をポスターで紹介

日 時：2017年10月22日(土)
10時00分～16時00分

会 場：神奈川県立湘南ひらつかキャンパス
(6号館226室)

主 催：神奈川県立総合理化学研究所

3 産官学 活動実績

(1) 展示会

「BIO tech 2017」

日 時：2017年6月28日(水)～30日(金)

会 場：東京ビッグサイト

出展者：光機能性材料研究所

中西 淳 プロジェクト研究員

テーマ：「細胞移動・薬剤評価系」

主 催：リードエグジビションジャパン(株)

(2) 展示会

「イノベーションジャパン2017」

日 時：2017年8月31日(木)～9月1日(金)

会 場：東京ビッグサイト

出展者：神奈川県立理学部化学科

山口和夫 教授

テーマ：「光応答性ホスホン酸単分子膜を用いた表面制御技術の開発」

主 催：国立研究開発法人科学技術振興機構

国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

(3) 展示会

「JASIS 2017 ～アジア最大級の分析・科学機器展～」

日 時：2017年9月6日(水)～8日(金)

会 場：幕張メッセ

出展者：神奈川県立理学部化学科

西本右子 教授

テーマ：「熱分析を使う公定法」

主 催：一般財団法人日本分析機器工業会

一般財団法人日本科学機器協会

(4) 展示会

「湘南ひらつかテクノフェア2017」

日 時：2017年10月26日(木)～28日(土)

会 場：ひらつかアリーナ

出展者：神奈川県理学部生物科学科
丸田恵美子 教授
テーマ：「神奈川県湘南ひらつかキャンパスの
植物相・チョウ相」
主 催：平塚商工会議所

(5) 展示会

「プリンタブルエレクトロニクス2018～有機エレクトロニクスデバイスに関する次世代ものづくり～」
日 時：2018年2月14日(水)～16日(金)
会 場：東京ビッグサイト
出展者：神奈川県理学部化学科
山口和夫 教授
テーマ：「近紫外光によって分解する表面修飾剤の開発と応用」
主 催：株式会社加工技術研究会

(6) 特 許

[日本出願]

- 1) 「画像処理装置、画像データ圧縮方法、圧縮データ伸長方法及び画像処理プログラム」
張 善俊、菅野将志
- 2) 「質問回答システム及び質問回答管理装置」
張 善俊
- 3) 「化合物、表面処理剤、及び表面処理方法」
山口和夫
- 4) 「フッ素原子含有ポリマーの分解方法、及びフッ素原子含有ポリマーの分解装置」
堀 久男
- 5) 「化合物、パターン形成用基板、光分解性カップリング剤、パターン形成方法及びトランジスタの製造方法」
山口和夫、伊藤倫子

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、情報科学、化学、生物学その他理学全般にわたる所員による一般研究論文、所員が所外の研究者と行なった共同研究に関する論文等を掲載する。投稿者は原則として神奈川大学総合理学研究所所員であるが、編集委員会の承認により所員以外の投稿論文も掲載する。論文の共著者については特に規定しない。本誌名称の略記は *Sci. J. Kanagawa Univ.* とし、和名は神奈川大学理学誌である。

2 掲載論文の種類

研究論文は、総説 (Review) と原著 (Full-Length Paper/ Note)、および報告書 (Report) とする。原著には短報 (Note) を含み、報告書 (Report) は原著に準ずる。

上記論文の他に、テクニカルノート (Technical Note)、教育論文 (Educational Paper) および研究交流報告 (Report of Research Communication) を掲載する。

掲載する論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁 (総説および原著)

総説および原著論文 (短報を含む) の原稿は、下記要領に従って、そのまま印刷できるように仕上げる。なお、テクニカルノート、報告書、教育論文および研究交流報告についてはそれぞれ以下の4、5、6、7に示す。

(1) 頁数

短報は、刷り上がり4頁以内とするが、それ以外の論文には特に頁制限はない。但し、編集委員会により論文が冗長と判断された場合には頁数は限定される。また、12頁を超える場合には、超過分に係わる経費は著者の負担とする。

(2) 原稿用紙サイズ

A4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 10 mm ずつの余白を置く。

研究課題名、著者名、研究課題名 (英語)、著者名 (英語) は中央揃え、所属 (英語)、Abstract (英文)、Keywords (英語) は左右両端揃えとする。

序論、材料と方法、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)、序論、材料と方法、結果、討論、謝辞、文献 (英語または日本語) の順とする。図と表は本文中の適切な位置に挿入する。

(6) 論文種の表示

第1頁、第1行目に左揃えで、前後に■記号を付して論文種を記入する。

例えば、■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、5語程度（英語）のKeywordsを付す。

文字は10Pを用い、見出し（Keywords:）はイタリックで太字とする。

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とする。

序論、材料と方法、結果、討論、謝辞、文献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10.5Pとする。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

(11) 文献

文献の項目見出しは左揃えとする。

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。

以下は記入例である。著書、分担著書、原著、学位論文、学会発表などにより表記法が異なるので、それぞれの記入例を参照して正確に記載する。

- 1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* **10** Suppl: 89-109.
- 2) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retract or muscle of *Mytilus edulis*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- 3) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.
- 4) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol. I*. Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 5) Owada M (2011) Phylogeny and adaptation of endolithic bivalves in the Mytilidae. *D.Sc. thesis, Kanagawa University, Japan.*
- 6) Taiz L and Zeigen E [西谷一彦, 島津研一郎 監訳] (2003) *テイツダイガー植物生理学 第3版*. 培風館. 東京.
- 7) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料

の元素分析法. *微生物* **5**: 34-44.

- 8) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*. 弘学出版, 東京.
- 9) 鈴木季直 (1992) 凍結技法, 第6章. *よくわかる電子顕微鏡技術*. 平野 寛, 宮澤七郎監修, 朝倉書店, 東京. pp. 137-148.
- 10) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. *神奈川大学総合理学研究所年報* 2003. pp.41-80.

(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。タイトルの末尾にピリオドはつけない。

表の上部には必ず番号 (表 1.、Table 1. など) とタイトルを付し、本文との整合を期す。

表のタイトルは、表の幅にあわせて両端揃えとする。タイトルの末尾にピリオドはつけない。

表のスタイルについては特に定めないが、用いる文字や数字のサイズは本文のそれを超えないように配慮する。

なお、本文への挿入の他に各表の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する

(13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

図には必ず番号 (図 1.、Fig.1. など) を付し、本文との整合を期し、図の下部に番号と説明文を加える。図が細分化されている場合には、A、B、C … (図 1A.、Fig.1A. など) をつけて区別する。

図のタイトルの末尾にはピリオドを置く。図のタイトルと説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

図のタイトルと説明文に限り、和文でもピリオド (.) とカンマ (,) を用いる (和文の句読点は用いない)。

図の番号および説明文の文字サイズは 9P とする。

図はできるだけ分かりやすいものとし、図中の文字や記号は高さ 3 ~ 5 mm 程度にする。

写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

なお、本文への挿入の他に各図の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する。これらの図は、あまり圧縮せず、電子密度 300dpi 程度 of 原図とする。

(14) 単位

SI unit を用いる。和文であっても、原則的に、数値および単位には半角文字を用い、%および°Cを除き、数値と単位の間は必ず半角分スペースをあける。

(15) 作製見本

希望者には作製見本 (デジタルファイル) を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

4 原稿の体裁 (報告書)

これに該当するものは、神奈川大学および総合理学研究所より研究費助成を受けた研究の報告書である。

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

個別の助成研究の報告書は原著と同等に扱うので3の規定に準じて原稿を作製する。

多人数による共同研究のうち、

(1) 各研究者が全員原著と同等の論文 (短報の場合も含めて) を投稿出来る場合は、それらを原著として扱い、原稿は3の規定に準じて作製する。

(2) 各研究者が要約を作製し、代表者がそれらを一つの報告書としてまとめる場合は、編集委員会の指示に従ってこれを作製する。この場合も、文書のレイアウト、フォントの種類とサイズなどの基本的な原稿作製基準は3の規定と同じである。

報告書のうち、著者が希望し編集委員会が採択したもの、あるいは編集委員会が選択し著者の同意が得られたものは原著または短報として掲載する。

5 原稿の体裁 (テクニカルノート)

これに該当するものは、研究技術および研究装置の紹介記事である。

研究論文 (原著および報告書) の規定に準じて原稿を作製する。

6 原稿の体裁 (教育論文)

これに該当するものは、自然科学分野の教育研究や教育技法に関する論文、および完成度が高く簡潔に纏められた実習テキストなどである。

研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

7 原稿の体裁（研究交流報告）

これに該当するものは、研究交流を目的とした他大学・研究所訪問記、海外研究留学報告、国内外開催の国際学会参加報告などである。

本誌、18巻掲載の該当論文を参照し、英文要旨を省略できることを除いて、研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

8 投稿と略題名（Running Title）提出

明瞭に印刷された図を含むオリジナルの印刷された原稿1部とそれがファイルされているデジタル記録媒体（FD、MO、CDなど）を編集委員会（神奈川大学総合理学研究所）に提出する。

論文の課題名が長い場合には、和文で25字、英文で50字以内の略題名（Running Title）が必要である。略題名は原稿に加え、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著作権を侵害するような原稿は採用されない。

10 原稿の校正

掲載決定原稿は、ゲラ刷りの段階で著者の校正を依頼する。校正は最低限の修正に留める。

11 投稿料

原則として投稿は無料であるが、カラー印刷を含むものについての著者経費負担の有無および負担額は編集委員会で決定する。投稿原稿の体裁が規定にあわず、編集段階で修正に経費が生じた場合は著者が実費を負担するものとする。また、いずれの範疇であっても、論文が12頁を超える場合には、超過分に係る経費は著者がその実費を負担するものとする。

12 別刷

掲載された総説および原著（短報を含む）は別刷り50部が著者に無料贈呈される。50部を超えて希望された別刷部数については実費を徴する。

13 著作権等

掲載論文の内容についての責任は著者が負うものとする。その著作権は著者に属するが、著作権のうち、複製権および公衆送信権については神奈川大学図書館に許諾を与えるものとする。論文内に使用した他者の著作物（図版や写真など）の転載許可は著者の責任において投稿前に行う。

出版権は神奈川大学総合理学研究所に属するが、総合理学研究所は頒布の便を図るために、神奈川大学学術機関リポジトリを通じて「Science Journal of Kanagawa University」を公開するものとする。

Author Index

- A**
- Aoki, Takashi 青木 孝…………… 5, 13
- Arai, Ken 新井 健…………… 19
- Arai, Yuki 新井裕喜…………… 47
- B**
- Bossard, Antoine …………… 1
- E**
- Ehara, Masahiro 江原雅博…………… 51
- F**
- Fujita, Misato 藤田深里…………… 83
- G**
- Gotoh, Tomonori 後藤智範…………… 39
- H**
- Hanazuka, Masafumi 花塚真史…………… 77
- Han, Hao 韓 浩…………… 97
- Hatano, Atsushi 羽田野敦史…………… 93
- Hayatsu, Manabu 早津 学…………… 55
- Hirose, Yuko 広瀬裕子…………… 55
- Hoshino, Yasushi 星野 靖…………… 19, 101
- I**
- Inoue, Kazuhito 井上和仁…………… 93
- Inoue, Yusuke 井上雄介…………… 47
- Irisawa, Toshifumi 入沢寿史…………… 13
- Isogai, Sumio 磯貝純夫…………… 83
- Ito, Shinnosuke 伊藤晋之介…………… 55
- Ito, Shiori 伊藤 栞…………… 55
- K**
- Kabe, Yoshio 加部義夫…………… 107, 113
- Kaji, Keisuke 梶 圭祐…………… 77
- Kanazawa, Ken'ichi 金沢謙一…………… 65, 73, 89
- Kanazawa, Yuki 金澤悠紀…………… 51
- Kaneko, Keiichi …………… 1
- Kase, Tomoki 加瀬友喜…………… 73
- Kasuga, Noriko Chikaraishi 力石紀子…………… 47
- Kataoka, Yusuke 片岡祐介…………… 93
- Kawamoto, Tatsuya 川本達也…………… 93
- Kihara, Nobuhiro 木原伸浩…………… 121
- Kinoshita, Yoshiki 木下佳樹…………… 33
- Kitashima, Masaharu 北島正治…………… 93
- Kiyono, Yuki 清野裕暉…………… 73
- M**
- Maeda, Nami 前田奈美…………… 55
- Maeda, Tatsuro 前田辰郎…………… 13
- Marumo, Sachi 丸茂 幸…………… 55
- Matsunaga, Satoshi 松永 諭…………… 47
- Mihara, Kohei 三原航平…………… 47
- Miyamae, Eriko 宮前枝里子…………… 47
- Mizuno, Tomohisa 水野智久…………… 13
- N**
- Nagamatsu, Leo 永松礼夫…………… 39
- Naitou, Ryuhei 内藤隆平…………… 19
- Nakata, Jyoji 中田穰治…………… 19
- Nakayama, Takashi 中山 堯…………… 97
- Nishimoto, Yuko 西本右子…………… 89
- Nomiya, Kenji 野宮健司…………… 47
- O**
- Ogata, Daichi 緒方大地…………… 73
- Ohira, Tsuyoshi 大平 剛…………… 77
- Ohta, Shosaku 太田祥作…………… 65
- Ono, Manami 小野真菜美…………… 55
- Owada, Masato 大和田正人…………… 73
- S**
- Saitoh, Masaya 齋藤礼弥…………… 73
- Sakurai, Hidehiro 櫻井英博…………… 93
- Satou, Hideto 佐藤秀人…………… 19
- Seki, Yuhei 関 裕平…………… 19
- Seo, Daisuke 瀬尾悌介…………… 93
- Shimozono, Natsumi 下園奈津美…………… 55
- Shiozawa, Takumi 塩澤拓実…………… 55
- Suzuki, Suechika 鈴木季直…………… 55
- Suzuki, Yoshihiro 鈴木祥弘…………… 89

T

Takeyama, Makoto	武山 誠	33
Tsuji, Hayato	辻 勇人	51
Tsutsui, Naoaki	筒井直昭	77

U

Utagawa, Chihiro	歌川ちひろ	55
------------------	-------	----

W

Watanabe, Eishiro	渡辺瑛士郎	89
Watanabe, Hiroshi	渡邊 宏	33
Watanabe, Nobuhiko	渡邊信彦	55

Y

Yoshida, Yukihiro	吉田幸宏	77
-------------------	------	----



編集後記

Science Journal of Kanagawa University 第 29 巻をお届けします。今回は原著論文 14 件、短報 1 件、報告書 1 件、教育論文 3 件のほか、研究交流記事 1 件が掲載されています。このなかには 12 件の共同研究助成論文が含まれています。投稿者の皆様に厚く御礼申し上げます。

さて、この第 29 巻の編集作業中の 2018 年 5 月 15 日に神奈川大学は創立 90 年を迎えました。「質実剛健・積極進取・中正堅実」の建学の精神と創立者である米田吉盛先生の「教育は人を造るにあり」の教育理念のもと神奈川大学は国内有数の私立総合大学へと発展してきました。理学部は神奈川大学創立 60 年を契機に建設された湘南ひらつかキャンパス（開設当時は平塚キャンパスと称されていました）に経営学部とともに開設され、ちょうど開設 30 年目を迎えます。また、総合理学研究所の前身である知識情報研究所は、理学部開設準備のために理学部より一足早く設置されていますので、総合理学研究所は 33 年の歴史を有します。折しも、神奈川大学は 2021 年 4 月に新たに「みなとみらいキャンパス」を

開設します。理学部と共に湘南ひらつかキャンパスに開設された経営学部は「みなとみらいキャンパス」へ移転することが決定されています。2 年遅れて理学部は 2023 年に横浜キャンパスに移転する計画です。教育、研究環境など理学部の横浜キャンパスへの移転計画には未だに見通せない点が多くある状況ですが、横浜地区への学部等の教学組織の集約は既に大学の基本方針となっています。これまで 30 年にわたって湘南ひらつかキャンパスで経営学部と共に培ってきた教育・研究の実践の積み重ねは、神奈川大学にとっても大きな財産になっています。本誌 Science Journal of Kanagawa University は、理学部・大学院理学研究科・総合理学研究所が一体となっていて行っている研究活動の記録であるとともに、今後の発展の礎となるでしょう。

最後になりましたが、本誌の一層の発展を祈願し、皆様のさらなるご支援をお願い申し上げます。

〔 神奈川大学総合理学研究所、
理学部生物科学科 井上和仁 〕

神奈川大学理学誌編集委員会

委員長

川本達也 化学科

委員

安積良隆 生物科学科

井上和仁 生物科学科

加部義夫 化学科

桑原恒夫 情報科学科

張 善俊 情報科学科

長 宗雄 数理・物理解学科

長澤倫康 数理・物理解学科

堀 久男 化学科

顧問

鈴木季直 神奈川大学名誉教授

Science Journal of Kanagawa University

Editor-in-Chief

Tatsuya Kawamoto Department of Chemistry

Editors

Yoshitaka Azumi Department of Biological Sciences

Kazuhito Inoue Department of Biological Sciences

Yoshio Kabe Department of Chemistry

Tsuneo Kuwabara Department of Information Sciences

Shanjun Zhang Department of Information Sciences

Muneo Chō Department of Mathematics and Physics

Michiyasu Nagasawa Department of Mathematics and Physics

Hisao Hori Department of Chemistry

Adviser

Suechika Suzuki Emeritus Professor of Kanagawa University

Science Journal of Kanagawa University Vol. 29 (Sci. J. Kanagawa Univ.)

発行日	2018 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