ISSN 1340-5799

^{平成23年度} 研究報告

REPORTS OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY CENTER OF WAKAYAMA PREFECTURE



WINTEC

和歌山県工業技術センター

研究報告発刊にあたって

平成23年度研究報告の冊子を発刊いたしました。

工業技術センターにおいて平成23年度は、所内選定による地域産業活性化促進事業の 一般研究、萌芽研究・基盤研究各1件、県内選定による戦略的研究開発プラン事業と新連 携共同研究事業がそれぞれ3件、国等の委託補助事業で地域イノベーション戦略支援プロ グラム(都市エリア型)1件5課題、戦略的基盤技術高度化支援事業5件、地域イノベー ション創出総合支援事業「地域資源活用型」2件、農林水産省技術会議委託プロジェクト 研究1件、イノベーション創出基礎的研究推進事業発展型研究(一般型)1件、研究成果 最適展開支援プログラムフィージビリティスタディ探索タイプ(A-STEP)2件の研究を実 施しました。これ以外にも県内企業からの依頼による受託研究30件を実施しております。 これらの概要は平成24年9月に発刊した「和歌山県工業技術センター(平成23年度業 務年報)」に記載しております。

当報告書では平成20年度から23年度の間に実施した研究の内、平成23年度末に公 表可能となりました16件の研究内容について掲載いたしました。研究実施時期は、単年 度事業で、平成20年度分1件、平成21年度分7件、平成22年度分8件、平成23年 度分8件(複数年度にわたる事業7件についても各年度毎で集計)となっています。

当センターでは実施した研究事業全ての課題名と概要を年報に掲載し、そのなから公表 可能な課題について、報告書に収録しております。すなわち、企業との共同研究などで共 同研究先の公表同意が得られていない、特許出願の予定や学会誌などに論文投稿を進めて おり公表時期の検討が必要な案件などについては、詳細公表を控えております。

過年度の研究課題は当該年度の年報に概要と共に掲載してあり、本年度も含めた課題一 覧はHP(http://www.wakayama-kg.go.jp/)をご覧下さい。また、HPでは過去数年分の 年報、研究報告等もカラーでご覧いただけます。これらの成果報告が皆様のお役に立つ事 ができれば幸いです。

当報告書について、ご意見やご質問などございましたらお気軽にご連絡下さい。

 ご連絡先 和歌山県工業技術センター 企画総務部 技術企画課 〒649-6261 和歌山市小倉60番地 TEL (073)477-1271 FAX (073)477-2880 電子メール wintec@wakayama-kg.go.jp

目次

水溶性ケイ皮酸誘導体の単離回収に関する検討	1
イチジクの一次加工	2
有田一识,月桐夫米、滕尿具花、小小和稻、二七央钾、田四妃平丁、他平里明	
クエン酸発酵による新しい柿果実飲料の開発	3
クチクラ分解酵素生産菌探索系の構築 藤原真紀、阪井幸宏、片桐実菜、山西妃早子、尾﨑嘉彦	4
香気成分・色素成分の活用技術開発 — 柿、梅の色保持に関する研究 —	6
改変ペプチドの微生物同時検査法への応用	8
ー槽型 ANAMMOX 反応の処理条件に関する研究	10
画像解析による短繊維の観察	14
マイクロ波抽出による可塑剤の迅速定量	16
X線CT高精度化およびリバースエンジニアリング技術の高精度化に関する研究	18
DLC 膜の分光測色	19
重本明彦、時枝健太郎、東谷篤志、保田将亨、田辺芳和、小藪 健	
「農業用アシストスーツの開発」分担課題 – 安全性評価に関する研究 –	22
脱レアメタルを指向した芳香族系化合物の効率的構造変換反応の開発	25
カーボンニュートラルを目指した有機EL素材の開発	26
新規紫外線吸収ポリマー微粒子の製造技術開発	28
ウヤクの指標成分 Laurolitsine の標準物質としての調製とその品質評価	30

水溶性ケイ皮酸誘導体の単離回収に関する検討

(食品産業部) 赤木知裕、山西妃早子 (近畿大学生物理工学部) 井上達也、三谷隆彦

1. 緒言

我々はこれまでに大量に廃棄される「梅酢」からク ロロゲン酸などの水溶性のケイ皮酸誘導体を主成分と するポリフェノール(PP)原体を取り出すことに着手し、 バッチ法にて数百グラムのサンプルを作製してきた。 今回は、より効率化を目指し、特にカラム法を用いた 製造法において、吸着工程について最適なアプライ量 と流速についての検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

バッチ法において使用してきた合成吸着剤 HP20(三 菱化学社製)にてカラム法の検討を行うこととした。

2. 1 カラム法における検討(破過テスト)

小カラム(樹脂長 6.34cm、樹脂径φ10mm、樹脂量5 ml)で検討を行った。カラム法については、以下のス キームで実験を行った。

①エタノール、水にて活性化した樹脂をカラムに充填 ②梅酢を流す(吸着工程)

③水洗

④エタノールを流す(溶離工程)

⑤水洗

小カラムにおいて指標物質(クロロゲン酸)を用いた 破過テストを行った。活性化させた樹脂を小カラムに 注入し、1000mg/Lの濃度に溶解したクロロゲン酸溶液 を SV=5 (24.85ml/hour)の流速で流した。サンプルは 30 分毎に回収し、Folin-Ciocalteu 法でポリフェノー ル含量を測定した。

2.2 カラム法における検討(流速の検討)

吸着工程での梅酢の流速について、梅酢の流速を SV=1、2.5、5と変化させてカラムにアプライした。 すなわち、活性化させた樹脂を小カラムに注入し梅酢 を SV=1(6.23ml/hour)、SV=2.5(15.58ml/hour)、SV= 5(24.85ml/hour)の流速で流した。サンプルは一定の 時間毎にカラム通過後に回収し、Folin-Ciocalteu 法 でポリフェノール含量を没食子酸換算で測定した。

3. 結果と考察

3.1 カラム法における検討(破過テスト)

図1に示すように、理想的な破過曲線が得られた。 200 分付近でカラムからクロロゲン酸の溶出が観察されており、流量にて 80ml、約 16mg のクロロゲン酸が 吸着された。次に、梅酢を用いてこのカラムにより吸 着工程の検討を行った。



3. 2 カラム法における検討(流速の検討)

吸着工程での梅酢の流速を SV=1、2.5、5と変化 させてもカラム通過溶液のポリフェノール濃度変化に 差がなく、比較的速い流速でも吸着が起こることが分 かった。流量を横軸にして比較するとほぼ同様の吸着 現象が起きていることが明らかとなった(図2)。



図2. カラム通過後のPP濃度

4. まとめ

梅酢にはクロロゲン酸、クマル酸やフェルラ酸など の多様な成分が含まれる¹⁾ことから、カラム法による PP 原体製造における吸着工程で理想的な破過曲線は得 られず、カラム吸着における終点は判別できない。し かし、本研究においてある程度まで流速を増加させて も吸着工程に影響はないことが明らかとなったので、 最終的には製造にかかるコストを考えながら、最適な アプライ量を決定する必要があると考えられる。

参考文献

1) 三谷隆彦 食品と開発 2010, No. 45, p81-83

イチジクの一次加工

(食品産業部) 有田 慎、片桐実菜、藤原真紀、赤木知裕、三宅英伸、山西妃早子、池本重明

1. 緒言

これまで、乾燥イチジクは輸入品がほぼ 100%で、 国産の乾燥イチジクはほとんど存在しない。和歌山県 内の食品加工業界からは県産の乾燥イチジクを使用し た、ケーキやパンを作製したいというニーズが寄せら れている。乾燥イチジクを作製する際に、冷凍イチジ クを使用することで年間を通じて乾燥イチジクの加工 が可能になる。しかし、果実凍結の際、果実内に氷塊 が成長し、細胞を破壊するため、冷凍果実の乾燥は難 しいとされていた。そこで、解凍時に糖液含浸を行い 身崩れを抑える方法について検討した。また、糖含浸 には、水分活性を下げる効果も期待される。一般的に 水分活性(Aw) 0.8 以下は微生物の繁殖しにくい、保 存性の良い食品であると言われている¹⁾。本研究では、 イチジクへの糖含浸が水分活性及び切断強度に与える 影響を調査した。

2. 実験方法

2.1 材料

和歌山県の JA 紀の里で購入したイチジクを使用した。また、スプーン印の細粒グラニュー糖及び食品添 加物グレードのクエン酸を使用した。

2.2 糖の含浸法

冷凍保存したイチジクに、イチジクの重量の 0~ 50%のグラニュー糖と 15%の水及び1%のクエン酸を加 え、真空パックした後に、10 分間沸騰湯浴中で加熱 した。

2.3 イチジクの乾燥方法

イチジクの乾燥は中根機械社製の通風乾燥機を用い、 50℃に加熱することにより行った。

2. 4 糖度の測定

イチジクの糖度の測定は、糖液含浸前、及び含浸後 は果実を均一化し、ATAGO(株)の屈折度計 DR-A1 を用 いて測定した。乾燥後のイチジクの糖度は、等量の水 を加えて均一化し、DR-A1 を用いて測定した値を2倍 にして算出した。

5 水分含量の測定

イチジクの水分含量は、(株)東洋製作所製の減圧乾燥機 V0-230 を用い、70℃5時間の減圧乾燥を行い、 重量変化より算出した。

6 水分活性の測定

イチジクの水分活性は、イチジクを細かく切断した 後、novasina 社製の水分活性測定器を用いて測定した。 2.7 切断時最大荷重の測定 イチジクの切断時最大荷重は、サン化学(株)社製の レオメーターCR-500DX を用いて測定した。

3. 結果と考察

3.1 糖液含浸法の検討

冷凍イチジクに糖液含浸を行う方法について検討を 行った。0%から 50%の範囲内では果実に対してグラ ニュー糖の割合が増えるほど、果実の糖度が高くなる 傾向が見られた(表1)。また、24 時間と 90 時間の浸 漬では糖の割合が 33%と 50%共に 90 時間の浸漬で糖度 が上がる傾向は見られたが、有意差はなく 24 時間の 浸漬で十分であると考えられた(表1)。

表1. 糖含浸法の検討

	糖割合	糖液Brix	果実Brix	
	0%	4.9	8.9 ± 1.5	
941点清盆	17%	17.9	18.2 ± 1.4	
2411亿俱仅	33%	30.0	24.1 \pm 2.4	
	50%	42.5	30.1 ± 5.5	
90h浸漬後	33%	29.7	26.5 \pm 1.3	
	50%	41.4	33.6 ± 1.4	

3.2 糖液含浸効果の検討

糖含浸を行った乾燥イチジクでは、行わなかったものよりも、同一の乾燥時間で水分活性が低く抑えられた(表2)。また、乾燥時間が同じ際の切断強度も糖含 浸を行った物の方が小さかった(表2)。

乾燥時間 水分活性(Aw)水分含量(%)切断強度(N) 0.92 53.66 12h 3.3 0.89 47.53 5.6 18h 糖含浸有 24h 0.82 32.70 6.9 30h 0.77 25.76 9.0 12h 0.95 7217 42 18h 0.94 61.42 5.7 糖含浸無 24h 0.90 44.34 8.7 34.51 30h 0.84 10.5

表2. ドライイチジクにおける糖含浸

また、水分活性が 0.6 の際の切断強度を比較する と糖含浸を行ったドライイチジクでは、行わなかっ たドライイチジクと比較して、0.67 倍の切断強度で あった(図省略)。

4. まとめ

以上の結果から、ドライイチジク製造に際しては 糖含浸を行うことにより、より早く、柔らかい製品 を作製できることが明らかになった。

参考文献

1) John A. Troller et al. 学会出版センター 2001 p97-11

クエン酸発酵による新しい柿果実飲料の開発

(食品産業部) 藤原真紀、阪井幸宏、池本重明

1. 緒言

本県の主要果実のひとつである柿の新たな用途開発 として、柿加工品を開発することを目的とした。近年、 消費者の健康志向により、健康飲料としての柿酢が注 目されているが、揮発酸である酢酸臭が苦手な消費者 も多い。また、従来の柿酢は酢酸発酵を行う前に柿の 糖分をアルコールに変換させるアルコール発酵工程が 必須など、複雑な原料処理ともろみ免許の取得が必要 となる。そこで、麹菌によるクエン酸発酵(アルコー ルを生成しない)を利用し、柿の機能性を損なわずに、 クエン酸を主体としたさわやかで飲みやすい柿酸味飲 料の開発を行うことを目指した。

2. 実験方法

和歌山県産平核無柿果実(脱渋、未脱渋)をカッター ミキサーで粉砕し、必要に応じてペクチナーゼ処理を した。培養容器に分注した後、70℃で約30分間殺菌処 理をした。殺菌処理後、常温に冷ました試料に、麹菌 の胞子懸濁液を接種し、振とう培養を行った。各培養 条件を以下の表1に示す。経時的に培養液のサンプリ ングを行い、HPLCにより有機酸の測定を行った。

No.	1	2	3	4	5	6	
脱渋	なし			脱渋 なし あり			
ペクチナー ゼ処理		なし			あり		
培地量(ml)	3000 500			1(00		
培養容器	5L果実 2L果実 500m 酒ビン 酒ビン フラ		500ml三角 フラスコ	500m	山坂ロフラ	ラスコ	
振盪速度 (rpm)	120	180	180	150	194	>200	

表1. 培養条件

3. 結果と考察

培養容器の形状、振とう速度、原料の酵素処理による粘度低下など、通気性、攪拌性を改善することで 1.5%以上のクエン酸が安定的に得られるようになった (表1、図1)。

得られた培養条件をもとに、入手した麹菌の中から クエン酸発酵能に優れた菌株の検索を行い、培地中の グルコースをほとんど消費し、かつ、クエン酸生産能 の高い菌株を見出した。

選択した菌株について、さらに詳細な培養条件の検 討を行った結果、冷凍脱渋柿を原料に、市販のペクチ ナーゼ・セルラーゼ製剤で処理を行い、25℃で振とう 培養を行うことで、約7%のクエン酸を得ることがで きた(図2)。



図2. クエン酸生産量に及ぼす培養温度の影響

クエン酸柿酢自体はほとんど無臭であり、酢酸など の刺激臭を嫌う消費者にも受け入れやすいと思われる。 また、ほかの素材の邪魔をしないため、新しいブレン ド素材として有望であると思われる。

4. 今後の課題

今後は攪拌・通気方式を現場に適した方式に変更した上で、工業化に向けて、より綿密に想定企業に即した条件検討が必要になると思われる。また、原料の殺菌方法や、培養温度の調節法等も現場に対応した方法への改良が必要になると思われる。

<謝辞>

本研究は、「地域イノベーションクラスタープログ ラム都市エリア型(一般)和歌山県紀北紀中エリア」、 「戦略的研究開発プラン」事業により実施された。

クチクラ分解酵素生産菌の探索系構築

(食品産業部) 藤原真紀、阪井幸宏、片桐実菜、山西妃早子 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所) 尾﨑嘉彦

1. 緒言

柿果実の有効利用に資する取り組みの一環として、 微生物酵素ペクチナーゼを用いた柿果実の剥皮技術の 開発に成功している^{1),2)}。この技術では、果実の最外 皮である角皮(クチクラ層)に物理的な穿孔処理を施し、 酵素の果皮組織への浸透を促す工程を含む。

今回、我々は、外皮クチクラを物理処理によらず分 解除去する方法を検討し、従来の剥皮技術をさらに汎 用性の高い技術とすることを目指した。

特に本研究では、クチクラ層を構成するクチン分子 をターゲットに、酵素を用いてクチクラを改変する方 法を検討し、活性の強い新たなクチクラ分解酵素を微 生物より探索することを目的として、評価系の開発お よび所有する菌株の評価を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 材料

クチンは、予めナイフで剥皮した平核無柿の果皮を Peelzyme (Novozyme 社製) で処理後、洗浄、超音波処理 した後、脱脂処理して調製した乾燥品を用いた。

2. 2 培養上清を用いた酵素活性の評価

クチンを 0.5%含む液体培地に、麹菌の胞子懸濁液 を接種し、25℃、10 日間振盪培養後の上清を採取し た。この培養上清を粗酵素液とし、4-Nitrophenyl butyrate 溶液を基質として酵素反応を行い、405 nm の吸光度から酵素活性を評価した。

2. 3 活性染色法

上記の培養上清を、SDS を含む(還元剤を含まない) バッファーと混合し、電気泳動の試料とした。泳動終 了後のアクリルアミドゲルを、Triton X-100 を含む 酢酸バッファーに浸漬し、ゲル中の SDS を除去した。 このゲルを、4-Methylumbelliferyl butyrate を含む 酢酸バッファーに浸漬し、37℃で振盪後、蛍光波長 (254、356 nm)で観察し、蛍光を発するバンドの有無 を評価した。

3. 結果と考察

3.1 培養上清を用いた酵素活性の評価

クチクラ分解活性の検証には、クチンを基質に用い るのが理想であるが、クチンは水に不溶であり、これ を基質として酵素活性を測定するのは困難である。そ こで、合成基質である 4-Ni trophenyl butyrate を用い て、クチン分解活性の指標となる簡易な評価方法を確 立した。この方法では、培養上清に含まれるクチン分 解酵素は、4-Nitrophenyl butyrate を切断し、反応溶 液は黄色に発色する。所有する7種の麹菌の培養上清 について評価したところ、D社焼酎用麹菌の培養上清 に、他と比較して顕著に強い基質分解活性が観察され た(図1)。



図1. 合成基質を用いた麹菌7種のクチン分解活性評価

3. 2 活性染色法

つぎに、上記7種の麹菌の培養上清を、合成基質 4-Methylumbelliferyl butyrate を用いた活性染色法 により評価した。培養上清中の各種タンパク質成分は、 電気泳動により各成分に分離されるが、このうち酵素 活性を有する成分は 4-Methylumbelliferyl butyrate を切断し、この成分のバンドが蛍光を発する。実験の 結果、D社焼酎用麹菌の培養上清と7種混合の培養上 清に、蛍光を発するバンドが観察された(図2)。



図2. 活性染色法による麹菌7種のクチン分解活性評価

この結果は、4-Nitrophenyl butyrate を用いた方 法による結果と一致する。7種混合の培養上清が、先 の方法ではほぼ活性が見られないのに対し、活性染色 法では活性を示唆する成分のバンドが見られる理由は、 これらの方法の測定感度が異なり、4-Methylumbelliferyl butyrateを用いた場合の蛍光の 検出感度が極めて高いためであると考えられる。これ らの結果から、2種の合成基質を用いた方法によりク チン分解酵素の産生が示唆されたD社焼酎用麹菌は、 クチクラ分解酵素生産菌として活用出来る可能性があ る。

- 4. まとめ
- ・クチクラ分解酵素を生産する微生物を効率的に探索 するための、評価系を確立した。この方法により、 クチクラ分解酵素生産菌のスクリーニングをより簡 便にすることが出来る。
- ・糸状菌7種のクチン分解活性を、今回確立した評価 系で検証したところ、焼酎用麹菌1種の培養上清中 に、クチン分解活性を持つ酵素タンパク質が含まれ ることが示唆された。

参考文献

- 1) 尾崎嘉彦、山西妃早子、木村美和子、中内道世 カキ果実 方法、剥皮果実及び包装剥皮果実 特許第 3617042 号(平成 16 年 11 月登録)
- 阪井幸宏、尾崎嘉彦、山西妃早子、山際美和子、中内道世、 池本重明、木本佳孝、中西秀明、中西登志明 カキ果実の 剥皮方法及び剥皮カキ果実 特許第 4896651 号(平成 24 年 1 月登録)

香気成分・色素成分の活用技術開発 柿、梅の色保持に関する研究

(食品産業部) 有田 慎、赤木知裕、三宅英伸 (化学産業部) 大崎秀介

1. 緒言

和歌山県のカキの生産量は、約35,000トンであり、 全国1位の生産量である。しかし、近年カキの販売価 格は低迷し、新たな需要の発掘のために、カキの加工 利用が望まれている。カキは特徴的な香りや酸味を有 さないため、カキ加工品においては特徴的な橙色を活 かす必要がある。カキはタンニンを多く含むこともあ り、細胞を破壊して果肉ピューレを作製すると速やか に褐変を起こし、橙色の退色が引き起こされる。

また、本県のオリジナル梅品種「橙高」¹も美しい 橙色が特徴的であるが、柿と同様に加工時に褐変、退 色する課題がある。

そこで本研究では、柿や「橙高」の褐変を抑制する 技術を開発するとともに、褐変の機構を解明し、製品 への応用を図った。

2. 実験方法

2.1 材料

冷凍保存後、解凍した CO₂ 脱渋処理「平核無」をホ モジナイズし、果肉:グラニュー糖:ホワイトリカー =1:1:2で混合してカキ果肉入りリキュールのモ デル(以下柿リキュール)を作製した。また、和歌山県 農業総合技術センター果樹試験場うめ研究所において 栽培された「橙高」を材料に用い、冷凍保存した 「橙高」をホモジナイズし、果肉を 20%の割合で梅 酒に混合して果肉入り梅酒のモデル(以下梅酒)を作製 した。

2.2 色変化の測定

色の変化は、各柿リキュール及び梅酒を容器の外から分光色差計 CM-600d(コニカミノルタ)で測定した。 2.3 カロテノイド含量の測定

カロテノイド含量は、柿リキュール及び梅酒からへ キサンで抽出し、遠心エバポレーターで乾固後、ヘキ サンで定容し、分光光度計を用いて 450nm の波長の吸 光度から、β-カロテン換算で定量した。

3. 結果と考察

3.1 柿の色保持に関する研究

柿果肉の色保持のために柿リキュールに6種類の抗酸化剤を1%の濃度で添加し、色の変化とカロテノイド含量の推移を調査したところ、ピロ亜硫酸カリウムが最も色保持されていること、食品添加物として使用できる範囲内ではアスコルビン酸が最も色保持に効果



カロテノイドの残存率はアスコルビン酸添加区がピ ロ亜硫酸カリウム添加区よりも高かった(図2)。また、 褐変により柿タンニンの可溶性は低下した(図省略)。 以上の結果から、柿果肉の色変化はカロテノイドの分 解だけではなく、ポリフェノールの酸化重合による不 溶化の結果として褐変したと推察された。



図2. 抗酸化剤がカロテノイド含量に及ぼす影響

色保持を達成するために、柿果肉の加熱を行い、ポ リフェノールオキシダーゼを失活させること、さらに 0.1%のアスコルビン酸を添加することで、6ヶ月間の カキ果肉の色保持及びカロテノイド含量の保持を達成 した(図3、4)。



図3. 加熱とアスコルビン酸が色差に及ぼす影響



3.2 梅の色保持に関する研究

「橙高」果肉において短期的な色保持が、加熱お よび剥皮で達成できることを明らかにした。さらに 果肉入りの梅酒の色保持については、加熱を行うか、 剥皮を行うことで色差の変化が抑えられることを明 らかにした(図5、6)。





また、果皮有と果皮無の果肉についてポリフェ ノール含量及びポリフェノールオキシダーゼ活性を 測定し、果皮にポリフェノール及びポリフェノール オキシダーゼの両方が多く存在することを明らかに した(図7、8)。



_{果皮有} 図8.果肉のポリフェノールオキシダーゼ活性

これらの結果から、加熱あるいは剥皮によりポリ フェノールオキシダーゼ活性が低下し、褐変が抑え られることが推察される。また、アスコルビン酸の 添加がカロテノイド残存率の向上に大きく影響する ことが明らかになった(図9)。



4. まとめ

柿リキュールの色保持には、加熱と 0.1%のアスコル ビン酸の添加の組み合わせが効果的であった。

梅酒では、剥皮や加熱によるポリフェノールオキシ ダーゼ活性の低下を行うことで褐変を抑えることが可 能になった。

また、柿リキュールと梅酒のカロテノイド残存率は アスコルビン酸の添加で向上した。

<謝辞>

この研究は、地域イノベーション戦略支援プログラ ム都市エリア型(一般型)の助成により行った。

参考文献

1) 根来圭一, 大江孝明 2010 園学研9別2, p.586

改変ペプチドの微生物同時検査法への応用

(繊維皮革部) 中村 允 (独立行政法人農業生物資源研究所) 石橋 純

1. 緒言

金(Au)は、ナノメートルサイズの微粒子になると 電子と光との相互作用によりプラズモン吸収を起こし、 鮮やかな赤色に発色するため、古くからステンドグラ スなどの工芸品に利用されてきた。また、微粒子の表 面状態や粒子径の変化によって色が変化するため、近 年ではこの現象をセンサーとして利用する研究が数多 く行われている¹¹⁻⁵⁵。特に金ナノ粒子表面に抗体タン パク質を化学修飾し、目的タンパク質の微量検出を行 う研究ではナノ粒子診断として注目を浴びており、現 在市販されている妊娠検査薬はこの現象を利用したも のである。

我々は、これまでに薬剤
耐性菌に抗菌活性を有する カブトムシディフェンシン由来改変ペプチドの利用研 究を行ってきた。この改変ペプチドは、細菌の細胞膜 と選択的に相互作用し、膜を破壊することで抗菌活性 を持つことが明らかになっている⁶⁻¹³⁾。そこで本研究 では、金ナノ粒子の表面に9残基の改変ペプチドを化 学修飾した金ナノ粒子誘導体を合成し、その細菌セン サーとしての性能を評価したので報告する。

現在、食品業界で実施される微生物検査は主に培養 法が用いられ、結果が判明するまでに数日を要する。 また、対象の細菌によって異なる培地を使用する場合 は、さらに操作工程が増えることから、食中毒原因菌 を迅速に同時検出できる検査技術の開発が求められて いる。そのため、本金ナノ粒子誘導体が迅速にかつ高 感度で細菌を検出できれば、食品中の細菌を検出する 検査薬としての利用が期待できる。

2. 実験方法

2.1 金ナノ粒子の調製

塩化金酸四水和物(HAuCl₄・4H₂0)を 42.2ng (0.102nmol)量り取り、100mLのイオン交換水に溶 解させることで、1.02nMの塩化金酸水溶液を得た。 クエン酸三ナトリウム二水和物を 114ng (0.388nmol)量り取り、10mLのイオン交換水に溶解 させることで、38.8mMのクエン酸水溶液を得た。塩 化金酸水溶液を還流撹拌させた後、クエン酸水溶液を 加え、15分還流撹拌した。放冷後、メンブランフィ ルター(孔径0.45 μ m)で吸引ろ過した。

2. 2 金ナノ粒子への修飾

上記の金ナノ粒子分散液 10mL と末端チオールのス ペーサーを有する改変ペプチドのエタノール溶液 0.5mL(2µmol/1mL)を混合し、2時間室温で攪拌した。 攪拌後、その溶液の5mLを取り、遠心分離(15000rpm、 10min)で遊離の配位子を除去した。残りの5mL は遠心 分離処理を行わずそのまま測定に用いた。

2.3 黄色ブドウ球菌モデルベシクルの調製

細菌に対する応答性は、黄色ブドウ球菌のモデルベ シクルを用いた。DMPG (ジミリストイルホスファチジ ルグリセロール) 14.72mg (2.14×10⁵mol)、カルジオ リピン 2.27mg (1.78×10⁻⁶mol) 、DMPC (ジミリストイ ルホスファチジルコリン) 5.66mg (8.35×10⁻⁶mol) を クロロホルム80mLに溶解させ、減王下で溶媒をゆっく り留去し、一晩減王乾燥した。乾燥後、100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4) (30mL) を加え、40℃の蒸留水で 加温しながら、脂質薄膜が分散懸濁するようになるま でナスフラスコを振盪した。この懸濁液をポリプロピ レン製の遠沈管に移し、液体窒素に浸漬して凍結後5 分間保持し、次いで 40℃の温水中で融解させた後、懸 濁液を軽く振盪した。リポソーム調製器 (AVESTIN 社 製、メンブランフィルターの孔径:100nm) によりエク ストルージョン処理を行ない(25回)、ベシクル溶液 を得た。4日間透析を行ない、黄色ブドウ球菌モデル ベシクル溶液を得た。

2. 4 ベシクル応答性の評価

金ナノ粒子溶液 5mL に黄色ブドウ球菌モデルベシク ル溶液を1 mL 加え、その変化を紫外可視吸光光度計で 追跡した。

3. 結果と考察

3.1 末端チオールスペーサーを付与した改変ペプ チドの分子設計

タンパク質やペプチドは、複雑な高次構造をとるこ とにより機能を発現するため、スペーサーを結合させ る位置によってその活性が変化することが一般的に知 られている。改変ペプチドは、細胞膜と相互作用する 際、ランダム構造からαヘリックス構造に構造変換す るため、この構造変換を阻害させないためにはスペー サーをC末端またはN末端のどちらかに結合させるこ とが必要である。そこで本研究では、N末端及びC末 端にスペーサーを導入した改変ペプチド誘導体を合成 した。これらを用いて作製した金ナノ粒子誘導体をN 末端結合型、C末端結合型とした。

3. 2 ベシクル添加によるスペクトル変化

図1に改変ペプチドを化学修飾した金ナノ粒子を、 図3にその吸収スペクトルを示した。未修飾のものに 比べてわずかに長波長シフトし、600nm 付近の吸光度 の増加が認められたが、N末端結合型とC末端結合型 の違いはほとんど認められなかった。これらにベシク ルを添加すると、化学修飾した金ナノ粒子は直ちに沈 殿が生じ、それに伴うスペクトルの変化が認められた (図2、図3)。これは、表面に修飾された改変ペプ チドがベシクルと相互作用することで金ナノ粒子が凝 集し、沈殿したためと考えられる。



図1.金ナノ粒子の分散液(左)、N末端結合型金ナノ粒子 (中央)、C末端結合型金ナノ粒子(右)



図2. ベシクル添加直後の金ナノ粒子の分散液(左)、N末端 結合型金ナノ粒子(中央)、C末端結合型金ナノ粒子(右)



Wavelength/nm



収ピークが認められた。これは、沈殿には至らない までも金ナノ粒子が凝集し、粒子径が増大したこと を示しており、ベシクル添加によりナノ粒子の表面 状態に変化が生じたためと考えられる。

N末端結合型とC末端結合型では、ベシクル添加 前後で大きな違いは認められなかった。このことは、 どちらの末端を起点として固定化した場合でも本来 の機能を保持していることを示唆している。

4 まとめ

本ナノ粒子誘導体を実用化するためには、以下の 課題を検討することが必要であり、今後さらに研究 を行っていく予定である。

(1) ナノ粒子誘導体の安定性

化学修飾した金ナノ粒子の分散液は、表面状態の わずかな変化にも敏感であり、凝集、沈殿を起こす。 従って、検査薬として応用するためには、製造して から少なくとも数ヶ月間は安定に分散している必要 性がある。安定性を向上させるためには、ポリエチ レングリコールなどで金ナノ粒子表面を被覆するこ とで一定の効果が期待できる。

(2) 改変ペプチドの修飾率

金ナノ粒子に修飾する集積度は、検出感度に関わ るため重要な検討項目である。改変ペプチドでナノ 粒子の全体を被覆する必要はなく、ポリエチレング リコールなどを混合させて修飾していくことを検討 する。上記の安定性と併せて検討する。

参考文献

- Marie-Christine Daniel et al., Chemical Reviews 2004, 104, 293.
- 2) Nidhi Nath et al., Analytical Chemistry 2002, 74, 504.
- Shu-Fang Cheng et al., Analytical Chemistry 2003, 75, 16.
- Amanda J. Haes et al., Journal of the American Chemica 1 Society 2002, 124, 10596.
- 5) Kae, Sato et al., Journal of the American Chemical Soc iety 2003, 125, 8102.
- Hisako, Saido-Sakanaka et al., Biochemical Journal 19 99, 338, 29.
- 7) Hisako, Saido-Sakanaka et al., Peptides 2004, 25, 19.
- Maki, Motobu et al., Journal of Veterinary Medical Sci ence 2004, 66, 319.
- Hisako, Saido-Sakanaka et al., Journal of Insect Biote chnology Sericology 2005, 74, 15.
- 1 O) Makoto, Nakamura et al., Biomacromolecules, 2011, 1 2, 1540.

ー槽型 ANAMMOX 反応の処理条件に関する研究

(生活産業部) 山際秀誠、高辻 渉

1. 緒言

近年、ANAMMOX 反応と呼ばれる嫌気性アンモニア酸 化反応が注目されている。この反応は、窒素固定→ア ンモニア化→硝化→脱窒という従来の生物学的窒素循 環系とは全く異なる窒素変換経路であり、NL4⁺が水素 供与体、NO2⁻が水素受容体となる自栄養性の脱窒反応 である(図1)。

ANAMOX 反応を NH_4^+ の除去に適応させるためには、 その前処理として流入 NH_4^+ の約半量を NO_2^- に変換する、 部分亜硝酸化処理が必要であり、一般的には、部分亜 硝酸化槽と ANAMOX 反応槽とからなるシステムによっ て窒素除去が行われている。一方、ANAMOX 反応を一 つの反応槽で行う一槽型の ANAMOX 反応の開発も進ん でおり、 熊本大学の研究チームでは固定化担体中でア ンモニア酸化菌と ANAMOX 菌が棲み分けされることに よって、一つの反応槽の中で部分亜硝酸化反応と ANAMOX 反応が同時に進行する一槽型の ANAMOX 反応 (Single stage Nitrogen removal using Anamox and Partial nitritation, SNAP 法) が開発された。

我々は、パイル織物を汚泥付着用の固定化担体とし て ANAMOX 反応の前処理としての部分亜硝酸化処理を 行い、長期安定運転を行う中で、部分亜硝酸化と同時 に ANAMOX 反応が進行する SNAP 反応が進行することを 確認した。ここでは、部分亜硝酸化処理から SNAP 反応 への変遷と SNAP 反応における流入負荷の影響について 検討を行った。



- 2. 実験
- 2.1 供試汚泥

供試汚泥として、和歌山市の和歌川終末処理場の活 性汚泥を用いた。この終末処理場には、生活廃水の他 に化学工場廃水の処理も行っている。

 2.2 パイル織物を用いた部分亜硝酸化処理および SNAP 処理

図2に部分亜硝酸化処理装置の概略図を示した。有 効容量約5 L の円筒状の反応槽の中央部分に図3に示



図2. 部分亜硝酸化および SNAP リアクタの概略図



図3. 固定化担体として用いたパイル織物
 材質:アクリル繊維
 パイル直径:1 mm
 パイル長さ:3 cm

したアクリル製パイル織物(パイル長:3 cm、面積: 684cm²、充填率:13.7m²/m³)を設置した。パイル織物 の設置によって、通気を行っているサイドでは、上昇 流が、その反対側では下降流が生じるように設計した。 種汚泥として、Initial MLSS = 3,000mg/L の濃度でパ イル織物を設置したリアクタに投入し、一日間、エア レーションを行うことによって、アクリル製パイル織 物の表面に付着固定させた後、合成無機廃水を滞留時 間が約24時間になるように無機合成廃水を添加し、連 続処理を行った。連続試験はワンパスで行い、返送工 程は備えなかった。表1に用いた部分亜硝酸化試験用 の無機合成廃水の組成を示した。無機合成廃水には微 量元素群として Trace element solution を1 mL/L で 添加した。窒素源として、NH₄C1 のみを用いており、 流入アンモニア濃度を部分亜硝酸化処理試験中は 50 mg-N/L から 199mg-N/L まで段階的濃度を上げ、SNAP 処 理試験においては、199mg-N/L から 1,525mg-N/L まで 上げた。50g/L NaHOO3溶液を用いて pH を 7.5 に調整し た。また、通気量を調整することによって溶存酸素濃 度を部分亜硝酸化処理実験中は 0.5~1.0mg/L の範囲で、 SNAP 処理試験中は、0.5~4.0mg/L の範囲で流入窒素負 荷に応じて変化させた。反応液温は 35 ℃に調整した。

表1. 部分亜硝酸化および SNAP 反応用合成廃水

NH₄Cl	192-3821 mg/L
KH ₂ PO ₄	10-200 mg/L
KCI	4-80 mg/L
CaCl ₂ • 2H ₂ O	1.5-30 mg/L
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5-10 mg/L
FeSO4 • 7H2O	9 mg/L
EDTA	5 mg/L
Tap water	1 L
Trace element solu	tion (1mL/L)
CoCl2•6H2O	0.24 g/L
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.25 g/L
H ₃ BO ₄	0.014 g/L
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.99 g/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ C) 0.22 g/L
Na ₂ SeO ₄ • 10H ₂ O) 0.17 g/L
NiCl ₂ •6H ₂ O	0.19 g/L
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.43 g/L

2. 3 分析方法

アンモニア態窒素 (NH₄-N) はインドフェノール青吸 光光度法により定量した (JIS K 0102-2008)。酸化態 窒素 (NOx-N、硝酸態窒素 (NO₃-N) + 亜硝酸態窒素 (NO₂-N)) は銅・カドミウムカラム還元-ナフチルエ チレンジアミン吸光光度法により定量し、亜硝酸態窒 素はナフチルエチレンジアミン吸光光度法により定量 した (JIS K 0102-2008)。硝酸態窒素は酸化態窒素と 亜硝酸態窒素の差より求めた。全窒素 (T-N) は TOC-V_{GH/GN} (㈱島津製作所製) で測定した。pH はFD-02 (東 京硝子器械㈱製) で測定した。溶存酸素濃度 (DO) は DO-21P (DKK·TOA (㈱製) で測定した。

3. 結果と考察

3.1 パイル織物を用いた部分亜硝酸化反応

アンモニア態窒素含有廃水に対して、ANAMMOX 反応 を適応させるためには、ANAMMOX 反応の前処理として、 部分亜硝酸化反応が不可欠である。そこで、これまで の硝化・脱窒処理試験に関する研究の中で、硝化汚泥 付着用の固定化担体として、最も有望であったアクリ ル製パイル織物(図3)をアンモニア酸化細菌固定用 の担体として用いた部分亜硝酸化処理について検討を 行った。 和歌川終末処理場の活性汚泥を種汚泥(Initial MLSS = 3,00mg/L)として用い、この汚泥を固定化担体として使用したパイル織物に十分に付着固定させた後、無機合成廃水を添加し、連続部分亜硝酸化処理実験を行った。部分亜硝酸化処理実験においては、滞留時間を22~24時間でほぼ一定として、流入アンモニア濃度を50mg-N/Lから199mg-N/Lまで段階的に上げていき、流入窒素負荷を上昇させた。結果を表2にまとめた。

表2. 固定化担体としてパイル織物を用いた部分亜硝酸化反応 の結果

Faze	HRT (hrs)	Inf.TN (kg/m³/day)	% of nitrogen removal	% of ammonium oxidation*1	% of nitrification*2	% of nitritation* ³
1	23	0.01	31	76	51	25
2	23	0.05	17	68	30	38
3	22	0.10	13	72	24	48
4	23	0.16	15	70	3	67
5	23	0.20	15	63	2	61
6	23	0.24	10	48	5	42
7	24	0.26	12	50	2	48

運転開始後の流入窒素負荷が低い Faze 1において は、アンモニア酸化率は76%であったが、この内、ア ンモニアから亜硝酸への亜硝酸化率は25%で低く、亜 硝酸から硝酸への硝化率は 51%と高かった。このこと から、この時点では、アンモニア酸化だけでなく、亜 硝酸酸化も進行していることが推測できた。また、流 入窒素負荷を 0.16kg-N/m³/day まで徐々に上げていく と、アンモニア酸化率は70%を維持したままで、硝化 率は3%にまで低下し、亜硝酸化率が67%まで上昇し、 部分亜硝酸化が進行していった(Faze 2~4)。その後、 さらに流入窒素負荷を上げていくと、アンモニア酸化 率は50~63%になる一方で、硝化率が2~5%程度に制御 され、部分亜硝酸化反応が進行していることを確認し た (Faze 5~7)。その後、運転開始260 日以降に流入 窒素負荷を 0.10kg-N/m³/day まで下げて、再び段階的 に負荷をあげていった。260 日から 380 日の期間の流 入窒素負荷と窒素除去率の経日変化を図4に示した。 流入窒素負荷を上げていった場合にも、窒素除去率は 20%前後を推移していたが、340日を越えた辺りから、 急激に窒素除去率が上昇し、360日には80%を越える窒 素除去率が得られた。この窒素除去については、用い た合成無機廃水中に有機物は添加されておらず、従属 栄養細菌による脱窒反応ではなく ANAMMOX 反応による 脱窒反応が進行しているものと推測された。



図4. 部分亜硝酸化処理を長期運転した時の流入窒素負荷と 窒素除去率の経日変化 Symbols:□;窒素除去率、→→;流入窒素負荷

3.2 SNAP 反応における流入アンモニア濃度の影響 部分亜硝酸化槽において、ANAMOX 反応と推測され る窒素除去が進行した。そこで、滞留時間(HRT)を約 23 時間で一定として、合成無機廃水中のアンモニア濃 度を上げることによって、流入窒素負荷流入窒素負荷 を上げていった。330 日以降の平均流入窒素濃度と処 理水中窒素濃度の経日変化を図5に示した。



図5. パイル織物を用いた SNAP 反応における流入窒素濃度と窒素除 去率の経日変化

Symbols: ○;窒素除去率, ──;流入窒素濃度

平均流入窒素濃度を 199、240、295、341mg-N/L に 徐々に上げた場合にも、それぞれの期間での処理水中 の平均窒素除去率は 65.0、76.0、79.2、77.9%になり 徐々に高くなると共に、窒素除去率のばらつきも徐々 に小さくなっていった。さらに、流入アンモニア濃度 を上昇させた場合にも、高い窒素除去率を維持するこ とができ、流入アンモニア濃度が約 1500mg-N/L 程度ま では SNAP 反応への流入アンモニア濃度の影響はほとん ど無いことが示された。流入アンモニア濃度を約 900 mg-N/L 以下で運転を行った 600 日までは 80~85%の窒 素除去率、流入アンモニア濃度を約 1,000mg-N/L 以上 で運転を行った 600 日以降は 85~95%の窒素除去率で 推移した。725 日以降に流入アンモニア濃度を平均 1525 mg-N/L として処理を行ったところ、平均窒素除 去率および平均窒素除去速度はそれぞれ約 91.4%と約 1.46 kg-N/m³/day に達した。

一方、比較的安定した窒素除去率が得られた 450 日 以降においても、520~570 日および 690~720 日の間 に、窒素除去率が急激に低下することがあった。この 要因を解析するために、500 日以降の処理水窒素濃度、 硝酸態窒素濃度、亜硝酸態窒素濃度、アンモニア態窒 素濃度の経日変化と溶存酸素濃度の経日変化を図6に 示した。



図6. SNAP 反応における処理液中の各態窒素と溶存酸素濃度の経日変化

Symbols : □ ; T–N, \diamondsuit ; NO₃–N, \triangle ; NO₂–N, \blacksquare ; NH₄–N, \blacksquare ; 溶 存酸素濃度

この結果、硝酸態窒素濃度は約 60~100mg-N/L、亜 硝酸態窒素濃度は20mg-N/Lを維持しており、大きな変 動がないことが判った。一方で、処理液中窒素濃度が 高くなった期間においては、アンモニア態窒素濃度が 高くなっており、このアンモニア態窒素濃度の変動が 処理液中の窒素濃度の変動の最大の原因であることが 判った。このアンモニア態窒素濃度が高くなった時に は、液中の溶存酸素濃度が低下する傾向が認められた。 この溶存酸素濃度が低下することによって、アンモニ アから亜硝酸へのアンモニア酸化反応が律速になって 処理液中のアンモニア態窒素濃度が増加していること が推測された。これらのことより、725 日以降では、 処理液中のアンモニア態窒素濃度と溶存酸素濃度の変 動に注意しながら通気量を調整するように運転管理を 行ったところ、非常に安定した SNAP 処理を維持するこ とが出来た。

3.3 SNAP 反応における滞留時間の影響

SNAP 槽において HRT 23 時間、流入アンモニア濃度 1,525mg-N/L で、安定した窒素除去が進行することを 確認できた。そこで、流入アンモニア濃度一定で、滞 留時間を短くすることによって流入窒素負荷を段階的 に上げた。結果を図7に示す。



図7. SNAP 反応における流入窒素負荷、窒素除去速度およ び窒素除去率の経日変化

Symbols:●;流入窒素負荷,○;窒素除去速度,□;窒素 除去率

滞留時間を徐々に短くすることによって、流入窒素 負荷を約 2kg-N/m³/day まで上げたところ、810 日を過 ぎたところで、急激に窒素除去速度および窒素除去率 が低下した。そこで、一度流入窒素負荷を1 kg-N/m³/day 程度にまで下げ、窒素除去率の回復を行い、 窒素除去率が約 80%程度に回復したのを確認後、再び 流入窒素負荷を上げていったところ、約3週間で約 1.5kg-N/m³/day の窒素除去速度に回復した。その後も、 流入窒素負荷を上げていき、平均流入窒素負荷を約 2.3kg-N/m³/day で運転を行った 870 日以降において、 平均窒素除去速度は約 1.94kg-N/m³/day、最大窒素除 去速度は 2.05kg-N/m³/day に達した。表3に他の一槽 型の ANAMMOX 反応の処理速度との比較をまとめた。今 回の実験で得られた最大窒素除去速度の 2.05 kg/m³/day は、無機合成廃水を用いてはいるものの、 その処理速度および窒素除去率は他の一槽型 ANAMOX 反応と比較して高くなり、SNAP 反応用の固定化担体と してパイル織物が非常に効果的であることが推察でき た。

4. まとめ

パイル織物を微生物付着用の固定化担体として用いた反応槽において、一槽型のANAMOX反応である SNAP反応を進行させることに成功した。そのSNAP反応槽における窒素除去速度は、最大で2kg-N/m³/day を超える速度が得られており、これまでに報告されている他の一槽型のANAMMOX処理と比較して、高い窒素除去速度が得られた。

参考文献

- Sliekers, A.O., Third, K.A., Abma, W., Kuenen, J.G. a nd Jetten, M.S.M., FEMS Microiol., 2003, 218, 339-344
- Vazquez-Padin, J.R., Pozo, M.J., Jarpa, M., Figueroa, M., Franco, A., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L. and Mendez, R., J. Hazardous Materials, 2009, 166, 336– 341
- Pynaert, K., Smets, B.F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S.D. and Verstraete, W., App. Environ. Mic robiol., 2003, 69, 6, 3626-3635
- 4) Vlaeminck, S.E., Terada, A., Smets, B., Linden, D.V.
 D., Boon, N., Verstraete, W. and Carballa, M., Enviro
 n. Sci. Technol., 2009, 43, 13, 5035-5041
- 5) Chen, H., Liu, S., Yang, F., Xue, Y. and Wang, T., Bi oresource Technol., 2009, 100, 1548-154
- Lieu, P.K., Hatozaki, R., Homan, H. and Furukawa, K., Japanese. J. Wat. Treat. Biol., 2005, 41, 2, 103–112
- 7) Kawakubo, Y., Takekawa, M. and Furukawa, K., The 2rd Joint workshop between Pusan National University and Kumamoto University "Advanced Engineering Technology for Environment and Energy, 2009

表3.	一槽型 ANAMMOX	反応槽における	窒素除去速度の比較
-----	-------------	---------	-----------

Process	Wastewater	Nitrogen loading rates (kg-N/m³/day)	Nitrogen removal rates (kg-N/m³/day)	References
CANON				
gas-lift reactor	Synthetic	3.7	1.5	(1)
Air pulsing SBR *)	Sludge liquor	0.46	0.36	(2)
OLAND				
RBC ^{#)}	Synthetic	1.2	1.0	(3)
RBC	Black water	0.94	0.7	(4)
SNAD				
RBC with nonwoven	Synthetic	0.69	0.48	(5)
SNAP				
Biofix	Synthetic	1.0	0.8	(6)
Biofix	Sludge liquor	1.85	1.6	(7)
Acrylic pile fabrics	Synthetic	2.3	2.05	This study

*; Sequencing Batch Reactor, #; Roatating Biological Contactor

(生活・環境産業部)

1. はじめに

化学繊維の長繊維を切断して短繊維としたステープ ルファイバーは、紡績糸、混紡糸の製造に用いられる 他、複合材料の強化繊維や静電植毛のパイルとして資 材用途にも良く用いられている。特に、資材用途の場 合、短繊維の形態は、製品への加工性や使用された製 品の物性に大きく影響するため、その形態を客観的に 評価することが重要となる。

本報告では、化学繊維を切断して得られる短繊維を 対象として、画像処理・解析による形態観察法につい て検討を行った。

2. 実験方法

使用した機器等を表1に示す。

短繊維は、ナイロン長繊維を約 1mm に切断したもの を用いた。画像取得にあたって、短繊維を水に分散さ せ、スライドガラス上に滴下し、さらにカバーガラス をのせたものを観察試料とした。

解析に先立ち、画像に対する二値化によって短繊維 の形状抽出を行った。

機器等	機種・メーカ等		
光学顕微鏡	オプチフォト2 (Nikon)		
CMOS カメラ	Evolution LC (Media Cybernetics)		
画像解析ソフト	Image-Pro PLUS Ver.6.3 (Media Cybernetics)		

表1. 使用機器等

3. 結果と考察

3.1 短繊維の直線性の評価

短繊維の形状の直線性を評価する方法についてまず 検討を行った。図1には、その処理手順を示した。

二値化像の白色領域の面積(A)を求め、ついで白 色領域の各頂点を結ぶ包絡線を描画し、さらに包絡線 に囲まれた領域の面積(B)を求める。短繊維が屈 曲・湾曲した形態を取っている場合、Bの値はAの値 よりも大となり、逆に短繊維が直線に近いほどBの値 はAに近い値を示す。例えば式(1)のような面積比 の計算により直線性を示すパラメータ(LI)を得るこ とができる。

LI=A/B 式(1)

また、図1の撮影像でも確認できるように、繊維端 に"かえり"が認められる場合がある。この"かえ り"は二値化像の白色領域の端部に観察されるため、

这一 宮本昌幸、解野誠司

両端除去の処理を行ったものに対して、同様に、二値 化像の白色領域の面積(Ac)と包絡線に囲まれた領域 の面積(Bc)を求め、式(1)と同様の計算により "かえり"の影響の無い直線性を示すパラメータ (LIc)を得ることができる。さらには、LIと LIcの

比較から"かえり"の有無およびその大小を評価する ことも可能である(図2)。

3.2 短繊維長の評価

以下に述べる短繊維長の評価は、3.1によって直 線性が高いと判定された繊維に対して有効である。化 学繊維の繊維幅はほぼ一定であることから、短繊維像 である二値化画像を細線化処理することで領域の中心 を通る線に縮退すると考えられる。この細線化処理し た線の長さを測定すれば短繊維の長さを測定すること が可能である。画像処理において細線化処理によって 得られた線は1ピクセル幅であり、この線が、鉛直も しくは水平方向に平行であるとき、その面積は線の長 さに相当する。しかしながら、繊維の像が、常に、鉛 直もしくは水平方向に平行とは限らないために、細線 化処理に先立って、繊維の画像内での傾きを計測し、 傾きに応じた角度で回転させることで、鉛直もしくは 水平方向に平行な繊維の像を得ることが必要となる (図3)。

繊維の像の傾きは、繊維の二値化画像について、繊 維の像を、オブジェクトの相当楕円とし、その長軸と 画像処理上の垂直軸が交わる角度として評価できる。



図1. 直線性の評価



図2. "かえり"の影響の無い直線性の評価



図3. 回転と細線化処理を用いる繊維長の評価



図4. 繊維の像の傾きの評価

図4には、オブジェクトの相当楕円(図中楕円)の 長軸(点線)と画像処理上の垂直軸が交わる角度の関 係を示した。繊維像の傾きは画像処理上の垂直軸が交 わる角度(θ)が計測され、回転処理のパラメータと して用いることができる。

図5には、以上の処理による測定の一例を示した。 測定例は、約 1mm のナイロン短繊維に対するものであ る。



図5. 画像処理による短繊維の長さの測定例

4. まとめ

化学繊維を切断して得られる短繊維を対象とした、 画像処理・解析による形態観察法について、短繊維の 直線性および短繊維長を評価する考え方を示すことが 出来た。

本観察法の考え方は、短繊維の繊維長が 1mm 以上の 場合にも適応でき、低倍率観察装置の取得画像に対し ても同様の計測が可能である。

マイクロ波抽出による可塑剤の迅速定量

(生活・環境産業部) 松本明弘、山下宗哲、前田拓也

1. 緒言

平成 22 年9月に食品、添加物等の規格基準(厚生 省告示第 370 号)の一部が改正され、おもちゃについ て6種類のフタル酸エステル類が規制された。また、 欧州連合(EU)の REACH(Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)高懸 念物質候補として、フタル酸エステル類が発表されて いる。プラスチック製家庭日用品製造業界より、フタ ル酸エステルを含有していないという証明が必要、ま た、含有しない場合、使用されている可塑剤が何であ るのかを知りたいという要望がある。ポリ塩化ビニル (PVC)中に含まれる可塑剤であるフタル酸エステル 類の分析方法は公定法¹⁾として存在するが、溶媒抽 出に一晩放置と時間を要する。一方、アジピン酸エス テル類等の可塑剤は規制されていない。

そこで、本研究では、PVC 中に含まれる可塑剤(フ タル酸エステル類2種およびアジピン酸エステル類2 種)を迅速に抽出するために、マイクロ波抽出法 (MWE)を適用し、液体クロマト質量分析装置(LC-MS) を用いて迅速な定量法を構築したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬

PVCには、和光純薬製 n=1100 を用いた。

可塑剤として、フタル酸ジ-n-ブチル (DBP)とアジ ピン酸ジ-n-ブチル (DBA)は、和光純薬製特級を使用 した。フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)とアジピ ン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA)は、和光純薬製一級 を用いた。

充填剤として炭酸カルシウムは和光純薬製食品添加 物用を使用した。また、安定化剤としてステアリン酸 カルシウム(和光純薬製日本薬局方)を使用した。

抽出溶媒には、ヘキサン(ナカライテスク製スペク トル用)およびアセトン(林純薬製電子工業用)を使 用した。

LC-MS の移動相には、純水(アドバンテック東洋製 ULTRA PURE WATER SYSTEM で製造) と LC 用メタノー ル(キシダ化学製)を使用した。

2. 2 装置および器具

試薬を混合・粉砕するためのボールミルは入江商会 製 V-1ML を用いた。また、試料片を作製するホットプ レスはテクノサプライ製卓上型ホットプレスを用いた。

試料から可塑剤を抽出するために、マイルストーン ゼネラル製マイクロ波試料前処理装置 ETHOS 1および



図1. 抽出容器. A, 試料; B, QS 容器; C, 石英キャップ; D, TFM 容器; E, ヘキサンとアセトンの混液; F, アセトン.

表1. マイクロ波抽出の条件

ステップ	時間(分)	出力 (W)	温度(℃)
1	20	1000	120
2	10	1000	120
3	30	0	120

表2. LC-MSの測定条件

LC	Accela system
カラム	Hypersil Gold(2.1 i.d. \times 50mm)
カラム温度	40°C
移動相	MeOH:H ₂ O (90:10)
流速	400 μ L/min
導入量	10 μ L
MS イオン化法 スプレー電圧 キャピラリー 温度 N₂ガス流量 質量範囲	Exactive ESI Positive 4kV 350°C 40 arbitrary unit m/z 150-1000

石英製インナー分解容器QS-50 (QS)を用いた。

LC-MS にはサーモフィッシャーサイエンティフィック製LC-MS Exactive を用いた。

全量フラスコは硬質ガラス製のものを使用した。

2.3 標準液の調製

 $1000 \mu g/g 標準原液: DBP、DBA、DEHP、DEHA をそれ$ ぞれ 0.5g を正確に採取し、アセトンで溶解し、50mLのメスフラスコに移し定容にした。

100 µg/g 標準液: 1000 µg/g 標準原液 5mL をホール ピペットで採取して 50mL のメスフラスコに移しアセ

トンで定容にした。

2. 4 試験片の作製

今回は硬質 PVC の試験片を作製した。PVC100 に、 炭酸カルシウム 3、ステアリン酸カルシウム 0.3、可 塑剤4種 (DBP、DEHP、DBA、DEHA) 1.5 となるように 配合し、ボールミルで4時間混合・粉砕した後、 $100 kgf/cm^2$ 、160 °C °C 1 分間ホットプレスで成形し、試験片とした。

2.5 標準操作

2.4で作製した試験片 0.3g を図1に示す抽出容 器に採取した。さらに可塑剤を抽出するためにヘキサ ン7mL およびアセトン3mL をQS 容器に加え、石英製 キャップを載せ、テトラフルオロメタキシール (TFM) 製容器にアセトン 9mL を入れ、表1に示した 条件でマイクロ波抽出を行った。抽出終了後、QS 容 器および TFM 容器内の抽出溶液をそれぞれ 25mL のメ スフラスコに移しアセトンで定容にした。各容器の溶 液を測定試料として、LC-MS を用いて DBP、DEHP、DBA、 DEHA を測定し、その和を定量値とした。表2に LC-MS の測定条件を示す。本法の有用性を検討するため、公 定法¹⁾で可塑剤の抽出試験を行った。

- 3. 結果と考察
- 3.1 検量線

2. 3で調製した DBP、DBA、DEHP、DEHA の 100μ g/g 標準液 0. 1mL をマイクロピペットでバイアル瓶に 採取し、メタノールを加え 1mL にした。この溶液を 2、 5、10、20 μ L を LC-MS に導入し、表 2 の条件で測定 し、2~20 μ g/L の範囲でピーク面積法により検量線 を作成した。得られた DBP、DBA、DEHP、DEHA の検量 線の相関係数および検出限界は、それぞれ 0.999、 0.993、0.997、0.997 および 5.8、1.1、3.3、7.1ng/g であった。

3.2 可塑剤の定量

2.4で作製した硬質 PVC 試験片について、2.5 標準操作のとおり、可塑剤4種の定量を行った。その 結果、溶液 F(図1)には DBP、DBA、DEHP、DEHA が含 まれていなかった。このことから、溶液 E(図 1)に抽 出された可塑剤は揮散して QS 容器から揮散・損失し ないことがわかった。MWE で可塑剤が揮散しないとい う金子ら²⁾の報告と一致した。溶液 E 中に含まれる 4種の可塑剤を測定した結果を表3に示す。LC-MS に よる DBP、DBA、DEHP、DEHA のモニターイオンは、そ れぞれの質量 278.34、258.35、390.56、370.57 にナ トリウムイオン 23 (Na⁺) が付加された分子とした。 本法と比較するために、公定法による測定結果も示し た。この結果より、フタル酸エステル類の DBP と DEHP は、公定法より MWE の方が定量値、回収率とも に大きな値を示した。一方、アジピン酸エステル類の DBA は公定法の方が大きな値を示した。また、DEHA は 公定法と MWE の定量値、回収率がほぼ同じになった。 2法ともに添加剤の抽出率は100%に達せず、60~ 90%になった。公定法を基準に考えると、MWE (DBA 以外)は添加剤の分析に有用であると考えられる。ま た、可塑剤の抽出および分析時間はそれぞれ 60 分お よび5分となり、公定法と比較しても大幅に時間が短 縮できた。本法は、硬質 PVC の可塑剤の迅速な定量法 である。

4. まとめ

本研究を行った結果、MWE を適用して LC-MS により、 硬質 PVC 中の可塑剤を迅速に定量することが可能と なった。また、公定法と比較しても、有用性を示すこ とができた。今後は、軟質 PVC について検討する予定 である。

参考文献

 1) 食品、添加物等の規格基準の一部改正について(食基発第 0802001号).

2) 金子直樹、榎本剛司、小林美佳 第 20 回環境化学討論会要 旨集 p. 20.

	抽出法	溶離時間	測定イオン	濃度	回収率
		(分)	(m/z)	(%)	(%)
DBP	MW	0.58	300.99	1.1	89
	厚生省告示第370号	0.58	300.99	0.8	64
DEHP	MW	1.17	413.27	0.7	70
	厚生省告示第370号	1.17	413.27	0.6	60
DBA	MW	0.55	281.17	0.8	75
	厚生省告示第370号	0.55	281.17	0.9	88
DEHA	MW	1.16	393.30	0.8	68
	厚生省告示第370号	1.16	393.30	0.8	69

表 3.LC-MS による DBP、DEHP、DBA、DEHA の定量

X線 CT 高精度化およびリバースエンジニアリング技術の高精度化に 関する研究

(機械金属産業部) 徳本真一、坂下勝則、花坂寿章

1. 緒言

当センターは産業用 CT スキャナを所有しており、 様々な製品内部の状態観察に利用している。また非金 属の小物体を対象とした内部状態の観察のためにミニ フォーカスX線 CT を開発した。しかし現在のミニ フォーカスX線 CT では、最大で 70 mm程度のサイズ が撮影限度である。なぜなら撮影可能な試料のサイズ は、X線発生器の照射角度、検出器のサイズなどハー ドウェアの仕様や、X線発生器と検出器の距離(SID)、 X線発生器とテーブル回転中心距離(SOD)などの幾何 学的位置関係で決定してしまうためである。撮影でき る対象物のサイズが大きいほど利用範囲が広がるが、 X線発生器の出力から、撮影対象は樹脂やゴムなどの 非金属で大きなサイズの撮影は困難である。しかしな がら、リバースエンジニアリングで活用するためには、 手のひらに乗るサイズ (十数 cm 程度) の物体を撮影 できれば十分に用途は広がる。そこで本研究では、検 出器のスライド機構と、線源の回転機構を付加し、よ り大きな物体を撮影することを可能とする装置の開発 を行った。

2. ミニフォーカスX線CT装置の改良

2. 1 ミニフォーカスX線CT

基本的なミニフォーカスX線 CT システムのスペッ クを表1に示す。本研究で用いるX線発生器は、管電 圧 50kV、管電流1 mA、焦点サイズ 70 µm という低出 力なX線発生器を用いており、樹脂やゴムなど非金属 の撮影が可能である。

スキャン方法	第3世代	
X線出力	管電圧:50kV 管電流:1 mA	
検出エリア	120×120mm 有効画素数 2240×2344PIXEL	
空間分解能	最小 0. 05mm	

表1. ミニフォーカスX線 CT 仕様

2.2 計測範囲拡大のための改良

今回、撮影が可能な試料のサイズを拡大させるため、 ミニフォーカスX線 CT を改良した。改良後のX線 CT の構成を図1に示す。まず、検出器が左右に任意の位 置に稼働する機構を作製した。これにより、複数回撮 影したデータを一つに統合することで、より広い領域 をカバーすることができ、より大きな対象物の撮影も 可能となる。またターンテーブル部に垂直方向のスラ イダ機能を追加した。これにより、垂直方向に大きな 物体の撮影も、複数回の撮影後データの統合で可能と なる。さらに、X線発生器に回転機構を付加すること でX線の照射角度が拡大し、照射線量不足をカバーす る。ただし、より正確にX線の焦点位置を回転中心に 合わせる必要があるため、回転機構の上にX-Y ステー ジを設置し、中心を合わせるための調整を可能とした。



図1. ミニフォーカスX線CT 装置の改良

3. X線CT 計測

今回、より大きな対象物でも撮影が可能であること を検証するサンプルとして、光造形装置で作成した 「だんじり」のレプリカ(長さ 110mm)の撮影を行っ た。検出器を左右に 40mm 程度移動と同期させ、X線 源も左右に±4°回転させ、2回撮影を行った。左右 に分けて撮影した透過画像を結合することで1つの透 過画像を作成した。その画像を用いて画像再構成を行 い、ボリュームデータを獲得した。図2にサンプルの 写真とボリュームデータを示す。1回の撮影では不可 能でも、2回の撮影に分ければより大きな物体でも撮 影が可能であることが実証できた。



図2. サンプルとボリュームデータ

4. まとめ

本研究では、検出器のスライド機構と、線源の回転 機構を付加し、より大きな物体を撮影することを可能 とする装置の開発を行った。

DLC 膜の分光測色

(企画総務部) 重本明彦(機械金属産業部) 時枝健太郎、東谷篤志(株式会社保田鉄工所) 保田将亨、田辺芳和、小藪 健

1. 緒言

ダイヤモンドライクカーボン (DLC) は湿式めっきな どと比較して表面硬度が高く、更に耐摩耗性を付与す るために自動車の部品や刃先へのコーティングなどに 採用されている。また、その黒く光り輝いた外観は商 品の差別化などにも一役買っており、腕時計のバンド などにも応用されている。

そこで、そのDLC 膜の外観評価として分光反射率測 定によってその色彩を評価するとともに、膜厚依存性 について調べた。

2. 実験方法

2.1 ダイヤモンドライクカーボンについて

ダイヤモンドライクカーボン¹⁾ (Diamond-like Carbon :DLC) は炭素と水素から成るアモルファスカー ボン膜であり、学術的には炭素 1 s 原子間の結合、即 ち sp^2 混成軌道と sp^3 混成軌道、加えて水素成分の比 率という 3 成分の比率で分類されることが一般的であ る²⁾。

成膜方法としては真空チャンバー内でのアーク蒸着 やマグネトロンスパッタリングといった PVD(物理気 相蒸着)法やプラズマ CVD(化学気相蒸着)法が用いら れる。一般的には PVD 法による皮膜は硬く、CVD によ る皮膜は柔らかいもののワークへの付きまわりが良い と考えられている。

今回は、成膜方法としてプラズマ CVD の一種である プラズマイオン注入法 (Plasma Base Ion Implantation: PBII)を選定した^{3),4)}。

2.2 成膜条件と硬度測定

金型用 SCM 鋼材に対し、原料ガスとしてアセチレン とトルエンを用いて成膜を行った。成膜時間は、それ ぞれ、60分、180分、240分、360分、420分である。

表面硬度についてはダイナミック微小硬度計⁵⁰(島 津製作所 DUH-200)を用いて測定した。実験条件は試 験力5.0gf、負荷速度1.35gf/sec、保持時間5秒で5 回測定を行ってその平均値を算出した。膜厚について は基板との段差をレーザー顕微鏡で測定した。また、 比較のために基材についても測定した。

2.3 分光測色について

一般的に表面コーティングにおいては、その性能として表面硬度や摩擦係数といった物理的性質が評価されてきた。ただ、近年においてはその装飾性や他のコ

ーティング製品との差別化から光沢を含んだ色合いに ついても言及されるようになってきている。更に生産 現場においてはコーティングの成否を経験的にその色 合いで見るということも行われている。そこで本稿で は分光反射率を測定し、更にそこから測色値を算出し た。測色値としては1976年に国際照明委員会(CIE)で 規格化された L*a*b*表色系による評価法を採用した⁶。

この方法では、L*で明度を表し、a*b*で色を表している。色の評価については図1で示すようにa*軸では赤(プラス側)から緑(マイナス側)にかけて、b*軸では黄色(プラス側)から青色(マイナス側)について基準軸を取っており、3次元空間でその色あいを評価することができる。



図1. L*a*b*表色系における色の関係

分光反射率測定にはコニカミノルタセンシング製の 分光測色計 CM-3700d を用いた。次に分光反射率データ を用いて入射白色光D65 に対して1976年に国際照明委 員会(CIE)で規格化されたL*a*b*表色系による測色値を 算出した。分光反射率測定では正反射光を含めた形 (SCI)と含めない形(SCE)で1つの試料に対して約 120 度ずつ角度を変えながら、3回測定を行い、そのデー タをそれぞれa、b、cとした。

3. 結果と考察

まず、成膜時間と表面硬度の結果について表1に示 す。基材の表面硬度は514H。であったのでDLC 膜によ って表面硬度が上昇していることが分かる。

試料 番号	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
成 膜 時 間 (分)	60	180	240	360	420
硬さ(H _D)	693	883	1494	1799	2105
膜厚(μm)	1.47	2.72	3. 38	5.01	7. 78

表1. 成膜時間とダイナミック微小硬度の関係

次に得られた分光反射率スペクトルを図2、図3に 示す。図2は正反射光を含めた「光沢を考慮した」測 定データ(SCIモード)、図3は正反射光を含めない、 即ち「光沢を考慮しない」測定データ(SCEモード)と なる。SCIモードにおける分光反射率では、試料No.1 において、波長640nmでの反射率のピークが確認され ている。他の試料は同様のスペクトル形状を示し、ピ ークは見られなかったが、試料No.3は他のものに比 べて全体的に反射率が低くなっている。







図3. 分光反射率(SCE モード)

SCE モードでは、全ての試料において、ピークは観測 されず、波長が長くなるにしたがって反射率が低下し ている。ただ、試料 No. 3については全般的に反射率 が高めに計測された。

更に分光反射率から算出した測色値を以下に示す。

	X2, 001 C		트
データ名	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)
No. 1a	48.18	2.26	2.59
No. 1b	48.17	2.27	2.64
No. 1c	48.1	2.26	2.68
No. 2a	47.91	0.23	2.15
No. 2b	48.03	0.21	2.06
No. 2c	48.06	0.22	2.05
No. 3a	46.21	0.01	1.4
No. 3b	46.26	0.03	1.4
No. 3c	46.16	0.05	1.48
No. 4a	47.88	0.22	2.09
No. 4b	48.11	0.21	1.97
No. 4c	47.98	0.2	1.98
No. 5a	47.25	0.16	2.16
No. 5b	47.51	0.19	2.08
No. 5c	47. 25	0. 22	2.27

表2. SCI モードによる測色値

1	₹3.	SCEモー	ドによる測色値	
~	· · ·	~~ <u>~</u>		

データ名	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)
No. 1a	0.9	0.07	-0.07
No. 1b	0.93	0.03	-0.1
No. 1c	0.86	0.07	-0.1
No. 2a	1.8	-0.01	-0.11
No. 2b	1.83	0.02	-0.08
No. 2c	1.89	0.03	-0.11
No. 3a	4.51	-0.36	-2.71
No. 3b	4.47	-0.37	-2.73
No. 3c	4.49	-0.33	-2.72
No. 4a	2.08	-0.01	-0.77
No. 4b	2.28	-0.05	-0.87
No. 4c	2.34	-0.04	-0.98
No. 5a	0.88	-0.01	-0.4
No. 5b	1	0.01	-0.4
No. 5c	0.91	0.04	-0.43

こうして得られた L*a*b*値は本来3次元空間でしか 正確に評価できないが、a*と b*に関する分布のばらつ きを見るために、a*を横軸に、b*を縦軸にグラフを作 ってみたところ、以下のようになった。







図5. SCEモードにおける a*b*値

正反射光を含めた SCI モード(図4)では、他の試料 と比較して、a^{*}b^{*}値の分布において試料 No.1 と No.3 に違いが見られる。特に No.1 については他のものより a^{*}の値が大きく、一方、光沢を考慮しない SCE モード (図5)では、試料 No.3 について他のものより、b^{*}の 値が小さいことが分かる。 4. まとめ

事業初年度となる平成23年度は、DLC成膜装置を導入し、異なる膜厚のDLC膜の試作と色の測定を行った。

その結果、膜厚や硬度に対する系統的な解釈はでき なかったものの成膜条件によって測色値が異なること が分かった。

次年度以降、実際にDLC コーティングした金型を用 いてプレス実験を行う。尚、当課題は経済産業省 戦略的基盤技術高度化支援事業「FRP 樹脂成形金型用 DLC 膜とその大型化技術の開発」の一部として実施された。

参考文献

1)S. Aisenberg and R. Chabot, J. Appl. Phys. , 1971, 42, p. 2953-2958

2) J. Robertson, Mater. Surf. Eng., 2002, R37, p129-281

- 3) J. R. Conrad, J. Appl. Phys., 1987, 62, p777.
- 4) 三木靖浩、足立茂寛、西村芳実、杉原雅彦、堀野裕治、奈良 県工業技術センター研究報告平成17 年度 vol. 31 p10
- 5) W. J. Poole, et al., Scripta Materialia, 1996, 34, 4, 559-564
- 6)色の表示方法 JIS Z8729 (2004)

「農業用アシストスーツの開発」分担課題安全性評価に関する研究

(電子産業部)前田裕司、上野吉史 (機械金属産業部) 古田 茂、花坂寿章、徳本真一、上森大誠

1. 緒言

本研究は、「農業用アシストスーツの開発」の分担 課題「安全性評価に関する研究」である。最終目標は、 開発する農業用アシストスーツの安全性評価に関する 調査を行い、安全性の基準を作成し、実証試験で安全 性を検証することにより、安全な農業用アシストスー ツを開発することである。

本年度においては、安全性評価に必要な実用化のための環境試験を実施した。

2. 上肢パワーアシストスーツの環境試験

本年度は環境試験として以下3つの試験を実 施した。

2.1 防水試験

パワーアシストスーツは全天候で利用するため、降雨状態で使用する状況も考えられる。その際、背中にある制御ボックスへの水の浸入を防ぐことが重要である。そのため、パワーアシストスーツに対する防水試験が必要となる。 2.1.1 防水試験装置および条件

JIS C 0920 「電気機械器具の外郭による保 護等級 水の浸入に対する保護等級」に準拠し た防水試験装置を開発し、生活防水である IPX3 に対応した試験を行った。防水試験装置は図1 に示す。ターンテーブルで試料を回転させ、上 部のシャワーにより試料に向けて降水する。試 験終了後に制御ボックス内に水の浸入がないか を目視により確認する。本試験における試験条 件は表1に示す。

降水量	10L/min
試験時間	1hour
テーブル 回転速度	1rpm

表1. 防水試験条件

2.1.2 防水試験結果

1度目の防水試験を行った際、図2に示すように背 中右側の基板取付用アングルのネジ部穴から水の進入 が確認できた。そのため図3に示す防水ワッシャーを 使い再度防水試験を行った。その結果、水の浸入は認 められなかった。結果を表2に示す。



図1. 防水試験装置





図2. 水浸入部



図3. 防水ワッシャー

表2. 防水試験結果

試験回数	1回目	2回目
防水ワッシャー	使用せず	使用
使用の有無		
水の浸入の有無	制御ボックス右	水の浸入無し
	側基板取付アン	
	グル部から水が	
	浸入	

2.2 繰り返し耐久試験

実環境において腕の振り上げ・振り下ろし動作を連 続的に行う作業や、腕を上げた状態での上向き収穫作 業を模擬した繰り返し耐久試験を行った。

2.2.1 繰り返し耐久試験装置および条件 繰り返し耐久試験の装置は図 4 に示す。AC サーボ モーターで駆動する腕モデルをパワーアシストスーツ に取り付け、強制的に繰り返しトルクを印加する。繰 り返し耐久試験の条件は図5に示す。左側は振り上 げ・振り下ろし動作で、10万サイクル行う。右側は 一定時間一定トルク状態を保持する動作(上向き収穫 作業)で約4000 サイクル行う。腕の振り上げ・振り 下ろし動作は、1000回、3000回、5000回、10000回、 20000 回、40000 回、80000 回、100000 回毎に、関節 部のガタや変形・破損等の外観検査、パワーアシスト スーツの駆動トルクや関節角度の確認を行い、使用上 問題がないかを検証する。一定時間一定トルク状態を 保持する動作は、240回毎に、関節部のガタや変形・ 破損等の外観検査、パワーアシストスーツの駆動トル クや関節角度の確認を行い、使用上問題がないかを検 証する。



図4. 繰り返し耐久試験装置



図5. 繰り返し耐久試験条件

2.2.2 繰り返し耐久試験結果

表3に繰り返し耐久試験結果を示す。表3上は振り 上げ・振り下ろし動作の結果、下は一定時間一定トル ク保持動作の結果を示す。どちらの場合も使用上問題 となる異常は見られなかった。よって本試験の使用回 数における使用は問題ないことが検証できた。ただし 本試験の範囲は1年から2年程度の使用を想定してお り、さらなる長期の使用においては、引き続き耐久試 験を行い検証する必要がある。

表3. 繰り返し耐久試験結果

振り上げ・振り下ろし動作

繰り返し回数	ガタの有無	変形の有無	駆動トルク	関節角度
1000	無し	無し	正常値	正常値
3000	黒	無し	正常値	正常値
5000	無し	無し	正常値	正常値
10000	無し	無し	正常値	正常値
20000	黒	無し	正常値	正常値
40000	黒	無し	正常値	正常値
80000	無し	無し	正常値	正常値
100000	無し	無し	正常値	正常值

一定時間一定トルク保持動作

繰り返し回数	ガタの有無	変形の有無	駆動トルク	関節角度
240	無し	無し	正常値	正常値
480	無し	無し	正常値	正常値
720	無し	無し	正常値	正常値
960	無し	無し	正常値	正常値
1200	無し	無し	正常値	正常値
1440	無し	無し	正常値	正常値
1680	無し	無し	正常値	正常値
1920	無し	無し	正常値	正常値
2160	無し	無し	正常値	正常値
2400	無し	無し	正常値	正常値
2640	無し	無し	正常値	正常値
2880	無し	無し	正常値	正常値
3120	無し	無し	正常値	正常値
3360	無し	無し	正常値	正常値
3600	無し	無し	正常値	正常値
3840	無し	無し	正常値	正常値

※駆動トルク、関節角度の正常値とは、正常の範囲内で動作していることを示す。

2.3 恒温恒湿試験

夏場などの高温多湿環境や、冬場の低温環境などで の使用を模擬するため、恒温恒湿試験機の中でパワー アシストスーツを駆動させる、恒温恒湿試験を行った。 2.3.1 恒温恒湿試験条件

高温多湿環境として 50℃90%、冬場の低温環境とし て 5℃を設定した。パワーアシストスーツの駆動条件 は、繰り返し耐久試験で行った、腕を上げた状態を模 擬した一定時間一定トルク保持動作で行った。試験時 間は、バッテリー限界である2時間とした。パワーア シストスーツのトルク等をモニタリングし、異常が生 じないか検証した。また、パワーアシストスーツ表面 温度の測定に熱電対を用い、異常な温度上昇がないか 検証した。温度測定位置は図6に示すように、(a)、 (b)、(c)の3点である。



図6. 温度測定位置

2.3.2 恒温恒湿試験結果

恒温恒湿試験結果を表4に示す。高温多湿環境 (50°C90%)、低温環境(5℃)とも、恒温恒湿試験後 の確認では、駆動トルク・関節角度の軌道に変化は生 じなかった。しかしながら試験終了後の各測定位置で の温度は、高温多湿環境(50°C90%)時においては、 最もモーターに近い位置であるモーターブラケット板 (a)の温度が 83.7℃まで上昇することがわかった。こ の位置は低温環境(5℃)でも 52.4℃まで上昇する。こ れらの温度においてもパワーアシストスーツが異常動 作を起こさないことが検証できた。しかしながら、夏 場など温度の高い状態では、ユーザーも肌を露出する ため、ユーザーが直接触れないような検討が必要であ ると考えられる。

<u>我</u> 4.1	旦(皿)旦(亚)砂(砂	や小口/下
試験条件	50°C90%	5℃
ガタの有無	無し	無し
変形の有無	無し	無し
駆動トルク	正常値	正常値
関節角度	正常値	正常値
温度(a)	83. 7°C	52. 4°C
温度(b)	68. 8°C	35. 4°C
温度(c)	59.8°C	24.7°C

表4.恒温恒湿試験結果

3. まとめ

本年度においては、安全性評価に必要な実用化のた めの環境試験を実施した。今後は下肢のパワーアシス トスーツに関しても同様の試験を行う。

なお本研究は、農林水産委託プロジェクト研究「農 作業の軽労化に向けた農業自動化・アシストシステム の開発」(農業用アシストスーツの開発)にて実施し ている。

脱レアメタルを指向した芳香族系化合物の 効率的構造変換反応の開発

(化学産業部) 多中良栄、森 一、三宅靖仁

1. 緒言

パラジウムやニッケル、銅などの遷移金属は、それ ぞれの金属の特異な触媒活性を活かし、各種有機合成 反応に幅広く使われている。しかし、これらの金属は 希少元素であるため、元素戦略の一つとして「貴金属 触媒の卑金属触媒への代替」が検討されている。卑金 属触媒なかでも鉄は、豊富な埋蔵量を誇り、低価格、 低毒性でもあるなど、環境調和型の触媒として注目さ れている金属の一つである。

近年、鉄を触媒として用いた合成反応も各種開発されてきており、例えば中村らは芳香族グリニア試薬と ハロアルカンのクロスカップリング反応を報告している¹⁾。今回、我々は県内企業が製造する芳香族化合物 群に対応しうる効率的構造変換反応の検討として、鉄 触媒を用いた上記クロスカップリング反応の検討を 行った。本報告では、反応の簡便化、効率化の観点か ら検討を行った結果について報告する。

2. 実験方法

中村らの報告に従い、以下の方法で実験を行った。

2.1 反応溶液の調製

0.1M 塩化鉄(III) THF 溶液は、無水塩化鉄(III) (81mg, 0.5mmol)をアルゴン雰囲気下で脱水 THF (5mL) に溶解し 調製した。1.0M グリニア試薬・TMEDA THF 溶液は、ア ルゴン雰囲気下で 1.0M グリニア試薬 THF 溶液 (10.8mL) に、TMEDA(テトラメチルエチレンジアミ ン)(1.6mL, 10.8mmol)を加えて調製した。

2.2 合成方法(シクロヘキシルベンゼンの合成)

アルゴン雰囲気下、ブロモシクロへキサン(61 μL, 0.5mmol)の脱水 THF (3mL)溶液を氷冷し、0.1M 塩化鉄 (III) THF 溶液(0.25mL, 0.025mmol)を加えた。続いて 氷冷下、1.0M フェニルマグネシウムブロマイド・ TMEDA THF 溶液(0.6mL, 0.6mmol)を、ゆっくり滴下し その後、氷冷下で30分間撹拌した。

氷冷下、塩酸(0.1M, 5mL)を滴下して反応を終了し、 通常の後処理を行い、油状物を得た。

3. 結果と考察

3.1 溶媒や空気の影響

フェニルマグネシウムブロマイドとブロモシクロへ キサンとの反応を行ったところ、文献通り¹⁾、ほぼ定 量的に反応が進行することが確認できた。この反応に おいて、反応雰囲気や反応温度、溶媒を変えて検討を 行った(表1)。

空気下で反応を行ったところ、カップリング生成物 は全く得られなかった。また、反応を室温で行うと、 収率は70%にまで低下した。反応溶媒をTHFからCPME (シクロペンチルメチルエーテル)に変えても、反応は 84%と良好な収率で進行することが確認できた。

表1. 溶媒や空気の影響			
MgBr +		at. FeCl ₃ ► MEDA	
atomospher	temperature	solvent	yield
argon	0°C	THF	100 %
air	0°C	THF	0 %
argon	室温	THF	70 %
argon	0°C	CPME	84 %

3.2 水分の影響

脱水 THF に表2に示すような割合の水をそれぞれ添加して反応を行った。その結果、添加量に応じて収率は低下するものの、水分量が100ppm程度であれば大きな収率の低下は起こらないことが明らかとなった。厳密な禁水条件は必ずしも必要ではないことから、簡便な合成反応としての利用が期待される。

表2. 水分量の影響



4. まとめ

今回、塩化鉄(Ⅲ) 触媒を用いた芳香族グリニア化合物とハロアルカンとのクロスカップリング反応における、反応に対する温度や水分量などの影響について明らかにした。今後、本反応におけるグリニア試薬や TMEDAの使用量削減などに取り組む予定である。

参考文献

Nakamura, Masaharu et al., J. Am. Chem. Soc., 2004, 12
 p. 3686-3687

カーボンニュートラルを目指した有機 EL 素材の開発

(化学産業部) 三宅靖仁、森 めぐみ、多中良栄、森 一、小畑俊嗣
 (電子産業部) 竿本仁志、森 岳志
 (株式会社日本化学工業所) 井上 要、越谷猛史、青木康典

1. 緒言

有機L 素子は低電圧で駆動可能な発光デバイスであ り、さらに自発光型で視野角が広く、かつ薄型化や軽 量化が可能であるという特徴を有する¹⁾。そのため、 次世代ディスプレイや照明用途向けとして注目され、 精力的に研究が行われてきた。このような有機LL 素子 の発光層として、様々な材料の開発も行われてきたが、 現在も発光効率や耐久性のさらなる向上を目指し開発 が進められている。一方、こうした先端技術産業にお いても「地球温暖化ガス」の削減は重要課題であり、 日本が掲げる高い削減目標を達成するためにはカーボ ンニュートラルであるバイオマスを有効に活用するこ とが将来的に必要不可欠な技術となってくる。

現在上市されている有機 EL 発光層用材料には様々な 種類が存在するが、いずれも「芳香環」と呼ばれる部 位を持つという共通点がある。芳香環を有する材料は、 一般的に紫外線を吸収することで「蛍光」を発する材 料としても知られ、特に固体状態でも蛍光を発するよ うな材料は、有機 EL の発光層用材料としても有望であ るとされている。そこで、「芳香環」を有する天然由 来の材料を原料として、まず固体状態で蛍光を発する ような材料の開発を行い、次いで有機 EL 素子の発光層 用材料としての可能性を探った。

2. 実験

原料となる天然由来芳香族化合物の条件として、

- ・単一成分であること
- ・大量に製造されていること

が挙げられる。これらは、品質にムラがなく、かつ安 定供給する上で必要不可欠な条件である。

本研究ではこうした条件を満たす天然化合物として、 和歌山県内において年間数十トンレベルで生産されて いる「フェルラ酸」に着目し、それを原料として有機 EL素材の開発を行った。フェルラ酸は、芳香環とそれ に連なる二重結合からなる母体に、フェノール性水酸

基、カルボン酸そしてメトキシ基 などの官能基を有するという、非 常にユニークな構造をしている

(図1)。フェルラ酸自体には蛍 光性はほとんど無いが、この構造 を元に分子設計を行い、蛍光性を 有する材料の開発を行った。

得られた材料の蛍光性について 図1. フェルラ酸

орон Сротон は蛍光分光光度計を用いて評価を行い、さらに有機 EL 素子化することにより、有機 EL の発光層用材料として の評価も行った。

3. 結果と考察

フェルラ酸を原料とした誘導体が有機 EL の発光層用 材料として利用可能か否かを判断するため、固体状態 で蛍光を発するフェルラ酸誘導体として、既に報告を 行っている縮合体 A²⁾を用いて発光層用材料としての 性能評価を行った。この縮合体は光励起において発光 の極大を 410nm 程度に有しており、青い蛍光を発する ことが確認されている(図2)。



図2. フェルラ酸縮合体Aの構造およびその蛍光

縮合体Aを PVK(ポリビニルカルバゾール)中に 1wt%添加し、その有機 EL としての評価を行ったとこ ろ、12V・580mA/cm²において青い発光を確認すること ができた。その際の EL スペクトルを測定したところ 400nm 辺りに極大を有しており、これは溶液状態や固 体状態の蛍光スペクトルとほぼ同様であることが明ら かとなった。念のため縮合体Aを添加していない系で も有機 EL 素子化したところ、色度ならびに EL スペク トルが異なっており、今回得られた発光は縮合体A由 来であることが確認できた(図3)。



しかしながら得られた発光は弱く、また耐久性に乏 しいことが分かった。これは励起状態にある縮合体A がそのエネルギーを放出する際、発光以外に失活のパ スが存在することを示している。その原因の1つとし ては、フェルラ酸の構造的特徴である二重結合の存在 が挙げられる。すなわち芳香環に連なる二重結合部分 のシスートランスの異性化ならびに酸化などが原因で構 造が変化し、その結果耐久性に影響が現れると推察で きる。そこで、この二重結合を封鎖した誘導体の設計 を行うこととした。

新規誘導体の設計

縮合体と同様「π共役系の延伸」を設計指針とし、 新規誘導体である「化合物S」の合成を行った(知財 の関係上、構造は割愛)。これらの新規誘導体の蛍光 スペクトルを測定した結果、クロロホルム溶液におい ていずれもグリーンの強い蛍光を示すことが明らかと なった。またその際の吸収ならびに発光スペクトルを 測定したところ、双方共にシャープな吸収ならびに発 光曲線を描いていることがわかった(図 4)。さらに それぞれの分解温度は 350℃程度であり、耐熱性にも 優れた材料であることも確認した。



図4. 化合物Sの吸収ならびに発光スペクトル そこで、この化合物を発光層用材料として用いて有 機 EL 素子化し、その性能について評価を行った(図 5)。その結果、化合物Sを発光層用材料として用い ることで「黄色」のEL 発光が得られることが明らかと なった。EL スペクトルからはその発光極大が 535nm で あることが示されており、クロロホルム溶液中で得ら れた 530nm と比較して若干長波長側にシフトしている



図5. 化合物Sを用いた有機EL素子ならびにその発光

ことがわかった(図6)。また、発光強度は 1645Cd/m² (16.0V, 738mA/cm²)であった。





図6. 化合物Sの a) EL スペクトルおよび b) 色度図

4. まとめ

以上のように、カーボンニュートラルを目指し、バ イオベースマテリアルであるフェルラ酸を原料として 各種誘導体の設計ならびに合成を行った。その結果、 有機 EL 発光層用素材として必要な、「固体状態で蛍光 を発する」材料を開発することに成功した。また有機 EL 素子化により、いくつかの化合物については発光層 用材料として有望であることも明らかとした。その際 の発光色は、有機 EL 素材として需要の高い青色および 黄色であることも分かった。特に黄色は、近年、モニ ター用カラーフィルターとして、赤(R)緑(G)青 (B)の3原色に4色目として黄色(Y)を加えた液晶 テレビが発売されるなど、需要が高まってきている色 である。

参考文献

- (a) Tang, C. W.; VanSlyke, S. A., Appl. Phys. Lett., 1987, 51(12), p. 913-915.
 (b) 細川地朝ほか、特許2651233 号
- 2) (a) 三宅靖仁ほか、特開 2009-209120. (b) 三宅靖仁ほか、 特開 2010-229215.

新規紫外線吸収ポリマー微粒子の製造技術開発

(化学産業部) 森 一、宮崎 崇、森 岳志、大崎秀介
 (生活・環境産業部) 山下宗哲
 (近畿大学生物理工学部) 仲 幸彦
 (新中村化学工業株式会社) 伊豫昌己、高田浩平、山田浩平

1. 緒言

高分子微粒子は医療関係(診断検査薬)、化粧品、 途料、コーティング剤、電子写真用トナーなど様々な 分野で利用されており、活発に研究開発が進められて いる材料の一つである。一般的に高分子微粒子の作製 のためには重合方法に工夫が必要で、従来は懸濁重合 や乳化重合、分散重合などの方法を利用して合成され てきた。これらの方法の場合、分散安定剤、界面活性 剤など溶液中で微粒子を安定化させるための添加剤の 利用が必須で、製品中にこれらの添加剤が残留するこ とが問題となる場合もある。また微粒子安定化の反応 条件が限定されるという課題も存在する。これまでに 近畿大学の仲准教授らは特定のモノマーが特定の溶媒 中で熱分解性ラジカル開始剤のみで微粒子を形成する ことを見いだしている 1)。本方法によれば余計な添加 剤を加えることなく、比較的単純な操作で微粒子を作 成することができる。そこで本報告では上記の方法を 利用した紫外線吸収性高分子微粒子の簡便な製造方法 の確立とその機能性の明確化を目的に共同研究を行っ た結果について、特に工業技術センターで実施した内 容を中心に報告する。

2. 実験方法

すでに平成21年度工業技術センター研究報告でフェ ルラ酸部を紫外線吸収部位として有する新規なアクリ レートモノマーの開発を報告している²⁰。今回、先に 開発した紫外線吸収性モノマー等を共重合モノマーに 用いた新規紫外線吸収性微粒子の作製の検討を行った。 尚、微粒子製造条件の詳細な検討は近畿大学で、一方 紫外線吸収性モノマーの安定的な製造方法および微粒 子のスケールアップ合成の検討については新中村化学 工業(株)にて別途検討が行われた。

本研究において、工業技術センターは近畿大学で開発された方法に基づき、中程度(数g~数+g)のスケールで主モノマーであるジエチレングリコールジメタクリレート (2G)と図1に示すモノマーA及びモノマーBとの共重合微粒子の作製について検討した。

具体的には100mLもしくは500mLの反応容器にモノマーの酢酸エチル溶液を入れ恒温槽で30分程度保持した。その後ラジカル重合開始剤(Dimethyl 2,2'azobis(2-methylpropionate))を加え撹拌し、恒温槽 に戻し重合反応を行った。反応終了後、メンブレン フィルターで微粒子を濾別し、得られた微粒子を減圧 乾燥することで目的とする微粒子を得た。



主モノマー2Gに対するモノマーA、モノマーBの割 合(2G:A or B = 9:1、19:1)および合成ス ケールなどについていくつか検討を行ったが、近畿大 学での検討の結果通り、共重合モノマーA、Bの割合 が高くない系では中スケールでの検討でも問題なく微 粒子が得られた(収率80~90%程度)。

3. 結果と考察

続いて生成した微粒子の形状について走査型電子顕 微鏡観察を行った結果を以下に示す。

既に報告されている 2G (図2) と同様にモノマー A (図3)、モノマーB (図4)を共重合させた場合 でも微粒子の形成が確認できた。また粒子の粒径も比 較的そろっているものが多く、本製造方法により非常



図2.2G から合成した微粒子



図3.2G:モノマーA(9:1)から合成した微粒子



図4.2G:モノマー B(9:1) から合成した微粒子

に均一性の高い粒子が得られていることが明らかと なった。さらにモノマーBを用いた際に、2Gのみ及び、 モノマーAを共重合モノマーに用いた場合より若干微 粒子の粒径が小さくなる傾向がみられ、粒子径の制御 の可能性が示唆される結果が得られた。

続いて微粒子の粒径分布の様子について、レーザー 回折式粒度分布測定装置を用いて検討した。測定は、 微粒子を濃度0.2重量%の中性洗剤水溶液中に分散さ せ、超音波処理を実施した後に、レーザー回折式粒度 分布測定装置(島津製作所社製 SALD-3100)を用い て測定した。測定に用いる屈折率の値は、1.60(実数 部)、0.00(虚数部)とした。2Gおよび2Gとモノ マーA或いはモノマーBから製造した微粒子について の測定結果を以下に示す。粒子径に関しては上述の SEM 観察と相違ない結果が得られた。また粒径分布に 関しても比較的分布が小さく、粒子径が揃った微粒子 が得られていることが改めて確認できた。

$1.08 \pm 0.13 \mu$ m	(2Gのみ)
2.55 \pm 0.08 μ m	(2G:モノマーA = 9:1 仕込)
$0.55 \pm 0.09 \mu m$	(2G:モノマーB = 9:1 仕込)

微粒子の機能性の確認のため、作製した微粒子の紫 外線吸収能力の確認を行った。測定は島津製作所(株) 製 UV-2550 で積分球付装置 ISR-240A を用いて、反 射モードで行った。測定結果を図5に示す。モノマー



図5. 合成した微粒子のUV スペクトルの比較

A、Bを配合した場合はいずれの場合も、元の紫外線 吸収ユニット(フェルラ酸部位)に起因する光(300-360nm)を吸収しており、微粒子内に間違いなく紫外線 吸収部位が組み込まれていることが明らかとなった。

製造した微粒子の特徴を把握するため、微粒子の物 性評価を実施した。本報では特に化粧品への応用を意 図して行った評価結果について報告する。

化粧品に用いられる微粒子の場合、直接肌に触れる ことから触感として肌触りの滑らかさが求められる。 肌触りの指標として、微粒子が塗布された基材の動摩 擦係数の評価を行った。基材としてはビューラック社 製バイオスキン(化粧品評価用人工皮膚)を用いた。 測定は図6に示す装置を作成し、微粒子を充分量(20 cm² あたり 0.2g)塗布した基材上で、直径 2фのバイオ スキン上に 50g の錘を乗せ、試験速度 300mm/min で 測定を行った。



図6. 動摩擦力の測定試験の模式図

測定結果を表1に示す。基材(バイオスキン)の動 摩擦力は 0.8~1N 程度であったことから、基材上に微 粒子を塗布することでいずれの場合も動摩擦力が小さ くなり、滑らかさが向上していることが判る。また比 較例の化粧品向けの酸化チタン微粒子と比べると、今 回合成した微粒子のいずれの場合も動摩擦力が小さく なっており、より肌触りが向上した化粧品として応用 が期待される結果が得られた。

表1. 動摩擦力の測定の結果

	動摩擦力(N)	SD
2G	0.03	0.011
2G/モノマ-A (仕込比9/1)	0.05	0.009
2G/モノマーB (仕込比9/1)	0.06	0.012
 微粒子 (X社化粧品向 け酸化チタン) 	0.25	0.025

4. まとめ

フェルラ酸部を紫外線吸収部位として有する新規ア クリレートモノマーを用いた紫外線吸収性の微粒子の 製造に成功した。今後上記の特徴などを活かしつつ、 商品開発を進めていく予定である。

<謝辞> 本研究は平成 23 年度 (公財) わかやま産業振興財 団 新連携共同事業 により実施されたものである。 参考文献

 1)仲 幸彦、大嶋 威之、宮武 繁、特許4851799
 2)森 一、細田朝夫、三宅靖仁、多中良栄、大崎秀介、小畑 俊嗣、保田真吾、山田浩平、太田康二、伊豫昌己、栢木 實、 築野卓夫、藤田宗紀、谷口久次、和歌山県工業技術センター平 成21年度研究報告、pp 4-5.

ウヤクの指標成分 Laurolitsine の標準物質としての 調製とその品質評価

(薬事開発部) 石原理恵、高松 朗、則藤真理子、入野眞一(独立行政法人医薬基盤研究所) 川原信夫

1. 緒言

天台烏薬(ウヤク)は、 *Lindera strychnifolia* Fernandez–Villar (*Lauraceae*) の根を基原とする生薬 であり、アポルフィン型アルカロイドである Laurolitsine が含まれている¹⁾。ウヤクは、第14 改 正日本薬局方第二追補(平成17年1月)より、日本薬 局方(以下、日局)に収載され、Laurolitsine を指標 成分とする薄層クロマトグラフィーによる確認試験が 設定されている²⁾。

一方、和歌山県新宮市高田地区では、徐福伝説に基づき、昭和61年から天台烏薬を利用した和漢薬産業創作事業が実施され、現在、18ha で約20万本の天台烏薬が栽培されている。

我々は、これまでに新宮産天台烏薬の根の品質評価 を実施してきた³³。本研究では、新宮産の根を用い Laurolitsine の抽出方法を確立した。さらに抽出した Laurolitsine が「ウヤク」の確認試験用標準品として 利用可能であることを実証した⁴。

2. 実験方法

2.1 天台烏薬の根

和歌山県新宮市高田地区で栽培されている天台烏薬の根を水洗いし、乾燥したものを用いた。

2.2 試薬及び試液

Laurolitsine の分離精製において、カラム精製のシ リカゲルは、Wakosil C-300 (40~60µm, 球状) (和 光純薬工業(株)製) を用いた。

品質評価において、核磁気共鳴スペクトル(Hー及 び¹³C-NMR)の測定は、重水素化ジメチルスルホキシ ド (DMSO-d, CIL 社製)を溶媒として用い、TMS を基 準物質として測定を行った。水分測定用試液には林純 薬工業(株)製を用い、残留溶媒測定の標準品にはクロ ロホルム標準液(1 mg/mL メタノール溶液、水質試験 用)(和光純薬工業(株)製)、酢酸エチル(試薬特 級)、メタノール(試薬特級)を、希釈溶媒には残留 溶媒試験用または残留農薬試験用を用いた。また、高 速液体クロマトグラフィーによる純度試験では、液体 クロマトグラフィー用試液を用いた。

「ウヤク」確認試験の薄層クロマトグラフィーの薄 層板はSilica gel 60 (メルク社製)を用いた。

Boldine はシグマ社製を用い、その他の試薬及び溶 媒は市販特級品を用いた。 2.3 装置

天秤:メトラー社製 AB204、核磁気共鳴スペクトル 測定装置:Bruker 社製 AVANCE400、飛行時間型質量分 析装置 (イオン化;ESI) : PerSeptive Biosystems 社 製 Mariner、高分解能質量分析装置 (HRMS, イオ ン化;ESI) : Applied Biosystems 社製 QSTAR-XL、旋 光度計:(株)堀場製作所製 SEPA200、微量水分測定装 置:京都電子工業(株)製 MKS-510N、パックドカラム 用ガスクロマトグラフ:(株)島津製作所製、キャピラ リーカラム用ガスクロマトグラフ:アジレント・テクノ ロジー社製、紫外可視分光光度計:(株)島津製作所製 UV-2550、フーリエ変換赤外分光光度計:(株)島津製作 所製 IRPrestige-21、高速液体クロマトグラフ:(株) 島津製作所製、真空乾燥機:東京理化器械(株)製 VOC-300、恒温恒湿器:(株)いすゞ製作所製 λ-202R

2. 4 Laurolitsine の分離精製

天台烏薬の根(以下、ウヤク)の皮にヘキサンを加 えて、室温で2日間脱脂後、吸引ろ過し、残留物を真 空乾燥した。残留物にアンモニア試液及び酢酸エチル を加えて激しく振り混ぜた後、遠心分離して酢酸エチ ル層を分取し、減圧下で溶媒留去し、真空乾燥した後、 酢酸エチル抽出物を得た(ウヤクの皮 540g からの総収 量23g)(図1-1)。





図1-2. ウヤクの皮からのLaurolitsineの精製(2)

その酢酸エチル抽出物をカラム精製により精製し、 Laurolitsine 粗結晶を得た(ウヤクの皮 540g からの 総収量6 g)(図1-2)。

得られた Laurolitsine 粗結晶の核磁気共鳴スペクト ル (Hー及び 13 C-NMR)を測定した結果、文献値 50 と一 致した。さらに、ESI-TOF/MS スペクトル測定で分子量 の確認を行った結果、positive mode で m/z 314 [M+H]⁺が検出され、negative mode では m/z 312 [M-H]⁻が検出された。

得られた粗結晶に 20%塩酸を加えて、加温して溶解 させた。さらに、この溶液を熱時ろ過して、ろ液を 5℃にて一昼夜放置し、再結晶させた。得られた結晶 をろ別し、真空乾燥して、Laurolitsine 塩酸塩を得た (粗結晶からの収率84%) (図2)。



図2. Laurolitsine 粗結晶から Laurolitsine 塩酸塩の精製

2. 5 Laurolitsine 塩酸塩の構造確認

得られた Laurolitsine 塩酸塩の核磁気共鳴スペクト ル(Hー及び¹³C-NMR)及び精密質量測定を行い、構 造確認を行った。

2. 6 Laurolitsine 塩酸塩の品質評価

得られたLaurolitsine 塩酸塩について、「ウヤク」 確認試験用標準品としての品質評価を行うため、日局 の通則及び一般試験法に準じて、性状、旋光度、水分 含量、強熱残分、残留溶媒、紫外可視吸収スペクトル、 赤外吸収スペクトル、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)による純度試験について試験を行った。

2. 6. 1 残留溶媒測定

酢酸エチル及びメタノールの測定は、本品を N, Mジ メチルホルムアミド (DMF) に溶解し、10mg/mL となる ように試料溶液を調製して行った.別に、酢酸エチル の濃度が 0.5µg/mL となるように、また、メタノール の濃度が 2 µg/mL となるように、各標準溶液を調製し た。各標準溶液及び試料溶液 2 µL につき、次の条件 でガスクロマトグラフィーにより試験を行い、ピーク 面積を自動分析法により測定した。

検出器:水素炎イオン化検出器

カラム: Gaskuropack 54 (ジーエルサイエンス(株) 製、3 mm i.d. ×3.0m) カラム温度:

- 酢酸エチル;注入後 10 分間 180℃に保ち、200℃ま で毎分 20℃で昇温し、次いで 30 分間 200℃に保つ。
- メタノール;注入後10分間90℃に保ち、200℃ま で毎分20℃で昇温し、次いで30分間 200℃に保つ。

注入口温度:220℃

検出器温度:240℃

キャリヤーガス:窒素

クロロホルムの測定は、本品をメタノールに溶解し、 2 mg/mL となるように試料溶液を調製して行った。別 に、クロロホルムの濃度が、0.2µg/mL となるように標 準溶液を調製した。標準溶液及び試料溶液1 µL につ き、次の条件でガスクロマトグラフィーにより試験を 行い、ピーク面積を自動分析法により測定した。

検出器:電子捕獲検出器

注入方法:スプリット注入法(スプリット比1:20)

カラム: HP-5 (アジレント・テクノロジー社製、

0.32mm i.d.×30m、膜厚 0.25µm)

カラム温度:40℃

注入口温度:200℃

検出器温度:250℃

キャリヤーガス:ヘリウム

2. 6. 2 純度測定 (HPLC法)

本品約10mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に10mL とした。この液1 mL を正確に量り、メタノールを加えて正確に10mL とし試料溶液とした。試料溶液5 μL につき、次の条件①または②で液体クロマトグラフィーにより試験を行った。試料溶液の各々のピーク面積を自動分析法により測定した。

試験条件①

検出器:フォトダイオードアレイ検出器

カラム:YMC-Pack ODS-AM AM-302 ((株)ワイエム シィ製、4.6mm i.d.×150mm、5 µm)

カラム温度:40℃付近の一定温度

- 移動相:1液;水/アセトニトリル/リン酸混液 (900:100:1)
 - 2液;水/アセトニトリル/リン酸混液 (100:900:1)

1液を5分間流した後、その後25分間で

2液が 100%になるようにグラジェントし、
 更に2液を10分間流す。

流量:1.0mL/分

試験条件2)

- 検出器:フォトダイオードアレイ検出器
- カラム:YMC-Pack ODS-AM AM-302 ((株)ワイエム シィ製、4.6mm i.d.×150 mm、5 μm)

カラム温度:40℃付近の一定温度

移動相:リン酸二水素カリウム 1.36g を水に溶かし て 500mL とした液/アセトニトリル混液 (87:13)

流量:1.0mL/分

2. 7 安定性試験

本品を次の各保存条件により保存し、安定性試験を 実施した。①真空 ②室温 ③室温遮光 ④室温遮光 シリカゲル(デシケータ) ⑤冷蔵(5℃) ⑥冷凍 (-25℃) の条件下で保存し、開始時及び1、2、3、 6ヶ月経過時に、HPLC にてピーク面積を測定し、開始 時のピーク面積に対する各ピーク面積の割合(%) を 算出した。試料溶液の調製法は、2.6.2による。試

験条件は、以下のとおりである。 検出器:フォトダイオードアレイ検出器

- 測定波長: 302nm
- カラム: Shim-pack vp-ODS ((株)島津製作所製 4.6mm i.d.×150mm、5 µm)

カラム温度:40℃付近の一定温度

- 移動相:リン酸二水素カリウム 1.36g を水に溶かし て 500mL とした液/アセトニトリル混液 (87:13)
- 流量:Laurolitsine のピークが約8分となるよう調 整する。
- 2.8 Laurolitsine 塩酸塩を標準品として用いた 「ウヤク」確認試験

本品 10mg をエタノール (99.5) 0.5mL に溶かし、標 準溶液Bとした。また、Boldine 10mg をエタノール (99.5) 0.5mL に溶かし、参照溶液Aとした。「ウヤ ク」確認試験の項にしたがい、試料溶液を調製した (中国産3ロット 試料溶液C、D、E、新宮産3 ロット 試料溶液F、G、H)。試料溶液(C、D、 E) 20 μ L、試料溶液(F、G、H) 10 μ L、標準溶液B 5 μ L 及び参照溶液A 5 μ L につき、「ウヤク」確認 試験の項にしたがい、薄層クロマトグラフィーを実施 した。

3. 結果と考察

3.1 Laurolitsine 塩酸塩の構造確認

核磁気共鳴(H−及び¹³C−MR)で測定を行い、構造式の確認を行った(表1)。

また、HRMS の測定結果より、精密質量 314.1392 (C₁₈H₂₀NO₄[M+H]⁺、理論値 314.1387) が得られた。さら に、本品の水溶液に硝酸銀試液を加えると、白色の沈 殿を生じた。

これらの結果から、本品はLaurolitsine 塩酸塩であることを確認した。

表1. Laurolitsine 塩酸塩の¹H-及び¹³C-NMR スペクトル

¹ H-NMR ¹)			¹³ C-NMR ²⁾	
position	chemical shift (multiplicity)		position	chemical shift
			C-1	143.4
			C-la	126.6
			C-1b	126.6
			C-2	150.7
H-3	6.65	(s)	C-3	114.4
			C-3a	119.7
H-4	2.99	(2H, m)	C-4	24.6
H-5	3.30	(2H, m)	C-5	40.1
H-6a	4.13	(m)	C-6a	51.9
H-7	2.85	(2H, m)	C-7	32.3
			C-7a	122.2
H-8	6.76	(s)	C-8	115.2
			C-9	146.4
			C-10	146.5
H-11	7.90	(s)	C-11	112.0
			C-11a	126.3
H-1-OMe	3.60	(3H, s)	C-1-OMe	59.4
H-10-0Me	3.79	(3H, s)	C-10-OMe	55.7
H-2-0H	9.50	(s)		
H-0-0H	0 30	(e)		

1) 1 H-NMR Spectrum was measured at 400 MHz, in DMSO- d_{6}

2) 13 C-NMR Spectrum was measured at 100 MHz, in DMSO- d_6

3. 2 Laurolitsine 塩酸塩の品質評価

3. 2. 1 性状

性状については、肉眼観察により、「灰白色~灰褐 色の結晶性の粉末である」とした。溶解性は、水に極 めて溶けやすく、エタノール(99.5)に溶けやすく、

メタノールに溶けにくいことが分かった。

3. 2. 2 旋光度、水分含量及び強熱残分

本品約 100mg を精密に量り、メタノールに溶かして 正確に 20mL とし、旋光度を測定した結果、 $[\alpha]^{35}$ +124°であった。また、水分含量は 4.1%であった。 更に強熱残分は 0.20%以下であった。

3. 2. 3 残留溶媒

ウヤクの皮からの分離精製に使用した溶媒(クロロ ホルム、酢酸エチル、メタノール)の本品中への残留 について検討した結果、すべて0.02%未満であった。

3. 2. 4 紫外可視吸収スペクトル

本品をメタノールに溶かしてメタノール(1→ 10000)溶液となるよう濃度を調製し、試料溶液とした。得られたチャートを図3に示した。



図3. Laurolitsine 塩酸塩の紫外可視吸収スペクトル

3. 2. 5 赤外吸収スペクトル 得られたチャートを図4に示した。



図4. Laurolitsine 塩酸塩の赤外吸収スペクトル

3. 2. 6 純度測定 (HPLC法)

試験条件①、②いずれにおいても、測定波長: 220nm、254nm、302nm で溶媒ピークを除く主ピーク以 外のピークの面積合計は、全体の1%に満たなかった。 代表的なクロマトグラムを図5に示した。



3.3 安定性試験

各保存条件により保存し、安定性試験を実施した結 果、①~⑥のいずれの保存条件でも、6ヶ月後まで 96%以上の残存率を示したが、遮光・乾燥(シリカゲ ル)保存では残存率は 100.6%で、Laurolitsine 塩酸 塩の保存条件として、最適であることがわかった(図 6)。



- ▲ (3)at room temperature, protection from light
- -**--**(4)at room temperature,protection from light in the presence of silica gel -**O**-(5)at 5°C
- ____(6)at -25℃

図6. 各種保存条件による Laurolitsine 塩酸塩の残存率の推移

 4 Laurolitsine 塩酸塩を標準品として用いた日 局「ウヤク」確認試験

薄層クロマトグラフィーでは、Af 値 0.40 付近の Laurolitsine のスポットに比べ、Af 値 0.55 付近の Boldine のスポットの方が発色しやすいため、標準品 を用いない現在の日局では、Laurolitsine の判別が困 難な場合がある。これに対して Laurolitsine 塩酸塩を 標準品として使用する本法では、Laurolitsine をより 正確に判別できることが分かった(図7)。



図7.得られた Laurolitsine 塩酸塩を標準物質として 用いた「ウヤク」確認試験

4. まとめ

天台烏薬の根の皮から、Laurolitsine を抽出し、塩酸塩として精製することができた。得られた Laurolitsine 塩酸塩の品質評価の結果より、「ウヤ ク」確認試験用標準品として十分な品質を有している ことがわかった。更に、「ウヤク」の確認試験に用い たところ、従来の方法に比べてより正確な判別ができ、 確認試験法への応用が可能であると考える。また、今 回精製したLaurolitsine 塩酸塩は、水分含量を測定し ておき、脱水物に換算すれば、定量用標準品としても 用いることができる可能性を見出した。現在、得られ た Laurolitsine 塩酸塩を標準品として、ウヤク中の Laurolitsine の定量法を検討中である。

参考文献

- 1) 富田真雄ほか 薬学雑誌 1969, 89(5), p. 737-740
- 2) 厚生労働省 第15改正日本薬局方 平成18年3月31日厚 生労働省告示第285号
- 3) 石原理恵ほか 第127 年会日本薬学会要旨集4 2007, p.46
- 石原理恵ほか 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2011, 42(8), p. 714-722
- 5) Stadler, R., Kutchan, T-M., Zenk, M-H. : *Phytochemistry*, 1989, 28 (4), p. 1083-1086

和歌山県工業技術セ	ンター研究報告(平成 23 年度)		
	平成 25 年 2 月		
編集・発行	和歌山県工業技術センター		
	和歌山市小倉 60		
	TEL (073) 477-1271		
	FAX (073) 477–2880		
印刷所	株式会社おかだプリント		
	TEL (0738) 22-2092		
	FAX (0738) 24-2131		



WINTEC

未来に結ぶ技術の架け橋 和歌山県工業技術センター