

# 膝島研究所の令和3年度プロジェクト概要

膝島研究所長 岩 本 隆 宏

## はじめに

膝島研究所では、独自の細胞移植技術や分子生物学的手法を駆使して、マウスならびにヒト膝島について、インスリン産生 $\beta$ 細胞の機能、障害、制御および再生に関する基盤的研究を行い、その成果を基に糖尿病の根治的治療法の開発を目指している。現在推進している具体的なプロジェクトは、「膝 $\beta$ 細胞制御におけるイオン輸送体の役割解明とその治療応用」ならびに「免疫抑制剤を用いない拒絶反応の新規制御法開発」の2つである。本稿では令和3年度における両プロジェクトの進捗状況について紹介する。

# 膵β細胞制御におけるイオン輸送体の役割解明とその治療応用

これまでの研究成果として、膵β細胞には1型  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体 (NCX1) が豊富に発現していること、また、この NCX1 を介する  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷が膵島移植直後の虚血性膵β細胞障害に重要な役割を果たすことをマウス同種同系膵島移植実験により明らかにしてきた。さらに、この治療応用へ向けたモデル実験として、NCX1 阻害薬を前処置した膵島細胞では移植早期膵島障害が回避されることをマウス同実験系により実証した<sup>(1)</sup>。しかしながら、臨床応用できる NCX1 阻害薬は現存しておらず(実験試薬のみ)、今後、臨床応用できる NCX1 阻害薬が開発された場合に、膵島移植による糖尿病治療に画期的な進歩をもたらすことが期待された。そこで、本プロジェクトでは NCX1 安定高発現細胞を用いて、市販の既存薬ライブラリーから新規 NCX1 阻害薬のスクリーニングを実施し、数種の候補薬を見出すことに成功した。現在、これら候補薬の NCX1 阻害特性を詳細に解析中である。さらに、膵β細胞特異的な NCX1 コンディショナルノックアウトマウスおよび

NCX1 トランスジェニックマウスを独自に作製して、膵β細胞における NCX1 の機能的役割（インスリン分泌およびβ細胞再生の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル機序）について解析を進めている。

また近年、糖尿病の発症・進行には  $Mg^{2+}$  代謝異常が密接に関係することが示唆されている。そこで、独自に作製した  $Mg^{2+}$  代謝異常モデルマウス ( $Mg^{2+}$  輸送体欠損マウス) を用いた *in vivo/in vitro* 実験により、糖尿病の発症・進行における  $Mg$  代謝異常の病態学的意義の解明にも取り組んでいる。膵β細胞には、種々の  $Mg^{2+}$  輸送体が発現しており<sup>(2)</sup>、インスリン分泌およびβ細胞再生における各  $Mg^{2+}$  輸送体の機能的役割について独創的な研究成果が期待される。

## 免疫抑制剤を用いない拒絶反応の新規制御法開発

移植医療における免疫抑制剤を用いない拒絶反応制御法開発は移植免疫学にとっての究極の目標である。特に近年開発が進められている iPS/ES 細胞より創生した機能性細胞を移植に用いる再生医療では免疫抑制剤の使用により細胞の特性として有する潜在的催腫瘍性が増強する可能性があり、免疫抑制剤を用いない新たな拒絶反応制御法開発が必須となっている。現時点では免疫隔離膜の開発、具体的には免疫隔離膜を装着したデバイスに細胞を封入し皮下に移植する治療法の研究開発が進められている。しかしながら、この方法では移植細胞の生着率が極めて低く、未だ成功には程遠いというのが現状である。通常移植細胞の生存はレシピエントから移植細胞への新生血管によって供給される酸素、栄養素に依存する。一方、免疫隔離膜デバイスを用いる場合、新生血管は免疫隔離膜によって遮断され、デバイス内移植細胞は免疫隔離膜を介した拡散によって供給される酸素、栄養素により生存できる。しかし、デバイス内部の細胞は酸素、栄養素が不十分となり大半

が移植後死滅し、結果として生着率低下、機能不全に陥る欠点があり、これらの課題を解決する新規拒絶反応制御法の開発が切望されている。

今回我々はマウス膵島同種移植の実験系を用いて免疫抑制剤を用いない新たな同種膵島移植拒絶反応制御法を確立、その機序を解明した。この端緒として最初に膵島移植部位を我々が新たに開発した鼠径部皮下脂肪組織内<sup>③</sup>として、移植部位の前処置により免疫抑制剤を使用せずに拒絶反応が制御可能であることを見出した。次に、皮下脂肪組織のどの細胞成分が拒絶反応制御に関与しているのかについて前処置した脂肪組織より単離した同種同系細胞と同種異系膵島を混合し、ドナーとして STZ 糖尿病レシピエントの腎被膜下に移植する実験系で細胞数、細胞の培養条件など多数の因子を検討し免疫抑制剤を用いずに同種移植膵島拒絶反応が制御できる細胞創生の至適条件を見出した。その混合移植によりレシピエントは移植後150日以上正常血糖を示した。加えて、免疫制御能を有する細胞から産生される免疫抑制性サイトカインも同定できた。興味深いことにこの細胞と同種膵島の混合移植により得られた拒絶反応は全身ではなく移植部位に局限した局所免疫不応答により拒絶が制御できていることが判明した。

将来的に、マウスで得られた上記知見の臨床応用には大動物での検証が必要であるが、成功すれば現在開発が進められている iPS/ES 細胞由来インスリン産生細胞を移植に用いる糖尿病の再生医療に画期的成果をもたらすことが期待できる。

## おわりに

「膵β細胞制御におけるイオン輸送体の役割解明とその治療応用」ならびに「免疫抑制剤を用いない拒絶反応の新規制御法開発」の両プロジェクトについて、令和3年度の進捗状況を説明した。次年度は、膵島研究所の最終年度となるが、上述した内容に従って、両プロジェクトをさらに推進して行きたいと考えている。

## 文献

1. Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M, Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K,

Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. Pretreatment of donor islets with the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplant* 13:2154-2160, 2013.

2. de Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Magnesium in man: Implications for health and disease. *Physiol Rev* 95:1-46, 2015.
3. Yasunami Y, Nakafusa Y, Nitta N, Nakamura M, Goto M, Ono J, Taniguchi M. A novel subcutaneous site of islet transplantation superior to the liver. *Transplantation* 102:945-952, 2018.



# 冠動脈 CT 検査を実施した患者における予後と 高比重リポ蛋白量やその機能との関連性

志賀 悠平<sup>1)</sup>、川平 悠人<sup>1)</sup>、井上 寛子<sup>2)</sup>、桑野 孝志<sup>1)</sup>、杉原 充<sup>1)</sup>、  
小川 正浩<sup>3、4)</sup>、朔 啓二郎<sup>5)</sup>、三浦 伸一郎<sup>1、2、4)</sup>

福岡大学医学部心臓・血管内科学<sup>1)</sup>、福岡大学西新病院内科（循環器部門）<sup>2)</sup>、福岡大学医学部臨床検査医医学<sup>3)</sup>、  
福岡大学基盤研究機関「心臓・血管研究所」<sup>4)</sup>、福岡大学医学部総合医学研究センター<sup>5)</sup>

Key words: 冠動脈 CT 検査、冠動脈疾患、高比重リポ蛋白

## はじめに

心臓・血管研究所は、2011年、福岡大学病院において、多くの心臓・血管造影検査、血管形成術、不整脈アブレーション治療、冠動脈バイパス術、弁置換・形成術等が安全・安心に行われた実績により、心血管病の基礎・臨床を包括することを目的に設置された。動脈硬化症、虚血性心臓病、心不全、不整脈、肺高血圧症等の先進的治療技術や治療薬開発を目標にしている。難治性心不全患者への新規デバイス、動脈硬化分子イメージングや治療薬開発、高度な臨床研究の実施、心大血管リハビリテーションの普及など多岐にわたるプログラムを推進している。

これらのプログラムの中で、これまで心臓・血管造影検査として実施した冠動脈 CT 検査によって診断された冠動脈疾患 (CAD) の有無やその患者の予後、及び、その寄与因子について報告してきた<sup>[1-5]</sup>。今回は、寄与因子として高比重リポ蛋白 (HDL) に焦点をあて報告する<sup>[6、7]</sup>。

## 方法

臨床症状より CAD を疑われた患者、または、1 つ以上の CAD の危険因子を有し、福岡大学病院にて冠動脈 CT 検査を施行された患者を対象とした。冠動脈 CT 検査にて 50% 以上の冠動脈狭窄を認めた場合を有意狭窄ありとし、CAD と診断した。冠動脈有意狭窄数を病変枝数で 0 枝病変、1 枝病変、2 枝病変、3 枝病変の 4 つのグループに分類した。CAD の危険因子としては、肥満（指標は body mass index）、高血圧（収縮期血圧、拡張期血圧）、脂質異常症（血

中低比重リポ蛋白コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール)、糖尿病(空腹時血糖、HbA1c 値)、慢性腎臓病、喫煙歴(現喫煙者、禁煙者、非喫煙者)、家族歴(CAD や突然死あり)の有無とした。また、内服薬のデータも収集した。さらに、HDL 機能の主作用であるコレステロール引き抜き能(CEC)、CEC の比率(%CEC)やその他の機能である抗アポトーシス作用(カスパーゼ3/7活性)や抗炎症作用[単球走化性因子(MCP)-1 分泌抑制能]について測定した。さらに、最高5年後までの予後調査[主要心血管イベント Major adverse cardiovascular event; MACE (cardiovascular death, ischemic stroke, acute myocardial infarction and coronary revascularization)の有無]を実施した。

## 結果

## 研究 1.

冠動脈 CT 検査を施行された連続151名を対象とした<sup>[6]</sup>。患者背景では、MACE(+) 群の喫煙率が MACE(-) 群に比較し高く、HDL コレステロール値は低い結果となった。MACE(+) 群と MACE(-) 群では、%CEC、カスパーゼ3/7活性、MCP-1 分泌に有

連絡先 福岡大学基盤研究機関 心臓・血管研究所長  
三浦伸一郎

〒814-0180 福岡市城南区七隈7丁目45-1

Tel 092-801-1011 Fax 092-865-2692

e-mail: miuras@cis.fukuoka-u.ac.jp

\* 本研究は福岡大学病院 IRB で承認され、患者より同意取得後実施された。

\*\* 本研究の詳細は、J Clin Med. 2021;10:2431. および Heart Vessels. 2021;36:1457-1465. に掲載された。

意差はなかったが、MACE(+) 群は、MACE(-) 群よりも CEC と HDL コレステロール値が有意に低値であった (図 1)。総 CEC は、HDL コレステロールと正の相関関係を認めたが、%CEC とは相関性がなかった。Receiver Operating Characteristic 曲線では、総 CEC と HDL-C の Area Under Curve は類似していた。HDL コレステロール値に依存した総 CEC は、MACE の存在と有意に相関していた。一方、%CEC は MACE と相関性がなかった。

## 研究 2.

冠動脈 CT 検査を施行された501人を対象とした<sup>[7]</sup>。冠動脈 CT 検査施行時の血中 HDL コレステロール値が高いほど、MACE の発生率が低いと仮定し、冠動脈 CT 検査を施行した患者の HDL コレステロー

ル値を Lower、Middle、Higher の HDL コレステロールレベルに分類し [Lower HDL コレステロール (L-HDL) group は、HDL コレステロール $\leq$ 47 mg/dl、n=167; Middle HDL コレステロール (M-HDL) group は、48 mg/dl $\leq$ HDL コレステロール $\leq$ 58 mg/dl、n= 167; Higher HDL コレステロール (H-HDL) group は、HDL コレステロール $\geq$ 59 mg/dl、n=167]、MACE との関連性を検討した。結果として、L-HDL group は、CAD 有病率、多枝病変、Gensini score、MACE すべてにおいて、他の HDL コレステロール group と比較して高値であった。H-HDL group は、CAD 有病率、多枝病変で他の HDL group と比較して低値であったが、多変量解析において MACE に寄与する因子は糖尿病であった。Kaplan-Meier Curves、ロジスティック回帰分析にて、M-HDL が MACE に最も寄与していた。

図 1. (A) %CEC, (B) total CEC and (C) HDL-C in the MACE(+) and MACE(-) groups.

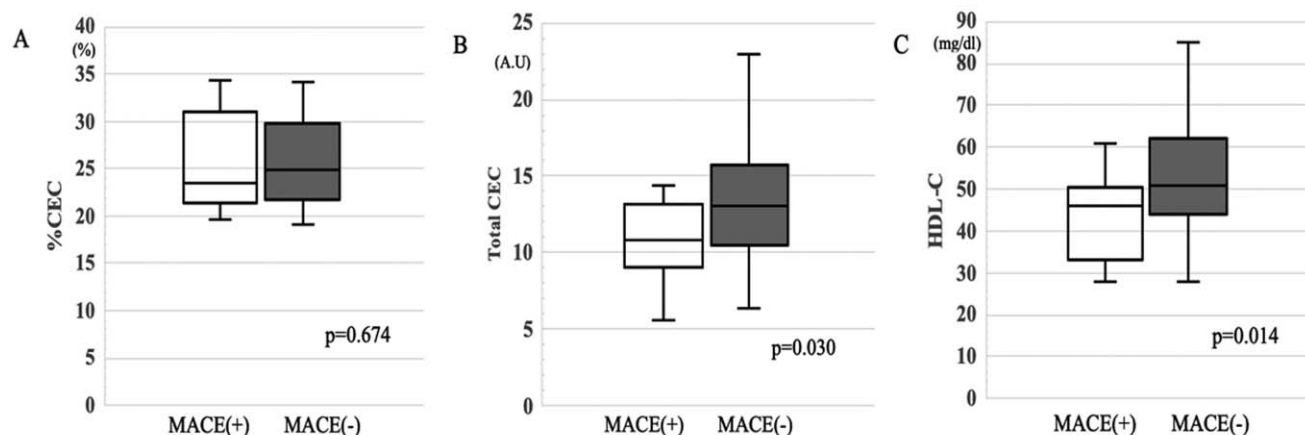
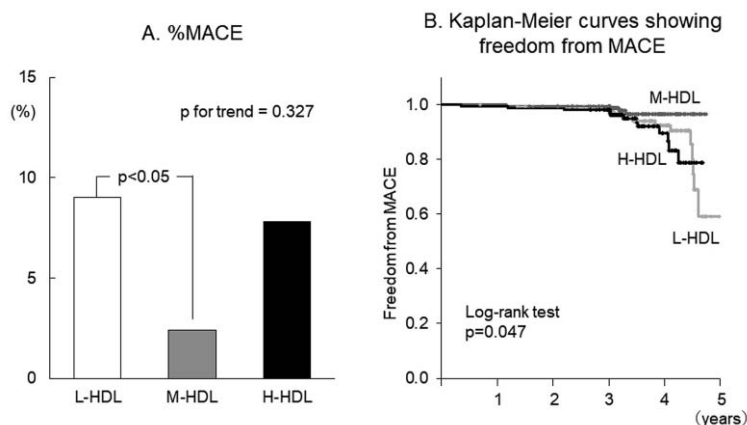


図 2. (A) %MACE in the L-HDL, M-HDL and H-HDL groups. (B) Kaplan-Meier curves showing freedom from MACE in the L-HDL, M-HDL and H-HDL groups.





## 考察

### 研究 1.

CEC に加え、HDL 機能である抗炎症作用及び抗アポトーシス効果 MACE の関連性について解析を行った。解析では、HDL コレステロール値に依存した総 CEC の HDL 機能は、MACE と有意な関連性を認めた。一方、%CEC 及び抗炎症作用及び抗アポトーシス作用は、MACE との関連性はなかった。この研究では、HDL 機能である抗炎症作用や抗アポトーシス効果が MACE と関連づけることはできなかったが、冠動脈 CT 検査を行った時点での HDL コレステロール値に依存した総 CEC 値が将来の主要心血管イベント発症予測が可能となることが示唆された。

### 研究 2.

動脈硬化性予防ガイドライン2017年版において HDL コレステロール値の管理目標値は、一次予防、二次予防ともに HDL コレステロール  $\geq 40$  mg/dL と定められているが、上限値に関しては定められていない。この研究では、HDL コレステロール  $< 47$  mg/dL が心血管イベントと相関することを確認した。また、より高いレベルの HDL コレステロール値は、心血管イベントのリスクとなるとの報告もあるが、本研究では、心血管イベントを予防する上で HDL コレステロール値だけではなく、糖尿病など動脈硬化危険因子の包括的なリスクマネジメントが必要であることが示唆された。

### おわりに

今後、私たちは、冠動脈 CT 検査で評価した患者をさらに長期にフォローし、MACE と様々な寄与因子との関連性を検討したい。

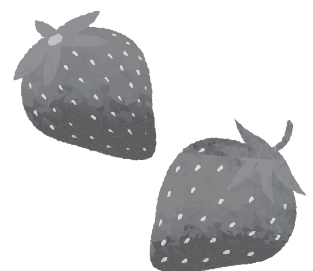
### Disclosures

本研究に対して利益相反関係にある企業はなし。

### 文献

- 1) Shiga Y, Morii J, Idemoto Y, Tashiro K, Yano Y, Kato Y, Kuwano T, Sugihara M, Miura SI. A Coronary Artery Calcium Score of Zero in Patients Who Have Undergone Coronary Computed Tomography Angiography Is Associated With Freedom From Major Adverse Cardiovascular Events. *J Clin Med Res.* 2020 Oct;12(10):662-667. doi:10.14740/jocmr4335. Epub 2020 Sep 21. PMID:33029273; PMCID:PMC7524563.
- 2) Imaizumi T, Shiga Y, Idemoto Y, Tashiro K, Ueda Y, Yano YM, Norimatsu K, Nakamura A, Kuwano T, Iwata A, Miura SI. Associations between the psoas major muscle index and the presence and severity of coronary artery disease. *Medicine (Baltimore).* 2020;99:e21086.
- 3) Inoue H, Shiga Y, Tashiro K, Kawahira Y, Suematsu Y, Idemoto Y, Tano K, Kuwano T, Sugihara M, Nishikawa H, Katsuda Y, Miura SI. Association Between the Level of Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Coronary Atherosclerosis in Patients Who Have Undergone Coronary Computed Tomography Angiography. *Cardiol Res.* 2021;12:10-15.
- 4) Higashi S, Shiga Y, Yano M, Imaizumi T, Tashiro K, Idemoto Y, Kato Y, Kuwano T, Sugihara M, Miura SI. Associations between smoking habits and major adverse cardiovascular events in patients who underwent coronary computed tomography angiography as screening for coronary artery disease. *Heart Vessels.* 2021;36:483-491.
- 5) Tsukihashi Y, Shiga Y, Suematsu Y, Idemoto Y, Tashiro K, Yano Y, Kato Y, Kuwano T, Sugihara M, Miura SI. Presence and severity of coronary artery disease in patients who achieved intensive blood pressure reduction at the time of coronary computed tomography angiography. *Hypertens Res.* 2021;44:206-214.
- 6) Inoue H, Shiga Y, Norimatsu K, Tashiro K, Futami M, Suematsu Y, Sugihara M, Nishikawa H, Katsuda Y, Miura SI. Associations between High-Density Lipoprotein Functionality and Major Adverse Cardiovascular Events in Patients Who Have Undergone Coronary Computed Tomography Angiography. *J Clin Med.* 2021;10:2431.
- 7) Kawahira Y, Shiga Y, Inoue H, Suematsu Y, Tashiro K, Kato Y, Fujimi K, Takamiya Y, Kuwano T, Sugihara M, Miura SI. Association between high-

density lipoprotein cholesterol levels and major adverse cardiovascular events in patients who underwent coronary computed tomography angiography: FU-CCTA registry. *Heart Vessels*. 2021;36:1457-1465.



# 飲酒マーカーとしての尿中エチルグルコシド異性体に関する研究

薬毒物探索解析研究所長 久保真一

薬毒物探索解析研究所は、中毒学に関する基礎的、臨床的研究を目的として、様々な研究に取り組んでいる。令和3年度には、剖検試料からの薬物抽出法に関する研究<sup>[1]</sup>と毛髪からのデートレイブドラッグの検出法に関する研究<sup>[2]</sup>について論文報告した。

本稿では、昨年に引き続き、飲酒の証明に関わる新たな飲酒マーカーに関する研究について取り上げる。

## 1. はじめに

飲酒は、飲酒運転、性犯罪など、様々な事件・事故に関わっている。飲酒の証明、酩酊の程度の評価には、血液、尿からのエタノール (EtOH) の検出とその濃度が重要である。しかし、飲酒後時間が経過すると、血中・尿から EtOH は検出できなくなる。そこで、我々は、EtOH が排泄され、血液や尿から検出できなくなった後でも、飲酒を証明できる、EtOH を補完する、新たな化学物質の探索とその意義について研究している。

これまで、1) 飲酒マーカーの候補としてのエチルグルコシド (EG) の選定、2) EG の異性体分析法の開発<sup>[3]</sup>、3) 各種酒類の EG および異性体の含有量に関する研究、4) 飲酒後の尿中に排泄される EG の経時変化に関する研究を進めてきた<sup>[4]</sup>。

今回は、EG の異性体  $\alpha$ EG と  $\beta$ EG を区別して定量することで、飲酒後尿中に排泄される EG の由来およびその意義について、検討を行ったので、紹介する。

## 2. 飲酒後の尿中 EG の排泄について

EG は日本酒に代表される醸造酒に含有される成分で、醸造の過程で産生されることが解っている。我々の研究では、日本酒では、EG の異性体のうち  $\alpha$ EG のみが高濃度に含有していた。ワインでは  $\alpha$ EG だけでなく、 $\beta$ EG も含有しており、その量も  $\alpha$ EG

より  $\beta$ EG が多かった。ビールも  $\alpha$  と  $\beta$  の両方の EG が含有されており、 $\alpha$ EG が多く含まれていることを明らかにした。一方、ウイスキーに代表される蒸留酒には、EG は含有されていなかった (図 1)。

これまでの研究から、飲酒後の尿中 EtOH、EG 濃度を分析することで、飲酒後の経過時間が推定できる可能性が明らかとなった。特に、尿中 EtOH 濃度が低下した後であっても、EG が検出できれば飲酒したと判断できるものと考えられた。即ち、醸造酒の場合、EG は飲酒マーカーとなり得るものと考えられた (図 2)。

しかし、EG を含まないウイスキーを飲酒した実験においても、飲酒後、尿中に EG が排泄されることが明らかとなった（図 2）。異性体分析を実施したところ、 $\alpha$ EG のみが排泄されていた。

何故、EG を含有していないウイスキーを飲酒して、尿中に  $\alpha$ EG が排泄されるかの疑問が生じた。

### 3. EG の生体内合成について

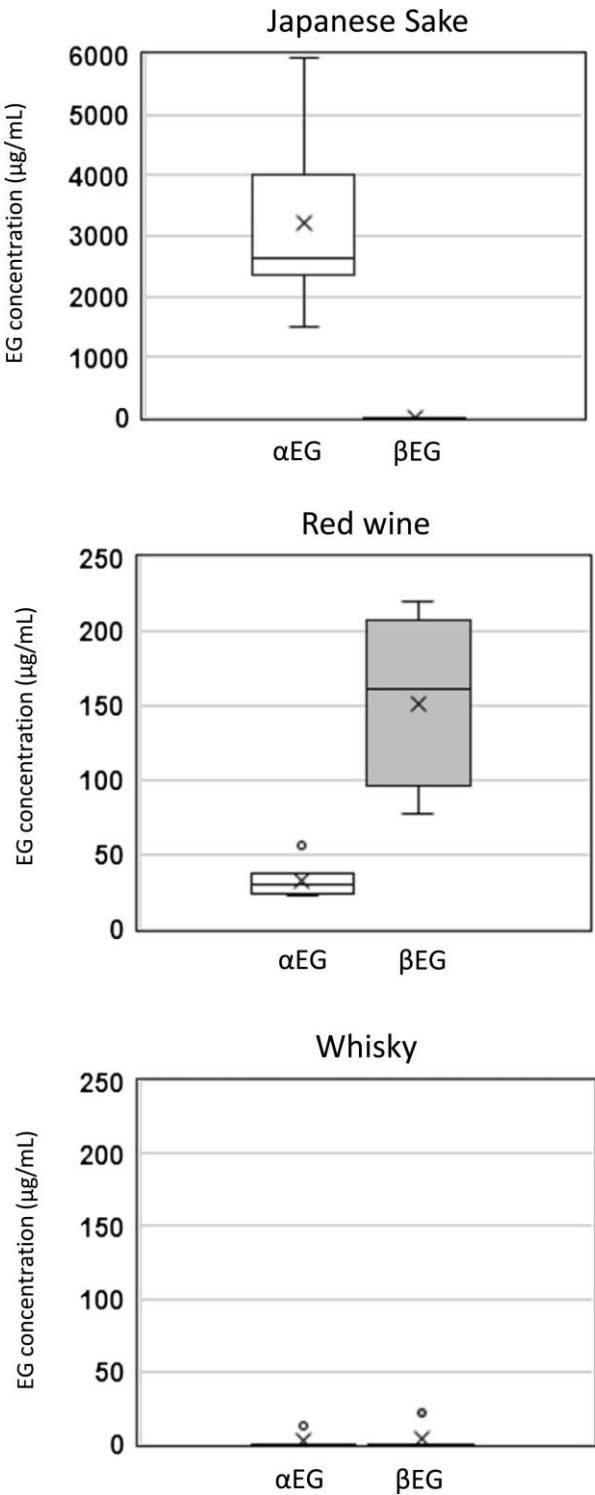
日本酒に含有する  $\alpha$ EG は、 $\alpha$ -グルコシド結合の多糖由来のマルトースと EtOH を基質とし、 $\alpha$ -グルコシダーゼの糖転移反応により清酒醸造時に生産される。一方、ヒト小腸中には  $\alpha$ -グルコシダーゼなどの 2 糖類分解酵素が存在する。そこで、小腸でグルコースを含むマルトースなどの 2 糖類と EtOH が同時に存在する場合、 $\alpha$ -グルコシダーゼが酵素として作用し  $\alpha$ EG が生成する可能性が考えられた。

そこで、ヒトの小腸の代わりに、ラット小腸パウダーを使って実験を行なった。EtOH とマルトースなどの 2 糖類を混和し、これにラット小腸パウダーを作用させ、EG の異性体分析を行った。その結果、 $\alpha$ EG とグルコースが検出されたが、 $\beta$ EG は確認できなかった (図 3)。

 $\alpha$ EG の生体内合成の可能性が確認できたことか

ら、2 糖類を含む食事とともに飲酒する場合、小腸内で、EtOH と 2 糖類が混在し、これに  $\alpha$ -グルコシダーゼが反応することで、 $\alpha$ EG が合成されるものと考えられた。

図 1. 日本酒、赤ワイン、ウイスキーに含まれる EG 異性体濃度



#### 4. 飲酒後尿中に排泄される EG の意義

尿中  $\alpha$ EG は、①飲酒した酒類に由来するものと、②食事とともに飲酒することで、酒類に関わらず、体内で合成されるものと考えられた。

尿中 EtOH と  $\alpha$ EG 濃度を測定することで、飲酒の有無、飲酒後の経過時間の推定が可能と考えられた。さらに、尿中 EG の異性体、 $\alpha$ EG と  $\beta$ EG 濃度を測ることで、①尿中  $\alpha$ EG が極めて高濃度の場合は、日本酒のように酒類そのものに高濃度の  $\alpha$ EG が含有していた可能性が、②  $\beta$ EG が検出される場合には、赤ワインのような酒類そのものに高濃度の  $\beta$ EG が含有している可能性が推定される。また、③食事と一緒に蒸留酒（ウイスキー等）を飲酒した場合は、EtOH と  $\alpha$ EG が検出され、④食事を摂らずに、蒸留酒のみを、飲酒する場合は、EG は産生されないものと考えられる。

図 2. 飲酒後の尿中 EtOH 濃度と尿中 EG 異性体濃度 (日本酒、赤ワイン、ウイスキー)

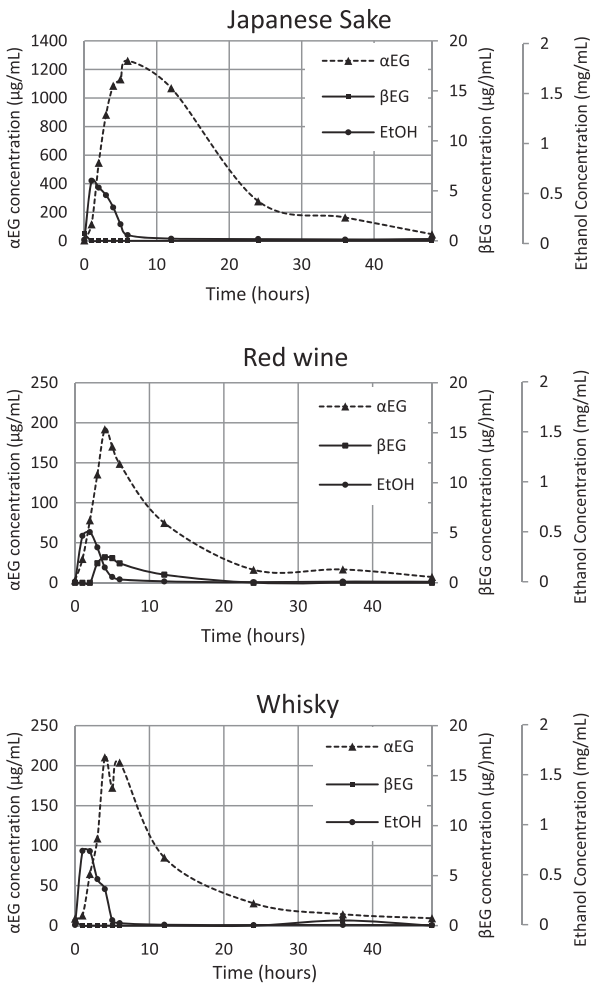
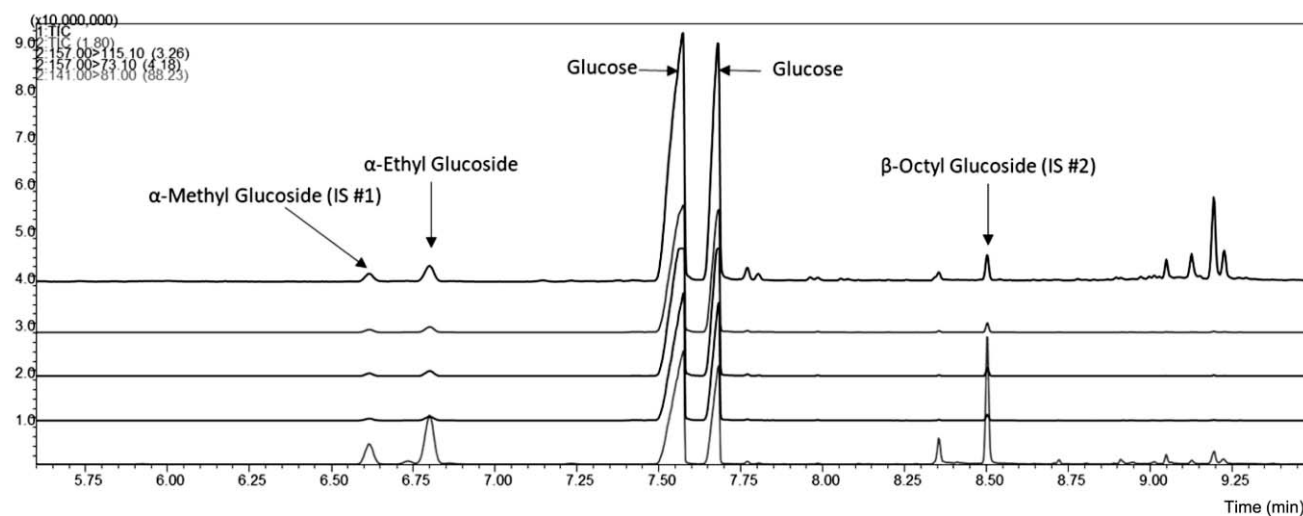




図3. マルトース、エタノール、小腸パウダー反応液の GC-MS/MS クロマトグラム



αEG とグルコースが確認できる。

以上のことから、尿中 EG および EG 異性体は、飲酒の有無、飲酒後の経過時間、飲酒した酒類を推定するために、有効な情報を提供できるものと考えられる。即ち、尿中 EG とその異性体は、EtOH を補完する飲酒マーカーとなりえるものと考えられる。

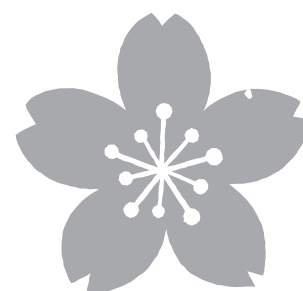
本研究は、福岡大学医の倫理委員会の承認のもとに実施している（2017M067、2018M056）。本研究は、科研費（17K19857、20K18989）の助成を受けたものである。

## 文献

- [1] Keiko Kudo, Kanju Saka, Brian Waters, Kenji Hara, Aya Matsusue, Masayuki Kashiwagi, Shin-ichi Kubo. Effects of putrefaction on the quantitative analyses of diphenhydramine in blood and tissues: model experiments by the routine matrix-matched calibration method and standard addition method with different internal standards. *Forensic Toxicology*, 39(2), 437-450, 2021.
- [2] Brian Waters、原 健二、柏木正之、松末 綾、高山みお、久保真一. 液体クロマトグラフィー タンデム質量分析計を用いた毛髪からの睡眠導入剤の分析法の実務応用. *法医学の実際と研究*, 64, 137-146, 2021.
- [3] Brian Waters, Ryoko Nakano, Kenji Hara, Aya Matsusue, Masayuki Kashiwagi, Shin-ichi Kubo.

A validated method for the separation of ethyl glucoside isomers by gas chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation in human whole blood and urine. *Journal of Chromatography B*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123074>

- [4] 久保真一. 新たな飲酒マーカー、エチルグルコシドに関する研究. *Research*, 26(1), 36-38, 2021.



## 小型宇宙推進系への適用を見据えた 高エネルギーイオン液体の合成に関する研究

工学部助教 松 永 浩 貴

### 1. はじめに

低コスト・高頻度な実証に適した超小型衛星（数十 kg 以内）を活用した宇宙開発や探査に向けた研究開発が世界中で進められており<sup>1)</sup>，将来の宇宙推進システムには，「安全」，「安価」，「使いやすい」，「小型高性能」であることが強く要求される。その中で，化学推進系における重要課題は推進剤開発である。現行の汎用推進剤であるヒドラジンは，毒性が高く，室温で可燃性の蒸気を形成するため，充填をはじめとした操作には特殊な設備や厳重な管理が必要である。また，衛星のさらなる小型軽量化のためには，エネルギー密度の高い推進剤を用いて推進剤タンクの体積を小さくすることが有効である。

筆者らはアンモニウムジニトラミド（ADN）を基剤とした可燃性の高エネルギーイオン液体（EILs）の調製を可能にした<sup>2)</sup>。ADN 系 EILs は，室温で固体（融点 92℃）の ADN に特定の固体可燃剤を混合することで凝固点降下させ，低融点の液体とした可燃性のイオン液体である（図 1）<sup>2)</sup>。固体同士の混合のみで得られ，イオン性化合物特有の高密度・低蒸気圧・高安定性により，燃料タンクの小型化，取扱性の向上，意図しない爆発リスク低減が期待される。化学平衡計算プログラム NASA-CEA<sup>3)</sup> を用いた計算では，ヒドラジンや国内外の推進剤候補を上回る理論真空比推力（ $I_{vac}$ ）を有する<sup>4)</sup>。これまでの研究で，低融点，高比推力 EILs の調製方法<sup>5)</sup>，レーザーを用いた新規点火方式の研究開発<sup>6)</sup>，安定性評価<sup>4)</sup>を進め，ADN 系 EILs の実現可能性が示されてきた。実用化に向けた喫緊の課題の一つは合成基盤の構築である。今後の宇宙利用拡大を見据えると，今後適用される推進剤には，安全で安価に入手（合成・製造）でき，取扱いが容易で着火性に優れていることが望まれる。筆者らは，原料である ADN の合成手

法および着火性に優れた EILs 組成についての検討を進めている。本稿では現在の主な研究状況と今後の方向性をまとめた。

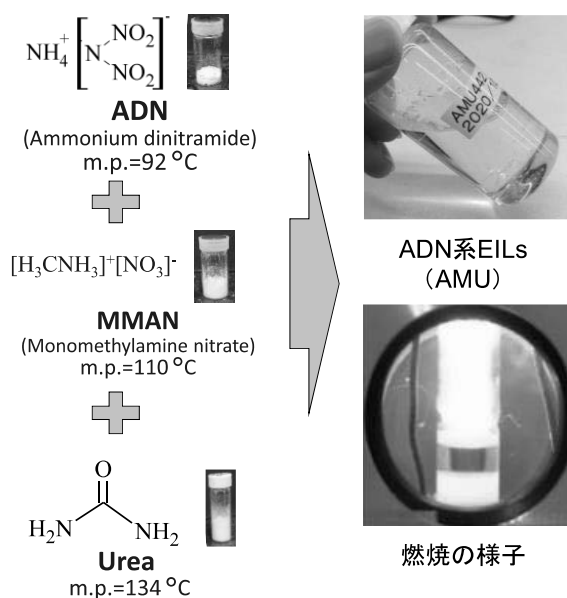


図 1 ADN 系 EILs 調製の例と燃焼の様子<sup>2)</sup>

### 2. ADN の合成基盤構築

ADN 合成法としてはスルファミン法が最も一般的である。反応式の例を図 2 に示す。回分反応器において混酸（−30～−40℃）中でスルファミン酸塩をニトロ化してジニトラミド酸（HDN,  $\text{HN}(\text{NO}_2)_2$ ）を合成し，塩基（グアニル尿素や水酸化カリウム）との中和で塩を得る<sup>7)</sup>。この中で，反応中に生成する HDN は熱的に不安定で，さらに発熱を伴いながら分解する物質であり，反応器内の温度のばらつきを考慮すると回分式反応器を用いた大量合成は困難であるとされる。そこで，小型連続反応器（数百  $\mu\text{L}$ ～数 mL）による合成技術を確立し，安全・低コスト・高品質な製造を目指すこととした。小型連続反応器で

は迅速な混合，効率よい放熱ができることから，高効率かつ安全な合成が期待される。

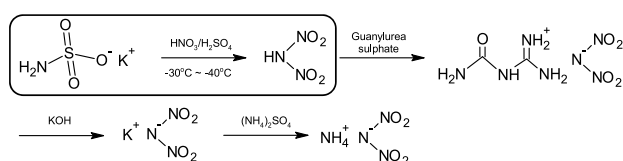


図2 ADNの合成反応の例<sup>7)</sup>  
(枠部分がニトロ化反応)

現在は初期検討として，小型連続反応器を試作し，スルファミン酸塩のニトロ化による HDN 合成の実現可能性評価を開始したところである。3D プリントで印刷した 120 mm×120 mm×16 mm の透明樹脂製の型に透明フッ素樹脂チューブ（内径 2 mm）を取り付け，ペルチエ冷却ユニットにチューブ側の面が触れるように設置した。冷却ユニットの温度が所定の温度に達した後スルファミン酸カリウム粉末を拡散させた硫酸および発煙硝酸を送液した。合成時の反応器の様子を図3に示す。出口溶液を水酸化カリウムで中和し，紫外分光高度計を用いて分析すると，ジニトラミドイオン  $N(NO_2)_2^-$  に由来する 285 nm の吸収が確認され（図4），HDN の合成が達成されたことが示された。さらに，バッチ式における反応温度より高温でも HDN の生成が確認された<sup>8)</sup>。連続反応器の効率よい放熱に起因すると考えられ，小型連続反応器によって安全な合成が可能であることが示された。今後は滞留時間と収率の関係の評価，詳細な反応挙動解析など実施することで収率の向上を目指すとともに，HDN 合成以降のプロセスについても連続化を検討する。

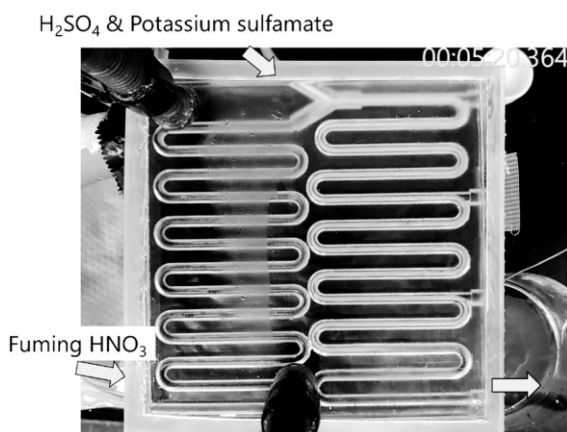


図3 小型連続反応器での反応の様子<sup>8)</sup>

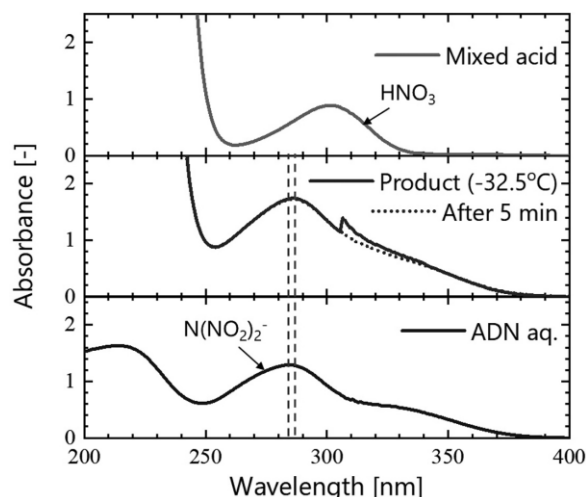


図4 生成物の紫外スペクトルの例<sup>8)</sup>

### 3. 着火性に優れた ADN 系 EILs の探索および評価

現行推進剤のヒドラジンが広く用いられる理由の一つは酸化剤（ $NO_2$ ， $N_2O_4$ ， $HNO_3$ など）との反応性が高いためである。ADN 系 EILs をヒドラジンに代わるロケット推進剤として実用化するためには，地上では安定で取扱いが容易でありながら，宇宙空間で使用する際にはエネルギーの付与によって瞬時に反応し，燃焼に至ることが望ましい。

そこで ADN と組み合わせる可燃剤を探索し，ヒドラジドに着目することとした。ヒドラジドはヒドラジンと似た構造を有するため加熱時に酸化剤との反応性が高いことが期待され，さらに毒性はヒドラジンより低い。筆者らは低分子のヒドラジドであるホルモヒドラジド FH( $HCONHNH_2$ ，融点 56 °C) に着目した。まず，混合比検討のため，ADN/FH の共融点  $T_m$  を各単体の示差走査熱量測定（DSC）および Schröder-van Laar 式<sup>9)</sup>，ADN/FH を用いた小型ロケットエンジン（スラスタ）の  $I_{vac}$  を NASA-CEA で予測した。混合比と融点および  $I_{vac}$  の関係を図5にまとめた。特に混合比 1 : 1 で室温付近の共融点をもち， $I_{vac}$  もヒドラジンを上回り，新規推進剤として期待できる特性を有することが示された<sup>10)</sup>。実際に混合比 1 : 1 で混合したところ室温で液体化し，着火性を有するイオン液体となることがわかった<sup>10)</sup>。現在は熱分解や着火反応の速度やメカニズムの解析を行っており，これらのデータを基にスラスタを用いた性能評価を進める計画である。

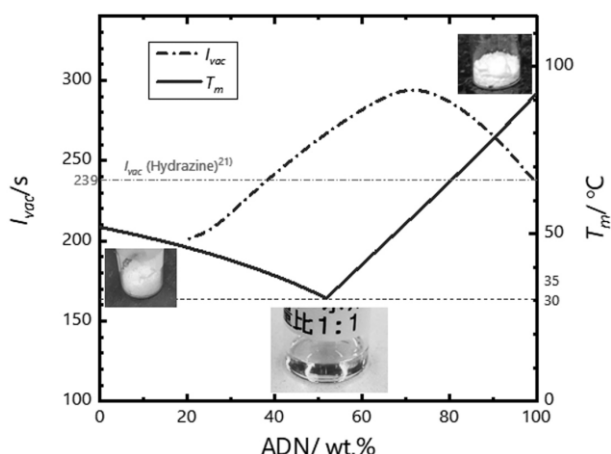


図5 ADN/FH の共融点および理論比推力<sup>10)</sup>

#### 4. まとめと今後の展望

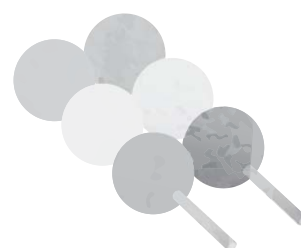
ADN系EILsを推進剤として実用化するために必要とされる要素技術開発のうち、筆者が進めている合成基盤構築に向けた取り組みについてまとめた。小型連続反応器による推進剤原料(ADN)の安全かつ高効率な合成、可燃剤にFHを用いることによって地上では安定で取扱いが容易でありながら使用時には瞬時に着火可能なEILsの確立が期待される。今後は各種条件、パラメータの定量化を進め、条件の最適化を進める。さらに、学内外の研究者と連携を取り、実用化に近いフェーズについての検討も進める準備を進めているところである。

#### 参考文献

- 1) 船瀬龍ほか, 日本航空宇宙学会誌, 67 (2019), pp.233-238.
- 2) Matsunaga, H., et al., Sci. Technol. Energ. Mater., 78 (2017), pp.65-70.
- 3) Gordon, S. and McBride, B. J.: Computer program for calculation of complex chemical equilibrium compositions and applications, NASA Reference Publication 1311 (1996).
- 4) 松永浩貴ほか, 宇宙航空研究開発機構研究開発報告, JAXA-RR-21-002 (2022), pp.1-5.
- 5) Shiota, K., et al., Sci. Technol. Energ. Mater., 78 (2017), pp.65-70.
- 6) Matsunaga, H., et al., Trans. JSASS, Aerospace Tech. Japan, 18, (2020), pp.323-329.
- 7) Badgujar, D. M., et al., Sci. Technol. Energ. Mater.,

77 (2016), pp.59-64.

- 8) Matsunaga, H., et al., 7th Int'l Symp. Energetic Materials and their Applications (ISEM2021), A6-4 (2021)
- 9) Karunakaran, K., J. Solution Chem., 10 (1981), pp. 431-435.
- 10) Matsunaga, H., et al., Proc. 33rd Int'l Symp. Space Technology and Science, 2022-a-19 (2022).





# 金属 3D プリンタにより積層造形したステンレス鋼の水素脆化特性

工学部機械工学科 和田 健太郎  
工学部機械工学科 山 辺 純一郎

## 研究背景

水素脆化とは、金属材料内部に侵入した水素原子が材料の強度や延性(粘さ)を低下させる現象である。現在、カーボンニュートラル実現に向けた水素エネルギーの利活用が期待されているが、水素を貯蔵・運搬する際に金属材料が高圧の水素ガスに曝されると、材料内部に水素原子が侵入して水素脆化が生じることがある。そのため、現在の国内基準においては、燃料電池自動車(FCEV)や水素ステーション(HS)などの水素利用機器の構成部材に使用可能な材料が、レアメタルであるニッケルを多量に含むステンレス鋼に限定されている<sup>1)</sup>。この材料は高価で低強度であるため、水素利用機器の価格を押し上げる要因となっている。現状倍程度であるFCEVやHSの製造費・建設費をガソリン車やガソリンスタンドと同等レベルまで低減するためには、材料コストの削減が必要不可欠である。

材料加工の分野では 3D プリンタを用いた金属材料の積層造形技術が急速に発展しており、気孔率や表面粗さといった造形物の品質は日々向上している。さらに、一部の研究では積層造形プロセスにより材料強度が上昇するという報告もなされており<sup>2)</sup>、適切な積層条件を選択すれば、部材の肉厚低減などによる材料使用量の大幅な削減が可能であると期待される。

こうした状況から、水素利用機器に適用される部材においても、今後積層造形を活用した形状最適化や高強度化による材料使用量の低減が検討されていくことが予測される。しかし、積層造形により作製した材料（積層材）の強度特性に及ぼす水素の影響に関する研究例は極めて少なく、積層造形材の高圧水素ガス環境への適合性に関する知見の蓄積が不十分である。そのため、著者らのグループでは積層造

形したステンレス鋼の強度・延性に及ぼす水素の影響を調査している。本報では、研究状況および将来展望を報告する。

## 試驗方法

研究の第一段階として、基本的な材料試験の1つである引張試験により強度・延性およびそれら特性に及ぼす水素の影響を調査している。水素環境での使用が認可されている安定オーステナイト系ステンレス鋼である SUS316L を調査対象とし、通常の製鋼プロセスで作製された「溶製材」と金属 3D プリントにより積層造形した「積層材」の2種類を試験した。従来研究において、オーステナイト系ステンレス鋼の水素脆化特性はニッケル当量<sup>3)</sup>と呼ばれるパラメータにより予測できることが解明されているが、本研究で用いた溶製材と積層材のニッケル当量は、それぞれ 27.4、27.6 wt.% と、ほぼ同等であった。積層造形はレーザー積層造形法 (selective laser melting) により実施し、積層条件は積層ピッチ 0.05 mm、レーザー強度 320 W、レーザースポット径 0.3 mm、走査速度 900 mm/s とした。

材料の強度特性に及ぼす水素の影響を調査する方法として、高圧水素ガス環境中で試験実施する「外部水素」による方法と、予め材料を高圧水素ガスに曝露することで水素原子を材料内部へ侵入させた後に大気中で試験実施する「内部水素」による方法が用いられている。外部水素による方法では材料の実使用環境に近い状況を模擬できる一方で試験が大掛かりとなることから、今回は内部水素による方法により材料の水素適合性を評価した。

引張試験には、直径 6 mm、長さ 30 mm のゲージ部を有する試験片を用いた。積層材・溶製材ともに旋盤加工により作製し、ゲージ部表面を #600 の研



磨紙により仕上げた。試験片を 100 MPa、270°C の高圧水素ガス中に200時間曝露することで水素を侵入させた後、室温・大気中において引張速度 0.09 mm/min にて引張試験を実施した。水素による延性低下量は、水素チャージ材と未チャージ材の絞り (RA) の比である相対絞り (relative reduction in area: RRA) により評価した。

## 試験結果および考察

Fig. 1 に、積層材および溶製材の応力-ひずみ線図を示す。未チャージ材同士で比較すると、溶製材に対して積層材では流動応力や引張強さなどが高い一方、伸びや絞りなどの延性は低い。Fig. 2 (a, c) に示す破面形態を比較すると、積層材では溶製材に比べてディンプルの数が多く、直径が小さかった。現時点では、積層造形によりディンプル形態が変化する要因は不明であるものの、類似の傾向は先行研究においても認められており<sup>4)</sup>、ディンプル形態の変化は積層材の低延性に関与していると想定される。

続いて、Fig. 1 中の水素チャージ材の結果に注目すると、積層材 (RRA=0.92) および造形材 (RRA=0.79) のいずれにおいても水素による強度・延性低下量は僅かであった。また、水素チャージによる破面形態 (Fig. 2) の変化もほとんど認められなかったため、今回試験対象とした SUS316L は溶製材・積層材いずれにおいても水素の影響をほとんど受けないと考えられる。

## 結言および今後の展望

レーザー積層造形した SUS316L の水素適合性を SSRT 試験により調査した結果、以下に示す結論を得た。

1. 高圧水素ガスに曝露していない材料では、積層材の延性が溶製材に比べて35%低下した。さらに、積層材では溶製材に比べてディンプル径が小さくディンプルの数密度が高かった。
2. 水素による延性低下量は積層材・溶製材のいずれでも僅かであり、破面形態からもこれらの材料は水素の影響をほとんど受けないことが明らかとなった。

以上の結果を踏まえると、現時点で考えられる課題は以下の通りである。

- (1) 積層造形による延性の低下は、今後積層造形した部材を構造物に適用する際に障壁となりうる。積層造形によりボイドの形態が変化する要因や、積層材に特有の破壊メカニズムの解明を通し、溶製材と同程度の延性を実現する積層条件を解明する必要がある。
- (2) ニッケル当量が同程度である場合、積層造形によりオーステナイト安定度が上昇するという報告<sup>5)</sup>がある。この結果をベースにすれば、SUS304 などの準安定オーステナイト系ステンレス鋼においては溶製材よりも積層材の方が優れた耐水素脆化特性を示すことが期待される。今後、準安定オーステナイト系ステンレス鋼において積層造形によりオーステナイト安定度が向上するメカニズムおよび水素脆化特性の変化挙動を解明し、安価で高性能な耐水素材料の開発に貢献していく。

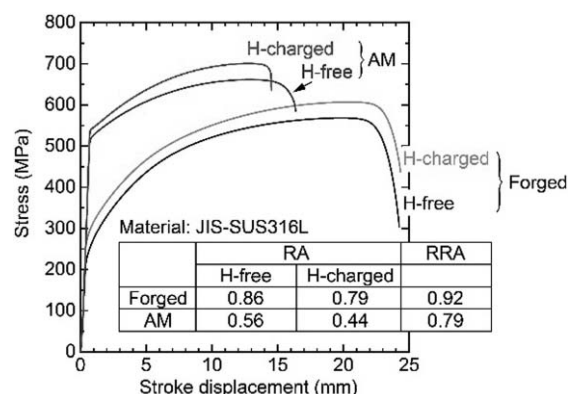


Fig. 1 Stress-stroke displacement curves, reduction in area (RA) and relative RA (RRA) of forged and additively-manufactured (AM) JIS-SUS316L.

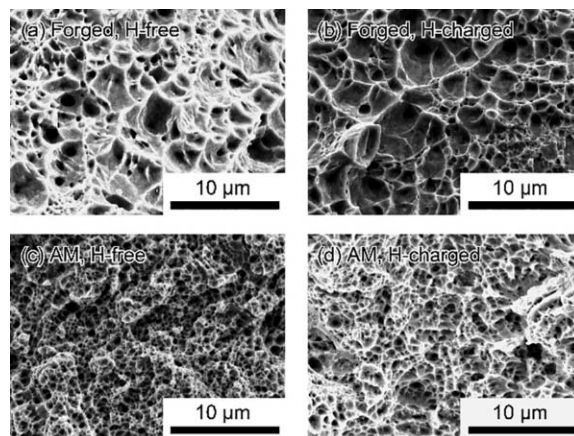


Fig. 2 Fracture surface morphologies of (a, b) forged and (c, d) additively-manufactured (AM) JIS-SUS316L (a, c) without and (b, d) with hydrogen-charging.

## 参考文献

- 1) H. Kobayashi, T. Yamada, H. Kobayashi and S. Matsuoka, “Criteria for selecting materials to be used for hydrogen refueling station equipment”, ASME 2016 Pressure Vessels and Piping Conference, PVP2016-64033 (2016).
- 2) Y.M. Wang, T. Voisin, J.T. McKeown, J. Ye, N.P. Calt, Z. Li, Z. Zeng, Y. Zhang, W. Chen, T.T. Roehling, R.T. Ott, M.K. Santala, P.J. Depond, M.J. Matthews, A. V. Hamza and T. Zhu, “Additively manufactured hierarchical stainless steels with high strength and ductility” Nature Materials, vol.17, pp.63-70 (2018).
- 3) M. Sanga, N. Yukawa and T. Ishikawa, “Influence of chemical composition on deformation-induced martensitic transformation in austenitic stainless steel”, Journal of the JSTP, Vol.41, pp.64-68 (2000).
- 4) S.W. Baek, E.J. Song, J.H. Kim, M. Jung, U.B. Baek and S.H. Nahm, “Hydrogen embrittlement of 3-D printing manufactured austenitic stainless steel part for hydrogen service”, Scripta Materialia, Vol.130, pp.87-90 (2017).
- 5) Y. Hong, C. Zhou, Y. Zheng, L. Zhang, J. Zheng, X. Chen, B. An, “Formation of strain-induced martensite in selective laser melting austenitic stainless steel”, Materials Science and Engineering: A, Vol. 740-741, pp. 420-426 (2019).



## 半導体実装研究所近況

半導体実装研究所長 末 次 正

令和2年度から三次元半導体研究センター長と福岡大学半導体実装研究所長の兼務しております、末次です。本研究所はふくおか IST（福岡県産業・科学技術振興財団）の三次元半導体研究センター（図1参照ください）と一体化した事業として糸島市で2011年から活動しています。今年新たに研究員が増えまして金山研究員が研究所専任として加わりました。その結果専任の研究員は加藤客員教授と韓客員教授と金山研究員の3名（図2参照ください）、佐藤事務の4人体制となっています。一方昨年まで兼務してもらっていたふくおか IST 所属の友景研究室出身の林主幹研究員と末吉研究員がふくおか IST を退職することとなり大きな戦力を失い痛手となりました。財政状況は共同研究収入に関してはコロナ禍による収入の落ち込みから回復過程にあります、第6波の到来が確実と思われますのでまだまだ予断を許さない状況です。一方補助金収入に関しては大きな成果がありました。NEDO 先導研究プログラムにふくおか IST 三次元半導体研究センター、福岡大学半導体実装研究所、長崎総合科学大学、イサハヤ電子株式会社の4者による共同研究案「先端実装技術を用いた多重直並列構成アダプティブ電源の研究開発」が採択され1年間の事業を開始しました。こ

れは電力消費の脱炭素化において特に急拡大するデータセンター向けの電源を直流給電化するにあたり高効率に電力変換できる DC-DC コンバータを作成するために我々の部品内蔵基板技術を用いて浮遊インダクタの少ないパワーモジュールを作成してそれを多段に接続して安価な MOSFET で高電圧の直流電力変換を行うというものです（図3参照ください）。NEDO および経済産業省からも大変注目されており我々も総力を挙げて取り組んでいるところで

毎年10月に行われているフジコミーティング特別講演会は今年も七隈キャンパスで11月11日にハイブリッドで行われました。ゼロカーボン社会達成や半導体製造の経済安全保障確保へ向けて我々の研究分野であるパワーデバイス実装や半導体後工程3次元実装技術が日本全体で注目される中例年にも増して盛大なフジコミーティングとなりました。まず株式会社産業タイムズ社泉谷渉会長に「異次元の爆裂成長に突入した半導体産業～拡大する設備投資と開発の方向性を探る!!～」と題して講演していただき半導体産業が急成長するフェーズに入ったこと、日本の政府・学术界が今回は本気で力を入れ始めていることが紹介されました。三菱電機株式会社 主席技監



図1：三次元半導体研究センター外観



図2：金山研究員（左）と韓客員教授（右）

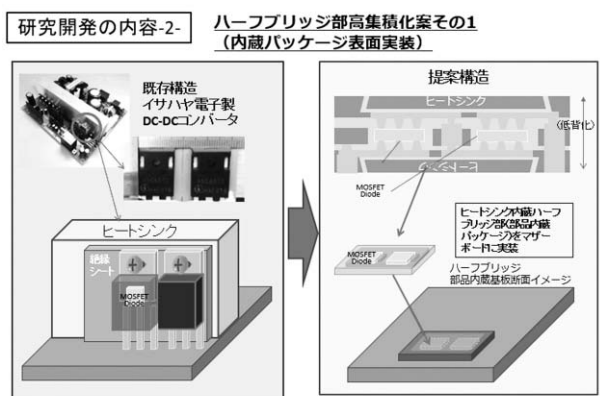
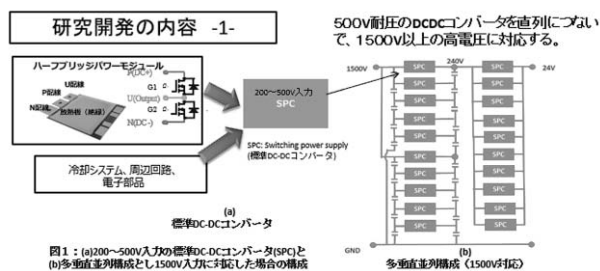


図3 : 「先端実装技術を用いた多重直列構成アダプティブ電源の研究開発」研究内容

マジウムダール ゴーラブ様から「パワーデバイスやモジュール技術の発展経緯と動向」、名古屋大学 未来材料・システム研究所山本真義教授から「EV 用パワーエレクトロニクス機器の最新技術・市場動向と次世代 EV に求められるパワエレ実装技術」、長崎総合科学大学大学院新技術創成研究所黒川不二雄学術教授（特命教授）から「カーボンニュートラル時代の電力変換技術」、株式会社東レリサーチセンター表面科学研究部赤堀誠至主任研究員から「先端パワーデバイスにおける分析評価技術」をご講演いただきました。我々の研究所の研究テーマを取り巻く状況、政府や産業界の期待の大きさを実感し我々の研究活動の重要性を再認識しました。私末次のほうからも、センターおよび研究所の研究開発状況について発表致しました。

部品内蔵基板の国際規格発行活動につきましては IEC/TC91 電子実装技術分野の国際規格が2015年発行の基板仕様・テスト方法の規格、2019年発行の三次元データフォーマットの規格に続いて三次元電子モジュールの電気的接続方法に関する評価方法に関する規格について発行へ向けて活動を進めてきましたが、2021年6月22日に国際規格第3号 IEC 62878-2-602 Device embedding assembly technology Part 2-602:

Guideline for stacked electronic module - Evaluation method of inter-module electrical connectivity (IS) として発行されました。今後半導体技術の中で重要となってくる三次元実装の分野においてキーとなる国際規格が日本発で特に本学によって取得されたことは大変大きなことだと思います。

2021年は新型コロナウイルス感染症がいったん緩んだ年となりました。一方当研究所においては大きな戦力喪失と新たな戦力追加という大きな変化とともに NEDO プロジェクトという大きな進展があった年となりました。来年は様々な不安を乗り越え本研究所の活動が無事に発展することを期待したいところです。





# 高圧超音波照射技術による複合材料製造

複合材料研究所長 三 島 健 司

複合材料研究所は、福岡大学の産学官連携研究機関として発足して以来、微小薬剤、マイクロカプセル、生体素材、再生医療用新規バイオスカフォールド生体材料、高周波スイッチング増幅器用の複合材料、高周波スイッチング増幅電源回路、材料製造装置、材料製造プロセス開発など複合材料ならびにそれらの製造プロセス・応用に係る研究を行っている。当研究所では、未知の危険をはらむ有害な物質を作り出すことなく、従来広く利用されその安全性が科学的・社会的にも認知された素材を利用し、それらをナノ化などの最新技術で複合化することで、従来得られなかった特性を付与して新規な複合材としてより早く実用化する開発システムを開発している。特に、二酸化炭素や水などの広く利用されている素材を超臨界流体と呼ばれる特殊な環境にすることで、従来にない機能性溶媒として利用している。

当研究所で開発したナノ・マイクロメートルオーダーの複合材料（マイクロカプセル）は、従来法では、達成できなかったナノ・マイクロメートルオーダーで構造制御されたドラッグデリバリーシステム（DDS）への新たな領域を開いた。これにより、多くの企業からの共同研究、受託研究の依頼があり、毎年、文部科学省の科学研究費補助金にも採択されている。

今回は、新規に開発した高圧超音波照射技術を用いた複合材料製造法（図1）について解説する。一般的に、高圧の液体溶媒に超音波を照射するとキャビテーションは発生しにくい、液体二酸化炭素中では、キャビテーションが発生しやすい。これらの理由から、高圧力下での超音波照射技術は医療・医薬・化粧品・食品などの分野への利用が期待されており、現在、応用領域が拡大している化学工学においても、ホットな領域である。図2に超音波の異なる照射法による高圧容器内の攪拌の様子を示す。高

圧容器外から振動板を用いて超音波照射を実施する超音波間接照射型装置（図 2 (a)）では、高圧容器内に十分なエネルギーが伝わらずに、攪拌が不十分となる。また、高圧容器内の振動子を用いて超音波照射を実施する投げ込み型振動子装置（図 2 (b)）であっても、超音波照射による剪断力が小さく、高圧容器内を十分に攪乱できない。一方、超音波ホーンを内蔵した超音波直接照射型装置（図 2 (c)）では、

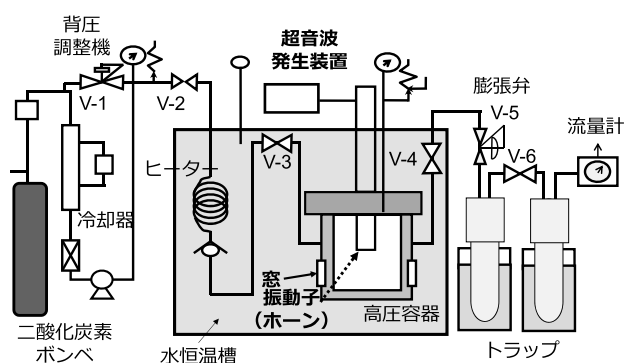


図1 高圧二酸化炭素と超音波直接照射を複合させた装置の概略図

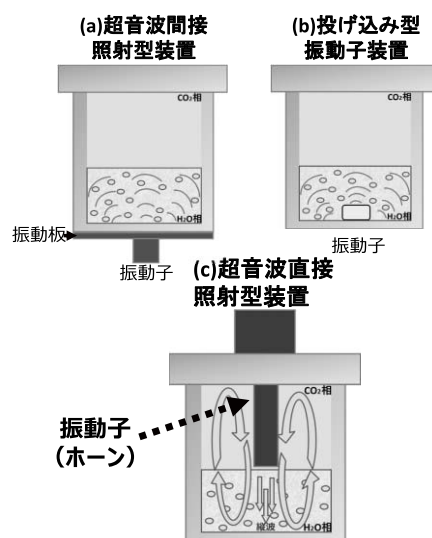


図2 超音波の異なる照射法による高圧容器内の気液二相の状態；  
(a)間接超音波、(b)投げ込み型振動子装置、(c)直接超音波



超音波振動子（ホーン）から照射された縦波が高压溶解内を大きく攪乱するため、マイクロ相分離を誘起し、ナノ界面が形成される。

今回の発明では、高压超音波照射技術により界面積が大きくなった特殊な相を利用して、内在する物質により 1) 天然果実からの有効成分の高濃度抽出、2) 高濃度ウルトラファインバブルの製造、3) リポソームの形成および 4) ピッカリングエマルジョンを利用したカプセル生成など、従来の二酸化炭素を用いた操作では不可能とされてきた新技術の開発を可能とした。1) 天然果実からの有効成分の高濃度抽出については、図 3 のように高压超音波照射のキャビテーションから生じるマイクロ・ナノサイズの気泡の破裂に伴い、植物の細胞壁などに微小な穴をあけ、化合物の品質を低下させることなく高濃度に成分を抽出することを可能とした。2) 高濃度ウルトラファインバブルの製造については、水と液体二酸化炭素の相分離系に、高压超音波照射技術を適用することにより、マイクロ相分離を誘起させ、高压容器内全体で無数のナノ界面（バブル）を形成させ、従来よりも高濃度なウルトラファインバブル水の製造を可能とした。3) リポソームの形成については、高压装置内に、高密度の気相と液相の界面を形成させ、そこに高压下で、超音波を超音波ホーンより照射することで、高密度の気相と液相の界面に脂質を高濃度に溶解し、マイクロ相分離により高濃度のリポソームを安定的に製造することを可能とした。4) ピッカリングエマルジョンを利用したカプセル生成については、高压容器内にセルロースナノファイバーを入れ、高压容器内に、水と液体二酸化炭素を加え、超音波振動子（ホーン）から超音波を照射することにより、界面活性剤を添加することなくピッカリングエマルジョン水溶液の調製およびセルロースカプ

セルの形成を可能とした。これらの高压超音波照射技術により製造された複合材料は、残存有機溶剤を含有する可能性が著しく低減されることによって、ドラッグデリバリーシステムなどの人体への利用においてもより高い安全性を提供することができる。

当研究所は、このようなナノ・マイクロ技術を用いて国内外に既に強い連携体制を確立しており、産業発展の著しいインドネシア・マレーシアなどのアジア地域と連携し、「環境低負荷製造技術」を国際学会の招待講演にて情宣している。既に、平成26年、27年、29年に本学において、国際学会を3回開催している。さらに、平成30年12月に「第7回日本マイクロ・ナノバブル学会」を大会長として開催した。さらに、文部科学省の科研費ならびに企業からの受託研究を受けて、特許申請、論文作成など多くの成果を上げている。

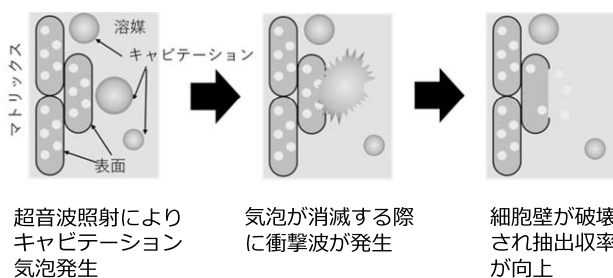


図 3 高压下での超音波直接照射抽出法による天然果実からの有効成分の抽出収率向上メカニズム



## 多層角膜モデルを用いた眼表面への大気汚染物質の影響評価：続報

大学院医学研究科	高	良	太
小林製薬㈱	田	中	保
慶應義塾大学	奥	田	明
福岡から診る大気環境研究所	西	田	春
医学部眼科学教室	内	尾	一
	尾	崎	明
福岡から診る大気環境研究所所長	林	政	彦

## 1. はじめに

大気汚染物質によるアレルギー反応の増強は、多くの器官で惹起されることが知られており、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などの増悪は臨床研究・基礎研究共にこれまでに多数の報告がされてきている。臨床研究により、外気の暴露を常に受けている眼表面も大気汚染物質によってアレルギー性結膜炎や春季カタルの増悪が起こると考えられている<sup>1)</sup>。基礎研究では、培養された結膜上皮細胞へディーゼル粒子 (Diesel Particulate Matter: DEP) を暴露させ、その有害性を検討している報告などがある<sup>2)</sup>。しかし、これら既報の多くは単層の培養上皮細胞を使用しているものであった。実際の体内組織ではこれら上皮細胞は多層であることが多く、眼表面の角膜上皮も多層構造である。最近、培養上皮細胞の多層モデルが市販されるようになっており、これを用いることで、生体反応により近い現象の確認が期待される。一方で、サイクロン方式により、暴露実験に使用できる量の大气浮遊状態に近い微粒子状のサンプルを得ることが可能になっている<sup>3)</sup>。

当研究所では、多層上皮培養モデルに、福岡大学屋上でサイクロン法により採取した粒子を暴露し、細胞生存率や各種サイトカイン分泌、そして細胞間同士の結合に重要である tight junction の計測を実施した。また、捕集された大気浮遊微粒子の特性についても計測し、その関係性について論文発表をしている<sup>4)</sup>。ここでは、その概要について報告する。

## 2. 手法：多層角膜檢體、暴露粒子、分析

使用した検体は、LabCyte CORNEA-MODEL (Japan tissue Engineering Co.Ltd., Aichi, Japan) である。本製品は、もともと物質の眼刺激性（安全性）を評価する標準的な動物実験である Draize 試験の代替法として開発されたものであり、実際の生体反応に近い状態を再現・検証できるとされている<sup>5)</sup>。細胞間接着分子も再現されており、分子生物学的な解析の他、コンタミネーションへの耐性も期待できる。

暴露する粒子は、サイクロン方式によって粒子径  $2.3\mu\text{m}$  以下 ( $\text{PM}_{0.3-2.4}$ ) および  $2.4\mu\text{m}$  以上 ( $\text{PM}_{>2.4}$ ) の2郡に分級された大気浮遊微粒子、および、標準黄砂、対照物質として、標準都市粉塵 (urban aerosol: UA) を使用した (図1)。これらの粒子群を3段階の濃度 (1, 10,  $100\mu\text{g/mL}$ 。UA は  $100\mu\text{g/mL}$  のみ) で先の培養上皮モデルへ暴露させた。

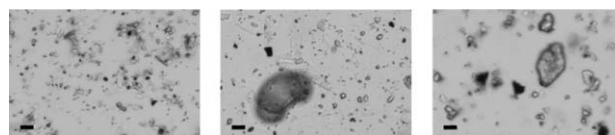


図1. 暴露粒子の光学顕微鏡像  
(左: PM<sub>0.3-2.4</sub>、中央: PM<sub>>2.4</sub>、右: UA)

暴露検体の細胞生存率の測定は水溶性テトラゾリウム塩を使用した cell counting kit-8 (CCK-8) にて実施し、細胞破壊の指標であるサイトカイン分泌として IL-6 および IL-8 の分泌量、また細胞の形態変化および細胞間結合についてはヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin: HE) 染色および zonula

occludens-1 (ZO-1) 抗体による免疫染色を用いて検討した。

暴露大気微粒子サンプルの組成、化学特性分析としては、エンドトキシン、βグルカン濃度、各イオン測定、金属成分および炭素成分解析、および酸化能について測定を行った。

3. 結果：多層化上皮細胞モデルの反応

3.1 細胞生存率とサイトカイン分泌量

生存率の PM<sub>0.3-2.4</sub> 濃度依存性はなかったが、PM<sub>>2.4</sub> の高濃度群（100 μg/mL）で有意に生存率が低かった。対照物質である UA 100 μg/mL でも同様の結果であった。

IL-6、および IL-8 ともに有意に分泌量が増加することはなかった。

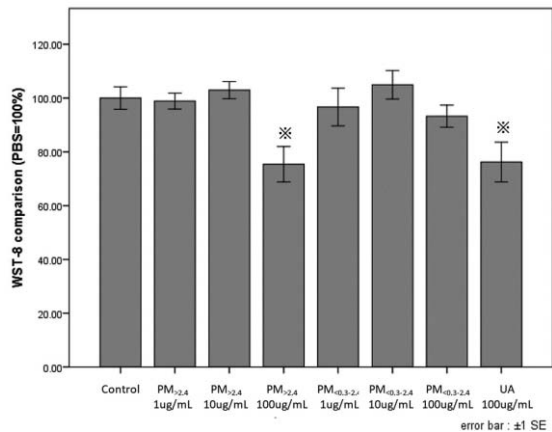


図 2. 細胞生存率

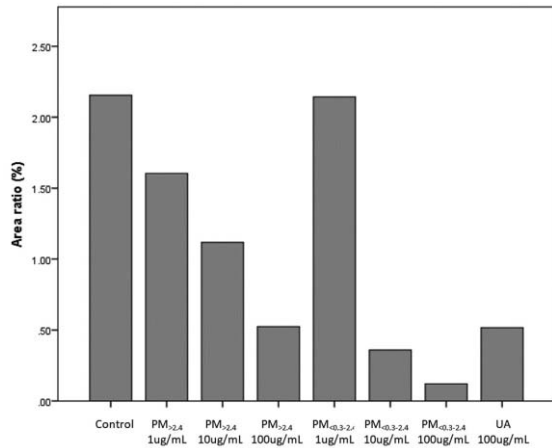


図 3. ZO-1 の発現率の変化

3.2 形態変化

障害性が最も高いと思われる 100 μg/mL の暴露群においても、予備実験で見られた細胞層の剥離は確認されず、厚さについても特に有意な変化は認められなかった。一方、ZO-1 による免疫染色では、各粒子群の濃度に依存して、その発現が低下していくことが確認された。

3.3 成分解析

エンドトキシン濃度は PM<sub>0.3-2.4</sub> で、β グルカン濃度および酸化能は UA で比較的高い傾向があった。また炭素成分では、元素炭素（Elemental Carbon: EC）が UA で非常に高い一方、有機炭素（Organic Carbon: OC）は PM 群で比較的高濃度であった。

表 1. 各粒子群の成分解析

	PM <sub>0.3-2.4</sub>	PM <sub>&gt;2.4</sub>	UA	Unit
Endotoxn	0.14	0.06	0.037	EU/mg
β-glucan	5163	7949	42405	pg/mg
Ions	Cl <sup>-</sup>	5152	11691	ppm
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	61570	74021	
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	36565	18032	
	Na <sup>+</sup>	13918	16140	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3494	1502	
	K <sup>+</sup>	1768	735	
	Mg <sup>2+</sup>	195	542	
	Ca <sup>2+</sup>	5295	7753	
Elements	Mg	11280	13077	ppm
	Al	44106	60357	
	Si	120368	187994	
	P	1090	1386	
	S	11821	8744	
	Cl	12022	58954	
	K	15042	24116	
	Ca	20742	42554	
	Ti	1990	3380	
	V	82	95	
	Cr	115	90	
	Mn	585	931	
	Fe	23181	36381	
	Ni	66	58	
	Cu	91	141	
	Zn	538	524	
	Pb	122	115	
Carbonaceous components	EC	9255	13573	ppm
	OC	99206	70508	
Oxidative potential***				pmol/min/μg
				21.6 18.3 30.8

\* : Refer to Mori, et al. Anal Bioanal Chem (2008)<sup>6</sup>

\*\* : Refer to Okuda Atmospheric Environment (2013)<sup>7</sup>

\*\*\* : Measured by dithiothreitol assay

#### 4. 考察：多層化上皮細胞の特性

サイクロン方式により大気浮遊状態に近い粒子状態で採取された粒子サンプルを多層培養上皮モデルに暴露した。暴露により、細胞間結合が濃度依存的に破壊されている可能性があり、特により微小な粒子群 ( $PM_{0.3-2.4}$ ) で破壊の程度が大きい可能性がある。しかし、生存率、各種サイトカインの分泌量には濃度依存的な有意差は見られなかった。これらの結果は、多層化されている角膜細胞層の強靱性を反映していると考えられる。我々の人体における角膜層は、「物を視る」ために透明を維持することが求められるため、外界からの異物に容易に炎症反応を示さない「恒常性」と「強靱性」が必要とされる。

各粒子群の成分解析とこれらの結果の関連性については、データ数が少ないため多変量解析等の統計学的な検討は出来なかった。しかし、生存率が低下した  $PM_{>2.4}$  や UA では  $\beta$  グルカン濃度や酸化能が高いことから、これらが細胞層へ影響を及ぼした可能性は高い。生体への影響は粒子径も関与するという報告もあり<sup>8)</sup>、今後、粒子径やイオン成分、元素成分等の影響を総合的に理解するため、データを増やす、多様な実験、統計学的手法による検討等が必要になると考えられる。

#### 5. 参考文献

- 1) 小沢昌彦、市頭教克、内尾英一. 春季カタルの増悪と黄砂の観測時期との関連. あたらしい眼科 (0910-1810) 25:1281-1284, 2008
- 2) Fujishima H, Satake Y, Okada N, et al. Effects of diesel exhaust particles on primary cultured healthy human conjunctival epithelium. *Ann Allergy Asthma Immunol* 110:39-43, 2013
- 3) Okuda T, Shishido D, Terui Y, et al. Development of a High-Volume Simultaneous Sampler for Fine and Coarse Particles using Virtual Impactor and Cyclone Techniques. *Asian J. Atmos. Environ* 12: 78-86, 2018
- 4) Ko R, Hayashi M, Tanaka M, et al. Effects of ambient particulate matter on a reconstructed human corneal epithelium model. *Sci Rep* 11:3417, 2021
- 5) Katoh M, Uemura N, Hamajima F, et al. Morphological Characterization of a Reconstructed Human

Corneal Epithelial Model (LabCyte CORNEA-MODEL) as an Alternative to the Draize Eye Test for the Assessment of Eye Irritation. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 17:2-8, 2012

- 6) Mori I, Sun Z, Ukachi M, et al. Development and certification of the new NIES CRM 28: urban aerosols for the determination of multielements. *Anal Bioanal Chem* 391:1997-2003, 2008
- 7) Okuda T. Measurement of the specific surface area and particle size distribution of atmospheric aerosol reference materials. *Atmospheric Environment* 75: 1-5, 2013
- 8) Renwick LC, Brown D, Clouter A, et al. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* 61:442-447, 2004

