



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>®</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。

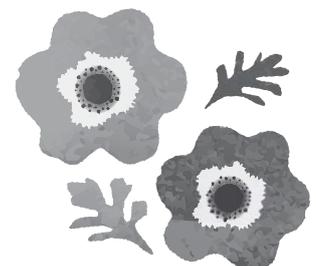
## 文献

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.





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.

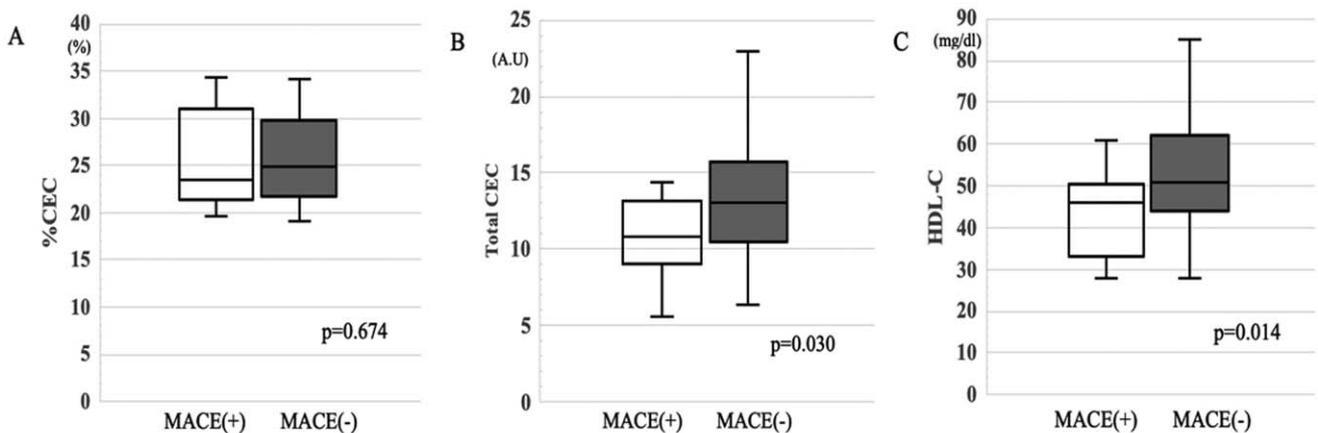
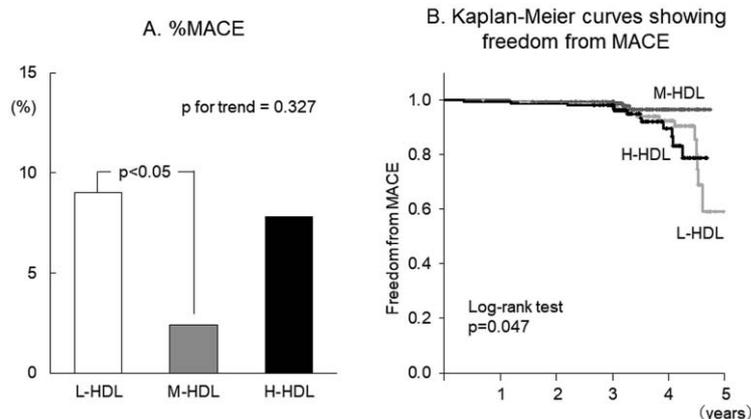


図 2. (A) %MACE in the L-HDL, M-HDL and H-HDL groups. (B) Kaplan-Meier curves showing freedom from MACE in the L-HDL, M-HDL and H-HDL groups.



## 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-

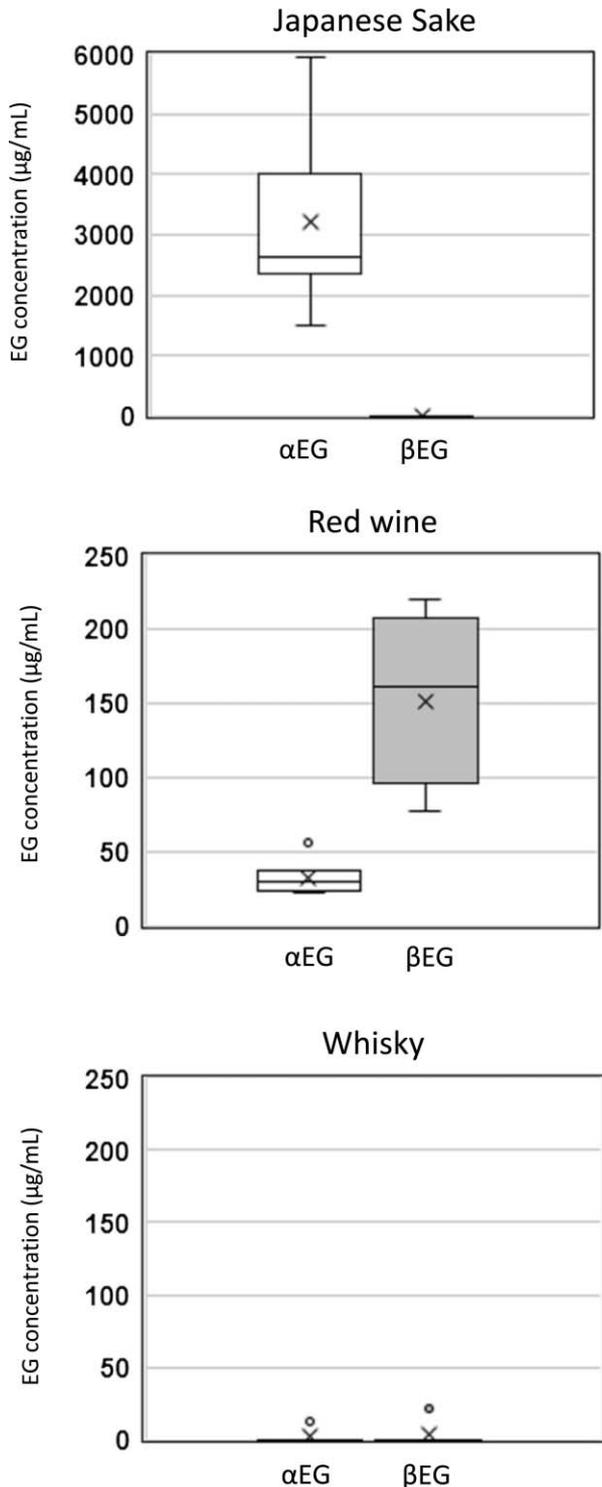
density lipoprotein cholesterol levels and major adverse cardiovascular events in patients who underwent coronary computed tomography angiography: FU-CCTA registry. *Heart Vessels*. 2021;36:1457-1465.





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)

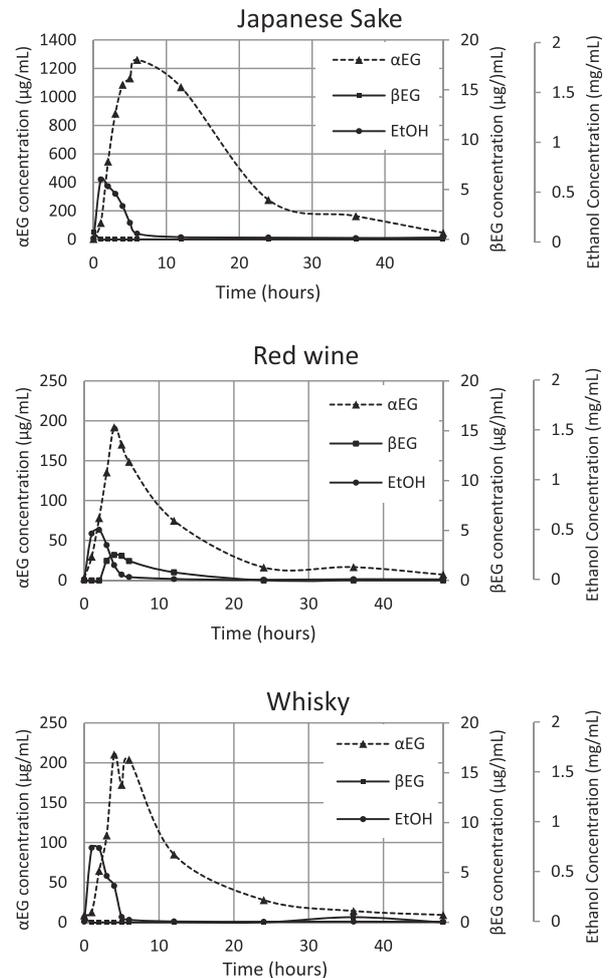
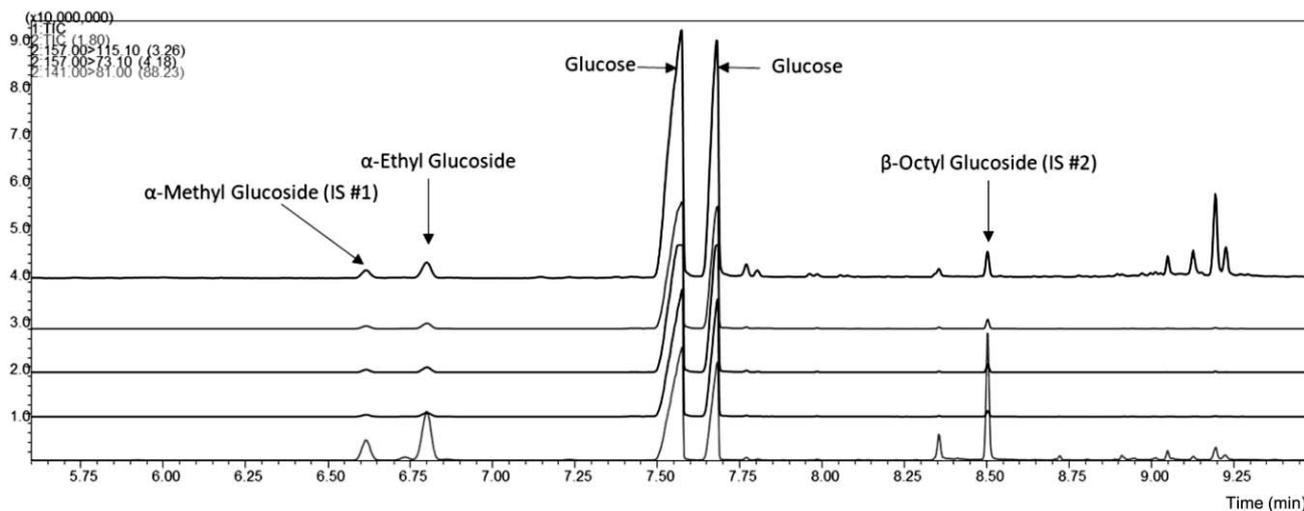


図3. マルトース、エタノール、小腸パウダー反応液の GC-MS/MS クロマトグラム



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。

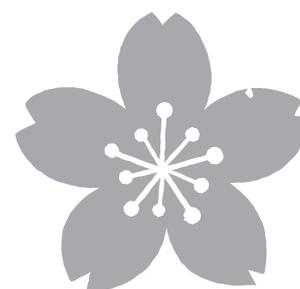
本研究は、福岡大学医の倫理委員会の承認のもとに実施している（2017M067、2018M056）。本研究は、科研費（17K19857、20K18989）の助成を受けたものである。

## 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.





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。

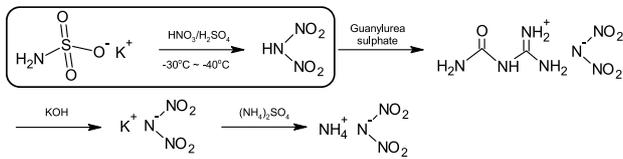


図2 ADNの合成反応の例<sup>7)</sup>  
(枠部分がニトロ化反応)

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。

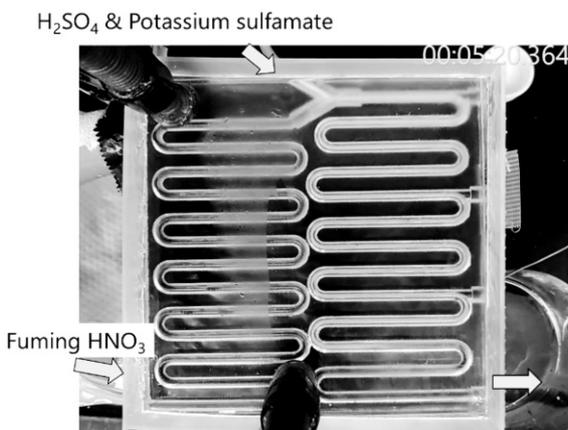


図3 小型連続反応器での反応の様子<sup>8)</sup>

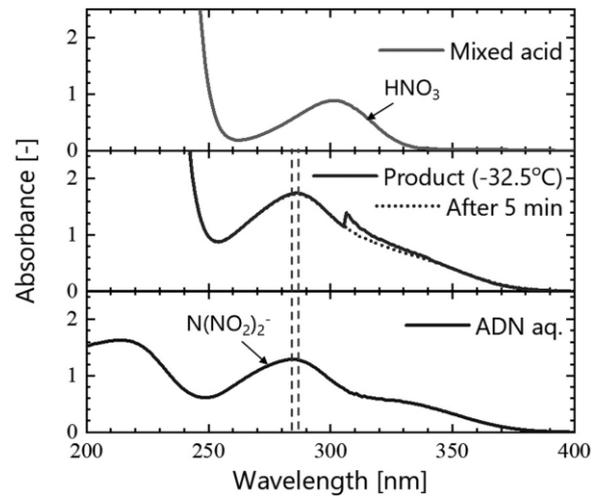


図4 生成物の紫外スペクトルの例<sup>8)</sup>

### 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  $56^\circ C$ ) 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。

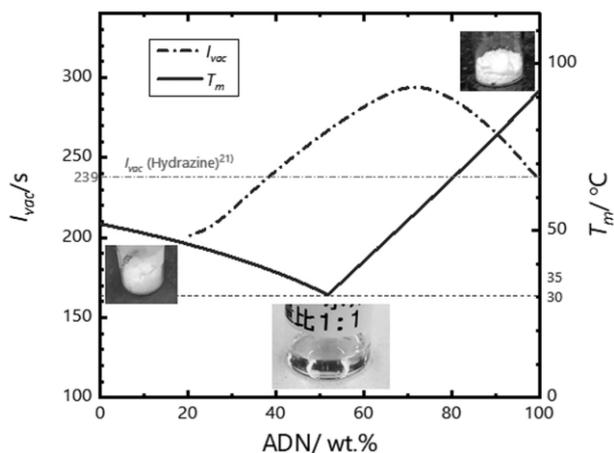


図5 ADN/FH の共融点および理論比推力<sup>10)</sup>

#### 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) Badgular, 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).





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) ニッケル当量と同程度である場合、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。

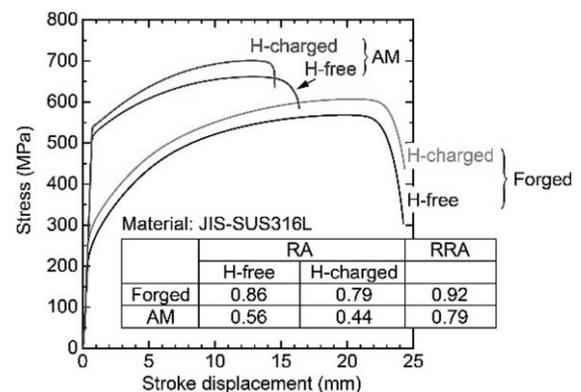


Fig. 1 Stress-stroke displacement curves, reduction in area (RA) and relative RA (RRA) of forged and additively-manufactured (AM) JIS-SUS316L.

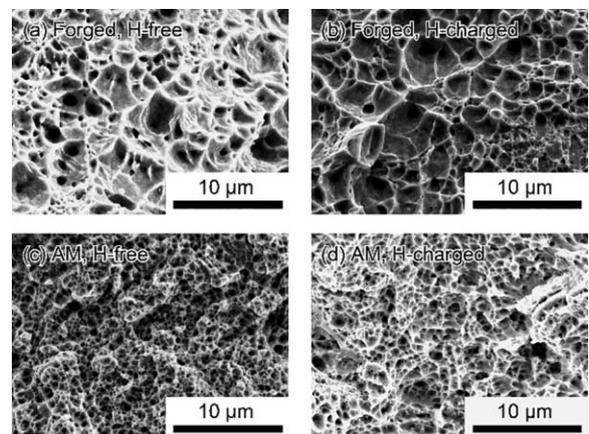


Fig. 2 Fracture surface morphologies of (a, b) forged and (c, d) additively-manufactured (AM) JIS-SUS316L (a, c) without and (b, d) with hydrogen-charging.

## 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. Calta, 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).





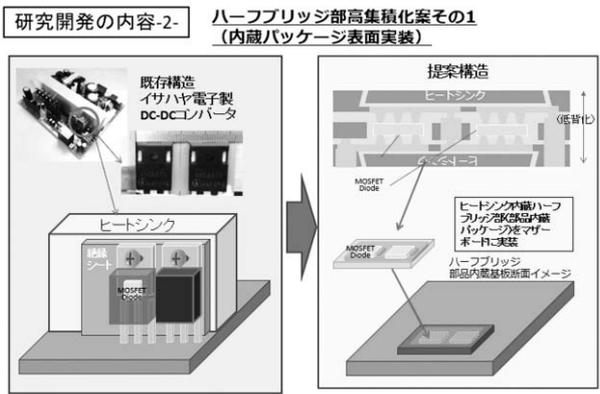
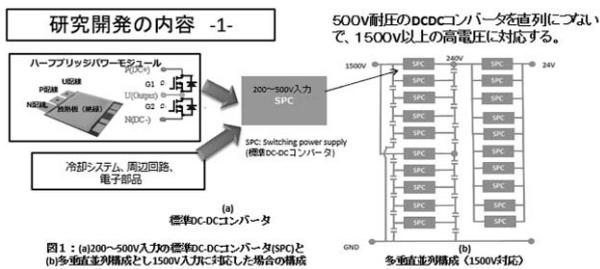


図3：「先端実装技術を用いた多重直列構成アダプティブ電源の研究開発」研究内容

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。





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。

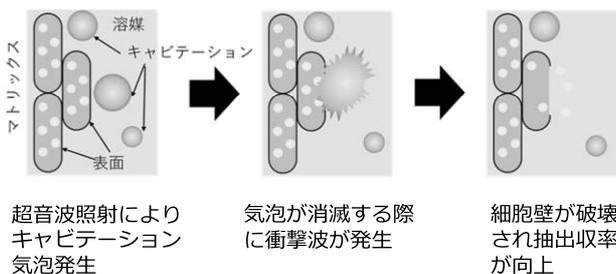


図 3 高压下での超音波直接照射抽出法による天然果実からの有効成分の抽出収率向上メカニズム





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変化することはなかった。

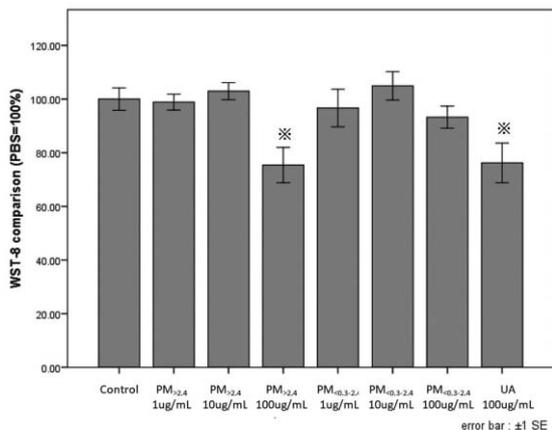


図 2. 細胞生存率

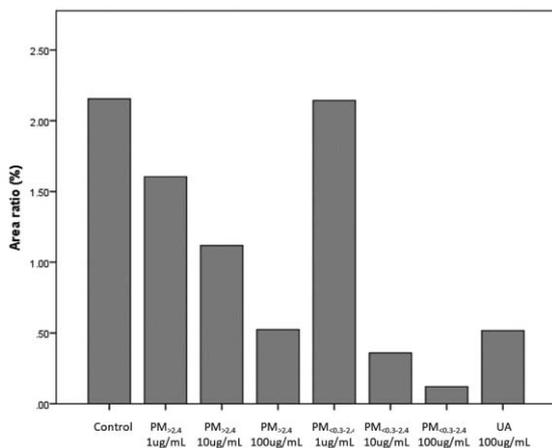


図 3. ZO-1 の発現率の変化

#### 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、元素状炭素 (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	5550
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	61570	74021	18010
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	36565	18032	79080
	Na <sup>+</sup>	13918	16140	2600
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3494	1502	2920
	K <sup>+</sup>	1768	735	2870
	Mg <sup>2+</sup>	195	542	2910
	Ca <sup>2+</sup>	5295	7753	41090
Elements	Mg	11280	13077	14000*
	Al	44106	60357	50400*
	Si	120368	187994	149000*
	P	1090	1386	1450*
	S	11821	8744	39100*
	Cl	12022	58954	8070*
	K	15042	24116	13700*
	Ca	20742	42554	66900*
	Ti	1990	3380	2920*
	V	82	95	73*
	Cr	115	90	66*
	Mn	585	931	686*
	Fe	23181	36381	29200*
	Ni	66	58	64*
Cu	91	141	104*	
Zn	538	524	1140*	
Pb	122	115	403*	
Carbonaceous components	EC	9255	13573	68000**
	OC	99206	70508	55000**
Oxidative potential***	21.6	18.3	30.8	pmol/min/μg

\* : 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<sub>0.3-2.4</sub>) 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靭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、「物を見る」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「強靭性」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<sub>2.4</sub> 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

