

博士學位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

(平成24年度授与分)

第15号

平成25年 5 月



富 山 県 立 大 学

目 次

課程博士

(学位の種類)	(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博士 (工学)	博知第7号	森川 大輔	音像定位における静的および動的音響特徴に関する研究	1
博士 (工学)	博知第8号	白 杉	Study on Hydrothermal Synthesis of Plate-Like Niobate Powders for Oriented Lead-Free Piezoceramic	7
博士 (工学)	博知第9号	吉川 武尚	マイクロレンズアレイの超精密切削加工に関する研究.....	13
博士 (工学)	博生第18号	曲 琛	Dissolution of woody biomass in ionic liquids for nuclear magnetic resonance analysis of cell wall components	17
博士 (工学)	博生第19号	磯谷 健太郎	Studies on the efficient biocatalysis for producing optically pure alcohols including (<i>R</i>)-(-)-quinuclidinol	23

論文博士

(学位の種類)	(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博士 (工学)	論博生第5号	内橋 伸介	Structure-function analysis and gene expression of mammalian UDP-glucuronosyltransferase	29
博士 (工学)	論博生第6号	安田 佳織	Prediction of the Metabolism of Drugs and Food Factors by Drug-Metabolizing Enzymes in Humans	35

氏 名 森 川 大 輔

学位の種類 博士（工学）

学位記番号 博知第7号

学位授与日 平成25年3月25日

論文題目 音像定位における静的および動的音響特徴に関する
研究

論文審査委員（主査）富山県立大学 教授 平原 達也

教授 野村 俊

教授 中村 清実

准教授 高木 昇

北陸先端科学技術大学院大学

教授 赤木 正人

内容の要旨

立体音の聴こえに関する物理的、生理的、心理的側面についてこれまでに多くの研究がなされ、音源から両耳に至るまでの音響伝達関数である頭部伝達関数（Head Related Transfer Function: HRTF）とそれに含まれる音響的特徴である両耳間時間差（Interaural Time Difference: ITD）、両耳間音圧差（Interaural Level Difference: ILD）、およびスペクトラルキュー（Spectral cue: SC）とよばれるスペクトルの特定周波数に含まれるピークやノッチが立体音像の定位に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。これらの研究をふまえて立体音再生技術が開発されているが、狙いどおりの立体音を呈示するためには、厳密な音響条件を満たす再生系が必要である、という問題点がある。また、厳密な音響条件を満たす再生系を用いても、HRTFの個人差が大きいために、再生した立体音響空間が歪む場合が多い、という問題点もある。そこで、立体音再生技術を高度化するために、ヒトの立体音知覚特性をより精緻に明らかにすることが求められている。特に、受聴者が頭部を動かして受聴する場合に生じる、動的な音響的特徴が音像定位に与える影響については未解明の点が多く、その解明が求められている。

そこで、本論文では、立体音像の定位に重要な音響的特徴を明らかにすることを目的として、立体音像の定位に必要な最小限の周波数帯域、立体音像の定位に必要な動的な音響的特徴と音響的特徴の時間的

変化の影響、動的な音響的特徴の頭部運動に対する角度誤差と遅延時間が立体音像の定位に与える影響、立体音像の定位に必ずしも必要ない低域と高域の音響的特徴の変形が立体音像の定位に与える影響を明らかにする。

各章の構成は以下のとおりである。

第1章は序論で、本論文で取り組む問題を明らかにし、目的及び本論文の構成について述べている。

第2章では、本論文の背景となる、立体音の音像定位に関するこれまでの物理的、生理的、心理的な知見をまとめて述べている。

第3章では、立体音像の定位をするために必要最小限の周波数帯域、すなわち、刺激音に何Hzから何Hzまでの周波数成分が含まれていれば、白色雑音と同程度の精度で立体音像の定位が可能であるか、について述べている。受聴者の周囲に並べたラウドスピーカで、白色雑音、高域通過雑音、低域通過雑音、帯域通過雑音、帯域阻止雑音を呈示し、水平面音像定位実験を行った。その結果、水平面の音像定位に必要な最小限の周波数帯域は2～12kHzであることと、受聴者の16kHzの最小可聴値と高域通過雑音の音像定位正答率の間には有意な負の相関があることがわかった。また、2～12kHzの周波数成分の一部が欠落した刺激音は、2kHz以下や12kHz以上の周波数成分を含めることによって、より高い精度で立体音像の定位ができることもわかった。一方、2～12kHzの周波数成分が全て欠落した刺激音は、低域音と高域音が別々に知覚されることがわかった。また、それを前面または背面から呈示した場合には、前後の2方向に音像が分かれて定位される場合が多いこともわかった。

第4章では、動的なITD、ILD、SCが水平面と正中面の音像定位に与える効果について述べている。受聴者の周囲に並べたラウドスピーカで、水平面または正中面から白色雑音、高域通過雑音、低域通過雑音、帯域通過雑音を呈示し、頭部を動かしながら受聴する条件で音像定位実験を行った。その結果、水平面の音像定位には主として動的なITDと動的なILDが貢献していること、正中面の音像定位には主として動的なITDと動的なSCが貢献していることがわかった。また、音像定位中に受聴者がどのように頭部を運動させるかを明らかにするために、実験中の頭部運動を計測した。その結果、立体音像の定位が困難な、帯域が制限された刺激音や正中面から呈示された刺激音に対して、受聴者は動的な音響的特徴を多く得るために頭部を大きく、速く動かすことがわかった。

第5章では、動的バイノーラル音を用いる場合、動的な音響的特徴の頭部運動に対する角度誤差と遅延時間が立体音像の定位に及ぼす影響について述べている。頭部運動に追従して動くダミーヘッドシステム（テレヘッド）の周囲に並べたラウドスピーカで、水平面または正中面から白色雑音を呈示し、テレヘッドの頭部追従角度と追従遅延時間を系統的に変化させた動的バイノーラル音を受聴者がヘッドホンで受聴する条件で音像定位実験を行った。その結果、動的バイノーラル音を用いる場合は、受聴者の頭部運動の追従角度を正確に反映させる必要は無いこと、受聴者の頭部運動に合わせて音像が動けば追従遅延は250ms程度まで許容されることがわかった。

第6章では、立体音像の定位に必ずしも必要ない低域と高域の音響的特徴の変形が立体音像の定位に及ぼす影響について述べている。すなわち、立体音像を二つに分離して定位したり、音像を頭内に定位したりすることなく、立体音像を自然に定位するためのHRTFの低域及び高域の変形条件について述べている。まず、立体音像を自然に定位させるHRTFを合成する方法を提案した。そして、白色雑音に低域や高域を系統的に変化させた水平面または正中面の合成HRTFを畳み込んだ動的バイノーラル音を受聴者にヘッドホンから呈示し、音像定位実験を行った。その結果、動的バイノーラル音を用いる場合は、1kHz以下の帯域はITDを1kHz以上のITDから予測した値に、8kHz以上の帯域はILDを2～8kHzの

ILDの平均値にすることで、立体音像が自然に定位されることがわかった。

第7章は結論で、本論文で明らかになった成果をまとめて述べている。すなわち、立体音像の定位に必要な最小限の周波数帯域は2～12kHzであること、水平面の音像定位には主として動的なITDと動的なILDが貢献しており正中面の音像定位には主として動的なITDと動的なSCが貢献していること、受聴者は定位が困難な刺激音に対して動的な音響特徴を多く得るために頭部を大きく早く動かすこと、動的な音響特徴は受聴者の頭部運動の追従角度を正確に反映する必要は無く、受聴者の頭部運動に合わせて音像が動きさえすれば250ms程度まで追従遅延が許容されること、動的バイノーラル音では1kHz以下の帯域をITDを1kHz以上のITDから予測した値、8kHz以上の帯域をILDを2～8kHzのILDの平均値に変形しても立体音像が自然に定位されること、を明らかにした。

すなわち、動的バイノーラル音を用いると、受聴者の頭部運動の追従角度を正確に反映させなくても、受聴者の頭部運動に対して音像の動きが250ms程度遅延しても、1kHz以下や8kHz以上のHRTFを変形しても、立体音像を希望する位置に定位させることが可能である。この結果は、これまでの動的な立体音再生技術で必要とされていた受聴者の頭部運動の正確な反映やHRTFの高精度な再現は必ずしも必要がないことを示しており、伝達遅延が不可避な立体音響テレプレゼンスシステムや、HRTFの高精度な再現が困難なパーソナル立体音再生システムにおいても、思いどおりの位置に立体音を呈示できることを示す。

審査の結果の要旨

本論文は、立体音像を十分な精度で再生するために必要な両耳に届く音の静的および動的音響特徴に関する研究をまとめたものであり、全7章で構成される。

ステレオフォニック技術やバイノーラル技術をはじめとして、立体音再生技術は広く利用されている。しかし、再生音像が頭内に定位したり前後が逆に定位したりするなど、再生音像空間が歪むという問題がある。その原因は、頭部形状の個人差が大きいため、設計どおりの音響特徴を持つ刺激音を受聴者の両耳に呈示できないからである。個人ごとに、また、環境ごとに音響条件を厳密に補正すればこの問題を解消できるが、個人差は多様であるために、汎用的な音響条件の補正法は実用化されていない。一方、この再生音像空間の歪みは、頭部を動かす受聴者の両耳で収録した動的バイノーラル音を用いることによっても、解消できる。しかし、これまでの立体音再生技術の基盤となる立体音像の知覚特性は、頭部を動かさない受聴者の両耳に届く音の静的音響特徴に基づいたもので、動的バイノーラル音の動的音響特徴と音像定位の関係についてはほとんど何も知られていない。

本論文では、時間構造やスペクトル構造を系統的に変形した刺激音と受聴者の頭部運動を反映させた刺激音を用いた音像定位実験によって、両耳に届く音の音響特徴が再生される立体音像に及ぼす影響を評価し、立体音像を十分な精度で再生するために必要な静的および動的音響特徴を明らかにしている。

第1章は序論で、現在の立体音響技術の問題点、ならびにヒトの立体音知覚特性の不明点を述べ、取り組むべき問題を明らかにして、本研究の目的を述べている。

第2章では、本論文の背景となる立体音に関する物理学、神経生理学、心理学的知見について述べている。まず、両耳に到達する刺激音の物理的な特徴を律する頭部伝達関数と、その作用で生じる刺激音の両耳間時間差 (ITD)、両耳間音圧差 (ILD)、スペクトラルキュー (SC) について述べ、次に、立体音を処理する聴覚神経生理学的メカニズムと、立体音の音像定位に関する聴覚心理学のこれまでに知見について述べている。

第3章では、受聴者が頭部を静止させて刺激音を受聴する場合に、音像定位に必要な刺激音の周波数帯域について述べている。受聴者の周囲に並べたラウドスピーカから白色雑音、高域通過雑音、低域通過雑音、帯域通過雑音、帯域阻止雑音を呈示して水平面の音像定位実験を行い、刺激音の高域あるいは低域通過雑音の遮断周波数と音像定位精度の関係は、低次の低域通過型フィルタおよび高域通過型フィルタの伝達関数で予測できること、刺激音に2kHz~12kHzの周波数成分が含まれていれば90%以上の精度で水平面音像定位ができること、受聴者の16kHzの最小可聴値が低いほど、高域通過雑音の音像定位正答率が高いこと、を明らかにしている。また、2kHz~12kHzの周波数成分の一部が欠落した刺激音の音像は、2kHz以下あるいは12kHz以上の周波数成分を含めることにより音像定位精度を上げられることを明らかにしている。さらに、2kHz~12kHzの周波数成分が全て欠落した刺激音の音像は二方向に分離するという現象を発見している。

第4章では、受聴者が頭部を動かしながら刺激音を受聴する場合に、音像定位に必要な刺激音の周波数帯域と受聴者の頭部運動について述べている。受聴者の周囲に並べたラウドスピーカから白色雑音、高域通過雑音、低域通過雑音、帯域通過雑音を呈示して水平面と正中面の音像定位実験を行い、水平面では動的な両耳間時間差 (Δ ITD) あるいは動的な両耳間音圧差 (Δ ILD) が含まれていれば、正中面では Δ ITDあるいは動的なスペクトラルキュー (Δ SC) が含まれていれば、帯域幅が1オクターブ程度

の狭帯域雑音あっても白色雑音と同じ精度で音像定位ができることを明らかにしている。また、音像定位実験中の受聴者の頭部運動を計測・解析することにより、頭部運動条件では、音像定位が困難な狭帯域雑音や正中面から呈示された刺激音に対して、受聴者は頭部を速く大きく動かし、より多くの動的音響特徴を得ることによって、音像定位精度を上げていることを明らかにしている。

第5章では、動的バイノーラル音に含まれる動的音響特徴の、頭部運動に対する角度誤差、および遅延時間の許容範囲について述べている。受聴者の頭部回転運動に追従して回転するダミーヘッドシステムの周囲に並べたラウドスピーカから白色雑音を呈示し、回転ダミーヘッドで収録した動的バイノーラル音をヘッドホン受聴する水平面と正中面の音像定位実験を、回転ダミーヘッドの頭部追従角度と追従遅延時間を系統的に変化させて行い、受聴者の頭部運動が動的バイノーラル音に反映されていることが重要で追従角度を正確に再現する必要はないことと、追従遅延が250msあっても音像定位ができることを明らかにしている。

第6章では、動的バイノーラル音の音像を自然に定位させる頭部伝達関数の変形条件について述べている。頭部伝達関数の特定の帯域を変形する信号処理法を提案し、音像が二つに分離定位したり頭内定位したりせず自然に頭外定位する、頭部伝達関数の低域と高域の変形条件を求めるための実験を行った。その結果、頭部伝達関数の1 kHz以下の低域成分には1 kHz以上のITDから球形頭部モデルから予測したITDを、8 kHz以上の高域成分には2～8 kHzの平均ILDを与えればよいことを明らかにした。

第7章では、第1章から第6章までの議論で得られた結論を述べている。

以上で述べたように、本研究は、これまであまり省みられなかった動的バイノーラル音に焦点を当て、立体音像を十分な精度で再生するために必要な動的バイノーラル音の音響特徴を明らかにすることにより、立体音再生システム的设计条件を明確にした。本研究は、その研究手法および結果において高い独創性が認められ、結果の解釈も適切である。本研究で得られた成果は、音響工学分野において工学的観点から極めて重要な知見が得られており、工学の発展に貢献できると評価される。なお、本論文に関連する発表論文は6編であり、そのうち申請者が筆頭のもの4編である。

平成25年1月15日に博士論文の審査および最終試験を実施した結果、申請者は、学術研究にふさわしい討論ができており、当該分野に関して十分な全般的知識と独立して研究を遂行できる能力を有すると判断されることから、本論文は博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。

氏 名 白 杉
学位の種類 博士（工学）
学位記番号 博知第8号
学位授与日 平成25年3月25日
論文題目 Study on Hydrothermal Synthesis of Plate-Like Niobate
Powders for Oriented Lead-Free Piezoceramics
(非鉛系配向圧電セラミックス用板状ニオブ酸塩粉
末の水熱合成に関する研究)
論文審査委員 (主査) 富山県立大学 教授 福原 忠
教授 松田 敏弘
教授 中村 清実
准教授 唐木 智明
工業技術センター次長 二口 友昭

内容の要旨

第1章は序論であり、研究の背景と目的を述べている。1940年代にチタン酸バリウム (BaTiO_3) の圧電性が報じられ、圧電セラミックスが実用化されはじめたが、1950年代にチタン酸ジルコン酸鉛 (PZT) 圧電セラミックスの発見をきっかけに、圧電材料が本格的に使用されるようになった。現在、広くエレクトロニクス・メカトロニクス・自動車などの分野でフィルタ、レゾネータ、圧電アクチュエータ、加速度センサー、圧電トランス、ソナー、超音波探知装置などの様々な圧電デバイスが活躍しているが、それらのデバイスを構成する圧電材料の大部分を占める圧電セラミックスの殆どはPZT系強誘電体セラミックスであり、原料の主成分として多量（重量の2/3）の酸化鉛を含んでいる。酸化鉛の有毒性から、国内ではその製造業者の事業撤退が相次ぎ、他の国では製造従業員の鉛中毒被害が指摘されている中、原料や製造、製品廃棄処理に関して、環境問題が懸念される。EUでは2006年7月からRoHS指令が実施され、電子部品におけるPb、Hg、Cd、 Cr^{6+} などの有害元素の使用が法律で禁止されたが、鉛を含まない圧電材料の性能は未だ実用化レベルに達しておらず、鉛系圧電材料を使わざるを得ないのが現状である。そのため、期限を限って例外規定としてRoHS指令対象から除外されている。世界的な環境調和の観点から、鉛を使わない高性能な圧電材料の開発が望まれている。

高性能な非鉛系圧電セラミックスの研究開発には主に3つの有効な方法があり、それらはナノドメイ

ン微細構造、垂直なMPBを有する材料組成、分極軸を制御した粒子配向が挙げられる。2004年のNature誌に、分極軸を制御したニオブ酸塩非鉛系配向セラミックスが優れた圧電特性を示すことがトヨタ中研の斎藤氏により報告され、注目を集めている。その際、配向セラミックスを作製する工程に必要なテンプレートである板状ニオブ酸塩粉末原料は、一般的にまず1000℃前後の高温での熔融塩法でビスマス層状構造の中間物を作製した後、もう一度1000℃前後の高温での置換反応を経て得られる。この方法は、コストが高く、量産化が難しいという欠点がある。板状ニオブ酸塩粉末作製に適する低コストで量産化可能な方法の解決は、高性能な非鉛系圧電セラミックスの開発乃至実用化に関わる課題となっている。

本研究では、化合物の合成及び結晶の成長によく使用される水熱合成法を提案した。まず板状ニオブ酸塩水和物を合成し、400~650℃の熱処理で板状ニオブ酸塩粉末を作製する工程である。水熱合成法は約200℃の密閉容器中で水溶液から酸化物などの合成ができ、省エネルギー・低コストで量産化に適する方法である。成功すれば、高性能な非鉛系圧電セラミックスの実用化に貢献できる。

第2章では作製方法及び測定方法などの実験手法を述べている。

第3章では、板状(K, Na)NbO₃粉末のサイズに対する水熱合成条件の影響について述べている。出発原料はNb₂O₅、KOHとNaOHである。原料K/Naが1:1から3.5:1、反応温度が200℃、反応時間が2から24時間で合成を行った結果、K/Na=1:1、または反応時間が8時間以上の場合、得られた化合物はキューブ状の最も安定なペロブスカイト構造の(K, Na)NbO₃ (KNN)である。しかし、K/Na>1.5:1、かつ反応時間が2から4時間の場合、扁円球状の未知な粉末が得られた。XRD分析の結果、この扁円球状の未知粉末は単斜晶系の対称性を持ち、格子定数a=1.190nm、b=1.633nm、c=0.875nmとβ=104.7°である。示差熱及び熱重量分析から、この扁円球状粉末は約10wt %の水を含む水和物であることが分かった。450℃で2時間の加熱処理により結晶水が除去され、ペロブスカイト構造のKNNになった。

さらに、反応原液に表面活性剤ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SDBS) の微量添加により、上記の未知水和物粉末の形状が扁円球状から板状に変化した。この板状水和物粉末を脱水処理して得られた板状KNNは(100)配向しており、ニオブ酸系配向圧電セラミックス作製に必要なテンプレートとして使用が可能である。

第4章では、水熱合成中ニオブ酸塩粉末形状に対する表面活性剤の効果を述べている。表面活性剤の効果を調べるため、SDBSの外に表面活性剤としてよく使われるヘキサメタリン酸ナトリウム (SH) とポリエチレングリコール (PEG) も試みた。これらの表面活性剤はすべて板状KNN水和物に効果があった。同様にNb₂O₅とKOHを原料にすると、板状のKNbO₃ (KN) 水和物が得られた。しかし、Nb₂O₅とNaOHを原料にした場合、NaNbO₃ (NN) 水和物の形状制御に表面活性剤の効果はまったくなかった。従って、板状水和物粉末形成のメカニズムは次のように説明できる。KNNとKNは強誘電体であり自発分極を持っている。最初に形成した分子の分極の面に表面活性剤イオンが付着し、その面の成長が妨げられた。結局、分極と垂直な周囲方向が大きく成長し、板状になった。NNが極性のない構造をしているので、形状制御に表面活性剤の効果はなかった。

KNN水和物にとって、SDBSがベストである。得られたKNN水和物の幅が1.5から5 μm、アスペクト(幅径比)が約10である。

第5章では、(K, Na)NbO₃の2段階水熱合成について述べている。前章で得られた板状KNN水和物粉末に多くの破片が混在している。破片のアスペクトが小さく、配向セラミックス作製工程のテンプレートとしては使えない。この破片の量を減らすため、熱水中の結晶成長を利用する2段階水熱合成法を考案した。まず第1段階に150℃で小さい板状KNN水和物を合成する。それを第2段階の原料液に混ぜ込み、80℃で10時間反応させると、破片の少ない板状KNN水和物粉末が得られる。そのとき粉末の幅が約7 μm、厚みが約0.6 μmである。80℃という低温で、特にオートクレーブを使う必要はなく、普通のピーカーでも対応できるので、省エネ低コストで量産化に非常に有利である。

第6章では、板状NaNbO₃粉末の水熱合成を述べている。セラミックスの焼結温度を考えると、テンプレートの耐熱温度が高いほどよいことは明らかである。しかし、前章で得られたKNNテンプレートの融点が約900℃であり、現在のニオブ塩系圧電セラミックスの焼結温度より低いので、テンプレートとして使いづらい。より耐熱温度(融点)の高い板状NN水和物粉末合成を水熱合成法で試みた。第4章で述べたようにNNの形状制御にSDBSなどの表面活性剤の効化はないことがわかったので、出発原料はNb₂O₅とNaOHだけにした。反応温度が20℃おきに80から200℃、反応時間が2時間おきに2から8時間、アルカリ濃度が2 mol/Lおきに2から16mol/L、Nb₂O₅の投入量も変化させて多量の合成実験を行った結果、ごく狭い合成条件で板状NN水和物粉末の合成に成功した。示差熱及び熱重量分析より、この板状NN水和物粉末は約20wt %の水を含み、約600℃で2時間の熱処理により結晶水が除去され、ペロブスカイト構造のNNになる。得られた板状NNは(100)配向しており、ニオブ酸系配向圧電セラミックス作製に必要なテンプレートとして使用が可能である。その幅が約35 μm、厚みが約3 μmである。またNNの分融点は1020℃前後である。

板状NN水和物粉末が形成できる条件はごく狭い。その形成のメカニズムもまだ完全に解明されていないが、本研究で得られた結果より下記のことを判明した。水熱合成過程中、まず棒状粉末ができて、次にそれらの棒状粉末が特定な方位に集まっていき板状になる。反応温度、反応時間、原料液のアルカリ濃度、さらにNb₂O₅の量も最終結果に影響する。

第7章では、本論文の研究を通じて得られた結果のまとめを述べている。本研究の成果として、低コストで量産化可能な水熱合成法と400～650℃の熱処理で板状ニオブ酸塩(K, Na)NbO₃及びNaNbO₃粉末の作製に成功した。それらの板状粉末は(100)面を持ち、非鉛系配向圧電セラミックスのテンプレートに使用できる。(K, Na)NbO₃の場合、SDBS援用と2段階水熱合成で幅約7 μm、厚み約0.6 μmの板状粉末が得られた。水熱合成中の表面活性剤の機能と板状水和物の生成メカニズムを解明した。NaNbO₃の場合、精密な水熱合成条件と原料調合比により幅約35 μm、厚み約3 μmの板状粉末が得られた。

審査の結果の要旨

エレクトロニクス・メカトロニクス・自動車などの分野では様々な圧電デバイスが使用されているが、その大部分を占める圧電セラミックスの殆どは酸化鉛を主成分とするPZT系強誘電体セラミックスであり、製造や廃棄処理に関しては環境問題が懸念されている。EUで2006年7月から実施されたRoHS指令において、圧電材料として使用されている鉛は、現在のところ代替品がないため、例外規定として指令対象から除外されている。以上のことから、高性能な非鉛系圧電セラミックスの研究開発は急務かつ必要不可欠である。

高性能な非鉛系圧電セラミックスの研究開発において、分極軸を制御したニオブ酸塩非鉛系配向圧電セラミックスが優れた圧電特性を示すことが報告され、注目を集めている。しかし、配向セラミックス作製に必要な板状テンプレート粉末は、一般的に1000℃前後の高温での熔融塩法で作製される。この方法は、コストが高く、量産化が難しいという欠点がある。板状ニオブ酸塩粉末作製に適する低コストで量産化可能な方法の解決は、高性能な非鉛系圧電セラミックスの開発乃至実用化に関わる課題となっている。

第1章では研究背景及び目的を述べている。低コストで量産化が可能な水熱合成法で板状ニオブ酸塩水和物を合成し、400～650℃の熱処理で板状ニオブ酸塩粉末を作製する工程を提案した。第2章では作製方法及び測定方法などの実験手法について述べた上で、第3章で表面活性剤SDBS援用の水熱合成法で板状KNN水和物の合成条件を調べた。得られたKNN水和物粉末は約10wt %の結晶水を持ち、格子定数 $a=1.190\text{nm}$ 、 $b=1.633\text{nm}$ 、 $c=0.875\text{nm}$ と $\beta=104.7^\circ$ の単斜晶系である。450℃で2時間の加熱処理により結晶水が除去され、ペロブスカイト構造の板状KNN粉末になる。この板状KNNは(100)配向しており、ニオブ酸系配向圧電セラミックス作製に必要なテンプレートとして使用が可能である。

第4章では3種類の表面活性剤の効果を調べ、SDBSが最も有効であることが分かった。得られたKNN水和物の幅が1.5から5 μm 、アスペクト（幅径比）が約10である。また、板状水和物粉末形成のメカニズムについて検討し、表面活性剤の効果を明らかにした。

第5章では板状粉末に混在している破片を減らす2段階水熱合成法を提案した。まず第1段階に150℃で小さい板状KNN水和物を合成する。それを第2段階の原料液に混ぜ込み、常圧下、80℃で10時間反応させると、破片の少ない板状KNN水和物粉末が得られる。この反応は特殊な高温加圧容器を必要とせず、通常のピーカーでも行えるので、省エネルギー・低コストで量産化に非常に有利である。

第6章ではより耐熱温度（融点）の高い板状NN水和物粉末を水熱合成法で作製できた。NN分子は極性がないので表面活性剤は効果がない。水熱合成の反応温度、反応時間、溶液アルカリ濃度、原料 Nb_2O_5 の投入量を正確に制御し、ごく狭い合成条件で板状NN水和物粉末の合成に成功した。この板状NN水和物粉末は約20wt %の水を含み、600℃で2時間の熱処理により結晶水が除去され、ペロブスカイト構造のNNになる。得られた板状NNは(100)配向しており、ニオブ酸系配向圧電セラミックス作製に必要なテンプレートとして使用が可能である。その融点は1020℃前後である。

第7章では、本論文の研究を通じて得られた結果のまとめを述べている。本研究の成果として、低コストで量産化可能な水熱合成法と400～650℃の熱処理で板状ニオブ酸塩(K, Na)NbO₃及びNaNbO₃粉末の作製に成功した。それらの板状粉末は(100)面を持ち、非鉛系配向圧電セラミックスのテンプレートに使用できる。(K, Na)NbO₃の場合、SDBS援用と2段階水熱合成で幅約7 μm 、厚み約0.6 μm の板状粉末が得られた。水熱合成中の表面活性剤の機能と板状水和物の生成メカニズムを解明した。NaNbO₃の

場合、精密な水熱合成条件と原料調合比により幅約 $35\mu\text{m}$ 、厚み約 $3\mu\text{m}$ の板状粉末が得られた。

以上の研究手法、得られた結果には独創性が認められ、その成果は圧電材料とそのデバイスの分野における工学的な価値が認められ、高性能な非鉛系圧電材料の研究開発と実用化に大きく貢献するものである。博士論文の研究方法論、得られた結果とその解釈が適切であり、的確な文章表現が与えられている。本論文に関連する発表論文は4編であり（そのうち申請者が筆頭のもの2編）、1編（申請者が筆頭）の投稿論文が掲載可となっている。また、国内特許出願は2件ある。

平成25年2月12日に博士論文の審査及び最終試験を行った結果、申請者は学術研究にふさわしい討論ができており、該当分野に関して十分な全般知識を有し、また独立して研究を遂行できる能力を持つと判断されることから、博士（工学）の学位を受けるに十分な学識と能力を有するものと判定し、学位論文として合格であると認められた。

氏 名 よし かわ たけ ひさ
吉 川 武 尚
学位の種類 博士（工学）
学位記番号 博知第9号
学位授与日 平成25年3月25日
論文題目 マイクロレンズアレイの超精密切削加工に関する研究
論文審査委員（主査）富山県立大学 教授 前田 幸男
教授 野村 俊
教授 大島 徹
准教授 神谷 和秀
新潟大学 名誉教授 梶田 正美

内容の要旨

液晶ディスプレイ（LCD：Liquid Cristal Display）などに用いられる光学部品は、輝度やコントラストなどの表示性能の向上を目的に、直径で数 μm から数十 μm の微細なレンズを多数個配置したマイクロレンズアレイ（MLA：Micro Lens Array）の形成が要求されている。例えば、3インチサイズのディスプレイには、約5千万個以上の膨大なMLAが形成される。LCD表示性能の向上には、レンズ形状および配置の最適設計と、設計仕様を忠実に再現する製造プロセスの開発が重要であり、この製造プロセスでは、個々のマイクロレンズを目標形状精度 $0.1\mu\text{m}$ 以下、位置精度 $\pm 1\mu\text{m}$ で形成することが開発課題となる。

そこで本研究では、MLAをロール金型表面に形成し、紫外線硬化樹脂に転写するRoll to Roll成形法に着目し、高精度・高機能なMLAフィルムの製造技術の開発を行った。その主な研究開発項目は、①超精密切削における加工誤差の発生要因の解明とそれに基づくMLA加工法の開発、②MLAを高速・高精度で加工するための積層型圧電素子（ピエゾ素子）を組込んだ微小切込みユニットの開発と、このユニットとNC工作機械との連動制御システムの開発、③光学フィルム成形用ロール金型にMLAを加工するためのロール回転ユニットの開発、④ダイヤモンド工具の摩耗が光学特性に及ぼす影響の解明と、それに基づき光学特性を向上させることが可能なスパイラル加工法の開発、⑤モアレ発生を低減できるMLA傾

斜配置の提案および本開発技術を適用・試作したMLAフィルムの光学特性の改善効果の検証である。

第1章では、微細光学部品の高性能・高品質化のためにMLAが有効であること、光学部品の製造に必要な要素技術と、研究の目的と方針を明確にしている。また、従来の微細形状加工に関する研究成果、さらに本研究の技術課題やその概要を述べている。

第2章では、マイクロレンズ成形用金型の各種加工法を比較し、加工誤差の発生要因および形状精度と位置精度の向上の検討を行った。このうち塑性加工と切削加工において、加工原理から発生し得る形状誤差の要因を分析し、ダイヤモンド工具を用いた超精密切削によりマイクロレンズの高精度加工が可能であることを明らかにした。さらに、超精密加工機の移動軌跡誤差がレンズの形状精度に及ぼす影響を明らかにし、 piezo素子駆動による微小切込みユニットとNC工作機を連動制御したMLA加工法を開発し、加工精度のうちの形状精度 $0.07\mu\text{m}$ 、位置精度 $\pm 0.8\mu\text{m}$ を達成できることを明らかにした。

第3章では、大面積のMLA金型加工に対応するため、微小切込みユニットの高速化を検討した。piezo素子は高速駆動させると発熱により構成部材が熱膨張し、切込み誤差の発生要因となる。そこで、低発熱piezo素子を試作し、その高速駆動時の発熱特性を実験的に検討し、熱膨張を従来比で約80%低減できることを明らかにした。このpiezo素子を微小切り込みユニットに組み込み、数kHzオーダーで長時間駆動した時の切込み方向の位置決め精度を $0.1\mu\text{m}$ に向上させた。さらに、加工機全体を恒温チャンバ内に設置し、長時間加工時の切込み変動に影響する温度変化を $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 以内に安定化させた。低発熱piezo素子を組み込んだ高速切込みユニットを用いて、駆動周波数 2.2kHz でマイクロレンズを切削加工した。その結果、切削方向の形状精度 $0.07\mu\text{m}$ 、割出し方向の形状精度 $0.04\mu\text{m}$ 、切削方向および割出し方向のレンズ位置精度 $\pm 0.8\mu\text{m}$ 以下と目標値を満足できることを明らかにした。以上の開発技術により、Cuめっき処理した平板金型（ $70\text{mm}\times 70\text{mm}$ ）に約6680万個のMLAをダイヤモンド工具により切削加工し、この平板金型で転写成形したフィルムの輝度分布を測定した結果、反射輝度を従来比で約3倍に向上できることを明らかにした。

第4章では、光学フィルムの連続シート成形に使用されるロール金型にMLAを形成するため、ロール旋回ユニットおよび、これと高速切込みユニットを連動させる制御装置を開発した。この旋回ユニットの主な構成は、ロール金型（外径 $130\text{mm}\times$ 長さ 390mm ）を回転軸受支持するに空気静圧軸受と、このロール金型をエアシリンダにより一定圧力で押付け支持する回転センタ方式であり、その回転精度は $0.1\mu\text{m}$ 以下である。また、ロール金型の加工面積は、平板金型（ $70\text{mm}\times 70\text{mm}$ ）と比較して約30倍であり、この長時間加工での切込み量を安定化させることを目的に、高速切込みユニットとロール旋回ユニットの相対位置を $\pm 0.03\mu\text{m}$ でインプロセス制御することで、切込み誤差を $\pm 0.1\mu\text{m}$ に低減できることを明らかにした。以上の開発したロール旋回ユニットにより、Cuめっき処理したロール金型にMLA（外径 $\phi 16\mu\text{m}\times$ 深さ $1\mu\text{m}$ 、楕円形状）を 2.2kHz で加工した結果、マイクロレンズの形状精度 $0.1\mu\text{m}$ 、位置精度 $\pm 0.9\mu\text{m}$ で約13億個のMLAを、165時間で加工可能なことを明らかにした。以上の研究成果から、MLAの超精密切削加工技術を平板金型とロール金型加工に適用するための課題と解決策を明らかにしている。

第5章では、ダイヤモンド工具の摩耗が光学特性に与える影響を検討し、光学部品として要求される品質を満足させるための加工プロセスを提案した。第4章の金型加工において、MLA加工原理と加工精度の確認のため、被削性が良好なCuめっきを用いた。しかし、Cuめっきは腐食し易いため保護めっきが必要となる。保護めっき処理では、めっき工程内での微細異物の付着などでめっき欠陥が発生する可能性が高く、製造上の不安定要因となる。そのため、ロール金型の材質としては、耐食性と硬さを兼ね備えたNi-Pめっきが望ましいが、Ni-Pめっきは硬く、大面積加工におけるダイヤモンド工具の摩耗により

形状精度が悪化する。そこで、単結晶ダイヤモンドの結晶方位と工具摩耗の相関の解明、工具摩耗がレンズ形状精度と輝度むらに及ぼす影響を実験的に明らかにした。これに基づき、工具摩耗が輝度むらに及ぼす影響を分散可能なスパイラル加工法を開発し、輝度分布の均一性を従来比で30%改善できることを明らかにした。

第6章では、MLAフィルムとカラーフィルタとの組合せで発生するモアレ現象をフーリエ解析から検討し、MLAを7°傾斜配置することでモアレ発生を低減できることを明らかにした。このMLAの傾斜配置をロール金型に加工するため、円周方向に1,140分割した多条スパイラル加工法を開発した。この加工法において、ロール金型の両端部の未加工領域部を低減する分割方式を検討し、光学フィルム成形用の有効幅362mmのロール金型を試作した。この試作したロール金型により成形したフィルムを用いて、LCDの反射膜を形成し、カラーフィルタと組合せて光学評価した結果、モアレ発生の低減に有効であることを明らかにした。さらに、工具摩耗が輝度むらに及ぼす影響を、256階調の白黒表示機能により解析する光学評価法を開発し、これにより輝度むらを低減できるMLA加工パスを決定した。以上のモアレ低減が可能な7°傾斜配置と、輝度むら低減が可能なMLA加工軌跡を適用したロール金型を試作した。この試作金型を用いて、転写成形したLCD反射膜フィルムを光学評価した結果、従来品に比べて、輝度むらやモアレなどの光学欠陥の低減と反射輝度（コントラスト）の高い優れた表示性能を得られることを明らかにした。

第7章では、本研究成果のMLAフィルムの工業化への展開として、携帯端末用の半透過・半反射型LCDの拡散反射膜フィルムへの適用に関して述べている。従来方式のサンドブラスト加工やフォトリソグラフィで製造された拡散反射膜フィルムは、反射角0°の正面反射輝度が高いこと、反射角20°付近の輝度が低下するなど、輝度分布が不均一であった。これに対し、本開発技術を適用した拡散反射膜フィルムは、反射角範囲0°～30°で輝度分布が均一であり、LCDパネルとして幅広い角度で反射輝度の高い表示性能を得られることを明らかにした。

第8章では、上述した超精密切削加工技術を、MLA金型に適用するための課題と解決策を明らかにし、今後とも市場拡大が期待できる光学部品産業へのMLA適用の加速に貢献できることを示した。

審査の結果の要旨

LCDなどに用いられる光学部品は、輝度やコントラストなどの表示性能の向上を目的に、直径で数 μm から数十 μm の微細レンズを多数個配置したマイクロレンズアレイ (MLA) の形成が要求されている。表示性能の向上には、MLA (直径 $10\mu\text{m}$ 、深さ $0.6\mu\text{m}$) の設計仕様を忠実に再現する製造プロセスの開発が重要であり、このマイクロレンズを目標形状精度 $0.1\mu\text{m}$ 、位置精度 $\pm 1\mu\text{m}$ で形成することが課題となる。本研究では、MLAをロール金型に形成し、これを紫外線硬化樹脂に転写するRoll to Roll成形法に着目し、高精度・高機能なMLAフィルム製造技術を開発した。本論文は全8章から成り、主な内容は以下の通りである。

第1章では、MLAの有効性と、MLA製造に必要な要素技術、および本研究の目的と方針を明確にしている。また、従来の微細加工に関する研究成果、さらに本研究の技術課題やその概要を述べており、博士論文の内容を含む分野に関して十分な全般的な知識を有すると認められる。

第2章では、ダイヤモンド工具による超精密切削加工において、 piezo素子駆動方式の微小切込みユニットと、これを搭載したNC工作機を連動制御させるMLA加工法を開発した。この加工法において、MLAの形状精度 $0.07\mu\text{m}$ 、位置精度 $\pm 0.8\mu\text{m}$ を達成可能である事を明らかにした。

第3章では、MLA成形用金型の大面积に対応すべく、高速駆動時の発熱・熱膨張の低減が可能な piezo素子を試作・組み込んだ高速切込みユニットを開発した。このユニットを周波数 2.2kHz で長時間駆動し、位置決め精度 $0.1\mu\text{m}$ が得られる事、MLAを平板金型 ($70\text{mm}\times 70\text{mm}$) に加工 \Rightarrow フィルム転写成形 \Rightarrow 輝度分布測定し、反射輝度を従来比で約3倍に向上できる事を明らかにした。

第4章では、光学フィルム成形用のロール金型にMLAを形成することを目的に、回転精度 $0.1\mu\text{m}$ 以下のロール旋回ユニットおよび工具の切込み誤差を低減する切込み補正加工方式を開発した。これにより、Cuめっき処理したロール金型 (外径 $130\text{mm}\times$ 長さ 390mm) に約13億個のMLAを形状精度 $0.1\mu\text{m}$ 、位置精度 $\pm 0.9\mu\text{m}$ 、切込み精度 $0.1\mu\text{m}$ 以下で加工可能である事を示した。

第5章では、耐食性に優れたNi-Pめっき処理したロール金型において、工具摩耗がMLAの形状精度と光学特性に及ぼす影響を実験的に明らかにした。これに基づき、工具摩耗が輝度むらに及ぼす影響を分散可能なスパイラル加工法を提案し、輝度分布の均一性を従来比で30%改善できる事を明らかにした。

第6章では、MLAと光学部品との組合せで発生するモアレ現象をフーリエ解析から検討し、MLAの 7° 傾斜配置によりモアレ発生を低減できることを明らかにした。このMLA傾斜配置をロール金型に加工するための多条加工法と、多条加工における輝度むらを解析する光学評価手法を考案し有効性を実証した。

第7章では、上述した開発技術を適用したMLAによるLCD反射膜を光学評価した結果、輝度むらやモアレの光学欠陥の低減と反射輝度 (コントラスト) の高い優れた表示性能を得られることを明らかにした。

第8章では、全体纏めと工学的、工業的な意義について述べており、本研究が今後とも市場拡大が予想される光学部品産業へのMLA適用の加速に貢献できることを明らかにした。

以上の博士論文の研究の方法論・研究手法、得られた結果とその解釈が適切であり、的確な文章表現が与えられている。その研究の手法・結果には独創性が認められ、その成果は機械加工学の諸分野、特に超精密切削加工の分野における工学的な価値が認められ、工業の発展に貢献できると評価される。本論文に関連する発表論文は7編であり、そのうち申請者が筆頭の学術論文誌での掲載は3編である。

平成25年1月7日に、博士論文の審査及び最終試験を行った結果、申請者は学術研究にふさわしい討論ができており、また独立して研究を遂行できる能力を持つと判断されることから、博士 (工学) の学位を受けるに十分な学識と能力を有するものと判定し、学位論文として合格であると認められた。

氏 名 ^{きよく} 曲 ^{ちん} 琛

(Qu Chen)

学位の種類 博士 (工学)

学位記番号 博生第18号

学位授与日 平成24年 9月28日

論文題目 Dissolution of woody biomass in ionic liquids for nuclear magnetic resonance analysis of cell wall components
(イオン液体への木質バイオマスの溶解と細胞壁成分の核磁気共鳴分析)

論文審査委員 (主査) 富山県立大学 教授 中島 範行

教授 伊藤 伸哉

教授 榊 利之

准教授 荻田信二郎

准教授 岸本 崇生

京 都 大 学 教 授 高野 俊幸

内容の要旨

地球温暖化の抑制や、石油消費量の削減のため、再生可能なバイオマスの利用拡大に関心が集まっている。特に、最大の蓄積量があり、食糧と競合することがない木質バイオマスの有効利用は、化石資源に頼らない循環型社会の実現に向けて、ますます重要な課題となっている。このような木質バイオマスのマテリアル利用やエネルギー化では、木質バイオマスの化学変換や酵素・微生物変換が必要であり、処理条件の最適化や、バイオマス利用に適した植物種や個体の選別のために、細胞壁成分の迅速な分析法の開発が望まれている。植物の細胞壁は、高分子化合物であるセルロース (約50%)・ヘミセルロース (約20~30%) (グルコマンナン、アラビノグルクロノキシラン)・リグニン (約20~30%) の複雑な複合体であり、そのまま水や有機溶媒に溶かすことはできない。そのため、これらの高分子成分の分離には煩雑な操作が必要であり、各成分の構造解析は非常に時間がかかるという現状がある。一方、イオン液体は、常温で液体状の塩であり、様々な分子設計が可能で揮発しない等の利点があり、繰り返し利用できるグリーン溶剤として注目されている。木材チップをイミダゾリウム塩等のイオン液体中で加熱攪拌することにより部分的に溶解できることが2007年に報告され、バイオマス分野においてもイオン液体に関連した研究が活発に行われている。

本論文は、高い溶解性を持つイオン液体を選定し、ボールミルにより微粉碎化した木質バイオマス

(針葉樹材、広葉樹材、タケ材)を温和な条件で溶解させ、そのままアセチル化処理し、核磁気共鳴(NMR)スペクトル法を用いて、木質バイオマス中の細胞壁全成分(セルロース、ヘミセルロース、リグニン)を分離せずに一度に分析する手法を確立し、その成果を全3章にまとめたものである。以下に本論文の構成を示す。

第1章では、ボールミルにより微粉碎化した針葉樹材(トドマツ、*Abies sachalinensis* MAST)を用いて、まず各種イオン液体への木質バイオマスの溶解性を明らかにしている。すなわち、セルロースやリグニンを溶かすことが報告されている各種アルキルイミダゾリウム塩を用いて100°Cで所定の時間加熱処理し、不溶解残渣の重量を測定することにより、各種イオン液体への溶解性を明らかにした。リグニンの良溶媒である1-butyl-3-methylimidazolium methylsulfate ([Bmim][MeSO₄])へのトドマツ木粉の溶解性が低いこと、セルロースの良溶媒である1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim]Cl)や1-allyl-3-methylimidazolium chloride ([Amim]Cl), 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim]OAc), 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate [Emim][(MeO)HPO₂]への溶解性が高いことから、木質バイオマスの溶解にはセルロースの溶解が必須であることがわかった。さらに、ボールミルによる微粉碎化処理時間の影響を検討し、ボールミル処理の時間が長いほど溶解性が高いことを示した。これらの結果をもとにイオン液体への溶解条件を検討した結果、8時間ボールミル処理したトドマツ木粉は、[Bmim]Cl中で100°Cで2時間加熱処理することにより完全に溶解でき、その溶液中に無水酢酸/ピリジンを入れることにより、細胞壁成分中のすべての水酸基を完全にアセチル化できることを示した。アセチル化したトドマツ木粉はCDCl₃やDMSO-*d*₆等のNMR測定溶媒に可溶であり、¹H, ¹³C, ¹H-¹³C HSQC NMR等の各種NMR測定が可能である。得られたNMRスペクトルの帰属は、単離したりグニンや、市販のセルロース、ヘミセルロース(アラビノキシラン、ガラクトマンナン、グルコマンナン)をアセチル化し、そのNMRスペクトルと比較することにより行った。特に、セルロースやヘミセルロース中のグルコース、マンノース、ガラクトース、キシロース、アラビノース残基の詳細な帰属を行った。また、複雑な構造を持つリグニン中の各部分構造: β-aryl ether (β-O-4), phenylcoumaran (β-5), resinol (β-β), spirodienone, cinnamyl alcohol, cinnamyl aldehydeもすべて検出することができた。以上により、トドマツ木粉中のすべての細胞壁成分(リグニン、セルロース、ヘミセルロース)の¹H-¹³C HSQC NMRスペクトルの帰属を行った。これらのことは、イオン液体を用いて木質バイオマス(針葉樹材)の全細胞壁成分のNMRによる簡便な分析法を確立したといえる。

第2章では、広葉樹材(シラカンバ、*Betula platyphylla*)およびタケ材(イネ科植物)(ハチク、*Phyllostachys nigra*)に本手法を適応させた結果について述べている。まず、ボールミル処理したシラカンバおよびタケ木粉を、それぞれイオン液体[Bmim]Clを用いて100°Cで加熱溶解処理し、その溶解性を明らかにした。トドマツと同様、ボールミルによる微粉碎化により溶解性が向上した。8時間ボールミル処理したシラカンバは6時間の溶解処理で、またタケ木粉は2時間の溶解処理で、完全に溶解できることがわかった。これらの結果から、樹種の違いによる溶解性は、トドマツ(針葉樹)>タケ>シラカンバ(広葉樹)の順であることが分かった。シラカンバおよびタケ木粉の場合も、トドマツ木粉と同様に、イオン液体に溶けた溶液中に無水酢酸/pyridineを入れることにより、細胞壁成分中のすべての水酸基を完全にアセチル化できる。これらのアセチル化した木粉も¹H-¹³C HSQC NMR等の各種NMR測定が可能である。各スペクトルのシグナルの帰属は、前述の市販のセルロース、ヘミセルロースとともに、単離したシラカンバリグニンやタケリグニンを用いた。ヘミセルロースでは、それまで帰属できていなかったキシランの還元末端及び非還元末端由来のシグナルも帰属することができた。広葉樹リグニ

ンに由来するシグナルや、イネ科植物に特有の*p*-coumaric acidおよびfeluric acidのエステルも検出できることを確認した。以上のことから、本手法が広く木質バイオマスの分析に利用できることを明らかにした。

第3章では、pyridine等の共溶媒を用いることにより、木質バイオマスをより温和な条件でイオン液体に溶解できることを示し、その条件を用いた細胞壁成分のNMRによる解析について述べている。まず、微粉碎化したトドマツ木粉を用いて、セルロースやリグニンの溶媒として使われている極性の高い溶媒：dimethylsulfoxide (DMSO), hexamethylphosphoramide (HMPA), 1, 4-dioxane, sulfolane, 2-methoxyethanol, *N,N*-dimethylacetamide (DMAc), pyridineの効果を検討した。イオン液体は[Bmim]Clに加え、[Amim]Cl, [Emim]OAc, [Emim][(MeO)HPO₂]についても、最適な溶媒系について検討した。その結果、DMSO, DMAc, pyridine等を共溶媒として用いると、イオン液体への木質バイオマスの溶解性を著しく向上させることができ、30℃という温和な条件でトドマツ木粉をイオン液体に溶解できることが明らかとなった。しかし、DMSOを共溶媒として用いた場合や、[Emim][(MeO)HPO₂]をイオン液体として用いた場合には、無水酢酸/pyridineを用いたアセチル化の反応収率が非常に低く、副反応が進行していると推察された。一方、[Emim]OAcを含む溶媒系は、溶解性は高いものの著しい着色が見られた。これら検討結果から、アセチル化等の誘導体化にも適した最も溶解性が高い溶媒系は[Amim]Cl/DMAcや[Amim]Cl/pyridineであることが分かった。これらの溶媒系を用いてトドマツ木粉の溶解およびアセチル化を行い、¹H-¹³C HSQC NMRスペクトルを測定した。その結果、pyridineを共溶媒に用いた場合には、溶解中あるいはアセチル化の最中に生成したと思われる副生成物のシグナルがほとんど見られないことから、NMRによる解析には[Amim]Cl/pyridine系が最も適していると判断した。さらに、[Amim]Cl/pyridine系を用いて、シラカンバおよびタケ材にもこの手法を適用したところ、溶解性はトドマツよりも劣るものの、アセチル化および、アセチル化木粉の¹H-¹³C HSQC NMRスペクトルも問題なく測定できることが示された。

最後に結語として、以上の内容を要約するとともに今後の展望についてまとめて述べている。

本研究を通じて、ボールミルにより微粉碎化した木質バイオマス(広葉樹材、針葉樹材、タケ材)を、30℃という温和な条件で溶解およびアセチル化できる溶媒系を確立し、得られたアセチル化木質バイオマスの全ての細胞壁成分(リグニン、セルロース、ヘミセルロース)をNMRにより分析することにより、イオン液体を利用したバイオマス成分の温和な溶解法とNMRによる解析法を確立したといえる。

審査の結果の要旨

木質バイオマス（植物）の細胞壁の主成分は、高分子化合物であるセルロース・ヘミセルロース・リグニンである。これらの成分の分離には煩雑な操作が必要であり、各成分の構造解析は非常に時間がかかる。本論文は、ボールミルを用いて微粉碎化した木質バイオマス（針葉樹、広葉樹、タケ）を温和な条件でイオン液体に溶解し、均一な溶液にした状態でアセチル化処理し、2次元核磁気共鳴（NMR）スペクトル法を用いて、細胞壁成分（セルロース、ヘミセルロース、リグニン）を分析するための簡便な手法を確立し、その研究成果を全3章にまとめたものである。その主な内容は以下の通りである。

第1章では、ボールミルにより微粉碎化した針葉樹材（トドマツ）を用いて、各種イオン液体への溶解性と、ボールミルによる微粉碎化処理時間の影響を明らかにした。セルロースやリグニンを溶かすことが報告されている各種アルキルイミダゾリウム塩を用いて100℃で所定の時間加熱処理し、不溶解残渣の重量を測定することにより、溶解性を明らかにした。また、リグニンの良溶媒であるイオン液体への溶解性は低い、セルロースの良溶媒への溶解性が高いことから、木質バイオマスの溶解にはセルロースの溶解が必須であることを示した。これらの結果を基に、木質バイオマスを1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim]Cl) 中、100℃で2時間加熱処理することにより完全に溶解させ、その溶液中で無水酢酸/pyridineを用いて細胞壁成分中のすべての水酸基を完全にアセチル化し、 ^1H - ^{13}C HSQC NMRスペクトルを用いて各成分の構造解析を行った。スペクトルの帰属には、単離したリグニンや市販のセルロース、ヘミセルロースを用いた。

第2章では、広葉樹材（シラカンバ）およびタケ材に本手法を適応させた。100℃でのイオン液体[Bmim]Clへの溶解性は、針葉樹（トドマツ）>タケ>広葉樹（シラカンバ）の順であった。シラカンバおよびタケの場合も、トドマツと同様に、アセチル化が可能であり、アセチル化物の ^1H - ^{13}C HSQC NMRスペクトルを用いた細胞壁成分の分析が可能であることを示し、本手法が広く木質バイオマスの分析に利用できることを明らかにした。

第3章では、DMAc, pyridine等の極性溶媒を共溶媒として用いると、イオン液体への木質バイオマス（針葉樹、広葉樹、タケ）の溶解性を著しく向上させることができ、30℃という温和な条件でイオン液体の溶解・アセチル化ができることを明らかにした。特に、イオン液体1-allyl-3-methylimidazolium chloride ([Amim]Cl) と組み合わせた[Amim]Cl/pyridineは、溶解中あるいはアセチル化中に生成すると推定される副反応物が抑えられることから、NMRによる細胞壁成分の分析には最適であることを示した。最後に結語として、以上の内容を要約するとともに今後の展望についてまとめて述べている。

以上で述べたように、本研究では、イオン液体を用いた木質バイオマスの温和な溶解と、それを利用した細胞壁成分（セルロース、ヘミセルロース、リグニン）の ^1H - ^{13}C HSQC NMRスペクトルによる簡便な解析法を確立したといえる。本手法は、木質バイオマスに広く適用できることが示されており、その研究手法および結果において高い独創性が認められ、結果の解釈も適切といえる。得られた成果は、分析化学、木材化学等の生物工学分野において、工学的観点から極めて重要な知見が得られており、工学の発展に貢献できると評価される。さらに、温和な条件下で木質バイオマスを溶解する手法を確立しており、今後この溶媒系を用いた木質バイオマスの化学変換や有用ケミカルの調製など、木質バイオマスのエネルギー化やマテリアル利用における貢献が今後大いに期待される。なお、本論文に関連する発表論文は3編であり、すべて申請者が筆頭である。

平成24年7月27日に博士論文の審査および最終試験を行った結果、申請者は、学術研究にふさわしい
討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有するものと
判定し、本論文は博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。

氏 名 いそ たに けん たろう
儀 谷 健太郎

学位の種類 博士（工学）

学位記番号 博生第19号

学位授与日 平成25年3月25日

論文題目 Studies on the efficient biocatalysis for producing optically pure alcohols including (*R*)-(-)-quinuclidinol ((*R*)-(-)-キヌクリジノールを始めとする各種光学活性アルコールの効率的バイオ生産に関する研究)

論文審査委員 (主査) 富山県立大学 教授 伊藤 伸哉
教授 浅野 泰久
教授 五十嵐康弘
講師 牧野 祥嗣
岐阜大学 教授 吉田 豊和

内容の要旨

光学活性アルコールは、医薬品や農薬、その中間体の合成において重要なキラルビルディングブロックである。光学異性体を合成する反応として、一般的にラセミ体の光学分割や天然化合物の誘導化、BINAP-Ruのような不斉金属触媒を用いた立体選択的な反応が知られている。これらの多くの反応は、光学純度の高い生成物が得られない、生産性が低い、高触媒コスト等の問題点を有している。酵素を用いたバイオ変換反応による不斉合成は、従来の合成法の問題点を克服できる場合が多く、温和な反応条件下で行うことができるため環境に与える負荷を減らすことができる。また触媒製造コスト、取扱いの簡便さの点においても酵素触媒法は優れた点が多く、工業的にも重要な手法となっている。

還元酵素や脱水素酵素を用いたケトン還元する反応の多くは、高い立体選択性を示すが、基質特異性の狭さやNADHやNADPHなどの補酵素の再生が必須となる事から、汎用性や生産性が低いという問題を有していた。このため、バイオ不斉還元プロセスには、formate dehydrogenase (FDH) や glucose dehydrogenase (GDH) などを用いた補酵素再生系が必要となる。これは安価で効率的な不斉還元プロセスにおける問題点である。

これまでに当研究室で見出されたスチレン資化性細菌 *Rhodococcus* sp. ST-10由来 phenylacetaldehyde reductase (PAR) や *Leifsonia* sp. S749由来の alcohol dehydrogenase (LSADH) は、他

の補酵素再生系の共存なしで、2-propanol(IPA)を水素供与体としてNADHの再生が可能のため、効率的な水素移動型不斉還元反応を行うことができる。IPAは、NADHやNADPHの再生系において、化学的性質や価格が安価である点から水素供与体として適切な化合物である。また、PAR/LSADHは幅広い基質特異性を持ち、様々なカルボニル化合物を高い立体選択性をもって(S)-体もしくは(R)-体の光学活性アルコールに還元することが可能なNADH依存型還元酵素である。

本論文では様々な光学活性アルコールの効率的な生産を目的とし、PARとLSADHを用いた光学活性アルコールの効率的な生産システムの構築とその解析、新規3-quinuclidinone還元酵素の探索、遺伝子クローニング、酵素の精製、機能解析を行い、補酵素の再生系にLSADHを用いた効率的な(R)-(-)-3-quinuclidinol生産システムについて研究を行った。

第一章では、PARとLSADHを用いた光学活性アルコールの効率的な生産システムの構築とその解析について論述している。これまでに進化分子工学的手法を用いたPARの改良により、20%IPA存在下におけるNAD⁺の還元活性および1%(w/v)*m*-chlorophenacyl chlorideの変換活性に優れた有用な2種の変異酵素(Sar268およびHAR1)が創製されている。またPAR及びその変異酵素(Sar268, HAR1)とLSADHの立体化学は、NADHからケトンのカルボニル基への水素移動のプロセスが完全に対称であることが報告されている。しかしながら、これら変異酵素の諸性質の機能解析は十分に行われていなかった。そこで、変異酵素Sar268およびHAR1の基質に対する K_m 値と V_{max} 値を測定し、 V_{max}/K_m 値が野生型のPARの値と比較して増加すること、特に*N,N*-dimethylformamideなどの極性有機溶媒を含む反応液中でも増加すること、また基質特異性が変化すること等を明らかにした。変異酵素は、変異による発現量の増加のみならず、こうした理由よりIPAと水との反応液中において高い活性と生産性を示すことが明らかとなった。また、PARの三次元構造ホモロジーモデリングにより基質結合部位周辺の領域や変異箇所、酵素の立体選択性を理論的に考察した。さらに、これらを高発現する大腸菌を生体触媒として利用することで、14種類のケトンからキラルアルコールを製造するための生産条件を最適化し、生成物である光学活性アルコールの光学純度、生産レベルを綿密に調べた。その結果、生成物の鏡像体過剰率は96~>99.9% e. e. で、これら27種の光学活性アルコールを高効率に生産できることを明らかにした。合成した光学活性アルコールは、(S)-(+)-3-quinuclidinolを含み、その多くが工業的に重要なものである。

第二章では、(R)-(-)-3-quinuclidinol生産システムについて述べている。(R)-(-)-3-Quinuclidinolは、医薬品の重要な中間体として知られており、認知症改善薬、気管支拡張剤、抗失禁薬のキラル中間体として使用されている。しかしながら、PAR/LSADHの系では合成することができない数少ない化合物である。そこで、3-quinuclidinoneを還元し、光学純度の高い(R)-(-)-3-quinuclidinolを生産する新規酵素の取得を目的として、休止菌体反応により約200の微生物をスクリーニングした。これより、生成物の鏡像体過剰率が>99% e. e. を示し、生産性の高い微生物として*Microbacterium luteolum* JCM9174(*M. luteolum* JCM9174)を選抜した。この細菌には2種以上の3-quinuclidinone還元酵素の存在が明らかとなった。最初に、既知の3-quinuclidinone還元酵素遺伝子との相同性に基づいてプライマーを設計し、PCRを行うことにより目的遺伝子を増幅した。この酵素遺伝子は、252アミノ酸残基に相当する768個のヌクレオチドから構成されており、bacilysin合成遺伝子クラスターの構成成分である*bacC* 遺伝子と同定された。次に、部分精製酵素のN-末端および内部配列情報を基に、異なる3-quinuclidinone還元酵素遺伝子を増幅した。当該遺伝子(*qnr*)は252アミノ酸残基に相当する759個のヌクレオチドから構成されていた。取得遺伝子配列のBLAST検索の結果、*Streptosporangium roseum* 由来の推定SDRと68.4%の相同性を示し、新規の酵素遺伝子であることが明らかとなった。両酵素は、いずれも短鎖アルコール脱水素酵素

／還元酵素（SDR）ファミリーに属していた。両酵素遺伝子のN末端にHis-tagを付加し大腸菌で発現させ、組換え酵素を精製し、その諸性質を明らかにした。BacCは3-quinuclidinone還元活性を100%とした時に7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-oneに対して27.8%、2-acetylpyridineに対して16.8%の相対活性を示した。他方、QNRは、3-quinuclidinoneにのみ活性を示し、両酵素の基質特異性が非常に狭いことが明らかとなった。しかしながら、何れの酵素も高い(*R*)立体選択性を示し、鏡像体過剰率>99.9% e. e. で(*R*)-(-)-3-quinuclidinolを生成した。

第三章では、QNRとBacCを用いた(*R*)-(-)-3-quinuclidinolの効率的な生産システムの構築について述べている。前章において、QNRとBacCを用いることにより3-quinuclidinoneより高光学純度の(*R*)-(-)-3-quinuclidinolを生産できることが判明した。そこで補酵素再生系を組み込んだ(*R*)-(-)-3-quinuclidinolの効率的な生産システムを構築した。水素供与体であるIPAの存在下でNAD⁺からNADHを再生するためにLSADHを還元酵素と共役させて反応を行うことにした。その目的のため、各種ベクター系を構築し、還元酵素遺伝子 (*qnr* または *bacC*) とLSADH遺伝子を単独または共発現させ、それらを触媒反応に供した。遺伝子組換え大腸菌は休止菌体のみならず、3% (w/v) polyethyleneimineと0.5% (w/v) glutaraldehydeで固定化し、それぞれ(*R*)-(-)-3-quinuclidinol生産反応に用いた。生産条件の最適化を、これらの生体触媒の組み合わせと基質の逐次添加により行った。その結果、固定化QNRと固定化LSADHを組み合わせることにより、15% (w/v, 939 mM) 3-quinuclidinoneを100%の収率で(*R*)-(-)-3-quinuclidinolに変換できることが判明した。この値は、これまでに報告されている中で最も高い生産レベルであった。また、基質とIPAは逐次添加が望ましいことも明らかとなった。生体触媒反応によって生成する(*R*)-(-)-3-quinuclidinolの鏡像体過剰率は>99.9% e. e. であった。以上の結果より、構築した大腸菌による触媒反応システムは、医薬産業に重要な(*R*)-(-)-3-quinuclidinolの実用的な生産手段となることを示した。

以上の様に、PAR変異酵素やLSADHを高発現する大腸菌を生体触媒に利用し、多種のケトンからキラルアルコールを高効率に生産できることを証明した。また、3-quinuclidinoneを還元し、光学純度の高い(*R*)-(-)-3-quinuclidinolを生産する新規酵素遺伝子 (*qnr* と *bacC*) を *M. luteolum* JCM9174より取得し、大腸菌による両酵素の発現系を構築し、効率的な(*R*)-(-)-3-quinuclidinolの生産法を確立した。これにより(*S*)-および(*R*)-quinuclidinol両光学異性体の効率的生産システムの構築に成功した。

審査の結果の要旨

ファインケミカルの分野においてますます重要となっている光学活性アルコールは、有用化合物の合成に汎用される重要なキラルビルディングブロックである。これまでに、さまざまな合成法が開発されており、酵素や微生物などを用いた生体触媒法は、温和な条件下で高い選択性にて反応が進行することから、工業的に重要な光学活性アルコールの合成手法となっている。

本論文では様々な光学活性アルコールの効率的な生産を目的とし、*Rhodococcus* sp. ST-10由来 phenylacetaldehyde reductase (PAR) と *Leifsonia* sp. S749由来の alcohol dehydrogenase (LSADH) を用いた光学活性アルコールの効率的な生産システムの構築とその解析、新規 3-quinuclidinone 還元酵素の探索、酵素精製、遺伝子クローニング等を行い、補酵素の再生系に LSADH を用いた効率的な (*R*)-(-)-3-quinuclidinol 生産システムの開発、および当該酵素の詳細な機能解析を行っている。

本論文は、「Studies on the efficient biocatalysis for producing optically pure alcohols including (*R*)-(-)-quinuclidinol ((*R*)-(-)-キヌクリジノールを始めとする各種光学活性アルコールの効率的なバイオ生産に関する研究)」と題し、序論と全三章から構成されている。主な内容は以下の通りである。

(1) PARの改良による2種の変異酵素 (Sar268およびHAR1) の諸性質の解析を行い、変異酵素 Sar268、HAR1 の基質に対する K_m 値、 V_{max} 値、基質特異性の変化、極性有機溶媒-水溶液中での活性の向上等を明らかにした。さらに、PAR変異酵素とLSADHを高発現する大腸菌を生体触媒として利用して、光学活性アルコールの生産条件の最適化を図った。最適条件における生成物の光学純度、生産レベルを綿密に調べ、27種の光学活性アルコールを高効率に生産できることを証明した。

(2) 3-Quinuclidinoneを還元し、光学純度の高い(*R*)-(-)-3-quinuclidinolを生産する *M. luteolum* JCM9174より、短鎖アルコール脱水素酵素/還元酵素 (SDR) ファミリーに属する新規酵素遺伝子の *qnr* と *bacC* の二種を取得した。両遺伝子が大腸菌で発現させ、組換え酵素を精製し、その諸性質を明らかにした。また両酵素の発現大腸菌を触媒に用いて、生成物の鏡像体過剰率が >99.9% e. e. という高い(*R*) 立体選択性を示すことを明らかにした。

(3) QNR及びBacC発現大腸菌を用いて高光学純度の(*R*)-(-)-3-quinuclidinolの効率的な生産システムの構築を行った。還元酵素 (QNRまたはBacC) と補酵素であるNADHの再生を行うLSADHを単独または共発現させ、それらを触媒反応に供した。また、遺伝子組換え大腸菌に加え、固定化大腸菌を(*R*)-(-)-3-quinuclidinol生産反応に用い、生体触媒の組み合わせと生産条件の最適化を図った。その結果、固定化QNRと固定化LSADHを組み合わせることによって、最も高い生産レベルを示すことを明らかにした。最適条件下で、15% (w/v, 939 mM) 3-quinuclidinoneを100%の収率で(*R*)-(-)-3-quinuclidinolに変換することに成功した。また合成した(*R*)-(-)-3-quinuclidinolの鏡像体過剰率は >99.9% e. e. であった。

以上、第一章から第三章まで、各種不斉還元酵素の詳細な機能解析、これら還元酵素遺伝子を発現する大腸菌を用いた様々なカルボニル化合物の不斉還元反応と光学活性アルコールの生産、新たに見出した 3-quinuclidinone還元酵素の機能解析、同酵素遺伝子の組換え大腸菌を用いた(*R*)-(-)-3-quinuclidinolの合成法について論述している。得られた成果は、ファインケミカル分野において重要な合成中間体である光学活性アルコールの工業的生産に十分応用可能であり、当該分野に寄与するところは大きい。特に有用性の高い(*S*)-および(*R*)-quinuclidinol両光学活性アルコールの効率的な生産システムの構築に成功した点は高く評価できる。

本論文に纏められた研究手法、得られた結果とその解釈は適切であり、的確な文章表現によって記されている。また、その内容には新規性および独創性が認められ、生物工学分野において高い工学的価値を有している。なお、本論文に関連する発表論文は3編であり、内2編は申請者が筆頭著者である。

平成25年1月31日に博士論文の審査及び最終試験を行った結果、申請者は学術研究にふさわしい討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、本論文は博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。

氏 名 内 橋 伸 介

学位の種類 博士（工学）

学位記番号 論博生第5号

学位授与日 平成25年3月25日

論文題目 Structure-function analysis and gene expression of mammalian UDP-glucuronosyltransferase
(UDP-グルクロン酸転移酵素の構造と機能及び遺伝子発現に関する研究)

論文審査委員 (主査) 富山県立大学 教授 榊 利之
教授 伊藤 伸哉
教授 五十嵐康弘
准教授 生城 真一
富山大学 准教授 佐久間 勉

内容の要旨

UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) は、医薬品成分をはじめ食品成分や生体内物質に至るまで、多様な化合物にグルクロン酸を転移 (抱合化) する酵素として、植物から哺乳類まで種を超えて広く存在する。医薬品の開発においては、その成分の体内からの代謝消失に関わる酵素群を同定することが必須であり、最も重要な薬物代謝酵素はシトクロムP450 (P450, CYP)、次いで重要な酵素がUGTである。医薬品の分野における生物工学の貢献は大きく、基礎研究から生産に至るまで、遺伝子工学や酵素工学はきわめて有用なツールとして広く利用されている。また、薬物代謝酵素による産物である医薬品代謝物の薬理活性や安全性を評価することは、医薬品成分自身の評価と同程度に重要であり、製薬メーカーではそれら代謝物を有機化学的に合成し、薬理評価や安全性評価を実施するケースが多々ある。しかし、化学的に不安定な代謝物などは、それら評価に耐えうる量を有機化学的に合成・供給することが困難なことが多く、酵素によって容易かつ安価にそれらを生合成させる試みがなされている。

申請者は第1章の研究において、富山化学工業株式会社で創製され抗リウマチ薬として開発中のT-5224のUGTによる代謝物の酵素による生合成を試みた。本研究では、まずT-5224のUGTによる複数の代謝産物の化学構造が未知であったため、機能性食品工学講座にて作製したヒトUGT遺伝子組み換え酵母を用いてそれら代謝物を大量に生合成し、化学構造を特定することに成功した。さらに、特定された

化学構造に基づいて詳細な研究を行い、ヒトの体内における各々の代謝物生成に寄与するUGTの分子種を同定することができた。

第2章及び第3章においては、マウス由来UGTに関する研究に取り組んだ。ヒト由来UGTについては研究が進んでおり、多くの分子種について発現系も確立しているが、実験動物のUGTに関しては基礎研究が未成熟なこともあり、発現系も確立されていない。しかし、医薬品の研究開発においてげっ歯類動物、とりわけマウス及びラットを用いた評価は避けて通ることのできない道である。実験動物を用いて得られたデータから、いかにしてヒトでの有効性と安全性を精度良く予測できるかは、医薬品開発にとってきわめて重要である。そのためには、医薬品成分の生体内での挙動が実験動物とヒトとでは必ずしも一致しないという動物種差の問題を解決することが必要である。申請者はマウスのUGTに関する課題に取り組み、ヒトとマウスとで相同性の高いUGTの分子種の中からマウスのみでaとbのサブタイプが同定されているUgt1a6a及びUgt1a6bに注目した。ヒトのUGT1A6によって代謝される化合物は多く、マウスUgt1a6a及びUgt1a6bの酵素学的な差異や、分化の生理的な意義を明らかにすることは、動物種差の問題を埋めることにつながると考えた。以下に論文の構成を示す。

第1章：新規なc-Fos/AP-1阻害剤T-5224のグルクロン酸抱合に寄与するヒトUGT分子種の同定

T-5224と名付けた化合物は富山化学工業株式会社によって創製された新規な化合物であり、抗リウマチ薬として開発中である。本化合物はリウマチ病患者で過剰となっているc-Fos/AP-1と呼ばれる分子を標的としている。T-5224はチトクロームP450による代謝を殆ど受けず、その構造上に複数の抱合可能な官能基を有し、実験動物において体内からの消失にグルクロン酸抱合の占める割合が高いことから、ヒトにおけるグルクロン酸抱合の寄与を推定することが求められていた。また、米国食品医薬品局 (FDA) の代謝物評価及び薬物相互作用評価に関するガイダンスにおいて、グルクロン酸抱合の評価について明記されている。開発フェーズの進んだ候補化合物のグルクロン酸抱合を評価するにあたってネックとなるのがグルクロン酸抱合体の合成である。特に、カルボン酸のグルクロン酸抱合により生成するアシルグルクロナイドは極めて不安定で、人工的に合成することが容易でない場合がある。機能性食品工学講座では、これらの課題を克服すべく、ヒトUGT遺伝子を導入したヒトUGT組み換え酵母を用いることで、安価で容易にそれらグルクロン酸抱合体を生合成させることに成功した。実際に筆者らは、T-5224をヒトUGT1A1遺伝子組み換え酵母から採取したマイクロソーム画分中で反応させることにより、G2及びG3と名付けた2種のグルクロン酸抱合体を生合成、単離精製することに成功した。その結果、G2がアシル-O-グルクロナイド、G3がヒドロキシル-O-グルクロナイドであることがわかった。

次に、経口剤として開発されているT-5224のグルクロン酸抱合に寄与するのが、肝臓であるのか小腸であるのかを明確にするために、ヒト肝臓及び小腸由来マイクロソームを用いて臓器による薬物除去能力の指標である固有クリアランスを評価した。経口投与された化合物の多くは小腸粘膜から吸収され、次に肝臓を通過して全身循環へと移行、標的部位へ到達することで薬理作用を発揮する。しかし、投与された全量が全身循環へ移行するわけではなく、まず小腸での膜透過、次いで小腸細胞内での代謝、そして肝臓での代謝を免れた分だけが全身循環へ移行する。T-5224の場合、G2、G3ともに固有クリアランスは肝臓の方が小腸よりも顕著に高く、ヒトにおいて肝臓のUGTがメインにT-5224のグルクロン酸抱合に寄与していると推定された。

続いて、T-5224のグルクロン酸抱合を担うUGTの分子種を特定すべく、以下の各手法を用いて研究を行った。(1)ヒトUGT発現系マイクロソームによるスクリーニング、(2)ヒトUGT発現系マイクロソームにおけ

る酵素キネティクス評価、(3)UGT阻害剤による阻害実験、(4)ヒト個体別肝臓ミクロソームによる活性・発現量の相関評価。(1)では、G2、G3ともにUGT1A1及びUGT1A3に、G3はUGT1A8(肝臓には発現していない分子種)によっても生成することがわかった。本結果に基づき、(2)でこれら3分子種での酵素キネティクスを評価した。UGTタンパク質の絶対的定量は一般的には困難とされているが、申請者は機能性食品工学講座で作製したヒトUGT分子種特異的抗体及びUGT標準タンパクを用いることでこれら3分子種のミクロソーム中UGT発現量を定量し、 k_{cat}/K_m を算出することに成功した。 k_{cat}/K_m はG2ではUGT1A1が、G3ではUGT1A3が最も高値を示したことから、それら分子種が各々の抱合体生成に強く寄与していることが示唆された。このことを検証すべく、(3)及び(4)研究を行った結果、G2生成には主にUGT1A1が、G3生成にはUGT1A1、UGT1A3の両分子種が寄与していることがわかった。

本研究により得られた成果はT-5224を医薬品として開発していく上で、きわめて重要な知見である。

第2章：Resveratrolのグルクロン酸抱合においてマウスUgt1a6a及び1a6bの酵素学的差異を決定するアミノ酸配列の同定

マウスUgt1a6a及びUgt1a6bは531アミノ酸からなり、98%の高い相同性を有する。しかし、両分子種を明確に区分して評価した報告例がないことから、これらの酵素学的差異を明らかにすることは、UGT研究において大きな貢献となることが予想された。申請者はヒトUGT1A6の基質になり、ワインなどに含まれるポリフェノールである *trans-resveratrol* 及びその立体異性体 *cis-resveratrol* を基質として、Ugt1a6a及びUgt1a6bの酵素学的差異の解明を試みた。

まず、両分子種のマウス発現系酵母ミクロソームを用いてresveratrolグルクロン酸抱合のキネティクスを比較したところ、*trans* 体の V_{max}/K_m はUgt1a6aの方が高く、*cis* 体ではその逆であることがわかり、両分子種がそれぞれ機能的に異なる性質を有することが示唆された。そこで、このキネティクスの違いを利用し、Ugt1a6aをUgt1a6bタイプへ変異させ、表現型として検出することを試みた。両分子種のアミノ酸配列で異なるのは10アミノ酸であり、いずれも基質認識領域の近傍に位置している。著者らはこれらアミノ酸についてUgt1a6aに1アミノ酸置換を施した10種のUgt1a6a変異株を酵母で作製し、このうちIle117Leu変異体において *trans-resveratrol* のキネティクスパターンがUgt1a6bタイプに近似していることを突き止めた。このことから、resveratrolのグルクロン酸抱合においてUgt1a6aの117番アミノ酸(Ile)がUgt1a6bと酵素的機能を差別化する重要なカギとなっていることが示唆された。

本研究は、マウスUgt1a6a及びUgt1a6bの酵素学的差異を初めて明らかにしたものであり、マウスUgt1a6の評価に際して両サブタイプの区分評価の必要性を訴えるものである。本研究で明らかとなった、わずかなアミノ酸の違い(Leu及びIle)がUGTの酵素機能の違いを生み出していることは大きな発見であり、UGTの動物種差の解明に向け、遺伝子工学的手法を用いて各アイソザイムの機能差を同種間及び異種間で細やかに比較することの重要性を再認識させられる結果である。

第3章：Serotoninのグルクロン酸抱合に寄与するマウスUgt1a6a及び1a6bの機能及び脳での発現量の比較

第2章の研究により、マウスUgt1a6a及びUgt1a6bが機能的に異なることが明らかになったが、その分化の生理的な意義について追及していく必要がある。そこで申請者は、UGT1A6の典型的基質であり、生理活性物質として中枢及び末梢組織で作用するserotoninに着目し、両分子種のserotoninグルクロン酸抱合活性を比較した。すると k_{cat}/K_m 値はUgt1a6bの方がUgt1a6aよりも高く、serotoninグルクロン酸抱

合に対する触媒能が両分子種間で異なることがわかった。次に、マウスUgt1a6a及びUgt1a6bをコードする遺伝子である*mUgt1a6a*及び*mUgt1a6b*の遺伝子産物であるmRNAを比較定量するために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に必要な特異的プライマーを作製し、マウス脳及び肝臓での両分子種のmRNA発現量を分離評価することに成功した。ここで互いにわずか21塩基対しか違わない両ゲノム配列からの遺伝子産物を特異的に増幅して検出定量できたポイントは、両遺伝子配列の3'末端側がaとbとで4塩基対連続して異なる領域に着目し、この4塩基対を末端とするプライマーを作製した点にある。このことにより、aの鋳型配列にbのプライマーはアニーリングすることができず、結果増幅できない仕組みになっている。これらプライマーを用いて両遺伝子産物を特異的に増幅定量した結果、脳ではUgt1a6bはほとんど発現しておらず、Ugt1a6aが脳の部位のうち特に海馬で高発現していることがわかった。一方、肝臓では両分子種がともに高発現していることがわかった。これらの結果より、脳においては主にUgt1a6aが、肝臓では両分子種がserotoninのグルクロン酸抱合に寄与していることが示唆され、両分子種は組織ごとでそれぞれ目的に応じた使い分けがなされていると推測された。

本研究により初めてマウス組織におけるUgt1a6a及びUgt1a6bのmRNA発現量の差異が明らかになった。これまで両者のmRNAを区別して定量した報告はなく、本研究の成果がマウスUgtの基礎研究及び動物種差の解明に新たな課題をもたらすことが期待される。

以上、本論文においては、遺伝子工学的手法により開発した代謝予測システムを用いることにより、医薬品候補化合物の代謝に関するきわめて重要な知見を得るとともに、動物種差の問題の解決につながるマウスの薬物代謝酵素に関する重要な知見を得た。

審査の結果の要旨

申請者は、医薬品をはじめ食品成分や生体内物質に至るまで、多様な化合物にグルクロン酸を転移し、水溶性を高めることにより体外に排泄する酵素、UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）の構造と機能および遺伝子発現に関する詳細な解析を行った。これらの研究は安全性の高い医薬品・機能性食品の開発に繋がる。主な内容は以下のとおりである。

第1章 T-5224と名付けられた化合物は富山化学工業(株)によって創製された新規なAP-1阻害剤であり、抗リウマチ薬として開発中である。T-5224はヒト体内で3種類のグルクロン酸抱合体に変換され、排泄されるが、開発段階を進めるためには、これらの構造決定とUGT分子種の特定化が必須である。本研究では富山県立大学で開発された各UGT分子種を発現する酵母を用いることにより、これらの構造を決定し、UGT分子種を特定化することができた。

第2章 マウスUgt1a6aおよびUgt1a6bは98%の高い相同性を有するが、酵素学的性質が幾分異なっている。Ugt1a6aに1アミノ酸置換を施した10種の変異株を酵母で発現させ、レスベラトロールを基質として、その酵素学的性質を調べた。その結果、Ugt1a6aの117番目のアミノ酸IleをLeuに変換することによりUgt1a6bタイプに変換されることがわかり、UGTの基質認識機構の解明に繋がる重要な知見が得られた。

第3章 マウスUgt1a6aおよびUgt1a6bは神経伝達物質セロトニンを基質とするが、脳内でどちらが重要な働きをしているか調べるため、それぞれのmRNA量を測定した。その結果、脳ではUgt1a6bはほとんど発現しておらず、Ugt1a6aが海馬で高発現していることがわかった。一方、肝臓においては両者ともに同レベルで高発現していることがわかった。非常に相同性が高いUGT分子種においても発現様式が大きく異なり、その生理的役割が異なることを示唆する重要な知見が得られた。

平成25年1月31日に博士論文の審査および最終試験を行った結果、申請者は、学術研究にふさわしい討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、本論文は博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。

氏 名 やす だ か おり
安 田 佳 織

学位の種類 博士（工学）

学位記番号 論博生第6号

学位授与日 平成25年3月25日

論文題目 Prediction of the Metabolism of Drugs and Food
Factors by Drug-Metabolizing Enzymes in Humans
（ヒト由来薬物代謝酵素を用いた食品成分・医薬品
の代謝予測）

論文審査委員 （主査）富山県立大学 教授 榊 利之
教授 中島 範行
教授 加藤 康夫
准教授 生城 真一
石川県立大学 准教授 小西 康子

内容の要旨

近年、高齢化社会の進行、生活習慣病の増加、医療費の増大といった背景から、疾病を予防する食品成分や副作用の少ない医薬品への期待が高まると同時に、それらの安全性や生理活性を簡便に知る方法が望まれている。医薬品開発時には安全性の観点から、ヒト体内における代謝物を予測しそれらの生理活性を調べることも、また、代謝酵素を同定し、医薬品がそれらに与える影響を調べることも必須となっている。今後、機能性食品の市場が大きくなるにあたり、医薬品と同様、機能性食品成分についても代謝を詳細に知りその安全性と作用メカニズムを知ることは重要な課題である。機能性食品工学講座では、これまでに遺伝子工学的手法を用いて薬物代謝に重要な役割を果たしているシトクロムP450（P450あるいはCYP）発現酵母を作製し、利用してきた。本論文では、このヒト由来P450発現酵母を用いることによって、サプリメントとして高い市場を占めているセサミンのヒト体内での代謝を予測するとともに、医薬品との安全な併用という観点からセサミンが薬物代謝酵素へ与える影響を調べた（第1～3章）。また、骨粗鬆症治療薬や癌治療薬といった医薬品として期待されるビタミンD誘導体についてヒト体内での代謝予測を行った。薬物代謝型P450発現系、ヒト肝ミクロソーム画分に加え、ビタミンDの代謝に重要な酵素であるCYP24A1の発現系を用いることによって、構造が異なる複数の誘導体の代謝様式を比較した（第4章）。以下に本論文の構成を示す。

第1章 薬物代謝型P450によるセサミンの代謝

ゴマ中の主要リグナンであるセサミンは、抗高血圧作用、抗酸化作用等のさまざまな生理作用が知られており、すでに機能性食品として販売されている成分である。セサミンは二つのメチレンジオキシフェニル基を持つ化合物であるが、これまでにメチレンジオキシフェニル基を持つ化合物が薬物代謝型P450に不可逆阻害を与える例が報告されていたことから、我々はセサミンがP450に不可逆阻害を与えるのではないかと考えた。まず、ヒト由来薬物代謝型P450発現酵母およびヒト肝ミクロソームを用いて、セサミン代謝に関与するP450分子種を調べた。11種の各P450分子種発現酵母菌体を用いてセサミンを代謝させたところ、数種において、抗酸化能の高い代謝物、セサミンモノカテコールが検出された。中でも変換率が高かったCYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6について、各酵母のミクロソーム画分を用いて速度論的解析を行ったところ、CYP2C19が最も高い k_{cat}/K_m 値を示したが、CYP2C19のヒト肝臓における存在比は低く、ヒト肝臓における各分子種の存在比を考慮するとCYP2C9の寄与が最も高いと推測された。ヒト肝ミクロソームを用いた各P450分子種特異的反応とセサミン代謝反応との相関およびP450分子種特異的抗体を用いた活性阻害実験から、主要な分子種はCYP2C9であること、また寄与率は低いCYP1A2も関与していることが示唆された。

次に、これらのP450分子種に対してセサミンが不可逆阻害剤となり得るかを各P450分子種発現酵母のミクロソーム画分を用いて調べたところ、CYP2C9において不可逆阻害がみられることが明らかになった。CYP1A2では競合阻害はみられたものの不可逆阻害はみられず、セサミンがCYP2C9に対する不可逆阻害剤となり得る可能性が示唆された。ヒト肝ミクロソーム画分を用いてセサミンのCYP2C9に対する不可逆阻害パラメーターを算出し、これまでにP450に対する不可逆阻害の報告があったリグナン類やベルガモチンと比較した。ベルガモチンはグレープフルーツジュースに含まれ、医薬品との併用によって医薬品の血中濃度が上昇し副作用を起こすことが知られている成分である。これらの成分と比較すると、セサミンの不可逆阻害の程度は低いことがわかった。今回の結果だけでは、実際にセサミンとCYP2C9代謝型医薬品との併用摂取によって副作用を引き起こすかの判断は難しいが、その可能性が示されたことから、今後in vivo実験によって詳細に安全性を調べる必要があると考えられる。

第2章 薬物代謝酵素P450およびUGTによるセサミンの連続的代謝

第1章ではセサミンが主にCYP2C9によってモノカテコール体へと代謝されること、また、その際にセサミンがCYP2C9に対して不可逆阻害を起こしうることを明らかにした。本章ではセサミンの一段階目の代謝物、モノカテコールがさらにどのように代謝されるかに焦点をあてた。代謝に関与する薬物代謝酵素分子種を明らかにすると同時に、セサミンがヒト体内でどの程度、生理作用をもつ代謝物へと変換されるのかを予測することが目的である。

ヒトCYP2C19発現酵母菌体にセサミンを代謝させ、セサミンの一段階目の代謝物であるセサミンモノカテコールを得た。このセサミンモノカテコールをヒト肝ミクロソーム画分、もしくは細胞質画分で代謝させた結果、P450によってジカテコール体、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によってグルクロン酸抱合体、また、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) によってメチル化体へと変換されることがわかった。その速度論的解析からセサミンモノカテコールはUGTによるグルクロン酸抱合化を受けやすく、UGTもセサミン代謝に重要な酵素であることが明らかになった。UGTはP450に次いでヒト体内での薬物代謝の寄与が大きいといわれている酵素であり、P450と同様、多くの分子種が存在する。どの分子種がセサミン代謝に関与するかを明らかにするために、ヒト肝における主要な12分子種

の発現系や10検体のヒト肝ミクロソーム画分を用い詳細に解析した結果、主にUGT2B7によって抱合化されていることが明らかになった。すなわち、ヒトにおけるセサミン代謝にはCYP2C9とUGT2B7、COMTが重要な役割を果たしていると考えられる。

ラットにおいても肝ミクロソーム画分もしくは細胞質画分を用い、ヒトの場合と比較したところ、P450によるカテコール化の k_{cat}/K_m 値がヒトとラットで大きく異なり、ラットではヒトよりも顕著に高い値を示した。すなわち、ヒトではグルクロン酸抱合体への代謝が起こりやすいが、ラットではモノカテコール体さらにはジカテコール体への代謝が起こりやすいと推測され、セサミンを摂取した際の主要代謝物がヒトとラットで大きく異なる可能性が示唆された。カテコール体は、セサミン自身とは異なり高い抗酸化能を持つ物質であり、セサミンが有する抗酸化作用は代謝されることによって初めて発揮されることが考えられる。今回、セサミン代謝に種差がみられることが明らかになり、実際にセサミンを摂取した場合の生理作用にも、代謝様式の違いに基づく種差がみられる可能性が高いことが示唆された。

第3章 セサミンとエピセサミンの薬物代謝酵素による代謝比較

前章までで、セサミンのヒト体内での代謝を予測してきたが、セサミンはゴマ油からの精製過程で約半分がエピセサミンに転換し、実際に健康食品として市場に出ているものはセサミンとエピセサミンの等モル混合物となっていることが知られている。本章ではエピセサミンによる代謝や薬物代謝酵素に対する阻害を調べ、セサミンと比較した。

ヒト肝ミクロソーム画分におけるP450による代謝を調べたところ、セサミンの場合と同様、エピセサミンもモノカテコール体へと代謝された。エピセサミンの場合、モノカテコール体に2種類の立体異性体 (*R*-モノカテコール、*S*-モノカテコール) が存在するが、それらがほぼ同量生成された。モノカテコール化に関与するP450分子種を調べたところ、セサミンの場合にはCYP2C9が高い寄与率を示していたのに対し、エピセサミンの場合にはCYP2C9とCYP1A2とがほぼ同程度に寄与しており、主に*S*-モノカテコール生成にはCYP2C9が、*R*-モノカテコール生成にはCYP1A2が寄与していた。これらの分子種に対する不可逆阻害を調べたところ、セサミンの場合と同様、CYP2C9に対して不可逆阻害を起こすことが明らかになった。その程度はエピセサミンの方が小さく、CYP2C9代謝型医薬品と併用する場合にはセサミンよりもエピセサミンの方が好ましいと考えられる。

生成したモノカテコール体は、ヒトミクロソーム画分、サイトゾル画分においてセサミンの場合と同様、ジカテコール、グルクロン酸抱合体、メチル化体へと代謝されたが、各反応における速度論的解析を行った結果、セサミンと比べてエピセサミンの方がP450やUGTによる代謝を受けにくいことがわかった。すなわち、ヒト体内においてエピセサミンはセサミンよりも代謝されにくく、代謝されない状態で生理活性を発揮する場合にはエピセサミンの方が有利であるといえる。一方、抗酸化能のように、代謝されカテコール体になることによって効果が現れるものについてはセサミンの方が有利である可能性が高い。

前述したように、多くのサプリメントはセサミンとエピセサミンの等モル混合物であるが、セサミンとエピセサミンは代謝が大きく異なることが明らかになり、用途に応じて使い分けていくことが好ましいと考えられる。

第4章 2 α 位に置換基を有するビタミンD誘導体のヒト体内での代謝予測

本章では、医薬品開発時における代謝予測への応用といった観点から、骨粗鬆症治療薬や癌治療薬と

して期待されているビタミンD誘導体について代謝予測を行った。活性型ビタミンDは、標的細胞においてCYP24A1により不活性化することが知られており、ビタミンD誘導体が標的細胞内で生理作用を持続するにはCYP24A1に代謝されにくいことが必須となる。すなわち、ビタミンD誘導体の代謝においては、肝臓での代謝のみでなく、標的細胞内のCYP24A1による代謝も重要な要素となってくる。機能性食品工学講座ではこれまでにヒト由来CYP24A1発現大腸菌を含む膜画分、アドレノドキシシンおよびNADPH-アドレノドキシシン還元酵素を含む再構成系により、活性型ビタミンDのCYP24A1による代謝を予測するツールとして利用してきた。本研究では、薬物代謝型P450発現系やヒト肝ミクロソーム画分に併せ、このCYP24A1発現系を代謝予測に利用した。

本研究で評価に用いた化合物は、2 α 位に置換基を有するビタミンD誘導体である。2 α 位に置換基を有するさまざまなビタミンD誘導体は高い生理活性を持っている。19-nor-2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ (MART-10)は、癌細胞増殖抑制作用が強く、癌治療薬として期待できる化合物である。本研究では、MART-10と他の2種類のビタミンD誘導体(2 α -(3-hydroxypropoxy)-1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ (O2C3)および2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ (O1C3))の構造による代謝様式の違いを調べた。O2C3とO1C3は2 α 位置置換基が異なり、O1C3とMART-10は19位のメチレン基の有無が異なる。

ヒト肝ミクロソーム画分と薬物代謝型P450発現系を用いて、これら3種の化合物の代謝を調べたところ、O2C3においてCYP3A4により脱ヒドロキシプロピル化された代謝物(1 α , 2 α , 25(OH) $_3$ D $_3$)が検出された。O1C3やMART-10ではほとんど代謝物が検出されず、これらはO2C3と比べ、肝臓内で代謝されにくいと考えられる。また、CYP24A1による代謝の速度パラメーターを比較したところ、どの化合物も天然型の活性型ビタミンD $_3$ (1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$)と比べて顕著に代謝されにくく、 k_{cat}/K_m 値は天然型である1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の1% (MART-10)、3% (O2C3)、4% (O1C3)であった。MART-10は肝臓でも標的細胞内でも最も代謝を受けにくく、体内で生理活性を発揮しやすい構造を維持しているといえる。今回の結果とこれまでに報告してきた生理作用とから、MART-10は癌治療薬として有望であると考えられる。

以上、本論文においては、遺伝子工学的手法により開発した代謝予測システムを用いることにより、機能性食品成分および医薬品候補化合物のヒト体内における代謝に関する重要な知見を得ており、本代謝予測システムが安全性の高い機能性食品や医薬品を開発する上で有用であることを示した。

審査の結果の要旨

申請者は、遺伝子工学的手法により確立した代謝予測システムを用いてゴマに含まれる機能性成分セサミンおよびエピセサミンのヒト体内での代謝様式および医薬品との相互作用を予測した。また、骨粗鬆症治療薬や癌治療薬として期待されるビタミンD誘導体についてヒト体内での代謝様式および有効性を推測した。これらの研究は安全性の高い機能性食品・医薬品の開発に繋がる。主な内容は以下のとおりである。

第1章 シトクロムP450発現酵母およびヒト肝ミクロソームを用いて、セサミンを代謝するP450分子種を調べたところ、主要な分子種はCYP2C9、次いでCYP1A2であることがわかった。また、CYP2C9において反応中間体が不可逆阻害を引き起こすことがわかり、CYP2C9代謝型医薬品との併用摂取によって副作用を引き起こす可能性が示唆された。

第2章 セサミンの代謝における初発の酵素はシトクロムP450であるが、その後、さらにどのような代謝を受けるか調べたところ、ヒトにおいてはCYP2C9、UGT2B7、COMTが重要な役割を果たしており、特にUGTによるグルクロン酸抱合反応が顕著であるが、ラットではP450により、モノカテコール体さらにはジカテコール体への代謝が起こりやすいと推測され、セサミンを摂取した際の主要代謝物がヒトとラットで大きく異なる可能性が示唆された。

第3章 セサミンはゴマ油からの精製過程で約半分がエピセサミンに異性化し、市販されているものは両者の等モル混合物である。代謝を比較したところ、ヒト体内においてエピセサミンはセサミンよりもP450による代謝を受けにくかった。抗酸化能についてはセサミンの方が優れており、未変化体が生理活性を発揮する場合にはエピセサミンの方が有利であると考えられる。

第4章 骨粗鬆症治療薬や癌治療薬として期待される2 α 位に置換基をもつビタミンD誘導体3種について代謝を比較した。CYP3A4およびCYP24A1による代謝を調べたところ、Mart-10と名づけた化合物は両P450分子種による代謝をきわめて受けにくいことがわかった。この化合物は強い癌細胞増殖抑制作用を示すが、代謝を受けにくいことが大きな要因になっていると思われる。

平成25年1月31日に博士論文の審査および最終試験を行った。また、学力の確認については、外国語(英語)、専門分野(有機化学、生化学、分子生物学、微生物学)について口頭試験を行い、本学大学院博士後期課程を修了した者と同等以上の学力を有すると認めた。この結果、博士(工学)の学位論文として合格であると認められた。