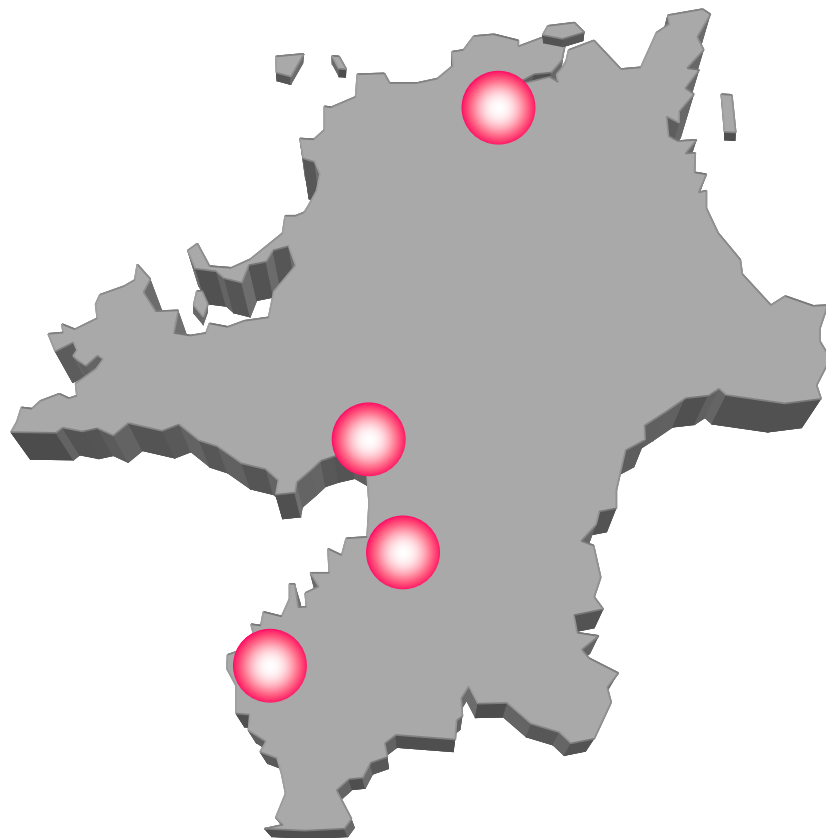


No.29 (2019)

研究報告



福岡県工業技術センター

◆◆研究報告◆◆

久留米餅におけるポリエステル系の導入と影響	1
	堂ノ脇 靖巳 久保 竜二
リサイクル原料を利用した新規アスファルト道路用表層材の開発	5
	藤吉 国孝 熊上 章太 梶原 輝樹 下川 裕士
骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発(第一報)	9
—破骨細胞分化誘導系での解析結果—	
	古賀 慎太郎 石川 智之 金沢 英一 緒方 貴宏 坂井 孝則 朴 晶淑
骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発(第二報)	13
—骨芽細胞分化誘導系での解析結果—	
	古賀 慎太郎 石川 智之 金沢 英一 緒方 貴宏 坂井 孝則 朴 晶淑
醤油膜ろ過残液処理法の検討(第3報)	17
—醤油膜ろ過残液エタノール沈殿物からの多糖類回収—	
	川口 友彰 野田 義治 植木 達朗 脇山 元気 坂田 文彦 野見山 修治
醤油膜ろ過残液処理法の検討(第4報)	21
—ろ過膜孔径の違いが生揚成分の膜透過性に与える影響—	
	川口 友彰 野田 義治 植木 達朗 脇山 元気 坂田 文彦 野見山 修治
冷凍アサリの開殻技術	25
	川口 友彰
X線応力解析を活用した金属表面熱処理プロセスの開発支援	29
	小川 俊文 南 守 島田 雅博 小野本 達郎
ホットエンボス加工による中空マイクロニードルアレイ成形技術の開発	33
	在川 功一 谷川 義博 安部 年史
オープンソースCAEによる多目的最適化システムの開発	37
	倉本 紘彰
IoT導入支援キットの開発	41
—WBGT測定および毒劇物管理への適用—	
	林 宏充 川畑 将人 奥村 克博 吉村 賢二
◆◆学協会誌掲載論文の概要◆◆	
醤油膜ろ過残液中多糖類のエタノール分別沈殿と清澄醤油の回収	45
	川口 友彰 野田 義治 植木 達朗 脇山 元気 野見山 修治
タデスプラウト抽出物によるコラゲナーゼ阻害	47
	川口 友彰 永田 香織

研究報告

久留米絣におけるポリエステル系の導入と影響

堂ノ脇 靖巳*1 久保 竜二*2

Textile physical behaviors by introducing polyester core yarn in Kurume-Kasuri

Kiyoshi Donowaki and Ryuji Kubo

久留米絣は綿織物であり、独特の「括り」による防染染色方法を確立している。このため、綿用染料が使えない繊維素材を導入することができなかった。そこで、本研究ではポリエステルを芯に、綿紡績糸を鞘にした複合糸を用いて久留米絣を試作し、従来の織物との繊維物性を比較した。この結果、軽さ、伸縮性、ドレープ性（滑らかさ、曲げ易さ、せん断性）、防しわ性、プリーツ性で優位性が示され、特に強度（引裂き、引張、摩耗）では2倍以上の向上が図れた。

1 はじめに

久留米絣は重要無形文化財および伝統的工芸品であり、綿100%の先染め織物である。久留米絣の特徴は染色と織で表現する「かすり」柄、および綿による肌なじみ（風合い）の良い素材感¹⁾が挙げられる。

一方、世界的に見ると繊維産業は成長産業であり、1990年から2016年まで約2.3倍に生産量が増加し、一人当たりの需要量も1.6倍に増えている。原料種別に見ると綿は全体の24%程度で、ポリエステル（以下、PETという。）を中心とした化学繊維が73%以上で年平均5.8%の伸び率で拡大している²⁾。国内でも繊維製品の最終消費量は、綿が全体の27%で、化学繊維が70%以上となっており³⁾、今後もこの傾向は拡大することが予想される。

本研究では綿織物である久留米絣にPET系の導入を試み、久留米絣に及ぼす影響を調べた。PET糸としては綿の素材感を残すためにPETが芯糸で、綿紡績糸が鞘となるPETコアヤーン（以下、PET混という。）を採用した。試作は、糸の太さが40番手単糸（以下、40/1という。）のPET混を緯糸のみに使用した織物、および経緯糸ともに通常久留米絣と同じく40番手双糸（以下、40/2という。）を使用した織物の二種類を製織し、各種繊維物性（嵩、強度、イージーケア性、快適性、伸縮性、ドレープ性など）を測定し、綿100%や通常久留米絣と比較した。

2 研究、実験方法

試作に用いたPET混は、混用率がPET40%、綿60%

のニットポー新瀉(株)製CFY33X40/1APM/SOLO（以下、PET混(日)という。）、PET60%、綿40%のユニチカトレーディング(株)製EC40WK40/1N（以下、PET混(ユ)という。）、および比較品として綿100%のKBツツキ(株)製TS40/1（以下、綿という。）を用いた。40/2の糸は40/1の糸2本を合糸し、18回/インチで撚り、撚りを安定させるために熱セットしたものを使用した。

PET混における綿を確認するために、綿のみを染色した。染色は定法⁴⁾を参考にして、2g/l次亜塩素酸ナトリウム、浴比1:20、常温で2時間放置して精練漂白した後、5%owf反応染料（Cibacron Super Black G）、60%owf芒硝、50%owfソーダ灰を用いて浴比1:20、80℃、45分間処理して行った。

試作織物に使用した糸の構成を表1に示す。試作No.1~3は経糸に通常よりも細い60/2綿を用い、緯糸に40/1糸を用いてPET混の影響を調査した。試作No.4~6は既に商品化している久留米絣（綿織物）で、No.4は一般的な久留米絣で経緯糸とも40/2、No.5、6は部分的に糸の太さが変化するスラブやネップの意匠撚糸を緯糸に用いた。試作No.7は一般的な久留米絣と同じ太さのPET混(ユ)を経緯糸に用いた。これら7つの試作品を用いて、PET混の導入と各種繊維物性への影響を調べた。

表1 試作織物の糸構成

No.	1	2	3	4	5	6	7
経糸	60/2 綿	60/2 綿	60/2 綿	40/2 綿	40/2 綿	40/2 綿	40/2 PET混 (ユ)
緯糸	40/1 綿	40/1 PET混 (日)	40/1 PET混 (ユ)	40/2 綿	21/1 スラブ	12/1 ネップ	40/2 PET混 (ユ)

*1 化学繊維研究所

*2 (株)久保かすり織物

表2 繊維物性評価の区分

大区分	小区分	単位
織密度		本/100mm
嵩	軽さ	g/m ²
	薄さ	mm
	圧縮し易さ	gf・cm/cm ²
強度	最大引張強さ	N
	最大伸び率	%
	引裂き強さ	N
	摩耗強さ	回
イージー 케어性	乾燥し易さ	min
	防しわ性	%
	寸法変化	%
快適性	通気し易さ	cm ³ /cm ² ・sec
	吸水し易さ	%
	保温し易さ	%
伸縮性		%
ドレープ性	滑らかさ (摩擦係数)	
	平滑さ	μm
	曲げ易さ	gf・cm ² /cm
	せん断し易さ	gf/cm・deg.

各種繊維物性評価は表2の区分のように分けた。

織物の織密度、嵩（軽さ、薄さ、圧縮）、強度（引張、伸び率、引裂き、摩耗性）、イージー케어性（乾燥、防しわ、寸法変化）、快適性（通気、吸水、保温）、伸縮性、ドレープ性（滑らかさ、平滑さ、曲げ、せん断）、その他、代表的なサンプルを用いたプリーツ性を評価した。それぞれについて、個別の試験方法を下記する。

「織密度」はJIS L 1096織物及び編物の生地試験方法 8.6.1織物の密度 A法（JIS法）に従って評価した。

「軽さ」はJIS L 1096 8.3.2標準状態における単位面積当たりの質量に従って評価した。

「薄さ」および「圧縮し易さ」はカトーテック（株）製KES-FB3圧縮試験機を用いて、0.5 gf/cm²時の厚み（mm）および圧縮仕事量（gf・cm/cm²）を求めた。

「最大引張強さ」はJIS L 1096 8.14.1 引張強さ及び伸び率 JIS法 A法（ストリップ法）に従って行い、試験片の幅25 mm、つかみ間隔100 mm、引張速度100 mm/minで切断時の強さ（N）を測定し、「最大伸び率」はこの時の伸び率（%）を測定した。

「引裂き強さ」はJIS L 1096 8.17.1 引裂強さ A-1法（シングルタング法）に従って行い、試験片の幅50 mm、引張速度100 mm/minで最大引裂き強さ（N）を測定した。

「摩耗強さ」はJIS L 1096 8.19.1 a) 摩耗強さ及び摩擦変色性 A法（ユニバーサル形法）A-1（平面法）に従って、研磨紙の種類Cw-C-P1200で行い、生地に孔があいたときの回数を測定した。

「乾燥し易さ」はJIS L 1096 8.25 乾燥性に従って標準状態で恒量になるまでの時間（min）を測定した。

「防しわ性」はJIS L 1059-1 8. 繊維製品の防しわ性試験方法-第1部：水平折り畳みじわの回復性の測定（モンサント法） B法（4.9 N荷重法）に従って防しわ率（%）を求めた。

「寸法変化」はJIS L 1096 8.39 B法（沸騰水浸せき法）に従って、処理前と処理後の縮みから寸法変化率（%）として算出した。

「通気し易さ」はJIS L 1096 8.26.1 乾燥性 A法（フラジュール形法）に従って試験片を通過する空気量（cm³/cm²・s）を測定した。

「吸水し易さ」はJIS L 1907 繊維製品の吸水性試験方法 7.3表面吸水法（最大吸水速度及び最大吸水速度時点の吸水量）を参考に、東洋紡エンジニアリング（株）製ラローズ法吸水測定装置（TL-01型）を用いて、最大吸水量を測定し、吸水率（%）を求めた。

「保温し易さ」はJIS L 1096 8.27.1 保温性 A法（恒温法）に従って保温率（%）を求めた。

「伸縮性」と「せん断し易さ」はカトーテック（株）製KES-FB1-AUTO-A自動化引張り・せん断試験機にて50 gf/cm²時の伸び率（%）とせん断剛性（gf/cm・deg.）を求めた。

「滑らかさ」と「平滑さ」は同社製KES-FB4表面試験機を用いて、摩擦係数と表面凹凸（μm）を測定した。

「曲げ易さ」は同社製KES-FB2純曲げ試験機にて曲げ剛性（gf・cm²/cm）を求めた。

この他、「プリーツ性」は試作No. 4, 7の2サンプルで行った。プリーツ加工はアズワン（株）製小型熱プレス機AH-2003を用いて、180℃、1分間、1 tの荷重でプレスして行った。評価方法はJIS L 1060 9.1.1 織物及び編物のプリーツ性試験方法 A-1法（開角度法）に従ってプリーツ保持率（%）を求めた。

3 結果と考察

3-1 PET混における綿の確認

40/1PET混(ユ)における綿の位置を調べるために、綿のみ染色することによって調査した。図1に染色した糸の拡大写真を示す。図1の黒い糸が綿、白糸がPETであり、断面および側面の写真から綿が鞘(外側)部分に多く位置してことが確認でき、肌に直接触れるのは綿であると言える。

3-2 試作織物の状況

図2には久留米絨の工程概略を示す⁵⁾。久留米絨は他の織物と異なって「図案」に従って防染(染まらない)する「括り」工程があり、また防染した柄を保持するために糊の着脱を繰り返すため、糸を扱

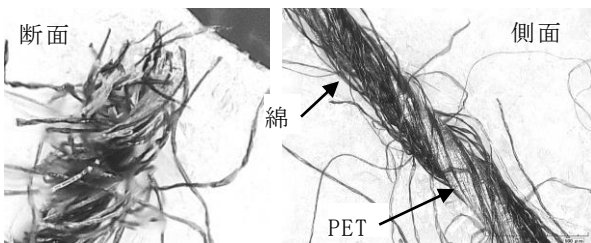


図1 染色後のPETコアヤーン写真
(黒：綿，白：PET)

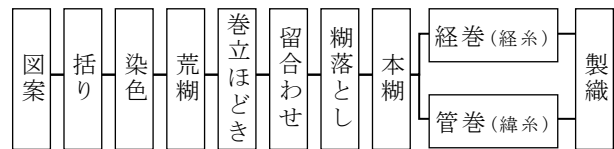


図2 久留米絨工程の概略

う頻度が高い。具体的には「染色(精練漂白などの前処理、水洗などの後処理含む)」した後、「荒糊」で糊付けし、「巻立てほどこき(括りを解く)」、「留合わせ(柄の保持)」、「糊落とし」した後、さらに製織時の毛羽を抑える「本糊」を行う。この後、柄合わせを行いながらビームに巻き取り、織機に仕掛ける「経巻(経糸)」、シャトルにセットする管に巻く「管巻(緯糸)」の準備を行い、シャトル織機で製織を行う。そこで今回はこの工程通りにPET混も処理した。この結果、染色でPETが染まらないために図1のように霜降り状の色味になるが、全ての工程で綿と変わらない取扱いができることを確認できた。

3-3 試作織物の物性評価

試作織物の繊維物性評価結果を表3に示す。全体的にPET混を導入することによって多くの物性が良

表3 繊維物性評価結果

大区分	小区分	単位	方向	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7
織密度		本/100mm	たて	317.5	324.0	324.5	217.5	214.5	219.5	214.4
			よこ	259.0	258.5	259.0	183.0	194.5	170.5	176.4
嵩	軽さ	g/m ²	—	111.7	110.5	111.4	133.0	134.9	158.1	124.1
	薄さ	mm	—	0.80	0.71	0.82	0.95	0.90	0.99	0.69
	圧縮し易さ	gf・cm/cm ²	—	0.28	0.24	0.29	0.32	0.29	0.30	0.20
強度	最大引張強さ	N	たて	314	310	294	162	182	189	307
			よこ	122	157	196	166	174	234	250
	最大伸び率	%	たて	23.6	20.5	20.4	23.7	23.1	28.4	26.3
			よこ	12.0	16.3	16.5	11.0	14.0	15.1	17.7
	引裂き強さ	N	たて	23.7	49.5	49.6	43.1	39.1	42.3	71.8
摩耗強さ	回	よこ	13.7	23.0	27.3	32.8	25.8	32.9	74.6	
イージーケアー性	乾燥し易さ	min	—	63.6	99.0	94.6	104.8	102.4	160.0	174.8
	防しわ性	%	たて	51.5	36.5	50.2	44.5	52.7	70.0	51.8
			よこ	94.4	103.0	100.8	109.0	102.6	105.6	122.4
	寸法変化	%	たて	106.4	125.8	122.8	110.2	111.2	107.6	120.4
よこ			-8.9	-9.8	-10.4	-1.3	-1.5	-1.2	-2.2	
快適性	通気し易さ	cm ³ /cm ² /sec	たて	-7.2	-13.6	-11.3	-0.6	-0.3	-0.2	-0.3
	吸水し易さ	%	—	27.7	29.5	27.8	52.7	69.6	62.6	59.4
	保温し易さ	%	—	120.4	139.9	128.0	150.7	132.0	153.4	150.7
伸縮性		%	たて	18.5	17.7	19.7	22.9	23.2	23.0	22.4
			よこ	3.2	3.0	3.1	5.3	5.6	5.9	6.5
ドレープ性	滑らかさ(摩擦係数)		たて	2.5	2.9	2.3	2.3	2.3	1.8	4.3
			よこ	0.202	0.200	0.205	0.238	0.230	0.212	0.204
	平滑さ	μm	たて	0.212	0.217	0.217	0.259	0.267	0.255	0.240
			よこ	5.0	6.0	5.0	11.0	11.3	10.2	11.8
	曲げ易さ	gf・cm ² /cm	たて	3.5	3.7	3.0	7.1	10.4	9.4	7.9
			よこ	0.0484	0.0480	0.0477	0.0633	0.0629	0.0726	0.0556
	せん断し易さ	gf/cm・deg.	たて	0.0301	0.0209	0.0242	0.0639	0.0523	0.0924	0.0515
よこ			0.933	0.917	0.907	0.930	0.920	1.147	0.877	
			よこ	0.910	0.870	0.887	0.910	0.927	1.147	0.863

好な方向にシフトしている。特に、強度区分で大きい効果が見られた。No. 1～3は緯糸のみにおけるPET混の効果を検討したが、混用率による大きな影響はなく、No. 1の綿と比べてNo. 2, 3は、最大引張強さ・伸び率、摩耗強さが約1.5倍向上し、引裂き強さはよこ方向だけでなく、たて方向も2倍向上した。これは経糸の60/2綿よりも緯糸の40/1PET混の引張強度・伸び率が大きく、経糸の引抜き抵抗が小さくなるため、引裂き時に複数の経糸が引張（緯糸）方向と平行に並んで、同時に切断されたためであると考えられる⁶⁾。また、通常の久留米緋（No. 4-6）と同じ太さの40/2PET混（ユ）で、かつ同じ織密度の試作織物No. 7では、さらに良好な結果となり、最大引張強さ・伸び率、摩耗強さが最大1.5倍以上、引裂き強さも最大2.9倍向上した。この他、No. 7は軽さ、薄さ、伸縮性、ドレープ性（滑らかさ、曲げ易さ、せん断性）、防しわ性で優位となり、軽量でサラリとした風合いにも拘わらず、強度がある織物であると言える。

一方、寸法変化では綿に比べて変化量が大きく、No. 2, 3ではよこ方向で10 %以上も縮んだ。これはPETの特徴の一つで、今回の試験条件は沸騰水に30分曝すため、ガラス転移温度(Tg)が69℃⁷⁾であるPETにとっては十分熱収縮できる条件であった。一方、同じPET混を使用したNo. 7においては撚糸後、熱セットしているため変化量は少なくなった。また、No. 7の混用率はPET60 %、綿40 %であり、同じ織密度であるものの綿の吸水性の高さ、綿紡績糸によるふくらみによって、従来の綿100 %の久留米緋よりも吸水性、保温性が低くなるのが懸念された。しかし、いずれも綿100 %と同等であったことから40 %綿で機能維持できることが示された。

図3にプリーツ性試験結果を示す。試作品No. 7において、洗濯前の開角度は従来の久留米緋No. 4より大きいですが、洗濯後には逆に小さくなり、プリーツ保持率が優位となった。この開角度の逆転現象は綿（No. 4）がシワになりやすいためであると考察される。

4 まとめ

PET混を導入した久留米緋は、従来の綿100 %の久留米緋よりも多くの物性項目で優位な結果が得られた。特に、引裂き強さ、耐摩耗性、最大引張強さで

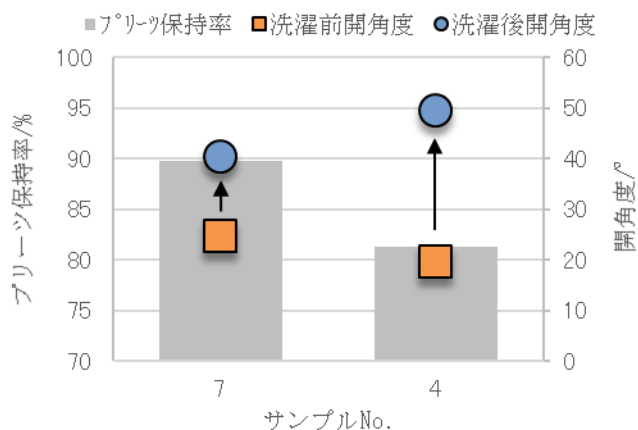


図3 プリーツ試験結果

は1.5～2倍以上の向上が見られた。この他、軽さ、薄さ、伸縮性、ドレープ性（滑らかさ、曲げ易さ、せん断性）、防しわ性、プリーツ性も向上が図れた。

久留米緋は、国内3大緋産地（久留米、備後、伊予）の中で、唯一、工業生産が行われている。今回のPET導入の取組みは、今後、国内で緋産地として生き残るために必要な取組みであると考えられる。また一方で、緋の洋装化も重要な取組みであるが、アパレル業界から求められる生地強度向上、イージーケア性、プリーツ性をもつ久留米緋はアパレルへの展開が期待できる。今後は、さらに異種素材として麻（リネン）100%、織り組織としてはドビー織機による織柄の導入も行っていく予定である。

5 参考文献

- 1) 久留米緋協同組合：久留米緋の魅力（オンライン）
<http://kurumekasuri.jp/久留米緋のいろは/久留米緋の魅力/>（参照2019-5-13）
- 2) 経済産業省製造産業局生活製品課：繊維産業の課題と経済産業省の取組，pp. 9(2019)
- 3) 日本化学繊維協会：繊維ハンドブック2019，pp. 50
- 4) 伊藤 博：新実用染色講座，pp. 43, 175, (株)色染社
- 5) 野口 英樹：繊維製品消費科学，59巻(6号)，pp. 417-422(2018)
- 6) 社団法人日本繊維機械学会：繊維光学[VI]最終繊維製品の製造と性能，pp. 313-314(1981)
- 7) 社団法人繊維学会：第2版繊維便覧，pp. 202(1995)

リサイクル原料を利用した新規アスファルト道路用表層材の開発

藤吉 国孝*1 熊上 章太*2 梶原 輝樹*2 下川 裕士*2

Development of Novel Surface Layer Material for Asphalt Road Using by Recycled Materials

Kunitaka Fujiyoshi, Shota Kumagami, Teruki Kajiwara and Hiroshi Shimokawa

都市ゴミ焼却施設から排出される溶融スラグは、角が尖ったものが多く直接手で触ると刺さる場合があり、また、数%の水分を含んでいるため、リサイクル材としての使用が難しかった。そこで、都市ゴミ焼却灰溶融スラグの磨砕乾燥条件について検討したところ、市販のミキサーを改造することで、磨砕と同時に乾燥も可能となり、角が丸く乾燥したスラグを作製することができた。更に、このスラグの粒度分布を調整しながらセメントに添加することで、モルタル系のアスファルト道路用表層材を開発した。従来のアスファルト道路用表層材は有機溶剤系の材料であり、下地の水系材料である路盤材が濡れたままでは施工できなかったが、下地の乾燥を待たずに施工可能な、水系の新規表層材を開発することができた。

1 はじめに

近年の環境意識の高まりから、リサイクルの重要性が増しており、従来廃棄されていた材料を原料の一部に使用した、環境配慮型の新商品開発が盛んに行われている。このような観点から、二瀬窯業(株)では、砂状の高炉水砕スラグを原材料の一部に利用した、セメントやモルタル製品の開発に取り組んでいる。

製鉄所から排出される高炉水砕スラグは角が尖ったものが多く、直接手で触ると刺さる場合があり、また、数%の水分を含んでいる。そこで二瀬窯業(株)では、高炉水砕スラグを磨砕加工して角を丸くし、更に乾燥させる独自技術を開発した。本技術を用いて高炉水砕スラグから砂状のリサイクル材を製作し、セメントやモルタル用の骨材として利用していたが、この独自のモルタル用骨材製造技術を、高炉水砕スラグ以外の新たな材料に展開させることが課題であった。

ところで、道路に設置されたマンホールは、15～20

年で交換する必要があるとされている。マンホールの交換作業は、マンホール周囲のアスファルト部分を切断・撤去し、新たに受枠を設置後、路盤材を充填し、表層材を塗布して新しい鉄蓋を被せることで行う(図1)。これらの作業は、道路管理者から許可された期間・時間内に確実に終了することが必要とされていることから、交換のスピード化が求められている。表層材は、路盤材(セメントを主体としたもの)を打設後乾燥するまで約1時間待機した後に、塗布する必要がある。これは、表層材にはアクリル樹脂を用いた有機溶剤系のものが使用されており、施工面である路盤材が濡れていると接着不良となるためである。

そこで本研究では、モルタル系材料で表層材を設計することにした。即ち、下地である路盤材と本研究の新規表層材は共に水系材料であるため、路盤材の乾燥を待つことなく表層材の施工が可能となる。更に、高炉水砕スラグ以外のリサイクル材として、都市ゴミ焼

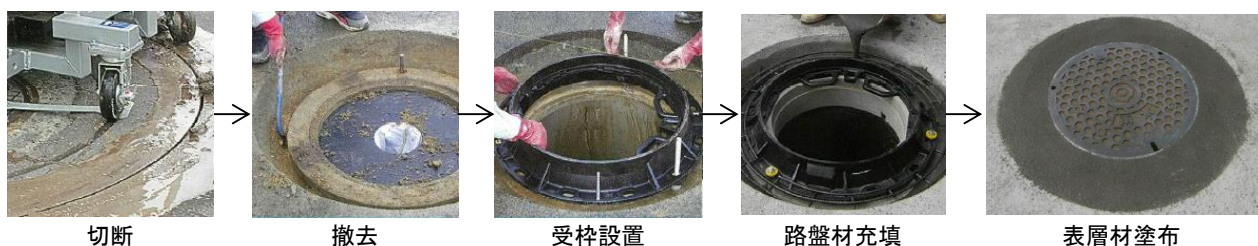


図1 マンホール交換作業の概略写真

*1 化学繊維研究所

*2 二瀬窯業(株)

却灰溶融スラグに着目した。具体的には、本研究では、まず都市ゴミ焼却灰溶融スラグの組成や有害元素の有無について検討し、次に、磨砕・乾燥方法について検討した。更に、磨砕・乾燥させた都市ゴミ焼却灰溶融スラグとセメント系材料との配合条件について検討した。

2 研究, 実験方法

2-1 都市ゴミ焼却灰溶融スラグ

本研究では、北九州市の都市ゴミ焼却施設である新門司工場から排出された焼却灰溶融スラグ(図2)を研究に用いた。



図2 都市ゴミ焼却灰溶融スラグの外観写真

2-2 都市ゴミ焼却灰溶融スラグの分析方法

2-2-1 主成分測定

都市ゴミ焼却灰溶融スラグを粉砕し、円盤状にプレス成形し、蛍光X線分析装置(XRF:リガク製SX PrimusII)を用いて、ファンダメンタル・パラメータ法による半定量分析を行うことで、主成分測定を行った。

2-2-2 微量有害物質の簡易含有量検査

JIS K 0058-2「スラグ類の化学物質試験方法—第2部:含有量試験方法」に基づいて測定溶液を調整し、共立理化学研究所製簡易水質検査器具パックテスト(6価クロムの測定にはWAK-Cr6+, ふっ素の測定にはWAK-F, ほうその測定にはWAK-B)を用いて、含有量を評価した。具体的には、パック試験チューブ内容積の半分程度に検液を吸い込み、数回振り混ぜ、所定の反応時間後に試験チューブ内の液の色を標準色と見比べることで濃度を決定した。

2-3 都市ゴミ焼却灰溶融スラグの磨砕

都市ゴミ焼却灰溶融スラグを太平洋機工製ショベル羽根式高速混合機WB-600型に投入し、所定時間攪拌することで、磨砕を行った。磨砕前後のスラグについて、

サンワサプライ製マイクロSCOPE400-CAM025を用いて粒形観察を行い、角が取れて磨砕されたかどうかを確認した。

2-4 都市ゴミ焼却灰溶融スラグの水分量の測定

都市ゴミ焼却灰溶融スラグを十分に加熱・乾燥させ、乾燥前重量(W_1)と加熱後重量(W_2)から、式(1)を用いて水分量を算出した。

$$\text{水分量(重量\%)} = (W_1 - W_2) \div W_2 \times 100 \quad (1)$$

2-5 表層材の設計

本研究における表層材には、下地となる路盤材の乾燥を待たずに施工可能な、セメントを主体とした水系の材料とすることとした。更に、骨材として磨砕・乾燥させた都市ゴミ焼却灰溶融スラグを添加した環境配慮型のモルタル系の材料とすることにした。

また、商品としては、粉体、エマルジョン、顔料の3種で1セットとすることにした。粉体は骨材やセメント粉等を混合したものである。エマルジョンは両親媒性化合物と水を混合したもので、粉体と混合して練混ぜた時に標準軟度のペーストが作製できる水分量が含まれるように設計した。また、施工現場に合わせて任意に色の調製ができるように、顔料を添付することにした。施工現場では、施工箇所の色調に合うように粉体と顔料を混合し、更にエマルジョンを投入・攪拌して作製したペーストを施工箇所に塗布し、乾燥・硬化させて、路面等の表面仕上げを行う。

2-6 表層材粉体の作製

磨砕・乾燥させた都市ゴミ焼却灰溶融スラグは、目開き0.85 mm, 0.15 mmの2種のふるいを用いて、大(0.85 mm以上), 中(0.15 mm以上0.85 mm未満), 小(0.15 mm未満)の3種類に分類し、大・中・小の混合割合を変えながらセメントと混合させて粉体とした。

2-7 表層材の分析・評価

本研究では顔料は添加せずに、粉体とエマルジョンを混合して練混ぜ、作製したペースト及びペーストを硬化させて作製したモルタル供試体について、分析・評価を行った。

具体的には、粉体とエマルジョンを混合し、練混ぜ

機（マルイ製モルタルミキサーMIC-362-1-01）を用いて作製したペーストについてJASS 15M-103に準拠してフロー値を測定し、流動性試験を行った。また、JIS R 5201に準拠し、練混ぜ終了後60秒以内にペースト容器の中に入れて表面を平滑にし、凝結の始点及び最終の測定をすることで硬化速度試験を行った。更に、JIS R 5201に準拠し、テーブルバイブレータを用いてペーストを成形用型に詰め、所定時間後に脱型することで、モルタル供試体（硬化体）を作製した。

作製したモルタル供試体について、JIS R 5201に準拠し、前川試験機製作所製圧縮試験機アムスラー式堅型（100 kN）を用いた圧縮強さ測定及び、九州丸東製万能材料試験機丸東式デジタル（10 kN）を用いた曲げ強さ測定を行った。

3 結果と考察

3-1 都市ゴミ焼却灰溶融スラグの成分分析

本研究で使用するスラグは都市ゴミ焼却灰を原料としていることから、組成のばらつきや有害成分が含まれていないかが懸念される。そこで、2018年12月に排出された焼却灰溶融スラグと、2019年2月に排出された焼却灰溶融スラグの2種類について、蛍光X線分析を行った。その結果、主成分はケイ酸（SiO₂）、石灰分（CaO）や酸化アルミ（Al₂O₃）であり、大きな組成変動は見られなかった（表1）。

表1 都市ゴミ焼却灰溶融スラグの主成分（重量%）

製造年月	SiO ₂	CaO	Al ₂ O ₃	その他
2018年12月	35	42	14	9
2019年2月	33	42	15	10

ここで、溶融スラグ骨材の有害物質含有量は、JIS A 5031「一般廃棄物、下水汚泥又はそれらの焼却灰を溶融固化したコンクリート用溶融スラグ骨材」により表2のように規定されている。これに対し、都市ゴミ焼却灰溶融スラグの蛍光X線分析の結果、カドミウム、鉛、ひ素、水銀、セレンは検出されなかった。また、蛍光X線での分析が困難である6価クロム、ふっ素、ほう素について、パケットテストを用いて簡易的に測定した含有量を表2に示すが、JIS A 5031で定められた基準値を大幅に下回る含有量であった。

表2 都市ゴミ焼却灰溶融スラグの有害物質含有量

項目	単位	含有量	基準値
カドミウム	mg / kg	—	≤150
鉛	mg / kg	—	≤150
6価クロム	mg / kg	<0.05	≤250
ひ素	mg / kg	—	≤150
純水銀	mg / kg	—	≤15
セレン	mg / kg	—	≤150
ふっ素	mg / kg	0	≤4,000
ほう素	mg / kg	5	≤4,000

3-2 都市ゴミ焼却灰溶融スラグの磨砕・乾燥条件の検討

都市ゴミ焼却灰溶融スラグは角が尖った粒子が多く含まれることから、施工者や製造工場従事者の健康・安全管理上、角を丸くする必要がある。そこで、磨砕条件について検討した。また、都市ゴミ焼却灰溶融スラグは水砕スラグであることから水分を含んでおり、そのままセメントと混合するとすぐに硬化してしまうため、乾燥条件についても併せて検討した。

都市ゴミ焼却灰溶融スラグを攪拌機に投入し、一定時間後に抜き取って粒径観察を行った。その結果、攪拌前は角が尖った形状の粒子が多く見られた（図3左図）が、攪拌に伴って次第に角が取れた粒子が増加した。ここで、使用した装置は攪拌機であるが、攪拌機の中のショベル型の羽根が高速で回転することで、都市ゴミ焼却灰溶融スラグの磨砕が行われたと考えられる。40分攪拌・磨砕後のマイクロ스코ープ像を図3右図に示すが、角が取れて丸くなった粒子が数多く見ら

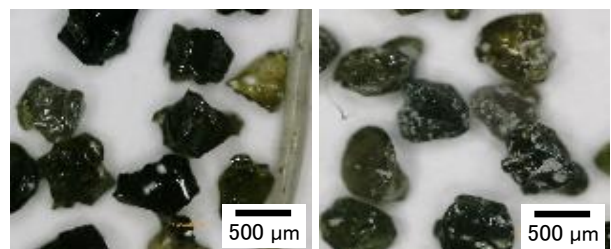


図3 都市ゴミ焼却灰溶融スラグのマイクロ스코ープ像（左図：磨砕前、右図：磨砕後）

れ、安全性が確保できていると判断した。

本研究で使用した攪拌機は、稼働させると摩擦熱や機械熱が発生する。よって、水分を含む都市ゴミ焼却

灰熔融スラグを投入して攪拌すると、磨砕と同時に乾燥も行うことができる。また、更に効率よく乾燥させるために、攪拌機に熱風発生器を接続し、約50℃の熱風を送り込みながら都市ゴミ焼却灰熔融スラグの磨砕を行い、所定時間後にスラグを抜き取って水分量の測定を行った。

その結果、磨砕機の稼働時間と共に水分率は低下し、40分後には水分量0%と十分に乾燥することが明らかとなった(表3)。

表3 磨砕機の稼働時間とスラグの水分量

稼働時間(分)	0	10	20	30	35	40
水分量(重量%)	11	3.4	1.7	0.8	0.1	0

3-3 表層材の配合条件の検討

磨砕・乾燥後の都市ゴミ焼却灰熔融スラグ(分級なし)を用いて作製した表層材硬化体では、圧縮強度等が不十分であった。そこで、大(0.85mm以上)、中(0.15～0.85mm)、小(0.15mm以下)の3種類に分級し、各種配合について検討したところ、大・中・小の配合割合によって、圧縮強度等の物性が異なることが明らかとなった。

そこで、最適と考えられる配合条件(大:約25%、中:約60%、小:約15%)でセメントや添加剤と一緒に混合し、表層材を作製した。この表層材試作品について、フロー値測定による流動性試験、硬化速度試験及び圧縮強度試験を実施した。その結果、現在一般的に市販されているアクリル樹脂を用いた有機溶剤系の表層材と同等以上の性能であった。

表4 表層材の物性値

	有機溶剤型 表層材	表層材 試作品
フロー値	150±15 mm	155 mm
硬化速度	10～30分	始発16分、終結18分
圧縮強さ	12.0 N / mm ² 以上	35.6 N / mm ²
曲げ強さ	7.5 N / mm ² 以上	7.7 N / mm ²

更に、実際にアスファルト陥没部分に路盤材を充填し、乾燥前にこの表層材を塗布したところ(図4)、剥離等は見られず良好な施工状態であった(図5)。



図4 表層材試作品の塗布・仕上げ状況



図5 表層材試作品施工後の路面状況

4 まとめ

都市ゴミ焼却灰熔融スラグの磨砕乾燥条件について検討したところ、市販のミキサーを改造することで、磨砕と同時に乾燥も可能となり、角が丸い乾燥したスラグを作製することができた。

更に、このスラグの粒度分布を調整しながらセメントに添加することで、モルタル系のアスファルト道路用表層材を開発した。従来のアスファルト道路用表層材は有機溶剤系の材料であり、下地の水系材料である路盤材が濡れたままでは施工できなかったが、下地の乾燥を待たずに施工可能な、水系材料の新規表層材を開発することができた。

謝辞

本研究の一部は、平成29年度補正ものづくり・商業・サービス経営力向上支援補助金にて実施した。

骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発(第一報) —破骨細胞分化誘導系での解析結果—

古賀 慎太郎*1 石川 智之*1 金沢 英一*1 緒方 貴宏*2 坂井 孝則*2 朴 晶淑*2

Development of Hypoxic and Closed Culture System Optimized for Bone-metabolizing Cells - Analysis of Osteoclastogenesis -

Shintaro Koga, Tomoyuki Ishikawa, Eiichi Kanazawa, Takahiro Ogata, Takanori Sakai and Piao Jingshu

生体内に近い環境で細胞培養や機能解析を行う技術が、骨代謝細胞の研究や骨再生医療において求められている。しかし通常の細胞培養では、生体内に比べて高酸素、また開放系であり、骨代謝細胞が存在する骨髄環境とは大きく異なっている。そこで、骨代謝細胞をより生体内に近い環境で培養・解析を行うため、低酸素・閉鎖系培養を取り入れた骨代謝細胞の新たな培養法の確立と、当該培養法による細胞の機能解析を行った。RAW264.7細胞を用いて解析した結果、低酸素依存的な細胞増殖の低下と破骨細胞顕著な分化阻害、骨吸収抑制が認められた。抑制のメカニズムについて、細胞死が亢進することや、分化に必要な転写因子の発現が低下することが明らかになった。また試作した閉鎖系培養容器で破骨細胞の分化誘導を行い、容器の課題を見出すことができた。

1 はじめに

骨は脊椎動物の骨格を形成する組織で、体の支持や血中ミネラルの恒常性、造血環境の提供など、生命維持に必要な多様な機能を担っている。骨組織は常に骨吸収と骨形成(骨代謝)を繰り返しており、正常組織ではこの骨代謝がバランスよく維持されている。しかし骨代謝のバランスが崩れ正常な骨代謝が行われない場合、骨粗しょう症や関節リウマチをはじめとした様々な疾患を引き起こすことが知られている。

骨吸収を担う破骨細胞は単球・マクロファージ系の細胞より分化し、酸やタンパク質分解酵素の分泌により骨成分を分解する。対して骨形成を担う骨芽細胞は間葉系の前駆細胞から分化し、コラーゲンやリン酸カルシウムなどの骨基質を形成する。これら骨代謝を担う細胞の分化・機能メカニズムを分子レベルで明らかにすることが、骨代謝の理解や骨関連疾患の病態解明に必要不可欠である。

細胞・分子生物学的な研究において細胞培養は根幹技術であり、生体(骨髄)内に近い環境下で細胞の培養と解析を行うことが、骨代謝メカニズムの正確な解明へとつながる。しかし従来の培養方法は大気酸素、開放系であり、生体内の環境(低酸素、閉鎖系)とは大きく異なっている。

そこで、低酸素・閉鎖系培養を取り入れた骨代謝細胞の新たな培養法の確立と、当該培養法による細胞の機能解析を行った。第一報では破骨細胞分化誘導系を用いた解析結果を報告する。

2 研究、実験方法

2-1 細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は ATCC より購入し、EMEM (イーグル MEM 培地「ニッスイ」③、日水製薬)に NEAA (非必須アミノ酸、和光純薬)と 10% 分の FBS (ウシ胎児血清, Corning) を添加した培地で培養を行った。大気酸素の場合は CO₂ インキュベーター (SCA-165DRS, アステック)、低酸素はマルチガスインキュベーター (APM-30D, アステック) を用いて培養し、酸素濃度は窒素ガスをインキュベーター内に導入することにより調整を行った。CO₂ 濃度はいずれの条件でも 5.0% とした。

2-2 細胞増殖の評価

RAW264.7 細胞を 1×10^5 cells/well で 6-well plate に播種し、培養を開始した。3 日後に細胞を剥がし、細胞数を Coulter Particle Counter Z1 (Beckman Coulter) により計数した。

2-3 破骨細胞の分化誘導と評価

RAW264.7 細胞を用いた分化誘導法と酒石酸耐性酸

*1 生物食品研究所

*2 (株)アステック 細胞科学研究所

性フォスファターゼ (TRAP) 染色は既報に従い実施した¹⁾。また骨吸収の評価は、細胞を予めリン酸カルシウムで被膜したガラス板上に播種し、破骨細胞へ分化後に細胞を除去、被膜部の分解箇所を破骨細胞による骨吸収部とした。吸収部は ImageJ ソフトウェア (NIH) により定量化を行った。

2-4 破骨細胞分化過程のモニタリング

細胞のモニタリングは、培養細胞観察システム (CCM-1.4XYZ, アステック) により実施した。RAW264.7 細胞を分化密度で播種後、分化開始時から 4 日後まで、5 分間隔でタイムラプス撮影を行った。

2-5 リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

各細胞の分化段階における遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した。細胞からの RNA 抽出は NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ) を使用し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ) により逆転写反応を行うことで cDNA を作製した。PCR 反応は TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ) を用いたインターカレーター法で、95°C 5 秒→60°C 30 秒で 40 サイクルの増幅条件により、Thermal Cycler Dice Real Time System II 装置 (タカラバイオ) を用いて解析した。解析した遺伝子と使用したプライマー配列は以下の通りである。

Rank-f 5' -CATCTTCGGCGTTACTACAGG-3'
Rank-r 5' -TCCACTTAGACTACTGCAAGCA-3'
Trap-f 5' -TCCTGGCTCAAAAAGCAGT-3'
Trap-r 5' -ACATAGCCACACCGTTCTC-3'
DC-STAMP-f 5' -TCCTCCATGAACAAACAGTTCCAA-3'
DC-STAMP-r 5' -AGACGTGGTTTAGGAATGCAGCTC-3'
Ctsk-f 5' -CAGTAGCCACGCTTCTCTATCC-3'
Ctsk-r 5' -GAGACAGAGCAAAGCTCACCA-3'
NFATc1-f 5' -CAAGTCTCACACAGGGCTCACTA-3'
NFATc1-r 5' -GCGTGAGAGGTTTATTCTCCAAGT-3'
βactin-f 5' -TGAGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'
βactin-r 5' -AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3'

2-6 閉鎖系培養容器の試作と破骨細胞の分化

閉鎖系培養容器は 5 cm×5 cm 角の容器で、厚さが 1, 2, 4 mm の 3 種類を試作した。辺縁部はガス透過性のシリコンゴムでシールし、2 ヲ所の細胞・培地導入口を持つ (図 1)。細胞の導入や液体の入れ替え・除去作業は、全てシリンジを用いて慎重に実施した。

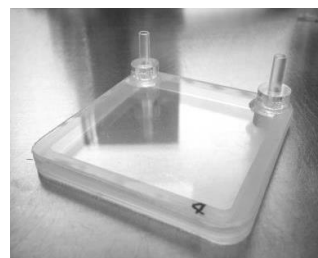


図 1 閉鎖系培養容器

1 容器あたり 3.3×10^5 cells の RAW264.7 細胞を播種し、翌日に培地交換して分化誘導を開始した。以後の分化スケジュールは開放系培養と同様に実施した。

3 結果と考察

3-1 低酸素が細胞の増殖に及ぼす影響

本研究においては、RAW264.7 細胞を破骨細胞前駆細胞株として用いた。図 2 に酸素濃度と細胞増殖との関係について示す。

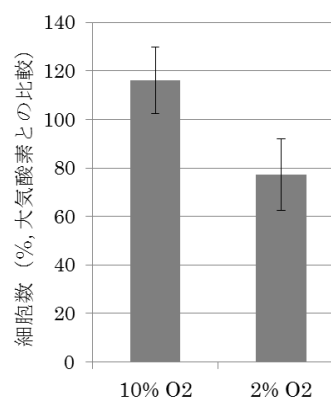


図 2 低酸素が細胞増殖へ及ぼす影響

計数した結果、10% O₂ で大気酸素と同等、あるいは増殖が良かったが、2% O₂ では明らかな増殖低下が認められた。5% O₂ でも同様に増殖が低下した (データ省略)。また培養中の細胞の状態が非常に悪くなり、継代を繰り返すほど増殖が不安定になることが分かった。この結果から、RAW264.7 細胞は 5% O₂ 以下の低酸素により細胞の増殖が低下することが分かった。

3-2 低酸素が破骨細胞分化と機能に及ぼす影響

破骨細胞分化への影響を調べるため、各酸素条件で分化させ、分化の指標である TRAP 染色を行った。低酸素にする時期は分化開始時からと、分化後半の 3 日目からの 2 条件検討した。

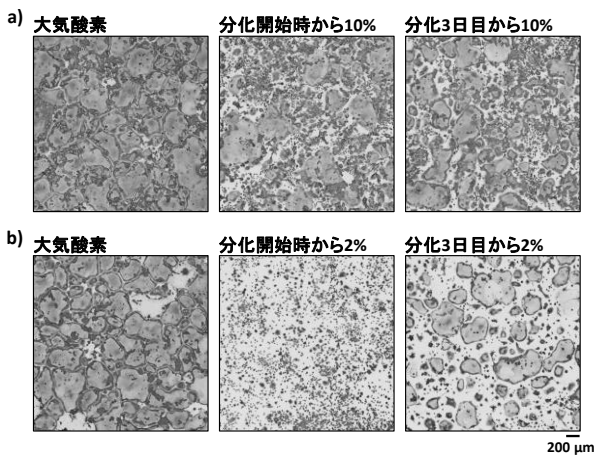


図3 破骨細胞分化における酸素濃度の影響

2%および10% O₂での結果を図3に示す。コントロールの大気酸素条件では、TRAP陽性の多核の成熟破骨細胞が多数形成される(図3左列)。しかし低酸素ではどの酸素濃度でも、また低酸素暴露の時期に関わらず、破骨細胞分化は阻害されることが分かった(図3)。またこの現象は酸素濃度が低いほど、あるいは低酸素暴露期間が長いほど顕著で、分化開始時から2% O₂にした場合、多核の破骨細胞はほとんど形成されない(図3-b))。この結果から、低酸素環境はRAW264.7の破骨細胞分化を顕著に阻害することが分かった。

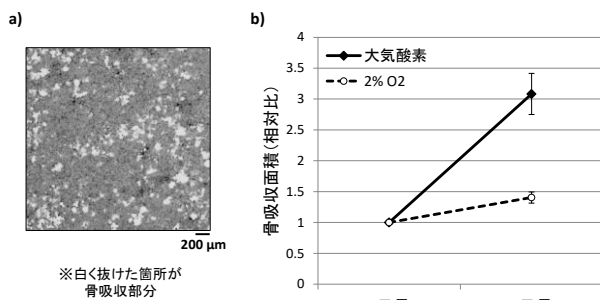


図4 低酸素が骨吸収活性に及ぼす影響

次に骨吸収活性について検討を行った。特に、破骨細胞分化において最も顕著な変化が見られた2% O₂条件に着目し、実験を行った。図3の結果から、破骨細胞分化阻害による骨吸収低下の影響を極力排除し、成熟破骨細胞における骨吸収活性を見る必要があった。そこで、成熟破骨細胞が形成される分化4日目までは大気酸素条件で分化誘導し、その後5日目まで2% O₂条件で培養した。

骨吸収活性の結果を図4に示す。グラフは4日目の吸収面積を1とし、その相対比として示している。破骨

細胞の骨吸収活性により、培養基板上のリン酸カルシウム化合物が分解され穴が生じる(図4-a))。この穴の面積を定量化して比較した結果、大気酸素条件では4~5日目にかけて吸収面積の増大が認められるのに対し、2% O₂では顕著に抑制されていた(図4-b))。このことから、低酸素はRAW264.7細胞の破骨細胞分化だけでなく、骨吸収も抑制することが分かった。

3-3 細胞のモニタリングによる低酸素の影響解析

これまでの結果から、低酸素により破骨細胞の分化は抑制されることが明らかとなった。その影響について詳細に解析するため、破骨細胞の分化過程における細胞の挙動をタイムラプス撮影により観察した。

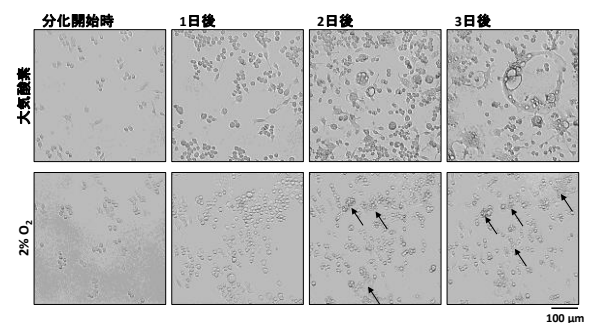


図5 破骨細胞分化過程のモニタリング

破骨細胞分化過程のモニタリング結果を図5に示す。大気酸素環境における破骨細胞分化は、細胞増殖や活発な遊走を経て細胞融合し、最終的に巨大な多核細胞を形成する(図5上段)。しかし2% O₂では、分化開始1日後までは大気酸素と同様の挙動であったが、それ以降は細胞死が亢進して細胞数が減少し、多核の破骨細胞はほとんど形成されなかった(図5下段: 矢印は死細胞を示す)。また、培地中へのLDH放出を指標とした細胞傷害活性の測定を行った結果、2% O₂では破骨細胞分化過程の中期において、顕著な細胞傷害が生じていることが判明した(データ省略)。これらの結果を合わせて、低酸素環境は分化の中期段階で過剰な細胞死を誘導し、破骨細胞の分化を顕著に抑制することが考えられる。

3-4 低酸素培養における遺伝子変動の解析

低酸素が破骨細胞分化過程における細胞の遺伝子発現にどのような影響を与えているか調べるため、リアルタイムPCRにより代表的な遺伝子群の解析を行った。なお各時点での遺伝子発現は、リファレンス遺伝子β-actinで補正を行い、0日目の発現を1として相対比を

算出した。各遺伝子の概要は以下の通りである。

RANK：破骨細胞分化に必須の受容体。

NFATc1：破骨細胞分化に必須の転写因子。

TRAP, *DC-STAMP*, *CTSK*：分化依存的に発現上昇する遺伝子で、破骨細胞分化や骨吸収に必要。

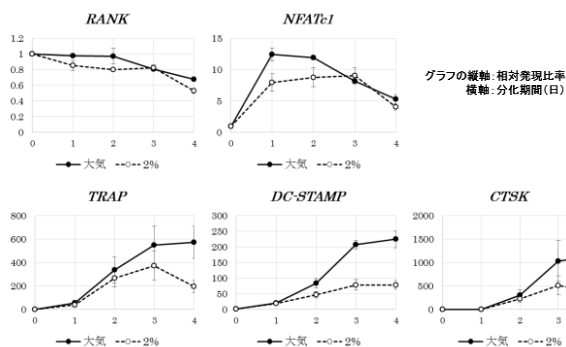


図6 破骨細胞分化過程における遺伝子変動解析

各遺伝子の発現変動を図6に示す。解析の結果、*RANK*の発現には影響がなかったが、分化初期において*NFATc1*発現は低下しており、また分化後期の*TRAP*, *DC-STAMP*, *CTSK*の発現も顕著に低下していた。これらの結果から、低酸素環境では破骨細胞分化初期のシグナル伝達が抑制され、必要な遺伝子群の発現が低下したことが考えられる。

3-5 閉鎖系培養容器を用いた破骨細胞分化の解析

最後に、試作した閉鎖系培養容器で破骨細胞分化の解析を行った。開放系培養との比較のため、同じ培養面積を持つT25培養フラスコを用意し、比較を行った。

まず試作容器への細胞の接着性について調べた結果、T25フラスコと同等の接着性を示し、生着細胞の数や形態にも異常は認められなかった（データ省略）。

図7に3種類の試作容器（厚さ1, 2, 4 mm）とT25フラスコにおける破骨細胞分化の結果を示す。分化開始4日目にTRAP染色を行った結果、閉鎖系培養容器では破骨細胞分化が阻害されており、特に1 mmと2 mm厚では阻害が顕著であった。また、4 mm厚容器では分化は認められるものの、多核の破骨細胞が明らかに少なかった（図7）。培養中の細胞を観察した結果、1 mmと2 mm厚の培養容器では分化途中で多くの細胞が死んでいることが判明した（データ省略）。さらに閉鎖系培養容器では、辺縁部と中心部で破骨細胞の分化の進行に偏りがあり、ガス交換部に近い辺縁部の方が分化していることが確認された（データ省略）。なお、このよ

うな現象はT25フラスコでは見られなかった。これらの結果から、試作した閉鎖系培養容器において、RAW264.7の破骨細胞分化は阻害され、特に中心部ではそれが顕著であることが分かった。前述した低酸素培養での解析結果と試作容器中心部での破骨細胞の表現型が類似していることから、溶存酸素量の違いにより辺縁部と中心部で分化に偏りが生じた可能性が高い。

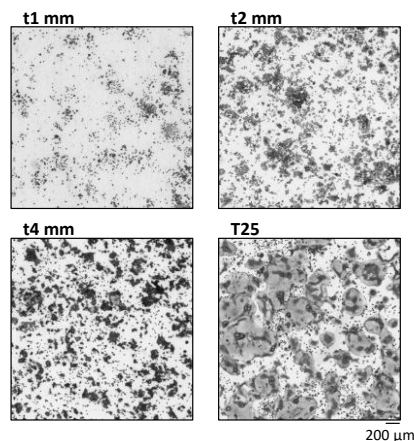


図7 閉鎖系培養容器における破骨細胞分化

4 まとめ

本研究により、低酸素は破骨細胞の分化シグナルを抑制し、細胞死を誘導、顕著に破骨細胞の形成と骨吸収機能を阻害することが分かった。また閉鎖系培養容器の開発において、今回の試作容器では低酸素が原因と思われる破骨細胞の分化阻害や、不均一な分化が生じることが判明した。本成果は均質な細胞状態を維持する培養容器の開発に活かし、低酸素培養を組み合わせた新たな培養法の確立を目指したい。

謝辞

本研究は筆頭著者を研究代表者とし、柿原科学技術研究財団 科学技術研究助成事業の支援を受け実施したものです。

5 参考文献

- 1) 古賀慎太郎：福岡県工業技術センター研究報告，No. 19, pp. 41-44 (2009)

骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発(第二報) — 骨芽細胞分化誘導系での解析結果 —

古賀 慎太郎*1 石川 智之*1 金沢 英一*1 緒方 貴宏*2 坂井 孝則*2 朴 晶淑*2

Development of Hypoxic and Closed Culture System Optimized for Bone-metabolizing Cells - Analysis of Osteoblastogenesis -

Shintaro Koga, Tomoyuki Ishikawa, Eiichi Kanazawa, Takahiro Ogata, Takanori Sakai and Piao Jingshu

生体内に近い環境で細胞培養や機能解析を行う技術が、骨代謝細胞の研究や骨再生医療において求められている。しかし通常の細胞培養では、生体内に比べて高酸素、また開放系であり、骨代謝細胞が存在する骨髄環境とは大きく異なっている。そこで、骨代謝細胞をより生体内に近い環境で培養・解析を行うため、低酸素・閉鎖系培養を取り入れた骨代謝細胞の新たな培養法の確立と、当該培養法による細胞の機能解析を行った。MC3T3-E1細胞を用いて解析した結果、低酸素環境は骨芽細胞分化を抑制する一方、継代培養時の分化能維持に良い影響を与えることが分かった。また分化過程で低酸素が細胞死を亢進することや、分化シグナルを抑制することが明らかになった。また試作した閉鎖系培養容器で骨芽細胞の分化誘導を行い、容器の課題を見出すことができた。

1 はじめに

骨は脊椎動物の骨格を形成する組織で、体の支持や血中ミネラルの恒常性、造血環境の提供など、生命維持に必要な多様な機能を担っている。骨組織は常に骨吸収と骨形成（骨代謝）を繰り返しており、正常組織ではこの骨代謝がバランスよく維持されている。しかし骨代謝のバランスが崩れ正常な骨代謝が行われない場合、骨粗しょう症や関節リウマチをはじめとした様々な疾患を引き起こすことが知られている。

骨吸収を担う破骨細胞は単球・マクロファージ系の細胞より分化し、酸やタンパク質分解酵素の分泌により骨成分を分解する。対して骨形成を担う骨芽細胞は間葉系の前駆細胞から分化し、コラーゲンやリン酸カルシウムなどの骨基質を形成する。これら骨代謝を担う細胞の分化・機能メカニズムを分子レベルで明らかにすることが、骨代謝の理解や骨関連疾患の病態解明に必要不可欠である。

細胞・分子生物学的な研究において細胞培養は根幹技術であり、生体（骨髄）内に近い環境下で細胞の培養と解析を行うことが、骨代謝メカニズムの正確な解明へとつながる。しかし従来の培養方法は大気酸素、開放系であり、生体内の環境（低酸素、閉鎖系）とは大きく異なっている。

そこで、低酸素・閉鎖系培養を取り入れた骨代謝細胞の新たな培養法の確立と、当該培養法による細胞の機能解析を行った。第二報では骨芽細胞分化誘導系を用いた解析結果を報告する。

2 研究、実験方法

2-1 細胞培養

マウス頭蓋骨由来細胞株 MC3T3-E1 は理研バイオリソースセンターより購入し、MEM α （アスコルビン酸不含、GIBCO）に Penicillin-Streptomycin（和光純薬）と 10% 分の FBS（ウシ胎児血清、Corning）を添加した培地で培養を行った。培養用インキュベーター、各種ガス濃度の調整については、前報「骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発（第一報）」と同様に実施した。

2-2 細胞増殖の評価

MC3T3-E1 を 5×10^4 cells/well で 6-well plate に播種し、培養を開始した。3 日後に細胞を剥がし、細胞数を Coulter Particle Counter Z1（Beckman Coulter）により計数した。

2-3 骨芽細胞の分化誘導と評価

MC3T3-E1 細胞を用いた分化誘導法とアルカリフォスファターゼ（ALP）染色は既報に従い実施した¹⁾。骨形成の指標であるアリザリンレッド染色（石灰化評

*1 生物食品研究所

*2 (株)アステック 細胞科学研究所

価セット, PG リサーチ) は, キットのプロトコールに従い実施した。

2-4 骨芽細胞分化過程のモニタリング

細胞のモニタリングは, 培養細胞観察システム (CCM-1.4XYZ, アステック) により実施した。MC3T3-E1 を分化密度で播種後, 分化開始後 11 日目から 14 日目まで, 10 分間隔でタイムラプス撮影を行った。

2-5 リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

リアルタイム PCR による解析は前報「骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発 (第一報)」と同様に実施した。解析した遺伝子と使用したプライマー配列は以下の通りである。

<i>Runx2</i> -f	5' -GCCCAGGCGTATTTTCAGA-3'
<i>Runx2</i> -r	5' -TGCCTGGCTCTTCTACTGAG-3'
<i>Osterix</i> -f	5' -CTCCTGCAGGCAGTCCTC-3'
<i>Osterix</i> -r	5' -GGGAAGGGTGGGTAGTCATT-3'
<i>Alp</i> -f	5' -CGGATCCTGACCAAAAACC-3'
<i>Alp</i> -r	5' -TCATGATGTCCGTGGTCAAT-3'
<i>Colla</i> -f	5' -CCAGCCGCAAAGAGTCTACA-3'
<i>Colla</i> -r	5' -TTCCACGTCTACCATTGGG-3'
<i>Osteocalcin</i> -f	5' -TGACCTCACAGATGCCAAGC-3'
<i>Osteocalcin</i> -r	5' -CGCCGGAGTCTGTCTACTAC-3'
<i>β actin</i> -f	5' -TGAGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'
<i>β actin</i> -r	5' -AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3'

2-6 閉鎖系培養容器の試作と骨芽細胞の分化

閉鎖系培養容器は前報「骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発 (第一報)」と同じ試作容器を使用した。1 容器あたり 6.6×10^5 cells の MC3T3-E1 細胞を播種し, 翌日に培地交換して分化誘導を開始した。以後の分化スケジュールは開放系培養と同様に実施した。

3 結果と考察

3-1 低酸素が細胞の増殖に及ぼす影響

本研究においては, MC3T3-E1細胞を骨芽細胞前駆細胞株として用いた。図1に酸素濃度と細胞増殖との関係について示す。

その結果, 10% O₂では大気酸素と同等, あるいは増殖が良い傾向であったが, 2% O₂では前報のRAW264.7細胞と同様に増殖が低下した。しかし顕微鏡観察による細胞の状態は大気酸素とほとんど変わらず, また継代を繰り返しても細胞の増殖は安定していた (データ

省略)。このことから, MC3T3-E1細胞は低酸素による増殖の低下はあるものの, RAW264.7細胞よりも安定な状態で維持可能であることが分かった。

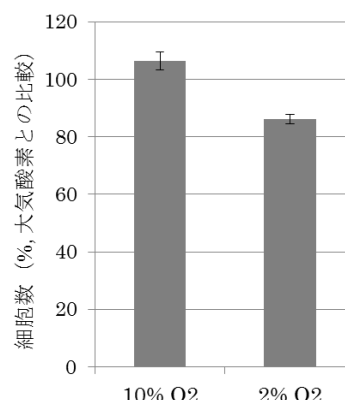


図1 低酸素が細胞増殖へ及ぼす影響

3-2 低酸素が骨芽細胞分化と機能に及ぼす影響

骨芽細胞分化と機能への影響を調べるため, 各酸素条件で分化させて検討した。

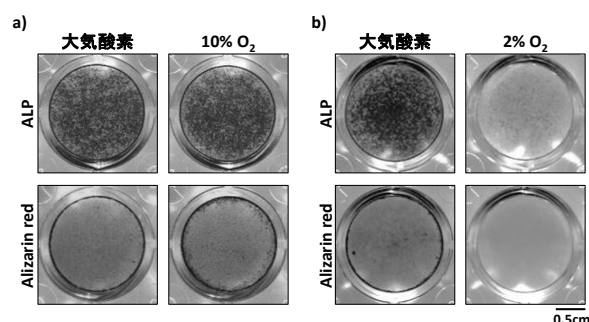


図2 骨芽細胞分化過程における低酸素の影響

分化期間を通して低酸素環境 (2%, 10%) で培養し, 7日目に骨芽細胞分化の指標であるALP染色, 14日目に機能の指標であるAlizarin red染色を行った (図2: 黒い部分が染色部)。コントロールの大気酸素条件と比較した結果, 10% O₂では分化・機能ともにほぼ同等であったが (図2-a)), 2% O₂では顕著に阻害が認められた (図2-b))。

また, 骨芽細胞分化中に24時間間隔での間欠的な低酸素暴露を行い, 分化能を検討したが, 10%と2% O₂条件ともに分化の促進は認められず, むしろ大気酸素条件よりも抑制されていた (データ省略)。これらの結果からMC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化・機能について, 特に2% O₂では, 暴露期間に関わらず阻害されることが分かった。

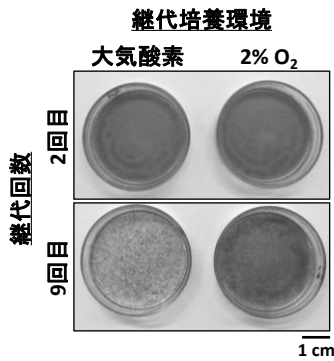


図3 骨芽細胞分化における低酸素の影響
(低酸素での継代培養の影響)

続いて上記とは異なる条件での低酸素の影響を調べるため、以下の実験を行った。低酸素 (2% O₂) で MC3T3-E1細胞を継代、維持培養を続け、その細胞を大気酸素条件で骨芽細胞へと分化させ、7日目にALP染色によりコントロールと比較を行った。その結果、大気酸素下での継代培養は、培養期間依存的に骨芽細胞への分化能を低下させるのに対し、2% O₂での継代培養はその低下を明らかに抑制することが分かった (図3)。このことはMC3T3-E1細胞において、低酸素が骨芽細胞分化能を維持する効果があることを示している。またこの結果は前述した分化過程での低酸素の影響 (図2) と逆で、低酸素が細胞の未分化段階と分化・機能段階で果たす役割が異なることが推察される。

3-3 細胞のモニタリングによる低酸素の影響解析

次に骨芽細胞分化過程における低酸素の影響を詳細に解析するため、培養中の細胞のモニタリングを行った。骨芽細胞の分化過程は破骨細胞のようにダイナミックな細胞の形態変化が起きないことから、分化後過程の骨形成 (リン酸カルシウム結節の形成) に着目し、タイムラプス撮影を行った。

その結果を図4に示す。大気酸素環境において骨芽細胞は、撮影開始 (11日目) から細胞の周囲に急激な骨形成 (図4の黒色部) が進み、24時間後にはプラトーに達した (図4上段)。10% O₂でも骨形成が起きるものの、非常に緩やかで大気酸素とは明らかな差が生じた (図4中段)。さらに2% O₂においては、全く形成を確認することができなかった (図4下段)。また2% O₂では分裂する細胞が非常に少なく、撮影後半には分裂も停止し、死細胞が急激に増える様子を観察することができた (データ省略)。これらの結果から、前報

の破骨細胞と同様に、骨芽細胞においても低酸素による細胞増殖の停止と細胞死が分化・機能阻害の要因と考える。上記モニタリング結果に加えて、2% O₂では骨芽細胞の分化特異的に急激な細胞傷害が生じることがLDH放出測定により判明しており、この可能性を裏付けている (データ省略)。

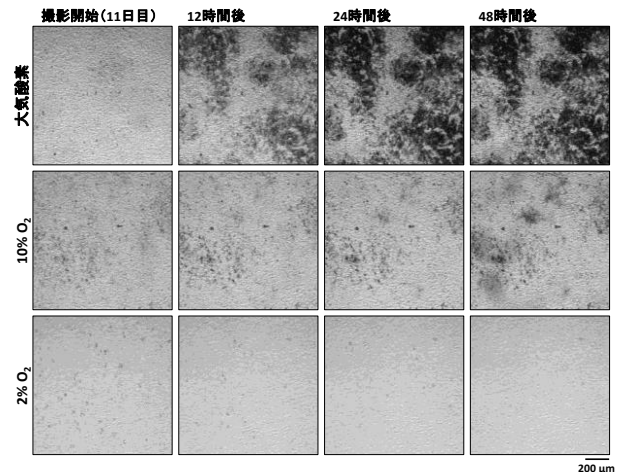


図4 骨芽細胞分化過程のモニタリング

3-4 低酸素培養における遺伝子変動の解析

低酸素が骨芽細胞分化過程における細胞の遺伝子発現にどのような影響を与えているか調べるため、リアルタイムPCRにより代表的な遺伝子群の解析を行った。解析した遺伝子の概要は以下の通りである。

Runx2, *Osterix*: 骨芽細胞分化に必須の転写因子。

ALP, *Col1a*: 分化初期～中期に発現する遺伝子。

Osteocalcin: 分化後期に発現する遺伝子。

各時点での遺伝子発現量はリファレンス遺伝子 β -actinで補正を行い、*Osteocalcin*のみ4日目、その他の遺伝子は0日目 (分化開始前) の発現量を1として、その相対変化を算出した (*Osteocalcin*は0日目で全く検出できなかったため)。

各遺伝子の発現変動を図5に示す。解析の結果、*Runx2*の発現は大気酸素と2% O₂でほとんど変わらず、*Osterix*は逆に2% O₂の方が分化後期で発現上昇することが分かった (図5上段)。しかし*ALP*, *Col1a*, *Osteocalcin*の発現は2% O₂で明らかに低下しており、特に*ALP*と*Osteocalcin*は顕著な低下が認められる (図5下段)。これらの結果から骨芽細胞分化過程において、低酸素は転写因子*Runx2*, *Osterix*の発現を抑制せずに、*ALP*, *Col1a*, *Osteocalcin*の発現を低下させることが

分かった。これらの骨芽細胞分化マーカーは*Runx2*と*Osterix*によって発現が制御されることが知られている。低酸素誘導転写因子であるHIF-1 α が他の転写因子の機能を直接制御する報告もあり、HIF-1 α を中心とした直接的、間接的なシグナル伝達が骨芽細胞分化制御に関わっていると考える。

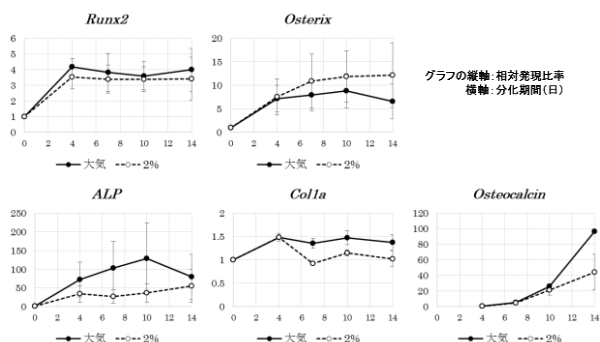


図5 骨芽細胞分化過程における遺伝子変動解析

3-5 閉鎖系培養容器を用いた骨芽細胞分化の解析

前報の破骨細胞の解析と同様に、試作容器での骨芽細胞分化について調べた。まず試作容器へのMC3T3-E1細胞の接着性については、T25フラスコと同等で異常は認められなかった。また分化途中の細胞についても顕微鏡観察を行ったが、RAW264.7細胞とは異なり、明らかな細胞死は観察できなかった（データ省略）。

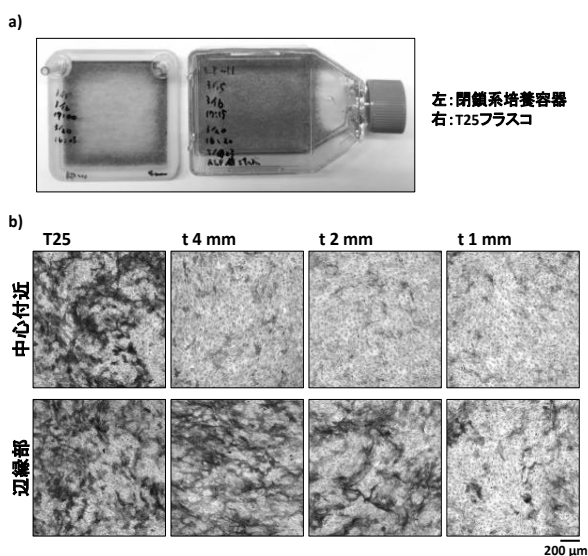


図6 閉鎖系培養容器における骨芽細胞分化

MC3T3-E1細胞を分化刺激後7日目にALP染色した結果、試作容器の辺縁部と中心部で、細胞染色像に顕著な差があることが分かった（図6-a）。このような現象は、

開放系のT25フラスコでは見られなかった（図6-a）。顕微鏡で観察すると、容器の全面に細胞は接着しているものの、一様に骨芽細胞の分化が認められるT25フラスコに対して、試作容器では中心部で顕著に骨芽細胞分化が阻害されていた（図6-b）。逆にガス交換部に近い辺縁部では骨芽細胞分化が進行しており、4 mm厚の容器ではT25フラスコと同等であった（図6-b）。

これらの結果から、試作した閉鎖系培養容器は、開放系培養と比べて全体的な骨芽細胞分化は低下、分化の偏りが見られ、特に容器中心部での分化が阻害されていることが分かった。前述の低酸素培養で得られた研究結果と、容器中心部の骨芽細胞の表現型が類似していることから、辺縁部と中心部の溶存酸素量の違いにより分化に差が生じた可能性が高い。

4 まとめ

本研究により、低酸素がMC3T3-E1細胞の分化シグナルを抑制して、顕著に骨芽細胞の形成と機能を阻害することが分かった。一方で、骨芽細胞分化能力の維持には、低酸素で継代培養した方が良いという結果も得られた。この低酸素の役割の違いから、酸素濃度により前駆細胞の増殖や分化の指向性を調整できる可能性が考えられる。

また閉鎖系培養容器の開発において、今回の試作容器では骨芽細胞の不均一な分化を生じることが判明した。このことは、細胞の酸素消費量を賄うには今回のガス交換方法では不十分であることを示している。

今後は本研究成果を間葉系幹細胞などに適用して研究することで、骨再生医療に必要とされている、良質な骨芽細胞の培養が可能な細胞培養装置の技術開発に活かしたいと考えている。

謝辞

本研究は筆頭著者を研究代表者とし、柿原科学技術研究財団 科学技術研究助成事業の支援を受け実施したものです。

5 参考文献

- 1) 古賀慎太郎：福岡県工業技術センター研究報告，No. 20，pp. 22-25 (2010)

醤油膜ろ過残液処理法の検討(第3報) — 醤油膜ろ過残液エタノール沈殿物からの多糖類回収 —

川口 友彰*1 野田 義治*2 植木 達朗*2 脇山 元気*2 坂田 文彦*1 野見山 修治*3

Study on Processing Method of the Shoyu Cross-flow Filtration Retentate

- Recovery of Polysaccharides from Ethanol Precipitate of the Retentate -

Tomoaki Kawaguchi, Yoshiharu Noda, Tatsuro Ueki, Motoki Wakiyama, Fumihiko Sakata and Shuji Nomiyama

醤油の清澄化および無菌化のためクロスフロー膜ろ過処理が行われているが、発生する高粘性・高濁度の濃縮残液（膜ろ過残液）による歩留り低下や処理困難性が問題となっている。これまでに我々は膜ろ過残液のエタノール処理により、粘性に寄与する高分子多糖類を除去し、低粘度の清澄醤油を回収できることを明らかにした。本研究では、膜ろ過残液エタノール処理で生じる沈殿物からの多糖類回収を試みた。エタノール沈殿物を水に溶解しクロスフロー膜ろ過を繰り返すことにより、容易に多糖類を回収・高純度化できることがわかった。一方、エタノール沈殿物中多糖類の膜透過性は生揚膜ろ過時より高く、繰り返しの膜ろ過は回収率を低下させることがわかった。得られた多糖類高含有液は濁りを有するが、プロテアーゼ製剤処理により濁度を低減することができた。

1 はじめに

近年、醤油製造においてクロスフロー方式の膜ろ過が普及している。クロスフロー膜ろ過処理は、醤油もろみを圧搾して得た生揚醤油の清澄化、無菌化、火入れ処理軽減等の利点を有する。一方、膜を通過しない多糖類や菌体を含む高粘性・高濁度の難分解性濃縮残液が処理生揚醤油の5~10%程度発生し、歩留まり低下、排水処理、廃棄コスト等が問題となっている¹⁾。特に、膜ろ過残液中には多量の醤油を含むため、何らかの醤油回収方法が求められている。

これまでに我々は、粘性に寄与する膜ろ過残液中多糖類の大部分がエタノール濃度33%(v/v)で沈殿すること、固液分離により清澄で低粘度の醤油が回収できることを報告した²⁾。膜ろ過残液にエタノール混合後、クロスフロー膜ろ過するのみで清澄醤油を回収でき、膜ろ過残液が生じる事業所においては、特別な技術・装置を必要としない容易で実用性の高い技術である。回収醤油は33%以上のエタノールを含んでいることから、火入れ醤油のアルコール調整用に直接利用可能である。また、エタノールを蒸留により回収して再利用、醤油分は生揚として利用することが可能である。一方で、高分子量成分は膜ろ過により再び濃縮され、高粘性・高濁度の濃縮残液として残存する。この中には、

増粘剤³⁾や乳化剤⁴⁾、機能性食品⁵⁾として有効利用が期待される醤油多糖類を多く含んでいることから回収が望まれる。そこで本研究では、醤油膜ろ過残液の33%エタノール沈殿物からの多糖類回収を試みた。

2 研究, 実験方法

2-1 試料

醤油膜ろ過残液は福岡県醤油醸造協同組合より提供されたものを使用した。エタノール沈殿物は膜ろ過残液100 mLに対して50 mLのエタノール(99.5%)を添加後、遠心分離することで調製した。プロテアーゼ製剤はオリエンターゼOP(エイチビィアイ(株))を用いた。

2-2 クロスフロー膜ろ過による透析ろ過

エタノール沈殿物全量に水を加え200 mLとした。VIVAFLOW50クロスフロー式ろ過ユニット(ザルトリウス)を使用し、流速400 mL/minでろ過した。膜ろ過透過液が180 mLに達したところでろ過を停止し、さらに180 mLの水を濃縮液に加え、ろ過を繰り返した。得られた濃縮液及び透過液は凍結乾燥後保存した。

2-3 酵素反応

濃縮液の凍結乾燥物を2%, オリエンターゼOPを終濃度0.01~0.1%となるように水に溶解し、45℃で2時間反応させた。

*1 生物食品研究所

*2 福岡県醤油醸造協同組合

*3 福岡県商工部

2-4 分析

HPLC (Waters Alliance HPLCシステム) により分子量分布を測定した。カラムは東ソー(株)製TSKgel guardcolumn G3000PW_{XL}, G6000PW_{XL}, G3000PW_{XL}を連結して使用した。溶離液20 mM Na-acetate (pH 5.0), 流速0.6 mL/min, 注入量50 μL, カラム温度25 °C, 内部ヒーター30 °C, 検出は示差屈折率で行った。水分含量は加熱乾燥式水分計MS-70 ((株)エー・アンド・デイ)で測定した。タンパク質はBCA法, 全糖量はフェノール硫酸法, 灰分は直接灰化法により測定した。

3 結果と考察

3-1 透析ろ過過程の解析

多糖類の回収方法として, エタノール沈殿, アルカリ条件下におけるカルシウム処理⁶⁾, カラムクロマトグラフィ等が考えられるが, 本研究では, 低コストで簡便かつ膜ろ過残液処理を課題とする事業所が既に保有する技術・装置であるクロスフロー膜ろ過による多糖類回収を検討することとした。

これまでに我々は, 生揚膜ろ過の際, 精密ろ過膜が醤油多糖類を含む高分子量成分の大部分を阻止することを明らかにしており²⁾, 精密ろ過膜を用いた透析ろ過による多糖類回収・高純度化が可能と考えた。そこで, 醤油膜ろ過残液の33 %エタノール処理で得た沈殿を水に溶解後クロスフロー膜ろ過(精密ろ過膜)に供した。10倍濃縮後, 透過分と同量の水を加え, さらに膜ろ過し, この操作を5回繰り返し, 脱塩及び多糖類濃縮を試みた(透析ろ過法)。得られた透過液および濃縮液の外観を図1に示す。膜ろ過1回目の透過液(図1上段)で見られた醤油の色は, 膜ろ過を重ねるごとに無色に近づき, 膜ろ過4, 5回目では淡く黄色がかる程度となった。膜ろ過3回目以降の透過液および濃縮液の凍結乾燥物(図1下段)については, 類似の外観を有しており, 多糖類の存在を示唆するものであった。

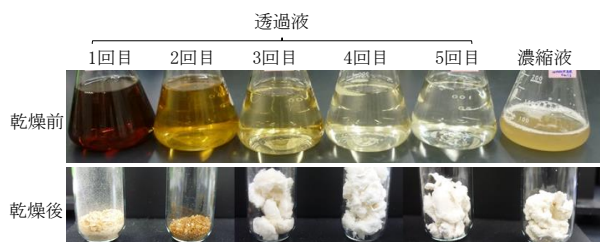


図1 透析ろ過(繰り返し数5回)物の外観

組成を調べた結果を表1に示す。膜ろ過1回目と2回目の透過液は, 総収量の81 %を占め, 灰分30 %程度であり, 低分子の夾雑物の大部分が透過したと考えられた。一方, 糖含有量も26~27 %程度あり, 33 %エタノール沈殿物中の糖類は高分子多糖類がほとんどであることから, 多糖類の膜透過を示唆する結果であった。膜ろ過3回目以降の透過液および濃縮液は, 糖含有量が55~60 %程度と高く, 図1でみられた多糖類存在可能性を支持するものであった。また, 全糖量, タンパク質および灰分について4, 5回目で透過量に違いがみられないことから, 濃縮液中に残存する膜透過性が類似した成分(多糖類含む)が徐々に透過しているものと推察され, 多糖類回収の観点からは, 繰り返しの膜ろ過は回収率低下をまねくと考えられた。以上の結果から, 膜ろ過2回目までに夾雑物質の大部分が透過し, 3回目以降では多糖類が主成分として透過することが推察された。

表1 透析ろ過(繰り返し数5回)物の組成分析結果

	収量 (g)	水分含量 (%)	全糖 (%)	タンパク質 (%)	灰分 (%)
透過液(1回目)	6.40 (68 %)	12.4	26.0	6.7	33.4
透過液(2回目)	1.25 (13 %)	11.4	27.6	6.0	30.6
透過液(3回目)	0.51 (5 %)	15.0	59.8	4.7	15.6
透過液(4回目)	0.34 (4 %)	13.3	57.6	2.2	9.3
透過液(5回目)	0.25 (3 %)	13.4	55.5	1.9	8.8
濃縮液	0.71 (8 %)	12.9	54.6	8.5	8.1

括弧内は全収量に対する割合

透過物と濃縮物の分子量分布を調べた結果を図2に示す。膜ろ過2回目(図2A)までは, 溶出時間32分以降の低分子成分(6.2 kDa以下)が主に透過するとともに, 溶出時間22分~30分の高分子量成分(21.7 kDa以上)も透過した。膜ろ過3回目(図2B, 実線)では主な透過成分が高分子量成分となり, 4, 5回目の透過液(図2B, 破線, 点線)においては低分子成分の透過はほとんどみられず高分子量成分が透過した。濃縮物は低分子成分が除去され高純度化していることがわかった(図2C)。また, 濃縮物と4, 5回目の透過液(図2B, 破線, 点線)のクロマトグラムは類似しており, 濃縮物中の多糖類が徐々に透過(損失)している状態であると考えられた。これらは表1の結果と一致するものであった。以上の結果より, 膜ろ過残液のエタノ

ール沈殿物を水に溶解し膜ろ過することにより、低分子共雑物を除去し多糖類高含有液を回収できること、33 %エタノール沈殿物中多糖類は精密ろ過膜透過性を有することがわかった。

生揚膜ろ過と比べ、33 %エタノール沈殿物膜ろ過で多糖類の膜透過性が高まった原因としては、詳細な検討が必要であるが、エタノール沈殿により生揚膜ろ過時の膜ファウリングが解消された可能性が考えられる。すなわち、生揚膜ろ過時には低分子成分と高分子量成分の相互作用で形成されていたファウラントが、エタノール沈殿による生揚中の低分子成分除去によって解消され、ろ過膜孔径に対し本来透過すべき分子量を有する成分が透過したものと推察できる。

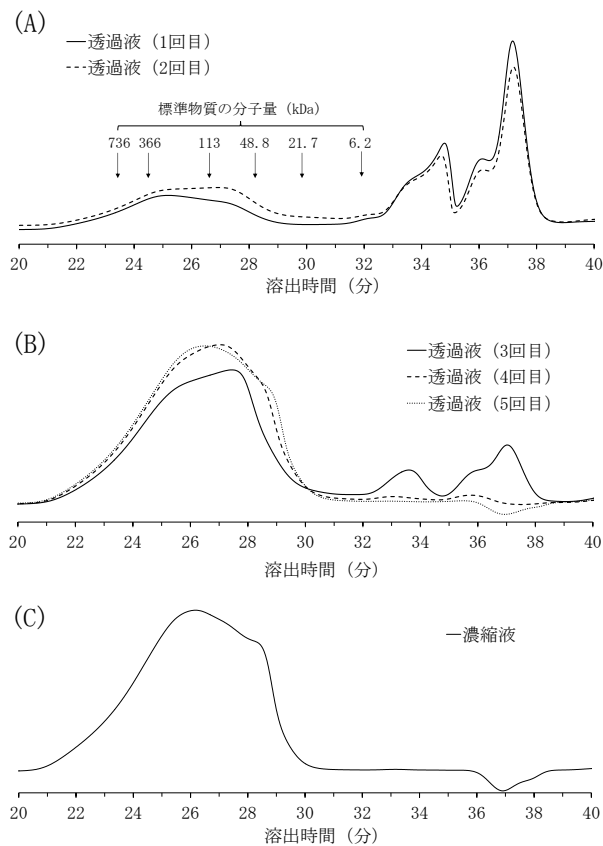


図2 透析ろ過物（繰り返し数5回）の分子量分布

3-2 透析ろ過による多糖類高含有液の回収

多糖類高含有化のため、膜ろ過を2回繰り返し、透過液・濃縮液を得た。これらを凍結乾燥後、分子量分布を分析した結果を図3に示す。低分子量の夾雑物が透過し、高分子量の多糖類の高純度化をしめすもので、表1、図2の結果と一致した。

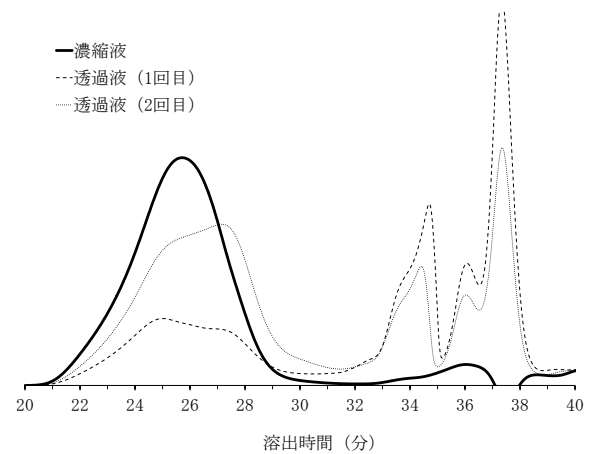


図3 透析ろ過物（繰り返し数2回）の分子量分布

表2に組成を分析した結果を示す。表1と同様、総収量の83 %がろ過膜を透過し除去されたことがわかった。回収した濃縮液中には、糖類が57.3 %（乾燥重量換算69 %）存在することがわかった。以上の結果より、膜ろ過残液のエタノール沈殿物に水を加え、膜ろ過を2回繰り返すのみで、多糖類高含有液を回収できることがわかった。膜ろ過残液100 mLから得られる多糖類高含有物は1.64 gであった。

表2 透析ろ過物（繰り返し数2回）の組成分析結果

	収量 (g)	水分含量 (%)	全糖 (%)	タンパク質 (%)	灰分 (%)
透過液 (1回目)	6.65 (71 %)	7.7	23.4	5.8	34.3
透過液 (2回目)	1.13 (12 %)	9.1	47.6	4.8	20.2
濃縮液	1.64 (17 %)	16.5	57.3	4.2	8.7

括弧内は全収量に対する割合

今回検討した精密ろ過膜では、膜ろ過2回で多糖類の透過（損失）も生じたが、膜を限外ろ過膜へ変更すればより高収率を得ることが期待できる。

3-3 酵素剤処理による濁度低減

生揚の膜ろ過は清澄化を目的としており、膜ろ過残液には混濁成分が濃縮されている。そのエタノール沈殿物や、エタノール沈殿物から回収した多糖類高含有物についても混濁成分は濃縮されたまま存在し続けている。そのため多糖類高含有物は濁りを有しており（図1上段）、用途によっては濁度低減が望まれる。濁りの原因成分としては珪タンパク質⁷⁾が考えられたため、プロテアーゼ製剤処理による濁度低減を試みた。

その結果、図4に示すように、オリエンターゼOP処理により、濁度が低下することがわかった。

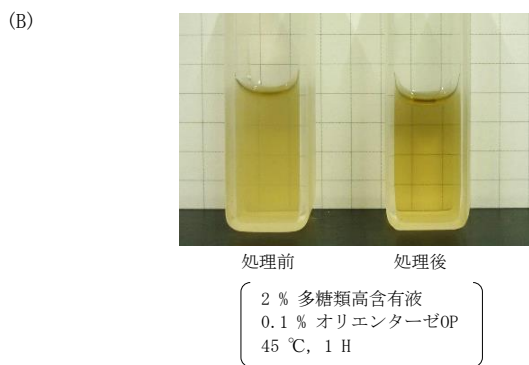
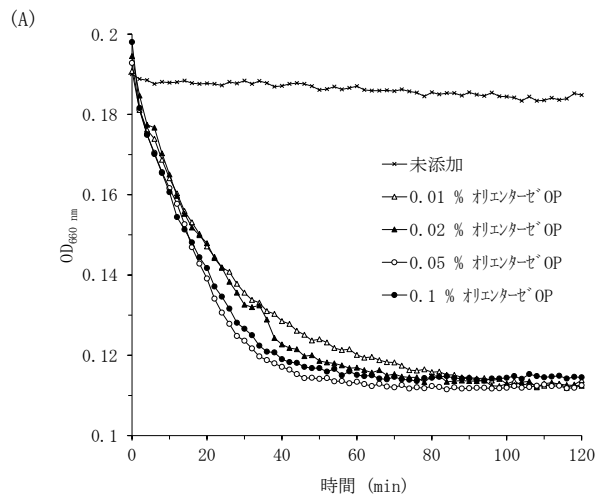


図4 多糖類高含有物の酵素処理による濁度変化
(A) 経時変化, (B) 処理前後の外観

4 まとめ

膜ろ過残液エタノール処理で生じる沈殿物からの多糖類回収を試みた。その結果、エタノール沈殿物を水に溶解しクロスフロー膜ろ過を2回繰り返すことにより、容易に多糖類高含有物を得られること、また、多糖類高含有物中の濁りをプロテアーゼ製剤により低減できることがわかった。本技術により、醤油膜ろ過残液のエタノール処理物から多糖類の回収が可能となり、エタノール処理による清澄醤油回収²⁾とあわせ、膜ろ過残液の有効な処理方法であると思われる。

5 参考文献

- 1) 野田義治, 植木達朗, 大場和徳, 脇山元気: 醤油の研究と技術, 37巻(6号), pp. 365-369(2011)
- 2) 川口友彰, 野田義治, 植木達朗, 脇山元気, 野見山修治: 醤油の研究と技術, 45巻(2号), pp. 103-109(2019)
- 3) 富士甚醤油株式会社: 特許第4087529号(2008)

- 4) 松田康: 日本醸造協会誌, 91巻(3号), pp. 167-171(1996)
- 5) 古林万木夫, 松下裕昭, 真岸範浩: 日本醸造協会誌, 104巻(9号), pp. 647-651(2009)
- 6) 川口友彰, 植木達朗, 野田義治: 福岡県工業技術センター研究報告, 28号, pp. 24-26 (2018)
- 7) 足鹿利幸, 若山守: 醤油の研究と技術, 39巻(1号), pp. 37-41(2013)

醤油膜ろ過残液処理法の検討(第4報) —ろ過膜孔径の違いが生揚成分の膜透過性に与える影響—

川口 友彰*1 野田 義治*2 植木 達朗*2 脇山 元気*2 坂田 文彦*1 野見山 修治*3

Study on Processing Method of the Shoyu Cross-flow Filtration Retentate

- Effect of Pore Size on Permeability in the Cross-flow Filtration -

Tomoaki Kawaguchi, Yoshiharu Noda, Tatsuro Ueki, Motoki Wakiyama, Fumihiko Sakata and Shuji Nomiyama

醤油のクロスフロー膜ろ過処理は混濁成分および菌体を除去する一方、多糖類を含む高分子量成分の膜透過をも阻止し、醤油成分ロスと残液処理困難性につながっている。そこで本研究では、膜孔径を従来使用されている0.1 μm から0.45 μm とし、生揚成分の膜透過性の変化を調べた。その結果、膜孔径0.45 μm では113 kDa以下の高分子量成分の膜透過性が高まること、火入れ歪（おり）タンパクは膜に保持され、火入れ後も歪が発生しないことを明らかにした。膜ろ過残液の高分子量成分は33 %エタノールで沈殿する分子量と一致し、エタノール処理でほとんど残存することなく除去することができた。生揚の膜ろ過において、膜孔径0.45 μm の膜適用は、醤油成分保持および副産物（膜ろ過残液）処理において有効であることが判明した。

1 はじめに

近年、醤油製造においてクロスフロー方式の膜ろ過が普及している。クロスフロー膜ろ過処理は、醤油もろみを圧搾して得た生揚の清澄化、無菌化、火入れ歪処理軽減等の利点を有する。一方、膜を通過しない多糖類や菌体を含む高粘性・高濁度の難分解性濃縮残液が処理生揚の5~10 %程度発生し、歩留まり低下、排水処理、廃棄コスト等が問題となっている¹⁾。特に、膜ろ過残液中には多量の醤油を含むため、何らかの醤油回収方法が求められている。

これまでに我々は、生揚と膜ろ過残液の分子量分布の比較から、膜ろ過（膜孔径0.1 μm ）により6.2 kDa以上の高分子量成分が膜に保持されることを明らかにした²⁾。膜ろ過残液中に存在するこれらの高分子量成分は、アルカリ条件下でのカルシウム処理³⁾やエタノール処理²⁾により沈殿・除去でき、膜ろ過残液からの低粘度清澄醤油の回収が可能であったことから、膜ろ過残液の主な粘性成分であることを確認している。したがって、これら高分子量成分を回収（膜透過）することで、生揚成分のロス削減と、粘性成分減少による膜ろ過残液の処理性向上が期待できる。そこで本研究では、生揚のクロスフロー膜ろ過において、精密ろ過膜の膜孔径を従来使用されている0.1 μm から0.45 μm

とし、生揚成分の透過性および膜ろ過残液の処理性を調べた。

2 研究, 実験方法

2-1 試料

醤油膜ろ過透過液・残液および醤油歪は福岡県醤油醸造協同組合より提供されたものを使用した。膜ろ過は、原料生揚を85 $^{\circ}\text{C}$ で加熱後、膜孔径0.1 μm あるいは0.45 μm の精密ろ過膜で行った。

2-2 火入れ

膜ろ過透過液の火入れは、瓶に入れて60 $^{\circ}\text{C}$ で2時間加熱後、85 $^{\circ}\text{C}$ で1時間加熱することにより行った。メスシリンダーに移し、5日静置後の歪容量を測定した。

2-3 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

醤油歪1 mLを水と混合し遠心分離し、得られた沈殿を水に懸濁した。遠心上清が透明となるまで繰り返し、沈殿をサンプルバッファーで溶解した。100 $^{\circ}\text{C}$ で5分加熱した後電気泳動に供した。

膜ろ過残液1 mLに0.2 mLの100 % (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) を加え15,000 \times gで5分遠心分離を行った。得られた沈殿を20 % TCA 1 mLで懸濁した。上記TCA処理を計3回行った後、沈殿に2 mLのエタノールを加え、TCA処理と同様の操作で2回洗浄を行った。沈殿をサンプルバッファーに溶解し、100 $^{\circ}\text{C}$ で5分加熱した後電気泳動に供した。

*1 生物食品研究所

*2 福岡県醤油醸造協同組合

*3 福岡県商工部

電気泳動はLaemmliの方法で行い、分離ゲルは10 % ポリアクリルアミドゲルを用いた。

2-4 膜ろ過残液のエタノール処理

膜孔径0.45 μm で膜ろ過して生じた膜ろ過残液20 mLにエタノール10 mLを加え、2,330 \times gで15分間遠心分離し上清を回収した。

2-5 分析

HPLC (Waters Alliance HPLCシステム) により分子量分布を測定した。カラムは東ソー(株)製TSKgel guardcolumn G3000PW_{XL}, G6000PW_{XL}, G3000PW_{XL}を連結して使用した。溶離液20 mM Na-acetate (pH 5.0), 流速0.6 mL/min, 注入量50 μL , カラム温度25 $^{\circ}\text{C}$, 内部ヒーター30 $^{\circ}\text{C}$, 検出は示差屈折率で行った。アミノ酸は全自動アミノ酸分析機(日本電子(株)JLC-500/V2)により、粘度はTVB10形粘度計(東機産業)を用いて25 $^{\circ}\text{C}$ で測定した。

3 結果と考察

3-1 膜孔径による透過成分および保持成分の変化

膜孔径の違いが生揚成分の膜透過性にどのように影響するかを分子量分布の変化により調べた(図1)。

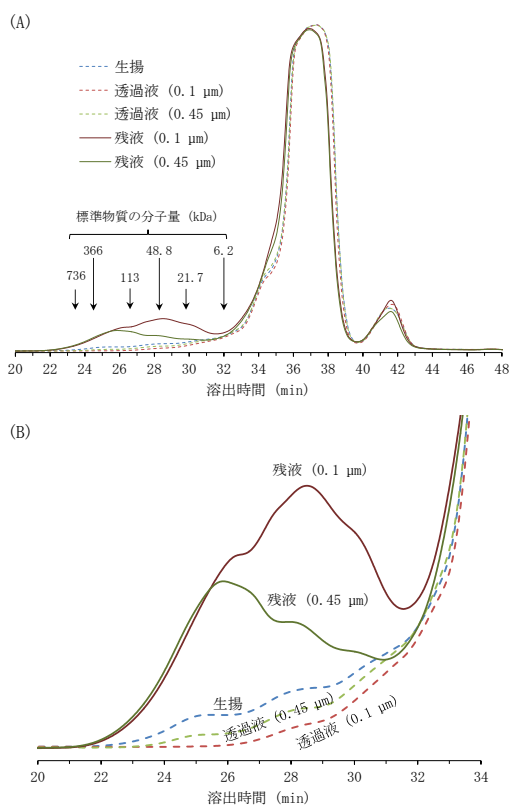


図1 膜ろ過透過液・残液の分子量分布

(A)クロマトグラム全体, (B)高分子領域拡大

6.2 kDaより低分子の領域(溶出時間33分以降)においては、透過液(破線)、残液(実線)の分布は膜孔径が異なってもよく一致しており、検討した膜孔径において低分子成分の透過性に顕著な差はないことがわかった(図1A)。一方、溶出時間33分より前の高分子量側では膜孔径の差による分子量分布の違いが認められた(図1B)。生揚にはもともと高分子量成分が存在しているが、いずれの膜孔径による膜ろ過においても、透過液は高分子量成分が除かれ、残液はその高分子量成分が蓄積することがみてとれる。膜孔径によりその程度が異なっており、膜孔径0.1 μm ではおよそ113 kDa以上(溶出時間26.6分以前)の高分子量成分の膜透過を阻止し、およそ113 kDaより小さな成分(溶出時間26.6~29分)についても半分以上膜透過を阻止していることがわかった。一方、膜孔径0.45 μm では、0.1 μm と比較し生揚成分の透過性が高く、およそ113 kDa以下の成分の半分以上が透過した。その結果として、膜孔径0.45 μm の残液にはおよそ113 kDa以下の成分が、膜孔径0.1 μm の残液よりも少なかった。

図2に、アミノ酸分析結果をしめす。膜ろ過透過液(図2A)、残液(図2B)ともに、生揚(斜線棒)と比較し、膜孔径による大きな差は見られなかった(膜孔径0.1 μm の残液においてわずかに減少がみられた)。この結果は、前述の低分子量成分のクロマトグラムにみられた結果を支持するものであった。

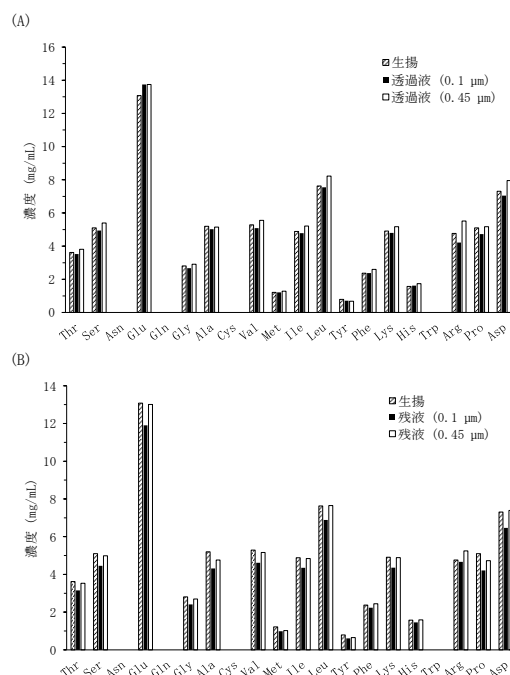


図2 膜ろ過透過液 (A)・残液 (B) のアミノ酸含量

また、膜ろ過前後の粘度に膜孔径による違いは認められなかった(表1)。

表1 膜ろ過透過・残液の粘度

生揚	膜ろ過透過液		膜ろ過残液	
	0.1 μm	0.45 μm	0.1 μm	0.45 μm
粘度 (mPa \cdot s)	3.8	2.72	28.5	29.7

以上の結果より、膜孔径0.45 μm での膜ろ過は0.1 μm に比べ、高分子量成分の透過性が高まること(醤油成分ロスを削減できること)がわかった。

一方で、透過する高分子量成分中に歪の原因となるタンパクも存在する可能性が考えられたため、火入れ試験およびSDS-PAGEによるタンパク分析を行った。火入れ試験の結果、いずれの膜孔径の膜ろ過透過液においても歪は生じなかった(データ未掲載)。図3にSDS-PAGEの結果をしめす。醤油歪にみられる45.1, 32.2, 30 kDa付近の濃い複数のバンド等のバンドパターンを、いずれの膜孔径の膜ろ過残液も有しており、歪の原因となるタンパクが膜で阻止されていると考えられる結果であった。火入れ試験の結果とあわせ、膜孔径0.45 μm の膜ろ過においても、火入れ歪が生じる程の歪タンパクの透過は無いと考えられた。

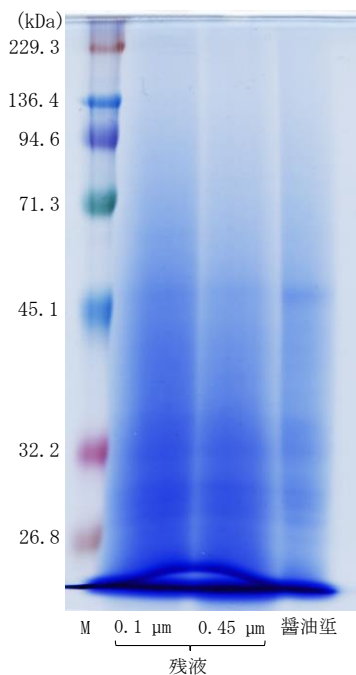


図3 膜ろ過残液と醤油歪の電気泳動結果

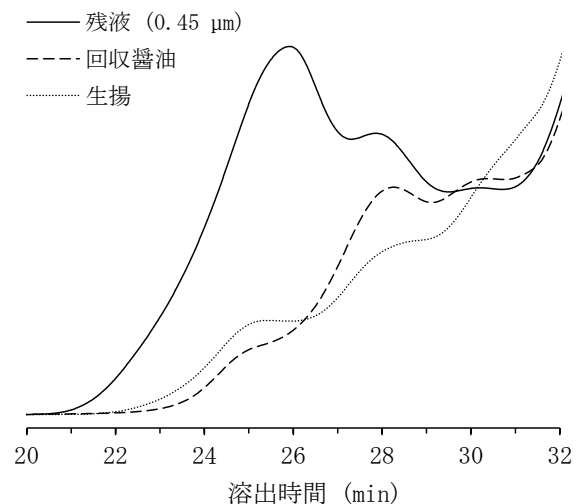
M: 分子量マーカー

3-2 膜ろ過残液のエタノール処理性

膜孔径0.45 μm による膜ろ過では、図1にしめすように溶出時間26分付近をピークとする成分が蓄積した。この分子量分布のパターンは33 %エタノール存在下で沈殿する膜ろ過残液(膜孔径0.1 μm)成分の分布パターン²⁾とよく一致しており、33 %エタノール処理により、蓄積成分の残存が少ない低粘度・清澄醤油を回収できることが考えられた。そこで、膜ろ過残液(膜孔径0.45 μm)を33 %エタノール処理後、回収した清澄醤油の分子量分布を調べた。

その結果、図4Aのように、回収醤油の分子量分布(破線)は、膜ろ過残液(実線)から高分子量成分が除去され、生揚(点線)のパターンに近づくことがわかった。回収醤油の粘度も同様に、生揚と同等の値をしめした(図4B)。

(A)



(B)

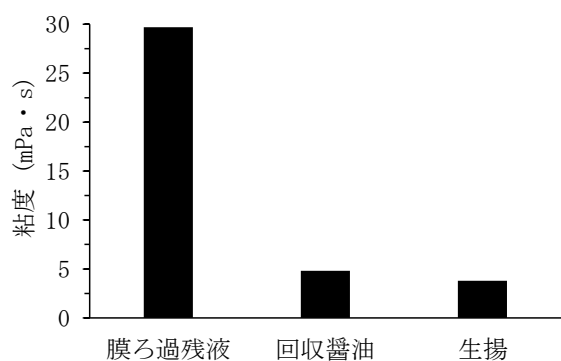


図4 膜ろ過残液エタノール処理によって得られた回収醤油の分子量分布(A)および粘度(B)

4 まとめ

生揚のクロスフロー膜ろ過処理において残液に蓄積する高分子量成分は、醤油成分ロス・膜ろ過残液処理困難性につながる。そこで本研究では、膜孔径変更によるこれらの問題改善を目的とし、生揚成分の膜透過性を調べた。その結果、膜孔径を0.1 μm から0.45 μm にすることで高分子量成分の膜透過性が高まり、成分ロスを削減できることがわかった。また、膜ろ過で生じた残液は、蓄積成分をほとんど残存することなく33 %エタノール処理で除去でき、清澄醤油回収可能であることがわかった。生揚の膜ろ過において、膜孔径0.45 μm の膜適用は、醤油成分保持および副産物（膜ろ過残液）処理において有効であると思われた。

5 参考文献

- 1) 野田義治, 植木達朗, 大場和徳, 脇山元気: 醤油の研究と技術, 37巻(6号), pp. 365-369(2011)
- 2) 川口友彰, 野田義治, 植木達朗, 脇山元気, 野見山修治: 醤油の研究と技術, 45巻(2号), pp. 103-109(2019)
- 3) 川口友彰, 植木達朗, 野田義治: 福岡県工業技術センター研究報告, 28号, pp. 24-26 (2018)

冷凍アサリの開殻技術

川口 友彰*1

Shell-opening Technique for Frozen Short-neck Clam

Tomoaki Kawaguchi

アサリは冷凍すると開殻し難くなることが知られている。そのためアサリ加工品製造では、原料には生鮮貝を用い、製造時期は漁期に限られるという課題がある。そこで本研究では、冷凍アサリを開殻できる条件について検討した。その結果、冷凍アサリは沸騰水・水蒸気・マイクロ波で直接加熱すれば開殻することがわかった。また、沸騰水・水蒸気により短時間加熱することで、調理後開殻可能な状態に解凍できることがわかった。この結果に基づき、水蒸気による急速解凍後、レトルト処理することでレトルト殻付アサリの製造が可能であることを明らかとした。本開殻技術により、冷凍殻付アサリをアサリ加工品製造原料として使用することができるようになり、年間を通じた製造が展開可能である。

1 はじめに

殻付アサリの加工は生鮮貝を原料とするため、加工品製造期間がアサリの旬の時期に限られている。そのため、長期間保存可能な冷凍殻付アサリを利用した加工品製造技術が求められている。

しかし、冷凍アサリは加熱調理しても殻が開かなくなることが多いことが知られており¹⁾、開殻しない貝は消費者に死貝と判断されるため商品価値が著しく低下する。冷凍アサリが加熱調理で開殻しなくなる原因はこれまでに明らかにされていないが、滝口²⁾は、凍結・解凍に伴う細胞破壊によって貝肉から溶出した結着性タンパク質が、貝肉と殻の結着を強めることによるという仮説を提案している。この仮説に基づき、沸騰水中で20秒以上加熱（結着性タンパク質の熱変性処理）して凍結すれば、凍結・解凍条件に関わらず加熱調理で開殻することを報告している²⁾。しかし、この凍結前加熱技術による“九州産”冷凍殻付アサリは見当たらず、近年求められる“産地による差別化”に対応することができていない。また、アサリ加工業者が自社で凍結前加熱処理により、原料冷凍アサリを製造・保管することも考えられるが、アサリ加工品製造と同時期（どちらも生鮮貝が調達できる時期に限られるため）に行うことは困難であると思われる。

そこで本研究では、所望の産地を選択でき、アサリ加工業者で冷凍保存・用時開殻処理が可能となるよう、一般的な冷凍庫で緩慢凍結したアサリを利用した開殻

技術を開発することとした。

2 研究, 実験方法

2-1 試料

アサリは2018年5月に熊本県産の生鮮貝を購入した。アサリの重量は3.8 gであった。砂抜き後、生鮮貝はそのまま使用し、冷凍貝は冷凍庫（-30℃）で凍結した。各試験条件で10~30個のアサリを使用した。

2-2 冷凍アサリの直接加熱による開殻試験

冷凍アサリを3分間沸騰水²⁾または蒸し器に直接投入し加熱した。また、冷凍アサリをマイクロ波（600 W）で1分または過熱水蒸気（180℃）で7分の加熱を、ウォーターオープンヘルシオ（SHARP（株）、AXCA400）により行った。レトルト処理は、冷凍アサリをレトルトパウチに入れシールした後、小型レトルト高圧蒸気滅菌器（アルプ（株）、RK-3030）で種々の温度・圧力で20分加熱した。対照として、生鮮アサリおよび室温解凍アサリを沸騰水に入れ3分加熱した。

2-3 冷凍アサリ急速解凍試験

冷凍アサリを沸騰水・蒸し器に直接投入し、所定時間加熱した後、室温まで冷却した。冷凍アサリをレトルトパウチに入れ、真空包装機（ホシザキ電機（株）、HPS-300A）にて真空度99%で包装した後、沸騰水に投入して加熱後、流水で室温まで冷却した。冷却したアサリは、沸騰水に入れ、3分間加熱した（真空包装したアサリは、包装から取り出して沸騰水に入れた）。

*1 生物食品研究所

2-4 急速解凍アサリを用いたレトルトアサリ製造

2-3と同様に調製した沸騰水または水蒸気解凍アサリをレトルトパウチに入れ、シール後、121℃でレトルト処理した。貝内に刺した温度センサーによりF値を自動計測し、F値=5で加熱終了とした。

真空包装でのレトルト処理は以下により行った。冷凍アサリを直接水蒸気で解凍した後、真空度70%で真空包装し、レトルト処理した。真空包装（真空度99%あるいは70%）した冷凍アサリを沸騰水で解凍処理後、そのままレトルト処理に供した。真空包装（真空度99%）した冷凍アサリを沸騰水で解凍した後、開封し、真空度70%で再封後レトルト処理した。

2-5 開殻状態

加熱処理後に観察された図1に示す状態により開殻状態を評価した。なお、開殻率は総数に対するA状態の割合とした。

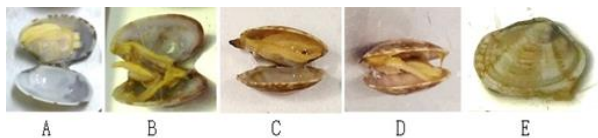


図1 冷凍アサリ加熱処理後の開殻状態

(A)完全に開き軟体部分が片側の殻に付着、(B)完全に開き軟体部分が両側の殻に付着、(C)45度未満の開きで軟体部分が片側の殻に付着、(D)45度未満の開きで軟体部分が両側の殻に付着、(E)閉じたまま

3 結果と考察

3-1 冷凍アサリの直接加熱による開殻

冷凍アサリは緩慢解凍後沸騰水に浸漬するとほとんど開殻しないが、凍結状態で直接沸騰水に浸漬すれば開殻することが知られている²⁾。緩慢凍結過程における大きな氷結晶生成による細胞破壊、解凍時の結着性成分溶出が、貝肉と殻の結合を強める（開殻しない）要因として提案²⁾されている。この仮説が正しいとすれば、冷凍アサリに、結着成分が熱変性（溶出前後いずれでも可）あるいは流出するような処理をすることで、冷凍アサリの開殻は可能と考えられる。そこで、冷凍アサリに種々の加熱処理を行い、開殻するかを調べた（図2）。その結果、冷凍アサリは沸騰水、水蒸気、マイクロ波により、全ての貝が開殻（状態A）することがわかった。過熱水蒸気では、状態Aがほとんどで一部、貝肉が両側の殻に付着する状態（状態B）とな

った。レトルト処理では、いずれの処理温度においても状態Aの貝が70%程度であった。一般的な処理温度である121℃では、閉じた貝（状態E）及び状態B・Dがみられた。温度が高くなると状態Eはみられず状態Bが30%程度であった。また、生鮮貝では全てが状態A、冷凍アサリ緩慢解凍後では全てが状態Eとなった。

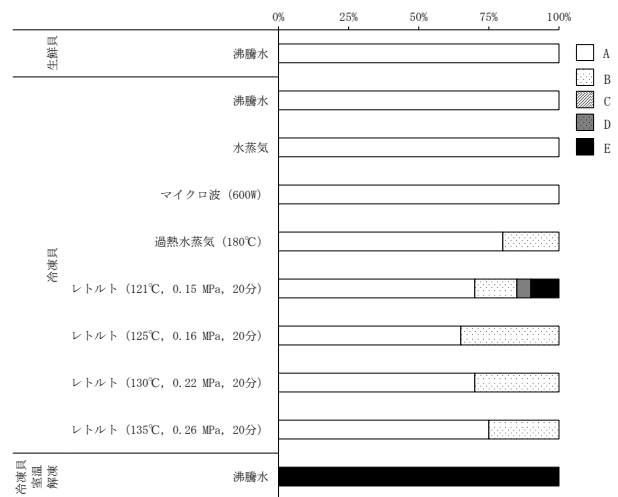


図2 直接加熱によるアサリの開殻状態

開殻状態A～Eの説明は図1に記載

過熱水蒸気処理において開殻率が100%にならなかった理由としては、冷凍アサリ投入の際の庫内温度低下や加熱ムラ等が考えられるが不明である。レトルト処理では冷凍アサリ投入後、庫内温度が所定温度に達するまでに時間を要すること・レトルトパウチにより熱伝導が低下することから、結着成分の溶出と貝肉と殻との結着を抑制できなかった可能性が考えられる（詳細については今後検討が必要である）。以上の結果は、前述の仮定を支持するものであり、冷凍アサリは急速加熱により開殻することがわかった。直接煮熟・蒸煮・電子レンジで調理する加工食品には、冷凍アサリを利用可能と考えられる。

3-2 冷凍アサリの急速解凍

現在レトルト殻付アサリが市場に流通しており、長期常温保存可能かつ加熱済み・即使用可能であるため利便性が高い上、開封後開殻するため生鮮貝を調理したかのように食すことができ需要がある。このような商品では、見た目や破損防止のためレトルトパウチ内では殻が閉じ、開封時に開殻する状態にする必要がある。しかしながら、図2のように冷凍アサリの直接レトルト処理では全ての貝を開殻することができなかつ

ため、レトルト処理単独での対応は難しいと思われる。そこで、前述の仮定に基づき、解凍アサリが開殻しない程度の加熱且つ結着性成分が熱変性もしくは流出するような処理により一旦解凍すれば、その後のレトルト処理（その他の加熱調理含む）で開殻するのではないかと考えた。このことを確認するために、まずは種々解凍処理を行い、解凍後のアサリの開殻性を沸騰水3分加熱により調べた（図3）。

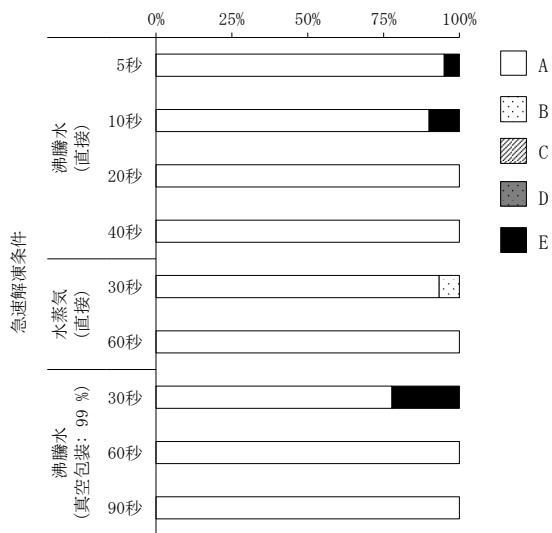


図3 急速解凍アサリの沸騰水による開殻性
開殻状態A～Eの説明は図1に記載

冷凍アサリを沸騰水に5～40秒浸漬後に冷却し再び沸騰水に3分浸漬した（40秒より長時間の沸騰水浸漬ではアサリの開殻がみられた）。その結果、10秒以下の沸騰水浸漬では開殻しないアサリがみられたが、20秒以上浸漬したアサリの開殻率は100%であった。しかし、緩慢冷凍アサリを沸騰水に直接浸漬した結果、成分流出による呈味性の著しい低下をまねいたことから、実用性の低い方法と判断した（データ未掲載）。水蒸気で30～60秒加熱したアサリは、60秒加熱したものの開殻率が100%であった（60秒より長時間の水蒸気加熱はアサリの開殻発生）。レトルトパウチに真空度99%で真空包装封入した冷凍アサリは、60秒以上の沸騰水浸漬により、開殻率が100%となった（90秒より長時間の加熱は開殻発生）。以上の結果より、予想通り、冷凍アサリを短時間沸騰水・水蒸気で加熱・解凍することにより、解凍時点では開殻することなく、その後の調理で開殻可能な状態とすることができた。この冷凍アサリ急速解凍は、凍結前加熱冷凍アサリ²⁾と同様に、解凍後の調理で開殻することから、利用範

囲が広く実用性が高いものと考えられる。そこで、実際のレトルト殻付アサリ製造に適応可能かを、呈味成分ロスが少ない、レトルトパウチ（真空包装）封入冷凍アサリの煮沸加熱あるいは冷凍アサリ水蒸気加熱により解凍したアサリを用いて検討した。

3-3 急速解凍アサリを用いたレトルト殻付アサリ製造

急速解凍アサリを用いてレトルト殻付アサリを製造する際、同一レトルトパウチ内で急速解凍およびレトルト処理を完結できることがエキス損失や工程上望ましい。そこで、図3の結果に基づき、冷凍アサリを真空包装（真空度99%）状態で沸騰水に60秒浸漬した後、続けてレトルト処理を行った（表1）。その結果、7割のアサリが開殻せず、残りが半開き状態と、明らかに真空包装が開殻を妨げることがわかった。そこで、真空度99%で真空包装した冷凍アサリを同一条件で解凍し、種々真空度の真空包装でレトルト処理したところ、真空度70%で全て開殻することがわかった（70%のみデータ掲載）。この結果に基づき、アサリの開殻を妨げない真空包装条件（真空度70%）で沸騰水による急速解凍処理（180秒）とレトルト処理を行ったところ、開殻率は10%であった。これは、レトルトパウチ内に残存する空気により貝への伝熱が妨げられたことによると考えられる。このように、高真空度の真空包装での急速解凍から、低真空度の包装でのレトルト処理にすればレトルト殻付アサリの製造は可能であるが、作業が煩雑であり実用性は低い。そこで、比較的解凍時のドリップが少なく真空包装不要の水蒸気解凍アサリにより、レトルト殻付アサリの製造を検討した。その結果、図3の結果と同様に30秒の水蒸気加熱による解凍ではレトルト処理で20%が開殻せず、60秒以上の水蒸気解凍処理で、100%開殻することがわかった。

表1 急速解凍アサリを用いたレトルトアサリ加工

解凍処理条件			レトルト処理条件		開殻状態					総数	開殻率 (%)	
包装	方式	時間	包装	温度	F値	A	B	C	D			E
真空 (99%)	沸騰水	60秒	真空 (99%)	121℃	5	0	0	3	0	7	10	0
真空 (99%)	沸騰水	60秒	真空 (70%)	121℃	5	10	0	0	0	0	10	100
真空 (70%)	沸騰水	180秒	真空 (70%)	121℃	5	1	0	0	2	7	10	10
無	水蒸気	30秒	真空 (70%)	121℃	5	16	0	0	4	0	20	80
無	水蒸気	60秒	真空 (70%)	121℃	5	20	0	0	0	0	20	100

開殻状態A～Eの説明は図1に記載

以上の結果より、緩慢冷凍アサリを水蒸気で急速解凍し、低真空度の真空包装でレトルト処理することにより、レトルト殻付アサリを製造できることがわかった。

4 まとめ

長期間保存可能な冷凍殻付アサリを用いたアサリ加工品製造の基礎的技術として、冷凍アサリ開殻技術の開発を試みた。その結果、沸騰水や水蒸気により、直接冷凍アサリを加熱すれば開殻すること、短時間加熱すれば調理後開殻可能な状態に解凍できることを明らかにした。これらをもとに、レトルト殻付アサリの製造が可能であることを明らかにした。本技術により、冷凍殻付アサリをアサリ加工品製造の原料として使用することができるようになり、年間を通した製造に有用であると思われる。

5 参考文献

- 1) 米田千恵：日本家政学会誌，62巻(6号)，pp. 361-368(2011)
- 2) 滝口明秀：千葉県水産研究センター研究報告，1号，pp. 85-88(2002)

X線応力解析を活用した金属表面熱処理プロセスの開発支援

小川 俊文*1 南 守*1 島田 雅博*1 小野本 達郎*2

Development Support for Metal Surface Heat Treatment Process Using X-Ray Stress Analysis

Toshifumi Ogawa, Mamoru Minami, Masahiro Shimada and Tatsurou Onomoto

金属材料・製品の品質・機能に影響を及ぼす残留応力の管理や把握，制御が一層重要となってきた。調査の結果，金属熱処理業界においては，プロセス改善のための残留応力解析に関するニーズが高い。そこで本研究では，X線応力解析の活用による金属表面熱処理プロセスの改善や高機能製品の創出を目標に取り組んだ。その結果，前工程にSR処理を導入することで，焼入れ後の歪量を低減することができ，加工プロセス改善に繋がること明らかになった。また，浸炭処理の最適化条件を見出すのに，残留応力測定は有効であり，部材を高度化出来ることがわかった。更に，同一鋼材でも全硬化層深さが異なるとSR処理による残留応力変化が異なるため，省エネを図るためには製品毎に適した条件でSR処理を実施することが必須であることが明らかになった。

1 はじめに

近年，自動車等輸送用機器分野を始め金属材料が使用されるあらゆる分野では，グローバル競争の激化から，コスト競争力に加え，厳しい品質管理や製品の高性能化の要求が高まっている。そのため，金属材料・製品の品質・機能に影響を及ぼす残留応力の管理や把握，制御が一層重要となってきた。特に金属熱処理業界からは，プロセス改善のための残留応力解析に関するニーズが極めて高い。そこで本研究では，平成27～28年度で構築した最新X線応力解析技術の活用による金属表面熱処理プロセスの改善や高機能製品の創出を目的とした。

2 研究・実験方法

2-1 残留応力の測定方法

残留応力の測定は，二次元検出器を搭載したX線回折装置（D8-DISCOVER，ブルカーAXS(株)製）で行った。X線発生源は，Co管球を使用した。管電圧35 kV，管電流40 mAとした。X線の照射は，直径1 mmとした。測定条件は，Fe(211)の回折ピークについて，Phi角方向7ポジション(0, 30, 60, 90, 120, 150, 180°)，Psi角方向2ポジション(15, 45°)の合計14個の回折環データを取り込んだ。残留応力の算出は，この14個の回

折環データを用いて2D法¹⁾で行った。

2-2 測定に用いた試験片と熱処理

本研究では，金属熱処理分野のニーズに基づき3つの課題に取り組んだ。①矯正加工プロセスの最適化，②熱処理による残留応力制御，③応力除去焼なまし処理(SR処理)条件の最適化である。

課題①の試験片は，機械構造用合金鋼SCM440を用いた。引抜き材から切出し・旋盤加工により，長さ300 mm，直径8, 10, 12, 14 mmの丸棒を作製した。この丸棒に対して高周波焼入れと焼戻しを行った。

課題②の試験片は，機械構造用合金鋼SCM415を用いた。形状は，長さ30 mm×直径30 mmの円柱とした。この円柱について真空浸炭と焼戻しを行った。

課題③の試験片は，機械構造用炭素鋼S45Cと機械構造用合金鋼SCM440を用いた。形状は，長さ150 mm×直径30 mmの円柱棒とした。この円柱棒について高周波焼入れと焼戻しを行った。

3 結果と考察

3-1 矯正加工プロセスの最適化について

本課題の目的は，寸法精度向上（生産性向上）である。精密工作機器の位置決め部品等に使用される軸もののワークの熱処理プロセスは，高周波焼入れ→焼き戻し→歪矯正となっている。現在1品毎に変形量測定，歪矯正を行っており，多大な時間と労力を要するた

*1 機械電子研究所

*2 福岡県商工部

め、少しでも歪矯正プロセスを削減させる必要がある。また、高周波焼入れ中、軸もののワークに反りが発生し回転軸から芯がずれると高周波加熱コイルの位置をその都度微調整する必要があるため、高周波焼入れ中のワークの反りは発生しない方が望ましい。

そこで、高周波焼入れ前に応力除去焼き鈍し処理（SR 処理）を取り入れることで、歪矯正プロセスを削減させることが可能であるかを検討した。長さ 300 mm×直径 14 mm の丸棒について、3 種類（SR 処理無し、100 °C×3 h の SR 処理有り、150 °C×3 h の SR 処理有り）の試験片を準備し、各プロセスにおける残留応力の測定結果を図 1 に示す。3 種類の試験片の残留応力の挙動は同じで、高周波焼入れ前は、引張の残留応力、高周波焼入れ後は、圧縮の残留応力であった。SR 処理が有る無しに関わらず、歪矯正後の圧縮残留応力に著しい差は見られなかった。

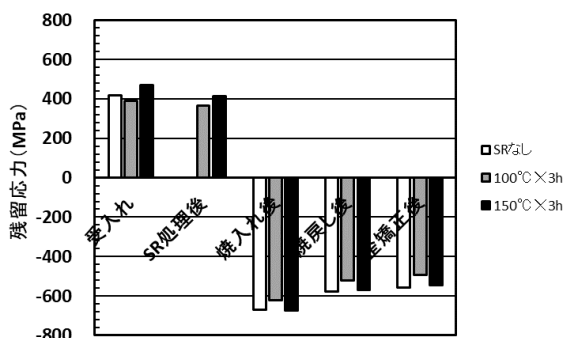


図 1 各プロセスでの残留応力

図 2 に各プロセスにおける歪量を測定した結果を示す。SR 処理無しの歪量は、焼入れ前 0.06 → 焼入れ後 0.57 に対し、100 °C×3 h の SR 処理有りの歪量は、焼入れ前 0.05 → 焼入れ後 0.29、150 °C×3 h の SR 処理有りの歪量は、焼入れ前 0.04 → 焼入れ後 0.25 であった。SR 処理の導入により歪量が、約半分になっていた。

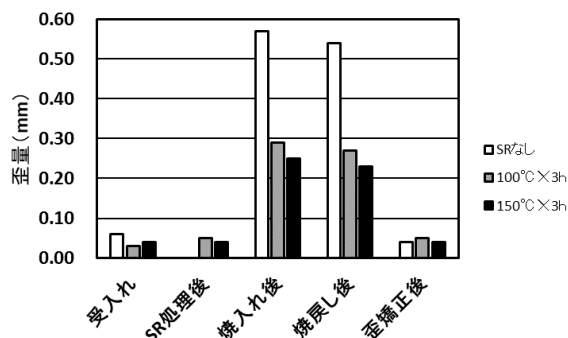


図 2 各プロセスでの歪量

以上の結果より、高周波焼入れの前段階に SR 処理を導入することで、歪矯正後の圧縮残留応力は従来と同程度を保持したまま、高周波焼入れ後の歪量を従来の半分程に削減させることが可能であることを明らかにした。このことは、歪矯正プロセスの時短化と作業者の負担軽減につながると考えられる。また、高周波焼入れ後の歪量が小さくなるということは、高周波焼入れ中におけるワークの軸ずれが小さくなると推測され、作業者の負担軽減に繋がると考えられる。これらの事が最終的には製品の仕上がり寸法精度の向上と生産性向上に繋がると推測される。

3-2 熱処理による残留応力制御について

本課題の目的は、製品の機能・機械的特性の向上である。熱処理分野における浸炭処理は、製品の機能・機械的特性を向上させる有効な手段である。通常、浸炭処理製品の品質管理は、硬さ測定、金属組織観察で行われている。そのため、硬さ測定が厳禁な単品物や硬さ測定が困難な形状製品に浸炭処理を行う場合、非破壊で浸炭処理製品の品質管理が可能な方法を必要とされている。そこで今回、浸炭処理と残留応力との相関について検討を行った。浸炭処理温度 900 °C で、処理時間を 1, 2, 4 時間の 3 条件の試験片を作製した。図 3 に、浸炭処理時間と試験片表面残留応力の相関を示す。処理時間の増加に伴い圧縮残留応力が増加していた。処理時間が長くなると、浸炭層が厚くなることから、浸炭層の厚みは、残留応力測定で把握することが可能である。

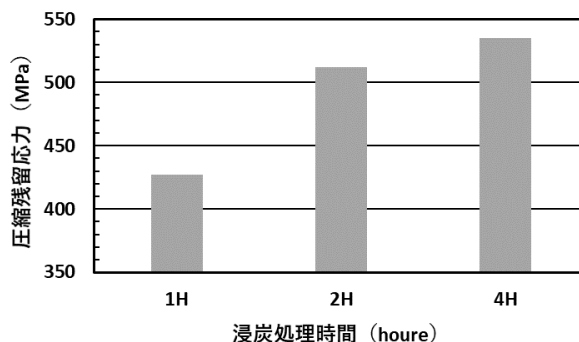


図 3 浸炭処理時間と試験片表面残留応力の相関

浸炭層の性状は、被浸炭品の浸炭処理前の状態の影響を受ける。ほとんどの被浸炭品は、機械加工を受けていることから、その表面には機械加工由来の残留応力が存在している。そこで、機械加工由来の残留応力

を除去するために、応力除去焼き鈍し処理 (SR処理) を行った後に浸炭処理を行って、浸炭層の性状に及ぼすSR処理の影響について検討を行った。SR処理は、2通りの温度 (600 °C, 670 °C) で実施した。SR処理温度と被浸炭品表面の残留応力との相関を図4に示す。SR処理を行うと被浸炭品表面の圧縮残留応力が、減少することが明らかになった。また、SR処理温度が高い程、被浸炭品表面の圧縮残留応力が、減少した。この結果から、被浸炭品に要求される機能・機械的特性を満足させるために、SR処理条件の選定には注意する必要があることが分かった。

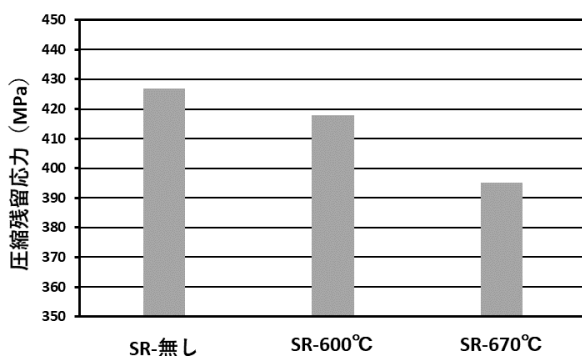


図4 SR処理温度と被浸炭品表面残留応力の相関

浸炭層の性状に及ぼすSR処理温度の影響について硬さ変化で評価可能であるかどうか検討を行った。硬さ測定は、ロックウェル硬さ試験機 (Cスケール) で行った。SR処理温度と被浸炭品表面の硬さとの相関を図5に示す。SR処理の無し有りやSR処理温度の違いに関わらず、被浸炭品表面の硬さは、いずれも58 HRCであった。この結果から、浸炭層の性状の変化は、被浸炭品表面のロックウェル硬さ変化での評価が難しいことが明らかになった。

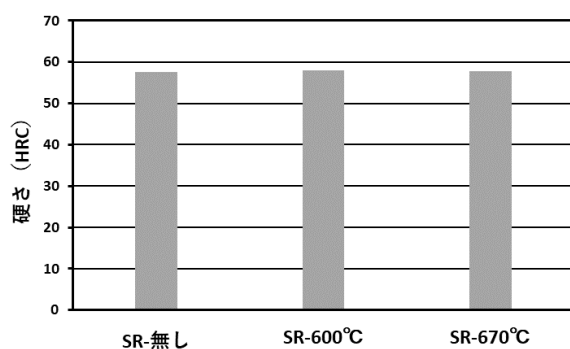


図5 焼戻し温度と試験片表面硬さの相関

3-3 応力除去焼なまし処理 (SR処理) 条件の最適化について

本課題の目的は、経験則の数値化 (生産性の向上) である。熱処理業界では、明確な数値的根拠が無くて経験則に基づいて熱処理が実施されている場合がある。その様な経験則に基づく処理条件を数値化することで、プロセスを改善出来る可能性がある。そこで今回、機械構造用炭素鋼 S45C と機械構造用合金鋼 SCM440 の試験片を用いて、高周波焼入れ後の SR 処理条件と残留応力の相関について検討を行った。2種類の鋼種に対し、全硬化層深さ3種類 (2, 4, 6 mm) の試験片を作製した。図6に、全硬化層深さと試験片表面の残留応力との相関を示す。S45C は、全硬化層深さの増加に伴い圧縮残留応力は約 160 MPa ずつ単調に減少した。一方、SCM440 は、全硬化層深さが 2 mm→4 mm に変化すると圧縮残留応力は、25 MPa 増加し、全硬化層深さが 4 mm→6 mm に変化すると圧縮残留応力は、85 MPa 減少した。この結果から、鋼種が違くと全硬化層深さの違いにより SR 処理条件を変える必要があるということがわかった。

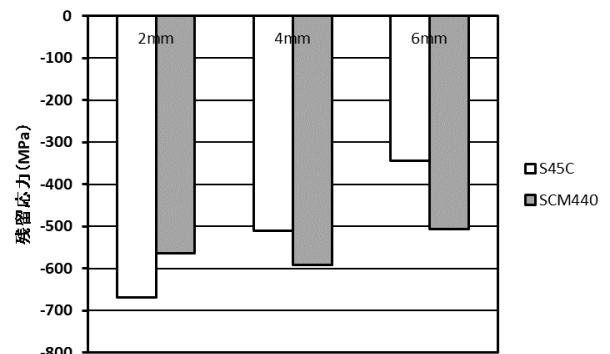


図6 全硬化層深さと試験片表面残留応力との相関

次に、S45C と SCM440 に対し、全硬化層深さが全硬化層深さ3種類 (2, 4, 6 mm) の試験片を複数本作製し、500 °C迄の任意の温度で焼戻しを行った。焼戻しは、任意の温度で1時間保持後室温まで空冷した。焼戻しを行った試験片の中心位置において試験片表面の残留応力を測定した。図7に S45C における焼戻し温度と残留応力の相関を示す。焼戻し温度の増加に伴い試験片表面の圧縮残留応力は、短調に減少した。焼入れままの状態において、試験片表面の圧縮残留応力は、全硬化層深さの増加に伴い小さくなっていったが、その傾向は、焼戻し温度が増加しても同じであった。

図 8 に SCM440 における焼戻し温度と残留応力の相関を示す。焼き戻し温度が 300 °C 未満の範囲では、全硬化層深さが 4 mm → 2 mm → 6 mm の順に圧縮残留応力が大きい、焼き戻し温度が 300 °C 以上の範囲では、全硬化層深さが 6 mm → 4mm → 2 mm の順に圧縮残留応力が大きかった。この様に S45C と異なる傾向が見られる理由として、SCM440 は合金元素の影響で S45C よりも試験片内部深くまで焼きが入るため焼戻しによる組織変化が複雑になることが関係していると考えられる。

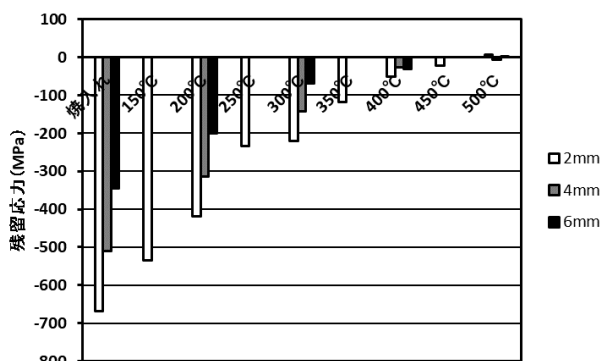


図 7 S45C における焼戻し温度と残留応力の相関

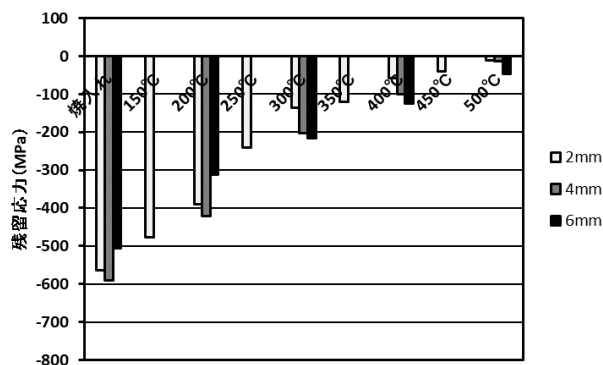


図 8 SCM440 における焼戻し温度と残留応力の相関

以上の結果より、形状が同じであっても鋼種が異なれば高周波焼入れと焼戻しにより生じる圧縮残留応力は異なること、また同一鋼材でも全硬化層深さが異なれば圧縮残留応力が異なることから、省エネを図るためには、製品毎に適した条件で SR 処理を実施することが重要であることが確認できた。

4 まとめ

残留応力測定・解析技術を用いて金属熱処理業界のニーズに基づき3つの課題に取り組んだ。その結果、

残留応力測定・解析が、矯正加工プロセスの改善に繋がり、最終的には製品の仕上がり寸法精度の向上と生産性の向上に繋がることが分かった。また、浸炭焼入れによる被浸炭品の浸炭層の厚みと浸炭処理前のSR処理温度の影響について残留応力で把握することが出来、製品の高機能化に残留応力測定は有効であることがわかった。更に、残留応力変化を把握することで、鋼種に応じた、製品の表面状態に応じたSR処理条件を見出すことが出来、省エネに繋がることが明らかになった。

以上の様に、金属表面熱処理プロセスの改善や高機能製品の創出を行う上で、残留応力測定・解析技術が有効であることを明らかにした。

謝辞

本課題を実施するにあたり、九州高周波熱錬(株)、(株)石井熱錬、第一高周波工業(株)のご協力を頂きました。誠にありがとうございました。

5 参考文献

- 1) 鈴木賢治ら：2次元検出器によるX線応力測定, pp. 41-56, 養賢堂(2015)

ホットエンボス加工による 中空マイクロニードルアレイ成形技術の開発

在川 功一*1 谷川 義博*2 安部 年史*1

Development of hollow microneedle array molding technology by hot embossing

Kouichi Zaikawa, Yoshihiro Tanigawa and Toshifumi Abe

近年の薬剤学・材料工学・加工工学のさらなる進歩に伴い、新たな薬剤投与技術や治療・診断技術が開発され、臨床の場で使用されつつある。「マイクロニードルアレイ」はそれら多くの新しい技術の1つであり、「痛み」や手技の煩雑性などの課題を解決しうる方法として注目されている。マイクロニードルアレイに関しては、国内外において研究開発が進んでいるものの、製造コストや成形精度について課題が残っており、安価で高精度な製造技術が必要とされている。そこで、本研究では、ホットエンボス加工によって製作された樹脂鋳型とマスター型を使用して中空のマイクロニードルアレイを低コストかつ高精度に成形可能な技術を開発する。

1 研究の目的と背景

近年の薬剤学・材料工学・加工技術のさらなる進歩にともない、新たな投与技術や治療・診断技術が開発され臨床の場で使用されつつある。「マイクロニードル技術」はそれら多くの新しい技術の1つであり、従来注射針を使用する治療や診断の際の「痛み」や「手技の煩雑性」などの課題を解決しうる方法として注目されている。マイクロニードルの形状は先端直径が1～25 μm 、底面直径と高さのアスペクト比が1以上の円錐形状であり、薬剤供給効率の関係から単独での使用が想定されることは少なく、その集合体である「マイクロニードルアレイ（以下、MNAという。）」としての使用が想定されている¹⁾。

従来のMNAの製造方法としては、主に次の3つが挙げられる。

- ① フォトリソグラフィ法²⁾（金属製中実ニードル）
- ② 引き上げ・引き下げ法³⁾（樹脂製中実ニードル）
- ③ 射出成形法（樹脂製中実ニードル）

金属製中実ニードルを製造する①はエッチングによる形状精度の低下やクリーンルーム等の設備コスト増大など、製造コストの高騰が課題となっているほか、折損による体内残存のリスクも挙げられる。一方、樹脂製中実ニードルを製造する②では形状精度のバラツキ、③では針先端を鋭利に成形することが困難な問題などが挙げられ、従来技術ではMNAを高精度・低コ

ストで製造することは困難である。

また、中実ニードルでは針表面に塗布またはコーティングされた薬剤のみが供給されるため、薬剤の供給量不足が課題となっている。

そこで本研究ではホットエンボス技術に着目した。ホットエンボスとは樹脂を軟化点温度以上に加熱し、形状部を押し付けることによって、それを樹脂へと転写する技術であり、所望のMNAと同形状のマスター型を放電加工にて製作し、樹脂鋳型(PEEK等)にその形状を熱転写することによって、MNAを成形する。さらにニードル成形後に再度ホットエンボスすることによって中空ニードルの成形を実施し、高精度かつ低コスト、そして薬剤の供給量も向上可能な中空タイプのMNAの量産化技術を開発することを目的とした。

2 実験方法

図1は本研究で開発する中空MNA成形工程を示したものである。このように①マスター型の製作、②樹脂鋳型の成形、③中空MNAの成形という3工程を経て成形した。

2-1 放電加工によるニードルマスター型製作

本研究では、放電加工でニードルのマスター型を製作するが、電極材としてグラファイトに銅を含浸させた材料（以下、銅グラファイトという。）を使用する。銅グラファイトはグラファイトの快削性に加え、銅特有の高い電気伝導率を有する新しい放電加工用電極材である。ニードルマスター型は円錐形状の集合体であ

*1 機械電子研究所

*2 公益財団法人 飯塚研究開発機構

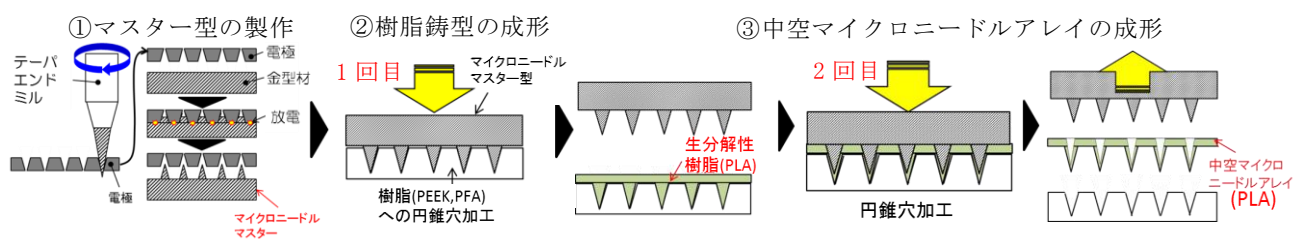


図1 本研究で開発した中空マイクロニードルアレイ製造工程の概要

るため、電極形状はその対称である微細な円錐穴を加工しなければならない。銅をはじめとする金属電極では、バリが原因となるマスター形状の精度低下が懸念されるため、この銅グラファイト電極を用いることとした。円錐穴の加工にはテーパエンドミルを使用し、その他の条件として、加工油には放電加工専用油“メタルワーク EDF-K2”（JXTG エネルギー社製）を、被削材には金型材として用いられる“ELMAX”（ポラー・ウッデホルム社；SUS440C 系）を用いて実験を行った。

2-2 ホットエンボス加工による樹脂鑄型の成形

図2に本研究で製作したホットエンボス装置の外観を示す。押し込み量や荷重の制御を容易にするため、ステッピングモータとエアシリンダを組み合わせて製作した。また、マスター型と樹脂鑄型は独立して温度制御が可能な仕様とするため、温度コントローラとヒータを2セット用意し、真空中で成形可能な装置とした。樹脂鑄型の材料としては、耐熱性、耐薬品性に優れるPEEK および離型性の検証と比較を行う目的で滑り性に優れるフッ素樹脂(PFA)を使用して成形を行った。

2-3 中空 MNA の成形

作製した樹脂鑄型に対し、ペレット状の生分解性樹脂であるポリ乳酸(PLA)を供給し、真空中または大気中で熔融させることによって、中実のMNAを成形した。さらに成形後、マスター型を使用して再度ホットエンボス加工を行うことによって、中空部を成形し、樹脂鑄型から離型させることにより、中空MNAを得た。

3 実験結果

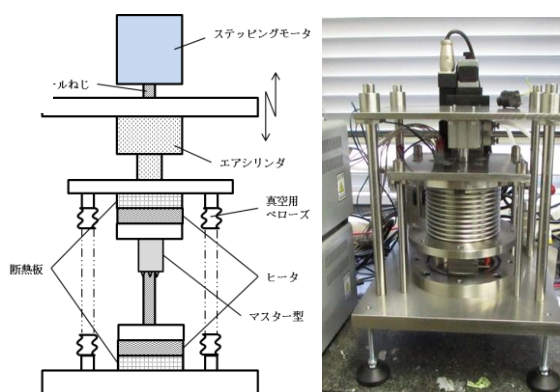


図2 ホットエンボス装置

3-1 放電加工によるニードルマスター型製作

表1は本研究で実施した放電加工の条件である。15×15 mmの面積に対し、1 mmピッチ、X,Y方向に10針ずつ計100針のニードルアレイを加工するため、同寸法で円錐穴を加工した電極を作製して加工に用いた。ピーク電流、パルス幅等の電気条件に関しては、繰り返し加工実験にて得られた最適条件としている。円錐穴を加工した電極からニードル形状を加工するためには、円揺動しながら下降する「らせん揺動」の動作が必要である。そのため、揺動半径によってニードルの形状が変化することが考えられる。そのため揺動半径を0.05 mmから0.20 mmまで段階的に変化させて、形状の比較を行った。図3はそれぞれの揺動半径で加工した際の形状の一部を抜き出して測定したものである。測定には非接触3次元測定器であるNH-3SP（三鷹光器社製）を用いた。結果を比較すると、揺動半径0.05 mmおよび0.10 mmの条件においては、先端に平坦部が残存する結果となり、先端に鋭利な形状が必要なMNAのマスター型としては、不十分な結果となった。0.125 mm, 0.15 mmでは先端が鋭利な形状となり、根元直径がそれぞれ232 μm, 204 μm, 高さが651 μm, 535 μmのニードルが確認された。0.20 mmではニードル部の高さが247 μmとなっており、高さが不足する結果となった。

図4は横軸に揺動半径、縦軸にニードル根元直径および高さを示したグラフである。揺動半径の増加につれ、直径は減少する傾向にあることが確認でき、高さは0.125 mmまでは減少量は小さいものの、それを超えると減少量が大きくなることを確認した。これらの結

表1 放電条件

Workpiece	ELMAX(SUS440C;15×15×45 mm)
Electrode	CuGr (TTK8C)
IP[A]	1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 8.0, 11.0
On Time[μs]	2.0, 8.8, 22.4
Off Time[μs]	8.0, 24.0, 30.4
Condenser[pF]	0, 1000, 4300, 9000, 19000, 52000

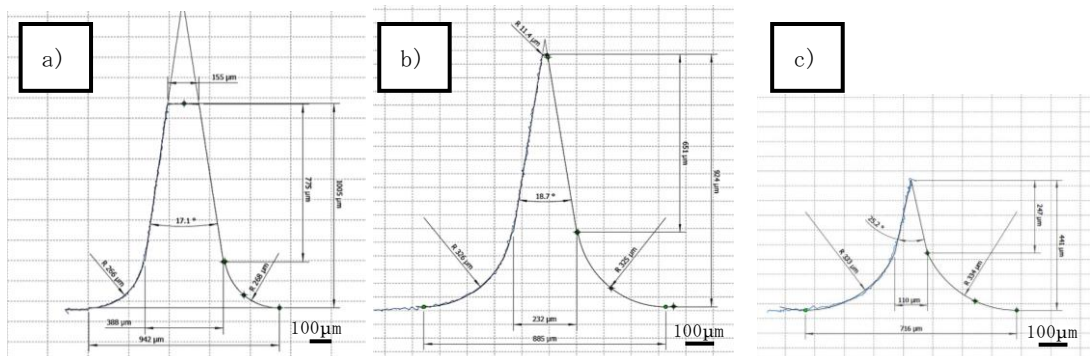


図3 揺動半径別のマスター型のニードル形状 a)0.05 mm, b)0.125 mm, c)0.20 mm

果から、揺動半径の条件は0.125 mmとし、この条件にて得られた形状(図5)をマスター型として使用した。

3-2 ホットエンボス加工による樹脂鑄型の成形

表2は樹脂鑄型成形時のホットエンボスの条件である。エンボス時の温度条件はPEEKおよびPFAの荷重たわみ温度およびガラス転移点温度を考慮して、それらを約50 °C上回る温度から段階的に定めた。離型時の温度に関しては、その温度を下回る温度で段階的に設定した。エンボス荷重はシリンダ空圧0.6 MPa=483 Nで一定とした。PEEKの場合は250 °C, PFAの場合は230 °C以上でマスター形状と近似した形状が得られたが、これらの温度よりも低い温度では転写深さが小さくなる結果となった。

これらの結果より、マスター形状に最も近い結果が得られたPEEK ; 270 °C, PFA ; 250 °Cを最良の樹脂鑄型成形条件とし、それぞれの鑄型を用いた中空MNA成形実験を実施した。

3-3 中空MNAの成形

表2にPLA(Nature3D社製)を用いてMNAを成形した際の条件を示す。なお、PLAはペレット状のものであり、成形の前処理として80 °Cにて2時間以上乾燥させて使用した。熔融温度は200 °Cとし、離型温度を変化させることにより、ニードル形状を比較・評価した。成形方法は図6に示すように(a)ペレットを熔融し、(b)その状態でPLAを治具(平板アタッチメント)で押し込み70 °Cまで冷却・押し込み開放、(c)治具を取り外し、180 °Cまで加熱後再度マスター型にてホットエンボス加工、という流れである。これらのプロセスを経て、中空MNAの成形を試みた。

まずは、中空部を成形する前に中実のMNAを成形することによって離型温度の最適化を図った。図7はPFAの樹脂鑄型において、離型温度を変化させて樹脂鑄型からMNAを離型した際の顕微鏡写真である。PEEK樹脂

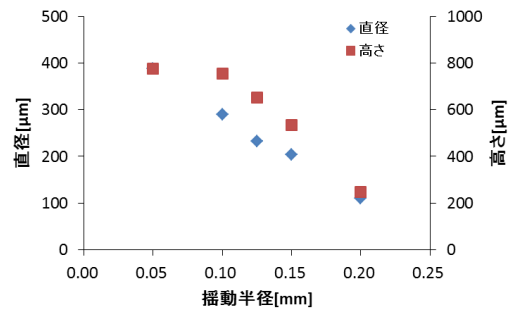


図4 揺動半径と直径, 高さの関係

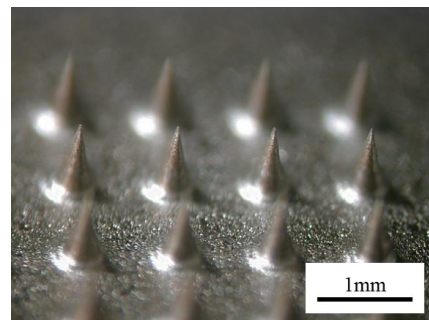


図5 マイクロニードルマスター型

表2 樹脂鑄型ホットエンボス条件

Plastic		PEEK,PFA
size[mm]		φ 30×5
PEEK	m.p.[°C]	340
	Tg[°C]	180
	Molding Temperature[°C]	230,250,270
	Release Temperature[°C]	140
PFA	m.p.[°C]	310
	Tg[°C]	150
	Molding temperature[°C]	210,230,250
	Release temperature[°C]	140
Embossed load[N] (Cylinder air pressure[MPa])		483 (0.6)
Z-axis feed amount[mm]		1.5

鋳型においても同様の実験を実施したが、離型性が悪くいずれの条件においても成形不良となった。したがって、以降の実験はPFAの樹脂鋳型を用いて実施した。

PLAの軟化点温度は70~80℃であるが、その近傍の条件で離型したものは良好な離型性を示した。一方、90℃以上の条件で離型したものに関しては、鋳型側にPLAが残存、もしくは針先端が引っ張られるような形となるなど、成形不良が発生する結果となった。

この結果を踏まえ、中空部分の成形を実施した。180℃まで加熱し、再度マスター型をホットエンボスすることによって中空部分を成形した。図8は中空部を成形する際に離型温度を変化させ、形状を比較した顕微鏡写真を示す。中実ニードルの離型時と同様、70℃ならびに80℃においては良好な形状であるが、90℃以上ではマスターに付着して樹脂が連れ上がり、中空部が成形されないという現象が確認された。

次に、中空部の体積を最大限に確保するため、鋳型の成形時のZ深さから上方に“逃げ量”を設定し、中空成形時のホットエンボス深さを0.1mm毎にずらしながら実験を行ったところ、図9のように、逃げ量0.5mmにおいて、良好なニードルが成形可能なことを確認した。

4 まとめ

- ①円錐穴を有する電極を用いて“らせん揺動”を行いながら放電加工を行うことにより、円錐形状であるマイクロニードルマスターを加工する技術を開発した。
- ②PEEK, PFAを用いてマスター型をホットエンボス加工することにより、マイクロニードル成形用の樹脂鋳型を得た。
- ③PEEK樹脂鋳型を用いたMNAの成形では離型性が悪く成形不可能であったが、PFA樹脂鋳型を用いたMNAの成形では、中空部を有する成形を確認した。

5 参考文献

- 1) 情報機構：マイクロニードル技術動向および応用展開 (2011)
- 2) S. Henry, D. McAllister, et. al.: J. Pharm. Sci., 87, pp. 922-925 (1998)
- 3) 高間 信行, 羅 凱峰, 丸岡 豊, 金 範 俊: 2018 年度精密工学会春季大会, pp. 519-520 (2018)
- 4) 小 粥 教 幸: Fragrance journal 43(1), pp. 49-55 (2015)

表 3 MNA 成形条件

Mold Material	PEEK, PFA
Molding Resin	PLA (Nature 3D)
Molding Temperature[℃]	200
Release temperature[℃]	70, 80, 90, 100
Embossed load[N] (Cylinder air pressure[MPa])	402 (0.5)
Relief amount[mm]	0.3, 0.4, 0.5

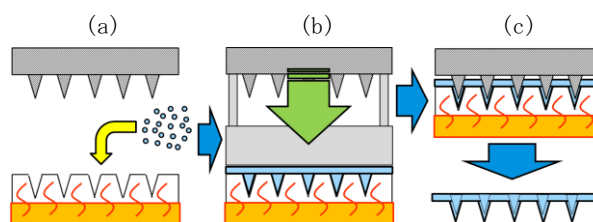
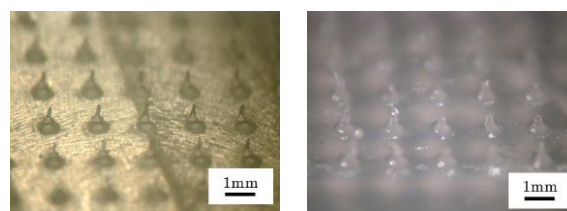
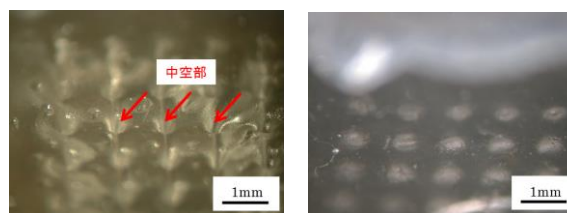


図 6 中空 MNA の成形工程



(a) 70℃ (b) 90℃

図 7 離型温度別の中実 MNA



(a) 70℃ (b) 90℃

図 8 離型温度別の中空部形状比較

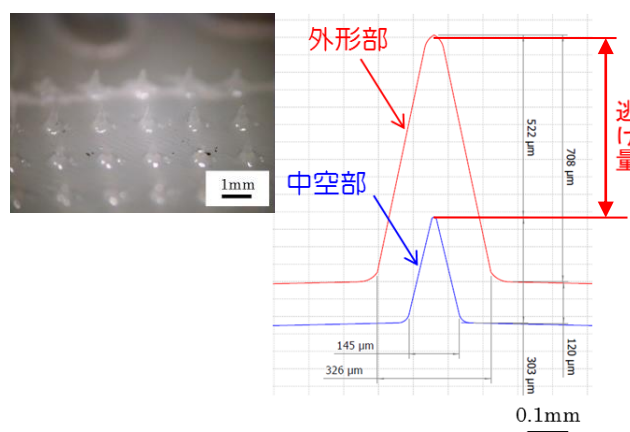


図 9 中空 MNA 形状

オープンソースCAEによる多目的最適化システムの開発

倉本 紘彰*1

Development of Multi-Objective Optimization System by Open Source CAE

Hiroaki Kuramoto

製品の構造設計は、形状や材料の制約を受けながら、コストと性能が要件を満たすように設計パラメータを決定することが求められる。本研究では、トレードオフ関係にある質量と剛性を目的関数として、設計変数の最適化を図る、オープンソースCAEをベースとした多目的最適化システムを開発した。本システムの有効性を検証するため、テストケースとして棚受け用ブラケットの寸法最適化を実行した。その結果、質量と剛性を同時に改善できるパレート解集合が得られ、ブラケットの質量を変えずに剛性を改善できる設計が導出可能であることを確認した。

1 はじめに

工業製品に対する軽量化は常に求められている一方で、構造部品の軽量化は剛性や減衰性能の低下を招くため、事前の慎重な検討が必要である。このような互いにトレードオフ関係にある2つ以上の目的を、設計上の制約条件を満たしながら同時に改善させる手段として、多目的最適化が有効である。多目的最適化ではトレードオフ関係を表すパレート解の集合が得られ、複数の設計パラメータをどのような値で組み合わせれば、目的を満たす解が得られるかが分かる。

多目的最適化では遺伝的アルゴリズムによる進化計算を行うため、有限要素法(FEM: Finite Element Method)による構造解析を用いた場合、 10^4 オーダの膨大な計算量が必要となり、時間やコストの面で課題がある。そこで、設計変数空間をパラメトリックにサンプリングした数十から数百程度のFEM解析結果をもとに、応答曲面法により近似モデルを作成し、最適化計算を行うことで計算コストを抑える手法が一般的に用いられる。応答曲面法には多項式近似モデル、RBFモデル、Krigingモデルなどがあるが、これらを用いて得られる解は推定値になるため、最終的にFEM解析結果との比較検証が必要となる。

現在、多目的最適化を設計現場で活用するためには、専用ソフトを自作する場合を除き、高価な商用ソフトを導入するか、サポートの無いオープンソースのソフトを組み合わせるしかなく、県内中小企業での活用は進んでいない。

以上を踏まえ、本研究では、設計現場での多目的最

適化の普及を目指し、質量と剛性を同時に改善できるオープンソースCAEによる多目的最適化システムを開発し、有効性の評価を行った。

2 研究, 実験方法

2-1 多目的最適化システム

今回開発した多目的最適化システムの概要を図1に、ソフトの構成を表1に示す。最適化エンジンとしてopenMDAOを用いた。openMDAOはNASAのGlenn Research Centerで開発されている、Pythonで記述されたオープンソースの最適化プラットフォームである¹⁾。計算の流れとしては、openMDAOで決定したパラメータセットを3DCADソフトであるFreeCAD²⁾に出力し、3Dモデルの変更を行う。その後、プリポストと構造解析ソルバーが一体となったSalome-Meca³⁾にモデルを引き継ぎ、静解析を行う。静解析の結果はCSVで出力され、質量と剛性が計算される。この計算結果をopenMDAOに返し、近似モデルの作成と最適化計算を行っていく。これら

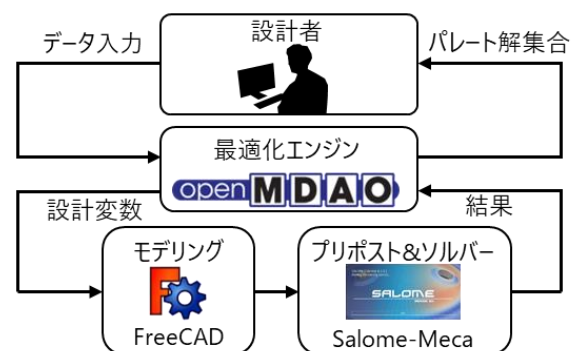


図1 多目的最適化システム

*1 機械電子研究所

表1 計算用PCとソフト構成

計算用PC	OS	Ubuntu 18.04LTS
	最適化	openMDAO 1.7.4
ソフト	3DCAD	FreeCAD 0.17
	FEM	Salome-Meca 2017

の環境をLinux上に構築し、手順は全てPythonスクリプトで自動化させている。

2-2 ブラケット形状の定義

今回、テストケースとして一般的な棚受け用ブラケット(図2)について、壁に固定された状態で、棚受け部分に分布荷重を受ける場合を考える。壁に固定される部分と分布荷重を受ける部分は寸法固定とし、方杖部分の寸法5個(A, B, C, D, E)を設計変数、質量と剛性を目的関数とした。設計変数のオリジナル値と定義範囲を表2に示す。

質量は3Dモデルの体積から比重を掛けて求めることができる。剛性については応力での評価は特異点の影響を受けるため、節点ごとに荷重の大きさと変位量の積を求め、その総和で表される平均コンプライアンスを用いている。平均コンプライアンスが小さいほど、剛性が高いことを表している。以上を定式化すると、

$$\text{Minimize } f_1(A, B, C, D, E) = M$$

$$\text{Minimize } f_2(A, B, C, D, E) = \sum u_i \cdot q_i = \theta$$

$$\text{Subject to } \sigma_{max} \leq \sigma_a$$

と表すことができる。ここで、 M は質量(kg), u_i , q_i は*i*番目の節点のy軸方向変位量(mm)と節点荷重(N), θ は平均コンプライアンス(J), σ_{max} , σ_a は最大応力(MPa), 降伏応力(MPa)である。

2-3 最適化手順

以下の手順に従って最適化計算を行う。

- Step 1. オリジナル構造のFEM解析を行い、質量と平均コンプライアンスの目標値を決定する。
- Step 2. 設計変数空間上で最適ラテン超方格法に基づいたサンプリングを行い、設計変数を決定する。
- Step 3. サンプリング点ごとにFEM解析を行う。
- Step 4. 質量と平均コンプライアンスの結果からそれぞれ近似モデルを作る。
- Step 5. 近似モデルからNSGA-II⁴⁾によってパレート解集合を求め、解を選択する。

今回、サンプリング数は100とし、近似モデルはKrigingモデルを用いた。

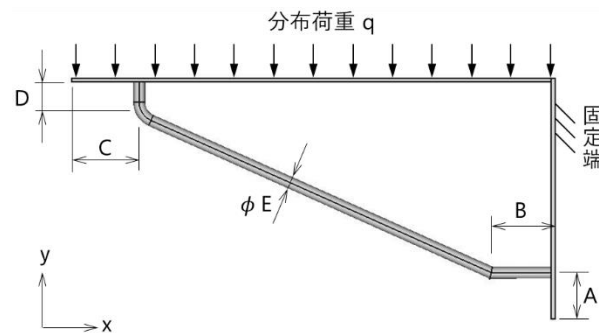


図2 ブラケットの設計変数定義

表2 設計変数の定義範囲 (mm)

設計変数	オリジナル	定義範囲
A	23	[20, 40]
B	30	[10, 50]
C	208	[120, 220]
D	10	[10, 50]
E	3	[2, 4]

3 結果と考察

3-1 オリジナル構造の解析

オリジナル構造のFEM解析を行い、質量と平均コンプライアンスを求めた結果を表3に示す。この値を比較対象の基準として、後ほど求めるパレート解集合の中から最適解を選択する。

表3 質量と平均コンプライアンス

M	0.135 kg
θ	0.442 J

3-2 多目的最適化結果

3-2-1 FEM解析結果

100回のFEM解析から、質量と平均コンプライアンスの結果をプロットしたものを図3に示す。図より、質量は0.1 kgから0.184 kgの範囲に、平均コンプライアンスは0.181 Jから1.784 Jの範囲に解が分布して存在することが分かった。また、図に示した矢印はグラフ左下方向に近づくほど、より軽く、より高剛性の理想的な形状であることを表しており、オリジナル構造よ

りも性能が改善された設計案の導出が可能であることが読み取れる。

3-2-2 パレート解集合

次に、Krigingモデルから求めたパレート解集合を図4に示す。NSGA-IIで用いたパラメータは、初期個体数を100、世代交代数を150とした。図より、パレート解集合は質量が0.116 kgから0.152 kg、平均コンプライアンスが0.156 Jから0.273 Jの範囲に存在していることが分かった。パレート解集合はオリジナル構造の質量を包含した範囲で存在しているため、今回検証用として、図中に破線の矢印で示したように、オリジナル構造と質量が同程度で、より高剛性な解を最適解として選択した。

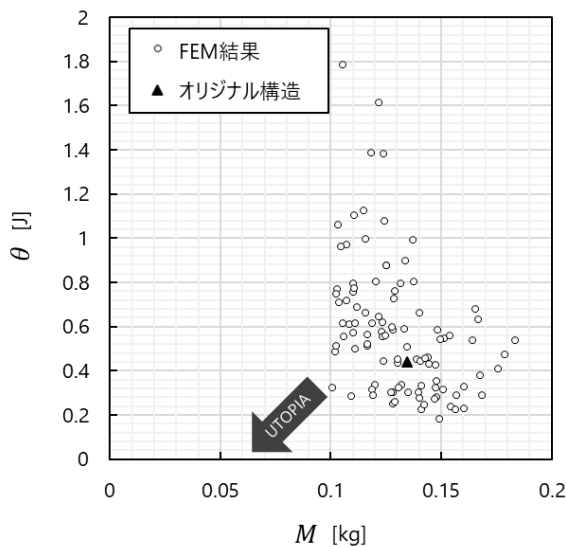


図3 FEM解析結果 (N=100)

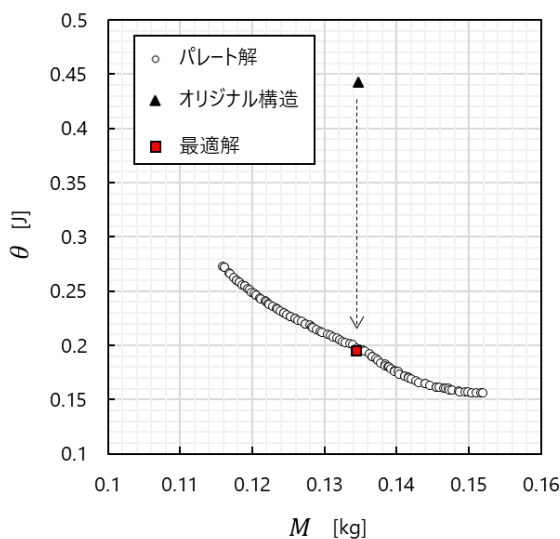


図4 パレート解集合

3-3 性能比較

選択した最適解の質量と平均コンプライアンス、およびそのときの設計変数を表4に示す。表3に示したオリジナル構造と比較すると、平均コンプライアンスが0.442 Jから0.197 Jに改善されていることが分かる。この目的関数は推定値のため、表の設計変数を用いて改めてFEM解析を行い、誤差を比較した結果を表5に示す。表より、最適解においては質量、平均コンプライアンスともに実用上十分な精度で推定できていることが分かった。

今回対象としていないパレート解についても、Krigingモデルによる推定値とFEM解析結果を比較した結果を図5、図6に示す。プロットが図中の直線上にあれば推定値と解析結果が一致していることを表しており、図より設計範囲全体で良く一致していることが分かった。一方で表5に示したように、質量に比べて平均コンプライアンスの誤差の方が大きいことから、変位量から計算される平均コンプライアンスは幾何学的非線形性に強く影響を受けていると考えられる。したがって、少ないサンプリング数では近似精度悪化の原因となるため、設計する製品ごとに、適切な近似モデル、およびサンプリング数を確認しながら最適化をすることが必要になる。

図7にオリジナル構造と最適構造のy軸方向変位量のFEM解析結果を示す。最適構造ではオリジナル構造と比べて最大変位が3.35 mmから1.56 mmに小さくなり、剛性が改善できていることが確認できた。

表4 選択した最適解の目的関数と設計変数

目的関数	M	0.135 g
	θ	0.197 J
設計変数	A	22.2 mm
	B	10.0 mm
	C	175.2 mm
	D	10.0 mm
	E	3.2 mm

表5 推定値とFEM結果の比較

	推定値	FEM結果	誤差
M	0.135 kg	0.134 kg	0.04 %
θ	0.197 J	0.195 J	1.33 %

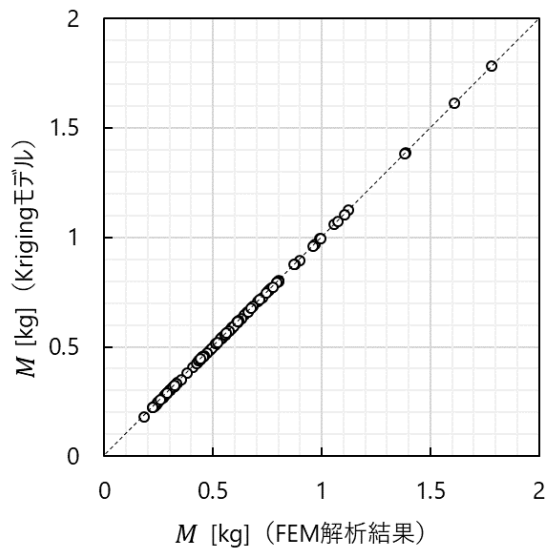


図5 質量の推定値とFEM結果の比較

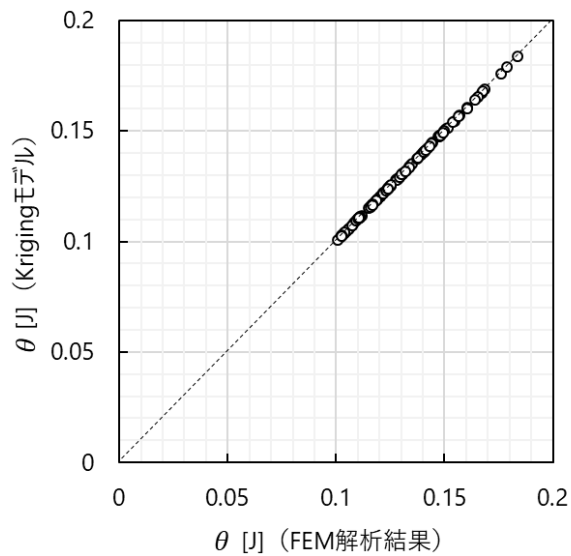


図6 平均コンプライアンスの推定値とFEM結果の比較

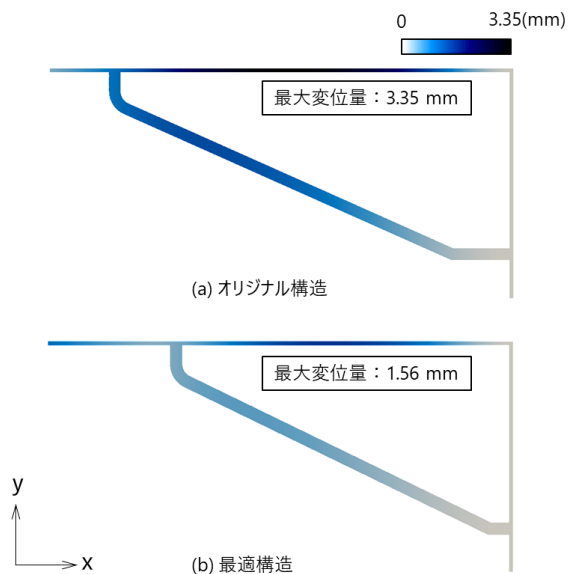


図7 オリジナル構造と最適構造のy軸方向変位量比較

4 まとめ

本研究では、オープンソースCAEをベースにした多目的最適化システムを開発し、その有効性を検証した。近似モデル化手法と組み合わせることで、設計範囲全域において、少ない計算量かつ実用上十分な精度で最適化が可能であることを確認できた。

5 参考文献

- 1) openMDAO: <http://openmdao.org/> (2019年4月)
- 2) FreeCAD: <https://www.freecadweb.org/?lang=ja> (2019年4月)
- 3) Salome-Meca: <https://code-aster.org/spip.php?article303> (2019年4月)
- 4) K. Deb: *Multi-Objective Optimization Using Evolutionary Algorithms*, Wiley (2002)

IoT導入支援キットの開発 －WBGT測定及び毒劇物管理への適用－

林 宏充*1 川畑 将人*1 奥村 克博*1 吉村 賢二*1

Development of IoT Starter Kit for Supporting Installation

- Application of WBGT Measurement and Poisonous/Deleterious Substances Management -

Hiromitsu Hayashi, Masato Kawabata, Katsuhiko Okumura and Kenji Yoshimura

製造業の生産性向上のためにはIoTやAIの活用促進が急務であるが、技術・ノウハウの不足や費用対効果が不明などの理由により、中小企業の生産現場におけるIoT導入は進んでいない。本研究では、県内中小企業が「気軽にIoTをはじめる」ことができるように、様々なセンサによって生産現場の状況を遠隔監視することができる「IoT導入支援キット」の開発を行った。IoT導入支援キットを活用して「WBGT（暑さ指数）測定システム」及び「毒劇物管理システム」を構築し、実証試験を実施した結果、本キットが生産現場に応じたシステムの構築及び効果の検証に有効であることを確認することができた。

1 はじめに

国内製造業の労働生産性は、OECD加盟の主要31ヶ国中15位（2016年）となっており、2000年以降年々低下している¹⁾。九州地域は全国と比べて生産性が低く、IoTやAIを活用した生産性向上への取り組みが急務であるが、中小企業の生産現場におけるIoT導入は進んでいない。

その理由として、技術・ノウハウを持った人材の不足、活用イメージが不明、費用対効果が不明、などが挙げられている。つまり、中小企業のIoT導入促進のためには、中小企業自らが「容易」に「現場に設置」して「効果を検証」できる必要がある。

本研究グループでは、県内中小企業が「気軽にIoTをはじめる」ことができるように、センサの設置からデータの遠隔取得、データの簡易分析までをハンズオンで支援する仕組みづくりに取り組んでいる。その一環として、企業ニーズの高い様々なセンサを備え、センサデータを無線（または有線）で伝送し、生産現場の状況を遠隔監視することができる「IoT導入支援キット」を開発しており、県内企業などの協力のもと現場での実証試験を進めている。

本報告では、IoT導入支援キットを活用して「WBGT（暑さ指数）測定システム」及び「毒劇物管理システム」を構築し、実証試験を実施したので、その内容について報告する。

2 IoT導入支援キット

県内の中小企業が「気軽にIoTをはじめる」ための支援ツールとして「IoT導入支援キット」を開発しており、本体（Raspberry Pi 3 Model B+）と各種センサで構成される。現在対応可能なセンサ機能及び通信機能を表1に、温度測定用（熱電対）の外観を図1に示す。各種センサデータは本体に逐次保存され、無線または有線通信により、PCやタブレットなどを用いて遠隔で監視、制御することが可能である。

表1 対応可能なセンサ機能・通信機能

(a) センサ機能

センサ	仕様
温度（熱電対）	-15～200 ℃
温度（放射温度計）	～1000 ℃
温湿度	20～60 ℃, 20～95 %
振動（加速度）	～400 Hz（～2 G）
画像（カメラ）	動画・静止画
QRコード（カメラ）	～10 kbyte
PLC出力	RS485, RS232C

(b) 通信機能

通信	仕様
IEEE802.11b/g/n/ac	無線（2.4 GHz帯/5 GHz帯）
TWE-Lite	無線（2.4 GHz帯）
IEEE802.3i/u/ab	有線（最大300 Mbps）
RS485	有線

*1 機械電子研究所

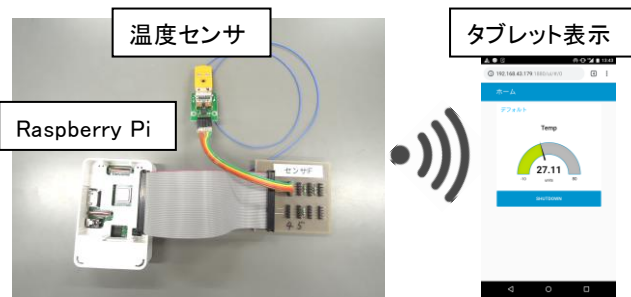


図1 IoT導入支援キット（温度測定用）

3 WBGT(暑さ指数)測定システム

3-1 WBGTと労務環境管理

WBGT(暑さ指数)は、熱中症予防のために提唱された指標で、単位は℃で示されるが、その値は気温とは異なる。人体と外気の熱収支に着目しており、人体の熱収支に与える影響の大きい「気温」「湿度」「日射・輻射」から算出できる²⁾。

WBGTは夏季の労務環境の改善に有効であり、様々な生産現場で採用されているが、作業エリア毎に設置したWBGT計を決められた時間に目視で確認・記録しているケースが多く、リアルタイムでの労務環境管理が課題となっている。

3-2 WBGT測定システムの構築

リアルタイムでの労務環境管理を実現するため、IoT導入支援キットを活用してWBGT測定システムを構築した。本システムはキット本体、温湿度センサ(SHT15:SENSIRION)、及び、遠隔監視用のPCで構成される。

屋内での使用を想定し、気温と湿度から算出可能な表2を基にWBGT計算式を導出する³⁾。表2を離散データとして、湿度H(%RH)におけるWBGT(℃)と気温T(℃)の関係を最小二乗法で直線近似すると、次式となる。

$$WBGT = f_a(H) \times T + f_b(H) \quad (1)$$

ただし、 $f_a(H)$ は傾き、 $f_b(H)$ は切片の値である。湿度H(%RH)における傾き $f_a(H)$ と切片 $f_b(H)$ の関係について最小二乗法で直線近似すると、次式となる。

$$f_a(H) = a_1 \times H + b_1 \quad (2)$$

$$f_b(H) = a_2 \times H + b_2 \quad (3)$$

ただし、 a_1 、 a_2 は傾き、 b_1 、 b_2 は切片の値である。式(1)に式(2)、式(3)と値を代入すると次式となる。

$$WBGT = (a_1 \times H + b_1) \times T + a_2 \times H + b_2 \\ = (0.0037 \times H + 0.6835) \times T + 0.0353 \times H - 1.984 \quad (4)$$

式(4)によるWBGTを表3に示す。表2とほぼ同様の傾向となり、太枠で囲んだ部分が表2と異なっているが、いずれも±0.5℃程度の誤差であり、実用上十分な精度といえる。

表2 WBGTと気温、湿度との関係

		相 対 湿 度 (%)																	
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
°C	40	29	30	31	32	33	34	35	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
	39	28	29	30	31	32	33	34	35	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
	38	28	28	29	30	31	32	33	34	35	35	36	37	38	39	40	41	42	
	37	27	28	29	29	30	31	32	33	34	35	35	36	37	38	39	40	41	
	36	26	27	28	29	29	30	31	32	33	34	34	35	36	37	38	39	39	
	35	25	26	27	28	29	29	30	31	32	33	33	34	35	36	37	38	38	
	34	25	25	26	27	28	29	29	30	31	32	33	33	34	35	36	37	37	
	33	24	25	25	26	27	28	28	29	30	31	32	32	33	34	35	35	36	
	32	23	24	25	25	26	27	28	28	29	30	31	31	32	33	34	34	35	
	31	22	23	24	24	25	26	27	27	28	29	30	30	31	32	33	33	34	
	30	21	22	23	24	24	25	26	27	27	28	29	29	30	31	32	32	33	
	29	21	21	22	23	24	24	25	26	26	27	28	29	29	30	31	31	32	
	28	20	21	21	22	23	23	24	25	25	26	27	28	28	29	30	30	31	
	27	19	20	21	21	22	23	23	24	25	25	26	27	27	28	29	29	30	
	26	18	19	20	20	21	22	22	23	24	24	25	26	26	27	28	28	29	
	25	18	18	19	20	20	21	22	22	23	23	24	25	25	26	27	27	28	
24	17	18	18	19	20	20	21	22	22	23	24	24	25	26	26	27	28		
23	16	17	17	18	19	19	20	20	21	22	22	23	23	24	25	25	26		
22	15	16	17	17	18	18	19	19	20	21	21	22	22	23	24	24	25		
21	15	15	16	16	17	17	18	19	19	20	20	21	21	22	23	23	24		

表3 WBGTと気温、湿度との関係（計算値）

		相 対 湿 度 (%)																	
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
°C	40	29	30	31	32	33	34	35	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
	39	28	29	30	31	32	33	34	35	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
	38	28	28	29	30	31	32	33	34	35	35	36	37	38	39	40	41	42	
	37	27	28	28	29	30	31	32	33	34	34	35	36	37	38	39	40	41	
	36	26	27	28	29	29	30	31	32	33	34	34	35	36	37	38	39	39	
	35	25	26	27	28	29	29	30	31	32	33	33	34	35	36	37	38	38	
	34	24	25	26	27	28	29	29	30	31	32	33	33	34	35	36	37	37	
	33	24	25	25	26	27	28	28	29	30	31	32	32	33	34	35	35	36	
	32	23	24	24	25	26	27	28	28	29	30	31	31	32	33	34	34	35	
	31	22	23	24	24	25	26	27	27	28	29	30	30	31	32	33	33	34	
	30	21	22	23	24	24	25	26	27	27	28	29	29	30	31	32	32	33	
	29	21	21	22	23	24	24	25	26	26	27	28	29	29	30	31	31	32	
	28	20	21	21	22	23	23	24	25	25	26	27	28	28	29	30	30	31	
	27	19	20	21	21	22	23	23	24	25	25	26	27	27	28	29	29	30	
	26	18	19	20	20	21	22	22	23	24	24	25	26	26	27	28	28	29	
	25	18	18	19	20	20	21	22	22	23	23	24	25	25	26	27	27	28	
24	17	18	18	19	19	20	21	22	22	23	24	24	25	26	26	27	28		
23	16	17	17	18	19	19	20	20	21	22	22	23	23	24	25	25	26		
22	15	16	17	17	18	18	19	19	20	21	21	22	22	23	24	24	25		
21	15	15	16	16	17	17	18	19	19	20	20	21	21	22	23	23	24		

3-3 実証試験

機械電子研究所の実験棟内に温湿度センサを設置し、WBGT測定システムの実証試験を実施した。センサ設置状況を図2に、気温、湿度、WBGTの遠隔監視画面を図3に示す。各データの画面表示を毎分更新して、同時に測定データファイルへ追記・保存するようにしており、リアルタイムでWBGTを遠隔監視できることを確認した。本システムにより、夏季の労務環境の改善や管理業務の効率化が期待できる。

気温、湿度、WBGTの長期測定データ（測定期間：R1. 5. 22~6. 18）を図4に示す。日々の温度サイクル、湿度サイクルや天気に関連した変動を確認することができる。年間を通して監視、分析することによって、空調設備の配置や稼働計画の最適化、光熱費の予測など様々な応用展開が考えられる。

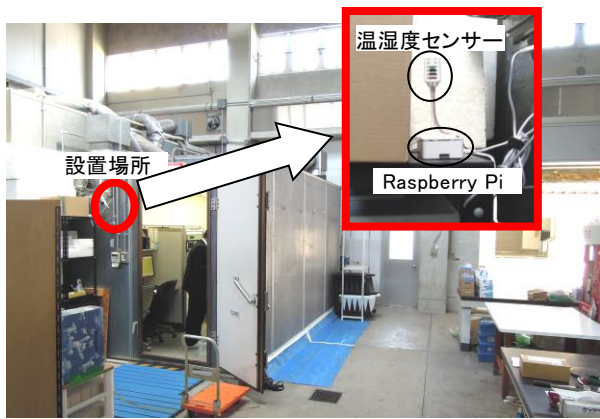


図2 WBGT測定システム設置状況

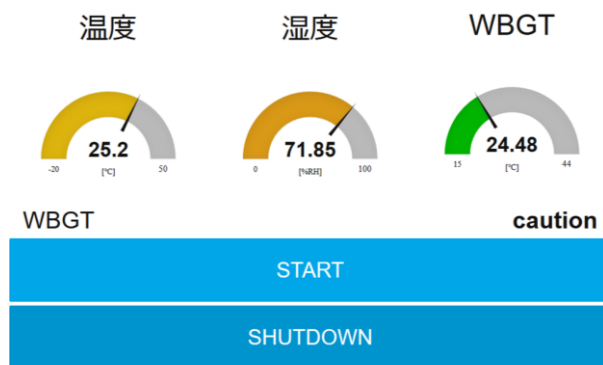
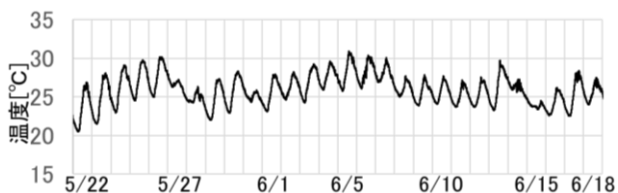
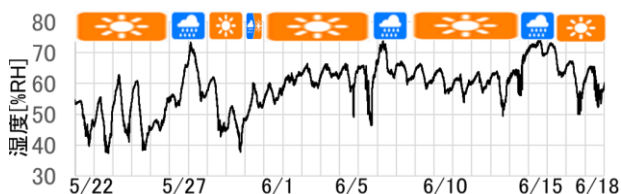


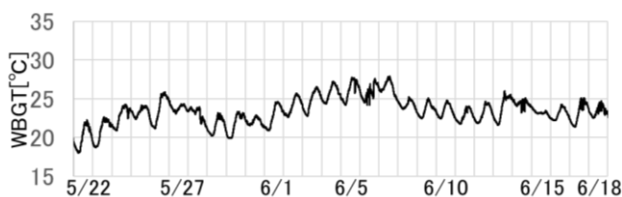
図3 遠隔監視画面



(a) 気温



(b) 湿度



(c) WBGT

図4 長期測定データ

(測定期間：R1. 5. 22～6. 18)

4 毒劇物管理システム

4-1 毒劇物管理

毒劇物の管理については「毒物及び劇物取締法」によって取締りが行われているが、毒物犯罪の増加に伴い、毒劇物の具体的な管理方法の指針が管理マニュアルとして厚生省から示され、「鍵付きの薬品庫」「在庫管理」「複数人で管理」「重量・容量の管理」「管理簿の作成」などが求められている⁴⁾。毒劇物を頻繁に使用する現場では、特に「在庫管理」「重量・容量管理」「管理簿作成」が大きな負担となっている。

4-2 毒劇物管理システムの構築

IoT導入支援キットを活用して毒劇物管理システムを構築した。システムの外観を図5に示す。本システムはキット本体、カメラ(CameraV2:element14)、電子秤(EW-1500i:A&D)、ブザー(UDB-05LFPN:DB Products)、モニタ、及び、遠隔監視用のPCで構成される。「使用者」「管理者」「毒劇物」のQRコードをカメラで読み込み、電子秤で重量計測することにより、毒劇物の「受払簿(在庫管理)」「使用簿(重量・容量管理)」「管理簿」を自動作成することができる。操作フローを図6に示す。毒劇物管理簿作成フローを黒い矢印、受払簿作成フローを白い矢印で示している。

毒劇物管理簿作成の操作手順は以下の通りである。

- ① カメラで使用者のQRコードを読み込む。
- ② カメラで毒劇物のQRコードを読み込む。
- ③ 電子秤で毒劇物の重量を計測する。
- ④ カメラで確認者/管理者のQRコードを読み込む。

これらの操作によって、「いつ」「だれが」「なにを」「使用量」「許可の有無」などの情報がデータベース(MySQL)に保存される。これらの情報は管理者が遠隔で取得することが可能であり、CSV形式やEXCEL形式で出力することができる。

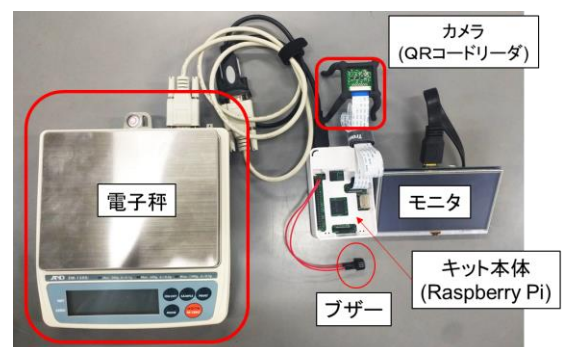


図5 毒劇物管理システム

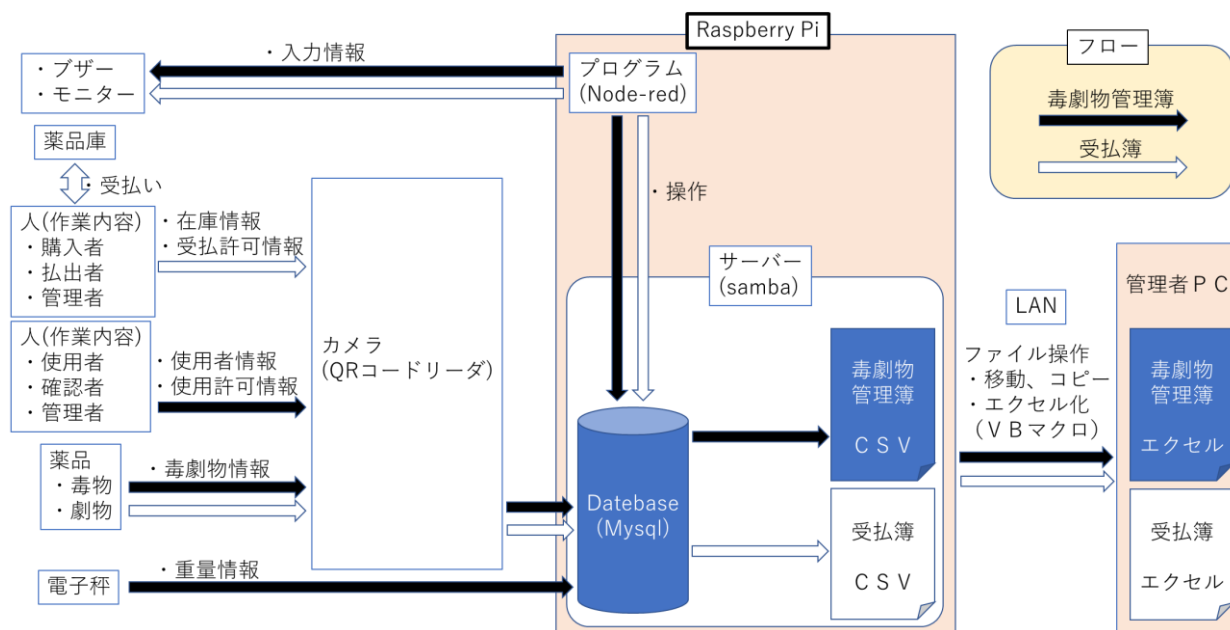


図6 毒劇物管理システム操作フロー

受払簿作成の操作手順は以下の通りである。

- ① カメラで購入者／払出者のQRコードを読み込む。
- ② カメラで毒劇物のQRコードを読み込む。
- ③ カメラで管理者のQRコードを読み込む。

これらの操作によって、毒劇物の増減をデータベースに記録する。毒劇物管理簿と同様に管理者が遠隔で取得することが可能であり、CSV形式やEXCEL形式で出力することができる。

4-3 実証試験

毒劇物の使用者、管理者などによる実証試験を実施し、「受払簿（在庫管理）」「使用簿（重量・容量管理）」「管理簿」が適切かつ自動で作成されることを確認した。本システムにより、毒劇物管理業務の効率化やヒューマンエラーの防止が期待できる。

5 まとめ

県内中小企業が「気軽にIoTをはじめる」ことができるための支援ツールとして「IoT導入支援キット」を開発し、「WBGT測定システム」及び「毒劇物管理システム」の構築、実証試験を実施した。その結果、本キットが生産現場に応じたシステムの構築及び効果の検証に有効であることを確認した。

今後はこれらのシステムを企業の生産現場に適用して「効果の検証」ができるようにハンズオン支援し、県内中小企業のIoT導入を促進する。

6 参考文献

- 1) 日本生産性本部：労働生産性の国際比較（2018）
https://www.jpc-net.jp/intl_comparison/intl_comparison_2018_press.pdf
- 2) 環境省：熱中症予防情報サイト（2019）
<http://www.wbgt.env.go.jp/wbgt.php>
- 3) 日本気象学会：日常生活における熱中症予防指針 Ver. 3 確定版（2013）
<http://seikishou.jp/pdf/news/shishin.pdf>
- 4) 厚生省：毒劇物盗難等防止マニュアル（2005）
<http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/doku/manu/manu.pdf>

学協会誌
掲載論文の概要

醤油膜ろ過残液中多糖類のエタノール分別沈殿と清澄醤油の回収

川口 友彰*1 野田 義治*2 植木 達朗*2 脇山 元気*2 野見山 修治*3

Ethanol fractional precipitation of polysaccharides from shoyu cross-flow filtration retentate

Tomoaki Kawaguchi, Yoshiharu Noda, Tatsuro Ueki, Motoki Wakiyama and Shuji Nomiyama

醤油製成において清澄化及び無菌化の目的で、生揚のクロスフロー膜ろ過処理が行われている。得られる醤油の品質と、ろ過工程自動化等の利点がある一方で、発生する高粘性・高濁度の濃縮残液（膜ろ過残液）による歩留り低下や膜ろ過残液の処理困難性が問題となっている。本研究では、膜ろ過残液エタノール処理の有効性を調べるため、エタノール沈殿物と回収醤油の解析を分別沈殿法により行った。その結果、膜ろ過残液中多糖類の大部分は33 %エタノール存在下で凝析沈殿することがわかった。固液分離により回収した醤油分は清澄で低粘度であった。エタノール処理においては温度・溶液条件制御不要で、エタノール添加後に直接膜ろ過可能であった。本技術は、追加の設備も要しないことから実用性が高く、醤油回収技術として簡便で有効な方法であることが示唆された。

1 はじめに

生揚のクロスフロー膜ろ過処理は、醤油を清澄で無菌かつその後の火入れオリ発生を低減とする一方で、高粘性・高濁度の濃縮残液（膜ろ過残液）が原料生揚の5~10 %発生する。その大部分が醤油であることから歩留り低下につながり、何らかの方法で醤油分を回収・利用する方法が求められている。

一般に膜ろ過残液中の酸性多糖類のような高分子電解質は、塩存在下でアルコール等の貧溶媒を加えることにより凝析沈殿し、アルコール濃度依存的に沈殿物質の重合度は低下することが知られている。このことから、低濃度アルコール処理を用いれば、膜ろ過残液からの高分子多糖類の分別除去と、低粘度で清澄な醤油の回収が期待できる。

これまでに、膜ろ過残液に対し種々のエタノール濃度で混合・固液分離を行い、清澄な醤油を回収できることが報告されており、エタノール処理の有効性を示唆している。しかしながら、エタノール処理により得られる清澄醤油及び沈殿物の物性・成分（特に高分子多糖類）やそれらのエタノール処理濃度による変化は評価されておらず、エタノール処理の有効性を明らかにするにはさらなる検討が必要である。

そこで本研究では、膜ろ過残液に対するエタノール処理の有効性を調べるため、高分子多糖類等の分離挙動及び回収醤油の性質を指標に高分子多糖類除去条件を検討した。

2 研究, 実験方法

2-1 試料

生揚を60 °Cで1時間加熱後に冷却し、有機膜ろ過装置によつてろ過して得た残液（膜ろ過残液）及び透過液（膜ろ過透過液）を使用した。

2-2 エタノール沈殿と清澄醤油の回収

醤油膜ろ過残液150 mLを激しく攪拌しながらエタノール（99.5 %）を少量ずつ加え、室温で3時間放置後の沈殿形成を目視で調べた。エタノールは、終濃度で20, 23, 29, 33, 37, 41, 44, 47, 50, 75 % (v/v)となるように加えた。沈殿が生じた条件では、デカンテーションにより固液分離し、上清回収量を調べた。減圧蒸留によりエタノールを除去した回収上清を分析試料とした。

2-3 エタノール分別沈殿

膜ろ過残液10 mLに対して、終濃度33 %になるように5 mLのエタノールを添加し均一に攪拌後、遠心分離を行った。得られた沈殿は、同濃度のエタノールで洗浄後、遠心分離により回収し、減圧乾固させてエタノール濃度0~33 %沈殿画分とした。洗液と上清は混合し、さらにエタノールを37 %となるように加え、以後前記操作を繰り返し、33~37 %沈殿画分を得た。同様に、37~41, 41~44, 44~47, 47~50, 50~75 %沈殿画分を調製した。

2-4 分析

HPLC (Waters Alliance HPLCシステム) により分子

*1 生物食品研究所
*2 福岡県醤油醸造協同組合
*3 福岡県商工部

量分布を測定した。カラムは東ソー(株)製TSKgel guardcolumn G3000PW_{XL}, G6000PW_{XL}, G3000PW_{XL}を連結して使用し、検出は示差屈折率で行った。タンパク質はBCA法、全糖量はフェノール硫酸法により測定した。

3 結果と考察

3-1 膜ろ過残液のエタノール処理による沈殿形成と回収醤油の性質

膜ろ過残液中の高分子量成分が沈殿を形成するエタノール濃度を調べた(表1)。その結果、終濃度33%以上のエタノールで沈殿形成することがわかった。醤油分回収率は沈殿が不十分な33%条件において低下するものの、80%前後であった。濁度、粘度いずれもエタノール濃度依存的な低減がみられた。醤油分のpHはエタノール処理前後で変化はほとんどみられず、ナトリウム濃度はエタノール処理濃度依存的にわずかに低下することがわかった。また、官能評価の結果は、いずれの処理条件においても膜ろ過残液の特徴を保持し、良好であった。

表1 エタノール処理前後の性質及び回収率

	膜ろ過残液		回収上清						
	(未処理)	(未処理)	(エタノール処理濃度(%))						
			33	37	41	44	47	50	
回収率 (%)	-	-	65	75	79	81	81	82	
OD _{660nm}	0.23	0.135	0.121	0.101	0.097	0.082	0.073	0.065	
粘度 (mPa・s)	60.2	2.9	6.9	6.1	3.9	3.9	3.4	2.6	
pH	4.6	4.7	4.7	4.7	4.6	4.7	4.6	4.5	
Na (g/l)	70.4	69.0	65.2	60.2	60.9	60.8	60.5	59.7	

分子量分布変化を調べた結果、高分子量成分はエタノール濃度依存的に除去されることがわかった(図1)。

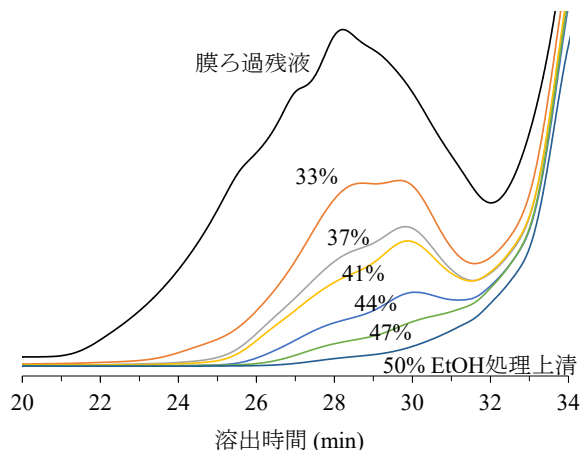


図1 回収醤油高分子量成分の分子量分布

3-2 エタノール分別沈殿による沈殿成分の解析

膜ろ過残液中の成分が各エタノール濃度条件下でどのように沈殿するのかをエタノール分別沈殿法により調べた(表2)。0~33%エタノール沈殿画分の収量は全沈殿の53%を占め、沈殿画分中の主な高分子成分は多糖類であることがわかった。

表2 エタノール沈殿画分の分析結果

	収量*(g)	組成			
		糖 (%)	タンパク (%)	水 (%)	食塩相当量 (%)
Fr. 0-33% ppt	0.569 (53%)	43.6	5.5	8.4	24.9
Fr. 33-37% ppt	0.092 (8%)	52.6	4.6	N.E.	N.E.
Fr. 37-41% ppt	0.023 (2%)	47.4	5.4	N.E.	N.E.
Fr. 41-44% ppt	0.039 (4%)	43.3	3.4	N.E.	N.E.
Fr. 44-47% ppt	0.015 (1%)	35.2	9.9	N.E.	N.E.
Fr. 47-50% ppt	0.035 (3%)	46.7	5.6	N.E.	N.E.
Fr. 50-75% ppt	0.310 (29%)	28.3	16.5	N.E.	N.E.

*膜ろ過残液処理量: 10 ml, 括弧内は全沈殿量に対する割合

各画分の分子量分布を調べた結果、濃度依存的に沈殿する成分の分子量が低分子にシフトすること、高分子多糖類の大部分がエタノール濃度33%で沈殿することがわかった。

3-3 エタノール沈殿に影響する因子

膜ろ過残液のエタノール沈殿と清澄醤油回収に影響を及ぼす可能性のある因子として温度、時間、固液分離方法、pHについて検討を行った。その結果、凝析への温度・時間による影響は見られなかった。pHは膜ろ過残液のpH付近(4.0~5.0)で影響は見られなかった。固液分離方法は、デカンテーション(24時間静置、回収率73%)、膜ろ過(回収率72%)で同等の回収率が得られた。

4 まとめ

醤油のクロスフロー膜ろ過残液の処理方法として、エタノール沈殿の有効性を調べた。分別沈殿法により、エタノール終濃度33%(v/v)で高分子多糖類の大部分が沈殿し、低粘度で清澄な醤油を回収できることがわかった。

5 掲載文献

- 1) 醤油の研究と技術, Vol. 45, No. 2, pp. 103-109 (2019)

タデスプラウト抽出物によるコラゲナーゼ阻害

川口 友彰*1 永田 香織*2

Collagenase inhibition by water-pepper (*Polygonum hydropiper* L.) sprout extract

Tomoaki Kawaguchi and Kaori Nagata

コラーゲンは皮膚のハリや弾性に重要な役割を有しており、コラーゲンの減少や変性がシワの形成に寄与していると考えられている。コラーゲンの減少にはコラゲナーゼが関与していることから、コラゲナーゼ活性阻害剤が皮膚の弾性維持やシワ形成抑制に有用であると考えられる。そこで本研究では、抗シワ食品素材の開発を目的とし、タデスプラウトのコラゲナーゼ阻害活性評価及び活性成分同定を行った。タデスプラウトメタノール抽出物のコラゲナーゼ阻害活性を調べたところ、濃度依存的阻害が認められた。阻害活性を指標にコラゲナーゼ阻害成分を単離し、quercetin-3-O-galactoside (ヒペロシド) と同定した。Lineweaver-Burkプロットにより、ヒペロシドのコラゲナーゼ阻害様式は不競合阻害であることがわかった。

1 はじめに

コラーゲンは細胞外マトリクスの主要成分の一つであり、皮膚のハリや弾性形成に貢献している。コラゲナーゼはコラーゲンを分解するマトリクスメタロプロテアーゼであり、生体内のコラーゲンターンオーバーに重要な役割を果たしている。一方で、炎症や紫外線照射された皮膚において観察される過剰なコラゲナーゼが、シワの形成に関与することが示唆されている。そのため、シワ形成抑制剤として、コラゲナーゼ阻害作用を有する食品の開発が行われている。

タデスプラウトは、刺身のつまとして利用され、福岡県朝倉市で全国の4分の3が生産されている。タデスプラウトは、抗酸化活性、チロシナーゼ阻害活性等の機能性を有し、ポリゴジアル等の機能性成分を含むことが報告されている。一方、これまでにタデスプラウトのコラゲナーゼ阻害活性に関する検討はなされていない。そこで本研究では、タデスプラウトのコラゲナーゼ阻害活性評価及びコラゲナーゼ阻害成分の同定を試みた。

2 研究. 実験方法

2-1 試料

タデスプラウトは(株)エヌ・エル・エーがJA筑前あさくらより入手し、乾燥粉末とした。乾燥粉末30 gに300 mLのメタノールを加え、室温で1時間攪拌抽出し

た。水-メタノール分配、HP-20カラムクロマトグラフィ (溶出: 水, 25 %メタノール, 50 %メタノール, 75 %メタノール, メタノール), 高速液体クロマトグラフィにより分画した。

2-2 コラゲナーゼ阻害活性評価

種々濃度の試料存在下で、10 µg/mL コラゲナーゼと0.4 mM Pz-ペプチドを37 °C 30分反応させた (溶液条件: 0.1 M Tris-HCl, 20 mM CaCl₂, pH 7.1)。クエン酸で反応停止後、酢酸エチルで反応産物を抽出し、320 nmの吸収を測定した。対照には、試料溶液の代わりに試料溶媒を用い、また、それぞれのブランクとして、酵素溶液の代わりに緩衝液を加えて同様の操作を行った。これらの吸光度からコラゲナーゼ活性阻害率を算出した。

2-3 分析

活性成分の吸収・マスマスペクトルはAgilent 1200 series HPLCのフォトダイオードアレー検出器及び質量分析計 (イオン化: ESI) により測定した。カラムはAgilent Poroschell 120 EC-C18 column (4.6 mm × 50 mm, 2.7 µm)を用いた。溶離液は(A)0.1 %ギ酸、(B)アセトニトリルを用い、5 %Bを10分維持したのち、5~45 %Bのグラジエント溶出を60分で行った。流速は0.5 mL/minとした。

3 結果と考察

3-1 タデスプラウトのコラゲナーゼ阻害活性と活性成分の分画

*1 生物食品研究所

*2 (株)エヌ・エル・エー

タデスプラウトメタノール抽出物のコラゲナーゼ阻害活性を評価したところ、濃度依存的な阻害を示した ($IC_{50}=156.7 \mu\text{g/mL}$)。コラゲナーゼ阻害成分の単離同定のため、水-ブタノール分配及びHP-20カラムクロマトグラフィで分画した。その結果、ブタノール可溶性画分のHP-20カラム50%メタノール溶出画分に活性 ($IC_{50}=23.5 \mu\text{g/mL}$) が認められた。この画分をさらにHPLCにより分画し、得られた各画分のコラゲナーゼ阻害活性を評価した結果を図1に示す。画分8 (保持時間28~32分)、画分8中のピーク2に活性が認められたことから、ピーク2の成分がタデスプラウトメタノール抽出物中の活性成分であることがわかった。

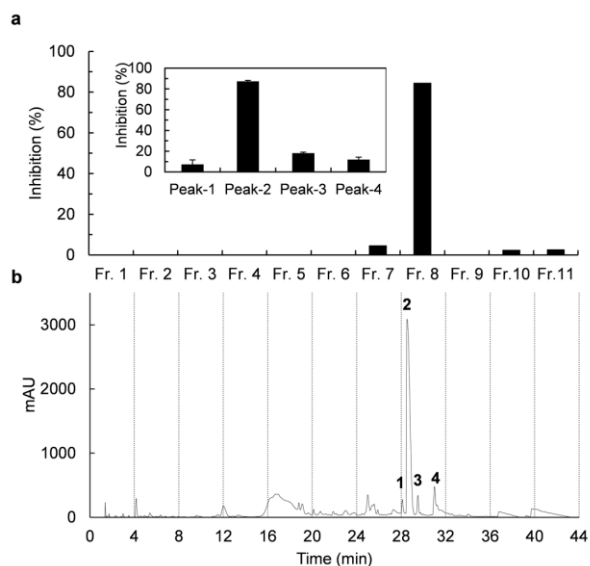


図1 コラゲナーゼ阻害活性のHPLCプロファイリング
a : 各画分のコラゲナーゼ阻害活性評価結果,
b : 分取時のクロマトグラム

3-2 コラゲナーゼ阻害活性成分の同定

活性が認められたピーク2を単離し、保持時間・吸収・マススペクトルから成分同定を試みた。その結果、得られた活性成分の各特性 (図2a) はケルセチン配糖体であることをしめし、標準試薬との比較 (図2b) では、quercetin-3-O-galactoside (ヒペロシド) と一致した。さらに同一性をコラゲナーゼ阻害活性により評価したところ、単離成分 ($IC_{50}=1.9 \mu\text{g/mL}$) とヒペロシド ($IC_{50}=1.7 \mu\text{g/mL}$) で同等であることがわかった。以上の結果から、タデスプラウトメタノール抽出物のコラゲナーゼ阻害成分はヒペロシドであることがわかった。ヒペロシドの阻害様式をLineweaver-

Burkプロットにより調べたところ、不競合阻害であることがわかった。

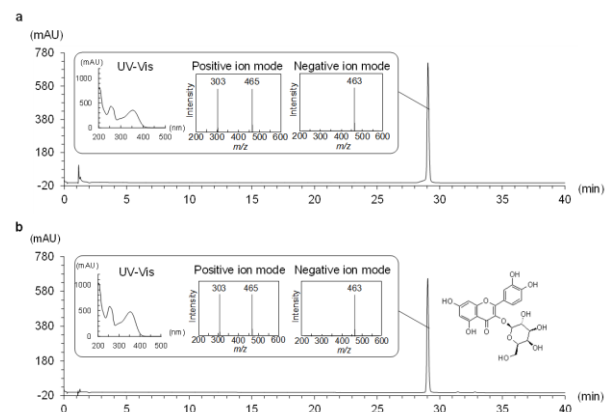


図2 単離成分と標準試薬のLC-DAD-MSクロマトグラム及び吸収・マススペクトル

a : 単離成分, b : ヒペロシド

4 まとめ

タデスプラウトのコラゲナーゼ阻害活性評価を行い、コラゲナーゼ阻害活性を有すること、その活性成分はヒペロシドであることを明らかとした。この結果、タデスプラウトがコラゲナーゼ阻害作用を有する抗シワ食品素材として有望であることがわかった。

5 掲載文献

- 1) Journal of Herbmmed Pharmacology, Vol. 8, No. 2, pp. 114-119 (2019)

連絡先

研究報告の内容の他、技術的な課題は各研究所【技術総合支援室】までお問い合わせください

福岡県工業技術センター	
企画管理部 (情報交流課)	〒818-8540 筑紫野市上古賀 3-2-1 代表 TEL:092-925-7721【問合せ TEL:092-925-5977】 FAX:092-925-7724
化学繊維研究所	〒818-8540 筑紫野市上古賀 3-2-1 代表 TEL:092-925-7721【問合せ TEL:092-925-7402】 FAX:092-925-7724
生物食品研究所	〒839-0861 久留米市合川町 1465-5 代表 TEL:0942-30-6644【問合せ TEL:0942-30-6213】 FAX:0942-30-7244
インテリア研究所	〒831-0031 大川市上巻 405-3 代表 TEL:0944-86-3259【問合せ TEL:0944-86-3259】 FAX:0944-86-4744
機械電子研究所	〒807-0831 北九州市八幡西区則松 3-6-1 代表 TEL:093-691-0260【問合せ TEL:093-691-0231】 FAX:093-691-0252

1

Fukuoka
Industrial
Technology
Center
<http://www.fitc.pref.fukuoka.jp/>
ISSN 0916-8230

福岡県工業技術センター研究報告

No.29 (2019)

令和元年 10 月発行

発行：福岡県工業技術センター
〒818-8540 福岡県筑紫野市上古賀 3-2-1
TEL 092-925-5977 FAX 092-925-7724

印刷：社会福祉法人 福岡コロニー



無断複写・転載を禁じます。

このリーフレットは再生紙を使用しています。(印刷用の紙へリサイクルできます)