

研究課題別総括

研究課題名：自由電子レーザー（FEL）の短波長化

研究代表者：早川 建（日本大学量子科学研究所）

研究従事者：田中 俊成（日本大学量子科学研究所）

早川 恭史（日本大学量子科学研究所）

中尾 圭佐（日本大学量子科学研究所）

野上 杏子（日本大学量子科学研究所）

境 武志（日本大学大学院総合科学研究科）

共同研究者：森 啓（日本大学薬学部）

【総括】

日本大学電子線利用研究施設では、波長 1.3~6 μm の自由電子レーザーを利用実験に供給しているが、可視光レーザーの需要も多く、これには FEL の非線形高調波によって対応している。しかし、非線形高調波は、コヒーレントな光ではあるが、基本波に比べ、その強度が数桁弱く、利用が限られている。可視光領域で FEL を発振させることも検討されたが、短波長で発振させるにはいくつか問題があることが明らかになっている。すなわち、波長が短くなるほど FEL 利得が小さくなり、発振させるためには電子ビームの品質を向上さなければならない。このため、加速器の入射器部分の改造が必要となる。また、アンジュレータも可視光用を別に用意しなければならず、現用の赤外用の FEL 発生装置と両立させるためには、ビームラインの大改造が必要となる。さらに、赤外 FEL を運用した経験から、光共振器用ミラーの耐性が、短波長になるほど厳しくなることがわかっている。これらの事情から、可視光領域で FEL を発振させることは、現実的ではないと判断された。これに代わる短波長化の方法として、非線形光学結晶(NLO: Non-Linear Optical crystal)を使って高調波を発生させる手段を検討した。通常のレーザーではよく使われており、変換効率はエネルギー密度に比例するので、FEL のようにエネルギー密度の高いパルスレーザーには適しているといえる。問題は FEL のように非常な広帯域な波長変化に追従できるかどうかである。波長可変範囲 0.4~1.3 μm を目標に、検討を行い、予備実験を始めた。非線形光学結晶としては、Nd:Yag レーザーなどの高調波発生用に使われ、入手が容易で、特性も良くわかっている KTP(KTiOPO₄)を使用した。まず、基本波から 2 次の高調波を発生させ、次に、その 2 次の高調波と基本波から 3 次の高調波の発生させる実験を行った。基本波の波長 1400nm~1800nm に対して、3~9% の効率で、2 次の高調波を発生させることができた。しかし、3 次の高調波に関しては、最大でも非線形高調波の 10 倍程度の光が得られるに過ぎなかった。これは KTP の結晶の中では基本波と 2 次の高調波の群速度の違いが大きいこと、LEBRA-FEL のように数 100fs のパルス幅しかないパルス光に対しては結晶中においてパルスが空間的に乖離し、それ故、相互作用領域が短くなり、十分な変換効率が得られないためである。また、2 次の高調波発生に於いても、この結晶は入射する基本波の互いに直交する偏光の成分が相互作用する TypeII と呼ばれる位相整合方式を使うが、結晶中では偏光の向きによっても位相速度、群速度共に異なるため、相互作用領域が短くなる。この経験を踏まえて、群速度の違いによるパルスの乖離を避けるため、基本波の偏光の向きが平行になる TypeI の位相整合条件が使える結晶（BBO: $\beta\text{-BaB}_2\text{O}_4$ ）に変更して、実験を行った。基本波の波長 1800nm~2100nm に対して、30%程度の効率で 2 次の高調波が得られた。この 2 次の高調波をもう一度別の結晶に入射し、同じように、30%程度の効率で 4 次の高調波を得た。基本波に対しては 10%程度の効率となる。光学系の構成を最適化すれば、さらに効率は向上すると思われる。現状でも、可視光の領域における十分強力な波長可変レーザーが得られたと考えている。結晶の特性から、波長 200nm 程度までは、強度は弱くなるが、短波長化が可能であると思われる。

研究課題名：パラメトリック X 線源 (PXR) の高性能化

研究代表者：早川 恭史 (日本大学 量子科学研究所)

研究従事者：早川 建 (日本大学 量子科学研究所)

田中 俊成 (日本大学 量子科学研究所)

中尾 圭佐 (日本大学 量子科学研究所)

佐藤 勇 (日本大学 大学院総合科学研究科)

桑田 隆生 (日本大学 大学院総合科学研究科)

境 武志 (日本大学 大学院総合科学研究科)

野上 杏子 (日本大学 量子科学研究所)

【総括】

本学術フロンティア推進事業で開発された 2 結晶型パラメトリック X 線 (PXR) 発生装置とビームラインは、2004 年の PXR 取り出し成功以来、世界で唯一の常設 PXR 線源として順調に稼働し、利用実験に PXR ビームを供給している。2007 年度末までに、Si(111)面を線源として用いることにより、5~20keV の範囲で連続エネルギー可変な単色 X 線の発生を実現している。単色性、大きな照射野、平坦な強度分布といった特性よりイメージングに適した X 線源であることがわかってきたため、(継続) 事業においては、イメージングを中心とした PXR 応用の高度化を進めた。中でも、エネルギー分散型 X 線吸収微細構造 (DXAFS: dispersive X-ray absorption fine structure) 分析や回折強調型位相コントラストイメージング (DEI: diffraction-enhanced imaging) が PXR によって可能であることを実験的に実証し、その技術基盤の基礎を確立したことは、本事業が世界に先駆けて成功したオリジナリティに溢れる成果であった。

PXR による DXAFS は、PXR 固有の一時関数的なエネルギー分散を直接的に利用したもので、X 線ラジオグラフとして吸収スペクトルを取得することが可能である。実際にこの方法を用いた Cu や Ni などの試料測定の結果、正当な XAFS スペクトルが得られることが確認できた。DXAFS の成功としては KEK のフォトンファクトリーなどの大型放射光施設には遅れたものの、より小規模な大学附置のリニアック施設で実現したという点で大きな意義を持つ。また、PXR 応用の開拓という観点で XAFS 測定を行ったのは、これが世界で初めてであった。将来的には、リニアックの特性を生かしたパルス同期システムを導入するなどにより、時分割測定が可能となれば、より競争力のある放射光施設に発展することが期待できる。

PXR は発生メカニズムのレベルでコヒーレントな X 線放射現象であるので、位相コントラストイメージングに適していることはある程度は予想されていた。通常、規模の小さい X 線源による位相コントラストイメージングは長い伝搬距離によるエッジ強調によるものが限度であったが、本事業では完全結晶のアナライザーを用いる DEI に成功した。これは PXR が、発生源であるターゲット結晶の結晶面と同じ面をアナライザーとして用い、(+,-,+) と配置した場合には、円錐状の広がりを持ちながら平面波的に回折されるという特性を利用したものである。これは従来の PXR 研究から大きく飛躍するものであり、大型放射光以外での DEI の実現という点でもインパクトの大きい成果である。また、将来的には DEI という高度なイメージング手法の医療現場への普及に貢献する可能性も有り、社会的にも意義のある精華といえる。

上記のような高度な応用においては、非常に高精度の実験を行う必要があり、数 eV のエネルギー精度、 μrad オーダーの角度精度が要求される。そのためには測定装置の高性能化も重要であるが、安定で高品質な X 線ビームを実現しなければならない。PXR ビームの変動要因を調べたところ、冷却水の温度変化によるリニアックやターゲット結晶の状態変化、および高圧冷却水のフローに起因するターゲット結晶振動が原因と

して突き止められた。温調システムの更新により $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$ 以下の温度安定性を実現し、飛躍的に PXR ビームの安定性が向上した。リニアックとしては異例なレベルの安定度であり、放射光蓄積リングに比肩しうるものとなった。また、実験の品質向上のためには、バックグラウンド放射線を低減することも重要であるので、PXR 発生装置および X 線輸送ビームラインにおける放射線遮蔽の強化を順次行った。これらに加え、PXR における電子ビーム収束調整の必要性から、PXR ターゲット結晶より発生する遷移放射を用いた、ビームプロフィールモニタも導入した。これにより、電子ビームの状態と得られる X 線の相関がより詳しく調べることが可能になった。このように、PXR 線源の特性研究や応用研究と加速器の高度化研究の連携により、日大電子線利用研究施設のリニアックは世界でも有数の性能を持つものとなった。

研究課題名：PXRによる位相差イメージング法の確立と応用

研究代表者：高橋 由美子(日本大学理工学部)

研究従事者：桑田 隆生(日本大学大学院総合科学研究科), 早川 恭史(日本大学量子科学研究所), 境 武志(日本大学大学院総合科学研究科)

共同研究者:寒河江 登志朗(日本大学松戸歯学部), 鈴木 薫(日本大学理工学部), 森 啓(日本大学薬学部), 飯田 厚夫(高エネルギー加速器研究機構)

【総括】

不透明な物体の内部構造観察には透過力の高いX線が不可欠であるが、従来の吸収イメージングでは、X線吸収係数が原子番号の4乗にほぼ比例しているため、重元素を含む被写体では強いコントラストを得るが、比較的軽い元素で構成される生体組織や液晶・高分子のようなソフトマターでは明瞭な画像が得られない。これに対し、位相差イメージングでは軽元素領域で吸収コントラストの約1000倍の感度が期待できる。本研究ではPXRのコヒーレントな性質を活用し、屈折率が 10^{-6} ~ 10^{-7} 程度の試料でもコントラストを得ることが可能な位相差イメージング法を確立することを目標として実験を行ってきた。

H17年度はブラッグ回折を用いた回折強調法(DEI: Diffraction Enhanced Imaging)の光学系を作製し、DEIの特徴であるアナライザ結晶角度に依存したコントラスト変化、エッジ強調など、位相情報に起因するコントラスト画像が得られた。試料として動植物(くも、葉)、プラスチックなどを観察した。

しかし、画像解像度が不十分であるため、H18年度は画像ボケの原因究明に取り組んだ。経時変化測定や環境測定を行った結果、光源の不安定性が主要因となっていることが解明された。電子ビーム・フィードバック機構の導入、冷却系温度制御の精密化など、加速器スタッフの協力によって改善が図られ、ビームの安定性が大幅に増し、画像の質が向上した。

H19年度は引き続き画像解像度の改善に取り組み、ビーム取り出し窓より下流の光学系を刷新した。特にゴニオメータでは40kgの大型ゴニオとタンジェントバーを組み合わせることによって安定性と最大 2×10^{-6} 度の精度を実現した。アナライザ結晶のパラメータの検討・特性評価によって最適化を図った。また、検出器としてII-CCDが導入され、検出側の空間分解能が $50 \mu\text{m}$ (IP)から $15 \mu\text{m}$ (II-CCD)に向上した。

これらの結果、DEI画像としては十分実用に耐える解像度を確保できた。くも・とかげ・魚などの生物標本、生花、マウス心臓などの生物試料、プラスチック・ファイバーやプラスチック・ボールなどのソフトマターについて位相コントラスト像を得ることができた。さらに、新たな光学系としてPXRの特徴である大面積($\sim \phi 100\text{mm}$)を活用できるLaue caseでのDEI、およびアナライザを用いない伝播法(Propagation-based Imaging)についての検討を行い、実現可能であるとの感触を得ている。

現在、位相差イメージングの研究では、必要なコヒーレンシーを確保するために数10mの長尺ビームラインやマイクロフォーカスX線源が用いられているので、比較的小規模のビームライン(約8m)、大きなビームサイズ($1.5 \times 1.5\text{mm}^2$)で位相コントラストが可能となったことは有意義であり、医療応用など産業化への道を開くものである。また、PXRは $1/\gamma$ (γ : ローレンツ・ファクター)の角度発散を有するため、X線取り出し口におけるビームサイズが $\phi 70\text{mm}$ 以上($E = 17.5\text{keV}$)となり、特別な光学素子を用いることなく比較的大型の試料を測定できることも他の施設に勝る点である。

本研究の結果から、光源・ビームラインの改良によりX線強度を増加することでPXRを用いた位相差イメージング法を汎用的な手法に発展させることが可能であると思われる。

研究課題名：光エネルギーを利用した絶縁膜の低温プロセス

研究代表者：大西 一功（日本大学理工学部：H19.3.31 に定年退職）

研究従事者：高橋 芳浩（日本大学理工学部：H19.4.1より研究代表者）

【総括】

近年 LSI の更なる集積化に伴い、MOSFET におけるゲート酸化膜の薄膜化が進行し、ゲートリーク電流の増加が大きな問題になっている。一方、誘電率が酸化膜より大きな高誘電率絶縁膜を用いた場合、より厚い絶縁膜により同じ電氣的容量を実現できることから、リーク電流の抑圧が可能となる。しかし、高誘電率絶縁膜をゲート材料とした MIS 構造では、MOS 構造よりも界面特性が劣ることが知られている。一般にシリコン酸化膜を下地膜として構成することにより界面特性の改善が行われているが、下地膜による電氣的膜厚の増大や、下地膜作製時に必要な高温プロセスに起因した熱ストレスなどの問題点が残されている。

そこで本研究では、低温プロセスにて、良好な絶縁特性および界面特性を有する絶縁膜の製膜を目的に、紫外線による光励起反応を利用した低温プロセスによる高誘電率絶縁膜の膜質向上について検討を行った。具体的には、i) 光励起反応による直接窒化の可能性および、本絶縁膜を高誘電率絶縁膜の下地膜としての応用 ii) 高誘電率絶縁膜製膜後の光励起プロセスによる膜質の改善 について検討を行った。

Si 基板を低圧アンモニアガス雰囲気中に設置し、基板に向けて波長 254nm の紫外線を導入した結果、基板温度 50°C 程度においても窒化が進行することを確認した。ただし、真空雰囲気および材料ガス中の水分に起因すると考えられる酸化も同時に進行しており、作製された膜は窒素含有率 10% 程度の酸窒化膜であり、膜厚は 1~2nm であった。また、作製された膜の電気伝導機構を評価した結果、シリコン窒化膜と同様に Poole-Frenkel 伝導が支配的であることを確認した。なお、本絶縁膜製膜後に高温酸素雰囲気中で酸化を行った結果、同程度の膜厚の酸化膜を有する構造に比べて、酸化進行速度が非常に低くなることが確認され、本酸窒化膜の強い耐酸化性を確認した。そこで、本絶縁膜の HfO₂ 高誘電率ゲート絶縁膜の下地膜としての応用について検討を行った。その結果、本絶縁膜を下地膜とすることにより、界面準位密度の低下、リーク電流の減少が可能であることがわかった。また、製膜後の熱処理時における界面再酸化による容量低下も抑制できることを明らかにした。これは、本絶縁膜の強い耐酸化性に起因するものである。

一方、HfO₂ 膜製膜後に NH₃ 雰囲気中で熱処理を行うことによる電氣的特性の変化について評価を行った。その結果、熱処理温度の上昇に伴って絶縁膜の比誘電率が增大すること。また、熱処理中、基板に向けて紫外線を導入した場合には、低温熱処理においても比誘電率が増加することを確認した。これは、紫外線により活性化した NH₃ により窒化が進行したことに起因するものと考えられる。また、紫外線励起 NH₃ 処理により、絶縁特性が改善することも確認した。

研究課題名：放射光援用プロセスによるフラーレンポリマーの合成

研究代表者：山本 寛（日本大学理工学部）

研究従事者：岩田 展幸（日本大学理工学部）

【総括】

本研究の目的は、高圧下で C₆₀ 集合体あるいはカーボンナノチューブ(CNT)に強力な放射光またはX線を照射することにより、ダイヤモンド的結合による3次元フラーレンポリマーを合成し、その驚異的特性を実験的に明らかにするところにある。得られる3次元C₆₀ポリマーはまさにダイヤモンドを越える、スーパー・ダイヤモンドと呼ぶにふさわしい特性をもたらすと期待される。また、CNT 繊維は軽く、高強度特性をもつ次世代の繊維となる。

そこで、本研究では特に放射光を有効に活用した新しいフラーレンポリマー合成プロセスを開発することを目指し、第一段階として、C₆₀ポリマー生成のFEL波長依存性を明らかにする等、C₆₀粉末を対象とした基礎的プロセスを構築し、具体的合成条件の最適化を検討した。第二段階として、最適化されたFEL波長を用い、バルク状試料を作製するプロセスに発展させるため、蒸着プロセスを導入して、C₆₀ポリマー厚膜を作製することを目指した。

C₆₀粉末(99.95%)を加圧した後、真空中(10⁻⁵Torr)で加圧しながらFELを照射した。このとき、試料表面に不均一な圧力がかかるようにアンビル表面にのこぎり型の凹凸をつけることによって、部分的に数GPa級の高圧が印加された。FELは数百psのマイクロパルスから構成される数十μsのマクロパルスであり、繰り返し周波数2Hzで照射された。約1350nm基本波のエネルギーは約0.5mJ/pulseであった。主に照射に用いたのは基本波の第3高調波であり、BAND Pass Filter(BPF)を通した後のレーザー強度はかなり低くなり、正確な値は計測することが出来なかった。照射時間は約2時間とした。えられた試料の評価にはRaman分光装置、X線回折装置を使用した。

圧力印加後、試料表面を観察すると金色の光沢を示す部分が形成された。その部分はアンビルの凸部に対応しており、推定7Gpaを越える高圧が印加された領域であった。圧力印加のみでは重合反応は進行していなかった。しかし、FEL照射後にその領域のラマン測定を行った結果、C₆₀オリジナルの1469cm⁻¹ピークに加え、光重合反応の進行を示唆する1455cm⁻¹付近の明確なピークが観察された。

この結果は、圧縮によって分子間距離が短縮された状態での光照射が重合反応を促進したことを示している。観察されたポリマー相はラマンピーク波長から判断して、重合が著しく進行していることが分かる。通常報告されている光重合相は1460cm⁻¹付近にラマンピークを示しており、明らかに今回得られた試料の重合度が高いことが理解できる。つまり、分子間距離を十分に縮小した後、レーザー照射することによって効果的にC₆₀光重合反応を促進できることが明らかになったといえる。

薄膜作製に用いた装置上部には赤外線ヒーターがあり、試料の加熱が可能となっている。また、ロータリーポンプとターボ分子ポンプを用いることで、10⁻⁶Pa程度の高真空が実現できる。装置内部にはミラーが設置しており、装置外部からのレーザー光を試料に照射する。

一方、厚膜形成を目指し、マイカ基板を基板ホルダーにセットし、赤外線ヒーターにより300℃で1時間基板の脱ガスを行った後、基板温度を100℃にし、C₆₀を2.0Å/sで蒸着すると同時に、FEL照射を2時間行った。FELは帯域通過フィルタ(BPF)を通し、1500nmから500nmを取り出した。

えられた試料のXRDスペクトルを比較した結果、FEL無照射のものも、照射したものも、同じ位置にピークが観察された。明確な結晶構造変化は見出せなかった。また、Ag(2)振動モードのRamanスペクトルを

比較したところ、無照射のものは 1469.5cm^{-1} に、FEL を照射したものは 1468.8cm^{-1} にピークが観察されており、ほとんど変化していなかった。

バルク C_{60} の実験で明らかのように、ポリマー化すると、ラマンピークは 9cm^{-1} 程度低波数側にシフトする。これは、 C_{60} 分子間の共有結合により各炭素原子が振動制限の影響を受けるためである。今回、いずれの薄膜試料においてもピークのシフトは確認できなかった。FEL 照射による C_{60} 薄膜ポリマー実現へ向け、使用する基板を変えることによって C_{60} 分子間距離を縮める、あるいは照射レーザー強度を上げる等の試みを続ける必要があるだろう。

以上、 C_{60} ポリマーを合成する新しいプロセスを開発することを目指し、バルクならびに薄膜を取り上げて光重合の可能性を探ってきた。その結果、バルク試料においては、GPa オーダーの高圧下で分子間距離を縮めることがポリマー化反応を促進する上で大きな効果をもたらすことが確かめられた。今後 10GPa 級の超高压実験を進めていく予定である。一方、現在までの薄膜形成プロセス中での FEL 照射効果は見出せていない。照射エネルギー強度の影響について、今後さらに検討を深めていく予定である。

研究課題名：自由電子とエキシマレーザの2フォトンプロセスによる環境半導体及びポリ乳酸の成膜及びパラメトリックX線によるXAFS観測

研究代表者：鈴木 薫（日本大学理工学部電気工学科）

研究従事者：清水 洋平、田宮 慶太、上村公勇、若松 隆、胡桃 聡、
並木 和広（日本大学理工研究科電気工学専攻）

共同研究者：佐藤 昌憲（駒沢大学医療健康科学部診療放射線技術科学科）
森 啓（日本大学薬学部）

[研究目的] 分子振動を共鳴励起する自由電子レーザ光や電子共鳴励起に必要な紫外線波長可変エキシマレーザ光による Pulse Laser Deposition ; PLD 法により酸化チタン (TiO₂)やオキシサルファイド (LaCuOS)・酸化亜鉛 (ZnO) 等の環境半導体を成膜し発光素子への応用をはかると同時に、レーザ転写法によりポリ乳酸やキトサンなどのバイオマテリアルを動物の歯や爪のような生体硬組織の表面上にマーキングする方法の開発、及び2フォトンプロセスによりその機能性を高めることを実験の目的とする。また、パラメトリックX線による ZnO や LaOCuS・CuO・ZnS 等のワイドバンドギャップ発光体を XAFS 観測するにより、酸素やイオウの局在と発光波長の相関を解明する。

[研究概要]

1. 自由電子レーザ転写法によるバイオマテリアルのマーキング

犬や猫などのペットにおける血統や飼い主及び牛や豚などの家畜における飼育環境などの情報を無血で非破壊な個体識別法として開発するために、爪や歯などの表面にマーキングを施す方法を検討した。蟹などの甲羅から抽出した生分解性で抗菌・脱臭作用を有するバイオマテリアルであるキトサンを溶媒とし、それを所定のパターンに転写できるレーザ転写 (LIFT)法を用い、溶媒の固有な分子振動に共鳴吸収する波長を選択し、最適な波長を特定するために自由電子レーザを光源としている。自由電子レーザをキトサンの-CH 伸縮振動に共鳴吸収する波長(3.38 μ m)とし、ドットの間隔は50 μ m、8 \times 8ドットの正方形にCST NUをマーキングしたときに1ドットの直径は37 μ mが最小であった。また、犬や猫牛の歯や爪など生体硬組織による生体蛍光とキトサンの蛍光は似通った波長であるため、識別用蛍光剤に可視光領域はRhodamin6Gを添加した結果、Rh6Gは蛍光の発光効率が高く自由電子レーザによるLIFTにおける損傷にも耐えることが確認された。

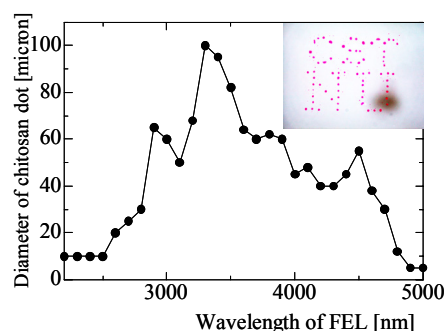


図1 ドット直径の自由電子レーザ転写における波長依存性とマークの一例

2. N₂プラズマアシスト PLD 法による義歯への抗菌用酸化チタン成膜

義歯の表面に抗菌や脱臭作用を生じる環境半導体である酸化チタンを薄膜形成する研究を行い成功したため、これに希土類元素のランタンを添加して太陽光などの光エネルギーにより水を分解する薄膜を PLD 法によって低温成膜した。図2はLaO₂とTiO₂を1:1で混合し圧縮成型したターゲットを波長266nmのYAG \times 4レーザによるPLD法で成膜した試料におけるXeランプ照射時におけるメチレンブルーの分解と水分解を示しており、試料のPost Annealing温度に依存して光触媒反応により分解が生じることが判明した。

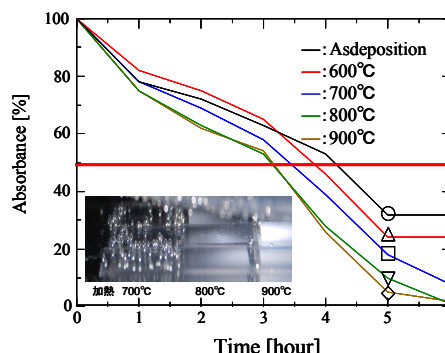


図2 La₂Ti₂O₇のメチレンブルー・水分解作用

3. PLD 法によるワイドギャップ半導体 LaOCuS の成膜

p 型酸化物半導体であるオキシサルファイド(LaOCuS)と n 型酸化物半導体の ZnO はワイドバンドギャップ半導体デバイスなどへの応用が期待されている。LaOCuS の組成比や不純物を添加した ZnO の非結晶化ターゲットを用いた PLD 法により薄膜を作成した。XRD 測定より、結晶性の良い ZnO と LaOCuS の薄膜を作製できた。PL 測定結果より ZnO に Al を添加した試料において 390nm にエキシトン発光のピークが確認され、3.2eV のワイドバンドギャップ半導体であることや、Al の添加量によって PL 発光の特性を制御でき、透明な薄膜が形成できた。LaOCuS では Cu と S を過剰に添加することで青緑・橙・白色の発光を制御できる。

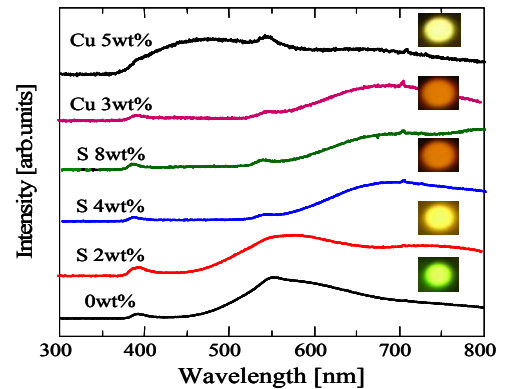


図3 LaOCuS の組成に対する PL 波長特性

4. PLD 法による ZnO の成膜と Al ドープの評価

ZnO はエキシトン発光を利用した青から紫外の発光デバイスとして注目を集めており、Al や Ga などをドープすることで電気伝導の向上や発光波長に影響があることが知られている。ZnO のみの(Al₂O₃ 混合なし)0wt%については 380nm 付近に ZnO のエキシトン発光(a)が顕著に確認できるが、1wt%混入すると(a)のエキシトン発光が衰退していることがわかる。2,3wt%のものについては新たに(b)(c)の発光が生じておりこれは Al ドープによる発光だと考えられる。また可視光領域において見られる(d)の発光は O 欠陥による発光である。

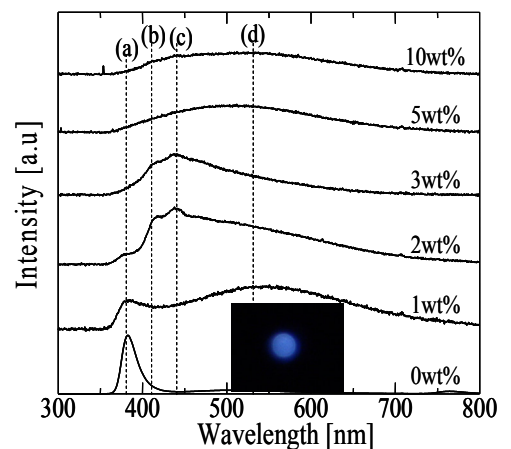


図4 ZnO:Al の PL 波長特性

5. パラメトリック X 線による XAFS 観測

PLD 法によりカプトン基板上に成膜した ZnO とコントロールに用いた Zn 箔を PXR により XAFS 測定した結果が図 5 である。Zn 箔の部分では X 線のエネルギーが吸収端の $E_c=9.663$ keV 以上になると吸収が急に増えているが、ZnO や ZnO:Al では吸収端付近での吸収が緩やかになり、吸収端から高エネルギー側では吸収量が波打って減衰している。Zn 原子が X 線のエネルギーを吸収すると内殻電子が核の束縛を離れ、光電子として飛び出していく以外に、近傍に存在する O や Al 原子により光電子が散乱され、干渉の結果遷移モーメントが変調されて微細構造が測定され、酸化や Al のドープによって微細構造の変化が認められている。

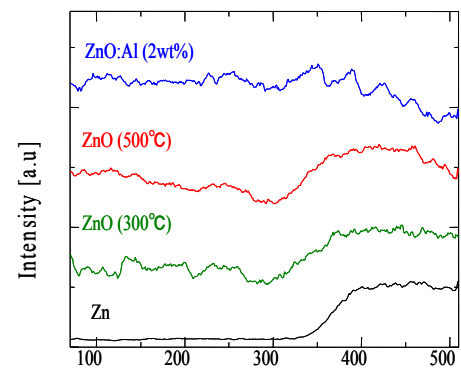


図5 Zn と ZnO 及び ZnO:Al の XAFS 特性

【まとめ】

自由電子レーザー転写法によりバイオマテリアルの一種であるポリ乳酸とキトサンを動物の歯や爪にマーキング方法を考案し、所定の場所へのドットマーキングに成功した。N₂ プラズマアシスト PLD 法による義歯への抗菌用酸化チタン成膜により、メチレンブルー分解の光触媒反応の吸収波長特性の拡大と審美性の向上を確認した。PLD 法によりワイドギャップ半導体 LaOCuS を成膜したときのフォトルミネッセンス発光と制御に成功した。PLD 法による ZnO の成膜と Al ドープの結果、Al 添加量により不純物発光は制御でき、吸収端から微細構造の変化が測定された。

研究課題名・PXR を用いた XAFS 測定法の検討及び光化学反応を利用した分子触媒の検討

研究代表者：森 啓（日本大学薬学部）

共同研究者：早川 恭史（日本大学量子科学研究所）

高橋 由美子（日本大学理工学部）

寒河江 登志朗（日本大学松戸歯学部）

加藤 二久（首都大学）

【総括】

・ PXR を用いた XAFS 測定法の検討

パラメトリック X 線放射(PXR)の実際エネルギー分布を、アルミステップを用いた方法、シリコン結晶を利用してブラッグ反射を利用する方法、SSD を使用する方法、物質の吸収端を利用する方法の 4 通りで計測し検討した。その結果計算予想通りの特徴あるエネルギー分布を確認できた。

次に銅関連の試料を用いて吸収法による X 線吸収微細構造(XAFS)の測定を行った。撮影媒体としてイメージングプレートを用い、PXR 特有のエネルギー勾配を用いることで線源の条件を一切動かさずに測定した。その結果吸収端近傍において吸収コントラストの微細構造を明瞭に確認できた。また資料として、純銅の薄膜、ニッケルと銅の合金の薄膜、硫酸銅溶液を寒天で固めたものを用いたところ、銅及びは白金と銅イオン(硫酸銅)の測定結果を比較すると 15eV 程度の吸収端のシフト(ケミカルシフト)が存在することが確認された。また銅と合金を比較すると吸収端の位置は同じものの広域 X 線吸収微細構造(EXAFS)領域での振動波形の変化が確認された。この結果から線源の波長スキャンをしないで短時間で XAFS が観測できることが示されたが、PXR の線量が少ないことにより撮影媒体のイメージングプレートの読み出し装置におけるアンプの特性の影響を強く受けることが判明した。また試料の均一性について試料を振動させることでその影響を抑えられることが判明した。また、事前に吸収端より低エネルギー側で撮影して、その透過度から資料の厚さの分布を測定して後で補正する方法も可能性が示唆された。ぼやけについてその後検討を進めて結果、試料からの蛍光 X 線の放出であることが判明し、試料とデバイスを 60mm 離すことで蛍光 X 線の影響を 5%以下に抑えられる結果が得られた。エネルギーが約 9keV 以上の空気での吸収の影響が少ない領域では PXR の線源そのものに志向性があるので試料とイメージングデバイスを十分離せば精度良く測定できることが示された。

・ 光化学反応を利用した分子触媒の検討

アミノ酸の蛍光試薬として知られているベンゾフラザン類は、生体成分あるいは薬物の官能基を検出・定量することに用いられると共に、各種アミノ酸の分離定量、光学活性薬物の分割定量など多岐に渡り応用されている。このベンゾフラザン類は、官能基を導入することによりさまざまな反応が起こりやすくなることが知られている。特に、4,7-ジメチルベンゾフラザンはフラーレン触媒を用いて可視光領域で一重項酸素と光反応を起こすことが報告され化学活性の高さが推測されているが、反応に触媒が必要なことと熱に弱い欠点がある。そこで著者らはベンゾフラザン類の光感受性に着目し、非熱課程の光反応を単一波長のレーザによって選択的に起こすことにより化学活性の高い新規性生物を目指した。

実験の結果ベンゾフラザンの 4,7 位にメチル基付加することで 355nm の光と反応し、反応収率は最大で 98% を得られた。その反応生成物は熱に対し不安定で原料に戻るがラジカルを持つことが推測され化学活性が高いことが推測された。また、反応は構造変化のみで他の物質が関わらないことからラジカルを触媒に有効利用できる可能性がある。

研究課題名：レーザーアブレーションによる新規光機能膜の創製とX線・紫外線による物性制御

研究代表者：望月 章介（日本大学文理学部）

研究協力者：藤代 史（日本大学理工学部）

【総括】

光による物質状態の制御とクリーンな方法による新物質の創製は古くよりの物質科学の夢である。物質を量子力学的に見ると、構成原子の種類を決めても、与えられた一つの圧力・温度条件でも種々の結晶構造が現れ、物質は本来の性質として構造多重性を有すると考えられる。このために、我々は物質には現在安定状態として現れている状態のほかに、有用な物性を有する状態が隠れて存在していると考えられる。この隠れた有用な状態は、温度変化や圧力印加等の物質全体の励起では現れず、特定の波長の光による電子励起で現れるであろう。この研究では

- (1) 光（含むX線）による構造多重性を利用した新規光情報メモリー現象を示す物質を探索・創製、
- (2) 二つの状態の間で量子揺らぎ状態にある量子常誘電体の光による状態制御

の実現させることを目的とした。

この研究目的遂行の為に、量子常誘電体・光機能物質として知られているチタン酸ストロンチウム SrTiO_3 、 KTaO_3 および他の金属酸化物（ MgO , anatase TiO_2 , Y_2O_3 ほか）について我々が発見した紫外レーザー光誘起フォトメモリー現象に着目し

- (1) 光で直接結合を切らない赤外線レーザー光でアブレーション法によりフォトメモリー性が高い薄膜を創製する、
- (2) 量子揺らぎ状態にある量子常誘電体 SrTiO_3 , KTaO_3 , CaTiO_3 を紫外光やX線で励起して、強誘電状態に転移させ、光による物質状態の制御法を確立する

ことの二点を具体的な研究目的とした。

具体的には以下の実験を行った。

- (1) 諸ガス雰囲気中で紫外線および赤外線領域のレーザーアブレーション法により希土類金属酸化物および遷移金属酸化物 薄膜、ナノ粒子膜を量子科学研究所と文理学部で作製する。作製された膜の評価実験は文理学部で行うー実験場所：文理学部、量子科学研究所
- (2) 極低温状態の量子常誘電体 SrTiO_3 , KTaO_3 にX線を照射し、誘電率の増大現象を測定する：文理学部、

実験結果と結論

上記実験(1)については、レーザーアブレーション法により SrTiO_3 , KTaO_3 , MgO , anatase TiO_2 , Y_2O_3 , (La, Li) TiO_3 , ZnO , TiO_2 等の薄膜の作製を試みて良質な膜を得て、紫外光レーザーによる欠陥制御によるフォトルミネッセンス特性制御が可能であることを示した。

上記実験(2)については、レーザーアブレーション法で作製した SrTiO_3 薄膜や CaTiO_3 薄膜を試料として行うとともに、ベルヌイ法により育成された SrTiO_3 単結晶の as-grown 結晶のアニール過程で誘電率増大現象とX線測定をアニール時間の関数として研究し、ミクロスコピック強誘電ドメインの重要性を指摘した。残念ながらパラメトリックX線誘起誘電率増大現象の観測は行えなかった。

研究課題名：PXRを用いた高圧下におけるX線回折の研究

研究代表者：高橋 博樹（日本大学文理学部）

研究従事者：滝沢 武男（日本大学文理学部）

川上 隆輝（日本大学量子科学研究所）

【総括】

いくつかの興味ある物質の基本的性質を調べる手段として、PXRを用いた高圧下におけるX線回折実験を計画した。研究期間にはそのための物質合成や高圧下での物質評価を行って来た。以下にその成果を示す。

（1）充填スクッテルダイト $\text{La}_{0.8}\text{Rh}_4\text{P}_{12}$ の圧力効果

充填スクッテルダイトの一般的な化学式は MT_4X_{12} （M、T、Xはそれぞれ希土類とアルカリ土類金属、遷移金属、プニクトゲン）である。現在超伝導体として14種類の充填スクッテルダイトが報告されているが、その中でも $\text{La}_x\text{Rh}_4\text{P}_{12}$ が17Kと最も高い超伝導転移温度 (T_c) を示している。充填スクッテルダイト MT_4X_{12} の結晶構造は、M元素を体心位置としてそれに近接する計12個のX元素が20面体を形成しており、さらにその周りをT元素による立方格子が覆うように存在している。本研究テーマでは、多数の充填スクッテルダイト化合物の中で最も高い T_c を持つ $\text{La}_x\text{Rh}_4\text{P}_{12}$ の超伝導状態の圧力効果を調べることを目的とし、ピストンシリンダーとダイヤモンドアンビルセル高圧発生装置を用いた0.5GPaから15GPaまでの高圧下における電気抵抗測定及び、マルチアンビル高圧発生装置を用いた格子定数測定を行った。結果より、 T_c は3.0GPa以下では-0.3K/GPaの割合で、それ以上では-0.5K/GPaの割合でそれぞれ減少している。また、体積は圧力に対してほぼ線形に減少している。この結果から求めた体積弾性率は118.64GPa ($B_0'=4$) であり、これは同等の格子定数を持つ充填スクッテルダイトの中では比較的低い値であった。

（2）鉄ベースの高温超伝導体 LaOFeP_n ($Pn=\text{P,As}$) の圧力効果

鉄ベースの高温超伝導体 LaOFeP_n ($Pn=\text{P,As}$) はFe- P_n 面を伝導面にもち、F-doped LaOFeAs はonsetで32Kの T_c を示すことが最近報告された。 LaOFeP はオンセット $T_c \sim 8\text{K}$ の超伝導体であるが、Fe-P層はたとえば銅酸化物超伝導体のCu-O層に比べ、圧力に対し大きく変化することが期待された。電気抵抗の圧力効果を測定し、 T_c の圧力効果を調べたところ12GPaで約13Kまで上昇することがわかった。圧力発生装置はピストンシリンダー、キュービック、ダイヤモンドアンビルである。また、高圧X線回折実験からは面に垂直なc軸がa軸に比べ、高圧下で大きく圧縮されることがわかった。一方、 $\text{LaO}_{1-x}\text{F}_x\text{FeAs}$ は非常に大きな圧力効果を示し、4GPaで43Kまで T_c が上昇することがわかった。

（3）ペロブスカイト型鉄酸化物の高圧下物性

$\text{CaCu}_3\text{Fe}_4\text{O}_{12}$ は高い原子価 Fe^{4+} を伴うペロブスカイト型鉄酸化物である。メスバウアー分光によって、約220K近傍で電荷分離 ($2\text{Fe}^{4+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{5+}$) および磁気秩序が同時に起こることがわかっている。また、電気抵抗は約220K近傍から大きく増加し始める。さらに、220Kから200Kまでの温度範囲で、磁気秩序していない Fe^{4+} と磁気秩序している Fe^{3+} 、 Fe^{5+} の共存相の存在が確認されている。本研究では、電荷分離、磁気秩序および電気抵抗の圧力効果について調べた。電気伝導・磁気的特性・電荷分離の圧力効果を調べるために、高圧下で電気抵抗測定と ^{57}Fe メスバウアー分光測定を行った。高圧発生装置にはダイヤモンドアンビルセルを用いた。電気抵抗とメスバウアー分光測定は、それぞれ圧力範囲は0.5GPaから28GPa、大気圧から50GPaまで行った。高圧下の電気抵抗測定は、加圧に伴い電気抵抗の温度依存性が半導体的な振る舞いから金属的な振る舞いに変化した。一方、高圧下のメスバウアー分光測定は、大気圧下で220Kであったキュリー温度が、約10GPaではキュリー温度が室温まで上昇した。50GPaまで圧力を上昇させると、電荷分離が抑制されることも明らかになった。

研究課題名：機能ゲノム科学の応用による自由電子レーザー生物学的効果の機序解明

研究代表者：安孫子 宜光（日本大学松戸歯学部）

研究従事者：柴田 恭子（日本大学松戸歯学部）

【総括】

レーザー照射が創傷や難治性潰瘍に治癒効果があると言及されて以来、炎症抑制、疼痛減少、骨折治癒促進など広範な臨床効果が報告されている。しかしながら、低出力レーザー照射による生物学的効果の作用機序は不明な点が多い。とくに分子レベルでの実証科学的な解明は遅れている。とくに自由電子レーザー生物学的効果の機序については研究が進展していない。従来の分子レベルでの研究アプローチは、生理活性物質の発見→精製→遺伝子クローニング→機能解析→タンパク質一次構造の解析が行われてきた。しかし、これらの研究方法では、すでによく知られている生理活性物質あるいは同定、精製に成功した分子しか捉えることはできない。当然ながら、目的とする生命現象に関わる未知の遺伝子については研究することは不可能である。近年、ゲノムサイエンス研究の飛躍的な進展に伴い、ヒトを含む種々の生物のゲノム計画が進められている。ゲノムデータベースの充実に伴って、細胞内で変動する遺伝子のトランスクリプトーム解析は、生命現象を理解することに多くの情報を与え得ると期待されている。

本研究では、ゲノムデータベース、バイオインフォマティクス研究技術を応用して自由電子レーザー照射の抗炎症作用の分子機序を解明を試み。ヒト膝関節滑膜細胞の細胞培養系の炎症病態モデルに自由電子レーザー照射を行って mRNA、タンパク質を回収して機能ゲノム科学技術を応用してそれぞれの発現量をプロファイリングすることで生物学的効果を明らかにした。

IL-1 β 、TNF- α は関節リウマチ患者の膝関節滑液中でも上昇していることが報告され、疼痛との関連も示唆されていることから、関節リウマチの発症および進展において重要な役割を担っていると考えられている。関節リウマチ患者由来の膝滑膜細胞にSV40遺伝子で不死化させた樹立株細胞にIL-1 β 、TNF- α を作用させ、同時に自由電子レーザーを照射し、増殖、血管新生、骨・軟骨破壊に関与するといわれているキモカインIL-8の産生に対する影響を調べ、その結果、自由電子レーザー照射によって産生量の低下がみられた。次いで、培養細胞系からmRNAを回収しAffymetrix Gene Chip (47,000遺伝子)を用いて、トランスクリプトーム解析を行った。さらにGene Spring解析ソフトを用いて遺伝子発現のプロファイリングを行った。さらにGene Chip 解析データをデータマイニングして信頼度の高い遺伝子解析データを情報伝達系コアデータベース(Ingenuity Signal Pathway Database; IPA)ツールを応用して、抗炎症作用に関与する情報伝達系を検索した。

IL-1 β 、TNF- α 刺激細胞は非作用細胞に比べて多数の遺伝子発現を変動させた。その中には、炎症性サイトカイン、キモカイン、炎症系転写因子が含まれていた。そして、自由電子レーザー照射によって、これらの炎症促進に関与する遺伝子群のmRNAレベルの低下がみられた。興味深いことにUbiquitin/Proteasome系に関与する遺伝子発現の変動も併せて観察された。Gene Chip解析データをデータマイニングした後、IPA解析データベースにuploadして、signal pathway解析した結果、NF- κ Bシグナル系、apoptosis シグナル系、cytokineシグナル系に関与する遺伝子群の発現変動が明らかになった。

自由電子レーザー照射は、MH7A細胞IL-1 β 刺激による情報伝達系、とくにapoptosis/proliferation、cytokine/chemokine、NF- κ B系を変動させることでIL-1 β 刺激による炎症促進へのシグナルを健常ステージに回帰することが推定された。自由電子レーザー照射は、これら情報伝達分子の遺伝子発現レベルに作用して炎症抑制に働くことが示唆され、リウマチの炎症抑制治療の開発に有効であると考えられる

研究課題名：動物実験系を応用した自由電子レーザーの生物学的効果の検証

研究代表者：多田 充裕（日本大学松戸歯学部）

研究従事者：久保山 昇（日本大学松戸歯学部）

木場 秀夫（日本大学松戸歯学部）

佐藤 裕介（日本大学松戸歯学部）

【総括】

レーザーの臨床応用に関しては、外傷など軟組織に対する創傷治癒促進効果などのほか、関節炎に対する消炎鎮痛効果などが報告されているが、経験による臨床治療の報告が多く、照射条件についても論拠に基づいたものは少なく、必ずしも十分な基礎的検討がなされていない。

本研究では、自由電子レーザー照射の生物学的効果についてラットを用いた *in vivo* 実験系で検討した。ヒト関節リウマチの動物モデルとして広く汎用されているウシⅡ型 collagen を感作して、コラーゲン誘発性関節炎（CIA）ラットを作製した。この動物を用いて自由電子レーザー（FEL）照射を行い、FEL 照射による抗リウマチ作用について検討した。

実験動物は Lewis 系雌性ラットを用い、初回感作として、抗原であるウシⅡ型 collagen（0.8mg）および Adjuvant Peptide（0.2mg）を含む Freund's Adjuvant Incomplete のエマルジョンを、動物 1 匹当たり 1ml を 0.1ml 約 10 ヶ所に分けて背部に皮内投与し、初回感作の 7 日後および 14 日後に同エマルジョンを尾根部より 0.3ml 皮内投与して実験的 CIA を発症させた。FEL 照射は、1,750 nm の波長で 500 秒間照射を行った。この時の総照射エネルギー密度は 5~6 J/cm²であった。動物は 1 群 5 匹とし 3 群に分け、第 1 群は正常（無処置）群、第 2 群は CIA 群、第 3 群は CIA ラットに FEL 照射を行った FEL 照射群とした。実験期間中は動物の一般状態を毎日観察し、週 2 回体重測定と週 1 回採血を行った。関節炎の肉眼的所見に関しては、週 1 回ノギスを用いて後肢足および膝関節の厚さにより評価した。また、各群の採取した血清は、ELISA-kit を用いて IL-1 β 、IL-6、CRP 濃度、リウマトイド因子である MMP-3 濃度を測定した。

抗腫脹効果については、第 2 群の CIA 群と第 3 群の FEL 照射群は、ともに collagen 接種後から関節炎が発症し、後肢の足蹠部が漸次に腫脹していった。第 3 群では FEL 照射開始から腫脹は軽減傾向を示し、CIA 群に対する腫脹抑制率は 12 日目で 21.4%であった。血清中の炎症性サイトカイン測定については、IL-1 β および IL-6 に関して、FEL 照射後 12 日目で IL-1 β 、IL-6 ともに FEL 照射することにより、有意な減少傾向を示した。リウマトイド因子である MMP-3 濃度においても、ほぼ同様な結果が認められた。

今回の実験結果より、FEL 照射によって足蹠の腫脹が軽減したことから抗炎症効果が認められた。そして、血中の炎症性サイトカインが減少したことから、これらのサイトカインを産生する滑膜細胞、骨芽細胞に対して FEL 照射が何らかの作用を及ぼしていることが示唆される。これは、FEL 照射の局所への直接作用と考えられる。さらに、FEL 照射により、慢性関節リウマチ患者の血清中の免疫複合体、IgG およびリウマトイド因子の減少がおこるなどの報告から考えると、間接的な全身への作用の可能性も示唆される。

以上の結果より、FEL 照射は、CIA ラットの足蹠腫脹および血清サイトカインおよび MMP-3 濃度の上昇を抑制した。したがって、FEL 照射は副作用のない非侵襲的な抗炎症効果を期待しうる関節リウマチの治療に有効であることが示唆された。

研究課題名：FEL 照射による骨形成促進作用の解明

研究代表者：清水 典佳（日本大学歯学部）

研究従事者：馬谷原 琴枝（日本大学歯学部）

清崎 丈司（日本大学歯学部）

【総括】

歯科矯正治療は顎骨、歯槽骨の骨添加を伴う治療であり、この課程を促進できれば治療期間の短縮や後戻り防止に大きく貢献できると考えられる。近年、低出力レーザー照射による骨形成促進作用が報告されているが、そのメカニズムを含め詳細は不明である。骨芽細胞は自ら種々の骨形成促進因子を産生しているため、レーザー照射が骨芽細胞を刺激し、種々の骨形成促進因子を産生しているという仮説を立てた。そこでレーザー照射による骨形成促進因子の発現を検討するとともに、最も効果的なレーザー照射条件を見出し、将来、臨床応用を図る基礎とすること目的に本研究を行った。

妊娠ラットより摘出した胎仔から骨芽細胞を採取し一定数の細胞を培養した。Ga-Al-As 半導体レーザー（パナラス 1000、波長 830nm、出力 500mW）をコンプレントになった細胞層に 1 回 10 分(4J/cm²)照射した。各処置を行った細胞を 21 日間培養後 dish 内に形成された bone nodule を定量した。また照射後、細胞の培養上清を 3 日ごとに採取し IGF-I および PGE₂ の産生量を定量した。さらに培養細胞にリコンビナント(r)IGF-I や抗 IGF-I 抗体の濃度を変え作用させた系と各種濃度の抗 IGF-I 抗体を作用させレーザー照射を行う系により、これらの処理が bone nodule 量に与える影響を検討した。その結果、添加した rIGF-I の濃度依存的に bone nodule の量が増大し、抗 IGF-I 抗体の濃度依存的に bone nodule 量が減少した。またレーザー照射では最高濃度のリコンビナント IGF-I 作用と同程度の nodule 形成促進が見られたが、抗 IGF-I 抗体作用によりその効果は無くなった。さらにレーザー照射は IGF-I 発現をタンパク、遺伝子レベルで促進し、タンパク発現は nodule 中央の細胞のみに見られた。しかし PGE₂ 産生には影響を与えなかった（Shimizu et al, Lasers in Surg Med, 2007）。一方、2Hz の低周波パルスが細胞増殖および bone nodule 形成を強く促進することがわかったため、骨芽細胞様細胞である Saos-2 を用いて半導体レーザーを 2Hz のパルスで 1~4J/cm² 照射し、上記と類似した実験を行ったところ、2J/cm² 照射で Bone morphogenetic protein(BMP)2,4,6,7 が照射後 9,12h で顕著に増大し、骨形成関連転写因子である Runx2, Dlx5, Osterix, Msx2 が 12~48h で顕著に増大すると共に、培養 21 日後の Ca 量も増大していた。（レーザー歯学会発表）。そこで Saos-2 に波長 1750nm の FEL を 10J/cm² 照射したところ 24 時間後に BMP-2 の発現が上昇し、半導体レーザーと類似した骨形成促進作用があることがわかった。

以上より、低出力半導体レーザーおよび FEL 照射は骨芽細胞の IGF-I や BMP s 発現促進を介して骨形成を促進していることがわかり、歯の移動時や縫合部拡大時の骨形成促進作用を期待できると考えられた。

研究課題名：マウス polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)に対するモノクローナル抗体の作製とその応用 ELISA system の開発

研究代表者：茂呂 周（日本大学大学院総合科学研究所）

研究従事者：浅野 正岳（日本大学歯学部）

【総括】

Mammalian expression vector にマウス pIgR cDNA を組み込んだ expression plasmid を静脈注射し、マウス体内で pIgR に対する抗体価が上昇している事を FACS により確認した。抗体価の上昇が認められたマウスのリンパ球を採取し、ミエローマ細胞との融合実験の結果、現在までに約 30 クローンのハイブリドーマの作製に成功している。作製されたハイブリドーマのうち特に反応性に優れたものを選択し培養を行った。培養上製を用いて同様の実験を行いマウス pIgR を認識する抗体の分泌を確認した後、当該クローンをマウス腹腔に注射し約 2 週間後に腹水を採取した。腹水から抗体分子を精製し抗体溶液とした。作製されたマウス pIgR に対するモノクローナル抗体を用いて Western blotting や免疫沈降実験、蛍光免疫染色法による生細胞の染色等の生化学的実験が行える事を確認している。これらモノクローナル抗体を用いてマウス生体材料に由来するサンプルにおけるマウス pIgR タンパク質の定量を可能にするシステム作製を目指してさらに以下の実験を行った。得られた 5 種類のモノクローナル抗体のエピトープを解析するべくマウス pIgR 分子の deletion mutant を作製し、Western blot 法を用いて解析を行った結果、No.7, 24, 41,46 の 4 種類の抗体が mpIgR の N 末端側を認識しているのに対して、No.19 のみが C 末端側を認識していることが判明した。この結果を踏まえ生体材料中の mpIgR の定量を目指して ELISA system の開発を試みた。No.7 および No.19 抗体の組み合わせにより開発を進めたところ人工的に作製した mpIgR 分子を特異的に認識しうる ELISA system の作製に成功した。この system を用いてマウス小腸、大腸、肝臓、脳などの組織から組織溶解液を作製し定量を行ったところ、マウス腸管組織における mpIgR の不均等な分布を確認することができた。

以上のように、当初目的としたマウス pIgR に対するモノクローナル抗体の作製に成功したのに加えて、これらを用いた定量システムの作製に成功した。今回開発された ELISA system は今後の粘膜免疫の研究に多大なる貢献をするものと期待される。

研究課題名：硬組織・生体材料・細胞培養系の表面改質・改造と分析

－LEBRA-FEL を利用した研究－

正常と病的硬組織・生体材料・薬剤の評価

－LEBRA-PXR を利用した研究－

研究代表者：寒河江 登志朗（日本大学松戸歯学部）

【総括】

生体硬組織の研究ならびに生体材料開発と評価は、それらの多くが無機質と有機質が複雑にかみ合った複雑系複合材料的な組成・組織構造をもつため、従来から研究に多くの困難が伴っていた。新しい光源とテクニックを利用することはこれまでの停滞を打ち破るブレークスルーを提供してくれるかもしれない。そのような期待を込めて日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設（LEBRA）の発生するパラメトリック X 線（PXR）を利用した研究を開始した。

実際に PXR の利用実験が可能となるまでの期間を利用して、この学術推進フロンティア事業の一環として LEBRA に準備された各種の予備実験装置（PSPC 型微小部 X 線回折装置、IP 型微小部 X 線回折装置など）を利用して、X 線実験・解析技術の向上に努め、その間いくつかの成果を発表した（業績の項参照）。

PXR を利用した実験は、歯の研磨薄片の直接レントゲン像撮影（これは CERN2006 で紹介された）に始まり、LEBRA-PXR の極狭帯域単波長性を利用した X 線吸収端の検出を試み、化石恐竜卵殻中の Sr の同定が行えた。また、LEBRA-PXR の高コヒーレンス X 線を利用した位相コントラストイメージングも試み、骨芽細胞様細胞の培養実験で形成されたノジュールを培養皿ごとの撮影あるいは動脈硬化の石灰化部位・肥厚部位の撮影に成功した。しかも、動脈硬化標本を使って半側を直接像撮影、半側を位相コントラスト撮影の同時記録にも成功した。

LEBRA-PXR を回折実験に応用する実験では、自然鉱物の石英とアパタイト、単結晶のグラファイトなどを用いて行い、ほぼ期待通りの結果を得ることが出来た。今後、より非晶質的な物質の構造解析へ進む準備が出来た。

一方で、LEBRA は加速器を使った自由電子レーザー（FEL）も提供できるようになった。LEBRA-FEL の波長可変特性を利用して、歯の硬組織に対するレーザーアブレーションを実験した。その結果、従来から歯の治療に用いられてきている Er:YAG レーザーの波長（2.94 μm ）あたりで最大の切削効果を見せた。しかし、詳細な実験・検討を加えたところ、エナメル質と象牙質では最大切削効果の現れる波長にわずかな違いがあり、組織特異性が考えられた。これは従来のレーザーアブレーション効果は水分の微小爆発によるという考えに修正をする必要がある。また、LEBRA-FEL では Er:YAG レーザー照射で形成される熱的変性物は認められなかった。このことから、医療用レーザーの開発研究にこの LEBRA-FEL は大いに貢献できると考える。

研究課題名：生体高分子タンパク質 X 線構造解析

研究代表者：宍倉 文夫（日本大学医学部）

研究従事者：桑田 隆生（日本大学大学院総合科学研究科）

宍倉 文夫（日本大学医学部）

共同研究者：高木 尚（東北大学大学院生命科学研究科）

桑田 隆生（日本大学大学院総合科学研究科）

杉田 博昭（筑波大学生物科学系）

鈴木 知彦（高知大学理学部）

竹内 浩昭（静岡大学理学部）

長井 孝紀（慶応大学医学部）

長谷川 智一（ファルマ・アクセス株式会社）

【総括】

学術フロンティア推進事業（継続）期間中に当該研究テーマで実施された研究と成果は、次の2項目に総括できる。

1. タンパク質 X 線結晶構造解析の実施とその成果：

1-1 節足動物昆虫綱双翅目のユスリカ幼虫（アカムシ）ヘモグロビン（Hb）の立体構造解析。

東北大学大学院生命科学研究科の高木尚教授と共同研究を行い、アカムシから精製した2種類のHb（VとVII）のX線結晶構造を解析し、それぞれの構造モデルを完成させた（公表）。

1-2 脊椎動物両生綱有尾目のアホロートルHbの一次構造解析。

静岡大学理学部竹内浩昭准教授並び慶応大学医学部長井孝紀教授と共同研究を行い、アホロートルから2種類のHb（Hb MとHb m）を精製してそれぞれのHbを構成するグロビタンパク質（ α^M , α^m , β は共通）の一次構造を明らかにした（公表）。X線結晶構造解析研究を実施するため、Hb MとHb mの結晶化を進めている。

1-3 脊椎動物爬虫綱カメ目の曲頸類Hbの一次構造解析。

曲頸類の現生種は5属25種類である。そのうち、4属4種類から2種類のHb（Hb AとHb D）を精製した。それぞれのHbから3種類（ α^A , α^D , β は共通）のグロビタンパク質を精製し、一次構造（12種類のグロビタンパク質）を明らかにした（ポスター発表）。研究に使用した曲頸類のカメ4種類は：*Pelomedusa subrufa*, *Pelusios subniger*, *Erymnochelys madagascariensis* と *Podocnemis unifilis* である。

1-4 脊椎動物爬虫綱カメ目の曲頸類 *Podocnemis unifilis*（モンキヨコクビガメ）・Hbの立体構造解析。

曲頸類 *P. unifilis*・Hb Aの結晶化に成功し、ファルマ・アクセス社の長谷川智一博士と共同研究を実施している。現在、Hb Aの立体構造のモデル化を完了した。さらに、CO-HbA（一酸化炭素化Hb）の結晶化に成功し、X線回折実験を進めている。

2. 国内及び国際的に研究活動を実施できる研究支援及び研究体制の形成：学術フロンティア推進事業（2000－2004）で立ち上げた生体高分子 X 線構造解析実験室を利用する実働グループが同継続研究期間内に国内・国外の研究施設と連携して共同研究できる体制作りを進めた。

2-1 イギリス Diamond Light Source, Ltd および Imperial College of London の岩田想教授との連携。

2-2 欧州放射光施設 The European Synchrotron Radiation Facility の Dr. Sean McSweeney 教授との連携。

2-3 文部科学省高エネルギー研究機構（KEK）と日本大学は3年間（2007年度－2009年度）の共同研究

を締結した。その中で、日本大学側共同研究員として当該 X 線構造解析グループも参加し、KEK の Photon Factory（若槻壮市教授）と共同研究を進めている。

2-4 ファルマ・アクセス株式会社の長谷川智一博士と共同研究の実施と連携。X 線回折実験から構造の精密化に至る解析手法には同時代の高度なコンピュータ科学を基盤とした当該分野の専門知識が必須となっている。そこで、当該分野における高度な解析手法を導入するため、ファルマ・アクセス（株）の長谷川智一博士と連携して共同研究を実施している。

上記 2-1 と 2-2 は当該グループの代表者（宍倉文夫）が 2006 年（夏期）に日本大学より海外研究員としてヨーロッパ放射光施設に派遣された。その折、Imperial College of London の岩田想教授（Diamond Light Source Ltd のフェロー兼任）ならび ESRF の Dr. Sean McSweeney 教授に当該施設の X 線結晶構造解析グループ（学術フロンティアで立ち上げた）に支援を要請した。これらのことが契機となって、当該グループは国内・国外の放射光施設との連携を進めることができるようになり、今後の当該施設の発展が期待できる。

研究課題名：節足動物における酸素運搬蛋白質ヘモシアニンの構造生物学的研究

研究代表者：桑田 隆生（日本大学大学院総合科学研究科）

共同研究者：宍倉 文夫（日本大学医学部）

長谷川 智一（ファルマアクセス株式会社）

杉田 博昭（筑波大学生命環境科学研究科）

【総括】

日本大学電子線利用研究施設では、平成 14 年度学術フロンティア推進事業の支援を受け、X 線結晶構造解析法に基づく蛋白質の構造生物学的研究を実施するための機器設備の導入、研究環境の整備を進めると共に、学内外の研究者からなる研究グループ(生体高分子構造解析グループ:代表、日本大学医学部宍倉文夫)を組織し、生体の必須蛋白質である酸素運搬蛋白質ヘモグロビンの立体構造解析を行ってきた。さらに本推進事業継続期間(平成 17 年度以降)では研究環境の整備を引き続き進めると共に、解析対象を酸素運搬蛋白質全般に広げ研究活動を進めてきた。本研究課題はその一環として節足動物の酸素運搬蛋白質ヘモシアニン(Hcy)の立体構造の解明を目的とし、平成 19 年度より新たな課題として研究を開始したものである。

節足動物 Hcy は銅を含む酸素運搬蛋白質であり、分子量約 75K のサブユニット蛋白質が 6 量体を形成し、さらにそれらが会合した多重 6 量体として生体中に存在している。Hcy 及びその相同蛋白質は節足動物各分類群に広く存在しており、各動物の進化過程において遺伝子重複を繰り返し、機能の多様化さらには機能分化と複雑な分子進化過程を経てきたと考えられている。Hcy 立体構造の解析、その構造変化過程の解明は、機能蛋白質の分子進化とそれに伴う立体構造の変化を知る上で重要な知見をもたらすものと期待できる。しかし、Hcy に関する構造生物学的な知見は極めて貧弱であり、数例の立体構造に関する報告はあるものの、酸素結合解離に伴う構造変化といった基本的な情報すら定かではない。さらに、生体中の基本的な機能単位である Hcy6 量体の立体構造については、その解析を試みた例はあるものの、未だその詳細を解明するには至っていない。そこで本研究課題では分子進化過程における Hcy の機能・構造変化の解明に向けた基礎的研究として、Hcy の生体中の基本単位であるサブユニット 6 量体の立体構造の決定を試みた。

カプトガニ Hcy を対象とした結晶化では、結晶化条件の探索の結果、脱酸素型 Hcy の単結晶を成長させることに成功した。また、作成した結晶を用いた X 線回折実験によって得られた回折データを解析すると、格子定数は最長辺で 300 Å を超えるものと予想される。加えて空間群の情報等を検討すると、非対称単位に 5~10 の Hcy サブユニットが存在すると見積もられ、Hcy の生理的な特徴などを合わせて考えると、作成した結晶内で Hcy は 6 量体を形成していることが明らかとなった。しかし、これまでのところ、4 Å 程度の分解能までの X 線回折パターンしか得られず結晶構造の決定に必要な良質な回折データを収集するには至っておらず、これは結晶内で Hcy 6 量体が不安定性による結果であることが予想された。

この様に本研究課題は、その序についた段階であるが、1) Hcy6 量体の結晶化条件の最適化、2) Hcy 結晶を用いた X 線回折実験における各種条件の最適化、など、今後の Hcy の立体構造解明に必要な実験上の問題を解決するに到った。今後、本研究を進めることにより、Hcy のみならず各種機能蛋白質の機能、構造上の変化過程を知る上で非常に重要な成果を得られることが期待できる。

研究課題名：ピロールイミダゾールポリアミドによる分子イメージングの開発研究

研究代表者：福田 昇（日本大学大学院総合科学研究科生命科学）

研究従事者：永瀬 浩喜（日本大学大学院総合科学研究科生命科学）

松本 宜明（日本大学薬学部臨床薬剤学）

奥畑 好孝（日本大学医学部放射線医学）

平野 大作（日本大学医学部泌尿器科学）

上野 高浩（日本大学医学部内科学）

池田 友紀博（日本大学大学院総合科学研究科生命科学）

【総括】

ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは塩基配列特異的に2本鎖DNAに強力に結合する新規低分子有機化合物で、我々はFmoc自働合成を開発、特許化し創薬開発している。今回の研究目的は、PIポリアミドを神経芽腫で増幅しているN-Myc遺伝子、また原発性アルドステロン症の腺腫の特異的遺伝子を検索し決定した後、これらの遺伝子発現を特異的に認識し抑制するPIポリアミドを分子設計および合成し、分子イメージングの遺伝子プローブとして開発する事である。

研究内容はPIポリアミドの遺伝子プローブとして薬物動態を検討するため、HPLC-UVでの検量法を確立し、ラット血清での減衰から通常の薬物と同様な動態を確認し、薬用量をラットに連続投与して体重、摂餌量、血圧などを検討し安全性を確認した。ターゲット遺伝子への特異的結合はゲルシフトアッセイ、BioCoreアッセイで、転写因子と同等の結合力を確認した。分子イメージングの開発は遺伝子プローブとしてPIポリアミドが¹⁹FおよびPBrラベルが可能であることを確認した。神経芽腫の分子イメージングとしてN-Mycに対するPIポリアミドを分子設計、合成した。現在、神経芽腫細胞NB-9の培養系でN-myc遺伝子の増幅を確認し、N-myc mRNA発現に対するPIポリアミドの抑制作用を確認した。原発性アルドステロン症の特異的遺伝子に対するPIポリアミドによる分子イメージング開発のため、泌尿器科での腺腫組織において特異的遺伝子の検索をRT-PCRとTOF-Mass解析で行い、特異的遺伝子を絞り込んでいる。

PIポリアミドを疾患のターゲット遺伝子の遺伝子プローブとして分子イメージングの開発プロジェクトは未だ始まったばかりであり、現在ターゲット遺伝子への特異的結合、アルドステロン症腺腫の特異的遺伝子の検索を行っており、最終目的の分子イメージングの確立を目指す。今後は基礎研究から、¹⁹FラベルPIポリアミドのMRI、PBrラベルPIポリアミドのPETでの検出法の画像技術開発を行いながら、PIポリアミドの全身投与での副作用の検討のため、大動物を用いて、大量安全性試験、反復毒性試験などを行う。さらに臨床応用のため、開発PIポリアミドの暫定規格試験、GMP開発を経て医学部で臨床試験に臨む。

研究課題名：自由電子レーザーの波長の違いが歯質に与える影響

研究代表者：池見 宅司（日本大学松戸歯学部）

研究従事者：神谷 直孝（日本大学松戸歯学部）

岩井 啓寿（日本大学日本大学大学院松戸歯学研究科）

【総括】

歯科診療に用いられている市販 Er : YAG レーザー（波長 $2.94 \mu\text{m}$ ）と同一波長とした FEL について、エナメル質あるいは象牙質蒸散能を比較し、削除深さ、削除後の組織形態について検討することを目的として実験を行った。その結果、照射エネルギーを 150mJ でパルス数 5pps とした Er : YAG レーザーと平均照射エネルギー 7.5mJ で 2pps とした FEL では、FEL において照射エネルギーが $1/500$ と極端に低いにも関わらず、エナメル質と象牙質の削除深さが Er : YAG レーザーよりも深く効率的に研削されることが判明した。照射後の組織形態は、Er : YAG レーザーにおいて両被照射体は熱が作用したと考えられる組織像を示したが、FEL では熱の作用が認められないシャープな削除面が得られていた。それらの違いの理由として、パルス幅の大きさの違いが挙げられる。パルス幅は Er : YAG レーザーで数百マイクロ sec とされ、本 FEL では 1 ピコ sec 以下の超短パルスとされており、 1 パルス当たりのエネルギーは約 10^6 程度大きくなるものと推測され、パルス数が少ないことから熱の蓄積も少なく、その影響がレーザーの違いとして被照射面に現れたものと考えられた。これまで、各種レーザーの使用用途等については、波長依存性だけが大きく取り上げられていたが、本実験を通して、レーザーの被照射体に与える影響は波長依存性だけでなく、 1 パルス当たりのエネルギーについて考慮する必要性が判明した。

今日の歯科医療では、齲蝕となった罹患象牙質をいかに効率的に削除して、健全象牙質を残すかという minimal intervention の考え方、術式が重要視されている。そこで、市販の歯科用 Er : YAG レーザーを使用して、象牙質に対するレーザー照射と蒸散能について検討した結果、象牙質の蒸散深さは総照射エネルギー量より 1 パルス当たりの照射エネルギーに強く依存するものと思われた。このことから、照射エネルギーが低い場合には、照射時間を延長しても効率の良い蒸散は得られないものと考えられた。健全象牙質試料における、 1 パルス当たりの照射エネルギーと蒸散深さの関係は、総照射エネルギー量を同一にした条件で回帰直線 $y=1.3x+141$ 、照射時間を 10sec と一定にした条件では $y=1.4x+119$ となり、両者とも相関係数 $r^2=0.98$ と良好な相関を示し、蒸散深さの予測ができる可能性が示された。照射時間を 10sec と一定にした条件の齲蝕象牙質試料では 56mJ/pulse 以上の照射エネルギーで蒸散深さが急増して 112mJ/pulse までは約 $240\sim 290 \mu\text{m}$ の深さを示し、その間の照射エネルギーでは安定した蒸散深さが得られるものと考えられた。また、蒸散深さは $56\sim 84\text{mJ/pulse}$ の範囲で健全象牙質試料よりも増大していた。XRD の結果から、健全、齲蝕象牙質試料ともにレーザー照射により結晶性が向上する傾向を示した。齲蝕象牙質試料に関して、低い照射エネルギーでは熱変性したコラーゲン線維等の有機質が多く存在しているものと考えられ、照射エネルギーを高くするにしたがって蒸散深さが深くなり、分析領域内に存在するハイドロキシアパタイトの比率が高くなることで XRD の回折パターンに変化を生じたものと思われた。

これらの知見は、歯科医療に Er : YAG レーザーを応用する際の基礎的な情報が得られただけでなく、今後、FEL を歯科医療応用に関する有用性が示された。

研究課題名：石灰巣の PXR による解析

研究代表者：高橋 元一郎（日本大学医学部）

研究従事者：齋藤 勉（日本大学医学部）

古橋 哲（日本大学医学部）

前林 俊也（日本大学医学部）

【総括】

目的： 乳癌検査に用いられる乳房 X 線検査（mammography, MMG）の診断は主に腫瘍と石灰巣の読影から成り立っている。とくに微細な石灰巣は早期の乳癌の診断や進展範囲を知るうえで重要である。parametric X ray (PXR)の単色性を生かして低いエネルギーの X 線で撮影すると高コントラストの画像となる。また PXR beam の平行性を生かすと空間分解能のよい詳細な画像となる。これらの特性を有した PXR を用いた乳房石灰巣の詳細な乳房画像検査法の研究が数施設で試みられている。われわれも PXR の特性を生かした最適画像撮像法を確立するため研究を行っている。

成果： 放射光からの PXR を撮影するための標本作製と撮影用の固定具を試作した。ついで歯科用インスタントフィルム、MMG 用 X 線フィルム、MMG 用 imaging plate で X 線テストチャートおよび石灰巣を有する標本を 2 種類のエネルギーの PXR で撮影した。また MMG 撮影装置を用い MMG 用 X 線フィルム、MMG 用 imaging plate、4 種類の非破壊検査用フィルム（IX-20, 50, 100, 150）で X 線テストチャートおよび石灰巣を有する標本を撮影した。

この結果、非破壊検査用フィルム（IX-20, 50, 100, 150）は医療用のフィルムに比べ詳細な像が得られた。詳細に画像を比較するには非破壊検査用フィルムが不可欠であった。しかし、X 線に対する感度が低く LEBRA の PXR では長時間（数時間から 10 数時間）の曝射でないと撮影ができないことがわかった。

LEBRA の PXR では出力が低いいため臨床に応用できるような画像を得ることは困難である。したがって、画像撮像法の基礎となる研究を行い将来の臨床画像の基とすることにした。人体に多くある脂肪、水分、筋肉などの鮮明に描出や、それらの中に存在する病変となる石灰巣や金属などの画像の鮮明に描出が可能な条件を検出することとした。

以下の実験計画を立て研究中である。

- ①. 撮影装置の作製： LEBRA の PXR 発生装置は水平ビームなので、長時間の撮影には精度の高い固定具が必要となる。試作した固定具を改良して本格的な固定具を作る。
- ②. 標本の作製： 脂肪、水分、筋肉、石灰巣や金属あるいはその代用物などの標本をできるだけ薄くし短時間で撮影が可能なものを作る。
- ③. 位相コントラスト撮影法の確立： 標本のもっともコントラストのよい画像が得られる方法を imaging plate などを用いて検討する。