

岡山理科大学紀要

第 50 号 A

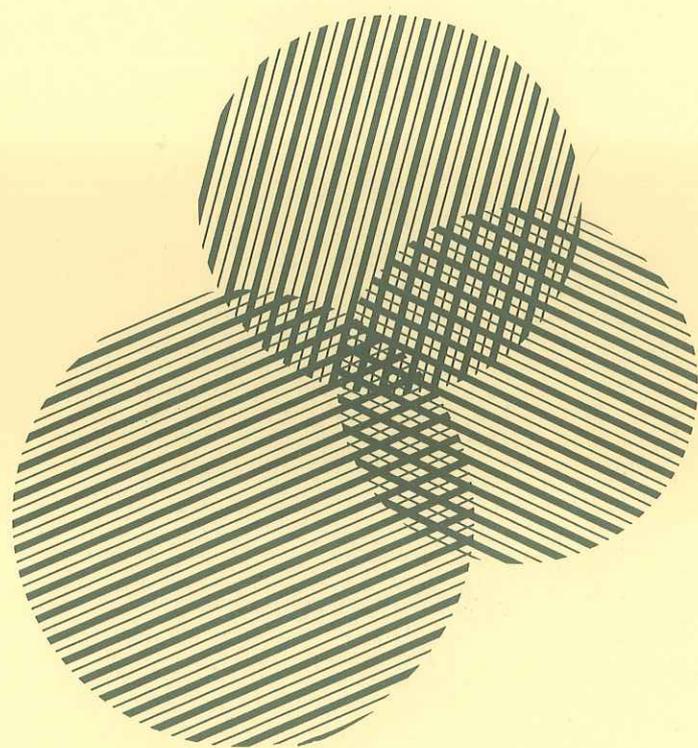
自然 科学



2014

岡山理科大学

岡山理科大学紀要



2014

岡山理科大学

第 50 号 A

自然科学

目 次

【数 学】

- 四丸直人, 高嶋恵三: a^n の先頭桁の問題に対する χ^2 検定の応用 1
- 須藤清一, 安原孝典: A planarity condition of chord diagrams for graphs with bridges 9

【化 学】

- 竹田邦雄: 界面活性剤によるタンパク質の構造変化 —— 界面活性剤とともに40年余 —— 13
- 横山 崇, 白石優太, 多田啓司, 増田和香子, 杉山正明, 前川 旭, 善木道雄: Capillary zone electrophoretic separation of carbon microparticles 23
- 小嶋健博: 天然酵素ペルオキシダーゼ触媒活性を持つ備前焼と鉄さびによる過酸化水素とグルコースの検出に関する研究 33

【生 物 学】

- 小川真実, 坂本祐介, 小川琢未, 松尾由美, 橋川成美, 橋川直也: ニコチン投与とうつ様行動の関係性の解明 37
- 小林博昭: Identification of red rice (*Oryza sativa* 'Akamai') cultivated in paddy fields in Tsushima, Kyusyu, Japan —— Plant opal analysis of tubercle forms developed from upper epidermal cells of red rice hulls —— 41

【地学・地球物理学】

- 澤 夏起, 佐藤丈晴, 西村敬一: 東北地方太平洋沖地震による西日本の地殻変動について 45

【機械・制御工学】

- 下岡 綜, 堂田周治郎, 赤木徹也, 守分善法: 低コスト圧力制御型疑似サーボ弁の性能評価と応用 55
- 大野 歩, 赤木徹也, 堂田周治郎, アブドル ナシル: チューブの屈曲を利用した低コストサーボ弁の静特性の改善 61
- 松井保子, 赤木徹也, 堂田周治郎: 柔軟球面アクチュエータを用いた可搬型リハビリ機器の試作と制御 67
- 森本貴文, 赤木徹也, 堂田周治郎, ムハマド アリフ: バックドライバビリティを有する空気圧駆動柔軟ロボットアームの試作 73

【化学工学】

- 宮原敏郎, 永谷尚紀, 三橋久実, 藤田佳江: 細胞状泡沫層の安定性に及ぼす混合アルコール添加の影響 79

No. 50 A
NATURAL SCIENCES

CONTENTS

[Mathematics]

- SHIMARU, N., TAKASHIMA, K. : Application of χ^2 test to the problem of leading digits of a^n 1
SUTO, K., YASUHARA, T. : A planarity condition of chord diagrams for graphs with bridges 9

[Chemistry]

- TAKEDA, K. : Structural Changes of Proteins by Surfactants 13
YOKOYAMA, T., SHIRAISHI, Y., TADA, K., MASUDA, W., SUGIYAMA, M., MAEKAWA, A.,
ZENKI, M. : Capillary zone electrophoretic separation of carbon microparticles 23
KOJIMA, T. : Peroxidase-like Activity of Bizenyaki and Iron Corrosion and its Applications in H₂O₂ and
Glucose Detection 33

[Biology]

- OGAWA, M., SAKAMOTO, Y., OGAWA, T., MATSUO, Y., HASHIKAWA, N., HASHIKAWA, N. :
Relationship between nicotine administration and depression-like behavior 37
KOBAYASHI, H. : Identification of red rice (*Oryza sativa* 'Akamai') cultivated in paddy fields in Tsushima,
Kyusyu, Japan — Plant opal analysis of tubercle forms developed from upper epidermal cells of
red rice hulls — 41

[Earth Science • Geophysics]

- SAWA, N., SATO, T., NISHIMURA, K. : Coseismic crustal movement in west Japan caused by the 2011 off
Pacific coast of Tohoku Earthquake 45

[Mechanical Engineering • Control Engineering]

- SHIMOOKA, S., DOHTA, S., AKAGI, T., MORIWAKE, Y. : Estimation and Application of Low-cost
Pressure Control Type Quasi-servo Valve 55
ONO, A., AKAGI, T., DOHTA, S., NASIR, A. : Improvement of Static Characteristics of Low-cost Servo
Valve Using Buckled Tube 61
MATSUI, Y., AKAGI, T., DOHTA, S. : Development and Control of Portable Rehabilitation Device Using
Flexible Spherical Actuator 67
MORIMOTO, T., AKAGI, T., DOHTA, S., ALIFF, M. : Development of Pneumatic Drive Flexible Robot
Arm with Backdrivability 73

[Chemical Engineering]

- MIYAHARA, T., NAGATANI, N., MIHASHI, K., FUJITA, K. : Effect of Addition of Mixed Alcohol on
Stability of Cellular Foam 79

a^n の先頭桁の問題に対する χ^2 検定の応用

四丸直人・高嶋恵三

岡山理科大学理学研究科応用数学専攻

岡山理科大学理学部応用数学科

(2014年9月22日受付、2014年11月6日受理)

1 導入と背景

自然数 a に対して 10 進法で a^n を表示する場合、 a が 10 のべき乗でない限り a^n の先頭桁の数字には、1 から 9 までの数字が出現する。 a^n の先頭桁の数字を自然数 k ($1 \leq k \leq 9$) とすると、

$$k \times 10^{\ell-1} \leq a^n < (k+1) \times 10^{\ell-1}$$

が成立する。これは、

$$\log_{10} k \leq n \log_{10} a \pmod{1} < \log_{10}(k+1)$$

と同値である。ここで、 $x \pmod{1}$ は実数 x の小数部分を表す (cf. [1])。H.Weyl ([8]) により、無理数列 $\{n \log_{10} a \pmod{1}\}_{n>0}$ は漸近的に $[0, 1)$ 上一様分布することが知られている。これと上の不等式より、次の結果

$$\frac{\#\{m; a^m \text{の先頭桁} = k, m \leq n\}}{n} \xrightarrow{n \rightarrow \infty} \log_{10}(k+1) - \log_{10} k$$

が容易に得られる。ここで、 $\#A$ は集合 A の要素の数を表す。この事実より、先頭桁の数字の経験分布と極限分布の「近さ」を χ^2 検定で測る問題が考えられ、高嶋・小谷 ([6]) の報告がある。彼らは $a=7$ の場合について一つの peak を持った「丘」が繰り返されることを報告している。

本報告では高嶋・小谷 ([6]) の議論を発展させ、 $\log_{10} a$ の連分数展開との関係を明らかにし、さらに、 $a=7$ だけでなく $a=33$, $a=54$ の場合についても、 $a=7$ の場合とは異なる形の「丘」が繰り返されることを報告し、それらの数値計算の結果について報告する。その際、この「丘」がその高さを減じながら繰り返し出現するという現象は、 $\log_{10} a$ の連分数展開の中に出現する、大きな孤立した部分分母 a_{η} に深く関係し、その部分分母までによる近似分数 p_{η}/q_{η} の分母の大きさ q_{η} が、繰り返しの「周期」にほぼ等しいこと、および、その大きな孤立した部分分母の 1 つ前までの近似分数 $p_{\eta-1}/q_{\eta-1}$ の分母 $q_{\eta-1}$ の step 毎に χ^2 検定の値の変化を見ることにより、グラフの形の概略を見ることができると報告する。

2 無理数回転と $\log_{10} a$ の連分数展開について

上記の述べたように、 a^n の先頭桁の数字の問題は、 $n \log_{10} a$ の挙動の問題でもある。実数 $\alpha (> 0)$ による無理数回転 $R_{\alpha}(x) = x + \alpha \pmod{1}$ を考える。また、実数 $\alpha (< 1)$ の連分数展開を Drmota and Tichy ([2])

に従って、以下のように表記することにする。

$$\alpha = \frac{1}{a_1 + \frac{1}{a_2 + \frac{1}{a_3 + \frac{1}{a_4 + \frac{1}{a_5 + \frac{1}{a_6 + \frac{1}{a_7 + \frac{1}{a_8 + \frac{1}{a_9 + \dots}}}}}}}}}}$$

このとき、実数 α は以下のようにして定まる有理数 $r_n = \frac{p_n}{q_n}$ によって非常によく近似されることが分かっている (cf. [3]) :

$$p_0 = 0, p_1 = 1, p_{n+1} = a_{n+1}p_n + p_{n-1},$$

$$q_0 = 1, q_1 = a_1, q_{n+1} = a_{n+1}q_n + q_{n-1},$$

$$|\alpha - r_n| < \frac{1}{q_n q_{n+1}}.$$

特に、 $a = 7$ の場合、 $\log_{10} 7$ の連分数展開は以下の通りである :

$$\log_{10} 7 = \frac{1}{1 + \frac{1}{5 + \frac{1}{2 + \frac{1}{5 + \frac{1}{6 + \frac{1}{1 + \frac{1}{4813 + \frac{1}{1 + \frac{1}{1 + \dots}}}}}}}}}}$$

この場合のように、連分数展開の部分分母 a_n に、非常に大きな値が出現する場合は (上記の例では $a_7 = 4813$)、 $q_6 = 510$, $q_7 = 2455069$, $q_8 = 2455579$ となり、無理数回転 $R_\alpha^n = n\alpha \pmod{1}$ ($\alpha = \log_{10} 7$) は有理数回転 $n \times r_6 = n \times \frac{431}{510} \pmod{1}$ で非常によく近似されることが分かる :

$$|\log_{10} 7 - r_6| = \left| \log_{10} 7 - \frac{431}{510} \right| < \frac{1}{510 \times 2455069}.$$

以下では、このような孤立した、大きな部分分母を a_η と表すことにする。即ち、 $\eta = 7$ である。

3 χ^2 検定とその数値計算の結果

a^n の先頭桁の数字の経験分布とその極限分布との差を測る道具として、統計学で「適合度の検定」として有名な χ^2 検定を考える。

数字 k ($k = 1, 2, \dots, 9$) の観測度数 $O_k(n) = O_k$ は次のように定義される :

$$O_k = \#\{m; a^m \text{ の先頭桁の数字} = k, 1 \leq m \leq n\}.$$

また、期待度数 $E_k(n) = E_k$ は

$$E_k = n \times (\log_{10}(k+1) - \log_{10} k) = n \times \log_{10} \left(1 + \frac{1}{k} \right)$$

で与えられる。この時、 χ^2 検定の検定値 $\chi_0^2(n) = \chi_0^2$ は次で与えられる：

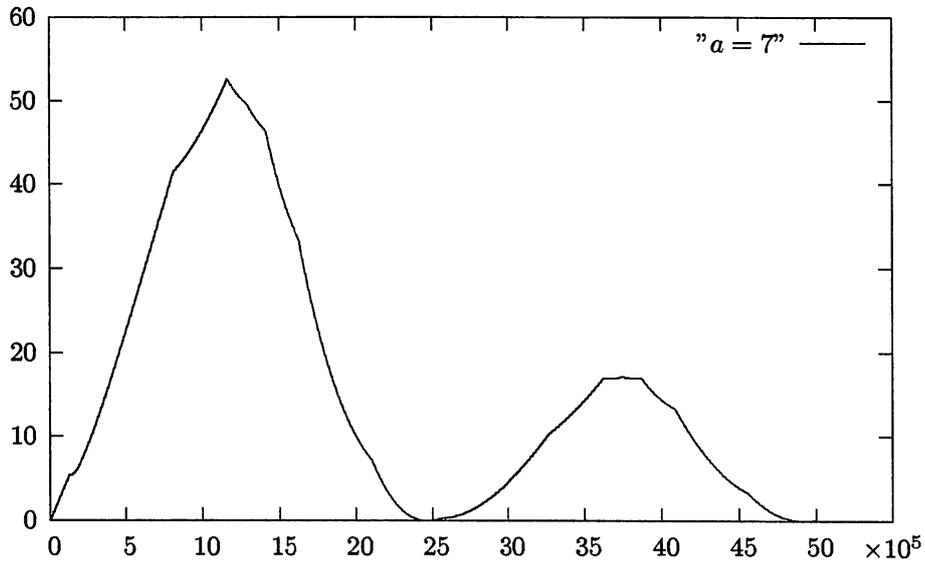
$$\chi_0^2(n) = \chi_0^2 = \sum_{k=1}^9 \frac{(O_k(n) - E_k(n))^2}{E_k(n)} = \sum_{k=1}^9 \frac{(O_k - E_k)^2}{E_k} .$$

この χ^2 検定の自由度は $8(=9-1)$ である。

3.1 $a = 7$ の場合の数値計算結果

Fig.1 に示されるように、 $a = 7$ の場合、グラフ上、一つの peak を持つ「丘」の繰り返しが見られ、それぞれの「谷」の間隔は $q_7 = 2455069$ であり、最初の谷 $q_7 = 2455069$ と $q_8 = 2455579$ の間は、「やや広い」谷間になっており、その幅は $q_6 = 510$ に等しくなっている。高嶋・小谷 ([6]) で報告されたように、このような一定の幅 ($q_7 = 2455069$) を持った「丘」と「谷」が暫くは繰り返される。ここで、 $\log_{10} 7$ の $r_6 = \frac{431}{510}$ の近似の議論から、 χ^2 検定値のグラフを $\text{step } q_6 = 510$ で表示することの重要性が分かる。また、数値計算

Fig.1 $a = 7, n = 5,000,000, \text{ step} = 510$

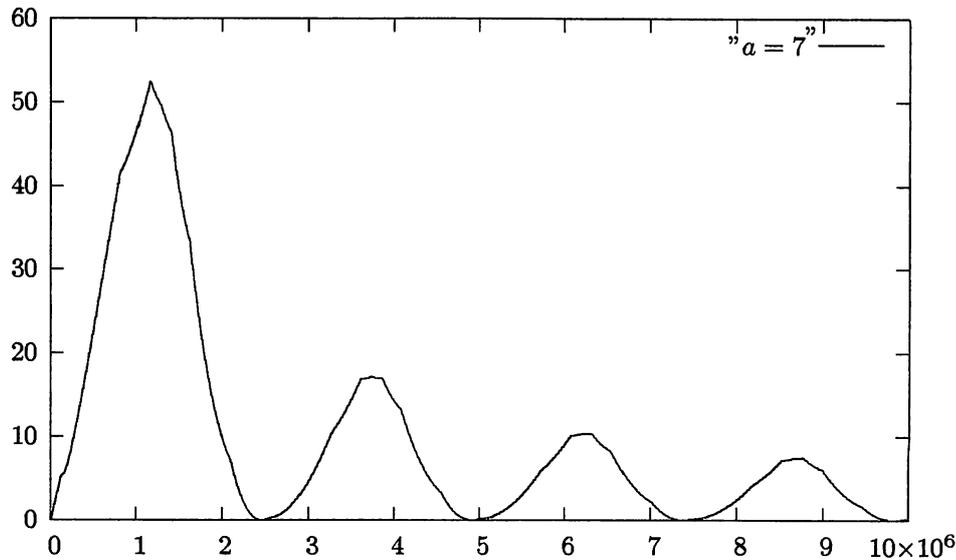


の結果では $\chi_0^2(n)$ の最大値は n が約 1,200,00 程の所で、その値は 52 以上となっている。自由度 8 の χ^2 検定でその検定値が 52 を超える確率は概ね 100,000,000 分の 2 程度である。

3.2 $a = 33$ と $a = 54$ の場合

まず、 $a = 33$ の場合、 $\log_{10} 33 - 1$ の連分数展開は以下のようになる：

$$\log_{10} 33 - 1 = \frac{1}{1 + \frac{1}{1 + \frac{1}{13 + \frac{1}{299 + \frac{1}{1 + \frac{1}{1 + \frac{1}{10 + \frac{1}{1 + \frac{1}{14 + \dots}}}}}}}}}} .$$

Fig.1a $a = 7$, $n = 10,000,000$, $\text{step} = 510$ 

この展開の結果より、 $a_4 = 299$, $r_3 = \frac{14}{27}$, $r_4 = \frac{4187}{8075}$, $q_3 = 27$, $q_4 = 8075$ であり、 $a = 7$ の場合と同様の議論が有効であることが分かる。しかし、Fig.2 で明示されているように $a = 33$ の場合のグラフは、明らかに 2つの peak を持った「丘」の繰り返しである。このことは $a = 7$ の場合と明確な差異であるが、今後の課題とする。

次に、 $a = 54$ の場合は $\log_{10} 54 - 1$ の連分数展開は以下ようになる：

$$\log_{10} 54 - 1 = \frac{1}{1 + \frac{1}{2 + \frac{1}{1 + \frac{1}{2 + \frac{1}{1 + \frac{1}{3 + \frac{1}{1 + \frac{1}{326 + \frac{1}{2 + \dots}}}}}}}}}} .$$

これより、 $q_7 = 71$, $a_8 = 326$, $q_8 = 23202$ であり、上記の $a = 7$, $a = 33$ の場合と同様の議論が適用できることが分かる。然しながら、Fig.3 に明らかなように、 χ_0^2 の値のグラフの概略はいずれの場合とも明確に異なることも分かる。

これらの例から分かるように、 a^n の先頭桁の数字の経験分布の漸近挙動を考える場合、 χ_0^2 の値を $\text{step } q_{\eta-1}$ 毎に考えることでグラフの概略を取り出すことができ、問題の本質的な差異を明確にできることが分かる。但し、ここで a_η は $\log_{10} a$ の連分数展開における非常に大きな部分分母であり、例えば、 $\log_{10} 7$ の場合、 $\eta = 7$, $\log_{10} 33$ の場合、 $\eta = 4$, $\log_{10} 54$ の場合、 $\eta = 8$ である。

連分数展開の一般理論より

$$r_2 < r_4 < \dots < r_{2n} = \frac{p_{2n}}{q_{2n}} < \dots < \alpha < \dots < r_{2n-1} = \frac{p_{2n-1}}{q_{2n-1}} < \dots < r_5 < r_3,$$

である。このことより無理数回転 $n \times \alpha$ の有理数回転については η が奇数であるか ($a = 7$ の場合)、偶数であるか ($a = 33$, $a = 54$ の場合) により近似の仕方が異なるが、議論そのものは自明な修正により同様に行えることも分かる。また、Fig.1, Fig.2, および Fig.3 より明らかに次のことが分かる：

Fig.2 $a = 33$, $n = 16,000$, $\text{step} = 27$

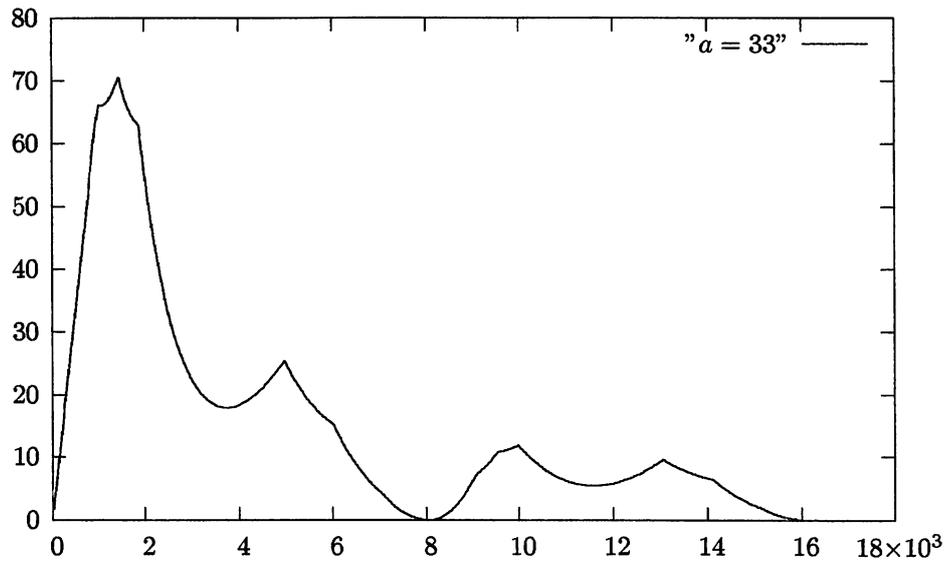
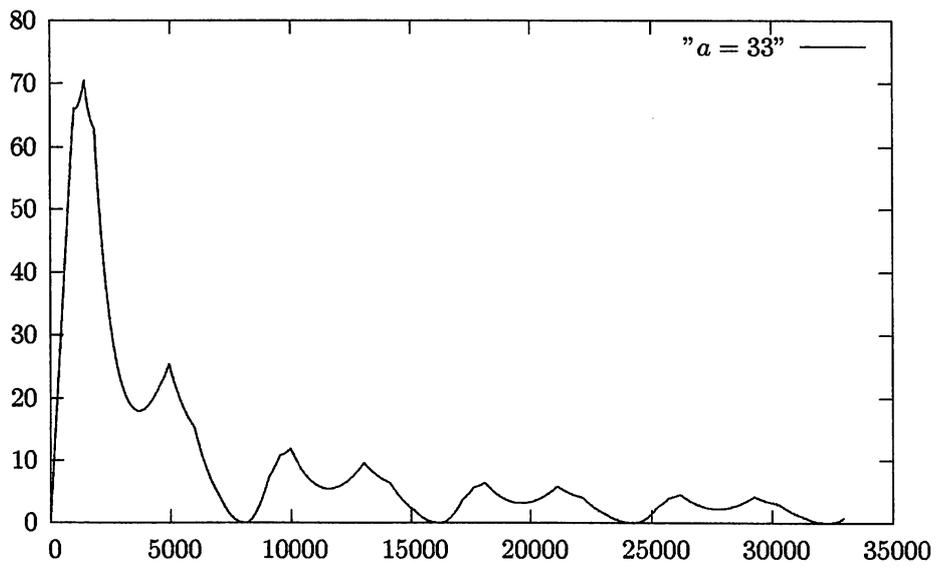


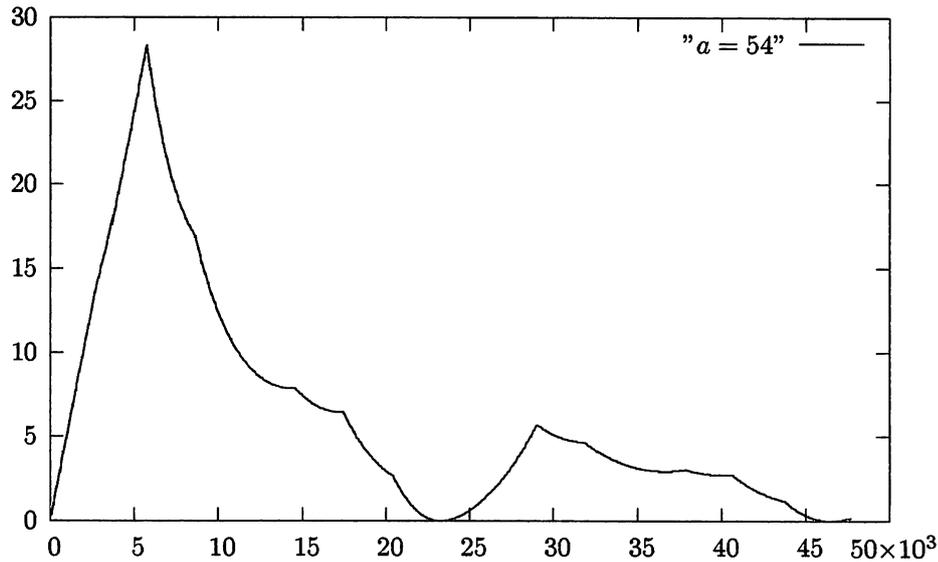
Fig.2a $a = 33$, $n = 33,000$, $\text{step} = 27$



$a = 7$ の場合は「丘」は1つの peak を持つが、 $a = 33$ の場合には「丘」は2つの peak を持つ。さらに、 $a = 54$ の場合には $a = 7, a = 33$ のいずれの場合とも異なる形の「丘」が繰り返される。

これらの議論の詳細については Mori and Takashima ([5]) に譲るが、そこでは、 $\log_{10} a$ の連分数展開の中に、孤立した大きな部分分母の出現することが重要であるだけでなく、各 $\log_{10} k$ ($k = 1, 2, \dots, 9$) と近似分数 $r_{\eta-1}$ の分母 $q_{\eta-1}$ から派生する分数 $j/q_{\eta-1}$ との関係が重要であることが示されている。これらの考察

Fig.3 $a = 54, n = 50,000, \text{step} = 71$

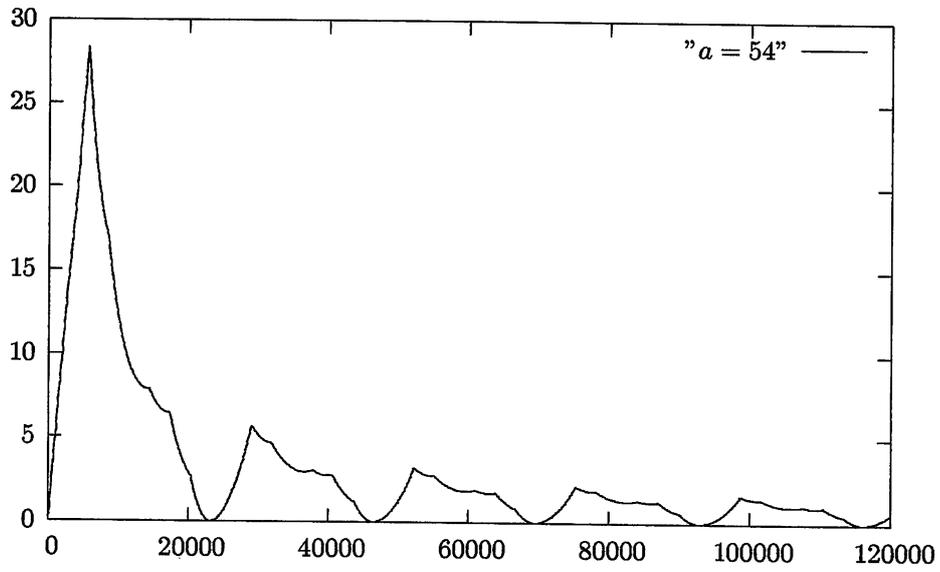


より、どの様な超越数 $\log_{10} a$ に対して、どのような形の「丘」が出現するのか、という問題が生ずるが、超越数 $\log_{10} k$ ($k = 1, 2, \dots, 9$ と $\log_{10} a$ の近似分数との関係が基本的な問題であるので極めて難しい問題であるといえ、今後の問題である。

References

- [1] Berger, A.: *Chaos and Chance*, Walter de Gruyter, Berlin, 2001.
- [2] Drmota, M. – Tichy, R. F.: *Sequences, Discrepancies and Applications*, Lecture Notes in Math. 1651, Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- [3] Hardy, G. H. – Wright, E. M.: *An Introduction to the Theory of Numbers*, 5th ed., Clarendon Press, Oxford, 1979.
- [4] Khinchin, A. Ya.: *Continued Fractions*, Dover Publications, New York, 1997.
- [5] Mori, Y. – Takashima, K.: *On χ^2 tests of leading digits of a^n , with $\log_{10} a$ having single isolated large partial quotient*, to be submitted to *Uniform Distribution Theory*.
- [6] 高嶋恵三、小谷真美: べき乗の先頭桁の数字について, 岡山理科大学紀要, **42 A** (2006), 7–11.
- [7] 高嶋恵三、長濱紗智、林紘: べき乗の先頭桁、無理数回転および連分数展開, 岡山理科大学紀要, **44 A** (2008), 9–13.

Fig.3a $a = 54$, $n = 120,000$, $\text{step} = 71$



[8] Weyl, H.: Über die Gleichverteilung von Zahlen mod. Eins, *Math. Ann.*, **77** (1916), 313–352.

Application of χ^2 test to the problem of leading digits of a^n

Shimaru, N, and Takashima, K.

*Department of Applied Mathematics,
Faculty of Science
Okayama University of Science
1-1, Ridai-cho, kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

(Received September 22, 2014; accepted November 6, 2014)

In this report, we discuss with the problem of leading digits of a^n , where a is a natural number, which is not equal to any power of 10. We report that in case that the common logarithm of a , $\log_{10} a$, has single isolated large partial quotient, graphs of χ^2 tests of the goodness of fits between empirical distributions of leading digit k 's and their limit distributions show very strange shapes and repetitions of "hills" and "valleys".

We give some explanations for these unusual phenomena by considering the continued fraction expansions of $\log_{10} a$ and their approximations by "rational numbers", derived their continued fraction expansions. We also report there are some different types of shapes of graphs, at least 3 types (cf. Fig.1 , fig.2 and fig.3), with one "peak" (in case of $a = 7$), with "two peaks" (in case of $a = 33$), and another shape (in case of $a = 53$).

Keywords: *leading digit, irrational rotation, χ^2 test, continued fraction expansion*

A planarity condition of chord diagrams for graphs with bridges

Kiyokazu Suto, Takanori Yasuhara *

Department of Applied Mathematics, Faculty of Science,

**Graduate School of Science,*

Okayama University of Science

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 29, 2014; accepted November 6, 2014)

Fleming and Mellor extended the notion of chord diagrams on circles to general graphs, and gave planarity conditions of them in various cases. We found a flaw in the proof of the case where the base graphs are directed and have bridges. We shall correct the proof, and give a similar condition in the non-directed case.

Keywords: graph; chord diagram; planarity.

Introduction

In [1], Fleming and Mellor extended the notion of chord diagrams on circles to general graphs, aiming to provide a new tool for spatial graph theory. One of the main goals of the article, is to discuss about planarity of chord diagrams for planar graphs. They gave some planarity conditions in various cases. We found a flaw in the proof of the case where the base graphs are directed and have bridges. In this article, we shall correct the proof, and show a condition for planarity of non-oriented chord diagrams for non directed graphs. Further we will discuss about the computational quantity to examine our condition.

1. Chord diagrams for graphs

Let $G = (E, V)$ be a graph with edge set E and vertex set V . In the definition below, we regard G as a one dimensional complex with the set E of one dimensional simplexes and with the set V of 0-dimensional simplexes.

A chord diagram $D = (C, \varepsilon)$ on G of degree n is a pair of n -elements set $C = \{c_1, \dots, c_n\}$, and a map ε of C into $2^{G \setminus V}$ where, for each $c \in C$, the image $\varepsilon(c)$ is two elements subset of $G \setminus V$. We call an element $c \in C$ a chord of D , and the elements in $\varepsilon(c)$ the endpoints of c . We further require that, for any $c, c' \in C$, if $c \neq c'$ then it holds that $\varepsilon(c) \cap \varepsilon(c') = \emptyset$.

When G is a directed graph, an oriented chord diagram D is a triplet (C, ε, σ) , where (C, ε) is the same as above, and σ is a map of $\cup_{c \in C} \varepsilon(c)$ into the set $\{-1, 1\}$. For $c \in C$, the two endpoints A and B of c is said to have the same orientation if $\sigma(A) = \sigma(B)$, or the opposite orientation otherwise.

These definitions are slightly different from those in [1], but essentially the same. If we take a loop (i.e. a graph with just one edge and just one vertex) as G , we obtain an equivalent for a classical chord diagram on a circle.

2. Intersection graphs of chord diagrams for graphs

Let $G = (E, V)$ be a graph which may be directed, D be a chord diagram on G . For a chord c of D , we denote by $P(c)$ the set of all non-directed paths in G which connect two endpoints of c .

Let c' be an another chord of D . If any paths $p \in P(c)$ and $p' \in P(c')$ overlap, but none of them properly

included in the another, we say that c and c' intersect. If D is a classical chord diagram on a loop G drawn in plane as line segments connecting points of a circle inside it, this definition indicates that c and c' geometrically intersect.

We consider a simple graph $\Gamma_G(D)$, the vertex set of which is the set of chords of D . Vertices c and c' of $\Gamma_G(D)$ are adjacent if and only if they intersect as chords of D . We call this graph the intersection graph of D .

3. Chord diagrams for planar graphs

From now on, we concentrate on chord diagrams for planar graphs.

Let G be a planar graph, D be a chord diagram for G , and f be an embedding of G into the plane \mathbb{R}^2 .

For a chord c of D with endpoints on edges e_1 and e_2 of G , we say that c respects f if the following conditions are satisfied:

- (1) The edges e_1 and e_2 lie on the boundary of a single region R of $f(G)$ (i.e. one of connected components of $\mathbb{R}^2 \setminus f(G)$).
- (2) This condition is required only when G is directed, D is oriented, and none of e_1 or e_2 is a bridge. If the above region R is on the same side of e_1 and e_2 with respect to the direction inherited from that of G , then the endpoints of c have opposite orientation. Otherwise the endpoints of c have the same orientation.

When G is directed and the edges e_1 and e_2 lie on the boundary of two different regions, any of the regions is always on the opposite side of each edge to the another region. So whether or not the condition (2) is satisfied, is independent from the choice of a region satisfying the condition (1).

If all chords of D respect f , we say that D respects f .

We now define a graph $\Gamma_G(D;f)$ resembling $\Gamma_G(D)$ but the adjacency condition is somewhat relaxed by using f . The vertex set of $\Gamma_G(D;f)$ is the set of chords of D . Vertices c and c' of $\Gamma_G(D;f)$ are adjacent if and only if, for any path p connecting the endpoints of c on the boundary of a single region of $f(G)$ and any path p' connecting the endpoints of c' on the boundary of a single region of $f(G)$, p and p' overlap, but none of them included in the another. We call $\Gamma_G(D;f)$ the intersection graph of G with respect to f .

If two chords are adjacent in $\Gamma_G(D)$, they are obviously adjacent in $\Gamma_G(D;f)$. Hence we can regard $\Gamma_G(D)$ as a subgraph of $\Gamma_G(D;f)$.

Let φ be an injective map φ from the set of chords of D onto a set of piecewise smooth curve segments in the plane \mathbb{R}^2 . We call φ embedding of D into the plane extending f , if φ satisfies the following three conditions:

- (1) For each chord c of D , $\varphi(c)$ is a curve inside a region of $f(G)$ connecting the images of endpoints of c by f .
- (2) For two different chords c and c' of D , $\varphi(c) \cap \varphi(c') = \emptyset$.
- (3) When G is directed and D is oriented, for any chord c of D , edges e_1 and e_2 in $f(G)$ on which endpoints of $\varphi(c)$ lie, and the region R inside which $\varphi(c)$ is, the endpoints of c have the opposite orientation if R is on the same side of e_1 and e_2 with respect to the directions inherited from G , or they have the same orientation otherwise.

4. Planarity of chord diagrams for planar graphs without bridges

In the case of the graph without bridge, we have the following planarity condition[1, Proposition 3]

Theorem 4.1. *Let G be a planar graph without bridges, f be an embedding of G into \mathbb{R}^2 , and D be a chord*

diagram for G . Then f extends to an embedding of D if and only if the following conditions are satisfied:

(1) D respects f .

(2) The chords of D are labeled by regions of $f(G)$ in such a way that:

- If a chord c of D is labeled by a region R of $f(G)$, the images of endpoints of c by f are on the boundary of R .
- For a region R of $f(G)$, if two chords c and c' of D are both labeled by R , then c and c' are not adjacent in $\Gamma_G(D; f)$.

Note that, although the above condition is restricted to the case where G is directed and D is oriented in [1], their proof is obviously applicative to the non-directed case.

5. Planarity of chord diagrams for planar graphs with bridges

As before, let G be a planar graph, f be an embedding of G into \mathbb{R}^2 , and D be a chord diagram for G .

For an edge e of G which is not a loop, by replacing e with two new edges e' and e'' connecting the same endpoints as e , we obtain a new graph. We denote by G_e the new graph, and call it the blowup of e in G . If G is directed, we give the same direction to the new edges as e .

For a subset S of the edge set of G , we denote by G_S the graph obtained by blowing up all the edges in S . It is obvious that f is naturally extended to an embedding of G_S into \mathbb{R}^2 . Let c be a chord of D , and k be the number of endpoints of c which lie on one of edges in S . If $k \geq 1$, we copy such endpoints to the newly added edges in G_S . We wish to add new chords to D connecting these new endpoints in the same manner as c . Though there are 2^k combinations of new endpoints which the new chords can connect, because of the requirement that all endpoints of chords must be different from each other, the combinations are divided to two groups, each of which contain 2^{k-1} pair of new possible endpoints. We choose one of the groups and replace c with new chords connecting the pairs of endpoints in the chosen group. When D is oriented, we give the same orientation to new endpoints as the original endpoints. We denote by $\beta(c)$ this chosen group when $k \geq 1$, and the pair of endpoints of c when $k = 0$. Repeating these choices for all chords, we obtain a new chord diagram. We denote it by D_S^β .

We consider a new graph $\overline{\Gamma_{G_S}(D_S^\beta; f)}$ containing the intersection graph $\Gamma_{G_S}(D_S^\beta; f)$ as a spanning subgraph.

Two chords c and c' of D_S^β are adjacent in $\overline{\Gamma_{G_S}(D_S^\beta; f)}$ if and only if they are adjacent in $\Gamma_{G_S}(D_S^\beta; f)$ or came from the same chord of D .

Taking the set of all the bridges of G as S , we obtain the following criterion for planarity of D .

Theorem 5.1. *Let G be a planar graph, f be an embedding of G into \mathbb{R}^2 , B be the set of all the bridges of G , D be a chord diagram for G , R_0 be the union of the regions inside two edges came from blowups of the elements in B , R_1 be the unbound region of $f(G_B)$, and R_2, \dots, R_n ($n \geq 2$) be all the bounded regions of $f(G_B)$ which are not included in R_0 . Then f extends to an embedding of D if and only if the following conditions are satisfied:*

(1) D respects f .

(2) There exists an above mentioned choice β for B such that the chords of D_B^β are labeled by R_0, R_1, \dots, R_n in such a way that:

- If a chord c of D_B^β is labeled by R_i , the images of endpoints of c are on the boundary of R_i .
- If two chords c and c' of D_B^β are both labeled by R_i , then c and c' are not adjacent in $\overline{\Gamma_{G_B}(D_B^\beta; f)}$.
- If two chords of D_B^β are came from one chord of D by blowing up of a bridge, one of them is labeled by R_0 , and the another is labeled by R_1 .

Proof. We first show the sufficiency. By removing all the chords labeled by R_0 from D_B^β , we obtain a chord diagram for G_B satisfying all the conditions in Theorem 4.1. Hence f extends to a planar embedding of this chord diagram. Chords in this diagram are in natural one-to-one correspondence with those in D , and further, they are all drawn outside R_0 in the embedding. So, collapsing R_0 to line segments, we naturally get a planar embedding of D .

The proof of the necessity is essentially the same as that of [1, Proposition 5], noting that an embedding of D automatically determines one choice β . Q.E.D.

Note that the conditions in our theorem requires that D_B^β respect f . When G is directed and D is oriented, this requirement uniquely determines the choice β . With this choice, D_B^β gives the reduced oriented chord diagram for G_B , and hence our theorem gives [1, Proposition 5] as a special case.

In the proof of sufficiency of [1, Proposition 5], it is mentioned that f extends to a planar embedding of the reduced oriented diagram. But there exist counter examples to this statement. One simplest example is single chord connecting two consecutive line segments.

As mentioned in [1], if G is directed and D is oriented, this criterion is examined in polynomial time.

In the non-oriented case, we do not have any idea to determine effectively which choice β gives a planar embedding. We must examine all the 2^N choices with N the number of chords, one of whose endpoints lies on a bridge.

References

- 1) T. Fleming and B. Mellor, Chord diagrams and Gauss codes for graphs, ArXiv preprint, arXiv:math/0508269v2, 2006.

界面活性剤によるタンパク質の構造変化

—界面活性剤とともに40年余—

竹田 邦雄

岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

(2014年9月1日受付、2014年11月6日受理)

1. 界面活性剤とタンパク質

1-1 界面活性剤

界面活性剤は、水のような部分（親水基）と油のような部分（疎水基）が化学結合した化合物である。界面活性剤を模式的に表すとき、マッチ棒（オタマジャクシでもいい）の形がよく使われる。マッチ棒の頭（オタマジャクシの頭）が親水基、軸（オタマジャクシのしっぽ）が疎水基として、万国共通に通じる。界面活性剤の身近な例は、家庭で使われる石けんである。界面活性剤は、水と油というように、全く相反するものの関係に使われる“水”と“油”がくっついたような化合物である。従って、界面活性剤なるものは、他のあまたの化学物質とは明らかに違う性質・機能をもっている。界面活性剤を、英語でsurfactantと言う。これは、surface active agent（表面で活発な物の意味）のアンダーラインの部分をつないだ造語とされている。“水”と“油”がくっついた界面活性剤の特徴を、この語源はよく物語っている。

実際、薬品・化粧品・食品などの製造業はもとより、はた目にはちょっと想像できないような製造業でも、界面活性剤はいろいろなものの製造過程で使われている。界面活性剤は、洗剤やシャンプーなどを別として、製品になったらその製品の主役になることは少ないが、製造過程では黒子的に重要な役割をしていて、界面活性剤なしではできなかつたであろうという製品は非常に多い。例えば、高層ビルを建設する際のコンクリートにも、現在ある種の界面活性剤が役立っていることなどは一般には知られていない。これに使われる界面活性剤は、コンクリートの流動化に役立っていて、高いところや遠いところへ液状のコンクリートを長いパイプを使って流すことを可能にしている。この界面活性剤を使用しなくても高層ビルはできるだろうが、手間暇がもっとかかってしまうに違いない。

界面活性剤は親水基と疎水基をもつので、どちらの性質が強いかで、その界面活性剤が水によく溶けるか、油によく溶けるかが決まる。こういうことから、界面

活性剤を両親媒性物質と呼ぶ場合もある。家庭用の石けんなどの界面活性剤は水に溶かして使うので、親水性がある程度強くないといけないことになる。

界面活性剤の親水的な性質が強ければ、たしかに水にはよく溶けるが、界面活性剤の1つひとつの分子（多くの界面活性剤の水になじむ親水性部分はイオン化していて、それを界面活性剤イオンと呼ぶ）の状態でも溶けるわけではない。界面活性剤は、疎水性部分をもっているため、1つひとつがばらばらに溶けているのはごく低濃度のときだけである。界面活性剤がある特定の濃度、臨界ミセル濃度（critical micelle concentration: CMC）を超えると、ミセルと呼ばれる会合体を形成して溶ける。このミセルは、大体50から100前後の数の界面活性剤が集まって、疎水基を内側に、親水基を外側に、多くの場合球状に形成されている。その大きさは、直径数nmである。著者は、後で簡単に触れるように、大学院時代のほとんどをこの界面活性剤のミセル形成の速度論に携わっていた。

ちなみに、今も昔も、“研究”にもっともよく使われている代表的な界面活性剤はドデシル硫酸ナトリウム（sodium dodecyl sulfate: SDS）である。意外に知られていないが、このSDSは、時にラウリル硫酸Naの名称で、歯磨きに1%前後含まれているので、多くの人が毎日接している界面活性剤でもある。

1-2 タンパク質

タンパク質、英語のproteinの語源になったギリシア語のproteiosは“主要な”という意味をもつそうである。タンパク質は、骨格や筋肉をはじめ内臓から皮膚・毛髪など生命体の多くを構築している。酵素という単語も日常的によく耳にするが、タンパク質のある種のものが酵素の機能をもち、酵素もタンパク質である。タンパク質は、わずか20種類のアミノ酸がどういう順番で何個並ぶかによって、その種類の多様性を可能にしている。アミノ酸の並んだ順番をタンパク質の一次構造と言う。この一次構造のルールは各生物のDNAに保

存されていて、そのルール通りに各生物の各部分に最適のタンパク質が作られるようになっている。

多くのタンパク質は、大体数百個のアミノ酸がつながったものである。アミノ酸は、水に溶け易いものも水に溶けにくいものもあり、その組成によって、タンパク質も水に溶け易いものも水に溶けにくいものもある。多くの水溶性のタンパク質は、数百というアミノ酸からできているが、水に接するタンパク質表面の方に水に溶け易いアミノ酸がうまく並び、水に溶けにくいアミノ酸はほとんど水に接しないようにタンパク質内部に折りたたまれている。この折りたたまれていることを英語ではfoldingと言うが、この英語に適当な日本語は「折りたたみ」くらいしかなく、このfoldingは日本語に訳して使われることはほとんどない。水溶性のタンパク質のfoldingの状態は、界面活性剤のミセルと似ている。数十年前、ある化学者が「水溶性のタンパク質は極性のコートを着た油滴」と称したが、まさにその通りである。この折りたたみ方も、タンパク質の内部には水分子程度の大きさのものが2つ3つしか入らないくらいに、非常に密に詰められている。

タンパク質がこのように折りたたまれると、アミノ酸は並んだ順番通りに表面にあたり、内部にあたりしない。このようにタンパク質が折りたたまれた状態の構造を三次構造と言う。タンパク質が折りたたまれるとき、一次構造のある部分でローカルに作っている構造を二次構造と言ひ、何種類かの二次構造がある。タンパク質は、あっちこちで作っている二次構造が折りたたまれているとみることできる。

2. 界面活性剤とタンパク質の相互作用

タンパク質の研究は、分野によって種々のタンパク質をターゲットとして今も多くの研究者によって広範に行われている。その中で、物理化学的興味からの研究対象には、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) というタンパク質が半世紀以上に渡ってもっとも多く選ばれて来ている。タンパク質と界面活性剤の相互作用の研究にも、このBSAと上述のSDSの組み合わせがもっとも多い¹⁻⁶⁾。BSAは、代表的なあるいは標準的なタンパク質として扱われていることも少なくないが、このタンパク質は相当個性豊かなものである。本稿では、ページ数の制限のためできるだけ図表は使わずに記述しようとしているが、あえてBSAの一次構造を図1に模式的に示す⁷⁾。このタンパク質は、583個のアミノ酸から成る1本鎖ポリペプチドでありながら、このポリペプチドの途中は17組のS-S架橋でかなり規則的に連結されていることが分かるであろう。

著者も、この数十年BSAとSDSの系を中心に、この間の相互作用によって、タンパク質の構造がどの程度、

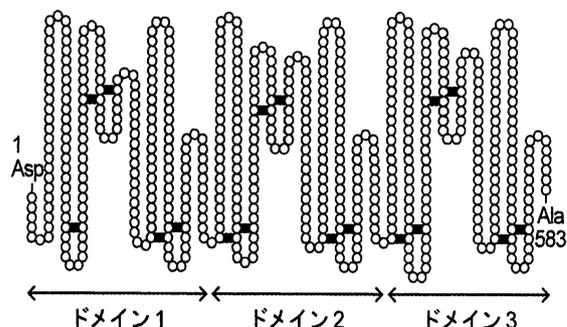


図1 BSAの一次構造の模式図

図中の■は、17組のS-S架橋の位置を示す。

どれくらいで変わるかを研究して来た¹⁻⁶⁾。この系の研究を続ける中で、BSAのS-S架橋の存在を無視してか知らずか、そのポリペプチドがSDSのミセルのまわりに巻きついた界面活性剤-タンパク質複合体のスケッチを無頓着に描いた論文の審査がまわって来たり、中には著者に審査がまわって来ない類似の論文が出版までされるようになったりして、一度怒りの警鐘を鳴らしたことがあった^{4,8)}。図1のBSAの一次構造を左右に3分割した部分をこのタンパク質のドメインと呼ぶが、ドメインが相互によく似ていることもこのタンパク質の特徴である。

界面活性剤とタンパク質の組み合わせは、通常ありえないように思えるかもしれないが、例えば、生体膜はまさに界面活性剤とタンパク質の系と言って差し支えない。また、生化学分野でよく利用されるタンパク質の分子量の簡便な定量法であるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (通称SDS-PAGE) でも、SDSといっしょにBSAを含む数種のタンパク質が基準分子量のタンパク質として使われている。このSDS-PAGEでは、SDSは、そのdodecyl sulfate (DS) イオンが多量にタンパク質に結合し、タンパク質固有の表面電荷が電気泳動に影響しないようにする役割をしている。

2-1 界面活性剤のタンパク質への結合

著者が、SDS-BSAの系に取り組み始めた1970年代後半、この関係の論文を調べていくと、この結合の問題は1950年代1960年代にやり尽くされているように思えた^{1,5)}。戦後、SDSとBSAが手に入れば、SDSのBSAへの結合等温線は半透膜を使った平衡透析で安価に作成できたようで、その結果は一流ジャーナルにたくさん発表されている。しかし、過去の結果には弱点があった。タンパク質を扱う場合、pHを一定に保つために緩衝溶液を使うが、この緩衝溶液の電解質の濃度がすべて高かった。無機物でも有機物でも (一部例外があるが) SDSのようなイオン性界面活性剤に共存すると、ミセル

を形成し易くし、CMCを低下させる。一方、界面活性剤のタンパク質への結合は、ミセルを作らないCMC以下の界面活性剤濃度でのみ進行する。従って、過去の高い電解質濃度の緩衝溶液を使った研究では、CMCが低下し、界面活性剤の結合が進行するその濃度領域が極端に狭くなり、結合の進行が細かく観察できていなかった。

著者らは、些細なことながら、この点に留意して、緩衝溶液の電解質の濃度をできるだけ低くして、CMCをある程度高い濃度で維持するようにして、結合の進行を過去の事例の約5倍広い界面活性剤濃度域で検討した¹⁻⁵⁾。その結果、SDSのBSAへの結合は、大きく分けて2段階に進行することが分かった。後に、BSA分子のフラグメント (BSA分子の断片)⁹⁾ へのSDSの結合も2段階に起こり、ドメイン単位で結合のし易い部分とそうでない部分をもつことを明らかにした。これは、SDSによるBSAの構造変化にも大いに関係してくる。

2-2 界面活性剤によるタンパク質の構造変化

タンパク質の構造変化を、二次構造の1つであるヘリックス (らせん状) 構造の増減を中心に円偏光二色性 (CD) 測定で検討してきた。SDSによってBSAのようなヘリックス構造の多いタンパク質のヘリックス構造は一部壊されるが、ヘリックス構造の多くないタンパク質にはSDSによってヘリックス構造が形成される。

液相中のタンパク質の二次構造の研究には、CDがもっともよく使われ、そのデータの信頼性も高い。しかし、著者がCD測定を始めてしばらくして、そのデータが半定量的な使い方がされていないことに気づいた。つまり、二次構造の1つであるヘリックス構造が多いとか少ないとか、ヘリックス構造ができたとか壊れたとかいう程度の使い方がされていない。

タンパク質の二次構造には、ヘリックス構造の他に、 β 構造やランダムコイルなどがある。縦軸にCDの強度 (平均残基楕円率)、横軸にCDの光の波長をとってできる曲線グラフ、つまりCDスペクトルが、これらの構造によって異なる。著者は、これらの構造によるスペクトルの違いを利用して、二次構造をもっと定量的に (数値的に) 検討できないかと思うようになった。

それで、タンパク質が、CD強度も大きく、主要な二次構造でもあるヘリックス構造、 β 構造、ランダムコイルをそれぞれ100%形成したときのある波長における固有の平均残基楕円率を $[\theta]_{\alpha}$ 、 $[\theta]_{\beta}$ 、 $[\theta]_{\text{c}}$ とし、さらにこれらの構造をタンパク質が実際に形成している割合を、それぞれ、 f_{α} 、 f_{β} 、 f_{c} ($f_{\alpha} + f_{\beta} + f_{\text{c}} = 1$) とすると、測定で得られる平均残基楕円率 $[\theta]_{\text{obs}}$ は、いずれの波長でも次の関係で表せると仮定してみた。

$$[\theta]_{\text{obs}} = f_{\alpha} [\theta]_{\alpha} + f_{\beta} [\theta]_{\beta} + f_{\text{c}} [\theta]_{\text{c}}$$

この関係を想定して、実際に測定によって得られる

50nmくらいの波長範囲のCDスペクトルにもっとも近似するスペクトルを1nmきざみで合成し、最適の f_{α} 、 f_{β} 、 f_{c} を求めることを試みた^{1-5, 10, 11)}。 f_{α} 、 f_{β} 、 f_{c} が分かると、そのタンパク質の構成アミノ酸の何個がこれらの構造を作っているかが推定できるわけである。

これは新規な試みであると思いながら、この作業に具体的にとりかかりつつ文献を調べてみると、少数ではあるが既にアメリカで先駆的にやっている人がいることに気づいた。しかも、最初にやっていたのは、当時ハガキによる論文の別刷り請求がある頃で、著者らの論文が出版される度に別刷り請求をしてくれていた教授のグループ¹²⁾であった。これで、先の仮定や試みが的外れでないことは分かった。この手法は、国内ではまだほとんどされていない時代であった¹⁾。

このシミュレーションによって、BSAのヘリックス構造を形成しているアミノ酸の数のみならずSDSによるその含量の増減、BSAフラグメントのSDSによる同様のヘリックス含量の増減や、BSAとBSAフラグメントへのSDSの結合等温線の様子からSDSによってBSAのどの部分のヘリックス構造が崩壊するかなどの議論が可能になった^{1-5, 9-11)}。一連の仕事の中で、著者らはまずBSAのヘリックス構造を形成しているアミノ酸は総アミノ酸数の66%と推定した^{1-5, 11)}。最近では、CDの各波長における $[\theta]_{\text{obs}}$ の値を、装置のパソコンから計算するパソコンに簡単に転送でき、データの入力に時間は全くかからなくなっているが、当初はパソコンに各波長における $[\theta]_{\text{obs}}$ の値を1つひとつ手で入力するのに時間がかかった。その後、1990年頃、BSAと酷似し、585個のアミノ酸から成るヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) のX線解析がされ、そのヘリックスを形成するアミノ酸は総数の67%と発表された¹³⁾。このX線解析に使われたHSAの結晶は、地球を離れて、スペースシャトル内で作成されたものであった。BSA分子単体のX線解析は未だされていないが、HSAに酷似しているBSAに対して著者らが求めた66%のヘリックス含量は結構妥当なものであったと思われる。

BSAとHSAの研究の歴史は長いですが、それらの構造に関しては、X線やCDのデータが全くない時代に、一次構造だけから立体構造を予測したBrownの研究⁷⁾が、その後の研究の土台になっていることを付記しておく。

界面活性剤によるタンパク質やホモポリペプチドの構造変化をこの手法で取り扱ったのは、私のところがある発表ができた^{1-6, 9-11)}。著者らは、さらにBSAのドメイン1.5個分相当 (BSA分子の半分) やちょうどドメイン1個分のフラグメントの研究⁹⁾から、各ドメインは、ミニBSA分子とも言うべき挙動をすることや、ドメイン間を結ぶ2か所の連結部分は、溶媒に露出していて、種々

の影響を受けやすいことを明らかにした。また、血液中で輸送タンパク質として働くBSAやHSAは、ドメイン単位で輸送される物質をつかむ機能をもつのではないかという示唆も得られた。

2-3 タンパク質の構造変化の速度論

著者の学位論文(1976年)は、“界面活性剤のミセル形成・崩壊反応の速度論”であった。1秒以下で起こる速い反応、いわゆる高速反応の測定は、1967年にノーベル賞を受賞したドイツのEigen教授が化学緩和法を確立することによって大きく開花した。著者らは、この速度論に界面活性剤として当然のごとくSDSを対象とした。手間のかかる高速反応の測定を繰り返し、最終的に、マイクロ秒オーダーの時間でモノマー状態の界面活性剤イオンが会合してミセルを形成し、このミセルに界面活性剤イオンのモノマーがミリ秒オーダーの時間で出入りする過程を想定して、複雑な速度式に取り組んだ¹⁴⁾。本学に奉職後、この内容の一部を理大通信にも紹介したことがある¹⁵⁾。2-1の界面活性剤の説明で述べたように、ミセル形成はあらゆる添加物の影響を受け、純粋にミセルの形成・崩壊を見ようとすれば水に界面活性剤だけを溶かした水溶液で検討するしかないが、当時高速反応の測定は、装置の都合上、電解質や色素を添加して行われていた。著者は、運よく、電気伝導度検出の圧力ジャンプ法によって、水にSDSだけを溶かした溶液でミリ秒オーダーの緩和過程を見ることに成功した¹⁶⁾。これは、その後の界面活性剤水溶液のミリ秒オーダーの緩和過程の研究で、この圧力ジャンプ法の測定が主流になるきっかけになった。

従って、著者が界面活性剤によるタンパク質の構造変化に手をつけたときから、この構造変化の速度論を手がけることは念頭にあった。しかし、理大に就職して籍をおいた研究室はまだ新しく、他を見回しても速度論をやっている研究室も、タンパク質を扱っている研究室もなかった。この構造変化の速度論は、当時の機械理学科の工作室に通い、当時は全く市販されていない装置を自作することから始まった。

この構造変化の速度論の測定には、化学緩和法ではなく、主に2液を急速混合するstopped-flow法を使った。界面活性剤によるタンパク質の二次構造変化をCD強度の変化で、タンパク質の三次構造変化を近紫外部の吸光度の変化で速度論的に(横軸が時間で)追跡しようとした。もちろん、界面活性剤の主役はSDS、タンパク質の主役はBSAであった。二次構造が関与するCDの特性波長が190~220nmで、速い時間で速度論的に検出するには、CDの信号強度は弱く、逆にノイズは大きかった。しかし、データは積算回数を重ねてきれいにし、世界で最短波長のCD強度の経時変化も測定できた。この測

定結果は、世界最短波長で成功したという記録としてはなく、どういう構造変化を追跡しているかを実証する明確な根拠になった。この速度論で、タンパク質以外に、アミノ酸の1つのリジンだけがつながったポリ-L-リジン^{1, 6, 17)}、リジンに非常に近い構造をした非天然のアミノ酸から成るポリ-L-オルニチン^{1, 6, 18)}のSDSまたは類似の界面活性剤溶液中の二次構造変化も検討した。これらホモポリペプチドの界面活性剤による二次構造変化の速度論も世界初であった。

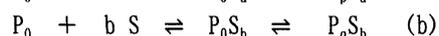
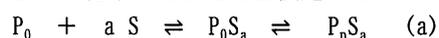
結論が出るまでには、何年か要したが、予想外の結果が続出した^{1, 6, 17-21)}。当初の目論見は外れて、タンパク質の二次構造変化と三次構造変化は同時に起こり、時間的に区別できないことがまず分かった。また、界面活性剤によるタンパク質やホモポリペプチドの構造変化は遅かった。界面活性剤によるヘリックス構造の崩壊は数十ミリ秒で、界面活性剤によるヘリックス構造の形成は秒オーダーの時間で起こった。

さらに、界面活性剤の結合量が増加して構造変化が大がかりになるほど、構造変化の速度は速くなるという結果に出くわした^{1, 6, 17-21)}。後述するタンパク質の熱変性で温度上昇に伴い構造変化も大がかりになるように、界面活性剤によるタンパク質やホモポリペプチドの構造変化も、界面活性剤溶液の濃度が高くなるにつれ、つまり界面活性剤の結合量が増加するにつれ大がかりになる。しかし、界面活性剤の結合量が増加して構造変化が大きくなると、構造変化の速度は速くなるわけである。これは、界面活性剤が飽和結合すると、タンパク質の構造は、結合量が飽和前の段階の構造を中間体として經由せずに変化すると考えざるをえない。なぜなら、界面活性剤によるタンパク質の構造変化の程度が小さい方が、その速度は遅いからである。

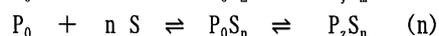
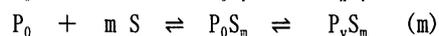
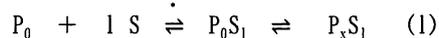
界面活性剤はタンパク質に対して数十から数百個レベルで結合する。界面活性剤の大部分はその疎水性の性質を使って、タンパク質の疎水性部分やすでにタンパク質に親水性部分で結合している界面活性剤の疎水性部分に結合する⁴⁾。この結合速度は、界面活性剤のミセル形成・崩壊の研究で経験^{14, 16)}した時間オーダー、遅くともミリ秒以下であると予想できる。界面活性剤-タンパク質複合体はミセル状に形成され、その表面はミセルに酷似していると考えられている。岡山で手作りした電気伝導度検出の圧力ジャンプ装置でSDS-BSA複合体の系にミリ秒オーダーの緩和過程を見つけた²²⁾。これは、思いがけないことに、界面活性剤のミセル形成・崩壊反応の速度論で、ミセルへの界面活性剤イオンのモノマーの出入りがミリ秒オーダーで起こると想定したことの妥当性を裏付けた。同時に、タンパク質の構造変化に伴い、そのタンパク質に結合している界面活性剤イオンが結合場所を移動しながら出入りして

いることも示唆してくれた。

これらの結果や推定を踏まえて、界面活性剤 (S) によるタンパク質やポリペプチド (P_0) の構造変化は次のような化学式で表せると仮定した^{1, 2, 6, 19-21)}。



⋮



1段階目 2段階目

ここで、小文字のアルファベットは P_0 への界面活性剤の結合量 ($a < b < \dots < l < m < n$) を示す。 $P_0 S_a \sim P_0 S_n$ はある量の界面活性剤が P_0 に結合した複合体で、タンパク質の構造はまだ変わっていない。 $P_p \sim P_z$ は結合量に応じて構造が変化したタンパク質やポリペプチドを示し、 $P_0 S_a \sim P_0 S_n$ からそれぞれ $P_p S_a \sim P_z S_n$ に変わる2段階目で構造変化は起こる。 $P_z S_n$ が、界面活性剤が飽和結合したタンパク質やポリペプチドで、それらの構造変化がもっとも大きい複合体を示す。界面活性剤の結合量によって、それぞれ違う反応経路で構造変化は起こる。(a) ~ (n) は各過程を示すのに便宜的に付けたが、これらは全反応としての表示で、各過程に二重衝突の素反応があり、2段階目が反応の律速段階になる。

タンパク質やポリペプチドへの界面活性剤の結合が2段階目の構造変化より速ければ、構造はすでに結合している界面活性剤をくっつけたまま変わることになる。タンパク質やポリペプチドの構造が変われば、結合している界面活性剤は結合場所も移動しなければならぬだろう。これを界面活性剤の再配列 (rearrangement) と名付けた。この界面活性剤の再配列を伴うタンパク質やホモポリペプチドの構造変化は、重い手かせ足かせをつけられたような状態での動きになるに違いない。

また、速度論ではないが、SDS-BSA複合体の光散乱電気泳動測定²³⁾ とキャピラリー電気泳動測定²⁴⁾ から、この反応メカニズムを補完する思いがけない結果も得られた。これらの測定で、BSA単体である P_0 とSDSが飽和結合したBSAである $P_z S_n$ はたしかに単一の状態として検出される。しかし、飽和結合しない界面活性剤の低濃度域では、界面活性剤の結合量が違う複数の状態の複合体が共存することが分かった。これは、先の $P_p S_a \sim P_z S_n$ の $a \sim n$ が決して連続的な数値ではなく、特定の不連続な数値であることを意味した。また、これは、複合体を形成する途中の段階では、 $P_x S_l$ と $P_y S_m$ のような準安定な複合体が共存し、界面活性剤の濃度増加に伴い $P_x S_l$ が徐々に減り $P_y S_m$ が徐々に増えていくような過程があることも実証した。

以上のような一連の構造変化の速度論から、一般的

なタンパク質の変性や構造変化のメカニズムについて、思いがけない問題点があることに気づいた。タンパク質の変性や構造変化は一般的には次のような化学式、すなわち化学平衡で書かれる。



Nというのはnative状態ということで天然の状態または構造、Dというのはdenatured状態ということで変性した状態または天然状態とは違う構造を示す。ちなみに、“変性”とはタンパク質や酵素の本来の性質や構造が変わることを広く指す。この $N \rightleftharpoons D$ の平衡は“2状態転移 (two-state model)”と呼ばれたりもしている。タンパク質の三次構造が立体的には折りたたまれていることに主眼をおいて、Nの代わりにfoldingのF、Dの代わりに“ほどけた”という意味でunfoldingのUを使う表現も最近20年くらいは使われている。また、中間体 D' を想定して、 $N \rightleftharpoons D' \rightleftharpoons D$ と表す反応モデル (three-state model) もある。しかし、大問題は、中間体を想定しても、スタートのNとゴールのDは変わっていないことである。界面活性剤によるタンパク質の構造変化の $N \rightleftharpoons D$ のD状態も構造変化の過程も界面活性剤の濃度・結合量によって明らかに異なる。最近タンパク質の熱変性による構造変化も検討しているが、50°Cで熱変性したときと100°Cで熱変性したときとDが同じであるはずがない。また、さらに100°Cで熱変性したときに、必ず50°Cで熱変性したときのD状態を中間体 D' として経由するかは甚だ疑問である。また、後述するように、 $N \rightleftharpoons D$ の可逆性はタンパク質に固有の限定的な温度範囲でしか成立しない。にもかかわらず、多くの研究者がタンパク質の構造変化などの温度依存性から平然と $N \rightleftharpoons D$ の平衡をベースにもっともらしく論文中で議論している。この議論の前提は、50°Cでも100°CでもD状態は同じで、可逆性もあるということであるが、そんなはずがなく、そういう前提で議論することは無意味と著者は思っている。

タンパク質が完全に変性しない、あるいは完全に構造変化しない条件下では、 $N \rightleftharpoons D$ のD状態まで進まずに、その途中の状態のものが、しかも多くの場合それが複数共存することを前提にすべきである^{23, 24)}。また、タンパク質の熱変性であろうと、変性剤による変性であろうと、容易ではないが、 $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡が成立する条件をおさえて、議論すべきである。

2-4 例外的な小さなタンパク質の場合

ハチの毒成分として含まれるタンパク質をメリチンと言う。このメリチンは、たった26個のアミノ酸から成り小さく、26個のアミノ酸中6個もプラスに帯電したアミノ酸をもち、マイナスに帯電したアミノ酸は全くもたないおもしろいタンパク質である。このメリチン

に興味をもって調べてみると、このタンパク質はSDSミセルのマイナスの電荷をもつ表面上でヘリックス構造を形成することを、アメリカのYang教授らが発表していた²⁵⁾。このYang教授は、この分野をリードして来た研究者の一人だが、彼からレーガンがアメリカ大統領になった頃、「アメリカではこの種の基礎研究ができなくなったので、これからは日本の研究者がやってくれ」と手紙をもらったことがある。上述したように、一般に界面活性剤によるタンパク質の構造変化は、タンパク質に結合していない界面活性剤イオンの平衡濃度がCMC以下で起こり、ミセルを形成するようになってからは、界面活性剤のタンパク質への結合も起こらなくなる。しかし、この小さなタンパク質のメリチンは、SDSのCMC以上でミセルの表面において劇的な構造変化をすることを著者らも検証した。

著者らは、メリチンがマイナスの電荷をもつSDSのミセル表面上でヘリックス構造を形成するなら、表面にマイナスの電荷をもつ高分子の鎖上ではどうか検討した。その結果、アミノ酸のグルタミン酸（側鎖部分が中性pHではマイナスの電荷をもつ）ばかりが繋がったホモポリペプチドのポリ-L-グルタミン酸の鎖上でも、非天然のアミノ酸のD-グルタミン酸ばかりが繋がったポリ-D-グルタミン酸の鎖上でも、メリチンはヘリックス構造を形成することが明らかになった²⁶⁾。これらの結果は、電荷をもつミセル表面やホモポリペプチドの鎖上がある種のタンパク質や酵素の独特の反応場になることを示唆している。

ついでながら、著者らは、プラスの電荷をもつ陽イオン性界面活性剤の場合も、CMC以上でメリチンがヘリックス構造を形成することを見つけた²⁶⁾。この場合、ミセル表面で構造変化するはずはなく、ミセルの中に可溶化された状態でヘリックス構造を形成すると考えざるをえなかった。

このように界面活性剤のCMC以上で顕著な構造変化をするメリチンは、界面活性剤との相互作用における例外的なタンパク質である。これは、上に紹介したメリチンの特殊な電荷状態と小さなサイズによるとしか考えられない。

2-5 界面活性剤-タンパク質複合体

界面活性剤がタンパク質に結合してできる複合体の表面は、ミセル表面に似ている。ミセル表面がある種の反応場になることに関連して、界面活性剤-タンパク質複合体の表面電位やそのサイズの変化を一時期検討した^{23, 24)}。

その頃まで、界面活性剤とタンパク質が結合した複合体の電気泳動速度やサイズをある特定の条件で測定した例はあったが、この系の本格的な系統的測定は著

者らが最初と言っていると思う。界面活性剤イオンがタンパク質に結合する場合、大部分の界面活性剤イオンはその疎水部でタンパク質に結合する。そのため、界面活性剤の親水部の電荷をタンパク質表面上に持ち込むことになり、界面活性剤のタンパク質への結合の進行と共に複合体の電荷状態は変わる。BSAは583個のアミノ酸からできているが、プラスに帯電したアミノ酸よりマイナスに帯電したアミノ酸が相対的に多いため、タンパク質全体としては本来マイナスの電荷をもっている。従って、BSAだけを電気泳動させると、このタンパク質はプラスの電極の方に泳動する。BSAにDSイオンが結合していくと、複合体はマイナスの電荷を多くもつようになるので、プラス電極への泳動速度は速くなった。一方、親水部にプラスの電荷をもつ界面活性剤イオンの結合が進むと、BSA本来の過剰なマイナスの電荷は少なくなり、ある量の界面活性剤イオンが結合したとき、プラス、マイナスのどちらの電極に向かって泳動しなくなり、泳動速度はゼロになった。親水部にプラス荷電をもつ界面活性剤がさらに結合していくと複合体はプラスの電荷をもつようになり、マイナスの電極の方に泳動するようになった。

このような複合体の電気泳動速度の変化は、説明してきたようにある程度予測できるものであったが、SDS（実際はDSイオン）が飽和結合したSDS-BSA複合体の電気泳動速度は、SDSミセルの電気泳動速度に近くなり、複合体表面とミセル表面の類似性を表面電荷の比較から実証できた。

界面活性剤とタンパク質が結合した複合体の大きさ、つまりサイズの変化については予測できなかった。DSイオンが結合すれば、複合体はコンパクトになるのか、DSイオンが結合した分ふくらむのか、どちらも考えられた。SDS-BSA複合体のサイズを、BSAにくっつけた蛍光色素の蛍光寿命のBSA分子の動きに伴う変化から測定しようと試みたことがあった。この試みでは、SDS低濃度しか検討できなかったが、DSイオンの結合に伴い複合体のサイズは大きくなる傾向が見られていた²⁷⁾。その数年後、動的散乱法によってDSイオンの結合に伴いSDS-BSA複合体のサイズは大きくなることを定量的に知ることができた²³⁾。予想以上に、DSイオンの結合に伴い複合体の直径はBSAの1.5倍くらいまで大きくなる。これは、タンパク質への界面活性剤の結合様式を考える上で貴重な知見になった。

2-6 逆ミセル中のタンパク質

ある種の界面活性剤を油のような非極性溶媒の中に入れて、冒頭で述べたミセルとは逆に、親水基を内側に疎水基を外側にした会合体を簡単に形成する。これを“逆ミセル”と言う。大きさによって、マイクロ

エマルションという場合もある。ちなみに、エマルションは牛乳のように水の中でできるタイプとバターのように油の中でできるタイプがあり、ここでは油の中でできるタイプの方の話である。

油の中でできる逆ミセルの内側の親水基の集まっている場所には少量の水を含み、この水部分をwater poolと呼ぶ。water poolの直径は数nmくらいで、小さなタンパク質が入ってもいっぱいになる。一般的に、water poolの水は界面活性剤の親水基周辺(water poolの外側)の“固定水”とwater poolの中央部分の“自由水”に分けて考えられる。“固定水”と言われる水は、界面活性剤の親水基の電荷に引き付けられている。これは水合イオンと同じで、逆ミセルを作る界面活性剤の親水基がマイナス荷電をもてば、 H_2O のHの方を向けて電氣的に相互作用することによって固定されている(厳密には固定というほどではないが)と考えられている。“自由水”の方は、界面活性剤の親水基の電荷の影響を受けず、普通の水と同じと考えられがちであるが、界面活性剤の親水基の電荷の影響が消えるほどwater poolは大きくはなく、著者はやはり“異常水”のままだと思う。

逆ミセルのwater poolにBSAを入れて、逆ミセルの大きさを動的光散乱法で測り、またwater poolの大きさの変化に伴うBSAの構造変化をCDで検討した²⁸⁾。小さいwater poolにBSAを入れる場合、water pool自身が拡がらないとBSAは入らない。BSAを含む逆ミセルのwater pool内の水は、逆ミセルを構成する界面活性剤の親水基の電荷の影響だけでなく、タンパク質表面に出ているアミノ酸のプラスやマイナスの電荷の影響も受け、“超異常水”の状態と思われる。逆ミセルのwater poolの大きさの変化に伴いタンパク質の構造も変化し、それはwater poolの異常水が変化するためと考えられる。

動物の細胞膜もある種の界面活性剤(リン脂質)で作られている。細胞内は逆ミセルの中とあまり変わらないと推定される。細胞内のタンパク質や酵素は、普通の水とは違う異常な水の中で生命維持のために活動しているに違いない。

2-7 界面活性剤によるタンパク質の構造の保護

上述して来たように、界面活性剤はタンパク質の構造を大なり小なり変える。しかし、他の要素で壊されるタンパク質の構造を界面活性剤は保護するように機能することがある。この課題は、1990年頃研究室の雑誌会で、修士の学生が1948年出版のアメリカのDugganとLuckの論文²⁹⁾について発表したことが発端になった。彼らは、BSAと尿素の系にSDSを加えた溶液の粘度測定(尿素はすごく濃い濃度で使うので、粘度はほとんど尿素の粘度のはず)によってこの現象を発見していた。

これは、おもしろい発見であったのに、長い間注目されず、HSA-尿素系へのSDSの添加効果を旋光分散測定によって検討した論文がその後1960年代に2報出ているだけであった。

“尿素”は昔からタンパク質の変性剤としては使われている代表的なものである。今さら尿素でタンパク質の変性や構造変化を云々しても新鮮さは全くないと当初思った。しかし、不思議なことに、尿素で変性したタンパク質にSDSを加えると、尿素変性を受けていないタンパク質にSDSを加えたときは全く違う影響をその構造に与えることが分かって来た。著者らは、まずBSA-SDS系に尿素を添加してこの現象をCDで追跡した^{3, 5, 30, 31)}。尿素変性によって壊されるはずのBSAの構造を、すごく低いSDS濃度で、すなわちごく少ないDSイオンの結合によって保護することが分かった。さらには、DugganとLuckの結果²⁶⁾からは予想もできない結果を得た。尿素変性によって壊されたBSAの構造がごく少ないDSイオンの結合によって再形成されることも新たに分かった。タンパク質の再生の実験も広範に行われているが、これは新たなタンパク質の再生の手法になると思われた。このSDSの保護効果は、次の熱変性で壊されるタンパク質の構造に対しても観測される。

2-8 130℃までのタンパク質の熱変性

この測定は、某メーカーが100℃以上でも測定可能なCDのセルホルダーを試作しているとの情報を得たことから始まった。早速、そのメーカーから試作途中のステンレス製の製品を取り寄せ、温度計測器などはこちらでとり付けて、測定にこぎつけた。

タンパク質のヘリックス構造の骨格部分は、氷を作る水分子間と同じ水素結合で形成されている。水素結合は、水 H_2O のH-O-Hの結合角度が104.5度で、結合の性質から H_2O のOはごく微量のマイナス電荷を、2つのHはごく微量のプラス電荷をもつため、電氣的に相互に引き合うことを言う。“氷”は1つの H_2O の周りに4つの H_2O をこの水素結合で引き付けている状態である。引き付けられている各 H_2O も同じように自分の周りの4つの H_2O を水素結合で引き付け、氷の中の H_2O はすべて水素結合でつながる規則的な構造をとっている。氷の水分子間の水素結合は0℃で切れ、氷は液体の水になり、100℃になると水分子はお互いに何の関わりももたない気体になる。タンパク質のヘリックス構造を形成している水素結合は、室温や体温付近では切れない。温度が100℃以上まで上げられるとなれば、高温になるとタンパク質のヘリックス構造を形成している水素結合が“どこまで”切れるか？あるいはヘリックス構造を形成している水素結合は温度が何度まで上がると切れるか？100℃になったら完全に切れるか？を世界で真

っ先に試してみたかった^{4, 32-36)}。

この水素結合が高温になると“どこまで”切れるかは、興味があるだけでなく、重要な意味をもつ。上述したように、一般的にタンパク質の変性や構造変化の研究は、 $N \rightleftharpoons D$ のような化学平衡を想定して行われる。この化学平衡というのは、左右どちら方向にも反応は可逆的に進行することを前提にしている。言うまでもなく、 N 状態と D 状態はタンパク質によってみな違う。 D 状態の方は、何で“どこまで”変性させるかによって同じタンパク質でも違って来る。変性剤を使ってタンパク質を変性させることも多くされるが、その変性剤で“どこまで”変性させたものを D 状態とするか、さらに、果たしてその D に対して $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡は成り立っているかは常に懐疑的である。熱変性においても、この事情は同じである。温度が 100°C 以上まで上げられるとなれば、 D 状態は高温になるとどこまで変わるか、さらにどの程度の温度まで $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡が成立するか、興味深々であった。

タンパク質はBSAを使い、熱変性に対する保護効果を見るための界面活性剤はSDSを使った^{4, 32, 36)}。BSA以外のタンパク質^{4, 34, 35)}も検討したが、結論的には、 130°C にしてもどのタンパク質のヘリックス構造も完全には壊れなかった。すなわち、この構造を維持している“そう強くないはずの水素結合”は高温でもすべては切れないことが分かった。 $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡が成立する温度範囲は、タンパク質によってはかなり高温まで広がるが、もちろんタンパク質によって違った。界面活性剤によるタンパク質の構造変化で、 $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡の D 状態は界面活性剤濃度によって違うと述べたが、もちろん熱変性においても同じことで、 D 状態は温度によって違う。

また、 90°C くらいまでの熱変性に対してBSAの構造をSDSは低濃度で強く保護する効果を示した。DSイオンの分子量はBSAの分子量の250分の1以下である。この熱変性に対しても、先の尿素変性に対しても、少ない場合はBSAにDSイオンが10個前後結合することによって、このタンパク質の構造を保護している。界面活性剤イオンが親水性と疎水性の両親媒性であることを活用してタンパク質分子内に架橋することによって保護すると著者らは考えている。リン脂質のような生体内に存在する界面活性剤は、両親媒性の機能を発揮して、生体膜を作る以外にも、意外な働きをしている可能性がある。

3. おわりに

著者らが、界面活性剤はSDSを、タンパク質はBSAを使って、界面活性剤-タンパク質混合系で掘り起こした現象を中心に述べた。本稿で、唯一例外的なタンパク

質としてメリチンに触れたが、ここで触れなかったタンパク質についても、時々思いがけない結果に出くわした。界面活性剤とは無関係に、光照射によってタンパク質の二次構造が壊れる現象にも出くわした。これは、CD装置のトラブルが発端であった。当時新しく購入したCD装置の信号強度が不安定だった。原因は、測定対象のタンパク質の構造が光源になっているキセノンランプ光の照射の影響を受けているためのものであった。急速、“光照射によるタンパク質の二次構造変化”の実験を始め、急いでアメリカのジャーナルに速報として投稿した^{37, 38)}。一方、メーカーの方は、早速その後の装置の光の通路にシャッターを付け、実質的な測定時間以外はサンプルに光が当たらないように改良した。光学機器である限り光を当てずに測定はできないから、実際に測定する時間以外はシャッターを付けるなどして光の照射をさえぎるべきである³⁷⁻⁴¹⁾。この件は、特に強度の強い光源を使う光学機器には共通して言えることである。今から考えてみて、著者にとってはこれが唯一の具体的な社会貢献だったと思う。

これらの仕事は、言うまでもなく、決して著者一人でできたわけではない。博士課程を修了した5名の卒業生、修士課程を修了した数十名の卒業生、卒論をした数百名の卒業生の協力のおかげである。

参考文献

- 1) 竹田邦雄, “蛋白質や合成高分子のコンフォメーションは界面活性剤溶液中で実際どう変わるのか—Conformational Changes of Proteins and Synthetic Polymers in Surfactant solutions; Conformational Analysis and Kinetics”, 表面, 23, pp.351-368 (1985).
- 2) 竹田邦雄, “界面活性剤によるタンパク質の高次構造の変化”, 生物物理, 30, pp.1-4 (1990).
- 3) 竹田邦雄, 森山佳子, “イオン性界面活性剤が見せるタンパク質構造の保護と再形成”, 表面, 42, pp.1-10 (2004).
- 4) 竹田邦雄, 森山佳子, “界面活性剤とタンパク質の相互作用”, オレオサイエンス, 11, pp.3-10 (2011).
- 5) K. Takeda, Y. Moriyama, and K. Hachiya, *Interaction of protein with Ionic Surfactant (part 1): Binding of Surfactant to Protein and Protein Fragments and Conformational Changes Induced by Binding*, Encyclopedia of Surfactant and Colloid Science, A. T. Hubbard Ed., Marcel Dekker: New York, pp.2558-2574 (2002).
- 6) K. Takeda, K. Hachiya, and Y. Moriyama, *Interaction of protein with Ionic Surfactant (part 2): Kinetics of Conformational Change of Protein Induced by the Binding of Surfactant; Dynamics of Protein-Surfactant Complexes; Interaction of Protein with Reverse Micelles*, Encyclopedia of Surfactant and Colloid Science, A. T. Hubbard Ed., Marcel Dekker: New York, pp.2575-2592 (2002).

- 7) J. R. Brown, *Serum Albumin: Amino Acid Sequence, Albumin Structure, Function, and Uses*, V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild Eds., Pergamon Press, Oxford, pp.27-51 (1977).
- 8) K. Takeda, and Y. Moriyama, *Comment on the Misunderstanding of the BSA-SDS Complex Model: Concern about Publications of an Impractical Model*, J. Phys. Chem., B 111, 1244-1245 (2007).
- 9) K. Takeda, A. Wada, T. Nishimura, T. Ueki, and K. Aoki, *Isolation of Domain-Sized Fragments of Bovine Serum Albumin by Limited Peptic Digestion and Their Secondary Structural Changes in Solutions of Urea, Guanidine Hydrochloride, and Sodium Dodecyl Sulfate*, J. Colloid Interface Sci., 133, 497-504 (1989).
- 10) K. Takeda, *Conformational Analyses of Poly(L-lysine) Induced by Various Surfactants*, Bull. Chem. Soc. Japan, 58, 1210-1214 (1985).
- 11) K. Takeda, M. Shigeta, and K. Aoki, *Secondary Structures of Bovine Serum Albumin in Anionic and Cationic Surfactant Solutions*, J. Colloid Interface Sci., 117, 120-126 (1987).
- 12) N. Greenfield and G. D. Fasman, *Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation*, Biochemistry, 8, 4108-4116 (1969).
- 13) X. M. He, and D. C. Carter, *Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin*. Nature, 358, 209-215 (1992).
- 14) 安永達也, 竹田邦雄, “界面活性剤のミセル形成と緩和”, 表面, 14, pp.190-206 (1976).
- 15) 竹田邦雄, “昔そして今、私の場合”, 岡山理科大学通信, pp.5-9 (1981).
- 16) K. Takeda and T. Yasunaga, *Kinetics of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle Dissociation by a Pressure-jump Method*, J. Colloid Interface Sci., 40, 127-128 (1972).
- 17) K. Takeda, A. Iba, and K. Shirahama, *Conformational Change of Poly(L-lysine) by Sodium Octyl Sulfate as Studied by Stopped-flow Circular Dichroism Method*, Bull. Chem. Soc. Japan, 54, 1793-1796 (1981).
- 18) K. Takeda, *Kinetics of Coil to α -Helix to β -Structure Transitions of Poly(L-ornithine) in Low Concentrations of Sodium Dodecyl Sulfate*, Biopolymers, 24, 683-694 (1985).
- 19) K. Takeda, *Conformational Change of Delta-chymotrypsin Caused by Sodium Dodecyl Sulfate as Studied by Stopped-flow Circular Dichroic Method*, Bull. Chem. Soc. Japan, 55, 1335-1339 (1982).
- 20) K. Takeda, *A Kinetic Study of the Conformational Change of Bovine Serum Albumin by Sodium Dodecyl Sulfate*, Bull. Chem. Soc. Japan, 56, 1037-1040 (1983).
- 21) K. Takeda, A. Wada, K. Yamamoto, K. Hachiya, and P. P. Batra, *Secondary Structure Change of Myoglobin Induced by Sodium Dodecyl Sulfate and its Kinetic Aspects*, J. Colloid Interface Sci., 125, 307-313 (1988).
- 22) K. Takeda, *A Kinetic Study of the Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Bovine Serum Albumin by Means of a Pressure-jump Method*, Bull. Chem. Soc. Japan, 55, 2547-2550 (1982).
- 23) K. Takeda, H. Sasaoka, K. Sasa, H. Hirai, K. Hachiya, and Y. Moriyama, *Size and Mobility of Sodium Dodecyl Sulfate-Bovine Serum Albumin Complex as Studied by Dynamic Light Scattering and Electrophoretic Light Scattering*, J. Colloid Interface Sci., 154, 385-392 (1992).
- 24) K. Sasa and K. Takeda, *Multiple Coexisting Species of Sodium Dodecyl Sulfate-Bovine Serum Albumin Complexes as Detected by Capillary Electrophoresis*, J. Colloid Interface Sci., 157, 516-517 (1993).
- 25) S. Kubota and J. T. Yang, *Conformation and Aggregation of Melittin: Effect of pH and Concentration of Sodium Dodecyl Sulfate*, Biopolymers, 25, 1493-1504 (1986).
- 26) K. Takeda and Y. Moriyama, *Helix Formation of Melittin on Poly(L-glutamic acid) and Poly(D-glutamic Acid)*, J. Am. Chem. Soc., 1040-1041 (1991).
- 27) K. Takeda and K. Yamamoto, *Fluorescence Lifetime and Rotational Correlation Time of Bovine Serum Albumin-Sodium Dodecyl Sulfate Complex Labeled with 1-Dimethylaminonaphthalene-5-Sulfonyl Chloride: Effect of Disulfide Bridges in the Protein on These Fluorescence Parameters*, J. Protein Chem., 9, 17-22 (1990).
- 28) K. Takeda, K. Harada, K. Yamaguchi, and Y. Moriyama, *Conformational Changes of Bovine Serum Albumin in an Aqueous Solution of Sodium Bis(2-ethylhexyl) Sulfosuccinate and in the Reverse Micelle of the Same Surfactant*, J. Colloid Interface Sci., 164, 382-386 (1994).
- 29) E. L. Duggan and K. Luck, *The Combination of Organic Anions with Serum Albumin: IV Stabilization Against Urea Denaturation*, J. Biol. Chem., 172, 205-220 (1948).
- 30) Y. Moriyama, Y. Sato, and K. Takeda, *Reformation of the Helical Structure of Bovine Serum Albumin by the Addition of Small Amounts of Sodium Dodecyl Sulfate after the Disruption of the Structure by Urea*, J. Colloid Interface Sci., 117, 420-424 (1993).
- 31) Y. Moriyama and K. Takeda, *Reformation of the Helical Structure of Human Serum Albumin by the Addition of Small Amounts of Sodium Dodecyl Sulfate after the Disruption of the Structure by Urea. A Comparison with Bovine Serum Albumin*. Langmuir, 15, 2003-2008 (1999).
- 32) Y. Moriyama, E. Watanabe, K. Kobayashi, H. Harano, E. Inui, and K. Takeda, *Secondary Structural Change of Bovine Serum Albumin in the Thermal Denaturation up to 130°C and Protective Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on the Change*. J. Phys. Chem. B, 112, 16585-16589 (2008).
- 33) Y. Moriyama, Y. Tanizaki, and K. Takeda, *Protective Effect of*

- Gemini Surfactant on Secondary Structural Change of Bovine Serum Albumin in Thermal Denaturation up to 130°C.* *J. Oleo Sci.*, 58, 573-579 (2009).
- 34) Y. Moriyama and K. Takeda, *Critical Temperature of Secondary Structural Change of Myoglobin in Thermal Denaturation up to 130°C and Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on the Change.* *J. Phys. Chem. B*, 117, 2430-2434 (2010).
- 35) Y. Moriyama, N. Kondo, and K. Takeda, *Secondary Structural Changes of Homologous Proteins, Lysozyme and α -Lactalbumin, in Thermal Denaturation up to 130°C and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Effects on These Changes: Comparison of Thermal Stabilities of SDS-Induced Helical Structures in These Proteins.* *Langmuir*, 28, 16268-16273 (2012).
- 36) Y. Moriyama, Y. Kawasaka, and K. Takeda, *Protective Effect of Small Amounts of Sodium Dodecyl Sulfate on the Helical Structure of Bovine Serum Albumin in the Thermal Denaturation.* *J. Colloid Interface Sci.*, 257, 41-46 (2003).
- 37) K. Takeda and Y. Moriyama, *Unavoidable Time-Dependent Ellipticity Changes of Proteins in the Current CD Measurements.* *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 6700-6701 (1991).
- 38) Y. Moriyama, T. Takehi, and K. Takeda, *Changes of α -Helical and β -Structural Conformations of Polypeptides Caused by the Irradiation of Xenon Lamp in the Current Circular Dichroism Apparatus.* *Anal. Biochem.*, 219, 378-380 (1994).
- 39) 竹田邦雄, 森山佳子, “CD 測定上の問題点—光照射によるタンパク質の構造変化”, *生物物理*, 34, p.45 (1994).
- 40) 竹田邦雄, 森山佳子, “CD 測定中に蛋白質が受けるフォト・ダメージ—光照射による蛋白質の構造破壊”, *蛋白質 核酸 酵素*, 39, pp.2837-2841 (1994).
- 41) 森山佳子, 竹田邦雄, “光照射によるタンパク質構造の破壊”, *J. Illum. Engng. Inst. Jpn.* (照明学会誌), 78, pp.65-67 (1994).

Structural Changes of Proteins by Surfactants

Kunio TAKEDA

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,
Okayama University of Science
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

(Received September 1, 2014; accepted November 6, 2014)

The interaction of an ionic surfactant, sodium dodecyl sulfate (SDS), with proteins was reviewed. Bovine serum albumin (BSA) was mainly selected as a counterpart of SDS. The SDS-induced secondary structural changes of some proteins including BSA and homopolypeptides, poly(L-lysine) and poly(L-ornithine), were quantitatively examined by the curve-fitting method of circular dichroism (CD) spectra. The structural change of BSA molecule was discussed in detail on the basis of the investigation of the structural changes of BSA fragments corresponding 1.5, 1, and 0.5 domains. The first kinetic studies of the structural changes of these proteins and homopolypeptides caused by the surfactants were also made by applying CD stopped-flow method. The proposed mechanism put forward an important question against the general understanding of the chemical equilibrium of protein denaturation. Recent studies of the thermal denaturations of proteins up to 130 °C also showed that the chemical equilibrium of $N \rightleftharpoons D$ of each protein exists only in a restricted temperature range.

Keywords: surfactant; protein; Sodium dodecyl sulfate; Bovine serum albumin; circular dichroism; secondary structure; protein structure.

Capillary zone electrophoretic separation of carbon microparticles

Takashi Yokoyama, Yuta Shiraishi*, Keiji Tada*, Wakako Masuda, Masaaki Sugiyama,

Akira Maekawa, and Michio Zenki

Department of Chemistry, Faculty of Science,

**Graduate School of Science,*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 8, 2014; accepted November 6, 2014)

Capillary zone electrophoretic separations of carbon particles in micrometer and submicrometer sizes were achieved in an aqueous 10 mM sodium tetraborate solution containing 10%(w/v) polyethylene glycol 400 at pH 9.2 as background electrolyte solution (BGE). Since migration time of the carbon particle increased with increasing its size, it was shown that the larger size of the carbon particle had a more negatively electric charge. Electropherograms corresponded to histograms of size distributions from images observed by scanning electron microscope (SEM) or a digital microscope. The size distribution could be measured within 20 min by capillary electrophoresis (CE). This means that the generally well-used SEM could be replaced by CE for measurements of size distributions for the carbon particles in micrometer and submicrometer, because the CE measurement could be easier than SEM at a shorter time. Also, a surface density of electric charge for a graphitic carbon microparticle of a 3.6 μm diameter was obtained from electrophoretic mobility measured by CE. It was $-1.1 \times 10^{-5} \text{ C m}^{-2}$ at 30°C. Since this value would depend on numbers of proton-dissociating carboxyl and phenol groups on the carbon microparticle in BGE, it could be used as an index to estimate oxidized carbons on the surface of carbon microparticles.

Keywords: capillary electrophoresis; carbon microparticle; electrophoretic mobility; size distribution; surface density of electric charge.

1. Introduction

A number of investigations for separation of nano- and microparticles have recently been reviewed.¹⁾⁻¹⁵⁾ Size exclusion chromatography, field flow fractionation (FFF), and capillary electrophoresis (CE) have mainly been applied to these investigations. Since these retention or migration times and peak widths depend on these diameters and size distribution, respectively, those values are useful for characterization of sizes and concentrations of the nano- or microparticles. Although these separations have been achieved, these have not been obtained a

satisfactory peak resolution. CE has also been applied to the separation of nanoparticles, such as gold, silver, metal oxides, quantum dots, colloids, polymers, liposomes, and viruses.¹⁾⁻¹⁵⁾ These separations of the nanoparticles have been achieved. On the other hand, applications of CE to separations of a few kinds of microparticles, which are microorganisms, such as mitochondria, bacteria, and biological cells, and aerosol particles, have been reported,^{3),10),16)-22)} although generally useful capillary tubes of inner diameters from 50 to 100 μm are considered to be too narrow for the separation of the microparticles. It is

suggested that the microorganisms would migrate one by one in the capillary tube. However, their separation mechanism has not been obvious. Therefore, the electrophoretic behavior of the microparticles in the capillary tube is of interest.

Generally, sizes of 2 – 10 μm of microparticles, such as silica gel, octadecyl silica gel, synthetic polymer, and graphitic carbon, have generally been applied as packing materials of column in liquid chromatography (LC). It is also very important for those manufacturers to control a quality for these sizes and shapes of the microparticles, because a packing column using different sizes and shapes of the microparticles often gives a poor separation for analytes. The size and shape of packing materials could be generally characterized from images of scanning electron microscope (SEM) and a transmission electron microscope (TEM). It is needed to acquire great skill for the SEM and TEM measurements. Furthermore, those sample preparations are troublesome and spend a long time. Therefore, it is required to observe a size distribution of microparticles via an easy sample preparation and a fast measurement. Since CE could relatively conduct the faster measurement and the easier sample preparation, it is interesting to investigate the CE measurement for the size distribution of microparticles.

Carbons have been used as industrial sources of various carbon products, such as an activated carbon, an electrode and a capacitor. Also, many carbon-based nanomaterials, such as fullerene, carbon nanotube, graphene, and carbon dots, have recently been applied to a field in analytical chemistry.²³⁾⁻³²⁾ Carbon microparticles have been used as packing materials of LC known as a graphitic carbon column. These carbon particles are generally prepared from combustion of organic materials. The combustion produces many alcohols, phenols, ethers, ketones, aldehydes, and carboxyl groups oxidized many carbons on surface of the carbon particles. Especially, these phenols and carboxyl groups cause a negatively electric charge of the carbon particles in an aqueous solution. Therefore, the carbons inhibit different chemical properties dependent on size, shape, surface condition and impurity. For example, although carbons do not generally inhibit fluorescence and are insoluble in water, carbon

nanoparticles of diameter of *ca.* 1 nm inhibit fluorescence and are soluble in water.^{25),31),33)} This is suggested by a reason why many hydrophilic hydroxyl and carboxyl groups exist on surface of these carbon particles. Accordingly, it is very important for the manufactures to control those qualities and to explore the surface conditions.

A separation of carbons is one method to control the quality of carbon particles. In case of carbons in nanometer size, their separations have been investigated by CE, FFF, LC, and sedimentation. CE generally produces a high resolution of analytes, comparing to FFF, LC, and sedimentation. The CE separations of graphene oxide and chemically converted graphene,^{34),35)} chemically modified fullerenes,³⁶⁾ single-walled carbon nanotubes,³⁷⁾ and carbon nanoparticles³⁸⁾ have been reported. The peak resolution and electrophoretic mobilities (μ_{ep}) of the various carbon nanomaterials of different surface conditions, sizes, shapes and impurities are useful for an evaluation to characterize these properties. However, the carbon nanomaterials have shown a broad peak and their CE separations have not been obtained a satisfactory peak resolution. Therefore, a further CE investigation would be needed to estimate the surface conditions, sizes, and shapes of the individual carbon nanomaterials.

In case of carbons in micrometer size, separation of graphene oxide sheets has been reported by sedimentation.³⁹⁾ A separation of carbon particles in the micrometer size has not been applied to CE. However, it is expected that the carbon micromaterials might migrate one by one like microorganisms or that these populations in the capillary tube might depend on the size distribution in a sample. Therefore, the CE separation might be useful for measurement of size distribution of carbon microparticles. Furthermore, an electrophoretic behavior of relatively large carbon microparticles in *ca.* 100 μm i.d. capillary of limited space is interested. Accordingly, the CE separation of the carbon microparticles was investigated.

2. Experimental

2-1 Apparatus

CE measurements were carried out on a CAPI-3200 instrument (Otsuka Electron., Osaka, Japan), equipped with a UV-visible absorbance

detector, and an autosampler in a thermostated room. A 500 mm long (378 mm to detector cell), 75 μm i.d. fused silica capillary (GL Science, Tokyo) was used. All measurements were performed at 30°C. Sample injection was carried out in the hydrodynamic mode, while keeping the capillary end at 25 mm height for 180 s, unless otherwise stated. The applied voltage used was 20 kV, unless otherwise stated. Carbons were monitored at 600 nm on side of cathode, because any water-soluble impurities like aromatic compounds in the carbons were not detected at this wavelength.

Carbons were characterized by a SEM JSM-6490 (JEOL, Tokyo), a digital microscope VHX-1000 (Keyence, Osaka, Japan), or a TEM H8100 (Hitachi, Tokyo).

The viscosity and density of background electrolyte solution (BGE) at $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ were measured using an Ostwald viscometer and a Density/Specific Gravity Meter DA-110 (Kyoto Electron., Kyoto, Japan), respectively.

2-2 Reagents and materials

The reagent grade sodium tetraborate was purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Polyethylene glycol (PEG) 200, 400, 1000, 2000, and 6000 were purchased from Wako (Osaka, Japan). Porous graphitic carbon particles 3 (A), 5 (B), and 7 μm (C) were pulled out from Hypercarb column (Thermo Scientific, Waltham, MA), and grassy, spherical carbon powder 2 – 12 μm (D) and graphitized carbon black nanopowder <500 nm (E) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), where the symbols A – E for these carbon particles are used. Various non-spherically broken carbons of 3, 4, 6, 7, 11 and 15 μm were gifted from Kuraray (Kurashiki, Japan). The symbol F for the non-spherical broken carbon of 7 μm is used.

Carbon submicroparticles were prepared by heating 4 g of glucose (Wako) dissolved in 20 ml of water in a Teflon crucible put on a lid at 180°C for 5 (G), 10 (H), 15 (I), and 20 h (J), where the symbols G – J for these prepared carbon submicroparticles are used, isolating carbon particles by centrifugation at 5000 rpm for 20 min, washing by water and ethanol, and drying at 80°C for 8 h, according a published preparation method.^{40,41)}

All water was purified using a Milli-Q water

system (Millipore, Bedford, MA), after distillation through a mixed ion-exchange resin column.

2-3 Procedure

The capillary was first conditioned with 1 M NaOH for 3 min. It was automatically washed with water for 3 min and rinsed with BGE for 3 min between runs. The BGE, which was prepared from PEG 400 and aqueous sodium tetraborate solution, was filtrated through a 0.45 μm hydrophilic polytetrafluoroethylene filter (Advantec, Tokyo), before using. A small dip peak due to a small difference of refractive indices between sample and BGE or acetophenone was used as an electroosmotic flow (EOF) marker. The time of the dip peak corresponded to migration time of acetophenone well-used as the EOF marker. The sample solutions were prepared as the 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solution distributed the carbons into BGE, unless otherwise stated. The μ_{ep} values were calculated from an equation (1)

$$\mu_{\text{ep}} = l_d l (t^{-1} - t_0^{-1}) V^{-1} \quad (1),$$

where l_d , l , t , t_0 , and V are the capillary length to detector, the total capillary length, the migration time of carbon, the EOF time, and the applied voltage, respectively.⁴²⁾

3. Results and discussions

3-1 Characterization of carbons

Figure 1 shows typical SEM, digital microscope

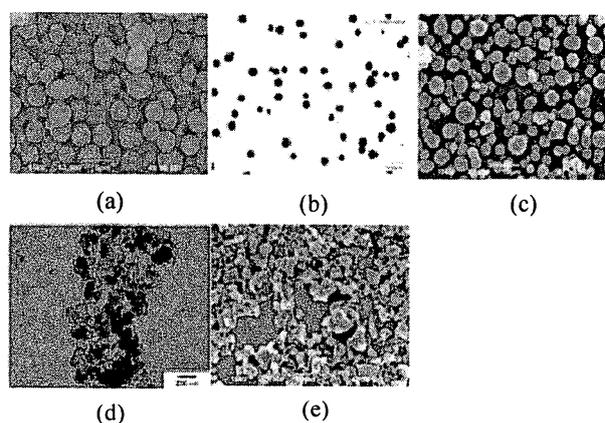


Figure 1. SEM, digital microscope, or TEM images of carbons. Carbon particles: A (a), B (b), D (c), and E (d); non-spherically broken carbons: F (e). The carbons of the symbols (a), (c) and (e), (b), and (d) were measured by SEM, digital microscope, and TEM, respectively.

or TEM images of carbon particles A, B, D, E, and non-spherically broken carbons F. Digital microscope image of carbon particles C was nearly the same as B. Almost all these carbon particles of A – E were spherical. The non-spherically broken carbons F of 7 μm were various shapes and sizes. The SEM images for the other non-spherical broken carbons of 3, 4, 6, 11, and 15 μm , which were measured as probably medians by the manufacturer, were almost the similar to those for F. These average diameters of the non-spherical broken carbons measured from the SEM images by a scale in this work were 6.1 ± 2.8 ($n = 579$), 5.0 ± 2.6 (490), 4.2 ± 2.5 (1095), 4.4 ± 2.5 (1065), 6.3 ± 4.3 (1190), and 7.8 ± 5.6 μm (1492), respectively, where n is number of the carbons measured from the SEM images by a scale, error is standard deviation, and the longest diameters of non-spherically broken carbons were measured as each of the diameters. Since the deviations of these average diameters were large, F of 4.4 ± 2.5 μm was mainly used in CE measurements as the representative non-spherically broken carbons. Figure 2 shows typical SEM images of prepared carbon submicroparticles. Although these shapes were spherical, many carbon submicroparticles were stuck together.

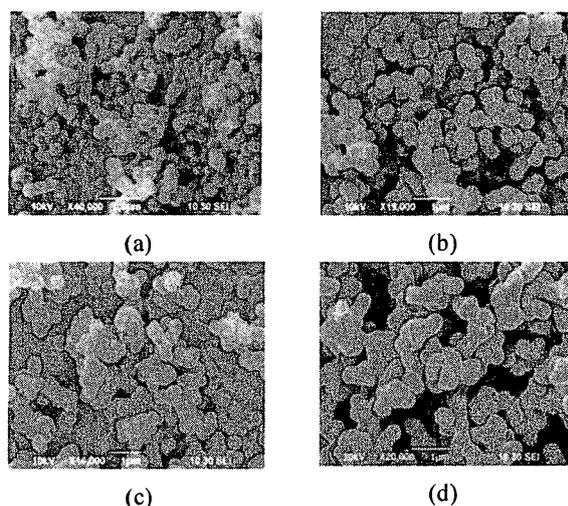


Figure 2. SEM images of prepared carbon submicroparticles. Prepared carbon submicroparticles: G (a), H (b), I (c), and J (d).

The average diameters of the carbons A – J measured from the microscope images are summarized in Table 1. The deviations of the average diameters for the carbons A – C, G and H were

relatively small, compared to those of D – F, I and J. The average diameters of the prepared carbon submicroparticles increased with increasing the heating time to prepare them.

Table 1 Average diameters of carbons measured from microscope images

Carbon	Average diameter / $\mu\text{m}^{1)}$	$n^{2)}$
A	3.2 ± 0.8	232
B	5.6 ± 0.7	133
C	5.7 ± 0.7	100
D	3.9 ± 1.2	292
E	0.044 ± 0.017	165
F	4.4 ± 2.5	1065
G	0.17 ± 0.03	100
H	0.41 ± 0.06	100
I	0.53 ± 0.18	100
J	0.75 ± 0.27	100

¹⁾ Error is standard deviation. ²⁾ n is number of carbons measured from microscope images by a scale.

Figure 3 shows typical histograms on size distributions of these carbon particles A, B, D and E. An obviously sharp mode (the largest population) of 3.6 μm was found in the histogram of the carbon microparticles A. On the other hands, the obviously sharp mode was not found in the histograms of carbon microparticles B, C and D. The wide range of sizes was found in the histogram of carbon nanoparticles E.

3-2 Dispersion medium of carbons

Some surfactants have generally been used as the dispersion medium of nanoparticles, such as gold nanoparticles.⁴³⁾ Halogenized solvents and heavy metal salts have often been used as additives to prepare a density of solution. Therefore, aqueous solutions of some cationic, anionic, and neutral surfactants, such as cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecylsulfate (SDS), sodium *n*-dodecylbenzenesulfonate (DBS), and Brij 58, of PEG 400, and of zinc sulfate, and 1-methyl-2-pyrrolidone solutions containing halogenized solvent, as the dispersion medium of sample to prevent coagulations and precipitation of the carbons, were investigated. The carbons of F in micrometer dispersed in the dispersion media

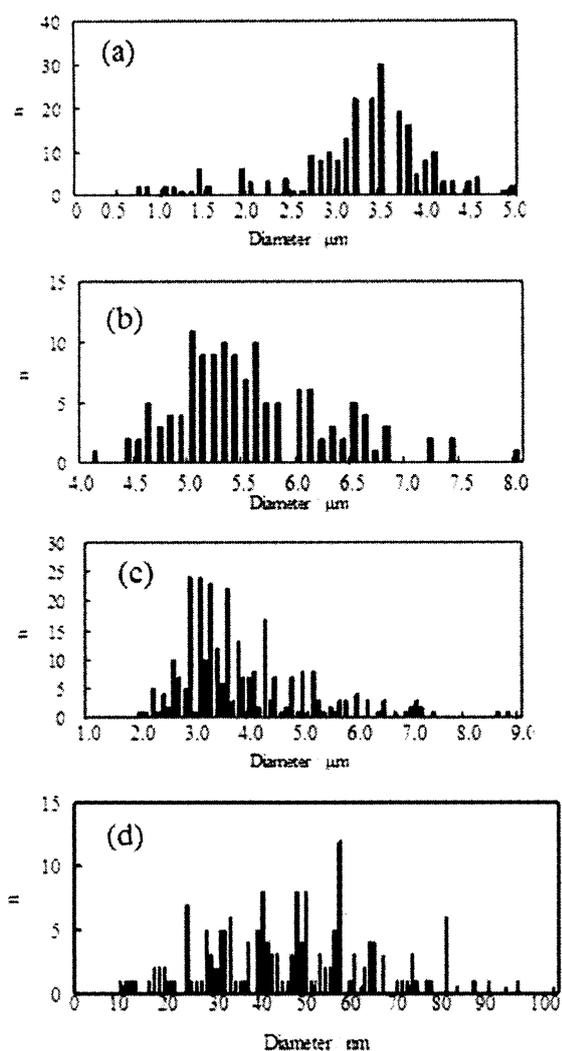


Figure 3. Histograms on size distributions of carbon particles measured from microscope images. Carbon particles: A (a), B (b), D (c), and E (d).

were stood in test tubes at room temperature. The media dispersing the carbons F for above several hours were as follows: aqueous solution of near saturated 35%(w/v) zinc sulfate, 0.01 – 0.07 M CTAB aqueous solution, 50 – 80%(w/v) PEG 400 aqueous solution, and 1-methyl-2-pyrrolidone solutions of >90%(v/v) 1,3-dibromopropane. On the other hands, the media occurred precipitations of the carbons F were as follows: 0.01 – 0.1 M SDS aqueous solution, 1.2×10^{-3} – 9.6×10^{-3} M DBS aqueous solution, 7.8×10^{-5} – 0.01 M Brij 58 aqueous solution, and mixed solutions of 1-methyl-2-pyrrolidone with chloroform or carbon tetrachloride. The anionic and neutral surfactants could not succeed in the dispersion of the carbons in

micrometer. The high concentration of cationic surfactant CTAB solution produced precipitants of the carbons, because the carbons have negatively electric charges in the aqueous solution. Since it is considered that CTAB would form ionic associates with the carbons even in the low concentration of CTAB solution, it could not be used as the dispersion medium. The 35%(w/v) zinc sulfate solution which has a high ionic strength would cause to occur a large joule heat during a measurement of CE. Also, the high concentration of 1,3-dibromopropane in 1-methyl-2-pyrrolidone solution could not produce EOF to require for the measurement of CE, because it has the very low relative permittivity. Therefore, these were not also used as the dispersion medium. Finally, the various PEG solutions were investigated in detail. The larger molecular weight and the higher concentration of PEG were, the longer dispersion life time of the carbons in micrometer was observed. Although the aqueous solutions of >20%(w/v) PEG 2000 and 6000 and of >60%(w/v) PEG 200 and 400 could disperse the carbons in micrometer for >24 hours, it was difficult to introduce these solutions into a 75 μm i.d. capillary for too high viscosity of these solutions. When the aqueous sodium tetraborate solutions with 40 – 50%(w/v) PEG 200 and 400 were used as BGE for CE, EOF became very slow. Therefore, it would spend a long time for the CE measurement of the carbons. Resultantly, the aqueous sodium tetraborate solution containing 10%(w/v) PEG 400 observed the dispersion life time of the carbons for several hours was used as the dispersion medium for both of sample and BGE, because the carbons in micrometer could be dispersed during the CE measurements and the proper EOF was available.

3-3 CE separation of carbons

Some conditions of kinds of electrolyte (sodium dihydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate, trisodium phosphate, and sodium tetraborate) in BGE, concentrations of the electrolyte (5 – 20 mM) and PEG 400 (0 – 30%(w/v)), pH (pH 4.5 – 11.8), applied voltage (10 – 25 kV), and sample injection time (30 – 180 s) for CE separation of carbon microparticles were investigated. When an aqueous 10 mM sodium tetraborate solution containing 10%(w/v) PEG 400 at pH 9.2 as BGE, 20 kV as the applied voltage, 180 s as the sample injection time were used, good

reproducibilities of electropherograms for the carbon microparticles A – C were available. However, the good reproducibility of electropherogram for the non-spherically broken carbon F was not available. In many cases of the CE measurements, the capillary tube was clogged by F. These would be reasons why these had the various shapes and a wide micrometer range of size distributions, as the SEM image shown in Fig. 1 (e). Also, these would be broken during the CE measurements, because these physical strengths were very weak. In cases of the other non-spherically broken carbons, the results were the same as those of F.

Figure 4 shows typical electropherograms of the carbon microparticles A, B, and D, where the electropherogram of the carbon microparticles C was almost the similar to that of B, because the average diameter of C was almost the same to that of B in Table 1. A number of sharp peaks of the carbon microparticles were observed on the electropherograms of A – D in micrometer size. The reproducibility of the electropherogram of E in nanometer size was poor, because the carbon E included various shapes with the spherical carbon nanoparticles and had the relatively large nanometer size distribution, as the image shown in Fig. 1 (d). Sharp and narrow peaks were observed for the carbon microparticles, although broad peaks have generally been observed for nanoparticles, such as gold and silver. In case of the particles in nanometer size, when many nanoparticles of almost the similar sizes could pass through a cell pass of 75 μm i.d. capillary, these peaks would be broad according to a normal distribution of the sizes. The nanoparticles of largely different sizes could be separated from each other. In case of the particles in micrometer size, only small population of microparticles could pass it through. For example, only the 15 microparticles as the largest population can stand in line on the cell pass of 75 μm i.d. for a 5 μm particle. Therefore, the peaks of the particles in the micrometer size were largely different from those in the nanometer size according to the normal distribution of the sizes. Each of the sharp peaks would be due to the individual carbon microparticles in the different micrometer sizes.

Generally, a migration time of an anionic solute toward a cathode decreases with increasing its size (hydrodynamic radius), because its μ_{ep} value is in

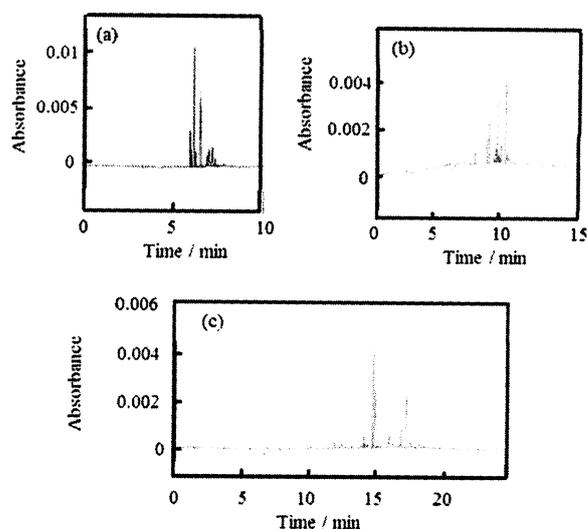


Figure 4 Electropherograms of carbon microparticles. Carbon microparticles: A (a), B (b) and D (c). Applied voltage: 20 kV; sample injection: 25 mm and 180 s; BGE: aqueous 10 mM sodium tetraborate solution containing 10%(w/v) PEG 400 at pH 9.2; sample: 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in BGE.

inverse proportion to its size (hydrodynamic radius).⁴²⁾ However, the migration time of the larger carbon particle was longer than that of the smaller carbon particle in the micrometer size. Since the hydration of the hydrophobic carbon microparticle would be weak, it is considered that the hydrodynamic radius would be almost the similar to the size of carbon microparticles without the hydration. In other words, thickness of the hydration would be negligible, compared to the very large size of the carbon microparticle. Therefore, the negatively electric charge of the carbon microparticle might increase with increasing its size.

Each of the electropherograms in Fig. 4 was almost the similar to each of the corresponding histograms on size distribution of carbon particles in micrometer size observed from microscopes in Fig. 3. This means that the electropherogram could obtain the size distribution of microparticles observed from the microscopes. In other words, the size distribution of microparticles could be observed by CE without the microscopes. Figure 5 shows an electropherogram and a histogram of mixture of carbon microparticles A – C. The electropherogram completely corresponded to the histogram on size distribution. The highest peak would correspond to that of a

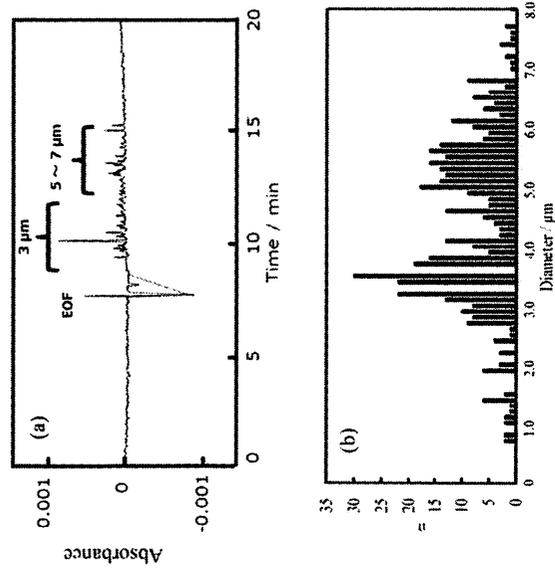


Figure 5. Electropherogram (a) and histogram (b) of mixtures of carbon microparticles A – C. Concentrations of carbon microparticles A, B, and C were 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ each. Other conditions as in Fig. 4.

diameter of the largest population of the carbon microparticles. The corresponding diameter was 3.6 μm from Fig. 3 (a) or Fig. 5 (b). Therefore, each of the migration times of the carbon microparticles could be related to each of the diameters of the carbon microparticles.

Figures 6 and 7 show typical electropherograms and histograms of the prepared carbon submicroparticles G and I, respectively. Only a broad peak was observed on the electropherogram of carbon submicroparticle G of 170 nm in the smallest nanometer size in this work. The size deviation of G was relatively small in Table 1. It is considered that both of the small size deviation and the small submicroparticle size of G produced the broad peak. In case of I of 530 nm larger than G, many sharp peaks on a broad peak were observed. The combination of broad and sharp peaks might be due to a co-migration of the relatively large carbon submicroparticles (sharp peaks) with the relatively small carbon submicroparticles (broad peak) coexisted in I. The many sharp peaks would show that some monodisperse carbon submicroparticles migrated without their coagulation, because the whole image for the sharp peaks on the electropherogram nearly corresponded to the whole image of the histogram of size distribution for I in Fig. 7 (b), as the case of carbon microparticles. The

results of the carbon submicroparticles H and J were almost the similar to that for I.

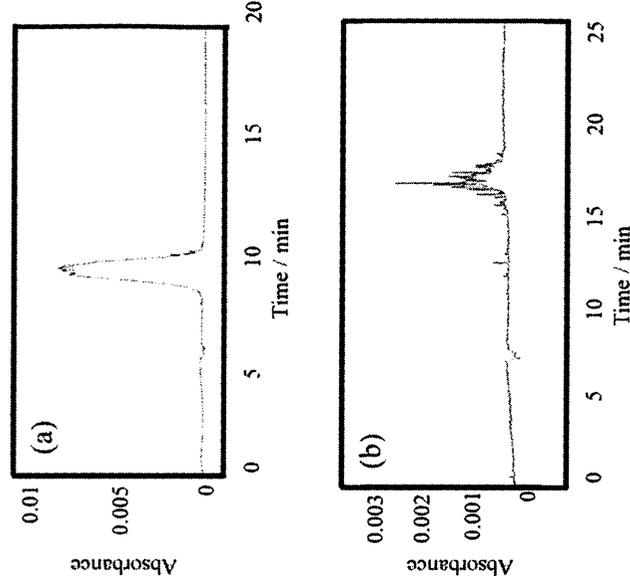


Figure 6. Electropherograms of prepared carbon submicroparticles. Prepared carbon submicroparticles: G (a) and I (b). Other conditions as in Fig. 4.

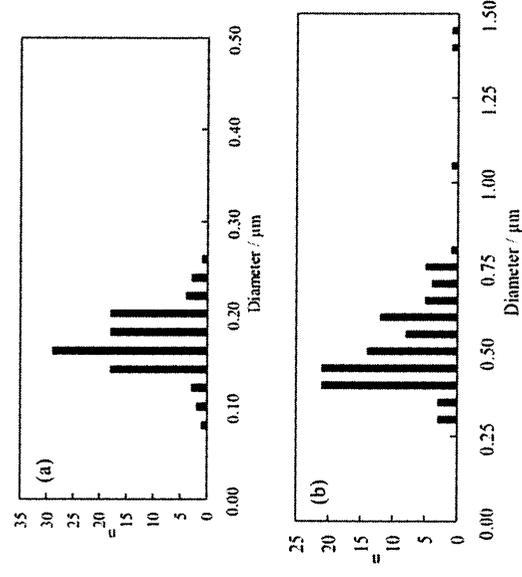


Figure 7. Histograms on size distributions of prepared carbon submicroparticles. Prepared carbon submicroparticles: G (a) and I (b).

3-4 Surface density of electric charge of carbon microparticle

The μ_{ep} value depends on both size and electric charge of solute from equation (2)

$$\mu_{ep} = q / 6\pi\eta r \quad (2),$$

where q , η , and r are the electric charge of solute (the apparent electric charge of carbon particle), the BGE viscosity, and the solute (carbon particle) radius, respectively.⁴²⁾ It has been reported that the equation (2) could not apply to nanoparticles.⁴⁴⁾ In case of the carbon microparticles, since it is considered that thickness of hydration would be negligible, due to the very large size of microparticle and a weak hydration of hydrophobic carbon microparticles, it can be assumed that the equation (2) can apply to the carbon microparticles. Furthermore, since the radius of carbon microparticle is very larger than water and PEG molecules and ions in BGE, an increase of the radius due to an ion association, the hydration, and an adsorption between carbon microparticle and ions, water or PEG molecules in BGE would be negligible. Therefore, the half diameter of spherical carbon microparticle observed from microscope image could be used as the r value. The r value of the largest population of carbon microparticle on histogram of size distribution would correspond to the highest peak on the corresponding electropherogram. Therefore, the half diameter of the largest population of the carbon microparticle A on histogram in Fig. 3 (a) was used. The r value was 1.8 μm . Also, the μ_{ep} value was calculated from a migration time of the highest peak in Fig. 4 (a) for the carbon microparticle A by eqn (1). The μ_{ep} value was $-1.07 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The density and viscosity of water at 30°C used are 0.99565 g cm^{-3} and 0.7977 mPa s , respectively.⁴⁵⁾ The BGE density and viscosity measured at $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ were 1.0150 g cm^{-3} and 1.202 mPa s , respectively. Therefore, an apparent electric charge of the carbon microparticle A, which was spherical in Fig. 1 (a), was calculated from eqn (2). The apparent q value was $-4.4 \times 10^{-16} \text{ C}$. As the carbon microparticle A was spherical, the surface density of electric charge of A was $-1.1 \times 10^{-5} \text{ C m}^{-2}$. Since it is considered that the negative surface density of electric charge would be related to numbers of proton-dissociating phenols and carboxyl groups existing on the surface of the carbon microparticle in BGE, the surface density of electric charge would depend on methods and source materials to prepare the carbon microparticles, pH and interactions of BGE with the carbon microparticles. However, the value could be used as an index of surface conditions for the carbon

microparticle.

The μ_{ep} values of carbon microparticle B prepared by the same manufacturer were observed in range of -2.20×10^{-4} to $-2.32 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in Fig. 3 (b). The average diameter of the carbon microparticle B was 5.6 μm in Table 1. Therefore, the apparent q values were approximately in range of -1.4×10^{-15} to $-1.5 \times 10^{-15} \text{ C}$ from eqn (2). The apparent q values of the larger size of the carbon microparticle B were obviously smaller than the carbon microparticle A. Therefore, B was more negative than A. The apparent q value became more negative with increasing the size of carbon microparticle. The numbers of dissociating phenols and carboxyl groups would increase with increasing with the size of carbon microparticle in BGE. In other words, the oxidized surface area of carbons on carbon microparticle would increase with increasing the size of the carbon microparticle. Consequently, the larger size of carbon microparticle migrated faster toward an anode (longer migration time).

The surface density of electric charge of B was approximately $-1.5 \times 10^{-5} \text{ C m}^{-2}$ from the apparent q values. The surface density of electric charge of B was near to A. Since both of A and B were prepared as a graphitic carbon microparticle by the same manufacturer, the surface conditions of the carbon microparticles would be like each other. Therefore, it is considered that the surface density of electric charge could be used as a specific value for a characterization of the carbon microparticles, such as preparation method and oxidized conditions of surface.

4. Conclusions

It was found that PEG 400 could be used as a dispersive reagent of carbon microparticles in a CE measurement. Carbon microparticles migrated faster toward an anode (longer migration time) with increasing its size. Many sharp peaks of the carbon microparticles on electropherogram were observed. The electropherogram of the sharp peaks corresponded to a shape of histogram on size distribution of the carbon microparticles. This shows that CE could determine the size distribution of the carbon microparticles at a short time without a measurement of SEM. Furthermore, both of the apparent electric charge q and the surface density of

electric charge of carbon microparticle were available. The apparent q value and the surface density of electric charge at 30°C for a 3.6 μm graphitic carbon microparticle were -4.4×10^{-16} C and -1.1×10^{-5} C m^{-2} , respectively. These values could be used as indices to evaluate oxidized conditions of carbons on a surface of the carbon microparticle.

This work was partly supported by a "Green and Element Chemistry" Project for Private Universities: matching fund subsidy from MEXT (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology). We thank Prof. Minoru Fukuhara of Department of Bio-applied Chemistry, Okayama University of Science (OUS), and Associate Prof. Makoto Takezaki of Department of Bio-applied Chemistry, OUS, and Associate Prof. Genta Sakane of Department of Chemistry, OUS for helpful advice on SEM, TEM, and digital microscope measurements, respectively. We also thank Mr. Hideharu Iwasaki of Kuraray Co. for gift of some carbon samples.

5. References

- 1) A. Chrambach, S. P. Radko, *Electrophoresis*, 2000, 21, 259-265.
- 2) S. P. Radko, A. Chrambach, *Electrophoresis*, 2002, 23, 1957-1972.
- 3) M. A. Rodriguez, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. B*, 2004, 800, 7-25.
- 4) I. G. Arcibal, M. F. Santillo, A. G. Ewing, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 51-57.
- 5) V. Kostal, E. A. Arriaga, *Electrophoresis*, 2008, 29, 2578-2586.
- 6) M. Barut, A. Podgornik, L. Urbas, B. Gabor, P. Brne, J. Vidič, S. Plevčak, A. Štrancar, *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 1867-1880.
- 7) F.-K. Liu, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 9034-9047.
- 8) N. Surugau, P. L. Urban, *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 1889-1906.
- 9) U. Pyell, *Electrophoresis*, 2010, 31, 814-831.
- 10) X. Subirats, D. Blaas, E. Kenndler, *Electrophoresis*, 2011, 32, 1579-1590.
- 11) M. R. Ivanov, A. J. Haes, *Analyst*, 2011, 136, 54-63.
- 12) M. Baalousha, B. Stolpe, J. R. Lead, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 4078-4103.
- 13) G. Yohannes, M. Jussila, K. Hartonen, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 4104-4116.
- 14) S. Oszwaldowski, K. Z.-Gibula, K. P. Roberts, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 2831-2842.
- 15) P. S. Fedotov, N. G. Vanifatova, V. M. Shkinev, B. Y. Spivakov, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 1787-1804.
- 16) C. F. Duffy, K. M. Fuller, M. W. Malvey, R. O'Kennedy, E. A. Arriaga, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 171-176.
- 17) B. G. Poe, M. Navratil, E. A. Arriaga, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1137, 249-255.
- 18) J. M. Davis, E. A. Arriaga, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 6335-6342.
- 19) J. Petr, O. Ryparová, J. Znalezioná, V. Maier, J. Ševčík, *Electrophoresis*, 2009, 30, 3863-3869.
- 20) J. M. Davis, E. A. Arriaga, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 307-315.
- 21) H. Tang, S. Hiemstra, J. E. Thompson, *Anal. Chim. Acta*, 2011, 702, 120-126.
- 22) M. Geiger, A. L. Hogerton, M. T. Bowser, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 577-596.
- 23) S.-T. Yang, X. Wang, H. Wang, F. Lu, P. G. Luo, L. Cao, M. J. Meziani, J.-H. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Huang, Y.-P. Sun, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 18110-18114.
- 24) S. C. Ray, A. Saha, N. R. Jana, R. Sarkar, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 18546-18551.
- 25) S. N. Baker, G. A. Baker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 6726-6744.
- 26) K. Scida, P. W. Stege, G. Haby, G. A. Messina, C. D. García, *Anal. Chim. Acta*, 2011, 691, 6-17.
- 27) Z. Lin, W. Xue, H. Chen, J.-M. Lin, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 8245-8251.
- 28) M. Delay, F. H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 402, 583-592.
- 29) G. A. P.-Trumpie, J. H. Wichers, M. Koets, L. B. J. M. Berendsen, A. van Amersongen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 402, 593-600.
- 30) F. P. Zamborini, L. Bao, R. Dasari, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 541-576.
- 31) W. Lu, X. Qin, S. Liu, G. Chang, Y. Zhang, Y. Luo, A. M. Asiri, A. O. A.-Youbi, X. Sun, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 5351-5357.
- 32) Y. Li, L. Xu, T. Chen, X. Liu, Z. Xu, H. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 2012, 726, 102-108.
- 33) H. Liu, T. Ye, C. Mao, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 6473-6475.
- 34) M. B. Müller, J. P. Quirino, P. N. Nesterenko, P. R. Haddad, S. Gambhir, D. Li, G. G. Wallace, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 7593-7597.
- 35) J. Zhao, G. Chen, W. Zhang, P. Li, L. Wang, Q. Yue, H. Wang, R. Dong, X. Yan, J. Liu, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 9100-9106.
- 36) K. C. Chan, A. K. Patri, T. D. Veenstra, S. E. McNeil, H. J. Issaq, *Electrophoresis*, 2007, 28, 1518-1524.
- 37) M. L.-Pastor, A. D.-Vidal, M. J. A.-Cañada, B. M. Simonet, B. Lendl, M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 2672-2679.
- 38) J. S. Baker, L. A. Colón, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 9048-9054.
- 39) X. Wang, H. Bai, G. Shi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133,

6338-6342.

40) X. Sun, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 597-601.

41) X. Sun, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 3827-3831.

42) D. R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley and Sons, New York, 1995.

43) F.-K. Liu, G.-T. Wei, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 510, 77-83.

44) A. Ibrahim, H. Ohshima, S. A. Allison, H. Cottet, *J. Chromatogr. A*, 2012, 1247, 154-164.

45) D. R. Lide (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 80th ed., CRC press, Boca Raton, FL, 1999-2000.

天然酵素ペルオキシダーゼ触媒活性を持つ備前焼と鉄さびによる過酸化水素とグルコースの検出に関する研究

小嶋 健博

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

(2014年9月30日受付、2014年11月6日受理)

1. 緒言

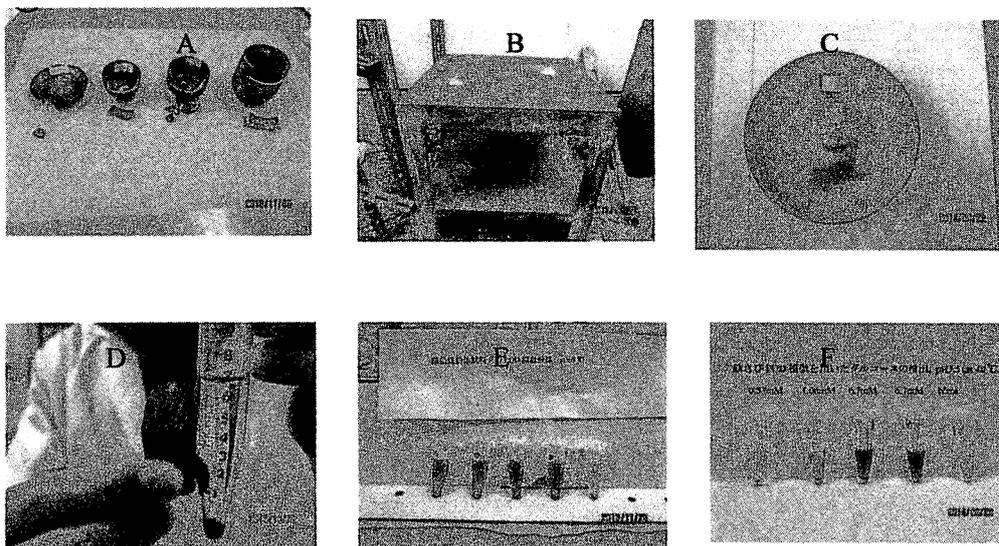
天然酵素は温度、pH や環境変化による変性、調製や精製が高価である欠点がある。近年、天然酵素に代わるペルオキシダーゼ(POD)を模倣した金属や酸化物ナノ粒子の研究が盛んに行われるようになった。

最初の研究は、これまで生物学的、化学的にも不活性と考えられていた Fe_3O_4 マグネタイトナノ粒子(MNPs)が天然酵素 POD のような触媒活性を持つことを Gao 等¹⁾が発見して以来、同様の触媒活性を持つ研究が多く報告^{2,3)}されるようになった。著者は備前焼の独特の色彩は酸化鉄に由来し⁴⁾、備前焼の中に POD のような触媒活性をもつ MNPs が含まれているのではという疑問から研究を開始した。

過酸化水素溶液に基質として 2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾ-チアゾリン-6-スルホン酸) ジアンモニウム塩(ATBS)溶液と備前焼の紛体を加えると青色を呈色し ABTS の酸化反応を促進することを見いだした。また、備前焼の代わりに自然界に存在する鉄さびも同様の触媒作用を示し、POD を模倣する触媒活性を有することも見いだした。本研究では、備前焼と鉄さびを用い、過酸化水素とグルコースの検出条件に及ぼす培養時間、pH、過酸化水素濃度、および温度の影響について検討したので報告する。

2. 結果と考察

Fig.1 Bizenyaki and Iron corrosion show peroxidase-like activity. A; Bizenyaki, B; Iron corrosion, C; Bizenyaki powder, D; Iron corrosion powder, E; Bizenyaki-ABTS- H_2O_2 , F; Iron corrosion-ABTS-Glucose.

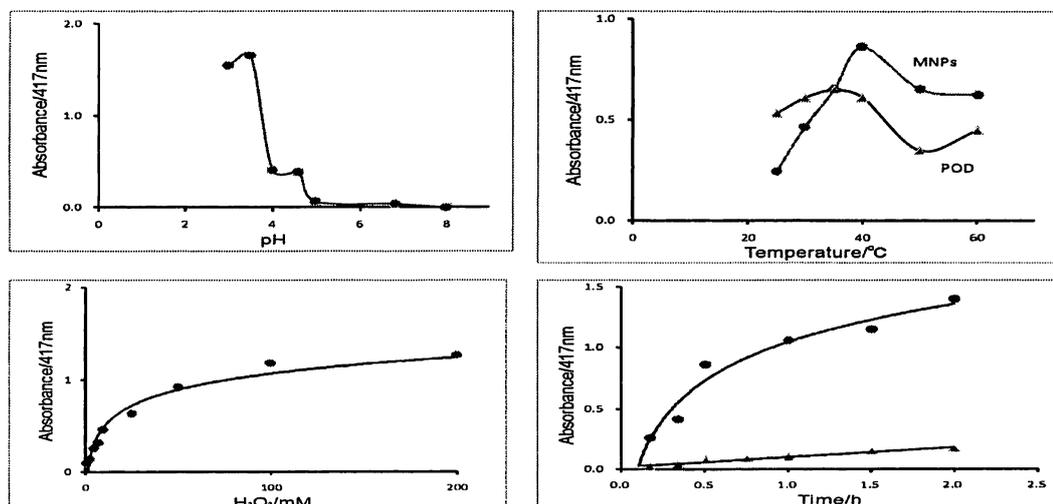


この実験に使用した備前焼 (A)と鉄さび (B)、その紛体を (C)と (D)に示した (Fig.1)。Fig1 の(D)

から鉄さびは磁性を有することを示している。過酸化水素溶液に基質として ABTS, 備前焼粉体を加えると青色を呈した (E)。はじめにグルコース溶液に酵素グルコースオキシダーゼ (GOX) を加え, グルコースをグルコン酸と過酸化水素に分解したのち, 基質 ABTS と鉄さびを加えたときの発色を Fig.1 の (F) に示した。この結果から備前焼粉体と鉄さびが天然酵素 POD の作用をすることを発見した。この POD 作用は, 備前焼や鉄さび中の MNPs が溶液中に溶け出し, 球状ナノ粒子の表面に存在する Fe^{2+} イオンが過酸化水素を水酸化イオンとヒドロキシラジカルに酸化分解し, このラジカルが基質である ABTS を酸化すると推定される⁹⁾。溶液中に溶出した MNPs の大きさは DLS 分析から 80nm と 130nm の粒子が存在し, 比色分析と ICP 分析から溶液中の鉄濃度は 0.5ppm 前後の溶出が見られた。また, 鉄さびや備前焼を 0.2M 酢酸緩衝溶液 (pH3.5) と混合した溶液を 40 °C で恒温槽中で振とう後, No5A ろ紙 (ϕ 90mm) を用いてろ過した。そのろ液とろ過に使用したろ紙が天然酵素 POD 作用を示したことから, 上記で溶出した MNPs が POD 作用をすることを推定できる。また, X 線解析と FT-IR 分析から 1600cm^{-1} と 3400cm^{-1} 付近に OH 吸収帯と 580cm^{-1} 付近に Fe-O 吸収帯がみられ⁹⁾, 鉄さび中に $\alpha\text{-FeOOH}$ が存在することがわかった。この MNPs の POD 作用は汚泥処理上で有機物の分解に使用されている Fenton 反応に類似したメカニズムで酸化促進が起こるものと思われる。

MNPs の POD 触媒作用に及ぼす過酸化水素濃度, pH, 温度の影響について検討した。その結果を Fig.2 に示した。pH については pH3.5, 温度 40 °C, 過酸化水素濃度については, 典型的なミカエリスメンテン曲線を示し, 過酸化水素濃度 0.5mM から 10mM まで直線となった。また, 培養時間は 60min で平衡に達した。この結果, 過酸化水素の分析に備前焼と鉄さびが POD として応用できることがわかった。次にグルコースオキシダーゼ (GOX) と MNPs を用いたグルコースの検出について検討した。グルコースの検出は 2 段階反応, 最初, 培養温度 35 °C, pH6.8 のリン酸緩衝溶液中で酵素 GOD によるグルコースの酸化で過酸化水素が生成する。次に培養温度 40 °C, pH3.5 の 2M 酢酸緩衝溶液に備前焼 (鉄さび) と基質として ABTS を加え培養した結果, 0.5mM から 10mM のグルコースを分析できることがわかった (Fig.1 の (F))。本研究から, 新たに備前焼は第 3 の機能, 活性酸素や過酸化水素を消化する酵素 POD 触媒作用に類似した機能を持つことが判明した。これらの鉄さびや備前焼粉体は安価で将来, 臨床, 環境分野, バイオセンサーや磁性を利用した新しい分離・分析法の開発に応用できると期待される。

Fig.2 The peroxidase-like activity of the Bizenyaki and iron corrosion is pH, temperature, H_2O_2 concentration and incubation time.



3. 実験方法

試薬と装置：ATBS, POD (1.11.1.7)はシグマ製, バソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウム, 酢酸, 酢酸ナトリウムはナカライテスク製試薬を, その他の試薬はすべて試薬特級品をそのまま使用した。純水はイオン交換水をミリQに通したものを使用した。備前焼はカッターで約1cm角に切断し, メノウ乳鉢で粉碎混合したものを, 鉄さびは本学キャンパスで採取した鉄さびを磁石で選別したものを使用した (Fig.1)。分光光度計は日立製作所製 D-5100, pHメータは堀場 D-51, 培養にはタイテック製パーソナル-11SDセットを使用した。

測定：マイクロチューブ (1.5ml) に鉄さび (備前焼粉末) 1.0mg 前後はかり取り, 1.0~100mM 過酸化水素溶液 20 μ L, 10.4mM ABTS 100 μ L, 0.2M 酢酸緩衝溶液 (pH3.5) 200 μ L と水を加え 1.0ml にした。このマイクロチューブを 40 $^{\circ}$ C にセットした恒温槽に入れ 2.0h 培養後, 5.0ml メスフラスコに試料 0.5ml 採取し, 水で全容 5.0ml にしたのち, 1.0cm ガラスセルを用い波長 417nm で吸光度を測定した。

参考文献

- 1) L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett and X. Yan: Nat. Nanotechnol., 2, 577 (2007).
- 2) 水口仁志：ぶんせき, 6, 352 (2013).
- 3) J. Xie, X. Zhang, H. Wang, H. Zheng, Y. Hung: Trends. Anal. Chem., 39, 114 (2012).
- 4) 山本雄一監修; 土井章, 草野圭弘, 山口一裕, 福原実: "やきもの"の話 -備前焼の楽しみ-, (2007), (加計学園教育振興会広報室).
- 5) R. C. C. Coate, F. C. C. Moura, J. D. Ardisson, J. D. Fabris, R. M. Lago: Applied Catalysis B, Environ. 83, 131 (2008).
- 6) J. Jiang, J. Zou, L. Zhu, L. Huang, H. Jiang and Y. Zhang: J. Nanosci. Nanotechnol., 11, 4793 (2011).

Peroxidase-like Activity of Bizenyaki and Iron Corrosion and its Applications in H₂O₂ and Glucose Detection

Takehiro Kojima

*Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science,
1-1, Ridai-cho, Kita-ku, Okayama-shi, 700-0005, Japan*

(Received September 30, 2014; accepted November 6, 2014)

The present paper demonstrate the proof of concept of using Bizenyaki and iron corrosion as an effective peroxidase substrate 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) in the presence of H₂O₂ to produce a blue solution. I further demonstrate successfully Bizenyaki- or iron corrosion-based colorimetric assay to detect H₂O₂ and glucose.

Keyword: Peroxidase mimetic; Bizenyaki; Iron Corrosion; Detction of H₂O₂ and Glucose; ABTS.

ニコチン投与とうつ様行動の関係性の解明

小川 真実・坂本 祐介*・小川 琢未

松尾 由美・橋川 成美・橋川 直也

岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

*岡山県岡山市立岡輝中学校

(2014年8月26日受付、2014年11月6日受理)

多くの疫学研究により禁煙とうつ病は密接な関係があることが報告されているが、ニコチン投与がうつ様行動に及ぼす影響については不明な点が多い。今回、マウスにニコチンを投与し、強制水泳試験法を用いてうつ様行動の解析をすることによりニコチンとうつ様行動との関係を解析した。ニコチン投与方法は、2週間毎日2回皮下注射で投与方法と、ニコチンを充填した浸透圧ポンプをマウスの皮下に埋め一定量のニコチンを2週間投与方法の二つを用いて検討した。マウスにニコチンを皮下注射投与してもうつ様行動に有意な変化は見られなかったが、浸透圧ポンプによりニコチンを投与するとうつ様行動の低下が見られた。一般行動試験および学習・記憶行動試験では、どちらのニコチン投与群においてもコントロールと比較して有意な差はみられなかった。以上の結果より、ニコチン投与は一般行動、学習・記憶行動には影響を与えないが、ニコチンの持続的な摂取がうつ様行動を低下する可能性が示唆された。

1. 緒言

喫煙とうつ病が密接な関係にあることは、多くの疫学研究により指摘されている。疫学的事実として、喫煙者のうつ病の生涯発病率は非喫煙者よりも高い(Kendler et al., 1993)という報告や、うつ病の既往のある喫煙者は既往のない喫煙者よりも喫煙に対する依存の程度が高い(Breslau et al., 1998)という報告、更に禁煙を開始するとうつ病が発現しやすい(Tsoh et al., 2000)などの報告がされている。

ラットを用いた実験においてニコチン (4 mg/kg/day)を一日2回14日間腹腔内投与すると最終日投与後18時間後の強制水泳試験における不動時間が有意に減少した報告がある(Tizabi et al., 2010)。一方で、ニコチン (1.28 mg/kg/day)を一日2回15日間皮下注射したラットでは投与一月後の強制水泳試験における不動時間の有意な増加が見られ、また1% sucrose preference testにおいてもうつ様行動を示したという報告もある(Iñiguez et al., 2009)。このようにニコチン投与によりうつ様行動を誘発するという報告と改善するという報告の両方があり、ニコチン投与がうつ様行動に及ぼす影響については不明な点が多い。

今回、ニコチン投与によりうつ様行動が誘発されるか否か、また、ニコチン投与が一般行動および学習・記憶行動に影響を与えるか明らかにすることにした。

2. 実験材料及び実験方法

2-1 実験動物

実験には、8週齢の雄性ICRマウスを用いた。動物はケージ内に4~6匹ずつ分けて2週間飼育した。自由給餌法にて飼育し、飲料水として水道水を与えた。

2-2 薬物の投与方法

・皮下注射

8週齢の雄性ICRマウスを用い毎日10:00と17:00に3 mg/kg/dayの投与量になるようNicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich JAPAN)を皮下注射(subcutaneous injection)により投与した。

・浸透圧ポンプ

8週齢の雄性ICRマウスをpentobarbital-Na (50 mg/kg i. p.)麻酔下にて首周辺の毛を刈った後、首の皮膚を切ってポケットを作り、浸透圧ポンプ(ALZET CANADA)を埋め込み、切り口を縫ってヨードにより消毒した。浸透圧ポンプにはニコチン投与量が48 mg/kg/dayとなるよう調整したニコチン溶液を充填した。

2-3 行動試験による評価

【一般行動の評価】

Open-field test ; オープンフィールド試験

自発行動量や不安行動、探索行動などの一般的な行動を評価する方法である。円形上のオープンフィールド槽（直径57.5 cm、高さ32 cm）を用いた。床は19区画にほぼ等面積となるよう線で仕切り、2つの円（直径13.5 cm、35.5 cm）を槽の中央に描きその中央の円から18等分にするように放射状の線を引いた。この線を横切った回数を自発行動量（locomotor activity）とした。すべての区分は面積が大体直径13.5 cmの円と同じになるようにした。このオープンフィールドの中央にマウスを入れ3分間の行動を測定した。

測定項目は、区画を横切った回数（locomotor activity）と立ち上がり動作（探索行動, rearing）の2つを観察した。全ての動物の行動はビデオにて録画し、解析を二重盲検的にカウンターを用いて行った。

【抑うつ様行動の評価】

Forced swim test; 強制水泳試験

うつ様行動の指標としてもっとも使用される方法である。マウスを28°Cの水を10 cmまで入れた1 Lビーカー（高さ15 cm、直径11.5 cm）に6分間つけ、1分後からの行動を5分間観察した。暴れることなく浮かんでいる時間（マウスが水から頭を出すのに必要なわずかな動きをしている時間も含む）を不動時間として記録した。

【学習・記憶行動の評価法】

Y-maze test; Y字型迷路試験

短期記憶の行動評価法である。マウスをY字型の装置内を探索させた際に認められる自発的交替行動を短期記憶(空間作業記憶)として評価した。Y字型の装置は黒色のアクリル板にて作成した（幅15 cm、壁の高さ15 cm、アームの長さ45 cm）。またY字型アームの先端はマウスからの視界を遮らないように透明のアクリル板を用いて筒状とした。測定を行う前にY字の各アーム先端の外側に新規物を置き、マウスが方向を分かるようにした。測定は8分間行った。マウスをY字迷路のいずれかのアームの先端に置き、迷路内を自由に探索させ、進入したアームを順に記録し、マウスの行動量とした。また、3方向のアームに進入する順序を観察し3回連続して異なるアームへ進入した回数を空間作業記憶として評価した。

2-4 統計学的解析

得られたデータ値は平均値±標準誤差(Mean ± S.E.M.)で表した。得られた結果は、Student's t検定(Student's t-test)を用いて統計学的処理を行った。いずれも有意水準5%以下を有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1 Open-field test; オープンフィールド試験

ニコチン投与によるマウスの行動変化を見るため、Open-field testを行った。皮下注射、浸透圧ポンプによるニコチン投与により自発行動量、立ち上がり行動に有意な変化は見られなかった(Fig. 1A, B, C, D)。

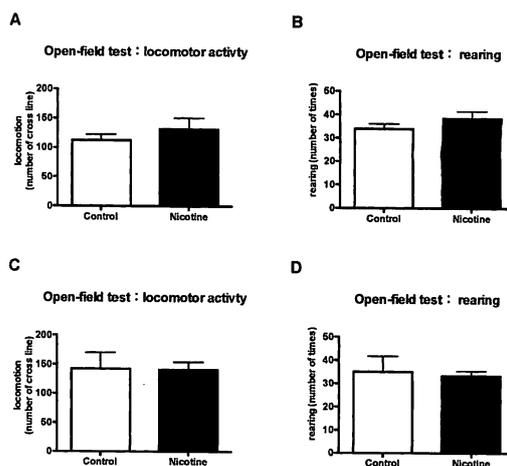


Fig. 1 Effect of 2 weeks of nicotine treatment (A, B; 3 mg/kg/day subcutaneous injection, C, D; 48 mg/kg/day osmotic pump) on locomotor activity (A) and rearing time (B) in the open filed test. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A, B) or osmotic pump (C, D) for 15 days (n=3-9).

3-2 Forced swim test; 強制水泳試験

ニコチン投与によるマウスの行動変化を見るため、Forced swim testを行った。皮下注射により3 mg/kg/day ニコチンを投与した群では不動時間に有意な変化は見られなかった(Fig. 2A)。しかし、浸透圧ポンプにより48 mg/kg/day ニコチンを投与した群では有意な不動時間の低下が見られた(Fig. 2B)。

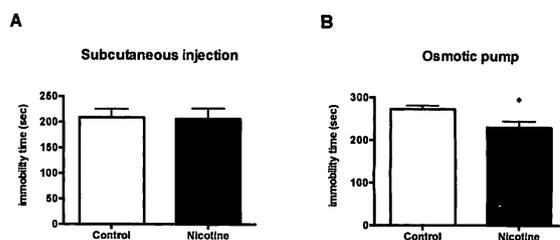


Fig. 2 Effect of 2 weeks of nicotine treatment (A; 3 mg/kg/day subcutaneous injection, B; 48 mg/kg/day osmotic pump) on immobility time during the forced swim test. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A) or osmotic pump (B) for 15 days. * $p < 0.05$ (t-test) (n=3-9).

3-3 Y-maze test; Y字型迷路試験

ニコチン投与によるマウスの短期記憶の変化をみるため、Y字型迷路試験を行った。皮下注射、浸透圧ポンプによるニコチン投与での短期記憶の変化はいずれにおいても見られなかった(Fig. 3A, B)。

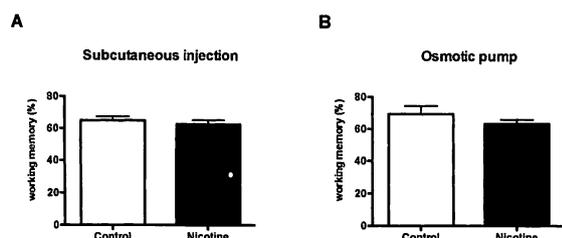


Fig. 3 Effect of 2 weeks of nicotine treatment (A; 3 mg/kg/day subcutaneous injection, B; 48 mg/kg/day osmotic pump) on the working memory. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A) or osmotic pump (B) for 15 days (n=3-9).

4. 考察

8週齢の雄性ICRマウスを用い10:00と17:00に3 mg/kg/dayの投与量になるよう、Nicotine hydrogen tartrate saltを皮下注射により2週間毎日投与する方法と、ニコチン投与量が48 mg/kg/dayとなるよう調整したニコチン溶液を浸透圧ポンプに充填してマウスに埋め込むことで2週間連続投与する二つの方法を用い、ニコチンによる行動変化を検討した。皮下注射により3 mg/kg/day ニコチン投与した群ではOpen-field testにおける自発行動量、立ち上がり行動、Y-maze testにおける短期記憶のいずれの項目においても有意な変化は見られず、またForced swim testにおける不動時間にも有意な変化は見られなかった。一方、浸透圧ポンプにより48 mg/kg/day ニコチン投与した群ではOpen-field testにおける自発行動量、立ち上がり行動、Y-maze testにおける短期記憶のいずれの項目においても変化は見られなかったが、Forced swim testにおける有意な不動時間の減少が見られた。

ニコチンには神経伝達物質の一種であるアセチルコリンと化学構造が似ているため、喫煙後、数秒で脳に到達し脳内でアセチルコリンに成り代わってニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR)に結合し、ドーパミンなどの神経伝達物質の過剰放出を引き起こす働きがある。nAChR は中枢神経に広範囲に分布しているため、ニコチンは脳の広い範囲に影響を与える。また、ニコチンの低用量投与では自律神経節の刺激により、覚醒やリラックスが生じ、集中力や学習力の改善といった作用がある。一方、高用量投与では自律神経節の

遮断により低血圧や呼吸麻痺などの作用がある。ニコチンの致死量は成人で40-60 mg程度と言われている。

今回浸透圧ポンプによるニコチン投与でのみForced swim testにおける有意な不動時間の減少が見られ、水ストレスに対するうつ様行動の改善が観察された。皮下投与では10:00と17:00の間欠投与であるのに対し、浸透圧ポンプでは常に一定の量投与できるという特徴があり、Forced swim testにおける有意な不動時間の減少はニコチンの持続投与が中枢神経に作用し興奮状態を引き起こした可能性が考えられる。一方、禁煙時にストレスを受けるとうつ病が出現しやすいという報告もあり(Tsoh et al., 2000)、二回間欠投与ではニコチン摂取が連続的でないため、むしろニコチン非摂取時におけるニコチン脱作用のうつ状態を引き起こす可能性も考えられる。

ニコチン投与による記憶への影響として、ニコチンにはシナプス間の伝達速度の促進や長期記憶能力を促す働きがあるという報告がある(López-Hidalgo et al., 2012)。しかしながら、今回浸透圧ポンプ投与、皮下投与いずれもコントロールと比較してY-maze testの変化は見られず、ニコチンは短期記憶に影響を及ぼさないと考えられる。

今後更なる検討として、うつ病モデルマウスとして使用されているストレス負荷マウスにニコチンを投与し行動解析することで、ニコチンとうつ様行動との関係がより一層明らかになると考えられる。また、今回はForced swim testのみでうつ様行動の評価として用いたが、他のうつ様行動評価法であるTail suspension testや1% sucrose preference testでの検討も行う必要があると考えられる。更に今回得られたニコチンによる行動の変化がどのニコチン受容体を介して行われるのか解明が必要である。

5. 謝辞

本研究は平成24-25年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団の研究助成を受けたものである。

参考文献

- 1) Breslau N., Peterson E. L., Schultz L. R., Chilcoat H. D., Andreski P. Major depression and stages of smoking. A longitudinal investigation. *Arch Gen Psychiatry*. 1998; 55: 161-166.
- 2) Iñiguez S. D., Warren B. L., Parise E. M., Alcantara L. F., Schuh B., Maffeo M. L., Manojlovic Z., Bolaños-Guzmán C. A. Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34: 1609-1624.

- 3) Kendler K. S., Neale M. C., MacLean C. J., Heath A. C., Eaves L. J., Kessler R. C. Smoking and major depression. A causal analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 1993; 50: 36-43.
- 4) López-Hidalgo M., Salgado-Puga K., Alvarado-Martínez R., Medina A. C., Prado-Alcalá R. A., García-Colunga J. Nicotine uses neuron-glia communication to enhance hippocampal synaptic transmission and long-term memory. *PLoS One*. 2012; 7: e49998.
- 5) Tizabi Y., Hauser S. R., Tyler K. Y., Getachew B., Madani R., Sharma Y., Manaye K. F. Effects of nicotine on depressive-like behavior and hippocampal volume of female WKY rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34: 62-69.
- 6) Tsoh J. Y., Humfleet G. L., Muñoz R. F., Reus V. I., Hartz D. T., Hall S. M. Development of major depression after treatment for smoking cessation. *Am J Psychiatry*. 2000; 157: 368-374.
- 7) Zago A., Leão R. M., Carneiro-de-Oliveira P. E., Marin M. T., Cruz F. C., Planeta C. S. Effects of simultaneous exposure to stress and nicotine on nicotine-induced locomotor activation in adolescent and adult rats. *Braz J Med Biol Res*. 2012; 45: 33-37.

Relationship between nicotine administration and depression-like behavior

Mami OGAWA, Yusuke SAKAMOTO*, Takumi OGAWA

Yumi MATSUO, Narumi HASHIKAWA and Naoya HASHIKAWA

*Graduate School of Science, Okayama University of Science
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

** Koki junior high school,*

12-17 Oka-machi, Kita-ku, Okayama 700-0867, Japan

(Received August 26, 2014; accepted November 6, 2014)

Many epidemiological studies have reported that there is a close relationship between smoking cessation and depression-like behavior. However, effects of nicotine administration on depression-like behavior remains unclear. In the present study, we have examined the influence of nicotine administration on mice depression-like behavior. Nicotine were administered to the 8-week-old ICR mice by subcutaneous injection (3 mg/kg/day) of two times in a day (AM 10:00 and PM 5:00) or by osmotic mini pump (48 mg/kg/day) for 15 days. Subcutaneous injection of nicotine did not affect depression-like behavior, but osmotic mini pump decreased immobility time of the forced swim test. General behavior in the open-field test and learning memory behavior in the Y-maze test did not change by nicotine administration (subcutaneous and osmotic mini pump) compared with control mice. These results suggest that consecutive intake of nicotine decrease depression-like behavior.

Keywords: nicotine; depression-like behavior; smoking cessation; behavior test.

Identification of red rice (*Oryza sativa* 'Akamai') cultivated in paddy fields in Tsushima, Kyusyu, Japan

— Plant opal analysis of tubercle forms developed from upper epidermal cells of red rice hulls —

Hiroaki KOBAYASHI

Department of Socio-Information, Faculty of Informatics,
Okayama University of Science,
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 5, 2014; accepted November 6, 2014)

Red rice, called “Akamai” in Japanese, has been studied for many years in the field of natural science and humanities in Japan. In the present study, red rice (*Oryza sativa* 'Akamai') was identified by analyzing plant opals through the investigation of tubercle forms in the upper epidermal cells of red rice hulls. There have been no reports of the identification of red rice hulls by plant opal analysis. Plant opals of hulls were extracted from soil samples obtained from a paddy field where only red rice was cultivated as dedication to a shrine whose name can be found in a Japanese document dating from the 10th century AD. The result of the plant opal analysis suggests that red rice is a temperate *japonica* rice variety and not a tropical *japonica* or *indica* rice variety. Plant opal analysis of hulls of *Oryza sativa* L. is thus helpful for identifying species of rice from the soil samples at archeological sites. This study defined a morphological character of tubercles of red rice hulls, which will be a useful marker for distinguishing *japonica* type red rice from other rice varieties of *O. sativa* L. by plant opal analysis.

Keywords: plant opal analysis; red rice; Tsushima; *japonica*.

1. Introduction

One of the methods for discriminating red rice between the *japonica* and *indica* type is the measurement of the grain size (Arashi, 1974; Hamada, 1956). Recently, DNA analysis has been used for identifying red rice (*Oryza sativa* 'Akamai') (Ishikawa et al., 1992; Okoshi et al., 2004). The purpose of the study is to determine whether plant opal analysis can be used for the classification of red rice. The festival of red rice cultivation on these fields is designated as National Important Intangible Folk-Cultural Properties. Tsushima is an island that lies between Kyusyu and Korea; it is approximately 138 km from Hakata port in Fukuoka prefecture and 49.5 km from Pusan port in Korea. The island measures 82 km from the north to the south and 18 km from the east to the west, with an area of approximately 708 km². Seven paddy fields of red rice are located at 34°7' N and 129°11' E in Tsutsu town, southern Tsushima, approximately 40 m above the sea level (Figs. 1 and 2). The harvested red rice is dedicated to a shrine called “Tagutsutama jinjya” in Japanese. This shrine has been identified as one of the shrines described in a Japanese document, Engishiki, dating to 927 AD. However, the original age of these paddy fields is unknown. Seven soil samples for the plant opal analysis were collected from the seven paddy fields, and one sample gained from the oldest paddy field, was used for the analysis (Fig. 3). In general, the older the paddy field, the more the plant opals of red rice will increase quantitatively.

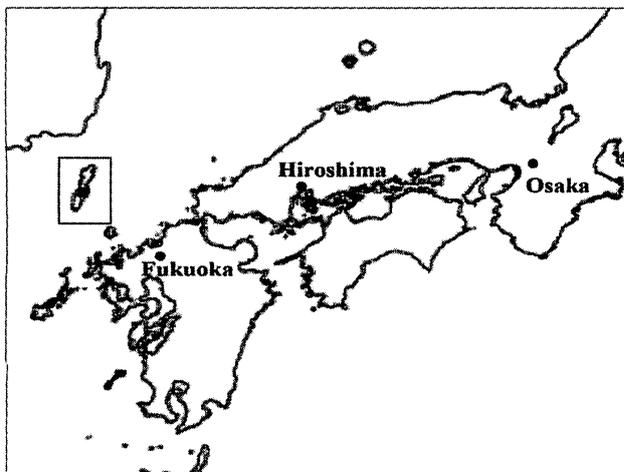


Fig. 1 The rectangle indicates the location of Tsushima in western Japan.

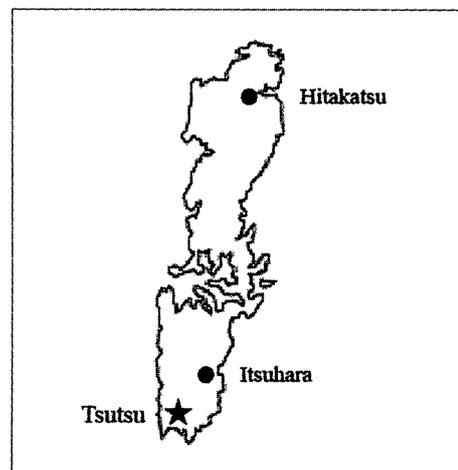


Fig. 2 The star mark indicates the location of red rice paddy fields at Tsutsu town.



Fig. 3 The oldest paddy field of red rice viewed from the southeast.

2. Plant opal extraction

- (1) Soil samples were dried in an electric furnace at 110 °C for 72 h.
- (2) On an electronic precision balance with a precision of 0.001 g, 1 g of soil sample was weighed.
- (3) The weighed sample was treated with 30 ml of 30 % H₂O₂ solution for rinsing, and it was heated until the liquid reduced to 10 ml.
- (4) Deionized water (50 ml) was added to this residue and according to Stokes' law, other impurities were repeatedly removed from the residue.
- (5) To separate any remaining mineral component, the plant opal component of the resulting residue was extracted by gravimetric separation (3000 rpm/s for 13 min) using a sodium polytungstate solution of density 2.30 g/ml.
- (6) After extraction, 20 µl aliquots of liquid containing plant opal components were placed on slides using a micropipette and dried in a desiccator for 3–4 h.
- (7) Cover glasses were placed over dried samples with a mounting reagent, and they were observed under an optical microscope at 200× and 400× magnifications. Hulls of *Oryza sativa* L. were counted and microphotographs were obtained with a single-lens reflex digital camera mounted on the microscope.

3. Results and Discussion

Tubercles and their morphological characters have been classified by Takahashi et al. (2005) and reviewed by Kobayashi (2013). The classification of tubercles in this study is based on these reports. Five hundred samples were microscopically examined. This examination required 6 g of dried soil sample and 66 slides, and 131 frames of each were examined. The examination revealed that all 500 tubercle samples were of type S. A marked struma was observed at the lateral branch of the long cell and the papilla was observed to exit from this struma. In many cases, strumae on adjacent long cells formed an intricate pattern (Fig. 4. 1–8). Types C and P were not found during the examination. According to Takahashi (2010), the latter two types belong to tropical *japonica* or *indica* rice varieties, whereas type S is observed only in temperate *japonica* varieties (Takahashi et al., 2005; Kobayashi 2008). Therefore, it was concluded that the red rice grown here was the temperate *japonica* type. This result of the plant opal analysis agreed with that of the DNA analysis of isozyme genes (Ishikawa et al., 1992). Recent studies (Takahashi 2008, 2010)

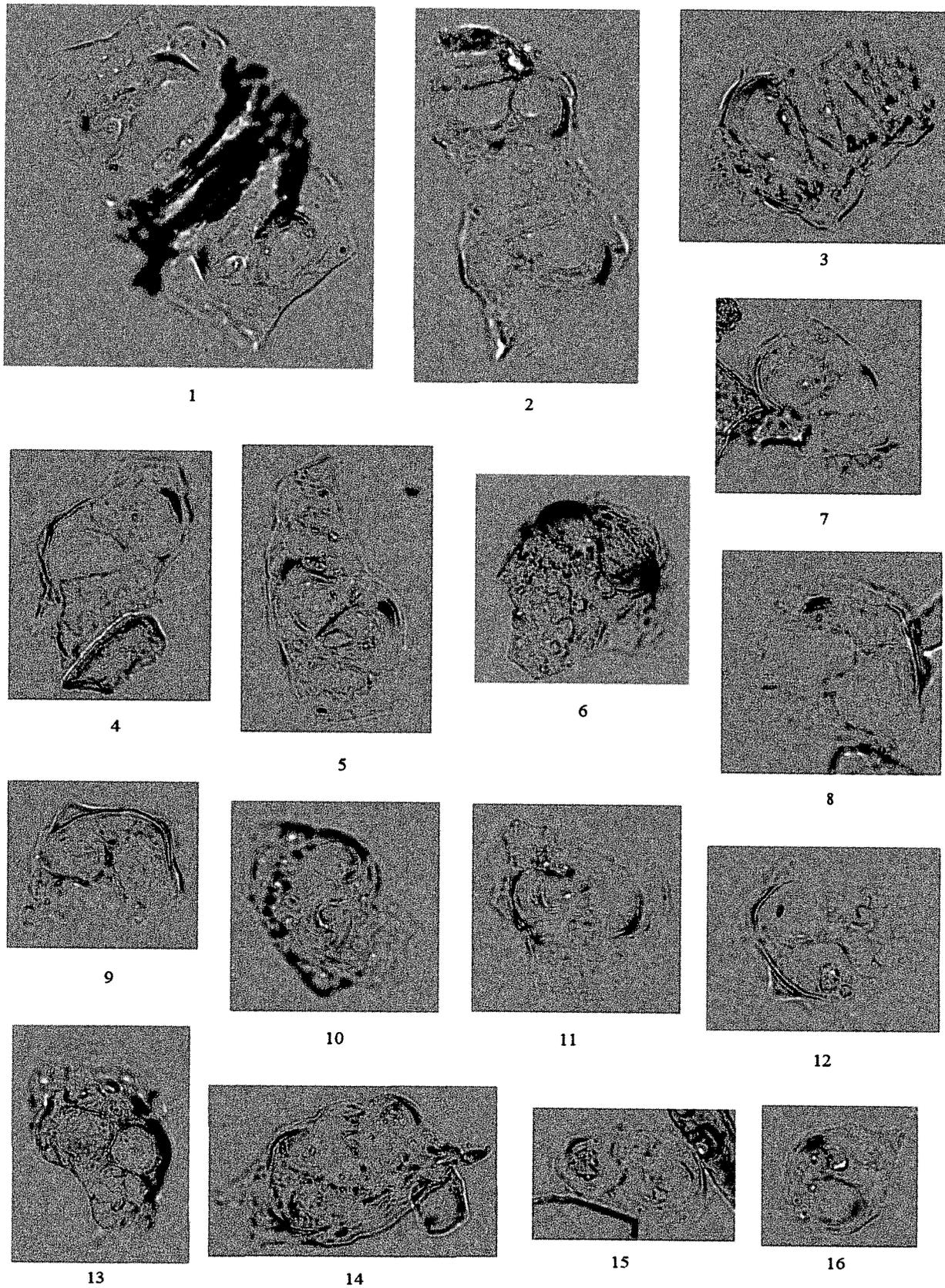


Fig. 4 Microphotographs showing plant opals of the tubercles of upper epidermal cells of red rice hulls.

(approximately 500×)

have shown that these three types already existed in the early Jomon period in Japan. A distinctive form of the tubercle was observed in 28 samples (5.6% of the 500 samples). The strumae face each other and do not form an intricate pattern in this tubercle. Moreover, each struma is slightly larger and appears round (Fig. 4. 9–16). Although its frequency is not large, this shape can be used to identify red rice among rice varieties of type S by plant opal analysis. It may be advisable to define a new type for this tubercle type.

5. Conclusion

The red rice grown in paddy fields in Tsushima is the temperate *japonica* type. Round strumae at the tubercles developed from the upper epidermal cells of hulls, and they may contribute toward the identification of *japonica* type red rice in *O. sativa* L. plant opals extracted from soil samples at archeological sites.

Acknowledgments

I thank Kimitoshi Syutou, who cultivates red rice in the paddy fields at Tsushima, for allowing me to collect the rice samples.

References

- Arashi, K., 1974. Study of red rice in Japan. Yusankaku Press Co., Ltd., Tokyo. (in Japanese)
- Hamada, H., 1956. The distribution of Japanese red rice and its characters. The Crop Science Society of Japan, vol. 24, no. 3, pp. 147-148
- Ishikawa, R., Maeda, K., Harada, T., Niizeki, M., Saito, K., 1992. Genotypic variation for 17 isozyme genes among Japanese upland varieties in rice. *Ikushugaku zasshi*, vol. 42, no. 4, pp. 737-746
- Kobayashi, H., 2008. The study of *Oryza sativa* L. found at sites in Japan: Plant opal analysis of tubercles at epidermal cells of the glumes of *Oryza sativa* L. Memorial collected papers for Prof. Chousuke Serizawa "Archaeology, Ethnology and History," Rokuichi Syobou Co., Ltd., Tokyo, pp. 595-606 (in Japanese)
- Kobayashi, H., 2013. Species of *Oryza sativa* L. stored in Aoyama castle destroyed in the late 16th century AD, Okayama, western Japan—Plant opal analysis of tubercles developed from the epidermal cells of the glumes of *Oryza sativa* L. — The bulletin of Okayama University of Science, no.49, A, pp.1-4
- Okoshi, M., Jingjie, H., Ishikawa, R., Fujimura, T., 2004. Polymorphic analysis of landraces of Japanese rice using microsatellite markers. *Japanese Soc. of Breeding* 6, pp. 125-133 (Summary in English)
- Takahashi, M., Tajima, M., Kobayashi, H., 2005. The excavation of Hikozaiki shell-mound, Okayama prefecture. *Koukogaku Journal* no. 527, pp. 28-31 (in Japanese)
- Takahashi, M., 2008. Epidemic tissues at hulls of Asian rice and its classification. Memorial collected papers for Prof. Chousuke Serizawa "Archaeology, Ethnology and History," Rokuichi Syobou Co., Ltd., Tokyo, pp.57-66 (in Japanese)
- Takahashi, M., 2010. Plant culture at Hikozaiki shell-mound. *Bull. Center for Okayama city Archaeological operations*, no. 2, pp. 19-46 (in Japanese)

東北地方太平洋沖地震による西日本の地殻変動について

澤 夏起・佐藤 丈晴*・西村 敬一**

岡山理科大学大学院総合情報研究科修士課程生物地球システム専攻

*岡山理科大学生物地球学部生物地球学科

**岡山理科大学総合情報学部生物地球システム学科

(2014年9月26日受付、2014年11月6日受理)

東北地方太平洋沖地震の影響は、西日本全域における地震時の地殻変動を解析し定常時と比較した結果、西日本全域まで及んでいることが示唆された。4観測点における座標変化および6基線における基線長変化を解析し、東日本だけでなく西日本にも東北地方太平洋沖地震の影響が及んでいることを明らかにした。さらに東北地方太平洋沖地震に伴った西日本全域の地殻変動の特徴を捉えるために、平面主ひずみおよび平面剪断ひずみを解析した。平面主ひずみでは、震源の方向に伸び、それと直交した方向に縮みを示す主軸が引かれ、それら主軸が震源域から遠ざかるにつれて小さくなる。平面剪断ひずみでも、震源域から遠ざかるにつれて小さくなる。以上の解析結果から、東北地方太平洋沖地震の影響が西日本全域にまで及んでいることが実証された。注目すべき特徴として、近畿地方東部に平面ひずみの有意な段差が生じていることであり、この段差は敦賀湾-伊勢湾線(TITL)と関係があると示唆される。

1. はじめに

2011年3月11日、三陸沖を震源とした東北地方太平洋沖地震(Mw9.0, 以下3.11地震と略記)によって東日本の各地で非常に大きな地殻変動が生じ、多くの報告がなされている。国土地理院では、図1のように、3.11地震時の水平変位が確認できる(http://mekira.gsi.go.jp/JAPANESE/h23_img/311coseismic_hor.pdf)。また、同HP内には、3.11地震時の地殻変動の様子がアニメーションで示されている(http://mekira.gsi.go.jp/JAPANESE/crstanime_tohoku110311.html)。しかし、西日本については、どの程度の地殻変動が生じたのか、どのような特徴があるのか明らかになっていない。本研究では、3.11地震に伴う西日本(近畿地方以西)の地殻変動に着目し、その特徴を捉えることを目的とした。

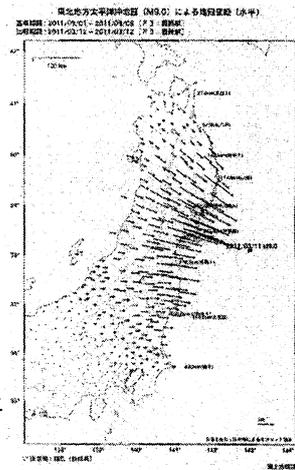


図1 東北地方太平洋沖地震に伴った東日本の水平変動

2. 使用したデータと解析方法

使用したデータは、国土地理院の「電子基準点の日々の座標値(F3解)」であり、用いた電子基準点の分布を図2に示す。このF3解とは、国土地理院の構築したGEONETの解析戦略第4版の最終解である。以前の第3版と比較すると、基本的な処理の流れや観測網の構成を踏襲しつつ、大気遅延勾配の推定や、アンテナの絶対位相特性モデルの採用、座標系のITRF2005への変更、解析固定点(電子

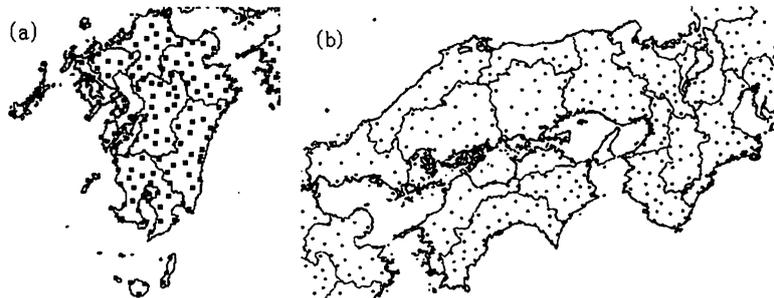


図2 九州(a)及び近畿・中国・四国地方(b)における電子基準点の分布

基準点「つくば1」)の座標値の取り扱いの変更、電離層遅延高次項の補正等の導入を行っている。したがって、以前の解析戦略よりも安定であり、かつ信頼できる結果が得られるので、平成21年(2009年)より解析戦

略第4版によるGEONET定常解析の正式運用が開始されている。

解析には、気象庁地震津波監視課の中村浩二氏により提供していただいたソフトPAT-MEを用いた。解析期間は、3.11地震を中心とした2年間(2010年1月1日から2012年3月31日)である。

3. 解析手順

PAT-MEによるデータ解析の手順を以下に示す。

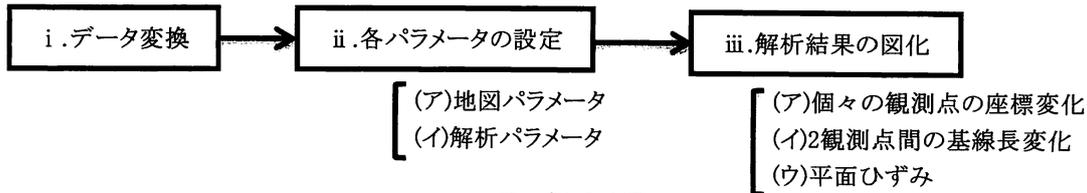


図3 解析手順

i. 国土地理院で作成された「電子基準点の日々の座標値(F3解)」をPAT-ME用のデータに変換した。

ii. 変換したデータから作図するために次の各パラメータを定めた。

(ア)「地図パラメータ」(図4)

表示する地図の範囲を定める。本研究では西日本を対象としたため、北緯30~36.5度、東経129~136.9度とした。

(イ)「解析パラメータ」(図5)

解析する期間を定める。電子基準点の位置を示す座標値は、日単位で変化しているため、通常は基準となる位置(始)および比較対象となる位置(終)には、一定期間の平均位置を用いる。本研究では、比較のため2種類の解析を行う。まず、[始]に2010年3月12~2011年4月10日、[終]に2011年2月9日~2011年3月10日を取った定常時の期間。次に、[始]に2011年3月1日~2011年3月10日、[終]に2011年3月12日~2011年3月21日を取った3.11地震を中心とした地震時の期間。このように設定することで、[始]および[終]のそれぞれの期間の平均値より、その差を求めている。

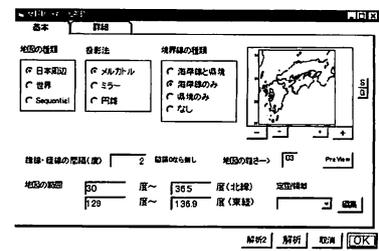


図4 地図パラメータ

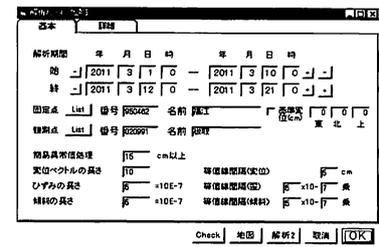


図5 解析パラメータ

iii. 解析結果を図に示した。

(ア)個々の観測点における3.11地震前後の変位

定常時および地震時の水平変位を図化することで、それぞれを比較した。また、観測点の位置の違いによる座標の変化を比較した。本研究では4事例挙げ、各観測点を比較できるように変位のスケールを4cmとした。

(イ)2観測点間の基線長変化

指定した2観測点間の距離の変化を数事例挙げて、観測点の位置の違いによる距離の変化を比較した。本研究では6事例挙げ、これらを比較できるように変位のスケールは1cmで調整した。

(ウ)平面ひずみ

西日本の各地点でどの程度歪んだのか確認する。なお、この平面ひずみを作成するには、不均等に分布している観測点を格子化する必要があるため、次章でグリiddingについて説明する。また、グリiddingしたのちに作成した平面ひずみには2種類あるが、このひずみについても次々章で説明する。

4. グリidding

PAT-MEでは、各観測点の変位をもとに、一定間隔の格子点の変位を内挿計算している。この内挿計算の方法は、単純な一次式で内挿している。以下の添字のiは観測点、jは格子点、k=1, 2は東西方向および南北方向における変位を表す。

各観測点 P_i の座標を (X_i, Y_i) とし、それぞれの観測点における変位成分を V_{ik} とする。

ある格子点 G_j での変位成分 V_{jk} を周囲の変位成分 V_{ik} から一次式で内挿計算するには、変位成分の場 V_{ik} がどちらの成分に対しても以下の一次式で表されることを仮定する。

$$V_{ik}(P) = aX_i + bY_i + c \quad - ①$$

この式は、平面の方程式となっている。つまり、格子点での変位成分を決めるにはこの式の係数a、b、cを決定し、格子点の座標を①式に代入して計算すればよい。

観測点から、このような方程式の係数が決定する最も一般的な方法は最小自乗法である。次に示す偏差自乗和 S_{jk} が最小になるようにa、b、cを決定する。

$$S_{jk} = \sum_i \alpha_{ij} \{V_{ik} - (aX_i + bY_i + c)\}^2 \quad - ②$$

α_{ij} は各格子点毎に与える重み係数であり、 α_{ij} には格子点 G_j と各観測点との距離の逆数が与えられる。したがって、格子点により近い観測点の方により大きな重みがかかることになる。

このソフト上での最小自乗計算は一定範囲内の観測点に対して行い、係数a、b、cを決定しているが、格子点に対して観測点が偏在しないことが前提になる。そのため、格子点から見た方位を0~90度、90~180度、180~270度、270~360度に分けて、それぞれに1点以上の観測点がある場合にのみ計算を行っている

5. 平面主ひずみ・平面剪断ひずみ

PAT-MEでは、地殻変動の様子を観察する方法として平面ひずみを採用している。平面ひずみとは、厚さ方向の変形が生じない状態のことであり、本研究では、平面主ひずみおよび平面剪断ひずみの2種類を作成する。以下にそれぞれのひずみについて説明する。なお、u、vはそれぞれx軸、y軸方向の微小変位成分を表す。

i. 平面主ひずみ

図6のように、xと $(x+\Delta x)$ が近くに位置しているとき、位置xがx軸方向にuだけ変位すると、 $(x+\Delta x)$ は $(u+\Delta u)$ だけ変位することになる。それぞれの位置の間隔も、変位前が Δx であったが、変位後は $(\Delta x + \Delta u)$ に変化する。 Δu とは $(\partial u / \partial x) \Delta x$ のことである。式で記すと以下ようになる。

$$\epsilon_x = \frac{\text{change in separation}}{\text{original separation}} = \frac{(\Delta x + \frac{\partial u}{\partial x} \Delta x) - \Delta x}{\Delta x} = \frac{\partial u}{\partial x}$$

同様に、 $\epsilon_y = \frac{\partial v}{\partial y}$ となる。

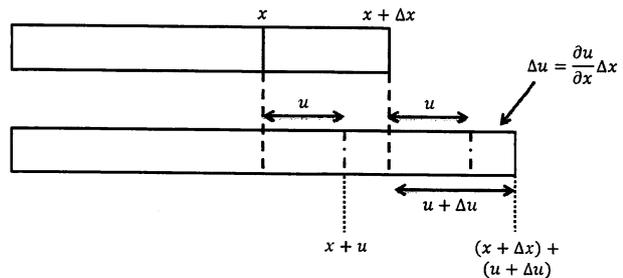


図6 ϵ_x の平面主ひずみの説明図

ii. 平面剪断ひずみ

一辺の長さがaである正方形を考える。底辺が固定されているとして、横向きに応力が加わると、平行四辺形に変形する(図7)。変形前と変形後での角度の差 ϕ を剪断ひずみの値としている。式で表すと以下ようになる。なお、PAT-MEで作成される平面剪断ひずみの分布図では○印で表示されるが、その大きさが平面剪断ひずみの大きさと対応している。

$$\gamma_{xy} = \frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x}$$

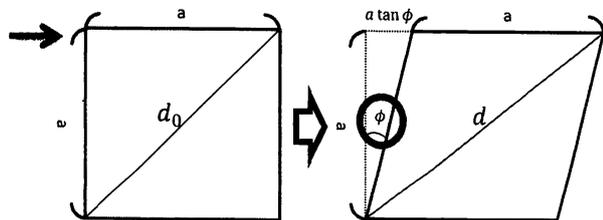


図7 平面剪断ひずみの説明図

6. 結果・考察

(ア) 個々の観測点における3.11地震前後の変位

3.11地震前と3.11地震時の地殻変動の比較を行い、それぞれ図8、図9に示した。地震前の期間としては、2010年3月12日から2011年3月10日を選び、以下では「定常時」とよぶことにする。一方、3.11地震時の期間としては、2011年3月1日から2011年3月21日を選び、以下では「地震時」とよぶことにする。図8、図9に長崎県の五島列島の「福江」を固定点とする定常時と地震時の地殻変動の変位分布を示す。「福江」を固定点にした理由は、震源である三陸沖から遠くに位置し、3.11地震の影響がより小さな観測点であるためである。

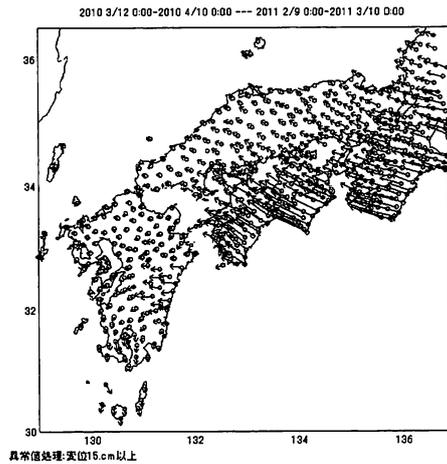


図8 3.11地震前1年間の地殻変動

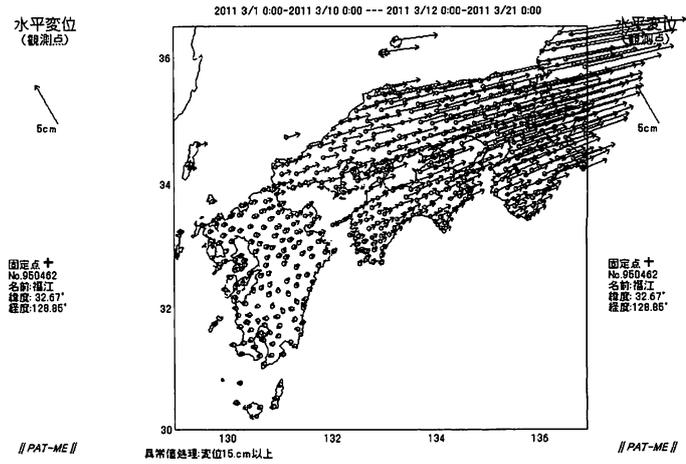


図9 3.11地震時の地殻変動

図8と図9を比較すると、定常時と地震時では、各観測点の水平変位が大きく異なっていることがわかる。図8は北西方向の変位を示す観測点が目立つのに対して、図9では震源の方向である東北東方向への変位を示す観測点が目立つ。つまり、3.11地震の影響が西日本にも及ぼされていることが示唆される。

そこで、個々の観測点の経度および緯度の日々の座標値を用いて、3.11地震時の解析期間である2011年3月1日から2011年3月21日の座標変化を整理した。本研究では、図10に示す、震源の方向にほぼ一直線上に並んでいる4観測点を選定した。ここでは震源域からの距離の違いによる座標変化の比較を目的としたため、観測点間の距離は同程度とまではいかないが、震源の方向にほぼ一直線上に並んでいることを優先し選定した。

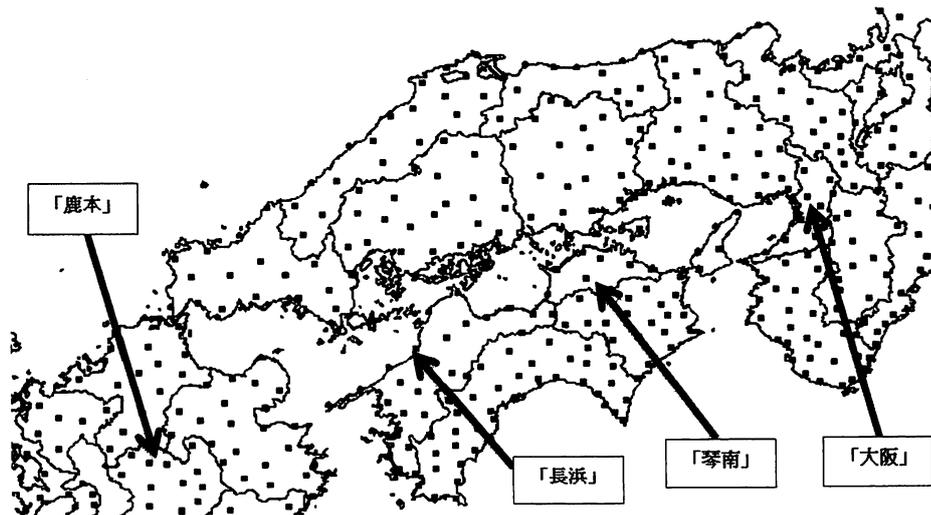


図10 個々の観測点の座標変化を確認するために選定した4観測点

図11は上から(a)「大阪」、(b)「琴南」、(c)「長浜」、(d)「鹿本」の経度変化を示す。また、図12は上から(a')「大阪」、(b')「琴南」、(c')「長浜」、(d')「鹿本」の緯度変化を示す。期間は2011年3月1日から

2011年3月21日である。変位のスケールは各観測点とも4cmで揃えている。

ここで注意すべきは、図にプロットした値は、24時間分の観測点データを基線解析した結果を示していることである。つまり、地震が起こった日の観測点データは、地震前のデータと地震後のデータを比例配分して、その日の正午のデータとして与えられている。そのため、地震の影響は部分的に反映されたものになる。3月11日の値はどの観測点についても不連続を示してはいるが、その日の地殻変動を正確に反映していない。したがって、3月11日のデータは以後の解析では扱わないことにした。それ以外の座標値は、大きな地殻変動の原因となる地震が起きていないので、信頼できるデータとして、解析に用いた。

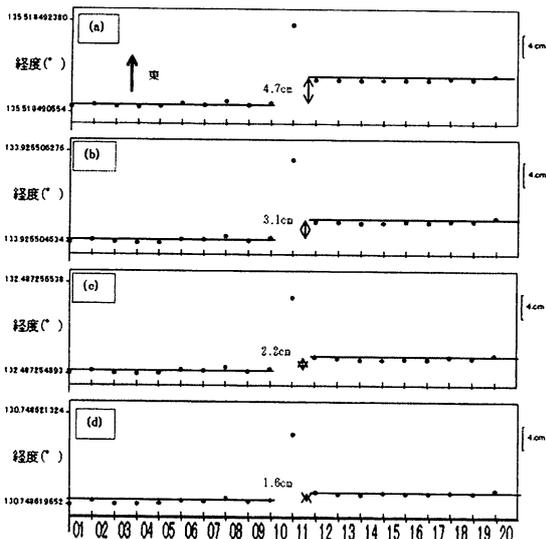


図11 大阪(a)、琴南(b)、長浜(c)、鹿本(d)の経度変化

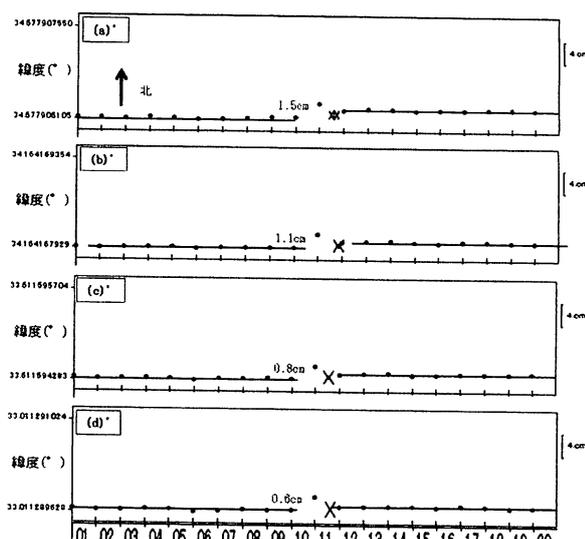


図12 大阪(a')、琴南(b')、長浜(c')、鹿本(d')の緯度変化

図11の各観測点の経度変化を見ると、はっきりと観測点の位置が東へ移動したことがわかるが、緯度変化(図12)では、各観測点とも変化は微小であった。図11の(a)から(d)、図12の(a')から(d')をそれぞれ比較すると、ともに「大阪」→「琴南」→「長浜」→「鹿本」の順に変化が小さくなっているのがわかる。それをより明確に示したのが下の図13である。

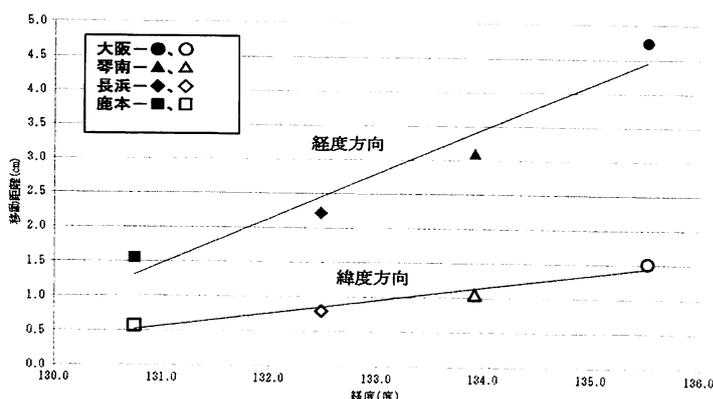


図13 経度方向および緯度方向の移動距離

図13は、横軸を経度にして、経度方向および緯度方向の移動距離を示す。各観測点とも、経度が小さくなると、経度方向および緯度方向の移動距離が小さいことがわかる。また、各観測点とも、経度方向の移動の方が大きい。

(イ)2観測点間の基線長変化

3.11地震の地殻変動をより詳しく見るために、2観測点間の基線長の変化を調べた。図15に解析した6基線の位置を示した。なお、基線長の向きは震源の方向である北東方向に、それぞれの基線長はおよそ100kmと、すべての基線長でほぼ等しくとっている。

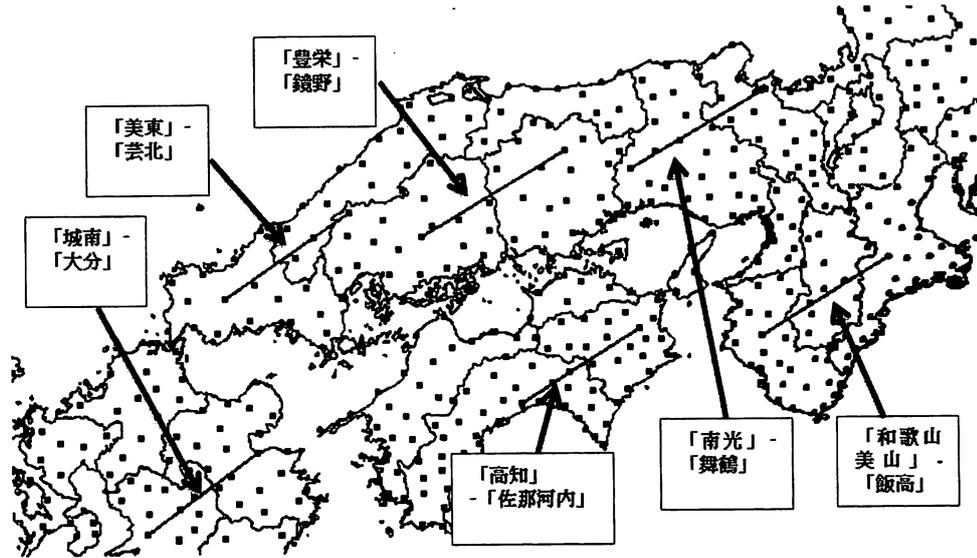


図14 2観測点間の基線長変化を確認するために選定した6基線

次の図15は図14に示した北側3基線の基線長変化で、上から「南光」-「舞鶴」、「豊栄」-「鏡野」、「美東」-「芸北」を表し、図16は図14の南側3基線の基線長変化で、上から「和歌山美山」-「飯高」、「高知」-「佐那河内」、「城南」-「大分」を表している。期間は、2011年3月1日から2011年3月21日である。スケールは1.0cmで揃えている。ここでも3.11地震当日の座標値は、検討の対象とはしていない。

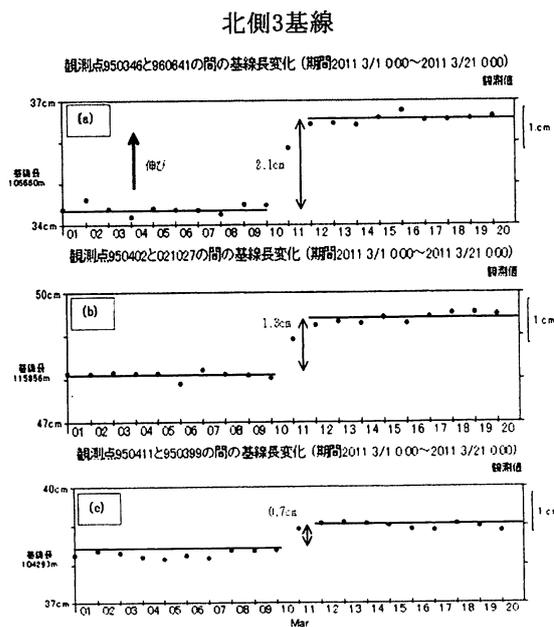


図15 「南光」-「舞鶴」(a)、「豊栄」-「鏡野」(b)、「美東」-「芸北」(c)の基線長変化

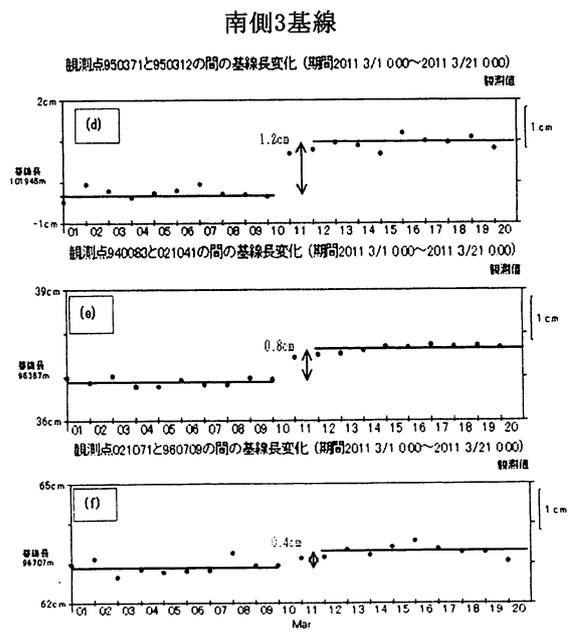


図16 「和歌山美山」-「飯高」(d)、「高知」-「那佐河内」(e)、「城南」-「大分」(f)の基線長変化

図15と図16から、図14の北側3基線および南側3基線はともに、西側の基線長ほど変化が小さくなっている。図17は、図15および図16の基線長変化をまとめて示す。北側3基線および南側3基線はともに、西側にある基線ほど基線長変化量が小さい。さらに北側3基線の方が南側3基線に比べて基線長変化量が大きい。これは北側の基線長の方が、3.11地震の影響を強く受けたことを意味する。北側の基線長の方が強く影響を受けたことは、図9の地震時の水平変位でも確認できる。北側(近畿地方上および中部・中国地方)の方が南側(近畿地方下部・四国地方・九州地方)よりも水平変位が小さいことがわかる。

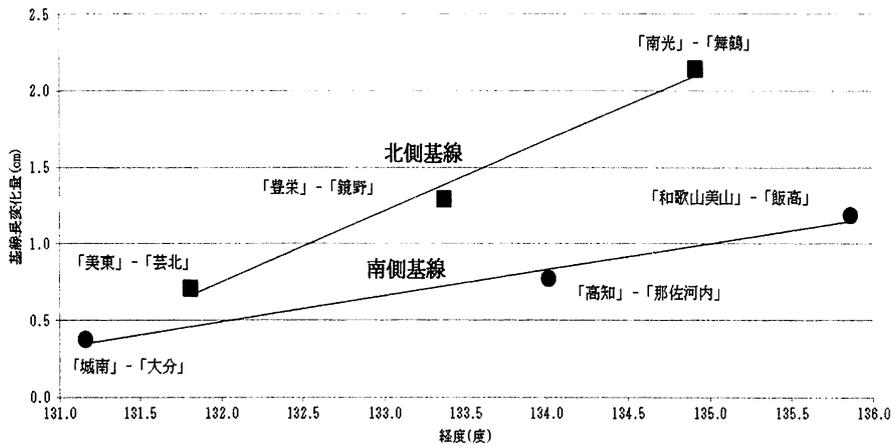


図17 6事例の基線長変化

(ウ) 平面ひずみ

以上の解析は個々の観測点を任意に選んで行ったが、以下では西日本のすべての変位を解析する。その最も有効な方法は、平面ひずみの分布を解析することである。

図18に平面主ひずみの分布を示す。すべての地点で北東-南西方向に伸び、北西-南東方向に縮んでいる。また、平面剪断ひずみ(図19)では、北東方向にひずみが大きくなる。これらの図より、震源域に近づくにつれて平面ひずみが大きくなる。つまり、3.11地震の影響が西日本全域にまで及んでいたことが明らかになった。

注目されるのは、図18および図19で、近畿地方東部を境にして変動が大きく変化したことである。そのおおよその位置を破線で示した。この境界の位置は、岡山(1956)が提唱した「敦賀湾-伊勢湾線」(図20)と一致していることから、この構造線がひずみの変位に何らかの影響を示したと示唆される。

図20は、敦賀湾-伊勢湾線(以下TITLと略記)の位置と、その両側にある高度不連続線を示す。高度不連続線とは、山地における高度の変化の程度が大きな箇所のことであり、断層崖や撓曲崖などの下端に相当する。この高度不連続線は、TITLを境にして走向を異にし、地質構造上、中日本と西日本を分ける境界にあたりと述べている。

岡山(1956)がTITLについて議論したのち、Kanaori et al.(1992)は、TITLの存在は、重力異常のリニアメントによっても確認できると指摘した。また、駒沢 他(1999)は、重力測定により日本列島をSE-NWに切る幾つかの低重力異常が何本を検出し、なかでもTITLは基盤の落差が数kmに達していると指摘した。つまり、TITLは地殻の深部にまで達する構造線であるといえる。

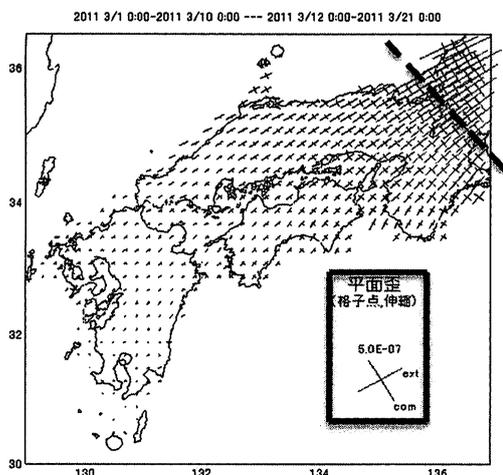


図18 西日本における平面主ひずみ

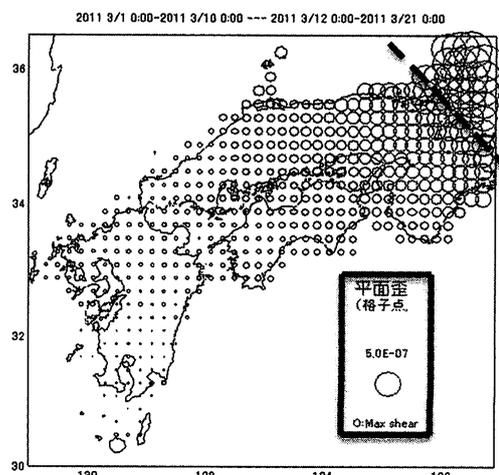


図19 西日本における平面剪断ひずみ

したがって、近畿地方東部を境にして平面ひずみの大きさが変化した原因は、TITLが深部にまで達しており、震源の方向と直交する方向に位置していることに因る。

さらに構造線との関連で、平面主ひずみの伸びを示す主軸の向きが、震源の方向と調和的であるが、地点によって異なる場合もある。琵琶湖付近の伸びの主軸の向きを基準にすると、中国地方ではほぼ同じ傾きを示すが、紀伊地域・四国地方・九州地方の向きはわずかに大きな傾きを示す。この違いを示す原因として、中央構造線(以下TMLと略記)が考えられる。主軸の向きが異なる点とTMLの関係性については、今後の検討すべき課題である。

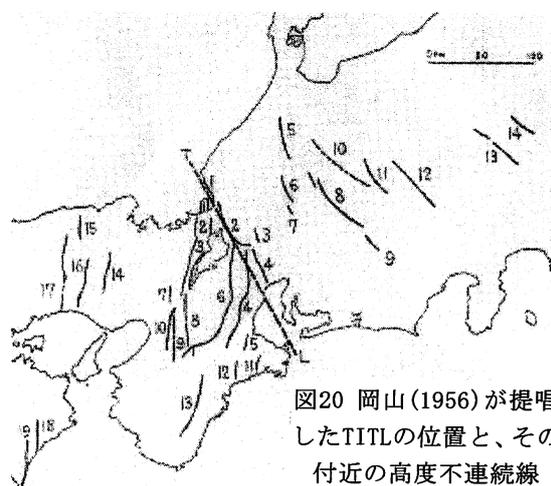


図20 岡山(1956)が提唱したTITLの位置と、その付近の高度不連続線

7. まとめ

本研究で、国土地理院の電子基準点の日々の座標値(F3解)を用いて、個々の観測点の水平変位、2観測点間の基線長変化、平面ひずみの分布を解析し以下の結果を得た。

- ・定常時と地震時の西日本全域の地殻変動の様子は大きく異なる。
- ・地震時の、各観測点の座標変化および各地点の平面ひずみは震源に近づくにつれて大きくなる。

これらから、3.11地震の影響が西日本にも及んでいたことが明らかになった。

さらに注目する点は、平面ひずみの分布図において、近畿地方東部に大きな段差が生じていることである。これは震源の方向に直交に位置し、かつ深部にまで達する構造線であるTITLの影響を受けたと考えられる。

また、平面ひずみの伸びの主軸の向きが、近畿地方上部および中部・中国地方と、近畿地方下部・四国地方・九州地方で異なることにも気づく。これには、それら地域の間位置している構造線であるTMLが絡んでいる可能性がある。

8. 謝辞

本研究で用いたソフトPAT-MEを提供していただいた気象庁地震津波監視課津波予測モデル開発推進官中村浩二氏に深く感謝します。

9. 引用文献

- 阿部 武治・清水 茂俊・山田 勝稔 (1991), 『弾性力学』, 現代機械工学シリーズ4, pp.9-30.
- Kanaori, Y., S. Kawakami and Y. Yairi (1992), Space-time correlations between inland earthquakes in central Japan and great offshore earthquakes along the Nankai trough: Implication for destructive earthquake prediction, *Engineering Geology*, 33, pp.289-303.
- Kanaori, Y., S. Kawakami and Y. Yairi (1992), THE BLOCK STRUCTURE AND QUATERNARY STRIKE-SLIP BLOCK ROTATION OF JAPAN, *tectonics*, vol. 11, no. 1, pp.47-56.
- 駒澤 正夫・広島 俊男・石原 丈実・村田 泰章・山崎 俊嗣・上嶋 正人・牧野 雅彦・森尻 理恵・志知 龍一・岸本 清行・木川 栄一 (1999), 『地球内部を概観する-100万分の1日本重力図』, 地質ニュース, 544号, pp.11-16.
- Loerie, W. (2007), *Fundamentals of Geophysics*, Cambridge University Press, pp.84-91.
- Murai, S., H. Araki (2012), Crustal movement before and after the Great East Japan Earthquake, *Coordinates*, Vol. III, Issue 5, pp.8-12.
- 中村 浩二 (1999), 『GPSデータ簡易表示プログラム(SEIS-PC)の開発』, 情報地質, 第10巻, 第4号, pp.257-266.
- 岡山 俊雄 (1956), 『柳ガ瀬断層と敦賀湾伊勢湾線』, 駿台史学, 7, pp.75-101.

Coseismic crustal movement in west Japan caused by the 2011 off Pacific coast of Tohoku Earthquake

Natsuki SAWA, Takeharu SATO* and Keiichi NISHIMURA**

Graduate School of Informatics, Okayama University of Science

**Department of Biosphere-Geosphere Science, Faculty of Biosphere-Geosphere Science, Okayama University of Science*

***Department of Biosphere-Geosphere System Science, Faculty of Informatics, Okayama University of Science*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 26, 2014; accepted November 6, 2014)

Although significant coseismic crustal deformation over a wide area and central Japan, Associated with the 2011 off the Pacific coast of Tohoku Earthquake, has been well studied by many researchers, no attention has yet been paid to that in west Japan, from the Kinki district to the Kyushu island. In this study, we examined the characteristic features of the crustal movement in west Japan by analyzing the daily coordinate values of GNSS-based control stations (F3) provided by the Geo-spatial Information Authority of Japan (GSI).

As result, it has been clarified that the 2011 Earthquake induces an effect on the crustal deformation in western Japan from the analyses of four datasets of horizontal change at GPS stations and six datasets of base length among paired GPS stations in western Japan. Longitudinal and shear strains in movement plains in western Japan indicate one discontinuous step at eastern Kinki district. it is considered that the cause is "Tsurugawan-Isewan tectonic line (TITL)", proposed by Okayama (1956), because this step is along TITL.

Keywords: the 2011 off the Pacific coast of Tohoku Earthquake; crustal movement; GPS stations; PAT-ME; Tsurugawan-Isewan tectonic line (TITL).

低コスト圧力制御型疑似サーボ弁の性能評価と応用

下岡 綜・堂田 周治郎*・赤木 徹也*・守分 善法**

岡山理科大学大学院工学研究科知能機械工学専攻

* 岡山理科大学工学部知能機械工学科

** 岡山理科大学大学院工学研究科システム科学専攻

(2014年9月30日受付、2014年11月6日受理)

1. 緒言

近年の急速な高齢化社会の進行に伴い、高齢者介護の労働者不足が深刻な問題になりつつある。そのため、人間を介護・支援できるロボットやパワーアシスト装置などに用いるウェアラブルアクチュエータの開発が望まれている¹⁾。人体への装着にあたり、人間親和性の高い軽量かつ制御性能の良いアクチュエータが望まれる。また、これらのシステムでは高い自由度を必要とし、複数のアクチュエータや制御弁が必要となるため、装着者への負荷は増加する。従って、使用者の負担を軽減し、簡素で制御性の高い制御弁の開発が強く望まれる。

そこで本研究では、小型・軽量で安価なON/OFF弁を用い、アナログ的に圧力を調整できる制御弁の開発を目的とする。本報告では、4種類の制御則を用いて圧力追従制御実験を行い性能評価を行う。また、試作した圧力制御型疑似サーボ弁とマッキベン型ゴム人工筋を用いた位置決め制御を行い、制御性能の評価を行う。

2. 疑似サーボの構造と動作原理

趙ら²⁾が開発した疑似サーボ弁の構造を図1に示す。この疑似サーボ弁は小型ON/OFF弁(株コガネイ製G010HE1)を2個繋ぎ合わせ、供給源側の弁を給排気弁(2位置3ポート弁)、アクチュエータ側の弁を流量調整のための可変絞りのPWM駆動弁(2位置2ポート弁)として使用する。このPWM弁のデューティ比を変えることで開口面積を制御し、圧力や流量をアナログ的に調整することが可能になり、ON/OFF弁では困難であった比例制御などのアナログ制御則の適用が可能となる。

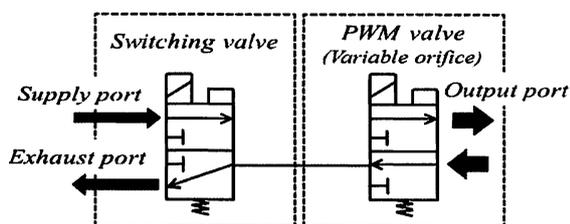


図1 疑似サーボ弁の構成

弁の具体的な動作は、制御入力 of 正負によって、給排気弁をオン、オフすることで給排気を切换え、制御入力 of 大きさによって、PWM弁 of 入力デューティ比を変え流量を調節する。このON/OFF弁 of 質量は15gである、弁を操作するためのコントローラはマイクロコンピュータ(ルネサスエレクトロニクス(株)製R8C/M12A)とトランジスタ(TOSHIBA(株)製MP4401)から構成されている。これらを含めた弁全体の質量は91gと通常のサーボ弁(330g)に比べ非常に軽量である。

3. 圧力制御システムの構成

弁 of 圧力制御システム、すなわち、圧力制御型疑似サーボ弁 of 構成を図2に示す。これは、疑似サーボ弁、マイクロコンピュータ、トランジスタ、圧力センサ(Panasonic(株)製ADP5160、A/D変換器を含む分解能: 0.61kPa)から構成される。制御 of 流れは以下のとおりである。目標電圧設定用 of ファンクションジェネレータ of 出力電圧と現在の圧力である圧力センサからの出力電圧をマイクロコンピュータ内部 of A/D変換器を用いて取り込み、その値を偏差として求め、後述する制御則に従って弁を駆動する。また、疑似サーボ弁 of 構成要素である2つのオンオフ弁 of うち、給排気を行う切换え弁はマイクロコンピュータ of I/Oポートに接続され、流量調整のためのPWM駆動弁はPWMポートに接続されている。そのため、制御則を各々の弁に適用する。

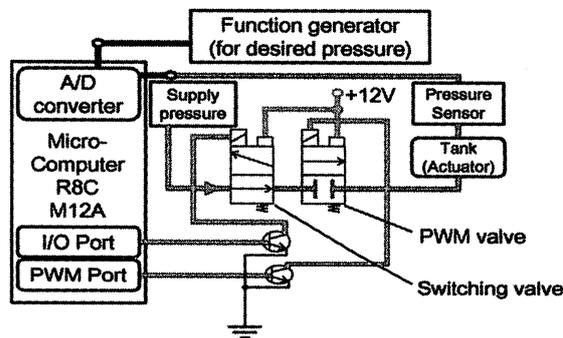


図2 圧力制御システム

例として比例制御則を以下に示す。

$$u = k_p e \quad (1)$$

給排気を行う切換え弁の制御則は以下の通りである。

$$u > 0 \quad \text{給排気 ON} \quad (2-1)$$

$$u \leq 0 \quad \text{給排気 OFF} \quad (2-2)$$

また、PWM弁への入力デューティ比は以下の式で与えられる。

$$d_u = |u| + 47.5 \quad (3)$$

ここで e は目標圧力と現在圧力との偏差、 k_p は比例ゲイン、 u は制御入力(デューティ比)、 d_u は入力デューティ比を示す。PWM弁への入力デューティ比は、不感帯(デッドゾーン)の補正のため、47.5%のデューティ比を u に上乘せする²⁾。

次に低差圧時の流量を補正するためにPWM弁への入力デューティ比を以下のように与えることにする。³⁾

$$u_s = |u| \frac{f(z)_{max}}{f(z)} + 47.5, \quad z = \frac{P_L}{P_S} \quad (4-1)$$

$$u_e = |u| \frac{P_S}{P_L} \frac{f(z)_{max}}{f(z)} + 47.5, \quad z = \frac{P_a}{P_S} \quad (4-2)$$

ここで、 u_s は給気時、 u_e は排気時の入力デューティ比、 P_L は負荷容積内圧力、 P_S は供給圧力、 P_a は大気圧力、 $f(z)_{max}$ は $f(z)$ の最大値(0.484)である。なお、 $f(z)$ は流れの状態を表す関数であり次式で与えられる。

$$f(z) = \sqrt{\frac{\kappa}{\kappa-1} (z^\kappa - z^{\frac{\kappa+1}{\kappa}})} \quad (0.528 < z \leq 1) \quad (5-1)$$

$$f(z) = \sqrt{\frac{\kappa}{\kappa+1} \left(\frac{2}{\kappa+1}\right)^{\frac{2}{\kappa-1}}} \quad (0 \leq z \leq 0.528) \quad (5-2)$$

4. 圧力制御性能の評価

圧力制御型疑似サーボ弁と、P、PD、PID、スライディングモード制御(以下、SM制御と略す)の4種類の制御則を用いて、圧力の追従制御実験を行い、性能評価を行う。

まず、実験方法について述べる。比例制御による追従実験の場合、PWM弁のPWM周期は5ms、コントローラの制御(サンプリング)周期は3.2msである、圧力制御信号をマイクロコンピュータの制御プログラムで表現する場合、A/D変換器出力のAD値で表すことにし、1AD値当

たり0.61kPaである。オフセット圧力は150kPa、圧力振幅は100kPaの正弦波入力を用いた。また、供給圧力を500kPaとし、負荷として15ccの容積を弁出力口に接続している。

4-1 PID制御

まず、P、PD、PID制御について述べる。比例制御Pは、制御入力を目標値と出力値の偏差をもとに制御する基本的なフィードバック制御方法である。微分制御Dは、出力値が目標値を行き過ぎた場合、その偏差を小さく抑える役割を果し、偏差速度に比例して入力を加え制御を行う。つまり、応答性や減衰性の改善のために用いられる。積分制御Iは、残留偏差が存在する場合、その偏差の時間積分に比例した入力を加え、定常偏差を改善するために用いられる。

PD、PID制御の制御則を以下のように表すことにする。

$$u = k_p e + k_d (e_i - e_{i-1}) \quad (6)$$

$$u = k_p e + k_i \sum_{j=0}^i e_{c(j)} + k_d (e_i - e_{i-1}) \quad (7)$$

ここで k_d は微分ゲイン、 k_i は積分ゲインを示す。

また、各制御ゲインは限界感度法で決定し、実験で微調整した。これらの値を表1に示す。

表1 圧力制御の制御パラメータ

	k_p	k_i	k_d
P	0.368	—	—
PD	0.56	—	0.034
PID	0.56	0.9 ^o	0.034

※単位は%/kPa

4-2 SM制御

SM制御は、制御入力の不連続に変化する非線形制御であり、希望する特性に適応でき、優れたロバスト性を有する。

SM制御則は以下の式で与えられる。

$$s = e + \alpha (e_i - e_{i-1}) \quad (8)$$

ここで、 s は切換え関数、 α は切換え定数である。

また、給排気の切換え弁は以下のように行う。

$$s > 0 \quad \text{給排気ON} \quad (9-1)$$

$$s \leq 0 \quad \text{給排気OFF} \quad (9-2)$$

PWM弁の入力デューティ比は式(4)と同じであり、制御則はP制御を用いる。 α は試行錯誤的に求め、0.1とする。

4-2 制御性能実験結果と考察

まず、目標周波数を1Hzとして実験した。その入出力波形例を図3に示す。これらを見ると、4種類の制御則はいずれも追従はしているが、P制御では出力の圧力振動が大きく、偏差が大きい。PD制御とPID制御ではP制御に比べると、偏差が小さくなっていて出力の行き過ぎも抑えられている。SM制御ではP制御より偏差は小さくなっているが、圧力振動が大きくなっていることが分かる。

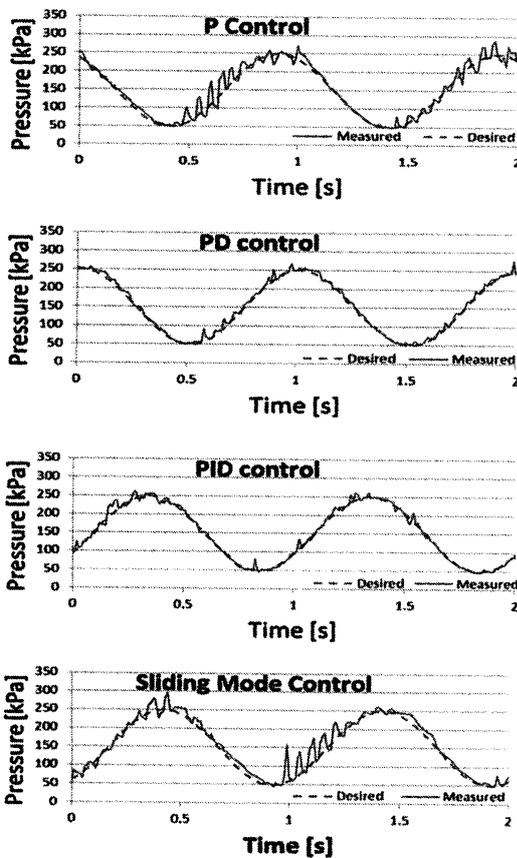


図3 1 Hz の場合の周波数応答実験結果

次にこれらの制御則を用いて0.1Hzから5Hzまでの目標周波数で実験を行った。その比較結果を図4に示す。図の縦軸はP、PD、PID、SM制御の各周波数応答の平均絶対誤差である。低い周波数(0.1-1Hz)の場合、PID制御が良い性能(絶対偏差:4.30kPa)を示している。また、高い周波数(2-5Hz)の場合、PD制御が良い性能(絶対偏差:21.5kPa)を示し、全体の周波数範囲では、SM制御が平均的に優れていることが分かる。しかし、2Hz以降からサーボ弁が目標周波数に追従しにくくなるため偏

差が大きくなっていることが分かる。

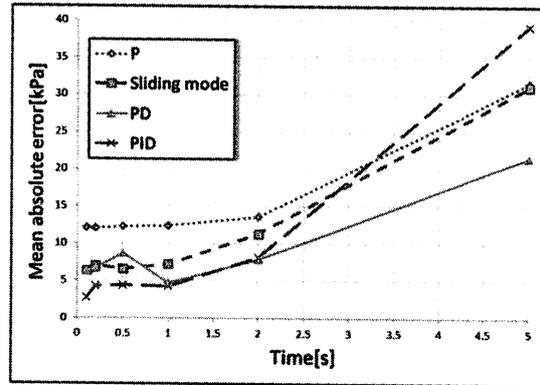


図4 絶対平均誤差における制御性能の比較

5. ゴム人工筋の位置決め制御への応用

圧力制御型疑似サーボ弁の応用として、マッキベン型ゴム人工筋を用いた位置決め制御を試み、制御性能について検討する。

5-1 制御システムの構成

マッキベン型ゴム人工筋の位置決め制御システムの構成を図5に示す。システムは、圧力制御型疑似サーボ弁、コントローラとしてのマイクロコンピュータ、外部DA変換器(LINEAR TECHNOLOGY LTC1660CN)、ポテンシオメータ(栄通信工業㈱製 18FLPA50、ストローク50mm、抵抗値10k Ω)、マッキベン型ゴム人工筋(自然長250mm、ストローク50mm、内径10mm)から構成される。ポテンシオメータは、人工筋と直列に接続する。制御システムのブロック線図を図6に示す、制御の流れは以下の通りである。まず、目標値電圧用のファンクションジェネレータの出力電圧とポテンシオメータの出力電圧をコントローラ内部のAD変換器を用いて取り込み、偏差を求め、制御則に従って、サーボ弁を駆動し、人工筋を制御する。弁の制御則は、4章で絶対偏差が小さかったPD制御とSM制御とし、人工筋の制御則は、P、PI制御である。

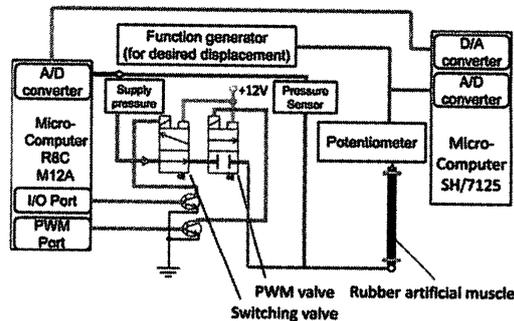


図5 位置決め制御システム

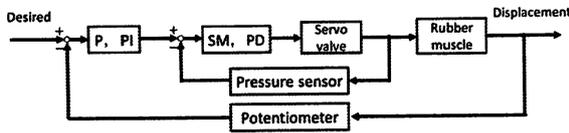


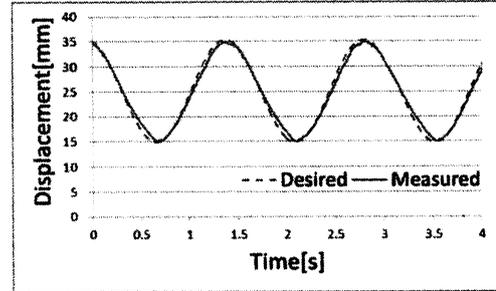
図6 位置決め制御のブロック線図

5-2 実験方法

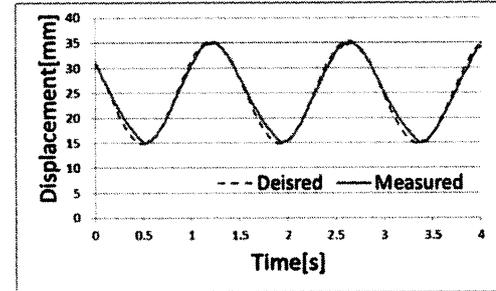
人工筋の位置決め制御の実験方法について述べる。オフセット変位25mm、変位振幅10mm、周波数0.5Hzと0.7Hz、供給圧力500kPaで実験を行う。位置決め制御の制御ゲインは、試行錯誤により、最適ゲインを求め、P制御の場合、 $k_p=307$ (kPa/mm)、PI制御の場合、 $k_p=204$ (kPa/mm)、 $k_f=266$ (kPa/mm)とした。なお、制御則によって計算された操作量 u に常に350kPa(人工筋のオフセット変位25mmに相当)の圧力を加えて疑似サーボ弁の目標圧力とした

5-3 実験結果と考察

弁にSM制御とPD制御を用い、人工筋の位置決め制御にP、PI制御を用いた場合の実験結果を図7に示す。図7(a)、(b)は弁の制御則にPD制御、位置決め制御にPとPI制御を用いた場合である。また、図7(c)、(d)は弁制御にSM制御、位置決め制御にPとPI制御を用いた場合である。その時の絶対平均誤差を表2に示す。図7から、いずれの場合も良好に追従していることがわかるが、P制御よりもPI制御を用いた方が偏差が小さいことがわかる。



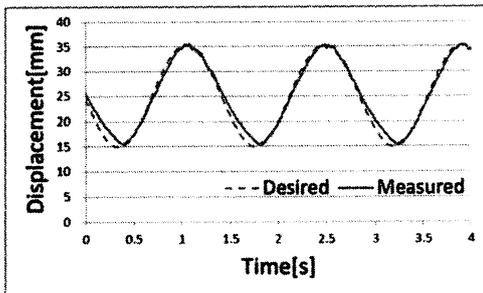
(c) 弁制御にSM制御、位置決め制御にP制御



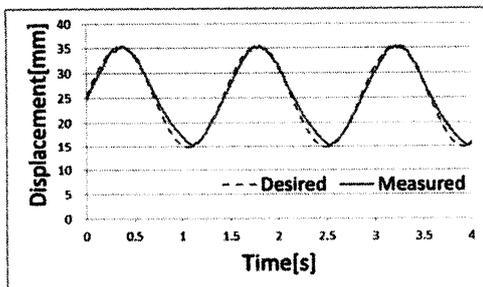
(d) 弁制御にSM制御、位置決め制御にPI制御

図7 0.7Hzにおける位置決め制御実験結果

さらに、表2を見ると、弁制御にSM制御を用いた場合、絶対平均誤差がPD制御の場合の70%程度になっていることがわかる。目標周波数が0.5Hzの場合の絶対平均誤差を表3に示す。0.5Hzの場合、位置決め制御にPI制御、弁制御にSM制御を用いた方が絶対平均誤差が0.251mmと最も小さいことが分かる。よって、位置決め制御にPI制御、弁制御にSM制御を用いるのが良いと言える。



(a) 弁制御にPD制御、位置決め制御にP制御



(b) 弁制御にPD制御、位置決め制御にPI制御

表2 0.7Hzにおける、絶対平均誤差

	MAE(P)	MAE(PI)
P	0.848	0.724
PD	0.614	0.538

※単位はmm

表3 0.5Hzにおける、絶対平均誤差

	MAE(P)	MAE(PI)
P	0.310	0.265
PD	0.336	0.251

※単位はmm

6. 結 言

圧力制御型疑似サーボ弁を用いて、4種類の制御則P、PD、PID、SM制御を用いて追従制御実験を行い、制御性能の比較を行った。その結果、低い周波数(0.1-1Hz)では、PID制御が良い性能を示し、高い周波数(2-5Hz)では、PD制御が良い性能を示した。広い周波数(0.1-5Hz)では、全般的にSM制御が良い性能を示した。

圧力制御型疑似サーボ弁の応用として、マッキベン型ゴム人工筋の位置決め制御実験を行い、性能評価を行った。その結果、弁にSM制御を用い、位置決め制御にPI制御を用いた場合が最も優れた制御性能を示すことを確認した。

参考文献

- 1) 長田義仁編：ソフトアクチュエータ開発の最前線～人工筋肉の実現をめざして～，NTS，pp.294-321(2004)。
- 2) 趙 菲菲・堂田周治郎・赤木徹也：“柔軟湾曲アクチュエータ用小型疑似サーボ弁の試作と解析”，日本機械学会論文集(C編)，Vol.76，No.772，pp.3665-3671(2010)。
- 3) Y. Moriwake, T. Akagi, S. Dohta and F. Zhao :
Improvement of Pressure Control Type Quasi-servo Valve and On/Off Valves Using Embedded Controller Proceedings of 2013 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics, pp. 882-887(2013).
- 4) S. Shimooka, S. Dohta, T. Akagi, Y. Moriwake and F. Zhao : Estimation of Pressure Control Performance in Low-Cost Quasi-Servo Valve Using Embedded Controller, Lecture Notes in Electrical Engineering 293, Springer, Vol.1, pp.359-366(2014).

Estimation and Application of Low-cost Pressure Control Type Quasi-servo Valve

So SHIMOOKA, Shujiro DOHTA*, Tetsuya AKAGI* and Yoshinori MORIWAKE**

Master's Program in Intelligent Mechanical Engineering, Graduate School of Engineering,

** Department of Intelligent Mechanical Engineering, Faculty of Engineering,*

*** Doctoral Program in System Science, Graduate School of Engineering,*

Okayama University of Science,

1-1, Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 30, 2014; accepted November 6, 2014)

Today, the care and welfare pneumatic equipment to support a nursing care and a self-reliance of the elderly and the disabled are actively researched and developed by many researchers. These wearable devices require many servo valves for multi degrees of freedom and precise control performance of the wearable actuator. The total weight load of the wearable devices increases according to the degree of freedom. In our previous study, a small-sized and light-weight pressure control type quasi-servo valve was developed to reduce the burden of the user in a power-assisted system. The valve consists of inexpensive on/off control valves and embedded controller. The valve consists of two on/off type control valves whose both output ports are connected each other. One valve is used as a switching valve to supply or exhaust, and the other is used as a PWM (Pulse Width Modulation) control valve that can adjust output flow rate like a variable fluid resistance. In this study, the pressure control performances using four kinds of control scheme were investigated and compared by experiment. The frequencies up to 5 Hz were applied to the tested pressure control system. As a result, PID controller gave the good performance in low frequency of 0.1 to 1 Hz. In the higher frequency of 2 to 5 Hz, PD controller gave the good performance. As an application of pressure control type Quasi-servo valve, we tested position control for Mckibben artificial muscle. The position control performance of Mckibben artificial muscle was investigated and compared by experiment. The pressure control using quasi-servo valve was operated by PD and Sliding mode control schemes. And the position control of an artificial muscle was operated by P and PI control. As a results, it can be confirmed that the sliding mode control for quasi-servo valve and the PI control for artificial muscle give a good control performance.

Keywords: quasi-servo valve; small-sized control valve; Mckibben artificial muscle; embedded controller.

チューブの屈曲を利用した低コストサーボ弁の静特性の改善

大野 歩・赤木 徹也*・堂田 周治郎*・アブドル ナシル**

岡山理科大学大学院工学研究科知能機械工学専攻

* 岡山理科大学工学部知能機械工学科

** 岡山理科大学大学院工学研究科システム科学専攻

(2014年9月30日受付、2014年11月6日受理)

1. 緒言

空気圧駆動システムにおいて、発生力が必要となる空気圧アクチュエータの小型化は難しいものの、周辺機器の小型化は可能である。特に、生産技術において駆動システムの小型化は有効な手段である。その周辺機器として制御弁の小型化は大きな課題である。現在主流の制御弁は、圧力差による大きな力が加わったポペットをソレノイドで駆動するため、大きなソレノイドが必要となり、弁の容積や重量が大きくなるという問題点がある。これは容積を大きくするだけでなく、弁のコストを高くするという問題につながる。実際に、空気圧システムにおいてアクチュエータに比べて弁のコストは大きなウェイトを占める。そこで、以前の研究で安価な振動モータでチューブ内のチェック弁のボールを駆動し、開閉する低コストな弁¹⁾を試作した。また、サーボ弁としてチューブ内に設定したチェック弁を複数個用いて流量を離散的に制御する安価な小型デジタルサーボ弁の開発を行った²⁾。しかし、流量を細かく調整するためには、チェック弁の数を増やす必要があり、弁が大きくなり、コストが増えるという問題点があった。

著者らは、以前に屈曲したチューブのねじれ角度を調整することにより開口面積を連続的に変える小型サーボ弁を開発した³⁾。また、チューブにねじれを加えるモータ角度と出力流量のヒステリシス特性を改善するため、圧力センサを用いた圧力フィードバック制御を行う弁を安価な組み込みコントローラを用いて実現した⁴⁾。本論文では、この弁の静特性であるモータ回転角に対する出力流量のヒステリシス特性やその弁を用いたゴム人工筋の位置決め制御性能の改善について述べる。

2. 低コストサーボ弁

試作弁の外観を図1に示す。試作弁は、空気圧配管用のポリウレタンチューブ(株式会社SMC TUS0425:内径2.5 mm、外径4.0 mm)、小型のラジコン用サーボモータ(株式会社GWS PICO/STD/F、速度500 deg./s、質量5.4 g)、チューブ

を保持するためのアクリル製の円板とチューブを保持する治具から構成される。図1左の側面写真に示すように、チューブを屈曲した状態から、図1右の正面写真のように直角方向にねじることで、屈曲部分に3次元的なねじれを生じ、流路面積を変えることができる。この方法は、単純に屈曲方向にチューブを動かす方法に比べ、小さな力でチューブを動かすことができ、コンパクトな弁が構成できる。また、サーボモータを挟んだ両側に屈曲したチューブを2本設置することで、給気、排気の流量調節と保持が可能である。3ポート弁のサイズは46×40×32 mm、質量は20 gである。

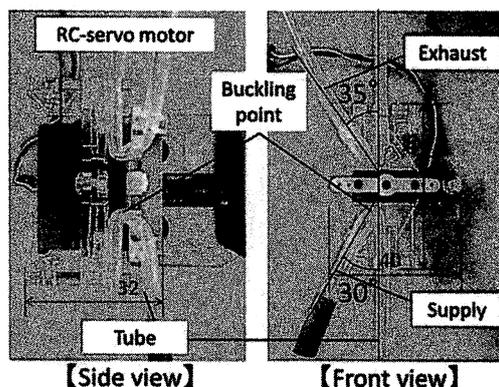


図1 低コストサーボ弁の構造

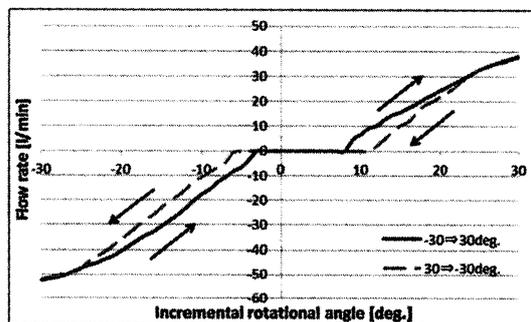


図2 低コストサーボ弁の出力流量特性

図2に試作弁のモータ回転角と出力流量の関係を示す。弁への供給圧力は500 kPaである。図中の実線はモータ回転角度を増加させた場合、破線は減少させた場合を示す。横軸は、図1に示す状態のモータの角度を0 deg.とした際のモータの相対的回転角である。また、サーボモータの可動角度範囲は、供給チューブがねじれない範囲である ± 30 deg.とした。図を見ると、弁の開閉方向に対してヒステリシスを有しているものの、 $-3 \sim 8$ deg.の範囲で保持が可能なオーバーラップを有していることがわかる。またこのヒステリシスの原因は、チューブのねじれ動作に伴いチューブがスライドすることによる摩擦の影響や圧力や流体の運動量によるチューブの膨張によって生じるものと考えられる。つまり、チューブを固定し、スライドを防ぐことによってヒステリシス特性は改善できるものと考えられる。また、保持のオーバーラップ部分はこのヒステリシス特性のため、多少大きくする必要があったが、ヒステリシス特性が改善されれば、このデッドゾーン部分を小さく設定でき、弁の速応性の改善につながるものと考ええる。

3. ウェアラブルサーボ弁を用いた位置決め制御

前述の弁を用いたゴム人工筋の位置決め制御システムの構成図を図3に示す。システムは試作弁、目標値入力用と制御量である人工筋変位を測定するための2つのポテンシオメータ(株MIDORI LP-50F)、自然長254 mm、内径10 mmのゴム人工筋(株FESTO MXAM-10-AA)、制御器となるマイクロコンピュータ(株Renesas H8/3664F)から構成される。制御の流れは以下の通りである。目標値入力用のポテンシオメータとゴム人工筋に接続されたポテンシオメータからの出力電圧をマイコン内の10 bitのA/D変換器を介して検出し、偏差を求め、PD制御則に基づいて試作弁を駆動し、ゴム人工筋の位置決め制御を行う。そのステップ応答結果を図4に示す。図中の破線は目標変位、実線は制御結果を示す。

実験では目標値をほぼステップ状に20 mm変化させ、制御には次式のPD制御則を用いた。これは、単純なP制御ではオーバーシュートが生じたためである。

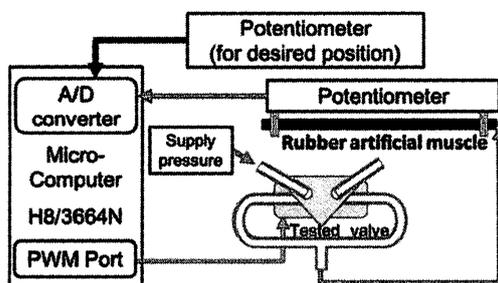


図3 ゴム人工筋の位置決め制御システム

$$u_{(i)} = K_p e_{(i)} + K_D (e_{(i)} - e_{(i-1)}) / \Delta t \quad (1)$$

ここで、 $e_{(i)}$ は目標値入力用のポテンシオメータの変位からゴム人工筋に接続されたポテンシオメータの変位を引いた偏差[mm]、 $u_{(i)}$ はサーボモータへ入力されるPWM信号のデューティ比の変化分である制御入力[%]、 Δt は制御のサンプリング周期[s]を示す。制御パラメータである比例ゲイン K_p と微分ゲイン K_D はそれぞれ試行錯誤的に求め0.088 %/mm、 2.4×10^{-5} %s/mmとした。制御ではモータに入力されるデューティ信号は図1に示す初期状態を基準位置とするため次式で与えられる。

$$d_{(i)} = u_{(i)} + 7.5 \quad (2)$$

ここで、 $d_{(i)}$ はサーボモータへの入力デューティ比[%]である。制御では目標値付近での振動を防ぐため、目標値の ± 0.5 mmの範囲でデッドゾーンを設けている。また、サンプリング周期は1.9 msである。

図4から、ゴム人工筋は多少の偏差を有するものの、オーバーシュートの少ない良好な応答が得られることがわかる。また図5に追従制御実験結果の例を示す。追従制御では目標値付近のデッドゾーンを設けずに制御を行った。この結果より、比較的良好に追従できているものの給気と排気が切り替わる際に0.4 s程度の遅れが生じているのがわかる。この遅れは弁の保持状態のためのオーバーラップ範囲の大きさに依存し、この弁の場合、ヒステリシス特性が存在するためデッドゾーンを大きくする必要があった。

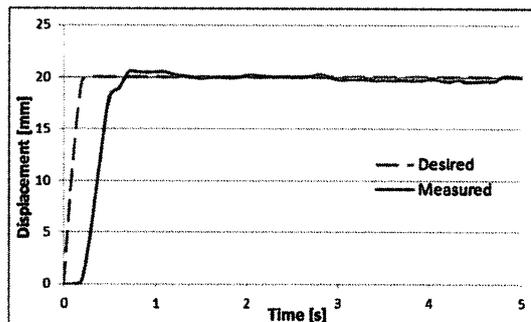


図4 ゴム人工筋の位置決め制御結果

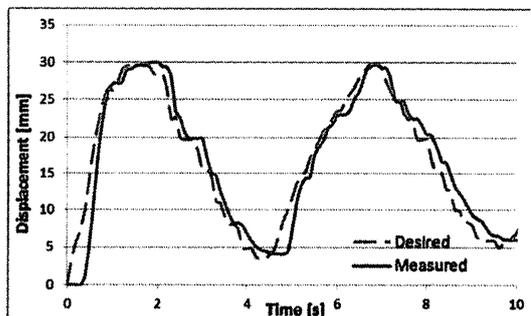


図5 ゴム人工筋の追従制御結果

4. 改良弁

そこで、ヒステリシス特性の改善とデッドゾーンの最小化をめざし、新たに改良した弁を図6に示す。弁は、図1の弁(従来弁とよぶことにする)と同様に空気圧配管用のポリウレタンチューブ、小型ラジコン用サーボモータ、チューブを保持するためのアクリル製の円板とチューブを保持する治具から構成される。従来弁との構造上の違いは、座屈チューブにねじれを加えることなく直接座屈角度を調整するようにした点である。これにより、以前に比べモータに加わる負荷が大きくなるため、チューブの初期座屈角を同じ(63 deg.)にし、チューブの屈曲による反発力を相殺するようにしている。また、モータの回転角度に対して、線形に出力流量が変化するように、試行錯誤的にチューブの座屈位置を求め、さらに、保持のためのデッドゾーンを小さくするため、初期の座屈角も検討した。これらチューブの最適配置は今後、弁の解析モデルの構築、シミュレーション等を行い最適設計を行う必要がある。以上の検討を行った弁形状を図6に示す。弁の動作原理は従来弁と同じであるが、チューブを屈曲方向に曲げることができるように円板についた壁により押さえながら角度を調整できるようにしている。この弁も従来弁と同様に、給気、排気の両方の操作を同時に行うことが可能である。弁のサイズは46×47×28 mm、質量は22.5 gと従来弁とほぼ同じサイズと質量である。

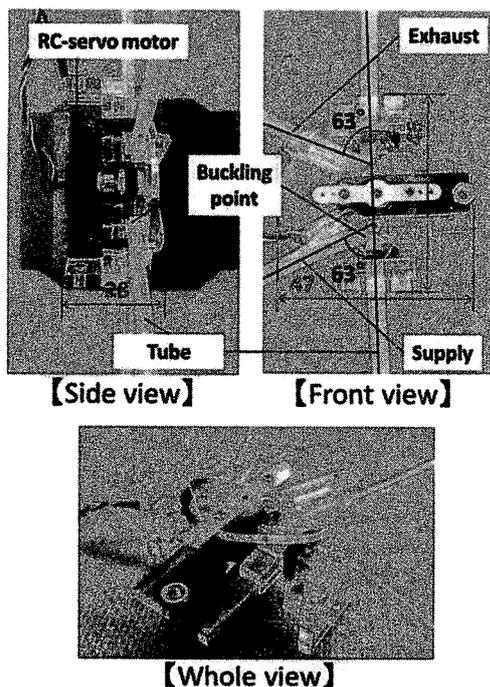


図6 改良弁の構造

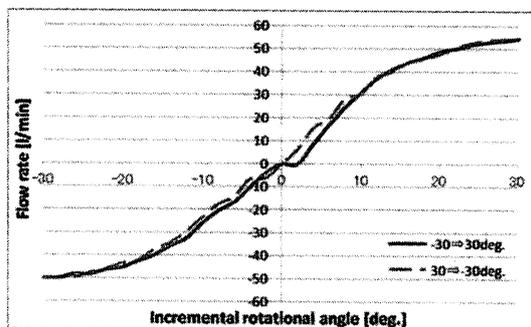


図7 改良弁の出力流量特性

図7に改良弁のモータの相対回転角と出力流量の関係を示す。図中の実線はモータ回転角度を増加させた場合、破線は減少させた場合を示す。図から、以前のチューブのねじりを利用した弁に比べヒステリシスが少なく線形な特性を有し、さらに、オーバーラップの範囲も $-1\sim 2$ deg.の範囲と小さく設定できていることがわかる。

5. 改良弁を用いたゴム人工筋の位置決め制御

前述の改良弁を用いてゴム人工筋の位置決め制御を行う。図8に人工筋の追従制御結果を示す。実験では、ポテンショメータを用いて変位が0~25 mmの範囲で約0.2 Hzの周期で変化するように目標値を手動で変えた。この図から、目標値入力に対してゴム人工筋の変位が良好に追従していることがわかる。

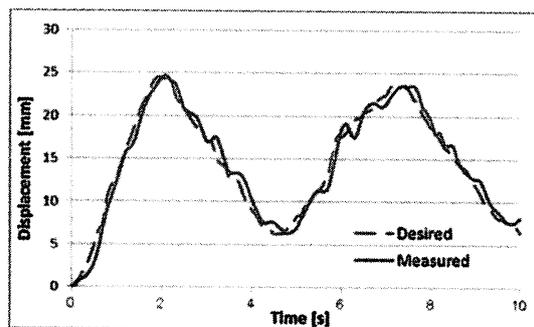


図8 ゴム人工筋の追従制御結果

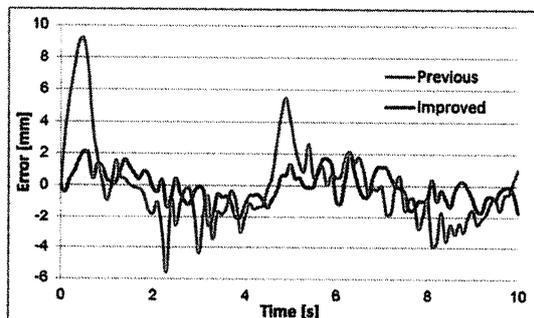


図9 ゴム人工筋の追従変位誤差の応答

また従来弁との比較として追従制御における偏差の過渡応答結果を図9に示す。ここで赤線は改良弁(曲げ型サーボ弁)を用いた場合、青線は従来弁(ねじれ型サーボ弁)を用いた結果である。これらの応答結果における追従誤差の標準偏差は改良弁を使用した場合は0.9 mm、従来弁の場合は2.0 mmと約45%に低減できている。これはモータ回転角に対するデッドゾーンを小さくすることでむだ時間が低減できたためと、弁の静特性の線形性が良くなったため、制御性能が改善されたものと考えられる。

6. 結 言

サーボモータを用いて屈曲チューブのねじれ角を変えることで連続的な流量調節を行っていた従来弁を改良し、屈曲角を直接調整するサーボ弁を提案し、試作した。その結果、モータ回転角に対する出力流量のヒステリシス特性を低減することができた。さらに、試作弁を用いてゴム人工筋の位置決め制御を行った結果、デッドゾーン領域を小さくできたことで、追従誤差の標準偏差を以前の2.0 mmから0.9 mmに改良できた。

今後は、弁の解析モデルを構築し、座屈チューブ配置の最適設計などを行う予定である。

参考文献

- 1) T. Akagi et.al., "Development of Small-sized Flexible Control Valve Using Vibration Motor", JFPS International Journal of Fluid Power System, Vol.2, No.2, (2010), pp.45-50.
- 2) S. Dohta et.al., "Development of Small-Sized Digital Servo Valve for Wearable Pneumatic Actuator", Journal of Procedia Engineering, Vol.41, (2012), pp.97-104.
- 3) A. Nasir, T. Akagi, S. Dohta and A. Ono, "Development of Small-Sized Servo Valve Controlled by Using Buckled Tube and Its Application", Journal of System Design and Dynamics, Vol.7, No.4, (2013), pp.516-527.
- 4) 大野歩・赤木徹也・堂田周治郎・正子祐輔・アブドルナシル:チューブの屈曲を利用した低価格ウェアラブルサーボ弁の試作, 岡山理科大学紀要, 第49号, (2013), pp. 29-33.
- 5) A. Ono, T. Akagi, S. Dohta, A. Nasir and Y. Masago, "Development of Low-Cost Pressure Control Type Wearable Servo Valve Using Buckled Tube", Proceedings of International Research Conference on Engineering and Technology, (2013), pp.64-71.

Improvement of Static Characteristics of Low-cost Servo Valve Using Buckled Tube

Ayumu ONO, Tetsuya AKAGI*, Shujiro DOHTA* and Abdul NASIR**

Master's Program in Intelligent Mechanical Engineering, Graduate School of Engineering,

** Department of Intelligent Mechanical Engineering, Faculty of Engineering,*

*** Doctoral Program in System Science, Graduate School of Engineering,*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 30, 2014; accepted November 6, 2014)

The typical electromagnetic solenoid valve drives its spool using a solenoid to open the flow passage. This complex configuration prevents to fabricate a low-cost valve. Therefore, the cost for valve occupies most of the total cost in a pneumatic control system. The purpose of our study is to develop a low-cost and small-sized control valve. In our previous study, a low-cost wearable servo valve that can control the output flow rate by changing the twisted angle of the buckled tube in the valve was proposed and tested. The pressure control type valve using the buckled tube was also developed so as to improve its hysteresis characteristics. In this paper, the improved valve using the buckled tube without being twisted was redesigned and tested. The relation between the motor angle and the output flow rate of the valve was investigated. As a result, we confirmed that the static characteristics had a linear relationship. The position control system of McKibben rubber artificial muscle using both tested valves and embedded controller was also executed. As a result, we also confirmed that the position control performance of the muscle using the improved valve was superior to the case using the previous valve.

Keywords: low-cost servo valve; buckled tube; hysteresis; embedded controller; static characteristics.

柔軟球面アクチュエータを用いた可搬型リハビリ機器の試作と制御

松井 保子・赤木 徹也*・堂田 周治郎*

岡山理科大学大学院工学研究科知能機械工学専攻

* 岡山理科大学工学部知能機械工学科

(2014年9月30日受付、2014年11月6日受理)

1. 緒言

高齢化社会を迎え、リハビリテーション機器やパワーアシスト装置の開発が盛んに行われている¹⁾。著者らは、これまでに人体に装着可能な柔軟空気圧シリンダを開発してきた²⁾。本研究では柔軟空気圧シリンダを利用した肩や腕を含むリハビリテーション機器の開発をめざす。具体的には、2つの柔軟空気圧シリンダをリング状に曲げ直角に交差させて構成する球面アクチュエータを改良し、それを用いて周方向に湾曲できる簡易な可搬型上肢リハビリテーション機器の開発をめざす。

本論文では、改良型球面アクチュエータや、それを用いた可搬型上肢リハビリ機器の構造、動作原理、基本特性、および制御実験結果について述べる。

2. ロッドレス型柔軟空気圧シリンダ

球面アクチュエータの基本となるロッドレス型柔軟空気圧シリンダ²⁾の構造を図1に示す。柔軟空気圧シリンダは、シリンダとガスケットに相当する柔軟チューブとシリンダヘッドに相当する一つの鋼球、チューブの外側に沿ってスライドできるスライドステージで構成される。鋼球は、両サイドから2つの真鍮製ローラによって挟まれている。

動作原理は、片側の圧力室を印加すると内部の鋼球が押され、それに伴いローラが押されスライドステージが動くというものである。最低駆動圧力は120kPaである²⁾。

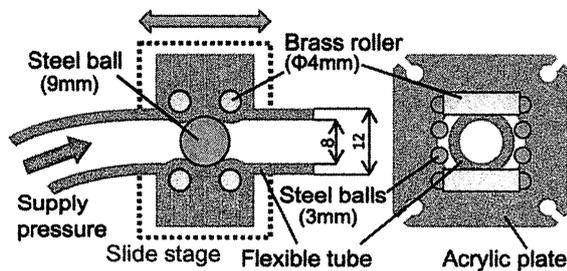


図1 柔軟空気圧シリンダの構造

3. 設置型球面アクチュエータ

図2に以前開発した設置型球面アクチュエータの概観を示す³⁾。アクチュエータはリング状に曲げた柔軟チューブ(湾曲半径80mm)2つを90度で交差させ固定している。また、スライドステージを下側の固定台に固定し、シリンダの両端(計4ヶ所)から空気を供給することで湾曲動作を行う。上側の固定台にシリンダ両端を同一平面上で固定しているため、シリンダを加圧すると上側の固定台自体が駆動する。下側のスライドステージは、チューブが互いに接触しないように10mmずらして固定している。アクチュエータのサイズは、幅170mm、高さ160mmで、全質量は300gである。

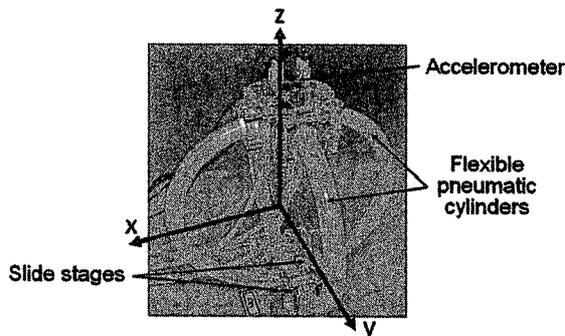


図2 設置型球面アクチュエータの概観

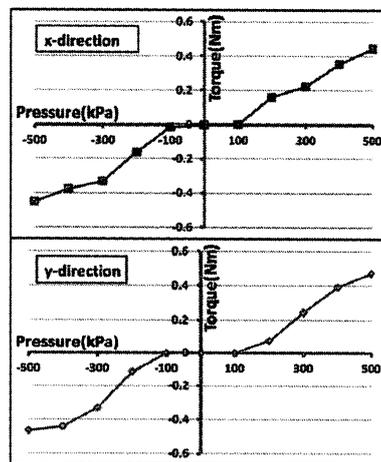


図3 発生トルク特性

図3に球面アクチュエータの印加圧力と発生トルクとの関係を示す。発生トルクは、それぞれのシリンダの円中心からワイヤ固定位置までの距離（X方向は80mm、Y方向は85mm）をもとに計算した。図3より、X方向の最大発生トルクは0.45Nm、Y方向は0.47Nmであり、0～±100kPaの入力圧力の範囲で、前述のロッドレス型柔軟空気圧シリンダの摩擦によるデッドゾーンが存在することがわかる。

4. 可搬型上肢リハビリ機器

4-1 構造と動作原理

図4に、従来の設置型球面アクチュエータを用いて試作した可搬型上肢リハビリ機器を示す。これは、肩や腕のリハビリテーションを目的としており、患者が両手で装置を保持して使用する（図5）。リハビリテーション機器に適用するためには、動作範囲とアクチュエータの発生トルクを大きくする必要がある。そこで、リング状柔軟空気圧シリンダの直径を160mmから260mmに変更した。また、前述のアクチュエータと異なり、図4下に示すように、2つのスライドステージを片側のベースに接続せず、保持ステージ上に固定している。これは装置の対称性を考慮したためである。アクチュエータの大きさは、幅260mm、高さ270mmであり、全質量は310gと軽量である。また、各保持ステージの姿勢角を測定するために、2つの加速度センサを使用する。

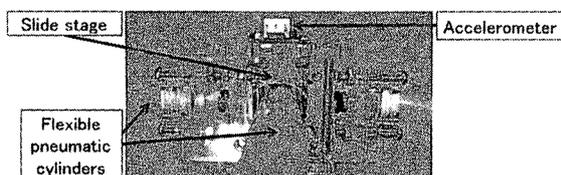
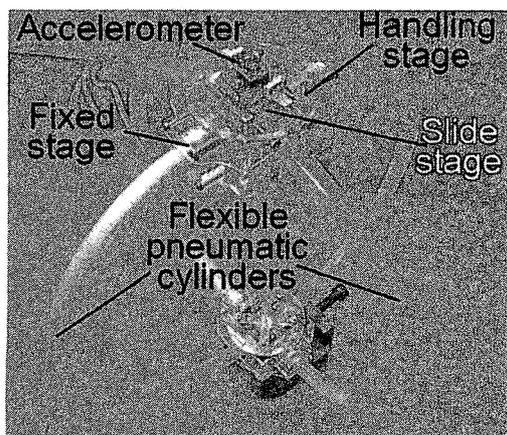


図4 可搬型上肢リハビリ機器の外観

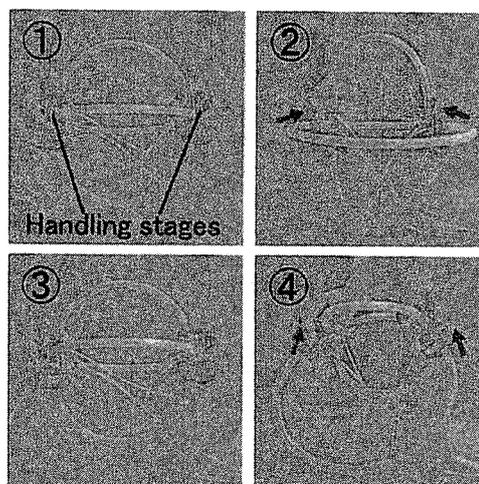


図5 動作の様子

4-2 角度変化

ここで、各保持ステージでの角度変化 θ 、 ψ 、 ϕ （図6参照）は以下の式で定義される⁴⁾。ここで A_{xout} 、 A_{yout} 、 A_{zout} は、それぞれx軸、y軸、z軸における加速度センサからの出力である。

$$\theta = \tan^{-1} \left(\frac{A_{xout}}{\sqrt{A_{yout}^2 + A_{zout}^2}} \right) \quad \dots (1)$$

$$\psi = \tan^{-1} \left(\frac{A_{yout}}{\sqrt{A_{xout}^2 + A_{zout}^2}} \right) \quad \dots (2)$$

$$\phi = \tan^{-1} \left(\frac{\sqrt{A_{xout}^2 + A_{yout}^2}}{A_{zout}} \right) \quad \dots (3)$$

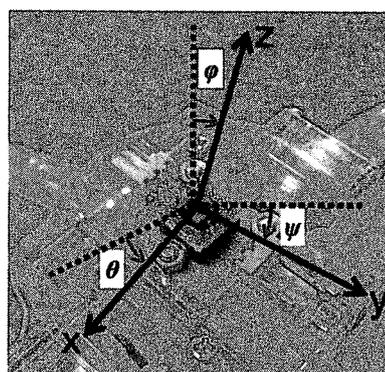


図6 角度変化

4-3 マスタースレーブ制御システム

図7に可搬型上肢リハビリ機器の姿勢制御システムの外観、図8にその構成を示す。システムは2つの加速度センサを有する球面アクチュエータ（スレーブ）、1つの加速度センサからなるマスター機器、柔軟空気圧

シリンダを駆動するための4つの疑似サーボ弁⁵⁾と制御器となるマイクロコンピュータ(ルネサステクノロジ SH/7125)から構成される。制御器や弁を含むシステムの全質量は約0.9kgである。制御方法は以下の通りである。シーケンスの目標角データ、もしくは理学療法士が操作するマスター機器によって、2つのステージ間の目標角を与え、マイコンのA/D変換器に接続された加速度センサの出力から各ステージの角度を算出し、スレーブの姿勢角を得る。そして、マスターとスレーブの角度偏差から制御則により疑似サーボ弁を駆動し、柔軟空気圧シリンダを制御する。ここで、制御のサンプリング周期は4ms、疑似サーボ弁のPWM周期は10msである。

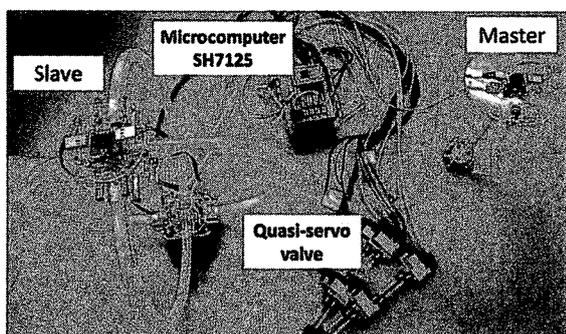


図7 システムの外観

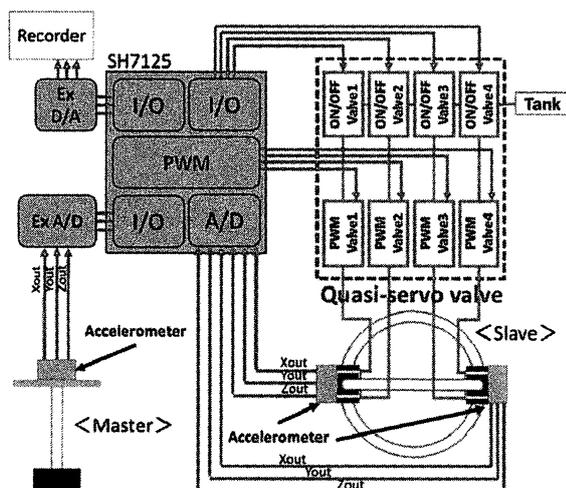


図8 システム構成図

5. 制御実験

5-1 シーケンス制御

図9にシーケンス制御における2つのステージ間の角度 θ 、 ψ の時間変化を示す。この動作は、図5に示す動作で角度を測定した結果である。実験は図8に示す制御システムを用いて行い、X方向、Y方向ともに0.8秒ごとに2つのステージ間の角度が変化するように動作させ

た。図9より、ステージ間の角度が計測できていることが確認できる。

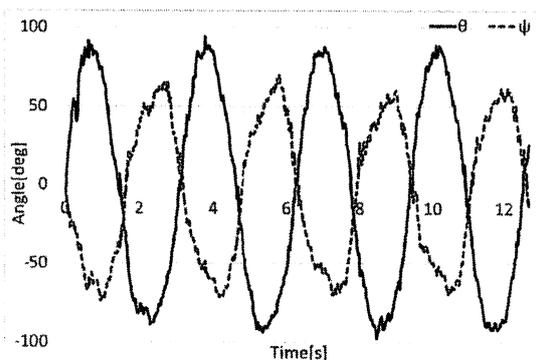


図9 シーケンス制御

5-2 目標値追従制御

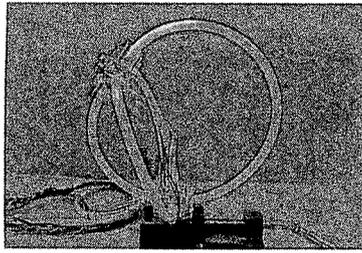
図8に示す制御システムを用いて、目標値追従制御を行った。目標値として式(4)に示すX方向、Y方向交互に目標角を変えるX-Y独立動作と、式(5)・(6)に示す2つの保持ステージに円軌道を生じるように角度変化を与えた。ここで、 θ_r 、 φ_r は目標姿勢角である。制御にはP制御則を用いた。

$$\begin{array}{lll}
 0s < t \leq 4s & \theta_r = 0^\circ & \varphi_r = 0^\circ \\
 4s < t \leq 8s & \theta_r = 45^\circ & \varphi_r = 0^\circ \\
 8s < t \leq 12s & \theta_r = 0^\circ & \varphi_r = 0^\circ \\
 12s < t \leq 16s & \theta_r = -45^\circ & \varphi_r = 0^\circ \\
 16s < t \leq 20s & \theta_r = 0^\circ & \varphi_r = 0^\circ \\
 20s < t \leq 24s & \theta_r = 0^\circ & \varphi_r = 45^\circ \\
 24s < t \leq 28s & \theta_r = 0^\circ & \varphi_r = 0^\circ \\
 28s < t \leq 32s & \theta_r = 0^\circ & \varphi_r = -45^\circ
 \end{array} \quad (4)$$

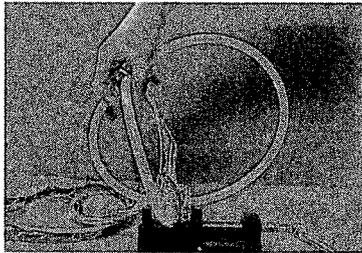
$$\theta_r = 55 \sin(0.67t) \quad \dots (5)$$

$$\varphi_r = 55 \sin(0.67t - 1.55) \quad \dots (6)$$

実験は、手を置かない場合と手を置いた場合の2つの環境で行った(図10参照)。図11、12にその実験結果を示す。図11、12の破線は目標角を示し、実線は実験結果を示す。また、各線の色の違いは測定角度の違いを示す。両図より、多少振動的だが、目標値に追従できていることが確認できる。手を置いた場合、手を置いていない場合に比べ、振動が少なくなっている。また、X-Y独立動作において手を置いた場合、ステージの質量増加のため、慣性力が大きくなり、大きなオーバーシュートが生じていることも確認できる。

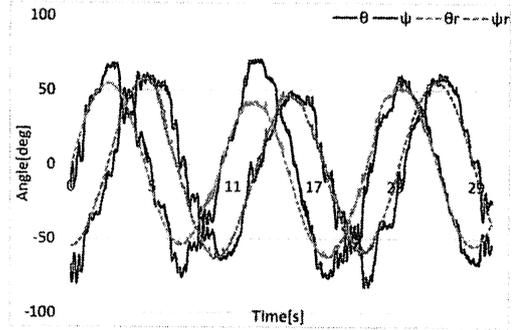


(a)手を置かない場合

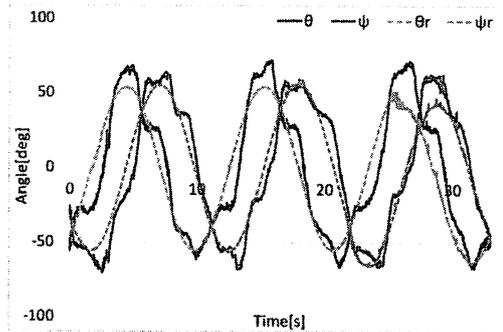


(b)手を置いた場合

図10 実験の様子(目標値追従制御)

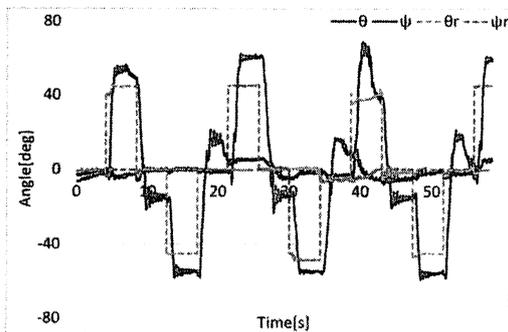


(a)手を置かない場合

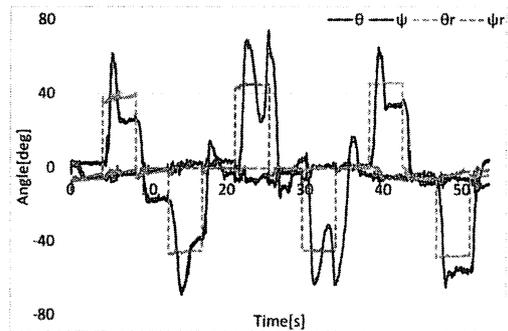


(b)手を置いた場合

図12 円動作(目標値追従制御)



(a)手を置かない場合

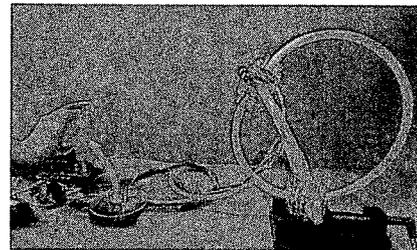


(b)手を置いた場合

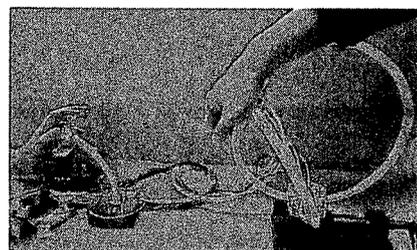
図11 X-Y独立動作(目標値追従制御)

5-3 マスタースレーブ制御

次に、目標値追従制御と同様の動作をマスター機器から与えることによって、マスタースレーブ制御を行った。図13に実験の様子、図14、15に実験の結果を示す。図中の破線および実線は依然と同じである。図14、15より、目標値追従制御と同様の傾向を示した。

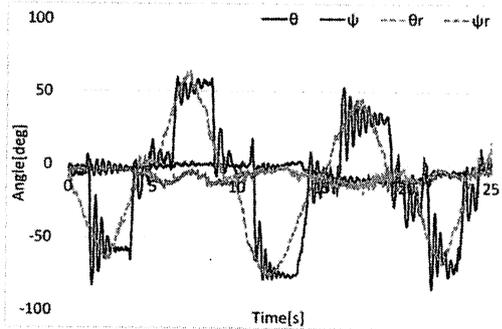


(a)手を置かない場合

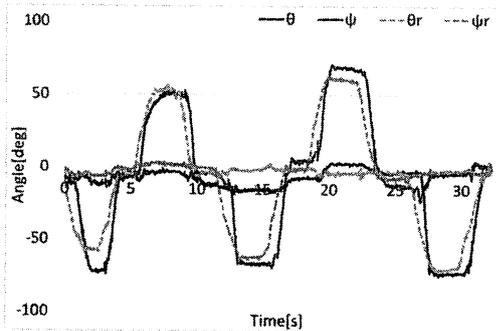


(b)手を置いた場合

図13 実験の様子(マスタースレーブ制御)

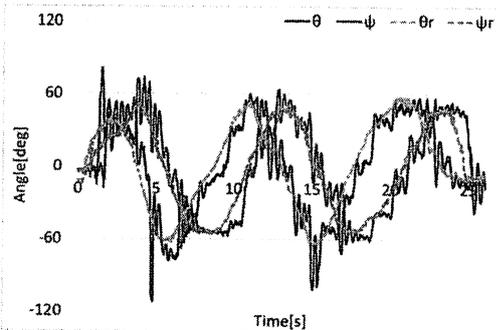


(a)手を置かない場合

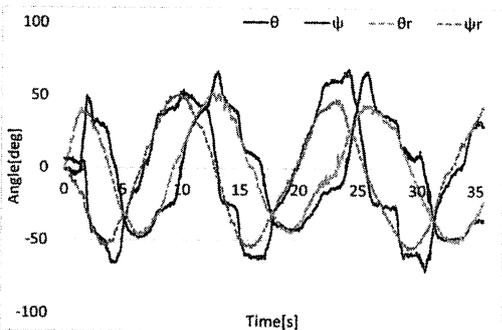


(b)手を置いた場合

図 1 4 X-Y独立動作(マスタースレーブ制御)



(a)手を置かない場合



(b)手を置いた場合

図 1 5 円動作(マスタースレーブ制御)

6. 結言

可搬型上肢リハビリ機器を開発するため、従来の設置型球面アクチュエータを大きくし、さらに、軽量化や対称性を考慮した機器を提案、試作した。

また、2つの保持ステージの角度を計測するために加速度センサを2つ用いた姿勢角制御システムを試作し、シーケンス制御、目標値追従制御、マスタースレーブ制御を行った。その結果、多少振動的ではあるが、目標値に追従できていることを確認した。

参考文献

- 1) T. Noritsugu, M. Takaiwa, and D. Sasaki: Development of Power Assist Wear Using Pneumatic Rubber Artificial Muscles, *Journal of Robotics and Mechatronics*, Vol. 21, No. 5, pp. 607-613 (2009)
- 2) 赤木徹也, 堂田周治郎: ロッドレス型柔軟空気圧シリンダの開発とその応用, *日本機械学会論文集(C編)*, Vol. 73, No. 731, pp. 2108-2114 (2007)
- 3) Changjiang Liu, Shujiro Dohta, Tetsuya Akagi and Ayaka Ando: Development of Flexible Spherical Actuator Using Flexible Pneumatic Cylinder, *Proceedings of 2012 International Conference on Advanced Mechatronic Systems*, pp. 81-86 (2012)
- 4) Christopher J. F.: Using an Accelerometer for Inclination Sensing. *Analog Devices Application Note AN-1027*, pp. 1-8 (2010)
- 5) 趙 菲菲, 堂田周治郎, 赤木徹也: 柔軟湾曲アクチュエータ用小型疑似サーボ弁の試作と解析, *日本機械学会論文集(C編)*, Vol. 76, No. 772, pp. 3665-3671 (2010)

Development and Control of Portable Rehabilitation Device Using Flexible Spherical Actuator

Yasuko Matsui, Tetsuya Akagi* and Shujiro Dohta*

Master's Program in Intelligent Mechanical Engineering, Graduate School of Engineering,

** Department of Intelligent Mechanical Engineering, Faculty of Engineering,*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 30, 2014; accepted November 6, 2014)

This study aims at developing a portable rehabilitation device which can be safe to use during holding it. In our previous study, a novel flexible pneumatic cylinder that can be used even if it is deformed by external force has been developed. In this paper, a portable rehabilitation device using the flexible spherical actuator that consists of two ring-shaped flexible pneumatic cylinders is proposed and tested. The low-cost control system using four small-sized quasi-servo valves and an embedded controller is also developed. The spherical actuator is also improved so as to apply to the portable rehabilitation device. In addition, the attitude measuring system for attitude control of the device using an embedded controller and two accelerometers is constructed and tested. The attitude control of the device using the measuring system is executed. As a result, the portable rehabilitation device that can give the rehabilitation motions to patients with attitude control can be realized.

Keywords: portable rehabilitation device; flexible pneumatic cylinder; flexible spherical actuator; embedded controller; low cost.

バックドライバリティを有する空気圧駆動柔軟ロボットアームの試作

森本 貴文・赤木 徹也*・堂田 周治郎*・ムハマド アリフ**

岡山理科大学大学院工学研究科知能機械工学専攻

* 岡山理科大学工学部知能機械工学科

** 岡山理科大学大学院工学研究科システム科学専攻

(2014年9月30日受付、2014年11月6日受理)

1. 緒言

近年、高齢者や身体障害者などのQOL(生活の質)の向上の観点から医療介護、リハビリテーションの分野での福祉機器の重要性が増している。このようなシステムに使用されるアクチュエータは、高い人間親和性が求められる。また、安全で人体に優しいソフトアクチュエータの開発が求められている¹⁾。著者らは、このような要求を満たすアクチュエータとして、ロッドレス型柔軟空気圧シリンダ²⁾を用いたロボットアームを試作し、手首のリハビリテーションを想定したマスタースレーブ制御を行った³⁾。このマスタースレーブ制御はバイラテラル方式ではないので、スレーブ側に負荷が生じて、マスター側にはその負荷を感じることはできない。

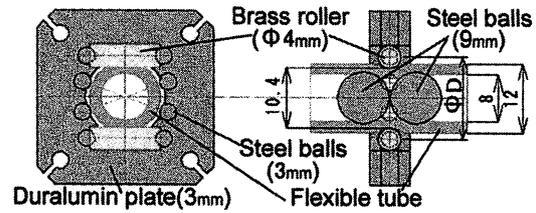
そこで、本研究では、PT(理学療法士)の操作性の改善のためバイラテラル式マスタースレーブ制御の実現をめざし、バックドライバリティを有するロボットアームの開発を行うことを目的とする。

2. 従来の柔軟空気圧シリンダ

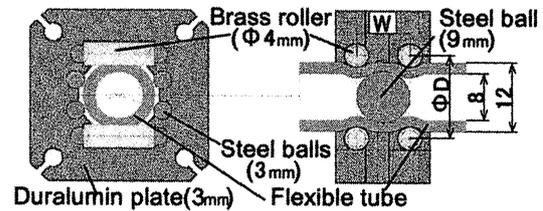
2種類のロッドレス型柔軟空気圧シリンダ²⁾の構造を、図1(a)、(b)に示す。(a)は、ダブルボールタイプ、(b)はシングルボールタイプである。どちらのタイプも似たような構成になっており、動作原理は同じである。

ダブルボールタイプの構造はシリンダ部に相当する柔軟チューブ、シリンダヘッドに相当する2個の鋼球、またチューブを介して2個の鋼球で真鍮製ローラのついたスライドステージで挟んでいる。真鍮製ローラの両端は鋼球で支えられ、ステージにはチューブを保持する役割の鋼球を4個設けている。シングルボールタイプ構造はダブルボールタイプとは異なり、2つのスライドステージで1つのボールを両側から挟んだ構造になっている。

両シリンダの動作原理は以下の通りである。まず、片側の圧力室を加圧すると内部の鋼球が押し、それに伴いチューブを変形させながら鋼球がローラを押し、スライドステージが駆動する。



(a) ダブルボールタイプ



(b) シングルボールタイプ

図1 柔軟空気圧シリンダの構造

両タイプの特徴を以下に示す。シングルボールタイプは摩擦力が少ないという利点を有するが、スライドステージ部分での柔軟性は低い。一方、ダブルボールタイプは高い柔軟性があるが、チューブ内部に鋼球を2つ入れているため摩擦力は大きい。最低駆動圧力は、シングルボールタイプの場合120kPaであり、ダブルボールタイプの場合130kPaである²⁾

3. 柔軟ロボットアーム

以前の研究で開発した柔軟ロボットアーム³⁾の構造を図2に示す。ロボットアームは外径100mmの円形ステージを2つ有している。下側の円形ステージには3本のシングルボールタイプの柔軟空気圧シリンダのスライドステージが円中心から直径66mmで120deg.の位置に取り付けられている。また、上側のステージにはそれぞれ3本のシリンダ端部を締結している。各シリンダへの圧力を変えることで、アーム中心軸を中心に全方向への湾曲が可能である。また、このロボットアームの湾曲角を制御するために上面の上部円形ステージの中

心に加速度センサを取り付けている。またシリンダ変位とロボットアームの姿勢角の関係式³⁾を用いて、ロボットアームの姿勢制御を行った。その際、上部円形ステージに固定された背骨チューブに付けたポテンシオメータにより変位計測を行った。このロボットアームのサイズはφ100×300mmであり、全質量は380g、最大湾曲角は約45degである。

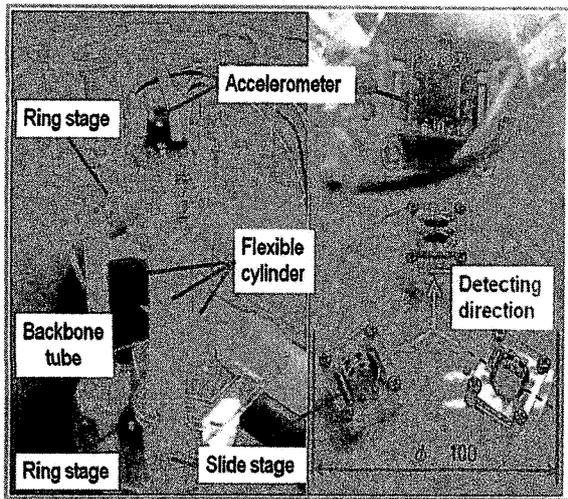


図2 柔軟ロボットアームの構造

以前の研究⁴⁾で上記の柔軟ロボットアームを使用してマスタースレーブ制御システムを開発した。図3にマスタースレーブ制御システムの概略図を示す。スレーブアームは試作ロボットアーム、加速度センサ、組み込みコントローラ(機Renesas Electronics SH/7125)と6つの疑似サーボ弁⁵⁾から構成されている。マスターアームは加速度センサと図3の左の写真に示すような円形ステージを付けた柔軟チューブから構成される。以前の研究ではスレーブアームがマスターアームの動きを比較的よく追従することを確認し、制御システムの有効性および、リハビリテーション装置のためのロボットアームの有用性を確認した⁴⁾。しかしながら、開

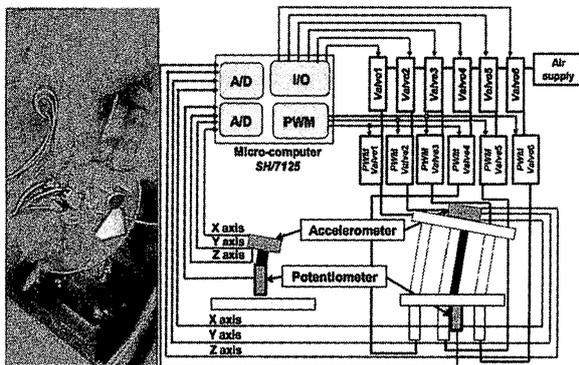


図3 マスタースレーブシステムの外観

発したロボットアームでは患者によって何かしらの負荷がスレーブアームに加えられたとしてもスレーブアームからの力を理学療法士が認識し、さらにマスター側を逆に動かすことができない。そこで、スレーブアームからの反力を認識することができるバックドライバビリティを有するマスターアームの開発が求められる。

4. バックドライバビリティを有する柔軟空気圧シリンダ

バックドライバビリティとは力の双方向伝達能力のことである。カフィードバックを有するマスターアームの開発するためには、前述のロボットアームのように力を発生するアクチュエータである必要がある。また、マスターアームを手動で動作する逆駆動性が必要である。そこで、バックドライバビリティを有する柔軟空気圧シリンダの開発を行った。図4に試作したバックドライバビリティを有する柔軟空気圧シリンダの構造を示す。構造はシリンダ部に相当する2本の柔軟チューブ(長さ250mm、内径8mm、外径12mm)、シリンダヘッドに相当する鋼球(外径9.5mm)がそれぞれの柔軟チューブに1つずつ入っている。このa、b 2つの鋼球でスライドステージ(アクリル樹脂製、縦40mm、横25mm、高さ3mm)を両側から挟むように配置している。そして、鋼球に近い方のスライドステージの面(左側チューブは上、右側チューブは下)にチューブを介して2対の真鍮製ローラ(外径4mm)を取り付けている。真鍮製ローラの両端は鋼球(外径3mm)で支えられ、ステージにはチューブを保持する役割の鋼球(外径3mm)を4個設けている。このシリンダの最低駆動圧力は約240kPaである。

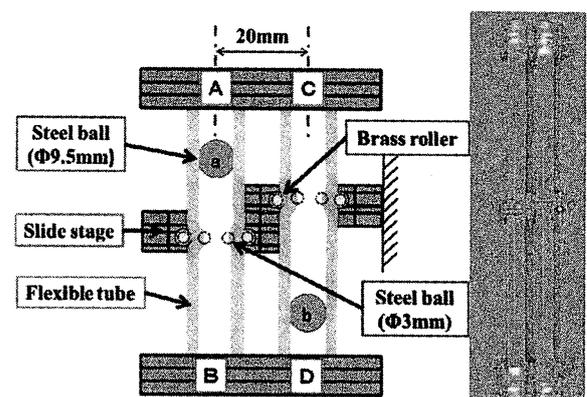


図4 試作シリンダの構造

動作原理は以下の通りである。チューブ端にある4つの給気口の内2つを加圧することで、図5に示す(a)プッシュ、(b)プル、(c)ロック、(d)リセット、(e)フリーの5つの動作を可能とする。(a)プッシュは給気

口A、Cを加圧することで、鋼球aが押しされ、圧力室が膨張しチューブを上方に押し出す。逆に(b)プルは、給気口B、Dを加圧することでチューブを下方に押し出す。(c)ロックは鋼球が近い方の給気口を同時に加圧することで鋼球が押しされステージを挟むというものである。(d)リセットは、鋼球のない側から加圧することで鋼球を押しステージから離れるというものである。(e)フリーは加圧を行わないので、ステージを手で自由に動かすことができる。ロックをする前に行うことで鋼球がスライドステージと干渉することを防ぐ目的もある。

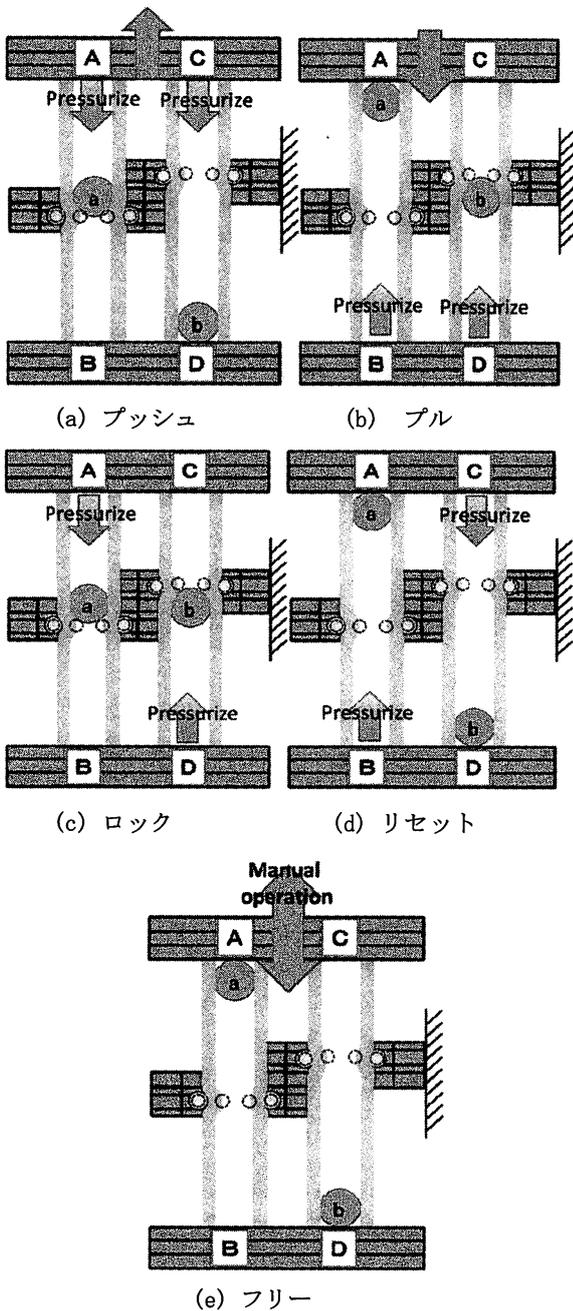


図5 試作シリンダの動作原理

5. バックドライバリティを有するロボットアーム

試作したロボットアームと制御システムの外観を図6に示す。ロボットアームは前述のシリンダを3組用いる。また、外径φ100mmの亚克力製ステージを2つ有しており、下側のステージには中心からφ66mm、120deg.の位置に3組の試作シリンダを取り付けている。上側のステージにはそれぞれ3組のシリンダ端部を接続している。このロボットアームのサイズはφ100×250mm、全質量は450gである。

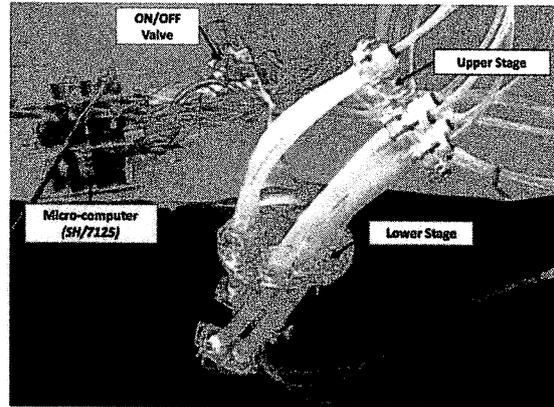


図6 試作柔軟ロボットアームの外観

図7に基本動作のための制御システムの構成を示す。システムは前述のバックドライバリティを有するロボットアーム、12個のON/OFF弁(株KOGANEI G010HE-1)、コントローラであるマイクロコンピュータ(株Renesas Electronics SH/7125)から構成される。

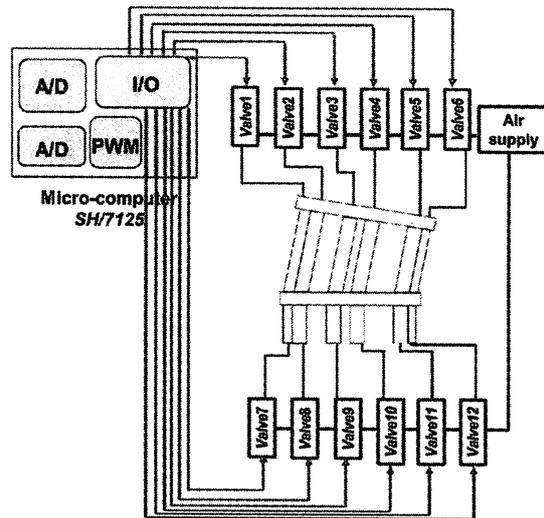
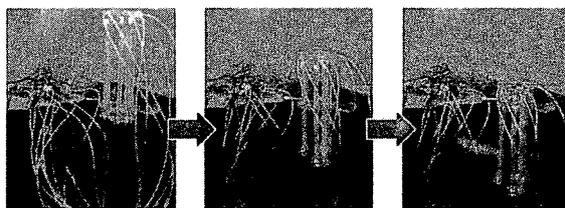


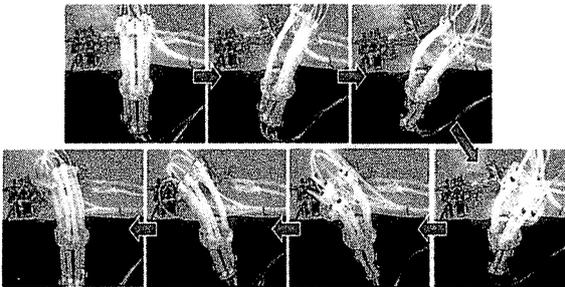
図7 システム構成図

図8に試作したロボットアームの各種動作風景を示

す。図8(a)に示す伸縮動作では、3組のシリンダをプッシュもしくはプルを行うことで伸縮動作を実現する。図8(b)に示す湾曲動作は、湾曲側とは逆側の1本のシリンダにロックを行い、残り2つのシリンダはプルすることで、加圧したシリンダは収縮つまり2つのステージ間距離が短くなり、ロックしたシリンダとは逆方向に湾曲する。またロック側に湾曲させる場合は、2つのシリンダの上側を加圧し、伸長させる。ここで試作ロボットアームの最大湾曲角は約90deg.である。この湾曲角は1つのシリンダの長さや固定位置に依存し、より長い柔軟空気圧シリンダを用いることで湾曲角を大きくすることができる。



(a) 伸縮動作



(b) 湾曲動作

図8 試作ロボットアームの動作風景

図9にロック状態の様子を示す。実験では供給圧力450kPaで、上側ステージに1kgの重りを置いて上昇動作とロック動作を行った。その結果、ロボットアームがスムーズに動作することを確認した。また、ロックは

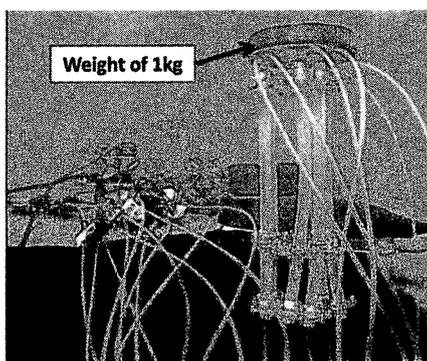


図9 ロックの様子

スライドステージを両側から鋼球で挟むため、大きな摩擦力を生じ、シリンダの発生力によりロック力は強くなり、450kPaの印加圧力で50N以上得られた。

図10にフリーでの動作風景を示す。すべてのシリンダをリセットした後、フリーにすることで手動での動作が可能であることがわかる。しかし、1つのシリンダに柔軟チューブを2本使用している点と従来のロボットアーム³⁾の大きさであるφ100mmのステージに合わせて設計しているため、シリンダ間隔が短くなり、剛性が高くなり湾曲しにくい(最大湾曲角約90deg.)、といった問題を生じている。しかしながら、本研究で試作したロボットアームはバックドライバビリティを有しており、バックドライバビリティの機能を有するマスター装置が実現可能である。

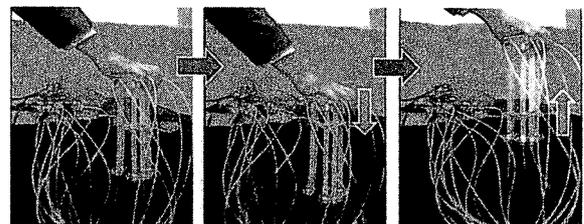


図10 フリーの動作風景

6. 結言

本研究は以下のように要約される。

- (1) バックドライバビリティを有するロッドレス型柔軟空気圧シリンダを提案、試作した。シリンダは、プッシュ、プル、ロック、リセット、フリーの5つの基本動作を有し、それらの動作原理を紹介した。
- (2) 試作シリンダの応用として、3組の試作シリンダを用いたマスター用柔軟ロボットアームを提案、試作した。また、組込みコントローラと12個のON/OFF弁を用いてロボットアームの制御システムを構成し、動作確認を行った。
- (3) 動作実験の結果、ロボットアームは、プッシュやプルの場合でスムーズに動作し、さらにスライドステージを両側から鋼球で挟むロックで50Nの保持力を有していることを確認した。また、フリー状態では手動でロボットアームを動かすことのできるバックドライバビリティ機能を有するマスターアームが実現できた。

参考文献

- 1) Y. Nagata, ed., "Soft-Actuators-Forefront of Development", NTS Ltd., (2004), pp291-335.
- 2) 赤木徹也, 堂田周治郎, "ロッドレス型柔軟空気圧シリンダの開発とその応用", 日本機械学会論文集(C編), Vol. 73, No. 731, (2007), pp. 2108-2114.

- 3) M. Aliff, S. Dohta, T. Akagi and H. Li, "Development of a Simple-structured Pneumatic Robot Arm and Its Control using Low-cost Embedded Controller", *Journal of Procedia Engineering*, Vol.41, (2012), pp.134-142.
- 4) T. Fujikawa, S. Dohta and T. Akagi, "Development and Attitude Control of Flexible Robot Arm with Simple Structure Using Flexible Pneumatic Cylinders", *Proceedings of 4th Asia International Symposium on Mechatronics*, (2010), pp.136-141.
- 5) F. Zhao, S. Dohta and T. Akagi, "Development and Analysis of Small-Size Quasi-Servo Valve for Flexible Bending Actuator", *JSME Trans., Series C*, Vol.76, No.772, (2009), pp.3665-3671.

Development of Pneumatic Drive Flexible Robot Arm with Backdrivability

Takafumi MORIMOTO, Tetsuya AKAGI*, Shujiro DOHTA*
and Mohd ALIFF**

Master's Program in Intelligent Mechanical Engineering, Graduate School of Engineering,

** Department of Intelligent Mechanical Engineering, Faculty of Engineering,*

*** Doctoral Program in System Science, Graduate School of Engineering,*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 30, 2014; accepted November 6, 2014)

In the remote controlled rehabilitation device, physical therapists must recognize the situation of the patient. The actuator in the device is also required to be flexible so as not to injure the body. In our previous study, the flexible pneumatic cylinder was proposed and tested. The flexible robot arm using the cylinders was also developed for human wrist rehabilitation. In the next step, it is necessary to develop the master device for bilateral master-slave control. In this paper, the flexible pneumatic cylinder with backdrivability is proposed and tested for bilateral control. The master robot arm using the tested flexible cylinders is also tested and constructed. As a result, the master robot arm with backdrivability which can be operated manually was realized.

Keywords: flexible pneumatic cylinder; backdrivability; flexible robot arm; rehabilitation device; bilateral control;

細胞状泡沫層の安定性に及ぼす混合アルコール添加の影響

宮原 敏郎・永谷 尚紀・三橋 久実・藤田 佳江*

岡山理科大学 工学部 バイオ・応用化学科
 *岡山理科大学 工学研究科 システム科学専攻
 (2014年7月4日受付、2014年11月6日受理)

1. 緒言

化学反応装置やバイオリアクター等で使用される液は、気液界面に界面活性物質などが吸着していることが多く、安定な泡沫層が形成されやすい。このことは、操作上好ましいものではない。そこで、この発泡を防ぐため消泡剤が使用されている。しかし、生産物から消泡剤を分離することは非常に難しいので物理的な方法で発泡が達成できれば好ましい。そのためには消泡の対象である細胞状泡沫層 (cellular foam) の形成特性を明確にする必要がある。

著者らは、これまでに細胞状泡沫層の安定性について、非イオン性、陰イオン性、陽イオン性、両性界面活性剤水溶液を用いて、多孔板上に細胞状泡沫層を形成し、Hartland and Barber¹⁾、Barber and Hartland²⁾の提案する薄膜化速度式より泡沫層の安定性を示す臨界膜厚さを実験的に検討した。その結果、陰イオン性界面活性剤水溶液からなる細胞状泡沫層が最も安定であることを確認した³⁾。さらに、バイオリアクター等では炭素源として添加されることが多いアルコール (メタノール, エタノール, 1-プロパノール) を陰イオン性界面活性剤水溶液に添加し、細胞状泡沫層の安定性に及ぼす影響を検討した。その結果、添加するアルコール濃度の増加に伴う細胞状泡沫層の安定性の減少、さらに、その影響が界面活性剤のHLB (hydrophile-lipophile-balance) 値が小さいほど大きくなる。さらに、添加するアルコールの炭素鎖の大きいものほど、泡沫層は不安定となることを見出した⁴⁾。

本研究では、アルコール添加による細胞状泡沫層の安定性をさらに明らかにするため、メタノールとエタノールの質量基準の等量混合アルコールを陰イオン性界面活性剤 (sodium lauryl sulfate) 水溶液に添加し、既往の単一アルコール添加の場合と比較検討することを目的とした。

2. 実験装置および方法

2-1 実験装置

使用した装置の概略をFigure 1に示す。装置は前報^{3, 4)}と同じであるが簡単に再説する。気泡塔本体は内径10 cm, 高さ2 mの透明アクリル樹脂製で、恒温槽からウォータージャケットへ液を流すことで塔内部の温度調節を可能とした。空気は圧縮機から供給され、空気ろ過機を通り、圧力調整器により圧力が調整される。ついで飽和器に入り、湿度と温度を調整された空気は、流量計で流量を計測された後塔下部に入り、多孔板を介して液中に分散され、液層上部に細胞状泡沫層を形成する。ここで使用した多孔板は孔数84, 孔径0.5 mm, ピッチ1 cm, 厚さ1 mmのステンレス製のものである。また、泡沫層頂部での蒸発および外乱を極力防ぐため、塔頂にはパイプのついた蓋を取り付けた。

本研究では、Table 1に示す陰イオン性界面活性剤sodium lauryl sulfate (SLS) の水溶液に、メタノール (MeOH) とエタノール (EtOH) の等量混合アルコールを添加した。表中のHLB値とは界面活性剤の親水基と疎水基の

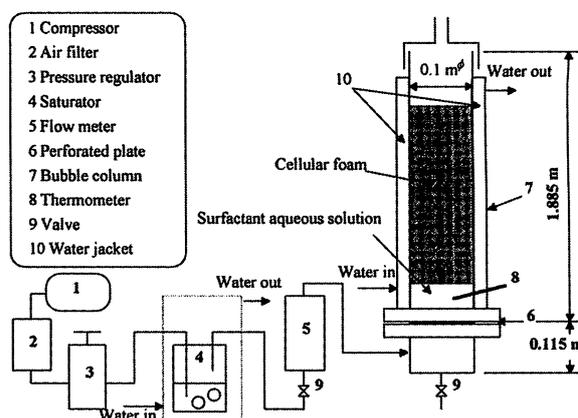


Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus

バランスを表すものであり、値が大きくなるにつれ親水性が強くなる。本研究ではHLB値をDavies法⁵⁾により算出した。表中のCMC (critical micelle concentration) は、Wilhelmy法により各界面活性剤水溶液の表面張力 (自動表面張力計CAVP-A3型, 協和界面科学(株)) を測定し、その変曲点より求めた。

2-2 実験方法

塔内部の温度が一定になったところで、所定の温度になった溶液1000 mlを塔頂より壁面を濡らすようにしながら多孔板上に供給する。泡沫層成長時では、ガスを通気しながら、泡沫層高を一定時間ごとに目視により測定した。一方崩壊時では、任意のガス流量で液層上部に160 cm程度の高さを持つ細胞状泡沫層を形成させた後、ガスの供給を停止し、成長時と同様に泡沫層高を目視により測定した。

前報^{3,4)}同様、本研究で使用した界面活性剤濃度はCMCの10倍濃度とした。本実験では、空塔ガス速度 $U_{gc} = 2.12 \times 10^{-4} - 2.13 \times 10^{-3}$ m/s, 液温度 $T = 303 - 318$ K, 添加する混合アルコールの濃度 $C_{MeOH+EtOH} 0.025 - 0.1$ wt% の範囲で行った。また、後述する細胞状泡沫層内の体積平均気泡径 d_b および細胞状泡沫層の安定性を左右する臨界膜厚さ δ_c を求めるに必要な液物性、密度 ρ (振動式デジタル密度計 DMA4500, 日本シイベルヘグナー株式会社), 粘度 μ (回転粘度計 PHYSICA MCR300, Paar Physica), 表面張力 σ を測定した。その詳細をTable 2に示す。各液物性は、液温度の増加によりやや減少しており、特に粘度に関しては、その影響が大きい。しかし、アルコールの添加による影響はさほどみられない。

Table 1 Characteristics of surfactant employed

Surfactant	Molecular formula	Molecular mass [kg / mol]	CMC [mol / m ³]	HLB [-]
Sodium lauryl sulfate (SLS)	C ₁₂ H ₂₅ OSO ₃ Na	0.288	8.00	40.0

Table 2 Physical properties of sodium lauryl sulfate aqueous solution

$C_{MeOH+EtOH}$ [wt%]	Temperature [K]	Density [kg/m ³]	Viscosity [Pa · s]	Surface tension [mN/m]
0.0	303	998.3	0.000965	35.5
	308	996.7	0.000858	33.8
	313	994.8	0.000733	33.2
	318	992.8	0.000676	31.2
0.025	303	998.8	0.00103	36.5
	308	997.1	0.000909	36.2
	313	994.9	0.000833	36.2
	318	993.1	0.000737	35.3
0.05	303	998.7	0.00109	36.3
	308	997.1	0.000973	36.1
	313	995.1	0.000870	36.1
	318	995.1	0.000794	35.8
0.075	303	998.6	0.00102	36.3
	308	996.8	0.000899	35.9
	313	996.1	0.000819	35.7
	318	993.1	0.000743	35.7
0.1	303	998.6	0.00101	35.9
	308	997.0	0.000932	34.1
	313	995.1	0.000860	33.4
	318	993.0	0.000782	33.3

体積平均気泡径を実測するのは非常に困難であるため、前報^{3,4)}と同様、Miyahara *et al.*⁶⁾により提案された多孔板で形成される気泡群の体積平均気泡径に対する相関式を用いた。得られた体積平均気泡径は液温度やアルコールの添加濃度および空塔ガス速度にほとんど影響されず、3–4 mm程度であった。

3. 実験結果および考察

3-1 成長時の泡沫層高

Figure 2に、細胞状泡沫層の成長時の泡沫層高の経時変化を、アルコールの添加濃度をパラメータとして示す。図より、泡沫層はアルコールの添加濃度の増加にともない不安定になり、最大泡沫層高は減少している。ここには示していないが、液温度の増加にともない泡沫層は不安定になり、同じ空塔ガス速度で低い泡沫層高を示す傾向が観察された。これは、前報^{3,4)}と同様、液温度の上昇にともなう液粘度の減少のためと考えられる。

3-2 崩壊時の泡沫層高

Figure 3に、細胞状泡沫層の崩壊時の泡沫層高の経時変化を、アルコールの添加濃度をパラメータとして示す。図より、泡沫層は、アルコールの添加濃度の増加にともない不安定になり、泡沫層の崩壊時間は短くなる。ここには示していないが、液温度の増加にともない泡沫層は不安定になり、同じ空塔ガス速度で泡沫層の崩壊時間が短くなる傾向が観察された。これは、前報^{3,4)}と同様、液温度の上昇にともなう液粘度の減少のためと考えられる。

3-3 臨界膜厚さ

前報^{3,4)}と同様に、細胞状泡沫層の安定性を左右する臨界膜厚さを検討するため、Hartland and Barber¹⁾およびBarber and Hartland²⁾により提案された細胞状泡沫層内の気液間液膜の排水に対するモデルを適用した。

Hartland and Barber¹⁾およびBarber and Hartland²⁾は、細胞状泡沫層内の気泡は、一面が正五角形の正十二面体気泡が充填したものであり、Figure 4に示すように細胞状泡沫層内のFilmの交点により形成されるPlateau borderを考え、気液間の排水は、相当半径 R の二つの平らな円板に挟まれた液の対称排水であり、排水された液はPlateau borderに入り下降流となるとし、薄膜化速度式を以下に示すReynoldsの式で与えている。

$$-\frac{d\delta}{dt} = \frac{8F\delta^3}{3n^2\pi\mu R^4} \quad (1)$$

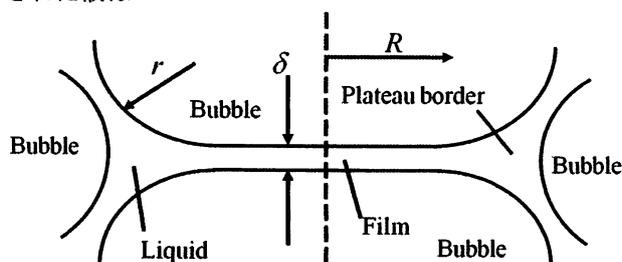


Fig. 4 Cross section through film and Plateau borders

ここで δ は時間 t での膜厚さであり、これが排水作用により薄くなり、ある臨界膜厚さ δ_c になったところで崩壊する。 F は膜に作用する力であり、膜の単位面積あたりに作用する力をManev *et al.*⁷⁾は、イオン性界面活性剤の場合にはcapillary pressure ΔP_c とdisjoining pressure Π の差であるとしている。しかし著者らは、前報^{3,4)}で、 ΔP_c は Π の十数倍となることを確認し、 Π の影響を無視できるものとして検討した。そこで本研究においても、 Π の影響を無視できるものとした。また n は剛体面の数であり、Figure 4に示すFilm両面の気液界面の数に相当する。Hartland and Barber¹⁾およびBarber and Hartland²⁾は界面活性剤濃度がCMC以上であれば、気液界

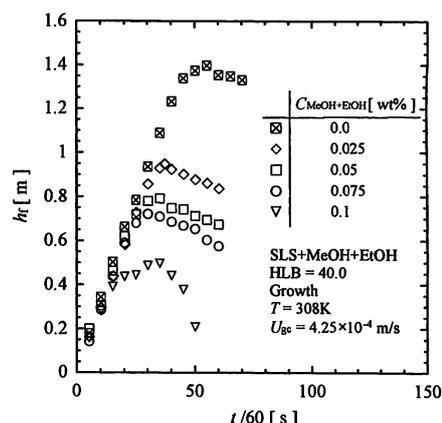


Fig. 2 Cellular foam height as a function of time under the growth

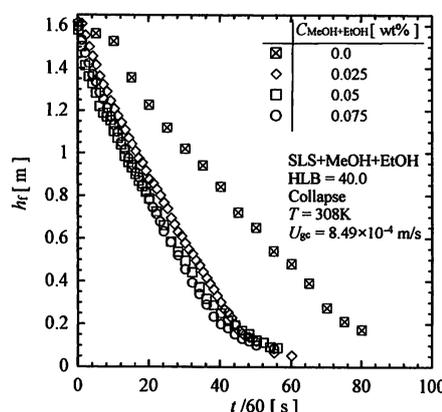


Fig. 3 Cellular foam height as a function of time under the collapse

面を剛体とみなせるとし、Eq. (1)で $n = 2$ として、以下に示す成長時および崩壊時における臨界膜厚さを求める式を報告している。

$$\delta_c = \frac{0.71(U_{gc}\mu)^{3/7}d_b^{3/7}}{(\rho g)^{1/2}(\sigma h_c)^{1/7}} \quad (2)$$

$$\delta_c = \frac{0.65d_b^{3/7}h_0^{1/2}\mu^{3/7}}{(\rho g)^{1/2}\sigma^{3/7}t^{3/7}} \left[\left(\frac{h_f}{h_0} \right)^{-1/7} - \frac{h_f}{h_0} \right]^{3/7} \quad (3)$$

本研究で使用した界面活性剤濃度は前述したようにCMCの10倍であり、気液界面を充分剛体とみなせることから、Eq. (2)およびEq. (3)を用いて、細胞状泡沫層の崩壊する際の膜厚さである臨界膜厚さを求め、細胞状泡沫層の安定性に対する検討を行った。

成長時の臨界膜厚さは、泡沫層高の最大値を泡沫層が崩壊する条件と考え、Eq. (2)中の h_c に代入して求めた。一方崩壊時では、おのおのの時間 t で得られた泡沫層高 h_f をEq. (3)中の h_f に代入し、おのおのの時間に対して得られた δ_c の算術平均値を臨界膜厚さとした。

本実験で得られた臨界膜厚さ δ_c は、条件が同じ場合には、成長時と崩壊時で大きな差は認められなかったため、 δ_c を同じ座標で取り扱うこととした。

Figure 5は臨界膜厚さ δ_c を混合アルコールの添加濃度をパラメータとして空塔ガス速度 U_{gc} に対して示したものである。図より、臨界膜厚さは、アルコール添加濃度の増加とともに増加している。これは、部分的に負に帯電した酸素とカチオンとの静電的相互作用や、部分的に正に帯電した水素とアニオンとの静電的相互作用により、プロトン性溶媒がイオン性化合物を溶解するからであると考えられる。この場合のプロトン性溶媒とはアルコール、イオン性化合物とは陰イオン性界面活性剤にあたる。

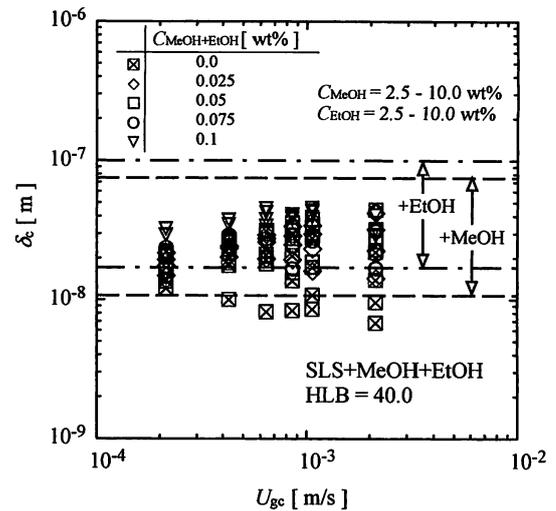


Fig. 5 Critical film thickness

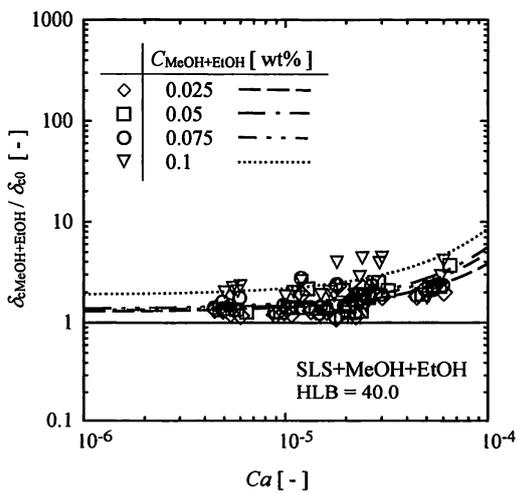


Fig. 6 Critical film thickness as a function of Ca

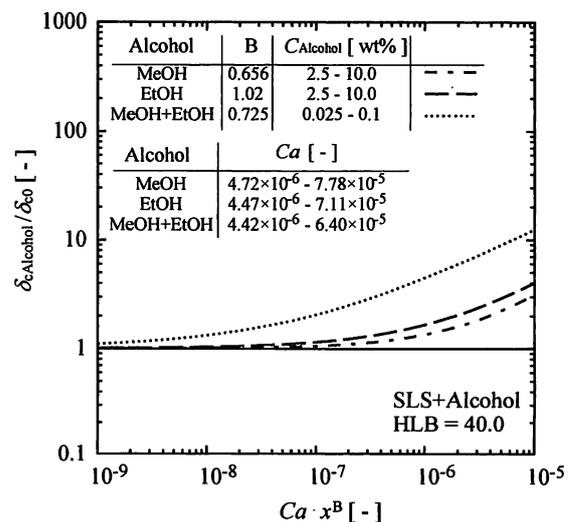


Fig. 7 Comparison of critical film thickness with previous results

このことから、アルコールが細胞状泡沫層を不安定にし、崩壊しやすくすると考えられる⁸⁾。なお図中にメタノールとエタノールを単独で添加した場合の結果を示す。メタノールとエタノール混合液の場合その濃度がwt%で1/100程度で単独の場合と同程度の臨界膜厚さを示していることは注目に値する。混合液にした場合なぜ効果が大きいかは現段階では不明である。

3-4 臨界膜厚さの相関

混合アルコールを添加した場合と添加していない場合の臨界膜厚さの比 ($\delta_{c, \text{MeOH+EtOH}}/\delta_{c0}$) を求め、キャピラリー数 Ca に対して点綴したものが **Figure 6** である。図より比の値が1より大きくなり、泡沫層は不安定となることがうかがわれる。 Ca の増加により比の値は右上がりの曲線を描き増加している。また混合アルコールの濃度の増加によりその影響は大きい。混合アルコールの濃度を質量分率として考慮すると次の相関式を得る。

$$\frac{\delta_{c, \text{MeOH+EtOH}}}{\delta_{c0}} = 1 + 4.4 \times 10^3 (Ca \cdot x^{0.725})^{0.517} \quad (4)$$

3-5 既往の結果との比較

本研究で得られた結果と既往の単独でMeOHとEtOHを添加した場合の結果⁴⁾との比較を **Figure 7** に示す。図より、アルコール添加の影響が始めている横軸の値はMeOH-EtOH等量混合液では 10^9 付近であり、MeOH, EtOHを単独で添加した場合は 10^7 付近であることが認められる。ここで横軸中のキャピラリー数 Ca の範囲はMeOH, EtOHとMeOHとEtOH等量混合液では同じ程度である。従ってこの差はアルコールの質量分率 x であると推察される。以上の結果からMeOHとEtOH等量混合液を添加した場合、単独で添加した場合の1/100程度の濃度で同程度の影響が見られる。

4. 結言

陰イオン性界面活性剤(SLS)水溶液にMeOHとEtOHの等量混合アルコールを添加し、細胞状泡沫層の成長および崩壊過程における泡沫層高を測定し、以下の結果を得た。

1. 泡沫層成長時の泡沫層は、温度、および等量混合アルコール添加濃度の増加により不安定となる。また、崩壊時における泡沫層高の崩壊時間は、温度および混合アルコール添加濃度の増加により短くなり、不安定となる。
2. 臨界膜厚さ δ_c は、混合アルコール添加濃度が増加するにつれて増加する。
3. 混合アルコールを添加した場合の臨界膜厚さを求める相関式を得た。
4. 等量混合アルコールを添加した場合、MeOHとEtOHを単独で添加した場合の1/100程度の濃度で同程度の効果が見られた。

Notation

Ca	= Capillary number = $\mu U_{gc}/\sigma$	[-]
C_{Alcohol}	= alcohol concentration	[wt%]
d_b	= bubble diameter	[m]
F	= force acting on liquid film	[N]
g	= gravitational acceleration	[m/s ²]
HLB	= hydrophile-lipophile-balance	[-]
h_f	= cellular foam height	[m]
h_{fc}	= cellular foam height at the rupture of lamella	[m]
h_0	= initial cellular foam height	[m]
n	= number of solid surface	[-]
R	= radius of circular film having the same area as face of dodecahedron	[m]
r	= radius curvatur of walls of Plateau border	[m]

T	= temperature	[K]
t	= time	[s]
U_{gc}	= superficial gas velocity	[m/s]
x	= mass fraction of alcohol	[-]
ΔP_c	= capillary pressure	[Pa]
δ	= film thickness	[m]
δ_c	= critical film thickness	[m]
δ_{c0}	= critical film thickness in the absence of alcohol	[m]
$\delta_{cAlcohol}$	= critical film thickness in the presence of alcohol	[m]
μ	= viscosity	[Pa·s]
Π	= disjoining pressure	[Pa]
ρ	= density	[kg/m ³]
σ	= surface tension	[N/m]

(Subscripts)

Alcohol = MeOH, EtOH, MeOH+EtOH

Literature cited

- 1) Hartland, S. and A.D. Barber; "A Model for a Cellular Foam," *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **52**, 43–52 (1974)
- 2) Barber, A. D. and S. Hartland; "The Collapse of Cellular Foams," *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **53**, 106–111 (1975)
- 3) Fujita, K.; "Stability of Cellular Foam," Doctoral Dissertation, Okayama University of Science (2007)
- 4) Fujita, K., S. Fujiwara, N. Nagatani and T. Miyahara; "Influence of Addition of Alcohol on Stability of Cellular Foam," *The Bulletin of Okayama University of Science*, No. 48A, 49–58 (2012)
- 5) Tsuji, S.; *Nyuka Kayoka no Gijutsu*, 10–12, Kogaku Tosho, Tokyo, Japan (1996)
- 6) Miyahara, T., Y. Matsuba, and T. Takahashi; "Size of Bubbles Generated from Perforated Plates," *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **8**, 13–17 (1982)
- 7) Manev, E. D., S. V. Sazdanova and D. T. Wassan; "Emulsion and Foam Stability –The Effect of Film Size on Film Drainage–," *Journal of Colloid and Interface Science*, **97**, 591–594 (1984)
- 8) Ikeda, M. and T. Okuyama; *Introduction to Organic Chemistry*, 261–262, Hirokawa Publishing Co., Tokyo, Japan (1999)

Effect of Addition of Mixed Alcohol on Stability of Cellular Foam

Toshiro MIYAHARA, Naoki NAGATANI, Kumi MIHASHI and Kae FUJITA*

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,

**Department of System Science, Graduate School of Engineering,*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received July 4, 2014; accepted November 6, 2014)

Previously, the stability of cellular foam generated from nonionic, anionic, cationic and amphoteric surfactant aqueous solutions was studied for the purpose of foam breakage in chemical reactors and bioreactors^{3, 4}). It was found that the cellular foam formed from anionic surfactant aqueous solution was the most stable one.

In the present study, the growth and collapse process of cellular foam formed on a perforated plate in a standard bubble column was observed using sodium lauryl sulfate (anionic surfactant) aqueous solutions under the addition of mixed alcohol (methanol+ethanol). As a result, the addition of mixed alcohol decreased the stability of cellular foam. Of particular note is that the effect was observed under the concentration of around 1/100 (0.025 – 0.1 wt%) compared with each alcohol.

Keywords: cellular foam; foam stability; anionic surfactant; critical film thickness; foam breakage; mixed alcohol.

紀要委員会委員

職名	氏名	分野
委員長	西戸 裕嗣	地学分野
副委員長	池田 正五	生物化学分野
	小松 雅治	情報工学分野
	坂部 望	社会科学分野
委員	山本 英二	図書館長
	竹中 茂夫	数学分野
	赤司 治夫	化学分野
	中川 幸子	物理分野
	中島 経夫	生物学分野
	永谷 尚紀	工業化学分野
	松下 尚史	機械工学分野
	クルモフ バレリー	電子工学分野
	宮地 功	情報科学分野
	中西 俊二	医用工学分野
	李 明	建築分野
	三木 恒治	文学分野
	中島 聰	人文科学分野
事務局	図書館 事務課	

岡山理科大学紀要 第50号 A (自然科学) 2014

平成26年11月6日編集

平成26年12月22日印刷

平成26年12月26日発行

波田 善夫
 発行者 岡山理科大学紀要委員会
 (代表者 西戸 裕嗣)

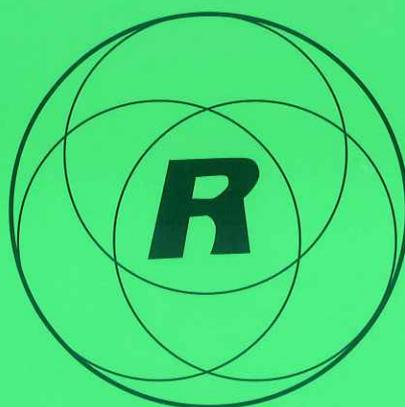
岡山理科大学
 発行所 〒700-0005 岡山市北区理大町1-1
 電話 086-252-3161(代)

西尾総合印刷株式会社
 印刷所 〒701-1152 岡山市北区津高651
 電話 086-254-1111(代)

©岡山理科大学 2014

THE BULLETIN
OF
OKAYAMA UNIVERSITY OF SCIENCE

No. 50 A
NATURAL SCIENCES



2014

OKAYAMA UNIVERSITY OF SCIENCE
OKAYAMA, JAPAN