

研究題目	BMI 技術を用いたヒトの運動機能拡張に関する研究
機関名	富山県立大学
研究代表者	工学部 知能ロボット工学科・講師・森重健一
分野	神経科学 生体情報工学
キーワード	脳波 アーチファクト 階層ベイズ推定 ロボット

1. 研究の背景と目的

脳波は脳の神経活動に伴って頭皮表面で生じる電位変化であり、運動や判断に関する様々な情報が含まれている。しかし、脳波データに含まれる神経活動を反映した信号は極めて小さく、眼球運動や心拍、筋電信号といった様々なノイズに歪められているため、脳情報の解読は困難を伴う。研究代表者は、脳波・脳磁図データを脳電流と複数ノイズ源の電流に一度に変換する方法を見だし、ノイズに乱されたデータであっても、それらを分離し脳電流のみを抽出する方法を開発した [1-3]。さらに、抽出した様々な脳領域での脳電流の中から、実験タスクに真に重要な脳電流だけに絞り込み、未知の計測データに対しても高い推定精度で時系列信号を解読することができた [4]。本研究では、研究代表者が見出してきたブレイン・マシン・インタフェース技術にロボットアームを組み合わせることで、人間の機能を拡張し、「第3の手」として利用可能なシステムの基盤技術を開発することを目的とする。さらに、ロボットアームという道具が人間の拡張機能としてどのように身体化され、それに伴って脳内表現がどう変化していくのか、明らかにするための一助とする。

2. 研究方法および成果

到達運動課題遂行中の筋電位や眼球運動が脳波に与える影響

健康者を対象に、実験参加者が肘の単関節到達運動を遂行しているときの脳波と筋電位、手先の運動軌道の計測を行い、自分自身が発するノイズが脳波へ及ぼす影響を調べた。実験参加者は背もたれとベルトのある椅子に座り、上肢はベルトで固定された。プラスチック製の回転台の上に、右腕を支持するための木製の板を固定した。手首は板を使ってベルトで固定し、腕を載せる作業台は肩の高さに合わせ、水平面上で肘の単関節運動を行なった。磁気レシーバを取り付けた手先および肘関節の位置は、三次元位置計測装置 Fastrak (Polhemus, Colchester, VT, USA) を用いて 60 Hz で計測された。課題遂行中、脳波およびアーチファクト源となる筋、および平面運動に主要な役割を果たす筋（肘単関節筋：腕橈骨筋（屈筋）、上腕三頭筋外側頭（伸筋）；二関節筋：上腕二頭筋（屈筋）、上腕三頭筋長頭（伸筋））の表面筋電位を記録した。計測には 64 チャンネル脳波計測システム ActiveTwo System (BioSemi, Amsterdam, Netherlands) を用い、サンプリング周波数 2048 Hz で記録した。脳波電極は拡張 10-20 法に基づき配置した。

実験タスクとして肘の単関節の到達運動を行った。実験参加者の正面を 0° とし、実験参加者は合図と同時に手先の位置を 0° から時計回りに 45° へ素早く移動させるように指示された。この動作を 1 試行とし、被験者は 100 試行遂行した。

計測した上肢の軌跡、脳波の電位マップ、筋電位の時系列波形を図 1 に示す。図 1 は、典型的な例として動作開始から 400 ms 後における手先位置との頭皮上のセンサの値と筋電位の大きさを表している。上肢を動かしているときの筋電位やそれに伴って生じる眼球運動が、頭皮上に配置したセンサ全体に（特に頭部周辺センサに）、大きく影響を及ぼしていることを明らかにした。

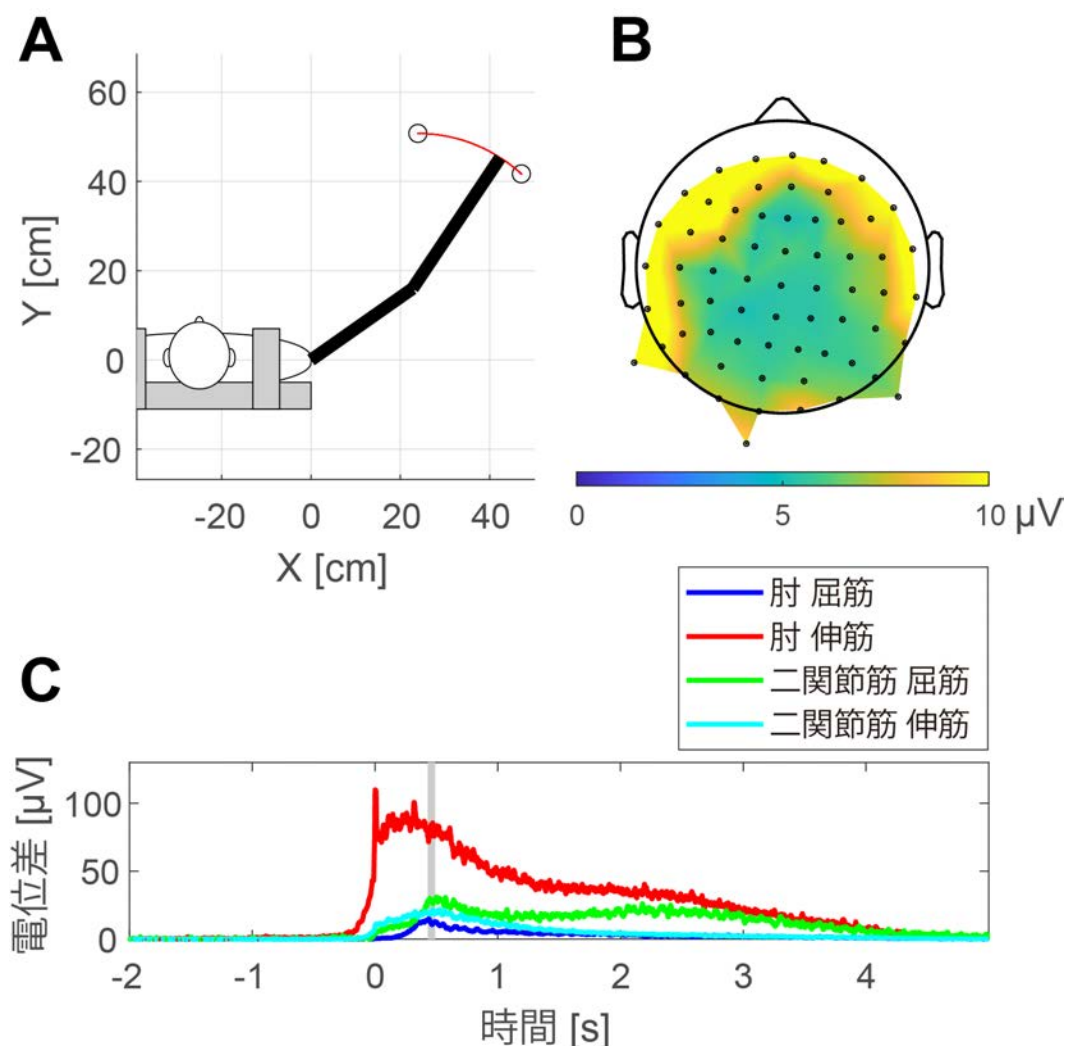


図 1 : 頭皮上のセンサと筋電位の大きさと手先位置 (A) 計測した上肢の軌跡 (赤色の実線), (B) 脳波データ電位差について試行間の標準偏差を表したマップ。頭部を上から見た図であり, 図の上側は鼻の方向を表す。(C) 筋電位の試行平均値の時間波形。肘の屈筋, 伸筋, 二関節筋の屈筋, 伸筋をそれぞれ青色, 赤色, 緑色, シアンで表す。

大脳皮質表面と複数のアーチファクト源の同時電流推定

脳波データからノイズの影響を取り除く方法として、主成分分析や独立成分分析といった統計的手法を用いることが従来から提案されている。しかし、ノイズと脳活動の時間波形の間に相関がある場合、その成分まで取り除いてしまうため、大きな問題であった。特にヒト腕の到達運動中の脳波の場合、その運動制御に関する神経活動は筋電位や眼球運動と相関がある場合が多く、既存の手法では両者を分離することが困難だった。そのようなノイズに歪んだ脳波からその影響を分離して脳活動のみを抽出するために、本研究課題では脳波逆問題を解くことで、計測した脳波データを大脳皮質表面と複数のノイズ限の電流に一度に変換しているため、歪みの少ない脳活動を抽出できる（拡張ダイポール法）。その際に、実験参加者のMRI構造画像から作成した頭部3次元モデルと到達運動のメタ解析fMRIデータを階層ベイズ推定の事前分布として用い、到達運動遂行中の脳波から大脳皮質表面とノイズ源に配置したダイポール位置での電流を推定した。メタ解析fMRIデータとして、Neurosynth (<https://neurosynth.org/>) [5] のデータベースに公開されている腕の到達運動のデータを用いた。

実験参加者は右手で到達運動実験を行っていたため、主に対側の一次運動野と補足運動野付近で大きな電流が推定され、その値の大きさや特徴は妥当だった（図2）。

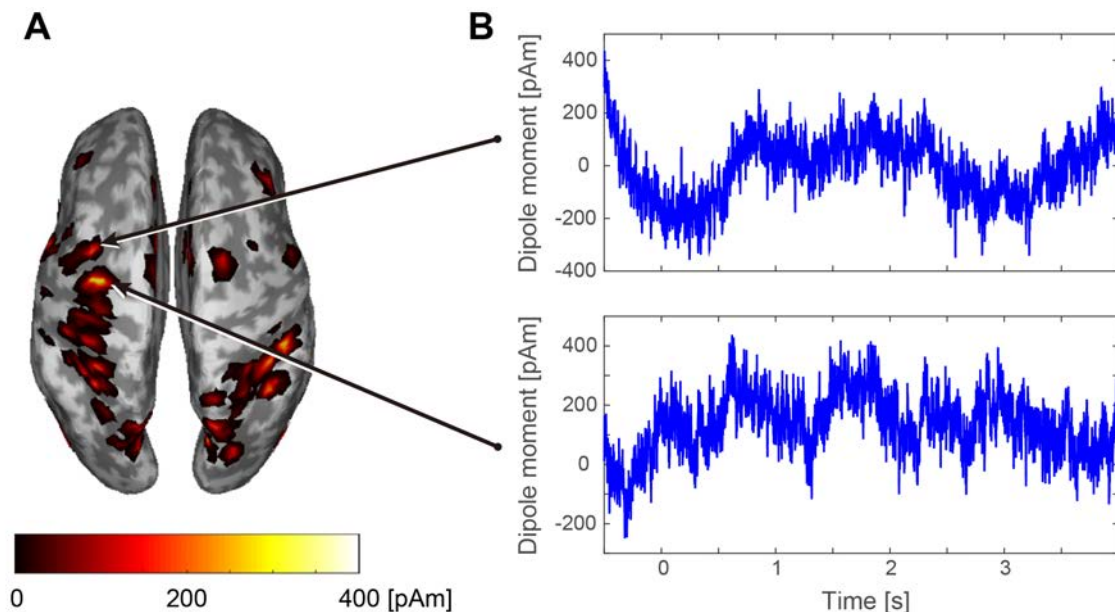


図2：推定電流の信号強度。(A) 電流強度を大脳皮質表面上にプロットした図。(B) 推定電流の時系列波形の例。

脳波を用いたロボットアーム制御システムの構築

実験参加者が椅子に座り、右腕・左腕を実際に動かす運動課題を行った。これに加えて、実際には動かさず、イメージのみを行う運動想起課題も行い、これらの課題を遂行しているときの脳

波を計測した。脳波データから周波数特徴を脳活動のパターンとして見分けることで実験参加者の運動意図を推定することを行ない、良好な結果が得られた。

さらに、脳波データからロボットアームをリアルタイムで制御するためのシステムを構築した(図3)。ロボットアームには Elephant Robotics 社 myCobot320 を使用した。これは 6 軸の回転自由度をもつ卓上ロボットアームである。またエンドエフェクタには、身体化の向上を期待し、シリコン製のヒトの手模型を用いた。myCobot は PC2 と有線接続しシリアル通信を通じて制御された。脳波の計測には、64 チャンネル脳波計測システム ActiveTwo System (BioSemi, Amsterdam, Netherlands) を用い、サンプリング周波数 2048 Hz で記録した。脳波電極は拡張 10-20 法に基づき配置した。

計測された脳波データは PC に取り込み、3 秒分のデータをバッファリングしたのち、TCP サーバとしてネットワーク的に利用することで、クライアントからの要求に応じて保持しているデータを送信する。バッファリングの際、脳波データは 2048 Hz から 512 Hz にダウンサンプリングされた。脳波データの前処理の後、Common Spatial Pattern (CSP) による特徴量抽出と Linear Discriminant Analysis (LDA) による 2 クラス分類を行った [6]。特徴抽出及び 2 クラス分類に必要なパラメータはオフラインで取得したデータをもとに学習し、そこで得られたパラメータを利用することでオンラインでのロボットアーム制御を行った。

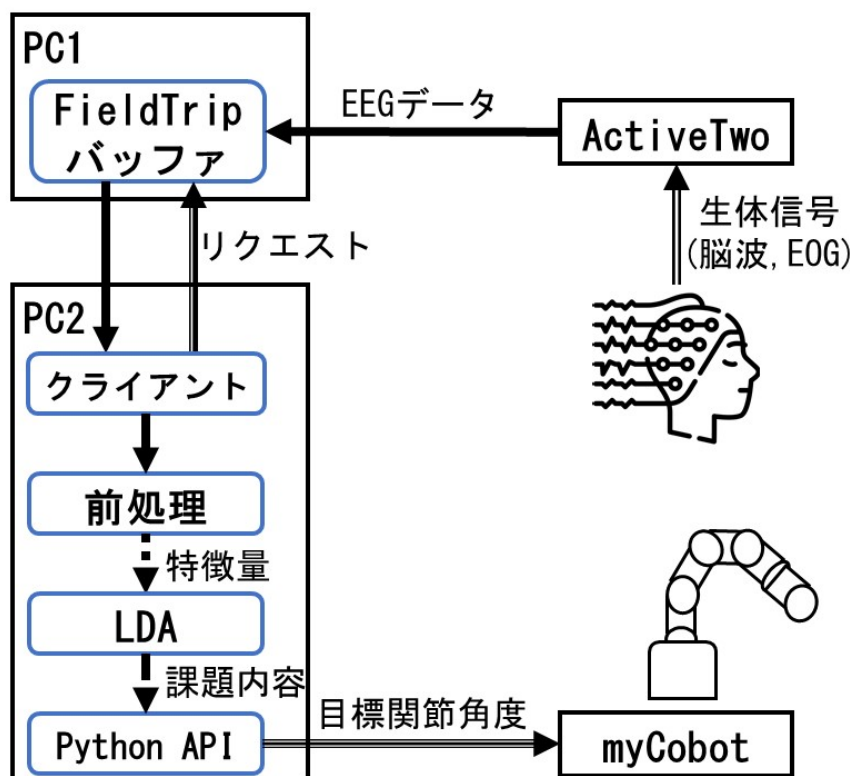


図3：脳波を用いたロボットアーム制御システムの概要

人間の機能を拡張し、「第3の手」が必要な協働課題として、木の板を片方の手とロボットアームを使って壁に押し付け、もう片方の手で壁に固定する作業を想定した。この協働課題では、実験参加者が部材の端を壁に押し付けたとき、腕を動かすことをイメージすることでロボットアームを動かし、部材のもう一方の端を壁に押さえ付ける必要がある。実験の結果、実験参加者の運動意図に応じてロボットアームを動かし、「第3の手」としてロボットアームを制御することが、ある程度実現できた。識別率については、特徴抽出や識別方法を含めて、さらなる改良が必要である。

4. 今後の展望


本研究では、肘単関節の到達運動遂行中の脳波を計測し、上肢を動かしているときの筋電位やそれに伴って生じる眼球運動が、頭皮上に配置したセンサ全体に及ぼす影響について明らかにした。さらに、脳波データを脳電流と複数ノイズ源の電流に一度に変換する方法を用いることで、ノイズに乱されたデータであっても、それらを分離し脳電流を推定することができた。

また、右腕・左腕を実際に動かす運動課題に加えて、実際には動かさず、イメージのみを行う運動想起課題も行い、これらの課題を遂行しているときの脳波を計測した。脳波データから周波数特徴を脳活動のパターンとして見分けることで実験参加者の運動意図を推定することを行ない、良好な結果が得られた。その特徴抽出および2クラス分類に必要なパラメータを利用することで、「第3の手」としてロボットアームの制御を試み、脳波でリアルタイムに制御可能なシステムを構築できた。

今後は、推定した脳電流から手先位置・速度・加速度、屈筋と伸筋の筋電位の時系列信号を再構成するとともに、それに置き換えてロボットアームを制御する予定である。そのことで、よりアーチファクトに対して頑健であり、かつ精度良くユーザの運動意図を推定できるシステムへの改良が期待できる。ブレイン・マシン・インタフェース技術とロボットアームを組み合わせることで、ロボットアームという道具がヒトの拡張機能として使い続けることで、その道具があたかも身体の一部のように扱われる状況を構築できることになる。そのことが脳活動に対してどのような変容を及ぼすのかについて、識別に必要な特徴量の変化や分類器の汎化性能、さらには機能的結合について継続的に解析及び評価することで、明らかにしていく予定である。

5. 参考文献

1. Sato, Masa-aki, Taku Yoshioka, Shigeki Kajihara, Keisuke Toyama, Naokazu Goda, Kenji Doya, and Mitsuo Kawato. 2004. "Hierarchical Bayesian Estimation for MEG Inverse Problem." *NeuroImage* 23 (3): 806–26.
2. Yoshioka, Taku, Keisuke Toyama, Mitsuo Kawato, Okito Yamashita, Shigeaki Nishina, Noriko Yamagishi, and Masa Aki Sato. 2008. "Evaluation of Hierarchical Bayesian Method through Retinotopic Brain Activities Reconstruction from fMRI and MEG

- 
- Signals.” *NeuroImage* 42 (4): 1397–1413.
3. Morishige, Ken-ichi, Taku Yoshioka, Dai Kawawaki, Nobuo Hiroe, Masa-aki Sato, and Mitsuo Kawato. 2014. “Estimation of Hyper-Parameters for a Hierarchical Model of Combined Cortical and Extra-Brain Current Sources in the MEG Inverse Problem.” *NeuroImage* 101: 320–36.
 4. Morishige, Ken-ichi, Nobuo Hiroe, Masa-aki Sato, and Mitsuo Kawato. 2021. “Common Cortical Areas Have Different Neural Mechanisms for Covert and Overt Visual Pursuits.” *Scientific Reports* 11 (1): 13933.
 5. Yarkoni, Tal, Russell A. Poldrack, Thomas E. Nichols, David C. Van Essen, and Tor D. Wager. 2011. “Large-Scale Automated Synthesis of Human Functional Neuroimaging Data.” *Nature Methods* 8 (8): 665–70.
 6. Koles, Zoltan J., 1991. “The quantitative extraction and topographic mapping of the abnormal components in the clinical EEG.” *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, Volume 79, Issue 6.

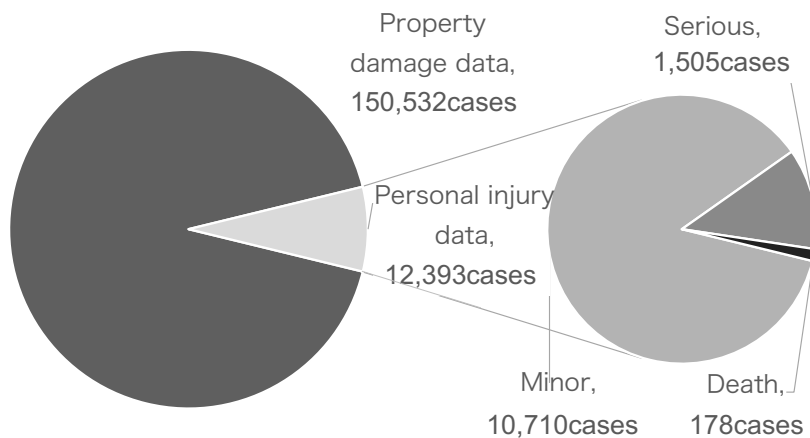
研究題目	形式概念分析と機械学習の融合による交通事故の解明・予測
機関名	富山県立大学
研究代表者	工学部 情報システム工学科・教授・中村正樹
分野	データサイエンス, ソフトウェア工学, 理論計算機科学
キーワード	交通事故分析, データ分析, 機械学習, 形式概念分析

1. 研究の背景と目的

交通事故は近年減少傾向にある一方で、超高齢化社会の進行に伴い、歩行中・自転車乗車中の死亡事故が52.9%（H29年度）を占めており、欧米諸国（アメリカ、ドイツ、イギリス、フランス、スウェーデン）のいずれの国よりも2倍以上となっている。これは欧米に比べ日本は、生活圏が歩行圏内に収まる割合が高い都市構造に関係しているものと考えられている。内閣府においても、今後の交通安全対策を講じる際の重要な視点として、「高齢者及び子供の安全確保」、「歩行者及び自転車の安全確保」、「生活道路における安全確保」を掲げており（H30年度）、車優先で整備されてきた交通システムから人優先の安全思想に移行していることがわかる。一方で、生産年齢人口は今後徐々に縮減することから、従来のような警察業務の質を落とすことなく提供することの課題が顕在化すると考えられる。

本研究では、このような課題の解決に向けて、交通事故に対して事故が発生する前に先制的な対策が取れるように、事故発生分析・予測システムを開発する。超高齢化を背景とした社会変容に警察業務のあり方が検討されており、そのために、交通事故の精緻なデータが近年蓄積されつつある一方、従来のデータ駆動による分析方法では因子が多様なために一般的な傾向を見いだせないケースが頻発している。交通事故発生メカニズムの解明を題材に、機械学習をはじめとするデータ駆動手法の課題の解決を目標とする。

富山県警察本部と連携し、人身事故、物損事故のデータ、交通事故防止のための対策事例などの提供を受ける。さらに、気象データや人流データ等の各種オープンデータや商用データを入手し、これらの異種のビックデータを統合的に活用するため、機械学習法を導入する。機械学習法を効果的に用いるため、形式概念分析を用いてデータを形式的な枠組みで取り扱う。これによって機械学習の入出力となる複雑な交通事故メカニズムを可視化する。富山県警察本部より提供された平成29年から令和3年の162,925件の交通事故データ（下図）には、およそ12,000件の人身事故が含まれ、そのうち、1,505件が重傷、178件が死亡事故である。

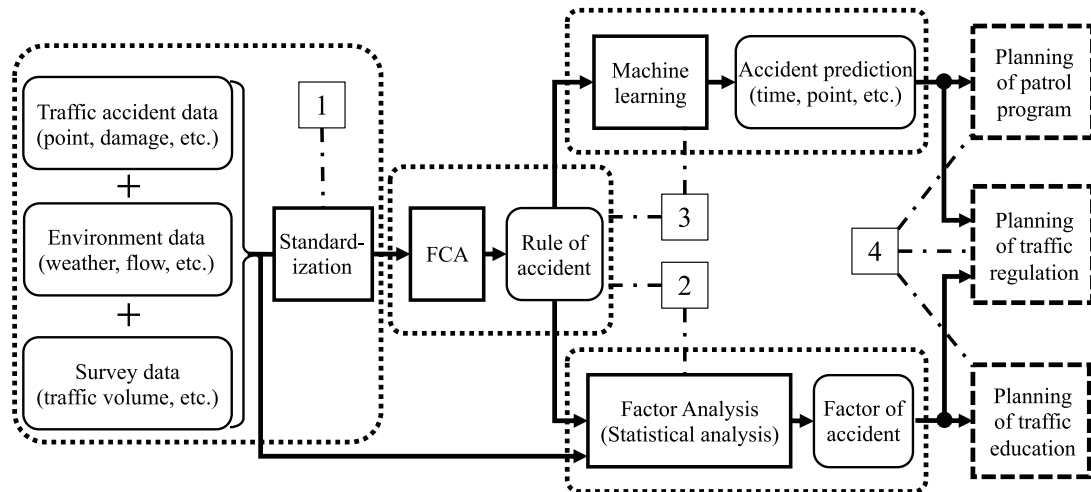


提案課題の達成により、交差点単位での事故のリアルタイム予測を分・時単位で実現し、予測に基づく集中的なパトロールが行えるようになる。有限の警察リソースを時空間上で効果的に活用することによって、場合によっては従来パトロールの対象外であった地域や時間帯における活動が可能となると考えられる。さらには、各地域での事故分析から共通項を抽出することにより、取締方式や体制の構築のみならず交通教育活動が設計可能となる。とくに高齢者の交通事故に対する新たな施策の構築は喫緊の課題であり、地域性を考慮した抜本的な対策が求められる。

2. 研究方法

富山県警察本部と連携し、人身事故、物損事故のデータ、交通事故防止のための対策事例などの提供を受ける。さらに、気象データや人流データ等の各種オープンデータや商用データを入手し、これらの異種のビックデータを統合的に活用するため、機械学習法を導入する。機械学習法を効果的に用いるため、形式概念分析を用いてデータを形式的な枠組みで取り扱う。これによって機械学習の入出力となる複雑な交通事故メカニズムを可視化する。

提案手法の流れを下図に示す。(1) 交通事故データから変換して得られたコンテキスト表に対し、形式概念分析を適用する。得られたルールをもとに、(2) 交通事故要因を分析し、(3) 交通事故予測のための機械学習モデルを作成する。それらの結果をもとに、(4) 巡回、交通規制、交通教育に資する分析結果を提示する。



形式概念分析は、数学的基礎に基づく概念構造の分析を特徴としており、概念データを思考の単位として、対象構造の明確化や事象の分析、データ自身およびデータ依存関係の可視化に用いられる。データ群をいったんオブジェクトとそれらが有する属性として整理し、属性同士の間で成立する包含関係（含意関係）を出力する。注目するオブジェクト群が必ず有する特徴を論理式として出力するため、機械学習器等の計算機処理との接続がよい。さらには、「属性 A をもつならば、属性 B も必ずもつ」といった人が直感的に理解しやすい形式の出力のため、データの可視化技法として有望である。つまり、対象交差点あるいは対象地域に特徴的な情報を抽出するだけでなく、統計的手法と異なり大数の法則を前提としないため、富山県における交通事故のみの少数のオブジェクト群に成立しうる特徴も論理式として表現できる。

ニューラルネットワークに基づく機械学習法は、近年画像音声認識分野において著しい進展がある技術である。画像や音声処理の分野を中心に成功例が報告されている一方で、それ以外の分野に対しては、どのようなデータあるいはデータの特徴を用いてニューラルネットワークを設計、整備すればよいかについて、十分な知見が得られていない。また、ニューラルネットワークが有用な結果を出力するよう見えたとしても、その出力結果が得られるメカニズムの解釈が困難であり、出力結果の信頼性をどのように担保すればよいかという課題がある。

本研究を達成するための実施計画を以下に示す。

- A) 異種ビックデータの可視化：交通事故データなどの異種ビックデータへ形式概念分析を適用し、データの形式化を行う。扱うデータの特徴や属性間の関係が論理式として形式化されるため、統合的に扱うことができる。こうして得られた異種ビックデータの特徴は、要因分析などを通して、交通取締や教育の設計に役立てられると同時に、交通事故予測システムの核となる機械学習の訓練データの選別に用いられる。
- B) 予測システムの構築：上記の形式化の結果を踏まえて、ニューラルネットワークに基づく機械学習による交通事故予測システムを実現する。例えば、ある時間と地点における道路形状や時間帯、人や車両の状況、天候などを入力することで、その時間と地点における事故発生割合を過去のデータベースから算出し、事故発生率を予測するようなニューラルネットワー

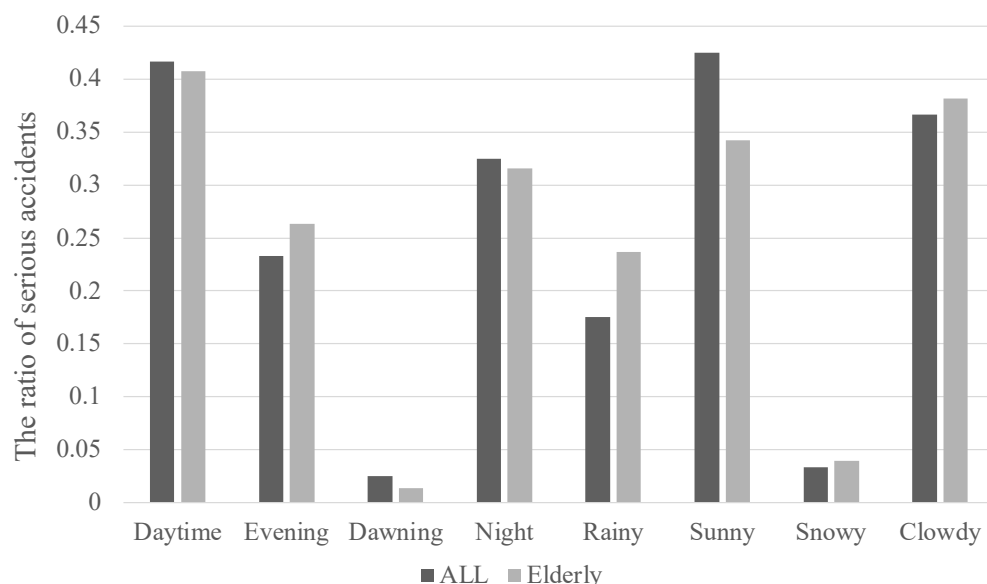
クを、データベースおよび特徴量に基づいて作成する。

- C) 予測システムの可視化：機械学習に基づく予測システムの出力結果を取締方式や体制の構築、および、交通安全活動の設計に利活用するための枠組みを構築する。ニューラルネットワークによる予測メカニズムは、内部でどのような計算が行われているかわからない。そこで、再び形式概念分析を用いて、構築した予測システムの入出力から予測メカニズムの可視化を試みる。可視化により予測の根拠を知ることができ、交通事故対策に利用可能となる。

3. 研究成果

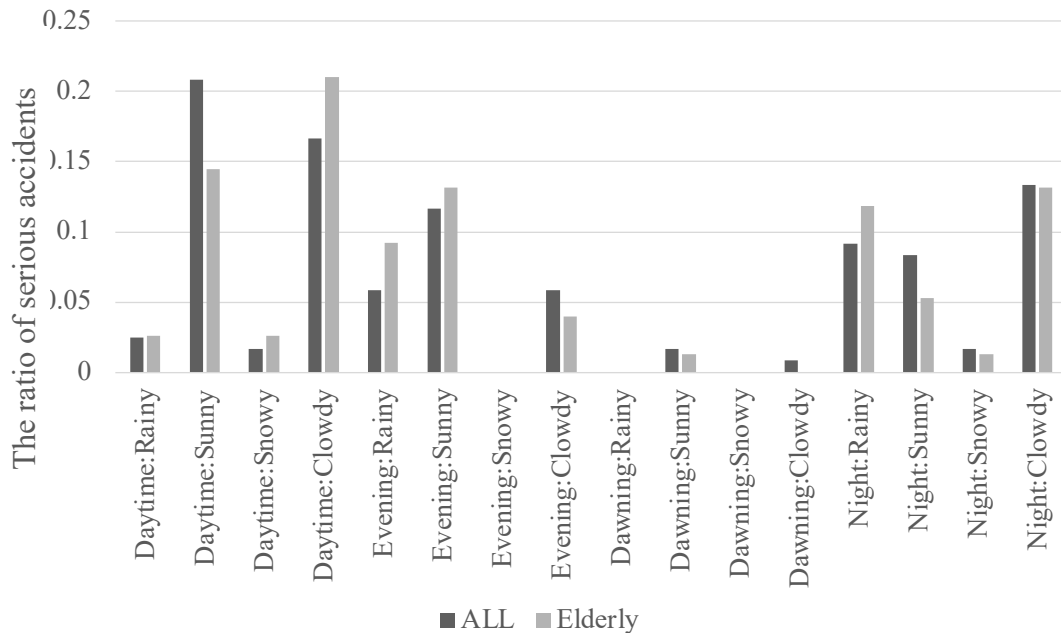
本研究では、形式概念分析による交通事故の事故要因を分析、機械学習による予測モデルを作成する手法を提案した。機械学習による予測モデル作成における、特徴量エンジニアリングや予測結果の分析において形式概念分析を活用する手法を検討した。本手法を用いて将来の人対車両事故が重傷・死亡事故になるかを予測するモデルを作成することで、本手法に関する有用性を得た。

形式概念分析により、例えば「曇りで昼の時間帯に横断歩道以外を横断していた高年期であり歩行者中の第二当事者と損傷がない第一当事者の間で発生した 19 件の交通事故のうち、16 件は第二当事者が重傷を負った」とルールが得られる。この関連規則より、第二当事者が横断歩道以外を横断しようとした際に重傷を負った事故において、年齢や時間帯、天候によって事故発生傾向に差があるという仮説が立てられる。交通事故データにおける人対車両事故のうち横断歩道以外を横断中かつ第二当事者が重傷である 120 件の事故を分析する。全体 120 件とそのうち第二当事者が高年期である 76 件に対し、時間帯と天候別に重傷・死亡事故の発生割合を下図に示す。



時間帯および天候のそれぞれでは、昼や曇りにおいて特に高年期の特徴は見られない。一方で、時間帯と天候の組み合わせにおいては、昼の時間帯かつ曇りの天候のときに第二当事者が高年期

となる事故が全体に対して発生しやすいという傾向が確認できる（下図）。すなわち、形式が稲分析により得られたルールに基づき天候と時間帯の組み合わせに着目して高年期の人身事故を分析した結果、天候、時間帯に単独では見つけられないような高年期の事故の傾向が発見された。



このように形式概念分析を適用することで、人手では探しきれない膨大な事故関連データから事故分析に効果的なヒントを得ることができる。

さらに、本研究では、形式概念分析の結果を用いることで、機械学習に基づく事故分類予測の精度が向上するという知見を得ることができた。提案手法の評価のため、予測対象を第一または第二当事者の人身損傷程度とし、平成29年から令和2年の人対車両の人身事故1,114件を学習データ、令和3年の同事故222件を検証データとして用いる。人身事故において、元データの人身損傷程度の属性には死亡、重傷、軽傷の3つの値がある。人身損傷程度の属性から新たな属性として、死亡事故または重傷事故を死亡・重傷事故（それ以外を軽傷事故）と定義し、事故が起きた際の死亡・重傷事故の予測を試みる。死亡・重傷事故は90件、軽傷事故は132件である。

提案する予測手法では、ある条件で発生する事故を分類する。例えば、道路形状や天候などの属性は予測時点でわかるが、衝突部位やエアバッグの作動などの属性は事故が起きた後でないとわからない。そのため、機械学習モデルの入力（説明変数）として利用可能な属性を検討し、486属性を抽出した。

機械学習に用いる説明変数の選択方法として、下記の特徴量エンジニアリング手法を検討し、どの手法がモデルの予測精度向上に寄与するのか確認する。提案手法1（形式概念分析により説明変数を選択）および提案手法2（交互作用特徴量を追加）を比較手法1（全説明変数を使用）および比較手法2（コサイン類似度により説明変数を選択）と比較する。提案手法1,2で用いる

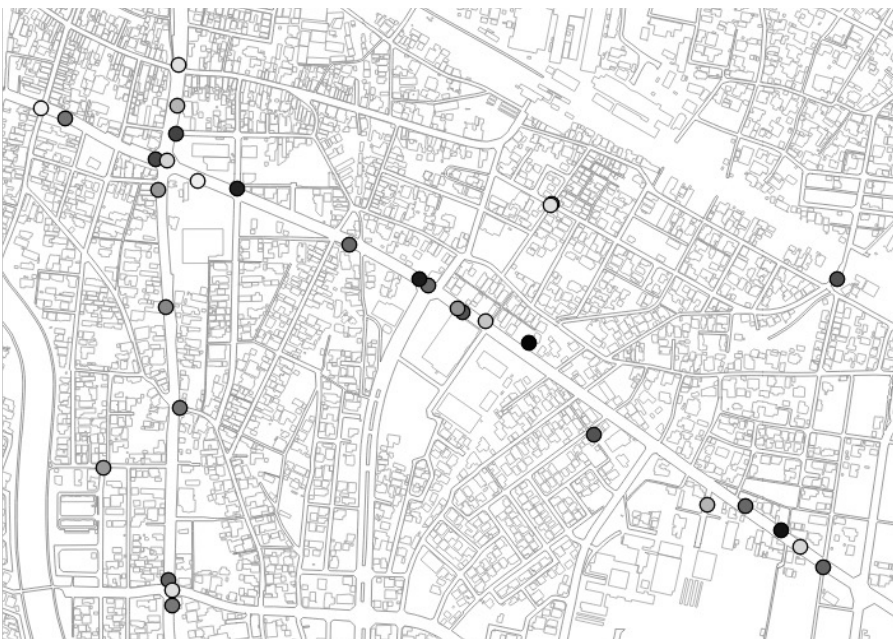
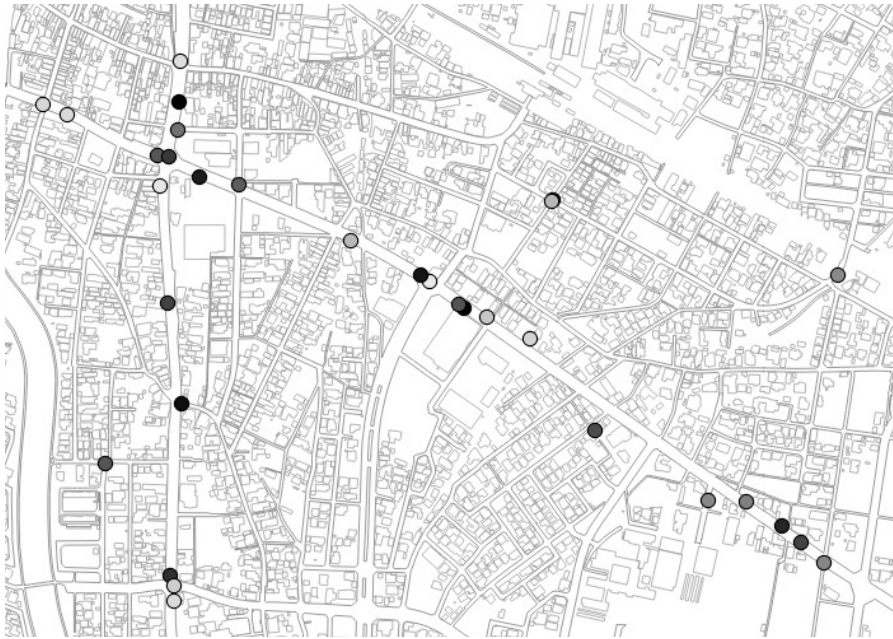
説明変数は、それぞれ 87, 227 属性である。比較手法 1 では全 486 属性をそのまま用いる。比較手法 2 では、コサイン類似度により属性間の距離を算出し、目的変数（死亡・重傷事故）との距離が近い属性として、提案手法 1 と同じ数の上位 87 属性を説明変数として用いる。平成 29 年から令和 2 年の人対車両事故 1,114 件に対し、各手法で抽出された説明変数と死亡・重傷事故の目的変数で作成した深層ニューラルネットワークにより、令和 3 年の人対車両事故 222 件を死亡・重傷事故（Fatal and Serious）とそれ以外（Minor）に分類した結果を下表に示す。

Proposed Method 1 (F1-score : 0.4912281)		Prediction	
		Minor	Fatal and Serious
Actual	Minor	93	39
	Fatal and Serious	48	42
Proposed Method 2 (F1-score : 0.5000000)		Prediction	
		Minor	Fatal and Serious
Actual	Minor	99	33
	Fatal and Serious	49	41
Comparative Method 1 (F1-score : 0.2880000)		Prediction	
		Minor	Fatal and Serious
Actual	Minor	115	17
	Fatal and Serious	72	18
Comparative Method 2 (F1-score : 0.3941606)		Prediction	
		Minor	Fatal and Serious
Actual	Minor	112	20
	Fatal and Serious	63	27

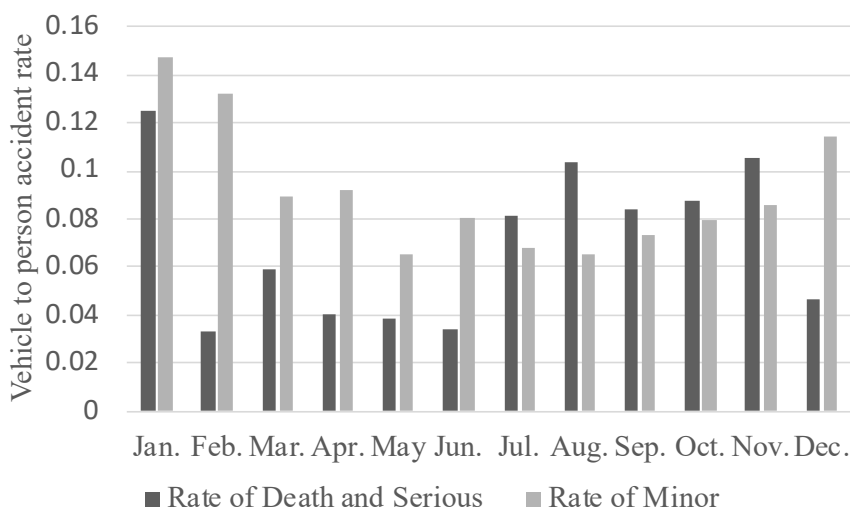
F1-score はすべての手法で 0.5 以下であり、特に再現率（実際の死亡・重傷の中で死亡・重傷と予測できた割合）が低くなった。この原因として、交通事故における人身損傷程度（死亡・重傷か軽傷か）が本データの属性以外の要因（例えば健康状態など）によるところが大きい可能性がある。一方で、提案手法は比較手法と比べて精度がよくなっており、特に比較手法で低かった再現率の精度向上が見られる。全 486 属性をそのまま説明変数として用いたモデルは、形式概念分析またはコサイン類似度による特徴量エンジニアリングを適用したモデルよりも F1-score が低い。形式概念分析を用いた提案手法 1 とコサイン類似度を用いた比較手法 2 では、提案手法 1 の方が F1-score が高い。また、交互作用特徴量も用いた提案手法 2 が最も高い F1-score である。提案手法 1,2 に比べ、比較手法 1,2 とも比較的多くの死亡・重傷事故を軽傷事故と誤って分類している。

本提案手法を用いた警察活動の支援方法を検討する。予測結果を可視化することで、重点的に取り締まる場所を絞り込むなどの警察活動を支援する。ここで、平成 29 年から令和 3 年に人身事故が発生した 12,393 地点については、機械学習モデルで用いた説明変数が既知である。本機械学習モデルを用いて、過去に事故が発生した地点に対し、ある条件における死亡・重傷事故の

傾向の地図上への可視化が可能である。例えば、全交通事故データに対して、日時と天候の値を「2022年1月26日水曜日における晴れの昼間」と「2022年10月26日水曜日における晴れの昼間」という架空の日時と天候に置き換えて、前節の提案手法2で作成した機械学習モデルで予測する。地域の例として、富山県射水市越中大門駅付近における予測結果のQGIS上への表示例を下図に示す（上：2022年1月26日水曜日における晴れの昼間，下：2022年10月26日水曜日における晴れの昼間）。図中の点は、重傷・死亡事故の危険性が高いほど濃く表示されている。図より、日時や天候が異なることで重傷・死亡事故の危険性が高いと予測される地点が異なることが確認できる。



機械学習モデル、特に深層ニューラルネットワークは内部構造が複雑であり、予測根拠の説明が難しいことが知られている。本モデルがどのような根拠で死亡・重傷事故を予測しているか知ることができれば、将来の事故防止に役立てることが可能である。そこで、機械学習モデルに対する形式概念分析の適用を試みる。上記の1月26日と10月26日で置き換えた架空の交通事故データにおける提案手法1の説明変数（道路幅、交差点道路幅、指定速度の量的データを除く）とそれぞれの死亡・重傷事故の予測結果（予測確率0.5以上）をコンテキスト表とし、形式概念分析を適用すると、確信度が80%以上の含意関係・関連は10,660件抽出される。例えば「10月の水曜日に非市街地で低層建物が密集している、ペイントの中央線である中央分離帯と三灯式の信号機が稼働している地点で人対車両事故が12件発生すると、10件が死亡・重傷事故と予測される」というルールが含まれる。架空の事故の形式概念分析であるが、元の交通事故データに対してフィッシャーの正確確率検定を適用すると前提部と結論部が同時に出現しやすいことが確認できる。ペイントの中央線である中央分離帯と三灯式の信号機という属性が成り立つ平成29年から令和3年に発生した1,336件の人対車両事故に対する軽傷事故と重傷・死亡事故の割合を下図に示す。7月から11月にかけて重傷・死亡事故の発生割合が高いことが確認でき、この中央線と信号機の2属性の組み合わせが、夏から秋で死亡・重傷事故になりやすいことが確認できる。



以上の研究成果は、下記参考文献の1,6で発表し、特に6については、講演会の最優秀論文賞および優秀発表賞と表彰された。上記以外にも、衛星画像を用いた事故予測モデルの検討(同2,4)や道路形状に基づく事故分析(3,5)、自転車事故の分析や形式概念分析の効率化(7)などの研究成果について、それぞれ学外発表した。

4. 今後の展望

本研究では、形式概念分析による交通事故の事故要因を分析、機械学習による予測モデルを作成する手法を提案した。前節では、死亡・重傷事故の予測結果を示したが、他に「自転車に関わる事故」や「事故類型（車両対車両，人対車両，車両単独）」に対する分類でも同等の予測精度

を得ている。今後は、死亡・重傷事故以外の予測対象に対する本手法の適用の仕方や結果の利用方法を検討する。予測結果の可視化では、過去に事故が発生した地点のみを予測地点としている。富山県全域における土地利用細分メッシュ単位あるいは道路や交差点単位での予測・可視化は今後の課題である。そのためには、事故が発生していないメッシュや道路に対しても、本手法で用いた説明変数の情報を得る必要がある。例えば、予測時点における予測地点の道路形状、信号機、路面状況などの情報を、地図情報サービスや直前の天候などを用いて補完することが考えられる。本研究では、既存の形式概念分析ツール **Concept Explorer** を用いたが、大量のデータの分析に対する計算コストが問題である。例えば、本目的にはツールの主要機能の1つである概念束の図示は必要ない。目的に適した効率的な形式概念分析ツールの選択あるいは作成は今後の課題である。

5. 参考文献

1. Shogo Kotani, Masaki Nakamura, Kazutoshi Sakakibara, Tatsuo Motoyoshi, Keisuke Hoshikawa, Toward prediction of traffic accidents using formal concept analysis of actual accidents and related data, The Proceedings of the International Conference on Machine Learning and Cybernetics (ICMLC), 6014, Toyama, 9-11 Sep. 2022
2. 浅井 智也, 中村 正樹, 榑原 一紀, 本吉 達郎, 星川 圭介, 富山県の交通事故データと衛星画像を用いた交通事故予測モデルの開発 2022 年電気・情報関係学会北陸支部連合大会, F2-46, 2022.9.3 (金沢大学, Online).
3. 甲斐 雅也, 中村 正樹, 榑原 一紀, 本吉 達郎, 星川 圭介, 富山県における交通事故現場周辺の道路形状 6 による事故属性の分析, 2022 年電気・情報関係学会北陸支部連合大会, F2-27, 2022.9.3 (金沢大学, Online).
4. 浅井智也, 中村正樹, 榑原一紀, 本吉達郎, 星川圭介, 交通事故データと衛星画像を用いた富山県特有の交通事故予測モデルの開発, 計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2022, SS04-01, pp.362-363, 2022 年 11 月 25-27 日, 近畿大学東大阪キャンパス
5. 甲斐雅也, 中村正樹, 榑原一紀, 本吉達郎, 星川圭介, 機械学習を用いた富山県における交通事故現場周辺の道路形状による事故属性の分析, 計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2022, SS04-07, pp.383-384, 2022 年 11 月 25-27 日, 近畿大学東大阪キャンパス
6. 小谷祥悟, 中村正樹, 榑原一紀, 本吉達郎, 星川圭介, 形式概念分析と機械学習による交通事故予測システムの検討, 計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2022, SS04-02, pp.364-369, 2022 年 11 月 25-27 日, 近畿大学東大阪キャンパス (最優秀論文賞, 優秀発表賞 W 受賞)
7. 中村正樹, 輿水樹, 柴田大翔, 小谷祥悟, 榑原一紀, 本吉達郎, 星川圭介, 形式概念分析による交通事故データ分析について ―自転車事故の分析と形式概念分析のための属性抽出手法―, 計測自動制御学会 システム・情報部門 社会システム部会 第 31 回社会システム部会研究会予稿集, pp.1-6, 2023.3.5-7 石垣島

謝辞

本研究に取り組むにあたって富山県警察本部に貴重なデータを御提供頂くとともに、有益な議論及び御提案を頂きました。心より感謝申し上げます。本研究の一部は、公益財団法人富山第一銀行奨学財団の令和4年度研究助成金を受けて行ったものです。

研究題目	富山における河川水中浮遊ゴミの現況把握と水理モデルを用いた輸送特性の検討
機関名	富山県立大学
研究代表者	工学部 環境・社会基盤工学科・准教授・久加 朋子
分野	河川工学
キーワード	浮遊ゴミ, 小矢部川, ドローン, 水理モデル, 輸送特性

1. 研究の背景と目的

近年、世界各地の海域で海ゴミ、とくにプラスチックゴミの問題が深刻化している。多岐に渡る既往研究の結果、これらのゴミ発生源は陸域から河川を通じて流出したものが大半を占めること、日本海域は海ゴミ集積のホットスポットであること、ゴミへの化学物質吸着等による生態系への影響等が報告されている¹⁾²⁾など。しかしながら、海ゴミに関する既往研究の多くは海洋や海岸が対象とされており、陸域発生源から河道内への流入、流入後の輸送特性、沿岸域に到達するごみ量推定等、河川水中浮遊ゴミの挙動に関する情報は比較的限られた状況にある³⁾⁴⁾⁵⁾など。なかでも、国内での河川内の報告事例は関東や九州地域に集中している³⁾⁶⁾⁷⁾など。

2009年7月15日、海岸漂着物処理推進法（平成21年法律第82号）が公布・施行され、富山県においても2010年度より海岸漂着物実態調査が実施されている。富山県調査では、県内20箇所の海岸を対象とし、100 m³あたりの漂着物量（m³）を把握している。その結果、県内の海岸では、射水市庄西町に位置する小矢部川河口の六渡寺海岸にて、最も漂着ゴミ量が大きいことが確認されている。

小矢部川は大門山を源流とする勾配 1/400～1/2640 の1級河川である。小矢部川は庄川・小矢部川流域における用水の排水経路でもあり、多数の支流が流れ込んでいる。主な支川には、旅川、千保川、祖父川、渋江川などがある。六渡寺海岸では海岸清掃活動を六渡寺地区住民にて年2回、ボランティア活動（六友会）にて月1回（3月～11月、8月を除く）、富山県による清掃委託が年3回実施される他、海ゴミに関する普及活動も展開されている。こうした活動の結果、六渡寺海岸における海ゴミ量は年々減っている。しかし依然としてごみ量が多い。そこで本研究では、小矢部川から河口に至るまでの浮遊ゴミの挙動を明らかとすることを目的とし、聞き取り



図-1 小矢部川の調査範囲(目視調査域, ドローン撮影範囲・計算区間, 定点カメラ位置)

調査（富山県環境政策課，富山市，六渡寺自治会），目視調査，ドローン（UAV）調査，定点カメラ・画像解析（8か所設置），水文データ整理，非定常2次元流れ解析にゴミモデルを追加し，現地データとの比較からモデル精度の検証までを実施した。



図-2 Autel Evo II

2. 研究方法

(1) 目視調査，ドローン飛行調査

目視調査とドローン飛行調査では，小矢部川本川の平水時のゴミ集積状況を把握するために実施した。図-1 に小矢部川本川および主な支川の位置，目視調査範囲，ドローン飛行調査範囲を示す。本調査（研究初年度）では，まず小矢部川を歩き，目視調査を行った。目視での調査箇所は富山県による既往調査報告等を参考とし，河道内にてゴミが確認できる可能性が高く，かつ河道内まで容易にアクセスできる場所を航空写真より選定した。

続いて，ドローン（Autel Evo II, Autel 社，図-2）によるゴミ調査を実施した。調査範囲は小矢部川河口（0 km）から 40 km 上流の南砺市（左岸側に南砺市福光斎場）までとし，これらの区間を 23 区間に分け，5 日間かけて撮影を行った。撮影時の飛行条件は，県立大グラウンドにて事前検討を行い，ペットボトルや袋等のゴミが十分に確認できる条件として飛行高度 70 m，フロントオーバーラップ 85%，サイドオーバーラップ 75%，ジンバルピッチ 90°，飛行速度 25 m/s とし，地上解像度 2cm を確保するようにした。撮影後，得られた多量の画像は MetaShape Professional（Metashape 社）を用い，区間ごとにオルソ画像合成までを行った。

(2) タイムラプスカメラを用いた定点撮影

タイムラプスカメラを用いた定点撮影は，降雨時における河道内でのゴミ挙動を把握するために実施した。カメラ設置箇所は，図-1 に示す 8 箇所（河口付近 6 台，支川付近 2 台）である。河口付近のカメラは六渡寺海岸へのごみが流入する様子や，伏木港付近におけるゴミの挙動を把握するものである。一方，小矢部川と祖父川（⑧），小矢部川と千保川（⑦）との合流点付近のカメラは，本川と支川とのゴミ挙動の違いを把握するものである。カメラ設置期間は，研究初年度である本調査では，いずれも 8/24~10/31 の約 2 ヶ月とし，降雪が始まる前にカメラの撤去を行った。定点カメラの撮影間隔は 5 分とし，5 時から 19 時まで，日の出から日の入り後までの明るい時間帯のみ撮影するように設定した。撮影終了後は，順次タイムラプスカメラを回収し，画像を確認し，ゴミの移動，支流から本川へのゴミの流入，流出傾向等を把握した。

(3) 水文データの整理

長江観測所の水文データを整理し，小矢部川下流域における日流量の年変動を把握すると共に，定点カメラ設置期間における千保川からの流入流量についても併せて整理した。前者は水文



図-3 計算格子と計算区間

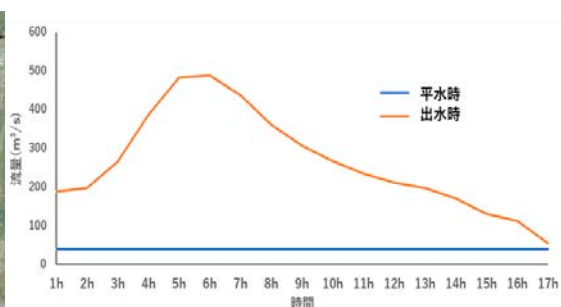


図-4 計算での流量ハイドログラフ

水質データベースから取得したデータであり、後者は富山県より提供頂いた。

(4) 水理モデルの改良とゴミ輸送特性の検討

本研究では、フリーソフトウェアである非定常平面 2 次元モデル iRIC Nays2d (<https://i-ric.org/ja/>) を一部改良した Nays2dSecondary を用い、粒子を流れに追跡させ、その移動軌跡を追跡した。計算範囲を図-3 に示す。計算範囲の河床高には、2021 年グリーンレーザーによる計測データ（富山河川国道事務所提供）を用いている。計算格子サイズは事前計算（2020/09/04 出水の流量ハイドログラフ）より検討し、計算水位と長江観測所の実績水位との比較から精度検証を行った結果、縦断方向に 7.5m、横断方向に 5.0m としている。格子のマニングの粗度係数は 0.03、河床材料は 31.38mm と設定している。計算は 2 ケース実施した。Case 1 と Case 2 の流量ハイドログラフを図-4 に示す。Case 1 は平水時を想定したものであり、Case 2 は出水時（500 m³/s 規模）を想定したものである。検討初年度のため、本検討では始めの段階として、現況の数値計算を用いてゴミ輸送およびゴミ集積状況がどの程度再現できるかを把握する。

3. 研究成果

(1) 目視調査によるゴミ調査結果

図-5 に、目視調査で確認したゴミの一部を示す。上流部では図-5a のように水深が浅い地点が多いため、低水路内に中州ができ、そこにいくつかゴミが確認できた。ゴミの種類としては、生活ゴミよりも図-5b のような農業用ゴミが多くみられた。中流域では、低水路幅が広がり、水深も上流部に比べ深くなっているため、低水路内でも河岸沿いの水深の浅い場所によくゴミが見られた（図-5c）。さらに中流域の一部では、図-5d のように五位庄頭首工直後のブロックに多くゴミが見られた。河岸沿いの植生にゴミが引っかかりも数多く確認できた（図-5e）。下流域では図-5f のように低水路から少し離れた高水敷上にペットボトルや缶など多くの生活ゴミが集まっている様子が見られた。河口付近の伏木港では、雨の日の直後、図-5g のように生活ゴミや自然系ゴミがくぼみ一面に滞留する状態が確認された。以上より全体でのごみの停止傾向は砂州や低水路内の中州、堰下流、高水敷、ブロック、河岸沿いの植生であった。そして上流から河口に行くにつれ農業用ゴミに対して、生活ゴミの割合が増えていく傾向にあった。なお、図-5d お

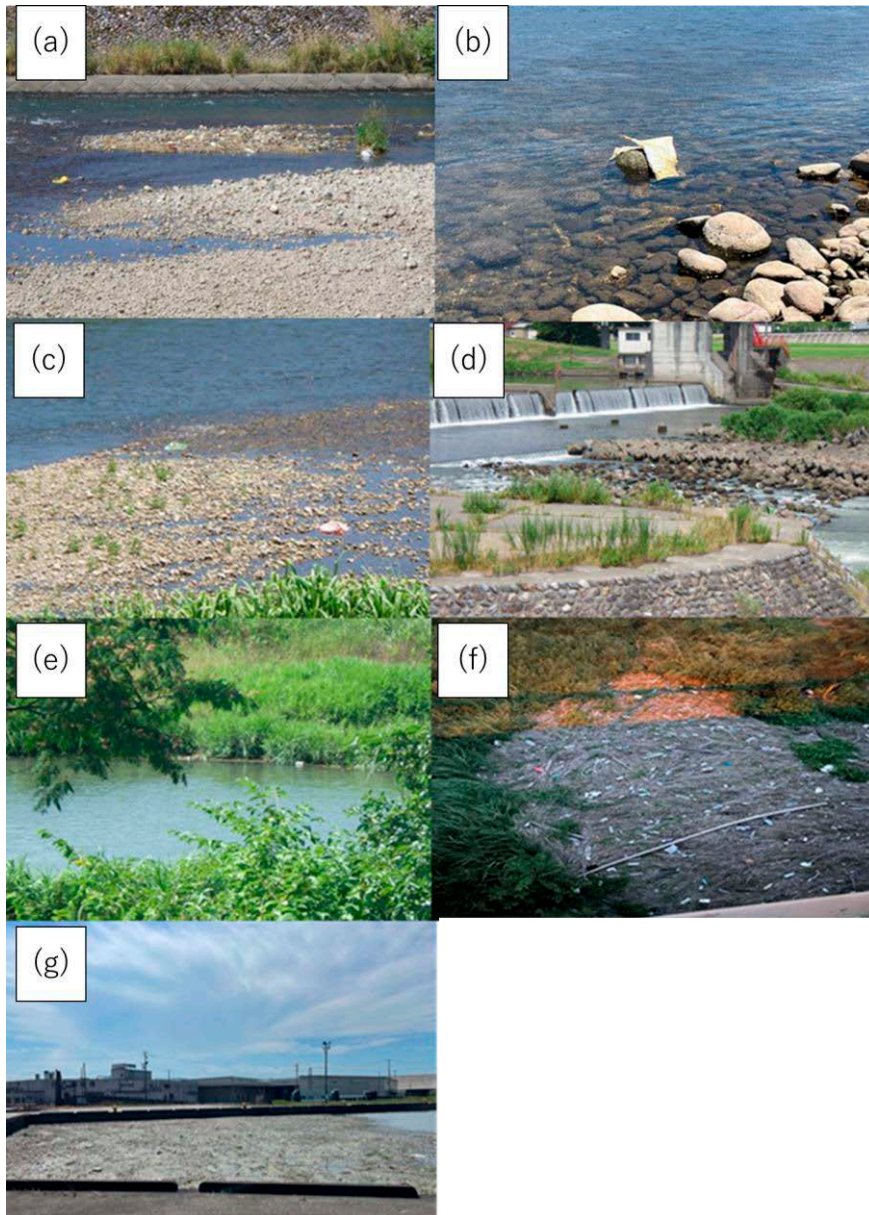


図-5 目視調査で確認できたごみ

よび図-5f は普段水位より高い場所なので、出水により水位が上がった際にその場に溜まったものと考えられる。図-5g は、出水後の写真であり、小矢部川を流れるゴミの一部が河口付近の伏木港のくぼみの中に入り、滞留したものと考えられる。

(2) ドローンにおける平水時のゴミ集積結果

図-6 に、ゴミが確認できた箇所を示す。図に示す紫点は右岸側、黄色点は左岸側、赤点は中州部分にて確認されたゴミの停止箇所を示す。さらに、図-6 の点をグラフにしたものが図-7 である。図-6 および図-7 より、ドローンによるオルソ画像作成失敗（欠損）区域を除けば、どの地点でもゴミが確認できたことが分かる。また、図-7 によると、(i) 上流域から下流域にかけて

ゴミの停止数が増加すること、(ii) ゴミの停止数は、五位庄頭首工 (図-8) や二日市頭首工付近のような落差のある構造物下流側に多いこと、(iii) ゴミの停止数は構造物の他に、支川(旅川、山田川、岸渡川、祖父川、千保川)の合流後にも増加することが確認された。

次に、右岸側と左岸側とでゴミの停止・集積特性に違いがあるかを把握する。図-9 に、右岸と左岸に分けたごみの停止数を示す。図-9 より、上流部(38k~30k)では青枠で囲んだ蛇行部の外岸部にごみが多いことが分かる。この他、色枠のない場所の主な停止場所は砂州上である。

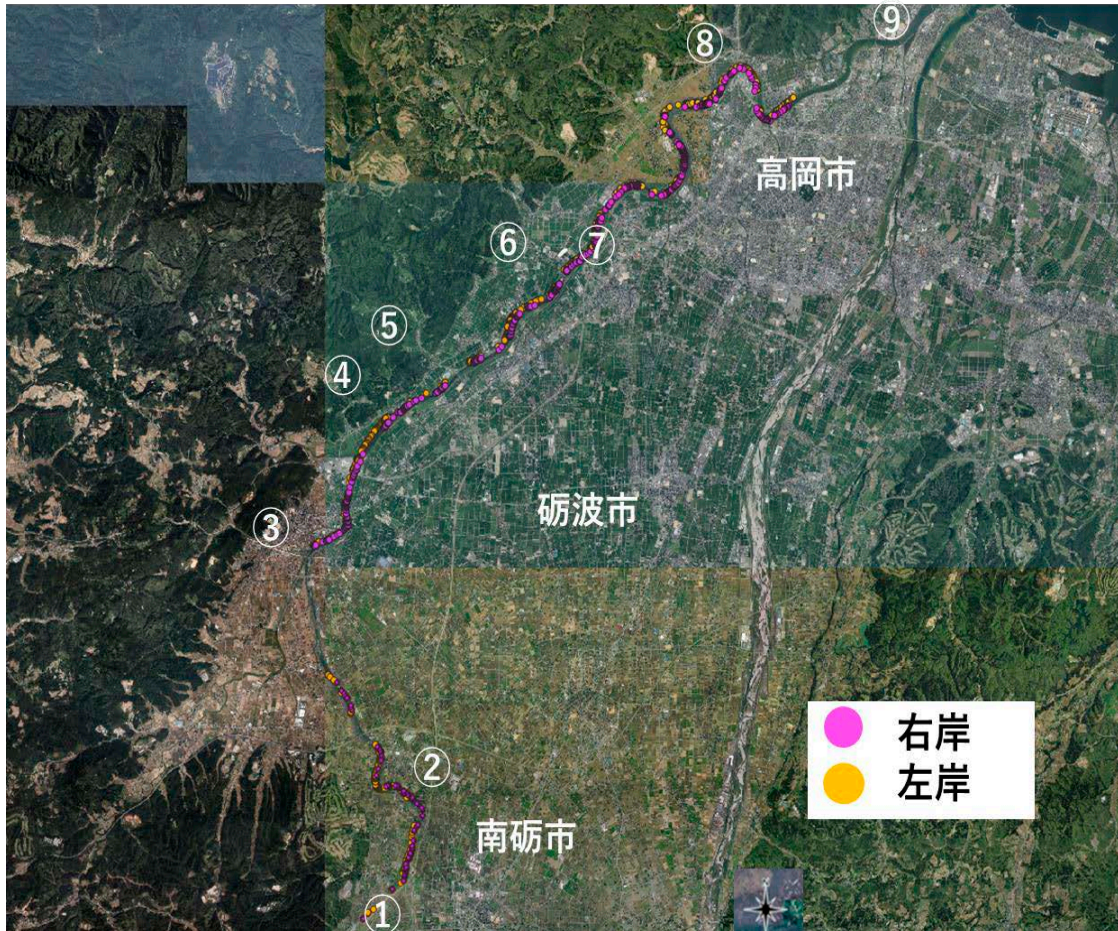


図-6 ドローンにて確認されたゴミの停止箇所(紫点は右岸側, 黄色点は左岸側)

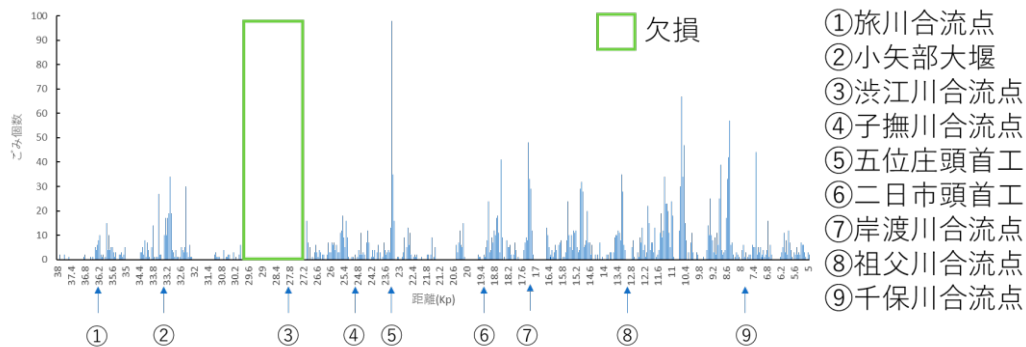


図-7 流程方向へのゴミ停止数の変化



図-8 五位庄頭首工下流のゴミ停止状況(紫点は右岸側, 黄色点は左岸側)

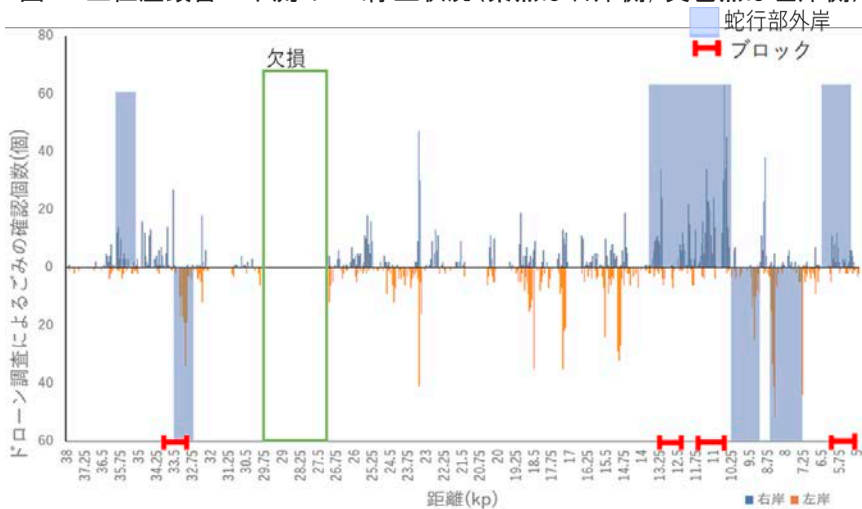


図-9 UAV 画像から確認した停止ゴミ(右岸・左岸)

上流部は水深も浅く低水路も狭いため、水位が上がりやすく、砂州上や低水路から離れた場所までゴミが到達し、停止したものと考えられる。

中流域(27k~14k)では上流部や下流部と異なり、蛇行部分が少なく単調な流れが多い。このため、図-9の20k~14kでは右岸左岸まんべんなくゴミが停止したと考えられる。

下流域(14k~5k)では、大きく蛇行する地形を有する。このため、図-9から分かるように、右岸と左岸で大きくゴミの停止に偏りが見られた。ゴミは蛇行部の外岸側(図-9の青枠部分)ほど停止数が多いことが分かる。ドローン画像や現地目視によると、これらは蛇行部の外岸側の設置されているブロックの上に停止するゴミであった。

(3) 定点カメラによるゴミ輸送結果

タイムラプスカメラ8台のうち、ある程度傾向がつかめたのは3か所(図-1の(2),(6),(8))であった。とくに千保川合流部(図-1の(2), 図-10)では、小矢部川本川と千保川から流入する浮遊ゴミが明瞭に確認できた。図-11に、8/24~10/31の期間の浮遊ゴミ数(5分間隔撮影画像を用いた)を示す。調査期間中、ゴミ輸送が確認されない日はなく、平水時も常に若干のゴミが河口



図-10 小矢部川と千保川合流点の撮影状況(白丸:流れているゴミ)

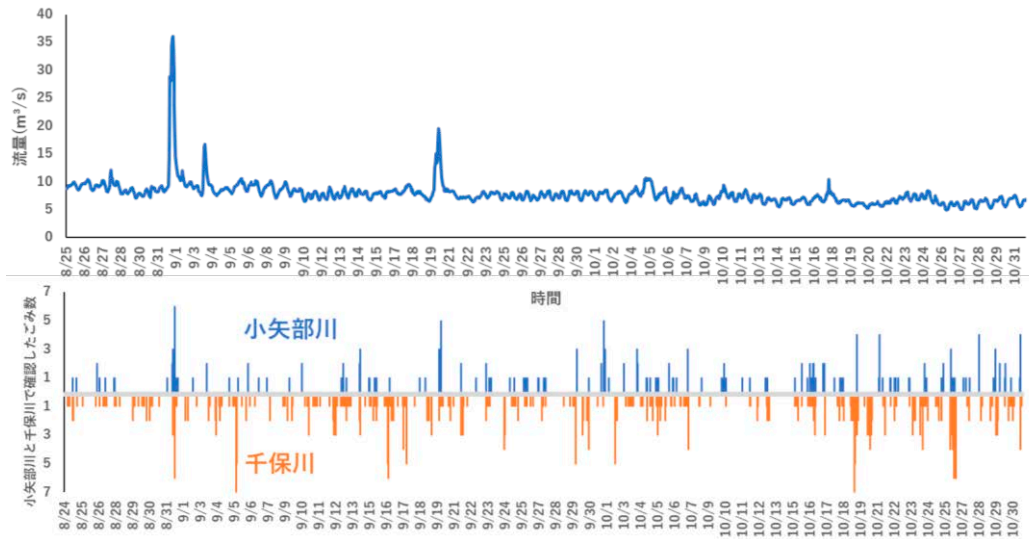


図-11 上)千保川の時間流量, 下)浮遊ゴミ確認数(小矢部川・千保川)

に向かって流出する状況が確認された。さらに、確認された浮遊ゴミ数は小矢部川で 191 個、千保川で 445 個となり、5 分間隔の画像の集計において、約 2.3 倍もの差が認められた。千保川は市街地を經由し、比較的小矢部川の下流付近で合流する支川であり、ゴミの多さが際立って多いことが分かる。このほか、出水時のみに着目すると、出水前半に浮遊ゴミが集中するファーストフラッシュ現象も確認された。

(4) 水理モデルによる検討結果

計算では、平面二次元浅水流モデルを用い、平均流速に追従する形での粒子の移動を計算した。粒子の停止条件には水深を用い、この値は今後の検証が必要であるものの、本検討では 0.01 m を設定した。図-12 および図-13 に平水条件と出水条件を与えた際の粒子の停止位置を示す。計算では繰り返し出水を与えていないため、粒子(浮遊ゴミ)停止数は限られるが、平水条件お

び出水条件の何れもゴミの停止が確認された。ただし、両者で停止場所は幾分異なった。

図-12 より、ドローン調査結果 (a) と平水シナリオでの計算結果 (b) とを比較する。図-12b によると、平水時の主な粒子停止箇所は砂州や中州の上、蛇行部外岸であることが分かる。図中

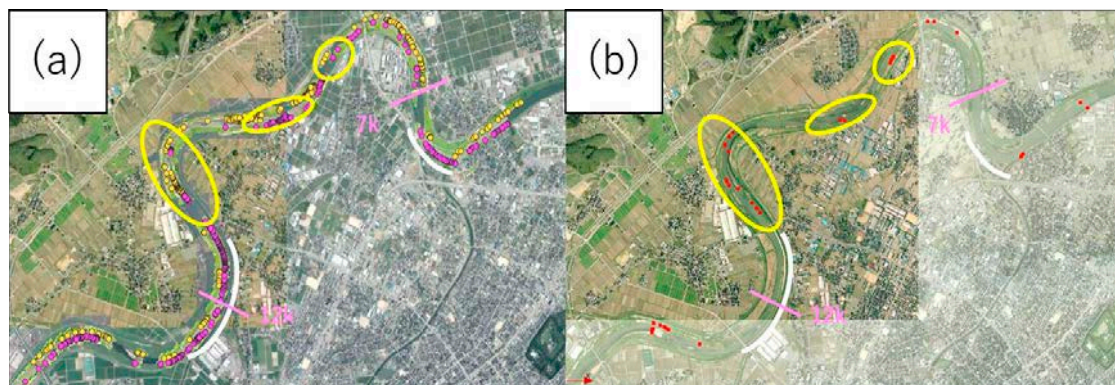


図-12 小矢部川におけるゴミ定着状況, ドローン結果(左), 平水シナリオの計算結果(右)

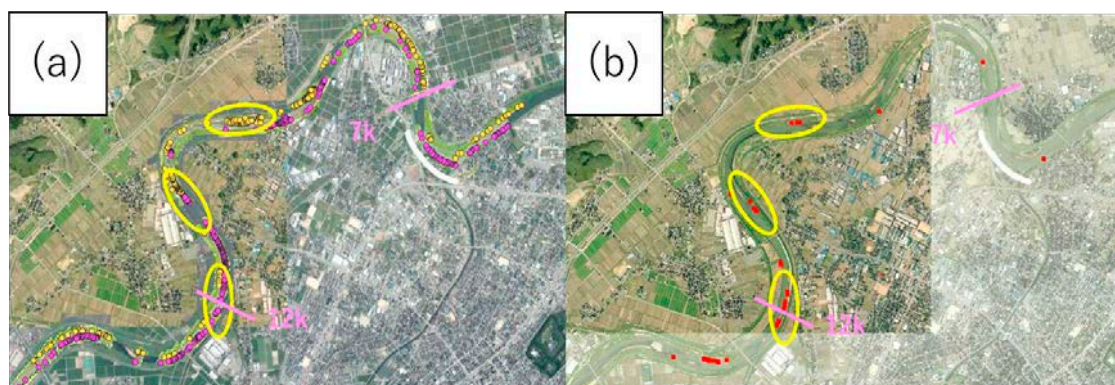


図-13 小矢部川におけるゴミ定着状況, ドローン結果(左), 出水シナリオの計算結果(右)

に黄色で示した箇所はドローン調査結果と一致するが、白印で示す場所では平水条件での粒子の停止は確認されることが分かる。続いて、図-13 より、ドローン調査結果 (a) と出水シナリオでの計算結果 (b) とを比較する。図-13b によると、出水条件下では、平水条件下にて再現されなかった河口より 12km 付近の蛇行外岸部への粒子停止が確認された。この場所は比較的水位が高い時にゴミが到達し、停止する場所であると分かる。一方、7k 付近の蛇行外岸部への粒子停止は、本計算条件下においても確認されなかった。これは、この場所が河岸沿いのブロック上へとゴミが停止する箇所であり、現況のモデルのままでは再現が難しい場所であると推察された。以上の計算より、まずは研究初年度の第一段階として、数値計算を用いてある程度の粒子(ゴミ)停止箇所の推定が出来る可能性を示すことが出来た。今後、今回用いた流れの平均流速ではなく、表面流速の近似計算を行い、その結果を用いて粒子の追従計算を実施することで計算精度の再検討を実施する。さらに、計算にて複数回の出水を繰り返すことで、ゴミが堆積するホットスポットが計算できるかどうか、流れるゴミのうち、何割程度が河道内に一時貯留されるかなどの検討に発展させていくことが課題である。

4. 今後の展望

本年度は研究初年度であり、まずは現況把握と数値計算にてゴミ輸送特性がどの程度再現できそうか把握することを目的とした。結果、現地の状況については、目視調査に加え、ドローン画像よりある程度把握できた。出水時のゴミ輸送については、定点カメラを用いて流れるゴミの数をカウントすることが十分出来ることを確認できた。ただし、静止画を用いたため、平水時に比べて出水時のゴミ輸送数を過小評価していることが課題である。さらに、数値解析では、平水と出水シナリオ下での検討を行い、水位の計算精度を揃えた上で、粒子の流れに追従させる検討を行った結果、ドローン調査結果と類似する場所への粒子の停止が確認された。ただし、実測と計算との相違する場所もあり、今後、モデル修正も含めた検討を進めることが必要である。


今後の展望は以下の通りである。まず、定点カメラを用いた調査については、静止画ではなく、動画を用いる方法へと変更する。また、本検討では小矢部川のみを対象としたが、R5年度は富山県1級河川の小矢部川、庄川、神通川との比較を試みる。通常、既往報告等では都市化率に応じて河川を通じたゴミ流出量が増加すると報告されるが、富山県では、神通川河口よりも小矢部川河口の六渡寺海岸のゴミ集積量が多い。そこで、R5はR4調査を発展させ、河川間比較より現況の把握に努める。県内河川にて対策を検討するには、河川からの流出量と海岸への堆積量との対応を明らかにしておくことが必須と考えるためである。ならびに、数値解析については、前述の通り、平均流速ではなく、表面流速を用いて粒子の追従計算を行う形へとモデル変更する。ならびに、複数回の出水シナリオを与えた計算を行い、ゴミ定着ホットスポットやゴミ定着から流失までの時間スケールを評価できるようにすることを考えている（R6実施予定）。

謝辞

本研究は富山第一銀行奨学財団および富山県立大学の研究助成を受けて実施した。国土交通省北陸地方整備局富山河川国道事務所および伏木富山港湾事務所、国土交通省伏木海上保安部、大阪税関 伏木税関支署、富山県、富山市には、水位、流量、河川測量データの観測データ、県内の海ゴミ・漂着ゴミに関する既往調査結果、ドローン撮影や定点カメラ設置などに纏わるご協力を頂いた。富山県立大学地域連携センターには、定点カメラ設置に纏わる調整にご協力いただいた。令和4年度の当研究室所属学生には、全員での現地調査に取り組んで頂いた。ここに謝意を表します。

5. 参考文献

1. 高田秀重: マイクロプラスチック汚染の現状、国際動向および対策、廃棄物資源循環学会誌, 29(4), pp. 261-269, 2018.
2. A. Isobe: Percentage of Microbeads in Pelagic Microplastics within Japanese Coastal Waters, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 110, No. 1, pp. 432- 437, 2016.
3. 二瓶泰雄・片岡智哉: 河川から考える海洋プラスチックごみ・マイクロプラスチック対策, 廃棄物資源循環学会誌, 29(4), pp.309-316, 2018.

- 
4. Mani, T., Hauk, A., Walter, U. & Burkhardt-Holm, P. Microplastics profile along the Rhine River. *Sci. Rep.* 5, 17988, 2014.
 5. 安達智哉・懸樋洗大・中谷祐介: 深層学習を用いた河川浮遊ごみ検出手法の開発と流出特性の解析, 土木学会論文集 B1 (水工学) , 78(2), pp. I_937-I_942, 2022.
 5. 二瓶泰雄・若月宣人: 洪水時河川における浮遊ゴミ輸送量計測の試み, 土木学会論文集 B, 66(1), pp. 19-24, 2010.
 6. 工藤功貴・片岡智哉・二瓶泰雄・日向博文・島崎穂波・馬場大樹: 日本国内における河川水中のマイクロプラスチック汚染の実態とその調査手法の基礎的検討, 土木学会論文集 B1 (水工学) , 73(4), pp. I_1225-I_1230, 2017.

研究題目	オゾンと過酸化水素を用いた CN-キトサン複合体による光触媒吸着反応の促進と水中有機汚染物質除去への適用
機関名	富山県立大学
研究代表者	工学部 環境・社会基盤工学科・准教授・黒田啓介
分野	環境工学
キーワード	可視光駆動光触媒、グラフィティックカーボンナイトライド、有機色素、抗生物質、促進酸化処理

1. 研究の背景と目的

世界中で都市化が進み水環境の汚染が進む中、安価で環境負荷が小さく、かつ高効率な水質浄化技術が求められている。光触媒による水質浄化は、強い酸化力を持つスーパーオキシドラジカル($\cdot\text{O}_2^-$)、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)、一重項酸素($^1\text{O}_2$)などの活性酸素種により水系媒体中の多くの有機汚染物質が高効率に分解されるため、廃水中の汚染物質を低減する環境負荷が少ない処理方法と考えられている¹⁾。反面、これまで多く用いられてきた光触媒である二酸化チタン(TiO_2)等は紫外線照射を要するため高コストな点や、触媒金属の溶出・腐食が問題であった。

近年、グラフィティックカーボンナイトライド ($\text{g-C}_3\text{N}_4$; 今後 CN と略す)が省エネルギーな光触媒として注目が高まっている。CN はメタルフリーのため毒性が低く、安価であり、尿素やメラミンなど窒素を豊富に含む前駆体の熱重合により容易に合成できる²⁾。またバンドギャップが狭いため可視光でも駆動し、金属を含まないため光腐食による金属の溶出の問題がないという利点がある³⁾。これまで研究代表者は、CN と吸着剤であるキトサンを用いて、太陽光が利用でき、汚染物質を酸化分解と吸着の両方で除去し、かつ処理後の固液分離が容易な低コストの光触媒担持型吸着ビーズを開発した²⁾。しかし、酸化力が弱く反応時間が2時間程度と長い点が課題であった。

そこで本研究では CN の分解速度の向上について検討するため、CN による光触媒分解に寄与する活性酸素種を同定するとともに、一般に酸化処理による水質浄化において反応速度の向上に有効とされているオゾン³⁾や過酸化水素⁴⁾の添加を検討した。除去対象物質は、発がん性のあるアシッドブラック1 (AB1) およびマラカイトグリーン (MG) の2種類の有機色素と、水環境中に広く分布するため薬剤耐性菌の発生が懸念される抗生物質のスルファメトキサゾール (SMX) とした。いずれの物質も途上国で使用量が多く、高濃度の廃水による水環境汚染が問題となっている。

2. 研究方法

2. 1 CN の作製

既存の研究²⁾を参考に、10 g の尿素 (富士フィルム和光純薬(日本)) をるつぼに入れ、電気炉で 550°C で2時間焼成し、室温まで冷却後、メノウ製の乳鉢と乳棒を使用して微粉末にし CN を得た。Surface Area & Size Analyzer (NOVA3200e, Quantachrome, FL)を用いて算出した

BET 比表面積は 65.0 m²/g であった。

2. 2 CN 担持キトサンビーズの作製

既報²⁾に従い、キトサン 1 g を 0.1 mol/L の酢酸溶液 100 mL に加え、さらに CN を加えて 24 時間攪拌することで溶解させ CN-キトサン溶液を作製した。作製した CN-キトサン溶液を 50 g/L のヘキサメタリン酸溶液中にシリンジポンプで送り入れ、一晚浸漬し CN 担持キトサンビーズを作製した。その後、キトサンビーズの洗浄水の pH が 6–7 付近になるまでビーズを純水で洗浄し 28 °C で 2 日間乾燥させ、光触媒吸着剤 CN/CS を得た。さらに等電荷点 pH など、ビーズの吸着に関わる物理的・化学的特性を評価した。

2. 3 色素分解実験と反応種の同定

AB1 と MG は Sigma-Aldrich (米国) より購入した。0.15 g の CN を 10 mg/L の AB1 または MG 溶液 (溶液 pH 6) 300 mL に加え (触媒濃度 0.5 g/L)、約 750 rpm で攪拌しながら 100W のキセノンランプ (放射波長域: 300–780 nm) を 27 cm 真上から照射した明条件 (光束: 78.5 cd)、段ボールで周りを覆い光を遮断した状態で行った暗条件で実験を行った。試料水 (採水量: 3 mL) を経時的に採水し、吸光度計 (UV-1800、島津) で色素濃度 (mg/L) を測定した。

さらに、光触媒反応による色素除去において主に寄与している反応種を確認するために、スカベンジャー添加による反応種の同定を行った。スカベンジャーは特定の反応種と特異的に反応して消費させることで、当該反応種の一連の反応への寄与を抑えることができるため、色素分解に寄与している反応種を同定するのに役立つ。

既存の研究^{6),7)}をもとに設定した、本研究で用いたスカベンジャーと対象反応種の対応を表 1 に示す。スーパーオキシドラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) にはベンゾキノン (BQ, 4 mmol/L)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) にはイソプロパノール (IPA, 40 mmol/L)、 h^+ にはヨウ化カリウム (KI, 1 g/L)、 e^- には二クロム酸カリウム ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 2 mmol/L) をスカベンジャーに用いた。実験では、10 mg/L の AB1 溶液 300 mL にスカベンジャーを表 1 の濃度で添加し、上記と同様に光触媒実験を行った。また、比較のため、二酸化チタン (TiO_2) を光触媒として同様に実験を行った。

表 1. スカベンジャーの種類と対象反応種

スカベンジャー	対象反応種	濃度	文献
ベンゾキノン(BQ)	スーパーオキシドラジカル($\cdot\text{O}_2^-$)	4 mmol/L	Eshaq et al., 2020
2-プロパノール (IPA)	ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)	40 mmol/L	Eshaq et al., 2020
ヨウ化カリウム(KI)	正孔(h^+)	1 g/L	Trandafilovic et al., 2017
二クロム酸カリウム($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	電子(e^-)	2 mmol/L	Eshaq et al., 2020

2. 4 オゾンと光触媒による SMX 分解実験

SMX は（富士フィルム和光純薬(日本)）から購入した。10 mg/L の SMX 溶液 200 mL (pH7) を、上面が石英ガラス製の密閉容器に入れ、CN 0.10 g を入れて攪拌し、300W キセノンランプにより可視光（波長 400 nm—600 nm）を上方 20 cm から照射した。純酸素から作成したオゾン気体（10.5 g/m³）を、微細な気泡を発生させる曝気用セラミック球により毎分 100 mL で試料水中に注入した（O₃ 注入量 1.05 mg/min）。過酸化水素は実験開始直前に 10 mg/L になるよう注入した。容器は水道水により常に冷却されている（図1）。これらにより、CN とオゾン、CN と過酸化水素、CN とオゾン+過酸化水素の各相乗効果による SMX の除去速度の変化を調べた。これらの結果から、SMX が可視光照射下でオゾンあるいは過酸化水素の添加によって実用的に除去可能か評価した。また、比較として光照射のない暗所での実験を行った。試料は 10 分毎に 3 mL 程度を採取し、孔径 0.45 μm の親水性フィルターでろ過したのちに SMX 濃度を吸光度計（UV-1800、島津）で測定した。

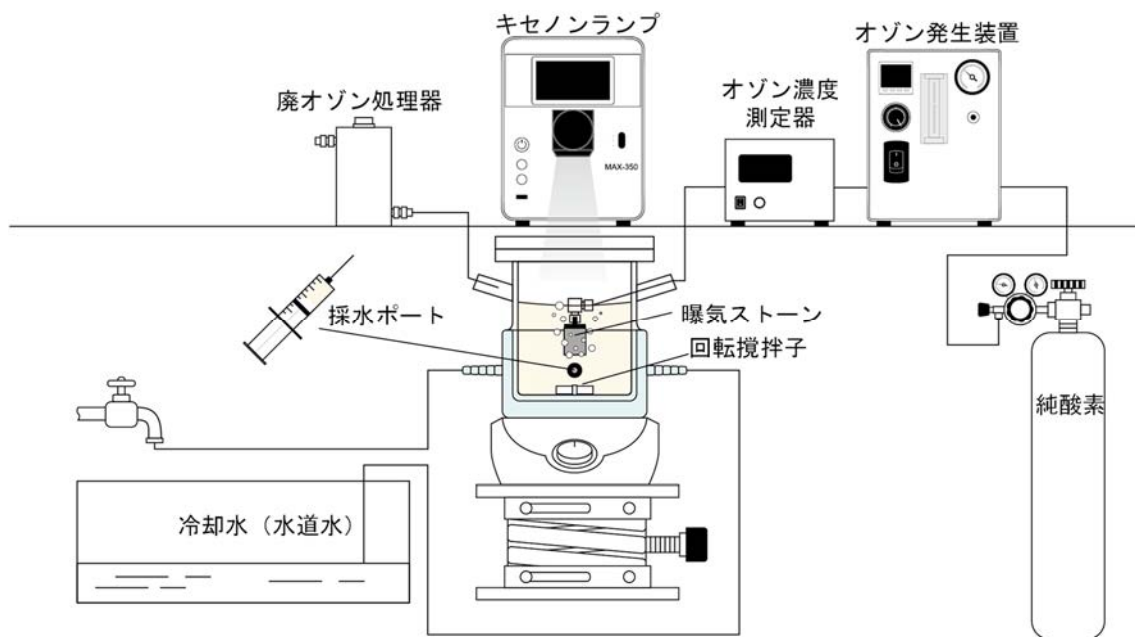


図1 オゾン実験の装置構成

3. 研究成果

3. 1 CN 担持キトサンビーズによる有機色素の吸着・分解実験

図2左、図2右に CN 担持キトサンビーズによる AB1 と MG の吸着・分解実験結果をそれぞれ示す。AB1 に関しては、暗条件では pH3、6、9 すべてにおいて濃度が減少せず、AB1 がほぼ吸着していないことがわかった。これに対し、キセノンランプを照射した明条件では AB1 の除去が見られたことから、光触媒反応により色素が分解されたと考えられる。除去速度は pH3 > pH6 > pH9 と pH が低いほど大きかった。これは溶液 pH がキトサンビーズの等電点 pH であ

る 5.42 より低い条件ではキトサンビーズ表面が電気的中性、溶液 pH が等電点 pH より高い条件ではキトサンビーズ表面が負に帯電するため、溶液 pH6、9 では陰イオンである AB1 と吸着剤表面が電氣的に反発し、AB1 が吸着剤表面で起こる光触媒反応の影響を受けにくかったためであると考えられる。さらに、CN の光触媒反応において酸性条件下では $\cdot\text{O}_2^-$ 生成が促進されるとともに e^- と h^+ の再結合が抑制される⁸⁾ことも pH3 で最も分解が速かった要因と考えられる。一方、実験時間が長くなった pH6 と pH9 では 600–1440 分の間に光触媒担持吸着剤が攪拌によって細かいフレーク状になっていく様子が目視で確認された。ビーズ状であった CN 担持キトサンビーズが細かいフレーク状になると比表面積が増すと考えられるため、この間の色素除去速度は増加した可能性があることに留意が必要である。

MG を用いた実験 (図 2 右) では、暗条件では C/C_0 は約 0.4–0.8 の間で吸着平衡に達したのに対し、明条件では C/C_0 がほぼ 0 になるまで色素を除去することができた。光触媒反応により吸着容量以上の色素を除去することができたといえる。明条件では最終的に溶液 pH が 3、6、9 の順で除去速度が大きかった。CN による MG の分解速度は比較的遅いため、明条件における CN 担持キトサンビーズによる MG の除去は実験初期 (開始から 200 分程度まで) では吸着と分解が同程度、それ以降は分解が卓越したと考えられる。CN は酸性条件下で光触媒反応が促進される⁹⁾ため、AB1 と同様、明条件では溶液 pH3、6、9 の順で最終的な MG の除去速度が大きかったと考えられた。

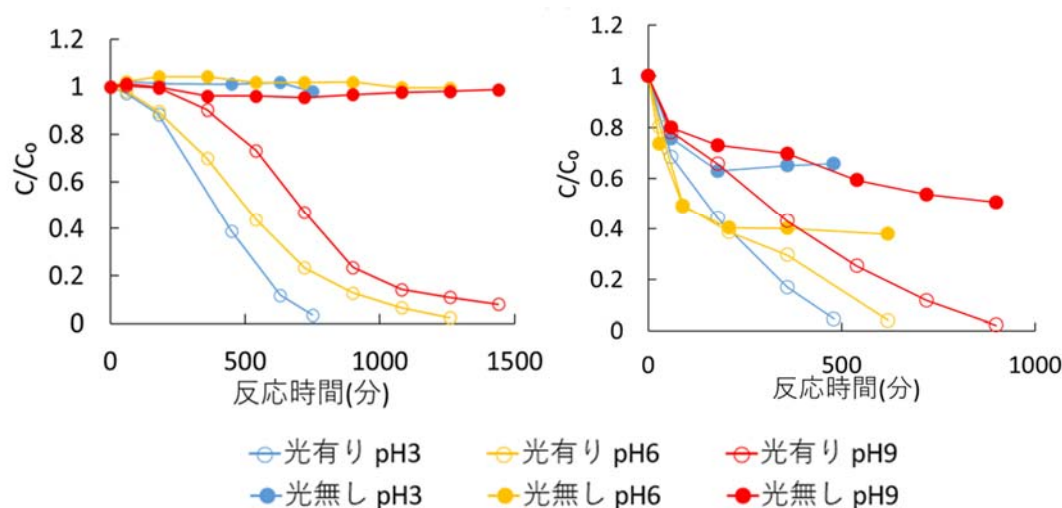


図 2 左) CN 担持キトサンビーズによる有機色素の吸着・除去実験結果。右は AB1、左は MG。縦軸は初期濃度に対する濃度比を示す。

3. 2 CN による有機色素の分解に寄与する活性酸素種の同定

スカベンジャーを添加した AB1 の光触媒色素分解実験結果を、CN を使用した場合を図 3 左に、二酸化チタン (TiO_2) を使用した場合を図 3 右に示す。

CN、 TiO_2 いずれにおいても、スーパーオキシドアニオン ($\cdot\text{O}_2^-$) を捕捉するベンゾキノン

(BQ) を添加すると AB1 の分解が抑制された。また、KI (h^+ のスカベンジャー) と $K_2Cr_2O_7$ (e^- のスカベンジャー) を添加した場合、スカベンジャーなしの場合に比べて反応速度が低下したが、その差は小さかった。よって、CN による AB1 の分解において h^+ と e^- の影響は小さいと考えられた。

これに対し、紫外線で駆動する TiO_2 を光触媒に用いて同様に実験した結果、KI および $K_2Cr_2O_7$ を添加した場合にスカベンジャーなしの場合に比べて大きく反応速度が低下しており、 h^+ と e^- の AB1 分解への寄与が大きいことが確認できた。CN における AB1 分解への h^+ の寄与が TiO_2 に比べ小さかった理由には、CB (伝導帯)/VB (価電子帯) の関係から CN によって生成された h^+ は OH^- を $\cdot OH$ に酸化することができない⁹⁾ ことが挙げられる。一方、 TiO_2 は OH^- を $\cdot OH$ に酸化することができるため、KI により h^+ の生成が抑えられると $\cdot OH$ の生成も抑制され、AB1 の分解速度が低下したと考えられる。また、 TiO_2 は CN よりも e^- 、 h^+ 、 $\cdot OH$ の寄与が大きいため、複数の反応種が複合的に AB1 分解に関わっていたと考えられる。 TiO_2 では反応種が複合的に物質分解に関わる点はヒドロキシ安息香酸 (p-HBA) の分解でも示されている⁹⁾。

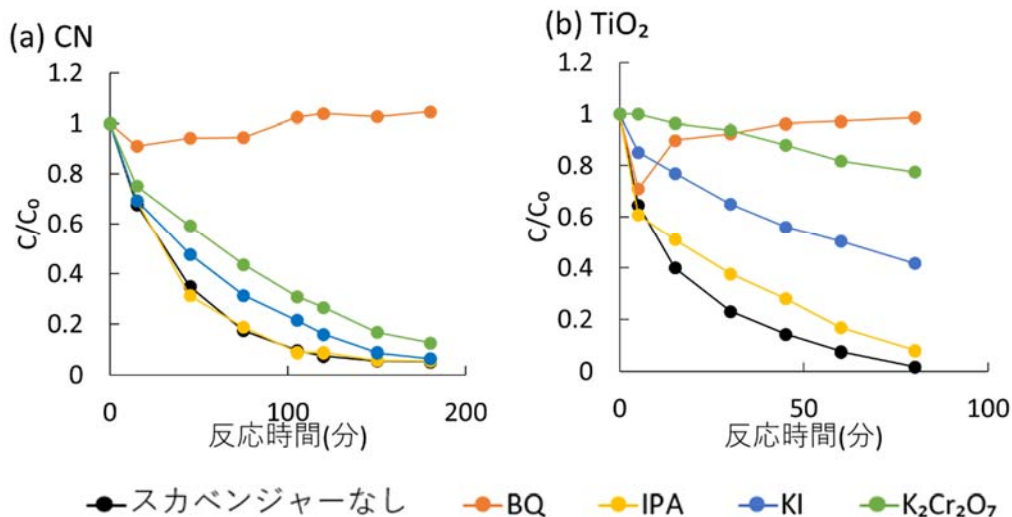


図3 左) CN による AB1 の光触媒分解におけるスカベンジャーの効果、右) CN 担持キトサンビーズによる AB1 の除去特性と溶液 pH の関係 (縦軸は初期濃度に対する濃度比)

3. 3 CN による SMX の光触媒分解とオゾン・過酸化水素添加の効果

CN による SMX の光触媒分解において過酸化水素添加が及ぼす影響を図4に、オゾン添加が及ぼす影響を図5に示す。

SMX は可視光照射のみや、可視光+過酸化水素、CN (暗条件)、CN および過酸化水素 (暗条件) では濃度が変化せず、分解が生じなかった (図4)。一方、可視光照射下の CN と、可視光照射下の CN+過酸化水素では SMX 濃度が低下し、分解が生じたと考えられる。しかしながら、CN と過酸化水素を組み合わせると、CN 単独の光照射の場合より分解速度が小さかった。これ

は、CNの光触媒反応によって生じた反応種の一部が過酸化水素により消費されたためである可能性がある。これらのことより、促進酸化法を用いた水質浄化においてしばしば用いられる過酸化水素の添加は、CNの光触媒反応を促進しないと考えられた。既存の報告では、UV照射によるSMXの分解が過酸化水素の添加によって加速しており⁴⁾、本研究の可視光を用いた実験結果と対比的であった。

一方、試料水にオゾンを追加（光照射なし）すると、SMXは急速に濃度が減少した（図5）。SMXの分解にオゾンが有効であることは既存研究⁴⁾とも調和的である。ここに可視光照射下のCNを組み合わせた場合、SMXの分解速度はオゾン単独に比べて増加したが、増加した割合は数%と小さかった。これは、オゾンとSMXの反応性の高さからSMXの分解速度がCNによる光触媒分解速度に比べて大きいことが一因とも考えられる。今後はCNの光触媒活性の向上に加えて、オゾン単独では分解しにくい物質を対象に検討していきたい。

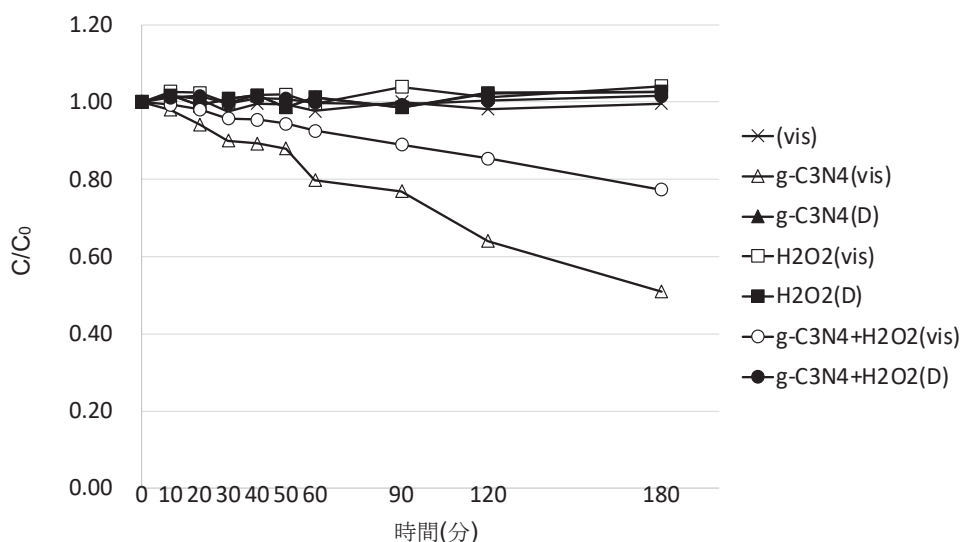


図4左 可視光照射下のCNによるSMXの光触媒分解特性と過酸化水素添加の効果（縦軸は初期濃度に対する濃度比。Visは可視光照射条件、Dは光照射なしの条件を表す）。

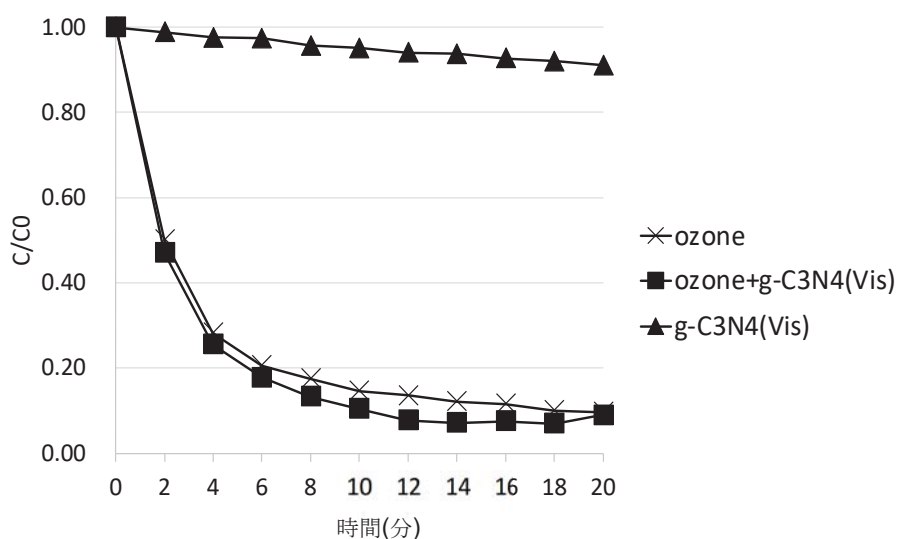


図5 可視光照射下のCNによるSMXの光触媒分解特性とオゾン添加の効果（縦軸は初期濃度に対する濃度比。Visは可視光照射条件を表す）。

4. 今後の展望

CNの有機色素の分解には $\cdot\text{O}_2^-$ が最も寄与していることが示されたが、CNによる汚染物質の分解力の向上には、 TiO_2 のように、光触媒反応で生成する $\cdot\text{O}_2^-$ 以外の反応種がより分解反応に寄与することが必要である。今後は、CNと他の光触媒とのヘテロ結合やドーピング等により、可視光駆動かつ、より光触媒活性の高いCNベースの光触媒の活用が求められる。これにより、光触媒とオゾンの併用においても、より速い分解が期待できる。今後はSMXの分解においてもスカベンジャー添加実験による活性酸素種を同定することで、SMXのオゾン+光触媒による分解に関与する反応種とメカニズムを明らかにすることができると考えられる。また、総有機炭素(TOC)を分析することによるSMXの無機化割合の測定や、光触媒をキトサン等の吸着剤に担持した場合のSMXの分解特性を調べる予定である。

光触媒による水質浄化技術は近年盛んに研究が行われているが、CNを用いた研究や、キトサン担持させた光触媒担持型吸着剤に関しては研究例が少なく、今後の研究余地は大きいと考えられる。また、カニ殻から得られるキトサンは医療や美容分野で使われているが、水質浄化に活用できれば富山のカニの付加価値向上・産業振興につながる可能性もある。

5. 参考文献

1. Zhong, J., Jiang, H., Wang, Z., Yu, Z., Wang, L., Mueller, J.F., and Guo, J. (2021) Efficient photocatalytic destruction of recalcitrant micropollutants using graphitic carbon nitride under simulated sunlight irradiation, *Environmental Science and Ecotechnology* 5; 100079.
2. 羽間悠菜・黒田啓介 (2022) グラフィティックカーボンナイトライドを用いた可視光駆動型

光触媒吸着剤による色素除去、第 56 回日本水環境学会年会要旨集、2022.3.16 (富山)

3. Xiao, J., Xie, Y., Rabeah, J., Brückner, A., and Cao, H. (2020) Visible-Light Photocatalytic Ozonation Using Graphitic C_3N_4 Catalysts: A Hydroxyl Radical Manufacturer for Wastewater Treatment, *Acc. Chem. Res.* 53, 5, 1024–1033.
4. Martini, J., Orge, C.A., Faria, J.L., Pereira, M.F.R., and Soares, O.S.G.P. (2018) Sulfamethoxazole degradation by combination of advanced oxidation processes, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 4054–4060.
5. Zheng, Y., Zhang, Z., and Li, C (2017) A comparison of graphitic carbon nitrides synthesized from different precursors through pyrolysis, *J. Photochem. Photobiol. A* 332; 32–44.
6. Eshaq, G., Wang, S., Sun, H., and Sillanpää, M. (2020) Core/shell $FeVO_4@BiOCl$ heterojunction as a durable heterogeneous Fenton catalyst for the efficient sonophotocatalytic degradation of p-nitrophenol, *Sep. Purif. Technol.* 231; 115915.
7. Trandafilovic, L.V., Jovanovica, D.J., Zhang, X., Ptasinska, S., and Dramicanin, M.D. (2017) Enhanced photocatalytic degradation of methylene blue and methylorange by $ZnO:Eu$ nanoparticles, *Appl. Catal. B.* 203; 740–752.
8. Fang, S., Lv, K., Ye, H., Du, D., and Li, M. (2015) Effect of acid on the photocatalytic degradation of rhodamine B over g- C_3N_4 , *Appl. Surf. Sci.* 358; 336–342.
9. Asif, A., Rafique, N., Hirani, R., Wu, H., Shi, L., Zhang, S., Wang, S., Yin, Y., Saunders, M., and Sun, H. (2022) Morphology/facet-dependent photo-Fenton-like degradation of pharmaceuticals and personal care products over hematite nanocrystals, *Chem. Eng. J.* 432; 134429.

研究題目	有機溶媒耐性微生物を利用した環境調和型 物質生産システムの構築
機関名	富山県立大学
研究代表者	工学部 生物工学科・講師・戸田 弘
分野	生物工学
キーワード	有機溶媒耐性菌、代謝工学

1. 研究の背景と目的

近年の合成生物学の発展に伴い、バイオプロセスによる有用物質生産の研究が加速している。しかし、これらの多くのバイオプロセスは水系反応で行われるため、医薬品中間体などの難水溶性化合物を対象とした微生物変換などでは、高濃度の基質を反応させることが困難である。この課題解決の一つアプローチとして、有機溶媒-水二相系反応が用いられるが、従来宿主として利用されてきた大腸菌宿主は有機溶媒耐性が低く、酵素菌体の失活による反応持続性の低下が問題となる。こうした課題解決のために、近年 *Rhodococcus* 属細菌や *Pseudomonas* 属細菌などの有機溶媒耐性菌を利用した物質生産プロセスが研究されている。我々はこれまでに、有機溶媒耐性菌 *Kocuria rhizophila* を利用したスチレン酸化酵素の発現及びキラル化合物の生産等について研究しており、また当該細菌で利用可能な新規シャトルベクターなどの開発も行っている(参考文献 1、2)。そこで本研究では、*K. rhizophila* DC2201 が有する有機溶媒耐性機構の解明や、代謝系遺伝子改変による有用物質生産について研究を行った。

2. 研究方法

K. rhizophila DC2201 が示す有機溶媒耐性機構の解明

有機溶媒耐性に関与する遺伝子を推測するために、次世代シーケンス(NGS)を用いた RNA 転写量の網羅的解析を試みた。*K. rhizophila* DC2201 を 100mL の LB 培地に植菌し、OD₆₆₀ が 0.5 になるまで 30℃ で振とう培養した。OD₆₆₀ が 0.5 に到達した時点で、終濃度が 10% になるようにジメチルホルムアミド(DMF)を添加し、培養を継続した。コントロールとして、DMF 未処理群についても培養を行った。DMF 添加後 30 分および 2 時間において、DMF 処理群および未処理群それぞれから培養液をサンプリングし、菌体を回収後市販の RNA 抽出キット(マッハライ・ナーゲル社)を用いて全 RNA の抽出精製を行った。抽出した RNA の NGS 解析およびデータ解析は日本ジーンウィズ株式会社に委託した。

K. rhizophila DC2201 代謝改変株による有用物質生産

データベースより各種生物由来フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)および桂皮酸脱炭酸酵素(FDC, PAD) 遺伝子の配列をそれぞれ取得し、遺伝子の合成を行った。遺伝

子合成は日本ジーンウィズ株式会社に委託した。またその際、アミノ酸のコドンをも *K. rhizophila* DC2201 に最適化した。合成した遺伝子をプラスミド抽出により調製後、制限酵素を用いて切断し、目的遺伝子の精製を行った。*Kocuria* 用発現ベクター pKITE101P および pKITE303P に PAL 遺伝子および FDC/PAD 遺伝子をそれぞれクローニングした後、*K. rhizophila* DC2201 へ導入した。得られた形質転換体を LB 液体培地で培養し、培養上清を回収したのちに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて桂皮酸およびスチレン蓄積量を分析した。

スチレン生産量の向上を目的として、*K. rhizophila* DC2201 代謝系の改変を試みた。芳香族アミノ酸であるトリプトファンおよびチロシン生合成に関与する TrpE および TyrA 両遺伝子破壊株の作成を行った。両遺伝子の周辺領域を含む約 3kbp のゲノム配列を PCR により増幅し、クローニングベクターへクローニングした。得られたプラスミドに対して inverse PCR を行うことで、TrpE および TyrA 遺伝子を欠損する形で増幅を行いライゲーション後大腸菌へ導入し TrpE、TyrA 両遺伝子欠損用カセットを作成した。作製した遺伝子破壊カセットを *K. rhizophila* DC2201 ゲノム破壊用プラスミド pKITE101 Δ RepA2SacB へクローニングし、それぞれ TrpE 破壊用プラスミド(pKITE101 Δ RepA2SacB-KrTrpE Δ)および TyrA 破壊用プラスミド(pKITE101 Δ RepA2SacB-KrTyrA Δ)を得た。作製したゲノム破壊用プラスミドを *K. rhizophila* DC2201 へ導入し、相同組換えを行わせたのちスクロース感受性を利用したスクリーニングにより TrpE 破壊株および TyrA 破壊株をそれぞれ得た。また、TrpE 破壊株に対し、TyrA 破壊用プラスミドを用いて上記の操作を再度行うことで、TrpE、TyrA 二重破壊株を作成した。得られた各破壊株を宿主として、PAL 発現プラスミド(pKITE101P-PAL)および FDC/PAD 発現プラスミド(pKITE303P-FDC-PAD)を導入し、桂皮酸およびスチレン生産量の変化について検討した。

水-有機溶媒二相系反応によるスチレン生産を検討するため、スチレン生産菌株を LB 培地で培養し培養菌体を調製した。培養菌体を遠心分離により回収し、無機塩最小培地に菌体湿重量で 10%(w/v)になるように懸濁し、炭素源として 2%グルコースを添加した。この菌体懸濁培地に 1/10 容の各種有機溶媒を添加し、30℃で振とう培養した。経時的に有機溶媒相を回収し、フィルタ処理後 HPLC により有機溶媒中へのスチレン蓄積量を分析した。

K. rhizophila DC2201 を利用したアスタキサンチン生産を目的として、代謝系改変およびカロテノイド合成遺伝子の導入を試みた。*K. rhizophila* DC2201 の内在性カロテノイド合成遺伝子である CrtEb を破壊するために、前述と同様の手法により CrtEb 破壊用プラスミド pKITE101 Δ RepA2SacB-KrCrtEb Δ を得た。このプラスミドを用いて前述同様に *K. rhizophila* DC2201 の遺伝子破壊を行い、CrtEb 破壊株を得た。

アスタキサンチン生合成に関与する遺伝子として、CrtY、CrtW、CrtZ のクローニングおよび発現プラスミドの構築を行った。データベースより各種微生物由来 CrtY、CrtW、CrtZ 遺伝子配列を取得し、遺伝子合成を行った。遺伝子合成は日本ジーンウィズ株式会社に委託した。合成し

た遺伝子を *Kocuria* 用発現ベクター-pKITE101P および pKITE303P ヘクローニングし、pKITE101P-CrtY および pKITE303P-CrtW-CrtZ を得た。作成した *K. rhizophila* DC2201 ΔCrtEb 株に上述の発現プラスミドを導入し、形質転換体を得た。形質転換菌体を LB 培地で培養し、培養菌体からメタノール-クロロホルム(3:1)を用いてカロテノイド類の抽出および HPLC による分析を行った。

3. 研究成果

網羅的 RNA 転写量解析による *K. rhizophila* DC2201 の有機溶媒耐性関連遺伝子の推測

10%DMF 処理および未処理両試験群の菌体より抽出した RNA を次世代シーケンスにより網羅的に解析した結果、転写量が 2 倍以上に上昇した遺伝子が 336、1/2 以下に減少した遺伝子が 287 見いだされた。転写量が上昇した遺伝子の属性を解析した結果、転写調節因子、トランスポーター、分子シャペロン、細胞膜合成など、他の微生物において有機溶媒耐性との関連が報告されている遺伝子が多く見いだされた(図)。これらに加え、本菌株に特徴的な遺伝子として細胞外多糖合成酵素関連酵素の遺伝子が多数見いだされた。このことより、*K. rhizophila* DC2201 では有機溶媒に曝露した際に細胞外多糖類の分泌量が大きく増加することが示唆される。本菌株と同じグラム陽性細菌である *Rhodococcus* 属細菌において、菌体外多糖類がその有機溶媒耐性に関与していることが報告されていることから(参考文献 4)、本菌株でも同様に細胞外に多糖類を分泌し、菌体周辺の親水性を上昇させることにより相性化合物からのバリア機能を強化していることが推測される。現在、これらの遺伝子の破壊株の作成及び有機溶媒耐性に及ぼす影響について検討している。

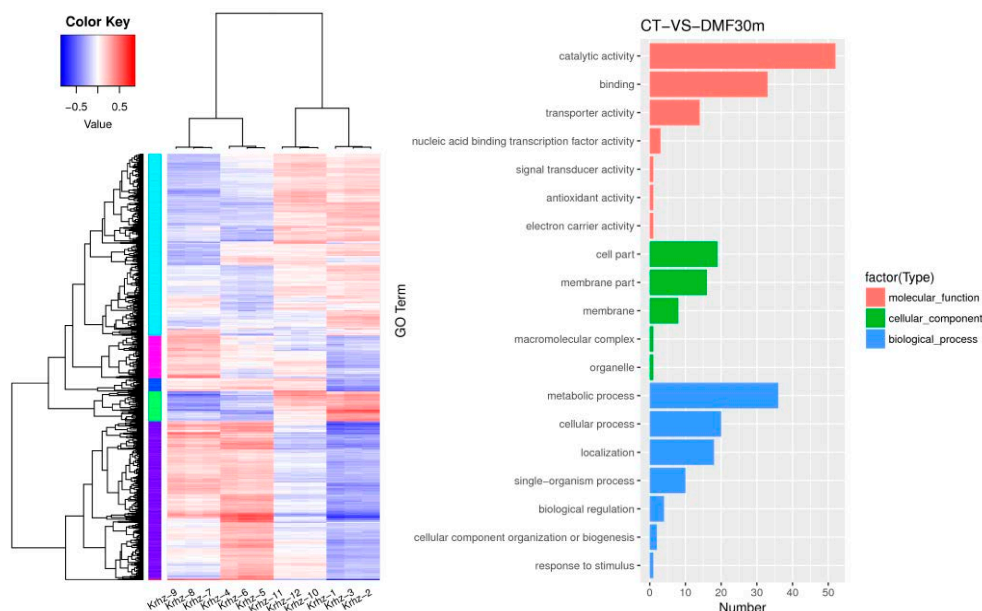


図1 RNA シーケンスによる、有機溶媒曝露下における遺伝子転写量解析結果

K. rhizophila DC2201 代謝改変株による有用物質生産

バイオマス由来原料を用いて様々な化成品などを生産する、いわゆる「バイオリファイナリー」技術は近年目覚ましい発展を遂げており、バイオエタノールやバイオプラスチック原料などすでに国内外において実用化が進んでいるものも多数ある。バイオリファイナリーにおいては大腸菌が主な微生物宿主として利用されているが、有機溶媒や細胞毒性の強い化合物に対する耐性はさほど高いものではなく、こうした化合物をターゲットとするバイオプロセスにおいては酵素や菌体の死滅・失活による生産性の低下が問題となる。この課題を解決するために、有機溶媒などに高い耐性を示す耐性菌を宿主として物質生産を行うことが研究されている。本研究で使用している *K. rhizophila* DC2201 は NEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構)のプロジェクトの一環でその有機溶媒耐性の高さが見いだされ、ゲノム配列の解析が完了するなどバイオリファイナリー技術の宿主として期待される菌である(参考文献 3)。

K. rhizophila DC2201 を利用した有用族化合物生産のモデルケースとして、芳香族化合物であるスチレンの生産を試みた。スチレンの生合成は、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンを出発物質として PAL による脱アミノ反応および FDC/PDA による脱炭酸反応の 2 段階により行われる(図 2)。これらの酵素は各種植物や微生物において見いだされており、データベースにその遺伝子配列が登録されている。そこでデータベースよりこれらの酵素遺伝子の配列を取得し、その遺伝子合成を行った。合成対象として *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)由来 AtPAL, *Rhodotolura glutinis* 由来 RgPAL, *R. toruloides* 由来 RtPAL, *Saccharomyces cerevisiae* (酵母)由来 ScFDC1, PAD をそれぞれ選択し合成した。合成遺伝子をそれぞれ *Kocuria* 用発現ベクター pKITE101P および pKITE303P へクローニングし *K. rhizophila* DC2201 へ導入した結果、いずれの遺伝子も *Kocuria* 菌体内で正常に発現し、それぞれ有意な酵素活性を発現することが確認された。両酵素の活性が確認された組換え菌体を用いて、グルコースからのスチレン生産を試みた。無機塩培地に菌体湿重量 10%になるように組換え菌体を懸濁し、2%グルコースを炭素源として培養した結果、培養 24 時間後に約 0.07mM のスチレンが培地中に蓄積した。このことより、組換え菌体において構築した人工代謝系が正常に機能し、フェニルアラニンからスチレンが生産されていると示唆される。

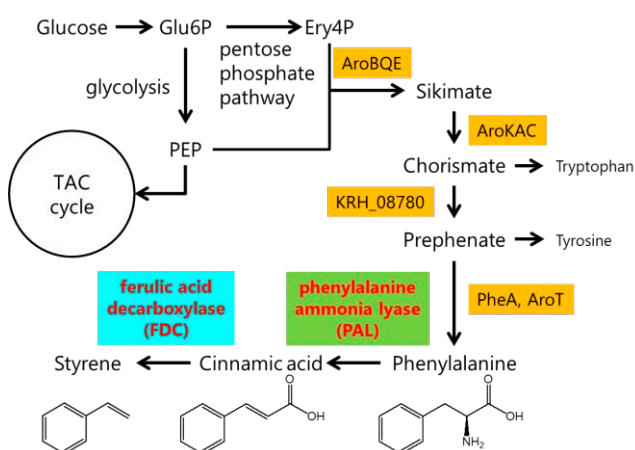


図 2 芳香族アミノ酸生合成およびスチレン生合成経路

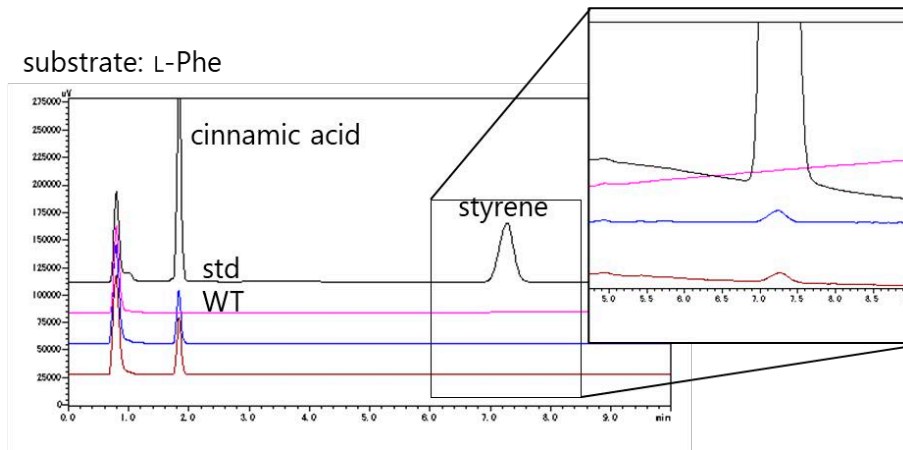


図3 スチレン生合成経路遺伝子導入株によるスチレン生産のHPLC分析結果

スチレン生産性を向上させるために、芳香族アミノ酸代謝系改変株の作成を行った。芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、トリプトファン、チロシンはいずれもシキミ酸経路を経由して生合成される。よって、トリプトファンおよびチロシン生合成に関与する遺伝子を破壊することでフェニルアラニン生産量が増加し、スチレン生産量が向上することが期待される。トリプトファン合成遺伝子 *TrpE* およびチロシン合成遺伝子 *TyrA* をそれぞれ破壊した株及びいずれも破壊した二重破壊株を作成し、それぞれに対して *PAL*, *FDC*, *PAD* 遺伝子を導入した。各形質転換体を用いて、上記と同様に無機塩培地を用いたグルコースからのスチレン生産を試みた結果、*TrpE* 破壊株において 0.18 mM、*TyrA* 破壊株において 0.2 mM、二重破壊株において 0.5 mM のスチレン生産が確認された(図4)。この結果から、芳香族アミノ酸生合成経路の改変により、フェニルアラニン生産量が向上し、結果としてスチレン生産量が向上したと考えられる。

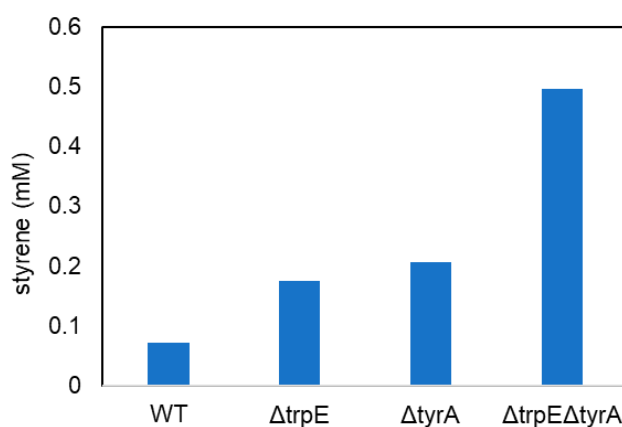


図4 *TrpE* および *TyrA* 破壊株を宿主としたスチレン生産量の変化

スチレンは細胞毒性の強い化合物であり、培地中に蓄積するスチレンにより宿主細胞が損傷を受け、最終的には死滅する。このことはスチレンを連続的にかつ高濃度で生産させるために解

決すべき課題である。2-プロパノールや1-ブタノールなど他の化合物においても、生成物を随時反応系中から除去することで細胞毒性を低下させ、生産性が向上することが報告されている。本研究では、有機溶媒-水二相系培養を行うことにより、生産されたスチレンを速やかに有機溶媒中に拡散させることで培地中スチレン濃度を低濃度に保たせ、細胞毒性の低下及び生産性の向上を試みた。TrpE, TyrA 二重破壊株を宿主としたスチレン生産菌体を懸濁した無機塩培地に、1/10 容の各種有機溶媒を添加し培養を行った。その結果、n-オクタンを重層した反応系において48時間反応後9.92 mMのスチレンが有機溶媒相に蓄積することが明らかとなった(図5)。反応系全体に換算すると0.99 mMとなり、有機溶媒未添加時(0.5mM)の約2倍量となる。よって、有機溶媒を重層することで培地中のスチレンが除去され、細胞への毒性低減およびスチレン生産性の向上へつながったと推測される。

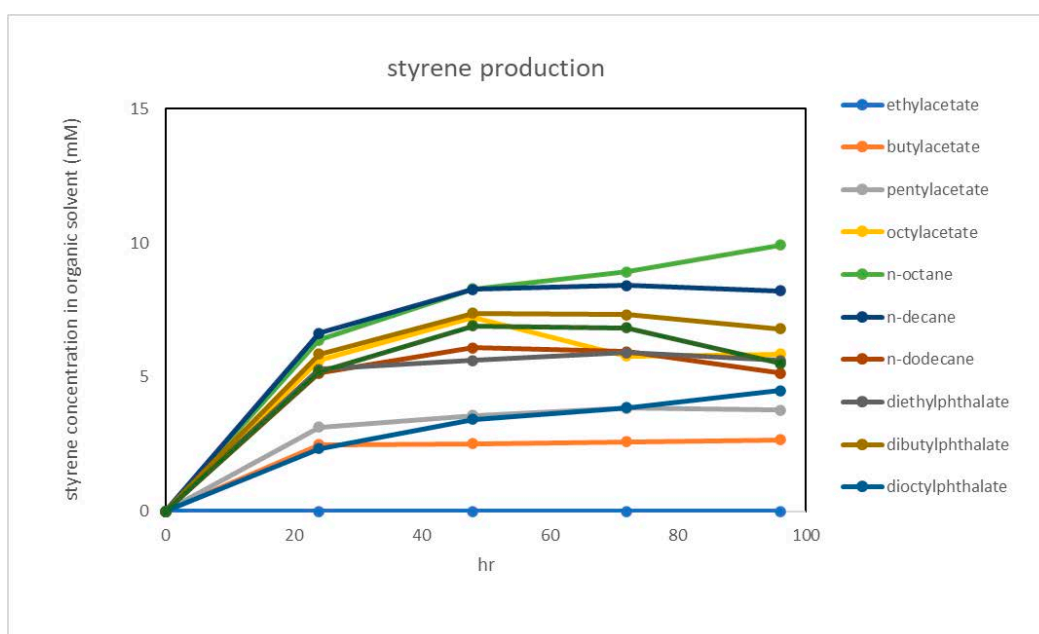


図5 有機溶媒-水二相系培養によるスチレン生産量の変化

カロテノイド化合物は様々な生物に含まれるテルペノイドの一種であり、高い抗酸化活性を示すものが多い。このことから、近年β-カロテンやリコペン、アスタキサンチンなどがサプリメントや化粧品成分として需要が高まっており、その効率的な生産法が研究されている。現在主な生産法としては化学合成法や藻類を用いたものが主流であるが、微生物を用いた未利用バイオマスからの生産法が確立されれば、SDGsの観点などからも望ましい。*Kocuria* 属細菌は内在性のカロテノイド生合成経路を有し、各種カロテノイドを生産している。本研究で用いている *K. rhizophila* DC2201 もデカプレノキサンチンなどの C₅₀カロテノイドを生合成、蓄積している。そこで、本菌のカロテノイド生合成経路を代謝改変することで、β-カロテンやアスタキサンチンといった工業的に利用価値の高いカロテノイドを効率的に生産することを目指した。

本菌が生産するデカプレノキササンチンは、リコペンを出発物質として *CrtEb*、*CrtYe* などの働きにより合成されている。一方、 β -カロテンやアスタキササンチンは *CrtY*、*CrtZ*、*CrtW* の活性によりリコペンから合成される。よって、*CrtEb* を破壊することでリコペン蓄積株を作成し、さらに外来遺伝子として *CrtYWZ* を導入することで β -カロテンやアスタキササンチンを合成できると考え、これら破壊株および外来遺伝子発現系の作成を行った。上述の芳香族アミノ酸合成遺伝子破壊株と同様の手法により *CrtEb* 破壊株を作成した結果、得られた菌体のコロニーの色が野生株の黄色からピンク色に変化した(図 6)。これはリコペンが有意に蓄積していることを示唆している。この破壊株からカロテノイドを抽出し HPLC にて分析した結果、野生株で見られるピークが消失し、リコペンのピークが増加していたことから破壊株において有意にリコペンが蓄積していることが確認された。

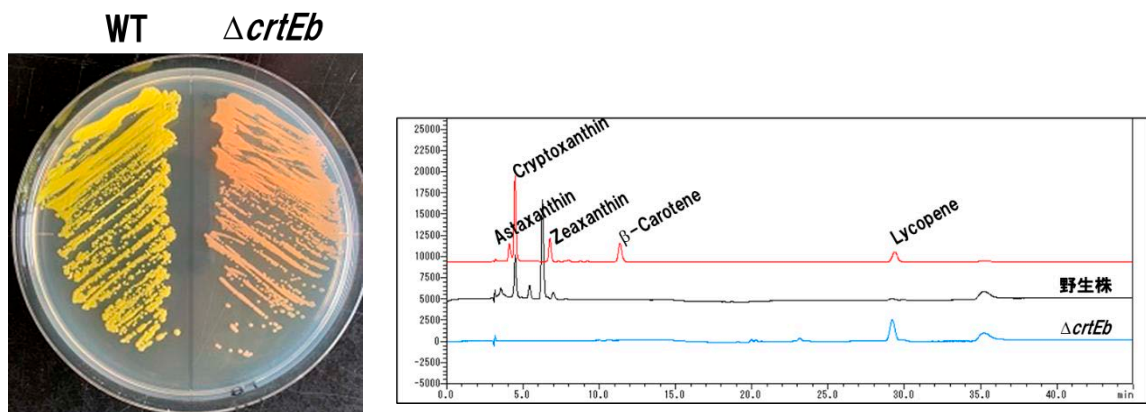


図 6 *CrtEb* 破壊株のコロニー形態および HPLC による細胞内カロテノイド分析結果

作成した *CrtEb* 破壊株に、各種微生物由来 *CrtY*、*CrtW*、*CrtZ* 遺伝子を発現ベクターを用いて導入し、 β -カロテン、カンサキササンチン、ゼアキササンチン、アスタキササンチンの生産について検討した。*Paracoccus haeundensis* 由来 *CrtY* 導入株において有意にリコペンのピークが減少し、代わりに β -カロテンのピークが得られたことから、本遺伝子が *K. rhizophila* DC2201 細胞内で発現しリコペンから β -カロテンを合成していることが明らかとなった。さらに、*CrtY* と *Brevundimonas aurantiaca* 由来 *CrtW*、もしくは *Pantoea ananatis* 由来 *CrtZ* をそれぞれ導入した株では、カンサキササンチンおよびゼアキササンチンの生産がそれぞれ確認された(図 7)。しかし、*CrtY*、*CrtW*、*CrtZ* の三遺伝子を同時に導入した株では、アスタキササンチンの生産は極微量であり検出限界以下であった。カンサキササンチンおよびゼアキササンチンを基質として、変換反応を試みた結果 *CrtZ* の活性が極弱かつ弱かつたことから、三遺伝子を導入することで *CrtZ* 遺伝子の発現量が低下したことが推測される。

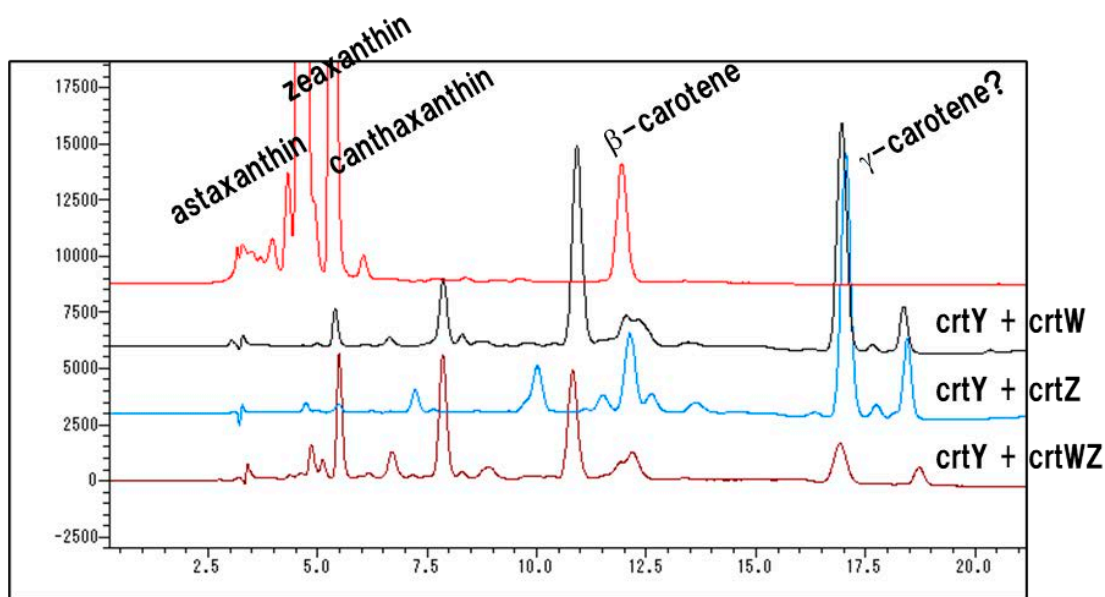


図7 HPLCによるCrtYWZ導入株の蓄積カロテノイド分析

4. 今後の展望

有機溶媒耐性に関与すると推測される遺伝子群を特定するために、転写量が特に顕著に上昇した約30遺伝子について破壊株および過剰発現株を作成中である。それら破壊株、過剰発現株について有機溶媒耐性を評価し、顕著に変化が見られた遺伝子について改変を加えることで、*K. rhizophila* DC2201の有機溶媒耐性をさらに向上させることが可能であると考えられる。宿主の有機溶媒耐性が向上することは、二相系反応などを行うにあたり使用可能な有機溶媒の選択肢が増えることやより毒性が強い化合物も合成可能になるなど、バイオプロセスによる物質生産の可能性を大きく広げることにつながると期待される。

K. rhizophila DC2201の代謝改変により、芳香族化合物であるスチレンおよびカロテノイド化合物であるβ-カロテン、ゼアキサンチン、カンサキサンチンの合成が可能であることが明らかとなった。このことから、*K. rhizophila* DC2201が各種物質生産に有用な微生物宿主であると期待される。今後、他の化合物の生産にも適用することを検討する。

5. 参考文献

1. H. Toda, T. Koyanagi, T. Enomoto, N. Itoh, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124, 255-262 (2017)
2. H. Toda, N. Itoh, *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2017.02313 (2017)
3. K. Fujita, et al., *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 511-518 (2006)
4. N. Iwabuchi, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30, 51-60 (2003)

研究題目	ビタミンD 充足に向けた診断・予防法の開発
機関名	富山県立大学
研究代表者	工学部 医薬品工学科・准教授・安田佳織
分野	生化学、薬物代謝
キーワード	ビタミンD、代謝

1. 研究の背景と目的

超高齢社会に突入した現代の日本において、丈夫な骨や筋力を維持し健康を保つことは重要課題である。骨や筋肉の形成には、ビタミンDが重要な役割を果たす。食品から摂取、もしくは皮膚で生合成されたビタミンD3は、体内で、25-ヒドロキシビタミンD3 (25D3) を経て、1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD3 (1,25D3) へと代謝され、ビタミンDレセプター (VDR) と結合することで種々の生理作用を示す (図1)。

活性型は1,25D3であるが、体内では大部分が25D3として存在し、血中25D3濃度が低くなるほど、骨粗鬆症や癌、また筋力低下のリスクが高まることが知られている。日本では、近年の生活習慣により血中25D3の不足・欠乏者の割合が増加しており、ビタミンD3の積極的摂取が望まれている。

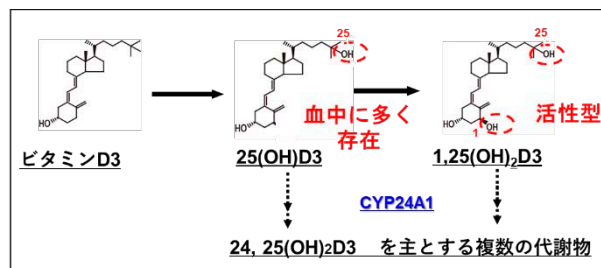


図1 ビタミンDの代謝経路

我々は、近年、複数のビタミンD遺伝子改変ラットを利用し、25D3が骨粗鬆症・くる病に対する予防・治療の両方に有望であること、一方で、ビタミンD不活性化酵素CYP24A1遺伝子欠損(KO)ラットでは、同量の25D3投与が腎石灰化等の重篤な副作用につながることを明らかにした。これらの結果は、ビタミンD3や25D3の積極的摂取が疾患予防と健康維持に重要であるが、一方で、CYP24A1が機能不全に陥った人の場合、ビタミンD3や25D3の摂取が副作用を引き起こす可能性を示唆している。すなわち、安全にビタミンD3や25D3の積極的摂取を推奨するために、事前に、血中ビタミンD代謝物を簡便かつ安価に測定する技術がきわめて重要になる。LC/MS/MSやELISA法による定量が一般的であるが、本研究では、分割型ルンフェラーゼを利用し、簡便かつ迅速なビタミンD代謝物定量系の開発を目指した。

ビタミンDが関与する疾患の予防・治療に対して25D3摂取が有効である可能性を前述したが、25D3は体内でCYP24A1による代謝を受け不活性化を受けやすい。そこで、重篤なビタミンD欠乏者に対してより効率よくビタミンDの充足を可能にすることを目指し、ビタミンD3や25D3よりもさらに効果持続性の高い25D3型誘導体の探索を行った。

2. 研究方法

2.1 分割型ルシフェラーゼを利用した簡便なビタミン D 代謝物定量系の開発

これまでに、我々は、野生型 VDR のリガンド結合領域 (LBD) と分割型ルシフェラーゼの融合タンパク質を大腸菌で発現させ、得た酵素液をバイオセンサーとするビタミン D 代謝物定量系を開発してきた[1,2]。今回は、生体内の 25D3 濃度をより正確に測定することを目的とし、VDR との結合能の高い 1,25D3 に対する応答を低下させるために、ラット VDR(R270L)の LBD と分割ルシフェラーゼの融合タンパク質を大腸菌内で発現させ、目的タンパクを取得した。取得したバイオセンサーに種々の濃度の 25D3 もしくは 1,25D3 を混合し、30 分間放置した。その後、発光基質であるルシフェリン、ATP を添加し、30 分後の発光値をプレートリーダーで測定した。

2.2 効果持続性の高い 25D3 型誘導体の探索

CYP24A1 活性については、CYP24A1 発現大腸菌の膜画分と電子伝達系を添加した再構成系を用い、代謝解析を行うことで算出した[3,4]。各種酵素や電子伝達系を含む反応溶液に 25D3 もしくはその誘導体を 5 μ M (終濃度) になるように添加し、15 分後、有機溶媒抽出法にて代謝物を得た。得られた代謝物を HPLC にて分析をし、基質から代謝物への変換率を算出した。VDR 結合能については、上述と同様のバイオセンサー (本項目では、ヒト VDR (野生型) の LBD と分割ルシフェラーゼの融合タンパク質を使用) を用いた。

3. 研究成果

3.1 分割型ルシフェラーゼを利用した簡便なビタミン D 代謝物定量系の開発

上述したとおり、これまでに、我々は、VDR のリガンド結合領域 (LBD) と分割型ルシフェラーゼの融合タンパク質を大腸菌で発現させ、得た酵素液をバイオセンサーとするビタミン D 代謝物定量系を開発してきた。このセンサーでは、LBD にリガンドが結合すると、LBD の構造変化に伴い、N 末領域 (LucN) と C 末領域 (LucC) が機能的な複合体を形成できなくなり、発光能を失う[1,2]。今回、血中 25D3 濃度を 1,25D3 と交差しない状態で、より正確に定量することを目的とし、上述の融合タンパク質について、該当する変異体を作製した。ラット VDR の 270 番目のアルギニン (Arg270 ; ヒトの Arg274 に相当) は 1,25D3 の 1 α 位水酸基と水素結合をすることで、1,25D3 との結合に重要な役割を果たすことが知られていることから、Arg270 をロイシンに置換した R270L 変異体の LBD を利用したバイオセンサーを作製し、WT の場合と比較した。その結果、WT の場合と異なり、R270L 変異体のバイオセンサーでは、1,25D3 は、25D3 と同程度まで発光能が著しく低下した (図 2)。生体では、25D3 が 1,25D3 の 500~1000 倍程度の濃度で存在することを考量すると、今回新たに作製したバイオセンサーは、生体試料中の 25D3 濃度測定により適した形のものになったといえる。

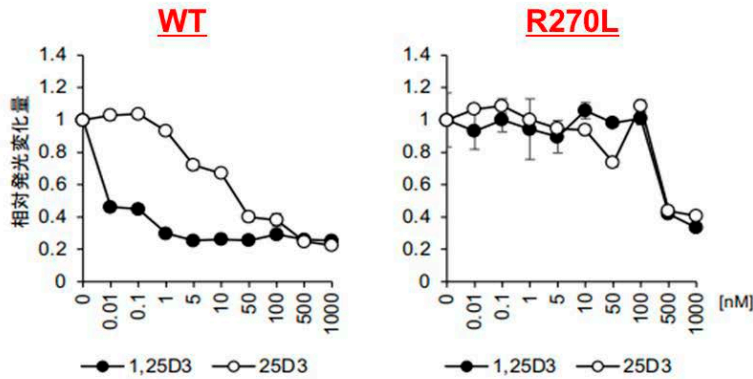


図2 野生型(WT)および変異型(R270L)のVDRリガンド結合領域を利用したバイオセンサーに対する25D3および1,25D3の応答

3.2 効果持続性の高い25D3型誘導体の探索

25D3の積極的摂取はビタミンDが関与する疾患の予防・治療に有望であるが、25D3も1,25D3と同様にVDRを介してCYP24A1による連続的な不活性化を受ける。すなわち、VDRへの結合能を維持しつつ、CYP24A1による不活性化を受けにくい25D3型誘導体は効果持続性が高いといえる。そこで、側鎖にフッ素を導入した8種類の25D3型誘導体について、CYP24A1の代謝活性、VDR結合能評価を行った。両実験の結果から、導入したフッ素基の位置や数により、CYP24A1代謝抵抗性やVDR結合能が大きく異なることがわかった。誘導体の中には、25D3に比べて顕著に高い結合能を有しつつ、CYP24A1代謝抵抗性を有するものも存在し、24,24F2-25D3は有望な誘導体になる可能性が高い。

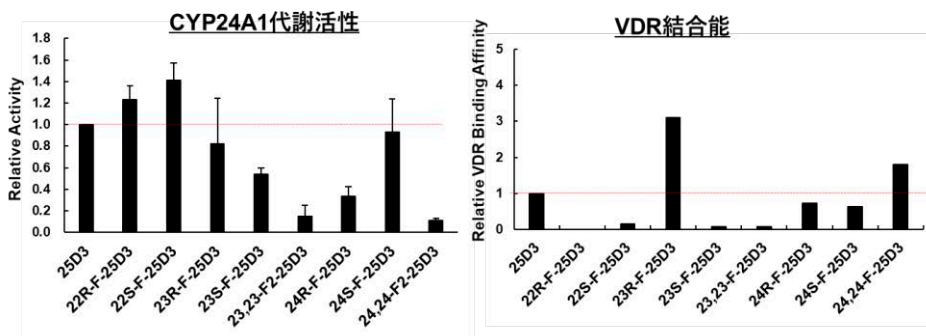


図3 25D3および各誘導体のCYP24A1代謝活性およびVDR結合能

*in vitro*系でCYP24A1代謝抵抗性のあった誘導体について、ラット体内における血中濃度の経時変化を25D3と比較したところ、*in vivo*においても25D3に比べて顕著に代謝されにくく、長時間高い血中濃度を維持していることがわかった。高いVDR結合能と代謝抵抗性を併せ持つ25D3型誘導体が、ビタミンDをより効果的に充足できる化合物として有望である。

4. 今後の展望

CYP24A1 の機能不全時には、ビタミン D3 や 25D3 の過剰摂取が副作用を引き起こしやすいことから、25D3 や 1,25D3 に加え、CYP24A1 代謝物である 24,25-ジヒドロキシビタミン D3 (24,25D3) 濃度の測定も重要であると考えており、今後、1,25D3、24,25D3 それぞれに特異的な定量系を開発したいと考えている。また、25D3 型誘導体については、今回と異なる構造を有する誘導体について *in vitro* 試験を継続し、有望であると判断した化合物については、生体内評価 (*in vivo* 試験) を行う予定である。一般的に使用されるビタミン D3 と比較して、25D3 摂取は血中のビタミン D 濃度をより短期間で上昇させることが報告されている。我々はこれまでに、CYP24A1 機能が正常である場合、25D3 が 1,25D3 と比べて安全性領域の高い予防・治療薬になる可能性を示しており、今回取得、もしくは今後さらに改良する 25D3 型誘導体が、より効果の高い予防・治療へと繋がることが期待される。

5. 参考文献

1. Mano et al., *Bioconjug Chem.* 26(10):2038-45 (2015)
2. Mano et al., *J Steroid Biochem Mol Biol.* 178:55-59 (2018)
3. Kusudo et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 321(4):774-82 (2004)
4. Yasuda et al., *Int J Mol Sci.* 22(21): 11839 (2021)

研究題目	富山県における乳児を持つ母親における 防災教育の課題
機関名	富山県立大学
研究代表者	看護学部 看護学科・准教授・村田 美代子
分野	看護学分野、母性看護、災害看護
キーワード	乳児 母親 災害 支援課題

1. 研究の背景と目的

我が国は近い将来新たな災害発生の緊迫性が指摘されており、これらの災害に備えていく必要がある。しかし妊娠出産は限られた期間にあり、災害を想定した備えより日々の生活や育児が優先される。そこで今回、出産を終えた3～4か月の乳児を持つ母親の減災に向けた支援課題を明らかにすることを目的に調査をおこなった。

2. 研究方法

研究を実施するために、富山県内の研究協力が得られた7市町村において乳児健診に来所した3～4か月児を持つ母親を対象に匿名性Webアンケート調査を実施した。

期間は2022年8月～12月。

調査項目は基本属性、被災経験、災害に対する意識、災害の想定と備え、災害に向けた支援の状況、被災想定時の不安、支援の要望について文献を参考に独自に作成した。加えて共助における他者の支援を受け入れを活用しようとする力を評価するために木村ら¹⁾の受援力尺度を含め計36項目について回答を求めた。

3. 研究成果

調査の結果、101名の回答（有効回答率94.4%）を得た。母親の年齢は32.2±4.7歳であった。

1) 被災経験

被災経験のあるものは7名(6.9%)で、被災した災害の種類は地震、豪雪、豪雨であり、ほとんどの母親は被災経験がなかった。

2) 災害の意識

家族と災害についての話をすると答えたものは62.4%、身近な地域で起こる災害については81.6%の母親が想定していた。また大規模災害（例えば南海トラフ地震や豪雨など）への関心も高く88.1%があると回答していた。

3) 災害の想定と備え

想定する災害の種類は豪雪、地震、豪雨、洪水、暴風、津波、土砂崩れ・崖崩れの順で多か

った。地域の防災マップやハザードマップの確認は63.3%、避難場所の確認は64.4%の母親があると回答しているが、避難経路の確認は25.0%と低かった。地震や津波による損害補償の加入は98.0%と高いものの家具や冷蔵庫の固定は59.0%と6割が固定していないと回答していた。また、災害時の家族との連絡方法の確認をしている母親は12.9%、生活用品の備蓄をしているのは29.7%、育児用品の備えについても23.0%と少ない状況であった。受援力尺度では先行研究より若干高めであった。

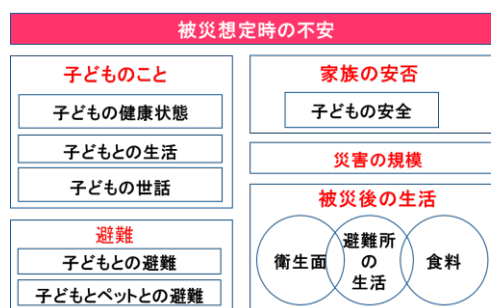
4) 災害に向けた支援の状況

妊娠中から防災対策について話を聞く機会があったと答えたのはわずか4%で、妊娠分娩における期間や子育てを始める中ではその機会は少ない結果であった。

5) 被災想定時の不安と支援の要望

被災を想定したときの母親の不安は、乳児を中心とした不安や避難所での生活であった。中にはペットと乳児を連れての避難に不安を示した母親がいた。

支援の要望では「富山県は災害が少なく、私は防災の意識が低くそのため、健診時など、防災グッズのリストなど（乳幼児向け）を貰えると備えやすい」や「常日頃から情報発信して欲しい」など災害の備えに対する情報を求めている。「必要最低限の赤ちゃん用の防災グッズが袋に入っているとありがたい、災害用のキットなど配布や販売などして欲しい」と具体的災害用品の配布を求めている。



4. 今後の展望

富山県における3~4か月の乳児を持つ母親は、地域の災害の想定や大規模災害への関心があり、家族と話しあうことや防災マップ・ハザードマップの確認行動はとっているものの、避難経路の確認や生活用品・育児用品の備えが低いことが明らかとなった。また、防災行動についての情報を得たい、乳児用の災害用品の配布希望などの要望があった。

いつ起こるか分からない災害に対して過度の心配は不要と考えるが、今回の調査からは3~4か月の乳児を持つ母親に対して災害時に乳児を連れた避難方法の確認や乳児に応じた育児用品の準備など平時の備えに関する情報の発信の必要性が示唆された。今後統計解析にて分析を行う予定である。

5. 参考文献

1. 木村美也子,尾島俊之: 未就学児を養育する母親の受援力尺度の信頼性と妥当性,日本社会医学学会誌,38(1),41-52,2021.