平成28年度(第41回)学術研究振興資金 学術研究報告

学校名	神戸薬科大学	研究所名等	共同研究
研究課題	次世代型チャンネルロドプシンモデルの開発 －発色団による長波長光応答モデルの構築－	研究分野	理学
キーワード	① チャンネルロドプシン ② 発色団 ③長波長光応答 ④ オプトジェネティクス		

○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
和田 昭盛	神戸薬科大学・薬学部	教授	研究代表者 研究計画・実施計画

○研究分担者

氏名	所属	職名	役割分担
七田 芳則	京都大学・大学院理学研究科	教授	ミュータントオプシンの作成と結合実験
山野 由美子	神戸薬科大学・薬学部	准教授	発色団の合成・構造解析
沖津 貴志	神戸薬科大学・薬学部	講師	発色団の合成・モデリング解析

次世代型チャンネルロドプシンモデルの開発
- 発色団による長波長光応答モデルの構築 -

1. 研究の目的

(1) レチナールを発色団とするチャンネルロドプシン（ChR）を脳のニューロンに発現させ、ニューロンを光で操作する技術が開発されてオプトジェネティクスと呼ばれている。この方法は、従来からある電極を用いた電気刺激による方法に対して、光を用いて神経細胞をコントロールするため、他の細胞への影響が極めて小さく、革命的な方法となっている。しかしながら、これまでのオプトジェネティクスには、Ch1とCh2が用いられ、励起波長として青色光および緑色光が使用されている。青色光や緑色光は、組織中の神経細胞に光が到達しにくく、光に対する応答が小さくなるという欠点がある。そこで、レチナールの共役系に更に二重結合を導入し、より長波長に吸収極大を持つ発色団を設計し、従来より長波長光で制御可能な新規ChRモデルを構築することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 和田グループは、より長波長での吸収極大を有するレチナール部分の共役系に二重結合を導入した発色団を設計・合成する。また、タンパク質との結合についてコンピューターを用いたドッキングシミュレーションを行い、発色団とタンパク質アミノ酸残基との相互作用について解析し、この結果をもとに更なる発色団の設計・合成を行う

①新規ChRの吸収曲線のブロードバンド化の原因がシクロヘキセン環内あるいは側鎖二重結合のどちらの影響が大きいのかを特定するため、レチナール側鎖に二重結語を1個導入した化合物を合成する。

②レチナールおよび3,4-デヒドロレチナールの共役系を更に延長するため、側鎖部分に二重結合を2個導入したアナログ化合物を合成する。

③タンパク質オプシンとのコンピューターによるドッキングシミュレーションを実施する。

(2) 七田グループは、ChR のタンパク質オプシンを作成し、これまで合成したアナログ化合物の結合実験を試み、タンパク質オプシン中に取り込まれるかどうかを確認する。結合したアナログ化合物については、ChRとしての光挙動を検討し、イオンチャネルとしての機能を持つかどうかを確認する。

3. 研究の成果

(1) 共役系の長い発色団の合成

①β-ヨノンを出発原料として、側鎖の延長と官能基変換により合成を行った。すなわち、側鎖の延長には、C2ホスホネートあるいはC5ホスホネートとのHorner-Emmons反応により炭素数を増加し、官能基変換は、エステルの還元と酸化によりアルデヒドへと変換した。ホスホネートの組み合わせを変えることにより、8位、12位および14位の後にそれぞれ二重結合を導入したアナログ3種を合成した。これらの化合物は、A1アルデヒドより二重結合が１個伸びたものであり、UV吸収スペクトルにおいていずれも吸収極大波長は約30nm長波長していた。

②これまでに合成したA2アルデヒドの側鎖に二重結合を1個導入した発色団から創製した新規ChRでの吸収曲線のブロードバンド化において、12位および14位に二重結合を導入したアナログでより大きな効果が見られたことから、二重結合を2個導入する位置として12位および14位を選択し、A1アルデヒドの場合にはβ-ヨノンを原料とし、A2アルデヒドの場合にはアクチノールを原料として、C2ホスホネートあるいはC5ホスホネート

とのHorner-Emmons反応の組み合わせと官能基変換により合成した。
③シクロヘキセン環を芳香環状に代えたアナログ化合物として、p-ジメチルアミノベンゼン環、p-メトキシベンゼン環を持つ化合物を合成した。

(2)オプシンの作成ならびに発色団との結合
①前年度に合成したA1アルデヒドの4位から二重結合を2個延長した化合物(I)およびA2アルデヒドの3位から二重結合を1個延長した化合物(II)について、タンパク質オプシンとの結合実験をしたところ、いずれの発色団もタンパク質中に取り込まれ新たなChRアナログが生成した。
②2種の新規ChRの吸収極大は、天然のChRの吸収極大（λmax)に比べてIで 7 nm IIで 12 nm 長波長シフトしていた。また、これまでのアナログから得られた新規ChRの場合と同様、吸収曲線にブロードバンド化が認められ、1/2 λmaxの吸収波長を比較するとIで 40 nm、 IIで 50 nmと大きく長波長シフトしていることが判明した。IとIIは、二重結合の数が同じことから、より長波長シフトする発色団を設計する場合には、A2アルデヒドに 3位から二重結合を延長する方がより効果的なことが判明した。
③また、生成した新規ChRについて、光反応を検討したが活性化は起こらず、応答しないことが明らかになった。

(3)コンピューターを用いたドッキングシミュレーション
ビタミンA2アルデヒドの側鎖部分に二重結合を一つ挿入した化合物3種類の時と同様に、A１アルデヒドの側鎖部分に二重結合を一つ挿入した化合物3種類についてC1C2-ChRのオプシンを用いてドッキングシミュレーションを行い発色団のコンホメーション解析を行った。また、(2)で記載のChRについてもドッキングシミュレーションを行っているところである。また、それぞれの最安定コンホメーションおけるE値と、吸収曲線の吸収極大値やブロードバンド化への影響いついても解析する予定である。

4. 研究の反省・考察

(1) A1アルデヒドのシクロヘキセン環を複素環に変えて発色団とCh1Ch2チャンネルロドプシンオプシンとの結合実験を実施するまでには至っていないので、早急に実施し新たなチャネルロドプシンアナログを形成するかを検討する。また、アナログを与えた場合にはその吸収極大がA2アルデヒドの時と同様に、1/2 λmaxの吸収波長のシフト値が大きくなるかどうかを確認する。
(2) コンピューターによるドッキングシミュレーションの安定コンホメーションが、実際の吸収極大特に、1/2 λmaxのシフト状況とよく一致することが判明したので、今後の発色団の設計においてどのように活用していくかを検討する。
(3) 長波長での吸収極大を持たせる方法として、レチナールを基盤として二重結合を延長するだけでは、大きな長波長シフトが望めず、限界があるように推察されるので、新しい発想に基づくアナログ化合物を設計位すると共に効率のよい合成法を確立する。できたアナログでは、天然のオプシンと結合するかどうかを検討する。
(4) 新たな発色団とオプシンから生成した新規ChRについて光反応を検討し、チャネルロドプシンとしての機能があるか確認する。

5. 研究発表

(1)学会誌等
①Okitsu, T.; Ogasahara, M.; Wada, A.
Convergent Synthesis of Dronedarone, an Antiarrhythmic Agent
Chem. Pharm. Bull. **2016**, *64*(8), 1149-1153.

②Luk, H. L.; Bhattacharyya, N.; Montisci, F.; Morrow, J. M.; Melaccio, F.; Wada, A.; Sheves, M.; Fanelli, F.; Chang, B. S. W.; Olivucci, M.
Modulation of thermal noise and spectral sensitivity in Lake Baikal cottoid fish rhodopsins
Sci. Rep. **2016**, *6*, 38425.

③Sato, K.; Yamashita, T.; Haruki, Y.; Ohuchi, H.; Kinoshita, M.; Shichida, Y.
Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, Opn5m and Opn5m2 in Ray-Finned Fish with Distinct Molecular Properties and Broad Distribution in the Retina and Brain.
PLoS One **2016**, 11(5) e0155339.

④Kato, M.; Sugiyama, T.; Sakai, K.; Yamashita, T.; Fujita, H.; Sato, K.; Tomonari, S.; Shichida, Y.; Ohuchi, H.
Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, Opn5m and Opn5m2 in Ray-Finned Fish with Distinct Molecular Properties and Broad Distribution in the Retina and Brain.
PLoS One **2016**, 11(11) e0163925.

⑤Yue, W. W.; Frederiksen, R.; Ren, X.; Luo, D. G.; Yamashita, T.; Shichida, Y.; Cornwall, M. C.; Yau, K. W.
Spontaneous activation of visual pigments in relation to openness/closedness of chromophore-binding pocket.
Elife **2017**, 6, e18492.

⑥Shigeta, A.; Ito, S.; Inoue, K.; Okitsu, T.; Wada, A.; Kandori, H.; Kawamura, I.
Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Structural Study of the Retinal-Binding Pocket in Sodium Ion Pump Rhodopsin
Biochemistry **2017**, *56*(4), 543-550.

⑦Kimura, K.; Hirota, Y.; Kuwahara, S.; Takeuchi, A.; Tode, C.; Wada, A.; Osakabe, N.; Suhara, Y.
Synthesis of Novel Synthetic Vitamin K Analogues Prepared by Introduction of a Heteroatom and a Phenyl Group That Induce Highly Selective Neuronal Differentiation of Neuronal Progenitor Cells
J. Med. Chem. **2017**, *60*(6), 2591-2596.

⑧Yamano, Y.; Nishiyama, Y.; Aoki, A.; Maoka, T.; Wada, A.
Total synthesis of lycopene-5,6-diol and γ-carotene-5',6'-diol stereoisomers and their HPLC separation
Tetrahedron **2017**, *73*(15), 2043-2052.

⑨Okitsu, T.; Matsuyama, T.; Yamashita, T.; Ishizuka, T.; Yawo, H.; Imamoto, Y.; Shichida, Y.; Wada, A.
Alternative Formation of Red-Shifted Channelrhodopsins: Noncovalent Incorporation with Retinal-Based Enamine-Type Schiff Bases and Mutated Channelopsin
Chem. Pharm. Bull. **2017**, *65*(4), 356-358.

(2)口頭発表

① 神崎　さくら子、石井　菜紬子、沖津　貴志、和田　昭盛
共役したクロメン環を有するレチナールアナログの合成研究
日本ビタミン学会第68回大会（2016.06.18 富山）

② 山野　由美子、諏訪脇　幸歩、菅原　史仁、和田　昭盛
Siphonaxanthinの合成研究
第30回カロテノイド研究談話会（2016.06.25 沖縄）

③ 眞岡　孝至、西野　梓、安井　裕之、山野　由美子、和田　昭盛
貝類やホヤ類はなぜfucoxanthinをmytiloxanthinに変換するのか抗酸化活性からの考察
第30回カロテノイド研究談話会（2016.06.25 沖縄）

④ 細川　雅史、小林　乗時、小林　次郎、三上　浩司、宮下　和夫、山野　由美子、和田　昭盛
紅藻スサビノリのカロテノイド生合成経路の解析

第30回カロテノイド研究談話会（2016.06.25 沖縄）

⑤ 沖津　貴志、池田　裕明、安田　峻佑、和田　昭盛
1,2-ジアゼチジン類と芳香族化合物のFriedel-Crafts型反応
第36回有機合成若手セミナー「明日の有機合成を担う人のために」（2016.08.09 京都）

⑥ 沖津　貴志、吉田　裕司、小林　恵子、松井　佑記、大西　莉加、安田　峻佑、和田　昭盛
ドナーーアクセプター置換1,2-ジアゼチジンの求核的開環反応
第46回複素環化学討論会（2016.09.27 金沢）

⑦ 和田　昭盛、山野　由美子、沖津　貴志、山下　高廣、今本　泰、七田　芳則
レチナール環構造に共役系を導入したアナログの合成とタンパク質オプシンとの相互作用
日本レチノイド研究会第27回学術集会（2016.10.21町田）

⑧ 山野　由美子、諏訪脇　幸歩、菅原　史仁、和田　昭盛
Siphonaxanthinの合成研究
第42回反応と合成の進歩シンポジウム（2016.11.07 静岡）

⑨ Shichida, Y.
Molecular properties of opsins belonging to one of the subgroups of Opn5.
17th International Conference on Retinal Proteins (2016.10.5 Potsdam, Germany)

⑩ Kojima, K.; Yanagawa, M.; Matsutani, Y.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Yamano, Y.; Wada, A.; Shichida, Y.
Comparative analysis of thermal activation rate in vertebrate cone visual pigments
日本動物学会第87回大会（2016.11.17. 沖縄）

⑪ Matsutani, Y.; Kojima, K.; Yanagawa, M.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Hisatomi, O.; Yamano, Y.; Wada, A.; Shichida, Y.
Optimization mechanism of vertebrate visual pigments for photic environment
日本動物学会第87回大会（2016.11.17. 沖縄）

⑫ 七田芳則
生体光操作技術の進展
第54回日本生物物理学会年会シンポジウム（2016.11.26 つくば）

⑬ Kojima,K.; Matsutani, Y.; Yanagawa, M.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Hisatomi, O.; Yamano, Y.; Wada, A.; Shichida, Y.
Thermal activation rates of visual pigments expressed in rods.
第54回日本生物物理学会年会（2016.11.26 つくば）

(3)出版物

なし

学 校 名	埼 玉 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	π共役系分子集合体の光配向制御	研 究 分 野	工 学
キーワード	① 液晶 ② 光配向 ③ 色素		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
木 下 基	工 学 部	准 教 授	研究総括・材料・物性評価・デバイス作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 崎 政 和	工 学 部	教 授	材料設計・調製

π共役系分子集合体の光配向制御

1. 研究の目的

近年、携帯電話やパソコンなどの情報端末の普及や公衆無線LANやFTTHなどの高速通信環境の充足が進むにつれて、手軽に情報のやりとりができるユビキタスな環境が整備されてきた。今後のユビキタスネット社会の持続的発展において、特にIoT化が加速しており、それらの基盤要素である光通信技術や安価なデバイスと材料に対する需要は日々増大している。

電場、磁場および光電場などの外場により分子配向を制御可能なπ共役系液晶は、フォトニクス材料としてのみならず電荷輸送性に優れるエレクトロニクス材料として魅力的であり、IoT化に貢献する材料として期待されている。これまでに液晶中にフォトクロッミック分子を分散あるいは液晶分子自体に光応答性を付与し、それらの光化学反応を利用した液晶の光配向制御に関する研究が多数行われ、液晶を利用した高速光−光制御が可能であることが示されている。しかしながら、これらの系を用いた光制御は分子構造の変化、つまり光化学プロセスを駆動力とするために必然的に系に乱れが生じ、微小領域において精密な配向制御を行うことは困難である。このため光化学プロセスを利用しない光配向制御法が望まれている。

光化学プロセスに換わる配向手法として光カー効果などの非線形光学効果を利用した例があるが、配向応答性は小さく、液晶の配向制御の手法としては適切でない。近年、少量のπ共役系色素アントラキノン誘導体を液晶にドープし色素を光励起することで、液晶の配向応答性を飛躍的に増大できる新しい配向手法が見出されている。その後、液晶性を示すチオフェン誘導体を用いることによって、アントラキノン誘導体より液晶が高い配向応答性を示すことが報告され、最近では、光配向を利用した新しい光学素子として展開されている。

π共役系色素を用いた液晶の光配向挙動は、励起色素分子と液晶分子の特異的な相互作用に基づくと推測されているが、明確な分子構造や詳細なメカニズムは未解明である。特に、これらの色素を用いた場合、照射光強度が高くなると色素からの熱の発生が顕著になる。このため、光熱効果により系の配向が乱れて配向安定性に欠けるため、優れた系の探索が重要な課題となっている。そこで、光で分子配向制御可能なπ共役系システムの構築を目指して、液晶分子の配向を安定に誘起できる色素を用いた液晶の光応答挙動について検討した。

2. 研究の計画

光で分子配向制御可能なπ共役系システムの構築のためには、優れた光配向性の色素の探索が鍵となる。また、色素からの熱の発生を抑制のための、色素の検討として、光の吸収により生成する励起状態からの熱失活の低減を考えて、蛍光性に優れる色素の検討を行うこととした。

(1) 蛍光性色素を用いた液晶の光応答挙動

有機EL素子用の発光性色素やレーザー色素として実績のある光や電気化学的に優れた安定性を示す市販材料を用い、液晶中における光応答挙動について、ポンププローブ法により評価した。

(2) 類似構造有する色素の光配向挙動の比較

(1)において光配向性を示した分子構造に着目し、それらと類似構造を有する色素を用いて、光応答挙動の違いについて詳細に比較・検討した。

3. 研究の成果

(1) 蛍光性色素を用いた液晶の光応答挙動

色素としてCoumarin 6をドープしたサンプルを用いた場合、閾値以上のポンプ光を照射するとサンプルを透過した光は、スクリーン上に干渉縞を形成した。これは液晶を透過した光が自己位相変調効果に基づき位相差を生じるためである。また、プローブ光を同時に入射したところ、ポンプ光の照射偏波面が平行方向の時だけ干渉縞が現れ、垂直方向の時には見られないこ

とから、液晶の配向方向は照射偏波面と平行方向であることがわかった。それゆえCoumarin 6が、従来の液晶性チオフェンと同様な配向挙動で、光配向することが明らかとなった。さらに、Coumarin 6を含むサンプルを用いて、干渉縞の光強度依存性を観察したところ、液晶性チオフェンを用いた場合と比較して、高光強度照射時においても安定に干渉縞を形成することがわかった。これは光照射にともなう色素からの熱の発生が、蛍光性に優れる色素を用いることにより低減化できたためと考えている。また、その他の色素を用いたサンプルについても光照射を行ったところ、Coumarin 7やCoumarin 30が、Coumarin 6と同様に液晶の光配向変化を誘起できるが、DCM、Nile Red、Rhodamine B、Coumarin 153やCoumarin 337においては、液晶の配向変化を誘起できないことがわかった。

(2) 類似構造有する色素の光配向挙動の比較

(1)において、ベンゾチアゾール骨格を有するCoumarin 6が優れた光配光特性を示すことが明らかとなった結果を受け、Coumarin 6のジエチルアミノフェニル骨格がジュロリジル骨格に変わったCoumarin 545およびCoumarin 545Tを用い、液晶の光応答挙動について比較・検討した。ある一定の光強度以上のレーザー光をサンプルに照射すると、いずれのサンプルにおいても透過光に干渉縞が観測されることから、Coumarin 545およびCoumarin 545TもCoumarin 6と同様な挙動で液晶を光配向できることが明らかになった。さらに、光を照射し続けると、Coumarin 6とは異なって、Coumarin 545およびCoumarin 545Tを用いたサンプルは、透過光による干渉縞が見られなくなり、初期配向へ緩和することがわかった。

4. 研究の反省・考察

(1) 光配向性色素における分子構造の特徴としては、比較的分子長の長いCoumarin誘導体が光配向しやすいことが推察される。さらに、光配向性色素の共通性を見出すために、すべてのサンプルの偏光吸収スペクトルを測定したところ、光配向性色素は、液晶の配向方向と平行方向に吸光度が大きく、垂直方向に吸光度が小さくなる吸収異方性があることが明確になった。また、孤立系の色素の分子軌道計算の結果から、双極子の向きや大きさには共通性がないが、基底状態のHOMOおよびLUMOの電子雲の変化に若干の共通性が見られることがわかった。具体的に、光配向性色素においては、HOMOにおける電子雲は色素全体に分布し、LUMOにおける電子雲は色素の中心部分に偏在していることが明らかとなった。従来、基底状態と励起状態の色素の電子状態の差が多いいほど光配向に有利と考えられていたが、電子状態の変化の様式に分布が寄与するのではないかという新たな知見が得られた。

(2) 類似構造有する色素の光配向挙動の比較の結果から、分子構造の平面性が光配向挙動に影響を与えることが示唆される。液晶中の色素の吸収スペクトルは、孤立系の色素と類似した形状であったが、蛍光スペクトルの形状は分子構造により差異がみられた。Coumarin 6は、孤立系とほぼ変わらなかったが、Coumarin 545およびCoumarin 545Tにおいては、孤立系の蛍光スペクトルに加えて新たなスペクトルが重なって観測された。これは励起状態のみに観測されることから、光照射に伴う励起色素とホスト液晶による励起錯体エキシプレックスの形成によるものと考えた。

5. 研究発表

(1)学会誌等

① M. Kinoshita, M. Furukawa, S. Oka, Y. Aoki, A. Shishido, “Photoresponsive Behavior of Orange and Red-Fluorescent Dyes in Nematic Liquid Crystals”, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **29**, 293-294 (2016).

(2)口頭発表

①木下 基、 古川 元行「ニッケル錯体を含む液晶の光応答挙動」2016年色材研究発表会 14B02、大阪(大阪大学)、14B02、2016年10月14日。

②浅見秀和、 岩崎政和「Grignard 試薬を用いたオキソシクロブテニルPd(Ⅱ)錯体の反応性に関する研究～ 新規シクロブテノール合成への展開 ～」第14回若手研究フォーラム 深谷(埼玉工業大学)A01、2016年7月16日。

③宮下聖樹、浅見秀和、岩崎政和「Pd錯体触媒を用いたプロパルギルクロリドと末端アルキンとのカルボニル化カップリング反応によるシクロブテノン類の合成に関する研究」、第14回若手研究フォーラム 深谷(埼玉工業大学)A02、2016年7月16日。

(3)出版物

なし

平成28年度(第41回)学術研究振興資金 学術研究報告

学校名	東京電機大学	研究所名等	共同研究
研究課題	地域継続居住を支えるCCRCにおける建築的特性と居住者の生活 －都心団地等改修型と地方集落新築型の比較－	研究分野	工学
キーワード	①日本版CCRC ②地域性 ③コミュニティ ④既存建物の改修利用 ⑤事業モデル		

○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
山田 あすか	未来科学部	准教授	研究代表者 総括 建築計画，福祉住環境・介護サービス視点からの研究・調査・分析デザイン，同実施

○研究分担者

氏名	所属	職名	役割分担
土田 寛	未来科学部	教授	都市計画視点からの研究・調査・分析デザイン，同実施
横手 義洋	未来科学部	准教授	建築史，住環境史視点からの研究・調査・分析デザイン，同実施
古賀 誉章	宇都宮大学大学院工学研究科	准教授	建築設計，環境心理生理視点からの研究・調査・分析デザイン，同実施

地域継続居住を支えるCCRCにおける建築的特性と居住者の生活
－都心団地等改修型と地方集落新築型の比較－

1. 研究の目的
(1)研究の背景
我が国は人口減少を伴う超高齢社会を迎え、過密地域では介護者・介護支援の不足、過疎地域では人口減少による生活必需施設の維持の困難さが想定されている。このようななか、過密地域（都心部）から過疎地域（地方都市とその辺縁部）への移住や住み替えを含む、人口移転・介護ニーズの移転構想が国策として進められている。このひとつとして、高齢期の安定的で充実した生活と、自助・共助・互助を基軸に公助によって必要な介護・看護サービスを提供する、日本版 CCRC（Continuing Care Retirement Community：継続的な介護を受けられる退職者のコミュニティ、後に「生涯活躍のまち」と構想名称を変更）が構想されている。この日本版 CCRC は、高齢者のためのケア付きの住宅である有料老人ホームやサービス付き高齢者住宅に、食堂や購買施設などの生活基盤施設、デイサービスや小規模多機能などの介護拠点を併せもち、居住者に安全安心な住まいを提供すると同時に、周辺地域に対しても雇用や介護の拠点として機能することが期待されている。

(2)研究の目的と研究の枠組み
日本版CCRC構想の推進にあたっては、地域特性に応じたその成立の様態がまだ十分に検証されておらず、先駆的事例での入居者らの生活の様子や、運営の様子の実態が丁寧に整理される必要がある。本研究では、日本版CCRC構想のモデルの一つである「地方都市での集落新築型」事例Ｎと、これと対照的でCCRCの概念の拡張モデルとなりうる「都心部での既存集合住宅改修型」事例Ｔを調査対象とする。こうしたモデルによる整理と事象の把握は、今後“地方都市と都心部”“新築と改修”“戸建て集落型と中高層集合住宅型” という多様なCCRCモデルを模索していく上での土台となると考える。本研究ではこの2つのモデルでの建築的特徴と、入居者の生活様態，コミュニティ運営の手法を整理し、建築の改修・転用利用による利点や課題点、地域連携やコミュニティ内での互助共助を含めた都市的レベルでの検討を行い、今後のCCRC構想推進のための基礎的知見とする。

2. 研究の計画
(1) 「地方都市での集落新築型」事例N
事例 N は，北関東の地方都市に立地し、新幹線駅から自動車で 20 分程度の山間部に新規開発された有料老人ホームを核とするケア付きコミュニティである。コミュニティ内に移動販売等も来るが、最も近い商店への移動には車が必要で、入居者らは自家用車か乗り合いのタクシーやバスを利用している。地方都市・新築型であるため、多数が県外からの移住者でありコミュニティ居住者同士の関わりは、園芸や音楽，調理教室などの趣味活動、居住環境保全活動を通じて培われている。

(2) 「都心部での既存集合住宅改修型」事例T
事例 T は、東京都 23 区内・城北エリアに位置し、地下鉄の最寄り駅から徒歩 10 分強、公共交通網としてバスも利用できるアクセシビリティの高い事例である。既存団地の一角にある高層集合住宅１棟のうち、空室が出ると順次改修して、居室が分散したサービス付き高齢者として運営している。徒歩 5 分ほどの団地内にスーパーや医療施設など生活関連施設があり、生活利便性が高い。

(3)調査概要
① **参与型観察調査（事例 N）** ： 事例内に調査・研究拠点を設け、調査員が長期滞在し、入居者らのコミュニティになじむなかで、イベントや日常的な作業・活動などを通じたコミュニティ形成や入居者らの生活や共助の様子を把握する。

② **入居者に対するアンケート・ヒアリング調査** ： 入居者からの聞き取りによって、入居の経緯や入居の決定要因、生活の様子（地域への生活の広がりや、日々の過ごし方、人間関係の様子）、介護が必要になった場合の生活ニーズ等について把握する。

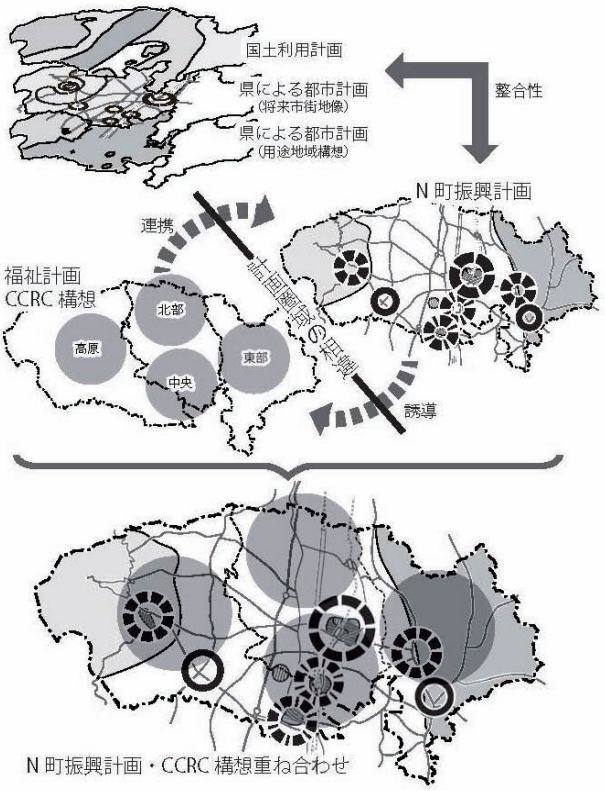
③ **運営者に対するヒアリング調査** ： コミュニティの運営者や生活支援事業等運営者からの聞

き取りによって、各種支援の利用の状況や必要な支援の状況、必要な支援の把握方法、コミュニティ周辺の事業との連携の実態、事業運営モデルなどの情報を収集し、整理する。

④ **文献調査** ： T団地の住棟配置、対コミュニティ機能の変遷などの文献を調査し、まとめる。

3. 研究の成果

(1) N町を題材とした、日本版CCRC構想の推進に必要な都市側の基盤形成に関する考察



① CCRC構想は、現代的な課題に対応しながら、地域という空間的な概念を導入することで、雇用の創出、都市機能の再生・維持を伴う高齢者福祉を契機とした持続的な地域社会を形づくる取組みである。一方で、都市・地域の一般的な状況として、少子・高齢化、自治体の財政問題などは深刻化しており、各種の都市地方再生の試みの多くでは有効な手立てが見いだせていない。そのような中で、高齢者福祉施設を契機とした地域再生の取り組みとしてCCRC構想が新たに都市内に地域もしくは拠点を形成し、持続的都市の活力の源になる可能性として期待は大きい。このとき、CCRC構想によって自立的な地域もしくは拠点が形成されるうえで、各地域の上位にある都市自体（全体）の各種計画等による将来像との整合がとれている必要があると考えられる。そこで本稿では、CCRC構想のモデルの一つと位置づけられる、事例N（N町）を事例として、その成立のプロセスから、都市の将来像と事例NにおけるCCRC構想との相互の関係を分析し、関係構築の実態と高齢者の持続的な居住を可能とする地域形成に関連した課題を抽出することを目的とする。

② 第一に、当該事例が立地する自治体において、概況とこれからのまちとCCRCの将来像を規定する各種計画等を文献調査ならびに当該自治体のヒアリングを通じて把握し、CCRCの形成への影響を考察する。第二に、サービス付き高齢者住宅について事業者に対するヒアリングを通じて、周辺地域との関係や自治体へのニーズを把握し、CCRCの実現と発展のために必要な事柄等について、考察を加える。第三に、両者の関連性を分析して課題等を抽出する。

③ 本事例においては、ひとつの民間事業としてCCRC 構想と関連した事業（地方移住を想定した高齢者向け複合施設の建設・運営）がなされている。国土利用計画は振興計画を受けての計画であるため、直接的な誘導方策は有していないと考えられるが、町のなかでの人々の生活支援のベースとなる、町の振興計画はじめ各種計画の拠点形成指針が、CCRC構想の標榜する拠点形成と十分に連携ができていない、あるいはコントロールの様相を呈していない可能性は否めない。これは、移住から定住、さらにはその後の高齢者の持続的な居住を可能とする地域形成に関連して、各種計画やCCRC構想に必要とされる総合性に関する課題を提示している。

(2) 事例Nでの観察調査・ヒアリング調査に基づく生活ニーズの把握

① 事例Nは周辺が県境に位置する過疎地域で、こうした地域の場合には移住促進によって提供できる近隣周辺地域でもサービス利用者が少なく、事例内のデイサービスの外部利用者も少ない。つまり、介護ニーズも過疎であるため元々の住民にとっては地域継続居住への効果が薄い。また、過疎地域に立地するため移動手段の確保が大きな問題となっていた。また、現状では事例Nが開設されたことでの地域の交通ネットワークの維持または形成などの効果は生じていない。

② 事例Nに移住した居住者からの移住理由の聞き取りによれば、自然環境の豊かさは移住の決め手

のひとつになっていた。また、施設内のサークルやイベントが入居者間の関係形成に効果的であった。移住者コミュニティであるため、施設のソフト面でのコミュニティ形成への積極的働きかけが重要だとわかる。

(3) 事例Tにおける住環境の変遷

① 高度経済成長期以降に誕生した団地は、1990年代頃にはファミリー世帯の子離れ、耐震性向上の要請などによって住棟の改修や環境の再整備が急速に進んだ。T団地は、住棟のT字型配置によって敷地内の開放性が強調され、団地内の通り抜けを可能にした「駅前団地」として知られる。当初は、団地内外の分離や歩車分離、団地内屋外空間をプレイロット(子供向けの遊び場)・プレイグラウンド・緑地として想定していたが、その後、様々な変更が余儀なくされた。

② 外空間に関する2001年の研究1)を下敷きに、特にT駅に直結する33ブロック、団地南端に位置し敷地外の住宅地と隣接する28ブロックを対象に、屋外のユーティリティ系、サーキュレーション系、スペース系、の変容をプロットした。

③ 現状観察で１階ピロティを含むオープンスペースの敷地内動線と利用状況を確認し、開発当時と比較した。33ブロックでは，年々団地内屋外空間利用に占める駐車場、駐輪場の割合が増えた。駅に近い33ブロックでは動線の確保のため、緊急車両の寄り付き空間は駐車場を経由しオープンスペースへ侵入する。車両の侵入増加と引き換えに、通り抜けピロティの消失等、歩行空間の自由度が失われた。一方、駅から離れた26ブロックの住棟前、集会場に隣接して設けられたオープンスペースは、放置自転車を撤去して地域の催事に活用されるが、車両の進入も可能になり、高齢化のせいか駐車も散見された。

④ 団地内オープンスペースには、今後も住民高齢化に伴う様々な仕様変更が想定される。住棟への車両アクセスを認めつつ、敷地内外の空間的つながりを維持し、かつ住民にとって質の高い屋外空間を実現していくことが今後の課題になることが確認できた。

文献1) 木下剛, 宮城俊作, 吉江達也「昭和40年代の高層高密度団地における屋外空間の構成とその後の変容」『ランドスケープ研究』2001，64(5)，pp. 697-702

(4) 事例Tにおける団地改修による「地域継続居住拠点」の形成

① 入居者らと運営者からの聞き取りによって、移住の理由や事例の評価、課題などを尋ねた。事例Tは［都心型］で、住居のある住棟とフロントのある住棟が離れた［分散型］配置である。このためフ

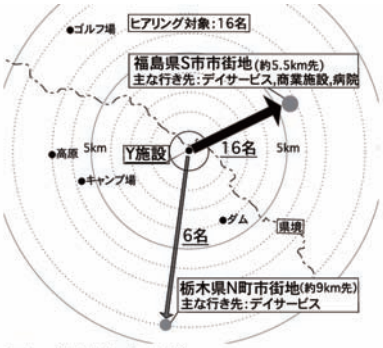


図 外出先と人数

表 移動手段

対象:19名,複数回答あり

移動手段	回答数
自家用車	6
カーシェア	1
タクシー	1
施設バス	13
デイの送迎	2
施設の人の車の送迎	1
身内の車の送迎	1

表 入居理由

(対象:17名,複数回答あり)

分類	詳細	入居理由	回答数
設施	立地	自然が良い	4
		田舎暮らし	1
	建築	木造住宅	2
		分棟形式	2
		集合住宅が嫌	1
		RC造が嫌	1
変化	自身	以前の仕事を辞めた	2
	身辺	伴侶と死別	2
		両親と死別	1
		妻の介護	1
		母の年齢	1
取り組み		体験入居	2
		自立した・自由なライフスタイル	2
		コミュニティが作れる	1
		サークルが面白そう	1
他者の影響		身内の勧め	2
		妻についてきた	1
その他		以前の住まいで死んだら迷惑になると思い	1

表 施設への要望

(対象:16名,複数回答あり)

分類	内容	回答数
交通	徒歩圏内に外出先がない	1
	施設バスの運行時間	1
	医療・金融機関が遠い	1
	交通全般	5
建築	収納が少ない	1
	部屋が狭い	1
	部屋が暗い	1
	軒のつなぎ目の雨風	2
	排水口の金属部の滑り	1
ケア	要介護時の対応	2
	妻の介護で出かけられない	1
イベント	旅行・温泉に行きたい	1
なし		4

※各分類の回答者数は、「交通」８名、「建築」３名、「ケア」３名、「イベント」１名、「なし」４名となっている。

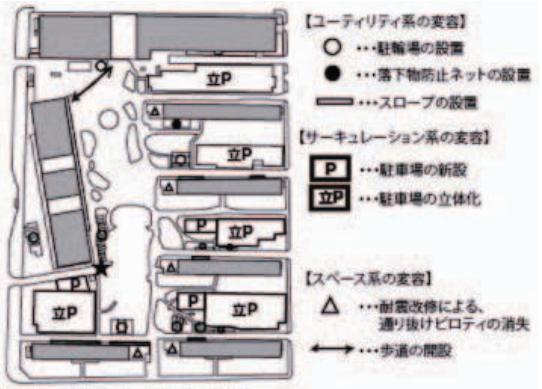


図2．33ブロックの空間変容

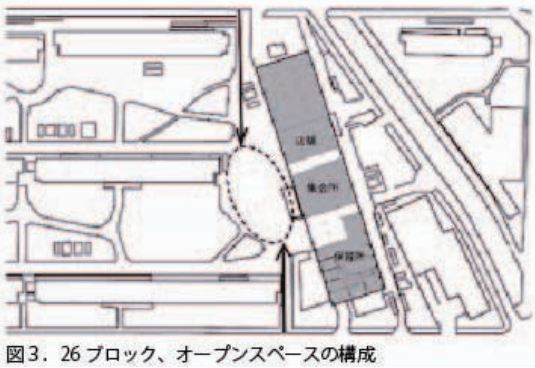


図3．26ブロック、オープンスペースの構成

ロントを地域に開放しやすく、また居住者が利用の頻度や距離感を自身の考えでコントロールでき、外出機会を提供する契機ともなっている。さらに、行き来の際に団地内の移動が生じ、居住者の日々の生活において地域に溶け込んだ福祉の提供が自然に行いやすい。一方、［改修型］の分散型であることで改修工事における周りの住宅への配慮の必要性、水回りの配管取り回しなど設備計画や断面・平面計画の自由度の制限、などの困難が指摘された。

② 入居者からの聞き取りをもとに、入居理由ならびに現在の評価の要因となる事例Tの特長を［改修型］［分散型］［都心型］［その他］の４つに整理した。入居者らは、このうち複数の特徴を評価しており、分散型サービス付き高齢者住宅という特徴と、T団地という立地の特性があいまった運営と生活の実態が把握できた。

(5) 秀例調査による事例の整理・データベース作成

① 現在は、複数の政策誘導や取組など、複数のCCRC類似事業がある。そこで、日本版CCRCのモデル事業、スマートウェルネス事業、生涯活躍のまち事業に認定された取組みや、それ以外の独自の取組みなど、全国の優れた事例を視察し、関係者等に聴き取り調査を行った。

② 高齢化率や居住地の密度、交通状況、地域の介護・看護資源など地域の実状に応じた、継続居住の取組がなされている。継続居住支援の拠点となるのは小規模多機能など通所系施設、グループホームや有料老人ホーム、サービス付き高齢者住宅などの住宅系施設、特別養護老人ホームなど入居系施設、と多岐にわたる。それぞれの地域で長年高齢期の生活を支えていた施設や法人が、地域の高齢化の進展と地域包括ケアへの支援体制の移行とを背景として、それぞれの取組を展開しておりそれらが整理されていないのが実情である。

③ また、CCRCの観点からは特に、子育て世代・セミリタイア世代・前期高齢者と幅広い年代層の移住促進が、結果的に地域継続居住の維持に役立つ方策のひとつと考えられていることがわかった。地域にいま住んでいる高齢者の生活支援・地域継続居住支援の意味でも、生活の場の整備と就労の場の整備の観点からの移住の促進が重要であると考えられていた。

4. 研究の反省・考察

今回の調査時点では、事例Tではまだ介護が必要な入居者がいなかった。このため、今後介護や支援が必要になった場合やそうした場合への備えを入居者がより強く認識するフェーズに入ったときに生じる課題や必要な配慮の把握は課題として残った。経時的な調査研究によって、この形式での福祉拠点整備や住環境整備における、より有効な知見が得られると考える。

5. 研究発表

(1)学会誌等

① 小西千秋、山田あすか、土田寛：CCRC 構想を推進するために必要な都市側の基盤形成に関する考察　―北関東に位置する N 町の高齢者施設と関連諸計画の考察を通じて、日本建築学会地域施設計画研究シンポジウム、Vol.35，掲載ページ未定，2017.07【掲載決定】

② 八角隆介、山田あすか、古賀誉章、横手義洋：団地改修・分散型サービス付き高齢者向け住宅の運営と利用者の生活実態についての事例的研究、日本建築学会地域施設計画研究シンポジウム、Vol.34，pp.103-108，2017.07

(2)口頭発表

① 小西千秋、山田あすか、土田寛：CCRC 構想を推進するために必要な都市側の基盤形成に関する考察　―北関東に位置する N 町の高齢者施設と関連諸計画の考察を通じて、日本建築学会地域施設計画研究シンポジウム、Vol.35，掲載ページ未定，2017.07.21【発表決定】

② 高瀬敦、山田あすか、古賀誉章：過疎地域における福祉型複合コミュニティのあり方と施設運営に関する研究、日本建築学会学術講演大会、掲載ページ未定，2017.9.1【発表決定】

(3)出版物

・該当なし

学校名	東洋大学	研究所名等	共同研究
研究課題	無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の血管透過性解析	研究分野	工学
キーワード	①マイクロ流体デバイス ②ナノ薬剤 ③血管		

○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
佐々木 直樹	理工学部	准教授	研究代表者 総括 実験・データ整理・論文作成

○研究分担者

氏名	所属	職名	役割分担
佐藤 香枝	日本女子大学 理学部	准教授	実験・データ整理・論文作成

無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の血管透過性解析

1. 研究の目的

厚生労働省の平成26年人口動態統計によれば、日本人の死因の第1位はがん（悪性新生物）であり、全体の28.9%を占める。かつては結核や脳卒中が第1位であったが、医療の発展に伴い、これらの病気で亡くなる人が減ったため、結果としてがんで亡くなる人が増えていると考えられている。従って、さらなる長寿健康社会を実現するには、従来法に比べて優れたがんの診断・治療法を開発し、超早期診断や低侵襲治療へと展開していく必要がある。

これまでのがんの診断・治療では、主に低分子の薬剤を血管に投与するため、これらが体内の腫瘍組織のみならず正常組織においても血管外に漏出する。このため、造影剤で患部を効果的に造影できない、或いは抗腫瘍剤が正常組織を攻撃し重篤な副作用が避けられない、などの問題が起こる。これを解決するために、ナノメートルサイズの粒子に薬物を封入した「ナノ薬剤」を血管に投与し、患部にピンポイントに送り届け薬効を発揮させる技術が盛んに研究されている。

ナノ薬剤を用いた患部選択的な薬物送達の原理は、Enhanced permeability and retention effect（EPR効果）として知られている。すなわち、癌周囲の腫瘍血管は正常血管に比べて血管壁の構造が疎であり物質透過性が高い。よって、ナノ薬剤は正常血管からは漏出せず、腫瘍血管からのみ効果的に漏出すると考えられている。従って、このような血管透過性を調べる技術は、有効なナノ薬剤の設計・開発に不可欠である。

これまでのナノ薬剤開発では、培養細胞や実験動物を用いてその効果を検証していた。しかし、培養皿などセンチメートルサイズの空間で静置培養される細胞は、マイクロメートルサイズの空間で血流にさらされている血管の細胞と大きく環境が異なる。また実験動物はブラックボックスであり、一般に体内の深部で起こるナノ薬剤の血管からの漏出を観察できず、薬剤が集積したか否かの結果でしか判断できない。加えて、ナノ薬剤が透過する血管壁の孔は形状・サイズが不均一であり、これらの物理的パラメータが透過性に与える影響を評価できない。すなわち、ナノ薬剤の血管透過性を精密評価する方法は現在のところ存在しない。

申請者は微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイスを用い、細胞を組み込んだ新たな血管モデルを構築すると共に(Electrophoresis, 33, 1729 (2012); PLOS ONE, 10, e0137301 (2015))、細胞を用いずに構築した擬似血管構造からのナノ粒子の漏出を評価してきた(Proc. MicroTAS 2013, 1818 (2013); Anal. Biochem., 458, 72 (2014))。細胞を用いないことで、血管壁の孔のサイズを始めとする物理的パラメータが透過性に与える影響を評価可能となる。そこで、これらの研究を更に推し進めることで、現在は不明であるナノ薬剤の血管透過性を生体外で明らかにするための新たな実験系が構築できると考えた。

2. 研究の計画

本研究ではマイクロ流体デバイスを用い、ナノ薬剤の血管透過性を評価するための無細胞生体モデルを開発する。マイクロメートルサイズの流路内に腫瘍血管構造を再現し、血流を模擬する流れの存在下でナノ薬剤の透過性を評価する。具体的に以下の3点を検討する。

(1)多孔膜を有するデバイスでの無細胞系ナノ薬剤透過試験

漏出性のある血管壁を模倣した多孔膜をデバイスに組み込み、ナノ薬剤に見立てた蛍光標識ナノ粒子の透過性を評価する。孔のサイズや粒子のサイズと透過性の関係を明らかにする。

(2)小型ポンプを組み込んだデバイスでのナノ薬剤透過試験

小型ポンプをデバイスに組み込み、ナノ薬剤の透過性を評価する。本ポンプを用い、微少量の溶液を循環させながら透過試験を行うことで、血管透過性に加えてナノ薬剤の血中滞在性も評価可能となる。このような血中滞在性の評価は、生体内でナノ薬剤を長期にわたって血中に存在させ、患部での薬剤濃度を維持する上で極めて重要である。項目1と同様に透過試験を行い、血管透過のみを調べた結果と比較考察する。

(3)血球や血清との共存系でのナノ薬剤透過試験

血球は血液の約半分を占めナノ薬剤の血管内分布に影響するほか、血清中に含まれる様々なタンパク質は吸着によりナノ薬剤の表面電荷に影響する。そこでこれらの共存下で上記の実験を行い、ナノ薬剤の透過性を評価し、生体内でナノ薬剤が効率的に血管を透過するための要素を明らかにする。

3. 研究の成果

(1)間質・リンパ管を考慮したデバイスの作製

前年度に開発したデバイス作製法を発展させ、血管に加えて、生体内で腫瘍を取り巻く間質、およびナノ薬剤の腫瘍からの回収を担うリンパ管に相当する要素をデバイスに組み込むこととした。まず、前年度に開発した作製法では、流路を仕切る多孔膜を組み込むことができるものの、特殊な装置による基板の表面処理が必要であり、本法を世に広めるには不利と考えた。そこで表面処理をせず、重ね合わせた基板をベイクすることで同等の操作を実現した。

具体的にはまず、レーザー加工で作製したマイクロ流体デバイスの鋳型をシリコーンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン(PDMS)でかたどりしたのち、別のシリコーンゴム基板と重ねベイクして貼り合わせた。基板に顕微鏡下で切り込みを入れ、デバイス上の流路を仕切るように多孔膜を挟み込んで接合した。本実験では多孔膜で仕切られた3本の流路を有するデバイスを作製し、それぞれ血管部・間質部・リンパ管部とした。間質部には、間質を模擬する物質としてマトリゲルを、申請者らの既報(Anal. Biochem. 2014)に従い充填できた。一方、生体内で間質を構成するヒト皮膚線維芽細胞NHDFを流路に充填し、実際の生体組織により近い構造を作ることも検討した。

(2)間質流存在下でのナノ粒子透過試験

蛍光標識ポリスチレンナノ粒子を血管部に、緩衝液をリンパ管部にそれぞれ導入し、ナノ薬剤透過試験を行った。シリンジポンプの高さを変えることで、生体内の血管から間質に向かう流れ（間質流）に相当する流れを起こし、透過性を調べた。間質流存在下で、リンパ管部に到達する粒子量が増加し、本研究の原理を実証できた。一方、間質部にとどまる粒子量は間質流存在下で減少し、間質部にとどまりやすいナノ薬剤の重要性を示唆する、極めて興味深い結果が得られた。

(3)全血中でのナノ粒子透過試験

これまで用いてきた緩衝液に代わり、市販のヒト全血を用いた実験を行った。ヒト全血をリン酸緩衝生理食塩水で希釈しさらに蛍光標識ナノ粒子を一定量加え、これをマイクロ流路にシリンジポンプで送液して蛍光観察した。ヘマトクリット値（血液中に含まれる血球の体積分率）20%以下で蛍光輝度が一定となり、これらの条件では全血成分の影響を気にせずに蛍光観察できることが分かった。血管および間質に相当する要素を有するデバイスに試料を流し経時観察したところ、全血成分存在下においても間質部へのナノ粒子透過量は直線的に増加していくこと、および緩衝液を用いた場合と比べ透過量が増大していることを示唆する結果を得た。

4. 研究の反省・考察

(1)間質・リンパ管を考慮したデバイスの作製

マイクロ流体デバイスの作製において、基板のベイクは極めて一般的な操作であり、これのみでデバイスを作製できたことの意味合いは大きい。今後、さらに高度なデバイスの開発を目指していく。間質部に線維芽細胞を組み込んだ実験では、数日間にわたる培養が達成できていない。培地交換の頻度を培養皿での実験よりも高くすることが必要だと考えられる。

(2)間質流存在下でのナノ粒子透過試験

間質流の影響を評価するきっかけとなるデータを得られ、極めて有意義であった。ただし、シリンジポンプの高低差のみでは流量制御に精確さを欠く部分もあるため、今後さらに検討

を進めていく。

(3)全血中でのナノ粒子透過試験

ナノ粒子の性質だけでなく、ナノ粒子が置かれている環境の影響も考慮する必要があることを示した、極めて興味深いデータが得られたと考えている。次年度、さらに検討を進めていく。

5. 研究発表

(1)学会誌等

①“マイクロ血管モデルの構築と分析化学的応用”、佐々木直樹、佐藤香枝、分析化学、65(5)、241-247 (2016).

②“A Membrane-Integrated Microfluidic Device to Study Permeation of Nanoparticles through Straight Micropores toward Rational Design of Nanomedicines”, N. Sasaki, M. Tatanou, T. Suzuki, Y. Anraku, A. Kishimura, K. Kataoka, K. Sato, Analytical Sciences, 32(12), 1307-1314 (2016).

(2)口頭発表

①“無細胞マイクロ微小循環モデルの開発”、臼井裕也、佐々木直樹、第76回分析化学討論会、岐阜薬科大学・岐阜大学、平成28年5月

②“Fabrication of an easy-to-observe membrane-integrated microfluidic device”, S. Watanabe, ○N. Sasaki, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2016), Dublin, IRELAND, 平成28年10月

(3)出版物

「腫瘍への届きやすさ評価　東洋大、マイクロチップ開発」日経産業新聞、平成28年5月2日

平成28年度(第41回)学術研究振興資金 学術研究報告

学校名	中部大学	研究所名等	共同研究
研究課題	自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による高感度センサーの開発 －新型鳥インフルエンザの選択的検出の研究－	研究分野	工学
キーワード	① 鳥インフルエンザ ② ヒト適応性変異株の選択的検出 ③ パンデミック監視 ④ ナノカーボン素子 ⑤ 低次元系物性 ⑥ 超高感度センサー ⑦ 特異的結合分子設計 ⑧ 素子プロセス開発		

○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
河原敏男	工学部	教授	全体の統括、デバイスの創製

○研究分担者

氏名	所属	職名	役割分担
鈴木康夫	生命健康科学部	客員教授	インフルエンザおよびウイルス受容体糖鎖関連研究
玉田敦子	人文学部	准教授	データの統計学的解析
上村和秀	生命健康科学部	准教授	糖鎖およびウイルス関連研究の遂行
中北愼一	香川大学 総合生命科学研究センター	准教授	シアロ糖鎖の化学合成および天然素材からの調製と応用

自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による高感度センサーの開発
－新型鳥インフルエンザの選択的検出の研究－

1. 研究の目的

インフルエンザは世界で最も広く分布する人獣共通感染症であり、その病原体インフルエンザウイルスは完全制圧不可能な最強ウイルスの一つである。そして、ヒトへの感染性を獲得したヒト型インフルエンザの脅威がWHO (世界保健機関) より発信されている。次期パンデミックが危惧される高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1亜型、以下H5N1）は、既に世界63ヶ国以上に広がり、16ヶ国でヒトへ伝播している。ヒトにおける致死率は約60%で、極めて高い。しかも、そのウイルスは、極めて変異しやすく、且つ渡り鳥やブタなどの中間宿主を介して､飛沫感染などにより、速やかな地球規模の伝播能力を持つ。これが、ヒト世界で流行可能なヒト適応変異を遂げた場合、数千万人規模の死者が出る可能性がある。そこで、ヒト適応変異を十分な検出感度で検出可能な、感染防疫体制構築のための実用的監視技術の世界展開が切望されている。

ヒト適応性変異は、現行の遺伝子や抗原変異監視では決して検出できず、唯一、ヒト喉の受容体シアロ糖鎖結合性で検出出来ることを我々は明らかにしてきた。そこで、ウイルス受容体シアロ糖鎖を用いたセンサーを開発し、その感度向上により世界規模の迅速監視が可能な実用的監視体制を築くことを目的に研究を行う。特に、H5N1のヒトへの適応性獲得変異シグナルをウイルスヘマグルチニン分子とその受容体シアロ糖鎖との特異的分子間相互作用で検出する。

センサーとしては、ナノカーボン材料による電子デバイス構造を用いる。ナノカーボン材料の一つであるグラフェンでは、その2次元性に起因する特異な電子構造、及び、ナノカーボンの高電子移動度や巨大な表面積を活用することにより、従来の感度を凌駕する高感度で、非標識かつ簡便に標的を電気的に検出できるセンサー系の構築が可能である。我々は、グラフェンを用いた電界効果トランジスタのデバイスプロセスを研究開発してきたが、グラフェンをセンサー素子とすることでシアロ糖鎖の特異的相互作用を検出する。特に、電気的検出のため電場の遮蔽距離を考慮した短い糖鎖分子系を用いたセンサープロセスの研究開発を行う。

本研究では、原理的に超高感度化が可能であるナノカーボン材料（グラフェン）とウイルス受容体シアロ糖鎖疑似分子の研究開発を発展させることで、これらを組み合わせた電子デバイスを開発する。そして、ウイルス感染の際に反応しやすい糖鎖の構造や分布を明らかにすることで、鳥ウイルスのヒト適応性獲得を短時間に目視的に捉える世界初の高精度、高感度検出技術の開発とその国際的な実用化の達成を目指す。特に、鳥ウイルスのヒト適応性変異を事前に超高感度（ウイルス粒子数10個以下）、安価（開発途上国で使用可）、軽量（5グラム以下）、高速（5分以内）、高性能（鳥ウイルス、そのヒト適応変異株を分別可）に検出・監視出来る電子デバイス開発を行う。そして、超高感度センサーによる事前診断・検出で世界流行阻止の感染防疫基盤の創製を目的としている。

2. 研究の計画

本課題では、鳥、ヒト型インフルエンザウイルスを超高感度で識別出来る新しいグラフェン構造体を創製する。そのためには、自然界の鳥及びヒト型インフルエンザウイルス受容体を解明し、単離又は化学合成する。それをグラフェン上に化学的に結合させた世界初の鳥およびヒト型インフルエンザウイルス受容体担持グラフェンを創製することでデバイス化、超高感度センサーを開発する。さらに、世界規模の防疫体制を目指す。そこで、平成28年度は次の2つの課題を実施した。

(1) グラフェンの成長を利用したデバイス化

自己組織化成長プロセスで、インフルエンザウイルスセンサーを作製すると共にその最適化を図る。特に、糖鎖のシアロ糖鎖プローブの構造多様化・分布制御を行う。糖鎖の幾何学的構造(長さ、枝分かれ、修飾基等)や、糖鎖の大域的分布構造等によりウイルスの反応様式が変化するので、多様な糖鎖プローブを調製し、糖鎖の構造とウイルスとの反応様式を調べることで、効果的にウイルスと反応するシアロ糖鎖プローブ・分布構造を開発する。さらに、ウイルスヘマグルチニン(HA)とシアロ糖鎖との分子相関の解析・反応形状評価を行う。分子反応機構解析では、各種反応時間、反応温度、pH、シアロ糖鎖の集積密度、シアロ糖鎖のグラフェン上での存在様式について検討して、HAとシアロ糖鎖との結合性・ウイルス動態を解析する。また、クライオ電子顕微鏡を用いて、糖鎖の幾何学的形状を観察する。同時に、糖脂質単分子膜や人工リボソーム脂質2重膜等の表面での反応と比較を行うことで、生物学的知見との対応を明らかにして高感度化を図る。

(2) 超高感度鳥インフルエンザセンサーによるウイルス調査

高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)がヒトへ伝播し、ウイルスのヒトへの適応性変異が起こりつつある国（過去ヒトへの感染が最も多発しているアジア諸国、インドネシア、ベトナム等）の機関、大学、研究所との共同監視体制を構築する。この体制のもとに、新開発の自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による超高感度センサーを用いて、ヒトへの感染力の強い、ヒト型受容体シアロ糖鎖結合性獲得変異株のフィールド監視調査を試みる。これにより、今回構築した世界初の革新的鳥ウイルスのヒトへの適応性変異獲得変異株を事前に発見する国際監視基盤と、新たなインフルエンザ世界流行を事前に阻止する体制基盤の確立を進める（WHO、日本国立感染症研究所とも連携する）。

3. 研究の成果

(1) グラフェンの成長を利用したデバイス化

平成27年度までに検討したナノカーボン材料の成長条件最適化を受けて、デバイスプロセスに関して検討を行った。まず、ゲート酸化膜の欠陥を避ける等のために、チャネル領域以外の配列制御していないナノカーボン層を除去する必要がある。酸素プラズマによるエッチングと転写法による除去を試みて、酸素プラズマエッチングで6桁程度ゲートリーク電流を減少させることが出来(図１)、転写法ではさらに1/3になった。その結果、p型のゲート電圧－ドレイン電流特性が得られた。また、金属特性の素子では水素エッチングにより電気伝導率が向上した。その際、ノイズ特性は1/f型となるが、水素エッチングでノイズ強度が減少し(図2)、電極界面でのコンタクトの改善が出来たことが分かった。

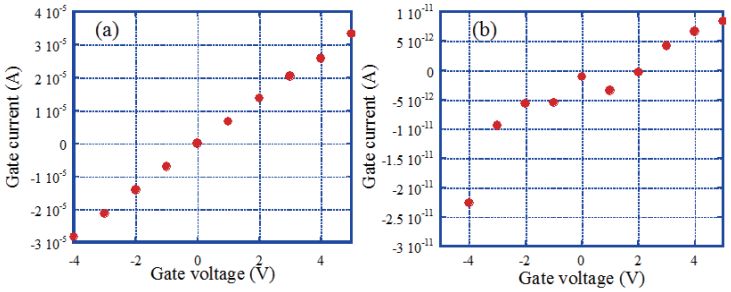


図1：O_2エッチング前後のゲートリーク特性。(a)前(b)後。

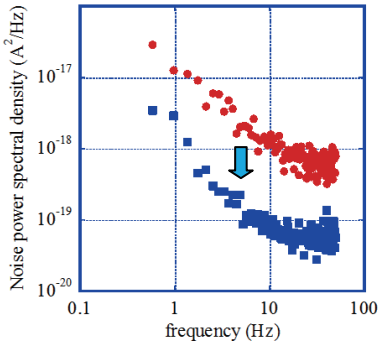


図2：H_2エッチングによるノイズ強度の減少。●：なし■：あり

糖鎖分子の最適化として、電気的検出では分子サイズが重要となるため、Sialylglycopeptide (SGP)と高分子であるシアロ糖鎖ポリマーを比較した。シアロ糖鎖ポリマーとHAタンパク質の反応に対する吸光度を評価することで、ヒト型受容体、鳥型受容体への結合性を評価した。一例として、図3にシアロ糖鎖ポリマーとヒト型、鳥型ウイルスの反応に対する吸光度を示す。図3で赤線はヒト型受容体、青線は鳥型受容体への結合性を示す。鳥型、ヒト型に応じて、反応性が高

い糖鎖の配位が異なることが分かった。SGPでも同様であるが、反応性にプレートごとのばらつきが見られた。これは、糖鎖の展開時に複数の吸着サイトが確率的に反応するためである。また、原子間力顕微鏡を用いて凝集等を検討すると共に、高さの検討を行い、デバイス化に関する検討を行った。

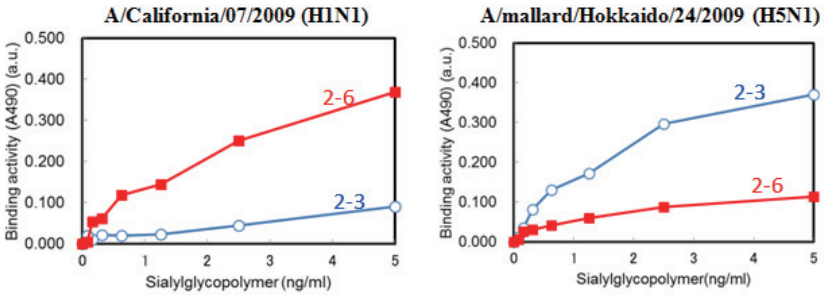


図3:ヒト型、鳥型ウイルスとシアロ糖鎖ポリマーの反応

(2) 超高感度鳥インフルエンザセンサーによるウイルス調査

平成27年度に検討したエジプトでの調査に引き続き、自然界で分離された鳥およびヒトインフルエンザウイルス(日本国内分離株、及び、実際に鳥からヒトへ伝播している国での分離株)の反応特異性を評価した。インドネシアで豚から分離されたH5N1型ウイルスで、2-3配位の糖鎖と2-6配位の糖鎖の両方に結合するウイルスが発見された。そして、鳥のインフルエンザウイルスからの変異が遺伝子解析により分かった。また、中国ではライブマーケットの鳥から分離されたH6N2型ウイルスの中に、2-6配位の糖鎖に結合性を示すウイルスが数多く(分離株中の34%)発見された。

以上、エジプトやインドネシアで分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の中に、ヒト型、鳥型レセプターシアロ糖鎖の両方へ結合性をもつ変異ウイルス株を複数見いだした。

4. 研究の反省・考察

(1) グラフェンの成長を利用したデバイス化

数層グラフェンに対する材料プロセス・デバイスプロセスの最適化は進んだが、十分な移動度が得られなかった。今後もナノカーボン材料の最適化を行い、高感度化を図りたい。また、赤血球凝集阻害活性の実験等から糖鎖の干渉を避けるスペースの重要性が明らかとなった。そのため糖鎖分子単独での構造最適化に加えて、分布制御が重要であると考えられる。今後、高分子鎖への糖鎖の修飾や脂質膜の制御による分布制御等、複数の制御方法を検討し、分布制御糖鎖プローブを使った超高感度検出システムの開発を行っていきたい。

(2) 超高感度鳥インフルエンザセンサーによるウイルス調査

エジプトに続き、インドネシアや中国でも2-6配位の糖鎖に結合を示すウイルスを見つけたが、タイなどその他の国でも後半に調査を行うことが出来ればよかった点が反省点である。今後、研究者間の交流をすすめて、さらなる調査、及び、既に調査を開始した国でも継続して調査を行い、鳥インフルエンザのヒト型レセプターへの結合性の変異を追いかけていきたい。

5. 研究発表

(1)学会誌等

① 河原敏男, 玉田敦子, 中北愼一, “シアロ糖鎖修飾による数層グラフェンインフルエンザバイオセンサーの研究開発,” 総合工学, 28 (2016) 22–29.

② R. Papon, K. P. Sharma, R. D. Mahayavanshi, S. Sharma, R. Vishwakarma, M. S. Rosmi, **T. Kawahara**, J. Cline, G. Kalita, M. Tanemura, “CuNi binary alloy catalyst for growth of nitrogen-doped graphene by low pressure chemical vapor deposition,” Phys. Status Solidi Rapid Res. Lett., **10** (2016) 749–752.

③ 玉田敦子, “古代ギリシアのリベラルアーツ構想とその近代化,” Glocal, **9** (2016) 4–5.

④ **T. Kawahara**, Singh K. Rupesh, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, R. Utsunomiya, T. Matsuba, “Plasma process for the improvements of device characteristics for self-aligned nano-carbon FETs,” Proc. of 38th International Symposium on Dry Process, (2016) 51–52.
⑤ Y. Kodama, H. Hiramatsu, M. Honda, **Y. Suzuki**, Y. Ito, T. Kawasaki, **K. Uemura**, “Recognition of mumps virus by mannan-binding lectin,” Immunobiology, **221** (2016) 1150-1151.
⑥ **T. Kawahara**, H. Hiramatsu, **Y. Suzuki**, **S. Nakakita**, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, T. Matsuba, R. Utsunomiya, “Development of Nano-Carbon Biosensors Using Glycan for Host Range Detection of Influenza Virus,” Condens. Matter, **1** (2016) 7.
⑦ **A. Tamada**, “Le goût et la sensibilité pour le sublime,” Implications philosophiques, numéro special "Culture et sentiment" (2017).

(2) 口頭発表
① 玉田敦子, “近代とリベラルアーツ ― 8世紀フランス修辞学を中心に,” 中部大学国際人間学研究科第5回研究会, 中部大学 (2016年7月27日).
② 河原敏男, 平松宏明, 鈴木康夫, 中北愼一, 渡邊洋平, 大野恭秀, 前橋兼三, 小野堯生, 金井康, 松本和彦, “インフルエンザバイオセンサー開発のための糖鎖分子の検討,” 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 朱鷺メッセ, 2016年9月13日～16日, 14p-P19-9, (2016年9月14日).
③ **T. Kawahara**, H. Hiramatsu, **Y. Suzuki**, **S. Nakakita**, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, T. Matsuba, R. Utsunomiya, “Developments of the nano-carbon bio sensors using glycan for influenza virus”, 13th International Conference on. Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN2016), Rome, Italy, 2016年10月9日～15日, 127 (2016年10月14日).
④ **T. Kawahara**, Singh K. Rupesh, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, R. Utsunomiya, T. Matsuba, “Plasma process for the improvements of device characteristics for self-aligned nano-carbon FETs,” 38th International Symposium on Dry Process, 北海道大学, 2016年11月21日～11月22日, P-4 (2016年11月22日).
⑤ 児玉佳輝, 平松宏明, 本田昌士, 鈴木康夫, 伊藤康彦, 川嵜敏祐, 上村和秀, “マンナン結合タンパク質によるムンプスウイルスの認識,” 糖鎖科学中部拠点「若手の力」フォーラム, 岐阜大学　応用生物科学部 (2016年11月26日).
⑥ 本田昌士, 橋詰祐希, 森本達也, 小野孝彦, 川嵜敏祐, 上村和秀, “IgA 腎症増悪機序におけるマンナン結合タンパク質の役割－HIGA マウスを用いた 解析－,” 糖鎖科学中部拠点「若手の力」フォーラム, 岐阜大学　応用生物科学部 (2016年11月26日).
⑦ **T. Kawahara**, H. Hiramatsu, Y. Ohmi, **Y. Suzuki**, **S. Nakakita**, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, “Comparison of Sugar Chains of Sialylglycopeptide and Sialyllactose for the Application of Influenza Bio Sensor,” 24th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM24), HAWAII CONVENTION CENTER, 2016年12月14日～16日 (2016年12月14日).
⑧ 川田拓哉, 小野堯生, 金井康, 大野恭秀, 前橋兼三, 井上恒一, 渡邊洋平, 河原敏男, 鈴木康夫, 中北愼一, 松本和彦, “ヒト感染性の即時鑑別のための糖鎖機能化グラフェンを用いたインフルエンザウイルスの検出,” 第64回応用物理学会春季学術講演会, パシフィコ横浜, 2017年3月14日～17日, 15a-B6-9 (2017年3月15日).
⑨ **A. Tamada**, “Enthousiasme, sublime, urbanite,” 名古屋大学高等研究院プロジェクト研究会, 一橋大学講堂 (2017年3月22日).

(3) 出版物
① **T. Kawahara**, H. Hiramatsu, **Y. Suzuki**, **S. Nakakita**, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, T. Matsuba, R. Utsunomiya, “*Atomically Controlled Surfaces Interfaces and Nanostructures*,” edited by A. Bianconi, A. Marcelli, Superstripes Press, Rome (2016) 総ページ数/340.
② 池内了、安藤隆穂、玉田敦子, “*中部高等学術研究所共同研究「人文学の再構築」第1回研究会報告書*、*Studies Forum Series*,” 中部高等学術研究所, (2016) 総ページ数/27.

学校名	工　学　院　大　学	研究所名等	共　同　研　究	
研究課題	ほ乳類キチナーゼの活性喪失とその活性化に関する研究 －酵素の活性化に関わる研究－	研究分野	農　学	
キーワード	①キチナーゼ, ② AMCase, ③ 酵素の不活性化, ④ 酵素の活性化			

○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
小山　文隆	先進工学部生命化学科	教授	研究代表者, 統括, 組換えタンパク質のベクターの構築,発現

○研究分担者

氏名	所属	職名	役割分担
坂口　政吉	先進工学部生命化学科	准教授	組換えタンパク質の精製・酵素化学的解析

ほ乳類キチナーゼの活性喪失とその活性化に関する研究
－酵素の活性化に関わる研究－

1. 研究の目的

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine の重合体で、真菌類、甲殻類、昆虫の主な構成成分である。ヒトとマウスは内在性のキチンを持たないが、キチンを加水分解する二種類の酵素、キトトリオシダーゼ (Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase、 AMCase)、を発現している。

AMCase は、喘息、アレルギーで発現が増加する。さらに、ヒト AMCase の一塩基多型 [non-synonymous SNPs (nsSNPs) がコード]によるアミノ酸置換は喘息に関係している。これらのことから、AMCase が喘息、アレルギー等の疾患の発症において重要な役割を果たしている。しかし、その病理学的機構は不明な点が多い。

ヒトとマウスの AMCase におけるアミノ酸配列の同一性は 86%、相同性は 90% で、両分子はよく似ている。大腸菌で、マウスとヒト AMCase を発現し、キチナーゼ活性を比較した。驚いたことに、ヒト AMCase のキチナーゼ活性はマウスの 1/75 で、活性が非常に低かった。これらの結果は、ヒト AMCase が、進化の過程で、機能を喪失(偽遺伝子化、Pseudogene 化)しかけている酵素である可能性を強く示唆した。

本研究では、ヒト AMCase の不活性化メカニズムを明らかにし、その活性化を試みた。以下の 2 項目を研究した。

(1) ヒト AMCase の酵素活性喪失のメカニズムを、ヒトとマウスのキメラ体作製、AMCase の 1 塩基置換 (nsSNPs にコード) に基づくアミノ酸置換に注目して明らかにした。
(2) ヒト AMCase (不活性型) の活性化、マウス AMCase (活性型)の不活性化を試みた。

2. 研究の計画

(1) ヒト AMCase の酵素活性喪失のメカニズム

① マウス-ヒト AMCase のキメラ体発現ベクターの構築と大腸菌での発現、精製

ヒトとマウス AMCase cDNA 断片を exon 単位で互いに繋いで、キメラ体を 6 種類作製した。作製した AMCase キメラ体 cDNA を発現ベクター pEZZ18 に導入し、大腸菌で発現した。

② AMCase キメラのキチナーゼ活性の解析

発現したキメラ体のキチナーゼ活性を合成基質(4-methylumbelliferyl *N,N'*-diacetyl-β-D-chitobioside) を使って測定し、キメラ体相互で比較した。高分子量キチン（コロイダルキチン）を各キメラ体が分解した際の分解産物の還元末端を蛍光標識し、電気泳動で分離し、比較した。

③ ヒト AMCase の不活性化に関する実験

ヒト AMCase のアミノ酸置換体（Variant A、Variant B、Variant C、Variant C/B）の cDNA を調製した。これらは nsSNPs にコードされている。Variant A～Variant C はすでに論文で報告されている variants である。しかし、Variant C/B は、ヒトでは報告されていない (Variant C の N 末と Variant B の C 末領域をつないで創製した)。Variant C/B のアミノ酸置換は、マウス AMCase に最も対応している。作製した ヒト AMCase variant cDNAs を大腸菌発現ベクター pEZZ18 に組み込み、上述のように大腸菌で発現した。発現したヒト AMCase variants のキチナーゼ活性について、合成基質を用いて比較した。コロイダルキチンをヒト AMCase variants が分解した際の分解産物の比較を行った。

(2) ヒト AMCase (不活性型) の活性化、マウス AMCase (活性型)の不活性化

① ヒト AMCase の活性化に関する実験

前ページ図3 で示した各種組換え体について、nsSNPs にコードされたアミノ酸置換の位置と種類に注目し、不活性なヒト AMCase の活性化が起こるかどうか、検討する。活性化が起きた場合、どのような nsSNPs にコードされたアミノ酸かを明らかにする。

② マウス AMCase の不活性化に関する実験

マウス AMCase の N 末端領域に nsSNPs にコードされた 3 アミノ酸置換 (D45N、N47D、 M61R) を導入し、マウス AMCase の不活性化を試みた。3 種類の nsSNPs にコードされたアミノ酸置換 (D45N、 N47D、 M61R) をマウス AMCase に導入し、 3つの組み合わせのコンストラクト（NDM、 DNR、 NDR と名付けた）を作製した。作製したマウス AMCase Variant cDNAs を pEZZ18 に組み込み、上述のように大腸菌で発現した。発現したマウス AMCase variants のキチナーゼ活性を測定し、variants 間で比較した。

3. 研究の成果

(1) ヒト AMCase の酵素活性喪失のメカニズム

AMCase は、喘息とアレルギー性炎症、食物消化に関わっている。しかし、AMCase のキチナーゼ活性の遺伝的制御に関する知見は、とても限られていた。組換えヒトAMCase のキチナーゼ活性をマウス AMCase と比較した時、ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、マウスに比べ、約 70 倍低下していた。このことから、本研究において、ヒト AMCase が活性を喪失していることを明らかにした。

次に、ヒトとマウスで AMCase のキメラタンパク質を作製することで、ヒト AMCase のキチナーゼ活性低下の原因がキチナーゼの活性中心を含む N 末領域に存在することを明らかにした。

ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、nsSNPs にコードされたアミノ酸置換によって変化した。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、N45、D47、R61 をマウス AMCase のアミノ酸配列において保存されている D45、N47、M61 に置換することによって著しく上昇させることができた。

(2) マウス AMCase の不活性化に関する実験

マウス AMCase のキチナーゼ活性は M61R 変異を導入することで顕著に減少させることができた。さらに、進化的解析から、AMCase の M61 は、ヒトやオランウータンを除いた他の霊長類やほ乳類で保存されたものであった。オランウータンの AMCase は 61I であり、これもマウス AMCase に置換した際にキチナーゼ活性を低下させた。これらのことから、M61 は、AMCase のキチナーゼ活性にとって重要なアミノ酸残基であることが示された。

4. 研究の反省・考察

平成 28 年度の計画は、ほぼ達成された。

本研究の結論として、ヒト AMCase キチナーゼ活性が nsSNPs によって制御され、高い活性を有したヒト AMCase variant のアミノ酸置換は、マウス AMCase のアミノ酸配列と一致することを明らかにした

本研究では、ヒト AMCase のキチナーゼ活性の喪失と活性化を調べてきた。ヒト AMCase のキチナーゼ活性の喪失は、この分子が進化の過程で機能を失い、偽遺伝子化しつつあることを示している。偽遺伝子化は、ゲノムレベルで起こる進化学的現象で、環境の変化に対応するため、遺伝子にアミノ酸置換が入り、機能喪失に至ったと推定している。

本研究では、61 番目の Met が、機能獲得的ともいえる強いキチナーゼ活性に関係することを明らかにした。Seibold らの集団遺伝学的解析で、ヒト AMCase の nsSNPs である G339T (Arg61Met) は、喘息に対して保護的に働くと報告されている。本研究の成果と Seibold らの先行研究で、喘息の抑制には AMCase のキチナーゼ活性が深くかかわる可能性を強く示している。

本研究で、機能喪失したヒトのキチナーゼで置換しているアミノ酸を明確にし、活性が高い

ほ乳類キチナーゼで保存されているアミノ酸に置換することで、不活性酵素の再活性化に成功している。この概念は、最小限の遺伝子操作で、他の不活性化酵素の再活性化にも応用できる。さらに、活性化したヒト AMCase は、喘息、アレルギーなど、AMCase がかかわる様々な疾患の治療法、補充療法の開発に用いることが出来る。

5. 研究発表

(1)学会誌等

① Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kimura, M., Kobayashi, Y., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Kamaya, M., Kino, Y., Bauer, P.O. and **Oyama, F.** (2016) Loss and gain of human acidic mammalian chitinase activity by nonsynonymous SNPs. ***Mol. Biol. Evol*. 33**, 3183–3193. Oxford University Press, December 14, 2016.

② Ohno, M., Kimura, M., Miyazaki, H., Okawa, K., Onuki, R., Nemoto, C., Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Nukina, N., Bauer, P.O. and **Oyama, F.** (2016) Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. ***Sci. Rep.* 6**, 37756. Nature Publishing Group, November 24, 2016.

③ Kimura, M., Wakita, S., Ishikawa, K., Sekine, K., Yoshikawa, S., Sato, A., Okawa, K., Kashimura, A., **Sakaguchi, M.**, Sugahara Y., Yamanaka, D., Ohno, N., Bauer, P.O. and **Oyama, F.** (2016) Functional properties of mouse chitotriosidase expressed in the periplasmic space of *Escherichia coli*. ***PLoS ONE* 11**, e0164367. Public Library of Science October 7, 2016.

(2)口頭発表

① 大川一明、大野美紗、樫村 昭徳、坂口政吉、菅原康里、小山文隆、ヒトとマウスの酸性哺乳類キチナーゼの機能解析と比較、第30回日本キチン・キトサン学会大会、ウエスタ川越、2016年8月19日

② 小山文隆、大野美紗、木村将大、大川一明、田畑絵理、脇田悟誌、樫村昭徳、坂口政吉、菅原康里、マウス胃における酸性ほ乳類キチナーゼの発現と生産細胞の同定、第30回日本キチン・キトサン学会大会、ウエスタ川越、2016年8月19日

③ Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kobayashi, Y., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., **Oyama, F.**, Loss and recovery of chitinolytic activity by amino acid substitutions in human acidic mammalian chitinase, the American Society of Human Genetics (ASHG) 66th Annual Meeting (Vancouver), カナダ バンクーバー, 2016年10月21日

④ Kimura, M., Wakita, S., Ishikawa, K. Sekine, K. Yoshikawa, S., Sato, A. Okawa, K., Kashimura, A., Yamanaka, D., Ohno, N., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., **Oyama, F.**, Protein A-mouse Chit1-V5-His expressed in Escherichia coli possesses chitinase functions comparable to CHO-expressed protein, the American Society of Human Genetics (ASHG) 66th Annual Meeting (Vancouver), カナダ バンクーバー, 2016年10月21日

⑤ **Oyama, F.**, Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A. Kobayashi, Y. **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Inactivation of mouse AMCase by introducing amino acid substitutions encoded by single-nucleotide polymorphisms in human AMCase gene, the American Society of Human Genetics (ASHG) 66th Annual Meeting (Vancouver), カナダ バンクーバー, 2016年10月19日

(3)出版物

なし

学校名	東京農業大学	研究所名等	共同研究
研究課題	脳栄養学的手法確立による栄養素による脳機能制御機構の解明	研究分野	農学
キーワード	①脳機能 ②神経科学 ③栄養素 ④不飽和脂肪酸 ⑤ビタミンA ⑥ビタミンB1 ⑦精神疾患		

○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
喜田 聡	生命科学部	教授	研究全般の実施

○研究分担者

氏名	所属	職名	役割分担
上原 万里子	応用生物科学部	教授	ミネラルを中心とした栄養素欠乏動物の作製と栄養生化学的解析の実施
大石 祐一	応用生物科学部	教授	不飽和脂肪酸やビタミン類を中心とした栄養素欠乏あるいは過剰摂取動物の作製と栄養生化学的解析の実施
福島 穂高	生命科学部	助教	神経科学的実験、行動学的解析、生理学的解析の実施

脳栄養学的手法確立による栄養素による脳機能制御機構の解明

1. 研究の目的

現在、脳機能に対する栄養素の役割が網羅的に解析され、実験・科学的事実に基づいた「脳栄養学」的知識が社会に提供される必要に迫られている。また、環境要因としての栄養素と精神疾患発症との関連性も不明であり、栄養素が精神疾患の病態に与える影響は解明されていない。一方、遺伝子操作マウスを解析する最新の神経科学的手法を活用すれば、脳機能に対する種々の栄養素の機能を明らかにすることも可能である。そこで、本課題では、最新の神経科学的手法と栄養学的手法を組み合わせた脳栄養学的手法を用いて、遺伝子レベルから行動レベルまで解析を進め、脳機能に対する栄養素の役割を統合的に解明する。さらに、精神疾患モデルマウスに対する栄養素摂取の効果を解析し、研究成果の応用を試みる。

2. 研究の計画

脳機能に対するビタミンA及びB１、ミネラル（Mg）の役割を以下の方針で解析する。

（１）研究方針

①遺伝子レベルの解析（次世代シークエンサーを用いたトランスクリプトーム解析）

次世代シークエンサーを用いて海馬及び前脳等の発現プロファイルを解析し、栄養素が作用する細胞内情報伝達経路を同定し、栄養素の摂取不足と過剰摂取が及ぼす影響を明らかにする。

②細胞レベルの解析（イメージングによるニューロン機能・性状解析）

発現解析で栄養素の標的として同定された脳部位あるいはニューロンを主として解析する。Arc発現のレポーターマウスあるいはThy1レポーター等マウスの脳を透明化し、(1)で同定されたニューロンを３次元的に解析し、各種マーカーを用いてニューロンを形態解析する。

③回路レベルの解析（海馬を中心とした電気生理学的解析）

in vivoユニット記録解析法及びin vivoカルシウムイメージング手法を用いて、海馬ニューロンの生理学的解析を実施し、シナプス伝達、さらには、回路制御に対する栄養素の役割を理解する。

④行動レベルの解析（行動バッテリー解析）

学習記憶課題、オープンフィールドテスト、不安行動解析課題、うつ様行動解析課題、社会行動・攻撃性評価課題、運動能力評価課題、概日リズム測定等により、栄養素の役割を評価する。

（２）実験系の説明

①ビタミンAのマウス解析系の説明

研究代表者は、ビタミンAの代謝産物レチノイン酸の核内受容体のドミナントネガティブ型RARα変異体(dnRAR)あるいは野生型RARを成体期に前脳領域特異的に発現させたコンディショナル変異マウス(dnRARマウス、RARマウス)を作製している。これら変異型マウスを用いて、ビタミンA情報伝達経路のgain of function及びloss of functionの影響を解析する。これら変異型マウスにレチノイン酸を投与した効果も解析し、脳機能に対するビタミンAの役割を総合的に理解する。

②ビタミンB1のマウス解析系の説明

ビタミンB1欠乏症であるウェルニッケ・コルサコフ症候群では、健忘や記銘力障害等の記憶能力障害が観察されるものの、ビタミンB1欠乏により記憶障害に陥るメカニズムは不明である。ビタミンB1欠乏食を10日間給餌し、この間チアミン拮抗剤ピリチアミン（0.5mg/kg）を毎日投与してビタミンB1欠乏を進行させ、11日目に塩酸チアミン（100mg/kg）を投与し、通常食で欠乏状態から回復させてビタミンB1欠乏回復マウスを作製し、上記の解析を行う。

③Mg欠乏のマウス解析系の説明

Mg欠乏により学習・記憶の障害が現れることが示唆されているものの、統合的な解析は行われていない。そこで、Mg欠乏食を４週間以上給餌したマウスを用いて、上記の解析を行う。

3. 研究の成果

（１）脳機能に対するビタミンAの役割の解析

①ビタミンAの標的となる記憶能力制御遺伝子の同定（次世代シークエンサーを用いたトランスクリプトーム解析）

次世代シークエンサーを用いて、RARマウスの海馬及び前脳領域を中心とした発現プロファイルの解析を継続した。得られた結果の中から、ムスカリン性アセチルコリンM4受容体に着目してその発現解析を行った。その結果、ムスカリン受容体の発現はマウス海馬においてビタミンA情報伝達経路により顕著な上方制御を受けることが明らかとなった。次にムスカリン性アセチルコリンM4受容体遺伝子プロモーター領域を取得し、*in silico*解析により、転写開始点5’上流にレチノイン酸応答領域に類似した配列を4箇所同定した。これらの類似配列を含むプロモーター領域のレチノイン酸（*All trans*-retinoic acid; ATRA）に対する反応性をNIH-3T3細胞を用いて解析した結果、ATRAによってプロモーター活性が正に制御されることが示され、ムスカリン性アセチルコリンM4受容体遺伝子がビタミンAの標的遺伝子であることが強く示唆された。

②行動レベルの解析

記憶形成に対するムスカリン性アセチルコリンM4受容体の役割を解析するために、このM4受容体のアゴニスト投与による記憶形成に対する効果を解析した。その結果、新規物体認識課題において、学習直後にM4アゴニストを投与した結果、アゴニスト未投与の野生型マウスは24時間後に既知と新規の物体の区別がつかなかったのに対して、アゴニストを投与されたマウスは新規の物体により興味を示し、顕著な記憶形成の向上が観察された。従って、ビタミンAがムスカリン性アセチルコリンM4受容体の発現制御を介して記憶能力を制御するメカニズムの存在が示唆された。

（２）脳機能に対するビタミンB1の役割の解析

①行動・細胞レベルの解析（行動バッテリー解析、ニューロン機能・性状解析のイメージング）

B1欠乏回復マウスでは、海馬依存性記憶形成能力の障害が観察され、記憶障害が不可逆的であることを示し、このマウスはウェルニッケ・コルサコフ症候群モデルであることを示した。B1欠乏により海馬ニューロンの欠落とスパイン密度の減少、すなわち、海馬の変性が誘導されることを示した（***Biosci. Biotechnol. Biochem.*** 80:2425-2436, 2016. 2016年度 ***BBBi***論文賞受賞）。

②ビタミンB1欠乏によるウェルニッケ・コルサコフ症候群の症状改善の試み

転写因子cAMP-responsive element binding protein (CREB)は記憶形成を正に制御しており、さらに、ニューロンの生存に必要であることが示されている。一方、我々はCREB活性型変異体（DIEDML）を前脳特異的に発現するDIEDMLマウスを作製し、このマウスは海馬依存性記憶形成能力の向上を示すことを明らかにした。そこで、CREB活性化がB1欠乏による海馬変性を妨げ、記憶障害を緩和するのではないかと考え、DIEDMLマウスにビタミンB1欠乏処置を施し、解析した。B1欠乏により、野生型マウスでは海馬成熟ニューロン数とスパイン密度の有意な減少が観察されたが、B1欠乏を誘導したDIEDMLマウスでは、これら海馬の変性は観察されなかった。さらに、B1欠乏を誘導したDIEDMLマウスでは海馬依存性記憶能力の低下は観察されなかった。従って、CREB活性化により海馬変性が妨げられ、B1欠乏による海馬依存性記憶障害が改善されることが示され、CREB活性化がB1欠乏誘導性記憶障害を妨げる有用な手段であることが示唆された。

（３）脳機能に対するMgの役割の行動学的解析と海馬形態学的解析

Mg欠乏食を5週間以上給餌したマウスには、恐怖条件づけ文脈課題及び社会的認知記憶課題において海馬依存性記憶の障害が観察された。一方、味覚嫌悪条件付け課題では扁桃体依存的記憶に影響は観察されず、オープンフィールド課題を用いた解析でも行動活性並びに不安行動に異常は観察されなかった。従って、Mg欠乏により海馬依存性記憶に障害が誘導されることが示された。一方、Mg欠乏によるスパイン密度の変化は観察されず、Mg欠乏により海馬ニューロンの形態に顕著な影響が生じないことが示された。

4. 研究の反省・考察

（１）脳機能に対するビタミンAの役割の解析

ビタミンA情報伝達経路の標的遺伝子として、ムスカリン性アセチルコリンM4受容体遺伝子が同定され、さらに、M4受容体のアゴニスト投与により記憶形成の向上が観察された。ビタミンAはM4受容体遺伝子発現を正に制御することで記憶能力向上に寄与する作用メカニズムが示唆された。

（２）脳機能に対するビタミンB1の役割の解析

ビタミンB1欠乏回復マウスではウエルニッケコルサコフ症候群と同様に不可逆的な海馬依存的記憶形成能力の障害が観察され、B1欠乏回復マウスはウエルニッケコルサコフ症候群モデルとなるものと考えられた。さらに、B1欠乏による記憶障害の原因が海馬の変性であることが強く示唆された。さらに、このB1欠乏誘導性の海馬変性と記憶障害はCREBの活性を高めたDIEDMLマウスでは観察されなかったことから、CREB活性化は海馬変性を妨げ、さらに、B1欠乏誘導性の海馬依存性記憶障害を改善することが示され、B1欠乏誘導性記憶障害を妨げる有用な手段がCREB活性化であることが強く示唆された。

（３）脳機能に対するMgの役割の解析

Mg欠乏により顕著な海馬依存性記憶障害が誘導されることが明らかとなった。しかし、ビタミンB1欠乏の場合とは異なり、この記憶障害は海馬ニューロンの変性に起因するものではないことも明らかとなった。Mg欠乏はNMADA型グルタミン酸受容体を不活性化する可能性があることから、今後、Mg欠乏による記憶障害のメカニズムを明らかにする必要がある。

（４）総括と今後の展望

本研究においてビタミンA、ビタミンB1、Mg等の脳機能に対する役割とその作用メカニズムの一端が明らかとなり、今後の脳栄養学推進の重要性が示された。また、Thy1レポーターマウスを用いたニューロンイメージングや、行動バッテリーなど、脳栄養学における研究ストラテジーも確立した。今後は、脳機能に対する栄養素・食品の役割・効果をより網羅的に解析する体制を整えることで、「食と脳」の観点から、QOLの向上に貢献することが望まれよう。

5. 研究発表

(1)学会誌等

①Tanimizu, T., Kenney, J.W., Okano, E., Kadoma, K., Frankland, P.W., Kida, S. Functional connectivity of multiple brain regions required for the consolidation of social recognition memory. *J. Neurosci.*, **37**, 4103-4116, 2017.
Doi :10.1523/JNEUROSCI.3451-16.2017.

②Serita, T., Fukushima, H., Kida, S. Constitutive activation of CREB in mice enhances temporal association learning and increases hippocampal CA1 neuronal spine density and complexity. *Scientific Reports*, **7**:42528, 2017.
Doi:10.1038/srep42528.

③Ishikawa, R., Fukushima, H., Frankland, P.W., **Kida, S**. Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval *eLife*, **5**: e17464, 2016.
doi: 10.7554/eLife.17464.

④Yu, Z., Fukushima, H., Ono, C., Sakai, M., Kasahara, Y., Kikuchi, Y., Gunawansa, N., Takahashi, Y., Matsuoka, H., **Kida, S.**, Tomita, H. Microglial production of TNF-alpha is a key element of sustained fear memory. **Brain Behav. Immun. 59**:313-321, 2017. 査読有
Doi : 10.1016/j.bbi.2016.08.011.

⑤Inaba, H., Kishimoto, T., Oishi, S., Nagata, K., Hasegawa, S., Watanabe, T., **Kida, S**. Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke-Korsakoff syndrome. ***Biosci. Biotechnol. Biochem.***, **80**:2425-2436, 2016. (2016年度 ***Biosci. Biotechnol. Biochem.*** 論文賞受賞)
Doi:10.1080/09168451.2016.1224639

⑥Inaba, H., Kai, D., **Kida, S**. N-glycosylation in the hippocampus is required for the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. ***Neurobiology of learning and memory***, **135**: 57-65, 2016.
doi: 10.1016/j.nlm.2016.06.018.

⑦石川　理絵、稲葉　洋芳、喜田　聡、メマンチンによる恐怖条件づけ記憶忘却の生化学的性状の解析、日本健康医学会雑誌、25:121-126, 2016.

(2)口頭発表

①喜田　聡「記憶制御に対するビタミン群の役割」(第99回日本栄養・食糧学会　関東支部シンポジウム「栄養とメンタルヘルス　-栄養と心の健康のかかわり-」) 2017年3月4日　明治大学(東京)

②喜田　聡「Regulation of Memory Retrieval by Hippocampal Circadian Clock」(ZING Conferences ”Memory Mechanisms in Health and Disease) Dec 5-8, 2016 Tampa (USA)

③喜田　聡 「海馬操作によるトラウマ記憶の忘却促進」2016年医療心理懇話会、2016年11月2日、フクラシア東京ステーション(東京)

④喜田　聡「Regulation of memory retrieval by forebrain clock」(19th Korean Society for Brain and Neural Science (KSBNS) annual meeting), Sep28-29, 2016, Seoul (Korea)

⑤喜田　聡「想起後の恐怖記憶制御のメカニズムとPTSD」 (第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会 合同年会　大会長合同企画「記憶・情動の分子基盤破綻と精神疾患」), 2016年9月8-10日　福岡国際会議場(福岡)

⑥喜田　聡「Active transition of memory phases from fear to safety」 第39回日本神経科学大会, 2016年7月20日～22日　バシフィコ横浜(神奈川)

⑦喜田　聡「Active transition from fear to safety」 (International Symposium on Microendophenotype on psychiatric disorders 「Cellular and Circuit Mechanisms underlying Psychiatric Disorders」) 2016年7月19日　横浜ワールドポーターズ(神奈川)

⑧喜田　聡「Identification of fear and extinction neurons」 (The 11th International Conference for Neurons and Brain Diseases) July 14-16, 2016 Vancouver (Canada)

⑨喜田　聡「恐怖記憶の制御基盤とその制御に対する海馬の役割」日本睡眠学会第41回定期学術集会　2016年7月7-8日　京王プラザホテル (東京)

⑩喜田　聡「ビタミンA情報伝達経路活性化による記憶能力向上の分子機構」日本栄養・食糧学会　2016年5月13-15日、武庫川女子大学 (兵庫)

(3)出版物

喜田　聡 「ビタミンによる脳機能制御」(特集・予防医学の扉を開く「食品に秘められた扉を開く」) 実験医学 35, 1378-1380, 2017

学 校 名	東京農業大学短期大学部	研究所名等	共 同 研 究
研究課題	ダイコン辛味形質をモデルとした環境耐性遺伝資源の探索	研究分野	農 学
キーワード	① 環境応答 ② 遺伝資源 ③ 園芸作物 ④ ゲノム ⑤ 育種		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 松 憲 治	生物生産技術学科	助 教	研究代表者 総括 実験・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 井 裕 樹	農 学 部	准 教 授	実験・論文作成

ダイコン辛味形質をモデルとした環境耐性遺伝資源の探索

1. 研究の目的

（1） ダイコンの農業形質をモデルケースとした環境応答に関する有用遺伝資源の探索

動くことのできない植物は、様々な環境変化に適応するための発達した情報伝達機構を備えている。環境適応の働きは、植物体の生存に有利に働く一方で、植物体の成長や二次代謝産物の生合成に影響を及ぼすことから、農業形質のばらつきを引き起こす原因にもなる。環境適応の分子機構を理解することは、農業形質に影響を与える栽培環境の変化に影響を受けにくい品種を育種する上での有用な知見となる。

ダイコンは、野菜の中で第3位の消費量を誇る重要品目であり、昨年の厚生労働省の調査で「日本人が最も食べる野菜1位」にランキングされるなど、日本人にとって最も身近な野菜の1つである。ダイコンを特徴付ける形質の1つが辛味であるが、「辛味の強さ」は栽培環境、特に気温（高温）による影響を受けやすく、揃いの良い青首総太系ダイコンであっても、ばらつきの生じやすい形質の１つである。本研究は、ダイコン辛味形質の高温応答をモデルケースとして、栽培環境条件に左右されやすい形質の均一化に資する遺伝資源の探索を行うことを目的として行われた。

（2） 辛味形質の高温応答性の解明および有用遺伝資源の探索

これまでに申請者らは、青首総太系ダイコンを対象に高精度の全ゲノム解析を行い、約65,000個の遺伝子を同定すると共に、それらをデータベース化し一般に公開してきた。さらに、獲得したゲノム情報を利用し「根の肥大」や「辛味成分の生合成」に関する分子機構の一端を明らかにした（Mitsui et al. 2015）。我々は、網羅的な遺伝子発現解析からダイコンの辛味成分の前駆体であるグルコシノレートの生合成量の調節を担うMYB型転写因子を同定した。MYB型転写因子は、グルコシノレート生合成経路の酵素をコードする複数の遺伝子の転写調節を介し、グルコシノレートの生合成量を調節していると考えられる。ダイコンは高温に晒されると辛味が増すが、申請者はこの応答に、このMYB遺伝子の発現上昇が関与していると考えている。申請者らが行った予備的な実験において、高温条件下で栽培した個体では、適温下で栽培した個体と比較して有意なMYB遺伝子の発現量の上昇が認められた。この結果から申請者は、MYB遺伝子が環境応答のセンサーとして機能し、その発現量の調節によって温度変化に連動したグルコシノレート生合成量の調整が行われていると考えた。さらに、MYB遺伝子の発現量には品種間差が見られ、その差がグルコシノレート生合成関連遺伝子の発現量と強い相関を示すという実験データを得ている。

本課題で、MYB遺伝子に高温応答性が見られること、その発現パターンに品種間差が認められることに着目し、この高温応答性の弱い系統を環境応答に鈍感な環境耐性系統と位置付け、豊富に存在するダイコン遺伝資源の中から環境耐性系統を選抜することを目的として行われた。環境耐性系統の発見は、栽培環境の変化に影響を受けにくい品種を育成するための育種素材として活用できるほか、環境応答の分子メカニズムを解明するためのモデルにもなり得ると考えられる。

2. 研究の計画

（1）高温応答性の評価期等の検討および環境耐性遺伝資源の探索

グルコシノレート生合成の調節に関わるMYB遺伝子は、ダイコンゲノム中に2コピー存在する。その発現量と、その下流に位置するグルコシノレート合成関連遺伝子の発現量を、適温下で栽培した個体と、高温下で栽培した個体との間で比較する。約30品種を対象に高温応答性の評価

を行い、他品種と比較して優位に高温応答性が弱い系統を環境耐性系統と位置付け選抜する。評価を進めるにあたり、高温応答性を評価する上で適切な生育ステージを見極めるために、数品種を対象に幼苗期から成熟期にかけて高温処理を行い、MYB遺伝子の高温応答性の評価を行う。具体的には以下のように実施する。発芽後14, 20, 40, 60日目まで生育させた個体を、適温(20℃) または 高温 (35℃)に設定した人工気象器に移動し、さらに3日間栽培し、高温処理を施す。処理後、各個体の根部からRNAを採取し、定量的RT-PCR法を用いてMYB遺伝子およびその制御下にあるグルコシノレート合成関連遺伝子の発現量を定量する。この評価実験から適当とされた生育ステージにおいて約30品種を対象に高温応答性試験を行い、環境耐性系統の選抜を試みる。

3. 研究の成果

（1）高温応答性の評価期等の検討

生育ステージ評価試験の結果、生育14日目から40日目の個体については、成長速度およびMYB遺伝子の発現量の個体間差が大きく、特に地域在来種は、個体間のばらつきが大きい傾向が見られた。そのため、高温応答性を評価するためには、成熟期の個体を用いることが適当であると判断した。また、地域在来種の評価においては、生育の揃った個体を確保するために、高温応答性試験に用いる予定数の倍程度の個体を栽培し、生育不良の個体を除いた上で高温応答性試験を行うなど、検定個体の均一化を施す必要があると判断された。

（2）高温応答性の評価期等の検討

9系統に対し高温応答性試験を行った。うち1系統が他系統と比較して優位に高温応答性が弱い傾向が見られたため、この系統を環境耐性系統の候補とした。検定対象とする品種数は当初を下回った。その理由について下記の考察において述べる。

4. 研究の反省・考察

（1）環境耐性遺伝資源の探索効率について

高温下でMYB遺伝子の発現量に変化が生じにくい遺伝形質を有する系統を環境耐性遺伝資源として位置付け選抜を試みたが、当初予定されていた品種数を検定するには至らなかった。先の研究成果で述べたように、発現量に変化が生じにくい候補系統が1系統選抜されたものの、今後高温応答性に関わるゲノム領域を限定するための情報を得るには数として不十分であった。その主な理由は、高温処理を施すための空間の制約が大きく、十分な品種数を対象とした選抜試験を行うことが困難であったことである。高温応答性の評価は、一般的な植物培養インキュベータを使用したが、個体間のばらつきの大きい在来品種では、個体サイズの小さい幼苗期に選抜試験を行うことが困難であったため、成熟期まで栽培する必要があった。成熟期まで栽培を行った場合は、空間の制約から一度の処理で１品種の検定しか行えない。高温処理区においては、個体をインキュベータに多く入れると過湿になるという制約もあった。また在来品種では、個体間の成長のばらつきが非常に大きく、高温処理検定に供試することのできる育ちの揃った個体を得るために、実際の検定に使用する個体数の倍以上の個体数を予め栽培する必要があったことも、選抜のスループットを大きく下げる原因となった。そのため、今後より大規模な選抜を進めるためには、温室や大規模なチャンバーの利用を検討していく必要があると考えられる。同時に、MYB遺伝子の発現制御領域の配列解析から、予め高温応答性に差が生じる可能性のある系統をインシリコで選抜し、それらの系統の試験を優先的に進めるといった方法も取り入れる必要があると考えられる。この取り組みはすでに進めている。一方で、比較的少数の品種数を対象とした選抜において環境耐性を有する候補系統を選抜できたことから、選抜効率を改善することで有望な系統の選抜が可能であることがわかった。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

なし

(3)出版物

なし

平成28年度(第41回)学術研究振興資金 学術研究報告

学校名	日本獣医生命科学大学	研究所名等	共同研究
研究課題	自然発症性家族性てんかん猫の包括的てんかん研究 −原因遺伝子の同定とてんかん外科の基礎研究−	研究分野	農学
キーワード	①てんかん ②自然発症性疾患モデル ③遺伝子解析 ④てんかん外科		

○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
長谷川 大輔	獣医学部	准教授	研究統括・成果発表

○研究分担者

氏名	所属	職名	役割分担
盆子原 誠	獣医学部	教授	遺伝子解析指導
五十嵐 亜紀	獣医学部	講師	遺伝子解析
松木 直章	東京大学 大学院農学生命科学研究科	平成29年6月30日退職	遺伝子解析指導
内田 和幸	東京大学 大学院農学生命科学研究科	教授	病理解析指導
大和 修	鹿児島大学 共同獣医学部	教授	遺伝子解析指導
太組 一朗	日本医科大学 医学部	講師	外科手術指導
川上 康彦	日本医科大学 医学部	准教授	脳波解析指導

自然発症性家族性てんかん猫の包括的てんかん研究
－原因遺伝子の同定とてんかん外科の基礎研究－

1. 研究の目的

(1)自然発症性家族性てんかん猫（FSEC）の原因遺伝子の同定

FSECは世界で初めての猫の家族性てんかんであり、ヒトおよび動物の家族性側頭葉てんかんモデルとして期待されている。これまでの所、我々は家系図解析や自家繁殖の結果より常染色体性劣性遺伝を疑っている。しかしながら、原因遺伝子は未だ同定されていない。本研究は以下の方法にて、FSECの原因遺伝子の同定を試みる。

① ヒトの家族性側頭葉てんかんで既知となっている遺伝子変異（主としてleucine-rich glioma-inactivated（LGI)蛋白）について、猫での相同遺伝子を同定、機能的クローニングを行い、変異解析を行う。猫のLGIファミリーについては未だ遺伝子配列が決定されていない。

② 上記①のような機能的クローニングで原因遺伝子が同定できない可能性も高く、より広範囲な解析が行えるよう、次世代シーケンサー（NGS）を用いた全ゲノム解析への着手する。

(2)FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

FSECのてんかん原性領域はこれまでの我々の研究結果（発作症候学、脳波解析および構造的MRI）から扁桃体-海馬領域に存在するものと推察されている。最終的に、ヒトの難治性側頭葉てんかんと同様、この領域を外科的切除（てんかん外科）することで発作抑制が得られるのであれば、将来的な獣医療における難治性てんかんに対する外科治療の導入に貢献することができる。それ故、本研究では以下の方法によりてんかん外科導入に向けた基礎研究を行う。

①FSECのてんかん原性領域を特定するための画像解析法を確立する。

②ヒトの側頭葉てんかん手術の一法である扁桃体海馬切除術を猫において行えるよう術式を確立する。

2. 研究の計画

(1)FSECの原因遺伝子の同定

①前年度（平成27年度）にヒトや犬の家族性側頭葉てんかんの原因・関連遺伝子として挙げられるLGI蛋白の相同遺伝子を猫で同定し（これまで猫のLGIファミリーの遺伝子配列は未同定であった）、FSECのサンプルを用いて変異解析を行ったが、てんかんの原因・関連遺伝子となるような明らかな変異は認められなかった。本年度はLGI蛋白の足場となるADAM22およびADAM23（これらもヒトおよび犬のてんかん原因遺伝子として同定されている）についてLGIファミリーと同様の方法で解析を行う。

②昨年度選定したFSEC４頭のサンプルを用いてNGS解析を行う。ただしNGS解析には高額な費用が掛かるため、他の手法（ゲノムワイド関連解析：GWAS）による解析も検討する。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

①前年度、発作間欠期および発作後期における拡散強調画像および潅流強調画像を用いることで、脳波による発作発現部位に一致した領域-海馬・扁桃体-で拡散・潅流の変化が認められたことからFSECのてんかん原性領域（機能異常域）がそれらの領域にあることを確認できた。本年度は現在、ヒトてんかんおよびその他の機能性脳疾患の画像解析として利用されているvoxel-based morphometry（VBM）の手法を用いて、海馬や扁桃体に変化が認められるかどうかを検討する。

②猫における扁桃体海馬切除術の術式を考案するため、入手が容易なイヌを用いて検討する。

犬５頭を用いた前側頭葉切除術を施術し、その術式の確立と術後合併症／後遺症について評価する。

3. 研究の成果

(1) FSECの原因遺伝子の同定

①前年度のLGIファミリーの遺伝子同定および変異解析と同様の手法（機能的クローニング）により猫のADAM22およびADAM23遺伝子の同定とFSEC個体における変異解析を行った。猫におけるADAM22およびADAM23の全配列を同定することに成功したが、残念ながらFSECにおいててんかんの原因・関連遺伝子となるような変異は認められなかった。

②FSEC４頭でNGSをもちい全ゲノムシーケンスを行った。その結果合計18.5Xのカバレージを得ることができ、バリアント・コーリングを実施後、SIFT解析を行ったところ、約7,000の有害なアミノ酸置換を検出した。今後これらの中から候補を絞っていくことになるが、一方で、NGSによる更なる研究は、費用および時間が膨大に係り、早期に原因遺伝子を究明するには困難があると判断したため、GWASおよび連鎖解析を検討した。猫のGWAS解析に用いるSNPアレイは米国Morris Animal Foundation（以下MAF）が使用権利を有していたため、MAFに使用および購入申請（研究計画書などの提出）を行い、許諾を得ることができた。このため次年度はGWAS解析、連鎖解析を用いてFSECの候補遺伝子座位を同定し、先のNGSで得られた全ゲノム情報と照合することで原因遺伝子の究明を図る。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

①次年度～本年度に行った拡散強調画像および潅流強調画像の研究について、論文として公表した（下記研究発表参照）。本年度の主要研究であったVBMについては、32頭の正常猫のMRIデータを基に、SPM（VBMのためのソフトウエア）を用いて、猫の標準脳テンプレートを作成した（世界で初めての試みであろう）。その猫標準脳テンプレートを基に、正常猫群（12頭）vs. FSEC群（25頭）の群間VBM解析および正常猫群 vs. FSEC各個体のVBM解析を行った。その結果群間解析では有意差は認められなかったが（これはおそらく個体によってててんかんの重症度や発作の側方性が異なるためであろう）、個体解析ではFSEC25頭中7頭で海馬・扁桃核領域での有意な体積変化が認められた。この所見はこれまでの脳波および画像解析所見と一致する。

②健常犬４頭に対し、ヒトの扁桃体・海馬領域の切除術の一方である前側頭葉切除術を施術した。うち１頭で脳底中央部に位置する中大脳動脈起始部からの出血および止血不能により術中安楽死があったが、３頭では扁桃体、海馬吻側を含む前側頭葉切除が可能であった。１頭では術後一過性に、１頭では術後２ヵ月まで永続した旋回運動（線条体損傷によるものと予想される）が認められたが、１頭では明らかな合併症／後遺症を認めなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) FSECの原因遺伝子の同定

①上記研究の成果にも記載したが、FSECの最大の原因遺伝子候補と予測していたLGIファミリーおよびADAM蛋白に明らかな変異が認められなかったのは至極残念な結果である。とはいえ、これまで同定されていなかった猫におけるこれらの遺伝子配列を同定できたことは、将来この領域に異常が推測される疾患−主にてんかんになるであろうが−の研究に大きく貢献できよう。我々の研究目的としてはネガティブデータであるが、前述した利用価値が大きいものと考えられることから、現在これらの成果を論文としてまとめ、投稿準備している。

②同様に、NGSを用いた全ゲノムシーケンスにてFSECの原因遺伝子を同定するには膨大な費用と時間がかかることを認識した。約7,000もの候補を挙げることはできたが、これをさらに頭数を増やし（＝また膨大な時間と費用が必要となる；ただし将来NGSがより一般的になり価格降下が起こるかもしれないが）、NGSで絞り込むのは極めて困難なものになるであろう。救い

はMAFより猫のSNPアレイの使用許可が得られたことである。またアメリカの獣医脳外科医を通じて猫の遺伝子解析の第一人者であるDr. Leslie Lyons（ミズーリ大）と本件についてコンタクトを取ることができた。次年度、MAFから提供される猫SNPアレイを用いたGWASおよび連鎖解析とDr.Lyonsによる協力を得ることで、また本年度NGSで得られた全ゲノム情報を利用することで、FSECの原因遺伝子同定が進むことを期待している。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

①猫のVBMの方法、すなわち猫の標準脳テンプレートを確立できたことは、本研究のみならず、将来的な猫の脳構造画像解析に多大な影響を与えるものと期待できる。FSECは個体により重症度や側方性が異なる（すなわち不均一な表現形である）事から群間解析では有意な結果を得ることはできなかったが、てんかん外科で必要となる個体毎の確認には利用可能であることが示された。今後てんかん外科を計画するにあたりVBM解析を用いた画像解析は、てんかん原性領域の決定に貢献するものになるであろう。

②犬での前側頭葉切除術の術式がほぼほぼ確立し、また慎重に手術することで重大な合併症／後遺症が出ないことがわかった。特に脳底部や海馬の奥での過剰な操作はウイリス動脈輪から派出する中大脳動脈や前脈絡叢動脈を損傷し、致命的になること、および基底核領域を損傷することで後遺症が出やすいことが判明した。これらを損傷せずに手術するにはある程度の熟練が必要であろう（手術回数が増す毎に損傷は少なくなっていったため）。平成29年度は健常猫，そしてFSEC個体での前側頭葉切除術実施を計画している。

5. 研究発表

(1)学会誌等

① Mizoguchi S, Hasegawa D, Hamamoto Y, et al. Interictal diffusion and perfusion magnetic resonance features of cats with familial spontaneous epilepsy. *American Journal of Veterinary Research* 78:305-310, 2017.

② Hasegawa D. Diagnostic techniques to detect the epileptogenic zone: Pathophysiological and presurgical analysis of epilepsy in dogs and cats. *The Veterinary Journal* 215:64-75, 2016.（本論文はThe Veterinary Journalの2016年年間最優秀論文賞-George Flemming Prizeを受賞した）

(2)口頭発表

① 濱本裕仁、長谷川大輔、溝口俊太ら。自然発症性家族性てんかん猫（FSEC）における拡散強調画像および脳潅流MRI：発作間欠期と発作後期での変化。第159回日本獣医学会学術集会（2016年9月6日）

② 長谷川大輔。新規画像診断機器の臨床獣医学への応用：３テスラMRIと特殊撮像法の適応. 第159回日本獣医学会学術集会（2016年9月6日）

③ 長谷川大輔。犬と猫の臨床てんかんと基礎てんかん研究。関東機能的脳外科カンファレンス（2016年4月2日）

(3)出版物

なし

平成28年度(第41回)学術研究振興資金 学術研究報告

学校名	麻布大学	研究所名等	共同研究
研究課題	動物疾患のマイクロバイオーム研究の基盤形成 ―細菌叢研究を基盤とする病態解析と治療戦略―	研究分野	農学
キーワード	① 犬　②獣医療　③マイクロバイオーム　④細菌叢解析		

○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
菊水健史	麻布大学・獣医学部	教授	研究代表者　総括　疾患による動物のストレスと細菌叢の関係解明・無菌マウスを用いた実験

○研究分担者

氏名	所属	職名	役割分担
川原井晋平	麻布大学・附属動物病院	講師	犬の皮膚疾患と細菌叢の研究 検体の保管とゲノムの抽出
青木卓磨	麻布大学・獣医学部	講師	犬の循環器疾患と細菌叢の研究
伊藤哲郎	麻布大学・附属動物病院	助教	犬の消化管疾患と細菌叢の研究
圓尾拓也	麻布大学・附属動物病院	講師	犬の腫瘍疾患と細菌叢の研究
印牧信行	麻布大学・附属動物病院	教授	犬の眼疾患と細菌叢の研究
上家潤一	麻布大学・獣医学部	准教授	組織細菌叢と病理組織像の関係解明
森田英利	岡山大学・ 環境生命科学研究科	教授	組織細菌叢の解析・個別菌の解析
服部正平	早稲田大学大学院・ 先進理工学研究科	教授	宿主－細菌叢相互作用の分子機構の解明・菌組成比に基づく主成分分析

動物疾患のマイクロバイオーム研究の基盤形成
－細菌叢研究を基盤とする病態解析と治療戦略－

1. 研究の目的

(1) 細菌叢共生システムの探求

① 健常個体（宿主）の恒常性機能における細菌叢の果たす役割を調べること。
進化の過程で常在細菌叢（マイクロバイオーム）とその宿主動物は共生システムを形成し、このバランスは免疫機能、肥満、心身の発達などに大きく関与する。そこで、健常個体の分娩様式、発育成長および宿主の遺伝的背景による細菌叢の変化を解明する。

② 細菌叢の変化が及ぼす疾患への影響と治療法を確立すること。
宿主側からの要因（食事や生活様式等）は、常在細菌叢の破綻（ディスビオシス）を生じさせ、宿主の健康状態に影響することで、疾病の発症と環境との関わりを過敏化させる可能性がある。帝王切開により出生した無菌個体は、腸内細菌叢の定着が遅く、免疫系が自然分娩子より未成熟といわれる。自然分娩時の母体からの腸内細菌叢の垂直伝播と、幼少期の親からの腸内細菌叢との接触は、成熟後の疾患、生理機能を大きく変化させることが知られる（Oiszak, et al., Science, 2012）。そこで、犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢（ストレス誘発性細菌叢）の同定を目指す。

2. 研究の計画

(1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢（ストレス誘発性細菌叢）の同定

① 人との共通性が高い犬の疾病（アレルギー性皮膚炎、白内障、心筋症、炎症性腸疾患、末期癌等）を対象とする。疾患ストレスのある罹患犬と心理ストレスのある健常犬から、糞便、皮膚、涙液、唾液など細菌叢サンプルおよび血清、尿など生体試料を採取する。これらを用いて各常在細菌叢の治療前後の変化を経時的に解析する。

② 採取した細菌叢サンプルから細菌叢のゲノムDNAを精製する。次世代シークエンサーを用いて既に確立されている網羅的細菌叢解析（16S解析）を実施する。UniFrac解析（群集解析）等により、疾病関連あるいは心理ストレス前後における細菌叢の構造とその変化を解明する。

(2) 分娩様式および環境要因が犬の腸内細菌叢に及ぼす影響

① 分娩様式が帝王切開と自然分娩である産子（出産後2か月）と母体から皮膚スワブおよび糞便を採取し、16S解析を行い、細菌叢に違いが生じるか明らかとする。

(3) ストレス誘発性腸内細菌叢の病態への因果関係の解明

① 研究施設内で飼育されたマウスは野外マウスより免疫系が幼若であることが報告されている（Beura L.K., et al.Nature, 2016）。ノトバイオートマウスの解析方法の確立を行うため、イヌの唾液を摂取させたマウスの免疫学的解析を行う。

(4) ストレス誘発性腸内細菌叢と各疾患バイオマーカーの関連性を解明

① CD14 は主に単球に発現し、大腸菌などグラム陰性菌のリポ多糖類と結合して自然免疫系に関わる。バイオマーカーとしての可能性を探るため、犬の *CD14 遺伝子*のクローニングおよび一塩基多型（SNP）の解析、FACS を用いた単球表面の CD14 発現解析を行う。

3. 研究の成果

(1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢（ストレス誘発性細菌叢）の同定

① アレルギー性皮膚炎の症例を中心に症例を収集して延べ50頭の検体を得た。トイプード

ルの犬種に関して、アレルギー発症時、食物アレルゲン負荷時と回避時など延べ27検体の腸細菌叢ゲノムDNAを精製し、16S解析とUniFrac解析を実施した。

② 犬の白内障症例の眼結膜、僧帽弁閉鎖不全症症例の糞便、炎症性腸疾患症例の糞便、放射線治療を受けている鼻腔および口腔内腫瘍症例の腫瘍周囲から細菌叢採取し、一部においてゲノムDNAを精製している。

③ 東北大震災によって心的ストレスをもつ犬を訓練し、家庭に譲渡することで、訓練前、譲渡後の心的ストレスの変化による腸細菌叢への影響を調べるための糞便を13件体収集した。

④ 慢性消化器疾患のマーモセットに対して糞便細菌叢移植（FMT）を試験的に実施し、症状の改善を認めた（Yamazaki Y ., et al., BMC vet res, 2017）。

(2) 環境および宿主要因が犬の腸内細菌叢（マイクロバイオーム）に及ぼす影響

① 妊娠したスタンダードプードル1頭より7頭を自然分娩により、3頭を帝王切開により作出した。この胎子から幼若発達変化を観察するための150検体の皮膚スワブと糞便を採材した。この検体をもとに細菌叢ゲノムDNAを精製し、網羅的細菌叢解析（16S解析）を実施した。

(3) ストレス誘発性腸内細菌叢の病態への因果関係の解明

① イヌ唾液を摂取させたマウスにおける末梢血および脾臓のCD3陽性リンパ球中のCD8陽性およびCD44陽性細胞の比率を検討した。イヌ唾液摂取マウスに感染による炎症反応は認められなかったが、リンパ球の比率にも差は認められなかった。

(4) ストレス誘発性腸内細菌叢と各疾患バイオマーカーの関連性を解明

① 犬の CD14 遺伝子のクローニングを初めて行い、2 つの一塩基多型（SNP）を同定した。そのうちひとつは転写調節領域と思われる部分に存在した。SNP の有無と単球表面の CD14 発現量の関連性が示唆されたが、SNP の有無と犬アトピー性皮膚炎との関連性は認められなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢（ストレス誘発性細菌叢）の同定

① 症例収集に遅れている。実施した16S解析の結果の解析および、引き続き症例数を増やして疾患と健常における常在細菌叢の破綻（ディスビオシス）を解析していく。

(2) 環境および宿主要因が犬の腸内細菌叢（マイクロバイオーム）に及ぼす影響

① 肉眼的に糞便を観察すると、胎便、離乳前、離乳後において明らかに便性が異なっていた。得られた16S解析結果の検討を行っていく。

(3) ストレス誘発性腸内細菌叢の病態への因果関係の解明

① イヌの唾液が、Beura L.K.ら（Nature, 2016）の報告に認められるような免疫系に影響する結果は得ることができなかった。免疫系への影響をみるには、ディスビオシスを生じさせた個体を用いた検討が必要であるかもしれない。

(4) ストレス誘発性腸内細菌叢と各疾患バイオマーカーの関連性を解明

① 国内の保険に登録した犬の疫学調査では、今回対象とした犬種は、犬アトピー性皮膚炎の好発犬種ではなかった。このため、関連性が認められなかったのかもしれない。好発疾患による検討および実際に SNP が転写調節に影響するか解析する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Ohkita M, Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T. Owners' direct gazes increase dogs' attention-getting behaviors. ***Behavioral Processes.*** 2016 125: 96-100
② Katayama M, Kubo T, Mogi K, Ikeda K, Nagasawa M, Kikusui T. Heart rate variability predicts the emotional state in dogs. ***Behavioral Processes.*** 2016 128: 108–112
③ Kawarai S, Fujimoto A, Nozawa G, Kanemaki N, Madarame H, Shida T, Kiuchi A. Evaluation of weekly bathing in allergic dogs with methicillin-resistant Staphylococcal colonization. ***Jpn J Vet Res.*** 2016 May;64(2):153-8.
④ Kanemaki N, Inaniwa M, Terakado K, Kawarai S, Ichikawa Y. Fundus photography with a smartphone in indirect ophthalmoscopy in dogs and cats. ***Vet Ophthalmol.*** 2017 20:280-284.
⑤ Mineshige T, Kawarai S, Yauchi T, Segawa K, Neo S, Sugahara G, Kamiie J, Hisasue M, Shirota K. Cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma with systemic dissemination in a dog. ***J Vet Diagn Invest.*** 2016 28(3):327-31.
⑥ Tanabe, T., Deguchi, T., Sato, T., Nemoto, Y., Maruo, T., Madarame, H., Shida, T. Naya, Y., Ogihara, K. and Sahara, H. (2016): Radioresistance of cancer stem-like cell derived from canine tumours. ***Vet Comp Oncol*** 14: e93-e101.
⑦ Sugimoto K, Fujii Y, Ogura Y, Sunahara H, Aoki T. Influence of alterations in heart rate on left ventricular echocardiographic measurements in healthy cats. ***J Feline Med Surg.*** 2016 Aug 8
⑧ Sato R, Aoki T, Kobayashi S, Uchida N, Simamura S, Yamasaki M. The modulating effects of propofol and its lipid carrier on canine neutrophil functions. ***J Vet Med Sci.*** 2016. 78:1825-1829.

(2)口頭発表
① 菊水健史、オキシトシンによる母子間の絆形成、小児成長研究会経団連会館、東京都港区、2017年2月
② Kikusui T. Reciprocal communication and endocrine response in human-dog interactions. CID International Symposium "Essentials of informative communication; What we can learn from inter-species communication" Senshu University, Chuo, Tokyo. 2016 Nov
③ 菊水健史、オキシトシンによるヒトとイヌの関係性の構築、日本動物心理学会第76回大会公開シンポジウム"身近な動物たちのコミュニケーション研究最前線"、北海道大学、北海道札幌市、2016年11月
④ 菊水健史、犬の問題行動を考えるときに理解してほしいこと?犬とはどんな動物なのか？犬は人をどのように見ているのか？、動物臨床医学会大会行動学分科会、大阪国際会議場、大阪府大阪市、2016年.11月
⑤ 菊水健史、動物学からみた親子の関係?乳幼児期子育ての意味を探る?、石川県子供をはぐくむ研究会、石川県金沢保健センター、石川県金沢市、2016年10月
⑥ 菊水健史、ヒトとイヌの共生、動物愛護ふれあいフェスティバル、いわき市総合保健福祉センター、福島県いわき市、2016年10月
⑦ 菊水健史、マウス社会性の機能解明、第50回日本実験動物技術者協会総会、教育講演、ウェスタ川越、埼玉県川越市、2016年9月
⑧ 菊水健史、ヒトとイヌの共生から見えてきたこと、日本社会心理学会第57回大会シンポジウム"比較することの意味と意義?社会心理学と比較認知科学の新たな接点を求めて?"、話題提供者、関西学院大学、兵庫県西宮市、2016年9月
⑨ 菊水健史、幼少期ストレス負荷による情動行動の変化、第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会合同年会企画シンポジウム"こころの健康と破綻を生み出す脳と環境の相互作用" 、福岡国際会議場、福岡県福岡市、2016年9月
⑩ Kikusui T. Oxytocin forms inter-individual relationship. ICP2016 Symposium "New Horizons in Cognitive Neuroscience: Face-to-face social interactions between two individuals probed by hyperscanning, neuronal recording, and neuroendocrinological approaches. Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa. 2016 Jul
⑪ 菊水健史、ヒトの表情を読み取るイヌの能力について、第7回WJVF市民公開講座、大阪

松下IMPホール、大阪府大阪市、2016年6月

⑫ Kikusui T. The social function of male mouse pheromone ESP1. ISOT Satellite Symposium "Olfaction: from Chemosensory Signals to the Brain" The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo. 2016年6月

⑬ 菊水健史、社会内分泌学、新・社会心理学コロキウム、東京大学、東京都文京区、2016年4月

⑭ 菊水健史、性シグナル伝達神経回路の機能的性差とその構築機構の解明、第89回日本内分泌学会学術総会シンポジウム'性分化疾患：その基礎と臨床、国立京都国際会館、京都府京都市、2016年4月

⑮ Maruo T, Iwano M, Nagata K, Fukuyama Y, Kawarai S, Yoshioka C, Kanai E, Orito K: The usefulness of a 3D sensor for detecting rotational errors for the canine head immobilized with a bite block system for radiation therapy. Veterinary Cansor Society. Orlando, Florida, 2016 Jan

⑯ Sugiyama Y, Goshyu T, Murakami H, Kawarai S, Madarame H. Canine skin mast cell degranulation from polyoxyethylene hydrogenated castor oil 60-containing human drugs. World Congress Of Veterinary Dermatology. Bordeaux, France, 2016 May

⑰ 杉野悠、川原井晋平、増田正樹、岩田将成、橋上竜二、藤田幸弘、圓尾拓也、斑目広郎、松浦忍、印牧信行、イヌCD14遺伝子のクローニングと遺伝子多型の探索、日本獣医学会学術集会、神奈川県藤沢市、2016年9月

⑱ 川原井晋平、江州智行、國澤沙世、金井詠一、茅沼秀樹、圓尾拓也、安斎眞一、賀川由美子、斑目広郎、イヌ肥満細胞腫の新規予後因子、東京都台東区、2016年6月、

⑲ 高橋聡一郎、加藤なつ紀、田端伴行、川原井晋平、食物アレルギーのネコの3例、神奈川県獣医師会学術大会、神奈川県伊勢原市、2017年3月

⑳ 加藤なつ紀、高橋聡一郎、田端伴行、東宮敦士、圓尾拓也、川原井晋平、イヌにおけるTSH刺激試験の有用性の検討、神奈川県獣医師会学術大会、神奈川県伊勢原市、2017年3月

㉑ 江州智行、國澤沙世、川原井晋平、福山泰広、金井詠一、茅沼秀樹、圓尾拓也、安斎眞一、賀川由美子、斑目広郎、犬の皮膚肥満細胞種におけるCD34の免疫組織化学的評価と予後との関連、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月

㉒ 横山大希、川原井晋平、菅原優子、榎本力弥、斑目広郎、茅沼秀樹、片側腸部に限局した休止期脱毛より腹腔内精巣の腫瘍化を疑った犬の１例、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月

㉓ 加藤なつき、高橋聡一郎、田端伴行、山口忠義、川原井晋平、斑目広郎、トリアムシノロンが奏功した猫の形質細胞性肢端皮膚炎の一例、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月

㉔ 田端伴行、高橋聡一郎、加藤なつき、東宮敦士、川原井晋平、皮内検査と血清特異的IgE検査の陽性一致率の調査、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月

㉕ 高橋聡一郎、加藤なつき、田端伴行、浅川瑞季、杉山由貴奈、東宮敦士、市原伸恒、大谷伸代、川原井晋平、メチルプレドニゾロン酢酸エステル投与後の猫の副腎予備能の評価、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月

(3)出版物

① 青木卓磨（共著）．犬の先天性疾患におけるインターベンション治療． 石田卓夫編：伴侶動物治療指針 臓器・疾患別 最新の治療法． 緑書房，2016，34 :63-70.

② 青木卓磨．高齢犬・高齢猫の心臓，MVM．2016，161:5-25.

③ 青木卓磨．動脈管開存症．Veterinary Circulation． 2016，6:9-25.

④ 杉本佳介，青木卓磨．猫の肥大型心筋症，CAP．2016，328:17-32.