

学 校 名	名 城 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	触媒環境の構築による細径単層カーボンナノチューブ の高効率生成 －酸化物担持材を用いた触媒の電子状態制御－		研 究 分 野 工 学
キ ー ワ ー ド	①カーボンナノチューブ ②CVD(化学気相成長)法 ③触媒 ④Pt ⑤Rh ⑥Ru ⑦XAFS ⑧XPS		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
丸 山 隆 浩	理 工 学 部	教 授	研究全体の統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
才 田 隆 広	理 工 学 部	助 教	触媒担持材の開発
成 塚 重 弥	理 工 学 部	教 授	触媒ナノ粒子の作製

# 触媒環境の構築による細径単層カーボンナノチューブの高効率生成 —酸化物担持材を用いた触媒の電子状態制御—

## 1. 研究の目的

- (1) 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は、ナノサイズの触媒粒子を用いた化学気相成長 (CVD) 法により一般に作製されるが、直径 1 nm 程度以下の細径の SWCNT を大量生産することは困難であった。本研究では、TiO<sub>2</sub> やアルミナなどの酸化物を白金族元素の触媒粒子の担持材に用いて SWCNT の成長を行うことで、直径 1 nm 程度以下の細径の SWCNT の生成効率の向上を目指した。
  - ①Pt触媒粒子の担持材としてTiO<sub>2</sub>を用い、細径のSWCNT成長を実現する。
  - ②白金族元素の金属触媒粒子の担持層としてアルミナを用いてSWCNT成長を行い、白金族元素による生成量増強効果の差異を明らかにするとともに、直径1 nm程度以下の細径のSWCNTの生成量の向上を目指す。
- (2) さらに、アルミナ担持層を用いることで SWCNT の生成量が向上する Rh 触媒に対し、アルミナ担持層の結晶性が触媒活性に与える影響を調べ、そのメカニズムの解明を目的とした。
  - ①X線光電子分光 (XPS) やX線吸収端近傍構造 (XANES)、透過電子顕微鏡 (TEM) 観察によるアルミナ担持層の評価
  - ②担持層が触媒の電子状態に与える影響の解明

## 2. 研究の計画

- (1) TiO<sub>2</sub> ナノシートを担持材に用いて Pt 触媒粒子からの SWCNT 成長を行なう。
  - ①交互吸着法を用いて、層数や被覆率を制御してTiO<sub>2</sub>ナノシートをSi基板上に堆積する技術を確立する。
  - ②TiO<sub>2</sub>ナノシート上に直径1~3 nm程度のPt触媒粒子を堆積させる技術を確立する。
  - ③TiO<sub>2</sub>ナノシート上に堆積したPt粒子からのSWCNT成長を行なう。
- (2) アルミナを担持材に用いて白金族元素の触媒粒子からの SWCNT 成長を行ない、アルミナ担持層が触媒粒子の物性に与える影響を解明する。
  - ①Pt, Ru, Rhなどの白金族元素の触媒粒子をアルミナ上に担持し、SWCNT成長を行い、比較する。
  - ②結晶性・酸化度の異なるアルミナ担持層を作製し、触媒活性に与える影響とそのメカニズムについてXANES, XPSおよびTEMを用いて調べる。

## 3. 研究の成果

- (1) TiO<sub>2</sub> ナノシートを触媒担持材に用いた Pt 触媒粒子からの SWCNT 成長
  - ①交互吸着法 (Layer-by-Layer Electrostatic Self-Assembly; LBL) 法を用いて、TiO<sub>2</sub> ナノシートをSiO<sub>2</sub>/Si基板上に積層させた。交互吸着法は、正の荷電粒子を含むカチオン溶液と負の荷電粒子を含むアニオン溶液を用意し、これらの溶液に基板を交互に浸漬させることにより、基板表面に正の荷電粒子に基づく層と負の荷電粒子に基づく層とを交互に形成することができる。本実験では、カチオン溶液にPDDA、アニオン溶液にTiO<sub>2</sub>ナノシート溶液を用いた。浸漬回数を変化させ、TiO<sub>2</sub>ナノシートの堆積状態を原子間力顕微鏡 (AFM) で調べたところ、3回の浸漬後、基板表面の約80%をTiO<sub>2</sub>ナノシートで被うことができた。また、TiO<sub>2</sub>ナノシート1層の厚さは約2 nm程度で、場所によってはTiO<sub>2</sub>ナノシートが2~3層に重なっている様子もみられた。次にSiO<sub>2</sub>/Si基板上に堆積させたTiO<sub>2</sub>ナノシート上に、電子ビーム (EB) 蒸着装置を用いて Pt触媒粒子を堆積させた。蒸着時間を制御することにより、SWCNT作製に適した、0.2 nm 相当の膜厚のPt触媒を高密度で堆積させることができた。  
さらに高真空アルコールガスソース装置を用いて、SWCNT成長を行った。本装置は、高真空下で原料ガスのエタノール蒸気を触媒に供給することができ、SWCNTに適した最適の流量に原料ガスを制御することができる。本実験では、SWCNTの成長温度を500~700℃、

エタノールガス圧力を $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^{-4}$  Paと変化させて、TiO<sub>2</sub>ナノシート上でのSWCNT生成の様子を調べた。

作製した試料のラマン分光測定を行ったところ、成長温度700°Cのときには、エタノール圧力 $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^{-4}$  Paの範囲でGバンドとRBMピークがみられ、SWCNTが成長していることがわかった。また、 $1.0 \times 10^{-2}$  Paのときに最もSWCNT成長が多くなった。成長温度600°Cにおいてもエタノール圧力 $1.0 \times 10^{-3}$  PaでSWCNTの成長が確認されたが、500°Cでは成長量は激減し、わずかにRBMピークが観測されるのみであった。

また、TiO<sub>2</sub>ナノシートを用いた試料とSiO<sub>2</sub>/Si基板上に直接成長した試料の比較を行ったところ、ラマン分光測定からは、TiO<sub>2</sub>ナノシートを用いた試料のほうが、SWCNT成長量が少なくなっていることがわかった。走査電子顕微鏡 (SEM) 観察から、TiO<sub>2</sub>上にSWCNTが生成しているもののSiO<sub>2</sub>/Si基板以上に比べて生成密度が低くなっている様子が観察された。成長温度700°Cのときには、1 nm付近の直径のSWCNTが多く生成したが、成長温度が600°Cのときには、直径0.7 nmのSWCNTも多く生成している様子がみられた。さらに、ラマンスペクトルのGバンドピークとDバンドピークの強度比からSWCNTの結晶性の評価を行ったところ、TiO<sub>2</sub>ナノシート上に成長したSWCNTのほうがG/D比が向上し結晶性が良くなる傾向があることがわかった。

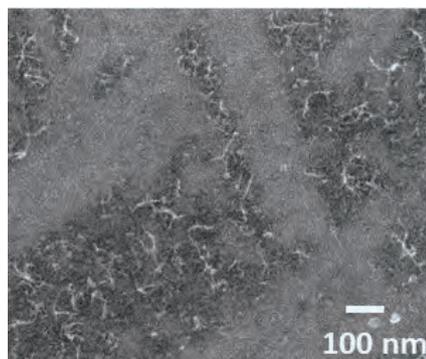


図1 TiO<sub>2</sub> ナノシート上の Pt 触媒粒子から生成した SWCNT の SEM 像. 白い繊維状の物質が SWCNT で白いエリアが SiO<sub>2</sub> 上に堆積した TiO<sub>2</sub> ナノシート.

②アルミナを担持層に、Pt、Rh、Ru触媒を用いて

SWCNT成長を行い、アルミナ担持層がSWCNT成長に与える影響について比較を行った。膜厚20 nmのアルミナをSiO<sub>2</sub>/Si基板の上に作製し、その上に各触媒を膜厚0.2 nm相当堆積して触媒粒子を形成し、高真空アルコールガスソース法によりSWCNTの作製を行った。ラマン分光測定とSEM観察から、SWCNTの生成量の比較を行ったところ、Ptを除く触媒金属では、アルミナ担持層を用いることでSWCNT生成量が増加した。すなわち、白金族元素を触媒に用いる場合も、Ptを除き、アルミナ担持層による触媒活性の効果があることがわかった。

(2) アルミナ担持層上に堆積した白金族元素を触媒粒子を用いた SWCNT 成長とアルミナ担持層が触媒活性に与える影響の解明

①SiO<sub>2</sub>/Si基板の上にアルミナ担持層を形成し、その上にPt、Ru、Rh触媒粒子を堆積させてSWCNT成長を行い、SiO<sub>2</sub>/Si基板の上に堆積させた場合との比較を行なった。Pt触媒の場合、アルミナ担持層上とSiO<sub>2</sub>/Si基板上でSWCNT生成量にほとんど差はなかったが、RuおよびRh触媒の場合、アルミナ上に担持させることで大幅にSWCNT生成量が向上した。また、Rh触媒を用いた場合、成長温度300°CでSWCNTを生成することができた。

②酸化度や結晶化の異なるアルミナ担持層を作製し、それらの上に担持したRh触媒を用いてSWCNT生成量の比較を行った。ラマン分光測定とSEM観察から、作製法によりSWCNT生成量が異なることがわかった。XPSやXANES測定から、内部まで十分酸化していないアルミナ層では、触媒粒子の内部拡散が生じ、SWCNT生成がほとんどみられないことがわかった。また、熱処理を行ったアルミナ担持層では、SWCNTが成長するものの生成量が減少した。TEM観察から、熱処理を行った試料では、Rh触媒粒子が凝集し肥大化している様子がみられた。熱処理によりアルミナの結晶化が生じてRh原子の表面マイグレーション距離が増大し、その結果、触媒粒子の凝集が促進され、SWCNT生成に適した粒径のRh粒子の数が減少し、SWCNT生成量が減少したと考えられる。以上の結果から、アモルファスのアルミナ膜を用いることで、SWCNTの生成量が向上することがわかった。また、アモルファスのアルミナ担持層の場合、アルミナ密度が高くなるほど、触媒金属のアルミナ内への内部拡散が減少し、SWCNT生成量が増加することがわかった。

③アルミナ担持層がRh触媒の電子状態に与える影響を調べるため、SWCNTの成長量とRh触媒の電子状態を真空紫外光電子分光測定により調べたところ、最もSWCNT生成量の多く

なるアルミナ担持層上では、Rh触媒の4d準位が最もフェルミ準位付近に存在していることが分かった。アルミナ担持層により、原料ガス分解に影響のある4d準位のエネルギー位置が変化し、触媒活性に影響を与えている可能性があることがわかった。

#### 4. 研究の反省・考察

##### (1) 酸化物を触媒担持材に用いた白金族元素の触媒粒子を用いた SWCNT 成長

①本研究の結果、TiO<sub>2</sub>ナノシート上にPtを触媒粒子として用いてSWCNTを成長させることに成功した。期待に反してSWCNTの生成密度は減少したが、SWCNTの結晶性が向上している様子がみられた。TiO<sub>2</sub>上で生成量が減少した原因は現在、考察中であるが、触媒粒子がTiO<sub>2</sub>ナノシート内に潜り込み、SWCNT成長に寄与する触媒粒子の数が減ってしまったことなどが考えられる。

②一方、アルミナを担持層として用いることで、RhやRu触媒からのSWCNTの生成量を増加させることができた。アルミナ担持層を用いたSWCNTの報告は多数あるが、触媒活性化に与える影響が、金属種により異なることが明らかとなった。これは金属により、触媒粒子からのSWCNT生成メカニズムが異なることを示唆している。

##### (2) アルミナ担持層が触媒活性に与えるメカニズムの解明

①アルミナ担持層の結晶性・酸化度が触媒活性に与える影響の詳細が明らかとなった。成長温度により、アルミナの結晶性が変化していることが考えられることから、他の温度の場合についても調べていく予定である。

②アルミナ担持層の結晶性・酸化度により触媒金属の電子準位が変化し、その結果、触媒の活性度が変化し、SWCNTの生成量に違いが生じることが初めて明らかとなった。今後は他の触媒金属の場合も、同様の現象が生じているのかについて明らかにしていきたい。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

①Takahiro Maruyama, Akinari Kozawa, Takahiro Saida, Shigeya Naritsuka, Sumio Iijima, “Low temperature growth of single-walled carbon nanotubes from Rh catalysts”, Carbon 116 (2017) 128-132.

②Hoshimitsu Kiribayashi, Takayuki Fujii, Akinari Kozawa, Seigo Ogawa, Takahiro Saida, Shigeya Naritsuka, Takahiro Maruyama, “Effects of fabrication method of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> buffer layer on Rh-catalyzed growth of single-walled carbon nanotubes by alcohol-gas-source chemical vapor deposition”, J. Cryst. Growth 468 (2017) 114-118.

③Hoshimitsu Kiribayashi, Takayuki Fujii, Takahiro Saida, Shigeya Naritsuka, Takahiro Maruyama, “Effects of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Type on Activity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Supported Rh Catalysts in Single-Walled Carbon Nanotubes Growth by CVD”, MRS Advances 2 (2017) 89-95.

##### (2) 口頭発表

①T. Maruyama, A. Kozawa, T. Saida, S. Naritsuka, and S. Iijima, “Single-Walled Carbon Nanotube Synthesis from Rh Catalysts by Alcohol Gas Source Method”, The 15th International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017), August 27-September 1, Yoshida Campus, Kyoto University, Kyoto, Japan. C1-001-010, Sept. 1 (2017).

②Takahiro Maruyama, Hoshimitsu Kiribayashi, Takayuki Fujii, Takahiro Saida, Shigeya Naritsuka, “Enhancement mechanism of catalyst activity of Rh particles supported on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> layers in SWCNT growth”, 2017 MRS Fall Meeting & Exhibit, Hynes Convention Center, NM02.11.25, Sheraton Boston Hotel, Boston (USA), November 26-December 1 (2017).

③丸山隆浩, 桐林星光, 才田隆広, 成塚重弥, “Rh触媒を用いた単層カーボンナノチューブ作製時におけるAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>バッファ層による生成量増加のメカニズム”, 第78回応用物理学会秋季学術講演会 7a-C11-3, 福岡国際会議場・福岡国際センター・福岡サンパレスホテル, 9月5日-8日 (2017)

- ④丸山隆浩, 桐林星光, 才田隆広, 成塚重弥, “カーボンナノチューブ成長用触媒粒子への $\text{Al}_2\text{O}_3$ 担持層の結晶性の影響”, 第7回名古屋大学シンクロトン光研究センターシンポジウム, 1月19日, 名古屋大学東山キャンパス

(3) 出版物

- ①Takahiro Maruyama, “Nanoscale Carbon Materials: Carbon Nanotubes”, in Atsushi Nagai, and Koji Takagi eds. “Conjugated Objects: Developments, Synthesis, and Applications”, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., CRC Press, USA, Chap. 16, 439-468 (2017).

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 ②AMCase ③酵素の不活性化 ④偽遺伝子化 ⑤酵素の活性化 ⑥Non-synonymous SNPs(nsSNPs) ⑦キチナーゼ様タンパク質Ym1 ⑧キチナーゼ様タンパク質Chi3l1			

○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	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 (GlcNAc) 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 (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase) を発現している。

AMCCase は、喘息、アレルギーで発現が増加する。さらに、ヒト AMCCase の 1 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。最近、我々は、マウス AMCCase が、消化器系条件下でプロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し得ることを示した。これらのことから、AMCCase が、喘息、アレルギー等の疾患の発症、他方では、胃での食物消化において重要な役割を果たしている、と考えられる。

ヒトとマウスの AMCCase 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 AMCCase を発現し、キチナーゼ活性を比較したところ、ヒト AMCCase 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。この結果は、ヒト AMCCase 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。同様の不活性化は、キチナーゼ様タンパク質 Ym1 と Chi311 でも知られている。Ym1 は AMCCase に、Chi311 は Chit1 にそれぞれ構造が類似しているが、キチナーゼ活性がなく、喘息をはじめとする様々な病気で増加する。

本研究では、まず、ヒト AMCCase の不活性化メカニズムを明らかにし、その活性化に成功した (平成 28 年度の研究成果; Okawa et al., (2016) Loss and Gain of Human Acidic Mammalian Chitinase Activity by Nonsynonymous SNPs, *Mol Biol Evol.* 33, 3183-3193)。平成 29 年度の研究では、キチナーゼ様タンパク質 Ym1、Chi311 の不活性化のメカニズムを探り、分子進化における酵素機能に影響を及ぼすアミノ酸、配列変化を推察した。具体的には、AMCCase での研究手法で、キチナーゼ様タンパク質 Ym1、Chi311 (これらは、不活性キチナーゼである) の不活性化のメカニズムを探り、活性化を試みた。さらに、家畜を含む様々な動物での AMCCase の活性の比較を行った。

## 2. 研究の計画

### (1) キチナーゼ様タンパク質 Ym1、Chi311 の活性化

① AMCCase cDNA から触媒ドメイン (Catalytic domain) cDNA を PCR 法で調製した。このドメインは、Ym1 と高い相同性を示す。Ym1 の活性中心に変異を導入したもので Ym1 mutant (Mut) cDNA を調製した。AMCCase、Ym1、Ym1 Mut の cDNA のアミノ酸配列が保存されている部分同士で組み合わせたキメラ体を 6 種類構築した (図 1)。作製したそれぞれの cDNA を pEZZ18 に組み込み、大腸菌で発現した。

② 発現した各キメラ体のキチナーゼ活性について、合成基質を用いて比較した。さらに、蛍光標識糖電気泳動法を改良し、コロイダルキチンに各融合タンパク質を作用させ、それら分解産物の比較を行った。

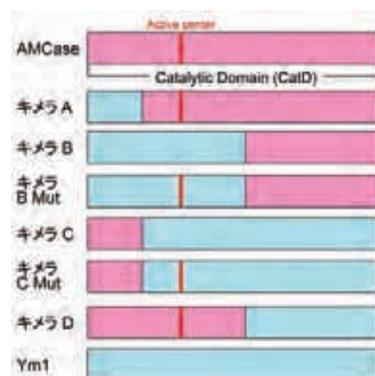


図 1 : AMCCase-Ym1 キメラ体の模式図

### (2) 家畜を含む動物の胃での AMCCase のキチナーゼ活性の比較

① 家畜を含む動物の胃での AMCCase mRNA レベルを定量し、種間で比較した: ニワトリ, ブタ, ウシ, イヌの胃における AMCCase mRNA レベルについて、種間での比較を行った。AMCCase mRNA レベルと食性との関係を明らかにした。

② 大腸菌組換え AMCCase の性質: 各種動物の大腸菌組換え AMCCase を調製し、キチナーゼ活性について特性解析を行った。そして、種間で性質を比較した。

### 3. 研究の成果

#### (1) キチナーゼ様タンパク質 Ym1、Chi311 の活性化

Ym1 に AMCCase の活性中心に相当するアミノ酸変異を導入したが、活性が認められなかった (結果示さず)。また、AMCCase の C 末端領域を導入したキメラ B でも活性を検出できなかった (図 3 キメラ)。しかし、活性中心を導入したところ活性化した (図 2 キメラ B Mut)。逆に、Ym1 の C 末端領域を持つキメラ D は失活した。

(図 2、キメラ D)。以上の結果は、Ym1 の C 末領域に不活性化にかかわるアミノ酸が存在することを示している。今後、Ym1 キメラ体の活性を確認し原著論文を完成する。Chi311 についても同様の実験を進めている。

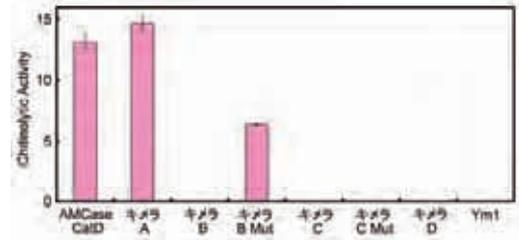


図 2 : AMCCase-Ym1 キメラ体の模式図

高分子量キチン基質詳細な解析のため、FACE 法の改良を行った。この方法は、HPLC, NMR などに比べても感度が高く、キチン分解産物の解析には非常に適していた (5. 研究発表、(1)学会等④)。

#### (2) 草食動物であるウシの AMCCase の不活性化

動物体内におけるキチンの分解性を検討するため、代表的な家畜であるウシにおける AMCCase の遺伝子発現レベル、酵素活性を比較した。その結果、ニワトリの胃に比べ、草食性のウシでは著しく低かった (5. 研究発表、(1)学会等①)。そこで、大腸菌組換え体タンパク質として AMCCase を発現させ、ニワトリとキチナーゼ活性を比較した。比活性も同様に、ウシ AMCCase のキチナーゼ活性は、マウスの 1/10 程度だった (図 3)。また、それぞれの至適 pH は、マウス AMCCase は、pH 2.0、ウシは pH 4.0 と、違いが生じた (図 3)。平成 28 年度の研究中、ヒト AMCCase のキチナーゼ活性は M61R の置換であることを明らかにした。しかし、ウシは M61 なので、ヒト AMCCase の不活性化とは異なるメカニズムであろうと考えられる。これらの結果から ウシ AMCCase の一次構造上にも、キチナーゼ活性に関わる種差があることが示唆された。

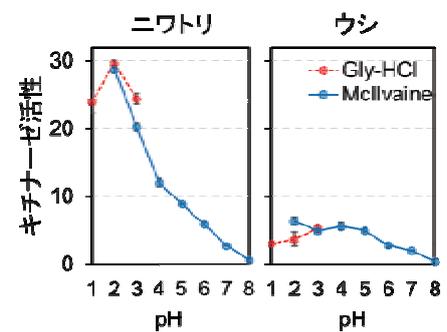


図 3. 大腸菌組換えニワトリとウシ AMCCase のキチナーゼ活性の比較。ウシ AMCCase は、ニワトリに比べ活性が著しく低かった。

### 4. 研究の反省・考察

ヒトやマウスなどのほ乳類における酵素活性の遺伝的制御に関してほとんど研究がされていなかった。平成 28 年度の研究中、ヒト AMCCase 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 AMCCase variant のアミノ酸置換は、マウス AMCCase のアミノ酸配列と一致することを明らかにした。

平成 29 年度の研究中では、平成 28 年度に確立した実験手法で、喘息とかかわる Ym1 の活性化を試みた。現在、Ym1 の不活性化に関する仮説は、活性中心の保存配列 (DXXDXDXE) の D と E へのアミノ酸変異、である。しかし、我々は、Ym1 において、それらのアミノ酸の D と E へのアミノ酸置換のみでは、活性化されなかった。加えて、マウス AMCCase の C 末の配列を導入することで Ym1 の活性化できることを明らかにした。これらは新規の知見である。平成 30 年度の研究で、Ym1 の不活性化に関わるアミノ酸の同定と、さらに効率の良い活性化のメカニズムを明らかにしている。さらに、Ym1 同様に不活性な Chi311 についても同様に不活性化のメカニズムと再活性化を試みている。

AMCCase は、マウス、ニワトリ、ブタ (これらは雑食性) の胃で、高く発現しており、比活性も高い (5. 研究発表、(1)学会等①~③)。他方、ウシ (草食性) では発現が低く、比活性も低い。ウシの AMCCase の活性化を試みる。ウシは重要な家畜であることから、これらの知見は食糧につながる。

本研究では、分子細胞生物学的な手法に加え、進化的な解析手法を用い、実際に不活性なヒト AMCCase, Ym1 の不活性化と再活性化のメカニズムを明らかにした。そしてウシの AMCCase の

不活性の原因に迫る。本研究は新規研究領域、新規応用領域の開拓に展開できる可能性が高い。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Tabata, E., Kashimura, A., Kikuchi, A., Masuda, H., Miyahara, R., Hiruma, Y., Wakita, S., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2018) Chitin digestibility is dependent on feeding behaviors, which determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs, *Sci Rep.* **8**, 1461. Nature Publishing Group, January 23, 2018.
- ② Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Kino, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2017) Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry, *Sci Rep.* **7**, 6662. Nature Publishing Group, October 11, 2017.
- ③ Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Imamura, Y., Seki, S., Ueda, H., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2017) Protease resistance of porcine acidic mammalian chitinase under gastrointestinal conditions implies that chitin-containing organisms can be sustainable dietary resources, *Sci Rep.* **7**, 12963. Nature Publishing Group, July 27, 2017.
- ④ Wakita, S., Kimura, M., Kato, N., Kashimura, A., Kobayashi, S., Kanayama, N., Ohno, M., Honda, S., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2017) Improved fluorescent labeling of chitin oligomers: Chitinolytic properties of acidic mammalian chitinase under somatic tissue pH conditions, *Carbohydr Polym.* **164**, 145-153. Elsevier Ltd., May 15, 2017.

### (2) 口頭発表

- ① **小山文隆**、大野美紗、樫村昭徳、木村将大、**坂口政吉**、菅原康里、大川一明、ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの nonsynonymous SNPs による活性の調節、日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋市、2018 年 3 月 17 日
- ② 田畑絵理、樫村昭徳、脇田悟誌、大野美紗、**坂口政吉**、菅原康里、**小山文隆**、ニワトリ酸性キチナーゼの消化酵素としての機能解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋市、2018 年 3 月 17 日
- ③ **Oyama, F.**, **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Okawa, Mechanistic insight of inactivation of mouse chitinase-like protein Yml, The 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG), Orlando, 2017 年 10 月 19 日
- ④ **小山文隆**、大野美紗、樫村昭徳、木村将大、**坂口政吉**、菅原康里、大川一明、ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの進化学的解析、第 31 回日本キチン・キトサン学会大会、宜野湾市、2017 年 8 月 24 日
- ⑤ 脇田悟誌、木村将大、樫村明徳、**坂口政吉**、菅原康里、**小山文隆**、キチンオリゴ糖蛍光標識法を用いた酸性ほ乳類キチナーゼの特性解析、第 31 回日本キチン・キトサン学会大会、宜野湾市、2017 年 8 月 23 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	妊娠を支えるエキソソーム由来miRNAの解明とその制御 —加齢に伴う妊孕性低下とmiRNAの関係—		研究分野	農 学
キ ー ワ ー ド	①エキソソーム ②加齢 ③卵および胚 ④卵巣 ⑤卵管 ⑥子宮 ⑦miRNA			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 田 尚 孝	農 学 部	教 授	研究総括及び生殖細胞実験系

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
亀 山 祐 一	生 物 産 業 学 部	教 授	生殖細胞実験系:マウス実験解析
下 井 岳	生 物 産 業 学 部	准 教 授	遺伝子改変マウス作製および解析: マウス実験解析
白 砂 孔 明	農 学 部	准 教 授	体細胞培養実験系:ウシ実験解析

# 妊娠を支えるエクソソーム由来 miRNA の解明とその制御 — 加齢に伴う妊孕性低下と miRNA の関係 —

## 1. 研究の目的

- (1) 妊娠と加齢：近年の社会情勢やライフスタイルの変化に伴い、30代後半で挙児を希望する女性が増加している。しかし、母体の加齢によって卵子数が減少するだけでなく、卵子内の活性酸素種の蓄積・ミトコンドリアの機能異常・異常受精の増加など複合的な原因で卵子の質が低下し、妊孕性が急激に低下する。加齢に伴う妊孕性の低下は現代社会で少子化問題の一大要因とされており、いかにして妊孕性を維持するのか、加齢に伴い妊孕性を低下させている原因を明らかにするのは喫緊の課題である。
- (2) 卵子・胚の周囲環境の重要性：これまでの加齢の研究では主に卵子や胚そのものの質的低下に焦点が当てられている。一方で卵子は長期間母体内で発育・受精し、受精卵・胚は卵管や子宮などの母体との相互作用を行い、胎児として娩出される。これらのプロセスは、卵子・受精卵の周囲の細胞や体液との高次な相互作用の下で実施される。我々はこれまで、加齢に伴い母体の体液（卵胞液）および卵子や初期胚の周囲の環境（顆粒層細胞や卵管細胞）が大きく劣化し、これが卵子や胚の質を低下させている要因であることを示す知見を得ている。
- (3) 以上から、①卵子・胚および周辺細胞（顆粒層・卵管・子宮細胞）はエクソソームを介してmiRNAを伝達することで互いの機能を制御する、②加齢に伴い適切なmiRNAによる制御機構が破綻し、周囲環境が悪化することで胚発生が低下する、という仮説を想定した。本研究では、卵巣・卵管・子宮内のエクソソームを介した卵や胚の発育制御機構とこれに加齢が及ぼす影響を検証し、加齢に伴う妊娠成立機構の破綻を改善する手法の開発を目指す。

## 2. 研究の計画

- (1) 若齢・老齢ウシにおけるエクソソーム内miRNAおよび老化関連因子の探索
  - ①卵子の発育に及ぼすmiRNAを同定するため、発育段階の異なる卵胞、質の異なる卵胞を対象に顆粒層細胞のRNA-seqから推測した上流因子としてのmiRNAと卵胞液中のmiRNAをsmall-RNA-seqによって推測し両者を比較した。
  - ②正常な胚発育へのmiRNAの関与を検討するため、子宮内（体内）および体外培養で発育した胚のRNA-seq解析を行った。
- (2) 卵子・胚と周囲環境の相互作用：若齢・老齢ウシ由来の miRNA の関与
  - ①卵胞液の性状を比較するため卵子の発育培地及び成熟培地に若齢および加齢のウシから採取した卵胞液を添加し卵子の体外発育および卵子の成熟後の発生能力を比較した。また加齢および若齢の卵胞液からエクソソームを抽出しsmall-RNA-seqを行った。
  - ②ウシに過剰排卵および人工授精を行い、胚の存在・非存在下の子宮内膜上皮細胞における RNA-seq解析を実施した。
- (3) 若齢および老齢マウスモデルにおける全身性エクソソーム内miRNAの特定  
全身性のエクソソームの重要性を見出すため、若齢・老齢マウスから採血し、高純度のエクソソームの抽出を行いsmall-RNA-seq解析を行った。

## 3. 研究の成果

- (1) 若齢・老齢ウシにおけるエクソソーム内miRNAおよび老化関連因子の探索
  - ①卵胞内のmiRNA：異なる発育ステージの卵胞から採取した顆粒層細胞のRNA-seq解析および卵胞液中エクソソームのsmall-RNA-seq解析から、卵子の発育に伴い発現が変化するmiRNAを同定した。さらに、良好な顆粒層細胞を多く含む卵胞と少ない卵胞の卵胞液からsmall-RNA-seq解析を行い、上記の因子と共通する因子の絞り込みから、卵胞発育を

制御する候補miRNAを同定した。また、若齢ウシ由来の卵胞液と比較して、これらのmiRNAの構成は加齢によって大きく変化することを見出した。

- ②胚発育とmiRNA：正常な胚発育へのmiRNAの関与を検討するため、子宮内（体内）および体外培養で発育した胚のRNA-seq解析を行った。体内発育胚では炎症や代謝が低く制御され、体外発育胚ではミトコンドリアに障害があることなど、質的な違いが大きいことが分かった。さらに、体内ではmiRNAが胚発育を制御することを示す結果を得た。
- ③卵胞内の環境：若齢ウシと比較して、加齢ウシの卵胞液中に多くの細胞外DNAと炎症系サイトカインが存在することを見出した。この原因として、ミトコンドリアが障害を受けると顆粒層細胞が細胞外にDNAを放出することを示した。

(2) 卵子・胚と周囲環境の相互作用：若齢・老齢ウシ由来のmiRNAの関与

- ①若齢由来と比較して老齢由来の卵胞液で卵子の発育を行うと体外発育した卵子の受精能力が著しく減退することが明らかになった。また体外成熟においても、卵子成熟の促進やギャップ結合の閉鎖が早まり、活性酸素種の過剰産生や多精子受精などの異常受精が起きた。また加齢個体の卵胞液中に多いまた少ないmiRNAを同定することが出来た。
- ②子宮内に胚の存在の有無で子宮上皮の細胞の遺伝子発現は著しく変化していた。さらに上流因子としてのmiRNAを同定することが出来た。

(3) 若齢および老齢マウスモデルにおける全身性エクソソーム内miRNAの特定

全身性のエクソソームの重要性を見出すため、若齢・老齢マウスから採血し、高純度のエクソソームの抽出に成功した。small-RNA-seq解析を行い、老齢特異的に変動するmiRNAを同定することが出来た。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) 若齢・老齢ウシにおけるエクソソーム内miRNAおよび老化関連因子の探索

異なるステージと卵胞の質を組み合わせることで、正常で高質な卵胞に関連するmiRNAの絞り込みが出来た。従来の研究では1回の網羅的解析から得られる候補は数十-数百と非常に効率の悪いものであったが、今回の検討では数個のmiRNA候補を選び、体外の培養系で検証したところ予想どおり卵子の体外発育や成熟を左右する結果を得ることが出来た。体内で発育した胚の中で低発現の遺伝子群の多くはmiRNAに関連付けられ体内ではmiRNAによる胚の発生制御が行われているものと考えられた。これらのmiRNAを培地に外挿することで胚の発生を改善する可能性があり、次年度検討を行う。

(2) 卵子の体外発育培地への卵胞液の添加により、若齢ウシ由来卵子の受精能力が低下したことは、月齢依存的な卵子の質低下が外部環境によって引き起こされている可能性があることを意味している。また月齢依存的に増減するmiRNAが同定できたため次年度これらの卵子発育に及ぼす影響を検証する。さらに、卵子の存在によって変動する子宮上皮の遺伝子発現が関連付けられるmiRNAを同定できた。これらは胚の遺伝子発現と一部オーバーラップしているものがありこれらの機能解析を次年度行う。

(3) 若齢および老齢マウスモデルにおける全身性エクソソーム内miRNAの特定

small-RNA-seq解析を行い同定したmiRNAは、次年度では初期胚の培地に外挿して胚発生に及ぼす影響を検証する。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Kansaku K, Itami N, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H

「Differential effects of mitochondrial inhibitors on porcine granulosa cells and oocytes.」 *Theriogenology* Vol. 103 pp. 98-103 2017年

- ②Itami N, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H

「Promotion of glucose utilization by insulin enhances granulosa cell proliferation and developmental competence of porcine oocyte grown in vitro.」 *Zygote*

Vol. 25 pp. 65-74 2017年

- ③Munakata Y, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H  
「Polyacrylamide gel as a culture substrate improves in vitro oocyte growth from porcine early antral follicles.」 *Molecular Reproduction and Development* Vol. 84 pp. 44-54 2017年
- ④Tanikawa N, Ohtsu A, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K  
「Age-associated mRNA expression changes in bovine endometrial cells in vitro.」 *Reproductive Biology and Endocrinology* Vol. 15 63 2017年

(2) 口頭発表

- ①Iwata H. Granulosa cell number and oocyte growth. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017 Sep 27-29, Okinawa, Japan. (招待講演 シンポジウム)
- ②Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Exosome-free follicular fluid has differential ability to support granulosa cell and oocyte development. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017 Sep 27-29, Okinawa, Japan.
- ③Tanikawa N, Ohtsu A, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Inflammation, interferon signaling, and cell cycle-related genes are changed with aging in bovine endometrial cells. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017 Sep 27-29, Okinawa, Japan.
- ④Shirasuna K, Tanaka H, Ohtsu A, Nakamura Y, Kawahara-Miki R, Iwata H, Kuwayama T. Inflammatory-related factors are activated depending on aging in bovine oviduct epithelial cells. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017 Sep 27-29, Okinawa, Japan.
- ⑤Kin A, Kansaku K, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Age-associated increases in mitochondrial DNA mutations in bovine oocytes. The 11<sup>th</sup> Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine. 2017 Oct 14-15, Osaka, Japan.
- ⑥Munakata Y, Kansaku K, Itami N, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Mitochondrial damage increases cell free mitochondrial DNA in spent culture medium of cumulus cells and oocyte complexes. The 11<sup>th</sup> Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine. 2017 Oct 14-15, Osaka, Japan.

(3) 出版物

なし

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
近 江 俊 徳	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
大 和 修	鹿 児 島 大 学 学 部 共 同 獣 医 学 部	教 授	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
太 組 一 朗	聖 マリアンナ 医 科 大 学 学 部 医 学	准 教 授	てんかん外科(外科技術)指導
川 上 康 彦	日 本 医 科 大 学 学 部 医 学	准 教 授	てんかん外科(脳波解析)指導

# 自然発症性家族性てんかん猫の包括的研究 —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当初想定していたLGIファミリー（平成27年度）およびそれに関連するADAM22およびADAM23（平成28年度）の機能的クローニング解析では、原因／関連遺伝子となるような変異は認められなかったため、平成29年度は下記②の広範囲なゲノム解析に全面移行する。なお、猫LGIファミリーおよびADAM22、ADAM23の解析結果については順次公表する。
- ②昨年度4頭のFSECにおけるNGSを用いた全ゲノムシーケンス (WGS) を行い、結果約7,000のアミノ酸置換を検出したが、低カバレッジであった。本年度は63,000SNPsのジェノタイプングが可能な猫SNP Array（米国Morris Animal Foundationの許諾を得て使用）を用いて96検体（FSEC及び遺伝学的に近縁な個体の合計81頭）をジェノタイプする。この結果を用いて、ゲノムワイド解析（連鎖解析、伝達不平衡検定[TDT]、ケース・コントロール解析）を実施する。これにより、FSECのてんかん発症に関与する座位の同定が可能となると考えた。昨年度のWGSはカバレッジが20を下回っていたため、illumina HiSeq X Tenを用いて高カバレッジのWGSデータ（4頭）を取得し、ゲノムワイド解析にて示唆された座位を探索することで、FSECの疾患原因/感受性バリエーションの同定に繋がると考えた。

### (2) FSEC を利用したてんかん外科の基礎研究

- ①昨年度から開始したFSECと健常猫を比較するVoxel-based morphometry (VBM) 法について解析および考察をつめて、研究報告および学術論文として公表する。また平成27年度から測定・解析を行ってきたMRスペクトロスコピー (MRS) に関して、その有用性につ

いて結論づける。

- ②昨年度にFSECの代替として健常ビーグル犬を用いた前側頭葉切除術を行っており（これまで4頭）、追加実験を行い（3頭）、前頭葉切除術の術式および術後合併症について考察する。くわえて最終的に猫での応用を含めた、無鎮静無拘束下での脳波測定法および定位的手術実現のための手術支援画像作成を検討する。

### 3. 研究の成果

#### (1) FSECの原因遺伝子の同定

- ①前述の通り、本年度の研究自体は下記②の広範囲なゲノム解析へシフトした。昨年まで解析を行ってきた猫LGIファミリーの同定および変異解析については、BMC Veterinary Research誌で公表した。
- ②SNP Arrayにおいて、総じて良好なジェノタイピング・データ・クオリティーが得られた。連鎖解析では、D2染色体にてSuggestive linkage (LOD score > 2) を認めた。さらにB1、B3、B4にもLOD score > 1を認めた。TDTではB3染色体に最も強い関連を認めた。ケース・コントロール解析ではC1に最も強い関連を認めた。上述の3つの手法にて得られた座位の近傍には、てんかん発症に寄与し得る、AMPA受容体やカリウム及びカルシウムチャンネルをコードする遺伝子やてんかん脳にて発現が亢進する遺伝子が認められた。これら座位における、かつFSECにてユニークな、遺伝子変異およびコピー数バリエーションを、本年度新たに獲得した高カバレッジ (30X) のWGSデータを用いて検討中である。

#### (2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

- ①最終的に、VBM解析では5頭のFSEC（これら5頭は通常のMRIでは明らかな構造異常を示さなかった）で海馬および／あるいは扁桃体に有意な灰白質容積の減少を認めた。本結果は9月にフィンランド・ヘルシンキで開催された欧州獣医神経病学会-専門医協会 (ESVN-ECVN) の年次大会でポスター発表し、現在Frontiers in Veterinary Science (Neurology and Neurosurgery) 誌に投稿、リバイス中である。一方、MRSの解析では、本来ならばFSECでてんかん原性領域と考えられる扁桃体や海馬での解析が望ましかったものの、猫の脳サイズが小さいために視床でしかスペクトログラムを測定することができなかった。しかしながら、FSECsではN-アセチルアスパラギン酸（減少）、グルタミン・グルタミン酸複合体（上昇）の有意な左右差が得られた。FSECsは個体によって焦点側が異なるため、MRSの結果のみで判断することはできないものの、発作焦点の側方性検索において一役を担えるものと考えられた。
- ②昨年度に引き続き、3頭の健常犬で前側頭葉切除術を行い、合計7頭における本術式およびその術後合併症について評価した。扁桃体および海馬吻側を含めた前側頭葉切除は7頭中5頭（71%）で成功し、2頭は術中の脳底動脈分枝からの制御不能な出血のため術中安楽死した。手術に成功した5頭中1頭は、皮膚縫合時に突然の心拍停止で死亡した。残りの4頭について、術後3ヵ月間のモニタリングおよび追跡MRI検査を行った。1頭は術後なんら合併症を認められなかった。残りの3頭では、一過性の対側性視覚障害および同側の側頭筋萎縮が認められたが、視覚障害は時間経過とともに回復した。これら術後合併症を示した個体では術後の追跡MRI検査において手術による浮腫あるいは損傷が視索領域に及んでいた。上述した前側頭葉切除術をより正確により低侵襲に行うためには、ニューロナビゲーターなどの手術支援画像が必要と考えられたため、それを可能にするためのMRI対応頭部固定具の開発を行った。一方、ワイヤレス生体計測装置を導入し、てんかん外科の術前検査として必須となる発作時脳波を取得するための無麻酔無拘束脳波測定を犬および猫で検討した。その結果いずれの動物種でも脳波測定は可能であるが、電極を止めておくための頭部包帯を嫌がり外そうとする行動が認められ、それを防除するためのエリザベスカラーの装着や多の方法を考慮する必要性があると考えられた。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) FSECの原因遺伝子の同定

これまでの FSEC の系統・維持において、未発症個体のゲノム DNA を確保していなかったことで、解析の幅が狭まってしまった。また、FSEC では近親交配が行われているため、解析検出力の低下が生じてしまった。しかしながら、本年度のゲノムワイド解析によって、いくつかの座位が示唆されたことは興味深い。連鎖解析にて D2 に Suggestive linkage が認められたが、家族性てんかんなどに代表される複雑疾患では、人医学においても Suggestive linkage のみを認めるという報告も少なくはない。今年度新たに獲得した WGS データは高カバレッジであり (30X)、猫 WGS データ・コンソーシアム (米国 99 Lives Consortium) と共同し (200 頭近いてんかんではない猫との) 比較検討が現在進行中である。

(2) FSEC を利用したてんかん外科の基礎研究

平成 27 年度から始まった本研究において、FSECs における拡散強調画像 (発作間欠期-発作後期)、脳灌流画像 (発作間欠期-発作後期)、MRS および VBM 解析を行うことができ、MRI で行えるてんかん原性領域の検索技術はおおよそ完成されたといつて良いだろう。今後は FSEC における個体毎のてんかん原性領域の同定をビデオ脳波、MRI と組み合わせて行っていく、本研究で犬において確立できた前側頭葉切除術を FSECs に応用していく所存である。またこれらの技術は、動物病院に来院するペットの犬猫に対しても十分適応可能であることから、近い将来的、難治性てんかんに苦しむ犬および猫に対する術前検査およびてんかん外科が実施されるものと期待する。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hamamoto Y, Hasegawa D, Mizoguchi S, Yu Y, Wada M, Kuwabara T, Fujiwara-Igarashi A, Fujita M. Changes in the interictal and early postictal diffusion and perfusion magnetic resonance parameters in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Research* 133:76-82, 2017.
- ② Yu Y, Hasegawa D, Fujiwara-Igarashi A, Hamamoto Y, Mizoguchi S, Kuwabara T, Fujita M. Molecular cloning and characterization of the family of feline leucine-rich glioma-inactivated (LGI) genes, and mutational analysis in familial spontaneous epileptic cats. *BMC Veterinary Research* 13:389, 2017.

(2) 口頭発表

- ① 長谷川大輔. 脳MRIの新しい撮像技術. 獣医神経病学会2017 (2017年7月8日・東京)
- ② 長谷川大輔. てんかん発作重積とてんかん外科. 第10回中部小動物神経病検討会 (2017年8月25日・名古屋)
- ③ Hamamoto Y (ポスター発表). Statistical structural analysis in familial spontaneous epileptic cats using voxel-based morphometry. Annual congress of ESVN-ECVN 2017 (2017年9月21-23日・フィンランド、ヘルシンキ)
- ④ Yu Y (ポスター発表). Evaluation of the epilepsy associated genes in familial spontaneous epileptic cats using whole genome sequencing. Plant & Animal Genome Conference XXXVI (2018年1月13-17日・米国、サンディエゴ)

(3) 出版物

なし

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	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	獣 医 学 部	准 教 授	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	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

進化の過程で常在細菌叢（マイクロバイーム）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。宿主側からの要因（食事や生活様式等）が常在細菌叢の破綻（ディスバイオシス）を生じ、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。本研究では、獣医学の分野でこれまでに試みられなかった細菌叢共生システムを探求し、健康個体（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と共に、細菌叢の変化が及ぼす疾患への影響と治療法の確立を目指し、細菌叢共生システムの探求と新規治療法の確立に向けた応用動物科学研究を実施する。

- (1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢の同定:健康個体と疾患個体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。細菌叢の変化と疾患との網羅的関連解析を実施し、ディスバイオシスをもたらす細菌叢の同定を目指す。
- (2) 分娩様式および環境要因が犬の腸内細菌叢（マイクロバイーム）に及ぼす影響:細菌叢の定着は無菌状態での出産後の環境、特に母子間での伝達によってなされる。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ており (Oiszak, et al., Science, 2012)、出産後の細菌叢定着様式が、個体の疾患のリスク因子である。そこで、分娩様式の違いが、成長過程における細菌叢の定着と関連するかを明らかにする。
- (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:ストレスを受けた動物は様々な心身の変化を呈する。ストレスがアレルギー性疾患、心疾患、中枢機能障害、消化器障害など多くの疾患の原因であり、ストレス制御機構の解明は、様々な疾患の治療法につながる重要な課題である。腸内細菌叢がストレス制御に関わることが知られており、このことからストレス制御と細菌叢の関係を、高ストレス下にある犬を対象として解析し、またマウスを用いて、そのメカニズムを解明する。
- (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:ストレスによる腸内細菌叢のディスバイオシスと疾患とをつなぐバイオマーカーを探求し、臨床場面での新たな診断ならびに治療法の確立に役立てる。
- (5) ストレス誘発性細菌叢の制御方法の確立と臨床的有効性の解明  
細菌叢の変化が及ぼす疾患への影響に対して細菌叢を整えることで、細菌叢共生による新規治療法の確立を行う。

## 2. 研究の計画

- (1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢の同定  
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康犬から、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。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。次世代シーケ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、疾病関連と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  
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

東日本大震災後に遺棄された犬は高いストレスレベルにあること、またヒトの心的外傷後ストレス障害様の行動と内分泌変化を示すことを見出してきた (Nagasawa et al. Sci. Rep. 2012)。同様のストレス下にあると想定される保護犬を福島県から譲り受け、長期リハビリテーション中のストレス応答性と腸内細菌叢の変化、ならびに社会性の変化を解析する。

さらに、マウスを用いて、ストレス誘発性の心身の変化における細菌叢の果たす役割の実証研究を実施する。これまでマウスでも幼少期のストレス経験が、生涯にわたる行動の異常と代謝内分泌疾患をもたらすことを見出してきた。本モデルを用いて、ストレス経験のマウスより採取した腸内細菌叢を、無菌マウスに定着させてノトバイオトマウスを作出、腸内細菌叢によるストレス応答性、中枢、行動、免疫系の変化を明らかにする。またヒトのストレス応答は、イヌとの共生により改善されること、特にヒトの心的外傷後ストレス障害に効果があることが知られており、この要因の一端に、イヌからの細菌叢の定着が考えられる (Fujimura et al, PNAS, 2014)。このことから、イヌの唾液を摂取させたマウスの内分泌変化ならびに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

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。

(5) ストレス誘発性細菌叢の制御方法の確立と臨床的有効性の解明

ストレス誘発性細菌叢を改善する候補となる生菌を分離して、細菌叢破綻の改善を指標とした臨床試験を実施する。

### 3. 研究の成果

(1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢の同定

それぞれ、アレルギー性皮膚炎 20 頭、白内障 13 頭、心筋症 2 頭、炎症性腸疾患 1 頭、鼻腔及び口腔腫瘍 4 頭とおよそ同数の健常犬より経時的に糞便、皮膚、涙液、唾液など細菌叢サンプルを採取した。このうちアレルギー性皮膚炎と白内障を発症した同一犬種より細菌叢のゲノム DNA を精製して、次世代シーケンサーを用いた網羅的細菌叢解析を実施した。UniFrac 解析 (群集解析) 等を行い、アレルギー性皮膚炎をもつスタンダードプードルの腸内細菌叢において  $\alpha$  多様性と  $\beta$  多様性に差があることが示唆され、白内障およびアレルギー性皮膚炎をもつトイプードルの涙液細菌叢において、 $\beta$  多様性に有意差があることが示された。(in preparation)

(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

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て 16S 解析を行った。子犬の皮膚および腸内細菌叢は、経日的に細菌叢に変化が生じ、2 歳齢では成犬と変わらないことが、 $\alpha$  多様性と  $\beta$  多様性の差から明らかとなった。(in preparation)

(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

福島県で遺棄された保護犬の長期リハビリテーション中の細菌叢ならびにストレス応答性を 3 年間、10 頭追跡した。導入直後のグルココルチコイドは平常時の 5-10 倍と高く、2 週間から 1 か月で平常値に戻った。また不安や恐怖の行動スコアが低下し、愛着のスコアが上昇した。並行して腸内細菌叢が変化し、腸炎などの疾患と関連の深いクロストリジウム科が低下、*Ruminococcus gnavus* の上昇が確認された。また保護犬が譲渡され、家庭犬となった後の追跡では、大腸癌の抑制効果を持つ *Lachnospiraceae* が上昇した。このように、ストレスに応じた細菌叢のダイナミズムが捉えられた。

マウスを用いた実証研究では、ストレス症候を呈する動物由来の細菌叢を無菌マウスに投与し、ノトバイオトマウスを作成、行動と免疫、中枢機能を評価した。ストレス動物

由来の細菌叢はマウスのうつ様行動を増加させ、新奇物に対するパニック様行動を誘発した。胃潰瘍を併発、消化管ならびにいくつかの免疫器官において、制御性T細胞の発現が抑制され、中枢では栄養因子の発現が低下した。心身共に障害が検出され、細菌叢がストレス感受性に大きく関与することが明らかとなった。

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。非常に興味深いことに、犬の唾液を投与されたマウスと同居したマウスの脳内オキシトシン濃度は上昇した。オキシトシンはヒトの心的外傷後ストレス障害様を軽減させる効果を持つことが示唆されており、イヌとの共生によるストレス応答性の改善効果が、イヌからの細菌叢を介したオキシトシン分泌上昇である可能性を見出した。

(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

イヌの*CD14*遺伝子のクローニングを行い、犬種における一塩基多型(SNP)の存在を明らかとした。*CD14*遺伝子のAP-1転写領域にSNPが存在したが、発現に対する影響は見いだせなかった。SNPの有無とFACSを用いた単球表面のCD14発現には違いが示唆されたが、SNPの有無とアトピー性皮膚炎の発症との間に関連性は見いだせなかった。(in preparation)

(5) ストレス誘発性細菌叢の制御方法の確立と臨床的有効性の解明

近年、健康人の皮膚細菌叢より分離された*Roseomonas mucosa*塗布が、アトピー性皮膚炎の破綻した皮膚細菌叢を改善することが報告された(Myles et al., JCI Insight, 2018)。この菌が、健康犬および子犬の細菌叢にも存在することが明らかとなった。

オオカミに由来するイヌは肉食である。高蛋白負荷に伴う腸内細菌叢の変化が、アレルギー性皮膚炎のイヌ腸内細菌叢に有用であるかを調べるために、獣肉を用いて高蛋白食になるように調整して、食事摂取前後の腸内細菌叢解析を行った。イヌ2頭に実施し、1頭の症状が改善したが、腸内細菌叢に有用と知られる*Lactobacillus*、*Bifidobacterium*属の顕著な増加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

犬の疾患病態に影響するストレス誘発性細菌叢の存在を示すデータが得られ、獣医領域における細菌叢解析の重要性を示すことができた。いくつかの症例では、飼い主の同意が得られにくく収集が進まない疾患分野もあった。引き続き検体収集とディスバイオシスの存在が明らかとなったアレルギーおよび白内障におけるストレス誘発性細菌叢の解析を進め、その因果関係の解明と治療法の確立につなげたい。

(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

出産前から2年間にわたる腸内細菌叢の定着を追跡した世界初の研究となった。さらに分娩様式の異なる同胎の子犬の追跡は、ヒトでは実現不可能なケースであった。発達に伴う細菌叢の構成は劇的に変化したことから、年齢のみならず食や環境の影響を受けつつ定着することが示された。分娩様式が子犬の皮膚および腸内細菌叢に影響を与えるか否か、明確な解答をすることができなかったが、一因として皮膚および糞便が経日的に変化することが明らかとなったことで解析手法がより複雑化したことが考えられた。

(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(H28の実績報告記載のまま)

ストレス応答性に関連するイヌの腸内細菌叢のダイナミズムが明らかになった。特にストレス状態が改善されることで、有益な菌種が増加したことから、細菌叢と疾患の循環様式の存在が示唆された。これまでヒトやマウスで報告されていたが、今回の研究で改めて、疾患の背景にあるストレスディスバイオシスが認められたことから、細菌叢を対象にした治療法の確立に向けた第一歩といえる。

マウスを用いた実証研究でも有益な結果が得られた。ストレス状態にある動物の細菌叢は、多個体に作用して、ストレス応答性を鋭敏化させることが示された。特にうつ様行動が増加、パニック障害、脳内の発育に悪影響を与えたことは、腸内細菌叢のもつ役割の重

要性を示せた。また胃潰瘍、免疫疾患の背景となる分子細胞変化を同定した。特に免疫疾患では、アレルギー性反応を抑制する制御系 T 細胞が減少したことから、ストレスを介したアレルギー症状の悪化の要因に、細菌叢の変化を見出せたことは重要な知見である。

イヌの唾液投与によって、オキシトシンの分泌が上昇したことは大きな発見である。これまでイヌとの生活がヒトの心身、特に精神疾患に有用であることが疫学的に知られていたが、今回、そのメカニズムとしてイヌが保有する細菌叢によって、ヒトのオキシトシン分泌が上昇、精神症状が改善されることが示唆され、世界初の発見となった。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

*CD14* 遺伝子 AP-1 転写領域に存在する SNP が発現に対して影響しなかったことで、この SNP の腸内細菌叢に及ぼす影響を調べる理由が脆弱となった。メタボローム解析などの新技術を用いることで、新規バイオマーカーを探索できるかもしれない。

(5) ストレス誘発性細菌叢の制御方法の確立と臨床的有効性の解明

皮膚の細菌叢破綻を改善する可能性のある菌種が、イヌの皮膚においても存在することが明らかとなった。しかし、イヌ本来の食性に戻した場合では、従来報告されている腸内細菌叢を改善する細菌種の顕著な変化は観察されなかった。イヌ本来の食性では、現在、ヒト化されたイヌの腸内細菌叢と異なった細菌種に着目する必要があるかもしれない。今後、症例数を増やして進めていく。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Yoshizawa M\*, Kawarai S\*, Torii Y, Ota K, Tasaka K, Nishimura K, Fujii C, Kanemaki N. Eosinophilic plasmacytic conjunctivitis concurrent with gingival fistula caused by *Schizophyllum commune* in a captive cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Med Mycol Case Rep.* 2017. 18:34-9. \*co-first author
- ②Yamazaki Y, Kawarai S, Morita H, Kikusui T, and Iriki A. Faecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection in a marmoset. *BMC Vet Res.* 2017. 13(1):150.

(2) 口頭発表

- ①西山優太、福山泰広、川原井晋平、金井詠一、安齋眞一、斑目広郎、代田欣二、圓尾拓也、パピローマウイルス介在性多中心性皮内扁平上皮癌の犬と猫の2例
- ②加藤なつ紀、高橋聡一郎、田端伴行、村上弘正、斑目広郎、代田欣二、川原井晋平、猫アレルギー性皮膚炎におけるFcεR1αを用いた血清抗原特異的IgE検査の検討、
- ③久保田翔太、仁比大記、園尾美穂、加藤なつ紀、望月美佐、木内明男、川原井晋平、蓬来温泉のマラセチア性皮膚炎に対する緩和効果、
- ④渡辺征、長谷川雅邦、瀬川和仁、川原井晋平、久末正晴、ナファモスタットメシル酸塩によるLPS刺激犬末梢血単核球のTNF-α産生抑制効果
- ⑤圓尾拓也、福山泰広、堀江和香、吉岡千恵、川原井晋平、犬の鼻腔腫瘍に対して照射とアクリジンオレンジ光線力学療法を実施した1症例、

(3) 出版物

- ①川原井晋平、松田秀則、荻田あづさ、伊東慶悟、安齋眞一. ロジックで学ぶ、犬と猫の臨床テクニック(第5回) 人医療から学ぶ獣医療の皮膚生検(解説). *Companion Animal Practice.* 2018. 33(3):52-7.
- ②久保田翔太、川原井晋平. その症状、歳のせいにしていませんか? 第3回皮膚. *SAC.* 2018. 190: 4-11.
- ③川原井晋平. 「細菌とアレルギーの新しい考え方(ブドウ球菌、腸内細菌叢を含む)」に寄せる、犬のアレルギー性皮膚炎と表在細菌(解説). *アレルギーの臨床.* 2017. 37(12):1163-9.

学 校 名	学 習 院 大 学	研究所名等	国 際 研 究 教 育 機 構
研 究 課 題	東アジアの都市における歴史遺産の保護と破壊 ー古写真と旅行記が語る近代ー		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	①アジア ②近代 ③歴史遺産 ④古写真 ⑤絵はがき ⑥旅行記 ⑦バーチャル・ミュージアム		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鶴 間 和 幸	文 学 部 史 学 科	教 授	研究代表者 統括・アジア古写真と東洋学

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
村 松 弘 一	東 洋 文 化 研 究 所	客員研究員	統括補・アジア古写真全体
伊 藤 真 実 子	国 際 研 究 教 育 機 構	教 授	万国博覧会と古写真
湯 川 真 樹 江	国 際 研 究 教 育 機 構	PD共同研究員	中国所蔵アジア古写真
三 瀧 み づ ほ	国 際 研 究 教 育 機 構	PD共同研究員	欧州所蔵アジア古写真
大 出 尚 子	国 際 研 究 教 育 機 構	客員研究員	満洲関係古写真
長 佐 古 美 奈 子	大 学 史 料 館	学 芸 員	学習院大学所蔵古写真
長 谷 川 怜	東 京 都 公 文 書 館	学 芸 員	絵はがき資料

# 東アジアの都市における歴史遺産の保護と破壊 —古写真と旅行記が語る近代—

## 1. 研究の目的

20世紀初め、それは日本人が写真と旅行記・手紙・新聞等によって日本に居ながらにして世界を知ることができるようになった時代である。携帯用小型カメラの開発、近代郵便制度の確立、絵葉書の製作・販売など、諸条件が揃ったのがその時期であった。百年の時間を経て、古写真や絵葉書は劣化が激しく、また、所蔵機関で資料的価値が認められずに廃棄されることも多い。幸いにも学習院大学には教材として使われたガラス乾板や絵葉書資料が千点以上残されている。これらの写真には百年前のアジア・日本の風景・風俗文化、歴史遺産（建築物）のすがたが残されている。本研究ではそのなかでも東アジアの都市にある歴史遺産はこの百年で保護されてきたのか、破壊されたのか、海外に流出した文物は現在どのような状態におかれているのか、という問題について考えたい。そのためには、国内外の機関における古写真・絵葉書・旅行記・新聞記事を収集・整理し、それらを時間軸に沿って並べ、変化を見る必要がある。すでに本学が所蔵している画像資料は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「近代アジアへの眼差しと教育—学習院コレクションの総合的活用」によっておおまかな調査は進んでいる。本研究ではその調査を基礎として、中国の北京・上海・青海・大連、台湾の台北・台中、韓国のソウル・釜山、ベトナムのハノイ、北方のサハリン、南洋のパラオなどの都市・地域をフィールドとして設定したい。これらの都市・地域には20世紀の初めに学習院関係者が訪れて、旅行記を残している。例えば、北京には白樺派の文豪・里見弴や志賀直哉、朝鮮には民芸運動の柳宗悦、サハリンには戯曲作家の長与善郎、パラオには彫刻家・民俗学者の土方久功、ベトナムには歴史学者の山本達郎・澄子、台北では台湾からの留学生・顔惠民の記録・記憶がある。さらに国内やヨーロッパ、中国に残された写真資料を渉猟し、現在の状況も踏まえ、時間軸に沿って歴史遺産の保護・破壊の過程をたどりたい。方法としては以下の3つのステップによってすすめる。

- 1、古写真資料の調査・収集・整理・公開—学習院所蔵のほかギメ東洋美術館（仏）やロンドン大学東洋アフリカ研究学科（SOAS、英）などで未整理の写真を調査。
- 2、旅行記・日記・新聞記事の収集・整理・関係づけ—文献資料を収集し、各都市の歴史遺産の状況を調査。
- 3、現在の歴史遺産の保護・破壊状況を調査

上記の調査・研究によって得られた成果は三つの方法で公開する。

### ① アジア古写真のWEBデータベース「バーチャル・ミュージアム」への掲載（2015年）

学習院および国内外の古写真を整理し、また、現代の写真も加え、イパレットと称される技術を利用した「バーチャル・ミュージアム」というサイトのコンテンツとして公開する。

### ② 写真展「近代アジアの肖像」の実施（2016年）

北京・台北・ソウルなどの都市の近代の移り変わりを海外の写真も含めて時間軸に沿って陳列する。歴史遺産の保護・破壊、そして未来のあり方を都内で開催する写真展によって多くの市民に広める。

### ③ 書籍『旅するアジア—写真と旅行記が語る近代（仮称）』の刊行（2017年）

写真と旅行記をリンクさせた書籍を編集・刊行する。特に、写真の対象物に関する当時の状況や感想などの旅行記の記事を中心にまとめ、画像資料と文書資料の結びつけをおこなう。

## 2. 研究の計画

平成29年度は、書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの150年』（研究計画段階での名称は「旅するアジア—写真と旅行記が語る近代」）の発行を目標とする。そのために、以下の作業に

取りくむ。

(1) 書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの 150 年』の発行

出版社を介した商業出版とする。学習院大学所蔵資料を中心とした古写真・絵葉書の図版を都市別にまとめて掲載し、都市の歴史とともに各図版に解説（一部には現在の写真）を付し、現在の地図上に撮影地の位置を示す。また、その都市を旅した人々の旅行記の記述により都市の風貌を描きだす。

(2) バーチャル・ミュージアムの完成

平成 27 年度に試用版が完成し、平成 28 年度に内容を充実させたバーチャル・ミュージアムを完成させる。撫順・瀋陽・蘇州・台中などのページを追加したうえで、ページ閲覧の操作性を改善する。青島・台中・台南で現地調査した成果を反映させる。

(3) 資料調査

学習院大学所蔵の絵葉書・古写真の撮影地点を古地図から特定し、旅行記に描かれた旅のルートを把握する。

(4) 現地調査

青島・台中・台南で現地調査を実施する。絵葉書・古写真に写された建築物や通りなどの現状について、同じアングルから現在の写真を撮影する。

### 3. 研究の成果

(1) 書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの 150 年』の発行

研究成果として村松弘一（学習院大学）・貴志俊彦（京都大学）を編者として、書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの 150 年』（勉誠出版、平成 30 年 3 月）を出版した。B5 版全 176 頁、フルカラー。目次は下記のとおりである。

旅のはじめに

絵葉書の誕生

本書とあわせて—絵葉書・古写真データベースの利用

東アジア地図・凡例

◆中国東北部（旧満洲）を旅する

大連—「満蒙」の玄関口／旅順—日露戦争の戦跡観光／瀋陽〔奉天〕—清朝の故地から近代都市へ／撫順—炭鉱の街／長春〔新京〕—「満洲国」の計画都市／哈爾濱—東洋の小パリ

◆華北を旅する

北京—八〇〇年の古都／西安—古都・長安の黄昏／青島—紅い瓦と碧い海／済南—泉の都

◆華南を旅する

上海—「魔都」と呼ばれた街／杭州—湖光山色／蘇州—詠われた水郷／南京—文雅の淵藪／香港—世界にひらく移民雑居の街

◆台湾を旅する

台北—「南進」の拠点／台中—台湾第二の都市／台南—重なり合う歴史の街

◆朝鮮半島を旅する

ソウル〔京城〕—朝鮮半島の中核都市／仁川・水原—ソウル近郊の都市／慶州・大邱—慶尚北道の都市／釜山（プサン）—港湾都市／平壤（ピョンヤン）—朝鮮半島第二の都市

旅のおわりに—描かれた近代都市・建築をめぐって

読者のためのブックガイド

このほかに、「旅の道標」と題するコラムを 17 点、同じく「あの作品の舞台」を 12 点掲載した。

(2) バーチャル・ミュージアムの完成

代表者を中心にページ閲覧の操作性を改善したうえで、撫順・瀋陽・蘇州・台中などのページを追加し、さらに既存の内容についても平成 29 年度に新たに判明した調査結果を

反映させた。

### (3) 資料調査

古書店から絵葉書を購入し、絵葉書の写真に関する情報をバーチャル・ミュージアムおよび書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの150年』に反映した。

また、研究に関する情報収集のため以下の施設を訪れた。

- ・名古屋市立博物館：企画展「異郷のモダニズム—満洲写真全史」の観覧、および学芸員による解説会「建国と崩壊のグラフィズム」への参加（6月17日）
- ・日本郵船歴史博物館：常設展示・特別展示の観覧（7月25日）

### (4) 現地調査

絵葉書・古写真に写された都市の建築物や通りなどと同じアングルから現在の状況を撮影した。平成29年度は台北・台中・台南・青島へ赴き、30余枚分の建築物の写真を撮影した。

台北・台中では、学習院大学所蔵の5枚の絵はがきを取り上げ、

- ① 日本統治期に建てられて現存するもの（総督官邸〔現台北賓館〕
- ② 日本統治期に建てられて現存しないもの（鉄道ホテル〔現新光三越ビル〕）
- ③ 日本統治期に撮影された場所（日月潭）

以上の三つに分類したうえで調査、撮影を行なった。

青島では学習院大学所蔵の19枚の絵葉書を取り上げ、

- ① ドイツ統治期に建てられたもの（忠の海海水浴場〔現在第一海水浴場〕、青島市迎賓館〔現在ドイツ総督旧址博物館〕、青島基督教堂、青島小学校〔現在総督府童子学童旧址〕、青島守備軍司令部〔現在人大常委会〕、日本領事館〔現在徳華銀行旧址〕、青島軍政署〔現在膠州帝国法院旧址〕、青島郵便局〔現在郵電博物館〕、陸軍病院〔現在総督府野戦病院旧址〕、青島桜公園〔現在中山公園〕、守備軍万年兵営〔現在中国海洋大学〕、高等女学校〔現在青島医学院黄台路教学区〕）
- ② その他（青島神社〔現在貯水山児童公園〕、青島栈橋）

以上の二つに分類したうえで調査、撮影を行った。

## 4. 研究の反省・考察

本研究は三年間の研究を通じて、現地調査／バーチャル・ミュージアム／展覧会／書籍刊行という年次計画を順番に実施し、平成29年度には最終目標の書籍刊行を達成することができた。その時々ではかならずしも十分なものではなかったかもしれないが、全体として大変大きな成果を得たと言ってよい。所蔵する絵葉書資料のボリュームはかなり増えたので、将来的にはバーチャル・ミュージアム等を通じた他大学とのWEB情報共有によってより広汎な資料を活用できることとなるだろう。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

- ① 武藤那賀子「『台湾研修』事前学習会」（於お茶の水女子大学附属高等学校、平成29年7月24日）
- ② 曹雯「清末租界発展終末」（於学習院大学、平成29年8月17日）学習院大学東洋文化研究所
- ③ 村松弘一「『古写真』の書誌学の試み—足立喜六『長安史蹟の研究』からの発想」（於：学習院大学東洋文化研究所「連続講座 東アジア書誌学への招待」）

### (3) 出版物

- ① 貴志俊彦・村松弘一編『古写真・絵葉書で旅する東アジア150年』勉誠出版、平成30年

学 校 名	昭 和 女 子 大 学	研究所名等	国 際 文 化 研 究 所	
研 究 課 題	ベトナム・クーラオチャム島の日越共同考古学調査 —文化資源を活用した島の観光開発—		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①ベトナム ②ホイアン市 ③考古学 ④観光開発 ⑤文化資源 ⑥遺跡の保存と活用			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
菊 池 誠 一	国 際 文 化 研 究 所	副 所 長	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 藤 勝 洋	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	観光まちづくり
大 橋 康 二	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	出土陶磁器調査
菊 池 百 里 子	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	発掘調査・観光開発
歳 原 佳 世 子	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	発掘調査
四 日 市 康 博	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	文献調査
田 中 眞 奈 子	人 間 文 化 学 部	講 師	文化財科学
山 岸 良 二	人 間 文 化 学 部	講 師	文化遺産調査・博物館展示調査

# ベトナム・クーラオチャム島の日越共同考古学調査 －文化資源を活用した島の観光開発－

## 1. 研究の目的

### (1) 文化資源を活用した島の観光開発

①ベトナム中部に位置するクアンナム省ホイアン市の東海上にクーラオチャム島がある。この島は七つの島からなっており、人が住む島はホンラオと呼ばれる比較的大きな島で住民の大半は漁業関係者である。また、高級食材として知られる海燕の巣が島の外洋面の洞窟から採取され、その採取関係者も居住する。

1997年頃に、この島の沖合の海底から15世紀頃の大量の陶磁器が引き揚げられ、この島の歴史的背景がにわかに注目を浴びた。また、9世紀から10世紀頃に書かれたアラブ商人の航海記にこの島の様子が記されている。それによると、真水が補給できる島という。こうしたことから、1998年から翌年にかけてハノイ国家大学が発掘調査を実施したところ、9世紀から10世紀頃のイスラーム・ガラスや陶器、また同時代の中国陶磁器が出土し、アラブ商人の記録を裏付けることとなった。以後、ベトナム歴史学界はこの島の歴史上の重要性を認識してきたものの、継続調査が行われることはなかった。

島を管轄するホイアン市当局は、ホイアン市旧市街地がユネスコの世界遺産に登録されているため、その観光開発の一環として、近年この島の観光開発を考えてきた。特に欧米人が近年、離島をリゾート地と考え、この島に行く観光客が増えてきたことが開発の要因でもある。

我われは、1993年から日越共同考古学調査チームを編成し、ホイアン旧市街地の考古学調査や歴史調査を実施し、現在も継続中である。こうしたホイアン地域の歴史的研究から、この島の重要性を踏まえ、日越共同の調査を考えてきた。そのため、まずは観光開発に先立つ日越共同考古学調査を実施し、島の文化遺産状況を確認し、下記の視点から考古学調査をし、島の観光開発に資することを目的に活動することにした。

- ②西アジア世界と中国世界が結びついた“海のシルクロード”のなかで、この島の位置を世界史視点から解明すると同時に、歴史上にはたした役割を解明することが必要と考え、その位置づけのための発掘調査を島内で行う。
- ③ホイアン市が進めている島の観光開発に、歴史学・考古学の視点を導入し、島に残る遺跡や出土品、調査成果を観光開発の資源として活用する観光開発計画案を策定する。そのため、島の文化遺産の悉皆調査と考古学調査を実施、観光アプリの開発をし、観光客に島の歴史的背景を理解してもらおう。
- ④上記の調査等をへて、観光開発計画をホイアン市当局に提言し、文化遺産を活用した観光開発を推進することを目的とする。

## 2. 研究の計画

(1) クーラオチャム島で発掘調査を実施し、島の歴史的意義を解明すると同時に観光開発に資する観光アプリの開発をする。

- ①【4月～7月】ベトナム側の関係機関（ハノイ国家大学、ホイアン市遺跡保存管理センター等）と考古学調査上の諸手続きを行う。
- ②【8月～9月】クーラオチャム島において発掘調査を実施し、遺跡の歴史的意義を解明し、島の世界史上における位置づけを行う。また、出土遺物の整理作業（写真撮影、実測等）をホイアン市博物館において実施する。島での調査は10日間ほどを予定している。
- ③【10月～3月】昭和女子大学において出土遺物図面のトレース作業を行う。観光アプリの開発をする。調査チームでの勉強会を設け、出土陶磁器やガラス製品についての共通の理解と今後の研究方針を確認し、次年度に備える。

## 3. 研究の成果

(1) クーラオチャム島の①文化財分布調査、②考古学調査、③資料館調査を実施している。こ

これらの計画は、ハノイ国家大学・クアンナム省文化局・ホイアン市遺跡保存管理センターと共同で実施している。調査中は、ベトナムテレビ局(VTV1)の密着取材もあり、ベトナム側の関心は高い。

①文化財分布調査：島内には、文化財が広く分布していることがわかった。しかし、案内板の設置はほとんどなく、いくつかある案内板はベトナム語での説明であり、外国人観光客に資するものではなかった。また、ホイアン市には旧市街地用の観光ガイドの育成はあるものの、島の歴史や文化遺産をよく知ったガイドも滞在しておらず、島の歴史を語る役割を果たしていない状況であった。

②考古学調査：発掘調査は、調査面積2m×2m四方の狭い試掘であった。しかし、9世紀前後のイスラーム・ガラスや陶器片、中国陶磁器片などが出土した。あらためて“海のシルクロード”上の要衝であったことが確認でき、今後、遺構確認が可能な本格的発掘調査実施の必要性があることを認識した。また、基礎的な遺物整理を実施したところ、遺物は、大きく分類するとイスラーム・ガラス、陶器と同時期の中国陶磁器、同時期のチャンパー陶器・土器が出土した。また、16世紀以降の中国陶磁器も存在した。

このことから、発掘地点は9～10世頃の居住地の一部と考えられ、その後は16世紀まで空白時期となっており、空白時期は島の別地点へ移動したものと考察される。イスラーム・ガラスは、薄青色、濃青色などのものであり、内陸シルクロード出土のイスラーム・ガラスの様相と異なっていることから、海路で運ばれたものと推測できる。

中国陶磁器は、越州窯系青磁、長沙窯陶器、白磁が出土し、初期貿易陶磁の様相を示している。9～10世紀頃のチャンパー陶器や土器の様相は、これまで当該時期の発掘調査件数が少なく不明であった。しかし、今回の調査によって陶器と土器が多く出土し、その様相がわかり、貴重な資料を得ることができた。このことは、チャンパー時代の研究に大きく貢献をするものと考察できる。

③資料館調査：調査展示品や解説が不十分であり、多くの問題点を確認した。具体的には、島内に資料館がひとつあるが、その展示面積に比べて展示品の少なさがめだつた。また、解説が不十分でベトナム語表記しかなく、外国人観光客に対応できていない状況であった。本来ならば、島の歴史的な位置づけを世界史のなかに置き、島の重要性を語るとともに、島の動植物、海洋資源までを紹介するコーナーも必要と考えられる。以上のことから、現在の資料館を日越共同で知恵を出し合い、充実した資料館としていく努力が必要である。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) 調査研究は順調に進んでいる。予想以上にベトナム側の受け入れ態勢が迅速に進み、当初は予定していなかった試掘調査を実施することが可能となった。その結果、次年度の本格的調査に道を切り開くことができた。しかし、下記の点について今後、今まで以上に取り組んでいきたい。

①発掘調査で多くの遺物が出土したことにより、その整理作業に時間をとられてしまった。整理作業をした後でないと、学会報告もできないため、本年度の学会でその成果を公表できなかった。しかし、次年度以降には、その成果を積極的に学会報告したい。まずは、来春の一般社団法人日本考古学協会での報告となる。また、東南アジア考古学会での報告も考えている。同時に、ベトナム人研究者と共同でベトナムの専門雑誌への投稿も視野に入れている。

②国内の研究者とさらに研究交流を密にしていきたい。今回出土した遺物には、イスラーム・ガラスや陶器がある。そのため、当該分野の研究者を調査隊に入れると同時に、考古学だけではなく、文献史、文化財科学、博物館学分野の研究者との意見交流をし、有益な助言を得ることにしたい。特に、島の資料館の改善には、日本の博物館関係者の助言は有益となろう。そのため、調査関係者や助言が得られる研究機関や博物館の研究者との会合を積極的に開催したい。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし（初年度のため、ございません）

(2) 口頭発表

なし（初年度のため、まだ十分な遺物整理が終わらず、発表はございません）

(3) 出版物

なし（初年度のため、ございません）

学 校 名	成 城 大 学	研究所名等	民 俗 学 研 究 所
研 究 課 題	地域社会における関係性の変容に関する実証的研究 —循環的ソーシャルキャピタルの構築にむけて—		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	①柳田國男 ②山村調査 ③海村調査 ④地域社会 ⑤日常生活 ⑥家業 ⑦ライフヒストリー ⑧循環的ソーシャルキャピタル		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 島 孝 夫	文 芸 学 部 ／ 民 俗 学 研 究 所	教授／所員	地域社会における関係性の変容に関する研究の 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 宣 一	成 城 大 学	名 誉 教 授	地域社会における年中行事の変容と生活改善諸 活動の展開に関する調査研究
俵 木 悟	文 芸 学 部 ／ 民 俗 学 研 究 所	教授／所員	地域社会における文化財保護活動の課題に関する 調査研究
亀 井 好 恵	民 俗 学 研 究 所	研 究 員	地域社会における人生儀礼の変容に関する調査 研究
今 野 大 輔	民 俗 学 研 究 所	研 究 員	地域社会における社会的弱者への対応に関する 調査研究
高 木 大 祐	民 俗 学 研 究 所	研 究 員	地域社会における民間信仰の展開に関する調査 研究
加 藤 幸 治	東 北 学 院 大 学 文 学 部	教 授	東日本大震災被災地における地域社会の再構築 に関する調査研究
玄 蕃 充 子	船 橋 市 教 育 委 員 会	学 芸 員	中山間地域における環境保全と資源利用に関する 調査研究
関 根 康 正	神 奈 川 大 学 日 本 常 民 文 化 研 究 所	客 員 研 究 員	都市生活における他者認識に関する調査研究
原 山 浩 介	大 学 共 同 利 用 機 関 法 人 人 間 文 化 研 究 機 構 国 立 歴 史 民 俗 博 物 館 研 究 部	准 教 授	地域社会における消費生活の生成と変容に関する 調査研究
丸 尾 依 子	山 梨 県 立 博 物 館	学 芸 員	離島における移住者の混住への対応に関する調査 研究
八 木 橋 伸 浩	玉 川 大 学 リベラルアーツ学部	教 授	町村合併の可否にともなう地域社会の再編に関する 現状と課題に関する調査研究
山 崎 久 登	東 京 都 立 砂 川 高 等 学 校	教 諭	離島社会における廃置分合の通史的調査研究
山 本 志 乃	旅 の 文 化 研 究 所	研 究 主 幹	地域社会における小資本生業の存立に関する調査 研究

# 地域社会における関係性の変容に関する実証的研究 —循環的ソーシャルキャピタルの構築にむけて—

## 1. 研究の目的

- (1) 地域をめぐる所与の環境との関係を循環的で強固なものに再構築するための関係性の検証
  - ① 平成23～25年度にわたり日本私立学校振興・共催事業団学術研究振興資金の研究助成を得て実施した「町村合併による社会・文化の再編に関する民俗学的研究—『平成大合併』を視野に一」の研究成果をさらに深化させることで、地域社会において自律的に形成されてきた住民自治のあり方を検証する。地域社会が直面している現状や課題を、主体となる地域社会に生きる人びとと所与の環境との関係を包摂的に把握することで、より安定した生活環境を維持することが可能になる循環的なソーシャルキャピタル（社会関係資本）を蓄積するための集団形成の論理を明らかにすることを試みる。
  - ② 今年度は、そのための具体的な方法として、地域で暮らす人びとのライフヒストリーを主たる資料とし、当該地域の日常生活を構成してきたさまざまな関係性を再検討し、当該地域の人びとのそれらに対する対応の分析をとおして、現在の地域社会の現状を包摂的に捉えなおすための実証的研究を行った。
- (2) 地域をめぐる所与の環境との関係を循環的で強固なものにするための関係性の再構築にむけた提言
  - ① 次年度以降は、上記のライフヒストリーの収集とそれらの分析作業を継続し、家業なき地域社会において紐帯となっている関係性の抽出を試み、現在の地域社会における集団形成の論理を明らかにするための検討を研究会で定期的に行う。
  - ② 定量的分析で把握される地域社会の現状は必ずしも、当該地域の暮らしの実態を示したものではないことを示し、当該地域において「ともに生きる」ことを選択した人びとの心意を明らかにしていくことで、地域社会における循環的で強固な暮らしにするための関係性の再構築にむけた提言を行う。

## 2. 研究の計画

- (1) 現地調査
  - ① 本学民俗学研究所が所蔵する、柳田國男主導により全国各地で同時に実施された共同調査である「山村調査」（昭和9年～11年）と「海村調査」（昭和12・13年）の調査地を主たる研究対象とした。平成28年度まで実施した「地域社会における関係性の変容に関する基礎的研究」において予備調査が終了している13地域を主対象に、各担当者が継続的に現地調査を実施した。
- (2) 研究会
  - ① 平成28年度までの基礎的研究においてすすめてきた調査成果の検証と共有を目途とした研究会を定期的で開催し、現地調査報告の成果を共有することを試みた。
  - ② 6月、7月、10月、12月に通常の研究会を開催し、3月にゲストスピーカーを交えた研究会を開催した。

## 3. 研究の成果

- (1) 現地調査
  - ① 予算の制約を調整しながら計画的な現地調査が実施された。前プロジェクトから継続されている対象地での継続的な調査活動は順調に推移している。今年度より着手した現地調査については、調査地や対象集団に関する基礎的調査に着手した
  - ② 今年度の現地調査の成果の概要は次のとおりである。平成の大合併にいたるまでの三次にわたる廃置分合は日本の経済活動を最優先させた施策で、当該地域で生きてきた人びとがともに生きることを前提として構築してきた循環的な関係を日常生活の要素ごとに分断させてしまうことにもなった。当該地域内で循環的に継承されてきた日常生活の諸要素が、経済活動に従属するような形で変容を余儀なくされていった。昭和の大合併は高度経済成長期を現出させることになったが、高度経済成長の展開につれて、自然

環境に依存する第1次産業は衰退し、日本社会の基層を形成していた世代を超えて継承されてきた家業も消失していった。家業の存在によって維持されてきた地域社会の紐帯も希薄なものになり、その後の市場経済の展開は地域社会における支えあう生活を急速に崩壊させていくことになった。平成の大合併がめざした行政的な公共性と当該地域社会で暮らす人びとが培ってきた自律的な公共性との間には大きな差異があり、前者の公共性は、主体となる人びと自身がそれらを選択しなければ受容できないものになりつつある。家業が消滅したことで、地域内においても世襲的な家業によって生計を維持してきた世代と、他の生業を選択した下の世代との間で当該地域社会に対する意識に齟齬が生じており、互助協同慣行などの協同性に対する意識も変容しつつある。総じて、地域社会内では自律的な生活意識が希薄化し、それにともない、主体を取りまく自然や社会を含む他者との関係性が大きく変容している。

前プロジェクトの成果を検証しながら継続調査を実施していくことで、上記の地域社会の現状をより明確に把握することができた。

## (2) 研究会

- ① 全5回の研究会を計画どおりに実施した。報告者が現地調査の成果を報告し、その事例を題材に、各自の現地調査の成果をもとにした比較研究的分析を行なった。

第1回研究会 6月3日(土) 16:00-18:30

議事 今期プロジェクトの研究計画等について

第2回研究会 7月29日(土) 13:30-16:00

報告 ホンムラと他出者

—山梨県南巨摩郡早川町茂倉のソウニンソクの現状と課題— 小島孝夫

議事 今期プロジェクトの研究計画等について

第3回研究会 10月7日(土) 15:00-18:00

報告 追跡調査という一つの研究法

田中 宣一

議事 今期プロジェクトの研究計画等について

第4回研究会 12月22日(金) 18:00-21:00

報告 減る人口と増えた観光客

高木 大祐

議事 今期プロジェクトの研究計画等について

第5回研究会 3月17日(土) 15:00-18:00

報告 日本一人口が少ない町・早川町と日本上流圏文化研究所の20年

日本上流圏文化研究所前事務局長 鞍打 大輔

山村集落への他出者によるかかわり—その重要性と課題—

滋賀県立琵琶湖博物館学芸員 大久保実香

議事 今期プロジェクトの総括と次年度の研究計画等について

- ② 今年度の研究報告に共通したテーマとして人口減少地域における日常生活の現状や課題が検討された。第5回研究会では、このテーマについてより具体的な検討を行うために、第2回研究会報告の対象地において継続的な調査研究を実施しているゲストスピーカーを交えて、「中山間地域のくらしの現状と課題」に関する討議を行い、今年度の研究活動を総括した。

報告者の現地調査を題材に検討した成果は次のとおりである。日本の経済活動を最優先させた施策である三次にわたる廃置分合が地域社会にもたらしたのは、世襲的な家業の継承を前提に、「利用」と「保全」とのバランスを調整することで維持されてきた地域社会における生き方の転換であり、生活の場としての地域社会の変容であった。こうした転換や変容の実態を理解するためには行政側が強力に推し進めた施策が外因であったとしても、それらを受容・対抗した地域社会の人びとの内因を理解していかなければ、地域社会に生きる人びとがより安定した生活環境を維持することが可能になる循環的なソーシャルキャピタルを蓄積するための集団形成の論理を明らかにすることは困難である。かつての「利用」と「保全」とのバランスは、当該地域の時代的・社会的背景に応じて形成させたものであり、現在、私たちの眼前で展開されている地域社会の日常生活にいたるまでの、当該地域で暮らしてきた人びとの選択や決断の過程の理解を抜きにして、本研究の目標を達成することはできない。

次年度以降の研究活動の視座として、地域社会の日常生活の成りたちや移り変わりを

理解していくためには、当該地域の実態調査と併せて、当該地域の暮らしを大きな影響を与えてきた時代的・社会的背景にも留意していかなければならないことがプロジェクト参画者全員で共有されることになった。

#### 4. 研究の反省・考察

##### (1) 現地調査

- ① 現地調査の進捗状況は、対象地域の事情や調査テーマにより一様ではない。
- ② 当該地域や集団が内包している複雑な関係性を理解していくためには継続的な現地調査が必須となるため、計画的な調査活動の実施にむけて調整を図りたい。

##### (2) 研究会

- ① 5回の研究会を開催したが、全員が毎回出席するということは困難であった。毎回の報告は個別に実施している調査の事例であるため、報告内容を全員で共有することが課題となった。
- ② この課題への対応策として、毎回の報告・討議内容を文章化することで、欠席者を含めた全員で共有できるようにした。各自の総括原稿を作成することや研究成果の出版作業にむけて、研究会での議論が記録化できるようになったことは初年度の大きな成果となった。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ① 小島孝夫 「地域社会における祭礼の変容－埼玉県北足立郡伊奈町下郷区の春祈禱を事例に－」『日本常民文化紀要』33輯 15-52頁 成城大学大学院文学研究科 2018年3月
- ② 俵木 悟 「『正しい神楽』を求めて－備中神楽の内省的な伝承活動に関する考察－」『日本常民文化紀要』33輯 53-94頁 成城大学大学院文学研究科 2018年3月

##### (2) 口頭発表

- ① 小島孝夫 「島渡りという戦略－石川県輪島市海士町の海女の生き方－」2017年韓国文化人類学会大会 2017年10月20日

##### (3) 出版物

- ① 小島孝夫 (監修) アン・ミジョン『济州島海女の民族誌－「海畑」という生活世界－』アルファベータブックス 2017年11月
- ② 関根康正編 『ストリート人類学－方法と理論の実践的展開－』風響社 2018年2月

学 校 名	法 政 大 学	研究所名等	野 上 記 念 法 政 大 学 能 楽 研 究 所	
研 究 課 題	能楽の国際参照標準確立と多面的展開に向けての総合研究		研究分野	文 学
キ ー ワ ー ド	①能 ②狂言 ③演劇 ④世阿弥 ⑤国際 ⑥学際			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 中 玲 子	能 楽 研 究 所	教 授	研究代表・総括・演出研究・芸芸伝承

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宮 本 圭 造	能 楽 研 究 所	教 授	能楽史の研究・関連芸能
伊 海 孝 充	文 学 部	教 授	謡本・狂言台本の研究
竹 内 晶 子	国 際 文 化 学 部	教 授	能の脚本構造の分析
林 容 市	文 学 部	専 任 講 師	芸芸伝達に関する実験と分析
高 橋 悠 介	慶 應 義 塾 大 学 附 属 研 究 所 斯 道 文 庫	准 教 授	能楽と宗教
横 山 太 郎	跡 見 学 園 女 子 大 学 文 学 部	准 教 授	芸芸伝承・能楽を廻る言説の研究
高 桑 い づ み	東 京 文 化 財 研 究 所	特 任 研 究 員	能の演出研究
玉 村 恭	上 越 教 育 大 学 学 校 教 育 学 部	准 教 授	能楽論の研究
Tomas Hare	プ リ ン ス ト ン 大 学 比 較 文 化 学 科	教 授	海外研究者総括・能と宗教・世阿弥の生涯
Monica Bethe	中 世 日 本 研 究 所	所 長	能の演出研究
Michael Watson	明 治 学 院 大 学 国 際 学 部	教 授	芸芸伝承・能楽社会の分析
Eike Grossmann	ハ ン プ ル ク 大 学 人 文 科 学 部	准 教 授	能楽史の研究・関連芸能
Paul Atkins	ワ シ ン ト ン 大 学 文 理 学 部 ア ジ ア 言 語 文 学 科	教 授	能の脚本構造の分析・金春禅竹の生涯
Shelley Quinn	オ ハ イ オ 州 立 大 学 東 ア ジ ア 言 語 文 学 科	教 授	能楽論の研究

# 能楽の国際参照標準確立と多面的展開に向けての総合研究

## 1. 研究の目的

- (1) 本研究課題は、国内外の研究者の共同研究により能楽研究の国際的な参照標準を定め、最新の研究情報を英語で海外の研究者や隣接他領域の研究者、さらには実演者に向けても発信することで、能楽研究のフィールドを拓けようとするものである。
  - ① 国内外の能楽研究者、演劇研究者が問題意識を共有し、方法論の違い等を認識したうえで、能楽史・能楽論・能楽の背景となる宗教思想・能楽の脚本構造や演出等々について、最新の研究の成果を英語でまとめていく。
  - ② 現代思想と能楽の関係、現代における能楽の諸相（経済基盤・人材教育等）、能楽とジェンダー等、従来の能楽研究では触れられてこなかった問題についても取り組み、英語で発信していく。

## 2. 研究の計画

- (1) 前年度に引き続き各チームで研究を進め、従来の解説書等で手薄だった分野から優先的に、能楽全書の英語原稿としてまとめていく。同時に、成果を日本語・英語それぞれで論文化していく。
  - ① 能楽史に関しては前年度の近代史に続き、大和猿楽の成立に関わる部分の研究を進める。また、能楽の特殊な興行形態・人材育成・経済基盤・素人の役割等について、前年度に引き続き、学会発表に向けて英語原稿の精度を高め、一部は論文化する。
  - ② 能の現行曲全体の英語による包括的なリスト（各曲のあらすじと基本情報を含む）の方針を決定し、原稿作成に入る。
  - ③ 演出に関わる諸問題、能楽と宗教、能のテキストの文学的特徴、世阿弥の能楽論、狂言の演劇的特徴等、優先的に進めてきた分野の英語原稿を完成させる。
- (2) 研究成果をシンポジウム、研究セミナー、講演、展示等で発信し、フィードバックを得る。
  - ① EAJS（ヨーロッパ日本学会）にて、能楽の特殊な興行形態・人材育成・経済基盤・素人の役割・能のテキストの文学的特徴等について、研究発表を行う。
  - ② EAJSに参加する日本学関係の出版社との交渉や編集についての相談をおこない、出版のめどをつけるため、EAJS大会までに全体の構成表を確定する。
  - ③ 能楽の芸芸伝承に関するスポーツ科学との学際研究と、能付資料に関する文献学的研究を併せて、資料展示と研究セミナーを開催する。
  - ④ 英語版能楽全書として、書籍として刊行する内容と別に、ウェブサイトで常に最新の研究成果を発表できる場の確保をはかり、そのコンテンツも蓄積していく。

## 3. 研究の成果

- (1) 各領域での原稿作成
  - ① 古代から中世への過渡期において大和猿楽がどのように成立・発展していったか、能楽史の根本に関わる部分の研究を進め、論文化した。
  - ② 能の台本に採り入れられた仏教関連語句のデータベース構築に向けた研究を進めるとともに、能役者を取り巻いていた宗教的環境について英語原稿を完成させた。能における素人の役割については成果を論文化した。
  - ③ 演出に関わる諸問題、世阿弥の能楽論、狂言の演劇的特徴等、優先的に進めてきた分野の英語原稿をほぼ完成させた。また現行曲の英語による包括的リストも、方針を決定し、全曲数の30%程度の原稿を作成した。
- (2) 国内外での研究発表、シンポジウムなど
  - ① 一般演劇とは大きく異なる能楽の興行形態、学校教育やオーディションに頼らない独特の能楽師養成のシステム、能楽における素人の役割、謡曲独特のレトリック等について

て、EAJS 大会にて英語での研究発表をおこなった。

- ② 能楽の技芸伝承に関し、スポーツ科学やエスノグラフィーの手法を使った研究と、能付資料に関する文献学的研究、役者のインタビュー、ワークショップ等を組み合わせた研究セミナーを開催し、研究成果を発表した。併せて、能の技芸伝承の基盤となる能付資料の変遷をたどる資料展示を行った。
- ③ 英語版能楽全書とゆるやかにリンクするウェブサイトの構築を開始し、作り物図、演能図などの画像資料や舞台写真等のコンテンツを蓄積している。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) 項目により進捗状況に差ができています。

- ① 限られた人数による共同研究で、各研究者が複数の項目を担当しているため、英語原稿がほぼ完成している項目もあれば、まだほとんど手が付けられていない項目もある。ただし、それらも執筆の枠組みや方針はすでに決まっており、現在手がけている項目が終わり次第、とりかかることができる。
- ② 研究活動として、従来の研究が手薄だった分野から始めたので、現在原稿化が進んでいる項目には新たな研究成果が多い。今後は、完結した英語版能楽全書として世に出すために必要な項目を加えていく作業になるが、その場合も、旧態依然のスタイルに留まらず、新たな視点による工夫やウェブサイトとの連携を考えていきたい。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 宮本圭造、金春家本面の復元、『能と狂言』15、pp76-92、能楽学会、2017年7月。
- ② 山中玲子、源氏物語と能楽研究、『能と狂言』15、pp34-46、能楽学会、2017年7月。
- ③ PELLECCCHIA Diego, Noh Creativity? The role of amateurs in Japanese Noh theatre, “Contemporary Theatre Review” 27-1, pp34-45, 2017.

(2) 口頭発表

- ① How is a Noh professional trained?、山中玲子、EAJS 15th International Conference、2017年8月、リスボン。
- ② For whom is noh staged? Training for the actors or performance for the audience?、宮本圭造、EAJS 15th International Conference、2017年8月、リスボン。
- ③ A comparative look at amateur practices in noh and contemporary theatre、PELLECCHIA Diego、EAJS 15th International Conference、2017年8月、リスボン。
- ④ Poetics of Chained Sentences: Kakekotoba and Engo in Noh Texts、横山太郎、EAJS 15th International Conference、2017年9月、リスボン。
- ⑤ Whose Words (and to Whom)? : Fusion of Narration and characters' Speeches in Noh、竹内晶子、EAJS 15th International Conference、2017年9月、リスボン。
- ⑥ 春日社と南都の律家をめぐって—禅律仏教／室町将軍／勸進猿楽、高橋悠介、能楽学会世阿弥忌セミナー（招待講演）、2017年8月。

(3) 出版物

なし

学 校 名	江 戸 川 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	大学生のドロップアウト防止のための介入方法の確立 —心理学・睡眠学・教育学からの総合的検討—		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①退学者対策 ②生活リズム ③介入 ④大学生			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
福 田 一 彦	社 会 学 部	教 授	研究統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宮 崎 孝 治	メディアコミュニケーション学 部	教 授	教育学的視点からの分析
Timothy M. Kelly	社 会 学 部	教 授	教育学的視点からの分析
中 村 真	社 会 学 部	教 授	心理学的視点からの分析
浅 岡 章 一	社 会 学 部	准 教 授	睡眠学的視点からの分析
室 城 隆 之	社 会 学 部	教 授	臨床心理学的視野からの分析
山 本 隆 一 郎	社 会 学 部	准 教 授	臨床心理学的視野からの分析

# 大学生のドロップアウト防止のための介入方法の確立 ー心理学・睡眠学・教育学からの総合的検討ー

## 1. 研究の目的

文部科学省の調査によれば、高等教育段階における中退者は6.9万人にもおよび、大学生における退学者数の増加は多くの大学で問題になっている。本学も含め各大学では、様々な取り組みが行われているが、まだまだ効果的な方法が確立しているとは言い難い状況である。本研究課題の目的は「大学生の退学（ドロップアウト）防止のための効果的な介入プログラムの開発」である。本学においても既に学習支援の体制を整えて学習面から指導したり、精神健康上の問題を有する学生向けに学生相談室を設置してカウンセラーによるカウンセリングが受けられる体制を整えたりと、様々な取り組みがなされてきたが、本研究課題は、このようなこれまでの教育学・心理学視点からの援助だけでなく、睡眠学の視点も加えた介入・援助プログラムを科学的データに基づいて開発することを目的として行われている。

日本の大学生の睡眠習慣は世界で最も乱れており、不健康感の訴えも強い (Steptoe *et al.*, 2006)。大学生における睡眠で特徴的な「夜更かし・朝寝坊」は、彼らの学業成績の低下や (e.g., Eliasson *et al.*, 2010)、精神的健康の低下 (e.g., Asaoka *et al.*, 2004) と関連している。我々も、睡眠学の観点から、これまでに大学生を対象とした睡眠調査を継続的に実施し、就床時刻の後退と眠気の増加および成績の低下との関連を報告し (福田・浅岡, 2012)、睡眠習慣の悪化が成績不振によるドロップアウトのリスクファクターであるとともに、大学卒業後の職場環境への適応にまで影響しうることを確認している (Asaoka *et al.*, 2014)。

本課題ではドロップアウトリスクの高い学生を早い段階で見つけ出し、予防的に介入する方法の確立を目指している。我々は、これまでにドロップアウトリスクの高い学生を見つげ出すための基準を教育的変数である GPA (Grade Point Average) および出席状況を基に提案した (Kelly, 2013, 2014)。平成27年度にはそれらの教育的変数のみでなく、心理学的変数および睡眠学的変数も用いてドロップアウトリスクの高い学生を予測しうる変数について検討した。その結果、入学直後に行われている学力テストの得点よりも、入学直後の睡眠変数、特に睡眠効率 (実際に眠っている時間÷床上の時間×100) がドロップアウトリスクの高い学生を正確に予測できる事が分かった。また、学年の進行に伴う睡眠習慣と学業成績の関係について検討すると、睡眠習慣の乱れが顕著となる第3学年において睡眠変数の学業成績に与える影響が大きいことを見出した。また、友人関係が良好である事、大学への入学目的が明確であることなどの心理学的変数は大学への愛着を高める事で大学不適応や学業成績の低下防止などに予防的に寄与している事も明らかとなった。

本研究では、以上の成果をふまえ、教育学・心理学・睡眠学的変数を用いてドロップアウトリスクの高い学生を抽出する方法の完成度をより高め、より多くの学生を対象にして介入方法を改善することを目的とした。

## 2. 研究の計画

### (1) 「質問紙調査の継続的な実施とスクリーニング手法の確立」

平成25年度より開始した睡眠習慣調査のデータ、出席率、成績データ、精神健康度等 (表1) の内容に関して縦断的データ収集を継続しておこなうとともに、平成29年度入学生を対象としても同様の調査を実施した。平成28年度で1年次から4年次までの縦断データが完成したので、このデータを用いて1学年時の教育学・心理学・睡眠学的変数から、2年終了時までの留年・退学及び学業に関する問題の有無を統計学的に予測する計算式を多変量解析によって作成し、精度を

表1 本課題における主な調査内容

- 教育的変数 (本学データベースより利用可能)
  - ・学業成績 (Grade Point Average: GPA) ・取得単位数
  - ・講義への出席率 ・入学時学力テスト
- 心理学的変数
  - ・精神健康度 ・大学への愛着 ・大学不適応感
  - ・入学目的 ・友人関係の尺度
- 睡眠学的変数
  - ・睡眠習慣 ・睡眠の質 ・日中の眠気

確認した。

## (2) 介入の実施

予測式によって抽出された留年・退学リスクの高い学生のうち、睡眠習慣に問題がある学生を対象として介入的指導を実施するとともに、大学の中にドロップアウト対策のためのシステムを構築する事を目的とした。

## 3. 研究の成果

大学1年生時(総計270名)のデータを対象に精神的健康度(General Health Questionnaire-12)、日中の眠気(Epworth Sleepiness Scale)、睡眠の質(Pittsburgh Sleep Quality Index)、睡眠習慣(Edogawa Sleep Habits Questionnaire)を調査した。入学後2年間の間に退学・留年した学生と進級に問題のなかった学生との間で、1年時の睡眠変数および精神的健康度を比較した。その結果、退学・留年者では、大学1年時において平日・週末ともに睡眠時間が短く、睡眠効率も低い事が示された。またそのような学生では、徹夜の回数や、日中の居眠りの回数も多く、精神的健康も悪化していた。これらの変数を独立変数、退学・留年の有無を従属変数とする多重ロジスティック回帰分析を実施したところ、週末の睡眠時間、居眠りの頻度、徹夜の回数が退学・留年を有意に予測していた。さらにこのロジスティック回帰分析で得られた退学・留年確率を独立変数、実際の退学・留年を従属変数としてROC解析を実施した。その結果、退学・留年確率0.21をCut-Offポイントに設定すると、感度68%、特異度82%となり、大学1年時の睡眠習慣によってその後の退学・留年を予測できる可能性が示唆された。

このように、大学入学直後の生活習慣の乱れが、学生のその後のドロップアウトをかなり良く予測する事が明らかとなったため、大学の教学システムにこの知見を元にしたドロップアウト予防の仕組みを実装するべく、実践的な試みを行なった。具体的には、毎年入学者に配布され、入学時ガイダンスで使用されている「学生生活スタートアップガイド」に、規則正しい生活習慣の重要性とその根拠となる事実を分かりやすく解説した。また、本学の退学者対策検討会において、本研究で得られた知見を元にして、在学生に対して「こころの健康」と「すいみんの健康」に関する簡易チェックリストを実施することとし、その結果を元にして本学教員などが個々の学生に対してアプローチできる仕組みを構築する試みを行なった。

## 4. 研究の反省・考察

本研究により、入学時の生活習慣が2年生までの留年や退学などのドロップアウトをよく予測する事が明らかになった。この点は、大学生のドロップアウト対策として、入学時点において生活習慣についての介入を行う事が重要であるという事を明確にしたという点では評価に値すると考えられる。問題は、このような介入の仕組みを大学のシステムの中にどのように実装するかという点である。今年度は、本学の入学者用のパンフレットに睡眠生活習慣の重要性についての内容を記載する事が出来たことは、本研究の成果として評価できるし、また、退学者対策検討委員会において、全学の在学生に対する簡易チェックリストの実施を決定できた事も成果として評価できると考えられる。しかしながら、実際の介入を行う際には、教員が片手間に行なうわけには行かず、その作業量のみではなく、専門性も要求される事から今後は専門の相談員などの設置も必要とされるだろう。専門員の設置など、人事に関わることは研究プロジェクトの範囲を超え、大学の経営方針とも整合性を持たせる必要があり、本プロジェクトの結果がさらに実効性を発揮するためには、このような大学の運営主体への働きかけといった実践的な努力が必要とされるだろう。今後は、この成果が実効性を持つような努力を行なって行きたいと考えている。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

①浅岡章一、大学生活への適応と睡眠習慣 ―乱れた睡眠習慣が退学・留年リスクに与える影響―、Modern Physician, 2017, 37, 853-855.

②福田一彦、保育園のお昼寝はすぐにも中止するべきである、Modern Physician, 2017, 37, 850-852.

### (2) 口頭発表

①浅岡章一、福田一彦、Kelly, T.M.、中村真、室城隆之、山本隆一郎、宮崎孝治 入学

直後の睡眠習慣の乱れは大学生の留年や退学を予測しうるか ～退学者対策としての睡眠習慣調査の有効性～ 第42回日本睡眠学会学術集会、横浜、2017年6月29日

- ②浅岡章一、福田一彦、Kelly, T.M.、中村真、室城隆之、山本隆一郎、宮崎孝治 大学1年時の睡眠習慣はその後の退学や留年を予測しうるか？ 第24回日本時間生物学会学術集会、京都、2017年10月28日

(3) 出版物

- ①福田一彦、生物とサーカディアン・リズム 生活リズムの乱れが生み出すもの. 児童心理、2018年、6、19-27.
- ②福田一彦、生物リズム (20章1節) 生理心理学と精神生理学・第Ⅱ巻・応用 (堀忠雄他監修) 北大路書房、2017年、211-216.
- ③浅岡章一、睡眠削減と睡眠延長 (19章1節) 生理心理学と精神生理学・第Ⅱ巻・応用 (堀忠雄他監修) 北大路書房、2017年、203-207.