

学 校 名	青 山 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	層状超伝導物質の3D微細加工と生体高分子検出への応用		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①高温超伝導体 ②微細加工 ③生体高分子検出 ④固有ジョセフソン効果			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 野 晴 久	理 工 学 部	教 授	研究代表者総括、素子の設計・実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 井 敏 之	理 工 学 部	教 授	実験方法の検討

# 層状超伝導物質の3D微細加工と生体高分子検出への応用

## 1. 研究の目的

- (1) 本研究では、液体窒素温度 (77 K) を超える高い超伝導転移温度により、動作温度の飛躍的増大が期待される  $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{CaCu}_2\text{O}_y$  (以下 Bi2212 と略記) 銅酸化物超伝導体を用いた生体高分子の検出方法を研究する。特に、この物質の特徴である超伝導層と絶縁体層が交互に積層する結晶構造に起因する固有ジョセフソン効果 (超伝導状態で発現する量子トンネル効果が結晶内部で自発的に発現する効果) に着目し、単結晶試料への3次元 (3D) 微細加工技術およびイオン衝突により発生する格子振動 (フォノン) が固有ジョセフソン接合と強く相互作用する特性を組み合わせた、従来にない新しい検出原理を探索する。
- (2) 上記の固有ジョセフソン接合素子との組み合わせや上記以外の検出原理の可能性を追求するために、層状超伝導物質の良好なへき開性を用いて作製される単結晶薄膜を微細加工し、飛行時間型質量分析法に従来から用いられている超伝導ストリップ線路型イオン検出器と類似のストリップ線路構造を作製する。スプリット線路素子と固有ジョセフソン接合素子の特性比較や組み合わせを検討することにより、上記以外の検出原理も含めた新しい生体高分子イオン検出技術の可能性を探る。

## 2. 研究の計画

- (1) 3D 微細加工を駆使した固有ジョセフソン接合素子の作製と特性評価
  - ① 昨年度に引き続き、ガリウム (Ga) イオンを用いる集束イオンビーム (FIB) 加工装置とアルゴン (Ar) イオンを用いるイオン照射装置を組み合わせ、微小ブリッジの側面部に2つのスリットを設けた3D微細構造を有するBi2212系固有ジョセフソン接合素子を作製し、本研究予算で導入するデジタルオシロスコープを用いて、その特性を評価する。
  - ② Bi2212結晶に含まれる遷移金属元素の組成比を整数比に近づけた単結晶試料による固有ジョセフソン接合素子を作製し、その特性を評価する。
  - ③ Bi2212系固有ジョセフソン接合素子に対するスイッチング電流分布測定とスイッチングレート解析から高次位相スイッチ現象について探査し、高分子イオン検出への応用可能性を探る。
- (2) 層状超伝導体の単結晶薄膜の作製とストリップ線路型素子の作製
  - ① 層状超伝導物質の良好なへき開性を利用した機械的剥離法を用い、銅酸化物系および鉄系超伝導体の単結晶薄膜を作製し、その特性を評価する。
  - ② イオン検出時の瞬時的撃力印加に伴う微小素子部の破損を回避するための絶縁保護膜を本研究予算で導入するスパッタ装置を用いて成膜し、その特性を評価する。
  - ③ 得られた単結晶薄膜に対してイオン照射装置を用い、ストリップ線路状の微細加工素子を作製し、その特性を評価する。
- (3) 機械的振動刺激を用いたイオン検出原理の検証実験
  - ① 従来手法によるイオン検出実験は環境整備に時間がかかるため、イオン衝突によるフォノン発生と類似する機械的振動を用いる新手法を提案した昨年度の研究成果に基づき、瞬時的な機械振動を印加する実験装置を開発し、本研究予算で導入する微小振動計測システムを用いて性能を評価する。
  - ② 機械的振動刺激に伴う特性変化を直接観測するための実験条件を詳細に調べ、最適化を図る。

## 3. 研究の成果

- (1) 3D 微細加工を駆使した固有ジョセフソン接合素子の作製と特性評価
  - ① 昨年度の研究成果で判明したFIB加工時のダメージ層がArイオン照射によって除去することができ、固有ジョセフソン接合素子のスイッチング電流密度向上など特性向上に有効なことが判明した。さらに、2つのスリット部分をFIB加工する際に生じる非晶質層を除

去するため、Si基板上に作製した微小孔（50 $\mu\text{m}$ 四方）と微小接合部が一致するように、Si基板上に素子を設置し、FIB加工後に上下からArイオン照射する新たな素子作製方法を確立した。また、固有ジョセフソン接合素子のアレイ化、多重化に向け、2つの微小固有ジョセフソン接合素子を直列に接続した2段型固有ジョセフソン接合素子の作製に成功した。

- ② Bi2212結晶の場合、遷移金属元素(Bi, Sr, Ca, Cu)の組成比が必ずしも化学量論的整数比にならず、臨界電流密度などの超伝導特性に影響することが知られている。このため、整数比(2:2:1:2)に近づけた単結晶試料を本学理工学部物理・数学科の下山淳一教授より提供していただき、その固有ジョセフソン接合素子の電流電圧特性と位相スイッチング特性を詳細に評価した。その結果、1つの素子に複数のジョセフソン接合が含まれる固有ジョセフソン接合素子において、各接合の特性ばらつきが従来に比べて非常に小さくなった反面、ある電流値近傍で測定されるスイッチング電流分布に、近接する複数のジョセフソン接合が関与してしまい、スイッチング電流分布が多重ピーク化しやすいつなが分かった。この特徴は位相スイッチング特性の解析を難しくするが、単一接合からの寄与のみと判断できる実験結果について解析すると、従来の素子に比べて臨界電流密度が飛躍的に増大していることが分かった。以上のことから、固有ジョセフソン接合素子の特性制御には、遷移金属イオンの組成比制御が重要なことが判明した。
- ③ Bi2212結晶のCaサイトをYで置換すると、超伝導転移温度や臨界電流密度に強く影響するキャリア注入量を系統的に制御することができる。本実験では、Y置換したBi2212単結晶試料から作製した固有ジョセフソン接合素子を用い、有限電圧状態からの位相スイッチ事象（高次位相スイッチ）に対するスイッチング電流分布のキャリア注入量依存性を調べた。その結果、高次位相スイッチでは、従来の人工的ジョセフソン接合アレイでは観測されなかったタイプの接合間相互作用の影響が強く示唆され、原子スケールでジョセフソン接合が密接する固有ジョセフソン接合系に特有の複雑な位相ダイナミクスが明らかになった。このような複雑な位相ダイナミクスは、イオン衝突に伴うフォノンとの相互作用にも強く影響すると考えられる。したがって、その位相ダイナミクスの解明は、新しい検出原理に向けた重要な知見をもたらすものと期待される。

## (2) 層状超伝導体の単結晶薄膜の作製とストリップ線路型素子の作製

- ① 昨年度得られた絶縁性樹脂の熱硬化条件を再吟味すると共に、石英基板に塗布する絶縁性樹脂の体積についてもデジタルマイクロスコープによる形状測定から定量化し、粘着テープによる機械的剥離法を用いて、Bi2212単結晶薄膜を再現性良く作製する条件を決定した。さらに、今年度から本格的に単結晶育成を開始した鉄カルコゲナイド超伝導体Fe(Te, Se)に対して、同様な機械的剥離法を用い、粘着テープに付着した薄膜試料をSi基板に直接転写することにより、膜厚0.2 $\mu\text{m}$ 以下の極薄膜試料を作製することに成功した。段差計を用いた膜厚測定と表面粗さ測定から、長さ数十 $\mu\text{m}$ にわたり平坦な微小極薄膜試料が得られていることが判明した。Bi2212単結晶の方が、へき開性はより優れていると考えられるので、この手法はBi2212単結晶の極薄膜作製にも十分役立つものと期待される。
- ② 今年度導入したスパッタ装置を用いて、Si基板上にSiO<sub>2</sub>またはSiNの絶縁保護膜（膜厚は約50nm）を成膜した。成膜後の微細加工におけるダメージの影響を試験するため、直径が数十nmの微小孔（ポア）を作り、微小孔を通過するDNAの泳動観測を行った。
- ③ ①で得られたBi2212単結晶薄膜に対して、ストリップライン状のフォトマスクをフォトリソグラフィ技術によって作製し、Arイオン照射を用いてストリップライン素子を作製した。昨年度判明した電極パターンの不備を改良し、液体窒素温度（約77K）までの電気抵抗測定を実施したが、超伝導特性は確認できなかった。薄膜試料の場合、膜厚減少と共に大気暴露による劣化が生じやすくなることを考慮すると、今回の実験結果から、ストリップライン素子の作製においても絶縁性保護膜の形成が必要なことが強く示唆される。

## (3) 機械的振動刺激を用いたイオン検出原理の検証実験

- ① ピエゾ素子を2枚貼り合わせたバイモルフ素子の先端に細いタングステン棒を取りつけ、タッピングと呼ばれる機械的振動刺激を与えるための駆動装置を作製した。駆動試験として、ノコギリ歯状の電圧波形をピエゾドライバに入力し、タングステン棒の先端が $\pm 100 \mu\text{m}$ 程度に振動していることを確認した。また、高分子イオンの衝突実験時を想定し、

DNA分子がSi基板表面に付着する様子の直接観測を試みた。DNA分子を浸したエチレンジアミン四酢酸(EDTA)溶液中にSi基板を置き、リンス後、AFM顕微鏡を用いてDNAの付着を確認することに成功した。

- ② バイモルフ素子に細い金属針を取り付け、ピエゾドライバを用いて発生させた機械的撃力を圧電センサに加え、発生する衝撃振動をデジタルオシロスコープで直接観測した。実際のイオン衝突時の衝撃とほぼ同じ機械的振動刺激を作製するには、様々なパラメータを調整する必要があるが、今年度は、まず、金属針と圧電センサとの距離、およびノコギリ歯状の電圧波形の振幅値や勾配値を系統的に変えた実験を繰り返した。その結果、金属針には硬い材質を用いる方が衝撃に伴う変形の影響を低減できること、および、金属針と圧電センサの位置をリニアステージで制御する方が、互いの距離を数十 $\mu\text{m}$ 単位で制御でき、再現性の高い実験結果が得られること、が判明した。

#### 4. 研究の反省・考察

- (1) 「研究の成果」の項(1)の①～③で述べた研究成果は、本研究の目的(1)に向けた重要な成果であり、研究の着実な進展を示している。特に、固有ジョセフソン接合素子を、①の素子作製技術、②の単結晶特性、③の位相ダイナミクス、と各方面で探求し、各々成果を挙げている点を強調しておきたい。本研究の目的(1)で挙げた新しい検出原理の創出には、このような基礎的研究成果の蓄積こそが最も重要であると考えられる。
- (2) 「研究の成果」の項(2)の①～③で述べた研究は、本研究の目的(2)に向け、今年度最も注力した研究である。特に、①で述べた鉄系超伝導体単結晶に対する微小極薄膜の作製は、本研究の提案時には全く想定しておらず、予想を大きく上回る進展を遂げたと評価できる。今後は、この技術をBi2212単結晶に適用していく予定である。一方、③で作製したBi2212ストリップライン素子の超伝導特性を確認できなかった点は、保護膜形成の重要性に対する認識不足を痛感した。その背景として、機械的剝離法による薄膜試料の作製とその素子化は、固有ジョセフソン接合素子の作製に比べて、まだ研究期間が短く、昨年度と今年度では、卒業研究の担当学生の入れ替わりにより、作製技術の進展が一進一退する状況にあったと考えられる。この点を反省し、翌年度は、大学院修士課程の院生と大学院進学予定の卒業研究生に薄膜試料作製を担当してもらい、高品質な薄膜作製技術の確立に努める。
- (3) 「研究の成果」の項(3)の①～②で述べた研究は、実験環境整備に多くの時間と費用を必要とするイオン衝突実験の実施を見直し、3年間の研究計画で一定の研究成果を挙げるために優先すべき研究として昨年度計画したものである。(1)や(2)で述べた固有ジョセフソン接合素子や超伝導薄膜素子に機械的振動刺激を加えて、その応答を直接観測する実験までは達しなかったが、①および②共に着実な成果を挙げる事ができた。翌年度以降、低温環境下での機械的振動印加実験に向けた装置開発に着手し、本研究の目的(1)および(2)に向けた新しい生体高分子イオン検出の技術開発に引き続き取り組んでいく考えである。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ①S. Umegai, A. Yamaguchi, Y. Kakizaki, D. Kakehi, H. Kitano, “Fabrications of Small and High-quality Intrinsic Josephson Junctions by Combinatorial Method of Ar-ion and Focused Ga-ion Etchings”, *Journal of Physics: Conference Series* **1054**, 012030 (2018).
- ②Y. Watabe, S. Umegai, H. Ohnuma, A. Yamaguchi, J. Shimoyama, and H. Kitano, “Dynamics of Phase Switch in the Intrinsic Josephson Junctions Made of Bi2212 with Perfectly-stoichiometric Cation Compositions”, *Journal of Physics: Conference Series* **1054**, 012031 (2018).
- ③H. Kitano, A. Yamaguchi, Y. Takahashi, S. Umegai, Y. Watabe, H. Ohnuma, K. Hosaka, and D. Kakehi, “Enhancement of macroscopic quantum tunneling in the higher-order phase switches of Bi2212 intrinsic Josephson junctions”, *Journal of Physics: Conference Series* **969**, 012065 (2018).

④T. Kubota, K. Lloyd, N. Sakashita, S. Minato, K. Ishida, and T. Mitsui, “Clog and Release, and Reverse Motions of DNA in a Nanopore”, *Polymers* 2019 11(1), 84, <https://doi.org/10.3390/polym11010084>.

(2) 口頭発表

①北野晴久, 大沼遥, 宮沢貴麿, 山口彩未, 保坂和孝, 孫悦, “Bi2212固有ジョセフソン接合系におけるマイクロ波照射時の位相スイッチングレート解析”, 日本物理学会2018年秋季大会(2018年9月9日), 9aA332-7.

学 校 名	上 智 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	水を溶媒とする環境調和型有機反応の汎用化 ー水を溶媒とする低廃棄物プロセスの開発ー		研究分野 工 学
キ ー ワ ー ド	①温度応答性ポリマー ②水中有機反応 ③触媒反応		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 教 之	理 工 学 部	教 授	研究総括およびポリマー合成・触媒反応実施

○研究分担者

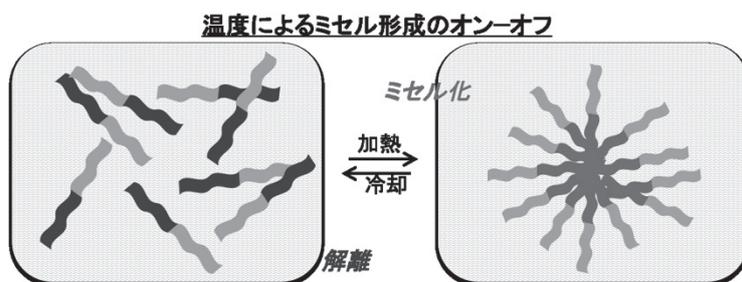
氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
陸 川 政 弘	理 工 学 部	教 授	ポリマー分析・データ解析

# 水を溶媒とする環境調和型有機反応の汎用化 —水を溶媒とする低廃棄物プロセスの開発—

## 1. 研究の目的

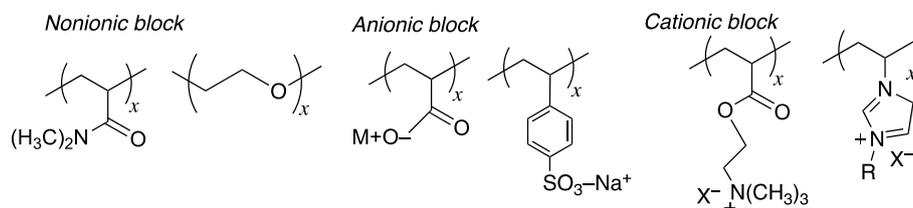
(1) 国連が設定した「持続可能な開発目標(SDGs)」の一環でもある環境保全の観点から、近年有機化学工業においては、水を溶媒とするプロセスの構築が望まれている。界面活性剤を用いてミセルを形成する方法は水中に疎水場をつくる有効な手法であるが、反応後に生成物を分離するために有機溶剤を必要とする。本研究では、温度応答性のポリマーを用いて水中にミセルを作ったり消したりする系を創製し、それを反応媒として用いることにより生成物の単離を容易にするプロセスを開発することを目的とした。その実現のために、32 °C 付近に下限臨界溶解温度(LCST)をもち、不連続的に親水—疎水性が変化するポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) [PNIPAAm]を適用した。PNIPAAm と親水性ポリマーのブロック共重合体は、LCST 以上で高分子ミセルを形成することが知られており、これに触媒機能を付与することによって、水中に分散する温度応答性の疎水性反応場を創出することを目指した。具体的には以下の目的を設定した。

- ① ポリマーに固定化された触媒を用いる再利用可能な水中触媒溶液の調整
- ② より汎用性の高いシステムの構築を目指した、外部添加触媒による反応系の開発



## 2. 研究の計画

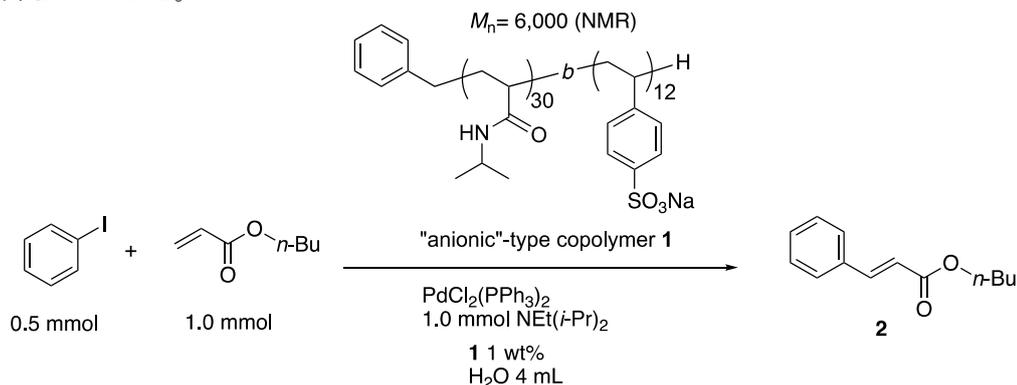
- (1) リビングラジカル重合によるブロックコポリマーの合成手法に基づき、温度応答性ブロックとしてイソプロピルアミド・エチルアミドなど種々の下限臨界共溶温度をもつセグメントを有するポリマーを新たに合成する。さらに、親水ブロックの鎖長を変えたポリマーについて濃度、温度、基質などミセルの形成・解離条件を検討する。
- (2) 親水性ブロックについては、アニオン性セグメントが有効であることがこれまでの検討から分かってきた。この合成のために、ポリマー末端にイオウ残基を有する RAFT 重合による合成からイオウを含まない ATRP 重合への転換を検討する。今後金属触媒を用いる反応への展開のため触媒毒となるイオウを含まない系が必要となるためである。また触媒はこれまでランダム重合によって導入してきたが、より高度に制御された反応系のために、ポリマー鎖一本について1原子の触媒を含む系を検討する



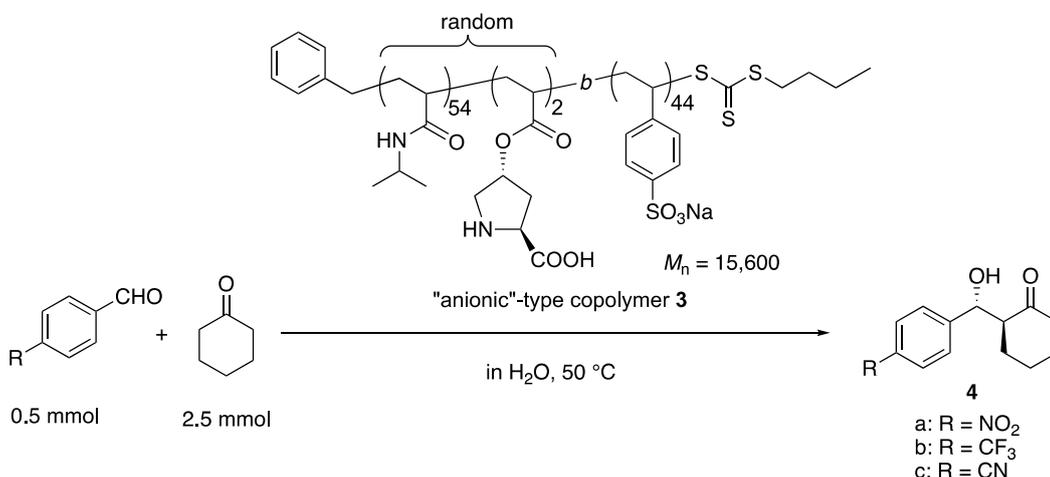
## 3. 研究の成果

- (1) 現在までに分子鎖長の差違はミセルの形成・有機反応の成績に大きな影響を与えないことが分かってきた。アニオン部位をベンゼンスルホン酸にしたブロックコポリマー**1**を合成し、これを用いたところ水中での触媒反応をより高い温度で行うことができるようになったので、これを用いてパラジウム触媒による有機反応を種々試みた。溝呂木-Heck 反応ではヨードベンゼンとアクリル酸ブチルからケイ皮酸ブチル**2**が収率よく得られた。また他のアルケンを用いた反応でも良好な収率で生成物を与え、反応系の汎用性が示された。その他鈴木-

宮浦反応、菌頭反応など主だった反応が収率よく進行し、かつ生成物を高効率で回収できることを明らかにした。



(2) 有機触媒である L-プロリンをポリマー鎖中に固定化した両親媒性ポリマー**3**を合成し、水中での不斉アルドール反応、不斉マイケル反応を検討した。既報では親水性部位にポリエチレングリコール鎖を用いていたが、これには反応後の生成物回収に手間がかかるという課題があった。そこでアニオン性の親水性部位を用いたところ収率・エナンチオ選択性を保ったまま回収効率を向上することに成功した。不斉アルドール反応では水中で 50°C でおこなった反応にも関わらず 98%ee という高い光学収率を達成した。



#### 4. 研究の反省・考察

- (1) 計画の中で、セグメント鎖長を種々変えたポリマーを合成する計画であったが、特に短い鎖長をもつポリマーはその精製が予想外に困難であることがわかり、進捗が遅かった。それに伴い種々モノマーを試みる計画にも遅れが生じたことが反省すべき点である。
- (2) パラジウムおよびプロリンを触媒とする反応が水の中で速やかに進行することが明らかとなった。これにより両親媒性ポリマーが形成するミセルが水中反応に有効であることを示すことができた。さらに温度応答性ポリマーの長所を活かす反応条件の探索が課題である。また検討の中で、親水性部位を変えることにより冷却条件下での有機層-水層分離が良好に進む例が見出された。これが再現性よく現れるようになれば、生成物の効率的回収が可能になるためより環境調和的な反応の実現に近づけたと言える。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① "Palladium-catalyzed Mizoroki-Heck reactions in water using thermoresponsive polymer micelles" Noriyuki Suzuki, Taiga Takabe, Yoshiko Yamauchi, Shun Koyama, Rina Koike, Masahiro Rikukawa, Wei-Ting Liao, Wen-Sheng Peng, Fu-Yu Tsai, *Tetrahedron*, **2019**, 75, 1351-1358.

(2) 口頭発表 なし

(3) 出版物 なし

以上

学 校 名	東 京 理 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①再生医療 ②軟骨 ③分化 ④細胞足場 ⑤間葉系幹細胞 ⑥相互侵入高分子網目ゲル ⑦ペプチド ⑧キトサン			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
橋 詰 峰 雄	工 学 部	教 授	細胞機能の評価、材料物性評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
飯 島 一 智	横 浜 国 立 大 学 工 学 部	准 教 授	遺伝子発現解析、免疫染色
大 澤 重 仁	理 学 部 第 一 部	助 教	高分子設計、細胞機能評価

# 新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生

## 1. 研究の目的

### (1) 背景

加齢に伴う軟骨の磨耗により膝関節の炎症・変形が引き起こされる変形性膝関節症の治療は超高齢社会を迎えた我が国における最重要課題の一つである。現在は人工関節への置換が広く行われ、本邦の市場規模は1000億円にも上るが、約9割を海外に依存しているのが現状である。また人工関節は、置換手術後のQOLの低下や、10年～20年で再置換の手術が必要となるなどの問題がある。本研究の目標は、人工関節に替わる自律再生軟骨の開発であり、これにより海外品シェアを国産再生組織製品に移行でき、大きな社会・経済効果が期待される。組織再生を目指した細胞移植において、一般に細胞は細胞足場材料とともに患部へ移植されるが、細胞足場材料に求められる機能は対象とする組織により異なる。関節軟骨においては、高い治療効果を得るために線維軟骨化を抑制し、耐摩耗性に優れた本来の硝子軟骨として修復・再生させることが重要であり、細胞の分化状態の制御・維持機能が求められる。さらに、膝関節軟骨では移植部位に対して常に大きな負荷がかかるため、十分な力学的強度も必要とされる。

申請者らは天然由来多糖のキトサン (CHI) と生体適合性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) からなる化学架橋ネットワークと自己会合性ペプチド RADA16 (Ac-RADARADARADARADA-CONH<sub>2</sub>) からなる物理架橋ネットワークにより構造化した、相互侵入高分子網目 (IPN) 型ゲルを開発した。化学架橋ネットワークが十分な力学的強度を、物理架橋ネットワークが細胞外マトリックスの構造を模倣することで播種された細胞の高機能化に寄与する。CHI/PEG/RADA16 IPN ゲル内に軟骨細胞を播種し培養すると、CHI/PEG ゲルや軟骨移植用足場材料として臨床応用されているアテロコラーゲンゲルと比べて高いグリコサミノグリカン (GAG) 産生と細胞増殖性を示した。さらに、ヒト軟骨細胞を IPN ゲルとともにマウスへ移植すると、炎症反応はほとんどみられず、アテロコラーゲンゲルと比較してより良好な GAG などの軟骨基質の蓄積がみられ、本 IPN ゲルの軟骨再生用足場材料としての有効性が示された。

一方、近年、再生医療における細胞ソースとして体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞が注目を集めている。間葉系幹細胞は患者本人の骨髄液や脂肪組織などから低侵襲に採取し生体外で増幅することができる。間葉系幹細胞は軟骨や骨、脂肪、心筋など間葉系に属する種々の細胞に分化することができ、軟骨再生においては軟骨底部の骨組織との連続的な再生も可能になると期待される。間葉系幹細胞を用いた組織再生は広く検討されているが、軟骨に関しては硝子軟骨への選択的分化手法が未だ確立されておらず、膝関節軟骨再生の大きな障壁となっていた。

### (2) 目的

成熟軟骨細胞の優れた足場材料である CHI/PEG/RADA16 IPN ゲルは間葉系幹細胞からの軟骨再生における足場材料としても有効であると考えた。本研究では、IPN ゲルを用いた間葉系幹細胞による軟骨再生法を開発を目指す。まず、IPN ゲル内における間葉系幹細胞の軟骨分化挙動を解析し、IPN ゲル中で間葉系幹細胞から誘導された軟骨組織の評価を行う。さらに、IPN ゲル内における間葉系幹細胞の軟骨分化機序を明らかにするとともに、IPN ゲルへの軟骨分化誘導因子の担持や分解ドメインの導入による分解性の付与など IPN ゲルの高機能化とそれが軟骨分化に与える影響について評価し、臨床利用可能な関節軟骨再生足場材料の開発へと展開する。

## 2. 研究の計画

### (1) IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織の評価

これまでの軟骨マーカー遺伝子発現解析より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞は硝子軟骨へと分化誘導されていることが示唆されてきた。本年度では凍結切片の免疫化学染色により、その組織構造と軟骨基質の蓄積について評価する。具体的には軟骨分化誘導後のゲルより薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色より組織構造について評価するとともに、アルシアンブルー染色によりグリコサミノグリカンを、免疫染色により I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンをそれぞれ検出する。また、間葉系幹細胞から軟骨への分化に伴う軟骨基質の産生により IPN ゲルの力学特性が変化すると推測される。そこでレオメーターを用いて軟骨分化に伴う

弾性率の変化についても解析する。

## (2) 軟骨組織形成に重要なパラメータの選定と最適化

効率的な組織再生には、細胞、足場、成長因子の三要素が重要である。移植に用いる細胞としては間葉系幹細胞を選択しており、これが IPN ゲル中で軟骨細胞に分化誘導されやすいことはこれまでで確認済みである。続いて本検討では、分化した軟骨が効率的に組織を形成するために必要な足場、成長因子の条件について検討する。具体的には IPN ゲルへの加水分解性の付与、また成長因子の足場への結合リンカーの長さを変えることが、ゲル内で培養する軟骨細胞の組織再生能に与える影響について検討する。

## 3. 研究の成果

### (1) IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織の評価

遺伝子発現解析より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨は硝子軟骨と推測されていた。本年は化学染色によりその組織構造と軟骨基質の蓄積について評価を行なった。軟骨分化誘導後のゲルより薄切片を作製し、HE 染色より組織構造について評価するとともに、アルシアンブルー染色によりグリコサミノグリカンを検出した。先行研究で効果があるとされるスフェロイドによる軟骨組織再生と比較すると、IPN ゲル中ではより多くの軟骨小腔様の構造と周囲への GAG や II 型コラーゲンなど軟骨基質の蓄積が観察された。以上より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織は、関節軟骨を形成する主成分である硝子軟骨と考えられ、また既存のスフェロイド培養に対する優位性が示された。軟骨組織が IPN ゲル内で形成したのであれば、軟骨組織由来の力学的強度が加味されるため、IPN ゲルの強度が向上すると考えられるが、レオメーターにより実際は培養経過に伴う力学強度の向上は確認されなかった。おそらく間葉系幹細胞は IPN ゲル中では軟骨細胞に分化が進んでいるのであろうが、その後の細胞外マトリックス形成などといった軟骨組織形成に関わる機能についてはまだ不十分であり、軟骨細胞の機能を上げるためのより高機能化した IPN ゲル設計が課題として見えてきた。

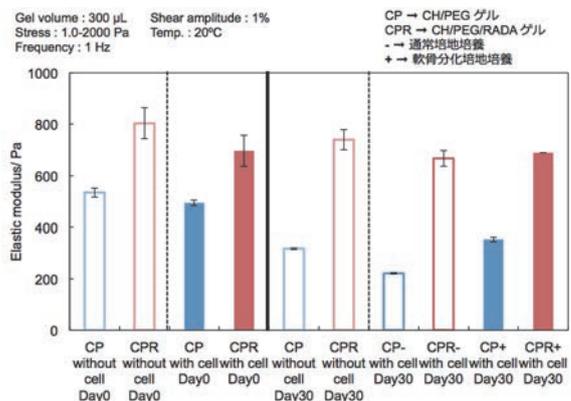


図1. 培養経過に伴うゲルの力学強度測定

### (2) ゲルへの分解性の付与と軟骨細胞

IPN ゲルは軟骨再生に伴って分解・吸収あるいは代謝され、最終的には間葉系幹細胞より分化した軟骨細胞によって産生された軟骨基質と完全に置換されることが安全性の観点から望ましい。また分解性を持つ足場は、分解により内部空隙が広がることで足場に内包された細胞が産生する ECM 蓄積量を増加させるという点より、組織形成能を高める効果も報告されている [Nicodemus, G. D. *et al.*, *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008, 14, 149-165]。本年は、両末端を官能基化した PEG と加水分解性ポリ乳酸 (PLA) を含む ABA 型ブロック共重合体 (NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS) をゲルの分解性架橋剤として合成し、これを介して CHI を基盤としたゲル CHI/PEG-PLA-PEG を作製し、CHI/PEG と比較評価した。CHI/PEG-PLA-PEG は CHI/PEG と比較して大きな重量減少が見られ、またさらに、内包した軟骨細胞のコラーゲン生成能が向上することが見出された (図2) [S. Ishikawa *et al.*, *Biomater. Sci. and Eng.*, *in press.*]。ゲルへの分解性の付与が、安全性のみならず軟骨組織再生能にも重要であることが見出された。

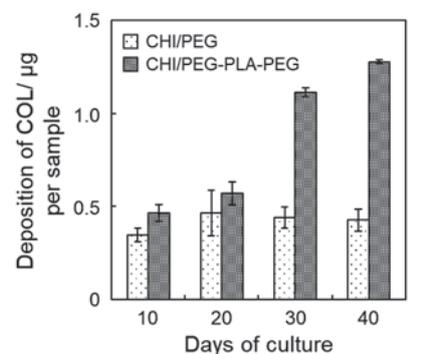


図2. 培養経過に伴うコラーゲン産生量

### (3) ゲル中への成長因子の担持

ゲル中にインスリン様成長因子 (IGF-1) や線維芽細胞増殖因子 (FGF)、トランスフォーミン

増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) など軟骨分化誘導に関連する増殖因子を足場内に担持させることで、培地中への添加と比較してより高効率に軟骨への分化を誘導することができると期待される。実際の細胞移植を想定した場合、担持する成長因子は他の組織に拡散しないよう、足場中に化学的に結合しておく必要がある。加えて、足場中に成長因子を化学結合した方が、持続的に成長因子が細胞と相互作用するため、より効果が高いという報告もある [ S. Rajabi *et al.*, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018;12:e438-e450]。本検討では、さらに足場内で化学結合した成長因子の効果を高めることを志向し、足場材中での成長因子の配置、運動性が重要であるとの仮説から、成長因子と足場材とを化学的に繋ぐリンカーの長さに着目し、これを変化させることによる組織再生機能向上を検討した。具体的には CHI に対して柔軟性の高い PEG リンカーを介して成長因子を化学結合させ、この CHI を基盤として調製した IPN ゲルを用いた軟骨細胞の三次元培養系について、PEG リンカーの分子量を変化させた時の軟骨細胞の機能変化を評価した (図 3)。軟骨組織形成能の指標である GAG 産生量は、PEG リンカーの分子量によって変化し、特に分子量 2000 Da である時に顕著に高かった。足場材と成長因子をつなぐリンカーの長さが、効率的な組織再生を促すために重要なパラメータであることが確認された。

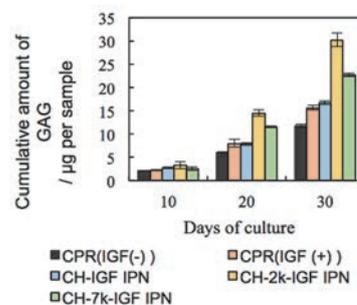


図3. 成長因子と足場をつなぐPEGリンカーの長さが異なるIPNゲル中で培養した軟骨細胞それぞれのGAG産生量。

#### 4. 研究の反省・考察

IPN ゲル中において間葉系幹細胞から誘導された軟骨が組織構造的にも硝子軟骨であることが確認され、さらに架橋剤への分解性ユニットの導入によるゲルへの分解性付与や IGF 担持方法の検討など IPN ゲルの高機能化についての実証を進めており、本研究は当初の研究計画通り進捗している。一方、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた軟骨分化の検討については、今後、分解性ゲルと成長因子の担持が間葉系幹細胞からの軟骨誘導に与える影響をより明確にすることで、硝子軟骨再生足場としての IPN ゲルの有効性を示すことに注力する。また、医学部との共同研究により移植臨床実験に着手しており、IPN ゲルを用いた軟骨再生の実用化に向けた研究体制が整いつつある (長崎大学医学部、東京大学医学部)。本研究の継続により、臨床利用可能な関節軟骨再生足場材料の開発が期待される。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ① Shohei Ishikawa, Kazutoshi Iijima, Kohei Sasaki, Mineo Hashizume, Masaaki Kawabe, and Hidenori Otsuka, Cartilage Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Silica Nonwoven Fabrics, *Appl. Sci.*, **8**, 1398-1412, 2018.
- ② Kazutoshi Iijima, Shohei Ishikawa, Kohei Sasaki, Mineo Hashizume, Masaaki Kawabe, and Hidenori Otsuka, Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Electrospun Silica Nonwoven Fabrics, *ACS Omega*, **3**, 10180-10187, 2018.
- ③ Kazutoshi Iijima, Seiko Ichikawa, Shohei Ishikawa, Daisuke Matsukuma, Yusuke Yataka, Hidenori Otsuka, and Mineo Hashizume, Preparation of Cell-Paved and -Incorporated Polysaccharide Hollow Fibers Using a Microfluidic Device, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, In press.
- ④ Shohei Ishikawa, Daisuke Matsukuma, Kazutoshi Iijima, Michihiro Iijima, Shigehito Osawa, and Hidenori Otsuka, N-Hydroxysuccinimide Bifunctionalized Triblock Cross-Linker Having Hydrolysis Property for a Biodegradable and Injectable Hydrogel System, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, In press.
- ⑤ Kazutoshi Iijima, Shun Ohyama, Kazuya Yuyama, Atsushi Shono, and Mineo Hashizume, Selective Fabrication of Hollow and Solid Polysaccharide Composite Fibers Using a Microfluidic Device by Controlling Polyion Complex Formation, *Polym. J.*, **50**, 1187-1198, 2018.

## (2) 口頭発表

- ① 石川昇平, 飯島一智, 大澤重仁, 飯島道弘, 大塚英典, キトサン/PEG/RADA16で構造化した相互侵入高分子網目ゲルへの生分解性付与と軟骨組織再生足場への応用, 第68回高分子討論会, 北海道大学, 2018年9月
- ② Shohei Ishikawa, Hiro Yamaguchi, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka, Articular Cartilage Regeneration Using Growth Factor Installed, Degradable and Injectable Hydrogel with Interpenetrating Polymer Network, 1st G' L' owing Polymer Symposium in KANTO, Tokyo, Japan, Dec. 2018.
- ③ Hiro Yamaguchi, Shohei Ishikawa, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka, Preparation of Growth Factor Conjugated Injectable IPN Hydrogel and the Effect of Conjugation-Linker Length on Improvement of Embedded Chondrocyte Function, 1st G' L' owing Polymer Symposium in KANTO, Tokyo, Japan, Dec. 2018.
- ④ Kazutoshi IIJIMA, Shohei ISHIKAWA, Mineo HASHIZUME, Hidenori OTSUKA Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Electrospun Silica Nonwoven Fabrics. 第28回日本MRS年次大会、福岡県・北九州国際会議場、2018年12月
- ⑤ Shohei Ishikawa, Hiro Yamaguchi, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. Acceleration of Articular Cartilage Regeneration in Degradable and Injectable IPN Hydrogel Containing Growth Factor. 日本化学会第99回春季年会、甲南大学、2019年3月

## (3) 出版物

- ① Shohei Ishikawa, Kazutoshi Iijima, and Hidenori Otsuka, (Ed. Alexandru Mihai Grumezescu), “Micro- and Nanotechnologies in Biomedical Engineering (multi volume SET 1-14), VOLUME 11: Biomedical Engineering Techniques” Elsevier, 25, 2018.
- ② Shigehito Osawa and Hidenori Otsuka, (Ed. Alexandru Mihai Grumezescu), “Micro- and Nanotechnologies in Biomedical Engineering (multi volume SET 1-14), VOLUME 11: Biomedical Engineering Techniques” Elsevier, 22, 2018.
- ③ 飯島一智, 石川昇平, 大塚英典, “Journal of the Japan Society of Colour Material, 講座「新しい機能をもった先端材料」、再生医療における繊維材料” J. Jpn. Soc. Colour Mater., 5, 2018.
- ④ Shigehito Osawa and Hidenori Otsuka, “PEGylation: Advances in Research and Applications” Nov. Sci. Pub. USA., 20, 2018.
- ⑤ 石川昇平, 大塚英典, “Colloid & Interface Communication 「ペプチド繊維と糖鎖から形成される相互侵入高分子網目構造(IPN) ゲルへの生分解性付与と組織再生足場への応用」” Coll. Int. Comm. 日本化学会, 3, 2018.
- ⑥ Mineo Hashizume, Kazutoshi Iijima, and Yusuke Yataka, “Surface Modification of Polymer Substrates for Hydroxyapatite Coating Using Biomimetic Processes, Chapter 2: Nanostructured Materials -Synthesis, Properties, and Applications” Nova Scientific Publishers, 2019.

学 校 名	神 奈 川 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	“可逆的”燃料電池用電極触媒の新展開 －計算化学と実験の融合による新規材料の創製－		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①燃料電池 ②水分解 ③電極触媒 ④酸素還元・生成反応 ⑤水素酸化・生成反応			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 本 太	工 学 部	教 授	研究代表者・総括 電極触媒の探索

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 邊 豊 和	防 衛 大 学 校	講 師	電極触媒の電子顕微鏡による キャラクタリゼーション
大 坂 武 男	神奈川大学工学研究所	客 員 教 授	電極触媒の電気化学的性能評価
郡 司 貴 雄	工 学 部	助 教	電極触媒の合成・放射光による キャラクタリゼーション
ブヤチャン ハン	Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea	教 授	電極触媒デザインの計算化学的検討

# “可逆的”燃料電池用電極触媒の新展開

## — 計算化学と実験の融合による新規材料の創製 —

### 1. 研究の目的

- (1) コア（金属）-シェル（窒素ドーパカーボン）の窒素ドーパカーボンの精密合成条件の検討
- (2) コア（金属）-シェル（窒素ドーパカーボン）の耐久性の検討
- (3) 高触媒機能を発現するコア材料の探索・理論的検証

### 2. 研究の計画

- (1) 窒素ドーパカーボン中の窒素のドーパ量と窒素ドーパカーボンの層数が触媒活性に大きな影響を与えることが明らかになっている。この計算予測を確証できるような窒素ドーパカーボンナノ粒子の生成条件を確立させる。
- (2) 可逆的燃料電池のカソードでは、酸素の還元反応とその逆反応が起こることから常に触媒は酸素雰囲気下にさらされている。さらに電極は高電位下におかれるため、サンプルの酸化劣化は重要な問題である。そこで合成した電極材料の“オペランド”電子顕微鏡観察によって、劣化機構を明らかにし、それを次の触媒デザインに反映し、触媒性能を向上させる。
- (3) 対象とする酸素還元反応(ORR)に関し、Ptの*d*-バンドセンターの位置とORR触媒活性との相関が広く議論されている。ORRの反応は、 $O_2$ がPt表面に吸着するところから始まり、電子を受け取って、還元生成物がPt表面から脱離することにより終了することから、 $O_2$ の2*p*軌道と相互作用するPtの5*d*軌道の位置が $O_2$ の吸着の度合いに関係し、Pt単独の電子状態より、ORRの反応に適切な電子状態をチューニングすることが必要と考える。窒素ドーパカーボンシェル中のコア金属、合金、金属間化合物を様々に変えたものを合成し、触媒性能を検討することで、さらに、計算結果との比較を繰り返すことにより、最適なコア物質を提案し、さらに電気化学的な活性評価を詳しく行う。

### 3. 研究の成果

- (1) コア（金属）-シェル（窒素ドーパカーボン）の窒素ドーパカーボン材料を精密合成するための条件を明らかにした。コア金属をカーボンブラック担持体に高分散で担持させる方法として、ポリオール法を適用することを考案した。カーボンブラックに担持された金属ナノ粒子の表面を炭素コートするための出発材料としてスクロースを用い、炭素化するためのアニール温度の最適化を行った。また、窒素ドーパのための窒素源として尿素とその量を最適化した。
- (2) 合成したサンプルのORR活性はこれまで報告されている非白金材料の場合と同様にOnset potentialが0.6 V vs. RHEであった。この値は、目的としている窒素ドーパカーボン材料を合成ができていることが確認できた。しかし、ORR活性はORRを続けると徐々に減少してしまう結果を得た。
- (3) *d*-バンドセンターの位置とORR触媒活性との相関を示す火山型のプロットの完成にはいたらなかったが、Pt系の材料において検討を進め、ORR活性においては当初の予想通りに火山型のプロットを得ることができた。

### 4. 研究の反省・考察

- (1) 窒素ドーパカーボン材料の作製条件のアニール温度によってカーボンコートの表面に生成する官能基が違ってくるということが明らかになり、合成条件と官能基の量などの関係性がつかめた。しかし、また、当初の目的である窒素ドーパカーボンの単層の合成を完成できて

いない。これまで合成した多層材料を二酸化炭素ガスで焼成することで、多層を一層、一層除去して、単層を作る条件を今後見出す必要がある。

- (2) ORR 活性が反応当初高く、その後、減少してくるのは、コア金属が徐々にイオンとなって溶出してしまい、コア金属と ORR が起こっている窒素ドープカーボン材料との電子的な相互作用がなくなっていることによると考えられ、コア金属が窒素ドープカーボン材料に完全におおわれていないために、コア金属表面が電解液に接してしまっているため、溶出してしまおうと考えた。薄い窒素ドープカーボン材料をコア金属ナノ粒子表面に作ることに注力してしまっただけで、窒素ドープカーボン材料が覆っていない部分ができてしまっていた。全体にある程度厚く作り、その後、上述したアニール過程を工夫することで全体に均一で単層のコート構造を作る条件を明らかにしていく予定である。
- (3) この研究結果は非常にインパクトがある内容であることから学術誌に論文として投稿準備中である。8 月末までには投稿を完了する予定である。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① F. Matsumoto, F. Ando, T. Gunji, T. Ohsaka, Tuning of d-Band Center of Platinum Nanoparticles by Changing Transition Metal Oxide Support Materials for Enhancement of Oxygen Reduction Reaction, ACS catalysis, 投稿準備中

### (2) 口頭発表

特になし

### (3) 出版物

特になし

学 校 名	大 阪 大 谷 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	タンパク質結晶の熱物性値の異方性に関する研究		研究分野 工 学
キ ー ワ ー ド	①磁気力 ②タンパク質結晶 ③非定常短細線加熱法 ④磁気浮上 ⑤熱伝導率 ⑥熱拡散率 ⑦異方性 ⑧磁気アルキメデス効果		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
牧 祥	薬 学 部	助 教	計測装置開発、データ解析、実験担当、論文執筆担当

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宇 田 川 周 子	薬 学 部	講 師	実験担当

# タンパク質結晶の熱物性値の異方性に関する研究

## 1. 研究の目的

- (1) 非定常短細線加熱法と磁気アルキメデス効果による磁気浮上を併用してタンパク質結晶の熱物性値（熱伝導率と熱拡散率）を詳細に計測する。
  - ①熱物性値の温度依存性を調べる。
  - ②タンパク質結晶とタンパク質溶液の定圧比熱  $C_p$  をそれぞれ推算し、それぞれのエンタルピを推定する。
  - ③タンパク質結晶とタンパク質溶液のエンタルピと温度の状態線図を作成し、結晶化条件の探索を試みる。
- (2) タンパク質結晶の熱物性値の異方性を調べる。
  - ①磁場配向を利用してタンパク質結晶の方位を制御し、非定常短細線加熱法を利用して熱物性値の異方性の存在を確認する。
  - ②異方性が存在する可能性が示された場合は、その効果を定量的に議論する。
- (3) 結晶成長時の熱対流の効果を実験と数値計算で予測する。

## 2. 研究の計画

- (1) 熱物性値の詳細計測のために以下の計画で研究を進める。
  - ①従来の非定常短細線加熱法のプローブの材質はタングステン(W)製で、リード端子と短細線の溶着が悪くて破断しやすく、長時間測定が困難であった。そこでプローブ材質を変更し、耐久性を向上させた新しいプローブを開発する。
  - ②熱拡散率は熱伝導率を密度と定圧比熱の積で割った値である。結晶の密度は比較的容易に測定出来るので、非定常短細線加熱法を利用して定圧比熱が推定出来る。その結果、タンパク質結晶とタンパク質溶液のエンタルピを推定出来る。ただし熱拡散率は測定誤差が指数項に入るため誤差が拡大しやすい。熱拡散率の測定は熱伝導率よりも慎重な実験を行う。
  - ③精度の高い測定が可能になった段階で、エンタルピと温度の状態線図の作成に着手する。結晶の析出個数や大きさは毎回異なることが予想されるので、実験回数を多くすることで状態線図の精度を高める。
- (2) タンパク質結晶の熱物性値の異方性を調べるために以下の計画で研究を進める。
  - ①鉛直上向きの磁気力で結晶を浮上させる方法は短細線と磁場配向した結晶  $c$  軸が垂直になる。この方法は既に確立し実験回数を重ねてデータの精度を高めてきた。一方、短細線と磁場配向した結晶  $c$  軸が同方向になるためには超電導マグネットを水平傾斜し、半径方向磁気力で磁気アルキメデス効果を成功させる必要がある。この方法は初の試みであり、成功するかどうかさえ不明であるが、理論的には可能である。磁気浮上に適した場所は限定されているため、設置位置を目視で微調整出来る可視化装置の開発を行いながら研究を進める。またプローブ全体の小型化も試みる。
  - ②一方、半径方向磁気力で結晶を磁気浮上させることに失敗した場合も想定して研究を進める。二液法による結晶化は磁気浮上法よりも結晶成長を制御しにくいことから、結晶が側壁で発生するリスクも考慮しなくてはならない。なるべく低過飽和状態で結晶化させる条件探索を実施するとともに、独自の結晶化容器を開発して、短細線周囲に確実に結晶が付着するように工夫する。
  - ③異方性が存在するかどうかの検証は困難が予想される。そのため統計解析の手法を利用して検証する。磁場配向の有無や方向を変えた結晶の温度特性は一元配置分散分析あるいはクルスカル・ウォリス検定と比較し、それぞれの特性曲線は共分散分析で評価する。
- (3) 磁気熱対流の影響を調べるために以下の計画で研究を進める。

タンパク質溶液は沈殿剤に塩化ガドリニウムを使用していることから常磁性溶液となっている。そこでガドリニウム塩を作動流体とする対流効果の可視化実験を実施する。

可視化は感温液晶を使って実現し、まだほとんど報告されていない容器側面からの観察を行う。熱損失の効果も定量的に推算する。また三次元数値計算を利用して流動形態を比較・予想する。

### 3. 研究の成果

(1) 熱物性値の計測の研究成果は以下である。

- ①プローブ材質を白金(Pt)に変更し耐久性と長時間計測の実現をした。温度を変えながらタンパク質結晶の熱物性値計測を実施することが容易になったことで、熱物性値の温度依存性を調べることに初めて成功した。
- ②使用したタンパク質結晶(卵白リゾチーム)の密度は既に先行研究で明らかになっている。その数値を利用してタンパク質結晶とタンパク質溶液のそれぞれのエンタルピを推算することに初めて成功し温度依存性も明らかにすることが出来た。しかし熱拡散率の測定誤差は熱伝導率の場合よりも大きく、実験精度の向上が必要であった。測定データのばらつきの原因として電気回路内部の問題と、回路外部の問題のそれぞれを検討している。しかし詳細は依然不明である。現在、電流と電圧のケーブルを被覆ケーブルに変更することで基準電圧の安定化に成功した。エンタルピと温度の状態線図の作成に向けて研究は順調に進んでいる。
- ③実験回数を増やすという当初の計画は、上記②の課題が克服された後になる。実験手順はほぼ確立させることが出来たので、慎重に研究を進めていく。

(2) タンパク質結晶の熱物性値の異方性を調べる研究の成果は以下である。

- ①ボア軸中心から偏心させた場所であるほど効果が顕著であることや、磁気浮上可能な場所が幅わずか1センチメートル程度の限られた場所でのみであることなど、多くの困難を予想していたが、こうした諸問題は超電導マグネットボア内部を直接観察出来る独自の可視化装置を開発することで克服出来た。超電導マグネットを水平傾斜した場合の電源ケーブルを支える支持台の製作も課題であったが、非磁性材質の脚立を利用することで安全に固定出来た。こうした入念な準備の結果、研究開始からほぼ半年で、半径方向磁気力でタンパク質結晶を磁気浮上させることに初めて成功した。浮上した結晶(リゾチームの正方晶)はどれもc軸が水平方向に磁場方向し、初めて見る特異な析出様態であった。この場所に非定常短細線加熱法のプローブを固定し、短細線周囲に結晶を付着させることが出来れば、磁場異方性の効果を確実に明らかに出来る。なお、半径方向磁気力は鉛直方向磁気力よりも弱いことが数値計算によって当初から予測していたが、本研究では5T以上の強磁場が必要であった。これは従来の磁束密度の2倍以上もあり、磁気力換算では4倍以上に相当した。安全に結晶化を行う必要性から、沈殿剤濃度を高め、より小さな磁場で磁気浮上出来る条件を探索中である。
- ②二液法では短細線を密度の異なる二液界面に固定して結晶を短細線に付着させる必要がある。しかしその界面はメニスカスによって湾曲し短細線に結晶を付着させることが非常に困難であった。そこで容器の底に穴をあけて細管路を設置し、高比重溶液をシリンジに導通させることで、結晶成長を観察しながら二液界面の高さを調整出来るように改造した。この結晶化容器の使用により、二液法による熱物性値の計測に初めて成功した。そして鉛直方向磁気力で浮上成長させた結晶と熱物性値の比較を初めて実現出来た。半径方向磁気力で浮上させた結晶の熱物性値計測はこれからであるが、少なくとも異方性の存在を示す有力な手がかりを明らかにすることが出来た。
- ③鉛直方向磁気力で浮上させた結晶と磁場なし条件で成長した結晶のそれぞれの熱物性値(熱伝導率および熱拡散率)について、まず、温度依存性をクルスカル・ウォリス検定した。その結果、温度依存性が有意に存在することを統計的に明らかにした。温度依存性は最小自乗法で定式化した。次に、磁場配向の効果が熱物性値に与える影響について共分散分析で評価した。その結果、鉛直方向磁気力で浮上成長させた結晶と二液法で磁場なし条件で成長させた結晶の温度依存性には、統計的な交互作用が認められた。これは即ち、磁場配向の効果が熱物性値に影響している可能性を示唆していた。半径方向磁気力で浮上させた結晶の熱物性値測定はこれからであるが、磁場配向の効果を確認する準備はほぼ整っている。

(3) 磁気熱対流の影響を調べる研究の成果は以下である。

結晶成長時の熱対流の効果を感温液晶で可視化した。結晶化溶液が常磁性になっていることから、対流の作動流体も同じガドリニウム塩による常磁性流体を用いた。熱損失の推定はChurchill and Ozoeの方法で定量的に行った。磁気熱対流の強さはレイリー数と

ヌセルト数で評価し、自然対流との相似性は磁気レイリー数で評価した。また三次元数値計算も実施した。最終的に全ての結果を Silveston の実験式と比較し、磁気レイリー数でヌセルト数を整理すると良い一致を見た。この研究結果は査読付学術論文で発表した。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) 熱物性値の計測の研究についての反省

プローブの材質変更とタンパク質結晶の温度依存性の測定は順調に実現させることが出来、論文化もあまり時間はかからなかった。しかし、未だに論文を受査させることが出来ないでいる。不査査の理由としてタンパク質結晶の熱物性値計測の重要性が不明であるというコメントが多かった。そこで二液法による測定結果と、タンパク質溶液の温度依存性のデータを追加して論文内容の充実を図った。内容の大幅な変更のために時間が多くかかってしまい現在に至っている。測定結果には自信があるので、論文の査査に向けて全力を傾ける必要がある。

(2) タンパク質結晶の熱物性値の異方性を調べる研究についての反省

半径方向磁気力で結晶を磁気浮上させる場合、適当な場所がマグネットボア内部の狭小な空間のみに限定されていることは数値計算で当初から予測していた。しかし本当に浮上するかどうかは未知であった。だから半径方向磁気力でタンパク質結晶を磁気浮上成長させることに初めて成功した成果は、今後の研究を大いに進展させる画期的な成果であった。先行研究を見ても、超電導マグネットを水平にして行った実験はモーゼ効果くらいしか知られていない。本研究は超電導マグネットの新しい活用法を提案することに繋がるかもしれないと考える。一方、結晶を浮上させることには成功したが、短細線に結晶を付着させることに成功したわけではない。鉛直方向磁気力に比べて大きな磁場を印加しなければ浮上が実現しないので、その問題を解決する必要がある。論文成果を査査するまでには、まだ多くの時間がかかるのは間違いない。また、本研究では二液法による結晶化も同時に進めているが、当初の計画では界面位置の調整が必要になるなど想定すらしていなかった。研究開始から1年以内に専用の結晶化容器を開発し、(1)の研究の論文にデータを追加出来たとしても、まだ論文化したわけではない。こうした課題を早く克服し、論文成果を加速させる必要がある。

(3) 磁気熱対流の影響を調べる研究についての反省

磁気熱対流の研究は既に多く査査されてきたが、狭小な超電導マグネット内部の対流を側面から直接観察した研究はほとんど知られていなかった。本研究のプロジェクト期間内に論文査査出来たことには満足している。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

- ① S. Maki, N. Hirota, and M. Hagiwara, “Visualization and analysis of magneto-thermal convection of paramagnetic liquid in the Rayleigh-Benard model”, *Physical Review E* 98, 033109 (19 pages) (September, 2018). DOI: 10.1103/PhysRevE.98.033109

学 校 名	大 阪 成 蹊 短 期 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①動物繊維 ②ケラチン ③ナノファイバー ④生体材料 ⑤再生繊維			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
澤 田 和 也	生 活 デ ザ イン 学 科	教 授	研究全般の実施と総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 里 俊 哉	大 阪 工 業 大 学 部 大 工 学	教 授	ナノファイバー物性評価と組織親和性評価
山 下 義 裕	生 活 デ ザ イン 学 科	准 教 授	ナノファイバー制作

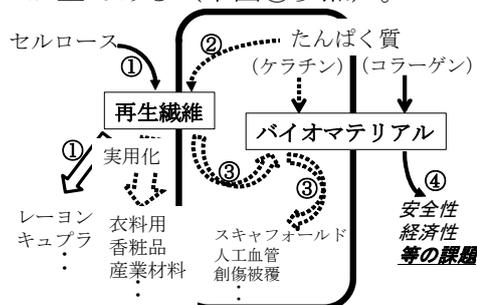
# 動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用

## 1. 研究の目的

### (1) 研究背景

再生繊維は構成成分に由来する特性を活かしつつ、さらに種々の付加価値を付与することが可能となるため、天然繊維そのものに比べて応用価値は高い。下図に示す通り、現在のところ再生繊維としての実用化は植物由来のセルロースが主である（下図①参照）。

一方、動物由来タンパク質は、一部で研究例があるものの、実用的な応用には至っていない。特に、(紡績・製織時の)羊毛屑や毛髪は大量に廃棄されており、殆どリサイクルされていない。そこで、本申請者はそれらの有効活用を目指し、動物繊維である“羊毛”から構成タンパク質のケラチンを抽出し、エレクトロスピンニング法によりナノファイバーとして再生繊維化する検討を実施した(右図②)。また、抽出ケラチンをフィルムや多孔質スポンジへと加工し、ナノファイバーと共に、バイオマテリアル応用化を検討した(図中③)。



本申請課題の研究対象領域(太枠部分)  
(原料素材を羊毛からヒト毛へと変換させて挑戦)

一連の研究により得られた成果は、既に国内外の学術論文および学会にて報告を終えている。本申請者が、一連の当該研究テーマに着想した経緯には、廃棄される動物繊維タンパク質のリサイクルという意味合い以外に、バイオマテリアル応用した際の、汎用素材(コラーゲン)と比較した場合の生体に対する高い安全性が挙げられる。コラーゲンは生体を構成する構造タンパク質であり、優れた生体親和性を示す反面、BSE等による安全性の危惧、複雑な精製工程、高コスト等の課題を有する(図中④)。

一方、同じく構造タンパク質であるケラチンを成分とする動物毛は、非血管性由来でありBSEの危険性が無い。さらに、ケラチンは細胞接着性因子として知られるアミノ酸配列を分子内に複数セグメント含んでおり、細胞との高い親和性も有する。加えて、安価で大量に安定入手が可能ということも特筆すべき利点である。

### (2) 先行研究と比較した本研究の特徴

これらの特性を活かし、本研究では本申請者の先行研究成果を発展させる。即ち、上図中の②及び③部分において、原素材を“羊毛”から“ヒト毛髪”へと応用すること、及び抽出手段を“酸化的”から“還元的”へと応用展開する(下表参照)。原素材にヒト毛髪を用いることで得られる利点(下表中⑤)は、異種(羊)由来から同種(ヒト)由来の材料となることで移植時の生体への安全性が飛躍的に高まることである。さらに、“酸化抽出ケラチン”が天然構造から変性しているのに対し、“還元抽出ケラチン”は天然構造に近い。その結果、生理学的特性の維持や、化学架橋を施すことなく力学的特性を再現できる利点も有する。一方、解決すべき課題も生じる。羊毛とヒト毛髪では含有アミノ酸組成差も大きく、色素含有の有無も異なる。また、年齢・性別・人種等による相違も想定され、それらは溶媒への溶解性や物性への影響とも深く関わっていると想定される。従って、上記利点を得るためには、それらの影響を幅広くスクリーニングすることが必要となる(表中⑥)。尚、本研究では応用対象がバイオマテリアルであることを勘案し、生体構造と同じくナノスケールで構造制御が可能な、ナノファイバー作成に焦点を絞った検討を実施する。

	ターゲットとする 応用分野	素材原料	抽出手段	利点	課題
現在までの研究	スキャフォールド (バイオマテリアル)	羊毛	酸化的	⑤	⑥
本申請課題研究		ヒト毛髪	還元的		

## 2. 研究の計画

### (1) 達成目標

当該年度の達成目標は、“ヒト毛髪”から“還元的”にケラチンを抽出し、エレクトロスピンニングによるナノファイバー作成の技術を確立することである。

### (2) 研究項目

-異種類ヒト毛髪ケラチンを用いたエレクトロスピンニングにおける条件パラメータの設定-  
 “羊毛”に比べて“ヒト毛髪”から得られるケラチンはエレクトロスピンニング化において多くの検討すべき課題が存在する。初年度はこれらの影響を克服し、ヒト毛髪由来ケラチンから再現性あるエレクトロスピンニング化技術を確立する。ヒト毛髪では、メラニン色素の影響をも評価するため、“黒髪”と“白髪”の異種類の毛髪を用いた検討を進める。

## 3. 研究の成果

初年次の当該項目の達成目標をもとに、検討を行った事項および成果は以下の通りである。

	① 洗浄	② 抽出	③ 再溶解	④ エレクトロスピンニング
本申請者の従来法（実施法）	界面活性剤 CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH	還元抽出法	ギ酸	印加電圧、ターゲット間距離、吐出速度の調整
本年度検討による新規追加事項	超臨界流体洗浄	抽出液中からの有機溶媒を用いた選択的不純物除去	溶媒スクリーニング	温度・湿度の統一
本年度の成果	表面残脂の完全除去	疎水性のコンプレックス不純物の除去	抽出ケラチンの完全溶解	ケラチンのみから構成される再現性の高いナノファイバーの作成

①の試料洗浄工程は、界面活性剤及びCHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH混合溶媒による手法が常法であった。しかしながら、吸着力の高い疎水性不純物の除去が困難であった。そこで本研究では、浸透力と拡散係数の極めて高い超臨界二酸化炭素による洗浄を従来工程に追加し、従来は除去困難であった表面残脂成分の除去を達成した。（右写真参照 抽出トラップに脂質が回収されている）

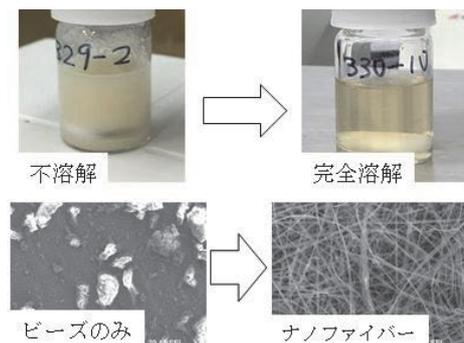


②は、還元法によるケラチン抽出工程であるが、従来法では疎水性アミノ酸側鎖と強固に相互作用している不純物の一部が最終抽出物まで残存していた。その結果、抽出ケラチンの再溶解性や成型工程にも影響を及ぼし、使用溶媒の選択制限や補助高分子等の共存による加工を余儀なくされ、純ケラチン（ケラチン100%）のみによる成型加工が困難であった。そこで本研究では、特定の有機溶媒を用いた抽出原液からの選択的不純物除去という新たな精製ステップを追加し、タンパク質の変性を起こさず、それを達成した。

さらに、この改善抽出プロトコルは、③の抽出ケラチンの最適溶媒のスクリーニングの幅を大きく広げることが可能にした。そして、従来は貧溶媒とされた溶媒でも適応可能（次頁写真上段）になることを突き止め、エレクトロスピンニング化に最適な溶媒選択が可能になった。特筆すべきは、還元抽出された純ケラチン（ケラチン100%）のナノファイバー化は困難とされてきたが、本年度の検討によりそれが可能になったことである（同写真参照）。

これにより、種の相違（白髪と黒髪）による成分の差と溶解性やナノファイバー化との関連性について、多くの基礎的知見を得ることも出来た。

④の工程では、ナノファイバー形成に影響を与える温度と湿度を完全にコントロール出来る環境を整え、最適の温度・湿度環境をスクリーニングすることで、極めて再現性の高いナノファイバー作成が可能な手法を概ね確立するに至った。



## 4. 研究の反省・考察

### (1) ケラチン抽出プロセスにおける反省と考察

上記の通り、抽出操作において、従来法に改良を加えることにより、疎水性不純物の抽出除去が効果的に行えるようになった。その結果、従来では不可能であった、純毛髪由来ケラチンを用いたナノファイバーが可能になった。この成果は今後の毛髪ナノファイバーを用いた応用化研究にとって特筆すべき成果である。しかし一方で、この疎水性不純物がどのような物質の同定は達成されていない。この疎水性不純物は、“抽出ケラチンを再溶解した上でナノファイバー化”という目的の観点からすれば、そのプロセスを阻害することから「不純物」と表現したが、その後の成型物の細胞親和性や生体との適度な接着性、親和性、さらには力学強度保持等の全ての面で、この疎水性物質が「不純物」と表現することが正しいかの判断は出来ない。この疎水性物質は、疎水性アミノ酸残基と相互作用している色素および低分子疎水性 $\gamma$ ケラチン類と推測されるが、これらの物質が成型物に混在した場合に、必ずしも応用目的に対して負の効果をもたらすとは限らない。実際、細胞親和性および増殖性の観点からすれば、適度な疎水性表面の存在は、その目的にとって効果的である。

今後、抽出の際に分離されたこれらの疎水性物質を同定し、成型物の応用目的に対して有用成分が含有されているならば、成型後の再度含有させる措置を検討する必要もある。

### (2) 物性評価における反省と考察

初年時に先行的に着手した検討において、作成したケラチンナノファイバーの力学強度評価を実施した。比較対象として作成した同材料のフィルムも同時に評価を行った。しかしながら、ナノファイバーシートにおいては、膜厚においてもナノサイズであり、測定限界を下回っていた。さらに、比較対象のフィルムにおいても湿潤時には同様の結果であった。力学面での物性評価は、バイオマテリアル応用における、重要な評価項目の一つであり、今後、強度の向上を図るための後処理を検討する必要がある。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① 再生医療用材料としての動物由来タンパク質、澤田和也、藤里俊哉、繊維機械学会誌、印刷中

### (2) 口頭発表

- ① Preparation of the fibrous bio-scaffold utilizing supercritical fluid extraction、K. Sawada, Y. Tanaka, M. Ogawa, T. Fujisato、IFPB2018(Balneário Camboriú, Brazil)
- ② Fabrication of acellular tissue utilizing supercritical fluid extraction、K. Sawada, Y. Tanaka, M. Ogawa, T. Fujisato、ISSDF(Daegu, Korea)
- ③ 癒着防止材応用のための動物毛由来ケラチンタンパク質、久米佑奈、澤田和也、藤里俊哉、ライフサポート学会バイオフィロンティア講演会、2019. 3. 10-12 (埼玉)

### (3) 出版物

- ① 生活材料学、11章(産業資材)・12章(医療を支える繊維素材)、アイ・ケイコーポレーション、2018. 10. 30

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キチナーゼ様タンパク質 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 (GlcNAc) の重合体で、真菌類、甲殻類、昆虫の主な構成成分である。ほ乳類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キチナーゼ、キトトリオンダーゼ (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase; 最近この酵素は、acidic chitinase, Chia とよばれている) を発現している。

他方、キチナーゼに構造が極めて類似しているが、キチナーゼ活性を示さない一群のタンパク質が知られている。これらはキチナーゼ様タンパク質 (Chitinase-like proteins) とよばれ、これまでマウスやヒトで同定され、Ym1、Chi311 (別名称 BRP-39, ヒトでは YKL-40 とよばれている) などが知られている。Ym1 は喘息や寄生虫の感染で、Chi311 は喘息や悪性腫瘍などで発現レベルが顕著に増加することから、注目されている。

ほ乳類キチナーゼとキチナーゼ様タンパク質は糖加水分解酵素ファミリー18 に属している。ファミリー18の活性中心のコンセンサスアミノ酸配列は、DXDXDXE で、グルタミン酸 (E) が触媒残基として機能する。キチナーゼとキチナーゼ様タンパク質を比較すると、活性中心を含むコンセンサス配列のアミノ酸が置換されている。そのため、キチナーゼ様タンパク質がキチナーゼ活性をもたないのは、活性中心のアミノ酸が置換しているからである、と一般的に考えられている。

本研究では、まず、マウス AMCCase に比べ、キチナーゼ活性が大幅に低下していたヒト 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)。次に平成 29 年度において、キチナーゼ様タンパク質 Ym1 の不活性化のメカニズムを探るため、Ym1 の活性中心に変異 (N136D、Q140E) を導入し活性化を試みたが、Ym1 の活性化は起こらなかった。そこで、マウス AMCCase の触媒ドメイン (AMCCase CatD) と Ym1 とで 6 種類のキメラ体を作製し、機能比較を行った。その結果、キチナーゼ様タンパク質 Ym1 は、活性中心のアミノ酸変異と AMCCase の C 末端領域と組換えることでキチナーゼ活性を発現することを明らかにした。

平成 30 年度の研究では、(1) Ym1 の活性化に関わる領域の絞り込み、(2) キチナーゼ様タンパク質 Chi311 の活性化、を行った。

## 2. 研究の計画

### (1) Ym1 の活性化に関わる領域の絞り込み

- ① これまでの研究で、Ym1 の活性中心にアミノ酸置換を導入し、C 末端領域を AMCCase と入れ換えたキメラ体がキチナーゼ活性を示すことがわかった。逆に、AMCCase の C 末端領域に Ym1 のアミノ酸配列を導入したキメラ体は失活した。この結果から、Ym1 の C 末端領域に不活性化に関わる重要な領域、アミノ酸が存在すると考えた。そこで、C 末端領域をさらに細分化した Ym1 と AMCCase のキメラ体 cDNA を作製した (図 1)。この 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について、合成基質を用いてキチナーゼ活性を測定し、キメラ間で比較した。さらに、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。

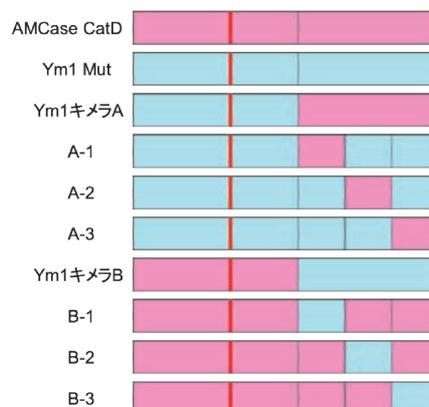


図 1: Ym1 活性化に関わる領域絞り込みのための Ym1 と AMCCase CatD のキメラ体の模式図

## (2) キチナーゼ様タンパク質 Chi311 の活性化

- ① Chi311 の活性中心に変異を導入し、Chi311 mutant (Mut) cDNA を作成した。また、Ym1 での研究結果から不活性化の原因が活性中心以外に存在していると考え、Chit1 の触媒ドメイン (Chit1 CatD) と Chi311 間でキメラ体の cDNA を構築した (図 2)。これら cDNAs を大腸菌で発現した。
- ② 合成基質を用い、発現した各種組換えタンパク質のキチナーゼ活性を比較した。さらに、コロイダルキチンに各融合タンパク質を作用させ、それら分解産物を解析した。

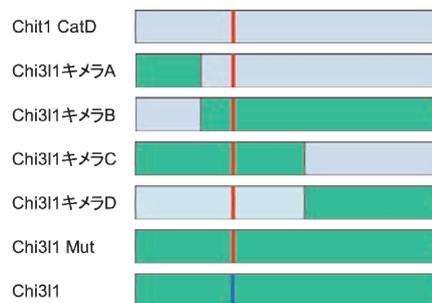


図 2 : Chit1-Chi311 間でのキメラ体模式図

## 3. 研究の成果

### (1) Ym1 の活性化に関わる領域の絞り込み

Ym1 キメラ A は高いキチナーゼ活性を有していた。この活性化に関わる領域を明らかにするために、Ym1 キメラ A-1、A-2、A-3 を作製し、キチナーゼ活性を測定した。しかし、いずれの組換えタンパク質でも酵素の活性化は認められなかった (図 3、4)。これは Ym1 の活性化において AMCCase CatD の C 末端領域が広い範囲で必要であることを示す。

次に、AMCCase CatD への Ym1 の C 末端領域挿入の影響を調べた。AMCCase キメラ B は完全に失活した。そこで、C 末端領域を三分割した B-1、B-2、B-3 について検討した。B-1、B-2 のキチナーゼ活性は低下したが、活性は残存した。しかし、B-3 は全く活性を示さなかった (図 3、4)。このことは、AMCCase CatD のキチナーゼ活性を、Ym1 の C 末端を導入することで不活性化できることを示す。

以上の結果は、Ym1 の失活が C 末端領域の複数の領域のアミノ酸の相互作用で起きている可能性を強く示唆した (図 4)。

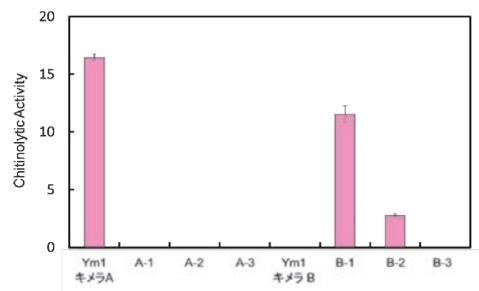


図 3 : pH 2.0 での Ym1 キメラ体のキチナーゼ活性の変化

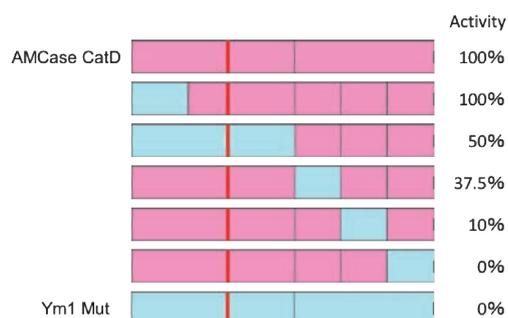


図 4 : キメラ体の結果から Ym1 には複数の活性低下の原因が存在する

### (2) キチナーゼ様タンパク質 Chi311 の活性化

まず、Chi311 に Chit1 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。この結果から、活性中心の変異のみでは Chi311 を活性化することができないことが分かった。これは、昨年度の Ym1 と同様の結果であった。

次に Chi311 と活性化キチナーゼである Chit1 CatD との間でキメラ体を作成し、キチナーゼ活性を測定した。Chit1 に Chi311 の N 末端領域を導入したキメラ A は活性が低下した。このことから、Chi311 の N 末端領域には活性低下に関わる原因があることが分かった。

Chi311 に活性中心を導入し、N 末端領域に Chit1 の配列を導入した Chi311 キメラ B は活性化しなかった。これに対し、Chi311 に活性中心を導入し、C 末端領域に Chit1 の配列を導入した Chi311 キメラ C は、わずかであったが活性化した。さらに、Chi311 の C 末端領域を Chit1 に挿入した場合、活性が大きく低下した。

以上の結果は、Chi311 の不活性化に、活性中心のアミノ酸変異に加え、N 末端領域、C 末端領域にその原因があることを示す。

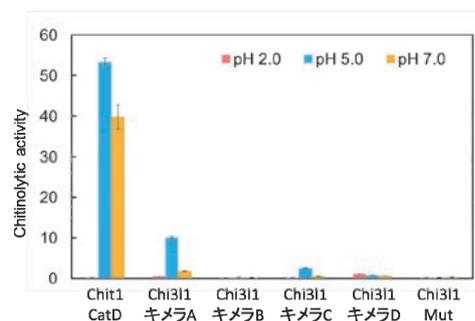


図 5 : Chi311 キメラ体のキチナーゼ活性の変化

## 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、進化的制御に関してほとんど研究がされていなかった。我々は、ヒト AMCase とマウス Ym1 と Chi311 について平成 28 年～30 年度において研究をおこなった。

まず、ヒト AMCase キチナーゼ活性が nonsynonymous SNPs によって制御され、キチナーゼ活性が極めて低かったヒト AMCase variant にほ乳類で保存されている 61M を導入することで活性化できることを明らかにした。次に、キチナーゼ様タンパク質 Ym1 および Chi311 の不活性化の原因と活性化を試みた。両キチナーゼ様タンパク質の不活性化の最も重要な原因は、活性に関わるアミノ酸の置換に加え、C 末端領域にキチナーゼ様タンパク質を不活性化させる領域が存在することを明らかにした。ここまでの研究において、C 末端領域にキチナーゼ様タンパク質を不活性化させる領域が存在することを明らかにし、Ym1 の C 末端側 59 アミノ酸、Chi311 では 142 アミノ酸の領域に絞り込んだ。現在、Ym1 と Chi311 について、それぞれの結果で原著論文を作成中であり、令和元年度中の受理を目指している。

我々は、ヒト AMCase が、マウス酵素に比べ活性が大きく低下しており、それは 1 アミノ酸置換が原因であり、アミノ酸を置換することで活性化できることを示した。これに対し、Ym1 と Chi311 について、複数のアミノ酸が不活性化に関わっていることを明らかにした。この件は、Ym1 と Chi311 の不活性化の解明および活性化の試みにおいて、想定以上に困難であった。しかし、原因となる領域をかなり絞り込んできているので、あと少しでアミノ酸が同定できると考えている。

Ym1 と Chi311 は、未だに機能が明らかになっていないが、多くの疾患で発現が増加することから、生物・医学的に重要な役割を果たしている可能性が高い。我々の研究結果から、Ym1 と Chi311 は、積極的にキチン分解活性を失うように進化しているとも考えられた。一般的に、機能を失いつつある遺伝子、失った遺伝子は、コード領域に停止コドンが挿入され、転写レベルが下がり、遺伝子自体が喪失することが知られている。これに対し、Ym1 と Chi311 は、コード領域がきちんと保たれ、正常組織での発現レベルが高く、炎症を伴う様々な疾患で発現が顕著に増加する。このことは、Ym1 と Chi311 は、キチナーゼとしての構造を保持しつつ、キチナーゼ活性以外の重要な役割を果たしているとも考えられる。その解明は今後の重要な課題でもある。

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、実際に不活性化ヒト AMCase を 1 アミノ酸置換で活性化することができた。さらに、Ym1、Chi311 の不活性化と再活性化のメカニズムを明らかにした。これらは、キメラ体の作成を中心とした手法によって実現された。このように、キチナーゼ、キチナーゼ様タンパク質を再活性化させたことから、この手法は非常に汎用性のある手法であり、さらなる新規研究領域、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., Uehara, M., Wakita, S., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Yurimoto, T., Sasaki, E., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2019) High expression of acidic chitinase and chitin digestibility in the stomach of common marmoset (*Callithrix jacchus*), an insectivorous nonhuman primate, *Sci Rep* **9**, 159.
- ② Uehara, M., Tabata, E., Ishii, K., Sawa, A., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2018) Chitinase mRNA levels determined by qPCR in crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) tissues: species-specific expression of acidic mammalian chitinase and chitotriosidase, *Genes* (Basel) **9**, 244.

### (2) 口頭発表

- ① Kishigami, N., Okawa, K., **Sakaguchi, M** and **Oyama, F.** (2018) Chitinase 3-like-1 with amino acid substitutions at the active site remains inactive. **68th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (San Diego)
- ② **Oyama, F.**, Kashimura, A., Kikuchi, A., Masuda, H., Miyahara, R., Hiruma, Y., Wakita, S., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y. and Tabata, E. (2018) Feeding behaviors determine acidic

chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs. **68th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (San Diego)

- ③Kishigami, N., Okawa, K., Sakaguchi, M., Oyama, F.(2018) Amino acid substitutions at the active site of Chitinase 3-like-1. **14th International Chitin and Chitosan Conference (14th ICC)** (Osaka)

(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	研究統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
下 井 岳	生 物 産 業 学 部	准 教 授	遺伝子改変マウス作製及び解析
白 砂 孔 明	農 学 部	准 教 授	体細胞培養実験系

# 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) 卵胞液中で推測した卵子の発生を制御する miRNA の外挿試験

- ①ブタの初期胞状卵胞卵子へ miRNA10b, 17, 27b, 145, 92a の添加試験を行った。
- ②ウシの初期胞状卵胞卵子に対してブタで効果のあった miRNA92a の添加効果を検討した。

#### (2) 胚発育において見つかった miRNA の機能解析

透明帯除去胚の培養系を確立し、子宮内における制御 miRNA 候補の添加による胚発育の変化の観察を行なった。

#### (3) エクソソームの分泌変化の分子背景の探索

### 3. 研究の成果

#### (1) 卵胞液中で推測した卵子の発生を制御する miRNA の外挿試験

①miRNA の添加は miR10b が卵子の体外発育を miR17 と 27b が体外発育卵子の発生能力を miR145 がクロマチンの形態を miR92a が卵子の体外発育、発生率、クロマチンの形状すべての項目において改善する結果となった。引き続き行った miR92a の効果の詳細な検討では miR92a は卵子の支持細胞である顆粒層細胞の VEGF、p-AKT、p-S6RP の活性化をおこす効果が確認できた。またミトコンドリア数と ATP の減少そして SIRT1 と pAMPK の活性低下が観察されたため miRNA の 92a は細胞の解糖系を亢進しミトコンドリアの機能を低下させる効果があると考えた。この仮説を裏付けるように卵子と細胞のグルコース消費が上昇し乳酸の蓄積が観察された。

②ブタで得られた結果をウシの卵子顆粒層細胞複合体を使って検証した。上記と同様に92aは細胞の解糖系の亢進とミトコンドリアの機能を変化させる結果を得ることが出来た。一方で、ウシの細胞はブタと異なりリポフェクタミンの添加により著しく脂質を蓄え増殖を亢進する二次的な効果が観察されたためウシの細胞には添加方法の修正が必要と考えた。

(2) 胚発育において見つかった miRNA の機能解析

胚の透明帯を除去しその発生を評価する培養系を確立した。またこの時に培地中に放出される小胞の量をリアルタイム PCR で確認したところ、若齢と加齢のウシ由来の胚や質の異なる胚ではその分泌量が異なることが明らかになった。また候補の一つである miRN17 が胚発生を改善することが明らかになった。

(3) エキソソームの分泌変化の分子背景の探索

細胞のオートファジーや小胞形成、プロテアソームの阻害剤を用いて細胞外小胞の分泌量を比較したところオートファジーの抑制は細胞外小胞の数を著しく増加させ、一方で小胞形成とプロテアソームの阻害剤はこれを減らした。またこの放出パターンは加齢により変化することが明らかになった。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) 卵胞液中で推測した卵子の発生を制御する miRNA の外挿試験

①ブタで得られた候補miRNAは予想どおり卵子の発育を大きく改善することが明らかになった。また解糖系の抑制は卵胞細胞を用いたRNAseqで予測したとおりであり、おおきな発見であると考えている。一方でmiR92aがどのような経路を介して解糖系に働きかけているのかは今後の課題である。

②ウシの卵子でも同様な効果を確認できたが遺伝子やmiRNAの導入において多用するリポフェクタミンはウシの細胞には思わぬ二次作用があることが分かり導入方法の再考を余儀なくされている。

(2) 胚発育において見つかった miRNA の機能解析

卵管のsmallRNAseqは1回目にRNAの純度が悪く現在再度検討中である。一方で胚のRNAseqから推測したmiRNAに発生促進効果があることが分かった。また胚からの小胞分泌においても胚の由来(卵子のドナーの月齢)が大きく作用することが分かり、加齢や生理条件がmiRNAの分泌に影響していると考えている。

(3) エキソソームの分泌変化の分子背景の探索

細胞から分泌される細胞外小胞の多少に影響する要因として細胞のオートファジー活性が示された。オートファジーの活性は細胞や母体の生理状態に大きく影響される知見があるため、現在加齢による細胞外小胞の分泌変化は細胞内部のオートファジーの活性変化によるものと考えて検討を行っている。また若齢と加齢間、肥満と痩身間で差のあるmiRNAを同定したためその背景の解明は今後の課題である。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Shibahara H, Munakata Y, Ishiguro A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Modification of the medium volume and gel substrate under in vitro culture conditions improves growth of porcine oocytes derived from early antral follicles. *J Reprod Dev* 2019; In press

②Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Cell-free DNA in medium is associated with the maturation ability of in vitro cultured oocytes. *J Reprod Dev* 2019; 65: 171-175

③Ishiguro A, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Addition of granulosa cells

collected from differential follicle stages supports development of oocytes derived from porcine early antral follicles. *Reprod Med Biol* 2018; 18: 65-71

(2) 口頭発表

- ①柴原秀典、宗像祥久、川原玲香、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. 卵胞液中エキソソームがブタ初期胞状卵胞由来卵子の体外発育に及ぼす影響 第59回日本卵子学会・2018年5月
- ②宗像祥久、柴原秀典、植田愛美、川原玲香、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. 卵子の成熟・発育を制御するブタ卵胞液中の細胞外小胞由来miRNA 第111回日本繁殖生物学会大会(信州大学)、2018年9月

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 洋 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	マイクロ皮膚モデルを用いるトリコテセンの皮膚抗炎症効果の検討		研究分野 農 学
キ ー ワ ー ド	①トリコテセン ②免疫抑制 ③皮膚免疫 ④マイクロ流体デバイス ⑤抗炎症剤		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 藤 直 子	理 工 学 部	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
佐々木直樹	理 工 学 部	准 教 授	実験・データ整理・論文作成
瀧 沢 麻 子	北里大学北里研究所病院 研 究 部	上 級 研 究 員	実験・データ整理・論文作成

# マイクロ皮膚モデルを用いる トリコテセンの皮膚抗炎症効果の検討

## 1. 研究の目的

アトピー性皮膚炎や乾癬等の皮膚炎は、身体的のみならず心理的・社会的ダメージが大きいため、患者の孤立を招き、患者のクオリティ・オブ・ライフ(QOL)を著しく低下させる疾患である。これらの皮膚炎に対し、ステロイド外用薬や生物学的製剤が使用されているが、深刻な副作用も指摘されている。よって、治療効果が高く副作用の少ない抗炎症剤の開発が急務と言える。

そこで本研究では、糸状菌(カビ)の毒素であるトリコテセン類の抗炎症作用に着目した。トリコテセンは、進化的に必ずしも近縁ではない複数の糸状菌によって生産される100種類以上のカビ毒の一群である。これまで研究代表者の安藤は、希少タイプ、中間体、新規型を含め50種類近いトリコテセンの生産・構造決定に取り組み、他に類を見ないトリコテセンライブラリーの構築を手がけてきた。さらにこれらの化学構造と生理活性の相関に着目し、特定の構造を有するトリコテセンが、皮膚培養細胞における炎症性サイトカインの産生を阻害し、また、免疫細胞の増殖を抑制しうることを明らかにしてきた。これらの作用は複数の機構で起こると考えられており、毒性がより弱く、炎症阻害作用のより強い物質を探索することで、新たな抗炎症剤としての応用が期待できると考えられた。

しかし、薬剤の一次スクリーニング系として、動物実験は倫理・費用面で問題がある上に、薬効の機序の解析に多大な労力を要し、さらに種間差がある以上、結果が必ずしもヒトにはあてはまらない、という欠点がある。培養組織を用いた皮膚モデルも市販されているが、価格が高い上に、トリコテセン類が作用する免疫系の細胞がモデル内に存在しないため、炎症の評価系としては不適である。すなわち、トリコテセン類の抗炎症作用を評価するには、皮膚の実質たる表皮や真皮だけでなく、血管や免疫系の細胞も併せて組み込んだヒト細胞による実験系が必須である。そこで安藤は、研究分担者の佐々木が専門とするマイクロ流体デバイスに着目した。これはマイクロメートルサイズの流路を分析場とするものであり、試料・試薬量の削減のみならず、複数種の細胞を組み込んでその相互作用を評価できる。安藤と佐々木は、これを用いた皮膚モデルの構築に取り組み、既に角化細胞のミクروسケール培養や物質透過性評価に成功してきた。そこで本研究ではこれらの要素を組み合わせ、さらに血管内皮細胞と白血球等の免疫細胞も加えることで、「皮膚の炎症状態を顕微鏡下で再現し、トリコテセンの抗炎症作用を評価する新規実験系が構築できる」と考えた。そこで、この目的を達成するために、以下の3項目について研究を遂行することとした。

- (1) 新規トリコテセン生産と活性評価
- (2) 白血球遊走能の評価
- (3) マイクロ皮膚モデルの構築

## 2. 研究の計画

本研究では、角化細胞、血管内皮細胞、免疫細胞を複合的に取り込んだマイクロ皮膚モデルの構築を目指す。さらに、多様な生理活性を有し、多数の誘導体が存在しうるトリコテセン類のライブラリーを充実させ、それらの抗炎症作用について、このマイクロ皮膚モデルを使用し評価することが目的である。よって、以下のような研究計画に基づき、研究を遂行した。

- (1) 新規トリコテセン生産と活性評価:天然で得られにくい新規トリコテセンを含むトリコテセン全般を生産する。これをヒト皮膚角化細胞であるHaCaT細胞と免疫細胞であるヒト白血球細胞株に添加し、細胞毒性と炎症系サイトカイン誘導阻害能を評価する。
- (2) 白血球遊走能の評価:市販のセルカルチャーインサートの下部に化学誘因物質を、上部に白血球を加え、遊走能を評価する。トリコテセンの遊走抑制作用を評価するに最も適した系の構築を行う。
- (3) マイクロ皮膚モデルの構築:申請者の独自技術を基に、多孔膜を観察面に対し垂直に組みこむデバイスを作製する。このデバイスにHaCaT細胞を導入・培養してマイクロ皮膚モデルとし、物質透過性や好中球様細胞の遊走試験等、本モデルの基本性能を検証する。

### 3. 研究の成果

#### (1) 新規トリコテセン生産と活性評価

トリコテセン類は多様な構造をもつが、その構造や細胞毒性と抗炎症作用の関連は未だ不明な点が多い。そのため、トリコテセンライブラリーを拡充し、それらの細胞毒性と抗炎症作用を検証することが重要である。そこで、*Fusarium* 属糸状菌が生産するトリコテセン、及びその誘導体について、deoxynivalenol 系トリコテセン4種、nivalenol 系トリコテセン8種、T-2 toxin 系トリコテセン8種、また、非 *Fusarium* 属糸状菌が生産するトリコテセン8種について、生産・精製・構造解析を行った。トリコテセンの毒性検証には、皮膚細胞の HaCaT 細胞、白血球細胞の HL-60 細胞、U937 細胞を用いた。総じて、*Fusarium* 属菌由来のトリコテセンの方が非 *Fusarium* 属菌由来に比べ、低毒性であった。次に、トリコテセンの抗炎症作用を検証するために、HaCaT 細胞に炎症性サイトカイン (IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$ ) を添加し、皮膚炎症性ケモカイン thymus and activation-regulated chemokine (TARC) を誘導させ、TARC 誘導に対する各トリコテセンの阻害能を調べた。その結果、*Fusarium* 属菌由来の T-2 toxin の誘導体である 7-hydroxy T-2 toxin が強い TARC 誘導阻害活性を示した。TARC はアトピー性皮膚炎のかゆみを引き起こすケモカインであるため、この誘導を阻害し、有効な抗炎症剤となりうるトリコテセン候補を獲得できたと言える。

#### (2) 白血球遊走能の評価

炎症を抑制するには、上記(1)で述べた炎症性ケモカインの誘導阻害のみならず、炎症部位への免疫細胞の遊走抑制も重要である。そこで、生体防御に関わる免疫細胞である白血球の遊走能を評価した。細胞種および化学誘引物質 (細胞の遊走を誘起する物質) について検討し、細胞種は上記(1)で用いた HL-60 を、ジメチルスルホキシドで好中球様細胞に分化誘導して用いることとした。化学誘引物質には、好中球様細胞の誘引物質として広く知られる、細菌性ホルミルペプチド N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) を用いた。市販のセルカルチャーインサートを用い、ウェル側 (多孔膜の下部) に fMLP 溶液を、インサート側 (多孔膜の上部) に蛍光染色した細胞懸濁液をそれぞれ加え、一定時間後にウェル側を顕微鏡観察した。ウェル側の細胞数は fMLP 濃度依存的に変化し 10 nM で極大値をとった。この結果から、トリコテセンの遊走抑制作用を評価するのに適した細胞種と化学誘引物質を決定できたと言える。

#### (3) マイクロ皮膚モデルの構築

トリコテセンの抗炎症作用を評価するためのマイクロ流体デバイスを開発した。まず、上記(2)で用いたセルカルチャーインサートの多孔膜を組み込んだマイクロ流体デバイスを新たに開発した。1デバイス上に24か所の細胞培養部 (膜が2本の流路に挟まれている) を配し、上記(1)で用いた HaCaT 細胞をこの培養部の膜上で培養した。生死アッセイにより、HaCaT 細胞をコンフルエントに培養できていることを確認した。さらに、蛍光標識デキストランをプローブとして HaCaT 細胞層の物質透過性を評価した。皮膚の刺激物として知られる二クロム酸カリウムを用いたところ、刺激後に物質透過性が増加し、本デバイスを用いる物質透過性の評価を実証した。

さらに、細胞遊走の評価が容易となる、2枚の多孔膜を基板に垂直に組み込んだマイクロ流体デバイスを作製した。作製法を検討し、基板表面をプラズマ処理して接着することで、通常は加熱が必要な操作を室温で行う新規手法の開発に成功した。これにより作製時間の短縮、さらには熱に弱い生体材料でコートした膜の組み込みを実現した。HaCaT 細胞培養前のデバイスを上記(2)で決定した好中球様細胞の遊走試験に応用したところ、当該細胞は fMLP の高濃度域へ濃度依存的に遊走し、本モデルの基本性能を実証できた。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) 新規トリコテセン生産と活性評価

本研究では、28種類のトリコテセンについて、その毒性と皮膚角化細胞に対する炎症性ケモカインの誘導阻害能を検証した。平成30年度は、新たに得られた生産・精製済みのトリコテセン全てについて検証を行えていないため、今後も検証を続けていく予定である。これらの結果から、構造活性相関の有用な情報が得られる可能性が高いと考えている。また、今回最も高い TARC 誘導阻害能を示した 7-hydroxy T-2 toxin は非天然型であるが、まだ生産・精

製・検証が行われていない類縁体が複数存在する。その取得と検証が急務と考えている。

## (2) 白血球遊走能の評価

本研究では既知の化学誘引物質を用い、細胞遊走の至適濃度を決定したが、生体内での白血球の遊走にはこれ以外にも種々の物質や細胞が関与していることが、近年の研究で明らかになってきている。今後、これらの要因についても考慮した上で研究を進める必要があると考えている。

## (3) マイクロ皮膚モデルの構築

本研究で開発した、24か所の細胞培養部を有するデバイスでは、実験の並列化による高スループット化が実現できるもの、実験条件を最大でも3条件しか設定できない。今後、流路の更なる集積化を進めることで、より実用性の高いデバイスにしていく必要があると考えている。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Kentaro KAMATA, Hiroki SATO, Kazuyuki MAEDA, Kazuo FURIHATA, Shunichi AIKAWA, Kentaro ADACHI, Akira TANAKA, Takeshi TOKAI, Yuichi NAKAJIMA, Yasuhiko YOSHIDA, Shohei SAKUDA, Makoto KIMURA, Naoko TAKAHASHI-ANDO. "Exploring an artificial metabolic route in *Fusarium sporotrichioides*: Production and characterization of 7-Hydroxy T-2 toxin", *Journal of Natural Products*, 81 (4), 1041-1044 (2018).
- ② Naoki SASAKI, Kimiaki TSUCHIYA, Hironori KOBAYASHI, "Photolithography-free Skin-on-a-chip for Parallel Permeation Assays", *Sensors and Materials*, 31(1), 107-115 (2019).

### (2) 口頭発表

- ① Marika SUGIMOTO, Fuka NAGATOMI, Naoki SASAKI, "A Dual-Membrane Microfluidic Device For Cell Migration Assay", *The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2018)*, Kaohsiung, Taiwan, 2018. 11. 11-15.
- ② Kentaro ADACHI, Kosuke MATSUI, Shunichi AIKAWA, Makoto KIMURA, Naoko TAKAHASHI-ANDO. "Production And Structural Analysis Of Unnatural Type A Trichothecenes Using Enzymatic Reaction", *The 16<sup>th</sup> International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, Kawagoe, 2018. 12. 18.
- ③ Koki SHINKAI, Kosuke MATSUI, Makoto KIMURA, Naoko TAKAHASHI-ANDO. "Glucoside Formation Of D-Type Trichothecene At C-4 Position By *Fusarium* App", *The 16<sup>th</sup> International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, Kawagoe, 2018. 12. 18.
- ④ Marika SUGIMOTO, Naoki SASAKI, "A Dual-Membrane Microfluidic Device For Chemotaxis Assays Of Immune Cells", *3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology*, P-8, Tsukuba, Japan, 2019. 3. 7-8.
- ⑤ 杉本茉莉花、永富風花、佐々木直樹、"並行多孔膜組み込みマイクロデバイスによる細胞遊走アッセイ"、日本分析化学会第67年会、Y1040、東北大学川内北キャンパス、2018年9月12-14日。
- ⑥ 岡田彩希、新海航輝、田中千智、木村真、安藤直子、"*Fusarium* 属菌と非 *Fusarium* 属菌由来のトリコテセンの生理活性の検証"、第114回日本食品衛生学会学術講演会 広島国際会議場、2018年11月15日-16日。
- ⑦ 新海航輝、岡田彩希、松井宏介、相川俊一、木村真、安藤直子、"構造活性相関の解明に向けた新規トリコテセンの創製と性状解析"、第114回日本食品衛生学会学術講演会 広島国際会議場、2018年11月15日-16日。
- ⑧ 足立健太郎、松井宏介、相川俊一、貞松和樹、中嶋佑一、前田一行、木村真、安藤直子、"トリコテセン前駆体生産と性状解析に向けた *Fusarium graminearum* 遺伝子破壊株の生産物解析"、第114回日本食品衛生学会学術講演会、広島国際会議場、2018年11月15日-16日。

⑨貞松和樹、鈴木将、大西健太、足立健太郎、木村真、安藤直子、“A 型トリコテセン生産菌の代謝産物プロファイルの検証”、第 114 回日本食品衛生学会学術講演会、広島国際会議場、2018 年 11 月 15 日-16 日.

(3) 出版物  
なし

学 校 名	北 海 学 園 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	巨大津波常襲地帯における災害文化の継承メカニズムの解明 —岩手県三陸海岸の津波地名の事例—		研究分野 人文地理学
キ ー ワ ー ド	①災害文化 ②被災経験 ③津波地名 ④継承メカニズム ⑤歴史的・地理的要因 ⑥岩手県三陸沿岸 ⑦『岩手沿岸古地名考』		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
村 中 亮 夫	立 命 館 大 学 部	准 教 授	研究代表者 総括、防災・教育班(班長)、防災・教育班の統括、研究計画の立案、データ分析、現地調査、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
磯 田 弦	東 北 大 学 大 学 院 科 理 学 研 究 科	准 教 授	社会・経済班(班長)、社会・経済班の統括、研究計画の立案助言、データ分析、現地調査
花 岡 和 聖	立 命 館 大 学 部	准 教 授	社会・経済班、データ分析、現地調査
塚 本 章 宏	徳島大学 大学院社会産業 理 工 学 研 究 部	准 教 授	防災・教育班、データ分析、現地調査
谷 端 郷	宮 崎 産 業 経 営 大 学 部 法 学	講 師	防災・教育班、データ整備、現地調査
大 邑 潤 三	東 京 大 学 地 震 研 究 所 地 震 予 知 研 究 セ ン タ ー	特 任 研 究 員	社会・経済班、データ整備、現地調査

# 巨大津波常襲地帯における災害文化の継承メカニズムの解明 — 岩手県三陸海岸の津波地名の事例 —

## 1. 研究の目的

本研究は、1896 年明治三陸地震津波発生直後に編纂された岩手県三陸沿岸の津波地名に関する記録集『岩手沿岸古地名考』を素材に、過去の被災経験を伝える津波地名（津波由来の地名）が現代まで継承されてきたメカニズムを歴史的・地理的な背景に着目しながら解明することを目的とする。申請者らは既に『岩手沿岸古地名考』の資料批判（谷端ほか 2017）とそこに掲載された津波地名の現存状況についての調査（村中ほか 2018）を終えているが、そこで浮かび上がったのは津波地名の著しい減少（被災経験の伝達力の低下）である。村中ほか（2018）では、40 件の津波地名のうち地名・由来ともに確認された津波地名は 11 件に止まり、その他の津波地名については地名のみ確認されたか、もしくは地名・由来ともに確認できなかった。この結果を踏まえ、本研究では様々な歴史的・地理的要因に影響を受けつつも 120 年の時を超えて継承された 11 件の津波地名にどのような継承・存立基盤があるのかを歴史地理学的に解明していく。

## 2. 研究の計画

### (1) 仮説

現在、津波地名の継承メカニズムは未解明であるが、申請者らが取り組んだ現地調査（村中ほか 2018）からは、以下のような津波地名の消滅・継承の背景について仮説が立てられる。

#### ①消滅の背景

- ・地図に載らないような林野内のミクروسケールの地名である場合【背景①-1】
- ・過疎化・高齢化の激しい小さな農山漁村の集落・林野内にある場合【背景①-2】

#### ②継承の背景

- ・地図や自治体・郷土誌、昔話の書籍に記載がある場合【背景②-1】
- ・家族や友人、地域の近隣住民から教えてもらう機会があった場合【背景②-2】

ただし、継承されている津波地名も限界集落に位置している場合が多く、【背景①-1・2】と同様の背景で近い将来消滅する公算が大きい地名も確認された。また、現在まで津波地名が継承されていたとしても、その内容が必ずしも当時と変わらないとも言えない言説も断片的に確認された。例えば、津波により山麓に鯨が打ち上げられ名付けられたとされる「鯨山」（岩手県山田町）については地名・由来ともに継承されているが、現地での聞き取り調査では「津波の際、鯨が山頂に打ち上げられたために名付けられた」とする住民も確認され、打ち上げられた場所として山麓と山頂が混在するようになりながら上書きされつつある実態も確認された。また三陸沿岸では、明治三陸地震津波と東日本大震災との間に、1933 年昭和三陸地震と 1960 年チリ地震による異なる浸水範囲の巨大津波が観測され、津波地名が移動・上書きされた可能

第 1 表 全研究期間の研究計画

工程	内容	平成 30 年	平成 31 年	平成 32 年
(i) 段階Ⅰ	地図データ整備と浸水範囲の復原	・旧版地図、近代以降の津波浸水範囲の GIS データ化		
(ii) 段階Ⅰ	山奈による調査資料の検討	・調査歴史資料の翻刻 ・山奈の調査復原		
(iii) 段階Ⅱ	現地での聞き取り調査	・2～3 箇所程度でパイロット調査	・全 11 箇所での本調査	・補足調査
(iv) 段階Ⅱ	地域の社会・経済、防災・教育の調査	・現地資料調査	・現地資料調査 ・津波碑の GIS データ化	・補足調査
(v) 段階Ⅱ	継承メカニズムの解明・モデル化	・文献研究	・データに基づくモデル化	・学会報告に基づくモデル修正
(vi) 段階Ⅲ	成果の公表		・学会報告 ・論文執筆	・学会報告 ・論文執筆

性もある。すなわち、被災の経験世代が世を去った後、上記のような歴史的・地理的な諸背景からの影響を受けつつ、津波地名は時を経て大きく a. 正確に継承、b. 誤謬を伴い更新・上書き、c. 消滅する仮説が立てられる。

## (2) 計画

### ① 全研究期間の研究計画

本研究では現在も現地を確認される 11 箇所津波地名に焦点をあて、下表のとおり、作業工程を(i)～(vi)の6工程に分けて進めて行く。これらの6工程は、(i)(ii)の【段階Ⅰ】基盤情報の整備・検討、(iii)(iv)(v)の【段階Ⅱ】データ収集・分析、(vi)の【段階Ⅲ】成果の公表、の大きく3段階に分けられる。平成30年度に実施した計画の詳細は後述の通りである。

## 3. 研究の成果

### (1) 基盤情報の整備・検討 (【段階Ⅰ】)

平成30年度は、まず段階Ⅰとして(i)(ii)を最優先に進めた。(i)では、本研究の基盤となる旧版地図や近代以降に三陸地方に襲来した津波(1896年明治三陸地震、1933年昭和三陸地震、1960年チリ地震)の浸水範囲に関するGISデータを作成した。浸水範囲については統一した一次資料が存在しないため基本的には現地で各自治体・郷土誌、災害誌類を閲覧することになるが、さしあたり平成30年度は国土交通省「津波被害・津波石碑情報アーカイブ」のwebサイトで整理されている情報についてGISデータを作成した。これらのデータは、今後計画されている現地調査の際に利用する基盤データとなると同時に、土地利用の変遷や集落移転の検討、そして津波ごとに異なる津波浸水範囲が津波地名の立地地点や由来に影響を与えたかを検証する際にも利用していくことになる。

次に(ii)では、山奈が現地踏査で見聞きした情報が『岩手沿岸古地名考』の記述内容に与えた影響を検証すべく、『岩手県海岸巡回古文書収集録(日誌)』(遠野市立博物館蔵)(以下、日誌)の記述内容の翻刻を進めた。翻刻は研究分担者の大邑が所属する京都大学古地震研究会の協力を得て、当会が運営する「みんなで翻刻」の枠組みで進めた。2018年11月18日に翻刻が完了し、現在、「みんなで翻刻」Webサイト(<https://honkoku.org/>)で閲覧可能である。この日誌には踏査の際の見聞メモや、閲覧した古文書の書き写しが山奈の直筆で綴られており、その他の郷土資料類も参考にしながら山奈の見聞きした内容を総合的に検討していきたい。

### (2) データ収集・分析 (【段階Ⅱ】)

平成30年度は、上記(i)(ii)を優先しながらも、段階Ⅱのうち(iii)(iv)として、津波地名の継承過程とそれに与えた歴史的・地理的影響要因に関する仮説の具体化・資料収集を開始した。(iii)については論文Ⅰ・Ⅱの知見に基づくパイロット調査地として大船渡市三陸町越喜来崎浜、釜石市鶴住居町の2箇所を選定し社会調査を実施した。社会調査は地域住民から個別具体的な情報を収集するための質的社会調査、および家庭に小学生を持つ住民を対象にした量的社会調査によって構成した。質的社会調査については2018年6月23～25日、8月21～24日の出張日程による個別の聞き取り調査・座談会形式の調査を、量的社会調査については2019年2～3月にかけて大船渡市立越喜来小学校、釜石市立鶴住居小学校に在籍する児童の保護者に対して実施した。(iv)については津波地名の消滅・継承の歴史的・地理的背景の仮説を意識しつつ、聞き取り調査を実施する過程で随時、資料収集を進めた。

## 4. 研究の考察・反省

### (1) 考察

本節では、質的社会調査と量的社会調査によって得られたデータに基づき、津波地名が継承される背景に関する仮説ごとに考察したい。まず、「地図や自治体・郷土誌、昔話の書籍に記載がある場合【背景②-1】」に関連する情報として、聞き取り調査からは鶴住居町在住の男性(昭和24年生まれ)が小松実『ふるさとの地名物語—釜石・大槌編—』岩手東海新聞社、1978年に記載されている情報をもとに語るにとどまり、その他の調査協力者からも地図や書物から情報を得ているという証言は得られなかった。同様に、小学校児童の保護者に対する量的社会調査からも仮説を裏付けるデータは得られていない。

一方で、「家族や友人、地域の近隣住民から教えてもらう機会があった場合【背景②-2】」に関連する情報については事例を確認できる。例えば、その昔の津波の際、ツリバチ(海水を汲み上げる紐付きバケツ)が流れ着いた場所からツリバチナガレ(大船渡市三陸町越喜来崎浜)

と呼ばれる津波地名については地形図等には記されていない地名であるが、小学校の行事や家業の手伝い、子どもの遊び場として、崎浜住民にとっては親しまれていたようである。ただし、津波地関連付けて認識している住民が必ずしも多くはなく、小学校児童の保護者に対する量的社会調査においてもツリバチナガレの由来を津波と関連付けて記憶している回答者の割合は回答者51名中2名（3.9%）にとどまる。

## (2) 反省

以上のように、平成 30 年度の研究についてはおおむね当初の計画に基づいて調査を終えたと言っても良い。大船渡市、および釜石市におけるパイロット調査として実施した質的社会調査、量的社会調査から得られたデータは、次年度以降の調査を計画するうえでの基盤データとなる。ただし、平成 30 年度の研究はデータ収集に重きが置かれていたため、データを詳細に検討できていない点が反省点である。今後、他の調査地においても順次データを収集していくと同時に平成 30 年度の調査で得られた成果を学会等で報告・議論していき、津波地名が世代を超えて継承される過程を体系的にモデル化していきたい。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

磯田 弦「災害地名調査のすすめ」、季刊地理学、70 巻 3 号、127-133 頁、東北地理学会、J-STAGE  
公開日：2018 年 10 月 10 日 <https://doi.org/10.5190/tga.70.3.127>

### (2) 口頭発表

なし。

### (3) 出版物

なし。

## 文献

谷端 郷・村中亮夫・塚本章宏・花岡和聖・磯田 弦（2017）：「山奈宗真著『岩手沿岸古地名考』の書誌学的検討と内容分析」、歴史地理学 59 巻 2 号：27-42 頁。

村中亮夫・谷端 郷・塚本章宏・花岡和聖・磯田 弦（2018）：「津波地名やその由来は継承されるのか？—山奈宗真著『岩手沿岸古地名考 全』の追跡調査—」、地理科学 72 巻 4 号：223-246 頁。