

平成 27 年度  
学術研究振興資金  
若手研究者奨励金 研究報告

平成 28 年 10 月

## はじめに

この報告書は、平成 27 年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金）を交付した研究課題について、その研究成果を取りまとめたものです。

「若手研究者奨励金」は、私立の大学、短期大学、高等専門学校の学術研究の振興のために、当事業団が広く一般から寄付を集めて、これを「学術研究振興基金」として運用し、その運用益から私立大学等における社会的要請の強い学術研究に対して助成を行う「学術研究振興資金」の一部を、優れた研究能力を有する若手研究者の研究意欲を高め、研究の発展を支援するために、平成 20 年度から設けられた制度です。

平成 27 年度は、人文・社会科学（「人文・社会科学系」）の研究 8 件に対し各 30 万円、自然科学（「理工系、農学系」「生物学系、医学系」）の研究 34 件に対し各 50 万円、計 42 件に対し 1,940 万円の資金を交付しました。

平成 20 年度に交付を開始して以来、平成 28 年 5 月末までに交付した資金総額は、269 件、1 億 2,090 万円となっております。これも、深いご理解を示された経済界をはじめとする多くの方々のご協力の賜物と心から感謝し、ご寄付くださった皆様に研究者の方々とともにお礼申しあげる次第でございます。

お蔭をもちまして、当基金の保有額は、平成 28 年 9 月末で、54 億 1,475 万円に達しました。当事業団では私立大学等における学術研究の発展を願い、さらに基金を充実させたいと考えております。当基金の趣旨をご理解のうえ、一層のご支援とご協力を賜りますようお願い申し上げます。

おわりに研究に携わる皆様におかれましては、この貴重な資金を有効にご活用いただき、特色ある学術研究の充実発展に寄与し、社会の要請に応えられますことを心からお祈りいたします。

平成 28 年 10 月

日本私立学校振興・共済事業団

理事長 河 田 悌 一

# 目 次

I	学術研究振興資金（若手研究者奨励金）応募状況及び 採択状況……………	1
II	平成 27 年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金） 研究課題一覧……………	2
III	平成 27 年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金） 研究報告……………	4

# I 学術研究振興資金（若手研究者奨励金）応募状況及び採択状況

(単位：千円)

分野	年度	20年度			21年度			22年度			23年度			24年度			25年度			小計			
		応募 件数	採択 件数	交付額	応募 件数	採択 件数	交付額	応募 件数	採択 件数	交付額	応募 件数	採択 件数	交付額	応募 件数	採択 件数	交付額	応募 件数	採択 件数	交付額	応募 件数	採択 件数	交付額	
合計		32	20	6,000	53	24	7,200	49	21	10,500	63	20	10,000	79	30	15,000	77	29	14,500	353	144	63,200	
内	人文・社会科学系	32	20	6,000	53	24	7,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85	44	13,200	
取	理工系、農学系	-	-	-	-	-	-	49	21	10,500	63	20	10,000	-	-	-	-	-	-	-	112	41	20,500
	生物学系、医学系	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	15,000	77	29	14,500	156	59	29,500	

分野	年度	26年度			27年度			合計		
		応募 件数	採択 件数	交付額	応募 件数	採択 件数	交付額	応募 件数	採択 件数	交付額
合計		108	41	18,900	114	42	19,400	575	227	101,500
内	人文・社会科学系	25	8	2,400	21	8	2,400	131	60	18,000
取	理工系、農学系	33	11	5,500	37	14	7,000	182	66	33,000
	生物学系、医学系	50	22	11,000	56	20	10,000	262	101	50,500

注1. 研究対象分野は、平成20、21年度は「人文・社会科学系」、平成22、23年度は「理工系、農学系」、平成24、25年度は「生物学系、医学系」の分野について、それぞれ募集・採択を行った。  
 注2. 若手研究者奨励金の採択件数からは、採択決定後に交付辞退のあった学校を除外している。

辞退の内訳は、次のとおりである。(平成20年度：3件、平成21年度：3件、平成22年度：1件、平成23年度：1件、平成24年度：3件、平成25年度：1件、平成26年度：3件、平成27年度：2件)

## Ⅱ 平成27年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金）研究課題一覧

	学校名	研究者名	研究課題	交付額 (千円)	頁
1	東北医科薬科大学	黒田 喜幸	肥満と関連する受容体GPCR5BによるATP合成制御シグナルの解明	500	5
2	埼玉医科大学	石川 雅浩	スーパーピクセルを用いた病理画像中の構造認識法の開発	500	7
3	和洋女子大学	難波 秀行	身体活動分析システムを用いた行動パターン分析	500	10
4	青山学院大学	石田 研太郎	胎仔性皮膚の再構築からの皮膚パターン形成のメカニズムの解析	500	13
5	北里大学	長尾 和右	新規遺伝子編集ツールを用いた遺伝性疾患の細胞治療の試み	500	16
6	杏林大学	井上 信一	$\gamma\delta$ T細胞によるマラリア免疫記憶制御機構の解明	500	18
7	慶應義塾大学	花屋 賢悟	酵素触媒を活用した不斉誘導体化試薬の創製	500	20
8	工学院大学	長谷川 浩司	音場浮遊液滴の非線形ダイナミクスに関する研究	500	23
9	順天堂大学	小川 文昭	統合失調症関連遺伝子によるミクログリアの機能修飾に関する研究	500	26
10	成城大学	及川 祥平	地域史の教育資源化をめぐる民俗学的研究	300	28
11	専修大学	高嶋 陽子	国際人権条約の域外適用に関する研究	300	30
12	大正大学	日下田 岳史	ウェブ調査による日本社会の学歴同類婚傾向に関する研究	300	32
13	淑徳大学	日野 勝吾	公益通報者の「保護」と「支援」のあり方に関する研究	300	35
14	東京女子医科大学	芦野 滋	ウィルス感染が誘導するステロイド抵抗性気管支喘息の病態解明	500	38
15	東京電機大学	大島 直樹	人の援助行動を引き出す「弱いロボット」に関する研究	500	41
16	東京薬科大学	多田 塁	広域スペクトラムを有する経鼻投与型肺炎球菌ワクチンの開発	500	44
17	東邦大学	高橋 果林	電子衝撃による分子ガスのフラグメント生成プロセスの研究	500	46
18	日本大学	藤田 智史	2光子励起顕微鏡を用いた高次脳における歯痛の発症機序の解明	500	48
19	日本医科大学	脇田 知志	急性骨髄性白血病におけるDNMT3a遺伝子変異の意義の解明	500	51
20	自治医科大学	内堀 亮介	ヒトCD269特異的キメラ抗原受容体の至適化に関する研究	500	53
21	東京工科大学	吉田 亘	DNAメチル化反応を触媒する機能性核酸の同定	500	56
22	麻布大学	藤野 寛	中枢神経系持続感染ウイルスによるオートファジー調節機構の解明	500	59
23	岐阜女子大学	佐々木 恵理	教員養成段階におけるレジリエンスの向上を図る心理教育教材の開発	300	61
24	愛知学院大学	神原 亮	最適な部分床義歯設計を目指した解析システムの創成	500	63
25	日本福祉大学	宮田 美和子	パーキンソン病の脳深部刺激療法術後の就労支援に関する研究	300	65
26	名城大学	鈴木 秀和	セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築	500	67
27	同志社女子大学	川村 暢幸	哺乳類初期胚の細胞内膜ダイナミクスによるシグナル伝達制御	500	70
28	立命館大学	檜垣 彰吾	絶滅危惧種ホンモロコにおける <i>in vitro</i> 精子生産技術の開発	500	72

## Ⅱ 平成27年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金）研究課題一覧

	学校名	研究者名	研究課題	交付額 (千円)	頁
29	大阪医科大学	中山 聖子	血液疾患における線維化の機序の解明	500	74
30	広島国際大学	山崎 貴博	脳卒中後片麻痺者の自立歩行を阻害する身体的認知的特性の研究	500	77
31	摂南大学	丸山 如江	多糖アルギン酸輸送体の構造・機能解析	500	80
32	神戸芸術工科大学	宮本 万理子	超高齢化社会におけるcommonsスペースの利活用に関する研究	500	83
33	大阪人間科学大学	勝間 理沙	児童期の攻撃性と感情処理過程との関連についての基礎的調査研究	300	86
34	関西学院大学	菊谷 早絵	新規葉緑体タンパク質の探索と機能同定	500	89
35	甲南大学	松田 洋平	炭素14陽子弾性散乱測定による三体力の研究	500	91
36	産業技術短期大学	松原 孝典	天然由来材料を化学修飾した染色性の高い染毛料の合成	500	93
37	川崎医科大学	内藤 忠相	プロテオチューナー法を用いたウイルス増殖に関わる宿主機能解析	500	96
38	就実大学	野上(原) 愛	L-アスパラギナーゼ誘発アレルギーのモデル動物作製と治療法の開発	500	99
39	安田女子大学	永澤 貴昭	高校生競技者に対する増量を目的とした食事介入が身体組成の変化に及ぼす影響	500	102
40	久留米大学	川崎 竜太	生活保護利用者の就労支援過程の再構築に関する研究	300	105
41	日本薬科大学	澤口 能一	非侵襲的超音波による脳梗塞治療後の新規血管再開塞予防法の開発	500	107
42	福岡工業大学	下川 倫子	滴の変形の動的ダイナミクスに関する実験的研究	500	109
<b>交付額計</b>				<b>19,400</b>	

(注) 人文・社会科学の研究については30万円、自然科学の研究については50万円を、一律交付している。

**Ⅲ 平成 27 年度學術研究振興資金  
（若手研究者奨励金）研究報告**

# 肥満と関連する受容体GPRC5BによるATP合成制御シグナルの解明

東北医科薬科大学 薬学部 黒田 喜幸

## 1. 研究の目的

GPRC5B (5B) は、リガンド不明のGタンパク質共役受容体 (GPCR) である。近年、ヒトにおける5Bの遺伝子多型は、肥満度を表す指数であるBMIと関連することが報告された。これを支持するように、5B欠損マウスは体格が小さく、脂肪や肝臓が小さい。さらに、糖尿病患者の膵島細胞では5Bの発現が亢進しており、膵島細胞の生存を制御していることも報告されている。これらの現象に関わる5Bのリガンドやシグナル伝達機構の詳細は未だ不明であるが、これを明らかにする基礎研究の成果は、肥満や糖尿病などの病因解明や治療に向けた応用研究への発展が期待できる。

これまでの実験で、5Bを強制発現した細胞でATP量が低下するという結果を得ている。TORシグナルやサーチュインは、細胞のATP量を制御していること、また肥満やインスリン感受性に関わることが示唆されていることから、5BによるATP量の低下という現象に関与するシグナルおよび分子となり得ると考えた。5B、TORシグナル、サーチュインという3因子の相互作用を検討することで、肥満や糖尿病に関わる新たなシグナル伝達経路の発見につながるのではないかと考えた。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 5B発現細胞の生存・増殖における栄養環境の影響

培養細胞のATPは、主に培養液中のグルコースを代謝することで合成されると考えられる。ATPは生命活動のエネルギー源であることから、5B発現細胞におけるATP合成量低下が、生存や増殖に与える影響を評価した。

5B遺伝子を導入した培養細胞 (HEK293) を、グルコース不含培地またはグルコース含有培地で培養し、MTTアッセイを用いて細胞数の変化を経時的に測定した。

### (2) 代謝関連遺伝子の発現解析

ATP合成との関与が考えられる遺伝子について、5B発現細胞における変化を解析した。グルコースの取り込みに関与するグルコース輸送体 (GLUT)、ATP合成酵素などの脱アセチル化を通してATP合成を制御するサーチュイン、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化とATP合成を脱共役するタンパク質 (UCP) を解析の対象とした。

グルコース不含培地またはグルコース含有培地で24時間培養した5B発現細胞からRNAを抽出し、リアルタイムPCRにより遺伝子発現量を解析した。

## 3. 研究の特色

糖尿病、高脂血症、高血圧症などの生活習慣病に起因する疾患は、日本人の死因の上位を占め、国の医療費増大の原因ともなり、社会的な医療健康問題となっている。肥満は生活習慣病のリスク因子であり、肥満の予防および改善への対策が必要である。本研究の対象としている5Bは、既にヒトの肥満や糖尿病との関連が指摘されている。5Bから発せられるシグナルが、どのような経路をたどって肥満や糖尿病を誘発するのかを解明し、この経路を遮断しうる化合物等を見出すための基礎的研究は、将来の肥満予防および改善に向けた新規薬剤の開発を見据えた応用研究に発展することが期待できる。

## 4. 研究の成果

### (1) 5B発現細胞の生存・増殖における栄養環境の影響

5B遺伝子を導入した細胞をグルコース含有培地で培養し、24時間および48時間後にMTTアッセイをおこなった。24時間および48時間のどちらの時点においても、5B発現細胞の細胞数は、対照細胞の細胞数と差を認めなかった。しかし、グルコース不含培地を用いて同様の実験をおこ



なったところ、5B遺伝子導入48時間後において、5B発現細胞の細胞数が、対照細胞の細胞数と比較して多いことがわかった。グルコースは細胞の生存や増殖に必須の栄養素であるが、5Bを発現した細胞は、生存や増殖におけるグルコースへの依存度が低下すると考えられる。

また、この現象に関わるシグナルを調べるため、細胞の生存や増殖と関わりのあることが知られているホスファチジルイノシトール3リン酸キナーゼ (PI3K) シグナルとラパマイン標的 (TOR) シグナルを阻害剤により抑制し、同様の実験をおこなった。その結果、どちらのシグナルを阻害しても、グルコース不含培地における5B発現細胞数の増加が抑制された。このことから、5B発現細胞では、PI3K-Akt-TORシグナルが亢進しており、低栄養環境における細胞の生存性が上昇していると考えられた。

## (2) 代謝関連遺伝子の発現解析

5B発現細胞を、グルコース不含培地またはグルコース含有培地で24時間培養し、グルコース代謝やATP合成に関与するGLUT、サーチュイン、UCPのmRNAの変化をリアルタイムPCRにより解析した。グルコース含有培地では、5Bを発現しても、いずれの遺伝子の発現量にも変化が見られなかった。一方、グルコース不含培地で培養された5B発現細胞では、対照細胞に比較して、GLUT1およびGLUT3遺伝子の発現が亢進していた。サーチュインおよびUCPについては、変化が認められなかった。5Bが直接あるいは間接的に、細胞外のグルコース濃度を感知し、グルコースの取り込みに関わるGLUTの遺伝子発現を上昇させていることが示唆された。

次に、5B発現細胞のグルコース不含培地での培養によるGLUT遺伝子の発現亢進にも、PI3KやTORシグナルが関与するのかを調べるため、阻害剤を用いた実験をおこなった。その結果、TORシグナルを阻害した場合、GLUT遺伝子の発現亢進が抑制されることがわかった。しかし、PI3Kシグナルの阻害では、発現が亢進したままであった。5B発現細胞におけるGLUT遺伝子の発現誘導は、PI3K以外のシグナルがTORを活性化させることで起こる可能性が示唆された。

本研究により、5Bはグルコース不足時にPI3K-Akt-TORシグナルを亢進し、細胞のグルコースへの依存度を低下させるとともに、GLUT発現を亢進させることでグルコース取り込み能を上昇させ、飢餓状態における細胞の生存性を高める役割をもつ可能性が示唆された。今後、5Bを発現した脂肪細胞が、低栄養状態で生存性が上昇するか、それが個体の肥満につながるかを検討していきたい。

# スーパーピクセルを用いた病理画像中の構造認識法の開発 —マルチスペクトル画像による高精度化の検討—

埼玉医科大学 保健医療学部 石川 雅浩

## 1. 研究の目的

肝細胞がんの確定診断には、病理診断が重要な役割を担っている。しかし病理診断は、専門医の経験に基づいて診断される部分があり定量性の低さが指摘されている。これに対して、画像処理による病理組織学的所見の定量化への期待が高まりつつある。病理医の診断に合致した定量化情報を精度良く算出するためには、病理画像中の組織構造の抽出技術が必須である。

本研究では、スーパーピクセルごとにスペクトル波形を求め、各構造へ分類することで病理画像中の構造認識実現を目指す。また、基礎的研究としてRGBよりも空間の広いMultispectral Image (MSI) を使用し、より頑健で高精度な構造認識技術の開発を行う。

## 2. 研究の計画・方法

まず、HE肝病理画像のMSIを撮影する。次に、MSIからRGB画像を生成し、スーパーピクセルを算出する。得られた、スーパーピクセルごとに形状特徴やMSIから特徴量を算出する。最後に、機械学習を用いてスーパーピクセルごとに各構造へ判別することで病理画像中の構造認識を目指す。

## 3. 研究の特色

本申請の特色として、第一にスーパーピクセルを用いた病理画像に適した構造認識技術の開発があげられる。第二に、MSIによる識別精度の高精度化の導入があげられる。病理画像の構造認識法として、スーパーピクセルとマルチスペクトルを組み合わせた研究は世界的にも新しい視点からのアプローチである。

## 4. 研究の成果

### (1) MSIによる色補正 (スペクトル補正)

本研究では色素量推定に基づいてスペクトル波形を補正する手法を実装した。

#### ① スペクトル画像の取得

本研究では所有するエバ・ジャパン社製のマルチスペクトルカメラを制御するソフトウェアを購入し、MSIを取得することとした。

#### ② 色素量に基づくスペクトル波形の補正

まず、基盤技術となる色素量推定について述べる。ランバート・ベールの法則より、ある点の波長 $\lambda$ における吸光度 $a(\lambda)$ は、色素量 $c_k$ と各色素に対応した吸収係数 $\varepsilon_k$ の線形和により表すことが可能である。この時、 $k$ は色素の数である。それぞれ波長方向に151次元でサンプリングされており、行列を用いた離散モデルで表すと次式のように表せる。

$$\begin{bmatrix} a(\lambda_1) \\ a(\lambda_2) \\ \dots \\ a(\lambda_{151}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1(\lambda_1) & \varepsilon_2(\lambda_1) & \varepsilon_3(\lambda_1) \\ \varepsilon_1(\lambda_2) & \varepsilon_2(\lambda_2) & \varepsilon_3(\lambda_2) \\ \dots & \dots & \dots \\ \varepsilon_1(\lambda_{151}) & \varepsilon_2(\lambda_{151}) & \varepsilon_3(\lambda_{151}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C(\lambda_1) \\ C(\lambda_2) \\ \dots \\ C(\lambda_{151}) \end{bmatrix}$$

従って、 $\mathbf{a} = \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{C}$ と表すと色素量 $\mathbf{C}$ は $\boldsymbol{\varepsilon}$ の擬似逆行列を吸光度ベクトル $\mathbf{a}$ に乘算することによって求めることが可能である。色素量推定により得られた色素量 $c_k$ に補正係数 $w_k$ をかけることにより補正した吸光度 $\bar{a}$ を得ることができる。本研究では、補正係数 $w_k$ を基準画像の色素量を各画像の色素量で除算して決定することとした。提案法により補正した波形からRGB画像を構成した結果を図1に示す。図1(a)が基準画像であり、図1(b)が補正対象画像であり、補正係数を求めて補正した結果が図1(c)である。図1(c)を確認すると基準画像の色素量に補正できていることが確認できる。

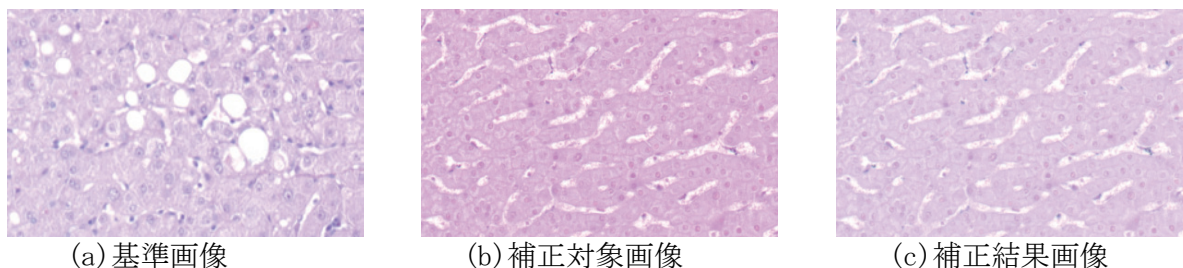


図1 提案法による色素量補正結果

③ 補正した各画素のスペクトル波形を用いた組織構造の分類

提案法を用いることで色情報のみで組織の判別精度が向上するかについて検討を行った。分類には、基準画像に脂肪滴、細胞核、細胞質、類洞、リンパ球のアノテーションを与え、各組織から100個の波形をランダムに選択し基準波形とした。様々な染色状態の画像を6枚(A~F)撮像し基準画像に合わせて色素量を補正してから、基準波形と各画素の波形の差の二乗和が最小になる組織へラベル付けすることとした。加えて、再構成したRGB画像からスーパーピクセルを算出し、スーパーピクセルごとに平均吸光度を求め、再度ラベリングすることとした。スーパーピクセルの算出にはSimple Linear Iterative Clustering(SLIC)を用いた。分類結果を表1に示す。波形補正を行うことで、平均精度が50%から70%に20%改善した。また、スーパーピクセル単位で平均波形を代表値とした場合6枚の画像で平均精度87%の精度が得られた。本研究成果は参考文献[1]にて発表済みである。

表1 色素量補正による画素単位の識別精度

	A	B	C	D	E	F
補正無し	0.55	0.25	0.69	0.11	0.81	0.59
補正有り	0.57	0.71	0.66	0.73	0.79	0.72
Superpixel	0.65	0.86	0.86	0.98	0.89	0.97

(2) MSIを使用した器械学習による肝病理画像の組織分類

画素単位の分類とスーパーピクセルを組み合わせ、色素量補正無しに機械学習により組織推定が可能かを検討した。機械学習にはSupport Vector Machine(SVM)を使用し、スーパーピクセルの算出にはSLICを用いた。分類のクラスは細胞核、細胞質、類洞、リンパ球、線維を対象とした。機械学習の精度評価として10fold-cross validationを用いた。分類結果を表2に示す。結果として、RGB画像よりもマルチスペクトル情報を用いることにより、全体の分類精度が69%から87%に18%改善した。これは、色素量による違いは非線形な機械学習法を用いることで、ある程度は吸収可能な事を示していると考えられる。本研究成果は参考文献[2]にて発表済みである。

表2 機械学習による分類精度

	16バンド	RGB3値
細胞核	0.92	0.83
類洞	0.82	0.80
リンパ球	0.92	0.92
線維	0.79	0.85
細胞質	0.88	0.63
全体	0.87	0.69

#### 参考文献

- [1] 石川雅浩ほか、「マルチスペクトル画像による色素量補正を用いたHE染色肝病理画像中の構造認識」、2016年電子情報通信学会総合大会、2016年3月15日～18日
- [2] 橋本江美、石川雅浩ほか、「マルチスペクトル画像を使用した肝病理組織標本の組織分類の検討」、2016年電子情報通信学会総合大会、2016年3月15日～18日

# 身体活動分析システムを用いた行動パターン分析

和洋女子大学 家政学群 難波 秀行

## 1. 研究の目的

身体活動の維持・増進は生活習慣病のリスクを下げ、メンタルヘルス不良の一次予防としても重要視されている（厚労省、身体活動基準2013）。しかし、日本人の身体活動はこの10年で減少傾向が報告されている（厚労省、国民健康栄養調査2012）。我々は1台数万円の3軸活動量計と同等の測定精度を持つ身体活動測定システムを開発してきた（特開2013-085611、難波秀行）。そこで、スマートフォンでも利用可能なアプリ版の身体活動分析ツールを開発し、ICT（情報通信技術）を用いた行動パターン分析を行うことを目的とした。

- (1) 身体活動パターンの分析により身体活動が高い人、低い人の特徴を明らかにする。
- (2) 身体活動のドメインを運動・スポーツ、移動、余暇活動、仕事（職業、家事）、睡眠に分類し階層化ニューラルネットワークを用いて特徴を明らかにする。
- (3) 身体活動とメンタルヘルスの関係について、ストレス対処能力として首尾一貫性（SOC: Sence of Coherence）、うつ病の自己評価尺度（CES-D Scale）を用いて明らかにする。

## 2. 研究の計画・方法

- (1) システムの試験運用、PCおよびスマートフォン画面での動作確認
- (2) データ集収および分析
  - ① 一般的な成人男女20～60歳代を居住地、職業、学歴、年収等、幅広く募集する。
  - ② 心理社会的要因（気分プロフィール、ストレス対処能力、主観的健康感、性、年齢、婚姻状況、職業、教育歴、世帯収入、居住地など）をデータベース化する。
  - ③ 心理的指標と身体活動の特徴を明らかにする。

## 3. 研究の特色

- (1) ICTを用いた仕組み
  - ① インターネットにつながる環境さえあれば世界中どこにいても利用できる。
  - ② 低コストで数万人規模の身体活動量の測定が可能。
  - ③ 活動内容と強度含めたライフスタイル分析が可能。
  - ④ 測定結果をインタラクティブ（双方向）にフィードバックできる。
- (2) 多人数の行動パターンの分析とメンタルヘルスの関係
  - ① 身体活動の強度別および内容別にその特徴や相互関係を検討する。
  - ② 心理的指標に優れている人、そうでない人の身体活動の特徴について検討する。

## 4. 研究の成果

- (1) 身体活動パターン分析

男女2738人を対象に24時間行動記録を週7日行わせた。表1には、分析対象者の身体的特徴および身体活動レベル、平均METs、活動強度別時間を示した。全体の平均年齢は44.0±10.7歳（20～69歳）、平均BMI 22.4±3.4、身体活動レベルは1.75±0.32であった。本研究の対象者の身体活動レベルは、食事摂取基準で示された値とほぼ同様であったことから平均的な日本人の活動レベルであったといえる。活動強度別の時間では、平均睡眠時間が387分（26.8%）、座位行動1.1～1.5METsが622分（43.2%）、低強度1.6～2.9METsが122分（8.5%）、中強度3.0MET以上が151分（10.5%）、4.0METs以上が36分（2.5%）であった。

表1 対象者の身体的特徴および身体活動につ

	全体 (n = 2738)	男性 (n = 1450)	女性 (n = 1288)
年齢 (year)	44.0 ± 10.7	45.6 ± 9.1	42.2 ± 12.0
体重 (kg)	61.1 ± 12.4	68.2 ± 10.1	53.0 ± 8.4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.4 ± 3.4	23.4 ± 3.4	21.2 ± 3.1
年代 (人)			
20~29歳	174 6.4%	0 0.0%	174 13.5%
30~39歳	760 27.8%	430 29.7%	330 25.6%
40~49歳	1050 38.3%	591 40.8%	459 35.6%
50~59歳	540 19.7%	304 21.0%	236 18.3%
60~69歳	214 7.8%	125 8.6%	89 6.9%
身体活動レベル (PAL)	1.75 ± 0.32	1.71 ± 0.37	1.79 ± 0.26
平均METs	1.43 ± 0.27	1.40 ± 0.30	1.47 ± 0.21
活動強度別時間 (分)			
睡眠	387 26.8%	376 26.1%	398 27.6%
1.1~1.5METs	622 43.2%	662 46.0%	576 40.0%
1.6~2.9METs	122 8.5%	107 7.4%	140 9.7%
3.0METs以上	151 10.5%	125 8.7%	180 12.5%
4.0METs以上	36 2.5%	47 3.3%	24 1.7%

図1には1日（睡眠を除く）に占める活動強度別時間と身体活動レベルの関係について示した。身体活動レベルと座位行動（1.1～1.5METs未満）、低強度（1.5～2.9METs未満）、中高強度（3METs以上）の間にそれぞれ、 $r=-0.581$  ( $p<0.01$ )、 $r=0.226$  ( $p<0.01$ )、 $r=0.766$  ( $p<0.01$ )の関連が見られた。本研究の結果から、座位行動時間は、中高強度と同じように身体活動レベルに影響すると考えられた。特にグラフ右下に着目すると1日の80%程度を座位行動で過ごすとは身体活動レベルは1.5程度に多く分布している。一方、中高強度が20~30%を占めると1.75~2.0に多く分布している。低強度活動時間と身体活動レベルの関連は弱かったが、思い出し法の限界点として、低強度活動の記憶想起の曖昧さと15分区切りの方法に課題があった可能性が考えられる。

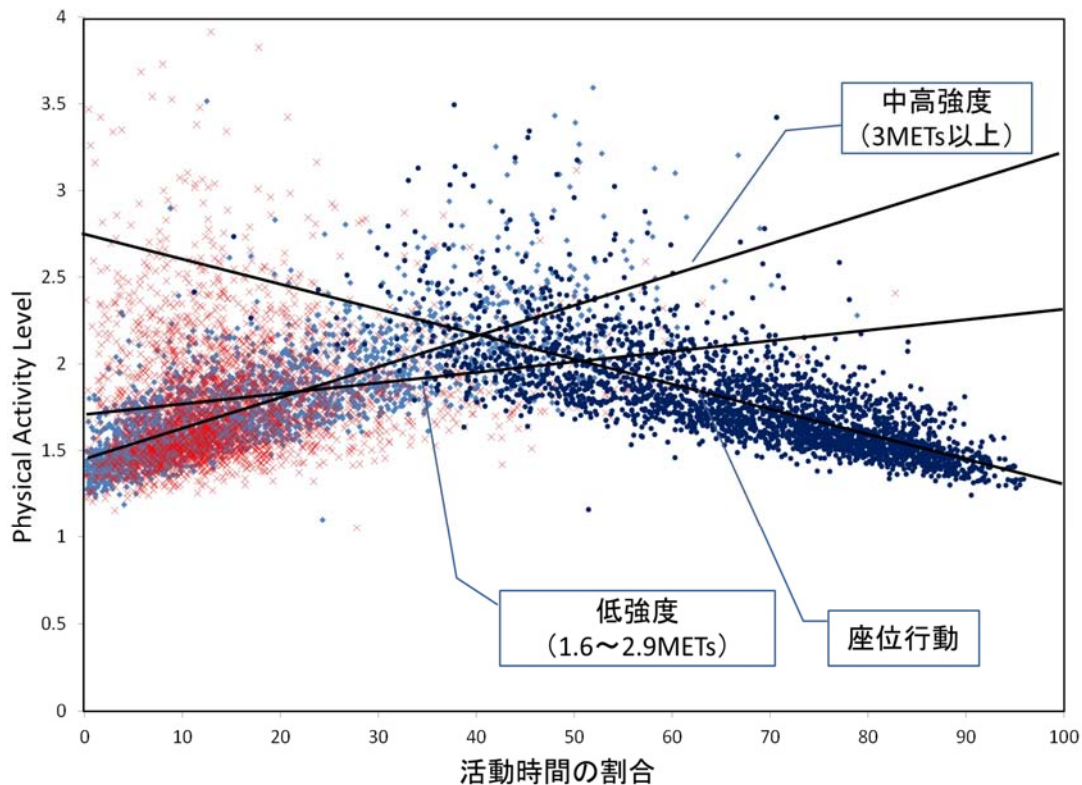


図1 1日に占める活動強度別時間と身体活動レベルの関係

(2) 身体活動のドメイン分析

階層化ニューラルネットワークの結果を図2に示した。身体活動レベルの予測に睡眠時間、日常生活時間、移動時間、仕事時間、スポーツ活動時間を独立変数にしたところ、これらの因子が複合的に隠れ層に影響しプラス方向にはスポーツ、移動、日常生活が影響し、マイナス方向には仕事、日常生活が影響していることが示された。独立変数の正規化した重要度はスポーツ100%、仕事63.2%、日常生活58.1%、移動58.1%、睡眠41.2%の順であった。

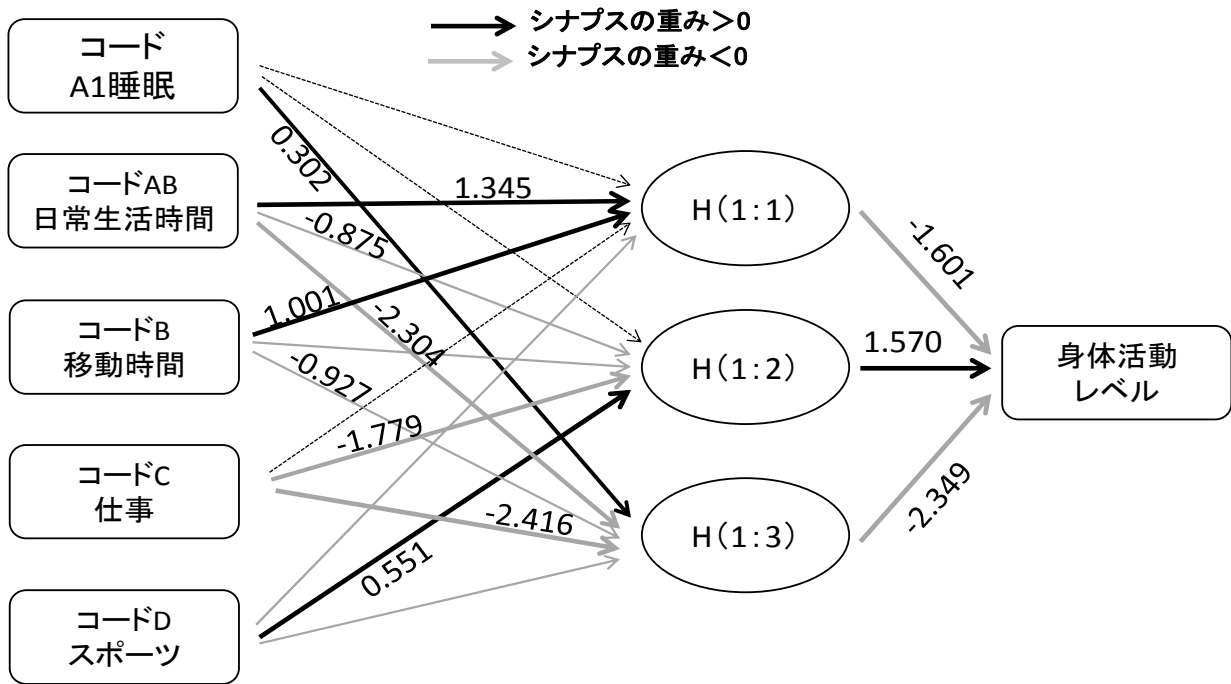


図2 身体活動レベルの階層化ニューラルネットワーク分

(3) 身体活動とメンタルヘルスの関係

メンタルヘルスと身体活動の関係について、96人を対象に検討したところ平均METsとSOC得点およびSES-D得点の間の相関係数はそれぞれ $r=0.083$  ( $p=0.421$ )、 $r=-0.033$  ( $p=0.747$ )でいずれも身体活動との間に有意な相関関連は見られなかった。SES-Dのうつ傾向がある群はない群に比較して中強度の活動時間が1日当たり30分程度短い傾向 ( $p=0.157$ )であったが、低強度の活動時間には差が見られなかった。今回の結果から、身体活動とメンタルヘルスについて明確な関連を示すことはできなかったことから、今後さらに対象者を増やした上で詳細な分析が必要と考えられた。

(4) 総括

スマートフォンでも利用可能なアプリ版の身体活動分析ツールを用いてデータを収集することができた。2738人のデータ分析により身体活動レベルに影響する活動強度別の時間、身体活動のドメインについて3METs以上の活動、スポーツが与える影響が強いことが示された。メンタルヘルスと身体活動については、今回の結果からは更なる検討が必要なが示された。

参考文献

1. Westerterp KR. Pattern and intensity of physical activity. Nature 410:539. 2001. PubMed PMID: 11279482.
2. 多変量解析によるデータマイニング. 石村貞夫ら. 共立出版 pp16-35, 2010.
3. Namba H, Yamada Y, Ishida M, Takase H, Kimura M. Use of a Web-Based Physical Activity Record System to Analyze Behavior in a Large Population. J Med Internet Res2015;17(3):e74.

# 胎仔性皮膚の再構築からの皮膚パターン形成のメカニズムの解析

青山学院大学 理工学部 石田 研太郎

## 1. 研究の目的

本研究は、単一化したニワトリ胚の皮膚細胞を生体外で立体的に配置することにより、皮膚付属器官の羽毛原基を含む皮膚を再構築する独自の技術を実験モデルとして、器官の大きさ・位置・数の決定と、その集積としての皮膚パターンを制御する仕組みの解析を目的とした。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 再生羽毛原基誘導場の再構築における細胞の挙動解析

はじめに、皮膚細胞の再構築から0.5、1.0、2.0、3.0日後において、羽毛原基の誘導期に発現する遺伝子の発現のパターンを*in situ* hybridization法により解析した。この解析により、ランダムに配置された組織幹細胞がどのようなステップを経て秩序立てられているのかを明らかにした。また、蛍光試薬により細胞を標識した再生皮膚の発生を蛍光顕微鏡で観察・追跡することによって、再生羽毛原基誘導時の細胞の由来や移動を細胞レベルで検討した。

### (2) 羽毛原基パターン形成におけるFGF/ERKシグナルの機能解析

FGF/ERKシグナルは外胚葉性器官発生で重要な役割をもつシグナル経路の一つである。再生羽毛原基の誘導時期にFGF/ERKシグナルを抑制すると羽毛原基が肥大化することを見いだしていた。そこで、FGF/ERKを阻害したときの羽毛原基形成過程における遺伝子発現の変化を解析した。

### (3) 羽毛原基パターン形成を制御する遺伝子の機能解析

(2)の解析で発現に変化が見られた遺伝子またはシグナル経路は、FGF/ERKシグナルの下流で羽毛原基パターン形成を直接的に関与している可能性が期待された。そこで、Wnt/ $\beta$ -catenin、Notch、BMPシグナルの各種阻害剤を用いて、再生羽毛原基の形成とパターン形成への影響を解析した。

### (4) 羽毛原基パターン形成制御のシミュレーションモデルの構築

物理シミュレーションソフトCOMSOLを用いて、数学的にランダムな初期条件（皮膚細胞の再構築直後）から安定状態（羽毛原基パターン形成の決定）に自律的に到達するまでの遺伝子発現と細胞動態の経時変化の数理シミュレーションモデルの構築を試みた。

## 3. 研究の特色

### (1) 細胞工学・分子生物学・数理生物学による器官原基誘導の仕組みへのアプローチ

本研究では、操作性の高い単一化した細胞から、羽毛原基誘導の場としての皮膚を細胞工学的に再構築し、羽毛原基が誘導される過程を顕微鏡下で観察できる。また、数理生物学的手法と組み合わせることにより、モデル上のパラメーターを実験的に操作し、結果と比較検証できる。以上のことから、本研究は皮膚上の器官原基の仕組みの解明に向けた、複数の切り口からの新しいアプローチになると考えられる。

### (2) 器官再生技術の応用による構成的発生生物学への展開

近年、多能性幹細胞や組織幹細胞を分化誘導することによって、培養レベルで立体的な器官の構築を達成した研究が相次いで報告されている。現在は複数の細胞種で構成される1種類の器官の誘導が主流であるものの、近い将来、関連した複数の器官、あるいは、ある性質を有する場と付随する複数の器官による複合体を誘導する方向に研究が展開すると予測される。単一化細胞集団の再構築によって皮膚と羽毛原基の複合体を再生させ、羽毛原基誘導の分子機構の解明を目指す本研究は、上記の一連の研究の展開における1つのマイルストーンになることが期待される。



## 4. 研究の成果

### (1) 再生羽毛原基誘導場の再構築における細胞の挙動解析

はじめに、胚齢7日目の背中の皮膚細胞を再構築し、器官培養0.5、1.0、1.5、2.0、3.0日後の遺伝子発現パターンを解析した。その結果、再構築直後は上皮・間葉境界面にランダムに発現していた遺伝子が、時間経過に伴い自律的にパターン形成し、羽毛原基の形成に至ることが明らかとなった（図1）。次に、再生皮膚・羽毛原基の細胞の由来を解析するため、PKH67とPKH26で上皮・間葉細胞をそれぞれ標識した再生皮膚を作製した。その結果、再生羽毛原基の上皮と間葉は、もともとの細胞の由来を維持したまま発生することが明らかとなった（図2）。

### (2) 羽毛原基パターン形成におけるFGF/ERKシグナルの機能解析

再生羽毛原基のパターン形成におけるFGF/ERKシグナルの機能を解析するため、阻害剤によってパターン形成を阻害した時の遺伝子発現を解析した。その結果、再生羽毛原基の間葉細胞の融合が観察された。以上の結果から、FGF/ERKシグナルは羽毛原基の間葉細胞のパターン形成の制御に関わることが示唆された（図3）。

### (3) 羽毛原基パターン形成を制御する遺伝子の機能解析

さらに、天然の羽毛原基の発生に関与することが知られているWnt/ $\beta$ -catenin、Notch、BMPシグナルの、再生羽毛原基の発生における機能を解析した。Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルを阻害すると、再生羽毛原基の誘導が抑制され、羽毛原基の形成が完全に阻害された（図4）。Notchシグナルを阻害すると、再生羽毛原基は誘導されるものの原基の伸長が有意に抑制された（図5）。また、BMPシグナルを阻害すると、羽毛原基のサイズが抑制レベルに相関して大きくなった（図6）。以上の結果から、再生羽毛原基の形成とパターン形成はこれらの主要なシグナル経路群によって厳密に制御されていることが示唆された。

なお、ここまでの研究成果は論文にまとめて学術雑誌で発表した。

**Kentaro Ishida\*** & Toshiyuki Mitsui (\*corresponding author)

Generation of bioengineered feather buds on a reconstructed chick skin from dissociated epithelial and mesenchymal cells

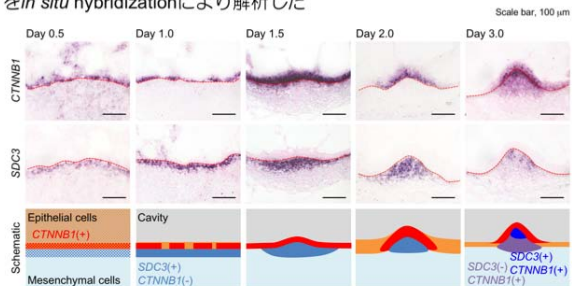
Development, Growth & Differentiation 58(3), 303-314, 2016

### (4) 羽毛原基パターン形成制御のシミュレーションモデルの構築

(1)で明らかにしたように、再生皮膚における羽毛原基の再生は、遺伝子発現がランダムな初期条件から時間経過に伴い自律的にパターン形成した結果として起こる。この特徴から、様々な生物パターンの記述に用いられる反応拡散理論を土台としたGierer-Meinhardt type modelが適用可能だと考えられた。また、人為的に再構築して限定された面積の羽毛原基形成場の端から一定の距離を保持した羽毛原基の形成は、Painterら(2012)によって報告された境界条件における分子拡散条件を取り入れた。その結果、ランダムな初期条件からの時間経過によって形成場の面積に相関した数のスポットパターンを自律的に形成する数理モデルを構築した。

図1：羽毛原基誘導過程の自律的パターン形成

皮膚の再構築から羽毛原基が誘導されるまでの遺伝子発現の経時変化を *in situ* hybridization により解析した

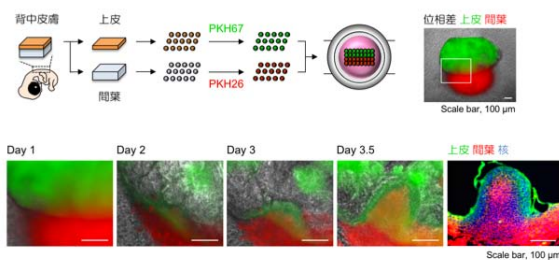


皮膚細胞を実験的に再構築することにより、羽毛原基誘導に関与する上皮・間葉の遺伝子発現が自律的にパターン形成した

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図2：蛍光標識再生皮膚による細胞の由来の解析

単一化した上皮・間葉細胞を蛍光色素で標識した再生皮膚を作製した

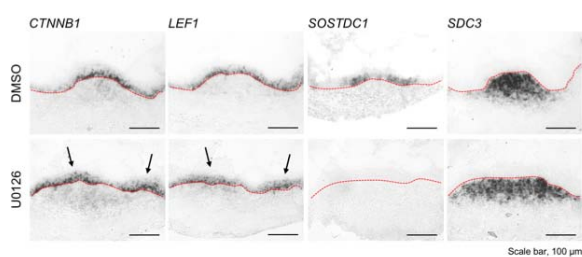


再生皮膚・羽毛原基の上皮・間葉組織は、それぞれ単一化上皮・間葉細胞に由来していることが明らかとなった

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図3：FGF/ERK経路の機能解析

FGF/ERK経路を阻害したときの羽毛原基パターン形成過程の遺伝子発現を *in situ* hybridization によって解析した

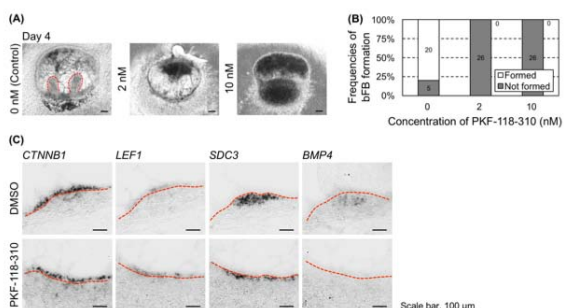


FGF/ERK経路の阻害によって羽毛原基の間葉細胞のパターン形成が阻害され、羽毛原基が融合することが示唆された

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図4：Wnt/ $\beta$ -catenin経路の機能解析

再生皮膚・羽毛原基を用いてWnt/ $\beta$ -catenin経路の機能解析を試みた

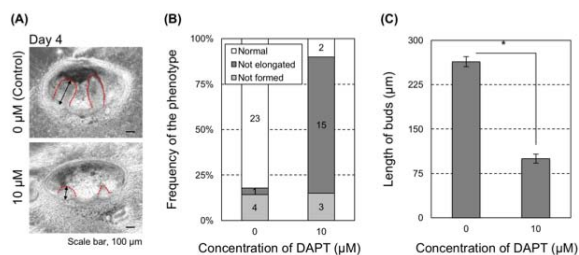


Wnt/ $\beta$ -catenin経路は羽毛原基の形成に必須であることが示された

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図5：Notch経路の機能解析

再生皮膚・羽毛原基を用いてNotch経路の機能解析を試みた

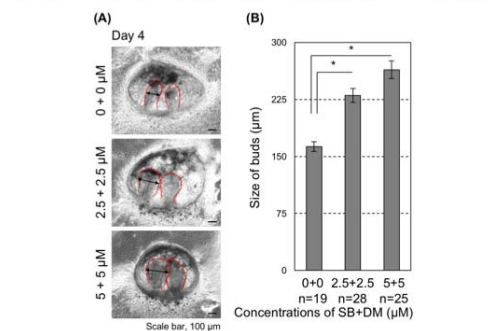


Notch経路は羽毛原基の伸長に関与するが示された

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図6：BMP経路の機能解析

再生皮膚・羽毛原基を用いてBMP経路の機能解析を試みた



BMP経路は羽毛原基の大きさの制御に関与するが示された

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

# 新規遺伝子編集ツールを用いた遺伝性疾患の細胞治療の試み

北里大学 医学部 長尾 和右

## 1. 研究の目的

難治性疾患の多くを占める遺伝性疾患において、有効な治療法が開発されている疾患は少ない。その中で遺伝子治療は有望な治療手段として社会の注目を集めてきた。最近注目を浴びているiPS細胞は遺伝性疾患を始めとする疾患に対する再生医療に向けた切り札と考えられているものの、遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常は、iPS細胞でも保持されたままであることが再生医療の障壁と考えられている。そこで本研究では、当研究室で以前より遺伝子解析を行っている常染色体優性の高発癌遺伝病である母斑基底細胞癌症候群(NBCCS、Gorlin症候群)由来不死化リンパ芽球株(LCL)及びiPS細胞のもつ遺伝子変異を新規の遺伝子編集ツールであるCRISPR/Cas9システムを用いて正常配列に戻すことにより新たな細胞治療への足がかりを築くことを目的とする。

## 2. 研究の計画・方法

当研究室で集積されているNBCCS患者由来線維芽細胞およびLCL、もしくは患者由来線維芽細胞から作製したiPS細胞を用いてCRISPR/Cas9システムによる遺伝子編集を行う。CRISPR/Cas9システム発現用プラスミドベクターはaddgene社から購入したpX330を使用し、原則症例毎に遺伝子編集の標的となる配列を組み込んだベクターを構築する。作製したプラスミドベクターをこれらの細胞にリポフェクション法もしくは電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行う。遺伝子導入後の細胞を96ウェルプレートなどに限界希釈し、クローン化された細胞のコロニーが出現するのを待つ。得られたクローン化細胞からゲノムDNAを抽出し、標的とした部位をPCRで増幅後、塩基配列を解析し、スクリーニングを行う。

## 3. 研究の特色

CRISPR/Cas9システムは強力な遺伝子編集ツールとして基礎医学分野で急速に普及しつつあるが、ヒト細胞に応用した例は少ない。さらに遺伝性疾患患者由来の不死化リンパ芽球株(LCL)あるいはiPS細胞から、遺伝子変異が修復された正常遺伝子型の細胞を作製する試みは極めて独創的である。NBCCSは*PTCH1*遺伝子の変異によって生ずる常染色体優性遺伝病であり、小奇形と高発癌を特徴とする。NBCCSにおいては様々な腫瘍が発症するが、その代表は顎骨内に発生する角化嚢胞性歯原性腫瘍と皮膚癌である基底細胞癌である。いずれも直ちに致命的となるものではないが、繰り返される外科的摘除術によって顎骨や皮膚に障害が生じQOLの低下が進行する。これに対して正常遺伝子型に編集された自己iPS細胞を用いた細胞治療は極めて有効な治療法となる可能性がある。更に本研究で用いる方法は他の遺伝子の編集にも応用可能であるため、広範囲な遺伝性疾患の細胞治療に貢献する手技となることが期待される。

## 4. 研究の成果

当研究室で遺伝子解析を行ったNBCCS患者症例の中から3症例を選択し、保存されていた患者由来線維芽細胞に4因子(OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC)をコードしたセンダイウイルスを感染させ、iPS細胞株を複数樹立した(国立成育医療センター研究所との共同研究)。これらのiPS細胞株を用いた遺伝子編集が可能かどうかを検討するため、まず*PTCH1*遺伝子座を含む約1.1 Mbの領域を欠損した症例のiPS細胞株を用いて遺伝子編集を試みた。*PTCH1*遺伝子のエキソン6上にCRISPR/Cas9システムの標的配列を設計し、pX330プラスミドベクターに組み込んだ。構築したベクターとピューロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミドをLonza社4D-nucleofector装置を用いて電気穿孔法により共遺伝子導入した。遺伝子導入48時間後にピューロマイシンによる薬剤選択を24時間行い、クローン化されたコロニーが出現するまで培養を続けた。得られた各クローン細胞79

株からゲノムDNAを抽出し、標的配列を含む領域をPCRで増幅後、塩基配列を解析したが、遺伝子編集されたクローンを得ることができなかった。そこで、標的配列を複数設計し、同様の実験を行ったところ、配列によって編集効率に大きな差があることが明らかとなった。最も効率よく編集を行えた標的配列では解析した21クローン中5クローンで編集されていた。同じ標的配列を用いてHeLa細胞で同様の実験を行ったところ、iPS細胞で編集が見られなかった標的配列でもHeLa細胞では比較的効率良く編集が行われており、他の配列に関してもiPS細胞に比べ編集効率が高かった。このことからiPS細胞では同一の標的配列を用いた場合でも遺伝子編集が起こる確率がHeLa細胞に比べ低いことが確認された。現在のところ標的配列から編集効率の差を判断する方法が発表されていないため、使用する標的配列で効率よく遺伝子編集が行えるかどうかは、実際に遺伝子導入を行ってみるよりほかない。そこで現在は標的配列を複数種類設計してベクターを構築し、遺伝子導入を行ってクローンの解析を続けているところである。本研究課題において遺伝子編集により突然変異を正常配列に戻したクローンを得るには至らなかったが、iPS細胞を用いた遺伝子編集と細胞治療の実践に向けて貴重な知見を得ることができた。

# γδ T細胞によるマラリア免疫記憶制御機構の解明 —マラリア感染防御機構解明のための基礎研究—

杏林大学 医学部 井上 信一

## 1. 研究の目的

マラリアは、全世界で年間約2億人の罹患者と100万人近い死亡者を出し、エイズや結核と並び世界三大感染症の一つとされている。マラリア根絶のためにワクチンの開発が待望されているものの、現在のところ開発成功に至っていない。この現状を打破するためには、マラリア原虫が感染した際の防御免疫機構を詳細に解明することが重要となる。これまでに、マラリア患者の末梢血や脾臓でγδ T細胞が増加しているとの報告があったことから、γδ T細胞とマラリアの関連性が示唆されてきた。我々は、マラリア原虫初感染において、γδ T細胞が樹状細胞の活性化を促進することによりマラリア防御免疫の亢進に寄与していることを報告してきた。しかしながら、脾臓でγδ T細胞の増加が見られるのは、樹状細胞の活性化が起こる感染初期より後の時期であった。つまり、このγδ T細胞の増加がマラリア原虫感染防御においてどのような意味をもっているのかは謎のままである。

そこで我々は、γδ T細胞がマラリア免疫記憶の形成や維持に働いているのではないかという仮説を立てた。本研究では、マウスマラリア原虫感染モデルを用いて、自然免疫様リンパ球の一つであるγδ T細胞が、マラリア原虫に対する免疫記憶細胞の分化や維持にどのような影響を及ぼしているのかについて解明することを最終目標としている(図1)。

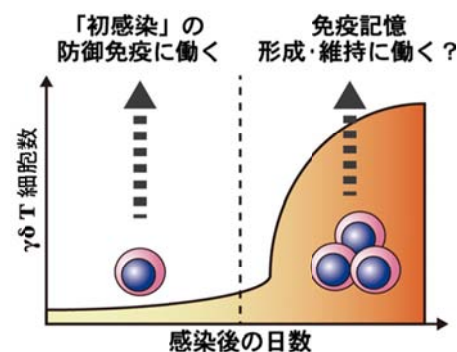


図1：感染経過とγδ T細胞機能の関係性

## 2. 研究の計画・方法

γδ T細胞によるマラリア免疫記憶の制御機構を解明するために、マウスマラリア原虫感染モデルを利用して以下の実験をおこなった。

- (1) マラリア原虫の感染赤血球 $1 \times 10^4$ 個を野生型C57BL/6Jマウスの尾静脈に接種し、感染させた。
- (2) マラリア原虫の感染状況を調べるために末梢血塗抹標本をギムザ染色して感染赤血球率を算出した。
- (3) マラリア原虫免疫記憶モデルを確立した。(弱毒株マラリア原虫である*Plasmodium berghei* XAT株に感染した後に自然治癒したマウスは、強毒株マラリア原虫である*Plasmodium berghei* NK65株を感染させても死亡することなく原虫を免疫的に排除出来るようになる。)
- (4) γδ T細胞の重要性を調べるために、γδ T細胞を欠損させる抗体GL-3を腹腔内投与した。
- (5) γδ T細胞の遺伝子発現を網羅的に調べるためにマイクロアレイ解析をおこなった。

## 3. 研究の特色

マラリア流行地域の住民は、幼児期に繰り返しマラリア原虫に感染するものの、再感染を免れる防御免疫を獲得することはまれで、せいぜい重篤な症状が抑制される程度の免疫を獲得するのみである。これらのことから、マラリアにおいては免疫記憶細胞が分化・維持されにくいと考えられており、マラリア原虫に対する宿主の免疫記憶細胞の分化とその維持機構の解明は喫緊の課題である。しかし、免疫記憶研究は精力的に研究が行われているものの、免疫記憶細胞の分化や維持の機序は未だ多くの謎に包まれている。弱毒株マウスマラリア原虫を感染させたマウスでは、強いマラリア防御免疫が誘導され長期の免疫記憶が維持されることがわかっている。そして極めて最近、申請者は、γδ T細胞がマラリア免疫記憶に強い関連性があるとのデータを得た。γδ T細胞

がマラリア免疫記憶に関与しているという報告はないことから、このマウス感染モデルを用いて $\gamma\delta$  T細胞機能を詳細に検討することにより、新規の免疫記憶制御機構が紐解かれることとなる。本研究の完遂によって、 $\gamma\delta$  T細胞による免疫記憶細胞に対する制御機序が明らかになれば、マラリアワクチン開発にとって有用な多くの情報が得られるはずである。

#### 4. 研究の成果

強毒株マラリア原虫(*P. b.* NK65株)を野生型マウスに接種すると、高原虫血症を呈して死亡した(図2; ○)。一方、弱毒株マラリア原虫(*P. b.* XAT株)をWTマウスに感染させると、末梢血中の感染赤血球の割合が3回ほどの上昇下降を繰り返した後に自然治癒した。この*P. b.* XAT株感染耐過マウスに*P. b.* NK65株を感染させると、マウスは死亡することなく原虫を免疫的に排除できたことから、マラリア原虫に対する免疫記憶が形成されていることが示された(図2; ●)。我々は、このマラリア原虫感染の免疫記憶実験系を用いることで、 $\gamma\delta$  T細胞と免疫記憶の関連性の手がかりを探った。まず、*P. b.* XAT株をWTマウスに感染させて免疫的に排除させて120日後、GL-3抗体によって $\gamma\delta$  T細胞を除去した。そして、コントロール群には非特異的IgGを投与した。その60日後に、各群のマウスに強毒株*P. b.* NK65を感染させて経時的に末梢血中の感染赤血球の割合を算定して比較することで、マラリア免疫記憶における $\gamma\delta$  T細胞の影響を調べた。その結果、一過性の $\gamma\delta$  T細胞欠損を引き起こしたマウスは*P. b.* NK65感染により死亡することはないものの、コントロールよりも原虫の排除効率が悪く、免疫記憶機能が低下していることが分かった(図2; ▲△)。

$\gamma\delta$  T細胞においてマラリア免疫記憶の制御に関連する遺伝子を探索するため、Naïveマウスと*P. b.* XAT株感染90日目のマウスより $\gamma\delta$  T細胞を採取して、マイクロアレイ解析をおこなった。現在、解析したデータからマラリア免疫記憶に関連する遺伝子の特定を進めている。*P. b.* XAT株感染90日目になると、CD40LやBAFFなどといったB細胞刺激因子の発現上昇はみられなかった。現在、いくつかのマラリア免疫記憶に関与すると想定される候補因子を選定し、その解析を進めている。

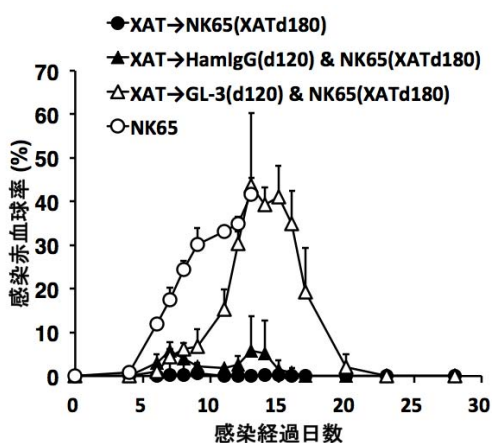


図2:  $\gamma\delta$  T細胞除去によるマラリア免疫記憶能の低下

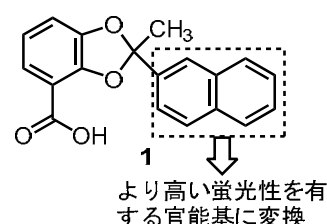
# 酵素触媒を活用した不斉誘導体化試薬の創製 — 超高感度化と効率的供給法の開発 —

慶應義塾大学 薬学部 花屋 賢悟

## 1. 研究の目的

不斉誘導体化試薬は1つ以上の不斉中心を有し、一对の鏡像異性体をジアステレオマーに誘導し、微量生体成分や天然由来の生理活性化合物立体構造の解析ならびに鏡像異性体比の決定を容易にする。現在用いられている蛍光不斉誘導体化試薬の検出感度は $10^{-15}$ molオーダーであるが、超微量成分の立体構造の解析、鏡像異性体比の決定のために、より高い検出感度をもつ蛍光不斉誘導体化試薬の開発が望まれている。

申請者は、大類らによって開発された蛍光不斉誘導体化試薬MNBカルボン酸(1)のリパーゼを用いる速度論的分割による簡便調製法を報告した(*J. Mol. Catal. B: Enz*, 2014)。本研究では、1,3-ベンゾジオキソールを母骨格とするMNBカルボン酸(1)のナフチル基を、より高い蛍光性を有する分子に置換した高感度蛍光不斉誘導体化試薬を設計・合成し、さらにその大量供給法を確立する。これら分子の合成の鍵段階は、色素またはその前駆体が結合したラセミ体アセタールの酵素触媒による速度論的分割である。

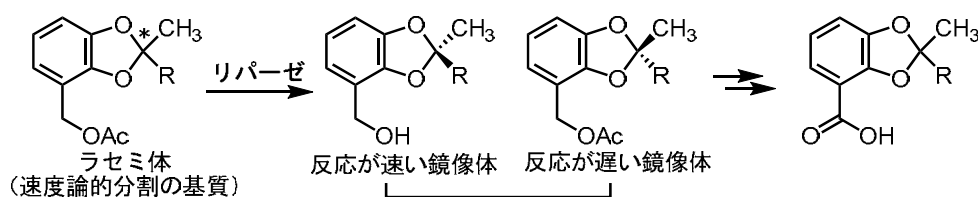


## 2. 研究の計画・方法

### (1) 蛍光不斉誘導体化試薬の設計・合成

不斉誘導体化試薬は、それ自身が純粋な鏡像異性体でなければならない。しかし、アセタール上の不斉中心は化学合成による直接的な構築が困難である。そこで本研究では、ラセミ体を合成し、酵素触媒を用いた速度論的分割により両鏡像体を作り分ける。

速度論的分割の基質は、メチルカテコールと、アセチル基が結合した種々の色素またはその前駆体の縮合反応を含む数工程で得る。リパーゼによるエステル交換で両鏡像体を分離後、それぞれ不斉誘導体化試薬へ誘導する(Scheme 1)。このラセミ体基質の速度論的分割の結果を計算化学により考察し、ラセミ体基質の設計に活かす。



Scheme 1. 速度論分割を活用した高感度蛍光不斉誘導体化試薬の調製

### (2) 蛍光不斉誘導体化試薬の性能評価

合成した不斉誘導体化試薬をアミノ酸の鏡像異性体分析に応用し、その性能を評価する。カルボン酸を酸クロリドとし、D-およびL-アミノ酸を結合する。得られたジアステレオマーをHPLCで分析し、ピークの分離度、すなわち鏡像異性体分離能、および検出限界を評価する。

## 3. 研究の特色

酵素触媒、特にリパーゼの遠隔不斉認識能(反応点から遠く離れた不斉中心を認識する能力)を活用する速度論的分割を鍵反応とする。通常、リパーゼはトリグリセリドのように反応点から

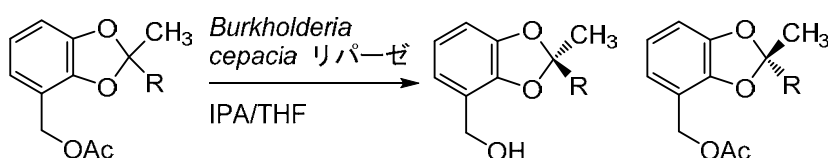
不斉中心まで2~3原子程度離れた不斉中心の立体化学を識別する。しかし、上述のMNBカルボン酸前駆体の速度論的分割では、リパーゼは反応点から6原子も離れたアセタール上の不斉中心を認識して鏡像選択的な反応を触媒する。遠隔位不斉中心認識においては、通常の前駆体の速度論的分割と異なるため立体選択性の経験則モデルが適用できない。そこで、実験的考察に加え、計算化学も積極的に活用し、高い親和性・触媒活性を酵素にもたらすようなラセミ体基質を設計する。

#### 4. 研究の成果

##### (1) 各種ラセミ体アセタート、アルコールのリパーゼを用いた速度論的分割

アセタール上に種々の置換基を有するラセミ体基質を合成し、エステル交換の条件下、*B. cepacia*リパーゼを作用させた。*t*-Bu基やフェニル基を有する基質の速度論的分割はほとんど選択性を示さなかった。一方、ナフチル基や*p*-置換芳香環を有する基質の速度論的分割は高い選択性を示した (Table 1)。以上の結果から、アセタール上の置換基は、周囲のアミノ酸と立体反発を生じる多環芳香族や置換ベンゼンが適していることがわかった。

Table 1. アセタール上に種々の置換基を有する基質の速度論的分割



R	ee(P) (%)	ee(S) (%)	conv. (%)	E
<i>t</i> -Bu	14.4	2.7	15.9	1.4
phenyl	23.6	7.9	25.1	1.7
naphthyl	94.5	74.4	44.3	72
biphenyl	>99	27.5	21.4	>200
<i>p</i> -iodophenyl	85.1	69.2	44.8	26
<i>p</i> -bromophenyl	84.9	89.7	51.4	37

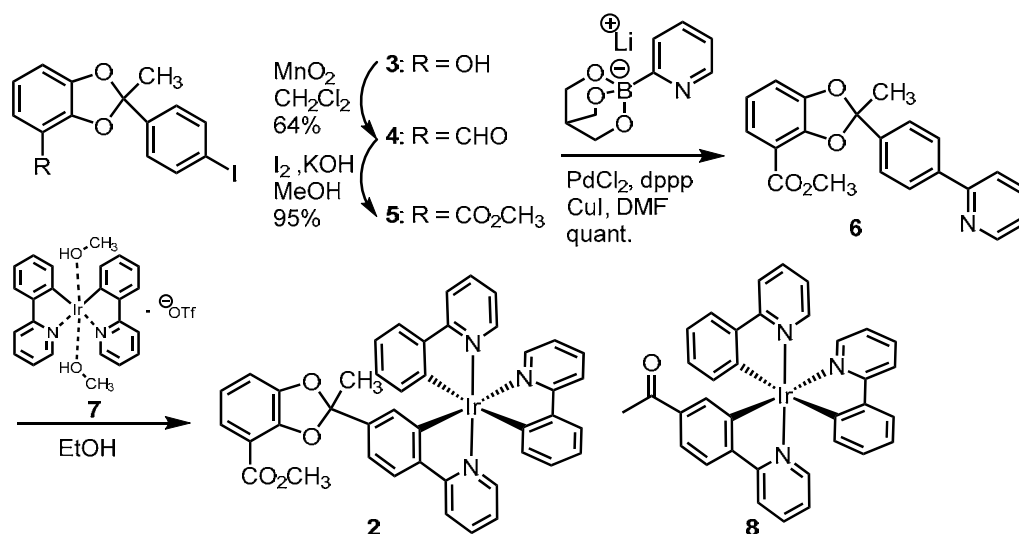
##### (2) *p*-ハロゲン化フェニル基を側鎖に有する基質を活用した蛍光不斉誘導体化試薬の合成とその機能評価

###### ① イリジウム (Ir) 錯体構造を有する蛍光不斉誘導体化試薬の創製

Ir錯体Ir(ppy)<sub>3</sub>は高い発光量子収率 ( $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$ ,  $\Phi = 0.40$ )を示す。アセタール上にIr(ppy)<sub>3</sub>を結合した蛍光不斉誘導体化試薬2の合成を試みた。

速度論的分割で得られた鏡像純度の高いアルコール3を、段階的な酸化によりエステル5へ誘導した。得られたエステル5とトリオールボレートの鈴木-宮浦カップリングにより、フェニルピリジン6を得た。フェニルピリジン6とIr錯体7を反応させると目的のIr錯体2が痕跡量得られた。2の生成はESI-MSによって確認した。しかし、主生成物は反応系中で生成するトリフルオロ酢酸によりアセタールが分解してしまったケトン8であった (Scheme 2)。

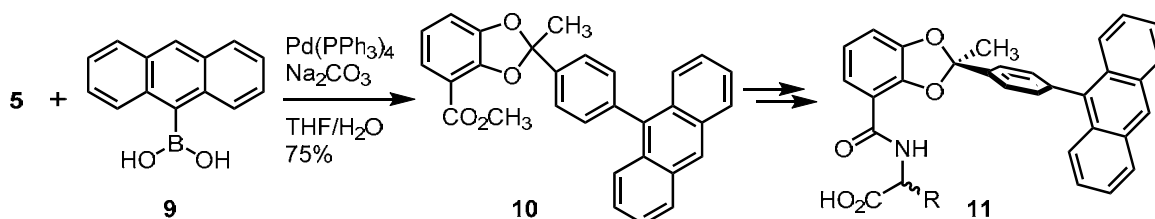




Scheme 2. Ir錯体2の合成

② アントラニル基を有する新規キラル分析試薬の創製

アントラセンはそれ自体蛍光量子収率  $\Phi$  が0.36 ( $\lambda_{em}$ : 382 nm in シクロヘキサン)と強い蛍光性を示し、9-フェニルアントラセンにすることにより、 $\Phi$  が0.49 ( $\lambda_{em}$ : 387 nm in シクロヘキサン)に上昇する。上述の方法で得た鏡像体過剰率の高いヨージド5と市販のボロン酸9の鈴木-宮浦カップリングによりアントラセン誘導体10を調製した (Scheme 3)。



Scheme 3. アントラセン誘導体の調製とアミノ酸の鏡像異性体比の分析

アントラセン誘導体を加水分解後、酸クロリドとしたのち、アラニンとフェニルアラニンの2種類のアミノ酸と縮合して、それぞれジアステレオマー対  $z$  へと誘導し、逆相カラムを用いるHPLCによる分析条件を検討した。MNBカルボン酸と比較して蛍光強度は上昇した。今回検討した条件ではフェニルアラニン誘導体の両ジアステレオマーはベースライン分離したものの、アラニン誘導体の両ジアステレオマーを分析できる条件は見いだせなかった。今後、アラニン誘導体を含め、複数アミノ酸を一挙に分析できるよう、展開溶媒の比率、グラジエントを検討する。

以上の成果は、第107回有機合成シンポジウム2015年 (東京)、Biotrans 2015 (Vienna, Austria)、Pacifichem 2015 (Honolulu, Hawaii) で発表した。

# 音場浮遊液滴の非線形ダイナミクスに関する研究

工学院大学 工学部 長谷川 浩司

## 1. 研究の目的

### (1) 研究背景(有用性)

近年、分析化学分野や生物・医学分野をはじめとした幅広い分野において、非接触流体制御技術が着目されている。特に、流体制御技術の1つである音場浮遊法は、容器壁面からの汚染の影響を抑制することや流体次第では人体への危険を回避することが可能であるというメリットに加え、静電浮遊法や電磁浮遊法などのその他の浮遊法と比較した場合に、制御対象流体に制約がないことから積極的な活用が望まれている。

### (2) 問題意識

申請者による強力超音波による液滴浮遊実験により、液滴の回転や振動、さらには分裂・微粒化に加え、大変形を伴う界面変形や内外流動など、非線形でダイナミックな挙動が発生することが明らかとなっている。このような非定常な界面大変形や内外流動の非線形ダイナミクスが、非接触流体制御の安定性にあたる影響、さらには、より高精度な流体制御技術への応用可能性については、理論的や解析的な知見は拡充されてきたものの、実験技術上の困難が主な理由となって、実験的知見が乏しいのが現状である。

### (3) 当該研究の到達点

本申請は、このような浮遊液滴の強い非線形性を示す挙動を流体力学の視点から解明し、現状では整備が不十分である浮遊液滴の非線形現象に関する定量的実験情報を拡充することで、浮遊液滴の非線形特性を活用した従来にはない高精度な非接触流体制御技術の確立に資するものであると考えられる。具体的には、申請者がこれまで蓄積してきた実験技術、知見を基に、浮遊液滴に生じる不安定性の1つである並進運動に着目し、その水平方向保持力の発生条件を検討した。研究のアプローチとしては、これまでの申請者の実験で主に使用してきた純水に加え、エタノール(表面張力の影響)、グリセリン(粘性の影響)およびそれら流体の水溶液を用いて実験を行うことで、流体物性が浮遊安定性に及ぼす影響を明らかにした。

## 2. 研究の計画・方法

本研究では、これまでに作製および実績のある実験装置を用いて、流体物性が音場浮遊液滴の並進運動に与える影響を実験的に検討した。液滴は、下部ホーンと上部反射板中に形成される音響定在波中の任意の節の位置付近に浮遊することが可能である。実験装置は、従来の一般的な装置中では平面であった上部リフレクターを曲面にするように独自の改良を加えることによりテスト部内の音場形成を強化させ、それにより浮遊液滴の安定保持の達成が期待される。浮遊液滴は、高速度カメラを用いて収録および観察され、得られた画像群に対して画像処理等を施し、その動的挙動等を解析した。試験流体としては、純水に加え、表面張力の影響を確認するためのエタノール、粘性の影響を確認するためのグリセリン、さらにはそれらの水溶液を用いて実験を実施した。おおよその研究遂行スケジュール(実績)は以下の通りであった。

(研究遂行スケジュール)

- 2015年～3月： 試験流体および実験条件表の精査(準備作業)
- 4月～7月： 予備実験(各種試験流体を基に傾向調査)
- 8月～2016年1月： 実験条件表の最終化および本実験(仮説検証)
- 2月～3月： 研究成果のまとめ(学会発表等含む)

### 3. 研究の特色

高精度な非接触流体制御技術の基礎を確立するにあたり、超音波浮遊液滴と音場の相互作用による非線形かつダイナミックな並進運動の発生メカニズムに関する定量的実験情報を収集する。これらの動的挙動は、流体制御の安定性に影響を与える可能性が指摘されている。本研究はこれまでは実験技術上の困難から対象とされることは少なく、避けられてきた非線形かつダイナミックな浮遊液滴の挙動に対して焦点をあてており、理論的、解析的な知見が中心的な分野において、定量的実験情報を収集蓄積することで、音場浮遊法を用いた高精度な非接触流体制御技術の基礎を確立するための科学的知見を提供する点において独創性があると考えられる。

### 4. 研究の成果

#### (1) 音場浮遊液滴の動的挙動の可視化計測および定量評価

Fig. 1には流体物性が液滴の並進運動に及ぼす影響を示す。3種類の試料を比較し、体積等価直径 $d$ 、音圧 $P_{rms}$ はそれぞれ2.5 [mm]、1.5 [kPa]とした。水とエタノールでは水平方向および鉛直方向で非定常な並進運動が確認された。特に鉛直方向ではその挙動に顕著な違いが見られた。固体球の場合、水平方向および鉛直方向でその並進運動が水・エタノールよりも抑制されていることが分かる。これらの浮遊試料の物性を考えると、固体球では内部流動や周囲への相変化が起きないことや、水とエタノールではその外部流動や蒸発過程が異なることから、流体に生じる流動性（外部流動・内部流動）は、浮遊液滴の並進運動の非定常性およびその挙動の変化を促進する1つの要因であることが考えられる。

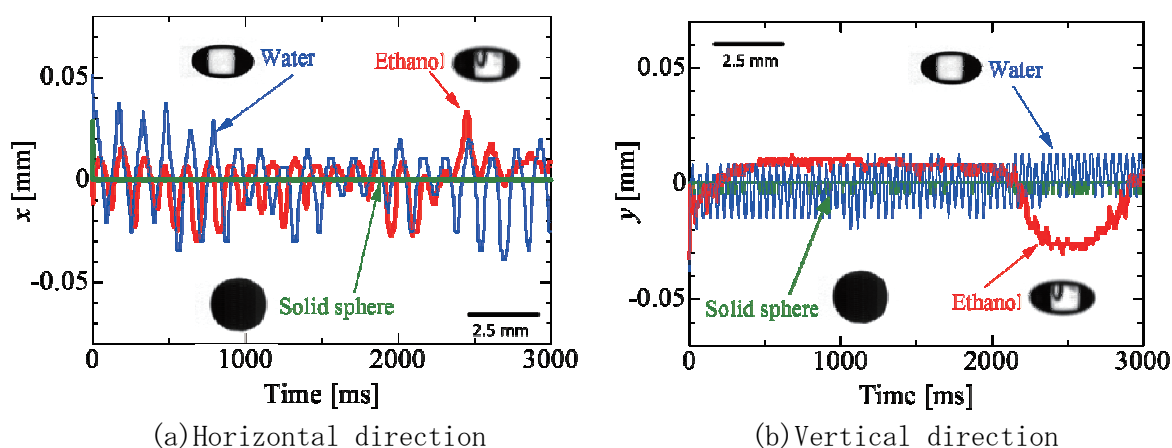
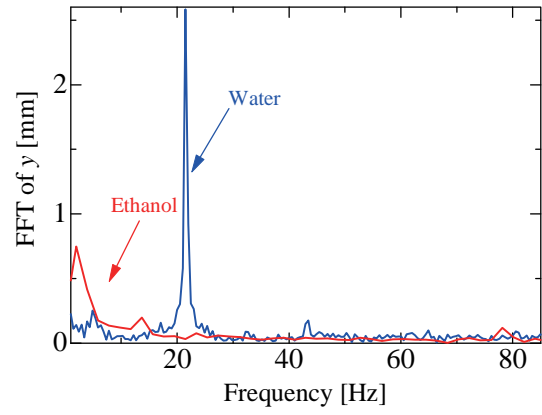
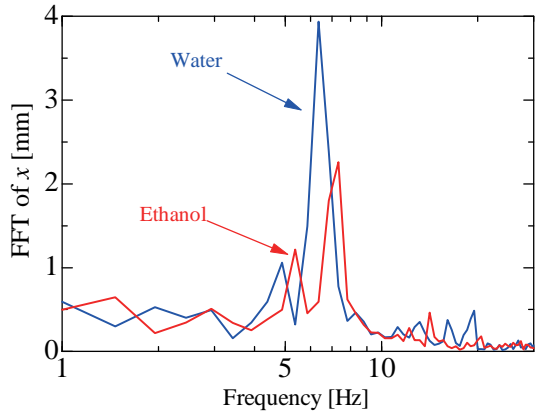


Fig.1 Effect of liquid property on translational motion of the droplet  
( $d = 2.5$  [mm]、 $P_{rms} = 1.5$  [kPa])

#### (2) 音場浮遊液滴の動的挙動の周波数解析

Fig. 2にはFig. 1で示された水・エタノールの水平方向および鉛直方向の並進運動のFFT解析の結果を示す。Fig. 2(a)に示す水平方向では、両者ともにピークが6.5 [Hz]付近となっている。一方、Fig. 2(b)に示す鉛直方向では、水が21.5 [Hz]、エタノールでは2 [Hz]にピークが確認された。また、浮遊液滴に非線形挙動が生じていることが、これらの高調波成分が確認されたことにより示されたと考えられる。今後は、バネ-マス系モデルを基にした浮遊液滴の動的挙動の更なる理解が必要であると考えられる。



(a) FFT of x

(b) FFT of y

Fig.2 FFT of translational motion of the droplet ( $d = 2.5$  [mm],  $Prms = 1.5$  [kPa])

# 統合失調症関連遺伝子によるミクログリアの機能修飾に関する研究

順天堂大学 医学部 小川 文昭

## 1. 研究の目的

生涯有病率約1%である統合失調症は、環境要因に加え、遺伝的要素がその発症に大きく寄与することが知られている。発症リスクに関与する遺伝子は複数報告されているが、中でも統合失調症などの精神疾患が多発するスコットランドの大家系から同定され、精神疾患発症と強く相互作用する均一性染色体転座によりに分断されていた*Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1)*は、そのユニークなクローニングの経緯から大きな注目を集めてきた。これまで私は、神経細胞におけるDISC1の機能解析に携わり、DISC1が神経細胞軸索内のミトコンドリア順行性輸送の促進因子であること(Ogawa et al., Hum Mol Genet 2014)、更に、統合失調症との関与が示唆されるNDE1やGSK3 $\beta$ といったDISC1結合分子もミトコンドリア輸送制御に関与していることを明らかにした(Ogawa et al., ACS Chem Neurosci 2016)。これらの研究成果は、エネルギー需要の高いシナプスや軸索終末といった箇所へのミトコンドリアの適時的確な輸送がDISC1をはじめとする複数の精神疾患関連因子により制御されており、そして、その制御機構の破綻は精神疾患発症のリスクをもたらすのではないかという可能性を初めて示したものである。

一方、統合失調症は「脳の機能障害」という概念の下、病態の根本に存在すると考えられている神経伝達の異常、神経発達障害といった点にフォーカスが当てられ、研究の視点は主に神経細胞に向けられている。しかし、脳の発生成熟、その高次機能の発揮には、グリア細胞の存在が必要不可欠である。中でもミクログリアは、中枢神経系の免疫細胞として他のグリア細胞とは異なる由来及び性質を持ち、シナプスの刈り込みや食作用による死細胞の除去を行うことで、脳内恒常性維持に重要な役割を果たしている。近年、統合失調症患者脳内におけるミクログリアの過剰な活性化、また、異常に活性化したミクログリア数の上昇が、死後脳解析及びPET解析から報告されており、病態の一因としての「統合失調症におけるミクログリア機能障害仮説」が注目を集めている。興味深いことに、統合失調症様フェノタイプを示すことが知られているDisc1-L100P変異体マウスを用いた最近の報告から、環境リスク要因の一つであるウイルス感染による母体免疫活性化がこの変異体マウスの統合失調症様フェノタイプを増悪させるということが示され(Lipina et al., J Neurosci 2013)、免疫系-すなわち脳内免疫細胞ミクログリアにおけるDISC1の機能的な重要性が示唆されている。

本研究では、神経細胞ではなく脳内恒常性維持に重要な役割を果たすミクログリアにフォーカスを当て、統合失調症関連遺伝子DISC1が有する未だ不明なミクログリアにおけるその分子機能の全容を明らかにする。ミクログリアを介した神経細胞機能修飾にDISC1がどのように関わっているのかを分子レベルで明らかにし、複雑な統合失調症病態分子機構の解明を目指す。

## 2. 研究の計画・方法

本研究計画では、マウス脳ミクログリア由来細胞株MG6を用いて、以下に述べる実験系により、統合失調症関連因子Disc1のミクログリアにおける機能的役割を明らかにする。

- (1) Disc1ノックダウンの影響を、ミクログリアの形態、動態(突起の動き、走行性)及び食作用に注目し、live-imagingにより解析する。
- (2) 海馬神経初代培養細胞との共培養系を用い、ミクログリアでのDisc1ノックダウンが神経細胞の軸索伸展、シナプス形成制御にどのような影響を与えるか検討する。
- (3) Imaging解析に加え、サイトカイン分泌に与える影響をELISAにより解析する。
- (4) Disc1ノックダウンによるミクログリア内遺伝子発現プロファイリングの変化を、タンパク質レベルで網羅的に解析する。
- (5) ミクログリアにおけるDisc1結合タンパク質を、免疫沈降法・LC-MS/MS解析により網羅的に同

定する。

### 3. 研究の特色

現在までに、統合失調症関連遺伝子は複数報告されているが、それらすべてが脳神経系特異的に発現しているわけではない。なかでも、有力なリスクファクターとして知られているDisc1は組織普遍的な発現を示し、脳神経系細胞のみならず免疫系を含む様々な細胞種にとって基本的で且つ重要な役割を果たしていると考えられる。現在までに、Disc1の免疫系への関与は示唆されているが、その分子機構の詳細は全く不明である。本研究により脳内免疫細胞であるミクログリアでのDisc1の生物学的機能が明らかにされ、ミクログリアを通じた免疫系からのアプローチといった新しい精神疾患研究の発展に寄与するとともに、従来の抗精神病薬とは一線を画した、動的なミクログリアをターゲットにした創薬研究に大きく貢献すると期待される。

### 4. 研究の成果

- (1) siRNAを用いたミクログリア細胞株MG6におけるDisc1ノックダウンの影響を、live-imaging及び蛍光免疫染色により検討した。その結果、Disc1の減少はMG6細胞の運動能に影響を与え、細胞はより不規則な動きを示した。更に、Disc1ノックダウンMG6細胞は、細胞運動性の指標となるラメリポディア（葉状仮足）を多く形成し、顕著な細胞形態の変化を示した。これらの結果より、Disc1はアクチン骨格の再編成を介してミクログリアの動態制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
- (2) MG6細胞は遺伝子導入効率が低いため、Disc1安定発現株を作製し、これを用いてLarge-scaleでの免疫沈降法・LC-MS/MS解析によるDisc1複合体の精製と結合因子の同定を行った。複数同定された新規Disc1結合因子の中で、エンドソーム-ゴルジ間の細胞内小胞輸送を制御するゴルジ体局在タンパク質、及びアクチン骨格再編成制御に関与するタンパク質に注目し、現在解析を進めている。
  - ① 蛍光免疫染色により、ミクログリアではDisc1は主にゴルジ体に局在することが明らかになった。興味深いことに、ゴルジ体に局在する新規Disc1結合因子をノックダウンすると、Disc1はゴルジ体に局在できなくなることから、Disc1のゴルジ体局在はこの新規Disc1結合因子により直接的に制御されていると考えられた。
  - ② マウスモデルを用いた解析から統合失調症様表現型と相互作用することが知られているDisc1-L100P変異は、もう一方の新規Disc1結合タンパク質であるアクチン骨格再編成制御因子への結合活性を著しく上昇させることが明らかとなった。

引き続き、本研究で同定された新規因子とDisc1との結合の意義を追及するとともに、上述の研究計画に従い、ミクログリアにおけるDisc1の生物学的役割を明らかにしていく。

# 地域史の教育資源化をめぐる民俗学的研究 — 愛知県新城市の状況を事例として —

成城大学 グローカル研究センター 及川 祥平

## 1. 研究の目的

### (1) 本研究の問題意識

筆者は記憶論を理論的支柱としつつ、ローカル社会における死者の「神格化」と「偉人化」の様態に民俗学の立場からアプローチしてきた。記憶論的視点のもとでは、後世の人々が過去をどのように利用するのかという問題意識から、歴史上の偉人や事件の地域社会における活用（歴史の資源化）の様態を問う必要がある。本研究はその中でも先行研究に乏しい教育資源化（教育への活用）の様態把握を試みるものであった。具体的には、愛知県新城市における長篠合戦の学校教育への活用の歴史と現状を明らかにし、歴史の教育資源化研究の理論的基礎構築を目指した。

### (2) 本研究の到達目標

上記問題意識のもとで論点としたのは、①戦前的教育と現在との連続／断絶、②地域史教育を通して教師らが伝えようとするものと、児童・生徒の体験の様態、③地域史表象ないし地域史認識と教育との相関関係、④マスメディアおよびアカデミック／非アカデミックな歴史研究との関係という諸点であった。以上を貫く関心は、地域社会における記憶（歴史）の継承の実態解明、および、ローカルな場における人々の歴史認識の様態とその形成ないし媒介過程の解明であった。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 調査方法

本研究では愛知県新城市の小・中学校のうち、対象校を毎年5月の「長篠合戦のぼりまつり」に参加する鳳来中部小学校、7月の「設楽原決戦場まつり」に参加する東郷東小学校に設定した。対象校の選択はフィールドでの関係者との対話をふまえて行なった。

### (2) 調査計画

第1工程として対象校での教育資料の収集、歴史資料の収集を行ない、行事・郷土教育への参与観察を実施した。それらの分析結果をふまえつつ、第2工程として関係者へのインタビュー調査を試みた。第1工程においては、各校の好意により十分な資料を収集することができたが、行事については、残念ながら、設楽原決戦場まつりは雨天のため当該年度は中止であった。もっとも、そのかわりに父兄らへの学習成果披露の場を参与観察することが叶った。第2工程については、地域の教育関係者・郷土史研究関係者を中心としてインタビューを実施した。

## 3. 研究の特色

### (1) 教育資源化への注目

地域社会における記憶や歴史の継承、そのアイデンティファイの問題を考える上で、学校教育が果たす役割は大きなものがあるが、これまでの文化的記憶論や歴史表象研究は、史蹟の形成論や観光祭等の経済資源的側面の解明に偏し、教育への言及があったとしても戦前的状況への関心が大半であった。歴史の資源化論の文脈で現代教育にアプローチする点は、本研究の特色といえる。また、教育への民俗学的接近ないし教育現場との交流は、実践的な知の構築につながり、様々な地域学が提唱される現在、高い社会貢献性を主張できる。

### (2) 歴史認識論的パースペクティブ

本研究は「民俗学的歴史認識論」の構築という大きな目的のもとに位置付け得る。民俗学は、

調査の場でごく普通の人々の歴史認識に接しながらも、人々にとって「歴史」はどのようなものとしてあり、どのように取り扱われ、体験されてきたのかという問題意識は深めずにきた。人々の歴史認識と歴史体験の様態に民俗学が注目するならば、議論は私たちの日常性を規定する「歴史をめぐる文化」の解明に向かうことになる。言わば「人々が歴史を認識すること」への関心であり、ここからは、現在、社会的課題とされる歴史認識をめぐる議論に対しても、新たな視角を提供するものとなる。

#### 4. 研究の成果

##### (1) 「長篠・設楽原合戦」観の再構築過程の解明

戦後、地域住民の「長篠合戦」観が大きく変容していることが確認できた。「長篠・設楽原合戦」とは、地元での長篠合戦への「名づけなおし」を踏襲したものである。長篠城の攻防に由来する「長篠合戦」という呼称が流通する一方、その名のもとでしばしばイメージされる織田・徳川軍と武田軍との衝突は長篠ではなく設楽原が主戦場であったという、名称とイメージとのズレを、地域の人びとは修正しようと試みてきた。この「ズレ」は地域の歴史認識にも影響を与えていた。かつてはかつての設楽原にあたる旧・東郷村の住民は史跡に居住していることを自覚しておらず、歴史学習の遠足で当時は別の自治体であった長篠城まで足を運んでいた。設楽原サイドからの長篠・設楽原合戦の捉え返しが、今日の東郷東小その他の地域史教育と「設楽原決戦場まつり」という新たな祭りの発生につながっている。なお、「設楽原」の史跡としての顕彰は、黒沢明の『影武者』の放映に郷土史家らが触発されたことが契機となっている。

##### (2) 戦前的教育と現代的教育

上記の理由により、当該地において設楽原での攻防戦は資源化されずにあつたが、長篠城での攻防戦における鳥居強右衛門は軍国主義教育にかなう忠臣として郷土教育に組み込まれていたことが確認できた。強右衛門の教育資源化は現在も継続されているが、戦前色が排除されており、今日的な教材的意義を与えられつつ、冷静な学習対象とされている。戦国期という殺伐とした時代の史跡を有す自治体の郷土教育が一般に直面する問題の位相についても見通しが得られたといえよう。

##### (3) 教育実践の模倣／伝播

当該地で伝統化されている長篠設楽原合戦の歴史再現劇は、他地域の教育実践を参考にしたものであることが明らかになった。かつて東郷東小に勤務していた教員が他地域で行なわれていた郷土の偉人を取り上げた寸劇に感銘をうけた経験に基づいて、長篠・設楽原合戦の劇化が構想されている。歴史劇という教育手法についてはさらに各地の実践例を収集したい。



# 国際人権条約の域外適用に関する研究

専修大学 法学部 高嶋 陽子

## 1. 研究の目的

伝統的国際法における人権の保障は、少数民族保護や外国人の待遇などの一部の例外を除けば、基本的には国内管轄事項とされ、各主権国家の国内法に委ねられていた。その後、ナチス・ドイツによるユダヤ人虐殺などの経験を経て、人権の国際的保障への関心が高まり、とりわけ第二次世界大戦後は、普遍的・地域的な「国際人権条約 (International human rights treaties)」が多数成立している。

しかしながら、人権の国際的保障に関する国際的な枠組が飛躍的な発展を遂げている一方で、国際人権条約が適用される具体的な範囲については多くの課題が残されている。とりわけ、国際人権条約が締約国の領域外においても適用されるのか否かという「域外適用 (extraterritorial application)」の問題をめぐっては、未だ理論上も実行上も明らかではない。条約の普遍性を重視するヨーロッパ諸国の研究では、域外適用に肯定的な議論が展開されているが、他方で、アメリカなどは、批判的かつ慎重な立場を維持しており、鋭い見解の対立が生じている。

以上の問題意識の下で、本研究は、主な国際人権条約 (国際人権規約、ヨーロッパ人権条約、米州人権条約) の条文規定の分析を通して、域外適用の「範囲」を明らかにすると共に、国際人権条約の域外適用の「理論的根拠」を探究することを目的としたものである。

## 2. 研究の計画・方法

本研究では、以下の2つの研究課題を設定し、次のような研究計画・方法を実行した。

- (1) 国際人権条約の域外適用の「範囲」を明らかにするため、国際人権規約自由権規約第2条、ヨーロッパ人権条約第1条、米州人権条約第1条の条文規定の分析を行った。とりわけ、条約上の権利義務の属地的・属人的側面に着目し、「場所的適用範囲 (*ratione loci*)」と「人的適用範囲 (*ratione personae*)」に分類して研究を進めた。

一次資料としては、国際人権条約の条文規定のほか、条約起草過程文書、締約国外交会議文書、国連人権委員会文書、ヨーロッパ人権裁判所および米州人権裁判所の判例などを研究した。具体的には、国際人権規約の研究手法として、国連総会第3委員会における起草過程の議論や米国修正案などの一次資料を調査し、条約の起草段階における意図が、その後の政府報告書審査や個人通報事例などの実行にどのように反映されているかを分析する研究方法を用いた。こうした研究方法を用いることで、国際人権条約の域外適用の「範囲」が、そもそもどのようなものとして生成され、変容ないし拡大されてきたかが明らかとなった。

- (2) 国際人権条約の域外適用の「理論的根拠」を明らかにするため、関連する国内外の先行研究を調査した。なお、学説整理の際には、国際人権条約の域外適用について、「肯定説」と「否定説」に分類した上で、先行研究が示す理論的根拠をそれぞれ精査した。

主な二次資料としては、『国際法外交雑誌』をはじめとする国内学術雑誌の掲載論文や学術書のほか、権威ある欧文学術雑誌である *European Journal of International Law* などに掲載の学術論文、その他の体系的学術書として、国際人権条約コメンタリーが相次いで出版されたため、これらの洋書籍を入手し、発展的研究を行った。こうした国内外の先行研究における学説の整理および批判的検討を通して、国際人権条約の域外適用の理論的根拠について示唆的な結論を得ることができた。

## 3. 研究の特色

本研究は、人権の国際的保障に寄与する分野であると同時に、国際法学の基盤を追求する研究分野であるという、二面的な特色を有している。例えば、国際人権規約の自由権規約は、現在そ

の締約国数は168カ国にのぼる。条約上の義務が締約国の領域外にまで及ぶか否かの問題は、締約国のみならず、ほぼ全ての国家の関心事項である。日本は、1979年に自由権規約を批准しており、日本における条約実施にも密接に関連している。また、従来の国際法学では、国際人権条約は、締約国の「領域内」でもっぱら適用されると理解されていたため、「域外適用」の問題は、かかる通説の限界を示唆するものでもある。新たな理論的根拠が探究される点にも、本研究の特色が存在する。

また、本研究は、主に欧米諸国で活発に進められてきており、多くの資料が欧文（英文・仏文）で存在し、日本語で行われた研究が未だ希少である。とりわけ、近年の国連やヨーロッパ人権裁判所の実行は、注目に値する。本研究では、諸外国の最先端の議論を分析し、社会に発信し還元することにもその意義と特色が見出せる。

#### 4. 研究の成果

本研究の結果、次のような成果が導出された。

- (1) 国際人権条約は締約国の「領域内」にのみ適用されるとの通説的理解に対して、「域外適用」の可能性が実定法解釈上も存在することが確認された。締約国は、条約上のあらゆる義務を無制限に負うのではなく、「管轄（jurisdiction）」や、個人の属性（国民・外国人）に基づいて、具体的な域外適用の「範囲」が確定されることも明らかとなった。
- (2) 国際人権条約の域外適用の「理論的根拠」が、従来の国際法理論の批判的検討を通して明らかとなった。すなわち、伝統的国際法では、厳格な「領域性」や「国籍」の要件の下での適用であったが、現在では、より実質的な「管轄（jurisdiction）」の概念を介して、国家と個人の間を捉える理論的基盤が存在することが実証され、これまでの研究に新たな知見を与えることが可能となった。

なお、本研究に関する学術論文として、拙稿「武力紛争における人権条約の域外適用可能性」『専修法学論集』第123号（2015年）を公表した。また、本研究で得られた主要な研究成果について、現在、論文執筆投稿中である。

# ウェブ調査による日本社会の学歴同類婚傾向に関する研究 —女性の高学歴需要と社会の開放性に注目して—

大正大学 人間学部 日下田 岳史

## 1. 研究の目的

本研究は、①日本社会の学歴同類婚傾向の趨勢を把握のうえ、②女性の大学進学需要の意味を社会移動の開放性という視角から検討するものである。研究の背景、問題意識、本研究から期待される知見は、次の二点から説明できる。

第一に、大学に進学するという事は、女性にとって、結婚を通じて期待される便益の確保に向けていっそう重要性を増しているという、研究上の背景が指摘される。他方男性の場合、大学進学需要は仕事上の期待便益から説明することが可能である。日本における高学歴化の構図は男女の間で非対称なものとなっていると言える。ただし、これらの知見は、大卒女性は大卒男性と結婚しやすいこと（学歴同類婚傾向）という所与の前提に、大卒男性は相対的に高所得者であるという事実を加味して得られた理論仮説（図1）を、データに基づいて実証することで引き出された（日下田2014）ものであることに留意が必要である。

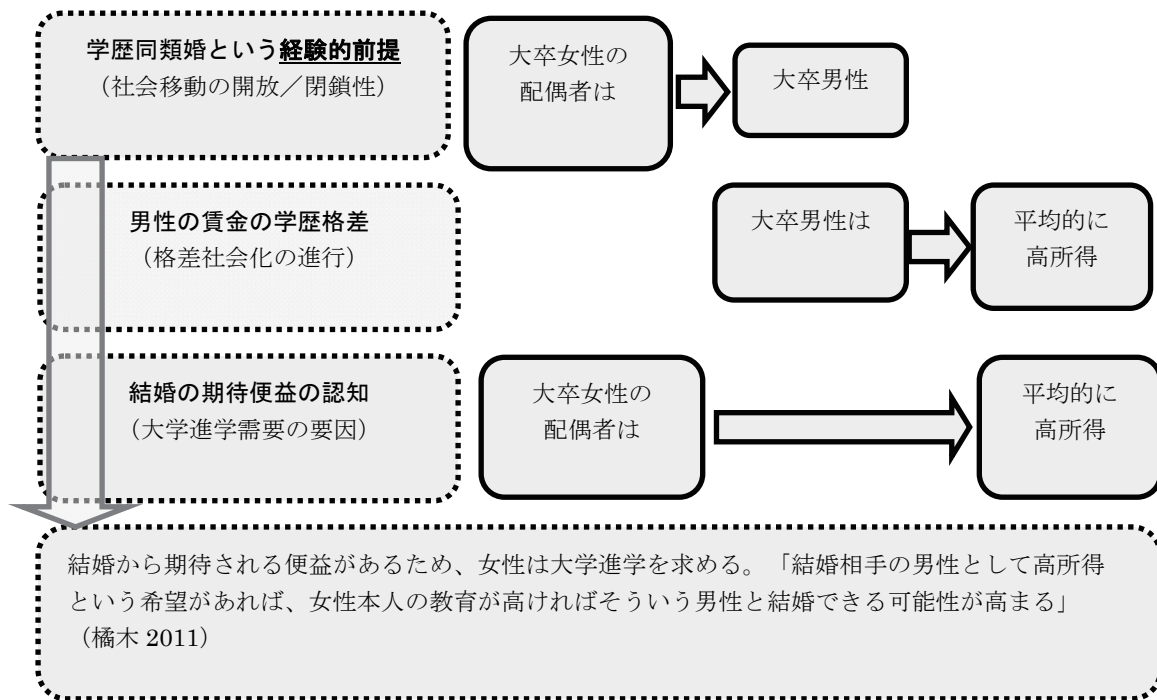


図1 (理論仮説) 結婚の効用が喚起する女性の大学進学需要

【出所】日下田 (2014) を一部改変。

これらの知見の妥当性を吟味するため、当該知見の前提とされている学歴同類婚傾向の趨勢を記述的に明らかにする必要があるという問題意識が引き出される。本研究から期待される知見として、例えば当該趨勢が弱まっているならば、高学歴化の構図の男女間の非対称性が希薄化しており、大学進学需要の規定要因が性別に関わらず同質化しているなどといったことが予想される。

第二に、第一の点と関わって、大学に行くか行かないかという選択によって様々な社会的な格差が発生しているという「学歴分断社会」論（吉川2009）がある。日本社会は学歴による分断が

先鋭化しているのか。この問題は社会階層論の主要な問いの一つであり、社会移動の開放性尺度の一つとして研究が蓄積されてきたのが、学歴同類婚傾向である（Breen and Jonsson2005）。

## 2. 研究の計画・方法

学歴同類婚傾向の趨勢を把握するためのデータセットを構築する。データセットとして満たすべき条件としては、第一に夫婦の学歴および結婚した暦年（または年齢）が分かること、第二に無作為抽出された全国調査であること、第三にサンプルサイズが有効回答ベースで1000以上であることが挙げられる（三輪2007）しかし予算制約があることも考慮の上、理想に近いデータセットの構築方法を検討する必要がある。

そこで、ウェブ調査モニターのうち有配偶者（30代、40代、50代）を母集団として、予算を踏まえてn=1100の質問紙調査を2015年10月に実施した。この時、ケース数が上記の各コーホートの男女でおおよそ同数となるよう、割付を行った。これらの手続きは、上に示した3条件のうちの「無作為抽出」の断念を意味している。このことは確かに、サンプルから母集団の様子を推測しようとする時、理論的に問題である。しかし、学歴同類婚傾向の趨勢を記述するのに資するデータセットは意外にも少ない（三輪2007）ことを踏まえれば、研究蓄積としての意義は小さくない。

## 3. 研究の特色

本研究の特色は学歴同類婚傾向の趨勢の把握を手がかりにして、女性の大学進学需要という高等教育の社会学の古典的領域と、社会移動の開放性の測定という階層研究の古典的領域との架橋を狙う点にある。

諸理論・諸方法の相克と統合が、高等教育研究に十分反映されているわけではなく、教育社会学に固有の方法論を問い直す必要（有本・金子・伊藤1989）がありながらも、「トロウの理論以降、高等教育の社会学的研究に広く利用される概念は見あたらない」（加野2013）という状況が続いている。本研究の特色は、2つの研究領域の結合を目論むものである。

## 4. 研究の成果

2で述べた方法に基づき実施されたウェブ調査から、妻の学歴と夫の学歴との関連を妻の年齢コーホート別に集計したものが、次の表1である。

表1 妻の学歴と夫の学歴との関連（学歴同類婚）

		(夫) 非大卒	(夫) 私立第1世代中核大学、または旧帝大・東工・一橋卒	(夫) その他の大学卒
妻30代以下	(妻) 高卒以下	69.1%	2.9%	27.9%
	(妻) 短大・専門	47.6%	7.7%	44.8%
	(妻) 大学	16.4%	34.2%	49.3%
妻40代	(妻) 高卒以下	71.4%	3.8%	24.8%
	(妻) 短大・専門	48.6%	19.4%	31.9%
	(妻) 大学	14.4%	28.8%	56.8%
妻50代	(妻) 高卒以下	63.8%	6.4%	29.8%
	(妻) 短大・専門	41.9%	18.5%	39.5%
	(妻) 大学	15.3%	27.1%	57.6%

【出所】日下田（2015）

50代の大卒の妻の夫の学歴分布に着目すると、84.7%(=27.1%+57.6%)が大卒である。40代の大卒の妻の場合、夫の85.6%(=28.8%+56.8%)が大卒である。そして30代の大卒の妻の場合、夫の83.5%(34.2%+49.3%)が大卒である。「大卒女性は大卒男性と結婚しやすいこと(学歴同類婚傾向)という所与の前提」は、堅持されている。表1に関する限り、「大卒女性は大卒男性と結婚しやすい(学歴同類婚傾向)」という意味での社会の開放性は、依然として同水準を推移していると解釈できる。

それでは、女性の大学進学需要は何を意味しているかという第二の問いに立ち返る。

女性の大学進学需要は、次の式1で定義することができる。社会の開放性は学歴同類婚の趨勢に、格差社会化の程度は男性の賃金の学歴格差にそれぞれ対応する概念である(図1)。

$$\text{女性の大学進学需要} = f(\text{社会の開放性, 格差社会化の程度}) \dots \text{式1}$$

式1の社会の開放性は、実証の結果、定数とみなして差し支えない。ゆえに、女性の大学進学需要は、学歴同類婚傾向を前提に、格差社会化(男性の賃金の学歴格差)の影響を受けて決定されるという理論仮説(図1)の妥当性が、改めて確認されたと言える。これらの議論を通じて、学歴の地位表示機能説(天野1986)、すなわち女性の学歴は婚姻の場で意味を持つという理論仮説が依然として説明力を持つという結論が浮かび上がる。

ただし、女性の短大・専門卒という学歴の意味が変容している可能性があることに、注意が必要だ。男性の大卒学歴を、私立第1世代中核大学(金子1996に基づき定義した)や旧帝大等といったいわゆる銘柄大学卒と、その他の大学卒に分類(表1)する。そうすると、女性の短大・専門卒という学歴と男性の銘柄大学卒との結びつきに、変化が生じている様子が浮かび上がる。50代の短大・専門卒の妻の場合、18.5%が、銘柄大学卒の夫を持つ。40代の妻は、19.4%である。これが30代の妻になると、7.7%に低下する。女性の高卒以下の学歴と男性の銘柄大学卒との結びつきも、おおむね同様の変化を呈しているようだ。

# 公益通報者の「保護」と「支援」のあり方に関する研究

淑徳大学 コミュニティ政策学部 日野 勝吾

## 1. 研究の目的

本研究では、平成18年4月1日に施行された「公益通報者保護法」（平成16年法律第122号）の実務運用状況等、公益通報者（労働者）が必ずしも法的に「保護」されていない現状認識を踏まえ、労働者・消費者の権利利益を保護する役割を担う労働組合や消費者団体等による公益通報者の「支援」のあり方を考究した。こうした公益通報者の「支援」の試みと同法の「保護」との連環を通じて、真の公益通報者保護と事業者による法令遵守（コンプライアンス）の確保、ひいては国民生活の安心や安全を目指した。

具体的に本研究は、公益通報者の「保護」の前提として位置づけられる公益通報者の「支援」策に着目する。公益通報者の「支援」から公益通報者「保護」の構造を支える新たなアプローチを立論することにより、公益通報者の「支援」と同法の「保護」の円滑な連環を通じた、真の「公益通報者保護」のあり方を提言するものである。公益通報者の具体的な「支援」として、例えばイギリスのPCaW（Public Concern at Work）やMIRS（Manx Industrial Relations Service）、アメリカのPOGO（Project On Government Oversight）等の各種団体の示唆等を受け、労働組合や消費者団体等を活用した、公益通報に係る発意・準備段階から公益通報後のフォローに至るまでの公益通報者に対する具体的かつ総合的支援のあり方を明らかにすることに主眼を置いた。

すなわち、労働組合や消費者団体をはじめとした各種団体からの実証的な調査を踏まえ、公益通報者の積極的「支援」の試みと同法の「保護」の連環を通じて、真の公益通報者保護と事業者による法令遵守（コンプライアンス）の確保、ひいては国民生活の安心や安全を志向するものである。

## 2. 研究の計画・方法

本研究の素材とした公益通報者保護法は施行後10年を迎えたが、実務においては法の理念との乖離が生じてきている。公益通報者にとって、同法に対する認知度は低く、様々な要因により公益通報意欲が阻害されている背景がある。その一因として、公益通報によって人事的な報復をはじめとした不利益取扱いを受けるおそれがあるといった心理的な圧迫等があり、公益通報者保護法はこうした不利益取扱いを禁止している（5条）。しかし、関連裁判例によると、公益通報と人事的報復との因果関係の立証が困難であることなどの理由で公益通報者は保護されていないのが現状である。すなわち、同法は公益通報者による立証活動の困難性等を起因として公益通報者の保護法としての役割を果たしていない。その主因は、法が公益通報者に対する「支援」を想定せず、厳格な法律要件を充足しない通報には法的保護を与えていないことであるとの仮説を定立した。

こうした仮説を基にしながら、本研究は、平成18年4月に施行された公益通報者保護法があくまで民事効（民事ルール）を規定しているに過ぎないことや、法的に保護されるための法律要件が厳格であることなどを主な理由として、公益通報者保護法の趣旨・目的に即した適正な法的保護を公益通報者に対して寄与していないという点を踏まえ、公益通報が社会正義に基づいた公正な経済社会を形成する一助となることを念頭に、消極的な法的「保護」に留まることなく、本来果たすべき公益通報者における法的保護の実効性をより強固にするための方策を模索した。

こうした本研究の基本的な視点に基づき、以下の研究計画及び方法により進行した。

第1に、公益通報者保護法に関する現況と課題を把握することはもちろんのこと、公益通報者の具体的な「支援」として有意な成果を生み出している、イギリスのPCaW（Public Concern at Work）、MIRS（Manx Industrial Relations Service）、また、アメリカのPOGO（Project On Government Oversight）等の各種団体のグッドプラクティスや、公益通報支援専門担当者へのヒ

アリングを行い、我が国への示唆的なアプローチの可能性を検討した。上記の各種団体が公益通報者の具体的支援を行い、公益通報者保護法を補完する機能を担っており、こうした団体の活動の活性化・役割の再認識こそ、わが国においても必要であると認識した。

第2に、労働組合や消費者団体等を活用した、公益通報に係る発意・準備段階から公益通報後のフォローに至るまでの、公益通報者に対する具体的かつ総合的支援のあり方を模索するため、現状を踏まえながら、公益通報者支援の観点をもとにして、各種団体の活動状況と課題、公益通報者の支援のあり方等のヒアリングを行い、公益通報者保護法の補完的役割を担うための方策を検討した。

こうした分析をもとにして、公益通報者保護法による公益通報者の消極的「保護」から脱却し、労働組合や消費者団体等の各種団体を基軸とする公益通報者の積極的「支援」に向け、具体的な支援施策を検討し、消費者庁等の関連省庁とも連携しながら、実証的に調査及び研究を行い、本研究の取りまとめを実施した。

### 3. 研究の特色

既述の通り、公益通報者保護法施行後、労働者や事業者に対する公益通報者保護法の周知がなされていないばかりか、公益通報者保護法の理念と現実との間に甚だしい乖離が生じているのが現状である。本研究によって、公益通報者保護法の周知普及の促進や同法の運用の充実、公益通報者「支援」策はもとより、法改正すべき立法事実が存するか否かについて詳説し、法的な観点のみならず、他分野の横断的・多角的に実証分析することにより、今後、より発展的な研究にも貢献可能であると考えている。

本研究の特色は次のとおりである。すなわち、未だにわが国の社会構造において浸透せず、いわゆる「敷居の高い」制度となっている公益通報者保護法制度を、労働者の背中をそっと押すことができる「支援」基盤を構築することによって、公益通報者の消極的「保護」から脱却し、公益通報者の積極的「支援」を通じて積極的「保護」にパラダイム転換する方策を提示する点である。一般社会において生起する不正行為等を除去する装置としての公益通報者保護法を再生するためのツールとして、「支援」を位置づけることにより、具体的かつ総合的な公益通報者保護スキームが完成することが可能となる。

また、公益通報者保護法案の審議過程のみならず、法施行後においても法理論上及び実務上、これまでほとんど論議されてこなかった、公益通報者の法的「保護」の前提となる「支援」に着目して、イギリス・アメリカにおける好個な事例を踏まえながら、労働組合や消費者団体等による総合的・一元的な公益通報「支援」策を通じて、公益通報者保護法との連環を意識し、真の公益通報者保護制度を構築・解明した点にある。

本研究の関連裁判例等で浮き彫りとなった、通報したにも関わらず法的救済を受けられなかった労働者や、通報根拠事実（証拠）に係る収集をはじめとした公益通報準備行為において頓挫した労働者、また、法律要件が厳格であるため、公益通報意欲が減退し、やむを得ず公益通報を行わなかった労働者等、公益通報に係る何らかの「支援」がなかったために、公益通報者保護法上の法的保護を受けられなかった事例がある。本研究により、当該事例について抜本的な解決が図られるとともに事業者による法令遵守（コンプライアンス）の確保につながり、終局的に国民生活の安心や安全にも資すると思料する。今後、本研究を踏まえ、立法事実の調査・研究を進めることにより、公益通報者保護法自体の見直しの一助にもなり、社会正義に基づいた公平・公正な社会の創生にもつながるものと期待したい。

### 4. 研究の成果

本研究では、職場内において認知した法令違反行為を職場等へ通報した労働者に対する解雇等の不利益取扱いから法的に保護するという現行公益通報者保護法の法律要件等を踏まえながら、事業者にとってのステークホルダーである労働組合や消費者団体等による公益通報者の「支援」

のあり方を模索し、総合的に公益通報者保護スキームを考究した。こうした着想自体、これまで先行論文あるいは実務運用上においても存しない。

また、長年にわたり研究してきた公益通報者保護法に係る研究業績を踏まえながら、イギリス・アメリカにおける公益通報者「支援」に係る事例の研究や、わが国における労働組合や消費者団体等、さらには労働者に対するヒアリングをはじめとした実態調査を行い、公益通報者の「支援」の試みや公益通報者保護法のあり方を再考するといった、理論と実務を架橋する実践的な研究を展開した。

上述のように、公益通報者保護法がより積極的に活用されるよう促進するため、法制度の枠組みに即した形で労働組合や消費者団体等の各種団体を活用した「支援」を通して、公益通報者の真の保護を達成することはもちろんのこと、事業者においても内部統制制度（コンプライアンス）として再び効果を発揮することにもつながる。

本研究によって産出された研究成果の一部として、下記の論稿に反映されている（なお、論稿の他、マスコミにおけるコメント等（例えば、朝日新聞朝刊（全国版）【私の視点】「公益通報者保護法「安心感」担保する改正を」（2015年10月22日））、NHKクローズアップ現代「内部告発者知られざる苦悩」（2016年1月21日）がある）。

- ・日野勝吾「公益通報者に対する「支援」に関する意義と課題—イギリスの公益開示法（Public Interest Disclosure Act 1998）と公益通報者の民間支援団体Public Concern at Workを例にして—」『淑徳大学研究紀要（総合福祉学部・コミュニティ政策学部）50巻185頁以下（2016年）
- ・日野勝吾「内部通報の正当性判断における通報対象事実の根幹部分の真実相当性」『総合福祉研究』20巻27頁以下（2016年）



# ウイルス感染が誘導するステロイド抵抗性気管支喘息の病態解明 —ステロイド代謝とヘルパーT細胞の関与—

東京女子医科大学 医学部 芦野 滋

## 1. 研究の目的

本研究では、気管支喘息の病態が、ウイルス感染あるいはウイルス成分投与によって悪化し難治化するメカニズムを、免疫細胞の一種であるヘルパーT (Th) 細胞の機能にフォーカスを当てて解明する。一般的な気管支喘息モデルマウスの肺に種々のウイルス又はウイルス成分を肺内に暴露させ、どのようなサイトカインが肺内で産生され、どのような気道炎症の質的変化が起こり症状が重症化していくのかを明らかにする。

具体的には、ウイルス感染が誘導する気道炎症の質的変化及び肺における免疫細胞の機能変化を呼吸生理機能の指標でもある気道過敏性(AHR)や、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の炎症細胞の数やサイトカイン濃度、肺実質内のTh細胞のサイトカイン産生能力、気道炎症に関わる遺伝子・タンパク発現量などから判断する。ウイルス感染の有無、あるいはウイルス感染の前後でそれらの差を比較する。

具体的な研究計画は後述するが、Th2サイトカイン主体のステロイド感受性喘息の肺組織と、ウイルス感染状態にあるステロイド抵抗性喘息の肺組織からTh細胞を単離し、ex vivoでTh細胞のサイトカイン産生能力及び喘息の病態変化に影響を与える種々のサイトカインシグナル分子の活性化状態なども把握する。

また、難治化に関わる現象としてステロイド抵抗性喘息が挙げられるが、肺内のTh細胞を中心とする免疫反応がステロイド代謝系に及ぼすか否かに着目し、難治性気管支喘息の新規制御法の開発を目指すことも最終目標の一つとした。

## 2. 研究の計画・方法

風邪症候群を引き起こすRSウイルスやライノウイルスあるいはウイルス成分として知られるdouble strand RNAを模倣する人工試薬 poly I:Cによって、なぜ気管支喘息が重症化するのか、また病態がステロイド薬に抵抗性を示すような難治性を示した場合、ステロイド代謝酵素が誘導されているかを検証し、有効な治療標的になり得るか確認することを計画した。本計画では、マウスを用いたin vivo及びex vivo実験を中心に、大きく以下の3項目を展開することを目指した。

(1) ウイルスあるいはウイルス成分投与で気管支喘息増悪モデルを構築。

喘息基質を有する患者がウイルス感染を起こす状況を想定し、一般的なTh2細胞依存的な気管支喘息モデル(アレルゲンovalbumin (OVA) + Th2アジュバントAlum (Al(OH)<sub>3</sub>)で感作後にOVAを吸入させるモデル)にウイルス感染を合併させる。具体的には、アレルゲン感作および吸入後(喘息成立のあと)に、先述したウイルスやpoly I:Cを気管内投与や経鼻投与で肺内へ投与して喘息増悪モデルを作製する。他の研究で、アレルゲン感作の間や吸入前(喘息発症のまえ)にウイルス成分を投与する実験はあるが、本研究のように実際の症例を想定した、すなわち喘息成立のあとにウイルス感染状態を設定するモデルは極めて少ない。喘息成立およびウイルス感染後、経時変化を追跡しながら、AHRを専用解析装置 flexivent で測定し、さらにBALF中の炎症細胞(マクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球など)を細胞塗末染色法で、種々のサイトカインレベルをELISAで調べる。また、ステロイド薬の一種、デキサメサゾン(Dex)を投与して、AHRや肺への炎症細胞浸潤、サイトカインレベルが軽減しないこと(ステロイド抵抗性)を確認する。ただし、喘息重症化を引き起こす最適な実験条件を設定するため、ウイルスやウイルス成分の投与実験を繰り返し喘息症状重症化モデルの構築をまずは最優先とする。

(2) 肺組織Th細胞の質的変化を解析し、サイトカインストーム依存的な病態の変遷を精査。

ウイルス感染後あるいはpoly I:C投与後に肺内のThサブセット(Th1, Th2, Th17)の組成がど

のように変わるかフローサイトメトリーにより解析する。肺内でIFN- $\gamma$ 産生が認められた場合はTh1が、IL-17産生が確認された場合はTh17の存在が予想される。一般のOVA/Alum喘息モデルではTh2細胞が主体であるが、ウイルス応答性免疫により喘息が重症化した際、IL-17、IFN- $\gamma$ などのサイトカインストームによってTh1やTh17細胞が新たに誘導される、あるいはTh2細胞がTh1/Th17-likeな細胞に変化するか肺組織からTh細胞を単離し ex vivoで再刺激し、細胞内サイトカイン染色によってサイトカイン産生能を調べたり、Th機能に重要なサイトカインシグナル分子群を解析することで明らかにする。すでにTh17/Th1型の気道炎症はステロイド抵抗性であることを見出しており、本研究のウイルス感染応答喘息モデルでも抗IL-17抗体や抗IFN- $\gamma$ 抗体や各種KOマウスなどを用いて重症化が解除(改善)され、AHRや気道炎症が軽減されるかどうかを検証する。

(3) Th細胞によるステロイド代謝酵素の発現。バランス変化及びその代謝酵素阻害剤の効果を検証。

本研究では、病態解明だけでなく、その制御法開発にも挑む。上述したように、IL-17/IFN- $\gamma$ の生理活性を失わせて、喘息重症化を解除できたとしても、それは難治化機構の一端を解明したに過ぎず、実際の治療法に応用するのは難しい。それらのサイトカインを中和した場合は、生体防御機構を破綻させ、日和見感染などの副作用を招いてしまう恐れがある。そこで、ウイルス応答反応が引き起こす難治化メカニズムに、ステロイド代謝酵素が誘導され、ステロイド治療に抵抗性を示す病態が惹起される可能性に着目した。

ウイルス応答反応が肺組織で起きている場合、すなわち例えば上述したようなTh17/Th1サイトカインが存在した場合、ステロイド薬を不活化する酵素が、肺で発現しているかをreal-time PCR法やwestern blot法で検証する。さらにその代謝酵素がTh細胞に発現するのか肺組織の支持細胞(気道上皮細胞、線維芽細胞、平滑筋など)に発現しているのかを確認するため、免疫組織染色によってその酵素の所在を明らかにする。

さらに、ステロイド代謝酵素阻害剤(市販品)を投与し、ウイルス感染誘導喘息増悪モデルのステロイド抵抗性を感受性に変えられるかをin vivoモデルを用いて(1)で述べた項目で検証する。

### 3. 研究の特色

本研究では、風邪症候群を引き起こすRS ウィルスやライノウィルス、あるいはウィルス成分であるpoly I:C を、通常の喘息モデルの肺内に投与したときに、喘息症状がどのように増悪し、ステロイド抵抗性になり得るのかを追究する。

Th細胞が産生するIL-17及びIFN- $\gamma$ 依存的な気道炎症がステロイド抵抗性であることを見出しているが(未発表)いまだその機序はわかっていない。本研究では、ウイルス感染時のIL-17/IFN- $\gamma$ の存在下で、肺内のTh細胞を中心とする免疫反応がどのように喘息難治化に寄与するかに着目する。

Th細胞がステロイド抵抗性に影響を与えることは、全世界で全く知られておらず、様々な学会においてもon goingで遂行されている論文未発表のプロジェクトは見当たらない。本研究が展開すれば、ステロイドが効力を示さない難治性喘息を打破できるブレイクスルーを見いだせると期待される。

### 4. 研究の成果

(1) ウィルス感染を想定してpoly I:Cを喘息マウスに投与することで、重症喘息モデルの開発に成功した。呼吸機能解析装置を用いて、AHRを測定したところ、通常の喘息モデルのAHRに比べて、polyI:C 投与喘息モデルのAHRは有意に亢進し重症化したことがわかった。さらに、気管支肺胞洗浄(BAL)を行って肺への浸潤細胞を解析した結果、通常の喘息では好酸球浸潤性の気道炎症であったのに対し、polyI:C 投与した喘息モデルでは、好中球の浸潤を伴った気道炎症に変化することが明らかとなった。さらに、BALで得られた上清中のサイトカインを測定すると通常の喘息モデルではTh2サイトカインが主体だったが、polyI:C投与喘息モデル

ではTh1/Th17免疫反応に関係するサイトカインの上昇が確認された。現在、このウィルス成分polyI:Cによって誘導される気道炎症の質的变化に伴って、喘息病態がどの程度ステロイド抵抗性に変化しているかをTh1/Th17に関係する分子群と併せて解析している。

Th1/Th17に関係するサイトカインが喘息増悪時に上昇することは臨床でも認められる現象で、この重症喘息モデルの解析を重点的に行えば、将来臨床に役立てられる新規知見が得られると期待された。肺内のサイトカイン産生パターンは、Th2からTh1/Th17へシフトしたことが示唆され、気道炎症の質的变化が重症化に寄与する可能性が十分に推察された。

- (2) 本研究で確立された喘息重症化モデルを用いて、Th細胞機能変遷の解析を行った。その結果、poly I:C投与によって重症化した喘息マウス肺のTh細胞はIL-13のようなTh2サイトカイン産生能は維持しており、IL-17産生に関しては上昇する傾向があった。IFN- $\gamma$ 産生能はわずかに上昇したが顕著な変化ではなかった。この喘息悪化モデルの実験条件では、Th細胞機能が劇的にTh2からTh1/Th17に変化したデータはまだ得られていない。ただし、少なくとも、polyI:Cを喘息マウスに投与すると、BALFのサイトカインレベルは、IL-6、IL-17およびIL-12、IFN- $\gamma$ が上昇したことから、Th17やTh1タイプの免疫反応が誘導されたことが考えられる。他の免疫細胞（マクロファージ、樹状細胞、CD8+ T細胞、NK細胞）由来のTh17/Th1サイトカインも、この喘息重症化に関与したことが推察される。

現在進行中であるが、IL-17 KOマウスを使用した実験では、poly I:Cによる気道炎症増悪が抑制されるという予備的データが得られている。すなわちウィルス応答性免疫反応による気管支喘息増悪の一端にはIL-17が関わっている可能性が示唆された。今後IFN- $\gamma$ KOマウスや抗IFN- $\gamma$ 抗体を投与してTh1/Th17反応の関与をより明確にする予定である。

- (3) Poly I:C投与によって重症化した喘息が、ステロイド抵抗性か否かを確認する必要性があり、難治化に関わる分子群がTh細胞内またはDC内に誘導されているか、あるいは気道上皮などの肺構成細胞が発現するかどうかを解析準備中である。有意な発現上昇が認められた際には、代謝酵素阻害剤を使用して、難治性が改善されるか検討する。

なお、以上の成果の一部をアメリカ胸部医学会でポスター発表し(American Thoracic Society 2015 International Conference, Thematic Poster Session, ID 63693, C35-ASTHMA THERAPY I)、海外研究者との情報交換で様々な重要因子探索についての助言を受け、現在それら分子群の発現・機能解析も展開させている。

# 人の援助行動を引き出す「弱いロボット」に関する研究

東京電機大学 情報環境学部 大島 直樹

## 1. 研究の目的

### (1) 背景

近年、人との親和的な関わりを可能とする情報処理システムの実現に向けて、ソーシャルなロボットや擬人化エージェントへの関心が高まりつつある。特に、ユーザに対して特定の行動を促すことの可能な説得性(persuasiveness)を有するロボットとのコミュニケーション技術に関する研究はパースエイシブ・ロボティクスと呼ばれ、国内外の研究機関において、その研究開発が精力的に行われている。

### (2) 有用性

研究代表者はこれまでに、ひとりでは何も出来ない「弱いロボット(岡田美智男 2012)」であっても、周囲の人々からの手助けを引き出すことの可能な説得性を有するコミュニケーション技術の開発に携わってきた。この研究では、高齢者福祉施設や近隣の小学校、交流施設において「弱いロボット」と関わる高齢者や子どものコミュニケーション行動を観察・分析するものである。その結果、ロボットはシンプルな構成であり、ロボットのできる機能が限定的であっても、そのような「弱いロボット」には、人の援助行動を引き出すような説得性が備わること明らかにした。

### (3) 問題意識と目標・ゴール

この「弱いロボット」研究について、以下の2つのメカニズムが十分に解明されておらず、パースエイシブ・ロボット構成のためのデザイン論の確立は十分ではない。

① 弱いロボットのどのような性質が、人の態度や観念に影響を与えているのか

② 弱いロボットのどのような振る舞いが、人のどのような援助行動を引き出すのか

そこで、本研究では、「現場での参与観察(事例データ収集)」「インタラクションの質的分析とモデル化」「動作モデルのロボットへの実装」「インタラクションの定量的分析とモデルの妥当化」に基づく循環的なアプローチにより、パースエイシブ・ロボットのための設計論の確立に向けた基礎的な知見を収集することを目標とする。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 研究の計画

まず、①実際のフィールドでロボットと関わりあう参加者たちの多人数インタラクションの参与観察に基づき、事例データを収集する。ここで得た観察データから、②人とロボットとのインタラクションを、エスノメソドロジーの概念に基づき質的に分析し、ロボットの動作生成のための簡易モデルを構築する。②のモデルに基づき、③ロボットの動作モデルを設計し、ロボットへの実装を行う。その後、④ロボットと人のインタラクションを定性的に分析し、③の動作モデルの最適化を行う。その後、④で最適化されたロボットを再度フィールドに持参し、①と同様の参与観察に基づき、人とロボットのインタラクションのデータを収集する。そして、②のプロセスを実施する。このように観察・分析、実装・評価のプロセスを循環的に繰り返しながら、パースエイシブな性質を備えたロボットの設計論確立に向けた知見収集を行う。

### (2) 研究の方法

本研究計画で検証する「弱いロボット」の構築に当たっては、既存のロボットの開発モジュールを用いる。具体的には、文部科学省科学研究費助成事業科学研究費補助金・平成26年度基盤研究(C)のもとで、人同士のコミュニケーションを支援する実機のロボットが試作されている。この既存の試作機をベースに、学内の競争的資金のもとで、複数タイプの動作モジュールの開発を行う予定である。これら既存の試作機をベースに、複数タイプの発話モ

ジュールを開発し、他の開発済みモジュールと連携しながら「弱いロボット」の構築を進める。

人とロボットのインタラクションの記録には、各種観測設備の設営が必要である。あらかじめ、施設関係者からの許可を得て実施する。具体的には、研究代表者がロボットと人のインタラクションのフィールドに出向き、参与観察のアプローチに基づき、事例データを収集・分析する。研究期間中に研究を実施するための実験スペース、設備は確保できており、実験環境設備は本学に整っている。適宜、湘南工科大学の湯浅将英講師、東京電機大学の武川直樹教授、豊橋技術科学大学の岡田美智男教授と研究議論を行い、モデルや理論の妥当化を図る。

### 3. 研究の特色

本研究の特徴は、人とロボットのインタラクション・ログ（行動ログ）の分析手法が従来と異なる点である。Human-Robot Interactionの分野では、厳密に統制された実験室内で収録したインタラクションデータを統計的に分析するなど、従来の実験パラダイムにより進められてきた。このような総括的分析では、ロボットの振る舞いと人間の行動との間にある相関関係を明らかにすることはできるが、ロボットと人の相互行為が生じた文脈やその相互行為との連鎖構造は明らかにすることが出来ない。そこで、実際の文脈の流れの中でその相互行為を捉え、その行為が引き出された行為との連鎖を辿る「ライブ版」で捉えることにより、その相互行為が生まれた因果関係をそぎ落とすことなく、より鮮明に、人同士の振る舞いを写し取ることができる。このような手法を用いて<人-ロボット>の相互行為の事例を生きたままに記述する点が特色である。

### 4. 研究の成果

2015年4月～2016年3月の研究期間のなかで、人とロボットのインタラクションを記録/分析した。その結果、ロボットが人に視線を向けながら流ちょうに発話するのではなく、独り言をつぶやくように下を向いて発話する動作モジュール、および、発話モジュールとの連携により、人同士の能動的なコミュニケーションが引きだされる事例（図1）を確認した。また、最小限の発話モジュールを搭載し、ロボットが発話するのではなく、人にマイクロフォンを向けて、人の発話を待つという動作モジュールとの連携により、マイクを向けられた相手に他のメンバが発話を譲るという場面（図2）を確認した。これらの事例分析（研究成果①）とデザイン思想（研究成果②）について、他の研究者と積極的に意見を交換し、パースエイシブ・ロボットのための設計論確立に向けて有益な知見を得ることができた。また、ホームページ（<http://sar1.jp>）において研究成果を公開し、本研究の意義を広く社会に発信したところである。

しかし、「弱いロボット」のどのような性質が、人の態度や観念に影響を与えているのかを十分に検証するには至っていない。今後は、これらの研究成果をさらに発展させ、パースエイシブ・ロボット構成のためのデザイン論の確立に取り組む予定である。



図1 独り言発話モジュールを搭載したロボット

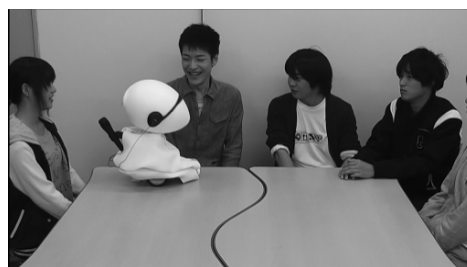


図2 最小限の発話モジュールを搭載したロボット

学会発表：計 2 件

研究成果①

藤森亮、斎藤夏生、齋藤悠太、石井勇輝、大島直樹、武川直樹：だれでも良いから喋ってよ...：話し出しやすい会話の「場」をデザインする独り言ロボット、HCGシンポジウム2015、pp. 500-507 (2015). **オーガナイズドセッション賞**

研究成果②

大島直樹・藤森亮・齋藤悠太・齋藤夏生・石井勇輝・金子博・武川直樹：人同士の能動的コミュニケーションを誘う「妖怪ロボット」のデザイン検討、HAIシンポジウム2015、G-8 (2015).

# 広域スペクトラムを有する経鼻投与型肺炎球菌ワクチンの開発

東京薬科大学 薬学部 多田 壘

## 1. 研究の目的

世界の死因の第2位は感染症に起因する。中でも肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)は、肺炎を代表とする致死的な疾患を誘発する最も病原性の高い微生物の1つである。これらの疾患により、世界中で年間3~5百万人が犠牲になっている。この問題の解決には、抗生剤が著効を示さない薬剤耐性肺炎球菌の増加もあり、肺炎球菌ワクチンが唯一の戦略だと思われる。現在、肺炎球菌ワクチンとして、23価肺炎球菌多糖体ワクチン及び13価肺炎球菌結合型ワクチンなどが実用化されている。しかしながら、上述のワクチンでは効果を示さない肺炎球菌が増加している。さらに、これらのワクチンは肺炎球菌の莢膜多糖に対する抗体産生を利用しているため、免疫記憶を惹起できず、5年を目処に再度ワクチン接種が必要となるなどの問題点がある。また、最もワクチン接種を必要とする乳幼児は、本質的に多糖に対する液性免疫を十分に誘導できないなどの問題点もある。

これまでに当研究室では、リポソームを利用したアジュバントシステムの開発を行ってきた。この過程において、ある種の正電荷リポソームそれ自体が経鼻投与型の粘膜アジュバントとして作用することを見いだした。本研究では、このリポソームを用いたワクチンシステムを応用し、肺炎球菌の血清型および患者の年齢に依存しない広域スペクトラムを有する経鼻投与可能な次世代型肺炎球菌ワクチンの開発を目指す。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 肺炎球菌抗原の作製

Pneumococcal surface protein A (PspA)のリコンビナント蛋白質を作製した。*S. pneumoniae*菌体からゲノムDNAを抽出し、目的の遺伝子断片をPCRにて増幅後、pET-16bベクターに組み込みpET-16b/PspAプラスミドを作製した。作製したプラスミドを*E. coli* BL21 (DE3)へ形質転換し、得られた菌体を超音波により破砕し、PspA画分を調製した。この画分をHis-tagを利用したアフィニティ精製後、ゲルろ過クロマトグラフィにより高純度のPspA作製を作製した。

### (2) リポソームの作製

DOTAPとDC-cholesterolを1:1の比率で混合し、ボルテックス処理法によりmultilamellar vesicleを作製した。このリポソームを、エクストルーダーにより100 nmのサイズに整粒し作製したもの(DOTAP/DC-cho1リポソーム)を用いた。

### (3) 肺炎球菌抗原とリポソームの経鼻投与による粘膜および全身免疫活性化能の検討

PspA抗原をDOTAP/DC-cho1リポソームと共にBALB/cマウスへ経鼻投与し、最終投与の1週間後に血清および粘膜洗浄液(鼻腔、肺胞および膈)を回収した。PspA特異的抗体産生を、ELISA法により定量した。さらに、免疫マウスより調製した細胞をPspA存在下で培養し、各種サイトカイン産生をELISA法により検討した。

### (4) 肺炎球菌感染モデルマウスに対する肺炎球菌リポソームワクチンの治療効果

PspA抗原をDOTAP/DC-cho1リポソームと共にBALB/cマウスへ経鼻投与し、最終投与の1週間後に致死量の*S. pneumoniae*を経鼻感染させ、生存率の比較を行った。

## 3. 研究の特色

既存の肺炎球菌ワクチンは、血清型により構造が異なる莢膜多糖成分に対する免疫応答を利用しているため、効果を示す肺炎球菌の血清型が限定的かつ免疫記憶の誘導が困難である。また、乳幼児に対して効果が低いなどの問題点もある。本研究で開発を目指す新規リポソームワクチン

は、肺炎球菌の血清型に依存しない蛋白質抗原を用いる事から、これらの全ての問題を解決可能である。さらに、本リポソームワクチンは経鼻投与型であり、肺炎球菌の感染面である鼻・肺粘膜において効果的に免疫応答を誘導できることから、粘膜免疫を誘導出来ない既存の皮下投与型ワクチンよりも感染防御能が高いと予想される。

#### 4. 研究の成果

##### (1) 肺炎球菌抗原とリポソームの経鼻投与による粘膜および全身免疫活性化能

作製したpET-16b/PspAプラスミドを形質転換した*E. coli* BL21 (DE3)を用いて、PspA蛋白質を発現させたところ、可溶性PspA蛋白質が得られた。得られた可溶性画分を、Hisタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過に供することにより、シングルバンドの高純度PspA蛋白質が得られた。このPspAをDOTAP/DC-cho1リポソームと共に経鼻的に免疫したところ、肺胞、鼻腔ならびに腔粘膜洗浄液中に、コントロール群およびPspA単独群と比較し、PspAをDOTAP/DC-cho1リポソームと併用した群において、PspA特異的IgA産生の亢進が見られた。さらに、血清中においても顕著なPspA特異的IgG産生が観察された。また、免疫マウスから調製した脾臓細胞をPspA存在下で培養したところ、IFN- $\gamma$ 、IL-4およびIL-17Aを産生していることが明らかとなった。

##### (2) 肺炎球菌感染モデルマウスに対する肺炎球菌リポソームワクチンの治療効果

PspA抗原をDOTAP/DC-cho1リポソームと共にBALB/cマウスへ経鼻投与し、最終投与の1週間後に致死量の*S. pneumoniae*を経鼻感染させ、生存率をモニタリングした。その結果、PspAとDOTAP/DC-cho1リポソームの併用群では、コントロール群やPspA単独群と比較して優位に生存率に改善が見られた。一方、PspAを単独で免疫した群においては、コントロール群との間に生存率に差はなかった。

本研究により、DOTAPとDC-cholesterolを構成脂質とする正電荷リポソームを粘膜アジュバントとして利用することで、新規の経鼻投与型肺炎球菌ワクチンとして機能することが明らかとなった。このリポソームを用いたワクチンシステムは、脂質成分および搭載物質(核酸、TLRリガンド等)を変化させることにより、容易に活性の改変が可能である点、さらに、種々の標的指向性を付与することが可能である点などから、さらなるシステムの改良により優れた新規肺炎球菌ワクチンとなることが期待される。



# 電子衝撃による分子ガスのフラグメント生成プロセスの研究

東邦大学 理学部 高橋 果林

## 1. 研究の目的

本研究の目的は、プラズマプロセッシング中で引き起こるプロセスガスの動的過程を明らかにすることである。プロセスガス中におけるエッチングの進行・制御の手法は確立されてきているが、これらは経験的な側面が大きく、プロセスガスの反応過程、つまり励起やイオン化、解離(フラグメント)といった動的過程の研究はあまり行われていない。本研究はこのような動的過程に着目し、反応の進行・制御を決めている要因を明らかにすること、さらには、新たなプロセスガス中におけるエッチングの手法の提唱にもつなげることを目指す。

## 2. 研究の計画・方法

本研究室に設置された、高分解能電子エネルギー損失分光器と散乱電子・イオン同時計測装置を用いて、電子衝撃におけるさまざまなプロセスガスの動的過程を探る。まず、高分解能電子エネルギー損失分光器を用いて、断面積の絶対値測定を行う。断面積の絶対値を決定するためには混合ガス法を用いる。その後、散乱電子・イオン同時計測を行い、フラグメント生成断面積を求め、フラグメント生成メカニズムを解明する。以下に、混合ガス法を用いた断面積の絶対値測定および散乱電子イオン同時計測によるフラグメント生成プロセスの研究の手法について述べる。

### (1) 混合ガス法を用いた電子衝撃における絶対断面積測定

混合ガス法とは、断面積のよく知られたヘリウム(He)と試料ガスの混ざった混合ガスに対してスペクトルを得て、Heの励起ピークを指標にし、試料ガスの励起断面積の絶対値を決定する手法である。混合ガス法は、断面積の絶対値化として有力な手法であると同時に、プロセスガスである $CF_4$ や $NF_3$ などの毒性・可燃性・腐食性ガスをHeにより希釈して用いることで、特殊ガスを安全に使用することができるというメリットがある。Heとプロセスガスの混合ガスに対して、電子エネルギー損失スペクトルを得て、プロセスガスの各励起に対する微分断面積および、イオン化に対する二重微分断面積の絶対値を決定する。本研究では、ガスノズル噴出後のガスの密度分布をシミュレーションし、実際の測定結果と合わせて混合ガス法の有用性を評価する。

### (2) 散乱電子・イオン同時計測によるフラグメント生成プロセスの研究

本研究では、分子がどのような状態を経由し、どのように崩壊過程を経たかといった一連の動的過程を調べるために、散乱電子・イオン同時計測実験を行う。これは、反応後の生成量を電子エネルギー損失値(つまり分子の励起エネルギー)の関数として測定することができるため、反応の中間状態および終状態を捉えることができる。分子の励起エネルギーの関数として、各イオン生成断面積および非イオン化断面積、およびこれらから得られる崩壊の分岐比を決定し、反応過程の詳細な情報を捉え、フラグメント生成メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の特色

本研究の特色は、研究データの少ないプロセスガスに対する微分断面積やフラグメント生成断面積を絶対値として得ることである。これらのデータは、プラズマプロセッシングにおいて反応の進行・制御における基礎データとなるほか、新たなプロセスガス中における制御手法の提唱にも繋がる。

また、多くの研究は、反応後にどのような生成物がどの程度生成するかといった、反応の終状態を捉えるものであるのに対し、本研究は終状態だけでなく、反応の中間状態を捉えることにある。反応の中間状態の情報を得るために、散乱電子・イオン同時計測実験を行い、入射電子のエネルギー損失値、つまり分子の励起エネルギーを特定した励起断面積およびフラグメント生成断面積を測定する。これらの情報は、フラグメント生成メカニズムの詳細を明らかにするのに重要

である。このように、プロセスガスの励起・イオン化・解離といった電子衝撃により引き起こる一連の動的過程を明らかにすることが本研究の特色である。

#### 4. 研究の成果

本研究では、まず断面積の絶対値化の手法に採用した混合ガス法の有用性を評価した。また、実際に簡単な分子である重水素 ( $D_2$ ) に対して散乱電子 - イオン同時計測を行い、フラグメント生成プロセスに対する知見を得た。以下にこれらの成果を示す。

##### (1) 混合ガス法の有用性の評価

本研究では、まず断面積の絶対値測定に適用した混合ガス法の有用性を評価するために、ガスノズルから噴出される混合ガスのガス密度分布をシミュレーションした。シミュレーションより、ガスノズルの長さ・径などに対して噴出された  $N_2$ -He 混合ガス ( $N_2:He = 1:1$ ) の密度比 ( $N_2/He$ ) をプロットした結果、想定しているガスノズルでは、 $N_2/He$  密度比はわずかに1より大きく、ガス噴出密度に分子量依存性があることがわかった。実際に、 $N_2$  に対する微分断面積の測定結果では、高分解能電子エネルギー損失分光器を用いて導出した断面積はわずかに補正項を加える必要があることが示された。なお、散乱電子 - イオン同時計測装置における測定では、散乱角などの不確定さが大きくなるため、わずかな密度比のずれは考慮する必要がないことがわかった。(日本物理学会2015年秋季大会17pAA-6)

##### (2) 散乱電子 - イオン同時計測によるフラグメント生成プロセスの研究

本研究では、まず簡単な分子として重水素 ( $D_2$ ) に対して入射エネルギー200 eV、散乱角6度の条件において実際に測定を行い、電子のエネルギー損失値 (つまり分子の励起エネルギー) に対する生成イオン  $D_2^+$  および  $D^+$  の生成断面積を決定した。この条件では、フラグメントイオン  $D^+$  の生成が低エネルギー損失値で大幅に抑制されることが示された。また、フラグメント生成比 ( $D^+/D_2^+$ ) や非イオン化断面積から、光学的禁制な二電子励起状態である  $Q_1^1\Sigma_g^+(1)$  状態に対する情報が得られ、その崩壊の分岐比を (解離性自動イオン化 : 中性解離) = 1 : 9 と決定した。これらことから、 $D_2$  ではフラグメントを伴うイオン化プロセスは起こりにくいことがわかり、 $D^+$  の生成を抑制していることが示された。(原子衝突学会第40回年会ホットトピック講演H7、日本物理学会2016年秋季大会15aKK-4)

# 2光子励起顕微鏡を用いた高次脳における歯痛の発症機序の解明 — in vivo イメージング法による研究 —

日本大学 歯学部 藤田 智史

## 1. 研究の目的

### (1) 研究開始当初の背景

- ① 歯の痛みは、耐え難い痛みにもかかわらず、患者自身が患歯を判別できないという臨床症状を示す例が少なくない。
- ② 歯の痛みの原因となる歯髄を除去する処置となる抜髄後も3-6%の患者がその後も引き続き痛みを訴えることや、歯痛錯誤と呼ばれる患歯とは異なる歯が痛むように感じる臨床症状が存在しており、歯の痛みや末梢神経の変化は中枢神経の処理機構に可塑的变化を生じさせると推測されている。
- ③ 歯髄からの情報のほとんどは痛みであり (Shigenaga et al., 1974; Belforte and Pazo, 2005)、その処理部位は、ラットでは中大脳動脈の尾側に位置する体性感覚野と島皮質の間であること、上下顎の応答部位はほぼ重なることが光学計測で明らかになっている (Nakamura et al., 2015, 2016)。
- ④ しかしながら、この部位のニューロンが実際どのように情報処理をしているかについては不明な点が多い。

### (2) 研究の目的

- ① 本研究では、上下顎の歯の痛みの情報がラットの大脳皮質でどのように処理されているのかを明らかにすることを目的とした。そのために、ラットの上下顎の臼歯歯髄に電気刺激を行った時の応答を、2光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージングで解析した。
- ② また、神経障害性動物モデルとして有名であり、歯痛錯誤の動物モデルとしての可能性が指摘されている下歯槽神経切断ラットにおける情報処理様式の変化を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 動物標本の作製

- ① 抑制性ニューロンにVenus蛍光蛋白を発現している遺伝子改変ラットにウレタン (1.5 g/kg) を腹腔内投与し、脳定位固定装置に固定し、上顎歯髄刺激で初期応答が認められると考えられる部位の頭蓋骨に骨窓を形成した。その後硬膜を除去した。

### (2) 二光子励起共焦点レーザー顕微鏡によるカルシウムイメージング

- ① 抑制性ニューロンを後の解析で同定できるように、2光子励起顕微鏡を用いて、3次元的にVenus蛍光蛋白を発現したニューロンの分布を記録した。
- ② カルシウム指示薬のOGB-488およびアストロサイトのマーカーであるSR-101を観察野となる部位に200  $\mu$ mの深さで微量注入した。

### (3) 歯髄に対する電気刺激

- ① 刺激のために、上下の臼歯の咬合面を削合して歯髄腔を露出させ、エナメル線を挿入した。刺激装置 (STG2008、Multi Channel Systems社製) を用いて、過去の報告に従い (Nakamura et al., 2015, 2016) 7 Vの刺激を5回50Hzの頻度で行い、ニューロンの応答を20回記録し、平均加算した。

### (4) 下歯槽神経切断モデルの作製

- ① イソフルラン(導入: 5%, 維持: 3%)による吸入麻酔で、術野の消毒後、右側の下顎骨を露出させて、骨削除し下歯槽神経を露出させ、眼科剪刀にて神経を切断後、閉創・縫合した。感染予防として、抗菌薬の投与を行った。

- ② カルシウムイメージングによる観察時期は、異常疼痛が出現することが分かっている切断1週間後とした。
- ③ 下歯槽神経切断モデルにおける歯髄刺激は、下顎の神経が一週間では機能が回復していない。そこで検討は上顎に対してのみ行い、対照群と比較した。

### 3. 研究の特色

#### (1) ニューロンの識別

- ① 本研究では、Venusラットを用い興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの分別を解析時に分布を再構成することで可能としたのは本実験の大きな特色である。

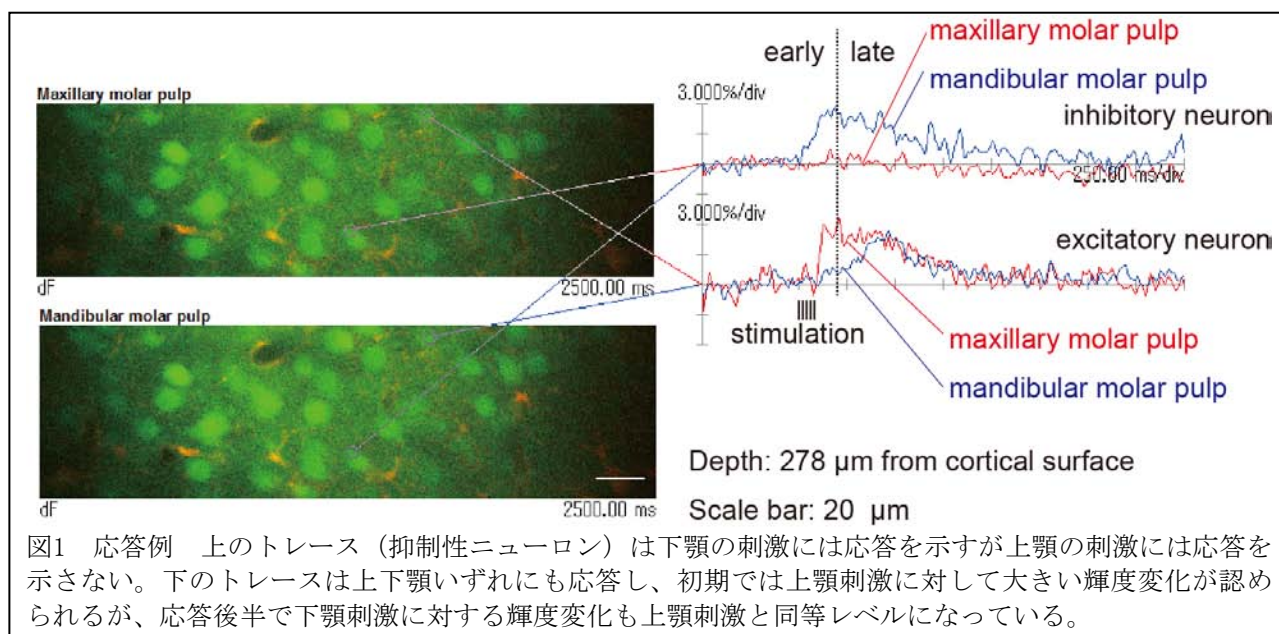
#### (2) ニューロン単位での応答の観察

- ① 用いた2光子励起顕微鏡によるカルシウムイメージングは、先進的な手法であり、細胞単位で応答の有無、強度、時間的変化等の活動性の詳細を検討した。

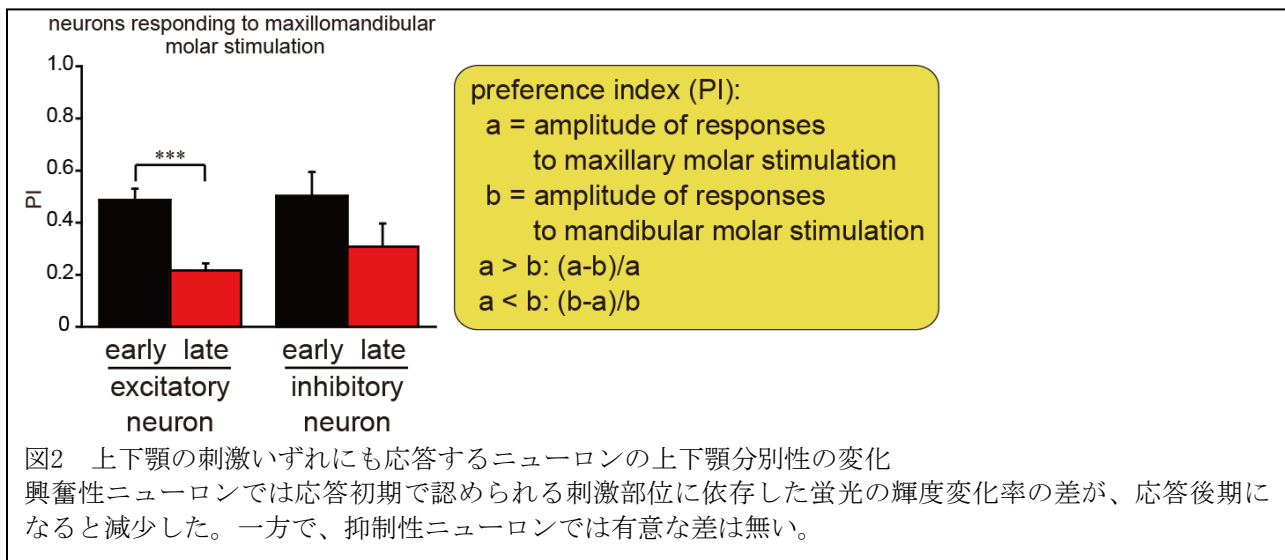
### 4. 研究の成果

#### (1) 正常動物における上下顎臼歯歯髄に応答するニューロンの特性

- ① 興奮性ニューロンを394個観察し、103個のニューロンが応答を示した。うち上顎のみに応答するニューロンが37個、下顎のみに応答するニューロンが22個、いずれにも応答するニューロンは44個 (図1) であった。
- ② 抑制性ニューロンを58個観察し、20個のニューロンが応答を示した。うち、上顎のみに応答するのが7個、下顎のみに応答するのが7個(図1)、いずれにも応答するニューロンは6個であった。



- ③ 図1に示すように、上下顎の刺激に対する応答性は、応答の有無、強弱に加えて時間的な要素にも違いをもたらした。この点をさらに追及する目的で、上下顎の刺激に対する応答強度の差を反応の前半、後半に分けて検討したところ、応答の前半では刺激部位に依存して応答強度が異なるのに対して、後半になるとその優位性が減弱することが明らかとなった (図2)。
- ④ これらのことから、上下顎の分別はニューロン単位ではある程度存在しているが、完全に分かれているわけではなく、特に応答の後半になると上下顎の分別性が乏しくなる可能性が示唆された。



(2) 下歯槽神経切断による応答特性の変化

- ① 下歯槽神経を切断した動物では、上顎臼歯歯髄刺激に応答するニューロンの割合は増加していた。
- ② 輝度変化率は興奮性ニューロンでは変化しなかったが、抑制性ニューロンでは増大した。
- ③ 輝度変化の持続時間は興奮性ニューロンで延長したが、抑制性ニューロンでは変化しなかった。
- ④ これらのことから、抑制性ニューロンの活動性は上昇しているにもかかわらず、興奮性のニューロンの活動が持続することが示唆され、抑制性ニューロンによる興奮性ニューロンに対する抑制機能が低下している可能性が考えられた。

(3) まとめ

- ① 大脳皮質における歯の痛みの情報処理をする部位で、興奮性ニューロンの一部は上下顎いずれにも応答し、特に応答の後半になるほど、その分別性が減弱することが明らかとなった。
- ② 歯の痛みの情報処理を行っている大脳皮質は末梢の神経障害によって可塑的变化が誘発され、抑制と興奮のバランスが変化することが示唆された。この可塑的变化の根底にあるメカニズムについては今後、さらなる検討を行いたい。

# 急性骨髄性白血病におけるDNMT3a遺伝子変異の意義の解明

日本医科大学 医学部 脇田 知志

## 1. 研究の目的

DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3a)変異は急性骨髄性白血病(Acute Myeloid Leukemia: AML)症例の約20%に検出されるAML関連遺伝子変異である。このDNMT3a変異はNPM1変異やFLT3-ITDなど他の遺伝子変異と重複して観察されること明らかにされているが、その機能は未だ十分には解明されていない。過去に我々は、再発AML症例に対するAML関連遺伝子変異の解析を行い、DNMT3a変異が初発・再発時に横断的に検出されることを見出し、さらにはDNMT3a変異が一部のmolecular genetic abnormalityの獲得、蓄積に関連し再発/治療抵抗性を誘導している可能性を報告した(Leukemia. 2013; 27:1044-52)。我々は本研究を通じてAML関連遺伝子変異の網羅的解析を行い、DNMT3aならびにTET2, IDH1/2などのDNA methylation modifiersの変異がmolecular genetic abnormalityの獲得・蓄積に与える影響、予後因子としての有用性について解析を行った。

## 2. 研究の計画・方法

日本医科大学附属病院またはその関連施設において治療されたAPLを除く初発*de novo* AML症例を対象として検体の保存ならびに分子学的検査・研究についての同意を得たうえで登録を行い。下記の網羅的遺伝子変異解析を行った。

### ① 染色体解析

全症例を対象に初回診断時骨髄検体を用いてG-band解析を施行した。骨髄検体の採取が困難であった症例では末梢血検体を用いて解析を行った。

### ② 分子遺伝子異常解析

20 遺伝子 *TET2*, *DNMT3a*, *ASXL1*, *MLL1*, *RUNX1*, *KIT*, *TP53*, *PTPN11*, *GATA2*, *WT1*, *STAG2*, *RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *DAXX*, *BCOR*, *BCORL1*, *NF1*, *DDX41*, *PHF6*のエクソンに対応したオーダーメイドプローブをもちいてエマルジョンPCRによるオリゴヌクレオチドライブラリーの作成を行い、Ion PGM™によるシーケンシングを行った。また、過去の報告においてHot Spotが決定されている*F1t3-ITD*, *F1t3-TKD*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, *N-RAS*, *K-RAS*、エマルジョンPCRのプローブ設計が困難であった*CEBPA*、Ion PGM™による解析が困難な*MLL-PTD*に対しては、過去に報告した既知の方法(Leukemia. 2013 Apr;27(5):1044-52)を用いて検索を行った。

### ③ 統計解析

患者背景はChi-square検定、Fisher検定、t検定(Mann Whitney test)によって比較解析を行った。また、Kaplan-Meier method log-rank testによってOverall survival(OS), Cumulative incidence of relapse (CIR)を解析した。予後因子については、Cox proportional hazards による多変量解析を行い、独立事象を抽出するために a stepwise backward procedure selection model を用いた。本検討における統計解析には GraphPad PRISM(ver. 5), IBM SPSS Statistics (version 21.0.0.0) softwareが用いられた。

## 3. 研究の特色

### (1) 急性骨髄性白血病における分子遺伝子異常の蓄積および腫瘍内ヘテロ不均一性に注目した点

多くの大規模コホート研究によってAMLの多様な遺伝子異常が明らかにされ、複数の遺伝子変異が協調してAMLの発症に関与することが明らかにされてきている。一方で、新規AML関連遺伝子変異を用いた予後層別化が試みられてきたが、多くの遺伝子変異が重複するために分類は複雑化し、結果として未だ一致した見解が得られていない。本調査は分子レベルでの遺伝子異常の重複、すなわち腫瘍内ヘテロ不均一性が治療抵抗性クローンの獲得に関わり、AMLの再発して

は生存予後に強くかかわる可能性を示した。腫瘍内ヘテロ不均一性に注目することによって、複雑化したAMLの予後層別化はより正確なものとなる可能性がある。

#### (2) 急性骨髄性白血病に最も高頻度に検出されるDNA methylation modifiersに着目

DNA methylation modifierであるDNMT3a, TET2ならびにIDH1/2の遺伝子異常はAMLにおいて最も高頻度に検出される遺伝子異常であるが、その機能は未だ十分には解明されていない。我々は臨床検体を用いた遺伝子変異解析の結果から、これらの遺伝子異常が分子レベルでの遺伝子不安定性に関わる可能性に注目してきた。今回の我々の調査は、DNA methylation modifiersの変異が、分子レベルでの遺伝子異常の蓄積に大きく関わることを示した。癌抑制遺伝子として知られるTP53は染色体異常を引き起こす遺伝子不安定性からゲノムを守るその性質から“the guardian angel of genome”と呼ばれてきた。DNA methylation modifiersは分子レベルでの遺伝子不安定性からgenomeを守るもう一つの“the guardian angel of genome”なのかもしれない。AMLにおいて遺伝子変異の蓄積がどのように引き起こされているのかを明らかにすることで、AMLの新たな治療戦略の開発に結び付く可能性がある。

## 4. 研究の成果

#### (1) Molecular genetic abnormalityの多重重複が染色体予後中間群AMLの予後を決定する

我々は上記のようにAML271症例に対してAML関連遺伝子に対する網羅的遺伝子変異解析を行い、後方視的に全生存期間 (Overall survival; OS)、累積再発率 (cumulative incidence of relapse: CIR) に与える影響について検討した。molecular genetic abnormalityの重複は染色体予後中間群に高頻度検出され (平均2.76個/症例)、このうち3つ以上のmolecular genetic abnormalityを有するcomplex molecular genetic abnormality (CMGA) を認める症例では有意にOSが短く、CIRが高いことが示された (5年OS: CMGA陽性群, 18.1%; CMGA陰性群, 45.9%;  $p = 0.0006$ ) (5年CIR: CMGA陽性群, 83.2%; CMGA陰性群, 52.6%;  $p = 0.0052$ )。このCMGA陽性は65歳以下の移植適応年齢の症例、正常核型群、FLT3-ITD 陰性群いずれのグループにおいても有意なOSとCIRを予測する予後不良因子であり、さらに多変量解析においても染色体予後中間群移植適応年齢症例のOSにかかわる独立した予後不良因子として抽出された (HR: 3.717,  $p = 0.0007$ , 95%CI: 1.7331-7.9722)。

#### (2) DNA methylation modifiers (DNMT3a, TET2ならびにIDH1/2) の変異はmolecular genetic abnormalityの多重重複に強く関与している。

CMGAグループのサブ解析ではDNA methylation modifiers (DNMT3a, TET2ならびにIDH1/2) の変異、FLT3ITD, NPM1変異が高率にmolecular genetic abnormalityの多重重複に参加することが明らかになった。近年の研究報告はDNA methylation modifiersの変異が前白血病段階から検出される創始遺伝子変異であることを示しており (Nature. 2014; 506(7488):328-33.)、これらの変異がAML細胞のFLT3ITD, NPM1変異獲得にかかわった可能性が高い。また興味深いことに、このmolecular genetic abnormalityの多重重複すなわち腫瘍内ヘテロ不均一性は、強力な予後不良因子であるFLT3ITD変異を伴う症例で頻度が高く、逆に強力な予後良好因子であるCEBPA両アレル変異を伴う症例では頻度が少ないことも明らかになった。この事実は、AMLの予後が遺伝子不安定性に導かれた腫瘍内ヘテロ不均一性に支配されている可能性を示している。

上記の成果は、Nature Publishing Group 刊行の Leukemia. 2016;30(3):545-54. に掲載された。

# ヒトCD269特異的キメラ抗原受容体の至適化に関する研究 —多発性骨髄腫を標的とした養子免疫遺伝子療法の開発—

自治医科大学 医学部 内堀 亮介

## 1. 研究の目的

近年、高齢化社会の進展とともにがんの罹患率ならびに死亡率は益々増加傾向にある。多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM) も高齢化社会の到来とともに増加傾向が認められてきているが、MMの治療法は未だ確立されておらず、分子標的治療薬 (ベルケード) や免疫調節薬 (サリドマイド、レナリドミド) の臨床開発が進み治療成績も向上しつつあるが、満足できるとは言いがたく、根治療法は存在しない。造血幹細胞移植と大量化学療法との併用による治療においても一定の効果が認められているが、治療の適応が65歳以下に限られるといった制限がある。そこで、従来の治療法とはコンセプトの全く異なりかつ全患者に施行可能な新しい治療法の開発が期待されている。例えば、抗がん作用を有する治療薬のがん病巣へのターゲティング技術の開発が、副作用を減じかつ有効性を高める上で極めて重要であり、遺伝子改変T細胞を用いた養子免疫遺伝子療法に注目が集まっている。

腫瘍などの標的細胞を特異的に認識する抗体とT細胞抗原レセプター (T-cell receptor; TCR) のシグナルドメインを遺伝子工学的に結合したキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor; CAR) が開発されている。CARを用いた治療戦略においてはHLA非拘束性に標的細胞を殺傷することが可能であるため、抗原特異的なTCRをT細胞に遺伝子導入して治療に用いるTCR遺伝子治療と比較して適応範囲は広く、これが利点の1つとなっている。特にヒトCD19特異的CARを用いた臨床研究が盛んに行われており、高い治療有効性が認められている。したがって、MM細胞を標的としたCARを用いることで、従来の治療には反応が乏しいような症例でも有効な治療法であると考えられ、再発・難治性の多発性骨髄腫の治療にも期待が持てる。しかし、ヒトMM細胞は一般的にCD19陰性の細胞集団であり、MMを標的としたCARを新たに作製する必要がある。申請者は、MM細胞で特に強く発現しているが、B細胞系以外の細胞 (造血幹細胞も含む) には発現が認められていない、CD269に対するモノクローナル抗体を作製した。

本研究では、多発性骨髄腫の克服に向けた中核となる新規治療法の開発を目的として、ヒトCD269特異的CARの至適化を行った。

## 2. 研究の計画・方法

ヒトCD269に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、最終的にハイブリドーマ6クローンを選別・取得した。この得られたハイブリドーマをもとにして、抗体の遺伝子情報の取得、単鎖抗体の作製、CARの作製と機能検定までを本研究で行った。詳細は下記 (1) ~ (6) に記した。

- (1) 取得抗体の抗原特異性の確認：得られたモノクローナル抗体の、ヒトCD269に対する特異性を確認する。具体的にはK562細胞、ヒトCD267強制発現K562細胞、ヒトCD268強制発現K562細胞、ヒトCD269強制発現K562細胞、マウスCD269強制発現K562細胞を使用し、ヒトCD269強制発現K562細胞にのみ反応する抗体を選別した。また、得られた抗体を用いて、ヒトMM細胞に対する反応性を検定した。
- (2) 取得抗体の遺伝子配列の解析：方法 (1) において選択したハイブリドーマからtotal RNAを調製し、5' RACE PCRによりH鎖、L鎖それぞれについて可変部位を含むcDNAを増幅した。増幅産物を回収してプラスミドベクターにクローニングし、複数のクローンについて塩基配列解析を行った。
- (3) ヒトCD269特異的CARレトロウイルスベクターの作製：得られた塩基配列をもとに、[ヒトGM-CSFレセプターリーダーペプチド][ヒトCD269特異的抗体VL(軽鎖可変領域)ドメイン][リンカー][ヒトCD269特異的抗体VH(重鎖可変領域)ドメイン][ヒトCD28細胞外ドメインの一部][ヒ



トCD28膜貫通ドメイン][ヒトCD28細胞内シグナルドメイン][ヒトCD3 $\zeta$ 細胞内シグナルドメイン]、または[ヒトGM-CSFレセプターリーダーペプチド][ヒトCD269特異的抗体VHドメイン][リンカー][ヒトCD269特異的抗体VLドメイン][ヒトCD28細胞外ドメインの一部][ヒトCD28膜貫通ドメイン][ヒトCD28細胞内シグナルドメイン][ヒトCD3 $\zeta$ 細胞内シグナルドメイン]からなるヒトCD269特異的CARの人工遺伝子を作製した。リンカーについては種類や長さを変えて複数検討した。作製したヒトCD269特異的CAR遺伝子をレトロウイルスベクターに搭載し、VSV-Gでシュードタイプ化した一過性のレトロウイルスベクターを作製した。CARからの活性化シグナルによってレポーター遺伝子（ルシフェラーゼELuc）の発現を誘導するJurkat細胞に、先程のウイルスベクターで遺伝子導入した（Jurkat/CD269-CAR/iELuc細胞とした）。

- (4) ヒトCD269特異的CARの機能検定：本研究ではMM細胞としてU266やRPMI8226細胞を使用した。また、CD269は全てのMM細胞株で発現していると考えられるが、CD269陰性コントロール細胞としてK562を使用し、ヒトCD269強制発現K562を陽性コントロール細胞として使用した。Jurkat/CD269-CAR/iELuc細胞を標的細胞と共培養し、誘導型ルシフェラーゼ遺伝子（iELuc）の発現強度から、CARの機能性を比較検討した。具体的には、CD269陰性のK562細胞と共培養した時にはJurkat/CD269-CAR/iELuc細胞のiELucの発現は誘導されず、CD269陽性の細胞と共培養した時にiELucの発現が誘導されるCARを検定により選別した。
- (5) ヒトCD269特異的CARレトロウイルスベクター産生細胞の取得：方法（4）において選択したCARのコンストラクトを搭載した一過性のレトロウイルスベクター（VSV-Gでシュードタイプ化）を作製した。これをPG13細胞に遺伝子導入し、シングルクローン化して、レトロウイルスベクターの安定産生株（PG13-269CAR）を取得した。
- (6) CD269-CAR発現リンパ球の*in vitro*における細胞傷害活性の評価：方法（5）において作製したRV-PG13の培養上清を用いて、健康人由来リンパ球にヒトCD269特異的CARを遺伝子導入した。このリンパ球を標的細胞（K562、K562-CD269、U266）と*in vitro*において異なるE/T比で共培養し、培養上清中のLDH活性を測定した細胞傷害活性を評価した。また、CARを導入したリンパ球のサブセットをFACSで解析し、さらに活性化時のIFN- $\gamma$ 産生をELISAで確認した。

### 3. 研究の特色

本研究を始めるにあたり、ヒトCD269に対する新規モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。作製した抗体をCARとして使用する為には、まず抗体の抗原結合部位を構成する2つの可変領域断片VLとVHの遺伝子配列情報を取得する必要がある。さらに、一本鎖抗体化するためには、リンカーと呼ばれる配列によってVLとVHを遺伝子工学的に連結する必要がある。しかし、挿入するリンカー配列によっては抗体としての機能が消失してしまう可能性があり、単鎖抗体化する過程における問題となっているが、具体的な作成方法はそれぞれの場合によって異なり、統一された見解はない。したがって、本研究においてもさまざまなリンカーで連結した単鎖抗体を作製し、機能性（特にリンパ球の活性化）に優れたCARを選別することが重要となる。

当研究室ではこれまでに、キメラ抗原受容体からの活性化シグナルによって遺伝子発現を誘導する、分子スイッチ機能を有したプロモーターの開発を行ってきた。このプロモーター下にレポーター遺伝子を挿入しておくことで、この発現カセットを導入したJurkat細胞にCARを導入すると、CARの活性化度合いを可視化あるいは定量化することができる。具体的には、標的となる細胞と共培養した場合、導入したCARが機能的であれば、レポーター遺伝子の発現量を比較・定量化することで、より機能性に優れたCARを取得することができる。このような方法を用いたCARの機能検定はこれまでに報告例はなく、本研究の特色のひとつである。

また、こうして作製されたヒトCD269に対するCARは、CD19に対するCARを用いた臨床研究からも推測されるように、重篤な副作用を認めることなく、効果的に抗腫瘍効果を誘導できると考えられる。そして、患者由来のリンパ球さえ採取出来れば年齢等の制約を受けることなく治療の実施ができるため、現状の治療法では治癒が見込めない再発・難治性MM患者に対する新たな治療戦略となりうる。

#### 4. 研究の成果

- (1) 取得抗体の抗原特異性の確認：抗CD269抗体を産生するハイブリドーマを6クローン取得した。その培養上清を検定用細胞に加え、二次抗体にPE (phycoerythrin) を結合した抗マウスIgGで標識してフローサイトメーターで確認した。得られた全ての抗体はCD269陽性の細胞とのみ反応した。また、得られた抗体のサブクラスは全てIgG1であった。
- (2) 取得抗体の遺伝子配列の解析：マウスIgG1の定常領域を標的としたプライマーを作製し、5' -RACE-PCRにて可変領域の遺伝子配列を解析した。CDR1-3の領域は全て異なる塩基配列であり、得られたハイブリドーマはそれぞれ異なる抗体を産生していることがわかった。
- (3) ヒトCD269特異的CARレトロウイルスベクターの作製：得られた塩基配列をもとに、まずは18アミノ酸のリンカー配列を利用したヒトCD269特異的CARの人工遺伝子を作製した。得られた抗体の可変領域はクローン間で全て異なっていたため、全てのクローンについてそれぞれCARを発現するレトロウイルスベクターを作製した。293T細胞を用いて一過性のレトロウイルスベクターを作製したところ、ほぼ同程度のRNA力価のウイルス上清を回収することができた。
- (4) ヒトCD269特異的CARの機能検定：回収したウイルス上清を用いて、iELucと共にレトロネクチン法でJurkat細胞に遺伝子導入した。この遺伝子改変Jurkat細胞は、CD269陽性細胞と共培養した時にのみルシフェラーゼ遺伝子の発現が強く誘導された。本研究で得られた抗体では[VLドメイン][リンカー][VHドメイン]で連結したもののほうが[VHドメイン][リンカー][VLドメイン]で連結したタイプよりも、自己活性(抗原刺激がない状態でのiELucの発光強度)のレベルが低く、かつ抗原刺激後のiELucの発光強度が高いことがわかった。その中で、3.3Eクローン由来のCARは特に反応性が良く、リンカー長を変えて同様の検定を行ったところ、VL、VHの順に20アミノ酸のリンカーで連結したもの(3.3E-L20H)が抗原特異性・反応性に最も優れていることがわかった。
- (5) ヒトCD269特異的CARレトロウイルスベクター産生細胞の取得：269-CAR(3.3E-L20H)を発現するレトロウイルスベクターを安定に産生するプロデューサー細胞を作製した。一過性のレトロウイルスベクター上清を濃縮した後にPG13細胞へ遺伝子導入した(PG13-269CAR)。PG13-269CARのシングルクローン化を行い、高力価のウイルス上清を回収できる細胞を選択した。このウイルス上清を用いて、レトロネクチン法にて健常者由来のリンパ球に遺伝子導入を行った。遺伝子導入後の増殖は良好であり、遺伝子導入効率は40-70%であった。
- (6) CD269-CAR発現リンパ球の*in vitro*における細胞傷害活性の評価：269-CARリンパ球は*in vitro*においてCD269陽性標的細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示した。また、CD269陽性の標的細胞との共培養時にのみIFN- $\gamma$ の産生を認めた。

# DNAメチル化反応を触媒する機能性核酸の同定 —高感度メチル化DNA検出法開発に向けた基礎研究—

東京工科大学 応用生物学部 吉田 亘

## 1. 研究の目的

DNAメチル化とはCG配列中のシトシン塩基がメチル化される現象であり、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている。一方ゲノムの異常なメチル化は癌など様々な疾患に関連しており、癌関連遺伝子のDNAメチル化レベルは癌のバイオマーカーとして期待されている。DNAメチル化レベルを検出する方法としては、メチル化シトシンには反応しないが、非メチル化シトシンをウラシルに化学置換させる亜硫酸水素ナトリウムを用いる方法がある。しかしこの手法は亜硫酸水素ナトリウム処理により9割以上のゲノムが分解されるため、この方法を用い数個の癌細胞を対象としてDNAメチル化レベルを測定することは困難である。PCRを用いれば数個の癌細胞から標的遺伝子を増幅できるが、合成されたPCR産物にはメチル基が維持されないため、通常のPCRでDNAメチル化レベルを測定することは不可能である。そこで本研究ではヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeを同定し、それをPCR中に加えればメチル基が維持されたまま標的遺伝子を増幅できるのではないかと考えた。つまり亜硫酸水素ナトリウムを用いずに、PCRを用いて高感度にメチル化レベルを測定できるのではないかと考えた。本研究ではランダムDNAライブラリーからヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeを同定することを試みた。

## 2. 研究の計画・方法

ヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeを同定するために下記のスクリーニングを実施した(図1)。

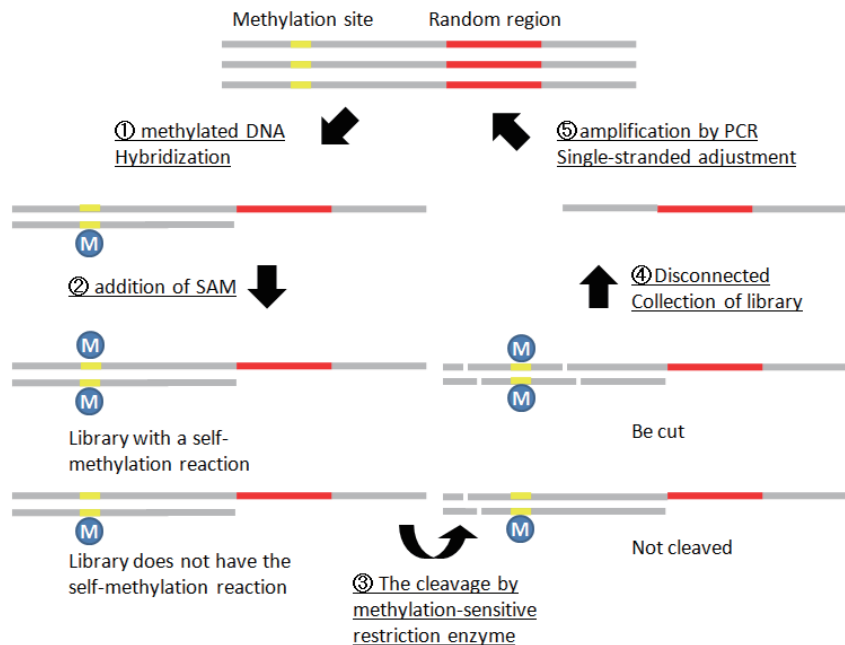


図1. DNAメチル化反応を触媒する機能性核酸の同定方法

(1) 5'側にメチル化サイト(CG配列)と3'側にランダム配列を含むDNAライブラリーに、5'側の配列と相補的な配列であり、かつメチル化したCG配列を含むDNAをハイブリダイゼーションさせた。

- (2) 調製したDNAライブラリーにメチル基のドナーとなるS-アデノシルメチオニン (SAM) を加え、一晚インキュベートした。
- (3) メチル化反応を触媒する機能性核酸は分子内の5'側のメチル化サイトをメチル化すると考えられる。そのため、両ストランドともメチル化されたDNAのみ切断する制限酵素MspJIを用いてDNAメチル化反応を触媒したDNAライブラリーのみ切断した。
- (4) MspJIにより切断されたDNAライブラリーを電気泳動法により回収した。
- (5) 回収したライブラリーをビオチン修飾プライマーによりPCRにより増幅し、アビジンビーズを用いて一本鎖DNAを調整した。

上記ステップを3回繰り返す、ヘミメチル化反応を触媒するDNAライブラリーが濃縮されたか検討した。

### 3. 研究の特色

本研究で開発する手法により癌関連遺伝子のDNAメチル化レベルを高感度に測定できれば、マーカー蛋白質や画像診断では発見が難しい癌の早期診断に多大な恩恵をもたらすと期待できる。亜硫酸水素ナトリウムを用いない方法としては、メチル化シトシンと反応する分子を修飾させたDNAプローブを用いる方法やメチル化DNA結合蛋白質を用いる方法が報告されている。しかし、これらの方法は検出シグナルをPCRにより増幅することができないため、高感度なメチル化DNA検出方法への応用ができないという問題点がある。一方、本研究で開発する方法はメチル化状態を維持したまま標的遺伝子をPCRで増幅するため、高感度に標的遺伝子のメチル化を検出できる方法である。

### 4. 研究の成果

合成したライブラリーにメチル化したDNAをハイブリダイゼーションさせ、SAMを加えた後にMspJIで切断した結果を図2(左)に示す。これまでの研究により切断していないライブラリーのバンドは約250bp付近に、MspJIで切断されたライブラリーのバンドは約150bp付近に得られること示している。1ラウンド目では150bp付近にバンドが得られなかったが、この領域にメチル化反応を触媒するライブラリーが存在すると仮定し、この領域を切り出し精製した。この精製産物を鋳型にPCRを行った結果、正確にDNAライブラリーを増幅することができたことから、切り出し精製を行ったサンプル中に目的のライブラリーが含まれることが示された。

そこで、1ラウンド目で回収したライブラリーをPCRで増幅し、一本鎖DNAを調整後、同様にスクリーニングを実施した。ライブラリーにSAMを加え、MspJIで切断した結果を図2(中央)に示す。2ラウンド目では若干150bp付近にバンドが観察されたことから、ヘミメチル化反応を触媒するライブラリーの濃縮が確認された。

最後に3ラウンドのスクリーニングを同様に実施した。ライブラリーにSAMを加え、MspJIで切断した結果を図2(右)に示す。第1ラウンド、第2ラウンドと較べて、ヘミメチル化反応を触媒したライブラリーである150bp付近のバンドが濃くなっていることが観察された。またヘミメチル化反応を触媒していないライブラリーである250bp付近のバンドは第1ラウンド、第2ラウンドと比較して薄くなっていることから、ヘミメチル化反応を触媒するライブラリーが濃縮できていることが確認できた。今後このライブラリーの配列を解析することによりヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeが同定できることが期待できる。

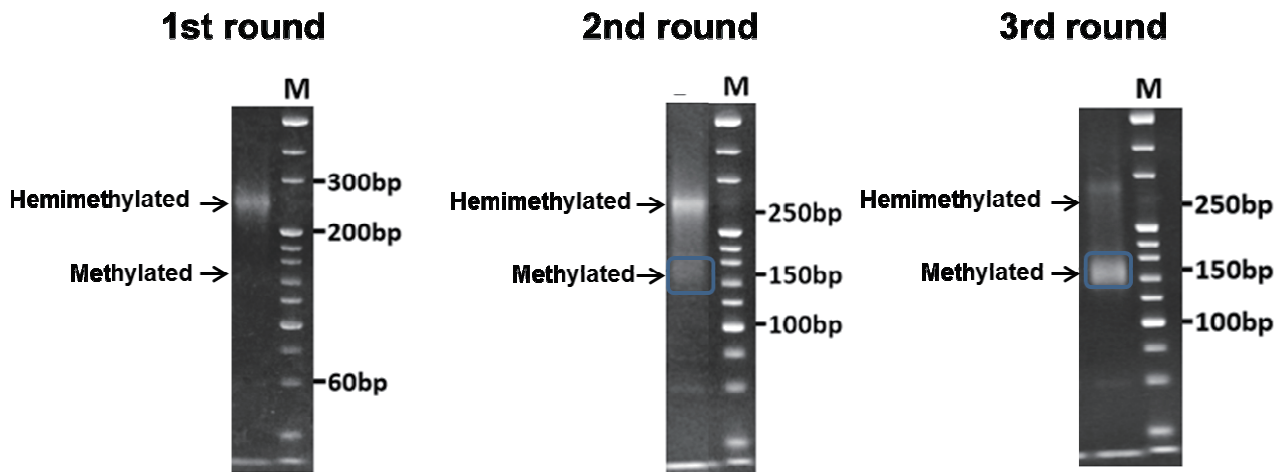


図2. ヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeのスクリーニング結果  
 左：第1ラウンド、中央：第2ラウンド、右：第3ラウンド

# 中枢神経系持続感染ウイルスによるオートファジー調節機構の解明

麻布大学 獣医学部 藤野 寛

## 1. 研究の目的

ボルナ病ウイルス (BDV) はヒトを含む多くの哺乳動物に感染し、一部の動物では非化膿性脳脊髄炎を引き起こすことが知られているウイルスである。これまでに、BDVは様々なヒト中枢神経系疾患と関連すると報告されている。加えて、牛などの産業動物においても、リピートブリーダーといった繁殖障害との関連が報告されている。BDVは高い神経親和性を示し、非細胞傷害性に中枢神経系に持続感染を成立させるという特徴を持つウイルスである。神経細胞という特殊な環境において、宿主への影響を抑えながら効率的にウイルスが増殖するためには、ウイルスタンパク質の量を制御することが重要であると考えられる。過去の網羅的研究においてBDVのPタンパク質はオートファジー関連因子との結合が示唆されている。そこで、Pタンパク質は宿主オートファジー関連因子と結合し、その局在あるいは機能を変化させることで宿主タンパク質分解系を制御するのではないかと予測される。

本研究では、BDVのPタンパク質と結合する宿主オートファジー関連タンパク質の同定及び結合領域の決定、結合の有無による宿主因子の挙動の変化、そしてウイルス増殖時のオートファジー調節機構の意義の解明を試みる。BDVによる宿主オートファジー調節機構の解明により、ヒトの健康を害し、産業動物の生産性を損なわせるBDVの病原性解明に役立つと共に、中枢神経系における異常タンパク質分解に関する新たな知見を得られるものと考えられる。

## 2. 研究の計画・方法

本研究では、ボルナ病ウイルス (BDV) によるオートファジー調節機構の解明を目指している。BDV感染によるオートファジー経路の活性化の有無、BDVタンパク質と結合する宿主オートファジー関連タンパク質の同定及び結合領域の決定、結合ドメイン欠損及び宿主因子のノックダウンによるBDVに対する影響を確認し、BDVの生活環におけるオートファジー調節機構の意義の解明を試みる。これらの解明のため、ウエスタンブロット法によるLC3-1・LC3-2タンパク質の比率の確認、IFAによるウイルス・宿主タンパク質の細胞内局在の確認、今日免疫沈降法によるウイルス・宿主タンパク質の相互作用の確認、リアルタイムPCRによるウイルスゲノム・mRNAの変動の確認を行う。

## 3. 研究の特色

本研究では中枢神経系に持続感染するRNAウイルスが宿主のオートファジー経路を操るという新しいモデルを提唱している。細胞新生の少ない神経系において、持続感染するウイルスのタンパク質を除去する機構は、強く細胞の生存に関わると考えられる。それにもかかわらず、これまでにBDV感染によるオートファジー経路に対する影響を解析した報告は存在しない。

ウイルスのポリメラーゼ補因子であるPタンパク質と非構造タンパク質であるXタンパク質の相互作用がウイルスのポリメラーゼ活性調節することが判明している。このポリメラーゼ活性の制御はXタンパク質によるPタンパク質の局在の変化が関係すると予測されている。感染初期には核内に存在するPタンパク質が、感染後期にはXタンパク質と共に細胞質へ移行することが解っている。一方で、Pタンパク質は複数の宿主因子との結合が報告されている。Pタンパク質との結合が示唆されているLC3タンパク質は細胞質においてオートファゴソーム形成に関わるタンパク質であり、オートファジーの成立に必須の因子である。以上の背景より、Pタンパク質が感染段階に応じて局在を変化させる際、同時にLC3タンパク質の局在を変化させることで、宿主のオートファジー経路を調節するのではないかという発想に至った。

本研究により新たなBDVの生活環を解明することで、BDV治療・予防に関する新たな知見を得

ることが出来る。また、BDVはヒトの脳からも分離されているウイルスであり、複数の精神疾患との関連が指摘されている。中枢神経系に持続感染するBDVによるオートファジー調節経路を知ることによって、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症のような神経細胞における異常タンパク質蓄積に関する新たな知見を得られるものと考えられる。

#### 4. 研究の成果

初めに、Pタンパク質及びXタンパク質によるLCタンパク質の局在変化を蛍光抗体法により確認したところ、コントロールでは細胞質に局在しているLC3-GFPタンパク質が、Pタンパク質の共局在で細胞核内に移動することが明らかとなった。また、この時にXタンパク質を発現させると、既知のX-Pタンパク質相互作用によりPタンパク質が細胞質に移動し、LC3-GFPタンパク質もPタンパク質と同様に細胞質に局在を変えることが判明した。次に、これらの局在の移動に関与する領域を決定するために、今日免疫沈降法によりPタンパク質とLC3-GFPタンパク質との相互作用を確認したところ、これらのタンパク質の相互作用は認められなかった。この結果から、Pタンパク質は間接的にLC3-GFPタンパク質の局在を変化させている可能性が示唆された。P及びLC3の結合が確認出来なかったため、次にBDV感染細胞におけるオートファジーの影響を確認した。BDVの持続感染したOL細胞（ヒトオリゴデンドログリア由来培養細胞）をHBSSによる飢餓処理、バフィロマイシンA1及びクロロキニンによるリソソーム阻害処理を行ったところ、いずれの処理においても宿主遺伝子発現が著しく減少するような条件下においても、BDVのmRNA及びゲノムRNAに有意な減少は認められなかった。リアルタイムPCRの結果から、BDVは宿主環境の変化に関わらず、持続的なウイルス遺伝子の発現が可能であると考えられる。以上より、BDVが宿主のオートファジー関連タンパク質の局在を変化させる可能性が示された。その一方で、それらの局在の変化が直接的なタンパク質相互作用に依らない可能性が示唆された。また、BDVは宿主遺伝子発現の抑制がかかる条件下でも、一定のポリメラーゼ活性を維持することが明らかとなった。

# 教員養成段階におけるレジリエンスの向上を図る心理教育教材の開発

岐阜女子大学 文化創造学部 佐々木 恵理

## 1. 研究の目的

### (1) 研究の学術的背景

教員の疲労度・負担感は高く、公立学校教員の精神疾患による病気休職者数の在職者に占める割合は増加傾向にある(文部科学省, 2013)。文部科学省(2013)は、教員のメンタルヘルス対策として第一に予防的なメンタルヘルスケアの取組が重要であるとし、教員本人、校長等、教育委員会でのセルフケアの促進を強調している。そのため教員養成段階から教職生活を意識した予防的取組が急務である。

本研究では、ストレスへの防衛因子や抵抗力を表す概念として「レジリエンス(resilience)」に注目する。レジリエンスとは、「困難な出来事を克服し、その経験を自己の成長の糧として受け入れる状態に導く特性(Grotberg, 2003)」や、「ストレスを経験しても心理的な健康状態を維持する、あるいは不適応状態を一時的なものとして乗り越え、健康状態へと回復していく力や過程(齋藤・岡安, 2011)」として捉えられている。レジリエンスのもつ困難な経験を自己の成長の糧として受け入れ成長・成熟する能力や心理的特性は、教師にとって教職生活全体を通じた資質能力の成長の基盤として重要な要因の一つである。

国内において教員のレジリエンス研究はわずかであり、教員養成段階のレジリエンス育成を検討した報告は見受けられない。また、大学による教育と現職教育との連携が十分ではなく、これらはメンタルヘルス対策についても同様であり、教職生活を意識した実証的な研究が求められる。

### (2) 研究の目的

本研究の目的は、教師のメンタルヘルスへの予防的取組の視点から、教員養成段階におけるレジリエンス育成のための心理教育教材を開発することである。

そこで、平成27年度については、教員養成段階における学生のレジリエンスの特徴と機能を明らかにし、心理教育教材を開発することの示唆を得ることとした。

## 2. 研究の計画・方法

平成27年度は、上述した目的に基づき、教員養成段階におけるレジリエンスの特徴と機能の概念モデル化を行った。学部生を対象に、レジリエンスと学生の教職能力や成長感の関係について検討した。

○調査方法：個別記入式質問紙調査

○調査対象者：教職課程を受講する女子大学生140名

○調査内容：①大学生用レジリエンス尺度(齋藤・岡安, 2011)；「ソーシャルサポート」「肯定的評価」「コンピテンス」「重要な他者」「親和性」5因子25項目、4件法。②学生の教職能力に関する項目；秋光(2011)の教育実習における学習内容尺度の「教職意欲の向上」因子を参考に作成(8項目、5件法)。③理想の教師像と教師像の明確さについて尋ねる項目(4項目、4件法)。④心理的well-being尺度(西田, 2000)のうち「人格的成長」因子(8項目、6件法)。

## 3. 研究の特色

レジリエンスを発揮することにより、心理的ストレス反応を低減させ心理的・身体的well-beingが導かれる可能性が示唆されている(山下・甘佐・牧野, 2011)。また、レジリエンスが高い教



師に指導された児童・生徒は、そうでない教師が担当する生徒以上に、学力を伸ばし、目標を達成しやすいことが報告されている (Day, 2008)。これらのことから、ストレス緩衝効果や精神的健康の維持だけでなく、児童・生徒に対して肯定的影響を与えることが推測され、教員養成段階のレジリエンス育成を検討していくことには意義があると考えられる。

#### 4. 研究の成果

##### (1) 教員養成段階における学生の教職能力がレジリエンスに与える影響

レジリエンス向上の要因を把握し、学生の教職能力がレジリエンス、人格的成長に与える影響を検討するために、強制投入法による重回帰分析を行った (図1)。その結果、教師になるために必要な向上心や探究心を持っていることや教師を目指す自覚が身についている、子どもを教育することへの使命感が身についているほど、レジリエンスの各因子に低～中程度影響を与えていた。また、レジリエンスを構成する因子の中でも、自己の能力に対する肯定的な評価を持っていたり、家庭外に情緒的サポート源があると、様々な面で成長し続けたり、自分自身を高めていきたい傾向が高まることが明らかになった。

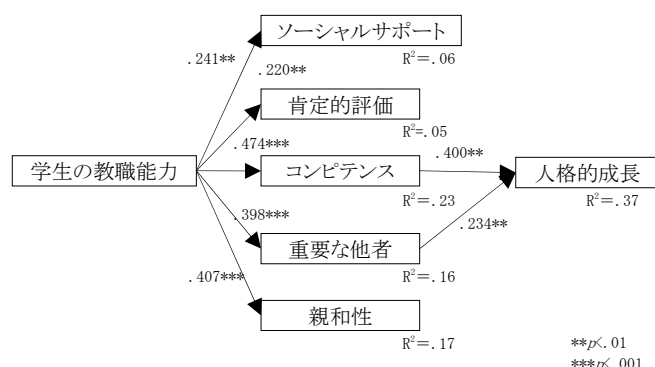


図1 学生の教職能力がレジリエンスに与える影響

##### (2) 目標・理想の教師像とレジリエンスの関連

目標となる教師の有無によるレジリエンスの差異を明らかにするために、目標となる教師がいる、どちらかというものを目標教師有群、どちらかというといない、いないを目標教師無群とし、対応のないt検定を行った。その結果、目標教師有群は、目標教師無群に比べて、有意にレジリエンス得点が高かった (表1)。目標となる教師がいたり、理想とする教師がいる学生のほうが、経験を肯定的に評価し、克服しようとする傾向があることが明らかになった。

表1 目標となる教師の有無によるレジリエンス得点差

	目標教師・有 (n=116)		目標教師・無 (N=21)		t値	p値
	M	(SD)	M	(SD)		
レジリエンス合計	78.36	(10.48)	71.95	12.56	2.50	*

\* p<.05, \*\* p<.01, \*\*\* p<.001

##### (3) 教師像の明確さとレジリエンスの関連

教師像の明確さとレジリエンスの関連を明らかにするために、相関係数を算出した。その結果、教師像の明確さ ( $r=.345, p<.001$ )、教師像の具体性 ( $r=.339, p<.001$ ) とレジリエンス間にある程度の有意な相関がみられた。どのような教師になりたいか、明確であればあるほど、具体的に考える機会が多いほど、レジリエンスも高い傾向があることが明らかになった。

以上の結果から、レジリエンス向上を図る心理教育は、これまで心の健康やセルフケア、バーンアウト予防の観点から取り組まれがちであるが、教員養成段階においては、このような教材の中で、これまで学修してきた教職に関する使命感や自覚、能力を伸ばし、それらをさらに発揮し、自身の強みとなる観点を踏まえた取り組みが必要であると考えられる。

# 最適な部分床義歯設計を目指した解析システムの創成

愛知学院大学 歯学部 神原 亮

## 1. 研究の目的

部分床義歯は、基本的に機能力に対して歯根膜粘膜負担様式を主体とするため、口腔内に残存した歯を含めた諸々の組織の特性を十分に把握し、安全の確保、かつ義歯自体の機能を十分に発揮させることは、極めて重要な事項である。そして、これらの事項を十分に把握するためには、口腔内において部分床義歯が、負荷される機能力に対して残存組織にいかなる影響を与えるのか検討することは必要不可欠である。これらの事象は歯科治療における臨床成果や臨床術式にも直結し得る根本的な問題として、詳細に解明されなければならない。近年では、コンピューターの性能の向上に伴い、有限要素法解析は、医療分野においても多くに用いられるようになってきた。

我々は、従前より有限要素法解析を用いてこれら部分床義歯に関する様々な力学的検討を行い、これ迄、CTデータおよび研究用模型を用いた細部再現性の高いモデル構築法に加え、最大の難関とされてきた顎堤粘膜および歯根膜の粘弾性挙動を可及的に忠実に再現させる手法を開発してきた。本研究は、これまでの研究成果を基盤として、実際の臨床の現場において、患者個人に最適な部分床義歯設計について三次元有限要素法を用いてシミュレートする解析システムを構築し、これら解析結果を歯科補綴臨床における義歯設計の力学的根拠とすることを最終目的としたものであり、多様な症例に対する多くの知見の収集は必要不可欠である。

そこで、今回、歯の欠損のみならず、顎顔面領域における腫瘍や外傷による広範な顎骨欠損に対して顎義歯を適用する場合、上顎顎義歯設計および支台歯周囲歯槽骨量の違いが、支台歯周囲歯槽骨にもたらす力学的影響を三次元有限要素法を用いて詳細に検討を行い、有用な顎義歯設計の一助となることを目的とした。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 有限要素モデルの構築

解析の対象とする上顎欠損は、Aramany class1とした。解析モデルの構築には、デンタルウイングス社製3Dスキャナー、三次元画像処理・編集ソフト (Mimics12.11, Materialise) を用いてモデル形状データをSTLフォーマットにて作成し、それらデータをCAE環境統合プリ・ポスト総合ソフト (Patran2010 windows64bit, MSC Software) にインポートすることにより有限要素モデルの構築を行った。本研究に用いた基本モデルを図1に示す。

### (2) 解析項目

解析項目とした上顎顎義歯設計は、上顎左側中切歯に直接支台装置としてレスト付ワイヤークラaspを付与し、第一、第二小臼歯、及び 第一、第二大臼歯には間接支台装置として双子鉤を設計したモデルを基本モデルとし、上顎左側中切歯から犬歯までを連結し、基本モデルと同様の設計を行った支台歯連結モデル、そして、上顎左側中切歯に直接支台装置として磁性アタッチメントを適用した磁性アタッチメントモデルの計3種とした。(図2) さらに、本研究では直接支台装置が適用される支台歯周囲歯槽骨量の違いにおける力学的検討も行うため、前述した3種の義歯設計に対して、上顎左側中切歯近心歯槽窩辺縁部を基準とし、歯槽骨量を5段階に変化させて検討を行った。歯槽骨量としては、構築した上顎モデルの近心歯槽窩辺縁部から顎骨最近心部までの距離が水平的に5mmの骨量であった為、基本モデルを5mmモデルとし、基本モデルから歯槽骨量を水平的に2mmずつ変化させ、3mmモデル、1mmモデル、さらに、近心歯槽窩辺縁部を超えて骨欠損した-1mm

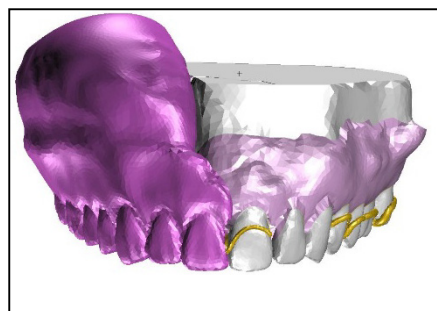


図1 基本モデル

モデル、-3mmモデルの合計5種類の歯槽骨モデルとした。(図3)

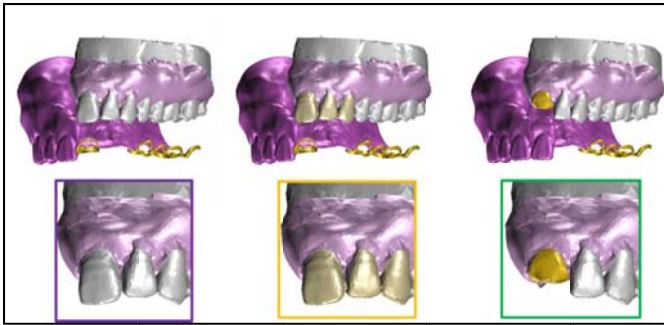


図2 解析項目 (上顎顎義歯設計)

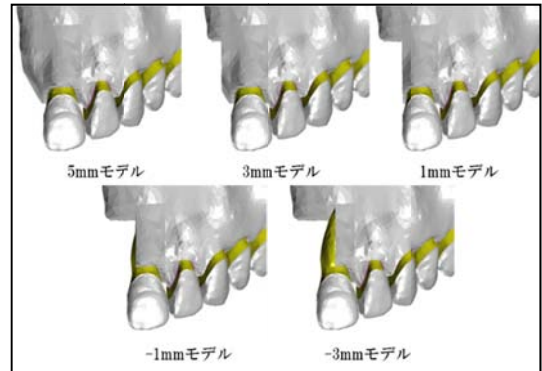


図3 解析項目 (支台歯周囲歯槽骨量)

### (3) 解析条件の設定

モデルの各構成要素における物性値の設定に関しては、全て様々な文献を参考にして設定した。歯根膜、顎堤粘膜の軟組織の材料特性に関しては、予備実験を行い材料定数変換プログラムにより材料定数を複数自動変換させることにより解析モデルに最適な生体挙動を示す材料非線形性を導入した。荷重条件としては、荷重部位を顎義歯咬合面 第一、第二小臼歯、第一、第二大臼歯相当部とし、荷重方向は咬合平面に対して垂直に付与した。荷重量については文献値を参考にし、合計120Nの荷重量とした。拘束条件は解析結果に影響のない、上顎モデル上縁部をX、Y、Z方向に完全拘束とし、接触条件は、顎義歯と接触する歯および顎堤粘膜部に接触関係をクーロン摩擦にて加えた。

## 3. 研究の特色

本研究は、三次元有限要素法を用いて、複雑な挙動を示す顎義歯および支台歯周囲組織に対して、可及的に詳細にシミュレートすることにより、広範囲な顎骨欠損に対する顎義歯設計に対して、顎骨欠損隣接歯に適用される直接支台装置の形態を検討し、さらに、顎骨欠損隣接歯周囲に残存する歯槽骨における力学的検討も同時に行ったものである。今回、有限要素法解析に設定した解析条件に関しては、可及的に臨床に即した文献値を参考に設定し、軟組織挙動に対しても生体挙動に近似した設定が可能となった。そのため、本研究結果は、顎義歯設計における直接支台装置の選択基準として有益な成果を得ることができたと考えられる。

## 4. 研究の成果

本研究にて得られた解析結果としては、上顎顎義歯設計における顎骨欠損部隣接歯への磁性アタッチメントの適用は、支台歯近心歯槽骨が水平的に1mmの厚みの場合に、直接支台装置にレスト付きワイヤークラaspを適用した基本モデルと比べ、近心歯槽骨に発生する応力を大幅に減少させ、また、支台歯を連結処置した場合と同等の力学的効果を示すものであった。また、支台歯近心歯槽骨が水平的に喪失した場合、基本モデルと比べ、支台歯変位量を減少させ、また、支台歯連結処置した場合と比べ周囲歯槽骨への発生応力を抑制する効果を示すものであった。

なお、本研究結果は第25回日本磁気歯科学会学術大会にて発表を行ったものである。

# パーキンソン病の脳深部刺激療法術後の就労支援に関する研究

日本福祉大学 健康科学部 宮田 美和子

## 1. 研究の目的

パーキンソン病(PD)は振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害などの運動機能障害を伴う進行性疾患である。PDの治療は内服薬療法が主体になるが、長期内服により薬剤効果の持続時間が短縮し、日内変動を伴う様々な合併症を認め、内服薬治療では限界が生じてくる。近年、進行期PDの治療として脳深部刺激療法(DBS)が注目されている。DBSは外科手術により脳深部に刺激電極を埋め込み電気刺激を行う療法で、内服薬の減量や振戦の軽減、オフ時の底上げに効果を示す治療法である。我が国でも2000年の保険適応以降、DBS術件数は飛躍的に増えている。運動機能に効果を示すDBSだが、手術後の遂行機能の低下や抑うつ気分なども報告されている。遂行機能は、目標設定、それに到達できる計画立案、必要な方略の選択、さらに同時進行で物事を処理しながら、自己や周囲の環境に配慮し、臨機応変に柔軟な対応をするなど、就労をはじめとする社会生活を行う上で必要不可欠な役割を担っている。

そこで本研究では、DBS治療を受けているPD患者を対象者に、就労に関する基礎調査を行った。さらにインタビューによる就労状況の調査結果から、PD症状により就労場面で困難になりやすい項目について調査し、DBS術後のPDに必要な就労支援について考察した。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 対象

発症年齢が20代～50代のPD患者で、両側視床下核刺激療法術が施行され、術後1年以上のフォローアップのできた22例(男性18例、女性4例、手術時平均年齢50.6歳)である。

### (2) 方法

対象者に対し職業歴について調査し、現在の就労状況により就労を継続している群(就労群)と離職した群(離職群)の2群に分類した。2群の手術時の年齢、性別、発症年齢、罹患年数を含む基礎情報、運動機能、日常生活動作、高次脳機能、抑うつ気分について、術前と術後1年の評価結果の比較を行なった。

さらに対面インタビューによる調査に協力が得られた6例のインタビュー結果から、PD症状により就労場面で困難を感じている事柄について症状別にまとめた。

## 3. 研究の特色

PDのDBSに関する研究は近年多く報告されているが、運動機能や高次脳機能、気分に関する報告が大半で、生活の質(QOL)や社会生活に関する報告は少ない。本研究により、DBS治療を受けているPDの就労の現状と課題を把握し、就労支援の方法を検討することができると考える。

## 4. 研究の成果

### (1) DBS術後の離職率について

対象者22名中、術後5年以内に退職している者が11名で、DBS術後の離職率は50%であった。

### (2) 就労群と離職群の基礎情報の比較について

就労群と離職群を比較した結果、手術時年齢には有意な差を認めなかった( $P=0.075$ )が、就労群の発症年齢が離職群よりも有意に低く( $P=0.001$ )、罹患年数が有意に高かった( $P=0.005$ )。術前後の内服薬量(術前: $P=0.06$ 、術後1年: $P=0.21$ )、運動機能(術前: $P=0.06$ 、術後1年: $P=0.09$ )、日常生活活動(術前: $P=0.13$ 、術後1年: $P=0.28$ )、遂行機能(術前: $P=0.43$ 、術後1年: $P=0.19$ )、抑うつ気分(術前: $P=0.30$ 、術後1年: $P=0.33$ )については、いずれの項目でも2群間で有意な差を認めなかった。

(3) PD症状における就労時に困難さを感じている状況とPD症状との関係

① 運動機能に関する問題

ア. 姿勢反射障害のため通勤ラッシュ時、人にぶつかったりするとふらついたまま転倒してしまう。

イ. 構音障害のため、顧客対応の窓口業務が困難となり別の部署に異動になった。

ウ. 警備の仕事だが、構音障害のため同僚とのトランシーバーを使ったやり取りの際に、何を言っているのか分からないと言われ、険悪になることがある。

② 遂行機能障害

ア. 工場のラインにいたが、1時間毎の精算数などの計算ができなくなり、度々ラインを止めてしまうことがあり、最終的には退職することになった。

イ. 今まで出来ていた仕事の段取りが上手くできない。優先順位をつけるのが難しくなった。

③ 気分障害

ア. 意欲低下(アパシー)の症状では、朝の通勤が億劫になった。仕事に行ってしまうと、いつも通り働けるが、家を出るまでが動けない。

イ. 抑うつ気分の症状では、休日に何かしようという気持ちにはとてもなれない。仕事ができるように、しっかり休養をとることしか考えられない。楽しみがないし、気分も晴れない。

④ その他

ア. 嚥下困難で食事に時間がかかる。昼食時には時間がかからないように食べやすい簡単なもので済ませる。

イ. 職場の人からこの病気について理解を得るのは難しい。手術前は手が震えたり、周囲に明らかに分かる症状で気遣ってもらえたが、術後は目に見えて分かる症状が減り、姿勢反射障害など見えにくい症状で困っているが、そのことを理解してもらいにくい。周囲は病気が治って良かったくらいに思っている。

(4) 考察

本研究の結果から、DBS後の離職率が50%であることが判明した。離職率の高い要因として周囲からの病気に対する理解が得られにくいことが考えられた。DBS前に振戦や薬剤性ジスキネジアなど第三者から見ではっきりと分かっていた症状がDBS後は改善されるため、就労における課題は内服薬治療時と異なる可能性が示唆された。DBS後は姿勢反射障害や遂行機能障害などのDBSでは改善しにくい症状と、先行研究でも報告されているDBS後に悪化しやすい構音障害が、就労を阻む要因となる可能性が高い。これらの症状へのリハビリテーションを行うと共に、就労場面での支援が必要と考える。

また雇用者側では、部署替えをするなど対象者への配慮がみられた。今後、雇用者側が抱える課題を抽出することで、対象者と雇用者の双方にとって有益な就労支援を検討することができると思われる。

# セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築

名城大学 理工学部 鈴木 秀和

## 1. 研究の目的

世界ではPC向けのアプリケーションよりスマートフォンやタブレット向けのモバイルアプリケーションのリリースを先行する「Mobile First」の潮流が強くなっており、新たなモバイルアプリケーションの登場によりビジネス・ライフスタイルを大きく変えるイノベーションの促進が期待されている。しかし、次の2つの課題がモバイルアプリケーションの普及を阻害している。

- (1) 高性能なサーバシステムの導入の必要性
- (2) サーバからの情報漏洩リスク

そこで本研究の目的は、これまで申請者が開発してきたエンドツーエンドで移動透過性を実現するNTMobile (Network Traversal with Mobility) を基盤とした、セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築を行うことである。モバイルアプリケーションはサーバを介さずにエンドツーエンドで暗号化通信を実現することにより、上記2点の課題を解決する。

## 2. 研究の計画・方法

- (1) ユーザ認証機構とNTMobileサーバ群の拡張

従来のNTMobileシステムにAS (Account Server) を新たに導入し、OpenIDと連携させることにより、ユーザ情報をNTMobileシステムから分離する。これにより、OpenIDサービスを提供するGoogleやFacebookなど頑健で高性能なシステムを利用することが可能になり、モバイルアプリケーション開発者からユーザ情報を管理するリスクを排除する。

- (2) セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築 (図1)

モバイルアプリケーションが (1) で拡張したユーザ認証機構を容易に利用できるようにするために、従来実装してきたNTMobileフレームワークを拡張する。NTMobileのシグナリング処理、パケットカプセル化機能および暗号化機能を共通ライブラリとしてC言語で開発するが、iOSおよびAndroidアプリケーションからは直接このライブラリを利用することができないため、Objective-CおよびJava用のラッパークラスを実装する。これにより、NTMobileシステムはアプリケーション開発者から隠蔽され、エンドツーエンド通信の実現や暗号化通信に関する専門的な知識が無くても、セキュアなモバイルアプリケーションを容易に開発できるようになる。

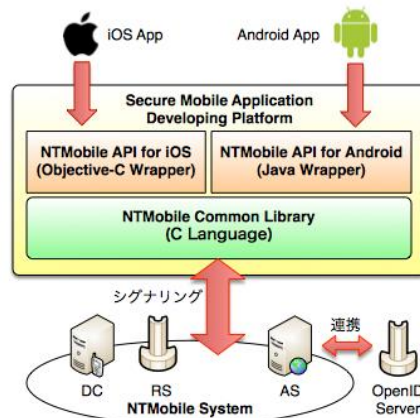


図1 本研究で構築する開発プラットフォーム

### 3. 研究の特色

移動透過性を実現する技術を応用して安全なモバイルアプリケーションを開発するプラットフォームを構築することは独創的であり、他に例はない。本研究で構築するプラットフォームを利用したモバイルアプリケーションが普及することにより、次のような効果が期待される。

(1) アプリケーション開発モデルの転換によるイノベーションの促進

モバイルアプリケーションはエンドツーエンドでデータ交換が可能になるため、サーバが不要となる。これにより開発資金が乏しい個人開発者の裾野が広がり、独創的なアプリケーションの登場が期待される。

(2) 安全・安心なモバイルアプリケーションの普及

エンドツーエンドで暗号化通信が可能になるため、サーバからの情報漏洩リスクを排除でき、ユーザは安心して利用することができる。

(3) モバイルネットワークトラフィックの抑制

NTMobileの機能により、モバイルネットワークへ流れるトラフィックをWi-Fiを経由してインターネットへオフローディングすることができ、モバイルネットワークの負荷を抑制できる。

### 4. 研究の成果

(1) ユーザ認証機構とNTMobileサーバ群の拡張

ASを導入し、OpenID Connectと連携して認証及び暗号化通信に必要な共通鍵を配付するために、NTMobileのシーケンスおよびDCの仕様を拡張した(図2)。本仕様の動作検証を行うために、CentOS 6.6を利用してASを構築し、OpenID ConnectとNTMobileの連携を実現するWebアプリケーションをPHPで開発した(図3)。動作検証用Androidアプリケーションを開発し、実環境にて認証処理時間を測定した結果、約10秒で完了することがわかった。この処理時間は初回の認証時だけに発生するものであり、十分に許容できるものである。

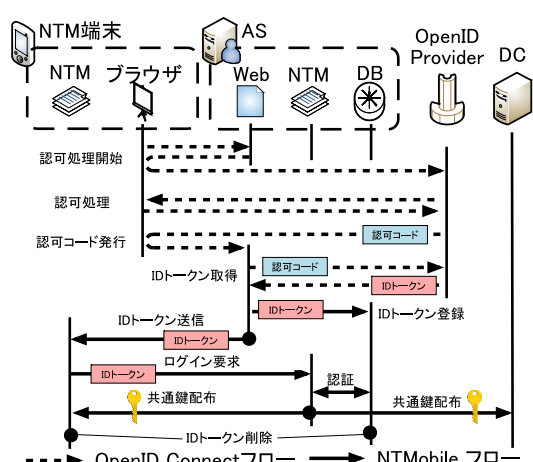


図2 OpenIDと連携した認証方法

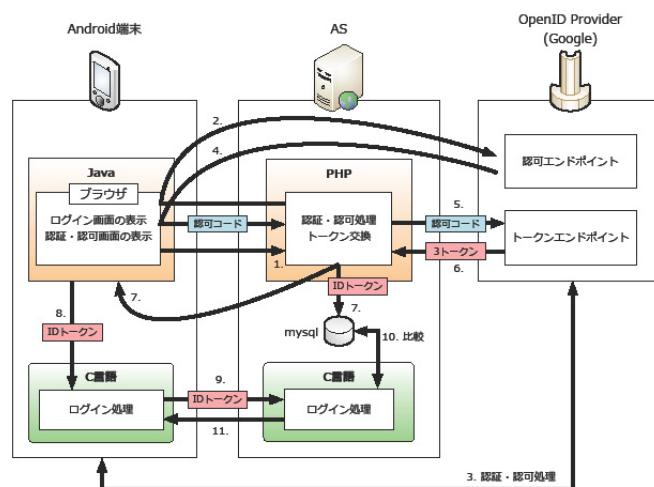


図3 ASの実装

(2) セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築

NTMobileシステムにおける共通ライブラリをC言語で開発した。通常のソケット通信アプリケーションの開発作法に合わせて、標準ソケットライブラリに対応したNTMobileソケットライブラリを実装した(表1)。また、NTMobileソケットライブラリをiOSおよびAndroidから呼び出せるようにするために、それぞれObjective-CおよびJavaラッパーを実装した。

表1 ソケットAPIに関する共通ライブラリとJavaラッパーの一例

処理	標準ソケット関数	NTMobileソケット関数 (C言語)	Javaラッパーメソッド
名前解決	getaddrinfo	ntm_getaddrinfo	NTMobile.getaddrinfo
ソケット作成	socket	ntm_socket	NTMobile.socket
バインド	bind	ntm_bind	NTMobile.bind
送信	sendto	ntm_sendto	NTMobile.sendto
受信	recvfrom	ntm_recvfrom	NTMobile.recvfrom
切断	close	ntm_close	NTMobile.close

開発したプラットフォームを用いて、UDPチャットアプリケーションをiPhone用とAndroid用を試作した。動作検証を行った結果、NTMobileシステムを利用してエンドツーエンド通信できることを確認した。なお、今回試作した開発プラットフォームには(1)で実現したユーザ認証機構は組み込まれておらず、今後継続してプラットフォームを実装し、完成させる必要がある。

### (3) 研究成果の発表

下記の学会において、計6件の研究成果を発表した。

- ① 平成27年度電気・電子・情報関係学会東海支部連合大会 (2015年9月) 2件
- ② 情報処理学会第77回MBL研究発表会 (2015年12月) 1件
- ③ 第13回情報学ワークショップ (2015年12月) 2件
- ④ 第78回情報処理学会全国大会 (2016年3月) 1件



# 哺乳類初期胚の細胞内膜ダイナミクスによるシグナル伝達制御

同志社女子大学 薬学部 川村 暢幸

## 1. 研究の目的

哺乳類初期胚では、胎盤が形成される以前の時期において、Visceral endoderm(VE)と呼ばれる細胞グループできわめて活発にエンドサイトーシスが起きており、かつ、様々なシグナルが行き交い細胞の分化がダイナミックに行われる。本研究では、様々なシグナル伝達が行き交う初期胚を用いて、膜動態の制御によるシグナル伝達の制御についての解明を目指す。

マウス初期胚発生において、様々なシグナル伝達が正確にコントロールされることが、正常な発生に必要である。近年、細胞外からの膜を通じたシグナル伝達経路の調節においてRabタンパク質等の関与する膜動態制御機構の関与が指摘されている。私は、*rab7*遺伝子ノックアウトマウス胚において、いくつかのシグナル伝達経路の異常が、中胚葉の形成異常を引き起こしている可能性を見いだしている<sup>1,2</sup>。そこで、マウス初期胚を用いて解析を行い、マイクロオートファジー等の膜動態制御による、細胞内シグナル伝達経路の制御について明らかにすることを旨とする。

## 2. 研究の計画・方法

- (1) *rab7*遺伝子ノックアウトマウス(*rab7<sup>ko/ko</sup>*)のwhole mount *in situ* hybridization法や蛍光抗体法による正常発生に必要なシグナル伝達経路の解析：*rab7<sup>ko/ko</sup>*マウスが胎生致死となる胎生6~7日近辺で重要な働きをしていることが報告されている因子についてその発現量や発現パターンをwhole mount *in situ* hybridization法、蛍光抗体法により解析した。
- (2) *rab7*遺伝子欠損細胞での解析：*rab7*遺伝子の必須エキソンを*loxP*配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウス(*rab7<sup>lox/lox</sup>*)胚から、胚性線維芽細胞を樹立し、刺激因子で刺激した際のシグナル伝達についてWestern blot法を用いて解析した。
- (3) 部分特異的*rab7*遺伝子ノックアウトマウスを用いた胚発生過程の解析：*rab7*遺伝子の必須エキソンを*loxP*配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウス(*rab7<sup>lox/lox</sup>*)に、さらに、VE細胞特異的に*Cre*遺伝子を発現する組み替えアレル(*Ttr-cre*)、Epiblast細胞特異的に*Cre*遺伝子を発現する組み替えアレル(*Villin-cre*)を導入し、各々の細胞群で特異的に*rab7*遺伝子をノックアウトさせた場合に胚発生過程にどのような変化が見られるかwhole mount *in situ* hybridization法、蛍光抗体法により解析した。

## 3. 研究の特色

本研究は、膜動態の調節によるシグナル伝達の制御を明らかにすることを旨とする。私は、VE細胞におけるエンドサイトーシス経路の終着点が頂端液胞 (Apical vacuole) という巨大な液胞であることを見いだしている。また、通常、小胞同士がひとつの空胞になる場合、小胞同士が接着し、互いの膜が融合して一つの連続した膜をつくるCanonical membrane fusion (図・上) 様式を経るが、初期胚の液胞では、大きな液胞が小さな前駆体を飲み込んだ後、液胞内で膜を分解してひとつの小器官になる、Microautophagy like fusion (図・下) で示した独特な様式を取ることを見だしこれまでに報告した。哺乳類細胞におけるマイクロオートファジーは報告が少なく非常にユニークな現象であり、マイクロオートファジーに着目したシグナル伝達の制御機構の解明は新しい視点をもたらすと考えている。また、これまで初期エンドソームがシグナル伝達の間として重要であるとされてきたが、私は、新たに、後期エンドソーム〜リソソームおよびそこに至る膜動態もまたシグナル伝達の調節に重要であることを提唱できると考えている。

*rab7*遺伝子はリソソームの機能不全に起因する「ライソゾーム病」と呼ばれる一連の希少疾患の原因遺伝子との指摘がある。本研究において、遺伝子ノックアウトマウスを作成し解析を行うことにより、それら疾病の病態解明・薬物治療などを用いた治療方法の開発などにも応用することが可能と考えている。

#### 4. 研究の成果

- (1) *rab7*遺伝子ノックアウトマウスの whole mount *in situ* hybridization法や蛍光抗体法による正常発生に必要なシグナル伝達経路の解析

*rab7<sup>ko/ko</sup>*マウス胚では、原腸陥入期に発生が停止するため、原腸陥入が起こる際に必要となるEMT（上皮間葉転移）現象が起こっているか否かについて検討したところ、原腸陥入の起こるprimitive streak領域の細胞のE-cadherin発現量が低下せず、EMTを阻害していることが明らかとなった。EMTはFGF8、BMP4、Wnt3、Nodalといった因子により誘導されるが、whole mount *in situ* hybridization法により検証したところ、これらの因子の発現量には変化が見られなかったのに対し、Wnt3とNodalの下流の因子の発現量が低下していることを見だし、Wnt3とNodalのシグナル伝達に異常を来していると考えられ、現在さらに解析を進めている。

- (2) *rab7*遺伝子欠損細胞での解析

*rab7<sup>lox/flox</sup>*胚から、胚性線維芽細胞を樹立し、Cre発現アデノウイルスを感染させることにより、*rab7*遺伝子ノックアウト細胞を作製した。ウイルス感染後48時間ではほぼ完全にRab7タンパク質の発現が消失することをWestern blot法により確認した。この細胞に対して、BMP、TGFβ、EGF刺激を行い、そのシグナル伝達を下流因子のリン酸化フォームを検出することにより解析したところ、細胞レベルではBMP、TGFβ、EGF刺激によるシグナル伝達には、野生型と*rab7*遺伝子ノックアウト細胞間で変化が見られなかった。胚レベルでは、TGFβスーパーファミリーに属するNodalのシグナル伝達に異常が見られたが、この違いは、線維芽細胞ではマイクロオートファジーという膜動態が見られないことに起因する可能性を考えている。

- (3) 部分特異的*rab7*遺伝子ノックアウトマウスを用いた胚発生過程の解析

*rab7*遺伝子の必須エキソンをloxP配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウスに、さらに、VE細胞特異的にCre遺伝子を発現する組み替えアレル(Ttr-cre)、Epiblast細胞特異的にCre遺伝子を発現する組み替えアレル(Villin-cre)を導入した。VE細胞特異的に*rab7*遺伝子を欠損したマウス胚は、*rab7<sup>ko/ko</sup>*胚と良く似た表現型を示したのに対し、Epiblast細胞で*rab7*遺伝子をノックアウトしたマウス胚は、胎生6~7日より後の段階で発生が停止することが明らかになった。この結果から、胎生6~7日における原腸陥入の停止という表現型は、VE細胞における*rab7*遺伝子機能が欠損したことにより引き起こされたことが示唆され、発生初期のVE細胞におけるRab7によるマイクロオートファジー制御の重要性が示唆された。今回新たに、Epiblast細胞で*rab7*遺伝子をノックアウトした場合は、発生中期程度まで発生が進行し胎生致死となることが明らかになった。これは、発生シグナルの伝達異常や栄養供給の異常などの可能性が考えられ、今後の検討課題である。

#### 引用文献

1. Kawamura, N. *et al.* Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat Commun* **3**, 1071, doi:10.1038/ncomms2069 (2012).
2. Kawamura, N., Sun-Wada, G. H. & Wada, Y. Microautophagy in the visceral endoderm regulates nutritional provision and differentiation signals during mouse early development. *Seikagaku* **86**, 778-782 (2014).

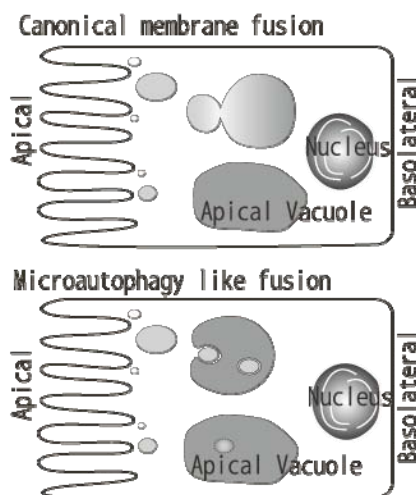


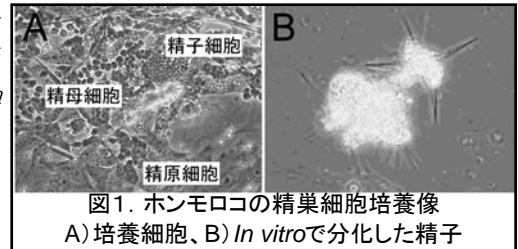
図 2 Canonical membrane fusionと Microautophagy like fusion

# 絶滅危惧種ホンモロコにおける *in vitro* 精子生産技術の開発 — 季節および性成熟段階に依存しない精子生産 —

立命館大学 薬学部 檜垣 彰吾

## 1. 研究の目的

申請者らは、琵琶湖固有種であり絶滅危惧IA類に指定されているコイ科魚ホンモロコを対象とし、遺伝資源の保存および将来的な資源量の回復を目標に、繁殖季節および性成熟段階に依存しない、*in vitro*精子生産技術および精巣細胞の凍結保存法の開発に着手しており、これまでに魚類では初めて、凍結保存した非繁殖期の成魚および稚魚の精巣細胞から、*in vitro*において、受精・発生能を有する精子を生産することに成功(図1)している。しかし、開発済みの培養法・凍結保存法では、生産される精子数が少なく、また、短期間(約1ヶ月)しか精子生産を維持できていない。



そこで本研究では、(1) 効率的な *in vitro* 精子生産技術の確立と (2) 精巣細胞凍結保存法の至適化を行う。(1) では、*in vitro* 生産精子数の増加と精子生産期間の長期間化に焦点を置く。

(2) では、魚類精巣細胞に適したガラス化凍結保存液の作製に焦点を置き、精原細胞生存率が高く、活発な精子分化が進行する条件を明らかにする。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 効率的な *in vitro* 精子生産技術の確立

開発済みの培養方法では、精巣細胞培養時に共培養状態にある体細胞の過剰な増殖が、生殖細胞の増殖を抑制し、*in vitro* 生産精子数の低下を招いていることが示唆されていた。また、同様の理由から、精子形成に伴い精原細胞数が減少し、精子形成開始後約1ヶ月で精原細胞はほとんど認められなくなるとともに精子形成はほぼ停止することから、精原幹細胞の再生分裂が活発に行われていないことが示唆されていた。そこで、本項では、体細胞の過剰な増殖を抑制し、かつ精子分化を促進し得るような培養法として、浮遊培養を試みた。

### (2) 精巣細胞低温保存法の確立

予備実験において、ホンモロコ精巣細胞の凍結保存には、凍結(緩慢冷却)法よりもガラス化(急速冷却)法が適しているとの結果を得ていることから、ガラス化法を軸に研究を行った。凍害防止剤としては、エチレングリコール(EG)、グリセロール(GC)、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、プロピレングリコール(PG)、ブチレングリコール(BG)を用いガラス化凍結保存した後、細胞生存率および精子への分化能を調べることで、ホンモロコ精巣細胞に適し凍害防止溶液を明らかにした。

## 3. 研究の特色

最新の国際自然保護連合(IUCN)の報告では、調査済みの淡水魚のうち約1/3が絶滅の危機に瀕しているとされている。そのような中、遺伝資源の保存として精子の凍結保存が試みられているが、野生の魚類の中には、季節繁殖性を示す種が多く存在し、精子形成を行っていない非繁殖期の成魚や稚魚は、利用可能な遺伝資源として見做されず、その多くが未利用のまま失われている。

そこで、申請者らは、それら非繁殖期の成魚や稚魚の精巣細胞から、*in vitro*において精子を生産することで、遺伝資源として利活用可能とすることを着想し、培養系の開発を行った。非繁殖期の成魚および稚魚の精巣細胞から、*in vitro*において、受精・発生能を有する精子の生産に成功しているのは申請者らのみである。本研究で得られた知見を、ホンモロコと同様に季節繁殖性を示す他魚種に応用することで、絶滅危惧種の遺伝資源保存が大幅に進むと考えられる。

## 4. 研究の成果

### (1) 浮遊培養法の確立

浮遊培養に適した培養皿を検討した結果、これまで使用していた接着培養用培養皿（細胞が接着しやすいように表面処理したもの）とは異なる、比較的細胞接着性の弱い培養皿（ペトリ皿：表面処理していないもの）上でホンモロコ精巣細胞の培養を行うことで、細胞が自発的に凝集することが観察された（図2）。

この凝集塊を経時的に回収後、固定・パラフィン包埋することで組織切片を作成し、生殖細胞特異的なタンパク質である vasa に対する免疫染色を行ったところ、体細胞を核としており、その表面で生殖細胞が増殖・分化していることが明らかとなった。

また、この凝集塊の培養を継続し、核 DNA 含量をフローサイトメトリー法により解析した結果、接着培養（Adhesion culture）に比べて浮遊培養（Suspension culture）では、体細胞を示す 2 倍体（2c）が著しく少ない一方、精子や精子細胞を示す 1 倍体（c）が劇的に増加することが明らかとなった（図3）。また、同様の傾向が培養開始 2 ヶ月後においても認められたことから、浮遊培養により、長期間活発な精子分化が進行することが示唆された。

さらに、凍結保存した非繁殖期成魚の精巣細胞をこの培養法で培養した後、人工授精に用いることで、接着培養では 1%未満であった受精率が約 25%へと大幅に改善され、非常に多くの稚魚が得られることを確認した。

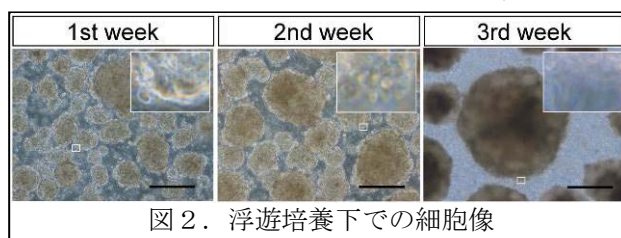


図2. 浮遊培養下での細胞像

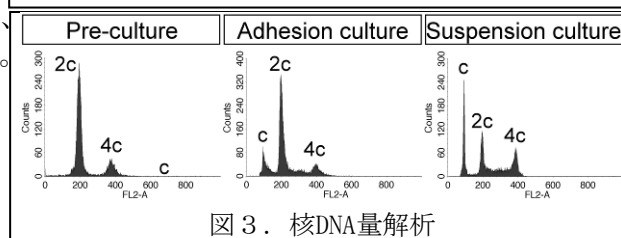


図3. 核DNA量解析

### (2) 精巣細胞低温保存法の至適化

5 種の凍害防止剤（EG、GC、DMSO、PG、BG）について、ガラス化に必要な最小濃度を調べた結果、それぞれ 7M、6M、5M、5M、4M であった。そこで、それら濃度の凍害防止剤を含むガラス化液を用いてホンモロコ精巣細胞をガラス化凍結保存した後、7 日間培養を行い、生殖細胞特異的なタンパク質である vasa に対する免疫染色をすることで生殖細胞の生存性を調べた。その結果、GC 以外の凍害防止剤を用いた場合で、多くの生殖細胞コロニーが確認された。それら生殖細胞の占める面積を測定・比較したところ、PG を含むガラス化液を用いて凍結保存した精巣細胞で、最も生殖細胞の生存性が高く、凍結保存しなかった精巣細胞に比較して、約 50%の生殖細胞が生存していることが示唆された。以上の結果から、ホンモロコの生殖細胞の凍結保存には、PG を用いたガラス化が適していることが明らかとなった。現在、上記方法により凍結保存した精巣細胞から分化した精子の受精・発生能を確認中である。

### 学会発表

- ① 檜垣彰吾・藤東貴昭・手島黎子・島田愛美・酒井則良・高田達之、琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*)における全精巣ガラス化低温保存の試み、第108回日本繁殖生物学会大会
- ② 高田達之・藤東貴昭・檜垣彰吾・手島黎子・島田愛美、フローサイトメトリーによる琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 精巣細胞の解析、第108回日本繁殖生物学会大会

# 血液疾患における線維化の機序の解明

大阪医科大学 医学部 中山 聖子

## 1. 研究の目的

### (1) 古典的ホジキンリンパ腫における線維化の機序の研究

古典的ホジキンリンパ腫は、比較的予後が良いと言われているが、化学療法や放射線療法に抵抗性の難治例がある。古典的ホジキンリンパ腫の病理組織像は少数の腫瘍細胞であるホジキン細胞と Reed-Sternberg (RS) 細胞の出現と、背景のリンパ球、形質細胞、好酸球、組織球などの炎症細胞からなる。腫瘍細胞が分泌するサイトカインは様々な炎症細胞浸潤に関与していると考えられている。古典的ホジキンリンパ腫は、さらに結節硬化型、混合細胞型、リンパ球豊富型、リンパ球減少型に分類されるが、約 80%を結節硬化型と混合細胞型が占める。結節硬化型は密な線維性隔壁によりリンパ節が分割される特徴的な組織像を呈する。古典的ホジキンリンパ腫における線維化の病態を解明することは、組織像の多彩性の解明、しいては古典的ホジキンリンパ腫の病因の解明および新たな治療法の開発に寄与するものと考えられる。本研究の目的は古典的ホジキンリンパ腫の線維化に関与するサイトカイン、炎症細胞の役割を研究することである。

### (2) 骨髄線維症における線維化の機序の研究

難治性血液疾患の一つである骨髄線維症は、原発性骨髄線維症の場合は3年生存率が約50%と予後不良である。基礎疾患に続発する二次性の場合も骨髄腔内の線維化を起し、本来の骨髄の造血機能を障害する。骨髄の線維化を抑制することが、本疾患の治療に重要である。古典的ホジキンリンパ腫で得られた線維化の機序の知識を基に、骨髄線維症の線維化の病態を解明することを目的とする。

## 2. 研究の計画・方法

古典的ホジキンリンパ腫におけるリンパ節の線維化の程度と、線維化に関与するといわれているマスト細胞および制御性 T 細胞など炎症細胞の浸潤との関係を調べ、どの細胞が線維化と密接な関係にあるかを検討した。さらに、線維化に関与する種々のサイトカインを分泌する細胞を同定した。同様に、骨髄線維症においても、骨髄における線維化に関連するサイトカインや炎症細胞浸潤を調べた。

(方法)

過去に生検された古典的ホジキンリンパ腫患者のパラフィン固定されたリンパ節の病理検体を用いて、トルイジンブルー染色や c-kit の免疫染色を施行しマスト細胞を検出し、浸潤頻度を調べた。さらに、線維化をおこすサイトカインである transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、線維化をもたらすマスト細胞の誘導及び増殖因子でもある interleukin-13 (IL-13)、マスト細胞の誘導および増殖因子の stem cell factor (SCF) や interleukin-3 (IL-3)、制御性 T 細胞のマーカーである forkhead box P3 (FOXP3) や CD25 の免疫染色を施行し、TGF- $\beta$ 、IL-13、SCF や IL-3 分泌細胞を同定し、制御性 T 細胞の浸潤頻度を調べた。さらに、マッソントリクローム染色を行い、線維化領域を検出し数量化し、TGF- $\beta$  陽性細胞、IL-13 陽性細胞、IL-3 陽性細胞、SCF 陽性細胞、制御性 T 細胞、マスト細胞の分布と線維化領域との比率の関係を統計学的に、古典的ホジキンリンパ腫のタイプ別に比較検討した。

同様に、骨髄線維症においても、過去に生検されたパラフィン固定後の骨髄の病理検体を用い、抗 mast cell tryptase 抗体を用いてマスト細胞を検出し、浸潤の程度を正常の骨髄組織と比較検討した。線維化に関与するサイトカインである TGF- $\beta$  や IL-13 の免疫染色を実施した。マスト細胞浸潤、サイトカイン、線維化の程度との関係性を調べた。

### 3. 研究の特色

マスト細胞はヒスタミンを分泌しアレルギー反応を起こす原因細胞だけではなく、多彩なサイトカインを産生する能力を有する免疫担当細胞の一つであることが分かってきた。マスト細胞が TGF- $\beta$  を産生し、IgG4関連疾患や間質性腎炎などの線維化に関与していることが最近報告された。古典的ホジキンリンパ腫では、発疹などのアレルギー症状がしばしば見られることから、古典的ホジキンリンパ腫の病態にマスト細胞が関与している可能性がある。ホジキン細胞やRS細胞が分泌するサイトカインには tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインが知られている。しかし、マスト細胞に着目した古典的ホジキンリンパ腫の研究は未だなされていない。ホジキン細胞やRS細胞が分泌するサイトカインとマスト細胞の浸潤の関連性、マスト細胞自身が分泌するサイトカインに焦点をあてて古典的ホジキンリンパ腫の病態解明を行うことは、化学療法とは異なる新たな治療法の開拓に繋がり、難治性古典的ホジキンリンパ腫の予後を改善すると思われる。

骨髓線維症の線維化の機序については、骨髓巨核球に関する報告が多いが病態解明は未だに不十分である。マスト細胞に注目した研究はなく、新たな視点から骨髓線維症の病態や組織像を研究することは、新たな治療法の開拓に繋がる。

### 4. 研究の成果

#### (1) 古典的ホジキンリンパ腫における線維化の機序の研究

リンパ節内の線維化比率は、結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫 (nodular sclerosis subtype of classical Hodgkin lymphoma; NSCHL) が、非結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫 (non-NSCHL) (混合細胞型、リンパ球豊富型) より有意に線維化比率が高かった (Figure 1a)。また、腫瘍細胞であるホジキン細胞や RS 細胞が IL-13 を産生する症例ほど、有意に線維化比率が高かった (Figure 1b)。マスト細胞数浸潤は、結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫では、非結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫より有意に多く (Figure 1c)、腫瘍細胞が IL-13 を産生している症例ほど有意に多かった (Figure 1d)。さらに線維化比率は、マスト細胞浸潤数に正比例していた。連続切片を作製し、トルイジンブルー染色と抗 TGF- $\beta$  抗体又は抗 IL-13 抗体の免疫染色を施行した結果、マスト細胞が線維化を誘導するサイトカインである TGF- $\beta$  や IL-13 を産生し、線維化に関与している可能性が示された。また、IL-3 陽性細胞は検出できなかったため、古典的ホジキンリンパ腫の病態に IL-3 が関与している可能性は低かった。制御性 T 細胞の浸潤程度と線維化比率に関連性は無く、さらに制御性 T 細胞は線維化に関与する TGF- $\beta$  や IL-13 を産生していなかった。

本研究で、1) 結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫症例では、腫瘍細胞が線維化に関与するサイトカインの IL-13 を産生し線維化をもたらす、2) 腫瘍細胞が産生する IL-13 により、マスト細胞の増殖および浸潤が誘導され、さらにマスト細胞から線維化のサイトカインである TGF- $\beta$  や IL-13 が産生されることで線維化が進行する、というメカニズムを示した。マスト細胞を介したメカニズムが結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫の病態に関与していると示されたことは、今後の古典的ホジキンリンパ腫の病態解明に繋がる。

ホジキンリンパ腫の腫瘍細胞における SCF の異常発現 (Figure 2) は、結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫と非結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫間で有意差は見られなかったが、約 45% の古典的ホジキンリンパ腫の症例で認めた。ホジキンリンパ腫の腫瘍細胞が SCF を発現するという報告は未だなく、新たな知見であった。SCF は古典的ホジキンリンパ腫の新たな治療ターゲットとなり得る可能性が示され、今後の新たな治療法の開拓に繋がると考える。

本研究の成果は、*International journal of immunopathology and pharmacology* (Nakayama S, et al; Role of mast cells in fibrosis of classical Hodgkin lymphoma, 2016, in press) に報告した。また、2016 年第 78 回日本血液学会学術集会にても発表予定である。

Figure 1

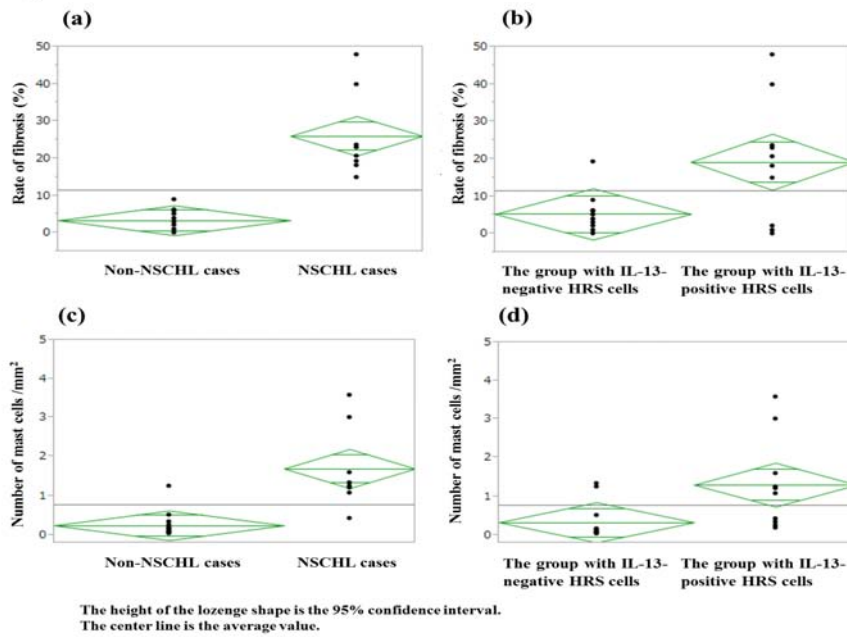
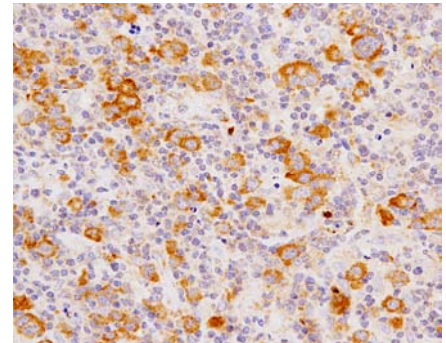


Figure 2



## (2) 骨髄線維症における線維化の機序の研究

骨髄線維症患者（①原発性骨髄線維症、②真性多血症/本態性血小板血症からの二次性骨髄線維症、③骨髄異形成症候群を伴う骨髄線維症）の骨髄組織では、①-③の各群いずれにおいても、骨髄組織におけるマスト細胞数浸潤が、正常骨髄組織と比較して優位に多かった。①群では②群に比較してマスト細胞浸潤が多かった。また、線維化の程度は、マスト細胞浸潤数に正比例していた。抗 mast cell tryptase 抗体と抗 TGF- $\beta$  抗体を用いた蛍光抗体を用いた二重免疫組織染色を施行した結果、マスト細胞は TGF- $\beta$  や IL-13 が陽性であった。以上より、骨髄組織に浸潤したマスト細胞が、線維化をもたらすサイトカインである TGF- $\beta$  や IL-13 を産生し、骨髄の線維化に関与していることが示された。

線維化の改善は、輸血依存の改善に繋がり、患者様の QOL の改善に寄与するため、線維化を抑制する治療法の開拓が望まれている。本研究により、マスト細胞を介した骨髄の線維化のメカニズムが示されたことで、骨髄線維症に浸潤したマスト細胞は、骨髄線維症における線維化抑制の治療ターゲットになり、新たな治療法の開拓に繋がると考える。

# 脳卒中後片麻痺者の自立歩行を阻害する身体的認知的特性の研究 — 一時系列カオス解析による軌道安定性の評価 —

広島国際大学 総合リハビリテーション学部 山崎 貴博

## 1. 研究の目的

歩行の自立は、脳卒中後片麻痺者の日常生活動作の自立に影響を与える最大の要因である。歩行の自立の判断は、しばしば臨床のセラピストの経験的判断に委ねられているが、特に歩行の要監視レベルから自立レベル移行時の判断に明確な基準は存在しない。歩行能力の程度を示す指標は、歩行スピードテストやtimed up & go testといった遂行時間で評価するものが多く、脳卒中後片麻痺者の歩行安定性に着目した定量的指標を用いた評価法は確立していない。

先行研究によると、歩行の自立に影響を与える要因は、麻痺側下肢機能、下肢筋力やバランス能力などの身体的因子および注意機能などの認知的因子があるとされている。しかし、これらの因子は、歩行が自立している片麻痺患者を対象とした場合の研究結果であり、歩行が自立するための阻害因子としての影響は不明である。

歩行を自立させるためには、転倒につながる身体的バランスの崩壊を生み出さないような安定性が必要である。先行研究では、高齢者の歩行時足圧中心位置の軌道不安定性は、身体能力の低下と相関があると報告されている。そして、身体能力は課題依存型であることと、足圧中心の軌道と身体重心の軌道には相関関係があること、加えて、身体重心は、身体機能や認知機能によって制御されているため、複合的な機能協調性の程度を評価することができることから、歩行時の身体重心移動の軌道に着目した安定性の評価が必要である。本研究の目的は、脳卒中後片麻痺者の歩行要監視レベルと歩行自立レベルの境界となる客観的指標として従来の評価である身体的認知的因子の影響に加え、身体重心移動の軌道安定性を反映する歩行安定性評価の定量的指標を開発し、臨床応用に発展させることである。そこで本研究では、①脳卒中後片麻痺を伴う歩行自立者と歩行要監視者の歩行安定性を比較すること、②歩行安定性の定量的指標の妥当性と歩行自立を達成するための理学療法治療介入の新たな視点を模索することとした。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 被験者

被験者は、脳卒中後片麻痺者23名であった。そのうち、歩行補助具や補装具を用いて歩行が自立している者が19名（男性12名、女性7名、年齢 $71.3 \pm 11.4$ 歳）、歩行に監視が必要な者が4名（男性1名、女性3名、年齢 $73.0 \pm 4.6$ 歳）であった。全ての被験者に研究の目的と内容を説明し、文書による同意を得た上で実験を行った。

### (2) 評価項目

生活自立度の評価は、日常生活自立度判定基準と機能的自立度評価表（以下、FIM）を用いた。歩行スピード能力の評価は、10m歩行スピードテスト（以下、10m歩行）とTimed Up & Goテスト（以下、TUGT）、二重課題歩行スピードテスト（以下、二重課題歩行）を行った。バランス能力の評価は、バーグバランステスト（以下、BBS）と予測最大1歩幅テスト（以下、最大1歩幅）を行った。運動機能障害の評価は、脳卒中機能障害評価法（以下、SIAS）とアシュワーススケール（以下、アシュワース）、ブルンストロームテスト（以下、BRS）を行った。心理・認知機能の評価は、ミニメンタルスケール（以下、MMSE）と転倒に対する自己効力感スケール（以下、FES）、Trail Making Test（以下、TMT）を行った。歩行安定性の評価は、歩行時の仮想重心軌道の安定性と麻痺側下肢の軌道安定性を評価するために時系列カオス解析のリアプノフ指数を用いた。

### (3) 歩行時の加速度データの収集

被験者の歩行時の仮想重心軌道の安定性と麻痺側下肢の軌道安定性を評価するために、小



型無線加速度計（MVP-RF8-GC-500，マイクロストーン株式会社）を腰背部中央（L3棘突起上）にベルトを用いて固定し、麻痺側下肢の腓骨外果上方には小型加速度計（MP-M6-02/500C，マイクロストーン株式会社）をテープで固定し取り付けた。両加速度計のサンプリング周波数は100Hzとした。被験者は加速度計を身に着けたまま、16m歩行路で10m歩行スピードテストと二重課題歩行テストを行い、その時の進行方向、左右方向、鉛直方向の加速度データを収集した。

#### (4) データ解析

歩行テストから得られた加速度データは、数値解析ソフトウェアMATLAB（Mathworks社製）を使用し、誤り近傍法を用いて再構成状態空間の次元を算出した。また、時間遅れ値は、最適な時間遅れ値を求めるために相互情報量を用い最初に極小値をとる時間とした。これら算出された再構成状態空間の次元値と時間遅れ値を、カオス時系列解析システムSunday Chaos Times（株式会社あいほら社製）を用いて最大リアプノフ指数を算出した。最大リアプノフ指数は、上下方向（以下、LE<sub>v</sub>）、左右方向（以下、LE<sub>m1</sub>）、前後方向（以下、LE<sub>ap</sub>）それぞれ算出した。

### 3. 研究の特色

本研究の特色は、脳卒中後片麻痺患者の日常生活に影響を与える歩行の自立可否に着目することによって、歩行自立を阻害する要因を抽出することや自立歩行基準の作成の一助となることである。これまでの研究は、歩行自立した者を対象としているため、その研究結果は、歩行自立者の歩行能力の程度を示すにとどまっていた。また、従来の身体的因子と認知的因子に加え、歩行安定性を評価することによって、身体的因子が歩行安定性に与える影響だけではなく、認知的因子が身体的因子または歩行安定性に与える影響も踏まえた多角的な歩行自立評価が可能となる。よって、本研究結果から、臨床のセラピストの経験的判断に委ねられていた歩行自立の主観的基準から、科学的根拠に基づく歩行自立の客観的基準へと移行することができる可能性がある。また、自立歩行許可の不明確な基準によって起こる医療事故を減少する可能性がある。さらに、転倒による骨折治療などの医療経済的負担の減少につながる可能性があると考えられる。

### 4. 研究の成果

各群の基本属性と最大リアプノフ指数は表1と表2に示す。

本研究の目的は、①脳卒中後片麻痺を伴う歩行自立者と歩行要監視者の歩行安定性を比較すること、②歩行安定性の定量的指標の妥当性と歩行自立を達成するための理学療法治療介入の新たな視点を模索することとした。①の目的において、歩行自立群と歩行監視群の最大リアプノフ指数の各成分の比較では、有意な差は認められなかったが、10m歩行体幹LE<sub>m1</sub>は、歩行監視群の方が低値を示す傾向があり、10m歩行下肢LE<sub>m1</sub>は、歩行監視群の方が高値を示す傾向があった。歩行自立レベルを歩行安定性の指標から検討するには、体幹及び下肢の左右方向の安定性に着目する必要があると考えられる。②の目的において、各群の10m歩行と二重課題歩行の最大リアプノフ指数の各成分の比較では、歩行自立群の二重課題体幹LE<sub>m1</sub>は、10m歩行体幹LE<sub>m1</sub>より有意に低いことが認められた。その他の変数においては有意な差は認められなかった。脳卒中後片麻痺者の歩行は、下肢の振り出しを確認する認知的歩行制御をする者が多いとされている。歩行自立群の歩行能力の高さを判定する指標としては、難易度の高い二重課題歩行が適していると考えられるが、歩行自立の可否を判定するには、認知的歩行制御下の10m歩行テストの体幹左右方向の安定性に着目する必要があると考えられる。また、興味深い結果として、歩行自立群の10m歩行体幹LE<sub>m1</sub>は、歩行監視群のそれよりも高く、歩行自立群の10m歩行下肢LE<sub>m1</sub>は、歩行監視群のそれよりも低い傾向があり対照的な結果となった。一般的にリアプノフ指数の値が高いほど軌道安定性は不安定であり、またその値が低いほど画一的なパターン化されていることになる。人間の歩行を捉えるうえでパターン化しすぎる場合は、外力への応答が困難となり、一定パターンからの逸脱によって制御不

能になる可能性も考えられるため、極端なリアプノフ指数の高低は問題となるのではないかと考えられる。そのため、歩行安定性の許容範囲を明確にしていく必要がある。

本研究の限界は、歩行監視群の被験者数が少ないため、統計学的解析を行っても信頼性に欠けるため、傾向にとどめておかなければならないことである。今後は、歩行監視レベルの被験者数を増やすことと、歩行自立の基準となる定量的指標を確立できるよう研究を進めていく必要がある。本研究では、体幹及び下肢の左右方向の軌道安定性が歩行自立を見極める指標としてなりうる可能性があるため、その左右方向の安定性を向上させる治療介入や歩行自立の可否の判断として活用できるよう継続して研究を進める価値があると考えられる。

表1. 各群の基本属性

	歩行自立群	歩行監視群	
年齢 (歳)	71.3±11.4	73.0±4.6	p=0.957
身長 (cm)	160.2±11.1	156.1±5.6	p=0.574
体重 (kg)	58.7±11.8	55.0±8.1	p=0.728
麻痺側 (右/左)	8名/11名	3名/1名	
歩行補助具 (有/無)	4名/15名	4名/0名	
下肢装具 (有/無)	3名/16名	0名/4名	
FIM (点)	121.0±5.5	111.0±6.2	p=0.006
10m歩行 (秒)	13.0±5.9	17.3±3.8	p=0.067
TUGT (点)	14.7±6.6	21.9±8.8	p=0.090
二重課題歩行 (秒)	16.6±9.0	24.9±8.5	p=0.162
BBS (点)	47.6±7.7	46.0±4.1	p=0.603
最大1歩幅 (cm)	64.6±20.3	57.8±22.0	p=0.574
SIAS (点)	60.3±11.9	64.8±8.4	p=0.564
アシユワース	0:9名、1:7名 3:1名、4:1名	0:1名、1:3名	
下肢BRS	Ⅲ:1名、Ⅳ:2名 Ⅴ:4名、Ⅵ:12名	Ⅴ:2名、Ⅵ:2名	
MMSE (点)	26.8±3.8	27.5±1.7	p=0.845
FES (点)	95.9±25.9	83.8±33.0	p=0.438
TMT (秒)	180.2±64.8	183.7±53.8	p=0.876

表2. 10m歩行と二重課題歩行時の最大リアプノフ指数

	歩行自立群	歩行監視群	
10m歩行体幹LEap	0.59±0.27	0.41±0.20	p=0.208
10m歩行体幹LEml	0.50±0.23 <sup>#</sup>	0.25±0.09	p=0.063
10m歩行体幹LEv	0.39±0.22	0.50±0.21	p=0.505
10m歩行下肢LEap	1.06±0.51	1.26±0.06	p=0.505
10m歩行下肢LEml	0.77±0.45	1.34±0.58	p=0.067
10m歩行下肢LEv	0.73±0.44	0.78±0.41	p=0.785
二重課題歩行体幹LEap	0.52±0.36	0.73±0.42	p=0.286
二重課題歩行体幹LEml	0.37±0.18 <sup>#</sup>	0.64±0.31	p=0.216
二重課題歩行体幹LEv	0.47±0.21	0.35±0.14	p=0.376
二重課題歩行下肢LEap	1.00±0.47	0.78±0.25	p=0.465
二重課題歩行下肢LEml	0.82±0.34	0.68±0.25	p=0.785
二重課題歩行下肢LEv	0.69±0.27	0.57±0.24	p=0.468

# : 10m歩行体幹LEml vs 二重課題歩行体幹LEml、p<0.05

# 多糖アルギン酸輸送体の構造・機能解析 —構造解析基盤の確立と輸送機構の解明—

摂南大学 理工学部 丸山 如江

## 1. 研究の目的

一般的に細胞外の高分子物質を取り込む場合、細胞は分解酵素を分泌し、低分子化した物質を細胞内に取り込む。一方、多糖アルギン酸資化性のグラム陰性細菌 *Sphingomonas* sp. strain A1 (A1株) は、アルギン酸分解酵素を細胞内に持ち、高分子のままアルギン酸を取り込む。アルギン酸は、結合タンパク質 AlgQ2 (ペリプラズム局在、分子量60,000) 依存的ABC輸送体 AlgM1M2SS (4量体、分子量140,000) により細胞質膜を通過し、細胞内へと運ばれる。取り込まれたアルギン酸は、細胞質で分解酵素 (アルギン酸リアーゼ) によって単糖にまで分解される。この特徴的な高分子取り込みの詳細を明らかにするため、これまでに、結合タンパク質とABC輸送体の *in vitro*機能解析系を確立し、また全体構造 (AlgM1M2SS-AlgQ2複合体) を決定した。ABC輸送体は、輸送サイクルの各段階において異なる構造を呈することにより基質を移送する。そのメカニズムを明らかにするため、各サイクルの構造決定を目指した結晶構造解析を進めているが、現状では、結晶化とX線回折データ収集の二つのステップが研究の律速となっている。本研究では、再現性のよいX線回折データ収集法を確立した。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 結晶化

AlgM1M2SSとAlgQ2およびアルギン酸オリゴ糖 (dMMM) を精製し<sup>(1)</sup>、結晶化用サンプルとした。96穴プレートを用いたシッティングドロップ蒸気拡散平衡法により結晶を作製した。7 mg/mL AlgM1M2SS、3.5 mg/mL AlgQ2、2 mM dMMM、4 mM ATP、4 mM MgCl<sub>2</sub>から構成されるタンパク質溶液と等容量の沈殿化剤を加え、50  $\mu$ Lの沈殿化剤に対する平衡化を20°Cで約一ヶ月行った。

### (2) 結晶凍結

#### ① 脱水法

抗凍結剤としてPEG400 (終濃度0~25%) を加えた母液(結晶化溶液に含まれるタンパク質以外の分子を結晶化開始時の倍濃度含む溶液)を用意し、結晶を30分ごとにPEG400の濃度が順に濃くなるように新しい母液に移したのち、低温窒素ガスを吹き付けることにより、結晶を瞬間凍結した。

#### ② HAG法

10%ポリビニルアルコール (PVA) 4500を含むコーティング液で膜を張ったループで結晶をすくい取り、湿度調整ガスを吹き付けながらX線を照射し、見積もられた結晶のモザイク性を指標として抗凍結条件の最適化を行った。最適化した湿度条件の下で、低温窒素ガスを吹き付けることで結晶を瞬間凍結した。

### (3) X線回折データ測定

回折データの測定にはSPring-8のビームラインBL38B1を利用した。波長1.00 ÅのX線を照射し、CCD検出器を用いてその回折データを収集した。得られた回折データはHKL2000プログラムによりプロセスした。

## 3. 研究の特色

近年、タンパク質の結晶構造解析において、放射光のX線強度や検出器の改良、あるいは、解析プログラムの汎用化・自動化によって、構造決定にかかる時間や労力が大幅に縮小された。それでも尚、膜タンパク質や巨大複合体の構造決定は困難なままである。それは、本研究の対象であ

るABC輸送体においても例外ではない。本研究では、アルギン酸ABC輸送体であるAlgM1M2SSの良質な回折データを再現性良く取得する方法を確立する。確立する手法は、異なるコンフォメーションを呈するAlgM1M2SSの構造決定や部位特異的変異体を用いた構造解析など、今後の研究の展開における基盤となる。

#### 4. 研究の成果

AlgM1M2SS-AlgQ2複合体の結晶は、18~22% PEG3000、0.1M ADA-NaOH (pH 6.6)、16 mM CHAPSO、および0.15 M NaClあるいは蟻酸ナトリウムを沈殿化剤とすることで、再現性良く得られた。タンパク質のX線結晶解析では、結晶を凍結してデータ測定を行うことが一般的であるが、タンパク質の結晶は水分を多く含んでいるため、結晶を凍結する際に氷の結晶が生成し、試料を劣化させてしまうことがある。従って、抗凍結処理により氷の結晶の生成を抑えることは不可欠である。得られた結晶を下の二つの方法で凍結し、回折データを収集した。

##### (1) 脱水法

膜タンパク質の結晶は、特に水分含量が高い傾向があるが、抗凍結剤の濃度を段階的に上げた溶液に結晶をさらし、水分含量を低下させることにより、回折データの分解能が上がることもある。PEG400を抗凍結剤とし、0%から25%まで5%刻みに抗凍結剤濃度を上げることにより、最終的に分解能3.2Åのデータが収集できた。しかしながら、抗凍結剤を含む母液に浸している間に多くの結晶が損傷し、分解能4Å以上のデータの取得率は5%以下であった。

##### (2) HAG法

2014年度からSPring-8 BL38B1にて一般使用が開始された HAG 法<sup>(2)</sup> (Humid Air and Glue-coating method: 湿度を調節しながら結晶凍結を行う結晶凍結法)を用いて、AlgM1M2SS-AlgQ2複合体のX線回折実験を行った。HAG法の最適条件を調べる為に①コーティング液 (A)10% PVA4500、(B)10% PVA4500、5% エチレングリコール、(C)10% PVA4500、5% グリセロール) と②凍結時の湿度条件 (湿度85%で結晶マウント後、段階的に湿度をA)上げる、B)下げる)の検討を行った。その結果、結晶化沈殿剤にNaClが含まれる場合は、10% PVA4500をコーティング剤とし、最終湿度90%での凍結が最適であり、一方沈殿剤に蟻酸ナトリウムを含む場合には、5% エチレングリコールを含む10% PVAをコーティング液とし、最終湿度85%で凍結したときに最も良いデータを与えた。得られたデータの分解能は3.4Åと3.6Åであった(図1)。今回得られたデータから計算した電子密度マップには、AlgM1とAlgM2のC末端に脱水法で得られたデータには見られない電子密度が確認されたことから、結晶凍結にHAG法を用いることで、X線回折データの質が向上することが示唆された。また、HAG法を用いることにより、分解能4Å以上のデータの取得率は約40%であった。

以上の結果より、HAG法は、本輸送体結晶の効率の良い回折データ収集法であることがわかった。また、立体構造から示唆される輸送経路(サブユニット界面に形成される内部空洞)にアミノ酸変異を導入し、その機能解析も行った。今後、これらの変異体の構造機能相関解析を進める際において、あるいは、新規なコンフォメーションをとるアルギン酸輸送体の構造解析において、HAG法は有用なツールに

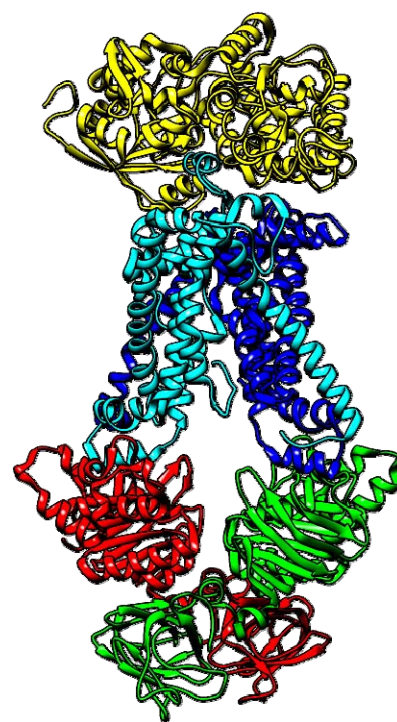


図1. HAG法を用いて凍結した結晶から求めた3.4 Å分解能のAlgM1M2SS-AlgQ2複合体構造。  
黄、AlgQ2；青、AlgM1；水色、AlgM2；黄緑と赤、AlgS

なると考えられる。

[参考文献]

- (1) Maruyama Y, Itoh T, Kaneko A, Nishitani Y, Mikami B, Hashimoto W, Murata K.(2015) Structure of a Bacterial ABC Transporter Involved in the Import of an Acidic Polysaccharide Alginate. *Structure* 23:1643-1654
- (2) 馬場清喜、熊坂崇 (2014) 湿度調整と水溶性ポリマーのコーティングを用いたタンパク質結晶マウント法、*日本結晶学会誌*、56:194-200

# 超高齢化社会におけるcommonsスペースの利活用に関する研究 —地域ケアシステム構築可能性の検討—

神戸芸術工科大学 芸術工学部 宮本 万理子

## 1. 研究の目的

近年、個々の暮らしの境界領域の明確化が著しく、空間のプライベート化が強まっている。下町等に見られる生活領域の表出（以下、生活領域の拡張）が薄れる傾向にあり、外部空間を共用する使い方や作法の喪失が近隣コミュニティの衰退につながることに懸念されている。

計画的に整備された団地における集合住宅では、こうした状況が現れやすい。今後は、こうした集合住宅においてもコミュニティを醸成するきっかけをつくっていくことが必要であると考えられる。超高齢化社会においては、地域のつながりをつくっていくことが地域ケアの基礎になる。

本研究では、岡山県営中庄団地を対象とし、地域つながりをつくるきっかけとなる生活領域の拡張が見られる空間特性を把握し、居住者の働きかけを生み出す空間のあり方を考察する。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 研究対象の特性

岡山県営中庄団地は各期ごとに設計者の設計意図により、特徴ある生活空間が創出されている。

第1期では、アクセス路、横道、抜け道など様々な道により曖昧な空間を生み出している。第2期では、「住まいの原風景から」「歩き回る」「街に開く」「見え隠れ」をコンセプトとし、住民による生活環境の創出を意図している。第3期の設計者は、「都市と建築の作られ方は自然の中での人々の生活行為が日常的な生活空間を生み出し、それがつながってゆく」と計画の背景を述べている。第4期では、ペDESTリアンデッキと流れるような住棟デザイン以外は、一般的な片廊下型の集合住宅である。

### (2) 研究方法

2015年9月1日～3日、団地内の外部空間における生活領域の表出状況を写真撮影した。撮影した写真から団地の平面配置図および各階平面図に表出状況のマッピングを行い、生活領域の拡張実態を把握した。また生活領域の拡張状況について類型化を行い、各期の計画意図と合わせて考察した。

「生活領域」は、1980年代に提唱された建築計画における考え方であり、本研究では公営賃貸住宅における「共用空間の私的領域化により、個人の生活が住戸外に表出した空間」とする。

## 3. 研究の特色

### (1) 既往研究における位置づけ

中庄団地については、藤田ら(2003)<sup>1)</sup>による団地ごとの設計手法の相違と住民組織の活動についての調査研究、毛利ら(2001)<sup>2)</sup>による立体路地が誘発する住民の生活行為及び生活に対するイメージに関する研究がある。また、元谷ら(2005)<sup>3)</sup>は、住民の生活動線に着目して、居住者が認識している場の広がりについて研究している。

計画的に開発された住宅団地において長く居住を続けるなかで、藤谷ら(2012)<sup>4)</sup>は、住民の空間への働きかけと近隣関係など社会環境との関係を、居住空間の共用性とプライバシーの調整の観点からとらえることができること、また高齢化社会ではその再調整が必要であると指摘している。しかし、生活領域の表出については、鈴木ら(1994)<sup>5)</sup>による密集市街地を対象とした下町の通り・路地・隙間における表出に関する一連の調査研究はあるものの、本研究が対象とする建て替えによる集合住宅団地における表出を扱っている論文は見られない。

(2) 研究の特性

既往研究からわかるように、集合住宅団地における表出と空間デザインの相互作用に着目するところに、本研究の新規性があり、植木鉢や椅子を置く、樹木を植える等の生活領域を拡張する行為を指標として、計画的集合住宅団地の空間構成を分析するところに特徴がある。

4. 研究の成果

(1) 生活領域の拡張の類型

生活領域の拡張は、モノを置くことにより置かれた範囲までの空間を私的領域化し生活領域を拡張しているタイプ、緑化により場の用途を本来の用途とは異なるものへと変更し私的領域化することで生活領域を拡張しているタイプがあった。2つのタイプを、行為の要素とその場の条件により分類すると、A：植木鉢空地型（18箇所）、B：植木鉢廊下型（38箇所）、C：ファニチャー空地型（9箇所）、D：ファニチャー廊下型（22箇所）、E：畑近場型（5箇所）、F：畑離型（1箇所）、G：樹木型（3箇所）の7タイプがあった。

(2) 建設時期における生活領域の拡張のタイプ

① 第1期

第1期では、植木鉢空地型10件（30%）、植木鉢廊下型9件（27%）、ファニチャー廊下型5件（15%）、ファニチャー空地型4件（12%）が見られた。

② 第2期

第2期では、植木鉢廊下型20件（61%）が6割を超えて最も多く、他には植木鉢空地型5件（15%）、ファニチャー空地型4件（12%）、ファニチャー廊下型4件（12%）があった。

③ 第3期

第3期は、1期（33カ所）、2期（33カ所）と比べると、表出は19カ所と少ない。主にファニチャー廊下型9件（47%）、植木鉢廊下型6件（32%）が見られた。

④ 第4期

第4期では、表出が見られた場所は11カ所で最も少ない。ファニチャー廊下型4件（36%）、植木鉢空地型3件（27%）、植木鉢廊下型3件（27%）であった。

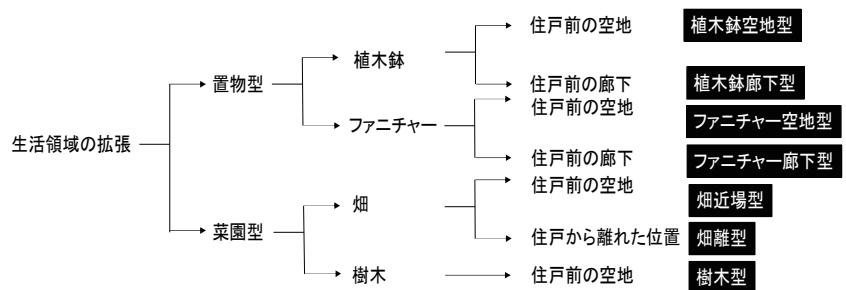


図1. 生活領域の拡張の類型

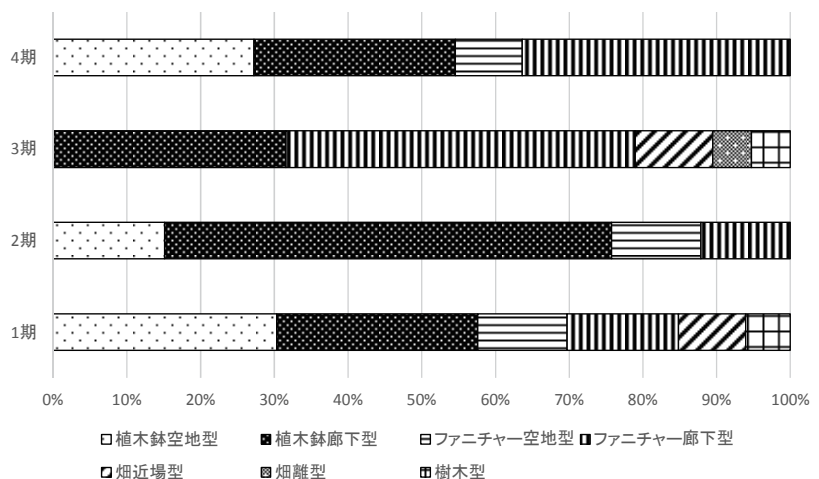


図2. 設計別にみた生活領域の拡張性の分類割合

(3) 考察

第1期と2期では、置かれている場所は異なるものの植木鉢型が過半を占めた。第1期の共用廊下の植木鉢は向かい合う住棟からの視線を遮るような配置となっていた。第2期では、共用廊下に並ぶ植木鉢は住戸と住戸の間を通る共用通路の彩りとなっていた。

第3期と4期では、ファニチャー廊下型が多かった。中央の開放性の高い空間に面する共用廊下は様々な階から眺められる。開放性の高い場所に置かれているファニチャーには、1期の植木鉢と同様に住戸内への視線を干渉する効果が期待されている。玄関前の傘立てやポールハンガー、ベンチ等は生活機能のあふれ出しである。

中庄団地の事例研究から、共用通路の配置、開放性の高い空間と住戸や通路との関係、生活空間における動線や視線の交錯などが、生活領域の拡張を誘発し、その意味を多様化させることがわかる。こうした空間条件を計画的にデザインすることにより、外部空間の共用を促し、居住者間の関係を醸成することが考えられる。地域ケアは、地域の居住者の関係性に依拠するところが大きく、そのシステム構築においては、こうした場のデザインの効果も期待できる。

今後は、予定していた神戸市郊外における地域ケアシステムの構築に本研究の知見を展開することが課題と考えている。

#### <注>

当初計画では、神戸市郊外団地において調査分析を予定していたが、予備調査から、計画意図が明確であり、多様な生活領域の拡張がみられる中庄団地（岡山県）が調査対象として適切と判断した。

#### <文献>

- (1) 藤田博子、杉田美子、北岡直子（2003）住民の住環境への働きかけを再生計画へと活かす為の研究、住総研2003年研究年報No.30、101～112
- (2) 毛利直宏、延藤安弘、森永良丙、渋谷高陽（2001）中庄団地第3期ブロックにおけるスタディーその2ー立体路地をきっかけとした住まい環境の形成ー、日本建築学会大会学術講演梗概集（関東）、127-128
- (3) 元谷麻純（2005）居住者が認識している場の広がりに関する研究、神戸芸術工科大学卒業論文
- (4) 藤谷英孝、丁志映、小林秀樹（2012）都市型低層集合住宅における共有領域の経年変化、日本建築学会計画系論文集、77巻、672号、283～289
- (5) 鈴木毅、横山勝樹、横山ゆりか、金栄爽、大月敏雄、荻谷哲朗、篠崎正彦、山添英順（1994）下町型集住形式に関する研究ー密集住宅地「根津」におけるケーススタディー、住宅総合研究財団、研究年報No.21、1～12



# 児童期の攻撃性と感情処理過程との関連についての基礎的調査研究

大阪人間科学大学 人間科学部 勝間 理沙

## 1. 研究の目的

多種多様な個人が集う学校は、他者との関わりを学ぶ、小さくはあるが重要な一つの社会の枠組みであるとも言える。ただし、すべての子どもが他者との適切な関わりをもてる訳ではない。そのため、教育現場では、児童生徒によるいじめや暴力の予防や対策が大きな課題の一つとなっている。これまで申請者は、それらの問題に関わる重大な個人要因として“攻撃性”に着目し、攻撃性の高さの低減やその予防につながる基礎的、応用的な研究を行ってきた。

本研究は、攻撃性の種類や性質の変化がめざましい児童期（小学生時期の後期）を対象として、先行研究を発展することで児童期の攻撃性の様態をさらに明らかにし、攻撃性の高まりを適正化、予防していくための有効なアプローチに必要な新たな知見を得るためのものである。

そのために本研究では、小学校4～6年生を対象とし、児童がもつ攻撃性の構造関係を明らかにし、攻撃性のサブタイプ毎に先行研究でも攻撃性との関連が見られた感情認知および共感関連反応（勝間・山崎，2008a, b, Fig.1参照）といった感情処理過程にどのようなメカニズムを持っているかを検討していく。具体的には、現在開発中の攻撃性の構造関係の測定（アセスメント）法を用い、攻撃性の構造関係の観点から、感情認知および共感関連反応との関連の再現性について検討する。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 調査対象者

人口15万人未満の小都市にある公立小学校1校および人口15万人以上の中都市にある公立小学校1校計2校に在籍する4～6年生388名を対象として質問紙調査を行った。回答に不備のあった者を除外した最終的な分析対象者の内訳は、4年生が男子44名と女子52名、5年生が男子35名と女子48名、6年生が男子91名と女子84名、さらに学年または性別が不明であった6名をあわせて、計360名となった。

### (2) 調査材料

#### ① 攻撃性構造的関係測定質問紙

質問紙の構成尺度は形態（顕在性、関係性）と機能（反応的、道具的）であり、実際の質問紙上では、形態項目を質問①、機能項目を質問②として、質問①、②の順で回答を求めた。形態項目については、それぞれの項目を“自分以外の人にふだんどのくらい行っているか”を、“まったく行わない（0点）”、“あまり行わない（1点）”、“ときどき行う（2点）”、“よく行う（3点）”、“とてもよく行う（4点）”の5段階で評定を求めた。さらに機能項目に対しては、“質問①（すなわち形態項目）で答えたことについて、それらのことを自分以外の人に行うとき、書かれている理由がどれくらいあてはまるか”を、“まった

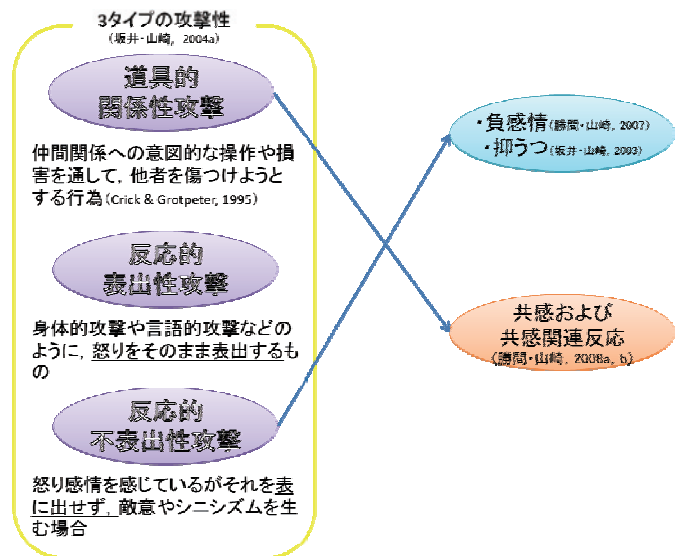


Fig.1 申請者の先行研究の概要

くない (0点) ”、“めったにない (1点) ”、“ときどき (2点) ”、“たいてい (3点) ”、“いつも (4点) ”の5段階で評定を求めた。

② 感情処理過程の場面設定法による測定 (ビニエツト)

ビニエツト (vignette) 法を使用して、他者の悲しみの場面に対する感情認知および共感関連反応を測定した。ビニエツト法とは、仮想的に設定された場面を使用して調査する方法である。場面については3つ用意した (A: ペットの死、B: 友人との離別、C: 大事な所有物の喪失)。そしてそれぞれの場面を読んで、「①〇〇さん (くん) は、悲しんでいる (感情認知: 悲しみ)」、「②わたし (ぼく) は、悲しくなる (エンパシー: 悲しみ)」、「③〇〇さん (くん) が、かわいそう (シンパシー)」、「④わたし (ぼく) は、つらくて嫌な気持ちになった (個人的苦痛)」という4つの項目について、「ぜんぜんそうおもわない (1点) 」～「とてもそうおもう (5点) 」の5段階で評定してもらった。悲しみの場面に対する共感を測定するのは、いじめ場面や攻撃反応場面などを用いた場合、怒り感情の知覚など他の要因によって、攻撃性の構造による違いを正確にとらえることができないと考えたためである。

### 3. 研究の特色

これまで発達・教育領域では攻撃性をいくつかの側面をもつものとして細分化が行われてきた。例えば、Dodge and Coie (1987) の“反応的攻撃”と“道具的攻撃”や、Crick (1995) の“顕在性攻撃”と“関係性攻撃”である。しかし近年では、攻撃性をその発動の根底にある機能 (underlying function) と、表に現れている形態 (overriding form) という観点から、それらを組み合わせて構造的にとらえることが提言されている。そして、構造的にとらえられた攻撃性は、4つのサブタイプに分けられ、それぞれの攻撃性から適応・健康上の問題との関連が再検討されるようになり、サブタイプ毎に異なった関連を示すことが示唆されている

(Marsee et al., 2007; Prinstein & Cillessen, 2003; 攻撃性の構造関係についてはFig. 2)。より詳細な攻撃性な理解や対処・予防のために、攻撃性の構造関係に基づいた研究が必要であると考えられる。しかし、本邦では攻撃性の構造関係についての研究はほとんど皆無であり、その測定尺度も存在していない。そこで、申請者が現在開発中の攻撃性の構造関係の測定法を用いることで、新たな攻撃性概念に焦点を当て、児童期の攻撃性についてのさらなる知見を得ることができ、攻撃性の構造関係に基づいた介入・予防法の考案へと寄与することが期待される。また、これまでの攻撃性研究では、攻撃性における感情や感情統制の役割を検討した研究はいまだ少ない。しかし近年では、感情が個人の意思決定に重要に関わっているというさまざまな理論や仮説 (e. g., Damasio, 1994) が提唱されている。申請者の先行研究からも、攻撃性の高い児童の意思決定過程に、共感といった他者への感情が深く関連していることが分かっており、その関連は攻撃性の構造関係の観点から明らかにすることで、さらに詳細な感情処理の過程を理解することができると思う。

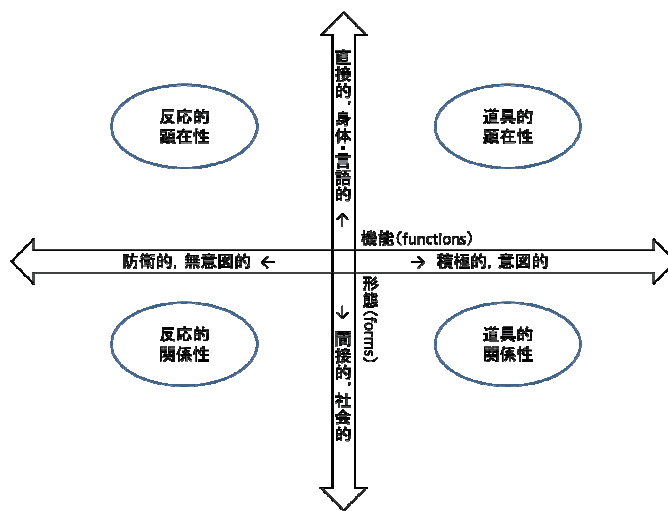


Fig. 2 攻撃性の構造関係

## 4. 研究の成果

### (1) 男女差の検定

Table 1 各尺度の男女差

	男子		女子		t値(df)
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
<b>攻撃性</b>					
形態:顕在性攻撃	4.49	3.56	2.49	3.00	5.73 (352)**
形態:関係性攻撃	3.22	2.98	2.61	2.85	1.97 (352)*
機能:反応的攻撃	3.85	3.05	2.83	2.79	3.29 (352)**
機能:道具的攻撃	1.49	2.27	.96	1.81	2.42 (352)*
反応的顕在性攻撃	8.75	6.17	5.43	5.57	5.10 (322)**
反応的関係性攻撃	7.13	5.76	5.73	5.42	2.23 (316)*
道具的顕在性攻撃	7.47	5.86	4.07	5.20	4.50 (212)**
道具的関係性攻撃	5.61	5.17	4.36	5.29	1.74 (211)
<b>感情処理過程</b>					
感情認知	13.64	1.82	14.20	1.22	3.39 (352)**
エンパシー	10.98	3.03	12.08	2.57	3.69 (352)**
シンパシー	12.95	2.23	13.69	1.75	3.51 (352)**
個人的苦痛	9.61	3.31	10.74	2.93	3.40 (352)**

一致しているが、陰湿で表面に現れないような攻撃は“女子の方が多し”という知見とは異なっている。今後もう少しデータを増やして、この傾向が普遍的なものかを検証していく必要がある。

### (2) 相関係数の分析

各尺度間の相関関係を見るために、ピアソンの積率相関係数を男女毎に算出した (Table 2)。まず、攻撃性尺度間の相関係数は、 $r=.45\sim.93$ まで中程度以上の有意な正の相関となっていた ( $p<.01$ )。そして、感情処理過程の尺度内でも同様に、 $r=.45\sim.74$ まで中程度の有意な正の相関となっていた ( $p<.01$ )。さらに、4タイプの攻撃性サブタイプと感情処理過程との関連については、男女では異なる関連性が見いだされた。男子では、道具的関係性攻撃と感情認知 ( $r=-.23$ ,  $p<.05$ ) との関連は見られたが、女子では見られなかった。このような男女での関連の違いは、これまでの知見ではあまり見られなかったものである。そのため、今後因果関係の分析も含めた、さらなる分析を行っていく予定である。

Table 2 尺度間の相関係数

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
I 形態:顕在性攻撃		.68** (170)	.65** (170)	.49** (170)	.94** (154)	.73** (158)	.94** (99)	.72** (110)	-.30** (170)	-.18* (170)	-.25** (170)	-.15 (170)
II 形態:関係性攻撃	.61** (184)		.63** (170)	.45** (170)	.75** (154)	.93** (158)	.68** (99)	.92** (110)	-.22** (170)	-.17* (170)	-.17* (170)	-.14 (170)
III 機能:反応的攻撃	.69** (184)	.61** (184)		.54** (170)	.88** (154)	.88** (158)	.73** (99)	.74** (110)	-.20** (170)	-.16* (170)	-.19* (170)	-.11 (170)
IV 機能:道具的攻撃	.61** (184)	.59** (184)	.57** (184)		.55** (154)	.52** (158)	.79** (99)	.77** (110)	-.31** (170)	-.11 (170)	-.20* (170)	-.11 (170)
V 反応的顕在性攻撃	.93** (170)	.65** (170)	.89** (170)	.62** (170)		.88** (153)	.93** (97)	.81** (103)	-.28** (154)	-.20* (154)	-.25** (154)	-.19* (154)
VI 反応的関係性攻撃	.70** (160)	.92** (160)	.86** (160)	.61** (160)	.82** (156)		.75** (96)	.93** (108)	-.18* (158)	-.15 (158)	-.15 (158)	-.13 (158)
VII 道具的顕在性攻撃	.96** (115)	.73** (115)	.82** (115)	.86** (115)	.96** (115)	.81** (101)		.82** (93)	-.34** (99)	-.23* (99)	-.33** (99)	-.26* (99)
VIII 道具的関係性攻撃	.75** (103)	.96** (103)	.74** (103)	.86** (103)	.78** (99)	.95** (103)	.85** (88)		-.23* (110)	-.10 (110)	-.16 (110)	-.10 (110)
IX 感情認知	-.18* (184)	-.06 (184)	-.18* (184)	-.15* (184)	-.23** (170)	-.15 (160)	-.22** (115)	-.14 (103)		.55** (170)	.70** (170)	.41** (170)
X エンパシー	-.23** (184)	-.09 (184)	-.18* (184)	-.12 (184)	-.26** (170)	-.19* (160)	-.27** (115)	-.17 (103)	.54** (184)		.64** (170)	.74** (170)
XI シンパシー	-.19** (184)	-.08 (184)	-.20** (184)	-.20** (184)	-.24** (170)	-.22** (160)	-.26** (115)	-.23* (103)	.78** (184)	.57** (184)		.56** (170)
XII 個人的苦痛	-.17* (184)	-.07 (184)	-.10 (184)	-.08 (184)	-.17* (170)	-.14 (160)	-.18** (115)	-.12 (103)	.41** (184)	.79** (184)	.48** (184)	

\* $p<.05$ , \*\* $p<.01$ . 右上段:男子, 左下段:女子, ○内はN

# 新規葉緑体タンパク質の探索と機能同定 —珪藻類の高効率光合成を担う分子機構の解明に向けて—

関西学院大学 大学院理工学研究科 菊谷 早絵

## 1. 研究の目的

海洋性珪藻類による一次生産量は、地球全体の約20%にも達することが知られている。珪藻類は無機炭素濃縮機構(CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism: CCM)により海水中の溶存無機炭素(dissolved-inorganic carbon: DIC)を効率的に利用することによって、これほど多くの一次生産を担うことが可能となっている。珪藻類をはじめとする真核藻類の葉緑体には、炭酸固定酵素であるribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)を多量に含むタンパク質顆粒であるピレノイドが存在する。ピレノイドは取り込んだDICを固定する収斂点として、CCMにおいて重要な役割を果たしていると考えられるが、その生化学的構造や機能についてはほとんど解明されていない。またピレノイドは進化初期の葉緑体に見られる構造であり、緑色植物では陸上化に伴って消失している。よって、その詳細は植物の葉緑体機能の進化を探る上でも重要である。しかし、珪藻類のピレノイドは単離が困難であり、ピレノイドに関する分子レベルでの知見は限られている。本研究では、ピレノイド機能の解明を目的として、ピレノイド局在タンパク質の網羅的解析及びそれらの相互作用関係と生理機能の解析を試みる。

## 2. 研究の計画・方法

本研究では、海洋性羽状目珪藻*Phaeodactylum tricornutum*を用い、新規のピレノイド関連タンパク質の探索及び機能同定を行う。

- (1) RubisCOと相互作用する因子の探索：既知のピレノイド局在タンパク質と相互作用するタンパク質を光クロスリンク実験により探索する。相互作用タンパク質を免疫沈降及びLC/MS解析によって同定する。得られた相互作用タンパク質の細胞内局在とその環境応答ダイナミクスを、GFP融合タンパク質を珪藻細胞内で発現させることにより確認する。
- (2) LCIBホモログの機能同定：緑藻*C. reinhardtii*のLCIBのホモログは、バクテリアや一部の藻類において保存されている。これまでに、*P. tricornutum*におけるCGHRファミリータンパク質の一つであるP43233がピレノイドに貫通するチラコイドに局在するCCMにおいて重要な因子であることが示唆されていた。その生化学的機能を同定するため、大腸菌で組換えタンパク質を発現・精製し、その酵素活性の測定を行う。

## 3. 研究の特色

ピレノイドに関するこれまでの研究として、ピレノイド含有画分に含まれる酵素活性の測定、タンパク質の免疫化学的同定により、ピレノイドの主要な構成成分はRubisCOであり、またRubisCO以外にも様々なタンパク質が局在することが示唆されている。これらのタンパク質が相互作用することによって、ピレノイドはCO<sub>2</sub>固定をはじめとする様々な一次代謝に必須の機能を果たしていることが考えられる。本研究では、ピレノイドがタンパク質の凝集体であることを利用し、光クロスリンク法により相互作用タンパク質を特異的に架橋し既知のピレノイド局在タンパク質とともに免疫沈降し、網羅的に同定する。これは本研究の独創的な手法であり、これまでに行われていた手法では困難であった、ピレノイドにおけるタンパク質間の相互作用関係及びピレノイドの生化学的構造の解明が期待される。

## 4. 研究の成果

- (1) RubisCOと相互作用する因子の探索：抗RubisCO抗体を用い、光クロスリンク法により架橋さ

せた*P. tricornutum*のRubisCO近傍に局在するタンパク質を免疫沈降し、質量分析により同定した結果、既知のピレノイド局在タンパク質以外に新規のピレノイド局在タンパク質候補が得られた。それらのGFP融合タンパク質を珪藻内で発現させて細胞内局在を解析した結果、ピレノイド周辺に局在する因子候補一つを得た。この因子は珪藻とごく一部の二次共生藻のみで見られる機能未知因子であり、今後この因子の機能同定を行う。

- (2) LCIBホモログの機能同定：LCIBのホモログは、約100アミノ酸残基ほどの高度に保存された領域を有する。この保存領域には、システイン、グリシン及びヒスチジンが保存されており、Cys, Gly, His-rich (CGHR) familyと命名した。*P. tricornutum*におけるCGHR familyの一つであるP43233の生化学的機能を解明するため、大腸菌を用いて組換えタンパク質を発現・精製し、その酵素活性を測定した。その結果、Pt43233はエステラーゼ活性及びCA活性を有することが明らかになり、CGHR familyは新規の炭酸脱水酵素であることが明らかとなった。また、これまで*P. tricornutum*におけるCCMは、 $\text{HCO}_3^-$ の形態で葉緑体内に取り込まれたDICはピレノイドに局在するPtCA1及びPtCA2という2つのCAによって $\text{CO}_2$ へと変換されてRubisCOへと供給されるというモデルが考えられていたが、今回の結果により、取り込まれた $\text{HCO}_3^-$ はピレノイドを貫通するチラコイドにおいて、その酸性環境とCAの機能によって $\text{CO}_2$ に変換されてピレノイド内のRubisCOへと供給されるというモデルが提唱された。

# 炭素14陽子弾性散乱測定による三体力の研究

甲南大学 理工学部 松田 洋平

## 1. 研究の目的

量子多体系は多様な現象を引き起こす。そのような多様性も実はある基本法則から成り立っており、その探究は現代物理学において重要な研究テーマとなっている。無限個の核子からなる核物質もまた無限量子多体系であり、その構造を現実的な核力の知識のみを用いて記述する事は、大変興味深い研究テーマの一つと言える。

1950年代にBruecknerは核子-核子相互作用から核物質を説明するBrueckner理論を構築した。1970年代にBrueckner理論を有限個の核子の集まりである原子核の陽子弾性散乱に適用する試みが行われ、中重核領域である程度の成功を収めた。しかし軽い原子核に対しては観測量を再現出来ずにあった。またBrueckner理論自身も飽和密度での核子当たりのエネルギーを再現出来ていなかった。近年、これらの問題は斥力の三体力を適切に取り入れる事で解決出来るという理論予想がなされている[1]。

本研究では、 $^{14}\text{C}$ の陽子弾性散乱測定を行う事で(弾性散乱を記述する光学ポテンシャルを決定する事で)、飽和密度付近での斥力の三体力の効果を実験的に決定する事を目指す。

## 2. 研究の計画・方法

300 MeVでの $^{14}\text{C}(p, p)$ 反応の測定を大阪大学核物理研究センター(RCNP)で行う。RCNPでは高強度の偏極陽子ビームを用いて、高分解能で測定を行う事が可能である。RCNPの実験装置と我々の解析手法を用いる事で、他の研究施設や他の研究グループでは簡単に得られない精度で三体力の抽出が期待される。

上記の実験を遂行するにあたり、最も重要な事は放射性物質である $^{14}\text{C}$ 標的を作成する事である。作成する標的は厚さ10 mg/cm<sup>2</sup>で、1 GBqに相当する。 $^{14}\text{C}$ 購入費用はRCNP側から助成を受けている。ただし $^{14}\text{C}$ は粉末の状態でしか購入出来無い為、自ら粉末を固め標的を作成する必要がある。

平成27年度は $^{14}\text{C}$ 標的を作成する予定であった。作成にあたり、まず標的の作成、運用、保管が行なわれるRCNPにおいて安全審査を行ない、RCNPセンター長の許可を貰う必要がある。許可が下りた後、標的作成に必要な機器を製作し標的作成に取りかかる計画であった。

## 3. 研究の特色

斥力の三体力を実験的に観測するには、300 MeVでの $^{14}\text{C}(p, p)$ 反応の測定を行うのが最適である。相対論的アプローチにおいて、原子核の陽子弾性散乱を記述するシュレディンガー等価型ポテンシャルの中心力ポテンシャル実部 $U_c$ は、

$$U_c \simeq \left( U_v + \frac{m}{E} U_s \right) + \left( \frac{U_v^2 + U_s^2}{2E} \right) + U_{\text{Darwin}}, \quad (1)$$

第一項      第二項:斥力

と表される[1]。ここで $U_s$ ,  $U_v$ はスカラーポテンシャルとベクトルポテンシャルである。この式(1)の第二項が斥力の三体力を表す項である。 $^{14}\text{C}$ の $U_c$ は、第一項と第三項が打ち消し合い、斥力の三体力を表す第二項とほぼ一致している。従って斥力の三体力を実験的に観測する上で最適な標的となっている。このような一致は他の核種やエネルギー領域では見られない。

先行研究において我々は陽子弾性散乱測定から光学ポテンシャル(密度分布)を精度良く求める手法を開発しており[3]、観測量から三体力が主となる光学ポテンシャルを実験的に精度良く求める事が可能である。実験的に三体力の効果を精度よく決定出来る手法を有しているのは国内外を通して我々の研究グループのみである。

$^{14}\text{C}$ は不安定原子核であるが、その寿命が長いこと固体標的にする事が可能であり、陽子ビームを用いた順運動学での測定が可能である。これにより不安定核ビーム施設で行われる逆運動学による測定では到達不可能な精度で偏極量も含めたデータを得る事が可能である。

#### 4. 研究の成果

安全審査を行なう為に、RCNPセンター長直属の機関として炭素14安全委員会が設置された。委員会のメンバーはRCNP内外の有識者それぞれ6名、4名で構成された。安全審査は2015年12月まで行なわれた。

安全審査の中で最も議論に時間を要したのは、標的作成時の安全と環境への配慮であった。作業は被曝を避ける為にグローブボックス内で行なわれる。安全性を高めるにはグローブボックスを強固な材質(不燃物、難燃物)で作成する方が良い。しかしその場合グローブボックス全体が大きな放射性廃棄物として残ってしまい、環境への配慮に欠けてしまう。そこで本研究では、(1) 環境にも配慮しつつ、(2) 安全性を担保し、さらには(3) 使いやすさも考慮したグローブボックスの設計を試みた。上記のようなグローブボックスは市販されておらず、本研究においてゼロから設計を行う必要があった。以下に本研究で炭素14安全委員会の了承を得る事が出来たグローブボックスの設計ポイントを記す。(1) グローブボックスは不燃物を用いず樹脂製のシートと骨組みで構成し、骨組みも含めて全体を廃棄した場合でも50 LのRI廃棄物容器に収まるようにした。(2) 使用したシートの厚さは0.5 mmであり、 $^{14}\text{C}$ からのベータ線を遮蔽するには十分な厚さとなっている。(3) グローブボックス内には完全に独立した2つのスペース(標的を作成するスペースと除染作業をするスペース)を設け、作成時の汚染が除染作業に影響しないようにした。またこれらのスペースには、スミア濾紙の出し入れなど用途毎に複数のポートを設け、グローブボックス内へのアクセス時に汚染が拡大しないようにした。

本研究にてこのような特製のグローブボックスの設計、製作を行った事により、炭素14安全委員会にて標的作成時の安全と環境への配慮が認められ、センター長に答申が渡された。その後、2016年2月にセンター長から作成許可を頂いた。

安全審査が長期化した事と予算の都合により $^{14}\text{C}$ 粉末の購入と標的作成は次年度以降に行なわれる事となった。しかし本研究にて平成27年度に、(1) 標的作成時の安全と環境への配慮したグローブボックスの設計、(2) 炭素14安全委員会による安全審査、(3) 標的作成に必要なグローブボックスも含めた機器の準備を済ませる事が出来た事で、来年度粉末を購入次第、速やかに標的作成が出来る状況まで到達する事が出来た。

今後は本研究で製作したグローブボックスを用いて $^{14}\text{C}$ 標的を作成し、 $^{14}\text{C}$ の陽子弾性散乱測定から飽和密度付近での斥力の三体力の効果を実験的に決定する予定である。 $^{14}\text{C}$ 標的の安全審査と作成許可は実験プロポーザルの許可とは個別の案件である事とその過程に時間を要する事から、本研究の成果によって物理量を抽出するまでのプロセスを大きく前進させる事に成功した。

#### 参考文献

- 1) Brockmann, and R. Machleidt, Phys. Rev. C 42, 1965 (1990).
- 2) W. R. Lozowski, Nucl. Instr. and Meth. A 282, 54 (1989).
- 3) J. Zenihiro et al., Phys. Rev. C 82, 044611 (2010); Y. Matsuda et al., Phys. Rev. C 87, 034614 (2013).

# 天然由来材料を化学修飾した染色性の高い染毛料の合成

産業技術短期大学 機械工学科 松原 孝典

## 1. 研究の目的

### (1) 背景と目的

毛髪の染色(染毛)では酸化染料がほとんど使用され、皮膚のかぶれ・アレルギー・毛髪の損傷などの発生が数多く報告されてきており、安全な染毛料が希求されている。

そのような中、安永らにより、天然由来染毛料としてカテキノンが開発された(特許第4982858号(2008))。カテキノンは、チャなどに含まれる(+)-カテキンを酵素で酸化させることで得られる。皮膚刺激無しに毛髪を黄～橙～茶色に染毛可能であり、染色毛髪の洗髪や光に対する色落ちは小さい。そのカテキノンの実用化には、①合成効率・②染色性の向上・③染色可能な色調の幅、の3課題があった。申請者は、①について研究を行い、新たな合成手法(化学酸化法や光酸化法)や1回の反応で得られる合成量を研究開始以前の25倍以上の高効率なカテキノンの合成技術を開発した(特許第5750664号(2015))。本研究では、②および③に着目する。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 申請時の計画

毛髪は全体的に負電荷を持っており、染料が正電荷を持っていれば、染色性が向上することが予想できる。そこで、(+)-カテキンの酸化反応の前あるいは後にカチオン化反応などを導入する2段階の反応により正電荷をもつカテキノンを得られると期待できる。

### (2) 変更した計画

上記で思案したカチオン化反応などは、毒物や劇薬指定される塩酸や有機溶媒類を使用し、安全性確保の観点からドラフトチャンバーを必要とする。しかし、それを研究施設内で準備できなかったため、別の手法で目的を達成するべく以下のように再計画した。

カテキノンは、(+)-カテキンの酸化反応後に粉末化し、染色の際にはその粉末を再溶解させて行う。しかしながら、粉末化の際に加熱などの処理が生成染料に付与され、合成直後の染料よりも染色性が低下していた。そこで、本研究では染料を合成する酸化反応を染色プロセスに活用し、染色性を向上させることを検討した。同手法を別のカテコール構造を有する天然物質(バイオカテコール)に応用し、色調の拡大も調査した。

## 3. 研究の特色

### (1) 特色および独創性

染毛用染料について安全性の要求が強くなってきているなか、染毛業界のアプローチは非常に少ない。本研究は、安心・安全な染毛の実現を目指し、新たな染毛料を開発する試みである。

また、天然由来の染料は布や糸を染める染色加工産業で使われているが、通常染まりづらく、洗浄や光による色落ちが大きい。そこで、染められる繊維を物理化学的に変化させたり、有害な金属類を使用したりするなどの処理を行う。染毛では人体負荷の危険性がある上記のいずれも適用できない。本研究では、染料に着目し、毛髪に負荷の少ない染色法の開発を目指す。

### (2) 社会への貢献

将来的に、①染毛によって引き起こされる疾病に苦しむ人々が減ること、②美容師・理容師などの染毛の施術者の安全が確保されること、③天然由来材料を用いて持続可能な社会に貢献すること、の3つが予想される。



## 4. 研究の成果

### (1) 研究結果

#### ① 天然由来材料の酵素酸化反応を活用した染毛法

以下の3手法により、O<sub>2</sub>ガス供給下で(+)-カテキン (Cat) とチロシナーゼの酵素酸化反応を利用した毛髪の色実験を試みた。

1) 再溶解染色法： 酵素反応で合成したカテキノン粉末を再溶解した溶液に白髪人毛を投入して染毛

2) 逐次染色法： カテキノン生成酵素反応を行ったのち、白髪人毛を投入して染毛

3) 同時酸化法： カテキノン生成酵素反応開始直後に白髪人毛を投入して染毛

染色処理ののち、所定の洗浄・乾燥処理を行った。得られた染色毛髪をコニカミノルタ社製分光測色計CM-2600dを用いて色を定量化した。

再溶解染色法では淡い黄色、逐次染色法および同時酸化法ではより濃い暗黄赤色に毛髪は染まる。濃色の毛髪ほど、黄色味の色度 $b^*$ 値が高く、 $b^*$ は再溶解染色法<逐次染色法<同時酸化法となり、酸化反応を染色過程に活用することで染色性が向上することが分かった(表1)。

また、他のバイオカテコールを用いて同時酸化法による染毛試験を検討した。その結果、(-)-エピカテキン (EC) ・L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) ・ヘマトキシリン (HX) ・ブラジリン (BZ) の4物質が利用可能であることが分かった(表2)。ECではCatと同様に黄色、DOPAでは灰色、HXでは暗黄赤色、BZでは黄味の茶色に毛髪は染色される。

#### ② 天然由来材料の化学酸化反応を活用した染毛法

酵素酸化反応を活用した手法により染色性が向上したため、化学酸化反応でも同様に試験を行った。同時酸化法による染毛を化学酸化系で染毛実験を行ったが、濃色に染色された毛髪は得られなかった。そこで、新たに以下の手法を試みた。

4) 後酸化法： 白髪人毛に対して、事前に(+)-カテキン水溶液による吸着処理をした後、塩基性水溶液中においてO<sub>2</sub>ガスの酸化処理をして染毛

染毛した毛髪は、酵素酸化反応系と比べ、濃色となり、やや赤みを帯びた。他のバイオカテコールではEC・HX・BZの3物質が利用可能であり、染色毛髪は、ECで黄色、HXで濃い茶色、BZで濃い赤茶色となることが分かった(表3)。特に、HXやBZでは濃い色となり、明度L\*値が低く、日本人の平均的な黒色毛髪に近い値の20~30程度となる。

酵素酸化反応および化学酸化反応を用いた2つの系で、Cat・EC・HX・BZの4物質が利用可能である。それらはカテコール構造以外にクロマン構造も共通する。

#### ③ チャ抽出物の利用

上記①・②では、染色に試薬を原料としていたが、実用上高価であり、それらは使えない。そこで、CatやECなどのカテキン類を多く含む安価なチャ抽出物を用いて染毛試験を行った。その結果、化学酸化系の後酸化法で染毛可能であり、濃色の茶色に染毛できた(表4)。

以上、研究成果をまとめると以下の通りである。

- ・ 天然由来物質の酸化反応を染毛プロセスに活用することで染毛可能であり、染色性を向上させることができた。
- ・ 様々な天然由来物質を用いる事で、様々な色調の染色毛髪が得られる。
- ・ 安価なチャ抽出物を用いて染毛が可能である。

### (2) 研究業績

- |                      |               |
|----------------------|---------------|
| ① 学術論文 (査読有)         | 2件            |
| ② 国際会議プロシーディング (査読有) | 3件 (うち2件未発表)  |
| ③ 国内の学会発表            | 7件 (うち1件未発表)  |
| ④ 解説記事               | 2件 (うち1件掲載予定) |

表1 (+)-カテキン(Cat)の酵素酸化反応を活用した染毛結果。

















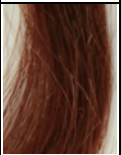




染色法	未染色	再溶解染色法	逐次染色法		同時酸化法	
O <sub>2</sub> ガス供給	—	○	×	○	×	○
写真						
明度 L*	73.4	62.5	59.5	59.6	59.7	58.4
赤-緑 色度 a*	4.16	6.30	12.6	16.1	9.85	16.9
黄-青 色度 b*	26.8	38.1	45.8	50.7	37.7	53.9
色差 ΔE*	—	15.8	25.0	30.1	18.1	33.4

表2 バイオカテコールの酵素酸化反応を活用した同時酸化法 (O<sub>2</sub>供給あり) による染毛結果。

バイオカテコール	Cat	EC	DOPA	HX	BZ	RA	CA	ChA
写真								
明度 L*	58.4	58.3	38.6	35.1	49.4	65.0	65.8	70.5
赤-緑 色度 a*	16.9	16.9	0.89	6.22	12.1	3.89	3.85	4.18
黄-青 色度 b*	53.9	45.7	6.27	21.3	25.9	21.4	22.9	25.7
色差 ΔE*	33.4	27.3	40.5	38.7	25.3	10.0	8.48	3.03



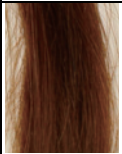




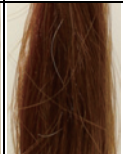
\*Cat: (+)-カテキン; EC: (-)-エピカテキン; HX: ヘマトキシリン; BZ: ブラジリン; RA: ロスマリン酸;  
CA: カフェー酸; ChA: クロロゲン酸

表3 バイオカテコールの化学酸化反応を活用した後酸化法 (O<sub>2</sub>供給あり) による染毛結果。

バイオカテコール	Cat	EC	DOPA	HX	BZ	RA	CA	ChA
写真								
明度 L*	47.5	56.3	71.0	23.8	32.1	54.1	66.7	64.3
赤-緑 色度 a*	21.0	18.3	2.92	17.0	22.9	8.79	2.29	4.34
黄-青 色度 b*	37.2	36.8	23.9	13.6	25.4	27.8	24.9	25.7
色差 ΔE*	32.5	24.3	3.95	52.9	45.4	19.8	7.19	9.10

\*Cat: (+)-カテキン; EC: (-)-エピカテキン; HX: ヘマトキシリン; BZ: ブラジリン; RA: ロスマリン酸;  
CA: カフェー酸; ChA: クロロゲン酸

表4 チャ抽出物の化学酸化反応を活用した後酸化法 (O<sub>2</sub>供給あり) による染毛結果。

チャ抽出物	SP EGCg	SP BG-3	SP 90S	PP 70A	PP 70S	PP KN	PP CG	PP G
写真								
明度 L*	29.8	29.5	26.8	29.6	26.5	28.8	30.1	28.5
赤-緑 色度 a*	11.1	14.6	15.5	11.9	15.8	12.7	13.7	14.4
黄-青 色度 b*	14.8	19.3	16.8	16.6	17.3	17.7	19.7	18.1
色差 ΔE*	47.6	47.2	50.5	47.4	50.7	48.0	46.4	48.4

\*SP: サンフェノン (太陽化学社製); PP: ポリフェノン (三井農林社製)

# プロテオチューナー法を用いたウイルス増殖に関わる宿主機能解析 —HSF1活性調節によるウイルス感染制御—

川崎医科大学 医学部 内藤 忠相

## 1. 研究の目的

本研究は、ウイルス増殖における宿主転写因子Heat shock factor 1 (HSF1) の機能的役割を明らかにし、そのメカニズムを基盤にウイルス感染の制御を目指す。

HSF1は、熱ショック等のストレス刺激により分子シャペロン遺伝子の転写を一過的に誘導し、タンパク質の凝集や失活を抑制する事で細胞恒常性の維持に機能している。一方、RNAウイルス、DNAウイルスおよびレトロウイルスを含めた様々なウイルスの感染時において、分子シャペロンがウイルスタンパク質の機能発現に関与する報告例が数多くなされている。そして、分子シャペロンの機能阻害剤によりそれらウイルスの増殖は抑制される。

しかし、分子シャペロン阻害剤はHSF1の活性化を促進する一面を持つ。非ストレス時において、HSF1はHsp90やHsp70と結合しており、シャペロン遺伝子群の過剰な転写の活性化が抑制されている。分子シャペロン阻害剤の処理により、不活性型の単量体HSF1からHspが遊離し、その結果として転写活性化型の三量体HSF1の形成量が増加することでシャペロン遺伝子群の発現が促進する。中長期的な時間軸で考えると、それら阻害剤は分子シャペロンタンパク質の発現量を増加させてしまい、ウイルス複製を促進する可能性も考えられる。

先行研究によるこれまでの解析例は、HSF1の二次的な活性化について考慮しておらず、さらにHSF1が制御する転写ネットワーク全体の変遷の影響を無視している。分子シャペロンタンパク質の活性制御効果をウイルス増殖抑制へと応用するには、HSF1を中心としたシャペロンネットワークの全容を理解した上で戦略を立てる必要がある。

本課題では、新規のタンパク質誘導発現系であるプロテオチューナー法を活用し、「急性感染モデル」としてインフルエンザウイルス、「潜伏・持続感染モデル」としてヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) を用いて感染時のHSF1機能を明らかにし、分子シャペロンが普遍的にウイルス感染現象に関わっているか検討する。

## 2. 研究の計画・方法

(1) 本研究では、「急性感染モデル」としてRNAウイルスであるインフルエンザウイルスを、「潜伏・持続感染モデル」としてレトロウイルスであるヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) を用いて、感染現象に影響を与えるシャペロンネットワーク動態の普遍的メカニズムを解明し、宿主細胞内におけるHSF1活性の意義を明らかにする。

### ① プロテオチューナー法を応用する細胞の樹立

FKBP12変異体にHSF1のドミナントアクティブ体 (DA) およびドミナントネガティブ体 (DN) を融合させたタンパク質を発現するプラスミドを構築し、インフルエンザウイルスおよびHTLV-1が感染する培養細胞株に導入する。そして、HSF1活性を人為的に制御できる細胞株を樹立する。HSF1のDA変異体およびDN変異体の設計については、先行研究の解析結果を応用する。

### ② HSF1が関与するウイルス増殖過程の特定

作製した細胞株にShield-1リガンドを処理し、HSF1の活性化または不活性化を誘導する。HSF1のドミナントアクティブ体の発現により、分子シャペロンタンパク質群の転写誘導が起こり、細胞内のシャペロンネットワーク環境が劇的に変化する。この系を用いて、「ウイルスゲノムの転写・複製反応」、「ウイルスタンパク質の集合反応」、「ウイルスゲノムの輸送や粒子出芽過程」など各段階においてHSF1活性が及ぼす影響を調べる。

### ③ 感染現象に影響を与えるシャペロンネットワーク機能の分子メカニズムの解析

HSF1活性が関与する特異的な感染過程が特定できたら、プルダウン法などを用いてウイルス

タンパク質と結合する宿主タンパク質を同定し、シャペロンネットワークと感染現象の相互作用を分子レベルで理解する。

試験管内における生化学的な解析により、ウイルス因子と相互作用するシャペロンタンパク質の結合領域を決定し、その相互作用ペプチドを発現させた細胞を用いた感染実験により、ウイルス複製が正または負に制御されるかを検討する。さらに、siRNAによる遺伝子のノックダウンや、ゲノム編集による遺伝子ノックアウトなどの逆遺伝学を応用し、ウイルス増殖に影響を与えるHSF1活性が制御する下流遺伝子の重要性を明らかにする。

また、ウイルス複製反応に対して最大限に影響を与えるHSF1活性化および不活性化のタイミングを検討し、効果的な感染制御を行うためのメカニズムを調べる。加えて、近年さかんにスクリーニングが行われているHSF1の活性化を促進する小分子化合物や、HSF1機能を阻害する化合物を利用してウイルス感染を有効に制御できるか検討する。

### 3. 研究の特色

これまでの研究から、「分子シャペロンはウイルスタンパク質の機能発現を支えており、その結果としてウイルス感染を正に制御する」というメカニズムは一般化しつつある。しかし国内外において、シャペロンネットワークのマスターレギュレーターであるHSF1の活性調節を考慮した検証はなされていない。

その理由として、「HSF1活性を調節する効果的な解析システム」が存在しなかったことが挙げられる。本課題ではその問題を解決するため、細胞にストレスを与えずにHSF1活性を可逆的に、また迅速に制御できるプロテオチューナー法を用いる事で、これまで明らかにされていないシャペロンネットワークと感染現象との相互作用を体系的に調べることができる。

申請者らは、膜透過性リガンドShield-1およびヒトFKBP12タンパク質変異体 (FKBP12mut) を応用した「プロテオチューナー法」を活用し、HSF1の活性を迅速かつ可逆的に調節するシステムを確立した。

これまで、HSF1を活性化させる方法として熱ショック刺激が行われてきたが、それでは非特異的に変性タンパク質が生成するためウイルス感染細胞内で正常な解析を行う事ができない。FKBP12mutは、細胞内に発現させると速やかにプロテアソームで分解される性質をもつ。この不安定化タンパク質にHSF1を融合させたFKBPmut-HSF1は、細胞内に発現させても直ちに分解される。一方、FKBP12mutにShield-1リガンドを結合させるとタンパク質が安定化し、融合タンパク質FKBPmut-HSF1が分解されずに細胞内に急速に蓄積する。

この特性を応用し、既知であるHSF1のドミナントアクティブ変異体またはドミナントネガティブ変異体をFKBP12mutに融合させ、さらにShield-1処理と組み合わせる事により、HSF1の活性化および不活性化を人為的および迅速に誘導する。この系を用いる事で、ウイルス複製時におけるHSF1の活性調節が及ぼす影響を解析する事ができ、感染制御に応用できる新たな知見を見出すことが期待できる。

### 4. 研究の成果

#### (1) 人為的なHSF1の活性化および不活性化状態を維持するプロテアチューナー系の確立

ヒトHSF1は全長529アミノ酸 (aa) からなり、185aa-203aa領域を内部欠損させた変異体 (HSF1- $\Delta$ 185-203) は、野生型HSF1と結合することでHSF1- $\Delta$ 185-203を含む三量体形成が促進され、恒常的な転写活性化が誘導される。一方、C末端領域である379aa-529aaを欠損させた変異体 (HSF1- $\Delta$ 379-529) を発現させて野生型HSF1と三量体を形成させることで、転写活性の抑制状態を維持できる。以上のようなHSF1のドミナントアクティブ変異体およびドミナントネガティブ変異体をFKBP12mutタンパク質に融合し、動物細胞発現用のプラスミドを構築した。インフルエンザウイルス感染およびHTLV-1感染実験に用いるMDCK、HeLaおよびJurkat細胞にプラスミドを導入し、FKBPmut-HSF1融合タンパク質の発現を確認した。

ウイルス感染の影響を検討するには、HSF1変異体を発現する細胞株を樹立するか、細胞への

発現プラスミド導入効率がほぼ100%の条件下で実験を行う必要がある。HeLaおよびJurkat細胞を用いてFKBPmut融合HSF1変異体を発現する細胞株の樹立を試みたが、細胞クローンを得ることができなかった。そのため、エレクトロポレーレーター2機種（Neon Transfection SystemおよびスーパーエレクトロポレーターNEPA21）を用いてプラスミドの導入効率を検討した結果、細胞に90%程度の効率で遺伝子導入できる条件を見出した。現在は、HSF1の活性化状態および不活性化状態を維持した細胞にウイルスを感染させ、ウイルス増殖に与える分子シャペロンの機能意義について検討している。

(2) HTLV-1がコードする転写制御因子Taxによって誘導発現する分子シャペロン遺伝子の同定

HTLV-1には、宿主遺伝子の転写活性を制御するウイルス性因子Taxがコードされており、感染細胞の癌化に関与することが報告されている。またHTLV-1は、感染細胞内で長期間にわたり宿主ゲノムに変異を蓄積していくことで、最終的に一部の感染細胞を腫瘍化に導くと考えられている。分子シャペロンタンパク質は、このようなゲノム異常を許容することで腫瘍化への形質転換を助けている可能性がある。そこで、HTLV-1感染細胞内の分子シャペロンネットワーク動態を調べるため、Taxによって誘導される宿主遺伝子をDNAマイクロアレイ解析によって調べた。293T細胞およびJurkat細胞にTaxを誘導発現させることで、Hsp90、Hsp70およびHsp40などの分子シャペロンのmRNA発現量が顕著に増加することを明らかにした。

先行研究の結果から、HTLV-1感染細胞の初期段階における染色体異常や遺伝子変異の蓄積を示す表現型は、Taxの発現のみで再現できることが報告されている。Taxによって分子シャペロン遺伝子の転写の活性化が促進されたことから、Taxが関与するHsps発現誘導はTax自身が誘引する染色体異常を潜在化し、腫瘍化の環境が整うまでの細胞の恒常性維持に寄与している可能性がある。また、Taxが直接的にHSF1の活性化を誘導した可能性も考えられることから、今後はTaxが関与するストレス応答メカニズムを分子レベルで調べ、HTLV-1感染細胞内におけるHSF1の制御機構の詳細を明らかにする。

# L-アスパラギナーゼ誘発アレルギーのモデル動物作製と治療法の開発

就実大学 薬学部 野上(原) 愛

## 1. 研究の目的

L-アスパラギナーゼ (L-Asp) は小児急性リンパ性白血病 (ALL) の標準治療において必要不可欠な治療薬であるが、高頻度でアレルギー反応を生じるため治療中止を余儀なくされ、しばしば ALL の治療完遂が困難となる。ALL 治療において L-Asp アレルギーの克服が重要な課題であるにもかかわらず、L-Asp アレルギーの有効な予防・治療方法はなく、病態解明と治療法の開発に必要なモデル動物さえ存在していない。そこで、L-Asp 誘発アレルギーのモデル動物を作製し、IgE による I 型アレルギー反応に着目した病態の解明を行う。さらに、抗 IgE 抗体が L-Asp によるアレルギー反応を抑制可能であるかを検討することで、L-Asp 誘発アレルギー反応に対する治療法を開発することを目的としている。

## 2. 研究の計画・方法

### (1) L-Asp 誘発アレルギーのモデル動物作製

定量的かつ経時的に経過観察を行うことが可能な耳介浮腫を指標として、L-Asp 誘発アレルギーのモデル動物作製方法を検討した。7週齢の BALB/c 雄性マウスに対して、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲル 1 mg/kg (Alum) を用いて L-Asp を全身感作し、続いて耳介への局所感作として右耳介に L-Asp を、左耳介に Saline を皮内投与した。L-Asp の投与スケジュールを図1に示した。

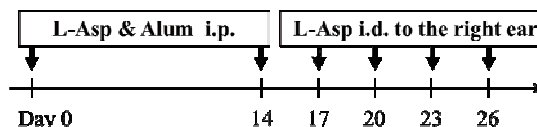


図1 L-Aspの投与スケジュール

#### ① L-Asp 誘発アレルギーの経時的变化

L-Asp を最終投与後の耳介厚を測定し、左耳介に対する右耳介の浮腫率 (%) の経時的变化を検討した。

#### ② 耳介浮腫に対する L-Asp の用量依存性

L-Asp を最終投与する直前と投与1時間後の耳介厚を測定し、耳介厚増加値を算出することで、耳介浮腫に対する L-Asp の用量依存性を検討した。耳介には全身感作する際の投与量 (L-Asp 10、20、100 IU/body) の 1/10 量を投与した。

#### ③ 耳介組織標本の染色像にみる L-Asp 誘発アレルギー反応

L-Asp を最終投与した1時間後の耳介組織標本を作製し、HE染色とトリイジンブルー染色を用いて、耳介における肥満細胞と好酸球の変化を観察した。染色像の高倍率視野あたりに観察される好酸球数と、観察された肥満細胞の脱顆粒率 (%) を算出した。

### (2) L-Asp 誘発アレルギーに対する抗 IgE 抗体の有効性

(1) で作製した L-Asp 誘発アレルギーのモデル動物を用いて、L-Asp 誘発アレルギーに対する抗 IgE 抗体 (Anti-IgE) の抑制効果を検討した。抗 IgE 抗体は L-Asp を最終投与する前日に腹腔内投与した。

#### ① 耳介浮腫に対する抗 IgE 抗体の効果

L-Asp を最終投与した1時間後の耳介厚増加値を算出し、耳介浮腫に対する抗 IgE 抗体 (50、100  $\mu$ g/body) の効果を検討した。

#### ② 耳介組織標本の染色像にみる抗 IgE 抗体の効果

L-Asp を最終投与した1時間後の耳介組織標本を作製し、HE染色とトリイジンブルー染色を用いて、耳介における肥満細胞の脱顆粒と好酸球の浸潤に対する抗 IgE 抗体の効果を検討した。また、染色像の高倍率視野あたりに観察される好酸球数と、観察された肥満細胞の脱顆

粒率 (%) を算出した。

### 3. 研究の特色

#### (1) 研究の新規性

L-Asp誘発アレルギーのモデル動物や治療薬の検討は報告されておらず、本研究が初めての報告となる。また、これまでにモデル動物が作製されていなかったことから、L-Asp誘発アレルギー反応の病態についても解明されておらず、本研究が初めての報告となる。

#### (2) 研究の独創性

本研究で治療薬としての有効性を検討する抗IgE抗体は、IgE中和抗体であるヒト化抗ヒトIgEモノクローナル抗体製剤のオマリズマブに相当するものである。オマリズマブは、重症喘息の治療薬として小児も含めた適用が既に承認されているため、非常に速い臨床応用が期待できる。

#### (3) 波及効果

小児の病死の死因1位はがんであり、その中でもALLは約30%、悪性リンパ腫 (ML) は約10%を占める。いずれも適切な治療を受けることができれば80%以上の無病生存率が期待される一方、適切な治療が行われなければ、必ず死に至る致死的な疾患である。L-AspはALLおよびMLの治療に広く用いられており、特に小児ALLの標準治療において必要不可欠な治療薬であるため、本研究によりL-Aspによるアレルギー反応の病態解明や治療薬の開発が可能となれば、L-Aspによる治療を完遂することが可能となり、多数の患者を救うことが期待出来る。

### 4. 研究の成果

#### (1) L-Asp誘発アレルギーのモデル動物作製

##### ① L-Asp誘発アレルギーの経時的变化

L-Aspを最終投与後の耳介浮腫率の経時的变化を図2に示した。耳介浮腫率はL-Aspの投与1時間後に最大値を示し、その後減少を始めて24時間後にはほぼ消失したことから、L-Asp誘発のアレルギー反応は即時型の応答を示すことが明らかになった。これより以下の検討では、耳介厚の評価はL-Aspの投与1時間後に行うこととした。

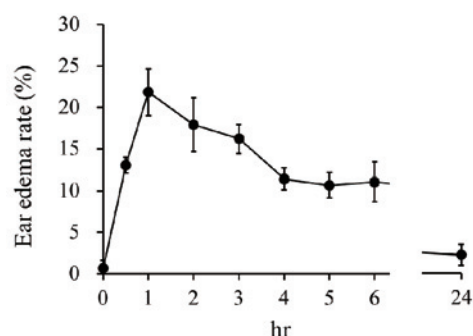


図2 L-Asp投与後の耳介浮腫率

##### ② アレルギー反応に対するL-Aspの用量依存性

左右の耳介厚増加値を図3に示した。salineを投与した左耳介と比較して、L-Aspを投与した右耳介厚はその用量に依存して増加した。以下の検討では、L-Aspによる耳介浮腫が最も強く誘発された用量 (全身感作: 100 IU、局所感作: 10 IU/body) を投与することとした。

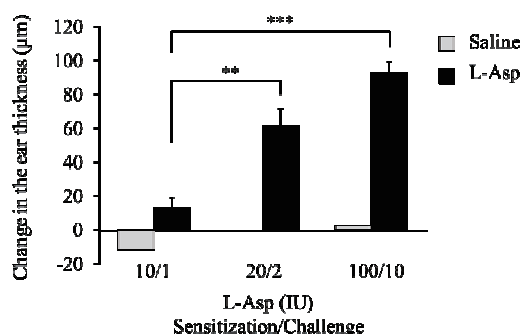


図3 耳介浮腫に対するL-Aspの用量依存性

##### ③ 耳介組織標本の染色像にみるL-Asp誘発アレルギー反応

HE染色像とトルイジンブルー染色像を図4に示した。HE染色像より、L-Aspを投与した右耳介では、好酸球の血管外浸潤が多く観察された。トルイジンブルー染色像より、salineを投与した左耳介では濃染され異染色性を示す肥満細胞が多数観察されたのに対し、L-Aspを投与した右耳介では、肥満細胞の脱顆粒反応が観察され、染色の程度が薄くなっていた。これらの結果は、図5に示した計測結果からも確認された。

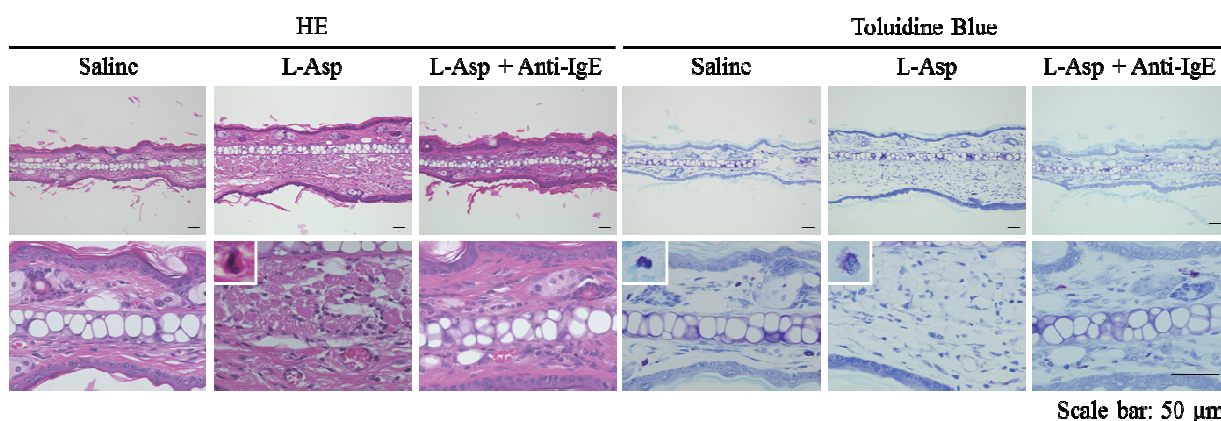


図4 耳介組織染色像

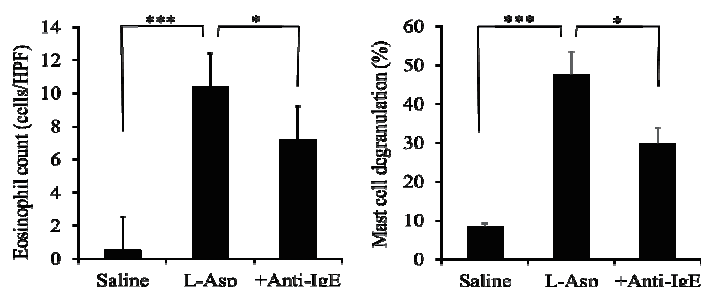


図5 好酸球数と肥満細胞の脱顆粒率

## (2) L-Asp誘発アレルギーに対する抗IgE抗体の有効性

### ① 耳介浮腫に対する抗IgE抗体の効果

抗IgE抗体を投与した左右の耳介厚増加値を図6に示した。L-Aspが誘発する右耳介厚の増加は、抗IgE抗体により用量依存的に抑制された。

### ② 耳介組織標本の染色像にみる抗IgE抗体の効果

各種染色像を図4に示した。L-Aspにより誘発された好酸球の血管外浸潤や肥満細胞の脱顆粒反応は、抗IgE抗体の前投与により抑制された。これらの結果は、図5に示した計測結果からも確認された。

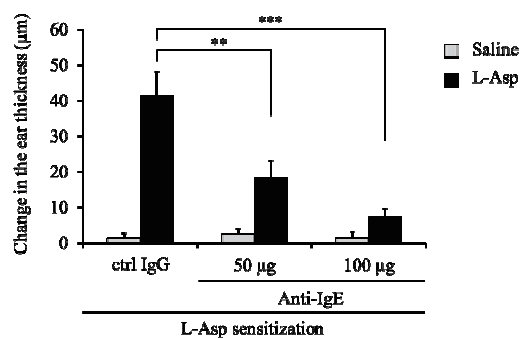


図6 L-Asp誘発耳介浮腫に対する抗IgE抗体の抑制効果

以上の結果より、L-Asp誘発アレルギーはI型様のアレルギー反応を呈し、抗IgE抗体により抑制可能であることが示唆された。小児ALLは治療を完遂することが出来れば、9割以上の完全寛解が期待出来るとされている。抗IgE抗体を用いることでL-Aspアレルギーが制御可能となれば、L-Aspによる治療完遂が可能となり、多数の患者を救うことが期待出来る。





#### (5) エネルギー消費量測定

増量群及びコントロール群に対して、3軸加速度計を用いて推定エネルギー消費量を算出してTEEを求めた。3軸加速度計はActive Style Pro（オムロンヘルスケア）を用いた。エネルギー及び各栄養素の摂取状況調査同様、3週目、6週目及び9週目からそれぞれ1週間エネルギー消費量測定を行い、TEIとTEEのエネルギーバランスからその後の食事量に反映させる。

#### (6) 身長および体重

身長計を用いて、立位にて眼窩下縁と耳角上縁を結ぶ線が水平になるようにして測定を行う。測定は、重力による影響が少ない午前中に行った。体重は、朝空腹時排尿後に毎日行った。

#### (7) 身体組成測定

二重エネルギーX線吸収（DXA）法を用いて、骨量、四肢の除脂肪軟組織、体脂肪および体水分にわたる精度の高い測定を行った。

#### (8) 運動能力測定

運動能力テストとして、介入前後に垂直飛び、20m走、YOYOテスト、プロアジリティー、スパイダー、サーブスピードテストを行った。

#### (9) 臨床検査

前夜から8時間以上の絶食の後、早朝空腹時に肘静脈より採血した。健康状態、栄養状態およびホルモンを測定した。

### 3. 研究の特色

本研究は、増量を行うための食事指導および補食を提供する増量群と食事指導を行わないコントロール群の二群に分けて介入研究を行う。身体組成は、DXA法を用いており精度の高い測定を行うことができる。

血液検査では一般生化学検査、末梢血検査項目に加えて筋タンパク同化作用を促進及び異化させるホルモンの検査を行う。先行研究では、本研究で用いるDXA法での身体組成測定及び血液検査はこれまで独立した研究の中で行われてきた。食事調査及びTEEの調査は介入前、介入後3週目、6週目及び9週目にそれぞれ1週間行い、調査後のエネルギー量及び栄養バランスを整えるための食事指導に利用される。筋量増大に必要なエネルギー量についての研究は極めて少なく、一致した見解が得られていない。

### 4. 研究の成果

12週間の食事介入の結果、エネルギーバランスは増量群 $520 \pm 559$  kcal、コントロール群 $134 \pm 257$  kcalであり増量群は+500 kcal程度であった。体重については、増量群は $2.6 \pm 0.8$  kg増加し、コントロール群は $0.1 \pm 0.5$  kgで変化はなかった。筋量は、増量群は $1.3 \pm 0.8$  kg増加し、コントロール群は $0.1 \pm 0.5$  kgであった。同様に脂肪量については、増量群は $1.0 \pm 0.8$  kg増加し、コントロール群は $-0.1 \pm 0.2$  kgであった。

介入期間中のエネルギーバランス			
		増量群	コントロール群
エネルギー摂取量	(kcal)	3501±488	3157±242
エネルギー消費量	(kcal)	3246±322	3058±26
エネルギーバランス	(kcal)	+520±559	+134±257
平均値±標準偏差			

介入前後の血液検査については、現在解析中であるが増量群、コントロール群の両群において、CKが高値であった。コルチゾール、テストステロン、IGF-1、等のホルモンについては、介入前後

に大きな変化はなかった。

運動能力測定については、現在解析中であるが増量群、コントロール群ともに垂直飛び、20m走、YOYOテストプロアジリティ、スパイダーは大きな変化はなく介入前後に有意な差は認められなかった。サーブスピードテストについては、増量群において、介入前と比較して介入後ではサーブスピードが増加していたが、コントロール群では変化がなかった。

**介入前後のサーブスピードの変化**

	介入前	介入後	変化量
<b>増量群</b>	<b>155.3±20.6</b>	<b>162.2±17.9</b>	<b>6.8±12.0</b>
<b>コントロール群</b>	<b>166.4±10.8</b>	<b>167.4±14.0</b>	<b>1.0±8.0</b>

本研究については、第28回日本トレーニング科学会にてポスター発表を行った。現在は、日本トレーニング科学会誌への論文投稿に向けて執筆中である。

# 生活保護利用者の就労支援過程の再構築に関する研究 — 稼働能力の判定・評価のための基礎研究 —

久留米大学 文学部 川崎 竜太

## 1. 研究の目的

本研究は、生活保護利用者の就労支援過程の再構築として、稼働能力の判定・評価システムを構築することを目的としている。生活保護利用者に対する支援について、稼働能力の有無についての確に判定することができれば、個々の生活保護利用者に応じた支援を展開できると考えている。その一方で、生活保護利用者が抱える課題は就労だけでなく、日常生活の支援、社会的なつながりの構築を目指していく必要もある。本研究の最大の目的は、そのような現状に対応するために、「稼働能力」の明確化と「生活支援」の実現を目指すことにある。本研究の特長は、①稼働能力の判定・評価のためのアセスメント項目、就労支援過程の再構築、②生活困窮者に対する生活支援の現状把握が挙げられる。

本研究では、稼働能力の判定・評価を実現するための基礎研究として位置付けているが、先行研究の検証やヒアリングを通して、就労支援や生活支援の現況を把握することで、今後の研究に繋げていきたい。

## 2. 研究の計画・方法

文献研究として、これまでの研究結果と先行研究によって得られた成果を踏まえつつ、職業教育を中心とした支援過程の再構築について論証している。文献研究を補足するために、就労支援や生活支援を実施している機関等へのヒアリングや視察を実施している。具体的には、①就労移行支援事業所、②生活支援の実際を学ぶための視察・セミナーへの参加、③生活困窮者自立支援事業を展開している福祉事務所にて行った。

倫理的配慮として、文献等の取り扱いについては、人物・その他の情報に関して、プライバシーと人権の点から配慮を行っている。ヒアリングで得られた情報については、掲載内容についてヒアリング機関からの許可を得ている。

## 3. 研究の特色

本研究の特色は、稼働能力の判定・評価のための支援過程の再構築として、就労への動機づけを高める仕組み作りを目指すことである。そのため、生活保護制度に関する既存の仕組みだけでなく、就労に関連する領域の先行研究にも注目して分析を行った。対象領域を広げることで、適切な稼働能力の判定・評価基準の創設に向けた基盤作りの役割を果たすことが期待できる。文献研究を補足するために、実践場面への視察を行うことで、現状把握にも努めた。ヒアリング・視察の成果は、以下に示すとおりである。

- ① 就労移行支援事業所ひまわりへのヒアリング：各種相談、パソコン関連の技能習得、就業に就くために必要となる講座やSSTの実施、その他、アニマルセラピーや各種イベントを実施している。実際の運用においては、アセスメントシートを用いて、利用者個々の実情に合わせた支援を展開していた。
- ② 視察・セミナーへの参加：日本ソーシャルワーカー協会2016年新春福祉交流セミナーに参加し、その後、大阪市西成区あいりん地域の視察を行った。
- ③ 日置市福祉事務所へのヒアリング：生活困窮者自立支援法（就労訓練事業）の取り組みについてヒアリングを行った。現状としては、中間的就労として認定されている民間の事業所が1ヶ所しかなく、就労実績もまだ少なく、協力事業所の開拓や就労先の確保が今後の課題であった。

#### 4. 研究の成果

稼働能力の判定・評価を行うためには、対象者へのアセスメントと法的基準の整備、職業教育の実施が必要である。とりわけ、就労支援を行う上では、①就労支援対象者の就労意欲と能力の確認、②職場の確保（開拓も含む）、③職場・職種とのマッチングを行う必要がある。しかし、就労支援といっても、自立＝就労（経済自立）と結びつけるだけでは過度の就労要求が生じかねないので、注意が必要である。

本研究では、稼働能力の判定・評価基準の再構築として、従来の就労支援過程に、アセスメントを重視した支援過程を提案したい。インテーク→「アセスメント①」→「アセスメント②」→プランニング→実施→モニタリング→評価→終結を提案する。アセスメント①では、就労可能性の判定として、ドイツのハルツ法の規定等を基に稼働時間を設定する、既存のアセスメントシート（障害者リハビリテーションの観点からも検証が必要であり、ヒアリング先の事業所でも活用されていたが、ストレスチェック項目の導入も検討すべきである）やジョブ・カードを活用して、就労支援対象者を決定する。特に、ジョブ・カードでは、キャリア構築の目安としても活用できるので、積極的に導入を検討すべきである。アセスメント②では、就労支援開始前教育を実施し、就労意欲の確認と向上を行い、職業把握と就業の意義を確認する必要がある。適時、職業訓練（SSTの実施等）を行う必要もある。その上で、就労支援対象者を分類する。就業能力と適正（職業）の判定や地域における有効求人状況の把握、職歴や学歴、資格により、就労支援対象者の希望を踏まえ、現状とのマッチングを考慮すべきである。

稼働能力の判定・評価のためには、アセスメント項目の充実が求められる。実践場面での検証が不十分であるので、適切な基準に基づいた就労促進が実現するように、今後の研究課題として検証を進めていきたい。

研究成果の一部は、下記にて報告している。

- ・「生活保護制度における稼働能力の判定・評価に関する一考察」日本社会福祉学会九州地域部会第56回研究大会（九州保健福祉大学）、2015年6月20日（土）～21日（日）

# 非侵襲的超音波による脳梗塞治療後の新規血管再閉塞予防法の開発 —超音波による血栓成長抑制作用の最適化—

日本薬科大学 薬学部 澤口 能一

## 1. 研究の目的

- (1) 本邦における原因別死亡率の上位を占める心筋梗塞、脳虚血性疾患は、いずれも血栓形成が関与する血管閉塞状態が原因となる疾患である。これらの疾患は、カテーテルによる血栓の吸引・除去、ステント留置術による血管拡張術や血栓溶解薬であるプラスミノゲンアクチベータ (rt-PA) などを用いた血流再開通治療が施行されている。しかし、いずれの療法においても血流再開通後の血栓による血管の再閉塞が問題となっており、この血管再閉塞の問題に対するアプローチとして抗凝固薬や抗血小板薬などによる2次予防法が広く用いられている。しかし、これらの薬剤の使用には出血性脳卒中などの副作用が伴うため、使用条件が限られている。特に、rt-PAを用いた血流再開通療法においては、治療後24時間以内に約10% - 20%の高確率で血管の再閉塞を発症するにもかかわらず、抗凝固薬などの使用により頭蓋内症候性出血の頻度が顕著に高くなることが報告されているため (Zinkstokら Lancet, 2012)、脳梗塞治療ガイドラインにおいてもrt-PA治療後24時間以内の抗凝固薬の使用は一切認められていない。そのため、新規血管再閉塞予防法の開発が急務である。
- (2) 本研究では、この血管再閉塞の問題に対し、手術や医薬品を全く必要としない新規のアプローチとして非侵襲的超音波のみを使用した血管再閉塞予防法の開発を目的とする。申請者はすでにウシ血漿・血栓を用いた検討により、非侵襲的超音波による血栓成長抑制効果を見出した (Sawaguchiら Jpn J Med Ultrasonics, 2011.)。しかし、先の検討では超音波による血栓成長抑制作用の最適化を計るには至っておらず、至適な超音波照射条件の探索およびその条件における超音波出力の閾値を見出す必要がある。また、ウシとヒトでは血液凝固系が一部異なるため、臨床を目指す上でヒト由来の血漿・血栓を用いた検討を行うことが必須である。そのため、血栓成長モデルにて血栓成長抑制作用に至適な超音波照射条件を確立し、その上でウシ血漿・血栓を用いた検討のみならず、ヒト血漿・血栓を用いた血栓成長モデルを確立し、臨床応用に向けた基礎的な検討を行う。

## 2. 研究の計画・方法

- (1) これまでに見出した血栓成長抑制効果の検討は予備的な検討であったため、超音波照射条件は単一の固定条件で検討を行ってきた。そのため、超音波による血栓成長抑制効果に大きく影響を及ぼすと思われるパラメーターである『周波数』および『駆動方式』の2点について検討を行い、血栓成長抑制効果が得られる至適超音波照射条件を見出すことで臨床応用に適した治療法の開発を目指す。
  - ① 現在臨床で用いられている経頭蓋的超音波の周波数は頭蓋骨を透過し易く、かつ画像解析が可能な周波数帯として、1.5~2.5 MHz帯の比較的低周波数帯が使用されている。しかし、本研究のコンセプトにおいては画像解析の必要が無いため、頭蓋骨の透過性が比較的良好、より低周波数の500 kHzの周波数のみで検討を行ってきた。本検討では、頭蓋骨を十分に透過可能な超音波の周波数である500 kHz~2 MHzをそれぞれ血栓成長モデルに照射することで血栓成長抑制効果を最大限に引き出すことができる周波数帯を明らかとし、超音波による血栓成長抑制効果のメカニズムについても検証する。
  - ② 超音波の駆動方式は、主に連続波駆動とパルス波駆動の2種類に分類される。これまでの研究では連続波駆動のみで検討してきた。超音波の駆動方式を連続波駆動からパルス波駆動に変更することで、(人体に非侵襲的な範囲で)瞬間的に数倍から数百倍の超音波エネルギーで駆動が可能となるため、さらなる血栓成長抑制効果が得られることが期待できる。なお、

超音波診断装置は全てパルス波駆動であるため、これまでに検討してきた連続波駆動からパルス波駆動に変更しても安全性が担保されると考えられる。

### 3. 研究の特色

- (1) 超音波は医療現場において、機器洗浄装置、結石の破壊装置、診断装置と幅広く用いられ、医療機器についてはJISおよびFDAにおいて安全基準が設けられている。本研究は、最終的に最も繊細な部位の一つである脳血管、然るに脳梗塞を発症した部位を標的として超音波を照射することを視野に入れているが、このような脳組織においても超音波は非常に安全性が高いと考えられる。また、2006年にMorlinaらは、rt-PA投与時に超音波（超音波診断装置）を脳梗塞部位に照射することで血管の再開通率が有意に向上することを報告したが、超音波を照射したことによる副作用は認められなかった。この報告からも出血リスクが高い状態の脳組織においても超音波の照射は非常に安全性が高いことが伺える。このように、超音波は脳出血リスクが高い患者に対しても非常に安全性が高く、臨床応用に適するツールであると考えられる。
- (2) 血管再開塞の問題に対し、薬物を一切用いない超音波のみによる2次予防法についての検討は我々のグループを除いて国内外問わず、まだ検討されていない独創性の高いアプローチである。

### 4. 研究の成果

血栓成長モデルをもちいた血栓成長抑制効果に最適な超音波の周波数・駆動方式の探索を行った結果、超音波の血栓成長抑制効果は周波数、駆動方式に大きく影響されず、音響強度依存的にその作用をあらわすことが示唆された。すなわち、血栓成長抑制効果を十分に引き出すためには、単純に頭蓋骨を効率よく透過させることが重要であることが示唆された。現在、本結果について取りまとめ、論文投稿準備中である。

# 滴の変形の動的ダイナミクスに関する実験的研究 —可溶二成分流体における流体不安定性の定量的理解を目指して—

福岡工業大学 工学部 下川 倫子

## 1. 研究の目的

流体の不安定性は身近な雲のパターン形成から億光年規模の宇宙の大域構造まで、豊かな自然現象を作り出す。流体の不安定性に立脚した現象は自然界にみられるだけでなく、輸送現象の効率化や輸送管の劣化などに関連していることから工学的にも重要な課題である。そのため、流体の不安定性に関して多くの研究がなされてきたが、可溶二成分溶液中で生じる不安定性については界面の取り扱いの難しさゆえ、十分に解明されていない。

可溶二成分流体が作る界面で起こる興味深い現象として、滴の分裂現象が挙げられる。水中にインクを一滴落とすと、沈降しているインクの滴は渦輪に変形し、渦輪の不安定化によって、複数個の液滴に分裂する。この現象は100年以上前に、J.J.Tomson等(J. J. Thomson and H. F. Newall, Proc. R. Soc. London **39**, 417 (1885).)によって報告されている。その後、Arecchi等(F. T. Arecchi, *et al.*, Europhys. Lett **9**, 333 (1989).)は二つの無次元量を用いてこの現象を整理した。誰でも簡単に実験することができるが、沈降しながら形も変化していく非定常な系であるため、分裂のメカニズムが明確になっているとはいえない。また、本研究で着目した滴の分裂現象は「渦輪の不安定性」と関わることから流体力学の基礎的な問題としても重要である。我々は滴の分裂個数(以下、分裂モード $m$ )を特徴づける物理量を実験で明らかにし、ダイナミクスを考察した。本研究の理解によって、可溶二成分流体界面での不安定化についての幅広い理解を促すことが期待される。

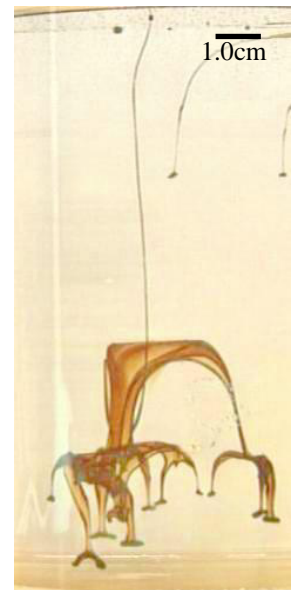


図1 滴の分裂  
(図2に示すカメラ1で撮影)

## 2. 研究の計画・方法

### (1) 実験計画

#### ① 分裂モードの出現頻度確率分布の測定

滴の溶液の粒径、粘度、密度を変化させたときの滴の分裂モード $m$ の確率密度分布を調べ、分裂個数の平均値 $\langle m \rangle$ を実験結果から求める。

#### ② 分裂モードを特徴づける物理量の決定

沈降中の滴は渦輪を形成し、渦輪の不安定化によって滴の分裂が起こる。図2に示すカメラ1、カメラ2で撮影した動画を使って分裂直前での渦輪の不安定化波長を実験で測定したところ、レイリーテラー不安定性で最大成長率を示すときの波長とよく一致していた。以上の結果を踏まえて、密度差による重力の効果駆動力としたナビエーストークス方程式を用いて現象をモデル化し、分裂モード $m$ を特徴づける物理量 $G$ を見積もる。実験で得られた $\langle m \rangle$ を $G$ で整理する。得られた結果から滴の分裂のダイナミクスについて議論する。

### (2) 実験方法

図2のように水平なガラス台におかれた二重円筒容器の内径部を粘性流体(以下、外部粘性流体)で満たす。滴はマイクロシリンジポンプを用い、滴下体積をコントロールし、外部粘性流体の表面に静かに置く。滴の変形過程を円筒容器の側面(カメラ1)とガラス台の下方(カメラ2)の二か所からカメラで撮影し、得られた動画を解析する。溶液の粘度は温度に大きく依存するため、温度を一様に保つ目的で、二重円筒(本研究費予算で購入)の外径部に恒温槽で温度コントロールされた一定温度(25°C)



の水を循環させ、流体の温度を一定に保つ。

滴溶液として $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 水溶液、外部粘性流体としてグリセリン水溶液を使用した(本研究費予算で試料を購入)。滴と外部粘性流体の粘性を一樣にするため、ポリエチレングリコール(本研究費予算で購入)を混合し、粘度を調整した。

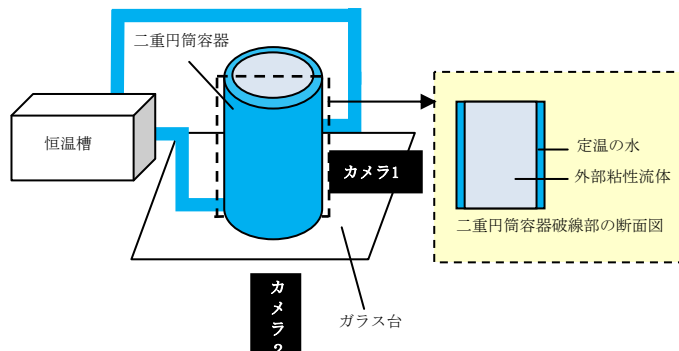


図2 実験方法概略図

### 3. 研究の特色

研究の特色は等加速度運動し、形が変化する渦輪の不安定性を対象としている点である。従来の渦輪の研究は取扱いの難しさゆえ、一定の半径を保ったまま等速運動するものを対象としていた。そのため、現実の系で多々見られる“運動しながら形も変化していく非定常な渦輪”を扱う手法の確立が必要とされる。申請者は過去に、詳細な実験結果と実験結果に立脚し提案した現象論モデルとの比較を通して、現象のダイナミクスを議論してきた。過去の経験を生かし、実験結果を元に提案された現象論的モデルから得られた分裂モードを決定する物理量を用いて、実験結果を整理することで液滴の分裂個数の決定機構を議論する。

### 4. 研究の成果

#### (1) 不安定モードの出現頻度分布の測定

滴の半径 $r$ 、二流体の粘度 $\eta$ や密度差 $\Delta\rho$ を変化させたときの滴の不安定モード $m$ の確率密度分布を調べ、平均値 $\langle m \rangle$ を実験結果から求めた。図4を見るとわかるように、同様の条件で実験を行っても分裂モードは一意に決まらず、揺らぐ(図4)。また、確率密度分布のピーク値 $m_{\max}$ は $r$ とともに増加し、分散の幅は大きくなった。さらに、粘度依存性、密度差依存性に関しては、以下の通りであった;(1) $m_{\max}$ は $\eta$ の増加とともに減少し、分散の幅は狭くなる。(2)  $m_{\max}$ は $\Delta\rho$ とともに増加し、分散の幅は広がる。以上、実験で得られた確率密度分布から、分裂個数 $\langle m \rangle$ の平均値を求めた。

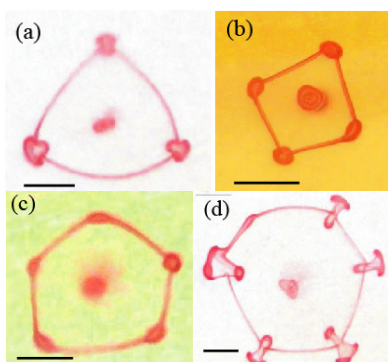


図3 水平方向の変形

(図2に示すカメラ2から撮影)

(a)  $m = 3$ , (b)  $m = 4$ , (c)  $m = 5$ , (d)  $m = 6$

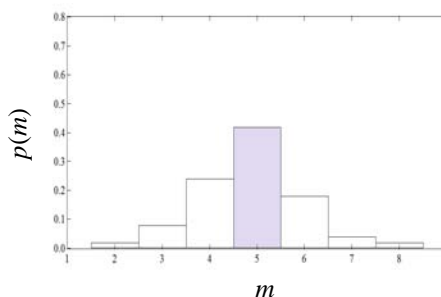


図4 モード数 $m$ に関する出現確率密度分布 $p(m)$

(2) 分裂モードを特徴づける物理量の決定

分裂直前での渦輪の不安定波長を実験で測定したところ、レイリーテラー不安定性で最大成長率を示すときの波長とよく一致していた(M. Shimokawa *et al.*, Phys. Rev. E **93**, 062214 (2016))。以上の結果を踏まえて、密度差による重力の効果を駆動力としたナビエーストークス方程式を用いて現象をモデル化した。

$$\frac{\partial U}{\partial t} + (U \cdot \nabla)U = -\frac{1}{\rho_0} \nabla P + \nu \nabla^2 U - \frac{\Delta \rho}{\rho_0} g e_z \quad (1)$$

$U$ は速度、 $\nu$ は動粘度、 $\Delta \rho$ は二流体の密度差、 $r$ は任意の位置での流体の密度、 $P$ は圧力、 $D$ は拡散係数を示す。位置 $x$ 、速度 $U$ 、時間 $t$ 、圧力 $P$ に関して、以下のルールに従い、(1)を無次元化する。;  $x/r \rightarrow x', U r/\nu \rightarrow U', t/(r^2/\nu) \rightarrow t', P/\rho_0(\nu/r)^2 \rightarrow P', (\rho - \rho_0)/\Delta \rho \rightarrow \rho'$ ,

無次元化による変数変換から得られた式が(2)である。

$$\frac{\partial U'}{\partial t'} + (U' \cdot \nabla')U' = -\nabla' P' + \nabla'^2 U' - G \rho' e_z \quad (2)$$

(2)式の $G$ は $G = (\Delta \rho / \rho_0)(r^3 / \nu^2)g$ を意味する。無次元量 $G$ を用いて、分裂モードの平均値 $\langle m \rangle$ を整理する。図5は $G$ と $\langle m \rangle$ の関係を示し、二流体の密度差 $\Delta \rho$ 、粘度 $\eta$ 、滴の半径 $r$ に対する依存性、また二流体の粘度が異なる場合の実験結果を重ねて、プロットしたものである。図5を見るとわかるように、二流体の粘度、密度差、滴の体積、二流体間の粘度差が異なるさまざまな実験条件で $\langle m \rangle$ と $G$ の関係を両対数グラフにプロットするとほぼ一つの直線上にのり、平均的な分裂の個数が $G$ に依存していることが分かる。ここで、 $G$ の意味について考えてみると、 $G$ は $(\Delta \rho / \rho_0)(r^3 / \nu^2)g$ であり、重力による駆動力と粘性散逸の比である。以上のことから、重力による滴の沈降現象と沈降中の流体間の粘性散逸量の競合が分裂モードの決定において重要であることが分かった。

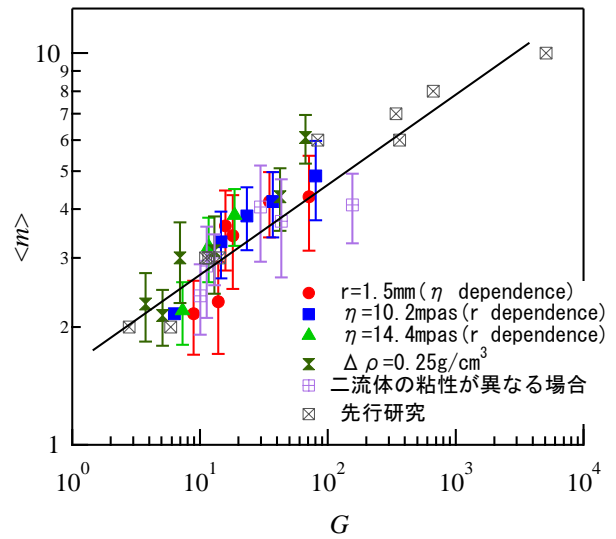


図5  $G$ と $\langle m \rangle$ の関係

(3) 成果発表

本研究は、(1) 研究会「非線形現象の捉え方」(2016. 5.13-15)、(2) Mini-symposium on cooperative phenomena in nonequilibrium systems(2016.3.4)で成果発表を行った。

## 平成 27 年度学術研究振興資金 若手研究者奨励金 研究報告

---

平成 28 年 10 月作成

編 集 日本私立学校振興・共済事業団  
助成部 寄付金課  
発行所 日本私立学校振興・共済事業団  
〒102-8145 東京都千代田区富士見 1-10-12  
電話 03(3230)7315・7316  
FAX 03(3230)8223

---

禁無断転載