

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。

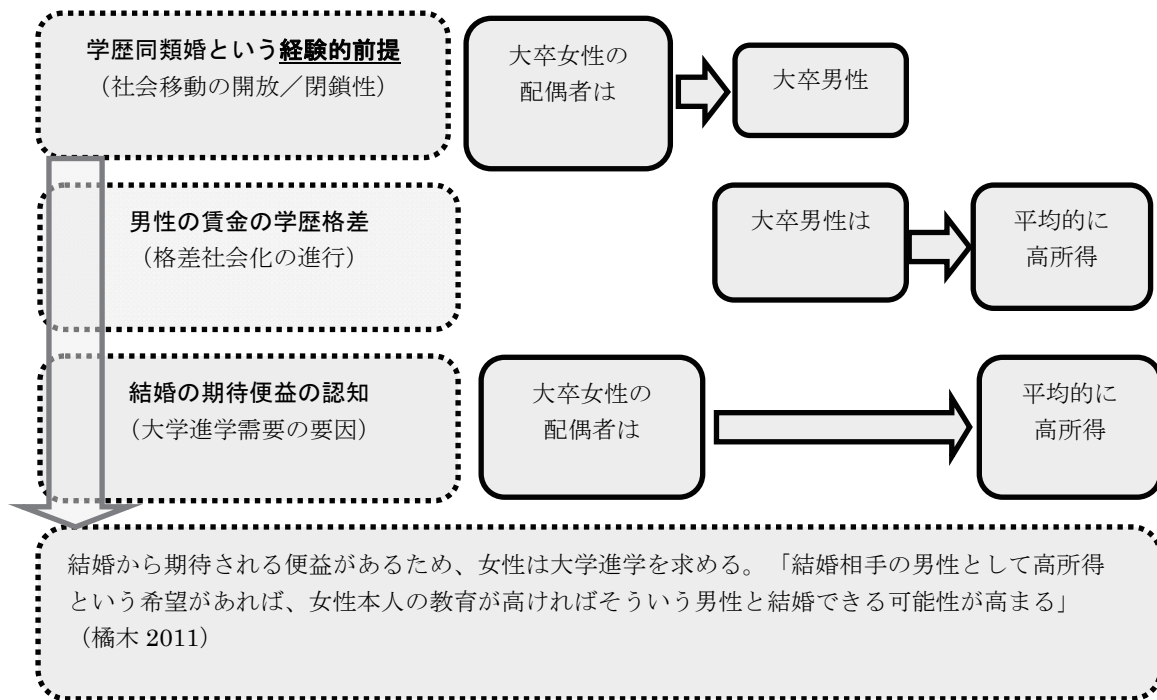


図1 (理論仮説) 結婚の効用が喚起する女性の大学進学需要

【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)₃)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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ KOマウスや抗IFN- γ 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

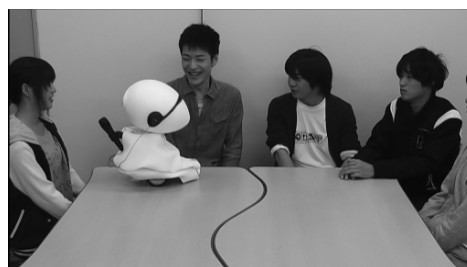


図2 最小限の発話モジュールを搭載したロボット

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碎し、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- γ 、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たる。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 μ 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を行い、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。

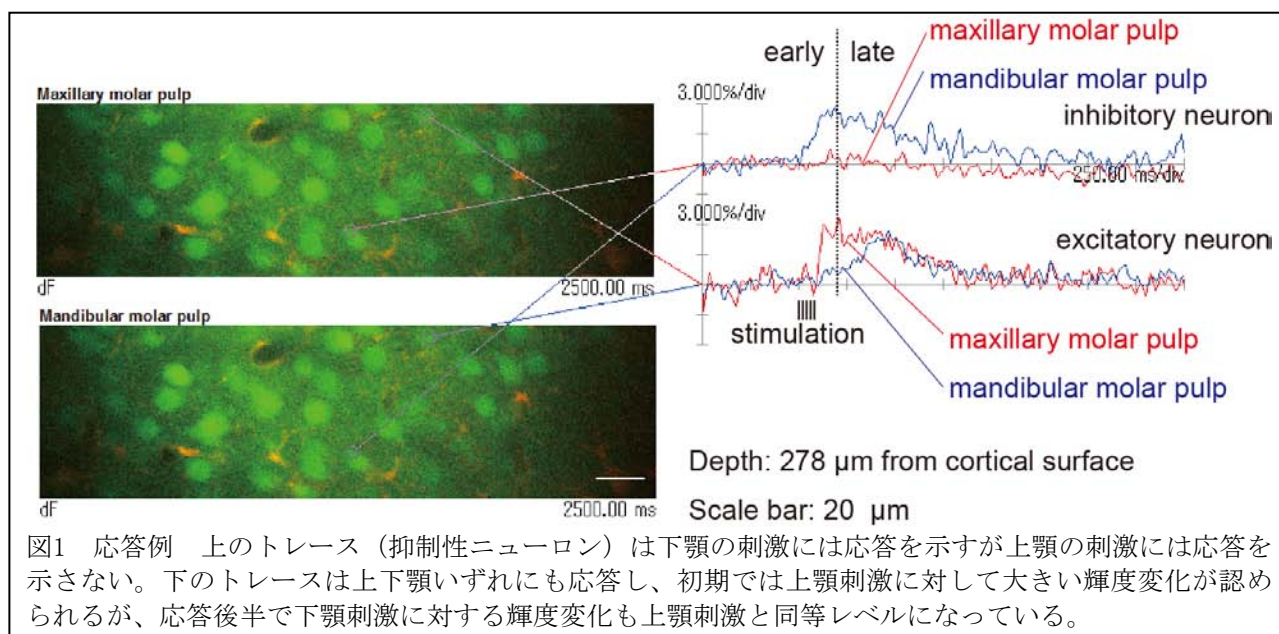
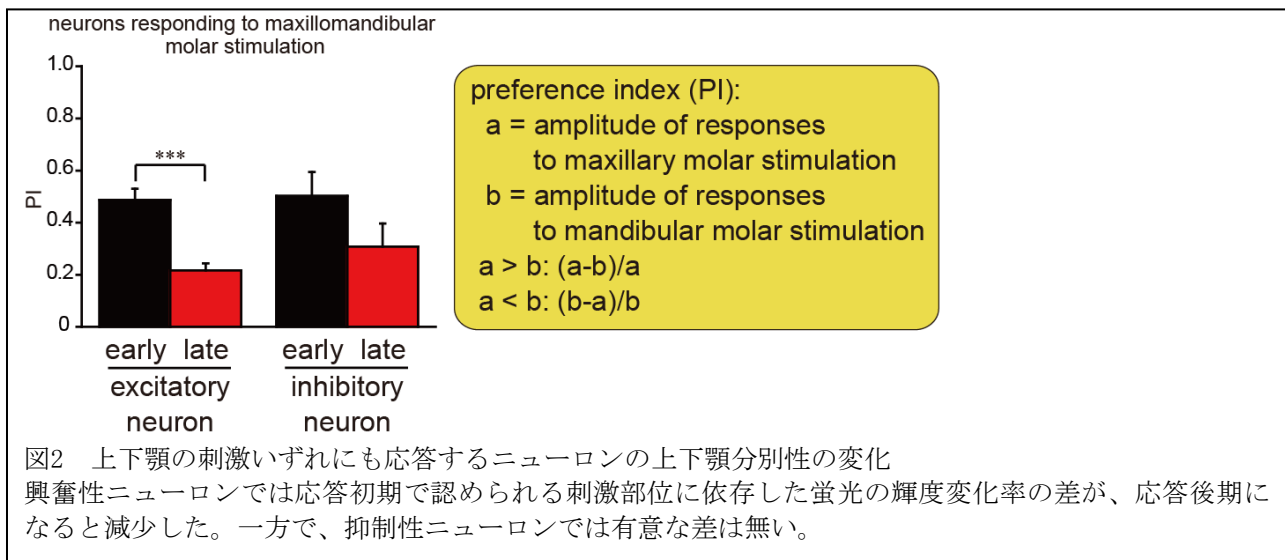


図1 応答例 上のトレース (抑制性ニューロン) は下顎の刺激には応答を示すが上顎の刺激には応答を示さない。下のトレースは上下顎いずれにも応答し、初期では上顎刺激に対して大きい輝度変化が認められるが、応答後半で下顎刺激に対する輝度変化も上顎刺激と同等レベルになっている。

- 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 ζ 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 ζ 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- γ 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- γ の産生を認めた。