

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。そのメカニズムを詳らかにするため、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⁽¹⁾、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 MgCl₂ 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 μ 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⁽²⁾ (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

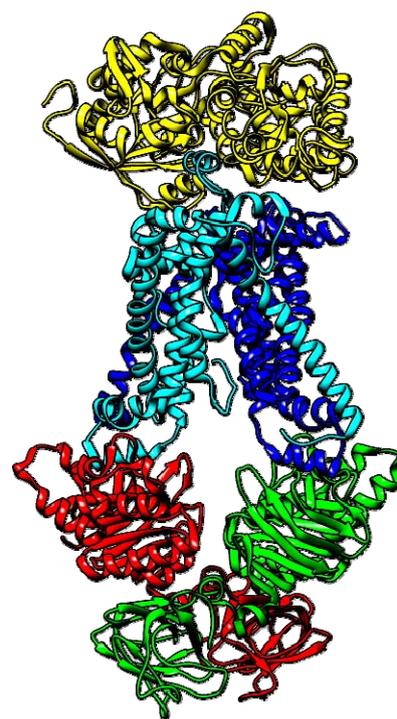


図1. HAG法を用いて凍結した結晶から求めた3.4 Å分解能のAlgM1M2SS-AlgQ2複合体構造。
黄、AlgQ2；青、AlgM1；水色、AlgM2；黄緑と赤、AlgS

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)¹⁾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)²⁾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)³⁾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)⁴⁾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)⁵⁾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。

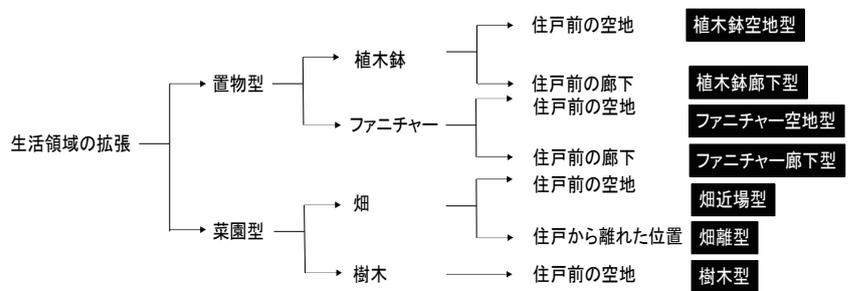


図1. 生活領域の拡張の類型

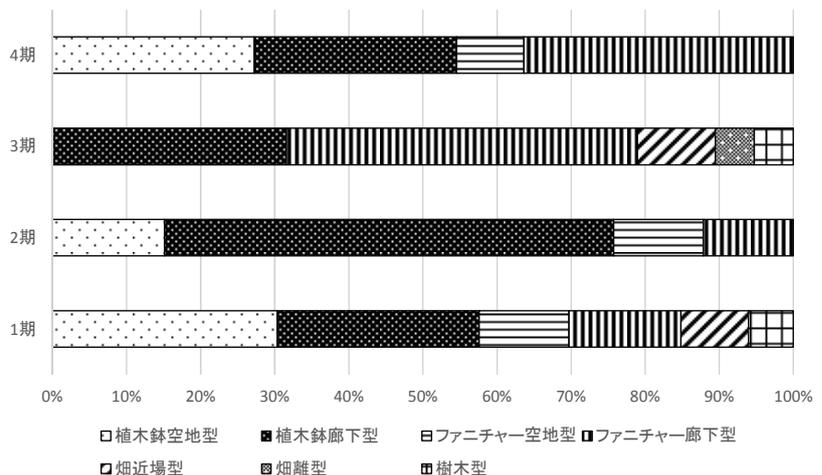


図2. 設計別にみた生活領域の拡張性の分類割合

(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

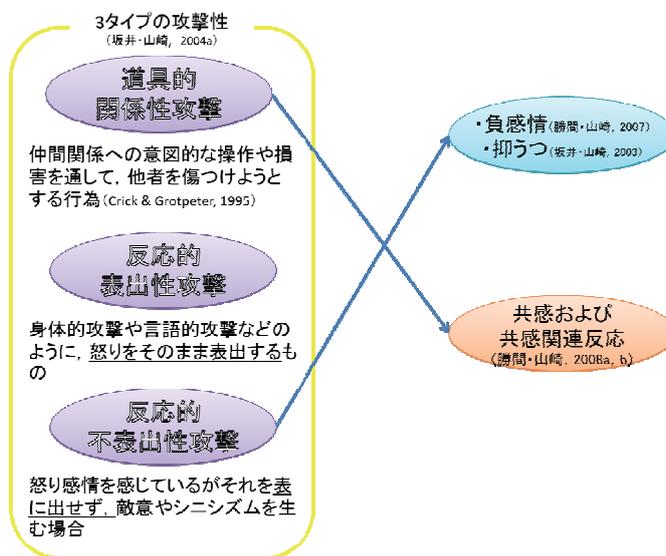


Fig.1 申請者の先行研究の概要

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)。

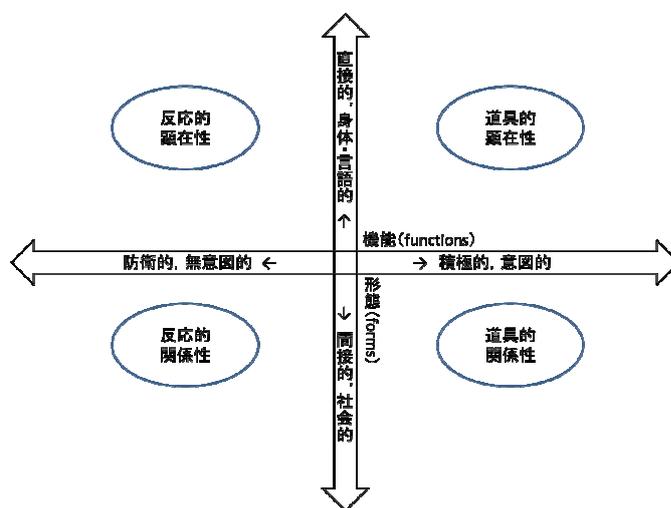


Fig. 2 攻撃性の構造関係

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。

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	
攻撃性					
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)
感情処理過程					
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)**

各尺度で男女差が見られるかを検討するために、*t*検定を行った (Table 1)。その結果、攻撃性尺度では、4タイプの攻撃性サブタイプのうち、道具的關係性攻撃のみ有意な男女差が見られなかった ($t=1.74$, $df=211$, $p=n.s.$)。しかし、その他の攻撃性得点はすべて、男子が女子よりも有意に高かった。さらに、感情処理過程として測定した感情認知および共感関連反応では、すべて、女子が男子よりも有意に高いという結果となった。これらの結果は、これまでの知見と部分的に一致するが、異なる知見も示唆している。つまり、これまでの欧米の知見では、暴力的な攻撃性については“男子の方が女子よりも攻撃性が高い”という部分は一致しているが、陰湿で表面に現れないような攻撃は“女子の方が多い”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、道具的關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(CO₂-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CO₂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、 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 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 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 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}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}C 標的を作成する事である。作成する標的は厚さ10 mg/cm²で、1 GBqに相当する。 ^{14}C 購入費用はRCNP側から助成を受けている。ただし ^{14}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}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}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}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}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}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}C 標的を作成し、 ^{14}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}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_2 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_2 ガスによる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 ₂ 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 (O₂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 (O₂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 (O₂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- Δ 185-203) は、野生型HSF1と結合することでHSF1- Δ 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- Δ 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。

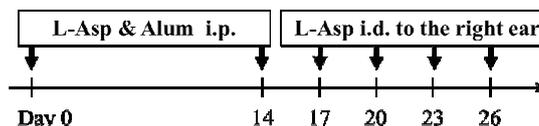


図1 L-Aspの投与スケジュール

① L-Asp 誘発アレルギーの経時的変化

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 (%) の経時的変化を検討した。

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染色とトル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 μ 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染色とトル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。

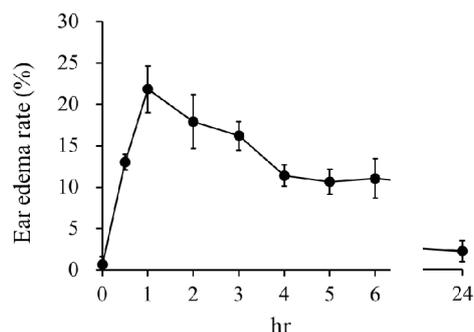


図2 L-Asp投与後の耳介浮腫率

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。

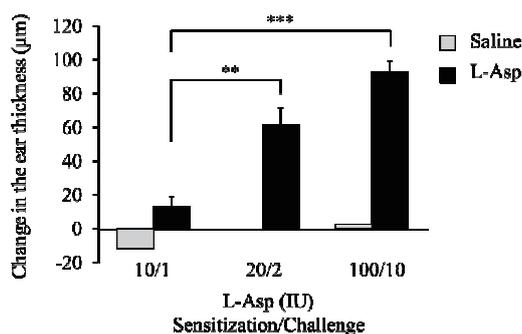


図3 耳介浮腫に対するL-Aspの用量依存性

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。

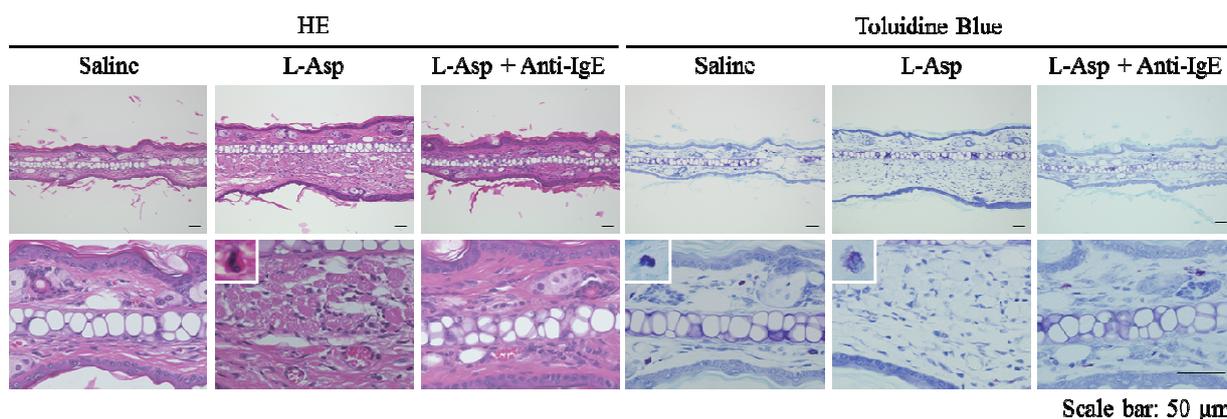


図4 耳介組織染色像

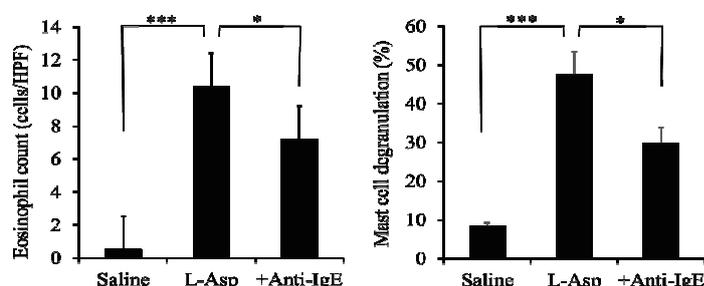


図5 好酸球数と肥満細胞の脱顆粒率

(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。

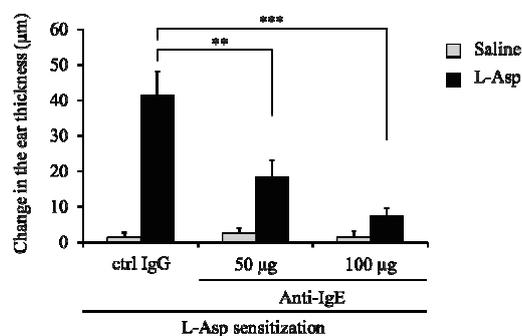


図6 L-Asp誘発耳介浮腫に対する抗IgE抗体の抑制効果

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。

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

安田女子大学 家政学部 永澤 貴昭

1. 研究の目的

競技者が増量を目的とした食事を継続的に摂取したときの身体組成、血液性状及びホルモンの変化を検討すること。

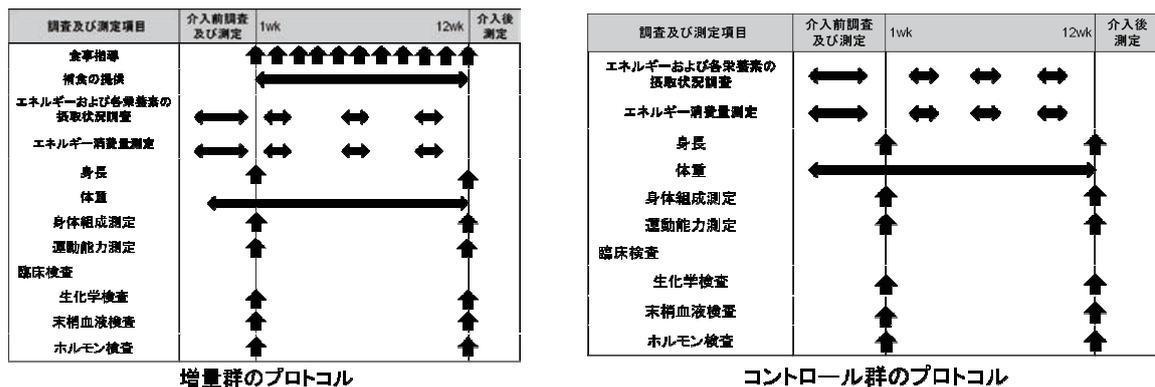
2. 研究の計画・方法

(1) 被験者

被験者は、男子高校生競技者を予定していたが先方の都合により不可能となったため大学生テニス競技者13名とした。

(2) 調査および測定のプロトコル

被験者は7名（増量群）と6名（コントロール群）にランダムに2群に分けた。増量群に対する食事指導の期間は12週間とし、その他の測定及び検査は増量群、コントロール群ともに同じ項目を行った。介入前後に身長測定、身体組成測定及び臨床検査を行い、増量群、コントロール群による違いを比較検討した。増量群及びコントロール群のプロトコルを下記に示した。



(3) 食事指導および補食の提供

介入中の食事内容を把握するため、増量群及びコントロール群に対して毎食食事の写真を撮影させメールにて送らせた。送られてきた写真に対して、介入前の食事調査結果から健康的な増量に必要と考えられるエネルギー及びバランスのとれた食事に対するアドバイスを増量群にのみ行った。増量群に対しては、バランスの取れた食事についてのアドバイスのみ行った。

増量群へは、練習後の補食を義務付けた。補食の内容は、プロテインパウダー、エネルギーバー、エネルギーゼリー、おにぎり、カステラとした。

(4) エネルギーおよび各栄養素の摂取状況調査

介入期間中は、増量群及びコントロール群に対して記録用紙及び写真を併用した食事記録法を用いた食事調査を3週目、6週目及び9週目からそれぞれ1週間行い、その後の食事内容に反映させた。増量群に対する各栄養素の目標量は、先行研究から増量時に必要と考えられる値を設定した。

- エネルギー : TEEを500~1000kcal程度上回る摂取量
- たんぱく質 : 1.5~2.0g/kg/day
- 脂質 : TEIの25~30%
- 糖質 : 5.0~12.0 g/kg/day

(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った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 ± 559 kcal、コントロール群 134 ± 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 ± 0.8 kg増加し、コントロール群は 0.1 ± 0.5 kgで変化はなかった。筋量は、増量群は 1.3 ± 0.8 kg増加し、コントロール群は 0.1 ± 0.5 kgであった。同様に脂肪量については、増量群は 1.0 ± 0.8 kg増加し、コントロール群は -0.1 ± 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)	$+520 \pm 559$	$+134 \pm 257$

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ー、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
増量群	155.3±20.6	162.2±17.9	6.8±12.0
コントロール群	166.4±10.8	167.4±14.0	1.0±8.0

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。

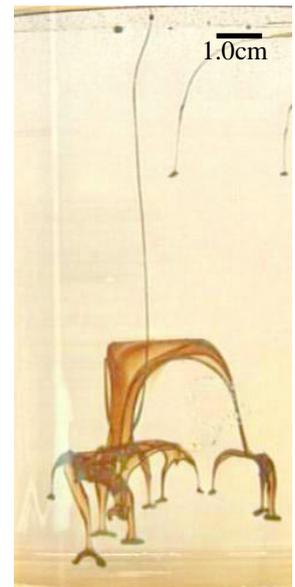


図1 滴の分裂
(図2に示すカメラ1で撮影)

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。

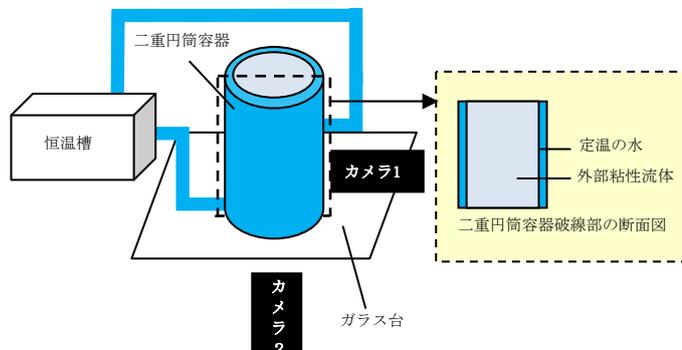


図2 実験方法概略図

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 η 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 η 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。

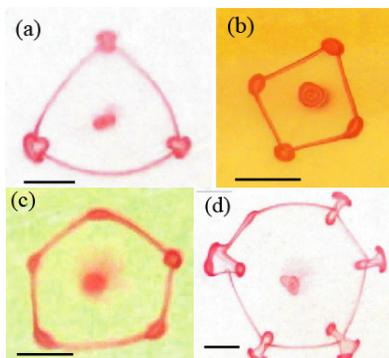


図3 水平方向の変形

(図2に示すカメラ2から撮影)

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

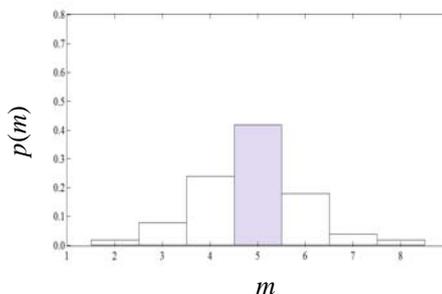


図4 モード数 m に関する出現確率密度分布 $p(m)$

(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、 ν 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 η 、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。

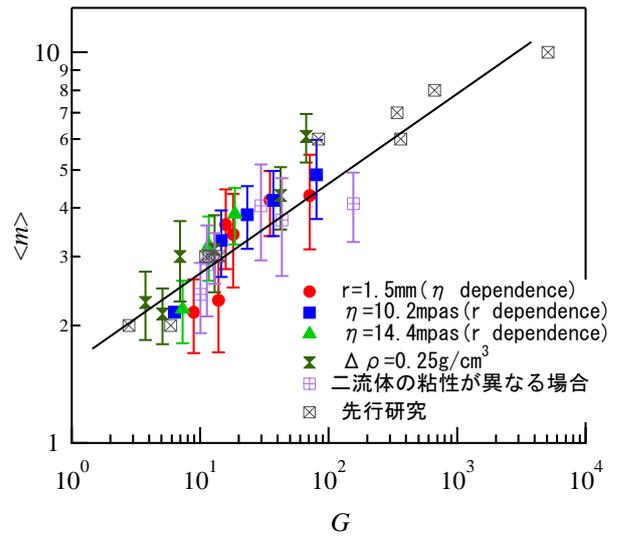


図5 G と $\langle m \rangle$ の関係

(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。