

平成 28 年度
学 術 研 究 振 興 資 金
若手研究者奨励金 研究報告

平成 29 年 10 月

は じ め に

この報告書は、平成 28 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、私学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 28 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 万円の本奨励金を交付しました。

平成 20 年度に交付を開始して以来、平成 29 年 5 月末までに交付した本奨励金総額は、311 件、1 億 3,930 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。

なお、本事業団では、「学術研究振興資金（若手研究者奨励金）」に替わりまして、私立大学等の若手研究者と女性研究者の研究を支援する「若手・女性研究者奨励金」（平成 29 年度から公募、平成 30 年度より交付）を新たに立ち上げました。本事業団では私立大学等における学術研究の発展を願い、さらに支援を充実させたいと考えておりますので、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 29 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 28 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 28 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

分野	年 度	20年度			21年度			22年度			23年度			24年度			25年度			26年度		
		応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)	応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)	応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)	応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)	応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)	応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)	応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)
内 訳	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	108	41	18,900
	人文・社会科学系	32	20	6,000	53	24	7,200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25	8	2,400
	理工系、農学系	—	—	—	—	—	—	49	21	10,500	63	20	10,000	—	—	—	—	—	—	33	11	5,500
	生物学系、医学系	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	79	30	15,000	77	29	14,500	50	22	11,000

分野	年 度	27年度			28年度			合 計		
		応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)	応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)	応募 件数 (件)	採択 件数 (件)	交付額 (千円)
内 訳	合 計	114	42	19,400	92	42	19,400	667	269	120,900
	人文・社会科学系	21	8	2,400	20	8	2,400	151	68	20,400
	理工系、農学系	37	14	7,000	29	13	6,500	211	79	39,500
	生物学系、医学系	56	20	10,000	43	21	10,500	305	122	61,000

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：4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：2件、平成26年度：3件、平成27年度：2件、平成28年度：1件)

Ⅱ 平成28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	獨協医科大学	布 矢 純 一	T細胞疲弊や老化に抵抗性をもつCAR-T細胞の開発	500	5
2	北里大学	佐々木 隼人	慢性腎臓病の治療法開発のための基礎的研究	500	7
3	杏林大学	岸 本 拓 磨	インスリン分泌における細胞膜脂質非対称の生理学的意義の解明	500	9
4	工学院大学	橋 本 英 樹	微生物由来金属酸化物から着想を得た非晶質鉄酸化物ナノ多孔体の作製と応用	500	11
5	芝浦工業大学	赤 木 亮 太	生理学的・バイオメカニクスの観点から解明する筋硬度の意義	500	14
6	昭和大学	唐 川 亜 希 子	炎症性骨破壊に対するデノスマブの作用機序解明	500	16
7	昭和女子大学	山 田 麻 以	競合企業の参入が企業の価格と利潤に与える影響について	300	18
8	専修大学	服 部 あ さ こ	「集団自決」訴訟における宮平秀幸証言の再検討	300	21
9	創価大学	細 木 藍	金-パラジウムナノ粒子を固定化したヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの研究	500	23
10	中央大学	栗 井 貴 子	ヒトtRNAメチル化酵素hTRM1の機能および構造解析	500	25
11	帝京大学	亀 田 浩 司	感覚野に多数存在する皮質脊髄路ニューロンの投射・機能解析	500	27
12	東海大学	佐 藤 綾	末梢への刺激は脳皮質興奮性を制御するか？	500	30
13	東京農業大学	小 林 朋 子	牛白血病ウイルス感染牛はなぜ増え続けるのか	500	32
14	東邦大学	岨 康 輝	新規アイソトポマーによるサンゴ礁の高精度降水量復元手法の開発	500	34
15	日本大学	田 中 融	血糖調節における翻訳調節因子YB-1の役割	500	37
16	星薬科大学	五 十 嵐 信 智	肥満誘発性便秘症における大腸アクアポリンの生理的意義の解明	500	40
17	自治医科大学	須 山 成 朝	視床下部室傍核オキシトシンニューロンのシナプス可塑性と摂食・エネルギー代謝調節	500	42
18	神奈川大学	相 澤 啓 仁	低次元有機導体の超伝導状態とバンド構造の関係	500	44
19	聖マリアンナ医科大学	市 川 大 介	多発性嚢胞腎の疾患管理：尿バイオマーカーL-FABPの可能性	500	47
20	横浜薬科大学	奥 野 義 規	グラフト型高分子を担体とした高活性固定化触媒によるフロー合成	500	49
21	富山福祉短期大学	村 田 泰 弘	障害者支援施設におけるQOLの向上を目指した支援の現状と課題	300	52
22	金沢医科大学	齋 藤 英 仁	うつ解明に向けたストレス状態の脳で発現変動する遺伝子の研究	500	55
23	愛知学院大学	藤 村 岳 樹	歯周病原菌の異所性肺感染におけるIL-17サイトカイン・ネットワークの検討	500	57
24	藤田保健衛生大学	前 田 亮	がん微小環境を標的とした間質性肺炎合併肺がんの新規治療戦略	500	59
25	名城大学	長 澤 麻 央	L. bulgaricusの摂取によるストレスならびにうつ病症状の制御に関する研究	500	61
26	京都薬科大学	渡 部 匡 史	ゲノム編集を用いたがんウイルス感染細胞からのウイルスゲノム除去	500	63
27	同志社大学	松 森 智 彦	近世村落の生産活動と環境適応	300	65
28	同志社女子大学	安 川 淳 一 朗	胎盤幹細胞の分化における膜融合関連タンパク質複合体の役割	500	67
29	立命館大学	金 子 光 佑	液晶性ナノ微粒子の創製とブルー相の電気光学特性の解析	500	69
30	立命館アジア太平洋大学	児 島 真 爾	労働者派遣法の比較制度分析	300	72

Ⅱ 平成28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
31	大阪歯科大学	嘉 藤 弘 仁	新規骨形成ペプチドの機能解析に基づく歯周組織再生創薬の挑戦	500	74
32	大阪薬科大学	森 重 雄 太	サルモネラのVBNC状態に関わる分子機構の解明	500	77
33	関西大学	植 木 美 千 子	日本人英語学習者における協同L2ライティング活動の有効性検証	300	80
34	関西医科大学	小 池 太 郎	一次感覚ニューロンの突起起始部を被うグリア細胞の性質	500	82
35	神戸薬科大学	内 藤 裕 子	コンドロイチン硫酸の発現異常による統合失調症様症状の発現機序	500	85
36	東洋食品工業短期大学	奈 賀 俊 人	セレウス食中毒の嘔吐毒素セレウリド類の合成と培養液中の動態解析	500	87
37	川崎医科大学	木 村 友 彦	インクレチン関連薬(GLP-1受容体作動薬)長期投与による受容体発現の変化	500	89
38	安田女子大学	羽 鳥 勇 太	消化管炎症におけるヘム分解酵素の抗炎症作用の機序解明	500	91
39	徳島文理大学	原 田 研 一	神経栄養因子様物質メラクトンAの不斉合成研究	500	93
40	福岡大学	草 野 修 平	タンパク質間相互作用の制御を目指した自己組織化分子の開発	500	95
41	福岡工業大学	傳 靖	多基準配分ゲームのアプローチによる日中協力の経済学的評価(Facilitating Sustainable Japan-China Cooperation through a Multi-criteria Allocation Game Approach)	300	98
42	尚絅大学短期大学部	河 村 諒	高齢者施設の終末期ケアにおける宗教的な関わりの検討	300	101
交付額計				19,400	

(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 28 年度学術研究振興資金 (若手研究者奨励金) 研究報告

T細胞疲弊や老化に抵抗性をもつCAR-T細胞の開発

獨協医科大学 医学部 布矢 純一

1. 研究の目的

慢性感染症や癌では持続的な抗原刺激が起こり、抗原排除に重要な役割を担う細胞傷害性T細胞(CTL)の機能異常や機能減弱が見られる。癌治療では、腫瘍抗原に特異的なキメラ抗原受容体(CAR)を遺伝子導入して作製した人為的改変T細胞(CAR-T細胞)による免疫治療が試みられており、B細胞悪性腫瘍に対するCD19を標的としたCAR-T細胞による免疫治療は臨床試験において良い成績を得ている。これまでのCAR-T細胞の開発研究から、十分な抗腫瘍活性を示すには*in vivo*でCAR-T細胞が効率よく増殖・維持されることが必要であるが、*in vitro*で十分な細胞傷害活性を示すにも関わらず、*in vivo*での増殖・維持が限られ、不十分な抗腫瘍活性しか示さないCAR-T細胞が存在する例が知られている。その原因の一つに、抗原非依存的な刺激によるCAR-T細胞の早期疲弊がある。従って、T細胞疲弊に抵抗性のCAR-T細胞を作製できれば、慢性感染症や固形腫瘍に対して有効に作用する免疫治療法を開発できるかもしれない。本研究ではCARに含まれる共刺激シグナル配列に着目し、疲弊抵抗性CAR-T細胞の開発を試みた。

2. 研究の計画・方法

(1) CAR-T細胞評価系の確立

HIV Env(NL4-3株)タンパク質の発現プラスミドpRE11(Teeranaipong P et al, J Int AIDS Soc, 2013)からHIV EnvをコードするcDNA断片をレンチウイルスベクターに挿入し、HIV EnvおよびGFPを発現するレンチウイルスベクターを作製した。ポリブレン法を用いてCHO細胞にHIV EnvおよびGFP遺伝子を導入後、5 μ g/mLのブラストシジンを含む培地で選択し、コロニーの単離を行った。得られた細胞クローンをMAGI-X4細胞と共培養し、細胞融合を指標として、HIV Env発現細胞のスクリーニングを行った。

(2) CAR-T細胞の作製

本研究では、HIV EnvのレセプターであるCD4分子の細胞外ドメインを抗原認識部位として有するCARおよびGFP遺伝子を発現レンチウイルスベクタープラスミドを用いた。レンチウイルスベクタープラスミドをサポータープラスミドと共に293FT細胞にトランスフェクションして、レンチウイルスベクターを作製した。レンチウイルスベクターを含む培養上清を回収し、0.45 μ mのフィルターで細胞残渣を除いた後に高速遠心を行い、レンチウイルスベクターの濃縮を行った。

ヒトPBMCは健常人ボランティアの末梢血液からFicollを用いて分離した。細胞培養プレートに接着する細胞を除いた後、抗CD3/CD28抗体磁気ビーズを用いてT細胞を活性化させた。活性化3日後に磁気ビーズを除き、レトロネクチンを用いてCAR発現レンチウイルスベクターによる遺伝子導入を行った。翌日、同様にして、二回目の遺伝子導入を行った。この後は、300U/mL IL-2と5%FBSを含むAIM-V培地を用いて、2-3日に一度培地交換を行いながら培養を行った。細胞が十分な数に増殖した時点でGFPを指標としてセルソーティングを行い、CAR-T細胞の純化を行った。

(3) CAR-T細胞の解析

CAR-T細胞の増殖を調べるため、経時的に細胞数およびGFP陽性細胞の頻度を解析した。抗原特異的なCAR-T細胞の活性化および細胞傷害活性を調べるため、作製したHIV Envタンパク質発現CHO(CHO-Env-GFP)細胞あるいはGFP発現CHO(CHO-GFP)細胞とCAR-T細胞を共培養し、24時間後の培養上清に含まれるIL-2および乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)量を測定した。細胞の活性化に伴うCAR-T細胞の疲弊を調べるため、疲弊マーカーであるPD-1の発現をフローサイトメトリーで解析した。

3. 研究の特色

- (1) 免疫チェックポイント分子に対する抗体を用いた阻害療法が癌に対して高い治療効果を示している。免疫チェックポイント分子阻害療法は、細胞表面に発現している免疫チェックポイント分子の相互作用を阻害し、免疫学的なブレーキを解除するというアイデアである。一方、本研究では、免疫チェックポイント分子の発現を内在的に制御し、養子免疫で用いるCAR-T細胞に免疫学的なブレーキを踏ませないというアイデアである。このように異なる作用機序で働く治療法を開発することは、それ単体での治療効果だけでなく、組み合わせることにより更なる治療効果の向上が期待できる。
- (2) 本研究ではCARに含まれる共刺激シグナルに着目したが、CAR-T細胞の疲弊抵抗性における共刺激シグナルの意義が明らかになれば、今後適切な共刺激シグナルを選択することでより有効に機能するCAR-T細胞を作製できると期待される。

4. 研究の成果

- (1) CAR-T細胞評価系の確立
U373-MAGI-CXCR4_{CEM}細胞との細胞融合アッセイにおいて多核を有する合胞体形成が認められ、CHO-Env-GFP細胞を樹立できた。また、CHO-GFP細胞も合わせて樹立した。
- (2) CAR-T細胞の作製および機能解析
4-1BBを共刺激シグナルとして有するCARを用いて、CAR-T細胞の作製を試みた。フローサイトメトリーで遺伝子導入率を解析すると、CAR遺伝子の導入率は5～10%であった。より純度の高いCAR-T細胞を得るためセルソーティングを行い、増殖後の細胞を解析したところ、約50%の純度のCAR-T細胞を樹立できた。作製したCAR-T細胞の機能を解析するため、標的細胞とCAR-T細胞を1:1で共培養し、24時間後の培養上清中の産生されるIL-2量をELISAで測定した。抗原を発現しないCHO-GFP細胞との共培養ではIL-2の産生は見られなかったが、抗原を発現するCHO-Env-GFP細胞では有意なIL-2産生を認めた。また、CHO-GFP細胞との共培養では細胞傷害活性が見られなかったが、CHO-Env-GFP細胞と異なる比率で共培養すると比率依存的な細胞傷害活性を示した。この結果から、CAR-T細胞の細胞傷害活性は抗原依存的であると考えられた。
- (3) CAR-T細胞表現型の解析
共刺激シグナルとしてCD28、4-1BB、HVEMを有するCAR-T細胞を作製し、増殖性の解析を行った。培養20日目で、CD28では約150倍に増殖したのに対して、4-1BBおよびHVEMでは約500倍に増殖していた。また、経時的にGFP陽性率を解析したところ、CD28を有するCAR-T細胞は培養16日目以降でGFP陽性細胞の頻度が減少したが、4-1BBあるいはHVEMを有するCAR-T細胞のGFP陽性細胞の頻度の減少は見られなかった。CAR-T細胞増殖の差がT細胞疲弊と関連するかを解析するため、疲弊マーカーの一つであるPD-1の発現を解析した。培養18日目において、CD28を有するCAR-T細胞は約60%の細胞がPD-1を発現していたのに対して、4-1BBでは約2%、HVEMでは約10%であった。これらの結果から、CD28を有するCAR-T細胞は細胞の活性化に伴う早期疲弊に陥っているのに対して、4-1BBあるいはHVEMを有するCAR-T細胞は早期疲弊に抵抗的な性質を持っていると考えられた。
- (4) 研究の総括
本研究によりHIV特異的CAR-T細胞の作製および評価系を構築することができた。今後、遺伝子導入効率の改良や新規CARのデザインを行い、より良いCAR-T細胞の作製系を構築したいと考えている。また、共刺激シグナルに注目した解析から、4-1BBやHVEMを有するCAR-T細胞ではCD28を有するCAR-T細胞で見られたような疲弊T細胞の特徴が見られず、疲弊抵抗性のCAR-T細胞であることが示唆された。これらの結果は、適切な共刺激シグナルを選択することで疲弊抵抗性のCAR-T細胞を作製できることを示唆している。今後、細胞傷害活性やメモリー表現型などの解析を行い、疲弊抵抗性CAR-T細胞の作製に向けた基礎的知見を得ていきたい。

慢性腎臓病の治療法開発のための基礎的研究 ー慢性腎臓病抵抗性メカニズムの解明ー

北里大学 獣医学部 佐々木 隼人

1. 研究の目的

腎臓は血液を濾過して余分な水分や酸・電解質、老廃物を尿として排泄し、必要なものは再吸収して体内を一定の環境に維持する働きをしている。慢性腎臓病は急性腎障害を除く全ての腎疾患に共通する腎機能停止までの慢性的な病態であり、慢性的な糸球体傷害から腎機能の低下及び腎障害が徐々に進行し、最終的に透析が必要となる末期腎不全に至る。腎不全は病死の第5位であり、三大死因である心疾患の原疾患でもある。その予備軍である慢性腎臓病は現在、成人の約8人に1人が罹患していると推定されており、事態は悪化していくと予想されるが、未だ根治療法は開発されていない。これまで各国で全ゲノム関連解析に基づくヒト腎症感受性遺伝子の探索研究が行われてきたが、見出された疾患感受性遺伝子は発症に対する影響度が極めて小さく分子標的治療のシーズ発見に至っていない。これはCommon diseaseである慢性腎臓病の治療において、疾患原因に対する治療的なアプローチよりも、慢性腎臓病の進行を止める治療が広く効果的であることを指し示しており、そのような治療法の開発が求められている。

ICGNマウス（以下、ICGN）は腎症を自然発症し、最終的に末期腎不全となる慢性腎臓病モデルマウスである。疾患原因は、腎糸球体の濾過機能を担う足細胞における $tensin2$ の欠失（ $Tns2^{ph}$ ）によって、足細胞が変性することに起因する。採択者は本変異が引き起こす腎症の重篤度はマウス系統によって著しく異なることを明らかにしてきた。ヒト慢性腎臓病においても著しい人種差があることが報告されている。これらの知見から慢性腎臓病の進行を抑制する因子の存在が示唆された。そこで採択者はICGNと抵抗性系統であるC57BL/6J（以下、B6）の交配群を用いて、腎障害を量的形質にした全ゲノム関連解析を行い、第2染色体に慢性腎臓病抵抗性遺伝子座を見出した。続いて、抵抗性系統であるB6の第2染色体に由来する部分断片をICGNに導入したコンジュニック系統の解析により、マウス第2染色体上に、足細胞傷害に対して抵抗する領域と、慢性腎臓病の終末病態である尿細管間質傷害に対して抵抗する領域が別々に存在することを明らかにした。本研究では、それら原因遺伝子の同定を試みた。

2. 研究の計画・方法

（1）足細胞傷害抵抗性

B6由来の原因遺伝子座を持つICGNコンジュニック系統から引き続きサブコンジュニック系統を作製して腎症の評価を行い、原因遺伝子座を限局する。腎症評価には尿中アルブミン量測定、腎糸球体の病理組織学的解析・超微細構造解析を用いた。

（2）尿細管間質傷害抵抗性

原因遺伝子座上にある遺伝子について、B6由来の原因遺伝子座を持つICGNコンジュニック系統とICGNを用いて腎臓における発現量を比較し、候補遺伝子を決定する。初代培養尿細管上皮細胞に候補遺伝子を標的とするsiRNAを導入後、腎線維化マーカーの発現量を調べ、候補遺伝子を絞り込む。実際には候補遺伝子がコードするタンパクの活性化の影響も検討した。

3. 研究の特色

現在、慢性腎臓病の病態である尿細管間質傷害を抑制する治療薬の開発が進められているが、齧歯類の実験モデルで顕著な効果が見られた薬でも、ヒト治験では尿細管間質傷害を抑制する作用が認められていない。この原因には、治験に用いられる片側尿管結紮モデルや腎臓摘出モデルなど、腎臓病研究に頻用される実験モデルは傷害から腎不全、さらに回復まで急性に経過するため、その病態は急性腎障害に近く、慢性的な糸球体傷害から末期腎不全まで不可逆的に経過する慢性腎臓病を再現出来ていないことが挙げられる。これに対して、本研究で用いるICGNは、①腎臓の血液濾過装置である糸球体足細胞の傷害と尿中へのタンパク漏出、②漏出タンパクによる尿細管間質傷害や腎性貧血、③最終的に末期腎不全に至るヒト腎症の病態ステージを順次示すヒト病態に近似した自然発症モデルである。この腎症モデルマウスを用いて明らかとなった①と②の病態に対する2つの抵抗性遺伝子座位には既知の腎障害関連遺伝子は座位しておらず、新規抵抗性遺伝子の同定と分子動態の解析、慢性腎臓病の病理発生の理解、診断・創薬・治療の新規ターゲットの解明に繋がる可能性がある。

4. 研究の成果

（1）足細胞傷害抵抗性

足細胞傷害抵抗性遺伝子領域をB6マウス由来に持つICGNコンジェニックマウスから、遠位部分でB6由来の染色体断片を持つサブコンジェニック系統のみを得ることができた。このマウスの足細胞傷害は軽減されておらず、足細胞傷害抵抗性遺伝子領域は遠位部分を除いた領域に局限された。今後は更なるサブコンジェニック系統の作出と並行して、腎糸球体を用いたRNA-seq解析により候補遺伝子を絞り込む予定である。

（2）尿細管間質傷害抵抗性

尿細管間質傷害抵抗性遺伝子領域をB6マウス由来に持つICGNコンジェニックマウスとICGNマウスの腎臓におけるRNAの発現レベルの比較から、候補遺伝子を1つ見出した。初代培養尿細管上皮細胞を用いたノックダウン実験では、候補遺伝子をターゲットにするsiRNAを導入した細胞で、間葉系マーカーの α -SMAの発現が顕著に増加した。また、候補遺伝子がコードするタンパクの賦活剤投与により尿細管上皮細胞の上皮間葉転換が減少した。この結果より、傷害因子に暴露された尿細管上皮細胞では候補遺伝子の発現量が変化して上皮間葉転換が誘導され、尿細管間質傷害へ進行することが示唆された。B6マウスの尿細管上皮は傷害因子によって候補遺伝子の発現量が変化しにくいために、尿細管間質傷害抵抗性になっていると考えられる。今後、尿細管上皮細胞における候補遺伝子のホメオスタシスを詳しく研究することで、尿細管間質傷害の予防および治療につながることを期待される。

インスリン分泌における細胞膜脂質非対称の生理学的意義の解明 ーコレステロールの二重膜間輸送が及ぼす影響ー

杏林大学 医学部 岸本 拓磨

1. 研究の目的

インスリン分泌（IS）不全は糖尿病の原因の一つであり、糖尿病の成因解明、新規治療薬の開発のためにインスリン分泌機構を明らかにする事は急務の課題である。ISは、膵臓β細胞内のゴルジ体から生成されたインスリン顆粒（顆粒）が輸送されて細胞膜に結合、血中グルコース濃度上昇に応答して顆粒が細胞膜と融合しインスリンが細胞外へ放出する、という過程を経る。しかし、脂質については、多くの報告があるにもかかわらずそれらの多くは未解明である。脂質代謝異常は、糖尿病リスク要因になる重要な問題で、脂質の機能を解明する必要がある。本研究では、コレステロール（Chol）に着目した。Cholは細胞膜の主要脂質である。Cholは細胞膜での分布は均一ではなく、関連蛋白質を取り囲む微小（100 nmオーダー）な脂質ドメインを作り分泌に影響を及ぼすと推測される。加えて、Cholは細胞膜内層に多く分布しているとされるが、外層に分布が偏るような変化が膜貫通蛋白質や脂質修飾蛋白質等の機能に影響する事が示唆されている。このようなことから本研究では膵β細胞の顆粒融合作用機序における細胞膜Cholの機能を解明するため、分布という観点から解析を行った。

2. 研究の計画・方法

本申請は顕微鏡観察を中心に細胞生物学的アプローチで進めた。以下をもとに、膵β細胞の顆粒におけるChol分布と分泌関連蛋白質の局在に対する相関を解析した。

- (1) **細胞膜Chol分布とISの相関の解析** 予備実験から顆粒が細胞膜内層側のCholが少ない部位から高い頻度で融合する事を明らかにした。この結果はCholの不均一な分布が制御される事がISにおいて重要になる可能性を示唆する。この分布は脂質分子が細胞膜で横方向移動するだけではなく、細胞膜外-内層間で輸送されることでも制御される可能性も考えられた。そのため、平面的な分布だけではなくChol外-内層分布の変化も調査し、Cholと関連蛋白質の分布の相関を解析した。
- (2) **細胞膜Cholの分泌関連蛋白質の制御** Chol量を変化させる方法（減少法＝①Methyl-β-Cyclodextrin(MβCD)処理、②Chol輸送阻害剤処理、増加法＝③MβCD-Chol複合体処理）を行い、細胞膜Cholと関連蛋白質の分布の変化及び分泌への影響を観察した。
- (3) **ABC輸送体のChol分布やISへの機能の解析** 細胞膜Chol外-内層分布の変化を引き起こすABCトランスポーターABCA1の機能に着目した。RNA干渉法によりABCA1をノックダウン(KD)し、細胞膜の関連蛋白質の分布及び分泌への影響を観察した。

実験には膵β細胞株MIN-6細胞を用いた。主要な関連蛋白質の観察は固定細胞では免疫染色にて、生細胞ではadeno virusでは蛍光蛋白質融合体を発現させて可視化し、共焦点顕微鏡にて撮影した。顆粒融合の過程は、細胞膜近傍の観察を可能とする全反射蛍光顕微鏡を用いたライブイメージングで観察した。所属研究室では、この顆粒融合可視化技術により分泌を担う顆粒の融合様式を特定している。この顆粒融合可視化法と結合性蛋白質プローブによる観察(Perfingolysin O domain4、Cholプローブ＝細胞膜内層は蛍光蛋白質融合体を細胞内発現、外層は同様の精製タンパク質)を組み合わせた同時観察法を用いた。顕微鏡画像はImageJによる定量的解析した。

3. 研究の特色

- (1) IS研究において数少ないChol観察技術による機能解析である。
脂質分子の存在量を特定する生化学的手法によりISにおけるCholの関与は示唆されるが、

作用機序は未解明である。申請者はこの解明には脂質分子の位置情報を特定し分布の観点から解析する必要があると考え同時観察法を確立した。

(2) **細胞膜表裏（外層と内層）における脂質の観察。**

Cholが細胞膜上で①不均一なドメイン構造を形成する事、②細胞膜外-内層で分布が異なる事、③顆粒や関連タンパク質はChol分布と逆相関して分布している事を明らかにした。本研究は顆粒融合過程での細胞膜Cholの存在の重要性に加え、細胞膜外-内層のChol分布のバランスが、その機能を調節する可能性を示す新しい知見となり、詳細な作用機序を解明する上で大きく貢献しうる。

4. 研究の成果

- (1) Chol可視化を同時に行った融合過程の観察から、細胞膜内層ではCholが少ない領域から高頻度で顆粒が融合する事を明らかにした。また、顆粒融合を制御するSyntaxin-1のクラスターの局在も、Cholが少ない領域に多く局在した。さらに、これらの蛋白質はCholが多い領域には存在せず、その領域の近傍に隣接していた。
- (2) Cholが減少する処理を行った場合(M β CD処理等)、細胞膜Cholは劇的に減少するが、それと相関して顆粒及びSyntaxin-1クラスターの局在が減少した。また、それに伴い顆粒融合が低下した。一方、Cholの量を増加させた場合(M β CD-Chol複合体処理)は、細胞膜でのCholは増大したが、局在の変化はなかった。
- (3) RNA干渉法によりABCA1をKDした場合、Cholの外層の分布量が減り、内層側に分布が偏っていた。また、ブドウ糖刺激でバッチ実験を行ったところ、KDにより顆粒融合の低下が確認された。さらに分泌様式の解析では、ABCA1のKDによる顆粒の融合は低下したことから、融合の際に受け側となる細胞膜内層のCholの量だけではなく、分布が影響しうる可能性が考えられた。この結果と相関して、ABCA1のKDによりSyntaxin-1のクラスターの減少が確認された。

以上の結果から細胞膜におけるChol量に加えてChol外-内層分布のバランスが、関連因子の分布や顆粒融合の制御に関わる可能性が確認された。引き続き詳細な機構を解析する予定である。

微生物由来金属酸化物から着想を得た非晶質鉄酸化物ナノ多孔体の作製と応用

工学院大学 先進工学部 橋本 英樹

1. 研究の目的

申請者はこれまでに微生物が創り出した鉄酸化物ナノ材料の構造解析と機能性材料への応用に関する研究を行ってきた。その結果、微生物由来鉄酸化物は①非晶質物質で、②最小構成一次粒子が3 nmで、③それらが繋がることで数十nmの繊維状二次構造体が形づくられ、④それらが更に重なり合うことで最終的に直径約1 μm のチューブ状三次構造体を形成していることを明らかにした。更にこの物質が、リチウムイオン電池電極材料、高彩度赤色顔料、高効率触媒等として優れた機能を示すことを見出した。また、この物質の原子配列を模した材料を作製しリチウムイオン電池の電極として評価したところ、人工的に合成した酸化鉄を凌ぐ特性を示すことも明らかにした。しかし、微生物由来鉄酸化物の高度に制御されたナノ構造と高次構造を人工的に模倣するには至っていない。ナノ構造・高次構造を制御することで新機能の発現や更なる特性の向上が期待される。そこで本申請では、微生物由来鉄酸化物の原子配列を模した鉄酸化物ナノ材料を基盤として、これを用いて3次元多孔質構造体を作製することを目的とした。更に得られた構造体を電極として水分解光触媒としての可能性を探索する。

2. 研究の計画・方法

図1に研究方法の模式図を示す。①微生物由来鉄酸化物の原子配列を模した鉄酸化物ナノ粒子ゲルを合成する。②ポリスチレン（PS）微粒子の自己組織化によりオパール構造を作製する。③オパール構造の隙間に鉄酸化物ゲルを流し込みPS粒子を除去し、鉄酸化物ナノ粒子の3次元多孔質構造（インバースオパール構造）を作製する。④得られた構造体を電極として水分解の光触媒としての機能を評価する。

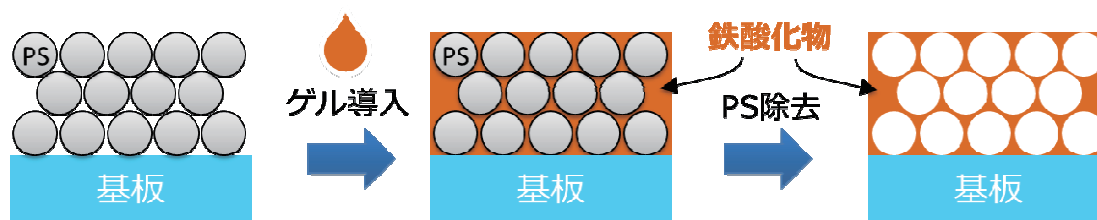


図1 PSの自己組織化→鉄酸化物ゲル導入→PS除去→鉄酸化物3D構造体。

3. 研究の特色

人類の今後の存続と発展を決定づけるエネルギー、資源、食糧、水に関わる多くの問題を解決するには、従来の常識に捕らわれずに新たな発想で新材料を創出することが重要である。申請者は、自然界に生息し代謝のために鉄酸化物やマンガン酸化物を人知れず生産する細菌に注目し、その産物を解析し応用してきた。細菌由来の金属酸化物は材料科学の分野では全く着目されていなかったが、その中には実に興味深い化学が詰まっており、この材料は人工物では実現できないようなリチウムイオン電池の特性を示すなど驚くべき機能を示した。このような自然由来の材料をヒントに新しい材料を創出することは、材料科学に新たなブレークスルーをもたらすと確信している。申請者は、微生物由来鉄酸化物の原子配列を模した鉄酸化物の合成を基盤として、これにナノ構造・高次構造を付与し新しい材料を開発する。合成した材料を太陽光を利用したエネルギー獲得の触媒として利用することで、エネルギー問題に貢献する。

4. 研究の成果

アセトン脱脂したITOガラス板にシリコン製Oリング（ ϕ 5.8 mm）を載せ、ポリスチレン（PS、粒子径： ϕ 0.5 μ m、 ϕ 1 μ m、 ϕ 3 μ m）懸濁液を滴下し、湿度95 %以上の容器内で1週間乾燥させた。その後、作製したオパール試料に水酸化鉄懸濁液を滴下し、真空排気することで水酸化鉄懸濁液をオパール構造内の間隙に充填し、溶媒が完全に乾燥するまで排気し続けた。その後、300 $^{\circ}$ Cで3時間加熱した。また、PS懸濁液と水酸化鉄懸濁液の混合液を用い同様にインバースオパールの作製を検討した。作製した試料の構造を走査型電子顕微鏡（SEM）により評価した。図2にオパール構造へ水酸化鉄を充填させた後、200 $^{\circ}$ Cで加熱することで鋳型としたPSを除去した後の構造体のSEM像を示す。PSでオパール構造を作製して水酸化鉄を充填したところ、試料表面の微細構造によりロータス効果が現れ、水酸化鉄が鋳型に充填されにくかった。一方、PSと水酸化鉄の混合懸濁液で複合体を作製した結果、充填度は改善されたが、PSより先に基板上に沈降した水酸化鉄粒子によりオパール構造の周期が乱れ、規則構造が得られにくかった。PSオパール構造を鋳型にした方法でも、PSと水酸化鉄の混合懸濁液を用いる方法でも、PS粒子径が大きいほど規則的な構造が形成されており、インバースオパール構造の製作難度はPS粒子径に依存した。これは水酸化鉄懸濁液の充填時にPS粒子自体の重さによりオパール構造を作っている粒子が固定されたことと、間隙が大きくなることで水酸化鉄懸濁液が浸入しやすくなったためと考えられる。また、300 $^{\circ}$ Cで加熱してPSを除去した水酸化鉄試料も作製した。300 $^{\circ}$ Cで加熱した試料の外観写真を図3左に示す。300 $^{\circ}$ Cで加熱した試料は赤みがかっており、水酸化鉄が α - Fe_2O_3 に変化したと考えられる。300 $^{\circ}$ Cで加熱した酸化鉄試料の表面と断面のSEM像を図3a、bに示す。 α - Fe_2O_3 に変化したことで骨格が収縮し、インバースオパール構造の周期が縮小した。断面を観察すると捲れ上がっている箇所も存在するが、本研究目的である多孔質構造の酸化鉄骨格インバースオパールの作製を確認した。作製した試料を電極として、水の電気分解の電位の測定を試みたが、測定中に試料が基板から剥がれ落ちたため評価することができなかった。この材料を電極として評価する際には、今後、作製した酸化鉄構造体と基盤との密着性の改善や酸化鉄自体の濡れ性の向上が求められる。

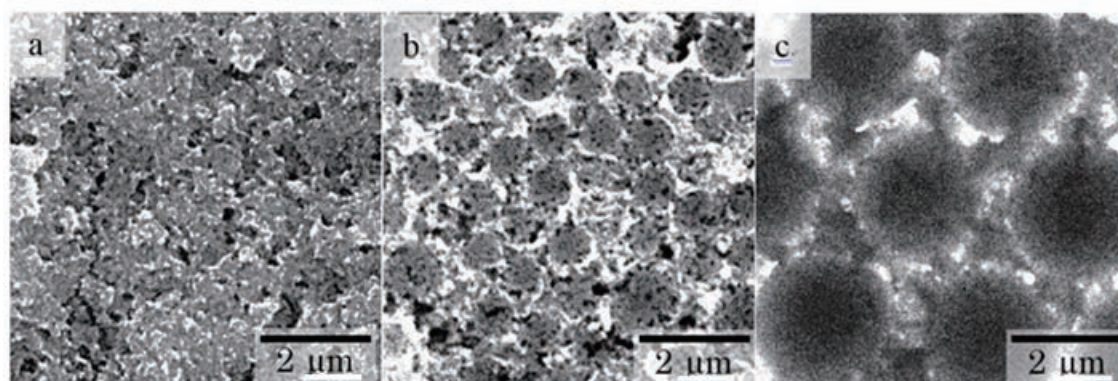


図2 オパール構造を鋳型にしたインバースオパール構造水酸化鉄のSEM像。

(a) PS粒子径 ϕ 0.5 μ m、(b) ϕ 1 μ m、(c) ϕ 3 μ m。

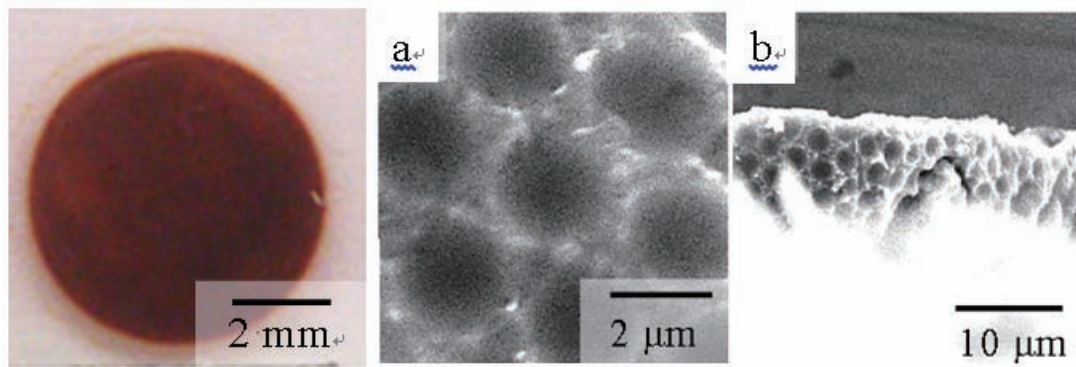


図3 左の写真は300 °Cの加熱で α -Fe₂O₃に変化した試料の外観写真。(a)PS粒子径 ϕ 3 μmを用いて作製したインバースオパール構造の表面SEM像。(b)断面SEM像。

生理学的・バイオメカニクスの観点から解明する筋硬度の意義

芝浦工業大学 システム理工学部 赤木 亮太

1. 研究の目的

近年開発された超音波エラストグラフィにより定量可能な筋硬度は、筋の状態の客観的な評価指標であり、“筋が柔らかい＝筋の状態が良好である”という考えに基づいて研究がなされている。しかしながら、筋硬度と筋機能や身体運動との関連性については検討されていない。一方、筋硬度は、筋の剛性率やヤング率で表されるものであり、筋の機械的性質を表す指標ともいえる。すなわち、バイオメカニクスの観点から筋硬度に着目することにより、ヒトの筋を材料として捉えた際の特性を評価することが可能となる。筋収縮の目的が関節運動ひいては身体運動を引き起こすことであることから、筋の材料特性が筋機能や身体運動にどのように貢献するのかを明らかにすることは、材料としての筋を評価するうえで不可欠である。特に、材料としての筋が疲労の蓄積により劣化（経年劣化）することを踏まえれば、年齢が筋硬度に及ぼす影響を加味して、筋機能や身体運動との関連性を明らかにすることは重要である。以上のことから、筋硬度と筋機能との関連性の検討を通じて、筋硬度の意義を生理学的及びバイオメカニクスの観点から明らかにしていくことを本研究の目的とした。

2. 研究の計画・方法

(1) 足関節底屈筋群を対象とした実験

被験者は、健常な若年（20～30歳）男性20名及び女性20名、健常な高齢（66～81歳）男性19名及び女性14名であった。下腿長近位30%部位における足関節底屈筋群の筋厚及びせん断波伝搬速度を、超音波診断装置及び搭載されているエラストグラフィ機能を用いて測定した。筋厚及び下腿長から当該筋群の筋体積を推定し、筋サイズの指標とした。また、変換式を用いて、せん断波伝搬速度から筋の剛性率を算出し、筋硬度の指標とした。筋機能として、数秒間の最大随意収縮による等尺性筋力及び電気刺激によって算出した随意的動員度を加味した最大筋力の2種類を評価した。

(2) 膝関節伸展筋群を対象とした実験

被験者は、健常な若年（20～30歳）男性27名及び女性19名であった。測定部位は大腿長近位50%とした。測定項目は、(1)と同様に、筋厚及び大腿長から推定した筋体積、せん断波伝搬速度から算出した筋の剛性率、等尺性筋力及び最大筋力であった。

3. 研究の特色

(1) “超音波エラストグラフィ法による筋硬度評価”というテーマの新規性

研究代表者がこれまで実施してきた、超音波エラストグラフィ法を用いた筋硬度に関する数多くの研究成果は、スポーツ科学や生理学、医学分野において、世界的に著名な国際学術誌に多数掲載されている。そして、上記の研究に追従する形で、ここ数年で超音波エラストグラフィ法を用いた研究が世界中で盛んになってきた。このように、超音波エラストグラフィ法を用いた筋硬度評価自体が、独創性・新規性に富んだものである。

(2) 筋硬度の筋機能への貢献を生理学的・バイオメカニクスの観点から検証する独創的アプローチ

本研究では、筋硬度を“筋の状態の客観的な評価指標”及び“材料としての筋の機械的性質”の2つの観点から捉える。すなわち、筋硬度が筋機能に果たす貢献について生理学的・バイオメカニクスの観点の双方から検証することで、筋硬度の意義を明らかにする。これは、これまで世界中で実施された筋硬度に関する研究とは一線を画する独創的なアプローチであり、スポーツ科学を専門とする傍ら、工学系大学において材料に関する専門科目（材料力学／生体材料学）を担当し

ている申請者だからこそ実施可能な研究といえる。

（3）ヒトの身体運動のメカニズム解明への寄与

筋硬度（筋の状態）を加味することにより、筋機能に対する理解をより深化させることができるため、本研究で得られる知見はヒトの身体運動のメカニズム解明に寄与する。

4. 研究の成果

筋体積と筋機能の関係は、いずれの場合も有意であった。しかしながら、筋の剛性率は、両筋群において、筋機能と有意な相関を示さなかった。また、筋体積及び筋の剛性率を独立変数、筋機能（等尺性筋力あるいは最大筋力）を従属変数として、ステップワイズ法による重回帰分析を行ったところ、単回帰分析の時と同様に、筋の剛性率は有意な説明変数として選択されなかった。

本研究の結果を踏まえ、生理学的観点に基づいた“筋が柔らかい＝筋の状態が良好である”という考えについて再検討する。今回は、個人間の違いに着目した研究であったが、筋の状態が筋機能に及ぼす影響については、個人内の変動を見ることによって、より鮮明にできる可能性がある。今後、この点を解決することにより、筋硬度の生理学的意義について正確に議論したい。一方、バイオメカニクスの観点に基づき、筋硬度の年齢差から見た“材料としての経年劣化”については、先行研究においても意見が一致しておらず、現時点で結論を出すことは難しい。今回、過去/現在の運動習慣の把握自体はできたものの、それらを考慮して議論できるほど、被験者数を確保できなかったため、今後被験者をさらに増やすことで、これらの点について議論を深めたい。

炎症性骨破壊に対するデノスマブの作用機序解明

昭和大学 歯学部 唐川 亜希子

1. 研究の目的

慢性歯周炎は細菌感染により惹起され、歯周組織の炎症と歯槽骨破壊に伴う歯牙欠損を生じる疾患である。歯周病の治療薬にはミノサイクリン塩酸塩軟膏や、エナメルマトリックス蛋白エムドゲインなどが用いられているが、歯槽骨に直接作用する歯周病治療薬はまだ開発されていない。

骨吸収抑制薬デノスマブ（抗RANKL抗体）は、破骨細胞の分化誘導因子RANKLの破骨細胞前駆細胞への結合を阻害して破骨細胞分化を抑制する完全ヒト型抗RANKLモノクローナル抗体であり、2012年に本邦で認可された。申請者らはこの新規骨吸収抑制薬デノスマブ（抗RANKL抗体）の、炎症性骨破壊に及ぼす影響の解明および歯周疾患局所治療薬としての適応拡大の検討を目的として本研究を行った。

2. 研究の計画・方法

デノスマブはマウスのRANKLに結合しないため、全く同じ薬理作用を持つ抗マウスRANKL抗体（OYC1、オリエンタル酵母社製）を使用した。

(1) 正常歯槽骨における抗RANKL抗体の作用解析

雄性C57BL/6マウス（5-10週齢）の上顎第一臼歯近心骨膜下に、3mg/kgの抗RANKL抗体を投与し、1週間後に μ CTにて上顎歯槽骨の解析を行った。

(2) 炎症性骨破壊モデルマウスにおける抗RANKL抗体の局所作用の解析

①炎症性骨破壊モデルマウス作成

マウス頭蓋冠骨膜下にLPS（リポ多糖、25mg/kg/ml）を投与し局所炎症を誘発した。LPSの基剤には精製水もしくはコラーゲンを、薬剤滞留時間が局所に及ぼす影響を検討した。

②骨吸収抑制薬投与

LPS投与1日後の同部位に、抗RANKL抗体（3mg/kg）、ゾレドロネート（ビスホスホネート製剤として比較検討に使用、2mg/kg）もしくは生理食塩水を骨膜下注射にて局所投与し、炎症性骨破壊に対する抑制効果を探した。基剤には生理食塩水またはコラーゲンをを用いた。

③局所作用の解明

LPS投与5日後に頭蓋冠を採取し、 μ CTおよび組織切片にて解析を行った。

④全身作用の解明

マウス腹腔内に抗RANKL抗体を投与すると脛骨骨端部の海綿骨骨密度が増加することから、頭蓋冠への局所投与時の全身作用についても検討を行った。LPS投与5日後に大腿骨・脛骨を採取し、 μ CTおよび組織切片を用いて解析を行った。

(3) 局所投与至適濃度・投与間隔の検索

骨粗鬆症治療時のデノスマブの投与間隔は1回投与を6か月毎であり、適切な投与間隔・期間が歯周病治療時の成否を左右すると考えられる。そこで、マウス体内にプログラマブル・マイクロインフュージョンポンプ（iPRECIO SMP-300、プライムテック社製）を埋入し、パソコンによるプログラム制御下で抗RANKL抗体の投与間隔・期間の変化が及ぼす影響を検討した。

3. 研究の特色

現在用いられている骨吸収抑制薬は全身を標的としており、局所炎症に対しての有用性は不明である。また抗RANKL抗体は、従来の骨吸収抑制薬であるビスホスホネート製剤とは異なる作用部位を持ち、強い骨吸収抑制作用を示すことから、将来的に歯周病への応用が期待される。本研究では、抗RANKL抗体デノスマブの炎症性骨破壊への作用機序を解析することで、歯周病治療薬としての新たなアプローチについて検討した。

本研究の特色として以下の2点が挙げられる。

- (1) 実験モデルに炎症性骨破壊モデルを使用した。従来の歯周病実験には過負荷な機械的刺激により急性炎症を惹起したモデルで実験が行われてきたが、本研究ではLPSの局所投与により、慢性歯周病の原因菌による歯槽骨破壊機序を再現した。また、コラーゲンをを用いて炎症性物質や薬剤を投与部位に長時間滞留させ、局所作用を詳細に解析した。
- (2) 抗RANKL抗体の至適濃度および投与間隔の検討のため、マイクロインフュージョンポンプを用いた検討を行った。抗RANKL抗体による全身治療では投与間隔や濃度が効果に影響を及ぼすことが知られており、局所使用における至適な投与間隔について、パソコンによるプログラム制御下での検討を試みた。

4. 研究の成果

- (1) 正常歯槽骨における抗RANKL抗体の作用解析

マウス正常歯槽骨への抗RANKL抗体投与後の μ CT像を対照群と比較したところ、抗RANKL抗体投与群と対照群に差は認めなかった。この時、大腿骨骨端部の骨量は増加したため、抗RANKL抗体が歯槽骨内に留まることなく全身作用を生じている可能性が考えられた。歯槽骨は骨組織のなかでも多孔性であり薬剤の血中移行が早いことから、歯槽骨に影響が認められなかった可能性が考えられるため、現在は歯槽骨への抗RANKL抗体の投与方法および解析法について検討を行っている。

- (2) 炎症性骨破壊モデルマウスにおける抗RANKL抗体局所作用の解析

LPS投与5日後、対照群では μ CT像にて頭蓋骨の骨吸収が認められ、組織切片のTRAP染色にて破骨細胞は増加した。抗RANKL抗体もしくはゾレドロネートの投与により骨吸収は抑制され、破骨細胞数も減少した。また、コラーゲンを基剤とした実験群では炎症の波及速度が低下し骨吸収も軽微となったが、この時骨吸収抑制薬を投与すると骨破壊が抑制された。いずれの群でも抗RANKL抗体およびゾレドロネート投与下での大腿骨量への影響は見られなかった。従って、頭蓋骨骨膜下に抗RANKL抗体を投与する本実験系は局所の慢性炎症性骨吸収モデルとして応用できること、また抗RANKL抗体およびゾレドロネートの局所投与は全身に影響を及ぼさないことが明らかになった。

骨吸収抑制薬の局所投与が細胞レベルで全身に及ぼす影響を確認するため、投薬後のマウスから骨髓細胞を採取した。今後セルソーティングなどにより細胞レベルでの研究を遂行する予定である。

- (3) 局所投与至適濃度・投与間隔の検索

マイクロインフュージョンポンプを用いて、週1回、4週間連続で抗RANKL抗体およびゾレドロネートを腹腔内に投与すると、大腿骨および脛骨は大理石骨病様を示した（予備実験）。現在ポンプはマウス背部に埋入し先端のみを目的とする腔などに誘導しているが、頭部への先端の埋入については検討例がないため、手技の取得と妥当性の確認を行っている。手技確立後に投与間隔の検討を行う予定である。

炎症性骨破壊に対するデノスマブの作用機序解明のため、（1）－（3）の検討を今後も継続する。

競合企業の参入が企業の価格と利潤に及ぼす影響について

昭和女子大学 グローバルビジネス学部 山田 麻以

1. 研究の目的

本研究の目的は、競合企業の参入により現存企業の価格と利潤が増加しうることを、ゲーム理論の枠組みの中で企業の戦略的行動を定式化し、理論分析により示すことである。

一般的に競合企業が参入すると現存企業の価格と利潤が低下することが知られており、ゲーム理論による分析でもこのことは証明されている。しかし、近年の実証分析（Ward et al. [2002], Frank and Salkever [1997], Pauwels and Srinivasan [2004]）では、小売業などの様々な産業で競合企業の参入により価格や利潤の上昇が生じたことが示されている。本研究は、現実で観察されたこのような実証分析の結果が、どのようなメカニズムによって引き起こされるのかを、川上企業と川下企業との垂直取引構造や企業間の技術といった要因に着目して明らかにする。

競合企業の参入により現存企業の価格や利潤が上昇するメカニズムを示すことは、企業活動や競争政策の観点から有用性がある（松島[2013]）。企業側からすれば、現存企業が競合相手の参入により自社の利潤が損なわれると考えているのであれば、競合企業の参入を阻止するだけでなく、独占を維持するためのロビー活動による訴えなどで費用がかかることにもなる。しかし、競合企業の参入というのはむしろ自社の価格と利潤を増加させうることを企業が知れば、その余計な費用を削減できる。また、競争政策の観点からも、競合企業の参入を促進した結果、現存企業の製品価格が上昇して消費者の厚生を損なうことになれば、競争政策が本来達成すべき消費者の厚生改善ができなくなるので、競合企業の参入の促進により価格が上昇する市場メカニズムが存在することを明示することは政府にとっても有益である。

2. 研究の計画・方法

本研究は、競合企業の参入が現存企業の価格と利潤を増加させるという実証分析による結果が生じたメカニズムをゲーム理論の枠組みで示すものなので、まずゲーム理論による既存研究のサーベイを行ったうえで、数理モデルの構築を行う。

(1) 既存研究のサーベイ（2016年4月～5月）

企業数と現存企業の利潤に関する研究のサーベイを行う。競合相手の参入が現存企業の価格や利潤を増やしうることを理論的に示した先行研究（Rosental [1980]、Pal and Sarkar [2001]、Inderst [2002]、Davis et al. [2004]、Chen and Riordan [2007, 2008]、Coughlan and Soberman [2005]、Ishibashi and Matsushima [2009]）では、製品が消費者の好みの意味で差別化されている状況や、品質の意味で差別化されている状況を想定しているものが多く、そのような状況では企業間の競争が緩和され価格や利潤が増加しうることを明らかにしている。

(2) 数理モデルの構築（2016年6月～7月）

競合企業の参入により現存企業の価格と利潤が増加するような数理モデルの構築を行う。この際、川上企業と川下企業の垂直取引構造と企業間の技術格差を取り入れることに加えて、現存企業の戦略的行動には既存の研究（販売量、数量、投資、水平的・垂直的製品差別化）にはないものを取り入れることを試みる。

(3) 数理モデルの修正と関連研究のサーベイ（2016年7月～8月）

既存の研究にはない現存企業の戦略的行動として考えられるものは、営業時間の選択である。

営業時間を戦略変数として分析した既存研究で代表的なものは Inderst and Irmen (2005) であ

る。

彼らは営業時間は差別化のツールとして有効であることを示し、価格競争が緩和されることを示した。Inderst and Irmen (2005) の数理モデルの枠組みを拡張したものとしては Shy and Stenbacka (2008), Wenzel (2010), Wenzel (2011) があり、いずれも営業時間の選択と価格競争の関係や、社会厚生への影響が分析されている。これらの既存研究を参考に数理モデルを修正する。

(4) 研究会への参加（2016 年 8 月～9 月）

信州大学での産業組織・競争政策研究会や沖縄国際大学での経済研究セミナーに参加し、企業間競争に関する新たな知見を得る。

(5) 数理モデルの分析（2016 年 10 月～3 月）

研究会で得た新たな知見を取り入れた数理モデルを再構築する。市場を小売業による寡占競争として市場環境を設定し、営業時間と価格を戦略変数とした数理モデルを解いて小売業による最適な営業時間や価格を導出する。解析的に解けない場合には計算ソフト mathematica を購入し、数値計算によって分析を行う。

3. 研究の特色

本研究の特色は、価格と営業時間を小売業の戦略変数として扱い、現存の小売業が新規の小売業の参入を阻止ができるような（つまり市場の独占）価格と営業時間を設定するか、参入を容認するような（この場合、市場での企業数が増える）価格と営業時間を設定するかのどちらが現存の小売業の利潤を高めるかを調べる点にある。また、現存の小売業が新規の小売業を容認して市場での企業数が増える場合に価格が上昇するかどうかについても調べている。

4. 研究の成果

(1) 数理モデルの基本設定

現存の小売業と新規の小売業の 2 つが存在するとする。現存企業は新規企業の参入を阻止するか容認するかの選択肢をもつ。また現存の小売業と新規の小売業は営業時間と価格を戦略変数としてもつ。現存の小売業は営業時間に応じて労働者を雇い、その全ての労働者と終身雇用契約を結ぶ。つまり、労働費用が固定費用（サンクコスト）となる。

(2) ゲーム構造

ゲームは下記の 3 段階ゲームとし、バックワードインダクションによりゲームを解く。

Stage 1 : 現存企業と独占の川上企業が契約する。

Stage 2 : 現存企業は終身雇用契約を結び、営業時間と価格を同時に決定する。

この時の現存企業の行動は「参入阻止の営業時間」参入容認の営業時間

Stage 3 : 企業 E が市場に参入するかどうかを決める。参入する場合は営業時間と価格を同時に決定する。

(3) 分析結果

現存の小売店にとって新規の小売店の参入を阻止するような価格と営業時間を設定して市場で独占となる方が利潤が高いか、それとも参入を容認するような価格と営業時間を設定して市場で

競争する方が利潤が高いかについて調べる。結果、消費者の持つ移動コストのパラメータが十分に低い場合には、価格も参入を容認する方が（市場における企業数が多い方が）高くなり競争が緩和されることがわかった。また営業時間という戦略変数は先行研究にあるような競合他社との製品差別化ツールとしてだけでなく、参入阻止のツールとしても使えるということも示唆された。

（4）課題

本研究で得られた営業時間が参入阻止のツールとして使えるという示唆は、営業時間の既存研究だけでなく参入阻止の既存研究にもないまったく新しい視点なので今後も続けたい。また今回はパラメータの数が多く分析で得られた解が煩雑となったので数値例による確認までしかできなかったが、今後はより解析的な分析を行いたい。分析の結果は、沖縄国際大学の研究セミナーなどで報告予定である。

「集団自決」訴訟における宮平秀幸証言の再検討 —矛盾する語りにみる「沖縄差別」の認識—

専修大学 人間科学部 服部あさこ

1. 研究の目的

- (1) 歴史の証言者としては一見、虚言を弄する者に見える証言者が、複数の証言活動を通じて実は、「事実を証言した」とされる人々と同様、ヤマト（本土）による沖縄の被害を伝えていたことを、インタビューの構築主義的アプローチによって明らかにする。

太平洋戦争末期、日本の民間人が生活していた複数の場所で生じた「集団自決」は、皇民化教育による殉国精神の内面化や、民間人と親しく交流していた日本兵から、敵国の捕虜となった際にどれほど残虐な扱いを受けるかを聞かされていたためなど、状況に強いられたものであることはすでに指摘されている。しかしながら、隊長による自決命令はなかったとする、控訴審における宮平秀幸氏の証言は、日本の沖縄に対する加害性を否定する立場の人々に今日に至っても利用されている。

とはいえ、裁判の証人として宮平氏が語ったことは、彼の認識の一部にすぎない。他の場での証言活動を行ってきた宮平氏の語りをもとに、その認識を全体的に理解すれば、宮平氏もまた、「集団自決」が、日本社会が沖縄を下位に置いていた結果の状況に強いられたものであることを伝えていることが読み取れる。本研究は、宮平氏の複数の語りをもとに、日本の加害性を否定するかに見える証言者もまた、沖縄差別を告発していたことを明らかにするものである。

2. 研究の計画・方法

(1) 資料の提示

- ①「集団自決」訴訟における宮平氏の証言に対して言及された雑誌・新聞記事において、宮平氏が“事実性に疑いのある証言をした人”として取り扱われていることを確認した。
- ②座間味村民の証言資料、手記、座間味村の史資料を参照した。座間味島の集団自決に関して、すでに“事実”として流通しているストーリーが存在し、それが“実際の出来事”としては宮平氏の証言と異なることを確認した。
- ③上述②に関連して、“事実”として流通する証言をした人々の心情について語られた資料を参照した。事実としての被害はあった一方で、座間味村民が、駐留の日本兵には恨みを抱いておらず、むしろ親愛の情を表明していたことが確認された。

(2) 現地調査

- ①宮平氏の遺族の方々に、内容に大きな過誤がないことを確認し、公表の許可を頂いた。
- ②個人で集団自決に関する史資料を収集し研究している人物に協力していただいた。収集されている資料の提示、証言に登場する場所の案内などを受けた。
- ③村史などの史資料に証言が掲載されておらず、裁判当時も証言者とならなかった人物に会い、インタビューを行った。

(3) インタビュー資料の分析

宮平氏へのインタビューをライフストーリーとして編集し、氏が事実として語った内容を整理する。ついで、当時を振り返って語られた心情などから、流通している“事実”と異なる語りが生まれるに至った心境を描き出した。

3. 研究の特色

(1) 見過ごされてきた証言資料の価値を見出す

歴史的事実を争う証言としては虚偽、すなわち無意味なものとしてとらえられてきた証言について、社会学的には十分な意義のあるものであることを明らかにした。これは「なにが」語られたかではなく、「なぜ」語られたかを理解する構築主義的な分析によって可能になるものである。

(2) 沖縄の離島からみた本島の連続性を示す

すべてのマイノリティがそうであるように、沖縄もまた均質な一枚岩の集団ではない。本島住民が離島出身者に差別的まなざしを向けていることは沖縄研究においてしばしば言及されることである。しかしながら、戦争の被害経験という点においては、日本社会から等しく差別的扱いをされていた存在として共通点が見いだせることを明らかにした。これは、沖縄県内の人々の多様性を超えて沖縄が一つの集団として団結していける可能性を示すものである。

4. 研究の成果

(1) 学会報告

2016年9月、第32回日本解放社会学会大会において、「軍国少年の記憶と沖縄差別の認識——『集団自決』訴訟における軍命否定証言の背景——」の題目で報告を行った。証言者へのインタビュー資料について構築主義アプローチによる解釈を提示し、沖縄差別問題研究において、一般的にはもう過去のものになっている証言が、県住民当事者の認識を表すものとして資料的価値があることを指摘した。

(2) 論文

①2016年11月発行の『専修人文論集』第99号掲載の、「軍国少年の記憶と沖縄差別の認識：沖縄戦『集団自決』訴訟におけるある証言者のライフストーリーから」を執筆した。本稿では、戦後日本の変化を経験した証言者が、軍国少年として沖縄戦を生きた過去を参照する語りに特に注目し、座間味島の集団自決について、日本政府の沖縄への差別的扱いに起因するものとする認識を指摘した。これは上述の4-(1)と同様、沖縄差別問題の一部として集団自決問題を位置付けられることを示すものである。

②2017年3月発行の『専修大学人間科学論集社会学篇』第7巻第2号掲載の「『集団自決』訴訟における軍命否定証言の背景」を執筆した。本稿では、証言者についてホリスティックなライフストーリーを紹介し、裁判当時マスメディアに興味本位で取り上げられてきた証言者について、言説行為そのものの意味づけ——もっと日常的な表現をすれば、“なぜそんな証言をしたのか”——を説得的に示した。これはインタビュー資料について、“何が語られたか”ではなく“なぜ語られたか”を理解する構築主義的アプローチが、埋もれてきた資料に社会学的な意義を付与することを示した点で、社会学の生活史研究における資料解釈の方法論の一角を傍証する研究となったと認識している。

金-パラジウムナノ粒子を固定化した ヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの研究

創価大学 理工学部 細木 藍

1. 研究の目的

近年、太陽光や風力といった再生可能エネルギーなどを利用した、クリーンなエネルギーシステムが求められており、そのエネルギーキャリアとして水素が注目されている。今後、燃料電池システムの普及に伴い、水素の需要は大きく増加することが予想される。しかし、水素は漏洩しやすく、着火エネルギーの小さな可燃性ガスであるため、水素ガスの漏洩を、安全に素早く検知可能なセンサデバイスが求められている。光ファイバによる水素センサは、小型、軽量であるといった利点に加え、センサ部に電氣的接点を有さないため、爆発危険性の高い環境下での利用が比較的容易に実現できるという特徴を有するため、実用的なセンサとして期待されている。

研究報告者は、機械的強度に優れ、容易にエバネッセント波を生じさせることができるヘテロコア光ファイバセンサを用いて、安定したマルチモード伝送が行える近赤外光領域850nmで動作するヘテロコア光ファイバ水素SPRセンサの研究を行ってきた。本研究では、新たに金ナノ粒子（AuNP）とパラジウムナノ粒子（PdNP）を組み合わせ、局在型表面プラズモン共鳴（LSPR）水素センサの構築を目的とする。具体的には、AuNPとPdNPをセンサ部周囲に固定化し、水素吸蔵による誘電率の変化を捉えるLSPR水素センサを試作し、その応答性を評価する。

2. 研究の計画・方法

(1) AuPdPとPdNPを固定化したヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの試作と評価

ヘテロコア光ファイバはコア径50 μm のマルチモード光ファイバの途中に長さ15mmのシングルモード光ファイバを挿入・融着によって作製する。ヘテロコア部周囲を3-aminopropyltrimethoxysilaneを用いて処理することでアミノ基を導入し、負に帯電したAuNP懸濁液に浸すことによってAuNPを固定化する。その後、ポリアリルアミン溶液に浸し、PdNP懸濁液に浸漬してPdNPを固定化することで、ヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの作製を行う。これらの作製したセンサにおいて、AuNPにおいてLSPRを励起し、PdNPの水素吸蔵による誘電率の変化を計測可能か吸収スペクトルから確認する。また、センサの応答特性として、水素4%に対する光損失応答を取得する。

(2) 金ナノロッドを組み合わせLSPR水素センサの応答特性や感度の評価

(1) で作製したセンサでは、AuNPがLSPRを励起しているため、想定される吸収波長のピークは、波長540nm近傍であると考えられる。しかし、実用性を考慮した場合、安定したマルチモード伝送が行える波長850nm帯域での操作が可能なLSPR水素センサの実現を目指す必要がある。そこで、金ナノ粒子の形状をナノロッドに変更した場合の吸収スペクトルの測定を行い、LSPRの吸収波長を近赤外光領域へシフト可能か検討する。併せて、金ナノロッドを利用した場合の水素4%に対するセンサ感度の検討も行う。

3. 研究の特色

従来の光ファイバ水素センサでは、水素吸蔵材であるパラジウム(Pd)薄膜や貴金属触媒と酸化タングステンからなる複合膜を利用している。研究報告者も、金、五酸化タンタル、Pdの多層膜を利用したヘテロコア光ファイバSPRセンサを提案している。一方、Pdは水素の吸蔵放出を繰り返すことで、膜の表面膨張や、層の剥離などが生じる恐れがある。そのため、センサを長期間に渡って使用しようとする、検知性能、応答性能などの特性が劣化する恐れがある。先に述べた問題に対して、本研究では粒径の小さいPdNPに着目したヘテロコア光ファイバLSPR水素センサを提案する。PdNPは表面を占める原子量が多いため、水素の吸蔵・放出を素早く行えることが期待

できる。PdNPの水素吸蔵による誘電率の変化を、LSPRを利用して光ファイバで捉えた報告例は少なく、本研究によって新たなLSPR水素センサの実現が期待できる。さらに、製作が容易で機械的強度の強いヘテロコア光ファイバとナノ粒子を組み合わせることから、水素に対する感度が高く実用性に富んだ光ファイバ水素センサを実現できる。

4. 研究の成果

- (1) 図1にヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの構造を示す。この構造では、センサ部と伝送路のコア径の違いによって、伝送路を伝搬してきた光の大部分は、センサ部のクラッド層へ漏れる。この漏れた光がクラッド層と外界との境界面で全反射を起こす際に、エバネッセント波が生じる。センサ部表面にAuNPとPdNPを固定化することで、AuNPによるLSPRの励起およびPdNPの水素吸蔵によってエバネッセント波が吸収され、伝搬光強度が減少する。AuNP（粒径40nm）上にPdNP（粒径4nm、3分間浸漬）を固定化したヘテロコア光ファイバセンサの水素4%に対する吸収スペクトルを計測したところ、約540nm付近での吸収ピークが認められた。さらに、水素吸蔵時における吸収ピークの増加も確認できた。この結果から、当初の目的であったAuNPでPdNPの水素吸蔵による誘電率の変化を捉える水素センサが構築可能であることが示された。
- (2) アミノ基を導入したヘテロコア部に吸収波長のピークを808nmに持つ金ナノロッドを固定化したセンサを作製し、水中における吸収スペクトルを計測した。その結果、波長800nm付近に特徴的なLSPRの吸収ピークを観測できた。この金ナノロッド上にPdNP（粒径4nm、3分間浸漬）を固定化したセンサにおいても、水素吸蔵に伴って吸収スペクトルが変化することを確認できた。これにより、金ナノロッドといった形状や大きさの異なる粒子を用いることで、吸収波長を任意の波長に操作可能であることがわかった。
- (3) PdNPのみをヘテロコア部に固定化したセンサの感度特性も検討した。ヘテロコア部表面をポリリジン溶液に浸漬し、これをPdNP懸濁液（粒径4 nm）に30分間浸漬させることによってPdNPを固定化した。図2は、波長850nmのLED光源を用いて、水素4%に対する光損失変化を計測した結果である。図2から、水素の吸蔵・放出を鋭敏にかつ再現性よく捉えていることを確認できた。また、センサの応答時間（光損失が安定した値の10%から90%に達する時間）は約1.0秒、回復時間（光損失変化が10%から90%に達する時間）は約4.0秒を示した。これらの結果から、PdNPを利用することで応答性の早い水素センサを実現できることが示された。

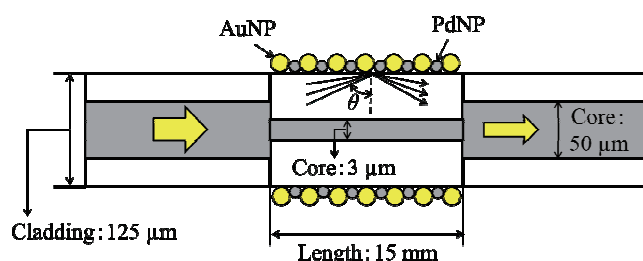


図1 AuNP/PdNPを固定化したヘテロコア光ファイバLSPR水素センサ

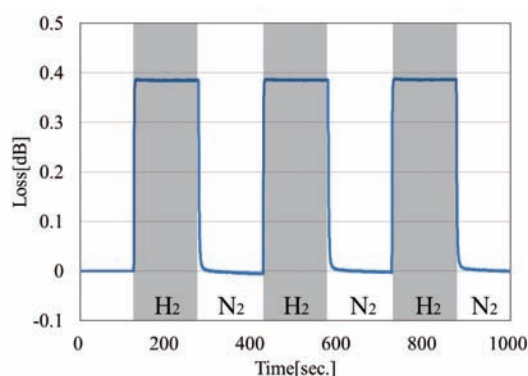


図2 PdNPを固定化したセンサの中心波長850nmLED光源による光損失応答

ヒト tRNA メチル化酵素 hTRM1 の機能および構造解析 ー 遺伝病のメカニズムの解明を目指してー

中央大学 理工学部 粟井 貴子

1. 研究の目的

近年、tRNA 修飾酵素をコードする遺伝子の変異に起因する遺伝子疾患が報告されはじめた。そのため、遺伝子疾患の診断や治療を目標に見据えた、ヒト tRNA 修飾酵素の機能解析は急務となってきた。tRNA の 26 位のグアノシンのメチル化酵素である hTRM1 [human tRNA (m²G26) methyltransferase] は、変異により知的障害を引き起こすことが報告されている。しかし、hTRM1 の変異によってどのようなメカニズムで知的障害が引き起こされるのかは全くわかっていない。本申請は 1 年間という限られた期間であるので、hTRM1 の生化学的機能解析を行うことにより、hTRM1 の変異に起因する知的障害のメカニズムの解明の手がかりをつかむことを目的とした。

2. 研究の計画・方法

hTRM1 の生化学的機能解析を行ない、hTRM1 の基本的性質を理解することを目指した。

(1) hTRM1 の発現系の構築及び精製法の確立、メチル化活性の確認

hTRM1 をコードする *htrm1* 遺伝子が大腸菌のコドン使用頻度に最適化した配列に、精製のための HAT-tag、可溶化のための Nus-tag 配列をつなぎ、プラスミド pGEX-6P-1 に挿入し、組み換え hTRM1 発現プラスミドを作成した。大腸菌 Rosetta gami B 株を、作成したプラスミドで形質転換し、組み換え hTRM1 の発現を行った。発現した hTRM1 は、Ni-NTA アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。ヒト tRNA^{Tyr} は、生体内で 26 位のグアノシンにメチル基を持つことが知られているため、hTRM1 によりメチル化されることが予想される。そのため、ヒト tRNA^{Tyr} を試験管内で作成し、精製した hTRM1 のメチル化活性の確認を行った。メチル化活性の確認は、放射線標識されたメチル基供与体 (14C-S-Adenosyl-L-methionine) を用いて、メチル基の tRNA への転移量の計測によって行なった。

(2) 修飾部位の決定

hTRM1 のホモログである真正細菌 *Aquifex aeolicus* Trm1 は、26 位のグアノシンだけでなく、27位のグアノシンもメチル化することがわかっている。27 位がメチル化されている tRNA は、これまでに、*Aquifex aeolicus* tRNA^{Cys}、ウシ tRNA^{Tyr}、ヒト tRNA^{Tyr} しか報告されておらず、ウシとヒトでは、その修飾酵素は発見されていない。そのため、ヒトでも hTRM1 が 27 位をメチル化している可能性が考えられる。そのため、hTRM1 による tRNA のメチル化部位を調べた。ヒト tRNA^{Tyr} と、tRNA^{Tyr} の 26 位を A に変えた tRNA^{Tyr(G26A)} 及び、27 位を A に変えた tRNA^{Tyr(G27A)} を試験管内で作成し、(1)で精製した hTRM1 によって、メチル基受容活性の確認を行った。メチル基受容活性の確認は、(1)と同様の方法で行なった。

(3) hTRM1 の基質 tRNA 認識部位の決定

hTRM1 が、tRNA のどの部分を認識して tRNA と結合し、反応を行なっているのかを知るために、ヒト tRNA^{Tyr} と、tRNA^{Tyr} の T-arm を欠く変異体 tRNA^{Tyr(ΔT-arm)}、D-arm を欠く変異体 tRNA^{Tyr(ΔD-arm)}、variable region を欠く変異体 tRNA^{Tyr(Δv-region)} を試験管内で作成し、(1)で精製した hTRM1 によって、メチル基受容活性の確認を行った。メチル基受容活性の確認は、(1)と同様の方法で行なった。

(4) 結晶構造解析を目指した酵母発現系の構築

hTRM1 をコードする *htrm1* 遺伝子を酵母のコドン使用頻度に最適化した配列に、精製のための HAT-tagをつなぎ、プラスミド pPIC3.5K に挿入した。酵母 SMD1168 株を、作成したプラスミドを用いて形質転換し、組み換え hTRM1 の発現を行った。発現した組み換え hTRM1 のメチル化活性の確認を行った。メチル基受容活性の確認は、(1)と同様の方法で行なった。

3. 研究の特色

これまで、tRNA 修飾の研究は主に、入手が容易で取り扱いやすく複雑性が低い単細胞生物で進められてきており、ヒトの tRNA 修飾の研究は遅れている。その背景には、「まずは簡単なモデル細胞で全容を明らかにすることを目標とした」などの理由がある。1965 年に tRNA 修飾が発見されて以来半世紀に渡る研究の結果、次第に tRNA 修飾の全容が明らかになりつつある。これからの tRNA 修飾の研究は、これまでに単細胞生物での研究で培われた知識と技術を発展させ、ヒトなどの複雑な生物の高次の生命現象の理解や遺伝子疾患の理解につなげることが課題となってきた。本申請は、tRNA 修飾酵素の変異に起因する神経系疾患の解明のための第一歩として、hTRM1 の機能解析を行なうものである。

4. 研究の成果

(1) hTRM1 の発現系の構築及び精製法の確立

プラスミドの作成に成功した。配列はシーケンス解析によって確認した。組み換え hTRM1 の発現と精製に成功した。精製した組み換え hTRM1 が活性を持つことが確認できた。

(2) 修飾部位の決定

ヒト tRNA^{Tyr} と、その 26 位を A に変えた tRNA^{Tyr (G26A)} 及び、27 位を A に変えた tRNA^{Tyr (G27A)} を試験管内で作成し、(1)で精製した hTRM1 によって、メチル基受容活性の確認を行った結果、ヒト tRNA^{Tyr} と、tRNA^{Tyr (G27A)} はメチル基受容活性を示したが、tRNA^{Tyr (G26A)} はメチル基受容活性を示さなかった。つまり、hTRM1 は 26 位のみをメチルし、27 位はメチル化しない酵素であることがわかった。27 位は他の酵素によってメチル化されることが示唆された。

(3) hTRM1の基質tRNA特異性の決定

tRNA^{Tyr (Δ T-arm)}、tRNA^{Tyr (Δ D-arm)}、tRNA^{Tyr (Δ v-region)} 試験管内転写産物はいずれもメチル基需要活性を示さなかった。つまり、T-arm、D-arm、variable region はどれも、hTRM1 によって認識されている。これまでに調べられている真核生物と古細菌の Trm1 は D-stem と variable region のみを認識しており、*A. aeolicus* Trm1 は T-arm のみを認識することがわかっていた。hTrm1 は、これまで知られていたどの Trm1 とも異なり、基質の認識が非常に厳密であるという結果が得られた。

(4) 結晶構造解析を目指した酵母発現系の構築

(1)では、結晶化に十分量の hTRM1 が得られず、また、アグリゲーションが見られたため、酵母での発現を試みた。形質転換した酵母の、組み換え *htrm1* 配列は、シーケンス解析によって確認した。組み換え hTRM1 メチル化活性を持つことが確認できた。しかし、十分の発現量を達成することができず、本申請期間中には構造解析には至らなかった。結晶化に十分量の hTRM1 を得るためには、プロモーター下流に *htrm1* 配列をタンデムにつなぐ、培養槽の規模を大きくするなどの改善が必要である。

感覚野に多数存在する皮質脊髄路ニューロンの投射・機能解析

帝京大学 医学部 亀田 浩司

1. 研究の目的

脊髄頸膨大の第7頸髄（C7）の灰白質には主として上肢の運動に関与する運動ニューロンが存在するが、そこへ軸索を投射する皮質脊髄路（CST）ニューロンは一次運動野（M1）や二次運動野（M2）といった領野の他にも、一次体性感覚野（S1）や二次体性感覚野（S2）にも多く存在することがげっ歯類において明らかになってきた。CSTニューロンの重要な機能に随意運動の実行があり、主にM1に存在するCSTニューロンがその役割を担っていると考えられるが、体性感覚野に存在するCSTニューロンも同様に随意運動の実行に直接関与しているのか、それとも別の機能を有するのかは不明である。よって本研究ではこれら広範囲に分布するCSTニューロンの機能解明をめざし、（1）運動野・体性感覚野から脊髄C7灰白質への軸索分布様式にどのような違いがあるのか、（2）体性感覚野からの脊髄内軸索分布と、皮膚からの一次求心性線維の分布領域にどのような関係性があるのか、を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の計画・方法

（1）運動野・体性感覚野からの脊髄内軸索分布の解析

- ①感染細胞にチャネルロドプシン2（ChR2）-EYFPを発現させるアデノ随伴ウイルス（AAV）をマウス大脳新皮質の特定の部位に局所注入し、そこに存在するCSTニューロンにChR2-EYFPを発現させる。
- ②AAV注入2週後、マウスを灌流固定し、大脳新皮質・脊髄の切片を作製する。その後抗GFP抗体（EYFPも認識する）を用いてChR2-EYFP発現細胞体・軸索を検出し、正確な注入部位の同定と脊髄C7灰白質内での軸索分布領域の解析を行う。

（2）体性感覚野からの脊髄内軸索分布と、皮膚からの一次求心性線維の分布領域の解析

- ①感染細胞にChR2-EYFPを発現させるAAVをS1内の特定の部位に局所注入し、そこに存在するCSTニューロンにChR2-EYFPを発現させる。
- ②AAV注入8日後、マウスの特定の体部位の皮膚内にコレラ毒素Bサブユニット（CTB）を注入し、皮膚からの一次求心性線維を標識する。
- ③CTB注入6日後、マウスを灌流固定し、脊髄の切片を作製する。その後、抗GFP抗体・抗CTB抗体を用いてChR2-EYFP発現軸索とCTB標識一次求心性線維を検出し、それらの脊髄C7灰白質内分布の関係性を解析する。

3. 研究の特色

CSTニューロンの主要な機能は随意運動指令の出力であり、その機能を担うCSTニューロンは主としてM1に存在すると理解されてきた。随意運動の実行は日々の生活に非常に重要であり、M1のCSTニューロンに関する研究はさかんに行われてきたが、その他の領野の機能に重点を置いた研究報告はほとんどない。本研究ではまさにその未知機能解明をめざし、新たな研究分野を開拓しようとするものである。また、錐体路障害では随意運動の実行が困難になることが知られているが、その他のCSTニューロンの機能も失われているはずである。本研究で得られた成果は、今まで見過ごされてきた病態側面の理解、その機能の回復法（リハビリテーション）の発展につながることで期待される。

4. 研究の成果

（1）運動野・体性感覚野からの脊髄内軸索分布の解析

CSTニューロンの脊髄内軸索分布を調べるためには、その軸索を可視化させる必要がある。そのために、感染細胞内でChR2-EYFPを発現させるAAVをマウスの各新皮質領域に微量注入した（図1）。注入部位はC7灰白質に軸索投射する新皮質領域を網羅するように選んだ（図1A）。注入2週後、マウスの脊髄を薄切し、抗GFP抗体で可視化して軸索分布を観察したところ、M1からの軸索は主に灰白質の中間帯・腹側に、S1前方部（S1r）は背内側に、S1後方部（S1c）は背外側に分布することがわかった（図2A-C）。興味深いことに、これらの分布領域はほとんど重複しなかった（図2D）。加えて、M2からの軸索はM1からのそれと同様に中間帯・腹側に、S2からは背側に分布することもわかった（図2E,F）。このような軸索分布様式の多様性は、それぞれの皮質脊髄路ニューロンが担う機能の多様性を反映しているものと考えられる。

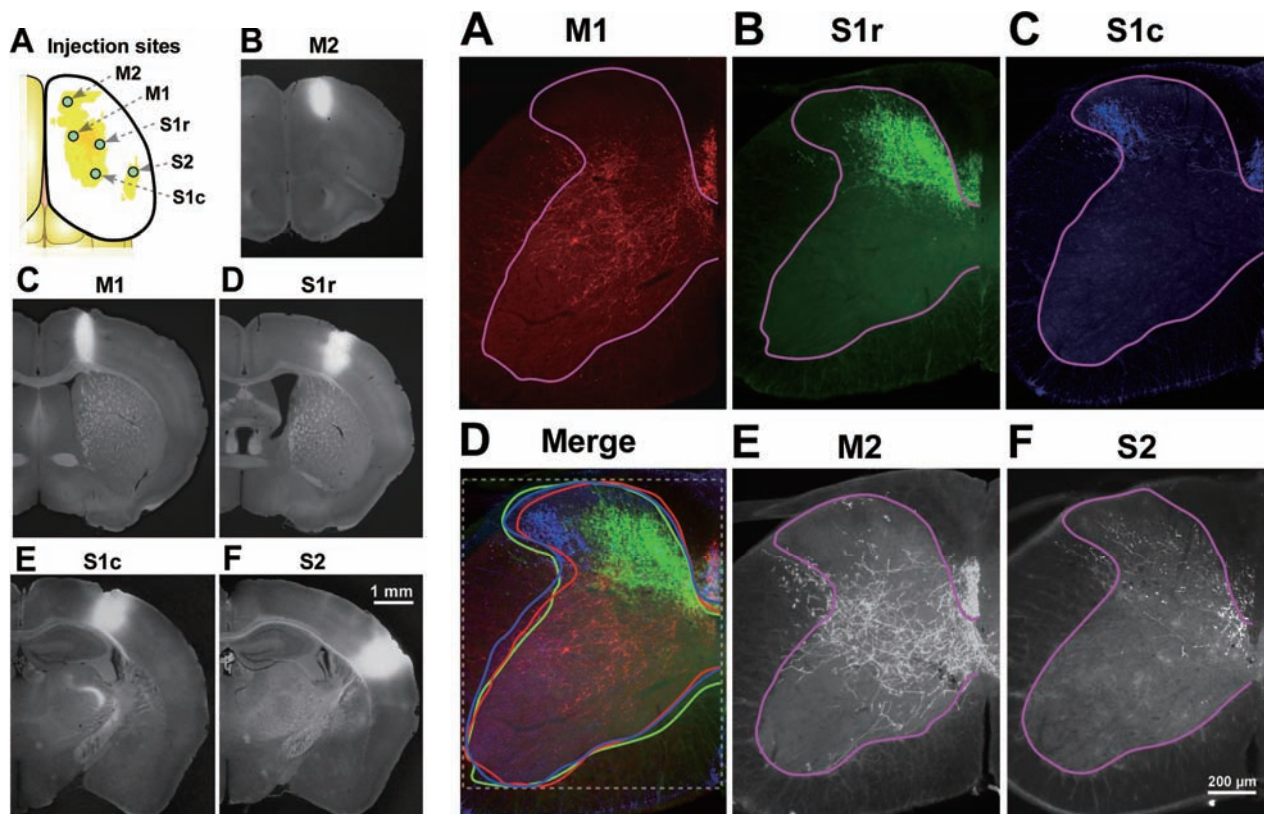


図1. 新皮質へのAAV注入。C7灰白質へ投射する新皮質領域（A内のヒートマップ）を広く網羅するように注入部位を選択した。

図2. C7灰白質における各新皮質領域からの軸索分布の様子。

（2）体性感覚野からの脊髄内軸索分布と、皮膚からの一次求心性線維の分布領域の解析

上述のように、S1rからの軸索はC7灰白質の背内側に、S1cは背外側に分布することがわかった。PaxinosとFranklinのmouse brain atlasによると、S1rとS1cはそれぞれ上肢と体幹からの感覚情報を処理する新皮質領域にあたる。また、脊髄灰白質の背側は体部位からの一次求心性線維の投射を受ける場所でもある。これらのことから本研究では次に、上肢と体幹皮膚からの一次求心性線維がC7灰白質に分布するのを検証した。異なる蛍光物質の付加されたCTBをマウスの手背と背中へ皮内注入し（図3A）、注入6日後にマウスの脊髄を薄切・観察したところ、どちら由来の一次求心性線維もC7灰白質の背側に分布することがわかった（図3B）。さらに、手背からの線維は背中からの線維に比べてより内側に分布することもわかった（図3B）。次に、S1rからの軸索と手

背からの一次求心性線維の分布領域の関係性を明確にさせるために、同一個体で両方の線維を可視化させたところ、それらの分布領域が重なることがわかった（図3C）。同様の解析をS1cと背中でも行ったところ、やはり分布領域が重なった（図3D）。これらの結果から、体部位ごとに皮膚由来の上行性の情報と新皮質由来の下行性の情報が集約される区画が脊髓灰白質背側部に存在することが示唆された。今後、脊髓灰白質背側部の細胞がこれらの情報をどのように処理するのかを解析することにより、体性感覚野からの情報の意義を明らかにしていく。

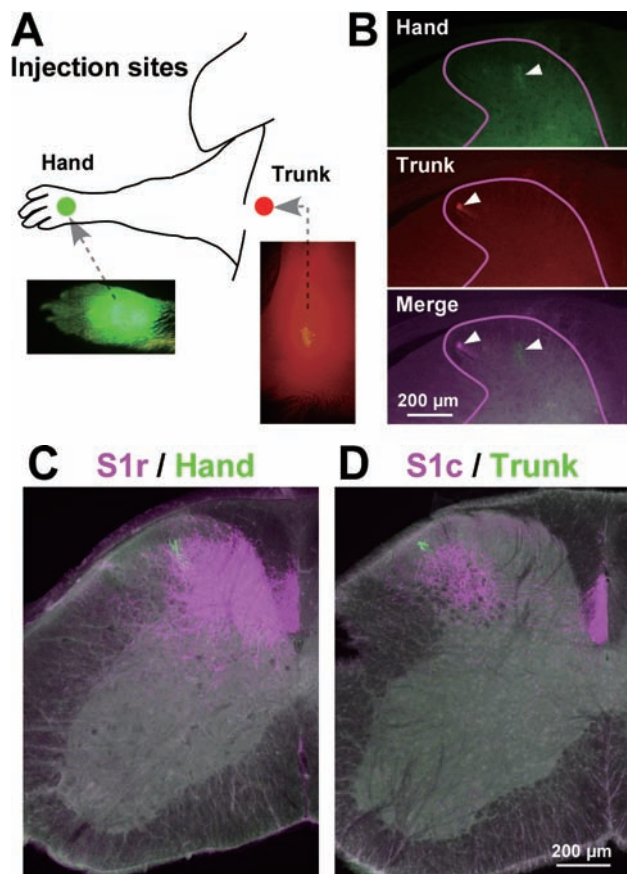


図3. 皮膚からの一次求心性線維のC7灰白質内分布と、体性感覚野からの軸索分布の関係性。

末梢への刺激は脳皮質興奮性を制御するか？ －皮質興奮性抑制機序の解明と臨床応用の検討－

東海大学 基盤工学部医療福祉工学科 佐藤 綾

1. 研究の目的

本研究は、末梢に対する刺激が、脳の第一運動野の皮質興奮性に与える影響を調査するとともに、磁気刺激のリハビリテーションへの新たな応用の可能性を見出すことを目的とする。

経頭蓋磁気刺激（TMS: Transcranial magnetic stimulation）は、被験者に苦痛を与えることなく、脳深部まで刺激ができる刺激法として開発された。先行研究において、TMSによる運動皮質の皮質興奮性の抑制機構は、TMSに誘発された脳の神経活動により生じる筋肉の興奮情報が、脳へフィードバックすることで生じる可能性があると考えられている。しかしながら、運動皮質の皮質興奮性の抑制機構と神経活動のフィードバックの関連性については明らかにされていない。運動皮質の皮質興奮性の抑制機構は、脳皮質を制御するために重要な役割を担う機能であり、そのメカニズムの解明は、脳神経・精神疾患の治療や症状軽減、リハビリテーションへの新たな応用につながると考えられる。このメカニズムについて、申請者のこれまでの研究を更に進展させるため、末梢神経・筋に対する刺激方法や刺激の周波数・強度などのパラメータを変更させ、運動皮質の皮質興奮性の影響を詳細に調査する。この研究は、末梢に対する刺激が運動皮質の皮質興奮性に与える影響の有効性を明らかにし、脳皮質の皮質興奮性の抑制のメカニズムの解明に近づけたいと考える。さらに、運動機能障害の治療およびリハビリテーションへの応用の可能性を検討する。

2. 研究の計画・方法

本研究は、TMSにより誘発される運動誘発電位（MEP: Motor evoked potentials）の振幅により、運動皮質の皮質興奮性の変化を捉える。末梢に対する刺激（末梢刺激）の刺激方法（磁気刺激および）刺激強度、刺激周波数を変更させることにより、脳運動皮質の皮質興奮性の抑制機構が発動する刺激方法や筋興奮の大きさ、それに伴う刺激強度、刺激周波数などについて検証する。実験工程を図1に示す。

被験者は健康な成人とし、インフォームドコンセント後に実験を実施する。実験は、3工程で構成される。まず、第1工程として、末梢刺激による運動皮質の皮質興奮性の影響を評価するため、左大脳半球の一次運動野に対してTMSを施行し、その際に誘発される右第一背側骨間筋のMEPを計測する。磁気刺激装置はMagstim社製 Super Rapid Stimulatorを用い、磁気刺激コイルは8の字コイルを使用する。TMSの刺激強度は、脳に磁気刺激の影響を与えないとされる静止運動閾値の105%、周波数は0.1Hzとする。TMSにより誘発されるMEPは、振幅が50 μ V peak-to-peakを超える10回の波形を評価の対象とする。第2工程では、磁気刺激（1Hz/100回、10Hz/500回）または電気

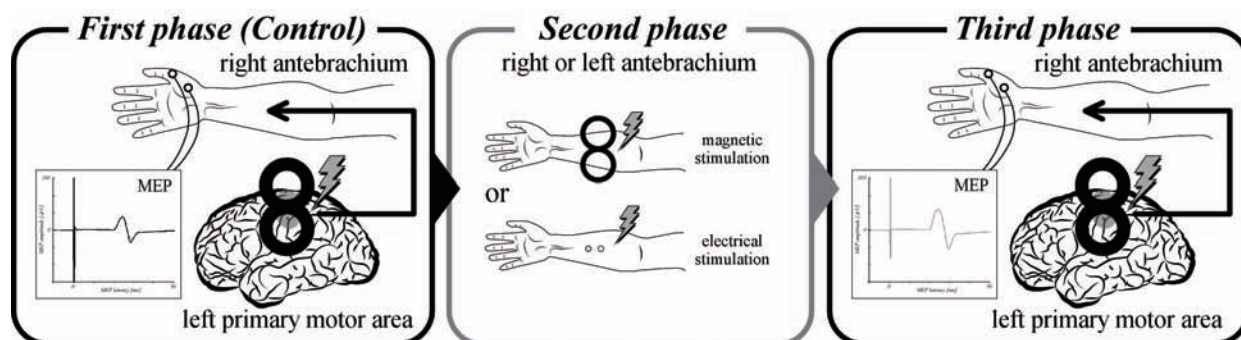


図1. 実験工程

刺激（1Hz/100sec、10Hz/50sec）を利用し、末梢刺激を実施する。末梢刺激の刺激部位は、左または右前腕とし、刺激強度は、各被験者の中指が振れる程度とする。第3工程では、第1工程と同様に、一次運動野に対してTMSを実施し、その際に誘発されるMEPを計測する。これらの実験工程は末梢刺激ごとに実施する。大脳運動皮質の皮質興奮性に対する評価は、末梢刺激前後で計測されたMEPの振幅（第1工程と第3工程）を比較することで検証する。

3. 研究の特色

TMSにより運動皮質の皮質興奮性の変化を捉える研究は、開発当時から盛んに実施されており、近年では運動機能回復に利用されている。先行研究では、運動皮質に対する高頻度のTMSは、皮質興奮性の促進、低頻度TMSでは抑制が生じると報告されている。しかし、その効果のメカニズムに関しては、未だに統一した見解が得られていない。近年、TMSの効果を利用した大脳皮質興奮性の制御が注目されている。脳卒中後の運動機能回復には脳の両側のバランス改善が必要であると考えられており、TMSの効果と運動機能回復訓練を組み合わせたリハビリテーションが試みられている。しかしながら、TMSを施行できる患者は限定される。さらに、大脳皮質興奮性の制御において、抑制機構のメカニズムの解明が重要となるが、抑制機構に関する報告はほとんどなされていない。そこで申請者は、運動皮質における皮質興奮性の抑制機構に着目し、末梢に対する刺激により求心性神経の興奮を誘発することで、大脳皮質興奮性の制御を実現することを提案する。

4. 研究の成果

本研究は、末梢に対する刺激（末梢刺激）の刺激方法と刺激部位、刺激周波数を変更することにより生じる運動皮質の皮質興奮性の変化を捉えることを目的とした。研究の結果、左運動皮質の対側前腕に対する1 Hzの末梢刺激（電気刺激および磁気刺激）では、末梢刺激後のMEP振幅は、末梢刺激前と比較して減少を示した。すなわち、1Hzの末梢刺激により運動皮質の皮質興奮性が抑制したと考えられる。対称的に、左運動皮質の同側前腕に対する1Hzの末梢刺激では、末梢刺激後のMEP振幅は増大を示し、運動皮質の皮質興奮性が促進したと考えられる。MEP振幅の増大は、対側または同側前腕に対する10Hzの末梢刺激においても確認された。以上の結果から、本研究では、前腕に対する末梢刺激により、運動皮質の皮質興奮性の制御の可能性を示す成果を得た。

以下の学会（1）、（2）において、本研究の成果発表を行った。さらに、申請者は本研究の成果の一部を学位論文として発表した（学位取得日：2017年4月30日付、九州大学大学院システム生命科学府）。

（1）6th International Conference on the Development of Biomedical Engineering（平成28年7月）

（2）38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society（平成28年8月）

牛白血病ウイルス感染牛はなぜ増え続けるのか — 遺伝子配列解析による感染経路の解明 —

東京農業大学 農学部 小林 朋子

1. 研究の目的

牛白血病ウイルス(Bovine Leukemia Virus:BLV)は、届出伝染病である地方病性牛白血病の原因ウイルスである。BLV感染牛の大部分は無症状で経過するが、数年の潜伏期間を経て約5%が発症し、悪性リンパ肉腫、消瘦、乳量減少、下痢などの症状を示す。牛白血病の発症牛は、と畜場において法律に基づき全廃棄処分となることから、畜産農家にとって経済的損失が極めて大きい疾病である。BLVの主な感染経路は、吸血昆虫の吸血や除角、直腸検査などにより感染する水平伝播と母乳や胎盤を介して感染する垂直伝播が知られている。日本国内におけるBLVの抗体検査は1980年に初めて行われ、全国的に1%未満の抗体保有率であった。その後、動物衛生研究所が行った2010年の全国調査では約35%の抗体保有率であり、BLV感染率は増加の一途をたどっている。BLVに一度感染すると、生涯ウイルスを持ち続け、無症状のまま新たな感染源となる。また、感染や発症を防ぐワクチンや治療法も実用化されていない。そのため、BLV対策としては、新たにBLVが感染することを防ぐとともに、感染牛を非感染牛に更新していくことが重要である。これまでに、農場内でのBLV感染拡大リスク要因として、放牧場における吸血昆虫の存在や、出血を伴う処置の際の不衛生な管理が挙げられている。一方、農場間の感染拡大においては、BLV感染牛が非感染農場に導入されることが主要なリスク要因となることが報告されている。本研究では、神奈川県A市をモデルとし、感染牛の保有するBLVの遺伝子配列の解析により、農場間におけるBLV流行動態の解析を目指した。

2. 研究の計画・方法

神奈川県A市において、家畜伝染病予防法第5条に基づく牛のブルセラ病等の検査の際、管轄する家畜保健衛生所の協力により、BLV検査に同意の得られた農家（27戸）において飼養されている乳牛、全頭のEDTA血を採取した。定期検査の残血清を用いて、ELISAによる抗BLV抗体検査を行い、抗体陽性牛が10頭以上存在する農家（15戸）について、抗体陽性の牛から乱数表を用いて配列解析検体を抽出し、血球中のBLVプロウイルスのenvSU領域（913bp）について、PCRによる増幅とダイレクトシーケンス法による配列決定を行った。配列決定した222配列に加えNCBIのデータベースに登録されているBLVenv遺伝子配列（日本国内27配列、国外29配列）を用いて、ベイズアン・マルコフ鎖モンテカルロ（MCMC）法によって時系列系統解析を行った。次に、得られた配列情報を用いて、Network5.0.によるmedian-joining(MJ)network algorithmによる感染ネットワーク解析を行った。さらに、同じく222配列を用いてMEGA7を用いた農場内での配列多様性解析を行った。また、抗体調査を行った全頭の牛について、個体識別番号情報から過去の移動歴と、最終移動後の農家における滞在時間を独立行政法人家畜改良センターのホームページから検索した。

3. 研究の特色

従来の抗体検査や遺伝子検査では一時点のBLVの感染率しか取得できる情報はなかった。そのためBLVの流行動態の把握は難しく、また、実際の農場において、具体的に「どこから」「どの程度」BLVの侵入があり、「どのように」感染を広めているのか、BLVの感染動態は明らかになっていない。本研究では、実際にBLVに汚染されている農場において流行しているウイルスの配列を分子疫学・分子系統学的に解析することにより、BLVの感染ネットワークを明らかにした。

4. 研究の成果

抗体調査を行った農家27戸の牛871頭のうち、抗BLV抗体陽性牛は409頭（46.9%）であった。抗体陽性牛が10頭以上存在する農家のうち、PCRによるBLVenv配列の増幅が難しい検体が多数含まれていた農家1戸を除いた14戸において飼養されている抗体陽性牛222頭の血液からDNAを抽出し、58種類のBLVenv配列が得られた。時系列系統解析により、神奈川県A市14農場から得られた222のBLVenv配列は、221配列が遺伝子型1型および残りの1配列が遺伝子型3型であった。また、神奈川県A市の乳用牛とNCBIのデータベースに登録されている九州の肉用牛は相同配列および近縁クラスターに属するBLVに感染していた。さらに、国内の遺伝子型1型の最も古い共通祖先配列が1970年ごろに存在していた。神奈川県A市のBLVが属するクラスターの分岐年代は2003年付近であり、そこを起点に多くの配列に分岐していた。Network5.0.によるmedian-joining(MJ)network algorithmの結果、同じ配列を持つ牛のクラスターのうち、10頭以上の感染牛を含むクラスターは4つあり、ほぼ全て同一の農場由来の感染牛が占めるクラスターと、多数の農場の牛が占めるクラスターが存在していた。また、MEGA7を用いた多様性解析の結果、各農場におけるBLVenv配列の多様性は、各農場の牛の平均移動回数と正の相関があり、最終移動農場での飼養期間と負の相関があることが明らかとなった。具体的には「自家産・自家育成」の農家の感染牛は同じ配列のBLVもしくは近縁配列のBLVに感染しており、逆に、牛を外部農場から入れる「導入」や「預託」を行う農場の感染牛は異なる配列のBLVに感染していることが多かった。これらの結果より、①飼養牛の移動回数が多い農家ほど、牛群へのBLVの侵入が何度も起きている、②いったん農場内に持ち込まれたBLVは、水平感染、あるいは垂直感染により大きく広がっている、ことが示唆された。こうした感染動態の把握は、感染牛のBLV遺伝子配列を大規模に解析したことにより初めて明らかとなり、将来的にBLV感染拡大への対策に有用な情報となると考えられる。本研究成果をまとめた平成28年度日本獣医疫学会における口頭発表は、優秀学会発表賞を受賞した。

新規アイソトポマーによるサンゴ礁の 高精度降水量復元手法の開発 — 高感度レーザー方式同位体比分光法での打開 —

東邦大学 理学部 嶋 康輝

1. 研究の目的

近年の気温上昇は降水量を変化させて、社会・経済活動に大きな影響を与える可能性があるため、地域ごとの降水量変化を予測することは非常に重要である。しかしながら、未だ信頼性の高い地域ごとの降水量予測モデルは確立していない。その原因の1つは、降水量変化の予測に必要な物理モデルの妥当性を評価するための、実測の降水量情報が地域ごとに不足しているためである。この問題を解消するため、炭酸塩骨格(CaCO_3)で年輪を形成する造礁性サンゴ骨格が有用である。 CaCO_3 の酸素安定同位体比($\delta^{18}\text{O}$)は、 CaCO_3 が生成する時の海水温と水の酸素同位体比にコントロールされ、水の酸素同位体比は降水量と相関する。つまり、サンゴ骨格 CaCO_3 の $\delta^{18}\text{O}$ と、精度の高い海水温情報があれば、過去の降水量を高精度で復元できる。なお、 CaCO_3 の $\delta^{18}\text{O}$ はサンゴ骨格を酸で反応させた時に発生する二酸化炭素のアイソトポマーで定量化する。高精度海水温復元方法として、申請者は二酸化炭素の新規アイソトポマーである $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ （質量数47）の $[\Delta 47]$ 計測に着目した。 $\Delta 47$ は理論的には海水温だけに依存する。しかしながら、質量47は $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ 以外の分子種を含むため、既存の装置で $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ だけを純粋に抽出し、議論することが困難であった。

本研究は、 $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ だけを計測できる新規に開発されつつある高感度レーザー方式同位体比分光法を用いて、サンゴ骨格の $\Delta 47$ と $\delta^{18}\text{O}$ を計測して、実際の降水量と比較し、高精度の降水量復元手法確立を目指すことを目的とした。

2. 研究の計画・方法

本研究では、下記の3つの手順によって、サンゴ骨格中の $\delta^{18}\text{O}$ と $\Delta 47$ から過去の降水量を復元する手法を開発することを目標に、以下の研究計画と方法を立案した。

(1) 研究試料の収集:

- ① 自然環境下で成長している塊状サンゴから直径約8cmの円柱状試料（サンゴコア）を採取する。サンゴ骨格は、数年程度の成長部位に相当する粉末試料と、季節時間分解能（約1–2mm/試料）で10年程度の成長部位（約10cm）の粉末試料を用意する。
- ② 幼生サンゴの水温・塩分をコントロールして飼育した試料を用いる。骨格の $\Delta 47$ 計測は、1測定で約0.1mgの試料量を必要とする。3回繰り返し計測を行うために、0.3mgの試料を用意する。

(2) 化学計測:

(1)で用意した試料の $\delta^{18}\text{O}$ と $\Delta 47$ を測定する。なお、 $\Delta 47$ 計測の前段階として、 Sr/Ca （従来の海水温指標）を計測する。

(3) 高精度の降水量復元指標の検証:

$\Delta 47$ から復元した高精度海水温、 $\delta^{18}\text{O}$ と降水量（気象庁記録）を比較検討して、高精度の降水量復元指標の有用性を検証する。

3. 研究の特色

本研究の特色は、高い有用性が知られていながら高精度での定量化が困難であった二酸化炭素

のアイソトポマーである $\Delta 47$ に着目した点である。さらに、海水温が測定されている海域のサンゴ骨格中アイソトポマーを用いて高精度海水温計を確立したあと、降水量復元指標を開発することである。

4. 研究の成果

(1)

- ① 本年度は、当初琉球列島でサンゴコア採取を計画していたが、2016年に起きたサンゴの大規模白化のため、淡水流入がある海域でのサンゴコアを、パラオ共和国アイライで2016年3月に採取された12本の試料を利用した(図1)。
- ② 2016年5-6月に*Acropora*属サンゴのプラヌラ幼生を沖縄県瀬底島で採取した。その後、東京大学大気海洋研究所にて、15mLのプラスチック容器内でプラヌラ幼生の飼育実験を行った。プラヌラ幼生は、初めに神経ペプチドを添加して変態させ、プラスチック容器内で定着させた。定着後、26℃の恒温槽で2週間程度飼育してサンゴ幼生に骨格形成を促した。その結果、 $\Delta 47$ の計測に十分な試料量を採取できた。

(2)・(3)

サンゴコアの化学計測を行うため、最初に高知大学海洋コア総合研究センターに設置されているX線コンピューター断層撮影法(CT)スキャナーで骨格構造を解析した。その後、パラオで採取したサンゴコアの成長先端から6 cm程度の骨格成長部位の一部を、デンタルドリルで平均的に粉末化した。 $\delta^{18}\text{O}$ (海水温と塩分の指標)は国立研究開発法人海洋研究開発機構に設置されている安定同位体比質量分析計で、本年度までに1つのサンゴコアにつき最大3回の繰り返し計測を実施した。 $\Delta 47$ 計測前に必要なSr/Ca比は東京大学大気海洋研究所に設置されている誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)で、本年度までに1つのサンゴコアにつき1回の計測を実施した。

図2は $\delta^{18}\text{O}$ とSr/Caの全サンゴコア平均値から各サンゴコアの偏差を示す。またサンゴ骨格の $\delta^{18}\text{O}$ とSr/Ca比に基づいた復元海水温は、1ヶ月ごとの $\delta^{18}\text{O}$ -海水温の関係式である $-0.2\text{‰}/^{\circ}\text{C}$ (Juillet - Leclerc and Schmidt 2001)、1ヶ月ごとのSr/Ca-海水温の関係式である $-0.06\text{mmol/mol}/^{\circ}\text{C}$ (Corrège 2006)を採用した。

$\delta^{18}\text{O}$ はSite 1(最も河口に近い場所)で最も低い値(高水温/低塩分)であったが、Sr/Caは同様の結果ではなかった。サンゴ骨格の $\delta^{18}\text{O}$ は塩分と海水温の影響を受ける。河口では淡水流入に伴う塩分低下に伴い水の $\delta^{18}\text{O}$ が低下する。そのため、サンゴ骨格の $\delta^{18}\text{O}$ の低下は、塩分の影響を示唆している。一方で、各サンゴコア、各サンプリングサイトでの $\delta^{18}\text{O}$ とSr/Ca比は $\pm 1\text{--}2^{\circ}\text{C}$ 程度相当のバラツキが見られた。サンゴ骨格の化学・同位体比組成は、生物学的要因に影響を受けることが報告されている。本研究結果は、 $\Delta 47$ 計測前に各サンゴコアの生物学的要因に関して更に検討を要することを示唆する。

本年度までに、試料の選定とその用意が整った。現在、高感度レーザー方式同位体比分光法の開発が最終段階にある。引き続き、高精度の降水量復元手法確立に関する研究を進めていく。



図1 パラオ共和国でのサンゴコア試料採取場所

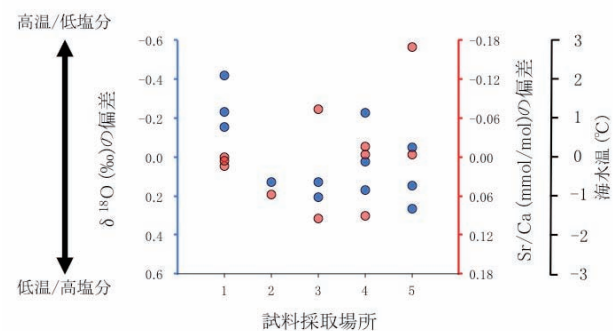


図2 サンゴコア上部6cm骨格成長部位の $\delta^{18}\text{O}$ と Sr/Ca 比。値は、全サンゴコア平均値から各サンゴコア値の偏差と換算温度を示す。

血糖調節における翻訳調節因子YB-1の役割 —YB-1は糖尿病治療の標的となるか？—

日本大学 薬学部 田中 融

1. 研究の目的

グルコースなどの糖質は、Glucokinase (GCK)をはじめとする様々な酵素により代謝され、エネルギーを生み出したり、グリコーゲンとして蓄えられたりする。特に肝臓は糖代謝が盛んに行われる組織である。肝臓における糖の取り込みはインスリン依存性と非依存性の両方の経路を介して行われる。糖代謝に関わる酵素の発現は血糖値に応じて調節を受けるが、転写レベルでの解析は数多く行われているのに対し、翻訳レベルでの調節に関する研究はほとんど行われていない。

翻訳調節因子YB-1は組織ごとに異なる時期に発現し、細胞状態に応じて特異的なmRNAの翻訳を調節している。私はこれまでに、YB-1が成長期に多くその後急激に減少する脳や骨格筋で、それらの組織に特異的なmRNAの翻訳を神経活動に応じて調節していることを明らかにしてきた。一方、肝臓ではYB-1は生涯を通して高度に発現が続く。そこで、YB-1のターゲットmRNAを調べたところ、GCKをはじめとしてhexokinase 1 (HK1) やpyruvate kinase (PK)、GAPDHなどの糖代謝関連酵素のmRNAやインスリン受容体のmRNAが同定された。このことから、YB-1が翻訳を通じて血糖値の調節に関与していることが示唆された。本研究では、糖やインスリンなどの刺激に対する血糖値調節の新たなメカニズムの解明を目的として、糖代謝において同じ反応を触媒するGCKとHK1に注目して、糖濃度あるいはインスリン依存的なYB-1によるこれらのmRNAに対する翻訳調節機構の解析を行う。本研究で用いる遺伝子組換え体は平成25年3月27日に日本大学遺伝子組換え実験安全委員会により承認を得ている。マウスを用いた実験に関しては、平成26年9月29日日本大学実験動物委員会の承認を得ている。

2. 研究の計画・方法

まず、肝由来の培養細胞であるHepG2細胞に対して、YB-1発現プラスミドやYB-1特異的siRNAを用いて細胞内のYB-1量を変化させ、そのときのGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳活性を調べて、YB-1が実際にこれらのmRNAに対して翻訳調節を行うことを確かめる。また、糖やインスリンなどの刺激に応じてGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳が変化することを解析する。さらに、YB-1をノックダウンした細胞に対しても同様の刺激を加え、これらmRNAの翻訳活性への影響を調べる。刺激を与えた細胞から細胞質を抽出し、ショ糖勾配遠心を行いYB-1のpolysome結合性とGCK mRNA、HK1 mRNAに対するYB-1の結合比率を解析する。この時の糖の吸収、代謝効率についても解析する。培養細胞で翻訳に影響を与えた刺激をマウスに与えて、GCK、HK1の翻訳活性を解析するとともにYB-1のポリソーム結合性を解析する。さらに、糖尿病モデルマウスを用いてYB-1の発現量や刺激によるGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳活性の変化、YB-1のpolysome結合性の変化を調べる。

3. 研究の特色

本研究は、これまで注目を集めてこなかった翻訳調節による血糖値の調節について、翻訳調節因子YB-1と糖代謝律速酵素のGCKおよびHK1に着目し解析するものである。遺伝子の発現は転写と翻訳の両方のレベルで調節されているが、翻訳調節の方が転写調節よりも下流に位置し、外部からの刺激に対して速やかに応答することができる。糖は消化管から吸収され血中に速やかに移行するため、血糖値の過剰な上昇を防ぐためには短時間で応答しなければならない。そのような迅速な反応には、翻訳調節の寄与が大きいと考えられる。

血糖値はインスリンによる糖の細胞内への取り込みや代謝の促進を通して、厳密にコントロールされている。2型糖尿病はインスリンの分泌不足だけでなく、細胞応答の不調によるインスリン抵抗性の出現によっても起こっている。現在使用されている糖尿病治療薬は、前者に注目してイ

ンスリンの血中濃度を増加させることに重点を置いたものが大半を占めるのに対し、後者のインスリン抵抗性に対するものは少ないのが現状である。経口血糖降下薬は患者の病態に応じて、複数組み合わせた併用療法を行うケースが多く、インスリン抵抗性改善薬はインスリン分泌促進薬と相乗的に働くことが期待できる。このようなことからインスリン抵抗性改善薬の開発は今後さらに加速していくことが予想される。インスリン抵抗性は肥満によって引き起こされるが、未だ不明な点が多く、治療薬開発のためにその分子基盤を明らかにすることが喫緊の課題である。現在、開発段階にあるインスリン抵抗性改善薬は、代謝酵素や転写因子をターゲットにしたものがほとんどで、翻訳調節をターゲットにしたものはない。YB-1はGCKやHK1、PK、GAPDHなど、多くの糖代謝関連酵素のmRNAに相互作用していることから、YB-1の活性を調節することにより血糖値のコントロールが可能になると考えられる。本研究によって、血糖調節における翻訳調節の重要性およびインスリン抵抗性と翻訳調節の関連性が明らかになり、YB-1を分子標的とした新たな糖尿病治療薬の開発に貢献することが期待される。

4. 研究の成果

GCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳に対するYB-1の影響を調べるために、肝臓由来の培養細胞であるHepG2に、YB-1を過剰に発現させた場合とYB-1をノックダウンさせた場合のGCKおよびHK1のタンパク質の量とmRNA量の変化を解析した。YB-1を過剰に発現させた細胞では、興味深いことにGCKタンパク質の量は減少したのに対して、HK1タンパク質は増加していた。このとき、どちらのmRNAの量も大きな変化は見られなかった。反対にYB-1をノックダウンさせた場合にはGCKタンパク質の量が増加し、HK1タンパク質の量が減少していた。このときもどちらのmRNAについても大きな変化はなかった。このことは、YB-1による翻訳調節がGCK mRNAとHK1 mRNAに対して反対の影響を及ぼすことを示している。

次に、糖やインスリン刺激に応じてGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳活性に変化が起こることを調べた。まず糖刺激による変化を解析した。HepG2細胞にGlucoseの濃度を通常の10倍濃度である10 mg/mLで30分から6時間処理し、GCK mRNAおよびHK1 mRNAの翻訳活性を解析したが、ほとんど変化がみられなかった。Glucoseの濃度をさらに増やし20 mg/mLでも調べたが大きな変化はなかった。この結果から、YB-1によるこれらのmRNAの翻訳活性は糖濃度による影響を受けないことが示された。インスリンによる刺激を加えた場合では、興味深いことにHK1 mRNAの翻訳はやや減少傾向であったがほとんど変化しなかったのに対し、GCK mRNAの翻訳活性は処理1時間から増加するのが観察された。空腹時におけるGlucoseの6位のリン酸化は主にHK1によって行われているが、食後の血糖値が上昇した状態ではHK1の働きは抑制され、反対にGCKがこの反応を行うようになる。この現象は通常、糖代謝産物によるHK1のアロステリック阻害とGCKのGlucoseに対する親和性の低さによって説明されるが、この実験から得られた結果は、血糖値の上昇によるインスリン濃度の増加を介して、GCKの翻訳量を増加させることによって血糖値の調節が行われることを示唆している。YB-1によるGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳調節は反対の動きをすることから、HK1の翻訳活性はインスリンによって抑制されることが予想されるが、実際には大きな変化はなかった。これはHK1の半減期が長く、翻訳が抑制されても分解が進行しなかったためだと思われる。また、GCKはインスリン刺激によって転写レベルでも増加することが報告されているが、興味深いことに転写阻害剤を加えずにインスリン刺激を与えても、処理3時間後まではmRNAの増加を伴わずにGCKのタンパク質の増加が観察された。これはインスリン刺激後の短い時間では転写レベルの発現増強に先行して翻訳活性化が起こることを示しており、肝臓においても外部からの刺激に素早く応答するために翻訳調節が重要であることを示唆している。インスリンによるこのGCKの翻訳活性化は翻訳阻害剤であるcycloheximideによって抑制された。さらに、インスリン刺激を与えたときのYB-1のporisome結合性をショ糖勾配遠心によって調べた。YB-1を含むporisomeはインスリンによって高分子量側にシフトし、この高分子フラクションにおけるGCK mRNAの存在量の増加が観察された。この結果はインスリンによるGCKタンパク質の発現量の増加と相関している。また、このフラクションにおけるHK1 mRNAの量に大きな変化はなかった。

培養細胞を用いた以上の結果から、YB-1はインスリン刺激によってGCK mRNAの翻訳活性化を介して血糖値を調節していることが示唆された。本研究では当初計画していた動物を用いた解析まで進むことができなかったが、今後は動物を用いて実際の生体内においてもYB-1によるGCK mRNAの翻訳活性化がおこることを確認し、さらに糖尿病モデルマウスを用いてこの翻訳調節が糖尿病とどのように関わっているか解析を行う予定である。

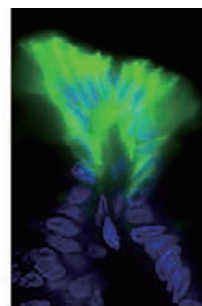
肥満誘発性便秘症における大腸アクアポリンの生理的意義の解明

星薬科大学 薬動学教室 講師 五十嵐信智

1. 研究の目的

近年、食生活の欧米化や社会環境の変化に伴い、肥満患者が増加の一途をたどっている。肥満の発症メカニズムについては、これまでに分子生物学的観点から様々なアプローチがなされており、その治療法の開発に向けて多くの新知見が見出され始めている。その一方で、肥満患者は種々の合併症を誘発することが知られており、その対策も重要な課題となっている。例えば、肥満患者は便秘症を併発するケースが多いことが報告されている。便秘症は直接生命にかかわる疾患ではないため、その治療は軽視されがちであるが、患者のQOLを考えると、発症機序に基づいた適切な対応を行うことが重要となる。これまで、肥満誘発性便秘症は腸管蠕動運動の低下により発症するものと考えられており、このような患者に対しては、瀉下剤を用いた対症療法が行われている。しかしながら、その治療効果は十分なものではなく、新たな治療法や予防法が切望されている。

このような中、近年、体内の水輸送において水チャネル「アクアポリン（AQP）」が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。ヒトにおいては、AQP0からAQP12までの13種類が同定されており、その発現や活性の変化により種々の疾患が誘発されることが報告されている。我々はこれまでに、便の水分量を最終的にコントロールしている大腸の粘膜上皮細胞にはAQP3が優位に発現していること（右図）、大腸のAQP3の発現や活性が低下すると下痢が誘発されることが報告されている。AQP3の発現が増加すると便秘が誘発されることを明らかにした。これらの結果から、大腸ではAQP3を介して水が管腔側から血管側へ輸送され、便が濃縮されることがわかった。本研究では、肥満誘発性便秘症の新たな治療法や予防法を見出すことを目的に、大腸のAQP3に焦点を当て、その発症メカニズムを解析した。



大腸におけるAQP3の発現分布
(Green; AQP3, Blue; Nuclei)

2. 研究の計画・方法

ラットにコントロール食（10%kcal脂肪含有）あるいは高脂肪食（60%kcal脂肪含有）を1週間あるいは3ヶ月間自由摂取させた。肥満の程度を確認後、排便状況および糞中水分量を調べた。また、大腸を摘出後、粘膜を採取し、AQP3のmRNA発現量およびタンパク質発現量をそれぞれリアルタイムRT-PCRおよびウェスタンブロッティングにより解析した。

3. 研究の特色

便秘症は直接生命にかかわる疾患ではないため、その治療については軽視されがちであるが、大腸癌や腸イレウスなどの原因になるばかりではなく、患者のQOLを著しく低下させることから、その緩和や治療は重要な課題である。本研究は、これまでほとんどわかっていなかった肥満誘発性便秘症の発症メカニズムについて、大腸の水輸送タンパク質であるAQP3に焦点を当て、解析したものである。本研究結果は、肥満誘発性便秘症におけるAQP3の生理的意義が言及できるばかりではなく、便秘症に対する新規治療戦略の研究基盤として重要な知見と考える。

4. 研究の成果

(1) 肥満誘発性便秘症モデルラットの作製

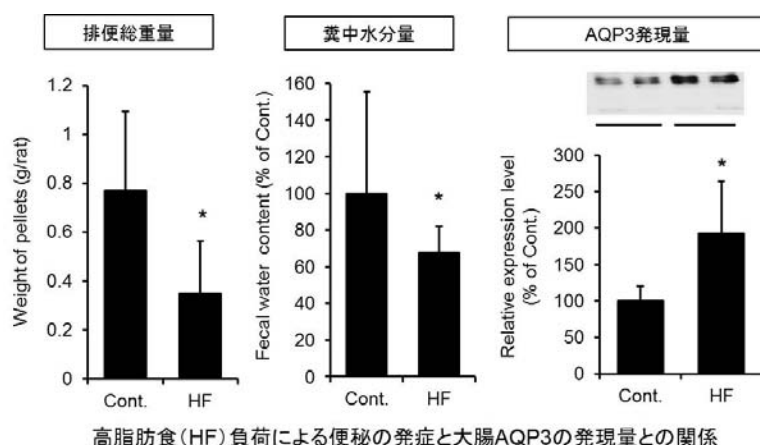
高脂肪食を3ヶ月与えたラットの体重および白色脂肪重量は、いずれもコントロール群と比べて有意に増加した。また、高脂肪食群の排便総重量および糞中水分量は、いずれもコントロール群と比べて有意に低下していた。

以上のことから、ヒトと同様に、高脂肪食を摂取して肥満が誘発された場合、便秘が発症することが確認できた。

(2) 肥満誘発性便秘症モデルラットにおける大腸AQP3の発現解析

高脂肪食を3ヶ月与え、肥満誘発性便秘症が認められたラットにおいて、大腸のAQP3の発現量を解析した。AQP3のmRNA発現量は、高脂肪食群ではコントロール群と比べて有意に増加していた。また、タンパク質発現量についても同様に、高脂肪食の3ヶ月摂取により、コントロール群と比べて約2倍有意に増加していた。

以上のことから、肥満誘発性便秘症発症時には、大腸のAQP3の発現量が増加し、大腸からの水の吸収が亢進し、便が硬くなり、その結果、便秘症が誘発された可能性が考えられた。



(3) 高脂肪食と大腸AQP3の発現増加との関係

ここまでの結果から、高脂肪食の摂取により肥満が誘発された際に、大腸のAQP3の発現量が増加し、便秘症が誘発されることがわかった。次に、このAQP3の発現増加が肥満によって生じたものであるのか、それとも高脂肪食そのものの直接的な影響によるものであるのかどうかを調べた。具体的には、高脂肪食を1週間与え、肥満が生じていないラットについて、大腸のAQP3の発現量を解析した。その結果、高脂肪食を1週間与えたラットでは、糞中水分量およびAQP3のタンパク質発現量は、いずれもコントロール群と比べて変化は認められなかった。

以上の結果から、高脂肪食を3ヶ月与えた際に認められたAQP3の発現増加は、高脂肪食そのものの影響ではない可能性が示唆された。

本研究の結果から、高脂肪食を長期間摂取し、肥満を呈した場合には、大腸におけるAQP3の発現量が増加し、これに伴って大腸での水の吸収が亢進し、便秘症が誘発される可能性が考えられた。また、高脂肪食を与えた際の便秘および大腸におけるAQP3のタンパク質発現量の増加は、高脂肪食による直接的な影響によるものではなく、肥満に起因した変化である可能性が示唆された。肥満時には、様々な生体内成分が大きく変化していることが知られている。今後、大腸AQP3の発現を増加させた成分やその増加メカニズムを明らかにすることにより、AQP3をターゲットとした肥満誘発性便秘症に対する新たな治療法や予防法の提案が可能となるであろう。

視床下部室傍核オキシトシンニューロンのシナプス可塑性と摂食・エネルギー代謝調節

自治医科大学 医学部 生理学講座 須山成朝

1. 研究の目的

シナプス可塑性、すなわちシナプス伝達の可逆的な調節は、外界からの入力に応じて最適な神経回路網を取捨選択・強化するための基礎過程である。視床下部の摂食・満腹中枢の神経回路網は全身の栄養・代謝状態によりダイナミックに変動し、司令を発して摂食・エネルギー代謝を調節する。この変動においてもシナプスの可塑的変化が報告されているが、現象の観察に留まり、機序は未解明である。

光遺伝学を含む最近の研究から、一次中枢→Oxytocin ニューロンの神経伝達が、摂食調節の中核の回路であることが明らかにされた (Atasoy et al., Nature 2012)。申請者は24時間絶食したラットにおいて、満腹を司る室傍核 Oxytocin ニューロンへの興奮性シナプス伝達の減弱を発見し、その機序として、NMDA 型グルタミン酸受容体（シナプス伝達増強の引き金）の減少を伴うAMAP型グルタミン酸受容体の減少を報告した(図1) (Suyama et al., Neuropeptides 2015)。室傍核は摂食抑制を司令する中枢であり、その中でOxytocinが中心的役割を担うことが申請者 (Maejima, Suyama et al., Cell Metabolism 2009) および内外の研究 (Takayanagi et al., 2009) により明らかにされている。

本研究は、＜摂食・代謝状態→OxytocinニューロンNMDA 型受容体調節→Oxytocinニューロンシナプス可塑性→摂食行動・エネルギー代謝調節＞の仮説を立て、これを検証することを目的とした。具体的に、①絶食で増加する摂食関連シグナルからNMDA 受容体変動を誘導するシグナルを同定し、細胞内シグナル伝達機構の解析を行った。②絶食-再摂食によるOxytocinニューロンのシナプス可塑性変化の回復過程を経時的に検討した。

2. 研究の計画・方法

8週齢雄性Oxytocin-mRFP transgenic rat (オキシトシン産生細胞で赤色蛍光タンパク質を発現するラット) から室傍核を含む急性脳スライスを作製し、Voltage clamp下で蛍光陽性細胞の興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) の測定を行い、興奮性シナプス伝達の強度を評価した。

- (1) 室傍核オキシトシンニューロンの興奮性シナプス伝達減弱を誘導する摂食関連因子の同定
 - ①絶食で増加する摂食関連因子として、摂食亢進ペプチドであるNeuropeptide Y (NPY) 10^{-8} Mを急性脳スライスに3時間以上暴露し、miniature EPSC, AMPA/NMDA電流比を測定した。間接的な効果を避けるため、tetrodotoxinを添加し、活動電位の発生を阻害した。
 - ②NPYの下流の細胞内シグナル伝達を薬理的に調節し、miniature EPSCを測定した。
- (2) 絶食-再摂食によるOxytocinニューロンのシナプス可塑性変化の回復過程と摂食量
 - ①24時間絶食後、1日摂食量を1週間測定した。
 - ②24時間絶食後、再摂食させたラットのminiature EPSCを、再摂食後24, 72時間、1週間後に測定した。

3. 研究の特色

- (1) 本研究は、この重要なOxytocin ニューロンの空腹/満腹に応じたシナプス可塑的調節、それを介した摂食調節機構の解明を、世界に先駆けて行うもので、独創的である。
- (2) 「環境変化に応じて複数の回路網からどの回路を選択・強化し、情報伝達が行われるか」を担うのはシナプス可塑性である。本申請は摂食・代謝調節の中核を担う Oxytocin ニューロンのシナプス可塑性調節機序を明らかにし、当該分野の発展の先駆けとなることが期待される。

- (3) Oxytocin ニューロンのシナプス可塑性機序の解明は、**過食・肥満の是正**に繋がると期待できる。

4. 研究の成果

- (1) 室傍核オキシトシンニューロンの興奮性シナプス伝達減弱を誘導する**摂食関連因子**の同定
- ① NPY添加によりminiature EPSCの振幅は顕著に減弱し、AMPA/NMDA電流比は有意な増加を示した。Miniature EPSCの振幅はAMPA電流を反映すると考えられるため、AMPA/NMDA比の増加は、NMDA電流の減少を示唆した。
 - ② 細胞内シグナル伝達系の探索のため、IBMX（phosphodiesterase阻害剤）を添加し、cAMP濃度上昇を誘導し、NPYによるminiature EPSCへの作用を検討した。NPY添加によるminiature EPSC振幅減弱作用は、NPY+IBMX添加により消失した。

NPY添加によるAMPA電流、NMDA電流の減少は、先行研究における絶食によるAMPA電流、NMDA電流の減少と一致する。また、NPYはcAMP減少を介して、NMDA受容体、AMPA受容体の低下を誘導することが示唆された。以上から、絶食によるオキシトシンニューロンの興奮性シナプス伝達減弱の機序として、＜絶食→NPY上昇→cAMP減少→NMDA受容体由来Ca流入の減少→AMPA受容体低下＞が示唆された。

- (2) **絶食-再摂食によるOxytocinニューロンのシナプス可塑性変化の回復過程と摂食量**
- ① 24時間絶食-再摂食群の摂食量は、再摂食後3日目まで有意な増加を示し、1週間後には自由摂食群と同程度に回復した。
 - ② 24時間絶食-再摂食群のminiature EPSCの振幅は、再摂食後3日目まで有意な減少を示し、1週間後には自由摂食群と同程度に回復した。

絶食-再摂食による過食とオキシトシンニューロンの興奮性シナプス伝達減弱は相関を示した。オキシトシンニューロンの活性化は摂食抑制を示すことから、興奮性シナプス伝達減弱による神経活動の抑制が過食の原因である可能性が考えられる。今後、絶食によるシナプス伝達減弱からの回復機序を明らかにし、絶食後のリバウンド過食への介入し、肥満是正の端緒となることが期待できる。

低次元有機導体の超伝導状態とバンド構造の関係

神奈川大学 工学部 相澤 啓仁

1. 研究の目的

超伝導体の多くはスピン一重項超伝導と呼ばれる状態に分類され、反平行スピンの電子が重心運動量ゼロのクーパー対を形成することで発現する。近年、本研究で注目する低次元有機導体 $(\text{TMTSF})_2\text{ClO}_4$ では、平行スピンを持った電子対によるスピン三重項超伝導やクーパー対の重心運動量が有限となる Fulde-Ferrell-Larkin-Ovchinnikov (FFLO) 超伝導などの可能性が報告されている。このような超伝導状態が報告されている物質は数種類しかなく、その発現機構の解明は物性物理学の重要な課題のひとつである。

この物質群の特徴のひとつは擬一次元的な電気伝導性にある。これを反映して、電子のバンド構造は擬一次元的になり、物性に重要な寄与をするフェルミ面の形状が非連結なものとなる。もうひとつの特徴として、圧力-温度相図上で超伝導相が磁性相と隣接していることが挙げられる。磁性状態は電子相関効果と密接に関係することから、対象物質の超伝導状態を理解するためには電子相関も重要と考えられている。これらを背景として、本研究では、低次元有機導体 $(\text{TMTSF})_2\text{ClO}_4$ の超伝導状態に注目し、電子相関を考慮した計算により、その発現機構とバンド構造の関係を解明する。

2. 研究の計画・方法

本研究の計画・方法の概略図を図1に示す。まず、対象物質の第一原理計算を行い、電子のバンド構造を決定した。その後、TMTSF分子上の最局在ワニエ軌道を計算し、一電子有効モデルを導出した。得られたモデルに電子間相互作用を考慮し、電子相関に起因する超伝導状態を解析した。これにより、対象物質の超伝導状態に対するバンド構造の影響を明らかにする。

- (1) 第一原理計算を用いて、対象物質における電子のバンド構造を求めた[図1(a)]。この際、異なる計算法(WIEN2kとPWscf)を適用し、結果の妥当性を確認した。
- (2) 第一原理計算の結果を踏まえ、TMTSF分子上の最局在ワニエ軌道をwannier90により求めた[図1(b)]。これにより、対象物質の有効モデルを非経験的計算により導出した。
- (3) 第一原理計算で考慮されていない電子間クーロン相互作用を有効モデルに導入した。これにより生じる電子相関効果を二粒子自己無撞着(Two-Particle Self-Consistent, TPSC)法で取り扱い[図1(c)]、磁気的性質と超伝導状態の関係を解析した。
- (4) 有効モデルの中で超伝導状態に強く影響する値を変数として扱い、バンド構造と超伝導状態の関係を解析した。

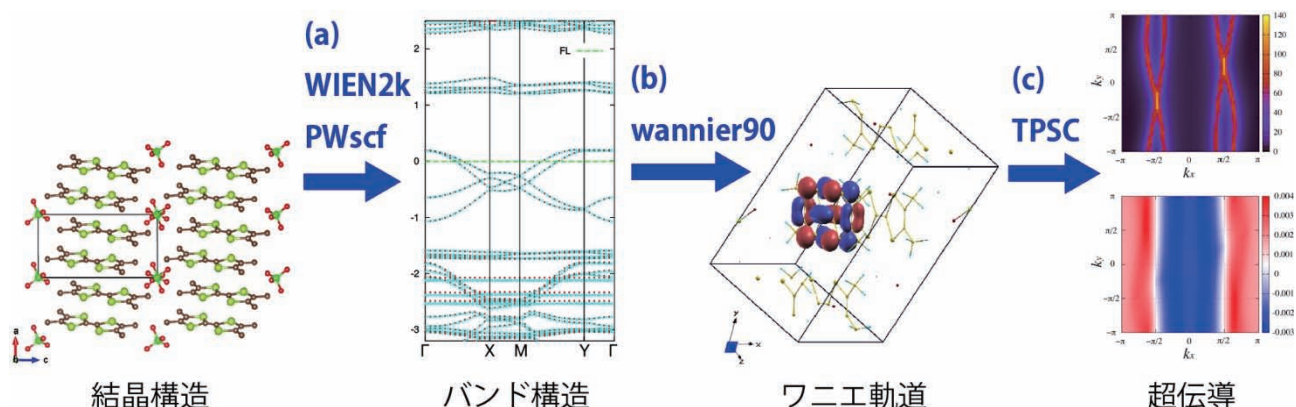


図1：本研究の計画・方法の概略図。

3. 研究の特色

無機物に比べて有機導体は多くの原子で構成されるため、第一原理計算は困難であった。しかし、近年の計算技術の発達により、第一原理計算を用いた有機導体の研究が世界的に活発化しつつある。本研究の特色のひとつは、それに加えて、最局在ワニエ軌道により有効模型を導出したことである。これにより、対象物質のバンド構造と有効模型を非経験的計算により定めることができた。電子相関の計算にTPSC法を用いた点も特色であり、このような複雑な有効模型での研究は少ない。本研究で見積もられた超伝導転移温度は、先行研究の測定値と近い値で得られた。微視的理論の結果が測定値と同程度になるかは自明ではなく、本研究の手法が対象物質とその現象を適切に扱っているものと予想される。この手法は他の物質でも適用可能なため、今後、様々な物質研究への適用が期待される。

4. 研究の成果

- (1) 第一原理計算で得られた有機導体 $(\text{TMTSF})_2\text{ClO}_4$ のバンド構造は図2(a)である。ただし、フェルミ準位を基準として表示されている。WIEN2kとPWscfの結果はフェルミ準位から離れたエネルギー領域でもよく一致しており、妥当な計算結果が得られていると考えられる。フェルミ準位近傍の実線は、最局在ワニエ軌道から導出された有効模型のバンド構造である。図2(a)から、有効模型を用いて求めたバンド構造がフェルミ準位近傍の第一原理バンド構造をよく再現することがわかる。図2(b)に示す第一原理計算で得られたフェルミ面の結果から、左右のフェルミ面がそれぞれ接触することがわかった。対象物質の初期のバンド計算では、これらのフェルミ面は離れており、今回の結果とは異なるものである。本研究で非経験的に導出された有効模型から、このような差異がTMTSF分子のエネルギー差の大きさに起因することがわかった。
- (2) 得られた有効模型にTMTSF分子上で作用する近距離の電子間クーロン斥力相互作用を導入し、電子相関効果をTPSC法で取り扱った。超伝導の発現機構として、磁気ゆらぎ媒介機構を仮定し、超伝導状態を解析した。図3は超伝導状態と磁気ゆらぎの強さの温度依存性である。通常、これらの値は低温化により増加し、1に到達する温度で超伝導や磁気秩序へ転移する。低温化にともない、磁気ゆらぎの発達は徐々に抑制される一方、超伝導状態は発達し続けることがわかった。温度依存性を外挿することで、超伝導転移温度は約 $1.6 \times 10^{-4} \text{ eV}$ (約2K) と見積もられ

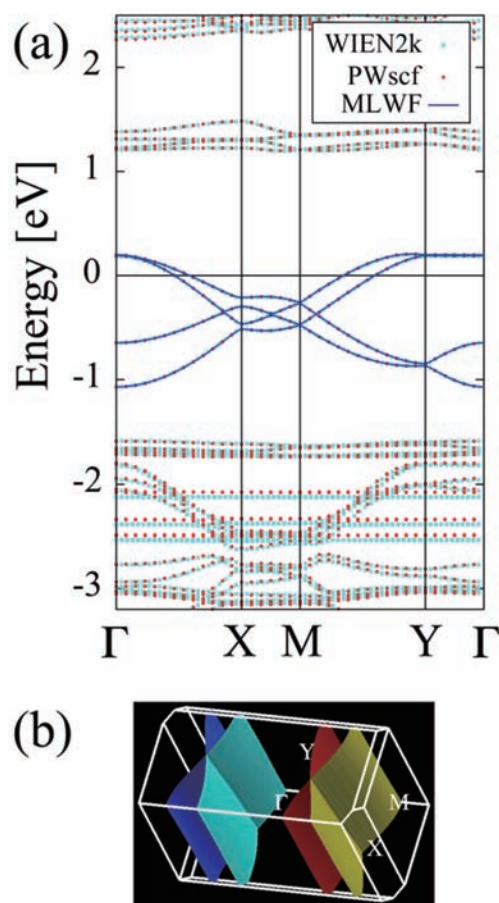


図 2 : (a) 第一原理計算によるバンド構造（点線）と最局在ワニエ軌道から導出された有効模型のバンド構造（実線）、(b) フェルミ面。

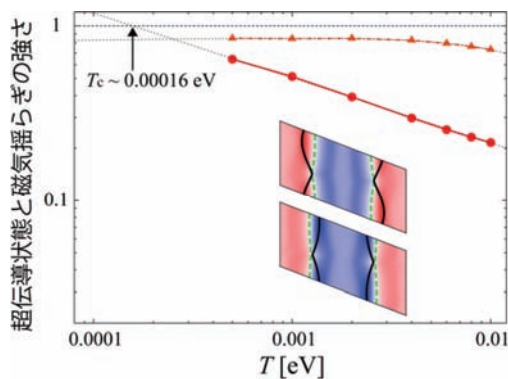


図 3 : 超伝導状態と磁気ゆらぎの強さの温度依存性。挿入図は各フェルミ面の超伝導ギャップ関数。

た。現実の物質の超伝導転移温度が約1Kであることから、本研究の手法は妥当な結果を与えていると考えられる。

- (3) 最近行われた超伝導ギャップの形状に関する実験は、初期のバンド計算の結果に基づいて解釈されている。これを踏まえ、TMTSF分子のエネルギー差を変数とみなした仮想模型を用いて、それが超伝導状態と磁気ゆらぎに与える影響を調べた。図4は、TMTSF分子のエネルギー差がそれらの強さに与える影響の結果である。エネルギー差の増加により、超伝導状態も磁気ゆらぎも抑えられることがわかった。磁気ゆらぎは、バンド構造の変化により異なる磁気構造のゆらぎが競合し始めるために抑制されることがわかった。さらに、この競合が超伝導状態に対して不利に寄与し、超伝導状態も抑制されることを解明した。

(4) 研究成果の公表

- ① Hirohito Aizawa and Kazuhiko Kuroki, “Superconductivity in an effective model derived from Wannier orbitals for an organic conductor $(\text{TMTSF})_2\text{ClO}_4$ ”, Physics Procedia, Vol. 81, pp. 21 (2016). (査読付き)
- ② 相澤啓仁、黒木和彦、「有機導体(TMTSF) $_2\text{ClO}_4$ の超伝導ギャップに対するアニオン秩序化ポテンシャルの関係」、日本物理学会 2016年秋季大会（金沢大学）
- ③ 相澤啓仁、黒木和彦、「擬一次元有機導体(TMTSF) $_2\text{ClO}_4$ における超伝導ギャップとアニオン秩序化ポテンシャルの関係」、平成28年度物性研究所短期研究会「パイ電子系物性科学の最前線」（東京大学）

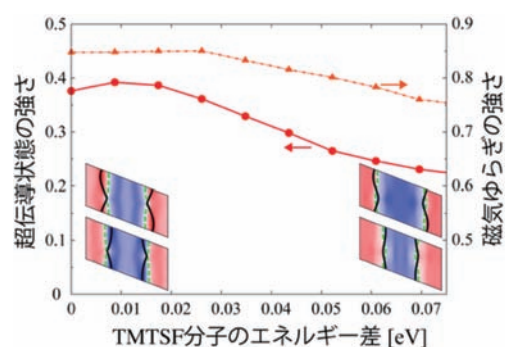


図 4：超伝導状態（左軸）と磁気ゆらぎ（右軸）の強さに対するTMTSF分子のエネルギー差の影響。挿入図はエネルギー差が小さい時と大きい時での超伝導ギャップ関数。

多発性嚢胞腎の疾患管理：尿バイオマーカーL-FABPの可能性

聖マリアンナ医科大学

医学部(内科学(腎臓・高血圧内科))市川 大介

1. 研究の目的

(1) 多発性嚢胞腎の腎障害進展に関して

- ① 遺伝性腎疾患である多発性嚢胞腎(PKD)は、両側腎臓に多数の嚢胞が発生して増大し、進行性に腎機能が低下する疾患である。
- ② PKDは、遺伝性腎疾患としてもっと頻度が高く、透析導入原因疾患の第5位である。毎年約7800人のPKD患者が、末期腎不全へと進行し、血液透析導入となっている。
- ③ PKDの診断は、画像診断により容易に行えるが、PKD進行の疾患管理(モニタリング)法は、十分に確立されていない。
- ④ 現在の診療では、血清クレアチニン(Cr)や画像から算出した腎容積を指標に、PKDの進行度を評価しているが、血清Crは、嚢胞が相当の大きさに腫大しないと増加せず、感度が低い事が問題である。CTやMRI検査などの画像検査から測定された腎容積が、PKD進行を予測する指標として広く認知されているが、画像からの腎容積算出は、専門機関でないと測定できず、また放射線被ばくや高額な検査費用の面から、頻回な測定は困難である。
- ⑤ 最近、PKD治療薬として、トルバプタンが保険適応となった。さらに、様々なPKD治療薬が開発途上にある。このような状況において、PKDの疾患管理を早期から頻回に行うための、簡便で、感度精度が高い有能なバイオマーカーが、必要不可欠である。

(2) 尿中L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)に着目して

- ① PKDは、尿細管上皮細胞の増殖、尿細管腔の拡大から始まる。尿細管腔拡大は、尿細管周囲毛細血管の狭窄をも惹起させるため、PKDの尿細管は低酸素ストレス下にあり、腎内では微小循環障害が生じている可能性がある。
- ② 尿中L型脂肪酸結合蛋白(L type fatty acid binding protein; L-FABP)は、最近保険収載された尿細管障害マーカーであり、急性腎障害や慢性腎臓病における早期診断、腎疾患重症度診断、腎疾患進行予測さらには、心血管疾患発症予測に有用であることが報告されている。
- ③ ヒト腎近位尿細管の上皮細胞に発現しているL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)は、その発現調節領域に、低酸素で誘導される転写因子が結合する低酸素応答領域が存在する。基礎実験では、低酸素刺激により、腎臓でのL-FABP発現が増加し、尿中への排泄が増加する事が報告されている。
- ④ 臨床研究では、尿中L-FABPは、腎内血流量の低下や貧血の進行に伴い増加する事が報告されており、尿中L-FABPは、既存のマーカーと異なり、腎内微小循環障害を鋭敏に反映するため、PKDのモニタリングマーカーとして有用である可能性がある。

(3) 本研究では、基礎的研究により下記の点について明らかにする事を目的とする。

自然発症突然変異PKDモデルのラットを使用し、PKD進行過程におけるL-FABPの腎動態を明らかにする。

2. 研究の計画・方法

（1）多発性嚢胞腎（PKD）モデル

①多発性嚢胞腎（PKD）モデルとして、PKD/CrljCrl-Pkhd1PKD/CrlCrljラットを使用する。このラットは、日本チャールス・リバー（株）のCDラット生産コロニーから発見され、Pkhd1遺伝子突然変異が同定されている自然発症突然変異PKDラットである。集合管由来嚢胞が初期に発生し、その後、嚢胞が腎組織全域に達し、1年で腎不全に進行、死亡する。コントロールとして、CDラットを使用する。

②4週齢のラットを購入し、8週、12週、16週で採尿、採血、腎臓摘出を行う。

（2）組織学的評価

①摘出した腎臓をカルノア固定し、形態学的検討（PAS染色）で尿細管間質障害を評価する。

②間質への炎症細胞浸潤は、マクロファージおよびTリンパ球の表面抗原であるED1、CD3に対する抗体を用いた免疫染色で評価する。

③尿細管間質の線維化は、マッソン染色、抗コラーゲンtype Iおよびtype 3を用いた免疫染色で評価する。

④染色された標本は、光学顕微鏡（対物レンズx10）で無作為に10視野観察され、障害および線維化部位や免疫染色で陽性となった部位の定量解析を専用ソフト（WinRoof）を使用し行う。

（3）血液・尿パラメーター測定

各種パラメーター測定を市販されているキットを用いて行う。

①血清：血清クレアチニン、

②尿：クレアチニン、L-FABP、

③腎機能評価：尿量、血清クレアチニン、尿クレアチニンから糸球体濾過量を算出する。

3. 研究の特色

（1）PKDは、胎児期より嚢胞が確認されるものの30-40歳代までの長期間無症状で経過するため、早期診断が困難な疾患である。また、PKD進行を簡便にモニタリングできる有用な尿中モニタリングマーカーが確立されていない。

（2）本研究では、新規尿細管障害マーカー尿中L-FABPに着目し、尿中L-FABPのPKDモニタリングにおける有用性を基礎的側面から明らかにする。

（3）基礎的研究では、自然発症突然変異PKDモデルを使用し、腎臓におけるL-FABP発現解析および尿中L-FABP測定を行う。このような検討は、未だかつて行われていない。

4. 研究の成果

（1）PKD ratの週齢とともに、嚢胞肥大、尿細管間質障害（炎症細胞浸潤、間質線維化）の進展を認めたが、有意な腎機能低下は認められなかった。

（2）PKD ratの尿中L-FABPは、コントロールのCD ratと比較し、12週齢、16週齢より有意に増加し、嚢胞肥大および尿細管間質障害の進行とともに、その値は増加した。

（3）尿中L-FABPと嚢胞肥大、尿細管間質障害の程度は、有意な相関を認めた。

（4）PKD ratでは、著明な肝障害をみとめたが、血清L-FABPは、PKD ratとCD ratで同程度であった。

（5）尿中L-FABPは、PKDの組織障害と強い相関を認めており、PKD疾患モニタリングに有用である可能性が示された。

グラフト型高分子を担体とした高活性固定化触媒によるフロー合成 —TEMPO担持触媒を用いた高効率酸化反応—

横浜薬科大学 薬学部 奥野 義規

1. 研究の目的

生態系に与える影響を最小限に留めるなど、新しい化学工業のあり方を模索する中で、グリーンサステナブルケミストリーという概念が生まれ、我が国においても化学製品に対する環境政策としてリサイクルを中心とした活動や法整備などが進められている。

このような背景のもと、グラフト型高分子[幹ポリマーに別の機能を有する枝ポリマーを接ぎ木（グラフト）した高分子のこと。以降GPと略する。]触媒が従来の汎用性高分子触媒と比べ、収量、収率、反応時間、TON（触媒回転数）、TOF（触媒回転頻度）、また、フロー反応への利用効率など、ほとんどすべての反応効率において格段に優れていることを世界に先駆け初めて証明した（*ChemSusChem*, 2015）。

その理由は、これまでの高分子には無い、グラフト鎖の優れたフレキシビリティにある。すなわち、既存の高分子はほとんどが架橋構造であり、高分子内部における基質-触媒-試薬の接触効率が低いいため収率、反応時間に悪影響を与える（Fig. 1b）。一方、GPでは、触媒を担持したグラフト鎖が自由に動けるため、フロー反応などの流動環境下において基質-触媒-試薬の接触効率を高く保つことが可能である（Fig. 1a）。

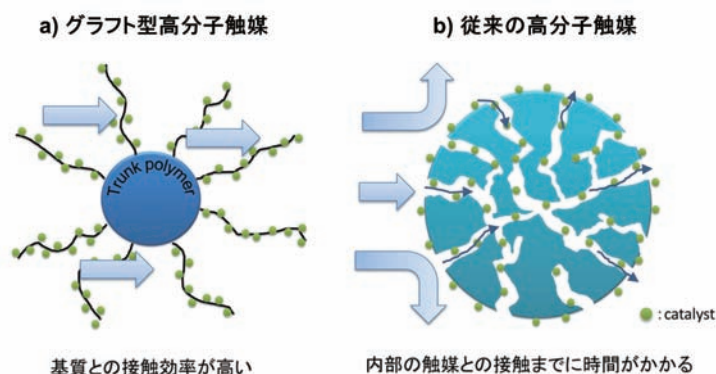


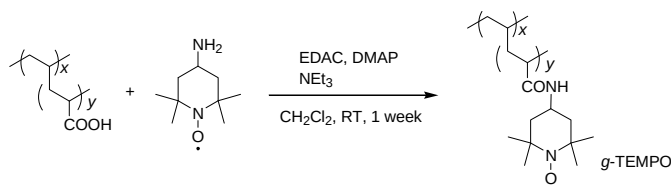
Figure 1 フロー反応における接触効率

以上の背景と知見から、GPを担体として用いることで、新規固定化触媒反応の開発とフロー反応への展開を実施し、次世代の環境調和型有機合成プロセスの構築を目指している。今回注目した酸化反応は様々な合成で用いられているが、例えば医薬品製造において、クロム酸酸化、Swern酸化、IBX酸化、Dess-Martin酸化などは、毒性廃棄物の処理、悪臭や爆発性、そして金属の残存など大きな問題を抱えている。そこで、NaOClなどの安価で安全な共酸化剤を用いることができ、プラントへの応用も可能な酸化触媒TEMPOに着目した。

2. 研究の計画・方法

(1) GP固定化TEMPO (*g*-TEMPO) の合成

高分子担体には、耐久性に優れたpolyethylene (PE) にpolyacrylic acid (PAA) を接ぎ木（グラフト重合）したPE-*g*-PAAを利用する。これは、高極性なPAAによる溶媒や基質との親和性の向上を目的としている。そこで、Scheme 1に従いPE-*g*-PAAに4-aminoTEMPOをアミド結合で担持させた*g*-TEMPOを合成した。



Scheme 1

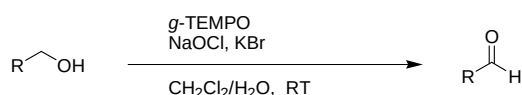
(2) *g*-TEMPO触媒的酸化反応（バッチ反応）

g-TEMPOを用いた有機溶媒中での様々な2級アルコール酸化（Scheme 2b）において一般試験を行った。

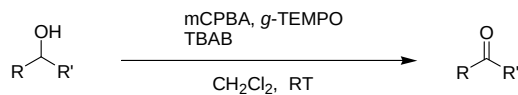
(3) フロー反応への応用

g-TEMPO を本研究室で開発したフロー反応システムに応用した。TEMPO を触媒とする場合、再酸化剤が必要となる。様々な再酸化剤が報告されている中、Scheme 2 に示した酸化方法のフローシステムへの適応試験を行った（一般試験）。更に、架橋構造や多孔性の既存の高分子固定化 TEMPO（Silica-TEMPO、PS-TEMPO）との触媒活性の比較検討を行った（優越性試験）。

a) 一級アルコール → アルデヒド



b) 二級アルコール → ケトン



Scheme 2

3. 研究の特色

固定化触媒は、経済性、実用性、省資源、省エネルギーにつながる環境負荷の小さい反応系として期待される。そこで、自由度、親水性、そして、接触効率の高い枝高分子を持つGPを固定化触媒の担体として利用することで、これまでの固定化触媒の持つ欠点を大幅に改善でき、フローシステムに最適で実用性の高い新規な固定化触媒を開発できる。また、フロー反応による医薬品製造の自動化の研究が進む中、この触媒をフローリアクターに適応することで次世代の医薬品製造プロセスとなることが期待できる。

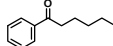
4. 研究の成果

(1) 有機相 - 固相の二相系酸化反応

①バッチ反応（Table 1）

有機溶媒（CH₂Cl₂/ *t*-BuOH=1:1）中、再酸化剤（*m*CPBA）を用いて、2級アルコール酸化反応を行った。ベンジル位のアルコールでは中程度の収率を得ることができた（Entry 1, 2, 3）が、脂肪族アルコールの場合、収率の低下が見られた（Entry 4, 5, 6）。

Table 1

$\text{R-CH(OH)-R'} \xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{t-BuOH (1:1), RT}]{\text{g-TEMPO (0.3 mol\%), mCPBA (1.2 equiv.), TBAB (2 mol\%)}} \text{R-CO-R'}$											
Entry	Product	Reaction Time [h]	Yield [%] ^{*1}	TON ^{*2}	TOF ^{*3} [h ⁻¹]	Entry	Product	Reaction Time [h]	Yield [%] ^{*1}	TON	TOF [h ⁻¹]
1		22h	77%	145	6.6	4		51h	4%	10	0.2
2		24h	84%	156	6.5	5		40h	71%	132	3.3
3		24h	87%	163	6.8	6		51h	2%	5	0.1

^{*1} Isolated Yield
^{*2} Turn Over Number
^{*3} Turn Over Frequency

②フロー反応（Table 2）

①のバッチ反応条件を用いて、フロー反応を行った。立体的に込み入ったベンジル位酸化（Entry 3）に関してはバッチ反応よりも収率の低下が見られたが、その他のベンジル位（Entry 1, 2）においては、収率の改善が確認できた。さらに、脂肪族アルコールの酸化反応（Entry 4）では、バッチ反応の4%から98%へと劇的に向上した。このことから、*g*-TEMPOが流動環境下、効率的な反応を実行できることを証明した。しかし、立体的に込み入ったアルコールでは酸化反応が進行しなかった（Entry 6）。今後は、条件設定など各化合物に合った最適条件を模索する必要があると考える。

Table 2

•Alcohol (0.26 - 0.37 M)
•TBAB (2 mol%)

•mCPBA (1.2 eq.)

Entry	Product	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
1		>99%	12.6	2.5
2		91%	9.1	1.8
3		73%	11.3	2.3

Entry	Product	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
4		98%	9.2	1.8
5		76%	8.7	1.7
6		nd*2	—	—

*1 Assay conversion was calculated by HPLC using an internal standard
*2 not determined

(2) 有機相 - 水相 - 固相の三相系酸化反応

①三相系フロー反応（比較試験）

一般的に水溶媒と固定化触媒は接触効率が低下する。そこで、接触効率改善のため、GPを担体とした *g*-TEMPOにて、NaOCl水溶液を再酸化剤として用いるMontanari Oxidation (*J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 2559-2562) へ応用した。さらに、この反応系において、GP担体の性能を比較する為に、架橋型ポリスチレンとシリカゲル担持TEMPOとフローリアクターシステムにおいて比較検討を行った。その結果、流動環境下では、Table 3で示すように、*g*-TEMPOが最も効率よく反応を進行させていることが判明し、GP担体の高い接触効率を証明することができた。

Table 3

Syringe A
•Benzyl alcohol (0.2 M)
In CH₂Cl₂
flow rate : 50 μL min⁻¹

Syringe B
•NaClO (0.25 M)
•KBr (0.5 M)
In H₂O (NaHCO₃ pH 9.1)
flow rate : 50 μL min⁻¹

Entry	Catalyst	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
1	<i>g</i> -TEMPO ^(b)	94%	12.1	4.0
2	PS-TEMPO*2	75%	9.6	3.2
3	Si-TEMPO*3	60%	7.7	2.6

*1 Assay conversion was calculated by HPLC using an internal standard method.
*2 Polystyrene-Supported TEMPO
*3 Silica-Supported TEMPO

②三相系フロー反応（一般試験）

フロー反応一般試験において、ベンジル位の酸化反応は効率よく進行した。しかし、パラ位にメトキシ基（電子供与基）を有するベンジルアルコールの酸化では、収率11%となり、電子密度に大きく影響されることが判明した。また、ベンジル位以外の1級、2級アルコールでは、中程度の収率となり、(1)-②と同様に各々の最適条件を検討する必要があると考える。

Table 4

Syringe A
•Alcohol (0.2 M)
R-OH In CH₂Cl₂
flow rate : 50 μL min⁻¹

Syringe B
•NaClO (0.25 M)
•KBr (0.5 M)
In H₂O (NaHCO₃ pH 9.1)
flow rate : 50 μL min⁻¹

Entry	Product	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
1		>99%	12.9	4.3
2		68%	8.7	2.9
3		51%	6.6	2.2

Entry	Product	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
4		93%	12.0	4.0
5		11%	1.4	0.3
6 *2		85%	10.9	3.6

*1 Assay conversion was calculated by HPLC using an internal standard method.
*2 Solvent : EtOAc / H₂O (1:1)

障害者支援施設におけるQOLの向上を目指した支援の現状と課題 －支援者の支援行動の実行要因と阻害要因を中心に－

富山福祉短期大学 社会福祉学科 村田 泰弘

1. 研究の目的

知的障害者や知的障害を伴う自閉症者が福祉サービスを選択し、利用できるようになることで、選択される側である福祉施設が自らのサービス内容を見直す必要性に迫られるようになった。つまり、「施設・職員主体のサービス」から「利用者主体のサービス」への転換である。「利用者主体のサービス」とは、利用者の生活の質（Quality of Life：以下、QOL）の向上を目指したサービスが挙げられるのではないだろうか。しかしながら、福祉施設職員による利用者への虐待に関する事件は後を絶たない。行動問題を示す利用者のQOLを目指した支援に悪戦苦闘している職員も多いのではないかと考えられるため、早急な実態把握が必要であろう。

そこで、当該研究では、障害者支援施設職員のQOLに対する認識と実行状況について明らかにすること、QOLを目指した支援行動の実行要因と阻害要因を明らかにすることを目的とし、障害者支援施設職員が利用者へのQOLを目指すために必要な環境整備を検討するための指針としたい。

2. 研究の計画・方法

(1) 研究計画

研究計画としては、平成28年4月から5月までに、先行研究を踏まえた質問項目を作成した。遠藤（2003）の「QOL」に関する質問項目に、先行研究を参考にしながら、障害者支援施設職員のQOLを目指す支援に必要な支援行動の要因に関わる質問項目を加えた。また、質問項目の妥当性を高めるために、障害者支援施設職員4名にその質問項目に沿って回答してもらい、質問項目の修正を行った。6月から7月にかけて、該当する障害者支援施設の生活支援員の人数分の質問紙を郵送・回収をする。質問紙調査の集計作業を8月に行い、調査結果に関する考察を9月から12月にかけて行った。

(2) 研究方法

①対象者

A県内の主に知的障害者を中心に受け入れている障害者支援施設に勤務する行動問題を示す担当利用者のいる生活支援員を対象とした。

②質問紙の作成手続き

筆者（障害児者入所施設勤務経験5年、社会福祉士、教育学修士、社会福祉学修士）が、先行研究を参考に、(1)生活支援員に関する質問紙、(2)行動問題を示す担当利用者に対する生活支援員の施設QOLに対する意識に関する質問紙、(3)施設QOLの向上を目指すために必要な生活支援員の支援実行に関わる要因に関する質問紙の暫定質問項目を作成した。

次に、A県以外で勤務する主に知的障害者を中心に受け入れている障害者支援施設の生活支援員4名に予備調査を行った。予備調査に参加した生活支援員は、男性利用者B棟責任者で勤続年数が5年5ヶ月の男性、男性利用者C棟責任者で勤続年数7年2ヶ月の男性、女性利用者棟責任者で勤続年数9年の女性、支援課長で勤続年数36年の女性であった。予備調査では実際に質問紙に回答してもらった後に、質問項目や質問の仕方、回答方法などの意見交換を行った。予備調査を踏まえて、質問紙の修正を行った。(1)の質問項目は、7項目であった。回答方法は、複数の選択肢の中から一つ選んでもらった。担当利用者の要求表現に関する質問項目と、行動問題の有無に関する質問項目では、要求表現と行動問題の内容について例示した。(2)の質問項目は、30項目であった。同じ質問項目について、施設QOLに対する理想(以下、理想)では、「1. 大切ではない」「2. あまり大切ではない」「3. まあまあ大切である」「4. 大切である」、施設QOLに対する現実(以下、現実)では、「1. できていない」「2. あまりできていない」「3. まあまあできている」「4. できて

いる」のいずれも4件法で回答してもらった。(3)の質問項目は、13項目であった。質問項目(1)から(12)までの回答方法は、「1. 必要ではない」「2. あまり必要ではない」「3. まあまあ必要である」「4. 必要である」の4件法であった。質問項目(13)は、質問項目(1)から(12)に該当しない場合に自由に記入してもらう自由記述であった。

③質問紙調査の手続き

2016年6月から7月の2ヶ月間にかけて調査を実施した。A県厚生部障害福祉課の「障害福祉サービス事業所等情報」に掲載されていた27の障害者支援施設に対して、(1)(2)(3)の質問紙を郵送により配布した。回答は無記名とし、個人の特定ができないようにした。質問紙には、回答できない場合は白紙で提出することが可能であるといった内容を明記した。回答後は、各施設で回収してもらい、返信用封筒に入れ、筆者宛に投函してもらうように依頼した。

④分析方法

(1)(2)(3)の質問項目について単純集計した。その後、(2)行動問題を示す担当利用者に対する生活支援員の施設QOLに対する意識に関する質問項目に関しては、回答番号を点数化し、対応ありt検定を行った。さらに、Cohenの効果量も算出した。分析に用いた統計ソフトは、SPSS(Verion24)であった。

3. 研究の特色

知的障害者や知的障害を伴う自閉症者の行動問題の改善を試みる研究は、対象者の生活場面に実際に介入する事例研究だけではなく、複数の福祉施設や学校などに対して行動問題に関わる質問紙を用いた調査研究からも報告されている。我が国における知的障害児者や発達障害児者の示す行動問題に関わる調査研究をレビュー(村田 2014)してみると、知的障害者などの行動問題の要因に関わる研究(石井2005)をはじめ、知的障害者などの行動問題に対する親のストレスに関わる研究(坂口・別府 2007)、自閉症生徒のコミュニケーション手段と行動問題に関する調査研究(平澤・藤原 2012)などが認められる。最近では、知的障害特別支援学校における行動問題の実態と教員の意識調査(小笠原・湯川他2015)が報告されている。しかし、障害者支援施設職員における利用者のQOLに対する認識と実行状況、障害者支援施設職員のQOLを目指した支援行動の実行要因と阻害要因を明らかにすることを目的とした調査研究は、ほとんど見当たらない。

4. 研究の成果

(1) 行動問題を示す担当利用者に対する生活支援員の施設QOLに対する意識

「施設QOLの現実」に関するすべての質問項目の平均値が、「施設QOLの理想」に関する平均値よりも低く、有意確率は $p<0.001$ であった。Cohenの効果量では、効果の大きさが17項目、中が9項目、小が4項目であった。以上の結果から、行動問題を示す知的障害者の施設QOLでは、生活支援員が考える施設QOLの「理想」と「現実」には差があることが明らかになった。

Cohenの効果量の効果が大きかった質問項目のうち、(2)個室を持つ、(5)食事時間を自由に選択できる、(12)外出が自由にできる、(18)施設全体の雰囲気明るい、(20)教養や知識を学ぶ機会がある、(25)プライバシーが守られている、(26)毎日お風呂に入れる、(29)食事メニューについて、朝・昼・夕のいずれかで自由に選択できる機会が毎日あるに関しては、生活支援員一人で改善を目指すことが難しい項目である。つまり、施設全体の方針が強い影響を与える項目であると考えられる。施設QOLの指標を施設全体で共有し、施設全体の取り組みとして定期的な確認と改善を継続していくことが求められていると思われる。施設QOLの指標を活用することで、各障害者支援施設の現状と課題の把握、さらには、利用者一人ひとりの支援内容の改善にもつながるであろう。

効果量の効果が大きかった質問項目のうち、(1)様々な行事を自分で選択して参加できる、(3)街へ出かけて社会資源を活用する、(10)友人ができる、(13)職員は利用者に対しての接し方・態

度・話し方について配慮している、(15)利用者の意思を尊重する、(17)楽しめる余暇活動がある、(19)利用者の不満・苦情を受け入れられる、(21)自分のお金で嗜好品や趣味のものが自由に買える、(30)施設外の友人と自由に交流ができるに関しては、利用者の示す行動問題の影響が考えられる。利用者への支援方法の決定は、担当者である生活支援員によるところが大きいと思われるが、行動問題に応じた支援に困難さを感じている生活支援員が多いことが推測される。利用者の示す行動問題への支援が不十分なために、利用者の様々な活動参加の機会の広がりにはマイナスの影響が生じたり、利用者の人権に配慮することを難しくしているのではないかと考えられる。利用者の示す行動問題に対応した支援の充実が早急に求められるであろう。

(2) 施設QOLの向上を目指すために必要な生活支援員の支援実行に関わる要因

生活支援員が施設QOLの向上を目指すために必要と考える取り組みとして、「必要」と回答した50%以上の質問項目（8項目）を整理すると、①担当利用者に関わる時間の確保に関すること（質問項目(1)）、②行動問題や障害特性に関する知識や技術を学ぶ機会に関すること（質問項目(2、8)）、③チームアプローチを円滑に進めるための機会に関すること（質問項目(9)）、④スーパービジョンの機会に関すること（質問項目(3、5、6、7)）であった。①担当利用者に関わる時間の確保に関することに関しては、担当利用者との十分な関わりを通して、担当利用者を理解し、施設QOLの向上につなげていきたいと考えていると思われる。生活支援員は、利用者支援以外にも、居室やトイレなどの掃除や洗濯、食事の運搬から配膳、書類作成など、一人で複数の役割を担っている。利用者支援以外の業務量の見直しや調整が求められる。②行動問題や障害特性に関する知識や技術を学ぶ機会に関することに関しては、担当利用者の行動問題や障害特性に応じた支援方法の理解を深めることで、担当利用者の施設QOLの向上に役立てたいと考えているためであると思われる。障害者支援施設における行動問題を示す利用者や障害特性に配慮を要する利用者の割合は高く、生活支援員は日々試行錯誤を繰り返しながら利用者支援に取り組んでいる。今後、施設全体の共通理解と統一した支援の実現には、施設全体での利用者の行動問題や障害特性に応じた支援に関する研修の計画的、定期的な実施が強く求められる。③チームアプローチを円滑に進めるための機会に関することに関しては、利用者の支援の実施や支援効果を高めるためには、施設全体の専門職の協力が必要と考えるからであろう。実際の利用者支援では、担当者である生活支援員以外の専門職とのチームアプローチによって実施される。24時間365日利用者支援を行う障害者支援施設では、すべての利用者に関する支援方法について、すべての専門職が理解し、統一した支援の実行が重要になる。円滑なチームアプローチを進めていくための体制整備も重要な検討課題となるとと思われる。④スーパービジョンの機会に関することに関しては、担当利用者の支援を振り返ることで、担当利用者への支援の質の向上につなげたいと考えているからであると思われる。同僚、上司、専門家などとの日々の支援の振り返りが、生活支援員の支援の質を高め、担当利用者の施設QOLの向上につながるのではないかと考える。特に、行動問題を示す利用者や障害特性に応じた支援を要する利用者を常時支援しなければならない生活支援員へのスーパービジョン体制の構築は、緊急に対応すべき課題であると言えるであろう。

以上のことから、施設QOLの向上を目指すために必要な生活支援員の支援実行に関わる要因として、①担当利用者に関わる時間の確保に関すること、②行動問題や障害特性に関する知識や技術を学ぶ機会に関すること、③チームアプローチを円滑に進めるための機会に関すること、④スーパービジョンの機会に関することが示唆された。施設QOLの向上を目指すために必要な生活支援員の支援実行の促進には、①②③④への改善が大きな鍵になると考えられる。一方で、①②③④への改善が進まなければ、①②③④が、施設QOLの向上を目指すために必要な生活支援員の支援実行の阻害要因となる可能性が高いと考えられる。

今後の課題として、障害者支援施設において、①担当利用者に関わる時間の確保に関すること、②行動問題や障害特性に関する知識や技術を学ぶ機会に関すること、③チームアプローチを円滑に進めるための機会に関すること、④スーパービジョンの機会に関することについての実態調査が求められると思われる。今回の研究成果と関連付けながら検討していきたい。

うつ解明に向けたストレス状態の脳で発現変動する遺伝子の研究 ー iPS細胞分化系を用いた遺伝子機能の解明ー

金沢医科大学 医学部 齋藤 英仁

1. 研究の目的

これまでの研究から、ストレスが「うつ状態」の重要なトリガーであること（Gold et al, N Engl J Med 319 : 413, 1988）、また、「うつ状態」が認知症の危険因子であること（Geerling M et al, Br J Psychiatry 176 : 575, 2000）が示されている。しかしながら、ストレスが脳の遺伝子発現にどのような影響を与え、それが神経機能などにどのような影響を与え、うつ状態や認知症に繋がるのかについては、研究が進んでいない。

申請者は、強制水泳ストレスを負荷する「うつモデルマウス」の脳海馬で発現が変化する遺伝子の同定を行い、複数の遺伝子を同定した。うち発現が低下する遺伝子は3種類、発現が上昇する遺伝子は4種類である。

本研究では、うつの分子基盤を解明する第一歩として

- (1) 強制水泳ストレス負荷マウスの脳海馬で同定した遺伝子発現変化が強制水泳以外のストレス負荷でも同様に起こるか
- (2) ストレス負荷マウスの脳海馬で同定した遺伝子発現変化が脳細胞の分化や機能にどう影響するかを明らかにする。

2. 研究の計画・方法

- (1) 強制水泳ストレス負荷マウスの脳海馬で同定した遺伝子発現変化が強制水泳以外のストレス負荷でも同様に起こるかについて、社会的敗北ストレスを負荷するマウスを用いて明らかにする。

①社会的敗北ストレスを負荷する「うつモデルマウス」を作成する。

C57BL/6マウスに体格的に優位なICRマウスから1日10分間の攻撃を10日間暴露する。

うつ様行動試験（社会行動試験、尾懸垂試験）を行い、社会的敗北ストレスによる「うつモデルマウス」が作成できたかを確認する。

②社会的敗北ストレスを負荷したマウスの脳海馬で発現変動する遺伝子を明らかにする。

マウスの脳から海馬を分離し、RNA精製後、qPCRで遺伝子発現を解析する。

- (2) ストレス負荷マウスの脳海馬で同定した遺伝子発現変化が脳細胞の分化や機能にどう影響するかをiPS細胞の分化系を用いて明らかにする。

①マウス海馬での発現変動細胞を明らかにする。

免疫組織染色法で当該遺伝子が発現している細胞種を明らかにする。

②レンチウイルスベクターの作製

ストレスで発現上昇する遺伝子については過剰発現レンチウイルスベクターを、発現が低下する遺伝子については当該遺伝子に対するshRNAを発現する発現ノックダウンレンチウイルスベクターを作成する。

③前駆細胞およびiPS細胞の準備と細胞分化の検証

④発現変動遺伝子が脳細胞分化に与える影響の解明

3. 研究の特色

ストレスがうつ状態発生の大きなリスクファクターであることから、本研究の特色は、

- (1) これまでほとんど明らかにされていないストレスによる脳の遺伝子発現変化を明らかにし、ストレスにより発現変動する遺伝子が脳細胞の分化と機能にどう影響を与えるのかを解明するところにある。

- (2) 強制水泳ストレスおよび社会的敗北ストレスを負荷して「うつ状態」に陥ったマウスの脳海馬で発現変動する遺伝子を同定し、その機能をiPS細胞および前駆細胞を用いて解明するところにある。

4. 研究の成果

(1) 社会的敗北ストレスを負荷する「うつモデルマウス」の作成

体格的に優位なICRマウスから1日10分間/10日間の攻撃を受けたC57BL/6マウスに社会行動試験を行なった。ストレスを受けていないマウスは、新奇ICRマウスに興味を示したのに対し、ストレスを受けたマウスは新奇ICRマウスから忌避反応を示した。また、尾懸垂試験において、ストレスを受けていないマウスは無動時間が短かったのに対して、ストレスを受けたマウスは無動時間が長かった。このことから、社会的敗北ストレスの負荷による「うつモデルマウス」が作成できたと考えられる。

(2) 社会的敗北ストレスを負荷したマウスの脳海馬での発現変動する遺伝子の解明

社会的敗北ストレスを負荷したマウスの脳海馬を分離後、RNAを精製し、qPCRで遺伝子発現を解析した。その結果、強制水泳ストレスを負荷する「うつモデルマウス」の脳海馬で発現が低下した遺伝子が同様に発現が低下することを確認した。また、強制水泳ストレスを負荷する「うつモデルマウス」の脳海馬で発現が上昇した遺伝子が同様に発現が上昇することを確認した。この結果から、強制水泳ストレス負荷マウスの脳海馬で同定した遺伝子が別のストレス負荷による「うつモデルマウス」でも同様の発現変化を起こすことが明らかとなった。

(3) マウス海馬での遺伝子発現変動した細胞の解明

海馬のパラフィン切片を免疫組織染色法により遺伝子産物に対する抗体で染色した結果、血管細胞には発現がなく、神経細胞に発現していることが明らかになった。

(4) レンチウイルスベクターの作製

発現が低下する遺伝子の1つに対するshRNAを発現する発現ノックダウンレンチウイルスベクターを作成し、効果を確認した。現在、他の遺伝子についてもレンチウイルスベクターを作成中である。

(5) 前駆細胞およびiPS細胞の準備と細胞分化の検証

「ヒト神経前駆細胞 ReNCell VM株」を入手し、神経細胞への分化を確認した。今後は、京都大学iPS細胞研究所から「健常人由来ヒトiPS細胞」を入手し、神経細胞への分化系を確立する予定である。

(6) 発現変動遺伝子が脳細胞分化に与える影響の解明

現在、作成したレンチウイルスベクターを用いて「ヒト神経前駆細胞 ReNCell VM株」の遺伝子発現を異常化させ、細胞分化への影響を検討中である。さらに「健常人由来ヒトiPS細胞」の遺伝子発現を異常化させ、細胞分化の影響を検討する予定である。

歯周病原菌の異所性肺感染における IL-17サイトカイン・ネットワークの検討

愛知学院大学 歯学部 藤村 岳樹

1. 研究の目的

超高齢社会となった我が国で問題となっている高齢者における肺炎の多くは、誤嚥性肺炎であり、歯周病原細菌や肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）が起因菌になると考えられている。また、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* は歯周炎の組織における検出量は少ないものの、口腔のフローラの構成を変化させることで炎症などの免疫の破綻をひき起こすキーストーン細菌であると考えられており、誤嚥性肺炎においても *P. gingivalis* がキーストーン細菌としてはたらいっている可能性がある。しかし、*P. gingivalis* と *S. pneumoniae* を用いた混合感染による実験的肺炎モデルに関する報告はなく、全く明らかになっていない。また近年、炎症性サイトカインである IL-17 は炎症誘導だけでなく、細胞性および液性獲得免疫といった広範な免疫応答を制御することが明らかにされ、感染防御の観点からも注目を集めている。本研究では、誤嚥性肺炎を想定し、歯周病原細菌と肺炎球菌の混合感染による実験的肺炎モデルマウスを確立し、IL-17 を共通な要素とするサイトカイン・ネットワークによる免疫制御および感染防御機構を解明することを目的とした。

2. 研究の計画・方法

(1) *P. gingivalis* および *S. pneumoniae* の混合感染実験的肺炎モデルマウスの作製

本研究申請時は *P. gingivalis* 単独感染により実験的肺炎モデルマウスを作製する計画であったが、誤嚥性肺炎の病態を強く反映できると考え、*P. gingivalis* および *S. pneumoniae* を用いた混合肺感染に変更した。

マウス経気道感染：実験動物には、C57BL/6 マウスを用いる。ジエチルエーテル吸入およびペントバルビタールナトリウムを腹腔内注射し全身麻酔下で、頸部を消毒後切開し、気管内に *P. gingivalis* および *S. pneumoniae* 菌液を 26 G シリンジで接種する。その際の総菌数は 1×10^7 CFU とした。群分けは PBS 群（コントロール群）、*P. gingivalis* 単独群、*S. pneumoniae* 単独群および混合感染群とした。混合感染群では *P. gingivalis* と *S. pneumoniae* の比率を 2 : 8 に調整し、実験的肺炎モデルマウスを作製した。すべてのマウスは、温度（ $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ）と湿度（ $45 \pm 10\%$ ）が一定な恒温動物室で 12 時間の明暗周期（8:00 A. M. ~ 8:00 P. M. 点灯）の環境下において、固形飼料を与え、飲料水として水道水を自動供給装置によって与え、飼育した。

(2) *P. gingivalis* および *S. pneumoniae* の混合感染実験的肺炎モデルマウスの病理組織学的検討

混合感染実験的肺炎惹起より 1 日後にマウスの肺を摘出し、通法に従いパラフィン包埋組織切片を作製する。ヘマトキシリン・エオジン染色を施し炎症性細胞浸潤を解析した。

3. 研究の特色

肺炎は高齢者を中心に致死的な疾患であり、その死亡率も増加傾向にある。また、老人性肺炎のほとんどは、誤嚥性肺炎であり、歯周病が強いリスクファクターであると考えられている。これまでに歯周病と肺炎の関係性に関しては様々な報告がされているが、免疫応答、特に IL-17 を中心としたサイトカインに関連した報告はほとんどされていない。歯周病原細菌と肺炎球菌による混合感染における免疫応答を解析する事で、誤嚥性肺炎に関連する免疫応答の特徴を解明する一助となると考えている。

また、感染モデルを用いた実験にて IL-17 は、初期の感染防御において重要な役割を担っていると考えられている。そこで、今回の実験で IL-17 や関連サイトカインや主要な IL-17 産生細胞の遺伝子発現に関して明らかにすることで、IL-17 による感染防御のメカニズム解明に繋がると考えている。また将来的には、IL-17 を標的とした生体防御機構の調節について検討し、肺炎の予防・治療にフィードバックすることを目指している。誤嚥性肺炎の発症メカニズムにおいて、高齢者

で免疫能が低下することが病因の1つとされており、IL-17産生細胞を制御し、免疫能を増強することで、予防や症状緩和に応用できるのではないかと考えている。日本において、肺炎は死因の第3位となっているが、その約96%は65歳以上の高齢者が占めている。日本の超高齢化社会時代はもう終わり、今や超高齢社会となっている。超高齢社会である日本において肺炎対策は命題であり、このような免疫療法の実現は、口腔ケアとは異なるアプローチでの誤嚥性肺炎の対策として、年々増加傾向にある肺炎での死亡数・死亡率の減少につながり、健康寿命の延伸、さらに国の医療費削減にも大きく貢献できると思われ、非常に意義深いものになると考える。

4. 研究の成果

*P. gingivalis*および*S. pneumoniae*を経気道的に混合感染させたマウスの肺にヘマトキシリン・エオジン染色を施し炎症性細胞浸潤を解析したところ、PBS群においては炎症性細胞の浸潤を認めず、肺胞構造も正常像を呈していた。一方、各菌の単独感染および混合感染を行った群においては気管支周囲に炎症性細胞浸潤および肺胞上皮の肥厚を認め、炎症の惹起が確認された。さらに、単独感染に比較し、*P. gingivalis*および*S. pneumoniae*の混合感染群では顕著な炎症所見が観察された（図1）。よって、*P. gingivalis*および*S. pneumoniae*の混合感染により単独感染と比較し、炎症が増強される可能性が示唆された。今後は採取した肺組織および肺胞洗浄液を用いてIL-17に関連した炎症性サイトカインの遺伝子発現、タンパク発現の解析および主要なIL-17産生細胞の解析を行う予定である。

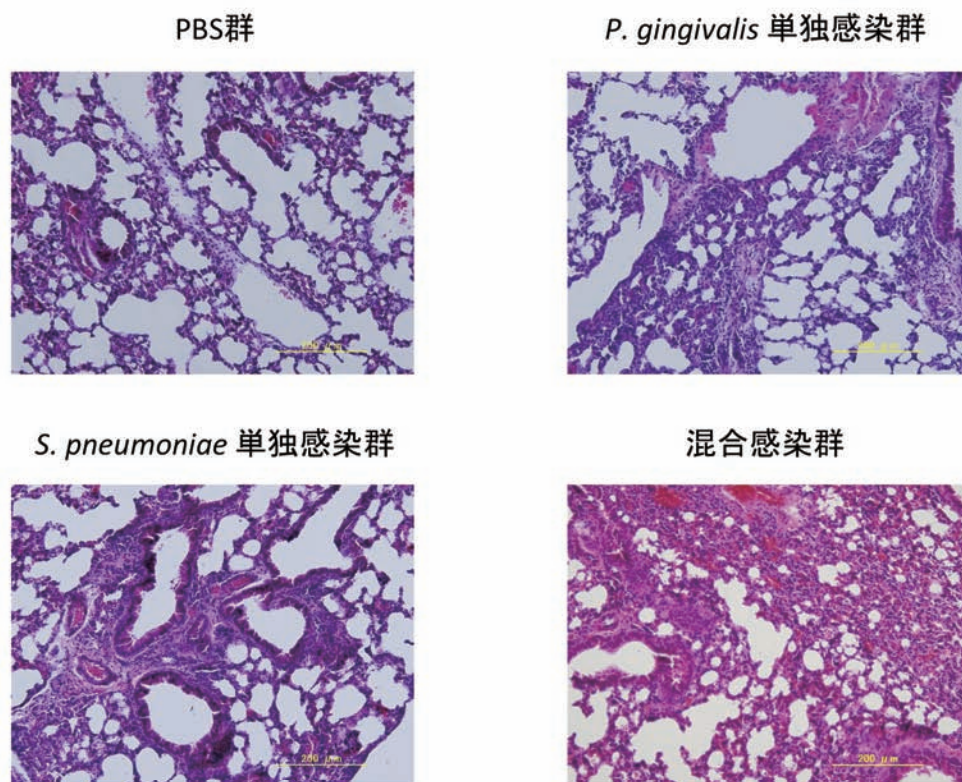


図1 *P. gingivalis*および*S. pneumoniae*の混合感染実験的肺炎モデルマウスの病理組織学的検討

がん微小環境を標的とした間質性肺炎合併肺がんの新規治療戦略 — 間質性肺炎合併肺癌に対する新たな治療戦略 —

藤田保健衛生大学 第一病理学 前田 亮

1. 研究の目的

肺がん患者の特徴としては、慢性閉塞性肺疾患や間質性肺疾患などの呼吸器疾患を基礎疾患に持つ患者が多いことがあげられる。特に、間質性肺炎は従来の治療では致死的な急性増悪を来しやすいことから、最も治療に苦慮する合併症であり、肺がん診療を行う上で高い頻度で遭遇する間質性肺炎合併肺がんの患者のがん治療が十分になされていないのが現状である。この現状を打破するために、治療に難渋する間質性肺炎合併肺がん患者の診療及び治療成績を向上させるための新たな治療戦略を構築することが本研究の目的である。

2. 研究の計画・方法

(1) 間質性肺炎と肺癌の進展

- ① 臨床データ（間質性肺炎合併肺癌は非合併肺癌よりも病理学的悪性度が高いことが判明）より、間質性肺炎の肺微小環境が既存の肺癌の悪性度を高めるのかという独自の新しい仮説を提唱し、その仮説を基礎実験で検証する。
- ② 間質性肺炎の肺微小環境が肺癌の進行を促進させるメカニズムの解明を目指す。

(2) 間質性肺炎合併肺癌に対する新たな治療戦略の構築

- ① 間質性肺炎合併肺がんの進展に対して、抗線維化薬が癌の進行抑制に対して効果を示すかを動物実験で検証する。
- ② 間質性肺炎合併進行非小細胞肺がんに対する抗線維化薬併用投与の安全性と有効性に関する臨床試験の早期実現を目指す。

3. 研究の特色

これまでの臨床研究成果から、本研究では、間質性肺炎における肺の微小環境が肺がんの進行を促進させるのかを検証すると同時に、抗線維化薬投与により間質性肺炎を制御することで、間質性肺炎合併肺がんにおけるがんの進行を抑制することができるのかを検証することに焦点を置いて、上記の目的を達成させる。本研究計画によって、間質性肺炎合併肺がんに対する新規治療戦略として、抗線維化薬を投与し間質性肺炎を制御することが、間質性肺炎合併肺がんの新たな治療アプローチ方法となり得るのかを明らかにすることで、現状の間質性肺炎合併肺がん治療に、大きなブレイクスルーをもたらす可能性のある、革新的治療戦略を提唱し得ると考えられる。

4. 研究の成果

(1) 研究ツールとしてのマウスモデルの確立

① 間質性肺炎マウスモデルの導入

C57BL/6マウスにブレオマイシンを経気道的に投与することで、ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスを作製した。ブレオマイシン投与後、14日目よりマウス肺に線維化病変が認められ、肺の線維化病変は少なくともブレオマイシン投与後28日目まで認められた。

② 肺がんの同所性肺移植モデルの確立

C57BL/6マウスの左肺に、同系マウス由来の肺がん細胞株である Lewis lung carcinoma cell (LLC) を同所性移植させる方法を確立した。同所性肺移植後7日目には肉眼的に腫瘍を確認することができ、10日目には縦隔リンパ節転移が認められた。生存期間は約20日で、対側肺を含む遠隔臓器への転移は認められなかった。

(2) *In vivo* イメージングシステムを用いた肺がん実験モデルの確立

LLC にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ルシフェリン投与と IVIS Imaging System により、*in vivo* でリアルタイムに腫瘍の経時的観察を行うモデルを確立した。

(3) 間質性肺炎における肺微小環境は、肺がんのリンパ節転移、対側肺転移を促進させる

ブレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスモデル（ブレオマイシン投与後14日目）にマウス肺がん細胞株 LLC を左肺に同所性肺移植し、同所性移植後14日目に形成された腫瘍を評価した。ブレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスモデルに形成された腫瘍と、コントロールとして PBS を経気道的に投与したマウスに形成された腫瘍を比較したところ、腫瘍の大きさに有意差は認められなかったものの、ブレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスモデルで形成された腫瘍では縦隔リンパ節転移量が有意に増加し、コントロールマウスでは全く認められなかった対側肺転移が認められるようになった。

(4) 抗線維化薬を投与し間質性肺炎を制御することで、肺がんの進行は抑制される

抗線維化薬投与により間質性肺炎を制御することで、間質性肺炎合併肺がんにおけるがんの進行を抑制することができるのかを検証した。ピルフェニドンは、2008年10月に特発性肺線維症の治療薬として初めて認可された抗線維化剤で、間質性肺炎の病態に関わる各種サイトカインおよび増殖因子に対する産生調節作用や、線維芽細胞増殖抑制作用を有することが知られている。肺がんの同所性肺移植モデルにブレオマイシンで間質性肺炎惹起させ、間質性肺炎に対する治療薬であるピルフェニドンを投与し、間質性肺炎を制御したところ、肺がんの縦隔リンパ節転移、対側肺転移が有意に抑制された。

本研究期間内において、間質性肺炎における肺の微小環境が肺がんの悪性度を高める因子として働いているという、臨床研究の成果に基づいた洞察より導いた作業仮説を、マウスモデルを用いて検証し、間質性肺炎における肺微小環境は、肺がんのリンパ節転移、対側肺転移を促進させることを示した。さらに、抗線維化薬投与により間質性肺炎を制御することで、間質性肺炎合併肺がんにおけるがんの進行を抑制することができるのかを検証し、既に臨床応用されている抗線維化薬ピルフェニドンが効果を示すことが非臨床モデルで立証することができたと考えている。

本研究の意義をご理解いただき、研究助成をご支援いただきました日本私立学校振興・共済事業団の関係各位に心より御礼申し上げます。

L. bulgaricusの摂取によるストレスならびにうつ病症状の制御に関する研究

名城大学 農学部 長澤 麻央

1. 研究の目的

現代社会において、私達は様々なストレスに曝されおり、これが身体的あるいは精神的な疾患の発症リスクを増加させることが知られている。中でも、精神疾患は、患者の生活の質を低下させるだけではなく、症状がひどい場合には自殺に繋がる危険性もある。そのため、現代社会においてストレス制御メカニズムの解明が急務である。動物がストレスを感じた際には食欲が低下するため、栄養状態が悪化することは周知の事実である。そのため、栄養状態を維持すること、あるいは、改善することがストレスによって現れる心身への悪影響を緩和できる可能性が考えられる。

そこで本研究では、栄養状態を良好に保つための食品として栄養価の高い乳製品（脱脂乳ならびに発酵乳）に注目し、これらを積極的に摂取することでストレスによって誘導される精神疾患を予防できるか検討した。

2. 研究の計画・方法

(1) 脱脂乳ならびに発酵乳中の遊離アミノ酸濃度の分析

脱脂粉乳（全国酪農業協同組合連合会）から15%還元脱脂乳を調製し、これを脱脂乳試料として給与試験に用いた。また、15%還元脱脂乳に*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*未同定株（以下BLと記す）を接種し、37℃で発酵させたものを発酵乳試料として給与試験に用いた。

(2) 乳製品の摂取がうつ様行動へ及ぼす影響

雄性のICRマウスを1週間馴化させた後に、蒸留水、脱脂乳あるいは発酵乳を長期に渡り経口摂取させた。給与試験終了後、うつ様行動を評価するために強制水泳試験を行った。

(3) 乳製品の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

雄性のICRマウスを1週間馴化させた後に、蒸留水、脱脂乳あるいは発酵乳を長期に渡り経口摂取させた。給与試験終了後、不安様行動を評価するためにオープンフィールド試験ならびに高架式十字迷路試験を行った。

(4) 慢性ストレス条件下において乳製品の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

①慢性ストレス動物モデルの作製

最近の研究から、炎症性サイトカインの産生を誘導するリポ多糖（以下LPSと記す）を腹腔内投与することで慢性ストレス様状態を誘導できる可能性が示されている。そこで、雄性のICRマウスに大腸菌0127:B8由来あるいは大腸菌0111:B4由来のLPSを投与することで慢性ストレスモデル動物を作製し、このモデル動物において不安様行動ならびにうつ様行動が誘導されるかを検証した。

②慢性ストレス動物モデルにおいて乳製品の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

雄性のICRマウスに蒸留水、脱脂乳あるいは発酵乳をあらかじめ長期に渡り経口摂取させた後に、大腸菌0111:B4由来のLPSを腹腔内投与することで、慢性ストレス誘導性の不安様症状を誘導した。その後、動物の不安様行動を観察することで、乳製品の摂取が慢性ストレス誘導性の不安様症状を予防できるか検討した。

3. 研究の特色

近年、食品の三次機能、いわゆる「機能性」が注目されており、世間からの「食」への関心が高まっている。流通している機能性食品のほとんどは肥満や高血圧などの身体的な健康に着目したものが多く、精神的な健康に焦点を当てた商品は少ない。しかし、現代社会においてストレスやそれによって誘導される精神疾患の予防あるいは症状緩和が急務である。本研究では、「食事」を介した「ストレスの制御」を目的としており、我々が直面しているストレス社会において必要不可欠な研究課題である。

4. 研究の成果

(1) 乳製品の摂取がうつ様行動へ及ぼす影響

乳製品の摂取がげっ歯類のうつ様行動へ及ぼす影響を明らかにするため、うつ様行動を評価できる強制水泳試験を行った。この試験において、「うつ様行動の程度」は「不動時間の長さ」と正の相関を示す。つまり、不動時間が長ければ強いうつ様行動を示しており、また、不動時間が短縮されれば抗うつ様効果が認められることを示す。本研究において、発酵乳を摂取させた場合には不動時間の短縮が認められなかったものの、脱脂乳を摂取させることで不動時間の有意な短縮が認められた。以上より、脱脂乳の積極的な摂取はうつ様行動を予防出来る可能性が示された。

(2) 乳製品の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

乳製品の摂取がげっ歯類の不安様行動へ及ぼす影響を明らかにするために、不安様行動を評価できるオープンフィールド試験ならびに高架式十字迷路試験を行った。オープンフィールド試験は、センターエリアでの移動距離を弱い不安様行動の指標とし、げっ歯類の不安様行動を評価する試験である。また、高架式十字迷路試験は、オープンアームでの移動距離を強い不安様行動の指標としてげっ歯類の不安様行動を評価する試験である。両試験において、「不安様行動の程度」と「センターエリアでの移動距離あるいはオープンアームでの移動距離」は負の相関を示す。つまり、それぞれの値が増加すれば抗不安様効果が認められることを示す。本試験において、脱脂乳ならびに発酵乳の長期摂取は、強い不安様行動の指標である高架式十字迷路試験におけるオープンアームでの移動距離に影響を及ぼさなかったものの、弱い不安様行動の指標であるオープンフィールド試験におけるセンターエリアでの移動距離を増加させる結果となった。以上より、積極的な乳製品の摂取は弱い不安様行動を予防出来る可能性が示された。

(3) 慢性ストレス条件下において乳製品の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

①慢性ストレス動物モデルの作製

LPSを投与することで強い不安様行動ならびにうつ様行動を呈する慢性ストレス動物モデルを作製できるか検討した。LPSを投与することで、不安様行動の指標である高架式十字迷路試験におけるオープンアームでの移動距離が減少することを確認した。一方、強制水泳試験におけるうつ様行動には影響を及ぼさなかった。以上より、LPSを投与することで、強い不安様行動を呈する慢性ストレス動物モデルを作製できることを確認した。

②慢性ストレス動物モデルにおいて乳製品の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

そこで次に、乳製品の積極的な摂取がLPS誘導性の強い不安様行動を予防出来るか検証した。LPSを投与する前に脱脂乳を長期間給与させることで、LPS投与によって減少するはずの高架式十字迷路試験におけるオープンアームでの移動距離を、LPSを投与していない動物と同じ水準まで回復させることができた。一方、発酵乳の摂取による影響は確認できなかった。以上より、脱脂乳の積極的な摂取によって慢性ストレス誘導性の強い不安様行動を予防出来る可能性が示された。

ゲノム編集を用いたがんウイルス感染細胞からの ウイルスゲノム除去 ー潜伏感染細胞からのカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス排除へ向け た分子基盤構築ー

京都薬科大学 渡部 匡史

1. 研究の目的

(1) 背景：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)は、初感染後に生涯に渡り潜伏感染を維持する。極度な免疫低下時に、KSHVは再活性化しカポジ肉腫や原発性体腔性リンパ腫(PEL)などのがんを発症させる。

(2) 問題点：現時点で、潜伏感染状態に移行したKSHVを生体から排除する手段は存在しない。KSHV関連腫瘍発症時には抗がん剤による対症療法がとられるが、患者全身状態が不良の場合が多く、治療には困難がともなう。

(3) 解決策：ゲノム編集により感染細胞中のウイルスゲノムを直接改変することで、KSHVの排除を目指す。ゲノム編集技術の一つであるCRISPR/Cas9システムは、配列特異的sgRNAとそれを認識するDNA切断酵素Cas9により標的配列を切断する。切断箇所の修復ミスによるフレームシフト変異のため、遺伝子欠損が生じる。本研究ではKSHVゲノムにコードされている潜伏感染遺伝子LANAを、欠損変異標的とする。KSHVは宿主細胞へ侵入後、自身のコードする数種の潜伏感染遺伝子によ

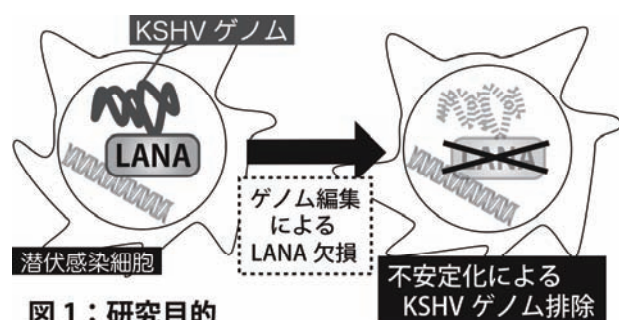


図1：研究目的

って感染細胞を腫瘍化し、潜伏感染状態へと移行させる。なかでもKSHV潜伏感染遺伝子であるLANAは、KSHVゲノムを宿主染色体に繋ぎとめ、細胞分裂に伴ったウイルス複製、さらには娘細胞へのウイルスゲノムの分配を司る。すなわちLANAを完全に欠損させることで、染色体に繋がりとめられていたKSHVゲノムの不安定化が生じ、感染細胞からのウイルス排除が可能であると考えられる(図1)。

(4) 達成目標：潜伏感染細胞中のKSHVゲノムを改変し、LANA欠失変異を誘導する。そしてKSHVゲノム不安定化に起因するウイルス排除の可能性を探索する。

2. 研究の計画・方法

CRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集には、sgRNAならびにCas9が細胞内に同時に発現する必要がある。そこで両分子を発現するCRISPR/Cas9レンチウイルスベクターを構築・調製する。KSHV感染細胞へのレンチウイルスベクター導入後、LANA遺伝子およびタンパク質レベルでのLANA発現欠損を確認する。そしてLANAは宿主細胞染色体へのウイルスゲノム保持に関与するため、LANA欠損によりウイルスゲノム不安定化の惹起が予想される。LANA欠損細胞株でのKSHVゲノム定量解析により、その変動を評価する。以上より、LANA欠損によるウイルスゲノム変動を解析し、ゲノム編集による潜伏感染KSHV排除の基盤を構築する。

3. 研究の特色

本研究の特色・独創性は、細胞内で潜伏状態にあるウイルスゲノムに、直接改変を施すことでウイルス排除を図る点にある。KSHV潜伏感染細胞でのウイルス産生は非常に低いレベルに抑えら

れている。そのためウイルス複製阻害剤を用いても、潜伏感染細胞を完全に排除できない。ゲノム編集技術により、はじめて潜伏感染細胞中のKSHVゲノムに対して直接作用することができる。本研究では、KSHV関連リンパ腫である原発性体腔性リンパ腫由来細胞株を用いるため、より生体内での潜伏感染環境を模した実験系であるといえる。さらにリンパ腫細胞株でのゲノム編集の高効率化・迅速化を図るため、CRISPR/Cas9レンチウイルスベクターを用いる点も本研究の特色である。レンチウイルスベクターにより、潜伏感染細胞などの静止期細胞への高効率な遺伝子導入が達成できる。

4. 研究の成果

(1) LANA特異的sgRNA配列の機能確認

まず、ゲノム編集の効果を決定づけるsgRNA配列の最適化を検討した。具体的には、LANA N末端領域-EGFP融合タンパク質発現プラスミドと4種のLANA標的sgRNA発現ベクタープラスミドとを細胞に共発現させた。LANA N末-EGFP融合タンパク質発現量をフローサイトメトリーにより定量したところ、4種いずれの配列でも顕著な融合タンパク質発現量低下をみとめた。このことは、プラスミド上のLANA N末端領域配列への変異発生によるフレームシフトの発生、すなわちゲノム編集が生じていることを意味する。以上より、LANAに対して有効に機能するsgRNA配列を同定した。

(2) KSHV感染リンパ腫由来PEL細胞株におけるLANA欠失によるウイルスゲノム量への影響

コントロールとしてlentiCRISPR-sgLuc、およびLANA標的sgRNA配列のうちlentiCRISPR-sgLANA#1を用いて、レンチウイルスベクターを調整した。これらレンチウイルスベクターをKSHV感染リンパ腫由来PEL細胞株BC3およびHBL6に感染させ、薬剤選択を行った。21日間培養後に、細胞中KSHVゲノムを定量した。その結果、BC3およびHBL6細胞のいずれにおいても細胞中KSHVゲノム量が顕著に低下していることをみとめた。さらに、潜伏感染細胞KSHVゲノム上のLANAコーディング領域に対して、変異・欠損が生じているかを確認するため、抽出DNAからLANAコーディング領域を増幅、TAクローニングののち、サンガー・シーケンス法により解析した。結果として、BC3細胞では全6配列中4配列(4/6 clone: 66.7%(欠損2、点変異2))に、HBL6細胞では全6配列中3配列(3/6 clone: 50%(欠損2、点変異1))に、変異・欠損導入を確認した。以上のことから、ゲノム編集によるLANA欠損により、細胞内ウイルスゲノム不安定化を誘導できることが明らかとなった。

しかしながら、ウイルスベクターの導入効率等の問題もあり、本研究の当初目的である潜伏感染細胞からのウイルスゲノムの完全排除には至っていない。これらに関しては今後の課題として研究を展開していきたい。

近世村落の生産活動と環境適応 ー産物データベースの構築と定量的・地理的分析ー

同志社大学 研究開発推進機構・文化情報学部 松森智彦

1. 研究の目的

『斐太後風土記』とは、明治初期に編纂が完了した岐阜県飛騨地方の物産誌である。また『防長風土注進案』は防長地方（山口県）の近世の物産誌である。従来の研究では、これらの物産誌記載産物の網羅的なデジタルデータ化と、地理情報システム（GIS）を用いた地理的分布の把握を行ってきた。産物の表記ゆれを整理し、産物の種類また生産量の特徴を把握することは、近世村落社会の生活文化の実態理解に有用である。本研究では、これまでの研究において構築した産物データベースとGISを用いて、物産誌記載のデータに基づくボトムアップの村落研究を行う。データに基づき、再現可能な手続きを用いて、近世村落社会の一般性と個別性について、生産活動と環境適応の視点より明らかにする。飛騨と防長の二つの産物データベースを統合し、近世村落の生産活動のモデルを作成する。二つの地域を比較し、地域間に共通する生業形態、それぞれの地域ごとで発現する特徴、そして地域内での多様性を、データベースとGISを用いて明らかにする。

2. 研究の計画・方法

二種類の成果物の作成を目標としている。一つ目は「日本近世産物データベース」の構築である。これは『斐太後風土記』DBと『防長風土注進案』DBを併合したもので、両DBの産物名を表記ゆれを考慮しながら併合し、産物名称のシソーラスを作成する。二つ目は研究報告書の作成である。章構成は①対象地域の地形的特徴、②村落の分布と立地、③人口、④産物の種類、⑤産物の構成、⑥産物の生産量、⑦飛騨（もしくは防長）地方村落社会の特徴とする。分析と執筆には上述のDBを利用する。⑤産物の構成については村落同士を一对比較し、それぞれの産物構成の類似と相違について定量的に分析する。⑥生産量については穀物・豆類について報告を行っている。記載頻度、生産量ともに多い9種を対象に生産量の大小、生産量の地理的偏在を分析し産物の特徴について論じている。同様に他種類の産物についても報告にまとめる。⑦飛騨（もしくは防長）地方村落社会の特徴については⑤と⑥の結果を総合し、生産活動からみた村落の実態について論述する。

3. 研究の特色

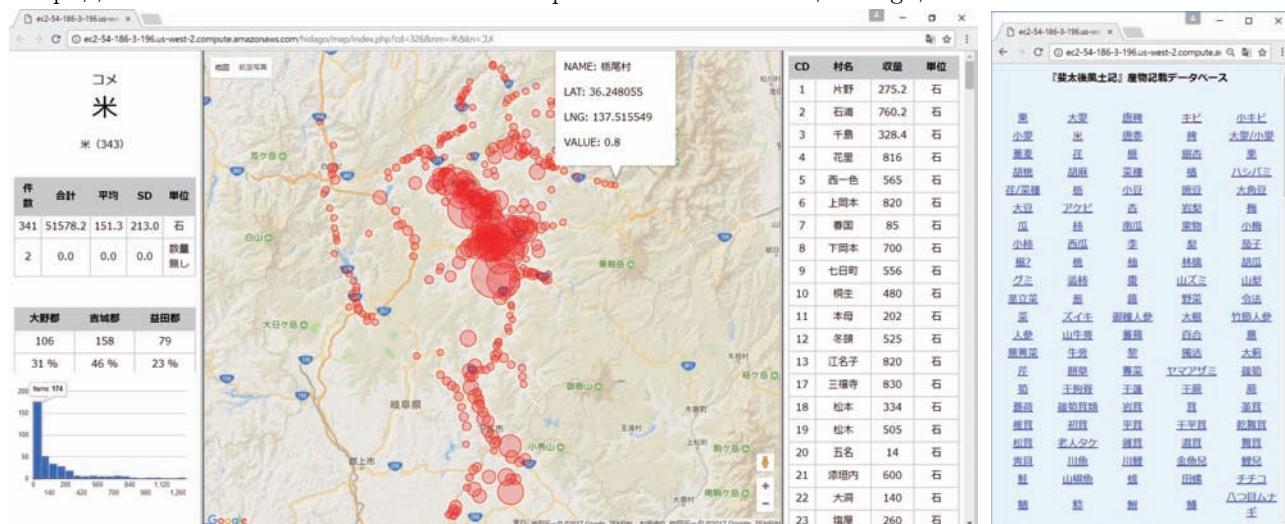
本研究の特色は、データベース・統計学・地理情報学を用いた文化情報学的アプローチを取り入れている点である。申請者はおよそ1万件的『斐太後風土記』の産物記載、2万件以上の『防長風土注進案』の産物記載をデータベース化しており、成果物として食品目録等の論文発表を行っている。表記ゆれの整理された大量のデータを整合性持って操作・管理する事ができ、その質的・量的データに対して再現可能な手続きによる定量的な分析を行うことができる。定量化されたデータに対し、基本集計やヒストグラム・箱ヒゲ図等による分布の評価、また主成分分析、クラスター分析など多変量解析等の統計学的分析が可能である。ほか、地理情報システム（GIS）を用いた村落の分布・立地などの地理学的分析が特色である。村落の生産活動には、村落の周囲の環境が大きく影響するため、それを評価、総合する必要がある。本研究では、旧版五万分一地形図を用いて村落位置を比定し、同地図や標高地図、河川地図を用いて立地の評価を行っている。

4. 研究の成果

産物データベースの構築及び成果公開用システムの開発を行った。『斐太後風土記』及び『防長風土注進案』の産物データベースについて、データの入力・精査・確認・紐付け作業を行った。

作業は一名の研究協力者の助力を得て、両データベースの全レコードについて、作業が完了した。また、成果公開・分析用のGISシステムの開発を行った。試験公開用のアドレスにて限定的に公開を行っており、サーバーはAmazon EC2、データベースはOracle DB、サーバーサイドはPHP、フロントエンドはHTMLとJavaScriptで実装している。次のアドレスにて限定的に公開を行っている。

<http://ec2-54-186-3-196.us-west-2.compute.amazonaws.com/hidago/>



成果公開・分析用のWeb GISシステム

本研究題目にて取り上げた、生業活動・環境適応については、特に産業・手工業製品を中心に分析を進めて、論文を投稿した。「『防長風土注進案』記載の産業と手工業製品」¹は山口大学の五島淑子氏、立命館大学の中村大氏との共同研究で、2013・2014・2015年に報告した 農作物・採集品、魚介類・海藻類、鳥獣類 編の続編である。本稿では『防長風土注進案』記載の201品目の産業・手工業製品について、分類を行い、表記ゆれを整理して目録として報告した。これら四稿の目録数は179品目と169品目、124品目を合わせ、673品目にのぼる。

同様に、岐阜県飛騨地方でも産業・手工業製品の整理作業を進めており、「『斐太後風土記』記載産物の生産量と地理分布（2）—繊維・織物類・紙類を中心に—」²を投稿している。これは2015年度に投稿した「『斐太後風土記』記載産物の生産量と地理分布（1）—穀物類・豆類を対象に—」の続編である。前稿では、産物生産量の分析を行うにあたり、食料となりうる産物のうち、記載頻度、生産量合計ともに最大で、主エネルギー源となりうる穀物類・豆類を対象とした。今年度は、非食用の産物のうち、記載頻度、生産量合計ともに高い繊維・織物類・紙類を対象とし、これらの量的特徴と地理的分布について詳しく論じた。

ほか、口頭発表では「『斐太後風土記』記載の手工業製品とその生産量」³が挙げられる。上記の繊維・織物類・紙類の論考をもとに、繭・生糸・真綿・紬・絹・布・麻・桑・煙草・苳・菜種・楮・紙の13品目について、生産量及び地理的分布の相補性を指摘し、議論を深めた。

従来の食品となりうる産物の研究に、今年度での産業・手工業製品の分析を加え、対象地域の地形的特徴、村落の分布と立地、人口、これらを総合して村落社会の特徴について考察し、報告書を執筆した。

¹ 松森 智彦・中村 大・五島 淑子 2017『山口大学教育学部研究論叢（第1部）』第66巻 1号, pp. 41-56

² 松森 智彦 2016『文化情報学』第12巻1号, pp. 1-10

³ 松森 智彦 2016「古典籍の保存・継承のための画像・テキストデータベースの構築と日本文化の歴史的研究 夏の研究集会」

胎盤幹細胞の分化における膜融合関連タンパク質複合体の役割

同志社女子大学 薬学部 安川 淳一郎

1. 研究の目的

哺乳類の特有の組織である胎盤は、胎児への栄養補給、老廃物排泄や呼吸を担い、哺乳類の発生における必須の器官である。発生段階における胎盤形成のメカニズムの解明は重要な課題であるが、不明な点が多く残されている。近年、エンドソームやリソソームといった細胞内の膜小胞が、細胞の増殖・分化に関わるシグナル伝達因子の活性化の場として重要であることが明らかとなりつつある。本研究において、細胞内膜小胞の動態に関わるタンパク質に着目し、胎盤の初期形成におけるシグナル伝達経路制御メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の計画・方法

(1) 膜融合関連タンパク質ノックアウトマウス胚における胚発生の解析

ノックアウトマウスが胎生致死となる発生段階において、whole mount *in situ* hybridization法や免疫組織化学蛍光抗体法を用いて、組織特異的な発現を示すマーカー遺伝子産物、マーカータンパク質を検出した。膜融合に関連する複数の遺伝子について、それぞれのノックアウトマウスを作出し、組織特異的なマーカーの発現パターンを比較した。

(2) ノックアウトマウス胚におけるシグナル伝達経路の解析

シグナル伝達経路に関与するタンパク質の活性化フォームに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学蛍光抗体法を用いて、ノックアウトマウス胚におけるシグナル伝達経路の活性化状態について解析した。

(3) 遺伝子欠損細胞におけるシグナル伝達経路の解析

組換え酵素の導入によって条件的に遺伝子を欠損させることができる遺伝子組換えアレル(*loxP*)を導入したマウスから胚繊維芽細胞を樹立し、シグナル伝達経路の活性化に対する遺伝子欠損の影響について、その活性化条件を検討・確立し、活性化フォーム特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法を用いて解析を行った。

3. 研究の特色

哺乳類特有の組織である胎盤の発生に関わるシグナル伝達における、膜動態関連タンパク質の寄与についてアプローチする本研究は他に類を見ないものである。膜動態関連因子はこれまで、真核生物のシンプルなモデル生物である出芽酵母を用いた研究が盛んに行われてきた。多細胞生物を用いた研究も進められ、酵母の液胞に相当すると考えられるエンドソームやリソソームなどの膜小胞の動態に関与し、機能の上でも進化的に保存されていることが示されてきている。一方で、個体の発生や、細胞の分化といったマクロな生命現象におけるこれらの因子の役割については、ほとんど明らかではない。本研究は、膜動態関連タンパク質の生物学的な役割について新しい知見を与えると考えられる。

小胞輸送経路であるエンドサイトーシス経路が、特定のシグナル伝達経路に関わる因子の輸送や分解を介して、シグナル伝達経路を制御することが知られている。また近年、膜小胞が、シグナル伝達制御の場となっていることが明らかになりつつある。しかしながら、膜小胞とその動態が果たすシグナル伝達の制御の全体像については、未だ明らかではない。本研究は、さまざまな外的刺激に応答するシグナル伝達経路の制御に関する膜動態の役割について、新たな示唆を与えると期待される。

4. 研究の成果

(1) 膜融合関連タンパク質ノックアウトマウス胚における胚発生の解析

膜融合関連タンパク質のノックアウトマウスが、着床後に胎生致死となることが予備的な解析で明らかとなっていた。着床時のマウス胚は、胚盤胞（blastocyst）と呼ばれ、胚体外胚葉（epiblast）、栄養外胚葉（trophectoderm）、ならびに原始内胚葉と、3つの組織に分かれる最初の時期である。ノックアウトマウス胚において、それぞれの胚葉に特異的なマーカータンパク質のパターンを観察したところ、これらの胚葉への分化は問題なく進んでいることがわかった。ところが、さらにその発生段階を追っていくと、ノックアウトマウス胚において、栄養外胚葉から分化する胚体外外胚葉の形成が不全となっていることがわかった。胚体外外胚葉は、胎盤の前駆組織にあたり、胚本体の成長に必須な領域である。この表現型は、別の、関連する膜融合タンパク質のノックアウトマウス胚でも同様に確認された。以上の結果から、膜融合関連タンパク質が、協調して、栄養外胚葉から胚体外外胚葉への分化に、重要な役割を果たしていることが示唆された。

（2）ノックアウトマウス胚におけるシグナル伝達経路の解析

ノックアウトマウス胚における分化異常の分子メカニズムを明らかにするために、ノックアウトマウス胚において、着床後の発生に寄与すると報告されているシグナル伝達因子の活性化状態を調べた。該当のシグナル伝達経路因子のノックアウトマウスは、着床後の発生段階で、胚体外外胚葉の分化発生に異常をきたして胎生致死になることが報告されている。加えて、細胞内小胞がその活性化に寄与するとの報告もあり、関係が考えられた。

シグナル伝達経路の活性化・不活性化を、タンパク質のリン酸化フォームを検出することによって評価することができる。ノックアウトマウス胚において、免疫組織化学蛍光抗体法により、活性型タンパク質を検出したところ、野生型胚と比べて、そのシグナルが低下していた。このとき、該当するタンパク質の総量に変化は認められなかった。以上の結果から、マウス胚において、膜融合関連タンパク質が、特定のリン酸化シグナルの伝達に寄与することが示唆された。

（3）遺伝子欠損細胞におけるシグナル伝達経路の解析

シグナル伝達経路に対する膜融合関連タンパク質の役割を、より詳細に明らかにするために、胚繊維芽細胞を用いた解析を行った。目的の遺伝子領域にLoxP配列を導入したマウスから胚繊維芽細胞を樹立し、アデノウイルスベクターを用いたCreリコンビナーゼの導入によって遺伝子を欠損させられることを確認した。さらに、タンパク質レベルでその発現が低下していることを確認した。

培地への刺激因子への添加、あるいは除去によって、胚繊維芽細胞における活性化状態を制御する系を確立した。この系を用いて、遺伝子を欠損させた細胞における、シグナル伝達経路因子の活性化について調べた。その結果、欠損細胞において、刺激因子に応答したシグナル伝達下流因子の活性化に、低下が認められた。加えて、シグナル伝達因子の活性化の低下は、シグナル伝達経路の特定の段階でおきていた。膜融合関連タンパク質が、特異的に、シグナル伝達の活性化に寄与することが示唆された。

また、上記のシグナル伝達経路に対して抑制的に機能する、別のシグナル伝達経路について、その活性化状態を検討したところ、遺伝子欠損細胞において、野生型と異なる活性化パターンを示し、条件によっては活性化の亢進が認められた。このことから、膜融合関連タンパク質が、複数のシグナル伝達経路の統合的な制御に寄与していることが考えられる。

以上の結果から、膜融合関連タンパク質が、特定のシグナル伝達経路を制御し、胎盤の前駆組織の分化に寄与することを明らかにした。本研究結果に基づいて、明らかにしたシグナル伝達経路と、胎盤細胞の分化との関係、ならびに詳細な制御メカニズムについて、さらに解析を進めてゆく。

液晶性ナノ微粒子の創製とブルー相の電気光学特性の解析 ーブルー相を用いた次世代液晶ディスプレイへの応用ー

立命館大学 生命科学部 応用化学科 金子 光佑

1. 研究の目的

本研究では、次世代液晶表示デバイスへの応用を念頭に置き、液晶相の1つである「ブルー相」に注目し、金ナノ微粒子を添加した系での電気光学特性の向上を目的としている。これまで液晶デバイスとして広く使われてきたネマチック液晶にPd、Ag/Pdなどのナノ粒子を添加することにより、それを用いた液晶ディスプレイの動作特性を改善することが報告されている。この効果をブルー相ディスプレイにも拡張し、一般に使われている液晶ディスプレイと同じ5V駆動や低消費電力、動作電圧の低減、室温における応答速度の向上を目指し、微粒子添加によってブルー相の電気光学特性の改良を行うという着想に至った。まず初めに、液晶に対する微粒子の分散性・相溶性を高めるための有効な手段として、液晶基で被覆した金ナノ微粒子含有液晶の合成を試み、材料設計の視点からブルー相の電気光学特性向上の方法を考案した。さらに微粒子添加の方法についても検討し、液晶材料との相溶性を高めるために微粒子に液晶性を持たせるという化学的なアプローチを進める。

2. 研究の計画・方法

ブルー相はネマチック液晶にキラルドーパントを添加し、液晶分子の配向にねじれを誘起させることにより得られる。したがって、ブルー相に微粒子添加を考える場合、ネマチック液晶・キラルドーパント・微粒子の3種混合系を対象とすることになる。一般的に微粒子のある材料に添加する場合、微粒子を保護材で包み、水や有機溶媒の中に分散させる。その際、適切な保護材を用いないと微粒子の凝集が生じ、良い分散および相溶性が得られない。良好な微粒子の分散状態を得ることは容易ではなく、その困難度は「水→有機溶媒→液晶」の順で大きくなる。したがって、分散性の良い微粒子を得るためには、微粒子の合成および特に適切な保護材の合成が極めて重要なポイントとなる。そこで本研究では新規有機・無機ハイブリッドナノ材料の開発を主軸とした以下の方法により、液晶材料の電気光学特性向上の新しい手法を提案する。

(1) 金ナノ微粒子含有液晶の合成

金微粒子を液晶分子で表面修飾することにより、金微粒子自身に液晶性を持たせることを目標とした。具体的にはチオール基(-SH基)を持つ有機化合物と金が結合しやすいことを利用し、チオール化合物の末端に液晶分子を結合させることにより、金微粒子を液晶分子で覆う。本研究では図1に示す2種類の液晶基で保護された金ナノ微粒子の合成を行った(Au-II, Au-III)。

(2) ブルー相の発現機構の解明

ネマチック液晶4-pentyl-4'-cyanobiphenyl (5CB) とフッ素系ネマチック液晶JC1041XX (JNC) の混合液晶(重量比1:1)に対し、全量に対して7.5wt%となるようにキラル剤(ISO)を加え、ブルー相を示す液晶材料(BPLC-1)を調製した。その試料に合成した金属微粒子Au-IIおよびAu-IIIを0.3wt%の割合でそれぞれ添加し、金ナノ微粒子含有液晶材料BPLC-2およびBPLC-3を調製した。得られた試料をセル厚10 μ mのガラスセルに注入し偏光顕微鏡観察を行い、相転移挙動を確認した。

(3) 電気光学特性の評価

光透過率の印加電圧依存性を測定することにより、閾値電圧を観察した。電場に対する応答時間の評価は入射光源としてHe-Neレーザーを用い、電場印加時の透過光強度変化を検出する。

ることにより評価した。また、試料を櫛歯型電極(In-plane switching: IPS電極)付基板とガラス基板からなるIPSセル($d \sim 15 \mu\text{m}$)に注入し、周波数500Hz(矩形波)のHe-Neレーザー入射光($\lambda = 633 \text{nm}$)を用いて電気光学特性(V-T曲線)を測定した。IPSセルの電極間距離は $10 \mu\text{m}$ 、電極幅は $5 \mu\text{m}$ とした。

3. 研究の特色

液晶への良好な分散性を得るために液晶基およびアルキル基で表面化学修飾された金ナノ微粒子の合成を試みた。化学修飾された微粒子単体での液晶相発現の報告例は現在まで非常に少ないため、液晶基の化学構造や結合様式を検討し、ネマチック相を発現する金ナノ微粒子の合成を目指した。液晶性を発現する微粒子の作製は本研究の最大のポイントであり、金属微粒子と液晶からなる複

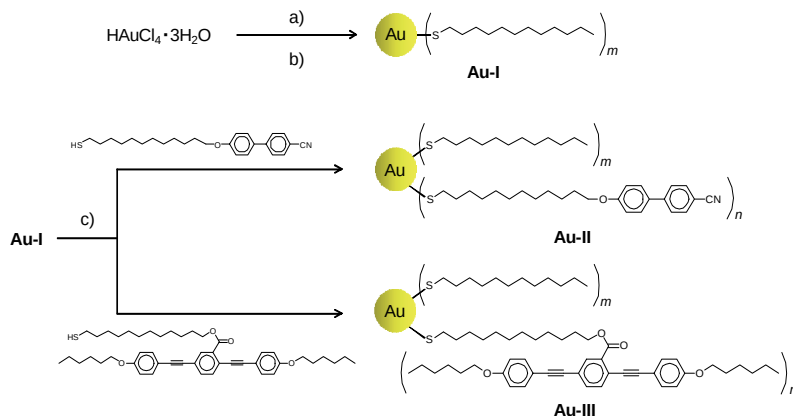


図1 液晶基を有する金ナノ微粒子の合成経路

合材料の液晶相の有無は液晶基の「分子構造」および「結合様式」に大きく左右されと考えられる。液晶基と金ナノ微粒子の間にはメチレン鎖などを介すが、結合様式の視点で考えた場合、片末端に結合させた「side-end型」と側方から結合させた「side-on型」に分類できる。そこで2種類の液晶基で保護された金ナノ微粒子の合成を行った結果、side-on型の金ナノ微粒子に液晶性を持たせることに成功した。

4. 研究の成果

(1) 金ナノ微粒子含有液晶の合成

得られたAu-IIおよびAu-IIIに関して偏光顕微鏡(POM)観察および示差走査熱量(DSC)測定を行い、相転移挙動を確認した。Au-IIは室温において黒色粉末の状態で、熱変化に対して相転移挙動を示さなかった。一方Au-IIIの偏光顕微鏡観察において、約 80°C までの温度範囲において複屈折性を示し、透明点(Tcl)以上の温度では暗視野組織が確認された。またDSC測定の結果から、偏光顕微鏡組織の変化が確認された温度と同様の温度において、相転移に伴う熱量変化を確認することができ(図2)、以上の結果からside-on型の金ナノ微粒子Au-IIIに液晶性を持たせることに成功した。また透過型電子顕微鏡(TEM)観察により、Au-IIおよびAu-IIIの粒径を求めた。Au-IIおよびAu-IIIの粒径は3-4 nmとそれぞれ見積もられた。

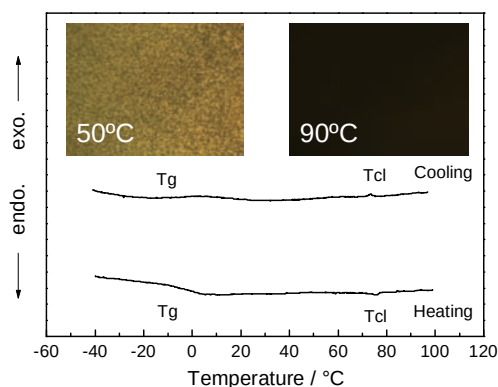


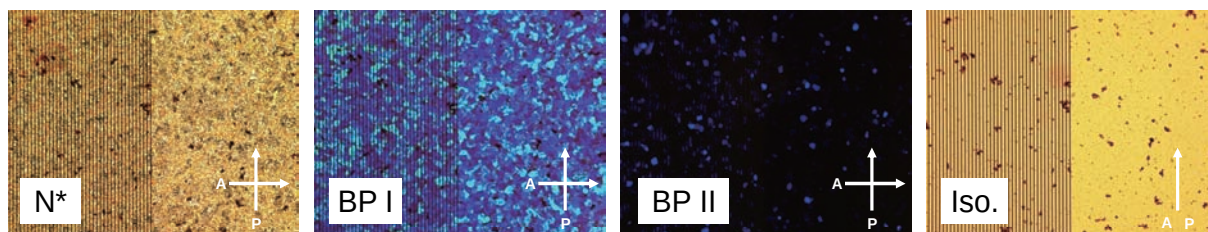
図2 Au-IIIのDSC曲線およびPOM写真

(2) ブルー相の発現機構の解明

各試料について偏光顕微鏡観察を行った結果、それぞれブルー相の発現が認められた。BPLC-1、BPLC-2およびBPLC-3の相転移挙動を表1に示す。ブルー相を示す液晶材料BPLC-1と金ナノ微粒子を添加したBPLC-2およびBPLC-3の相転移挙動を比較すると、金ナノ微粒子添加により透明点の減少が確認されたが、ブルー相の温度範囲の拡大は認められなかった。またBPLC-2に関しては、Au-IIに由来するマクロな凝集体が確認され(図3(a))、ブルー相を示す液晶材料(BPLC-1)との相溶性が悪いことが明らかとなった。一方、BPLC-3の液晶相・等方相において金ナノ微粒子は均一に分散し、各相においても凝集体が観察されず、液晶材料

(BPLC-1)との良好な相溶性が確認された(図3(b))。さらに、ブルー相に特有なプレートレット組織が確認されたことから、微粒子の添加によって液晶性が阻害されないことが明らかとなった。Au-IIIは液晶相を示すことが確認されており、液晶材料との相溶性の向上の原因であると考察される。

(a)



(b)

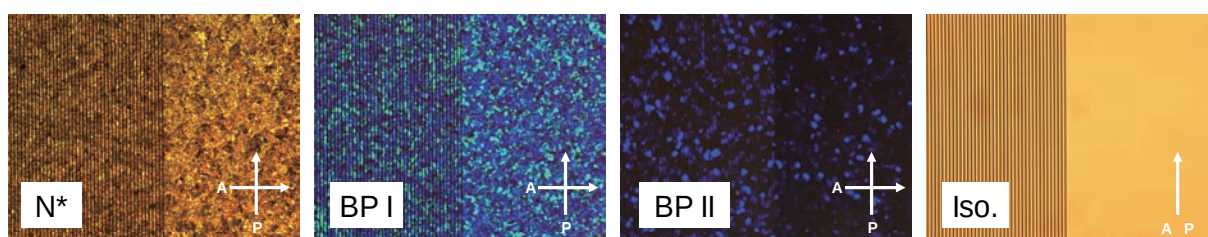


図3 (a)BPLC-2および(b)BPLC-3の偏光顕微鏡写真

N*：キラルネマチック相，BP：ブルー相，Iso.：等方性液体

(3) 電気光学特性の評価

BPLC-1およびBPLC-3(Au-III-0.3wt%)のBP Iにおける電気光学特性(V-T曲線)の結果を図4に示す。BPLC-1のon-set電圧は約30Vで V_{max} は110Vであった。一方、BPLC-3のon-set電圧はBPLC-1と同様な値を示すが、 V_{max} はBPLC-1と比較して数V低く95Vであり、微粒子添加による低電圧駆動の可能性が示唆された。BPLC-2(Au-II-0.3wt%)については印加電圧42Vまではブルー相で通常に見られる電気光学応答が確認できたが、50V以上においては電場印加による光学応答を示さなくなった。電気光学特性を測定した後のセルを偏光顕微鏡で観察したところ、電極間に微粒子が凝集していることが確認された。これは電圧の印加により電極間に微粒子のブリッジ構造が形成されたためであると言える。したがって、ある一定以上の電場強度において均一な分散性は保持されず、電気光学特性の測定は行うことができなかった。

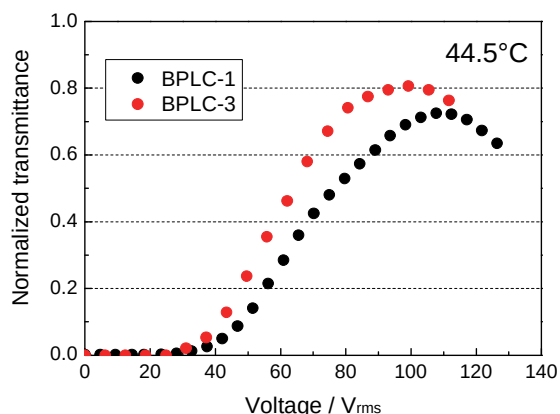


図4 BPLC-1およびBPLC-3のV-T曲線

謝辞

本研究に協力していただいた、九州大学先端物質化学研究所の菊池裕嗣教授に厚く御礼申し上げます。

労働者派遣法の比較制度分析 ードイツ、韓国、日本の事例からー

立命館アジア太平洋大学 アジア太平洋学部 児島 真爾

1. 研究の目的

本研究は、労働法の国際比較研究を通じて、社会学的制度論へ理論的な貢献を行うことを目的としている。韓国、ドイツ、そして日本の労働者派遣制度の相似点と相違点をまとめあげ、記述的な分析を行うことに加え、同じ労働者派遣制度でも先進国間で相違・相似点が生まれている要因を明らかにする。グローバル化が進むなか、諸外国の制度は国内制度の発展に影響を与えるが、その結果、日本の法制度はいかにして同型化あるいは差異化しているのか。国境を越えた相互作用として労働者派遣制度の成立・変遷過程を分析することで、制度的同型化理論と差異化理論への貢献を行う。本研究は、記述的分析と理論的分析の二つの柱から成り立っている。

2. 研究の計画・方法

本研究は労働法制度の国際比較研究であるため、(1)文献の収集と講読、(2)比較分析が可能な形での年表の作成、(3)現地調査、(4)法制度成立および改正プロセスの分析、そして(5)国内および国際学会での発表と論文の出版、の5つの段階を経る。この5つの段階を3年計画で実施する。本奨励金申請時の計画としては、助成年度の平成28年度は日独比較を行い、平成29年度は日韓比較を行い、そして最終年度の平成30年に3カ国の総合的な比較検討を行うとした。しかし、フィールドワーク実施に向けて現地の研究者と予定を調整する過程において、平成28年度と29年度の計画を逆転させる形で先に韓国での現地調査を実施するほうが適切だと判断した。したがって、助成年度である平成28年は前年からの研究成果に積み重ねる形で、(3)と(4)を中心に日韓比較の研究調査を行った。

3. 研究の特色

本研究の特色は、理論と方法論の双方におけるグローバルな視点の採用にある。

(1)労働者派遣法についてはこれまで膨大な先行研究の蓄積があるが、その多くは諸外国の制度が国内制度の設計に与えた影響についての分析が不足している。新社会学制度論は制度の変化を説明する理論であり、諸外国の制度が国境を越えて均質化または差異化していく過程の説明を試みる。DiMaggio and Powell (1983) の制度的同型化理論に始まり、Beckert (2010) の制度的差異化理論は、諸外国の法制度の形成過程をグローバルな相互作用の観点から分析するうえでは有効である。労働者の生活を左右する法制度がどのように国境を越えた相互作用の結果形成されていくのか、そのメカニズムを明らかにすることに、本研究の特徴と意義がある。

(2)方法論上の独創性は、「グローバル・エスノグラフィ (Burawoy 2000, Gille and O'Riain 2002)」を行う点にある。グローバル化とは国境を越えた因果連鎖の拡大と強化を指すが、国を越えたつながりを分析し説明する上では研究者も国境をまたいで調査を実施し、つながりの具体的な形を紐解いていかなければならない。本研究は国内法の成立・改正を分析するために複数の外国でフィールドワークを行うという偏心化された方法論を採用する点においても独創的である。

(3)本研究の結果、いつ、どのような条件の下で諸外国の制度が参照され、国内法の策定プロセスに影響を及ぼすのか、そのメカニズムが明らかになる。それにより、財界のニーズと労働者のニーズとの間で均衡のとれた労働法制の構築を阻害している要因を特定し、制度構築プロセスを改善する方法を模索することへとつながることが期待される。

(4)最後に、本研究の意義は日本の事例を用いて日英両語で論文を発表する点にある。社会学的制度論は近年もっとも発展の著しい理論の一つであるが、西欧中心主義的に発展しがちである。本研究は韓国および日本からの知見を提供することで、その不均衡の是正を試みる。

4. 研究の成果

研究の成果としては、(1)分析ツールとなる新社会学的制度論に関する文献を読み込み、理論的知識を深めた。(2)ドイツ、韓国、および日本の労働者派遣制度について英語および日本語で公刊された先行研究や、政府機関発行の一次資料を読み込み、労働者派遣制度の制定および改正の過程をまとめあげた。(3)国内（関東地域）および海外（韓国）でフィールド調査を実施した。(4)現在執筆中の論文が、Arne KallebergおよびHuiyan Fu編著による書籍に掲載されることが決まった。

具体的には、(1) グローバル化と制度変化の関係性についてinstitutional isomorphism と divergenceのそれぞれの観点から論じられた文献を精読した。(2)ドイツ、韓国、および日本の労働者派遣制度について英語および日本語で書かれた先行研究を読み込んだことに加えて、2017年1月からは安倍政権の「働き方改革実現会議」が発足し、均等待遇原則（同一労働同一賃金）の法制化に向けた改革が政府によって進められたこともあり、各種委員会が公開する議事録などの資料の精読に取り組んだ。(3)平成28年8月27日から9月3日にかけて、東京・神奈川・千葉にてフィールド調査を実施した。労働組合の代表者や派遣労働者に対して聞き取り調査を行い、非正規労働者の待遇改善を求める社会運動の現状や、非正規労働者の賃金体系や生活状況について情報収集を行った。また、平成29年3月2日から4日にかけて、韓国にてフィールド調査を実施した。1998年に制定された派遣法に焦点を絞り、職種で使用を制限する日本の制度が参照されながらも、均等待遇原則も同時に導入された要因を分析する目的で、韓国の非正規雇用にまつわる法案の成立過程に詳しい研究者・労働組合活動家に対して聞き取り調査を実施した。(4)収集した資料をもとに、論文の執筆に取り組んだ。元米国社会学会会長のArne Kalleberg教授、および中国の労働者派遣制度に詳しいHuiyan Fu教授から誘いがあり、本論文はこの二名が編集する書籍に掲載される運びとなっている。中国、米国、および日本の非正規雇用問題の実情や雇用制度に詳しい専門家が寄稿した論文を編纂した研究書として、米国またはイギリスの大学出版会からの出版を目指している。本論文は現在執筆中であり、2017年8月末までに編集者に初稿を提出する予定である。

新規骨形成ペプチドの機能解析に基づく歯周組織再生創薬の挑戦 —エムドゲイン®に代わる新規分子医薬の開発—

大阪歯科大学 歯学部 嘉藤 弘仁

1. 研究の目的

(1) これまでの研究の背景、問題点（エムドゲインの問題点）

エムドゲインは歯周組織再生療法において最も臨床に応用されている製剤のひとつである。しかし、エムドゲインは動物（ブタ歯胚）由来の製剤であるため、未知の病原体やさまざまなタンパクが混在しているなどの問題がある。したがって、生物に由来しない人工合成ペプチドの研究・開発が求められている。

(2) 新規骨形成ペプチドの作製とその問題点

旧タイプのエムドゲインをラット背部皮下に注入し、骨・軟骨様組織と好酸性の円形小体が生じることを発見した。その円形小体が硬組織形成に関係していると仮説を立て、円形小体のタンパク質解析を行った。その結果、ブタのアメロジェニン前駆物質であることが判明した（J Periodontol 2005; 76: 1934-1941）。その解析を基に、人工的にエムドゲイン由来の新規骨形成ペプチドを作製し、硬組織誘導能があることを確認した。

しかし、新規骨形成ペプチドが硬組織を誘導する作用機序や分子メカニズムについての検討はほとんどされていない。この詳細な分子メカニズムを解明し、合成ペプチドの詳細な作用機序を検討する必要がある。

(3) 何をどこまで明らかにしようとするのか

歯周組織再生に重要な役割を果たすと報告されているヒト歯根膜幹細胞に新規骨形成ペプチドを応用し、硬組織形成を誘導する際の作用機序・シグナル経路を遺伝子やタンパク質の発現を検討し、明らかにすることを目的にする。

2. 研究の計画・方法

本研究では、ヒト歯根膜幹細胞に新規骨形成ペプチドを作用させ、硬組織形成を誘導する際に発現する遺伝子やタンパクを分子レベルで解明する。

(1) ヒト歯根膜幹細胞の初代培養

申請者は本研究に用いるヒト歯根膜幹細胞の初代培養の方法は確立しており、その成果は（Kato H et al. Journal of Periodontology 2013）で報告している。

(2) 新規骨形成ペプチドの作用機序・シグナル経路の解明

新規骨形成ペプチドをヒト歯根膜幹細胞に作用させ、遺伝子（mRNA）、タンパクを抽出する。得られたcDNAを用いて網羅的遺伝子解析（マイクロアレイ解析）を行い、未知の遺伝子を探索する。

また抽出されたタンパクを用いてウエスタンブロット法により、分子レベルで新規骨形成ペプチドの作用機序を明らかにする。

3. 研究の特色

(1) 高品質・安価・大量に作製することが可能であり、in vivoで骨様組織が形成される。

エムドゲインはブタ歯胚から作製される。そのため、少量しか生産できず、高価な製剤で

ある。また、ロット間により品質にもバラつきがあることが懸念されている。

これを解決できるのがこの新規骨形成ペプチドであり、**高品質・安価・大量**に生産することが可能である。

また申請者らはすでに新規骨形成ペプチドを作製して骨組織が形成されることについて特許を取得しており、産業化を予定している。

(2) 分子量が小さいため抗原として認識されない（抗体反応が起きない）。

エムドゲインは複数回投与すると抗体が産生されるという報告がある（J Periodontol 2006; 77: 1355-1361）。この事実は生体内で抗体が産生され、その効果が減弱すると考えられる。

ペプチドの分子量が大きい（5,000 Da以上）と抗原として認識される（Nature 1982; 299: 593-596）。しかし、この新規骨形成ペプチドの分子量（1,118 Da）はかなり小さいものである。

したがって、このペプチドは抗原として認識されるリスクが極めて低い。これは生体内で抗体が産生されず、複数回にわたって使用しても効果の減弱やアレルギーが生じないと考えられる。

4. 研究の成果

(1) マイクロアレイ解析

ヒト歯根膜幹細胞に新規骨形成ペプチドを作用させると、Leucine-rich repeat-containing protein (LRR)の遺伝子発現が対照群と比較して 35 倍増強された。LRR は骨芽細胞に高く発現する遺伝子であるとされている。

したがって、新規骨形成ペプチドは LRR に作用し、歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された。この発見は新規骨形成ペプチドが LRR を介して作用する新しい知見を発見することができたといえる。

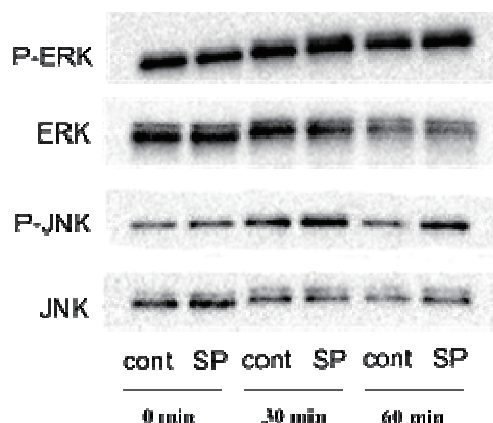
(2) ウェスタンブロット解析（作用機序の解析）

歯根膜幹細胞と同様に、硬組織再生に重要な細胞であるヒト間葉系幹細胞に合成ペプチドを作用させ、タンパクを抽出し、ウェスタンブロットを用いて、シグナル経路の解析を行った。

エムドゲインは MAPK 経路のひとつである ERK を介して生理活性を示すことが知られている。そこで、採取したタンパクを用いて、ERK の発現について検討した。その結果、合成ペプチドは ERK の発現を有意に活性化することが示唆された。

さらに、ヒト歯髄幹細胞の ERK、JNK のリン酸化に及ぼす SP の影響についてウェスタンブロット法を用いて検討を行った。SP はヒト歯髄幹細胞の ERK および JNK シグナルのリン酸化を増強することが明らかになった。

したがって、エムドゲインと同様に、新規骨形成ペプチドは MAPK 経路を介して、ヒト歯髄幹細胞の細胞増殖、硬組織分化を促進する可能性が示唆された。



(3) まとめ

本研究では、ヒト歯根膜幹細胞をはじめとする硬組織再生に重要な役割を担う細胞を用いて、現在まで解明できていなかった新規骨形成ペプチドの作用機序について検討を行った。その結果、エムドゲインと同様に、MAPK経路を介して、増殖や分化を制御することが明らかになった。しかしながら、今後の課題として、新規骨形成ペプチドについてはin vivo実験などを追加し、さらなる検討が必要であると考えられる。

サルモネラのVBNC状態に関わる分子機構の解明 ーカタラーゼによるVBNCからの復帰促進ー

大阪薬科大学 薬学部 森重 雄太

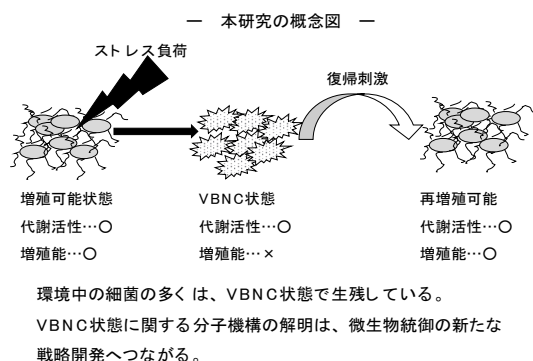
1. 研究の目的

本研究は、ストレス条件下におけるサルモネラの生残戦略の一つとして、サルモネラの「生きているが培養できない」状態(viable but non-culturable; VBNC)への移行と、そこから増殖可能な状態への復帰機構を明らかにすることを目的とする。

我が国で発生した食中毒事例のうち半数以上は「原因食品不明」であり、感染経路を特定することが困難である。近年の研究から、その理由の一つとして、細菌のVBNC化の関与が示唆されている。

VBNC化は、細菌が環境中で生残するための戦略の一つとして考えられている。1982年にColwellらがVBNC状態のコレラ菌の存在を報告して以来、関連する数多くの報告がなされて来た。しかし、VBNCに関する分子機構の詳細には未だ不明な点が多い。また、種々の研究結果から、病原細菌はVBNC状態へ移行してもなお、その病原性を維持していることが示唆されている。したがって、その分子機構を解明することは、食品衛生のみならず、感染制御の観点からも重要である。

本研究では、我が国のみならず世界各国で大規模な食中毒を起こしているサルモネラ (*Salmonella* Enteritidis; SE) を用いて、これを乾燥ストレス負荷によってVBNC状態へ移行させ、VBNC状態から増殖可能な状態への復帰に寄与する分子機構を、生化学的、分子生物学的手法を用いて明らかにする。



2. 研究の計画・方法

(1) 乾燥ストレス負荷による SE の VBNC 化

対数増殖期中期にあるSEを、 1×10^7 CFU/10 μ Lの密度になるように生理食塩水中に懸濁し、頭頂部に孔径0.22 μ mのメンブランフィルターを備えた培養チューブの底部に10 μ Lを接種し、これを自動乾燥装置内で室温にて相対湿度20%未満の条件下で一晩乾燥することにより、乾燥ストレスを負荷する。その後、グルコースを含まないM9最少培地1 mLを添加して攪拌し、氷上で1時間静置する。これにより、乾燥状態から回復させる。VBNC状態の評価は、呼吸活性及びグルコース取り込み活性に基づく生菌選択的な染色法とフローサイトメトリー(FACS)を用いた迅速検出法(Morishige *et al.* 2015)を用いて行い、定量的に解析する。

(2) VBNC 化した SE の増殖可能な状態への復帰

乾燥ストレスによりVBNC化したSEを、M9最少培地中に懸濁し、これにウシ肝臓由来カタラーゼを添加して、水浴を用いて37°Cで6時間静置する。カタラーゼ処理は、酸化ストレスによってVBNC状態へ移行したSE(Morishige *et al.* 2013)を、増殖可能な状態へ復帰させることが予備検討によって明らかになった。また、乾燥ストレスによって誘導されたVBNC菌に対しても、カタラーゼの添加によるVBNC状態からの復帰に、一部効果が表れた。本研究では、この点をさらに詳細に検討し、より大きな効果が得られる条件を確立する。

(3) (2)における VBNC 状態からの復帰前後における遺伝子発現の変動解析

カタラーゼ処理前後のSE菌体を回収する。RNAを抽出して、リアルタイムPCR法で解析し、VBNC状態からの復帰に際してどのような遺伝子の発現が変動するのかを解析し、そのキーとなる遺

伝子を同定する。カタラーゼの作用については、培地中にカタラーゼを添加することで、SEがVBNC状態から復帰する過程で、ごく微量産生される過酸化水素を分解して増殖に適した環境を作るためではないかと思われる。この菌体内外の変化に対応する遺伝子発現を検出する。特に、乾燥ストレス負荷に際して浸透圧の上昇を伴うことから、酸化ストレス及び浸透圧ストレス関連遺伝子、そしてエネルギー代謝関連遺伝子に注目して、探索する。

(4) (2)におけるVBNC状態からの復帰に寄与すると考えられる遺伝子の欠損変異株の作成

(3)の実験で同定された、VBNC状態からの復帰のキーとなる遺伝子を、Red recombinase plasmid pKD20を用いてノックアウトした変異株を作成する。カタラーゼ処理によるVBNC状態からの復帰に対する影響を解析することで、VBNC状態からの復帰における分子機構の解明ができると考えられる。

3. 研究の特色

本研究は、これまで長らく解明がなされて来なかった、「増殖可能であった細菌がどのようなメカニズムでVBNC状態へ移行し、再び増殖可能な状態へ復帰するか」を明らかにするもので、乾燥ストレスによるVBNC化については、従来には無い、極めて新しい研究である。

VBNC状態は、細菌が関与するあらゆる分野において重要な課題であり、その詳細な機構を解明することは、微生物が関係する分野に広く多大な貢献をすることが期待される。しかし、その分子機構に関する知見は乏しく、これを研究する者は国内外を問わず、非常に少ない。

本研究では、食品の保存方法として一般に用いられる「乾燥状態」を利用して細菌にストレスを負荷する。その際に、菌体内で発現変動する分子を生化学的・分子生物学的に解析して、未知の制御機構と物質を明らかにすることにより、その結果を食品衛生上の管理に応用することができると期待される。

また、本研究ではVBNC状態の測定法として、筆者が開発した評価系を用いて、細菌の代謝活性に基づく生菌選択的染色法を採用している。この方法によって、本来の意味での「生きているが培養できない」細菌を選択的に検出できる。この方法は従来、VBNC菌の検出法として広く用いられてきた死菌選択的な染色法とは異なり、VBNC状態の本質的な理解に直接結びつくことが特色である。

4. 研究の成果

- (1) 貧栄養条件下で乾燥ストレスを負荷することにより、短時間で再現性良く、SEをVBNC状態へ移行させることに成功した。栄養をほとんど含まない生理食塩水にSEを懸濁し、前述の自動乾燥装置で一晩乾燥ストレスを負荷し、グルコースを含まないM9培地を添加して乾燥状態から回復させ、FACSで個々の菌の代謝活性を測定した。その結果、増殖能を失っているにも関わらず、呼吸活性やグルコース取り込み活性を維持している菌が、多く検出された。この結果から、乾燥ストレス負荷によってSEはVBNC状態へ移行したのと考えられる。従来、長い日数を要していたVBNC状態への誘導を、本研究ではわずか1日に短縮して完了することが可能となった。これによってVBNC状態の解析及び研究が容易になり、種々の測定法の応用が可能になると期待される。
- (2) VBNC状態へ移行したSEを、カタラーゼ処理によって増殖可能な状態へ復帰させることに成功した。前述の方法でSEをVBNC状態へ移行させ、これにカタラーゼを添加して37℃で6時間インキュベートすると、未処理のものと比較して約3-30倍、増殖能を有する菌数が増加した。この際に、菌液の吸光度は増加しなかったことから、この現象はカタラーゼ処理による増菌効果ではなく、VBNC状態へ移行したSEがカタラーゼ処理によって増殖可能な状態へ復帰したのと考えられる。筆者はこれまでに、酸化ストレスによってVBNC化したSEの復帰に際して、ピルビン酸処理が有効であることを示した（Morishige *et al.* Microb. Environ. 2013）が、乾燥ストレ

スによってVBNC化したSEに対しては、ピルビン酸は無効であった。これらの結果から、乾燥ストレスによってVBNC化したSEを増殖可能な状態へ復帰させるには、カタラーゼ処理が有効であることが示唆された。

- (3) 乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行に際し、DNA結合タンパク (Dps) の関与が示唆された。乾燥ストレス負荷したSEからRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によって遺伝子の発現変動を解析した。その結果、乾燥ストレス負荷前と比較して、乾燥ストレスによってVBNC状態へ移行したSEにおいて、Dpsをコードする遺伝子である *dps* の発現が上昇していることが明らかになった。この結果から、乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行において、Dpsが何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。
- (4) *dps* のみが乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行及び復帰に必須では無く、その他複数の因子が関与する可能性が示唆された。前述の結果を踏まえて、*dps* を欠損した変異株 (Δdps 株) を作成し、乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行及び増殖可能な状態への復帰に対する影響を調べた。その結果、野生株、 Δdps 株共に、乾燥ストレス負荷によりVBNC状態へ移行し、カタラーゼ処理により増殖可能な状態へ復帰することが示された。この結果から、乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行及び復帰において、*dps* のみならず、その他複数の因子の関与が示唆された。

筆者は、酸化ストレス負荷によってVBNC状態へ移行したSEに対してカタラーゼ処理をすると、増殖能の回復にカタラーゼをコードする遺伝子の一つである *katE* の発現が上昇するという結果を得ている(森重 他 第89回日本生化学会大会)。現在、*katE* 欠損変異株を作成し、乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行及び復帰に対する影響を解析している。

なお、以上の成果の一部は、2016年8月29日-9月1日の間に開催された、7th ASM Conference on *Salmonella* (ドイツ)にて発表し、Journal of Food Protection誌に掲載された。(Morishige *et al.* J. Food. Protect. 80 (2) 2366-2374 (2017))

日本人英語学習者における協同 L2 ライティング活動の有効性検証 ーグループ編成の影響に焦点をあててー

関西大学 外国語学部 植木 美千子

1. 研究の目的

従来、「書く」という行為は、学習者が一人で行うものであるという認識が、教員側にも学習者側にも根強くあり、英語（L2）ライティング活動のプロセスに、他の学習者を関与させることはほとんどなかった。しかし、近年の第二言語習得研究では、L2ライティング活動に、ペアやグループ形態を導入し、協同的に1つのライティングを完成させる活動（＝協同L2ライティング活動）の重要性が指摘されつつある。また、協同L2ライティング活動には、ペアによるものと、グループによるものがあるが、（L2ネイティブ話者の関与が少ない）日本のような英語を外国語として学ぶ環境（EFL）においては、ペアよりもグループで活動を行った方が、より多くの利点があることが示唆されている（Dobao, 2014）。そこで、本研究では、日本人大学生英語（L2）学習者を対象に、グループ形態の協同L2ライティング活動を実施し、協同ライティング活動中の学習者同士のインタラクションと、L2ライティング成果物を分析することによって、協同L2ライティング活動の際の有効なグループ編成のあり方と教育的介入の方法について提言することを目的とした。協同L2ライティング活動の有用性としては、読み手の注意や関心をより意識するようになる（Leki, 1993）、文法的な正確さが向上する（Wigglesworth & Storch, 2009）、語彙の定着が促進される（Kim, 2008）、長期に渡る学習効果が認められる（Shehadeh, 2011）、などが指摘されている。しかし、それらの効果出現は、グループのメンバーとなる個々の学習者のL2運用能力に依拠するところが大きいと言われており（Storch, 2013）、その結果、どのようなL2運用能力の学習者を組み合わせてグループを編成するのかが、活動の成否を左右する大きな鍵となると指摘されている。これまでの協同L2ライティング研究では、Lesser（2004）が、ペアの形態で、どのような学習者の組み合わせがL2ライティング成果物の質や言語習得に影響するのかという研究を行っているが、グループを対象に、編成の影響を検討した研究は皆無と言わざるを得ない。そこで、今後、日本の英語教育において協同L2ライティング活動を広く普及していくために、グループ編成がL2ライティングの成果物の質や言語習得にもたらす影響を明らかにすることが本研究の目的であった。

2. 研究の計画・方法

本研究では、日本人大学生英語学習者（合計35名）を調査参加者として、グループを活用した協同L2ライティング活動を実施した。調査参加者の英語力に応じたグループ編成を行った。ライティング活動では、L2ライティングの産物を協同で1つ作成していく。この過程をマルチモーダル（映像、音声、文字）に記録し、どのようなインタラクションが行われたかを、Language Related Episode (Swain & Lapkin, 2002) という単位で切り出して、会話分析等の質的手法で分析した。また、得られたL2ライティングの成果物（つまりライティング作品）は、幾つかの評価基準を設けて統計的手法で分析し、前述した質的分析の結果と関連づけた。また、これらのデータ・分析をもとに、グループ編成の形態が、L2ライティングの成果物の質や言語習得のプロセスにもたらす影響を明らかにした。

3. 研究の特色

本研究の特色として、第一に、協同L2ライティングにおけるグループ編成の影響を、L2ライティング成果物だけでなく、活動中の学習者同士のインタラクションを考慮に入れて、質的手法できめ細かく分析を行った点があげられる。例えば、どの部分（文法、構文など）に焦点をあてながら、学習者同士のインタラクションが展開しているのか、学習者間の関係性がどのように協

同L2ライティングに影響するか、また、それらがL2ライティング成果物にどのように反映されるのかなどに関して、知見を得ることが可能となった。このような質的手法の導入によって、L2ライティング成果物のみを対象に量的分析を行うことが多かった従来の研究アプローチ方法に多様性を持たせることとなった。第二に、経験が中心であった協同L2ライティング活動に、エビデンスに基づいた具体的な提言を行うことが可能になった点があげられる。本研究によって、日本人英語学習者を対象とした研究がほぼ皆無であった分野にエビデンスを示しながら、協同L2ライティングの有効性を提示することができた。

4. 研究の成果

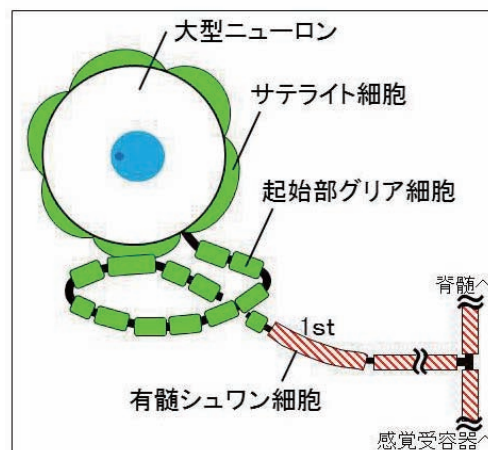
本研究の結果、L2協同ライティングの効果はペア、グループのどちらのグループ編成形態にも正の結果をもたらすことが確認された。効果の強さはグループ形態というよりも、ペアまたはグループを構成する日本人英語学習者の英語能力が影響を与える可能性が高いことが判明した。英語能力が高い（e. g., TOEIC 700-750点程度）日本人学習者の場合ペアというグループ形式の方が、協同L2ライティングの効果がより強く現れる傾向にあるが、グループ学習になると、「協同」というよりも「分担」という学習形態になってしまう可能性があることが確認された。一方英語能力が比較的低い（e. g., TOEIC 350-400点程度）日本人英語学習者の場合、ペアよりもグループ形式の方が、協同L2ライティング効果が高いことが明らかとなった。しかし、グループ形式での効果が確認された一方で、活動そのものに時間がかかってしまうというデメリットも確認された。

一次感覚ニューロンの突起起始部を被うグリア細胞の性質 — 3次元的組織観察による細胞分化過程の解析 —

関西医科大学 医学部 小池太郎

1. 研究の目的

脊髄神経節（DRG）には感覚を受容する一次感覚ニューロンが存在し、図に示すように、部位により異なる種類のグリア細胞に被われている。ニューロンの細胞体は扁平なサテライト細胞に被われ、大型ニューロンの突起（細胞体からT字分岐部までの部分）および軸索（分岐後の部分）は髄鞘を形成する有髄シュワン細胞に被われる。さらに、ニューロンの突起 起始部は上記とは別のグリア細胞集団（起始部グリア細胞）に被われる。このグリア細胞は、髄鞘を形成しないシュワン細胞である無髄シュワン細胞とは別もので、1960年に報告されて以降、文献的記載が全く無いため、この細胞についての



知見は皆無であった。私はこれまでの研究から、末端付近の起始部グリア細胞は分裂能を持っていること、1st有髄シュワン細胞の髄鞘が薄いこと、チミジンアナログ投与後2週間で1st有髄シュワン細胞が陽性を示すことを突き止めていた。これらのことから、末端部の起始部グリア細胞が有髄シュワン細胞の前駆細胞で、この細胞が分裂し、新生細胞が1st有髄シュワン細胞に分化、髄鞘を形成していくという仮説を立てた。本研究ではこの仮説を証明するため起始部グリアの細胞種同定および分裂細胞を、三次元的組織観察法を用いておこなった。

2. 研究の計画・方法

動物：6週齢のWistar rat、雄のDRGを用いた。

細胞種マーカーを用いた免疫組織化学による細胞同定と分布：DRG厚切りスライスを用い、各細胞種マーカーの蛍光多重染色により起始部グリア細胞の細胞種同定および同定細胞の分布パターンを解析した。末梢神経系グリアで発現するS100とglutamine synthetase、髄鞘で発現するmyelin basic protein、サテライト細胞で発現するKca2.3、髄鞘形成前から直後のシュワン細胞で発現するOct-6、大型ニューロンで発現するneurofilament200をマーカーとして用いた。

チミジンアナログの追跡による細胞分裂・分化の追跡：細胞周期のS期に細胞に取り込まれるチミジンアナログであるBrdUを腹腔投与後、経時的に固定し、BrdUと細胞種マーカーとを共染色することで、分裂細胞の細胞種同定および分布パターンを解析した。

細胞の分布解析（組織の三次元的観察）：螺旋状に蛇行するDRGニューロンの突起起始部全体が入っている個所を共焦点レーザー顕微鏡にて撮影後、目的の細胞の分布の場所をイメージングブラウザにて計測した。目的細胞が「ニューロン突起に沿ってDRG細胞体から何mmの位置か、1st有髄シュワン細胞から数えて何細胞目か」を三次元的観察により解析した。

Oct-6陽性細胞の電子顕微鏡的観察：厚切り切片を用い蛍光免疫組織化学にてOct-6を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡にて像を撮影した。その後切片をエポキシ樹脂に再包埋し、超薄切片を得た。予め共焦点レーザー顕微鏡で撮影しておいたOct-6陽性細胞を電子顕微鏡にて探し出し、観察・撮影を行った。

3. 研究の特色

一次感覚ニューロンの突起を被う起始部グリア細胞に関する記述は、細胞体型サテライト細胞やシュワン細胞のそれとは異なり、解剖学や組織学の教科書には記載されていない。また、研究論文に関しても20世紀初頭にHortegaが発見し、1960年にPannese (*Z Zellforsch Mikrosk Anat*) が記載したのを最後に、この細胞に関する研究報告は見受けられない。本研究は数十年の間着目されてこなかったグリア細胞に再び焦点をあて、現在の研究技術を用い細胞の特徴・性質の一端を明らかにした研究である。

本研究では組織の詳細な三次元的観察・解析をおこなった。これにより「蛇行するニューロン突起と周囲のグリア細胞」という複雑な組織構造を呈する組織において、細胞動態の一端が明らかとなった。

4. 研究の成果

細胞種マーカー陽性細胞の分布

起始部グリア細胞がサテライトと同様の細胞であるかを確かめるため、サテライト細胞マーカーであるKca2.3を用いて分布を解析した。その結果、ニューロン突起起始部の長さを100%（ニューロン細胞体側を0%、1st髄鞘側を100%）とした時、Kca2.3は0%から60%の位置に分布することが分かった。また、80%から100%の位置には全く存在しないことが判明した。次に髄鞘形成前から髄鞘形成直後の有髄シュワン細胞で発現するOct-6陽性細胞の分布を解析した。Oct-6陽性細胞のほとんどがニューロン突起起始部の70%から100%の位置に分布することが判明した。両マーカーに二重陽性を示す細胞はごくまれに観察することができた。神経堤幹細胞のマーカーとして知られるPAX3を免疫組織化学を用いて観察したが、陽性細胞は存在しなかった。また、Oct-6を発現するより前の幼弱なシュワン細胞で発現するAP2alphaは全てのグリア細胞で陽性となり、特徴的な分布パターンは認められなかった。

電子顕微鏡における細胞分類

Kca2.3およびOct-6陽性細胞の微細構造を電子顕微鏡にて観察した。Oct-6陽性起始部グリア細胞は細胞質が薄く、細い細胞質の突起をニューロンの突起に巻き付けるように伸ばす傾向が認められた。また、この突起間にはデスモゾーム様の接着装置がまれに認められた。Kca2.3陽性起始部グリア細胞はOct-6陽性のものと比べ、比較的細胞質に富み、細く短い細胞質の突起をランダムな方向でニューロンの突起側へ伸ばす傾向が認められた。これらの微細構造については今後定量的な解析を行う予定である。

電子顕微鏡標本作製の過程で、シリコンウェハーをクレーン状に糸で吊り下げたままナイフポートの中に沈め連続超薄切片を効率よく回収する方法を独自に開発した。この方法はarray tomographyに応用可能であり、現在論文投稿中である。

分裂起始部グリア細胞の分布と運命追跡

分裂している細胞の細胞種を同定するため、BrdU 1回投与後1時間で固定し、各主細胞マーカーと多重染色し観察をおこなったところ、BrdU陽性細胞のうち約70%がOct-6陽性細胞であった。また、BrdUはニューロン突起起始部の遠位端の起始部グリア（1st髄鞘に最も近い位置）もしくは2番目の細胞に取り込まれている場合が大半であった。

BrdU 1回投与後、24時間にBrdU陽性細胞を観察したところ、ニューロンの突起に沿って2つのBrdU陽性細胞が並んでいる様子（Twin cell）が認められた。この細胞はOct-6陽性であった。

起始部グリア細胞の付加と分化を長期的に観察するため、1日1回のBrdU投与を1か月間行なった動物を作製した。有髄シュワン細胞への分化に関しては、1stおよび2nd有髄シュワン細胞がBrdU陽性になる場合がまれに認められた。一方、1st有髄シュワン細胞にBrdUが認められないにも関わらず、BrdU陽性起始部グリアがニューロン突起起始部遠位に並んでいるケースはよく認められた。

まとめ・考察

これまでの実験で起始部グリア細胞について以下の性質を明らかにした。

1. 起始部グリアはKca2.3でニューロン細胞体側に分布するものとOct-6陽性で遠位側に分布するものの少なくとも2種類が存在した。
2. Oct-6およびKca2.3陽性細胞の間には微細構造の違いが示唆された。Oct-6陽性のものは髄鞘形成前シュワン細胞の電顕的特徴を有していた。
3. BrdU投与実験から、Oct-6陽性細胞は分裂・分化し有髄シュワン細胞に分化していることが明らかとなった。
4. 分裂細胞の長期的影響の観察から、有髄シュワン細胞は順次付け足されていることが明らかとなった。しかし、分化せずに起始部グリア細胞として付け足されるものも多数存在すると考えられた。

今後、アロディニアや慢性疼痛モデル動物を用い起始部グリア細胞の性質を追究することで、起始部グリアの痛みへの関与を追究したい。

コンドロイチン硫酸の発現異常による 統合失調症様症状の発現機序

神戸薬科大学 薬学部 内藤 裕子

1. 研究の目的

統合失調症は、思春期～青年期を中心に発症する精神疾患であり、幻覚、妄想、会話・思考力の低下、意欲の減退、認知機能障害といった多彩な精神症状を示す。遺伝的要因と様々な環境因子が絡み合って発症すると考えられており、その分子病態としてドパミン神経の活動異常等が示唆されているが、原因となる分子メカニズムはいまだ解明されていない。糖鎖関連遺伝子改変マウスで統合失調症様症状を示す例が複数あること、最近のゲノムワイドな相関解析等により、統合失調症の発症と関連する遺伝子として糖鎖の生合成を担う糖転移酵素が挙げられていることなどから、糖鎖修飾の異常が発症原因の一端を担っていると考えられる。

本研究で着目した、中枢神経系の主要な細胞外マトリックス成分であるコンドロイチン硫酸(CS)は、グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)から成る二糖単位が数十回繰り返した直鎖状の硫酸化多糖である。哺乳動物細胞に存在するCSの多くは、硫酸基転移酵素の働きにより、GalNAc残基の6位もしくは4位に硫酸化修飾を受けている。所属研究室では、CSが硫酸化パターンの違いにより、軸索伸長に対し抑制的にも促進的にも働くこと、脳の発達に伴い硫酸化パターンが変化すること、そして硫酸化パターンに依存した脳機能調節機構が存在することを世界に先駆けて明らかにしてきた。6位硫酸化CSは胎仔～幼弱マウスで多く発現しているが、その後減少し、4位硫酸化CSが増加する。最近、6位の硫酸化を担うコンドロイチン6-O-硫酸基転移酵素1(C6ST-1)の変異マウスが統合失調症様症状を呈することが示唆された。そこで、本研究では、CSの構造多様性による神経系の制御機構と、その破綻による精神疾患発症機構の解明を目的として、C6ST-1ノックアウトマウスの脳・神経系の詳細な表現型解析を行い、CS鎖硫酸化の、神経細胞およびそのネットワークの成熟への影響を検討した。

2. 研究の計画・方法

本研究では、神経系発達・成熟に対するC6ST-1欠損の影響に焦点を絞り、C6ST-1ノックアウトマウスの表現型の解析を行うことで、CSによる硫酸化パターン依存的な脳機能制御機構とその破綻による病態発生機構の解明を目指した。

(1) C6ST-1ノックアウトマウスの行動解析

統合失調症の指標として知られるプレパルス抑制を測定した他、精神疾患モデルに特徴的な行動異常に焦点を当てた行動解析として、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、明暗箱試験を行った。

(2) 神経系発達へのC6ST-1欠損の影響の検討

統合失調症患者の死後脳の解析や疾患モデルマウスを用いた研究により、統合失調症では、特定の抑制性神経細胞の周囲に形成されるペリニューロナルネット(PNN)と呼ばれる細胞外マトリックス構造や神経細胞の成熟、機能に異常が見られることが報告されている。そこで、C6ST-1ノックアウトマウスにおいてPNNの形成や神経系の発達に異常があるか調べるため、脳切片の免疫組織染色を行った。

3. 研究の特色

統合失調症の発症には、複数の遺伝的要因、環境要因が組み合わさって関与し、患者によって引き金となる因子が異なると考えられることから、その分子機構は未だ不明で、対症療法的治療が行われているのが現状である。したがって、根本的な治療法確立のため、症状をもたらす分子

メカニズムの解明が強く求められている。精神疾患の研究で主に利用されてきたヒト由来サンプルは死後脳であるが、長期にわたる服薬による影響も考えられるため、メカニズムの解明には動物モデルを用いた研究が必須である。

本研究では、疾患の原因分子として、CSの硫酸化パターンの違いに着目した。CSの機能に関する研究は、そのほとんどがコンドロイチナーゼ処理によりCSを分解するという方法で行われてきた。しかし、コンドロイチナーゼ処理では、硫酸化パターンに関わらず、全てのCSが失われてしまい、硫酸化パターンに依存した機能を明らかにすることはできない。本研究では、CSの発現は正常だが、その硫酸化パターンのみが改変された動物を用いることが特徴的であり、特定の硫酸化構造のみの発現変化という、実際の生体内で生じていると考えられる制御機構の破綻による機能異常を明らかにしていく点が、生理的に意義深い。

細胞の外側に位置し、多様かつ細胞の種類、活性化状態、疾患等に特異的な構造をとる糖鎖は、薬物等の標的となりやすい。本研究により、統合失調症の分子メカニズムの解明に迫れるだけでなく、新たな治療薬の開発につながることを期待される。

4. 研究の成果

(1) *C6ST-1*ノックアウトマウスの行動解析

プレパルス抑制試験を行ったところ、*C6ST-1*ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べてプレパルス抑制の低下が見られ、統合失調症様症状を示すことが明らかとなった。また、高架式十字迷路試験や明暗箱試験において、有意な差ではなかったものの、*C6ST-1*ノックアウトマウスが不安傾向にあることを示す結果が得られ、*C6ST-1*の欠損が神経認知機能に負の影響をもたらすことが示唆された。

(2) 神経系発達への*C6ST-1*欠損の影響の検討

行動実験において、*C6ST-1*ノックアウトマウスで統合失調症の指標とされるプレパルス抑制の低下が見られたことから、統合失調症患者で減少が報告されている抑制性神経細胞を中心に、神経細胞の数等に変化があるか、免疫組織染色により検討を行った。その結果、*C6ST-1*ノックアウトマウスの大脳皮質では、野生型マウスに比べ、PNN形成パルブアルブミン陽性細胞の数が減少していることが明らかとなり、これが統合失調症様症状をもたらす要因となっている可能性が示唆された。

セレウス食中毒の嘔吐毒素セレウリド類の合成と 培養液中の動態解析

東洋食品工業短期大学 包装食品工学科 奈賀 俊人

1. 研究の目的

セレウリド（Cereulide、図1）は、1995年磯部らにより、*Bacillus cereus*（セレウス菌）によって惹起される嘔吐型食中毒（セレウス食中毒）の原因毒素として単離・構造決定された32員環状デプシペプチドである。一方、ホモセレウリド（Homocereulide）は、上村らにより、海岸近くに生息するセレウス菌（海洋性セレウス菌）から、腫瘍細胞に対する強い細胞毒性物質として単離された類縁体であり、セレウリドのL-バリン酸がL-アロイソロイシン酸に代わった構造を有している。上村らは、海洋性セレウス菌の培養液中には、ホモセレウリドとセレウリドが共存することを報告している。

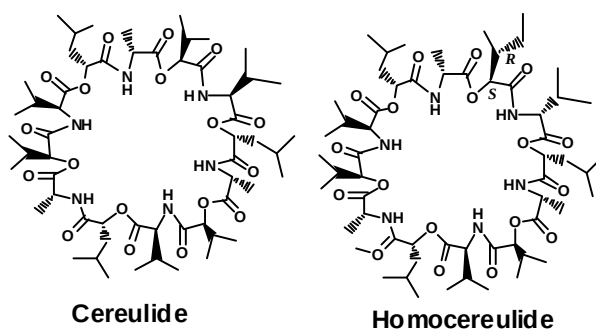


図1 セレウリド類の化学構造

セレウリドの全合成は、これまでに著者らの研究グループを含む3つの研究グループにより達成され、非天然の近縁体の合成や生物活性が報告されている。しかし、ホモセレウリドの全合成は、現在も未達成であり、ホモセレウリドの詳細な物性やセレウス食中毒への分子レベルでの関与も明らかにされていない。本研究は、多くの未解明の課題が残るセレウス食中毒の実態と全容を、ケミカルバイオロジーの手法で明らかにすることを目指して、① ホモセレウリドの全合成と毒性評価、② 培養液中セレウリド類の動態解析について研究を展開した。

2. 研究の計画・方法

(1) ホモセレウリドの合成

市販の光学活性なL-およびD-アミノ酸を原料に用いてホモセレウリドを合成した。構成分子である光学活性なヒドロキシ酸類は、対応するアミノ酸より調製し、アミド結合およびエステル結合は液相法で構築した。本合成では、ドデカ（12）デプシペプチドであるホモセレウリドを、3種のテトラ（4）デプシペプチドに逆合成的に帰結し、これらをフラグメントとして段階的に結合させて直鎖状の前駆体に導き、これを分子内環化反応に附して32員環を構築してホモセレウリドを得る合成経路を計画した。

(2) 培養液中のセレウリド類の動態解析

セレウス菌の長時間培養液のLC-QTOFMS分析では図2のようなクロマトグラムが得られる。この中で、セレウリド（ピーク a）およびホモセレウリド（ピーク b）は確定されているが、周辺に検出される微量物質の構造は未解明である。我々は、これらの分析結果から、培養液中にはセレウリド、ホモセレウリド以外に、構造未知の新規セレウリド類縁体や分解産物が存在すると想定し、各ピークの

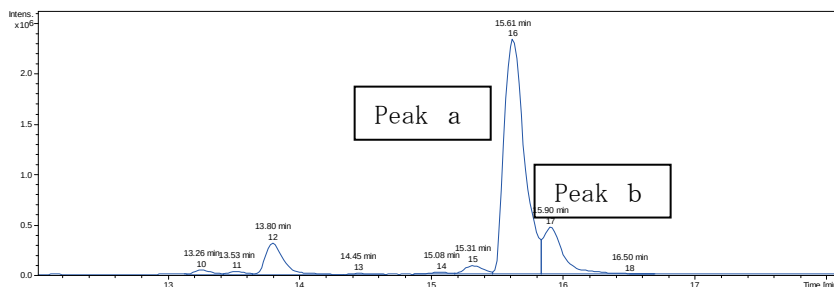


図2 セレウス菌培養液のLC-MSクロマトグラム

a：セレウリド、b：ホモセレウリド、その他にセレウリド類と考えられる微小ピークが検出された。

生成と集積量を時系列で解析し、これらの動態変動プロファイルを作成することを計画した。

3. 研究の特色

セレウス菌は好気性細菌で芽胞を形成し、産生する食中毒毒素であるセレウリドの耐熱性が高い。食品缶詰やレトルトパウチを製造する現場では、食品中のセレウリド毒素汚染の実態把握、防止法とリスク管理指針の作成等が急務である。しかし、分析の標準品となるホモセレウリドの全合成は未達成で、HPLC分析等によるリスク管理も確立されていない。本研究で合成されたセレウリド類は、セレウス毒素の検査において分析標準品として活用できるほか、未解明であったセレウス食中毒機構の有用なツール分子としての応用が期待される。また、セレウリド分解の機序を解明することができれば、これまで困難とされてきたセレウス毒素の無毒化などへの応用が期待される。

4. 研究の成果

(1) ホモセレウリドの合成

液相フラグメント縮合法によってデブシペプチドユニットを順次構築する磯部らのセレウリド合成手法を参考にして、ホモセレウリドの全合成を達成した（図3）。ホモセレウリドの構成単位である、テトラデブシペプチドA、A' および Cを、市販のアミノ酸を原料として合成した。デブシペプチドの構成単位であるα-ヒドロキシ酸は、対応する光学活性なアミノ酸のアミノ基を立体保持のままヒドロキシル化して調製した。また、合成の鍵となるL-アロイソロイシン酸はCに含まれる。テトラデブシペプチド（A、A'）からオクタデブシペプチド（B）を経て、前駆体のドデカデブシペプチド（D）へと導き、Dの分子内エステル化反応により32員環を構築して、目的とするホモセレウリドを得た。

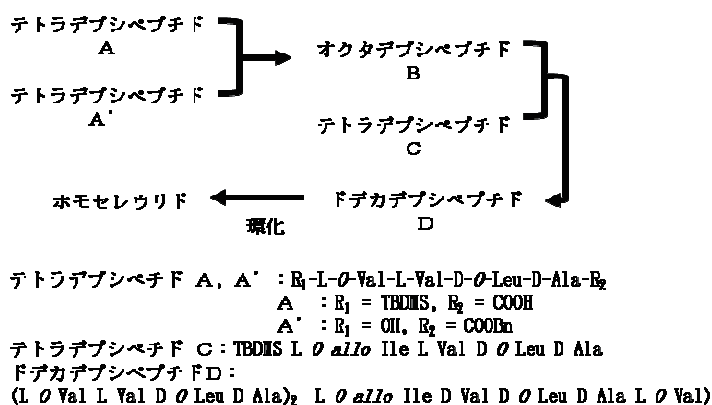


図3 フラグメント縮合法によるホモセレウリドの合成

合成したホモセレウリドの機器分析値は構造を支持し、LC-MS分析におけるリテンションタイムおよび質量スペクトルは培養液中のホモセレウリドピークに一致した。以後の動態解析には合成品を標準品として用いた。

(2) 培養液中のセレウリド類の動態解析

Bacillus cereus JCM17690株（理研JCMより入手、R. Gilbert F4810/72由来）を120時間まで培養した。LC-MSにより分析し、合成標準品を用いて作成した検量線をもとにして、セレウリド類の濃度を経時的にプロットし、産生と分解の消長を明らかにした。セレウリドは培養12時間から検出され、約40時間で最大濃度となり、その後徐々に減少した。培養液のLC-MSクロマトグラムでは、図4に示すようなセレウリド関連化合物に由来すると考えられるピークが確認され、分子量およびリテンションタイムから、セレウリドのエステル分解物と推定された。ピークcのマススペクトルおよびリテンションタイムは、合成中間体テトラデブシペプチドL-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Alaと一致した。また、ピークdおよびeは[L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala]_n (n=2 or 3)とは質量スペクトルが一致したものの、リテンションタイムは僅かに異なり、現在構造を特定している。テトラデブシペプチドは培養12時間から検出されるが、セレウリドが最大濃度となる40時間から徐々に増加し、57時間で最大濃度を迎えた後に減少した。セレウリドと分解物の間に化学的等量関係は見られなかった。

インクレチン関連薬（GLP-1 受容体作動薬）長期投与による 受容体発現の変化

—長期使用での薬剤効果減弱のメカニズム—

川崎医科大学 医学部 木村 友彦

1. 研究の目的

β 細胞不全が2型糖尿病病態進展の主たる原因と考えられており、早期からの積極的な薬物介入による厳格な血糖管理の継続が極めて重要である。これまでに我々は食事制限、さらにはThiazolidine薬やインクレチン薬が β 細胞保護効果を有することを報告してきた。さらに最近、これらの薬剤が病態進展期よりも病態早期においてより有効であることを報告した。この要因の1つとして、インクレチン薬の標的部位であるGLP-1受容体遺伝子発現が病態早期に比べ進展期で明らかに低下したことにより、インクレチン作用を限定的にしたことが考えられる。これらの結果から、早期からのGLP-1受容体作動薬長期間投与は病態の進展を防ぎ、最終的に「健常人と変わらぬ寿命とQOLの維持」につながると推察される。2016年にはGLP-1受容体作動薬による治療が心血管イベントを抑制することが明らかになり使用頻度は今後さらに高まると予想される。一方で、非生理的濃度のリガンドの長期暴露により受容体発現が低下することが一般的に知られているが、GLP-1受容体についての検討は現時点ではない。GLP-1受容体作動薬 Dulaglutide長期投与が、膵 β 細胞GLP-1受容体発現等に及ぼす影響について、肥満2型糖尿病モデルマウス、コントロールマウスを用い検討する。

2. 研究の計画・方法

7週齢雄性db/dbマウスをDulaglutide(D)群、Control(C)群に群別し17週間薬剤介入した(D群：Dulaglutide 0.6mg/kg $\times$ 2/week, C群：PBS1週2回皮下投与)。コントロールとしてdb/mマウスを用い同様に検討した。継時的に体重、摂餌量、生化学パラメーターを比較し介入後インスリン感受性試験を行った。介入終了後、単離isletのグルコース応答性インスリン分泌反応、insulin含量、中性脂肪含量を測定した。また、単離isletからmRNAを抽出し、Real-time RT-PCR法にて膵ラ氏島遺伝子発現を解析した。また膵切片におけるインスリン・グルカゴン染色、Ki67免疫染色、TUNEL染色を行い長期介入後の β 細胞比率、 β 細胞増殖・アポトーシスについて評価した。2群間の差の検定にはStudent's t検定を用いた。

3. 研究の特色

本研究の目的は、膵 β 保護作用を有するGLP-1受容体作動薬を長期投与し、GLP-1受容体発現に及ぼす影響を明らかにすることである。比較的病態早期の動物へのGLP-1受容体作動薬投与による β 細胞保護効果については多く報告されている。我々は早期モデルに加え病態進展モデルへの介入実験を併せて行い、早期からの介入が β 細胞保護効果により有効である事を2015年報告した。しかし、GLP-1受容体作動薬長期投与時のGLP-1受容体発現への影響について検討した報告はない。長期投与においても受容体発現に影響を与えず代謝パラメーターを改善するようであれば早期からの継続した治療が重要になる。このように本研究で得られることが期待される結果は、単に分子機構の解明だけではなく、糖尿病の実臨床においても極めて重要な情報となることが期待され、社会貢献性も高いと考えられる。

4. 研究の成果

db/dbマウスにおいてD群ではC群に比し、摂餌量の有意な低下をみた。その結果、空腹時血糖値は全週にわたりD群で有意に抑制された。体重は介入中期まではD群で有意に低値であったが、介入後期では逆転した。空腹時インスリン値はD群では摂餌量低下から介入前半は有意に低値であったが、介入後期には逆転し、これは β 細胞保護効果の影響と考えられた。インスリン感受性はdb/dbマウスではD群で有意な改善がみられた。db/dbマウスの膵ラ氏島GLP-1受容体発現はC群で、7週齢コントロールマウスに比べて有意な低下がみられたが、D群では糖毒性の軽減により、むしろ増加していた。またdb/dbにおけるその他の膵ラ氏島遺伝子発現はD群ではC群に比し、インスリン合成・分泌関連遺伝子発現を亢進させ、酸化・小胞体ストレス、炎症、線維化、アポトーシス関連遺伝子発現を抑制させた。免疫染色の結果から β 細胞比率はD群で有意に高値であった。db/mではD群で有意な摂餌量の低下がみられ、その結果わずかだが有意に体重増加が抑制された。空腹時血糖値、インスリン値は両群間に大きな差はみられなかった。膵ラ氏島GLP-1受容体発現は7週齢のコントロールマウスに比し、C群もD群も同程度の発現量であり有意な差はなかった。結果としてGLP-1受容体作動薬 Dulaglutideの超長期間投与下において、膵ラ氏島GLP-1受容体発現は低下せず、安定した血糖降下・ β 細胞保護効果を有している事が示唆された。一般的に内在化する受容体はそのリサイクリングによりDown-regulationしにくい事が報告されており、GLP-1受容体も内在化型GPCRであることから長期投与下においても発現が維持されたと考えられる。GLP-1受容体作動薬は心血管イベントを抑制することが2016年に明らかにされており、長期投与下においても安定した効果の維持から細小血管合併症だけでなく、大血管合併症抑制が期待できる。なお、本研究は2017年日本糖尿病学会、米国糖尿病学会で報告済みであり、論文投稿間近である。

消化管炎症におけるヘム分解酵素の抗炎症作用の機序解明 ー炎症性腸疾患の新規治療薬の開発を目指してー

安田女子大学 薬学部 羽鳥 勇太

1. 研究の目的

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患の報告数は近年急速に増えてきている。疾患の原因は消化管における慢性的な過剰免疫応答であると考えられているが、発症の分子機序にはまだ不明な点が多い。消化管を炎症から保護する作用を有する分子として、細胞内ヘム分解酵素（ヘムオキシゲナーゼ-1、HO-1）が知られている。近年の研究から、マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生が自食作用（オートファジー）を介して抑制的に制御されること、HO-1の発現がオートファジーを誘導することがわかっている（Waltz, P., et al., Autophagy 7(2011) 315）。このような背景のもと、申請者は、腸上皮マクロファージ内でHO-1がオートファジー誘導を介して消化管炎症を制御している可能性を考えた。そこで本研究では、*in vitro*消化管炎症モデルとしてマクロファージと腸上皮細胞の共培養系を用い、炎症による組織障害を機能学的・形態学的に分子レベルで評価すること、HO-1の発現誘導・阻害が炎症に与える影響を検討すること、同じくオートファジーに与える影響を検討することを目的とする。消化管炎症におけるHO-1の組織保護作用の分子機序を解明することにより、炎症性腸疾患に対する更なる予防・創薬への貢献が期待される。

2. 研究の計画・方法

本研究の目的は『消化管炎症におけるヘムオキシゲナーゼ-1依存的組織保護作用の機序解明』である。ストレス応答因子やオートファジーの炎症保護への関与を考え、これを検証する為に以下の実験を行う。

- (1) *in vitro*消化管炎症モデル（Caco-2細胞とTHP-1細胞の共培養系）を構築し、正常な腸上皮機能、すなわちタイトジャンクション（TJ）の形成による細胞単層の不透過性（バリア機能）が炎症により障害されることを確認する。
- (2) 炎症性バリア障害への遊離ヘムの影響を検討する。
- (3) 遊離ヘムを添加し、オートファジーへの影響を検討する。また、オートファジー誘導・阻害が炎症性バリア障害に与える影響を検討する。

3. 研究の特色

炎症性腸疾患の患者数は増加の一途をたどっており、同じく増加しつつある大腸癌のリスクを高める要因としても大きな問題となっている。手術に伴う患者への負担は大きく、内科的治療の手段を一層充実させていくことが重要である。現在、治療薬として抗炎症剤・免疫抑制剤が用いられているが、新たな作用機序を持つ治療薬の開発に向けて、本研究が着目するHO-1依存的な炎症抑制機序の解明がその足掛かりになると期待できる。例えば、HO-1もしくはヘムの生体内動態を制御する分子群（ヘムの吸着・輸送・分解・合成を制御する分子）の働きを阻害・促進するような薬剤を利用することで、炎症に伴う消化管障害を軽減できる可能性がある。実際、HO-1発現誘導を介して消化管保護作用を示す薬剤としてL-グルタミンが報告されている（Takahashi et al., J. Clin. Biochem. Nutr. 44(2009) 28）。HO-1の炎症抑制作用が最初に利根川進博士の研究室から報告されたのは1997年であるが（Poss, D. and Tonegawa, S., Proc Natl Acad Sci USA, 94(1997) 10925）、イメージング技術の進展を背景に近年になってHO-1がオートファジー制御因子として改めて注目されるようになった。本研究では、炎症性腸疾患におけるHO-1の役割について、オートファジー制御因子としての側面から初めて検討する。本研究では、この新

たな試みをイメージング技術・上皮バリア評価手法を適用して効果的に達成する為に、実験系として *in vitro* 消化管炎症モデル、すなわち培養腸上皮細胞（Caco-2）とマクロファージ（THP-1）の共培養系を選択した。

4. 研究の成果

（1）*in vitro* 消化管炎症モデルの構築

Caco-2細胞をトランスウェル上で10～14日間極性培養し、半透膜側に基底膜構造、頂端膜構造を有する細胞シートを得た。タイトジャンクションの形成を、免疫染色（ZO-1およびOccludin）と経上皮抵抗値の顕著な上昇によって確認した。一方、THP-1細胞をフォルボールエステル処理によりマクロファージに分化誘導した。Caco-2細胞シートを形成した培養チャンバーを、THP-1細胞培養プレートに移動し、共培養を行った。THP-1は、基底膜側からCaco-2細胞に作用し、経上皮抵抗値の著しい減少を特徴とするタイトジャンクションの破綻を引き起こした。一方、フォルボールエステル処理を行っていない未分化のTHP-1細胞との共培養では、経上皮抵抗値は変化しなかった。以上の結果より、マクロファージに分化したTHP-1細胞特異的にバリア障害作用が亢進することが明らかになった。また、トランスウェルを用いた培養系でCaco-2細胞とTHP-1細胞を共培養することにより、*in vitro* 消化管炎症モデルが構築された。

（2）遊離ヘムがバリア障害に与える影響の検討

細胞シートに低濃度（20 μ M）の遊離ヘムを加えることにより、THP-1によるバリア障害作用が亢進することが明らかになった。この濃度域の遊離ヘムにはバリアに対する直接障害作用がないこと、未分化THP-1との共培養系でも障害作用は見られなかったことから、遊離ヘムはマクロファージによるバリア障害作用を促進する活性を有すると考えられる。

（3）遊離ヘムがオートファジーに与える影響の検討

上記結果から、遊離ヘムはCaco-2またはマクロファージのいずれか（または双方）に作用してバリア障害を促進することがわかった。オートファジーの関与を考え、オートファゴソーム局在蛋白質であるLC3の存在量およびプロセッシングをウェスタンブロッティングによって検討した。アミノ酸飢餓条件下のCaco-2では、LC3の分解およびプロセッシングを特徴とするオートファジーの亢進が見られた。遊離ヘムを添加することにより、分解・プロセッシングは共に抑制され、オートファジーが抑制されている可能性が示された。

以上、本研究の成果から、遊離ヘム・ヘム分解酵素のバリア障害への関与が明らかになり、その分子機序の解明に向けた *in vitro* モデルが確立した。また、オートファジーの制御因子としての遊離ヘムの重要性を見出した。今後、更に炎症性サイトカイン発現量などの検討を進めることにより、炎症における遊離ヘム・ヘム分解酵素の役割を明らかにしていきたい。

神経栄養因子様物質メリラクトンAの不斉合成研究 —Pd触媒および有機触媒を用いる不斉四級炭素構築法の開発—

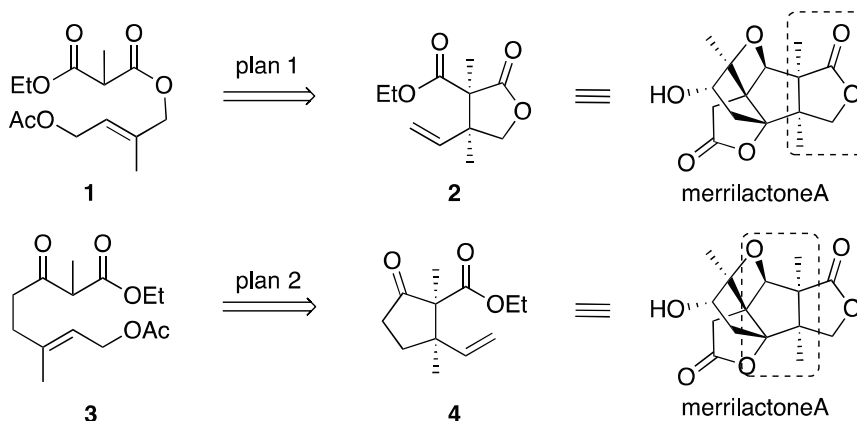
徳島文理大学 薬学部 原田 研一

1. 研究の目的

わが国における高齢化は急速な速度で進んでおり、老年人口の増加とともにアルツハイマー病型人治療患者の急増が深刻な社会問題となっている。現在、日本で使用されているアルツハイマー病治療薬には脳代謝改善薬と脳内のアセチルコリンの濃度を高める目的で開発されたAChE阻害剤がある。しかし、これらの薬物は、認知症にともなう変性神経細胞の改善には至らないことから治療効果に限界がある。また、治療薬として神経細胞の分化・成長に関与する神経栄養因子の利用も検討されているが、生体内のタンパク質分子であることから血中では分解されやすく、血液脳関門を通過できないという問題を克服しなければならない。申請者の属する研究室では、この神経栄養因子様活性に注目し、天然物由来の低分子神経栄養因子様活性物質の探索とその作用機序の解明を行ってきた。その結果、中国産シキミ科植物 *Illicium merrillianum* から単離されたセコプレジザン型セスキテルペン メリラクトンAが、ラット胎児大脳皮質由来初代培養神経に対して低濃度で強力な神経突起伸展促進活性を示すことを見いだした。本化合物は、脂肪性低分子であるため、容易に脳へ移行すると予測でき、これまでの治療薬とは根本的に異なる新しいアルツハイマー病治療薬のリード化合物として期待されている。しかし、微量成分であることから、その活性発現機構の解明には化学合成による試料の供給が必要である。そこで本研究では、活性発現機構の解明に必要な試料の量的供給を目的とし、メリラクトンAの効率的な不斉合成研究を企画した。本合成研究では、神経栄養因子様物質メリラクトンAの大量合成を目指すだけでなく、新規不斉四級炭素構築法の開発を行なうことで *Illicium* 属植物から単離された他の神経栄養因子様物質であるジアジフェニンやジアジフェノリドなどの共通骨格の合成にも応用可能な合成経路を確立する計画である。本合成が完了できれば詳細な薬理学試験を行なうために必要な試料を供給でき、神経栄養因子様活性の構造活性相関研究および薬理作用発現機構解明への展開が可能となる。

2. 研究の計画・方法

本研究では、メリラクトンAの鍵構造となる連続した四級炭素の構築法として、分子内Tsuji-Trost反応を応用する新規二連続四級炭素構築法について検討をおこなった。今回、二連続四級炭素構築法として二種類の分子内Tsuji-Trost反応を検討した。一つ目は、エステル化合物 **1** に対するラクトンの形成を伴う反応で、二つ目は化合物 **3** に対するシクロペンタノン環を構築する反応である。

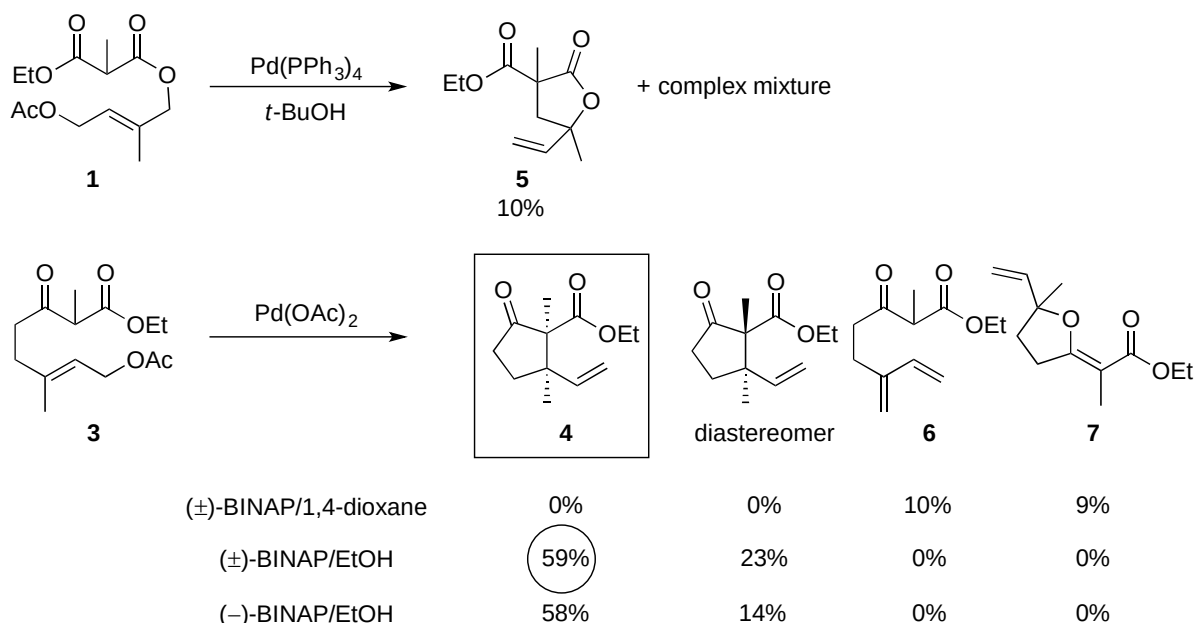


3. 研究の特色

申請者の属する研究室で見いだされたメリラクトンAは、低分子ながら高度に酸化され、三個の四級炭素を含む七個の不斉中心を有する五環性の非常に複雑で特異な構造を有する化合物である。本化合物は強力な神経突起伸展促進活性を示すことから、これまでの治療薬とは全く異なる機序でアルツハイマー病を根本的に治療する新薬になると期待できる。この特異な構造と生物活性は世界中の科学者の注目を集め、多くの研究グループがメリラクトンAの合成研究を続けており、これまでに二つのグループが不斉合成を達成している。2005年Danishefskyらのグループは、不斉エポキシ環開環反応による左右非対称化を鍵反応として、全29段階でメリラクトンAの初めての不斉合成を達成した。また、2007年井上らはキラル塩基を用いた分子内アルドール反応による左右非対称化をおこない23段階の合成経路で不斉合成を達成した。両グループはともに左右非対称化反応による不斉導入を鍵として全合成を完了したが、どちらの合成経路も合成段階が長く、未だ薬理機構解明への試料供給には至っていない。本合成研究では、これまでの合成法とは全く異なった合成戦略を企画し、遷移金属であるパラジウム触媒を使用する不斉Tsuji-Trost反応による不斉四級炭素構築反応を鍵として、これまでにない効率的で簡便なメリラクトンAの不斉合成をおこなう計画である。本合成で行う、不斉四級炭素構築法の開発は一般的に困難とされている四級炭素をエナンチオ選択的に構築するだけでなく、環状構造を同時に形成できるため、様々な天然物合成への応用が可能である。

4. 研究の成果

最初に、数段階で調製した化合物**1**に対してTsuji-Trost反応をおこなった。しかし、様々な反応条件を試みたが副生成物**5**や複雑な混合物を与えるのみで目的物**2**を得ることはできなかった。次に、化合物**3**に対するTsuji-Trost反応を検討した。1,4-ジオキサン溶液中Pd(OAc)₂-BINAP触媒下反応をおこなうとβ-水素脱離と*o*-アルキル化をおこした**6**と**7**が主生成物として得られた。詳細に反応条件を精査した結果、溶媒としてプロトン性極性溶媒であるエタノールを用いた場合にβ-水素脱離と*o*-アルキル化を抑制することができ、**4**を59%の収率で得ることに成功した。また、(-)-BINAP触媒下では**4**を58%の収率で得た。化合物**4**は、メリラクトンAの鍵構造を有し、この中間体から現在メリラクトンAへの誘導を検討中である。今回開発に成功したシクロペンタノン環の形成を伴う二連続四級炭素の構築法はこれまでに例はなく、メリラクトンAの全合成に留まらず、天然物合成における強力な方法になると考えている。



タンパク質間相互作用の制御を目指した 自己組織化分子の開発

福岡大学 理学部 草野 修平

1. 研究の目的

タンパク質は単体で機能するものも存在するが、その殆どが他のタンパク質と複合体を形成して初めてその機能を発現する（タンパク質間相互作用：PPI）。最近では、PPIと疾患の具体的な関連性に付いても解明されつつある。このような背景から、PPIを制御することの重要性がますます大きくなってきているが、その方法論は確立されていない。この原因として、PPIが平均で約800～2000Å²という広範な領域において、水素結合・疎水性相互作用・静電相互作用など複数の結合を介して行われることが挙げられる。すなわち、既存の分子設計概念では、PPI制御可能な分子の獲得は困難なのである。そこで、本研究課題では、PPI制御分子の開発を目指し、タンパク質表面を覆うだけの大きな分子表面積を持ち、かつ、タンパク質表面の結合領域に対して多点的に相互作用するタンパク質表面結合分子の開発を行う（Fig. 1）。さらに、独自のアプローチとして、タンパク質結合分子を「合成」するのではなく、自己組織化を用いて「組み立てる」方策をとる。これにより、大きな分子構造を持ちながらも、簡便な分子構築が実現される。以上の分子戦略に基づき、本研究では以下の2点を明らかにする。

- (1) 自己組織化体の構築およびタンパク質表面に対する結合能評価
- (2) 自己組織化体を用いたPPI阻害

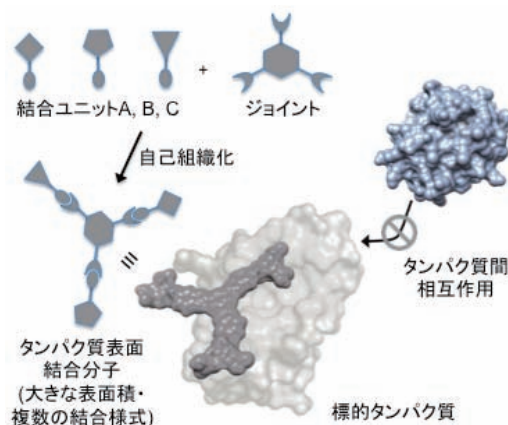


Fig. 1 本研究課題のコンセプト

2. 研究の計画・方法

- (1) 自己組織化タンパク質表面結合分子の構築法の確立

自己組織化体の形成には、中性条件・室温にて混合するだけで安定な複合体を形成し、尚かつタンパク質との副反応を引き起こさない反応が理想的である（直行性）。そこで今回、自己組織化には、オキサボロールとcis-ジオール間のボロネート形成反応を採用した（Fig 2）。自己組織化体のタンパク質表面への結合を簡便かつ定量的に検出するために、テトラフェニルエテン（TPE）を中心骨格としたオキサボロール誘導体1を設計した。TPE誘導体は水溶液中で無蛍光であるが、タンパク質表面に結合すると蛍光発光を示すようになる。また、Fig 2に示すように化合物1は4つのオキサボロールを発散型に持つため、自己組織化体は大きな分子表面積を有し、さらにタンパク質表面との相互作用ユニット4つを持つことができる。cis-ジオールは、アニオン性、カチオン性、水素結合形成官能基、疎水性官能基など様々な官能基が導入でき、簡便に合成できるものが理想的である。そこで、市販の試薬から3工程で合成可能な化合物2をcis-ジオールとして設計した。

- (2) タンパク質表面に対する自己組織化体の結合能評価

各種ジオールを用いて多様な構造を持つ自己組織化体を網羅的に形成させる。得られた自己組織化体の結合能評価には、Lysozyme、Cytochrome C、Albumin、MDM2などタンパク質表面の構造や電荷が異なる各種タンパク質を用いる。その解析は蛍光プレートリーダーを用いてハイスループットに行う。タンパク質への結合が確認された自己組織化体に関しては、質量分析を行いその構造情報の獲得を行う。その結果を分子設計にフィードバックすることで、タンパク質表面に対する特異性と高い結合能を同時に満たす自己組織化体の獲得に繋げる。

(3) 自己組織化体を用いたPPI制御への展開

自己組織化体のタンパク質表面への結合が、実際にPPIを阻害できることをin vitro系で示す。上記検討項目(B)で得られたCyt cやMDM2に結合する自己組織化体を用いて、Cyt c-Cyt c oxidaseやMDM2-p53間のPPIをモデル系とした阻害実験を行う。

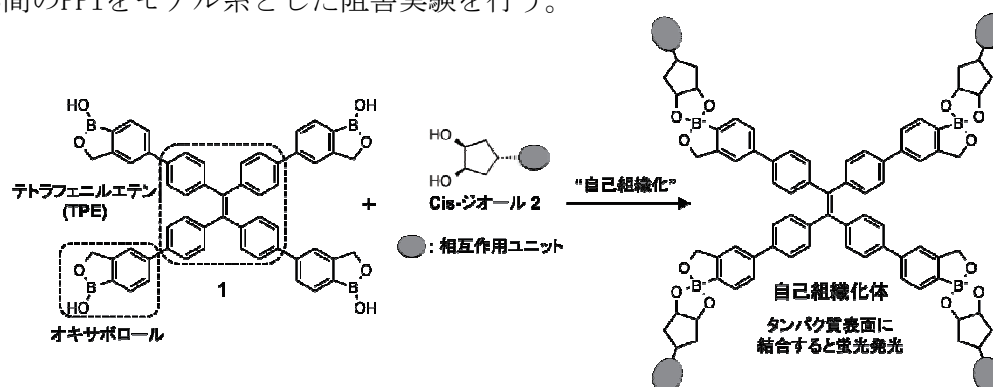


Fig. 2 自己組織化体の分子設計

3. 研究の特色

本研究の最大の特徴は、自己組織化タンパク質表面結合分子の分子設計にある。すなわち、本分子の大きな分子表面積は効率的なPPI制御を可能とし、タンパク質表面に対して複数の相互作用ユニットを同一分子内に持つ点は、多点相互作用による標的タンパク質に対する高い結合能と特異的結合を実現する。さらに、本系では分子構築に自己組織化を用いているため、自己組織化体を構成するユニットの組み合わせを変換し、混合するだけで、多様な構造体を取らせることができる。この点は、一般的な有機合成による分子合成と比較し、目的分子の構築を簡便にし、標的タンパク質に対する自己組織化体の構造最適化を簡略化する。

4. 研究の成果

研究期間内に、以下の研究成果を挙げることに成功した。

(1) 化合物1およびcis-ジオール誘導体の合成

ジブロモベンゾフェノンを出発原料として、本研究の基盤となるTPE誘導体1の合成に成功した。また、タンパク質との相互作用ユニットを持つ様々なcis-ジオール誘導体2を合成することに成功した。

(2) 自己組織化反応(ボロネート形成反応)の解析

まず、タンパク質非存在化にて、(1)で合成した化合物1と2のボロネート形成反応について定量解析を行い、その適用可能な反応濃度範囲を明らかにした。その結果、タンパク質との結合解析に適した μM オーダーで反応が十分に進行することを確認した。

(3) 自己組織化反応を利用したタンパク質結合分子の獲得

化合物1と各種cis-ジオール2を混合して得られた自己組織化体をタンパク質に添加すると、タンパク質に対して結合性を示す自己組織化体の蛍光発光が確認できた。この蛍光変化からその結合親和性を解析すると、 $10^4 \sim 10^5 (\text{M}^{-1})$ オーダーの結合定数でタンパク質に結合していることが明らかになった。さらに、タンパク質の種類に応じて、高い親和性を示す自己組織化体の構造が異なることも質量分析の結果から見出した。

これらの成果について、以下の学会にて発表を行った。

①日本化学会 第96春季年会（ポスター発表）

○小西 沙英、林田 修、草野 修平

“ボロン酸エステル形成反応を利用したタンパク質表面結合分子の開発”

第53回化学関連支部合同九州大会（ポスター発表）

○小西 沙英、林田 修、草野 修平

“ボロネート形成反応を用いたタンパク質表面結合分子の開発”

第10回バイオ関連化学シンポジウム（ポスター発表）

○小西 沙英、林田 修、草野 修平

“ボロネート形成反応に基づいたタンパク質表面結合分子の開発と結合能評価”

日本化学会 第97春季年会（口頭発表）

○小西 沙英、林田 修、草野 修平

“新規ボロン酸誘導体の合成とcis-1, 2-ジオールとのボロネート形成を利用した分子認識”

多基準配分ゲームのアプローチによる日中協力の経済学的評価 —越境大気汚染問題における日中協力の便益分析—

Fukuoka Institute of Technology
Department of System Management
Jing Fu

1. Objective

While only six cities in China meeting the second tier of the National Ambient Air Quality Standards (NAAQS) in 2015, air pollution is impacting every aspect of people's daily life and has become one of the biggest challenges to sustainable economic growth. Air quality of some regions in Japan, i.e., Fukuoka, is partially affected by the transboundary air pollutants as well. Coal combustion for electricity production is one of the main industrial air pollutant sources. Although the world debates on the need to develop renewable energy and gradually abandon the use of fossil fuels, we still fully expect coal to remain as a vital part of energy production in the foreseeable future. This research is aimed to build a theoretical foundation for a potential collaboration between Japan and China in the development of clean coal technologies featuring IGCC (Integrated Gasification Combined Cycle).

2. Methodology

In this research, the air quality improvement efficiencies of 29 provinces (excluding Tibet and Hainan) in China are first evaluated and compared by clustering two-stage DEA (data envelopment analysis) with undesirable intermediate measures, then multi-criteria allocation game is utilized to analyze the potential benefit or cost split if Sino-Japan clean air collaboration might be realized.

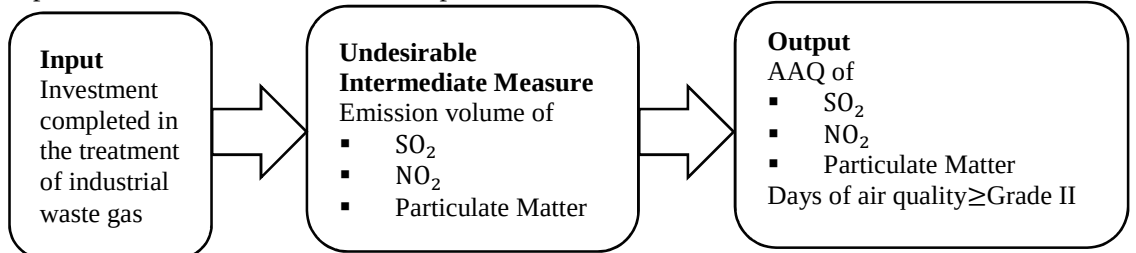
(1). Two-stage DEA with undesirable intermediate measures

① Output-oriented overall efficiency

$$\begin{aligned} & \min e_j^1 \cdot e_j^2 \\ \text{subject to:} & e_j^1 \geq 1 \\ & e_j^2 \geq 1 \end{aligned}$$

where e_j^1 and e_j^2 are output-oriented efficiencies of DMU j in the two stages.

② Input, intermediate measure, and output



(2). Clustering analysis

Taking the efficiencies and slack values by two-stage DEA as the attributes, clustering scheme of KMeans is applied to select the target regions with the highest priority to be installed with IGCC. For 3 clusters, results by EM (expectation-maximization) scheme does not differ too much with that by KMeans.

(3). Multi-criteria allocation game

Official collaborations between Japan and China in environmental fields are decreasing year by year, and IGCC might be another initiative. If Japan and China may collaborate in the development of IGCC, how should the potential benefit or cost be allocated? In this research, multi-criteria allocation game is utilized and the strategic form game is defined as

$$G := \left(N, \{W^j\}_{j \in N}, \{f^j\}_{j \in N} \right)$$

where $N = \{1, 2, \dots, n\}$ is the set of players, $W^j = \{w^j = (w_1^j, \dots, w_m^j) | w_1^j + \dots + w_m^j = 1, w_i^j \geq 0 \forall i \in M\}$ is the strategy set of player $j \in N$, and $f^j: W^1 \times \dots \times W^n \rightarrow R$ is the payoff function of player $j \in N$, which is given by

$$f^j(w^1, \dots, w^n) = \left(\sum_{i=1}^m \left(\frac{1}{n} \sum_{j=1}^n w_i^j \right) c_{ij} \right) E$$

The characteristic function form game is defined following von Neumann and Morgenstern (1944). Due to the constant-sum and essential properties, the core of the game is empty. Hence, Shapley value is selected in our analysis. Criteria include both economic (initial investment, dynamic investment, and generating unit cost) and environmental performance indices (emissions of SO_2 , NO_2 and PM). With 10% emission reduction per year, a dynamic allocation analysis is conducted between each of the three demonstration IGCC power plants in the target regions and Nakoso IGCC power plant.

3. Scientific Characteristics and Originality

Two-stage efficiency analysis is necessary to identify the target regions as industrial production is only one of the air pollutant sources. However, it is often criticized due to the inherent conflict of the intermediate measures that arises between the two stages. One solution by Liang et al. (2008) is to view the two stage process from a centralized perspective by assuming the weights of the intermediate measures to be the same. This approach is not well justified to be a two-stage model as the intermediate measures are cancelled out. In this research, we define an output-oriented overall efficiency and propose a solution by adjusting the intermediate measures to the lower target value $\min(t - \bar{h}^* \bar{z}_j - s^{+*}, z_j - \bar{s}^{-*})$. Our purpose is to “zoom in” the differences between the DMUs, even if this adjustment might sacrifice some efficiency. The comparative results show that it works better than the centralized solution in the clustering analysis.

Our TU multi-criteria allocation game provides an endogenous benefit/cost allocation mechanism. The weights are defined as the average weights over all players, and hence the consensus is reached based on their own performance indices and strategy sets. It will potentially improve players’ perceived fairness.

4. Results

(1). Air quality improvement efficiency analysis by clustering two-stage DEA with undesirable intermediate measures

The output-oriented overall efficiency in our two-stage DEA with undesirable intermediate measures is proved to be greater than the centralized efficiency in Liang et al. (2008). As shown in Fig. 1 and 2, our efficiencies range from 1 to 5, while the centralized efficiencies are vibrating at 1 and clustering results cannot be validated neither externally nor internally. However, in the presence of a single undesirable intermediate measure, these two efficiencies are identical.

Following our analysis, Hebei, Shandong, Shanxi, Inner Mongolia, Liaoning, and Henan are in cluster 0 and should be selected as the target regions with the highest priority to be installed with IGCC. There are about 20 IGCC projects in China either at the demonstration stage or in plan, but only 3 of them are located in the target regions above. Considering the huge initial investment, in-plan locations should be re-evaluated as every penny counts.

(2). Dynamic benefit/cost allocation analysis by multi-criteria allocation game

Most of the above-mentioned projects in China still stay in the primary level due to limited experience in construction and operation of the IGCC power plants. Japan is more advanced as Nakoso IGCC power plant has been commercialized since 2013. Bilateral collaboration in the development of IGCC will benefit both sides. Following our multi-criteria allocation game, with 10% emission reduction per year in the target regions of China, Japan may claim more benefit in the upcoming 6-8 years (Fig. 3).

(3). Our results have been presented in Spring National Conference of ORSJ (Okinawa, March 2017), and 15th International Conference on Data Envelopment Analysis (Prague, Czech Republic, June

2017).

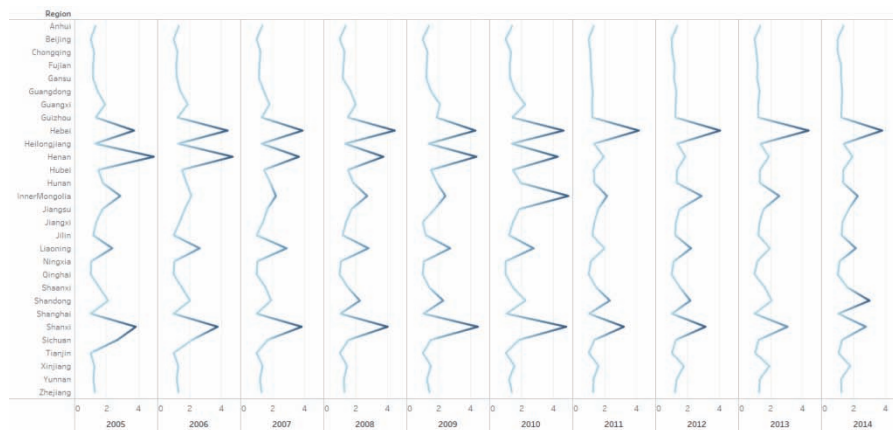


Fig. 1 Output-oriented overall efficiencies of 29 provinces in China (2005-2014)

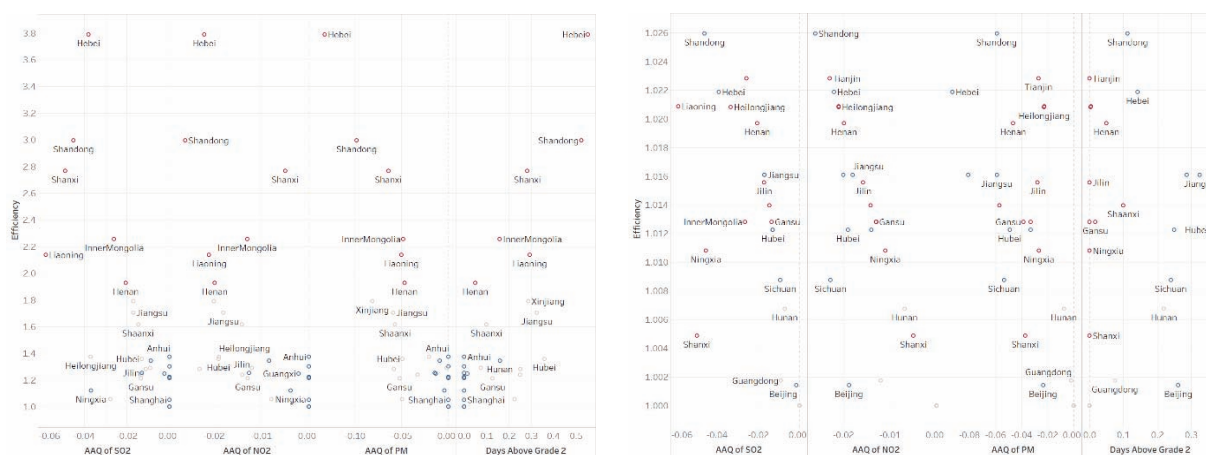


Fig. 2 Efficiency-output clustering results in 2014 (left: our solution; right: centralized solution)

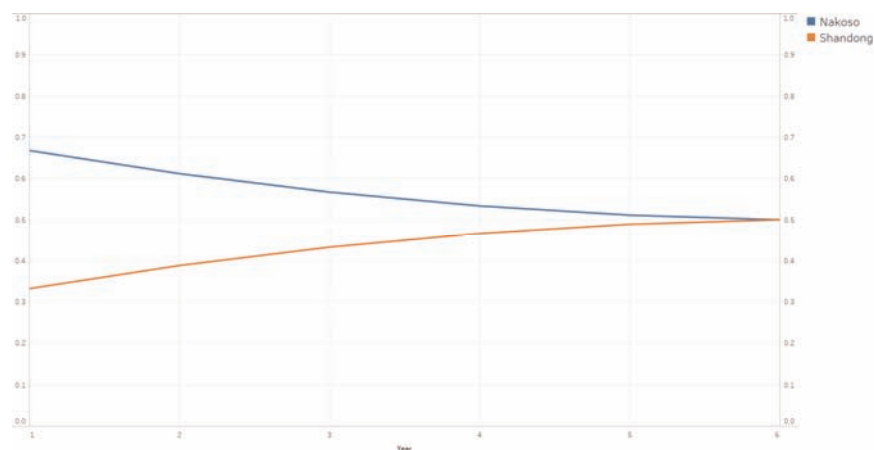


Fig. 3 Dynamic benefit allocation between IGCC power plants in Japan and China

References

- [1]. J. von Neumann and O. Morgenstern, *Theory of Games and Economic Behavior*, Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, 1944.
- [2]. L. Liang, W. D. Cook and J. Zhu, “DEA models for two-stage processes: game approach and efficiency decomposition”, *Naval Research Logistics*, DOI 10.1002/nav.20308, 2008.

高齢者施設の終末期ケアにおける宗教的な関わりの検討

尚綱大学短期大学部 河村 諒

1. 研究の目的

2006年の介護保険制度及び2009年の介護報酬の改定により、高齢者施設における看取りや終末期ケアが期待されるようになった。政府統計（2015）では、介護老人保健施設や老人ホームで死亡する割合が2006年から2014年にかけて約2倍に増加しており、高齢者施設における看取りや終末期ケアの社会的要請が高まっている。

終末期ケアにおいて、身体的・心理的苦痛以外にもスピリチュアルペインを軽減し支えることも重視されており（鈴木・流石，2012；寺門・佐伯・稲留・原・シュライナー，2005）、特にスピリチュアルペインの軽減のためには、宗教の信仰を重要視している（寺門他，2005）。川島（2005）は、生死に何らかの意味を見出す際に宗教の影響が大きく、宗教が死後の世界の信念や死の受容、低い死の不安と関連することを示唆している。このように、終末期ケアにおけるスピリチュアルペインに対して、宗教的な関わりは重要であるといえる。

しかしながら、スピリチュアルペインに対する宗教の関わりに関して、介護現場では必要性が十分に認知されておらず、実践もあまりされていない（上前，2008）。個別的な施設における宗教的儀礼や信仰を通して利用者のスピリチュアルペインが緩和されたという事例報告や実践報告（川元，2013；岡本，2006；大和田，2015）はあるものの、複数の施設を対象にした具体的な内容や仕方等の共通点や相違点の比較調査はなされていない。スピリチュアルペインに対する宗教的な関わりの認知や実践を普及・促進するためにも、複数の施設における宗教的な関わりの経験やノウハウ等を具体的に整理する必要があるといえる。

本研究では、充実した宗教的な関わりを実践している複数の高齢者施設の経験やノウハウ、工夫点や改善点等を具体的に整理・提示し、終末期ケアの質の向上を図ることを目的とする。

2. 研究の計画・方法

宗教法人が経営母体である特別養護老人ホーム5施設の介護職員9名、宗教法人が経営母体ではない特別養護老人ホーム2施設の介護職員3名の計12名（男性7名、女性5名）対象に半構造化面接を行った。職員の平均年齢は34.6±11.5歳であった。

調査内容は、施設及び調査対象者が実践している宗教的な関わりを想起してもらい、1) 工夫点や配慮点、2) 問題点や課題点、3) 利用者の様子、4) 調査対象者の利用者に対する関わり方の変化、5) 実践に対する考え方、を尋ねた。

調査実施期間は2016年9月～2017年1月であった。

3. 研究の特色

近年、高齢者施設での看取りや終末期ケアに対する制度の充実が図られ、看取りの件数も増加している。終末期ケアにおいては、利用者のスピリチュアルペインの緩和が重視されており、その際、宗教的な関わりを行うことの有意義さが示唆されている。しかし、介護福祉の現場ではスピリチュアルペインに対する宗教的な関わりは、必要性が十分に認知されておらず、実践もあまりされていないため（上前，2008）、先行研究がほとんど見当たらない。

高齢者施設の終末期ケアにおける宗教的な関わりを普及・促進するために、本研究では、まず、充実した宗教的な関わりを実践している複数の高齢者施設を対象に面接調査を行い、各施設の経験やノウハウ、工夫点や課題点、利用者のスピリチュアルペインの変化等を具体的に整理する。同時に、宗教的な関わりをあまり行っていない複数の高齢者施設も対象にし、積極的ではない視点からの課題点や実践に対する考え方等も具体的に整理する。

本研究の結果により、終末期ケアにおける宗教的な関わりの実践について明らかにすることは、宗教的な関わりの”必要性”の認知を促すとともに “課題点” や “限界” を浮き出させることになり、今後どのように終末期ケアとしての宗教的な関わりを改善・促進したらよいかを検討するための基礎的資料となりうる。

本研究は終末期ケアにおけるスピリチュアルペインと宗教をキーワードとした事例研究である。このような視点を切り口にした実証研究はなく、十分に意義があると考ええる。

4. 研究の成果

録音された面接データから逐語録を作成した。上述の調査内容各1)～5) ごとに関連する発言内容を抽出した。発言内容に関して、前後の文脈の意味を踏まえて、各内容の類似点、相違点に基づき小カテゴリーに分類をしさらに小カテゴリーを大カテゴリーに分類した（表1）。

工夫点や配慮点における小カテゴリーの「これまで行ってきた宗教行動の把握」や「過度な死の意識化の緩和」、及び利用者の様子の大カテゴリーにおける「日常場面での精神的変化」や「宗教行動に対する希望」、「自身の死」から、高齢者施設における宗教的な関わりは終末期特有の関わりだけではなく日常場面としての関わりも有用であると考えられる。日常生活の延長線としての宗教行動が故人とのつながりを意識化させ、自身の死について考える機会になる可能性が考えられた。

また利用者の様子的小カテゴリーにおける「信頼感の形成」、関わり方の変化の大カテゴリーにおける「職員自身の意識の変化」や「介護の実践の変化」、宗教的な関わりの実践に対する考え方の大カテゴリーにおける「介護職員面」から、宗教的な関わりは利用者のスピリチュアリティだけでなく、介護職員の介護の質や意識にもポジティブな影響を与えているといえる。宗教に対する思いが利用者と介護職員との間で異なることは、職員にとって宗教を意識し大切さを感じる機会となり、死生観や宗教観の醸成につながるのではないかと考えられる。

表1 宗教的な関わりの実践に関するカテゴリー分類

大カテゴリー	小カテゴリー
1) 実践に伴う工夫点や配慮点	
個別対応	声かけ(n=6)
	任意参加(n=3)
	実践後の反応確認(n=1)
	これまで行ってきた宗教行動の把握(n=1)
	過度な死の意識化の緩和(n=1)
	障がいへの対応(n=1)
施設としての全体的対応	他宗派(宗教)の容認(n=1)
	職員個人の宗教・信仰の不明示(n=1)
	緊張しない雰囲気づくり(n=1)
	僧侶(専門家)による実践の明示(n=1)
2) 問題点や課題点	
利用者面	宗教的発言(意思表示)の不明示(n=2)
	障がいによる参加の困難さ(n=1)
介護職員面	介護職員の宗教的知識・宗教観の浅薄さ(n=2)
	若い介護職員の宗教に対する積極性(n=1)
	意義の無理解(n=1)
施設面	すべての宗教・宗派へは不対応(n=2)
3) 利用者の様子	
日常場面での精神的変化	表情や口調が変化(n=5)
	気持ちの静穏化(n=4)
	快活化(n=2)
過去や他者とのつながり	信頼感の形成(n=2)
	過去の事柄の想起(n=2)
	他者の死に共感(n=1)
自身の死	死の不安の低減(n=2)
	生きることへの前向き(n=1)
宗教行動に対する希望	家での宗教行動を希望(n=1)
4) 関わり方の変化	
職員自身の意識の変化	宗教への興味、重要性を認識(n=2)
利用者への意識の変化	利用者の宗教への思いを認識(n=1)
介護の実践の変化	話をする機会の増加(n=3)
	利用者の生活の質への配慮の強化(n=1)
	利用者との話の中身の深化(n=1)
5) 宗教的な関わりの実践に対する考え	
利用者面	利用者が大切にしてきたことへの機会・場の提供(n=4)
	利用者間の交流の場(n=1)
	利用者自身の死後の処置の具体化(n=1)
	利用者の心の安らぎ(n=1)
介護職員面	宗教観の醸成(n=2)
	利用者を思い出す機会(n=1)
	自身の介護を見直す機会(n=1)
	利用者の話を聞く機会(n=1)
	職員自身の成長(n=1)
施設面	不要(n=1)
	施設の方針として不実践(n=1)

平成 28 年度学術研究振興資金 若手研究者奨励金 研究報告

平成 29 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・7319
FAX 03(3230)8223

禁無断転載